

青海高原降解纤维素微生物的调查、分离、鉴定*

谢占玲¹ 李秀萍² 杨家华¹

(青海大学农牧学院 西宁 810003)¹ (青海畜牧兽医科学院 西宁 810003)²

摘要: 从青海高原林区分离筛选 300 余株分解纤维素的细菌及 31 株降解纤维素的真菌。测定纤维素分解菌含量土样为 2.6×10^5 /g。对纤维素酶水解圈较大的 11 株真菌, 根据其滤纸酶活筛选出一株分离自互助北山林的高产纤维素酶的真菌 No.0143 菌株, 根据其形态学及培养特征鉴定为康氏木霉 (*Trichoderma koningii* Qudem), 该菌湿固体发酵物含滤纸酶活力 (FPA) 为 15u/g。该菌无毒副作用, 可用于饲料业。

关键词: 分解纤维素微生物, 康氏木霉, 纤维素酶, 滤纸酶活力

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 02-0091-04

THE STUDY ON DEGRADING CELLULOSE MICROORGANISMS IN QINGHAI PLATEAU

XIE Zhan-Ling LI Xui-Ping YANG Jia-Hua

(Biology Science Department of Qinghai University, Xining 810003)¹

(Qinghai Veterinary Academy, Xining 810003)²

Abstract: In this paper, 300 bacteria strains and 31 fungi strain were isolated from Qinghai plateau. The numbers of cellulose degradation organisms in soil is 2.6×10^5 /g. A strain *Trichoderma koningii* No.0143 which produces cellulase was isolated from 11 fungi in the east area in Qinghai, its FPA activity was 15u/g. It can be used in enzymatic feed.

Key words: Cellulose degradation microorganisms, *Trichoderma koningii* Cellulase, FPA

微生物资源的开发利用已产生了重大的社会效益, 但是对微生物资源重要性的认识远远不及对动植物资源那样普及^[1]。青海高原独特的生态环境孕育了特殊的生物物种, 其中微生物资源极为多样, 本研究初步分离研究该地区纤维素分解微生物, 确定了一株纤维素真菌的分类地位。纤维素酶在饲料、食品、采油、医药、化工、纺织等方面有巨大的潜在市场。纤维素酶制剂是安全的饲料添加剂, 还能有效提高青贮饲料的营养价值, 因此, 纤维素酶的研究已成为当前动物营养学中的一个热点^[2,3]。

1 材料与方法

1.1 主要试剂药品和菌种

1.1.1 试剂: 购自上海化学试剂厂羧甲基纤维素钠粉 (CMC-Na), 新华一号滤纸。

1.1.2 菌种: 康氏木霉 AS3.2774 株, 购自中国科学院微生物研究所, No.0143 分离自青海原始林区。

* 青海省自然科学基金资助 (No.99-07-04)

收稿日期: 2003-04-06, 修回日期: 2003-09-01

1.2 培养基

1.2.1 无机盐培养基: 参考文献 [4]。

1.2.2 纤维素平板: 参考文献 [4]。

1.2.3 双层平板培养基: 参考文献 [4]。

1.2.4 土豆汁培养基 (PDA) 和麦芽汁琼脂 (MEA): 参考文献[5]方法配制。

1.2.5 固体发酵产酶培养基: 参考文献 [6]。

1.3 方法

1.3.1 样品采集: 从青海的海东、海南、海北的原始森林区采集土样 (距表层 5cm 处)、枯枝落叶样、枯树样 200 多份, 分别用于分离纤维素降解细菌及真菌菌株。

1.3.2 菌株的分离和筛选: 将各样品制成 0.2% 的悬液按 10 倍递增稀释至 2×10^8 , 各样取每个稀释度样液 0.2 mL 分别接种于培养基平板, 28℃ ~ 30℃ 培养 3 ~ 5d, 观察并挑选产纤维素酶的菌落、计数。

1.3.3 菌株 FPA 的测定: 分别接菌孢子悬液于固体产酶培养基, 28℃ 培养 72h 成曲。酶液制备及活力测定按文献 [6, 7] 方法进行, 用 3.2774 为对照。

1.3.4 分离菌株的急性毒性试验: 3 株菌酶活的斜面培养物中, 每菌株胃服 8 只小鼠, 每只小鼠每天分 2 次胃服菌悬液, 每次 2 mL, 共持续 7d, 对照组胃服马铃薯煮沸液。每天记录小鼠临床表现各 2 次, 至 14d 后扑杀进行病理解剖学和组织学检查。

1.3.5 菌种鉴定: 酶解圈最大和滤纸酶活力最高的真菌菌株 No.0143, PDA 和麦芽汁琼脂培养基上 25℃ 培养 4d, 进行菌落、菌丝、孢子形态、产酶特性等观察。

2 结果与分析

2.1 纤维素细菌、真菌的分离

2.1.1 纤维素细菌平板计数: 共分得分解纤维素的细菌 300 余株, 其中菌落颜色黄色、红色、无色透明、橘黄色、黑色、白色 (表 1)。青海林区土样中的菌落计数的结果表明纤维素分解菌含量平均为: 2.6×10^5 /g。含量较多的有噬纤维菌属 (*Cyto phaga*)、生孢噬纤维菌属 (*Sporocytophaga*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)。

表 1 青海林区土壤纤维素平板培养基菌落计数

| 土样号 (稀释 100 倍) | 互助林区 | 平安林区 | 海北草地 | 祁连山东段林区 |
|----------------|------|------|------|---------|
| 霉菌菌落数 | 2 | 8 | 1 | 3 |
| 干白菌数 | 1 | 7 | | 7 |
| 黄色圆菌落数 | 54 | 15 | 8 | 12 |
| 白色圆菌落数 | 220 | 78 | | |
| 红黄色圆菌落数 | 5 | 13 | | |
| 白色油滴凸起菌落 | 69 | 70 | 150 | 25 |
| 橘黄色 | | | | 5 |
| 白色扁平周遍不规则菌落 | 147 | | | 147 |
| 黑色油漆样菌落 | | | 2 | 1 |
| 合计 | 498 | 183 | 160 | 200 |

2.1.2 真菌酶活测定: 31 株真菌, 选出 11 株纤维素水解圈较大的真菌, 测定滤纸酶活力, 挑选出产酶活力较高的真菌 3 菌株 (No.0143、1 号和 2 号), No.0143 产酶最高

(见表 2)。

表 2 不同真菌菌株的纤维素相对滤纸酶活力比较 (28℃, 114h)

| 菌株编号 | 0143 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|----------|------|------|------|------|-----|------|------|-------|-------|-------|-------|
| 相对酶活 (%) | 100 | 59 | 56 | 44 | 40 | 13.3 | 9.47 | 9.2 | 7.87 | 7.87 | 1.6 |
| OD 值 | 0.75 | 0.44 | 0.42 | 0.33 | 0.3 | 0.1 | 0.07 | 0.069 | 0.059 | 0.059 | 0.012 |

No.0143 菌株其湿固体发酵物滤纸酶活力测定结果, 经计算其滤纸酶活力为 15 u/g。

2.2 分离菌株的急性毒性试验结果

分离菌株 No.0143、1 号和 2 号的全培养物急性毒性试验可见: 1 号试验组小鼠至第 3d 全部死亡, 剖检胃肠道发暗褐色、肾脏积水; 2 号试验组至第 7d 死亡 4 只, 死亡后剖检胃肠道病理变化不太明显, 存活者表现被毛粗乱、倦卧罐底、不思饮食, 至第 11~12d 恢复正常; No.0143 组与对照组在试验期间均活动与生长正常, 未出现任何中毒症状, 病理剖检各组织器官均正常。初步证明 No.0143 株分离菌安全无毒。

2.3 No.0143 菌株的鉴定

(1) 菌落在 PDA 和麦芽汁琼脂培养基上生长快, 室温下 3d 就可达到直径 9 cm; (2) 菌落开始为白色致密平坦菌丝, 中间形成浅绿色的产孢子丛束区, 随时间推移整个培养基平皿变成浅绿色至绿色的产孢子丛束; (3) 菌落在 MEA 培养基的反面无色, 而在 PDA 培养基的反面变成黄绿色, 菌丝无色, 壁光滑, 分枝复杂, 有隔, 直径 2.0~10.0 μm; (4) 厚垣孢子间生或少量顶生, 圆形、椭圆形或桶形, 壁光滑直径可达到 12 μm; (5) 分生孢子梗为菌丝的短侧枝对生或互生分枝, 其可继续分枝, 形成二、三级分枝, 最终形成似松柏式的分枝轮廓, 分枝末端为小梗; 小梗瓶形或锥形, 基部稍收缩, 中央宽往上变窄近于直或中部弯曲, 大小为 7.5~12.0 μm × 2.5~3.5 μm; (6) 分生孢子单细胞, 椭圆形、卵圆形或长形, 大小为 3.0~5.0 μm × 1.9~3.3 μm, 壁光滑, 在光学显微镜下观察单个孢子近无色或浅绿色, 成堆时绿色。可产生纤维素酶等。根据上述特性, 鉴定 No.0143 菌株为康氏木霉 (*Trichoderma koningii* Qudem.)

3 讨论

青藏高原自第三纪末强烈隆起上升成为世界上独特地理单元, 它的存在不仅影响欧亚大陆生物物种和生物地带的分布格局, 而且其生态环境影响着生物物种的形成与演化。青海高原位于青藏高原的东北部, 年平均气温低 (-5℃~9℃), 雨量稀少, 蒸发量大, 气候干燥, 昼夜温差大, 冬季寒冷漫长, 夏季凉爽短促, 属典型高原大陆性气候。其独特的地理及气候环境孕育了特殊的微生物群体。虽然前人分离了许多高产纤维素酶的菌株, 但未见在青海高原分离产纤维素酶菌的报道, 分离的菌株定种为康氏木霉 (*Trichoderma koningii* Qudem) No.0143p 的真菌, 是纤维素酶的木霉属真菌。本研究表明, 对照产纤维素酶菌株 3.2774 纤维素滤纸酶活力只有青海高原互助林区分离的产纤维素酶的菌 *Trichoderma koningii* Qudem No.0143 的 76.7%; No.0143p 产酶能力、性能优于 3.2774, 并不具有毒性, 因此 *Trichoderma koningii* No.0143p 株可用于节粮代粮型饲料。本文首次报道了青海高原林区存在的纤维素降解微生物。共分离到具降解纤维素的细菌 300 余株、真菌 31 株中, 分布较多为分解纤维素细菌菌株, 其他真菌分类地位的确定有待进一步研究。目前研究典型的纤维素分解细菌有: 好氧菌纤维单胞菌属 (*Cellulomonas*)、模式株-产黄纤维单胞菌 (*Cellulomonas flavigena*), 此外, 噬纤维菌属

(*Cyto phaga*)、生孢噬纤维菌属 (*Sporocytophaga*)、多囊菌属 (*Sporangium*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 的菌都可分解纤维素; 厌氧和兼性厌氧的纤维素分解细菌有: 瘤胃球菌属、芽孢杆菌属、梭菌属、丁酸弧菌属等。典型的真菌有: 木霉属、青霉属、曲霉属、脉胞菌属、白腐菌、褐腐菌、软腐菌等。从青海高原的土样、枯枝落叶样、枯树样 200 多份, 分离过程中发现青海原始林区土样中纤维素分解微生物主要种类因地区、采样季节的不同而不同。共分离到的 300 余株细菌、31 株真菌可以确定青海高原原始林区虽然海拔 2,700 ~ 3,200 m 的高寒地带, 含有多种分解纤维素的微生物, 每克土样中含有 2.6×10^5 /g 纤维素分解菌。这些降解纤维素的微生物种群的降解作用对青藏高原的碳素循环有怎样的影响? 也是今后青藏高原专题研究的一个方向, 该方面研究对全球碳素循环的研究具有重要的理论意义, 对研究欧亚大陆微生物种群和微生物地带的分布格局及生态环境影响微生物物种的形成与演化有着重要的意义。在分离过程中发现有许多有应用前景的细菌, 如黑色的油漆样菌在滤纸生长非常迅速, 可以考虑其作为菌体蛋白饲料等。

参 考 文 献

- [1] 徐丽华, 李文均, 催晓龙, 等. 微生物学报, 2003, 30 (1): 106 ~ 108.
- [2] Stokes M R. J Dairy Sci, 1992, 75: 764 ~ 773.
- [3] King L. J Dairy Sci, 1991, 74: 4284 ~ 4296.
- [4] 郝士海. 现代细菌学培养基和生化试剂手册. 天津: 中国科学技术出版社, 1992. 347 ~ 348.
- [5] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术. 北京: 人民教育出版社, 1982. 9 ~ 11.
- [6] 张加春, 王权飞, 余尊祥. 食品与发酵工业, 2000, 26 (3): 21 ~ 22.
- [7] 赵 昕, 王 冬, 高培基编. 纤维素微生物及纤维素酶技术. 济南: 山东大学出版社, 1994.