

从白蚁中分离到具有纤维素酶活的贪噬菌^{*}

吴 燕 迟绍丽 倪金凤^{**}

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘 要 以黄胸散白蚁 *Reticulitermes flaviceps* 后肠为材料,分离培养具有降解纤维素能力的微生物,以进一步了解白蚁后肠微生物的种类。通过以羧甲基纤维素钠(CMC-Na)为唯一碳源的富集及选择培养基培养、筛选,获得一株具有纤维素酶活的菌株 R3063。形态学鉴定、革兰氏染色观察及 16S rDNA 基因序列分析表明该菌株属于贪噬菌(*Variovorax* sp.)。目前尚未见贪噬菌具有纤维素酶活的报道。

关键词 白蚁,纤维素降解菌,纤维素酶,贪噬菌

Isolation of a strain of *Variovorax* sp. R3063 with cellulase activity from termite

WU Yan CHI Shao-Li NI Jin-Feng^{**}

(State Key Lab of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract A bacterial strain with cellulase activity was cultured from the hindgut suspension of the termite *Reticulitermes flaviceps* using a medium with sodium carboxymethyl cellulose (CMC-Na) as the sole carbon source. Phenotypic characterization, including morphology, gram-staining and growth and 16S rDNA gene sequence analysis indicate that the strain belongs to the genus *Variovorax*.

Key words termite, cellulose-degradation bacteria, cellulase, *Variovorax* sp.

纤维素是一种丰富的可再生资源,地球上每年光合作用可产生大于 100 亿吨的植物干物质,其中一半以上是纤维素和半纤维素(Leschine, 1995)。纤维素酶将纤维素降解为葡萄糖,进而发酵生产生物乙醇,能够缓解人类能源紧缺问题,也是解决化石能源危机,发展可再生能源重要途径之一。纤维素酶已广泛用于医药、饲料加工、果汁制取、造纸及纺织等多个领域,它的应用前景广阔(Ögel *et al.* 2001;李西波等 2006)。扩大纤维素酶产生菌的筛选范围,对纤维素酶的应用有重要意义。目前分离的纤维素降解菌多来自真菌(木霉、曲霉)、细菌等(Wilson and Wood, 1992; Li, 1997)。

白蚁以木质纤维素为食,是热带和亚热带地区木质纤维素的重要分解者(Yamada *et al.*, 2005)。当前对白蚁的研究,多数集中于白蚁作为害虫的防治技术,关于白蚁超强降解纤维素机制

和功能的研究较少。白蚁后肠含有 300 多种共生微生物,包括原生动物、细菌、古菌等(Leadbetter and Breznak, 1996;陈虹等 2005)。白蚁依赖内源性纤维素酶和外源纤维素酶共同分解食入的木质材料,其中内源性纤维素酶主要由白蚁唾液腺和前肠上皮细胞分泌,外源纤维素酶由共生微生物产生(Breznak and Brune, 1994; Nakashima *et al.*, 2002; Hongoh *et al.*, 2008; Ohkuma, 2008)。共生微生物在白蚁降解纤维素中发挥着重要作用,目前从白蚁中分离到的木质纤维素降解菌有芽孢杆菌(*Bacillus*) (König 2006)、螺旋菌(*Spirochaeta*) (Dröge *et al.*, 2006)、链霉菌(*Streptomyces*) (Tamburini *et al.*, 2004)、葡萄球菌(*Streptococcus*) (余金勇等 2002;何刚强等 2009)等。本文首次报道从黄胸散白蚁 *Reticulitermes flaviceps* 中分离到具有降解纤维素能力的贪噬菌。

^{*} 资助项目:国家自然科学基金项目(30870085)、教育部留学回国人员科研启动基金。

^{**} 通讯作者, E-mail: jinfngni@sdu.edu.cn

收稿日期:2010-04-01, 接受日期:2010-08-26

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 白蚁 黄胸散白蚁取自浙江大学华家池校区,采集的白蚁放置在有盖的塑料器皿中,1周左右喷洒1次水,实验室内饲养。

1.1.2 仪器和试剂 江南新兴解剖镜,OLYMPUS显微镜,TaKaRa PCR仪,E. Z. N. A.™ Bacterial DNA Kit (OMEGA),Taq 酶 (TRANS),刚果红,引物合成、PCR产物测序(上海博尚生物科技)。

1.1.3 培养基 富集培养基 ① CMC1: KH_2PO_4 0.2%, MgSO_4 0.015%, 酵母粉 0.2%, CMC-Na 1%; ② CMC2: KH_2PO_4 0.2%, MgSO_4 0.015%, KNO_3 0.1%, CMC-Na 1%。选择培养基 ① 选择平板1: 牛肉浸膏 0.15%, 蛋白胨 0.5%, CMC-Na 0.3%, NaCl 0.5%, 刚果红 0.1%, 琼脂 1.5%; ② 选择平板2: 牛肉浸膏 0.15%, 蛋白胨 0.5%, CMC-Na 0.1%, NaCl 0.5%, 琼脂 1.5%。

1.2 解剖白蚁及白蚁后肠菌悬液制备

选取2头工蚁,放置冰上稍微冷冻使其活动性减弱,以便于操作。用70%的酒精擦拭解剖镜的载物台,然后在载物台上滴一滴0.9%生理盐水,用解剖镊子夹一头白蚁放在上面。按住头部,在尾部用镊子轻轻的往外拉,整个肠道即被拉出,截取后肠部分置于盛有无菌水的灭菌Eppendorf管中。经无菌水冲洗2次后,转入含约200 μL 富集培养基 CMC1 或 CMC2 的 Eppendorf 管中,用无菌的解剖针搅动后肠使其内容物溢出,然后转入10 mL 富集培养基 CMC1 或 CMC2 中混匀,此为白蚁后肠菌悬液。

1.3 纤维素降解菌的富集培养

取以上白蚁后肠菌悬液5 mL 转入无菌的玻璃试管中,分别于30℃、37℃条件下振荡培养,培养1~3 d后,按2%的接种量,取0.1 mL 菌液转接至5 mL新的富集培养基 CMC1 或 CMC2 中进行第2次富集培养。

1.4 用选择平板筛选纤维素降解菌

将富集培养后的菌液做系列稀释,选取合适倍数(本实验中稀释到 $10^4 \sim 10^5$ 倍)涂布于CMC选择平板,以平板上出现均匀的单菌落为准。平板分别于30℃、37℃恒温培养1~3 d。待长出单菌落后,用牙签点种在CMC选择平板上,每个单菌落点种两个平板,一个平板用于刚果红染色观

察,另一个作为保存平板。两个平板置于同样条件,分别于30℃或37℃恒温培养1~3 d。

刚果红染色方法:用70%乙醇将菌落洗掉,然后用0.1%刚果红浸染30 min,再用1M NaCl水溶液脱色(20~30 min),观察菌落周围的透明圈有无,若有透明圈,则可初步断定具有纤维素降解活性。

1.5 纤维素降解菌的分离纯化

将选择平板上有透明圈的克隆划线分离,得到的单克隆进行刚果红染色,再重复上述划线分离步骤,直至得到稳定降解纤维素的单克隆。

1.6 菌株的鉴定

1.6.1 形态鉴定 菌落、菌体形态观察及革兰氏染色(杨革,2005)相结合进行形态学鉴定。

1.6.2 提取基因组DNA及16S rDNA序列分析

基因组DNA的提取按照E. Z. N. A.™ Bacterial DNA Kit (OMEGA)说明书操作,采用引物27f 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1492r 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' 扩增目的克隆(R3063)的16S rRNA基因。PCR反应体系(50 μL): 10 × Taq buffer 5 μL , 2.5 mM dNTP 4 μL , 基因组DNA 1 μL , 5U/ μL Taq 0.5 μL , 2 μM 27f 1 μL , 2 μM 1492r 1 μL , ddH₂O 37.5 μL 。PCR反应条件: 94℃预变性5 min, 94℃ 40 s, 52℃ 1 min, 72℃ 1 min 30 s, 30个循环, 72℃延伸5 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳确认,得到约1.5 kb的产物送上海博尚生物技术有限公司测序。获得的序列在NCBI/blast中进行同源性比对(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>)。

2 结果与分析

2.1 纤维素降解菌的富集与分离纯化

本实验实际操作时,首先在富集培养基CMC1中富集培养2次,观察到培养基由澄清变浑浊,说明有微生物生长。然后涂布培养液于选择平板1上,待克隆长出再点种培养进行刚果红染色。不论是30℃还是37℃培养,发现平板上的微生物种类不多,说明尽管肠道内微生物很多,但多数不能培养。刚果红染色法分析了约400个菌落,没有观察到透明圈。分析可能原因有下面两点:①所用的富集培养基CMC1中包含有机氮源酵母粉,它也作为碳源,提供非纤维素降解菌生长,从而纤维素降解菌不能优势富集,非目的菌也大量

生长。②CMC 选择平板 1 中含有 0.3% 的 CMC 和 0.1% 的刚果红,CMC 浓度比较高,只有纤维素酶活性很高时,才能将 CMC 完全分解从而观察到透明圈。对于活性较低的纤维素降解菌可能不能观察到透明圈。

鉴于上述结果分析,作者调整了培养基成分。首先用无机氮源代替有机氮,配制以 CMC-Na 为唯一碳源的富集培养基 CMC2,其次用选择平板 2 进行平板培养和筛选。在平板 2 中,CMC-Na 的浓度由 0.3% 降至 0.1%,培养基中不含刚果红。按照调整后的培养基培养筛选,在 $10^4 \sim 10^5$ 稀释倍数下分离出单菌落,单菌落点种、刚果红染色后,观察到透明圈,对产透明圈的克隆重复点种 2 次,在 30 °C 培养条件下分离到 10 个纤维素降解克隆(图 1)。经过多次划线分离,选取透明圈较大的单克隆(命名为 R3063),进行分析鉴定。另外在 37 °C 条件下培养的菌落,通过以上步骤没有分离到具有纤维素酶活的微生物。

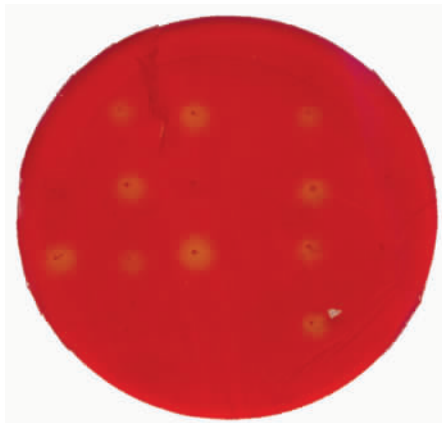


图 1 刚果红染色平板

Fig. 1 Gongo red staining of isolated strain

2.2 菌株鉴定

2.2.1 形态学观察 平板上培养 3 d 的 R3063,菌落边缘整齐、表面湿润,颜色呈淡黄色,直径约 0.9 mm。革兰氏阴性,无芽孢,菌体为短杆状。

2.2.2 16S rDNA 序列分析 图 2 为 16S rDNA 的 PCR 电泳结果,扩增到约 1.5 kb 长的片段。经过序列同源性比对,发现 R3063 与贪噬菌(*Variovorax* sp.)具有 100% 的相似性,因此判定该菌属于贪噬菌。

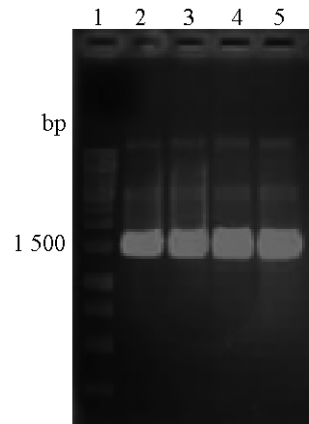


图 2 16S rDNA 的 PCR 结果

Fig. 2 PCR analysis of 16S rDNA

1: Marker 2-5: 16S rDNA

3 讨论

白蚁后肠含有 300 多种微生物(Hongoh *et al.* 2008),这些微生物对白蚁显著的纤维素降解能力贡献着重要作用。目前从白蚁中分离到的木质纤维素降解菌有芽孢杆菌(König, 2006)、螺旋菌(Dröge *et al.*, 2006)、链霉菌(Tamburini *et al.* 2004)、葡萄球菌(余金勇等, 2002; 何刚强等, 2009)等。本文首次从黄胸散白蚁中分离到具有降解纤维素能力的贪噬菌。据文献报道,贪噬菌大多生活在土壤中,参与有机磷、硝基酪氨酸、除草剂、三氯乙烯等的生物降解(Futamata *et al.*, 2005; Nishino and Spain, 2006; Sørensen *et al.*, 2008),尚无贪噬菌具有纤维素降解能力的报道。贪噬菌属于变形菌门(Proteobacteria)。宏基因组学研究发现高等白蚁肠道菌群中有 9 种属于变形菌门的细菌(Warnecke *et al.* 2007)。本研究中的 R3063 菌分离自白蚁后肠,但 R3063 是否确实来源于白蚁后肠尚需进一步核实,因为在取白蚁后肠进行富集培养时,无菌处理也可能不充分,白蚁生长环境(如土壤、腐木等)中的微生物可能污染后肠从而混入培养液里。尽管这种可能性较低,但不能排除分离到的纤维素降解菌 R3063 来源于白蚁生长环境。

参考文献(References)

- Breznak JA, Brune A, 1994. Role of microorganisms in the digestion of lignocelluloses by termites. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 453—487.

- 陈虹 梅建凤 闵航 2005. 白蚁肠道微生物. 微生物学杂志 25(2): 75—79.
- Dröge S ,Fröhlich J ,Radek R 2006. *Spirochaeta coccoides* sp. nov. ,a novel coccoid spirochete from the hindgut of the termite *Neotermes castaneus*. *Appl. Environ. Microbiol.* ,72(1): 392—397.
- Futamata H ,Nagano Y ,Watanabe K ,Hiraishi A 2005. Unique kinetic properties of phenol-degrading *Variovorax* Strains responsible for efficient trichloroethylene degradation in a chemostat enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* ,71(2): 904—911.
- 何刚强 堵国成 刘立明 霍光华 2009. 从白蚁中分离筛选纤维素分解菌及其产酶性质. 食品与生物技术学报 28(3): 352—355.
- Hongoh Y ,Sharma VK ,Prakash T ,Noda S ,Taylor TD ,Kudo T ,Sakaki Y ,Toyoda A ,Hattori M ,Ohkuma M ,2008. Complete genome of the uncultured Termite Group 1 bacteria in a single host protist cell. *PNAS* ,105(14): 5555—5560.
- König H 2006. *Bacillus* species in the intestine of termites and other soil invertebrates. *J. Appl. Microbiol.* ,101(3): 620—627.
- Leadbetter JR ,Breznak JA ,1996. Physiological ecology of *Methanobrevibacter cuticularis* sp. nov. and *Methanobrevibacter curvatus* sp. Nov. ,isolated from the hindgut of the termite *Reticulitermes flavipes*. *Appl. Environ. Microbiol.* ,62: 3620—3631.
- Leschine SB ,1995. Cellulose degradation in anaerobic environments. *Annu. Rev. Microbiol.* ,49: 399—426.
- 李西波 刘胜利 王耀民 王文兵 2006. 高产纤维素酶菌株的诱变选育和筛选. 食品与生物技术学报 25(6): 107—110.
- Li XZ ,1997. *Streptomyces cellulolyticus* sp. nov. , a new cellulolytic member of the genus *Streptomyces*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* ,47: 443—445.
- Nakashima K ,Watanabe H ,Saitoh H ,Tokuda G ,Azuma JI ,2002. Dual cellulose-digesting system of the wood-feeding termite ,*Coptotermes formosanus* Shiraki. *Insect Biochem. Mol. Biol.* ,32(7): 777—784.
- Nishino SF ,Spain JC ,2006. Biodegradation of 3-Nitrotyrosine by *Burkholderia* sp. Strain JS165 and *Variovorax paradoxus* JS171. *Appl. Environ. Microbiol.* ,72(2): 1040—1044.
- Ohkuma M ,2008. Symbioses of flagellates and prokaryotes in the gut of lower termites. *Trends in Microbiol.* ,16(7): 345—352.
- Ögel ZB ,Yarangümeli K ,Dündar H ,İfij I ,2001. Submerged cultivation of *Scytalidium thermophilum* on complex lignocellulosic biomass for endoglucanase production. *Enzyme Microb. Tech.* ,28: 689—695.
- Sørensen SR , Albers CN , Aamand J , 2008. Rapid mineralization of the phenylurea herbicide diuron by *Variovorax* sp. Strain SRS16 in pure culture and within a two-member consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* ,74(8): 2332—2340.
- Tamburini E ,Perito B ,Mastromei G ,2004. Growth phase-dependent expression of an endoglucanase encoding gene (eglS) in *Streptomyces rochei* A2. *FEMS Microbiol. Lett.* ,237(2): 267—272.
- Warnecke F ,Luginbühl P ,Ivanova N ,Ghassemian M ,Richardson TH ,Stege JT ,Cayouette M ,McHardy AC ,Djordjevic G ,Aboushadi N ,Sorek R ,Tringe SG ,Podar M ,Matin HG ,Kunin V ,Dalevi D ,Madejska J ,Kirton E ,Platt D ,Szeto E ,Salamov A ,Barry K ,Mikhailova N ,Kyrpides N ,Matson EA ,Zhang XN ,Hernández M ,Murillo C ,Acosta LG ,Rigoutsos I ,Tamayo G ,Green BD ,Chang C ,Rubin EM ,Mathur EJ ,Robertson DE ,Hugenholtz P ,Leadbetter JR ,2007. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. *Nature* ,450: 560—565.
- Wilson CA ,Wood TM ,1992. Studies on the cellulase of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* ,with special reference to the capacity of the enzyme to degrade crystalline cellulose. *Enzyme Microb. Tech.* ,14(4): 258—264.
- Yamada A ,Inoue T ,Wiwatwitaya D ,Ohkuma M ,Kudo T ,Abe T ,Sugimoto A ,2005. Carbon mineralization by termites in tropical forests ,with emphasis on fungus combs. *Ecol. Res.* ,20: 453—460.
- 杨革 2005. 微生物学实验教程. 北京: 科学出版社. 22.
- 余金勇 吴跃开 普照 2002. 白蚁肠道 B-99 菌株降解纤维素的初步研究. 贵州林业科技 30(4): 16—19.