

白蚁肠道木质纤维素降解细菌的分离与培养

Isolation and cultivation of lignocellulolytic bacteria from termite gut

李靖¹, 李苗¹, 倪金凤^{1,*}

¹微生物技术研究院, 微生物技术国家重点实验室, 山东大学, 青岛市, 山东省

*通讯作者邮箱: jinfgni@sdu.edu.cn

摘要: 白蚁是自然界木质纤维素的重要分解者, 本文介绍以羧甲基纤维素钠为唯一碳源的富集培养基CMC2, 从黄胸散白蚁后肠中分离培养具有纤维素降解活性的细菌; 以木聚糖为唯一碳源的基本盐培养基BB-, 从黄翅大白蚁后肠中分离培养具有木聚糖降解活性的细菌。

Abstract: Termites are important decomposers of lignocellulose in nature. Here, the cellulose degrading bacteria were isolated and cultured from the hindgut of *Reticulitermes speratus* using enrichment medium CMC2 supplement with sodium carboxymethyl cellulose as the sole carbon source, and the xylan degrading bacteria were isolated and cultured from the hindgut of *Macrotermes barneyi* using the basic salt medium BB- with xylan as the sole carbon source.

关键词: 白蚁, 肠道微生物, 木质纤维素降解, 纤维素酶, 木聚糖酶

研究背景: 木质纤维素是植物细胞壁的主要成分, 是地球上最丰富的可再生生物质。天然的木质纤维素材料由纤维素、半纤维素和木质素组成 (Himmel, 2007)。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, 2005; Kudo 2009)。白蚁依赖自身内源性木质纤维素酶和外源性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/中肠上皮细胞分泌, 外源纤维素酶由共生微生物产生 (Ni and Tokuda, 2013)。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 (Hongoh, 2011), 这些共生微生物在白蚁的营养代谢、木质纤维素降解过程中发挥着重要作用 (Brune, 2014)。分离培养相关微生物有助于进一步研究木质纤维素分解菌的代谢、生理和功能酶系统。本文介绍从两种白蚁肠道获取纤维素和木聚糖降解细菌的方法。

材料与试剂

1. 黄胸散白蚁采自于浙江大学华家池小区，将采集的白蚁蚁巢放置于有盖的塑料盒子中带回实验室，1 周喷水 1 次，室内室温饲养。
2. 黄翅大白蚁采自于湖南衡阳地区，放置于恒温恒湿培养箱 (26℃，湿度 90%)。
3. 琼脂 (生工生物工程有限公司，产品目录号: A505255)
4. 酵母粉 (Oxoid, England, 产品目录号: LP0021)
5. 胰蛋白胨 (生工生物工程有限公司，产品目录号: A505247)
6. NaCl, K₂HPO₄, MgSO₄, KNO₃, NaAc (国药集团化学试剂有限公司，上海，分析纯)
7. 乙醇 (国药集团化学试剂有限公司，上海，分析纯)
8. 有盖的 4.4 L 塑料箱 (29.5cm*20cm*9.6cm)
9. 桦木木聚糖 (Birchwood xylan) (Sigma 公司)
10. 羧甲基纤维素钠 (Carboxymethylcellulose sodium, CMC-Na) (生工生物工程有限公司)
11. 富集培养基 CMC2 (见溶液配方)
12. CMC2 选择平板 (见溶液配方)
13. BM 基本盐培养基 (Basic Media, BM) (见溶液配方)
14. BB-培养基: 在去除 NaAc 的 BM 培养基中加入 0.2 %的桦木木聚糖
15. 70 %酒精
16. 0.9 %生理盐水
17. 1 M NaCl
18. 0.1 %刚果红溶液
19. 移液器和枪头
20. 1.5 ml 离心管
21. 无菌水
22. 玻璃试管
23. 镊子
24. 解剖针
25. 灭菌牙签

26. 涂布棒

27. Millex-GP 针头式过滤器 (Millipore)

仪器设备

1. 体视显微镜 (奥林巴斯, 日本, model: SZ51)

2. 超净工作台 (苏净安泰, 苏州, model:SW-CJ-1FD)

3. 分析天平 (赛多利斯公司, 北京, model: ALC-110.4&1100.2)

4. 立式高压灭菌器 (申安公司, 上海, model:LDZM-80L)

5. 电热恒温培养箱 (精宏实验设备公司, 上海, model: DNP-9052)

6. 水浴振荡器 (哈东联电子技术开发有限公司, 哈尔滨, model: HZS-H)

实验步骤

一、白蚁解剖及后肠菌悬液制备

1. 选取白蚁工蚁 (黄胸散白蚁) 5 头, 放置冰上稍微冷冻使其活动性减弱, 便于后续操作。
2. 将白蚁放入装有 70 % 的酒精的 2 ml 离心管中消毒 2 分钟, 然后转入无菌水中清洗 2 次, 每次 1 分钟。
3. 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, 用镊子夹一头白蚁放于其中。
4. 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 1.5 ml 离心管中, 经无菌水冲洗 2 次后, 转入含 200 μ l 富集培养基 CMC2 的 1.5 ml 离心管中, 用无菌的解剖针搅动后肠使其内容物溢出。
5. 将上述含有 5 头白蚁后肠内容物的培养基转入 10 ml 富集培养基 CMC2 中混匀, 即为白蚁后肠菌悬液。

二、纤维素降解菌的富集培养

1. 取上述黄胸散白蚁后肠菌悬液 5 ml 转入无菌的玻璃试管中, 于 30 $^{\circ}$ C, 200 r/min 条件下振荡培养。

2. 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 CMC2 中进行第 2 次富集培养。

三、用选择平板筛选纤维素降解菌

1. 将富集培养后的菌液做系列稀释, 选取合适稀释倍数 (本实验中稀释到 $10^{-4} \sim 10^{-5}$) 的菌悬液, 涂布于 CMC2 选择平板, 以平板上出现均匀的单菌落为准。

2. 将平板放置于 30℃ 下恒温培养 1~3 d。

3. 待长出单菌落后, 用牙签点种在 CMC2 选择平板上。

4. 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 °C 恒温培养 1~3 d。刚果红染色的具体方法为: 用 70 %酒精将菌落洗掉, 然后用 0.1 %刚果红浸染 CMC2 选择平板 30 min, 再用 1 M NaCl 水溶液脱色 30 min。

5. 观察菌落周围有无透明圈产生, 如有透明圈产生, 则可初步判断该菌株具有纤维素降解活性。

四、纤维素降解菌的分离纯化

1. 将CMC2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。

2. 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。

五、木聚糖降解菌的分离纯化

1. 参照前面白蚁解剖和菌悬液制备的方法, 从 50 头黄翅大白蚁工蚁获得后肠样品。

2. 以 0.5 %接种量接种至 BB-培养基中 30 °C 培养 3 d, 至木聚糖降解较完全。

3. 将上述培养液涂布于固体 BM-平板, 30℃培养 3 d。

4. 将生长的克隆用牙签点于固体 BB-平板上进行筛选。

5. 在固体 BB-平板上用刚果红染色实验筛选木聚糖降解菌。

结果与分析

一、从黄胸散白蚁分离到纤维素降解菌株

以 CMC-Na 为唯一碳源的富集培养基 CMC2 进行肠道菌富集培养，然后涂布于 CMC2 选择平板上进行培养和筛选。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。对产生透明圈的菌落重复点种 2 次，在 30°C 培养条件下分离到 10 个纤维素降解菌株 (图 1A) (吴燕，2011)。

二、从黄翅大白蚁后肠分离到木聚糖降解菌

目前，还没有报道白蚁甚至是昆虫来源的木聚糖酶，但是在白蚁肠道内能够检测到木聚糖酶的活性 (宁娜 2015)，其白蚁肠道内的木聚糖酶可能是由肠道共生微生物提供。使用调整过的 BM 培养基：在 BM 培养基中去除 NaAc，加入 0.2 % 桦木木聚糖，通过刚果红平板筛选获得一株木聚糖降解菌 Mb1 (石小玉，2016)。

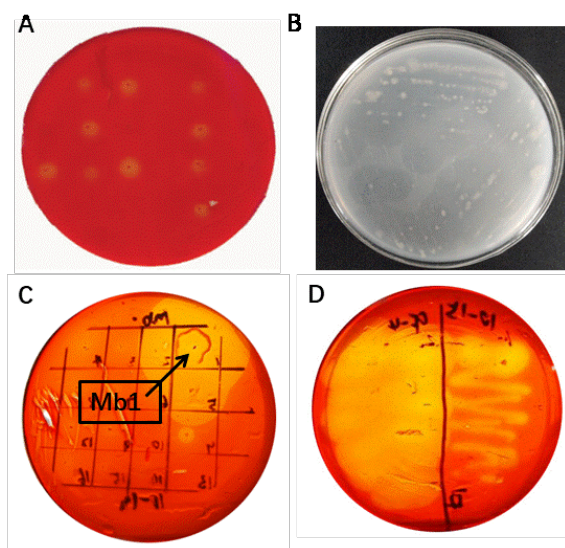


图 1. 木质纤维素降解菌筛选和刚果红染色平板

注：A：纤维素降解菌的筛选。B：木聚糖降解菌的划线培养。C 和 D：木聚糖降解菌的筛选和刚果红染色。

失败经验

选用含有酵母粉 (0.2 %)，以 CMC-Na 为唯一碳源的培养基富集培养 2 次，刚果红染色法分析了约 400 个菌落，没有获得有透明圈克隆。在富集培养基中加入无机氮源 KNO_3 (0.1 %) 代替酵母粉，获得有透明圈的克隆，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。

137

138 溶液配方

139 1. 富集培养基CMC2:

140 KH_2PO_4 2g , MgSO_4 0.15 g, KNO_2 1 g, CMC-Na 10 g, 加蒸馏水定容至1 L。
141 121℃, 高压蒸汽灭菌30 min。

142 2. CMC2 选择平板:

143 酵母粉 5 g, 胰蛋白胨 10 g , CMC-Na 2 g , NaCl 10 g , 琼脂 15 g, 加蒸馏水
144 定容至 1 L。121℃, 高压蒸汽灭菌 30 min。

145 3. BM 基本盐培养基 (Basic Media, BM):

146 KH_2PO_4 0.2 g, NH_4Cl 0.25 g, KCl 0.5 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g, NaCl 1.0
147 g, NaAc 0.0246 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.62 g, Na_2SO_4 2.84 g, HEPES (pH 6.8) 10
148 mM; trace element solution 1 ml; mixed vitamin solution 1 ml; 琼脂 18
149 g, 加蒸馏水定容至 1 L

150 4. Trace element stock solution g/L:

151 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.19 g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, ZnCl_2 0.07
152 g, H_3BO_3 0.006 g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.036 g, $\text{NiCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.024 g, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
153 0.002 mg, HCl (25 % [v/v]), 配制 10 ml 过滤除菌

154 5. Mixed vitamin stock solution:

155 4-aminobenzoic acid 0.04 g, biotin 0.01 g, nicotinic acid 0.1 g, calcium-
156 pantothenate, 0.05 g, 配制 10 ml, 然后用 Millex-GP 针头式过滤器过滤除菌。

157 6. BB-培养基:

158 BM-NaAc+0.2 % Birchwood xylan, 即在无 NaAc 的 BM 培养基中加入 0.2 %的桦
159 木木聚糖 (Birchwood xylan)

160

161 致谢

162 本项目获得国家重点基础研究发展计划 (973 计划, 编号: 2011CB707402), 国家自然
163 科学基金 (编号: 31970119, 31272370, 30870085) 及山东大学微生物技术国家重点
164 实验室自主设置课题的支持。

165

参考文献

1. 宁娜, 张倪, 吴燕, 倪金凤. (2015). [台湾乳白蚁和黄翅大白蚁消化道主要木质纤维素降解酶活性的比较](#). *应用与环境生物学报*. 21(4): 678-682.
2. 石小玉, 张宁, 宁娜, 员超, 倪金凤. (2016). [一株培菌白蚁后肠木聚糖降解细菌的分离与鉴定](#). *微生物学通报*. 43(3): 504-509.
3. 吴燕, 迟绍丽, 倪金凤. (2011). [从白蚁中分离到具有纤维素酶活的贪噬菌](#). *应用昆虫学报*. 48(1): 33-28.
4. Brune, A. (2014). [Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts](#). *Nat Rev Microbiol*. 12(3): 168-180.
5. Himmel, M. E., Ding, S. Y., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., Brady, J. W. and Foust, T. D. (2007). [Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production](#). *Science*. 315(5813): 804-807.
6. Hongoh, Y. (2011). [Toward the functional analysis of uncultivable, symbiotic microorganisms in the termite gut](#). *Cellular and Molecular Life Sciences*. 68(8): 1311-1325.
7. Kudo, T. (2009). [Termite-microbe symbiotic system and its efficient degradation of lignocellulose](#). *Biosci Biotechnol Biochem*. 73(12): 2561-2567
8. Ni, J. and Tokuda, G. (2013). [Lignocellulose-degrading enzymes from termites and their symbiotic microbiota](#). *Biotechnol Adv*. 31(6): 838-850.
9. Yamada, A., Inoue, T., Wiwatwitaya, D., Ohkuma, M., Kudo, T., Abe, T. and Sugimoto, A. (2005). [Carbon mineralization by termites in tropical forests, with emphasis on fungus combs](#). *Ecological Research*. 20(4): 453-460.