

王纪辉,王修俊,杨志波,等. 1 株降解秸秆高温菌的分离、鉴定及降解能力[J]. 江苏农业科学,2015,43(12):376-378.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.12.117

1 株降解秸秆高温菌的分离、鉴定及降解能力

王纪辉,王修俊,杨志波,尹 爽,刘佳慧,田 多,曲 源

(贵州大学酿酒与食品工程学院/贵州大学发酵工程与生物制药省级重点实验室,贵州贵阳 550025)

摘要:为分离得到高温高效降解菌株,促进作物秸秆快速腐解还田,解决秸秆资源的高效利用、培肥土壤和保护生态环境问题,从水稻秸秆中筛选分离出 1 株高温菌,具有降解农作物秸秆的能力。该菌株经鉴定为嗜热蹻菌,其最佳降解条件为:发酵时间 15 d,发酵温度为 55 ℃,高温菌株用量 2 mL。在上述条件下,纤维素含量由初始的 33.13% 下降到 25.92%,木质素含量从最初的 12.65% 下降到 8.57%。

关键词:秸秆;高温菌;分离;鉴定;降解能力

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)12-0376-03

我国是农业大国,每年将产生大量的农作物秸秆,然而大量的作物秸秆并没有得到有效利用,大部分被露天焚烧或者随意丢弃,导致资源的大量浪费,并且加剧环境污染,阻碍交通^[1-5]。目前国内外作物秸秆处理实践表明,高温发酵是实现秸秆再利用的有效途径之一。由于传统的作物秸秆处理方法存在发酵时间长、腐殖质转化不完全等问题,因此,如何解决这些问题,缩短发酵周期、提高秸秆降解速率一直是国内外学者研究的一个重要课题^[6-7]。作物秸秆中难降解有机物的存在是导致上述问题的主要原因,而发酵高温期是有机大分子降解的主要阶段,但微生物在这个阶段受高温因素的影响,其种群数量和活性会普遍降低,由此限制了有机物的快速分

解^[8]。目前,针对促进秸秆快速降解的研究主要集中在工艺优化和筛选高温菌方面,与常温菌相比,高温菌具有代谢快、活性高、酶的热稳定性好、有机物降解速率快、营造高温条件杀死病原菌等特点^[9]。所以,在作物秸秆中接种高温菌进行发酵,可增加高温期微生物的数量,促进难降解有机物的快速转化,从而提高作物秸秆的降解速度^[10]。因此,本试验从表面长有菌丝的水稻秸秆上筛选分离出 1 株高温菌株,并将该菌接种到秸秆上对其降解秸秆能力进行研究,旨在为促进秸秆的快速降解提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

水稻秸秆采自贵州省贵阳市郊农田。

主要试剂:重铬酸钾、硫酸亚铁、二氧化硅、邻啡罗啉、95% 乙醇、乙二胺四乙酸二钠、硼酸钠、十二烷基硫酸钠、无水磷酸氢二钠、乙二醇乙醚、丙酮等。

试验仪器:生化培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂)、净化工作台(上海索谱仪器有限公司)、恒温恒湿箱

收稿日期:2015-04-23

基金项目:贵州省社会发展科技攻关项目(编号:黔科合 SY[2010]3041)。

作者简介:王纪辉(1988—),男,河南周口人,硕士研究生,研究方向为食品发酵。E-mail:shikewangjihui@163.com。

通信作者:王修俊,博士,教授,主要从事食品安全及发酵工艺方面的研究。E-mail:wangxiujun678@sohu.com。

用的发挥条件,可以更好地挖掘微生物的解磷潜能^[10]。本研究通过透明圈法初步分离出具有解无机磷能力的细菌 4 株,菌株在培养基上能够形成良好的透明圈,说明这些菌株可以分泌一些酸性物质,并向培养基中扩散,使菌落周围的磷酸盐(磷酸三钙)溶解,即这些菌株具有溶磷性^[11],采用钼锑抗比色法测定上清液中的有效磷含量,确定菌株 JP-7 具有较强的解磷能力,但要想进一步应用到实际生产中,还必须加强对菌株生长繁殖特点的研究。

参考文献:

- [1] 吴 平,印莉萍,张立平. 植物营养分子生理学[M]. 北京:科学出版社,2001:103-104.
- [2] 戴沈艳,贺云举,申卫收,等. 一株高效解磷细菌的紫外诱变选育及其在红壤稻田施用效果[J]. 生态环境学报,2010,19(7):1646-1652.
- [3] 江丽华,刘兆辉,石 璟,等. 真菌 F2 的解磷能力及其生长动态

研究[J]. 中国农学通报,2009,25(1):42-46.

- [4] 唐 勇,陆 玲,杨启银,等. 解磷微生物及其应用的研究进展[J]. 天津农业科学,2001,7(2):1-5.
- [5] 赵小蓉,林启美,孙焱鑫,等. 细菌解磷能力测定方法的研究[J]. 微生物学通报,2001,28(1):1-4.
- [6] 朱 颖,姚 拓,李玉娥,等. 红三叶根际溶磷菌分离及其溶磷机制初探[J]. 草地学报,2009,17(2):259-263.
- [7] 张祥胜. 发酵液有效磷含量测定方法研究[J]. 湖州职业技术学院学报,2008,6(3):1-3.
- [8] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001.
- [9] 别小妹,陆兆新,房耀维,等. 利用 16S rDNA 序列分析鉴定一株产抗菌物质的微生物菌株[J]. 食品科学,2006,27(11):466-470.
- [10] 韩玉竹,赵建军,曾 兵,等. 多花黑麦草根际解磷菌的分离及解磷能力测定[J]. 草地学报,2011,19(5):766-770.
- [11] 李凤霞,梁锦绣,周 涛. 宁夏产枸杞根际溶磷菌分离及溶磷能力分析[J]. 植物资源与环境学报,2006,15(2):29-32.

(上海博讯实业有限公司医疗设备厂)、手提式压力蒸汽消毒器(北京市永光明医疗仪器厂)、万用电炉(天津市泰斯特仪器有限公司)、电热恒温鼓风恒温干燥箱(上海贺德实验设备有限公司)、电子天平(上海良平仪器仪表有限公司)、精密酸度计(上海虹益仪器仪表有限公司)、恒温振荡器(江苏常州澳华仪器有限公司)、光学显微镜(上海光学仪器厂)。

1.2 试验方法

1.2.1 高温菌株的分离 把秸秆放在湿润的土堆里,置于 55 ℃ 的恒温培养箱中培养,直到长出菌落,然后从水稻秸秆堆中选取表面长有菌丝的水稻秸秆,放入盛有无菌水和玻璃珠的三角瓶中,用漩涡混合器混合 30 min,将菌丝溶解于无菌水中,再用涂布法接种到 PDA 平板培养基中,在 55 ℃ 的恒温培养箱中培养;经富集后,接种到查氏培养基上涂布分离,并在 55 ℃ 的恒温培养箱中培养 3 d,纯化至单菌落,接种于斜面试管^[11-12]。

1.2.2 高温菌株的鉴定 参照《常见细菌系统鉴定手册》^[13]和《伯杰氏细菌鉴定手册》^[14]进行初步鉴定。16S rDNA 序列测定:按照生工 SK1201-UNIQ-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒说明书对高温菌株进行 DNA 提取纯化及 16S rDNA 序列分析。正向引物序列为 ITS1:5'-TCCGTAGGTGAACCT-GCGG-3',20 bp;反向引物序列为 ITS4:5'-TCCTCCGCT-TATTGATATGC-3',19 bp。PCR 反应总体积 50 μL:各 1 μL 10 μmol/L 前引物、末端引物,1 μL 10 mmol/L dNTP,5 μL 10 × PCR Buffer,0.25 μL 5 U/μL *Taq* DNA 聚合酶,1 μL DNA 模板,补足无菌去离子水至 50 μL。PCR 反应扩增程序:98 ℃ 5 min;95 ℃ 35 s,55 ℃ 35 s,72 ℃ 40 s,35 个循环;72 ℃ 8 min^[15]。

1.2.3 高温菌株种子液制备 取去皮的新鲜马铃薯 200 g 切成小块放入烧杯中,加水 1 000 mL,煮沸 20 min 后,用 2 层纱布过滤,向滤液中加入 20 g 葡萄糖,补充水至 1 000 mL,121 ℃ 灭菌 30 min。冷却后接种高温菌,55 ℃ 下培养 3 d。

1.2.4 纤维素和木质素含量的测定 (1) 将于 105 ℃ 烘至恒质量的水稻秸秆粉碎过直径 0.5 mm 筛后取 1 g 试样(精确至 0.000 1 g),置于 100 mL 碘瓶中,设 3 组平行,加入 70 mL 中性洗涤剂,放入已沸的高压锅中,100 ℃ 保温 40 min,115 ~ 121 ℃ 保温 20 min;取出,用 3 号 30 mL 砂芯坩埚过滤至 pH 值 6.5 ~ 7.0,依次用 95% 乙醇、无水乙醇和丙酮洗涤 2 次,将残渣置于真空干燥器中干燥 20 min^[16-17]。(2) 将残渣连同坩埚置于 100 mL 烧杯中,加入 70 mL 2 mol/L 盐酸溶液,然后放入已沸的高压锅中,100 ℃ 保温 50 min,过滤至中性,依次用 95% 乙醇、无水乙醇和丙酮洗涤 2 次,残渣于 80 ℃ 烘至恒质量为 m_1 ^[18-19]。(3) 将残渣连同坩埚置于 150 mL 烧杯中,加入冷却至 20 ℃ 72% 硫酸,20 ℃ 降解 4 h,后加入 90 mL 蒸馏水,室温过夜,次日用蒸馏水洗残渣至 pH 值为 6.5,烘干至恒质量为 m_2 。将残渣在 550 ℃ 马福炉中灰化,干燥器中恒质量为 m_3 。相应公式为:

$$\text{纤维素含量} = \frac{m_1 - m_2}{m} \times 100\% ;$$

$$\text{木质素含量} = \frac{m_2 - m_3}{m} \times 100\% .$$

式中: $m_1 - m_2$ 为纤维素质量,g; $m_2 - m_3$ 为木质素质量,g^[20];

m 为试样质量,g。

2 结果与分析

2.1 高温菌株的分离纯化

在 55 ℃ 下从水稻秸秆堆中分离来菌株(图 1),可以看出菌落呈白色圆形,为丝状菌,从形态上可以初步断定为真菌。

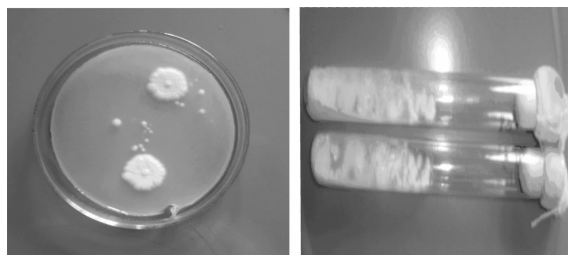


图1 高温菌平板(左)和试管斜面(右)

2.2 高温菌株分子生物学鉴定结果

对高温菌株进行分子水平鉴定,基因组电泳分析结果见图 2,PCR 产物电泳结果见图 3,16S rDNA 序列见图 4。

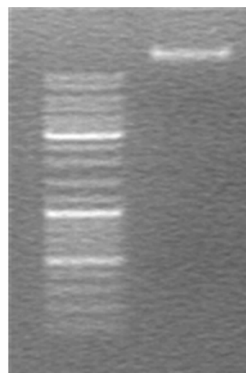


图2 基因组电泳分析结果

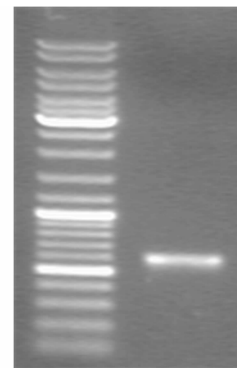


图3 PCR产物电泳分析结果

由图 3 可知,该菌株的荧光条带清晰、无杂带,表明 DNA 纯度较高,可用于菌株 16S rDNA 序列的测定,说明 PCR 扩增成功,能满足后续的测序需要。将图 4 测序结果在 NCBI 基因序列数据库中通过 BLAST 进行基因同源性比对,比对结果表明该菌株为嗜热蹻节菌。

2.3 高温菌株分解水稻秸秆效果

取 10 g 水稻秸秆粉于 250 mL 三角瓶中,加 30 mL 蒸馏水,灭菌冷却后,接种 2 mL 菌株种子液,于 55 ℃ 下培养,测定纤维素和木质素含量,测定结果见图 5、图 6。

5'-TCGGGTCCCAATCTCCACCCGTGTCTACCACACCTGGTGTGCTTTGGCGGGCCCACTCCTCCGGTCTCCGCCGGGGGGGTCGTCCCGGGGCGCGGTTTGGCGGGGCGCGTGCCCGCCAGAGGCACTACTGTGAATGCTTGTGTGAATGCGAGGATTGTCTGAGTGATGAAATGCAATCGTTCAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTATGTGAATTGCAGAAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCGAACCCTCAAGCACGGCTGTGTGTTGGGCCGCCGTCCCCCGTTGCAGGGGGGGGGACGGGCCTGAAAGGCAGCGCGGCGTCCCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTCTGTCACGCGCTCAAGGAGGGGTCCGGCCGGGGCCATAGCCTCAAAGGTCAAACTTTTTCCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAGTACCC-3'

图4 高温菌株测序结果

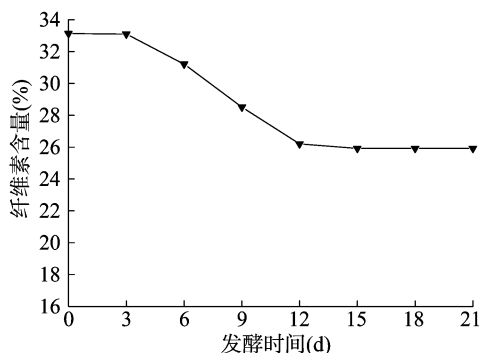


图5 嗜热蹠节菌发酵处理水稻秸秆分解纤维素效果

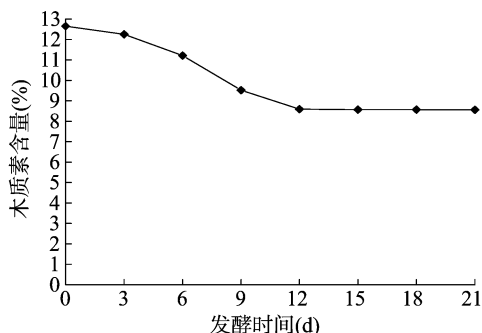


图6 嗜热蹠节菌发酵处理水稻秸秆分解木质素效果

由图5可知,嗜热蹠节菌对水稻秸秆中的纤维素有分解作用,随着发酵时间的延长,纤维素含量呈下降趋势;发酵时间为15 d时纤维素含量下降到最低值,纤维素含量由初始的33.13%下降到25.92%;之后随着发酵时间的延长纤维素含量趋于稳定。

从图6中可以看出,嗜热蹠节菌对水稻秸秆中的木质素也有分解作用,在发酵时间为15 d时木质素含量降到最低值,木质素含量从最初的12.65%降到8.57%;之后随着发酵时间的增加,木质素含量不再下降。

3 结论

本试验从水稻秸秆堆中分离出1株高温菌,从形态上看菌落为白色、圆形、丝状,经分子生物学鉴定,该菌为嗜热蹠节菌;通过对高温菌株降解水稻秸秆效果的研究表明:发酵时间15 d、发酵温度为55℃、高温菌株用量2 mL,秸秆中纤维素含量由初始的33.13%下降到25.92%;木质素含量从最初的12.65%降到8.57%。

本研究表明,在作物秸秆中接种高温降解菌可促进难降解有机物的快速转化,提高作物秸秆的降解速度、消化率及其可利用营养物的含量,具有较高的研究价值和广阔的开发利

用前景。

参考文献:

- [1]周沅洁,马桂英,王修俊,等.一株降解玉米秸秆菌株的分离、鉴定及其降解能力的研究[J].广东农业科学,2012(20):87-90.
- [2]刘保平.作物秸秆的微生物降解研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2009.
- [3]董文.秸秆的微生物降解研究现状[J].科技信息,2007(5):13.
- [4]赵荷娟,魏启舜,王琳,等.南京市农作物秸秆综合利用现状及发展[J].江苏农业科学,2014,42(12):384-386.
- [5]常志州,王德建,杨四军,等.对稻麦秸秆还田问题的思考[J].江苏农业学报,2014,30(2):304-309.
- [6]程旭艳,霍培书,尚晓瑛,等.堆肥中高温降解菌的筛选、鉴定及堆肥效果[J].中国农业大学学报,2012(5):105-111.
- [7]徐美青.用于蘑菇养殖的秸秆堆肥中高温纤维素降解菌的筛选鉴定及相关水解酶的研究[D].济南:山东大学,2012.
- [8]韩鲁佳,闫巧娟,刘向阳,等.中国农作物秸秆资源及其利用现状[J].农业工程学报,2002,18(3):87-91.
- [9]魏志文,赵士豪,李宝库.多菌株发酵秸秆饲料研究[J].安徽农业科学,2008,36(32):14108-14110.
- [10]马桂英,王修俊,曲源,等.农作物秸秆资源的基本现状及其研究[J].科技成果管理与研究,2011,61(11):59-60.
- [11]韩波波.高温菌的分离纯化及性质研究[D].上海:华东师范大学,2008.
- [12]许志超.一株长白山温泉高温菌的分离鉴定及培养条件优化[D].长春:吉林农业大学,2013.
- [13]东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001.
- [14]布坎南 R E.伯杰氏细菌鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001.
- [15]张慧.高温菌株生理生化及有机物降解性质研究[D].上海:华东师范大学,2010.
- [16]薛惠琴,杭怡琼,陈谊.稻草秸秆中木质素、纤维素测定方法的研讨[J].上海畜牧兽医通讯,2001(2):15.
- [17]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(8):50-52.
- [18]殷中伟.秸秆纤维素高效降解菌株的筛选及对秸秆降解效果初步研究[D].北京:中国农业科学院,2010.
- [19]郭红伟,王娇,常娟,等.木质纤维素酶高产菌株的筛选及其对玉米秸秆降解效果的影响[J].生物加工过程,2012(5):39-43.
- [20]王元明.高温纤维素降解菌的筛选及其复合菌剂对秸秆降解效果的研究[D].南京:南京农业大学,2013.