

不同植被土壤产淀粉酶放线菌的分离与筛选

李堆淑

(商洛学院 生物医药工程系, 陕西 商洛 726000)

摘要: 为了从土壤中获得产淀粉酶放线菌, 对陕西省洛南县 7 种植被下不同土层土壤中的产淀粉酶放线菌进行了分离纯化, 研究了化学抑制剂 $K_2Cr_2O_7$ 质量浓度和土壤稀释液浓度对放线菌分离效果的影响, 并通过菌落形态特征和生理生化指标对产淀粉酶放线菌进行了综合分析。结果表明, 当土壤稀释液为 $10^{-5} \sim 10^{-4}$ g/mL、 $K_2Cr_2O_7$ 质量浓度为 50 mg/L 时, 最有利于放线菌的分离; 同一植被下表层土壤(5~20 cm)中放线菌数量显著多于深层土壤(20~30 cm); 从 7 种不同植被下土样中共筛选出 10 株放线菌菌株, 其中有 8 株是产淀粉酶放线菌菌株, 从槐树下土壤中分离出的 M4 菌株对淀粉的水解能力最强, u_0 为 14.27, 并初步被判定为诺卡氏菌属放线菌; 8 株产淀粉酶放线菌均能利用葡萄糖进行糖酵解, 6 株能利用乳糖, 7 株不能利用蔗糖, 6 株不能利用麦芽糖, 仅 2 株能够产生色氨酸酶, 并且所有菌株均具有较强的耐碱性(pH 值 7.0~7.5), 6 株具有较强的耐盐性(10%), 6 株具有柠檬酸盐利用能力。

关键词: 土壤; 淀粉酶; 放线菌; 分离; 筛选

中图分类号: Q93-331 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2013)02-0152-05

Isolation and Screening of Amylase-producing Actinomycetes from the Soil under Different Vegetations

LI Dui-shu

(Biopharmaceutical Engineering Department, Shangluo University, Shangluo 726000, China)

Abstract: To obtain amylaseproducing actinomycetes from soil, amylaseproducing actinomycetes were isolated and purified from different soil layers under seven vegetations in Luonan county of Shanxi province. The effects of chemical inhibitor $K_2Cr_2O_7$ concentration and soil diluted concentration on the isolation of actinomycetes were studied, and a comprehensive analysis of amylaseproducing actinomycetes was done with the morphological characteristics and physiological and biochemical index. The results showed that the effective concentration of soil diluent was $10^{-5} - 10^{-4}$ g/mL, and the effective concentration of $K_2Cr_2O_7$ was 50 mg/L for isolating actinomycetes; the amount of actinomycetes in the surface soil (5—20 cm) was more than those in deep soil (20—30 cm) under the same vegetation; a total of 10 actinomycete strains were isolated from the soil under seven different vegetations, eight of them were amylaseproducing actinomycetes, the strain M4 exhibited the strongest ability of starch hydrolysis ($u_0 = 14.27$), which was isolated from the soil under locust tree, and was preliminarily identified as *Nocardia* spp.. Eight amylaseproducing actinomycetes strains all involved in glycolytic pathway, all of them could ferment glucose, six strains of them could ferment lactose, seven strains of them could not ferment sucrose, and six strains of them could not ferment maltose; two strains of them could produce tryptophanase; eight stains all showed the strong alkali resistance (pH 7.0—7.5); six strains of

收稿日期: 2012-07-12

基金项目: 陕西省教育厅 2010 年科学研究计划项目(2010JK522); 陕西省商洛市 2010 年科学研究计划项目(SK12010-10); 商洛学院科研基金项目(12SKY-FWDF015)

作者简介: 李堆淑(1977-), 女, 宁夏隆德人, 讲师, 硕士, 主要从事植物病理学及微生物学研究。E-mail: lds1202@163.com

them had good salt tolerance(10%), and six strains of them could make good use of citrate as a carbon source.

Key words: soil; amylase; actinomycete; isolation; screening

淀粉酶是能够催化淀粉分子水解转化成低聚糖的一类酶的总称,淀粉酶对淀粉的分解作用是生物体利用淀粉进行新陈代谢的初级反应,也是工业上利用淀粉的依据^[1-2]。淀粉酶种类繁多,特点各异,广泛应用于造纸、果汁和食品加工、印染、发酵、医药、工业副产品、青贮饲料、洗涤剂及废料的处理、微生态制剂等多种领域,是目前国内外应用最广、产量最大的酶种之一^[3-5]。淀粉酶的巨大潜力使其在当今社会中的需求量日益提高,因此,获得高产量、高活性的淀粉酶显得至关重要。目前关于产淀粉酶细菌的研究较多^[6],但是关于产淀粉酶放线菌的研究比较少^[6-9]。在国内,只有刘雪珠等^[6]对海洋来源产淀粉酶放线菌进行了分离鉴定、诱变选育及培养条件的优化。阿不都克里木等^[7]研究了新疆鄯善沙漠产淀粉酶放线菌的生长特性。在国外,Chakraborty等^[8]对海洋链霉菌属产淀粉酶进行了分离和鉴定,Oyeleke等^[9]分离了木薯废弃物中的产淀粉酶放线菌。鉴于此,本研究从陕西省洛南县不同植被下采集土样,筛选出产淀粉酶放线菌菌株,并对其形态特征、生理生化特性进行鉴定,以期为扩大产淀粉酶菌株来源提供可能性,为开发新菌株用于淀粉酶工业提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品 2012年4—5月在陕西省洛南县采集槐树、三叶草、油菜、小麦、菠菜、马铃薯、玉米7种植被类型下的土样(土层深度为5~20 cm和20~30 cm)共14份,风干后备用。

1.1.2 培养基 放线菌培养基为改良的高氏一号琼脂培养基: KH_2PO_4 1.0 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, K_2HPO_4 0.5 g, 淀粉 20.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, 琼脂 18.0 g, NaCl 0.5 g, 加蒸馏水定容至1 L; 淀粉降解菌培养基: 蛋白胨 10.0 g, 牛肉膏 3.0 g, NaCl 5.0 g, 可溶性淀粉 20.0 g, 琼脂 20.0 g, 加蒸馏水定容至1 L, 调 pH 值为 7.4。

1.2 方法

1.2.1 分离纯化放线菌 称取5 g土样,倒入含15~20个已灭菌小玻璃珠的150 mL三角瓶中,加入99 mL无菌水,震荡5~10 min,使土壤样品充分打散,即得 10^{-2} 土壤稀释液,静置5 min,用1 mL无菌注射器吸取 10^{-2} 土壤稀释液1 mL移入装有

9 mL无菌水的试管中,吹吸3次,让菌液混合均匀,即得 10^{-3} 土壤稀释液,以此类推,最后稀释获得 10^{-5} 土壤稀释液。用无菌注射器分别吸取1 mL 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 土壤稀释液接种于高氏一号培养基表面,用涂布器涂布均匀。为了抑制细菌和真菌生长,分别向上述培养基中各加入25、50、75 mg/L的化学抑制剂 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 溶液0.1 mL,然后将培养皿倒置放入恒温培养箱中(28~30 °C),培养至长出单菌落(5~7 d)。

1.2.2 筛选放线菌 取出长有单菌落的放线菌培养平板,挑选表面质地致密、丝绒状或有皱褶、干燥、不透明、覆有不同颜色干粉的单菌落进行编号,并挑取少许菌苔涂片,做结晶紫染色^[10],以便于进行放线菌的判定。将判定为放线菌的单菌落用三点法接种于淀粉降解菌培养基2~3皿,并进行标记,然后将接种培养基倒置,28~30 °C,培养5~7 d。

1.2.3 筛选淀粉降解菌 采用淀粉水解试验筛选淀粉降解菌。取1皿上述淀粉降解菌培养基,向其中喷洒稀碘液,如果菌苔周围出现无色透明圈,说明淀粉已被水解,该菌为阳性。根据菌苔周围出现的无色透明圈的大小,可初步判断该菌水解淀粉能力的强弱。根据公式 $u_0 = (D/d)^2$ 计算菌株水解淀粉能力,从而定量比较菌株水解淀粉能力的大小,其中, D 为透明圈直径(mm), d 为菌落直径(mm)。由于菌落本身形态各异,三点法接种不均匀等原因,有些成熟的菌落及其周围形成的透明圈不是很规则的圆形,为减少误差,水解能力计算公式中的直径采用平均直径。平均直径=(横向直径+纵向直径)/2。根据记录从剩余2皿中挑取对应的有明显透明圈的单菌落,转接,经平板划线法得到纯种,然后接种于斜面培养基中,长出单菌落后,于4 °C保存。

1.2.4 产淀粉酶放线菌的生理生化特性测定 参照文献^[10]的方法对产淀粉酶放线菌进行革兰氏染色以鉴定其是否为阳性,进行吡啶试验以确定其是否可以产生色氨酸酶,比较它们的甲基红试验、乙酰甲基甲醇试验结果以判断其是否存在糖酵解途径,采用蔗糖、麦芽糖、乳糖和葡萄糖鉴定其能够发酵的糖种类。另外,将产淀粉酶放线菌分别接种在10% NaCl 、pH值7.0~7.5、柠檬酸盐为唯一碳源的高氏一号培养基上,观察其生长情况,以鉴定其耐盐性、耐碱性和利用柠檬酸钠为碳源的能力。

2 结果与分析

2.1 放线菌的分离

对涂有 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 土壤(土层深度为 5~20 cm)稀释液的培养平板进行细菌、真菌、放线菌菌落数目的统计,结果如表 1 所示。土壤稀释液为 $10^{-4} \sim 10^{-5}$ 时均有利于细菌、真菌、放线菌的观察,在放线菌分离培养基中加入 50 mg/L $K_2Cr_2O_7$ 溶液对杂菌的抑制效果最佳,可以有效抑制细菌和

真菌的数量,而且不会影响放线菌的种类和数量。从槐树、三叶草、油菜、菠菜、小麦、马铃薯、玉米 7 种植被下的土样中分离出放线菌的菌落数量为:槐树下土样中的放线菌最多,油菜和三叶草下土样中的放线菌较多,菠菜、小麦、马铃薯和玉米下土样中的放线菌极少,其中马铃薯和玉米下土样中放线菌极少的原因有可能是 4—5 月采集土样时马铃薯和玉米生长较小,不适合放线菌的生长发育,对此还需要进一步的深入研究。

表 1 $K_2Cr_2O_7$ 对不同植被土壤中放线菌分离的影响

个/皿

$K_2Cr_2O_7$ 质量浓度/(mg/L)	植被	10 ⁻³ 土壤稀释液			10 ⁻⁴ 土壤稀释液			10 ⁻⁵ 土壤稀释液		
		细菌	真菌	放线菌	细菌	真菌	放线菌	细菌	真菌	放线菌
25	A	30	1	>300	10	0	>300	2	0	>300
	B	53	1	82	39	1	71	7	1	40
	C	49	2	248	25	1	230	7	9	0
	D	51	1	10	28	2	6	2	0	4
	E	25	1	13	13	2	4	6	1	1
	F	28	1	7	20	1	5	10	2	3
	G	20	1	5	16	1	3	16	1	1
50	A	5	1	>300	1	0	>300	0	0	>300
	B	4	0	200	4	0	180	2	0	170
	C	6	0	223	5	0	239	2	1	38
	D	5	0	15	3	1	2	5	0	2
	E	7	1	12	4	1	0	6	1	1
	F	4	0	8	3	0	6	5	0	5
	G	3	1	10	1	1	8	4	0	1
75	A	11	2	>300	2	0	>300	0	1	>300
	B	43	1	64	38	0	32	4	0	103
	C	29	0	47	26	1	46	2	0	3
	D	12	0	1	5	1	0	7	0	0
	E	8	1	1	6	1	0	9	1	0
	F	13	1	4	7	1	1	9	0	2
	G	9	1	2	5	0	0	5	1	1

注:A. 槐树;B. 三叶草;C. 油菜;D. 菠菜;E. 小麦;F. 马铃薯;G. 玉米

2.2 同一植被下不同土层中放线菌的数量

对含有 50 mg/L $K_2Cr_2O_7$ 溶液并涂有 10^{-4} 土壤稀释液(土层深度为 5~20 cm 和 20~30 cm)的培养平板进行细菌、真菌、放线菌菌落数目的统计,结果如表 2 所示。同一植被下不同土层中放线菌的数量不同,3 种植被下 5~20 cm 土层中放线菌的数量均显著多于 20~30 cm 土层,不同植被下同一土层中放线菌的数量差异均不显著。其中,槐树下不同土层中放线

菌数量相差最大,其 5~20 cm 土层中放线菌菌落数量是 20~30 cm 土层的 6 倍多;相差最小的是油菜下土壤,其 5~20 cm 土层中放线菌菌落数量是 20~30 cm 土层的 3.4 倍;三叶草下土壤,其 5~20 cm 土层中放线菌菌落数量是 20~30 cm 土层的 3.6 倍。土壤深度的差异造成土壤中放线菌数量的差异,这是不同深度土壤有机质含量、透气性、pH 值、温度和湿度等多种因素共同作用的结果。

表 2 同一植被下不同土层放线菌菌落的数量

槐树		三叶草		油菜	
土层深度/cm	放线菌数量/(个/皿)	土层深度/cm	放线菌数量/(个/皿)	土层深度/cm	放线菌数量/(个/皿)
5~20	>300*	5~20	180*	5~20	239*
20~30	45	20~30	50	20~30	70

注: *表示在 0.05 水平上差异显著,下同。

2.3 放线菌菌株的菌落形态特征

由表 3 可以看出,在不同植被下土样中,根据放线菌菌落的大小、颜色、形状、高度及边缘特征,并结

合结晶紫染色结果,共得到 10 株放线菌菌株。其中,从槐树下土样中分离出 4 株放线菌菌株、三叶草下土样中分离出 3 株、油菜下土样中分离出 2 株、菠

菜下土样中分离出1株。

2.4 淀粉降解菌的筛选

对分离得到的10株放线菌菌株进行淀粉水解试验,获得8株可以水解淀粉的产淀粉酶放线菌菌株,其水解能力 u_0 值均大于3(表4)。由表4可以

看出,M4和M6菌株的水解能力较强,其 u_0 值分别为14.27和12.38,显著高于其他菌株。经观察发现,M4菌株菌落因基内菌丝伸入培养基中而与培养基紧密连在一起,不易挑取,并且平滑、发亮呈水渍状,被初步确定为诺卡氏菌属放线菌。

表3 放线菌菌株的菌落形态特征

菌株编号	颜色	大小	形状	高度	边缘	菌株来源
M1	灰白色	大	卵圆	突起	不整齐	槐树
M2	灰白色(中心有褐斑)	大	卵圆	突起	不整齐	槐树
M3	灰白色	小	圆	突起	整齐	槐树
M4	灰白色	小	圆	平滑	整齐	槐树
M5	白色	中	圆	突起(有明显的小颗粒)	整齐	三叶草
M6	灰白色	小	圆	突起	不整齐	三叶草
M7	白色	中	圆	突起	整齐	三叶草
M8	灰白色(中心是粉红色)	大	椭圆	突起	整齐	油菜
M9	灰白色	大	卵圆	扁平	不整齐	油菜
M10	乳白色(边缘是淡黄色)	小	圆	突起	整齐	菠菜

表4 放线菌对淀粉的降解能力

菌株	透明圈直径(D)/ mm	菌落直径(d)/ mm	水解能力(u_0)
M1	23.9	12.8	3.49
M2	23.3	11.7	3.96
M3	11.8	5.0	5.57
M4	20.4	5.4	14.27*
M5	22.7	8.8	6.66
M6	19.7	5.6	12.38*
M7	20.9	7.9	7.01
M8	23.9	12.4	3.72

2.5 产淀粉酶放线菌的生理生化特性

由表5可见,8株产淀粉酶放线菌菌株的生理生化特性为:均为革兰氏阳性菌,这在一定程度上再次证明此8株放线菌菌株均为阳性;仅2株菌株能够产生色氨酸酶;均能分解葡萄糖进行糖酵解,但代谢产物不尽相同,6株菌株能利用乳糖、7株不能利用蔗糖、6株不能利用麦芽糖;在pH值为7.0~7.5时均生长良好;6株菌株具有较强的耐盐(10%)能力;6株菌株可以很好地利用柠檬酸盐。

表5 产淀粉酶放线菌的生理生化特性

菌株	革兰氏染色	吡啶试验	甲基红试验	乙酰甲基甲醇试验	乳糖	葡萄糖	蔗糖	麦芽糖	耐盐(10%)	pH 7.0~7.5	柠檬酸盐利用
M1	阳性	阳性	阳性	阴性	阳性	阳性	阴性	阴性	良好	良好	良好
M2	阳性	阳性	阳性	阴性	阳性	阳性	阴性	阴性	良好	良好	良好
M3	阳性	阴性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	较差	良好	良好
M4	阳性	阳性	阳性	阴性	阳性	阳性	阴性	阴性	良好	良好	良好
M5	阳性	阳性	阳性	阴性	阳性	阳性	阴性	阴性	较差	良好	较差
M6	阳性	阳性	阳性	阴性	阳性	阳性	阴性	阴性	良好	良好	良好
M7	阳性	阴性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	良好	良好	较差
M8	阳性	阳性	阳性	阴性	阳性	阳性	阳性	阳性	良好	良好	良好

3 结论与讨论

土壤中微生物种类繁多,且数量庞大,要有效地从土壤中分离出活性较好的产淀粉酶放线菌,需要在培养基中添加适量有效的杂菌抑制剂,抑制土壤中的细菌和真菌,而不影响放线菌的生长,以确保放线菌有足够的营养和生长空间。郑雅楠等^[11]研究认为,培养基中加入150 mg/L $K_2Cr_2O_7$ 时抑制杂菌的效果最佳,并有利于放线菌的生长;司美茹

等^[12]研究认为,75 mg/L $K_2Cr_2O_7$ 能使土壤中的细菌数量大大减少,本研究结果以50 mg/L $K_2Cr_2O_7$ 最佳, $K_2Cr_2O_7$ 的最佳抑制浓度不同,可能是由于地区不同而造成不同植被下的杂菌也不同造成的,具体原因还需要进一步的探讨。

为了有效地分离出产淀粉酶放线菌,采集土样时要考虑季节、周围植被、土壤有机质含量、土壤酸碱度以及土壤含水量等因素。本试验在4—5月采取槐树、三叶草、油菜、小麦、菠菜、马铃薯、玉米7种

植被下的 0~25 cm 土样,发现槐树下土样中放线菌最多,三叶草和油菜下土样中放线菌较多,其他 4 种植被下土样中放线菌极少。石红霄等^[13]研究发现,青藏高原藏嵩草草甸和沼泽草甸下 0~25 cm 土层中的微生物数量大于其他植被类型,这与本研究结果基本一致。

本研究发现同一植被下不同土层中放线菌的数量不同,5~20 cm 土层中放线菌数量显著多于 20~30 cm 土层,这说明土壤质地对放线菌数量影响较大。据研究表明,养分含量高、有机质丰富的土壤更有利于放线菌的生长,而土壤质地会直接影响土壤养分、pH 值和含水量状况^[14],从而影响放线菌数量。李为等^[15]研究发现,不同土壤深度的土样中,放线菌数量随深度的增加而减小。赵艳云等^[16]研究山东省无棣县贝壳堤地区芦苇、大穗结缕草、二色补血草、砂引草、碱蓬 5 种植被下的土壤微生物发现,所有植被中微生物数量均随着土层深度的增加而呈逐渐下降的趋势。然而,阎德仁等^[17]认为,在养分状况好的表层土壤中,微生物数量反而较低。本研究结果与李为等^[15]、赵艳云等^[16]的研究结果基本一致,与阎德仁等^[17]的研究结果相反。

本研究从 7 种不同植被下土样中筛选出 10 株放线菌,其中有 8 株放线菌能够产生淀粉酶,从槐树下土壤中分离出的 M4 菌株对淀粉的水解能力最强,为 14.27。8 株产淀粉酶放线菌均为革兰氏阳性菌;其中仅 2 株菌株能够产生色氨酸酶;8 株产淀粉酶放线菌均能分解葡萄糖进行糖酵解,但最终代谢产物不尽相同,多数菌株能利用乳糖,不能利用蔗糖和麦芽糖;在 pH 值为 7.0~7.5 时均生长良好;6 株菌株具有较强的耐盐(10%)能力;6 株菌株可以很好地利用柠檬酸盐。

参考文献:

- [1] 王俊英,孔显良. α -淀粉酶、糖化酶在食品工业中的应用的现状和展望[J]. 微生物学通报,1995(3):140-141.
- [2] 韩萍,魏云林. α -淀粉酶低温适应性分子机制的研究进展[J]. 微生物学杂志,2006,26(4):77-81.
- [3] 金志雄,毛达勇,张珍,等. 产 α -淀粉酶菌株液体培养发酵条件的探讨[J]. 环境科学与技术,2006,29(2):32-34.
- [4] 徐良玉,石贵阳,陶飞,等. 快速筛选耐酸性 α -淀粉酶生产菌株的平板透明圈法[J]. 无锡轻工大学学报,2003,22(5):91-94.
- [5] Konsoula Z, Liakopoulou-Kyriakides M. Thermostable α -amylase production by *Bacillus subtilis* entrapped in calcium alginate gel capsules[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39(4):690-696.
- [6] 刘雪珠,杨小盼,王健鑫,等. 海洋来源产淀粉酶放线菌的分离鉴定、诱变选育及培养条件优化[J]. 浙江大学学报:理学版,2010,37(6):680-685.
- [7] 阿不都克里木·热依木,古丽米热·热孜. 新疆鄯善产淀粉酶沙漠放线菌的生长特性研究[J]. 新疆师范大学学报:自然科学版,2007,26(2):77-79.
- [8] Chakraborty S, Khopadea A, Kokare C, et al. Isolation and characterization of novel α -amylase from marine *Streptomyces* sp. D1[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2009, 58(2):17-23.
- [9] Oyeleke S B, Oduwole A A. Production of amylase by bacteria isolated from a cassava waste dumpsite in Minna, Niger State, Nigeria [J]. African Journal of Microbiology Research, 2009, 3(4):143-146.
- [10] 黄秀梨,辛明秀. 微生物学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社,2007.
- [11] 郑雅楠,杨宇,吕国忠,等. 土壤放线菌分离方法研究[J]. 安徽农业科学,2006,34(6):1167-1168,1170.
- [12] 司美茹,薛泉宏,来航线. 放线菌分离培养基筛选及杂菌抑制方法研究[J]. 微生物学通报,2004,31(2):61-65.
- [13] 石红霄,于建龙. 青藏高原不同植被类型土壤微生物数量及影响因子[J]. 土壤通报,2012,43(1):47-51.
- [14] 杨丹玲. 横断山北部高山区土壤放线菌的初步研究[D]. 成都:四川农业大学,2007.
- [15] 李为,余龙江,袁道先,等. 西南岩溶生态系统土壤微生物的初步研究[J]. 生态学杂志,2004,23(2):136-140.
- [16] 赵艳云,胡相明,刘京涛. 贝壳堤地区微生物分布特征及其与植被分布的关系[J]. 水土保持通报,2012(2):271-274.
- [17] 阎德仁,王晶莹,杨茂仁. 落叶松人工林土壤衰退趋势[J]. 生态学杂志,1997,16(2):62-66.