

张蕴琦,徐凤花,张书敏,等. 水稻秸秆降解菌系的筛选及其菌群组成分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(8):257-260.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.08.069

水稻秸秆降解菌系的筛选及其菌群组成分析

张蕴琦¹, 徐凤花¹, 张书敏¹, 吴 优¹, 张 晴²

(1. 东北农业大学资源与环境学院, 黑龙江哈尔滨 150030; 2. 河南新网环境监测服务有限公司, 河南郑州 450000)

摘要:将崩解滤纸能力强的菌系 1 在 30 ℃ 条件下以水稻秸秆为唯一碳源连续驯化 41 代, 25 代后羧甲基纤维素钠 (CMC) 酶活力、滤纸酶活力和秸秆失重率基本稳定, 较第 1 代提高了 59.7%、61.0% 和 62.4%。利用 PCR-DGGE 对驯化进程中菌系 1 细菌组成多样性及优势菌群的变化动态进行分析, 原始样品共检测到 13 个主要条带, 优势菌群由 *Solitalea* sp.、假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.) 和一些不可培养微生物组成。经滤纸及水稻秸秆驯化, 部分细菌被淘汰, 微生物多样性减少, 滤纸和水稻秸秆驯化稳定期优势菌群均包括多形拟杆菌属 (*Bacteroides* sp.)、梭菌属 (*Clostridium* sp.) 和假单胞菌属, 表明这些优势菌群对滤纸纤维素和水稻秸秆纤维素均有较强的降解能力, 此外, 条带 10 (*Uncultured Clostridium* sp. Clone 3-2) 在水稻秸秆驯化 33 代颜色变深成为优势菌, 推测在水稻秸秆降解过程中具有一定的作用。

关键词: 菌系 1; 驯化; 水稻秸秆; 变性梯度凝胶电泳; 多样性; 优势菌群

中图分类号: X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)08-0257-04

2013 年黑龙江省水稻秸秆量为 2 400 万 t, 约占秸秆总量的 39.3%^[1]。由于水稻秸秆木质素缩聚单元比例较高, 与纤维素和半纤维素结合较紧密, 硅质化程度高^[2], 同时黑龙江年均气温较低, 因此其自然降解速度缓慢, 资源化利用率低, 大量焚烧严重污染环境。

近年来国内外学者选育出一些能够降解水稻秸秆的菌株, 主要包括木霉菌、青霉菌和一些细菌, 但是, 研究发现单菌株产酶能力有限^[3], 且水稻秸秆结构复杂, 很难被高效降解, 而菌系通过多种微生物协同作用对水稻秸秆降解效果更好, 然而, 目前对菌系的研究较少。本试验在 30 ℃ 下以 6 种不同来源的样品为菌源, 采用限制性筛选的方法, 利用水稻秸秆定向驯化培养, 获得能够高效稳定降解水稻秸秆的菌系, 并通过分子生物学技术揭示该菌系细菌组成多样性及优势菌群的变化动态。

收稿日期: 2016-09-08

基金项目: 国家科技支撑计划 (编号: 2012BAD14B06); 黑龙江省哈尔滨市技术成果转化项目 (编号: 2014DB3BN037)。

作者简介: 张蕴琦 (1993—), 女, 黑龙江五常人, 硕士研究生, 主要从事农业废弃物无害化处理与肥料化利用研究。E-mail: xiaoqiYQ@163.com。

通信作者: 徐凤花, 教授, 硕士生导师, 主要从事应用微生物研究。Tel: (0451) 55190951; E-mail: xfh00001@126.com。

1 材料与方法

1.1 样品来源 (表 1)

表 1 样品来源

样品编号	样品来源
1	牛瘤胃液
2	林地地表土壤
3	低温堆肥样品
4	稻秸腐烂物
5	城市污泥
6	稻田土

1.2 培养基

富集培养液^[4]: 蛋白胨 5 g, 酵母粉 1 g, NaCl 5 g, CaCO₃ 2 g, 微量元素液 0.5 mL, 土壤浸汁 100 mL, 蒸馏水 900 mL, 121 ℃ 灭菌 30 min。

微量元素溶液成分: ZnSO₄ 0.29 g, CaCl₂ 0.24 g, CuSO₄ 0.25 g, MgSO₄ 0.17 g。

土壤浸汁: 土壤与去离子水以质量比 1:1, 搅拌混合, 过滤, 灭菌后备用。

蛋白胨纤维素培养液 (PCS)^[5]: 蛋白胨 5.0 g, 纤维素 (新华滤纸/水稻秸秆) 5.0 g, NaCl 5.0 g, CaCO₃ 2.0 g, 酵母粉 1.0 g, 蒸馏水 1.0 L, 121 ℃ 灭菌 30 min。

[16] 王金昌, 郑国华, 傅筱冲. 一株解钾解磷菌株的筛选[J]. 江西科学, 2014, 32(1): 51-53, 103.

[17] Shoenitz M, Ribaud C M, Pardo M A, et al. Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2009, 41(9): 1768-1774.

[18] Walpola B C. Effect of fungicides on phosphate solubilization by *klebsiella oxytoca* and *Enterobacter ludwigii*[J]. Korean Journal of

Soil Science and Fertilizer, 2013, 46(2): 112-116.

[19] 王 舒, 张林平, 张 扬, 等. 红壤区油茶根际解磷细菌的筛选、鉴定及其解磷能力[J]. 林业科学研究, 2015, 28(3): 409-416.

[20] 黄达明, 李 倩, 管国强, 等. 一株解磷细菌的筛选、鉴定及其溶磷培养条件的优化[J]. 生物技术通报, 2015, 31(2): 173-178.

[21] 刘云华, 吴毅歆, 杨绍聪, 等. 洋葱伯克霍尔德溶磷菌的筛选和溶磷培养条件优化[J]. 华南农业大学学报, 2015, 36(3): 78-82.

1.3 试剂

EDTA(乙二胺四乙酸)、SDS(十二烷基磺酸钠)、CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)、磷酸二氢钠、异丙醇、蛋白酶 K、磷酸氢二钠、异戊醇、溶菌酶、Tris-饱和酚、甲叉双丙烯酰胺、丙烯酰胺、去离子甲酰胺、尿素、冰乙酸、过硫酸铵、DNA 胶回收试剂盒,试剂均为分析纯。

DNA 提取液的配制^[6]:0.1 mol/L Tris-HCl,0.1 mol/L EDTA,0.1 mol/L Na_2PO_4 ,1.5 mol/L NaCl,1% CTAB,pH 值为 8.0。

1.4 试验方法

1.4.1 样品富集 称取 1~6 号样品各 10 g,分别加入 150 mL 富集培养液中,30 ℃ 恒温振荡培养,富集 3 代,10 d/代,传代接种量为 15%。

1.4.2 菌系初筛 采用滤纸条崩解法,向 150 mL 蛋白胨纤维素培养基(滤纸)中接入 20 mL 富集培养液,30 ℃ 静置培养,驯化 5 代,10 d/代,选择滤纸崩解的样品,继续多代驯化。

1.4.3 菌系复筛 待菌系降解滤纸能力稳定后,采用蛋白胨纤维素培养基(水稻秸秆)继续定向驯化培养,第 4 天测定 CMC 酶活及滤纸酶活,第 7 天测定样品中秸秆失重率。

1.4.4 纤维素酶活性测定 采用 DNS 法^[7]测定 CMC 酶活性和滤纸酶活性。

1.4.5 秸秆失重率测定 将水稻秸秆发酵液离心,弃上清,加入盐酸和硝酸混合液,过滤,再用蒸馏水反复冲洗,将剩余物转入培养皿,于 105 ℃ 电热恒温鼓风干燥箱中烘干至恒质量,称质量。按照公式计算失重率^[8]。

$$\text{失重率 } \omega = [(m_1 - m_2) / m_0] \times 100\%。$$

其中, m_0 为水稻秸秆初始质量(g), m_1 为培养皿与样品烘干恒质量(g), m_2 为培养皿质量(g)

1.4.6 菌系 DNA 提取及 PCR-DGGE 分析

1.4.6.1 菌系总 DNA 提取及纯化 取原始样品以及滤纸和水稻秸秆驯化中期、稳定期的发酵液为样品,置于离心管(样液为 10 mL),-20 ℃ 冻存。按照吕新等报道的高盐法^[6]提取 DNA,得 DNA 粗提液,取 5 μL 作琼脂糖凝胶电泳检测,并选用 OMEGA 生物技术公司的琼脂糖凝胶回收试剂盒进行胶回收,纯化 DNA。

1.4.6.2 菌系 16S rDNA V3 可变区 PCR 扩增 用于 DGGE 电泳的 PCR 扩增产物引物序列为^[9]338F(5'-CGCCGCGCGCGCGCGGGCGGGGACCGGGGGGACTCCTACGGGAGGCAG-3')和 518R(5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3');反应体系^[10]:模板 DNA 1 μL ,10 × PCR buffer 2.5 μL ,dNTP (2.5 mmol/L)2 μL ,正反引物各 0.5 μL ,5 U/ μL Taq 聚合酶 0.25 μL ,加双蒸水至 25 μL ;PCR 反应条件^[11]:94 ℃ 预变性 10 min;94 ℃ 变性 1 min,65 ℃ 复性 8 min,72 ℃ 延伸 2 min,共 40 次循环;72 ℃ 延伸 10 min,PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.4.6.3 变性梯度凝胶电泳 采用 Bio-Rad 变性梯度凝胶电泳对 PCR 产物进行分离,丙烯酰胺凝胶浓度为 8%,变性剂梯度为 35%~65%,电泳缓冲液为 1 × TAE,上样量为 30 μL PCR 产物和 10 μL 6 × 溴酚蓝二甲苯氰溶液,在 60 ℃、60 V 条件下电泳 14 h。紫外凝胶成像系统分析结果,并对 DGGE 图谱上的优势条带和差异条带进行割胶回收,将其放入灭菌

的 200 μL 离心管中,加入 20 μL 灭菌的去离子水中,4 ℃ 放置过夜。取 2 μL DNA 浸出液为模板进行 PCR 扩增,并再次进行变性梯度凝胶电泳,对单一条带进行切胶回收及 PCR 扩增,扩增产物送交华大基因公司测序。

2 结果与分析

2.1 菌系驯化

将不同来源的 6 个样品在 PCS 培养基(滤纸)中驯化至第 5 代,仅 1 号和 3 号样品滤纸条部分崩解,其他样品滤纸无明显崩解现象。对 1 号和 3 号样品驯化至 23 代,第 7 天 1 号样品滤纸均崩解为片状,3 号中滤纸断裂;第 10 天 1 号滤纸完全降解,菌液呈淡黄色,3 号滤纸崩解为片状,表明随着驯化代数的增加,样品中菌系对滤纸崩解能力逐渐增强。

2.2 菌系复筛

为得到能够快速稳定降解水稻秸秆的菌系,将菌系 1 和菌系 3 在以水稻秸秆为唯一碳源的 PCS 培养基中定向驯化培养,不同驯化代代 CMC 酶活性与滤纸酶活性如图 1 所示。1~25 代酶活性均逐渐提高,第 25 代菌系 1 CMC 酶活性与滤纸酶活性分别为 59.4、29.3 U/mL,较第 1 代提高了 59.7%、61.0%,菌系 3 为 50.2、25.6 U/mL,较第 1 代提高了 49.9%、56.1%,菌系 1 较菌系 3 高 18.3%、14.5%,表明驯化培养对提高菌系 1 酶活性效果明显,且菌系 1 酶活性强于菌系 3。杨冰从长期耕种的水稻田中筛选出水稻秸秆降解复合菌系 I-D,37℃ 条件下培养 2 d,CMC 酶活最高为 24.2 U/mL^[12]。

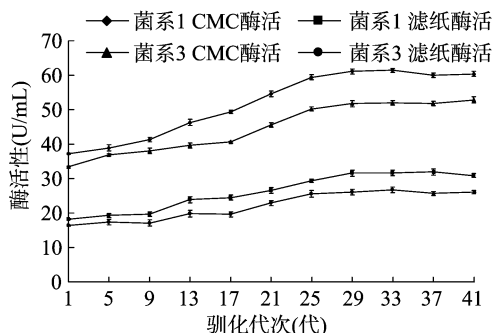


图1 不同驯化代代菌系的酶活性

由图 2 可见,在各代代驯化培养第 7 天时,1~25 代水稻秸秆失重率逐渐增加,第 25 代菌系 1 和菌系 3 秸秆失重率为 39.3%、31.0%,较第 1 代提高 62.4%、62.3%,菌系 1 较菌系 3 高 26.8%,表明菌系 1 对水稻秸秆降解能力强于菌系 3。刘甲峰等从免耕多年还田的土壤中驯化获得 1 组纤维素降解菌系,第 7 天稻秸失重率为 30.0%^[13]。朱虹等从稻草堆底土壤筛选的纤维素降解菌系第 7 天稻秸失重率为 39.6%^[14]。

2.3 DGGE 监测菌系 1 群落结构

2.3.1 菌系 1 总 DNA 提取 由于菌系 1 降解能力强于菌系 3,因此采用 PCR-DGGE 技术对菌系 1 优势菌群变化动态进行分析。总 DNA 电泳结果见图 3,各样品基因片段大小均约为 23 kb,5 条主带清晰较亮,表明 DNA 完整性较好,但各条带存在拖尾现象,且点样孔处均不同程度地发亮,说明样品中含有未除去的蛋白质等杂质。以纯化后的总 DNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增产物大小为 200 bp 左右,条带清晰单一(图 4),可用于 DGGE 分析。

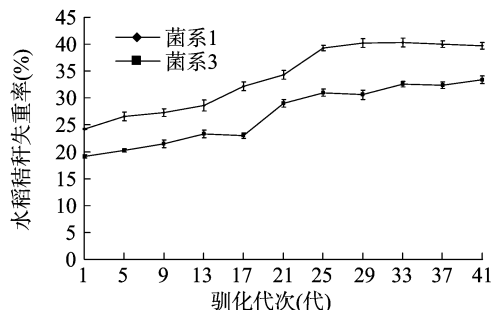
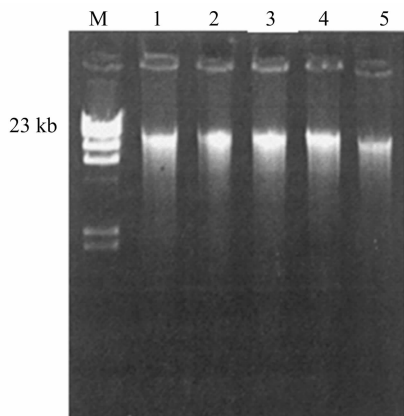


图2 不同驯化代次水稻秸秆失重率



M—marker, 1—原始样品, 2—滤纸驯化中期(第9代),
3—滤纸驯化稳定期(第23代), 4—水稻秸秆驯化中期(第13代),
5—水稻秸秆驯化稳定期(第33代)。图4、图5同

图3 各样品总DNA电泳图

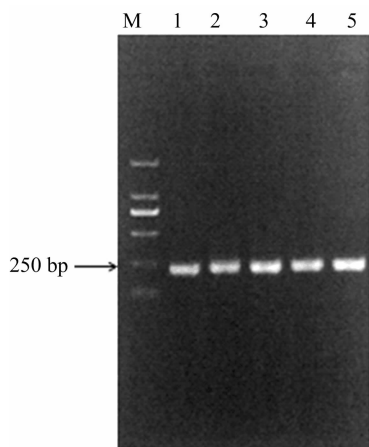


图4 PCR 扩增产物电泳图

2.3.2 菌系1 菌群组成变化动态 DGGE 图谱中1 个条带可能代表1 种微生物,同时颜色相对较深的条带是优势菌,菌系1 不同时期条带的数目及颜色深浅存在差异,如图5 所示,在驯化过程中,微生物组成发生变化。原始样品共检测出13 个主要条带,说明微生物多样性较丰富,条带2、4、5、6、7、11、12、13 颜色较深,代表菌系的优势细菌。滤纸驯化过程中,条带2、4、5、11、12、13 颜色持续变浅,对滤纸降解能力较弱,驯化9 代,与原始样品相比,条带1、8、9 颜色变深,条带3、10、11 颜色深浅没有明显变化,第23 代条带3、6、7 变深,条带1、3、6、7、8、9 代表的细菌成为优势菌,表明这些细菌逐渐适应滤

纸培养环境并趋于稳定,对滤纸降解能力较强。

水稻秸秆驯化培养13 代的样品检测出9 个主要条带,菌系微生物多样性减少。与滤纸驯化23 代相比,条带2、4、5 代表的细菌被淘汰,条带1、10、11、12、13 深浅无明显变化,条带3、6、7、8、9 变浅,表明水稻秸秆驯化初期,菌系中微生物由于未能适应碳源的变化,活性降低,当培养33 代时,条带11 消失,条带1、3、6、7、8、9、10 较深,代表的细菌为优势细菌,说明这些条带代表的细菌对水稻秸秆降解能力较强,共同组成一个能稳定降解水稻秸秆的菌系。

DGGE 图谱条带测序后与 GenBank 数据库源性比对结果见表2,除条带4、5、10、11、12、13 与某些不可培养微生物相似外,其他各主要条带的近缘菌分别归属于多形拟杆菌属 (*Bacteroides* sp.)、假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.)、梭菌属 (*Clostridium* sp.) 和 *Solitalea* sp.。原始样品优势菌群为 *Solitalea* sp.、*Pseudomonas* sp. 和一些不可培养微生物,经滤纸驯化优势菌群变化较大,演替为 *Bacteroides* sp.、*Clostridium* sp. 和 *Pseudomonas* sp.,水稻秸秆驯化稳定期优势菌群包括 *Bacteroides* sp.、*Clostridium* sp.、*Pseudomonas* sp. 和 Uncultured *Clostridium* sp. Clone 3-2。

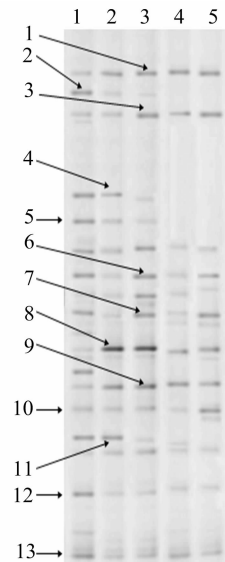


图5 不同驯化时期复合菌系 DGGE 图谱

3 讨论

菌系1 DGGE 图谱中条带1 与多形拟杆菌 (*Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482) 同源率为97%,驯化各时期均为优势菌,多形拟杆菌是一种碳水化合物降解细菌, Kim 等研究发现 *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 含有1 个编码糖苷转移酶的基因,能够降解纤维素等多糖物质^[15]。条带3、6 序列与荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens* Pf0-1) 相似性达到99%,条带7 与铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1) 相似性为100%,在不同时期样品中均存在。目前已有研究显示,荧光假单胞菌和铜绿假单胞菌均具有纤维素降解能力,尹礎等分离出1 株产酶能力较强的纤维素降解菌,其与荧光假单胞菌16S rDNA 核苷酸同源率达到99% 以上^[16]。李平等将筛选的5 株细菌构建1 组高效纤维素降解菌系,经

表 2 DGGE 条带 16s rDNA 序列相似性分析

条带号	最相近菌种	GenBank 登录号	序列相似性(%)
1	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI-5482	NC_015844.1	97
2	<i>Solitalea canadensis</i>	NC_017770.1	97
3	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1	NC_007492.2	99
4	Uncultured <i>Bacterium</i>	AM500845.1	97
5	Uncultured <i>Bacterium tbr1</i> -10	AF280825.1	97
6	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1	NC_007492.2	99
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	NC_002516.2	100
8	<i>Clostridium</i> sp. AP81	AB273730.1	97
9	<i>Clostridium cellulolyticum</i> H10	CP001348.1	98
10	Uncultured <i>Clostridium</i> sp. Clone 3-2	AY883101	96
11	Uncultured <i>Clostridium</i> sp. Clone C05-72	GQ265318	93
12	Uncultured <i>Bacterium</i> clone Niitsu 14-30	AB187811	95
13	Uncultured <i>Bacterium</i> RSb40	AJ289215	98

16S rDNA 序列测定分析有 1 株是铜绿假单胞菌^[17]。条带 8 与 *Clostridium* sp. AP81 序列相似性为 97%，条带 9 与 *Clostridium cellulolyticum* H10 同源率为 98%，均始终清晰。种玉婷等筛选的木质纤维素降解复合菌系 LZF-12 优势菌也有条带 8 和条带 9^[8]。由此可知，菌系 1 由多种具有降解纤维素能力的细菌组成，协同促进水稻秸秆的降解。

条带 10(Uncultured *Clostridium* sp. Clone 3-2)、条带 12(Uncultured *Bacterium* clone Niitsu 14-30)和条带 13(Uncultured *Bacterium* RSb40)在驯化进程中始终存在，其中条带 10 在水稻秸秆驯化 33 代明显变深成为优势菌，推测在水稻秸秆降解过程中具有一定的作用，但目前尚无这几种不可培养细菌降解纤维素的报道，因此需要进一步的研究。

4 结论

本研究筛选的菌系 1 有较好的水稻秸秆降解能力，在水稻秸秆驯化前 25 代 CMC 酶活性、滤纸酶活性和秸秆失重率逐渐提高，25 代后由于菌系适应以水稻秸秆为碳源的培养条件而趋于稳定。

利用 PCR-DGGE 方法揭示该菌系优势菌群的变化动态，经水稻秸秆驯化，菌系微生物组成多样性减少，优势菌群由多种能够降解纤维素的细菌组成，为 *Bacteroides* sp.、*Clostridium* sp.、*Pseudomonas* sp. 和 Uncultured *Clostridium* sp. Clone 3-2。

参考文献：

[1]孙 彬,张 楠,崔昌龙,等. 黑龙江省作物秸秆综合利用现状、存在问题与发展建议[J]. 安徽农业科学,2015,43(6):238-239.

[2]徐 杰. 水稻秸秆降解放线菌的分离鉴定及其降解机理研究[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学,2010.

[3]青格尔,高聚林,于晓芳,等. 玉米秸秆低温高效降解复合菌系 GF-20 的菌种组成及降解稳定性研究[J]. 中国农业科学,2016,49(3):443-454.

[4]杜俊杰,徐凤花,赵忠宝,等. 低温兼性厌氧纤维素降解菌系的选

育[J]. 东北农业大学学报,2012,43(2):83-87.

[5]宋亚彬,戚桂娜,邓 伟,等. 中温木质纤维素降解复合菌系 BYND-8 的筛选及培养条件优化[J]. 黑龙江八一农垦大学学报,2008,20(6):62-67.

[6]吕 新,陈丽华,李玥仁. 4 种不同土壤微生物 DNA 提取方法对 DGGE 分析微生物群落的影响[J]. 福建农业学报,2012,27(4):367-372.

[7]王 琳,刘国生,王林嵩,等. DNS 法测定纤维素酶活力最适条件研究[J]. 河南师范大学学报(自然科学版),1998,26(3):66-69.

[8]种玉婷. 稻秆降解复合菌系的筛选及其发酵特性研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2011.

[9]蒋绍妍,王文星,薛向欣,等. 不同 16S rDNA 靶序列 PCR-DGGE 分析油页岩细菌多样性[J]. 东北大学学报(自然科学版),2014,35(7):1033-1038.

[10]刘菲菲,李 赤,刘勇勤,等. 香蕉植株内生细菌群落的 PCR-DGGE 分析[J]. 果树学报,2012,29(2):235-240.

[11]Watanabe K,Teramoto M,Futamata H,et al. Molecular detection, isolation, and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge[J]. Applied and Environmental Microbiology,1998,64(11):4396-4402.

[12]杨 冰. 水稻秸秆纤维素降解菌复合系 I-D 的筛选及其降解特性的研究[D]. 长沙:湖南农业大学,2013.

[13]刘甲锋,沈德龙,李 力,等. 复合菌系 RSS-4 传代对水稻秸秆腐解的影响[J]. 微生物学杂志,2010,30(4):30-35.

[14]朱 虹,宋仅星,樊美珍. 降解水稻秸秆兼抑制水稻纹枯病菌多功能复合菌系的构建[J]. 中国微生态学杂志,2011,23(10):865-876.

[15]Kim Y M,Yamamoto E,Kang M S,et al. *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 glycoside hydrolase family 66 homolog catalyzes dextranolytic and cyclization reactions[J]. The FEBS Journal,2012,279(17):3185-3191.

[16]尹 礎,夏乐先,柳建设,等. 一株纤维素降解菌株的分离鉴定及产酶特征研究[J]. 环境科学与技术,2009,32(3):50-53.

[17]李 平,王焰新,刘 琨,等. 高效纤维素降解菌系的构建[J]. 地球科学(中国地质大学学报),2009,34(3):533-538.