

牛明芬,武肖媛,于海娇,等.牛粪纤维素降解菌的筛选与初步鉴定[J].江苏农业科学,2014,42(11):393-395.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.139

牛粪纤维素降解菌的筛选与初步鉴定

牛明芬,武肖媛,于海娇,梁文娟,王思博

(沈阳建筑大学市政与环境学院,辽宁沈阳 110168)

摘要:通过“富集—初筛—复筛”流程,筛选出 4 株对纤维素有强降解能力的菌株,分别标记为 TG₁、HN₁、HP₂、P₃。对 4 株菌的纤维素酶活性进行了定量测定;通过生理生化试验,初步鉴定 TG₁ 为放线菌,HP₂ 为地衣芽孢杆菌,P₃、HN₁ 为枯草芽孢杆菌。

关键词:纤维素降解菌;分离;纤维素酶活;鉴定

中图分类号: Q939.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)11-0393-02

随着我国养牛行业的发展,牛存栏量也逐年增加。根据调查显示,2009 年我国奶牛存栏量达 1 260 万头,2010 年的存栏量达 1 420.1 万头。存栏量为 200~2 000 头的肉奶牛基地,每天可产生的牛粪在 5~50 t^[1]。未经处理的牛粪随意堆放,不仅造成了人们的视觉污染,而且对大气、土壤、水造成了很大污染。相较于其他畜禽粪便,牛粪含纤维素、半纤维素等有机难降解物质比较多,自然降解时间长^[1-2]。针对牛粪中含纤维素较多且自然降解时间长的特点,本试验将降解纤维素能力强的菌株分离筛选出来,以期用于后续的牛粪堆肥试验缩短牛粪堆肥发酵时间。

1 材料与方法

1.1 样品采集

土壤样品采自沈阳建筑大学树林落叶堆积处;牛粪样品采自本溪木兰牛场的鲜牛粪、腐熟牛粪、堆积 1 年的牛粪。落叶堆积处取样时,在土层 5~10 cm 处进行采样,平面采样用“之”字形取样,剖面取样采用定点取土^[3]。

1.2 培养基

培养基为:牛肉膏蛋白胨培养基、PDA 培养基、高氏合成一号、刚果红纤维素钠筛选培养基、滤纸条液体培养基、羧甲基纤维素钠培养基、牛肉膏蛋白胨酪素培养基、羧甲基纤维素钠(CMC-Na)液体发酵培养基^[3]、豆饼粉液体发酵培养基。

1.3 试验方法

1.3.1 纤维素降解菌的富集 分别称取 5 g 不同的采集样品,置于 45 mL 装有玻璃珠无菌水的三角瓶中,放入 30℃、120 r/min 的摇床,培养 1 d。

1.3.2 纤维素降解菌的筛选 (1)初筛:用稀释涂布平板法,将 10⁻⁷~10⁻⁴ 浓度的菌液涂于刚果红纤维素钠筛选培养基上,将平板分别放入 30、50℃ 恒温箱培养 4 d,挑取明显的

单菌落在 PDA 培养基上进行划线纯化,将纯化好的菌种接入 PDA 培养基斜面保存。(2)复筛:将纯化好的菌株点接到羧甲基纤维素钠培养基上,放入 30、50℃ 培养 4 d,用刚果红染液进行染色,量取菌圈直径(*d*)和透明圈直径(*D*),并计算透明圈直径与菌圈直径比值 *D/d*,选取 *D/d* 值与 *D* 值大的菌接入滤纸条液体培养基中,进行滤纸条崩溃试验,观察滤纸条崩溃的快慢和程度。选取使滤纸条崩溃程度大的菌,分别接种于 CMC-Na 液体发酵培养基、豆饼粉液体发酵培养基上,培养 64 h,测定纤维素酶活性。

1.3.3 粗酶液的制备 取发酵液倒入离心管中,3 000 r/min 下离心 10 min,上清液即为粗酶液。

1.3.4 纤维素酶活性测定^[4-5] (1)羧甲基纤维素酶(CMCase)活性测定:根据 GB 20287—2006《农用微生物菌剂》进行羧甲基纤维素酶活测定;(2)滤纸酶(FPA)活性测定:根据 NY/T 1847—2010《微生物肥料生产菌株质量评价通用技术要求》进行滤纸酶活性测定。

1.3.5 纤维素降解菌的初步鉴定^[6-7] 对筛选出的菌株菌落形态及显微镜下的形态进行观察,并进行生理生化试验。通过对照伯杰氏手册完成对菌株的初步鉴定。

2 结果与分析

2.1 菌种初筛

通过刚果红纤维素钠筛选培养基的筛选,共获得 21 株菌,其中从土壤中分离出来的菌有 9 株,都为常温菌;从牛粪中共分离出来 12 株菌,其中常温菌 6 株,高温菌 6 株。将分离出来的菌在 PDA 培养基划线纯化后接种到 PDA 斜面保存,待用。

2.2 菌种复筛

用刚果红染色羧甲基纤维素钠与滤纸条崩溃试验进行菌种复筛,测试菌株的纤维素降解能力,详见表 1。王志超等认为 *D/d* 值超过 2.5 的菌株纤维素酶活性高^[8]。也有人认为,*D*>2 cm 时,酶活较高。从表 1 可以看出,菌株 P₁、HN₁ 的 *D/d* 值超过了 2.5,且透明圈直径 *D* 大于 2 cm;菌株 P₃、HP₂、TG₁、TG₄ 的 *D/d* 值接近 2.5,且透明圈直径 *D* 大于或接近 2 cm,纤维素酶活性也相对比较。

选用 P₁、HN₁、TG₁、HP₂、P₃ 做滤纸条崩溃试验,试验结果

收稿日期:2014-03-25

基金项目:辽宁省沈阳市科技攻关项目(编号:F-13-144-3-00)。

作者简介:牛明芬(1967—),女,辽宁本溪人,博士,教授,主要研究方向为固体废弃物资源化利用。E-mail:836580304@qq.com。

通信作者:武肖媛,硕士研究生,主要研究方向为固体废弃物资源化利用。E-mail:827510061@qq.com。

见表 2。由表 2 可以看出,接种 TG₁ 滤纸条崩溃得最快最明显,P₁ 最不明显。

综合刚果红染色羧甲基纤维素钠与滤纸条崩溃试验,筛选出 HN₁、TG₁、HP₂、P₃ 4 株菌进行后续纤维素酶活性的定量测定与菌株的初步鉴定。

表 1 菌株的纤维素酶活性测定

菌株号	菌圈直径(<i>d</i>) (cm)	透明圈直径(<i>D</i>) (cm)	<i>D</i> / <i>d</i> 值
P ₁	0.90	2.30	2.56
P ₂	0.71	1.30	1.83
P ₃	1.02	2.51	2.46
P ₅	1.00	1.22	1.22
N ₅	0.75	1.10	1.47
N ₇	0.61	0.83	1.36
HN ₁	1.40	4.15	2.96
HN ₃	0.90	1.25	1.39
HN ₄	1.40	1.75	1.25
HN ₆	1.50	2.30	1.53
HN ₇	1.60	2.00	1.25
HP ₂	1.20	2.80	2.33
TG ₀	0.73	1.25	1.71
TG ₁	0.90	2.15	2.39
TG ₄	0.81	1.95	2.41
TN ₁	0.65	1.21	1.86
TN ₃	0.69	1.41	2.04
TN ₄	0.95	2.15	2.26
TN ₅	1.00	2.05	2.05
TP ₁	0.71	1.45	2.04
TP ₄	0.80	1.60	2.00

表 2 滤纸条崩溃测定

编号	P ₁	HN ₁	TG ₁	HP ₂	P ₃	CK
第 1 天崩溃程度	-	-	-	-	-	-
第 3 天崩溃程度	-	-	+	-	-	-
第 6 天崩溃程度	-	+	++	-	-	-
第 10 天崩溃程度	±	++	+++	+	+	-

注:“+”表示滤纸条崩溃明显,加号越多崩溃程度越大;“±”表示滤纸条崩溃现象观察不明显;“-”表示滤纸条没有崩溃。CK 为没有接菌的对照。

2.3 纤维素酶活性的测定结果

将筛选得到的 4 株菌分别接入 CMC-Na 液体发酵培养基、豆饼粉液体发酵培养基中,培养 64 h,对其进行 CMCase 酶活性和 FPA 酶活性的测定,结果见表 3。

表 3 CMCase 酶活性与 FPA 酶活性测定

培养基类型	菌株	CMCase 活性 (U/mL)	FPA 活性 (U/mL)
CMC-Na 液体发酵	HN ₁	3.674	1.357
	HP ₂	1.031	1.854
	TG ₁	3.252	2.504
	P ₃	2.752	1.239
豆饼粉液体发酵	HN ₁	11.517	4.248
	HP ₂	4.595	5.856
	TG ₁	1.833	1.453
	P ₃	8.712	3.598

由表 3 可以看出,TG₁ 在 CMC-Na 液体发酵培养基中产生的酶活性要高于其在豆饼粉液体发酵培养基中的;HN₁、HP₂、P₃ 这 3 株菌在豆饼粉液体发酵培养基中的酶活性要高

些,可以在后续的发酵优化试验中作为参考菌株。

2.4 纤维素降解菌的初步鉴定结果

2.4.1 TG₁ 鉴定结果 (1)菌落特征:在高氏合成一号培养基上长的比较快,菌落为圆形,中间凸起,初期为白色,之后菌落出现灰色粉末物质,易被挑取,有强烈的土腥味。(2)显微观察结果:革兰氏染色为阳性,可看到孢子丝呈直形。根据以上试验结果初步鉴定 TG₁ 为放线菌。

2.4.2 P₃ 鉴定结果 (1)菌落特征:菌落在牛肉膏蛋白胨培养基上干燥,呈半透明、边缘不规则状,培养基背面微发黄,有一定黏度,不易挑取。(2)显微观察结果:菌株 P₃ 呈短杆状,有芽孢生成。(3)生理生化试验结果:菌株 P₃ 为好氧菌,革兰氏染色为阳性,生长最适温度为 25~30℃,可使明胶液化,V-P 反应与甲基红试验呈阳性,可降解淀粉,产过氧化氢酶,能还原硝酸盐,可在 0~7% 盐浓度中生长,能利用柠檬酸盐,不可利用丙酸盐,在初始 pH 值为 9 的培养基中生长良好。根据以上试验结果初步鉴定 P₃ 为枯草芽孢杆菌。

2.4.3 HN₁ 鉴定结果 (1)菌落特征:菌落在牛肉膏蛋白胨培养基上呈乳白色,圆形,不透明,边缘为波浪状,有褶皱,有黏度,不易挑取。(2)显微观察结果:菌株 HN₁ 呈短杆状,芽孢中生。(3)生理生化试验结果:菌株 HN₁ 为好氧菌,革兰氏染色为阳性,生长最适温度为 45~50℃,可使明胶液化,V-P 反应呈阳性,甲基红试验呈阴性,可降解淀粉,产过氧化氢酶,能还原硝酸盐,可在 0~7% 盐浓度中生长,能利用柠檬酸盐,不可利用丙酸盐,不能在厌氧环境中生长,在初始 pH 值为 8~9 的培养基中生长良好。根据以上试验结果,初步鉴定 HN₁ 为枯草芽孢杆菌。

2.4.4 HP₂ 鉴定结果 (1)菌落特征:菌落在牛肉膏蛋白胨培养基上长势良好,菌落呈大片状,向外扩张,不透明,背面呈现红色,易挑取。(2)显微观察结果:菌株 HP₂ 呈短杆状,芽孢端生。(3)生理生化试验结果:菌株 HP₂ 可在有氧环境中生长,也可在厌氧条件下生长,在厌氧环境中生长产生红色色素,革兰氏染色为阳性,生长最适温度为 45~50℃,可使明胶液化,V-P 反应与甲基红试验呈阳性,产过氧化氢酶,能还原硝酸盐,可在 0~7% 盐浓度中生长,能利用柠檬酸盐与丙酸盐,在初始 pH 值为 8~9 的培养基中生长良好。根据以上试验结果,初步鉴定 HP₂ 为地衣芽孢杆菌。

3 结论与讨论

本试验从腐熟的牛粪与土壤中共分离出 21 株对纤维素有分解能力的菌株,土壤中分离出的 9 株菌均为常温菌,牛粪中分离出 6 株高温菌和 6 株常温菌。通过刚果红染色羧甲基纤维素钠与滤纸条崩溃试验进行复筛,筛选出 4 株对纤维素降解能力强的菌株。

用 2 种基础发酵培养基对筛选出的 4 株菌进行纤维素酶活性的定量测定,发现菌株 P₃、HN₁、HP₂ 在豆饼粉发酵培养基中的酶活性较高,TG₁ 在 CMC-Na 发酵培养基中的酶活性较高,在下一步进行发酵培养基优化中可做参考。FPA 酶活与 CMCase 活性高低不一致,说明降解纤维素的酶是一种纤维素复合酶。经初步鉴定,HP₂ 为地衣芽孢杆菌;P₃、HN₁ 为枯草芽孢杆菌;TG₁ 为放线菌。在牛粪降解菌中的细菌多为芽孢杆菌^[9],这与本试验结果一致。

万洪善,袁 芹. 改性碳纳米管吸附水中肠道菌群的研究[J]. 江苏农业科学,2014,42(11):395-397.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.140

改性碳纳米管吸附水中肠道菌群的研究

万洪善,袁 芹

(连云港职业技术学院,江苏连云港 222006)

摘要:以 1-乙基-3(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺(EDC)为相偶联剂,通过海藻酸钠(SAL)对碳纳米管(CNTs)进行修饰和改性,选取水中肠道菌群作为对象,研究改性碳纳米管对水中微生物的吸附效果,探讨了溶液 pH 值、吸附时间和吸附剂量对吸附过程的影响。结果表明,CNTs 经海藻酸钠改性后,对肠道菌群的吸附能力提高,当溶液 pH 值 7.0 时,具有最大吸附率,在初始 90 min 内保持较高的吸附速率,且吸附率随着吸附剂量的增加而增大,改性碳纳米管(SAL-MWCNT-COOH)吸附剂从 2.5 mg 增加到 12.5 mg 时,吸附率从 78.6% 提高到 89.6%。

关键词:碳纳米管;表面改性;大肠杆菌;吸附

中图分类号:TQ424.3

文献标志码:A

文章编号:1002-1302(2014)11-0395-03

粉末活性炭(PAC)是目前饮用水净水处理的常用材料,但 PAC 净水存在微生物泄漏使水二次污染的问题。近年来,纳米水处理技术在国内外取得了一定的效果。纳米材料,如碳纳米管(CNTs),具有特殊的水处理能力并且能够有效地去除化学污染物和生物污染物^[1]。CNTs 作为一种新型材料,经世界范围内众多学者的研究验证,具有非常优秀的吸附性能,甚至大大超过当前制水行业普遍使用的活性炭^[2-5]。近年来,随着 CNTs 抗菌性能被发现,其在水处理抗菌领域的潜在应用渐渐引起了科学界的广泛关注。与传统的化学消毒剂不同,CNTs 应用于水中抗菌并不会产生消毒副产物(DBPs)问题。此外,由于其巨大的比表面积,CNTs 对水中细菌具有极强的吸附性能,CNTs 对水中病菌可能具有浓缩和灭活双重性能^[6]。因此,CNTs 在水处理抗菌领域可能具有良好的应用前景。但 CNTs 的长度一般在几百纳米到数十微米之间,在其吸附微污染物后,采用常规水处理工艺中的分离方法,很难将 CNTs 完全从水中分离出来,而微小尺寸的 CNTs 对水环境造成二次微污染势必对人体的健康造成不良的影响^[7],这些问题严重地限

制了 CNTs 在水处理中的实际应用。本试验以水中常见细菌大肠杆菌(*Escherichia coli*)作为对象,以 1-乙基-3(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺(EDC)为相偶联剂,在水介质、弱酸性条件下,采用超声波辅助法接枝水溶性高分子海藻酸钠(alginate sodium,SAL),得到修饰的碳纳米管复合物,研究 SAL-MWCNTS-COOH 复合材料对肠道菌群的吸附性能。

1 材料与方法

1.1 试验材料及设备

MWCNT(多壁碳纳米管,XFM13,南京先丰纳米科技材料有限公司);大肠杆菌 *E. coli*(来源于连云港市第一人民医院);LB 培养基,自制;SAL(国药集团化学试剂有限公司);碳二亚胺盐酸盐(EDC)(sigma-aldrich 公司);其他试剂均为分析纯。JEM-100CX II 透射电子显微镜(transmission electron microscope,TEM,日本电子株式会社);BL6-180 型高功率数控超声波清洗器(上海比朗仪器有限公司);SX-500 型灭菌锅(sigma-aldrich 公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 SAL-MWCNT-COOH 复合物的制备 SAL-MWCNT-COOH 复合物的制备参考文献[8]。

1.2.2 测试与表征 在扫描电镜和透射电镜上完成。

1.2.3 SAL-MWCNT-COOH 复合物吸附+大肠杆菌的试验 将 *E. coli* 活化后置于 LB 液体培养基中,在 37℃ 下恒温

收稿日期:2014-02-08

基金项目:高校科研成果产业化推进项目(编号:JHB2011-77);江苏省连云港市农业攻关项目(编号:CN1211);江苏省连云港市工业攻关项目(编号:CG1304-2)。

作者简介:万洪善(1970—),女,江苏连云港人,硕士,副教授,主要从事化学教学与科研工作。E-mail:wahs9799@126.com。

参考文献:

- [1]任 平,赵文娟,张 强,等.不同微生物酶对牛粪堆肥腐熟的影响[J].安徽农业科学,2010,38(5):2525-2526,2592.
- [2]方方舟,王培清.牛粪堆肥各阶段主要纤维素降解菌分离与作用规律分析[J].中国土壤与肥料,2012(6):88-92.
- [3]孙一博.高效纤维素降解菌的筛选鉴定及特性研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2013:1-53.
- [4]GB 20287—2006 农用微生物菌剂[S].
- [5]NY/T 1847—2010 微生物肥料生产菌株质量评价通用技术要

求[S].

- [6]中国科学院微生物研究所细菌分类组.一般细菌常用鉴定方法[M].北京:科学出版社,1978.
- [7]布坎南 R E,吉布斯 N E.伯杰细菌鉴定手册[M].8版.北京:科学出版社,1984.
- [8]王志超,陆文静,王洪涛.好氧堆肥中高温纤维素分解菌的筛选及性状研究[J].北京大学学报:自然科学版,2006,42(2):259-264.
- [9]刘 佳,李 婉,许修宏,等.接种纤维素降解菌对牛粪堆肥微生物群落的影响[J].环境科学,2011,32(10):3073-3081.