

杜东霞,汪彬. 1株大分子有机物降解菌的分离、鉴定及酶学分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(5):268-270.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.05.070

1株大分子有机物降解菌的分离、鉴定及酶学分析

杜东霞,汪彬

(湖南省微生物研究院,湖南长沙 410009)

摘要:通过平板培养法从高温堆肥中分离筛选出1株高温高效大分子有机物降解菌W-10。W-10具有同时分解纤维素、蛋白质和淀粉等大分子有机物的能力。该菌株的生长特性表明,在pH值为5.0、温度为50℃时,羧甲基纤维素酶(CMCase)、蛋白酶、 α -淀粉酶的酶活性达到最高值,分别为144.75、97.51、83.85 U/mL。将测得的16S rDNA基因序列在NCBI数据库中进行同源性比对,综合形态特征和16S rDNA基因序列同源性分析,将该菌株初步鉴定为芽孢杆菌属。

关键词:高温堆肥;大分子有机物;芽孢杆菌属;W-10

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)05-0268-03

我国是农业大国,年产各类秸秆约8.0亿t,占世界秸秆总量的1/5左右。这些秸秆除了一部分用于饲料、造纸、纺织和燃料加工外,其余均作为农业废弃物丢弃或就地焚烧,不仅浪费了宝贵的资源,同时也污染了生存环境^[1-2]。

通过高温堆肥降解农业废弃物是资源化利用的良好途径之一。高温堆肥是一种利用各种微生物高温高效降解有机废弃物,并产生稳定的最终产物的过程。高温堆肥可有效促进纤维素废弃物的资源化利用,并降低农业废弃物对环境的污染。在堆肥发酵过程中,为缩短发酵周期及提高堆肥质量,以人为方式添加一些高温微生物,高温微生物产生的热稳定酶可将基质中的纤维素及木质素分解,并产生大量的能量和热量,不仅可以使农业废弃物转化为有机肥,而且可以有效抑制堆肥中有害病原菌的孳生。在堆肥基质中,除了纤维素外,还有其他蛋白质及糖类的存在,应深入研究并充分利用高温微生物对纤维素、蛋白质及糖类等大分子有机物的降解作用,加速农业废弃物转化为有机肥。因此,开展堆肥高温微生物的

研究具有重要的意义^[3-5]。

本研究从堆肥中筛选出能够高效降解纤维素、蛋白质和淀粉的高温菌株,并对其酶活性进行测定,目的在于为高效降解大分子有机物菌株的选育和相关酶制剂开发提供菌种资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 样品采集 猪粪、城市生活垃圾及秸秆自然堆肥,堆体温度上升到55℃时,采集中层样品于无菌器皿中,4℃保存备用。

1.1.2 培养基 (1)分离初筛培养基:牛肉膏蛋白胨培养基:牛肉膏5.0 g/L,蛋白胨10.0 g/L,NaCl 5.0 g/L,水1.0 L, pH值为7.2~7.4。

(2)大分子有机物降解复筛培养基. 羧甲基纤维素钠培养基(CMC-Na培养基):CMC-Na 15 g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0 g/L、 KH_2PO_4 0.5 g/L、 K_2HPO_4 2.0 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L、NaCl 6.0 g/L、 CaCl_2 0.1 g/L,固体培养基加1.5%琼脂,加蒸馏水补至1 L、pH值为7.0~7.5,压力为1.05 kg/cm²、灭菌25 min。

(3)刚果红纤维素鉴定培养基。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2%、 KH_2PO_4 0.1%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、NaCl 0.05%、CMC-Na 2%、刚果红0.02%、琼脂2%、pH值自然。

收稿日期:2016-06-15

基金项目:湖南省自然科学基金(编号:13JJ2035);湖南省“一化四体系”专项资金。

作者简介:杜东霞(1980—),女,山东菏泽人,硕士,助理研究员,主要从事农牧废弃物资源化利用等方面的研究。E-mail: xiaoping310@126.com。

[14]黄耀,孙文娟. 土壤学——近20年来中国大陆农田表土有机碳含量的变化趋势[J]. 科学通报,2006,51(7):1.

[15]Gunapala N, Scow K M. Dynamics of soil microbial biomass and activity in conventional and organic farming systems[J]. Soil Biology & Biochemistry, 1998, 30(6): 805-816.

[16]张奇春,王雪芹,时亚南,等. 不同施肥处理对长期不施肥区稻田土壤微生物生态特性的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2010, 16(1): 118-123.

[17]田小明,李俊华,王成,等. 连续3年施用生物有机肥对土壤养分、微生物生物量及酶活性的影响[J]. 土壤, 2014, 46(3): 481-488.

[18]Kanchikerimath M, Singh D. Soil organic matter and biological

properties after 26 years of maize-wheat-cowpea cropping as affected by manure and fertilization in a Cambisol in semiarid region of India[J]. Agriculture Ecosystems & Environment, 2001, 86(2): 155-162.

[19]汤宏,沈健林,张杨珠,等. 秸秆还田与水分管理对稻田土壤微生物量碳、氮及溶解性有机碳、氮的影响[J]. 水土保持学报, 2013, 27(1): 240-246.

[20]张瑞福,颜春荣,张楠,等. 微生物肥料研究及其在耕地质量提升中的应用前景[J]. 中国农业科技导报, 2013, 15(5): 8-16.

[21]丁雷,李俊华,赵思峰,等. 生物有机肥和拮抗菌对土壤有效养分和土壤酶活性的影响[J]. 新疆农业科学, 2011, 48(3): 504-510.

1.1.3 主要仪器试剂 DNA Marker[宝生物工程(大连)有限公司];Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司];*Taq* 聚合酶[宝生物工程(大连)有限公司];PCR 仪(Mastercyclerpro)(Eppendorf 公司);Gel Doc XR 凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种筛选 (1)菌种的分离与初筛。采取样品经剪碎、研细后,称取 1 g 放入装有 99 mL 无菌生理盐水的三角瓶中,180 r/min 振荡 30 min,静置;用移液管吸取 1 mL 上清液于含有 9 mL 无菌生理盐水的试管中,振荡均匀后,梯度稀释到 $10^{-3} \sim 10^{-7}$,吸取 0.3 mL 后 3 个稀释度的试样涂布于羧甲基纤维素钠平板培养基上,在 50 °C 条件下可生长的菌落即具有纤维素分解酶能力,再从中挑选出菌落进行进一步划线分离。

(2)菌种的复筛。将具有纤维素分解酶能力的菌株涂布于刚果红初筛培养基上,经 72 h 培养,分别测定水解圈直径(D)和菌落直径(d),并计算 D/d 值(即 HC 值)。挑取生长速度快且 HC 值大的菌株,再将 HC 值大的菌株接种于液体发酵培养基中,30 °C、120 r/min 振荡培养 72 h,3 000 r/min 离心 10 min,收集上清液即粗酶液,测 CMC 酶活性,选出 CMC 酶活性高产菌株,作为复筛菌株。

1.2.2 酶活的测定方法 羧甲基纤维素酶(CMC 酶,简称 CMCase)活性的测定:参照文献[6]略作改进,1 mL 用 0.1 mol/L pH 值为 4.8 的柠檬酸缓冲液配制的质量分数为 1% 的 CMC-Na 溶液,加入 0.5 mL 适当稀释的酶液,于 50 °C 反应 30 min 后,加入 1.5 mL 二硝基水杨酸(DNS)试剂终止反应,沸水浴中煮沸 5 min,稀释定容至 25 mL,在 530 nm 下测定吸光度,按 DNS 法测定糖浓度。1 个酶活性单位(IU)定义为 1 min 催化底物水解生成 1 μ g 葡萄糖所需的酶量。以 100 °C 水浴中灭活 10 min 的粗酶液为空白对照。

微晶纤维素酶活性测定:吸取 1.0 mL 10 g/L 微晶纤维素悬浮液(称取 1.000 g 微晶纤维素,加 0.05 mol/L pH 值为 4.8 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液溶解,稀释定容至 100 mL)和 0.5 mL 适当稀释的酶液,50 °C 保温 1 h,离心后,取 1.0 mL 上清液用 DNS 法测定还原糖生成量^[7]。

β -葡萄糖苷酶活性测定:取 0.1 mL 适当稀释的酶液,加入到 1 mL 1% 水杨酸溶液中(以 0.05 mol/L pH 值为 5.0 柠檬酸缓冲液配制),50 °C 恒温水浴中酶解 30 min,DNS 法测定还原糖浓度^[8]。

α -淀粉酶活性测定:吸取 1 mL 10 g/L 可溶性淀粉(称取 1.000 g 淀粉溶于 100 mL 0.1 mol/L pH 值为 5.6 柠檬酸缓冲液中),0.5 mL 酶液,DNS 法测定麦芽糖生成量。酶活性定义为 1 g 干曲 1 min 内转化底物生成的麦芽糖毫克数,即 mg/(g·min)^[7]。

蛋白质酶活性测定:采用 Folin-酚法^[9-10]测定蛋白酶的活性。酶活定义:1 mL 酶液在一定 pH 值和温度下,1 min 水解酪蛋白产生 1 μ g 酪氨酸的酶量为 1 个酶活性单位(U/mL)。

1.2.3 菌种鉴定 形态鉴定:将纯化的细菌划线接种于牛肉膏-蛋白胨培养基上,50 °C 培养 72 h,观察菌落形态、大小、颜色、表面及边缘等特征。采用革兰氏染色和芽孢染色,并在光学显微镜下观察细胞形状、芽孢及着生特点。

分子鉴定:提取 DNA 后,对 16S rDNA 目的片段进行 PCR 扩增^[11]。引物序列:F,5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3';R,5' - GGTACCTTGTTCAGACTT - 3'。

PCR 反应体系(50 μ L):去离子水 39 μ L,PCR buffer 5 μ L,dNTP 2 μ L,上、下游引物各 1 μ L,模板 DNA 1 μ L,*Taq* DNA 聚合酶 1 μ L。PCR 反应条件:94 °C 5 min;94 °C 30 s,56 °C 30 s,72 °C 90 s,30 个循环;72 °C 10 min。PCR 产物由生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列测定。序列输入 GenBank 数据库中比对,选择同源性高的序列使用 MEGA 5.2 软件邻接法构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 W-10 的分离和初步鉴定

试验分离得到大量具有较好纤维素分解能力的细菌、真菌和放线菌类菌株,其中 W-10 为 1 株生长较快且具有较高纤维素分解能力的细菌菌株。将接种有 W-10 的复筛平板培养基培养 72 h 后,用 0.1% 刚果红水溶液浸染 15 min,再用 1 mol/L NaCl 水溶液脱色,刚果红可将未被降解的 CMC 染成红色,而接种有 W-10 菌落处形成了透明的水解圈(图 1),初步表明 W-10 具有较好的纤维素分解能力。



图1 刚果红染色后呈现酶水解纤维透明圈

2.2 W-10 的 CMCase 活性分析

将 W-10 菌株接种到以 CMC-Na 为唯一碳源的限制性液体培养基上,在 50 °C、不同 pH 值(pH 值分别为 4、5、6、7、8、9、10)条件下培养 72 h,按照 DNS 法测定菌株的羧甲基纤维素酶活性。图 2 结果表明,W-10 菌株的羧甲基纤维素酶活性的 pH 值适应范围较宽,在 pH 值为 5 时达到最高值 144.75 U/mL,并在 pH 值为 5~8 范围内均保持较高水平。

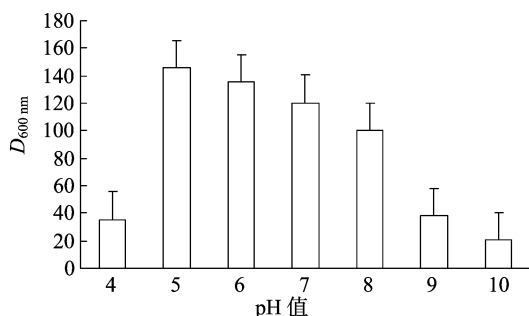


图2 不同 pH 值对 W-10 CMCase 活性的影响

2.3 纤维素分解酶活性分析

将菌株 W-10 接种于羧甲基纤维素钠液态培养基上,50 °C 培养 72 h,取其粗酶液测定菌株的 CMCase、微晶纤维素酶、 β -葡萄糖苷酶的酶活性。结果表明,在 50 °C 时,菌株 W-10 的 CMCase、微晶纤维素酶、 β -葡萄糖苷酶 3 种酶活性

均较高,分别为(144.75 ± 0.12)、(94.11 ± 0.15)、(80.55 ± 0.08) U/mL。

2.4 蛋白质降解酶和 α-淀粉降解酶活性分析

在堆肥基质中,除了纤维素外,还有其他的糖类及蛋白质存在,因此,研究该菌株对多种大分子有机物的降解能力具有重要意义。将所选定的 W-10 菌株于 50 ℃ 培养 72 h 后,将其粗酶液进行纤维素酶、蛋白酶、α-淀粉酶活性的研究。

由图 3 可知,50 ℃ 培养 72 h 后,W-10 菌株纤维素酶、蛋白酶、α-淀粉酶的酶活性分别达到 144.75、97.51、83.85 U/mL,其中以纤维素降解酶的活性最高。

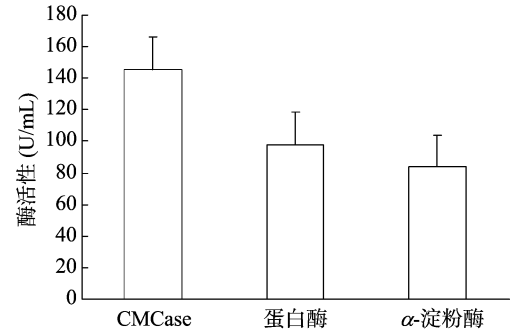


图3 菌株 W-10 纤维素酶、蛋白酶及 α-淀粉酶活性分析

2.5 菌种鉴定及系统发育分析

2.5.1 菌株的形态鉴定

2.5.1.1 菌株的菌落与形态特征 将菌株 W-10 接种于牛肉膏蛋白胨培养基上培养后,该菌菌落呈圆形、白色、表面粗糙褶皱、边缘不整齐。油镜下观察,菌体呈短杆状、末端钝圆、有芽孢、呈椭圆状,位于菌体中央或稍偏,革兰氏染色阳性。

2.5.1.2 菌株的生理生化特征 菌株 W-10 的生理生化特征见表 1。

表 1 菌株 W-10 的生理生化特性

特征	利用情况	特征	利用情况
甲基红试验	+	葡萄糖	+
伏-谱试验	+	木糖	-
淀粉水解试验	+	阿拉伯糖	-
硫化氢试验	-	卵磷脂酶	-
吲哚试验	+	7% 氯化钠生长试验	+
过氧化氢酶试验	+	硝酸还原试验	+

注:“+”表示试验检测呈阳性;“-”表示试验检测呈阴性。

2.5.1.3 菌株的 16S rDNA 序列分析 如图 4 所示,W-10 菌株与枯草芽孢杆菌相似性最高,结合 W-10 菌株的菌落形态特征和生理生化特性,初步确定该菌株为枯草芽孢杆菌。

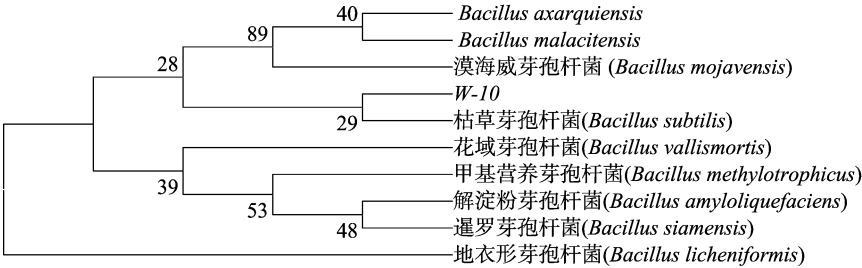


图4 菌株 W-10 的 16S rDNA 序列系统发育树

3 结论与讨论

高温堆肥是利用不同微生物间的协同作用,将复杂的大分子有机物降解为细胞可以吸收利用的小分子物质,并释放出 CO₂、能量和热量的过程。在高温堆肥过程中,高温高效纤维素降解菌株对堆肥物料的分解起着至关重要的作用。本研究采用纤维素刚果红平板透明圈筛选法,从高温堆肥物料中分离、纯化、筛选出 1 株高温菌 W-10,该菌株具有同时分解淀粉、蛋白质和纤维素等大分子有机物的能力。在 pH 值为 5.0 和温度为 50 ℃ 时,羧甲基纤维素酶、蛋白酶和 α-淀粉酶的酶活性达到最高值,分别为 144.75、97.51、83.85 U/mL,并且具有很好的热稳定性。将测得的 16S rDNA 基因序列在 NCBI 数据库中进行同源性比对,综合形态特征和 16S rDNA 基因序列同源性分析,将该菌株初步鉴定为枯草芽孢杆菌。该菌株繁殖能力强、作用温度范围广、热稳定性好、作用底物广泛,有利于工业化生产,又是自然界中广泛存在的非致病细菌,对人畜无害,不污染环境,所以高效高温菌 W-10 具有良好的研究和应用前景。

参考文献:

[1] 顿宝庆,吴 薇,王旭静,等. 一株高纤维素酶活力纤维素分解菌

的分离与鉴定[J]. 中国农业科技导报,2008,10(1):113-117.
[2] 白春艳,魏如腾,侯红萍. 多菌混合发酵产纤维素酶及生物法预处理秸秆的研究[J]. 中国酿造,2016,35(1):57-61.
[3] 薛桥丽,王 炜,胡永金,等. 堆肥中高温纤维素酶菌株的筛选及其酶性质研究[J]. 中国酿造,2012,31(1):30-33.
[4] 李国学,张福锁. 固体废物堆肥化与有机复合肥生产[M]. 北京:化学工业出版社,2000.
[5] Tuomela M, Vikman M, Halakka A, et al. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review[J]. Bioresource Technology, 2000, 72(2):169-183.
[6] 石文卿,陶能国,刘跃进,等. 一株高产纤维素酶真菌的分离及产酶特性研究[J]. 环境工程学报,2011,5(6):1435-1440.
[7] 司美茹,薛泉宏,蔡 艳. 混合发酵对纤维素酶和淀粉酶活性的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2002,30(5):69-73.
[8] 武秀琴. 康宁木霉 TZ-1 产酶条件的研究[J]. 食品与发酵科技,2009,45(148):44-46.
[9] 吴国峰. 工业发酵分析[M]. 北京:化学工业出版社,2006.
[10] 王朋朋,常 娟,王 平. 蛋白酶和淀粉酶产生菌的筛选及酶学性质分析研究[J]. 动物生产,2009,45(21):48-51.
[11] 别小妹,陆兆新,房耀维,等. 利用 16S rDNA 序列分析鉴定一株产抗菌物质的微生物菌株[J]. 食品科学,2006,27(11):466-470.