

两组纤维素分解菌复合系 MC-A1 和 MC-N1 的筛选及其协同功能初探

张瑞清,袁堂玉,孙燕霞,刘克宁

(山东省烟台市农业科学研究院,山东烟台 265500)

摘要:采用连续传代方法分别从自制堆肥和几种自然发酵基质中筛选出纤维素分解能力较强的两组混合菌复合系 MC-A1 和 MC-N1,前者是通过高温摇瓶发酵定期传代获得的耐高温好氧性的纤维素分解菌群,后者则是通过高温静置培养定期传代获得的耐高温兼氧性的纤维素分解菌群,这两组纤维素分解菌复合系在 96 h 内对天然纤维素材料麦秆粉的分解率分别达到 42% 和 38%,分解速度最快时期均发生在 48~96 h 内,96 h 以后麦秆粉分解率迅速减缓。麦秆粉发酵培养液先接种好氧性纤维素分解菌复合系 MC-A1 摇瓶发酵 96 h,再接种兼氧性纤维素分解菌复合系 MC-N1 静置培养 96 h,麦秆粉的分解效率可以提高到 47%,说明这两组纤维素分解菌复合系在非天然纤维素分解过程中发挥协同作用。

关键词:纤维素分解;复合系;高温;好氧;兼氧;协同功能

中图分类号:X172; X705 **文献标识码:**A

Selection and cooperative functionality of two groups of cellulose degrading microbial communities MC-A1 and MC-N1 with different degradation effects

ZHANG Rui-qing, YUAN Tang-yu, SUN Yan-xia, LIU Ke-ning

(Yantai Academy of Agricultural Sciences, Yantai 265500, China)

Abstract: We screen two groups of composite microbial systems, MC-A1 and MC-N1, with stronger cellulose degrading capabilities from homemade compost heap and several natural fermentation materials by regular regeneration during incubation. MC-A1 is a composite thermophilic aerobic cellulolytic microbial community which is acquired by a subculture technique of shake-flask-fermentation broth, while MC-N1 is another composite microbial community with thermophilic anaerobic cellulolytic capability which is obtained by static cultivation and regular regeneration. It is discovered that the degradation rates of communities MC-A1 and MC-N1 for wheat-straw powder can reach 42% and 38% within 96 h. Their quickest degradation rates occur between 48 h and 96 h, but these rates steeply decline after 96 h. This degradation rate can reach 47% by incubation of MC-A1 through 96 h shake-flask-fermentation and then incubation of MC-N1 through 96 h static cultivation. This demonstrates that these two cellulolytic microbial communities show cooperative function in the course of the degradation of non-natural cellulose.

Key words: cellulose degradation; composite microbial system; high temperature; aerobic; anaerobic; cooperative functionality

随着社会的发展和人们消费水平的提高,城乡生活垃圾日益增多,其中数量最大的就是纤维素类物质,有关纤维素分解方面的研究对于减轻城乡固体废弃物对环境造成压力和开展纤维素资源化利用具有十分重要的意义^[1]。从自然环境中分离筛选纤维素分解菌已有诸多相关报道,但鉴于纯培养分离获得的单一菌株对天然纤维素分解能力有限,且传代性状不稳定,因此近年来,混合菌在天然纤维素分解研究上的作用日益受到重视^[1-5]。堆肥过程中通过微生物接种的生物强化技术近年来备受国内外研究者的关注^[6],尤其在环境纤维素的分解方面,混合菌的作用研究日益受到重视^[7]。有目的的构建稳定的复合菌系将是环境微生物应用上的一条有效途径^[1]。崔宗均等^[1]摆脱传统的微生物纯培养分离方法,通过传代驯化获得一组能够强烈分解稻草等天然纤维素的高效稳定的纤维素分解菌群,但由于该混合菌群需要微好氧环境(DO在0.02~0.4之间)才能发挥最大活性,因此对于目前纤维素类废弃物的高温好氧发酵而言,其开发应用上会受到一定限制。为此,笔者利用两年的时间分离、筛选、复合获得两组不同类型的纤维素分解菌群,并利用这两组降解菌群对有机生活垃圾进行了发酵处理,可将有机生活垃圾的发酵周期大幅度缩减。本文仅对这两组纤维素分解菌系的筛选过程和功能差别进行报道。

1 材料与方 法

1.1 高温好氧纤维素分解菌的筛选和复合系 MC-A1 的创建

1.1.1 筛选基质的制作

自制堆肥:将生活垃圾筛下物(通过1.0 cm网眼)、新鲜鸡粪、多年堆积的腐烂枯枝落叶(取自西双版纳热带雨林多年堆积的底层枯枝落叶和表层腐殖化土壤)和麦秆渣(多年堆积麦秆堆周边自然腐烂的麦秆碎渣)等比例混合物,按3:2:1的体积比混合,调节至60%左右的含水量,堆积成长宽各2 m、高1 m的锥形体,室温下自然发酵,定期喷水和翻堆通风。

1.1.2 好氧纤维素分解菌复合系 MC-A1 的筛选及驯化

待堆体内部高温开始时(堆肥第3天,发酵温度60℃以上)分批次(发酵第3、9、15、21、28、40天)从堆体中部取样品10 g于100 mL生理盐水中振荡30 min,静置10 min,取10 mL悬浊液接种于100 mL麦秆粉发酵培养液(成分为0.5%蛋白胨,0.5% NaCl,0.2% CaCO₃,0.1%酵母粉,MgSO₄·7H₂O 0.03%,FeSO₄·7H₂O 0.001%,MnSO₄ 0.002%,ZnCl₂ 0.002%,CoCl₂ 0.0002%,土壤浸提液(土壤与去离子水以质量比1:1搅拌混合,过滤、灭菌后备用)10%,吐温80 1.5%,备用麦秆粉(麦秆粉碎后用1.5%的NaOH溶液浸泡24 h,清水冲洗数次再浸泡24 h,用酸调节pH值至中性,80℃烘干,筛取介于16目和40目筛孔之间的样品)1.5%,pH值自然,55℃、180 r/min条件下摇瓶培养。待培养液pH值严重偏酸或者偏碱(pH<6或pH>8)时,将偏酸和偏碱发酵物混合等量混合,静止10 min后取10 mL上清液转接至新鲜的麦秆粉发酵液中,如此反复转接数代,边传代边筛选出麦秆粉分解速度较快且pH值保持稳定的混合体,以至获得高效稳定的高温好氧纤维素分解菌复合系 MC-A1。

1.1.3 MC-A1 的纤维素分解能力

(1)滤纸片失重法:将1.50 g滤纸作为唯一碳源制作100 mL滤纸培养液(成分为0.5%蛋白胨,0.5% NaCl,0.2% CaCO₃,0.1%酵母粉,MgSO₄·7H₂O 0.03%,FeSO₄·7H₂O 0.001%,MnSO₄ 0.002%,ZnCl₂ 0.002%,CoCl₂ 0.0002%,吐温80 1.5%,80℃烘干的滤纸条1.5%,pH值自然),接种5 mL MC-A1菌液,55℃、180 r/min分别摇瓶培养72 h和96 h后,5000 r/min离心15 min,倒去上清液,用盐酸和硝酸的混合液冲洗而消除菌体,离心,水洗再离心,80℃烘干后称重,计算残留量和失重率。

(2)麦秆粉失重法:以麦秆粉为唯一碳源制作100 mL麦秆粉发酵培养液(参见1.1.2),接种5 mL MC-A1菌液,55℃、180 r/min摇瓶培养,每24 h测定一次麦秆残留量和失重率(方法同上)。

1.2 高温兼氧纤维素分解菌复合系 MC-N1 的筛选和分解力测定

1.2.1 筛选基质

排污口底层污泥、畜禽粪便堆积场底层发酵物、垃圾填埋场底层生活垃圾。

1.2.2 兼氧纤维素分解菌复合系 MC-N1 的筛选及驯化

参考崔宗均等^[1]的方法,略加改动。

(1)培养液:蛋白胨纤维素培养液(PCS),成分为 0.5% 蛋白胨,1.5% 纤维素(滤纸条),0.5% NaCl,0.2% CaCO₃,0.1% 酵母粉,55℃ 人工气候箱中静止培养。

(2)筛选及驯化方法:称取 1 g 分离基质接种于装有 5 mL PCS 培养液的试管中,55℃ 静止培养,待浸在培养液中的滤纸条刚刚分解断裂时,转接于同样的新鲜 PCS 培养液中,如此分别转接数代以后,将 pH 值反应偏酸的和偏碱的培养物混合接种,边传代边筛选出滤纸分解速度快且 pH 值保持稳定的混合体,以至驯化出高效稳定的兼氧纤维素分解菌复合系 MC-N1。

1.2.3 MC-N1 的纤维素分解能力

(1)滤纸片失重法:以 80℃ 烘干的滤纸条(1.50 g)为唯一碳源制作 100 mL PCS 培养液,接种 5 mL MC-N1 菌液,55℃ 分别静止培养 72 h 和 96 h 后,5000 r/min 离心 15 min,倒去上清液,用盐酸和硝酸的混合液冲洗而消除菌体,离心,水洗再离心,80℃ 烘干后称重,计算失重量和失重率。

(2)麦秆粉失重法:以备用麦秆粉(参见 1.1.2)为唯一碳源制作 100 mL PCS,接种 5 mL 菌液,55℃ 人工气候箱中静止培养,每 24 h 测定一次麦秆残留量和失重率(方法同上)。

1.3 两组纤维素分解菌复合系对麦秆的协同分解作用

为验证这两组不同类型纤维素分解菌复合系能否对同一纤维类物质(麦秆)发挥协同分解作用,本试验设计摇瓶发酵-静止培养和静止培养-摇瓶发酵两种试验方法,即根据摇瓶发酵和静止培养的先后顺序不同测定这两组复合系对麦秆的分解作用。试验选用的发酵培养液为麦秆粉发酵培养液(参见 1.1.2),每种复合系接种量为 10 mL。

2 结果与分析

2.1 高温好氧纤维素分解菌的分离筛选

2.1.1 高温好氧菌群的筛选

当自制堆肥温度升高到 60℃ 时开始 6 次取样(编号 D03, D09, D15, D21, D28, D40)分别接种到 100 mL 麦秆粉发酵培养液中摇瓶发酵,在最初几代摇瓶筛选过程中,麦秆粉培养液 pH 值很不稳定(表 1),传至第 4 代,培养液的 pH 值已出现严重分化,其中第 2 次(D09, pH = 5.0)和第 3 次(D15, pH = 5.5)样品的培养液 pH 值偏酸,其余 4 次样品的培养液严重偏碱(pH 值在 8.5~9.0 之间)。

表 1 堆肥不同批次样品摇瓶发酵周期、培养液 pH 和麦秆粉分解情况

Table 1 Fermentation period, cultivation pH and degradation of wheat-straw powder in cultivations with different incubation samplings from homemade compost heap

样品编号	第 1 代				第 4 代			
	发酵周期/h	pH 值	残留量	分解率/%	发酵周期/h	pH 值	残留量/g	分解率/%
D03	96	8.5	1.38 ± 0.02	8	240	9.0	1.36 ± 0.04	9
D09	72	5.5	1.32 ± 0.03	12	108	5.0	1.30 ± 0.03	13
D15	72	5.5	1.35 ± 0.02	10	120	5.5	1.33 ± 0.04	11
D21	96	8.0	1.37 ± 0.04	9	168	8.5	1.36 ± 0.03	9
D28	120	8.0	1.34 ± 0.03	11	144	8.5	1.32 ± 0.03	12
D40	96	8.0	1.42 ± 0.02	5	192	9.0	1.39 ± 0.02	7

注:反应底物均为 1.50 g 麦秆粉,反应初体积为 100 mL。

不同批次样品摇瓶发酵时麦秆粉失重率有所差别,但同一批次样品在最初几代转接过程中麦秆粉的分解率变化不大。第 1 代 5%~12%。从第 4 代开始,将偏酸的 2 组培养液混合,将偏碱的 4 组培养液混合,然后将这 2 组混合培养液再等比例混合,静止 10 min 后取 10 mL 上清液转接到新鲜麦秆粉发酵培养液中继续

摇瓶发酵,此后,待发酵液 pH 值又开始偏酸或者偏碱时,再将其等量混合继续转代,如此反复数代,获得一组连续 8 代以上培养液 pH 值稳定在 6.8 且麦秆粉失重率保持在 40% ~ 42% 的混合体,定名为高温稳定好氧纤维素分解菌复合系 MC-A1。

2.1.2 MC-A1 的纤维分解能力

接种 MC-A1 的滤纸培养液,48 h 观察到滤纸条多处断裂,72 h 滤纸条已经完全崩溃,96 h 测定其分解率达到 95% (表 2)。接种 MC-A1 的麦秆粉,48 h 观察到麦秆碎片边缘模糊,72 h 后麦秆碎片周边已成絮状,这时麦秆的分解率为 36%,96 h 后培养液已成絮凝状,再次测定麦秆分解率达到 42%。从 MC-A1 对麦秆粉的分解进程(图 1)可以看出,摇瓶发酵 48 ~ 72 h 之间麦秆粉迅速降解,96 h 以后麦秆粉分解率迅速下降,此后继续发酵至 144 h,麦秆粉的分解速度基本没有太大变化,残留量维持在 0.84 ~ 0.87 g 之间。说明 MC-A1 对麦秆粉的分解在 96 h 内达到最大分解效率。

表 2 MC-A1 对滤纸和麦秆的分解力

Table 2 Activity of filter paper and wheat-straw powder degradation by MC-A1

底物	72 h		96 h	
	残留量/g	分解率/%	残留量/g	分解率/%
滤纸	0.12 ± 0.01	92	0.07 ± 0.01	95
麦秆粉	0.96 ± 0.03	36	0.87 ± 0.03	42

注:反应底物均为 1.50 g,反应初体积为 100 mL。

2.2 高温兼氧纤维素分解菌的分离筛选

2.2.1 兼氧菌群的筛选

以排污口底层污泥、畜禽粪便堆积场底层发酵物、垃圾填埋场底层生活垃圾为分离基质进行 PCS 传代培养,期间将同一基质不同批次样品中 pH 值偏酸和偏碱的培养液混合后再继续传代培养。不同基质对滤纸条的分解速率仅在开始几代有差异,之后差异逐渐缩减,pH 值均稳定在 6.5 ~ 7.0,且分解速度逐渐趋于一致(表 3),因此 20 代以后将 3 组培养液混合成 1 组继续驯化,混合后,滤纸的崩溃速度迅速提高到 48 h,继续经历一个月的传代、驯化稳定期,获得 1 组 pH 值稳定在 6.5 且在 48 h 内将滤纸条(1.5%)完全降解的纤维素混合菌群,其在 4 L 规模的 PCS 培养液中连续投放滤纸,1 个月以后仍然有分解活性,将培养液再次转接到新鲜 PCS 培养液中,滤纸崩溃速度仍然维持在 48 ~ 72 h 之间。这组高效稳定的纤维素混合分解菌群定名为 MC-N1。

2.2.2 MC-N1 的纤维分解能力

采用失重法测定 MC-N1 对滤纸和麦秆粉的分解率(表 4),结果表明,滤纸在 72 h 内的平均分解率高达 94%,96 h 再次测定滤纸分解率达到 96%,而麦秆粉的平均分解率 72 h 为 28%,96 h 时达到 38%。每隔 24 h 测定麦秆粉残留量(图 2),MC-N1 对麦秆粉的快速分解期在 48 ~ 96 h 之间,96 h 以后麦秆的分解迅速减缓。

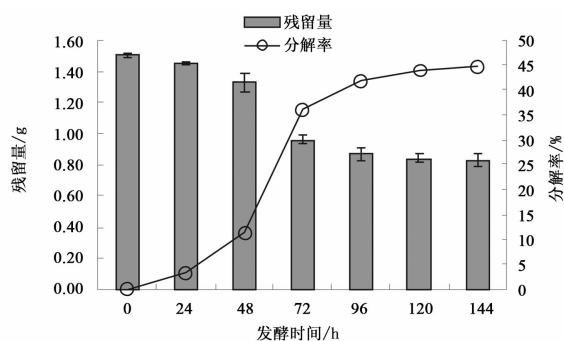


图 1 纤维素分解菌复合系 MC-A1 对麦秆粉的分解进程

Fig. 1 Degradation progress of wheat-straw powder by MC-A1

表 3 3 种基质培养物的滤纸崩溃速度(单位:h)

Table 3 Collapse point of filter paper in 3 different base materials

分离基质	第 1 代	第 4 代	第 10 代	第 20 代
污泥	120	120	96	72
畜禽粪便	108	144	108	72
生活垃圾	96	108	96	72

注:反应底物均为 1.50 g,反应初体积为 100 mL。

表 4 MC-N1 对滤纸和麦秆的分解力

Table 4 Activity of filter paper and wheat-straw powder degradation by MC-N1

底物	72 h		96 h	
	残留量/g	分解率/%	残留量/g	分解率/%
滤纸	0.09 ± 0.01	94	0.06 ± 0.01	96
麦秆粉	1.08 ± 0.05	28	0.93 ± 0.04	38

注:反应底物均为 1.50 g,反应初体积为 100 mL。

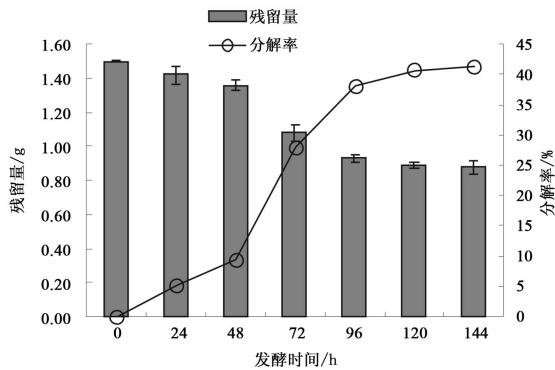


图2 纤维素分解菌复合系 MC-N1 对麦秆粉的分解进程

Fig.2 Degradation progress of wheat-straw powder by MC-N1

表5 两种复合系对麦秆分解力的协同作用

Table 5 Cooperation degradation rate of wheat-straw powder by MC-A1 and MC-N1

处理	发酵时间/h	残留量/g	分解率/%
A1-N1	96 × 2	0.80 ± 0.02	47
A1-A1	96 × 2	0.84 ± 0.02	44
CK-A1	96	0.87 ± 0.02	42
N1-A1	96 × 2	0.87 ± 0.03	42
N1-N1	96 × 2	0.87 ± 0.04	42
CK-N1	96	0.93 ± 0.03	38

注:反应底物为 1.50 g,反应初体积 100 mL。

2.3 两种纤维素分解菌复合系的协同分解作用

取两种复合系的二级发酵液各 5 mL 按不同添加次序加入到三级发酵液中发酵,接种 MC-A1 时选择摇瓶发酵,接种 MC-N1 时则静止培养。结果发现(表 5),当先加入 MC-A1 复合系进行第一阶段的摇床发酵,再加入 MC-N1 复合系进行第二阶段的静止培养(A1-N1 处理),两阶段联合作用对麦秆的分解率大幅度提高,高达 47%,显著($P < 0.05$)高于对照处理(CK-A1 处理,摇瓶发酵 96 h)下麦秆分解率 42%,而两阶段连续摇瓶发酵(A1-A1 处理)时的麦秆分解率(44%)较对照仅提高了 2 个百分点。反之,先加入 MC-N1 复合系进行第一阶段的静止培养再添加 MC-A1 进行第二阶段的摇瓶发酵(N1-A1 处理),尽管麦秆的分解率(42%)较两阶段持续静止培养(N1-N1 处理)和对照(CK-N1 处理,静止培养 96 h)的麦秆分解率 42% 和 38% 相当或有一定的提升作用,但较先摇瓶后静止培养处理(A1-N1 处理)显著($P < 0.05$)降低。这说明,先摇瓶发酵后静止培养(A1-N1 处理),这两个复合系对麦秆的分解存在一定的协同作用,而先静止培养后摇瓶发酵(N1-A1 处理),这两个阶段的分步发酵没有发挥协同作用。由此推断,这两个复合系具有不同的分解功能。

3 结果与讨论

本研究在前人研究方法的基础上进一步探索,通过好氧环境摇瓶发酵经代数转接获得一组高效稳定的高温好氧纤维素分解复合系 MC-A1,该菌群在 96 h 内对麦秆的分解率分别达到 42%,但 96 h 以后其分解能力迅速下降;而通过兼氧环境静止培养筛选获得的一组高效稳定的高温兼氧纤维素分解菌复合系 MC-N1,其 96 h 内对麦秆的分解率为 38%,96 h 以后其分解能力也迅速降低;二者联合作用可将麦秆的分解率提高到 47%,证明其在纤维素分解过程发挥了一定的协同作用,其原因可能是由于长期定向转接,菌群中能够良好适应该环境的微生物在特定培养条件下发挥特定的分解功能,不同的功能群体联合作用时产生了某种增益作用(synergistic collaboration)。由于这两组复合系在筛选方法和培养条件上有本质的区别,因此它们属于两类完全不同的纤维素分解菌复合系。此外,这两组菌群的菌种组成难以确定,本研究采用多种培养基试图从这两个菌群的发酵液中纯培养分离单菌落,但都未分离成功。纤维素分解菌复合系的未知性增加了其作用机理方面的研究难度,有待进一步深入探讨。

参考文献:

- [1] 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, (3): 36-39.
- [2] 王伟东,崔宗均,牛俊玲,等. 一组木质纤维素分解菌复合系的筛选及培养条件对分解活性的影响[J]. 中国农业大学学

报, 2004, 9(5): 7-11.

- [3] 张晓伦, 刘旭, 饶泽昌. 高效纤维素分解菌混合培养及其降解能力[J]. 南昌大学学报(理科版), 2005, 29(5): 500-502.
- [4] 牛俊玲, 崔宗均, 李国学, 等. 高效纤维素降解菌复合系的筛选构建及其对秸秆的分解特性[J]. 农业环境科学学报, 2005, 24(4): 795-799.
- [5] 董玉玲, 朱万斌, 郭鹏, 等. 一组小麦秸秆好氧分解菌系的构建及组成多样性[J]. 环境科学, 2010, 31(1): 250-254.
- [6] 周辉宇, 陆文静, 王洪涛, 等. 高效纤维素分解菌生物强化技术在工厂化好氧堆肥中的应用初探[J]. 农业环境科学学报, 2005, 24(1): 182-186.
- [7] 史玉英, 沈其荣, 娄无忌, 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.

(上接第 23 页)

参 考 文 献:

- [1] 陈汉斌, 郑亦津, 李法曾. 山东植物志(上卷)[M]. 青岛: 青岛出版社, 1992: 675-776.
- [2] 杨德奎, 孙京田. 珍珠菜属八种植物的花粉形态研究[J]. 广西植物, 2003, 23(2): 143-144.
- [3] 杨德奎, 吴晓霞. 山东酢浆草属花粉形态的研究[J]. 广西植物, 2004, 24(2): 128-129.
- [4] 杨德奎, 孙京田. 山东牵牛属植物叶片气孔器及花粉亚显微研究[J]. 山东科学, 2001, 14(2): 10-15.
- [5] 杨德奎, 王善娥, 郭小燕, 等. 山东鸭趾草科植物的花粉形态研究[J]. 山东师范大学学报(自然科学版), 2005, 20(3): 80-82.
- [6] 王伏雄, 钱南芬, 张玉龙, 等. 中国花粉形态研究[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 256-266.
- [7] 李景奇, 秦小平, 王聚瀛. 几种百合的花粉形态研究[J]. 武汉植物学研究, 1993, 11(2): 120-124.
- [8] 梁松筠. 豹子花属的花粉形态研究兼论与百合属的界限问题[J]. 植物分类学报, 1985, 22(6): 405-417.