

文章编号 :1003-8701(2014)02-0087-06

纤维素厌氧降解菌的分离筛选及复合菌系构建研究

迟 畅¹, 李 洋², 沙洪林^{1*}, 王洪民³, 王迎春⁴

(1. 吉林省农业科学院资源与环境研究所, 长春 130033; 2. 吉林省农业科学院经信中心, 长春 130033;
3. 吉林省四平市伊通镇广播电视台, 吉林 四平 130700; 4. 吉林省农安县农业广播学校, 吉林 农安 130200)

摘 要: 为利用 Hungate 厌氧技术, 从常年堆放秸秆堆下面的新鲜土壤及腐烂秸秆中分离出 3 株分解纤维素能力相对较强的专性厌氧菌, 经初步鉴定为芽孢梭菌属。进一步对其进行复合菌种构建, 筛选出了具有高效降解秸秆的复合菌剂 II 及适宜生长的培养基。

关键词: 纤维素厌氧降解; CMC 酶活; 复合菌系构建

中图分类号: S188

文献标识码: A

Separation and Screening of Anaerobic Cellulose Degradation Bacteria and Setting Up of Compound Strains

CHI Chang¹, LI Yang², SHA Hong-lin^{1*}, WANG Hong-min³, WANG Ying-chun⁴

(1. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033; 2. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033; 3. Broadcast and TV Station of Yitong Town, Siping City, Jilin Province, Siping 130700; 4. Nongan County Agricultural Broadcasting School of Jilin Province, Nongan 130200, China)

Abstract: Using the Hungate technology, 3 strains of anaerobic bacteria which cellulose decomposing capacity is relatively strong were isolated from the fresh soil and rotted straw under perennial piled straw buttress. They were preliminarily identified as bacillus clostridium genera. Furthermore, compound strains were set up, and a high efficient compound bacterium agent II of degradation of straw and its appropriate growth medium was selected.

Keywords: Anaerobic cellulose degradation; CMC enzyme activity; Setting up of compound strains

我国是一个农业大国, 农作物秸秆年产量约为 7 亿 t 左右, 列世界之首^[1]。其中约 45% 用作畜牧业饲料、工业原料和造肥还田, 还有约 4 亿 t 的秸秆被低效作为生活燃料, 甚至废弃和就地焚烧。这样不仅破坏了生态平衡, 使土壤肥力衰竭, 还污染环境, 同时存在火灾的隐患。在目前人口增加, 耕地减少, 资源短缺的情况下, 合理高效利用这些资源就显得极为重要。针对上述问题, 以秸秆作为原料进行厌氧降解研究, 比较了不同菌株对秸秆

的降解影响, 进而为秸秆资源多层次转化为高效生物能源和优质有机肥提供了依据。

1 材料和方法

1.1 菌种来源

样品来源于公主岭朝阳坡农家院里, 采集时选择的是常年堆放秸秆堆下面的新鲜土壤及腐烂秸秆。

1.2 培养基

(1) 纸条培养基(PY): K_2HPO_4 2.5 g, KH_2PO_4 2 g, NaCl 3 g, $MgSO_4$ 0.2 g, $CaCO_3$ 0.05 g, 刃天青 (0.1%) 1 mL, L- 盐酸半胱氨酸 0.5 g, 维生素液 4 mL, 微量元素 4 mL, 蒸馏水 1 000 mL。每个试管中放入一个滤纸条(3 cm × 1 cm), 用 NaOH 调 pH 值至 7.0, 分装厌氧管, 121℃ 灭菌 20 min。

注: 维生素液(TV): 生物素 2 mg, 叶酸 2 mg,

收稿日期: 2013-08-25

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(20100569); 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, E-mail: shahonglin@163.com

盐酸吡哆醇 10 mg,核黄素 5 mg,硫胺素 5 mg,钴胺素 0.1 mg,对氨基苯甲酸 5 mg,硫辛素 5 mg,蒸馏水 1 000 mL。

微量元素(TM):氮三乙酸 1.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 3.0 g, $MnSO_4$ 0.5 g, $FeSO_4$ 0.1 g, $CoCl_2$ 0.1 g, $CuSO_4$ 0.01 g, H_3BO_4 0.01 g, $NaCl$ 1.0 g, $CaCl_2$ 0.1 g, $ZnSO_4$ 0.1 g, $AlK(SO_4)_2$ 0.01 g, $NaMoO_4$ 0.01 g,蒸馏水 1 000 mL。

(2)固体培养基:在纸条培养基的基础上,加入琼脂 2%,纤维素 0.5%代替滤纸条作为碳源。分装厌氧管,121℃灭菌 20 min。

(3)PYG培养基:在 PY 培养基中加入 1%的葡萄糖作为碳源,其他成分不变。

(4)MM 基础纸条培养基: $Na(NH_4)HPO_4$ 2.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, KH_2PO_4 1.0 g, $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.3 g, $CaCO_3$ 5.0 g,蛋白胨 1.0 g,蒸馏水 1 000 mL。每个试管中放入一个滤纸条(3 cm × 1 cm),用 NaOH 调 pH 值至 7.0,分装厌氧管,121℃灭菌 20 min。

(5)CM₄ 培养基: KH_2PO_4 1.5 g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1.0 g, K_2HPO_4 2.9 g, $(NH_4)_2SO_4$ 1.3 g,酵母膏 2.0 g, L- 盐酸半胱氨酸 1.0 g, $FeSO_4$ 1.25 mg,蒸馏水 1 000 mL。

(6)TYE 培养基: KH_2PO_4 0.75 g, K_2HPO_4 1.5 g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.2 g, NH_4Cl 0.9 g, $NaCl$ 0.9 g,酵母膏 3.0 g,蛋白胨 10.0 g, L- 盐酸半胱氨酸 1.0 g,10% $FeSO_4$ 30 μL, TM 9 mL, TV 1 mL,蒸馏水 1 000 mL。

(7)ZAP 培养基: KH_2PO_4 0.75 g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.4 g, K_2HPO_4 1.5 g, NH_4Cl 0.9 g, $NaCl$ 0.9 g,酵母膏 0.6 g,蛋白胨 2.0 g, L- 盐酸半胱氨酸 1.0 g,10% $FeSO_4$ 10 μL, TM 9 mL, TV 1 mL,蒸馏水 1 000 mL。

(8)TB 培养基: KH_2PO_4 1.5 g, K_2HPO_4 4.2 g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.38 g, NH_4Cl 0.5 g,酵母膏 2.0 g, L- 盐酸半胱氨酸 1.0 g, TM 50 mL, TV 1 mL,蒸馏水 1 000 mL。

(9)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。

(10)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 的醋酸钠溶解并定容至 100 mL,将上述两种溶液等体积混合^[2]。

(11)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 试验方法

整个试验中,厌氧试管分装液体或固体培养

基的全部操作都是利用 Hungate 厌氧技术进行。培养基的制备方法如下:

培养基配置好后,煮沸 5~10 min,停止加热冷却到室温后加入 0.05%的 L- 盐酸半胱氨酸,再用 NaOH 调 pH=7.0,滴入几滴刃天青,继续加热到沸腾待溶液变为无色时停止加热冷却后进行厌氧分装。

1.3.1 菌种富集

将菌种来源样品接种于 PY 培养基的血清瓶中进行富集,待滤纸条完全崩解后再转入厌氧管中活化。

1.3.2 菌种分离和纯化

取试管滤纸条崩解速度快的菌液稀释,10-1、10-2、10-3……,等 8 个梯度,接种于固体培养基,滚管,培养一周左右,待菌落长成后挑取接种至 PY 培养基中,待滤纸条完全崩解后再进行稀释、滚管等步骤,如此反复 5~8 次,直至管中长出菌落单一、显微镜下细胞形态一致的菌株时,即为纯菌株。

1.3.3 最适生长温度

将菌种按 15℃、20℃、25℃、30℃、35℃、40℃、45℃、50℃8 个梯度,在 PYG 培养基中培养 2 d,以 721 分光光度计测 520 nm A 值表示菌种的生长情况。

1.3.4 最适生长 pH

用 NaOH 调菌液 pH 值,5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5,7 个梯度,在 PYG 培养基中培养 2 d,以 721 分光光度计测 520 nm A 值表示菌种的生长情况。

1.3.5 生长曲线的测定

在温度和 pH 适合的条件下,将菌种在 PYG 培养基中培养 2 d,每间隔 2 h 以 721 分光光度计测 520 nm 的 A 值,绘制菌种的生长曲线。

1.3.6 培养基比较

以 PY 作为参照,菌种分别在 MM、CM₄、TYE、ZAP、TB 5 种培养基中培养,观察其生长情况。

1.3.7 酶活测定

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。将分离出的 3 种纯菌株分别接入纸条培养基中 50℃进行发酵培养,将粗酶液经离心 5 min,取上清液测定纤维素酶活。

1.3.7.1 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

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(mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4
蒸馏水(mL)	8	7.8	7.6	7.4	7.2	7.0	6.8	6.6
DNS(mL)	2	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0

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^[3]。

1.3.7.2 CMC-Na 酶活测定

测定步骤 取 4 支试管 ,1 支作空白参照 ,另外 3 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 4 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 4 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^[4]。

$$\text{纤维素酶活} = (W \times N \times M \times 1000) / T \text{ U/mL}$$

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)。

1.3.8 菌株鉴定

菌株的形态鉴定参照《伯杰氏细菌系统分类学手册》。

2 结果与分析

2.1 分离菌株菌落和细胞形态

在 PY 培养基中分离出 3 株专性纤维素厌氧菌 , 根据菌落的形态大小分别命名为 X-1、X-2、X-3。又通过对菌株形态的鉴定 , 可以初步得出这 3 种菌株均属于芽孢梭菌属。

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	白色的细小菌落 , 中间突起 , 透明圈边缘整齐 , 表面湿润有光泽。	革兰氏染色阳性 , 细胞呈杆状 , 可运动 , 芽孢呈圆形 , 比菌体粗 , 位于菌体顶端。	芽孢梭菌属
X-2	白色的细小菌落 , 中间突起 , 透明圈边缘不整齐 , 表面湿润有光泽。	革兰氏阴性 , 细胞呈杆状 , 芽孢呈卵圆形 , 端生。	芽孢梭菌属
X-3	白色至淡黄色的细小菌落 , 中间突起 , 透明圈边缘整齐 , 表面有光泽。	革兰氏阴性 , 细胞呈微弯杆状 , 可运动 , 端生膨大芽孢。	芽孢梭菌属

2.2 温度试验

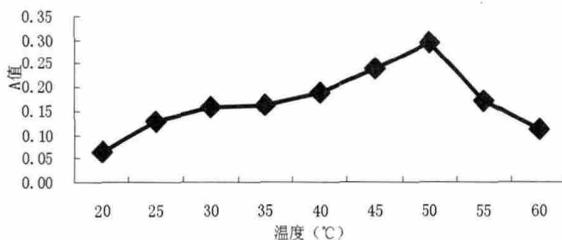


图 1 X-1 的温度测定结果

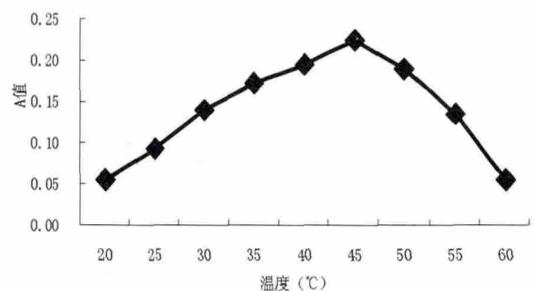


图 3 X-3 的温度测定结果

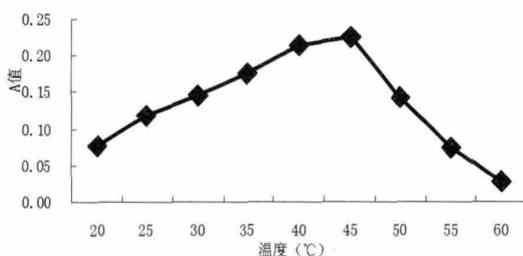


图 2 X-2 的温度测定结果

各菌株接种到纸条液体培养基中 , 培养 18h 后 , 在 721 分光光度计上测 520 nm 处的 A 值 , 从图 1~ 图 3 可知 : 3 株生长范围为 20~ 60℃ , 15℃ 以下基本不生长。X-1、X-2、X-3 的最适应生长温度分别为 50℃、40~ 45℃、45℃。

2.3 pH 值试验

各菌株在适合的温度下 , pH 的范围 5.5~8.5 , 结果可知 : X-1 菌株适合生长 pH 为 7.0 (图 4) , X-2 和 X-3 菌株所适合生长 pH 为 8.5 偏碱性 (图 5、图 6)。

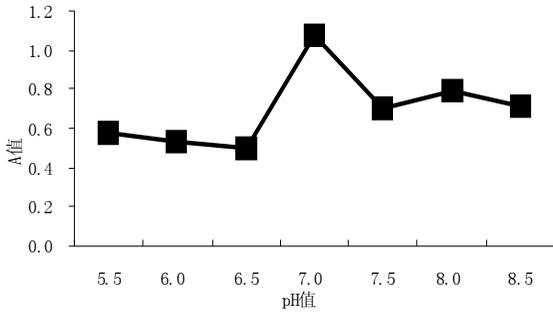


图 4 X-1 的 pH 值测定结果

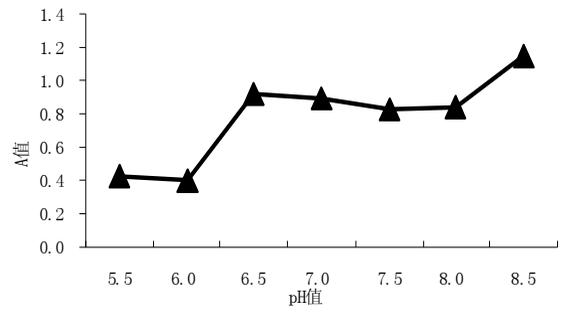


图 5 X-2 的 pH 值测定结果

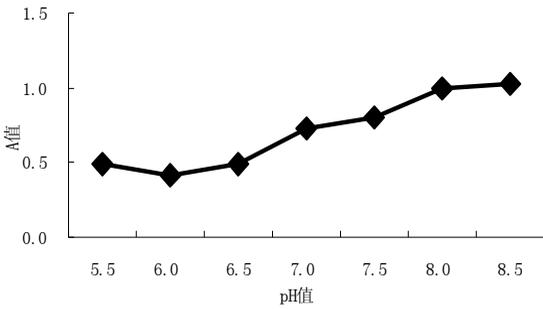


图 6 X-3 的 pH 值测定结果

2.4 生长曲线的测定

将 3 种菌株分别接种在纸条培养基中进行培养,每间隔 2 h 取样,在 520 nm 波长下测 A 值。由图 7~图 9 可以看出,X-1 菌株培养约 4~6 h 进入对数生长期,16 h 后进入稳定生长期;X-2 菌株培养约 2~4 h 进入对数生长期,14 h 后进入稳定生长期;X-3 菌株培养约 4~6 h 进入对数生长期,16 h 后进入稳定生长期。

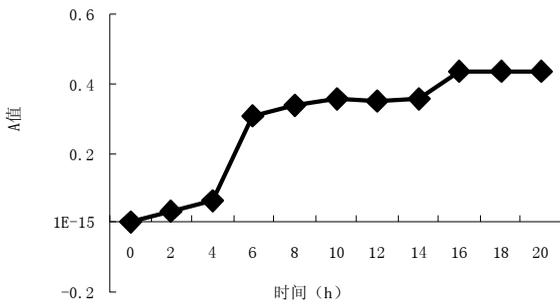


图 7 X-1 的生长曲线测定结果

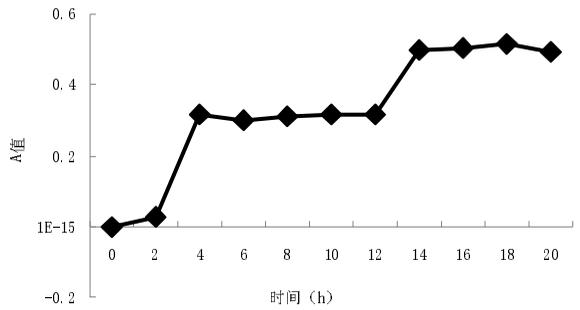


图 8 X-2 的生长曲线测定结果

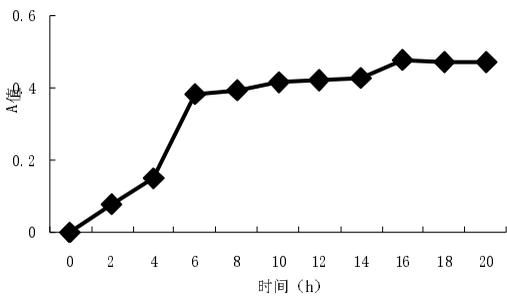


图 9 X-3 的生长曲线测定结果

2.5 培养基比较

以纸条培养作为参照,观察各菌株在纸条、MM、TYP、CM4、ZAP、TB 6 种培养基中的生长情况,结果见表 3。从表 3 可知,3 菌株在 TB 培养基中的活力较低,而在 ZAP 培养基中的生长活力较高。

2.6 酶活测定结果

标准葡萄糖曲线绘制结果如图 10,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。

表 3 菌株培养基比较

菌株	纸条	MM	TYP	CM4	ZAP	TB
X-1	+++	+++	++	±	++++	±
X-2	++	++	++	±	++	±
X-3	+++	±	+	±	++	±

注:++++ 生长活力非常好;+++ 生长活力好;++ 生长活力较好;± 生长活力一般。

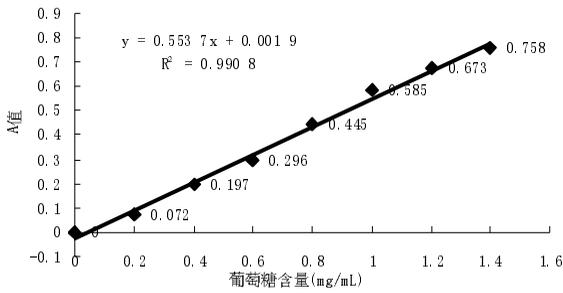


图 10 葡萄糖标准曲线

试验以 CMC-Na 作为底物,CMC 酶活测定数据结果如表 4 所示。可见,X-1 的酶活最高为 37.79 U/mL,其次为 X-2 为 28.42 U/mL,X-3 是 25.63 U/mL。

表 4 菌种发酵酶活力测定结果 U/mL

菌种编号	CMC
X-1	37.79
X-2	28.42
X-3	25.63

3 复合菌剂的构建

秸秆纤维素的降解是需要多种菌株在相互协同作用下分解的,这样不仅可以提高降解效率,还可以缩短发酵周期。而单一纤维素分解菌,在加快

秸秆降解进程中作用比不上复合微生物菌株的共同作用。因此本次试验以上述筛选的高效纤维素菌株及引进的菌株出发,筛选培育具有高效降解的复合菌剂。

3.1 制备方法

将 X-1、X-2、X-3 3 种菌株在相应的培养基上扩大培养。并按一定比例复合培养 5 种复合微生物菌液(I、II、III、IV、V),步骤同 1.3,其配比如表 5。

表 5 复合微生物菌剂配比

复合菌剂编号	X-1	X-2	X-3
I	30	60	10
II	60	10	30
III	25	25	50
IV	60	30	10
V	30	10	60

3.2 酶活测定结果

3.2.1 碳源对各菌剂酶活的测定结果

选取 3 种菌株生长状况较好的 ZAP 培养基,分别以蔗糖、可溶性淀粉、麦芽糖、D-果糖、松子糖、棉子糖作为碳源,pH 值自然,30℃,180 r/min 摇床 24 h,测量 CMC 酶活。从表 6 可以看出,对于 5 种混合菌剂而言,蔗糖是它们最理想的碳源。

表 6 碳源对各菌剂产酶能力影响

碳源	I	II	III	IV	V
蔗糖	14.28	24.49	18.32	21.76	20.53
可溶性淀粉	8.97	17.26	9.91	13.52	16.32
麦芽糖	8.49	11.93	8.36	10.76	8.32
D-果糖	7.43	4.34	3.55	5.32	8.24
松子糖	7.16	7.53	8.25	8.26	10.25
棉子糖	6.98	3.32	7.97	8.78	5.27

3.2.2 氮源对各菌剂酶活的测定结果

在 ZAP 培养基中,分别以 1%牛肉膏、尿素、2%蛋白胨作为氮源,pH 值自然,30℃,180 r/min 摇床 24 h,测量 CMC 酶活。表 7 中可以看出,牛肉膏和蛋白胨是这 5 种菌剂理想的氮源。

3.2.3 pH 值对各菌剂酶活的影响

在 ZAP 培养基中,pH 值分别调为 4,5,6,7,8,9,10,7 个梯度。30℃,180 r/min 摇床 24 h,测量 CMC 酶活。由表 8 可见,这 5 种菌剂在中性或偏碱性的环境中 CMC 酶活值相对较高。

表 7 氮源对各菌剂产酶能力影响

氮源	I	II	III	IV	V
1%牛肉膏	7.57	9.64	7.35	9.26	8.15
尿素	5.25	6.35	5.75	6.73	5.74
2%蛋白胨	6.26	8.54	6.23	8.29	7.54

表 8 pH 值对各菌剂产酶能力影响

U/mL

pH	I	II	III	IV	V
4	6.86	7.92	6.69	5.03	6.80
5	6.84	7.88	6.78	7.25	6.96
6	7.17	7.52	6.86	7.28	6.63
7	8.81	9.54	6.75	8.44	7.06
8	6.61	8.83	6.41	7.84	7.25
9	5.58	6.65	5.65	6.53	5.32
10	5.92	6.38	5.44	6.56	5.52

从上述的分析中可以得出:复合菌剂 II 为最优的配比,所适宜的培养基应以蔗糖为碳源,牛肉膏和蛋白胨为氮源,pH 值为中性或偏碱性。在这种条件下,复合菌剂 II 才能加快秸秆的降解率,减少反应时间。

3.3 复合菌剂 II 生长条件的研究

3.3.1 pH 值对复合菌剂 II 生长的影响

用选定的碳源和氮源加入到 ZAP 培养基中,pH 值分别调为 4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9,11 个梯度。30℃,180 r/min 摇床 24 h,分别测量 CMC 酶活,结果见图 11。

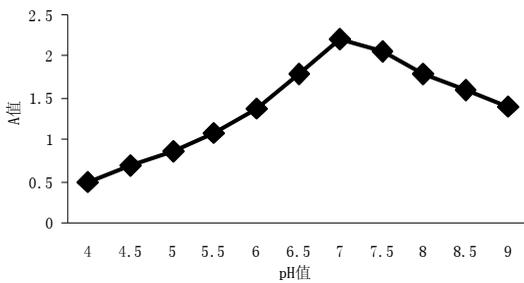


图 11 pH 值对复合菌剂 II 影响

由图 11 可知,复合菌剂 II 在 pH 值 7~7.5 时酶活性最高。

3.3.2 温度对复合菌剂 II 生长的影响

用选定的碳源和氮源加入到 ZAP 培养基中,分别在 10℃、14℃、18℃、22℃、26℃和 30℃下进行培养 3 d,测定 CMC 酶活性,结果见图 12。

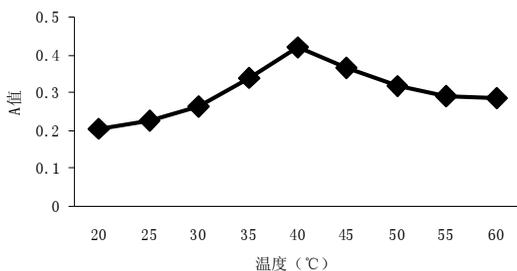


图 12 温度对复合菌剂 II 影响

由图 12 可知,复合菌剂 II 最适合的生长温度是 40~45℃。

4 结 论

在长期堆放的秸秆堆的土壤采集大量的样品中,进行富集、筛选,获得了 3 株厌氧纤维素分解菌,他们具有很强的纤维素降解能力。在对其各种指标的分析中可以得出:X-1、X-2、X-3 的最适应生长温度分别为 50℃、40~45℃、45℃;X-1 菌株适合生长 pH 为 7.0,X-2 和 X-3 菌株所适合生长 pH 为 8.5 偏碱性;X-1 菌株培养约 4~6h 进入对数生长期,16h 后进入稳定生长期;X-2 菌株培养约 2~4h 进入对数生长期,14h 后进入稳定生长期;X-3 菌株培养约 4~6h 进入对数生长期,16h 后进入稳定生长期;培养基的比较中,3 菌株在 TB 培养基中的活力较低,而在 ZAP 培养基中的生长活力较高。

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。本试验的结果表明:3 种菌株混合培养具有一定的协同效应。

通过对复合菌剂构建的研究,探讨了复合菌剂的优选方法,筛选出了具有高效降解秸秆的菌剂及适宜生长的培养基。配比的 5 种菌剂,以菌剂 II 为最优,适宜的培养基:蔗糖 10 g, KH_2PO_4 0.75 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g, K_2HPO_4 1.5 g, NH_4Cl 0.9 g, NaCl 0.9 g,牛肉膏 0.6 g,蛋白胨 2.0 g, L- 盐酸半胱氨酸 1.0 g, 10% FeSO_4 10 μL , TM 9 mL, TV 1 mL,蒸馏水 1 000 mL。复合菌剂 II 的最适生长条件是 pH7,温度 40℃。

参考文献:

- [1] 阮文全,郁丹,邹华,等.小城镇废弃物沼气生产技术进展[J].中国沼气,2006,24(4):28-31.
- [2] 王琳.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.
- [3] 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.
- [4] 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.