

◆ 生物科学 ◆

山口红树林土壤芽孢杆菌多样性及纤维素酶活性筛选研究^{*}李菲¹,李喆²,覃仙玲¹,黄庶识²,苏芯莹¹,潘信利^{2**}

(1. 广西科学院,广西近海海洋环境科学重点实验室,广西南宁 530007;2. 广西科学院,广西海洋天然产物与组合生物合成化学重点实验室,广西南宁 530007)

摘要:为探究广西山口红树林保护区内土壤中芽孢杆菌的多样性,挖掘具有稳定性好、耐高温的纤维素酶活性菌株,本研究利用可培养技术和基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树分析研究红树林土壤中可培养芽孢杆菌的多样性,并以羧甲基纤维素钠为唯一碳源,结合刚果红纤维素培养法、滤纸条崩解试验、纤维素酶活力测定法,对分离出的芽孢杆菌开展纤维素降解活性研究。结果表明,从红树林土壤中共分离出 171 株芽孢杆菌,隶属于 4 科 12 属 40 种,其中芽孢杆菌属为优势菌属;从中筛选出 9 株具有显著纤维素酶活性的芽孢杆菌,其中 4 株具有显著的热稳定性。广西山口红树林自然保护区内土壤中蕴含着十分丰富的可培养芽孢杆菌种类,且部分菌株呈现出显著的纤维素酶活性,具有较大的挖掘潜力。

关键词:广西红树林 土壤 芽孢杆菌 物种多样性 纤维素酶活性

中图分类号:Q939.1 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2021)05-0473-09

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20211202.002

0 引言

中国是农业种植和畜禽养殖的大国,农作物秸秆的露天焚烧及畜禽粪便的随意排放给环境带来严重的污染^[1,2]。目前,高温堆肥是农作物秸秆及畜禽粪便资源化利用的重要方式。堆肥技术以微生物为主导^[3],对堆肥中结构复杂的木质纤维素原料进行解聚

或分解^[4,5],转化成农业生产上所需的肥料。堆肥的高温期温度可达 55℃ 以上,是原料中病原菌、虫卵和杂草种子灭活及驱动秸秆腐熟的主要阶段^[3]。但是,过高的温度会抑制土著微生物的活性,降低堆肥中微生物的丰度和多样性,甚至导致菌株活性丧失,从而限制木质纤维素的降解速度^[6,7],而在堆肥过程中添加耐高温纤维素分解菌则可以有效解决这些问题^[8]。研究表明,添加纤维素降解微生物,特别是高温降解

收稿日期:2021-03-29

^{*} 国家自然科学基金项目(31560017),广西科技计划科技基地和人才专项(桂科 AD17129019),广西海洋天然产物与组合生物合成化学重点实验室运行补助项目(20-065-63),广西科学院基本科研业务费项目(2018YBJ303,2019YBJ101)和广西青年科学基金项目(2018GXNSFBA050021)资助。

【作者简介】

李菲(1988-),女,助理研究员,主要从事广西北部湾海洋微生物研究。

【**通信作者】

潘信利(1987-),女,助理研究员,主要从事海洋微生物资源开发与利用研究,E-mail:pxl@gxas.cn。

【引用本文】

李菲,李喆,覃仙玲,等. 山口红树林土壤芽孢杆菌多样性及纤维素酶活性筛选研究[J]. 广西科学,2021,28(5):473-481.

LI F,LI Z,QIN X L,et al. Study on Diversity and Screening of Cellulase Activity of *Bacillus* from Shankou Mangrove Soil [J]. Guangxi Sciences, 2021,28(5):473-481.

微生物,能够加快木质纤维素降解,促进堆肥腐熟,提高堆肥效率^[9-11]。目前,国内外学者已从堆肥中分离出多种高温纤维素降解菌,如链霉菌 *Streptomyces* sp. CN9^[12],烟曲霉菌 *Aspergillus fumigatus* Z5^[13],解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* XD-3^[14],梭状芽孢杆菌 *Clostridium* sp.,假丝酵母菌 *Candida* sp.^[15]等。然而,已有报道中高温纤维素降解菌耐受温度大多为 50-60℃,而实际生产中好氧堆肥高温期的温度可高达 70℃,这使得大部分菌株的活性降低甚至失活,从而导致该阶段的纤维素分解速度大幅下降,难以适应生产需求。为了更好地满足实际生产需求,筛选耐高温的纤维素降解菌并研究其纤维素酶活的热稳定性,对加速高温好氧堆肥的腐熟进程具有重要意义。

红树林作为热带和亚热带的独特潮间带生态系统,常年受到海水周期性浸淹、波浪、强风、强流、径流、沉积物及污水(废水)等特殊因素的影响,促使其组成成分多样化,能量和物质循环速度加快,生产力和有机质的降解活性增强,大量的植物残体和落叶的堆积,不断为微生物提供纤维素等物质^[16]。胡芮等^[17]在红树林土壤中获得一株产嗜热纤维素酶的枯草芽孢杆菌,该菌株在 55-60℃时可维持较高酶活;曾思泉等^[18]从三亚红沙河红树林区分离出一株降解纤维素的枝孢属真菌 SCSIO 43503,在 45-50℃时纤维素酶活性较高。可见,从红树林生境获得产纤维素酶菌株具有广泛的研究前景。广西山口红树林是广西红树林湿地特征的红树林自然保护区之一^[19],属北热带季风区,生长着白骨壤、桐花树、秋茄等红树植物,有 111 种大型底栖动物^[20],其海水污染程度低,动植物资源丰富,具有较强的研究价值。

本研究以广西山口红树林保护区内的土壤作为研究对象,通过 16S rRNA 基因序列的系统发育树分析,获得红树林土壤中可培养芽孢杆菌的多样性信息。同时,结合刚果红纤维素培养法、滤纸条崩解试验、纤维素酶活测定法,筛选出具有耐高温、稳定性强的纤维素酶活性菌株,为从海洋环境中寻找新的微生物资源提供理论依据和实践指导。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 红树林土壤样本

2019 年 5 月从广西山口红树林自然保护区(109°38'14" E, 21°28'53" N)中采集潮间带低潮 3 处

土壤样本(每处相距 5 m,由近岸红树林往外采集),每处土壤取至地下 0.5 m 深,将样品混合后装于密封袋,4℃低温保藏备用。

1.1.2 主要试剂和仪器

培养基原料、TAE 缓冲液、2×EasyTaq Super-Mix、扩增引物、DNA Marker、GoldView 核酸染料等购于北京康为世纪生物科技有限公司,Chelex 100 树脂购于美国 BioRad 公司。使用的仪器包括 SW-CJ-2F 型超净工作台、HH. B11-BS-II 型恒温培养箱、TS-100C 型恒温振荡器、VB-55 型高压灭菌锅、Tgradient 型 PCR 扩增仪、伯乐电泳仪、凝胶成像仪、泰斯特 SYG 数显实验水浴锅、Thermo 酶标仪等。

1.1.3 培养基

(1)细菌分离培养基:M7、M10、M5 和 P3,其配方详见表 1。

表 1 细菌分离培养基配方

Table 1 Formula of bacterial isolation culture media

培养基 Culture medias	主要成分 Main components	其他共有成分 Other components
M7	酵母提取粉 5.0 g L-天门冬酰胺 1.0 g 甘油 10 mL Yeast extract powder 5.0 g L-Asparagine 1.0 g Glycerol 10 mL	复合盐母液 10 mL, 琼脂 14.0 g,去离子水 1 000 mL, pH 值 7.2-7.4
M10	可溶性淀粉 10.0 g 水解酪素 0.5 g Soluble starch 10.0 g Hydrolyzed casein 0.5 g	Compound salt ion concentrate 10 mL, agar 14.0 g, deionized-water 1 000 mL, pH 7.2-7.4
M5	海藻糖 5.0 g 脯氨酸 1.0 g 土壤浸出液 20 mL Trehalose 5.0 g Proline 1.0 g Soil extract 20 mL	
P3	燕麦粉 20.0 g Crude oat 20.0 g	

注:复合盐母液配方为 KNO₃ 1.0 g, NaCl 0.5 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, K₂HPO₄ 0.5 g, NH₄NO₃ 0.1 g, FeSO₄ 0.01 g, MnCl₂ · H₂O 0.001 g, ZnSO₄ · 7H₂O 0.001 g, 去离子水 10 mL

Note: The formula of compound salt ion concentrate is KNO₃ 1.0 g, NaCl 0.5 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, K₂HPO₄ 0.5 g, NH₄NO₃ 0.1 g, FeSO₄ 0.01 g, MnCl₂ · H₂O 0.001 g, ZnSO₄ · 7H₂O 0.001 g, deionized water 10 mL

(2)纯化培养基:链霉菌培养基 2 号(ISP2)的改良固体培养基^[21]。

(3)纤维素酶初/复筛培养基:刚果红纤维素培养基,参照文献^[22]配制,羧甲基纤维素钠 10.0 g,复合盐母液 10 mL, 2 g/L 刚果红染液 1 mL, 琼脂 14.0 g。

(4)羧甲基纤维素钠(CMC-Na)发酵培养基:羧

甲基纤维素钠 5.0 g, 复合盐母液 10 mL, 蒸馏水 1 000 mL。

(5) 滤纸条培养基配方: 胰蛋白胨 1.0 g, 2 张 1 cm×6 cm 滤纸条, 去离子水 1 000 mL。

1.1.4 其他试剂配制

(1) DNS 溶液: 酒石酸钾钠 182 g, 3,5-二硝基水杨酸 6.3 g, NaOH 21 g, 苯酚 5 g, 蒸馏水 1 000 mL; 储存至棕色瓶中, 室温条件下放置 7 d 后使用, 有效期 6 个月。

(2) 柠檬酸 - Na₂HPO₃ 缓冲液 A: 7.16 g Na₂HPO₃ 溶于水, 加入 2.1 g 柠檬酸, 定容至 200 mL, pH 值约为 5.0。

1.2 方法

1.2.1 菌株分离纯化

称取 2.0 g 样品装于 20 mL 无菌水中摇匀, 即为原液; 将原液按 10⁻² 和 10⁻³ 比例进行稀释, 备用。取 200 μL 样液分别涂布至 4 种分离培养基中, 28℃ 培养 3-7 d, 并随时观察菌株的生长情况, 挑取肉眼可见菌落进行纯化培养, 记录其形态特征和菌落数, 以 30% (V:V) 甘油-ISP2 混合液作为保护剂, 将纯化好的菌株保存于冻存管并置于 -70℃ 冰箱内。

1.2.2 16S rRNA 基因测序和系统发育分析

采用 chelex-100 树脂^[23] 快速提取细菌的 DNA 并作为 PCR 模板, 根据 Walsh 等^[24] 的方法对其进行 PCR 扩增。扩增和测序引物均为细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3') 和 1522R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'), PCR 反应条件参照李菲等^[25] 的方法设定。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测合格后, 委托北京擎科新业生物技术有限公司进行测序分析。序列经 BioEdit Sequence Alignment Editor 软件整理后, 利用 EzBioCloud 数据库 (<https://www.ezbiocloud.net/>) 进行在线比对^[26]; 选取同源性最高菌株的序列作为参比对象, 采用 MEGA 10.0 软件中的 Neighbor-Joining 法构建系统发育树, 通过重复取样 1 000 次所获得的自举值检测各分支的置信值, 对各菌株的系统发育地位进行分析^[27]。采用 Excel 软件计算多样性指数, 计算公式如下:

Simpson 指数:

$$\lambda = 1 - \sum (N_i/N)^2;$$

Shannon-Wiener 指数:

$$H' = - \sum N_i/N (\ln N_i/N);$$

Pielou 指数:

$$P = \sum [(N_i/N)(N - N_i)/(N - 1)],$$

其中, N 为分离到的细菌菌株数总和, N_i 为第 i 个菌种的菌株数。

1.2.3 产纤维素酶菌的筛选

运用点植法将待测芽孢杆菌接种于纤维素酶活初筛培养基上, 40℃ 恒温培养 3 d。用平板透明圈法初步判定菌株的纤维素酶活性, 对选出具有纤维素酶活性的菌株进行 50, 60 和 70℃ 耐高温复筛, 观察培养基上菌苔产生透明圈的情况; 并用游标卡尺测量菌落直径 (D) 和透明圈直径 (H), 计算 H/D 值, 直径比大表示菌株水解 CMC 的能力强^[28]。选取酶活性显著的菌株进行下一步研究 (滤纸条崩解试验)。用 0.9% 灭菌的生理盐水将新鲜的活性菌株制成菌悬液, 调节 OD_{600} 值至 0.6。在 98 mL 滤纸条培养基中接入 2 mL 菌液, 在 37℃、180 r/min 下培养 7 d, 以不接种菌种的滤纸条培养基作为空白组, 每组 3 个重复。根据滤纸条的断裂崩解程度来初步判断菌株的降解性能^[29]。

1.2.4 纤维素酶活力测定

(1) 粗酶液制备

挑取新鲜活性菌株, 加入 0.9% 灭菌的生理盐水制成菌悬液, 用麦氏比浊管将菌悬液浓度调至约 1×10^8 CFU/mL, 取 2% 菌悬液接种至 10 mL CMC-Na 发酵培养基中, 50℃、180 r/min 振荡培养 3 d, 6 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为粗酶液。

(2) 葡萄糖标准曲线绘制

分别取 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 mg/mL 的葡萄糖溶液 2 mL, 加入 1 mL DNS 溶液, 沸水浴 10 min, 冷却后补加 21.5 mL 蒸馏水。在 540 nm 波长下测定其吸光值, 并绘制葡萄糖标准曲线。

(3) 菌株纤维素酶活力测定

通过测定滤纸酶活 (FPA)、内切酶酶活 (CM-Case) 和外切酶酶活 (C1), 综合表征菌株粗酶液纤维素酶活力。测定参数和反应条件如表 2 所示。待反应结束, 分别加入 1.5 mL DNS 试剂, 沸水浴 10 min 后置于冷水中冷却; 用酶标仪测定其吸光值, 设定波长为 540 nm。参照葡萄糖标准曲线方程 [$y = 0.5148x - 0.0171$ ($R^2 = 0.9978$)], 分别计算这 4 株菌株的滤纸酶 (FPase)、纤维素内切酶 (CMCase) 和外切酶 (C1) 酶活, 分析其在 50-90℃ 时相对酶活的变化规律, 以此表征与木质纤维素降解过程相关酶的热稳定性。

表 2 纤维素酶活测定条件

Table 2 Determination conditions of cellulase activity

纤维素酶种类 Cellulase types	底物 Substrate	反应条件 Reaction conditions	其他成分 Other components
滤纸酶活 FPA	1 cm×3 cm 滤纸 1 cm×3 cm filter paper	50℃ 水浴 1 h 50℃ at water bath for 1 h	
内切酶酶活 CMCase	0.5% 羧甲基纤维素钠 0.5% CMC-Na	50℃ 水浴 0.5 h 50℃ at water bath for 0.5 h	2 mL 缓冲液 A, 1 mL 粗酶液 2 mL of buffer A, 1 mL crude enzyme solution
外切酶酶活 C1	0.5% 微晶纤维素 0.5% microcrystalline cellulose	50℃ 水浴 2 h 50℃ at water bath for 2 h	

(4) 酶活力计算

按照江高飞等^[28]的方法进行数据处理,在水温 50℃下,1 mL 粗酶液在 1 min 内水解底物生成 1 μg 葡萄糖所需的酶量为 1 个纤维素酶酶活力单位(U/mL)。相对酶活性(%) = (样品酶活性 - 对照酶活性)/对照酶活性 × 100%。

2 结果与分析

2.1 红树林土壤芽孢杆菌的多样性

从广西山口红树林保护区的土壤中分离出可培养芽孢杆菌 171 株,通过形态、大小和颜色等形态学特征进行初步排重,选取 77 株细菌进行 16S rRNA 基因测序,结果获得 40 种芽孢杆菌,隶属于 4 科 12 属;构建其 Neighbor-Joining 系统发育树(图 1),其中芽孢杆菌属为优势菌属,占分离菌株的 60%。

2.2 培养基的分离效果

采用 4 种分离培养基,从土壤中共分离出 171 株芽孢杆菌,分离效果见表 3。结果显示:以菌属数为评价标准,培养基的分离效果从优到劣排序为 M7 > P3 > M5 > M10;以菌种数为评价标准,培养基的分离效果从优到劣排序为 M7 = P3 > M5 > M10;以菌株数为评价标准,培养基的分离效果从优到劣排序为 M7 > P3 > M5 > M10。综合多样性指数分析,4 种培养基分离出的芽孢杆菌多样性相近,但 M7 和 P3 培养基分离出芽孢杆菌的数量和种类均较为丰富。此外,本研究发现燕麦、甘油和海藻糖可作为分离红树林生境中细菌潜在的理想碳源,脯氨酸、天门冬氨酸和水解酪素为潜在的理想氮源。

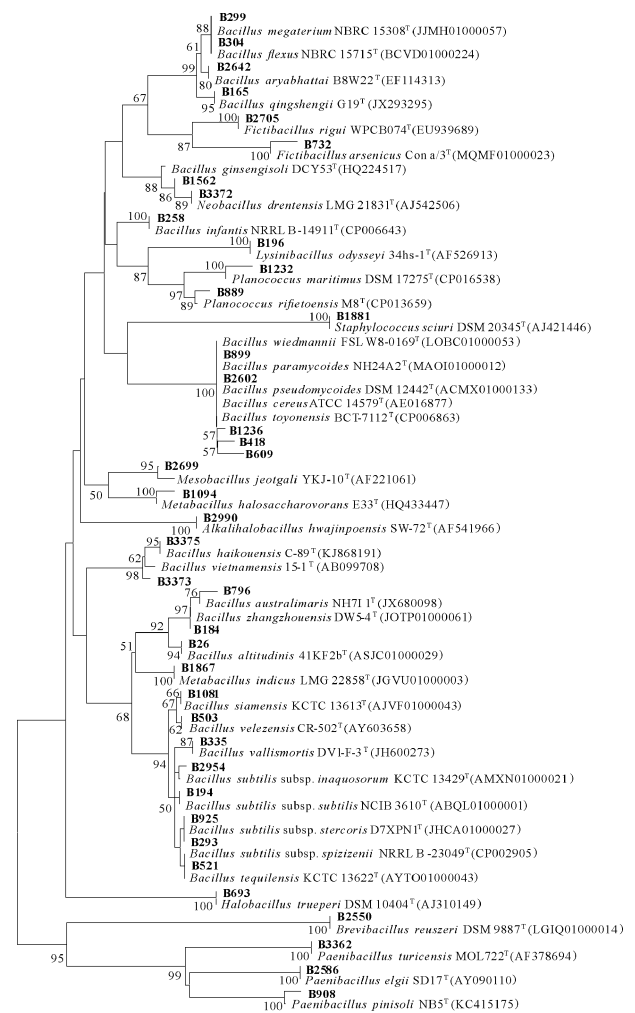


图 1 土壤中芽孢杆菌的 16S rRNA 基因序列 Neighbor-Joining 系统发育树

Fig. 1 Neighbor-Joining phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequence of *Bacillus* in soil

表 3 不同培养基分离出芽孢杆菌多样性情况

Table 3 Diversity of *Bacillus* isolated from different culture media

培养基 Culture media	菌株数 Number of bacteria	菌种数 Number of strains	菌属数 Number of genus	Simpson 指数 Simpson index (λ)	Shannon- Wiener 指数 Shannon- Wiener index (H')	Pielou 指数 Pielou index (P)
M10	32	14	3	0.918	2.561	0.739
M5	34	15	5	0.920	2.617	0.742
M7	54	24	8	0.941	2.994	0.751
P3	51	24	7	0.945	3.032	0.771

2.3 产纤维素酶菌株的筛选鉴定

运用点植法将 40 株芽孢杆菌接种至刚果红纤维素培养基上,置于 4 个不同温度(40, 50, 60 和 70℃)条件下培养 3 d,结果获得 9 株能产生明显透明水解圈的菌株(图 2)。该 9 株菌均在 40℃ 和 50℃ 时生长良好, B1235 在 60℃ 时生长缓慢,其余 8 株细菌在 60℃ 时生长良好,在 70℃ 时生长缓慢。水解圈试验结果表明,不同温度下分离菌株的纤维素分解能力存在显著差异,即在刚果红纤维素培养基上水解圈与菌落直径比(H/D)不同(表 4):在 40, 50, 60 和 70℃ 条件下,9 株菌的 H/D 值分别为 4.4-10.5, 4-10.5, 3-16.5 和 1.5-7.2。不同活性菌株之间的 H/D 值存在较大的差异,菌株 B26、B299、B1081、B2954 和 B925 的 H/D 值在 40℃ 和 50℃ 时没有明显波动,在 60℃ 时达到最高,70℃ 时最小,说明该 5 株菌在 60℃

表 4 产纤维素酶菌株初筛结果

Table 4 Primarily screening results for cellulase producing strains

菌株 编号 Strain number	菌落直径 Colony diameter (D , mm)				水解圈直径 Diameter of transparent ring (H , mm)				水解圈直径/菌落直径 H/D			
	40℃	50℃	60℃	70℃	40℃	50℃	60℃	70℃	40℃	50℃	60℃	70℃
B26	1.90 ± 0.01	2.00 ± 0.01	1.60 ± 0.16	5.50 ± 0.25	19.90 ± 0.01	20.75 ± 0.06	26.25 ± 0.06	9.20 ± 0.01	10.47	10.38	16.41	1.67
B299	2.40 ± 0.36	4.75 ± 0.06	2.85 ± 0.30	1.70 ± 0.16	12.20 ± 0.01	20.00 ± 0.04	27.75 ± 0.06	7.15 ± 0.01	5.08	4.21	9.74	4.21
B1081	2.05 ± 0.06	3.00 ± 0.04	2.15 ± 0.02	2.80 ± 0.09	10.75 ± 0.06	23.25 ± 0.06	25.90 ± 0.01	9.10 ± 0.01	5.24	7.75	12.05	3.25
B2954	2.15 ± 0.01	2.40 ± 0.01	1.80 ± 0.01	1.05 ± 0.01	13.55 ± 0.30	15.40 ± 0.16	24.30 ± 0.04	7.55 ± 0.01	6.30	6.42	13.50	7.19
B925	2.65 ± 0.02	3.85 ± 0.02	4.00 ± 0.09	1.80 ± 0.09	11.65 ± 0.12	16.65 ± 0.02	20.55 ± 0.56	7.65 ± 0.02	4.40	4.32	5.14	3.33
B194	2.05 ± 0.01	2.45 ± 0.12	5.05 ± 0.01	6.25 ± 0.06	10.25 ± 0.06	16.90 ± 0.01	17.25 ± 0.06	10.60 ± 0.36	5.00	6.90	3.42	1.70
B521	1.05 ± 0.02	2.90 ± 0.81	6.05 ± 0.01	2.65 ± 0.02	7.75 ± 0.06	16.25 ± 0.56	21.65 ± 0.02	8.35 ± 0.02	7.38	5.60	3.58	3.15
B1235	1.85 ± 0.02	1.05 ± 0.01	-	-	10.60 ± 0.01	6.25 ± 0.06	-	-	5.73	5.95	-	-
B2550	1.25 ± 0.01	2.25 ± 0.02	5.10 ± 0.01	7.35 ± 0.02	11.55 ± 0.06	13.10 ± 0.01	16.75 ± 0.06	12.05 ± 0.06	9.24	5.82	3.28	1.64

注:“-”表示无活性

Note: "-" means no activity

时产生的纤维素酶活性最高,纤维素酶量最大;其余 4 株菌(B2550、B521、B1235、B194),在 50℃ 以上均表现出 H/D 值变小,且同一温度下 4 株菌的 H/D 值均较小。虽然水解圈直径和菌落直径的比值可以直观表征酶浓度的高低,但不能作为菌株酶活的唯一量指标,故需进一步测定这些菌株的产酶能力。

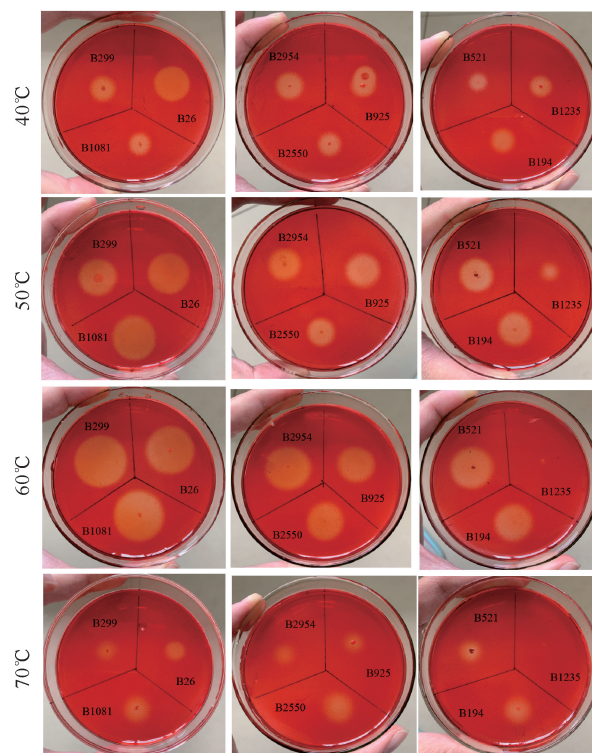


图 2 9 株产纤维素酶菌株在不同温度下的平板酶活性

Fig. 2 Cellulase activity of 9 cellulase producing strains by plate assay at different temperature

将初筛得到的9株菌接种到滤纸条培养基中, 50℃恒温培养7d后, 测定滤纸条的崩解程度。如图3所示, 菌株B1081、B2954、B26和B299将滤纸片崩

解成块状, 滤纸整体膨胀, 崩解效果显著。相比之下, 包括B1235在内的另外5株菌仅使滤纸边缘有一定程度的膨胀, 几乎没有降解效果。

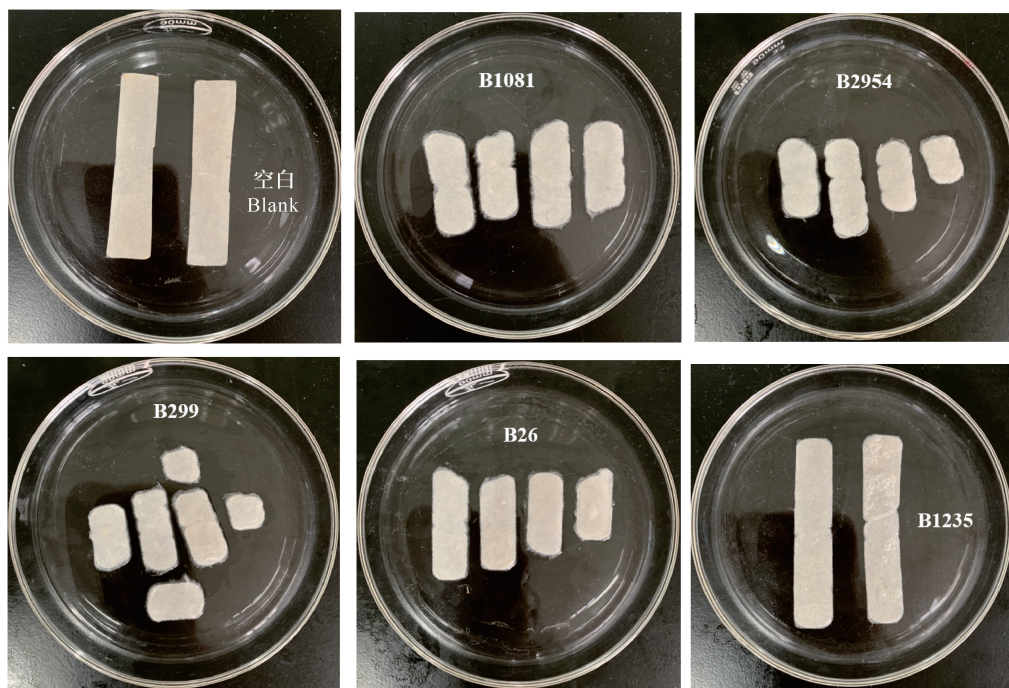


图3 5株产纤维素酶菌株培养7d后对滤纸的降解效果

Fig. 3 Degradation effect of 5 cellulase-producing strains on filter paper after 7 days of culture

2.4 高效降解纤维素酶的热稳定性

由于菌株B1081、B2954、B26和B299对滤纸的崩解效果显著, 因此有必要进一步研究这些菌株的酶活力。如图4所示, 4株高温纤维素降解菌的纤维素内切酶活性和滤纸酶活性热稳定性变化趋势相似, 即都随着温度的升高总体呈先升高后降低的趋势, 在80℃时相对活性达到最高, 酶活性大小排序均为

B1081>B2954>B299>B26。但4株菌的外切酶活性热稳定性表现不一致, B1081, B299和B2954随温度升高, 其活性降低, 即在50℃时最高; 而B26随温度增加, 其活性先增加后降低, 在60-70℃时活性较高, 但其活性在80-90℃时未检测出, 可能是高温导致其失活。

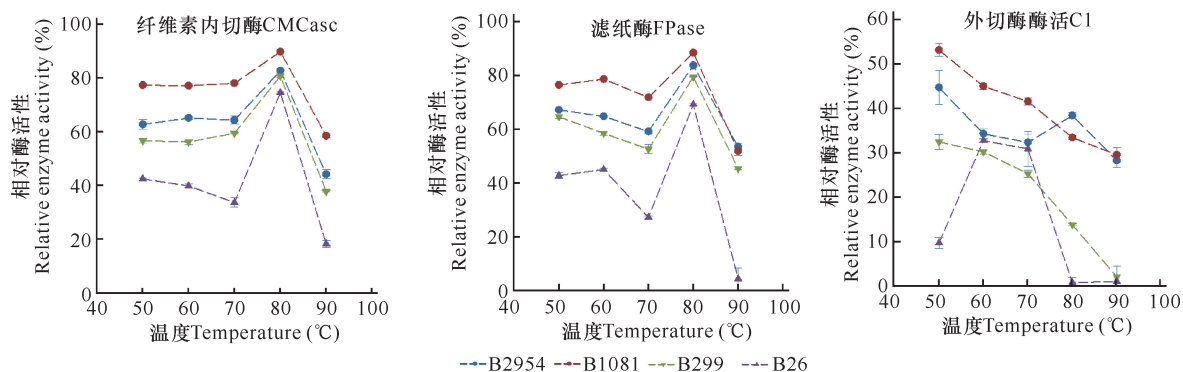


图4 4株活性菌株的3种纤维素酶的热稳定性

Fig. 4 Thermostability of 3 cellulases from 4 active strains

3 讨论

芽孢杆菌(*Bacillus*)是红树林土壤区系中常见

的细菌类群^[30], 且大多数情况下为优势菌群, 其繁殖能力强, 可产耐热、耐旱、抗紫外线的芽孢, 具有提升植物抗逆能力与促进植物生长的特性。目前, 芽孢杆

菌广泛应用于工农业、医药卫生、环保等领域,在处理工业废水、降解原油及土壤中的难溶化合物,防治植物病虫害等方面取得很好的成效^[31]。陈蓉等^[32]在湛江海滨公园的红树林淤泥样品中分离出两株具有高效产酶活性和部分耐药性的芽孢杆菌。赵雅慧等^[22]从山口红树林土壤中分离出具有多种功能酶活性的细菌,其中芽孢杆菌为优势菌属。Shome 等^[33]发现印度南部的 Andaman 红树林沉积物中, *Bacillus* 类群占细菌区系的 50%; Ranjan 等^[34]也获得同样结果,即 *Bacillus* 类群为印度 Bhitarkanika 热带红树林环境土壤细菌中的优势菌属。在九龙江口、福建漳江口、厦门凤林湾及八门湾等红树林土壤微生物类群中 *Bacillus* 属均为各自的优势菌属^[35-38]。本研究对广西山口红树林土壤可培养芽孢杆菌资源进行系统的报道,采用 4 种成分差异较大的培养基对广西山口红树林土壤中的芽孢杆菌进行定量分析,其中 M7 和 P3 培养基上菌落数较为丰富, M7 和 P3 培养基中碳源较为丰富,利于更多芽孢菌群的生长。

国内外对高温纤维素降解菌的研究主要集中于芽孢杆菌属,早在 1917 年由荷兰学者分离到的嗜热脂肪芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*)^[39],从糖厂、温泉及棕榈油厂分离到的、在 60℃ 高温下具有稳定纤维素降解酶活性的地芽孢杆菌^[40-42],从鸡粪锯末好氧堆肥样品中分离到的,具有持续耐高温且具纤维素酶活性的地芽孢杆菌^[43]等。然而,单一菌种的降解能力有限,且酶活稳定性难以保持^[44,45]。嗜热脂肪地芽孢杆菌在 60-70℃ 时,能促进好氧堆肥的腐熟进程且改善堆体理化性质,温度超过 70℃ 时堆体理化性质会发生异常,影响堆肥进程^[46]。相比之下,本研究中获得的 *Bacillus subtilis* subsp. *Inaquaosorum* B2954 和 *Bacillus siamensis* B1081,耐热性更强,在 80℃ 甚至更高温下仍然保持较高的纤维素酶活力,可更好地在堆肥或农作物环境中充分发挥其各种胞外酶的作用。

4 结论

芽孢杆菌属是广西山口红树林保护区内土壤中的优势菌属,且种类丰富,纤维素酶活性显著,具有较大的挖掘潜力。其中,芽孢杆菌 B1081、B2954、B26 和 B299 具有显著的纤维素酶活力及热稳定性,而 B2954 和 B1081 具有更强的纤维素酶活性和环境相容性。

参考文献

- [1] YANG X, LI Q, TANG Z, et al. Heavy metal concentrations and arsenic speciation in animal manure compost in China [J]. *Waste Management*, 2017, 64(64): 333-339.
- [2] 覃诚. 中国秸秆禁烧管理与美国秸秆计划焚烧管理比较研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2019.
- [3] 徐杰, 许修宏, 门梦琪, 等. 木质纤维素降解菌剂 DN-1 促进堆肥腐熟度的评估[J]. *中国土壤与肥料*, 2016(6): 146-151.
- [4] HOSSEINI S M, AZIZ H A. Evaluation of thermochemical pretreatment and continuous thermophilic condition in rice straw composting process enhancement [J]. *Bioresource Technology*, 2013, 133: 240-247.
- [5] SÁNCHEZ O J, CARDONA C. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks [J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(13): 5270-5295.
- [6] ZHAO Y, ZHAO Y, ZHANG Z C, et al. Effect of thermo-tolerant actinomycetes inoculation on cellulose degradation and the formation of humic substances during composting [J]. *Waste Management*, 2017, 68: 64-73.
- [7] AWASTHI M K, LIU T, CHEN H, et al. The behavior of antibiotic resistance genes and their associations with bacterial community during poultry manure composting [J]. *Bioresource Technology*, 2019, 280: 70-78.
- [8] SARKAR S, BANERJEE R, CHANDA S, et al. Effectiveness of inoculation with isolated *Geobacillus* strains in the thermophilic stage of vegetable waste composting [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(8): 2892-2895.
- [9] 韩梦颖, 王雨桐, 高丽, 等. 降解秸秆微生物及秸秆腐熟剂的研究进展[J]. *南方农业学报*, 2017, 48(6): 1024-1030.
- [10] 刘月, 许修宏, 徐杰, 等. 功能菌剂对堆肥中木质纤维素降解的影响[J]. *中国土壤与肥料*, 2014(4): 81-86.
- [11] 杨恋, 杨朝晖, 曾光明, 等. 好氧堆肥高温期的嗜热真菌和嗜热放线菌群落结构[J]. *环境科学学报*, 2008, 28(12): 2514-2521.
- [12] 吴翔, 陈强, 徐丽华, 等. 一株降解纤维素的高温放线菌的筛选及其产酶条件研究[J]. *农业环境科学学报*, 2007, 26(增刊): 101-104.
- [13] LIU D, ZHANG R, YANG X, et al. Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2011, 65(5): 717-725.
- [14] 易旻, 杨玉婷, 李梦霖, 等. 一株耐高温纤维素降解菌的分离筛选及鉴定[J]. *吉首大学学报: 自然科学版*,

- 2017, 38(4): 72-77.
- [15] KHELIL O, CHEBA B. Thermophilic cellulolytic microorganisms from western algerian sources: Promising isolates for cellulosic biomass recycling [J]. *Procedia Technology*, 2014, 12: 519-528.
- [16] HOLGUIN G, VAZQUEZ P, BASHAN Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: An overview [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2001, 33(4): 265-278.
- [17] 胡芮, 孙晓晖, 杨森森, 等. 红树林生境产嗜热纤维素酶芽孢杆菌的筛选及其活性分析[J]. *应用海洋学报*, 2020, 39(3): 352-358.
- [18] 曾思泉, 凌娟, 林丽云, 等. 1株红树林来源枝孢属真菌的分离鉴定及纤维素酶性质分析[J]. *微生物学杂志*, 2018, 38(2): 37-42.
- [19] 余辰星, 杨岗, 陆舟, 等. 迁徙季节水鸟对滨海不同类型湿地的利用——以广西山口红树林自然保护区为例[J]. *海洋与湖沼*, 2014, 45(3): 513-521.
- [20] 韦受庆, 陈坚, 范航清. 广西山口红树林保护区大型底栖动物及其生态学的研究[J]. *广西科学院学报*, 1993, 9(2): 45-57.
- [21] 李菲, 高程海, 余炼, 等. 秋茄内生细菌多样性及抑制甘蔗黑穗霉菌活性研究[J]. *中国抗生素杂志*, 2017, 42(4): 318-327.
- [22] 赵雅慧, 张舒琳, 吴家法, 等. 山口红树林根际土壤可培养细菌多样性及其活性筛选[J]. *海洋学报*, 2018, 40(8): 138-151.
- [23] 周双清, 黄小龙, 黄东益, 等. Chelex-100快速提取放线菌DNA作为PCR扩增模板[J]. *生物技术通报*, 2010, 26(2): 123-125.
- [24] WALSH P S, METZGER D A, HIGUCHI R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material [J]. *Biotechniques*, 1991, 10(4): 506-513.
- [25] 李菲, 高程海, 余炼, 等. 川蔓藻内生及根际细菌多样性与抑菌活性研究[J]. *广西植物*, 2018, 38(7): 924-933.
- [26] KIM K H, ROH S W, CHANG H W, et al. *Nocardio-ides basaltis* sp. nov., isolated from Black Beach Sand [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59: 42-47.
- [27] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [28] 江高飞, 暴彦灼, 杨天杰, 等. 高温秸秆降解菌的筛选及其纤维素酶活性研究[J]. *农业环境科学学报*, 2020, 39(10): 2465-2472.
- [29] 李建树, 孙丽坤, 韩向敏, 等. 高温纤维素降解微生物的筛选、鉴定及其酶活力测定[J]. *甘肃农业大学学报*, 2020, 55(3): 29-37.
- [30] 蒋云霞, 郑天凌, 田蕴, 等. 红树林土壤微生物的研究: 过去、现在、未来[J]. *微生物学报*, 2006, 46(5): 848-851.
- [31] 张华勇, 李振高. 土壤芽孢杆菌及其资源的持续利用[J]. *土壤*, 2001(2): 92-96.
- [32] 陈蓉, 钟敏娟, 刘洪锷, 等. 两株海洋滩涂淤泥芽孢杆菌的筛选鉴定及药敏试验[J]. *南方农业学报*, 2018, 49(12): 2551-2558.
- [33] SHOME R, SHOME B R, MANDAL A B, et al. Bacterial flora in mangroves of Andaman; Part I. Isolation, identification and antibiogram studies [J]. *Indian Journal of Marine Sciences*, 1995, 24: 97-98.
- [34] RANJAN M R, RANJAN S M, KANTI D T, et al. Diversity and seasonal fluctuation of predominant microbial communities in Bhitarkanika, a tropical mangrove ecosystem in India [J]. *Revista de Biología Tropical*, 2012, 60(2): 909-924.
- [35] 林鹏, 张瑜斌, 邓爱英, 等. 九龙江口红树林土壤微生物的类群及抗菌活性[J]. *海洋学报*, 2005, 27(3): 133-141.
- [36] 李元跃, 吴文林. 福建漳江口红树林湿地自然保护区的生物多样性及其保护[J]. *生态科学*, 2004, 23(2): 134-136.
- [37] 王海琪, 潘文, 项炯华, 等. 厦门凤林红树林区土壤可培养微生物数量及细菌类群初探[J]. *集美大学学报: 自然科学版*, 2011, 16(5): 352-358.
- [38] 崔莹, 黄惠琴, 刘敏, 等. 八门湾红树林土壤芽孢杆菌分离与多样性分析[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(2): 229-235.
- [39] DONK P J. A highly resistant thermophilic organism [J]. *Journal of Bacteriology*, 1920, 5(4): 373-374.
- [40] SUNG M H, KIM H, BAE J W, et al. *Geobacillus toebii* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from hay compost [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52(6): 2251-2255.
- [41] SARKAR S, BANERJEE R, CHANDA S, et al. Effectiveness of inoculation with isolated *Geobacillus* strains in the thermophilic stage of vegetable waste composting [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(8): 2892-2895.
- [42] RAHMAN N Z R A T, LEOW T C, SALLEH A B, et

- al. *Geobacillus zalihae* sp. nov., a thermophilic lipolytic bacterium isolated from palm oil mill effluent in Malaysia [J]. BMC Microbiology, 2007, 7(1): 77.
- [43] 程旭艳, 霍培书, 尚晓瑛, 等. 堆肥中高温降解菌的筛选、鉴定及堆肥效果[J]. 中国农业大学学报, 2012, 17(5): 105-111.
- [44] 罗颖, 欧阳嘉, 许婧, 等. 耐热纤维素酶产生菌的筛选、鉴定及产酶条件优化[J]. 食品与生物技术学报, 2007(1): 84-89.
- [45] 张楠, 杨兴明, 徐阳春, 等. 高温纤维素降解菌的筛选和酶活性测定及鉴定[J]. 南京农业大学学报, 2010, 33(3): 82-87.
- [46] 何秀红, 罗学刚, 贾文甫, 等. 高温快速堆肥处理屠宰废弃物效果研究[J]. 环境科学与技术, 2016, 39(1): 171-177, 182.

Study on Diversity and Screening of Cellulase Activity of *Bacillus* from Shankou Mangrove Soil

LI Fei¹, LI Zhe², QIN Xianling¹, HUANG Shushi², SU Xinying¹, PAN Xinli²

(1. Guangxi Key Laboratory of Marine Environmental Science, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China;

2. Guangxi Key Laboratory of Marine Natural Products and Combinatorial Biosynthesis Chemistry, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China)

Abstract: In order to investigate the diversity of *Bacillus* in the soil of Shankou mangrove reserve in Guangxi, the strains with good stability and high temperature resistant cellulase activity were excavated. In this study, the diversity of cultivable bacillus in mangrove soil was studied by culturable method and phylogenetic tree analysis based on 16S rRNA gene sequences. Carboxymethyl cellulose sodium was selected as the only carbon source. Combined with Congo red cellulose culture method, filter paper strip disintegration test and cellulase activity assay method, the cellulase degradation activity research on the isolated *Bacillus* was carried out. The results showed that a total of 171 *Bacillus* strains were isolated from mangrove soil, belonging to 4 families, 12 genera and 40 species, among which *Bacillus* was the dominant genus. 9 *Bacillus* strains with significant cellulase activity were screened out, and four of them had significant thermal stability. There are abundant cultivable *Bacillus* species in the soil of Shankou Mangrove Nature Reserve in Guangxi, and some strains show significant cellulase activity, which has great potential for excavation.

Key words: mangroves in Guangxi, soil, *Bacillus*, genetic diversity, cellulase activity

责任编辑:米慧芝



微信公众号投稿更便捷

联系电话:0771-2503923

邮箱:gxxk@gxas.cn

投稿系统网址:http://gxxk.ijournal.cn/gxxk/ch