

## 水稻秸秆降解优良放线菌的筛选和鉴定



XU Jie

徐 杰, 杨 谦

(哈尔滨工业大学 生命科学与工程系, 黑龙江 哈尔滨 150001)

**摘 要:** 利用纤维素琼脂选择培养基和刚果红染色方法,从常年堆放的水稻秸秆堆下面的新鲜土壤及腐烂秸秆中筛选分离获得一株具有较高纤维素酶活菌株,经培养特征观察和 16S rRNA 序列分析鉴定为链霉菌 C-5。该菌株同时具有一定的漆酶、过氧化物酶、木聚糖酶和果胶酶活性,并且能在 30 d 内使水稻秸秆的干物质失重率达 72% 以上,具有很好的水稻秸秆降解能力,对提高水稻秸秆

的资源利用率有良好的应用前景。

**关键词:** 水稻秸秆分解菌;链霉菌;16S rRNA 序列;测序

中图分类号:TQ351.0

文献标识码:A

文章编号:0253-2417(2008)05-0055-05

## Isolation and Identification of An Effective Actinomycete Strain for Degradating Rice Straw

XU Jie, YANG Qian

(Department of Life Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001, China)

**Abstract:** An actinomycete strain C-5, capable of degradating rice straw effectively, was isolated from soil which had been under the stock pile for several years, using methods of cellulose culture-medium selection and Congo red dyeing. The isolated strain was identified as *Streptomyces* sp. according to its phenotypic features and 16S rRNA phylogenetic analysis. This strain has enzymatic activities of cellulase, laccase, peroxidase, xylanase and pectinase simultaneously. After 30 d of inoculating with C-5, the dry weigh of rice straw was decreased by 72%. C-5 could decompose rice straw effectively and had good application prospects in improving utilization of the rice straw resource.

**Key words:** actinomycete strain for rice-straw degradation; streptomycete; 16S rRNA sequence; sequencing

秸秆资源来源广泛、数量巨大,将秸秆转化为人类急需的能源、食物和化工原料,对于人类社会解决环境污染、食物短缺和能源危机具有重大的现实意义<sup>[1]</sup>。据粗略统计,我国每年产生农作物秸秆 5.8 亿吨,占世界秸秆总产量的 20%~30%。在作物秸秆资源中,以水稻秸秆最多,达到 1.75 亿吨,占秸秆总量的 31.6%。目前,国内外研究对水稻秸秆进行物理和化学的预处理,除去木质素和硅层,降低纤维素的结晶度,再通过纤维素酶、半纤维素酶进行降解。虽然物理法和化学法预处理在一定程度上都能破坏晶体结构,去除水稻秸秆的木质-硅化层,但物理法成本高,耗能大,操作复杂;而化学法酸碱浸泡处理纤维素所需的酸碱成本很高,并造成严重的二次污染,均不宜采用。而用生物法处理秸秆具有无污染、成本低、操作简单的优点,可以打破秸秆的木质素、纤维素、半纤维素之间的紧密结构,已经成为世界各国学者转化处理利用纤维废弃物的研究热点和趋势<sup>[2]</sup>。目前有关水稻秸秆降解菌的研究多集中于细菌和真菌<sup>[3-4]</sup>,对有关在土壤中对植物残体降解起重要作用的放线菌降解木质纤维素的情况了解相对较少<sup>[1]</sup>。大部分放线菌能容易地利用半纤维素,并能在一定程度上改变木质素的分子结构,继而分解溶解的木质素。同时,放线菌具有类似于真菌的菌丝结构,能够穿透不溶性的纤维素类底物以达到降解的目的<sup>[5-8]</sup>。本实验通过大量的筛选得到了一株具有较高纤维素酶活,并对水稻秸秆有很好分解效果的放线菌 C-5。经鉴定该菌株属于链霉菌,同时具有一定的

收稿日期:2007-11-21

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划(2006BAD07A01);黑龙江省科技攻关(GC05C209)

作者简介:徐杰(1978-),女,黑龙江齐齐哈尔人,博士生,从事纤维微生物降解方面的研究;E-mail: xj3455@sina.com.cn。

木质素酶、半纤维素酶、果胶酶等多种酶活。到目前为止,同时具有多种木质纤维素酶活的链霉菌还未见相关报道,本研究对链霉菌 C-5 对水稻秸秆的分解效果作了初步的探讨,以期将这株菌应用于水稻秸秆生物降解提供实验基础和指导作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

样品:于2006年9月,在佳木斯水稻研究所(中华人民共和国水稻原种繁育基地)的4个区域采样,分别为总队、一连、二连和三连。采样时选择的是常年堆放的水稻秸秆垛下面的新鲜土壤及腐烂秸秆,每垛土样用干净的采样铲取5~10个点,总共约2 kg。将采集的样品放入采样袋中混合均匀带回实验室,4℃保存、备用。

器材:恒温培养箱,752光栅分光光度计,恒温水浴锅,电热恒温鼓风干燥箱,空气浴振荡器等。

### 1.2 培养基及培养条件

**1.2.1 初筛培养基(纤维素琼脂培养基)<sup>[9]</sup>**  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 g, NaCl 1 g,  $\text{CaCO}_3$  2 g, 琼脂 20 g,  $\text{H}_2\text{O}$  1 L。121℃灭菌,倒平板,待培养基凝固后将与平板大小一致的无菌滤纸贴在平板的培养基上,盖上培养皿盖后恒温培养,观察纤维素菌在滤纸上的生长。

**1.2.2 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)培养基<sup>[10]</sup>** CMC-Na 15 g,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1 g, 酵母提取物 1 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g, 蒸馏水 1 L, 琼脂 15 g。

**1.2.3 复筛产酶培养基<sup>[11]</sup>**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0 g,  $\text{MgSO}_4$  0.3 g, NaCl 0.1 g,  $\text{NaNO}_3$  2.5 g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.1 g,  $\text{FeCl}_3$  0.01 g, 稻草粉 20 g, 蒸馏水 1 L。

**1.2.4 木聚糖酶活性检测培养基<sup>[12]</sup>** 酵母提取物 1.0 g, 木聚糖 5 g, 琼脂粉 15 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.0 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4.0 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  15.4 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g, 蒸馏水 1 L。

**1.2.5 果胶酶活性检测培养基<sup>[12]</sup>** 70 mL 蒸馏水中加入 0.7 g 多聚半乳糖醛酸(果胶), 1.0 g 酵母提取物, 1.5 g 琼脂粉, 定容至 100 mL。

**1.2.6 秸秆降解实验培养基**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0 g,  $\text{MgSO}_4$  0.5 g, NaCl 0.1 g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.3 g,  $\text{FeCl}_3$  0.01 g, 蛋白胨 3 g, 酵母提取物 0.5 g, 牛肉膏 1 g, 蒸馏水 1 L。

### 1.3 方法

**1.3.1 菌种的分离及筛选** 分离:将从菌源地采样得来的样品分别溶于无菌水中,稀释成一系列不同的稀释度,取0.01、0.001、0.0001、0.00001、0.000001等5个稀释度,涂布于纤维素琼脂培养基,每个稀释度涂布3个平板,30℃培养箱培养。长出菌群后,反复划线分离至长出单菌落。初筛:将分离得到的单菌落接种于CMC-Na平板上,30℃恒温箱中培养3~5 d。然后用质量浓度为1 g/L的刚果红溶液染色0.5 h<sup>[13]</sup>,之后弃去染液,用浓度为1 mol/L的NaCl溶液脱色0.5 h,选取透明圈和菌落直径比( $D/d$ )值大的菌株再进行划线分离,低温保存。复筛:将初筛得到的单菌落制成菌悬液后,接种于以稻草粉为唯一碳源的液体发酵产酶培养基中190 r/min振荡培养72~144 h,收集上清液用于酶活测定,优选出的一株产酶活力较高的菌株命名为C-5。

**1.3.2 酶活的测定** 纤维素酶活力的测定方法见参考文献[14];木聚糖酶活性和果胶酶活性检测方法见参考文献[12];过氧化物酶活性检测方法见参考文献[15];漆酶活性检测方法见参考文献[16]。

**1.3.3 水稻秸秆降解实验** 选用2006年秋收脱谷后的干稻秆,用1%的NaOH浸泡24 h后冲洗至中性,60℃干燥后供实验用。250 mL三角瓶中装100 mL培养液,加入3 g干稻秆,121℃灭菌15 min后,接种10%(体积分数)的C-5菌悬液,30℃振荡培养。将第0、5、10、15、20、25、30 d的培养物以5000 r/min离心20 min,倒出上清液,清水洗,离心,105℃烘干后称质量,计算稻秆全质量的失重率(减重法)变化。

**1.3.4 菌株鉴定** 培养形态鉴定:根据《放线菌第二卷种和属的分类、鉴定和描述》和《链霉菌鉴定手册》操作。16S rDNA鉴定方法参见参考文献[17]。

## 2 结果与讨论

### 2.1 水稻秸秆降解菌的分离筛选

**2.1.1 菌株的分离和初筛** 通过纤维素琼脂平板培养从采集的27份土壤样品中共分离获得99株具有纤维素分解能力的放线菌菌株,用刚果红染色后选出有明显透明圈的菌株54株,其中 $D/d$ 值在2.5以上者15株。它们在刚果红初筛平板上的菌落直径和透明圈直径见表1。

表1 刚果红染色法实验及纤维素酶活测定结果<sup>1)</sup>

Table 1 Results of Congo red staining method experiment and cellulase activity

菌株 strains	透明圈直径( $D$ )/mm diameter of the haloes	菌落直径( $d$ )/mm diameter of the colony	$D/d$	CMC 酶活/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) activity of CMCase	滤纸酶活/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) activity of FPase
A2-3(2)	10.4 ± 0.02	2.80 ± 0.01	3.73	36.33 ± 0.026	11.93 ± 0.051
A1-3(4)	12.7 ± 0.01	3.50 ± 0.05	3.63	35.67 ± 0.028	12.57 ± 0.041
A1-3(5)	12.7 ± 0.03	3.75 ± 0.03	3.39	46.16 ± 0.046	16.33 ± 0.068
A1-3(6)	29.3 ± 0.02	6.50 ± 0.09	4.50	7.33 ± 0.017	1.50 ± 0.01
A2-3(7)	15.9 ± 0.03	4.00 ± 0.00	3.97	5.31 ± 0.048	1.33 ± 0.02
A2-3(8)	14.2 ± 0.02	4.00 ± 0.00	3.55	36.54 ± 0.09	8.16 ± 0.02
A2-3(10)	21.3 ± 0.04	5.00 ± 0.00	4.26	3.00 ± 0.00	6.57 ± 0.03
A2-3(18)	16.2 ± 0.01	4.20 ± 0.05	3.86	12.38 ± 0.058	3.17 ± 0.02
T1-2(24)	14.3 ± 0.02	2.70 ± 0.02	5.30	18.00 ± 0.046	4.00 ± 0.02
B5-2(29)	21.5 ± 0.06	5.20 ± 0.08	4.13	15.31 ± 0.05	5.16 ± 0.03
T1-2(30)	16.1 ± 0.01	3.90 ± 0.06	4.13	13.69 ± 0.09	6.39 ± 0.06
B3-2(32)	14.6 ± 0.03	5.20 ± 0.07	2.80	8.32 ± 0.02	3.66 ± 0.02
A2-3(43)	17.9 ± 0.04	4.70 ± 0.04	3.80	3.67 ± 0.02	13.59 ± 0.04
A1-3(47)	24.0 ± 0.09	6.00 ± 0.00	4.00	11.00 ± 0.04	5.37 ± 0.01
B5-1(48)	16.8 ± 0.04	3.80 ± 0.02	4.42	11.65 ± 0.03	3.11 ± 0.01

1) 数据为3次重复的平均值 ± 标准差 data are average of 3 replicates ± standard error

初筛的纤维素琼脂培养基是以 Whatman 滤纸作为筛选底物,因为 Whatman 滤纸是结晶度和聚合度均为中等的纤维素材料,所以菌株对其降解程度可以较真实的反应出菌株对天然纤维素的降解程度<sup>[18]</sup>。图1为具有纤维素分解能力的菌株在滤纸平板上的生长情况。

纤维素分解菌能分泌纤维素酶而将平板培养基中的纤维素降解成小分子的低聚糖及纤维二糖、葡萄糖等,水解后的糖类同刚果红染粒可形成红色沉淀。因此在纤维素刚果红培养基上,纤维素分解菌的菌落周围均能形成透明的水解圈,且透明圈的大小同酶活性的高低有一定的数量关系。因此,刚果红纤维素平板透明圈筛选法可用于识别产纤维素酶的菌株,还可用于初步判定酶活性高低。然而,虽然透明圈大小直接反映了酶浓度的高低,但不能完全代表菌株产酶能力,对此,Teather 等指出,液体样品的酶浓度与透明圈的直径呈线性关系,可以对酶活进行初步定量。但是仅以透明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,其原因是多方面的,如固体和液体培养条件不同;不同菌株具有不同的产酶速度和不同的纤维素酶系;菌苔大小及在平板上堆积情况的差异等都会造成透明圈大小与液体发酵酶活结果的不完全一致,所以液体发酵复筛必不可少。

**2.1.2 菌种的复筛** 将初筛得到的15株放线菌菌株接入复筛产酶培养基中进行液体摇瓶发酵,连续培养7d后,根据测定各菌株所产纤维素酶的活力优选出一株产酶活力较高的菌株,命名为C-5。酶活测定结果见表1。图2为C-5在刚果红染色后的纤维素平板上的菌落和透明圈。

### 2.2 木聚糖、果胶多聚糖降解活性的测定

对这株放线菌进行木聚糖和果胶多聚糖降解活性的检测结果表明,C-5在两者的检测培养基上均能产生透明圈,说明C-5具有一定的降解木聚糖和果胶多聚糖的能力,但从菌落的生长状态和透明圈的明显程度及大小上来看,其降解木聚糖的能力要稍大于降解果胶多聚糖的能力。

### 2.3 木质素酶活性的测定

对这株放线菌进行漆酶活性和过氧化物酶活性的检测,对照样为煮沸5min的C-5粗酶液。结果表明,C-5在两者的检测培养基上均发生了显色反应(见图3,图4),说明这株放线菌具备一定的木质

素降解能力。

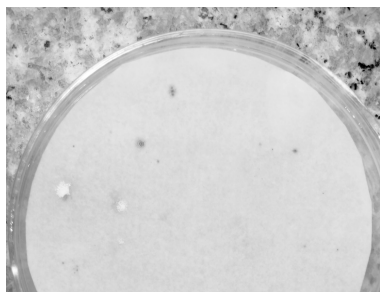
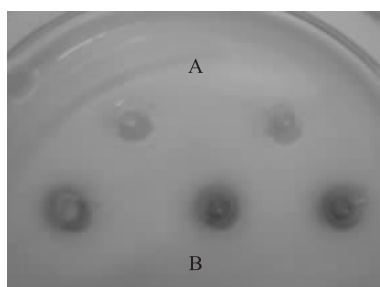


图1 具有纤维素分解能力的菌株在滤纸上的生长状态  
Fig.1 Growth of strains with cellulose-decomposing ability on the filter paper

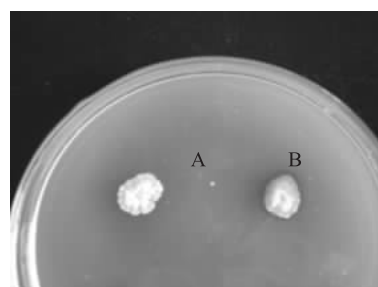


图2 C-5 刚果红染色后的菌落和透明圈  
Fig.2 Colony and clear halos formed by C-5 on the screening plate stained with Congo red



A. 对照样 control; B. C-5的粗酶液 extracellular fluid of C-5

图3 C-5 漆酶活性的平板检测  
Fig.3 Plate assay for demonstration of laccase activity of C-5



A. 对照样 control; B.滴加了测定液的菌落 colony after adding liquid for determination

图4 C-5 过氧化物酶活性的平板检测  
Fig.4 Plate assay for demonstration of peroxidase activity of C-5

## 2.4 C-5 对水稻秸秆降解能力

从图5可以看出,本实验筛选得到的放线菌 C-5 可以在 30 d 以内使水稻秸秆的干物质失重率达 72 % 以上。发酵 30 d 后,绝大部分水稻秸秆已经被降解,发酵液变得十分黏稠,颜色变深,说明秸秆降解生成了大量的糖类物质。以上的结果显示 C-5 具有很强的水稻秸秆降解能力,是一株优良的水稻秸秆降解菌。

## 2.5 菌株鉴定

**2.5.1 培养特征观察** 根据《放线菌第二卷种和属的分类、鉴定和描述》和《链霉菌鉴定手册》,对 C-5 的鉴定结果如下:C-5 在高氏 1 号培养基上的菌落特征为菌落大,多皱,幼菌落表面光滑,老菌落粗糙,质地硬而致密,隆起,气生菌丝体覆盖在菌落表层,边缘呈白色,中间有呈金属光泽孢子,环状;在黑色素培养基上不产生黑色素;在淀粉培养基上的气生菌丝大部分呈灰色,稍有白点,基丝无色,无色素生成;在葡萄糖天门冬素琼脂培养基上不产生乳脂状,基丝无色至稍黄,无色素生成;在蔗糖察氏琼脂培养基上气丝呈深灰色,基丝无色至稍灰,无色素生成;在马铃薯块培养基上气丝浅灰色,基丝深褐色,无色素生成。经初步鉴定 C-5 属于链霉属的烬灰系列(Cinereus),暂时命名为链霉菌(*Streptomyces* sp.)C-5。

**2.5.2 16S rRNA 序列分析** 目前分类方面一般采用的作法是除了需要形态观察、培养特征、生理生化特性试验外,还要进行核酸序列或氨基酸序列的测定,其中相当有效的分类鉴别方法之一是采用 PCR

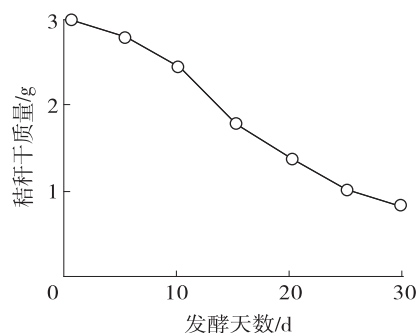


图5 发酵过程中水稻秸秆干物质质量的变化

Fig.5 Change of dry weight of rice straw during fermentation

扩增 16S rRNA 进行序列分析<sup>[19]</sup>。本研究将 C-5 的 16S rRNA 序列与基因库菌株进行序列比对,结果表明,C-5 的 16S rRNA 序列与链霉菌菌株的 16S rRNA 序列相似性达到 99% 以上。表 2 列出了基因库中介绍了几株功能与 C-5 的 16S rRNA 序列最相近的链霉菌菌株,其中 *Streptomyces sp.* An53 具有降解几丁质的功能,*S. sp.* XS904 具有杀虫的活性,*S. sp.* SNG9 则能降解聚乙烯及其共聚物,*S. sp.* CHR3 具有很强的分解水银的功能,而唐德链霉菌(*S. tendae*)则会造成马铃薯的疮痂病。以上菌株均未见其降解木质纤维素方面的相关报道。本研究发现链霉菌 C-5 具有纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶、过氧化物酶和漆酶等多种木质纤维素酶活性,同时对水稻秸秆有很好的降解效果,其生物降解机理有待进一步探讨。

### 3 结论

**3.1** 从土壤中分离纯化后,经刚果红染色和液体摇瓶发酵复筛,得到一株产纤维素酶活较高的菌株 C-5。经培养形态观察和 16S rRNA 序列分析鉴定 C-5 为链霉菌,命名为 *Streptomyces sp.* C-5。

**3.2** 链霉菌 C-5 具有较高纤维素酶活,同时具有一定的木聚糖酶、果胶酶、过氧化物酶和漆酶活性,首次报道了同时具有多种木质纤维素酶活性的放线菌。

**3.3** 链霉菌 C-5 具有优良的水稻秸秆降解能力,液体发酵 30 d 可使水稻秸秆的降解率达 72% 以上,进一步研究其对水稻秸秆的生物降解过程对水稻秸秆资源的转化利用具有重大的现实意义。

#### 参考文献:

- [1] 陈洪章,李佐虎. 纤维素原料微生物与生物量全利用[J]. 化工科技市场,2001(5):17-20.
- [2] BRODA P. Biotechnology in the degradation and utilization of lignocellulose[J]. Biodegradation,1992(3):219-238.
- [3] 王蔚,高培基. 褐腐真菌木质纤维素降解机制的研究进展[J]. 微生物学通报,2002,29(3):90-93.
- [4] 胡晓燕,曲音波. 细菌纤维素的研究进展[J]. 纤维素科学与技术,1998,6(4):56-64.
- [5] 吴襟,何秉旺. 诺卡氏菌放线菌-甘露聚糖酶的化学修饰及活性中心的研究[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2000,16(2):227-230.
- [6] 席北斗,刘鸿亮,白庆中,等. 堆肥中纤维素和木质素的生物降解研究现状[J]. 环境污染治理技术与设备,2002,3(3):19-23.
- [7] WALTER S,SCHREMPF H. Physiological studies of cellulase (avicelase) synthesis in *Streptomyces reticuli*[J]. Appl Environ Microbiol,1996,62(3):1065-1069.
- [8] KIZHEKKEDATHU N. Mangrove actinomycetes as the source of ligninolytic enzymes[J]. Actinomycetologica,2005,9(2):40-47.
- [9] 李卓隼. 农业微生物学实验技术[M]. 北京:中国农业出版社,1996.
- [10] 谢正喆. 现代微生物培养基和试剂手册[M]. 福州:福建科技出版社,1994.
- [11] 孙晓华,罗安程. 纤维素分解菌的分离、筛选及环境适应性初步研究[J]. 科技通讯,2005,21(2):236-240.
- [12] MINAMIYAMAT H,SHIMIZU M,KUNOH H, et al. Multiplication of isolates R-5 of *Streptomyces galbus* on rhododendron leaves and its production of cellwall-degrading enzymes[J]. Journal of General Plant Patholog,2003,69:65-70.
- [13] CANTWEL L A,MCCONNELL D J. Molecular cloning and expression of a *Bacillus subtilis*  $\beta$ -glucanase gene in *Escherichia coli*[J]. Gene,1983,23:211-219.
- [14] 燕红,杨谦,王希国. 两株芽孢杆菌产纤维素酶的研究[J]. 林产化学与工业,2006,26(2):83-86.
- [15] 王亚珍,吴庆禹,池玉杰. 针叶树上主要多孔菌培养特性[J]. 东北林业大学学报,1998,26(5):26-29.
- [16] SRINIVASAN C. Demonstration of laccase in the white rot *Basidiomycete phanerochaete chrysosporium* BKM2F1767 [J]. Applied and Environmental Microbiology,1995,61(12):4272-4277.
- [17] 刘妍,李志勇. 具有多重酶活性的澳大利亚厚皮海绵共附生放线菌的研究[J]. 生物技术通报,2006(5):121-125.
- [18] 蔡燕飞,李华兴,彭桂香,等. 纤维素分解菌的筛选及鉴定[J]. 林产化学与工业,2005,25(2):67-70.
- [19] 阎旭光,吴剑波. 16S rRNA 在放线菌分子鉴别和分类中的作用及 RFLP 和 RAPD 的应用[J]. 国外医药抗生素分册,1997,18(6):409-417.

表 2 C-5 的 16S rRNA 同源性比对结果

Table 2 The closet strains to strain C-5 according to 16S rRNA sequence

登陆号 accession No.	菌株名称 strain names	相似性/% identity
AF026080.1	<i>Streptomyces sp.</i> CHR3	100.00
DQ826592.1	<i>Streptomyces sp.</i> XS904	100.00
AJ002084.1	<i>Streptomyces sp.</i> strain NAR54(K6)	100.00
AF295602.1	<i>Streptomyces sp.</i> SNG9	99.82
AM039887.1	<i>Streptomyces sp.</i> An53	99.65
D63873.1	<i>Streptomyces tendae</i>	99.54