

玉米秸秆降解菌群 CDS-10 筛选及其特性研究

唐 玉, 范欲航, 朱熙栋, 胡鸿姣, 李海云, 姚 拓

(甘肃农业大学 草业学院/草业生态系统教育部重点实验室/甘肃省草业工程实验室/中-美草地畜牧业可持续发展研究中心, 甘肃 兰州 730070)

摘要:为筛选出对玉米秸秆等农业固体废弃物能够快速降解的微生物菌群,从不同畜禽粪便和秸秆腐熟物中分离出 5 类初始菌群并相互组配,通过继代培养筛选出高效稳定的降解菌群 CDS-10,测定其不同培养代数的降解能力,酶活性和降解成分变化。结果表明:随着培养代数的增加,CDS-10 菌群的降解能力逐步增加并在第 30 代后趋于稳定,分解率为 63.09%;外切葡聚糖酶,内切葡聚糖酶,滤纸酶活性在第 30 代后趋于稳定,其中,外切葡聚糖酶活性显著升高,达到 11.63 U/mL;玉米秸秆中纤维素,半纤维素和木质素均有不同程度减少,半纤维素的降解率最高,达 92%。说明在适宜条件下,CDS-10 菌群对玉米秸秆具有稳定高效的分解能力,主要降解玉米秸秆成分中的半纤维素,且影响降解效果的酶主要是外切葡聚糖酶。

关键词:玉米秸秆;菌群;分解率;酶活性;秸秆成分

中图分类号:S513 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-5500(2020)01-0080-06

DOI: 10.13817/j.cnki.cyycp.2020.01.012

玉米是世界上广泛种植的三大粮食作物之一,同时也是畜牧业生产中不可或缺的青贮饲料来源之一,其种植面积仅次于小麦和水稻^[1]。据统计,我国在作物种植过程中每年产生的玉米秸秆超 2 亿 t^[2]。农作物秸秆是重要的生物质资源,秸秆中的纤维素、半纤维素、木质素等多种物质均可以为工农业提供原料^[3]。玉米秸秆还田不仅可使营养成分全部释放到农田,还可改善土壤的结构,通水透气性等,但是玉米秸秆还田自然分解周期长^[4],直接还田的降解速率慢,导致土壤肥力下降,影响下一茬作物的生长,进而影响农业生产。研究玉米秸秆降解,可以解决土壤生态环境恶化、农产品污染、植物病害严重等问题。

目前,主要采用高温、离子辐射、浓酸(碱)处理等物理或化学方法降解纤维素,但容易造成环境的二次污染。而利用生物方法即纤维素分解菌分解玉米秸秆,其具有增殖速度快、无污染、能耗低、适应性强等优点,既可以解决环境污染,又可作为肥料还田。利用微生物分泌的纤维素复合酶加快分解秸秆木质纤维素,释放养分,能有效增加土壤有机质含量、控制水土流失、调节生态环境。Lynd L R 等^[5]研究报道,受环境因素与所产纤维素降解酶的影响,单一微生物很难高效降解纤维素类物质,而多种纤维素降解菌混合培养后,其产酶具有多样性,在各种酶的相互协同作用下有利于提高纤维素类物质的转化率。如崔宗均等^[6]利用限制性培养技术和优化组合的方法,筛选驯化出一组高效而稳定的纤维素分解复合菌系 MC1,该复合菌系的能力远远高于纯培养的单个菌株,并能够有效分解经化学处理的木质纤维素材料^[6-7]。王德武等^[8]利用限制性培养基从不同材料(森林腐殖质、腐烂的玉米秸秆、牛场料槽旁土样、麦垛底部土样和牛鸡粪混合储粪池中土样)中筛选纤维素分解菌群,采用失重法测定菌群对不同纤维材料的分解能力及其在不同初始酸碱条

收稿日期:2019-08-24; **修回日期:**2019-12-05

基金项目:省级大学生创新创业训练计划项目(201810733014);校级科研训练计划项目(20180243)资助

作者简介:唐玉(1998-),女,四川成都人,本科生。

E-mail:1012753045@qq.com

姚拓为通讯作者。E-mail:yaotuo@gsau.edu.cn

件下的分解特性,用固体平板法对其菌株组成特性进行了初步探究,筛选的纤维素分解菌群能够高效分解纤维素,同时对秸秆类木质纤维材料也具有较强的分解能力。程玥晴等^[9]以小麦秸秆纤维素为主要原料,在纤维素分解过程中,通过继代转接,筛选和驯化了一组高效而稳定的纤维素高效腐解菌系 CMS-3,主要由隶属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)、梭菌属(*Clostridium*)和瘤胃杆菌属(*Ruminobacter*)^[10]的菌种组成。

以采集畜禽粪便和腐熟秸秆为筛选材料,通过继代培养筛选出对玉米秸秆具有高效降解作用的菌群,并对其不同培养代数的降解能力、酶活特性和降解产物变化情况进行研究,以期为其进一步研究推广应用提供理论依据与技术支持。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌群筛选材料 菌群筛选材料采自腐熟的畜禽粪便和玉米秸秆,每个样品采集 2 kg,装入无菌自封袋并进行标记,带回实验室以供降解菌群筛选。

1.1.2 供试材料 (1)玉米秸秆及预处理 收集 10 kg 废弃玉米秸秆粉碎成 3~5 cm 小段,将粉碎秸秆浸泡于 1.5% H_2SO_4 溶液中 24 h^[11],然后用清水冲洗至中性,置于 105℃ 烘箱中烘干备用。(2)滤纸及预处理 将滤纸(双圈牌)剪切成条状(2 cm×3 cm),置于 2.5% NaOH 溶液中浸泡 72 h^[12],然后用清水冲洗至中性,置于 105℃ 烘箱中烘干备用。

1.1.3 培养基 蛋白胨纤维素培养液(PCS)组成^[13-14]:蛋白胨 5.0 g,酵母膏 5.0 g,纤维素(滤纸或玉米秸秆)5.0 g,NaCl 5.0 g, K_2HPO_4 1.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.16 mg, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 mg, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.16 mg, $CoCl_2$ 0.2 mg,补加蒸馏水至 1 000 mL,调节 pH 为 7.0,121℃ 灭菌 25 min 备用。

1.2 优良菌群的筛选

从腐熟秸秆凋落物及牛粪中各取 10 g 样品^[15]于 90 mL 生理盐水中振荡 15 min,静置 10 min,取 10 mL 悬浊液接种于 150 mL 滤纸条培养基内培养^[16](试验设 3 个重复),命名为第 1 代,待培养 7 d 后,将原菌种按 5% 接种量接入新鲜培养基内,重复操作,依次命名为第 2、3、4、…、 n 代。如此反复继代培养至菌株活力较稳定、杂菌污染率低、分解效果较明显,改用秸秆纤维素培养基代替滤纸条培养基。当培养物继代 10 代以上,由于

微生物间的协同作用^[17-20],可将分解能力强的培养物相互混合组配,继续继代培养,筛选出分解能力强、pH 稳定的菌群 CDS-10,并进行保存和后续研究。

1.3 不同代数 CDS-10 降解能力的测定

在 100 mL PCS 培养液中,添加 5.0 g 玉米秸秆。灭菌后,每瓶培养基中各加入不同代数的菌液 2 mL,在 25℃,180 r/min 条件下培养 15 d^[21]。每个处理设置 6 个重复,15 d 后,将剩余玉米秸秆取出,烘干称重并计算其分解率。

1.4 不同代数 CDS-10 酶活性测定

1.4.1 粗酶液提取 将不同代数菌群 CDS-10 培养液 12 000 r/min 离心 10 min,上清液即为粗酶液。

1.4.2 内切葡聚糖酶活力测定 取 2 mL 羧甲基纤维素溶液于 25 mL 刻度试管中,加 0.1 mL 经适当稀释的粗酶液,混合均匀后于 50℃ 水浴 20 min。水浴结束后,在试管里加入 3 mL 的 DNS 试剂,沸水浴 10 min,定容后测定 $D_{520\text{ nm}}$,以每 1 min 产生 1 μmol 还原糖定义为 1 个酶活力单位(U)^[21-24]。

1.4.3 滤纸酶活力测定 取 0.5 mL 适当稀释的粗酶液,加 2 mL 醋酸缓冲液和 50 mg 滤纸于 25 mL 刻度试管中,50℃ 水浴 1 h,水浴结束后往试管里加入 3 mL 的 DNS 试剂,沸水浴 10 min,定容至 25 mL 后,测定 $D_{520\text{ nm}}$,以每 1 min 产生 1 μmol 还原糖定义为 1 个酶活力单位(U)。以在 100℃ 水浴灭活 5 min 的粗酶液为对照,其余步骤相同。酶活力均指扣除灭活酶液中还原糖后计算得到的结果^[21-24]。

1.4.4 外切型葡聚糖酶活力测定 把滤纸酶活力测定方法中的滤纸条换成 50 mg 脱脂棉,与上述方法相同^[21-24],计算酶活力:

$$\text{酶活} = [(ax + b) \times n \times 1000] / vt$$

式中: x 为样品 OD 值; a 和 b 为葡萄糖浓度和相应的 OD 值; n 为酶液稀释倍数; t 为酶促反应时间; v 表示所加的酶液量。

1.5 不同代数 CDS-10 降解玉米秸秆成分的测定

将装有样品的滤袋(滤袋与样品总重为 m_1)浸泡于洗涤剂中,采用 Van Soest^[25] 方法测定中性洗涤纤维(NDF)含量(%),酸性洗涤纤维(ADF)含量(%),木质素(ADL)含量(%),半纤维素含量(%),纤维素含量(%).

1.6 数据分析

采用 SPSS 22.0 进行单因素方差分析(one-way

ANOVA),并用 Excel 2010 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 不同代数 CDS-10 对玉米秸秆降解效果

随着培养代数的增加,玉米秸秆分解效果越来越明显(图 1)。CDS-10 菌系对玉米秸秆的分解能力在 30 代以后逐步上升最终趋于稳定,菌系 CDS-10 对玉米秸秆的分解效果显著,在第 50 代时玉米秸秆分解率达到 63.09%。

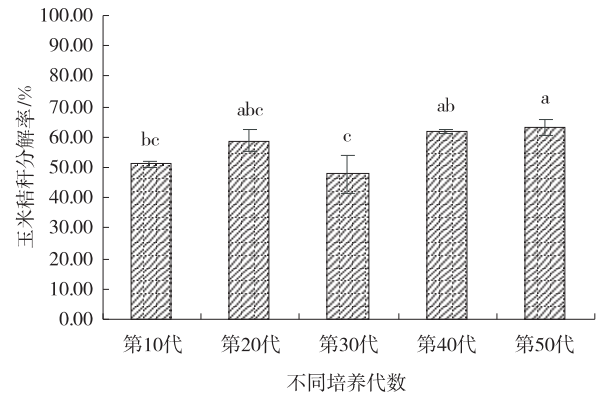


图 1 不同代数 CDS-10 对玉米秸秆分解变化

Fig. 1 Variation of maize straw decomposition by CDS-10 with different generations

2.2 不同代数 CDS-10 分解玉米秸秆过程中酶活力变化

不同代数 CDS-10 外切葡聚糖酶活性较 CK 组增加了 1~2 倍(图 2),随着培养代数的增加,外切葡聚糖酶活性变化较明显,但在 30 代后逐渐趋于稳定;内切葡聚糖酶活性(图 3)随着代数的增加整体变化也降低,但是 20 代至 50 代活性又缓慢上升呈现变化不大的趋势,在此期间其活性变化保持在 2 U/mL 以内;滤纸酶活力(图 4)变化不显著,自身较稳定,没有随着代数的增加有较明显的变化。

2.3 不同代数 CDS-10 分解玉米秸秆过程中成分变化

玉米秸秆中的主要成分纤维素、半纤维素和木质素的含量在 CK 基础上都有不同程度的减少,反映了 CDS-10 菌群的分解能力不同。在 CDS-10 菌群培养至第 30 代后对玉米秸秆各成分的分解率趋于稳定,且相较于未处理的空白(CK)组均有较大提高。其中,半纤维素分解效果显著,含量从 13.2%降低到了 1.0%,降解率为 92%。纤维素分解效果较显著,含量从 59.2%降至 14.0%,降解率为 76%。木质素分解效果

不显著,其含量从 4.5%降至 3.3%,降解率为 27% (图 5~7)。

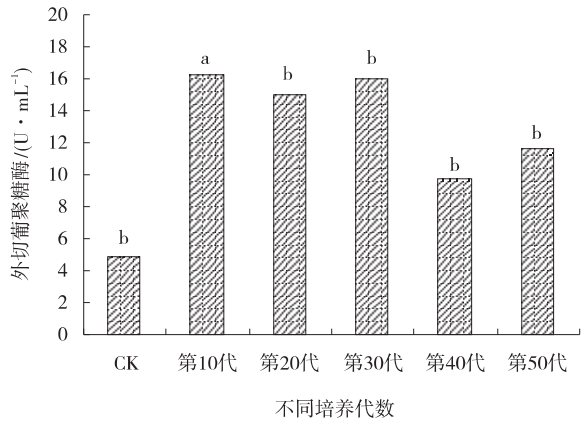


图 2 不同代数 CDS-10 分解玉米秸秆过程中外切葡聚糖酶活性变化

Fig. 2 Variation of glucanase activity during decomposition of maize straw by CDS-10 with different generations

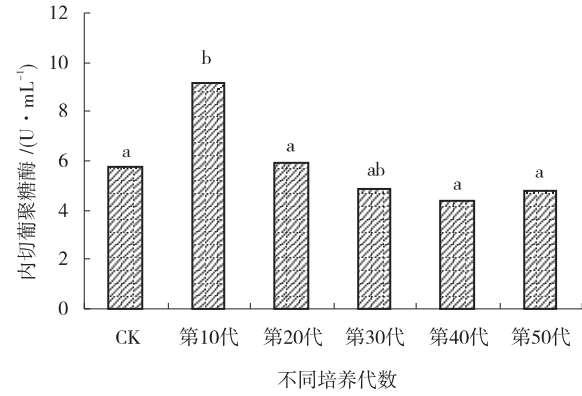


图 3 不同代数 CDS-10 分解玉米秸秆过程中内切葡聚糖酶活性变化

Fig. 3 Variation of endoglucanase activity during decomposition of maize straw by CDS-10 with different generations

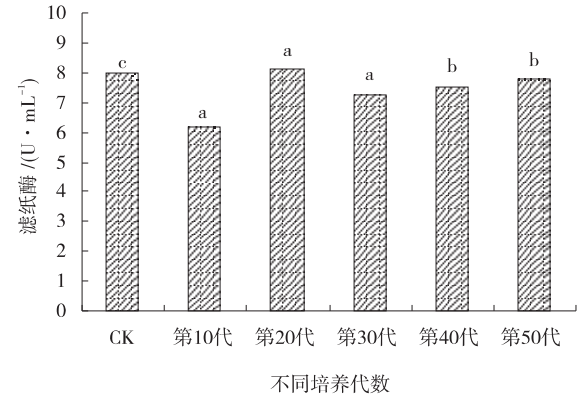


图 4 不同代数 CDS-10 分解玉米秸秆过程中滤纸酶活性变化

Fig. 4 Variation of enzyme activity in filter paper during decomposition of maize straw by CDS-10 with different generations

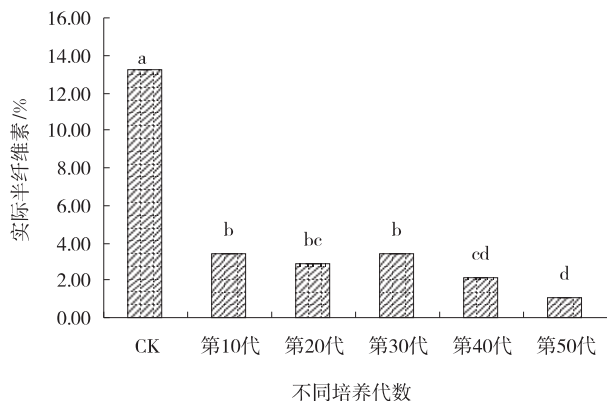


图 5 不同代数 CDS-10 分解玉米秸秆过程中半纤维素含量变化

Fig. 5 Variation of hemicellulose content during decomposition of maize straw by CDS-10 with different generations

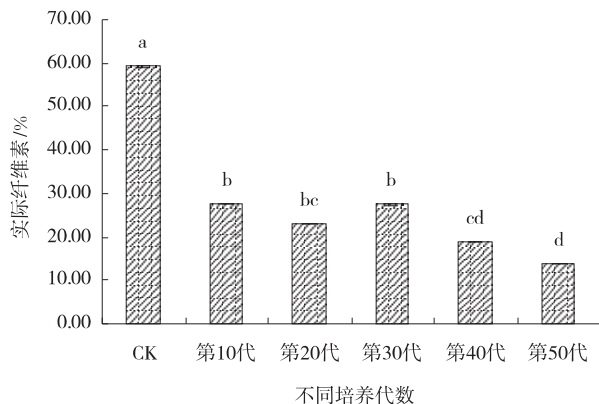


图 6 不同代数 CDS-10 分解玉米秸秆过程中纤维素含量变化

Fig. 6 Variation of cellulose content during decomposition of maize straw by CDS-10 with different generations

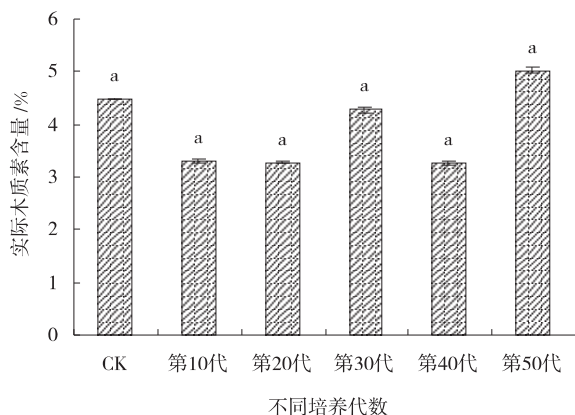


图 7 不同代数 CDS-10 分解玉米秸秆过程中木质素含量变化

Fig. 7 Variation of lignin content during decomposition of maize straw by CDS-10 with different generations

3 讨论

在农业生产中,能够被绿色有效运用的秸秆仅占产量的 30%,大多数秸秆采用焚烧、堆砌等方式处理,这样不仅浪费资源,还造成了生态环境污染。因此,用安全、低能耗和高效的方式处理秸秆成为研究热点。在秸秆还田过程中,加入纤维素降解菌可以促进玉米秸秆的降解速度,是解决秸秆还田问题的有效技术之一^[26]。基于上述科学问题,以畜禽粪便和腐熟秸秆为菌源材料,以玉米秸秆为碳源,通过继代培养筛选出高效纤维素降解菌群 CDS-10,并对其分解率、成分、酶活性进行了探究。

试验表明,纤维素分解菌系 CDS-10 培养 15 d 的秸秆分解率为 63.09%,高于王伟等^[27]筛选的 HLF4 和 YDL3 对玉米秸秆降解 15 d 的秸秆失重率为 49.33% 和 53.53%,也高于王加友等^[28]筛选的 SY-403 菌株对秸秆降解 20 d 的降解率 21.68%。菌系 CDS-10 对玉米秸秆中纤维素、半纤维素、木质素的降解率分别为 76%,92% 和 27%,半纤维素和纤维素的分解率较高,木质素分解率较低。而张立霞等^[29]筛选出一种降解纤维素和木质素能力强的菌株组合黄孢原毛平革菌+黑曲霉+青霉+木霉,其纤维素、半纤维素、木质素的降解率分别为 29.60%,12.02% 和 29.10%。其中纤维素、半纤维素的分解率大幅度低于试验菌群 CDS-10,说明研究筛选的菌群 CDS-10 对玉米秸秆有较强的分解能力。纤维素降解菌群 CDS-10 的外切葡聚糖酶活力较高,在继代培养的过程中,菌群 CDS-10 的酶活力趋于稳定,说明在培养过程中,在各种酶间的拮抗协调作用下,菌群 CDS-10 已经形成了一个稳定的复合菌群结构。由于天然秸秆中纤维素结构复杂、难以分解,纤维素在自然界中的降解是真菌,细菌和相应的微生物群落相互作用的结果^[30]。

研究筛选的复合菌群 CDS-10 具有较好的纤维素降解能力,对纤维素等有机肥料的降解利用具有指导意义,但是复合菌群 CDS-10 内的协同机制仍有待进一步研究探讨。在筛选过程中,对 CDS-10 菌群的培养条件并没进行探究,试验将对获得的菌群 CDS-10 发酵培养条件进行优化。

4 结论

研究筛选出一组高效稳定的玉米秸秆降解菌群 CDS-10,其分解能力在培养至第 30 代后趋于稳定。

培养 15 d 后,对玉米秸秆的分解率达 63.09%。玉米秸秆的纤维素,半纤维素和木质素含量分别下降 76%,92%和 27%;CDS-10 菌群的外切葡聚糖酶,内切葡聚糖酶和滤纸酶活力在培养至第 30 代后趋于稳定,外切葡聚糖酶活性最高。

参考文献:

- [1] 张丽娜,陈志,杨敏丽,等.我国玉米生产效率时空特征分析[J].农业机械学报,2018,49(1):183—193.
- [2] 李晓秀.玉米秸秆复合降解菌 ZFX-1 的构建及降解效果初探[D].哈尔滨:东北农业大学,2017.
- [3] 赵伟,陈雅君,王宏燕,等.不同秸秆还田方式对黑土土壤氮素和物理性状的影响[J].玉米科学,2012,20(6):98—102.
- [4] 刘建胜.我国秸秆资源分布及利用现状的分析[D].北京:中国农业大学,2005.
- [5] Lynd L R, Weimer P J, Van Z W H, *et al.* Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2002, 66(3): 506—577.
- [6] 崔宗均,李美丹,朴哲,等.一组高效稳定纤维素分解菌复合系 MC1 的筛选及功能[J].环境科学,2002,23(3):36—39.
- [7] Guo P, Wang X F, Zhu W B, *et al.* Degradation of corn stalk by the composite microbial system of MC1[J]. Journal of Environmental Sciences, 2008, 20(1): 109—144.
- [8] 王德武,姚拓,杨巧丽,等.高效稳定纤维素分解菌群筛选及其分解特性研究[J].草业学报,2014,23(2):253—259.
- [9] 程玥晴,聂铭,陈霞,等.纤维素高效分解复合菌系筛选及分解特性研究[J].南方农业,2018,12(34):28—31.
- [10] 蔡妙英,卢运玉,赵玉峰.细菌名称(第二版)[M].北京:科学出版社,1996.
- [11] Haruta S, Cui Z, Huang Z, *et al.* Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 59(4—5): 529—534.
- [12] 史玉英,沈其荣,姜无忌,等.纤维素分解菌群的分离和筛选[J].南京农业大学学报,1996,19(3):62—65.
- [13] Thakare U, Patil N, Malpathak N. Performance of chick pea under the influence of gibberellic acid and oxygenated peptone during germination [J]. Advances in Bioscience and Biotechnology, 2011, 2(1): 40—45.
- [14] 冯妍,裴宇航,周晓飞,等.纤维素降解菌的筛选与高效混合菌群的构建[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2012,40(4):155—160.
- [15] 潘虎,董俊德,卢向阳,等.高效纤维素降解菌群的构建及其生物多样性分析[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2012,38(2):139—145.
- [16] 周俊强,邱忠平,韩云平,等.纤维素降解菌的筛选及其产酶特性[J].环境工程学报,2010,4(3):705—708.
- [17] 冯玉杰,李冬梅,任南琪.混合菌群用于纤维素糖化和燃料酒精发酵的试验研究[J].太阳能学报,2007,28(4):375—379.
- [18] Kato S, Haruta S, Cui Z J, *et al.* Effective cellulose degradation by a mixed-culture system composed of a cellulolytic *Clostridium* and aerobic non-cellulolytic bacteria [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 51(1): 133—142.
- [19] 魏姣,万学端,吴润,等.产纤维素酶真菌菌株的分离筛选及产酶条件优化[J].甘肃农业大学学报,2016,51(6):8—15.
- [20] 李慧君,杜双田,孙婷,等.纤维素分解菌的筛选及玉米秸秆降解[J].西北农业学报,2010,19(8):74—79.
- [21] 廖祥兵,陈晓明,肖伟,等.DNS法定量测定还原糖的波长选择[J].中国农学通报,2017,33(15):144—149.
- [22] 芦光新,陈秀蓉,杨成德,等.一株纤维素分解菌的鉴定及对两种草坪草凋落物分解活性的研究[J].草业学报,2011,20(6):170—179.
- [23] Lungisa M, Brendan S W, Brett I P. Celluloses (CMCase) and poly-phenol oxidases from thermophiles *Bacillus* spp. isolated from compost[J]. Soil Biol Biochem, 2006, 38: 2963—2966.
- [24] 房兴堂,陈宏,赵雪锋.秸秆纤维素分解菌的酶活力测定[J].生物技术通讯,2007,18(4):628—630.
- [25] Van Soest P J, Robertson J B, Lewis B A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition [J]. Journal of Dairy Science, 1991, 74(5): 3583—3597.
- [26] 蒋小武,朱乐欣.纤维素分解菌应用研究进展[J].畜禽业,2011(4):28—31.
- [27] 王伟,郑大浩,杨超博,等.高效纤维素分解菌的分离及秸秆降解生物效应[J/OL].中国农业科技导报, DOI: 10.13304/j. nykjdb. 2018. 0670
- [28] 王加友,赵彭年,杨德玉,等.一株纤维素分解菌的筛选、鉴定及其对玉米秸秆的降解效果[J].生物技术进展, 2018, 8(2): 132—139.
- [29] 张立霞,李艳玲,屠焰,等.纤维素分解菌的筛选及其不同组合对秸秆降解的效果[J].饲料工业,2013,34(22):29—36
- [30] 蒋荣清,袁兴中,曾光明,等.一组高效木质素降解复合菌的筛选[J].应用与环境生物学报,2010,16(2):247—251.