

小麦秸秆高效腐解菌复合系 WSS-1 的 选育及其菌群分析

李文学, 李 力, 李 俊*, 沈德龙, 姜 昕

(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和温度梯度诱导法, 从四川成都平原多年还田的土壤中筛选得到了常温条件下对小麦秸秆具有高效腐解功能的复合菌系 WSS-1。该复合菌系在 28℃、4d 可完全崩解滤纸, 进一步的腐解麦秆的试验结果表明: 接种 WSS-1 处理在第 6 天左右达到 CMC 酶活最高值, 这比目前广泛使用的菌剂 A 提前了 4d; 经 WSS-1 腐解 20d 后的麦秆断裂拉力值下降了 73.66%, 降低幅度分别比空白对照和菌剂 A 处理多出 33.7% 和 8.9%。采用 16S rDNA 克隆文库法对其细菌组成进行解析, 结果表明 WSS-1 的优势菌群为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、球形芽孢杆菌 (*Bacillus sphaericus*)、粪产碱菌 (*Alcaligenes faecalis*) 双酶梭菌 (*Clostridium bifermentans*) 和粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*)。

关键词: 微生物复合系; 小麦秸秆; 腐解; 16S rDNA

Screening and bacterial composition analysis of a complex microbial system WSS-1 for high efficiently decomposition of wheat straws

LI Wenxue, LI Li, LI Jun*, SHEN Delong, JIANG Xin

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

Abstract: A complex microbial system (CMS) WSS-1 was screened and domesticated from the soils which had a long term straw-returning to fields in Sichuan Province using the restricted cultivation and gradient-temperature induction methods. The WSS-1 could completely decompose filter paper within 4d at 28℃ implying that it had the potential of degrading wheat straw under natural condition. The peak of cellulase production by WSS-1 appeared in the sixth day of the wheat straw decomposition experiments, four days earlier than that treated with the widely used Inoculant A. The tension value at breakpoint of wheat straws treated by WSS-1 could decrease by 73.66% after 20d, which was about 33.7% and 8.9% less than that of the control and the Inoculant A treatment, respectively. The bacterial composition of WSS-1 was analyzed by using 16S rDNA clone library method. The dominant communities of WSS-1 were *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus*, *Alcaligenes faecalis*, *Clostridium bifermentans* and *Enterococcus faecium*.

Key Words: complex microbial system; wheat straw; decomposition; 16S rDNA

农作物秸秆是重要的生物资源, 全世界每年秸秆产量约为 22 亿 t^[1], 其中我国每年的作物秸秆产量达到了 7 亿多吨^[2], 接近世界总量的 1/3。以前, 在我国农村能源短缺情况下, 大部分秸秆被农民用作燃料。但随着农村经济的发展和农村能源问题的解决, 秸秆已不再作为主要燃料。目前, 秸秆成为资源循环利用和环境保护中必须要解决的主要问题之一。否则, 焚烧秸秆造成的浪费资源、污染环境、危害人们的身体健康、影响陆路交通和飞行安全^[3-5]的事件将屡禁不止, 频繁发生。

农作物秸秆中含有大量有机质、氮、磷、钾和微量元素, 通过微生物的腐解将其腐殖质化, 为农田提供大量

基金项目: 国家科技支撑资助项目 (2006BAD25B04); 中央级公益性科研院所科研业务费专项资助项目 (2008-10)

收稿日期: 2008-11-27; **修订日期:** 2009-02-11

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: jli@caas.ac.cn

优质的有机肥料,增加土壤有机质和土壤肥力。秸秆还田利用是解决秸秆资源化、无害化、变废为宝的途径,具有很好的经济效益、环境效益和社会效益^[6]。近几年推行的秸秆直接还田是节省劳动力、大量消耗利用秸秆的新模式,已成为一项重要的农业推广技术,并且能提升土壤有机质含量和土壤肥力^[7]。但在自然条件下,由于秸秆组成结构的稳定,分解腐熟的速度较慢,在水田、旱地和林地中秸秆 1a 的腐解残留率分别只有 57.74%、47.83% 和 52.38%^[8],所以大量秸秆直接还田后会影响到下茬作物发芽、生长发育和病虫害发生,导致作物产量的降低。因而在传统的农业耕作实践中,只能少量秸秆直接还田。若将大量的秸秆先堆置腐熟后施入农田,因需要较多的劳力和较繁琐的过程,推广难度较大。因此,研究和应用秸秆腐熟菌剂成为秸秆直接还田的关键。

本文针对我国长江流域冬小麦收获与下茬水稻间茬口时间紧、需要加速小麦秸秆腐解的实际问题,采用限制性外淘汰与温度梯度诱导法从成都平原连续秸秆还田 10a 的土壤中,筛选对小麦秸秆腐解效果好的复合菌系,并通过 16S rDNA 克隆文库法分析其菌群组成,为该腐熟菌复合系的生产与开发应用提供基础。同时,通过本文的研究为筛选新型腐熟菌剂提供一条新的思路。

1 实验方法

1.1 材料

1.1.1 材料来源

土壤样品及在腐解秸秆样品取自四川双流、大邑、温江、中江等地区全量免耕还田 3—4a 不同生境的田块,取 0—20cm 耕层土壤及腐解中的秸秆,尽快运至实验室 4℃ 存放,得到土壤样品 12 个。

1.1.2 复合菌系筛选培养

纤维素-蛋白胨培养基(PCS),其成分为 0.5% 蛋白胨、0.5% 麦秆粉末(过 60 目筛)、0.5% NaCl、0.2% CaCO₃、0.1% 酵母粉,自然 pH,使处于 DO 为 0.02—0.4mg/L 的微好氧状态,静置培养。

1.2 筛选构建复合系 WSS-1 方法

在本试验设计的限定条件下,先进行复合系的效果筛选,再逐步进行降温诱导驯化程序来构建所需的复合系。

(1)分别将上述采集不同地点的土样 100g 加入 300ml 的 PCS 培养基中,45℃ 恒温静置培养;从中选取滤纸崩解较快、颜色变化明显的处理,再进行传代培养;传代培养按体积分数 5% 接种量接入下一级 PCS 培养基进行,直至得到可在 7d 内将滤纸崩解的菌系组合。

(2)将筛选得到的腐解效果较好的菌系相互混合,仍按(1)的筛选过程操作,直至获得腐解效果稳定、4d 内将滤纸崩解的菌系组合^[9]。

(3)将上述筛选得到的腐解菌系以每次降低 2℃ 的梯度培养,进行以上筛选操作。使其能在较低的温度下保持一定的腐解效果。从而筛选得到 28℃ 条件下可在 4d 内将滤纸崩解的复合菌系 WSS-1。

1.3 复合系 WSS-1 腐解麦秆效果测定

以 CMC 纤维素酶活性和麦秆断裂拉力值指标评价复合菌系的效果,同时测定腐解过程 pH 值的变化。

称取麦秆 500g,按麦秆:水(质量比) = 1:5 进行浸泡,接种 1% 的 WSS-1 复合系菌液,在 28℃ 的恒温箱中进行腐解,腐解周期 20d,每隔 48h 取样,测定 CMC 纤维素酶活性、麦秆断裂拉力值和 pH 值。以不接复合系 WSS-1 作空白对照和以市场应用最广的菌剂 A 作为比对。羧甲基纤维素酶(CMC)的活力测定参照文献^[10-11]。

测定麦秆的断裂拉力值的操作如下:在腐解过程中第 0、5、10、15、20d 取样,每次取相同部位的秸秆测定 20 次,取其平均值(采用山度 SH-500 型数字显示拉力计测定麦秆断裂的拉力值,单位牛顿(N))。

1.4 复合系 WSS-1 16S rDNA 克隆文库的构建

1.4.1 总 16S rDNA 全长扩增

WSS-1 复合系总 DNA 提取参照文献^[12],总 16S rDNA 全长扩增按文献^[13]进行。扩增引物分别为 P0:

5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; P6: 5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'。25 μ l 的 PCR 扩增体系为: 10 $\times$ buffer (Mg^{2+}) 2.5 μ l, dNTP (2.5 mmol/L) 2.0 μ l, 引物 (浓度 10 μ mol/L) 各 1 μ l, Taq 酶 (2.5 U) 0.25 μ l, 稀释模板 1 μ l, ddH₂O 补足至 25 μ l。

1.4.2 克隆文库的构建

割胶纯化 PCR 产物, 与 pMD19-T 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 涂板, 37 $^{\circ}$ C 培养 12h 后, 挑取阳性克隆子, 用限制性内切酶 *Hinf* I 和 *Rsa* I 分型, 每个酶切类型挑取一个代表菌株进行测序, 用 DNA Man、Gene Tool 等软件对测序结果进行编辑、分析, 序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST 同源性检索后下载同源序列。

2 结果与分析

2.1 复合系 WSS-1 的筛选

从四川不同来源的 12 个土壤样品经过 PCS、45 $^{\circ}$ C 条件静止培养, 各处理间的颜色和滤纸崩解速度表现出差异。滤纸崩解最快的处理出现在第 3 天, 颜色变化明显; 而崩解慢的处理在 12d 时, 颜色变化不明显。选取滤纸崩解较快、颜色变化明显的处理进行后续的传代培养, 直至得到能在 4d 内使滤纸崩解的一组复合菌系。将该腐解菌系以每传 2—3 代降低 2 $^{\circ}$ C 的梯度进行诱导培养, 滤纸崩解速度要求稳定在 4d 内。最终筛选得到可在 28 $^{\circ}$ C、4d 下将滤纸完全崩解的复合菌系, 且连续传代后的效果稳定, 复合菌系命名为 WSS-1。

2.2 复合系 WSS-1 麦秆腐解效果

2.2.1 羧甲基纤维素酶活力变化

由图 1 可知, 以麦秸为底物, 复合菌系 WSS-1、菌剂 A 处理和不加菌对照的 CMC 酶活性变化均呈现由低到高再降低的趋势。各处理的酶活变化如下: 复合菌系 WSS-1 在第 6 天左右达到最高值 84.1U, 菌剂 A 在 10d 左右达到最高值 40.2U, 对照在 12d 左右达到最高值 23.4U (酶活数值用均数 $\pm$ 标准差表示), 表明复合菌系 WSS-1 在腐解速度和强度上都优于目前广泛使用的菌剂 A。

2.2.2 pH 值的测定

由图 2 可知, 在腐解麦秸的过程中, 复合系 WSS-1 在 1—6d 中的腐解液 pH 值持续上升, 而在 6—12d 中其 pH 值开始下降, 12d 之后其 pH 值趋于稳定, pH

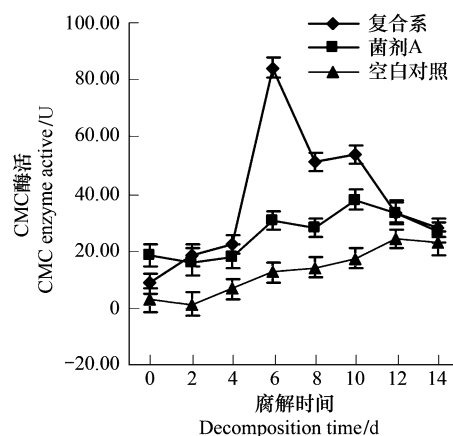


图 1 麦秆腐解过程中 CMC 酶活性变化

Fig. 1 CMC activity's changing during wheat straw's decomposition

值维持在 7.3 附近。说明在 1—6d 的腐解前期阶段, 菌株产生和积累碱类物质; 随着秸秆的进一步腐解, 可能是纤维素类大分子被持续降解成为可直接利用的单糖小分子, 产生有机酸类, 导致在 6d 之后的 pH 值持续下降, 直至 12d 时腐解过程趋于稳定。而菌剂 A 则与 WSS-1 相反, 1—6d pH 值则持续下降, 6d 后 pH 值稳定在 6.5—6.3。从麦秸腐解过程中 pH 的变化可以看出复合系 WSS-1 的代谢类型完全不同于菌剂 A。空白对照处理由于没有加任何微生物, 所以 pH 值无明显变化。

从图 2 还可以看出, 应用腐解菌系后第 6—12 天是麦秸腐解过程的重要阶段, 腐解液的 pH 的逐渐下降反映出菌系的代谢较为活跃。

2.2.3 麦秆的断裂拉力值的测定

随着麦秸的腐解, 麦秸的抗拉强度也会降低, 因此测定麦秸断裂时的所需拉力值就能较好地表征麦秸的腐解程度。将各腐解处理中麦秸断裂拉力随处理时间绘制图 3。由图 3 可知, 复合系 WSS-1 经过 20d 的腐解过程, 麦秆的断裂拉力值从最开始的 88N 减小到 23N, 降低幅度达到 73.66%, 而菌剂 A 从开始的 88N 减小到 31N, 降低幅度为 64.75%, 空白对照从 88N 减小到 53N, 降低幅度仅有 39.92%。与空白对照和菌剂 A 相比, 接种 WSS-1 的降低幅度分别多出 33.7% 和 8.9% (以上断裂拉力数值用均数 $\pm$ 标准差表示)。测定结果说明

复合系 WSS-1 能够明显加速麦秆的腐解。

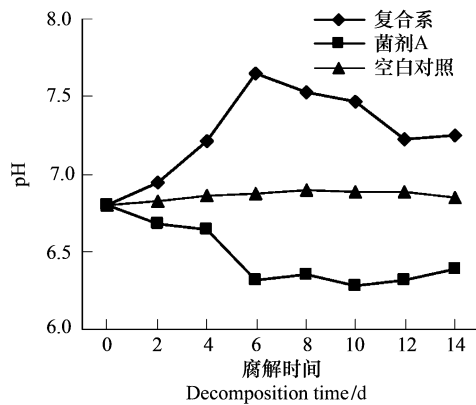


图2 麦秆腐解过程中 pH 值的变化

Fig. 2 pH changes during wheat straw's decomposition

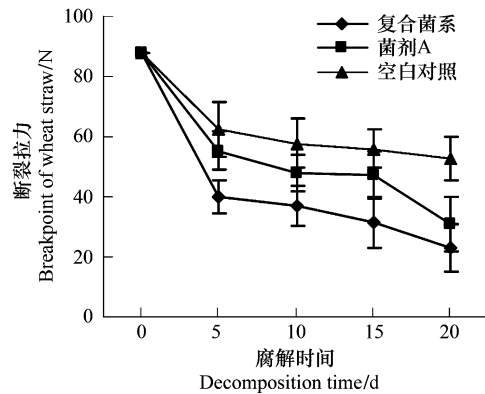


图3 麦秆腐解过程中麦秆断裂所需拉力的变化

Fig. 3 The changes of breaking power of wheat straw during decomposition

2.3 复合系 WSS-1 的 16S rDNA 克隆文库分析

对随机挑取复合系 WSS-1 的 142 个阳性克隆采用限制性内切酶 *Hinf* I 和 *Rsa* I 进行酶切,共得到 26 个酶切类型。图 4 和图 5 分别为 *Hinf* I 和 *Rsa* I 部分酶切分型图。图 4 中泳道 1、2、3、5、10、11 的酶切类型一致;泳道 6、9、12 酶切类型一致;其它 3 个泳道各代表一个酶切类型。图 5 是 *Hinf* I 酶切条带一致的菌株,再经 *Rsa* I 酶切后得到的 3 种图谱类型,分别是泳道 1、3、7、9、10、11 为相同的酶切类型,泳道 2、4、5、8、12 为同种类型;泳道 6 代表另一种类型。综合 *Hinf* I 和 *Rsa* I 酶切带型,可以确定泳道 1、3、10、11 为相同酶切类型,泳道 2、5 为相同酶切类型,其它泳道各代表一个酶切类型。

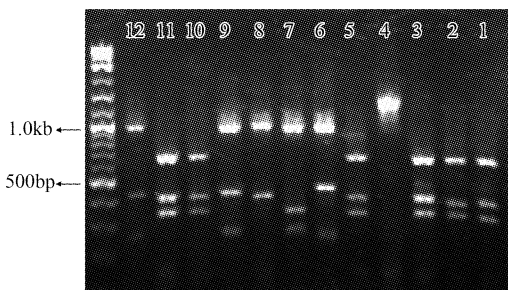


图4 部分样品的 *Hinf* I 酶切图谱

Fig. 4 Results of partial digested sample's by *Hinf* I

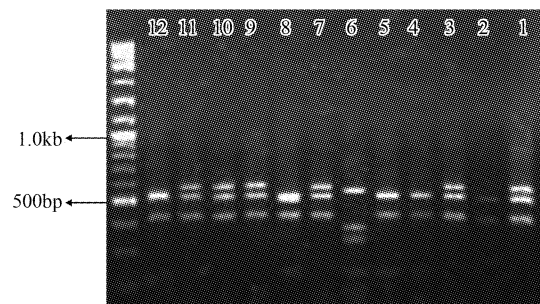


图5 部分样品的 *Rsa* I 酶切图谱

Fig. 5 Results of partial digested sample's by *Rsa* I

每个酶切类型挑取 1 个代表克隆子进行测序,测序结果在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对,将序列比对结果相同的克隆子定义为一个操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU)。复合系 WSS-1 一共得到 16 个 OTU。主要 OTU 所含克隆子数目及其相似性菌株如表 1 所示。

由表 1 结果可知,复合系 WSS-1 中的克隆子于 GenBank 数据库中已知细菌的 16S rDNA 序列相似性最高的为 99%,最低的为 94%;表中所示的 OTU1—OTU7 的克隆子数最多,为克隆文库中优势菌株,其菌种分别是 *Bacillus subtilis*, *Clostridium* sp., *Bacillus sphaericus*, *Alcaligenes faecalis*, *Clostridium bifermentans*, *Enterococcus faecium* 和 *Bacillus* sp.;经分析一共得到的芽孢杆菌属的克隆子有 47 个,占库容总量的 33.11%;属于梭菌属的克隆子有 33 个,占库容总量的 23.25%;属于粪产碱菌的克隆子有 13 个,占库容总量的 9.16%;属于粪肠球菌的克隆子有 11 个,占库容总量的 7.75%。另外还有 6 个 OTU 分别属于 *uncultured bacterium clone*、*Bordetella* sp.、*flavobacterium* sp.、*Bacterium* sp.、*Escherichia coli*、*Brevundimonas* sp. 分属于上述 6 类的克隆子数量分别是:9、8、6、8、3 和 2 个,它们分别占克隆文库库容总量的 6.34%、5.63%、4.23%、5.63%、2.11% 和

1.41%。其余为只有 1 个克隆子的 *Bacillus fusiformis* 和 *Enterococcus*, 它们只占克隆文库库容总量的 0.7%。

表 1 16S rDNA 克隆文库法分析复合系 WSS-1 主要细菌组成

Table 1 The bacteria composition of WSS-1 by using 16S rDNA clone library method

操作分类单元 Operational taxonomic unit	各 OUT 克隆子数 Clones number of the OTU	最相似菌株 (NCBI 登录号) Max ident strain (accession number of NCBI)	各 OTU 百分比/% Percent of OTU	相似性/% Max ident
OTU1	20	<i>Bacillus subtilis</i> (EF491625)	14.09	99
OTU2	20	<i>Clostridium</i> sp. (AB114263)	14.09	98
OTU3	18	<i>Bacillus sphaericus</i> (DQ286315)	12.68	99
OTU4	13	<i>Alcaligenes faecalis</i> (AY548384)	9.16	99
OTU5	13	<i>Clostridium bifermentans</i> (AF320283)	9.16	94
OTU6	11	<i>Enterococcus faecium</i> (AJ276355)	7.75	99
OTU7	9	<i>Bacillus</i> sp. (EU584552)	6.34	99

3 讨论

研究表明,仅接种某一单株菌对农作物秸秆的腐解效果不理想,尤其是在田间应用效果尤不稳定,因此,需要多种微生物共同参与和协同作用才能取得较好的腐解效果^[11]。基于此,本文未采用传统的纯培养分离方法,而是以来自不同生境条件的自然菌群为基础,以秸秆拉力强度变化、酶活等能直接反应秸秆腐解程度的参数为筛选指标,通过连续限制性培养和降低温度诱导的定向驯化,筛选得到了复合菌系 WSS-1。腐解麦秆试验结果显示:复合菌系 WSS-1 在腐解过程中的第 6 天左右 CMC 酶活即达到最高值,比目前市场中广泛使用的菌剂 A 提前了 4d,而且在整个腐解过程中麦秆的断裂拉力值也比空白对照和菌剂 A 处理下降的要快。试验证实筛选得到的复合菌系 WSS-1 在常温条件下对麦秆腐解具有较好效果。

本文采用构建 16S rRNA 基因克隆文库的方法对复合菌系 WSS-1 进行了菌群分析,揭示出复合系 WSS-1 中的优势菌群为:*Bacillus subtilis*、*Bacillus sphaericus*、*Alcaligenes faecalis*、*Clostridium bifermentans* 和 *Enterococcus faecium*。16S rRNA 克隆文库通过扩增各种细菌共有基因序列片段对细菌的有无及相对数量进行分析,以广泛用于环境样品的细菌多样性研究^[14-16]及其检测分析。16S rRNA 基因克隆文库分析菌群有其独特的优势,能够较准确地反映样品中细菌的存在情况,尤其是那些目前尚不可培养的细菌菌群。但该方法也存在成本较高、重复性不好等不足。随着 16S rRNA 技术不断改进和提高,该方法必将成为细菌群体结构研究的有力工具,并得到广泛应用。

近年来随着对耕地质量的关注,秸秆的利用变得越来越重要。国内外学者对秸秆的利用作了大量研究和试点示范工作。在多种秸秆利用方式中,目前我国最可行的方式是秸秆直接还田。鉴于我国复种指数高、茬口紧的现状,如何加速秸秆腐熟成了秸秆直接还田的瓶颈。目前大量商业化应用的腐熟菌剂产品均存在田间腐熟效果不稳定和腐解速度不快等缺点。本文筛选得到的复合菌系 WSS-1 对麦秆腐解效果的稳定和速度方面具备了应用的潜力和较好的前景,下一步需要在复合系主要菌种作用机理、发酵生产和田间应用方面加强研究,为该复合系的推广应用提供基础。

References:

- [1] Kim S, Dale B E. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy*, 2004, 26:361-375.
- [2] Sun Y M, Li G X, Zhang F D, Shi C L, Sun Z J. Status quo and developmental strategy of agricultural residues resources in China. *Transactions of the Chinese Society of Agriculture Engineering*, 2005, 21(8):169-171.
- [3] Shi L, Zhao Y C, Chai X L. Comprehensive Utilization Techniques Progress of Crop Straws in China. *China Biogas*, 2005, 23(2):11-14.
- [4] Liu L X, Wu C Z, Hong W, Li J, Cai B L, Lin S W. Advances in comprehensive utilization of crop straw. *Subtropical Agriculture Research*, 2006, 2(1):75-80.
- [5] Kong L G, Jiang X L. Exploration and the Significance of Biomass Utilization in China. *Forum on Science and Technology in China*, 2007, 9:100-

104.

- [6] Chen Z. Screening and mixed culturing of cellulose decomposition microbes in the straw composing. Beijing: China Agriculture University, 2005: 1-2.
- [7] Zhang Q Z, Wu W L, Lin G H. Effect of wheat residue amendment on carbon sequestration in high-yielding region in the North China Plain. Journal of Liaoning Technical University, 2006, 25(5): 773-776.
- [8] Wang A L, Gao W S, Huang J Y. Study on the ecological effect of returning stalks into soil with different methods. Journal of China Agricultural Resources and Regional Planning, 2000, 21(2): 41-45.
- [9] NIU J L. Construction and Application of a High Efficient Complex Microbial System to Degrade Cellulose-Lindane during Composting. Beijing: China Agriculture University, 2005: 25-26.
- [10] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, 1959, 31: 426-428.
- [11] Horikoshi K, Nakao M, Kuroso Y, Sashihara N. Cellulase of an alkalophilic bacillus strain isolated from soil. Canadian Journal of Microbiology, 1984, 30: 774-779.
- [12] Gao P P, Zhao L P. DNA Extraction from Activated Sludge for Molecular Community Analysis. Acta Ecologica Sinica, 2002, 22(11): 2015-2019.
- [13] Di Cello F, Bevivino A, Chiarini L, Fani R, Paffetti D, Tabacchioni S, Dalmasi C. Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63: 4485-4493.
- [14] Pace N R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. Science, 1997, 276(5313): 734-740.
- [15] Winker S, Woese C R. A definition of the domains Archaea, Bacteria and Eucarya in terms of small subunit ribosomal RNA characteristics. Systematic and Applied Microbiology, 1991, 14(4): 305-310.

参考文献:

- [2] 孙永明, 李国学, 张夫道, 施晨璐, 孙振钧. 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] 石磊, 赵由才, 柴晓利. 我国农作物秸秆的综合利用技术进展. 中国沼气, 2005, 23(2): 11-14.
- [4] 刘丽香, 吴承祯, 洪伟, 李键, 莱冰玲, 林淑伟. 农作物秸秆综合利用进展. 亚热带农业研究, 2006, 2(1): 75-80.
- [5] 孔令刚, 蒋晓岚. 生物质及其开发利用的价值与意义. 中国科技论坛, 2007, 9: 100-104.
- [6] 陈展. 秸秆堆肥中纤维素降解菌的筛选及组合. 北京: 中国农业大学, 2005: 1-2.
- [7] 张庆忠, 吴文良, 林光辉. 小麦秸秆还田对华北高产粮区碳截留的作用. 辽宁工程技术大学学报, 2006, 25(5): 773-776.
- [8] 王爱玲, 高旺盛, 黄进勇. 秸秆直接还田的生态效应. 中国农业资源与区划, 2000, 21(2): 41-45.
- [9] 牛俊玲. 堆肥中高效降解纤维素-林丹复合菌系的构建及应用. 北京: 中国农业大学, 2005: 25-26.
- [12] 高平平, 赵立平. 可用于微生物群落分子生态研究的活性污泥总 DNA 提取方法研究. 生态学报, 2002, 22(11): 2015-2019.