

廖瀚峰,周礼红,潘肇仪,等.除臭效果菌株中具有分解纤维素能力菌株的筛选及鉴定[J].江苏农业科学,2014,42(12):386-388.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.12.129

除臭效果菌株中具有分解纤维素能力菌株的筛选及鉴定

廖瀚峰¹,周礼红^{1,2},潘肇仪¹,高燕燕¹,韦名科¹

(1. 贵州大学生命科学学院微生物学系,贵州贵阳 550025; 2. 青藏高原微生物国家地方联合工程研究中心,西藏拉萨 850000)

摘要:为了筛选同时具有除臭和产纤维素酶能力的菌株,采用滤纸崩解试验初筛筛选到 6 株具有产纤维素酶能力的菌株,通过用 DNS 法测定其滤纸酶、内切葡聚糖苷酶和 β -葡萄糖苷酶的酶活进行复筛,最终筛选到具有较高产纤维素酶能力的菌株 G2,其酶活力分别为 1.737、3.179、1.232 IU/mL。通过形态学观察及 16S rDNA 分子鉴定,初步确定该菌株为淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*),从而为微生物除臭菌剂的制备提供了菌种资源。

关键词:纤维素酶;滤纸崩解试验;筛选鉴定;16SrDNA

中图分类号: X173 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)12-0386-03

垃圾处理是当代世界各国共同关注并亟待解决的环境问题之一,也是城市发展与健康领域中的一项重要研究内容。我国城市生活垃圾年清运量约为 1.6 亿 t,除少部分焚烧、堆肥或回收利用外,绝大部分被运送到填埋场进行填埋处置,在填埋过程中由于有机质腐败分解,不可避免地造成恶臭污染^[1-2]。城市突发性恶臭污染越来越严重,严重干扰了人们的正常生产生活,投诉量不断攀升^[3-4]。近些年来,在北京、上海、杭州、广州等一些大中城市发生的垃圾填埋场恶臭扰民事件,成为填埋场周边地区的社会不稳定因素,严重制约我国经济、社会和环境的持续发展。

我国城市垃圾比较特殊,垃圾中有机物占主要成分,主要有淀粉、蛋白质、脂类、纤维素、半纤维素、木质素等。其中木质素难以被微生物降解^[5];纤维素和半纤维素因为具有紧密的结晶结构,使其具有很强的不可降解性,积累过多会导致环境问题。城市生活垃圾中有大量纤维素,且随着人们生活水平提高而呈现逐年上升的趋势^[6]。所以纤维素和半纤维素的处理也是生物法处理城市垃圾的关键环节之一^[7]。筛选出同时具备分解纤维素和快速除臭能力的菌株对于采用生物法处理城市垃圾尤为重要。本研究通过筛选出具有产纤维素酶能力的快速除臭菌株,以期为提高生物法处理城市垃圾效率、微生态除臭提供更多的微生物菌种资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 供试菌株为贵州大学生命科学学院微生物实验室保存的 16 株具有快速发酵及一定除臭功能的菌株(分别编号为 G1、G2、G3、G4、G5、X1、X2、X3、X4、X5、X6、F1、F2、F3、Y1、Y2)。

1.1.2 试剂 DNS 试剂^[8]、0.05 mol/L 甘氨酸-氢氧化钠

缓冲液(pH 值 8.5)、甘氨酸-氢氧化钠缓冲液配制的 1% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液、甘氨酸-氢氧化钠缓冲液配制的 1% 水杨苷溶液、蒸馏水。

1.1.3 培养基 (1)滤纸崩解培养基:0.5 g MgSO₄, 2 g KH₂PO₄, 0.5 g KCl, 0.001 g FeSO₄·7H₂O, 10 g 酵母膏, 1 g 蛋白胨, 1 000 mL 蒸馏水, 自然 pH 值。(2)发酵产酶培养基: 10 g CMC-Na, 0.5 g MgSO₄, 2 g K₂HPO₄, 0.5 g KCl, 0.01 g FeSO₄·7H₂O, 5 g 酵母膏, 0.5 g 蛋白胨, 1 000 mL 蒸馏水, pH 值为 7.2~7.4。(3)菌种活化培养基: 10 g 胰蛋白胨, 5 g 酵母提取物, 10 g NaCl, 16 g 琼脂粉, 1 000 mL 蒸馏水, pH 值为 7.2。

1.1.4 主要设备与仪器 S1000 PCR 扩增仪, 美国伯乐 BIO-RAD 公司生产; DYY-11 型电泳仪, 北京市六一仪器厂生产; Gel Doc XR+凝胶成像系统, 美国伯乐 BIO-RAD 公司生产; TH2-82A 数显气浴恒温振荡器, 常州普天仪器有限公司; Olympus 生物显微镜, 奥林巴斯株式会社。

1.2 方法

1.2.1 种子液的制作 将供试菌株转接到用 250 mL 三角瓶装的 100 mL 液体菌种活化培养基中, 于 37℃、170 r/min 培养 24 h, 制成种子液。

1.2.2 滤纸崩解试验 将活化后的供试菌株接种到用 250 mL 三角瓶装的 150 mL 滤纸崩解培养基中, 再加入 1 条 1.5 cm×8.0 cm 灭菌过后的 Whatman No. 1 滤纸条, 同时设立不接任何菌株的空白对照 CK, 在 37℃、160 r/min 下培养; 间隔 72 h 后, 观察滤纸片的崩解情况, 并选出滤纸崩解效果明显的菌株, 测定其滤纸酶、内切葡聚糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶的酶活。

1.2.3 粗酶液的提取 将滤纸崩解效果明显的菌株从试管斜面转接至发酵产酶培养基中, 于 37℃、170 r/min 培养 48 h, 再于 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 即为粗酶液。

1.2.4 滤纸酶活的测定^[9] 在试管中放入 1 cm×6 cm 的 Whatman NO. 1 滤纸(约 50 mg)1 条, 加入 0.5 mL 适当稀释的纤维素酶粗酶液以及 1 mL 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液, 45℃ 温浴 60 min 后, 立即加入 3 mL DNS 试剂终止反应, 沸水浴 5 min 后迅速冷却至室温, 加蒸馏水定容至 25 mL, 在 540 nm 扣除空白测吸光度, 根据葡萄糖标准曲线换算成

收稿日期:2014-01-13

作者简介:廖瀚峰(1989—),男,广西桂林人,硕士研究生,从事微生物菌剂研究。E-mail:5851122lh@163.com。

通信作者:周礼红,博士,副教授,从事微生物研究。E-mail: Lhzhou33@126.com。

IU/mL。空白管的粗酶液先用沸水水浴 10 min,加入 DNS 试剂后加入粗酶液,其余操作和样品管一样。1 个滤纸酶活力单位定义为:以滤纸为底物,在 45 °C 恒温的条件下,水解反应中 1 min 催化底物水解形成 1 μmol 葡萄糖的酶量。

1.2.5 内切葡聚糖苷酶的测定 在试管中加入 0.5 mL 适当稀释的纤维素酶粗酶液和 2 mL 1% CMC - Na 溶液作为底物,45 °C 温浴 30 min 后,立即加入 3 mL 的 DNS 试剂终止反应,沸水浴 5 min 后迅速冷却至室温,加蒸馏水定容至 25 mL,冷却后在 540 nm 扣除空白测吸光度,根据葡萄糖标准曲线换算成 IU/mL。空白管的粗酶液先用沸水水浴 10 min,加入 DNS 试剂后加入粗酶液,其余操作和样品管一样。1 个内切葡聚糖苷酶活力单位定义为:以 1% CMC - Na 为底物,在 45 °C 恒温的条件下,水解反应中 1 min 催化底物水解形成 1 μmol 葡萄糖的酶量。

1.2.6 β -葡萄糖苷酶的测定 在试管中加入 0.5 mL 适当稀释的纤维素酶粗酶液和 2 mL 1% 水杨苷溶液作为底物,45 °C 温浴 60 min 后,立即加入 3 mL 的 DNS 试剂终止反应,沸水浴 5 min 后迅速冷却至室温,加蒸馏水定容至 25 mL,冷却后在 540 nm 扣除空白测吸光度,根据葡萄糖标准曲线换算成 IU/mL。空白管的粗酶液先用沸水水浴 10 min,加入 DNS 试剂后加入粗酶液,其余操作和样品管一样。1 个 β -葡萄糖苷酶活力单位定义为:以 1% 水杨苷为底物,在 45 °C 恒温的条件下,水解反应中 1 min 催化底物水解形成 1 μmol 葡萄糖的酶量。

1.2.7 16S rDNA 序列分析 采用生工生物工程(上海)股份有限公司 Ezup 柱式基因组 DNA 抽提试剂盒(细菌)提取。

PCR 反应体系(25 μL):12.5 μL Dream Taq™ Green PCR Master Mix(2 \times);1 μL 16S 上游通用引物 27F;1 μL 16S 下游通用引物 1492R;9.5 μL ddH₂O;1 μL 模板 DNA。

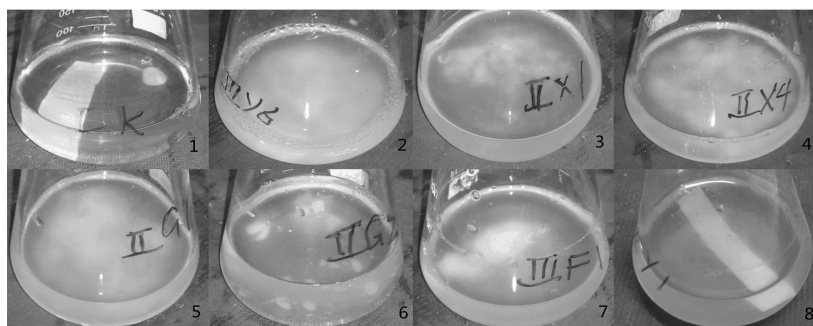
上游通用引物 27F 序列为 5' - AGAGTTTGATCCTGGCT-CAG - 3';下游通用引物 1492R 序列为 5' - GGTACCTTGT-TACGACTT - 3'。PCR 反应条件为:94 °C,4 min;94 °C 预变性 30 s,54 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1.5 min,30 个循环;72 °C 终延伸 10 min,4 °C 停止。

PCR 产物由生工生物工程上海股份有限公司使用 Applied Biosystems 3730XL 测序仪进行测序。将所得序列通过 NCBI 的 BLAST 功能进行序列比对分析。利用 MEGA 5.0 软件制作系统进化树。

2 结果与分析

2.1 初筛试验结果

通过滤纸崩解试验,从供试菌中筛选具有产纤维素酶能力的菌株。将 16 株供试菌接入有无菌滤纸条的滤纸崩解培养基后 72 h 观察结果。空白组滤纸条保持完整,边缘没有崩解情况。菌株 F1 对滤纸条产生一定程度的崩解效果,滤纸发生断截并且边缘呈絮状,但总体保持完整。菌株 Y6、X1、X4、G1 均对滤纸产生明显的崩解效果,培养基浑浊且底部有部分絮状物,推测是滤纸条完全崩解后产生的沉淀物。菌株 G2 对滤纸条表现出较为彻底的崩解效果,培养基相对于其他菌株较为澄清,底部只有少量絮状残留物。Y1 等其余 10 株供试菌株没有明显的滤纸崩解现象(图 1)。



1: 空白对照; 2: Y6; 3: X1; 4: X4; 5: G1; 6: G2; 7: F1; 8: Y1

图1 滤纸崩解试验

2.2 复筛试验

将滤纸崩解作用明显的 6 个菌株用液体产酶培养基发酵 2 d 后测定其滤纸酶、内切葡聚糖苷酶和 β -葡萄糖苷酶的酶活。根据滤纸崩解和酶活力测定结果筛选出具有较高纤维素酶活力的菌株。在 45 °C、pH 值 8.5 条件下,G2 的滤纸酶活性和内切葡聚糖苷酶活性最高,分别为 1.737、3.179 IU/mL,比其他菌株至少分别高出 50.01%、29.02%。滤纸酶活性最低的是 F1 菌株,为 0.616 IU/mL,同时其 β -葡萄糖苷酶活性只有 0.394 IU/mL,这可能是在滤纸崩解试验中该菌株对滤纸条的分解利用不如其他 5 个菌株的原因(图 2)。关于纤维素酶水解天然纤维素的机制,目前普遍认为是由纤维素酶 3 种组分协同作用的结果。内切葡聚糖苷酶负责进攻纤维素的非结晶区,随机水解 β -1,4-糖苷键,将长链纤维素分子截短,产生大量带还原性末端或非还原性末端的小分子纤维素,

外切葡聚糖苷酶从纤维素线状分子的末端水解切下纤维二糖单位, β -葡萄糖苷酶最后将纤维二糖水解开成葡萄糖^[10]。虽然菌株 G1 内切葡聚糖苷酶活性较低(0.628 IU/mL),生成小分子纤维素效率较慢,但是高活性的 β -葡萄糖苷酶(1.441 IU/mL)可以快速将由外切葡聚糖苷酶水解产生的纤维二糖水解开成葡萄糖,故 G1 的滤纸酶活性依然可以保持在较高的水平。

结合滤纸崩解试验和酶活力测定试验,认为 G2 是有相对较高纤维素酶活力的菌株,其滤纸酶、内切葡聚糖苷酶和 β -葡萄糖苷酶的酶活分别为 1.737、3.179、1.232 IU/mL。

2.3 高纤维素酶活力菌株 G2 的鉴定

菌株 G2 的显微形态:菌体呈短杆状,大小为(0.5 ~ 0.8 μm) \times (1.5 ~ 3.0 μm),染色均匀,具运动性,兼性厌氧,可形成内生芽孢,芽孢囊膨大,呈椭圆形,芽孢着生点在菌体

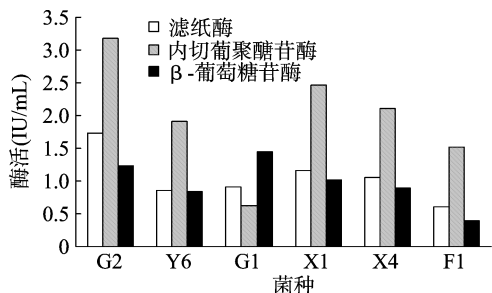


图2 菌株G2、Y6、G1、X1、X4、F1的滤纸酶、内切葡聚糖苷酶和 β -葡萄糖苷酶活性

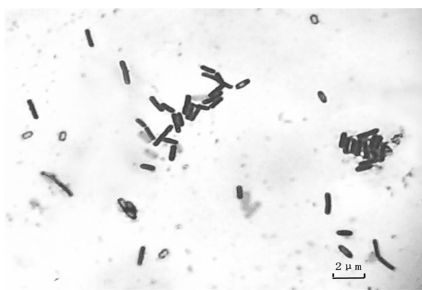


图3 菌株G2显微形态

中心,游离芽孢表面着色弱,革兰氏染色阳性(图3)。菌株G2在LB培养基上呈白色不透明菌落,表面粗糙,菌落边缘不规则,在多种培养基上均不产色素。

以菌株G2的全基因组DNA为模板,PCR扩增后经1%琼脂糖凝胶电泳检测,得到1条约1.5 kb的特异性条带,经序列测定,长度为1 452 bp。将其与GenBank中报道菌株的

16S rDNA序列进行相似性分析表明,亲缘关系相近的前20个序列都为芽孢杆菌属(*Bacillus*)的菌株,同源性均超过98%。运用MEGA5.0软件中的邻接法计算菌株G2的16S rDNA序列与同源性99%以上序列的进化关系,以地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)作外群,经1 000次bootstrap验证,获得系统进化树(图4)。

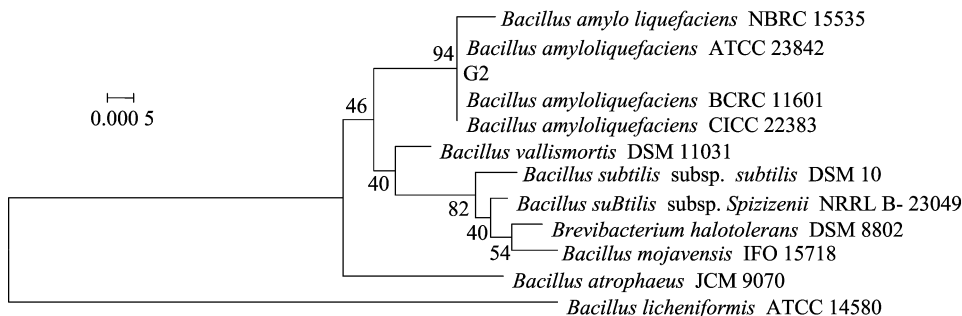


图4 菌株G2基于16S rDNA的邻接法系统发育树

结合形态学与16S rDNA分子鉴定结果,初步确定G2为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。

3 结论

国际上常用的除臭方法一般有化学法、物理法和生物法。生物除臭法中主要的作用因素是具有除臭功能的微生物,筛选高效除臭菌不仅可以提高恶臭物质的消化和降解速率,抑制恶臭菌的生长,同时也能够有效分解垃圾中难降解的大分子有机物。国内对垃圾微生物除臭已有相关研究,如王光玉等利用微生物加速降解条件的初步研究^[10];汪英学等筛选可以降低垃圾填埋场氨气和硫化氢气体的微生物^[11];叶劲松等研究了垃圾中纤维素含量与纤维素降解菌之间的变化规律^[12]。但是目前尚未筛选出同时具有除臭和产纤维素酶能力菌株的相关报道。本研究从贵州大学生命科学学院微生物实验室提供的具有快速发酵和除臭功能的菌株中,通过滤纸崩解试验筛选到6株具有一定产纤维素酶能力的菌株。通过在45℃、pH值8.5条件下测得各菌株的滤纸酶、内切葡聚糖苷酶和 β -葡萄糖苷酶的酶活,挑选出纤维素酶活性最好的菌株G2。通过形态学和菌株16S rDNA扩增与分析,初步确定G2是解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)。本试验筛选出同时具有除臭及产纤维素酶能力的菌株,对有效利用分解城市垃圾中的纤维素和半纤维素、缩短垃圾发酵时间、增加垃圾发酵效率,以及为微生物除臭菌剂的制备提供菌种资源。

参考文献:

- [1] 石磊,边炳鑫,赵由才,等. 城市生活垃圾卫生填埋场恶臭的防治技术进展[J]. 环境污染治理技术与设备,2005,6(2):6-9.
- [2] 刘景岳,刘晶昊,徐文龙. 我国垃圾卫生填埋技术的发展历程与展望[J]. 环境卫生工程,2007,15(4):58-61.
- [3] 吴希文,李秀荣,黄国强,等. 恶臭污染影响评价概述[J]. 环境科学动态,2002(2):21-23.
- [4] Rotton J, White S M. Air pollution, the sick building syndrome, and social behavior[J]. Environment International, 1996, 22(1): 53-60.
- [5] 杨朝晖,曾光明,蒋晓云,等. 城市垃圾堆肥过程中的生物学问题研究[J]. 微生物学杂志,2005,25(3):57-61.
- [6] 陈坚. 环境生物技术[M]. 北京:中国轻工业出版社,1999:244-245.
- [7] EL-Masry H G. Utilization of Egyptian rice straw in production of cellulases and microbial protein[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1983, 34: 725-732.
- [8] QB 2583—2003 纤维素酶制剂[S].
- [9] Ghose T K. Measurement of cellulase activities[J]. Pure and Applied Chemistry, 1987, 59(2): 257-268.
- [10] 王光玉,陈雷,宣世伟,等. 生活垃圾好氧堆肥微生物接种的初步研究[J]. 环境科学与技术,2005,28(2):20-21.
- [11] 汪英学,赵述森,吴定心,等. 新型复合微生物制剂对垃圾填埋场的除臭效果[J]. 湖北农业科学,2012,51(1):35-38.
- [12] 叶劲松,吴克,蔡敬民,等. 生物垃圾好氧处理中的纤维素降解菌生长规律研究[J]. 生物技术,2007,17(2):69-72.