

“分解纤维素的微生物的分离”疑点探讨

赵 辉¹ 龙秋月² (1 广东省深圳大学附属中学 深圳 518054; 2 广东省深圳市宝安区新安中学 深圳 518101)

摘 要 本文针对“分解纤维素的微生物的分离”实验中常见的四点疑问进行探讨,为该实验教学的顺利开展提供参考。

关键词 纤维素分解菌 培养基 分离 实验教学

“分解纤维素的微生物的分离”是人教版高中生物学教材选修1《生物技术实践》中的一个课题,主要目的是使学生了解微生物分离的基本原理,掌握从土壤中筛选纤维素分解菌的技术,培养学生基于生物学知识进行工程学思维、参与动手实践的能力。在实际教学中,师生对教材中的部分内容存在种种疑问,本文梳理并分析了常见的四点疑惑,以期广大一线教师更好地开展本课题的教学。

1 培养基中为何要添加非纤维素类碳源

教材中分别给出了纤维素分解菌的选择培养基与鉴别培养基的配方,两种培养基中都出现了非纤维素类的其他碳源,疑问:如此一来,是否培养与分离的就不是单纯的纤维素分解菌,为什么要配制这样的培养基呢?

针对为什么在选择性培养基中添加酵母膏和水解酪素的疑问,在教学时,首先应引导学生关注选择培养基的目的是为了创造适宜环境使某种微生物迅速繁殖,而其他微生物受抑制;其次,分析纤维素分解菌的选择培养基中的碳源含量:纤维素粉为5g,酵母膏和水解酪素均分别为0.5g;再者教材“微生物的实验室培养”中关于培养基成分的要求:除了需要碳源、氮源、水、无机盐等营养物质外,还需要满足微生物生长对pH、特殊营养物质以及氧气的要求。由此,学生理解了在以纤维素粉为主要碳源、并添加少量酵母膏与水解酪素作为生长因子的环境中,该选择培养基才可以更好起到富集培养的作用。

针对鉴别纤维素分解菌的培养基添加含有淀粉的土豆汁可能引起假阳性的疑问,要明确:①刚果红可以与纤维素之外的其他多糖(如淀粉)发生显色反应;②用稀释涂布平板法对微生物进行鉴定要求平板上至少可以形成单个菌落;③由于微生物本身酶系统的影响,不同微生物对碳源的利用是有选择性和顺序性的。一般情况下,微生物会优先利用淀粉,淀粉耗尽才会利用纤维素。在CMC-Na(羧甲基纤维素钠)为唯一碳源的固体培养基上,微生物繁殖的速度很慢。在涂布后,为使单个微生物存活并发展为菌落,可以在鉴别培养基中加入适量土豆汁满足纤维素分解菌株早期快速生长代谢的需求,效果比仅以CMC-Na为唯一碳源的培养基更明显。这是由于土豆汁中除了含有淀粉外,还含有丰富的钙、磷、铁、钾等矿物质,以及维生素A、维

生素C和B族类维生素,营养丰富,有利于微生物的繁殖。不过土豆汁的浓度不宜过大,一开始分解淀粉的微生物也会繁殖,但由于加入的淀粉量较少,随着淀粉的消耗,这些微生物的生命活动会逐渐受到抑制,最后只剩下纤维素作为唯一碳源,此时纤维素分解菌则能继续利用纤维素繁殖并形成菌落,这也是为什么刚果红染色法中产淀粉酶的微生物周围形成的透明圈较为模糊的原因。

2 是否可以用纤维素粉代替 CMC-Na

针对是否可用纤维素粉替代的疑问,通过查阅文献可知:①在纤维素刚果红培养基中,使用CMC-Na作为唯一的碳源,可以保证获得的菌株具有分解纤维素的高效性;②CMC-Na并非碳源的唯一选择,也可以利用结晶纤维素为唯一碳源并结合刚果红染色法来筛选菌株;③普通的纤维素粉也可以成为唯一碳源,只不过在配制前,应对纤维素粉和琼脂进行预处理(纤维素粉加1mol/L HCl溶液浸泡12h,然后蒸馏水洗多次至pH达中性,再过滤、烘干),以除去药品中可能存在的其他碳源;④有研究发现,鉴别培养基中不设置唯一碳源会达到更理想的效果^[1]。所以,教材中纤维素分解菌的选择和鉴别培养基配方仅仅是一种参考,可以进行适当变动或改进。

3 为何透明圈中的纤维素分解菌菌落本身会呈现红色

针对教材中图2-13中透明圈中的纤维素分解菌菌落本身为何会呈现红色的疑问,分析实验可知,在刚果红-纤维素固体培养基上,纤维素被水解后,菌落周围颜色变浅形成透明圈,颜色浓郁的红色物质主要集中在菌落生长区域;透明圈中红色物质主要集中在菌丝中,菌丝周围的红色显著变浅甚至无色。

研究表明,纤维素类物质被微生物分泌的酶水解后形成大量含有 β -1,4-D-吡喃型葡萄糖与 β -1,3-D-葡聚糖及乳糖-葡甘露糖聚合糖等结构的物质,与刚果红染料结合形成大量的红色多聚糖-刚果红复合物,菌丝吸收多聚糖-刚果红复合物,使刚果红也伴随着多聚糖进入了菌丝体,所以菌丝周围培养基的颜色变浅甚至无色^[2]。而进入菌丝中的多聚糖-刚果红复合物进一步被真菌分解为可以利用的小分子多糖加以吸收,无法被利用的刚果红染料则沉积在菌丝中,或

非洲猪瘟简介

裴庭苇 于志军* 刘敬泽 (河北师范大学生命科学院 石家庄 050024)

摘要 非洲猪瘟是由非洲猪瘟病毒引起的高致病性传染病,2018 年 8 月首次传入我国,目前已在国内 25 个省区蔓延,防控形势严峻。本文对非洲猪瘟的病原体、传播途径及防控策略进行概述。

关键词 非洲猪瘟 病原体 传播途径 防控策略

非洲猪瘟是由非洲猪瘟病毒引起的高致病性传染病,2018 年 8 月首次传入我国,目前已发现在国内 25 个省区蔓延,对我国的生猪养殖产业造成了比较严重的威胁。非洲猪瘟属于世界动物卫生组织(OIE)的法定报告动物疫病,中国农业部将其列为一类动物疫病,是《国家中长期动物疫病防治规划(2012—2020 年)》中明确规定须重点防控的外来动物疫病之一。非洲猪瘟引起的临床症状特征包括发热、皮肤发紫、淋巴结、肾脏和胃肠黏膜明显出血,并伴有呼吸和神经系统症状,致死率可达 100%。目前我国对非洲猪瘟的感染机制尚不清晰,也无相应的疫苗用于防治。面对疫病的流入和传播,做好疫病防制计划,严格防制疫情扩散显得十分迫切。

1 非洲猪瘟病毒简介

非洲猪瘟(African swine fever, ASF),又称非洲猪

进入菌丝与真菌细胞中的葡聚糖成分再次结合,形成多聚糖-刚果红复合物,使刚果红固定在细胞内,最终使菌丝呈现红色。

4 以透明圈大小作为菌株产纤维素酶活力大小的定量指标是否可靠

刚果红染色法是目前公认的一种有效分离纤维素分解菌方法。实验发现,即使是低活菌株也能形成清晰的水解圈,具有明显的可识别性。这是由于纤维素酶是一种复合酶,由 C1 酶(内切葡聚糖酶:这类酶作用于纤维素分子内部的非结晶区,随机水解 $\beta-1,4$ 糖苷键,将长链纤维分子截断,产生大量非还原性末端的小分子纤维素)、Cx 酶(外切葡聚糖酶:作用于纤维素分子的非还原端,依次水解 $\beta-1,4$ 糖苷键,每次切下一个纤维二糖分子)和葡萄糖苷酶(水解纤维二糖和短链的纤维寡糖生成葡萄糖,对纤维二糖和纤维三糖的水解很快,随着葡萄糖聚合度的增加水解速度下降)组成。它们一起组成复合酶系,实际的降解过程是多种组分共同催化水解的结果。但在实践中,测定这三种组分酶活力所用底物分别是脱脂棉、CMC-Na 和对硝基酚- β -葡萄糖苷,所以在降解甲甲基纤维素(CMC)时,菌落透明圈大小只能表征 Cx 酶活力高低,并不能反映微生物分解纤维素的真实能力。

另外,虽然可根据透明圈的大小以及出现的迟早

瘟疫,是由非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)引起的烈性传染病。ASFV 是非洲猪瘟病毒属中唯一的 DNA 病毒^[1],由囊膜包裹,呈二十面体立体对称,平均直径 200 nm,病毒基因组为一条线性的双链 DNA 分子^[2]。基因组长度约为 170~190 kb,末端含有共价键,含有 151 个开放阅读框,编码 200 多种蛋白质^[3]。基因组中央保守区长度为 125 kb,该区域中 B646L 基因(编码 P72 蛋白)常作为非洲猪瘟病毒分型依据。ASFV 分离株的基因组特异性和长度在不同区域存在差异,该区域特征为 ASF 的传播和跟踪奠定了基础。目前,ASFV 有且只有一个血清型,根据 B646L 基因进行分类,分为 23 种基因型^[4]。

非洲猪瘟病毒在不同的环境或污染物中的存活能力各不相同。ASFV 在外界环境中抵抗能力很强。在

粗略估计菌株产酶情况,却不能真正代表菌株的产酶能力,仅以水解圈大小作为菌株产纤维素酶活力大小的唯一定量指标是不太可靠的。因为发酵生产中体积生产率(volume productivity)即单位质量菌体,单位时间内合成目标产物的数量是生产成本的决定性因素。但在菌种选育和条件优化试验中,都习惯以单位体积的产物量为依据,忽略了时间和菌体量这两个制约因素,其结果往往使发酵周期长、生产效率低的菌株被作为目标菌株投入大生产。

综上,为确定得到的是纤维素分解菌,进行发酵产纤维素酶的复筛实验必不可少。实验室一般用滤纸作为底物,因为滤纸是聚合度和结晶度都居中的纤维性材料,结构较为松散,非还原性末端也较多,容易同时被内切酶和外切酶降解,再由葡萄糖苷酶分解成葡萄糖等还原糖,此时用比色法定量测定还原糖的生成量,才可反映纤维素酶的总酶活力。

主要参考文献

- [1] 叶姜瑜. 一种纤维素分解菌鉴别培养基[J]. 微生物学通报, 1997, 24(4): 251-252.
- [2] 张超, 李艳宾, 张磊, 等. 纤维素-刚果红培养基鉴定产纤维素酶真菌的机理研究[J]. 纤维素科学与技术, 2007, 15(2): 39. ◇