

1 株堆肥耐低温纤维素降解菌的筛选、 鉴定及生长特性的初步研究

尚晓瑛 程旭艳 霍培书 李季

中国农业大学资源与环境学院,北京 100193

摘要 为增加用于堆肥的耐低温纤维素分解菌的资源,通过微生物筛选实验及纤维素酶活力测定实验,从黑龙江双峰林场采集的腐殖土样中筛选得到8株耐低温纤维素降解菌,其中菌株B6-15的纤维素酶活性最高,为24.94 U/mL,且该菌在初始pH 7.0,NaCl质量分数0.25%,20℃环境中培养时生长量最大。采用形态学、生理生化特征及16S rDNA核酸序列分析鉴定的方法,初步确定该菌属于假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)。对菌株B6-15所产纤维素酶的热稳定性进行研究,结果显示在10℃存放后仍能保持54.43%的酶活性,表明该耐低温菌所产的纤维素酶为低温酶。

关键词 耐低温菌;纤维素降解;假单胞菌属;筛选;生长特性

中图分类号 Q 93-33 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)05-0558-05

堆肥技术是一种使废弃物无害化、减量化和资源化的关键技术,其中微生物在堆肥过程中发挥着重要的作用,能提高堆肥效率,更有效地实现有机质矿化^[1]。低温下堆肥起温是决定堆肥迅速进入高温期、实现无害化的关键。低温下,中温菌和高温菌很难正常生长繁殖,降解堆肥中的大分子有机物质^[2]。因此,低温菌就成为了一个研究重点。有研究表明,低温环境中堆肥接种低温菌剂可使堆肥温度快速上升,进入高温期^[3];谢宇新等^[4]筛选出的纤维素低温分解菌D5属于假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.),在低温堆肥升温过程中对堆肥起温具有重要作用。

本研究从黑龙江双峰林场采集的腐殖土(环境温度为一20℃)中筛选得到1株耐低温纤维素降解菌,应用形态学、生理生化特征及16S rDNA生物学手段对其进行鉴定,并探讨菌株的生长特性,以期研究耐低温纤维素降解菌的堆肥应用提供理论基础及实践依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2个供试腐殖土样于2011年2月在黑龙江双峰林场采集,采集时的环境温度为-20℃。

试验中用到的培养基有:

- 1) 固体培养基:蛋白胨1%,牛肉膏0.5%,NaCl 0.5%,琼脂1.5%,去离子水配制,pH 7.0。
- 2) 液体培养基:成分同固体培养基,去掉琼脂。
- 3) 选择培养基:主要成分参考文献[5]。
- 4) 液体发酵培养基:NaCl 0.5%,蛋白胨1%,酵母粉0.5%,CMC-Na 0.5%,KH₂PO₄ 0.1%,去离子水配制,pH 7.0。

1.2 方法

1) 菌株驯化。称取10g样品加入90mL无菌水中,充分振荡静置后,取10mL上清液加入液体培养基中,采取5℃-7℃-10℃的温度梯度进行驯化培养,培养周期是3d(表1)。1个周期后,取10mL的驯化菌液接种到新鲜的液体培养基中进行第2周期温度梯度的驯化培养,驯化3个周期,得到3批驯化菌液。

表1 驯化阶段及其温度梯度

Table 1 The period of domestication and the temperature gradient

阶段 Period	I			II			III		
时间/d Time	1	2	3	4	5	6	7	8	9
温度/℃ Temperature	5	7	10	10	7	5	5	7	10

2) 纤维素降解菌的分离。分别取驯化得到的菌悬液0.5mL,加入到4.5mL无菌水中,以梯度稀

收稿日期:2012-02-08

基金项目:国家“十二五”科技支撑计划项目(2012BAD14B01)和省部产学研结合项目(粤财教[2011]366专项)

尚晓瑛,硕士研究生,研究方向:农业废弃物综合利用。E-mail:xy_nemesis_8711@sina.com

通讯作者:李季,教授,研究方向:重点生态工程关键技术与产业化。E-mail:lijj@cau.edu.cn

释法制成 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 的稀释液, 分别取 0.1 mL 平板涂布。在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下培养 3 d, 选择菌落分散较好的平板, 挑取单菌落培养。之后将菌体点接于选择培养基平板上, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d 后观察能否在菌落周围形成透明的水解圈, 并测量菌落及其周围透明圈直径。在菌落周围可以形成透明水解圈的菌株即为要筛选的菌株。

3) 纤维素酶活力的测定。以滤纸为底物, 应用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法^[6] 在 540 nm 处测定吸光值并计算纤维素酶活力。每分钟水解纤维素产生 $1\text{ }\mu\text{g}$ 葡萄糖所需要的酶量定义为 1 个酶活力单位, U。

4) 菌株所产纤维素酶的热稳定性研究。将发酵液以 5 000 r/min 离心 10 min, 取出上清液即为粗酶液, 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。将粗酶液分别于 10、20、30、40、 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温 1 h, 之后在 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下用 DNS 法测定残余酶活。以 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存的粗酶液测得的酶活为 100%, 计算不同温度保温后的残余相对酶活力^[7]。

5) 菌株鉴定。以肉眼观察平板上菌落形态, 在显微镜下观察细菌形态, 之后参考文献^[8] 对菌株进行初步鉴定。参考文献^[9] 进行生理生化特性鉴定。通过 Fang 等^[10] 的方法扩增菌株 16S rDNA, 经过测定序列后, 使用 Blast 程序将序列提交 GenBank 数据库, 进行相似性比较分析, 并构建系统发育树。

6) 菌株的生长情况测定。将菌株接入液体培养基中, 在 $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的摇床中 160 r/min 进行培养, 通过连续测定液体培养基中细菌的 $D_{600\text{ nm}}$ 值, 确定菌株生长状况, 制作生长曲线。

7) 菌株生长特性的初步研究。测定菌株在 10、15、20、30、 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下的生长情况; 测定菌株在初始 pH 值为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 及在质量分数 0%、0.25%、0.5%、1%、2%、4%、8% 的 NaCl 中 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后的生长量。

2 结果与分析

2.1 耐低温纤维素降解菌的筛选

1) 菌株初筛及复筛。通过分离实验, 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养条件下, 从样品中筛选出耐低温降解纤维素菌 8 株, 其水解透明圈与菌落直径测量结果见表 2。将筛选得到的菌株于 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境下培养 3 d 后测定纤维素酶活性, 结果如表 2 所示, 可看出纤维素酶活性最高的为菌株 B6-15, 其酶活为 24.94 U/mL。纤维素酶活性较高的是 B1-37、B4-6、B5-36, 分别为 13.60、9.82、11.35 U/mL。综合上述结果, 选择菌

表 2 不同菌株的透明圈大小及其菌落直径

Table 2 The size of transparent circle and colony diameter of bacteria

菌株 Strain	透明圈直径/cm Transparent circle diameter	菌落直径/cm Colony diameter	纤维素酶活/ (U/(mL·min)) Cellulase activity
B1-37	0.80	0.15	13.60
B4-5	0.80	0.10	9.82
B5-15	0.80	0.20	5.52
B5-16	0.90	0.30	5.59
B5-19	0.70	0.20	6.31
B5-36	0.60	0.15	11.35
B6-4	0.65	0.20	5.65
B6-15	1.00	0.25	24.94

株 B6-15 作为后续研究的对象。

2) 菌株 B6-15 所产纤维素酶的热稳定性研究。结果如图 1 所示, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温后, 保留 54.43% 的酶活; $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温后, 残余酶活最高, 为 70.32%; 30、40、 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温后残余酶活分别为 43.21%、32.69%、28.25%。因此, 存放酶液的温度越高, 残余酶活越低。

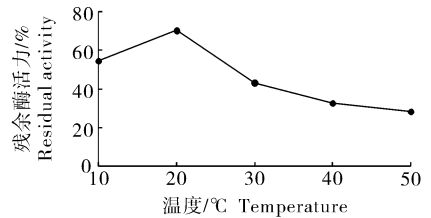


图 1 菌株 B6-15 所产纤维素酶的热稳定性

Fig. 1 Thermal stability of cellulase from strain B6-15

2.2 菌株鉴定

1) 菌株形态特征。菌株 B6-15 在平板上的菌落形态如图 2-A 所示, 菌落为圆形, 呈浅黄色乳状, 直径为 2~3 mm, 表面光滑, 较湿润, 中央较突起, 边缘整齐, 不透明。通过显微镜观察, B6-15 的细胞形态如图 2-B 所示, 单细胞呈短杆状, 革兰氏阴性, 无芽孢, 有荚膜。

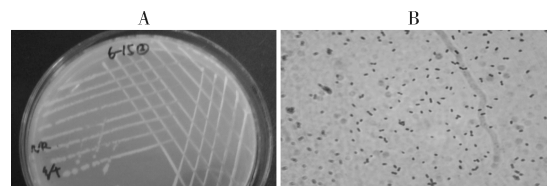


图 2 菌株 B6-15 的菌落形态(A)及细胞形态(B)

Fig. 2 Colony morphology(A) and cell morphology(B) of strain B6-15

2) 生理生化特征。研究结果(表 3)表明: 菌株 B6-15 可分解葡萄糖产酸, 不能分解蔗糖、乳糖产酸, 具有运动力, 在穿刺线上生长形状呈丝状, 乙酰甲基甲醇实验、苯丙氨酸脱氨酶实验、柠檬酸盐利用

表 3 菌株 B6-15 部分生理生化特征¹⁾

Table 3 Partly biochemical and physiological characteristics of the strain B6-15

项目 Item	结果 Result	项目 Item	结果 Result
葡萄糖发酵 Glucose fermentation	+	M R 实验 M R test	+
蔗糖发酵 Sucrose fermentation	-	过氧化氢酶实验 Catalase test	+
乳糖发酵 Lactose fermentation	-	苯丙氨酸脱氢酶实验 Phenylalanine dehydrogenase	-
运动性 Motion characteristics	+	柠檬酸盐利用实验 Citrate utilization test	-
V-P 实验 V-P test	-		

1) +: 阳性 Positive; -: 阴性 Negative.

实验为阴性反应, 甲基红实验、接触酶实验为阳性反应。

3) 菌株 B6-15 的 16S rDNA 鉴定。结果如图 3 所示, 菌株 B6-15 与 *Pseudomonas fragi* ATCC 49968T(AB021395) 相似性达 98.917%, 可看出 B6-15 属于假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)。结合上述研究结果, 初步鉴定菌株 B6-15 属于假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)。

4) 菌株 B6-15 的生长情况。通过连续测量液体培养基中菌株 B6-15 的 $D_{600\text{ nm}}$ 值(图 4), 可知: 菌株 B6-15 在 15 °C 环境中可较快生长, 进入对数期, 且对数期较短, 培养 16 h 后基本达到稳定期。

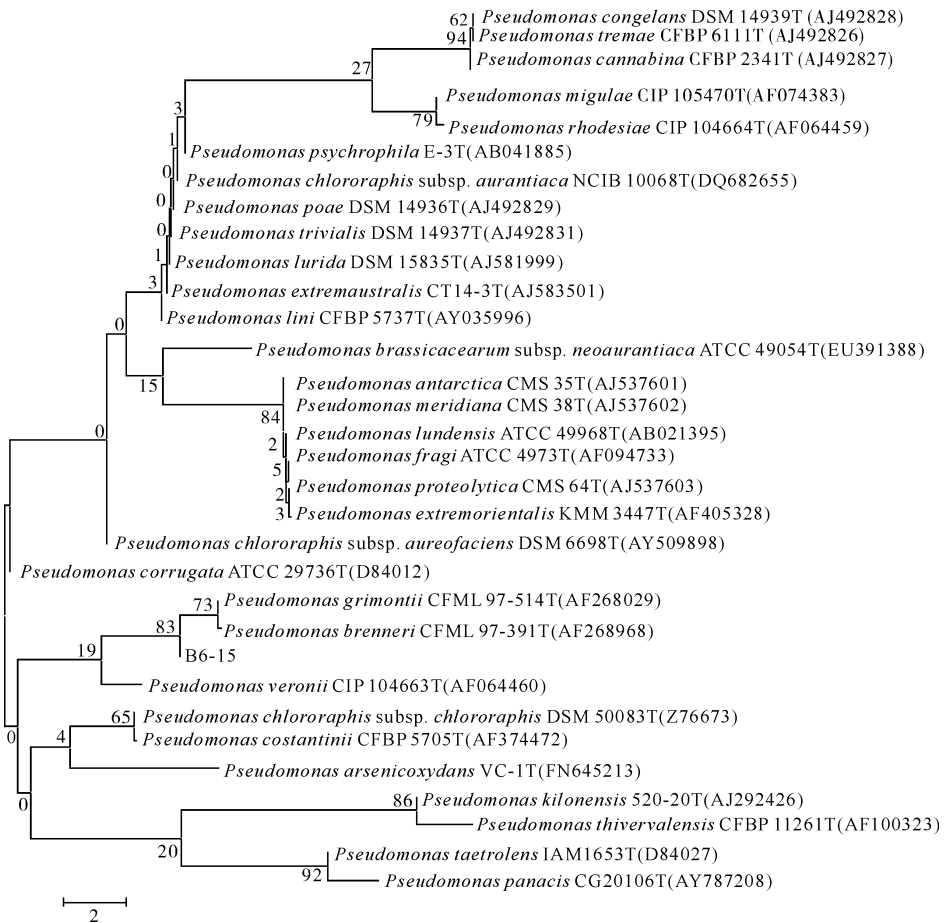


图 3 菌株 B6-15 的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of strain B6-15

2.3 菌株生长特征的初步研究

1) 温度对 B6-15 生长的影响。将菌株 B6-15 种子液以 1% 的接种量接入液体培养基中, 分别在不同温度下培养, 连续测定液体 $D_{600\text{ nm}}$ 值, 结果(图 5)显示: 菌株 B6-15 在 10~40 °C 均能生长, 最适生长温度为 20 °C。该菌在不同温度下, 培养 16 h 后均陆

续进入稳定期, 生长周期较长。从生长量来比较, 在 20 °C 环境下, 培养 20 h 后菌株 B6-15 的生长量最大。

2) 初始 pH 值对菌株 B6-15 生长的影响。将菌株 B6-15 种子液接入初始 pH 值不同的液体培养基中, 20 °C 培养 24 h, 测定 $D_{600\text{ nm}}$ 值, 结果(图 6)显示: 菌株 B6-15 在初始 pH 为 6.0~8.0 生长较快, 最适初始

pH 值为 7.0。

3) NaCl 质量分数对菌株 B6-15 生长的影响。将菌株 B6-15 种子液接入不同质量分数 NaCl 液体培养基中, 20 °C 培养 24 h, 测定 $D_{600\text{ nm}}$ 值, 结果(图 7)显示:

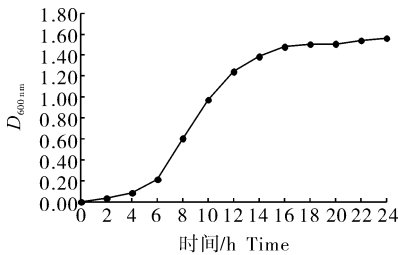


图 4 培养时间对菌株 B6-15 生长的影响
Fig. 4 Effects of culturing time on growth of the strain B6-15

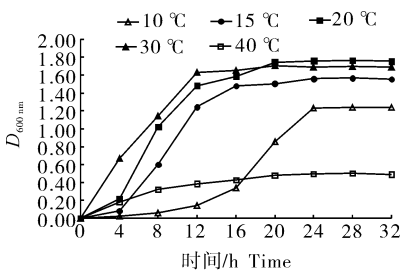


图 5 温度对菌株 B6-15 生长的影响
Fig. 5 Effect of culturing temperature on growth of strain B6-15

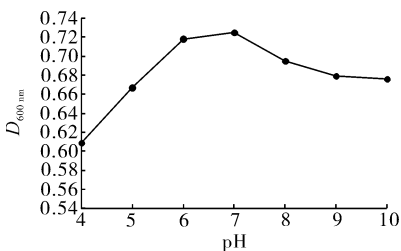


图 6 初始 pH 对菌株 B6-15 生长的影响
Fig. 6 Effects of pH on growth of strain B6-15

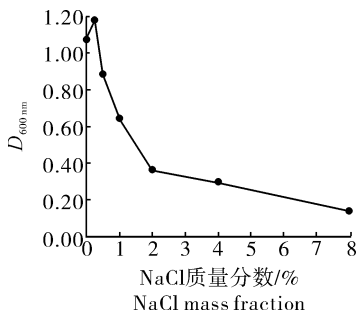


图 7 NaCl 质量分数对菌株 B6-15 生长的影响
Fig. 7 Effects of NaCl mass fraction on growth of strain B6-15

NaCl 质量分数为 0%~1% 时, 菌株 B6-15 生长最快, 最适 NaCl 质量分数为 0.25%。

3 讨论

本研究通过纤维素降解菌分离实验, 从黑龙江双峰林场腐殖土中筛选出 8 株耐低温纤维素降解菌株, 其中菌株 B6-15 的纤维素酶活性最高, 为 24.94 U/mL。在同等条件下, 该酶活低于 Akila 等^[11]筛选的 *Clostridium* sp. PXYL1 所产纤维素酶的酶活 (35.75 U/mL), 高于黄玉兰等^[5]筛选的 *Brevundimonas* sp. XW-1 所产纤维素酶的酶活 (15.6 U/mL)。通过对菌株 B6-15 进行形态学、生理生化特性、16S rDNA 鉴定, 初步鉴定该菌属于假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.), 假单胞菌属是 Migula 于 1894 年建立的, 是薄壁菌门假单胞菌科的模式属^[12]。据已有报道^[13-15]显示, 对假单胞菌属的降解性能研究集中于降解蛋白质、淀粉及脂肪, 但该属中对纤维素降解菌的研究较少, 因此, 该菌在低温应用中具有较大的潜力。经过生长特性的初步研究, 发现菌株 B6-15 生长的最适温度为 20 °C, 且在 10 °C 左右仍生长良好, 在 40 °C 时生长缓慢。根据耐低温菌 (psychrotrophs) 能够在 0 °C 左右生长良好, 最适生长温度约为 20 °C 的特征, 可以确定该菌为耐低温菌。其最适初始 pH 值为 7.0, 在 pH 4.0 时生长最缓慢, pH 10.0 时生长较缓慢, 因此, 该菌耐酸性差, 但具有一定的耐碱性。该菌的最适 NaCl 质量分数为 0.25%, 在 0% 的 NaCl 下仍生长较快, 而在 4%~8% 的 NaCl 下生长极缓慢, 故该菌的耐盐性差。

该菌所产的纤维素酶具有较好的热稳定性, 20 °C 保温后的残留酶活为 4 °C 保存后酶活的 70.32%, 50 °C 保温后仍残留 28.25% 的酶活力。由此可见, 提高粗酶液的存放温度, 该酶的热稳定性下降, 与王玢等^[7]研究的酶热稳定性结果相比较, 可初步确认该酶为低温酶。据报道^[16-17], 低温酶在低温环境下具有较高催化活性, 且最适反应温度可达 25~40 °C。

菌株 B6-15 在 10 °C 能正常生长繁殖, 对纤维素有一定的降解能力, 且所产的纤维素酶具有较好的热稳定性和耐碱性, 但耐酸性和耐盐性较差。因此, 该菌可为研究低温纤维素降解菌的堆肥应用提供理论基础和实践依据, 并具有较大的应用潜力。

参 考 文 献

[1] BOLTA S V, MIHELIC R, LOBNIK F, et al. Microbialcom-

- munity structure during composting with and without mass inocula[J]. *Compost Sci & Util.* 2003, 11(1): 6-15.
- [2] 孙晓东, 李建宏, 潘欣, 等. 低温菌株的筛选及酚降解能力的研究[J]. *南京师范大学学报: 自然科学版*, 2001, 24(2): 83-86.
- [3] 籍宝霞, 张丽萍, 程辉彩, 等. 低温微生物菌剂处理鸡粪研究[J]. *中国家禽*, 2009, 31(18): 41-43.
- [4] 谢宇新, 徐凤花, 王彦伟, 等. 低温菌株的筛选及对堆肥温度的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2011, 30(7): 1436-1442.
- [5] 黄玉兰, 李征, 刘晓宁, 等. 一株耐低温纤维素酶高产菌株的筛选、鉴定和产酶的初步试验[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(5): 637-644.
- [6] GHOSE T K. Measurement of cellulase activities[J]. *Pure Appl Chem*, 1987, 59(2): 257-268.
- [7] 王玢, 汪天虹, 张刚, 等. 产低温纤维素酶海洋嗜冷菌的筛选及研究[J]. *海洋科学*, 2003, 27(5): 42-45.
- [8] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 66-127.
- [9] 周德庆. 微生物学实验教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 49-51, 220-225.
- [10] FANG Y W, LU Z X, LU F X, et al. A newly isolated organic solvent tolerant *Staphylococcus saprophyticus* M36 produced organic solvent-stable lipase[J]. *Current Microbiology*, 2006, 53: 510-515.
- [11] AKILA G, CHANDRA T S. A novel cold-tolerant *Clostridium* strain PXYL1 isolated from a psychrophilic cattle manure digester that secretes thermolabile xylanase and cellulase [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 219: 63-67.
- [12] 郭亚辉, 郭坚华, 李斌. 根据 16S rRNA 序列对假单胞菌属分类学的研究进展[J]. *微生物杂志*, 2004, 24(2): 38-41.
- [13] DANG H Y, ZHU H, WANG J, et al. Extracellular hydrolytic enzyme screening of culturable heterotrophic bacteria from deep-sea sediments of the Southern Okinawa Trough [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 25(1): 71-79.
- [14] GROUDIEVA T, MARGARITA K, HODA Y, et al. Diversity and cold-active hydrolytic enzymes of culturable bacteria associated with Arctic sea ice, Spitzbergen [J]. *Extremophiles*, 2004, 8: 475-488.
- [15] BERLEMONT R, DELSAUTE M, PIPERS D, et al. Insights into bacterial cellulose biosynthesis by functional metagenomics on Antarctic soil samples [J]. *The ISME Journal*, 2009, 3: 1070-1081.
- [16] PANG H, ZHANG P, DUAN C J, et al. Identification of cellulase genes from the metagenomes of compost soils and functional characterization of one novel endoglucanase [J]. *Curr Microbiol*, 2009, 58: 404-408.
- [17] ZENG R Y, XIONG P J, WEN J J. Characterization and gene cloning of a cold-active cellulase from a deep-sea psychrotrophic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. DY3 [J]. *Extremophiles*, 2006, 10(1): 79-82.

Screening, identification and growth of a cold-adapted cellulose-decomposing bacterium for composting

SHANG Xiao-ying CHENG Xu-yan HUO Pei-shu LI Ji

*College of Resources and Environmental Sciences,
China Agricultural University, Beijing 100193, China*

Abstract Through the screening experiment and the cellulase activity measurement experiment, eight cold-adapted cellulose-decomposing bacteria have been isolated from forest humus at Heilongjiang Province for increasing the resources of cold-adapted cellulose-decomposing bacteria for composting. Among the eight bacteria, the strain B6-15 had the highest cellulase activity of 24.94 U/mL. And when the strain B6-15 was cultivated at pH 7.0, 0.25% of NaCl concentration, it could get the maximum growth. Strain B6-15 was identified as a *Pseudomonas* sp. by its morphological, the physiological and biochemical properties and 16S rDNA sequence analysis methods. Then the thermal stability of cellulase produced by strain B6-15 was examined and the result showed that the cellulase was a kind of cold active enzyme and had 54.43% residual activity at 10 °C.

Key words cold-adapted bacterium; cellulose-degrading; *Pseudomonas* sp.; screening; growth characters