

一株瘤胃纤维素降解菌的分离鉴定及其 纤维素降解特性

刘占英^{1,2} 侯先志^{1*} 刘玉承¹ 刘小刚¹ 胡建华² 杨帆¹ 赵子夫¹

(1. 内蒙古农业大学动物科学与医学学院 内蒙古 呼和浩特 010018)

(2. 内蒙古工业大学化工学院 内蒙古 呼和浩特 010051)

摘要: 从蒙古绵羊瘤胃内容物中分离到一株纤维素降解细菌 WH-1, 通过形态、生理生化特征、G+C mol% 含量和 16S rRNA 序列分析对分离菌株进行鉴定, 鉴定为溶纤维丁酸弧菌属 (*Butyrivibrio fibrisolvens*) 的溶纤维丁酸弧菌 (*Butyrivibrio fibrisolvens*)。同时, 用 Mega 4.1 软件构建的系统发育树显示分离菌株 WH-1 与多株溶纤维丁酸弧菌 (*Butyrivibrio fibrisolvens*) 的亲缘关系最近。对该菌株纤维素降解特性的初步研究表明: 当温度为 37°C、pH 值为 7.0、接种量为 25%、纤维二糖添加质量占总碳源质量的 20% 时, WH-1 的 72 h 滤纸降解率达到 16.81%±2.99%。

关键词: 瘤胃纤维素降解细菌, 溶纤维丁酸弧菌

Isolation, Identification and Characterization of a Cellulose-degrading Bacterial Strain from the Rumen of Sheep

LIU Zhan-Ying^{1,2} HOU Xian-Zhi^{1*} LIU Yu-Cheng¹ LIU Xiao-Gang¹
HU Jian-Hua² YANG Fan¹ ZHAO Zi-Fu¹

(1. College of Animal Science and Animal Medicine, Inner Mongolia University of Agriculture,
Hohhot, Inner Mongolia 010018, China)

(2. College of Chemical Engineering, Inner Mongolia University of Technology, Hohhot, Inner Mongolia 010051, China)

Abstract: A bacterial strain named as WH-1 that can degrade cellulose was isolated from the rumen of the Mongolia sheep. The isolate was identified as *Butyrivibrio fibrisolvens* based on phenotypic and morphologic properties, the G+C mol% content of DNA and the 16S rRNA gene sequence analyses. In addition, the phylogenetic analysis of the 16S rRNA sequence also indicated that the isolate grouped closely with other members of *Butyrivibrio fibrisolvens*. The primary factors affecting the degradative ratio of cellulose were examined. The highest degradative ratio of filter paper reached 16.81%±2.99% under the conditions of 37°C, pH 7.0, inoculum size being 25%, and the percentage of cellobiose in total carbon sources being 20% within 72 hours of fermentation.

Keywords: Cellulose-degrading rumen bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*

纤维素是地球上最丰富、数量最大的可再生有机资源^[1],占植物干重的1/3到1/2^[2],在碳循环中扮演着关键性角色^[3]。然而,由于纤维素不溶于水和有机溶剂的难降解特性,使如此庞大的可再生资源没有得到很好地利用。目前,在我国,纤维素类资源大部分被烧掉,既破坏生态平衡,又污染环境,且能量利用率低(10%左右)^[4],还有一些纤维类资源由于未及时处理而变成固体垃圾,造成严重的环境污染。所以,如果用适当的方法将这些可再生的纤维素降解为可利用的糖液,再进一步转化为乙醇^[5]、单细胞蛋白^[6,7]以及有机酸^[8]等物质,对解决当今所面临的食物短缺、能源危机和环境污染问题具有重大的现实意义^[9,10]。

过去的研究中,有人以酸处理^[11]、碱处理^[12]以及蒸汽加热处理^[13]等方法来处理纤维素,但这些方法由于存在降解产物回收率不高和产生的废弃物存在二次污染等缺陷,使其应用大大地受到了限制。利用微生物产生的纤维素酶降解纤维素,具有条件温和、产物产率高和无二次污染等特点,成为目前较有效且更接近自然的一种纤维素处理方法^[2,14]。

在以往的报道中,研究较多的纤维素降解菌是好氧真菌^[15],对厌氧和兼性厌氧纤维素降解菌研究较少,而二者在乙醇生产、固体类污染物处理和饲料发酵等方面的应用相对于好氧菌更具优势,所以近年来有关兼性厌氧和厌氧纤维素降解菌的研究逐渐增多^[16-18]。

存在于反刍动物瘤胃中的纤维素降解菌虽然具有较高的纤维素降解活力,但因其对培养条件要求苛刻而研究的较少。本研究从蒙古绵羊的瘤胃内容物中分离到一株厌氧纤维素降解细菌,对其进行了鉴定和系统发育分析。并初步研究了该菌株的纤维素降解特性。

1 材料和方法

1.1 菌种分离

样品和分离培养基:样品取自绵羊瘤胃内容物,用充有CO₂的保温瓶采取瘤胃液100 mL,迅速带回实验室,匀浆10 s,一层纱布过滤去掉残渣,滤液作为菌种来源备用。在以羧甲基纤维素为唯一碳源的固体滚管培养基上进行初筛,以滤纸为唯一碳源的液体培养基中进行复筛。

分离培养基、富集培养基和复筛培养基以及菌

种初筛和复筛方法见文献[19]。

1.2 菌种鉴定

1.2.1 形态观察:菌种筛选过程中用革兰氏染色观察菌体形态,菌种鉴定时用JEM-2010高分辨透射电子显微镜观察菌体形态。

1.2.2 生理生化特征的鉴定:参照《常见细菌系统鉴定手册》^[20]和《伯杰细菌系统鉴定手册》(第九版)^[21]。

1.2.3 基因组G+C mol%的测定:用带控温装置的UV-1700型紫外可见分光光度计(Shimadzu)测定熔解曲线,通过熔解温度 T_m 值计算G+C摩尔百分含量。

1.2.4 16S rRNA序列分析:1)基因组DNA的提取:见文献[22]。

2)16S rRNA序列的PCR扩增及测序:以细菌16S rRNA通用引物^[23]对菌株的基因组DNA进行PCR扩增,扩增产物克隆后进行序列测定,测序委托宝生物工程(大连)有限公司完成。

1.2.5 系统发育分析:将测得的16S rRNA序列用NCBI的Blast程序进行序列同源性比对,并用ClustalW 1.8软件和MEGA 4.1软件构建基于16S rRNA序列的系统发育树。

1.3 纤维素降解率和纤维素酶活力的测定

纤维素降解率测定以滤纸为测定对象,测定滤纸降解率,纤维素酶活力测定根据IUPAC的规定^[24],通过滤纸酶活力进行测定,二者具体测定方法见文献[19]。

酶活力单位规定为每分钟由每毫升发酵液催化滤纸产生葡萄糖的微摩尔数。

1.4 温度、pH值、接种量和纤维二糖添加比例对滤纸降解率的影响

1.4.1 不同培养温度对纤维素降解率的影响:测定当培养温度分别为20℃、30℃、37℃、39℃、45℃和50℃时,WH-1的72 h滤纸降解率。

1.4.2 培养基不同初始pH值对纤维素降解率的影响:测定当培养基的初始pH值分别为5、5.5、6、6.5、7、7.5和8时,WH-1的72 h滤纸降解率。

1.4.3 接种量对纤维素降解率的影响:测定当接种量分别为10%、15%、20%、25%和30%时,WH-1的72 h滤纸降解率。

1.4.4 纤维二糖添加比例对纤维素降解率的影响:测定当纤维二糖添加质量分别占总碳源(纤维素加

纤维二糖质量之和)的 0%、10%、20%、30%、40% 和 50%时, WH-1 的 72 h 滤纸降解率。

1.5 数据统计分析

使用 SAS 8.02 软件进行数据处理, 利用其中的 ANOVA 程序进行方差分析, 多重比较用 Duncan 法。

2 结果与分析

2.1 菌种筛选

通过初筛和复筛, 从蒙古绵羊瘤胃内容物中分离到多株纤维素降解细菌, 其中 50%为弧菌。从中选出初筛时透明圈较大, 复筛时滤纸降解程度较大, 经多次传代稳定性较高的一株编号为 WH-1 的细菌做进一步研究。

2.2 菌种鉴定

2.2.1 形态特征: 菌体形态特征见图 1。菌株 WH-1 革兰氏染色阴性, 细胞呈弯曲杆状, (0.4 μm~0.6 μm)×(2 μm~5 μm), 有钝的锥形末端, 以单个的、成双的或成链的形式存在。在羧甲基纤维素固体培养基上培养时, 形成圆形、乳白色、半透明的粘稠菌落。

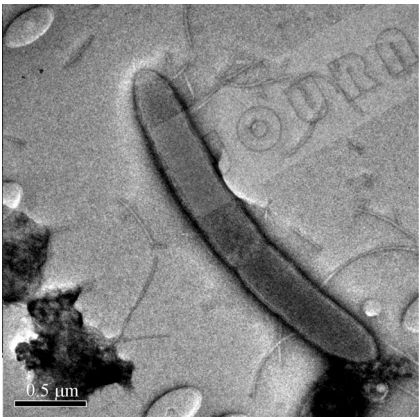


图 1 菌株 WH-1 指数生长期的透射电镜照片(×6000)
Fig. 1 Transmission electron micrograph of WH-1 in the exponential growth phase(×6000)

2.2.2 生理生化特征: WH-1 的生理生化特征见表 1。

2.2.3 基因组 G+C mol%的测定: 由熔解曲线测出熔解温度 T_m 值为 87.45, 计算得 G+C mol%为 40.7。

2.2.4 16S rRNA 序列测定: 由 PCR 扩增产物电泳图(图 2)可见, 扩增得到目的片段长约 1.5 kb 左右, 与 16S rRNA 序列长度一致。将扩增的 16S rRNA 序列克隆后测序得到 1417 bp 长度的序列, 该序列在

表 1 菌株 WH-1 的生理生化特征 Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain WH-1	
生理生化特征检测 Tests of physiological and biochemical characteristics	结果 Results
Acids from	
Glucose	+
Mannitol	—
Lactose	—
L-arabinose	+
Raffinose	—
Sorbitol	—
Salicin	+
Maltose	—
Melibiose	—
Fructose	+
Glycerol	—
Sodium lactate	—
Galactose	+
D-xylose	+
Cellobiose	+
Cellulose	+
Catalase	—
Nitrate deoxidize	+
H ₂ S synthesis	—
Motility	+
Fermentation style	Anaerobic

Note: +: Positive reaction; —: Negative reaction.

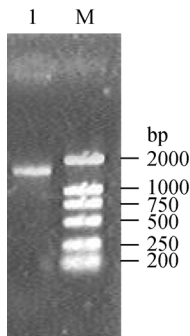


图 2 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳
Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments
M: DNA marker, DL2000; 1: PCR-amplified 16S rRNA gene fragments of WH-1.

GenBank 中的登录号为 EU684229。

2.2.5 基于 16S rRNA 的系统发育树的构建: 将得到的 16S rRNA 序列通过 Blast 程序与核酸序列库中

的序列进行局部同源性比较(Blastn), 结果表明 WH-1 与多株 *Butyrivibrio fibrisolvens* 的 16S rRNA 序列同源性较高。对获得的同源序列进行序列比对, 同时再从中调取溶纤维丁酸弧菌属不同种的 16S rRNA 序列和溶纤维丁酸弧菌的模式种, 将所有 16S rRNA 序列用于构建系统发育树。16S rRNA 序列用

ClustalW 1.8 软件包排序, 选择大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 模式菌株为外群, 用 MEGA 4.1 软件包中的 Kimura2-Parameter Distance 模型计算进化距离, 用 Neighbor-Joining 法构建了无根系统发育树 (图 3), 1000 次随机抽样计算自举支持率(Bootstrap), 以评估系统发生树的置信度。

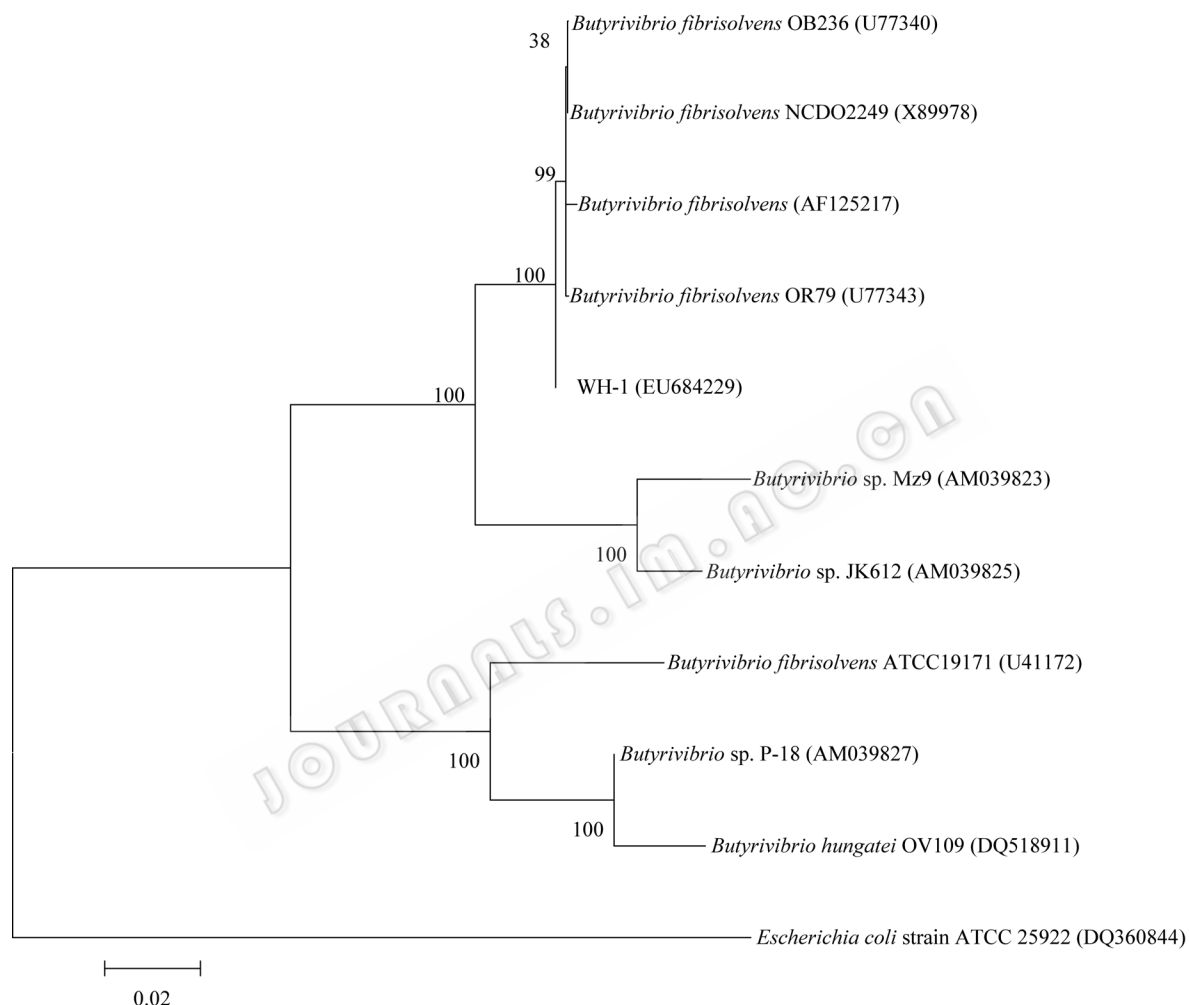


图 3 以 16S rRNA 同源性为基础的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequence data

Note: The numbers at each branch points indicate the percentage supported by bootstrap; Numbers in parentheses are the 16S rRNA sequences accession number in GenBank; Bar, 2% sequence divergence.

由图 3 的系统发育树可见, WH-1 与多株溶纤维丁酸弧菌(U77340, U77343, X89978, AF125217)处于一个聚类, 且自举支持率很高。一般认为, 若两菌株的 16S rRNA 序列同源性大于 97%, 即可认为二者属于同一种^[25,26]。从系统发育树和序列同源性角度分析, 菌株 WH-1 是溶纤维丁酸弧菌的一个菌株, 再结合形态、生理生化和 G+C mol%鉴定结果将分

离菌株 WH-1 鉴定为溶纤维丁酸弧菌属(*Butyrivibrio fibrisolvens*) 的溶纤维丁酸弧菌 (*Butyrivibrio fibrisolvens*)。

2.3 温度、pH 值、接种量和纤维二糖添加比例对纤维素降解率的影响

温度、pH 值、接种量和纤维二糖添加量对纤维素降解率的影响见表 2。

表 2 培养条件对纤维素降解率的影响
Table 2 Effect of culture conditions on the degradative ratio of cellulose

Temperature(°C)	Cellulose disappearance(%)	pH	Cellulose disappearance(%)	Inoculum size (%)	Cellulose disappearance(%)	The ratio of cellobiose in carbon sources(%)	Cellulose disappearance(%)
20	12.39±0.60 ^{bc}	5	0.00±0.00 ^a	10	10.40±1.15 ^{bc}	0	6.23±1.01 ^c
30	12.91±1.06 ^b	5.5	0.10±0.03 ^a	15	9.89±1.62 ^c	10	15.13±3.97 ^a
37	15.90±1.84 ^a	6	4.87±0.89 ^c	20	14.65±1.50 ^a	20	16.81±2.99 ^a
39	15.19±0.65 ^a	6.5	10.78±1.62 ^c	25	16.23±2.36 ^a	30	16.25±0.99 ^a
45	12.08±0.79 ^{bc}	7	16.10±1.13 ^f	30	15.21±3.66 ^a	40	16.01±1.95 ^a
50	1.59±0.34 ^e	7.5	15.72±1.23 ^f			50	12.42±3.08 ^{ab}
		8	12.23±2.64 ^e				

Note: The values of cellulose disappearance in the graph are: $\bar{x} \pm s$; a-f: $\bar{x} \pm s$ within the columns of cellulose disappearance with different superscripts are significantly different.

由表 2 可见: 当温度为 37°C、pH 值为 7.0、接种量为 25%、纤维二糖添加量为总碳源的 20% 时, WH-1 的滤纸降解率最高, 72 h 滤纸降解率达 16.81%±2.99%, 测得此时滤纸酶活力为 0.80 IU/mL±0.10 IU/mL。

3 结论

本研究采用透明圈初筛、滤纸降解情况复筛的方法, 从蒙古绵羊瘤胃内容物中分离到一株厌氧纤维素降解细菌。通过初筛选出具有内切葡聚糖酶(EC3.2.1.4)活力的菌种, 但这些菌种不一定同时具有外切葡聚糖酶(EC3.2.1.91)活力和β-葡萄糖苷酶(EC3.2.1.21)活力, 所以需要通过进一步复筛筛选出同时具有 3 种纤维素酶活力的纤维素降解菌。对影响其纤维素降解率的一些主要因素进行了初步研究, 确定其最佳纤维素降解条件, 并在最佳条件下测定了纤维素降解率和滤纸酶活力。实验结果表明所分离菌株具有较高的纤维素降解率^[27], 同时也对应较高的滤纸酶活力。

本研究所筛选菌种经鉴定为溶纤维丁酸弧菌(*Butyrivibrio fibrisolvens*)。该菌种虽然是反刍动物饲料各种日粮条件下瘤胃中存在的主要细菌, 但是过去一直被认为产纤维素酶的能力不高^[28]。直到近些年, 随着分子生物学技术的发展, 对未培养微生物监测技术的提高, 人们对溶纤维丁酸弧菌的纤维素降解能力才有了新的认识, 研究发现在溶纤维丁酸弧菌中有些菌株也具有较高的纤维素降解能力^[29,30]。

目前, 普遍认为溶纤维丁酸弧菌(*Butyrivibrio fibrisolvens*)在系统发育和遗传型上存在多样性^[28]。

事实上, 模式菌株 ATCC 19171 并不是 *Butyrivibrio*

fibrisolvens 的一个典型分离物^[31], 这也解释了在本研究所构建的系统发育树中模式种和大多数 *Butyrivibrio fibrisolvens* 不在一个分支上的原因。

致谢: 感谢内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室, 感谢国家基金委提供的资金资助。

参 考 文 献

- [1] Lynd LR, Wyman CE, Gerngross TU. Biocommodity engineering. *Biotechnol Prog*, 1999, **15**(5): 777–793.
- [2] Lynd LR, Paul JW, Vanzyl WH, *et al.* Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Biology Reviews*, 2002, **66**(3): 506–577.
- [3] Doi RH, Kosugi A. Cellulosomes: plant-cell-wall-degrading enzyme complexed. *Nat Rev Microbiol*, 2004, **2**(7): 541–551.
- [4] 陈洪章, 李佐虎. 纤维素原料微生物与生物量全利用. 化工科技市场, 2001, **5**: 17–20.
- [5] Beguin P, Aubert JP. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol Rev*, 1994, **13**(1): 25–58.
- [6] Kuzmanova S, Vandeska E, Dimitrovski A. Production of mycelial protein and cellulolytic enzymes from food wastes. *J Ind Microbiol*, 1991, **7**: 257–261.
- [7] Moo-young M, Chahal DS, Swan JE, *et al.* SCP production by *Chaetomium cellulolyticum*, a new thermotolerant cellulolytic fungus. *Biotechnol Bioeng*, 1977, **19**(4): 527–538.
- [8] Andren RT, Mandels M, Modeiros JE. Production of sugar from waste cellulose by enzymatic hydrolysis: Primary evolution of substrates. *Process Biochem*, 1976, **11**: 2–11.
- [9] 徐 赦, 龙敏南, 乌小兵, 等. 高产纤维素酶菌株的筛选及产酶条件研究. 厦门大学学报(自然科学版), 2005, **44**(1): 107–111.
- [10] Lutzen NW, Nielsen MH, Oxenboell KM, *et al.* Cellulase

- and their applications in the conversion of lignocellulases to fermentable sugars. *Phil Trans Royal Soc*, 1983, **300**: 283–291.
- [11] Gamal RF. Effect of substrate pretreatment on microbial protein production. *Egypt J Microbiol*, 1985, (Spec. Issue), 81–89.
- [12] Chahal DS. Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulose production. *J Appl Environ Microbiol*, 1985, **49**(1): 205–210.
- [13] Beltrame PL, Carniti P, Visciglio A, *et al.* Fractionation and bioconversion of steam-exploded wheat straw. *Bioresour Technol*, 1992, **39**: 165–171.
- [14] 戴上凯. 热稳定性纤维素分解细菌分离株之特性探讨与亲缘关系的研究. 国立中山大学生物科学研究所博士学位论文, 2005.
- [15] 梁如玉, 杨婉身, 冯明镜, 等. 纤维素酶水解研究. 微生物学通报, 1998, **24**(3): 145–148.
- [16] Kang MS, Im WT, Jung HM, *et al.* *Cellulomonas composti* sp. nov., a cellulolytic bacterium isolated from cattle farm compost. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007, **57**(6): 1256–1260.
- [17] Tripathi VK, Sehgal JP, Puniya AK, *et al.* Hydrolytic activities of anaerobic fungi from wild blue bull (*Boselaphus tragocamelus*). *Anaerobe*, 2007, **13**(1): 36–39.
- [18] Thareja A, Puniya AK, Goel G, *et al.* *In vitro* degradation of wheat straw by anaerobic fungi from small ruminants. *Arch Anim Nutr*, 2006, **60**(5): 412–417.
- [19] 刘占英, 侯先志, 刘玉承, 等. 一株分解纤维素的肠球菌的分离鉴定. 内蒙古大学学报, 2008, **39**(2): 166–171.
- [20] 东秀珠, 蔡妙英, 王宝玲, 等. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, p.302.
- [21] Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, *et al.* *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed. Maryland: Williams & Wilkins Baltimore, 1994, pp.574–590.
- [22] 张莉莉, 张苓花, 史剑斐, 等. 利用氯化苄提取真菌基因组 DNA 及其分子生物学分析. 大连轻工业学院学报, 2000, **19**(1): 36–39.
- [23] Weissburg WG, Barns SM, Pelletier DA, *et al.* 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriology*, 1991, **173**(2): 697–703.
- [24] Zhang YH, Lynd LR. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulose systems. *Biotechnol Bioeng*, 2004, **88**(7): 797–824.
- [25] Clayton RA, Sutton G, Hinkle PS, *et al.* Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa. *Int J Syst Bacteriol*, 1995, **45**(3): 595–599.
- [26] Kolbert CP, Persing DH. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. *Curr Microbiol*, 1999, **2**(3): 229–305.
- [27] 赵小蓉, 林启美, 孙焱鑫, 等. 纤维素分解菌对不同纤维类物质的分解作用. 微生物学杂志, 2000, **20**(3): 12–14.
- [28] Hobson PN, Stewart CS. The rumen microbial ecosystem. 2nd ed. London: Blackie academic & professional, 1997, pp.35–38.
- [29] McSweeney CS, Dulieu A, Bunch R. *Butyrivibrio* spp. and other xylanolytic microorganisms from the rumen have cinnamoyl esterase activity. *Anaerobe*, 1998, **4**(1): 57–65.
- [30] Koike S, Yoshitani S, Kobayashi Y, *et al.* Phylogenetic analysis of fiber-associated rumen bacterial community and PCR detection of uncultured bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, **229**(1): 23–30.
- [31] Forster RJ, Teather RM, Gong J. 16S rDNA analysis of *Butyrivibrio fibrisolvens*—phylogenetic position and relation to butyrate-producing anaerobic bacteria from the rumen of white-tailed deer. *Lett Appl Microbiol*, 1996, **23**(4): 218–222.