

纤维分解菌与伴生菌的分离鉴定及其协同作用

中国科学院植物生理研究所纤维素酶组*

(上海)

372-24 D 菌株是从土壤中分离获得的一株纤维分解细菌,它能与伴生菌 372-24 M 协同生长,在以纤维素为唯一碳源的基础盐培养液中,发酵分解纤维素。31—33℃ 振荡培养五天,混合发酵可分解预处理稻草粉纤维素 97—98%,同时得到菌体蛋白质 5—7 克/升。当硫酸素存在时,纤维分解细菌亦能单独发酵分解纤维素。我们研究了这两株纯培养的形态、培养特征、生理生化反应及分解纤维素能力。经鉴定,372-24 D 为产黄纤维单胞菌,372-24 M 为腐臭假单胞菌。

纤维单胞杆菌具有较强的纤维分解活性,近八十年来,国内外做了菌种分离、培养条件和鉴定分类等工作^[1-5]。近几年来,美国工作较多^[6-9],并将纤维素转化成可食用的单细胞蛋白。尽管目前他们在技术上还存在一些问题,但已着手筹备建厂^[10]。

我们从土壤中分离筛选到一株纤维分解细菌及一株伴生菌,两者具有协同生长效应。在以纤维素作唯一碳源的简单培养基中进行双菌混合发酵,纤维素分解失重的百分数较高,并得到相当数量菌体。五年多来,纯种形态及生理特性稳定。经鉴定 372-24 D 为产黄纤维单胞菌,372-24 M 为腐臭假单胞菌。

材料和方法

一、培养基

(一) 斜面培养基

1. D 菌斜面培养基配方(克): (按 Han & Srinivasan^[6],量稍有改变) CMC-Na20, (NH₄)₂SO₄ 2, NaCl 6, KH₂PO₄ 0.5, K₂HPO₄ · 3H₂O 2, MgSO₄ · 7H₂O 0.1, CaCl₂ · 2H₂O 0.1, 酵母膏 1.0, 琼脂 20, 蒸馏水 1 升, pH7.0—7.5。

2. M 菌斜面培养基配方(克): 酵母膏 5, 蛋

白胨 10, NaCl 5, 琼脂 20, 蒸馏水 1 升, pH7.0—7.5。

(二) 发酵培养基

1. 单菌发酵培养基配方(克): KH₂PO₄ 1, K₂HPO₄ · 3H₂O 2.5, MgSO₄ · 7H₂O 0.5, FeSO₄ · 7H₂O 0.05, MnSO₄ · H₂O 0.02, (NH₄)₂SO₄ 20, 盐酸硫胺 50 微克(上药一厂), 吐温 80 1 毫升, CaCO₃ 20, 碱处理稻草粉** 50, 水 1 升, pH7.0—7.2。

2. 双菌混合发酵培养基配方(克): 尿素 5, KH₂PO₄ 1.0, K₂HPO₄ · 3H₂O 1.0, MgSO₄ · 7H₂O 0.5, FeSO₄ · 7H₂O 0.05, MnSO₄ · H₂O 0.02, 酵母膏 0.2, 碱处理稻草粉 50, 水 1 升, pH7.0—7.2。

二、培养条件

往复振荡培养四天或五天,振幅 4.5 厘米,频率 108 次/分,温度 32 ± 1℃。

三、测定方法

1. 纤维素失重测定: 发酵液经 1500 转/分离心 5 分钟,弃上清液,收集全部沉淀,按别洛杰尔

本文于 1977 年 9 月 24 日收到。

* 上海第六化纤厂参加菌种筛选工作。

菌种鉴定由中国科学院微生物研究所协助进行,并得到山东大学王祖农同志指教。

** 碱处理稻草粉制备: 用 2.5% NaOH 与稻草粉共煮沸半小时,溶比 1:12,然后用自来水冲洗至中性,拧干,测干重,置冰箱备用。

斯基法测定纤维素含量^[11]。(单菌发酵时,先加 25 毫升 12% HCl, 去除剩余的 CaCO_3 , 然后再测纤维含量。)样品与对照纤维素含量之差即为失重。

2. 稻草粉失重测定: 布氏漏斗内放置一张直径 9 公分的定性滤纸, 抽滤发酵液, 用蒸馏水洗涤残留物, 抽干后取出滤纸连同残留物, 105℃ 烘干称重恒重。

3. 菌体蛋白的测定: A. 发酵液经 1500 转/分离心 5 分钟, 取上层菌体悬浮液 5 毫升, 加 1 毫升 50% 三氯乙酸(TCA), 加热煮沸 10 分钟, 沉淀菌体蛋白。用 1% TCA 洗沉淀两次, 收集蛋白沉淀, 定氮, 并计算蛋白质含量。B. 发酵液经 1500 转/分离心 5 分钟, 上清液适当稀释, 并配成 1N NaOH 悬浮液, 100℃ 加热 10 分钟, 溶解菌体蛋白。4000 转/分离心 15 分钟, 弃沉淀, 上清液用 Folin 法测定^[12], 用牛血清蛋白做标准曲线。样品与对照之差, 为菌体蛋白增量。

4. 菌体生长曲线测定: 培养基(克): CMC-Na20, 尿素 5, KH_2PO_4 1.0, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.02, 水 1 升, pH 7.0—7.2。经培养不同时间, 测生长瓶内菌液混浊度, 波长 620 毫微米。

5. 细菌鉴定: 鉴定方法主要根据《微生物学方法手册》^[13], 定名按 Bergey 氏《细菌鉴定手册》第七版^[14]和第八版^[15]。

结果和讨论

一、产黄纤维单胞菌

1972 年 12 月分离自造纸厂木材堆栈土壤, 编号为 372-24 D。

(一) 形态特征

在牛肉汁斜面上, 经 24、48、72 小时培养, 培养物用电子显微镜和光学显微镜观察, 细胞呈短杆形, 两端圆, 细胞单个或成对有 V 字形排列, 细胞大小为 $0.4-0.5 \times 1.3-1.5$ 微米。

革兰氏染色呈阳性反应。经穿刺培养和显微镜下检查, 没有运动能力, 没有鞭毛, 无荚膜, 不形成芽胞(图版 I-1)。

(二) 培养特征

菌落在牛肉汁琼脂平皿上呈圆形, 光滑, 湿润, 稍突起, 边缘整齐, 有光泽, 不粘, 呈非水溶性浅黄色。在牛肉汁培养基上生长非常缓慢, 32℃ 培养 24 小时菌落直径在 1 毫米以下, 72 小时 1.5 毫米左右。在羧甲基纤维素钠琼脂上亦呈非水溶性浅黄色。用滤纸条合成培养基 32℃ 培养三天后, 在气液界面上滤纸崩溃或软化, 经摇动, 滤纸断裂。明胶穿刺接种, 缓慢液化, 20℃ 静止培养 15 天后呈漏斗状液化。30℃ 培养 24 小时马铃薯块出现生长, 菌落及土豆块均呈乳白色。在牛肉汁液体培养基中二天出现混浊, 无沉淀物。石蕊牛奶二天后稍产酸, 一周未见凝固(表 1)。

表 1 D 菌与 M 菌培养特征

菌号 培养特征	372-24 D	372-24 M
牛肉汁琼脂平皿	圆形, 光滑, 湿润, 稍突起, 边缘整齐, 有光泽, 浅黄色, 培养三天, 1.5 毫米	圆形, 光滑, 边缘整齐, 有光泽, 培养 1 天, 1.5 毫米左右, 产水溶性黄绿色素, 黄绿色荧光
明胶穿刺	缓慢液化, 漏斗状	不液化
马铃薯块	生长, 乳白色	生长, 丁香棕色
牛肉汁液体培养	混浊, 无沉落物	混浊, 表面有片状膜, 底部有沉淀
石蕊牛奶	稍酸	碱性
羧甲基纤维素钠琼脂平皿	圆形, 光滑, 湿润, 有光泽, 呈非水溶性浅黄色	
滤纸条培养	三天后, 在气液界面上滤纸断裂	

(三) 生理生化反应

1. 硝酸盐还原试验, 阳性。
2. 过氧化氢酶试验, 阳性。
3. 淀粉水解, 阳性。

4. 生长因素试验: 在含有 10—50 微克/升盐酸硫胺的合成培养基上能生长, 在含有 10 微克/升生物素 (Biotin) 的合成培养基上也能弱生长。两种维生素在同一培养基中时生长比任一单独时都好, 而合成培养基中无硫胺素和生物素以葡萄糖为碳源时未见生长。

5. 糖醇利用试验: 结果见表 2。

表 2 D 菌与 M 菌糖醇利用的结果

糖	菌 号	372-24D	372-24M
葡萄糖		+	+
纤维二糖		+	△
蔗糖		+	△
乳糖		±	△
麦芽糖		+	
木糖		+	△
阿拉伯糖		+	△
甘油		-	-
甘露醇		-	-
糊精		+	
淀粉		+	

注: +产酸; △产碱; -不变; ±微酸。上述各糖均不产气。

6. 不利用 L-门冬素。

7. 不利用 D-核糖。

8. 不利用乙醇。

9. 不利用琥珀酸盐。

10. 不利用酚。

11. 不利用 β -羟基丁酸盐。

12. 不利用丙酸盐。

13. 可以利用乙酸盐。

14. V. P. 试验阴性。

15. 不产生靛基质。

16. 无溶血圈。

17. 氮源同化: 能利用有机氮源, 如蛋白胨, 牛肉膏, 牛血清蛋白, 尿素及多

种氨基酸, 也能利用无机氮源 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NaNO_3 。

18. 耐盐试验: 在 3% NaCl 的牛肉汁培养基上可以生长, 菌苔略薄。

19. 对氧的要求: 双层固体管及穿刺法, 经 1—2 天培养后, 表面到中下部生长, 下端不长。是兼性厌氧菌。

20. 生长温度: 在 25—34℃ 生长良好, 以 30—34℃ 最好, 致死温度 60℃ 15 分钟。

按 Bergey 手册, 372-24 D 菌株应属棒状杆菌科 (Corynebacteriaceae), 纤维单胞杆菌属 (*Cellulomonas*)。手册第七版中, 该属共有十种, 但不运动, 能还原硝酸盐产生亚硝酸盐的只有两种, 其中产黄纤维单胞菌在营养琼脂上产黄色素, 在马铃薯块上呈奶油黄生长; *C. uda* 在牛肉汁琼脂上生长呈灰白色。由于 37-24 D2 在牛肉汁琼脂上呈浅黄色, 马铃薯块上呈乳白色, 与该两种都有细微差别。但鉴于原著中对这些种的特性描述都较简单^[1,2], 特别是在第八版中, 强调了该属中种的相似性, 只列举了一种^[15]。本文结果与第八版相对照与该种描述相同, 因此 372-24 D 定名为产黄纤维单胞杆菌 (*C. flavigena*)。

二、腐臭假单胞菌

1972 年 12 月分离自土壤, 编号: 372-24 M。

(一) 形态特征

短杆菌, 多为卵状, 细胞大小约为 0.8—0.9 × 1.5—1.6 微米。菌体两端圆, 细胞多单个存在。

革兰氏染色阴性, 未见芽胞, 运动, 鞭毛着生于细胞一端, 1—5 根 (图版 I—2)。

(二) 培养特征: 结果见表 1。

(三) 生理生化反应

1. 细胞内聚积 β -羟基丁酸试验: 阴

性。

- 2. 聚β-羟基丁酸盐利用：阴性。
- 3. 不利用海藻糖作碳源生长。
- 4. 不利用肌醇作为碳源生长。
- 5. 能利用 L-缬氨酸作为碳源。
- 6. 吐温 80 分解试验：阴性。
- 7. 蛋黄反应试验：阴性。
- 8. 精氨酸双分解试验：阳性。
- 9. 硝酸盐还原：阳性。
- 10. 过氧化氢酶试验：阳性。
- 11. 醣醇同化试验，结果见表 2。
- 12. V. P. 试验：阴性。
- 13. 甲基红试验：阴性。
- 14. 靛基质试验：阴性。
- 15. 淀粉水解：阴性。
- 16. 不产生 H₂S。
- 17. 溶血试验：血平皿观察无溶血圈。
- 18. 好氧生长。
- 19. 生长温度：20—37℃ 都能生长，在 37℃ 生长最好，42℃ 以上未见生长。

本菌各项特征测定结果与 Bergey 手册第八版比较，除少数未测非鉴别项目外，均与 220—222 页描述相同。据此，本菌定名为腐臭假单胞杆菌 (*Pseudomonas putida*)。

三、产黄纤维杆菌与腐臭假单胞杆菌的协同作用

(一) 双菌协同生长

在以羧甲基纤维素为唯一碳源的基础培养基中，产黄纤维杆菌纯培养（简称 D 菌）生长微弱，而腐臭假单胞杆菌（简称 M 菌）几乎不长，而 D 与 M 同时接种，则菌体生长旺盛，发酵液浑浊度迅速增高，光密度增强 7 倍左右。

由此可见，D 菌与 M 菌之间存在协同生长作用，其机理有待进一步探讨。

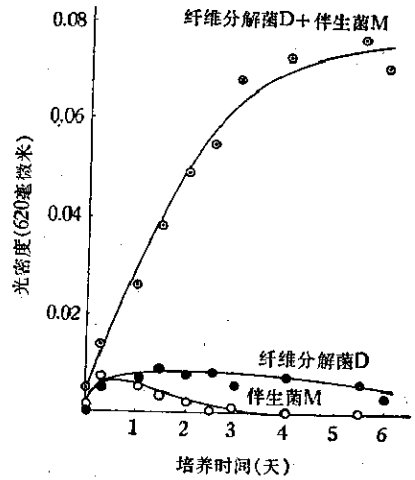


图 3 生长曲线

(二) 分解预处理稻草粉活性的比较

在分离纯化菌种过程中，我们发现 D 菌分纯以后，分解预处理稻草粉的活性比非纯种大大下降。纯种对不溶纤维素虽有分解能力，但活性很低，这时往往容易认为获得了纯种，丢失了活性。这是前人报道中常见的一种观点^[1,3]。若同时接种伴生菌 M，则纤维素分解活性立即恢复原来非纯种的水平，而 M 菌是不能分解预处理稻草粉的（见表 3）。试验表明产黄纤维杆菌与腐臭假单胞菌在分解不溶纤维素过程中，也存在协同作用。

表 3 D 菌及 M 菌分解预处理稻草粉的协同作用

菌 株	碱处理稻草粉液化程度	碱处理稻草粉失重	
		残渣净重(克)	失重(%)
未纯化菌种 E	+++	0.12	91
D	+	1.21	10
M	—	1.31	2
D + M	+++	0.03	98
对 照	—	1.34	—

注：双菌混合发酵培养基，30℃ 往复振荡培养四天。

(三) 双菌混合发酵纤维素失重及菌体蛋白增量

D 菌与 M 菌混合发酵, 可以较快地分解利用纤维素, 并繁殖大量菌体。采用以预处理稻草粉纤维素为唯一碳源的简单培养基, 经过四至五天振荡培养, 双菌混合发酵可分解纤维素达 97—98%, 同时得到菌体蛋白质 5—7 克/升。

表 4 D 菌与 M 菌混合发酵时纤维素失重及菌体蛋白增量

发酵时间(天)	试验次数	预处理稻草粉纤维素失重			菌体蛋白质增量(克/升)
		发酵后剩余纤维素(克)	纤维素失重(%)	平均数(%)	
4	1	对照	0.8841	96.6	—
		样品	0.0300		
	2	对照	1.1759	98.2	5.24
		样品	0.0217		
5	1	对照	0.900	98.2	5.94
		样品	0.061		
	2	对照	1.3598	98.0	6.94
		样品	0.0305		

注: 双菌混合发酵培养基, 32±1℃, 振荡培养。

(四) 单菌发酵纤维素的效果

从前面已知混合发酵时分解纤维素的效果较好, 但根据试验分析, 并非唯有协同

表 5 D 菌单菌发酵时纤维素失重

试验次数	纤维素失重	发酵后纤维素重量(克)	纤维素失重(克)	失重百分数(%)	平均数(%)
1	对照	0.833	0.803	96.4	97.6
	样品	0.030			
2	对照	0.8155	0.7996	98.1	97.6
	样品	0.0159			
3	对照	1.1759	1.1549	98.2	97.6
	样品	0.0210			

注: 单菌发酵培养基, 32±1℃, 振荡培养四天。

作用才能达到这样的效果。产黄纤维单胞杆菌也可不要伴生菌单独分解纤维素, 关键是发酵条件问题。若在培养基中加入 50 毫克/升盐酸硫胺, 加入 2% CaCO_3 调节发酵液之 pH, 同时给予必要的无机盐, 即可单菌分解大部分纤维素, 达到双菌的水平(见表 5)。

纤维分解菌的分离, 前人曾拟定出一些方法^[1,3,6,16], 一般认为获得纯种和纯种保持纤维分解活力还有一些问题。我们从全国收集了大量有腐烂纤维素的土壤, 反复在滤纸条上富集, 并在多种碳源平皿上分离纯化, 在牛肉汁皿上分开伴生菌, 最后获得 372-24 D 产黄纤维单胞菌和 372-24 M 恶臭假单胞伴生菌, 经反复检查证明为纯种。正如试验表明, 纯种获得后的确存在利用纤维素能力降低现象, 而当我们采用加入伴生菌混合发酵的时候, 纤维分解活性明显恢复。这说明并不是纯种丢失了纤维分解性状, 而是以纤维素为唯一碳源的基础培养基不适宜纤维单胞杆菌生长。如缺少硫胺素。如在培养基中添加适量硫胺素或酵母膏, 同时调节发酵液 pH, 不使其逐渐变酸, 单菌发酵可达到协同作用的效果, 这就为我们进一步研究纤维素的利用和协同作用问题提供了一个线索。协同作用(亦有叫共生作用的)用于利用纤维素制造单细胞蛋白的研究已有一些报道^[8,9], 我们获得的这两株细菌在这一方面也表现出比较好的效果。我们在实验中采用的碱处理稻草粉浓度已达 5%, 但与其它碳源发酵的基质浓度相比差距较大, 作为不溶纤维素在扩大发酵上情况究竟如何, 有待进一步研究。

参 考 资 料

- [1] Kellerman, K. F., McBeth, I. G. et al.: *Ctbl. f. Bakt.* 2 Abt., 39: 502—522, 1913.
- [2] Kellerman, K. F., McBeth, I. G.: *ibid.*,

- 34: 485—494, 1912.
- [3] 王祖农等: 植物学报, 6: 3, 217—234, 1957.
- [4] McBeth, I. G.: *Soil Science*, 1: 4, 437—487, 1916.
- [5] Reese, E. T.: *J. Bact.*, 53: 1, 389—400, 1949.
- [6] Han, Y. W. and Srinivasan, V. R.: *Appl. Microbiol.*, 16: 1140—1145, 1968.
- [7] Srinivasan, V. R. and Han, Y. W.: *Adv. Chem. Ser.*, 95: 447—460, 1969.
- [8] Murray, E. D. Ed.: *Developments in Industrial Microbiology*, Washington, D. C., Vol. 13, 47—53, 1972.
- [9] Srinivasan, V. R.: *Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose*, M. Bailey, et al.: Ed., Helsinki, 393—405, 1975.
- [10] LSU. and Beehtel: *Chemical & Engineering News*, 52: 7, 20, 1974.
- [11] A. M. 别洛杰尔斯基等: 植物生物化学实验指导, 曹宗翼等译, 高等教育出版社, 北京, 第42页, 1956.
- [12] Lowly, O. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193: 265—275, 1951.
- [13] Conn, H. J. Ed.: *Manual of Microbiological Methods*, The Society of American Bacteriologists Committee on Bacteriological Technic, New York, McGraw-Hill, 1957.
- [14] Breed, R. S.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th ed., London, Bailliere, Tindall & Cox, Ltd., 88—152, 601—605, 1957.
- [15] Buchanan, R. E., Gibbons, N. S.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., The Williams & Wilkins Company, Baltimore, Md., 217—243, 629—631, 1974.
- [16] A. A. 伊姆歌列斯基: 纤维素微生物学, 马麟祥等译, 科学出版社, 北京, 1958.

STUDIES ON THE ISOLATION AND IDENTIFICATION OF A CELLULOSE-DECOMPOSING BACTERIUM WITH SPECIAL REFERENCE TO ITS ASSOCIATION WITH A STRAIN OF SAPROPHYTIC BACTERIUM

Cellulase Research Group, Institute of Plant Physiology, Academia Sinica
(Shanghai)

A strain of cellulose-decomposing bacterium 372-24D together with a saprophytic bacterium 372-24M were isolated from soil. They grew syntrophically in a liquid medium containing basal salts with cellulose as sole carbon source. Cellulose degradation proceeded during the bacterial growth. When such mixed culture was conducted with a reciprocal shaker at $32 \pm 1^\circ\text{C}$, it was found that cellulose of alkali-treated rice straw powder was almost completely decomposed after 5-day incubation and that approximately 5—7 g/l of cell protein

was thus obtained from such culture. Experiments also showed that the bacterial strain 372-24D alone was able to grow in cellulose medium and decompose cellulose without co-existence of the bacterial strain 372-24M, if the basal medium was supplemented with a small amount thiamine (ca. 50 mg/l). On the basis of the investigation of morphological and physiological properties and cellulolytic activity of these isolates, strain 372-24D was identified tentatively as *Cellulomonas flavigena* and strain 372-24M as *Pseudomonas putida*.