

刘海青,刘富平,胡文婷,等. 壮实鹿角珊瑚纤维素降解菌的选育[J]. 江苏农业科学,2014,42(2):329-330.

壮实鹿角珊瑚纤维素降解菌的选育

刘海青^{1,2}, 刘富平¹, 胡文婷^{1,2}

(1. 海南大学海洋学院热带生物资源教育部重点实验室, 海南海口 570228; 2. 海南大学海洋学院海洋生物实验教学中心, 海南海口 570228)

摘要:采用富集平板稀释法、刚果红染色法选育壮实鹿角珊瑚纤维素分解菌,用 DNS 法测定菌株降解纤维素酶活。结果表明,壮实鹿角珊瑚体内含有共附生纤维素分解菌,该菌可分泌降解纤维素酶,富集培养及刚果红染色法可有效筛选此类活性菌株。

关键词:壮实鹿角珊瑚;纤维素;生物质

中图分类号: Q939.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)02-0329-02

生物质是唯一可以转化为液体燃料的可再生能源^[1],以木屑、农作物秸秆、椰壳等生物质为原料的纤维素乙醇,不仅避免了生物乙醇与人争粮争地的弊端,而且燃放时释放的温室气体与燃烧汽油相比少 90%^[2]。微生物是纤维素酶的主要来源^[3],分离、选育出针对不同行业的高效降解纤维素菌种,促使纤维素资源化利用已成为国内外的研究热点^[4]。海洋微生物资源丰富,许多微生物寄生在珊瑚体内或附着在珊瑚表面,与珊瑚协同进化,在演化过程中二者形成了互惠关系^[5]。海洋高盐、高压、低温、寡营养等独特的环境赋予了海洋微生物独特的代谢途径^[6]。珊瑚共附生菌不仅能够独立产生丰富的次生代谢产物,还可分泌具有各种功能的活性酶,参与珊瑚次生成分的合成,或对珊瑚次生代谢产物进行转化^[7],是天然产物新的来源。本研究选育壮实鹿角珊瑚纤维素分解菌,旨在为促进纤维素资源化利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

壮实鹿角珊瑚样品采自海南岛蜈支洲近海海域。富集培养基(CMC): KH_2PO_4 0.2%、 MgSO_4 0.015%、 KNO_3 0.1%、CMC-Na 1%,共 100 mL。马铃薯培养基:马铃薯 100 g、葡萄糖 10 g、NaCl 5 g、琼脂 7.5~100 g、无菌水 500 mL、pH 值自然,共 500 mL。真菌初筛培养基: K_2HPO_4 2.0 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g、NaCl 6 g、CMC-Na 15 g、琼脂粉 1.5%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0 g、 CaCl_2 0.1 g、 KH_2PO_4 0.5 g、pH 值 7.0~7.4,蒸馏水 1 000 mL。真菌保种培养基:真菌培养基(PDA)。甲液:将 6.9 g 结晶苯酚溶于 15.2 mL 10% NaOH 溶液,用蒸馏水稀释至 69 mL,在此溶液中加入 6.9 g 亚硫酸氢钠。乙液:将 255 g 酒石酸钾钠溶于 300 mL 10% NaOH 溶液中,再

加入 880 mL 1% 3,5-二硝基水杨酸溶液。将甲乙溶液混合即得黄色试剂,储于棕色瓶中放置 7~10 d 后使用。溶液在棕色瓶内保存 1 年有效。

1.2 方法

1.2.1 壮实鹿角珊瑚样品悬液的制备 将 30 g 壮实鹿角珊瑚样品加少量水磨碎后转移至盛有 10 mL CMC 富集培养液中,静置。

1.2.2 纤维素降解菌的富集培养 取以上壮实鹿角珊瑚样品悬液 10 mL 转入无菌三角瓶中,30 ℃ 下振荡培养 1~3 d,按 2% 的接种量,取 0.2 mL 菌液转接至 10 mL 新富集培养基 CMC₂ 中进行第 2 次富集培养。

1.2.3 纤维素降解菌的筛选 分别取富集培养后的 2 种菌悬液各 1 mL 做系列稀释,稀释 $10^5 \sim 10^7$ 倍,每种菌液取 0.1 mL 分别涂布于真菌培养基 PDA 及细菌选择平板,每种稀释倍数做 3 个平行板,平板于 30 ℃ 下恒温培养 1~3 d,以平板上出现均匀的单菌落为准。待长出单菌落后(以 40 个单菌落为准)选取 4 个平板。用接种环挑选单菌落点种在真菌及细菌初筛培养基上,每板接种 5 株菌株。每株菌株点种 2 个平板,1 个平板用于刚果红染色,另一个作为保存平板。

1.2.4 纤维素降解菌的初步鉴定 刚果红染色法:30 ℃ 培养 1~3 d 后,测量并记录各菌落直径后用 70% 乙醇将菌落洗下,然后用 0.1% 刚果红浸染 30 min,倾去染液,再用 1 mol/L NaCl 浸泡脱色 30 min,倾去 NaCl 浸泡液,观察菌落周围有无透明圈,若有透明圈,测量并记录透明圈的直径,计算透明圈直径与菌落直径的比值(HC 值)。

1.2.5 纤维素降解菌的分离纯化 挑选 HC 值大于 1 的菌株作为初筛菌种,通过连续划线法分离纯化菌株,将镜检后得到的初筛菌株转接到保种培养基保藏斜面,4 ℃ 下保藏备用。

2 结果与分析

2.1 纤维素降解菌的筛选

采用以 CMC-Na 为唯一碳源富集平板稀释分离,图 1、图 2 为壮实鹿角珊瑚真菌第 3 天至第 8 天的生长变化过程,第 3 天培养基上长出 1 个圆斑,营养菌丝呈圆形晶亮白色放射状,中间有 1 个黑色孢子囊,孢子囊逐渐向周围扩散,覆盖了白色菌丝。

收稿日期:2013-05-29

基金项目:长江学者和创新团队发展计划(编号:IRT1123);海南省教育厅高等学校科学研究项目(编号:Hjkj2008-15);海南大学青年基金(编号:qnjj1151)。

作者简介:刘海青(1971—),女,山西大同人,硕士,副教授,主要从事天然产物活性研究。Tel:(0898)66289567;E-mail:892035892@qq.com。

通信作者:刘富平,博士,副教授,主要从事微生物制药研究。

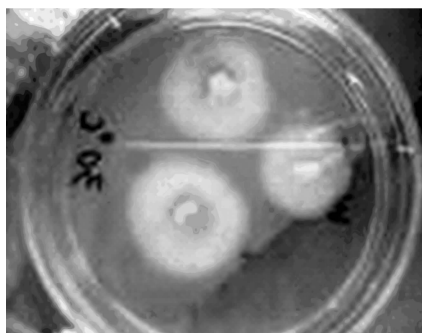


图1 壮实鹿角珊瑚真菌第3天生长形态

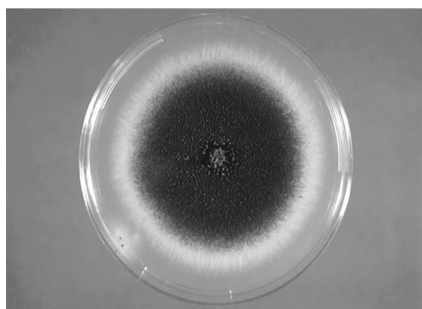


图2 壮实鹿角珊瑚真菌第8天生长形态

2.2 纤维素降解菌的初步鉴定

经刚果红染色法初步鉴定,分离到 1 株具有降解纤维素能力的真菌,试验表明,纤维素降解菌染色后能在纤维素琼脂培养基上快速产生清亮的透明圈,HC 值 >1 (图 3、图 4)。



图3 真菌及其孢子水解透明圈(2011年12月30日)

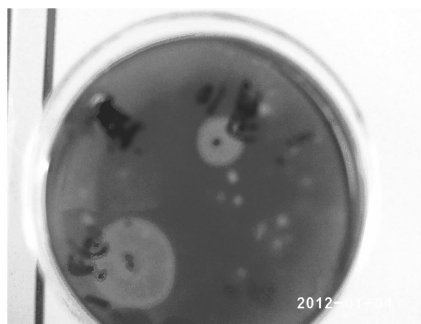


图4 真菌及其孢子水解透明圈(2012年1月4日)

3 结论与讨论

本研究表明,壮实鹿角珊瑚体内含有共附生纤维素分解菌,该菌可分泌降解纤维素酶,富集培养及刚果红染色法可有效筛选此类活性菌株。笔者最初采用羧甲基纤维素钠 CMC - Na - 刚果红培养基进行纤维素降解菌初筛,但是菌株无法在培养基上生长且不能产生透明圈,所以改用富集后的培养液进行梯度稀释,涂布于 PDA 培养基上培养,然后转接到真菌初筛培养基上,再用刚果红染色法染色,1~2 d 后可以看到清晰的透明圈,说明此菌株只能以先培养后刚果红染色的方法进行初步鉴定。

参考文献:

- [1] 袁振宏,罗文,吕鹏梅,等. 生物质能产业现状及发展前景[J]. 化工进展,2009,28(10):1687-1692.
- [2] 聂恒,朱静,段旭,等. 纤维类物质生产乙醇的研究进展[J]. 云南化工,2011,38(3):28-34.
- [3] 杨友坤,朱凤香,王卫平,等. 纤维素酶及其应用现状[J]. 安徽农学通报,2009,15(13):59-62.
- [4] 文少白,李勤奋,侯宪文,等. 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.
- [5] 李艳华,张利平. 海洋微生物资源的开发与利用[J]. 微生物学通报,2003,30(3):113-114.
- [6] 周世宁,林永成,姜广策. 海洋微生物的生物活性物质研究[J]. 海洋科学,1997,3(3):27-29.
- [7] 张文,郭跃伟. 海洋生物柳珊瑚的化学成分及生物活性研究进展[J]. 中国天然药物,2003,1(2):69-75.