

纤维素降解菌的分离筛选及其秸秆降解能力研究

汤莹, 赵旭, 李娟, 王子宁

(甘肃省农业科学院土壤肥料与节水农业研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 通过筛选高效的秸秆纤维素降解菌, 为进一步资源化利用农作物秸秆提供优质的微生物资源。采集奶牛粪样品, 通过纤维素平板刚果红染色法初筛及发酵液纤维素酶和木聚糖酶活性测定法复筛菌种, 探究选出菌株对秸秆的降解能力。结果表明, 筛选获得9株产纤维素酶的菌株, 其中菌株TX1的透明圈与菌落直径比值最大, 为1.729。菌株TX7的纤维素酶活力和木聚糖酶活力最强, CMC-Na酶(CX)活力为0.2247 U/mL, 滤纸酶(FPA)活力为0.2960 U/mL, 木聚糖酶活力为8.84 U/mL。菌株TX3对小麦秸秆半纤维素和纤维素的降解能力最强, 每1.000 g小麦秸秆的纤维素、半纤维素质量分别为0.185、0.190 g; 菌株TX7对小麦秸秆木质素的降解能力最强, 每1.000 g小麦秸秆的木质素质量只有0.037 g。由此可见, 菌株TX3、TX7具有进一步研发成高效降解秸秆微生物菌剂的潜力, 为秸秆纤维素的转化利用提供了优质的菌种资源。

关键词: 纤维素降解菌; 秸秆; 筛选; 降解能力; 奶牛粪

中图分类号: X172

文献标志码: A

文章编号: 2097-2172(2024)11-1055-05

doi:10.3969/j.issn.2097-2172.2024.11.014

Isolation and Screening of Cellulose Degrading Bacteria and Their Straw Degradation Capacity

TANG Ying, ZHAO Xu, LI Juan, WANG Zining

(Institute of Soil, fertilizer and Water-saving Agriculture, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China)

Abstract: In order to screen for efficient cellulose degrading bacteria for straw, so as to provide high-quality microbial resources for the further resource utilization of crop straw, dairy cow dung samples were collected, and the strains were initially screened by cellulose plate Congo red staining and rescreened by cellulase and xylanase activity measurement in fermentation broth to explore the degradation capacity of the selected strains on straw. Results showed that 9 strains of cellulase-producing bacteria were obtained, among which strain TX1 exhibited the largest hyaline circle to colony diameter ratio of 1.729. Strain TX7 had the strongest cellulase and xylanase activity, with a CMC-Na enzyme (CX) activity of 0.2247 U/mL, a filter paper enzyme (FPA) activity of 0.2960 U/mL, and a xylanase activity of 8.84 U/mL. Strain TX3 showed the strongest degradation capacity for hemicellulose and cellulose in wheat straw, with cellulose and hemicellulose masses of 0.185 g and 0.190 g, respectively, per 1.000 g of wheat straw. Strain TX7 exhibited the strongest degradation capacity for lignin in wheat straw, with a lignin mass of only 0.037 g per 1.000 g of wheat straw. Thus, strains TX3 and TX7 have the potential for further development into efficient strawdegrading microbial agents, providing high-quality microbial resources for the conversion and utilization of straw cellulose.

Key words: Cellulose degrading bacteria; Straw; Screening; Degradation capacity; Dairy cow dung

纤维素、半纤维素、木质素是农作物秸秆的主要成分, 占农作物总干重的90%以上^[1]。2022年我国农作物秸秆总量达到 8.56×10^8 t, 其中 7.22×10^8 t被资源化利用, 秸秆的资源化利用率达到87.6%^[2]。目前我国主要将秸秆用于生产肥料、饲料及燃料, 分别占秸秆利用量的54%、23%和

14%, 其中将秸秆肥料化利用是主要的秸秆资源化利用模式^[3-4]。然而秸秆还田腐解的过程中, 秸秆会与农作物竞争吸收土壤中的水分、氮素等营养元素, 影响农作物的生长, 造成减产^[5]。但秸秆快速降解还田可以有效增加土壤有机质, 改善土壤理化性状, 提高土壤肥力, 促进作物生长, 增

收稿日期: 2024-09-18

基金项目: 中央引导地方科技发展资金项目(23YQA0323); 甘肃省现代农业科技支撑体系区域创新中心重点科技项目(2023GAAS07); 甘肃省农业科学院科技成果转化项目(2024GAAS-CGZH04)。

作者简介: 汤莹(1974—), 男, 甘肃临夏人, 副研究员, 主要从事农业资源高效利用、作物耕作栽培及土壤培肥等方面的研究与示范推广工作。Email: 344413975@qq.com。

加作物产量^[6-7]。利用微生物提高秸秆降解速度是目前常用的一种降解秸秆方法,对秸秆还田技术的快速应用具有重要意义。赵方圆等^[8]从牛羊粪堆肥中分离筛选出1株具有纤维素降解能力的菌种 *Aspergillus* sp. YN1,该菌在30℃条件下摇瓶发酵72h后的滤纸酶活性高达1500 U/mL。周泽等^[9]从羊粪中分离筛选7株具有纤维素降解能力的菌种,将其接种到小麦秸秆中30d,可将19.36%的秸秆降解。王文凡等^[10]从牛羊粪堆肥中分离筛选出1株具有纤维素降解能力的细菌,其对秸秆有较强的降解能力,接种秸秆并发酵7d,可降解19.35%的秸秆。我们利用纤维素刚果红平板从新鲜奶牛粪中分离纯化筛选具有纤维素降解能力的菌种,通过比较菌种发酵液的纤维素酶活力和木聚糖酶活力以及菌种对小麦秸秆纤维素、半纤维素、木质素的降解能力,筛选确定降解秸秆的适宜微生物菌种,以期为进一步资源化利用农作物秸秆提供优质的微生物资源。

1 材料与方法

1.1 供试培养基

供试牛肉膏培养基:牛肉膏3.0g、蛋白胨10.0g、NaCl 5.0g、琼脂15.0g,水1000mL, pH 7.2~7.4。

纤维素培养基:蔗糖20.0g、K₂HPO₄ 1.0g、FeSO₄ 0.1g、MgSO₄·7H₂O 0.5g、NaCl 0.5g、NaMoO₄ 0.005g、CaCO₃ 2.0g、琼脂15.0g、羧甲基纤维素2.0g,1000mL蒸馏水, pH 7.5±0.2。

小麦秸秆无机盐培养基:K₂HPO₄·3H₂O 13.3g、KH₂PO₄ 4.0g、MgSO₄·7H₂O 0.2g、(NH₄)₂SO₄ 0.5g、琼脂15.0g、蔗糖20.0g、小麦秸秆粉(过120目筛)4.0g,蒸馏水1000mL, pH 7.0。

1.2 样品的采集

金昌市金川区某奶牛养殖场采集奶牛粪鲜样5份,依次编为1#、2#、3#、4#、5#。

1.3 纤维素菌的分离纯化

1.3.1 分离 采用梯度稀释涂平板法,即称取奶牛粪鲜样品10g,放入灭菌三角瓶中,加无菌水90mL,180 r/min 摇床振荡1h后吸上层稀释液,再用无菌水做10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶梯度稀释,分别吸取100 μL 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶的奶牛粪上层稀释液涂布于牛肉膏培养基和纤维

素培养基平板,30℃培养48h^[11]。

1.3.2 纯化 待平板上长出菌落后将不同平板培养基上的单个菌落挑取到纤维素培养基上划线培养48h,待菌落长好后,连续将单个菌落在纤维素平板培养基上划线培养3次,直到无杂菌为止^[11]。

1.4 纤维素菌的初步筛选

挑取单菌落于纤维素酶筛选平板上,30℃培养48h后用0.1%刚果红溶液染色1h,去掉染液,然后用1mol/L NaCl溶液浸泡,随后观察是否有透明圈产生。并根据有无透明圈及透明圈与菌株菌落比例的大小来筛选菌株^[12]。

1.4.1 纤维素酶活力单位 酶活力单位(U)的定义为在一定条件下每分钟产生1 μg 还原糖(以葡萄糖计)为1个活力单位,以每毫升发酵液所含酶活力单位表示即U/mL。

1.4.2 纤维素酶 CMC-Na 酶(CX)活力单位的测定 将发酵液在4℃、8000 r/min 条件下离心15min,取上清液,然后取4支洗净烘干的20.0mL具塞刻度试管,编号(1、2、3、4)后各加入1.0mL 5% CMC-Na,并向1号试管中加入1.5mL DNS溶液以钝化酶活性,作为空白对照,比色时调零用。将4支试管同时在40℃水浴中预热5~10min,再各加入1.0mL粗酶液,40℃水浴中保温30min后取出,立即向2、3、4号试管中各加入1.5mL DNS溶液以终止酶反应,充分摇匀后沸水浴5min,取出冷却后用蒸馏水定容至20.0mL,充分混匀。以1号试管溶液为空白对照调零点,在540nm波长下分别测定2、3、4号试管液的OD值(吸光度)并记录结果^[13]。

1.4.3 纤维素酶滤纸酶(FPA)活力单位的测定 1mL酶液于50℃、pH 4.8条件下,每分钟水解1cm×6cm的滤纸(FPA)产生1 μg 还原糖(以葡萄糖计)的酶量定义为1个FPA酶活力单位^[14]。

取4支15.0mL刻度的试管,各加0.2mL酶液,再加pH 4.8醋酸缓冲液1.8mL。其中3支作为测定管,各加1条规格为1cm×6cm滤纸条,充分浸泡置(50±0.5)℃恒温水浴30min;另1支作为空白管同时置(50±0.5)℃恒温水浴30min,然后各试管均分别加入DNS显色2.0mL,同时在空白管加1条规格为1cm×6cm滤纸条。各试管均放沸水浴锅反应5min,冷却后定容至15.0mL,

以空白管调零点,在 540 nm 吸收峰下用分光光度计测 OD 值(吸光度)。

1.4.4 木聚糖酶活力测定 用 0.2 mol/L、pH 4.8 的醋酸缓冲液配制 1% 的木聚糖溶液,加入 1.0 mL 适当稀释的酶液,于 50 ℃ 反应 30 min 后,加入 2.0 mL DNS 试剂终止反应,沸水浴中煮沸 5 min,冷水冷却后稀释至 15.0 mL,于 540 nm 比色。

酶活力的计算应扣除发酵液和底物所含的糖,以木糖作标准溶液,以每分钟生成 1 μg 木糖作为 1 个酶活单位^[15]。

1.5 菌株对秸秆纤维素木质素的降解

准确称量风干小麦秸秆样品 1.000 g 置于烧杯中,然后将初筛选出的菌种接种到加液体的无机盐培养基中,30 ℃、180 r/min 摇瓶培养 120 h,过滤取出后加入烧杯,参照王丽华等^[16]的方法检测秸秆纤维素、半纤维素、木质素的含量。

1.6 统计分析方法

利用 SPSS 25.0 软件进行实验数据的统计分析,利用 Microsoft Excel 2010 作图。

2 结果与分析

2.1 纤维素分解菌的分离纯化

通过纤维素平板分离、纯化共得到 15 株纤维素分解菌,菌落编号及形态描述如表 1 所示,分离纯化出的 15 株菌的菌落形状均为圆形,其中 TX4 的菌落最大,直径为 4.0 mm; TX2 的菌落最小,直径只有 1.2 mm。菌落颜色有红褐色、白色、灰绿色、黑褐色、灰色、乳白色、黄色等 7 种。菌落均不透明并有光泽。边缘形状有波状、缺刻、整齐等 3 种。

2.2 纤维素降解菌株的初筛

将分离纯化获得的 15 株菌接种到刚果红平板上后,9 株菌有透明圈,分别为 TX1、TX2、TX3、TX4、TX5、TX6、TX7、TX13、TX14,其中 TX1、TX3、TX7、TX14 菌株刚果红透明圈见图 1。透明

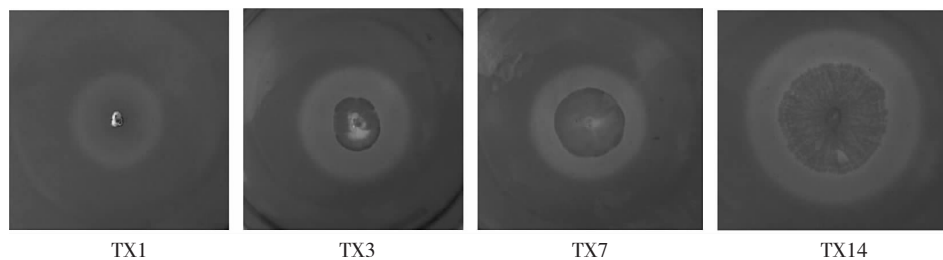


图 1 部分菌种菌株刚果红透明圈

表 1 分离纯化菌株的菌落形态

菌落	形状	菌落直径/mm	颜色	光泽	透明	边缘形状
TX1	圆形	1.7	红褐色	有	不	波状
TX2	圆形	1.2	白色	有	不	缺刻
TX3	圆形	2.1	白色	有	不	波状
TX4	圆形	4.0	灰绿色	有	不	波状
TX5	圆形	3.0	黑褐色	有	不	整齐
TX6	圆形	2.6	灰色	有	不	波状
TX7	圆形	1.8	白色	有	不	波状
TX8	圆形	2.0	乳白色	有	不	整齐
TX9	圆形	2.2	白色	有	不	波状
TX10	圆形	1.6	黄色	有	不	整齐
TX11	圆形	2.6	白色	有	不	整齐
TX12	圆形	1.8	乳白色	有	不	波状
TX13	圆形	2.3	黄色	有	不	整齐
TX14	圆形	1.4	黑褐色	有	不	波状
TX15	圆形	1.6	白色	有	不	整齐

圈与菌落直径比值的大小如图 2 所示。菌株 TX1 的透明圈与菌落直径比值最大,为 1.729;菌株 TX14 的比值最小,为 0.300。透明圈与菌落直径比值的由大到小依次为 TX1、TX3、TX13、TX2、TX6、TX7、TX4、TX5、TX14。因此可以判定,菌株 TX1、TX3、TX13 的纤维素降解能力最强,菌株 TX14 的纤维素降解能力最弱。

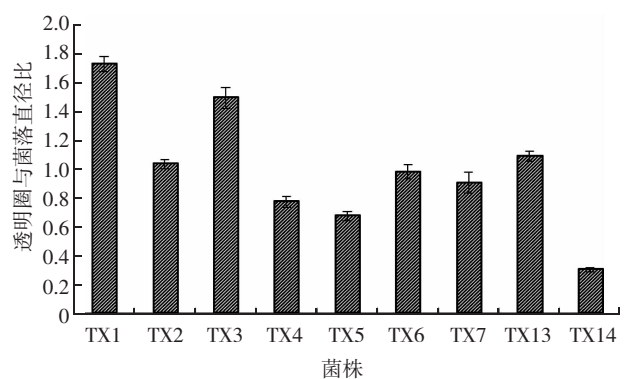


图 2 不同菌种菌株的透明圈与菌落直径比

2.3 菌株纤维素酶活力比较

从图 3 可以看出,不同菌株纤维素酶以菌株 TX7 的纤维素酶活力最强,其 CMC-Na 酶(CX)活

力、滤纸酶(FPA)活力均最强,分别为0.2247、0.2960 U/mL;菌株TX14的CMC-Na酶(CX)活力最弱,为0.0160 U/mL;菌株TX13的滤纸酶(FPA)活力最弱,为0.0440 U/mL。CMC-Na酶(CX)活力由大到小依次为TX7、TX1、TX3、TX6、TX2、TX13、TX5、TX4、TX14;滤纸酶(FPA)活力由大到小依次为TX7、TX1、TX3、TX2、TX14、TX4、TX6、TX5、TX13;由此可知,菌株TX7、TX1、TX3的纤维素酶活力最强。

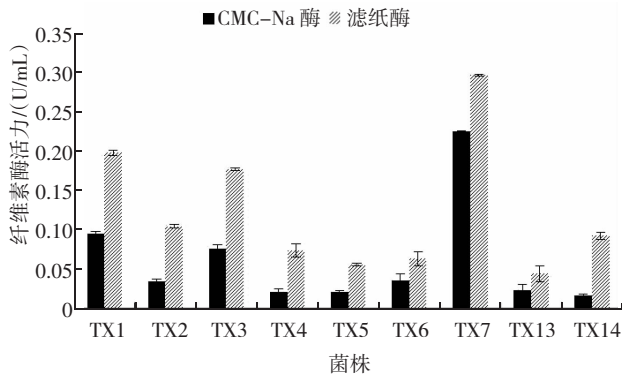


图3 不同菌株纤维素酶活力

2.4 菌株木聚糖酶活力比较

菌株木聚糖酶活力大小如图4所示,其中以菌株TX7的木聚糖酶活力最强,为8.84 U/mL;菌株TX13的木聚糖酶活力最弱,为1.56 U/mL。各菌株木聚糖酶活力由大到小依次为TX7、TX1、TX3、TX14、TX2、TX6、TX4、TX5、TX13。由此可知,菌株TX7、TX1、TX3的木聚糖降解能力最强,菌株TX4、TX5、TX13的木聚糖降解能力最弱。

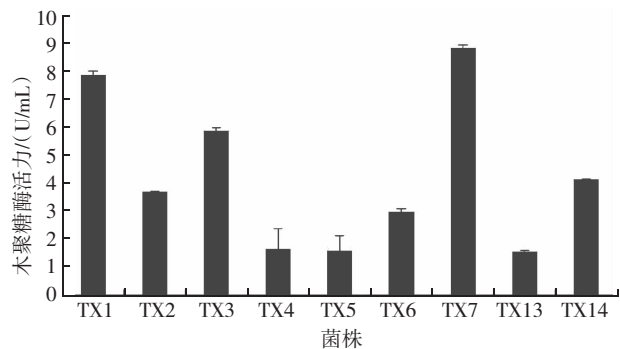


图4 不同菌株木聚糖酶活力

2.5 菌株对小麦秸秆纤维素、木质素降解能力的比较

菌株对降解小麦秸秆主要成分纤维素、半纤维素、木质素的能力如图5所示。小麦秸秆的半纤维素、纤维素、木质素含量越高,表明菌株对

小麦秸秆半纤维素、纤维素、木质素的降解能力越弱,反之则越强。菌株TX7对小麦秸秆木质素的降解能力最强,每1.000g小麦秸秆的木质素质量最低,只有0.037g。TX3对小麦秸秆半纤维素和纤维素的降解能力最强,每1.000g小麦秸秆的纤维素和半纤维素质量最低,分别为0.185、0.190g。菌株降解纤维素能力由大到小依次为TX3、TX1、TX7、TX14、TX2、TX13、TX6、TX4、TX5;降解半纤维素能力由大到小依次为TX3、TX1、TX7、TX2、TX13、TX5、TX6、TX4、TX14;降解木质素能力由大到小依次为TX7、TX1、TX3、TX4、TX13、TX14、TX6、TX2、TX5;由此可知,菌株TX3、TX1、TX7对秸秆纤维素、半纤维素、木质素的降解能力最强,确定为进一步研究的菌株。

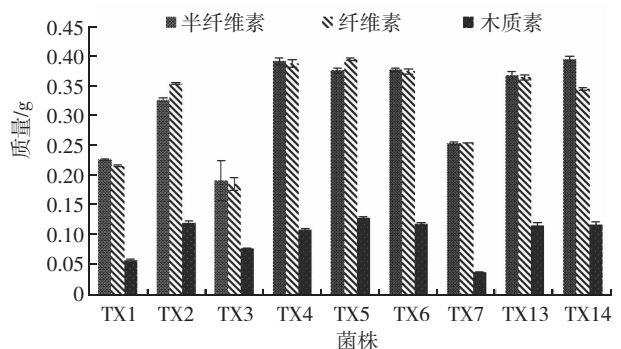


图5 不同菌株降解小麦秸秆主要成分的能力

3 讨论与结论

利用微生物降解纤维素具有成本低,适应性强等优点,可有效降解农作物秸秆中的纤维素,将其转化为易分解的小分子有机物,筛选高效降解农作物秸秆纤维素的微生物,提高秸秆的利用率是农业降本增效的重要技术之一[17]。农作物秸秆中,半纤维素和木质素将纤维素包裹在内部[18],降解秸秆的过程中,先要将半纤维素和木质素降解,纤维素降解酶才能与纤维素接触并将其降解[19]。微生物通过分泌纤维素酶(cellulase)、木聚糖酶(xylanase, Xyl)等多种酶联合作用对秸秆纤维素和木质素进行降解[20]。具有纤维素降解功能的细菌相比于真菌具有繁殖快、抗逆性强、耐酸碱、酶活性高的优点,细菌分泌的有机酸类物质对降解木质纤维素有重要作用,近年来已成为纤维素降解微生物研究领域的热点[21-22]。本研究从采集的奶牛粪样品中筛选获得9株产纤维素酶的菌株,

其中菌株 TX1 的透明圈与菌落直径比值最大为 1.729。菌株 TX7 的纤维素酶活力和木聚糖酶活力均最强,其 CMC-Na 酶(CX)活力为 0.224 7 U/mL,滤纸酶(FPA)活力为 0.296 0 U/mL,木聚糖酶活力为 8.84 U/mL。菌株 TX3 对小麦秸秆半纤维素和纤维素的降解能力最强,每 1.000 g 小麦秸秆的纤维素和半纤维素质量最低,分别为 0.185、0.190 g;菌株 TX7 对小麦秸秆木质素的降解能力最强,每 1.000 g 小麦秸秆的木质素质量最低,只有 0.037 g。由此可见,菌株 TX3、TX7 具有进一步研发成高效降解秸秆微生物菌剂的潜力,可为秸秆纤维素的转化利用提供优质的菌种资源。

参考文献:

- [1] 黎忠. 来自 *Streptomyces ipomoeae* 的木聚糖酶协同纤维素酶降解蔗渣的研究[D]. 南宁: 广西大学, 2020.
- [2] 霍丽丽, 姚宗路, 赵立欣, 等. 秸秆综合利用减排固碳贡献与潜力研究[J]. 农业机械学报, 2022, 53(1): 349-359.
- [3] HAO C. Resource promotion of ammonification straw[J]. *Agricultural Forestry Economics and Management*, 2023, 6(4): 32-37.
- [4] 石祖梁, 贾涛, 王亚静, 等. 我国农作物秸秆综合利用现状及焚烧碳排放估算[J]. 中国农业资源与区划, 2017, 38(9): 32-37.
- [5] YAN H J, WANG X D, YANG Y, et al. The effect of straw-returning on antimony and arsenic volatilization from paddy soil and accumulation in rice grains[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 263: 114581.
- [6] 吕开宇, 仇焕广, 白军飞, 等. 中国玉米秸秆直接还田的现状与发展[J]. 中国人口资源与环境, 2013, 23(3): 171-176.
- [7] PAN X Y, XU R K, NKOH J N, et al. Effects of straw decayed products of four crops on the amelioration of soil acidity and maize growth in two acidic Ultisols[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021, 28(5): 5092-5100.
- [8] 赵方圆, 范宁杰, 陈一楠, 等. 纤维素降解菌 *Aspergillus* sp. YN1 的产酶条件及酶学特性[J]. 微生物学通报, 2010, 37(8): 1194-1199.
- [9] 周泽, 付卫刚, 雷杨, 等. 羊粪中纤维素降解菌的筛选、鉴定及评价[J]. 草地学报, 2023, 31(11): 3535-3542.
- [10] 王文凡, 刘银秀, 谢晓杰, 等. 牛粪堆肥中纤维素高效降解菌的筛选与产酶条件优化[J]. 微生物学通报, 2023, 50(11): 4796-4811.
- [11] 张慧, 赵恪, 林陈强, 等. 纤维素降解菌的分离筛选及产酶条件优化[J]. 福建农业学报, 2023, 38(9): 1117-1123.
- [12] LI F, XIE Y, GAO X, et al. Screening of cellulose degradation bacteria from Min pigs and optimization of its cellulose production[J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2020, 48: 29-35.
- [13] 赵萍, 夏文旭, 郭健, 等. 一株玉米秸秆纤维素分解菌株的分离鉴定及酶学性质[J]. 微生物学通报, 2016, 43(5): 991-997.
- [14] 姚晓红, 孙宏, 沈琦, 等. 纤维素降解菌的筛选及其对西兰花废弃茎叶品质的改善[J]. 浙江农业科学, 2024, 65(2): 459-464.
- [15] 张慧, 赵恪, 林陈强, 等. 纤维素降解菌的分离筛选及产酶条件优化[J]. 福建农业学报, 2023, 38(9): 1117-1123.
- [16] 王丽华, 李杰勤, 林平, 等. 高粱 bmr-6 和 bmr-12 基因对产量和品质性状的效应比较[J]. 作物学报, 2011, 37(7): 1308-1312.
- [17] 陈欢, 史子浩, 吴春会, 等. 不同来源纤维素降解菌的筛选、鉴定及产酶能力的比较[J]. 草地学报, 2024, 32(4): 1252-1258.
- [18] TSEGAYE B, BALOMAJUMDER C, ROY P. Optimization of microwave and NaOH pretreatments of wheat straw for enhancing biofuel yield[J]. *Energy Conversion and Management*, 2019, 186: 82-92.
- [19] TAHA M, SHAHSAVARI E, ALHOTHALY K, et al. Enhanced biological straw saccharification through coculturing of lignocellulose-degrading microorganisms[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 175(8): 3709-3728.
- [20] REDDY A P, SIMMONS C W, DHAESELEER P, et al. Discovery of microorganisms and enzymes involved in high-solids decomposition of rice straw using metagenomic analyses[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e77985.
- [21] HASUNUMA T, OKAZAKI F, OKAI N, et al. A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology[M]. *Bioresource Technology: Biomass, Bioenergy, Biowastes, Conversion Technologies, Biotransformations, Production Technologies*, 2013.
- [22] KHAN A W, MURRAY W D. Influence of *Clostridium saccharolyticum* on cellulose degradation by *Acetivibrio cellulolyticus*[J]. *Applied Microbiol*, 2010, 53(3): 379-383.