

一株烟草秸秆降解菌的分离、鉴定及酶学性质研究^①

邹芳¹, 赵娟¹, 雷燕萍¹, 祖朝龙², 曹慧^{1*}

(1 南京农业大学生命科学学院/农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095;

2 安徽省农业科学院烟草研究所, 合肥 230031)

摘要:从皖南地区烟稻轮作田土壤中经 CMC-Na 初筛获得 5 株纤维素降解菌, 经 DNS 法测定纤维素酶活性复筛得到一株降解活性较高的降解菌 YC-2。根据该菌 16S rDNA 序列比对结果, 结合形态和生理生化特征, 确定 YC-2 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。对 YC-2 酶学性质进行相关研究, 并分析 YC-2 对烟碱的耐受情况及对烟草秸秆的降解情况, 结果表明: 在 7 天内, YC-2 对烟草秸秆降解率为 10.14%; 酶学特性表现为最适反应温度为 60℃且在 15~60℃ 之间具有稳定性; 最适反应 pH 为 7.0, 在 pH 4.0~7.5 范围内稳定性较好; YC-2 在浓度为 1~2 g/L 烟碱中能快速生长, 而在高浓度的烟碱中生长受到抑制。因此, 菌株 YC-2 产纤维素酶活性较高、相对耐热耐碱且对烟杆有一定分解作用, 通过进一步诱变选育和发酵条件优化有较好的田间应用潜力。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 纤维素酶; 产酶特性

中图分类号: S154.39

自然界中, 纤维素可占植物体总质量 40% 左右^[1]。然而, 由于植物秸秆结构的特殊性(纤维素构成细胞壁, 其间缠绕具有空间结构的半纤维素及木质素)而导致微生物很难降解秸秆纤维素^[2]。作为农业生产大国, 中国每年秸秆产量超过 6 亿 t^[3], 除秸秆还田^[4]外, 秸秆气化、热解发电、秸秆青贮等技术皆因收集运输与储存难、成本高等问题无法大规模应用^[5]。近年来, 中外大量研究表明菌剂的施用不仅能有效加快秸秆腐解, 还对土壤养分、土壤微生物及作物产量有一定的促进作用。Hart 等^[6]筛选的一株毛束霉属真菌显著降低了小麦秸秆 C/N 值, 提高了土壤团聚体稳定性。Kausar 等^[7]将绿色木霉及黑色曲霉混菌培养并经试验证明其显著降低了稻秸纤维素、半纤维素、木质素及 C/N 含量。金海洋等^[8]在水稻秸秆还田过程中添加纤维素分解菌剂显著降低了水稻秸秆的强度, 并增加土壤脲酶、多酚氧化酶等酶活性及下季作物西瓜产量和糖度。

烟稻轮作为我国皖南地区特有的一种种植模式, 在我国东南和华南烟区已被农户广泛采用。据调查显示, 我国每年大约产生 1.0×10^6 t 烟草废弃物, 其中含有多种致癌致畸物质, 如氨基联苯、甲奈胺、苯并

[α]芘等^[9]。70.0% 的烟杆残留在田间未加以利用, 从而造成烟杆分解速度慢、氮饥饿、青枯菌和 TMV 烟草病菌寄生等问题, 影响后季作物生长^[10]。为提升农田土壤肥力, 减少农田面源污染^[11], 筛选高效有降解活性的微生物是最为经济、环保的方法。由于烟草秸秆木质素含量相对较高、且含有对多种微生物生长有抑制作用的烟碱, 微生物对烟秸秆的降解可能更为困难。本研究旨在分离出高效分解烟草秸秆并可对烟碱具有一定耐受作用的菌株, 加速秸秆的腐烂, 为烟稻轮作模式的推广提供菌株材料和科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试土壤采自皖南地区烟稻轮作试验田, 烟秸秆来自湖北省恩施烟草所。

1.2 研究方法

1.2.1 烟草秸秆降解菌株的筛选 称取 10.0 g 试验土样置于 90 ml 灭菌的蒸馏水中, 并于 180 r/min 摇床中振荡 30 min, 取 1 ml 10^{-3} 的稀释菌液涂布于 CMC-Na 固体平板(培养基成分为 CMC-Na 15 g, 酵母膏 1 g, NH_4NO_3 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, KH_2PO_4

基金项目: 安徽省烟草公司科技项目(2014551004)资助。

* 通讯作者(hcao@njau.edu.cn)

作者简介: 邹芳(1989—), 女, 湖北咸宁人, 硕士研究生, 主要从事环境微生物学研究。E-mail: 455284318@qq.com

1 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 ml)上, 在 30℃ 的培养箱中培养 3 天, 刚果红染色观察菌落周围水解圈情况, 将 A 值(透明圈直径及与菌落直径之比)较大的菌株接种到以烟草粉末为唯一碳源的平板上, 选取生长速度快的菌株, 连续纯化获得纯培养。

1.2.2 酶活性测定复筛 1)粗酶液的制备。分别将 CMC-Na 固体平板上筛选出的细菌、真菌、放线菌于 28℃ 180 r/min 振荡培养制成种子液。取 1 ml 的种子液接种至 100 ml 的产酶发酵培养基中, 28℃ 180 r/min 的摇床中培养 72 h 后 4 000 r/min 离心 10 min, 收集上清, 作为粗酶提取液。

2)羧甲基纤维素钠酶活力(CMC)及滤纸酶活力(FPA)测定。取合适稀释度的稀释酶液, 依据 Mandels^[12]纤维素酶活性测定方法并稍作改动, 得出粗酶液酶活性。定义酶活力为每分钟催化底物生成 1 μ mol 葡萄糖所需要的酶量为一个酶活力单位 U。

1.2.3 菌株鉴定 观察秸秆降解菌株在培养基上的生长情况、菌落形状、菌落颜色、菌落透明度、干燥程度及其边缘整齐度等特征, 并对菌株进行革兰氏染色, 参照文献[12]的方法对筛出菌株进行生理生化鉴定。直接挑取目的菌落, 以菌体热解后暴露的 DNA 模板进行 PCR 扩增, 并将扩增的产物酶连转化至本实验室保存菌种 *E.coli* DH10b 中, 挑取阳性克隆测序后采用邻接法(Neighbor Joining Method)建立菌株系统发育树。

1.2.4 菌株对烟草秸秆降解率及对烟碱浓度的耐受性测定 在 100/250 ml 的产酶发酵培养基中, 按照最佳接种量将培养好的种子液接种于液体产酶培养基中, 以烟碱为唯一碳源, 并设置烟碱浓度为 1~5 g/L 5 个梯度浓度, 测定菌液的 OD₆₀₀ 值, 得出菌株对烟碱的耐受浓度范围。

取 0.5 g 烟草秸秆粉加入到 100 ml 的秸秆降解培养基中, 高温灭菌, 按照 10% 的接种量将培养好的菌液接入培养基中, 180 r/min 30℃ 培养 7 天, 以不接菌的三角瓶作为空白对照, 取出后用蒸馏水冲洗除去烟草秸秆以外的物质, 烘干后称量剩余秸秆质量。秸秆降解率测定采用失重法, 其中 m_1 为初始秸秆质量, m_2 为发酵 7 天洗净烘干后秸秆质量。

1.2.5 YC-2 酶学特性的研究 根据 1.2.2 粗酶液的制备方法, 反应体系为 500 μ l 粗酶液加 1.5 ml 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, 设置不同温度、pH、金属离子, 采用 DNS 法测定其 CMC 酶活力和 FPA 酶活力, 以研究粗酶液的酶学特性。

1.2.6 金属离子对降解菌株 CMC 酶活力和 FPA 酶活力的影响 将最终浓度为 1 mmol/L 的 Zn²⁺、Pb²⁺、Fe²⁺、Mn²⁺、Mg²⁺、Cu²⁺ 6 种金属离子添加至酶反应

体系中, 以无任何金属离子添加的对照组所测酶活为 100%, 得出添加金属离子的相对酶活力。

2 结果与分析

2.1 降解菌株的初筛

本研究从 CMC-Na 固体平板上共获得 354 株单一菌株, 将菌株在固体培养基上进行划线纯化, 选取具有较大水解圈菌株接种到以烟草粉末为唯一碳源的固体平板上, 随后挑选 5 株 A 值较大且在烟草粉末平板上生长较快的菌株, 其中 YC-1 为放线菌, YC-2~YC-5 为细菌。5 株降解菌的脱色圈直径与菌落直径结果如表 1, 菌株在 CMC-Na 固体平板上的降解情况如图 1。

表 1 5 株烟草秸秆降解菌在 CMC-Na 固体培养基上菌落和降解圈直径(cm)
Table 1 Colony and halo of five degrading bacteria for tobacco straw in CMC-Na medium

| 菌株代号 | 透明圈直径 D (cm) | 菌落直径 d (cm) | D/d |
|------|----------------|---------------|-------|
| YC-1 | 2.45 ± 0.04 | 0.91 ± 0.03 | 2.69 |
| YC-2 | 1.44 ± 0.03 | 0.44 ± 0.03 | 3.27 |
| YC-3 | 1.90 ± 0.03 | 0.52 ± 0.02 | 3.67 |
| YC-4 | 2.24 ± 0.04 | 0.81 ± 0.02 | 2.76 |
| YC-5 | 1.82 ± 0.02 | 0.64 ± 0.03 | 2.84 |

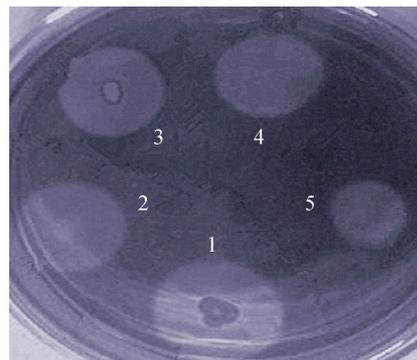


图 1 菌株在 CMC 平板上的降解效果

Fig. 1 Degradation effects of strains on CMC medium plates

2.2 降解菌株的粗酶活性测定复筛

利用 DNS 法测定还原糖含量, 依据酶活性定义计算出粗酶酶活力, 其酶活力大小如表 2 所示, 可以看出 YC-2 号菌株的总体酶活力较高, CMC 粗酶酶活力为 38.65 U/ml, FPA 酶活力为 14.38 U/ml。因此, 选择 YC-2 作为后续研究对象。

2.3 降解菌株的鉴定

2.3.1 形态学鉴定 将降解菌株 YC-2 在固体牛肉膏蛋白胨平板上划线纯化, 30℃ 的培养箱中培养 3 天观察。该菌落为圆形, 表面粗糙不透明, 污白色, 干燥, 有皱褶, 菌落中央有深色的伞状线; 经革兰氏染色油镜观察该菌株为革兰氏阳性短杆菌(图 2)。

表 2 5 株菌株的 CMC 酶活力和 FPA 酶活力测定
Table 2 CMase and FPase activities of five strains

| 菌株编号 | CMC 酶活力(U/ml) | FPA 酶活力(U/ml) |
|------|---------------|---------------|
| YC-1 | 30.43 ± 0.88 | 13.21 ± 0.86 |
| YC-2 | 38.65 ± 0.51 | 14.38 ± 0.92 |
| YC-3 | 28.90 ± 0.85 | 2.29 ± 1.41 |
| YC-4 | 20.98 ± 0.23 | 7.02 ± 1.81 |
| YC-5 | 25.83 ± 0.74 | 8.54 ± 0.88 |

2.3.2 生理生化特征鉴定 以常见的枯草芽孢杆菌为对照(CK),降解菌株 YC-2 的生理生化试验结果如表 3 所示。

2.3.3 16S rDNA 鉴定 对降解菌株 16S rDNA 的

PCR 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳上验证,得到一条 1 600 bp 左右的条带,送至金斯瑞公司测序后,得到一条长 1 530 bp 的序列,将测得的序列在 NCBI 中比对,发现其与枯草芽孢杆菌属(*Bacillus subtilis*) 16S rDNA 序列一致性高达 100%。将测序序列信息提交 Genbank,菌株的登录号为 GQ421472.1,下载同源性较高的序列,利用 MEGA 5.0 基于邻接法构建菌株的系统发育进化树,见图 3。结果显示 YC-2 与 *Bacillus subtilis* strain NB、*Bacillus* sp. IHBB 在同一分支且距离很小,结合菌株形态学观察和生理生化特征,可判定该菌是枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

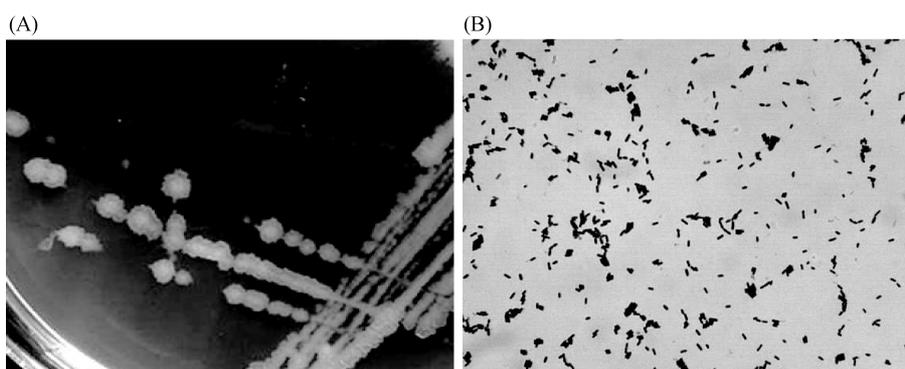


图 2 YC-2 降解菌形态(A)和菌株镜检(B)结果
Fig. 2 The morphology (A) and microscopy (B) of the strain YC-2

表 3 YC-2 的生理生化特性
Table 3 Physiological and biochemical characteristics of strain YC-2

| 菌株 | YC-2 | CK | 菌株 | YC-2 | CK |
|--------|------|----|---------|------|----|
| 甲基红试验 | - | - | 脲酶试验 | - | - |
| 淀粉水解试验 | + | + | 明胶液化试验 | + | + |
| 糖发酵试验 | + | + | 氧化酶试验 | - | - |
| V-P 试验 | + | + | 卵磷脂酶试验 | - | - |
| 产硫化氢试验 | - | - | 过氧化氢酶试验 | + | + |
| 吲哚试验 | - | - | 柠檬酸盐试验 | + | + |

2.4 降解菌株对烟碱的耐受性及对烟杆的降解率

2.4.1 对烟碱的耐受性 烟碱属高毒性化合物,很多微生物无法对其直接利用。本实验以烟碱为唯一碳源,并设置烟碱浓度分别为 1~5 g/L 5 个梯度浓度,在 pH 6.5, 30℃ 下培养 24 h,测定菌株的 OD₆₀₀。结果如图 4 所示:当烟碱浓度为 2 g/L 时,菌株的生长最佳,当烟碱浓度为 3 g/L,生长次之。当烟碱浓度逐渐上升至 5 g/L 时,菌株的生长受到抑制。因此,菌株在浓度为 1~3 g/L 烟碱中能快速生长,而在高浓度的烟碱中生长受到抑制。

2.4.2 对烟草秸秆的降解率 以 10% 的接种量将菌液接入秸秆降解培养基中,发酵 7 天后,测得结果

如表 4:菌株在 7 天内对烟草的降解率为 10.14%,而自然条件下降解率为 2.26%。

2.5 降解菌株的酶学性质

2.5.1 最适反应温度 将粗酶液的反应体系置于 15~80℃ 下反应,把酶活力最高者作为 100%,结果如下图 5A 所示:CMC 酶活力和 FPA 酶活力的最适反应温度为 60℃。温度小于 60℃ 时,酶活力呈现上升趋势,当温度过高时,会使酶的结构发生改变甚至使酶失活。将酶液在不同温度下保持 30 min,结论显示在 15~60℃ 之间酶活力较稳定。

2.5.2 最适反应 pH 用缓冲液将反应体系 pH 调成 3.0~10.0,结果如图 5B:pH 在 3.0~7.0 之间时,

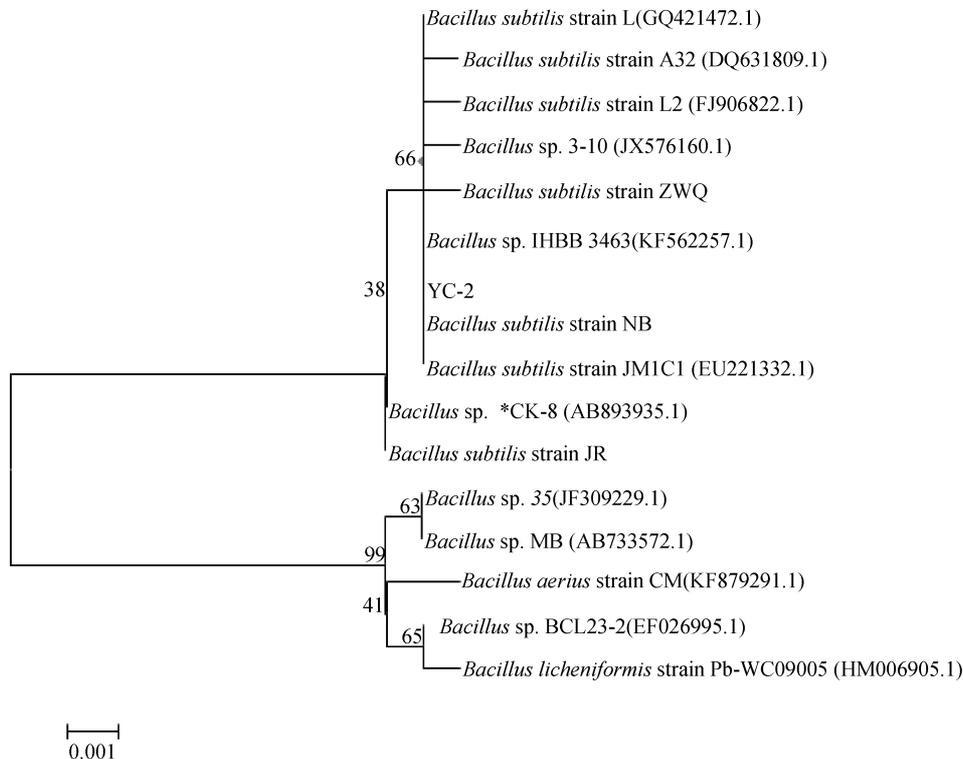


图 3 基于 16S rDNA 序列菌株 YC-2 的系统发育进化树
Fig. 3 Phylogenetic tree of strain YC-2 based on 16S rDNA sequences

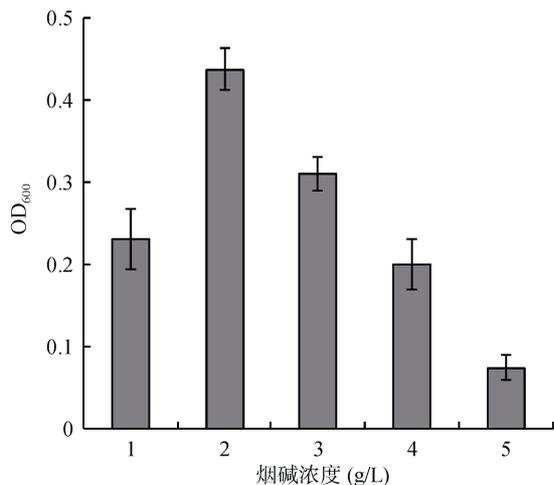


图 4 烟碱浓度对菌株 YC-2 生长的影响
Fig. 4 The effects of neonicotinoids concentration on growth of strain YC-2

表 4 菌株 YC-2 对烟草秸秆的降解效果
Table 4 The effect of strain YC-2 on tobacco straw degradation

| 处理 | m_1 (g) | m_2 (g) | 降解率(%) |
|------|-------------------|-------------------|--------|
| CK | 0.500 2 ± 0.002 3 | 0.488 7 ± 0.001 5 | 10.14 |
| YC-2 | 0.500 0 ± 0.001 6 | 0.449 3 ± 0.006 5 | 2.26 |

酶的活性呈上升趋势,当 pH 为 7.0 时,酶活力最大。当反应体系为碱性时,酶活力显著降低。酶活力稳定性试验显示在 4.0 ~ 7.5 的环境下酶活力稳定性较高,依然可达 60% 以上。

2.5.3 金属离子的影响 将最终浓度为 1 mmol/L 的 Zn^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 6 种金属离子添加到酶反应体系,测定的纤维素酶活性如图 6 所示。相比于对照组, Zn^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 对该酶活性有明显抑制作用, Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 有明显激活作用,而 Mn^{2+} 对酶作用不明显。

3 讨论

DNS 法测得枯草芽孢杆菌 YC-2 的 CMC 粗酶酶活力为 38.65 U/ml, FPA 酶活力为 14.38 U/ml。相对于刘东阳等^[14]筛选的蜡状芽孢杆菌 X6 菌株 FPA 酶活力 3.65 U/ml,陈晶晶等^[15]获得的 XWS-12 菌株 CMC 最大酶活力 25 U/ml, Kaur 等^[16]筛选获得的 CDB18 菌株的最大内切葡聚糖酶 24 U/ml 来说,本文两种酶活力均较大。但 7 天内降解率为 10.14%,与付丽丽^[17]分离的 3 株作物秸秆降解菌(对稻秆、麦秆、玉米秸秆在 7 天内均可降解 40.0% 以上)相比降解率不高,其原因之一可能是烟草秸秆纤维素含量更高、结构更为复杂引起的。烟草秸秆的田间分解,在其他土著微生物的协同作用下,可能会提高纤维素的降解效率。有研究表明加入木霉、青霉混合菌降解玉米秸秆,发酵 30 天后玉米秸秆可降解 68.0%,而单独加入这两种菌,降解率只有 40.0% 左右,说明混合菌株一般可以加快秸秆的降解速度^[18]。烟草秸秆所含的烟碱

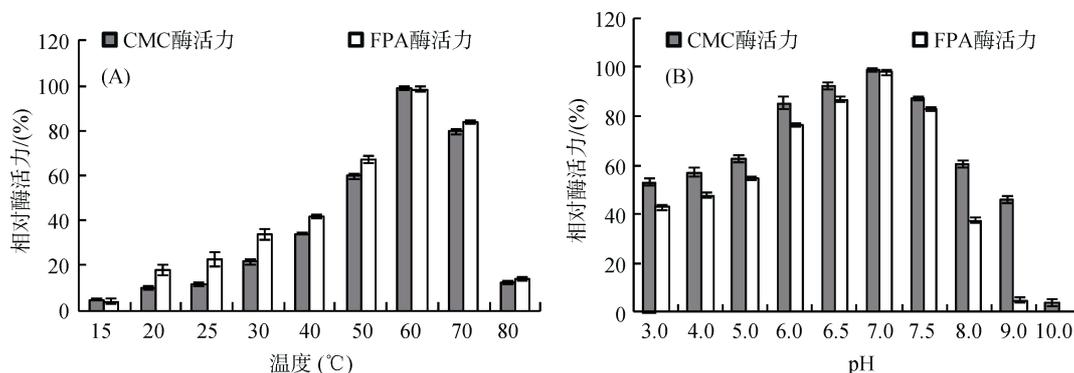


图 5 温度及 pH 对纤维素酶活力稳定性的影响

Fig. 5 Effects of temperature and pH on stability of cellulase activity

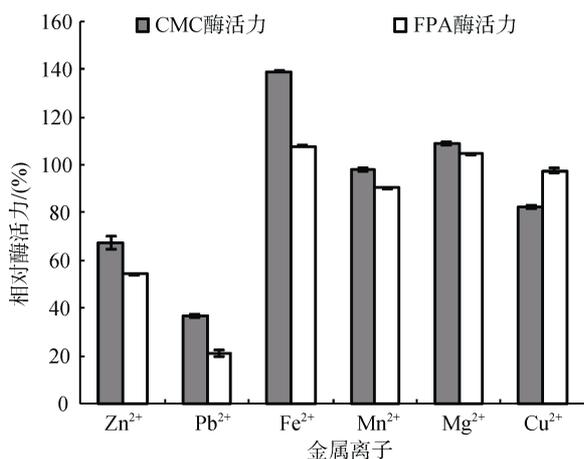


图 6 金属离子对纤维素酶活力的影响

Fig. 6 The effects of metal ions on cellulase activity

对许多种类的微生物生长有抑制作用^[19], YC-2 对烟碱的耐受性试验结果表明该菌可在烟碱含量 1~3 g/L 的环境下快速生长。李凤菊等^[20]检测的烟茎中尼古丁虽因地而异,但含量多在 0.1%~0.4%,本实验分离的烟草秸秆降解菌 YC-2 有更高的烟碱耐受性。

酶学性质初步研究显示, YC-2 所产的纤维素酶反应最适 pH 为 7.0, 在 4.0~7.5 范围内均可保持较高酶活; 最佳反应温度为 60℃, 温度在 15~60℃ 之间酶活稳定性较高。与一般纤维素酶相对酶活力及最适反应 pH(4.0~5.5)^[21] 相比, 本研究筛选的菌株产酶兼具活力较高、相对耐热耐碱的特点, 因此 YC-2 是一株具有较好应用推广潜力的纤维素酶生产菌株。谢凤行等^[22]用物理、化学等多种方法对一株产纤维素酶的枯草芽孢杆菌原生质体诱变处理后发现所有诱变菌株皆可明显提高菌株产纤维素酶能力, 谢天文等^[23]优化产酶条件后也得出类似结论, 这为后续研究提供了借鉴及参考价值。

此外, 金属离子的添加可作为纤维素酶的抑制剂或激活剂, 在纤维素催化过程中影响其活力从而改变

其降解效率。Zn²⁺、Pb²⁺、Cu²⁺对纤维素酶有明显抑制作用, 究其原因可能是 Pb²⁺、Cu²⁺等重金属离子对微生物具有毒害作用, 并可使蛋白质变性, 且毒害作用在重金属离子过量时尤为明显, 与 John 等^[24]的研究结果相同。低浓度的二价离子如 Zn²⁺对纤维素酶有抑制或轻微激活作用^[25-26], Ca²⁺、Mg²⁺对纤维素内切酶皆有一定程度的激活作用^[26], 这与本实验结果一致, 但部分离子(如 Ba²⁺等)会因纤维素酶种类的不同而改变其激活或抑制的角色^[26]。

4 结论

本研究以皖南烟稻轮作区为典型研究区域, 通过采集该地区土壤样品, 结合平板分离及纤维素酶活性测定筛选出分解烟草秸秆的微生物菌株 YC-2, 经形态学、生理生化鉴定, PCR 扩增 16S rDNA 测序比对, 判断该菌为一株枯草芽孢杆菌。对该菌株进行后续实验得出, 1~3 g/L 烟碱浓度下菌株可正常生长, 烟秆降解率 10.14%, 为自然状态下 4.5 倍左右。对降解菌粗酶液进行系列酶学性质研究后发现其温度在 15~60℃, pH 4.0~7.5 内皆有较高稳定性, 而金属离子 Zn²⁺、Pb²⁺、Cu²⁺明显抑制其活性, Fe²⁺、Mg²⁺则对该酶有明显激活作用。本实验筛选出的产纤维素酶活力较高、相对耐热耐碱且对烟秆有一定腐解作用的菌株 YC-2, 通过进一步诱变选育和发酵条件优化, 有较好的田间应用潜力。

参考文献:

- [1] Saha B C. Hemicellulose bioconversion[J]. Journal of Industrial Microbiology Biotechnology, 2003, 30(5): 279-291
- [2] Sun Y, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review[J]. Bioresource Technology, 2002, 83(1): 1-11

- [3] Sambrook J, Russell D W. 黄培堂译. 分子克隆实验指南(第三版)[M]. 北京: 科学技术出版社, 2002: 1 450-1 456
- [4] 陈坤, 李传海, 朱安宁, 等. 长期保护性耕作对纤维素降解基因 *cbh* 多样性的影响[J]. 土壤学报, 2015, 52(2): 406-414
- [5] 肖体琼, 何春霞, 凌秀军, 等. 中国农作物秸秆资源综合利用现状及对策研究[J]. 世界农业, 2010(12): 31-36
- [6] Hart T D, De Leij F, Kinsey G, et al. Strategies for the isolation of cellulolytic fungi for composting of wheat straw[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2002, 18(5): 471-480
- [7] Kausar H, Sariah M, Saud H M, et al. Development of compatible lignocellulolytic fungal consortium for rapid composting of rice straw[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2010, 64(7): 594-600
- [8] 金海洋, 姚政, 徐四新, 等. 纤维素分解菌剂对水稻秸秆田间降解效果的研究[J]. 上海农业学报, 2004, 20(4): 83-85
- [9] Rathbone D A, Bruce N C. Microbial transformation of alkaloids[J]. Current opinion in microbiology, 2002, 5(3): 274-281
- [10] 熊冬梅, 周红丽. 纤维素降解菌群的研究进展[J]. 酿酒科技, 2005(5): 94-97
- [11] 何荣玉, 闫志英, 刘晓风, 等. 秸秆干发酵沼气增产研究[J]. 应用与环境生物学报, 2007, 13(4): 583-585
- [12] Mandels M, Andreotti R, Roche C. Measurement of saccharifying cellulase[C]//Biotechnol. Bioeng. Symp.; (United States). Natick: Army Natick Development Center, MA, 1976, 6.
- [13] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 262-276
- [14] 刘东阳, 王蒙蒙, 马磊, 等. 高效纤维素分解菌的分离筛选及其分解纤维素研究[J]. 南京农业大学学报, 2014, 37(6): 49-58
- [15] 陈晶晶, 陶少强, 夏强, 等. 一株高活性纤维素降解细菌的筛选鉴定及酶学特性[J]. 土壤, 2014, 46(2): 302-307
- [16] Kaur M, Arora S. Isolation and screening of cellulose degrading bacteria in kitchen waste and detecting their degrading potential[J]. Mechanical and Civil Engineering, 2012, 2(1): 33-35
- [17] 付丽丽. 作物秸秆纤维素的分离和筛选[D]. 浙江: 浙江大学, 2012: 1-56
- [18] 顾挺, 申卫收, 钟文辉, 等. 稻秆纤维素降解菌的分离筛选和降解性能研究[J]. 南京师范大学学报, 2011, 11(1): 73-78
- [19] Chen C, Li X, Yang J, et al. Isolation of nicotine-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. Nic22, and its potential application in tobacco processing[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2008, 62(3): 226-231
- [20] 李凤菊, 毛泽宇, 冶保献, 等. 烟草中不同部位尼古丁的测定与比较[J]. 分析科学学报, 2007, 23(5): 548-549
- [21] 余兴莲, 王丽, 徐伟民. 纤维素酶降解纤维素机理的研究进展[J]. 宁波大学学报(理工版), 2007, 20(1): 78-82
- [22] 谢凤行, 张峰峰, 周可, 等. 原生质体诱变选育高纤维素酶活性枯草芽孢杆菌的研究[J]. 华北农学报, 2010, 25(5): 211-214
- [23] 谢天文, 袁月祥, 闫志英, 等. 一株嗜酸性产纤维素酶真菌的特性及产酶条件优化[J]. 应用与环境生物学报, 2010, 16(6): 863-869
- [24] John D, Ferchak E, Kendall P. Effect of cellobiose, glucose, ethanol, and metal ions on the cellulase enzyme complex of *Thermomonospora fusca*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1983, 25(12): 2 865-2 872
- [25] 李德莹, 龚大春, 田毅红, 等. 金属离子对纤维素酶活力影响的研究[J]. 酿酒科技, 2009, 6(180): 40-46
- [26] 张洪鑫, 陈小泉, 蒋玲玲, 等. 金属离子对纤维素酶内切酶和外切酶活性的影响[J]. 纤维素科学与技术, 2011, 19(4): 6-13

Isolation, Identification and Enzymatic Property of a Tobacco Straw Degradation Strain

ZOU Fang¹, ZHAO Juan¹, LEI Yanping¹, ZU Chaolong², CAO Hui^{1*}

(1 College of Life Sciences/Key Laboratory of Microbiology Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2 Tobacco Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, China)

Abstract: To obtain microorganism strains for degrading tobacco straws, a strain named YC-2 was screened from a tobacco-rice rotation field in south of Anhui Province using CMC-Na medium and measuring cellulose activity. The strain was identified as *Bacillus subtilis* based on its physiological and biochemical characteristics and 16s rDNA analysis. The enzymatic properties of the strain and degradation rate of tobacco straws by the strain were investigated. The effects of neonicotinoids concentration on the growth of YC-2 were also examined. The results indicated that the strain degraded 10.14% of the tobacco straw within 7 days. The optimal temperature and pH were 60°C and 7.0 for the enzymatic reactions of the strain, respectively. The CMCase and FPase were stable in the range of temperature from 15 to 60°C and at pH from 4.0 to 7.5. The low neonicotinoids concentration of 1–2 g/L promoted YC-2 growth, while high concentration of neonicotinoids would inhibit the growth of the strain. Therefore, this strain has high activity for cellulase production and good tolerance to heat and alkali, and can decompose tobacco straw. Potential application in fields can be realized by further mutation breeding and fermentation condition optimization of the strain.

Key words: *Bacillus subtilis*; Cellulose; Enzymatic properties