

土壤中纤维素分解菌的分离与鉴定研究

唐蕊

(邢台学院 生物化学系,河北 邢台 054001)

摘要:从不同的土壤中经初筛和复筛得到 17 种不同的纤维素分解菌,根据其菌落特征、个体形态特征以及其生理生化反应的特征进行初步鉴定。结果表明:17 种纤维素分解菌有 9 种为不同种的木霉,4 种为不同种的青霉,3 种为不同种的曲霉,1 种为赤霉。

关键词:纤维素分解菌;纤维素酶;分离;筛选;鉴定

中图分类号:S 182 文献标识码:A 文章编号:1001-0009(2011)13-0041-02

纤维素是地球上数量最大的可再生资源,占植物干重的 35%~50%,是地球上分布最广、含量最丰富的碳水化合物。但由于其利用率很低,既造成了生物资源的浪费,又对环境造成了很大的污染。如何将这些生物资源加以充分利用是目前亟待解决的问题。自然界中能够降解和利用纤维素的微生物种类繁多,真菌、细菌、放线菌以及部分酵母菌等主要的微生物类群中都有^[1]。虽然目前在纤维素酶高产菌选育方面的研究已取得了较好的成效,但高酶活纤维素分解菌的分离选育仍具有重要意义。该试验从不同土壤中筛选纤维素分解菌,并初步对其进行鉴定,旨在扩大纤维素分解菌种质资源,为其运用到工业生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 土样 土样采于邢台学院小树林、草坪以及河底淤泥。

1.1.2 主要培养基^[2] 富集培养基:(NH₄)₂SO₄ 0.4 g,K₂HPO₄ 0.2 g,MgSO₄·7H₂O 0.01 g,蛋白胨 0.1 g,酵母膏 1.0 g,用水定容至 100 mL,pH 自然,试验加入滤纸条。纤维素刚果红培养基:(NH₄)₂SO₄ 2 g,MgSO₄ 0.5 g,K₂HPO₄ 1 g,NaCl 0.5 g,纤维素粉 2 g,刚果红 0.4 g,琼脂 22 g,水 1 000 mL,pH 自然。预处理:纤维素粉用 0.1%盐酸处理 24 h 后,用水洗至 pH 中性,过滤、烘干。

1.2 试验方法

1.2.1 土样的采集 取表层以下 5~10 cm 处的土样,放入事先灭菌的牛皮纸袋中备用。

1.2.2 纤维素分解菌的富集培养 取土样各 5 g,分别倒入装有 50 mL 无菌水的锥形瓶中,然后在磁力搅拌器上搅拌 10 min,静置,取上清液 10 mL 加入到富集培养基中,摇床 28℃培养 3 d 左右,待滤纸条崩解后进

行纤维素分解菌的分离。

1.2.3 初筛分离培养 将富集后的样品分别涂布到纤维素刚果红培养基上,每个样品接 3 个平板,每个平板接种 0.2 mL,28℃培养 3 d。

1.2.4 复筛纯化培养 将初筛分离出的水解圈比较明显的菌株进行编号,然后接种到纤维素刚果红培养基上,每菌株接种 2 个平板,28℃培养 3 d,以进行复筛、纯化。

1.2.5 菌株的初步鉴定 PDA 培养基上菌落特征观察:将复筛纯化得到的菌株接种到 PDA 培养基上,每菌株接 2 个平板,28℃培养 3 d,观察其菌落特征。个体形态特征的观察:将复筛纯化得到的不同菌株分别制成临时装片,置于显微镜下观察其孢囊梗或分生孢子梗,菌丝和孢子的形态特征。

2 结果与分析

2.1 纤维素分解菌的筛选结果

选择初筛分离培养菌落周围水解圈比较明显的,接种到纤维素刚果红培养基上进行复筛,得到 17 个菌株。

2.2 菌株的初步鉴定结果

2.2.1 PDA 培养基上菌落特征的观察结果 纯化得到的 17 种菌在 PDA 培养基上培养的菌落特征见表 1。

表 1 PDA 培养基上菌落特征的观察结果

菌株	菌落特征
BX-1	菌落大而疏松,平坦,表面及边缘粗糙,灰绿色,不透明
BX-2	菌落大而疏松,隆起,表面及边缘粗糙,青绿色,不透明
BX-3	菌落大而疏松,突起,表面及边缘粗糙,绿色,不透明
BX-4	菌落大而疏松,突起,表面及边缘粗糙,绿色,边缘白色,不透明
BX-5	菌落大而疏松,突起,表面及边缘粗糙,绿色,边缘白色,不透明
BX-6	菌落大而疏松,突起,表面及边缘粗糙,墨绿色,边缘透明
BX-7	菌落大而疏松,突起,表面及边缘粗糙,绿色,边缘白色,不透明
BX-8	菌落大而疏松,突起,表面及边缘粗糙,灰绿色,边缘白色,不透明
BX-9	菌落大而疏松,突起,表面及边缘粗糙,绿色,边缘透明
BX-10	菌落较小而密,突起,表面及边缘粗糙,绿色,边缘白色,不透明
BX-11	菌落较大而密,较平坦,表面及边缘粗糙,绿色,边缘白色,不透明
BX-12	菌落大而疏松,突起,表面及边缘粗糙,灰色,产黑色素,不透明
BX-13	菌落大而疏松,菌丝多而长,菌丝白色,产紫色素,不透明
BX-14	菌落大,较密,较扁平,表面及边缘粗糙,绿色,边缘白色,不透明
BX-15	菌落较大而密,突起,表面及边缘粗糙,灰色,产黑色素,不透明
BX-16	菌落较大而密,突起,表面及边缘粗糙,灰绿色,边缘白色,不透明
BX-17	菌落较大而密,突起,表面及边缘粗糙,灰色,产黑色素,不透明

作者简介:唐蕊(1976-),女,河北秦皇岛人,硕士,副教授,现从事微生物学教学与科研工作。E-mail:xtxytr@126.com。
收稿日期:2011-04-19

2.2.2 个体形态特征的观察结果 将纯化得到的 17 种菌分别制成临时装片,置于显微镜下观察其菌丝和孢子的形态特征,结果见表 2。综合表 1、2,初步鉴定结果为 BX-1 ~ BX-9 为不同种的绿色木霉 (*Trichoderma*),BX-10、BX-11、BX-14、BX-16 为不同种的青霉(*Penicillium*),BX-12、BX-15、BX-17 为不同种的曲霉(*Aspergillus*),BX-13 为赤霉(*Gibberella*)^[3]。

表 2 个体形态特征的观察结果

菌株	孢囊梗或分生孢子梗及菌丝特征	孢子特征
BX-1	多分支的分生孢子梗,菌丝有隔	卵圆形颗粒状绿色孢子
BX-2	多分支的分生孢子梗,菌丝有隔	卵圆形颗粒状绿色孢子粘聚成球
BX-3	多分支的分生孢子梗,菌丝有隔	卵圆形颗粒状绿色孢子
BX-4	多分支的分生孢子梗,菌丝有隔	卵圆形颗粒状绿色孢子粘聚成球
BX-5	多分支的分生孢子梗,菌丝有隔	卵圆形颗粒状绿色孢子
BX-6	多分支的分生孢子梗,菌丝有隔	卵圆形颗粒状绿色孢子粘聚成球
BX-7	多分支的分生孢子梗,菌丝有隔	椭圆形颗粒状绿色孢子
BX-8	多分支的分生孢子梗,菌丝有隔	卵圆形颗粒状绿色孢子
BX-9	多分支的分生孢子梗,菌丝有隔	卵圆形颗粒状绿色孢子
BX-10	分生孢子梗多次分枝成扫帚状,菌丝有隔	分生孢子串生
BX-11	分生孢子梗多次分枝成扫帚状,菌丝有隔	分生孢子串生
BX-12	分生孢子梗的顶端膨大成顶囊,菌丝有隔	分生孢子串生
BX-13	分生孢子梗多级分叉分支,菌丝有隔	分生孢子镰刀状,分隔
BX-14	分生孢子梗多次分枝成扫帚状,菌丝有隔	分生孢子串生
BX-15	分生孢子梗的顶端膨大成顶囊,菌丝有隔	分生孢子串生
BX-16	分生孢子梗多次分枝成扫帚状,菌丝有隔	分生孢子串生
BX-17	分生孢子梗的顶端膨大成顶囊,菌丝有隔	分生孢子串生

3 结论与讨论

目前用于生产纤维素酶的微生物大多属于真菌,

而研究的较为透彻的是木霉属和曲霉属^[4-5]。该试验从土壤中分离出的 17 种纤维素分解菌中,木霉占有 9 种,超过一半;青霉和曲霉也占有相当大的比重,而分离得到的 BX-13 菌株为赤霉,并且在纤维素刚果红培养基上培养时产生的水解圈比较大,说明其分解纤维素的能力比较强。这在目前的文献中并不多见,因此对赤霉中能够分解纤维素这一类菌群需进行进一步研究。

现阶段在高酶活纤维素酶产生菌选育方面的研究已经有不错的成效,其选育方法也由过去的单一方法更加多样化,但是纤维素酶的生产仍然存在着酶活力比较低、生产周期长等问题,还不能真正应用于大规模工业化生产^[6]。如何加大纤维素酶的产量是一个值得研究的课题,具有重大的理论价值。培养基的组成和培养条件等方面对纤维素酶的产生均有重要影响,而如何优化培养条件使菌株产纤维素酶活性更高也正是应该继续研究的重点。

参考文献

[1] 崔琰,陈红漫,尚宏丽,等. 中性纤维素酶产生菌的筛选及其培养基的优化和酶学性质研究[J]. 浙江农业科学,2006(2):214-217.
[2] 岳思君,李学斌,李爱华,等. 高酶活纤维素分解菌分离筛选的研究[J]. 安徽农业科学,2009,37(1):11-12,15.
[3] 黄秀梨. 微生物学[M]. 2 版. 北京:高等教育出版社,2003:50-58.
[4] 魏亚琴,李红玉. 纤维素酶产生菌—根霉的分离选育与鉴定[J]. 兰州大学学报(自然科学版),2008,44(专辑):102-106.
[5] 魏亚琴,李永泉,李红玉. 纤维素酶产生菌—青霉和放线菌的分离选育研究[J]. 兰州大学学报(自然科学版),2008,44(专辑):87-91.
[6] 张喜宏,刘义波,高云航. 纤维素酶及纤维素酶产生菌选育的研究进展[J]. 饲料工业,2009,30(22):14-16.

Screening and Identification of Cellulose-decomposing Microorganisms in Soil

TANG Rui

(Department of Biology and Chemistry,Xingtai University,Xingtai,Hebei 054001)

Abstract: 17 strains of cellulose-decomposing microorganisms were isolated from different soil. According to their colony characteristics and microscopic cysts or conidiophore stalk,mycelium and spores characteristics and features of their physiological and biochemical reactions,9 strains were identified as *Trichoderma*,4 strains were identified as *Penicillium*,3 strains were identified as *Aspergillus* and 1 strain was identified as *Gibberellic*.

Key words: cellulose-decomposing microorganisms; cellulase; separation; screening; identification