

## 一组秸秆分解菌群的稳定性及对还田秸秆的促腐效果

李培培<sup>1,2</sup> 韩宝文<sup>3</sup> 曹燕篆<sup>1</sup> 李佳佳<sup>1</sup> 王小芬<sup>1</sup> 崔宗均<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业大学 农学与生物技术学院/生物质工程中心,北京 100193;

2. 河南农业大学 资源与环境学院,郑州 450002;

3. 河北省农林科学院 农业资源环境研究所,石家庄 050051)

**摘要** 探讨一组秸秆还田菌群 ADS-3 的功能稳定性及初步观察其接种于土壤后对还田秸秆的促腐效果。结果表明:在培养瓶中菌种 ADS-3 对小麦、水稻和玉米 3 大农作物秸秆都有稳定高效的分解能力,35 °C 条件下培养 11 d,能分解稻秆 51.6%、小麦秸秆 44.7%、玉米秸秆 40.8%;在 4、15 和 35 °C 条件下,尽管 ADS-3 对小麦秸秆的分解率差异很大,依次为 6.8%、21.6% 和 44.7%;但是用变性梯度凝胶电泳(DGGE)检测其培养液,发现不同温度条件下 ADS-3 的微生物组成稳定。将菌种接种到模拟秸秆还田土壤中,初步试验结果表明 ADS-3 能显著提高秸秆的腐解速度( $P < 0.05$ )。试验结果为该菌群进一步开发秸秆还田促腐菌剂提供试验参数和依据。

**关键词** 秸秆; 菌群; 接种

中图分类号 S 144

文章编号 1007-4333(2011)05-0045-05

文献标志码 A

## Functional stability and straw-degrading enhancement of a microbial community

LI Pei-pei<sup>1,2</sup>, HAN Bao-wen<sup>3</sup>, CAO Yan-zuan<sup>1</sup>, LI Jia-jia<sup>1</sup>, WANG Xiao-fen<sup>1</sup>, CUI Zong-jun<sup>1\*</sup>

(1. Center of Biomass Engineering/College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. College of Resources and Environment, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

3. Institute of Resource and Environment, Hebei Academy of Agriculture and forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China)

**Abstract** The functional stability of a microbial composite community ADS-3 and its effect on straw degrading enhancement after straw returning to field were investigated. The results indicated that ADS-3 had high degrading capacity for three privileged crop straws in flask, with 51.6% for rice straw, 44.7% for wheat straw and 40.8% for corn straw 11 days after incubation. Although ADS-3 could degrade 6.8%, 21.6% and 44.7% of wheat straw under temperatures of 4, 15 and 35 °C respectively, polymerase chain reaction (PCR) denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) revealed its microbial component was rather stable. Wheat straw degrading enhancement was significantly improved by inoculating straw-amended soil with ADS-3 ( $P < 0.05$ ). This study provided test parameters for further field experiment and agent preparation.

**Key words** straw; microbial community; inoculated

秸秆还田是增加土壤有机质含量,全面提升地力的有效途径,对促进农业的可持续发展起到重要作用<sup>[1-3]</sup>。近几年,随着农业机械化程度的提高,秸秆直接还田因其省工省时日益为农民所接受。但全量机械化秸秆还田后,大量的农作物秸秆在土壤中分解十分缓慢,影响农事操作和后季作物生

根<sup>[3]</sup>;秸秆碳氮比含量高,分解过程中造成作物的氮饥饿现象等一系列问题<sup>[4]</sup>。有些农民为了省时省力,放火焚烧秸秆,造成严重的空气污染,增加了温室气体的排放<sup>[5-6]</sup>。因此加快秸秆在田间快速腐解是解决上述问题的重要途径之一。微生物处理技术因其廉价高效一直受到研究者的重视,有不少将

收稿日期:2010-03-10

基金项目:国家“十一五”支撑计划“沃土工程”项目(2006BAD25B04);公益性行业科研专项(200803033)

第一作者:李培培,博士研究生,E-mail:lipei@cau.edu.cn

通讯作者:崔宗均,教授,博士生导师,主要从事生物质资源利用研究,E-mail:acuizj@cau.edu.cn

分离到的可培养单菌接种至土壤中加速有机污染物分解的报道<sup>[7-9]</sup>,但是单菌在环境利用中的效果一直不是很理想,限制了该项技术的推广和应用。近期研究表明<sup>[10-11]</sup>混合菌群的分解能力十分强大,通过长期的定向驯化,本研究室已经筛选出一组专门用于秸秆还田促腐的微生物菌群 ADS-3<sup>[12]</sup>,该菌群能在 15 d 内降解小麦秸秆 60% 以上,降解滤纸 80% 以上,具有较好的秸秆还田促腐菌剂的开发潜力。本研究主要探讨 ADS-3 对不同农作物秸秆的分解能力和温度对微生物群落组成稳定性的影响,研究实验室条件下模拟的秸秆还田实验中该菌群的接种促腐效果,为该菌群秸秆促腐菌剂的开发利用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

#### 1.1.1 供试菌种

本实验室筛选的一组具有高效秸秆降解能力的复合菌群 ADS-3<sup>[12]</sup>。

#### 1.1.2 供试秸秆

小麦、水稻和玉米秸秆均来自中国农业大学科教试验园区。小麦、玉米秸秆分别剪至 5 cm 小段。玉米秆直径大,先将一棵玉米秆沿着节接切成若干段,然后每段分割成宽约 0.5 cm、长 5 cm 的小段。3 种秸秆分别用质量分数 1% NaOH 浸泡 24 h 后,流水冲洗至中性,105 °C 烘至恒重。

#### 1.1.3 供试土壤

土壤取样地点为中国农业大学科教试验园区,取 0~20 cm 的耕层土,取样后放置阴凉处晾干,混匀,过 2 mm 筛后备用。土壤 pH 7.8,全氮含量为 1.05 g/kg,有机质含量为 22.51 g/kg。

#### 1.1.4 培养基

改良 Czapek 培养基 1.0 g/L  $K_2HPO_4$ , 1.0 g/L  $(NH_4)_2SO_4$ , 1.0 g/L  $NaNO_3$ , 0.5 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.01 g/L  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.5 g/L KCl, 10 g/L 秸秆, pH 7.0~7.5。

### 1.2 试验设计

ADS-3 的功能稳定性试验:100 mL 培养瓶内添加 50 mL 培养基,分别添加 0.5 g 小麦、水稻和玉米秸秆作为底物碳源,于 121 °C 条件下高压灭菌 20 min,冷却后备用。将预培养 3 d 的菌种按 0.5% 体积比接种后,35 °C 静止培养。在 0(接种当天)、1、3、5、7、9 和 11 d 分别取样。设置以小麦秸秆为底物

的培养基,接种后,分别放置于 35、15 和 4 °C 条件下,培养 11 d。每种不同秸秆底物的培养基均设置相同条件下不接菌的对照,来消除培养条件对重量的影响。每次取 3 个重复。

土壤中接种促腐试验:200 mL 一次性塑料水杯内直立放入 1 g 小麦秸秆,然后加入 250 g 风干土壤,菌种接种量大致为  $10^8$  CFU/g 土壤(干土),用灭菌去离子水调节土壤含水量为最大持水量的 80%,空白对照用灭菌去离子水调节至含水量一致。置于 35 °C 黑暗条件下培养 11 d。

### 1.3 秸秆分解过程中总重量的变化

培养瓶中将各个培养时期的秸秆分解残渣过滤,烘干后称重。土壤中培养 11 d 后的小麦秸秆取出,用水淘洗干净,105 °C 烘干称重,计算减重率。

### 1.4 小麦秸秆分解过程中 pH 值、生物量的测定

取培养液 0.5 mL 用 HORIBA B-212 型微量 pH 计测定。取培养液 1.5 mL 用 UVmini-1240 核酸蛋白分析仪(SHIMADZU, Japan)测定 600 nm 波长下的吸光度作微生物生长量。

### 1.5 PCR-DGGE 检测菌种组成稳定

培养 11 d 后,不同温度条件下的培养液经 4 °C 条件下 8 000 r/min 离心 10 min,弃上清,收集菌体细胞,用氯仿-苯酚抽提法提取微生物总 DNA<sup>[13]</sup>。用引物对 357f-GC 和 517r<sup>[14]</sup> 扩增细菌的 16S rRNA 基因的 V3 可变区,PCR 反应条件参考文献[15]。扩增片段按文献[16]的方法做变性梯度凝胶电泳,检测不同温度条件下菌种变化。

### 1.6 数据统计

数据的分析应用统计分析软件 SAS 8.0 进行方差分析(ANOVA)和 Duncan 多重比较(显著水平为 0.05)进行显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 ADS-3 对 3 种作物秸秆的分解能力

分别在培养的 0、1、3、5、7、9 和 11 d 测定小麦、水稻和玉米秸秆的分解减重率,结果如图 1 所示。在早期的前 5 d,3 种秸秆分解均比较旺盛,减重效果差异并不显著( $P>0.05$ )。在分解后期的 9 和 11 d,三者减重均达到差异显著水平( $P<0.05$ )。经过 11 d 的培养,小麦秸秆减重率为 44.7%、水稻秸秆为 51.6%,玉米秸秆为 40.8%。根据前文报道<sup>[12]</sup>,11 d 后,该菌群对秸秆的分解速率呈缓慢下降态势。本试验结果表明,ADS-3 对 3 种农作物秸秆均

具有可观的分解能力,其中对稻秆的分解效果最好,小麦次之。

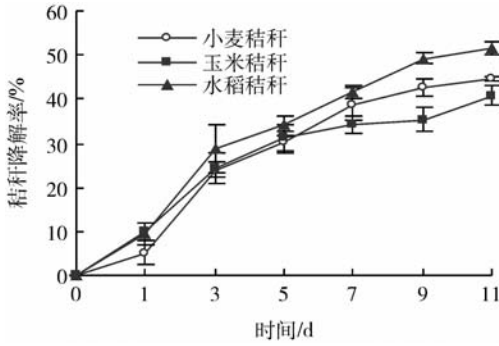


图1 培养过程中3种秸秆的降解率

Fig. 1 Degradation rates of three crop straw by ADS-3

### 2.2 培养过程中OD和pH变化动态

ADS-3在11d的培养过程中的微生物生长量(以OD表示)和pH如图2所示。OD值在培养过程中迅速上升,由接种初期的0.14增加到培养结束时的1.36,说明菌种ADS-3有较快的增殖速度和菌种活性,有较好的扩大培养及开发利用潜力。尽管OD值在11d结束时仍有上升的趋势,但是,随着秸秆的分解速度变慢微生物生长量终将趋于稳定。在整个培养过程中,菌液的pH在7.4和6.7之间浮动,适宜于土壤pH条件,表现比较好的土壤中接种应用潜力。

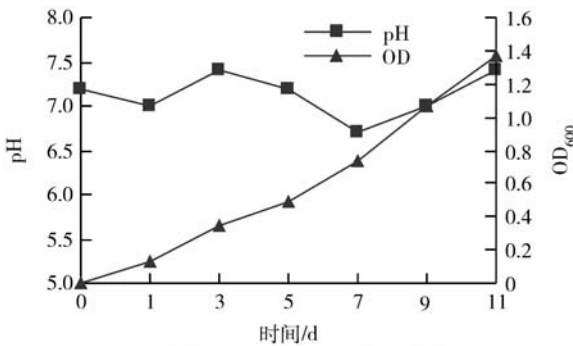


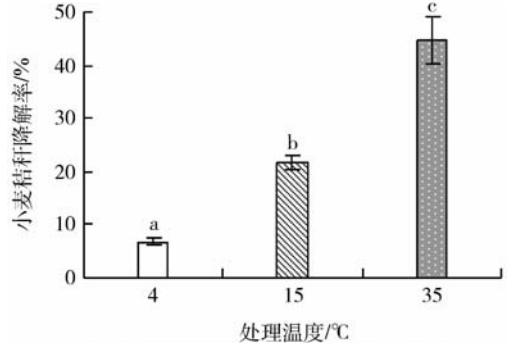
图2 培养过程中菌种的生物量(OD)和pH变化

Fig. 2 Dynamic trends of OD and pH during degradation by ADS-3

### 2.3 温度对ADS-3分解能力的影响

不同温度条件下,菌种ADS-3对小麦秸秆的分解能力见图3。经过11d的培养,在4℃条件下,降解率为6.8%;15℃条件下降解率为21.6%;35℃条件下降解率为44.7%,它们之间降解差异均达到

显著水平( $P < 0.05$ )。自然条件下,温度越高微生物活性越大,分解速度越快<sup>[17]</sup>。



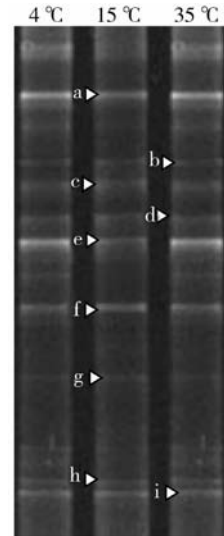
不同字母表示达显著差异水平( $P < 0.05$ )。

图3 不同温度条件下ADS-3对秸秆的降解能力

Fig. 3 Degradation rates of wheat straw under three different temperatures by ADS-3

### 2.4 不同温度下ADS-3菌种组成稳定性

在4、15和35℃条件下培养11d后的培养液提取DNA,进行16S rRNA基因片段的DGGE分析,见图4。不同温度条件下DGGE图谱上的各个水平位置的条带几乎一致,明亮条带代表菌群中的



优势条带所对应微生物组成:a为*Bacillus* sp. (EU522078, 97%);b为Uncultured bacterium clone (EU219961, 93%);c为Uncultured *Clostridiales* bacterium (AB198476, 92%);d为Uncultured *proteobacterium* (DQ234649, 100%);e为*Pseudomonas* sp. (FJ693705, 100%);f为*Azospirillum lipoferum* (FJ871055, 92%);g为*Delftia* sp. (FJ378038, 100%);h为Uncultured *Magnetospirillum* sp. (FJ542973, 100%);i为Uncultured bacterium (GQ025242, 98%)。

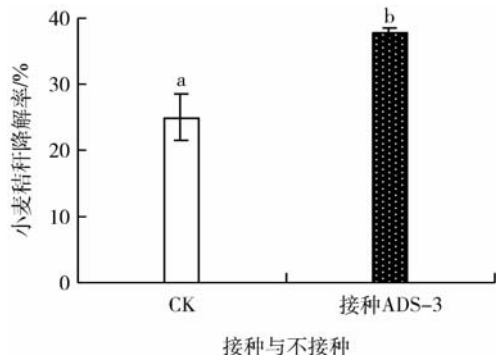
图4 不同温度条件下,ADS-3的DGGE条带组成

Fig. 4 Changes of DGGE patterns of ADS-3 under three different temperatures

优势菌,从胶上切下这些条带,测定 DNA 序列。结果分析表明,所同一水平位置的条带指示同一种菌(图 4),说明其微生物组成的一致性结果。尽管秸秆减量数据结果表明,低温条件严重影响秸秆的降解率,但低温条件下,菌种组成并没有发生变化。有研究报道称这种经过“外淘汰法”筛选到的复合菌群,微生物间存在协同关系,组成稳定<sup>[18-19]</sup>。自然环境条件下,温度是变化不定的,这种菌种稳定性为进一步秸秆还田促腐菌剂开发提供依据。

## 2.5 土壤中促腐效果

接种 ADS-3 到土壤中的促腐效果如图 5 所示。接种 11 d 后,小麦秸秆降解率为 37.7%,而未接种对照降解率为 25.0%,差异达到显著水平( $P < 0.05$ )。初步试验说明菌种 ADS-3 在土壤中具有较好的秸秆促腐效果,比对照腐解速度提高了 12.7%。下一步将进行较大规模的秸秆还田促腐试验,探明促腐效果并监测接种微生物在土壤中的存活情况。



不同字母表示达显著差异水平( $P < 0.05$ )。

图 5 土壤中接种 ADS-3 对秸秆的促腐效果

Fig. 5 Enhancement of straw degradation after inoculated ADS-3 into straw-amended soil

## 3 讨论

1) 水稻、小麦和玉米秸秆是我国产量最高的 3 大农作物秸秆,ADS-3 对这 3 类农作物秸秆都具有较强的分解能力,其中水稻秸秆分解效果最好,小麦次之。玉米秸秆的降解率较低,这可能和试验所用材料有关,本试验所用玉米秸秆主要是玉米的茎,质地粗硬木质化程度高。ADS-3 菌群的筛选与构建方法不同于其他人工单菌株的简单混合,它能够充分发挥微生物群体间的协同功能<sup>[18]</sup>,从而稳定高效地分解天然木质纤维素。培养过程中,ADS-3 菌种繁

殖迅速,说明菌种微生物活性强,有利于进一步扩大培养。菌种微生物在生长过程中 pH 变化在 7.4 和 6.7 之间,变化幅度小,接近自然条件下土壤酸碱度。尽管不同温度条件 ADS-3 对秸秆的分解能力差异很大,但是 PCR-DGGE 分析结果证明,ADS-3 在不同的温度条件下菌种组成仍然稳定,具有优良的抗自然温度变化冲击的能力。

2) 本研究结果表明,在 11 d 内接种 ADS-3 能促进还田秸秆的快速腐解,同未接种对照相比促腐效果达到了差异显著水平,微生物菌剂接种到土壤中的理论意义显著。但在实际应用中,由于土壤环境是一个巨大的缓冲体系,存在微生物间的竞争或其他不良环境因子的影响,阻碍了接种微生物的生长及其作用的发挥<sup>[8]</sup>。尽管如此,也不乏成功的接种微生物取得理想效果的实验报道<sup>[9]</sup>。菌种选择是关系接种成败的关键因素之一,从生态条件相似的环境中筛选菌种作为接种剂能有效提高接种效果<sup>[9,20]</sup>。本试验所用的秸秆促腐菌群 ADS-3 是采用腐烂的作物秸秆和土壤为菌源,经过长时间的限制性培养获得的一组微生物复合系。不同于已经报道的侧重于产酶或者产糖<sup>[15,18]</sup>的其他几组常温秸秆分解菌复合系,ADS-3 是专门用于开发秸秆还田促腐菌剂的。因此本研究根据土壤营养条件比较贫瘠的特点,筛选所用培养基主要成分为无机氮源及微量元素,接近土壤环境,为菌种在土壤中更好的定殖并发挥功效奠定了基础。

3) 试验结果也证明,ADS-3 促腐效果明显,具有进一步开发应用的潜力。今后需要结合分子生物学的方法,对该菌群的菌剂制备及微生物接种标准进行研究,并探索适宜的土壤调控措施及菌种生长的环境条件,对提高大田接种促腐效果进行研究。

## 参 考 文 献

- [1] 刘巽浩,高旺盛,朱文珊. 秸秆还田的机理与技术模式[M]. 北京:中国农业出版社,2001:10-60
- [2] 卢萍,单玉华,杨林华,等. 秸秆还田对稻田土壤溶液中溶解性有机质的影响[J]. 土壤学报,2006,43(5):736-741
- [3] 江永红,宇振荣,马永良. 秸秆还田对农田生态系统及作物生长的影响[J]. 土壤通报,2001,32(5):209-213
- [4] Wang J G, Bakken L R. Competition for nitrogen during decomposition of plant residues; Effect of spatial placement of N-rich and N-poor plant residues [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1997, 29(2):153-162
- [5] Gaddea B, Bonneta S, Menkeb C, et al. Air pollutant emissions

- from rice straw open field burning in India[J]. Thailand and the Philippines, 2009, 157(5):1554-1558
- [6] 毕于运, 王亚静, 高春雨. 我国秸秆焚烧的现状危害与禁烧管理对策[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(27):13181-13184
- [7] Dejonghe W, Boon N, Seghers D, et al. Bioaugmentation of soils by increasing microbial richness: missing links [J]. Environ Microbiol, 2001, 3(10):649-657
- [8] Johannes A, Van veen, Leonard S, et al. Fate and activity of microorganisms introduced into soil [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1997, 61(2):121-135
- [9] Juhanson J, Truu J, Heinaru E, et al. Survival and catabolic performance of introduced *Pseudomonas* strains during phytoremediation and bioaugmentation experiment [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2009, 70(3):446-455
- [10] Kato S, Haruta S, Cui Z J, et al. Network relationships of bacteria in a stable mixed culture [J]. Microb Ecol, 2008, 56(1):403-411
- [11] 文少白, 李勤奋, 侯宪文, 等. 微生物降解纤维素的研究概况 [J]. 中国农学通报, 2010, 26(1):231-236
- [12] Li P, Wang X, Yuan X, et al. Screening of a composite microbial system and its characteristics of wheat straw degradation [J]. Agricultural Sciences in China, 2011, in press
- [13] Zhu H, Qu F, Zhu L H. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride [J]. Nucleic Acids Res, 1993, 21(22):5279-5280
- [14] Muyzer G, de Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3):695-700
- [15] Guo P, Zhu W, Wang H, et al. Functional characteristics and diversity of a novel lignocelluloses degrading composite microbial system with high xylanase activity [J]. J Microbiol Biotechnol, 2010, 20(2):254-264
- [16] 王小芬, 王伟东, 高丽娟, 等. 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 在环境微生物研究中的应用详解 [J]. 中国农业大学学报, 2006, 11(5):1-7
- [17] Song Q, Arthur J M, Richard W B, et al. Response of soil microbial activity to temperature, moisture, and litter leaching on a wetland transect during seasonal refilling [J]. Wetlands Ecology and Management, 2005, 13(1):43-54
- [18] 王小娟, 李培培, 袁旭峰, 等. 4 组常温小麦秸秆复合菌系的比较研究 [J]. 中国农业大学学报, 2011, 16(1):24-29
- [19] 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
- [20] Fantroussi S E, Agathos S N. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? [J]. Curr Opin Microbiol, 2005, 8(3):268-275

(责任编辑: 袁文业)