发酵牛羊粪的纤维素分解菌筛选

李松龄

(青海省农林科学院 土壤肥料研究所,青海 西宁 810016)

摘　要:通过固体培养初选和摇瓶发酵复选,从腐烂的秸秆、腐草、腐树干中筛选获得酶活较高的真菌、放线菌和细菌各2株,将6个菌株分别接种到不同的碳源的牛羊粪中,经过2 d培养后测定其CMC酶活。结果表明:不同菌种对同一粪便的酶活力不一样;同一菌株在不同粪便中表现的酶活力也不一样。其中,P2-6和P2-7在牛粪上酶活力最强,P2-6和B2-6及P2-7在羊粪上酶活力较强。最终确定以上3株菌株为牛羊粪堆肥发酵的首选菌株。

关键词:牛羊粪;纤维素分解菌;酶活;筛选

中图分类号:S 182　文献标识码:A　文章编号:1001—0009(2011)20—0058—03

纤维素是世界上最丰富的可再生资源,但一直没有得到充分利用。传统的理化方法降解纤维素时存在很多问题,如反应条件剧烈、设备昂贵、后处理存在环境污染以及生产成本较高,而利用微生物降解纤维素因经济、有效、节约成为当前热点之一[1]。将自然界中分解纤维素的微生物接入畜禽废弃物中进行堆肥,不仅能解决环境污染问题,还能变废为宝,将废弃物降解成绿色肥料或土壤调节剂,起到改良土壤和增加肥效的作用[2]。由于纤维素本身致密的结构及不易降解的特性导致其难以被充分利用或被大多数微生物直接作为碳源物质而转化利用,从而阻碍了堆肥技术在处理有机固体废物领域的发展。能够降解木质纤维素的微生物种类很多,包括细菌、真菌和放线菌等,各种微生物的降解效果也有较大的差别[3]。同时,青海省是我国四大牧区之一,有着丰富的牛羊粪资源,要将其变废为宝提高附加值必须进行堆肥化处理,然而青海省所生产堆肥用的发酵菌剂几乎都从国外和省外引进,成本较高且对原料适应性差,效果不太理想。因此,进行对纤维素有较强分解能力的菌群筛选研究工作显得尤为重要。

1　材料与方法

1.1　试验材料

1.1.1　不同粪便有机物料的制备　取新鲜的牛、羊粪便,在60℃烘干,粉碎至粉末,备用。

1.1.2　培养基　牛肉蛋白胨琼脂培养基(细菌):牛肉膏3.0 g,蛋白胨10.0 g,NaCl 5.0 g,琼脂粉13~15 g,蒸馏水1 000 mL,pH 7.2~7.4。高氏1号培养基(放线菌):K_2HPO_4 0.5 g,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g,KNO_3 1.0 g,$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g,NaCl 0.5 g,可溶性淀粉20.0 g,琼脂粉13~15 g,蒸馏水1 000 mL,pH 7.2~7.4。PDA培养基(真菌):马铃薯汁1 000 mL,葡萄糖20.0 g,琼脂13~15 g。羧甲基纤维素纳培养基(CMC培养基)[4]:NaCl 6.0 g,$MgSO_3 \cdot 7H_2O$ 0.1 g,KH_2PO_4 0.5 g,$CaCl_2$ 0.5 g,K_2HPO_4 2.0 g,CMC-Na 15 g,$(NH_4)SO_4$ 2.0 g,pH 7.0~7.4,蒸馏水1 000 mL,固体培养基加1.5%琼脂。

1.1.3　试剂及仪器　二硝基水杨酸试剂:称取酒石酸钠9.1 g溶于50 mL的水里,于溶液中依次加入3,5-二硝基水杨酸0.315 g,NaOH 2.0 g,加热搅拌,使之溶解,再加入重蒸酚0.25 g,无水亚硝酸钠0.25 g,搅拌使之溶解,冷却后定容至100 mL。储存于棕色瓶中,放置1周后使用。柠檬酸缓冲液(pH 4.6):甲液:0.1 mol/L柠檬酸,称取19.21 g柠檬酸,加蒸馏水至100 mL。乙液:0.2 mol/L磷酸氢二钠溶液,称53.63 g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$,加蒸馏水至1 000 mL。取甲液26.7 mL,乙液23.7 mL混合后加水稀释100 mL。磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(pH 5.0):取乙液25.7 mL加甲液24.3 mL,加水稀释至100 mL。羧甲基纤维素钠缓冲液:称取CMC 1 g,加入100 mL水;在水浴上加热溶解。再加入磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液20 mL,水40 mL混匀。500 mg/L标准葡萄糖溶液:称取在105℃干燥2 h的分析纯葡萄糖0.500 g,加水溶解,稀释定容至1 000 mL。

1.2　试验方法

1.2.1　样品的采集　腐烂秸秆、腐草、腐烂的树木均采集于青海省平安、乐都等地。

1.2.2　样品处理　将采集的5个样品分别称取10 g放入25 mL无菌水中振荡30 min后,吸取上清液进行浓度稀释:10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}、10^{-5}。将稀释后的菌液分别涂布在牛肉膏蛋白胨琼脂培养基、高氏1号

作者简介:李松龄(1972-),男,青海乐都人,在读硕士,副研究员,现主要从事土壤肥料和农业微生物研究工作。E-mail:lisl1999513@souhu.com。

收稿日期:2011—08—01

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

培养基、PDA 培养基的平板上，28℃恒温培养 48 h。

1.2.3 菌株鉴定与纯化 在培养 48 h 后，从分别在各培养基上挑去菌落（相同菌落只取 1 个菌落），将真菌、放线菌、细菌分别接种于 3 种培养基中进行划线纯化，共获得 127 个菌落。将这些菌落分别保存在试管培养基中，并进行菌种与样品之间的联系编号（S1-1）。

1.2.4 初选 将细菌、真菌、放线菌的单菌落分别点种在 CMC 平板上，每个菌种接 3 个平板，每个平板接 3 个点。在 28℃下恒温培养 48 h，用 1 mg/mL 的刚果红溶液染色 10 min 后，再用 1 mg/mL 的 NaCl 溶液脱色 5 min，观察培养基上面的透明菌圈[5]，记录透明圈的大小与菌落的大小。根据透明菌圈与其菌落的直径之比的大小选择产酶量高的 14 株菌：真菌 5 株、细菌 3 株、放线菌 6 株。

1.2.5 液体发酵测定酶活进行复选 粗酶液的制备：对上述 14 株菌株进行复选，分别接种于 25 mL 羧甲基纤维素钠发酵培养基中，28℃下恒温培养 48 h；离心前先将菌液振荡 30 min 使得菌液充分混匀，所得发酵液经 4℃、5 000 r/min 离心 30 min，收集上清液作为粗酶液，用于酶活的测定。内切葡聚糖酶的（C_X）测定：用 CMC 酶（羧甲基纤维素酶）活力，代表内酶活。用 DNS 法[6]测定反应后还原糖（葡萄糖）的含量。酶活定义为上述条件下，1 mL 发酵液 1 min 催化底物 1 μmol 葡萄糖的酶量为 1 个酶活力单位“IU”。还原糖的测定：取刻度试管 14 支，各加入稀释酶液 0.5 mL（空白对照加入 0.5 mL 的蒸馏水），CMC 缓冲液 2.0 mL，混匀，置 50℃恒温水浴中糖化 30 min，取出后加入 DNS 试剂 2.5 mL。摇匀，在 721 型分光光度计 520 nm 比色，比色杯为 1.0 cm，测出样品液的 OD 值，查阅标准曲线后，求出溶液中葡萄糖的含量。

1.2.6 计算 在 pH 5.0、50℃下，每 1 mL 发酵液 1 min 催化底物生成 1 μmol 葡萄糖的酶量作为 1 个酶活力单位“IU”。IU=（G×n）/（0.5×30×180）。G：样品溶液中葡萄糖的含量（μg）；n：酶液稀释的倍数；0.5：吸取酶液的数量（mL）；30：糖化的时间（min）；180：葡萄糖的分子质量（g/mol）。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选

2.1.1 菌株初步鉴定 将样品接种于牛肉蛋白胨琼脂培养基（细菌）、高氏 1 号培养基（放线菌）、PDA 培养基（真菌）中进行菌种类型筛选。共得菌株 127 株：真菌 48 株、细菌 52 株、放线菌 27 株。

2.1.2 CMC 固体培养基初选 将鉴定后的菌株分别接种于 CMC 固体培养基培养，28℃培养 2 d，然后再用刚果红染色，再用 NaCl 脱色，初选出透明圈直径与菌落直径比较大的 14 株菌株（表 1）。

表 1 CMC 固体培养基初筛出的 14 菌株

菌株代号	透明圈直径/mm	菌落直径/mm	D/d
样 G1-1	14.0	3.0	4.666667
样 G3-2	23.0	5.5	4.181818
样 G3-3	14.0	3.5	4.000000
样 G3-6	17.5	6.5	2.692308
样 G3-7	17.0	4.0	4.250000
样 G4-6	23.0	6.5	3.538462
样 P1-3	10.0	2.5	4.000000
样 P2-2	34.0	5.0	6.800000
样 P2-6	26.0	7.5	3.466667
样 P2-7	15.5	4.0	3.875000
样 P4-1	23.5	3.0	7.833333
样 B2-6	19.0	4.5	4.222222
样 B4-2	18.5	3.0	6.166667
样 B4-6	24.0	4.0	6.000000

2.1.3 液体发酵测定酶活复筛结果 将初选的 14 株菌株接种于 CMC 液体培养基中培养，28℃培养 2 d，将发酵液在 4℃、5 000 r/min、离心、收集上清液，利用 DNS 法测定还原糖的含量，酶液没有稀释。经计算得到最终结果：细菌样 B2-6、样 B4-6，放线菌样 G3-7、样 G3-6，真菌 P2-6、P2-7 的内切酶活力较高（表 2），并保存做下一步研究。

表 2 14 株菌株粗酶液 CMC 酶活力

菌株代号	吸光度/A	酶活/ IU
样 G1-1	0.011	0.034745
样 G3-2	0.036	0.037639
样 G3-3	0.030	0.036944
样 G3-6	0.044	0.038102
样 G3-7	0.051	0.039375
样 G4-6	0.053	0.039606
样 P1-3	0.039	0.037986
样 P2-2	0.041	0.038218
样 P2-6	0.066	0.041111
样 P2-7	0.058	0.040852
样 P4-1	0.038	0.037870
样 B2-6	0.063	0.040764
样 B4-2	0.041	0.038218
样 B4-6	0.048	0.039028

2.2 不同粪便对菌株酶活力的影响

B2-6、B4-6、G3-7、G3-6、P2-6、P2-7 分别接种于不同碳源的牛羊粪液体培养基中，28℃培养 2 d、4℃、5 000 r/min、离心、收集上清液，利用 DNS 法测定其 CMC 的酶活，酶液稀释 10 倍。由表 3 可知，不同菌种对同一粪便的利用能力不一样；同一菌株在不同粪便中表现的利用能力也不一样。其中，P2-6 和 P2-7 在牛粪上酶活力最强，P2-6 和 B2-6 及 P2-7 在羊粪上酶活力较强，将以上 3 株菌株保留并进行堆肥发酵前景较好。

表 3 不同碳源对菌株酶活力的影响

菌株代号	牛粪	羊粪
样 G3-7	0.121435	0.102917
样 G4-6	0.133299	0.122882
样 P2-6	0.148344	0.135613
样 P2-7	0.145451	0.129826
样 B2-6	0.121472	0.130405
样 B4-6	0.113044	0.091343

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3 结论

通过3种不同培养基对菌种进行鉴定，再CMC固体培养基培养，刚果红染色、NaCl脱色，根据透明圈直径与菌落直径之比完成对菌种的初选，选出产纤维素酶活较高的14株菌株。通过液体发酵培养复选，获得6株纤维素酶活高菌株。将这6株菌株接种于不同牛羊粪培养基中发酵后测定酶活，最终确定P2-6和B2-6及P2-7为牛羊粪堆肥发酵的首选菌株。

参考文献

[1] 张辉，桑青.生物降解纤维素研究进展[J].安徽农业科学，2007，35(27)：8651-8655.
[2] 李秀金，董仁杰.粪草堆肥特性的试验研究[J].中国农业大学学报，2002，7(2)：31-35.
[3] 王宝申.纤维素分解菌的分离筛选研究[J].天津农业科学，2007，13(4)：50-52.
[4] 曾青兰.纤维素分解菌的分离筛选[J].安徽农业科学，2007，35(36)：11946-11947.
[5] 顿宝庆，吴薇，王旭静.一株高纤维素酶活力纤维素分解菌的分离与鉴定[J].中国农业科技报，2008，10(1)：113-117.
[6] 孙伟伟，曹维强，王静.DNS法测定玉米秸秆中总糖[J].食品研究与开发，2006，27(6)：78-83.

Screening of Cellulose-decomposing Microorganisms on Fermentation Cattle and Sheep Manure

LI Song-ling
(Institute of Soil and Fertilizer, Qinghai Academy of Agricultural Forestry Sciences, Xining, Qinghai 810016)

Abstract: By screening in rotting straw, grass and trunk through solid culture preliminary and broth assay method, it obtained fungi, actinomycete and bacterial each two strain. Inoculation with each strain to cattle and sheep mature droppings, the CMC enzyme activity was measured after two days. The results showed that different strains behaved differently to the one mature; and it told the same trend for one strain to the different dung. It was found that CMC enzyme activity was strong on the condition of the fungi of P2-6 and P2-7 by using in two mature and bacterial of B2-6 in sheep dung. Finally, the 3 strains were determined as the best ones for fermentation cattle and sheep mature.

Key words: cattle and sheep mature; cellulose-decomposing microorganisms; enzyme activity; screening

《湖南农业科学》2012年征订启事

《湖南农业科学》是由湖南省农科院、湖南省科技厅星火促进会和湖南农业大学联合主办的国内外公开发行的综合性农业技术类期刊，2007年起入选中国科技核心期刊，是CSCD来源期刊。2010年影响因子为0.682，在国内同类期刊中名列前茅。

《湖南农业科学》自2010年起正式变更为半月刊，其中上半月学术刊，下半月为推广刊。学术刊以刊登基础性科研论文为主，报道农业相关的重要领域的研究成果，读者对象为大专院校师生、科研院所农业科研工作者、农业相关部门管理人员等。推广刊则以刊登应用性科技文章为主，关注“三农”，服务于农业新产品、新技术的推广普及，主要读者对象为行业管理人员、农业科研人员、涉农企业、乡镇农技推广站、经销商、科技示范户与种养大户等。

本刊为大16开本，上半月学术刊160页，下半月推广刊60页，封面铜版纸，内芯轻涂纸，印刷精美，内容丰富。单期定价8.00元，全年192.00元。邮发代号42－20。欢迎到当地邮局征订(邮局仅征订学术刊)，或直接汇款至本社邮购(需订推广刊的请直接与杂志社联系0731－84693060)。

地 址：长沙市芙蓉区马坡岭湖南省农业信息与工程研究所《湖南农业科学》杂志社
邮 编：410125
电 话：0731－84691322(学术刊)/84693060(推广刊)
E－mail：hnnykx@vip.163.com(学术刊)或hnnykxjsb@163.com(推广刊)

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net