

# 草鱼肠道纤维素酶产生菌主要种类的分离与鉴定\*

何力<sup>1</sup> 郝勃<sup>2</sup> 谢从新<sup>2\*\*</sup> 罗晓松<sup>1</sup> 张征<sup>1</sup> 朱祥云<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>中国水产科学研究院长江水产研究所 荆州 434000)  
(<sup>2</sup>华中农业大学水产学院 武汉 430070)

**摘要** 从我国特有的草鱼肠道内分离到纤维素酶产生菌,其中4株具有较高的纤维素分解能力,测量了其羧甲基纤维素酶(CMCase)、棉花酶和滤纸酶(FPase)活性,并进行了种类鉴定.结果表明,草鱼肠道具有一定的纤维素分解能力,可能来自于肠道细菌所产生的外源性纤维素酶的协同作用;草鱼肠道内纤维素分解菌具有较高酶活性;不同菌株所产生的相同纤维素酶的活性存在差异;其中,X7的CMCase活性最高,达0.83 U/mL,X5的棉花酶活性最高,达0.87 U/mL,X8的FPase活性最高,达0.54 U/mL.4种菌株的菌落形态有差异,经16S rRNA基因鉴定,X5、X6、X7为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),X8为阿氏肠杆菌(*Enterobacter asburiae*).图6表3参19

**关键词** 草鱼;肠道;纤维素酶产生菌;分离;鉴定

CLC Q959.468.06

## Isolation and Identification of Major Cellulase-producing Fungi in Intestines of Grass Carp\*

HE Li<sup>1</sup>, HAO Bo<sup>2</sup>, XIE Congxin<sup>2\*\*</sup>, LUO Xiaosong<sup>1</sup>, ZHANG Zheng<sup>1</sup> & ZHU Xiangyun<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000, Hubei, China)  
(<sup>2</sup>College of Aquaculture, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract** Cellulase producing strains were isolated from the intestines of grass carp which is endemic to China, and 4 of them were found with high cellulase activity. The activities of carboxymethyl cellulase (CMCase), cotton lyase and filter paper enzyme (FPase) were measured and the species were identified. The results showed that the intestines of grass carp had the ability to decompose cellulase, which might be the synergistic effect of exogenous cellulase produced in the intestines. The cellulase producing strains in grass carp intestines possessed high enzyme activities, which were different in the strains. CMCase in X7 had the highest activity with the value of 0.83 U/mL, while X5 and X8 had the highest cotton lyase and FPase with the values of 0.87 and 0.54 U/mL, respectively. The colony morphology was different among the 4 strains. 16S rRNA genotype identification indicated that X5, X6 and X7 belonged to *Bacillus subtilis* and X8 to *Enterobacter asburiae*. Fig 6, Tab 3, Ref 19

**Keywords** grass carp; intestine; cellulase producing strain; isolation; identification

CLC Q959.468.06

随着人口增长和人们生活水平的不断提高,能源危机、食物短缺和环境污染等问题日益严重,寻找开发新能源、节省粮食、减少环境污染的有效途径,显得越来越重要.纤维素是植物细胞壁的主要组成成分,是自然界最丰富的碳水化合物和可再生资源,在一定条件下可以被水解成单糖,而单糖可转化成多种可利用的产品,如燃料、化工原料、饲料、食品和药品等<sup>[1]</sup>.目前,纤维素资源除少量作为建材、织物、纸张和饲料外,绝大部分作为废物未被利用,究其原因,在于纤维素的水解通常需要强酸,反应要在高温、高压下进行,成本较高,技术上也较复杂,因此,如何降低成本,将纤维素转化为人类可利用的能源或物质,一直为中外学者所关注.

自从1906年在蜗牛消化道中发现纤维素酶<sup>[2]</sup>以来,纤维素的微生物降解得到了足够的关注,并从产生菌、酶结构和

应用上开展了相关的研究.草食性动物依靠其体内大量的共生菌和原生动物来消化纤维素,这一理论最初由Cleveland于1924年提出,现已在白蚁、船蛆、海龟、部分反刍动物和爬行动物的研究中得到证实<sup>[3,4]</sup>.

通常认为,草鱼是典型的植食性鱼类,仅能利用被咽喉齿等磨研破裂的细胞内的原生质,然而,从草鱼的粪便颗粒形态来分析,草鱼肠道应具有一定的纤维素分解能力.一般认为鱼类肠道本身没有纤维素酶的分泌功能<sup>[5]</sup>,以此推断,草鱼的这种分解能力应该来自于肠道微生物.本实验研究的目的是从草鱼中筛选出具有较高活性的纤维素酶产生菌,来证实上述推断,并为进一步获得能适应水生变温动物的纤维素酶,利用自然界纤维素能源或物质从事渔业生产作前期研究,通过对相应菌株进行种类鉴定,以丰富纤维素酶产生菌的资源名录库.

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株培养和筛选

1.1.1 鱼体采集 在武汉市江夏区梁子湖采集草鱼10尾活体,均重3.5 kg.

收稿日期:2008-07-09 接受日期:2008-10-07

\*国家科技支撑计划项目(No. 2006BAD01A12)和中国水产科学院淡水生态与健康养殖重点实验室开放课题项目(No. FEA-2006108)资助 Supported by the Key Sci & Tech Project of the 11<sup>th</sup> Five-year Plan of China (No. 2006BAD01A12) and the Exoteric Project of Key Laboratory of Freshwater Ecology and Healthy Aquaculture, CAFS (No. FEA-2006108)

\*\*通讯作者 Corresponding author (E-mail: xiecongxin@sohu.com)

1.1.2 **鱼体处理** 将草鱼在水簇池内空腹暂养48 h;用1%碘溶液擦拭鱼体后,以无菌手术刀剖开腹部,取出肠道;剥除肠道外壁脂肪,将肠道分成约10 cm的小段作为样品,于0 °C保存。

1.1.3 **菌株初筛** 以无菌方法称取1 g样品,置于灭菌后的研钵中剪碎研磨,加入少量无菌水,使其充分溶解。按照10倍递增稀释法稀释肠液,取0.1 mL最终稀释液于羧甲基纤维素钠选择培养基平板上,置于37 °C,恒温培养72 h。

1.1.4 **菌株复筛** 三点接种法将初选菌落在纤维素刚果红培养基平板上划线,于37 °C恒温培养72 h<sup>[6]</sup>。

用游标卡尺测量平板上菌落水解圈( $D$ )与菌落直径( $d$ ),挑取单株 $D/d$ 大的菌落,利用显微镜镜检,得到纯化的菌株,接种至斜面菌种培养基,于4 °C保存。

## 1.2 纤维素酶的活力测定

1.2.1 **粗酶液制备** 取各菌种分别接种于含羧甲基纤维素钠、脱脂棉和滤纸的发酵培养基三角瓶中,于37 °C、180 r/min恒温摇床震荡培养。分别取d 5、d 6、d 7的发酵液在8 000 r/min条件下离心5 min,去除菌体,取上清液,得粗酶液<sup>[7]</sup>。

1.2.2 **葡萄糖标准曲线绘制** 取10 mL试管,按表1配制溶液。每管加入2 mL DNS显色液,摇匀后,置于沸水浴中加热,5 min后流水冷却,蒸馏水定溶至10 mL<sup>[8]</sup>,在490 nm波长处测定各管的吸光度( $A$ )值,以葡萄糖的 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 值与 $A$ 值,绘制葡萄糖标准曲线。

表1 葡萄糖标准曲线溶液配制  
Table 1 Solution preparation for standard curve of glucose detection

试管号 Test tube No.	标准葡萄糖溶液 Glucose (V/mL)	蒸馏水 Distilled water (V/mL)	醋酸钠缓冲液 Buffer solution of sodium acetate (c/0.2 mol L <sup>-1</sup> , pH 4.8)	$A_{490\text{nm}}$
1	0	8	2.0	0
2	1.0	7	2.0	0.072
3	2.0	6	2.0	0.148
4	3.0	5	2.0	0.225
5	4.0	4	2.0	0.297
6	5.0	3	2.0	0.367

1.2.3 **酶活力测定** 以灭活粗酶液作对照,采用DNS法分别检测内切葡聚糖酶(CMCase)、滤纸酶(FPase)及葡聚糖外切酶活力。以50 °C、pH 4.8条件下1 min使底物生成1  $\mu\text{mol}$ 葡萄糖所需的酶量定义为一个酶活单位,以U/mL表示<sup>[9]</sup>。

## 1.3 产酶菌株的种类鉴定

1.3.1 **菌株形态学特征** 在显微镜下观察菌株的运动性;菌株涂片,革兰氏染色,观察染色特性;取菌株培养物划线接种于牛肉膏蛋白胨培养基中,于37 °C培养24 h,观察菌落的形态、大小和颜色<sup>[10]</sup>。

1.3.2 **生理生化实验** 参见文献[11]。

1.3.2 **16S rRNA基因鉴定** DNA的提取参照Marmur的方法<sup>[12]</sup>。应用标准的双链PCR反应扩增菌株的16S rRNA全基因片段,采用的引物为16(+): 5' GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' 和16(-): 5' CGGCTACCTTGTTACGAC 3', 两引物间的距离约1 500碱基对(上海生工技术有限公司合成)。20  $\mu\text{L}$ 反应液中含有: 10 x PCR缓冲液10%,  $\text{MgCl}_2$  1.5 mmol/L, dNTP

200  $\mu\text{mmol/L}$ , 引物各1.2  $\mu\text{g}$ , 1 DNA聚合酶1单位。PCR扩增条件: 94 °C 预变性4 min后,接着以94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 2 min, 循环30次,最后在72 °C保温10 min。扩增得到的产物经DNA纯化系统纯化。PCR产物经末端补平磷酸化并与载体pTJ19连接后转化到*E. coli* TG1菌株中,培养至对数生长期,用QLAprep spin Miniprep Kit(50)提取并纯化质粒DNA,该DNA直接用作测序的模板。测序:采用ABI PRISM TM 377DNA sequencer进行序列测定(由中国科学院水生生物研究所完成)。将序列数据与GenBank中已存在的细菌16S rRNA基因序列应用BLAST程序进行相似性比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 产酶菌株的筛选

根据菌落形态和生长状况,获得8个能在羧甲基纤维素选择培养基平板上生长良好的菌株,分别以X1、X2、X3、X4、X5、X6、X7、X8表示。将菌株进一步划线分离,经分离纯化稀释后,涂布于纤维素刚果红培养基平板上,测量水解圈( $D$ )与菌落直径( $d$ ),计算其比值,结果见表2。

表2 刚果红复筛菌株水解圈与菌落直径比较  
Table 2 Diameter comparison of hydrolyzing zones and colonies of repeated screening

菌株编号 Strain	水解圈直径( $D$ )/mm Hydrolyzing zones	菌落直径( $d$ )/mm Diameter of colonies	$D/d$
X1	1.92±0.02	1.53±0.05	1.26±0.14
X2	1.24±0.05	0.79±0.10	1.57±0.19
X3	2.04±0.05	1.54±0.08	1.33±0.11
X4	0.94±0.01	0.31±0.06	3.00±0.06
X5	1.56±0.03	0.63±0.05	2.48±0.05
X6	1.11±0.01	0.89±0.04	1.24±0.14
X7	1.63±0.03	0.96±0.08	1.70±0.12
X8	1.23±0.05	0.83±0.04	1.48±0.02

### 2.2 还原糖与DNS反应产物的最大吸收波长

波长不同所测的 $A$ 值也不相同,据此计算出的酶活力也差别较大。对DNS与还原糖反应产物的光吸收特性进行了分析,其470~550 nm光吸收曲线如图1所示。从图1曲线可知,反应产物在470~550 nm之间都有较大的光吸收值,其最大吸收峰为480 nm处,通常比色定糖法采用520 nm波长<sup>[13]</sup>,这与本实验最大吸收峰偏差较大,相对灵敏度较低,但如果在480 nm处测 $A$ 值,其数值波动较大,重复性差,且DNS显色液在此处也有较大吸收值,故选取490 nm作为测定波长较为合适。

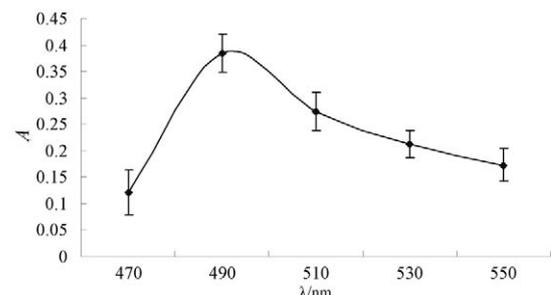


图1 DNS与还原糖反应产物的光吸收曲线图  
Fig. 1 Spectra of the reaction of DNS with glucose

2.3 酶活性的测定

将筛选得到的菌株接种到液体发酵培养基,测定羧甲基纤维素酶(CMCase)、滤纸酶(FPase)和棉花酶(Cotton lyase)活力,根据总体酶活性大小,进一步筛选.结果(图2)表明,草鱼肠道中存在产纤维素酶的分解菌;同一菌株底物不同,各种酶活力的大小不同;不同菌株间各种酶活力大小也存在明显差异.在8种菌株中,X7的CMCase酶活最高,达0.83 U/mL,说明该菌株对水溶性纤维素底物有较高的活力;FPase活性高的是X7、X8,分别达到0.49 U/mL和0.54 U/mL,说明这些菌株纤维素酶系的协同作用较强,对多组分的纤维素底物作用能力高;X5的棉花酶活最高,达到0.87 U/mL,说明该菌株对含结晶区域较多的纤维素底物分解能力强.综合考虑酶的协同作用和D/d值,选择X5、X6、X7、X8号菌株进行鉴定实验.

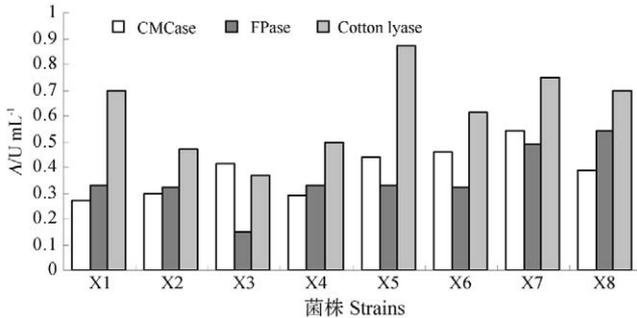


图2 不同菌株的液体发酵实验结果  
Fig. 2 Liquid-state fermentation with different strains

2.2 菌株的鉴定

2.2.1 形态学特征 经观察,菌落的外形特征见表3.

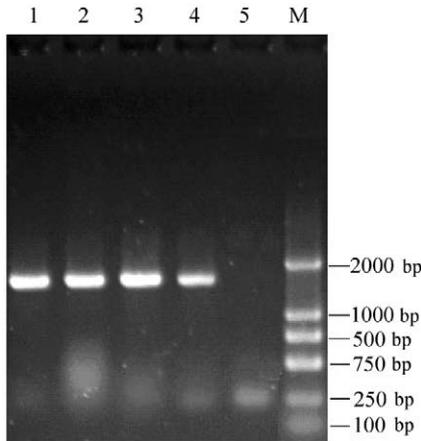


图3 细菌16S rRNA基因的PCR产物  
Fig. 3 PCR amplification of 16S rRNA gene  
1, 2, 3, 4: 细菌的PCR产物; 5: 对照

2.2.2 生化实验鉴定 X5、X6和X7在厌氧条件下不生长,木质素分解试验阴性,硫胺素分解试验阴性,硝酸盐还原试验阳性,葡萄糖培养能产酸不产气,水解淀粉和酪素. X8在厌氧条件下能生长,葡萄糖培养能产酸产气,氧化酶试验阴性,苯丙氨酸脱氢酶试验阴性,硫化氢试验阴性.

2.2.3 细菌16S rRNA基因序列扩增 以细菌16S rRNA基因通用引物P1和P2对所提取的4个细菌株的DNA进行PCR扩增,得到16S rDNA序列,长度约为1 500 bp (图3).为了减少PCR反应中的随机性偏差,每个模板进行了5个平行的PCR反应.

2.2.4 细菌pMD18-T-16SrRNA克隆载体的鉴定 pMD18-T-16S rRNA-1-4用EcoRI和Hind III双酶切的产物,经1%琼脂糖电泳,能切出大小相符的条带(图4).测序结果显示,X5、X6和X7株细菌所测序列输入GENBANK,以BLAST程序进行比较分析,它与芽孢杆菌属很自然地组成一群,自由选择26条16S rRNA,利用MEGA4.0软件进行多重序列比对绘制进化树,表明与芽孢杆菌属中枯草芽孢杆菌种(*Bacillus subtilis*)的16S rRNA序列的相似性达到99% (图5),确定3株细菌为枯草芽孢杆菌;X8菌株细菌所测序列经同样过程分析,发现它与肠杆菌属很自然地组成一群,与肠杆菌中阿氏肠杆菌种(*Enterobacter asburiae*)的16S rRNA序列的相似性达到99% (图6),确定这株细菌为阿氏肠杆菌.

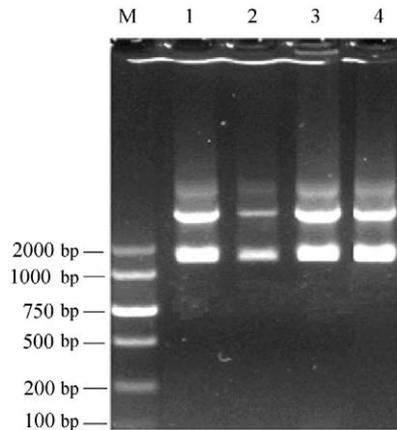


图4 克隆质粒酶切鉴定  
Fig. 4 Digestion analysis of cloning vector

3 讨论

自然界中,草鱼是一种以植物为主要食物来源的植食性鱼类,在其消化系统中,应该存在某种机制使其能够适应食物.由于草鱼本身无法产生纤维素酶,从理论上讲,草鱼肠道内必然有纤维素产生菌的存在.本试验结果证实了这一推断,在草鱼肠道筛选出了纤维素产生菌.说明草鱼对植性食

表3 菌株的形态特征  
Table 3 Morphological characteristic of 4 strains

菌株 Strain	革兰氏染色 Gram reaction	芽孢 Bacterial spore	运动型 Motile	细胞形态 Cellular shape	菌落形态 Colonial configuration	菌落边缘 Margin	菌落颜色 Colonial color
X5	+	+	+	杆状 Bacillus	不规则形 Irregular shape	嗜蚀状 Praerosed brim	白色 White
X6	+	+	+	杆状 Bacillus	圆形 Round	裂片状 Shaped like a lobe	白色 White
X7	+	+	+	杆状 Bacillus	不规则形 Irregular shape	丝状 Filamentous brim	白色 White
X8	-	-	-	杆状 Bacillus	标点状 Shaped like punctuation	完整 Intactness	污白色 Offwhite

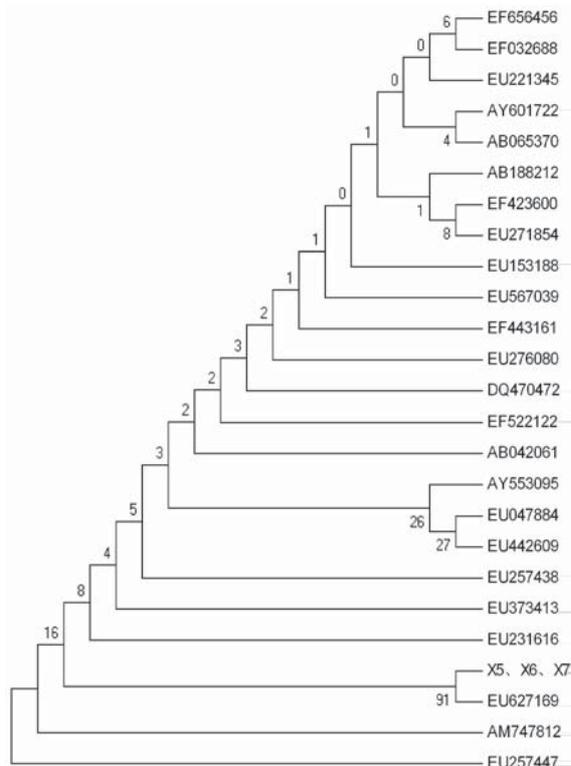


图5 X5、X6、X7菌株和相关菌种的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of X5, X6, X7 and related bacterial species

物的消化,除了咽喉齿切割研磨的机械作用外,细菌产生的外源性纤维素酶也起到重要的作用,这既为鱼类消化生理学补充了实验证据,也为纤维素酶在水产中的应用开辟了一条研究方向。

本试验结果表明,分离的8株菌株纤维素酶的分解能力不同.有的菌株具有较高的羧甲基纤维素酶活性,而另外一些则显示高滤纸酶或高棉花酶活性.可以推断,草鱼肠道是多种菌株产生纤维素酶,相互协作,共同完成对纤维素的降解。

多年来,科研人员广泛研究了产纤维素酶的微生物,以真菌为多.在细菌方面主要有:假单胞菌属(*Pseudomonas*)、弧菌属(*Vibrio*)、微球菌属(*Micrococcus*)、链球菌属(*Streptococcus*)和杆菌属(*Bacillus*)等属中的种类<sup>[14]</sup>.本试验分离的具有纤维素分解能力的4株菌中,有3株为芽胞杆菌属的枯草芽胞杆菌,另一株为肠杆菌属的阿氏肠杆菌.枯草芽胞杆菌是目前水产养殖的微生物制品中最常用的菌种,用于去除有机物和转化无机氮<sup>[15]</sup>,也是鱼类肠道中的正常菌群,能促进蛋白质、淀粉和脂肪的消化<sup>[16, 17]</sup>,尚未见到具有纤维素分解酶活性的相关研究.阿氏肠杆菌则隶属于肠杆菌属,肠杆菌属细菌在人和动物的肠道中常可见,是肠道中的正常菌群,能引起条件致病性感染,但对阿氏肠杆菌的报道并不多见,且大都是从人的粪便或血液等标本中分离,在鱼类中分离阿氏肠杆菌的报道基本上没有见到<sup>[18]</sup>,实验证明其具有较强的纤维素分解能力,说明肠道内的致病细菌,在一定的条件下可能是鱼类肠道的益生菌。

高纤维素含量的水产饲料和水产动物内源性纤维素酶

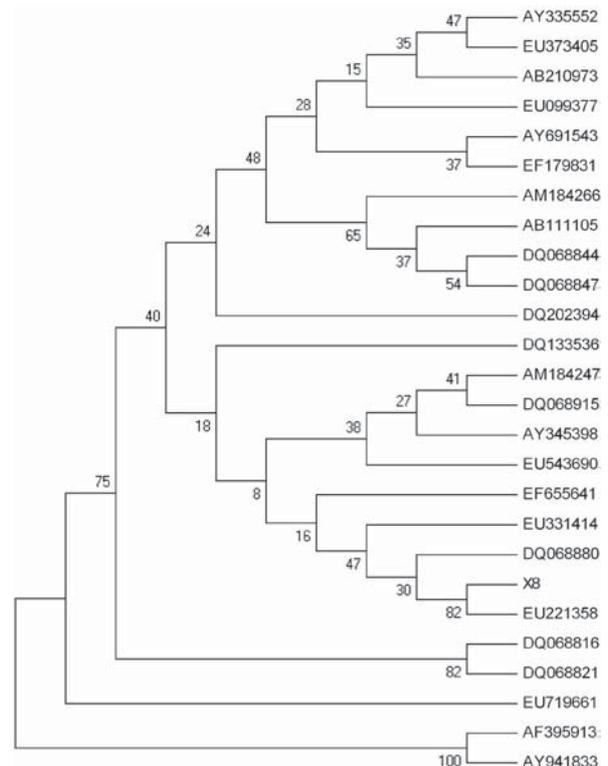


图6 X8菌株和相关菌种的系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree of X8 and related bacterial species

的严重缺乏,导致日粮中占相当比例营养物质随纤维素作为粪便排入水体,使水环境恶化,浪费饲料,增加成本,添加纤维素酶可补充水产动物内源酶组成不足,可提高营养物质和纤维素的消化能力<sup>[19]</sup>.鱼类为变温动物,体温随水温而改变,其消化生理特点与畜禽类等陆生动物有明显的差异,对饲料酶制剂等会有其特定的要求.本试验筛选的产纤维素酶菌株来源于鱼体内,其环境要求符合鱼类的生理特点,其中X7为环境益生菌,在所选菌株中,其纤维素酶活性较高,如进一步研究,将所产生的纤维素酶应用于水生动物饲料中,提高纤维素的利用率,可能会有较广阔的应用前景。

## References

- Xiao CL (肖春玲), Xu CX (徐常新). Application study on microbial cellulase. *J Microbiol* (微生物杂志), 2002, **22** (2): 33-35
- Wu XR (吴显荣), Mu XM (穆小民). 纤维素酶分子生物学研究进展及趋向. *生物工程进展*, 1994, **14** (4): 25-27
- Hungate RE. The rumen microbial system. *Annu Rev Ecol & Syst*, 1975, **6**: 39-66
- Bjorndal K A. Cellulose digestion and volatile fatty acid production in green turtle *Cheloniemydas*. *Comp Biochem & Physiol*, 1979, **63A**: 127-133
- Trust TJ, Sparrow RAH. The bacterial flora in the alimentary tract of freshwater salmonid fishes. *Can J Microbiol*, 1974, **20**: 1219-1228
- Teather RM, Wood PJ. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl Environ Microbiol*, 1982, **43** (4): 777-780
- Shen XL (沈雪亮), Xia LM (夏黎明). Studies on screening of cellulose

- producing bacteria and enzymatic characteristics. *Chem & Ind For Prod* (林产化学与工业), 2002 (1): 47~51
- 8 Yan MH (严民宏), Wang EL (王二力), Zhou YC (周元聪), Chen YC (陈远聪), Tao ZJ (陶宗晋). Studies on ultrafiltration flux rate of glucoamylase. *J East China Inst Chem Technol* (华东化工学院学报), 1991 (2): 82~86
- 9 T.K. Ghose, Measurements of cellulase activities, *Pure Appl Chem* 1987, **59**: 257~268
- 10 祖若夫, 温宝龙. 微生物实验教程. 上海: 复旦大学出版社, 1993. 58~60
- 11 东秀珠, 陈妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001. 253~272
- 12 Marmur JA. Procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganism. *J Mol Biol*, 1969, **3**: 208~218
- 13 张龙翔. 生化实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1997. 1~3
- 14 Horikoshi K, Nakao M, Kurono Y, Sashihara N. Cellulases of an alkalophilic *Bacillus* strain isolated from soil. *Can J Microbiol*, 1984, **30**: 774~779
- 15 Liu F (刘飞), Zhang FQ (张凤琴), Zhao QZ (赵强忠), Zhao MM (赵谋明). Effect of adding nutrients and *Bacillus subtilis* on purification of aquaculture wastewater. *J Agro-Environ Sci* (农业环境科学报), 2007, **26** (4): 1282~1286
- 16 Chang WS (常维山), Zhang CY (张春阳), Niu ZX (牛钟相), Zhu LX (朱立贤), Xie YM (谢幼梅). Selection, identification and application of probiotic bacterium which produces high activity proteimase. *Chin J Anim Sci* (中国畜牧杂志), 2003, **39** (3): 11~12
- 17 Jin ZX (金志雄), Wu WQ (吴文琴), Zhang Z (张珍). Study on the disintegrating starch ability of *B. subtilis*. *Chin J Microecol* (中国微生物生态学杂志), 2004, **16** (3): 142~143
- 18 Qin YX (覃映雪), Wang XL (王晓林), Yan QP (鄢庆枇), Wang B (王贇), Ye DF (叶冬凤). Study on the intestinal microflora of *Epinephelus awoara*. *Mar Fish Res* (海洋水产研究), 2007, **28** (5): 18~23
- 19 Beauchemin KA, Rode LM, Sewah VJH. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forage. *J Anim Sci*, 1995, **75**: 641~644