

高效纤维素降解菌分离筛选、复合菌系构建及 秸秆降解效果分析*

李静¹ 张瀚能¹ 赵翀¹ 张金羽¹ 张琪¹ 张靖莹¹ 刘茂柯² 陈强¹ 赵珂^{1**}

¹四川农业大学资源学院微生物学系 成都 611130

²四川省农业科学院水稻高粱研究所 泸州 646000

摘要 从川西高原贡嘎山区杜鹃林下土壤中分离纤维素降解菌, 构建具有高效降解纤维素能力的复合菌系, 并对秸秆降解效果进行分析, 为农业废弃物的循环利用提供菌种资源和理论依据. 样品及经风干、高温等预处理后, 采用平板涂布法进行分离, 共获得79株菌株; 通过刚果红实验对分离获得的菌株进行初步筛选, 运用DNS法测定各菌株的羧甲基纤维素酶活 (Carboxymethyl cellulase, CMCase), 复筛得到15株具有CMCase活能力的菌株. 经滤纸条崩解实验、秸秆崩解实验及降解率测定, 最终确定了各菌株的纤维素降解能力, 进一步经拮抗实验, 选取相互无拮抗的菌株构建5个复合菌系: A (112、146、156、171), B (145、147、150、153), C (110、116、174), D (147、154、171), E (145、146、150、152、153). 复合菌系的滤纸酶活 (Fpase) 与秸秆降解率测定结果显示, 组合C对秸秆的降解率较单菌株116提高了50.71%, 组合D对秸秆的降解率较单菌株154提高了41.54%. 经形态学和分子生物学鉴定, 纤维素降解能力比较好的两个组合中的菌株分别被鉴定为类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus* sp.)、芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.)、不动杆菌属 (*Acinetobacter* sp.) 以及链霉菌属 (*Streptomyces* sp.). 本研究表明, 复合菌系纤维素降解能力优于单一菌株, C、D两组复合菌系表现出较高的纤维素降解能力, 具有进一步开发的价值. (图8表4参32)

关键词 纤维素降解; 分离鉴定; 复合菌系; 滤纸崩解; 玉米秸秆

CLC Q939.96

Isolation and screening of cellulose decomposing microbe and the straw decomposing effect of complex microbial system*

LI Jing¹, ZHANG Hanneng¹, ZHAO Chong¹, ZHANG Jinyu¹, ZHANG Qi¹, ZHANG Jingying¹, LIU Maoke², CHEN Qiang¹ & ZHAO Ke^{1**}

¹Department of Microbiology, College of Resource and Environment, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

²Rice and Sorghum Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Luzhou 646000, China

Abstract This study aimed to isolate cellulose decomposing microbes from the soil under *Rhododendron* sp. in Gongga Mountain and to construct a complex microbial system with high cellulolytic ability. All together 79 strains were isolated using two pretreatment approaches. Congo red medium and DNS method were employed to evaluate their carboxymethyl cellulase activity. The results showed 15 strains having a great CMCCase ability. Subsequently, the cellulose degradation ability of the 15 strains was determined by analysis results of filter paper degradation, corn straw degradation and degradation rate of corn straw. Based on the antagonism effect among strains, the isolates with high efficiency in cellulose decomposing ability and no antagonism were selected to construct five complex microbial systems: A (112, 146, 156, 171), B (145, 147, 150, 153), C (110, 116, 174), D (147, 154, 171), and E (145, 14, 150, 152, 153), all of which were further measured the filter paper enzyme activity and corn straw degradation rate. The results showed that the corn straw degradation rate of community C was 50.71% higher than that of 116 single strain belonging to community C, and that the corn straw degradation rate of strains community D was 41.54% higher than that of 154 single strain belonging to community D. The 16S rRNA gene sequence similarity between the six isolates of two communities and the typical strains published in Genbank was 99% to 100%, and those sequences belonged to four genera *Paenibacillus* sp., *Bacillus* sp., *Acinetobacter* sp. and *Streptomyces* sp. Our research revealed that the cellulose decomposing ability of complex microbial system is higher than that of single strain. Both Complex C and D showed a great capacity in cellulose decomposing, therefore of great exploitation value.

Keywords cellulose decomposition; separation and identification; complex microbial system; filter paper degradation; corn straw

收稿日期 Received: 2015-10-31 接受日期 Accepted: 2016-01-30

*四川省科技支撑计划项目 (2014NZ0044) 资助 Supported by the Science and Technology Supporting Plan of Sichuan Province (2014NZ0044)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: zhaoke82@126.com)

纤维素是植物细胞壁的重要组成成分, 最小组成单元为葡萄糖, 其资源是一种可持续的能源物质, 同时也是尚未得到充分利用的一类可再生资源^[1-3]。农作物秸秆是粮食生产的主要副产品, 而农作物秸秆中含有大量的纤维素, 是农业生产中一种重要的生物资源, 也是目前尚未得到充分利用的纤维素资源之一^[4]。全球每年秸秆总产量约为70亿t^[5], 实际应用于饲料及工业生产的秸秆仅占总量的30%, 少数秸秆就地还田, 而大多数的秸秆主要还是以焚烧的形式进行处理, 这种做法不仅造成了资源的浪费, 还引发了一系列生态和环境问题^[6]。因此, 寻找一种安全、低能耗及环境友好的秸秆处理方式, 对秸秆的资源化利用具有重要意义。相较于物理化学等处理方法, 微生物降解秸秆具有无二次污染、处理方式温和、能耗低等特点而被广泛关注^[7-8]。自然条件下, 纤维素类物质降解是多种微生物协同作用的结果^[9]。研究表明, 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^[10]。因此, 相对于单一降解纤维素菌的研究而言复合菌系的研究更加值得关注。

贡嘎山位于四川省甘孜州康定县以南, 最高海拔7 556 m, 在5 000 m以下的低海拔森林覆盖率高, 林下覆盖大量枯枝落叶, 在微生物活动下枯枝落叶被分解, 由于枯枝落叶层中含有大量的纤维素, 因而这种环境对纤维素降解菌具有天然富集作用, 纤维素降解菌相对较多, 更容易获得具有降解纤维素能力的微生物。因此, 为改善农作物秸秆的利用现状, 本研究从川西高原贡嘎山杜鹃林下土壤中分离具有降解纤维素能力的菌株, 筛选出具有高效降解纤维素能力的菌株, 构建复合菌系, 为秸秆资源化利用提供菌种资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源 2015年5月, 采集川西高原贡嘎山区海拔3 500 m杜鹃林下土。去除土壤表面的动植物残体等杂质后, 取0-10 cm的表层土壤样品, 装于塑料袋中, 封口, 冷藏以备。

1.1.2 培养基 (1) 分离培养基: CMC培养基: 羧甲基纤维素钠(CMC-Na) 10.0 g, K_2HPO_4 1.0 g, NH_4NO_3 1.0 g, CaCl 0.02 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.05 g, 琼脂 20.0 g, 蒸馏水1 000 mL; E1培养基: 混合糖9.0 g (葡萄糖1.0 g, 海藻糖1.0 g, 鼠李糖2.0 g, 棉子糖1.0 g, 木糖4.0 g), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, K_2HPO_4 1.0 g, KH_2PO_4 1.0 g, NH_4HO_3 1.0 g, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.05 g, CaCl₂ 0.02 g, 琼脂 20.0 g, 蒸馏水1 000 mL; E2培养基^[11]、BHM培养基^[12]。

(2) 纯化保种培养基: LB培养基: 蛋白胨10.0 g, NaCl 10.0 g, 酵母提取物5.0 g, 琼脂20.0 g, 蒸馏水1 000 mL; ISP₄培养基: 淀粉10.0 g, $(NH_4)_2SO_4$ 4.0 g, CaCO₃ 2.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 4.1 g, K_2HPO_4 2.62 g, 琼脂20.0 g, 蒸馏水1 000 mL。

(3) 筛选培养基: 刚果红培养基: CMC-Na 2.0 g, KH_2PO_4 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25 g, $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 g, 刚果红

0.1 g, 琼脂20.0 g, 蒸馏水1 000 mL; 复筛培养基: CMC-Na 5.0 g, KH_2PO_4 1.0 g, $NaNO_3$ 3.0 g, KCl 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.01 g, 蒸馏水1 000 mL; 滤纸液体培养基: $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, KH_2PO_4 1.0 g, 酵母膏0.1 g, 蒸馏水1 000 mL; 滤纸条(1 cm × 6 cm) 3条/三角瓶。

(4) 秸秆液体培养基: CMC-Na 10.0 g, 蛋白胨2.0 g, NaCl 0.5, K_2HPO_4 1.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, 酵母膏0.5 g, 蒸馏水1 000 mL, 玉米秸秆每瓶2.0 g。

1.2 菌株的分离筛选

1.2.1 菌株的分离和纯化 采集到的土壤样品一部分作为新鲜样直接用无菌水制成 10^{-4} - 10^{-7} 菌悬液, 一部分经风干和高温处理用无菌水制成 10^{-4} - 10^{-7} 菌悬液, 分别在各固体分离培养基上涂布, 放置于28 ℃生化培养箱中培养, 将分离到的细菌和放线菌分别在LB和ISP₄培养基上进行纯化和保种, 将保种好的菌株放置4 ℃冰箱冷藏。

1.2.2 菌株的培养和初筛 分离得到的细菌和放线菌分别均匀地涂布于LB和ISP₄培养基上, 放置于28 ℃生化培养箱中培养, 观察到培养基表面菌株生长均匀, 用直径为5 mm的打孔器将均匀生长的菌株连同培养基一起打孔制成菌饼并接种于刚果红固体培养基上, 置于28 ℃生化培养箱中培养3-5 d后, 观察培养基表面菌落是否产生透明的水解圈, 并测定水解圈直径, 设置3个重复。

1.3 羧甲基纤维素酶(CMCase)活性测定

将初筛获得的菌株制成种子悬浮液, 按10%的接种量接种于碳源为CMC-Na的复筛培养基的三角瓶中, 28 ℃恒温震荡培养, 分别测定3、5、7、9、11 d各菌株的羧甲基纤维素酶(CMCase)活力, 设置3个重复。

1.3.1 标准曲线的绘制 无水葡萄糖80 ℃烘干至恒重制成1 mg/mL标准葡萄糖溶液, 取6支试管分别加入标准葡萄糖溶液各0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL, 补加蒸馏水至2.0 mL, 加入DNS试剂1.5 mL, 沸水浴5 min, 冷却后定容至25 mL, 分光光度540 nm下测定OD值, 绘制出标准曲线。

1.3.2 粗酶液的制备 配制液体复筛培养基分装于250 mL的三角瓶中, 每瓶45 mL, 接入5 mL的种子菌悬液, 置于28 ℃的摇床中培养, 在3、5、7、9、11 d分别取1.5 mL发酵液于离心管中, 10 000 r/min离心10 min得粗酶液。

1.3.3 酶活力测定 酶活力测定方法^[13-14]略有改进, 取0.1 mL粗酶液, 加入1.9 mL质量分数为1%的CMC-Na溶液。在45 ℃恒温下水解20 min, 加入1.5 mL DNS显色液进行沸水浴5 min, 定容至25 mL, 540 nm处比色, 测其OD值, 与标准葡萄糖曲线对照, 由OD值计算出葡萄糖量(m_1)。另将上清液各0.1 mL, 加水1.9 mL, 再加1.5 mL DNS, 沸水浴5 min, 定容至25 mL, 540 nm处比色, 测得粗酶液的葡萄糖量(m_2)。将 m_1 减去 m_2 得到真正由CMC酶降解1% CMC溶液得到的葡萄糖量, 由光密度值计算出的葡萄糖量A, 通过公式计算纤维素分解菌在上述条件下的酶活力(单位: $\mu\text{mol}/\text{mL}$): 酶活力 = $A \times 10 \times 1000/20$ 。

1.4 滤纸条崩解实验

滤纸条降解实验可以反映不同菌株所分泌的各种纤维酶的综合酶活力水平^[15]。将筛选到的具有高CMCase活性的菌株制成种子悬浮液, 分别接种10 mL于装有90 mL滤纸液体

培养基的250 mL三角瓶中, 28 °C, 120 r/min恒温震荡培养, 定期观察滤纸条被降解的情况。

1.5 秸秆崩解及降解率的测定

1.5.1 秸秆崩解实验 玉米秸秆于50 °C烘干至恒重, 用剪刀将其剪切成0.5 cm × 1 cm的片状, 将各菌株种子悬浮液接种5 mL于45 mL将碳源换成玉米秸秆的复筛培养基中, 每瓶0.5 g玉米秸秆, 28 °C, 120 r/min恒温震荡培养, 在以秸秆为唯一碳源条件下, 每天观察秸秆的崩解程度。

1.5.2 秸秆降解率的测定 将玉米秸秆50 °C烘干至恒重, 粉碎过40目筛, 在每个三角瓶中加入90 mL秸秆降解培养基, 然后分别加入2 g玉米秸秆, 121 °C灭菌30 min, 各接种10 mL菌悬液, 28 °C恒温振荡培养, 20 d后, 将培养物5 000 r/min离心10 min, 弃上清, 用蒸馏水反复清洗3次, 每次清洗后5 000 r/min离心10 min, 弃上清, 80 °C烘至恒重, 计算失重率。对照为接入10 mL无菌水的液体培养基, 每个处理设置3个重复。

1.6 拮抗实验

参照杨林丽等人的实验方法^[16]。

1.7 复合菌系不同菌株组合滤纸酶(Fpase)活性测定

根据各菌株CMCase活力、滤纸条崩解能力及玉米秸秆的降解效果, 结合拮抗实验结果, 构建复合菌系。将各组合菌株的菌悬液按照体积比1:1混合, 分别接种10 mL于90 mL秸秆液体培养基中, 28 °C, 120 r/min恒温震荡培养7 d后, 取上清制备粗酶液测定其滤纸酶活性。滤纸酶活(Fpase)测定方法参考萨如拉等人的方法^[17]: 取0.2 mL酶液, 加入pH为4.8的醋酸钠缓冲液1.8 mL。测定管中加入1 cm × 6 cm滤纸条, 充分浸泡与空白管同时置50 °C恒温水浴60 min; 然后加入DNS显色液2 mL, 空白管同时加1 cm × 6 cm滤纸条, 沸水浴10 min, 冷却后加蒸馏水至25 mL, 以空白调零, 540 nm测OD值。每个处理设置3个重复。

1.8 复合菌系不同菌株组合对秸秆的降解率测定

测定方法同1.5.2, 复合菌系各菌悬液按1:1共接种10 mL于90 mL秸秆降解培养基中, 每个处理设置3个重复。

1.9 菌株的鉴定

1.9.1 形态学鉴定 通过观察筛选得到的15株有效菌株在平板上的生长形态进行判断, 分别对细菌和放线菌采用革兰氏染色和简单染色^[18]进行显微形态观察。

1.9.2 分子生物学鉴定 对筛选出的具有高效降解纤维素能力的菌株进行DNA的提取, 细菌选用冻融法^[19], 放线菌选用蒋淑梅等人的方法^[20]。采用20 μL反应体系, 用细菌基因通用引物(8-27F、1523-1504R)对提取的DNA进行PCR扩增^[21]。测序结果在美国生物技术研究中心(National Center for Biotechnology, NCBI)数据库中进行BLAST比对, 在GenBank等公共数据库中寻找相似性最大菌株的基因序列, 借助MEGA5.0软件分析采用Neighbor-joining法构建系统发育树^[22]。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离与初步筛选

本研究从3个土壤样品中共分离得到79个菌株, 经刚果红培养基初步筛选得到15株具有CMC降解能力的菌株(110、

112、113、116、145、146、147、150、152、153、154、156、171、174、179), 其水解圈效果明显(图1)。综合形态学和显微观察初步判定110、113、116、174为细菌, 其余11株为放线菌。

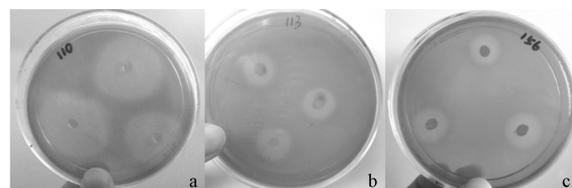


图1 菌株在刚果红培养基上的水解效果. a: 菌株110; b: 菌株113; c: 菌株156.

Fig. 1 Transparent hydrolysis circle of isolates on Congo red medium. a: strain 110; b: strain 113; c: strain 156.

初筛的结果表明, 筛选获得的15株菌均可在刚果红培养基形成明显的水解圈, 还具有产生羧甲基纤维素酶(CMCase)的能力。由表1可见, 菌株110、116解圈直径较大且CMCase活力相对较高, 如菌株110水解圈直径为32.5 mm, CMCase活力为75.05 μmol/mL; 菌株112、174水解圈较小而CMCase活力却相对较高, 如菌株174水解圈直径仅为7.1 mm, CMCase活力却高达71.75 μmol/mL; 菌株145、152水解圈直径较小, CMCase活力也相对偏低, 如菌株152水解圈直径为1.5 mm, CMCase活力为15.41 μmol/mL; 而菌株113、150、153、156、179水解圈直径与菌株171、146、147、154相似, 但其CMCase活力明显低于后者, 如菌株113与菌株154水解圈直径均在13-14 mm之间, 但两者的CMCase活力分别是14.75 μmol/mL和70.65 μmol/mL, 可见菌株在刚果红培养基上形成的水解圈大小与其所产生的CMCase活力之间并无明显的相关性。此外, 菌株110、116、174在第5天时CMCase活力达最大, 菌株113、112、145、146、147、154、171、179在第7天时CMCase活力达最大, 菌株150、152、153、156在第9天时CMCase活力达最大, 表明不同菌株达到最大酶活力所需的时间也是不一致的(表1)。

表1 各菌株降解纤维素能力评价

Table 1 Assessment of the cellulose degradation activity of isolates

菌株编号 Strain No.	水解圈直径 Hydrolysis spot diameter (d/mm)	CMC最高酶活 Highest CMCase ($\mu\text{mol mL}^{-1}$)	最高酶活出现时间 Time of the highest CMCase (t/d)
110	32.5 ± 1.63	75.05 ± 0.38	5
113	13.5 ± 0.82	14.75 ± 0.12	7
116	31.0 ± 1.08	78.13 ± 0.38	5
174	7.1 ± 0.28	71.75 ± 0.16	5
112	2.5 ± 0.16	33.68 ± 0.73	7
145	6.5 ± 0.24	14.97 ± 0.20	7
146	14.9 ± 0.56	65.15 ± 1.02	7
147	11.9 ± 1.98	59.43 ± 0.33	7
150	11.1 ± 1.84	14.97 ± 0.22	9
152	1.5 ± 0.22	15.41 ± 0.51	9
153	20.5 ± 0.41	14.97 ± 0.66	9
154	13.1 ± 1.16	70.65 ± 0.36	7
156	14.9 ± 0.43	15.19 ± 0.24	7
171	13.3 ± 0.91	53.05 ± 0.19	7
179	13.9 ± 1.42	19.08 ± 0.18	7

2.2 菌株对滤纸条的崩解效果

对筛选得到的15株具有CMC降解能力的菌株进一步测

定其崩解滤纸的能力. 结果表明, 15株菌对滤纸条均具有一定的崩解能力, 18 d内15株菌可将滤纸条完全崩解(表2).

筛选得到的15株菌中, 菌株116和154对滤纸条的降解能力最强, 在3 d天内可以将滤纸条完全崩解(图2). 滤纸在被菌株降解时先被软化随后被降解为长度较短的滤纸条, 再逐渐被完全降解, 如菌株171对滤纸条作用3 d滤纸条被降解为长度较短的片段(图2).

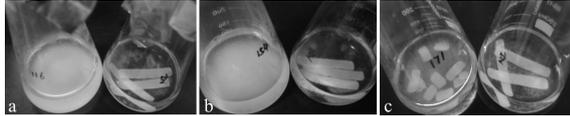


图2 菌株的滤纸崩解效果. 培养3 d后与对照相比: a、b, 滤纸条被菌株116、154完全崩解; c, 滤纸条被菌株171部分崩解.

Fig. 2 Effect of filter paper degradation of strains. a: Filter paper strips completely degraded by Strain 116; b: Filter paper completely degraded by Strain 154; c: Filter paper strips partially degraded by Strain 171.

2.3 菌株对秸秆的崩解效果及降解率

2.3.1 菌株对秸秆的崩解效果 经前期筛选将获得的15株菌接种于秸秆液体培养基培养20 d后, 各菌株对秸秆的崩解作

用各不相同, 15株菌中有13株表现出对秸秆的具有崩解能力. 如表3所示, 各菌株对秸秆作用的前3天秸秆形态均无明显变化, 第5天开始菌株116、154作用的秸秆开始被降解, 其中菌株154在11 d内能够将玉米秸秆完全崩解, 其它菌株如110、116、147、171在15 d内也能够崩解大部分玉米秸秆培养; 而菌株145、150、152对玉米秸秆的崩解作用不明显.

不同菌株对秸秆的崩解程度不同, 秸秆崩解后的形态有所差异. 如在菌株153的作用下, 秸秆被降解得较少; 在菌株116的作用下, 大部分秸秆被崩解为碎屑状; 而在菌株154的作用下, 秸秆完全被崩解为碎屑状(图3).

2.3.2 菌株的秸秆降解效果 由图4可知, 各菌株对玉米秸秆均表现出一定的降解作用. 其中菌株110、116、174、147、154、171表现出较高的秸秆降解效果, 这6株菌对秸秆的降解率分别为14.8%、21.1%、18.4%、16.8%、19.5%、16.5%; 菌株152对玉米秸秆的降解效果最差, 其降解率仅为1.3%.

2.4 拮抗实验结果

菌株174与其他12株菌的两菌相交处均有菌生长, 说明174与其他12株菌之间无拮抗作用, 可以进行组合; 菌株110、

表2 各菌株的滤纸崩解效果

Table 2 Effect of filter paper degradation of strains

菌株编号 Strain No.	滤纸条崩解时间 Time of filter paper degradation									
	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d	11 d	13 d	15 d	17 d	18 d
110	+	++	++++							
112			+		++			++++		
113					+		++			++++
116	++	++++								
174	+	++	++++							
145			+		++		++++			
146		+		++		++++				
147	+	++	++++							
150				+		++		++++		
152				+			++		++++	
153				+		++			++++	
154	++	++++								
156		+		++		++++				
171		+	++	++++						
179				+			++			++++

+ : 滤纸条断裂; ++ : 滤纸条被降解一半; ++++ : 滤纸条完全被降解.

+ Filter paper broken; ++ Filter paper half degraded; ++++ Filter paper completely degraded.

表3 秸秆崩解程度

Table 3 Degradation degrees of corn straw by the microbial strains

菌株编号 Strain No.	秸秆崩解时间 Time of straw degradation								
	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d	11 d	13 d	15 d	17 d
110			+		++	+++			
112								+	
116			+	++	+++				
174				+		++			
145									+
146								+	
147				+		++		+++	
150									+
152									+
153							+		
154			+	++	+++	++++			
156								+	
171				+		++			

+ : 秸秆被降解较少; ++ : 秸秆被降解一半; +++ : 秸秆基本被降解; ++++ : 秸秆完全降解.

+ Only a little straw degraded; ++ Half of the straw degraded; +++ Majority of straw degraded; ++++ All straw degraded.

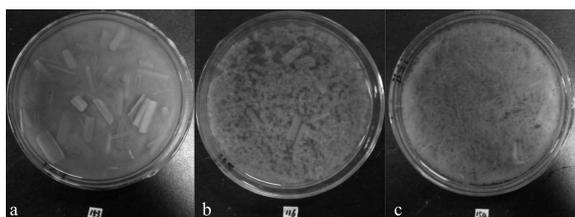


图3 菌株培养20 d对玉米秸秆崩解的效果. a: 菌株153; b: 菌株116; c: 菌株154.

Fig. 3 Corn straw degradation effect of the strains cultivated for 20 days. a: Strain 153; b: Strain 116; c: Strain 154.

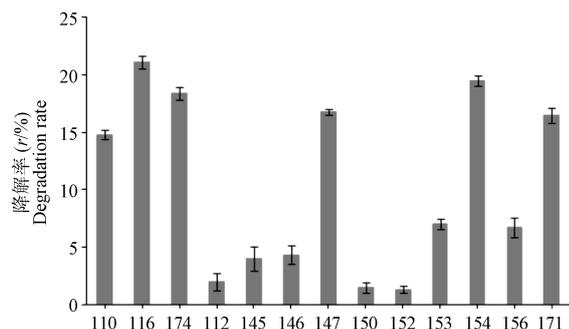


图4 不同菌株对玉米秸秆的降解.

Fig. 4 Degradation rate of corn straw by different strains.

116与其他11株菌的两菌相交形成了无菌区,说明这些菌株之间存在拮抗作用,不能进行组合.根据各菌株间的拮抗关系(表4)将无拮抗作用的菌株组合构建复合菌系.

2.5 各复合菌系滤纸酶(Fpase)活性测定

根据各菌株的CMCase活力、滤纸条崩解能力、对玉米秸秆的降解效果以及各菌株间的拮抗关系,构建5组复合菌系: A, 112、146、156、171; B, 145、147、150、153; C, 110、116、174; D, 147、154、171; E, 145、146、150、152、153(其中C为细菌组合, A、B、D、E为放线菌组合).由图5a可以看出,所构建的5组复合菌系均具有一定的滤纸酶活性,其中组合C和D滤纸酶活力高于其它组合,分别为18.36 U/mL和15.47 U/mL,表明复合菌系C、D与其他3个组合相比,具有较高的纤维素降解潜力.

表4 各菌株间的拮抗关系

Table 4 Antagonistic relationship of strains

菌株编号 Strain No.	110	116	174	112	145	146	147	150	152	153	154	156	171
110	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
116	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
174	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
112	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
145	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
146	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
147	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
150	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
152	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
153	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
154	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
156	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
171	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: 相互拮抗; -: 无拮抗作用.

+: Antagonistic; -: Non-antagonistic.

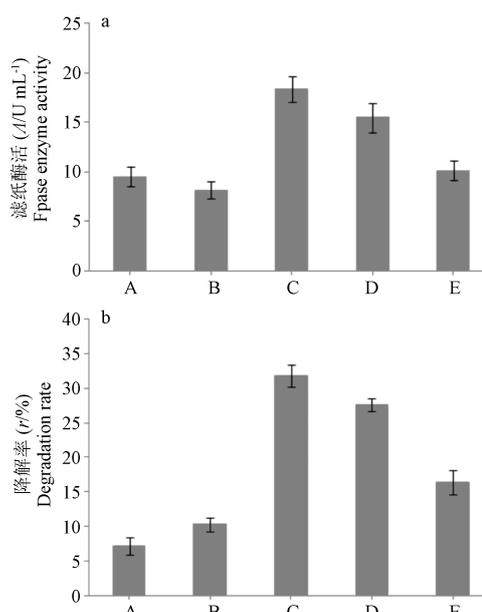


图5 不同复合菌系的滤纸酶活力(a)和对玉米秸秆的降解率(b).

Fig. 5 Fpase enzyme activities (a) and corn straw degradation rate (b) of different compound strains.

A: 112, 146, 156, 171; B: 145, 147, 150, 153; C: 110, 116, 174; D: 147, 154, 171; E: 145, 146, 150, 152, 153.

2.6 各复合菌系秸秆崩解效果及秸秆降解率

5组复合菌系接种于秸秆液体培养基中培养20 d后,组合C、D崩解秸秆的程度较高,显示出较好的崩解效果;组合A、B、E崩解秸秆效果不明显(图6).秸秆降解率经测定表明,不同复合菌系秸秆的失重率存在较大的差异.由图5b可知,组合C和D对玉米秸秆的降解率分别为31.8%和27.6%,表现出较好的降解效果,其中组合C对秸秆的降解率较组合中对秸秆降解率最高的单菌株116提高了50.71%;组合D对秸秆的降解率较组合中对秸秆降解率最高的单菌株154提高了41.54%;组合A、B、E虽然对秸秆也表现出一定的降解能力,但其降解效果与组合中的单菌株相比,并无太大差异.

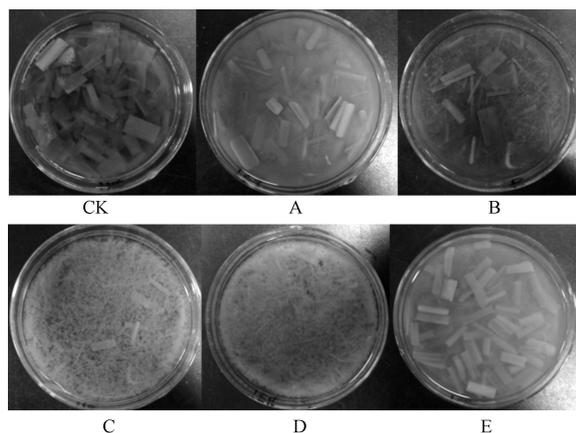


图6 复合菌系秸秆崩解效果。CK: 空白。

Fig. 6 Straw disintegration effect of compound strains.

CK: blank control. A: 112, 146, 156, 171; B: 145, 147, 150, 153; C: 110, 116, 174; D: 147, 154, 171; E: 145, 146, 150, 152, 153.

2.7 菌株的鉴定

综合形态学特征及16S rRNA基因分析,对构成具有较高纤维素降解潜力的复合菌系C、D的菌株110、116、174、147、154、171进行分类鉴定。

2.7.1 形态学鉴定 菌株147、154、171的菌落呈圆形,表面干燥,菌落周围呈放射状,显微镜形态观察表明,这3株菌具有丝状菌丝及球状的孢子链,呈现明显的放线菌特征;菌株110、116、174的菌落表面湿润,在显微镜下菌体呈球状或杆状,为典型的细菌结构。图7为菌株147、154、171、110、116、174的显微形态特征图。

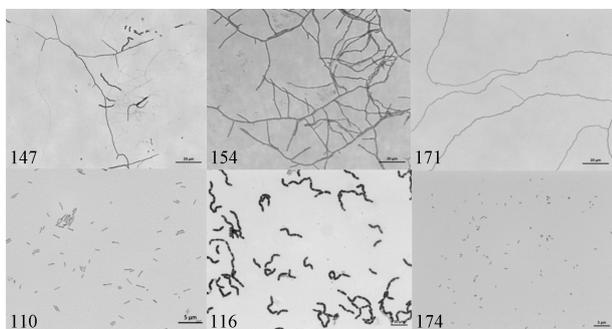


图7 菌株的显微形态特征。

Fig. 7 Microscopic morphology of strains.

2.7.2 菌株系统发育分析 6株菌经16S rDNA序列测定,序列结果在GenBank中用Blast进行检索和同源性比较,用相关软件进行序列比对、相似性计算、进化距离矩阵计算、聚类分析,构建系统进化树(图8)。菌株110、116、147、154、171、174与对应相似性最高的菌株同源性为99%-100%,分别属于链霉菌属(*Streptomyces*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)。

3 讨论

高效纤维素降解菌的筛选中,应采用多重评价标准对菌株的降解能力进行综合分析。不同微生物特性不同,表现出

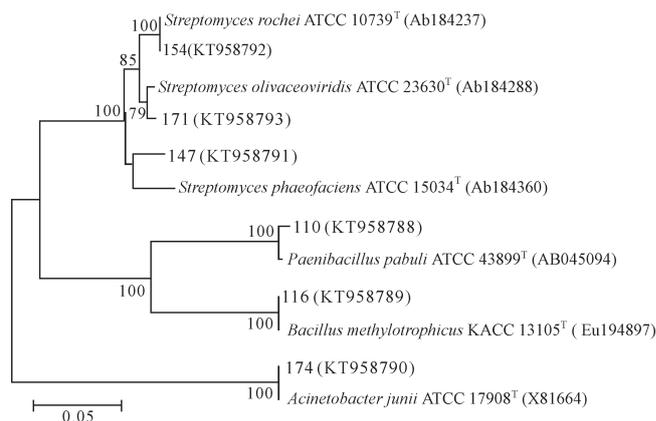


图8 纤维素菌16S rRNA序列系统发育树。

Fig. 8 Phylogenetic tree of 16S rRNA of cellulose-degrading strains.

来的酶活力与其对底物的降解能力间的相关性存在差异^[15]。本研究中,初筛获得的15株菌均能在刚果红培养基上产生水解圈,说明这些菌株都具有降解CMC的能力。在后续CMC酶活力测定实验中发现,能在刚果红培养基上产生水解圈的15株菌中有些水解圈直径大的菌株CMC酶活力也相对较高,有些则相反,表明各菌株水解圈直径大小与酶活力高低没有很好的相关性^[23],说明刚果红培养基只能为定性判断菌株是否具有降解CMC的能力提供参考;滤纸条降解试验中;筛选出能将滤纸完全降解的15菌株,说明这15株菌均具有纤维素降解能力,而各菌株完全降解滤纸条所需时间的不同则反映了各菌株降解纤维素能力的高低,在相同接种量下,完全降解滤纸条时间越短说明菌株降解纤维素的能力越强;与郭夏丽等人构建的复合菌系滤纸酶活力^[24]相比,本研究所构建的复合菌系C、D的滤纸酶活力分别为18.36 U/mL和15.47 U/mL,表明这两组复合菌系具有高效降解纤维素的潜力;此外,这两组复合菌系对玉米秸秆的降解率分别达到了31.8%和27.6%,与构成复合菌系C、D中的单菌株对秸秆的降解率相比分别提高了50.71%和41.54%,进一步证明了这两组复合菌系对纤维素的降解能力。

纤维素的降解是多种酶协同作用的结果,单一的菌株通常无法产生所有的纤维素降解酶系^[9, 25],所产生的纤维素降解酶比较单一,降解效果不佳;而多种菌株混合培养后可能会产生不同的酶系,在各酶之间的协同作用下,可提高纤维素降解效果^[24]。本研究结果表明,多株菌的复合菌系C、D对纤维素的降解优于组合中的各单菌株,这与杨林丽等人的研究结果^[16]相一致。但组合A、B、E对秸秆降解能力与组合中的单菌株相比无明显变化,出现这种现象的原因可能是组合菌株在养分含量有限的生长条件下出现了营养物质争夺的现象,导致各菌株均不能达到最佳生长状态,从而抑制了各菌株产生纤维素酶的能力,也可能是组合中的各菌株所产的纤维素酶的酶系相同,在相同接种量的条件下,复合菌系中的菌株也无法达到很好的协同作用。对比复合菌系的滤纸酶活、玉米秸秆降解效果及降解率的测定结果发现,导致各菌株与各复合菌系纤维素降解效果差异的原因,可能还与纤维素酶是一种具有底物特异性的多组分酶系有关,不同碳源对纤维素酶的生成具有不同的诱导能力^[26],虽然滤纸聚合度和

结晶度接近天然纤维素,但与天然纤维素物质之间依然存在差异,因此复合菌系的滤纸酶活力与对秸秆降解的能力之间存在差异,如组合A的滤纸酶活高于组合B的滤纸酶活,而组合B对秸秆的降解效果却优于组合A,但总体表现为复合菌系对秸秆的降解能力优于单一菌株,表明通过复合菌系的构建可以有效提高菌株对纤维素的降解能力。此外,复合菌系在自然条件对天然纤维素进行降解时,由于组合的菌株种类有所差异,增大了有效菌株在自然环境中的生存和生长的几率。因此,利用复合菌系降解农业秸秆废弃具有更广泛的应用前景。

分离高效降解纤维素菌的研究已有较多报道,从这些报道中可以看出研究较多的是霉菌,尤以绿色木霉、里氏木霉和康氏木霉为典型^[9,27],对细菌和放线菌组成的复合菌系对纤维素降解的研究相对较少,而细菌的基因一般不含内含子,可直接从基因组DNA中克隆目的基因,既利于研究纤维素酶基因的多样性,也利于高效纤维素酶基因工程菌的构建^[28];放线菌是土壤微生物重要的组成部分,是木质纤维素、几丁质等高分子聚合物的主要分解者,目前已筛选出很多降解纤维素的放线菌菌株^[29-31]。此外,放线菌在生长过程中可以产生功能多样的抗菌素,抑制杂菌生长^[32]。因此,这两类菌所构建的复合菌系具有较广的应用前景。

综上所述,本研究从环境独特的贡嘎山杜鹃林下土壤中分离纤维素降解菌,通过构建不同菌株组合成的复合菌系显著提高了微生物对玉米秸秆的降解能力,为农业秸秆废弃的资源化利用提供了菌种资源和理论依据。

参考文献 [References]

- 1 吴文韬,鞠美庭,刘金鹏,刘博群,佟树敏.一株纤维素降解菌的分离,鉴定及对玉米秸秆的降解特性[J].微生物学通报,2013,40(4):712-719 [Wu WT, Ju MT, Liu JB, Liu BQ, Tong SM. Isolation, identification and corn stalk degradation characteristics of cellulose-degrading bacterial strain NH11 [J]. *Microbiology*, 2013, 40(4): 712-719]
- 2 范力敏,季萍,陈晓湘,孙韦强.转化纤维素资源生成酒精的研究[J].环境科学学报,1990,10(3):356-358 [Fan LM, Ji P, Chen XX, Sun WQ. Transformation of resource generation cellulosic ethanol research [J]. *Acta Sci Circumst*, 1990, 10(3): 356-358]
- 3 Ragauskas AJ, Williams CK, Davison BH, Britovsek G, Cairney J, Eckert CA, Frederick WJ, Hallett JP, Leak DJ, Liotta CL. The path forward for biofuels and biomaterials[J]. *Science*, 2006, 311(5760): 484-489.
- 4 付丽丽.作物秸秆纤维素降解菌的分离与筛选[D].杭州:浙江大学,2012 [Fu LL. Isolation and screening of cellulose-degrading bacteria for crop straws [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2012]
- 5 Sanchez OJ, Cardona CA. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks [J]. *Bioresour Technol*, 2008, 99(13): 5270-5295
- 6 Zeng X, Ma Y, Ma L. Utilization of straw in biomass energy in China [J]. *Renewable Sustainable Energy Rev*, 2007, 11(5): 976-987
- 7 Sarria-Alfonso V, Sánchez-Sierra J, Aguirre-Morales M, Gutiérrez-Rojas I, Moreno-Sarmiento N, Poutou-Pinales RA. Culture media statistical optimization for biomass production of a ligninolytic fungus for future rice straw degradation [J]. *Indian J Microbiol*, 2013, 53(2): 199-207
- 8 Guo H, Chang J, Yin Q, Wang P, Lu M, Wang X, Dang X. Effect of the combined physical and chemical treatments with microbial fermentation on corn straw degradation[J]. *Bioresour Technol*, 2013, 148: 361-365
- 9 Lynd LR, Weimer PJ, Van Zyl WH, Pretorius IS. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002, 66(3): 506-577
- 10 Haruta S, Cui Z, Huang Z, Li M, Ishii M, Igarashi Y. Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 59(4-5): 529-534
- 11 Lu W-J, Wang H-T, Yang S-J, Wang Z-C, Nie Y-F. Isolation and characterization of mesophilic cellulose-degrading bacteria from flower stalks-vegetable waste co-composting system [J]. *J Gen Appl Microbiol*, 2005, 51(6): 353-360
- 12 Lo Y-C, Su Y-C, Cheng C-L, Chang J-S. Biohydrogen production from pure and natural lignocellulosic feedstock with chemical pretreatment and bacterial hydrolysis [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 2011, 36(21): 13955-13963
- 13 林远声,列璞怡.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(1):82-85 [Lin YS, Lie PY. Degradation of cellulose fungi separation, screening and determination of enzyme activity. *Acta Sci Nat Univ Sunyatseni*, 2004, 43: 82-85]
- 14 尚婷婷,李全宏,邓尚贵.高效降解纤维素菌系的筛选分离及复合菌系的构建[J].中国农学通报,2014,30(31):254-260 [Shang TT, Li QG, Deng SG. Screening of straw cellulose degrading microorganisms and construction of a high efficient complex microbial system [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2014, 30(31): 254-260]
- 15 王海滨,韩立荣,冯俊涛,张兴.高效纤维素降解菌的筛选及复合菌系的构建[J].农业生物技术学报,2015,23(4):421-431 [Wang HB, Han LR, Feng JT, Zhang X. Screening of highly efficient cellulose degradation microbes and construction of composite strains [J]. *J Agric Biotechnol*, 2015, 23(4): 421-431]
- 16 杨林丽.纤维素降解菌筛选及混合菌种纤维素降解能力测定.杨凌:西北农林科技大学,2013:22 [Yang LL. Screening of cellulose-decomposing bacteria and measuring activity of CMCase of the mixed bacteria [D]. Yangling: Northwest Agriculture & Forest University, 2013: 22]
- 17 萨如拉,高聚林,于晓芳,胡树平.玉米秸秆低温降解复合菌系的筛选[J].中国农业科学,2013,46(19):4082-4090 [Sarula, Gao JL, Yu XF, Hu SP. Screening of Low Temperature Maize Stalk Decomposition Microorganism [J]. *Sci Agric Sin*, 2013, 46(19): 4082-4090]
- 18 袁红莉,王贺祥.农业微生物学及实验教程.北京:中国农业大学出版社,2009:441-443 [Yuan HL, Wang HX, Li Y, Song Y, Wu K. Agricultural microbiology and experiment tutorial [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2009: 441-443]
- 19 冯广达,陈美标,羊宋贞,朱红惠.用于PCR扩增的细菌DNA提取方法比较[J].华南农业大学学报,2013,34(3):439-442 [Feng GD, Chen MB, Yang SZ, Zhu HH. A comparative study on bacteria DNA extraction methods used for PCR amplification. *J South China Agric Univ*, 2013, 34(3): 439-442]

- 20 姜淑梅, 张龙, 戴世鲲, 李翔. 一种简单、有效的适于PCR操作的放线菌DNA提取方法[J]. 生物技术, 2007, **17** (1): 39-41 [Jiang SM, Zhang L, Dai SK, Li X. A quick and efficient method for genomic DNA extraction from actinobacteria [J]. *Biotechnol*, 2007, **17** (1): 39-41]
- 21 曹艳茹, 姜怡, 李有龙, 陈秀, 靳荣线, 和文祥. 孟加拉虎粪便放线菌的分离及其多样性[J]. 微生物学报, 2012, **52** (7): 816-824 [Cao YR, Jiang Y, Li YL, Chen X, Jin RX, He WX. Isolation methods and diversity of culturable fecal actinobacteria associated with *Panthera tigris tigris* in Yunnan Safari Park [J]. *Microbiology*, 2012, **52** (7): 816-824]
- 22 Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Mol Biol Evol*, 2011, **28** (10): 2731-2739
- 23 陈燕, 周孙全, 郑奇士. 常温纤维素降解菌的分离与鉴定[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2010, **30** (8): 1018 [Chen Y, Zhou SQ, Zheng QS, Zhou YJ, Wang Y, Tan YM. Isolation and Identification of cellulose-degrading bacteria under room temperature [J]. *J Shanghai Jiaotong Univ*, 2010, **30** (8): 1018-1021]
- 24 郭夏丽, 程小平, 杨小丽, 王岩. 高效玉米秸秆降解菌复合系的构建[J]. 中国农学通报, 2010, **26** (7): 261-266 [Guo XL, Yang XL, Li SY, Wang Y. Construction of composite consortia with high capacity of lignocellulose degradation [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2010, **26** (7): 261-266]
- 25 罗辉. 高效厌氧纤维素降解菌的筛选, 复合菌系构建及应用研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2008 [Isolation of effective cellulolytic anaerobic bacteria, construction and application of mix culture [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2008]
- 26 伍时华, 徐雅飞, 黄翠姬. 降解纤维素菌株的筛选[J]. 食品科技, 2006, **31** (8): 50-52 [Wu SH, Xu YF, Huang CJ. Study on screening of cellulose degradation strains [J]. *Food Sci Technol*, 2006, **31** (8): 50-52]
- 27 Brady SK, Sreelatha S, Feng Y, Chundawat SP, Lang MJ. Cellobiohydrolase 1 from *Trichoderma reesei* degrades cellulose in single cellobiose steps [J]. *Nat Commun*, 2015, **6**: 1-9
- 28 陈春岚, 李楠. 细菌纤维素酶研究进展[J]. 轻工科技, 2007, **23** (1): 18-20 [Chen CL, Li N. Bacterial cellulose enzyme is reviewed [J]. *Guangxi J Light Ind*, 2007, **23** (1): 18-20]
- 29 Pragma R, Yasmin A, Anshula J. An insight into agricultural properties of actinomycetes [J]. *Int J Res Biol Sci*, 2012, **1**: 7-12
- 30 de Menezes AB, Prendergast-Miller MT, Poonpatana P, Farrell M, Bissett A, Macdonald LM, Toscas P, Richardson AE, Thrall PH. C/N Ratio Drives Soil actinobacterial cellobiohydrolase gene diversity [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2015, **81** (9): 3016-3028
- 31 孟建宇, 李衡, 樊兆阳, 冯福应. 低温纤维素降解菌的分离与鉴定[J]. 应用与环境生物学报, 2014, **20** (1): 152-156 [Meng JY, Li H, Fan ZY, Feng FY. Isolation and identification of cellulose-degrading bacteria under low temperature. *Chin J Appl Environ Biol*, 2014, **20** (1): 152-156]
- 32 宋波, 羊键. 一株降解纤维素的放线菌的筛选及其产酶条件的研究[J]. 微生物学杂志, 2005, **25** (5): 36-39 [Song B, Yang J. Screening of a cellulose-decomposing actinomycetes strain and its enzyme-producing conditions [J]. *J Microbiol*, 2005, **25** (5): 36-39]