

秸秆污泥堆肥产纤维素酶细菌的筛选及产酶条件优化

余婷婷, 葛 骁, 李买军, 张盛华, 褚艳春, 郭海宁, 王小治^①, 封 克 (扬州大学环境科学与工程学院, 江苏 扬州 225127)

摘要: 从添加秸秆进行堆肥处理的污泥中采集样品,通过富集培养和刚果红平板染色法筛选分离出具有纤维素降解能力的细菌,再通过酶活力测定从中分离筛选出 1 株相对高活性的产纤维素酶细菌 C1;通过基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析,初步确定该菌株为 *Devosia* sp.。利用单因素试验对目的菌株 C1 进行产纤维素酶发酵条件优化,结果表明菌株 C1 产纤维素酶的最佳发酵时间、培养温度、摇床转速以及最适初始 pH 值分别为 60 h、30 ℃、130 r·min⁻¹和 7.2~7.5,且在该条件下其滤纸酶(FPase)和羧甲基纤维素酶(CMCase)活力分别达 23.10 和 54.97 U·mL⁻¹。

关键词: 纤维素降解; 筛选; 酶活力; 条件优化; 鉴定

中图分类号: X172; X705 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-4831(2013)06-0768-05

Screening of Strains of Cellulase-Producing Bacteria in Compost of Sewage Sludge and Straw and Optimization of Cellulase-Producing Conditions. SHE Ting-ting, GE Xiao, LI Mai-jun, ZHANG Sheng-hua, CHU Yan-chun, GUO Hai-ning, WANG Xiao-zhi, FENG Ke (College of Environmental Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China)

Abstract: Samples collected from compost of sludge and straw were incubated for enrichment culture, and then strains of bacteria capable of decomposing cellulose were screened out with the Congo red staining plate method. Enzyme activities of the stains of bacteria were measured and one strain, relatively higher in cellulose-producing activity, was isolated as C1. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences revealed that the isolated strain of bacteria, C1, was preliminarily identified as *Devosia* sp. Single factor experiments were adopted to optimize the fermentation conditions for C1. Results show that for C1, 60 hours of incubation at 30 ℃ with the culture medium being in the range of 7.2~7.5 in initial pH in the shaker rotating at a rate of 130 r·min⁻¹ was the optimal cellulase-producing condition. Under such conditions, the activities of filter paper enzyme (FPase) and carboxymethyl cellulase (CMCase) produced by Strain C1 reached 23.10 and 54.97 U·mL⁻¹ respectively.

Key words: cellulose-decomposing; screening; activity of enzyme; condition optimization; identification

大量城市生活污水的处理与处置是我国目前亟待解决的环境问题。堆肥化处理是使污泥无害化、资源化的一条有效途径,具有广阔的应用前景^[1-2]。堆肥过程中的调理剂选择对堆肥效率和产品品质具有重要影响,目前普遍使用的调理剂有农作物秸秆、生活垃圾和木屑等。其中农作物秸秆资源尤为丰富,大部分被弃置或焚烧,利用率低,且带来严重的环境污染。因此,将秸秆作为调理剂添加到污泥中进行堆肥化处理,能够同时有效地处理城市和农村的两大有机固体废物污染问题,并达到资源重新利用的目的,具有较好的经济和环境效益。目前,在城市污泥快速降解和农业废弃物发酵过程中纤维素的应用和作用研究方面报道较少^[3]。作物秸秆纤维素、半纤维素和木质素的含量高,而粗纤维素是一类相当难分解的物质,要解决秸秆污泥

的堆肥问题应先解决纤维素的降解问题。

一直以来,纤维素的微生物降解受到极大重视,已有不少关于纤维素酶产生菌、酶结构和应用方面的研究^[4-7]。目前研究发现的能降解纤维素的微生物多是从秸秆堆腐物和牛粪等样品中分离得到的木霉、青霉和曲霉等真菌,普遍存在酶活力较低的问题。细菌则由于繁殖快,发酵周期短,利于工业生产。近年来关于细菌产纤维素酶的研究日益引起人们的重视,研究发现的产纤维素酶细菌主

收稿日期: 2013-03-14

基金项目: 扬州市-扬州大学校地合作专项(YZ2011146); 江苏省普通高校研究生科研创新计划(CXLX13-910); 国家大学生创新创业训练计划(201311117025)

① 通信作者 E-mail: xzwang@yzu.edu.cn

要有芽孢杆菌、瘤胃细菌(磺化瘤胃球菌、白色瘤胃球菌等)和热纤梭菌等。但大多是直接从环境中筛选分离^[8]或是针对以秸秆堆肥为主体的纤维素降解菌的筛选^[9-12],而将其应用到以污泥堆肥为主体的环境中时效果往往不佳。

大量研究表明,堆肥过程中细菌往往比真菌多得多^[13-14],尤其是以污泥为主体的堆肥过程,细菌是降解有机物和产热的主要微生物类群(至少80%~90%的微生物活动产生于细菌)。鉴于此,采用富集培养、刚果红平板筛选以及酶活力测定方法从秸秆与污泥混合发酵后的堆肥产品中分离获得1株相对高效的产纤维素酶细菌,并对其进行初步鉴定及产酶条件的初步研究,旨在为污泥堆肥的生物处理提供原始菌株。

1 材料与方法

1.1 供试样品

试验菌株来源于扬州市汤汪污水处理厂的脱水污泥(添加秸秆)堆肥产品。

1.2 培养基

富集培养基: NH_4Cl 1.1 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g; K_2HPO_4 1.0 g; FeSO_4 0.001 g; NaCl 0.5 g; CaCl_2 0.01 g; KCl 0.2 g; 羧甲基纤维素钠(CMC-Na) 25 g; H_2O 1 L; pH 值 7.0~7.2。该培养基用于菌种的富集驯化。

纤维素-刚果红培养基: 蛋白胨 3.0 g; 酵母提取物 0.5 g; CMC-Na 100 g; NaCl 5.0 g; KH_2PO_4 1.0 g; 刚果红 4.0 g; 琼脂 16.0 g; H_2O 1 L; pH 值 7.2。该培养基主要用于纤维素降解菌的初步筛选。

液体发酵培养基: 蛋白胨 10.0 g; 酵母提取物 10.0 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0 g; KH_2PO_4 4.0 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g; CMC-Na 10.0 g; H_2O 1 L; pH 值 7.2。该培养基主要用于纤维素降解菌的酶活力复筛。

1.3 富集驯化

称取 10 g 样品于装有 90 mL 无菌水及无菌玻璃珠的三角瓶中,振荡摇匀 12 h 后静置 30 min。吸取一定量的上清液放入富集培养基中,28 °C 条件下以 $130 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床培养 5 d。连续富集培养 3 次,使纤维素降解菌达到一定浓度,衡量标准为培养基黏度明显降低。

1.4 初筛

从黏度明显降低的富集样中取驯化液 10 mL,并依次梯度稀释为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} ,分别涂布于纤维素-刚果红初筛平板上,重复

3 次。28 °C 光照培养箱中培养 5~7 d,观察有无透明圈。将筛选到的具有透明圈的菌落进行纯化,纯化后的菌株接于种子斜面培养基上,4 °C 条件下保存。

1.5 复筛

采用 3,5-二硝基水杨酸比色定糖法(DNS)测定酶解液中的还原糖含量^[15],以此确定菌株的酶活力。

粗酶液的制备:将纯化后的菌株分别接种于 50 mL 发酵培养基中,28 °C 条件下以 $130 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床培养 4 d,取发酵液在 4 °C 条件下以相对离心力 1 137 离心 10 min,所得上清液即为粗酶液。

羧甲基纤维素酶(CMCase)活力测定:吸取 0.5 mL 粗酶液(同时以灭活粗酶液作对照)于 10 mL 比色管中,加 1.5 mL $\varphi = 1\%$ 的 CMC-Na 乙酸缓冲溶液(pH 值 4.8),50 °C 恒温水浴 30 min,加 1.5 mL DNS 显色剂,沸水浴 5 min,即刻放入水中冷却,定容至 10 mL,摇匀,测光密度。

滤纸酶(FPase)活力测定:将底物的滤纸条(1 cm×6 cm)卷成小卷塞入比色管底部,加入 0.5 mL 粗酶液(同时以灭活粗酶液作对照),再加入 1.5 mL 乙酸缓冲液(pH 值 4.8),50 °C 恒温水浴 1 h,加 DNS 1.5 mL,沸水浴 5 min,即刻放入水中冷却,定容至 10 mL,摇匀,测光密度。

将 50 °C、pH 值 4.8 条件下 1 mL 酶液 1 min 催化底物生成 1 μg 葡萄糖所需的酶量定义为 1 个酶活力单位,以 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 表示。

1.6 菌株鉴定

细菌 C1 的 16S rRNA 测序工作由上海生工生物工程有限公司完成。

进化树构建:根据测序结果,用 BLAST 搜索程序从 GenBank 中调出相似度较高的相关菌株的 16S rRNA 基因序列,使用 Clustalx 软件包对挑选出的同源性较高的菌株进行序列多重比对,再通过 MEGA 5.0 软件包采用邻接法(neighbor-joining method)进行聚类分析和系统进化树的构建。

1.7 纤维素降解菌产酶条件的初步优化

1.7.1 发酵时间对产纤维素酶的影响

将菌株 C1 接种于 50 mL 发酵培养基(pH 值 7.2)中,30 °C 条件下以 $130 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床培养,每隔 4 h 测试其在 570 nm 处的光密度值(D_{570}),48 h 以后每隔 12 h 测试 1 次。分别对培养 24、36、48、60、72、84 和 96 h 后的发酵液按 1.5 节所述方法制备粗酶液并测定 CMCase 和 FPase 酶活力,重复 3 次,以确定最佳发酵时间。

1.7.2 培养温度对产纤维素酶的影响

将菌株 C1 接种于 50 mL 发酵培养基 (pH 值 7.2) 中,分别在 25、30、35 和 40 °C 条件下以 130 r · min⁻¹ 摇床培养,达到最佳发酵时间后取发酵液测定 CMCase 和 FPase 酶活力,重复 3 次,以确定最佳发酵温度。

1.7.3 摇床转速对产纤维素酶的影响

将菌株 C1 接种于 50 mL 发酵培养基 (pH 值 7.2) 中,30 °C 条件下分别以 100、130、150 和 180 r · min⁻¹ 振荡培养,达到最佳发酵时间后测定 CMCase 和 FPase 酶活力,重复 3 次,以确定最佳发酵转速。

1.7.4 培养基初始 pH 值对产纤维素酶的影响

将发酵培养基初始 pH 值分别调节为 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 和 8.0,将菌株 C1 接入,根据优化后的培养时间、转速、温度进行培养,培养结束后分别测定 D₅₇₀ 值及 CMCase、FPase 酶活力,重复 3 次,以确定最佳培养基初始 pH 值。

2 结果与分析

2.1 纤维素降解菌的筛选结果

通过以 CMC-Na 为唯一碳源的富集培养基的驯化,将驯化样梯度稀释并涂布于纤维素-刚果红初筛培养基上,挑选出在平板上生长良好、有透明圈的 16 株细菌,一一纯化,并保存于种子平板上,留待进一步筛选。

对初筛的 16 株细菌分别测定其 CMCase 和 FPase 酶活力。由表 1 可知,B8、C1、C2、C3、C7 和 C8 这 6 株细菌均具有一定的纤维素酶活性,而其中菌株 C1 的 CMCase 和 FPase 酶活力分别为 46.00 和 18.21 U · mL⁻¹,明显高于其他 5 株细菌,故选其作为目的菌株。

表 1 16 株纤维素降解细菌的酶活力筛选结果

Table 1 Enzyme activities of 16 strains of cellulose-decomposing bacteria

菌株	酶活力/(U · mL ⁻¹)		菌株	酶活力/(U · mL ⁻¹)	
	CMCase	FPase		CMCase	FPase
B1	0.73	1.09	C1	46.00	18.21
B2	3.88	1.73	C2	3.56	8.41
B3	2.28	1.25	C3	3.21	10.08
B4	2.92	0.50	C4	0.65	3.27
B5	3.39	2.08	C5	0.92	4.11
B6	2.87	0.47	C6	1.54	5.19
B7	5.16	1.45	C7	3.19	4.92
B8	5.36	3.84	C8	2.99	6.25

2.2 种鉴定

用 BLAST 软件在 GenBank 中搜索出与菌株 C1

基因序列同源性较高的 11 株相似序列,采用相关软件进行序列多重比对及聚类分析,得到如图 1 所示的系统发育进化树。可以看出,菌株 C1 以 99% 的 16S rRNA 基因核苷酸序列相似度和较高的自展值 (bootstrapvalue,100%) 与 *Devosia* sp. DDB001 聚为 1 个分支,表明菌株 C1 与 *Devosia* sp. 亲缘关系最近,因此,菌株 C1 可能是 *Devosia* 属。

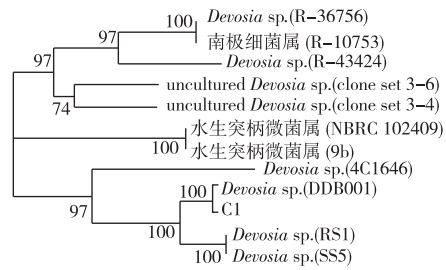


图 1 菌株 C1 的系统进化树
Fig. 1 Phylogenetic tree of Strain C1

2.3 菌株 C1 产酶条件的初步优化

2.3.1 培养时间优化

将菌株 C1 接种于 50 mL 发酵培养基中培养时的生长曲线见图 2。可以看出,菌株 C1 在 12~36 h 内 D₅₇₀ 值增长迅速,60 h 后趋于稳定。

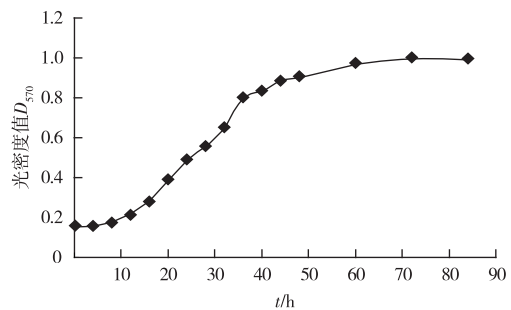


图 2 菌株 C1 的生长曲线
Fig. 2 Growth curve of Strain C1

如图 3 所示,在最初的 24 h CMCase 和 FPase 酶活力明显偏低,这可能是因为菌株接种到液体环境中后有较长一段时间的适应期。而在 36、48 和 60 h 时 CMCase 和 FPase 酶活力呈现逐步大幅度升高趋势,结合图 2 可知,这是因为该时间段内菌株生长活跃,大幅度增殖,经历对数期并逐步趋于稳定。60 h 后达到稳定期后的菌液酶活力开始出现小幅度下降,这与细菌生长开始步入衰亡期以及底物浓

度或受代谢产物的抑制有关。

由于菌株 C1 在 60 h 时 D_{570} 值较大, 长势趋于稳定(图 2), 且此时酶活力最高(图 3), 故确定菌株 C1 的最佳发酵时间为 60 h。

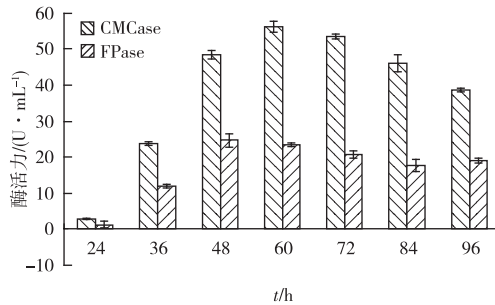


图 3 发酵时间对菌株 C1 酶活力的影响

Fig. 3 Effect of fermentation time on enzyme activity of Strain C1

2.3.2 培养温度优化

如图 4 所示, 培养温度对菌株 C1 的酶活力, 尤其是 CMCase 酶活力影响明显。当温度低于 30 °C 时, 随温度升高, 酶活力迅速升高, 30 °C 时酶活力达到最高; 超过 30 °C 后, 随温度升高, 酶活力逐步下降。因此, 对菌株 C1 而言, 最适宜的发酶温度为 30 °C。

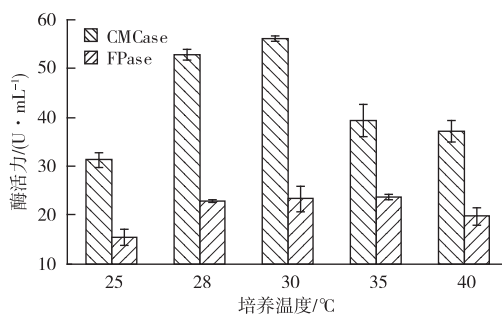


图 4 培养温度对菌株 C1 酶活力的影响

Fig. 4 Effect of incubation temperatures on enzyme activity of Strain C1

2.3.3 摇床转速优化

图 5 显示, 摇床转速对菌株 C1 的酶活力影响并不明显。4 个转速条件下菌株 C1 的产纤维素酶能力差别不大。比较而言, 摇床转速为 130 r · min⁻¹ 时, 菌株 C1 产纤维素酶能力相对略高。故菌株 C1 的产酶发酵最佳转速设定为 130 r · min⁻¹。

2.3.4 培养基初始 pH 值优化

菌株 C1 的 D_{570} 值变化见图 6。从图 6 可见, 初始 pH 值对菌株 C1 的 D_{570} 值有较大影响。初始 pH

值在 4.5~6.5 之间时菌株 C1 的 D_{570} 值较低, 其后随着初始 pH 值的增加而迅速增加。当初始 pH 值为 7.0、7.2 和 7.5 时, D_{570} 值分别为 1.147、1.199 和 1.174。此后随着初始 pH 值的进一步增加, 菌株 C1 的 D_{570} 值呈逐渐降低趋势。表明该菌株生长的最适宜初始 pH 为中性偏碱性。

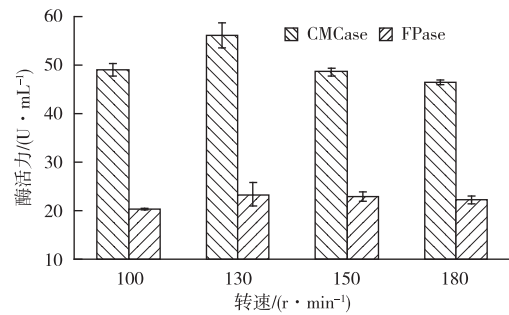


图 5 摇床转速对菌株 C1 酶活力的影响

Fig. 5 Effect of shaker rotation rate on enzyme activity of Strain C1

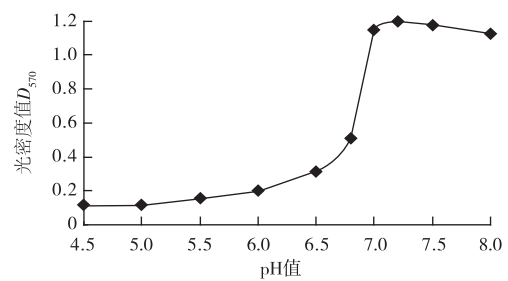


图 6 不同培养基初始 pH 值条件下菌株 C1 的生长状况

Fig. 6 Effect of initial pH of culture medium on growth of Strain C1

如图 7 所示, 与初始 pH 值为 6.8 和 7.0 相比, 在偏碱性的初始 pH 值(7.2~8.0)条件下, 菌株 C1 的酶活力大幅度提高。

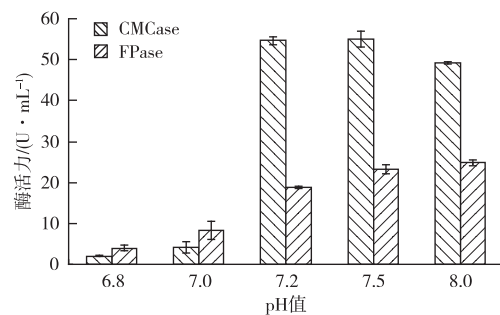


图 7 不同培养基初始 pH 值对菌株 C1 酶活力的影响

Fig. 7 Effect of initial pH of culture medium on enzyme activity of Strain C1

在初始 pH 值为 7.2、7.5 和 8.0 时,CMCase 和 FPase 酶活力分别达 54.69 和 18.77、54.97 和 23.10、49.30 和 24.99 U · mL⁻¹。结合图 6,可以确定菌株 C1 产酶的培养基最适初始 pH 值为 7.2~7.5。

3 讨论

利用以 CMC-Na 为唯一碳源的选择性培养基进行富集驯化,并采用刚果红平板染色方法进行初筛,通过菌落周围产生的透明圈可迅速获取目的菌株。采用 DNS 法测定发酵液中纤维素降解酶活力,获得 1 株相对高效的纤维素降解细菌 C1。该菌株的系统进化关系分析显示,其与 *Devosia* sp. DDB001 以 99% 的相似度处于同一分支,所以该菌株可能是 *Devosia* 属。

由于滤纸结构中既包含结晶性纤维素,也包含非结晶性纤维素,通常以 FPase 酶活力衡量纤维素菌酶系的综合降解能力^[16]。但由于该试验设计主要针对污泥堆肥中的细菌,而细菌产生的纤维素降解酶组分单一(通常只有 CMCase),故其产酶条件优化过程主要考察指标包括 CMCase 酶活力。

目前普遍应用于污泥堆肥的菌剂主要是 EM 菌剂^[17],这是一种由多种微生物如酵母菌、放线菌和乳酸菌等复合制成的高效微生物菌剂,通过各微生物之间的协同作用可有效提高堆肥效果。但由于植物纤维素存在于细胞壁中,受木质素保护,许多微生物不能分解木质素,使 EM 菌对纤维素的分解受到了限制。该试验获得的产纤维素酶效果最好的菌株 C1 可能是 *Devosia* 属,这在目前有关高产纤维素酶细菌的研究中鲜有报道,其产生的纤维素酶活力与国内外已报道的高酶活力菌株相比优势并不明显。但鉴于菌株 C1 来源于污泥堆肥本体的显著优势,具有一定的研究应用价值,可进一步通过诱变等方法提高酶活力,或通过与 EM 菌的配合施用来验证其实际应用效果,以期加入处理污泥堆肥的复合微生物菌剂中而得以应用。

参考文献:

- [1] 何晶晶,顾国维,李笃中,等.城市污泥处理与利用[M].北京:科学出版社,2003:29.
[2] 何培松,张继荣,陈玲,等.城市污泥的特性研究与再利用前景

分析[J].生态学杂志,2004,23(3):131-133.

- [3] 席北斗,刘鸿亮,孟伟,等.高效复合微生物菌群在垃圾堆肥中的应用[J].环境科学,2001,22(5):122-125.
[4] LYND L R, WEIMER P J, VAN ZYL W H, *et al.* Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2002, 66(3): 506-577.
[5] 韩鸿鹏,郝青梅,张丽琴,等.放线菌产纤维素酶固定化研究[J].生态与农村环境学报,2011,27(6):109-113.
[6] FATHALLH E M, NAGAOKA T, WASAKI J, *et al.* Isolation and Characterization of Cellulose-Decomposing Bacteria Inhabiting Sawdust and Coffee Residue Composts[J]. Microbes and Environments, 2012, 27(3): 226-233.
[7] 费辉盈,常志州,王世梅,等.常温纤维素降解菌群的筛选及其特性初探[J].生态与农村环境学报,2007,23(3):60-64.
[8] WIRTH S, UIRICH A. Cellulose-Degrading Potentials and Phylogenetic Classification of Carboxymethyl-Cellulose Decomposing Bacteria Isolated From Soil[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2002, 25(4): 584-591.
[9] 牛俊玲,崔宗均,李国学,等.高效纤维素分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.
[10] 刘震东,李文哲,刘爽,等.高效木质纤维素分解菌复合系的发酵特性[J].东北农业大学学报,2009,40(8):105-109.
[11] HARUTA S, CUI Z, HUANG Z, *et al.* Construction of a Stable Microbial Community With High Cellulose-Degradation Ability [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 59(4/5): 529-534.
[12] 吴翔,陈强,徐丽华,等.一株降解纤维素的高温放线菌的筛选及其产酶条件研究[J].农业环境科学学报,2007,26(增刊1):101-104.
[13] SABINE P, STEFANIE K, FRANK S, *et al.* Succession of Microbial Communities During Hot Compositing as Detected by PCR-Single-Strand-Conformation Polymorphism-Based Genetic Profiles of Small-Subunit rRNA Genes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(3): 930-936.
[14] 朴哲.高温堆肥体系的物质降解机理及微生物学特性研究[D].北京:中国农业大学,2002.
[15] 张丽青,吴海龙,姜红霞,等.纤维素降解细菌的筛选及其产酶条件优化[J].环境科学与管理,2007,32(10):110-117.
[16] LI X, GAO P. Isolation and Partial Properties of Cellulose-Decomposing Strain of *Cytophaga* sp. LX-7 From Soil[J]. Journal of Applied Microbiology, 1997, 82(1): 73-80.
[17] 倪永珍,李维炯.EM 技术应用研究[M].北京:中国农业大学出版社,1998:24-32.

作者简介:余婷婷(1988—),女,江苏南通人,硕士生,主要研究方向为固体废弃物处理处置及资源化利用。E-mail: tingtingshe.1988@ yahoo.com.cn