

堆肥中高效降解纤维素林丹复合菌系的构建及功能

牛俊玲¹, 李国学¹, 崔宗均^{2*}, 王伟东², 刘建斌²

(1. 中国农业大学资源环境学院, 北京 100094; 2. 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100094)

摘要:以 4 种高温期的堆肥样品为材料, 经 2 种筛选方法、多代淘汰及其不同系之间优化组合, 最后筛选驯化出一组能有效降解纤维素和林丹的复合微生物菌系。该复合系对滤纸、脱脂棉、稻秸粉和锯末等不同纤维素材料均有较强分解能力, 相比之下对天然纤维素含量高的碳源(如滤纸、脱脂棉)分解活性更高。两者的 CMC 糖化活性在第 5 d 都达到 40 U 以上, 分解率达到 95 % 以上。该复合菌系能在较大的 pH 范围内保持高的纤维素林丹分解活性, 在 pH 为 7.0、8.0、9.0 条件下林丹降解率均较高, 达到 45 % 以上, 而纤维素分解率也都在 90 % 以上。而且在 pH 6~9 之间的培养条件下, 林丹降解与滤纸分解之间有很好的 consistency。

关键词:堆肥; 纤维素林丹分解菌; 复合系; 功能

中图分类号: X705 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2005)04-0186-05

Construction and Function of a High Efficient Complex Microbial System to Degrade Cellulose and Lindane in Compost

NIU Jun-ling¹, LI Guo-xue¹, CUI Zong-jun², WANG Wei-dong², LIU Jian-bin²

(1. College of Resources and Environmental Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 2. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: A complex microbial system capable of degrading cellulose and lindane with high efficiency was isolated from four compost heaps. It was selected and domesticated through two methods and by combination of different microbial communities. The results show that the complex microbial system can decompose filter paper, absorbent cotton, rice straw powder and sawdust effectively, especially has high degrading activity for the materials with higher native cellulose such as filter paper and absorbent cotton. As for both of them, the CMC saccharification activity is more than 40 U and the degradation efficiency is more than 95 % on the 5th day of inoculation. The complex microbial system can also keep a higher degrading capability in a wider range of pH. Filter paper and lindane can be degraded effectively by the complex microbial system during pH 7.0~9.0, and the degradation rates are more than 90 % and 45 % respectively. Under pH 6.0~9.0, there is a good consistency between the degradation of Lindane and the decomposition of filter paper.

Key words: compost; cellulose and lindane degradation bacteria; complex microbial system; function

木质纤维素占地球光合产物的 60 % 以上, 也是有机废弃物的主成分。因其结构坚硬, 分解难, 在堆肥化处理中一直成为限制堆肥化速度的因素。因此, 加速木质纤维素的分解便成为堆肥充分腐熟的关键^[1, 2], 对纤维素资源的开发利用也具有重要意义。

自然界的纤维素在多种微生物的共同作用下可以彻底分解, 但近百年纯培养微生物学技术未能很好地解决天然纤维素的分解。因此近年混合菌的作用逐渐引起重视^[3], 笔者等利用限制性培养技术和菌群之间的优化组合, 已成功筛选和构建一组高效而稳定的纤维素分解菌复合系 MC1^[4~6], 证实了人工构建微生物群体的高效纤维素分解能力和稳定性。另一方面, 虽然我国在 1984 年全面禁止生产和使用六六六, 但从 1990 年起, 我国又批准林丹有限制地在森林治虫、治蝗以及防治小麦浆虫等方面使用^[7](工业品六六六活性组分 γ -666 含量达到 99 %

以上时成为林丹), 使有机氯产品在工农业生产中普遍应用, 因此, 减少有机氯农药在环境中的残留, 对环境保护和食品安全工作具有重要意义。近年来一些研究表明, 土壤中存在分解六六六的微生物, 在高温厌氧和微耗氧条件下分解速度较快^[8~10]。这些为筛选高效降解有机氯物质的微生物组合提供了可能。

本研究在成功构建高效而稳定的纤维素分解菌复合系 MC1 的基础上, 进一步利用微生物之间的协同关系, 驯化构建了能在高温和微好氧条件下有效降解纤维素与林丹双重功能的微生物复合系, 本文报告该复合系的驯化构建过程、降解功能及其部分

收稿日期: 2004-11-06; 修订日期: 2005-01-04

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(2002BA516A03); 国家高技术研究发展计划(863)项目(2002AA245031)

作者简介: 牛俊玲(1972~), 女, 山西长治人, 博士研究生, 研究方向为固体废弃物处理与资源化。

* 通讯联系人

发酵特性.

1 材料与方法

1.1 供试堆肥样品

从各地堆肥场采集不同原料的好氧堆肥高温期的样品,分别为:牛粪+醋糟,猪粪+花生壳,稻秸+鸡粪,麦秸+人粪尿.

1.2 培养条件

纤维素蛋白胨培养基(PCS),其成分为 0.5% 蛋白胨,0.5% 纤维素(滤纸或麦秆粉),0.5% NaCl,0.3% CaCO₃,0.1% 酵母粉,pH 7.0,在 50℃ 静止培养,使处于 DO 为 0.02~0.4 mg/L 的微好氧.

1.3 复合菌系的驯化构建方法

(1) 分别从各堆肥样品中取 5g 加于 100 mL PCS 液体培养基中,在 50℃ 条件下恒温静止富集培养,待浸在培养液中的滤纸进入旺盛崩解断裂阶段时,将发酵液以体积分数 5% 的接种量加入同样的新鲜培养液中,观察培养液的气泡、滤纸的颜色及崩解情况、培养液混浊程度.在滤纸分解的旺盛时期,连续传代,并测定其 pH 值,边传代边筛选出滤纸分解速度快而且 pH 保持稳定的菌系,将其中 pH 反应偏酸的和偏碱的进行混合接种,传代直至稳定.然后,取 5% 已选出的几种纤维素分解复合系培养液分别接种于 PCS 培养基中,并加入浓度为 50 mg/L 的林丹,培养方法同上,然后逐渐提高林丹用量,至培养液中的林丹浓度达到 200 mg/L,选出在此林丹浓度下滤纸分解速度快、pH 稳定的复合菌系.

(2) 在 100 mL 加有一定浓度林丹的培养基中分别加入 5g 上述堆肥样品,培养基组成及培养条件均同上.待浸在培养基中的滤纸完全崩解断裂进行转接.连续传代并逐渐提高林丹用量,至培养液中的林丹浓度达到 200 mg/L,将 pH 反应偏酸的和偏碱的培养液混合接种,边传代边筛选出滤纸分解速度快的复合菌系.

以上 2 步同时进行,最后将经分别筛选出的菌系混和接种,连续传代,直至选出一组滤纸分解速度快、pH 稳定以及林丹降解率高的高效稳定复合菌系.

1.4 复合菌系对不同纤维素材料的分解能力

分别取 0.5g 的滤纸、脱脂棉、稻秸粉和锯末作为碳源制作 100 mL PCS,接种 5 mL 菌液,50℃ 静止培养,接种后的 1、3、5、7d 分别测定培养液中的纤维素酶活,5d 时测定纤维素材料的分解率.

1.5 复合菌系在不同初始 pH 条件下的降解特性

将 5 mL 菌液接种到 pH 分别调成 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 的 100 mL PCS 中,培养液中林丹浓度为 100 mg/kg,0.5g 滤纸作为纤维素材料,培养条件同上.接种后的 1、3、5、7d 分别取培养液的上清液 1 mL 用来测定培养液中的纤维素酶活,3d 时测定滤纸的分解率和 7d 测定林丹降解率.

1.6 测定方法

纤维素酶活性的测定采用 CMC 糖化力法^[4].

纤维素材料的分解率测定:将培养液直接以 3 000r/min 离心,倒上清液,用盐酸和硝酸的混合液冲洗而消除菌体^[11],离心,清水洗,离心,105℃ 烘干后称重,计算减重和分解率.

林丹降解能力的测定:将加林丹处理发酵的培养液采用丙酮-石油醚提取,浓硫酸净化,惠普 HP-4890D 型气相色谱仪测定,测定条件为 Equity-5 型毛细管柱,长 30 m,直径 0.32 mm,柱温从 120℃ 程序升温至 260℃,升温速度 20℃/min,进样口温度 280℃,电子捕获检测器,温度为 280℃,保留时间 22 min^[12].

林丹降解率 % =

$$\frac{\text{对照培养液中的含量} - \text{发酵液中的含量}}{\text{对照培养液中的含量}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 复合菌系的筛选与驯化

在 4 种堆肥样品中,麦秸+人粪尿(A1)、稻秸+鸡粪(B1)2 样品培养液中的滤纸分解速度较快,经 3d 后相当于培养物 0.5% 的滤纸全部崩解掉,牛粪+醋糟(C1)、猪粪+花生壳(D1)次之.随着传代,它们的滤纸分解速度下降,培养液的 pH 值也发生了变化,A1、C1、D1 培养液趋于微酸性,B1 培养液趋于微碱性(表 1).将 A1、C1、D1 分别与 B1 混合接种,连续传接若干代后,各菌系的滤纸分解能力及 pH 都趋于稳定.然后,将 A1B1、C1B1、D1B1 混合菌体分别接种于含 50 mg/L 林丹的培养基中进行驯化培养,逐渐提高林丹用量,至培养液中的林丹浓度达到 200 mg/L.从图 1 可以看出,培养 5d 后,林丹浓度在 100 mg/L 以下时,对纤维素降解复合菌系的功能没有明显影响.当林丹浓度增加到 150 mg/L 时,菌系对滤纸的分解率已有明显下降,这可能是由于复合菌系中有部分菌株的生长受到限制,但不是关键菌,所以此时 3 个菌系对滤纸的分解率仍均在 60% 以上,其中分解能力最强的 A1B1 的滤纸分解率为

表 1 4 种堆肥样品培养物的滤纸分解和 pH 随传代的变化

样品	第 1 代		第 5 代		第 10 代	
	崩解时间/ h	3 d 后的 pH	崩解时间/ h	3 d 后的 pH	崩解时间/ h	3 d 后的 pH
麦秸 + 人粪尿(A1)	72	6.0	96	6.9	96	6.5
稻秸 + 鸡粪(B1)	72	6.7	144	8.0	168	8.5
牛粪 + 醋糟(C1)	84	7.4	96	6.5	84	6.3
猪粪 + 花生壳(D1)	96	7.5	120	5.7	120	6.5

75.6 % .到 200 mg/ L 时滤纸分解率急剧下降 ,说明此浓度对纤维素降解菌系有明显抑制作用 ,3 个菌系对滤纸的分解率低于 50 % .可能在此浓度下 ,复合菌系中有部分关键菌株的生长受到限制 .所以在以下过程中均以 150 mg/ L 林丹浓度对菌系进行驯化 .在 3 种混合菌系中 ,纤维素分解能力最强的是 A1 B1 .

4 种堆肥样品在加有 50 mg/ L 林丹的培养液中对滤纸都有一定程度的分解能力 ,其中稻秸 + 鸡粪 (B2) 的分解速度最快 ,其后依次为麦秸 + 人粪尿 (A2) 、牛粪 + 醋糟 (C2) 、猪粪 + 花生壳 (D2) .随着传代次数及林丹浓度的逐渐增加 ,它们对滤纸的分解能力下降 ,培养液的 pH 值也发生了变化 .表 2 是在 150 mg/ L 林丹浓度的条件下 ,4 种堆肥样品培养物对滤纸的分解情况和 pH 值的变化 ,从中可以看出 ,B2 、D2 培养液趋于微碱性 ,A2 、C2 趋于微酸性 .将

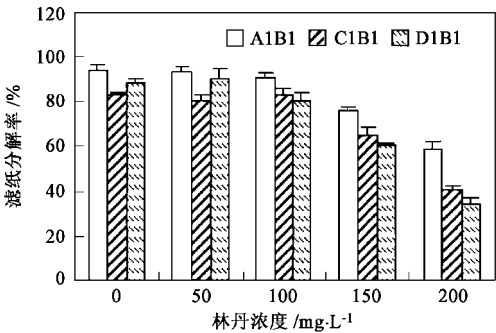


图 1 纤维素分解复合菌在不同浓度林丹的条件下对滤纸的分解情况

Fig.1 Degradation capability of filter paper by the cellulose-degradation microbial community under different lindane concentration

这 4 种样品的培养液互相混和接种 ,连续传接若干代 ,结果得到 2 组滤纸分解速度快的复合菌系 A2B2 、B2C2 .

表 2 150 mg/ L 林丹条件下 4 种堆肥样品培养物的滤纸分解和 pH 随传代的变化

测定项目	麦秸 + 人粪尿(A2)	稻秸 + 鸡粪(B2)	牛粪 + 醋糟(C2)	猪粪 + 花生壳(D2)
崩解时间/ h	120	168	144	240
3 d 后的 pH	6.2	8.5	5.8	8.4

最后将筛选出的菌系 A1 B1 、C1 B1 、D1 B1 与 A2B2 、B2C2 互相混和接种 ,在 200 mg/ L 林丹浓度的培养基中连续传接 30 代 ,得到一组滤纸崩解速度快 ,林丹降解率高的复合菌系 (CMS) .

2.2 复合菌系 CMS 对不同纤维素材料的分解特性

分别以滤纸 、脱脂棉 、稻秸粉和锯末作为碳源进行试验 ,结果表明 (图 2) ,该复合菌系在所有供试纤维素材料的培养液中均能生长 ,但对不同材料的降解及其所产生的纤维素酶活性有很大差别 .4 种纤维素材料中对脱脂棉和滤纸的分解活性最高 ,两者的 CMC 糖化活性在第 5 d 都达到高峰 ,达到 40 U 以上 ,此后下降 .锯末作为碳源时 ,测得的纤维素酶活很低 ,仅有 10 U 左右 ,稻秸作为碳源时的活性介于前 2 类物质的中间 .用减重的方法对分解率进行测

定时 ,5 d 内 95 % 以上的脱脂棉和滤纸已分解消失 ,稻秸分解率也达到 50 % 以上 (表 3) .可见 ,该复合菌系对纤维素材料的分解效果与材料中纤维素含量的高低成正比 ,对较纯的纤维素材料脱脂棉和滤纸分解率高 ,对纤维素含量较低 、木质素含量相对较高的锯末分解能力低 .

表 3 CMS 对不同纤维素材料的分解能力

测定项目	锯末	稻秸	脱脂棉	滤纸
分解率/ %	23.5	54.9	95.5	98.3

2.3 复合菌系 CMS 在不同 pH 条件下的降解特性

从图 3 可以看出 ,不同初始 pH 的培养液接种后 ,它们的 pH 很快向中性方向变化 ,培养 1 d 后 ,原

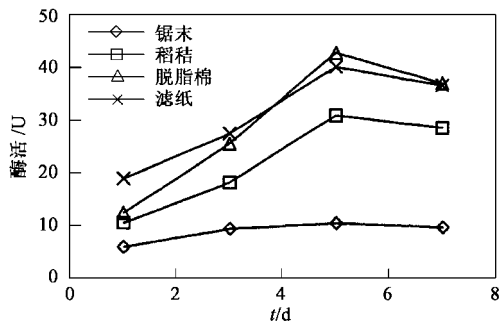


图 2 CMS 对不同纤维素材料产酶活性的影响

Fig. 2 Effect of different cellulose materials on cellulase activity by CMS

pH 为 4 ~ 9 的发酵液的 pH 都集中到 7 左右,此后 pH6 ~ 9 的处理保持在 7.0 左右一直到第 3d 过后逐渐升高;而 pH4、pH5 处理的 pH 值此后又持续下降到 5.5 左右,3d 后开始升高;pH10 处理的也从培养开始呈下降趋势,但下降较慢,在第 3d 降到最低值 7.2. 发酵液的 pH 下降可能由于复合菌系在分解纤维素的过程中产生大量的有机酸造成的,所以在 pH 降到最低值时是发酵液中滤纸分解的最旺盛时期,随着滤纸的减少及有机酸的进一步分解转化,pH 就逐步回升.从图中可以看出,除原 pH4 和 pH5 的始终未升到 8.0 外,其余的均在升到 8.0 后又有所下降,这与崔宗均等^[4]所做的纤维素复合菌系发酵液的 pH 变化情况不一样.在他们的实验中,不同初始 pH 处理发酵液的 pH 值在滤纸全部崩解后逐渐上升最后稳定在 8.0 ~ 8.5 之间.这个差异可能是由于在本实验中,林丹在碱性条件下脱 HCl,使得发酵液的 pH 值没有稳定在 8.0 以上.

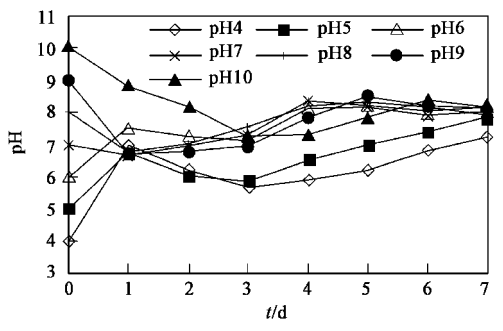


图 3 不同初始 pH 下接种后发酵液中 pH 值的变化

Fig. 3 Change of pH in culture media after inoculating with different pH

对不同 pH 条件下发酵液的产酶历程进行测定,结果表明(图 4),发酵前 5d 所有处理的纤维素酶活都随着发酵时间延长而逐渐升高,在第 5d 出现

最高峰,之后迅速下降.其中以 pH7 和 pH8 处理的活性最高,pH9、pH6、pH10 和 pH5 分别次之,pH4 活性最低.可见该复合系能在较大的 pH 范围内均保持高的纤维素分解活性,但在中性及偏碱环境中活性最强.

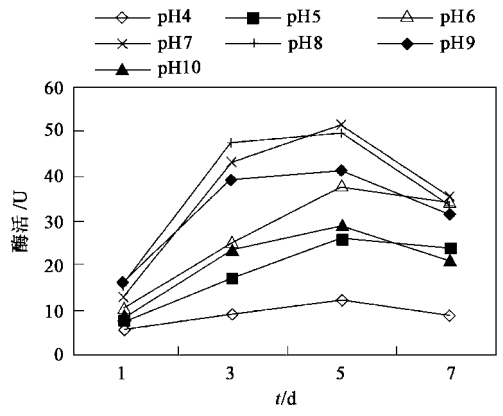


图 4 不同初始 pH 条件下纤维素酶活的变化

Fig. 4 Cellulase activity after inoculating with different pH

该复合菌系在不同初始 pH 培养条件下 3d 内对滤纸的分解情况见表 4.从表中可以看出,在 pH7 ~ 9 条件下,3d 内滤纸的分解率都达到了 90 % 以上,pH6 处理的次之,pH4、pH5 和 pH10 处理的滤纸分解率明显较低,均在 50 % 以下.本实验的结果显示,用 CMC 糖化力法测定的纤维素酶活与滤纸的分解有较好的一致性.

对不同初始 pH 条件下林丹降解率的测定结果表明(表 4),pH8 和 pH9 处理的发酵液中林丹的降解率较高,达到了 50 % 以上,其次是 pH10、pH7 和 pH6,而 pH4 和 pH5 几乎没变化.可见在发酵过程中,在纤维素分解最佳的 pH7 ~ 9 范围内,也同样有利于林丹的降解,而在纤维素分解较少的 pH10 处理条件下,林丹的降解率高达 49.62 %,这主要是由于在发酵初期培养液即处在碱性条件下,林丹脱 HCl 分解较多造成的.

表 4 不同初始 pH 下接种后复合菌系对滤纸和林丹的降解情况

Table 4 Degradation of cellulose and lindane after inoculating with different pH

pH	3d 滤纸分解/ %	7d 林丹降解率/ %
4	24.7	8.14
5	43.8	5.52
6	81.4	36.36
7	94.2	47.20
8	92.7	57.36
9	90.5	54.8
10	43.6	49.62

3 结 论

(1)从堆肥高温期的样品中筛选驯化出一组能有效降解纤维素和林丹的复合微生物菌系.该复合菌系对不同纤维素材料均有较强的分解能力,且分解效果与材料中纤维素含量的高低成正比.该复合菌系对木质素含量高的物质分解率相对较低,可能是由于其对木质素分解较弱造成的.

(2)本复合菌系能在较大的 pH 范围内保持高的纤维素林丹分解活性,这有利于其在不同物料堆肥中的广泛应用.

(3)本复合菌系在纤维素分解后期形成碱性环境是造成林丹分解的原因之一,但在 pH 7、pH 8 和 pH 9 条件下林丹降解率均较高,也都达到 45 % 以上,pH 8 和 pH 9 处理的降解率甚至高于 pH 10,而且在 pH 6~9 之间的培养条件下,林丹降解与滤纸分解之间有很好的 consistency,说明该复合菌系在降解纤维素的同时,本身对林丹有一定的生物降解功能,其作用机理正在进一步研究.

参考文献:

[1] 李国学,张福锁. 固体废物堆肥化与有机复混肥生产[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000. 75~98.

[2] Tuomela M, Vikman M, Halakka A, *et al.* Biodegradation of

lignin in a compost environment: a review[J]. *Bioresource Technology*, 2000, **72**(2): 169~183.

[3] 史玉英,沈其荣,姜无忌,等. 纤维素分解菌群的分离和筛选[J]. *南京农业大学学报*, 1996, **19**(3): 59~62.

[4] 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[J]. *环境科学*, 2002, **23**(3): 36~39.

[5] Haruta S, Cui Z, Huang Z, *et al.* Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability[J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2002, **59**: 529~534.

[6] 朴哲,崔宗均,苏宝林,等. 一组高效稳定纤维素分解菌复合系 MCI 的酶活特性[J]. *中国农业大学学报*, 2003, **8**(3): 74~79.

[7] 江孝绰,李瑞琴,江希流. 施用林丹跟踪监测研究[J]. *农业环境保护*, 1994, **13**(6): 252~255.

[8] 沈德中. 污染物的原位生物处理-生物清消技术[J]. *环境科学进展*, 1993, **1**(5): 56~59.

[9] Michel F C, Reddy Jr C A, Forney L J, *et al.* Microbial degradation and humification of the lawn care pesticide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid during the composting of yard trimmings[J]. *Appl Environ Microbiol.* 1995, **61**(7): 2566~2571.

[10] 李国学,孙英. 高温堆肥对六六六(HCH) 和滴滴涕(DDT) 的降解作用研究[J]. *农业环境保护*, 2000, **19**(3): 141~144.

[11] Updegraff D M. Semimicro determination of cellulose in biological materials[J]. *Analytical Biochemistry*, 1969, **32**: 420~424.

[12] GB/ T 14551-93, 生物质量: 六六六和滴滴涕的气相色谱测定法[S].