

# 嗜热厌氧纤维素降解细菌的分离、鉴定及其系统发育分析\*

韩如旸 闵 航 陈美慈 赵宇华

(浙江大学生命科学学院 杭州 310029)

**摘 要** 利用纤维素降解细菌和纤维素粘附的方法分别从新鲜牛粪、高温堆肥和本实验室保存的纤维素降解富集物中分离得到 4 株嗜热厌氧纤维素降解细菌。分离菌株为革兰氏染色阴性,直的或稍弯曲杆菌,菌体大小为  $0.4\mu\text{m} \sim 0.6\mu\text{m} \times 3\mu\text{m} \sim 15\mu\text{m}$ ,严格厌氧,不还原硫酸盐,形成芽孢。多数芽孢着生于菌体顶端。分离菌株能利用纤维素滤纸、纤维素粉 Whatman CFII、微晶纤维素、纤维素粉 MN300 和未经处理的玉米秆芯、甘蔗渣、水稻秸秆。分离菌株在 pH6.2~8.9、温度  $45^\circ\text{C} \sim 65^\circ\text{C}$  范围内利用纤维素,最适 pH 为 7.0~7.5,最适温度为  $55^\circ\text{C} \sim 60^\circ\text{C}$ ,发酵纤维素产生乙醇、乙酸、 $\text{H}_2$  和  $\text{CO}_2$ 。分离菌株还可利用纤维二糖、葡萄糖、果糖、麦芽糖、山梨醇作为碳源。部分长度的 16S rDNA 序列分析表明,分离菌株 EVA1 与 *Clostridium thermocellum* 具有 99.8% 相似性。

**关键词:** 纤维素降解,嗜热厌氧细菌,16S rDNA,系统发育分析

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2002)02-0138-07

纤维素是自然界中最丰富的可再生资源。自然界存在着许多种能降解纤维素的嗜热厌氧细菌,该类细菌在高温厌氧条件下具有较强的纤维素降解能力和热稳定性的纤维素酶,因此对人们进一步了解纤维素微生物降解机理、自然界物质转化和纤维素资源的最优化利用具有重大的理论意义和潜在的应用价值<sup>[1]</sup>。多数嗜热厌氧纤维素降解细菌在纤维素降解过程中对纤维素具有强烈的粘附作用<sup>[1]</sup>。

根据纤维素降解细菌对纤维素的粘附作用,用不溶性纤维素粉直接滚管的方法成功分离得到 4 株嗜热厌氧纤维素降解细菌<sup>[2]</sup>,并对分离菌株直接转化纤维素产生乙醇的特性<sup>[3]</sup>、对纤维素的粘附作用以及纤维素酶的部分特性进行了研究<sup>[4]</sup>。本文报道分离菌株的微生物学特性和基于 16S rDNA 序列的系统发育分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 分离源和分离纯化方法

EVA1 菌株来源于新鲜牛粪(采自浙江大学华家池校区奶牛场);EVA2 和 EVA3 菌株来源于高温堆肥(采自浙江大学华家池校区奶牛场);EVA4 菌株从本实验室保存的一个纤维素降解富集物中纯化得到。培养基配方,分离和纯化的步骤见文献[2,3,4]。

\* 本研究为浙江省自然科学基金项目(396070)

作者简介:韩如旸(1972-),男,浙江省象山县人,现为浙江大学在读博士生,主要研究方向为环境微生物学和有机污染物的生物降解。

收稿日期:2001-06-28,修回日期:2001-11-22

## 1.2 菌株测量

用 Olympus CH 型光学显微镜直接测量菌体大小。

## 1.3 显微摄影

用带拍摄装置的 Olympus BH-2 型光学显微镜直接拍摄纤维素粉培养基中形成的透明圈和纤维二糖培养基中生长的菌落,菌落中的菌体用接种针挑取后涂抹在载玻片上,滴加 1/4 滴蒸馏水,加盖盖玻片,用相差拍摄。液培状态的菌体直接拍摄相差照片。

## 1.4 电镜研究

将分离菌株纤维二糖液体培养基 48h 培养物负染,纤维二糖琼脂培养基生长 96h 的菌落制成超薄切片后用 JEM-1200EX 型透射电镜观测和拍摄。

## 1.5 细菌生长量测定

纤维二糖和葡萄糖为碳源时直接利用装有 10mL 培养基的 1.5cm × 15cm 厌氧试管在 752 型分光光度计上测定波长为 610nm 时的 OD 值。纤维素滤纸为碳源时 1.5cm × 15cm 厌氧试管装有 10mL 基础培养基和滤纸条(长度小于 3cm,以免挡住光路),测定方法如下:滤纸降解并溃烂之前,可以直接利用厌氧试管测定 OD 值;滤纸溃烂并软缩于试管底部后,则采用 1000r/min 离心 5min,使培养液中的纤维片段沉淀下来后测定 OD 值。每 12h 测定 1 次。

## 1.6 最适温度和最适 pH 测定

接种至纤维素滤纸培养基后分别放置在 35℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃、70℃ 下培养,观察纤维素滤纸降解。配制不同 pH 值的纤维素滤纸培养基,使之 pH 值在 5.5 和 9.0 之间,约每隔 0.3 设定 1 个处理,接种后 57℃ 培养 5d 后测定纤维素降解。

## 1.7 碳源利用和产物测定

在基础培养基中加入 1% 糖类作为碳源,以纤维素为碳源培养至纤维素开始溃烂时的培养物作为接种物,接种量为 1%,57℃ 培养 7~15d,目测培养液浊度。纤维素降解率和乙醇测定方法见文献 [3],H<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub> 测定见文献 [5],有机酸测定见文献 [5],还原糖浓度测定见文献 [6]。

## 1.8 16S rDNA 的 PCR 扩增和序列分析

供试菌株用纤维二糖培养基培养 48h,吸取 1mL 菌液于 eppendorf 管中,12 000r/min 离心 1min,弃上清,加入 200μL 重蒸水,漩涡混匀后,沸水浴 2min,12 000r/min 离心 5min,上清液作为模板 DNA 直接用于 PCR 扩增。

用于 16S rDNA 的 PCR 反应的引物为一对通用引物<sup>[7]</sup>。正向引物 BSF8/20 5'-AGAGT TTGAT CCTGG CTCAG-3'( *Escherichia coli* 的 16SrDNA 对应位置为 8~27);反向引物 BSR1541/20 5'-AAGGA GGTGA TCCAG CCGCA-3'( *Escherichia coli* 的 16S rDNA 对应位置为 1541~1522)。

PCR 反应体系<sup>[8]</sup>(50μL)为:10 × Taq 聚合酶缓冲液 5μL, MgCl<sub>2</sub>(25mmol/L)4μL, dNTP (5mmol/L)2μL,引物 BSF8/20 和引物 BSR1541/20 各 1μL,模板 DNA 1μL, Taq 酶(10 000U/mL)0.5μL,重蒸水 35.5μL。PCR 程序如下<sup>[8,9]</sup>:94℃ 预变性 2min;94℃ 1min,56℃ 1min,72℃ 2min;第 2 步循环 29 次,72℃ 10min,60℃ 10min,室温放置。PCR 产物用 QLAGene 公司的 DNA 纯化试剂盒纯化。测序由上海申友生物技术有限责任公司完成,测序用引物为

引物 BSF8/20。

## 1.9 系统发育分析

将测定得到的 16S rDNA 的部分序列与 RDP II 数据库中的中度嗜热和极端嗜热的纤维素降解厌氧细菌的 16S rDNA 进行比对分析,并利用 RDP II 的 Phylip Interface 构建进化树<sup>[10]</sup>。用于分离菌株系统发育分析的菌种名称,菌株编号及其 16S rDNA 序列登录号见表 1。

表 1 用于系统发育树构建的分离菌株和相关参比菌株的细菌名称,菌株编号和序列登录号

Table 1 Names of isolates and related strains and accession numbers of sequences in phylogenetic tree

Names of bacteria	Numbers of strains	Accession numbers
<i>Clostridium stercorarium</i>	NCIMB 11754	L09174
<i>Clostridium thermolacticum</i>	TC21(DSM 2911)	L09176
<i>Clostridium cellulosi</i>		L09177
<i>Clostridium josui</i>	III FERM P-9684	AB011057
<i>Clostridium thermocellum</i>	DSM 1237	L09173
<i>Thermoanaerobacter thermocopriae</i>	JT-3(IAM 13577)	L09167
<i>Thermoanaerobacter 'cellulolyticus'</i>	NA10 IFO 14436	L09183
<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	Tp8T.6.3.3.1(ATCC 43494)	L09178
<i>Caldicellulosiruptor kristjanssonii</i>	177R1B	AJ004811
<i>Caldicellulosiruptor lactoaceticus</i>	6A(DSM 9545)	X82842

## 2 结果和分析

### 2.1 分离菌株形态学

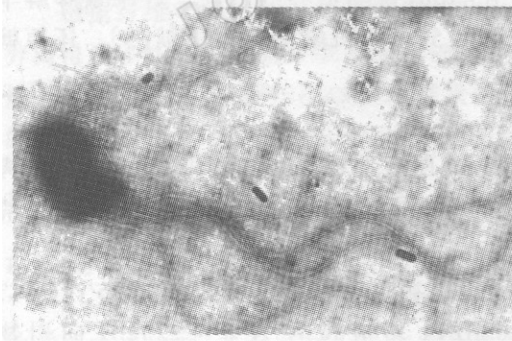


图 1 具有周生鞭毛的 EVA1 菌体的负染电镜照片(10,000×)

Fig. 1 Electron micrographs of negative-stained EVA1 cell with peripheral flagella (10,000×)

2.1.1 菌体形态:分离得到的 4 个菌株 EVA1、EVA2、EVA3 和 EVA4 形态相似。以纤维素滤纸为碳源培养 48h ~ 72h 的菌体为杆状,大小为  $0.4\mu\text{m} \sim 0.6\mu\text{m} \times 3\mu\text{m} \sim 15\mu\text{m}$ ,平均长度为  $8\mu\text{m}$ ,也可见长达  $30\mu\text{m} \sim 60\mu\text{m}$ ,甚至  $100\mu\text{m}$  的丝状体;带芽孢的菌体一般为  $8\mu\text{m} \sim 15\mu\text{m}$ ;丝状体某些部位膨大至  $1.0\mu\text{m} \sim 1.5\mu\text{m}$ 。电镜研究表明,分离菌株鞭毛周生(图 1)。分离菌株以纤维素和纤维二糖为碳源培养时均可形成芽孢。芽孢椭圆或圆形,大小为  $1.0\mu\text{m} \sim 1.5\mu\text{m} \times 2.0\mu\text{m} \sim 2.5\mu\text{m}$ ,平均为  $1.5\mu\text{m} \times 2.0\mu\text{m}$ 。绝大多数芽孢着生于顶端(图 2A),但还可观察亚顶端生芽孢和膨大的菌体(图 2B)。

在纤维素降解初期,菌体对纤维素具有强烈的粘附作用,此时芽孢大量形成,且形态一致。

2.1.3 菌落:分离菌株在纤维素固体培养基滚管中培养 5d 后出现无色透明圈,继续培养

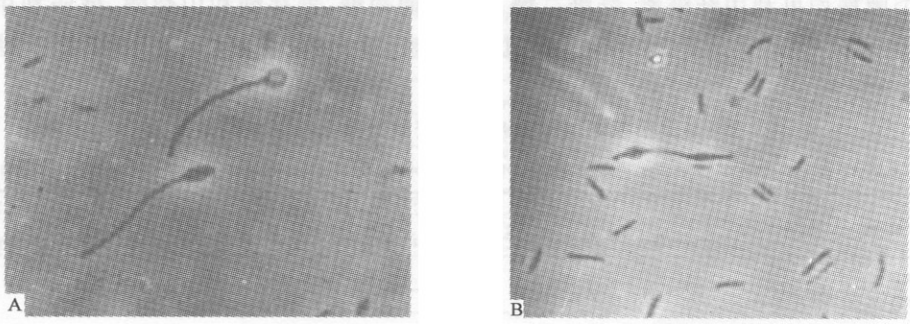


图 2 在纤维素培养基上生长 96hEVA1 菌株

Fig. 2 Phase-contrast photomicrograph of EVA1 cells grown for 96h

A. Cells with one terminal spore (2,000 ×); B. Cells with one subterminal spore and one swollen place (900 ×).

透明圈逐渐扩大,最后可使琼脂中的纤维素全部降解。透明圈内纤维素降解过程中始终不产生黄色素,但其表面可形成乳白色菌苔<sup>[2]</sup>。分离菌株在纤维二糖固体培养基滚管中培养 48h 出现菌落;培养 72h 后菌落呈圆形,侧面观为纺锤形,直径为 1mm 左右,边缘光滑,乳白色;继续培养至 96~120h,菌落开始向表面扩散,中央核心区直径仍为 1mm 左右,而扩散区直径可达 2.5~3.0mm,甚至扩散至整个培养基表面;菌落颜色渐渐变成淡黄色或金黄色。

## 2.2 分离菌株的生理生化特性

4 个分离菌株均为严格厌氧的革兰氏染色阴性细菌,可形成芽孢,不还原硫酸盐。在 pH6.2~8.9,温度 45℃~65℃ 范围内可利用纤维素作为唯一碳源生长,其最适 pH 为 7.0~7.5,最适温度为 55℃~60℃。

分离菌株能利用纤维素滤纸,纤维素粉 Whatman CF II,微晶纤维素,纤维素粉 MN300 和未经处理的玉米秆芯,甘蔗渣,水稻秸秆。分离菌株最优先利用纤维二糖,菌株一般培养 24h~48h 达到生长最大值;利用纤维素培养比利用纤维二糖培养滞留期长 12h~24h;利用葡萄糖时滞留期可长达 96h~120h。利用纤维二糖时培养 36h~48h 细菌生长量达到最大值,经 120h 发酵,pH 下降至 5.0 以下。发酵纤维素和纤维二糖产生乙醇、乙酸、H<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub> 等(表 2)。

表 2 分离菌株发酵纤维素和纤维二糖产乙醇和乙酸量以及纤维素降解率

Table 2 Ethanol and acetic acid production from cellulose and cellobiose fermentation and the rate of cellulose degradation by the isolates

Name of strain	1% Cellulose filter paper as carbon resource			1% Cellobiose as carbon resource	
	Ethanol/(mg/L)	Acetic acid/(mg/L)	Rate of cellulose degradation/%	Ethanol/(mg/L)	Acetic acid/(mg/L)
EVA1	473	604	56	247	538
EVA2	420	687	43	368	648
EVA3	631	687	63	431	676
EVA4	326	581	42	473	632

4 个菌株均可利用纤维素、纤维二糖、果糖、葡萄糖、麦芽糖和山梨醇,微弱利用蔗糖,不能利用阿拉伯糖、半乳糖醛、半乳糖、肌醇、乳糖、甘露醇、甘露糖、棉子糖、鼠李糖、山梨糖、淀粉和木糖(表 3)。

表 3 分离菌株和其它中度嗜热厌氧纤维素降解梭菌的比较

Table 3 Comparison of characteristics of isolates to other moderately thermophilic cellulolytic anaerobic bacteria

Characteristics	Isolates	<i>C. thermocellum</i> <sup>[11]</sup>	<i>C. stercorarium</i> <sup>[12]</sup>	<i>C. josui</i> <sup>[13]</sup>	<i>C. thermopapyrolyticum</i> <sup>[14]</sup>	<i>C. cellulose</i> <sup>[15]</sup>	<i>T. thermocopriae</i> <sup>[16,17]</sup>
Temperature range/°C	45 ~ 65	37 ~ 70	ND	25 ~ 60	45 ~ 66	40 ~ 65	47 ~ 74
Optimum temperature/°C	55 ~ 60	60 ~ 64	65	45	59	55 ~ 60	60
Gram stain	-	-	-	-	+	-	-
Substrates							
Arabinose	-	-	+	+	+	-	W
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+
Dulcitol	-	ND	-	-	ND	ND	ND
Fructose	+	-	-	-	+	+	+
Galactose	-	-	+	-	+	+	W
Glucose	+	+	+	+	+	ND	+
Inositol	-	-	-	-	-	+	ND
Lactose	-	-	+	W	+	+	W
Maltose	+	-	+	+	+	+	W
Mannitol	-	-	-	-	+	+	-
Mannose	-	-	ND	-	ND	+	+
Raffinose	-	-	-	-	-	+	W
Rhamnose	-	ND	+	-	ND	-	-
Sorbitol	+	-	-	-	-	-	W
Sorbitose	-	-	-	-	ND	-	ND
Sucrose	W	-	-	-	-	-	W
Starch	-	-	+	-	+	+	W
Xylose	-	-	+	+	+	+	ND
Fermentation products	E, A, H, C	E, A, H, C	E, A, L, H, C	E, A, P, B	E, A, B, Bu, H, HS, C	E, A, H, C	B, L, E, H, HS, C

+ indicated utilization; - indicated no utilization; W indicated weak utilization; ND indicated no determination; E indicated ethanol; A indicated acetic acid; P indicated propionate; B indicated butyrate; Bu indicated butanol; L indicated lactate; H indicated H<sub>2</sub>; HS indicated H<sub>2</sub>S; C indicated CO<sub>2</sub>.

### 2.3 分离菌株的系统发育分析

获得分离菌株 EVA1 的 16S rDNA 部分序列,共 510bp,EMBL 序列登录号为 AJ410280。菌株 EVA1 和 10 个嗜热厌氧纤维素降解细菌的系统发育树见图 3。

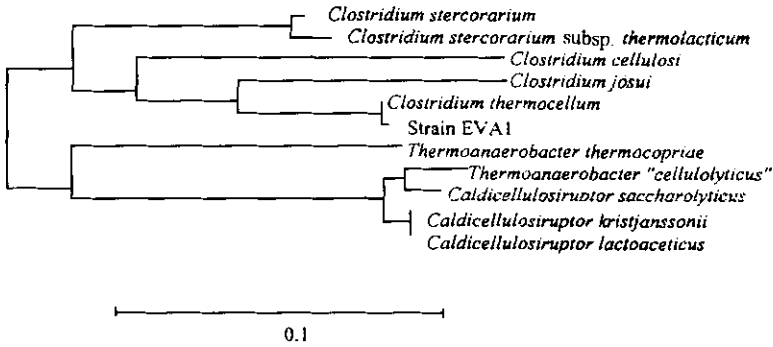


图3 基于16S rDNA序列同源性的菌株EVA1和10个嗜热厌氧纤维素降解细菌(分别属于 *Clostridium*, *Thermoanaerobacterium* and *Caldicellulosiruptor* 属)的系统发育树

Fig.3 Unrooted phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence of stain EVA1 and sequences of ten validly described thermophilic cellulolytic anaerobic Bacteria, which belong to *Clostridium*, *Thermoanaerobacterium* and *Caldicellulosiruptor*, respectively. Scale bar indicates evolutionary distance.

### 3 讨论

已被正式描述的嗜热厌氧纤维素降解细菌分为两类,一类是属于 *Clostridium* 属和 *Thermoanaerobacter* 属的能形成芽孢的中度嗜热菌,包括热纤梭菌(*C. thermocellum*)<sup>[11]</sup>,嗜热堆肥梭菌(*C. stercorarium*)<sup>[12]</sup>(包括嗜热堆肥梭菌嗜热乳酸亚种(*C. stercorarium* subsp. *thermolacticum*)即嗜热乳酸梭菌(*C. thermolacticum*)<sup>[18]</sup>,月素氏梭菌(*C. josui*)<sup>[13]</sup>,嗜热溶纸梭菌(*C. thermopapyrolyticum*)<sup>[14]</sup>,嗜纤维梭菌(*C. cellulosi*)<sup>[15]</sup>,热粪生热厌氧杆菌(*Thermoanaerobacter thermocopriae*)即热粪生梭菌(*C. thermocopriae*)<sup>[16,17]</sup>。另一类是属于热解纤维素菌属 *Caldicellulosiruptor* 的不形成芽孢的极端嗜热菌,包括解糖热解纤维素菌(*Caldicellulosiruptor saccharolyticus*)<sup>[19]</sup>,产乳酸乙酸热解纤维素菌(*C. lactoaceticus*)<sup>[20]</sup>,克氏热解纤维素梭菌(*C. kristjanssonii*)<sup>[21]</sup>。

本项研究的分离菌株为中度嗜热菌,与极端嗜热的热解纤维素菌属(*Caldicellulosiruptor*)的细菌差异较大。分离菌株的生理生化特性和部分长度的16S rDNA的同源性分析表明,分离菌株最接近于 *C. thermocellum*,二者的16S rDNA序列相似性为99.8%。与 *C. thermocellum* 相比,分离菌株能利用的碳源更多,如分离菌株能利用麦芽糖,果糖和山梨醇,而 *C. thermocellum* 则不能利用上述3种碳源。

### 参 考 文 献

- [1] Leschine S B. *Annu Rev Microbiol*, 1995, 49:399 ~ 426.
- [2] 韩如畅,陈美慈,赵宇华,等.微生物学通报,2000,27(5):363 ~ 366.
- [3] 韩如畅,陈美慈,闵航,等.应用与环境生物学报,1999,5(suppl):170 ~ 174.
- [4] 韩如畅,梅建凤,闵航,等.浙江大学学报(农业与生命科学版),2001,27(2):165 ~ 168.
- [5] 钱泽澍,闵航.沼气发酵微生物学.杭州:浙江科技出版社,1984.
- [6] 张龙翔,张庭芳,李令媛.生化实验方法和技术.北京:高等教育出版社,1997:1 ~ 3.
- [7] <http://silk.uic.ac.be/primer/database.htm>

- [ 8 ] Devereux R, Willis S G. Amplification of ribosomal RNA sequences :Molecular Microbial Ecology Manual. Netherland :Kluwer Academic Publishers. 1995. 3. 3. 11.
- [ 9 ] Damiani G, Amedeo P, Bandi C, *et al.* Bacteria Identification by PCR-Based Techniques. Chapter 10, Microbial Genome Methods. CRC Press. 1996. 167 ~ 177.
- [ 10 ] Maidak B L, Cole J R, Liburn T G, *et al.* *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(1): 173 ~ 174.
- [ 11 ] Sneath P H A, Mair N S, Sharpe M E, *et al.* Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 2. The Williams and Wilkins Co., Baltimore. 1986.
- [ 12 ] Madden R H. *Int J Syst Bacteriol*, 1983, 33: 837 ~ 840.
- [ 13 ] Sukhumavasi J, Ohmiya K, Shimizu S, *et al.* *Int J Syst Bacteriol*, 1988, 38: 179 ~ 182.
- [ 14 ] Mendez B S, Pettinari M J, Ivanier S E, *et al.* *Int J Syst Bacteriol*, 1991, 41: 281 ~ 283.
- [ 15 ] Yang H, Youfang D, Yanquan L. *Int J Syst Bacteriol*, 1991, 41: 306 ~ 309.
- [ 16 ] Jin F, Yamasato K, Toda K. *Int J Syst Bacteriol*, 1988, 38: 279 ~ 281.
- [ 17 ] Collins M D, Lawson P A, Willems A, *et al.* *Int J Syst Bacteriol*, 1994, 44: 812 ~ 826.
- [ 18 ] Fardiau M L, Ollivier B, Garcia J L, *et al.* *Int J Syst Evolu Bacteriol*, 2001, 51: 1127 ~ 1131.
- [ 19 ] Rainey F A, Donnison A M, Janssen P H, *et al.* *FEMS Microbiol Lett*, 1994, 120: 263 ~ 266.
- [ 20 ] Mladenovska Z, Mathrani I M, Ahring B. *Arch Microbiol*, 1995, 163: 223 ~ 230.
- [ 21 ] Bredholt S, Sonne-Hansen J, Nielsen P, *et al.* *Int J syst Evolu Bacteriol*, 1999, 49: 991 ~ 996.

## Isolation, Identification and Phylogenetic Analysis of A Thermophilic Cellulolytic Anaerobic Bacterium\*

Han Ruyang Min Hang Che Meici Zhao Yuhua

(College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

**Abstract** : Four strains of thermophilic cellulolytic anaerobic bacteria were isolated from fresh feces, heat compost, cellulolytic mixed culture with a method based on adherence of cellulolytic bacteria to cellulose. The cells of isolates were straight or slightly curved rods that were  $0.4\mu\text{m} \sim 0.6\mu\text{m} \times 3\mu\text{m} \sim 15\mu\text{m}$ , Gram negative, strictly anaerobic, sulfate reduction negative, spore-forming bacteria. Most of the cells had oval terminal spores, while subterminal spores, middle spores, two or more spores also could be observed and spore formation could occur in any position. The isolates degraded cellulose filter paper, cellulose powder Whatman CF II, microcrystalline cellulose, cellulose powder MN300 and unpretreated maize stem core, sugarcane residue and rice straw. The pH and temperature ranges for growth on cellulose were 6.2 ~ 8.9 and  $45^\circ\text{C} \sim 65^\circ\text{C}$  respectively with the optima, 7.0 ~ 7.5 and  $55^\circ\text{C} \sim 60^\circ\text{C}$ , respectively. The major fermentation products from cellulose were acetic acid, ethanol,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ . The isolates could ferment cellobiose, glucose, fructose, maltose, and sorbitol. The phylogenetic analysis based on 16S rDNA suggested strain EVA1 was the closest relative of *Clostridium thermocellum* with 99.8% sequence similarity.

**Key words** : Cellulose degradation, Thermophilic anaerobic bacterium, 16S rDNA, Phylogenetic analysis