

文章编号:1671-6833(2010)01-0074-04

秸秆降解菌的筛选及菌种组合

郭夏丽, 杨小丽, 李顺义, 王 岩

(郑州大学 化学工程学院, 河南 郑州 450001)

摘 要: 秸秆直接还田会给作物生长带来不利影响, 在还田过程中补加纤维素降解菌剂是解决其不利影响的有效方法。通过平板初筛及酶活综合测定及秸秆降解率测定复筛, 从腐烂秸秆、牛粪堆肥、森林土等样品中筛选到5株高效纤维素降解菌, 其中X1菌的酶活最佳, 酶系组成最合理, 其Cx, Cb, Cl和FPA分别达到53.6 U/mL、69.7 U/mL、9.5 U/mL和11.6 U/mL, 对秸秆的降解率达40.2%。进一步进行菌种组合, 得到了一组秸秆降解率有明显增加的复合菌X1+X2, 其降解率达到45.5%。根据X1和X2的菌落及个体形态特征, 初步判定其均为青霉菌。

关键词: 秸秆还田; 纤维素降解; 筛选; 菌种组合

中图分类号: S19 **文献标识码:** A

0 引言

秸秆还田是我国实施“沃土工程”, 不断提高耕地质量, 实现农业可持续发展的重要措施, 也是解决秸秆焚烧问题的有效方法, 但简单的直接粉碎还田, 秸秆会同作物争水争肥, 给农业生产带来不利影响^[1]。在还田过程中添加纤维素降解菌是解决这一问题的有效方法。

秸秆主要组分包括纤维素、半纤维素和木质素, 其中纤维素是制约秸秆降解的重要因素。纤维素的降解是内切型葡聚糖酶(Cx酶)、外切型葡聚糖酶(Cl酶)和 β -葡萄糖苷酶(Cb酶)等协同作用的结果^[2]。以往的研究一般只侧重其中部分酶活性的测定, 难以全面了解菌种的降解酶系, 往往存在酶组分比例不协调等问题^[3]。笔者尝试以多种纤维素酶活性作为菌种的筛选指标, 以期得到酶活性较高, 酶组分比例协调的菌种, 对高效纤维素降解菌的筛选方法做了进一步探索。进一步利用菌种之间的协同作用, 将筛选到的菌种进行组合, 以得到纤维素降解能力更强的菌种组合。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

菜园土、森林土、稻田土、朽木、腐烂秸秆和牛粪堆肥。

1.2 培养基

富集培养基: K_2HPO_4 2.0 g, $(NH_4)_2SO_4$ 1.4 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 g, $CaCl_2$ 0.3 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 5.0 mg, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 1.6 mg, $ZnSO_4$ 1.7 mg, $CoCl_2$ 2.0 mg, 秸秆粉 2%, 蒸馏水 1 000 mL。

刚果红纤维素鉴别培养基: $(NH_4)_2SO_4$ 2.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, KH_2PO_4 1.0 g, NaCl 0.5 g, CMC-Na 20.0 g, 刚果红 0.2 g, 琼脂 20.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, 自然 pH 值。

液体产酶培养基: 秸秆粉与麸皮质量比按4:1混匀, 取2 g加入250 mL三角瓶中, 每瓶再加入100 mL Mandels 营养液, 自然 pH 值。

Mandels 营养液: $(NH_4)_2SO_4$ 1.4 g, KH_2PO_4 2.0 g, 尿素 0.3 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 g, $CaCl_2$ 0.3 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 7.5 mg, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 2.5 mg, $ZnSO_4$ 2.0 mg, $CoCl_2$ 3.0 mg, 水 1 000 mL。

固体产酶培养基: 秸秆粉与麸皮质量比按4:1混匀, 每克固体加入3 mL营养液, 自然 pH 值, 每个250 mL三角瓶装入20 g培养基, 自然 pH 值。

秸秆降解率测定培养基: 新鲜玉米秸秆晾干劈开成四瓣, 剪成1 cm见方的块, 称取4 g加入150 mL的三角瓶, 每瓶再加入12 mL的营养液, 混合均匀, 自然 pH 值。

营养液的配制: $(NH_4)_2SO_4$ 20.0 g, 尿素 3.0 g, 蛋白胨 3.0 g, $CaCl_2$ 0.1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

收稿日期: 2009-09-20; 修订日期: 2009-11-08

基金项目: 河南省科技攻关项目 (0624060001)

作者简介: 郭夏丽 (1966-), 女, 河南新乡人, 副教授, 博士。主要从事环境生物研究, E-mail: guoxl@zzu.edu.cn。

5.0 g, KH_2PO_4 1.0 g, NaCl 0.1 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 50 mg, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 16 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 14 mg, CoCl_2 20 mg, 水 1 000 mL, 自然 pH 值。

1.3 方法

1.3.1 菌种富集

称取菌种来源样品 5 g, 加入以秸秆为唯一碳源的 100 mL 富集培养基中, 28 ℃ 恒温震荡培养 7 d, 吸取 5 mL 培养液转入新的富集培养基, 富集 3 代。

1.3.2 菌种初筛

取富集 3 代的培养液适当稀释, 在刚果红鉴别固体培养基上分离纯化菌种, 斜面保存。

1.3.3 菌种复筛

液体产酶试验: 将初筛菌种分别接入液体产酶培养基, 30 ℃ 振荡培养 4 d, 过滤酶液, 测定酶活。

固体产酶试验: 将初筛的菌种分别接入固体产酶培养基, 30 ℃ 静置培养 5 d 后, 每瓶加 50 mL 蒸馏水摇匀后静止 2 h, 测定酶活。

1.3.4 酶活性测定

采用 DNS 还原糖法测定各纤维素酶活性。纤维素酶活性定义: 1 mL 酶液于 50 ℃, pH 为 4.8 的条件下, 每分钟水解底物产生 1 μg 还原糖(以葡萄糖计)的酶量定义为 1 个酶活力单位。

FPA 活力单位的测定: 取两支 25 mL 刻度的试管, 各加 0.2 mL 酶液, 再加 pH 为 4.8 的醋酸缓冲液 1.8 mL。测定管加入 1 cm \times 6 cm 滤纸条, 充分浸泡置 50 ℃ 恒温水浴 60 min, 空白管同时置 50 \pm 0.5 ℃ 恒温水浴 60 min。然后分别加入 DNS 显色液 2 mL, 空白管同时加 1 cm \times 6 cm 滤纸条。沸水浴 10 min, 冷却后加水至 15 mL, 以空白管调零点, 在 550 nm 测 OD 值。

Cx 活力单位的测定: 取两支 25 mL 刻度的试管, 各加 0.2 mL 酶液。测定管加 1.8 mL CMC(质量分数 1%), 空白管只加 pH 为 4.8 的醋酸缓冲液 1.8 mL。然后置 50 \pm 0.5 ℃ 恒温水浴 60 min。然后分别加入 DNS 显色液 2 mL。放沸水浴锅反应 10 min, 冷却后加水至 15 mL, 以空白管调零点, 在 550 nm 测 OD 值。

C1 酶测定则只用把 FPA 酶活测定中的滤纸条换成 50 mg 的脱脂棉, Cb 酶测定需把 CMC 酶活测定中的 CMC(质量分数 1%) 换成水杨素(质量分数 1%)

$$\text{纤维素酶活力} = \frac{(ax + b) \times n \times 1\,000}{0.2t} \text{ U/mL}$$

式中: x 为样品 OD 值的平均值; a 和 b 为由葡萄

糖浓度和相应的 OD 值通过回归方程求得; n 为酶液的稀释倍数; t 为酶促反应的时间; 0.2 为所加酶液的量。

1.3.5 秸秆降解率测定

将菌种接种于秸秆降解率测定培养基, 28 ℃ 静止培养 10 d, 定期摇匀。将降解过的秸秆用蒸馏水冲洗, 除去菌体, 将残留物过滤, 105 ℃ 烘干后称重, 以不接菌的为对照, 失重法计算秸秆降解率。

1.3.6 菌种形态观察

菌落形态观察: 平板划线接种, 30 ℃ 培养, 观察菌落边缘、表面质地及颜色等形态特征。载片培养观察孢子和菌丝形态: 按文献[4]中的方法对所筛选菌种进行显微观察。

2 结果与讨论

2.1 菌种初筛结果

将来自于堆肥、森林土、菜园土、腐烂秸秆等处的样品在以秸秆为唯一碳源的培养基中进行 3 代富集, 再经过刚果红鉴别培养基筛选, 共筛到真菌 32 株, 细菌 12 株, 放线菌 4 株, 将菌种斜面保存。

2.2 菌种复筛

纤维素的降解是多酶体系作用的结果, 多酶体系包括 Cx 酶, C1 酶和 Cb 酶等 3 种主要成分。滤纸是聚合度中等的纤维素材料, 其酶活力代表了总纤维素酶活力。为此笔者选择测定 Cx、C1、Cb、FPA 四种酶活力大小, 作为菌种的复筛依据。

菌种分别接入液体和固体产酶培养基, 培养 5 d 后酶活测定结果如表 1 所示。通过固液两种发酵方式进行酶活测定, 筛选得到了 5 株酶系组成各异的真菌。由试验结果可以看出, 菌 X1 的酶系组成最为合理, 各种酶活性都较高, 可以对其进行进一步研究。

表 1 菌种发酵酶活力测定结果

Tab. 1 Result of enzyme activity assay of liquid and solid fermentation U \cdot mL⁻¹

菌种 编号	FPA		Cx		Cb		C1	
	液态	固态	液态	固态	液态	固态	液态	固态
X1	9.7	11.6	41.2	53.6	22.5	69.7	6.4	9.5
X2	15.6	9.9	37.4	33.5	14.3	66.3	7.4	4.2
X3	5.3	8.9	35.2	35.4	25.6	69.9	6.0	3.7
X4	11.9	6.6	20.1	30.9	58.7	70.1	4.2	3.8
X5	18.9	9.8	22.0	42.0	21.0	55.7	3.1	6.9

对比液态发酵和固态发酵的试验结果, 发现同一菌株, 液态发酵的 FPA 远高于固态发酵, 而

固态发酵的 Cx 酶活和 Cb 酶活则高于液态发酵。推测在液体培养中 Cx、C1 和 Cb 分散性好,能够较好地协同作用,由此 FPA 活性高。在固体培养中,Cx 和 Cb 酶活高,可能是由于相应底物浓度高促成的。

在本试验中,所筛的纤维素酶活较高的菌种全部为真菌。细菌和放线菌虽然在刚果红培养基上有明显的脱色作用,但是所测定的酶活性都不高。放线菌虽然也产生纤维素酶,但是其酶活往往不高,细菌的纤维素酶主要是葡聚糖内切酶,对大多数结晶纤维素酶没有作用,且产生的酶多为胞内酶或吸附在细胞壁上,很少分泌到细胞外^[5],而真菌产生的酶多为胞外酶,产酶效率高,酶系组成也较为合理,所以酶活测定较高。

2.3 秸秆降解率测定结果

将单菌种及其组合菌接入秸秆降解率测定培养基,静止培养 10 d,秸秆降解率测定结果如图 1 所示。

由试验结果可知,5 株单菌的秸秆降解率都在 35.00% 以上。观察降解后的秸秆,茎髓降解较多,而外表皮降解的较少,主要是因为外表皮是由致密的表皮细胞构成^[6],且表皮中的木质素含量最高^[7],木质化严重,微生物分泌的酶很难充分接触到纤维素分子,造成了降解困难。

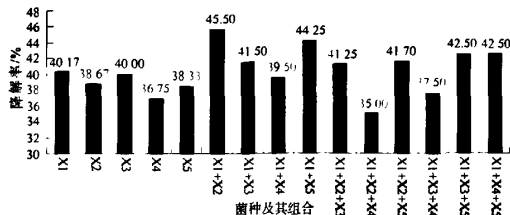


图 1 秸秆降解率测定结果

Fig. 1 Result of straw degradation efficiency

在所有单株菌中,X1 对秸秆的降解率最高,这主要是因为它的各个纤维素酶活性都比较高,酶组成比较合理。纤维素降解是多酶体系共同作用的结果,由于较少的微生物能合成组分健全的纤维素酶系,因此不同的微生物之间需要协同作用才能完全降解纤维素,由此复合菌的性能往往优于单一菌种。鉴于 X1 的优良性能,将其作为主导菌,与其他菌种进行复合。

由图 1 可知,X1 + X2 的组合效果最好,降解率达到 45.50%,与 X1 相比提高了 13.26%,X1 + X5 次之,降解率达 44.25%。两菌组合中,X1 + X4 的降解率甚至略有下降,可能是 X4 号菌对其

它菌有抑制作用。从图中的结果还可以看出,三菌种的组合效果不够好,降解率提高比较少,甚至还有大幅的下降,可能是因为菌种越多,其中的竞争性抑制就会越大,对降解造成了不利影响。

2.4 菌种形态观察结果

形态学特征是菌种鉴定的重要依据,根据菌落及菌丝和孢子的特征,可以对菌种做简单的鉴定。将菌种接种在 PDA 平板上,观察菌落特征。并采用周德庆推荐的方法对所筛选菌种进行显微观察,该方法使真菌只在载玻片和盖玻片之间的狭小空间内生长,菌丝和孢子分散度好,可以在不破坏菌体生长的情况下对孢子和菌丝进行连续观察,查阅真菌鉴定手册^[8],对菌种做了初步的鉴定。结果如图 2、3 所示。

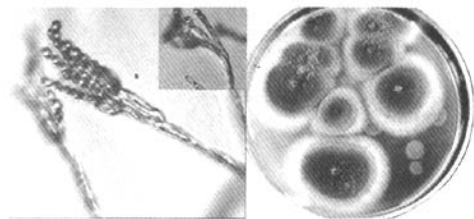


图 2 X1 形态观察结果(400 倍)

Fig. 2 The observation of X1

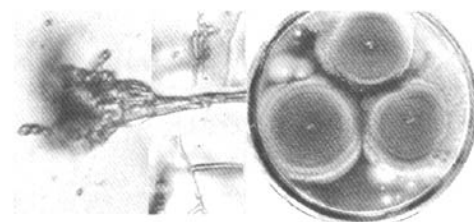


图 3 X2 形态观察结果(400 倍)

Fig. 3 The observation of X2

由图 2、3 可知,X1、X2 菌落及显微观察均相似,菌落均为绿色,形状都为圆形,毡状,外围有白色菌丝生长带,颜色略有差异,X1 颜色为暗绿色,X2 为灰绿色。二者显微观察均有明显的青霉菌状特征,有单层小梗,孢子圆形,链状排列,菌丝有隔。根据以上特征,两株菌可初步判断为青霉菌。

3 结论

本试验通过对菌种多种纤维素酶活性测定,筛选得到了 5 株酶活较高且酶系组成比较合理的菌种。其中 X1 菌的酶活性最好,酶系组成也较合理,其对秸秆降解率在所有菌种最高,达到 40.17%,说明了纤维素的降解是多酶体系协同作

用的结果,以多种酶指标进行纤维素降解菌的筛选是一种更为有效的筛选方法.进一步将 X1 与其它菌种组合复合,得到了一组降解性能有大幅提高的组合菌 X1 + X2,其对秸秆的降解率达到了45.50%,与 X1 相比提高了 13.26%.部分组合菌的降解率有所下降,说明部分菌种之间存在抑制作用,菌种组合并非都有利于秸秆降解率的提高.

参考文献:

- [1] 李少昆,王克如,冯聚凯,等.玉米秸秆还田与不同耕作方式下影响小麦出苗的因素[J].作物学报,2006(3): 463-465.
- [2] 刘树立,王华,王春艳,等.纤维素酶分子结构及作用机理的研究进展[J].食品科技,2007(7): 12-15.
- [3] 郭德宪,曹健,鲍宇茹.利用生物技术降解纤维素的研究进展[J].郑州工程学院学报,2001,22(3): 82-86.
- [4] 徐士菊,强义国,周德庆.一种简便的微生物载片培养法[J].生物学教学,1980(1): 40-41.
- [5] 陈洪章.纤维素生物技术[M].北京:化学工业出版社,2005: 37-40.
- [6] 陈洪章.秸秆资源生态高值化理论与应用[M].北京:化学工业出版社,2006: 33.
- [7] 闫贵龙,曹春梅,鲁琳,等.玉米秸秆不同部位主要化学成分和活体外消化率比较[J].中国农业大学学报,2006(03): 70-74.
- [8] 魏景超.真菌分类鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979.

The Screening of Straw - decomposing Microorganism and Strain Combination

GUO Xia - li, YANG Xiao - li, LI Shun - yi, WANG Yan

(Shool of Chemical Engineering and Energy, Zhengzhou University. Zhengzhou 450001, China)

Abstract: Straw returning to farmland directly has negative effects on seed germination and crop growth. Adding high - efficient cellulose - decomposing bacteria is an effective method to resolve this problem. Five strains with different cellulase composition were isolated from rotten straw, cow dung compost, and paddy soil. One of the five strains which named X1 had the maximum cellulase activity and the optimal cellulase composition. In this study the Cx, Cb, C1 and FPA of X1 were 53.6 U/mL, 69.7 U/mL, 9.5 U/mL and 11.6 U/mL, and the straw degradation efficiency was up to 40.20%. The degradation efficiency of the combination of strains X1 and X2 was up to 45.50%, which higher than the others combination strains. According to the morphological characteristics of X1 and X2, it was deduced that they were *Penicillium*.

Key words: straw returning to farmland; cellulose degradation; screening; strain combination