

DOI: 10.11829/j.issn.1001-0629.2012-0546

线叶嵩草内生生产纤维素酶 细菌分离及初步鉴定

李振东^{1,2}, 陈秀蓉¹, 杨成德¹, 李鹏¹

(1. 甘肃农业大学草业学院 草业生态系统教育部重点实验室 甘肃省草业工程实验室

中一美草地畜牧业可持续发展研究中心, 甘肃 兰州 730070;

2. 甘肃省社会科学院农村发展研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘要:以东祁连山高寒草地优势牧草线叶嵩草(*Kobresia capillifolia*)为对象, 分离和筛选纤维素分解内生细菌, 并对产纤维素酶的条件进行了优化。结果表明, 从线叶嵩草内分离到6个内生细菌的菌株, 其中2个菌株具有分解纤维素的能力, 并重点研究了菌株X5, 其纤维素溶解圈直径与菌落直径比达10.45, 初始产生的纤维素酶活性为0.456 U, 经优化, 产纤维素酶的最佳培养条件为: 蛋白胨和酵母粉各 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 羧甲基纤维素钠 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH值8.5, 培养温度 $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 酶活性达0.862 U; 菌体杆状, 大小为 $(0.66 \sim 0.92) \mu\text{m} \times (1.67 \sim 2.43) \mu\text{m}$, 革兰氏阳性, 产芽孢; 结合形态特征、生化特性和16S rDNA序列鉴定为球形芽孢杆菌(*Bacillus sphaericus*)。

关键词: 高寒草地; 内生细菌; 球形芽孢杆菌; 纤维素酶; 16S rDNA

中图分类号: Q946-33

文献标识码: A

文章编号: 1001-0629(2014)01-0048-08^{*} 1

Isolation and identification of cellulose-decomposing microorganisms in *Kobresia capillifolia*

LI Zhen-dong^{1,2}, CHEN Xiu-rong¹, YANG Cheng-de¹, LI Peng¹

(1. Pratacultural College, Gansu Agricultural University, Key Laboratory of Grassland Ecosystem Ministry of Education, Grass Engineering Laboratory of Gansu Province, Sino-U. S. Centers for Grazingland Ecosystem Sustainability, Lanzhou 730070, China;

2. Institute of Rural Development, Gansu Academy of Social Sciences, Lanzhou 730070, China)

Abstract: Endophytic cellulose-decomposing bacteria were isolated from *Kobresia capillifolia* which is dominant grass on alpine grassland in the Eastern Qilian Mountains. All of the isolated bacteria strains were screened and identified. At the same time, the conditions of producing cellulose were optimized by orthogonal test. Totally, there were 6 endophytic bacteria strains isolated from *K. capillifolia* and only two of them —— X5 and X6 can decompose cellulose. Only strain X5 were further analysis as its potential cellulase enzymatic activity which was 0.456 U. And the ratio of the diameter between lysis zone and colony diameter of strain X5 was up to 10.45. The optimum culture conditions for producing cellulose were $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ peptone, $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ yeast powder, $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sodium carboxymethylcellulose, pH 8.5 and $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ culture temperature. Cellulase enzymatic activity of strain X5 was 0.862 U after optimization, which was the 1.89 times of that before optimization. Strain X5 was Rod-shaped with a size of $(0.66 \sim 0.92) \mu\text{m} \times (1.67 \sim 2.43) \mu\text{m}$, Gram-positive, and can produce spores. Based on these physiological and biochemical

* 收稿日期: 2012-12-31 接受日期: 2013-02-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(31160122); 草业生态系统教育部重点实验室(甘肃农业大学)开放课题(CYzs-2011011)

第一作者: 李振东(1978-), 男, 甘肃临夏人, 副研究员, 博士, 主要从事草地微生物多样性研究。E-mail: lizhendong22@163.com

通信作者: 杨成德(1975-), 男, 甘肃武都人, 副教授, 博士, 主要从事微生物资源方面的研究。E-mail: yangcd@gsau.edu.cn

characteristics and 16S rDNA gene sequence analysis, X5 were identified as *Bacillus sphaericus*.

Key words: alpine grassland; endophytic bacteria; *Bacillus sphaericus*; cellulase; 16S rDNA

Corresponding author: YANG Cheng-de E-mail: yangcd@gsau.edu.cn

纤维素是地球上含量最高、最丰富的可再生资源,全球每年纤维素的生成量高达 2 000 亿 t^[1-2]。据不完全统计,全世界每年因废弃物焚烧造成的直接经济损失达数十亿元,利用率低(10%左右)^[3-6]。纤维素主要来源于植物,是植物细胞壁的主要成分,由植物通过光合作用的方式将太阳能转化为生物能并储存在植物体内。纤维素是由 D-葡萄糖以 β -1,4 糖苷键结合起来的链状高分子化合物,具有在常温下不溶于水、也不溶于稀酸和稀碱的刚性结构,在自然条件下分解缓慢^[7]。所以,人类虽然拥有如此丰富的可再生资源,却饱受能源危机、粮食短缺、环境污染等问题的困扰。但在一定条件下纤维素可以被水解成单糖,单糖可再通过不同途径生产各种产品^[8]。目前对纤维素类物质的有效利用主要采取生物法,即利用微生物产生的酶将纤维素、半纤维素降解转化为能源、食品、饲料和化工原料等,这已成为纤维素类资源再生利用研究的热点^[9-11]。能产生纤维素酶的微生物种类很多,目前国内外已分离选育出 53 个属的几千个菌株,其中丝状真菌是研究最多、对天然纤维素降解活性较高的类群^[12-13]。但菌种来源主要是林场、土壤、草食动物的消化道、动物粪便、堆肥、废纸浆、温泉等^[11,14-17],鲜见从优质牧草内分离纤维素分解细菌的报道。牧草内生纤维素分解细菌可以随牧草进入草食动物的消化道内,促进动物对饲草的消化吸收。研究发现,利用纤维素分解菌发酵秸秆,能够降低秸秆中纤维素含量而提高蛋白质和碳水化合物含量^[18]。我国农作物秸秆年总产量约 7 亿 t^[14],是一个巨大的纤维素库。因此,筛选出合适的牧草内生纤维素分解细菌,成功定殖到农作物中,将大大提高我国农作物秸秆转化为高效饲料的比例。优质牧草内生纤维素分解细菌的筛选研究对农作物秸秆利用和畜牧业发展具有巨大的潜在价值。

目前,我国草地面积占世界草地面积的 12.5%,居世界第二,占全国陆地总面积 41%,其中 1/3 是高寒草地,主要分部在北方高寒地区^[19]。但对高寒草地优势牧草内生纤维素分解细菌的研究尚未见报道。线叶嵩草(*Kobresia capillifolia*)是莎草科多

年生草本植物,是高寒草甸类的主要建群种和优势种,耐牧性和抗逆性强,营养丰富,具有粗蛋白质、粗脂肪、无氮浸出物高以及粗纤维低的“三高一低”的特点,是家畜喜食的优良牧草^[20]。为此,拟研究该植物中是否存在内生纤维分解细菌,及其产酶能力和分类地位。

1 材料与方法

1.1 样地概况

甘肃农业大学高寒草原试验站,位于祁连山东端甘肃省天祝县金强河地区(37°11′—37°18′ N、102°23′—102°78′ E),海拔 2 900~3 200 m。寒冷潮湿,空气稀薄,太阳辐射强。年均温 -0.1 °C,全年 >0 °C 年积温 1 380 °C·d;水热同期,年日照时间 2 600 h;无绝对无霜期,无四季之分,仅分冷热两季,植物生长季为 120~140 d,年降水量 416 mm;年蒸发量 1 592 mm;区内土层较薄,厚 40~80 cm;土壤含水量 16.32%~29.06%;土壤容重 0.682~1.120 g·cm⁻³;土壤有机质含量高,为 10%~16%。

1.2 材料

2009 年 7 月中旬在甘肃农业大学高寒草原试验站线叶嵩草地采集优势植物线叶嵩草 10~20 整株,带回实验室分离内生菌保存备用。供试标准菌株为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),购自中国普通微生物菌种保藏管理中心。

1.3 试剂和主要仪器

蛋白酶 K、溶菌酶、刚果红和 Taq DNA 聚合酶购自上海生工生物技术公司,用于 DNA 提取的试剂制备参考《精编分子生物学实验指南》^[21]。MyGene32 Thermal Block PCR 热循环仪;S2000 型分光光度计。

1.4 培养基和试剂配制

用牛肉膏蛋白胨培养基分离和保存线叶嵩草内生细菌,按参考文献配制:纤维素分解菌的筛选培养基和纤维素酶活性测定发酵培养基^[22],羧甲基纤维素钠溶液和 3,5-二硝基水杨酸溶液(DNS)^[23]。

1.5 试验方法

1.5.1 线叶嵩草内生细菌的分离方法 将线叶嵩

草用水冲洗干净后称取 2 g, 表面消毒后置无菌研钵中研碎, 吸取适当稀释植物组织研磨浸出液 0.2 mL 涂布于牛肉膏蛋白胨平板上; 将平板倒置于 28 °C 恒温培养箱培养 5~7 d, 根据菌落形态分类划线纯化, 将纯化后的菌种 4 °C 保存于牛肉膏蛋白胨斜面备用^[24]。

1.5.2 纤维素分解菌的定性筛选 将分离到的线叶蒿草内生菌株在牛肉膏蛋白胨培养基上划线, 28 °C 培养 36 h, 挑取单菌落点接在筛选培养基, 每皿点接 4 点, 3 个重复, 点接无菌水为对照, 置于 28 °C 培养箱中培养, 菌落长出后用 1 mg · L⁻¹ 的刚果红对平板染色 15 min, 然后用 1 mol · L⁻¹ 氯化钠脱色 15 min, 观察有无分解纤维素产生的透明圈及透明圈的大小^[22]。以透明圈与菌落直径比值大小确定其分解纤维素能力。挑选分解纤维素能力强的菌株, 测定其纤维素酶的活性大小。

1.5.3 纤维素分解菌的纤维素酶活测定 用 DNS^[25] 法绘制葡萄糖标准曲线, 得出回归方程, 计算细菌分解纤维素所生成葡萄糖的量。

粗酶液的制备: 将上述挑选出的具有分解纤维素能力的菌株活化后接种到牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 28 °C, 180 r · min⁻¹, 摇床振荡培养 12 h 作种子液。然后按 2% 的接种量接入 100 mL 发酵培养基中, 28 °C, 200 r · min⁻¹, 摇床振荡培养 48 h, 8 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 所得上清液为酶液。

纤维素酶活力测定^[26] 及定义: 酶活力的测定以羧甲基纤维素钠作为底物, 经纤维素酶水解生成还原糖, 用 DNS 法测定还原糖的含量, 由还原糖的量求得酶活力的大小。取 1 mL 粗酶液与 1 mL 1% CMC-Na 溶液(50 °C 预热 10 min) 混合, 在 50 °C 水浴中加热 30 min, 取出加入 2 mL DNS 显色剂, 煮沸 5 min, 冷却至室温后定容到 25 mL, 在分光光度

计 520 nm 处测定 OD 值(酶空白试验中除酶液事先灭活外, 其余条件不变)。在一定的反应条件下, 一个酶活单位(U) 定义为 1 min 内分解底物生成 1 μmol 葡萄糖所需的酶量。计算公式为:

酶活力(U) = [葡萄糖含量(mg) × 稀释倍数 × 5.56] / [反应液中酶液加入量(mL) × 反应时间(min)]。式中, 系数 5.56 表示 1 mg 葡萄糖的微摩尔数。

1.5.4 产纤维素酶条件的优化 为了确定最佳产酶条件, 在发酵培养基基础上选用不同的碳源和氮源以及不同 pH 值做单因素试验, 确定菌株产酶的最佳碳源、氮源和最适 pH 值范围, 并采用 L₁₆(4⁵) 正交表设计试验(表 1), 确定菌株产酶的最佳培养条件。

1.5.5 纤维素分解菌的鉴定 形态特征的观察和生理生化特征的测定参照《伯杰细菌鉴定手册》^[27] 和《常见细菌系统鉴定手册》^[28] 的相关方法进行, 用枯草芽孢杆菌标准菌株作为对照菌株。分子生物学鉴定按照李振东等^[29] 的方法进行。

1.5.6 试验数据处理 试验数据采用 Excel 2003 和 SPSS 16.0 进行处理。

2 结果与分析

2.1 线叶蒿草内生菌的分离结果

分离筛选出 X5 和 X6 两株内生菌能产生纤维素溶解圈, X5 形成的透明圈与菌落直径比为 10.45, 说明其有较强的分解纤维素的能力(图 1、表 2)。

2.2 X5 菌株产生的纤维素酶活力测定

菌株 X5 的反应液 OD₅₂₀ 值为 0.041, 其粗酶液的纤维素酶的活性为 0.456 U。菌株 X6 的反应液 OD₅₂₀ 值为 0, 说明在发酵培养基中 X6 分解纤维素酶的能力非常弱, 或者无分解纤维素酶的能力。

表 1 试验因素水平表

Table 1 Levels of experimental factors

| 水平 Level | 因素 Factors | | | |
|-------------|------------|---|--|----------------------------|
| | pH (A) | 羧甲基纤维素钠 CMC-Na/g · L ⁻¹ (B) | 氮源 Nitrogen/g · L ⁻¹ (C) | 培养温度 Temperature/°C (D) |
| 1 | 5.5 | 5 | 10 | 20 |
| 2 | 6.5 | 10 | 15 | 28 |
| 3 | 7.5 | 15 | 20 | 37 |
| 4 | 8.5 | 20 | 25 | 45 |

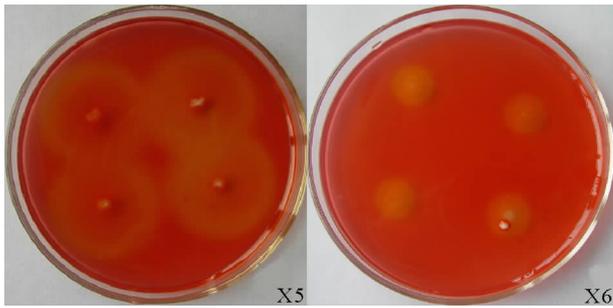


图1 筛选出的菌株(X5、X6)溶解纤维素照片

Fig. 1 Photos of cellulose dissolved by X5 and X6 bacteria strains

表2 细菌分解纤维素形成透明圈的大小

Table 2 Bacterial decomposition of a clear zone the size of the cellulose

| 菌株 Strain | 透明圈直径 Transparent circle diameter/mm | 菌落直径 Colony diameter/mm | 比率 Ratio/ % |
|--------------|--|-------------------------------|-------------------|
| X5 | 29.29 | 2.80 | 10.45 |
| X6 | 14.58 | 3.88 | 3.76 |

表3 碳源和氮源对X5产酶的影响

Table 3 Effects of various carbon and nitrogen sources on enzyme production

| 碳源 Carbon | 浓度 Concentration/% | 酶活力 CMCase activity/U | 氮源 Nitrogen | 浓度 Concentration/% | 酶活力 CMCase activity/U |
|-------------------------|-----------------------|--------------------------|---------------------------------|-----------------------|--------------------------|
| 羧甲基纤维素钠 CMC-Na | 1 | 0.457 | 蛋白胨 Peptone | 2 | 0.417 |
| 可溶性淀粉 Soluble starch | 1 | 0 | 酵母粉 Yeast powder | 2 | 0.429 |
| 葡萄糖 Glucose | 1 | 0 | 蛋白胨+酵母粉 Peptone+Yeast powder | 2 | 0.465 |
| 蔗糖 Sucrose | 1 | 0 | 牛肉膏 Beef extract | 2 | 0.407 |
| | | | 硫酸铵 Ammonium sulphate | 2 | 0 |

根据正交试验结果计算分析可知(表4),菌株X5产纤维素酶的最佳培养条件为(A₄B₁C₁D₁),即蛋白胨和酵母粉各5 g·L⁻¹,羧甲基纤维素钠5 g·L⁻¹,pH值为8.5,培养温度为20℃。对菌株X5产纤维素酶的因素影响大小顺序为温度>氮源>pH>羧甲基纤维素钠。X5产纤维素酶的最佳培养温度为20℃,是优化时所设温度中最低的一个,表明菌株X5比较适应宿主线叶嵩生存的低温环境。在最佳培养条件下测得菌株X5产生的纤维素酶的酶活性为0.862 U,是优化前酶活性(0.456 U)的1.89倍,说明X5在最佳条件(A₄B₁C₁D₁)下

2.3 产纤维素酶培养条件优化

经过对菌株X5在不同培养条件下产生的纤维素酶的活性测定发现,X5在初始pH为5、6、7、8、9的发酵培养基可产较高活性的纤维素酶(图2);X5产纤维素酶的最佳碳源和氮源分别是羧甲基纤维素钠和蛋白胨+酵母粉(表3)。

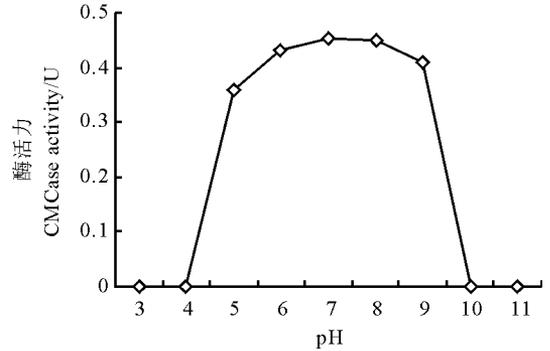


图2 pH值对X5产酶的影响

Fig. 2 Effects of pH value on the produce of enzyme

产生的纤维素酶活性的增幅不大。

2.4 纤维素分解菌的鉴定

2.4.1 菌株X5的16S rDNA序列扩增 提取的细菌基因组DNA,在1%琼脂糖凝胶上进行电泳检测。结果表明,提取的细菌基因组DNA浓度较高,纯度较好,可用作PCR扩增的模板。

PCR扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测,结果表明,基因组DNA中扩增出的16S rDNA核苷酸片段在1500 bp左右处有一明亮的PCR特异性条带,浓度都为60~100 ng·μL⁻¹,且无其它非特异性条带(图3),说明PCR扩增获得的目的DNA片段产

表 4 X5 产纤维素酶培养条件正交优化结果

Table 4 The orthogonal optimization experiment design of cellulase production of X5 and the experiment results

| 试验号 Test No. | A | B | C | D | 酶活性 Enzyme activity |
|-----------------|-------|-------|-------|-------|---|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0.646 |
| 2 | 3 | 1 | 3 | 3 | 0.459 |
| 3 | 4 | 1 | 4 | 4 | 0.331 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 2 | 0.301 |
| 5 | 4 | 3 | 2 | 1 | 0.375 |
| 6 | 3 | 2 | 4 | 1 | 0.428 |
| 7 | 2 | 4 | 3 | 1 | 0.379 |
| 8 | 4 | 4 | 1 | 3 | 0.232 |
| 9 | 1 | 4 | 4 | 2 | 0.398 |
| 10 | 3 | 3 | 1 | 2 | 0.228 |
| 11 | 3 | 4 | 2 | 4 | 0.228 |
| 12 | 1 | 2 | 2 | 3 | 0.232 |
| 13 | 1 | 3 | 3 | 4 | 0.293 |
| 14 | 4 | 2 | 3 | 2 | 0.411 |
| 15 | 2 | 3 | 4 | 3 | 0.426 |
| 16 | 2 | 2 | 1 | 4 | 0.230 |
| k ₁ | 0.334 | 0.392 | 0.434 | 0.457 | |
| k ₂ | 0.284 | 0.334 | 0.325 | 0.334 | A ₁ B ₁ C ₁ D ₁ |
| k ₃ | 0.386 | 0.336 | 0.331 | 0.337 | |
| k ₄ | 0.396 | 0.337 | 0.309 | 0.271 | |
| R | 0.111 | 0.058 | 0.125 | 0.186 | D>C>A>B |

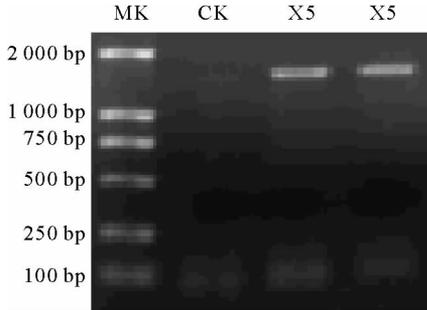


图 3 X5 16S rDNA PCR 电泳图

Fig. 3 X5 16S rRNA PCR electrophoresis map

量高、纯度好,可用于基因测序。

2.4.2 16S rDNA 序列测定及系统发育学地位的确定 经测序,X5 16S rDNA 基因有 1 474 个碱基对。将基因序列在 GenBank 中的登陆,获得登陆号为 EU236728。X5 16S rDNA 基因序列与 *Lysinibacillus sphaericus* (EU880531) 的同源性达 99.93%,与 *L. fusiformis* (FJ418643) 的同源性为 99.86%,与 *B. fusiformis* (AY907676) 的同源性为 99.73%,与 *B. sphaericus* (AJ311893) 的同源性为 99.46%;X5 16S rDNA 序列与模式菌株 *B. sphaericus* DSM 28 (AJ310084)/*L. sphaericus* DSM 28

(NR_042073) 的同源性为 99.25%,与模式菌株 *B. fusiformis* DSM 2898 (M77486) 的同源性为 98.80%,与模式菌株 *L. sphaericus* IAM 13420 (D16280) 的同源性为 98.64%。

从系统发育树(图 4)来看,X5 与两株 *B. sphaericus* 模式菌株(ATCC 14577、DSM 28)、两株 *B. fusiformis* 模式菌株(DSM 2898、ATCC 7055)和两株 *L. sphaericus* 模式菌株(IAM 13420、DSM 28)聚在一支,与模式菌株 *B. fusiformis* DSM 2898 的遗传距离小于 0.002,与另外 5 株模式菌 *B. sphaericus* DSM 28 和 ATCC 14577、*L. sphaericus* IAM 13420 和 DSM 28、*B. fusiformis* ATCC 7055 的遗传距离均为 0.007,说明 X5 与 *B. sphaericus*、*B. fusiformis*、*L. sphaericus* 具有很近的亲缘关系。一般认为,16S rDNA 序列同源性小于 98% 属于不同的种,同源性小于 93%~95% 属于不同属^[30],初步确定 X5 认为球形芽孢杆菌(*B. sphaericus*)。

2.4.3 菌株形态特征 的观察 X5 在牛肉膏蛋白胨培养基上菌落圆形,边缘整齐,中央隆起,表面磨沙状,奶油色;杆状,革兰氏染色呈阳性,产芽孢(图 5、6),菌体大小(0.66~0.92) μm ×(1.67~2.43) μm 。

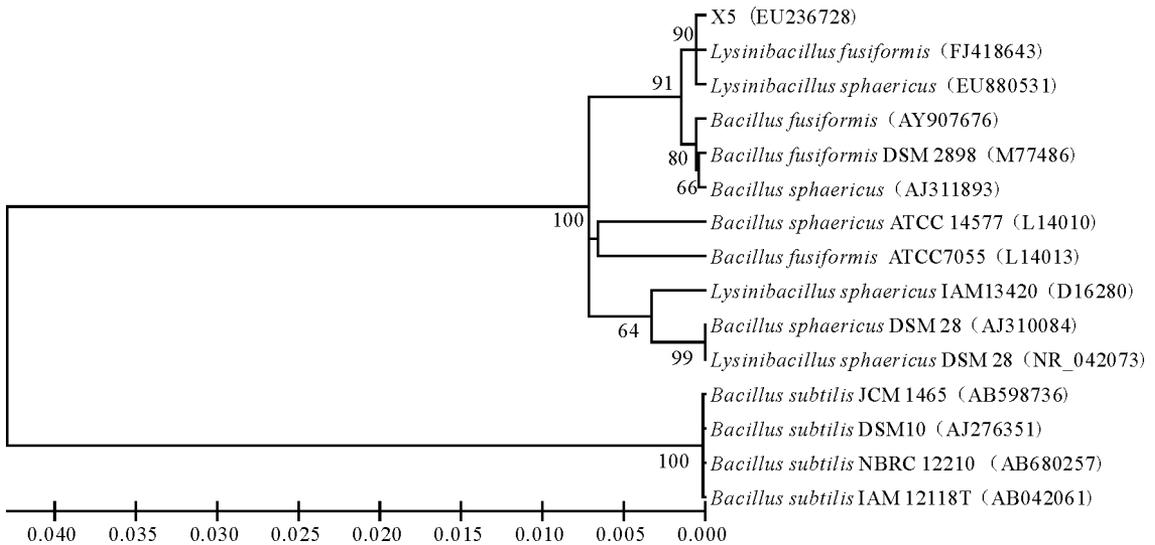


图4 X5的16S rDNA系统发育树

Fig. 4 16S rDNA phylogenetic tree of X5



图5 X5的菌落

Fig. 5 Colony of X5 strain



图6 X5革兰氏染色

Fig. 6 Gram of X5 strain

2.4.4 生理生化特征 菌株X5好氧,具有运动性,其它测试结果如表5所示,所测试项目中标准菌株的反应均与文献报道一致。根据《伯杰氏细菌鉴定手册》^[27]和《常见细菌系统鉴定手册》^[28]及16S rDNA序列分析结果确定X5为球形芽孢杆菌。

3 讨论

3.1 健康植物体内含有纤维素分解细菌

本试验筛选出的线叶嵩草内生细菌X5在筛选

平板上形成的透明圈与菌落直径比为10.45,在发酵培养基中产生的纤维素酶活性为0.456 U,在优化后的发酵培养基中产生的纤维素酶活性为0.862 U,是优化前的1.89倍。张红英等^[31]筛选出的芽胞杆菌的纤维素酶活性为3.80~354.72 U,李振红和陆贻通^[32]筛选出的高效纤维素降解菌的纤维素酶活性为10~85 U;韩学易等^[33]筛选出的枯草芽胞杆菌C-36产酶活性由优化前的68.5 U提高到优化后的196.33 U。相对一般的纤维素分解菌,菌株X5的纤维素酶活性并不高,但菌株X5分离自高寒草地优势牧草,其纤维素分解能力可提高牧草的品质。利用其内生性,若能成功定殖到农作物体内,通过发挥其纤维素分解能力可大大提高我国农作物秸秆转化为高效饲料的比例,对农作物秸秆利用和畜牧业发展具有巨大的潜在价值。

本研究的供试菌株是从健康的植物体内分离获得的,具有分解纤维素的能力,但对宿主植物没有造成伤害,因此认为该菌株可能是条件致病菌,其在植物体内时,纤维素酶的活性受到抑制,可能在特定的条件下被激活,对宿主植物造成危害,其具体作用机理还有待进一步研究。

3.2 *B. fusiformis*、*B. sphaericus*、*L. fusiformis*和*L. sphaericus*为同一菌

Ahmed等^[34]认为*B. fusiformis*和*Lysinibacillus fusiformis*同物异名,*B. sphaericus*和*L. sphaericus*是同一种菌;National Center for Biotechnology In-

表 5 X5 和枯草芽孢杆菌部分生理生化特征

Table 5 X5 and *B. subtilis* some of physiological and biochemical characteristics

| 试验项目 Test item | 枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i> | X5 |
|--|---------------------------|----|
| 葡萄糖利用 Use of glucose | + | - |
| 葡萄糖产气 Gas production from glucose | - | - |
| 阿拉伯糖利用 Use of arabinose | + | - |
| 蔗糖 Use of sucrose | + | - |
| 明胶液化 Gelatin liquefaction | + | - |
| 淀粉水解 Starch hydrolysis | + | - |
| 7% NaCl 生长 Growth with 7% NaCl | + | - |
| V. P. 试验 V. P. test | + | - |
| V. P. 培养物终 pH > 7 pH Value of culture after V. P. test > 7 | - | + |
| 吲哚试验 Formed indole | - | - |
| 硝酸盐还原 Nitrate reduction | + | - |
| 酪蛋白水解 Casein hydrolysis | + | + |
| 利用柠檬酸盐 Use of citrate | + | - |
| 利用丙酸盐 Use of propionate | - | - |

注：“-”表示阴性，“+”表示阳性。

Note:“-”negative,“+” positive.

formation (NCBI) 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 也同样认为上述两者为同物异名。根据 X5 16S rDNA 基因序列 blast 分析, X5 与 *L. sphaericus* (EU880531)、*L. fusiformis* (FJ418643)、*B. fusiformis* (AY907676)、*B. sphaericus* (AJ311893) 的同源性均在 99.46% 以上, 本研究也支持以上结论。

4 株 *B. subtilis* 的模式菌株与两株 *B. sphaericus* 模式菌株和两株 *B. fusiformis* 模式菌株之间的遗传距离均为 0.043。*B. sphaericus* 模式菌株之间的遗传距离为 0.007; *B. fusiformis* 模式菌株之间的遗传距离为 0.007。但是, *B. fusiformis* 模式菌株与 *B. sphaericus* 模式菌株之间的遗传距离均小于或等于 0.007。因此, 本研究认为 *B. fusiformis* 是 *B. sphaericus* 同物异名菌, 这与 Buchanan 和 Gibboas 等^[27] 的研究结果一致。

本研究在菌株 X5 16S rDNA 序列 blast 相似性分析时发现, X5 和 *B. sphaericus* 相似度超过 99% 以上的有 4 个, 和 *B. fusiformis* 相似度超过 99% 的有 6 个, 和 *L. sphaericus* 相似度超过 99% 的有 20 个, 和 *L. fusiformis* 相似度超过 99% 的有 17 个。

通过以上分析, 本研究认为 *B. fusiformis*、*B. sphaericus*、*L. fusiformis* 和 *L. sphaericus* 为同一菌。X5 与以上菌的 16S rDNA 序列同源性大于 99%, 没有达到 100%, 这可能与这些菌的生长环境不同有关, 是同种菌的个体差异。这种个体间的差异有待于进一步研究考证。

4 结论

从健康的东祁连山高寒草地优势牧草线叶嵩草内分离到 6 株内生细菌, 菌株 X5 和 X6 具有分解纤维素的能力, 且菌株 X5 产生的纤维素酶活性为 0.456 U, 其纤维素溶解圈直径与菌落直径比达 10.45, 为优良的纤维素分解菌, 产酶条件经优化后的酶活性达 0.862 U, 是优化前的 1.89 倍; X5 菌体杆状, 革兰氏阳性, 产芽孢, 菌体大小 (0.66 ~ 0.92) μm \times (1.67 ~ 2.43) μm ; X5 的 16S rDNA 基因有 1474 个碱基, 与球形芽孢杆菌模式菌株 DSM 28 的同源性为 99.25%, 在 GenBank 中的登陆号为 EU236728。结合生理生化特征及 16S rDNA 基因序列同源性分析, 将 X5 鉴定为球形芽孢杆菌。

参考文献

- [1] Bayer E A, Chanzy H, Lamed R, Shoham Y. Cellulose, cellulases and cellulosomes[J]. Current Opinion in Structural Biology, 1998, 8(5): 548-557.
- [2] Lynd L R, Weimer P J, van Zyl W H, Pretorius I S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2002, 66(3): 506-577.

- [3] 郭德宪,曹健,鲍宇茹.利用生物技术降解纤维素的研究进展[J].郑州工程学院学报,2001,22(3):82-86.
- [4] 倪维斗,李政,靳晖.对用生物质原料生产燃料用乙醇之我见[J].中国工程科学,2001,3(5):44-49.
- [5] Beguin P, Aubert J P. The biological degradation of cellulose[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1994, 13(1): 25-58.
- [6] 吕秀阳, 迫田章义, 铃木基之. 纤维素在近临界水中的分解动力学和产物分布[J]. 化工学报, 2001(6): 556-559.
- [7] 文少白, 李勤奋, 侯宪文, 李光义, 邓晓. 微生物降解纤维素的研究概况[J]. 中国农学通报, 2010, 26(1): 231-236.
- [8] Sukumaran R K, Singhanian R R, Mathew G M, Pandey A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production[J]. Renewable Energy, 2009, 34(2): 421-424.
- [9] 赵政, 陈学文, 朱梅芳, 黄俊华, 李仕坚, 严高彰, 凌泽辉. 添加乳酸菌和纤维素酶对玉米秸秆青贮饲料品质的影响[J]. 广西农业科学, 2009, 40(7): 919-922.
- [10] 靳振江. 纤维素酶降解纤维素的研究进展[J]. 广西农业科学, 2007, 38(2): 127-130.
- [11] 付传明, 何金祥, 黄宁珍, 何成新, 周浩, 王新桂. 秸秆纤维素分解真菌产酶条件优化及高酶活突变株诱变选育[J]. 西南农业学报, 2010, 23(3): 714-718.
- [12] 黄小晖, 付日辉, 李德, 霍光华. 白蚁肠道纤维素分解菌的筛选鉴定及产酶条件的研究[J]. 江西农业大学学报, 2009, 31(6): 1140-1145.
- [13] 张传富, 顾文杰, 彭科峰, 吴永英, 曹立群, 王立群. 微生物纤维素酶的研究现状[J]. 生物信息学, 2007, 5(1): 34-36.
- [14] 王炳晓. 奶牛瘤胃兼性厌氧纤维素分解细菌的分离鉴定及其产酶研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2008.
- [15] 朱玉玺. 纤维素优良降解菌的筛选分离及其特性研究[D]. 西安: 西安建筑科技大学, 2005.
- [16] 孟会生, 刘卫星, 洪坚平. 纤维素分解菌群的筛选组建与羧甲基纤维素酶活初探[J]. 山西农业大学学报, 2006, 26(1): 27-28, 31.
- [17] 张辉, 杨启银, 戴传超, 闫淑珍, 王慧萍. 牛粪堆肥中好氧纤维素降解菌群及产酶条件研究[J]. 江苏农业科学, 2004(6): 146-150.
- [18] 潘锋. 秸秆微生物共发酵生产单细胞蛋白研究[D]. 南京: 南京理工大学, 2002.
- [19] 廖国藩, 贾幼陵. 中国草地资源[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1996: 344.
- [20] 王得贤. 几种药剂对线叶蒿草种子萌发的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2004(5): 52-53.
- [21] Ausubel F M, Kingston R E, Moore D D, Seidman J G, Smith J A, Struhl K. 精编分子生物学实验指南[M]. 金由辛, 包慧中, 赵丽云, 译校. 北京: 科学出版社, 1998: 39-40.
- [22] 高凤菊, 陈惠, 吴琦, 梁如玉, 韩学易, 官兴颖. 产纤维素酶芽孢杆菌 C-36 的分离筛选及其鉴定[J]. 四川农业大学学报, 2006, 24(2): 175-177, 213.
- [23] 赵玉萍, 杨娟. 四种纤维素酶酶活测定方法的比较[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(3): 116-118.
- [24] 满百膺, 陈秀蓉, 李振东. 高寒牧草内生细菌分离培养条件的优化[J]. 草原与草坪, 2008(5): 27-30.
- [25] 田纪春. 谷物品质测试理论与方法[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 583-587.
- [26] 唐仕荣, 杨树林. 产纤维素酶细菌的复合诱变及产酶条件优化[J]. 发酵科技通讯, 2006, 35(1): 7-10.
- [27] Buchanan R E, Gibboas N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组, 译. 北京: 科学出版社, 1984: 732-748.
- [28] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 62-65, 353-412.
- [29] 李振东, 陈秀蓉, 李鹏, 满百膺. 珠芽蓼内生菌 Z5 产 IAA 和抑菌能力测定及其鉴定[J]. 草业学报, 2010, 19(2): 61-68.
- [30] 易有金, 尹华群, 罗宽, 刘学端, 刘二明. 烟草内生短芽孢杆菌的分离鉴定及对烟草青枯病的防效[J]. 植物病理学报, 2007, 37(3): 301-306.
- [31] 张红英, 金钺, 李娟, 陈丽颖, 崔保安. 芽孢杆菌抗菌活性和纤维素酶活性的测定[J]. 中国微生态学杂志, 2009, 21(9): 801-803.
- [32] 李振红, 陆贻通. 高效纤维素降解菌的筛选[J]. 环境污染与防治, 2003, 25(3): 133-135.
- [33] 韩学易, 陈惠, 吴琦, 梁如玉, 高凤菊, 胥兵. 产纤维素酶枯草芽孢杆菌 C-36 的产酶条件研究[J]. 四川农业大学学报, 2006, 24(2): 178-181.
- [34] Ahmed I, Yokota A, Yamazoe A, Fujiwara T. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov., sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(5): 1117-1125.