

程鹏, 刘姗姗, 王玉, 等. 1 株高产纤维素酶菌株的筛选鉴定及对稻秆降解的研究[J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(1): 84-91.
CHENG Peng, LIU Shanshan, WANG Yu, et al. Screening and identification of a cellulase-producing strain and its degradation of rice straw[J]. Journal of South China Agricultural University, 2019, 40(1): 84-91.

1 株高产纤维素酶菌株的筛选鉴定及 对稻秆降解的研究

程 鹏^{1,2}, 刘姗姗¹, 王 玉¹, 卢存龙¹, 刘爱民¹

(1 安徽师范大学 生命科学学院/生物环境与生态安全安徽省高校省级重点实验室/重要生物资源保护与利用研究
安徽省重点实验室, 安徽 芜湖 241000; 2 中国科学技术大学 生命科学学院, 安徽 合肥 230026)

摘要:【目的】筛选高效纤维素降解菌, 用于稻秆原位还田菌剂的开发。【方法】通过稻秆粉培养基和刚果红-纤维素选择性培养基, 从芜湖地区腐殖土中筛选分离出高效纤维素降解菌 CX1, 测定不同底物条件和不同反应温度下的纤维素酶活性。通过滤纸条崩解试验、土培降解试验、菌株与化学物质协同降解稻秆试验、发酵液对小麦幼苗生长的影响试验, 探究菌株 CX1 腐解稻秆的特性。【结果】通过菌株形态学特征及 16S rDNA 序列相似性 (99%) 比对, 确定 CX1 为高温嗜热芽孢杆菌 *Thermophilic Bacillus* sp.。以稻秆粉为底物, 50 °C 条件下菌株 CX1 纤维素酶活力达 13.87 U·mL⁻¹, 65 °C 时酶活力仍能达到 9.73 U·mL⁻¹。添加菌株 CX1 培养 4 d 后滤纸条完全崩解, 到 15 d 时, 稻秆纤维素降解率达到 52.55%, 土培 40 d 时稻秆相对降解率达到 25.38%。预先用质量浓度为 0.05 g·mL⁻¹ 的 NaOH 溶液浸泡处理的稻秆更利于菌株 CX1 对稻秆的降解, 腐解 14 d 时稻秆失重率比对照组增加了 6.69%。添加经菌株 CX1 降解稻秆后的发酵液可使小麦的各项生长指标有明显提高, 小麦的出苗率、苗高、根鲜质量和苗鲜质量分别提高了 9.66%、55.55%、59.71% 和 118.84%。【结论】菌株 CX1 对高温具有耐受性, 能高效降解纤维素, 可在农业生产中促进稻秆原位还田方面发挥积极的作用。

关键词: 稻秆降解; 纤维素酶; 高温嗜热芽孢杆菌; 腐解特性

中图分类号: Q89

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2019)01-0084-08

Screening and identification of a cellulase-producing strain and its degradation of rice straw

CHENG Peng^{1,2}, LIU Shanshan¹, WANG Yu¹, LU Cunlong¹, LIU Aimin¹

(1 College of Life Sciences, Anhui Normal University/Provincial Key Laboratory of Biotic Environment and Ecological Safety/Conservation and Utilization of Biological Resource in Anhui, Wuhu 241000, China; 2 School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)

Abstract: 【Objective】To screen efficient cellulose degrading bacteria, and develop a bacterial agent for rice straw degradation and in situ returning to field. 【Method】The efficient cellulolytic bacterium CX1 was screened from soil in Wuhu area by using rice straw powder medium and Congo red-cellulose selective medium. The cellulase activity under different substrate conditions and different reaction temperatures were determined. We performed the filter paper disintegration test, soil degradation test, experiment on synergistic degradation of rice straw by bacterium and chemical substances, and tested the effect of fermentation broth on growth of wheat seedlings. The decomposition characteristics of strain CX1 were analyzed. 【Result】Strain CX1 was identified

收稿日期: 2018-05-07 网络首发时间: 2018-12-28 14:39:01

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20181227.1104.018.html>

作者简介: 程 鹏 (1996—), 男, 硕士研究生, E-mail: chengpeng0428@163.com; 通信作者: 刘爱民 (1968—), 女, 教授, 博士, E-mail: amliu9393@163.com

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFD0801403); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (201610370113); 安徽省教育厅
创新团队项目 (201549); 安徽省皖江城市带退化生态系统的恢复与重建 2011 协同创新中心基金

as Thermophilic *Bacillus* sp. based on morphology and 16S rDNA sequence similarity (99%). Using rice straw powder as the substrate, the activity of cellulase from CX1 reached $13.87 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ at $50 \text{ }^\circ\text{C}$ and $9.73 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ at $65 \text{ }^\circ\text{C}$. The filter paper completely disintegrated after 4 days of culture with CX1. The degradation rate of rice straw cellulose reached 52.55% after 15 days of culture with CX1. The relative degradation rate of rice straw reached 25.38% after 40 days of degradation in soil. The rice straw immersed with $0.05 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ NaOH solution in advance was more easily to be degraded by strain CX1, and its weight loss rate increased by 6.69% compared with the control group. The addition of fermentation broth from rice straw degradation with strain CX1 obviously promoted the growth of wheat seedlings, and the germination rate, seedling height, root fresh weight and seedling fresh weight increased by 9.66%, 55.55%, 59.71% and 118.84%, respectively. 【Conclusion】 Strain CX1 has high temperature resistance and can efficiently degrade cellulose. It can be used for promoting rice straw returning to field in agricultural production.

Key words: rice straw degradation; cellulase; Thermophilic *Bacillus* sp.; decomposition characteristic

我国是农业大国,有着丰富的稻秆资源。但稻秆纤维素结构复杂、难降解,农业实践中大多采用就地燃烧的方式还田,资源利用不充分,并且对环境造成巨大污染。目前,利用生物学手段开发清洁的新能源已成为世界各国解决环境污染和资源利用矛盾的重要方式之一^[1]。稻秆中富含营养元素,其降解还田有利于土壤有机质的提高,稻秆的原位还田能够增加土壤肥力,有效提高农作物的质量和产量^[2-4]。还田稻秆的生物降解主要由土壤微生物产生的一系列水解酶完成,然而稻秆表面具有一层蜡质,且其结构复杂,使一般的微生物降解纤维素十分困难,纤维素的分解利用效率不高^[5-6]。因此需要对稻秆进行预处理,目前该研究主要集中在稻秆的预处理手段方面,其主要有物理、化学和生物途径。但是我国的稻秆预处理研究还相对较少,研究层面较浅,预处理的基础方法不够成熟,还不能大规模地、高效地应用到农业生产中去^[7]。找到合适有效的秸秆处理方法且大规模地在田间推广应用,是推动我国秸秆资源综合利用发展的重要课题。常用的化学预处理法是利用化学试剂对作物秸秆进行作用,使细胞壁中纤维素和木质素之间的联系不再紧密,从而使秸秆消化率得到提高。化学处理中常用碱化处理法,氢氧化钠处理稻秆效果较好,也比较实用,因此在化学处理运用中较为普遍^[8-9]。然而,化学处理稻秆成本较高,在大田生产中广泛应用可能性较小。更多的研究表明,稻秆还田时配施秸秆腐解菌剂(即含有高效降解秸秆能力的微生物),可以降低稻秆还田的不利影响,提高腐解效率^[10-12]。

本研究从芜湖地区林下土壤中筛选纤维素分解菌,对其进行分离鉴定,利用产生的纤维素酶降解稻秆,探究菌株产生的纤维素酶的特性,测定不

同条件下的稻秆降解率,利用该菌株在实验室条件下降解稻秆后的发酵液探究其对小麦幼苗生长的影响。

1 材料与方法

1.1 土壤来源

2016年6月于安徽省芜湖市神山公园林下采取土样。拂去表面落叶层,取地表下5~10 cm层土壤。

1.2 培养基及配方

稻秆粉培养基:配方参考 Yao 等^[13]略作改动。KH₂PO₄ 1.00 g, MgSO₄·7H₂O 0.40 g, CaCl₂ 0.10 g, FeCl₃ 0.01 g, NaCl 0.20 g, (NH₄)₂SO₄ 3.00 g, 稻秆粉 20 g, 琼脂 18 g, 蒸馏水定容至 1 000 mL。

刚果红-羧甲基纤维素钠培养基:配方参考张超等^[14]。

LB 固体培养基:蛋白胨 10.00 g, 酵母膏 5.00 g, NaCl 10.00 g, 琼脂 12.00 g, 蒸馏水定容至 1 000 mL。

液体发酵产酶培养基:取 2.50 g 烘干成恒质量的稻秆段(长度 2~3 cm),加 120 mL 营养液。营养液配方:KH₂PO₄ 1.00 g, MgSO₄·7H₂O 0.40 g, CaCl₂ 0.10 g, FeCl₃ 0.01 g, NaCl 0.20 g, (NH₄)₂SO₄ 3.00 g, 蒸馏水定容至 1 000 mL。

滤纸条崩解培养基:KH₂PO₄ 1.00 g, MgSO₄·7H₂O 0.40 g, (NH₄)₂SO₄ 3.00 g, 酵母膏 0.10 g, 蒸馏水定容至 1 000 mL。

Mandels 营养液:配方参考 Kang 等^[15]。

以上培养基的 pH 控制在 7.2~7.5, 121 °C 条件下高温湿热灭菌 30 min。

1.3 菌株的筛选

取 8 g 土样,加 3 g 稻秆段及 100 mL 蒸馏水, 160 r·min⁻¹ 摇瓶震荡富集 10 d,取 1 mL 土样溶液稀

释成 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 共 4 个梯度, 再依次取 100 μL 涂布于稻秆粉培养基平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养约 2 d, 挑选长势较好的单菌落, 反复划线培养。再将效果较好的菌株转接到刚果红-羧甲基纤维素钠培养基上进行复筛, 参考菌株在平板上水解圈直径 (D) 与菌落直径 (d) 的比值, 选取效果最好的菌株作为研究对象^[16]。

1.4 菌株鉴定

1.4.1 形态学鉴定 观察其菌落与菌体形态, 并进行革兰氏染色镜检。

1.4.2 分子鉴定 使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 提取该菌株的基因组 DNA, 送至上海派森诺生物科技股份有限公司进行 16S rDNA 测序分析, 运用 NCBI Blast 分析工具对测序结果进行相似性比对, 鉴定菌株。

1.5 菌株生长曲线和纤维素酶活力变化曲线测定

试验过程中, 菌株的接种量 (φ) 为 3%, 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 160 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养。下列试验中每个样品均为 3 个重复。

1.5.1 生长曲线测定 将活化后的菌株接种到 LB 液体培养基, 每隔 2 h 取样, 测定 $D_{600\text{nm}}$ 值。

1.5.2 纤维素酶活力变化曲线测定 将菌株接种到液体发酵产酶培养基中, 160 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养 15 d, 每隔 24 h 取样, 4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 留上清液作为粗酶液^[17]。纤维素酶活力测定: 以 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 葡萄糖标准溶液作为底物, 通过 $D_{540\text{nm}}$ 值测定得到标准曲线, 具体原理参考 DNS 法^[18-19]。在 50 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 4.6 条件下, 每分钟催化水解纤维素生产 1 μg 葡萄糖所需要的酶量定义为 1 个酶活力单位 (U)。

1.6 不同反应条件下的纤维素酶活力测定

将菌株接种到液体发酵产酶培养基中, 160 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养 5 d, 离心获得粗酶液, 用于纤维素酶特性的研究。纤维素酶活力测定的具体原理方法和步骤参考 DNS 法^[18-19]。一方面, 在 50 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 分别以质量浓度为 0.01 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 CMC-Na 溶液、滤纸条和稻秆粉为底物测定纤维素酶活力, 另一方面, 以稻秆粉为底物, 测定并比较不同温度条件下的纤维素酶活力。

1.6.1 以 CMC-Na 溶液为底物测定酶活力 取 1.5 mL 质量浓度为 0.01 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 CMC-Na 溶液, 50 $^{\circ}\text{C}$ 预热。试验组添加 1 mL 粗酶液, 对照组添加 1 mL 沸水浴灭活的粗酶液, 测定酶活力。

1.6.2 以滤纸条为底物测定酶活力 取 2 条 1 $\text{cm}\times 4\text{cm}$ 的滤纸条, 添加 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的醋酸-醋酸钠缓

冲液 (pH 4.6) 1.5 mL, 测定酶活力。

1.6.3 以稻秆粉为底物测定酶活力 以 0.20 g 稻秆粉为底物, 加入 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH 4.6) 1.5 mL, 测定酶活力。

1.6.4 不同温度条件下的纤维素酶活力测定 以 0.20 g 稻秆粉为底物, 分别测定 40、45、50、55、60 和 65 $^{\circ}\text{C}$ 梯度反应条件下的纤维素酶活力。

1.7 菌株高效降解纤维素特性的检验

1.7.1 稻秆残渣中纤维素含量检测 分别将摇床培养发酵 5、10 和 15 d 的对照组和试验组降解后稻秆的残渣烘干至恒质量, 剪碎。分别取 0.1 g 稻秆残渣, 测定纤维素含量, 并计算出纤维素的降解率^[20]。

纤维素降解率 = $(M_1 - M_2) / M_1 \times 100\%$, 其中 M_1 为对照组稻秆残渣中纤维素的含量, M_2 为试验组稻秆残渣中纤维素的含量。

1.7.2 滤纸条崩解试验 将活化后的菌株接种到滤纸条崩解培养基, 每个三角瓶中放 3 条 1 $\text{cm}\times 6\text{cm}$ 的滤纸条, 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 130 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇瓶培养, 以未加菌株的试验为对照, 定期观察滤纸条崩解情况。

1.7.3 土培降解试验 活化后的菌株接种到 LB 液体培养基, 培养 18 h, 取 6.0 g 烘干成恒质量的稻秆段 (长度 2~3 cm) 装在 40 目尼龙纱网袋中, 将网袋放入内置 5.0 kg 土壤的花盆内, 每个处理加入 Mandels 营养液 30 mL 和菌液 15 mL, 覆土约 5 cm, 适量浇水浸透土壤。对照组用等量蒸馏水代替菌液。所有花盆随机摆放于温室中, 环境温度在 20~25 $^{\circ}\text{C}$ 。分别将降解 10、20、30 和 40 d 后剩余残渣取出, 洗净, 烘干至恒质量, 测定稻秆质量变化动态, 计算稻秆相对降解率 (RDR)^[21]。

$\text{RDR} = (m_1 - m_2) / m_1 \times 100\%$, 其中, m_1 为对照组残渣的质量, m_2 为试验组残渣的质量。

1.8 检验菌株耐高温生长特性

菌株活化扩增后, 取 1 mL 菌液于 EP 管中, 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴处理 5 d, 吸取 100 μL 于刚果红-纤维素平板上, 涂布均匀, 45 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养约 2 d, 观察菌株的生长和透明圈情况^[22]。

1.9 菌株与化学物质组合降解稻秆

用质量浓度为 0.05 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 NaOH 溶液浸泡稻秆段 (长度约 3 cm), 处理 24 h 后清洗并烘干。对照组稻秆用蒸馏水浸泡处理相同时间。用上述处理后的稻秆配制液体发酵产酶培养基, 添加筛选到的菌株, 分别在 160 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养 7 和 14 d 时, 取出稻秆残渣, 清洗并烘干, 计算稻秆质量损失率。

1.10 稻秆降解后发酵液对植物生长的影响

在农业生产中,筛选纤维素高效降解菌并制作菌剂的目的是加快稻秆降解,使稻秆中的营养物质原位还田,促进农作物生长,减少化肥的使用。因此,在本研究中设计相关试验,探究在实验室条件下稻秆降解后的发酵液对小麦幼苗生长的影响^[23]。设置4组试验。A组:将Hoagland's营养液作为植物培养液;B组:蒸馏水浸泡处理稻秆段24h,洗净、烘干后作为原料,配制液体发酵产酶培养基,不添加菌株;C组:菌株接种量(φ)为3%,其余处理同B组;D组:质量浓度为 $0.05\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的NaOH溶液处理稻秆段24h,其余处理同C组。

$160\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇瓶培养9d,发酵液 $4\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10min,留上清液。避免发酵液浓度过高,上清液与蒸馏水按体积比1:3混合。培养皿底部铺1层薄的、均匀的脱脂棉,再覆盖1张滤纸,每个培养皿中播种小麦种子20粒,分别加入Hoagland's营养液或相应的植物培养液20mL。置于 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 光照培养箱中培养12d,期间每天中午、晚上分别添加相应的培养液5mL。

1.11 数据分析与处理

数据处理使用Excel 2010程序和SPSS 19.0等统计分析软件。采用生物学最小显著差数法(LSD法)对试验数据结果进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选与鉴定

选取在刚果红-羧甲基纤维素钠培养基平板上长势最好的菌株作为研究对象,命名为CX1。以菌株在羧甲基纤维素钠平板上 D/d 作为标准判断其纤维素降解能力,一般情况下 D/d 越大说明对纤维素的分解能力更强^[24]。在平板上 D 为水解圈直径, d 为菌落直径; d 菌落直径一般不变, D 水解圈越大,即 D/d 越大,表明菌株产纤维素酶能力越强,降解纤维素能力越强。如图1所示,菌株CX1在平板

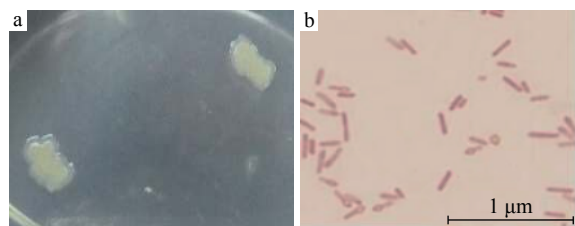


图1 菌株CX1在刚果红-纤维素平板上的透明圈

Fig. 1 Transparent circle of strain CX1 on Congo red-cellulose plate

上长势较好, D/d 为5,说明菌株CX1能较好地降解纤维素。

如图2a所示,在LB培养基上CX1菌落呈淡黄色,表面湿润,形状不规则。如图2b所示,光学显微镜下细菌形态呈杆状,有芽孢,染色鉴定为革兰阳性菌。



a: 菌落形态; b: 菌体的显微形态

a: Colony morphology; b: Thalli micromorphology

图2 菌株CX1的形态特征

Fig. 2 Morphological characteristics of strain CX1

国内外研究学者普遍认可,16S rDNA序列相似性超过97%,可以当作属内的同种^[25]。通过NCBI Blast对16S rDNA测序结果进行相似性比对,得到与菌株CX1序列相似性最大的菌种信息(相似性达99%),因此,菌株CX1确定为嗜热芽孢杆菌 *Thermophilic Bacillus* sp.。

2.2 菌株CX1生长曲线和纤维素酶活力变化曲线

由图3可以看出,摇床培养前18h细菌接近直线增长,生长速率较快,所以选择培养18h的菌株CX1接入液体发酵产酶培养基降解稻秆较为合适。

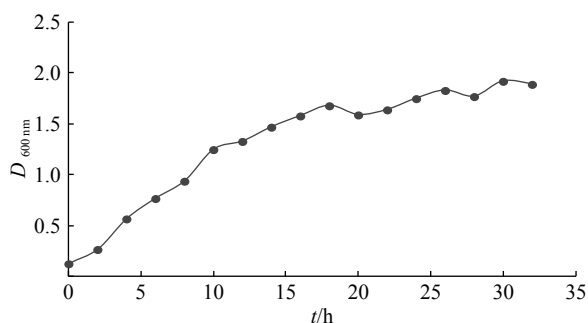


图3 菌株CX1的生长曲线

Fig. 3 The growth curve of strain CX1

以 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 葡萄糖标准溶液作为底物,测定 $D_{540\text{ nm}}$,绘制标准曲线。曲线方程为: $y=0.6977x-0.0524(R^2=0.9933)$,式中, x 代表葡萄糖含量, y 代表 $D_{540\text{ nm}}$ 。纤维素酶活力变化曲线如图4所示,摇床培养前5d,酶活力均呈上升趋势,此后略有波动,逐渐稳定。测得第7天时纤维素酶活力最大,为 $10.7\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

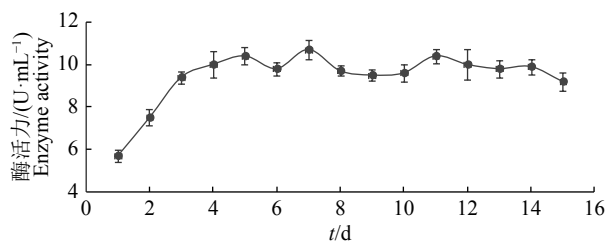


图 4 纤维素酶活力变化曲线

Fig. 4 Change in cellulase activity

2.3 菌株 CX1 所产纤维素酶的特性

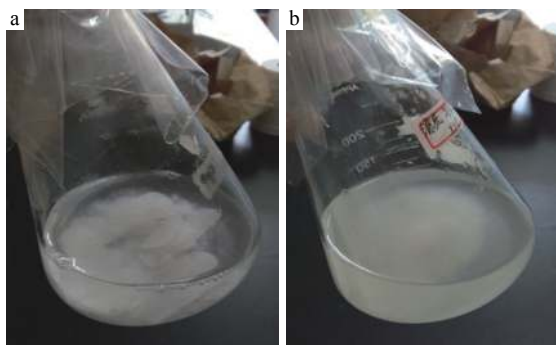
2.3.1 不同底物条件下的纤维素酶活力 微生物对不同的底物会表现出差异的酶活力,对真实底物的降解最能反映它在实际应用中的潜力^[26]。以滤纸和稻秆粉为底物测得的酶活力(分别为 12.32 和 13.94 U·mL⁻¹)大于以 0.01 g·mL⁻¹ 的 CMC-Na 溶液为底物测定的酶活力(10.38 U·mL⁻¹),说明在测定菌株 CX1 所产纤维素酶的活力时以稻秆粉或滤纸为底物更适宜。

2.3.2 不同反应温度下的纤维素酶活力 不同反应温度下纤维素酶活力是不同的,反应温度在 50 和 55 °C 时测得酶活力分别为 13.87 和 13.45 U·mL⁻¹。在 50~65 °C 范围内酶活力总体呈下降趋势,但在 65 °C 时,酶活力仍能达到 9.73 U·mL⁻¹,体现了菌株 CX1 所产纤维素酶耐高温的特性。

2.4 菌株 CX1 降解纤维素的特性

2.4.1 稻秆残渣中纤维素的含量 由于稻秆中纤维素被木质素包裹,降解前期效果不明显,纤维素降解率较低。经测定,第 5~15 天的 10 d 内,稻秆的纤维素降解率增加了 27.17%,到第 15 天腐解结束时,菌株 CX1 对稻秆纤维素降解率达到了 52.55%。

2.4.2 滤纸条的崩解和土培降解稻秆 由图 5 可以看出,加入菌株 CX1 培养 4 d 后,滤纸条完全崩解;而不添加菌株的对照组,滤纸条仍大量存在、呈片状堆积。



a: 对照; b: 添加菌株 CX1 培养 4 d 后,滤纸条完全崩解

a: Control; b: Filter paper was completely disintegrated after 4 days of culture with strain CX1

图 5 滤纸条的崩解

Fig. 5 The disintegration of filter paper

如图 6 所示,经菌株 CX1 处理后,土培 10、20、30 和 40 d 的稻秆相对降解率随时间呈现上升趋势。稻秆自身结构复杂,导致降解过程缓慢,细菌在后期降解速率增加较快,在土培 40 d 后相对降解率达到 25.38%。

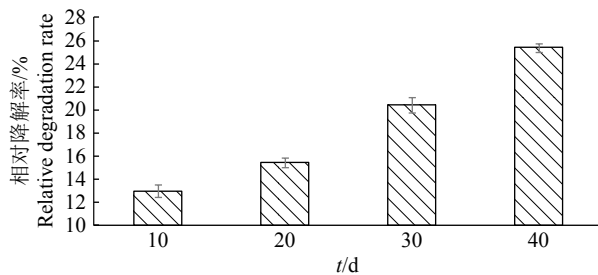


图 6 稻秆土培降解试验结果

Fig. 6 The experimental result of rice straw degradation in soil

2.5 菌株 CX1 耐高温生长的特性

由图 7 可见,菌株 CX1 经 65 °C 水浴处理 5 d 后,仍能在纤维素平板上正常生长,并出现明显的透明圈。说明菌株 CX1 能够耐受高温生长。



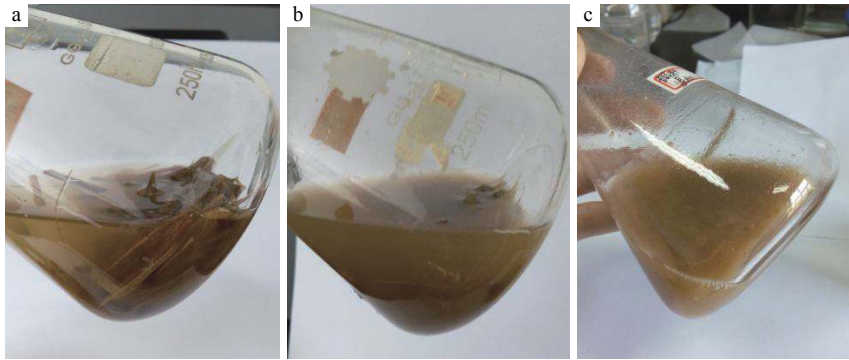
图 7 高温处理后的菌株 CX1 在刚果红-纤维素平板上的生长

Fig. 7 Strain CX1 treated with high temperature grew on a Congo red-cellulose plate

2.6 菌株 CX1 与 NaOH 溶液协同降解稻秆

由图 8 可见,与用蒸馏水浸泡处理的稻秆相比,经质量浓度为 0.05 g·mL⁻¹ 的 NaOH 溶液浸泡处理的稻秆降解效果更加明显。摇瓶培养 14 d 时,不添加菌株 CX1 的三角瓶中溶液清澈,稻秆呈段状(图 8a);用蒸馏水浸泡处理的稻秆配制的培养基中添加菌株 CX1 发酵结束后溶液比较浑浊,部分稻秆已碎,沉积在瓶底部(图 8b);用 0.05 g·mL⁻¹ 的 NaOH 溶液浸泡处理的稻秆配制的培养基中添加菌株 CX1,发酵结束后溶液浑浊、黏稠,在瓶底部稻秆呈碎末状堆积(图 8c)。

腐解 14 d 时,经质量浓度为 0.05 g·mL⁻¹ 的 NaOH 溶液浸泡处理的稻秆质量损失率达到 47.25%,与用蒸馏水浸泡处理的稻秆相比,质量损失率增加了 6.69%。表明在生物降解稻秆之前运用化学手段对稻秆进行预处理,会使稻秆降解更加快速,可提高降解率。



a: 蒸馏水浸泡处理的稻秆, 不添加菌株 CX1; b: 蒸馏水浸泡处理的稻秆, 添加菌株 CX1; c: 质量浓度为 0.05 g·mL⁻¹ 的 NaOH 溶液浸泡处理的稻秆, 添加菌株 CX1

a: Rice straw immersed with distilled water, no added CX1; b: Rice straw immersed with distilled water, adding CX1; c: Rice straw immersed with 0.05 g·mL⁻¹ NaOH solution, adding CX1

图 8 菌株 CX1 与 NaOH 溶液协同降解稻秆

Fig. 8 Synergistic degradation of rice straw by strain CX1 and NaOH solution

2.7 菌株 CX1 降解稻秆后的发酵液对小麦生长的影响

指标与 A 组 (添加完全培养液) 相比差距不大, 表明使用菌剂 CX1 的发酵液对小麦幼苗生长具有明显的促进作用。B、C 两组相比, 添加菌剂后, 小麦生

由图 9 和表 1 数据可知, 添加菌剂后小麦的生长



a: A 组, Hoagland's 营养液培养; b: B 组, 蒸馏水浸泡处理稻秆, 不加菌剂 CX1; c: C 组, 蒸馏水浸泡处理稻秆, 添加菌剂 CX1; d: D 组, 质量浓度为 0.05 g·mL⁻¹ 的 NaOH 溶液处理稻秆, 添加菌剂 CX1

a: Group A was cultured using Hoagland's nutrient solution; b: Group B was treated with distilled water soaking rice straw, no added CX1; c: Group C was treated with distilled water soaking rice straw, adding CX1; d: Group D was treated with 0.05 g·mL⁻¹ NaOH solution soaking rice straw, adding CX1

图 9 不同处理组小麦幼苗的生长情况

Fig. 9 Growth of wheat seedlings under different treatment conditions

表 1 菌株 CX1 降解稻秆后的发酵液对小麦幼苗生长的影响¹⁾

Table 1 Effects of fermentation broth from rice straw degradation with strain CX1 on growth of wheat seedlings

处理 Treatment	出苗率/% Germination rate	苗高/cm Seedling height	m _鲜 /g Fresh weight	
			根 Root	苗 Seedling
A 组 Group A	80.03±3.26a	13.05±0.42a	0.988 2±0.054 8a	2.066 5±0.088 5a
B 组 Group B	68.54±2.33b	7.65±0.51d	0.296 1±0.046 5c	0.562 0±0.093 0d
C 组 Group C	75.16±2.83a	11.90±0.35b	0.472 9±0.065 9b	1.229 9±0.095 5b
D 组 Group D	77.31±3.76a	9.49±0.48c	0.415 7±0.042 2b	0.864 7±0.116 7c

1) A 组是 Hoagland's 营养液培养, B 组是蒸馏水浸泡处理稻秆, 不加菌剂 CX1, C 组是蒸馏水浸泡处理稻秆, 添加菌剂 CX1, D 组是质量浓度为 0.05 g·mL⁻¹ 的 NaOH 溶液处理稻秆, 添加菌剂 CX1; 同列数据后不同小写字母表示差异显著 (P<0.05, LSD 法)

1) Group A was cultured using Hoagland's nutrient solution. Group B was treated with distilled water soaking rice straw, no added CX1. Group C was treated with distilled water soaking rice straw, adding CX1. Group D was treated with 0.05 g·mL⁻¹ NaOH solution soaking rice straw, adding CX1; Different lowercase letters in the same column indicated significant difference (P<0.05, LSD method)

长的各项指标均有明显提高,小麦的出苗率、苗高、根鲜质量和苗鲜质量分别提高了 9.66%、55.55%、59.71% 和 118.84%。C、D 两组相比,0.05 g·mL⁻¹ NaOH 溶液处理后,小麦的出苗率提高了 2.86%,苗高、根鲜质量和苗鲜质量分别降低了 25.40%、13.76% 和 42.23%。

试验结果表明,在实验室条件下,菌剂 CX1 的添加确实对小麦作物的重要生理指标产生积极的影响。另外,经 0.05 g·mL⁻¹ NaOH 溶液处理后的稻秆发酵产生的植物培养液对小麦生长的促进作用要弱于 C 组(蒸馏水处理的稻秆),原因可能是碱液的预处理使稻秆表面结构遭到一定的破坏,部分营养物质流失。

3 讨论与结论

本研究从芜湖地区林下腐殖土中分离筛选出纤维素分解效果较好的菌株 CX1,通过形态学和 16S rDNA 序列相似性比对,确定菌株 CX1 是 1 株革兰阳性菌,属于高温嗜热芽孢杆菌。以稻秆为材料探究了其所产纤维素酶的特性,通过测定稻秆降解残渣中纤维素的降解率、滤纸条崩解试验和土培降解稻秆试验,进一步验证了菌剂 CX1 降解纤维素的高效性。

稻秆在堆肥腐解过程中产生较高温度,对多数微生物的纤维素酶活力会产生不利影响^[27-28]。因此设计了相关试验验证 CX1 对高温的耐受性,试验发现,在 65 °C 条件下菌株 CX1 仍具有较好的生长特性和纤维素降解能力,这也是菌株 CX1 作为稻秆腐解菌剂自身具有的巨大优势。纤维素高效降解菌的筛选和特性研究是近些年国内外学者的研究热点,但在腐解菌剂作用下秸秆还田后会对农作物产生何种影响一直不清楚,同时,生物方法与物理化学手段协同处理秸秆提高降解率也鲜有报道。本研究初步尝试探究 *Thermophilic Bacillus* sp. CX1 与化学物质组合协同降解稻秆的作用效果,结果表明,碱液的预处理会使稻秆降解更加快速,明显提高降解率。在实验室条件下,探究稻秆降解后发酵液对植物生长的影响,发现菌株 CX1 的添加能对小麦幼苗的生长产生积极的影响,为菌剂 CX1 用于实际农业生产中稻秆的原位还田起到一定的指导作用。

本研究以 CX1 单菌株为研究对象,相比目前已发现的细菌而言,对稻秆的腐解效果较好。与韦中等^[21]筛选的细菌 ZJA-6 相比,CX1 在土培降解试验中相同时间下相对降解率提高了 14.78%;菌株 CX1

产生的纤维素酶活力高达 13.87 U·mL⁻¹,也远高于 Kazeem 等^[29]筛选的细菌 *Bacillus licheniformis* 2D55 产生的纤维素酶活力。由于,稻秆化学结构比较复杂,单一的微生物产生水解酶的种类和量有限,因此对稻秆的降解能力也有限。随着近年来对纤维素降解菌的深入研究,人们发现多种微生物和酶的协同作用会显著促进稻秆降解过程^[30-31]。而复合菌系的建立恰好可以满足这一需求,在今后的研究中可以探究 CX1 和其他具有高效降解纤维素能力的微生物之间的协同关系,进一步构建降解高效、性质稳定的稻秆降解复合菌系。

参考文献:

- [1] 林艳梅,生吉萍,申琳,等. 适冷纤维素降解微生物研究进展[J]. 生物技术, 2010, 20(2): 95-97.
- [2] 王文明. 微生物降解秸秆原理简析[J]. 南方农业, 2018, 12(4): 38-40.
- [3] YAN D Z, WANG D J, YANG L Z. Long-term effect of chemical fertilizer, straw, and manure on labile organic matter fractions in a paddy soil[J]. *Biol Fertil Soil*, 2007, 44(1): 93-101.
- [4] 张蕴琦,徐凤花,张书敏,等. 水稻秸秆降解菌系的筛选及其菌群组成分析[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(8): 257-260.
- [5] 陈小华,朱洪光. 农作物秸秆产沼气研究进展与展望[J]. *农业工程学报*, 2007, 23(3): 279-283.
- [6] LI P P, WANG X J, YUAN X F, et al. Screening of a composite microbial system and its characteristics of wheat straw degradation[J]. *Agric Sci China*, 2011, 10(10): 1586-1594.
- [7] 焦翔翔,靳红燕,王明明. 我国秸秆沼气预处理技术的研究与应用进展[J]. 中国沼气, 2011, 29(1): 45-50.
- [8] 杨兴华. 预处理对小麦秸秆糖化及沼气发酵[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.
- [9] 刘思颖. 纤维素降解菌的筛选及其在秸秆干发酵产沼气中的应用[D]. 武汉: 湖北工业大学, 2011.
- [10] 冯炘,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.
- [11] 雷湘兰,孙倩,沈振国,等. 纤维素降解菌复合菌系的构建及产酶研究[J]. 农业与技术, 2018, 38(3): 6-7, 20.
- [12] 宋云皓,满都拉,段开红,等. 玉米秸秆纤维素降解菌的筛选及复合菌系的构建[J]. 饲料工业, 2017, 38(19): 33-37.
- [13] YAO M Y, LIU X F, YUAN Y X, et al. Isolation of a fungus with selective delignification and its degradation

- of corn stalk[J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2009, 15(3): 427-431.
- [14] 张超, 李艳宾, 张磊, 等. 真菌产纤维素酶培养基中刚果红转移机理研究[J]. *微生物学通报*, 2006, 33(6): 12-16.
- [15] KANG S W, PARK Y S, LEE J S, et al. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass[J]. *Bioresour Technol*, 2004, 91(2): 153-156.
- [16] 陈亚玲, 陈立志, 程鹏, 等. 高效稻秆降解菌的分离鉴定[J]. *广东农业科学*, 2017, 44(5): 72-77.
- [17] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- [18] WEI G F, PAN I, DU H M, et al. ERIC-PCR fingerprinting-based community DNA hybridization to pinpoint genome-specific fragments as molecular markers to identify and track populations common to healthy human guts[J]. *J Microbiol Methods*, 2004, 59(1): 91-108.
- [19] 李慧君. 秸秆纤维素降解菌的筛选及其利用研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010.
- [20] 王金主, 王元秀, 李峰, 等. 玉米秸秆中纤维素、半纤维素和木质素的测定[J]. *山东食品发酵*, 2010, 158(3): 44-47.
- [21] 韦中, 徐春淼, 郑海平, 等. “挂壁”法筛选常温稻秆腐解菌及其降解能力研究[J]. *农业环境科学学报*, 2015, 34(10): 2027-2031.
- [22] 任世英, 邵奎, 李雯, 等. 一株耐高温纤维素酶产生菌的分离和鉴定[J]. *工业微生物*, 2016, 46(4): 19-24.
- [23] 王友保. 生态学实验[M]. 芜湖: 安徽师范大学出版社, 2010.
- [24] 李晓秀. 玉米秸秆复合降解菌 ZFX-1 的构建及降解效果的初探[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2017.
- [25] 韩梦颖, 王雨桐, 高丽, 等. 降解秸秆微生物及秸秆腐熟剂的研究进展[J]. *南方农业学报*, 2017, 48(6): 1024-1030.
- [26] 王海滨, 韩立荣, 冯俊涛, 等. 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.
- [27] 胡丽娟, 薛高尚, 卢向阳, 等. 响应面法优化芽孢杆菌 25-2 产纤维素酶发酵条件[J]. *酿酒科技*, 2012, 214(4): 21-26.
- [28] 王晓林, 张西玉, 白方文, 等. 高效降解秸秆纤维素菌株的筛选鉴定及产酶条件优化[J]. *四川师范大学学报(自然科学版)*, 2011, 34(1): 105-109.
- [29] KAZEEM M O, SHAH U K M, BAHARUDDIN A S, et al. Prospecting agro-waste cocktail: Supplementation for cellulase production by a newly isolated thermophilic *Bacillus licheniformis* 2D55[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2017, 182(4): 1318-1340.
- [30] LIAO H, XU C, TAN S, et al. Production and characterization of acidophilic xylanolytic enzymes from *Penicillium oxalicum* GZ-2[J]. *Bioresour Technol*, 2012, 123(21): 117-124.
- [31] CHANG A J, FAN J Y, WEN X H. Screening of fungi capable of highly selective degradation of lignin in rice straw[J]. *Int Biodeter Biodegr*, 2012, 72(7): 26-30.

【责任编辑 李晓卉】