



陈雪丽,迟凤琴,易晓东,等.纤维素降解菌群 TF18 的作用机制[J].黑龙江农业科学,2021(2):41-44,45.

纤维素降解菌群 TF18 的作用机制

陈雪丽^{1,2},迟凤琴¹,易晓东³,王 爽¹,万书明¹,张美芝³,李伟群¹

(1. 黑龙江省农业科学院 土壤肥料与环境资源研究所/黑龙江省土壤环境与植物营养重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150086;2. 黑龙江省农业科学院 博士后工作站,黑龙江 哈尔滨 150086;3. 黑龙江大学 现代农业与生态环境学院,黑龙江 哈尔滨 163319)

摘要:为进一步优化降解菌发酵条件和开发秸秆降解菌剂,以分离自自然腐烂玉米秸秆的纤维素降解菌群 TF18 为对象,研究该菌群的最佳培养条件及其作用机制。结果表明:TF18 菌群是一个复杂的有机整体,最佳培养时间为 72 h,最佳培养基为 PD(马铃薯葡萄糖培养基)和 KB,通过先分泌纤维素酶(CMC)和 β -糖苷酶(β -Gase),再分泌全酶(FPA)和外切酶(C1)的方式达到降解秸秆的目的。通过纤维素酶活性与微生物类群酶活性的相关性分析得出放线菌群是分泌纤维素酶的主要微生物类群。TF18 菌群发酵液与粉碎后的玉米秸秆混合 8 d 后玉米秸秆降解率可以达 21.3%。因此,TF18 菌群可以作为降解作物秸秆的目标微生物资源,进一步开发秸秆降解菌剂等产品。

关键词:玉米秸秆;腐解菌群;纤维素酶

秸秆还田既是有机物料资源高效利用、培肥地力的最佳选择^[1],也是减少潜在环境污染和经济损失的重要措施^[2],然而玉米秸秆产出量大、纤维素含量高^[3]是秸秆还田过程中的瓶颈问题。以往针对纤维素降解菌的分离纯化,高效低温降解菌的驯化等已有大量报道^[4-8],但大多为单一高效菌株或多株高效菌株的二次复配^[9-10],在实践应用过程中存在拮抗、田间定殖能力弱的问题。研究表明,纤维素降解菌的作用机制是纤维素酶类的代谢,包括纤维素酶、全酶、 β -糖苷酶和外切酶等^[6,11]。本研究以分离自自然腐解玉米秸秆的降解菌群作为对象,研究菌群成员在不同秸秆降解阶段的作用机制和代谢酶种类,为进一步开发优化降解菌发酵条件和秸秆降解菌剂的开发提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

供试秸秆腐解菌群 TF18 为从土壤中筛选的低温复合菌群,主要成分为芽孢杆菌、纤维弧菌、酵母菌等。与课题组保存的枯草芽孢杆菌(A),胶冻样芽孢杆菌(B)和解淀粉菌(C)进行复配。

以纤维素降解菌群 TF18(F)为基础分别加入枯草芽孢杆菌(FA),胶冻样芽孢杆菌(FB)和解淀粉菌(FC)以及 FAB、FBC、FAC、FABC 等组合进行液体培养。

1.2 方 法

1.2.1 菌群生长曲线及最佳培养条件筛选 以菌群及菌群与不同功能菌组合的培养液作为种子液,将种子液 100 μ L 接种到装有 100 mL PD 液体培养基的 250 mL 三角瓶中,28 $^{\circ}$ C、160 $r \cdot \min^{-1}$ 振荡培养,每隔 2 h 取样 1 次,24 h 后每隔 24 h 取样 1 次,每次 1.5 mL,用可见分光光度计检测在 600 nm 处的吸收值(OD_{600}),并稀释涂平板检测每毫升菌悬液含的菌落个数($CFU \cdot mL^{-1}$),并换算成 $\log CFU \cdot mL^{-1}$ 。以培养时间为横坐标,以菌悬液在 60 nm 处的吸收值和每毫升的菌落数为纵坐标,绘制菌落生长曲线。

1.2.2 培养基 pH 对菌群生长的影响 每 100 mL 三角瓶装 50 mL PD 培养液,灭菌后用无菌的 1 $mol \cdot L^{-1}$ NaOH 和 HCl 调到 pH 分别为 3, 5, 7, 9 和 11,接入种子液 100 L,3 次重复,28 $^{\circ}$ C、160 $r \cdot \min^{-1}$ 条件下菌群分别培养至 24 和 72 h 取样,测定 OD_{600} 的吸收值、 $\log CFU \cdot mL^{-1}$ 等指标。

1.2.3 培养基种类对菌群生长的影响 在以上最佳培养时间及最适 pH 条件下,将菌群分别接种到培养基 PD、LB 和 KB 中,装液量为 100 mL 三角瓶装 50 mL 培养液。分别接入种子液 100 μ L,3 次重复,在 28 $^{\circ}$ C、160 $r \cdot \min^{-1}$ 条件下菌

收稿日期:2020-10-28

基金项目:黑龙江省农业科学院杰出青年基金项目(2019JC-QN005);中央引导地方科技发展专项(ZY18A04);黑龙江省博士后资助项目(LBH-Z17198);黑龙江省农业科学院院级课题(2018YYYF017)。

第一作者:陈雪丽(1980—),女,博士,副研究员,从事土壤微生物生态研究。E-mail:xuelichen99@163.com。

群分别培养至 24 和 72 h 取样,测定 OD₆₀₀ 值、Log CFU·mL⁻¹ 等指标。

1.2.4 秸秆腐解菌群代谢酶活性 纤维素酶(CMC)和 FPA 酶活力测定参照 QB2583-2003 中华人民共和国轻工行业标准^[12],外切酶(C1)和 β-糖苷酶(β-Gase)的测定方法参照殷中伟^[6]的方法。

1.2.5 秸秆腐解菌腐解能力分析 将玉米秸秆烘干至恒重,准确称重 0.50 g,加入 50 mL 产酶培养基,将目标菌株接入液体 CMC-Na 培养基中,48 h 后转接入产酶培养基,30 ℃,120 r·min⁻¹ 下培养,3 次重复,在第 8 天取出,测定失重率及样品纤维素、半纤维素和木质素含量。

失重率=(初始质量-残体质量)×100/初始质量

参照罗晶^[13]的方法采用差重法测定玉米秸秆中纤维素、半纤维素和木质素含量。

1.2.6 数据分析 应用 SPSS(Version 22.0 for Windows)软件进行显著性和相关性统计分析,采用 Sigma-Plot 2000(10.0)绘图。

2 结果与分析

2.1 纤维素降解菌群生长曲线的测定

菌群及菌群与功能菌复配组合在培养 24 h 时生长达到峰值,而后下降,除菌群 F 在 96 h 时出现显著下降外,其余功能菌组合的 OD₆₀₀ 值稳定在 1.5 左右。菌群与 ABC 三种功能菌复配组合(FABC)在培养 24 h 时 OD₆₀₀ 值最高,在 144 h 的培养期内,OD₆₀₀ 值稳定。因此,认为 FABC 为最佳菌群复配组合(图 1)。将每个取样时间的样品菌落数进行生长曲线绘制,结果表明,FABC 复配菌群在培养 24 h 时有效活菌数达到 5 亿 CFU·mL⁻¹,之后随着培养时间延长有效活菌数升高缓慢(图 2)。

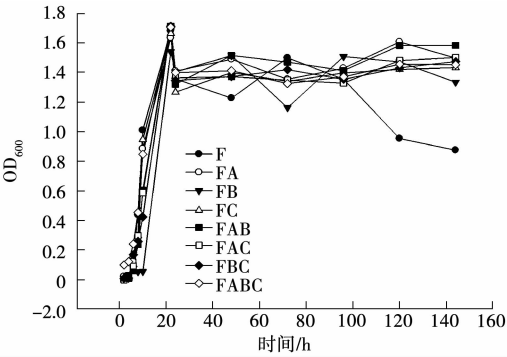


图 1 纤维素降解菌群生长曲线

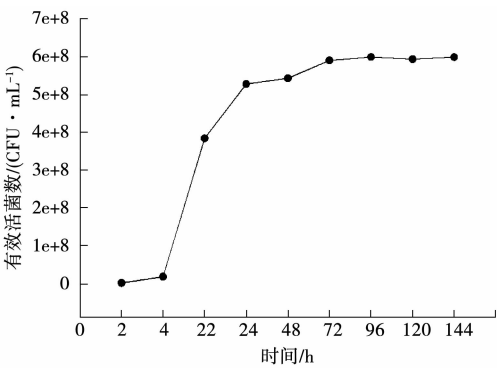


图 2 FABC 菌群有效活菌数

2.2 培养基 pH 对菌群生长的影响

由图 3 可知,各复配菌群适宜在 pH 大于 5 的条件下生长,在培养 24 h 阶段(图 3A),各复配组合菌群在 pH 为 5,7,9,11 的培养基中生长情况相似,差异不显著。培养 72 h 阶段(图 3B),pH 为 11 的培养基中,复配菌群的 OD₆₀₀ 值最大,生长繁殖最快。因此,复配菌群的最佳培养 pH 为 11。

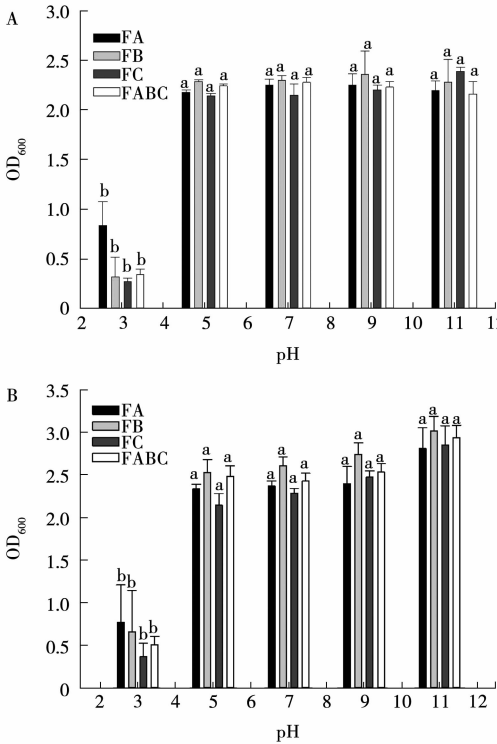


图 3 不同 pH 条件下复配菌群 24 h(A)和 72 h(B) 生长状况

2.3 培养基种类对菌群生长的影响

将菌群分别接种到培养基 PD、LB 和 KB 中培养 72 h 测定 OD₆₀₀ 值,结果表明 PD 和 KB 培养

基测定 OD₆₀₀ 值达到 2.0 以上,为该菌群的最佳培养基(图 4)。

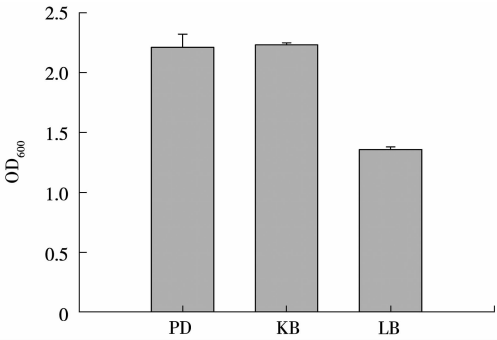


图 4 不同培养基条件下复配菌群生长状况(72 h)

2.4 纤维素降解菌群的纤维素酶代谢动态

通过对纤维素菌群发酵液纤维素酶活性进行连续测定结果表明,纤维素酶(图 5B)和 β 糖苷酶(图 5D)在培养 2 d 时达到分泌高峰,而外切酶(图 5C)和全酶(图 5A)活性在培养 5 和 6 d 达到峰值。按照酶活性的绝对值评价,纤维素酶(CMC)为菌群发酵过程中的主要代谢酶种类。

2.5 纤维素酶活性与不同类群菌相关性分析

通过分别测定细菌、真菌和放线菌群的 4 种关键酶活性,并分析酶活性与微生物类群数量之间关系发现,细菌酶活性和放线菌酶活性与菌群总酶活性具有显著相关性,其中放线菌酶活性与总酶活性之间呈极显著相关(表 1)。由此可以推断,细菌和放线菌菌群在秸秆腐解过程中起主要作用。

表 1 不同微生物类群与酶活性相关性分析

项目	细菌酶活性	真菌酶活性	放线菌酶活性
总酶活性	0.774*	-0.260	0.943**

注:* 在 0.05 水平上显著相关;** 在 0.01 水平上显著相关。下同。

2.6 四种纤维素酶的相对活性

酶是微生物生长过程中的代谢产物,随着培养时间的推移,微生物分泌的酶种类和活性各不相同。本研究中发现总的纤维素酶绝对酶活性在 24 h 达到最高峰,纤维素酶和 β 糖苷酶活性在菌群培养到 48 h 时达到最高,随着培养时间的延长,其活性降低;然而外切酶活性是随着培养时间的推移逐渐升高。由此说明,秸秆腐解过程中是多个纤维素酶共同作用的结果,不同酶种类在不同的腐解阶段起主要作用。

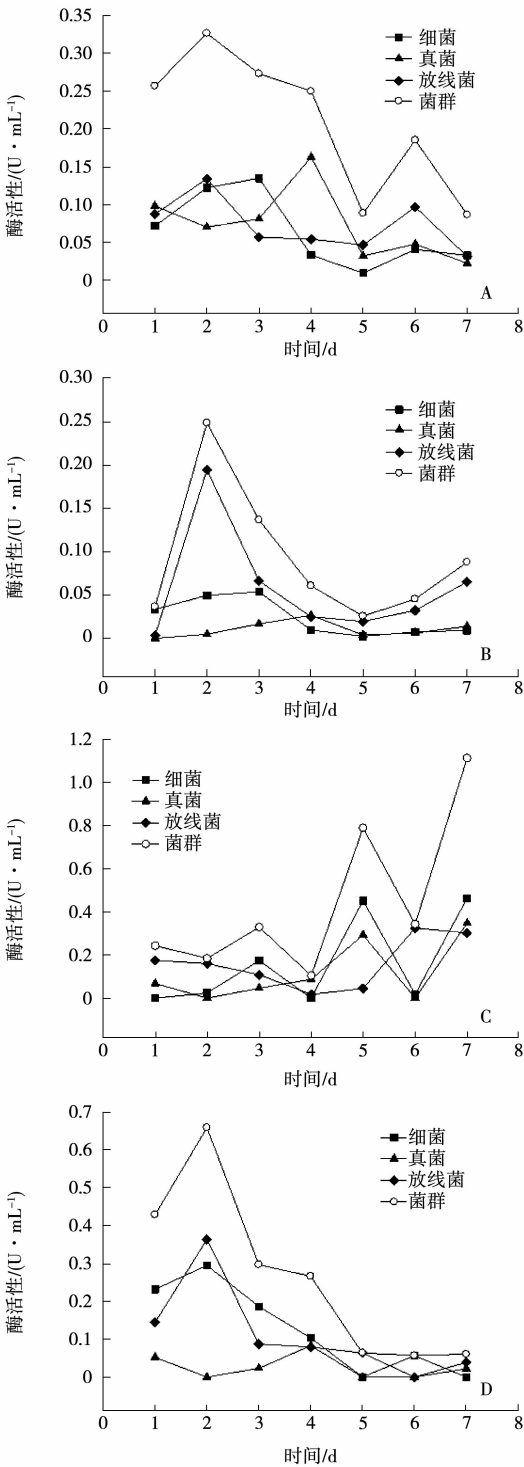


图 5 菌群 TF18 的全酶(A)、纤维素酶(B)、外切酶(C)和 β 糖苷酶(D)活性

2.7 纤维素酶活性与微生物类群酶活性间相关关系

由表 2 可知,纤维素酶活性与放线菌酶活性呈极显著正相关。其余 3 种酶活性与微生物类群酶活性之间相关关系不显著。由此可以看出,纤

纤维素酶活性主要来源于放线菌群,而其他 3 种酶活性是多种微生物类群共同代谢的结果。

表 2 纤维素酶活性与微生物类群酶活性之间相关性分析

项目	CMC	FPA	C1	B-Base	细菌酶活性	真菌酶活性	放线菌酶活性
CMC	1	0.611	-0.260	0.727	0.716	-0.320	0.949**
FPA		1	-0.889**	0.872*	0.442	-0.407	0.485
C1			1	-0.648	-0.040	0.371	-0.159
B-Base				1	0.604	-0.399	0.668
细菌酶活性					1	-0.261	0.581
真菌酶活性						1	-0.448
放线菌酶活性							1

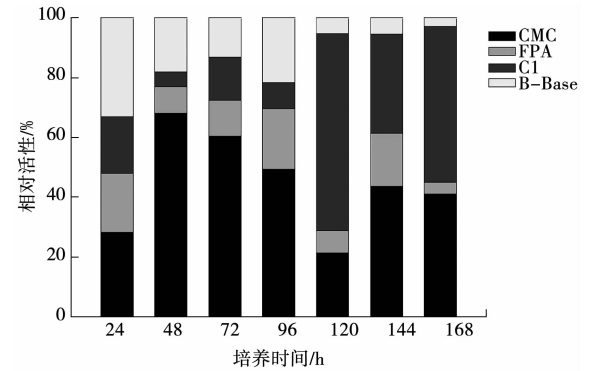


图 6 四种纤维素酶相对活性动态变化

2.8 纤维素降解菌群秸秆降解能力

将腐解菌群扩繁,通过对秸秆粉的腐解程度来衡量腐解菌的腐解能力。结果表明培养 8 d 后腐解菌群的玉米秸秆降解率达 21.3%,同时纤维素和半纤维素含量分别降低 20.9%和 16.8%(表 3)。

表 3 腐解菌群的秸秆腐解能力

处理	失重率/%	纤维素含量/%	半纤维素含量/%	木质素含量/%
常规秸秆	-	33.1	35.5	10.1
腐解秸秆	78.7	12.2	18.7	10.6

3 结论与讨论

秸秆降解菌群的组成和代谢活性以及环境条件,尤其温度和碳氮比是纤维素酶活性的主控因子,在秸秆降解的不同阶段,微生物群落组成呈现显著变化^[14-15]。从微生物分类地位上得到同样的研究结果,本研究认为放线菌是纤维素酶活性的主要代谢菌群,在秸秆腐解的前期起到关键作用。纤维素酶的代谢高峰期与微生物类群密切相关,李乐等^[16]分离得到高效纤维素代谢真菌的代谢高峰期 为 84 h,其中纤维素酶(CMC)和菌体生物量达到最大值。本研究纤维素降解菌群 TF18 的纤维素酶(CMC)代谢高峰期为 3 d 即 72 h,因此,在 TF18 菌群最优化的发酵条件基础上,进行解磷、解钾等功能菌株复配,构建高效功能菌群以及载体筛选,为该高效菌群的定殖和功能发挥提供保障。黑龙江省具有作物秸秆资源丰富的优

势,该高效功能菌群具有广阔的应用前景和开发潜力,为作物秸秆资源循环利用提供技术依据。

参考文献:

[1] 高永祥,李若尘,张民,等. 秸秆还田配施控释掺混尿素对玉米产量和土壤肥力的影响[J/OL]. 土壤学报:1-13[2020-11-10]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1119.P.20201019.1656.011.html>.

[2] 刘世平,聂新涛,张洪程,等. 稻麦两熟条件下不同土壤耕作方式与秸秆还田效用分析[J]. 农业工程学报,2006,22(7):48-51.

[3] 张素瑜,王和洲,杨明达,等. 水分与玉米秸秆还田对小麦根系生长和水分利用效率的影响[J]. 中国农业科学,2016,49(13):2484-2496.

[4] 张梦君,邱晨浩,柴立伟,等. 高效降解纤维素低温真菌的筛选、鉴定及发酵优化[J]. 微生物学通报,2019,46(10):2494-2503.

[5] 孟建宇,冀锦华,贾丽娟,等. 基于三种碳源筛选低温纤维素降解菌及其复合系的降解能力分析[J]. 生物技术通报,2019,35(8):77-84.

[6] 殷中伟. 秸秆纤维素高效降解菌株与复合系的筛选鉴定及其对秸秆降解效果研究[D]. 北京:中国农业科学院,2010.

[7] 青格尔,高聚林,于晓芳,等. 玉米秸秆低温高效降解复合菌系 GF-20 的菌种组成及降解稳定性研究[J]. 中国农业科学,2016,49(3):443-454.

[8] 宋云皓,满都拉,邵晋楠,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.

[9] 王天生,李传博,王宁,等. 纤维素降解菌的筛选与复合菌系的初步构建[J]. 中国微生态学杂志,2018,30(1):19-21.

[10] 关怡,尹娣,杜茜,等. 产纤维素酶菌株 *Trametes* sp. LYW-1 的分离鉴定及产酶条件分析[J]. 中国农业大学学报,2018,23(10):96-102.

[11] Murashima K, Kosugi A, Doi R H. Synergistic effects of cellulosomal xylanase and cellulases from *Clostridium cel-lulovorans* on plant cell wall degradation[J]. Journal of Bacteriology,2003,185(5):1518-1524.

[12] 中华人民共和国国家发展和改革委员会. QB2583-2003, 中华人民共和国轻工行业标准[S]. 2003.

[13] 罗晶. 物理预处理秸秆菌群发酵工艺研究[D]. 天津:天津理工大学,2011.

[14] 张红. 植物秸秆腐解特性及微生物多样性的响应研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2017.

[15] 吴文韬,鞠美庭,刘金鹏,等. 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.

[16] 李乐,李明星,汤国雄,等. 一株纤维素酶产生菌的筛选与产酶特性研究[J]. 环境科技,2019,32(1):24-29.



毛莹,郑冬梅,辛愿,等.桑树对沙化土壤改良的试验研究[J].黑龙江农业科学,2021(2):45-48.

桑树对沙化土壤改良的试验研究

毛莹,郑冬梅,辛愿,施柳

(沈阳大学 环境学院/区域环境生态恢复教育部重点实验室,辽宁 沈阳 110044)

摘要:为促进沙化土壤治理,本文选择适应性强的桑树作为改良植物,探究桑树在不同沙化程度的土壤中的适应能力,对不同沙化程度土壤的生态修复效果,以及有落叶影响下对土壤理化性质的影响。在不同处理条件的土壤中种植半年生桑,以同样种植桑的正常土壤作为对照,通过盆栽试验测定不同处理土壤的理化性质及桑的生长发育情况。结果表明:土壤中有机质含量整体呈增加趋势,提高了 6.30%~68.97%;全铁含量增加了 11.24%~26.73%;全钾含量增加了 3.87%~28.94%。在种植桑树后,不同沙土比的土壤肥力状况均得到了改善,土壤的养分含量提高,桑树在不同沙化程度的土壤环境中适应能力极强,对不同沙化程度的土壤生态修复效果显著,种植桑树是改良沙化土壤理化性质的有效方式。

关键词:沙化土壤;桑树;土壤改良;生态修复

土地沙化是因为各种原因地表植被遭到破坏,土壤变为含沙量较多的土壤的过程。土壤沙化已经成为一个全球性环境问题之一,沙化在全球范围内蔓延,每年以 5 万~75 万 km² 的速度持续扩张,目前全球遭受沙化威胁和其他干旱地区的土地面积已达地球陆地面积的 41.3%^[1],我国是世界上受沙化危害最严重的国家之一,沙化

土地面积已达 1.73×10⁶ km²,占国土总面积的 18.03%^[2-3]。在沙化区域选择抗旱,水土保持性良好,可以防风固沙的植被种植适当改善土壤的理化性质,降低沙化程度,阻止沙化蔓延^[4-5],通过种植植被恢复土壤生产力并高效开发利用,是目前治理沙化最有效最具生态效益的方法。

桑为桑科桑属落叶乔木或灌木,原产于中国中部,分布较广,有着长达 3 000 年的栽培历史,桑树品种多适应性强,生命力旺盛,范围分布很广^[6];相较于其他植物,桑树因其发达的根系、较快的生长速度、耐贫瘠、耐干旱、适应性强等特点而在生态环境治理中备受关注,同时也被认为是经济作物中生态效益最好,在生态作物中经济价值最高的树种^[7]。因此,本文选择桑树作为对象,

收稿日期:2020-08-04

基金项目:辽宁省重点研发计划指导计划项目(2019JH8/10200024);辽宁省高等学校创新人才支持计划(LR2016 078);国家自然科学基金(41571085)。

第一作者:毛莹(1997—),女,在读硕士,从事土壤生态修复研究。E-mail:916273239@qq.com。

通信作者:郑冬梅(1977—),女,博士,教授,从事污染土壤生态修复研究。E-mail:zhengdm126@126.com。

Mechanism of Cellulose Degrading Bacteria TF18

CHEN Xue-li^{1,3}, CHI Feng-qin¹, YI Xiao-dong², LI Wei-qun¹, WANG Shuang¹, WAN Shu-ming¹, ZHANG Mei-zhi²

(1. Institute of Soil Fertilizer and Environmental Resources, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Soil Environment and Plant Nutrition of Heilongjiang Province, Harbin 150086, China; 2. Postdoctoral Workstation, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China; 3. College of Modern Agriculture and Ecological Environment, Heilongjiang University, Harbin 150086, China)

Abstract: In order to further optimize the fermentation conditions and develop straw degrading bacteria, the decomposing microflora TF18 isolated from natural decaying maize straw was studied in this study. The results showed that the decomposing microflora was a complex organic whole, and the suitable incubation condition was on PD and KB for 72 h. The purpose of straw degradation was achieved by secreting cellulase(CMC) and beta-glycosidase(beta-Gase) first and then total enzyme(FPA) exonuclease(C1). Moreover, actinomycetes were the main microbial groups secreting cellulase. The degradation rate of corn straw could reach 21.3% after 8 days of mixing TF18 fermentation broth with crushed corn straw. Therefore, the microflora TF18 could be candidate microorganism resources for straw decomposition agents.

Keywords: maize straw; decomposing bacteria; cellulase