

# 造纸废液氧化塘纤维素酶产生菌群的分析与产酶菌株的筛选

张静静 聂犇 杨江科\*

(武汉轻工大学 生物与制药工程学院 湖北 武汉 430023)

**摘要:**【目的】解析造纸废液氧化塘中产纤维素酶微生物的群体组成和结构; 筛选并获得一批纤维素酶产生菌, 丰富菌株资源, 并为纤维素酶的工业应用和环境污染的生物处理奠定基础。

【方法】基于 16S rRNA 基因序列信息, 系统考察了造纸废液氧化塘环境中产纤维素酶细菌的群体组成和结构, 并通过测定纤维素酶在不同 pH 条件下酶活变化考察所产纤维素酶的特性。

【结果】造纸废液氧化塘中产纤维素酶微生物具有丰富的多样性。在分类上分属于 Firmicutes、Actinobacteria、Alpha-proteobacteria 和 Gamma-proteobacteria 4 个门(亚门) 15 种。来自泥液混合样和黑液排污口泥样的产纤维素酶细菌群体多样性最为丰富, 由 6–7 个种的细菌组成; 而来自强碱性的黑液下层样品中微生物的多样性则较为贫乏, 主要由来自 *Bacillus* 类细菌组成。分离菌株除酸性纤维素酶产生菌外, 碱性纤维素酶和中性纤维素酶产生菌也较为丰富, 且其分布与样品来源有紧密的关系。【结论】对造纸废液氧化塘产纤维素酶微生物群体组成和结构的研究, 不仅有利于对新菌株资源的挖掘, 也可为特殊环境的微生物学研究提供参考。

**关键词:** 造纸废液, 纤维素酶, 16S rRNA 基因, 群体组成, 酶学活性

## Community composition and screening of cellulase-producing bacteria in a papermaking wastewater oxidation pond

ZHANG Jing-Jing NIE Ben YANG Jiang-Ke\*

(School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan, Hubei 430023, China)

**Abstract:** [Objective] To study the community composition of cellulase-producing bacteria in papermaking wastewater oxidation pond, and to screen cellulase-producing bacteria to enrich the microorganism resources for industrial application and biological treatment of environmental pollution. [Methods] The community compositions and the phylogeny of cellulolytic bacteria in the papermaking wastewater oxidation pond were studied on the sequences of the 16S rRNA genes. Cellulase secreted by these bacteria were characterized under different pH value. [Results] The cellulolytic bacteria in the papermaking wastewater samples were diversified. They could be phylogenetically classified into Firmicutes, Actinobacteria, Alpha-proteobacteria and Gamma-proteobacteria and further divided into 15 species at a higher resolution. The communities in liquor-mud mixture and sludge outlet of black liquor have the most abundant diversity, and contained

基金项目: 国家教育部重点项目(No. 212118); 湖北省教育厅重点项目(No. D20131703); 国家 863 计划项目(No. 2013AA102800-04)

\*通讯作者: Tel: 86-27-83943875; Fax: 86-27-83943875; ✉: yang.jiangke@yahoo.com

收稿日期: 2013-12-26; 接受日期: 2014-02-11; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-02-20

six to seven species. These rich diversities maybe owing to the marginal effect and mild pH condition of the environments. Due to the stringent pH condition, the microbial diversity of the lower layer of pond was relatively poor, and *Bacillus* was the dominant group. The types of cellulase produced by the bacteria in oxidation pond not only contained acidic cellulase, but also contained abundant alkaline cellulases and neutral cellulases. **[Conclusion]** A number of excellent cellulase-producing bacteria were screened with potential applications.

**Keywords:** Papermaking wastewater, Cellulase, 16S rRNA genes, Community composition, Enzymatic characteristics

纤维素酶是指能断开纤维素  $\beta$ -1,4 葡萄糖苷键并将其水解为葡萄糖或纤维寡糖的一组酶。它是一个由起协同作用的多酶组成的复杂酶系。根据各组成酶在分解纤维素的功能不同,纤维素酶可分为三类:(1) 葡聚糖内切酶,简称 EG。这类酶作用于纤维素分子内部的非结晶区,随机水解  $\beta$ -1,4 葡萄糖苷键,生成大量带有非还原性末端的小分子纤维素;(2) 葡聚糖外切酶,这类酶作用于纤维素线状分子末端,通过水解  $\beta$ -1,4 糖苷键而切下纤维二糖分子;(3)  $\beta$ -葡萄糖苷酶,简称 BG。这类酶将葡聚糖外切酶作用后产生的纤维二糖水解成葡萄糖分子<sup>[1]</sup>。

纤维素酶是主要的工业用酶之一,广泛应用于食品、饲料、纺织以及环境污染的生物治理等众多领域<sup>[1]</sup>。通过向食品和饲料中添加纤维素酶可显著提高其营养效价。在纺织工业中,通过纤维素酶对布料的生物处理可以显著提高其质量;在造纸工业中,造纸过程产生的废水(废渣)是环境污染,特别是水污染的主要来源。长期以来人们一直在积极寻找和探索造纸废物的治理利用方法,并开展了大量的研究工作<sup>[2-3]</sup>。氧化塘法是造纸废水处理方法中应用广泛的方法之一<sup>[4-5]</sup>。它主要依靠塘内生長的微生物来处理造纸污水。对纤维素类造纸废物可通过氧化塘中纤维素分解菌及其产生的酶来降解。通过生物法治理造纸废水不仅具有无污染、成本低、操作简单、效果良好等优势,而且能够实现资源化利用。如使用纤维素酶作用于草粉和新闻纸粉末,所得10%和90%的糖液可作为发酵工业的原料来生产酒精等发酵产品<sup>[6]</sup>。

高效纤维素酶及其产生菌株是纤维素工业应用和环境污染生物处理的基础。本研究基于 16S rRNA 基因序列信息,系统考察了造纸废物处理场环境中产纤维素酶细菌的群体组成和结构,筛选出一批具有产纤维素酶活性的细菌,并对其酶学性质进行了测定。本研究不仅可积累一批优良的产纤维素酶菌株资源,而且对造纸废物处理场产纤维素酶微生物群体组成和结构的研究有利于挖掘新菌株资源,且可为特殊环境的微生物生态学等研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

样品采集地汉阳造纸厂造纸废水氧化塘(N30°27'36", E114°11'59")主要承接造纸厂原料碱处理车间(黑液)、制浆车间和造纸车间产生的废水。废水中夹杂着大量纤维素、木质素、细小纤维等固形物。对该处理场各个不同部位采集样本,每样点采 3 份。采样部位分别为外缘的泥液混合样(BM)和黑液液体样(BL),处理场内部的液渣下层样(BU)以及黑液排污口泥样(SS)和排污口水样(SL)。

### 1.2 培养基

筛选培养基 A (g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, CMC-Na 5, NaCl 2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1, 琼脂粉 15, 蒸馏水 1 L, 用 HCl 或 NaOH 调节不同 pH 值。

筛选培养基 B (g/L):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.4,  $\text{MgSO}_4$  0.3, NaCl 0.3,  $\text{FeSO}_4$  0.005,  $\text{MnSO}_4$  0.001 6, CMC-Na 10.0, 琼脂粉 15.0, 蒸馏水 1 L,

用 HCl 或 NaOH 调节不同 pH 值。

LB 培养基(g/L)<sup>[7]</sup>: 蛋白胨 10, 酵母粉 5, 琼脂粉 15, NaCl 10, 蒸馏水 1 L。

发酵培养基(g/L): CMC-Na 5, 蛋白胨 5, 酵母膏 1, NaCl 1, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5, 蒸馏水 1 L, 用 NaOH 调节 pH 至 7.0。

以上培养基均在  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 25 min 后使用。

### 1.3 纤维素酶产酶菌株的初筛

称取 5 g 样品加入装有 45 mL 无菌水的三角瓶中, 37 °C 下充分振荡 15 min 后制成菌悬液, 分别吸取菌悬液 1 mL 进行 10 倍梯度法稀释。分别从  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  三个稀释梯度中吸取 100  $\mu$ L 菌悬液, 均匀涂布于筛选培养基 A 平板上, 在室温条件下倒置培养 2–3 d, 长出单菌落后, 根据菌落颜色和形态的不同挑取单菌落点种到筛选培养基 B 平板上。室温培养 48 h 后, 用 1 g/L 的刚果红染色液染色 1 h, 弃掉染液, 加入适量的 1 mol/L NaCl 溶液并漂洗 1 h。依照菌落的周围是否出现清晰的透明圈, 加以判断并筛选纤维素酶产生菌<sup>[8]</sup>。

### 1.4 产纤维素酶菌株的发酵

将初筛得到的菌株分别接种到装有 5 mL LB 培养基的小摇瓶中, 37 °C、180 r/min 振荡培养 12 h, 制成种子液, 按 10% 的比例转接到 50 mL (250 mL 三角瓶) 液体发酵培养基中进行摇瓶发酵, 于 37 °C、180 r/min 培养 48 h。取培养液 5 000 r/min 离心 4 min, 所得上清液即为粗酶液, 用于测定酶活力。

### 1.5 纤维素酶活性测定

葡萄糖标准曲线的绘制。准确称取 1 g 无水葡萄糖, 定容到 1 000 mL。精确移取葡萄糖标准液 0、0.2、0.4、0.6、0.8 mL 于具塞刻度试管中, 加蒸馏水至 2.0 mL, 在各试管中分别加入 3.0 mL 的 DNS 试剂, 在沸水浴中煮沸 10 min 后流水冷却, 加入蒸馏水定容到 25 mL 后摇匀, 放置 10 min 后在 540 nm 波长处测定吸光度<sup>[9]</sup>。空白组以 1.0 mL 蒸馏水代替葡萄糖标准液。标准曲线以葡萄糖含量为

横坐标, 吸光度为纵坐标。其拟合线性回归方程  $y=0.681\ 0x-0.047\ 6$ ,  $R^2=0.998\ 8$ 。

酶活性测定。采用滤纸(抚顺市东阳工贸有限公司)酶活测定方法<sup>[9]</sup>测定纤维素酶活性, 本实验分别测定了 pH 在 6.0、7.0 和 8.0 情况下各菌株的滤纸酶活, 其中 pH 6.0 和 7.0 的缓冲液为磷酸缓冲液, pH 8.0 的缓冲液为 Tris-HCl 缓冲液。具体操作: 以其中一个灭活 10 min 的粗酶液为空白对照, 用作测量吸光度时的参照。取 1 mL 粗酶液加入 1 mL 缓冲液中, 并加入 50 mg (1 cm×6 cm) 滤纸作为反应底物, 空白组不加滤纸, 在 45 °C 水浴锅中反应 30 min 后沸水中煮沸 10 min 终止反应, 加入 3 mL DNS, 空白组中加入 50 mg 滤纸, 在沸水中反应 10 min, 流水冷却后用蒸馏水定容至 25 mL, 在 540 nm 波长处测定吸光度, 即以 DNS (3,5-二硝基水杨酸)法<sup>[10]</sup>测定反应释放出的还原糖, 并对应葡萄糖标准曲线计算酶活。1 个酶活力单位(U/mL)定义为每分钟水解滤纸释放出相当于 1.0  $\mu$ g 葡萄糖含量时所需的酶量, 用  $U$  表示。纤维素酶活测定的标准曲线公式为:  $y=0.681\ 0x-0.047\ 6$ 。其中  $y$  表示吸光度值,  $x$  表示葡萄糖浓度, 计算葡萄糖浓度(g/L)。根据  $U$  的定义, 获得发酵液酶活力。

酶活力( $U$ )计算公式:

$$U = \frac{c \times N}{T \times V}$$

其中,  $c$ : OD 值对用的葡萄糖浓度(g/L);  $V$ : 加入的酶液的体积(mL);  $N$ : 酶液的稀释倍数;  $T$ : 反应时间(min)。

分离菌株所产纤维素酶在 pH 6.0、7.0 和 8.0 条件下测定其酶活, 并通过均一化处理后, 在 MeV 8.0 软件的辅助下生成生物反应各菌株间酶活变化情况的 Heatmap 图谱。

### 1.6 产纤维素酶菌株的分子生物学鉴定

细菌基因组 DNA 的提取。挑取于 4 °C 保存备用的菌株进行活化, 待长出单菌落后接种到 3 mL LB 液体培养基中培养 12 h, 1 000 r/min 离心 2 min

弃上清,用溶菌酶处理菌体后 SDS 裂解,利用蛋白质等杂质不溶于高浓度盐而 DNA 溶于高浓度盐的原理沉淀蛋白等杂质,再用苯酚、氯仿进行抽提,抽提出的 DNA 用 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测。

16S rRNA 基因的扩增及序列分析。提取出的 DNA 以 27F 5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3', 1492R : 5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'作为上下游引物进行聚合酶链式反应 PCR。PCR 反应体系(50  $\mu$ L):模板 DNA 1.5  $\mu$ L,正、反向引物各 1.5  $\mu$ L (10  $\mu$ mol/L),10 $\times$ Buffer 5  $\mu$ L, *rTaq* DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L,蒸馏水 36  $\mu$ L。PCR 反应条件:94  $^{\circ}$ C 5 min;94  $^{\circ}$ C 50 s,54  $^{\circ}$ C 50 s,72  $^{\circ}$ C 90 s,共 30 次循环;72  $^{\circ}$ C 6 min<sup>[11]</sup>。扩增产物用 0.8%琼脂糖凝胶进行电泳检测,检测合格后送往武汉市华大基因公司进行测序。

系统发育分析。所筛选的产纤维素酶菌株的 16S rRNA 基因序列 GenBank 登录号为:KF758802、KF758803、KF758804、KF758805、KF758806、KF758807、KF758808、KF758809、KF758810、KF758811、KF758812、KF758813、KF758814、KF758815、KF758816、KF758817、KF758818、KF758819、KF758820、KF758821、KF758822、KF758823、KF758824、KF758825、KF758826、KF758827、KF758828、KF758829、KF758830、KF758831、KF758832、KF758833、KF758834、KF758835、KF758836、KF758837、KF758838。在 MEGA 4 软件的辅助下,分离菌株及参比菌株的 16S rRNA 基因序列先通过 ClusterW 程序进行聚类分析,产生各序列间的相似性矩阵,

再采用 Neighbour-Joining 法构建系统发育树,并在发育树中标出 Bootstrap 值( $n=1\ 000$ )>50%的分支。

## 2 结果与分析

### 2.1 造纸废物各样品的 pH 值状况

本研究测定了所采集各样品的 pH (表 1)。由表 1 可见,排污口泥样(SS)为中性,排污口水样(SL)为酸性,泥液混合样(BM)、黑液液体样(BL)和液渣下层样(BU)均为碱性环境,其中黑液下层样(BU) pH 达 8.5。

### 2.2 产纤维素酶菌株筛选和酶学性质分析

样品经梯度稀释、涂布后,在筛选培养基 A 上长出系列菌株。通过菌落形态表型和显微形态观察,各挑取不同类型菌落 2-3 株代表菌株,共约 100 余株,再将其转接到刚果红纤维素酶活鉴定培养基 B 上(图 1)。通过观察有无透明圈来判断其有无酶活,经观察,其中 35 株菌株在刚果红培养基上产生较明显的透明圈。初步判断这 35 株菌株为产纤维素酶的菌株。

本研究通过液体摇瓶发酵,并测定其在不同 pH 条件下纤维素酶活特性等方式来确定分离菌株所含纤维素酶的特性(表 2)。由表 2 可知,所分离的 35 株菌株均可产生纤维素酶,且所产纤维素酶的酶活在不同 pH 下表现出较大的差异。多数菌株在 pH 6.0 条件下的酶活均明显高于 pH 7.0 和 pH 8.0 (表 2,图 2)。如菌株 SS-1-11 在 pH 6.0 下的酶活为 1 248.90 U/mL,远高于中性和碱性条件下的酶活。表明此类菌株为酸性纤维素酶产生菌。另一方面,部分菌株如 BLS-1-2 和 SS-2-4 等在 pH 8.0 的酶活显著高于 pH 6.0 和 pH 7.0 下的

表 1 各样品的酸碱度  
Table 1 The pH value of the samples

样品 Sample	泥液混合样 Black liquor and sludge mixture (BM)	黑液液体样 Black liquid (BL)	液渣下层样 Lower layer of black sludge (BU)	排污口泥样 Sewage sludge (SS)	排污口水样 Sewage liquor (SL)
pH	8.2	7.6	8.5	7.0	6.6

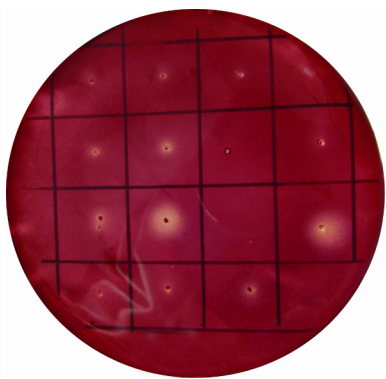


图 1 分离菌株在刚果红纤维素酶活鉴定平板上的表型  
Figure 1 The phenotypes of isolated strains on Congo red plate

酶活。表明此类菌株即为产碱性纤维素酶菌株。此外，菌株如 BL-1-6 等没有明显的 pH 偏好性，在 pH 6.0、7.0 和 8.0 条件下均能表现出较好的酶活，部分纤维素酶在 pH 7.0 条件下的酶活略高于其它 pH 条件，此类纤维素酶属于中性纤维素酶 (图 2)。

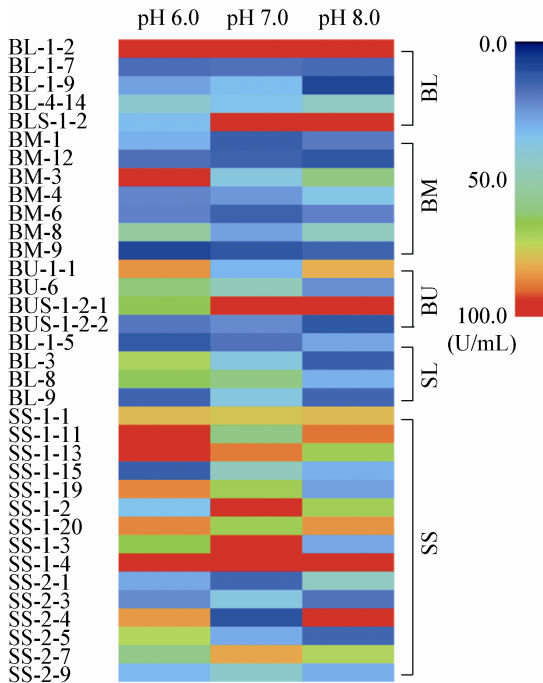


图 2 不同来源的菌株产纤维素酶活差异及在不同 pH 条件下的变化趋势  
Figure 2 The heatmap showing the cellulase activity of every strain under different pH conditions

另一方面 ,纤维素酶的性质与该菌株的环境条件相关联。排污口泥样的产纤维素酶菌株多样性最为丰富 ,所分离的各类菌落形态的菌株占总菌数的 42.8%；泥液混合样的产纤维素酶菌株也较为丰富，占总菌数的 15.6%。而液渣下层样和排污口水样的菌株则较为单一；不同的环境中，各类型的纤维素酶产生菌株的比例存在着明显的差异。碱性环境样品(如黑液下层样 pH 8.5)中产碱性纤维素酶的菌株比例明显高于排污口泥样(表 2，图 2)。

2.3 产纤维素酶菌株的鉴定

本研究基于 16S rRNA 基因序列对分离菌株的系统发育状况进行了系统的分析(图 3)。由图 3 可知 ,造纸废物处理场样品的产纤维素酶的种类非常丰富。分离菌株在分类地位上分属于 Firmicutes、Actinobacteria、Alpha-proteobacteria 和 Gamma-proteobacteria 四个门(亚门)。来自 *Bacillus* 属 (Firmicutes 门)的菌株在属分类水平占主导地位，占总菌数的 42.5%。表明 *Bacillus* 是样品中纤维素酶产生菌的主要群体。例如，表 2 中所述的典型产酸性纤维素酶菌株 SS-1-11，产碱性纤维素酶菌株 BLS-1-2 则分属于 *B. pumilus* 和 *B. subtilis*。来自 Gamma-proteobacteria 的菌株也占较大的比重，共包含 6 个属，表现出丰富的多样性。而 Actinobacteria 和 Alpha-proteobacteria 则仅由 *Micrococcus* 和 *Janibacter* 等少数群体组成。中性纤维素酶产生菌 BL-1-6 即属于 *J. luteus*。

样品中微生物的群体组成和多样性存在明显的区别(图 4)。来自黑液液体样(BL)和排污口泥样(SS)的微生物群体组成最为多样。如 BL 样品中微生物群体分属 3 个门(亚门) 7 个种；来自 SS 样品微生物分属于 *B. pumilus*、*B. subtilis*、*B. cererus* 和 *B. koreensis* 等 5 个种。而来自 BM、BU 和 SL 等样品微生物多样性则较为贫乏 ,仅由 3–4 个种组成，且占整个产纤维素酶微生物群体比例均低于 20% (图 4)。

表 2 各菌株所产纤维素酶在不同 pH 条件下的酶活  
Table 2 The enzyme activity of cellulase produced by the isolated bacteria under different pH conditions

Sources	Strains	Enzyme activity (U/mL)		
		pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0
黑液液体样 Black liquid (BL)	BL-1-6	555.07	535.49	544.05
	BL-1-7	96.18	99.85	93.73
	BL-1-9	136.56	159.81	61.92
	BL-4-14	191.63	165.93	203.87
泥液混合样 Black liquor and sludge mixture (BM)	BLS-1-2	158.59	435.14	671.32
	BM-1	148.80	82.72	105.97
	BM-12	98.63	86.39	74.15
	BM-3	509.79	176.95	266.28
	BM-4	113.31	127.99	169.60
	BM-6	112.09	86.39	110.87
	BM-8	240.58	134.12	207.54
	BM-9	61.92	74.16	87.62
	BU-1-1	359.28	153.70	344.59
液渣下层样 Lower layer of black sludge (BU)	BU-6	269.95	213.67	121.88
	BUS-1-2-1	282.18	403.33	405.78
	BUS-1-2-2	104.75	118.21	75.38
排污口水样 Sewage liquor (SL)	SL-1-5	76.60	101.08	137.79
	SL-3	304.21	176.95	82.72
	SL-8	280.96	263.83	147.58
	SL-9	87.62	176.95	88.84
排污口泥样 Sewage sludge (SS)	SS-1-1	337.25	328.68	338.47
	SS-1-11	1 248.90	263.83	376.41
	SS-1-13	402.10	373.96	295.64
	SS-1-15	82.72	208.76	146.35
	SS-1-19	367.84	296.87	134.12
	SS-1-2	165.93	530.59	298.09
	SS-1-20	367.84	295.64	359.28
	SS-1-3	287.078	634.61	139.01
	SS-1-4	485.32	544.05	492.66
	SS-2-1	141.46	90.06	203.87
	SS-2-3	118.21	176.95	102.30
	SS-2-4	356.83	71.71	424.13
	SS-2-5	311.55	143.91	90.06
	SS-2-7	258.93	350.71	307.88
	SS-2-9	156.14	195.30	145.13

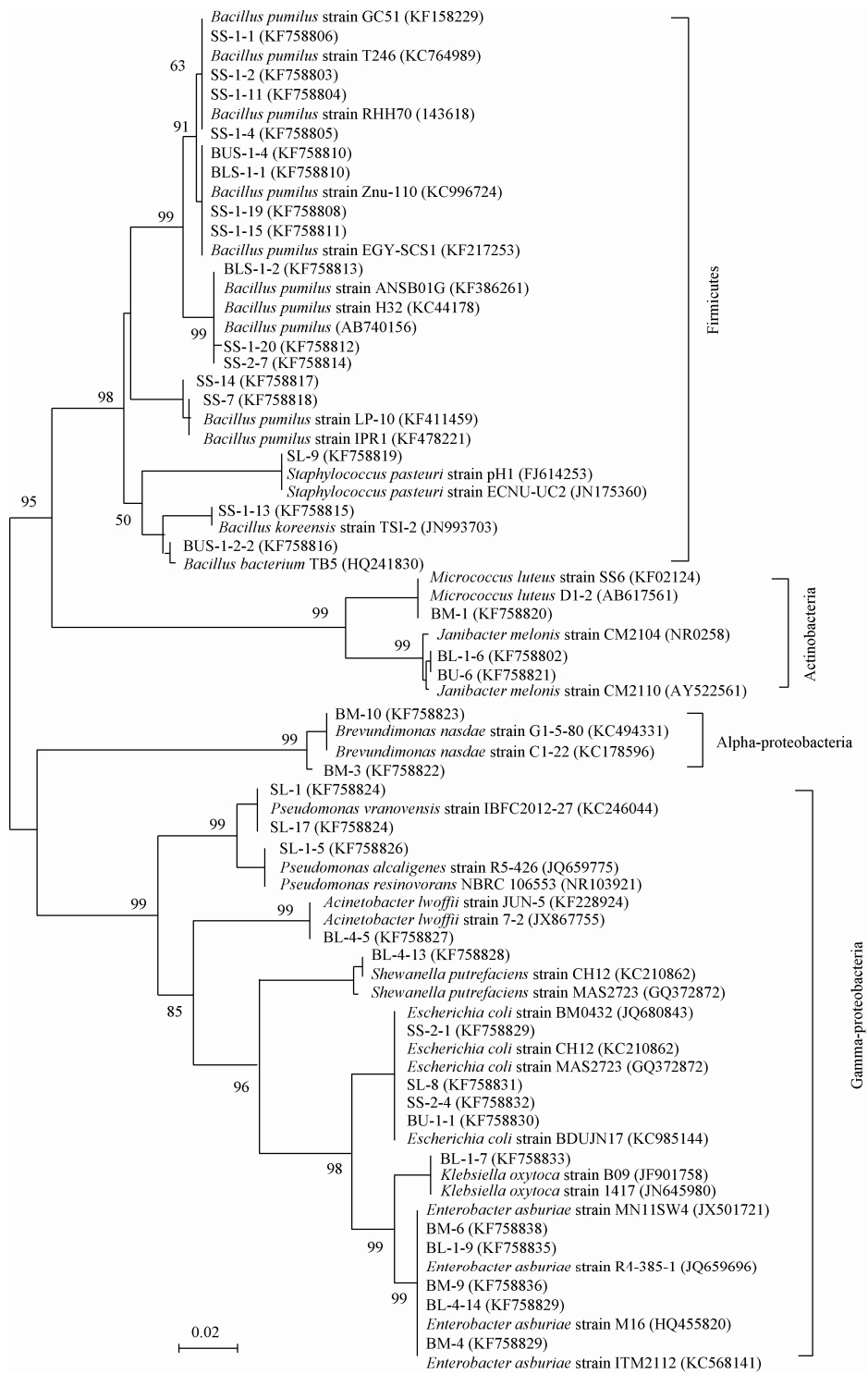


图 3 基于 16S rRNA 基因序列产纤维素酶菌株的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic relationship of the isolated cellulase-producing bacteria based on 16S rRNA gene

Note: Bootstrap values ( $n=1\ 000$ ) greater than 50% are indicated at nodes. Kimura-2 distances were derived from a distance matrix to construct a optimal unrooted tree using the Neighbour-Joining method. Numbers in parentheses are the accession numbers of the sequences used.

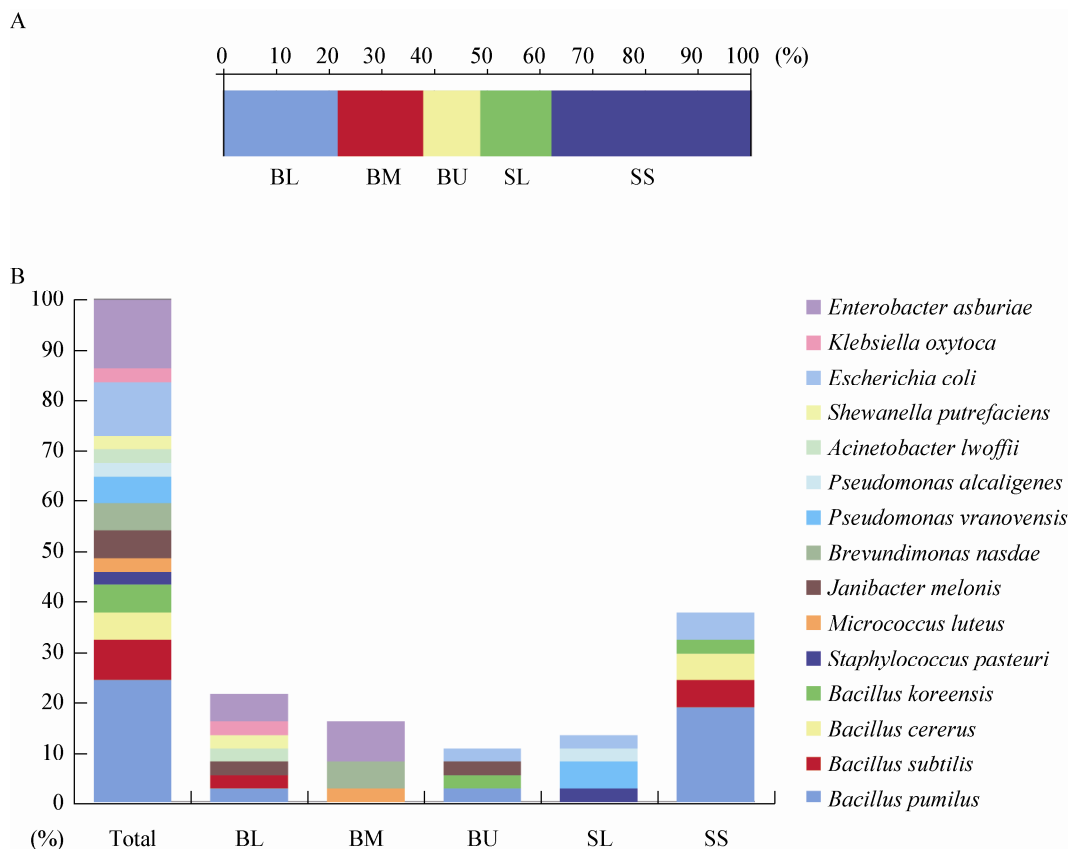


图4 黑液样品中产纤维素酶菌株的群体组成及分布

Figure 4 Community composition and distribution of bacteria in papermaking black liquor samples

Note: A: Ratio of bacteria from every sample to the total isolates; B: Composition of bacteria in every sample and whole isolates.

### 3 小结与讨论

在对环境微生物群体组成和结构进行研究的过程中,直接以环境微生物宏基因组作为研究对象而发展起来的焦磷酸测序法、DNA 微阵列和荧光原位杂交等技术是目前流行的方法<sup>[12-13]</sup>。然而,由于微生物纤维素酶基因的复杂性和异质性,难有合适的通用引物扩增环境样品中所有微生物的纤维素酶基因。因此,当前对产纤维素酶微生物群体结构的研究依然建立在纯培养的基础上<sup>[14-15]</sup>。在本研究首先对样品总的微生物群体进行了分离,再通过CMC-Na 平板对其中纤维素酶产生菌进行了初步鉴定。随后的发酵试验进一步复证了,CMC-Na 平板筛选法的快捷性和准确性,可用于样品中产纤维素酶菌株的分离和群体结构分析(图1,表2)。

高效的纤维素酶及其产生菌株是工业应用和纤维类造纸废弃物环境污染资源化的基础。当前,广泛应用的纤维素酶产生菌通常为木霉(*Trichoderma*)和曲霉(*Aspergillus*)等丝状真菌。这类真菌所产纤维素酶通常为酸性酶,适宜 pH 约为 3.0-5.0,在碱性环境下活性很低或者没有活性、pH 适应范围较窄,限制了纤维素酶在纺织和造纸废物污染治理等碱性环境中的应用。另一方面,以往从造纸废物中分离的产纤维素酶细菌以 *Bacillus* 类居多<sup>[16-18]</sup>。本研究基于 16S rRNA 基因序列对黑液样品中产纤维素酶细菌群体结构的研究发现,样品中产纤维素酶细菌群体具有丰富的多样性。共分为 Firmicutes、Actinobacteria、Alpha-proteobacteria 和 Gamma-proteobacteria 4 个门(亚门) 15 种。除 *Bacillus* 属细菌外, *Enterobacter* (占 25%)、

*Micrococcus* (占 8%)和 *Pseudomonas* (占 8%)等群体也占较大比重。这些细菌所产纤维素酶大多为碱性和中性纤维素酶,它们可广泛用于纺织、造纸废物污染治理等碱性环境中,有效地扩大了纤维素酶的利用范围。因此,本研究对造纸废物处理场样品中产纤维素酶微生物群体组成和结构的研究,不仅有利于对新菌株资源的挖掘,且可为特殊环境的微生物学研究提供参考。

## 参 考 文 献

- [1] Bhat MK. Cellulases and related enzymes in biotechnology[J]. *Biotechnology Advances*, 2000, 18(5): 355-383.
- [2] 杜仰民. 造纸工业废水治理进展与评述[J]. *工业水处理*, 1997, 17(3): 1-5.
- [3] Blanco A, Negro C, Monte C, et al. The challenges of sustainable papermaking[J]. *Environment Science and Technology*, 2004, 38(21): 414A-420A.
- [4] 马效民. 氧化塘处理造纸污水[J]. *林业科技情报*, 2003, 35(4): 42-43.
- [5] Madera CA, Peña MR, Mara DD. Microbiological quality of a waste stabilization pond effluent used for restricted irrigation in Valle Del Cauca, Colombia[J]. *Water Science and Technology*, 2002, 45(1): 139-143.
- [6] Hasunuma T, Okazaki F, Okai N, et al. A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 135: 513-522.
- [7] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 21-27.
- [8] Cantwell BA, McConnell DJ. *Molecular cloning and expression of a Bacillus subtilis  $\beta$ -glucanase gene in Escherichia coli*[J]. *Gene*, 1983, 23(2): 211-219.
- [9] 刘韞滔, 禡淑霞, 龙传南, 等. 纤维素降解菌 L-06的筛选、鉴定及其产酶条件的分析[J]. *生物工程学报*, 2008, 24(6): 1112-1116.
- [10] Ghose TK. Measurement of cellulase activities[J]. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, 1987, 59(2): 257-268.
- [11] Kuwahara T, Norimatsu I, Nakayama H, et al. Genetic variation in 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions and the possible use of this genetic variation for molecular diagnosis of *Bacteroides* species[J]. *Microniology Immunology*, 2001, 45(3): 191-199.
- [12] DeLong EF. Microbial population genomics and ecology: the road ahead[J]. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(9): 875-878.
- [13] Torsvik V, Øvreås L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2002, 5(3): 240-245.
- [14] Ulrich A, Wirth S. Phylogenetic diversity and population densities of culturable cellulolytic soil bacteria across an agricultural encatchment[J]. *Microbiology Ecology*, 1999, 37(4): 238-247.
- [15] Yang JK, Zhang JJ, Yu HY, et al. Community composition and cellulase activity of cellulolytic bacteria from forest soils planted with broad-leaved deciduous and evergreen trees[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(3): 1449-1458.
- [16] 曾青兰. 纤维素降解细菌的分离鉴定和筛选[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(24): 10309-10310.
- [17] 陈红漫, 赵璐, 杨佳影. 一株产胞外中性  $\beta$ -葡萄糖苷酶菌株的鉴定及酶学特性研究[J]. *食品科学*, 2009, 30(15): 160-163.
- [18] Xiao W, Wang ZG, Wang YX, et al. Comparative molecular analysis of the prokaryotic diversity of two soils in southwest China[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2013, 53(11): 942-952.