

高效降解玉米和水稻秸秆菌株配伍研究

辛银川¹, 张一折¹, 周小龙¹, 任玉霞¹, 张亚捷², 杨琦¹, 陈继峰^{1*}

(1. 郑州大学 生物工程系, 河南 郑州 450001; 2. 河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453000)

摘要: 为了解决大田秸秆直接降解困难以及市售菌剂田间直接降解秸秆效果不理想的问题, 从森林土壤、农田土壤、腐烂秸秆中通过平板筛选和酶活性测定(羧甲基纤维素钠和滤纸酶活性测定)得到多株能高效降解纤维素的菌株, 并且通过正交试验得到一组(含有菌株 51、R19、P11、104、R18)协同作用能力强的产纤维素酶霉菌组合。用玉米秸秆和水稻秸秆作为材料, 利用这个组合复配一些细菌、酵母菌对其进行降解试验。30 d 后, 秸秆明显失重、体积变小、颜色变黑, 有酱色液体渗出。通过测定, 玉米秸秆和水稻秸秆的失重率分别达到 59% 和 52%, 明显优于市售菌剂(37%, 20%)。并对评价菌株产酶能力的方法进行了讨论。

关键词: 秸秆降解; 纤维素酶; 菌株筛选; 菌株配伍

中图分类号: Q503 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2011)08-0125-05

Screening of Effective Microorganisms and Their Combination for Degrading the Straw of Maize and Rice

XIN Yin-chuan¹, ZHANG Yi-zhe¹, ZHOU Xiao-long¹, REN Yu-xia¹
ZHANG Ya-jie², YANG Qi¹, CHEN Ji-feng^{1*}

(1. Bioengineering Department, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;
2. College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453000, China)

Abstract: The strains of microorganisms with high cellulase activity from the soil of forest and farm, rotten stalks were screened by the method of plate-selection for solving the problem of straw degradation without high efficiency in field with recent commercial product. Two kinds of cellulase detection methods (sodium carboxymethylcellulose and filter paper) were used to determine cellulase activity. A combination of microorganisms including the strains of 51, R19, 75, 610 and R18 was screened with high cellulase activity, which could work together with other microorganisms to degrade the straw of maize and rice more efficiently than a commercial product in 30 days. The weight of the straw became lighter with smaller size, and the color became black, also some sausage-color liquid oozed. The weight decreasing rate was 59% for maize straw and 52% for rice straw, much higher than the commercial product (37% and 20%, respectively). The methods for evaluating cellulase activity of strains were also discussed in the paper.

Key words: Straw degradation; Cellulose; Screening screening; Strain combination

秸秆是地球上最丰富的生物资源之一, 但由于自然状态下难以降解等因素导致利用率过低。中国作为一个农业大国, 年产各类秸秆达到 6 亿 ~ 7 亿 t^[1], 每年产出的秸秆相当于 300 多万 t 氮肥,

收稿日期: 2011-03-07
作者简介: 辛银川(1985-), 男, 河南焦作人, 在读硕士研究生, 研究方向: 应用微生物学及微生物生物技术。
E-mail: xyczhen@163.com
*通讯作者: 陈继峰(1967-), 女, 河南南阳人, 副教授, 博士, 主要从事生物技术的教学与科研工作。
E-mail: chenjifeng@zzu.edu.cn

700 多万 t 钾肥, 70 多万 t 磷肥, 相当于我国每年化肥用量的 $1/4^{[2]}$ 。其中 45%~47% 作为燃料补充农村能源的不足, 15% 以烧荒形式烧掉, 只有很少一部分过腹还田或直接还田^[3]。焚烧秸秆不仅浪费了资源, 而且严重污染环境, 破坏土壤生态平衡。研究表明, 秸秆还田可改善土壤团粒结构, 提高保水透气能力, 提高地温, 增加土壤有机质含量, 防止土壤板结, 促进增产增收^[2,4]。同时, 在农村劳动力大量涌向城市的今天, 还可以节省劳动力, 减少资源浪费和保护环境, 具有重要的现实意义和经济价值。所以, 秸秆还田有利于农业可持续发展。但是, 将秸秆大量直接还田, 腐解期长, 会引起作物与秸秆腐烂过程中的自然存在的微生物争水争肥, 对作物生长不利。玉米秆直接还田时秸秆中的玉米螟还会在未腐熟的玉米秸秆中过冬, 给来年的种植埋下隐患^[5]。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。纤维素的降解需要纤维素酶的作用, 纤维素降解酶按照其催化功能可分为三大类: 外切- β -1, 4-葡聚糖酶 (exo- β -1, 4-glucanases), 又称为纤维二糖水解酶 (Cellobiohydrolases), 简称为外切酶 (CBH); 内切- β -1, 4-葡聚糖酶 (endo- β -1, 4-glucanases), 简称为内切酶 (EG); β -葡萄糖苷酶 (β -1, 4-glucosidases)^[6]。把天然木质纤维素底物降解为葡萄糖等单糖, 必须在几类纤维素酶系组分的共同作用下才能完成^[6]。所以, 单一菌株难以达到理想的降解效果。鉴此, 从不同的基质中筛选出数株高效产纤维素酶的菌株, 配合其他微生物菌株, 制成生物菌剂, 研究其降解秸秆的能力, 以便达到对玉米、稻草秸秆快速、高效降解的目的。

1 材料和方法

1.1 材料

菌株和秸秆来源: 菌株为从森林土壤、农田土壤、腐烂秸秆等材料中筛选出的能降解秸秆的多种菌株; 玉米、水稻秸秆来自大田, 并于通风干燥处保存完好。

所使用的培养基及主要试剂的配方如下。

富集培养基: KH_2PO_4 1.0 g, NaCl 0.1 g, NaNO_3 2.5 g, MgSO_4 0.3 g, FeCl_3 0.01 g, CaCl_2 0.1 g, 去离子水 1 L, 粉碎后的定量滤纸 2%, pH 7.0 左右。

筛选培养基: CMC-Na 10 g, KH_2PO_4 1.0 g, NaCl 0.1 g, NaNO_3 2.5 g, MgSO_4 0.3 g, FeCl_3 0.01 g, CaCl_2 0.1 g, 琼脂 18 g, 去离子水 1 L, pH

7.0 左右。

分离保存培养基: PDA 培养基, 去皮马铃薯 200 g, 蔗糖 20 g, 去离子水 1 L, 自然 pH。

发酵产酶培养基^[7]: CMC-Na 10 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 g, KH_2PO_4 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, 蛋白胨 10 g, 牛肉膏 5 g, 去离子水 1 L。

刚果红染液: 刚果红 1 g, 去离子水 1 L。

脱色液: NaCl 15 g, 去离子水 1 L。

市售菌剂: 为国内有一定影响的微生物催腐剂, 来自成都合成生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 富集和筛选 将所收集的土壤或秸秆样品 5 g, 加入到 45 mL 含有玻璃珠的无菌水中, 配成 10% 的土壤悬液。取 5 mL 土壤悬液, 接种于 95 mL 富集培养基中, 28℃ 振荡培养。待菌长出后, 取 5 mL 菌液接入同样的培养基中 28℃ 培养。同样的方法传代 3 次。

将富集的纤维素降解菌菌液倍比稀释成不同浓度, 取 0.2 mL 涂布于富集培养基平板上, 30℃ 保湿培养, 挑选生长旺盛的菌株用无菌牙签接种至筛选培养基平板上, 每个平板点接 1 株, 30℃ 恒温培养 3 d。然后将平板用刚果红染液染色 5 min, 用脱色液洗脱 2 遍。挑选透明圈直径与菌落直径比值大的菌株以及生长较旺盛的菌株划线分离纯化, 挑取单菌落保存至 PDA 试管斜面。

1.2.2 菌株拮抗试验 各个菌株两两之间做拮抗试验, 将 2 种菌株在富集培养基平板上平行划线, 两条线间距离 1.5 cm, 30℃ 恒温培养 3 d, 如果相邻两条线上的菌株生长在一起, 说明这 2 种菌不拮抗, 如果相邻两条线上的菌株分开生长, 中间有明显的间隔, 说明这 2 种菌拮抗。对无拮抗作用的菌株进行混合培养, 有拮抗作用的菌株根据平板培养生长情况取舍。

1.2.3 酶活性测定 酶活性单位定义为每分钟水解底物产生 $1\mu\text{mol}$ 还原糖所需的酶量为一个酶活性单位。羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 酶活性测定和滤纸酶活性 (FPA) 测定方法如下。

CMC-Na 酶活性测定: 参照魏晓星^[8]的方法, 培养液经离心后取上清 0.1 mL, 分别加入 1% CMC-Na 0.4 mL 作为底物, 50℃ 反应 30 min 后加入 3, 5-二硝基水杨酸溶液 (DNS) 0.5 mL, 混匀, 沸水浴加热 5 min, 用水冷却, 每管加入 4 mL 蒸馏水稀释, 在 540 nm 下比色。

滤纸酶活性 (FPA) 测定: 参照赵玉萍等^[9]的方法, 培养液经离心后取上清 1 mL, 预热到 50℃, 加入

1 条 1cm×6cm 新华滤纸 (50±1)mg, 50℃保温 1h。取出,沸水浴灭活 5min,冷却至室温,用 3mL DNS 试剂显色后稀释 3 倍,540nm 测 OD 值。

1.2.4 正交试验 利用所筛选出的无拮抗及酶活性较大的菌株,设计正交试验。将菌株视为因素,存在与不存在视为水平,组建一个 11 因素 2 水平的正交表。将正交表中的各配伍的菌株混合发酵,并用 CMC-Na 和 FPA 法测定酶活性,以比较各配伍菌株的产酶能力。对酶活性高的组合进行复配,再进行秸秆降解试验。

1.2.5 秸秆降解试验 将菌液按 10%(质量百分比)的接种量加入秸秆中,另加 0.5%尿素。常温降解 30d,每隔 10d 观察 1 次秸秆颜色变化、腐烂程度,30d 后检测秸秆失重率。平行试验 3 次。将所购买菌剂设为阳性对照,按说明书施用;同时设置空白对照,即加入相同量的无菌水。

秸秆失重率的测定方法:把发酵前与发酵结束后的秸秆用流水冲洗干净,105℃烘干后称质量,并计算失重率。

2 结果与分析

2.1 降解菌株初筛结果

在筛选培养基上,用刚果红染色筛选得到 10 株霉菌,2 株放线菌(表 1)。其中菌株 J4、51、XJ42、R19、P11、J13、75、104、YQ3、R18 为霉菌,菌株 103 和 610 为放线菌。

表 1 各菌株的菌落及透明圈大小			
菌株	菌落直径(d)/ cm	透明圈直径(D)/ cm	D/d
J4	0.10	0.75	7.50
51	0.62	2.50	4.03
103	0.30	1.00	3.33
XJ42	0.35	1.10	3.10
R19	0.55	1.60	2.91
P11	0.60	1.50	2.50
J13	0.80	1.92	2.39
75	0.33	0.69	2.12
104	0.63	1.23	1.95
610	0.39	0.75	1.92
YQ3	0.61	1.09	1.79
R18	6.20	6.50	1.05

从表 1 中可知,透明圈直径(D)在 1.50cm 以上的菌株从大到小依次为 R18、51、J13、R19、P11;所形成透明圈直径与菌落直径比值(D/d)在 2.50 以上的菌落从大到小依次为 J4、51、103、XJ42、R19、P11。透明圈大小或者透明圈与菌落比值大小可以

作为产酶能力筛选的初步标准,较大者可视为有较强的产酶能力,但需要进一步试验,再以 CMC-Na、FPA 法测定酶活性大小,进而确定产酶能力大小。

2.2 拮抗试验结果

通过拮抗试验发现,YQ3 与 610 之间形成明显的透明带,存在拮抗作用,其他菌株之间无拮抗作用。从平板初筛结果看,菌株 610 的 D/d 大于菌株 YQ3(表 1),在平板上生长较快,液体发酵培养也显示其生长迅速。因此舍去 YQ3,保留菌株 610 进行酶活性测定。

2.3 酶活性测定结果

用 CMC-Na、FPA 测定酶活性,结果显示(表 2),菌株 51、104、J13、P11 用 CMC-Na 法测定酶活性都在 3U/mL 以上。其中,菌株 51 的 CMC-Na 酶活性最高,达到 4.90U/mL。这几株菌相对应滤纸酶活性除 P11 以外,都超过了 1.00U/mL。说明 CMC-Na 酶活性较高的菌株大多数滤纸酶活性也比较高。

表 2 各菌株酶活性测定结果			U/mL
菌株	CMC-Na 酶活性	滤纸酶活性	
J4	0.77	0.37	
51	4.90	1.06	
103	0.90	0.53	
R19	2.95	0.88	
XJ42	2.02	0.84	
P11	3.21	0.42	
J13	3.97	1.08	
75	2.88	1.30	
104	4.69	1.78	
610	2.64	0.42	
R18	2.08	0.43	

2.4 正交试验结果

各菌株配伍情况及混合发酵后酶活性测定结果见表 3。从表 3 可以看出,配伍 7,即菌株 51、R19、P11、104、R18 共同发酵显示出了较强的协同产酶能力,酶活性测定结果显示,CMC-Na 酶活性为 6.01U/mL,滤纸酶活性为 2.07U/mL,均高于单菌株发酵产酶的最高值(表 2,CMC-Na 法测定单菌株酶活性最高(4.90U/mL),滤纸法测定单菌株酶活性最高(1.78U/mL)。但大多数配伍显示了参与组合菌株的平均效果。菌株配伍中涉及到对于营养物质和空间的竞争,相互间互不拮抗的菌株未必能够协同生长,相互促进。以配伍 7 为研究对象,进行下一步秸秆降解试验。

表 3 秸秆降解菌株配伍正交试验结果

配伍 编号	J4	51	103	XJ42	R19	P11	J13	75	104	610	R18	CMC-Na 酶 活性/(U/mL)	滤纸酶活 性/(U/mL)
1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	4.01	1.35
2	●	●	●	●	●							2.72	1.34
3	●	●				●	●	●				2.70	0.54
4	●		●			●			●	●		1.14	1.37
5	●			●			●		●		●	1.04	0.76
6	●				●			●		●	●	1.01	0.85
7		●			●	●			●		●	6.01	2.07
8		●		●				●	●	●		2.78	0.28
9		●	●				●			●	●	1.18	1.59
10				●	●	●	●			●		2.58	0.72
11			●		●		●	●	●			3.85	0.88
12			●	●		●		●			●	1.00	0.62

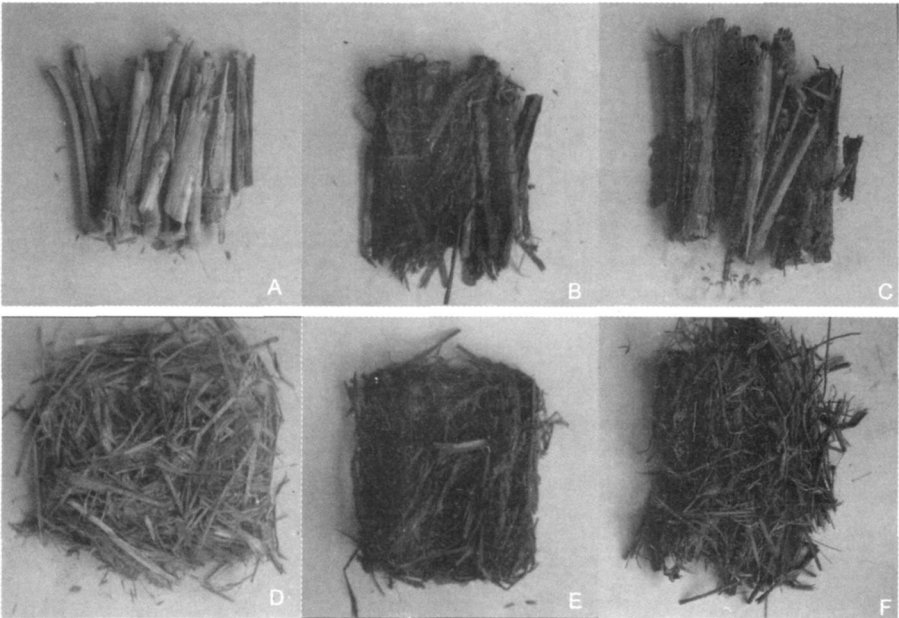
注：“●”表示对应菌株存在，无此符号表示菌株不存在

2.5 配伍菌株秸秆降解试验结果

利用表 3 中的菌株配伍 7 复配几种酵母菌、细菌等菌株(改良配伍 7)对玉米、水稻秸秆分别进行了降解试验。通过 30 d 的降解，秸秆明显失重，玉米秸秆失重达到 59%，水稻秸秆失重达到 52%(表 4)，同时秸秆颜色变为深黑色，腐烂，程度明显优于

市售菌剂(图 1)。

表 4 玉米、水稻秸秆失重率 %		
处理	玉米秸秆	水稻秸秆
空白	7	6
改良配伍 7	59	52
市售菌剂	37	20



A、B、C 分别为玉米秸秆空白对照、改良配伍 7 和市售菌剂；
D、E、F 分别为水稻秸秆空白对照、改良配伍 7 和市售菌剂

图 1 配伍菌株对玉米和水稻秸秆的降解效果

从图 1 可以看出，通过腐解试验，改良配伍 7 表现良好的降解效果，空白对照经过 30 d 后外观上基本没有变化，减重很少。市售菌剂作用后秸秆颜色变深为黄褐色，体积变化不明显，玉米秸秆不易撕

烂，水稻秸秆可以撕烂。改良配伍 7 秸秆变为黑褐色，装秸秆的盒子底部残留酱色液体，秸秆非常易于撕烂，处于腐烂状态。

从表 4 和图 1 可以看出，改良配伍 7 对玉米秸秆

和水稻秸秆的失重率均超过了 50%, 降解 2 种秸秆的效果与空白对照差异明显, 并且明显优于市售菌剂。

3 讨论

在自然界中, 霉菌具有很强的降解纤维素、木质素等难降解生物质的能力, 在筛选所得的菌株中, 霉菌占主要地位, 这与大多数人的研究结果相符。

采用刚果红平板法进行纤维素降解菌的筛选具有很多优越性, 可以通过透明圈出现的时间得到开始产酶的时间, 通过透明圈的大小与菌落的比值可以初步判定菌株的产酶能力大小, 这种方法因为直观、易操作而被广泛使用。在使用这种方法的时候, 有些学者倾向于选取透明圈与菌落比值大的菌株^[10-11], 有些学者则单纯从透明圈较大的菌株中进行筛选^[12], 还有的综合考虑两方面的因素进行筛选。本试验参考两方面的因素对菌株进行了筛选。

透明圈的大小与酶活性大小有一定的相关性, 在平板上所形成透明圈较大的菌株, 酶活性测定往往也较高。虽然透明圈大小反映了酶浓度的高低, 但不能代表菌株产酶能力, 液体样品的酶浓度与透明圈的直径成直接关系显然不是绝对的, 仅以透明圈大小作为菌株产纤维素酶活性大小的唯一定量指标不可靠^[12]。R18 透明圈与菌落比值较小, 但其所形成的透明圈在众多菌株中最大, 在以 CMC-Na 为唯一碳源的平板上生长旺盛, 3~4 d 后, 菌丝布满整个平板, 但酶活性测定结果显示并不是最高的。这可能是因为培养时间、固体和液体培养条件的不同所造成的。在包衍等^[12]的研究中, 透明圈直径、CMC-Na 酶活性和滤纸酶活性在单个菌株上并没有绝对的相关性, 这与本研究的结果相符。在酶活性测定中, 通过 CMC-Na 主要测得的是微生物发酵产生内切葡聚糖酶的多少, 而滤纸是一种结晶度中等的材料, FPA 测定酶活性反映了多种酶协同作用降解纤维素的能力。试验结果反映出, 发酵产生较多外切酶的菌株未必能够产生较多的内切酶、糖苷酶等, 通过 FPA 的测定, 可以更准确的反映出菌株产酶和综合降解纤维素的能力。为了筛选到真正可以协同降解纤维素的菌株, 采取多种酶活性测定方法来进行菌株的筛选可以增强配伍间的酶活性多样性和互补性, 是很必要的。

本试验中的毛霉属 R18, 透明圈与菌落直径比值较小, 但是在以 CMC-Na 为唯一碳源的平板上生长旺盛, 显示了优良的降解纤维素的能力。分析可

能是菌株 R18 本身生长利用了纤维素降解产生的还原性小分子物质, 同时菌株的生长掩盖了透明圈; 或者通过非水解的方式对纤维素类物质进行利用。秸秆降解试验中, 通过观察, 前期 R18 大量快速繁殖也起到了很大的作用。这说明, 在利用刚果红平板进行纤维素降解菌的筛选时, 不仅要看透明圈与菌株直径的比值, 也要注意透明圈形成的时间以及菌株生长速度。本试验以 5 种不同的霉菌组合协同其他微生物降解秸秆, 取得了较好的效果。秸秆是一种复杂的生物材料, 构成秸秆的主要成分纤维素也需要多种酶系共同作用才能降解。在试验中要考虑到多种菌的协同作用, 本试验证明所得到的 5 株菌—即配伍 7(菌株 51、R19、P11、104、R18)协同作用时产酶明显高于单一菌种, 将其与其他微生物协同作用对玉米和水稻秸秆的降解具有很好的效果。

参考文献:

- [1] 刘文志. 作物秸秆还田的综合评价[J]. 现代化农业, 2008(2): 17-19.
- [2] 韩会雄. 农作物秸秆综合利用技术推广研究[J]. 湖南农机, 2009, 36(3): 22-24.
- [3] 史央. 秸秆降解的微生物学机理研究及应用进展[J]. 微生物学杂志, 2002, 22(1): 50-53.
- [4] Han W, He M. The application of exogenous cellulase to improve soil fertility and plant growth due to acceleration of straw decomposition[J]. Bioresource Technology, 2010, 101: 3724-3731.
- [5] 杨谦. 以木霉菌为主的微生物菌群在秸秆降解中的应用 02144797. 7[P]. 2004-06-30.
- [6] 方诩, 秦玉琪, 李雪芝, 等. 纤维素酶与木质纤维素生物降解转化的研究进展[J]. 生物工程学报, 2010, 26(7): 864-869.
- [7] 林远声. 降解纤维素的真菌分离、筛选及其酶活测定[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2004, 43(z1): 82-85.
- [8] 魏晓星. 葡萄穗霉(*Stachybotrys* sp.)的分离鉴定及其 β -葡萄糖苷酶的性质分析[D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
- [9] 赵玉萍, 杨娟. 四种纤维素酶酶活测定方法的比较[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(3): 116-118.
- [10] 朱玉玺. 纤维素优良降解菌的筛选分离及其特性研究[D]. 西安: 西安建筑科技大学, 2008.
- [11] 胡华. 高效纤维素降解菌株的筛选及其复合系菌剂在秸秆堆肥中的应用[D]. 雅安: 四川农业大学, 2008.
- [12] 包衍, 王晓辉, 张伟琼, 等. 纤维素分解菌的选育及酶活测定[J]. 生物学杂志, 2007, 24(2): 56-58.