

一株秸秆降解耐冷细菌的分离及其主要生物活性

王靖然, 董珊珊, 侯雨昕, 韩梅*

(沈阳农业大学土地与环境学院, 农业部东北耕地保育重点实验室, 土肥资源高效利用国家工程实验室, 辽宁沈阳 110866)

摘要 [目的]从自然生境中筛选低温降解秸秆的优良菌株, 为提高冷凉条件下秸秆腐解效率提供菌种资源。[方法]16℃下, 以玉米秸秆唯一碳源继代富集培养, 以CMC-刚果红分离培养基初筛, 以玉米秸秆唯一碳源发酵复筛。[结果]从蘑菇渣中筛选获得1株在16~25℃时产纤维素酶和秸秆降解能力最强的菌株mgz-5, 经形态学和16S rDNA序列分析等鉴定为鸡粪苍白杆菌(*Ochrobactrum gallinifaecis* sp.)。[结论]菌株的低温适应能力强, 对数期长, 繁殖速度快, 低温产酶活性高, 应用潜力大。

关键词 秸秆腐解; 低温菌; 筛选; 纤维素酶

中图分类号 S182 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)08-0085-05

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.08.023

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Isolation and Identification of 1 Strain of Low Temperature and High Efficiency Cellulose Degradation Bacteria and Biological Activity of the Strain

WANG Jing-ran, DONG Shan-shan, HOU Yu-xin et al (College of Land and Environment, Shenyang Agricultural University, Key Laboratory of Arable Land Conservation (Northeast China), Ministry of Agriculture, National Engineering Laboratory for Efficient Utilization of Soil and Fertilizer Resources, Shenyang, Liaoning 110866)

Abstract [Objective] Filter low temperature and high efficiency straw degrading strain from natural habitat, provide strain resources for improving the decomposition efficiency of straw under cold climate. [Method] Under 16℃, enriched culture in the medium with corn straw as the only carbon source, primary screen in the isolation medium with Sodium Carboxymethyl Cellulose and Congo Red, second screen in the medium with corn straw as the only carbon source. [Result] The strain (mgz-5) with the strongest cellulase production and straw degradation ability was isolated from mushrooms, it was identified as *Ochrobactrum gallinifaecis* sp. by morphology and 16S rDNA sequence analysis. [Conclusion] The strain has strong adaptability to low temperature, long logarithmic phase, fast reproduction speed, high enzyme activity under low temperature and high potential application value.

Key words Straw decomposition; Psychrophiles; Filter; Cellulase

秸秆的主要成分为纤维素和半纤维素, 其利用的途径之一是还田, 作为肥料为下茬作物提供营养物质。秸秆腐解实际是靠某些微生物分泌纤维素酶的水解作用实现的, 产纤维素酶的微生物以真菌居多, 细菌较少。纤维素酶是复合酶, 一般包括内切-1,4-β-葡聚糖酶(Cx)、外切-1,4-β-葡聚糖酶(C1)和β-葡萄糖苷酶(CB)3种组分, 其中Cx为关键酶, 3种酶协同降解纤维素^[1]。

温度是影响生物生存的限制因素, 所有微生物均具有特征性的最适生长温度, 在适宜温度下微生物具有最大的生长和繁殖速率^[2]。根据最适生长温度, 微生物可被分为高温菌、中温菌和低温菌3类。其中, 低温菌又分为耐冷菌和嗜冷菌, 耐冷菌的最适生长温度在20~25℃^[3], 嗜冷菌的最适生长温度<16℃, 上限为20℃。同时, 微生物还具有一定的温度耐受范围, 低于或高于这一温度范围, 它们就会因新陈代谢失活而不能生长。通常低温菌产低温酶, 中高温和耐高温菌产高温酶, 低温酶最适作用温度为5~40℃, 中高温酶最适作用温度为45~65℃^[4-5]。我国北方地区秸秆资源丰富, 但冷凉期长, 秸秆自然腐解速率慢, 限制了秸秆中养分释放和下季播种, 因此开展低温高效秸秆腐解菌剂的研究, 挖掘适合当地气候条件的菌种资源, 对于促进秸秆腐解、提高秸秆利用率和培肥地力具有重要的现实意义^[6-7]。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌源材料。还田玉米秸秆(htjg)和还田土(htt)采自沈阳农业大学北山试验基地, 腐熟玉米秸秆堆肥(jgdf)采自沈阳农业大学北山试验基地堆肥场, 常青藤落叶下土壤(lyt)采自沈阳农业大学软枣猕猴桃试验基地围墙外, 蘑菇渣(mgz)采自沈阳农业大学食用菌厂, 玉米秸秆高留茬土(lct)和免耕土(mgt)采自辽宁省农业科学院试验基地, 腐解松针土(szt)和风景树下土(sxt)采自沈阳市东陵公园。

1.1.2 玉米秸秆。采自沈阳农业大学北山试验基地, 晾干, 去叶鞘, 截短, 于阴凉通风处晾干和存放。

1.1.3 培养基。富集培养基: 以赫奇逊(Hutchinson)培养基为基础, 以玉米秸秆为唯一碳源, 替代原配方中碳源。培养基其他成分: KH₂PO₄ 1.00 g, NaCl 0.10 g, FeCl₃·6H₂O 0.01 g, MgSO₄·7H₂O 0.30 g, NaNO₃ 2.50 g, CaCl₂·6H₂O 0.10 g, 蒸馏水 1 L, 每100 mL培养基加1.00 g秸秆段(需准确称量), 自然pH。

CMC-刚果红分离培养基: CMC-Na 10.0 g, KNO₃ 1.0 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, NaCl 1.5 g, 刚果红 0.2 g, 蒸馏水 1 L, 琼脂粉 13~15 g, 自然pH。

产酶发酵培养基: K₂HPO₄ 13.3 g, KH₂PO₄ 4.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, (NH₄)₂SO₄ 0.5 g, 蒸馏水 1 000 mL, 秸秆粉 5.0 g, 自然pH^[8]。

CMC-Na产酶发酵培养基: K₂HPO₄ 13.3 g, KH₂PO₄ 4.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, (NH₄)₂SO₄ 0.5 g, 蒸馏水 1 L, CMC-Na 10.0 g, 自然pH。

基金项目 国家重点研发计划项目(2017YFD0300700)。

作者简介 王靖然(1997—), 男, 吉林九台人, 硕士研究生, 研究方向: 低温微生物秸秆降解。*通信作者, 硕士生导师, 从事资源环境微生物研究。

收稿日期 2021-07-15; **修回日期** 2021-08-05

秸秆降解培养基:同富集培养基。

1.1.4 主要试剂。DNS 显色剂:3,5-二硝基水杨酸 3.05 g, NaOH 6.7 g, 50 °C 下恒温搅拌待完全溶解,加入四水酒石酸钾钠 101 g, 50 °C 下溶解苯酚 2.5 mL, 加蒸馏水定容至 500 mL, 储存于棕色瓶中, 保存备用^[9]。

0.05 mol/L 柠檬酸缓冲溶液: $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ 4.83 g, $C_6H_5O_7 \cdot Na_3 \cdot 2H_2O$ 7.94 g, 蒸馏水定容 1 L, pH 4.8。

1% CMC-Na 溶液: 1.0 g 羧甲基纤维素钠溶于柠檬酸缓冲溶液, 并定容至 100 mL。

0.5% 水杨素溶液: 0.5 g 水杨素溶于柠檬酸缓冲溶液, 并定容至 100 mL。

PCR 扩增体系: 通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), 50 μ L 反应体系, DNA 模版 5 μ L, 上下游引物各 2 μ L, *Taq* 混合酶 25 μ L, ddH₂O 加至 50 μ L。

1.2 试验方法

1.2.1 秸秆预处理。取玉米秸秆截成长约 1 cm 的段, 用蒸馏水浸泡 24 h, 去除可溶性有机物, 冲洗数次, 45 °C 烘干; 另取适量经浸泡烘干的秸秆段, 用粉碎机粉碎成 20 目秸秆粉, 备用。

1.2.2 样品采集。在 10 °C 以下自然环境中采集菌源样品适量, 装入无菌自封袋带回实验室, 4 °C 冷藏。

1.2.3 继代富集培养。取 10.0 g 菌源样品于装有 90 mL 无菌水的三角瓶中, 振荡 20 min, 充分静置, 吸取上清液 1 mL 于 100 mL 富集培养基中, 16 °C 下静止培养, 每天观察、摇动 1 次, 待秸秆段松散变软, 培养液颜色变深, 以 5% 接种量转接至新鲜的富集培养基上, 如此重复继代培养 5 次。

1.2.4 菌株的初筛。采用透明圈法。对第 5 代富集培养液进行 10 倍梯度稀释, 取各稀释度溶液 0.1 mL, 分别涂布于 CMC-刚果红分离培养基上, 16 °C 下培养, 挑取有明显透明圈的单菌落在新的分离培养基上三区划线, 多次纯化, 直至获得纯培养, 4 °C 保存。

1.2.5 菌株的复筛。通过透明圈直径和菌落直径比值 (D/d)、纤维素酶活、秸秆降解率等对初筛分离物进一步筛选。

(1) 种子液的制备。用接种环挑取初筛分离物 1~2 环, 接入 100 mL 产酶发酵培养基, 于 16 °C 下培养 5 d, 备用。

(2) D/d 值的测定。取种子液涂布于分离培养基上, 于 16 °C 下培养, 待菌落长出并产生明显的透明圈, 用直尺测量透明圈直径 D 和菌落直径 d , 计算 D/d 比值。

(3) 粗酶液的制备。取 5 mL 种子液接入 100 mL 产酶发酵培养基, 于 16 °C 培养 5 d, 4 °C 下 8 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液, 备用。

(4) 纤维素酶活力的测定。采用 DNS 显色法^[10-11]。除测定 3 种纤维素酶 Cx、C1 和 CB 外, 同时测定滤纸酶 (FPA) 的活性, FPA 代表 3 种纤维素酶协同作用的总活力。1 mL 酶液于一定温度下进行酶解反应, 1 min 产生 1 μ g 葡萄糖的纤维素酶含量定义为 1 个酶活力单位, 以 U/mL 表示。

(5) 秸秆降解率的测定。采用失重法^[12]。取种子液 5 mL, 接入 100 mL 秸秆降解培养基, 于 16 °C 下培养, 期间经常观察和摇动, 至 30 d 时取出秸秆段, 烘干称重, 计算处理前后秸秆段的失重率作为降解率, 按下式计算:

$$\text{秸秆降解率} = (W_1 - W_2) / W_1 \times 100\%$$

式中, W_1 和 W_2 分别为降解前和降解后的秸秆质量。

1.2.6 菌株鉴定。取种子液接于不加刚果红的 CMC-分离培养基上, 16 °C 培养 5 d, 收集菌苔, 提取 16S rDNA, PCR 扩增, 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳提纯, 送交上海生工测序, 结果在 NCBI 数据库中进行 Blast 比对, 采用 MEGA 7.0 构建系统发育树, 确定菌株系统发育地位。

1.2.7 最适生长温度的测定。采用比色法^[13]。以 5% 的接种量, 取种子液接于产酶发酵培养基, 分别于 16、20、25、28 °C 下静置培养, 每隔 24 h 取样, 测定 OD₅₄₀ 值, 至 OD 值下降 3 个点停止测定。以空白培养基为对照。

1.2.8 菌株生长曲线和代时 (G) 的测定。采用稀释平板计数法。以 5% 的接种量取种子液接于 300 mL 产酶发酵培养基, 置于最适生长温度下静置培养, 每 24 h 准确取 0.1 mL 培养液, 涂布于分离培养基上, 可做适当稀释, 置于最适生长温度下培养, 7 d 左右计数菌落, 计算 1 mL 培养液的活菌数, 以时间为横坐标, 活菌对数值为纵坐标绘制生长曲线。取对数期内 2 点 t_1 和 t_2 时的活菌数 N_1 和 N_2 , 代入公式 $n = \lg(N_2/N_1) / \lg 2$ 和 $G = \Delta t / n$, 计算 G 。式中, n 为繁殖代数, $\Delta t = t_2 - t_1$ 。

1.2.9 最适产酶温度的测定。采用 DNS 显色法。以 5% 的接种量, 取种子液接于 CMC-Na 产酶发酵培养基, 于 35、30、25、20、16、10、7、4 °C 培养 5 d, 取发酵液测定纤维素酶活。以温度为横坐标、酶活力为纵坐标作图。

2 结果与分析

2.1 菌株的初筛 在 16 °C 下菌源样品继代富集培养 5 代, 取第 5 代培养物, 采用 CMC-刚果红分离培养基以稀释平板计数法, 经多次分离纯化, 分离获得具有纤维素降解能力的分离物 11 个: lct-1、htjg-2、htt-7、jgdf-3、lyt-3、jgdf-6、szt-1、mgz-3、mgt-2、sxt-2、mgz-5。

2.2 菌株的复筛

2.2.1 D/d 值。初筛分离物在 CMC-刚果红分离培养基平板上产生的透明圈直径 D 和菌落直径 d 的比值见表 1。由表 1 可知, 菌株 mgz-5 的 D/d 最大, 达 2.71; jgdf-3、szt-1 次之, 分别为 2.31 和 2.43。

2.2.2 纤维素酶活力。在 16 °C 下, 以玉米秸秆为唯一碳源的液体发酵培养基中各菌株 4 种纤维素酶活力见图 1。由图 1 可知, mgz-5 的 4 种纤维素酶活均高于其他菌株, 且差异显著 ($P < 0.05$), 其 Cx、C1、CB 和 FPA 的酶活力依次为 11.066、12.387、7.160 和 22.594 U/mL; 其次为 jgdf-3。

2.2.3 秸秆降解率。在 16 °C 下, 玉米秸秆处理 30 d 的降解率见图 2。由图 2 可知, mgz-5 和 jgdf-3 的秸秆降解率较高, 且差异显著 ($P < 0.05$)。在培养过程中也观察到二者的培养液颜色变深, 絮状物析出的速度较其他处理快, 秸秆段软化更加明显。经过初筛和复筛, 以及多项指标综合考察, 筛选

出较优菌株 mgz-5。

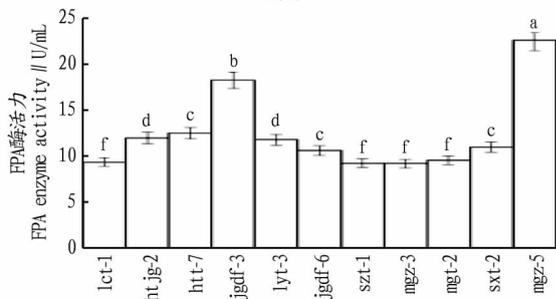
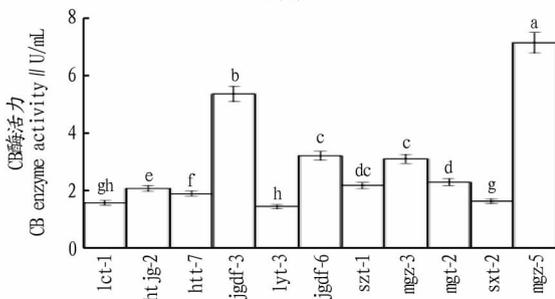
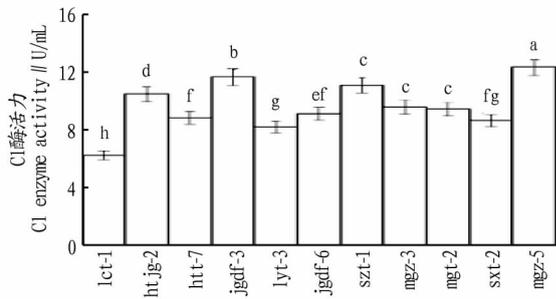
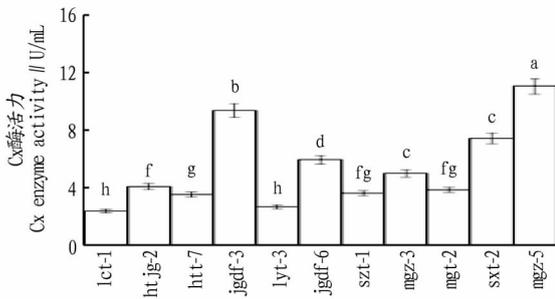
2.3 菌株的鉴定 通过对 mgz-5 进行 16SrDNA 提取、PCR 扩增和序列分析表明,16S rDNA 的大小在 1 496 bp, 确证 mgz-5 为细菌。mgz-5 的琼脂糖凝胶电泳结果见图 3, 其 PCR 扩增产物条带清晰, 带型完整、无杂带, 说明扩增产物较纯。测得的序列在 NCBI 数据库中比对, 发现 mgz-5 与 *Ochrobactrum* 属的序列相似性最高, 同源性均在 95% 以上, 用 MEGA 7.0 构建 mgz-5 的系统发育树(图 4)。

由图 4 可见, mgz-5 与 *Ochrobactrum gallinifaecis* strain Iso 196 位于同一分支上, 说明二者同源, 因此, 可以确定 mgz-5 为鸡粪苍白杆菌属(*Ochrobactrum gallinifaecis* sp.)。

表 1 初筛分离物在 CMC-Na 平板上的 D/d 值

Table 1 D/d value of primary screening separation on CMC-Na plate

序号 No.	菌株 Strain	D/d 值 D/d value
1	lct-1	1.21
2	htjg-2	1.62
3	htt-7	1.53
4	jgdf-3	2.31
5	lyt-3	1.35
6	jgdf-6	1.42
7	szt-1	2.43
8	mgz-3	1.65
9	mgf-2	1.42
10	sxt-2	1.53
11	mgz-5	2.71

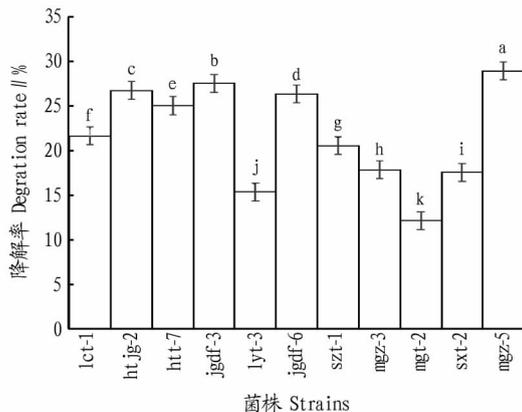


注: 柱上不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)

Note: Different lowercase letters on the column indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$)

图 1 各菌株 4 种纤维素酶活力比较

Fig.1 Comparison of four cellulase activities of each strain



注: 柱上不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)

Note: Different lowercase letters on the column indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$)

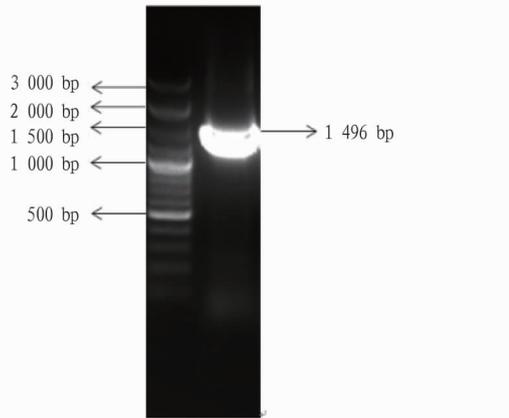
图 2 不同菌株对玉米秸秆的降解率

Fig.2 Degradation rate of different strains to corn stalks

图 3 mgz-5 的 ITSrDNA PCR 扩增产物电泳图

Fig.3 Electrophoresis of mgz-5 ITSrDNA PCR products

2.4 最适生长温度 不同温度下菌液的 OD₅₄₀ 随时间变化曲线见图 5。由图 5 可知, mgz-5 在 25 °C 下 OD₅₄₀ 最高, 表明在



该温度下细胞繁殖最快,最适合菌株生长繁殖。

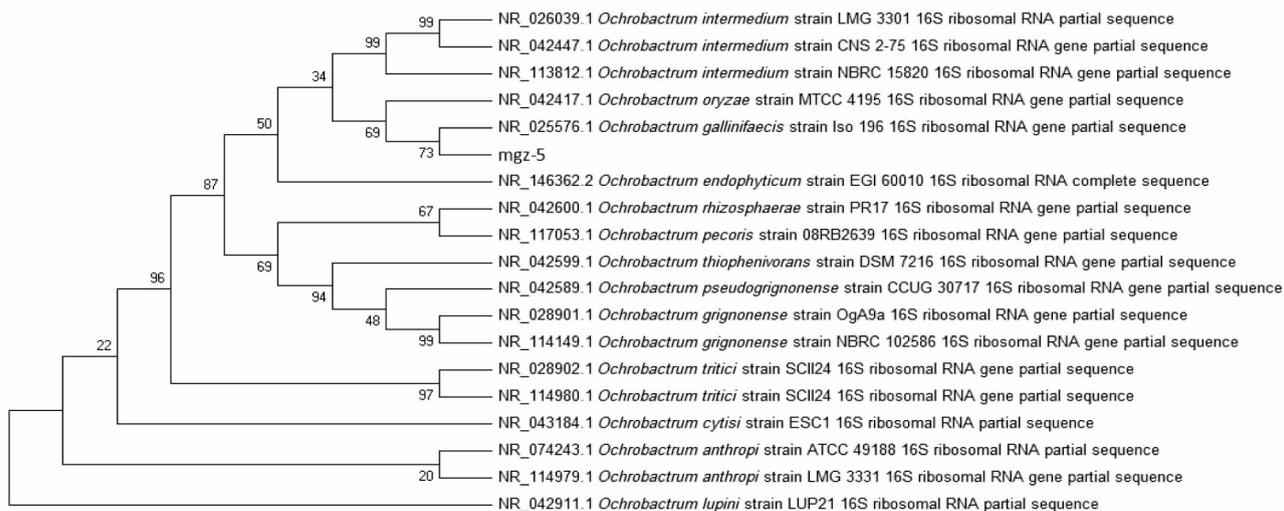


图4 mgz-5 的 16S rDNA 系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence of mgz-5

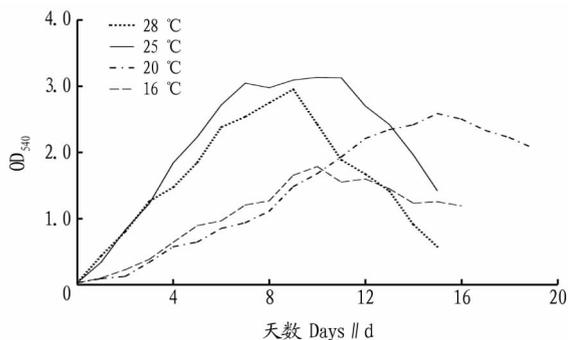


图5 4个温度下mgz-5的OD值曲线

Fig.5 The OD curve of mgz-5 under four temperatures

2.5 生长曲线 在最适生长温度 25 °C 下,mgz-5 的 1 mL 活菌数对数值随时间的变化情况见图 6。由图 6 可知,菌株无明显延滞期,接种后几乎直接进入对数期,5 d 为对数期末,6~13 d 为稳定期,稳定期维持时间较长(8 d),对于收获酶和菌体等发酵产物极为有利。

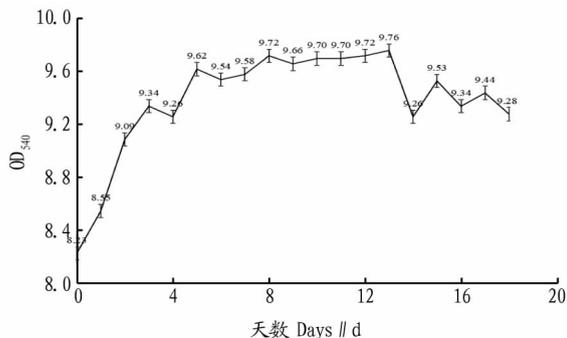


图6 25 °C下mgz-5的生长曲线

Fig. 6 The growth curve of mgz-5 under 25 °C

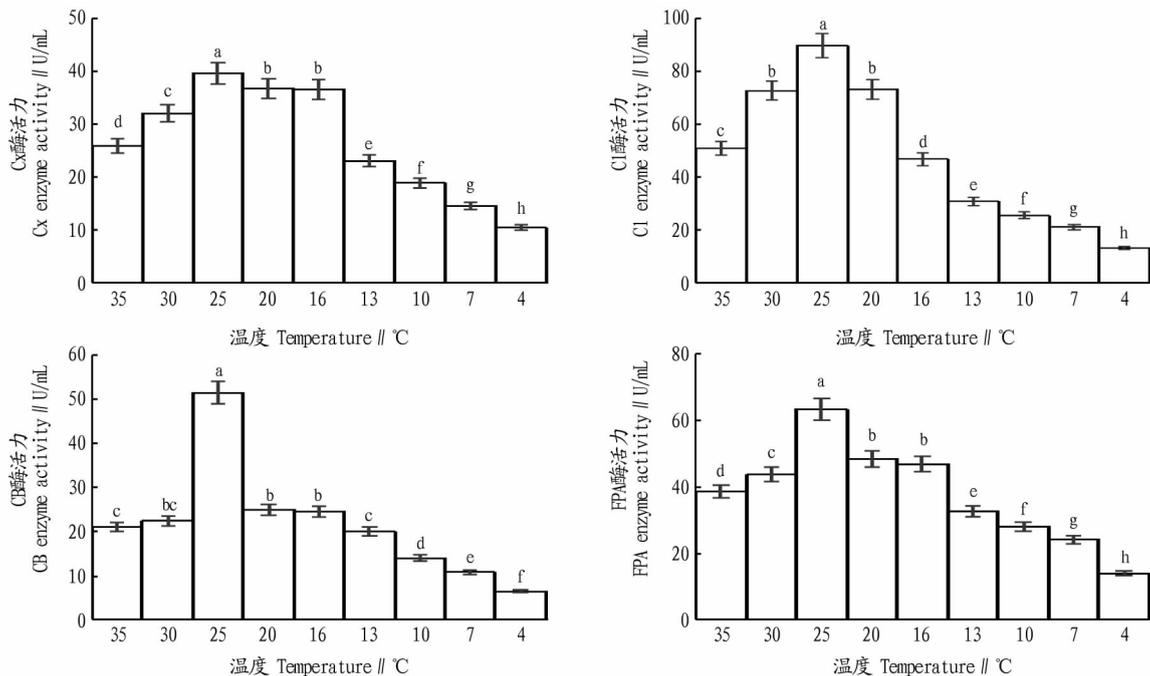
2.6 菌株的代时(G) 对数期内的微生物个体生物学特性比较稳定,故计算代时需要采用对数期内任意 2 点的活菌数计算。菌株 mgz-5 的对数期在 0~5 d,故可取 $t_1 = 24$ h 和 $t_2 = 48$ h 2 点,查得对应的活菌数为 $N_1 = 3.54 \times 10^8$ CFU/mL 和

$N_2 = 1.23 \times 10^9$ CFU/mL,故代入 n 和 G 的计算公式,求得 $G = 13.3$ h。

2.7 菌株最适产酶温度 温度是影响微生物生长和代谢的限制性因素。在 4~35 °C 下测得 mgz-5 的 3 种纤维素酶活以及滤纸酶活,结果见图 7。由图 7 可知,在所测较低温度范围内,4 种纤维素酶均具有一定的活性。其中,25 °C 时 4 种酶活性具有最高值,分别为 Cx 39.518 U/mL, C1 89.687 U/mL, CB 51.499 U/mL, FPA 63.423 U/mL,且均与其他温度下的酶活力差异显著。而且,作为关键组分的 Cx 在 25~16 °C 区间存在一个近平台期,即 39.52~36.48 U/mL,表明 Cx 在该温度区间能保持较高酶活力;此外,C1、CB 和 FPA 在该温度区间亦分别有较高的酶活,表明该菌株具有较好的低温降解秸秆的潜质。

3 结论与讨论

目前国内对于纤维素降解菌的研究以中高温菌居多,低温纤维素降解菌的研究相对较少,李春艳等^[14]从生活垃圾土壤中分离得到 1 株,该菌株的最高 Cx 酶活性为 14.12 U/mL,王勇等^[15]从常年堆积枯枝落叶的腐殖土壤中筛选出 1 株真菌,该菌株最高 Cx 酶活性为 8.47 U/mL,孟建宇等^[16]从土壤中筛选得到 1 株,其最高 Cx 酶活性为 11.6 U/mL。高云航等^[17]从长白山冻土中筛选到 1 株,其最高 Cx 酶活性为 59.7 U/mL。该研究结果表明,Mgz-5 的最高 Cx 酶活性为 39.518 U/mL,对比其他低温纤维素降解菌,mgz-5 的最高 Cx 酶活性处于中上水平,且在 25 至 16 °C 都具有较高的 Cx 酶活性。mgz-5 的低温生长具有对数期长、无明显延滞期和代时短的特点,可以较好地适应低温环境。mgz-5 作为 1 株优质高效低温秸秆降解菌具有较好的应用前景。后续研究将围绕 mgz-5 进行低温纤维素菌系的构建,菌系中加入产 CB 酶能力强的菌株,使 mgz-5 产 Cx 酶强的优点得以充分发挥,为我国东北部冷凉地区的秸秆降解提供技术支持。



注:柱上不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)

Note: Different lowercase letters on the column indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$)

图7 低温度下4种纤维素酶活力比较

Fig.7 Comparison of four cellulase activity under low temperature

参考文献

- [1] 孙振涛,赵祥颖,刘建军,等.微生物木聚糖酶及其应用[J].生物技术,2007,17(2):93-97.
- [2] 崔秀秀.一株耐冷细菌产低温纤维素酶发酵条件优化及其活性酶谱分析[D].沈阳:沈阳农业大学,2016.
- [3] BIRCH P R J, SIMS P F G, BRODA P. Substrate-dependent differential splicing of introns in the regions encoding the cellulose binding domains of two exocellulohydrolase I-like genes in *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Applied and environmental microbiology, 1995, 61(10): 3741-3744.
- [4] NIDETZKY B, CLAEYSSSENS M. Specific quantification of *Trichoderma reesei* cellulases in reconstituted mixtures and its application to cellulase-cellulose binding studies [J]. Biotechnology and bioengineering, 1994, 44(8): 961-966.
- [5] TIEN M, KIRK T K. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burds [J]. Science, 1983, 221(4611): 661-663.
- [6] WARIISHI H, VALLI K, GOLD M H. Oxidative cleavage of a phenolic diarylpropane lignin model dimer by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Biochemistry, 1989, 28(14): 6017-6023.
- [7] 崔宗均,李美丹,朴哲,等.一组高效稳定纤维素分解菌复合系 MC1 的筛选及功能[J].环境科学,2002,23(3):36-39.
- [8] 王慧,刘小平,郭鹏,等.复合菌系 XDC-2 分解未经化学处理的水稻秸秆[J].农业工程学报,2011,27(S1):86-90.
- [9] 盛铭浩,徐凤花,代欢,等.低温纤维素降解复合菌系的选育及性能分析[J].湖北农业科学,2013,52(8):1814-1816,1828.
- [10] 萨如拉,高聚林,于晓芳,等.玉米秸秆低温降解复合菌系的筛选[J].中国农业科学,2013,46(19):4082-4090.
- [11] GHOSE T K. Measurement of cellulase activities [J]. Pure and applied chemistry, 1987, 59(2):257-268.
- [12] 青格尔,于晓芳,高聚林,等.玉米秸秆低温降解复合菌系降解能力及微生物组成研究[J].中国生态农业学报,2020,28(11):1753-1765.
- [13] 黄亚丽,黄媛媛,马慧媛,等.低温秸秆降解真菌的筛选及在秸秆还田中的应用[J].中国农学通报,2020,36(21):53-60.
- [14] 李春艳,于琦,冯露,等.低温纤维素降解菌分离鉴定及产酶条件优化[J].东北农业大学学报,2015,46(10):74-81.
- [15] 王勇,张育铭,朱洪磊,等.高效纤维素降解菌的筛选及产酶活力测定[J].江苏农业科学,2020,48(23):255-260.
- [16] 孟建宇,陈勿力吉玛,郭慧琴,等.常温和低温纤维素降解菌的分离及其降解特性[J].农业生物技术学报,2021,29(1):73-84.
- [17] 高云航,勾长龙,王雨琼,等.1株高效低温纤维素分解菌的分离鉴定及产酶条件优化[J].中国兽医杂志,2014,50(12):77-79,49.