



● 李 莉 池景良 主编

秸秆生物降解技术 研究与应用

Research and Application of
Straw Biodegradation Technology



 辽宁科学技术出版社
LIAONING SCIENCE AND TECHNOLOGY PUBLISHING HOUSE

辽宁省优秀自然科学著作

秸秆生物降解技术 研究与应用

李 莉 池景良 主编

辽宁科学技术出版社

沈 阳

主编 李 莉 池景良

编委 赵新海 王志学 李 鑫 桓明辉 孙翠焕

© 2014 李莉 池景良

图书在版编目(CIP)数据

秸秆生物降解技术研究与应用 / 李莉, 池景良主
编. —沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2014.2

(辽宁省优秀自然科学著作)

ISBN 978-7-5381-8465-5

I. ①秸… II. ①李… ②池… III. ①秸秆—生物
降解—研究 IV. ①S38

中国版本图书馆CIP数据核字(2014)第017368号

出版发行: 辽宁科学技术出版社

(地址: 沈阳市和平区十一纬路29号 邮编: 110003)

印刷者: 沈阳新华印刷厂

经销者: 各地新华书店

幅面尺寸: 185mm × 260mm

印 张: 12.25

字 数: 260千字

印 数: 1~2000

出版时间: 2014年2月第1版

印刷时间: 2014年2月第1次印刷

责任编辑: 李伟民

特邀编辑: 王奉安

封面设计: 嵘 嵘

责任校对: 刘 庶

书 号: ISBN 978-7-5381-8465-5

定 价: 36.00元

联系电话: 024-23284360

邮购热线: 024-23284502

<http://www.lnkj.com.cn>

《辽宁省优秀自然科学著作》评审委员会

主 任：

康 捷 辽宁省科学技术协会党组书记、副主席

执行副主任：

黄其励 东北电网有限公司名誉总工程师

中国工程院院士

辽宁省科学技术协会副主席

副主任：

金太元 辽宁省科学技术协会副主席

宋纯智 辽宁科学技术出版社社长兼总编辑 编审

委 员：

郭永新 辽宁大学副校长

陈宝智 东北大学安全工程研究所所长

刘文民 大连船舶重工集团有限公司副总工程师

李天来 沈阳农业大学副校长

刘明国 沈阳农业大学林学院院长

邢兆凯 辽宁省林业科学研究院院长

辽宁省科学技术协会委员

吴春福 沈阳药科大学校长

辽宁省科学技术协会常委

张 兰 辽宁中医药大学附属医院副院长

王恩华 中国医科大学基础医学院副院长

李伟民 辽宁科学技术出版社总编室主任 编审

前 言

我国设施农业自20世纪50年代起步发展,到本世纪初进入了规模快速发展阶段。2010年全国设施蔬菜面积达5 020万亩,净产值5 800多亿元。设施农业的发展既保障了城市农产品的供给又为提高农村经济发展和农民增收作出巨大贡献。辽宁是设施农业的发源地,截至2011年年底,设施农业面积已达1 061万亩,规模居全国第一。但由于设施农业的集约化大生产造成品种单一、种植密度大、复种指数高、连做频率大、不合理施肥等因素,加之,辽宁属北方寒冷地区,冬季大棚地温和温室中 CO_2 浓度低下,出现了设施土壤质量退化、病虫害加重等问题,从而导致蔬菜产量和质量下降,限制了设施蔬菜的可持续发展。而如何解决这些问题,也正是农业种植栽培专家所关注和重视的。辽宁省微生物科学研究院利用微生物的广泛适应性和多功能性,针对秸秆的主要成分特性研究的秸秆生物降解技术正是在此基础上深化开展来的,它可以全方位地解决上述问题,实现设施农业的增产增收。

秸秆生物降解技术是利用高效降解秸秆的微生物复合菌剂在对施入土壤秸秆定向快速腐熟,改善设施蔬菜生产环境的同时,还具有提高土壤质量、防治病虫害、促进作物生长、提高产量、改善产品品质等功能,是一项现代农业生物工程创新技术,也是一项引发“设施土壤革命”的新技术。推广应用该技术,减少了秸秆资源的浪费,实现了 CO_2 的减量排放,减少了化肥农药的用量,实现低碳农业和循环农业。该项技术的应用,对秸秆资源化利用,提高农产品产量和改善农产品质量,保障设施农业可持续发展,加速农业产业结构调整,增加农民收入,使设施农业真正成为强农富农和城市农产品供给工程等都具有重大的意义。项目推广过程中,恰逢国家正在进行大田土壤有机质提升技术的推广,加速了该技术的推广速度和应用范围。本书是总结秸秆生物降解技术研究与应用工作,并广泛参考国内外在设施蔬菜生产、微生物对秸秆的降解、土壤有机质提升等相关研究成果的基础上编写而成的,希望能在初步总结此技术的基础上,为我国农业工作者相关工作提供一点借鉴、参考的便利,能为促进农民增收、农业增效、农业生产的良性循环和可持续发展提供科学的技术支撑作出一些贡献,并在实践中不断完善、改进、创新,从而在农业发展中发挥更大作用。

本书共分十章。第一章、第六章由李莉、王志学执笔,第二章、第四章由池景良、赵新海执笔,第三章由赵新海执笔,第五章由李鑫执笔,第七章由王志学、赵新海、桓明辉执笔,第八章、第九章由桓明辉、孙翠焕执笔,第十章由池景良执笔。全书插图由李鑫、池景良提供,全书由李莉、池景良统稿。

本项目在研究与应用过程中得到沈阳农业大学黄毅教授、孙军德教授的指导和帮

助；得到朝阳市老科技工作者协会和项目转化单位辽宁宏阳生物有限公司的大力支持和帮助，在此一并表示感谢。

由于作者水平、才识所限，加之撰写时间仓促，虽经再三思考和斟酌，或仍有收罗未当、涵盖未全、叙述未清、表意未明等疏忽之处，敬请读者批评指正。

本书的出版，得到辽宁省科协优秀自然科学专著基金的资助，谨致谢意。

目 录

第一章 具有降解秸秆功能的微生物种类及其分离方法	001
一、具有分解秸秆作用的微生物	001
二、具有分解秸秆作用的微生物纯培养菌种筛选分离方法	002
三、具有秸秆分解作用复合菌种筛选方法	003
四、菌种定殖能力测试方法	004
第二章 秸秆生物降解高效复合菌群的构建	005
一、复合微生物菌群的构建	005
二、菌种鉴定	018
第三章 复合菌剂生产工艺关键技术研究	028
一、复合菌剂生产实验室小试研究	028
二、菌种生产工艺中试研究	054
三、产品工业化生产研究	062
第四章 秸秆腐熟剂作用机理及应用技术研究	068
一、秸秆木质纤维素的微生物降解机制	068
二、CO ₂ 施肥效应与作用机理	074
三、热量效应及作用机理	077
四、抗病效应及作用机理研究	078
五、培肥改土效应及作用机理	088
六、改善土壤微生态平衡效应及机理研究	094
七、小结	100
第五章 秸秆生物降解技术应用及操作规程	102
一、秸秆生物降解技术概况	102
二、秸秆生物降解技术使用方法研究	105
三、秸秆生物降解技术在大棚中的使用方法	109
四、秸秆生物降解技术在大田中的使用方法	114
第六章 秸秆生物降解技术在日光温室中的应用效果	118
一、日光温室应用秸秆生物降解技术对温室环境的影响	118
二、对温室土壤质量的影响	122
三、秸秆生物降解技术对日光温室作物的影响	130

第七章 秸秆还田对大田土壤氮、磷、钾素的影响	144
一、秸秆还田对土壤氮素的影响	144
二、秸秆还田对土壤磷的影响	146
三、秸秆还田对土壤钾的影响	149
第八章 秸秆生物降解技术在大田中的应用效果	154
一、秸秆生物降解技术在大田中的应用效果评价	154
二、秸秆生物降解技术在大田中存在的问题及改进措施	164
三、常见秸秆还田机简介及存在的问题	165
第九章 秸秆生物降解技术使用中出现的問題及解决措施	169
一、使用秸秆生物降解技术时原料碳氮比问题	169
二、秸秆生物降解菌剂使用方法及用量的问题	170
三、病虫害防治问题现状及改进措施	171
四、以秸秆替代化肥的问题	172
五、有机肥和化肥的配合施用问题	173
六、秸秆生物降解技术的使用成本问题	175
第十章 有机物料腐熟剂类型与登记	178
一、有机物料腐熟剂概述	178
二、有机物料腐熟剂与微生物肥料的区别	179
三、有机物料腐熟剂的基本类型及特点	179
四、如何进行有机物料腐熟剂登记	180
五、购买使用有机物料腐熟剂应注意的问题	185

第一章 具有降解秸秆功能的微生物种类及其分离方法

秸秆生物降解技术是通过利用具有分解秸秆中大分子物质,如纤维素、半纤维素、木质素、蛋白质等功能的真菌、细菌,根据不同的目的及使用方法,将秸秆中的大分子进行部分或完全分解,在充分利用秸秆资源的同时大幅度提高蔬菜产量、改善蔬菜品质的现代农业生物工程创新技术,是一项引发“土壤革命”和“设施农业革命”的新技术。该项技术的应用对秸秆资源化利用、提高农产品产量和改善农产品质量、保障设施农业可持续发展、加速农业产业结构调整、增加农民收入,使设施农业真正成为强农富农和城市农产品供给工程等都具有重大的意义。本书中所指的秸秆生物降解是利用具有分解秸秆功能的各种真菌、细菌接种于种植行下人为放置在地下的秸秆表面,覆盖土壤,在其上种植各种作物,在微生物作用下秸秆中的大分子物质被部分分解,降解为葡萄糖、短链脂肪酸、氨基酸或 CO_2 供农作物生长利用,同时提高地温、改良设施土壤,促进作物生长。

一、具有分解秸秆作用的微生物

(一) 真菌

秸秆是成熟农作物茎叶(穗)部分的总称。通常指小麦、水稻、玉米、薯类、油料、棉花、甘蔗、蔬菜和其他农作物在收获籽实、果实后的剩余部分。秸秆主要是由碳、氢、氧等元素组成的一系列有机物质,如纤维素、半纤维素、木质素等高分子聚合物,其中纤维素占31%~40%、半纤维素35%~48%、木质素15%~25%。秸秆分解主要是分解其中的纤维素、半纤维素、木质素。

具有分解纤维素作用的真菌:纤维素酶是多组分酶,不同微生物所合成纤维素酶组分不同,对纤维素降解效果相差很大,目前国内外研究应用最多的菌种是木霉属(*Trichoderma*)真菌,由其产生的酶系比例协调,对纤维素分解效果最好。以下真菌都具有分解纤维素的能力:*Alternaria*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Coprinus*, *Fomes*, *Fusarium*, *Myrothecium*, *Penicillium*, *Polyporus*, *Rhizoctonia*, *Rhizopus*, *Trametes*, *Trichothecium*, *Verticillium*, *Zygorynchus*。

具有分解半纤维素作用的真菌:大多数具有纤维素分解能力的真菌都能分解半纤维素,并且具有很高的胞外半纤维素酶活性,如:*Alternaria*, *Fusarium*, *Trichothecium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Zygorynchus*, *Chaetomium*, *Helminthosporium*, *Penicillium*, *Coriolus*, *Fomes*, *Polyporus*。

具有分解木质素作用的真菌包括：在自然界中完全降解木质素需要各种微生物菌群的协同作用，白腐真菌是目前已知的唯一能在培养基上将木质素彻底降解为二氧化碳和水的一类微生物，目前，研究最多的白腐真菌有黄孢原毛平革菌（*Phanerochaete chrysosporium*）、变色栓菌（*Trametes versicolor*）、烟管菌（*Bjerkandera adusta*），食用菌类，如：香菇（*Lentinus edodes*）、平菇（*Pleurotus striatus*）等。下列真菌也都具有分解木质素的能力，如：*Clavaria*, *Clitocybe*, *Collybia*, *Flammula*, *Hypholoma*, *Lepiota*, *Mycena*, *Pholiota*, *Arthrotrichum*, *Cephalosporium*, *Humicola*。

（二）细菌

具有分解纤维素作用的细菌：土壤中的假单胞菌属（*Pseudomonas*）、芽孢杆菌属（*Bacillus*）及动物瘤胃中的瘤胃球菌（*Ruminococcus*）、堆肥中的诺卡氏菌（*Nocardia*）、节杆菌（*Arthrobacter*）、链霉菌（*Streptomyces*）都具有很强的纤维素分解能力，其他细菌：如：*Angiococcus*, *Cellfalcicula*, *Cellulomonas*, *Cellvibrio*, *Clostridium*, *Cytophaga*, *Polyanngium*, *Sorangium*, *Sporocytophaga*, *Vibrio*, *Micromonpora*, *Streptosorangium*等都有一定的纤维素分解能力。

具有分解半纤维素作用的细菌：具有分解纤维素的细菌基本都具有分解半纤维素的作用，如：*Bacillus*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Cytophaga*, *Lactobacillus*, *Vibrio*, *Streptomyces*等。

具有分解木质素作用的细菌：使用细菌分解木质素的研究很少，目前已知的种类有 *Pseudomonas*, *Flavobacterium*。

二、具有分解秸秆作用的微生物纯培养菌种筛选分离方法

（一）样品选择

从土壤中有有机质含量高的土壤样品、食草性动物的肠道、粪便、腐烂的秸秆、枯枝落叶、朽木等样品中进行菌种筛选，筛选出有效菌种的概率相对高。

（二）筛选方法

用两种方法——稀释平板法或组织分离法直接筛选，先富集培养再进行筛选，先用富集培养基连续进行富集培养，再进行稀释平板法筛选。

富集培养基配方： K_2HPO_4 2.0 g, KH_2PO_4 0.5 g, $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 g, $MgSO_4$ 0.3 g, $CaCl_2$ 0.3 g, 秸秆 20.0 g, 蒸馏水 1 000 mL（秸秆称量后，加水浸泡 1 h，将水倒掉，目的是尽量去除秸秆中多余的还原糖，然后使用）。

刚果红—纤维素培养基： $(NH_4)_2SO_4$ 2.0 g, $MgSO_4$ 0.5 g, KH_2PO_4 1.0 g, $NaCl$ 0.5 g, CMC-Na 20.0 g, 刚果红 0.2 g, 琼脂粉 17 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 自然。

愈创木酚变色反应培养基： KH_2PO_4 1.0 g, NaH_2PO_4 0.2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, V_{B1} 0.1 mg, $CaCl_2$ 0.1 mg, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 mg, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 mg, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.2 mg, 愈创木酚 100 mg/L, NH_4NO_3 8.06 mg, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL, 调节 pH 至 5.0。

细菌纯化用培养基：营养琼脂培养基。

真菌纯化用培养基：PDA 培养基。

液体产酶培养基：秸秆粉 10.0 g，麦麸 5.0 g， K_2HPO_4 2.0 g， $(NH_4)_2SO_4$ 1.4 g， $MgSO_4$ 0.3 g， $CaCl_2$ 0.3 g，蒸馏水 1 000 mL，pH 自然。

固体产酶培养基：秸秆粉和麦麸按照 4 : 1 比例混合均匀，加水至含水量为 65% 左右。

富集培养方法：取样品 5.0 g，加入到 100 mL 富集培养基中，28 ℃ 恒温振荡培养 5 d，吸取 10 mL 培养液到新的富集培养基中继续培养，连续进行富集培养 3~5 代，再进行产纤维素酶、木质素酶菌种的筛选。

产纤维素酶菌种初筛：吸取富集培养 3~5 代后的培养液 1 mL，加入到 9 mL 无菌水中，做连续梯度稀释，取稀释液 0.1 mL 分别涂在刚果红—纤维素培养基、愈创木酚变色反应培养基上，培养 3~5 d，纤维素产生菌选择透明圈大或者透明圈与菌落直径比例大的菌落进行纯化培养，木质素酶产生菌选择变色圈大的菌种进行纯化培养。

（三）酶活性测试方法

纤维素酶活测定：采用 3,5-二硝基水杨酸法（DNS 法）。

木质素酶活测定：ABTS 分光光度法。

三、具有秸秆分解作用复合菌种筛选方法

筛选方法有两种，一种是直接富集培养，培养后的菌种直接用来做菌种进行生产；另一种是将筛选到的菌种进行相容性试验及产酶活性试验，将能够相容且复合使用比单独使用产生酶活高的组合作为菌种进行生产。

（一）富集培养法

按照菌种筛选方法中的富集培养法进行菌种筛选，筛选出的就是复合菌种，此种方法筛选出的菌种相互协调，菌种活性高，培养方法简单。但是该类菌种组成变化大，随培养条件（温度、时间等）、秸秆种类、秸秆产地等有很大的变化，并且其中的菌种种类、数量都无法确定，都属于未知，不利于产品申报。

（二）纯菌种复合培养法

使用单一菌种用于秸秆降解，容易得到纯培养，生产方法简单。但是单一菌种其产生的酶种类有限，多数菌种只具备产生纤维素酶、半纤维素酶和木质素酶中的 1~2 种酶，而秸秆中主要成分纤维素、木质素、半纤维素的完全降解需要 3 种酶的同时存在。因此，在秸秆降解菌种的生产中，需要对产生不同酶的菌种进行复合，以便生产出能完全降解秸秆中的纤维素、木质素、半纤维素的菌种（秸秆中除含有纤维素、半纤维素、木质素外，还含有蛋白质、粗脂肪、果胶质等物质，完全降解秸秆需要更多的菌种参与，在生产实践中很难做到，因此在秸秆降解菌种的筛选过程中，只针对其中的主要成分进行菌种筛选）。

菌种间相容性确定方法：对峙培养法。

细菌与细菌或酵母菌之间的相容性：在营养琼脂培养基平板上，点接两种菌种，两

种菌种距离1 cm,接种后,28~30℃培养3 d,观察有无拮抗线。

细菌或酵母菌与丝状真菌的相容性:①细菌或酵母菌与真菌之间的相容性:先划线接种细菌或酵母,呈三角环围形,约占平板面积的2/3,再于平板培养基中央点接丝状真菌。28~30℃,培养3~5 d,观察记录两菌间有无拮抗线。②细菌或酵母菌与真菌之间的相容性:同时点接细菌或酵母菌与丝状真菌,两点之间距离2~3 cm,28~30℃,培养3~5 d,观察记录两菌间有无拮抗线。

丝状真菌之间相容性:

将不同丝状真菌分别涂平板培养7 d,用打孔器切下直径为8 mm的菌饼,分别接种于定量培养基的平板的两端,两个菌饼之间的距离大于5 cm,于25℃培养3~5 d,观察有无拮抗线。

如果有拮抗线,说明两种菌种不能同时培养,或者说不能同时应用于同一个产品中;如果没有拮抗线,则说明两个菌种间可能应用于同一个产品中。

混合培养法:应用菌种筛选中使用的液体或固体培养基同时接种两个或两个以上的菌种(每个菌种提前检测活菌数),同时用相同的培养基分别接种单一菌种,25~30℃培养5 d,检测其纤维素酶、木质素酶活性及每种菌的活菌数。如果复合培养物的酶活性高于各单一培养物的酶活性,并且所接各种菌的活菌数都有增加,则此组合可以应用与生产。如果复合培养物的酶活性低于各单一培养物的酶活性或所接各种菌的活菌数都下降或部分下降,则不能应用于生产。

四、菌种定殖能力测试方法

秸秆中主要成分的降解需要各种相应酶来完成,而土壤中降解秸秆相应酶的数量相对少,降解秸秆需要时间长,在短时间内降解秸秆需要田间产生各种酶的微生物,添加到秸秆周围的微生物菌种正常生长繁殖,才能不断地向细胞外分泌各种酶,而添加到秸秆中的菌种受土壤抑菌作用的影响,多数菌种不能像无其他杂菌状态下一样生长,添加到土壤中后,多数菌种会被抑制而不能萌发,处于休眠状态或很快被其他土壤细菌杀死。因此,所筛选的菌种必须是在有秸秆存在的情况下,能够在土壤中长期存活,并快速生长繁殖的菌种,才能够有效分解秸秆,也就是筛选的菌种必须是在土壤中定殖能力强的菌种,只有这样的菌种才具有使用价值。

菌种定殖力测试前需要进行菌种标记,标记方法有抗生素标记、绿色荧光标记等,具体方法详见第二章。

第二章 秸秆生物降解高效复合菌群的构建

秸秆含有纤维素、半纤维素、木质素等有机质及作物生长所需的大量元素和微量元素。秸秆在设施土壤中，通过秸秆高效降解微生物菌群的作用，被定向快速分解，产生热量可以提高地温；产生CO₂可以提高作物光合效率；其分解中间产物可以供作物生长所需，增加土壤有机质；秸秆分解过程可以增加土壤酶活性，优化土壤微生物种群结构，提高土壤生物活性，减少病虫害发生；秸秆分解过程可以固定一定数量的氮源，实现氮肥缓释，减少化肥用量；从而改善设施农业越冬生产的不利环境，提高作物的产量和品质，减少CO₂向大气中的排放，实现秸秆在设施农业中的资源化、环保化利用。本研究根据酶工程学理论，筛选秸秆高效降解菌种；根据微生物生态学理论构建秸秆高效降解复合微生物菌群；根据微生物形态学理论、基因工程理论及遗传学理论，对秸秆高效降解微生物菌株进行微生物分类鉴定和遗传学分析。

一、复合微生物菌群的构建

（一）秸秆降解菌种分离纯化

秸秆主要成分包括纤维素、半纤维素和木质素，因此筛选高效纤维素、半纤维素、木质素分解菌，是利用微生物转化秸秆的关键。在本试验中对采集的各类样品和收集的相关菌剂进行了分离，并建立了以秸秆粉为唯一营养源的筛选模型，旨在为缩短初筛时间，快速、简单、有效地筛选到大量的产纤维素酶菌株，为进一步的复筛及今后的生产提供菌种。

1. 材料与方法

（1）试验材料

试验材料见表2-1。

表2-1 自采样品及购入的相关产品

样品 编号	样品名称	产地	采集境内描述		
			海拔/m	气压/HPa	气温/℃
A	微生物制剂	收集			
B	秸秆腐解样品	朝阳境内采集	216	983	22
C	腐熟阔叶-1	采集凤凰山	583	953	20
D	腐熟阔叶-2	采集凤凰山	381	949	24
E	腐熟针叶，表面有白色菌丝	采集凤凰山	339	970	24
F	秸秆腐解样品下的表面土样	采集凤凰山	220	989	20

续表

样品 编号	样品名称	产地	采集境内描述		
			海拔/m	气压/HPa	气温/℃
21	木桩	朝阳县小菠萝赤	—	—	—
22	杨树腐朽立木	朝阳县小菠萝赤	—	—	—
23	槐树腐朽立木	朝阳县小菠萝赤	—	—	—
24	伐木桩	辽宁省农业科学院 水土保持研究所实验基地	—	—	—
25	槐树腐朽立木	朝阳飞机场	—	—	—
26	杨树腐朽立木	锦州地区	—	—	—
27	槐树腐朽立木	锦州地区	—	—	—

(2) 培养基

马丁氏培养基—筛选真菌用。

牛肉膏蛋白胨琼脂—筛选细菌用。

改良高氏1号培养基—筛选放线菌用。

秸秆粉培养基：称取20 g 秸秆粉，加水1 000 mL，搅拌均匀，加热，加20 g 琼脂，不断搅拌使琼脂熔化，防止锅底烧糊。待琼脂全部熔化时，取三角瓶和试管分装后，121 ℃灭菌30 min，试管摆放成斜面，备用。

(3) 菌种分离方法

样品稀释：准确称取0.5 g 样品，放入已经事先灭菌的、装有玻璃珠和50 mL 无菌水的三角瓶中，置于振荡器上振荡30 min，使细胞分散，静置1 min，即成 10^{-2} 稀释液，用移液器吸取1 mL 10^{-2} 稀释液，移于装有9 mL 无菌水的试管中，混合均匀，以此类推，连续稀释成 10^{-3} ， 10^{-4} ， 10^{-5} ， 10^{-6} ， 10^{-7} ， 10^{-8} ， 10^{-9} 稀释度。

涂布平板法：先将各种培养基熔化后趁热倒入无菌平板中，待凝固后编号，然后用移液器（枪头灭菌）吸取0.1 mL 菌液对号接种在不同稀释度编号的琼脂平板上（每个编号设置2次重复）。再用无菌刮铲将菌液在平板上涂抹均匀，由低浓度向高浓度涂抹。将涂抹好的平板平放于桌上20~30 min，使菌液渗透入培养基内，然后将平板倒转，于27 ℃培养箱里培养，至菌落长出后即可分离并计数。

组织分离法：对于从外观看霉层明显，不易采用稀释法的样品，采取组织分离法分离，即先将材料先用70%酒精浸泡30 s，然后用镊子夹住在火焰上将酒精烧去，随后用灭菌的解剖刀将组织的表层去掉，剩余的部分切成小块组织，用镊子将其放入事先标记好的平板中，每平板上均匀摆放4点。每个样品2次重复。

样品中菌数的计算方法：（培养皿内菌落数×该培养皿接种液的稀释倍数）/样品的重量。

2. 结果与分析

(1) 不同培养基对分离菌数的影响

不同培养基对分离菌数的影响见表2-2。

表 2-2 样品在不同培养基上菌数情况比较

培养基名称	真菌/ (cfu·g ⁻¹)	细菌/ (cfu·g ⁻¹)	放线菌/ (cfu·g ⁻¹)	种类
马丁氏培养基	6.0 × 10 ⁶	—	—	—
牛肉膏蛋白胨琼脂	—	4.0 × 10 ⁸	—	21
改良高氏 1 号培养基	—	—	1.33 × 10 ⁷	—
秸秆粉培养基	4.0 × 10 ⁶	2.0 × 10 ⁸	0.5 × 10 ⁷	11
琼脂板 (空白对照)	—	—	—	—

注：表中数据为 3 次重复平均值。

采用秸秆粉作为唯一营养源的秸秆粉培养基上可以生长真菌、细菌、放线菌，从琼脂板空白对照上无菌落生长，可以明确能够在秸秆粉培养基上生长的菌体是利用秸秆中的某些成分才得以生存繁殖，从表 2-2 中可以看出，与马丁氏培养基、牛肉膏蛋白胨琼脂和改良高氏 1 号培养基等经典微生物培养基相比秸秆粉培养基在真菌、细菌及放线菌菌数上有所减少。由于在不同的培养基上菌落的生长形态不同，不易比较菌群是否有差别，单从菌落形态上看，3 种培养基的菌株种类共约有 21 种，而秸秆粉培养基仅约 11 种菌落，说明秸秆粉培养基可以筛掉大量不能利用秸秆的菌种，大大减少了工作量，因此本筛选方法可以作为秸秆降解菌的快速筛选方法。

(2) 菌种分离、纯化及保藏

菌种分离、纯化及保藏见表 2-3。

表 2-3 菌种分离、纯化及保藏情况

cfu/g

样品编号	真菌	细菌	放线菌	总数
1	15	2	2	19
2	2	7	1	10
3	3	8	3	14
4	6	5	1	12
5	11	3	2	16
6	2	4	3	9
7	5	4	1	10
8	2	4	1	7
9	3	0	2	5
10	8	3	2	13
11	6	2	2	10
12	12	1	1	14
13	4	2	2	8
14	3	1	0	4
15	2	1	1	4
16	10	1	2	13
17	8	1	0	9
18	6	1	0	7
19	5	1	1	7
20	10	1	0	11
合计	123	52	27	202

3. 结论与讨论

从20个样品中共分离到菌株202株，其中真菌123株、细菌52株、放线菌27株。

菌种筛选是微生物应用研究的第一步，也是最为重要步骤。为了花费最少的工作量，在更短的时间里取得最大的筛选成效，就要求采用效率较高的科学筛选方案和手段。菌种分离工作以量为主，应尽可能快速、简单。本试验建立了用于降解秸秆的纤维素酶产生菌的初筛模型，将原来的前期工作量减小为1/3。

(二) 产纤维素酶菌种、产木质素酶菌种初筛

对从样本中分离纯化到的菌种，利用定性鉴别培养基进行产纤维素酶、木质素酶的菌种进行初筛。

1. 材料与方法

(1) 菌株

从样品中分离的菌株，其中细菌52株、放线菌27株、真菌123株。

(2) 培养基

纤维素酶产生菌的鉴别：应用刚果红纤维素培养基（g/L）：KH₂PO₄ 0.5 g，MgSO₄·7H₂O 0.5 g，琼脂 14.0 g，明胶 20.0 g，纤维素粉 1.88 g，刚果红 0.2 g，蒸馏水 1 000 mL，调节pH至7.0。

木质素酶产生菌的鉴别：采用添加愈创木酚的变色反应培养基（g/L）：KH₂PO₄ 1.0 g，NaH₂PO₄ 0.2 g，MgSO₄·7H₂O 0.5 g，V_{B1} 0.1 mg，CaCl₂ 0.1 mg，FeSO₄·7H₂O 0.1 mg，ZnSO₄·7H₂O 0.01 mg，CuSO₄·5H₂O 0.2 mg，愈创木酚 100 mg/L，NH₄NO₃ 8.06 mg，琼脂 20 g，蒸馏水 1 000 mL，调节pH至5.0。

(3) 方法

产纤维素酶菌种确定：将菌种接种于刚果红纤维素培养基，28℃培养2~5 d，根据透明圈大小对纤维素分解能力强的菌株进行初步筛选。

产木质素酶菌种确定：将初步获得的纯菌株接种在添加愈创木酚的变色反应培养基上，培养2~5 d，根据变色圈大小对木质素酶活力强的菌株进行初步筛选。

2. 结果

筛选获得具有纤维素酶活和木质素酶活的菌株共计45株，其中细菌12株、放线菌7株、真菌26株。其菌落形态及显微形态见表2-4~表2-6。

表2-4 细菌菌株菌落形态及显微形态描述

菌株号	菌落形态	显微形态
A-01-2	菌落奶油色，圆形，边缘规则	短杆，不产生芽孢
A-01-6	菌落白色，圆形，边缘规则	椭圆形或柱形，产生芽孢，端生
B-02-8	菌落淡黄色至白色，边缘不规则	长杆，产生芽孢，中生或偏中生
B-05-2	菌落白色，荷包蛋状	短杆，不产生芽孢
B-06-9	菌落灰色，圆形，边缘不规则	短杆，芽孢端生
B-08-12	菌落边缘白色，中央微黄，菌落突起	短杆，产生成串的芽孢，芽孢中生或偏中生
B-09-1	菌落奶油色，突起，具褶皱	短杆，产生芽孢，中生或偏中生

续表

菌株号	菌落形态	显微形态
B-11-6	菌落深褐色，圆形，边缘规则	椭圆形或柱形，产生芽孢
B-15-1	菌落边缘白色，中央微黄色，突起	短杆，产生芽孢，中生或偏中生，成串生长
B-16-9	菌落粉色，圆形，边缘规则	短杆，芽孢中生
B-18-7	菌落灰白色，具褶皱	球形，不产生芽孢
B-18-12	菌落透明，形状不规则，基内生长良好。	长杆，产生芽孢，中生

表 2-5 放线菌菌株菌落形态及显微形态描述

菌株号	菌落形态	显微形态
A-01-1	菌落白色，粉状，边缘蓝色，背面产生黄色色素	菌丝弯曲
A-01-7	菌落白色，粉状，背面黄色	菌丝大多较直，尖端弯曲
A-02-4	菌落灰色，粉状，具轮纹	菌丝较直
A-05-2	菌落暗红色，粉状	菌丝弯曲
A-06-9	菌落浅绿色，粉状	菌丝较直
A-13-3	菌落灰白色，粉状，具褶皱	菌丝较直
A-19-3	菌落边缘白色，中央淡褐色，粉状	菌丝大多较直，末端弯曲

表 2-6 真菌菌株菌落形态及显微形态描述

菌株号	属种	形态
F-01-1	曲霉属 <i>Aspergillus</i>	菌落黄色，分生孢子头球形，孢子球形，光滑或稍粗糙
F-01-5	青霉属 <i>Penicillium</i>	菌落青色，产孢梗帚状分支，孢子圆形
F-01-6	木霉属 <i>Trichoderma</i>	菌落绿色，生长迅速，孢子短圆柱形，光滑
F-02-10	木霉属 <i>Trichoderma</i>	菌落绿色，生长迅速，孢子球形至亚球形，光滑
F-02-12	帚霉属 <i>Scopulariopsis</i>	菌落烟灰色，分生孢子梗单生或丛生，具梗基，孢子卵形，光滑
F-03-3	曲霉属 <i>Aspergillus</i>	菌落黑色，分生孢子头球形，孢子球形，光滑或稍粗糙
F-04-6	漆斑菌属 <i>Myrothecium</i>	菌落白色，上附着深绿色漆斑，产孢梗轮枝状分枝，孢子棒状，两端具油球
F-05-1	未定属	菌落白色，粉状，孢子单生于产孢梗上，孢子近球形，基部平截
F-05-5	粘帚霉属 <i>Gliocladium</i>	菌落浅绿色，产孢梗初期轮枝状分枝，帚状分枝，孢子长椭圆形，一端平截
F-06-2	拟青霉属 <i>Paecilomyces</i>	菌落淡紫色，产孢梗瓶状，顶端尖细，孢子椭圆形，大小不均，具厚垣孢子
F-06-14	地霉属 <i>Geotrichum</i>	白色，奶油状；菌丝叉状分枝，分生孢子圆柱形，两端稍钝圆
F-08-3	葡萄穗霉属 <i>Stachybotrys</i>	菌落黑色，瓶梗梨形，透明，分生孢子椭圆形，橄榄绿色，具疣突
F-08-7	青霉属 <i>Penicillium</i>	菌落深绿色，分生孢子梗帚状分枝，孢子近球形，光滑
F-09-1	漆斑菌属 <i>Myrothecium</i>	菌落白色，上附着巧克力色漆斑，产孢梗轮枝状分枝，孢子纺锤形
F-10-4	枝孢属 <i>Cladosporium</i>	菌落墨绿色，芽枝产孢
F-10-12	毛壳菌属 <i>Cheatomium</i>	菌落白色，后期着生黑色子囊壳，子囊壳附属丝二叉状分枝
F-11-2	帚霉属 <i>Scopulariopsis</i>	菌落淡棕色，分生孢子梗丛生，具梗基，孢子近球形，具疣突
F-12-5	拟青霉属 <i>Paecilomyces</i>	菌落黄褐色，产孢梗瓶状，顶端尖细，孢子椭圆形，大小不均，具厚垣孢子
F-13-3	曲霉属 <i>Aspergillus</i>	菌落深褐色，分生孢子头球形，孢子球形，粗糙
F-15-9	毛壳菌属 <i>Cheatomium</i>	菌落白色，后期着生黑色子囊壳，子囊壳附属丝波浪状
F-16-3	金孢属 <i>Chrysosporium</i>	菌落白色至黄色，孢子单生于短梗上，孢子基部平截的近球形
4225	枝穗霉属 <i>Clonostachys</i>	菌落背面近无色、淡黄色至浅黄色。菌落表面细粒状，白色或微黄色，后期变为褐色小点