

王永伦,余克非,郑展望. 1 株耐高温纤维素降解菌发酵条件优化与秸秆降解应用[J]. 江苏农业科学,2023,51(19):229-236,244.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.19.033

1 株耐高温纤维素降解菌发酵条件优化与秸秆降解应用

王永伦,余克非,郑展望

(浙江农林大学环境与资源学院,浙江杭州 310000)

摘要:采用刚果红培养基和高温筛选的方法从小麦秸秆模拟堆肥中分离出 1 株耐高温枯草芽孢杆菌属的单菌株 *Bacillus subtilis* 03,通过 16S rDNA 序列分析对该菌株进行分子生物学鉴定;采用单因素试验和正交试验法对菌株的发酵条件进行优化。通过对高温发酵过程中秸秆降解率和纤维素酶活性的测定,评估目标菌株在高温下对秸秆的降解性能。结果表明,分离所得的目标菌株 *Bacillus subtilis* 03 为枯草芽孢杆菌属(GenBank 登录号:SUB12359776),此菌株可在 60 ℃下降解纤维素;高温下该菌株最适产酶条件:培养时间 12 h,羧甲基纤维素钠的浓度 14 g/L,硫酸铵浓度 1.4 g/L,接种量 4%,pH 值为 7,发酵周期 8 d,钾离子(K^+)浓度为 0.08 $\mu\text{mol/L}$,钴离子(Co^{2+})浓度为 0.12 $\mu\text{mol/L}$,镁离子(Mg^{2+})浓度为 0.12 $\mu\text{mol/L}$,钙离子(Ca^{2+})浓度为 0.12 $\mu\text{mol/L}$ 。另外,菌株 *Bacillus subtilis* 03 具有良好的耐碱性特征,碱性条件下仍可产生较高的纤维素酶活,所产纤维素酶的酶促反应活性和稳定性在 pH 值为 10 时仍能分别保留最适 pH 值(pH 值为 7)下的 73.28%、68.14%。菌株优化固态发酵条件接种于秸秆堆肥 36 d 后,秸秆减量达到 32.72%。在堆肥过程中菌株降解秸秆产生的腐殖酸使堆肥 pH 值产生了显著变化而且高温阶段菌株数量约为升温阶段末期的 87.5%,pH 值和菌株数量变化都显示了该菌株在高温下对秸秆的强降解能力。

关键词:纤维素降解菌;耐高温;发酵条件;纤维素;秸秆降解

中图分类号:S141.4;S182 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)19-0229-08

随着我国农作物种植面积的不断增长^[1],如何对秸秆资源进行高效利用是当前存在的主要问题之一^[2]。此前,秸秆的主要利用方式有焚烧和直接还田^[3]。焚烧的方法会造成环境污染,不符合生态环保的理念,秸秆直接还田会导致农作物发生病虫害的风险大大增加^[4-5]。利用堆肥降解秸秆具有成本低、操作简单和适应性广泛等优势。因此,利用堆肥降解秸秆被国内外学者广泛研究^[6]。

利用堆肥降解秸秆的关键是纤维素降解菌的筛选和应用。但在堆肥的高温阶段具有纤维素降解能力的菌株生长繁殖会受到高温限制。因此,筛选的菌株必须具有耐高温能力。另外,高温纤维素降解菌在降解秸秆的过程中常常出现纤维素酶活性低的情况^[7],菌株所产纤维素酶的活性不仅仅与菌株本身性质有关,还受菌株发酵条件(pH 值、接

种量、碳源、氮源、金属离子种类与浓度)影响^[8],通过优化菌株的固态发酵条件可以有效提高菌株所产的纤维素酶活性^[9]。

目前,研究者已对纤维素降解菌的堆肥效果进行了大量评估。董雪丽等将在腐化秸秆中筛选的低温纤维素降解菌株 JiTF01 应用于北方低温环境下的秸秆堆肥(pH 值为 6.67、接种量 2.89%、培养时间 12~13 d),发酵 21 d 后,水稻秸秆的降解率可达 45.24%^[10]。孟童瑶等将实验室中的木质素降解菌制成菌剂用于园林废弃物堆肥,木质素、纤维素降解率分别较未加菌剂的处理提高了 23.91% 和 8.34%^[11]。张鹏飞等将园林废弃物堆肥中筛选的嗜热脂肪地芽孢杆菌制成菌剂接入园林废弃物堆肥 28 d 后,纤维素降解率为 28.47%^[12]。但以上研究多基于低温和常温进行,对于堆肥高温阶段菌株产纤维素酶特性和秸秆降解效果的报道较少。

本试验在高温下从小麦秸秆的模拟堆肥中采用刚果红培养基和高温筛选的方法选出 1 株能够降解纤维素的菌株,对筛选出的纤维素降解菌在 60 ℃下产纤维素酶的条件进行优化,用于秸秆降解,并测定堆肥中的秸秆降解率和该菌株数量、pH 值、纤维素酶活性的变化,以期后续高温纤维素降解菌

收稿日期:2023-04-11

基金项目:浙江省重点研发计划(编号:2020C02009、2021C03190);
高等学校学科创新引智计划(编号:D18008)。

作者简介:王永伦(1999—),男,安徽合肥人,硕士研究生,主要从事
秸秆资源化利用研究。E-mail:2272386353@qq.com。

通信作者:郑展望,博士,教授,主要从事农村污水处理研究。
E-mail:zhengzw@zafu.edu.cn。

的研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集

模拟堆肥的小麦秸秆购自河南省郑州市某农场,样品购回后放置于浙江农林大学农村环境研究所储物间干燥环境下通风保存,后续堆肥降解所用小麦秸秆与上述秸秆相同。

1.2 培养基与试剂

LB 液体培养基(1 L):10 g 胰蛋白胨,10 g 氯化钠,5 g 酵母粉,去离子水 1 L。

LB 固体培养基(1 L):10 g 胰蛋白胨,10 g 氯化钠,5 g 酵母粉,20 g 琼脂,去离子水 1 L。

刚果红固体培养基(1 L):10 g 羧甲基纤维素钠,1 g 磷酸氢二钾,0.1 g 七水硫酸镁,0.1 g 硫酸亚铁,0.5 mg 硫酸锰,10 g 胰蛋白胨,10 g 酵母粉,20 g 琼脂粉,去离子水 1 L。

发酵培养基(1 L):15 g 羧甲基纤维素钠,1.4 g 硫酸铵,2 g 磷酸氢二钾,0.5 g 七水硫酸镁,0.3 g 氯化钙,0.8 mg 五水硫酸铜,0.5 mg 硫酸锰,去离子水 1 L,pH 值 = 7。

DNS 试剂(100 mL):18.2 g 酒石酸钾钠,2.1 g 氢氧化钠,0.63 g 3,5-二硝基水杨酸,0.5 g 苯酚,0.5 g 亚硫酸钠,去离子水 100 mL(避光保存 10 d 后使用)。

柠檬酸缓冲液(400 mL)(0.05 mol/L,pH 值为 5):将 118 mL(0.1 mol/L)柠檬酸钠溶液和 82 mL(0.1 mol/L)柠檬酸溶液充分混合,用超纯水定容至 400 mL。

1% 产酶底物(400 mL):将 4 g 羧甲基纤维素(CMC)溶解在 400 mL 柠檬酸缓冲溶液中(适当加热以增大 CMC 的溶解度)。

1.3 菌株的筛选与鉴定

1.3.1 菌株的分离与初筛 本试验于 2022 年 8—12 月在浙江省杭州市临安区浙江农林大学农村环境研究所微生物实验室内进行,将小麦秸秆切碎后(1~2 cm)称取 20 g 碎末放置于 500 mL 锥形瓶中,调节其含水率为 60%~65%置于 60 ℃ 恒温培养箱模拟堆肥^[13]。第 15 天取 3 g 堆肥置于装有 50 mL 无菌水的烧杯,在转速为 200 r/min 的摇床中摇晃 30 min 后,取上清液梯度分别稀释至 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 。吸取 50 μ L 各稀释液涂布于刚果红培养基,置于 60 ℃ 恒温培养箱直至长出清晰菌落,挑

取形态不同的菌落划线培养直至出现单菌落。用 1 mg/mL 的刚果红溶液和 1 mol/L NaCl 溶液分别对刚果红培养基上的菌株进行染色与脱色各 15 min^[14],选择刚果红培养基上透明圈较大的菌株进行复筛^[15]。

1.3.2 菌株的复筛 将初筛得到具有纤维素降解能力的菌株接种至发酵培养基,并将接种纤维素降解菌的发酵培养基置于 60 ℃、180 r/min 的恒温摇床中培养 10 d 后,测定上述各菌株的纤维素酶活性。选择纤维素酶活性最高的菌株作为本试验的目标菌株,每个处理 3 次重复。

1.3.3 菌株的鉴定 将目标菌株接种在 LB 固体培养基上,放置在 60 ℃ 恒温培养箱培养 2 d 后提取该菌株 16S rDNA 利用 27 F/1492 R(27 F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAC-3';1492 R:5'-CATCGGCTACCTTGTACGA-3')对其进行扩增,聚合酶链式反应(PCR)片段由有康生物科技有限公司(杭州)进行测序分析,将得到的目标菌株基因序列与基因库中给出的其他菌株 16S rDNA 基因序列进行比对,使用 MEGA 11 软件的邻接法(neighbor-joining,简称 NJ)构建高度相似的目标菌株系统发育树。

1.4 菌株生长曲线的测定

取目标菌株对数期培养液 2 mL 接种于 200 mL 的 LB 液体培养基中,置于 60 ℃、180 r/min 的恒温摇床培养 24 h 后分别离心取上清液,测定波长 600 nm 处的 D 值,记录 $D_{600\text{ nm}}$ 最大时菌株的培养时间,每个处理重复 3 次。

1.5 酶活定义与粗酶液的制备

纤维素酶活性的定义为 1 mL 粗酶液在酶解过程中(4 ℃,pH 值 = 5)消耗 1 mL 的 1% 产酶底物产生 1 μ mol 葡萄糖的纤维素酶含量,单位为 U/mL^[16]。目标菌株粗酶液的制备:目标菌株的发酵液在 4 ℃ 下、5 000 r/min 离心 15 min 后得到的上清液^[17]。

1.6 菌株产酶条件优化

1.6.1 碳源、氮源的种类与浓度对纤维素酶活影响 试验中选择 4 种碳源(淀粉、蛋白胨、羧甲基纤维素钠、木质素磺酸钠)和 4 种氮源(氯化铵、硫酸铵、尿素、酵母粉),设计不同的碳源浓度(10~18 g/L,梯度 2 g/L)与氮源浓度(1~1.8 g/L,梯度 0.2 g/L),按最适培养时间培养("1.4"节得出),测定不同种类碳源与氮源及其不同浓度下目标菌株的纤维素

酶活,并记录目标菌株纤维素酶活最大时碳源与氮源的种类及浓度。

1.6.2 金属离子对纤维素酶活的影响 试验选择的金属离子^[18]为 K^+ 、 Co^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} ,各金属离子均设置 3 个浓度分别为 0.08、0.10、0.12 $\mu\text{mol/L}$,设计 4 因素 3 水平正交试验如表 1 所示。在确定目标菌株液体培养基中最适碳源、氮源种类与浓度后(由“1.6.1”节得出)向各组目标菌株的液体培养基中添加表 1 所列的各组金属离子组合,按最适培养时间培养(由“1.4”节得出),测定各组液体培养基中目标菌株的纤维素酶活并记录纤维素酶活最大时该组合中各金属离子的种类和浓度。

表 1 金属离子的种类与浓度正交实验设计

处理	金属离子含量($\mu\text{mol/L}$)			
	K^+	Co^{2+}	Mg^{2+}	Ca^{2+}
CK	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.12	0.10	0.12	0.08
2	0.12	0.12	0.08	0.10
3	0.10	0.08	0.12	0.10
4	0.10	0.12	0.10	0.08
5	0.10	0.10	0.08	0.12
6	0.08	0.12	0.12	0.12
7	0.08	0.08	0.08	0.08
8	0.12	0.08	0.10	0.12
9	0.08	0.10	0.10	0.10

1.6.3 pH 值、接种量、培养时间 确定目标菌株培养基中最适的碳源、氮源、金属离子的种类与浓度(由“1.6.1”“1.6.2”节得出)后,使用单因素试验对目标菌株的发酵条件(接种量、pH 值、培养时间)进行优化。优化的初始条件设置为接种量 3%、pH 值为 7、培养时间 6 d,每次试验只改变接种量、pH 值、培养时间中的 1 个因素。设置接种量的范围为 1%~10%、pH 值的范围 4~10、培养时间的范围 1~9 d,测定目标菌株在不同条件下的纤维素酶活性。上述试验中,用于接种的 LB 液体培养基中菌株数量为 0.5×10^7 CFU/mL (X mL 发酵培养基接种含有上述菌株数量的 LB 液体培养基的体积为 $X\%$ mL)。

1.7 纤维素酶的性质探究

1.7.1 酶促反应 pH 值对纤维素酶影响 将 1 mL 目标菌株的粗酶液分别加入到 pH 值为 1、2、3、4、5、6、7 的 1% 产酶底物中,置于 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中水浴 30 min,测定在不同 pH 值的 1% 产酶底物中目标菌

株的纤维素酶活,并记录纤维素酶活的最大值以及此时 1% 产酶底物的 pH 值,试验重复 3 次,纤维素酶活取平均值。

1.7.2 pH 值对纤维素酶稳定性影响 将 1 mL 目标菌株的粗酶液分别加入到 pH 值为 1、2、3、4、5、6、7 的柠檬酸缓冲液中保存 3 h 后,测定目标菌株的粗酶液在不同 pH 值柠檬酸缓冲液中的纤维素酶活性,并记录纤维素酶活的最大值以及此时柠檬酸缓冲液的 pH 值,试验重复 3 次,纤维素酶活取平均值。

1.8 秸秆降解过程探究

1.8.1 秸秆堆肥与降解率测定 为研究目标菌株对秸秆的降解效果,将该菌株按最适条件培养(由“1.6.1”“1.6.2”“1.6.3”节得出)最适时间(由“1.6.3”节得出)后,按最适比例(由“1.6.3”节得出)接种在以 100 g 小麦秸秆为唯一碳源的发酵培养基中,测定预处理(使用去离子水浸泡冲洗后干燥后放入高速搅拌机磨碎,过 40 目的网筛,在 121 $^{\circ}\text{C}$ 、121 kPa 下灭菌 30 min)小麦秸秆的降解率。每 6 d 取 5 g 秸秆堆肥样品测定样品中秸秆降解率和目标菌株的纤维素酶活性,样品测定前的处理方式将样品采用无菌水进行冲洗后放入 110 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温烘箱中进行干燥,并记录其质量。小麦秸秆的降解率计算方法如下: $A = (B - C) / B \times 100\%$,其中 B 为添加预处理秸秆的质量, C 是烘干后样品的质量, A 为降解率。试验重复 3 次,秸秆的降解率取 3 次试验测定的平均值。

1.8.2 样品 pH 值测定 取 0.1 g 堆肥样品加入装有 10 mL 无菌水的烧杯中,放入 60 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 的恒温摇床中摇晃 30 min,使用 pH 计对不同样品的 pH 值进行测定,记录不同样品中的 pH 值。试验重复 3 次,pH 值取平均值。

1.8.3 微生物数量统计 取 0.1 g 堆肥样品加入装有 10 mL 无菌水的烧杯中,放入 60 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 的恒温摇床中摇晃 30 min,稀释涂布于 LB 固体培养基,将其置于温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温培养箱中按最适培养时间(由“1.4”节得出)培养,利用活菌计数法对样品中的微生物数量进行统计,记录不同样品中的菌株数量。

1.9 数据分析

本研究采用 SPSS 22.0 软件进行显著性分析,多重比较方法为 Duncan's 法,目标菌株邻接树使用 MEGA 11 进行构建,采用 Origin 2019 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选

在小麦秸秆的模拟堆肥中,共筛到具有纤维素降解能力的菌株 16 株。刚果红溶液染色和氯化钠溶液脱色后透明圈较为明显的菌株有 5 株,分别将这 5 株纤维素降解菌顺序编号为 01、02、03、04、05。这 5 株纤维素降解菌在 60 ℃ 下纤维素酶活性、透明圈直径,透明圈直径与菌落直径的比值如表 2 所示,在 5 株菌中,菌株 01、02、04、05 的纤维素酶活性较低而菌株 03 的纤维素酶活最高,为 15.71 U/mL。因此,选定菌株 03 作为本试验的目标菌株。

表 2 耐高温纤维素降解菌筛选结果

菌株	纤维素酶活性(U/mL)	透明圈直径(cm)	菌落直径(cm)	透明圈直径/菌落直径
01	6.35 ± 0.11	1.04 ± 0.05	1.03 ± 0.04	1.009
02	8.75 ± 0.21	1.21 ± 0.04	0.88 ± 0.09	1.375
03	15.71 ± 0.61	2.35 ± 0.11	0.76 ± 0.02	3.092
04	5.02 ± 0.09	2.00 ± 0.13	0.91 ± 0.17	2.197
05	2.57 ± 0.13	1.42 ± 0.07	1.15 ± 0.15	1.234

2.2 菌株 03 的鉴定

由图 1 可见,菌株 03 在刚果红培养基上的菌斑为圆形,菌斑的中间有白色孢子向四周发散与周围的白色菌丝连接,根据《中国真菌志》初步鉴定其为芽孢杆菌^[19],根据分子生物学的鉴定结果建立该菌株的系统发育树如图 2 所示,菌株 03 与枯草芽孢杆菌属的菌株 16S rDNA 序列之间具有高达 90% 的相似性,所以菌株 03 被认为是一株枯草芽孢杆菌,故将其命名为 *Bacillus subtilis* 03,该菌株的基因序列已提交至美国国家生物技术信息中心(NCBI)并申请登录号为 SUB12359776。

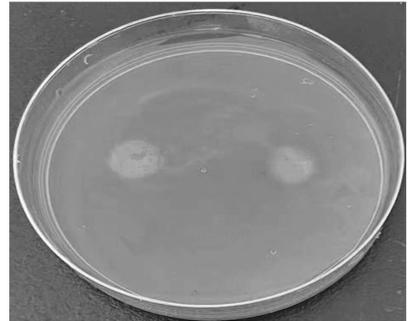


图 1 *Bacillus subtilis* 03 菌株的形态特征

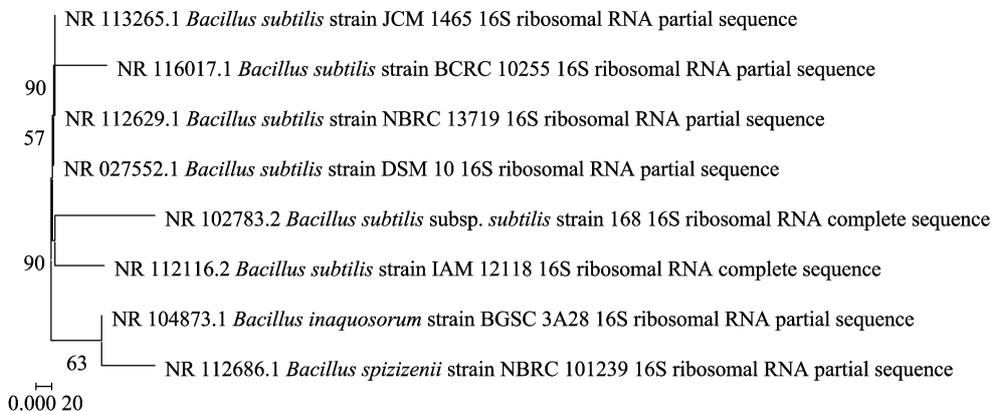


图 2 MEGA11 构建 *Bacillus subtilis* 03 发育树

2.3 菌株 *Bacillus subtilis* 03 的生长曲线

由图 3 可见,菌株在 0~6 h 内生长速度较慢,此时菌株处于环境适应期^[20]。在 6~12 h 时,菌株处于对数生长期。菌株在 LB 液体培养基中培养 12 h 后, $D_{600\text{ nm}}$ 达到最高,为 1.273,随后菌株数量逐渐趋于稳定。与大多数纤维素降解菌^[21-22] 相比,菌株 *Bacillus subtilis* 03 所需生长时间较短,具有快速繁殖的能力。

2.4 菌株 *Bacillus subtilis* 03 产酶条件优化结果

2.4.1 最适碳源、氮源的种类与浓度 由图 4-A 可见,菌株 *Bacillus subtilis* 03 在不同碳源中均可以产

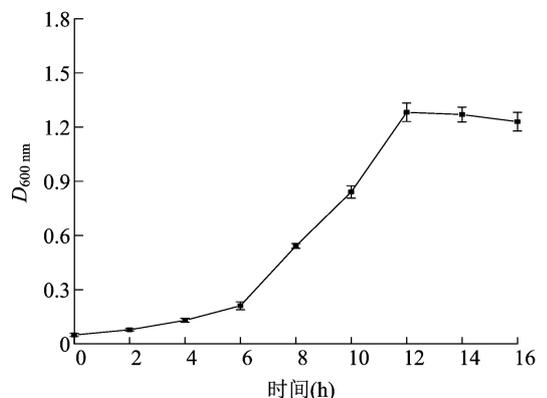
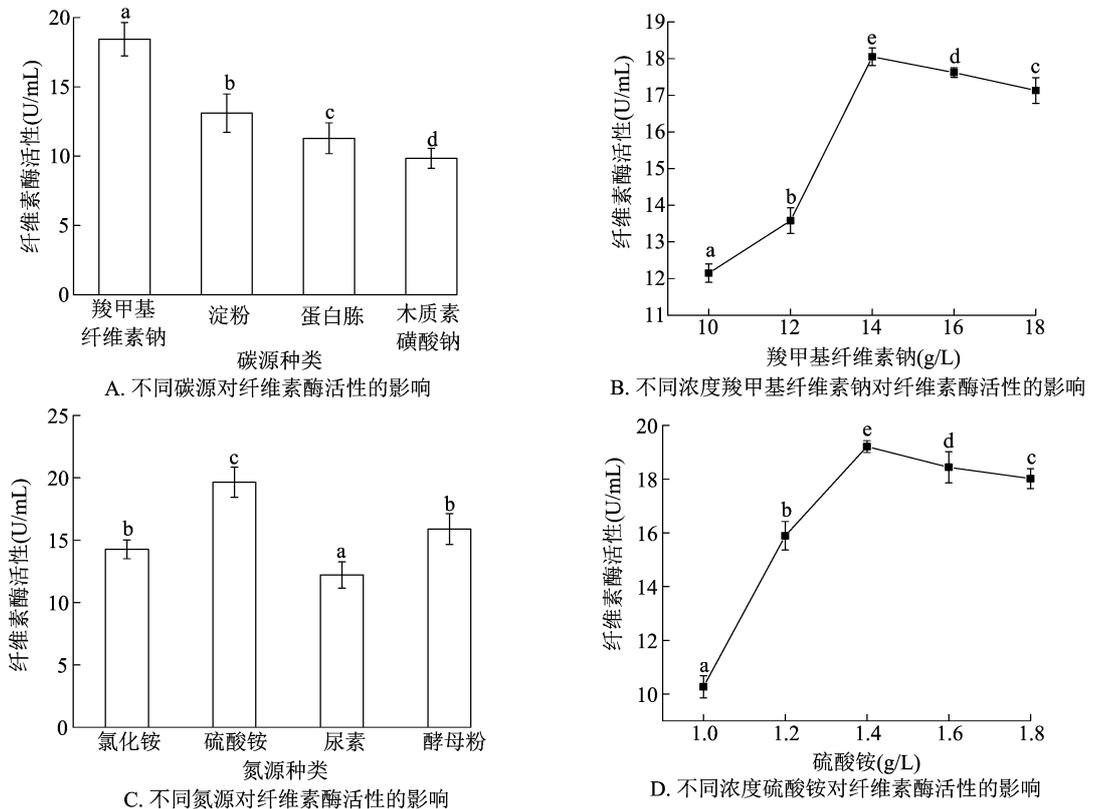


图 3 菌株 *Bacillus subtilis* 03 生长曲线

生纤维素酶,其中以羧甲基纤维素钠为唯一碳源时,该菌株的纤维素酶活最高。菌株在发酵培养基中最适碳源种类的顺序为羧甲基纤维素钠 > 淀粉 > 蛋白胨 > 木质素磺酸钠,由图 4 - B 可见,当羧甲基纤维素钠的浓度为 14 g/L 时,菌株 *Bacillus*

subtilis 03 的纤维素酶活为 18.14 U/mL。由图 4 - C 可见,在唯一氮源的发酵培养基中菌株 *Bacillus subtilis* 03 的最适氮源顺序为硫酸铵 > 酵母粉 > 氯化铵 > 尿素,由图 4 - D 可见,当硫酸铵浓度为 1.4 g/L 时,该菌株的纤维素酶活为 18.88 U/mL。



不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。下同
图4 不同种类与浓度的碳源、氮源对纤维素酶活性的影响

2.4.2 金属离子组合选定 由表 3 可见,与 CK 组相比,处理 1 和处理 3 的纤维素酶活性提升并不显著,这是因为金属离子的种类与浓度会影响菌株纤维素酶的合成^[23];其他处理菌株 *Bacillus subtilis* 03 的纤维素酶活均有显著提升,其中处理 6 的纤维素酶活最高,为 (23.84 ± 1.22) U/mL。综上所述,添加处理 6 中的金属离子组合(Co^{2+} 浓度为 $0.12 \mu\text{mol/L}$, Mg^{2+} 浓度为 $0.12 \mu\text{mol/L}$, Ca^{2+} 浓度为 $0.12 \mu\text{mol/L}$),有利于菌株 *Bacillus subtilis* 03 纤维素酶活性的提升。

2.4.3 接种量、pH 值、培养时间对纤维素酶活性的影响 由图 5 - A 可见,当接种量为 1% ~ 10% 时,菌株的纤维素酶活性均处于较高水平。接种量为 4% 时,该菌株的纤维素酶活性最高,为 25.15 U/mL。因此,菌株 *Bacillus subtilis* 03 的最适接种量为 4%。

由图 5 - B 可见,当 pH 值为 4 时,纤维素酶活

性最低,pH 值为 7 时菌株酶活性最高。当 pH 值为 8 时,菌株的纤维素酶活性下降速度较为缓慢。同时菌株在 pH 值为 7 ~ 10 时,纤维素酶活性的范围

表 3 不同种类与浓度的金属离子对菌株纤维素酶活性的影响

处理	K^+ 含量 ($\mu\text{mol/L}$)	Co^{2+} 含量 ($\mu\text{mol/L}$)	Mg^{2+} 含量 ($\mu\text{mol/L}$)	Ca^{2+} 含量 ($\mu\text{mol/L}$)	纤维素酶活性 (U/mL)
CK	0.00	0.00	0.00	0.00	$10.15 \pm 0.88\text{a}$
1	0.12	0.10	0.12	0.08	$11.04 \pm 0.76\text{a}$
2	0.12	0.12	0.08	0.10	$12.33 \pm 1.02\text{bc}$
3	0.10	0.08	0.12	0.10	$11.12 \pm 2.15\text{ab}$
4	0.10	0.12	0.10	0.08	$12.69 \pm 0.74\text{cd}$
5	0.10	0.10	0.08	0.12	$13.21 \pm 1.35\text{e}$
6	0.08	0.12	0.12	0.12	$23.84 \pm 1.22\text{f}$
7	0.08	0.08	0.08	0.08	$14.37 \pm 1.28\text{de}$
8	0.12	0.08	0.10	0.12	$13.45 \pm 0.88\text{cde}$
9	0.08	0.10	0.10	0.10	$13.11 \pm 1.88\text{cde}$

为 20.01 ~ 27.55 U/mL。当 pH 值为 10 时,菌株的纤维素酶活性可以保持最适 pH 值(pH 值 = 7)时纤维素酶活的 72.63%。结果表明,菌株 *Bacillus subtilis* 03 在碱性条件下具有较高的纤维素降解能力。

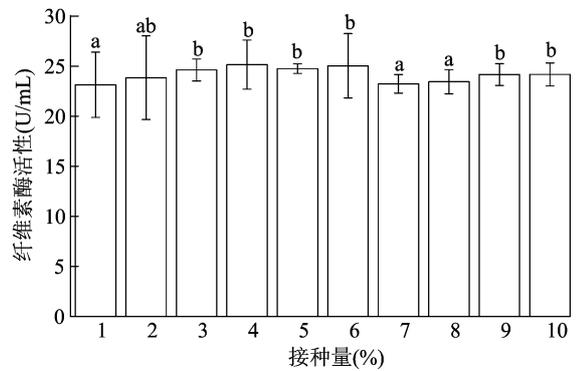
由图 5 - C 可见,菌株 *Bacillus subtilis* 03 在发酵的前 4 d 纤维素酶活性均处于较低水平。当发酵至 5 d 时,菌株的纤维素酶活性快速增高,在 8 d 时纤维素酶活性达到最高,为 29.34 U/mL。该菌株发酵 8 d 时纤维素酶活性最高,证明其具有长时间产纤维素酶的能力,这对菌株 *Bacillus subtilis* 03 在高温下对秸秆进行持续降解具有重要意义。

2.5 不同 pH 值下菌株纤维素酶的特性

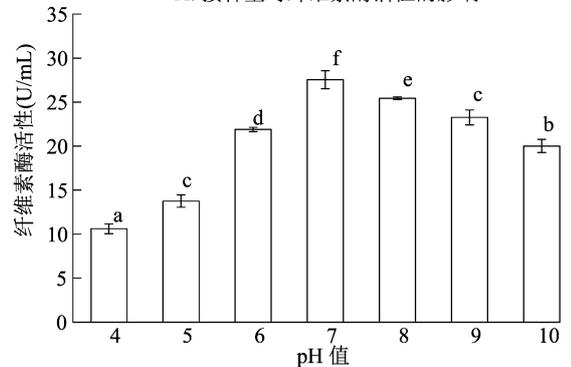
本试验发现菌株 *Bacillus subtilis* 03 在碱性环境下仍能保持较高的纤维素酶活性(“2.4.3”节),为进一步研究菌株在碱性环境下所产纤维素酶的特性,取该菌株的粗酶液在不同 pH 值下对该菌株的酶促反应活性进行研究。由图 6 可见,在 pH 值为 7 时酶促反应的活性和稳定性均为最大,在 pH 值为 10 时菌株 *Bacillus subtilis* 03 的酶促反应活性和稳定性仍可以保持 pH 值为 7 时的 73.28%、68.14%。

2.6 秸秆堆肥中 pH 值与微生物数量变化

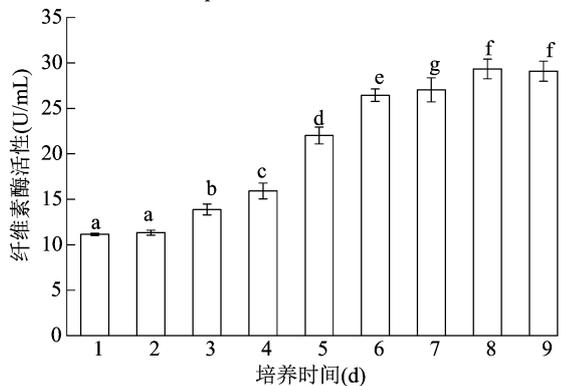
2.6.1 堆肥 pH 值的变化 由图 7 可见,0 ~ 6 d 时,菌株 *Bacillus subtilis* 03 的数量较少,对秸秆的降解能力弱,产生的腐殖酸较少,此时 pH 值下降的主要原因是菌株大量繁殖产生的 CO₂ 使堆肥的 pH 值下降。6 ~ 12 d 时,菌株进入对数生长期,此时 pH 值下降的主要原因是菌株大量分解秸秆中的纤维素产生腐殖酸导致堆肥 pH 值快速下降。12 ~ 18 d 时,堆肥 pH 值下降的速率与堆肥升温阶段相比并未降低,这显示了菌株可以有效克服高温胁迫持续对秸秆进行降解生成腐殖酸。在 18 ~ 24 d 时菌株产生的少量氨类物质使 pH 值开始有所升高。24 ~



A. 接种量对纤维素酶活性的影响



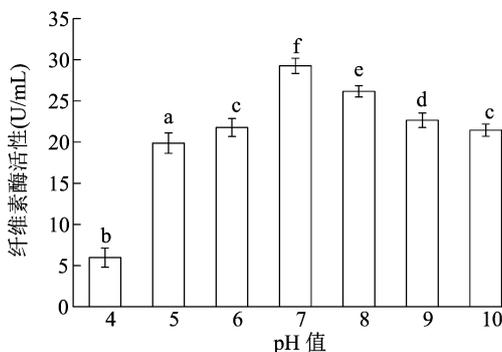
B. pH 值对纤维素酶活性的影响



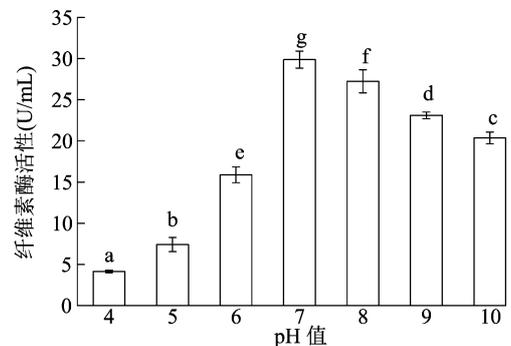
C. 培养时间对纤维素酶活性的影响

图5 不同条件对纤维素酶活性的影响

36 d 时堆肥开始进入降温阶段,此时秸秆被大量分解,堆肥中的纤维素含量降低,菌株 *Bacillus subtilis*



A. 不同 pH 值下纤维素酶的酶促反应活性



B. 不同 pH 值下纤维素酶的稳定性

图6 不同 pH 值下纤维素酶的酶促反应活性与纤维素酶稳定性

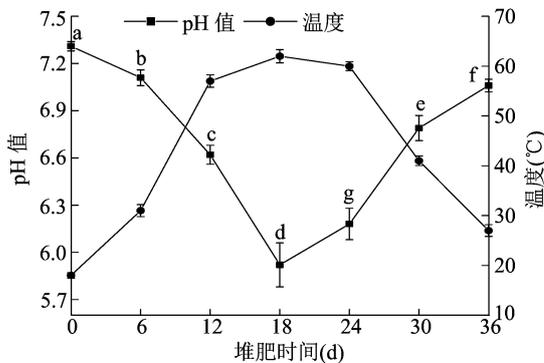


图7 堆肥过程中 pH 值变化

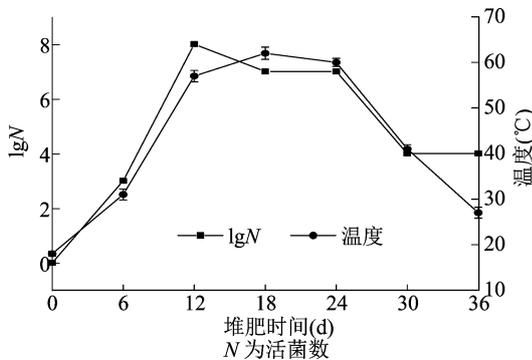


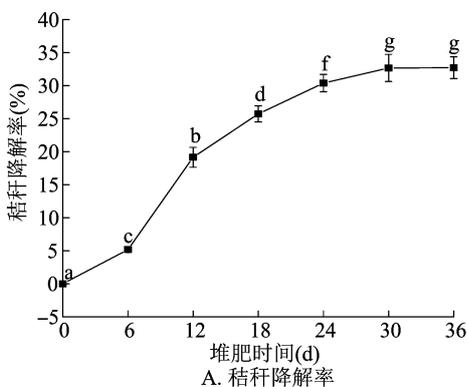
图8 堆肥过程中微生物数量变化

03 不得不分解部分富里酸提供营养物质,此时堆肥的 pH 值开始持续升高。由堆肥中 pH 值的变化可知,菌株 *Bacillus subtilis* 03 在降解秸秆中纤维素时,不仅可以产生腐殖酸还可以生成部分氨类物质,这对于秸秆资源化利用具有重要意义。

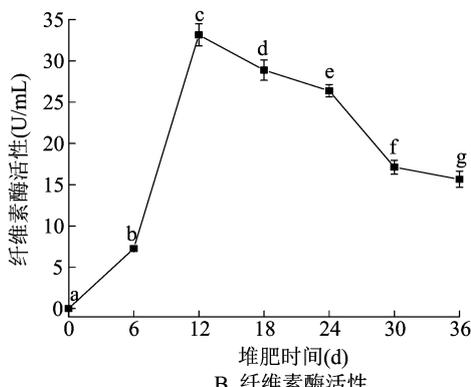
2.6.2 堆肥中微生物的数量变化 由图 8 可见,在 0~6 d 时菌株处于环境适应期,繁殖速度较低。在 6~12 d 时进入对数生长期后菌株数量大幅度提升。12 d 时菌株的数量达到 1×10^8 CFU/mL。在 12~24 d 时堆肥进入高温阶段,菌株的数量略有减少,但仍处于较高水平,表明菌株具有耐高温的特性。在 24~36 d 时堆肥进入降温阶段,此时秸秆中纤维

素被大量降解,菌株不得不分解部分腐殖酸提供营养,这导致了堆肥中菌株数量下降。堆肥中微生物的数量变化显示,堆肥进入高温阶段后,堆肥中菌株的数量约为菌株数量最高值的 87.5%,仍处于较高水平,这对于菌株持续降解秸秆具有重要意义。

2.6.3 秸秆降解率与纤维素酶活变化 由图 9 可见,堆肥 6 d 时,秸秆的降解率为 5.18%,纤维素酶活性为 7.26 U/mL。堆肥 12 d 时,秸秆的降解率为 19.15%,纤维素酶活性为 33.15 U/mL。堆肥 12 d 后,菌株的纤维素酶活性开始下降,但秸秆降解率却持续增加。在堆肥 30~36 d 时,秸秆的降解率分别为 32.67% 和 32.72%。



A. 秸秆降解率



B. 纤维素酶活性

图9 堆肥过程中秸秆降解率与纤维素酶活性变化

3 讨论

本试验在 60 °C 时分离出 1 株能在高温下降解纤维素的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* 03), 通过单因素试验与正交试验设计对其产酶条件进行优化,有效提升了菌株 *Bacillus subtilis* 03 的纤维素酶活。另外,研究发现菌株 *Bacillus subtilis* 03 在碱性环境下仍具有较高的纤维素酶活。当 pH 值为 10 时,菌株的纤维素酶促反应活性和纤维素酶稳定性可以保留最适 pH 值 (pH 值 = 7) 的 73.28%、

68.14%, 目前大多数纤维素降解菌适应酸性和碱性的范围较窄,菌株在 pH 值为 10 时具有较高的纤维素酶活扩大了其应用范围。目前有研究显示,在碱性环境下秸秆中的氢键分解速度加快,木质素和纤维素的溶解性也会有适度的增加;由于秸秆生物发酵受到 pH 值的影响,碱性处理后的秸秆往往需要中和至一定范围的 pH 值后才能进行生物发酵^[24]。由于该菌株具有耐碱性特征,碱性处理后的秸秆可以直接用于微生物降解,这会减少秸秆处理过程的成本,但目前关于具有在碱性条件下降解纤维素能

力的菌株鲜有报道。

耐高温纤维素降解菌对克服秸秆堆肥高温阶段存在的秸秆降解率低的问题具有重要意义,郜道玉等在牛粪中筛选的 3 株嗜热链霉菌和地衣芽孢杆菌在 50 ℃ 下,菌株的纤维素酶活为 104.32 ~ 168.92 U/mL,表明该菌株具有较高的纤维素降解潜力^[25]。易旻等在鸡粪蘑菇渣堆肥中筛选的解淀粉芽孢杆菌在产酶条件优化后,菌株的纤维素酶活为 6.14 U/mL^[26]。张秧等将从小麦秸秆中筛选的 3 株纤维素降解菌接入小麦秸秆堆肥中,堆肥的高温期温度峰值分别为 58.2、54.7、53.7 ℃,秸秆堆肥高温阶段分别维持了 9、6、6 d,秸秆降解率达到分别为 18.87%、24.48%、22.08%^[27]。

此外,刘心吾等在土壤中筛选的耐高温纤维素降解菌,其分离的菌株在 60 ℃ 下接种在秸秆堆肥中 20 d 后,纤维素的降解率为 20.47%^[28]。而本研究在堆肥 18 d 时秸秆的降解率为 25.71%,说明菌株 *Bacillus subtilis* 03 能更高效地在高温环境下降解秸秆。

4 结论

为解决秸秆堆肥高温阶段微生物大量死亡,导致秸秆降解率低的问题。本研究在小麦秸秆的模拟堆肥中筛选出 1 株耐高温纤维素降解菌 *Bacillus subtilis* 03。通过单因素试验和正交试验对该菌株产酶条件进行优化。结果显示:培养时间为 12 h,羧甲基纤维素钠的浓度为 14 g/L,硫酸铵浓度为 1.4 g/L,接种量为 4%,pH 值为 7,发酵周期 8 d, K^+ 浓度为 0.08 $\mu\text{mol/L}$, Co^{2+} 浓度为 0.12 $\mu\text{mol/L}$, Mg^{2+} 浓度为 0.12 $\mu\text{mol/L}$, Ca^{2+} 的浓度为 0.12 $\mu\text{mol/L}$ 时,该菌株的纤维素酶活最高,为 29.34 U/mL。菌株 *Bacillus subtilis* 03 在碱性环境中具有良好的酶促反应活性和纤维素酶稳定性,在 pH 值为 10 时该菌株的纤维素酶活和纤维素酶稳定性可以保留最适 pH 值 (pH = 7) 的 73.28%、68.14%,在一定程度上扩大了其应用范围。堆肥中 pH 值的变化,反映出秸秆中纤维素降解后产生了大量的腐殖酸,这显示出该菌株对秸秆的强降解能力。堆肥高温阶段该菌株的数量约为升温阶段末期的 87.5%,证明该菌株具有耐高温能力。菌株 *Bacillus subtilis* 03 前期对秸秆的降解速率较快,但随着纤维素酶活的降低和秸秆堆肥中纤维素含量的减少,导致秸秆降解速率逐渐下降,在 36 d 时堆肥中秸秆的降解率达到了 32.72%。研究结果为秸

秆降解提供了理论依据和实践基础,对解决农业生产过程存在的秸秆废弃物产量大、处理难的问题具有重要意义。

参考文献:

- [1] 张晓庆,王梓凡,参木友,等. 中国农作物秸秆产量及综合利用现状分析[J]. 中国农业大学学报,2021,26(9):30-41.
- [2] 魏蔚,吴昊,宋时丽,等. 复合菌剂对小麦秸秆降解速率土壤酶和土壤微生物类群的影响[J]. 土壤,2019,51(5):955-963.
- [3] 隋华,陈静. 秸秆焚烧的危害及综合利用探究[J]. 南方农业,2020,14(8):165-166.
- [4] Zeng X Y, Ma Y T, Ma L R. Utilization of straw in biomass energy in China [J]. Renewable Sustainable Energy Reviews 2007, 11 (5): 976-987.
- [5] 李静,张瀚能,赵翀,等. 高效纤维素降解菌分离筛选、复合菌系构建及秸秆降解效果分析[J]. 应用与环境生物学报,2016,22(4):689-696.
- [6] Sarkar S, Banerjee R, Chanda S, et al. Effectiveness of inoculation with isolated *Geobacillus* strains in the thermophilic stage of vegetable waste composting [J]. Bioresource Technology, 2010, 101 (8): 2892-2895.
- [7] Soares F L, Melo I S, Dias A C F, et al. Cellulolytic bacteria from soils in harsh environments [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28(5): 2195-2203.
- [8] Gong X J, Zou H T, Qian C R, et al. Construction of in situ degradation bacteria of corn straw and analysis of its degradation efficiency [J]. Annals of Microbiology, 2020, 70(1): 1-15.
- [9] 张楠,杨兴明,徐阳春,等. 高温纤维素降解菌的筛选和酶活性测定及鉴定[J]. 南京农业大学学报 2010, 33(3): 82-87.
- [10] 董雪丽,季静,张松皓,等. 一株耐低温纤维素降解菌的发酵条件优化和秸秆降解研究[J]. 农业生物技术学报, 2022, 30(5): 978-989.
- [11] 孟童瑶,李素艳,邹荣松,等. 固定化木质素降解菌对园林废弃物堆肥的影响[J]. 浙江农林大学学报, 2021, 38(1): 38-46.
- [12] 张鹏飞,李素艳,余克非,等. 木质素降解细菌的筛选及园林废弃物降解研究[J]. 安徽农业大学学报, 2018, 45(4): 676-681.
- [13] 蔡昌凤,杨茜,方剑平,等. SRB 固态发酵条件优选及动力学方程建立[J]. 环境工程学报, 2014, 8(11): 4586-4592.
- [14] Steiner E, Margesin R. Production and partial characterization of a crude cold-active cellulase (CMCase) from *Bacillus mycoides* AR20-61 isolated from an alpine forest site [J]. Annals of Microbiology, 2020, 70: 67.
- [15] Chang Y C, Ikeutsu K, Toyama T, et al. Isolation and characterization of tetrachloroethylene- and cis-1,2-dichloroethylene-dechlorinating propionibacteria [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2011, 38 (10): 1667-1677.
- [16] 张悦,季静,关春峰,等. 秸秆纤维素降解菌的筛选及其产酶特性研究[J]. 纤维素科学与技术, 2018, 26(4): 28-37.

- 2018,44(3):295-300.
- [10] 赖金平,姚锋先,徐丽红,等. 有机液肥对赣南脐橙园土壤团聚体及其有机碳分布的影响[J]. 中国土壤与肥料,2022(6):16-24.
- [11] 张勇,徐智,邓亚琴,等. 有机类肥料部分替代化肥条件下新垦红壤团聚体变化特征及其与土壤养分供应的关系[J]. 西南农业学报,2021,34(12):2685-2690.
- [12] 孟庆英,杨晓贺,姚亮亮,等. 秸秆与微生物菌肥配施对盐碱稻田土壤团聚体及真菌群落多样性的影响[J]. 黑龙江农业科学,2022(8):25-30.
- [13] 高鸣慧,李娜,彭靖,等. 秸秆和生物炭还田对棕壤团聚体分布及有机碳含量的影响[J]. 植物营养与肥料学报,2020,26(11):1978-1986.
- [14] 陈国靖,蔡进军,马璠,等. 宁夏黄土丘陵区典型林草植被类型对土壤水稳性团聚体的影响[J]. 水土保持研究,2018,25(5):49-53,60.
- [15] 李娟,韩霖昌,陈超,等. 黄土高原丘陵沟壑区土地利用方式对土壤团聚体特征的影响[J]. 水土保持学报,2017,31(1):248-253,259.
- [16] 孙雪,张玉铭,张丽娟,等. 长期添加外源有机物料对华北农田土壤团聚体有机碳组分的影响[J]. 中国生态农业学报(中英文),2021,29(8):1384-1396.
- [17] 徐国鑫,王子芳,高明,等. 秸秆与生物炭还田对土壤团聚体及固碳特征的影响[J]. 环境科学,2018,39(1):355-362.
- [18] 张维理,Kolbe H,张认连. 土壤有机碳作用及转化机制研究进展[J]. 中国农业科学,2020,53(2):317-331.
- [19] 刘靛. 有机物料对复垦土壤有机碳含量及微生物活性的影响[D]. 太原:山西大学,2017:2-3.
- [20] 潘全良. 施用生物炭和炭基肥对棕壤有机碳组分和活性的影响[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2016:5-6.
- [21] 傅敏,郝敏敏,胡恒宇,等. 土壤有机碳和微生物群落结构对多年不同耕作方式与秸秆还田的响应[J]. 应用生态学报,2019,30(9):3183-3194.
- [22] 武杞蔓,刘朋宇,张颖,等. 微生物菌肥对番茄生长、品质及糖代谢相关酶的影响[J]. 江苏农业科学,2022,50(24):125-130.
- [23] 武杞蔓,张金梅,李明莹,等. 有益微生物菌肥对农作物的作用机制研究进展[J]. 生物技术通报,2021,37(5):221-230.
- [24] 宋时丽,吴昊,黄鹏伟,等. 秸秆还田土壤改良培肥基质和复合菌剂配施对土壤生态的影响[J]. 生态学报,2021,41(11):4562-4576.
- [25] 陈超,宓文海,居静,等. 长期不同施肥模式对中低产黄泥田土壤团聚体组成及碳组分的影响[J]. 华北农学报,2022,37(3):168-174.
- [26] 孙丰豪,潘付艳,张志春,等. 生物质炭配比施肥对栗钙土团聚体有机碳含量及其氧化稳定性的影响[J]. 青海大学学报,2021,39(2):42-48.
- [27] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3版. 北京:中国农业出版社,2000.
- [28] 李明,李忠佩,刘明,等. 不同秸秆生物炭对红壤性水稻土养分及微生物群落结构的影响[J]. 中国农业科学,2015,48(7):1361-1369.
- [29] 朱秋丽,王纯,严锦华,等. 施加秸秆与废弃物对茉莉园土壤团聚体及碳氮磷含量的影响[J]. 水土保持学报,2017,31(4):191-197.
- [30] 王翠丽,王军强,陈亮,等. 不同耕作方式对绿洲区农田土壤团聚体中微生物生物量碳、氮含量的影响[J]. 江苏农业科学,2022,50(12):246-251.
- [31] 张伟明,陈温福,孟军,等. 东北地区秸秆生物炭利用潜力、产业模式及发展战略研究[J]. 中国农业科学,2019,52(14):2406-2424.
- [32] 李孝梅,李永梅,乌达木,等. 玉米间作大豆、萝卜对红壤不同粒径水稳性团聚体碳氮分布的影响[J]. 中国土壤与肥料,2022(1):104-111.
- [33] 朱建彬,郭相平,谢毅,等. 秸秆隔层还田及水氮管理对设施土壤团聚体及固碳特征的影响[J]. 江苏农业学报,2021,37(3):632-638.
- [34] 张秀芝,李强,高洪军,等. 长期施肥对黑土水稳性团聚体稳定性及有机碳分布的影响[J]. 中国农业科学,2020,53(6):1214-1223.

(上接第236页)

- [17] 张爽. 低温纤维素降解菌的筛选及其玉米秸秆降解效果研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2018:7-19.
- [18] 杨耀刚,田瑞华. 金属离子及表面活性剂对土著菌产纤维素酶的影响[J]. 江苏农业科学,2018,46(24):366-369.
- [19] 孔华忠. 中国真菌志[M]. 北京:科学出版社,2009:272-273.
- [20] Li D P, Feng L, Liu K R, et al. Optimization of cold-active CMCase production by psychrotrophic *Sphingomonas* sp. FLX-7 from the cold region of China[J]. Cellulose,2016,23(2):1335-1347.
- [21] 郭晓威,王秀然,解长睿,等. 木质素降解菌株的分离及其降解玉米秸秆过程中产酶特点[J]. 微生物学报,2017,57(12):1806-1816.
- [22] Al-balawi T H A, Wood A L, Solis I A, et al. *Anoxybacillus* sp. strain UARK-01, a new thermophilic soil bacterium with hyperthermostable alkaline laccase activity [J]. Current Microbiology,2017,74(6):762-771.
- [23] 洪培,疏义林,柯丽霞. 金属离子对平菇和杏鲍菇纤维素酶活性的影响[J]. 安徽农业科学,2015,43(26):59-60,66.
- [24] Rattanaporn K, Tantayotai P, Phusantisampan T, et al. Organic acid pretreatment of oil palm trunk; effect on enzymatic saccharification and ethanol production[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2018,41:467-477.
- [25] 郝道玉,周源,龚萍,等. 耐高温纤维素降解菌株的筛选、鉴定及其酶活力的测定[J]. 试验研究,2022,19:69-73.
- [26] 易旻,杨玉婷,李梦霖,等. 一株耐高温纤维素降解菌的分离筛选及鉴定[J]. 吉首大学学报(自然科学版),2017,38(4):72-76.
- [27] 张秧,艾为党,靳向丹,等. 3种菌剂对小麦秸秆好氧堆肥降解效果比较[J]. 环境工程学报,2021,15(2):701-716.
- [28] 刘心吾,张威,马玲玲,等. 耐高温木质纤维素降解菌株的分离筛选、鉴定及降解工艺的研究[J]. 中国农学通报,2020,36(21):118-125.