

瘤胃中纤维素分解菌的分离、鉴定及其产酶条件的优化

买尔哈巴·艾合买提¹, 樊振¹, 李越中², 古丽斯玛依·艾拜都拉¹, 乌斯满·依米提^{1*}

¹新疆大学生命科学与技术学院, 乌鲁木齐 830046

²山东大学生命科学学院, 微生物技术国家重点实验室, 济南 250100

摘要: 【目的】从新疆细毛羊、牛和骆驼瘤胃液中分离出具有分解纤维素能力的好氧细菌, 用于绿色粗饲料微生物添加剂的研发。【方法】采取新鲜瘤胃液, 接种于羧甲基纤维素钠平板, 通过刚果红染色和液体复筛培养基, 筛选出分解纤维素能力强的好氧细菌; 形态学、生理生化试验与 16S rDNA 序列分析方法相结合对细菌进行鉴定; 同时对纤维素分解能力强的 4 株细菌进行不同条件下酶活力测定。【结果】共分离到 84 株具有分解纤维素能力的细菌, 其中筛选出较强分解纤维素能力的 40 株。该菌包括 37 株 G⁻ 菌和 3 株 G⁺ 菌; 经鉴定 40 株纤维素分解菌分别属于 6 个属 10 个种, 其中 16 株为寡养单胞菌属, 10 株为苍白杆菌属, 5 株为鞘氨醇杆菌属, 3 株为微杆菌属, 3 株为副球菌属, 2 株为假单胞菌属。其中产酶能力强的 4 株菌在不同条件下的酶活力表明, 它们在最佳碳源为秸秆粉、pH5.5-6.0 的偏中性条件和 37℃ 培养条件下的酶活力较高。不同菌株对不同纤维素类物质的分解能力不一样, 同一菌株对不同纤维素碳源的利用能力也不相同。【结论】分离获得的瘤胃纤维素分解菌是从新疆不同地区、干旱半干旱环境下饲养的动物胃液中分离、筛选出来的, 有较强的纤维素分解能力, 将为高品质、高消化率的青贮饲料生产提供优质菌种资源及一定的科学依据。

关键词: 瘤胃液, 纤维素分解菌, 分离与鉴定, 酶活力测定

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2013) 05-0470-08

新疆是以农业为主的农牧大省, 年产各类作物秸秆 1000 多万吨, 全疆秸秆综合利用率仅达到 10%, 仍有约计 900 万吨没能被利用 (2010)。据估算, 全国农作物秸秆产量每年就有 6 亿吨左右, 而这巨大的生物资源长期以来都被废弃或作为柴草烧掉, 或在田间焚烧, 既造成严重的大气污染, 破坏了生态环境, 又浪费了宝贵的再生利用资源。另外, 农作物秸秆因纤维素和木质素含量高、糖含量低, 在作为粗饲料时消化率非常低。因此运用微生物工程技

术处理秸秆, 提高粗饲料中的蛋白和碳水化合物含量, 被认为是解决上述问题的有效方法。过去的研究中, 有人以酸处理和碱处理以及蒸汽加热处理等方法来处理纤维素^[1-3], 但这些方法由于存在降解产物回收率不高和产生的废弃物存在二次污染等缺陷, 使其应用大大地受到了限制。利用微生物产生的纤维素酶降解纤维素, 具有条件温和、产物产率高和无二次污染等特点, 成为目前较有效且更接近自然的一种纤维素处理方法^[4]。

基金项目: 国家自然科学基金 (31260014); 山东大学微生物技术国家重点实验室开放课题 (M2011-07)

* 通信作者。Tel: +86-15909913615; E-mail: xafkat@sina.com

作者简介: 买尔哈巴·艾合买提 (1985-), 女, 维吾尔族, 新疆焉耆县人, 硕士研究生, 主要从事微生物资源开发。E-mail: mm198511@yahoo.cn

收稿日期: 2012-09-24; 修回日期: 2012-12-31

国内关于纤维素分解细菌的研究报道较多,但菌种来源主要是林场、土壤、动物粪便、堆肥、垃圾堆、温泉^[5-9]等。而从反刍动物瘤胃液中分离纤维素分解细菌的报道较少^[10-13]。由于青贮饲料或微贮饲料的发酵要经历耗氧期再进入厌氧发酵,因此好氧细菌作为青贮或微贮饲料微生物添加剂更具有优势。为此,本研究对反刍动物(牛、羊和骆驼)瘤胃液中的纤维素分解菌进行了分离和鉴定,并筛选出高酶活力菌株,以期绿色粗饲料微生物添加剂的研究和开发提供基础资料,将在促进新疆畜牧业的发展及提高经济效益方面产生一定的意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品:采自乌鲁木齐市安宁渠屠宰场新鲜牛、羊和骆驼瘤胃液。

1.1.2 培养基:(1)羧甲基纤维素钠培养基;(2)液体复筛培养基;(3)产酶发酵培养基;(4)秸秆纤维素的制备。参见文献[14-16]。

1.1.3 主要试剂和仪器:试剂均为市售分析纯(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司);细菌基因组DNA提取试剂盒(TIANGEN,北京);PCR产物纯化试剂盒(上海生工生物工程技术有限公司);*Taq* DNA聚合酶(宝生物工程(大连)有限公司)。TGL-16B型台式高速离心机;ML-30L型全自动高压蒸汽灭菌器(上海博迅公司);电热恒温干燥箱(宁波江南仪器厂);DYY-11型电脑三恒多用电泳仪;Dk-8D电热恒温水浴槽;凝胶成像仪(Alpha Innotech美国)公司;HWS型智能恒温恒培湿箱(江苏省金坛市医疗仪器厂);JD200-3型电子天平(沈阳龙腾电子称量仪器有限公司);CX21FS1型显微镜(日本OLYMPUS)。

1.2 菌种初筛

采集新鲜瘤胃液迅速带回实验室,匀浆10 s后经3层纱布过滤,滤液作为菌种来源备用,再用刚果红染色法进行初筛。

1.3 滤纸分解率测定

将初筛的各菌株接种到以滤纸为唯一碳源的液体培养基中,37℃,在转速为160 r/min的摇床培养5 d,观察滤纸的崩解效果,以“+”的多少来表示滤纸崩解程度^[15]。

1.4 酶活测定复筛

将初筛得到的水解圈较大的菌株接种到复筛培养基中,37℃下160 r/min振荡培养5 d,发酵液经8000 × g离心10 min,取上清液测定纤维素酶活。酶活力单位(U)定义为:在上述条件下,每小时由底物生成1 μmol葡萄糖所需的酶量定义为一个酶活力单位(U)。

1.5 滤纸酶活(FPA)测定

将去淀粉处理的新华滤纸(1 × 6cm)放进20 mL具塞刻度试管,加入0.5 mL粗酶液和1.5 mL(0.05 mol/L,pH4.5)柠檬酸缓冲液,将试管在50℃水浴中保温1 h后取出立即向试管中加入1.5 mL DNS溶液以终止酶反应,充分摇匀后沸水浴5 min,取出冷却后按DNS法在540 nm波长下测定还原糖^[17]。

1.6 羧甲基纤维素酶活(CMCase)测定

移取0.5 mL粗酶液于试管中,加入含0.5% CMC-Na的柠檬酸缓冲液1.5 mL(0.05 mol/L,pH4.5),将试管在50℃水浴30 min后,立即按DNS法测定还原糖含量。

1.7 菌株的鉴定

1.7.1 菌株的形态学观察及生化鉴定:经复筛得到的菌株观察其菌落的形态特征,通过革兰氏染色在显微镜下观察并记录菌体形态和染色特征。

1.7.2 16S rDNA 鉴定:菌株过夜培养后用细菌基因组提取试剂盒获得模板DNA,PCR反应的引物为一对细菌通用引物27f和1492r,PCR反应体系为25 μL,反应条件见文献[18]。PCR产物测序由山东省农业科学院高新技术研究中心完成。将得到的16S rDNA部分序列在GenBank数据库中BLAST比对获得相似性高的序列。

1.8 高产菌株产酶条件研究

1.8.1 不同碳源对菌株纤维素分解酶活力的影响:将复筛结果中的产纤维素酶能力较高的菌株Y6、L13、Ne、Nf接种到以产酶发酵培养基为基础,加入2%的纤维素作为碳源的液体培养基中^[19](碳源分别设为稻草粉、纤维素粉和滤纸浆)于37℃,160 r/min培养5 d,按DNS法测定其酶活;酶活力单位(U)同上。

1.8.2 不同pH对菌株纤维素分解酶活力的影响:以产酶发酵培养基为基础,以pH为主要变量因子进行试验,pH分别设5.0、5.5、6.0、7.0和8.0等5

个变量,按上述方法分别将筛选出的 Y6、L13、Ne 和 Nf 接种到液体培养基中,于摇床中 37℃、160 r/min 培养 5 d,按 DNS 法测定其酶活。

1.8.3 不同温度对菌株纤维素分解酶活力的影响:

将 4 个高产菌株接种至产酶发酵培养基中分别置于 25℃、30℃、37℃、40℃ 和 45℃ 中 160 r/min 培养 5 d 后按 DNS 法测定其酶活。

2 结果和分析

2.1 菌种筛选

从瘤胃液样品中分离到能分解纤维素的细菌 84 株,对其按透明圈直径与菌落直径之比(D/d)较大以及滤纸条溃烂程度大于“++”筛选出 40 株,按 DNS 法对分离的 40 株纤维素分解菌进行滤纸酶

活(FPAase)、羧甲基纤维素钠酶活(CMCase)测定(图 1,表 1)。

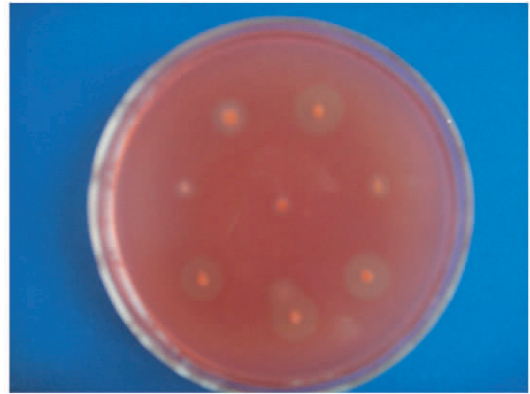


图 1. 菌株在刚果红平板上产生的透明圈

Figure 1. Transparent circle of strains in Congo red plates.

表 1. 初筛菌株菌落透明圈直径比、滤纸溃烂度、FPA 酶活和 CMC 酶活测定结果

Table 1. Results of first screening of diameter of transparent ring/diameter of colony, filter paper breakdown, FPA activity and CMC activity

Strains	D/d	Filter paper resolution	FPA enzyme activity/(U/mL)	CMC enzyme activity/(U/mL)	Strains	D/d	Filter paper resolution	FPA enzyme activity/(U/mL)	CMC enzyme activity/(U/mL)
Y1	6.29	++	2.929	4.21	L21	4.67	+++	9.096	9.16
Y2	4.69	++	1.388	2.844	L22	5.56	++	1.476	4.986
Y4	5.48	+++	6.679	5.664	L27	4.00	++	7.973	7.893
Y6	8.00	+++	9.674	10.403	L29	3.23	+++	9.027	9.33
Y10	3.61	++	6.331	6.623	L30	5.00	++	8.962	8.766
Y11	3.57	++++	7.348	9.531	Na	3.71	++	2.493	4.114
Y13	3.44	++	2.057	4.821	N3	6.11	++	3.86	2.37
Y14	5.36	+++	7.043	8.455	Ne	4.69	++	1.97	4.027
Y17	7.41	++	2.115	4.559	N6	8.40	++	5.546	6.062
Y19	5.53	+++	7.828	5.838	Ne	6.00	++++	10.008	11.789
Y21	6.00	+++	8.366	9.036	N9	3.25	+++	8.802	9.667
Y24	3.42	++	6.127	6.245	N13	6.07	++	8.525	11.12
Y27	5.00	++	5.909	7.147	Nf	9.63	++++	9.965	11.208
L2	7.04	++	2.886	3.009	N16	5.71	++	2.697	4.579
L5	4.67	++	1.04	3.068	N18	4.75	++	8.962	9.173
L6	8.33	++	2.595	2.195	N19	4.38	++	1.621	4.23
L12	4.00	++	2.101	3.736	N20	3.25	+++	7.639	6.585
L13	8.57	++++	10.401	10.626	N22	3.44	+++	8.947	8.213
L17	4.06	++	8.118	8.766	N23	6.00	++	3.7	2.195
L18	7.78	++	8.017	8.969	N24	6.15	++	6.331	5.335

D/d: Diameter of transparent ring (mm) /Diameter of coloy (mm); Level of filter paper rotter “+” means filter paper no broken. edge of filter paper rugged “++” means filter paper broken and the liquid medium no sticky; “+++” means filter paper broken and the liquid medium sticky with pieces; “++++” means filter paper broken and the liquid medium sticky and even.

Numbers starting with “Y” means that strain was isolated from sheep rumen fluid; starting with “N” means that strain was isolated from cattle rumen fluid; starting with “L” means that strain was isolated from camel rumen fluid.

由表 1 中可以看出, 菌株 Y11、L13、Ne 和 Nf 对滤纸的分解能力较强, 在 5d 内全成糊状。菌株 Y6、L13、L21、L29、Ne 和 Nf 的酶活力较高, 对秸秆粉等纤维素类物质有较强的分解能力。其中 Ne 的酶活力最高, FPA 酶活和 CMC 酶活分别为 10.008 U/mL 和 11.789 U/mL; 同时可见, FPA 酶活高的菌株其 CMC 酶活也高, 而且滤纸分解度较明显, 这与透明圈直径测定结果成正比。综合初筛和两类酶活测定结果, Y6、L13、Ne 和 Nf 四个菌株的酶活力指标均较高, 可视为高产纤维素酶的菌株。

2.2 菌株的鉴定

2.2.1 形态学观察结果: 40 株纤维素分解菌在羧甲基纤维素钠培养基上生长 48 h 后, G⁻ 细菌大多形成圆形隆起、边缘整齐、光滑湿润、半透明淡黄色、不透明黄绿色菌落, 有的同心环状, 不透明, 奶油白色, 中间微黄不透明白色菌落, 直径 1.5 mm - 4.0 mm 左右, 镜检为 G⁻ 短杆菌, 两端钝圆, 有的可见芽胞;

G⁺ 细菌大多形成圆形或梭形、扁平、边缘不整、无光泽的白色菌落, 直径 2 mm - 3mm 左右, 镜检为 G⁺ 球杆菌, 有的可见芽胞。

2.2.2 生化试验结果: 通过生理生化试验, 分离到的 40 株细菌可鉴定到属或属以下水平。其中 3 株为革兰氏阳性菌, 37 株为革兰氏阴性菌; 接触酶、过氧化氢酶试验、硝酸盐还原、葡萄糖发酵皆为阳性, 吲哚、V-P 试验、淀粉水解、明胶液化、乳糖、半乳糖、甘露醇皆为阴性, 部分菌株蔗糖、果糖发酵阳性, 大部分菌株具有运动性。

2.2.3 16S rDNA 鉴定: 经 16S rDNA 基因序列分析鉴定, 40 株细菌分别属于 6 个属 10 个种。即寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas*)、苍白杆菌属 (*Ochrobactrum*)、鞘氨醇杆菌属 (*Sphingobacterium*)、微杆菌属 (*Microbacterium*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和副球菌属 (*Paracoccus*), 具体种名见表 2。

表 2. 40 株纤维素分解菌的菌种分类

Table 2. Classification of 40 bacteria

Genus name	Species name	Strains	Similarity/%
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Y6 [*] , Y10, Y11, Y14, Y21, Ne [*] , N13, Nf [*] , N18, N9, L13 [*] , L17, L18, L21, L29, L30	98.8 - 99.5
	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	Y1, Y13, Y17, Y27, Na, N16, N19, L22	99.0 - 99.5
<i>Ochrobactrum</i> sp.	<i>Ochrobactrum pseudintermedium</i>	Y2	99.4
	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	Nc	99
<i>Sphingobacterium</i> sp.	<i>Sphingobacterium thalpophilum</i>	Y4, Y19, Y24, N6, N24	99.0 - 99.5
<i>Microbacterium</i> sp.	<i>Microbacterium oxydans</i>	L6	99.2
	<i>Microbacterium maritopicum</i>	N3, N23	99
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas beteli</i>	N20	98.7
	<i>Pseudomonas mosselii</i>	L27	99.5
<i>Paracoccus</i> sp.	<i>Paracoccus kondratievae</i>	L2, L5, L12	98.9 - 99

* * Means exhibited strong abilities in decomposing cellulose.

2.3 高产菌株产酶条件研究

2.3.1 不同碳源对菌株纤维素分解酶活力的影响: 将高产纤维素酶菌株 Y6、L13、Ne 和 Nf 在不同碳源的培养基中培养 5 d 后, 测得酶活; 结果表明 (图 2), 秸秆粉为碳源时, Y6 的 FPA 酶活最高, 达到了 10.997 U/mL。而 Nf 的 CMC 酶活最高, 达到 11.149 U/mL; Y6 对纤维素粉的利用能力较优于其他菌株, 其次是 Ne 和 Nf; Nf 对底物滤纸浆的利用能力最好, 其 FPA 酶活和 CMC 酶活分别为 9.979 U/mL 和 5.975 U/mL。碳源不仅对它们的生长必不可少, 而且对于它们的产酶能力也有重要影

响。产生这种差异可能是由于纤维素类作用底物中除了纤维素外, 还含有其他一些糖类等物质影响酶活; 另一方面可能与他们纤维素的结构有关; 此外, 可能与其菌体所含的纤维素酶体系有关。总之, 不同菌株对同一碳源作用产生的酶活不同, 菌株以秸秆粉为碳源时的酶活显著高于以纤维素粉和滤纸浆为碳源时的酶活。

2.3.2 培养温度和初始 pH 对菌株纤维素分解酶活力的影响: 对选定的 4 株菌进一步优化产酶条件, 改变培养温度和初始 pH, 结果表明, 4 株菌最适培养温度均为 37℃, L13 和 Y6 的最适 pH 条件是 5.5,

Y6 和 Ne 的最适 pH 条件为 6.0 (表 3), 该条件下的酶活较高。试验菌株在相同培养基, 不同 pH 条件下均以偏中性生长, 温度越高对菌株的产酶越不利, 这与相关报道^[20] 具有一致性。适当的 pH 条件可以促进菌株的生长, 对产酶有利, 但过碱或过酸条件

却会抑制酶的产生, 这与酶的负反馈机制有关。在产酶发酵过程中, 发酵温度是一个非常重要的因素, 合适的发酵温度不仅有利于菌体浓度的快速增加, 而且要符合产酶的条件; 培养基的初始 pH 也影响着菌体的生长和产物纤维素酶的稳定性。

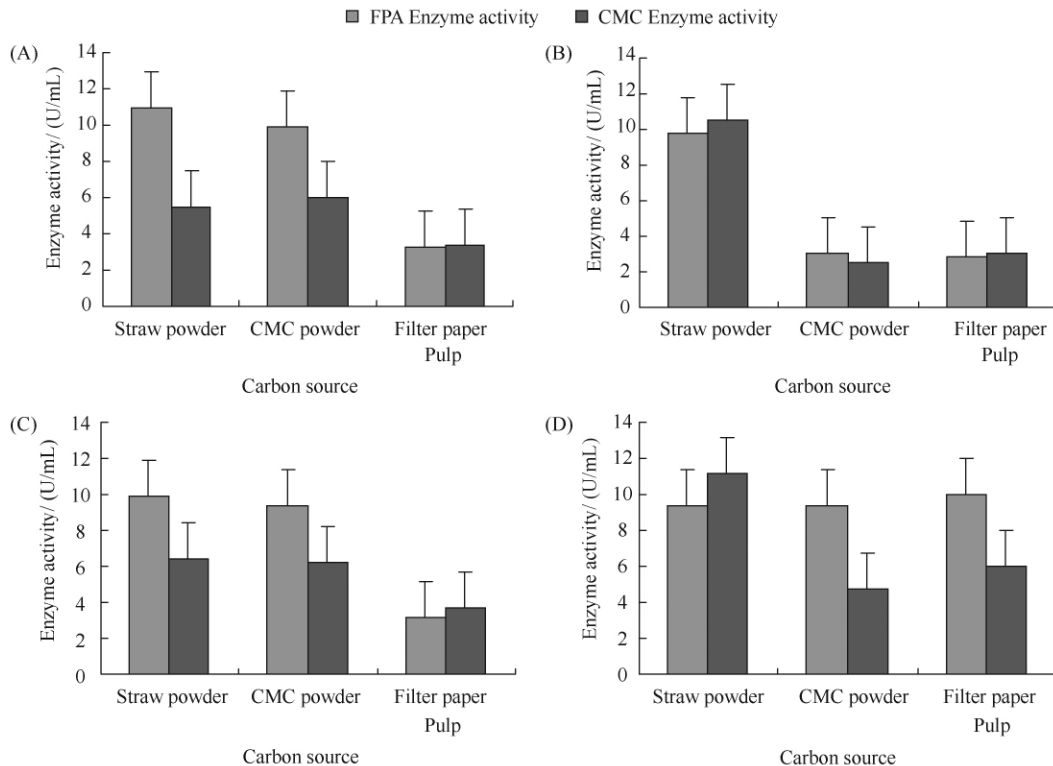


图 2. 不同碳源对菌株酶活力的影响

Figure 2. Effects of different carbon sources on strains' enzyme activity. The letters of charts represent each strain. A: strain Y6; B: strain L13; C: strain Ne; D: strain Nf.

另外, 还要考虑酶促反应中底物对酶活力的影响。表 3 中数据表明, 以 CMC 为反应底物测得的酶活力值比以滤纸为底物测得的酶活力值高, 即两种酶的内切酶活力较高。滤纸容易同时被内切酶和外切酶降解, 再由葡萄糖苷酶分解成葡萄糖等还原糖, 反映的是纤维素酶三类酶组分的协同作用的总酶活^[21]; 另外由于外切酶对纤维素链的专一性高, 而内切酶的专一性较低, 在降解 CMC 时, 主要反映的是内切酶的活力。可能是由于 CMC 为水溶性底物, 而滤纸与酶属多相催化, 所以反应的空间阻碍较大, 也说明了吸附对酶的活性部位与纤维素的结合及催化均有很大影响^[22]。因此, 酶对不同底物的活性是不同的, 同一酶活测定方法获得的几种酶制剂的活力数值, 在作用其它底物时仅能作为参考。

表 3. 菌株最佳产酶条件及其酶活

Table 3. Optimal conditions for cellulase production

Strain	Best conditions	CMC enzyme activity / (U/mL)	FPA enzyme activity / (U/mL)
Y6	pH 6.0 37°C	7.68	4.65
L13	pH 5.5 37°C	7.65	4.05
Ne	pH 6.0 37°C	10.51	5.26
Nf	pH 5.5 37°C	9.07	6.11

3 讨论

瘤胃中 50% 纤维素的消失被认为是瘤胃细菌、真菌和原虫共同作用的结果, 而在这一消化过程中, 80% 由细菌完成^[23]。瘤胃细菌产生的纤维素酶在一定程度上反映了反刍动物瘤胃内纤维素降解程度

的高低,筛选高效纤维素降解菌及测定其酶活力对于评价纤维素在瘤胃中的降解有一定参考价值。

瘤胃微生物产生的酶可分布于瘤胃液酶、附在饲料颗粒上的酶和瘤胃微生物菌体上酶,内源葡聚糖酶和外源葡聚糖酶存在于细胞表面或细胞质中。而 β -葡糖苷酶和 β -岩藻糖苷酶的糖苷降解酶主要存在于瘤胃液中。这表明瘤胃微生物特别是纤维分解菌与附着在植物细胞壁的菌对纤维质的分解至关重要。根据瘤胃液酶所含微生物数量及分泌的酶,瘤胃液酶在瘤胃饲料降解中具有重要作用。Martin认为在瘤胃各部分 ^{15}N 标记微生物生物量中,固体附着微生物及其酶活约占瘤胃总微生物量及总酶括的74%^[24]。

本研究中4株纤维素降解能力强的菌株是从瘤胃液中获得,它们产生的酶有可能分布于瘤胃的任何部位。基于它们以秸秆粉为最佳碳源,它们为固体附着细菌的可能性较大,但还需要进一步深入研究探讨它们的来源。4株菌皆在36-48 h之内将滤纸完全崩解溃烂,其中Y6和Nf的滤纸酶活在50℃反应条件下可达到10.997 U/mL和11.149 U/mL,与其他的纤维降解菌相比在较高的反应温度下仍保持较高且稳定的活力。程超等^[10]分离的F10菌在麸皮和纤维素粉为碳源、30℃和pH5.5条件下的酶活力最高,达到432 U/g;刘占英等^[12]从绵羊瘤胃中分离的菌株WH-1的滤纸酶活力仅为0.8 U/mL。

对于产酶条件,本实验中的菌株以容易获取、成本低廉的秸秆粉为最佳碳源。它们在37℃,pH5.5-6.0条件下的酶活最高,该条件接近瘤胃的内环境,故认为菌种在瘤胃中能够发挥其产酶能力。在实际应用中,麸皮和纤维素粉价格昂贵,使之成本较高,可将脚料、玉米秸秆等农业废弃物用于饲料发酵,这无论是在开发新能源,还是在提高饲料转化率、减少环境污染等方面都具有相当广阔的前景和应用价值。因此,在制作青贮饲料添加剂时,本研究中的纤维素降解菌在产酶条件和产酶能力方面与其他纤维素降解菌相比具有显著地优势。

近几年国内有关瘤胃纤维素分解菌的报导较多,樊川等^[13]从牛瘤胃中分离鉴定出了5株纤维素降解菌,其中包括溶纤维丁酸弧菌、黄色瘤胃球菌、伶俐瘤胃球菌、胃八叠球菌、产琥珀酸拟杆菌、梭菌、假单胞菌等;刘占英^[12]等从内蒙古绵羊瘤胃中分离

出23株纤维素降解菌,其中包括溶纤维丁酸弧菌、白色瘤胃球菌、黄色瘤胃球菌、产琥珀酸丝状杆菌、解多糖梭菌和粪肠球菌。本研究分离出的寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)、鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium*)、微杆菌属(*Microbacterium*)和副球菌属(*Paracoccus*)未曾报导从瘤胃中分离获得。

用纤维素分解菌处理秸秆,能够降解秸秆中的纤维素成分,使其变成含有较多酶解糖类、香甜可口、易于消化吸收的饲料。自然界中能够降解纤维素的微生物很多,但是从饲喂安全的角度出发,考虑到瘤胃中的微生物区系,从瘤胃液中筛选出能够分解纤维素的微生物,制成微生物制剂或饲料添加剂,理论上比从其他环境中筛选出的微生物做为反刍动物的微生物制剂或饲料添加剂更具安全性和适应性。

参考文献

- [1] Gamal RF. Effect of substrate pretreatment on microbial protein production. *Egyptian Journal of Microbiology*, 1983 (Spec. Issue): 81-89.
- [2] Chahal DS. Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulose production. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 1985, 49 (1): 205-210.
- [3] Beltrame PL, Carniti P, Visciglio A, Focher B, Marzetti A. Fractionation and bioconversion of steam-exploded wheat straw. *Bio-resource Technology*, 1992, 39: 165-171.
- [4] 戴上凯. 热稳定性纤维素分解细菌分离株之特性探讨与亲缘关系的研究. 国立中山大学生物科学研究所博士学位论文, 2005: 20-21.
- [5] Chen Y, Zhou S, Zheng Q, Zhou Y, Wang Y, Tan Y. Isolation and identification of cellulose-degrading bacteria under room temperature. *Journal of Shanghai Jiaotong University*, 2010, 36 (8): 1018-1021. (in Chinese)
陈燕, 周孙全, 郑奇士, 周义军, 王艳, 谭佑铭. 常温纤维素降解菌的分离与鉴定. 上海交通大学学报, 2010, 36 (8): 1018-1021.
- [6] Wang B. Isolation and screening of cellulose-decomposing strains. *Tianjin Agricultural Science*, 2007, 13 (4): 50-52. (in Chinese)
王宝申. 纤维素分解菌的分离筛选研究. 天津农业科学, 2007, 13 (4): 50-52.

- [7] Zhang J. Isolation and identification of high-temperature cellulolytic microbes. *Journal of Henan Normal University*, 2011, 39 (3) :141-143. (in Chinese)
张进良. 高温纤维素分解菌的分离鉴定. 河南师范大学学报, 2011, 39 (3) :141-143.
- [8] Sun D, Lv G, Wang Z. Study on extraction and stability of pigment from peel. *North Garden*, 2010 (23) :56-58. (in Chinese)
孙德鹏, 吕国华, 王智霞. 高温纤维分解菌的筛选. 北方园艺, 2010 (23) :56-58.
- [9] Cheng H, Sun Y, Han G, Ren D, Yang J, Cai J. Molecular identification and characterization of a thermostable cellulose-secreting strain. *Food and Fermentation Industries*, 2011, 37 (7) : 28-33. (in Chinese)
陈红漫, 孙玉辉, 阚国仕, 任大明, 杨佳颖, 蔡金涛. 产耐热纤维素酶菌株的分子鉴定及产酶条件优化. 食品发酵工业, 2011, 37 (7) :28-33.
- [10] Cheng C, Hao Y, Zhang L. Isolation and identification of cellulose-decomposing bacteria from rumen. *Feed Industry*, 2008, 29 (19) :39-40. (in Chinese)
程超, 郝永清, 张林冲. 瘤胃内分解纤维素细菌的分离与鉴定. 饲料工业, 2008, 29 (19) :39-40.
- [11] Wang B, Cai T, Su P, Lu J, Yao M, Ge S, Qin M. Isolation and identification of cow ruminal facultatively anaerobic cellulolytic bacteria. *Journal of Northwest A & F University*, 2009, 37 (3) :35-42. (in Chinese)
王炳晓, 柴同杰, 苏鹏程, 吕静, 姚美玲, 戈胜强, 秦梅. 奶牛瘤胃兼性厌氧纤维素分解菌的分离鉴定. 西北农林科技大学学报, 2009, 37 (3) :35-42.
- [12] Liu Z, Hou X, Liu Y, Liu X, Hu J, Yang F, Zhao Z. Isolation, identification and characterization of a cellulose-degrading bacterial strain from the rumen of sheep. *Microbiology*, 2009, 36 (3) : 460-463. (in Chinese)
刘占英, 侯先志, 刘玉承, 刘小刚, 胡建华, 杨帆, 赵子夫. 一株瘤胃纤维素降解菌的分离鉴定及其纤维素降解特性. 微生物学通报, 2009, 36 (3) :460-463.
- [13] Pan C, Yang X, Zhang X, Guo C. Isolation and identification of cellulose degrading microorganism resources from the rumen of cattle. *Heilongjiang Science and Technology Information*, 2009, 36: 213. (in Chinese)
樊川, 杨旭升, 张欣, 郭春景. 牛瘤胃中纤维素降解菌类微生物资源的分离及鉴定. 黑龙江科技信息, 2009, 36:213.
- [14] Li P, Zhang D, Wang H, Wang X, Wang X, Cui Z. Fermentation and preservation of cellulose-degrading microbial community. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2011, 27 (Supp. 1) :152-156. (in Chinese)
李培培, 张冬冬, 王慧, 王小娟, 王小芬, 崔宗均. 分解秸秆纤维素菌群的发酵及保存方法. 农业工程学报, 2011, 27 (增刊 1) :152-156.
- [15] Hao Y, Yang X, Hong X. Separation and screening of straw cellulose decomposing microorganisms. *China Feed*, 2005 (11) :15-17. (in Chinese)
郝月, 杨翔华, 洪新. 秸秆纤维素分解菌的分离筛选实验. 中国饲料, 2005 (11) :15-17.
- [16] Gao Y, Zhang X, Liu J, Zhan L. Isolation, identification and optimization of enzyme production of cellulolytic bacteria from the goose gut. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2011, 23 (3) : 466-472. (in Chinese)
高云航, 张喜宏, 刘佳丽, 战利. 鹅肠道纤维素分解菌的分离鉴定及其产酶条件的优化. 动物营养学报, 2011, 23 (3) :466-472.
- [17] Kong L, Zhao M, Wu Y. Filter paper sugar-DNS colorimetric method for determination of cellulose enzyme activity. *Dyeing and Finishing*, 1999, 1: 36-38. (in Chinese)
孔雷, 赵鸣铺, 吴永红. 滤纸糖-DNS 比色法测定纤维素酶活力. 印染, 1999, 1:36-38.
- [18] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 3rd eds. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 :604-605.
- [19] Feng J, Yao X, Wei B, Tan P, Qu D. Isolation and screening of straw cellulose-decomposing microbes. *Genomics and Applied Biology*, 2009, 28 (3) :477-479. (in Chinese)
冯健玲, 姚晓华, 韦秉兴, 覃培升, 屈达才. 稻草秸秆纤维素分解菌的分离筛选. 基因组学与应用生物学, 2009, 28 (3) :477-479.
- [20] Zhou H, Jiang H, Zhang H, Chen C. Screening on the cellulose-decomposing microorganisms a optimization of fermentation conditions. *Journal of Nanjing Xiao Zhuang University*, 2010, 26 (6) :37-40. (in Chinese)
周红霞, 江海涛, 张红琳, 陈聪颖. 纤维素分解菌的分离筛选和产酶条件优化. 南京晓庄学院学报, 2010, 26 (6) :37-40.
- [21] Cauchon N, Leduy A. Effect of dilution on CMCase and xylanase assays. *Biotechnology and Bioengineering*, 1984, 26:977.

- [22] Galas E, Pyc R, Pyc K, Siwińska K. A universal method for determination of cellulase activity. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 1980, 11: 229.
- [23] White BA, Mackie RI, Doerner KC. Enzymatic hydrolysis of forage cell walls. *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*, 1993 (a): 455-484.
- [24] Martin C, Williams AG, Michalet DB. Isolation and characteristics of the protozoal and bacterial fractions from bovine ruminal contents. *Journal of Animal Science*, 2004, 72 (11): 2962-2968.

Isolation and identification of rumen bacteria for cellulolytic enzyme production

Maierhaba Aihemaiti¹, Zhen Fan¹, Yuezhong Li², Gulisimayi Aibaidoula¹, Wusiman Yimit^{1*}

¹College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China

²State Key Laboratory of Microbial Technology, College of Life Science, Shandong University, Jinan 250110, China

Abstract: [Objective] We screened aerobic bacteria with cellulolytic activity from ruminal fluid of sheep, cattle and camel in Xinjiang. [Method] Fresh ruminal fluid was inoculated on sterilized sodium carboxymethylcellulose agar plates. Highly cellulolytic aerobic bacteria were screened out by using Congo red staining and liquid secondary screening culture media. The combination of morphological and biochemical test with 16SrDNA sequence analysis were used to classify the strains. Enzymatic activities of four strains with strong cellulose-decomposing abilities were studied under different culture conditions. [Results] Out 84 isolated cellulolytic strains, 40 exhibited strong abilities in decomposing cellulose. They are including 37 Gram-negative isolates and 3 Gram-positive strains. Identification of these 40 strains shows that they belong to 11 species of 6 genera, 16 strains in *Stenotrophomonas maltophilia*, 10 *Ochrobactrum*, 5 *Sphingobacterium*, 3 *Microbacterium*, 3 *Paracoccus* and 2 *Pseudomonas*. The results of the enzymatic studies of four strains with strong cellulolytic abilities indicates that the strains have the best enzyme producing property when straw powder was chosen as the carbon source; the pH at 5.5 - 6.0 and temperature at 37°C. [Conclusion] The strains with highly cellulolytic abilities isolated from ruminal fluid show strong abilities in cellulose decomposition.

Keywords: ruminal fluid, cellulolytic bacterium, isolation and identification, enzyme activity

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31260014)

* Corresponding author. Tel: +86-45909913615; E-mail: xafkat@sina.com

Received: 24 September 2012 / Revised: 31 December 2012