

兼性厌氧纤维素菌的分离与系统发育分析*

蒋 芳¹ 赵 婷¹ 刘成君^{1**} 卢 涛² 张和民³

(生物资源与生态环境教育部重点实验室四川大学生命科学学院 成都 610064)¹

(四川大学化学工程学院 成都 610065)² (中国保护大熊猫研究中心 卧龙 623006)³

摘要: 从四川卧龙中国保护大熊猫研究中心提供的野外放归大熊猫“祥祥”的粪样中, 分离到一株产纤维素酶的兼性厌氧菌株。该菌株经初步生理生化鉴定为肠杆菌科沙雷氏菌(*Serratia*), 命名为 *Serratia* JF-1116。用 PCR 技术扩增了该菌的 16S rDNA 全序列, 并对其进行了克隆和测序, 对该序列在 GenBank 中的 BLAST 结果表明, 所有与该序列高度同源的序列均为肠杆菌科的 16S rDNA 基因序列, 选取同源性高的菌株的 16S rDNA 基因序列进行系统发育分析, 菌株与 3 株 *Serratia* 聚类在一起。

关键词: 纤维素酶, 筛选, 16S rDNA, 系统发育

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 03-0109-05

The Isolation and Phylogenetic Analysis of Facultative Anaerobic Cellulase-producing Strain*

JIANG Fang¹ ZHAO Ting¹ LIU Cheng-Jun^{1**} LU Tao² ZHANG He-Min³

(Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment Ministry of Education, College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064)¹

(College of Chemical Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065)²

(China Research and Conservation Center for the Giant Panda, Wolong 623006)³

Abstract: A bacillus strain was isolated from the dejecta of the Giant Panda “Xiangxiang” returned to wild, afforded by China Giant Panda Protection and Research Center, Wolong Sichuan. By primary research, the strain was identified as *Serratia* and called as *Serratia* JF-1116. The 16S rDNA gene of the bacteria strain, was amplified, cloned and sequenced. BLAST of the sequence in GenBank indicated that the species with close similarity to JF-1116 were from genus *Enterobacter* only. The phylogenetic tree was produced from 16S rDNA of JF-1116 and other 18 *Enterobacter* species with the high similarity. JF-1116 was clustered with 3 strains of *Serratia*.

Key words: Cellulase, Screening, 16S rDNA, Phylogenesis

从 70 年代以来, 随着矿物能源的日趋枯竭和环境污染越来越严重, 纤维素酶的研究重点已转移到利用纤维素酶来开辟新能源和防止纤维素底物的污染方面。一些生活污物, 常含一定量的纤维素, 利用微生物所产生的纤维素酶来将它分解转化, 解决环境污染问题已成为目前研究的重点。另外, 纤维素酶在改善动物饲料营养成分、食品加工等方面的应用也具有一定的研究价值。

自然界中能够降解和利用纤维素的微生物种类很多, 过去对纤维素酶的研究多为霉菌, 对细菌因酶活较小研究得较少。但霉菌为好气性微生物, 污物的纤维素类分解、饲料发酵等大都是在缺氧环境或少氧环境中进行。本文实验样品来自野外放归大熊猫的粪样, 由于大熊猫的主要食物竹子是一种粗纤维量很高的粗饲料, 从而有利于选择

* 四川省科技厅应用基础研究基金项目 (No. 03JY029-067-2)

** 通讯作者 Tel: 028-85470039, E-mail: liucj66@vip.sina.com

收稿日期: 2005-08-27, 修回日期: 2005-11-18

出生活力旺盛,产纤维素酶活高的兼性厌氧细菌,故而在此方面的应用上更具有现实意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:亚成体大熊猫“祥祥”由四川卧龙中国保护大熊猫研究中心饲养,2003 年 7 月 8 日放归野外放养场。

1.1.2 采样:粪样采集从 2003 年 7 月 8 日开始,在 2003 年 7 月~2004 年 6 月期间,每月采样 1 次,共 12 次,采集大熊猫新鲜粪便 1g,即刻放入装有 10mL 运送培养基的转运管内。

1.1.3 转运管的制备(自制):用竹签和脱脂棉制成棉拭子(棉拭子润湿后挤干再润湿后,挤出水量为 0.4~0.5mL)后,将适当长度的棉拭子固定于丁基橡皮塞内,然后手持橡皮塞,将棉拭子插入培养基管内,并将丁基橡皮塞轻轻盖好。经 1×10^5 Pa, 15min 高压灭菌后,马上将丁基橡皮塞盖紧。

1.1.4 培养基:运送培养基为 LB 培养基。筛选培养基 A (1,000mL) 羧甲基纤维素钠(CMC-Na) 1.88g,明胶 2.00g,刚果红 0.20g, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25g,琼脂粉 18g^[1]。筛选培养基 B (1,000mL) 微晶纤维素粉 1.88g,明胶 2.00g,刚果红 0.20g, KH_2PO_4 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25g,琼脂粉 18g^[1,2]。

1.1.5 菌种鉴定培养基:参见《常见细菌系统鉴定手册》^[3]。

1.2 方法

1.2.1 菌种初筛:吸取 0.1mL 粪样稀释液,制成 10^{-1} ~ 10^{-7} 各种稀释度的粪样溶液在超净台上选取 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} 3 个浓度分别涂布在筛选培养基 A 上,28℃ 下培养 2d,然后用无菌牙签把在筛选培养基 A 上长出的细菌菌落转接到筛选培养基 B 上,于 28℃ 下培养 2d。挑选透明圈直径较大的菌落在筛选平板 B 上划线分离至纯种,斜面保藏。

1.2.2 菌种复筛:将初筛菌种活化后接种于发酵培养基中,在 28℃、180r/min 下进行产酶实验,筛选出酶活高的菌株做进一步的研究^[4]。

1.2.3 菌种鉴定方法:参照《伯杰氏细菌系统分类手册》^[5](第八版)和《常见细菌系统鉴定手册》^[3]等文献中的方法进行。

1.2.4 菌体形态鉴定:参照《微生物学实验手册》^[6]制备扫描电镜样品,培养 18h 对数生长期的菌株,涂片、镜检、2.5% 戊二醛固定、乙醇梯度洗涤、临界点干燥、喷镀白金、扫描电镜下观察及照相。

1.2.5 厌氧培养方法^[7]:采用黄磷燃烧法,深层半固体培养基法,黄磷燃烧法用美蓝或燃着的酒精棉球在玻璃缸内作实验。

1.2.6 基因组总 DNA 的提取:参考《精编分子生物学实验指南》^[8]提取细菌总 DNA。

1.2.7 16S rDNA 的 PCR 扩增:根据文献[9]的报道,挑选一对 16S rDNA 的通用引物进行 PCR 扩增,其序列如下:引物 F8/20: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',引物 R1541/20: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'。PCR 扩增条件:94℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 1min, 55℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 2min, 25μL 反应体系 35 个循环后再 72℃ 延伸 10min。扩增产物通过胶回收纯化。

1.2.8 纯化产物的 TA 克隆和序列测定:参照文献[9]进行阳性克隆的筛选与鉴定。将阳性克隆菌株送于上海英骏生物技术有限公司测序,测序引物为 T7 和 SP6。

1.2.9 系统发育树的构建^[10]: 将测得的 16S rDNA 序列在 GenBank 上进行 BLAST, 对获得的同源序列进行序列分析。选取一株芽孢杆菌为种外群, 用 CLUSTAL W 1.8 进行多序列比对, 采用 PHYLIP 软件包构建分子进化树。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选

通过菌株的初筛、复筛和摇瓶产酶实验, 发现从 2003 年 11 月 16 号的粪样中筛选出的菌株水解圈最大, 该菌株在筛选培养基 B 上的结果如图 1 所示。

2.2 菌株的鉴定

筛选到的菌株培养 2d 后, 在筛选培养基 B 上, 菌落呈白色, 湿润, 菌落表面光滑, 边缘形状规则, 液体静置培养表面会形成菌膜。革兰氏染色为阴性, 菌体成直杆状, 大小为 $0.9\mu\text{m} \sim 2.0\mu\text{m}$, 端圆, 有运动性。其扫描电镜照片如图 2。

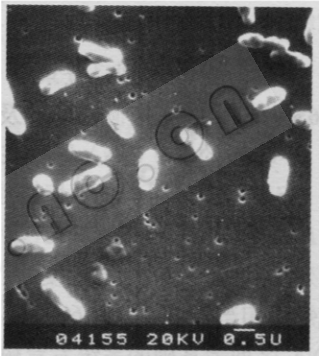
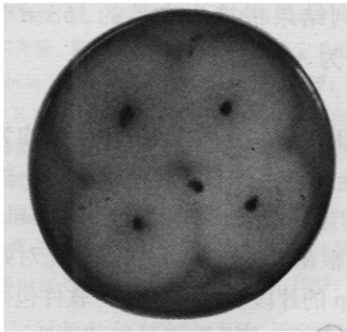


图 1 该菌株在筛选培养基 B 上形成的透明圈

图 2 扫描电镜照片 ($\times 15,000$)

2.3 菌株对氧气的需求结果

菌株在黄磷燃烧的干燥器中, 能旺盛生长, 透明圈很大, 说明该菌具兼性厌氧特性。只是在干燥器中培养的平板表面菌落生长情况, 不似好氧培养时那样稠厚而已。由半固体培养基深层接种, 可看出在表层和穿刺线均有生长, 说明具有兼性厌氧的特性。

2.4 生理生化特征鉴定

参照《常用细菌系统鉴定手册》^[3] 提供的方法进行生理生化特征鉴定, 结果见表 1。

表 1 生理生化特征

特征	JF-1116	特征	JF-1116	特征	JF-1116
革兰氏染色	-	葡萄糖	+	乳糖	(+)
芽孢染色	-	麦芽糖	+	丙酸盐利用	+
过氧化氢酶	+	蔗糖	+	吲哚	-
从葡萄糖上产气	+	木糖	+	明胶液化	+
硝酸盐还原	+	甘露醇	+	M. R	-
苯丙氨酸脱羧	-	山梨醇	+	V. P	+
精氨酸双水解	+	肌醇	+	V. P PH 值	5.4~6.5
赖氨酸脱羧	(+)	阿拉伯糖	+	柠檬酸盐利用	+

注: + 阳性, - 阴性, (+) 迟缓阳性, 由以上检索表中得出该菌株与肠杆菌科 (Enterobacteriaceae) 中的沙雷氏菌属 (*Serratia*) 中的格氏沙雷氏菌 (*Serratia grimesii*) 的生理生化特征基本吻合

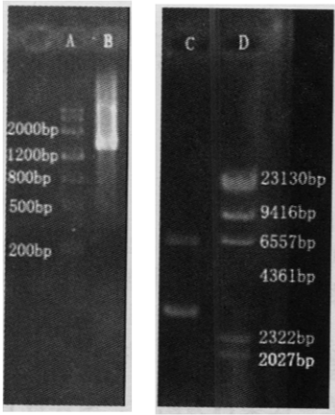


图3 JF-1116 16S rDNA PCR 片段和重组质粒的琼脂糖凝胶电泳图

2.5 16S rDNA 的 PCR 扩增、转化子的克隆、筛选和鉴定

采用细菌的一对通用引物，以菌株 JF-1116 的总 DNA 为模板扩增出 1,600bp 左右的 16S rDNA 的片段，将 PCR 片段进行 TA 克隆到载体 pGEM-T 上，转化 *E. coli* 感受态细胞 JM109 得到转化子，提取转化子中的质粒进行琼脂糖凝胶电泳结果见图 3 (A: 天为时代 DNA Marker III, B: 16S rDNA PCR 片段, C: 重组子质粒 DNA, D: (DNA/HindIII Marker)。

2.6 菌株 JF-1116 16S rDNA 基因全序列测定

选取阳性克隆的重组子进行序列测定，选用通用测序引物 T7、SP6 测定 2 个反应，每个反应测 800bp 左右，将两个序列结果拼接为完整的 16S rDNA 序

列，为 1,617bp。该序列已登录到 GenBank，登录号为 AY502205。

2.7 16S rDNA 序列相似性比较及系统发育学分析

将 JF-1116 的 16S rDNA 序列在 GenBank 中进行 BLAST，所获得的同源序列均为肠杆菌科的 16S rDNA 序列，其中相似性最高的为 *Serratia* 属的菌株。在此基础上以一株芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的 16S rDNA 序列为外种群构建系统发育树。由于 GenBank 中获得的序列长短不同，为了获得更可信的系统发育树，根据 CLUSTAL 的结果将比对好的序列均截短为相当于 JF-1116 16S rDNA 序列 62~1430 bp 的片段。应用 PHILIP 软件包得到以 16S rDNA 序列为基础的系统发育树结果见图 4 (分支旁的数值为聚类的置信度%)。

根据 JF-1116 菌株的形态特征、生理生化特征，对照《伯杰氏细菌鉴定手册》，初步确定菌株 JF-1116 属于沙雷氏菌 (*Serratia*)，16S rDNA 测定结果也支持这一结论。从图 4 中我们看到 JF-1116 和 *S. grimesii* 亲缘最近，其分支置信度为 90%，结合分子进化

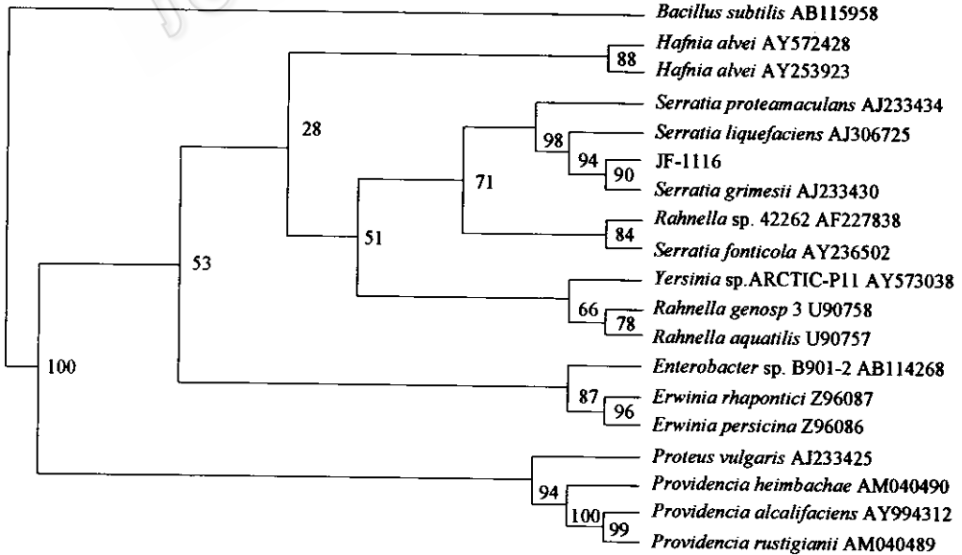


图4 菌株 JF-1116 在 Enterobacteriaceae 中的系统发育地位

树和生理生化鉴定结果,我们将 JF-1116 确定为格氏沙雷氏菌 (*S. grimesii*)。

3 讨论

目前研究纤维素酶的工作,用中温好气性木霉的居多数,尤其在我国占压倒性多数。近年来,在细菌方面虽有研究,一方面和细菌产的纤维素酶在细胞中的位置有关,另一方面也和胞外酶的分泌量有关,总的说来研究较少。但从环境保护等方面的应用来看,对一些细菌的研究,如厌氧菌、兼性厌氧菌等的研究是很必要的。

菌株 JF-1116 由于其来源的特殊性,又是兼性厌氧菌,适宜作污物软化分解中的菌种以及对动物饲料的配置有很大的利用价值,对它主要进行了菌种的分类鉴定,以期能为解决环境保护和动物营养问题找到新的适宜的菌种。

参 考 文 献

- [1] 沈雪亮. 林产化学与工业, 2002, 22 (1): 47 ~ 51.
- [2] 刘东波, 张 影. 微生物学通报, 2004, 31 (2): 30 ~ 33.
- [3] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [4] Ghose T K. Pure Appl Chem, 1987, 59: 257 ~ 268.
- [5] R E 布坎南, N E 吉本期. 伯杰氏细菌鉴定手册 (第八版). 北京: 科学出版社, 1984.
- [6] 周德庆. 微生物学实验手册. 上海: 上海科技出版社, 1982.
- [7] 陈聪敏. 厌氧菌及其感染. 上海: 上海医科大学出版社, 1989.
- [8] F 奥斯伯, R 布伦特. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 1998.
- [9] C W 迪芬巴赫, G S 德维克斯勒. PCR 技术实验指南. 北京: 科学出版社, 2002.
- [10] Rainey F A, Ward N L. J bacteri, 1993, 175 (15): 47 ~ 55.