

潘 林,胡 影,于天雁,等. 纤维素降解菌的筛选与复合菌群的构建[J]. 江苏农业科学,2017,45(13):229-232.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.13.061

纤维素降解菌的筛选与复合菌群的构建

潘 林¹, 胡 影¹, 于天雁², 王志刚¹

(1. 齐齐哈尔大学生命科学与农林学院,黑龙江齐齐哈尔 161006; 2. 富裕县逸夫中学,黑龙江齐齐哈尔 161200)

摘要:堆肥中的纤维素是制约堆肥进程的关键。通过对样品进行常温和高温多代驯化,获得 4 株高效纤维素降解菌,其中 2 株常温菌 *Bacillus amyloliquefaciens* LZN01、*Bacillus amyloliquefaciens* LZN02, 2 株高温菌 *Bacillus licheniformis* LZN03、*Bacillus licheniformis* MLY0。4 株菌对滤纸均有降解能力,且常温菌复合菌系的滤纸崩解能力、滤纸酶活性与 CMC 酶活性分别为 10.81%、0.17 U/mL 与 7.41 U/mL,高温菌复合菌系分别为 5.69%、0.10 U/mL 与 12.69 U/mL。4 株菌间不存在拮抗效应,多数能够交叉生长,能够构建成为复合菌群。因此,这 4 株菌在构建纤维素复合菌群并应用到堆肥体系中具有一定的前景。

关键词:纤维素;降解菌;复合菌群;堆肥

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)13-0229-04

堆肥是畜禽废弃物无害化、资源化的有效手段,但其中高含量的纤维素是制约堆肥进程的关键^[1],在堆肥过程中接种纤维素降解菌,可以有效促进纤维素的分解,加速堆肥腐熟,并提高堆肥的品质^[2]。但单一菌株在堆肥中可发挥的作用有限,筛选高效纤维素降解菌株并构建高效的堆肥菌系,是处理畜禽废弃物的有效手段。构建不同功能的复合菌系可加速堆肥发酵进程,因而受到广泛关注^[3-4]。因此,本试验从腐殖土和堆肥样品中分离筛选高效纤维素降解菌株,并构建高效功能性复合菌系,为堆肥腐熟剂的研发提供参考。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

试剂:羧甲基纤维素钠购于天津科密欧化学试剂有限公司,其余试剂均为国产分析纯。

仪器:T6 新世纪紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司);D-37520 离心机(德国);100-230V 纯水系统(MILLIPORE)。

1.2 培养基

羧甲基纤维素钠培养基:CMC-Na 20 g,Na₂HPO₄ 2.5 g,KH₂PO₄ 1.5 g,蛋白胨 2.5 g,琼脂 20 g,蒸馏水定容至 1 000 mL。

刚果红培养基:K₂HPO₄ 0.5 g,MgSO₄·7H₂O 0.25 g,CMC-Na 1.88 g,刚果红 0.2 g,明胶 2 g,琼脂 20 g,蒸馏水定容至 1 000 mL。

滤纸条培养基:KH₂PO₄ 1.0 g,NaCl 0.1 g,NaNO₃ 2.5 g,MgSO₄ 0.3 g,FeCl₃ 0.01 g,CaCl₂ 0.1 g,滤纸条(1 cm×6 cm) 3 条/三角瓶,蒸馏水定容至 1 000 mL。

收稿日期:2016-03-18

基金项目:黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划(编号:UNPYSCT-2015092)。

作者简介:潘 林(1964—),男,黑龙江齐齐哈尔人,硕士,副教授,主要从事生物学方面的教学与研究工作。Tel:(0452) 2738361; E-mail:plin@163.com。

通信作者:王志刚,博士,副教授,主要从事微生物学方面的教学与研究工作。Tel:(0452)2738781;E-mail:wzg1980830@sina.com。

[6] Kim K S, Rhee K H, Yoon J H, et al. *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) induces apoptosis by the activation of caspase-3 in oral cavity cancer cells[J]. *Oral Oncology*, 2005, 41(4):383-389.

[7] Zhou C, Li X, Du W, et al. Antitumor effects of ginkgolic acid in human cancer cell occur via cell cycle arrest and decrease the Bcl-2/Bax ratio to induce apoptosis[J]. *Chemotherapy*, 2010, 56(5):393-402.

[8] 严铸云,庞 蕾,罗 静,等. 银杏内生真菌菌种的分离及鉴定[J]. *华西药学杂志*, 2006, 21(5):425-427.

[9] 王梅霞,陈双林,霍 娟. 一株银杏内生真菌的分离及其产黄酮类物质的初步研究[J]. *工业微生物*, 2004, 34(2):15-18.

[10] 苗莉云,张 鹏,周蓬蓬,等. 产紫杉醇内生真菌枝状枝孢霉 MD2 的发酵条件优化[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(6):1033-1040.

[11] 缪 莉,王元元,朱 磊,等. 四种植物内生真菌的分离及其抗

肿瘤活性的筛选[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(6):865-869.

[12] 马君千,王雪玲,缪 莉,等. 共附生微生物抗肿瘤活性菌的筛选与鉴定[J]. *生物技术通报*, 2012(9):137-142.

[13] 黄银久,宋宝安,金林红,等. SRB 法和 MTT 法抗肿瘤药物筛选结果相关性研究[J]. *生物学杂志*, 2009, 26(4):13-16.

[14] 葛 飞,石贝杰,高樱萍,等. 一株高抗氧化活性银杏内生真菌 SG0016 的鉴定及其培养条件优化[J]. *西北植物学报*, 2015, 35(2):403-409.

[15] 包 飞. 产银杏内酯 B 内生真菌的筛选及培养条件优化[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2008.

[16] 郝双红,王绪昆,殷培军,等. 侧柏内生真菌 G21 代谢产物稳定性及发酵条件优化[J]. *农药*, 2015(6):414-417.

[17] 谭友莉,马云桐,严铸云,等. 三角叶黄连内生真菌产物红色色素的稳定性研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2013, 25(8):1101-1106.

液体产酶发酵培养基:CMC - Na 7.5 g,大豆粉 7.5 g, CaCl₂ · 2H₂O 0.3 g,MgSO₄ · 7H₂O 0.25 g,KH₂PO₄ 4 g,滤纸 2.5 g,蒸馏水 1 000 mL,121 ℃,灭菌 20 min。

1.3 样品来源

从扎龙自然保护区采集的腐殖土和黑龙江田雨绿色农业工程有限公司的鸡粪堆肥中取样,并进行常温(30 ℃)及高温(50 ℃)多代驯化,筛选常温、高温菌。

1.4 试验方法

1.4.1 菌株的筛选与纯化 取 5 g 驯化后的样品与水按 1∶10 比例混合,130 r/min 振荡 10 min,静置。取上清液稀释涂布于刚果红培养基上,常温菌置于 30 ℃ 下培养;高温样品于 50 ℃ 水浴 30 min 后,取上清液进行稀释涂布,50 ℃ 培养。挑取透明圈清晰的菌株进行分离纯化,将所得到的菌株接入滤纸条培养基中验证其对滤纸的分解情况。

1.4.2 滤纸崩解试验 设置单一菌株试验组、常温混合菌与高温混合菌试验组,将各菌株组合的菌液按 2% 比例接入液体选择培养基中,将各菌液按照 2% 比例接种于 100 mL 滤纸条培养基中,常温菌 30 ℃、130 r/min 条件下振荡培养;高温菌 50 ℃、130 r/min 条件下振荡培养,分别于培养 2、4、6、8、10 d 测定滤纸崩解情况。每个处理设置 3 次重复。

1.5 拮抗试验

采用划线法将筛选出的纤维素降解菌在羧甲基纤维素钠培养基上进行画线,各线之间不相交,30 ℃ 培养 24 h 后观察各菌株之间的拮抗作用。

1.6 不同菌株组合粗酶液制备与酶活性测定

设置单一菌株试验组、常温混合菌与高温混合菌试验组,将各菌株组合的菌液按 2% 比例接入液体产酶发酵培养基中,130 r/min 振荡培养,每隔 24 h 取培养液 2 mL,4 ℃,8 000 r/min 离心 20 min,上清液作为粗酶液,采用 3,5 - 二硝基水杨酸法^[5](DNS)测定酶液中还原糖含量,对照标准曲线后测定滤纸酶(FPase)活性与羧甲基纤维素酶(CMCase)活性,酶活性单位参照国际单位规定定义,即在 1 mL 体系中,1 min 内催化纤维素水解生成 1 μmol 葡萄糖所需的酶量为 1 个酶活性单位(U/mL)。

1.7 菌株鉴定

采用形态学、生理生化及 16S rDNA 序列比对进行综合鉴定,由上海美吉生物公司测序,测序结果在 GenBank 中进行比对,用 MEGA 4.0 软件进行序列比对与系统发育分析,并建立系统进化树。

1.8 数据处理

采用 Origin 8.5 软件进行数据统计分析与图表制作。

2 结果与分析

2.1 菌株分离纯化与功能的初步鉴定

分离纯化得到 4 株纤维素降解能力较强的菌株,包含 2 株常温菌株(LZN01、LZN02)与 2 株高温菌株(LZN03、MLY01)。LZN01 菌落为乳白色偏黄、圆形,边缘不规则,表面褶皱隆起,革兰氏阳性,杆状,可形成芽孢;LZN02 菌落形态为白色,表面呈紧密状,干燥,革兰氏阳性,与培养基结合紧密不易挑取;LZN03、MLY01 菌落为乳白色偏黄,LZN03 菌落圆形,革兰氏阳性,细杆状;MLY01 菌落扁平、边缘不整齐呈须

根状,表面粗糙褶皱,革兰氏阳性,细长杆状。由表 1 可知,透明圈直径与菌落直径比值表现为 LZN01 > MLY01 > LZN03 > LZN02。透明圈直径与菌落直径的比值大小可以初步判定纤维素降解菌降解能力的大小,原则上其比值越大,对纤维素的降解能力越强。

表 1 纤维素降解菌株在刚果红培养基上透明圈大小

菌株	菌落直径 (mm)	透明圈直径 (mm)	透明圈直径/菌落直径
LZN01	0.80 ± 0.12	5.30 ± 0.21	6.77 ± 0.99
LZN02	2.63 ± 0.15	6.50 ± 0.37	2.48 ± 0.06
LZN03	1.83 ± 0.04	6.43 ± 0.13	3.52 ± 0.13
MLY01	2.21 ± 0.23	8.04 ± 0.85	3.69 ± 0.49

2.2 菌株 16S rDNA 鉴定

通过 16S rDNA 测序和系统进化树的同源性进行比较分析(图 1)可知,LZN01 与 LZN02 同为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*),亲缘关系稍远,鉴定结果不是同一菌株;而 LZN03 与 MLY01 为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*),亲缘关系较近,形态学与镜检结果不同,初步鉴定 2 株菌并非同一菌株。

2.3 滤纸条崩解试验

由图 2 可知,4 株菌对滤纸均有一定的降解能力,其中常温菌 LZN02 的降解能力较强,培养 10 d 时可降解 19.11% 的滤纸,而复合菌系可降解 10.81% 的滤纸;耐高温菌复合菌系降解 10 d 时可降解 5.69% 的滤纸。高温复合菌系的滤纸崩解能力高于单一菌株,说明构建高温菌复合菌系可以提高菌系的滤纸降解能力,而常温菌复合菌系的滤纸降解率低于单一菌株 LZN02。

2.4 常温菌滤纸酶活性与 CMC 酶活性

滤纸酶活性大致可以反映纤维素酶的 3 种酶(C1 酶、Cx 酶与葡萄糖糖苷酶)之间的协同作用,而 CMC 酶活性则仅反映纤维素酶内切 β-1,4 - 葡聚糖的活性,酶液与底物 CMC - Na 的结合较强,故 CMC 酶活性远大于滤纸酶活性。试验结果表明,在整个培养周期内,复合菌系的滤纸酶活与 CMC 酶活大多高于单一菌株,复合菌系在培养 6 d 时有最大滤纸酶活性(0.17 U/mL)与 CMC 酶活性(7.41 U/mL),但与 LZN02 相比,酶活增加不明显,也进一步证实 LZN02 可能与 LZN01 存在空间或营养的竞争(图 3)。

2.5 高温菌滤纸酶活性与 CMC 酶活性

由图 4 可知,复合菌系的滤纸酶活性在培养 5 d 达到最大(0.10 U/mL),酶活力稍高于单一菌株;而复合菌系的 CMC 酶活与单一菌株相比,变化幅度较大,在培养 4 d 达到最大(12.70 U/mL)。CMC 酶活性变化大,说明复合菌系内切 β-1,4 - 葡聚糖的活性较强,并且与常温组相比,高温组 2 株菌均为细菌,生长速度较快且 2 株菌之间存在协同作用。

2.6 菌株间的拮抗作用

由表 2 可看出,LZN01 与 LZN03、MLY01 间无明显的拮抗作用,但不能交叉生长;LZN02 与 LZN01、LZN03 和 MLY01 无拮抗可以交叉生长;LZN03 和 MLY01 无拮抗可以交叉生长。常温菌株的最适生长温度为 35 ℃,高温菌株的最适生长温度为 45 ℃,结合堆肥过程中温度的变化特征,这 4 株菌完全具备构建符合菌群的条件。

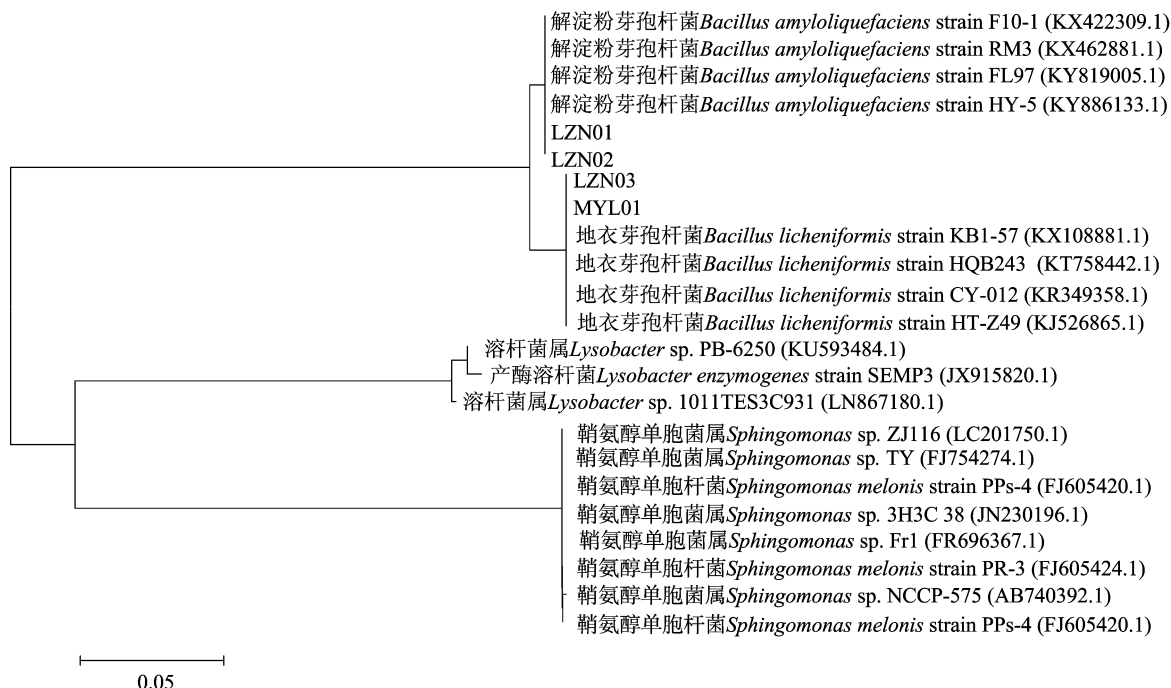


图1 纤维素降解菌株系统进化树

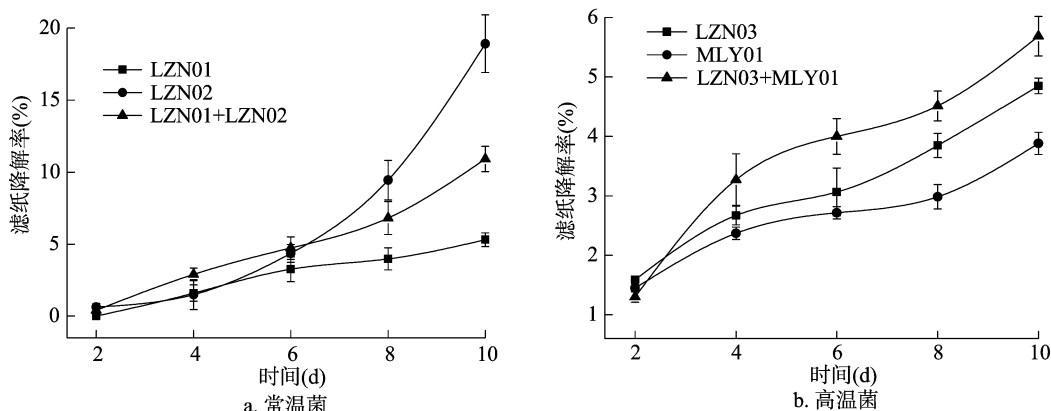


图2 纤维素降解菌滤纸降解率

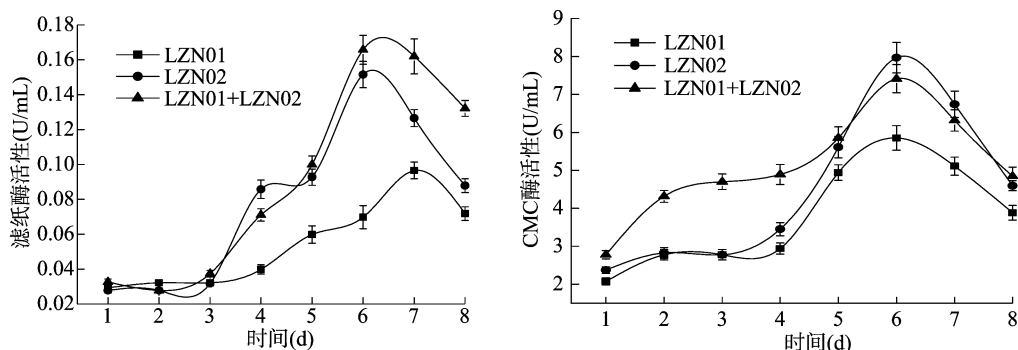


图3 纤维素降解常温菌酶活性

3 讨论

本试验通过对样品进行常温和高温多代驯化,得到4株高效纤维素降解菌,包括常温菌 *B. amyloliquefaciens* LZN01、*B. amyloliquefaciens* LZN02,高温菌 *B. licheniformis* LZN03、*B.*

licheniformis MLY01。解淀粉芽孢杆菌与地衣芽孢杆菌是重要的生防微生物资源^[6],芽孢杆菌在自然界中的分布十分广泛,可产生多种抗菌物质且对人畜无害,对环境友好,因而备受国内外植物与环境专家的重视^[7]。*Bacillus amyloliquefaciens* 已在美国作为杀菌剂进行了登记,用于防治

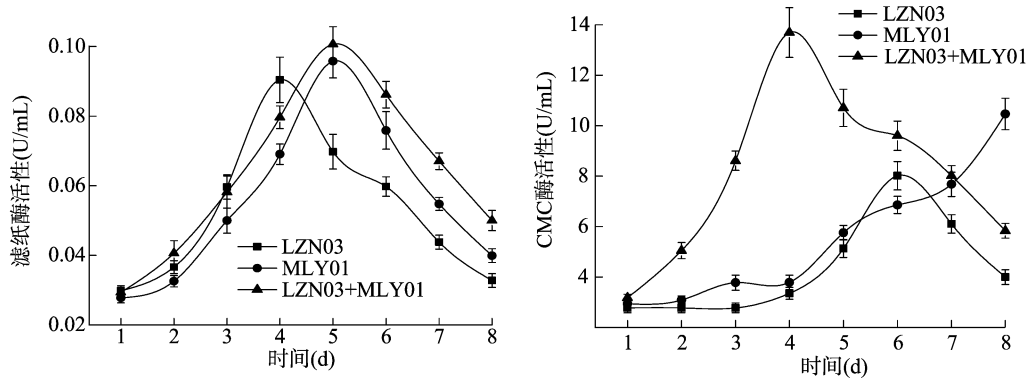


图4 纤维素降解高温菌酶活性

表2 纤维素降解菌株之间的拮抗活性

菌株	LZN01	LZN02	LZN03	MLY01
LZN01		++	+	+
LZN02	++		++	++
LZN03	+	++		++
MLY01	+	++	++	

注：“+”表示菌株间无明显拮抗作用但不能交叉生长；“++”表示菌株间无拮抗作用，可以交叉生长。

土传的丝核菌和镰刀菌；可促进植物生长，并作为植物生长调节剂进行了登记；我国利用枯草芽孢杆菌防治植物病害的应用研究也达到了世界先进水平，现已开发出一批生防作用优良的枯草芽孢杆菌菌株；芽孢杆菌因具有芽孢，因此同时具有耐高温、耐酸碱等特性，在堆肥的整个时期内均为优势菌群，起着重要作用，并且芽孢杆菌也对堆体的升温有促进作用^[8]。

分别对筛选得到的4株菌进行滤纸降解能力以及酶活性的测定，结果显示，供试菌株对滤纸有一定的降解能力，其中LZN02的降解能力最强。单一的细菌、真菌和放线菌尽管活性较高，但在加速堆肥化进程中的效果却不如复合微生物菌群的共同作用明显，自然界中木质素、纤维素的降解是真菌、细菌及相应微生物群落共同作用的结果^[9]，因而复合菌系具有更高的应用价值。而酶活性测定结果显示，无论是常温复合菌系还是高温复合菌系，其CMC酶活性与单一菌株相比，变化幅度较大，而滤纸酶活性的增加则不明显，说明微生物对不同底物的降解能力和适应性存在差异，并且细菌和真菌降解纤维素的机理不同，真菌主要靠分泌多种胞外酶对纤维素进行降解，而大多数细菌的纤维素降解则是通过细胞胞外酶进行的，须要附着在纤维素表面上才能将其降解^[10]。崔宗均等利用酸碱互补的原则驯化得到高效复合菌系MCI^[11]。崔诗法等从枯枝落叶中分离到1组由平板可分离细菌和难培养细菌组成的纤维素分解复合菌系St-13^[12]。本试验通过常温以及高温的多代驯化，得到的菌株更符合堆肥不同阶段温度特性，并且4株菌也是堆肥体系各时期均可存在的优势菌株，因此应用更为广泛。同时，本研究所构建的复合菌系只有4株菌组成，生产工序简单，质量容易控制，且均为环境友好型菌株，在实际生产应用中操作性强，应用价值较高。

4 结论

本试验通过对样品进行常温和高温多代驯化，得到4株高效纤维素降解菌，常温菌（LZN01、LZN02）为解淀粉芽孢杆菌（*Bacillus amyloliquefaciens*），高温菌（LZN03、MLY01）为地衣芽孢杆菌（*Bacillus licheniformis*）。高温菌复合菌系的滤纸崩解能力在培养5d时高于单一菌株，且各菌株间不存在拮抗效应，因此，这几株菌在构建纤维素复合菌群方面具有广泛的应用前景。

参考文献：

[1] 曹云,常志州,黄红英,等. 畜禽粪便堆肥前期理化及微生物性状研究[J]. 农业环境科学学报,2015,34(11):2198-2207.

[2] 黄翠,杨朝晖,肖勇,等. 堆肥嗜热纤维素分解菌的筛选鉴定及其强化堆肥研究[J]. 环境科学学报,2010,30(12):2457-2463.

[3] Narisawa N, Haruta S, Cui Z J, et al. Effect of adding cellulolytic bacterium on stable cellulose-degrading microbial community[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering,2007,104(5):432-434.

[4] 徐智,张隍利,张发宝,等. 接种内外源微生物菌剂对堆肥效果的影响[J]. 中国环境科学,2009,29(8):856-860.

[5] 王志刚,徐伟慧,厉悦,等. 纤维素降解菌协同效应与粗酶液影响因素[J]. 浙江农业学报,2012,24(2):279-283.

[6] 顾文杰. 禽粪好氧堆肥除臭菌筛选及其促腐熟效果研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2008.

[7] 陈志谊,刘永峰,刘卹洲,等. 植物病害生防芽孢杆菌研究进展[J]. 江苏农业学报,2012,28(5):999-1006.

[8] 易境. 猪场废弃物堆肥中芽孢杆菌和梭菌属细菌的分子生态学研究[D]. 武汉:华中农业大学,2013.

[9] 黄丹莲. 堆肥微生物群落演替及木质素降解功能微生物强化堆肥机理研究[D]. 长沙:湖南大学,2011.

[10] 陈丽莉. 纤维素酶生产菌的选育及纤维素降解特性的研究[D]. 长春:长春理工大学,2008.

[11] 崔宗均,李美丹,朴哲,等. 一组高效稳定纤维素分解菌复合系MCI的筛选及功能[J]. 环境科学,2002,23(3):36-39.

[12] 崔诗法,廖银章,黎云祥,等. 纤维素分解复合菌系St-13的筛选及产酶条件的研究[J]. 现代农业科学,2009,16(1):8-11.