

嗜碱纤维素分解细菌的筛选·鉴定及酶活分析

张越锋¹, 吕玲玲^{1*}, 张海沈², 王开权²

(1. 百色学院农业与食品工程学院, 广西百色 533000; 2. 塔里木大学生命科学学院, 新疆阿拉尔 843300)

摘要 [目的] 从新疆某棉浆废水生化处理系统中分离具有纤维素分解能力的耐碱细菌, 分析其物种多样性及纤维素分解酶活性, 为生物法处理碱性、纤维素含量高的废水提供菌株。[方法] 采用 4 种特异性碱性培养基分离耐碱细菌, 采用刚果红染色法对其中纤维素分解菌进行筛选, 通过 16S rDNA 基因序列分析和生理生化试验对纤维素分解细菌进行初步分类鉴定, 采用 DNS 法对其进行酶活测定。[结果] 从各类样品中分离出 50 株耐碱细菌, 筛选出 12 株纤维素分解细菌, 其中有 7 株芽孢杆菌(*Bacillus*)、2 株涅斯捷连科氏菌(*Nesterenkonia*)、1 株耐盐短杆菌(*Brevibacterium halotolerans*)、1 株假单胞菌(*Pseudomonas*)、1 株另类希氏菌(*Alishewanella*), 大部分菌株的最适 pH 为 11~12, 且具有良好的耐盐性和纤维素分解酶活力。菌株 49228 和 49239 分别与 *Nesterenkonia flava* CAAS 251(T)、*Pseudomonas indoloxydans* IPL-1(T) 的最大相似性为 97.71% 和 98.5%, 疑似为潜在的新物种。[结论] 该结果初步明确了棉浆废水生化处理系统中的碱性细菌为优势种群, 嗜碱纤维素分解菌的获得可为生化法处理纤维素含量高的碱性废水处理提供优势菌株。

关键词 棉浆废水; 纤维素分解细菌; 筛选; 鉴定; 嗜碱细菌; 酶活分析

中图分类号 Q93 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)12-0016-05

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.12.004



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Screening, Identification and Enzymatic Activity Analysis of Alkaliphilic Cellulose Decomposing Bacteria

ZHANG Yue-feng¹, LÜ Ling-ling¹, ZHANG Hai-shen² et al (1. College of Agriculture and Food Engineering, Baise University, Baise, Guangxi 533000; 2. College of Life Sciences, Tarim University, Alar, Xinjiang 843300)

Abstract [Objective] To isolate alkali-resistant bacteria with cellulose decomposition ability from some samples of a cotton pulp wastewater biochemical treatment system in Xinjiang, and analyze their species diversity and cellulose decomposition enzyme activities, these strains could be used for biological treatment of wastewater with high alkaline and cellulose content. [Method] Four kinds of specific alkaline media were used to isolate alkali-tolerant bacteria, Congo red staining were used to screen the cellulolytic strains, and 16S rDNA gene sequence analysis and physiological and biochemical experiments would be used to identify taxonomy of cellulose-decomposing bacteria, and the cellulase activity of these strains were determined by DNS method. [Result] Fifty strains of alkali-resistant bacteria were isolated from various samples, and 12 strains of cellulolytic bacteria were screened, including 7 strains of *Bacillus*, 2 strains of *Nesterenkonia*, 1 strain of *Brevibacterium halotolerans*, 1 strain of *Pseudomonas*, 1 strain of *Alishewanella*, the optimum pH of most strains was 11-12, and had good salt tolerance and cellulolysis enzyme activity. Among them, Similarity of 49228 and 49239 to *Nesterenkonia flava* CAAS 251(T) and *Pseudomonas indoloxydans* IPL-1(T) was 97.71% and 98.5% respectively, they might be potential new species. [Conclusion] The research showed that alkaline bacteria are the dominant species in the treatment system of cotton pulp wastewater, those alkalophilic cellulose-decomposing bacteria can be used as engineering strains for treatment of alkaline wastewater with high concentration of cellulose.

Key words Cotton pulp wastewater; Cellulose decomposing bacteria; Screening; Identification; Alkaliphilic bacteria; Enzyme analysis

棉浆黑液是以棉短绒为原料生产棉浆粕过程中产生的高污染的废水, 其中含有大量的纤维素、木质素、半纤维素等有机污染物, 该废水具有碱性高、色度大、难降解的特点^[1], 其如何深度处理已成为人们普遍关注的问题之一。目前, 对棉浆黑液的处理主要采用生物法或者以生物法为核心的耦合工艺, 如生物活性炭纤维法^[2]、超声-生物法^[3]和生化-物化组合工艺^[4]等。在这些工艺中, 微生物的种类及代谢活性高低是决定废水处理效率高低的关键因素, 基于棉浆黑液具有碱性高、纤维素含量高的重要特点, 从某些特定样品中筛选具有分解纤维素活性的高效嗜碱细菌具有重要价值。有研究表明, 棉浆黑液中蕴含着大量嗜碱微生物, 如文金丽等^[5]以棉浆黑液为细菌分离培养基, 从某化纤厂黑液物化处理系统中分离到 16 株嗜碱细菌, 经鉴定这些菌株主要为产芽孢的革兰氏阴性细菌。

嗜碱细菌是一类存在于盐碱土壤或水体等环境中, 在高

pH 或高盐条件下能够稳定生长的一类微生物^[6-7]。由于长期的环境选择压力使嗜碱细菌演化形成了特殊的生物结构、生理机能和遗传基因, 从而对盐碱环境的胁迫表现出良好的适应性, 此外, 还可以产生多种碱性酶和其他生物活性物质, 是研究生物进化、生命起源和生物多样性的重要材料, 也是一类极具应用前景的极端环境微生物资源^[8-9], 可广泛应用于洗涤剂工业^[10]、纺织^[11]、造纸^[12]、污水处理^[13]等领域。因此该研究从棉浆黑液生物处理系统的水样和泥样中分离嗜碱细菌, 然后筛选具有代谢纤维素能力的活性菌株, 并进行菌种初步鉴定及酶活性测定分析, 以期嗜碱纤维素分解细菌的挖掘以及在碱性难降解废水处理中的应用提供菌株资源和参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品。采集新疆阿拉尔市某棉浆厂的棉浆黑液、生化池水样和生化池泥样。这 3 类样品的特点是色度高, 含有的主要污染物为纤维素、木质素及其水解产物, 其中棉浆黑液的碱性最高(pH 约为 12.0)、纤维素含量最大, 生化池水样和泥样的酸碱性接近中性(pH 约为 6.5)、纤维素较低。样品采集过程均严格按照无菌操作进行。

基金项目 广西中青年骨干教师基础提升项目(2019KY0750); 百色学院校级科研项目(2018KN07)。

作者简介 张越锋(1982—), 男, 山西河曲人, 副教授, 硕士, 从事污水处理和微生物次生代谢产物研究。* 通信作者, 助理研究员, 博士, 从事极端环境微生物资源研究。

收稿日期 2021-08-20

1.1.2 嗜碱细菌分离培养基。下列培养基为系列 pH 不同的培养基。①改良培养基一号:棉浆黑液+15%琼脂,pH 12~13,121 °C 灭菌 30 min。②改良培养基二号:生化池水样+15%琼脂,pH 12~13,121 °C 灭菌 30 min。③马铃薯-蔗糖培养基:马铃薯 200.0 g(切块于 1 L 水中煮沸 15 min,过滤的萃取液),蔗糖 20.0 g,琼脂 15.0 g,定容于 1 L 容器中,pH 7~13,121 °C 灭菌 30 min。④LB 固体培养基:酵母提取物 5.0 g,胰蛋白胨 10.0 g,NaCl 10.0 g,琼脂粉 18.0 g,pH 7~13,121 °C 灭菌 30 min。⑤LB 液体培养基:酵母提取物 5.0 g,胰蛋白胨 10.0 g,NaCl 10.0 g,pH 7~13,121 °C 灭菌 30 min。

1.1.3 纤维素分解细菌筛选培养基。羧甲基纤维素 10.0 g, MgSO₄ 1.0 g, KNO₃ 1.0 g, K₂HPO₄ 0.3 g, NaCl 0.5 g, 酵母粉 2.0 g, 琼脂 15.0 g, 定容于 1 L 容器中, pH 7~13, 121 °C 灭菌 30 min。

1.1.4 生理生化试验培养基。酵母提取物 5.0 g, 胰蛋白胨 10.0 g, 琼脂粉 18.0 g, 定容于 1 L 容器中, 根据培养条件调节不同 pH 和 NaCl 浓度, 121 °C 灭菌 30 min。

1.1.5 主要仪器与设备。LXJ264201 型离心机(北京医疗仪器修理厂);LDZX-50KB 立式电热压力蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂);DNP-9162 型电热恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司);Mycycler™ Thermocycler PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);HYA 恒温摇床(中国科学院武汉仪器厂);SW-CJ-2F 超净工作台(上海博讯实业有限公司);LGJ-10C 型冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂)。

1.1.6 主要试剂。DNS 试剂,采用文献[14]中方法进行配制。CMC 缓冲液:称取 1.0 g CNC-Na 溶于 pH=9 的缓冲液中(100 mL),沸水浴加热至溶化,冷却,过滤,取滤液 50 mL,加 pH=7 缓冲液 10 mL,混匀。刚果红染液:精确称取 2.5 g 刚果红溶于 100 mL 烧杯中,定容在 250 mL 容量瓶。

1.2 方法

1.2.1 嗜碱细菌的筛选分离、纯化及保藏。称取不同的土样 10 g,分别放入盛 90 mL 带有玻璃珠的无菌生理盐水中,在摇床上振荡约 3 h。将土壤悬浮液和水样进行梯度稀释,选 10⁻²、10⁻³和 10⁻⁴稀释度样品涂布于上述分离培养基平皿,每个平皿接种 100 μL,分离培养基 pH 分别为 7、8、9、10、11、12,每个稀释度设 3 个重复。培养皿于 28 °C 倒置培养 2~5 d 后观察菌落生长情况,挑取单菌落至 LB 固体培养基上纯化。对纯化的细菌进行编号并于 30%甘油中-20 °C 保藏。

1.2.2 菌株 16S rRNA 基因测序和序列分析。采用 CTAB (cetyltrimethylammonium ammonium bromide)法提取细菌总 DNA,16S rRNA 基因的 PCR 扩增和测序引物均为通用保守引物 27F 和 1492R,测序工作由上海生物工程有限责任公司完成。将分离菌株的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 数据库中的已知序列进行 BLAST 比对,确定菌株分类地位。

1.2.3 产纤维素酶细菌的筛选。将供试菌株用点接法接种于加 1%羧甲基纤维素钠培养基平板上,37 °C 培养 7~10 d,用 1%的刚果红染色 10 min,菌落周围有透明圈的为阳性,即为可以产生纤维素酶的菌株^[15]。

1.2.4 菌株生理生化及形态学观察鉴定。

(1)活化菌株。利用三线法将 12 株细菌接种在 LB 固体培养基内,进行培养 2~3 d。

(2)菌株对盐浓度的耐受性。制作盐浓度为 0、5%、10%、15%、20%、25%的 LB 液体培养基,分别将 12 株细菌接种于培养基内,48 h 后观察测定吸光度。

(3)菌株对 pH 的耐受性。制备缓冲溶液 pH 为 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 的 LB 液体培养基,将 12 株菌接种在培养基内,48 h 后观察测定吸光度。

(4)菌株对温度的耐受性。将 12 株菌接种于 LB 液体培养基内,放入温度为 10、15、20、25、30、37、40、50 °C 培养箱内进行温度试验,48 h 后观察测定吸光度。

(5)菌株形态学观察。将 12 株于 37 °C 下培养 48 h 后的菌株置于显微镜下,进行形态观察并拍照。

1.2.5 纤维素分解细菌 CMC 酶活的测定。

1.2.5.1 葡萄糖标准曲线的绘制。取 11 支 10 mL 的比色管,0~10 号试管分别加入 0~1.0 mL 葡萄糖标准溶液(1 mg/mL),摇匀后加入 2 mL DNS 试剂,沸水浴 5 min,冷却至室温再用蒸馏水定容至 10 mL,摇匀后在波长为 520 nm 下测定吸光度(以 1 号比色管中的空白样为对照)。以葡萄糖含量(mg)为横坐标,吸光度为纵坐标绘制葡萄糖标准曲线。

1.2.5.2 酶活测定方法。将纤维素分解菌接种于 50 mL 培养基中,于 37 °C 摇床培养 48 h,在 4 °C、10 000 r/min 离心 20 min 除去菌体,取上清液作为粗酶液。具体测定方法参照文献[14]。

2 结果与分析

2.1 嗜碱细菌的分离对棉浆黑液、生化池泥样、生化池水样 3 种样品中的菌落进行分离、纯化后,共得到 50 株嗜碱细菌,详细情况见表 1。由表 1 可知,棉浆黑液中共分离到 31 株嗜碱细菌,占总数的 62%;生化池水样中共分离得到 13 株嗜碱细菌,占总数的 26%;生化池泥样中分离得到 6 株嗜碱细菌,占总数的 12%。由此可见,棉浆黑液生物处理系统中含有丰富多样的嗜碱细菌,是嗜碱细菌分离的优良场所,这些嗜碱细菌可作为碱性废水生物处理法的菌种。

表 1 菌株分布情况

Table 1 The distribution of strains

来源 Source	改良培养基一号 Modified medium No.1	改良培养基二号 Modified Medium No.2	马铃薯-蔗糖培养基 Potato-sucrose medium	LB 固体培养基 LB solid medium
生化池泥样 Biochemical pool mud sample	1	0	0	5
棉浆黑液 Cotton pulp black liquor	6	1	12	12
生化池水样 Biochemical pool water sample	3	0	1	9

上述所分离得到的嗜碱细菌大部分来自棉浆黑液中,这

可能是由于细菌长期适应强碱性棉浆黑液的结果。而生化池水样和泥样中尽管微生物种类丰富,但这 2 种环境均为弱酸性或碱性,故嗜碱细菌较少。

2.2 纤维素分解细菌的筛选

2.2.1 纤维素分解细菌的初筛。利用羧甲基纤维素钠的培养基,对所得到的 50 株菌株进行纤维素分解能力的初步筛选,详细结果如表 2 所示。由表 2 可知,50 株细菌中共筛选出 12 株具有分解纤维素能力的细菌,分别是 49011、49082、49208、49209、49210、49228、49232、49239、49243、49252、49261、49267,占菌株总数的 24%。由此可见,棉浆黑液生物处理系统中含有丰富的嗜碱纤维素分解细菌。

表 2 纤维素分解能力的初筛

Table 2 Initial screening of cellulose decomposition capacity

序号 No.	菌株编号 Strain number	纤维素 分解能力 Cellulose decomposition ability	序号 No.	菌株编号 Strain number	纤维素 分解能力 Cellulose decomposition ability
1	49011	+	26	49242	-
2	49082	+	27	49243	+
3	49201	-	28	49244	-
4	49202	-	29	49245	-
5	49205	-	30	49247	-
6	49208	+	31	49248	-
7	49209	+	32	49249	-
8	49210	+	33	49250	-
9	49211	-	34	49251	-
10	49212	-	35	49252	+
11	49215	-	36	49253	-
12	49216	-	37	49254	-
13	49218	-	38	49255	-
14	49220	-	39	49256	-
15	49221	-	40	49257	-
16	49223	-	41	49258	-
17	49228	+	42	49259	-
18	49229	-	43	49260	-
19	49230	-	44	49261	+
20	49232	+	45	49262	-
21	49235	-	46	49263	-
22	49238	-	47	49264	-
23	49239	+	48	49265	-
24	49240	-	49	49266	-
25	49241	-	50	49267	+

注:“+”代表阳性,“-”代表阴性

Note:“+” means positive,“-” means negative

2.2.2 纤维素分解细菌的复筛。利用羧甲基纤维素钠培养基,对初步筛选的 12 株具有分解纤维素能力的细菌进行进一步复筛,测定其分解纤维素能力的强弱。以得到的透明圈直径作为参考条件,详细结果见表 3,部分纤维素分解能力如图 1 所示。

由表 3 可知,纤维素分解细菌的复筛结果与初筛结果是一致的,上述 12 株细菌均具有良好的分解纤维素能力,其中有 10 株细菌的透明圈直径超过了 20 mm,占总数的 83%。其中 7 株来源于棉浆黑液中,进一步说明棉浆黑液是分离嗜碱

纤维素分解细菌的优良场所。

表 3 纤维素分解细菌能力测定

Table 3 Determination of cellulose decomposition ability

序号 No.	菌株编号 Strain number	透明圈直径 Transparent circle diameter//mm	来源 Source
1	49011	21.6±0.1	生化池泥样
2	49082	24.2±0.2	棉浆黑液
3	49209	26.2±0.1	棉浆黑液
4	49208	38.0±0.1	棉浆黑液
5	49210	24.6±0.2	棉浆黑液
6	49228	25.8±0.2	棉浆黑液
7	49232	29.6±0.1	棉浆黑液
8	49239	21.0±0.1	生化池水样
9	49243	25.6±0.1	棉浆黑液
10	49252	8.9±0.2	生化池泥样
11	49261	20.4±0.3	生化池水样
12	49267	19.6±0.1	生化池水样

2.2.3 供试菌株测序。将 12 株具有分解纤维素能力的细菌 DNA 进行 PCR 扩增后进行测序,得到测序结果。将菌株测序结果与 BLAST 数据库已知种进行比对后结果见表 4,结果显示其中有 7 株芽孢杆菌(*Bacillus*),包括 6 株耐盐芽孢杆菌(*Bacillus halodurans*)和 1 株沙福芽孢杆菌(*Bacillus safensis*),共占检测细菌的 58%;2 株涅斯捷连科氏菌(*Nesterenkonia*),占检测细菌的 17%;1 株耐盐短杆菌(*Brevibacterium halotolerans*);1 株假单胞菌(*Pseudomonas*);1 株另类希氏氏菌(*Alishewanella*)。其中菌株 49228 和 49239 与已知菌的相似性较低,分别为 97.71%和 98.50%,为潜在新物种。从棉浆黑液中分离的菌株多以革兰氏阳性杆菌为主,占总数的 48%。

2.3 生理生化试验

2.3.1 菌株对 pH 的耐受性。Horikoshi^[16]根据耐受碱的程度不同,将在 pH 10~12 最适或生长良好,但在 pH 6.5 左右不能或仅能缓慢生长的称为嗜碱细菌。在 pH ≥ 10.0 最适生长,且 pH 低于 8.0 时不生长的为专性嗜碱细菌;在 pH ≥ 10.0 最适生长,且在中性环境中也能生长的为兼性嗜碱细菌;能在 pH 7~9 生长,但在 pH ≥ 10.0 不能生长为耐碱细菌。

对 12 株纤维素分解细菌的 pH 耐受性试验结果(表 5)显示,所有菌株都只能在碱性条件下生长,故均为嗜碱细菌,其中 49228、49232、49243、49239、49252、49261 为专性嗜碱细菌,49011、49082、49208、49210、49267 为兼性嗜碱细菌,无耐碱细菌。可见上述所有菌株对碱性环境均表现出较强的嗜嗜性和适应性,其中大部分菌株的最适 pH 在 10~12,这些菌株具有耐极端碱的特性。

2.3.2 菌株对温度的耐受性。从表 6 可以看出,所有菌株都可以在 15~37 ℃ 的环境中生长,都不能在 40 ℃ 以上的环境中生长。可见菌株对环境的依赖性不是很高,在常温下均能够正常生长。可能由于该菌株长期在自然温度中受到驯化,所以室外温度中都能正常生长繁殖。

2.3.3 菌株对盐浓度的耐受性。对 12 株菌进行盐浓度耐受试验,结果显示(表 7),供试菌株均可在 0~10% 盐浓度条件

下正常生长,表现出对氯化钠的良好耐受性,而 49208、49209、49210、49228 对盐浓度耐受能力更强,可达到 20%,按照嗜盐细菌分类划分,其中 49208、49209、49210、49228、

49243、49261 为中等嗜盐细菌。可见这些菌株不仅表现出良好的耐碱性同时还表现出良好的耐盐性,可用于盐碱度均高的环境领域。

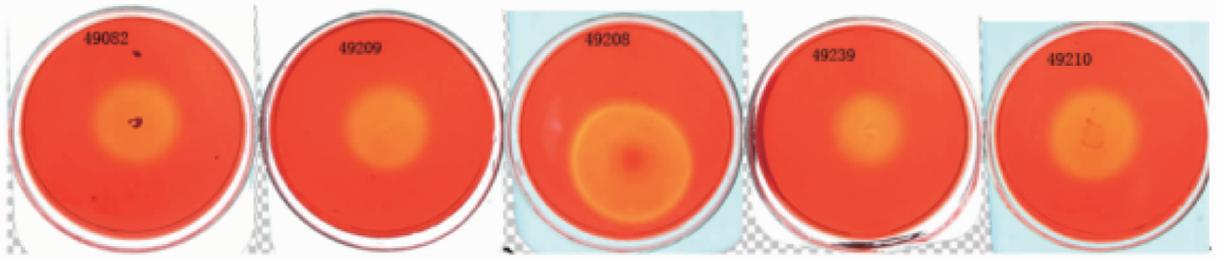


图 1 纤维素分解细菌的筛选

Fig.1 Screening of cellulose decomposition bacteria

表 4 菌株测序结果

Table 4 Sequencing results of strains

序号 No.	菌株编号 Strain number	登录号 Login ID	种属 Species	最大相似性 Maximum similarity//%	来源 Source
1	49011	AM747812	<i>Brevibacterium halotolerans</i> DSM 8802(T)	99.65	生化池泥样
2	49082	ASJD01000027	<i>Bacillus safensis</i> FO-36b(T)	100	沉淀池水样
3	49209	AB021187	<i>Bacillus halodurans</i> ATCC 27557(T)	99.71	沉淀池水样
4	49208	AB021187	<i>Bacillus halodurans</i> ATCC 27557(T)	99.86	沉淀池水样
5	49210	AB021187	<i>Bacillus halodurans</i> ATCC 27557(T)	99.85	沉淀池水样
6	49228	EF680886	<i>Nesterenkonia flava</i> CAAS 251(T)	97.71	沉淀池水样
7	49232	AB021187	<i>Bacillus halodurans</i> ATCC 27557(T)	99.72	沉淀池水样
8	49239	DQ916277	<i>Pseudomonas indoloxydans</i> IPL-1(T)	98.50	生化池水样
9	49243	AB021187	<i>Bacillus halodurans</i> ATCC 27557(T)	99.85	沉淀池水样
10	49252	EF680886	<i>Nesterenkonia flava</i> CAAS 251(T)	100	生化池泥样
11	49261	ALAB01000035	<i>Alishewanella aestuarii</i> B11(T)	99.34	生化池水样
12	49267	AB021187	<i>Bacillus halodurans</i> ATCC 27557(T)	99.49	生化池水样

表 5 菌株对 pH 的耐受性

Table 5 Tolerance of strains to pH

序号 No.	菌株编号 Strain number	生长 pH Growth pH	最适 pH Optimum pH
1	49011	7~12	10~11
2	49082	7~12	10~11
3	49243	8~12	11
4	49208	7~11	10
5	49209	7~12	10~11
6	49210	7~12	10~11
7	49228	8~13	11
8	49232	8~13	10~11
9	49239	8~13	12
10	49252	8~12	10~12
11	49261	9~13	10~11
12	49267	7~13	11~12

2.4 葡萄糖标准曲线 从图 2 可以看出,葡萄糖标准曲线方程为 $y=0.7x$ ($R^2=0.999$),可见葡萄糖浓度在 0~1.0 mg/mL 与吸光度线性相关性很好。

2.5 纤维素酶学特性分析 从菌株纤维素酶活测定结果(表 8)可以看出,总体来讲,上述 12 株菌均具有较高的纤维素酶活力,具有较强的分解纤维素能力,其中 49011、49082、

49239、49208、49243 这 5 株菌的酶活均在 30 U 以上,具有重要的应用研究价值。

表 6 菌株对温度的耐受性

Table 6 Tolerance of strains to temperature

序号 No.	菌株编号 Strain number	生长温度 Growth tem- perature//°C	最适温度 Optimum te- mperature//°C
1	49011	15~37	25~30
2	49082	15~37	30~35
3	49208	10~40	30~35
4	49209	15~37	35
5	49210	20~37	30~35
6	49228	20~37	25~35
7	49239	10~37	25~30
8	49232	15~37	35
9	49243	20~37	30~35
10	49252	20~37	30~35
11	49261	15~37	30~35
12	49267	15~37	35

3 结论与讨论

该研究从棉浆黑液的各个生物处理工段的水样和泥样中共分离获得了 50 种嗜碱细菌,从形态等特征结构分析,这些菌株具有良好的物种多样性。其中 12 株具有明显的纤维

表7 菌株对盐浓度的耐受性
Table 7 Tolerance of strains to salt

序号 No.	菌株编号 Strain number	生长盐浓度 Growth salt//%	最适盐浓度 Optimum salt//%
1	49011	0~13	0~5
2	49082	0~15	0~5
3	49208	0~20	5~10
4	49209	0~20	5~10
5	49210	0~20	5~10
6	49228	0~20	7~9
7	49232	0~10	0~5
8	49239	0~15	0~5
9	49243	0~15	5~10
10	49252	0~10	0~5
11	49261	0~15	5~10
12	49267	0~17	0~5

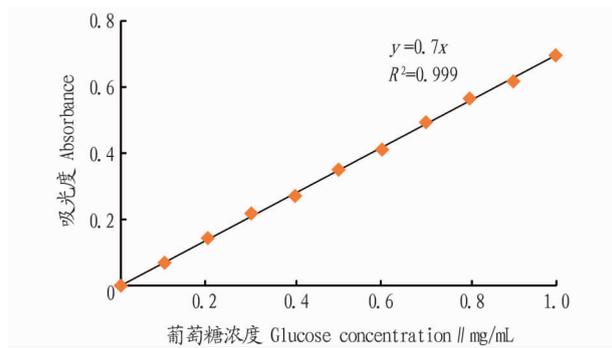


图2 葡萄糖标准曲线

Fig.2 Glucose standard curve

表8 纤维素酶活测定结果

Table 8 Cellulase activity determination results

序号 No.	菌株编号 Strain number	吸光度 Absorbance	含糖量 Sugar content μg/mL	酶活 Enzyme activity//U
1	49011	0.103	147.14	38.147
2	49082	0.086	122.86	31.853
3	49208	0.096	137.14	35.554
4	49209	0.032	45.71	11.851
5	49210	0.036	51.43	13.333
6	49228	0.047	67.14	17.407
7	49232	0.053	75.71	19.629
8	49239	0.112	160.01	41.484
9	49243	0.089	127.14	32.962
10	49252	0.021	30.11	7.806
11	49261	0.067	95.71	24.814
12	49267	0.047	67.14	17.407

素分解能力,占总细菌数的24%,说明棉浆黑液是分离嗜碱纤维素分解细菌的良好场所。对12株纤维素分解细菌的生理生化试验和16S rRNA鉴定结果显示,这些菌以芽孢杆菌为主,同时具有良好的耐盐特性,其中有2株菌与已知菌相似度较低,为潜在新物种,具有一定后续研究价值。12株细菌的纤维素酶活结果显示,这些菌株都可以产生纤维素分解酶,绝大部分都具有较高的酶活力,可见这些菌株可以很好地利用纤维素。该研究结果初步明确了棉浆废水生物处理系统中嗜碱细菌的组成和分布,这些菌株的获得可为盐碱度较高、纤维素含量较高的难处理废水的深度处理提供菌种资源,具有较高的工业应用价值。

参考文献

- [1] 许白羽,何丽,马江平,等.棉浆粕黑液废水处理试验研究与工艺优化[J].工业水处理,2014,34(5):60-63.
- [2] 张越峰,吕玲玲,骆俊乐,等.生物活性炭纤维(BACF)法处理棉浆黑液的研究[J].现代化工,2016,36(4):141-143.
- [3] 赵丽红,孙洪军,高艳娇,等.超声-生物法联合处理棉浆黑液的研究[J].工业安全与环保,2011,37(4):1-2.
- [4] 杨健,王士芬.生化-物化组合工艺处理棉浆粕生产综合废水[J].环境科学与技术,1999(3):31-33,43.
- [5] 文金丽,缪礼鸿,王璐,等.棉浆黑液生物处理系统中嗜碱细菌的多样性[J].武汉大学学报(理学版),2007,53(4):491-496.
- [6] 曹军卫,沈萍,李朝阳.嗜极微生物[M].武汉:武汉大学出版社,2004.
- [7] TAKAMI H,INOUE A,FUJI F,et al.Microbial flora in the deepest sea mud of the Mariana Trench[J].FEMS Microbiol Lett,1997,152(2):279-285.
- [8] XU Y,ZHOU P J,TIAN X Y.Characterization of two novel haloalkaliphilic archaea *Natronorubrum bangense* gen.nov.,sp.nov.and *Natronorubrum tibetense* gen.nov.,sp.nov.[J].Int J Syst Bacteriol,1999,49(1):261-266.
- [9] 张伟周,毛文扬,薛燕芬,等.内蒙古海拉尔地区碱湖嗜碱细菌的多样性[J].生物多样性,2001,9(1):44-50.
- [10] SAKIYAMA T,TOYOMASU T,NAGATA A,et al.Performance of protease as a cleaning agent for stainless steel surfaces fouled with protein[J].J Ferment Bioeng,1998,85(3):297-301.
- [11] DORADO J,FIELD J A,ALMENDROS G,et al.Nitrogen-removal with protease as a method to improve the selective delignification of hemp stemwood by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp.strain BOS55[J].Appl Microbiol Biotechnol,2001,57(1/2):205-211.
- [12] REID I,RICARD M.Pectinase in papermaking:Solving retention problems in mechanical pulps bleached with hydrogen peroxide[J].Enzyme Microb Technol,2000,26(2/3/4):115-123.
- [13] GUPTA R,BEG Q K,LORENZ P.Bacterial alkaline proteases:Molecular approaches and industrial applications[J].Appl Microbiol Biotechnol,2002,59(1):15-32.
- [14] 韩硕,赵岩,宋天顺,等.纤维素分解菌的筛选和酶学性质分析[J].西北农业学报,2013,22(4):172-177.
- [15] 燕红,钟方,高新亮,等.耐盐碱菌株的分离筛选及生物学特性和盐碱去除效率的研究[J].生态学杂志,2012,31(4):1000-1008.
- [16] HORIKOSHI K.Alkaliphiles:Some applications of their products for biotechnology[J].Microbiol Mol Biol Rev,1999,63(4):735-750.