

从白蚁中分离到具有纤维素酶活的贪噬菌^{*}

吴 燕 迟绍丽 倪金凤^{**}

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘 要 以黄胸散白蚁 *Reticulitermes flaviceps* 后肠为材料,分离培养具有降解纤维素能力的微生物,以进一步了解白蚁后肠微生物的种类。通过以羧甲基纤维素钠(CMC-Na)为唯一碳源的富集及选择培养基培养、筛选,获得一株具有纤维素酶活的菌株 R3063。形态学鉴定、革兰氏染色观察及 16S rDNA 基因序列分析表明该菌株属于贪噬菌(*Variovorax* sp.)。目前尚未见贪噬菌具有纤维素酶活的报道。

关键词 白蚁,纤维素降解菌,纤维素酶,贪噬菌

Isolation of a strain of *Variovorax* sp. R3063 with cellulase activity from termite

WU Yan CHI Shao-Li NI Jin-Feng^{**}

(State Key Lab of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract A bacterial strain with cellulase activity was cultured from the hindgut suspension of the termite *Reticulitermes flaviceps* using a medium with sodium carboxymethyl cellulose (CMC-Na) as the sole carbon source. Phenotypic characterization, including morphology, gram-staining and growth and 16S rDNA gene sequence analysis indicate that the strain belongs to the genus *Variovorax*.

Key words termite, cellulose-degradation bacteria, cellulase, *Variovorax* sp.

纤维素是一种丰富的可再生资源,地球上每年光合作用可产生大于 100 亿吨的植物干物质,其中一半以上是纤维素和半纤维素(Leschine, 1995)。纤维素酶将纤维素降解为葡萄糖,进而发酵产生生物乙醇,能够缓解人类能源紧缺问题,也是解决化石能源危机,发展可再生能源重要途径之一。纤维素酶已广泛用于医药、饲料加工、果汁制取、造纸及纺织等多个领域,它的应用前景广阔(Ögel *et al.*, 2001; 李西波等, 2006)。扩大纤维素酶产生菌的筛选范围,对纤维素酶的应用有重要意义。目前分离的纤维素降解菌多来自真菌(木霉、曲霉)、细菌等(Wilson and Wood, 1992; Li, 1997)。

白蚁以木质纤维素为食,是热带和亚热带地区木质纤维素的重要分解者(Yamada *et al.*, 2005)。当前对白蚁的研究,多数集中于白蚁作为害虫的防治技术,关于白蚁超强降解纤维素机制

和功能的研究较少。白蚁后肠含有 300 多种共生微生物,包括原生动物、细菌、古菌等(Leadbetter and Breznak, 1996; 陈虹等, 2005)。白蚁依赖内源性纤维素酶和外源纤维素酶共同分解食入的木质材料,其中内源性纤维素酶主要由白蚁唾液腺和前肠上皮细胞分泌,外源纤维素酶由共生微生物产生(Breznak and Brune, 1994; Nakashima *et al.*, 2002; Hongoh *et al.*, 2008; Ohkuma, 2008)。共生微生物在白蚁降解纤维素中发挥着重要作用,目前从白蚁中分离到的木质纤维素降解菌有芽孢杆菌(*Bacillus*) (König, 2006)、螺旋菌(*Spirochaeta*) (Dröge *et al.*, 2006)、链霉菌(*Streptomyces*) (Tamburini *et al.*, 2004)、葡萄球菌(*Streptococcus*) (余金勇等, 2002; 何刚强等, 2009)等。本文首次报道从黄胸散白蚁 *Reticulitermes flaviceps* 中分离到具有降解纤维素能力的贪噬菌。

^{*} 资助项目:国家自然科学基金项目(30870085)、教育部留学回国人员科研启动基金。

^{**} 通讯作者, E-mail: jinfngni@sdu.edu.cn

收稿日期:2010-04-01, 接受日期:2010-08-26

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 白蚁 黄胸散白蚁取自浙江大学华家池校区,采集的白蚁放置在有盖的塑料器皿中,1 周左右喷洒 1 次水,实验室内饲养。

1.1.2 仪器和试剂 江南新兴解剖镜,OLYMPUS 显微镜,TaKaRa PCR 仪,E. Z. N. A.™ Bacterial DNA Kit (OMEGA),Taq 酶 (TRANS),刚果红,引物合成、PCR 产物测序(上海博尚生物科技)。

1.1.3 培养基 富集培养基 ① CMC1: KH_2PO_4 0.2%, MgSO_4 0.015%, 酵母粉 0.2%, CMC-Na 1%; ② CMC2: KH_2PO_4 0.2%, MgSO_4 0.015%, KNO_3 0.1%, CMC-Na 1%。选择培养基 ① 选择平板 1: 牛肉浸膏 0.15%, 蛋白胨 0.5%, CMC-Na 0.3%, NaCl 0.5%, 刚果红 0.1%, 琼脂 1.5%; ② 选择平板 2: 牛肉浸膏 0.15%, 蛋白胨 0.5%, CMC-Na 0.1%, NaCl 0.5%, 琼脂 1.5%。

1.2 解剖白蚁及白蚁后肠菌悬液制备

选取 2 头工蚁,放置冰上稍微冷冻使其活动性减弱,以便于操作。用 70% 的酒精擦拭解剖镜的载物台,然后在载物台上滴一滴 0.9% 生理盐水,用解剖镊子夹一头白蚁放在上面。按住头部,在尾部用镊子轻轻的往外拉,整个肠道即被拉出,截取后肠部分置于盛有无菌水的灭菌 Eppendorf 管中。经无菌水冲洗 2 次后,转入含约 200 μL 富集培养基 CMC1 或 CMC2 的 Eppendorf 管中,用无菌的解剖针搅动后肠使其内容物溢出,然后转入 10 mL 富集培养基 CMC1 或 CMC2 中混匀,此为白蚁后肠菌悬液。

1.3 纤维素降解菌的富集培养

取以上白蚁后肠菌悬液 5 mL 转入无菌的玻璃试管中,分别于 30 $^{\circ}\text{C}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下振荡培养,培养 1~3 d 后,按 2% 的接种量,取 0.1 mL 菌液转接至 5 mL 新的富集培养基 CMC1 或 CMC2 中进行第 2 次富集培养。

1.4 用选择平板筛选纤维素降解菌

将富集培养后的菌液做系列稀释,选取合适倍数(本实验中稀释到 $10^4 \sim 10^5$ 倍)涂布于 CMC 选择平板,以平板上出现均匀的单菌落为准。平板分别于 30 $^{\circ}\text{C}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 1~3 d。待长出单菌落后,用牙签点种在 CMC 选择平板上,每个单菌落点种两个平板,一个平板用于刚果红染色观

察,另一个作为保存平板。两个平板置于同样条件,分别于 30 $^{\circ}\text{C}$ 或 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 1~3 d。

刚果红染色方法:用 70% 乙醇将菌落洗掉,然后用 0.1% 刚果红浸染 30 min,再用 1M NaCl 水溶液脱色(20~30 min),观察菌落周围的透明圈有无,若有透明圈,则可初步断定具有纤维素降解活性。

1.5 纤维素降解菌的分离纯化

将选择平板上有透明圈的克隆划线分离,得到的单克隆进行刚果红染色,再重复上述划线分离步骤,直至得到稳定降解纤维素的单克隆。

1.6 菌株的鉴定

1.6.1 形态鉴定 菌落、菌体形态观察及革兰氏染色(杨革,2005)相结合进行形态学鉴定。

1.6.2 提取基因组 DNA 及 16S rDNA 序列分析

基因组 DNA 的提取按照 E. Z. N. A.™ Bacterial DNA Kit (OMEGA) 说明书操作,采用引物 27f 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1492r 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' 扩增目的克隆(R3063)的 16S rRNA 基因。PCR 反应体系(50 μL): 10 $\times$ Taq buffer 5 μL , 2.5 mM dNTP 4 μL , 基因组 DNA 1 μL , 5U/ μL Taq 0.5 μL , 2 μM 27f 1 μL , 2 μM 1492r 1 μL , ddH₂O 37.5 μL 。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 30 s, 30 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳确认,得到约 1.5 kb 的产物送上海博尚生物技术有限公司测序。获得的序列在 NCBI/blast 中进行同源性比对(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>)。

2 结果与分析

2.1 纤维素降解菌的富集与分离纯化

本实验实际操作时,首先在富集培养基 CMC1 中富集培养 2 次,观察到培养基由澄清变浑浊,说明有微生物生长。然后涂布培养液于选择平板 1 上,待克隆长出再点种培养进行刚果红染色。不论是 30 $^{\circ}\text{C}$ 还是 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养,发现平板上的微生物种类不多,说明尽管肠道内微生物很多,但多数不能培养。刚果红染色法分析了约 400 个菌落,没有观察到透明圈。分析可能原因有下面两点: ① 所用的富集培养基 CMC1 中包含有机氮源酵母粉,它也作为碳源,提供非纤维素降解菌生长,从而纤维素降解菌不能优势富集,非目的菌也大量

生长。②CMC 选择平板 1 中含有 0.3% 的 CMC 和 0.1% 的刚果红,CMC 浓度比较高,只有纤维素酶活性很高时,才能将 CMC 完全分解从而观察到透明圈。对于活性较低的纤维素降解菌可能不能观察到透明圈。

鉴于上述结果分析,作者调整了培养基成分。首先用无机氮源代替有机氮,配制以 CMC-Na 为唯一碳源的富集培养基 CMC2,其次用选择平板 2 进行平板培养和筛选。在平板 2 中,CMC-Na 的浓度由 0.3% 降至 0.1%,培养基中不含刚果红。按照调整后的培养基培养筛选,在 $10^4 \sim 10^5$ 稀释倍数下分离出单菌落,单菌落点种、刚果红染色后,观察到透明圈,对产透明圈的克隆重复点种 2 次,在 30 °C 培养条件下分离到 10 个纤维素降解克隆(图 1)。经过多次划线分离,选取透明圈较大的单克隆(命名为 R3063),进行分析鉴定。另外在 37 °C 条件下培养的菌落,通过以上步骤没有分离到具有纤维素酶活的微生物。



图 1 刚果红染色平板

Fig. 1 Congo red staining of isolated strain

2.2 菌株鉴定

2.2.1 形态学观察 平板上培养 3 d 的 R3063,菌落边缘整齐、表面湿润,颜色呈淡黄色,直径约 0.9 mm。革兰氏阴性,无芽孢,菌体为短杆状。

2.2.2 16S rDNA 序列分析 图 2 为 16S rDNA 的 PCR 电泳结果,扩增到约 1.5 kb 长的片段。经过序列同源性比对,发现 R3063 与贪噬菌 (*Variovorax* sp.) 具有 100% 的相似性,因此判定该菌属于贪噬菌。

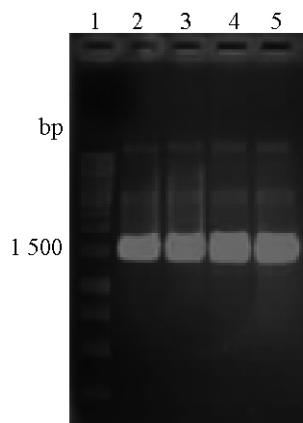


图 2 16S rDNA 的 PCR 结果

Fig. 2 PCR analysis of 16S rDNA

1:Marker 2-5:16S rDNA

3 讨论

白蚁后肠含有 300 多种微生物 (Hongoh *et al.*, 2008),这些微生物对白蚁显著的纤维素降解能力贡献着重要作用。目前从白蚁中分离到的木质纤维素降解菌有芽孢杆菌 (König, 2006)、螺旋菌 (Dröge *et al.*, 2006)、链霉菌 (Tamburini *et al.*, 2004)、葡萄球菌 (余金勇等, 2002; 何刚强等, 2009) 等。本文首次从黄胸散白蚁中分离到具有降解纤维素能力的贪噬菌。据文献报道,贪噬菌大多生活在土壤中,参与有机磷、硝基酪氨酸、除草剂、三氯乙烯等的生物降解 (Futamata *et al.*, 2005; Nishino and Spain, 2006; Sørensen *et al.*, 2008),尚无贪噬菌具有纤维素降解能力的报道。贪噬菌属于变形菌门 (Proteobacteria)。宏基因组学研究发现高等白蚁肠道菌群中有 9 种属于变形菌门的细菌 (Warnecke *et al.*, 2007)。本研究中的 R3063 菌分离自白蚁后肠,但 R3063 是否确实来源于白蚁后肠尚需进一步核实,因为在取白蚁后肠进行富集培养时,无菌处理也可能不充分,白蚁生长环境(如土壤、腐木等)中的微生物可能污染后肠从而混入培养液里。尽管这种可能性较低,但不能排除分离到的纤维素降解菌 R3063 来源于白蚁生长环境。

参考文献 (References)

- Breznak JA, Brune A, 1994. Role of microorganisms in the digestion of lignocelluloses by termites. *Annu. Rev. Entomol.*, 39: 453—487.

- 陈虹,梅建凤,闵航,2005. 白蚁肠道微生物. 微生物学杂志,25(2):75—79.
- Dröge S,Fröhlich J,Radek R,2006. *Spirochaeta coccoides* sp. nov., a novel coccoid spirochete from the hindgut of the termite *Neotermes castaneus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(1): 392—397.
- Futamata H,Nagano Y,Watanabe K,Hiraishi A,2005. Unique kinetic properties of phenol-degrading *Variovorax* Strains responsible for efficient trichloroethylene degradation in a chemostat enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(2): 904—911.
- 何刚强,堵国成,刘立明,霍光华,2009. 从白蚁中分离筛选纤维素分解菌及其产酶性质. 食品与生物技术学报,28(3):352—355.
- Hongoh Y,Sharma VK,Prakash T,Noda S,Taylor TD,Kudo T,Sakaki Y,Toyoda A,Hattori M,Ohkuma M,2008. Complete genome of the uncultured Termite Group 1 bacteria in a single host protist cell. *PNAS*, 105(14): 5555—5560.
- König H,2006. *Bacillus* species in the intestine of termites and other soil invertebrates. *J. Appl. Microbiol.*, 101(3): 620—627.
- Leadbetter JR, Breznak JA, 1996. Physiological ecology of *Methanobrevibacter cuticularis* sp. nov. and *Methanobrevibacter curvatus* sp. Nov., isolated from the hindgut of the termite *Reticulitermes flavipes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 3620—3631.
- Leschine SB, 1995. Cellulose degradation in anaerobic environments. *Annu. Rev. Microbiol.*, 49: 399—426.
- 李西波,刘胜利,王耀民,王文兵,2006. 高产纤维素酶菌株的诱变选育和筛选. 食品与生物技术学报,25(6):107—110.
- Li XZ, 1997. *Streptomyces cellulolyticus* sp. nov., a new cellulolytic member of the genus *Streptomyces*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47, 443—445.
- Nakashima K, Watanabe H, Saitoh H, Tokuda G, Azuma JI, 2002. Dual cellulose-digesting system of the wood-feeding termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32(7): 777—784.
- Nishino SF, Spain JC, 2006. Biodegradation of 3-Nitrotyrosine by *Burkholderia* sp. Strain JS165 and *Variovorax paradoxus* JS171. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(2): 1040—1044.
- Ohkuma M, 2008. Symbioses of flagellates and prokaryotes in the gut of lower termites. *Trends in Microbiol.*, 16(7): 345—352.
- Ögel ZB, Yarangümeli K, Dündar H., Ifij I, 2001. Submerged cultivation of *Scytalidium thermophilum* on complex lignocellulosic biomass for endoglucanase production. *Enzyme Microb. Tech.*, 28: 689—695.
- Sørensen SR, Albers CN, Aamand J, 2008. Rapid mineralization of the phenylurea herbicide diuron by *Variovorax* sp. Strain SRS16 in pure culture and within a two-member consortium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(8): 2332—2340.
- Tamburini E, Perito B, Mastromei G, 2004. Growth phase-dependent expression of an endoglucanase encoding gene (*eglS*) in *Streptomyces rochei* A2. *FEMS Microbiol. Lett.*, 237(2): 267—272.
- Warnecke F, Luginbühl P, Ivanova N, Ghassemian M, Richardson TH, Stege JT, Cayouette M, McHardy AC, Djordjevic G, Aboushadi N, Sorek R, Tringe SG, Podar M, Matin HG, Kunin V, Dalevi D, Madejska J, Kirton E, Platt D, Szeto E, Salamov A, Barry K, Mikhailova N, Kyrpides N, Matson EA, Zhang XN, Hernández M, Murillo C, Acosta LG, Rigoutsos I, Tamayo G, Green BD, Chang C, Rubin EM, Mathur EJ, Robertson DE, Hugenholtz P, Leadbetter JR, 2007. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. *Nature*, 450: 560—565.
- Wilson CA, Wood TM, 1992. Studies on the cellulase of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*, with special reference to the capacity of the enzyme to degrade crystalline cellulose. *Enzyme Microb. Tech.*, 14(4): 258—264.
- Yamada A, Inoue T, Wiwatwitaya D, Ohkuma M, Kudo T, Abe T, Sugimoto A, 2005. Carbon mineralization by termites in tropical forests, with emphasis on fungus combs. *Ecol. Res.*, 20: 453—460.
- 杨革, 2005. 微生物学实验教程. 北京: 科学出版社. 22.
- 余金勇, 吴跃开, 普照, 2002. 白蚁肠道 B-99 菌株降解纤维素的初步研究. 贵州林业科技, 30(4): 16—19.