

水稻秸秆腐解复合菌系 RSS-4 的选育及其腐解特性

刘甲锋 李力 陈慧君 关大伟 姜昕 李俊 沈德龙*

(中国农业科学院农业资源与农业区划研究所 北京 100081)

摘要: 采用限制性培养技术与温度梯度诱导相结合的方法, 从四川成都平原多年还田的土壤中筛选、构建出一组在中温条件下对水稻秸秆具有腐解功能的复合菌系 RSS-4。该复合菌系在 22°C 条件下, 秸秆腐解试验表明: pH 先升高后降低, 最后稳定在 7.20; 纤维素酶活、半纤维素酶活均经历了先升后降的变化趋势, 最高酶活分别为 0.91、3.40 U; 到 16 d 腐解结束时, RSS-4 对秸秆、纤维素及半纤维素的降解率分别达到了 45.0%、55.5% 和 44.1%, 而木质素在整个腐解过程中未发生明显的变化; 说明所筛选构建的这组腐解复合菌系可加速秸秆的腐解。同时发现采用未灭菌的筛选方法筛得的复合菌系 RSS-4 比灭菌所得的 RSS-4' 腐解效果要好。

关键词: 水稻秸秆, 复合菌系, 筛选, 腐解特性

Screening and Functional Properties of a Complex Microbial System RSS-4 for Effective Decomposition of Rice Straws

LIU Jia-Feng LI Li CHEN Hui-Jun GUAN Da-Wei JIANG Xin LI Jun
SHEN De-Long*

(Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: A complex microbial system (CMS) RSS-4 with high ability of rice straw degradation was screened and constructed from the soils sampled from fields cultivated with straw-returning techniques for a long term in Sichuan Province by using the restricted cultivation and gradient-temperature induction methods. When RSS-4-induced rice straws degrading experiment was performed at 22°C, the pH value of the system increased at the initial stage and then slightly decreased until to 7.20. The CMC activity and xylan activity also showed an increase at the beginning and followed by an obvious decrease, with the peak values being 0.91 U and 3.40 U, respectively. At the end of fermentation (16 d), the weight of rice straws and the component cellulose and hemicellulose reduced to 45.0%, 55.5% and 44.0%, respectively, while no obvious change happened in the lignin content. It was also found that the RSS-4 by the unsterilized method has better degradation effect than that of the RSS-4' by the sterilized method.

Keywords: Rice straw, Composite microbial system, Screening, Degradation property

农作物秸秆是一种重要的可再生性生物质资源,全世界每年秸秆产量约为 22 亿吨^[1],其中我国每年的作物秸秆产量就达到了 7 亿多吨^[2],接近世界总量的 1/3。若这一资源能够得以有效利用,则对解决当今世界所面临的能源紧张、环境污染问题有着深远的意义。

作物秸秆除含大量的纤维素、半纤维素、木质素、蛋白质等有机物质外,还含有氮、磷、钾、钙、镁、硫、硅和各种微量元素,它们在土壤中分解为腐殖质可提高土壤有机碳含量。因此,秸秆还田是增加农田有机物投入、改善土壤理化性状、培肥土壤、提高作物产量的一项直接而有效的措施^[3]。但是由于秸秆中含量高达 40%–50%的纤维素大分子被木质素包围,而木质素分子很稳定,使得秸秆中的纤维素难于被分解利用,秸秆腐解速度慢、腐解效果差已成为限制秸秆资源利用的瓶颈。近年的研究和实践证明,应用具有快速降解秸秆的物料腐熟菌剂,是解决秸秆还田问题的关键。随着降解机理研究的逐步深入,人们已发现秸秆的降解需要多种微生物、多种酶的协同作用^[4]。因此,充分利用自然界多种微生物的协同关系,人工筛选构建能够产生多种纤维素酶的高效稳定复合菌系,引起了人们的高度重视,成为了一个新的研究热点^[5–6]。本实验室李文学等从成都多年还田的土壤中分离得到了一组高效腐解小麦秸秆的复合系 WSS-1,经过 20 d 的腐解,剪切拉力从最开始的 88 N 减小到 23 N,减小率达到了 73.66%,常温条件下对未经处理的麦秆表现出很好的腐解效果^[7]。这些复合菌系均是在高温或常温、液体发酵条件下筛选得到的,而关于中温尤其是固体条件下筛选秸秆腐解复合菌系则未见报道。

本文针对我国长江流域春水稻收获后与下茬油菜播种间温度低、需要加速水稻秸秆腐解等问题,以多年原位还田的土壤样品为菌种来源,筛选构建了一组在中温条件下能高效、快速腐解秸秆的复合菌系 RSS-4,并研究了其腐解特性。同时,对复合菌系的筛选方法进行了相应的改进,即在固体培养条件下采用未灭菌方法筛选水稻秸秆腐解复合菌系,以期开拓出一条筛选腐解复合菌剂的新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料来源: 土壤样品取自四川崇州、大邑地

区全量免耕还田 4–5 a 不同生境的田块,取 0–20 cm 耕层土壤及腐解中的秸秆,运至实验室 4℃ 存放,共得到 10 个土壤样品。

1.1.2 培养条件: 固体培养基: 稻秆粉(粉碎后过 60 目筛) 75 g, 麸皮(粉碎后过 60 目筛) 30 g, 营养盐溶液 100 mL, 翻搅均匀, 自然 pH。分灭菌和不灭菌两种处理方法来筛选复合菌系, 接菌后静止培养。

营养盐溶液: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5%, CaCl_2 0.01%, NaCl 0.01%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005%, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.0016%, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0014%, CoCl_2 0.002%^[8]。

1.2 复合菌系的筛选构建方法

1.2.1 菌种池的构建: 以成都地区采集的多年原位还田土样为原材料, 各自构建秸秆腐解微生物菌种驯化池, 作为筛选复合菌系的菌源。具体的做法是: 首先准备 10 个 5.0 L 的塑料桶, 桶中装入 5.0 kg 采自中国农业科学院作科所昌平农场水稻土, 保持含水量 60%左右, 搅拌均匀, 以水稻秸秆为主要碳源, 加入尿素、磷酸二氢钾、氯化钾作基肥, 施用量分别为 0.12、0.05、0.12 g/kg, 以此模拟大田的营养环境。然后将各土壤样品(500 g)或菌剂(20 g)依次施入桶中, 在室温条件下静置培养, 并且定期喷洒水分, 注入新的营养盐溶液。

1.2.2 复合菌系的筛选构建过程: 在固体发酵培养基中以水稻秸秆粉末为唯一碳源, 添加麸皮和无机氮调节 C/N (约 28), 加水调匀后加入菌种池中的样品, 培养的初始温度为 28℃, 含水量控制在 60%左右, 待 pH 值趋于稳定及 C/N 小于 20 (16 d)时取 15% 固体发酵曲进行转接。如此连续继代培养, 同时进行温度诱导, 淘汰分解能力弱和不稳定的复合菌系, 待稻秆腐解时间和速度稳定以后, 即初步筛选到中温条件下水稻秸秆腐解复合菌系。

1.3 复合菌系对稻秆的分解特性

配制固体发酵培养基, 接种 15%的复合菌系, 然后置于 22℃ 的恒温箱中静止培养。以不接菌作空白对照, 并以市售应用效果较好的菌剂 A 作为处理对照。在培养的第 2、4、6、8、10、12、14、16 天分别测定腐解产物的 pH 值。同时测定腐解产物的酶活性(包括 CMC 酶活和半纤维素酶活)、C/N、失重率以及腐解过程中木质纤维素类物质含量的变化。

1.4 测定方法

1.4.1 C/N 的测定: 取腐解产物烘干、粉碎、过筛,

用凯氏定氮法测定其全 N 量; 按石蜡油-重铬酸钾氧化法测定其全 C 量^[9], 最后计算 C/N。

1.4.2 pH 值的测定: 取不同腐解时间的样品 5.00 g, 加水浸提后, 用上海雷磁仪器厂生产的 pH-3C 型精密 pH 计测定 pH 值。

1.4.3 酶活的测定: 取不同腐解时间的湿酶曲于 40℃ 烘干后粉碎过筛(40 目), 按酶曲重量的 10 倍加入蒸馏水, 于 40℃ 水浴浸提 1 h, 用快速中号滤纸过滤, 滤液 3000 r/min 离心 15 min, 上清液即为粗酶液。

羧甲基纤维素(CMC)酶活及半纤维素酶活的测定参照文献[10–11]。以每毫升粗酶液每分钟产生 1 μmol 葡萄糖或木糖所需的酶量定义为 1 个酶活单位(U/g)。

1.4.4 降解率的测定方法: 将 5.00 g 剪接后的稻秆片段(长约 2 cm)置于特制网兜中, 与固体腐解同步进行。在不同发酵时间, 取出后用稀盐酸和硝酸的混合液冲洗而消除菌体, 后用流水冲洗干净, 105℃ 烘干后称重, 计算不同腐解时间稻秆的重量, 计算失重量和失重率。

1.4.5 木质纤维素含量的测定: 样品中纤维素、半纤维素和木质素的测定采用中性洗涤纤维分析法^[12–14]。

2 结果与分析

2.1 复合菌系的筛选构建

采用 1.2 的筛选驯化方法, 从四川不同来源的土壤样品构建的菌种池取样接种到新配制的固体培养基, 于初始温度(28℃)下静止培养, 待腐解产物的 pH 趋于稳定、C/N 下降到 18.6 (16 d), 表明腐解已基本完成, 此时取 15% 固体发酵曲进行转接。如此连续继代培养, 并同时对其进行低温梯度诱导(0.5℃/代), 边传代边培养直至筛选得到一组在中温条件下(22℃)具有较强的水稻秸秆腐解能力, 且腐解过程中 pH 酶活等变化趋势保持稳定的复合菌系 RSS-4。同时发现采用未灭菌的方法筛得的复合菌系(RSS-4)比灭菌方法所得的复合菌系(RSS-4')腐解效果要好。因此, 本实验最终选取 RSS-4 作为研究对象。

C/N 值是检验肥料腐熟度的一个重要指标。一般来讲, 堆肥 C/N 值达到 20 以下, 就可以认为基本腐熟, 可以直接施用^[15–16]。腐解前的固体培养基

C/N 在 28 左右, 在经过 RSS-4 腐解的前 4 天内, 其比值迅速下降到 23.8, 此后的减小速度变慢, 12 d 后趋于平稳, 直到腐解完成后降至 18.6 (以上 C/N 数值用均数 ± 标准差表示), 说明腐解过程已经基本完成。其变化趋势如图 1 所示。

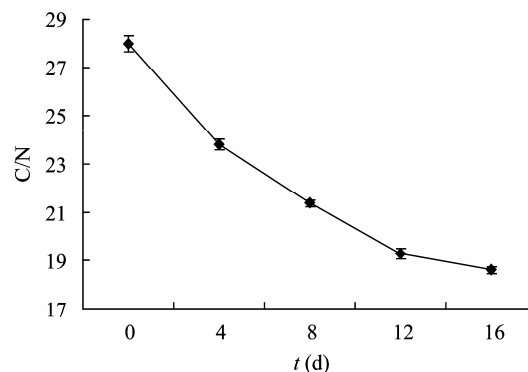


图 1 稻秆腐解过程中 C/N 变化

Fig. 1 Change of C/N during rice straw's decomposition

2.2 腐解过程中 pH 的变化

由图 2 可知, 固体培养基的初始 pH 偏酸, 在接种复合菌系 RSS-4 后的 4 d 内腐解产物的 pH 值从起始的 6.23 迅速升高到最高值 7.72, 4 d 后 pH 值开始下降, 这时腐解微生物开始起作用, pH 逐渐下降到 7.20 左右并趋于稳定。这与牛俊玲等^[4,17]所报道的复合系对稻秆分解过程中发酵液的 pH 先降后升的变化趋势正好相反。这很可能是由于开始时固体培养基中的 NH_4^+ 水解使得 pH 偏低, 随着微生物的加入及其对 NH_4^+ 的利用, 分泌的碱类物质得以积累, pH 值开始上升; 之后随着碱类物质被降解、菌种的更替及稻秆的腐解, pH 值逐渐下降并最终稳定在中性

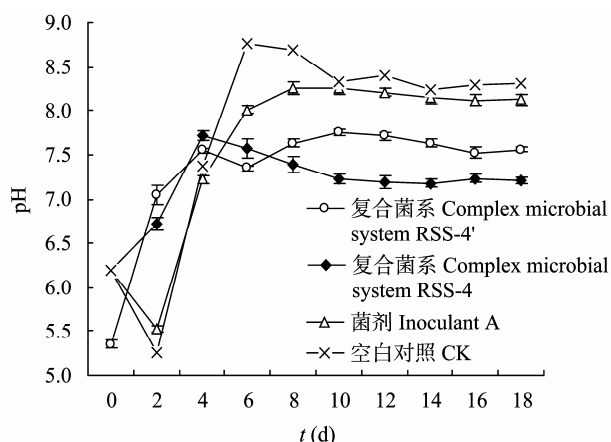


图 2 稻秆腐解过程中 pH 值的变化

Fig. 2 Change of pH during rice straw's decomposition

条件。RSS-4'腐解稻秆的 pH 变化趋势与 RSS-4 的基本相似,只是其最初的 pH 更低(5.35),最后稳定在 7.50 (以上 pH 数值用均数±标准差表示)附近,比后者的稍微高一些;而菌剂 A 和空白对照则与文献报道的基本相似,均经历了先降后升的变化趋势。

2.3 腐解过程中酶活的变化

RSS-4 腐解过程中用糖化力法每 48 h 测定一次纤维素酶活力,其 CMC 酶活的变化曲线如图 3 所示。由该图可知,CMC 酶活在腐解的整个过程中处于升降交替的变化之中,但是其总体趋势仍可认为是先高后低,最高酶活出现在第 16 天,为 0.90 U/g,之后迅速下降并趋于稳定。相比之下,RSS-4'、菌剂 A 和空白对照的变化要缓和许多,其最高值分别出现在 16 d (0.67 U/g)、14 d (0.49 U/g)、16 d (0.34 U/g)。

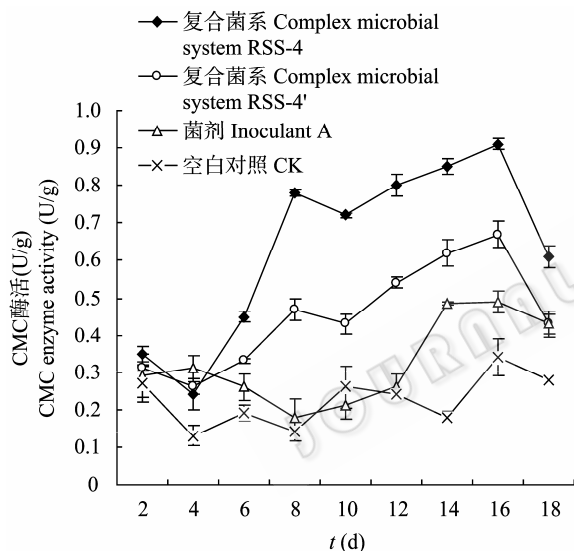


图 3 稻秆腐解过程中 CMC 酶活性变化

Fig. 3 Change of CMC activity during rice straw's decomposition

半纤维素酶活的变化曲线如图 4 所示。据图可知,其变化趋势也大致同 CMC 酶活及滤纸酶活,也呈现出先高后低的走势。它在腐解的 12 d 就达到最高酶活,为 3.40 U/g。而 RSS-4'、菌剂 A 和空白对照得最高值却出现在 12 d (2.35 U/g)、16 d (2.0 U/g)、16 d (1.30 U/g) (以上酶活数值用均数 ± 标准差表示)。

综上所述,无论是 CMC 酶活还是半纤维素酶活,复合菌系 RSS-4 在腐解过程中的最高值和平均值都要远大于 RSS-4'、菌剂 A 和空白对照。这说明了复

合系 RSS-4 不仅能够加速稻秆的腐解,并且采用未灭菌的方法筛得的复合菌系(RSS-4)比灭菌方法所得的复合菌系(RSS-4')和菌剂 A 腐解效果要好。

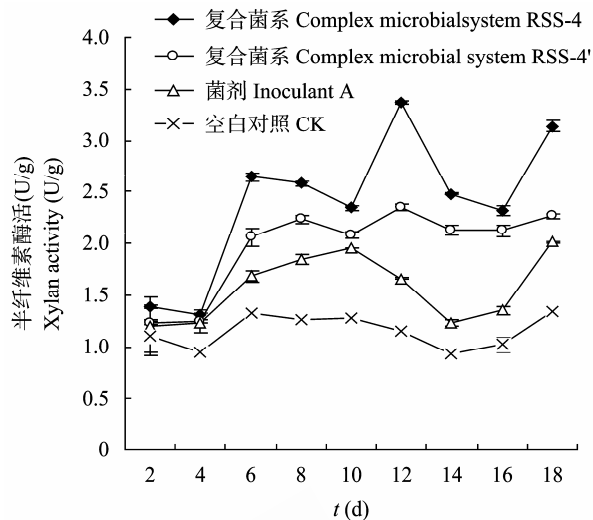


图 4 稻秆腐解过程中半纤维素酶活性变化

Fig. 4 Change of xylan activity during rice straw's decomposition

2.4 腐解进程中稻秆的重量变化

分别在处理培养的 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20 d 测定稻秆的分解率,结果如图 5 所示。在 20 d 的腐解过程中,稻秆干重从起始的 5.00 g 减少到 2.73 g,失重率达到了 45.4%;从图中还可看出,稻秆重量的减少主要发生在腐解的前 16 天,腐解到 16 d 时稻秆还剩余 2.75 g,重量减少 45.0%,平均每天减重 2.8%,此后几乎不再减少。由此可见,本实验中所构建的复合菌系 RSS-4 在腐解的前 16 d 内对稻秆的分解活性始终处于较高水平。

相比之下,RSS-4'从开始的 5.00 g 减少到 3.18 g,失重率为 36.4%;而菌剂 A 和空白对照只分别减少到 3.25 g、3.52 g(以上数值用均数 ± 标准差表示),失重率分别为 35.0%、29.6%。与后面的 3 个处理相比,接种 RSS-4 处理的失重率分别要多出 9.0%、10.4%和 15.8%。说明复合菌系 RSS-4 能够加速稻秆的腐解,并且其腐解的能力比 RSS-4'和菌剂 A 均有所增强。

2.5 腐解进程中稻秆内木质纤维素类物质含量的变化

分别对 RSS-4 不同腐解时间稻秆中的纤维素类、半纤维素以及木质素含量进行了测定。其结果如图 6 所示。

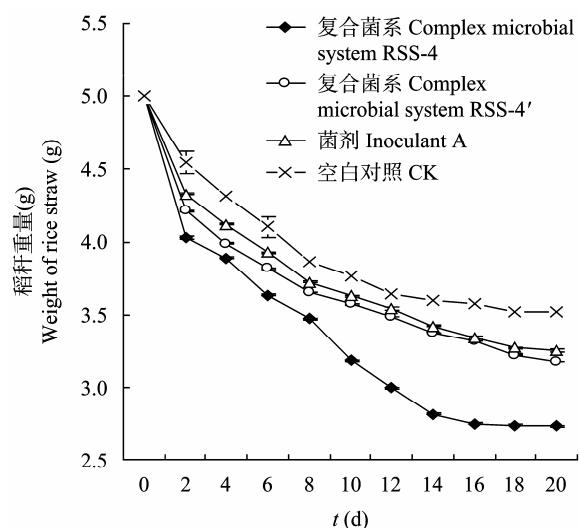


图5 腐解过程中稻秆重量的变化

Fig. 5 Change of the weight during rice straw's decomposition

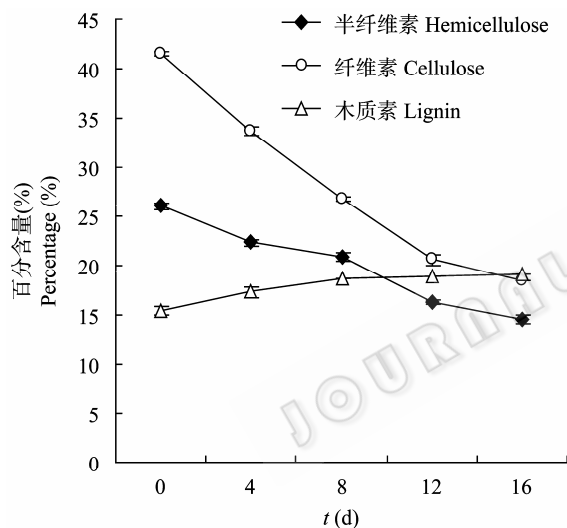


图6 腐解过程中木质纤维素类物质含量的变化

Fig. 6 The content changes of cellulose, hemicellulose and lignin during rice straw's decomposition

从该图可以看出, 纤维素和半纤维素含量在整个腐解过程中均逐渐减少, 而且二者均在发酵的前 12 天内降解速度最快, 其中前者的下降趋势比后者要大些。纤维素含量在前 12 天内下降了 50.0%, 而半纤维素下降了约 37.0%。12 d 后二者的下降趋势都开始变慢, 在发酵结束时纤维素的含量共减少了 55.5%, 半纤维素含量减少了 44.1% (以上数值用均值±标准差表示); 而木质素百分含量在整个发酵过程中呈上升趋势, 而且前 4 天随着稻秆重量的迅速减少, 纤维素和半纤维素的较快分解, 木质素的百

分含量上升速度也较快, 随后处于较为平缓的状态。这说明木质素在干稻秸中的绝对含量在腐解过程中有增无减。这表明该复合菌系对木质素几乎没有多少分解作用, 进一步验证了木质素的降解是最困难的。它们在腐解过程中的变化与牛俊玲等^[17]所报道的稻秆分解过程中木质纤维素类物质含量的变化趋势基本一致, 尤其是木质素含量的变化趋势更是相近。

3 结论

人们不断发现很多生物过程其实是一种微生物不能单独完成或只能微弱进行的, 必须依靠两种或两种以上的微生物来共同完成^[18]。农作物秸秆的腐解尤为如此。因此, 本研究突破传统的单一菌种纯培养筛选构建模式, 以成都平原多年还田的土壤为基础, 通过长期限制性培养、定向驯化及低温诱导, 筛选构建得到了一组复合菌系 RSS-4。稻秆腐解试验结果表明: pH 先升高后降低, 最后稳定在 7.20; 腐解过程中无论是 CMC 酶活还是半纤维酶活, 在最高值和平均值都要远大于 RSS-4'、菌剂 A 和空白对照; 而且在整个腐解过程中其对稻秆的降解率也要比后面 3 个处理下降的速度更快、幅度更大。同时还发现经过 16 d 的腐解后, 培养基的 C/N 从最初的 28.0 降到 18.6, 表明腐解已基本完成; 对稻秆、纤维素及半纤维素的降解率分别达到了 45.0%、55.5% 和 44.0%。所有这些结果都说明复合菌系 RSS-4 在中温条件下对未经处理的稻秆有很好的腐解效果。同时还发现 RSS-4 比 RSS-4' 和菌剂 A 具备更强的腐解效果。这很可能是由于稻秆中原本就含有一些对腐解有帮助的菌, 它们与复合菌系相互补充, 共同促进了稻秆的腐解。

鉴于秸秆腐解速度慢、腐解效果差已成为限制秸秆资源利用的瓶颈。目前, 研制开发理想的作物秸秆快速腐熟剂已成为微生物制剂的一个新热点。本文突破传统的筛选思路, 采用固体发酵的方式以及低温诱导的策略, 并结合未灭菌的筛选方法选育出一组能够在中温 (22℃) 条件下加速腐解水稻秸秆的复合菌系 RSS-4, 该复合菌系在稻秆腐解效果的稳定和速度方面具备了更为广泛的应用潜力和较好的发展前景, 下一步要做的就是进一步探索该复合菌系的作用机理和发酵参数以及多菌种混合培养的

规律,最终完成菌系的实验室小试及工艺优化,为其推广应用提供基础。

参 考 文 献

- [1] Kim S, Dale BE. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy*, 2004(26): 361–375.
- [2] 孙永明, 李国学, 张夫道, 等. 中国农业废弃物资源现状与发展战略. 农业工程学报, 2005, **21**(8): 169–171.
- [3] 曾木祥, 张玉洁. 秸秆还田对农田生态环境的影响. 农业环境与发展, 1997, **51**(1): 17.
- [4] 王蔚, 高培基. 褐腐真菌木质纤维素降解机制的研究进展. 微生物学通报, 2002, **29**(3): 90–93.
- [5] 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. 环境科学, 2002, **23**(3): 36–39.
- [6] 李为, 薛红蕾, 王江丽, 等. 一组高效棉秆降解菌复合系的构建及其降解特性研究. 新疆农业科学, 2009 **46**(1): 72–77.
- [7] 李文学. 南方水田麦秆分解菌复合系 WSS-1 的筛选及其菌群分析. 中国农业科学院硕士论文, 2009.
- [8] 李亚澜. 纤维素高效降解菌的分离鉴定及固态发酵条件研究. 西南交通大学硕士论文, 2005.
- [9] 鲍士旦. 土壤农化分析. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [10] Krishna C, Chandrasekaran M. Banana waste as substrate for a amylase production by *Bacillus subtilis* CBTK 106 under solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1996, **46**(2): 106–111.
- [11] 杨涛, 马美湖. 生物质降解酶酶活的测定方法. 中国酿造, 2006(11): 67–69.
- [12] 王玉万, 徐文玉. 木质纤维素固体基质发酵物中半纤维素、纤维素、木质素的定量分析程序. 微生物学通报, 1987, **14**(2): 81–84.
- [13] 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. 上海畜牧兽医通讯, 2001(2): 15.
- [14] 杜甫佑, 张晓昱, 王宏勋. 木质纤维素的定量测定及降解规律的初步研究. 生物技术, 2004, **14**(5): 46–48.
- [15] 刘另更. 中国有机肥料. 北京: 中国农业出版社, 1991: 38–59.
- [16] Golueke CG. Principles of biological resource recovery. *Biocycle*, 1981(22): 36–40.
- [17] 牛俊玲, 崔宗均, 李国学, 等. 高效纤维素分解菌复合系的筛选构建及其对秸秆的分解特性. 农业环境科学学报, 2005, **24**(4): 795–799.
- [18] 冯树, 张忠泽. 混合菌——一类值得重视的微生物资源. 世界科技研究与发展, 2001, **22**(3): 44–47.

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年,是中国微生物学会和中国科学院微生物研究所主办,国内外公开发行,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:基础微生物学研究;农业微生物学研究;工业微生物学研究;医学微生物学研究;食品微生物学研究;环境微生物学研究;微生物功能基因组研究;微生物蛋白质组学研究;微生物模式菌株研究;微生物工程与药物研究;微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中国生物科学类核心期刊。曾获国家级优秀科技期刊三等奖,中国科学院优秀科技期刊三等奖,北京优秀科技期刊奖,2000 年再获中国科学院优秀期刊三等奖,2001 年被选入新闻出版署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

自 2008 年本刊已经全新改版,由双月刊改为月刊,更换了彩色封面,纸张改用铜版纸,由原来的小 16 开本改为标准大 16 开本 (210×297),发表周期缩短,内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买,2011 年的每册定价为 48 元,全年 576 元,我们将按期免费邮寄。

另,本刊编辑部现存有少量过期期刊,如有需要者可直接与编辑部联系,款到即免费寄上。(请事先与编辑部联系,获悉每册售价。敬请在汇款单上注明所购刊物的年代、卷、期和数量)

邮购地址: (100101)北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn, bjb@im.ac.cn; 网址: <http://journals.im.ac.cn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: BM413