

东北梅花鹿肠道纤维素降解微生物的分离筛选*

黄 岚 简倩楠 刘雪阳 阮岑茜 阿妮尔 段安清 王红芳 郝晓冉†

(北京师范大学生命科学学院, 100875, 北京)

摘要 食草动物依赖胃肠道微生物分解利用天然木质纤维素物质. 为获得高效纤维素降解菌, 本文将东北梅花鹿粪便样品, 经过研磨, 重悬于羧甲基纤维素钠(CMC-Na)作为唯一碳源的富集培养基中, 进行富集培养和筛选, 用革兰氏碘液染色显示纤维素水解圈, 通过纤维素水解圈直径(D)和菌落直径(d)比值, 初步判断纤维素降解菌降解纤维素能力. 筛选出 106 株纤维素降解微生物, 包括 72 株细菌、22 株真菌和 12 株放线菌. 细菌 16S rDNA 和真菌 ITS 序列测序结果显示, 这些纤维素降解菌主要集中分布于变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)和子囊菌门(Ascomycota). 本文提供了一种快速有效的反刍动物肠道纤维素降解微生物的筛选方法, 为东北梅花鹿肠道微生物高通量测序结果提供实验数据支持.

关键词 纤维素降解微生物; 肠道微生物; 东北梅花鹿; 反刍动物

中图分类号 Q939.9

DOI: 10.12202/j.0476-0301.2021082

纤维素是由 β -1,4-糖苷键串联葡萄糖苷形成的直链高分子聚合物, 存在于植物细胞壁、被囊动物以及某些细菌中, 是地球上最丰富的可再生生物质资源^[1]. 除少数部分被反刍动物利用外, 大量的纤维素以废弃物的形式存在于自然界中. 土壤、作物废弃物和动物肠道中存在大量的纤维素降解微生物, 这些微生物产生的纤维素降解酶可将结构紧密的纤维素水解成葡萄糖等物质, 在生物圈的碳循环过程中发挥重要的作用. 筛选高效纤维素降解菌应用于生产实践, 开发纤维素为食品、肥料、纸张、染料和化学品等行业的生产原料^[2], 是人类解决粮食问题和能源问题的途径之一.

自 1912 年 Kellerman 等^[3]首次从土壤中分离出可降解纤维素的微生物 *Cellulomonas flavigena* 以来, 能降解纤维素和能产生纤维素酶的各种微生物被陆续分离鉴定出来, 包括真菌、细菌和原生动物等^[2]. 常见的纤维素降解细菌主要集中于放线菌门(Actinobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes), 纤维素降解真菌主要集中于壶菌门(Chytridomycetes)、子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)^[4]. 高通量测序技术的快速发展, 为挖掘植食性动物肠道中潜在的纤维素降解微生物资源提供了便利. 目前, 牛^[5-6]、熊猫^[7]、骆驼^[8]、北美豪猪(*Erethizon dorsatum*)^[9]、白蚁(*Globitermes brachycerastes*)^[10]等植食性动物肠道微生物组数据已报道, 其中存在大量潜在的纤维素降解

微生物.

东北梅花鹿(*Cervus nippon*)是一种中型反刍动物, 属哺乳纲(Mammalia), 偶蹄目(Artiodactyla), 反刍亚目(Ruminantia), 鹿科(Cervidae), 鹿属(*Cervus*), 为国家一级保护动物, 在《中国濒危野生动物红皮书》中被列为濒危级别. 东北野生梅花鹿全年取食植物种类丰富, 至少采食 81 种植物, 归属为 40 个科, 如壳斗科、槭树科、蔷薇科、莎草科、豆科等^[11-12]. 高通量测序获得的肠道微生物组数据显示, 野生东北梅花鹿冬季肠道优势菌群集中于厚壁菌门、拟杆菌门(Bacteroidetes)和软壁菌门(Tenericutes), 夏季集中于放线菌门、变形菌门(Proteobacteria)和拟杆菌门, 预测东北梅花鹿肠道存在大量的纤维素降解菌^[11]. 研究者也有从梅花鹿瘤胃、肠道分泌物或者粪便中分离获得纤维素降解菌的报道^[13-15]. 但是传统纤维素筛选方法用时相对较长, 效果不太明显, 获得的微生物种类比较单一. 本研究介绍一种快速从野生东北梅花鹿等反刍动物粪便分离筛选纤维素降解微生物, 包括细菌、真菌、放线菌的方法, 为开发反刍动物肠道纤维素降解微生物资源提供便利, 也有望获得全新的高产纤维素酶的优良菌株及基因资源.

1 材料与方法

1.1 样品预处理 东北梅花鹿粪便采集自东北虎豹

* 国家自然科学基金资助项目(32071494)

† 通信作者: 郝晓冉(1983—), 女, 博士, 实验师. 研究方向: 分子真菌学. E-mail: 2015xrhao@bnu.edu.cn

收稿日期: 2021-04-06

国家公园^[16], 于 4 °C 保存. 将粪便放入洁净的研钵内, 先用钵杵将粪便样品按压成小颗粒, 加入液氮, 待液氮快要挥发完毕时迅速研磨, 将粪便样品磨成粉末状.

1.2 制备悬液进行富集培养 称量 1.00 g 粪便粉末, 加入含有 10 颗玻璃珠的 100 mL 富集培养基中, 摇晃均匀, 制备成 10^{-2} 悬液. 分离纤维素降解细菌采用富集培养基 A^[17](羧甲基纤维素钠, 即 CMC-Na 15.0 g、 NH_4NO_3 1.0 g、酵母膏 1.0 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g、 K_2HPO_4 1.0 g, pH 7.0, 蒸馏水定容至 1000 mL), 置于 37 °C 振荡培养箱中, 以 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速振荡培养 5 d. 分离纤维素降解真菌或放线菌采用富集培养基 B^[18](CMC-Na 5.0 g、 NaNO_3 3.0 g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g、KCl 0.5 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, 自然 pH, 蒸馏水定容至 1000 mL), 置于 28 °C 振荡培养箱中以 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速振荡培养 5 d.

1.3 制备稀释液并涂布平板 在超净工作台内用无菌水将富集培养液进行 10 倍梯度系列稀释至 10^{-8} , 各取 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 梯度稀释液 0.1 mL 分别涂布于筛选培养基上, 每个梯度涂布 3 个平板, 密封后倒置培养. 分离纤维素降解细菌采用筛选培养基 C(CMC-Na 2.0 g、 NaNO_3 2.0 g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g、KCl 0.5 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g、蛋白胨 0.2 g、琼脂粉 20.0 g, 蒸馏水定容至 1000 mL), 接种平板置于 37 °C 培养箱中培养 3~5 d. 分离纤维素降解真菌或放线菌采用改良察氏培养基^[18](CMC-Na 5.0 g、 NaNO_3 3.0 g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g、KCl 0.5 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g、琼脂粉 20.0 g, 自然 pH, 蒸馏水定容至 1000 mL), 接种平板置于 28 °C 培养箱中培养 5 d.

1.4 微生物纯培养 对筛选培养基上形成的较大的单一菌落顺序编号并进行纯化培养. 对于细菌, 首先使用灭菌牙签将菌落点种至新的筛选培养基 C 中, 标记编号, 用封口膜封口后倒置于 37 °C 恒温培养箱中培养 3~5 d. 观察菌落形态, 采用划线纯化方法, 进一步纯化菌种. 对于真菌和放线菌, 采用菌丝尖端接种法进行多代连续纯化, 直至获得纯培养. 具体方法是: 灼烧解剖刀并冷却, 从菌落边缘切取边长为 0.5 cm 的菌丝块, 并转移至新鲜的改良察氏培养基平板上, 注意要使菌丝面贴着培养基, 每个新鲜平板上只培养 1 个菌落, 密封后正置于 28 °C 恒温箱中培养 5 d.

1.5 纤维素降解微生物初筛 根据菌落形态将获得的微生物划分为真菌、细菌和放线菌, 利用接种环将细菌转接于新筛选培养基 C 平板上并画圈(每个 9 cm 平板可接 16 株菌), 于 37 °C 恒温培养箱连续培养 3~5 d. 利用菌丝尖端接种法接种真菌单菌落于新鲜的改良察氏培养基平板上, 于 28 °C 恒温培养箱连续培养

5~7 d. 利用菌丝尖端接种法接种放线菌单菌落于新改良高氏 1 号培养基^[18](CMC-Na 2.0 g、 KNO_3 1.0 g、NaCl 0.5 g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g、琼脂粉 20.0 g, pH 7.4~7.6, 蒸馏水定容至 1000 mL) 平板上, 于 28 °C 恒温培养箱连续培养 5~7 d. 每株菌需要接种 2 个平板, 分别用于初筛和备份.

在筛选培养基平板中, 纤维素降解菌能够分泌纤维素酶, 水解培养基中的羧甲基纤维素为可利用的单糖, 碘液可以与纤维素结合使培养基呈现紫色, 不与单糖结合, 因此菌落周围会产生透明的水解圈. 通过水解圈可以判断是否为纤维素降解菌. 具体做法是: 待菌落生长到格子的 1/2 或者平板的 1/2~2/3 时, 加入革兰氏碘液(Gram's iodine, 碘化钾 2.0 g, 碘 1.0 g, 蒸馏水 300 mL, 置于棕色试剂瓶常温储存)^[19], 直至完全覆盖菌落, 室温静置反应 5 min 后弃去染液, 观察菌落并拍照. 选择所有出现透明圈, 即具有纤维素分解能力的菌株进行下一步复筛, 菌株甘油管保存于 -80 °C.

1.6 纤维素降解微生物复筛 挑取待测细菌单菌落接种到 5 mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 以 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的转速, 置于 37 °C 恒温振荡培养箱中振荡培养 24~48 h, 个别生长缓慢菌种可能要连续培养到 5 d, 以得到浓度相当的菌液. 在装有筛选培养基 C 的方形培养皿(边长 12 cm)底部画 16 个均等的格子. 用移液器吸取 5 μL 菌液滴到方格里, 每株菌种滴 4 个格子, 作为平行样. 标记菌种编号和接种日期后, 置于 37 °C 恒温培养箱内培养 3 d.

对于真菌或者放线菌, 采用菌丝尖端接种法分别接种菌丝块于改良察氏培养基、改良高氏 1 号培养基平板上, 每株菌做 3 个平行, 置于 28 °C 恒温培养箱内培养 5 d.

采用革兰氏碘液观察菌落水解圈, 具体方法是: 将革兰氏碘液倒入平板直至完全覆盖菌落, 静置反应 5 min 后弃去染液, 再静置 1 min 后在白光透照仪上观察水解圈. 测量菌落直径(d)和透明圈直径(D), 计算水解圈比值(D/d)的大小, 数值较大的菌株, 可初步判断为纤维素分解能力较强的菌株.

1.7 纤维素降解菌 16S rDNA 或 ITS 序列的扩增和测序 分别接种待测细菌于 20 mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基, 置于 37 °C 培养箱中, 振荡培养 1~3 d. 接种放线菌于 20 mL 高氏 1 号培养基, 置于 28 °C 培养箱中, 振荡培养 3~4 d. 离心收集菌体, 利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(TIANGEN, DP302-02)提取待测菌基因组. 接种待测真菌菌丝块于 100 mL PDB 培养基

中,置于 28 °C 振荡培养箱中连续振荡培养 3~4 d. 利用布氏漏斗分离菌丝和发酵液,菌丝经冷冻干燥后,加入液氮研磨成粉末. 称取 20 mg 菌粉到 2 mL 无菌离心管,参考已报道文献方法提取真菌基因组^[20]. 以待测菌基因组 DNA 为模板,采用细菌鉴定通用引物 Primer A(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAGG-3')和 Primer B(5'-ACGGCAACCTTGTTACGAGTT-3')扩增细菌或放线菌的 16S rDNA. 采用真菌鉴定通用引物 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')扩增真菌的 ITS 序列. PCR 反应体系(50 μL): 34.5 μL 的 ddH₂O, 5.0 μL 的 10×Ex Taq Buffer, 4.0 μL 的 2.5 mmol·L⁻¹ dNTP Mixture, 2.0 μL 的 10 μmol·L⁻¹ 上游引物, 2.0 μL 的 10 μmol·L⁻¹ 下游引物, 100~150 ng 的基因组 DNA, 0.5 μL 的 TaKaRa Ex Taq. PCR 反应条件: 95 °C 预变性 4 min; 98 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min 30 s(16S rDNA)或 30 s(ITS), 运行 33 个循环; 72 °C 延伸 7 min, 之后 4 °C 保存. 利用琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 结果, PCR 产物合格即送交

苏州金唯智生物科技有限公司测序.

1.8 序列比对及系统进化树构建 将待测菌的 16S rDNA 序列(或 ITS 序列)在 NCBI 数据库中进行 Nucleotide BLAST, 选取同源性较高的序列, 应用软件 MEGA 中的 ClustalW 程序进行进一步多序列比对, 将比对的结果用 Neighbor-Joining 法, 选用 Kimura 2-parameter 数学模型构建系统进化树.

2 结果

2.1 梅花鹿粪便样品中纤维素降解微生物菌落计数

按照研磨、配制悬浮液、富集培养、梯度稀释、涂布筛选平板的流程(图 1), 将梅花鹿粪便中存在的纤维素降解微生物分离出来. 经过富集培养, 能利用 CMC-Na 的微生物数量提升, 保证后续获得的微生物种类和数量. 筛选培养基平板上生长出很多菌落, 有细菌、霉菌和放线菌, 各个稀释梯度涂布的平板都有微生物生长, 菌落数为 30~300 所对应的稀释度为 10⁻⁶~10⁻⁸. 对各类微生物分别进行计数, 细菌数为 (4.74~6.30)×10⁸ mL⁻¹, 放线菌和真菌数为 (2.0~2.5)×10⁸ mL⁻¹.

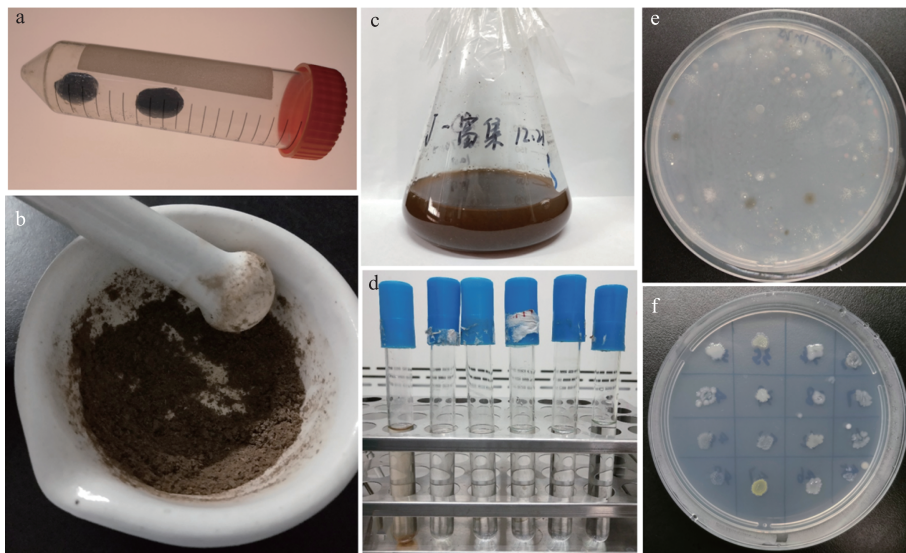
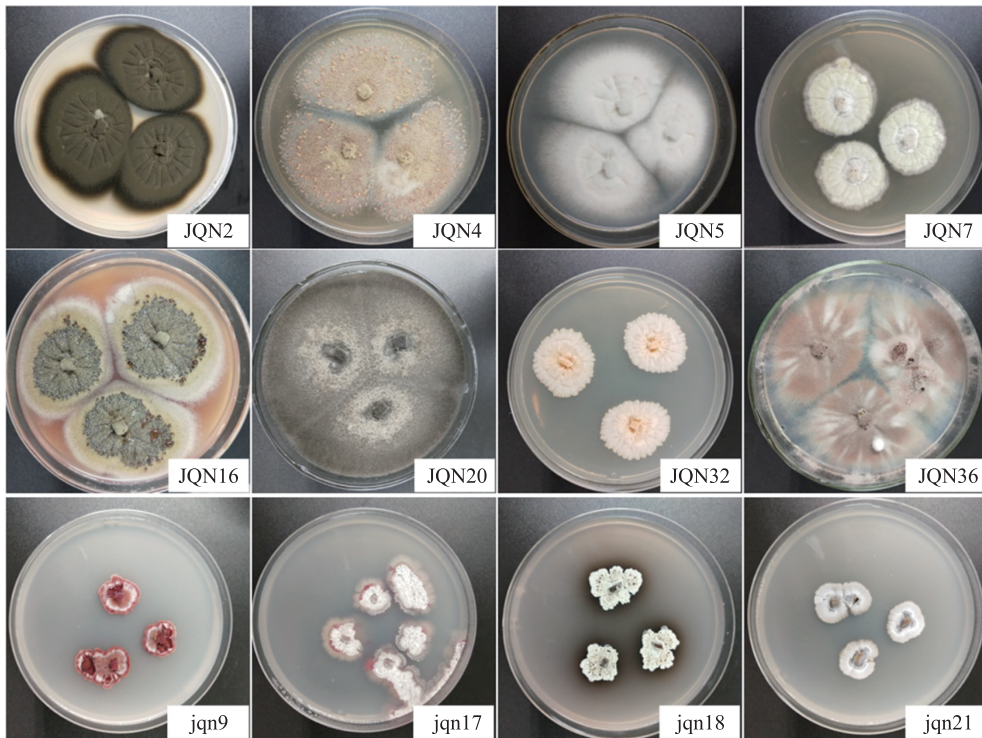


图 1 梅花鹿肠道纤维素降解微生物的分离

挑选筛选培养基上生长比较大的菌落, 进行分离纯化, 共得到 164 个单菌落. 以 MHL 开头顺序编号命名细菌, 以 JQN、jqn 分别开头顺序编号命名真菌和放线菌. 各细菌经过初次纯化后, 通过菌落颜色、边缘形状、是否水润、是否有褶皱等菌落特征, 初步判断细菌是否产色素、是否有荚膜、是否产芽孢, 进行初步分类(图 1-f). 通过菌落颜色、形状、边缘、质地等对获得的真菌和放线菌进行分类(图 2). 针对菌落表型一致的菌株, 选择其中 1 株进行后续的研究.

2.2 纤维素降解微生物筛选结果 在第 1 次分离纯化的筛选培养基上倒入革兰氏碘液进行染色, 5 min 后弃去染色液, 静置片刻后观察水解圈, 筛选出 106 株菌能够产生水解圈, 根据菌落形态, 其中有 72 株细菌、22 株真菌、12 株放线菌.

为了进一步确认这 106 株菌的纤维素降解能力, 用同样的方法进行复筛, 注意细菌采用滴板法接种, 真菌和放线菌采用菌丝尖端接种法接种, 每株菌至少做 3 个平行, 测量菌落的直径(d)和染色后形成的透



JQN2、JQN4、JQN5、JQN7、JQN16、JQN20、JQN32、JQN36 为真菌, 在 PDA 培养基上生长形成的菌落; jqn9、jqn17、jqn18、jqn21 为放线菌, 在高氏 1 号培养基上生长形成的菌落。

图 2 部分纤维素降解真菌、放线菌菌落形态

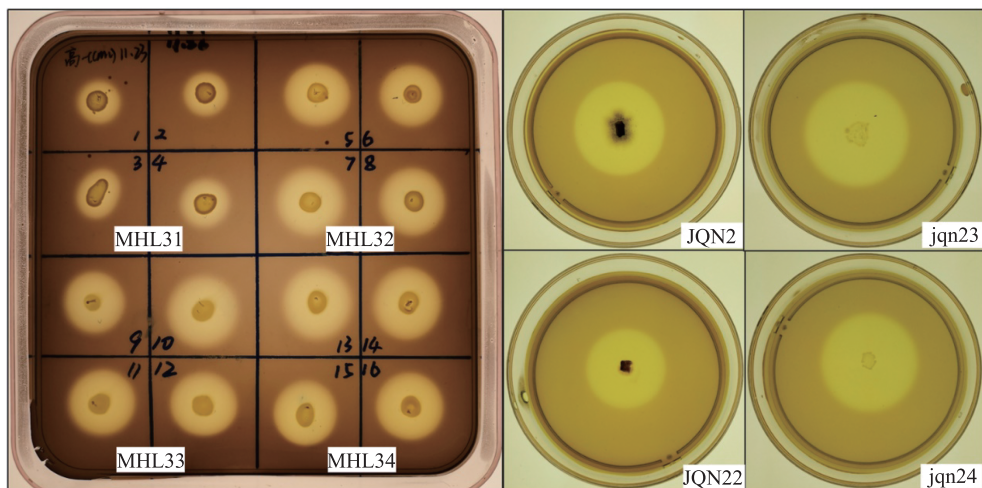
明圈直径(D), 计算菌株的 D/d 值, 用以表征菌株纤维素降解能力强弱; D/d 值越大, 表示纤维素降解能力越强。

复筛方法重复性较好, 各菌株都能够产生水解圈(图 3)。对各菌株的 D/d 值进行排序, 前 45 株菌的 D/d 值结果如图 4 所示, 有 5 株放线菌、2 株真菌和 38 株细菌。放线菌 jqn24、jqn23 和 jqn17 的 D/d 值最大, 分别为 5.61 ± 1.13 、 4.47 ± 0.56 、 4.33 ± 1.19 , 但是这几株菌生长非常缓慢; 真菌 JQN22 与 JQN2 有较强的纤

维素降解能力, D/d 值分别为 4.08 ± 1.27 和 2.65 ± 0.47 ; 细菌 MHL78 和 MHL34 有较强的纤维素降解能力, D/d 值分别为 3.66 ± 0.41 和 3.66 ± 0.25 。

2.3 纤维素降解菌的菌种鉴定

2.3.1 纤维素降解细菌和放线菌的鉴定 将筛选到的纤维素降解细菌或放线菌进行 16S rDNA 基因扩增, 均得到约 1500 bp 的 PCR 产物(图 5)。根据 NCBI 的 BLAST 比对以及系统发育树(图 6)可知, 这些纤维素降解细菌集中于 8 个属, 分别为螯台球菌属



MHL31~34 为纤维素降解细菌, JQN2、JQN22 为纤维素降解真菌, jqn23、jqn24 为纤维素降解放线菌。

图 3 纤维素降解微生物分解 CMC 产生水解圈

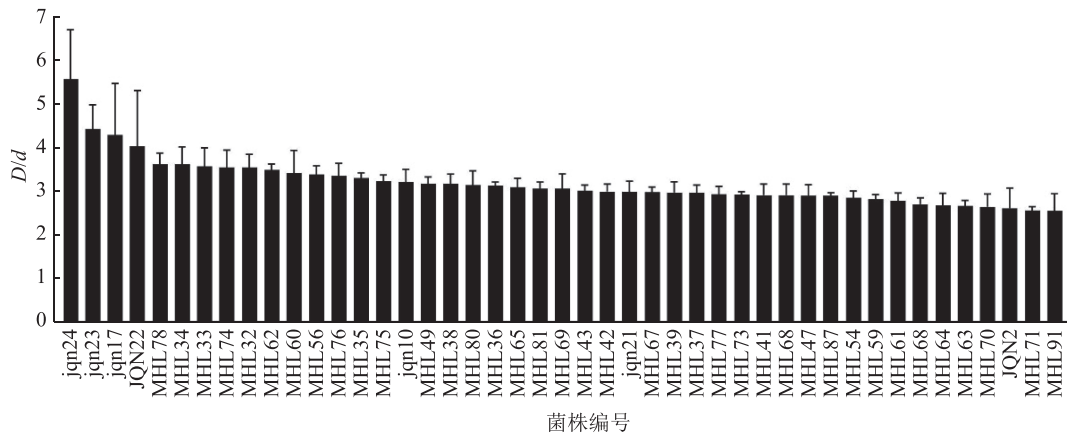
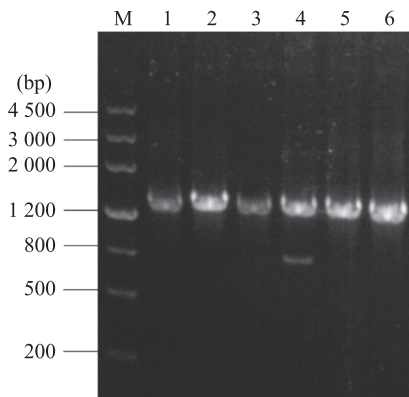


图 4 纤维素降解微生物水解纤维素能力



M 为 Maker III, 1~6 泳道是菌株 MHL 59、MHL62、MHL64、MHL67、MHL 68、MHL73 的 PCR 产物。

图 5 纤维素降解细菌 16S rDNA 序列扩增结果

(*Chelatococcus*)、短波单胞菌属 (*Brevundimonas*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、莱略特氏菌属 (*Lelliottia*)、类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*)、鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*)、根瘤菌属 (*Rhizobium*)、柄杆菌属 (*Caulobacter*) 等, 放线菌则分布于纤维素菌属 (*Cellulosimicrobium*) 和链霉菌属 (*Streptomyces*)。

2.3.2 纤维素降解真菌的测序鉴定 将筛选到的纤维素降解真菌进行 ITS 基因扩增, 均得到约 500 bp 的 PCR 产物(图 7)。

根据 NCBI 的 BLAST 比对以及系统发育树(图 8) 可知, 这些纤维素降解真菌集中分布于 8 个属, 分别是曲霉属 (*Aspergillus*)、链格孢属 (*Alternaria*)、枝顶孢属 (*Acremonium*)、青霉属 (*Penicillium*)、淡紫紫孢霉属 (*Purpureocillium*)、漆斑霉属 (*Myrothecium*)、枝孢霉属 (*Cladosporium*) 和色串孢属 (*Torula*)。

3 讨论

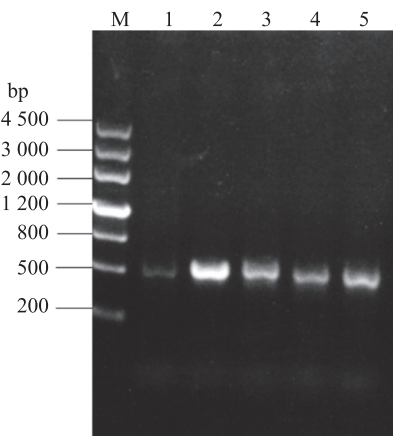
肠道微生物组具有群落结构复杂、数量庞大、多样性丰富、功能丰富等特点, 与宿主的饮食习惯、食

物结构组成以及宿主与肠道微生物的相互作用密切相关^[21]。得益于高通量测序技术的飞速发展, 肠道微生物的多组学研究发展迅猛, 产生了海量的组学数据, 通过数据挖掘和结果分析, 研究者可以了解肠道微生物组的变化与人类和动物的健康关系, 预测肠道微生物宏基因组的功能^[21-22]。除此之外, 对肠道微生物菌群进行功能验证, 研究肠道微生物菌群与宿主相互作用、开发利用功能性菌株、靶向肠道干预宿主健康等, 还需要借助于培养法获得活的肠道菌群^[23]。目前最常采用的肠道微生物分离培养方法是梯度稀释平板涂布法^[19]。

反刍动物具有不同于其他动物的特殊生理结构, 可食用难以被其他动物体所消化的木质纤维素物质, 重要贡献者就是存在于反刍动物瘤胃和肠道内的微生物菌群, 这些微生物可分泌大量的木质纤维素消化酶, 帮助反刍动物从低营养的植物纤维中摄取所需的能量。高通量测序数据显示, 反刍动物肠道存在大量的木质纤维素降解微生物资源^[8-9,11], 通过培养法有望获得高效纤维素降解菌或者新的功能基因。本研究以梅花鹿粪便为样品, 以羧甲基纤维素作为底物, 通过富集培养, 利用革兰氏碘液显色反应显示水解圈, 介绍一种快速分离培养肠道纤维素降解微生物的方法, 在较短时间内快速筛选出 106 株具有纤维素降解能力的菌株。与传统方法比较, 本方法有 2 个优点: 1) 所获得的产纤维素微生物的种类比较丰富, 得益于富集培养, 以及后续的细菌真菌分别筛选培养, 除了获得大量的纤维素降解细菌, 还获得了纤维素降解真菌和放线菌。2) 筛选快速简便。传统的刚果红染色法需要刚果红染色液至少作用 15 min, 然后用 NaCl 溶液洗涤至少 15 min^[24]。本研究使用的革兰氏碘液^[16] 只需染色 3~5 min 即可显出水解圈, 且透明圈边缘更加清晰, 便于测量, 革兰氏碘液可重复使用, 不会影响染色



图 6 基于 16S rDNA 基因序列构建的东北梅花鹿肠道纤维素降解细菌(放线菌)的系统发育树



M 为 Maker III, 1~5 泳道是菌株 JQN1、JQN2、JQN16、JQN34、JQN46 的 PCR 产物。

图 7 纤维素降解真菌 ITS 序列扩增结果

效果。当然, 仅仅依赖透明圈直径与菌落直径的比值反映菌落纤维素降解能力还不够精确, 只能作为定性

分析结果。后续还需要进行形态学和生理生化鉴定, 进一步对菌株进行鉴定, 并进行液体培养实验, 检测各菌株的纤维素酶的活性。

目前关于东北梅花鹿肠道微生物的研究还很少, 已报道的高通量测序研究集中分析了肠道厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门、软壁菌门和放线菌门等细菌^[11,16]。本文也通过 16S rDNA 与真菌 ITS 序列测序对所获得的各纤维素降解菌株进行了菌种鉴定, 与高通量测序结果一致, 本文分离到的纤维素降解细菌也主要集中于变形菌门、厚壁菌门和放线菌门, 但是没有获得软壁菌门的细菌, 这可能跟这类细菌难以培养有关^[25]。很多拟杆菌门细菌也具有分解纤维素的能力, 但是该类细菌都是厌氧菌, 本实验方法都是在有氧条件下进行的, 因此无法获得拟杆菌门细菌。另外, 经过富集培养, 我们还获得了子囊菌门的 22 株真菌。本

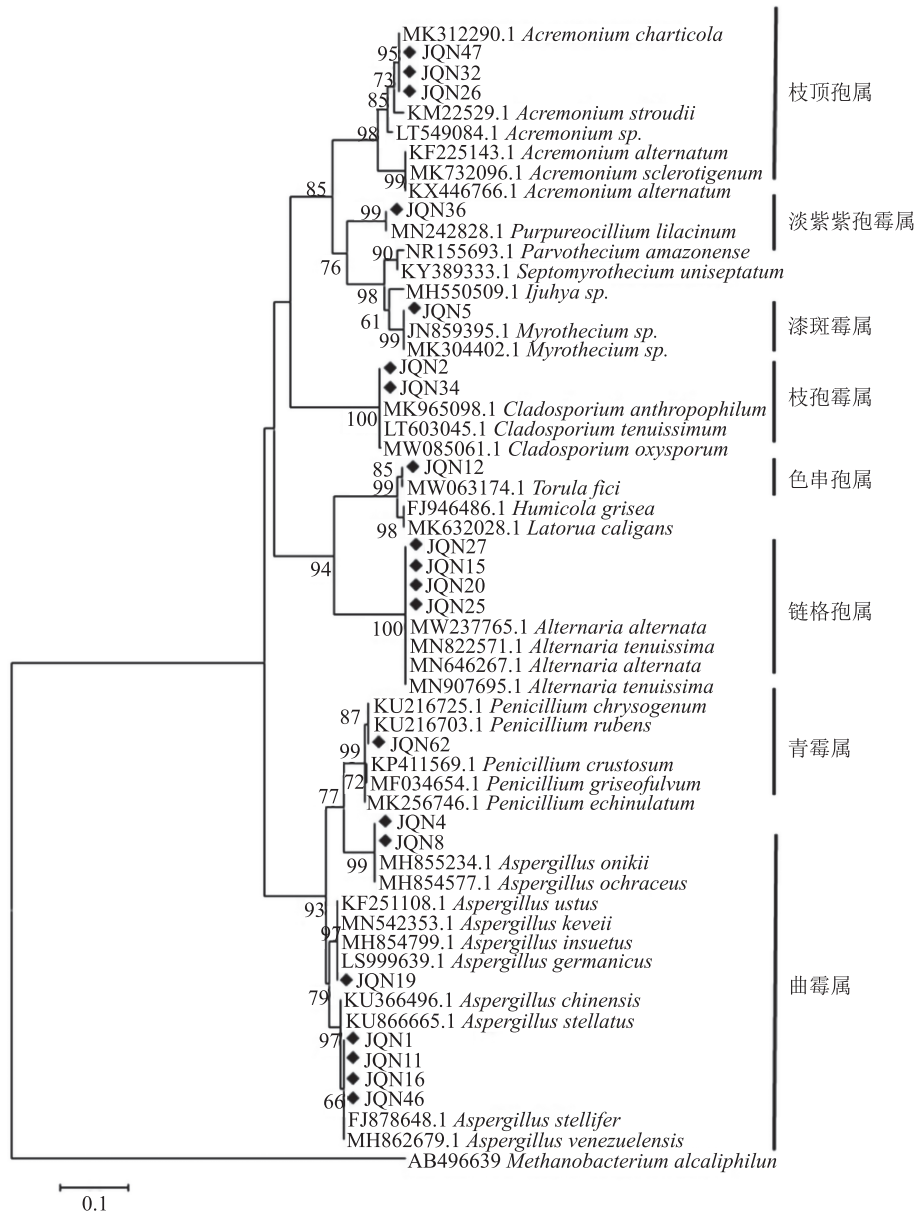


图 8 基于 ITS 序列构建的东北梅花鹿肠道纤维素降解真菌的系统发育树

文的研究结果为东北梅花鹿肠道纤维素降解微生物高通量测序数据提供实验依据,同时还补充了东北梅花鹿肠道纤维素降解真菌和放线菌的种类,丰富了纤维素降解菌资源.

4 参考文献

[1] LYND L R, WEIMER P J, VAN ZYL W H, et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2002, 66(3): 506

[2] BARZKAR N, SOHAIL M. An overview on marine cellulolytic enzymes and their potential applications[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(16): 6873

[3] ABT B, FOSTER B, LAPIDUS A, et al. Complete genome

sequence of *Cellulomonas flavigena* type strain (134^T) [J]. *Standards in Genomic Sciences*, 2010, 3(1): 15

[4] KAMESHWAR A K S, QIN W S. Recent developments in using advanced sequencing technologies for the genomic studies of lignin and cellulose degrading microorganisms[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2016, 12(2): 156

[5] 马晨, 张和平, 刘彩虹, 等. 牛瘤胃与肠道微生物多样性的研究进展[J]. *动物营养学报*, 2014, 26(4): 852

[6] MATTHEWS C, CRISPIE F, LEWIS E, et al. The rumen microbiome: a crucial consideration when optimising milk and meat production and nitrogen utilisation efficiency[J]. *Gut Microbes*, 2019, 10(2): 115

[7] ZHU L, WU Q, DAI J, et al. Evidence of cellulose metabolism by the giant panda gut microbiome[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America, 2011, 108(43): 17714
- [8] AMERI R, LAVILLE E, POTOCKI-VÉRONÈSE G, et al. Two new gene clusters involved in the degradation of plant cell wall from the fecal microbiota of Tunisian dromedary[J]. PLoS One, 2018, 13(3): e0194621
- [9] HE J, YI L, HAI L, et al. Characterizing the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract segments of the Bactrian camel[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 654
- [10] LIU N, LI H J, CHEVRETTE M G, et al. Functional metagenomics reveals abundant polysaccharide-degrading gene clusters and cellobiose utilization pathways within gut microbiota of a wood-feeding higher termite[J]. The ISME Journal, 2019, 13(1): 104
- [11] GUAN Y, YANG H T, HAN S Y, et al. Comparison of the gut microbiota composition between wild and captive sika deer (*Cervus Nippon hortulorum*) from feces by high-throughput sequencing[J]. AMB Express, 2017, 7(1): 212
- [12] 张素青. 基于高通量测序技术的东北梅花鹿(*Cervus nippon hortulorum*)食性研究[D]. 北京: 北京师范大学, 2017
- [13] 韦海婷, 李光玉, 金春爱, 等. 鹿源高效纤维素降解菌的筛选和鉴定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018(7): 162
- [14] 张彤. 两株鹿源芽孢杆菌的分离鉴定及生物学特性研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2017
- [15] 陈龙, 王春风, 钱爱东. 一株鹿源纤维素降解菌Lu14的分离与鉴定[J]. 吉林农业大学学报, 2016, 38(5): 523
- [16] 管宇. 基于高通量测序技术对梅花鹿及东北豹、华北豹肠道微生物多样性的研究[D]. 北京: 北京师范大学, 2019
- [17] 何静. 双峰驼肠道微生态特征及纤维素分解菌的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2019
- [18] 徐云迪. 产纤维素酶真菌的筛选、鉴定及其酶学特性的研究[D]. 南宁: 广西大学, 2018
- [19] KASANA R C, SALWAN R, DHAR H, et al. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine[J]. Current Microbiology, 2008, 57(5): 503
- [20] 胡阳. 球毛壳菌次生代谢的分子生物学研究[D]. 天津: 南开大学, 2013
- [21] 杜梦璇, 姜民志, 刘畅, 等. 肠道微生物菌株资源库的构建与应用开发[J]. 微生物学报, 2021, 61(4): 875
- [22] BARKO P C, MCMICHAEL M A, SWANSON K S, et al. The gastrointestinal microbiome: a review[J]. Journal of Veterinary Internal Medicine, 2018, 32(1): 9
- [23] VILANOVA C, PORCAR M. Are multi-omics enough? [J]. Nature Microbiology, 2016, 1(8): 1
- [24] GHIO S, LORENZO G S, LIA V, et al. Isolation of *Paenibacillus* sp. and *Variovorax* sp. strains from decaying woods and characterization of their potential for cellulose deconstruction[J]. International Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2012, 3(4): 352
- [25] WANG Y, HUANG J M, ZHOU Y L, et al. Phylogenomics of expanding uncultured environmental tenericutes provides insights into their pathogenicity and evolutionary relationship with Bacilli[J]. BMC Genomics, 2020, 21(1): 1

Isolation of cellulolytic microorganisms from sika deer feces

HUANG Lan JIAN Qiannan LIU Xueyang RUAN Cenqian A Nier DUAN Anqing
WANG Hongfang HAO Xiaoran[†]

(College of Life Sciences, Beijing Normal University, 100875, Beijing, China)

Abstract Herbivores rely on gastrointestinal microorganisms to decompose and utilize natural lignocellulosic materials. Here cellulose-degrading microorganisms were isolated from feces of sika deer (*Cervus nippon hortulorum*) to screen for highly efficient cellulose-degrading microorganisms. The feces samples were crushed, re-suspended in enrichment medium with sodium carboxymethyl cellulose (CMC-Na) as the sole carbon source. The sample suspension was diluted and spread on selection medium. Cellulose hydrolysis circle was measured by Gram's iodine staining. Ratios of D (diameter of cellulose hydrolysis circle) to d (colony diameter) were used to determine cellulose degradation ability of the isolated microorganisms. Altogether 106 cellulose-degrading microorganisms were obtained, including 72 bacteria, 22 fungi and 12 actinomycetes. Bacterial 16S rDNA and fungal internal transcribed spacer (ITS) sequencing revealed that the isolated microorganisms were mainly distributed in Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria and Ascomycota.

Keywords cellulose-degrading microorganisms; gut microbiota; *Cervus nippon hortulorum*; ruminant animal

【责任编辑: 武 佳】