牛粪降解优良菌株的筛选及发酵剂配方的优化

杨 莹,来航线,陈 雄,王旭东
(西北农林科技大学 资源环境学院,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 为了有效处理牛粪等高纤维废弃物,从牛粪发酵基质中分离分解纤维素优良的菌株,同时对筛选出的高产纤维素酶活菌株进行初步鉴定和发酵剂配方中氮源(棉粕、豆粕和尿素)的优化。结果表明,从牛粪堆腐发酵基质中分离出 22 株降解纤维素能力较强的菌株;依据综合性状从中优选出优良菌株 Z5 和 Z8,初步鉴定其均为曲霉属真菌;在 3 个发酵剂配方中发酵培养 72～96 h 时,Z5 在以棉粕为氮源的配方中有效菌数含量最高,而 Z8 在 3 个配方中的有效菌数差别不大,两菌株在 3 个配方中的有效菌数量均达到 10^{14} 数量级;在以棉粕为氮源的配方中,菌株 Z5 和 Z8 均可获得最高的羧甲基纤维素酶活,其中 Z5 发酵培养 72 h 羧甲基纤维素(CMC)酶活最高,达 4 463.57 μg/(g·min),Z8 在发酵培养 96 h 时 CMC 酶活最高,达到 3 265.67 μg/(g·min)。综合菌株生长状况得出,菌株 Z5 和 Z8 均可作为降解畜禽粪便发酵剂的优良生产菌株,棉粕是较为理想的固体发酵氮源。

[关键词] 纤维素分解菌;菌株筛选;纤维素酶活;发酵剂
[中图分类号] X713 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2007)12-0125-04

Selection of high efficient strains for decomposing cow manure and the optimization of fermentation formula

YANG Ying, LAI Hang-xian, CHEN Xiong, WANG Xu-dong
(*College of Resources Environment, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*)

Abstract: In order to deal with high fibre wastes such as cow manure effectively, superior cellulose decomposing strains were isolated from cow manure fermentation substrate. The selected high activity cellulase of strains were identified and the nitrogen source(cottonseed meal, soybean meal, urea) of the components of the starter were optimized. The results showed that 22 strains that could degrade cellulose effectively were isolated from cow manure fermentation substrate. Z5 and Z8 were screened according to comprehensive characters and were identified as Aspergillus preliminarily. Fermented and cultivated 72－96 h continuously in the starters with three different nitrogen source respectively, there was the highest content of active bacteria in the cottonseed meal for Z5, while for Z8 there were small differences among the three starters. And the contents of active bacteria of the two strains all reached 10^{14}. The highest carboxymethyl cellulose activity was acquired in the starters with cottonseed meal as nitrogen source. When Z5 was cultured 72 h, the carboxymethyl cellulose activity was the highest and could attain to 4 463.57 μg/(g·min), while for Z8 was 96h, it reached 3 265.67 μg/(g·min). In conclusion, Z5 and Z8 can be used as superior strains for degrading animal manure, and cottonseed meal is the ideal nitrogen source of solid fermentation.

Key words: cellulose decomposing microorganisms; selection of strains; cellulase activity; fermentation

* [收稿日期] 2006-11-22
[基金项目] 陕西省科技攻关项目(2003K02-G13-02)
[作者简介] 杨 莹(1981－),女,江苏徐州人,在读硕士,主要从事土壤化学研究。E-mail:yangying20010228@163.com
[通讯作者] 来航线(1964－),男,陕西礼泉人,副教授,硕士生导师,主要从事微生物资源利用与微生物生态研究。

随着规模化养殖业的扩大、人民生活水平的提高以及环保意识的逐渐增强，进行畜禽粪便的堆肥化处理、资源化利用和商品化生产，防止和消除集约化养殖厂畜禽粪便的污染，为农业生产提供优质高效的有机肥源，是我国绿色食品、有机食品和生态农业持续发展的需要。为了有效处理牛粪等高纤维废弃物，充分利用可再生性资源，国内外对微生物分解转化纤维素的研究极为重视[1-2]。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，还能够变废为宝，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[3]。目前，虽然一些学者对畜禽粪便堆肥的工艺条件、影响因素、应用效果等方面进行了研究[4-6]，但对较难降解的牛粪堆肥研究得还较少。因此，本研究从牛粪自然堆肥中筛选出好氧纤维素分解菌，并研制高效发酵剂，旨在为有效处理牛粪等高纤维类废弃物提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 *供试样品* 堆腐牛粪发酵基质采自陕西杨凌奶牛良种繁育中心，用以从中分离并筛选纤维素分解优良菌株。对照菌株 A8 和 H8 为羧甲基纤维素(CMC)酶活较高的真菌，由西北农林科技大学资源环境学院薛泉宏教授提供。

1.1.2 *发酵原料* 麦草、麸皮、棉粕、豆粕和尿素，均由西北农林科技大学畜牧良种场提供。

1.1.3 *培养基* 纤维素分解菌株筛选培养基[7]采用纤维素刚果红培养基和稻草粉固态培养基(称取秸秆粉 2 g、麸皮 1 g，装于 200 mL 的罐头瓶中，加营养盐溶液 7.5 mL(pH 调至 5 左右))。营养盐溶液为 10 g/L 硫酸铵、0.5 g/L $CaSO_4$ 和 5.0 g/L 磷酸钙的混合溶液，0.1 MPa 灭菌 1 h。

1.2 方 法

1.2.1 *纤维素分解优良菌株的分离与筛选*[8] 微生物分离采用稀释平板法，其中真菌用 PDA 培养基进行分离，细菌用牛肉膏蛋白胨培养基分离，放线菌用高氏培养基分离。将分离获得的菌株采用点接法接种于纤维素刚果红平板培养基上，28 ℃下培养 72 h，记录菌落直径(d_2)及在其周围产生的透明圈直径(d_1)，并以两者比值(r)的平均值表示其分解强度，以筛选出分解能力较强的菌株。

1.2.2 *酶液的制备*[8] 采用稻草粉固态培养基接种供试菌株进行发酵，于 28 ℃下培养 72 h 后取样，并于 40～50 ℃下烘干获干酶曲，粉碎备用。向干酶曲中加 10 倍蒸馏水，搅拌，于 40 ℃水浴锅中保温 45 min，用脱脂棉过滤入离心管中，离心取上清液备用。每处理重复 2 次。

1.2.3 *CMC 酶活的测定* CMC 酶活采用 DNS(3,5-二硝基水杨酸)法测定[8]。在 pH 5.0、40 ℃条件下，1 g 纤维素酶曲在 1 min 内水解 CMC 生成 1 μg 葡萄糖的酶活性，定义为 1 个酶活力单位。

1.2.4 *高活纤维素酶产生菌株的初步鉴定* 依据微生物的形态及培养特征进行初步鉴定[9]。

1.2.5 *固体发酵剂配方的优化* 采用固体发酵法优化发酵剂配方。依据经验配方，在碳源确定时，不同种类有机氮源(棉粕和豆粕)的添加量宜为质量分数 4%～6%[10]。据此本试验设计 3 个配方(表 1)，分别于培养 48，72，96 和 120 h 测定微生物数量和 CMC 酶活，以衡量发酵剂配方的优劣。

表 1 3 个固体发酵剂的配方组成

Table 1 Content of fermentation formula

编号 Code	麦草粉/g Straw powder	麸皮/g Bran	棉粕/g Cotton seed meal	豆粕/g Soybean meal	尿素/g Urea	营养盐/mL Nutrition salt
1	2	0.5	0.5	0	0	7.5
2	2	0.5	0	0.5	0	7.5
3	2.4	0.6	0	0	0.005	7.5

2 结果与分析

2.1 纤维素分解菌株的分离与筛选

从供试牛粪发酵基质中共分离出 22 株降解纤维素能力较强的微生物，其中放线菌 7 株，编号为 F1～F7，以链霉菌为主，有 1 株为小单胞菌；真菌 10 株，编号为 Z1～Z10，以曲霉为主，包括青霉和木霉；细菌 5 株，编号为 X1～X5，均为芽孢菌。

由于本试验中真菌的初筛结果明显优于细菌和放线菌，故将以上 10 株真菌接种于纤维素刚果红平板培养基上进行复筛，于 28 ℃下培养 72 h，测定其 r 值，结果见表 2。

一般地，r 值越大，菌的产酶能力也就越强[11]。从表 2 可以看出，10 株真菌的产酶能力均较高，其中菌株 Z7 分解纤维素的能力最强，r 平均值为 2.34，其次为菌株 Z10、Z2 和 Z6，r 平均值均达 2.0

以上。

表 2　自牛粪发酵基质中分离的 10 株真菌的 r 值

Table 2　r value of experiment strains separated in ferment substrate

菌株代号 strain number	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6	Z7	Z8	Z9	Z10
r 平均值 Average of r	1.85	2.16	1.50	1.71	1.63	2.02	2.34	1.41	1.30	2.25

刚果红纤维素平板是较好的分离筛选培养基，r 值大小可大致反应产酶能力的高低，但还不够准确，还需进行 CMC 酶活的测定。因此，本试验采用固体发酵法对以上 10 株真菌以及 A8 和 H8 的 CMC 酶活进行了测定，以判定其产纤维素酶能力的大小，结果见表 3。从表 3 可以看出，CMC 酶活超过4 000 μg/(g·min)的有 7 株，占总数的 58.3%，说明供试菌株均有较高的产纤维素酶特性。通过对培养特征的观察，Z5 生长最快，产孢子最早，且量也最多，而 Z8 的 CMC 酶活较高。综合考虑菌落的培养特征和孢子产酶特征，选择 Z5 和 Z8 作为生产发酵剂的优良菌株。

表 3　A8 和 H8 及供试菌株的 CMC 酶活

Table 3　Activity of cellulose of experiment strains and A8，H8

菌株 Strain	吸光度 Absorbency	葡萄糖含量/μg Glucose content	CMC 酶活/(μg·g^{-1}·min^{-1}) CMC enzyme activity unit
Z8	0.552	427.75	5 117.28
Z5	0.502	399.61	4 648.14
Z4	0.452	372.20	4 191.35
A8	0.265	268.12	2 456.79
Z7	0.278	274.32	2 521.59
Z6	0.556	429.61	5 148.14
H8	0.238	253.12	2 206.79
Z2	0.460	376.56	4 263.88
Z3	0.537	419.05	4 972.22
Z1	0.049	392.94	4 537.03
Z9	0.050	252.14	2 847.25
Z10	0.020	217.85	2 439.76

2.2　菌株 Z5 和 Z8 的初步鉴定

对菌株 Z5 和 Z8 采用乳酸石炭酸棉蓝水浸片法[8]进行染色，并在显微镜下观察其形态特征，结合培养特征，依据《真菌鉴定手册》[9]对其进行初步鉴定，可知 2 株菌均为曲霉属真菌，其鉴定结果见表 4。

表 4　菌株 Z5 和 Z8 的初步鉴定

Table 4　Initial identification of Z5 and Z8

菌株 Strain	形态特征 Shape character	培养特征 Incubation character	鉴定结果 Identify result
Z5	菌丝体较发达，菌丝有隔膜，形成分生孢子梗，顶端膨大成椭圆形，有单层小梗 Mycelium is well developed and has septum. Conidiophore peduncle is formed. The top is ellipse，has monolayer peduncle	菌落圆形，气生菌丝不发达，孢子灰绿色，成同心圆状 Colony is round，aerial mycelium is not developed，spore is celadon and concentric round	曲霉属 Aspergillus Micheli
Z8	菌丝无隔，近乎无色，单细胞多核，形成分生孢子梗，顶端膨大成球形 Mycelial has no septum and nearly achromaticity，belonging to one－selled and coenocyte. Conidiophore peduncle is formed and top is roundness	菌落扁平，生长缓慢，初期产生白色菌丝，产淡绿色孢子，气生菌丝不发达，基内菌丝发达 Colony is flat and growing slowly. White mycelial was produced at early stage，pea green spore is formed. Aerial mycelium is not developed，but substrate mycelium is well developed	曲霉属 AspergilLus Micheli

2.3　菌株 Z5 和 Z8 固体发酵剂配方的优化

碳源是构成菌体细胞物质和代谢产物的主要成分，也是能量的来源。纤维素酶是诱导酶，因此必须保证在培养基中供给纤维素以诱导纤维素酶的合成，但有机氮源也会影响纤维素酶的合成，故必须在小麦秸杆粉和稻草粉中加入一定量的有机氮源，才能有效促进纤维素的合成。按表 1 设计方案处理，测定 Z5 和 Z8 有效菌数含量及 CMC 酶活，其结果见表 5 和图 1。

2.3.1　有效菌含量　从表 5 可知，在培养 72～96 h 时，3 个配方 Z5 菌株的有效菌含量大小顺序为配方 1＞配方 3＞配方 2，可见氮源为棉粕的配方有效菌数高于豆粕和尿素，说明棉粕更适合作为 Z5 菌株的缓效氮源；3 个配方 Z8 菌株的有效菌数含量大小顺序为配方 2＞配方 1＞配方 3，但 Z8 菌株对不同氮源的利用程度相当。

表 5　3 个发酵剂配方中菌株 Z5 和 Z8 的有效菌含量

Table 5　Available number of Z5 and Z8 in fermentation formula　　g^{-1}

菌株 Strain	配方 1 Formula 1	配方 2 Formula 2	配方 3 Formula 3
Z5	2.3×10^{14}	1.46×10^{14}	1.76×10^{14}
Z8	1.74×10^{14}	1.76×10^{14}	1.30×10^{14}

2.3.2 CMC 酶活 酶活是衡量发酵剂优劣的一个重要标准，测定不同培养时间的酶活，出现酶活峰值的时间越短，酶活越高，微生物数量越多，配方就越优良。由图 1 可以看出，菌株 Z5 随着培养时间的增加，3 个配方中 CMC 酶活均逐渐增大，在培养 72 h 时酶活均达到最高值，其中配方 1 的 CMC 酶活最高，达到4 463.57 μg/(g·min)；3 个配方中菌株 Z8 的 CMC 酶活亦随培养时间增加而逐渐增大，在培养 72 h 时，配方 3 中 CMC 酶活性达到最高值，而在培养 96 h 时，配方 1 和配方 2 中的 CMC 酶活性达到最高值，其中配方 1 的酶活最高，为 3 265.67 μg/(g·min)。这主要是因为 Z8 在培养初期为菌丝，在后期才产生大量的孢子，因此其纤维素酶产生的时间要推后一点。由以上结果可知，固体发酵培养基中添加棉粕时，菌株 Z5 和 Z8 的 CMC 酶活均较高，说明棉粕作氮源能促进菌株的生长和纤维素酶活的提高。

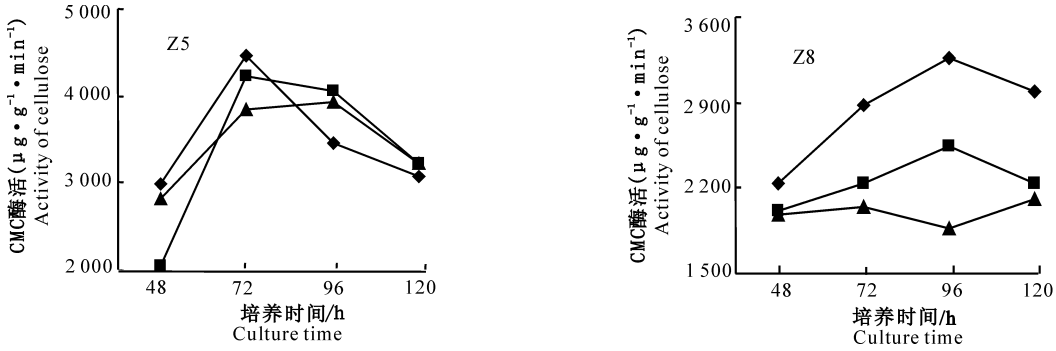

图 1 菌株 Z5 和 Z8 CMC 酶活随时间的变化曲线

—◆—. 配方 1；—■—. 配方 2；—▲—. 配方 3

Fig. 1 Activity of cellulose of Z5 and Z8 strains at different culture time

—◆—. Formula 1；—■—. Formula 2；—▲—. Formula 3

3 结 论

1)本研究从供试的牛粪发酵基质中分离到 22 株具有较强降解纤维素能力的微生物，其中放线菌 7 株，真菌 10 株，细菌 5 株；并通过刚果红纤维素平板培养基对效果较好的 10 株真菌进行了复筛，依据 r 值初步确定了其产纤维素酶能力，其中菌株 Z7 分解纤维素能力最强，r 平均值为 2.34，其次为菌株 Z10、Z2 和 Z6，r 平均值均达 2.0 以上。

2)对菌株 CMC 酶活的测定表明，10 株真菌的产纤维素酶能力均较高，其中 CMC 酶活超过 4 000 μg/(g·min)的有 7 株，占总数的 58.3%。结合培养特征，选择菌株 Z5 和 Z8 作为生产发酵剂的优良菌株；经初步鉴定，菌株 Z5 和 Z8 均为曲霉属真菌。

3)在以棉粕为氮源的配方中，菌株 Z5 和 Z8 均可获得最高的羧甲基纤维素酶活，其中 Z5 在发酵培养 72 h 时 CMC 酶活最高，达 4 463.57 μg/(g·min)，Z8 在发酵培养 96 h 时 CMC 酶活最高，达到 3 265.67 μg/(g·min)。在 3 个发酵剂配方中，2 株菌的微生物数量都达到了 10^{14} 数量级。综合菌株生长状况，菌株 Z5 和 Z8 可作为降解畜禽粪便发酵剂的优良生产菌株，棉粕是较为理想的固体发酵氮源。

[参考文献]

[1] 冯克宽，王明谊. 黑曲霉 Sta-122 菌株产纤维素酶的研究[J]. 西北师范大学学报：自然科学版，1991，27(1)：61-65.

[2] Gijzen H J. Continuous cultivation of rumen microorganisms，a system with possible application to the anaerobic degradation of lignocellulosic waste[J]. Appl Environ Microbiol，1986，8：246-250.

[3] 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.

[4] 吴鸿强. 城市垃圾堆肥深度加工的处理工艺及设备[J]. 环境保护，1998(3)：22-24.

[5] 庞金华，程平宏，余廷园. 高温堆肥的水气矛盾[J]. 农业环境保护，1999，18(2)：73-75.

[6] 张 辉，刘维红，杨启银，等，几种微生物在牛粪堆肥中的试验研究[J]. 江苏农业科学，2006(1)：108-113.

[7] 王淑军，杨从发，陈 静. 固态降解农作物秸秆纤维素菌株分离筛选方法的研究[J]. 淮海工学院学报，1999，3(1)：42-45.

[8] 程丽娟，薛泉宏. 微生物学实验技术[M]. 西安：世界图书出版公司，1998.

[9] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海：上海科学技术出版社，1979.

[10] 来航线. 食用与药用真菌学[M]. 西安：世界图书出版公司，1998.

[11] 史 央，蒋爱芹，戴传超，等. 秸秆降解的微生物学机理研究及应用进展[J]. 微生物学杂志，2002，22(1)：47-48.