

高温纤维分解菌的筛选

孔德鹏¹, 吕国华², 王智霞³

(1. 石河子大学 农学院园艺系, 新疆 石河子 832000; 2. 石河子大学 设施生物种苗研发中心, 新疆 石河子 832000;
3. 乌苏市第一中学, 新疆 乌苏 833000)

摘 要: 从树皮堆肥的高温阶段分离出分解纤维素能力较强的 2 个高温微生物菌株, 对 2 个微生物菌的生长速率、耐温性以及纤维素酶活性进行检测。结果表明: YP、NP 在 45~65℃ 的温度下生长, 最适生长温度为 50℃; 在普通细菌培养基和以羧甲基纤维素钠(CMC)为唯一碳源的限制性培养基上均能够快速启动并旺盛生长, 分别在培养 84 h 左右可以达到最大活菌数; YP、NP 均具有滤纸崩解能力和较高的 Cx 酶活, 能够在 2~4 d 内快速启动圆形滤纸条分解, 5~8 d 圆形滤纸条全部降解成絮状物。

关键词: 高温; 好氧堆肥; 纤维素分解菌; 纤维素酶
中图分类号: Q 946.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)23-0055-04

第一作者简介: 孔德鹏(1986-), 男, 在读硕士, 研究方向为设施园艺及无土栽培。
通讯作者: 吕国华(1963-), 男, 教授, 研究方向为设施园艺与生物种苗产业化。E-mail: kongdp2008@sohu.com。
收稿日期: 2010-10-11

堆肥技术作为一种最具发展潜力的有机废物处理处置方式, 越来越受到国内外研究人员的重视^[1-5]。有机固体废物, 尤其是农业秸秆、城市绿化废物和城市生活垃圾的主要成分为木质纤维素, 它是地球上分布最为广泛, 含量最为丰富的碳水化合物, 占据了全球植物总干重的 60%以上^[6]。由于纤维素本身致密的结构及不

[5] 孟宪昌, 王孟鸽. 红橘皮黄色素的提取及理化性能研究[J]. 化学世界, 2001, 42(3): 138-141.

[6] 李志洲. 脐橙皮色素的提取及稳定性研究[J]. 宝鸡文理学院学报(自然科学版), 2003, 23(4): 276-278.

[7] 王丽芬, 夏仁学. 脐橙皮的颜色与其色素的组成及含量的关系[J]. 华中农业大学学报, 2003, 22(6): 599-602.

[8] 董丽花, 朱苗苗. 橘皮色素的最佳提取工艺和稳定性研究[J]. 泰山医学院学报, 2008, 29(2): 124-127.

[9] 马自超, 庞业珍. 天然食用色素化学及生产工艺学[M]. 北京: 中国林业出版社, 1994: 59-78.

[10] 张孟民. 柑桔皮提取果胶及综合利用的研究[J]. 宝鸡文理学院学报, 1994(1): 38-41.

[11] 钦传光, 丁焰, 王顺朝. 柑桔皮色素的提取及其性质研究[J]. 食品工业科技, 1997(5): 10-11.

Study on Extraction and Stability of Pigment from Orange Peel

ZHU De-yan

(College of Biological Engineering Jingchu University of Technology, Jingmen, Hubei 448001)

Abstract: Taking ethanol and petroleum ether as extractant, the extraction of water-soluble and oil-soluble pigment of orange peel were studied, the results showed that the maximum absorbance of oil-soluble was at 440 nm and maximum absorbance of water-soluble was at 475 nm by UV spectroscopy; Its thermal stability were good; Its color of pigment remain basically unchanged by pH 5~12; Food additives had little effect on the pigment.
Key words: pigment from orange peel; extraction; stability

易降解的特性导致其难以被充分利用或被大多数微生物直接作为碳源物质而转化利用^[7]。因此,木质纤维素的生物降解成为生物技术处理有机固体废物的关键,也是近年来研究的重点。在木质纤维素降解的进程中,温度的高低决定了降解时间的长短,其中堆肥的高温阶段是木质素、纤维素和半纤维素等分子产生破坏、断裂和分解的主要阶段,理论上高温阶段利于木质纤维素的降解。然而,微生物种群受到很大的抑制,表现为种类单一、数量减少,比中温阶段要少 1~2 个数量级,这无疑限制了大分子难降解的木质纤维素物质的快速降解^[8]。

已有的研究表明,在堆肥高温阶段,其中绝大部分的寄生虫、孢子、虫卵和病原菌等被杀死,是保证堆肥无害化的最重要阶段。同时堆体温度不宜过高,否则不仅抑制大部分微生物的生长和活性,而且会过度消耗有机质,降低堆肥产品质量。堆体温度应控制在 45~65℃之间,尤其是在 55~60℃时比较好,此时也是木质纤维素等大分子物质降解的最适温度^[9]。因此,研究该温度范围内的微生物活性及降解性能具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 堆肥材料 在新疆自治区石河子市东北郊木材加工厂采集堆积垃圾(主要为碎树皮)。

1.1.2 培养基 高温纤维菌筛选培养基选用改进的纤维素刚果红培养基: K_2HPO_4 0.50 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g、NaCl 0.3 g、微晶纤维素粉 1.88 g、刚果红 0.20 g、明胶 2.00 g、琼脂 14.00 g、水 1 000 mL、pH 自然; 发酵培养基: K_2HPO_4 1.0 g、 MgSO_4 0.3 g、NaCl 0.3 g、 CaCl_2 0.2 g、 FeCl_3 0.01 g、水 1 000 mL、pH 7.0; 增殖培养基: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0 g、 KH_2PO_4 4.0 g、 MgSO_4 0.3 g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.23 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g、蛋白胨 3.0 g、琼脂 30.0 g、水 1 000 mL、pH 6.0。

1.2 试验方法

1.2.1 高温纤维素分解菌的筛选、分离及纯化 将采集到的试验材料混匀,取一部分做为试验样品,样品按逐级稀释法稀释成 $10^{-4} \sim 10^{-8}$ 的悬浊液,分别用接种针和接种环接种到改进的刚果红纤维素琼脂培养基上^[10],分别置于 45、50、60、65℃恒温、恒湿箱中培养 6~7 d。选取能在菌落周围形成清亮透明圈的菌株,再反复转接数代,直至分离纯化菌种。将筛选到的菌株在成分改进的纤维素琼脂培养基的培养皿上 4℃保存,以便作进一步的研究。

1.2.2 高温纤维分解菌的数量及生长特性的测定 采用稀释平板法,胶带密封培养皿(刚果红培养和发酵培养),50℃培养 10 d 后计数。样品于 105℃下烘 8 h 至恒重,获得样品的干重,进而得到微生物计数的基本单位

cfu/g(干样)。将获得的菌株 YP、NP 分别接种于 150 mL 以羧甲基纤维素钠为唯一碳源的液体纤维细菌合成培养基(CMC 培养基)中,50℃下 120 r/min 振荡培养,间隔 4 h 取样,采用分光光度计法在 600 nm 波长下测定其吸光度,进而检测其菌落密度。

1.2.3 菌株的纤维素酶检测 采用透明圈法检测获得菌株的 Cx 酶活性,从单菌落挑取若干细胞接种至刚果红纤维素培养基上,于 60℃下恒温培养,每 12 h 测定各菌株产生的透明圈直径大小以及相应的菌落直径大小,分别以 D 和 d 表示,纤维素酶 Cx 组分活性按 D/d 计算得出。

1.2.4 菌株的降解滤纸能力强弱的检测 为正确检测分解菌降解能力的强弱,将获得菌株 YP、NP 分别接入以圆形滤纸条为唯一碳源的发酵培养基中培养,以确认菌株是否具有分解纤维素的能力,以及分解速率的快慢等指标。

2 结果与分析

2.1 纤维素降解菌的形态特征

根据 1.2.1 方法筛选得到 2 株能在 50℃下较快生长,同时能够在改进的刚果红培养基上形成清亮透明圈的高温木质纤维分解菌^[11],分别标记为 YP、NP。其在改进的纤维素培养基上的菌落形态特征:YP 的菌落小而厚,多皱,群落具有粘性,不易挑取,幼菌落表面光滑,老菌落粗糙,外缘整齐,呈白色,环状;菌丝无横隔,产白色色素,孢子成链状,圆形,光滑。NP 的菌落大,气生菌丝体发达,该菌株生长迅速,10 d 即可长满整个培养皿,菌落呈绒状,气生菌丝发达,菌丝初为白色,后期孢子呈青绿色,培养基颜色不改变。分生孢子梗从菌丝的短侧枝上生出,分布不规则,呈二叉分枝,顶端膨大,形成孢囊,分生孢子为球形,浅绿色,菌丝有横隔。具体特征见图 1。

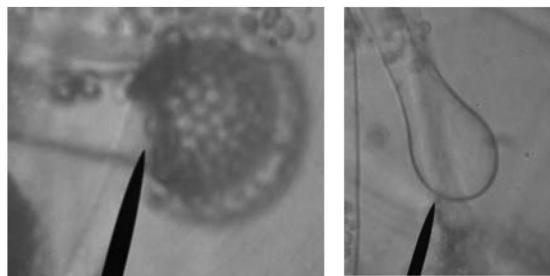


图 1 NP 菌落形态特征

2.2 高温纤维分解菌的数量及生长特性的测定

选取能在 50℃下菌落周围形成清亮透明圈的菌株,再用反复转接数代,直至分离纯化菌种。结果如图 2 所示,YP 与 NP 相比较,高温纤维分解菌数量较多。在改

进刚果红和发酵培养基上高温纤维分解菌数量差异不显著。在增殖培养基上 NP 的高温纤维分解菌数量显著 ($P<0.05$) 多于增殖培养基中高温分解菌 NP 的数量; 在增殖培养基上 YP 与 NP 的数量极显著 ($P<0.01$) 多于刚果红培养基和发酵培养基中的数量; 刚果红培养基和发酵培养基中的高温纤维分解菌 YP、NP 的数量差异不显著^[12]。

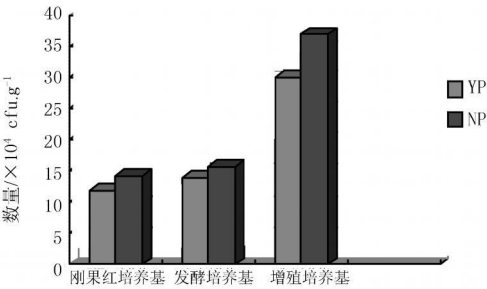


图2 3种培养基中的高温纤维分解菌数量

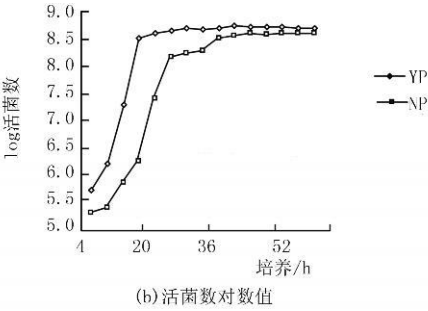
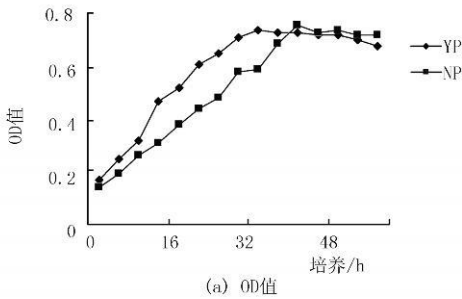


图3 菌株YP、NP在CMC液体培养基中的生长曲线



图4 部分接种筛选菌株后的滤纸崩解情况与空白相对照

表1 2株筛选菌株D/d值与接种时间关系

t/h	D/d		t/h	D/d	
	YP	NP		YP	NP
12	1.80	1.65	72	3.85	3.86
24	2.45	1.80	84	3.94	4.07
36	2.89	2.26	96	3.94	4.07
48	3.27	2.75	110	3.91	4.07
60	3.65	3.34	122	3.87	4.02

活性均较高,同时D/d值显示NP菌株的Cx酶活性均较高。
刚果红琼脂平板是较好的分离筛选培养基,产酶菌

YP、NP在50℃下CMC培养液中培养生长特征如图3。菌株YP、NP在CMC培养液中最多经历4h以后进入快速增长的对数期,其中YP启动较NP要快YP、NP在24h左右即达到最大活菌数,在36、44h左右其OD值最大,菌株生长进入稳定期。
2.3 菌株的纤维素酶检测
筛选菌株接种于刚果红纤维素琼脂培养基上之后测得的D/d值与接种时间关系见表1。不同菌种的D/d值变化情况有所不同,具体表现为:菌种YP的D/d值于接种后启动较快,84h即达到最大值,96h后D/d值变小。菌种NP的D/d值于接种后启动较慢,但在84h达到最大值,其最大值保持36h,D/d值于110h后开始减小。总的来说,菌株YP、NP均能在刚果红纤维素琼脂培养基上形成透明圈,12h的时候就都能看到明亮清楚的透明圈,且随着时间的积累透明圈逐渐明显。以D/d值来衡量Cx酶的活性,可看出,2菌株的Cx酶

株能在红色平板上形成透明圈,且透明圈/菌落直径比值大小大致反映产酶的高低,但也有少数菌株其透明圈/菌落比值较高却酶活较低。为正确检测分解菌降解

能力的强弱, 将获得菌株 YP、NP 分别接入以圆形滤纸条为唯一碳源的发酵培养基中培养。在接种 1~2 d 后, 滤纸表面出现絮状物, 滤纸开始软化, 第 3 天滤纸开始崩解, 溶液中出现大量的絮状物; 至培养第 10 天时, 接种了菌株 YP、NP 的培养基中的圆形滤纸条全部降解成絮状物, 与不接种的对照形成了鲜明对比。结果发现酶活高低与滤纸条溃烂断裂的时间和程度有一定关系, 酶活较高的菌株很快使滤纸条溃烂且振摇成糊状。图 4 显示了以菌株 YP、NP 为代表的高温纤维素分解菌降解滤纸条的能力。

滤纸降解情况的结果显示, 接种了菌株的培养基中不同温度下的滤纸均有不同程度的降解, 其中尤以 NP 和 YP 最为明显, 滤纸降解在 6~7 d 天内完全降解, 而对照无反应(图 4), 其中 YP 和 NP 在常温下发酵, 滤纸完全降解需要 20 d 左右。发酵结束时, 对圆形滤纸片的降解情况的表现结果显示, 除了不接种的对照在整个试验过程中基本未发生变化外, 接种了 YP 与 NP 菌株的滤纸完全降解, 其中 NP 降解最为明显。试验中所筛选的菌株能在高温下迅速启动滤纸降解, 崩解速度快, 效果较明显, 常温下菌株降解滤纸时间较长, 但也可以完全降解滤纸。结果表明, 2 个菌株在高温与常温下均能降解滤纸, 温度高降解菌的酶活性较高, 培养温度的高低影响降解速率的快慢(高温下降解的机制有待进一步研究)。

3 结论

试验从树皮堆肥的高温阶段分离出分解纤维素能力较强的 2 个高温微生物 YP 与 NP。在 3 种培养基中高温纤维分解菌 NP 的数量比 YP 要大, 在改进刚果红和发酵培养基上高温纤维分解菌数量差异不显著。在增殖培养基上 NP 的高温纤维分解菌数量显著 ($P <$

0.05) 多于增殖培养基中高温分解菌 NP 的数量; 在增殖培养基上 YP 与 NP 的数量极显著 ($P < 0.01$) 多于刚果红培养基和发酵培养基中的数量; 刚果红培养基和发酵培养基中的高温纤维分解菌 YP、NP 的数量差异不显著。YP 与 NP 均能在刚果红培养基上形成透明圈, 均能在短时间内分解滤纸; 同时菌株酶活高低与滤纸条溃烂断裂的时间和程度有一定关系, 酶活较高的菌株 NP 很快使滤纸条溃烂且振摇成糊状。

参考文献

- [1] Strom P F. Identification of thermophilic bacteria in solid waste composting [J]. Appl Environ Microbiol, 1985, 50: 907-913.
- [2] Tuomela M, Vikman M, Hatakka A, et al. Biodegradation of Lignin in a Compost Environment: A Review [J]. Bioresource Technology, 2000, 72: 169-183.
- [3] Waksman S A, Umbréit W W, Cordon T C. Thermophilic Actinomyces and Fungi in Soils and in Composts [J]. Soil Sci 1939 47: 37-61.
- [4] Buswell J A, Odier E. Lignin Biodegradation [J]. CRC Crit Rev Biotechnol 1987(6): 1260.
- [5] 程斐, 孙朝晖, 赵玉国 等. 高温分解纤维素的易变糖丝菌菌株筛选及其特性 [J]. 南京农业大学学报, 2002, 25(2): 35-38.
- [6] Tengerly R P, Szakacs G. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation [J]. Biochemical Engineering 2003 13(2-3): 167-179.
- [7] 邹仪明. 植物纤维素化学 [M]. 2 版. 北京: 中国轻工业出版社, 1995: 152-154.
- [8] 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: 91-94.
- [9] Finstein M S, Miller F G, Strom P F, et al. Composting Ecosystem Management for Waste Treatment [J]. BioP Technology, 1983(1): 347-353.
- [10] 李露, 吕国华, 孟胜. 基质开发的研究现状、存在问题及发展趋势 [J]. 安徽农学通报, 2005, 11(7): 28-29.
- [11] 李卓隶, 胡正嘉. 微生物学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2005.
- [12] 湛方栋, 何永美. 3 种培养基分离高温纤维分解菌及其酶活测定 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(15): 6171-6172, 6232.

Screening of Thermophilic Cellulolytic Bacteria

KONG De-peng¹, LV Guo-hua², WANG Zhi-xia³

(1. College of Agriculture Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000; 2. Biological Seed Research and Development Center in Facilities Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000; 3. Wusu City First School, Wusu, Xinjiang 833000)

Abstract: Summary from the bark of the high temperature phase of compost decomposition of cellulose isolated from the two high capacity strong microbial strains. On the growth rate of these microorganisms, heat resistance and detection of cellulase activity were found. The results showed that NP, YP can be growth under 45~65℃, the optimal growth temperature was 50℃; in the general culture medium for bacteria and to carboxymethyl cellulose (CMC) as sole carbon source were able to restrictive medium grow rapidly and vigorously, respectively, can be achieved in the culture around 84 h the maximum viable count. Cellulase activity of their test results showed that the isolates were obtained with filter paper capacity and high breakdown Cx activity, to the 2~4 d quick start within the circular filter paper decomposition, 5~8 d all round filter paper degradation into the floc.

Key words: high temperature; aerobic composting; cellulose decomposing bacteria; cellulose