

文章编号: 1674-7054(2013)04-0342-05

海南树栖白蚁肠道中高产纤维素酶菌株的筛选

黄耀华¹, 曹志方¹, 王学梅¹, 王金花¹, 赵建国¹, 杨雨辉^{1, 2}

(1. 海南大学 农学院 海南 海口 570228; 2. 海南省热带动物繁育与疫病研究重点实验室 海南 海口 570228)

摘 要: 以栖息在海南印度紫檀树上的等齿印白蚁的变种为材料, 通过以羧甲基纤维素钠(CMC-Na)作为唯一碳源的选择性培养基的筛选, 获得1株高产纤维素酶的菌株, 经初步鉴定, 该菌为芽孢杆菌属的细菌。发酵培养48 h, 该菌所产纤维素酶的活性达到 $(7.813 \pm 0.340) \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

关键词: 白蚁; 高产纤维素酶菌株; 筛选; 海南

中图分类号: Q 93-331

文献标志码: A

纤维素是植物细胞壁的主要成分, 也是自然界中存在最丰富的多糖^[1]。产纤维素酶微生物对纤维素类化合物的降解和转化起着重要的作用, 对这些产酶微生物的筛选和研究, 可为人们通过微生物技术开发和利用纤维素类化合物提供可能^[2]。白蚁以木质纤维素为食, 是热带生态系统中木质纤维素的重要降解者之一, 在木质纤维素的生物循环中发挥着重要的作用^[3]。有研究表明, 白蚁主要依靠自身分泌的和体内共生生物分泌的纤维素酶来分解食物中的木质纤维素, 其中共生微生物在白蚁降解纤维素的过程中发挥着重要作用^[4]。到目前为止, 我国仅有少数关于白蚁肠道内分泌纤维素酶微生物的研究报道^[5], 而对于海南地区白蚁体内分泌纤维素酶共生菌的研究还是空白。为了开发和利用纤维素酶, 笔者对海南树栖白蚁体内产生纤维素酶的菌株进行了初步的分离和鉴定, 并测定了所产纤维素酶的活性。

1 材料与方法

1.1 材料

1) 白蚁采自海南大学校园内的印度紫檀树上。

2) DNS (3, 5-二硝基水杨酸) 试剂配制参见文献[6]。

3) 培养基为纤维素刚果红培养基和液体发酵培养基。纤维素刚果红培养基: CMC-Na(羧甲基纤维素钠) 10.0 g, 蛋白胨 2.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, KH_2PO_4 4.0 g, 刚果红 0.4 g, 琼脂 15.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0。液体发酵培养基: CMC-Na 10.0 g, 蛋白胨 2.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, KH_2PO_4 4.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0。

1.2 方法

1.2.1 白蚁的鉴定 收集兵蚁型白蚁30只, 使用显微镜、放大镜进行观察, 观察内容包括: ①颜色; ②被毛情况; ③局部具体特征。根据观察结果对照中国白蚁分科检索表和世界白蚁分科检索表进行种属的判断。

1.2.2 产纤维素酶菌株的筛选与鉴定

1.2.2.1 白蚁后肠悬浮液的制备 将收集到的白蚁用 $\varphi = 75\%$ 的乙醇消毒3~4 min, 无菌水冲洗3~4

收稿日期: 2013-09-10

基金项目: 海南省教育厅项目(Hkj2011-12)

作者简介: 黄耀华(1991-) 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 动物学

通信作者: 杨雨辉(1971-) 男, 博士, 教授, 研究方向: 动物学

次,置于无菌平板中,无菌解剖白蚁,挑取肠道悬浮在少量无菌水中,此液即为白蚁肠道悬浮液。在实验过程中,设置表面消毒效果对照实验组,将消毒过的白蚁腹部在纤维素刚果红培养基上滚动擦拭,作为对照,以检验白蚁表面消毒是否彻底。

1.2.2.2 平板分离细菌单菌落^[7] 将制备好的白蚁后肠悬浮液进行10倍倍比稀释,分别取0.2 mL各梯度的稀释液,无菌操作涂布于纤维素刚果红培养基上,30℃倒置培养48 h。待菌落长出后,用革兰氏碘液浸染3~5 min。观察菌落周围透明圈大小,根据透明圈大小判断菌株降解纤维素的能力。选取透明圈最大的菌株进一步研究。

1.2.2.3 菌株的纯化与鉴定 挑取透明圈最大的菌株通过平板划线纯化后,采用革兰氏染色在显微镜下观察其形态,芽孢染色观察其芽孢的形态,微量生化反应管检测菌株生理生化特征。根据以上特性确定分离菌株的归属。

1.2.3 测定羧甲基纤维素酶活性的DNS法^[6]

1.2.3.1 葡萄糖标准曲线的绘制 取11支20 mL刻度试管,编号。向试管中加入2 mL浓度为0.1, 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 0.7 0.8 0.9 1.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的葡萄糖溶液,再加入1.5 mL DNS试剂,摇匀后在沸水浴中加热煮沸5 min,取出冷却后用蒸馏水定容至20 mL。以1号试管溶液作为对照,在分光光度计上测定各管吸光度(OD值),测定波长为540 nm。然后,以葡萄糖含量为横坐标、对应的OD值为纵坐标,绘制葡萄糖标准曲线。

1.2.3.2 粗酶液的制备 液体发酵培养基接种产酶菌株后,在30℃,转速 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下振荡培养48 h,发酵液以 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的转速离心10 min,上清液即为粗酶液。

1.2.3.3 羧甲基纤维素酶活性的测定 取4支20 mL具塞试管(1支空白对照管,3支样品管),加入 $\varphi = 1\%$ 的CMC-Na溶液1.00 mL后,分别向3支样品管中加入待测酶液0.5 mL,空白管中加入灭活的待测酶液0.5 mL,反应体系为2 mL,混匀,盖塞。将4支试管同时置于50℃水浴中,准确计时,反应30 min,取出。迅速、准确地向各管中加入DNS试剂1.50 mL,摇匀。再将4支管同时放入沸水浴中加热煮沸5 min,取出,迅速冷却至室温,用水定容至20 mL,以空白管为对照,在分光光度计波长540 nm下,分别测量3支样品管中样液的吸光度,取平均值,通过葡萄糖标准曲线计算得到生成葡萄糖的含量。

1.2.3.4 酶活力单位的定义 1个酶活力单位(U)定义为:在一定反应条件下,每分钟由底物CMC生成1 μg 葡萄糖所需的酶量。

$$\text{酶活}(\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}) = \text{生成葡萄糖的量}(\text{mg}) / [\text{反应时间}(\text{min}) \times \text{所用的酶量}(\text{mL})]$$

2 结果

2.1 白蚁的鉴定 白蚁兵蚁显微镜下的照片见图1,根据观察结果绘制的白蚁兵蚁图见图2。



图1 兵蚁的外观(10倍显微镜下)

Fig.1 Appearance of dinergate(10×)

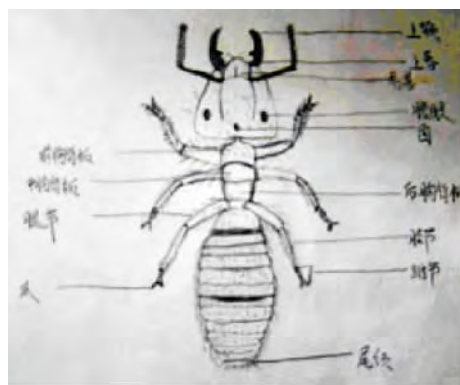


图2 根据观察结果绘制的白蚁兵蚁图

Fig.2 The schematic diagram of appearance of dinergate

2.1.1 颜色 头壳棕褐色,上颚棕褐色,上唇淡黄色,触角颜色出现明显的2种不同颜色,连接头部一节

(即第一节触角)为棕黄色(与头壳颜色相近),其余 11 节为浅黄色,长度比例大约为 1:1。腹部乳白色略带淡黄,前胸背板为淡黄色,六足颜色基本一致,为淡黄色,下部颜色较深,为棕黄色。复部节背板上部为棕黄色,下部为棕褐色,比例约为 1:2.5。

2.1.2 被毛情况 触角具稀释极细极短毛,头被毛较密集,额前最密集,而头部两侧几乎无毛(极少短毛)。上颚短毛密集,上唇具有 2 根长毛和约 10 根短毛。背部长毛少,前胸背板覆有极少长毛,腹部短毛密集,后颈无毛。中部毛为短毛,稀疏。腹部节背板短毛稀疏。足上端长毛较为稀疏,下部则短毛密集。

2.1.3 其它特征观察 体型较一般白蚁大,触角均为 12 节,头壳较大,约占整个体长的 1/4。头壳近似锥形,从前端向后依次变宽,头后端最宽,后缘微成弧形。长大于宽,触角周围微凸,侧面观较厚,头中缝线明显,约占整个头壳的 1/4。唇基隆起,上唇前部略尖,上颚对称,左上颚与右上颚均向内侧弯曲,约占整个头壳的 2/7,似月牙状,内缘均有 1 个三角形齿。后颈近似梯形,表面微凸,后部最宽,近前部最狭。触角 12 节,第 1 节最长,倒数第 2 节最短。有凶,较明显,圆形,凶前具 2 条纵沟,直接延伸至触角,两沟中部隆起。前胸背板呈马鞍形,前缘向上翘起(有前叶),后缘向上翘起,略突出,前后缘中央无明显凹入,过渡平滑,前胸背板长: (1.30 ± 0.17) mm,前胸背板宽: (1.33 ± 0.19) mm。跗节均为 4 节,第 1 节和最后 1 节最长,倒数第 2 节最短。

2.1.4 白蚁的分类^[8] 对照中国白蚁分科检索表,通过该种白蚁跗节数为统一的 4 节,前胸背板狭于头部,前胸背板马鞍状,有前叶(前缘向上翘起) 3 个特征判断该种白蚁为白蚁科。对照世界白蚁分科检索表,通过该种白蚁跗节数为统一的 4 节,头部有凶,尾须短,触角节数为统一的 12 节,前胸背板马鞍状,有前叶(前缘向上翘起) 6 个特征判断该种白蚁为白蚁科。结合中国白蚁分科检索表和世界白蚁分科检索表确定该种白蚁为白蚁科。

对照白蚁科兵蚁属种检索表,通过该种白蚁上颚发达,有机能及上颚对称,顶端弯等特征判断该种白蚁为大白蚁亚科,接着根据头非圆形(该种白蚁头部略成三角形),上唇端部无透明区,中、后胸向两侧不很扩张,兵蚁单型,两上颚内缘中部各有 1 枚缘齿,两上颚内缘中部各有 1 枚三角形大齿等特征,判断该种白蚁为印白蚁属,等齿印白蚁的变种。

2.2 产纤维素酶菌筛选 将培养白蚁肠道菌的刚果红平板覆盖革兰氏碘液后,部分菌落周围出现透明圈,结果见图 3。挑选其中透明圈较大的菌落进一步研究,结果表明,该菌落呈白色不透明状,细菌革兰氏染色阳性,呈直杆状,结果见图 4。芽孢染色后证明该菌可产生芽孢,结果见图 5。该菌株的生理生化特征表现为能利用葡萄糖、麦芽糖、甘露糖、阿拉伯糖、木糖、山梨醇、鼠李糖,不能利用乳糖蔗糖,能液化明胶,不能使硝酸盐还原成亚硝酸盐,不产过氧化氢酶。参照《伯杰细菌鉴定手册》^[9],将此菌鉴定为芽胞杆菌属细菌。

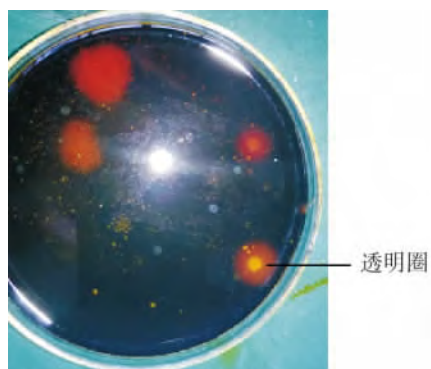


图3 刚果红平板覆盖革兰氏碘液后菌落周围的透明圈

Fig.3 The transparent circle of colony's surrounding

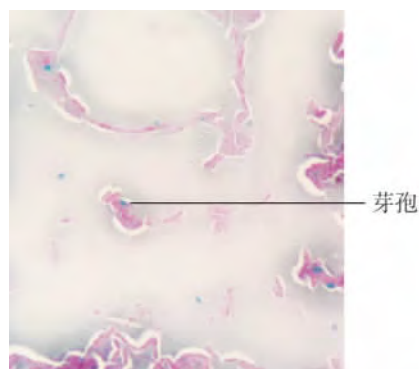


图4 细菌革兰氏染色后的结果

Fig.4 The result of Gram staining

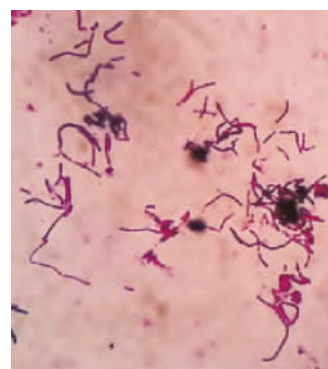


图5 细菌芽孢染色后的结果

Fig.5 The result of spore staining

2.3 羟甲基纤维素酶活性的测定 以葡萄糖含量为横坐标、对应的 OD 值为纵坐标,绘制的葡萄糖标准曲线为 $y = 0.785x - 0.028$ $R^2 = 0.996$ 。测定了其所产纤维素酶在酶促反应温度为 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时的羟甲基纤维素酶活达到 $(7.813 \pm 0.340) \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3 讨论

3.1 本实验用白蚁与记载的等齿印白蚁在头长连上颚、头宽、前胸背板宽、后足胫节长以及头色、上颚色、前胸背板形态、唇、上颚中大齿等主要特征方面基本一致,分布省份吻合。但也存在一些差异,如本实验白蚁头部则近似三角形,后端略宽,触角为统一的12节,这与记载资料中等齿印白蚁其头部近长方形,后端略狭,触角14节不同。因此,笔者认为该白蚁应为等齿印白蚁的1个变种。这种变化可能是白蚁在海南地区长期进化的结果。

3.2 白蚁肠道中含有非常丰富的微生物,这些微生物对白蚁降解纤维素具有重要的作用^[5]。目前从白蚁体内分离到的具有降解木质纤维素能力的细菌主要有芽孢杆菌^[10-11]、葡萄球菌^[12]、链霉菌^[13-14]等。笔者从海南树栖白蚁肠道中分离出1株高产纤维素酶的菌株,经鉴定,该菌属于芽孢杆菌属的细菌,产生的纤维素酶酶活可达到 $(7.813 \pm 0.340) \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,与国内报道的同类菌的酶活相当^[15-16],具有较好的开发利用前景。

参考文献:

- [1]相辉,周志华. 白蚁及共生微生物木质纤维素水解酶的种类[J]. 昆虫知识, 2009, 46(1): 32-40.
- [2]肖春玲,徐常新. 微生物纤维素酶的应用研究[J]. 微生物学杂志, 2002, 22(2): 33-35.
- [3]YAMADA A, INOUE T, WIWATWITAYA D, et al. Carbon mineralization by termites in tropical forests, with emphasis on fungus combs. Ecol. Res. [J]. 2005, 20: 453-460.
- [4]杨天赐,莫建初,程家安. 白蚁消化纤维素机理研究进展[J]. 林业科学, 2006, 42(1): 110-115.
- [5]陈虹,梅建凤,闵航. 白蚁肠道微生物[J]. 微生物学杂志, 2005, 25(2): 75-79.
- [6]万先凯. 一株高活力纤维素分解菌的筛选及酶学性质研究[D]. 天津: 天津大学, 2004: 30-32.
- [7]KASANA R C, SALWAN R, DHAR H. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. Curr. Microbiol. [J]. 2008, 57(5): 503-507.
- [8]李桂祥. 中国白蚁及其防治[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [9]布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 第8版. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组译. 北京: 科学出版社, 1984. 729-795.
- [10]余金勇,吴跃开,普照. 白蚁肠细菌 B99 菌株降解纤维素的初步研究[J]. 贵州林业科技, 2002, 30(4): 16-19.
- [11]高云航,王巍,李秋菊,等. 白蚁肠道木质素及纤维素分解菌的分离鉴定及产酶条件优化[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2013, 52(2): 84-89.
- [12]何刚强,堵国成,刘立明,等. 从白蚁中分离筛选纤维素分解菌及其产酶性质[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(3): 352-355.
- [13]霍光华,黄小晖,SHANNON DILLON,等. 白蚁肠道二株链霉菌株所产纤维素酶的分离、纯化及其特性[J]. 食品科学, 2012, 33(17): 158-164.
- [14]黄小晖,付日辉,李德,等. 白蚁肠道纤维素分解菌的筛选鉴定及产酶条件的研究[J]. 江西农业大学学报, 2009, 31(6): 1140-1145.
- [15]胡爽,王炜,詹发强,等. 一株产纤维素酶细菌的筛选鉴定[J]. 生物技术, 2008, 18(5): 36-38.
- [16]郭大城. 产纤维素酶细菌的分离鉴定及产酶条件的初步研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2008.

Screening of Cellulase Producing Bacteria from Termites Living in Trees in Hainan

HUANG Yaohua¹, CAO Zhifang¹, WANG Xuemei¹, WANG Jinhua¹, ZHAO Jianguo¹, YANG Yuhui^{1,2}

(1. College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228; 2. Hainan Key Lab of Tropical Animal Reproduction & Breeding and Epidemic Disease Control, Haikou 570228, China)

Abstract: Termites *Indotermes isodontatus*'s varietas living in *Pterocarpus indicus* Willd were collected in Hainan to isolate cellulase producing bacteria from the intestinal tract of the termites. A bacterial strain producing cellulase was screened by selective culture with CMC-Na as the only source of carbon. This bacterial strain was preliminarily identified to be under *Bacillus*. The cellulase produced from the bacteria strain showed an activity of $(7.813 \pm 0.340) \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ when the strain was cultured for 48h.

Key words: termite; cellulase producing bacterial strain; Screening; Hainan

(上接第 334 页)

Isolation and Identification of *Klebsiella pneumonia* from the blood of a farmed *Python molurus bivittatus* infected with pneumonia

GUO Guiying¹, LI Xiang², LI Dan², LIAO Chenghong², YANG Nuo², ZENG Jifeng²,
ZHENG Jiping^{2,3,4,5}, ZHANG Liling², YU Jinan⁶

(1. Academic Affairs Office, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China; 3. Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresources: State Key Laboratory Breeding Base, Haikou 570228, China; 4. Ministry of Education Key Laboratory of Tropical Biological Resources, Hainan University, Haikou 570228, China; 5. Ministry of Education Key Laboratory for Conservation, Development and Utilization of Tropical Crop Germplasm Resources, Hainan University, Haikou 570228, China; 6. College of Materials and Chemical Engineering, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: *Python molurus*, as a large nonvenomous python species found in many tropical and subtropical forests, has been farmed for its high value in fine skin, nutrition and medicine in recent years. But pneumonia, the most serious and the most common disease of python, has caused death of python at a high rate. Blood sample was collected from a farmed Burmese python (*Python molurus bivittatus*) with pneumonia to determine the pathogens of pneumonia. The specimens were incubated at 33 °C for 48 h to produce colony growth under the aerobic condition or with 5% CO₂ in bacterial, actinomycetal and fungal mediums, separately. The isolated colonies were then characterized by gram staining and resorted to 16S rRNA gene sequencing and GenBank BLAST. The result showed that the isolates from the python was identified to be *Klebsiella pneumonia*.

Key words: *Python molurus*; pneumonia; *Klebsiella pneumonia*