

大熊猫肠道纤维素分解菌的分离鉴定及产酶性质

樊程¹, 李双江¹, 李成磊¹, 马双¹, 邹立扣², 吴琦^{1*}

¹四川农业大学生命科学与理学院, 雅安 625014

²四川农业大学都江堰校区微生物学实验室, 都江堰 611830

摘要: 【目的】从健康大熊猫新鲜粪便中分离具有纤维素酶活性的菌株, 并对其进行菌种鉴定及产酶性质研究。【方法】利用羧甲基纤维素钠培养基分离纯化具有较高纤维素酶活性的菌株, 根据形态学特征、生理生化特性以及 16S rDNA 分析对其进行分类鉴定, 研究影响该菌株纤维素酶的产酶条件, 以及对不同纤维素底物的降解情况。【结果】分离得到一株纤维素酶产生菌株 P2, 该菌株为好氧的革兰氏阳性细菌, 生长温度范围 20–50°C (最适温度 37°C), pH 范围 6.0–9.0 (最适 pH7.0), NaCl 浓度范围 0%–15% (最适 2% NaCl), 培养 24h 达到产酶高峰。16S rDNA 基因序列分析显示, 菌株 P2 与解淀粉芽胞杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) NBRC15535 相似性为 99.66%。该菌株对四种纤维素底物(滤纸、脱脂棉、秸秆、竹纤维)均有不同程度的降解, 内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶、 β -葡萄糖苷酶和总酶活具有不同的酶活变化。【结论】本研究首次从大熊猫粪便中分离出了好氧纤维素分解菌, 并鉴定为解淀粉芽胞杆菌, 对上述四种纤维结构均有一定的破坏和分解作用, 为进一步研究大熊猫竹纤维消化机制提供了菌源。

关键词: 大熊猫, 纤维素酶, 解淀粉芽胞杆菌

中图分类号: Q814 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2012)09-1113-09

大熊猫 (*Ailuropoda melanoleuca*) 是中国的特有种, 数量十分稀少, 属于国家一级保护动物。一般来说, 10 月龄左右的亚成年大熊猫进入食性转换期, 其主食由母乳或牛乳等高蛋白食物逐渐转变成以竹为主的高纤维食物。在成年时, 平均每只大熊猫每日进食竹子的量高达 12.5 kg, 且平均进食时间为 12 h, 但实际上只消化了竹子干重的 17%^[1]。大熊猫除消化竹子中 90% 以上的蛋白质和脂肪等营养物质外, 还能利用 8% 的纤维素, 以及 27% 的半纤维素^[2]。研究发现, 有着草食性哺乳动物进食特点的大熊猫, 却拥有典型的肉食性哺乳动物的消化系

统^[3]。2010 年, 大熊猫的基因组序列公布, 其中可以找到编码与肉食性动物消化系统相关酶的基因, 但没有发现编码纤维素酶的相关基因^[4]。因此, 大熊猫对纤维素的消化须依赖其肠道微生物的作用。

1988 年, 国内的张志和等^[5]、国外的 Hirayama K^[6] 等陆续进行了大熊猫肠道菌群的研究。孙飞龙等^[7]、邹兴淮等^[8]、王强等^[9]、王兴龙等^[10] 研究了不同时期大熊猫肠道的菌群种类和分布、肠道致病菌以及微生态制剂。对于纤维素分解菌的研究极少, 且目前尚未分离出具有较高纤维素酶活的菌株。有关研究^[11–12] 均认为大熊猫肠道中降解纤维素的

* 通信作者。Tel: +86-835-2886126; Fax: +86-835-2886136; E-mail: wuqi@yaho.com.cn

作者简介: 樊程(1990–), 男, 四川人, 本科生, 生物科学专业。E-mail: fctruth@yaho.com.cn

收稿日期: 2012-03-28; 修回日期: 2012-05-15

微生物为梭菌属的专性厌氧菌,无论在菌种的种类还是数量上都无法满足广泛试验和实际应用的需要,并且由于大熊猫肠道的生理环境应适合需氧菌或兼性厌氧菌生长,因此对可能存在的该类菌种的分离鉴定还需要通过改进培养条件等方法开展更深入的研究。

本实验从雅安碧峰峡熊猫基地的健康大熊猫新鲜粪便中,利用 CMC-Na 培养基法分离筛选出 1 株分解纤维素能力较强的菌株 P2,并对其进行了菌种鉴定、产纤维素酶条件研究、对不同纤维素底物的降解形态学观察,以及菌株产纤维素酶活性的比较。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源:样品采自雅安碧峰峡熊猫基地 8 只健康大熊猫(1 只为老年)的新鲜粪便。

1.1.2 培养基:① 富集和分离纯化培养基:CMC-Na 2 g, Peptone 0.5 g, Yeast extract 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25 g, $(NH_4)_2SO_4$ 0.25 g, Na_2HPO_4 0.05 g, KH_2PO_4 0.5 g, 刚果红 0.2 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 调至 7.2。② CMC-Na 液体培养基: CMC-Na 10g, Peptone 10 g, Yeast extract 10 g, NaCl 5 g, KH_2PO_4 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, 蒸馏水 1000 mL。pH 调至 7.2。

1.1.3 主要试剂和仪器:Peptone、Yeast extract 购自 OXOID 试剂公司, Gelatin 购自 SIGMA 试剂公司, Universal DNA Purification kit 购自 Tiangen 生化公司, 微生物微量生化鉴定管购自杭州微生物试剂有限公司, 其他化学试剂均为国产分析纯。OLYMPUS CX21 光学显微镜购自 OLYMPUS 公司、S1000 Thermal PCR 仪购自 BIO-RAD 公司、Gel DOC 2000 凝胶成像系统购自 BIO-RAD 公司、UV-2102 C 型紫外可见分光光度计购自 UNICO 公司。

1.2 纤维素分解菌的筛选

1.2.1 富集培养及初筛:从新鲜熊猫粪球内部称取 10 g 粪样,加入装有 90 mL 无菌水(带玻璃珠)的三角瓶中,振荡 20 min,8 个粪便样本分别制成稀释度为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 的样液。在 CMC-Na 平板涂布 10^{-4} 稀释度的粪便样液 500 μ L,置于 37 $^{\circ}C$ 恒温培养箱好氧培养 48 h 后,根据菌体生长情况调整稀释梯度培养。48 h 后,保持培养条件

不变,挑取各平板上生长出来的水解圈较大的单菌落在 CMC-Na 平板上反复划线纯化。挑取各样品平板上的单菌落再次点种在 CMC-Na 平板上,37 $^{\circ}C$ 恒温培养 48 h,测量各菌株的菌体直径 d 与水解圈直径 D 。

1.2.2 复筛:将 D/d 值较大的菌株分别接种到 10 mL CMC-Na 液体培养基中,比较经过复筛菌株的 D/d 值,综合参照 1.5.2 的方法测定的纤维素总酶活确定进一步研究的菌株。

1.3 菌株 P2 的生理生化鉴定

采用刚果红染色^[13]观察菌株 P2 的菌落形态,采用革兰氏染色法观察菌体形态。参考文献[14-16]中的微生物生理生化鉴定法,将菌种初步鉴定到属。

1.4 菌株 P2 的 16S rDNA 基因序列分析

1.4.1 16S rDNA 的 PCR 扩增:在菌株 P2 划线活化后的 CMC-Na 平板上挑取单菌落,参考文献[17]中的方法,使用细菌通用引物^[18] 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')、1492R (5'-TACG GYTACCTTGTACGACTT-3') 进行菌落 PCR,送 invitrogen(上海)生物技术有限公司进行序列测定。

1.4.2 系统发育树的构建:将菌株 P2 的 16S rDNA 测序结果采用通过 BLASTn 程序与 GenBank 中的 16S rDNA 基因序列进行同源性比较,利用 clustal w 算法在 MEGA4.1 软件中分析并采用 Neighbor-Joining 构建系统发育树^[19]。

1.5 菌株 P2 产纤维素酶条件的研究

1.5.1 纤维素酶总活力测定^[20]:经 24 h 培养的菌株 P2 种子液,取 100 μ L 转接 20 mL CMC-Na 液体培养基,37 $^{\circ}C$,160 r/min 发酵培养 48 h。取 1 mL 粗酶液,加入 1.5 mL 0.8% CMC-Na 溶液,50 $^{\circ}C$ 保温 30 min,随后加入 2.5 mL DNS 显色剂沸水浴 5 min,冷水淋浴 3 min 冷却后测定 OD_{540} 。酶活单位(IU)按国际单位定义为:1 mL 酶液 1 min 产生 1 μ mol 还原糖的酶量作为 1 个酶活单位。

1.5.2 培养时间对菌株生长及产酶的影响:经 24 h 培养的菌株 P2 种子液,取 100 μ L 转接 20 mL CMC-Na 液体培养基,37 $^{\circ}C$,160 r/min 摇床培养,测定其 6 h、12 h、24 h、36 h、48 h、60 h 和 72 h 发酵液的 OD_{600} 值和纤维素总酶活。

1.5.3 温度对菌株生长及产酶的影响:培养液置于 5 $^{\circ}C$ 、20 $^{\circ}C$ 、30 $^{\circ}C$ 、37 $^{\circ}C$ 、43 $^{\circ}C$ 、50 $^{\circ}C$ 和 65 $^{\circ}C$ 培养 24 h,

测定发酵液的 OD_{600} 值及纤维素总酶活。

1.5.4 pH 值对菌株生长及产酶的影响: 用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 调 CMC-Na 液体培养基 pH 值分别为 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 和 10.0, 种子液分装接种后, 37°C, 160 r/min 摇床培养 24 h, 测定发酵液的 OD_{600} 值及纤维素总酶活。

1.5.5 NaCl 浓度菌株生长及产酶的影响: 配制 NaCl 浓度分别为 0%、2%、5%、7% 和 10% 的 CMC-Na 液体培养基, 种子液接种后于 37°C, 160 r/min 摇床培养 24 h, 测定发酵液的 OD_{600} 值及纤维素总酶活。

1.6 菌株 P2 对纤维素的作用

1.6.1 降解纤维素源的形态学观察: 将菌株 P2 接种 10 mL CMC-Na 液体培养基, 37°C, 160 r/min 摇床振荡培养 24 h。吸取 100 μ L 菌液分别转接到以滤纸条、竹丝、秸秆丝、脱脂棉代替 CMC-Na 为纤维素源的 20 mL 摇瓶培养基。培养基处理方式分别为 CMC-Na 液体培养基中的 CMC-Na 分别替换为 1 cm \times 0.05 cm 竹丝、1 cm \times 0.05 cm 秸秆丝、1 cm \times 0.3 cm 滤纸条、1 cm \times 0.3 cm 脱脂棉条, 设置 3 个平行组。160 r/min 摇床振荡培养, 每隔 12 h 观察底物的降解情况, 持续 72 h; 5 d 后利用光学显微镜观察底物的降解情况。

1.6.2 纤维素酶活测定: 在培养 6 h、12 h、24 h、36 h、48 h、60 h、72 h、96 h 和 120 h 后, 分别测定菌株 P2 纤维素酶总酶活、内切葡聚糖酶 (EG)、外切葡聚糖酶 (CBH) 和 β -葡萄糖苷酶 (BG) 的酶活^[21-23]。

2 结果和分析

2.1 菌株 P2 的形态学特征

经过初筛, 在需氧条件下筛选出水解圈较明显的菌株 P1 和 P2, P1 的 D/d 值为 3.2, 纤维素总酶活为 0.1392 IU/mL; P2 的 D/d 值为 5, 纤维素总酶活为 0.2189 IU/mL, 以菌株 P2 为后续研究菌种。观察表明, 该菌株菌落呈乳白色且不透明, 近椭圆形, 表面有褶皱, 边缘不规则, 中生孢子, 为革兰氏阳性杆状细菌。

2.2 菌株 P2 的生理生化特性

生理生化试验结果见表 1。根据菌株 P2 的形态学特征及生理生化特性^[15], 将其初步鉴定为芽胞杆菌属的枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) 或其变种。

表 1 菌株 P2 的生理生化试验结果

table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain P2

Biochemical assays	Result	Biochemical assays	Result
Control	+	Growth temperature: 5°C	-
Anaerobic growth	-	20°C	+
M-R test	+	30°C	+
V-P test	+	37°C	+
Indole	-	43°C	+
Gelatin liquefaction	+	50°C	-
Starch hydrolysis	+	65°C	-
Catalase	+	pH value:	2 NG
Ornithine decarboxylase	+	3	NG
Deaminase	-	4	NG
Nitrate reduction	+	5	w
Citrate	-	6	+
Hydrogen sulfide	-	7	+
Carbamide	+	8	+
Glucose	+	9	+
Glucose (aerogenesis)	-	10	w
Lactose	-	NaCl concentration:	0% +
Xylose	-	2%	+
Sucrose	+	5%	+
Raffinose	-	7%	+
Mannitol	-	10%	+
Salicin	+	15%	w

+ : positive; - : negative; w : weak; ND : no data.

2.3 菌株 P2 的 16s rDNA PCR 扩增结果及系统发育分析

菌株 P2 的 16 s rDNA 经 PCR 获得了大小约为 1.5 kb 的特异性扩增产物。测序结果经 BLASTn 分析表明, 该菌株与 *Bacillus amyloliquefaciens* NBRC15535 (NR_041455) 亲缘关系最近, 相似性达到 99.66%, 将此序列登录 GenBank (JQ715455)。采用 MegAlign 软件的 clustal w 算法构建系统进化树 (如图 1)。

2.4 菌株 P2 最适培养及产纤维素酶条件

菌株 P2 的生长及产酶曲线见图 2。由图可知, 0-3 h 为菌株 P2 的生长调整期, 4-24 h 为其对数生长期, 25-36 h 为稳定期, 36 h 后为衰亡期; 纤维素总酶活随着菌密度的增大而增大, 在 24 h 时达到峰值 0.1827 IU/mL。菌株 P2 在 37°C 时生长最好, 纤维素总酶活达到 0.1677 IU/mL。在 pH 值为 7.0 时纤维素总酶活达到峰值 0.1837 IU/mL, pH > 7 时菌密度曲线与产酶曲线相比下降幅度较大。菌株 P2 在 2% NaCl 时生长最好, 且酶活达到峰值 0.2298 IU/mL; NaCl 浓度为 10% 时仍生长良好。

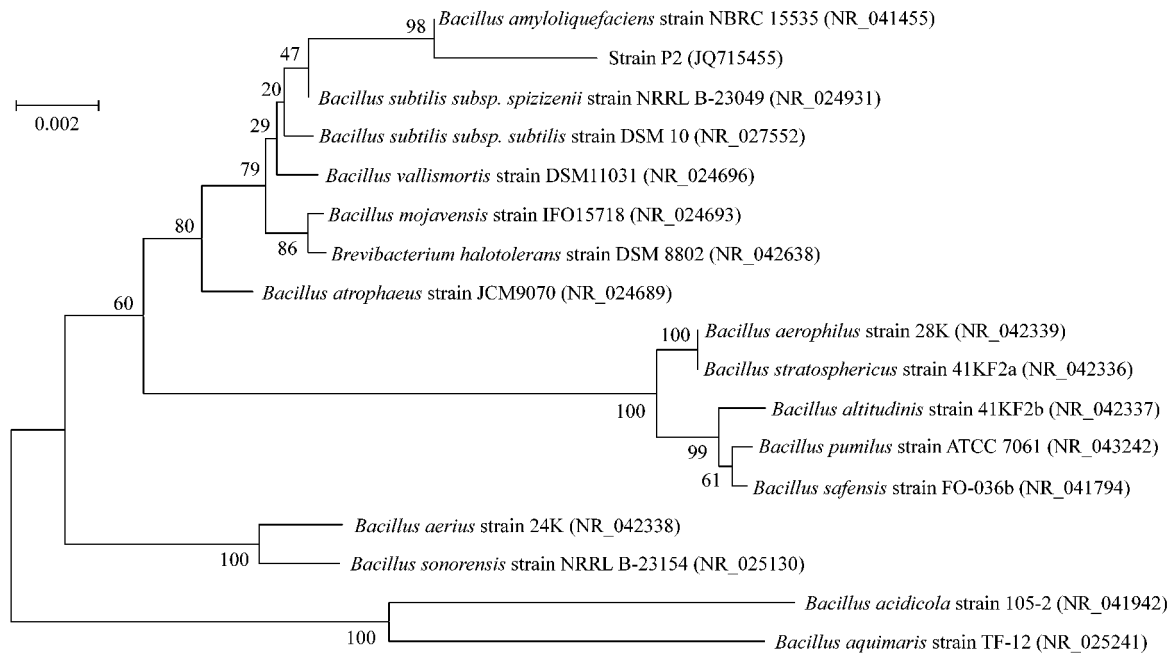


图1 基于16S rDNA基因序列构建的菌株P2系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of strain P2 based on 16S rDNA sequence. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The tree rooted was constructed by the neighbor-joining method with bootstrap values calculated from 1000 resampling. The numbers at each node indicate the percentage of bootstrap supporting. The scale bar indicates 0.2% substitutions per nucleotide position.

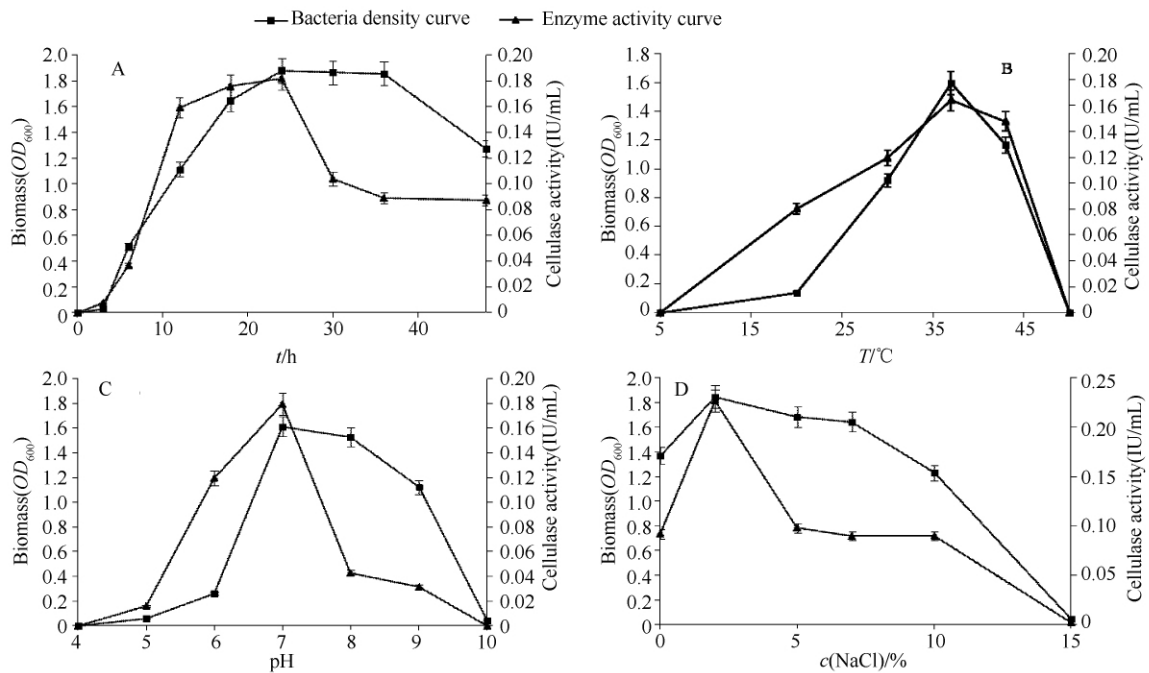


图2 各种因素对菌株P2生长及产酶的影响

Fig. 2 Effect of various factors on the growth and cellulase production of strain P2. A: Culture time; B: Temperature; C: pH value; D: Salt concentration.

2.5 菌株 P2 对纤维素的作用

2.5.1 降解纤维素源的形态学观察: 将菌株 P2 接种到不同纤维素源培养基, 每隔 12 h 观察底物被降解情况并进行记录, 见表 2。由表 2 可以看出滤纸条的降解在形态上表现得较为明显, 24 h 后能够直观地观察到滤纸条边缘呈松散的絮状; 60 h 后出现崩解、变短的现象。培养 5 d 后, 在光学显微镜观察到的 4 种底物分解情况见图 3。由图可知, 滤纸纤维素由多层结构完整的不规则排列的条状纤维构成, 纤维排列松散且表面结构完整; 实验组中滤纸纤维素被分解的现象明显, 滤纸纤维已开始崩解、断裂, 且有菌体嵌入滤纸纤维中将其分解成细丝状。脱脂棉纤维素由不规则排列且松散的条状纤维构成; 在实验组中可观察到棉纤维崩解、断裂的现象明显。在降解秸秆的图片中清晰可见由于 P2 菌的作用, 破坏了秸秆原有的光滑表面, 暴露出秸秆内部长条状细胞, 使秸秆纤维从中间分裂。对于竹纤维, 对照组表面光滑并有排列整齐的保护组织和内部的输导组织, 而实验组竹纤维发生断裂, 由于 P2 菌已破坏了竹纤维保护组织并侵入到输导组织, 使竹纤维表面疏松瓦解、输导组织部分从中间断裂开。

2.5.2 不同纤维素源培养时的纤维素酶学特性: 根据菌株 P2 在不同纤维素底物培养过程中的产酶

曲线 (如图 4) 可以看出, 在对不同纤维素底物的降解过程中, 纤维素总酶活在 48 - 72 h 达到峰值, 与 3 种组分酶的酶活峰值基本一致。其中在滤纸条和脱脂棉作纤维素底物时, 3 种组分酶酶活与纤维素总酶活在 48 h 同时达到峰值; 而在秸秆与竹纤维组中, 纤维素总酶活与 β -葡萄糖苷酶的酶活分别在 48 h、72 h 同时达到最大值。

表 2 菌株 P2 对不同纤维素源的降解情况
table 2 Degradation of different cellulolytic sources

Cellulosic fiber	12h	24h	36h	48h	60h	60h
fp0	—	—	—	—	—	—
fp1	A	B	B ⁺	—	C	C ⁺
fp2	A	B	B ⁺	—	C	—
b0	—	—	—	—	—	—
b1	A	A ⁺	A ⁺⁺	—	—	D
b2	A	A ⁺	A ⁺⁺	—	—	D
s0	—	—	—	—	—	—
s1	—	—	A ⁺	—	—	D
s2	—	—	A ⁺	—	—	D
c0	—	—	—	—	—	—
c1	—	A	—	A ⁺⁺	A ⁺⁺	D
c2	—	A	—	A ⁺⁺	A ⁺⁺	D

A: Appeared brown color; B: Edges went round; C: Length contraction; D: Completely brown. Retention: —; State went deeper: plus +; fp: Filter paper; b: Bamboo; s: Straw; c: Cotton. 0: Control group; 1, 2: Experimental group.

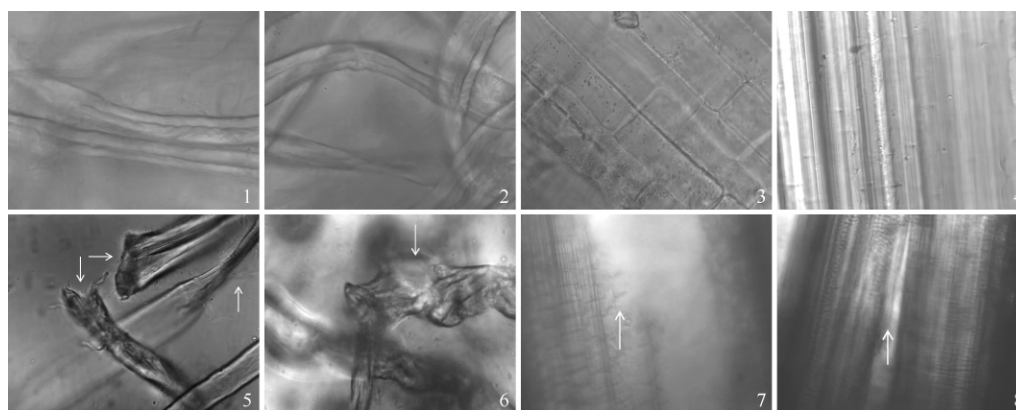


图 3 菌株 P2 降解不同纤维素源 5 d 后的光学显微照片

Fig. 3 Optical micrograph of the degradation of different cellulose substrates by strain P2 after 5d (1000 \times). 1 and 5: Filter paper fiber; 2 and 6: Absorbent cotton fiber; 3 and 7: Straw fiber; 4 and 8: Bamboo fiber. 1-4: Control group; 5-8: Experimental group.

3 讨论

大熊猫在哺乳纲食肉目动物中具有特殊的系统发育地位。朱立峰等^[13]从野生和圈养大熊猫粪便样本中提取并分析了 5522 条 16S rRNA 序列, 发现

大熊猫肠道菌群主要由厚壁菌门 (*Firmicutes*) 的芽胞杆菌纲 (*Bacilli*) 和梭菌纲 (*Clostridia*) 细菌组成, 通过测定其中 3 只野生大熊猫肠道菌群的宏基因组并进行功能基因的分类鉴定, 发现了纤维素酶及半纤维素酶的相关编码基因。该研究结果在分子水平上为大熊猫利用肠道微生物消化竹子中的纤维素和半纤

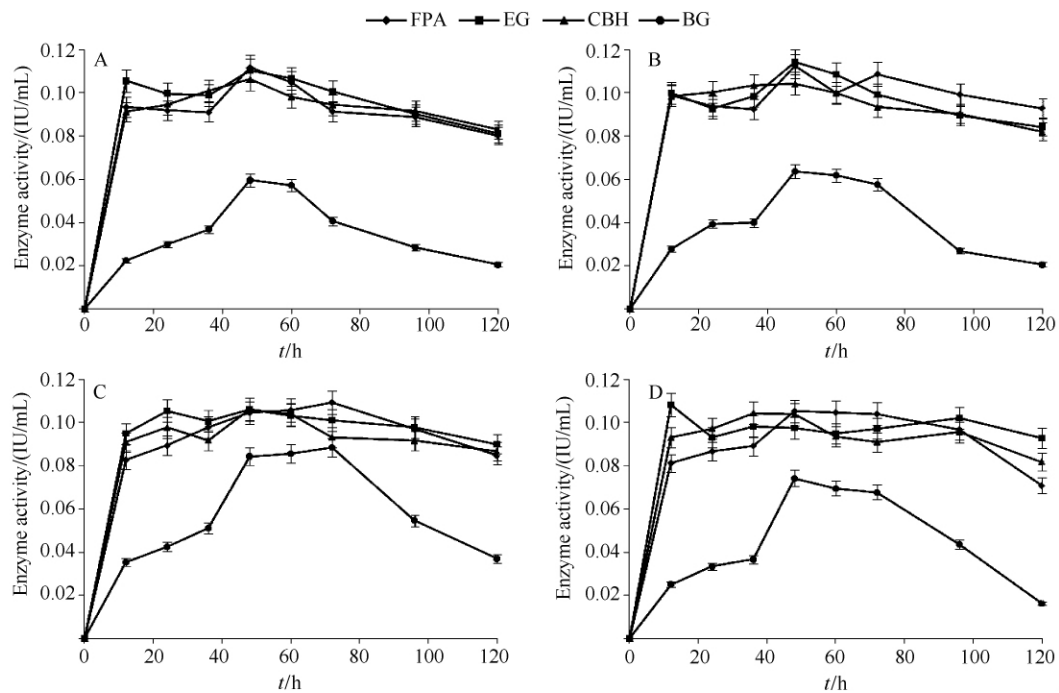


图4 不同纤维素底物对菌株 P2 纤维素酶酶系的影响

Fig. 4 Effect of various cellulose substrates on the cellulase system of strain P2. Codes on the lower right corner of each graph represent certain kind of substrates degraded by strain P2. A: Filter paper; B: Absorbent cotton; C: Straw; D: Bamboo. Curves in each graph display the change tendency of enzymatic activity with endoglucanases, exoglucanases, β -glucosidases and cellulase (represented as filter paper activity).

纤维素提供了证据。荣华等^[12]通过富集培养的方法获得了具有降解纤维素能力的梭菌属菌株 PD-2, 该研究在菌种筛选时专一性地采用了厌氧培养。以梭菌属为代表的厌氧纤维素分解菌对纤维素底物具有较强的粘附作用, 并且能够发酵纤维素和纤维二糖生成乙醇、乙酸、 H_2 、 CO_2 等产物。但在大熊猫肠道较短、含氧量相对其他哺乳动物较高的实际生理环境下^[5], 严格厌氧细菌的生长和定植受到限制, 而有利于以芽胞杆菌属为代表的好氧或兼性厌氧菌的定植。本实验从雅安碧峰峡熊猫基地健康大熊猫的肠道分离出一株好氧纤维素分解菌 P2, 菌株 P2 能够在 $20^\circ C - 50^\circ C$ 的温度范围内生长 (最适温度 $37^\circ C$); pH 范围为 5.0 - 9.0 (最适 pH 为 7); 最适 NaCl 浓度为 2%, 并能在 NaCl 浓度为 15% 时生长, 可判定其为中等嗜盐菌^[25], 在产纤维素酶芽胞杆菌的相关研究报道中较为少见。结合形态学特征、生理生化特性和 16S rDNA 序列分析结果, 鉴定菌株 P2 为解淀粉芽胞杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*), 在菌种种类上与以往的同类研究结果不同, 且从大熊猫粪便中首次分离出具有降解纤维素能力的芽胞杆菌属菌

种。

纤维素分解菌降解纤维的机理是通过与粗纤维的附着、粘连、穿透等一系列作用, 产生纤维素酶将纤维的各组分进行分解^[26]。目前被普遍接受的是协同理论^[27], 即在内切葡聚糖酶, 外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶的协同作用下, 纤维素被逐步降解为能被宿主动物所利用的单糖, 为宿主动物的代谢提供能量和挥发性脂肪酸等物质。菌株 P2 的纤维素酶酶系中含有上述 3 种组分酶, 且内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶的酶活性有时会大于纤维素总酶活, 而 β -葡萄糖苷酶与纤维素总酶活的酶活性最大值出现时间完全吻合。但当纤维素总酶活达到最大值时, 3 种组分酶的活性均达到峰值, 这也证明了纤维素降解过程中 3 种组分酶的协同作用。

菌株 P2 对环境中常见 4 种纤维素底物均表现出良好的降解能力, 其中在降解脱脂棉纤维时的纤维素总酶活最高, 达到 0.1125 IU/mL, 与崔宗均等^[28]、韩如旻等^[29]的研究中纤维素分解菌对不同纤维素底物的降解情况相符。自然界的纤维素在极少数情况下, 主要是在棉纤维中, 处于高度纯化的状

态, 并且棉纤维结晶度为 80% - 90%, 聚合度为 3500 - 10000, 比木质纤维素高, 是天然纤维素的最完善结晶和抗性最强的形式, 在降解反应中纤维素酶系的协同作用表现更强。而在大多数情况下(如秸秆、竹纤维), 纤维素纤维嵌入到主要由半纤维素和木质素构成的间质中^[30-32], 使得降解这些未经处理的纤维素底物变得十分困难, 纤维素总酶活较低。由于 EG 和 CBH 均能引起纤维素的分散和脱纤化, 从而在棉纤维、秸秆和竹纤维为底物的发酵液中均表现出较高的活性。而滤纸是一种多重底物, 结构较为松散, 具有更多的非还原性末端和无定形区域, 因此不需要过多地利用 CBH 将结晶区域的纤维素长分子链开裂, 以及使长链分子末端部分发生游离的作用, 从而使得 EG 具有比 CBH 更高的酶活。在本实验条件下, 菌株 P2 的纤维素总酶活最高可达 0.2283 IU/mL, 比已报道的从大熊猫粪便^[12] 和笋干^[33] 分离出的天然纤维素分解菌具有更高的酶活, 且纤维素酶系能在较高 pH 范围内保持良好的纤维素分解能力。因此, 该菌株为进一步研究大熊猫竹纤维消化机制提供了菌源, 在生物质降解等实际应用上具有良好的前景。

参考文献

- [1] Schaller GB, Hu JC, Pan WS, Zhu J. The Giant Pandas of Wolong. Chicago: The University of Chicago Press, 1984.
- [2] Dierenfeld ES, Hintz HF, Robertson JB, Van Soest PJ, Oftedal OT. Utilization of bamboo by the giant panda. *Journal of Nutrition*, 1982, 112 (4): 636-641.
- [3] 陈玉村, 翁妮娜, 邹兴淮, 王爱民, 郑丁团. 人工饲养大熊猫竹粉配合料与常规料粗纤维素消化率的比较研究. 东北林业大学学报 (*Journal of Northeast Forestry University*), 1998, 26 (4): 36-38.
- [4] Li RQ, Fan W, Tian G, Zhu HM, He L, Cai J, Huang QF, Cai QL, Li B, Bai YQ, Zhang ZH, Zhang YP, Wang W, Li J, Wei FW, Li H, Jian M, Li JW, Zhang ZL, Nielsen R, Li DW, Gu WJ, Yang ZT, Xuan ZL, Ryder OA, Leung FCC, Zhou Y, Cao JJ, Sun X, Fu YG, Fang XD, Guo XS, Wang B, Hou R, Shen FJ, Mu B, Ni PX, Lin RM, Qian WB, Wang GD, Yu C, Nie WH, Wang JH, Wu ZG, Liang HQ, Min JM, Wu Q, Cheng SF, Ruan J, Wang MW, Shi ZB, Wen M, Liu BH, Ren XL, Zheng HS, Dong D, Cook K, Shan G, Zhang H, Kosiol C, Xie XY, Lu ZH, Zheng HC, Li YR, Steiner CC, Lam TTY, Lin SY, Zhang QH, Li GQ, Tian J, Gong TM, Liu HD, Zhang DJ, Fang L, Ye C, Zhang JB, Hu WB, Xu AL, Ren YY, Zhang GJ, Bruford MW, Li QB, Ma LJ, Guo YR, An N, Hu YJ, Zheng Y, Shi YY, Li ZQ, Liu Q, Chen YL, Zhao J, Qu N, Zhao SC, Tian F, Wang XL, Wang HY, Xu LZ, Liu X, Vinar T, Wang YJ, Lam TW, Yiu SM, Liu SP, Zhang HM, Li DS, Huang Y, Wang X, Yang GH, Jiang Z, Wang JY, Qin N, Li L, Li JX, Bolund L, Kristiansen K, Wong GKS, Olson M, Zhang XQ, Li SG, Yang HM, Wang J, Wang J. The sequence and de novo assembly of the giant panda genome. *Nature*, 2010, 463 (7279): 311-317.
- [5] 张志和, 何光昕, 王行亮, 钟顺隆, 张安居, 李光汉. 大熊猫肠道正常菌群的研究. 兽类学报 (*Acta Theriologica Sinica*), 1995, 15 (3): 170-175.
- [6] Hirayama K, Kawamura S, Mitsuoka T, Tashiro K. The faecal flora of the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *Journal of Applied Bacteriology*, 1989, 67 (4): 411-415.
- [7] 孙飞龙, 刘敬贤, 席丹, 王万云, 高更更, 冯宁, 杨水云. 大熊猫肠道疾病致病菌. 经济动物学报 (*Journal of Economic Animal*), 2002, 6 (2): 20-23.
- [8] 邹兴淮, 曾鲁军, 孙中武, 闫文, 何光昕, 吴孔菊, 陈玉村, 翁妮娜. 大熊猫疾病死亡因素分析及其保护对策. 东北林业大学学报 (*Journal of Northeast Forestry University*), 1998, 26 (1): 53-56.
- [9] 王兴龙. 微生态学与微生态制剂的研究进展. 中国兽医学报 (*Chinese Journal of Veterinary Science*), 1997, 17 (1): 101-103
- [10] 王强, 何光昕, 余星明, 赵波, 张安居, 余建秋, 杨志, 雷蕾, 张再蓉, 曾蔚. 微生态制剂在大熊猫疾病治疗中的临床应用研究. 中国微生态学杂志 (*Chinese Journal of Microecology*), 1998, 10 (6): 349-353.
- [11] 荣华, 邱成书, 胡国全, 刘晓凤, 张辉, 费立松, 徐恒, 邓宇. 一株大熊猫肠道厌氧纤维素菌的分离鉴定、系统发育分析及生物学特性的研究. 应用与环境生物学报 (*Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*), 2006, 12 (2): 239-242.
- [12] Zhu LF, Wu Q, Dai JY, Zhang SN, Wei FW. Evidence of cellulose metabolism by the giant panda gut microbiome. *PNAS*, 2011, 108 (43): 17714-17719.
- [13] Teather RM, Wood PJ. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and*

- Environmental Microbiology*, 1982, 43 (4) : 777.
- [14] Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG. Taxonomic Outline of the Prokaryotes, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd eds. New York: Springer press, 2004.
- [15] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京:科学出版社,2001.
- [16] 周德庆. 微生物学实验手册. 上海:上海科学技术出版社,1986.
- [17] 郝建国,薛燕芬,马延和. 一株产蛋白酶嗜碱菌株的分离、鉴定及酶学特性. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2010, 50 (1) :54-59.
- [18] Baker GC, Smith JJ, Cowan DA, Review and re-analysis of domain-specific 16S primers, *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 55 (3) : 541-555.
- [19] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4 (4) : 406-425.
- [20] Ghose TK. Measurement of cellulose activities. *Pure and Applied Chemistry*, 1987, 59 (2) : 257-268.
- [21] Westermark U, Eriksson KE. Cellobiose: Quinone Oxidoreductase, a new wood-degrading enzyme from White-rot fungi. *Acta Chemica Scandinavica*, 1974, B 28 (2) : 209-214.
- [22] Coward-Kelly G, Aiello-Mazzari C, Kim S, Granda C, Holtzapple M. Suggested improvements to the standard filter paper assay used to measure cellulase activity. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, 82 (6) : 745-749.
- [23] Biely P, Mislovicova D, Toman R, Soluble chromogenic substrates for the assay of endo-1,4- β -xylanases and endo-1,4- β -glucanases. *Analytical Biochemistry*, 1985, 144 (1) : 142-146.
- [24] Zhang BW, Li M, Zhang ZJ. Genetic viability and population history of the giant panda, putting an end to the evolutionary dead-end. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24 (8) : 1801-1810.
- [25] Olliver B, Caumette P, Garcia JL, Mah RA. Anaerobic bacteria from hypersaline environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1994, 58 (1) : 27-38.
- [26] Miron J, Ben-Ghedalia D, Morrison M. Invited Review: Adhesion Mechanisms of Rumen Cellulolytic Bacteria. *Journal of Dairy Science*, 2001, 84 (6) : 1294-1309.
- [27] Henrissat B, Driguez H, Viet C, Schulein M: Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. *Bio-Technology*, 1985, 3 (8) : 722-726.
- [28] 崔宗均,李美丹,朴哲,黄志勇, Masaharu I, Yasuo I. 一组高效稳定纤维素分解菌复合系 MC1 的筛选及功能. 环境科学 (*Environmental Science*), 2002, 23 (3) : 36-39.
- [29] 韩如旸,梅建凤,闵航,陈美慈. 嗜热厌氧纤维素降解菌对纤维素的粘附及其酶活性研究. 浙江大学学报 (农业与生命科学版) [*Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Science)*], 2001, 27 (2) : 165-168.
- [30] Lynd LR, Wyman CE, Gerngross TU. Biocommodity engineering. *Biotechnology Progress*, 1999, 15 (5) : 777-793.
- [31] Marchessault RH, Sundararajan PR. Cellulose // Aspinall GO. The Polysaccharides, Volume 2. New York: Academic Press, 1993: 11-95.
- [32] Van Soest PJ. Nutritional Ecology of the Ruminant. 2nd eds. New York: Cornell University Press, 1994.
- [33] 朱军莉,韩剑众,励建荣. 纤维素分解菌 BSX5 的分离、鉴定及产酶条件. 食品与生物技术学报 (*Journal of Food Science and Biotechnology*), 2006, 25 (3) : 15-18.

Isolation, identification and cellulase production of a cellulolytic bacterium from intestines of giant panda

Cheng Fan¹, Shuangjiang Li¹, Chenglei Li¹, Shuang Ma¹, Likou Zou², Qi Wu^{1*}

¹College of Life and Basic Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China

²Laboratory of Microbiology, Dujiangyan Campus of Sichuan Agricultural University, Dujiangyan 611830, China

Abstract: [Objective] To isolate and identify the cellulose-producing bacterium from fresh feces of healthy giant pandas, and characterize its cellulase production. [Methods] A strain with high activity of cellulase was isolated and purified by carboxymethyl cellulose-Na (CMC-Na) medium. The morphological, physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA gene were analyzed to identify the taxonomic position of the strain. Meanwhile, its cellulase producing conditions and degradation of several cellulose substrates were studied. [Results] A cellulose-producing strain P2 was obtained. Strain P2 is a gram-positive and aerobic bacterium. Its growth temperature ranges from 20 to 50°C (optimum at 37°C) and pH 6.0 to 9.0 (optimum at 7.0), and NaCl concentration at 0% - 15% (optimum at 2.0%). It took 24 h to reach the peak of cellulase production. Phylogenetic analysis based on 16S rDNA sequence showed that strain P2 is most closely related to the *Bacillus amyloliquefaciens* NBRC15535 with the similarity of 99.66%. Strain P2 possesses different abilities to degrade four different cellulose substrates including filter paper, absorbent cotton, straw, and bamboo fiber. During the degradation, it shows different enzymatic activity curves with endoglucanases, exoglucanases, β -glucosidases and cellulase. [Conclusion] An aerobic cellulolytic bacterium was isolated from feces of giant pandas for the first time, and was identified as *Bacillus amyloliquefaciens*. Due to its ability to degrade the cellulose materials with different structures, strain P2 could be used in the further study on the digestion mechanism of bamboo of giant panda.

Keywords: giant panda, cellulase, *Bacillus amyloliquefaciens*

(本文责编:王晋芳)

* Corresponding author. Tel: +86-835-2886126; Fax: +86-835-2886136; E-mail: wuqiwwq@yahoo.cn

Received: 28 March 2012 / Revised: 15 May 2012

《微生物学报》审稿程序

问: 贵刊的审稿程序是怎样的? 一般多长时间可以知道稿件是否被录用?

答: 本刊严格遵守“三审制”, 即: 编辑部内审, 专家外审, 主编总审。从投稿日期开始, 争取在 2 个月之内给出审稿结果, 3-6 个月之内发表。

- (1) 收到来稿后, 首先要由编辑初审, 通过后再送外审。将请 2 位专家进行审阅, 再送主编进行最后的总审, 这个过程一般不会超过 2 个月。如果初审 2 位专家的意见分歧较大, 编辑部将再请第 3 位专家进行初审, 之后再送主编总审, 那么此稿的审理时间可能会超过 2 个月。
- (2) 完成审稿后 (即主编给出总审意见), 编辑会给作者发出 E-mail 告知修改意见 (包括学术上的和写作格式上的)。作者在返回修改稿后, 经本刊审核合格后方可被录用。

在此提醒作者, 在没有完成全部审稿之前, 不要在远程系统中看到初审意见时就急于返回修改稿件。