

一种嗜热厌氧纤维素降解细菌的分离纯化方法*

韩如昉 陈美慈 赵宇华 闵 航 马晓航

(浙江大学生命科学院 杭州 310029)

摘要: 根据纤维素降解细菌对不溶性纤维素底物的粘附作用, 利用 Hungate 厌氧操作技术直接以不溶性纤维素粉为基质进行滚管, 分离和纯化获得嗜热厌氧纤维素降解细菌。

关键词: 纤维素降解, 嗜热厌氧细菌, 分离, 纯化

中图分类号: Q939.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)05-0363-04

A METHOD FOR ISOLATION AND PURIFICATION OF THERMOPHILIC CELLULOLYTIC ANAEROBES

HAN Ru-Yang CHEN Mei-Ci ZHAO Yu-Hua MIN Hang MA Xiao-Hang

(College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029)

Abstract: A new method based on adherence of cellulolytic bacteria to insoluble cellulose for isolation and purification of thermophilic cellulolytic anaerobes was reported, in which Hungate anaerobic operating techniques were used to roll tubes with insoluble cellulose powder as substrate.

Key words: Cellulose-degradation, *Thermophilic anaerobe*, Isolation, Purification

纤维素是自然界中储量最丰富的有机物。自然界存在着许多种真菌、放线菌和细菌能降解纤维素, 其中

* 浙江省自然科学基金项目 (No.396070)

收稿日期: 1999-07-26, 修回日期: 1999-11-20

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

包括嗜热厌氧纤维素降解细菌。该类细菌在高温厌氧下具有较强的纤维素降解能力,可利用某些未经处理的植物秸秆,显示出该类细菌及其纤维素酶的理论研究价值和在纤维素废料和农作物秸秆处理等方面的广阔的应用前景。本实验室以新鲜牛粪为富集源获得一个纤维素降解混物,但一直未能纯化。以前的研究者大多采用纤维素滤纸球磨处理 72h,然后利用球磨浆滚管的方法使分离成功^[1~4]。作者根据纤维素降解细菌对纤维素的粘附作用,设计了一种用不溶性纤维素粉直接滚管以分离和纯化嗜热厌氧纤维素降解细菌的新方法,并从新鲜牛粪、高温堆肥和本实验室保存的富集物中成功分离得到 4 株嗜热厌氧纤维素降解梭状芽孢杆菌(*Clostridium* spp.)。

1 材料与方法

1.1 培养基

基础培养基为经修改的 CM3 培养基。每 1000mL 成分如下: KH_2PO_4 1.5g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 2.90g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.30g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.00g, CaCl_2 0.15g, 酵母粉 2g, 还原剂 L-半胱氨酸 0.5g, 氧化还原电位指示剂 0.1% 刃天青 2.00mL。用 4N NaOH 调节 pH 至 6.8~7.2, 分装于 1.5cm × 15cm 厌氧试管, 液体培养基每管 10mL, 固体培养基含 2% 琼脂, 每管 4.5mL。气相为 100% N_2 。

分离纯化培养基分别为 CM3 纤维素滤纸培养基: 10mL 基础培养基加入 1cm × 4cm 滤纸条 1 张; CM3 纤维素粉液体培养基: 10mL 基础培养基加入少量 Whatman CF11 纤维素粉(加入量以铺满圆底为宜); CM3 纤维素粉固体培养基: 4.5mL CM3 琼脂培养基加入适量纤维素粉(加入量以铺满圆底为宜); CM3 纤维二糖固体培养基: 4.5mL 含 1% 纤维二糖的 CM3 琼脂培养基。

所有过程使用 Hungate 厌氧操作技术, 57℃ 下培养。

1.2 分离和纯化步骤

1.2.1 分离源: 样品来源于新鲜牛粪和高温堆肥。采样后样品无需再作处理。

1.2.2 富集: 取少许样品直接加入 CM3 纤维素滤纸培养基(加样量以铺满试管圆底为宜), 用振荡器振荡后在 57℃ 下培养至滤纸溃烂。用注射器将 0.5mL 原培养物转接至新的相同培养基, 培养至滤纸溃烂后进行第 2

次转接。

两次转接后, 培养液中已经不再含有原分离源样品的固体沉淀物, 因此可清楚地观察到纤维素滤纸降解全过程。一般培养 48~60h 纤维素滤纸开始出现小黄斑, 继续培养, 整张滤纸均能变成黄色, 此时纤维素降解细菌大多已经粘附于滤纸之上, 但滤纸仍未变软。将原培养液全部吸出, 注入 10mL CM3 基础培养基清洗试管内部, 此时避免剧烈振动试管, 以免造成粘附于滤纸上的菌体脱落。清洗两次并注入 10mL 新鲜的相同培养基继续培养 24h, 吸取 0.5mL 培养液进行转接。利用滤纸培养基转接 4~5 次后, 吸取 0.5mL 转接至 CM3 纤维素粉液体培养基中。

转接后将试管上下颠倒数次, 然后将其水平放置使纤维素粉均匀平铺于试管内壁。培养一段时间后, 纤维素粉逐渐从白色变成黄色, 并紧贴于试管内壁; 纤维素粉层与培养液交界处出现一片乳白色混浊的菌膜。此时, 镜检可观察到纤维素降解菌和纤维素粉之间的强烈粘附(图 1)。

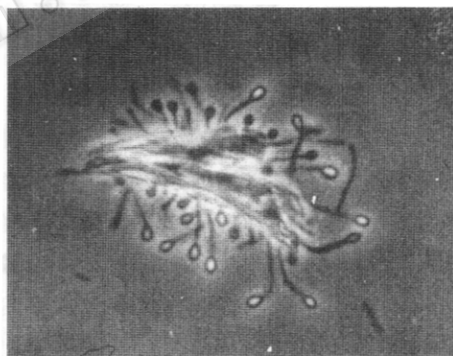


图1 分离菌株对纤维素的粘附作用(900×)
纤维素粉培养基培养48h

1.2.3 纤维素粉滚管: 轻轻晃动试管使紧贴于试管内壁的纤维素粉层脱落并悬浮于培养基中, 静置 30min 纤维素粉全部沉至底部后, 将试管小心倒置使底部纤维素粉和培养液分离, 吸出全部培养液, 保留底部的纤维素粉。将 4.5mL 融化的纤维素粉琼脂培养基注入原试管, 轻轻晃动使试管底部的纤维素粉均匀分布于融化的培养基中; 接着, 利用纤维素粉琼脂培养基进行 10 倍系列稀释(一般以 10^{-1} ~ 10^{-5} 为宜), 每次转接前将纤维素粉轻轻摇匀, 但不要使用振荡器, 以免破坏细菌和纤维素粉之间的粘附。滚管使纤维素粉均匀分布于试管壁, 57℃ 培养。

1.2.4 吸取透明圈: 粘附于纤维素粉之上的纤维素降解菌继续利用纤维素进行分裂、增殖和扩散, 新生成的纤维素降解细菌与另外的纤维素粉接触之后又开始降解作用。这样, 纤维素粉逐渐被降解, 培养 5~10d 之后出现大小不一的透明圈(图 2)。同时, 纤维素降解导致培养基中可溶性糖分增加, 原先存在于混培物中的非纤维素降解菌亦开始生长并在透明圈中形成菌落。镜检挑选不含杂菌菌落的透明圈, 用玻璃毛细吸管将透明圈吸取至纤维素滤纸培养基; 80℃ 水浴 15min 使琼脂块中的细菌释放在培养基中, 57℃ 培养至滤纸溃烂。

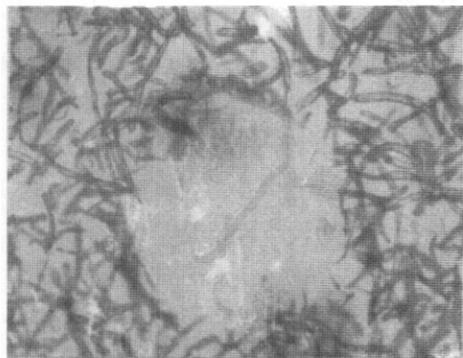


图2 纤维素降解后形成的透明圈(36×)

纤维素粉琼脂培养基滚管培养120h

1.2.5 纤维二糖培养基滚管: 吸取 0.1mL 培养液利用纤维二糖固体培养基进行 10 倍系列稀释(一般以 10^{-1} ~ 10^{-9} 为宜), 每次转接前用振荡器将菌体和培养基混匀。滚管后 57℃ 培养。一般培养 48~72h 菌落成熟, 用毛细吸管将单菌落吸至滤纸培养基, 80℃ 水浴 15min 使琼脂块中的细菌释放到培养基中, 57℃ 培养至滤纸溃烂。经数次纯化获得培养物, 镜检菌体和滚管菌落形态一致可确认为纯培养。

2 结果与讨论

2.1 分离物

利用上述方法分离得到的 4 个分离菌株均为直的或稍弯曲杆状, 大小为 $0.6\sim 0.8\mu\text{m} \times 3\sim 15\mu\text{m}$, 革兰氏染色阴性, 严格厌氧, 不还原硫酸盐, 形成芽孢, 初步鉴定为 *Clostridium* 属。分离菌株大多数芽孢着生于菌体顶端, 还可观察到亚顶端生芽孢。分离菌株在 pH6.2~8.9, 温度 45~65℃ 范围内利用纤维素, 最适 pH 为 7.0~7.5, 最适温度为 55~60℃, 发酵纤维素产生乙醇、乙酸、 H_2 和 CO_2 。分离菌株能利用纤维素滤纸, 纤维素粉 Whatman CF11, 微晶纤维素, 纤维素粉 MN300 和未经

处理的玉米秆芯, 甘蔗渣, 水稻秸秆。关于分离物降解纤维素产乙醇的部分特性已经报道^[5]。1% 滤纸为底物培养 120h, 纤维素降解率为 59%; 玉米秆内芯底物浓度较低时(小于 0.5%)培养 180~240h, 分离物可以降解几乎所有的玉米秆内芯^[5]。此外还利用纤维二糖、葡萄糖、果糖、麦芽糖、山梨醇等。

2.2 嗜热厌氧纤维素降解细菌分离和纯化的难度

嗜热厌氧纤维素降解细菌分离和纯化的困难在于: (1) 纤维素为不溶性基质, 多数纤维素降解细菌必须先与纤维素粘附才能将其水解; 直接利用纤维素粉琼脂培养基滚管会使纤维素降解细菌无法触及纤维素上的降解位点, 使纤维素无法降解。(2) 非纤维素降解细菌利用纤维素水解产生的可溶性小分子糖类为碳源, 其生长几乎与纤维素降解细菌同步, 而且种类和增殖速率可能超过纤维素降解细菌, 嗜热厌氧纤维素降解细菌易与其它嗜热厌氧菌形成稳定的混培物, 所以直接滚管无法获得可以挑取的单个菌落。Erbezniak 等证实 *Clostridium thermocellum* JW20 (ATCC31549) 菌株是 *Clostridium thermocellum* 和 *Thermoanaerobacter ethanolicus* 的混培物^[6]。有的杂菌亦生成芽孢, 菌体形态与纤维素降解菌一致。

2.3 分离和纯化的关键

2.3.1 Whatman CF11 纤维素粉 是分离和纯化的首选纤维素材料: 纤维素降解细菌均可利用 Whatman CF11 纤维素粉、微晶纤维素和纤维素粉 MN300 生长。纤维素降解细菌利用纤维素粉 MN300 生长时未观察到粘附状态。微晶纤维素颗粒太细, 只能粘附少数几个纤维素降解细菌, 且纤维素降解细菌与微晶纤维素粘附作用时间较短。纤维素降解细菌对 Whatman CF11 纤维素粉粘附的维持时间较长, 处于粘附状态的细菌生长状态较一致, 粘附作用较强, 转接过程中二者不易脱离。这一特点对于纤维素粉滚管产生透明圈极为重要。

2.3.2 保持粘附状态: 与粘附作用有关的各个步骤绝对不能振荡, 以免破坏粘附作用导致滚管后无法获得透明圈。作者曾用富集物上清液滚管, 无法得到透明圈, 表明富集物中的纤维素降解细菌均通过粘附机制进行纤维素降解。当然, 是否所有的嗜热厌氧纤维素降解细菌都以粘附作用作为纤维素降解的前提仍需进一步研究。

2.3.3 去除杂菌: 为保证纤维素降解细菌在富集物中占

绝对优势,作用利用空白培养基清洗,高温水浴的方法尽量减少杂菌数量,但杂菌有时仍然出现在透明圈中。因此在吸取透明圈之前,必须在显微镜下确认无杂菌透明圈。这样仍无法排除透明圈内存在未长成菌落的非纤维素降解菌的休眠芽孢,亦无法证明整个透明圈中包含的纤维素降解菌属于同一种,所以需纤维二糖培养基多次滚管才能获得纯培养。

2.3.4 菌体释放:纤维二糖培养基滚管长出的菌落必须 80℃ 水浴 15min 使菌体释放到培养基中,否则琼脂可能阻碍纤维素降解细菌和纤维素的粘附作用,使纤维素无法降解,导致分离失败。

2.4 粘附法和球磨浆法的比较

人们普遍采用纤维素滤纸球磨浆滚管的方法分离嗜热厌氧纤维素降解梭菌属 *Clostridium*^[1~4,8,9]。本文介绍的方法和纤维素粉球磨浆法相比有下列特点: (1) 纤维素粉比纤维素粉球磨浆结晶度高,较难降解,利用不溶性纤维素粉更能有效地分离得到纤维素酶活性强的菌株,而富集物中可能存在数量占优势但纤维素降解活性较弱的种群。分离菌株的纤维素酶活性测定正在进行,将另文报道。 (2) 纤维素降解细菌和纤维素的粘附后用新鲜培养基清洗可迅速减少富集物中非纤维素降解细菌的数量,使纤维素降解细菌成为优势种群。

(3) 球磨浆法须将纤维素粉用球磨机处理 72h 以获得纤维素匀浆,需要特殊的机械设备。 (4) 利用琼脂培养基中形成的透明圈制成超薄切片进行电镜观测亦可用于纤维素的微生物降解过程的研究。

参 考 文 献

- [1] Madden R H. *Int J Syst Bacteriol*, 1983, 33: 837~840.
- [2] Jin F, Yamasato K, Toda K. *Int J Syst Bacteriol*, 1988, 38: 279~281.
- [3] 贺延龄, 丁友舫, 隆言泉. *微生物学报*, 1991, 31: (2): 85~89.
- [4] 谭蓓英, 王大相. *微生物学报*, 1992, 32(3): 155~160.
- [5] 韩如暘, 陈美慈, 闵 航等. *应用与环境生物学报*, 1999, 5(suppl): 170~174.
- [6] Erbezniak M, Jones C R, Dawson K A, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63: 2949~2951.
- [7] Sneath P H A, Mair N S, Sharpe M E, *et al.* *Bergey's manual of systematic bacteriology*. vol. 2. The Williams and Wilkins Co., Baltimore. 1986.
- [8] Stainthorpe A C, Williams R A D. *Int J Syst Bacteriol*, 1988, 38: 119~121.
- [9] 谭蓓英, 贺 青, 王大相. *微生物学报*, 1991, 31: (6): 484~487.