

文章编号:1003-8701(2013)04-0088-03

秸秆纤维素降解菌的分离及筛选初探

迟 畅¹, 王 昱², 李 洋², 于旭波¹, 沙洪林^{1*}

(1. 吉林省农业科学院农业资源与环境研究所, 长春 130033;

2. 吉林省农业科学院农业经济与信息服务中心, 长春 130033)

摘 要:从常年堆放秸秆堆下面的土壤及腐烂的秸秆中筛选出 6 株降解纤维素能力较强的菌株, 并对这 6 株菌进行滤纸(FPA)酶活和羧甲基纤维素钠(CMC)酶活的测定。其中 X-3、X-4、X-5 菌的酶活最佳, X-3 的 FPA 和 CMC 酶活分别为 2.69 U/mL、33.28%; X-4 的 FPA 和 CMC 酶活分别为 24.70U/mL、60.55U/mL; X-5 的 FPA 和 CMC-Na 酶活分别为 9.06U/mL、44.91U/mL, 该 3 株菌株在 7 d 内对秸秆的降解率高达 39.35%、44.38%和 52.40%, 根据 X-3、X-4、X-5 的菌落及个体形态特征, 初步判定 X-3、X-5 为唐氏木霉。

关键词:秸秆; 纤维素降解; FPA 酶活; CMC 酶活

中图分类号: S182

文献标识码: A

A Preliminary Exploration of Isolation of Strain for Degrading Cellulose of Straw

CHI Chang¹, WANG Yu², LI Yang², YU Xu-bo¹, SHA Hong-lin^{1*}

(1. Institute of Agricultural Environment and Resources Research, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033; 2. Agricultural Economic and Information Service Center, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

Abstract: Six strains having good ability of degrading the cellulose were prepared by screening from soil and rotted straw, then, the PFA enzyme activity and CMC enzyme activity of the six strains were determined. The results showed that X-3, X-4, X-5 had the maximum activity, the FPA and CMC of X-3 were 2.69 U/ml and 33.28%, the FPA and CMC of X-4 were 24.70 U/ml and 60.55 U/ml, the FPA and CMC of X-5 were 9.06U/ml and 44.91U/ml. The degradation rate of the straw of X-3, X-4, X-5 in 7days were 39.35%, 44.38% and 52.40%. According to characters of colony and single bacteria, it was preliminary determined that X-3 and X-5 belong to *Trichoderma koningii*.

Keywords: Straw; Cellulose degradation; FPA enzyme activity; CMC enzyme activity

秸秆是农作物的主要副产品, 也是十分宝贵的生物资源。近年来, 随着我国农村经济的发展和水平的提高, 秸秆不再是农民能源消费的唯一选择, 大量秸秆被遗弃田间地头, 露天焚烧秸秆现象十分普遍。露天焚烧秸秆不仅污染环境, 还造成了大量的资源浪费, 已成为严重的社会和经济

问题。农作物秸秆中含有大量有机质、氮、磷、钾和微量元素, 是农业生产中重要的有机肥源之一。农作物秸秆主要由纤维素、半纤维素和木质素组成, 利用细菌、真菌和放线菌等微生物可有效将秸秆中可生物降解的有机物向稳定的腐殖质转化。要解决秸秆堆肥问题首先应解决纤维素降解问题。目前, 对秸秆降解的研究多集中在放线菌^[1-2], 对秸秆自身腐烂产生霉菌的降解情况了解却相对较少。本实验通过筛选得到了 3 株具有较高纤维素酶活, 并对秸秆有很好降解效果的霉菌 X-3、X-4、X-5。并对 3 个菌株对秸秆的降解效果做了初步探讨, 为进一步研究菌种之间的协同作用提高秸秆的降解率和堆肥菌剂提供了良好基础。

收稿日期: 2013-01-18

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(20106025); 国家科技支撑计划课题(2012BAD04B02)

作者简介: 迟 畅(1986-), 女, 硕士, 研究实习员, 主要从事农业微生物研究。

通讯作者: 沙洪林, 男, 研究员, 硕士,

E-mail: shahonglin@163.com

1 材料和方法

1.1 菌种来源

选择的是常年堆放秸秆堆下面的土壤和腐烂的秸秆。

1.2 试剂的配制

(1)微晶纤维素培养基 : NH_4NO_3 4.3 g , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g , KH_2PO_4 4.3 g , CaCl_2 0.3 g , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0 mg , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.6 mg , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.4 mg , CoCl_2 2.0 mg , 微晶纤维素 10 g , 琼脂 18 g ,0.05 Mpa 灭菌 20 min。

(2)刚果红鉴别培养基 : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0 g , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 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。

(3)液体产酶培养基 :取秸秆粉 4 g 加入盛有 100 mL Mandels 营养液的 250 mL 三角瓶中 ,pH 值自然。

Mandels 营养液 : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4 g , KH_2PO_4 2.0 g ,尿素 0.3 g , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g , CaCl_2 0.3 g , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7.5 mg , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2.5 mg , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.0 mg , CoCl_2 3.0 mg ,蒸馏水 1 000 mL^[3]。

(4)秸秆降解培养基 : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20.0 g ,尿素 3.0 g ,蛋白胨 3.0 g , CaCl_2 0.1 g , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0 g , NaCl 0.1 g , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 50.0 mg , $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 16.0 mg , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 14.0 mg , CoCl_2 20.0 mg ,蒸馏水 1 000 mL。

(5)3,5-二硝基水杨酸溶液(DNS) :酒石酸钠 18.2 g 溶于 50 ml 水中加热 ,再称取 0.63 g DNS、 NaOH 2.1 g、苯酚 0.5 g、 Na_2SO_4 0.5 g 搅拌至溶

解 ,冷却定容 100 mL ,贮于棕色瓶中 ,室温放置一周后使用。

(6)pH4.6 醋酸 - 醋酸钠缓冲液 :11.8 mL 冰醋酸定容至 100 mL ,称取 27.2 g 醋酸钠溶解并定容至 100 mL ,将上述两种溶液等体积混合^[4]。

(7)1%CMC-Na 溶液 :0.5 gCMC-Na 溶于 50 mL pH4.6 醋酸 - 醋酸钠缓冲液即可。

1.3 方法

1.3.1 菌种的分离

将菌种来源样品分别接种于无菌水的三角瓶中 ,稀释成 10-1、10-2、10-3……10-8 等 8 个梯度 ,涂布于微晶纤维素平板 ,在 28℃ 恒温培养箱中培养 3 d ,长出菌落后反复画线分离纯化。

1.3.2 菌种的初筛

用接种环挑取少量的菌种接种在刚果红鉴别培养基上 ,再进行画线分离 ,斜面保存。

1.3.3 菌种的复筛

将初筛菌种分别接入液体产酶培养基 ,28℃ 静止培养 7 d ,收集上清液过滤 ,用于测定酶活。

1.3.4 酶活性测定

采用 DNS 还原糖方法测定纤维素酶的活性。即 :在一定的范围内 ,反应液红色深浅的变化与还原糖浓度呈正比。

1.3.4.1 葡萄糖标准曲线的测定

将葡萄糖烘干 2 h 至恒重 ,称取 0.1 g 溶于 100 mL 水中 ,加热至溶解。取 7 个具塞试管 ,依次编号 1,2,3,4,5,6,7 ,取 1 mg/mL 标准葡萄糖溶液各 0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,1.2 mL ,加水和 DNS 溶液至 10 mL ,加塞摇匀沸水中加热 5 min ,冷却后定容至 25 mL。在 520 nm 波长下测 A 值^[5]。

表 1 葡萄糖标准曲线试剂量

管号	0	1	2	3	4	5	6	7
葡萄糖标准液	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4
蒸馏水	8	7.8	7.6	7.4	7.2	7.0	6.8	6.6
DNS	2	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0

1.3.4.2 FPA 酶活测定

取 3 支试管 ,1 支作空白对照 ,另外 2 支作平行被测管。各加入 0.2 mL 酶液和 pH4.6 的醋酸钠缓冲溶液 1.8 mL ,2 支被测管中加入 1 cm × 6 cm 滤纸条 ,充分浸泡后将 3 支试管放入 50℃ 水浴锅 60 min ,然后分别加入 2 mL DNS 显色液 ,同时空白管加入 1 cm × 6 cm 滤纸条 ,再将 3 支试管沸水浴 10 min ,待冷却后用蒸馏水定容 15 mL ,以空白管调 0 ,在 520 nm 波长下测 A 值^[6]。

1.3.4.3 CMC-Na 酶活测定

取 3 支试管 ,1 支作空白对照 ,另外 2 支作平行被测管。各加入 0.2 mL 酶液 ,被测管中加 1.8 mL CMC-Na 溶液 ,空白管只加 1.8 mL pH4.6 的醋酸钠缓冲溶液 ,然后将 3 支试管置于 50℃ 水浴锅 60 min ,然后分别加入 2 mL DNS 显色液 ,再将 3 支试管沸水浴 10 min ,待冷却后用蒸馏水定容至 15 mL ,以空白管调 0 ,在 520 nm 波长下测 A 值^[7]。

纤维素酶活 = $(W \times N \times M \times 1\ 000) / T$ u/mL

W : 从葡萄糖标准曲线中查得的葡萄糖的浓度(mg/mL) ;N :酶液稀释的倍数 ;M :反应后样品总体积(mL) ;T 为酶促反应时间(min)。

1.3.5 秸秆降解率的测定

取玉米秸秆粉 4 g 加入 100 mL 秸秆降解培养基中 ,121℃ 灭菌 30 min 待冷却后分别接入各菌种(接种量为 10%)发酵 7 d ,最后用蒸馏水把降解发酵物进行冲洗 ,除去秸秆以外的杂质 ,烘干称重 ,以不接菌的空白为对照。通过失重法计算秸秆降解率。

1.3.6 菌株鉴定

菌株的形态鉴定参照 :《链霉菌鉴定手册》和《真菌分类鉴定手册》^[8]。

2 结果与分析

2.1 菌种的分离与筛选

2.1.1 初筛

将来源样品稀释在微晶纤维素平板上进行培养 ,分离出 20 株具有降解纤维素能力的菌株 ,再通过刚果红鉴别培养基筛选 ,筛选出 4 株真菌 ,2 株放线菌 ,根据菌落的形态大小进行初步鉴定 ,命名为 X-1、X-2、X-3、X-4、X-5、X-6。

表 2 各菌落形态和个体形态的镜检结果

菌落	菌落形态	镜检	初步鉴定
X-1	浅黄色 表面光滑 不透明 干燥 , 与基质结合牢固 不易挑起。	革兰氏阳性 ,菌丝纤细 无隔菌丝上长出 很多分支小梗 ,顶端着生一个孢子。	小单孢子菌属
X-2	乳白色 表面无光 不透明 菌丝紧密 干燥 , 与基质结合牢固 不易挑起。	菌丝纤细、无隔、多核、多枝 ,革兰氏阳性。	链霉菌属
X-3	灰绿色 干燥致密 绒毛状 不透明 , 与基质结合紧密 易挑起。	分生孢子为球形、多枝、单细胞、绿色 ,菌丝有 隔。	木霉属
X-4	黑色 干燥 绒状 不透明 连成片 , 与基质结合紧密 不易挑起。	孢子头球状 黑色 ,分生孢子梗平滑。	黑曲霉
X-5	黄绿色 干燥 绒毛状 不透明 连成片 , 与基质结合紧密 易挑起。	分生孢子为球形、多枝、单细胞 ,菌丝有隔。	木霉属
X-6	中间墨绿色 边缘呈白色菌丝圈带 干燥 , 绒毛状 不透明 菌落背面呈褐色 ,与基质结合紧密。	分生孢子梗从菌丝垂直生出集成束状 , 其顶端有一至多次分枝呈扫帚状。	青霉属

2.1.2 复筛

2.1.2.1 葡萄糖标准曲线绘制

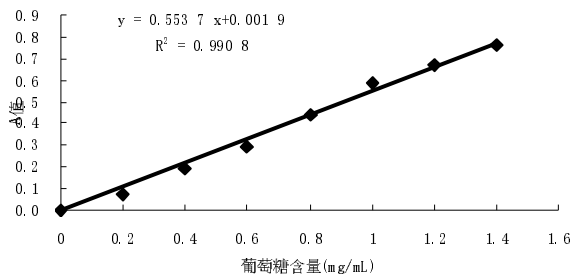


图 1 葡萄糖标准曲线

标准葡萄糖曲线绘制结果如图 1 ,以葡萄糖含量(mg/mL)为横坐标 ,520 nm 测定的 A 值为纵坐标。线性相关系数 $R^2=0.9908$,回归曲线的线性较好 ,可以用于酶活力的测定。

2.1.2.2 酶活测定结果

本试验分别以滤纸和 CMC-Na 作为底物 ,其 FPA 和 CMC 酶活测定数据结果如表 3 所示。从图 2 可知 ,FPA 酶活的大小顺序是 X-4>X-6>X-1>X-2>X-5>X-3 ,图 3 可以看出 CMC-Na 酶活顺

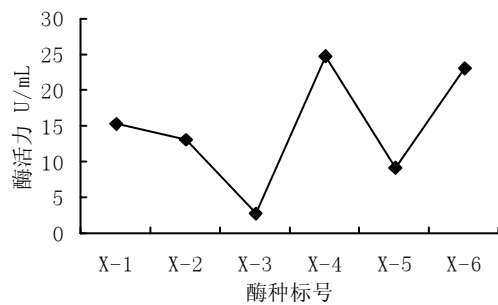


图 2 菌种发酵 FPA 酶活力测定结果

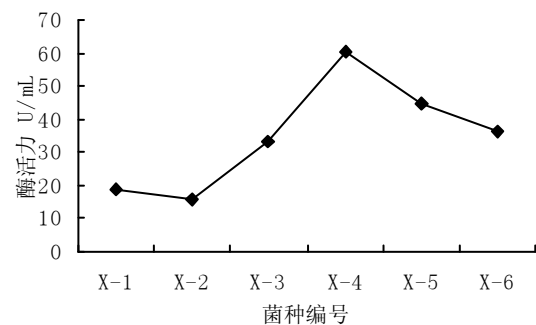


图 3 菌种发酵 CMC 酶活力测定结果

序为 X-4>X-5>X-6>X-3>X-1>X-2。这 6 株

CMC 酶活比总酶活 FPA 高,这说明酶对水溶性底物有较高的活力,而滤纸与酶是多相催化,酶分子也是高分子物,所以反应的空间阻碍较大,这也说明了吸附对酶的活性部位与纤维素分子链段的结合及催化有很大的影响。

表 3 菌种发酵酶活力测定结果 U/mL

菌种编号	FPA	CMC
X-1	15.15	18.69
X-2	13.07	15.86
X-3	2.69	33.28
X-4	24.70	60.55
X-5	9.06	44.91
X-6	23.18	36.05

2.1.3 秸秆降解率测定

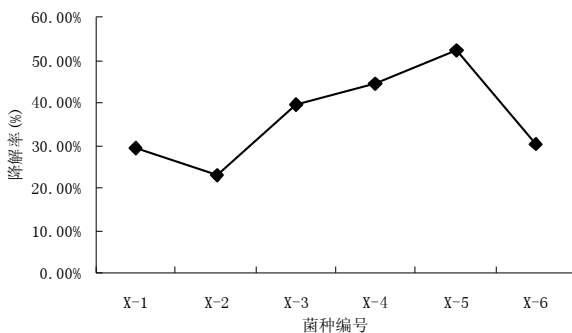


图 4 各菌种对秸秆的降解结果

由图 4 可以看出,各菌种在同等条件下对秸秆都有一定的降解能力。其中 X-5 有较明显的降解能力,降解率高达 52.4%,其次 X-4 降解率 44.38%,X-3 降解率 39.35%,X-6 降解率 30.20%,X-1 降解率 29.28%,X-2 降解率 22.82%。

2.1.4 菌种形态观察结果

根据《真菌分类鉴定手册》观察得出,X-3,X-5 菌落均相似,菌落为绿色,但略有差异,干燥,绒毛状,不透明,镜检下均是分生孢子为球形,多枝,单细胞,绿色,菌丝有隔,根据以上特征初步判定为康氏木霉;X-4 菌落为黑色,干燥,绒毛状,不透明,连成片,镜检下孢子头球状,黑色,分生孢子

梗平滑,由此初步可以判断为黑曲霉。

3 结论与讨论

本试验筛选出分解秸秆的具有高活性酶活的霉菌 3 株,并对玉米秸秆降解率进行了测定,以霉菌 X-5 最好,具有较高的降解能力,降解率高达 52.4%。

从筛选出高酶活的菌种来看全部为真菌。细菌和放线菌虽然在刚果红培养基中有明显的透明圈出现,但是所测定的酶活性都不高。细菌的纤维素酶主要是葡聚糖内切酶,大多数对结晶纤维素没有降解活性,且所产生的酶多是胞内酶或吸附在细胞壁上,不分泌到培养液中,所以很难提纯,而真菌产生的酶多为胞外酶,所以酶活测定较高。在自然条件下,任何一种酶都不能单独降解纤维素,这一过程必须依靠多种微生物共同存在并协同作用时,才能实现水解过程。因此,可以将此次纤维素酶活性作为菌系构建的筛选指标,进一步探索纤维素降解能力更强的菌种组合。

本试验只对单个菌种酶活以及对玉米秸秆的降解能力进行了初步测定,对多个菌种的协同作用以及降解秸秆霉菌的快速扩繁技术等有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 刘保平,王宏燕,房红岩,等.降解秸秆的细菌和放线菌的分离与筛选[J].东北农业大学学报,2010(2):55-60.
- [2] 徐杰,杨谦.水稻秸秆降解优良放线菌的筛选和鉴定[J].林业化学与工业,2008,28(5):56-57.
- [3] 郭夏丽,杨小丽,李顺义,等.秸秆降解菌的筛选及菌种组合[J].郑州大学学报(工学版),2010,31(1):75-76.
- [4] 王林,刘国生,王林嵩,等.DNS法测定纤维素酶活力最适合条件研究[J].河南师范大学学报(自然科学版),1998,26(3):66-69.
- [5] 赵玉萍,杨娟.四种纤维素酶活力测定方法的比较[J].食品研究与开发,2006,27(3):116-117.
- [6] 傅力,丁友昉,张箴,等.纤维素酶测定方法的研究[J].新疆农业大学学报,2000,23(2):45-48.
- [7] 林祥木,董金秀,陈汉清,等.产纤维素酶菌株的筛选及产酶条件的选择[J].福建农林大学学报(自然科学版),2003,32(4):510-513.
- [8] 魏景超.真菌分离鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979.