

# 白蚁栖息环境中蜡状芽孢杆菌的分离及其纤维素酶活性分析

吴燕 侯信锋 迟绍丽 倪金凤\*

(山东大学 微生物技术国家重点实验室 山东 济南 250100)

**摘要:**【目的】了解白蚁栖息环境中是否有降解纤维素的微生物。【方法】以羧甲基纤维素钠为唯一碳源,利用刚果红染色,根据透明圈大小进行筛选。通过显微形态、革兰氏染色及 16S rRNA 基因序列分析对菌株进行鉴定。DNS 法测定菌株产纤维素酶与生长周期的关系,并进一步分析纤维素酶性质。【结果】从台湾乳白蚁(*Coptotermes formosanus* Shiraki)栖息环境中筛选到一株具有较高纤维素酶活性,革兰氏阳性菌株 TT15, 16S rDNA 序列分析鉴定为蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus* Gd2T)。菌株培养前 12 h 没有纤维素酶活性,随着培养时间的增加,纤维素酶活性逐渐增大;当生长达到稳定期(48 h),酶活性达到最大并保持稳定。菌株 TT15 纤维素酶活性的最适 pH 和最适反应温度分别为 5.0 和 50 °C。【结论】从白蚁栖息环境中分离到一株具有较高纤维素酶活性的蜡状芽孢杆菌 TT15,可作为产细菌纤维素酶的优良菌株。

**关键词:** 白蚁, 栖息环境, 纤维素酶活, 蜡状芽孢杆菌

## Isolation and characterization of a *Bacillus cereus* strain with cellulose-degradation activity from a termite-inhabiting soil

WU Yan HOU Xin-Feng CHI Shao-Li NI Jin-Feng\*

(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan, Shandong 250100, China)

**Abstract:** [Objective] The study aims to determine whether the termite-inhabiting soil harbors cellulose-degradation bacteria. [Methods] Using a selective medium supplemented with so-

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30870085); 国家 973 计划项目(No. 2011CB707402)

\*通讯作者: Tel: 86-531-88363323; 信箱: jinfngni@sdu.edu.cn

收稿日期: 2011-11-27; 接受日期: 2012-02-15

dium carboxymethyl cellulose (CMC-Na) as the sole carbon source and the Congo red activity staining method, we have isolated a cellulose-degradation strain. Microscope morphology, Gram-staining, and 16S rRNA gene sequencing analyses were utilized to characterize the isolated strain. Enzyme activity and properties were assayed by the DNS method. **[Results]** A Gram-positive strain (named as TT15) with high cellulase activity was obtained from a *Coptotermes formosanus*-inhabiting soil. Based on the 16S rDNA analysis, TT15 was identified to be a strain of *Bacillus cereus* Gd2T. The cellulase activity was not detected in the first 12 h of continuous culture, but afterwards, the enzyme activity was detected and increased with culture time. The activity reached the maximum level at the early stationary phase of growth (48 h) and remained stable later on. The optimum pH and temperature were 5.0 and 50 °C, respectively. **[Conclusion]** We have isolated a *B. cereus* Gd2T strain TT15 with high cellulase activity from a *C. formosanus*-inhabiting soil. The strain might be used for biomass conversion biotechnology.

**Keywords:** Termite, Inhabiting soil, Cellulase activity, *Bacillus cereus*

地球上每年光合作用可产生大于 100 亿 t 的植物干物质, 其中一半以上是纤维素和半纤维素<sup>[1]</sup>。以纤维素为主的生物质资源是地球上含量最多的可再生资源, 利用纤维素酶降解生物质产生葡萄糖, 进而发酵生产乙醇, 对于解决人类能源紧缺问题, 减少人类对化石能源的依赖与环境污染, 具有重大意义和广阔的应用前景。

已知产纤维素酶的生物很多, 如细菌、放线菌、真菌等微生物及白蚁、蜗牛等动物。白蚁是热带和亚热带地区木质纤维素的重要分解者<sup>[2]</sup>。研究表明, 低等白蚁能高效降解纤维素主要依赖于其双重纤维素降解机制——即白蚁自身产生的内源性纤维素酶和共生微生物来源的纤维素酶<sup>[3-4]</sup>。白蚁后肠有 300 多种共生微生物<sup>[5]</sup>, 包括原生动物、细菌、古菌等<sup>[6-7]</sup>。目前从白蚁分离到的具有纤维素酶活的细菌有芽孢杆菌(*Bacillus*)<sup>[8]</sup>、螺旋菌(*Spirochaeta*)<sup>[9]</sup>、链霉菌(*Streptomyces*)<sup>[10]</sup>、葡萄球菌(*Streptococcus*)<sup>[11-12]</sup>和贪噬菌<sup>[13]</sup>等。台湾乳白蚁(*Coptotermes formosanus* Shiraki)在我国分布广泛, 是社会危害性最大的低等白蚁之一, 它生存适应能力强, 室内比较容易饲养。本文报道

以饲养的台湾乳白蚁环境土壤为材料, 通过常规筛选方法, 获得一株产胞外纤维素酶的蜡状芽孢杆菌 *Bacillus cereus* TT15。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品:** 台湾乳白蚁取自青岛白蚁研究所, 室内培养于含有木头、土壤的塑料盒中。

**1.1.2 培养基及主要试剂:** CMC 富集培养基:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2%,  $\text{MgSO}_4$  0.015%,  $\text{KNO}_3$  0.1%, 羧甲基纤维素钠(CMC) 1%。选择培养基: 牛肉浸膏 0.15%, 蛋白胨 0.5%, 羧甲基纤维素钠 0.1%,  $\text{NaCl}$  0.5%, 琼脂 1.5%。产酶培养采用 LB 培养基(蛋白胨 1%, 酵母粉 0.5%,  $\text{NaCl}$  1%)。3,5-二硝基水杨酸(DNS)试剂配制见参考文献[14]。细菌基因组提取试剂盒采用 OMEGA 公司产品, *Taq* 酶购自 TRANS 公司, 引物合成及 PCR 产物测序由上海博尚生物科技公司完成。

**1.1.3 主要仪器:** Eppendorf 离心机, TaKaRa PCR 仪, OLYMPUS 显微镜, 博日公司的恒温金属浴, 尤尼柯上海仪器有限公司的 2802H-UV/VIS 分光光度计。

## 1.2 样品处理与菌株的分离纯化

**1.2.1 样品处理与富集培养:** 称取饲养白蚁盒中土壤样品 0.05 g 于灭菌后的 1.5 mL 离心管中进行研磨, 磨成粉末状后加入 CMC 富集培养基 1 mL 振荡混匀。转接 450  $\mu$ L 土壤混浊液到无菌玻璃试管中, 加入 4.5 mL CMC 富集培养基于 37  $^{\circ}$ C、150 r/min 条件下培养。同时转接 450  $\mu$ L 土壤混浊液, 同样处理方法于 30  $^{\circ}$ C、150 r/min 条件下培养。37  $^{\circ}$ C 培养 1 d 后, 按 2% 的接种量转接入含有 5 mL 新的 CMC 富集培养基的试管中, 置于 37  $^{\circ}$ C、150 r/min 摇床中进行第二次富集培养。30  $^{\circ}$ C 条件下的样品培养 3 d 后进行相同转接处理。

**1.2.2 选择培养与菌落筛选:** (1) 第二次富集培养的样品在 37  $^{\circ}$ C 液体培养 1 d 后, 将培养液稀释  $10^4$  和  $10^5$  倍, 涂布于选择培养基平板上, 于 37  $^{\circ}$ C 生化培养箱中培养, 1 d 后用牙签挑取单菌落, 转接到新的选择平板上继续在 37  $^{\circ}$ C 培养 1 d。通过刚果红活性染色, 根据透明水解圈有无及大小来挑选菌落。(2) 第二次富集培养在 30  $^{\circ}$ C 的样品液体培养 3 d 后, 将培养液稀释  $10^5$  和  $10^6$  倍, 然后涂布于选择培养基平板上 30  $^{\circ}$ C 培养 2 d。用牙签挑取单菌落再接种于选择平板 30  $^{\circ}$ C 培养 2 d, 进行刚果红染色。(3) 刚果红染色: 70% 乙醇洗去菌落, 用 0.1% 的刚果红溶液染色 30 min, 然后用 1 mol/L NaCl 脱色 30 min。(4) 将产生水解圈的菌落进行划线分离, 得到的单菌落再次进行牙签点种和刚果红染色。挑取水解圈较大的菌落, 进行第二次划线分离, 并进行牙签点种和刚果红染色, 观察水解圈的大小, 直至得到稳定降解纤维素的纯克隆。

## 1.3 鉴定

**1.3.1 革兰氏染色与镜检:** 革兰氏染色方法参见参考文献[15]。

**1.3.2 16S rRNA 基因序列分析:** 用试剂盒规定方法提取基因组 DNA。以基因组 DNA 为模板, 通

过 PCR 反应扩增 16S rRNA 基因。引物: 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 1492r (5'-GGTACCTTGTACGACTT-3')。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 40 s, 52  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 90 s, 共 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。序列测序验证后提交到 GenBank 数据库, 用 BLAST 进行相似性比较。

## 1.4 菌株 TT15 生长曲线与产酶性质测定

**1.4.1 液体培养:** 将菌株 TT15 接种到含 5 mL LB 液体培养基的试管中, 30  $^{\circ}$ C、150 r/min 培养约 16 h。按 1% 的接种量转接到含有 100 mL LB 液体培养基的三角瓶中。30  $^{\circ}$ C、150 r/min 摇床培养, 分别于 8、12、16、20、24、36、48、60 h 取菌液, 做相应稀释, 测  $OD_{600}$ , 绘制生长曲线。

**1.4.2 菌株 TT15 纤维素酶活测定:** (1) 酶液提取: 用 1.4.1 中的培养菌液, 在培养时间为 8、12、16、20、24、36、48、60、72、84、96、108、120 h 时取 500  $\mu$ L 菌液, 经 4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液即为粗酶液, 用以测定酶活性(粗酶液可暂时保存在 -20  $^{\circ}$ C, 最后一起测酶活)。(2) DNS 法测定纤维素酶活: 以 1% CMC (0.1 mol/L、pH 5.0 的 HAc/NaAc 缓冲液溶解) 为底物, 取 200  $\mu$ L 底物与 50  $\mu$ L 粗酶液, 充分混合后在 50  $^{\circ}$ C 恒温条件下反应 30 min。反应结束后加 100  $\mu$ L DNS 溶液, 沸水浴反应 5 min, 立即在冰水混合物中冷却, 补加蒸馏水 650  $\mu$ L 使反应体系为 1 mL,  $OD_{520}$  测定吸光值, 做 3 个平行。(3) 对照: 先加 200  $\mu$ L 1% CMC 底物于 1.5 mL EP 管中, 再加 100  $\mu$ L DNS 溶液, 然后加 50  $\mu$ L 酶液, 沸水浴反应 5 min 后, 于冰水混合物中冷却, 补加蒸馏水 650  $\mu$ L,  $OD_{520}$  测定吸光值。(4) 酶活性定义: 一个酶活力单位(Unit)定义为 pH 5.0、50  $^{\circ}$ C 条件下每小时产生 1  $\mu$ mol 还原糖的酶量。

**1.5 菌株 TT15 纤维素酶最适反应条件的确定** 按照 1.4 所述培养方法, 收集培养 2 d 后的上

清液, 用于最适反应条件的确定。

**1.5.1 最适 pH 的确定:** 用 0.1 mol/L HAc/NaAc 配制 pH 分别为 4.0、4.5、5.0、5.5 和 6.0 含有 1% CMC 的缓冲液, 用 0.1 mol/L Tris-HCl 配制含有 1% CMC、pH 为 7.0 的缓冲液。酶活性测定方法同上, 于 50 °C、不同 pH 值下测定纤维素酶活性, 每次做 3 组平行。

**1.5.2 最适反应温度的确定:** 按上述酶活性测定步骤, 分别在 30 °C、40 °C、50 °C、60 °C、70 °C 温度下反应 30 min,  $OD_{520}$  测吸光度, 每次做 3 组平行。

## 2 结果

### 2.1 富集和分离纯化结果

37 °C 培养时共点种 163 个克隆, 其中 A65 观察到水解圈。但对其(包括其周围的菌落)进行再次点种和染色后, 未观察到水解圈。

30 °C 培养时共点种 100 个克隆。其中 B15 有较大水解圈, 直径略小于 2 cm。对 B15 进行划线分离, 挑取单菌落再进行点种, 30 °C 培养 1 d 后刚果红染色, 得到的水解圈直径介于 0.8 cm–1 cm。挑选透明圈较大的菌落进行第二次行划线分离, 牙签挑取单菌落进行点种, 30 °C 培养 1 d 后刚果红染色。得到大小较为均一的水解圈, 约为 0.8 cm–1 cm (图 1), 通过两次分离纯化, 得到了

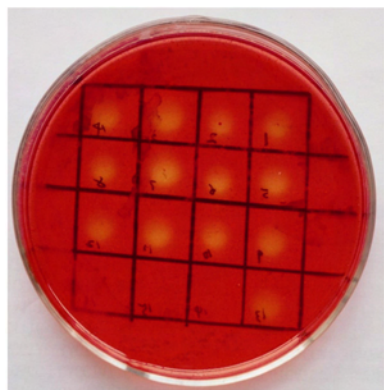


图 1 菌株 TT15 第二次划线分离后刚果红染色

Fig. 1 Congo red staining of strain TT15

纤维素降解活性比较稳定的纯菌株, 将所得菌株命名为 TT15。

### 2.2 菌株 TT15 的分类鉴定

**2.2.1 生长、形态及革兰氏染色:** 菌株 TT15 菌落呈白色, 圆形, 边缘有锯齿, 点种在选择平板上 30 °C 培养 1 d 后直径约为 3 mm。TT15 细胞呈杆状, 革兰氏染色阳性。实验证明, 该菌在 37 °C 的选择平板上也生长良好。

**2.2.2 16S rRNA 基因序列分析:** 通过 PCR 扩增菌株 TT15 的 16S rRNA 基因, 得到约 1.5 kb 的片段。序列分析与 BLAST 比对结果表明, 该序列与蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)的 16S rRNA 基因序列相似度达 100%, 确定菌株 TT15 为蜡状芽孢杆菌, 命名为 *Bacillus cereus* TT15。该序列 GenBank 登录号为 HQ284031。

### 2.3 菌株 TT15 生长与产酶关系

从菌株 TT15 的生长与产酶关系曲线可看出 (图 2), 菌株 TT15 的生长符合一般的细菌生长规律。经过调整期后, TT15 呈现指数生长特点; 培养 24 h 后, 生长达到稳定期; 60 h 时, 生长进入衰退期。产酶特点: 前 12 h 没有纤维素酶活, 16 h 时测到酶活, 随着培养时间的延长, 酶活逐渐增加, 48 h 时酶活基本达到最大值并趋于稳定, 培养到 180 h, 酶活保持稳定, 没有下降。

### 2.4 菌株 TT15 纤维素酶最适反应条件

**2.4.1 最适 pH:** 如图 3 所示, TT15 产生的纤维素酶在不同 pH 条件下的酶活性特点为: 当 pH<5.0 时, 随着 pH 值的增加, 酶活增加; 在 pH 为 5.0 时, 酶活最大; 当 pH>5.0 时, 纤维素酶活随着 pH 的增加而下降。纤维素酶的最适 pH 为 5.0。由于在确定最适 pH 时, 测定了 pH 为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、7.0 下的酶活, 而标准曲线是在 pH 5.0 的条件下测定的, 并不适合用于计算各个 pH 下的酶活大小, 所以最适 pH 的酶活采用  $OD_{520}$  吸光度值表示。

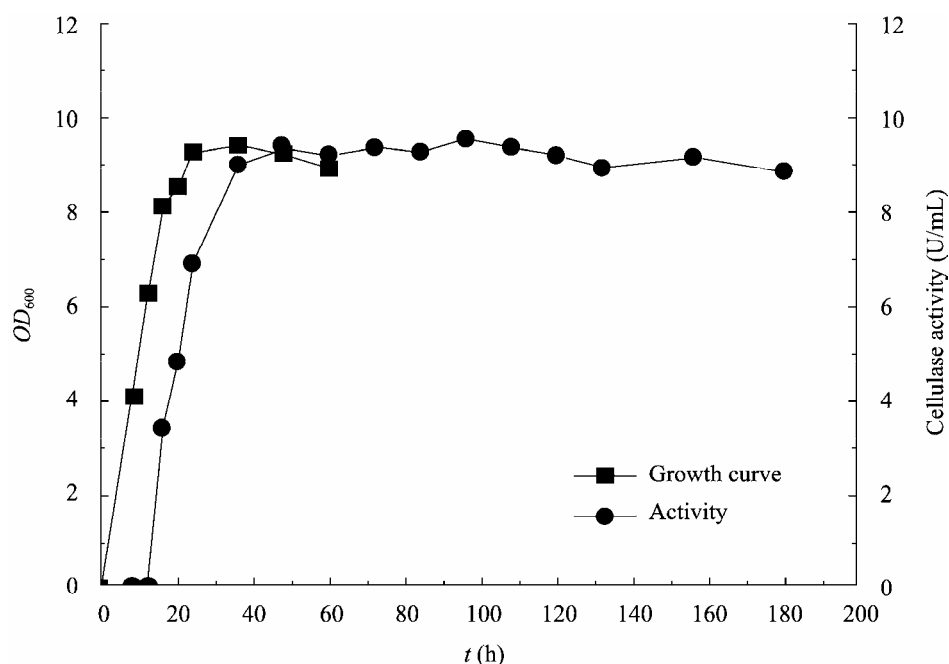


图2 菌株 TT15 产纤维素酶与生长关系曲线

Fig. 2 Cell growth and cellulase activity in strain TT15

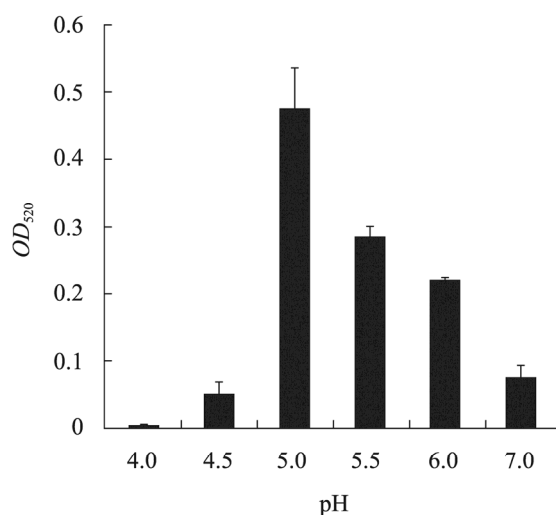


图3 TT15 纤维素酶活与最适 pH

Fig. 3 The effect of pH on cellulase activity of TT15

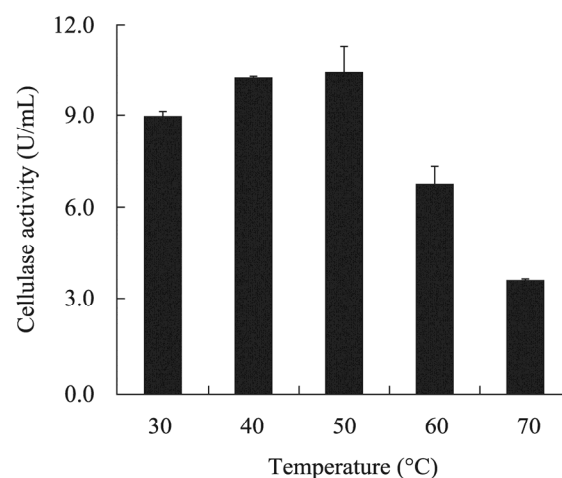


图4 TT15 纤维素酶活与最适反应温度

Fig. 4 The effect of temperature on cellulase activity of TT15

**2.4.2 最适反应温度:** 如图 4 所示, 从 30  $^{\circ}\text{C}$  到 50  $^{\circ}\text{C}$ , TT15 纤维素酶活性随着温度升高而增加, 最高酶活性达到  $10.36 \pm 0.93$  U/mL。最适反应温度

为 50  $^{\circ}\text{C}$ , 当温度高于 50  $^{\circ}\text{C}$ , 纤维素酶活性随着温度升高而下降, 在 70  $^{\circ}\text{C}$  时酶活性下降到最高值的一半以下。

### 3 讨论

本文首次报道从室内培养的台湾乳白蚁环境土壤中获得一株产胞外纤维素酶的蜡状芽孢杆菌 TT15。蜡状芽孢杆菌隶属于厚壁菌门, 芽孢杆菌属, 在自然界分布广泛, 常存在于土壤、灰尘、污水和动物肠道中。产纤维素酶的蜡状芽孢杆菌报道很少, 用 *Bacillus cereus* 和 Cellulase 两个关键词在 NCBI PubMed 上检索, 找到 4 篇文献, 相关文献仅两篇, 一篇是从花茎堆肥中分离到降解纤维素的蜡状芽孢杆菌<sup>[16]</sup>, 另一篇是从一种散白蚁肠道获得降解纤维素的蜡状芽孢杆菌<sup>[17]</sup>。目前尚无从台湾乳白蚁肠道获得蜡状芽孢杆菌的报道, 我们前期初步实验也未从台湾乳白蚁肠道中获得该菌, 但宏基因组等研究证明高等白蚁和低等白蚁后肠内广泛存在厚壁菌门微生物<sup>[5,18]</sup>, 因而不排除台湾乳白蚁肠道中存在蜡状芽孢杆菌, 白蚁后肠中许多微生物参与木质纤维素降解, 从白蚁生活土壤中分离到的具有纤维素酶活性菌株可能是由白蚁肠道代谢物排出的。

由于蜡状芽孢杆菌 TT15 是从含有羧甲基纤维素钠的培养基上筛选获得的, 因而文中纤维素酶活性主要指的是内切葡聚糖苷酶活性, 我们也分析了滤纸酶活, 但没有测到。TT15 菌分泌的胞外纤维素酶活性最高达  $10.36 \pm 0.93$  U/mL, 最适反应温度和 pH 分别为 50 °C 和 5.0。因为培养基、培养条件及其酶活性测定方法等不同, TT15 菌胞外酶活与报道的两种蜡状芽孢杆菌酶活性无法进行对比。另外所得到的数据都是在小规模培养条件下(100 mL 培养基)得到的, 如果改变培养基组分, 培养条件最优化, 酶活性还能提高。本研究分离的具有较高纤维素酶活的 TT15 菌可作为今后深入研究的优良菌株, 也为生物质资源转化应用提供了潜在的酶资源。

### 参考文献

- [1] Leschine SB. Cellulose degradation in anaerobic environments[J]. Annual Review of Microbiology, 1995, 49(1): 399–426.
- [2] Yamada A, Inoue T, Wiwatwitaya D, et al. Carbon mineralization by termites in tropical forests, with emphasis on fungus combs[J]. Ecological Research, 2005, 20(4): 453–460.
- [3] Nakashima K, Watanabe H, Saitoh H, et al. Dual cellulose-digesting system of the wood-feeding termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2002, 32(7): 777–784.
- [4] Ohkuma M. Symbioses of flagellates and prokaryotes in the gut of lower termites[J]. Trends in Microbiology, 2008, 16(7): 345–352.
- [5] Hongoh Y, Sharma VK, Prakash T, et al. Complete genome of the uncultured Termite Group 1 bacteria in a single host protist cell[J]. The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(14): 5555–5560.
- [6] 陈虹, 梅建凤, 闵航. 白蚁肠道微生物[J]. 微生物学杂志, 2005, 25(2): 75–79.
- [7] Hongoh Y. Diversity and genomes of uncultured microbial symbionts in the termite gut[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2010, 74(6): 1145–1151.
- [8] König H. Bacillus species in the intestine of termites and other soil invertebrates[J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 101(3): 620–627.
- [9] Dröge S, Fröhlich J, Radek R, et al. *Spirochaeta coccoides* sp. nov., a novel coccoid spirochete from the hindgut of the termite *Neotermes castaneus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(1): 392–397.
- [10] Tamburini E, Perito B, Mastromei G. Growth phase-dependent expression of an endoglucanase encoding gene (*eglS*) in *Streptomyces rochei* A2[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 237(2): 267–272.
- [11] 余金勇, 吴跃开, 普照. 白蚁肠细菌 B99菌株降解纤维素的初步研究[J]. 贵州林业科技, 2002,



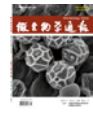

30(4): 16-19.

- [12] 何刚强, 堵国成, 刘立明, 等. 从白蚁中分离筛选纤维素分解菌及其产酶性质[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(3): 352-355.
- [13] 吴燕, 迟绍丽, 倪金凤. 从白蚁中分离到具有纤维素酶活的贪噬菌[J]. 应用昆虫学报, 2011, 48(1): 95-98.
- [14] 王建. 利用分光光度法测定纤维素酶中 Cx 酶活性[J]. 河南农业科学, 2000(10): 31-32.
- [15] 杨革. 微生物学实验教程[M]. 北京: 科学出版社, 2005.

- [16] Lu WJ, Wang HT, Yang SJ, et al. Isolation and characterization of mesophilic cellulose-degrading bacteria from flower stalks-vegetable waste co-composting system[J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 2005, 51(6): 353-360.
- [17] Thayer DW. Carboxymethylcellulase produced by facultative bacteria from the hindgut of the termite *Reticulitermes hesperus*[J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 1978, 106(1): 13-18.
- [18] Warnecke F, Luginbühl P, Ivanova N, et al. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite[J]. Nature, 2007, 450(7169): 560-565.

## 征订启事

### 2012 年中科院微生物所期刊联合编辑部联合征订

	《微生物学报》月刊(每月 4 日出版), 单价 55.00 元, 全年定价 660 元。刊号: ISSN 0001-6209; CODEN WSHPA8。国内邮发代号: 2-504; 国外邮发代号: BM67。
	《生物工程学报》月刊(每月 25 日出版), 单价 65.00 元, 全年定价 780 元。刊号: ISSN 1000-3061; CODEN SGXUED。国内邮发代号: 82-13; 国外邮发代号: BM5608。
	《微生物学通报》月刊(每月 20 日出版), 单价 58.00 元, 年价 696 元。刊号: ISSN 0253-2654; CODEN WSWPDI。国内邮发代号: 2-817; 国外邮发代号: BM413。
	《菌物学报》双月刊(单月 15 日出版), 单价 80 元, 全年定价 480 元。刊号: ISSN 1672-6472; CODEN JXUUAЕ。国内邮发代号: 2-499; 国外邮发代号: Q723。
订阅	欢迎广大读者直接与本刊发行部联系订购, 我们将按期免费为您邮寄
	汇款地址: (100101)北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中科院微生物所 B401
	收信人: 《 》编辑部; 电话: 010-64806142; E-mail: bjb@im.ac.cn
	请在附言处注明“订刊费”及所订期刊名称、年代、卷、期和数量