

文章编号: 1674-5566(2018)04-0624-09

DOI:10.12024/jsou.20180302229

## 团头鲂和草鱼肠道纤维素酶产生菌的筛选和鉴定

王魁云<sup>1</sup>, 蒋霞云<sup>1</sup>, 江小妹<sup>1</sup>, 邹曙明<sup>2</sup>

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 农业部种质资源与利用重点开放实验室, 上海 201306)

**摘要:** 采用以羧甲基纤维素(CMC)为唯一碳源的选择性培养基,通过直接筛选和富集分离纯化再筛选的初筛方法,透明圈法和摇瓶发酵的复筛方法,从团头鲂和草鱼肠道中,筛选到2株具有较高纤维素酶活性的纤维素酶产生菌 MA35 和 MC。16S rDNA/ITS 分子鉴定和形态学观察分析表明:来源于团头鲂的真菌 MA35 鉴定为雪白曲霉(*Aspergillus niveus*),来源于团头鲂的细菌 MA1 和来源于草鱼的细菌 CI10 为同一种细菌 MC,鉴定为维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)。发酵趋势的研究表明:在发酵过程中,与 MC 相比,MA35 具有更高的胞外和胞内纤维素酶活力。本研究不仅从草鱼肠道内筛选到了纤维素酶产生菌,而且从我国特有的水生生物团头鲂肠道内分离到了一株新的纤维素酶产生菌,为草食性鱼的合理性养殖和鱼类饲料的膳食性配比提供了科学的研究基础。

**关键词:** 草食性鱼; 纤维素酶产生菌; 筛选; 鉴定

**中图分类号:** Q 939; S 917.1 **文献标志码:** A

纤维素酶(cellulase)是一类专门催化纤维素链中 $\beta$ -1,4-糖苷键水解,使纤维素转化成葡萄糖、纤维二糖、纤维低聚糖的酶,可被广泛应用于食品、饲料、纺织、环保、医药、生物质能源等领域<sup>[1-3]</sup>。自然界中许多细菌、真菌、昆虫、动物都能产生纤维素酶<sup>[4]</sup>,尤其是草食性的动物与昆虫,它们的消化道里面存在协助消化的纤维素酶产生菌<sup>[5]</sup>。研究表明:多数纤维素酶的来源是微生物,尤其是细菌和真菌<sup>[6]</sup>。

团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)和草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)为典型的草食性鱼类,两者均能以水草为生,在我国淡水养殖中占据重要的地位,并对维持淡水养殖系统的生态平衡具有显著的作用<sup>[7-8]</sup>。目前,水产养殖中面临的最大问题是饲料的利用率不高,废物的排放高等问题<sup>[9]</sup>,然而纤维素酶可以改变饲料的品质,补充动物的消化酶,促进营养物质的吸收,消除抗营养因子,某些纤维素酶产生菌的单细胞蛋白可以作为饲料来源,改善动物的饲料品质<sup>[10]</sup>。已有的全基因组测序结果表明草鱼和团头鲂的基因组

内并无编码纤维素酶的基因存在<sup>[11-12]</sup>,这也佐证了草食性鱼类分解利用纤维素所需的纤维素酶是由其自身消化道内微生物分泌产生<sup>[13]</sup>,然而草食性鱼类肠道纤维素酶产生菌的组成及活力等关键问题仍尚待揭晓。本研究以黑麦草投喂辅以饲料养殖的团头鲂和草鱼为研究对象,分离和筛选到了几株主要的纤维素酶产生菌,对其进行菌种鉴定及发酵趋势的初步研究,旨在为草食性鱼肠道纤维素酶的应用提供科学依据,为草食性鱼类膳食性饲料的配比提供基础性研究。

### 1 材料与方法

#### 1.1 样品采集

实验鱼为二龄草鱼(~1 kg)和团头鲂(~0.8 kg)各3尾,取自农业部团头鲂遗传育种中心。养殖池塘面积约1 hm<sup>2</sup>,实验鱼投喂复合饲料和种植黑麦草,比例约为1:2。

#### 1.2 培养基<sup>[5,14]</sup>

LB培养基(g/L):胰蛋白胨10;酵母提取物5;NaCl 10(pH自然)。

收稿日期: 2018-03-02 修回日期: 2018-05-10

基金项目: 国家自然科学基金(31201760,31572220)

作者简介: 王魁云(1988—),男,硕士研究生,研究方向为生物学。E-mail:wkuiy07@163.com

通信作者: 蒋霞云, E-mail:jiangxy@shou.edu.cn

PDA 培养基(g/L):葡萄糖 20;马铃薯粉 6;琼脂 20(pH 5.6 ± 0.2)。

羧甲基纤维素培养基(g/L):CMC(羧甲基纤维素) 10;KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4;Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4;MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2;CaCl<sub>2</sub> 0.001;FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.001;蛋白胨 2;琼脂粉 15。

滤纸培养液(g/L):NaNO<sub>3</sub> 2.5;KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2;MgSO<sub>4</sub> 0.2;CaCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.1;NaCl 0.2;1 × 6 cm 滤纸条。

种子培养液(g/L):葡萄糖 2;KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4;Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4;MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2;CaCl<sub>2</sub> 0.001;FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.004;蛋白胨 2(pH 7)。

发酵培养液(g/L):CMC 10;KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4;Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4;MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2;CaCl<sub>2</sub> 0.001;FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.004;蛋白胨 2。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 样品的制备

解剖团头鲂和草鱼,取肠道的前后两端结扎,剪下结扎好的整个肠道,放进灭菌烧杯内。在净化工作台下解剖肠道,收集肠道内容物,并刮取肠道黏膜,黏膜和内容物混匀后作为样品,置于 4 °C 冰箱备用<sup>[4-5]</sup>。

#### 1.3.2 纤维素酶产生菌的初筛

称取 1 g 样品,用 0.9% 的生理盐水稀释到合适的浓度备用。

##### 1) 直接初筛方案

移取 20 μL 稀释液直接涂布于羧甲基纤维素选择培养基上,28 °C 培养数天;另外,移取 100 μL 稀释液于 10 mL 滤纸培养液中,到滤纸溃烂时,稀释涂布于羧甲基纤维素培养基上筛选,28 °C 培养数天。

##### 2) 富集分离纯化再筛选方案

移取 20 μL 稀释液分别涂布于 LB 或 PDA 平板上,28 °C 培养 48 h 后,挑选大而饱满的菌落,接种到羧甲基纤维素培养基上筛选,28 °C 培养数天。

#### 1.3.3 纤维素酶产生菌的复筛

##### 1) 透明圈法

在初筛平板上挑选生长良好的菌落平板划线分离得单菌落。纯化的菌株,点种在直径为 6 cm 的羧甲基纤维素培养基平板上,先后采用革兰氏碘液染色法和刚果红染色法染色<sup>[15-16]</sup>,观察透明圈直径和菌落大小情况。

##### 2) 摇瓶发酵法

选取透明圈大且菌落饱满的菌株,接入 100 mL 种子培养液中,28 °C、150 r/min 培养 36 h。将种子液以 3% 接种量接入 100 mL 发酵培养液中,28 °C、150 r/min 培养 48 h 得到发酵液,测定纤维素酶活。

#### 1.3.4 纤维素酶的酶活测定

##### 1) 粗酶液的制备

发酵液经过 12 000 r/min、4 °C 离心 15 min,取上清液作为胞外酶粗酶液;发酵液抽滤后所得菌体中加入 15 mL、0.05 mol/L pH 4.8 柠檬酸缓冲液,超声波细胞破碎(600 W)30 min 后,12 000 r/min、4 °C 离心 15 min,离心所得溶液即为胞内酶粗酶液。

##### 2) 纤维素酶活

1 mL 酶反应体系为:含 1% 羧甲基纤维素的 0.05 mol/L pH 4.8 柠檬酸缓冲液 0.5 mL,粗酶液 0.5 mL。混合液在 50 °C 水浴反应 30 min 后,立即加入 DNS 溶液并煮沸 5 min 以停止反应,冷却后测定 OD<sub>540</sub><sup>[17]</sup>。上述反应以煮沸的粗酶液作为对照,每组 3 个平行重复实验。一个酶活力单位(U)定义为每分钟释放 1 μg 葡萄糖所需要的酶量<sup>[14,17]</sup>。

#### 1.3.5 菌株鉴定

##### 1) 16S rDNA/ITS 序列分析

用细菌基因组提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]和真菌基因组提取试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]提取出菌体总 DNA。细菌 16S rDNA 序列引物为 27F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', 1492R: 5'-TACGGYTACCTTGTACACTT-3'<sup>[18]</sup>。真菌 ITS 序列引物为 ITSF: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', ITSR: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'<sup>[19]</sup>。PCR 反应体系为 25 μL:模板 DNA 1 μL,上下游引物各 1 μL, MIX 10 μL, ddH<sub>2</sub>O 12 μL。PCR 反应过程:95 °C 预变性 3 min,95 °C 变性 1 min,52 °C 复性 1 min,72 °C 延伸 2 min,30 个循环,72 °C 延伸 10 min<sup>[20]</sup>。PCR 扩增产物送往生工生物工程(上海)股份有限公司测序。测序结果与 GenBank 数据库中的序列进行 BLAST 检索比对,选取相似性高的微生物序列,利用 Cluster W 软件进行多重序列比对,在 MEGA 7.0 软件中,根据 Kimura 2-parameter model 遗传距离模型,使用

邻接法 (neighbour-joining, NJ) 构建系统发育树<sup>[21]</sup>。

## 2) 菌落形态学特征

为了充分地观察菌落的形态学特征,将菌株点种在 LB/PDA 培养基上,培养数天,不断地观察菌株的培养特征,细菌进行革兰氏染色,普通光学显微镜观察,真菌取生长良好的菌苔制片,进行扫描电子显微镜(日本日立,S-3400N)15 kV 高真空模式观察。参照《伯杰氏系统细菌学手册》<sup>[22]</sup>、《中国真菌志》<sup>[23]</sup>分析菌株。

## 2 结果

### 2.1 纤维素酶产生菌的初筛

利用以羧甲基纤维素为碳源的选择性培养基,一共从团头鲂和草鱼肠道初筛到 108 株单菌落菌株,其中直接以羧甲基纤维素培养基进行筛选的方案得到 20 株,滤纸溃烂后再筛选得到 21 株,PDA 富集分离后再筛选得到 23 株,LB 富集分离后再筛选得到 44 株。分离纯化的典型单菌落形态如图 1-a,b 所示。

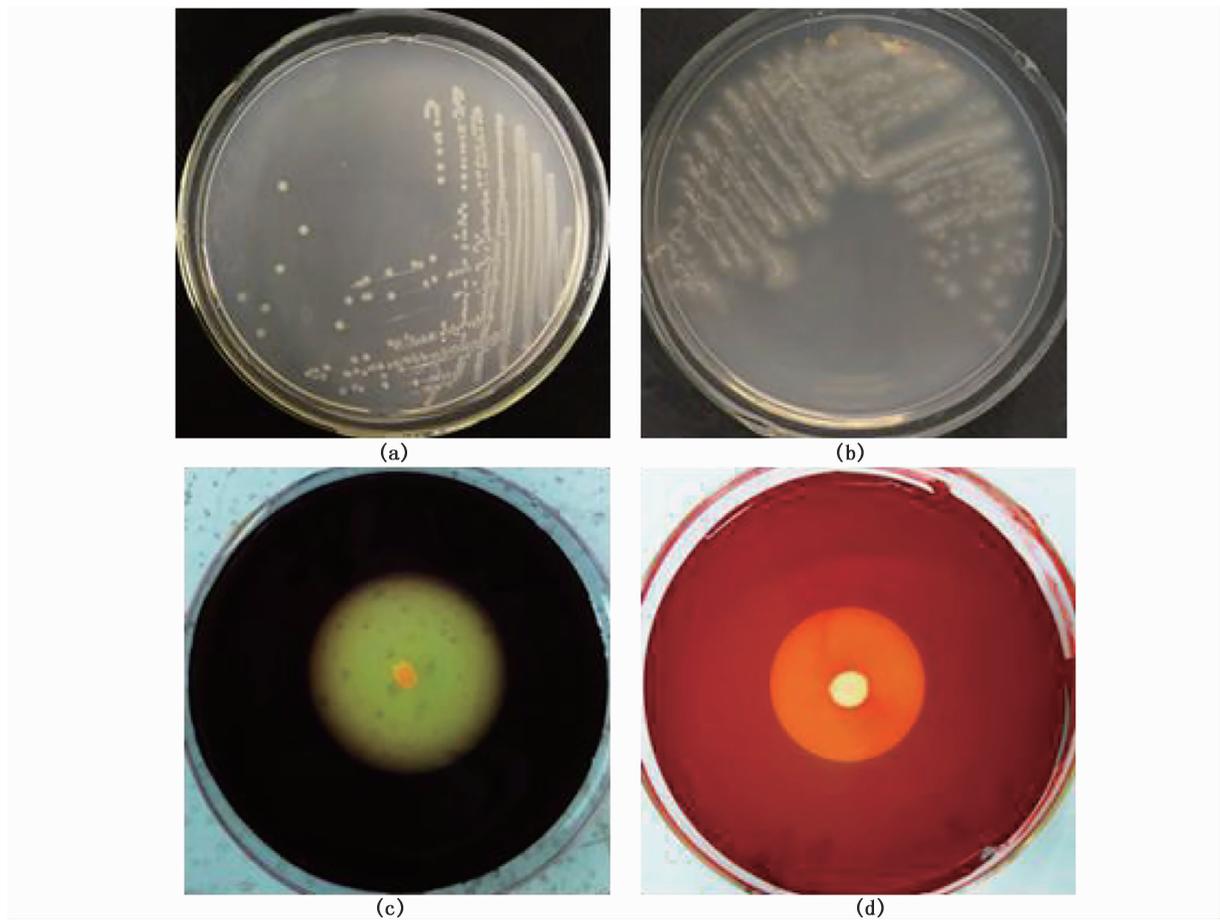


图 1 纤维素酶产生菌株的筛选

Fig. 1 Screening of cellulose-producing strains

- (a) 分离的单菌落; (b) 分离的单菌落; (c) 革兰氏碘液染色; (d) 刚果红染色  
(a) Streaked single colony; (b) Streaked single colony; (c) Gram's iodine staining; (d) Congo red staining

### 2.2 纤维素酶产生菌的复筛

#### 2.2.1 透明圈法复筛

对初步分离得到的 108 株单菌落菌株进行革兰氏碘液染色,35 株呈现较大的透明圈 ( $>0.8$  cm,如图 1-c 所示),其水解圈直径  $D$  及菌落直径

$d$  如表 1 所示。另外,对这 35 株菌株的单菌落进行刚果红染色,发现 22 株菌株分别出现了明显的透明圈(如图 1-d 所示),其水解圈直径  $D$ 、菌落直径  $d$  以及水解圈与菌落直径的比值  $D/d$ ,如表 1 所示。

表 1 菌株的透明圈与纤维素酶活性  
Tab.1 Transparent circle of strains and their cellulase activity

| 来源<br>Source                           | 编号<br>Number | 革兰氏碘液染色<br>Gram's iodine staining | 刚果红染色<br>Congo red staining | 摇瓶发酵酶活<br>Shake flask fermentation cellulase activity (U/mL) |
|--|--------------|-----------------------------------|-----------------------------|--|
|  |              | D(cm)/d(cm)                       | D(cm)/d(cm)                 |  |
| 草鱼<br><i>Ctenopharyngodon idellus</i>  | 3            | 1.20/0.38 = 3.16                  | 1.75/0.50 = 3.50            | ND   |
|  | 4            | 1.90/0.40 = 4.75                  | 1.88/0.68 = 2.76            | ND   |
|  | 5            | 1.75/0.43 = 4.07                  | 0.83/0.63 = 1.32            | ND   |
|  | 10           | 1.80/0.40 = 4.50                  | 2.85 /0.68 = 4.19           | 1.14 ± 0.16  |
|  | 17           | 1.30 /0.40 = 3.25                 | -                           | ND   |
|  | 18           | 1.50/0.45 = 3.33                  | 1.63/0.53 = 3.08            | ND   |
|  | 19           | 1.80/0.40 = 4.50                  | 1.10/0.50 = 2.20            | ND   |
|  | 21           | 0.88/0.33 = 2.67                  | 0.80/0.50 = 1.60            | ND   |
|  | 22           | 2.45/0.50 = 4.90                  | -                           | ND   |
|  | 23           | 2.47/0.42 = 5.90                  | -                           | ND   |
|  | 25           | 2.50/0.35 = 7.14                  | -                           | ND   |
|  | 26           | 2.75/0.38 = 7.24                  | 1.80/0.53 = 3.40            | 0.67 ± 0.34  |
|  | 27           | 2.50/0.33 = 7.58                  | 1.45/0.50 = 2.90            | 0.53 ± 0.25  |
|  | 28           | 2.47/0.42 = 5.90                  | -                           | ND   |
|  | 29           | 2.48/0.40 = 6.20                  | -                           | ND   |
|  | 30           | 1.85/0.28 = 6.61                  | 1.30/0.48 = 2.71            | ND   |
|  | 31           | 1.90/0.35 = 5.43                  | 0.63/0.50 = 1.26            | ND   |
|  | 32           | 2.00/0.38 = 5.26                  | 0.90/0.55 = 1.64            | ND   |
|  | 33           | 1.80/0.35 = 5.14                  | 1.30/0.65 = 2.00            | ND   |
|  | 34           | 0.80/0.40 = 2.00                  | -                           | ND   |
| 团头鲂<br><i>Megalobrama amblycephala</i> | 1            | 1.68/0.42 = 4.00                  | 2.75/0.55 = 5.00            | 1.39 ± 0.19  |
|  | 2            | 1.00/0.43 = 2.33                  | -                           | ND   |
|  | 6            | 2.45/0.45 = 5.44                  | -                           | ND   |
|  | 7            | 2.00/0.38 = 5.26                  | -                           | ND   |
|  | 8            | 0.80/0.40 = 2.00                  | 1.10/0.80 = 1.38            | ND   |
|  | 9            | 1.60/0.38 = 4.21                  | 1.73/0.48 = 3.60            | ND   |
|  | 11           | 2.42/0.45 = 5.38                  | -                           | ND   |
|  | 12           | 0.80/0.35 = 2.28                  | -                           | ND   |
|  | 13           | 1.70/0.45 = 3.78                  | 1.45/0.45 = 3.22            | ND   |
|  | 14           | 1.60/0.40 = 4.00                  | 1.90/0.48 = 3.96            | ND   |
|  | 15           | 2.48/0.45 = 5.51                  | 1.80/0.45 = 4.00            | ND   |
|  | 16           | 2.00/0.38 = 5.26                  | 1.00/0.50 = 2.00            | ND   |
|  | 20           | 1.10/0.32 = 3.44                  | 1.48/0.43 = 3.44            | ND   |
|  | 24           | 2.48/0.45 = 5.51                  | -                           | ND   |
|  | 35           | 2.50/0.33 = 7.61                  | 4.10/3.60 = 1.14            | 4.43 ± 0.71  |

注:-表示透明圈不显著(D/d 约为 1);ND 表示未检测

Notes: - indicates that the transparent circle is not significant (D/d is about 1); ND indicates that it is not detected

### 2.2.2 摇瓶发酵复筛

选取革兰氏碘液法和刚果红染色法中透明圈均较显著的 5 株菌株(MA1、CI10、CI26、CI27、MA35),进行摇瓶发酵复筛,结果显示各菌株都具有一定的纤维素分解能力,其中 MA1、CI10、MA35 的发酵液具有较显著的纤维素酶活力,分别为 1.39 U/mL、1.14 U/mL、4.43 U/mL,MA35 的纤维素酶活最大(表 1)。因此,为了进一步地研究,选取菌株 MA1、CI10、MA35 作为待鉴定菌株。

### 2.3 纤维素酶产生菌的鉴定

#### 2.3.1 菌株 MA35 的鉴定

以 MA35 基因组 DNA 为模板,扩增菌株 ITS 序列,序列测定后进行 BLAST 搜索比对,结果显示 MA35 与 *Aspergillus niveus* SRR333 相似度达到 99%,选取相似度高的菌株序列,利用 Clustal X 对菌株序列进行多重序列比对分析,通过 MEGA 7.0 中的邻接法构建出 MA35 的系统发育树(图 2),系统发育分析表明 MA35 属于 *Aspergillus niveus*。

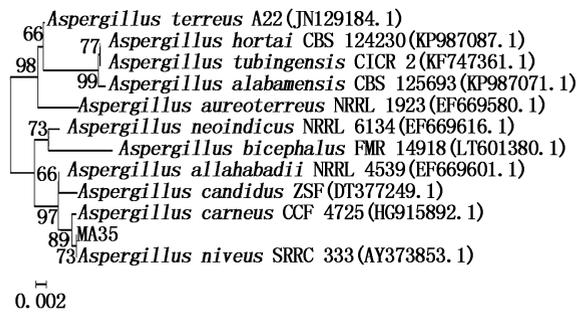


图2 基于 ITS 基因序列对 MA35 构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of MA35 based on ITS sequence analysis

对菌株 MA35 的培养特征持续性观察, 菌株表面呈白色, 具有辐射状沟纹和同心环纹, 不透明, 圆形, 边缘整齐, 无渗液, 凸起, 无光泽, 不

滑, 不湿润, 质地致密絮状, 菌落反面淡黄色; 随着菌落的老去, 菌落会逐渐变黄(图 3-a, c)。扫描电子显微镜观察显示, 菌株有透明的有隔菌丝, 胞壁平行、光滑, 分生孢子头大小不一; 孢梗茎壁光滑; 顶囊呈半球形(图 3-b, d)。MA35 的形态学特征与《中国真菌志》中雪白曲霉的描述一致。分子生物学鉴定和形态学特征观察的结果表明, MA35 属于真菌界、半知菌亚门、半知菌纲、壳霉目、杯霉科、曲霉属、雪白曲霉种。

### 2.3.2 菌株 MA1 和 CI10 的鉴定

分别提取 MA1、CI10 菌株的基因组 DNA, 利用 PCR 扩增出相应的 16S rDNA 序列, 进行测定分析, 序列测定结果显示两者序列一致, 再与 GenBank 数据库的序列进行 BLAST 搜索比对, 结

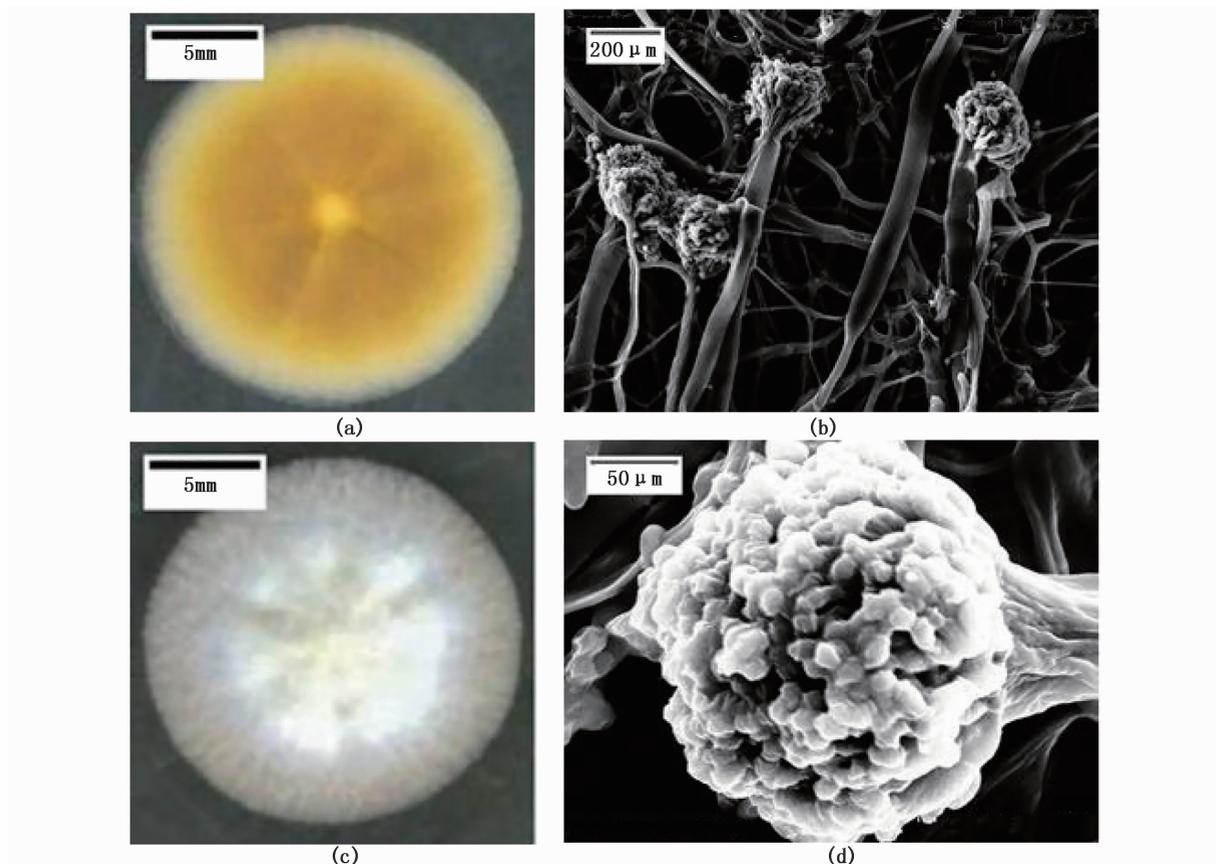


图3 菌株 MA35 的形态学特性

Fig. 3 Morphological properties of strain MA35

(a) 菌落表面; (b) 菌丝; (c) 菌落反面; (d) 顶囊孢子

(a) Colony surface ; (b) Mycelium; (c) Colony reverse; (d) Sporangiospore

果显示 MA1、CI10 与 *Aeromonas veronii* VM25 相似度达到 99%，MA1、CI10 的系统发育树如图 4 所示，系统发育分析表明 MA1、CI10 属于 *Aeromonas veronii*。根据系统发育分析结果，将 MA1、CI10 统一命名为 MC。

菌株 MC 表面白色,不透明,圆形,边缘整齐,中央微凸起,无光泽,光滑,湿润,奶油状(图 5-a)。MC 为革兰氏阴性短杆菌(图 5-b)。参照《伯杰名细菌鉴定手册》，鉴定结果表明,MC 属于细菌界、变形菌门、 $\gamma$ -变形菌纲、弧菌目、弧菌科、气单胞菌属、维氏气单胞菌种。

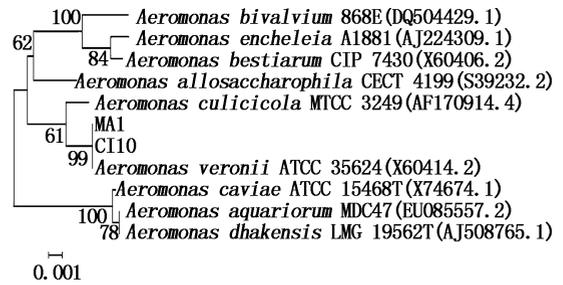


图 4 基于 16S rDNA 基因序列对 MA1、CI10 构建的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of MA1 and CI10 based on 16S rDNA sequence analysis

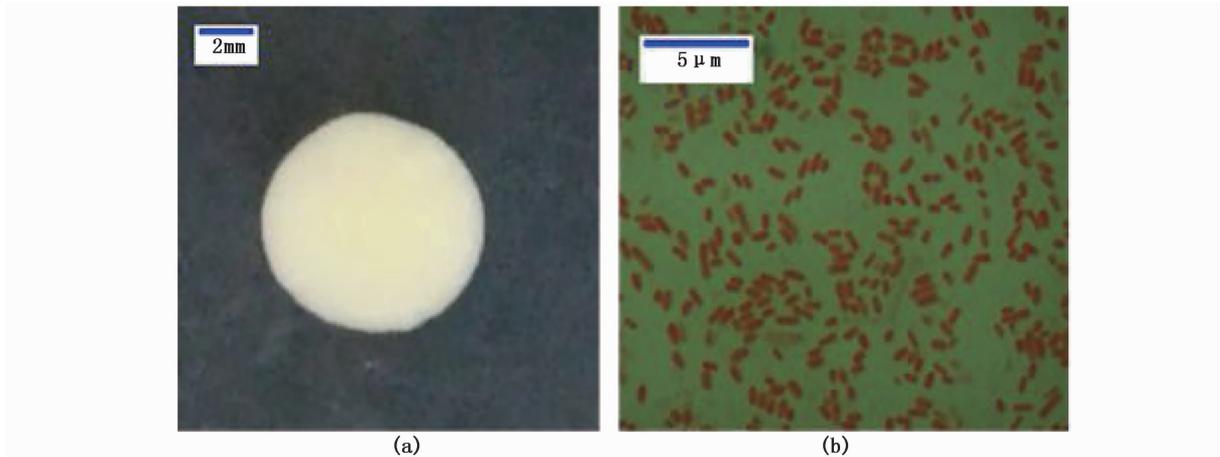


图 5 菌株 MC 的形态学特性

Fig. 5 Morphological properties of strain MC

- (a) 菌落表面; (b) 革兰氏染色
- (a) Colony surface; (b) Gram's staining

### 2.4 纤维素酶产生菌 MC 和 MA35 的发酵趋势比较

以羧甲基纤维素为唯一碳源,摇瓶培养细菌 MC 和真菌 MA35(100 mL),在发酵 24、48、72 h 时分别测定菌株的发酵液(胞外)和菌体(胞内)纤维素酶活力,结果如图 6 所示。

由图 6 可知,细菌 MC 和真菌 MA35 均能产生胞内和胞外纤维素酶,在不同的发酵时期(24 h、48 h、72 h),胞内纤维素酶的活性均高于胞外纤维素酶的活性,而且在发酵过程中,MA35 比 MC 具有更高的胞外和胞内纤维素酶活。

### 3 讨论

本研究以羧甲基纤维素为唯一碳源的选择性培养基,通过定性初筛及定量复筛的方案,从团头鲂和草鱼肠道获得了 2 株具有较高纤维素酶

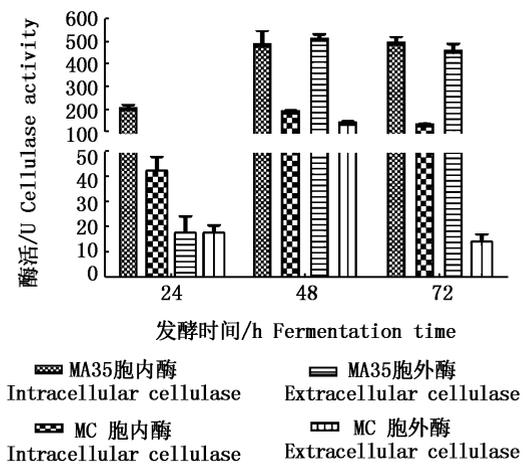


图 6 纤维素酶产生菌 MC 和 MA35 的发酵趋势

Fig. 6 Fermentation trend of cellulase-producing strains MC and MA35

活性的菌株。经过分子鉴定及形态学观察的分析表明,来源于团头鲂的 1 株真菌 MA35 为雪白曲霉;来源于团头鲂的 MA1 和来源于草鱼的 CI10 实为同一种细菌 MC,是维氏气单胞菌。进一步的摇瓶发酵趋势研究表明,雪白曲霉 MA35,较维氏气单胞菌 MC,在发酵过程具有更高的胞外和胞内纤维素酶活力。本实验采用了直接筛选和富集分离纯化再筛选的方案,为了避免菌群数量不够或者菌株调整期差异过大带来的影响。对于初筛的菌株进了革兰氏碘液染色和刚果红染色的透明圈法筛选,避免了两种筛选机制差异带来的少筛或者误筛的情况<sup>[24]</sup>。关于草鱼肠道纤维素酶产生菌的研究已有报道,如 2006 年 SAHA 从草鱼肠道筛选到了 *Bacillus circulans* 和 *Bacillus megaterium*<sup>[5]</sup>,2011 年 JIANG 等分离出了 *Aeromonas hydrophila* 和 *Aeromonas veroni*,并指出 *Aeromonas* 是草鱼肠道的主要菌群<sup>[25]</sup>,2014 年水生生物研究所的王微微从草鱼肠道分离出 *Aeromonas veronii*、*Aeromonas jandaei*、*Plesiomonas shigelloides*、*Enterobacter cloacae*、*Enterobacter aerogenes*、*Aeromonas hydrophila*<sup>[4]</sup>。本实验也从草鱼肠道分离出了 *Aeromonas veronii*,与 JIANG 等的研究结果一致。关于团头鲂肠道纤维素酶产生菌的研究,本研究是首创,并且分离出了 *Aspergillus niveus* 和 *Aeromonas veronii*。团头鲂和草鱼肠道都出现了维氏气单胞菌,进一步验证了,维氏气单胞菌是草食性鱼肠道的主要纤维素酶产生菌。对两种菌株进行了发酵趋势的研究,发现两种菌株在 48 h 左右时均达到最大纤维素酶活,说明两种菌株都具有水解纤维素的能力,只是雪白曲霉的纤维素酶活更高。伴随着水产动物病害发生及抗生素滥用的问题,研究水产动物肠道内存在何种菌,是益生菌还是有害菌,具有何种消化酶能力,是否能减少抗生素使用、提高水产养殖水平的科学研究,越来越受到关注。因为益生菌作为饲料添加剂,能够控制疾病、提高免疫力、提供营养、促进消化能力和控制水质,在水产养殖业中广泛使用<sup>[26]</sup>。本研究从草鱼和团头鲂肠道筛选出来的雪白曲霉和维氏气单胞菌,都是纤维素酶产生菌,然而,有研究表明雪白曲霉和维氏气单胞菌都是致病菌<sup>[27-28]</sup>,那么,对于依赖肠道纤维素酶产生菌消化纤维素的草食性鱼,这两种菌是益生菌还是有害菌,如何利用

纤维素酶或者纤维素酶产生菌合理地养殖草食性鱼的问题,就成了一个值得研究的课题。本研究从团头鲂和草鱼肠道筛选到的纤维素酶产生菌,为后续研究草食性鱼的合理性养殖与膳食性饲料配比,提供了研究素材和科学基础。

#### 参考文献:

- [1] SINGHANIA R R, SUKUMARAN R K, PATEL A K, et al. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2010, 46(7): 541-549.
- [2] LIN H L, LI W G, GUO C H, et al. Advances in the study of directed evolution for cellulases [J]. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 2011, 5(4): 519-525.
- [3] MAKI M, LEUNG K T, QIN W S. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2009, 5(5): 500-516.
- [4] 王微微, 吴山功, 邹红, 等. 草鱼肠道纤维素降解细菌的分离与鉴定[J]. *水生生物学报*, 2014, 38(2): 291-297. WANG W W, WU S G, ZOU H, et al. Characterization of cellulose-decomposing bacteria in the intestine of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(2): 291-297.
- [5] SAHA S, ROY R N, SEN S K, et al. Characterization of cellulase-producing bacteria from the digestive tract of tilapia, *Oreochromis mossambica* (Peters) and grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes) [J]. *Aquaculture Research*, 2006, 37(4): 380-388.
- [6] 张传富, 顾文杰, 彭科峰, 等. 微生物纤维素酶的研究现状[J]. *生物信息学*, 2007, 5(1): 34-36. ZHANG C F, GU W J, PENG K F, et al. Present situation of research on microbial cellulase [J]. *China Journal of Bioinformatics*, 2007, 5(1): 34-36.
- [7] 刘寒. 基于基因组学的团头鲂植食性机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016. LIU H. Based on the genomics of *Megalobrama amblycephala* reveals the adaption to herbivorous diet [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016.
- [8] 吴兴兵, 许璞, 张伟明, 等. 7 种重要经济鱼类的 ISSR 扩增结果分析[J]. *水生生物学报*, 2008, 32(3): 445-448. WU X B, XU P, ZHANG W M, et al. Analysis of inter simple sequence repeat (ISSR) amplification results of seven fishes[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, 32(3): 445-448.
- [9] 解缓启, 张文兵, 韩冬, 等. 水产养殖动物营养与饲料工程发展战略研究[J]. *中国工程科学*, 2016, 18(3): 29-36.

- XIE S Q, ZHANG W B, HAN D, et al. Study on the developmental strategies for the engineering of aqua nutrition and feed[J]. *Engineering Sciences*, 2016, 18(3): 29-36.
- [10] 刘大森,鞠涛,杨方,等. 纤维素酶在反刍动物饲料中的应用研究进展[J]. *东北农业大学学报*, 2011, 42(6): 7-11.
- LIU D S, JU T, YANG F, et al. Applied research progress of cellulase in ruminant animal feed[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2011, 42(6): 7-11.
- [11] LIU H, CHEN C H, GAO Z X, et al. The draft genome of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) reveals the development of intermuscular bone and adaptation to herbivorous diet[J]. *Gigascience*, 2017, 6(7): 1-13.
- [12] WANG Y P, LU Y, ZHANG Y, et al. The draft genome of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) provides insights into its evolution and vegetarian adaptation [J]. *Nature Genetics*, 2015, 47(6): 625-632.
- [13] LI H, WU S G, WIRTH S, et al. Diversity and activity of cellulolytic bacteria, isolated from the gut contents of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) (Valenciennes) fed on Sudan grass (*Sorghum sudanense*) or artificial feedstuffs [J]. *Aquaculture Research*, 2014, 47(1): 153-164.
- [14] GUPTA P, SAMANT K, SAHU A. Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential[J]. *International Journal of Microbiology*, 2012, 2012: 578925.
- [15] 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): 503-507.
- [16] TEATHER R M, WOOD P J. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, 43(4): 777-780.
- [17] GHOSE T K. Measurement of cellulase activities[J]. *Pure and Applied Chemistry*, 1987, 59(2): 257-268.
- [18] FRANK J A, REICH C I, SHARMA S, et al. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(8): 2461-2470.
- [19] WHITE T J, BRUNS T D, LEE S B, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]// *PCR-Protocols: A Guide to Methods and Applications*. New York: Academic Press, Inc., 1994, 38: 315-322.
- [20] CHENG L D, JIANG X Y, TIAN Y M, et al. The goldfish hAT-family transposon Tg2 is capable of autonomous excision in zebrafish embryos[J]. *Gene*, 2014, 536(1): 74-78.
- [21] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406-425.
- [22] 布坎南,吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8版. 北京: 科学出版社, 1984: 482-486.
- BUCHANAN R E, GIBBONS N E. *Bergey's manual of determinative bacteriology* [M]. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984: 482-486.
- [23] 齐祖同,孔华忠,孙曾美. 中国真菌志. 第五卷,曲霉属及其相关有性型[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 68-69.
- QI Z T, KONG H Z, SUN Z M. *Flora fungorum sinicorum, volume 05, Aspergillus to teleomorphi cognati* [M]. Beijing: Science Press, 1997: 68-69.
- [24] MEDDEB-MOUELIHI F, MOISAN J K, Beauregard M. A comparison of plate assay methods for detecting extracellular cellulase and xylanase activity [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2014, 66: 16-19.
- [25] JIANG Y, XIE C X, YANG G M. Cellulase-producing bacteria of *Aeromonas* are dominant and indigenous in the gut of *Ctenopharyngodon idellus* (Valenciennes) [J]. *Aquaculture Research*, 2011, 42(4): 499-505.
- [26] 窦春萌,左志哈,刘逸尘,等. 凡纳滨对虾肠道内产消化酶益生菌的分离与筛选[J]. *水产学报*, 2016, 40(4): 537-546.
- DOU C M, ZUO Z H, LIU Y C, et al. Isolation and screening of digestive enzyme producing probiotics from intestine of *Litopenaeus vannamei* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(4): 537-546.
- [27] 秦启贤,秦立模,章强强. 临床真菌学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2001: 365.
- QIN Q X, QIN L M, ZHANG Q Q. *Clinical mycology* [M]. Shanghai: Fudan University Press, 2001: 365.
- [28] 马志宏,杨慧,李铁梁,等. 西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*)致病性维氏气单胞菌的分离鉴定[J]. *微生物学报*, 2009, 49(10): 1289-1294.
- MA Z H, YANG H, LI T L, et al. Isolation and identification of pathogenic *Aeromonas veronii* isolated from infected Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(10): 1289-1294.

## Screening and identification of cellulase-producing strains from intestines of *Megalobrama amblycephala* and *Ctenopharyngodon idellus*

WANG Kuiyun<sup>1</sup>, JIANG Xiayun<sup>1</sup>, JIANG Xiaomei<sup>1</sup>, ZOU Shuming<sup>2</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Utilization Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Using the selective medium with carboxymethyl cellulose (CMC) as the sole carbon source, through direct screening and screening after enrichment, separation, purification as the preliminary screening methods, and the transparent circle method and shake flask fermentation as the second screening methods, two strains of cellulase-producing microorganisms with higher cellulase activity, MA35 and MC, were screened out from intestines of *Megalobrama amblycephala* and *Ctenopharyngodon idellus*. 16S rDNA/ITS molecular identification and morphological observation showed that: MA35 from *Megalobrama amblycephala* belonged to *Aspergillus niveus*, MA1 from *Megalobrama amblycephala* and CI10 from *Ctenopharyngodon idellus* were actually identical bacteria, MC, belonged to *Aeromonas veronii*. Fermentation trend studies indicated that MA35 had a higher extracellular and intracellular cellulase activity compared to MC. This study not only screened out cellulase-producing strains from the intestines of *Ctenopharyngodon idellus*, but also isolated a new cellulase-producing strain from Chinese unique aquatic organism *Megalobrama amblycephala*, providing a scientific research basis for the rational aquaculture of herbivorous fish and the dietary ratio of fish feed.

**Key words:** herbivorous fish; cellulase-producing strain; screening; identification