

高温木质纤维素降解菌的筛选鉴定及其堆肥应用

武肖莎¹, 李再兴^{2*}, 黄亚丽², 马骏², 韩学滨¹, 张凡¹

(1. 河北昊源环境工程有限公司, 河北石家庄 050011; 2. 河北科技大学环境科学与工程学院, 河北石家庄 050018)

摘要 为解决畜禽粪便堆肥发酵启动难、木质纤维素降解不充分等问题, 筛选能在高温(50~70℃)堆肥中高效降解木质纤维素的高温降解菌株, 并评估其在牛粪-秸秆堆肥应用效果。从高温时期堆肥样品中筛选能在50、60和70℃高温下生长、产酶的高温降解菌株。通过水解圈、秸秆崩解、纤维素酶活测试试验, 筛选出BS40-4菌株, 通过形态学观察和16S rRNA测序法, 确定为枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*。该菌株的堆肥应用效果结果表明, 接种BS40-4菌株的处理具有发酵启动快、升温迅速、高温持续时间长、木质纤维素降解充分等优势, 可有效提高堆肥发酵效率。

关键词 木质纤维素; 高温降解菌; 筛选鉴定; 堆肥发酵; 应用效果

中图分类号 S141.4 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)20-0068-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.20.019



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Screening, Identification and Its Composting Application of High-temperature Strain for Degrading Lignocellulose

WU Xiao-sha¹, LI Zai-xing², HUANG Ya-li² et al (1. Hebei Haoyuan Environmental Engineering Coporation Ltd., Shijiazhuang, Hebei 050011; 2. School of Environmental Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, Hebei 050018)

Abstract To solve these problems of difficult start-up and insufficient degradation of lignocellulose during livestock and poultry manure composting, this study screened high-temperature strains that could efficiently degrade lignocellulose during high-temperature (50~70℃) composting, and evaluated its application effect in cow manure-straw composting. High-temperature compost samples were used to screen high-temperature degrading strains that could grow and produce enzymes at 50, 60 and 70℃. BS40-4 strain was screened through these experiments of hydrolysis loop, straw disintegration, and cellulase activity testing, and determined to be *Bacillus subtilis* by morphological observation and 16S rRNA sequencing. The application effects of BS40-4 strain in composting showed that inoculating BS40-4 strain treatment had the advantages of fast fermentation start, rapid heating, long high temperature duration and sufficient lignocellulose degradation, which could effectively improve the composting efficiency.

Key words Lignocellulose; High-temperature degrading strain; Screening and identification; Composting fermentation; Application effect

随着我国城市化速度不断加快以及人民对美好生活的追求, 奶制品和肉制品的需求量与日俱增, 这推动着畜禽养殖产业在养殖模式上不断革新, 养殖规模也不断扩大。与此同时, 来自养殖产业的畜禽粪便污染和资源不合理利用成为阻碍畜禽养殖业可持续发展和控制农业面源污染的重要因素。好氧堆肥由于其在经济和生物学上的优势, 成为一种管理和利用畜禽粪便的环境友好型生物技术^[1]。好氧堆肥技术利用不同微生物和相应酶将不稳定和有害的有机物转化为稳定且安全的复杂化合物(如腐殖质)的过程, 从而实现有机质矿质化、稳定化、腐殖化以及病原微生物无害化^[2]。

堆肥物料中富含结构复杂、微生物可利用性差的木质纤维素, 严重阻碍堆肥化进程^[3]。木质纤维素主要由半纤维素、纤维素和木质素组成, 由于木质素的致密三维网状芳环结构和纤维素的高结晶度等特点, 使得木质纤维素很难被酶解或微生物降解^[4]。因此, 堆肥实际应用过程中普遍存在启动缓慢、周期较长、高温期停留时间短、木质纤维素降解不充分等问题。如何有效提高堆肥过程中木质纤维素的降解效率成为堆肥领域的研究热点。

在堆肥中利用外源微生物强化手段以优化微生物群落结构, 提高微生物产酶活性, 可有效改善堆肥效率低、木质纤维

素降解难、周期长等问题^[5]。罗晓莎等^[6]研究表明在猪粪-木屑堆肥中接种嗜热侧孢霉可加快堆肥升温, 提高纤维素类和木质素降解的关键酶活性, 促进有机质分解和转化。张喜庆等^[7]从自然发酵的牛粪中分离获得的高效纤维素分解菌在堆肥发酵方面具有较大的应用潜力。王顺利等^[8]在牛粪堆肥中接种木质纤维素分解复合菌剂, 提高了堆肥升温速度和高温持续期温度, 促进了堆肥快速腐熟, 减少了养分损失。因此, 通过在堆肥中接种微生物是加速木质纤维素物质降解、提高堆肥效率、促进堆肥腐熟的关键方法。

堆肥高温期的过高温会降低木质纤维素降解菌的活性、丰度和多样性, 从而降低了其降解木质纤维素的效率, 因此, 在堆肥过程中添加高温木质纤维素降解菌可以有效解决此类问题。该研究从牛粪-秸秆堆肥高温时期样品中筛选出高温(50~70℃)下能高效降解木质纤维素的菌株并进行鉴定, 将其接种于牛粪-秸秆堆肥发酵过程中, 探究其堆肥应用效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 堆肥样品。高温木质纤维素降解菌筛选所需高温时期的堆肥样品来源于河北省某堆肥企业。

1.1.2 堆肥原料。新鲜牛粪来自河北省某奶牛养殖场, 玉米秸秆来自河北省石家庄市近郊农户。2种原料的理化性质见表1。

1.1.3 培养基。该研究主要采用4种培养基: ①富集培养基, 用于高温降解菌初步富集筛选^[9]; ②羧甲基纤维钠

基金项目 河北省省级科技计划项目(19227306D)。

作者简介 武肖莎(1993—), 女, 河北邯郸人, 助理工程师, 硕士, 从事固体废物资源化研究。*通信作者, 教授, 博士, 硕士生导师, 从事水污染控制和固体废物资源化研究。

收稿日期 2021-02-25

(CMC-Na)培养基和刚果红平板培养基,用于高温降解菌分解木质纤维素相关的酶活性检测^[10];③秸秆降解培养基,用于高温降解菌株的复筛。以上所用的培养基在试验前应进行121℃高压灭菌30 min。

表1 堆肥原料的理化性质

Table 1 Physico-chemical properties of composting raw materials

原料 Raw material	含水率 Moisture content %	pH	总碳 Total carbon g/kg	总氮 Total nitrogen g/kg	碳氮比 C/N ratio
牛粪 Dairy manure	74.30	7.76	403.8	21.7	18.6
玉米秸秆 Straw	7.88	7.52	385.1	13.8	27.9

1.2 方法

1.2.1 高温降解菌株的培养与初筛。称取5 g高温时期的堆肥样品接入50 mL无菌水的150 mL三角瓶中,25℃、150 r/min条件下振荡1 h,静置30 min吸取1 mL悬浊液加入100 mL富集培养基中,分别置于50、60、70℃下150 r/min振荡培养7 d。将50、60、70℃的富集培养液用蒸馏水稀释浓度梯度为 $10^{-3} \sim 10^{-8}$ 的悬浊液,将其涂布于CMC-Na培养基上,分别置于50、60、70℃筛选温度下培养48 h,用1 g/L刚果红染液染色30 min,弃去染液,加入1 mol/L NaCl反复冲洗,挑选有水解圈的菌株分离纯化。将目标菌株的单菌落点接至刚果红平板培养基上,分别置于50、60、70℃筛选温度下培养48 h,根据透明圈直径(D)和菌落直径(H)比值大小初步判断菌株产纤维素酶能力,D/H值大表示菌株水解羧甲基纤维素的能力强。

1.2.2 高温降解菌株的复筛。将D/H值大的目标菌株分别接种至富集培养基培养5 d后,用无菌水制成菌悬液,取5 mL菌悬液接种于秸秆降解培养基中,分别置于50、60和70℃下150 r/min培养15 d后,取出秸秆,依次用蒸馏水、稀酸溶液、蒸馏水冲洗,80℃烘干至恒重后称质量,通过失重法计算秸秆降解率(%)。CMC酶、FPA酶、 β -葡萄糖苷酶等木质纤维素酶活采用DNS法测定。通过秸秆降解率和木质纤维素关键酶活2个评价指标对高温降解菌株复筛。

1.2.3 高温降解菌株的鉴定。对“1.2.2”复筛的目标菌株进行形态学和分子生物学方法鉴定,由生工生物工程(上海)有限公司进行测序。

1.2.4 堆肥应用效果试验。以新鲜牛粪和玉米秸秆为原料,新鲜牛粪与玉米秸秆湿物质量比5:2,调节初始含水率为60%,C/N值为25。未接种菌剂的处理命名为CK,接种3‰目标菌株菌剂的处理命名为BS,接种3‰EM菌剂(市场销售)的处理命名为EM。堆肥设备为反应器堆肥装置,发酵周期为35 d,通风方式为连续通风,通风速率以0.4 L/(kg·min),在第0天、第35天采集堆肥样品,并根据处理将其命名为CK-0、CK-35、BS-0和BS-35等。堆肥期间对发酵温度和环境温度进行实时监测。堆肥样品中纤维素、半纤维素、木质素含量采用Van Soest分析法测定。

2 结果与分析

2.1 高温降解菌株的分离与初筛 在50、60、70℃筛选温度

条件下,通过稀释涂布平板法,对高温时期的堆肥样品进行了反复分离与纯化,获得10株具有木质纤维素降解能力的高温降解菌,其中包括50℃下分离得到5株(BS40-1~BS40-5),60℃下分离得到3株(BS40-6~BS40-8),70℃分离得到2株(BS40-9~BS40-10)。菌株刚果红平板透明圈直径(D)、菌落直径(H)和D/H的数据如图1所示。D值和D/H值越大,产纤维素酶能力越强,透明圈出现也越早。水解圈试验结果表明,筛选温度不同,分离得到的菌株的木质纤维素降解能力差异显著。50、60和70℃筛选温度下分离得到的菌株D/H值分别为2.63~5.14、2.25~4.63、1.81~4.31。因此,D/H值大小与筛选温度的高低存在负相关关系。经刚果培养基初步筛选出3株不同温度下具有明显降解优势的高温降解菌株,其中包括50℃分离得到的BS40-4,60℃分离得到的BS40-6,70℃分离得到的BS40-9。

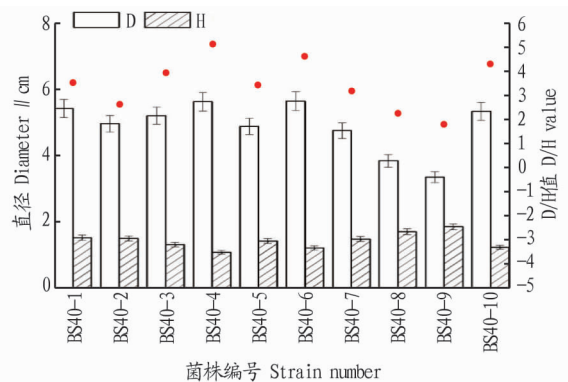


图1 不同菌株的水解圈结果

Fig.1 Results of hydrolysis zone of different strains

2.2 高温降解菌株的复筛 由于不同菌株的生长速度、产酶周期、菌落大小等方面存在差异性,D/H值的大小不能准确代表实际菌株纤维素酶活大小。因此,为了进一步验证10株菌对木质纤维素的降解能力,将10株菌株分别接入秸秆降解培养基中,计算玉米秸秆降解率。从图2可以看出,不同温度下的高温降解菌株对玉米秸秆降解能力具有显著差异,具体为50、60和70℃温度下分离得到的菌株的秸秆降解率分别为5.56%~30.83%、10.76%~27.72%和2.73%~13.41%。秸秆降解试验筛选出不同温度下的玉米秸秆降解明显的菌株与刚果红培养基结果保持一致。玉米秸秆降解率的大小与筛选温度的高低也存在负相关关系。其中,接种BS40-4的玉米秸秆降解率达30.83%,显著高于其他菌株的秸秆降解率。这可能由于BS40-4菌株具有较高的木质纤维素酶活,因此对玉米秸秆降解效果较好。

以CMC-Na为碳源,获取10株菌株的粗酶液。图3展示了10种菌株的粗酶液中CMC酶、FPA酶和 β -葡萄糖苷酶活性。纤维素酶是一种复合酶,主要包括CMC酶、FPA酶和 β -葡萄糖苷酶,3种酶活性的高低在一定程度上代表着菌株降解纤维素的能力。由于纤维素的降解是多种酶活协同作用的结果,因此3种酶的总活性高低用于评价菌株降解纤维素的能力大小。综合来看,菌株BS40-4的3种酶活力及总活力均高于其他菌株,该菌株的 β -葡萄糖苷酶活为

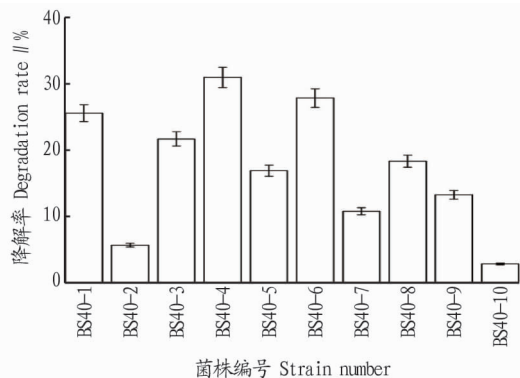


图2 不同菌株玉米秸秆降解率

Fig.2 Corn stalk degradation rate of different strains

19.42 U/mL, CMC 酶活为 32.89 U/mL, FPA 酶活为 27.38 U/mL。

综合水解圈、秸秆降解试验、木质纤维素酶活性的试验结果,选择高温降解菌株 BS40-4 进行鉴定和下一步的堆肥应用效果研究。

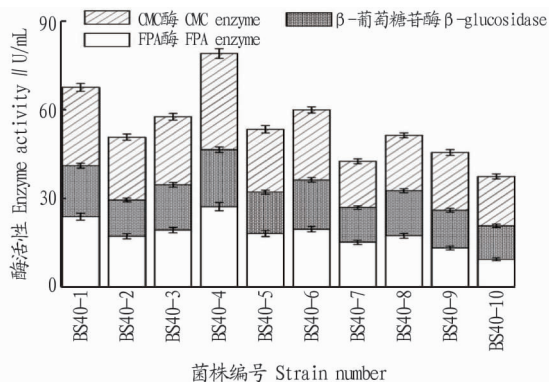


图3 不同菌株的木质纤维素酶活性

Fig.3 Lignocellulase activity of different strains

2.3 高温降解菌株 BS40-4 鉴定 从高温降解菌株 BS40-4 电镜结果(图4)可以看出,菌株 BS40-4 在电镜下呈杆状,有鞭毛,能运动。

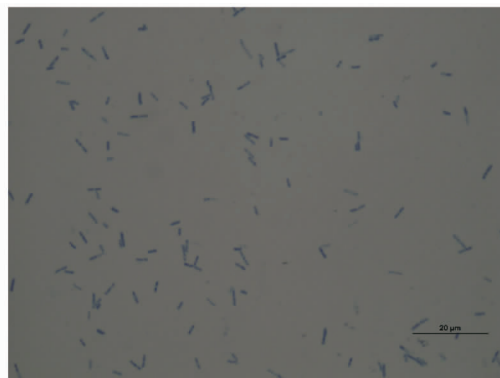


图4 BS40-4 菌株的形态学观察

Fig.4 Morphological observation of BS40-4 strain

提取细菌 BS40-4 的 16S rRNA 基因组并由生工生物工程(上海)有限公司进行测序。在 NCBI blast 数据库进行同源性比对,并构建系统发育树。图5显示,该菌株 BS40-4 与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)显示的序列同源性最高。结合形态学观察和 16S rRNA 序列分析,最终鉴定该菌株为枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*,命名为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) BS40-4。BS40-4 菌株已保存于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏号为 CGMCC No.19757。

2.4 接种 BS40-4 的高温堆肥应用效果 发酵温度是评估堆肥腐熟效果的重要物理指标之一,反映出微生物的活跃程度。堆肥发酵温度变化遵循一般规律,即堆肥依次经历了升温阶段、高温阶段、降温阶段和腐熟阶段(图6)。由于堆肥原料中高温降解菌较少,CK 处理升温慢且高温期持续较短,高温期最高温度也明显低于 EM 和 BS 处理。以 EM 处理为对照,BS 处理发酵温度升温更快,高温期持续时间更长,能充分杀死堆肥中的病原微生物和虫卵等。这说明该研究筛选的高温降解菌株 BS40-4 在高温下微生物活性更旺盛,酶活性更强,木质纤维素降解反应快,使得堆肥体系维持较长的高温期。因此,高温降解菌 BS40-4 在提高堆肥发酵效率具有优越的应用潜力。

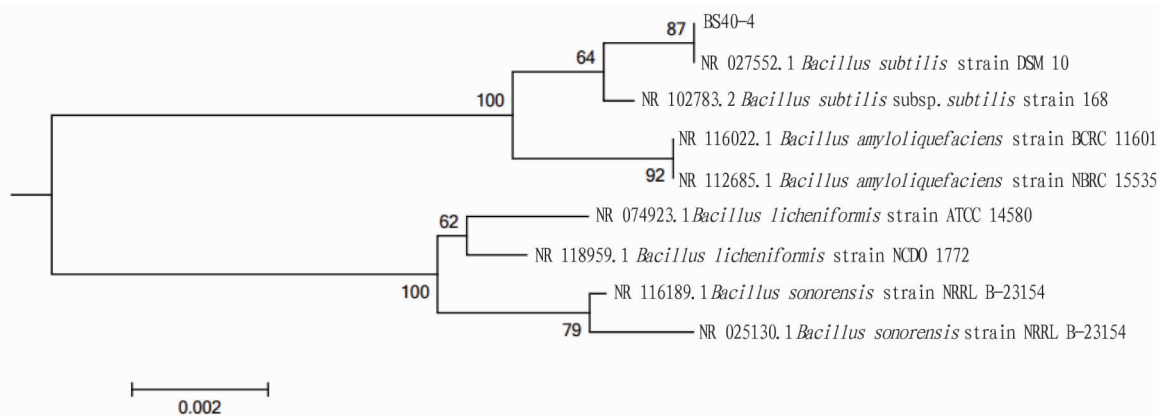


图5 BS40-4 的系统发育分析

Fig.5 Phylogenetic analysis of BS40-4

木质纤维素的降解是堆肥过程中的关键控制环节,可以体现堆肥的稳定化和腐殖化进程。在堆肥过程中木质纤维素的降解效果见图7。经过堆肥发酵后,牛粪-秸秆混合物

质的木质纤维素含量均有所下降。堆肥发酵后,BS 处理堆肥后的木质纤维素含量比堆肥初始值下降了 34.0%,高于 CK 处理(23.7%)和 EM 处理(28.6%)。这说明接种 BS40-4

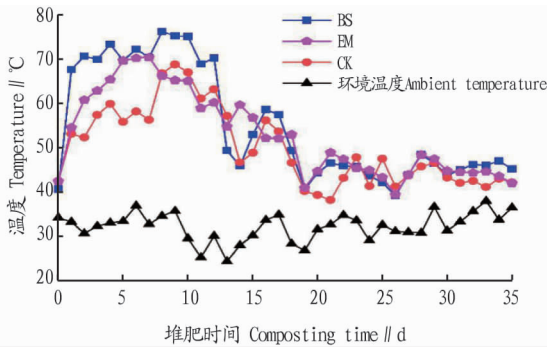


图6 牛粪-秸秆堆肥发酵温度变化

Fig.6 Temperature change of dairy manure-straw composting fermentation

菌株的处理在堆肥中半纤维素、纤维素和木质素的降解更为充分更迅速,堆肥后三者分别下降 13.6%、23.5%和 7.1%。因此,高温降解菌株 BS40-4 可在畜禽粪便堆肥中有效提高木质纤维素的降解效率和能力。

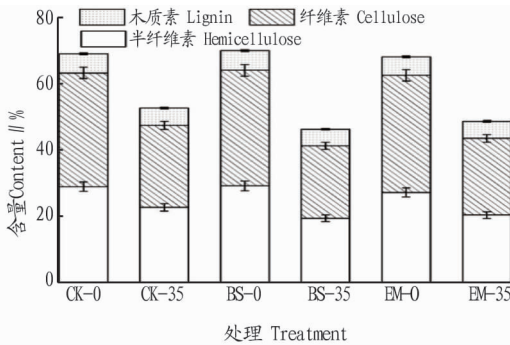


图7 牛粪-秸秆堆肥发酵中木质纤维素变化

Fig.7 Changes of lignocellulose in cow manure-straw composting fermentation

3 结论

(1) 该研究从高温时期堆肥样品中筛选能在 50、60 和 70 °C 高温下生长、产酶的高温降解菌株,结合水解圈、秸秆崩解、纤维素酶活测试试验结果,筛选出高温降解菌株 BS40-4,通过形态学观察和 16S rRNA 测序法,确定为枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*。

(2) BS40-4 菌株的堆肥应用效果表明,对比未接种或接种 EM 菌剂的处理,接种 BS40-4 菌株的处理具有发酵启动快、升温迅速、高温持续时间长、木质纤维素降解充分等优势,从而提高堆肥发酵效率。

参考文献

- [1] AWASTHI M K, SARSAIYA S, WAINAINA S, et al. A critical review of organic manure biorefinery models toward sustainable circular bioeconomy: Technological challenges, advancements, innovations, and future perspectives[J]. *Renewable and sustainable energy reviews*, 2019, 111: 115-131.
- [2] GAO X T, TAN W B, ZHAO Y, et al. Diversity in the mechanisms of humin formation during composting with different materials [J]. *Environmental science & technology*, 2019, 53(7): 3653-3662.
- [3] 徐杰, 许修宏, 门梦琪, 等. 木质纤维素降解菌剂 DN-1 促进堆肥腐熟度的评估[J]. *中国土壤与肥料*, 2016(6): 146-151.
- [4] 朱晨杰, 张会岩, 肖睿, 等. 木质纤维素高值化利用的研究进展[J]. *中国科学: 化学*, 2015, 45(5): 454-478.
- [5] 李荣华, 涂志能, ALI AMJAD, 等. 生物炭复合菌剂促进堆肥腐熟及氮磷保留[J]. *中国环境科学*, 2020, 40(8): 3449-3457.
- [6] 罗晓莎, 王明明, 宋颖, 等. 接种嗜热侧孢霉对堆肥木质纤维素降解的影响[J]. *安徽农业科学*, 2021, 49(2): 63-67, 71.
- [7] 张喜庆, 勾长龙, 娄玉杰, 等. 高效纤维素分解菌的分离鉴定及堆肥效果研究[J]. *农业环境科学学报*, 2016, 35(2): 380-386.
- [8] 王顺利, 刘克锋, 李荣旗, 等. 木质纤维素分解复合菌剂强化牛粪堆肥工艺[J]. *农业机械学报*, 2014, 45(4): 201-207.
- [9] 余培斌, 杜焜, 陈建新. 高温好氧堆肥过程中芽孢杆菌的筛选、鉴定及应用[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(12): 199-205, 212.
- [10] 金迪, 彭清静, 易浪波, 等. 一株纤维素降解细菌的筛选、鉴定及产酶条件分析[J]. *中国微生物学杂志*, 2010, 22(4): 289-292, 295.

(上接第 21 页)

- [58] 翟世涛, 杨健, 张磊, 等. 三峡库区支流澎溪河浮游动物的季节性变化与水质评价[J]. *中国农学通报*, 2012, 28(14): 307-312.
- [59] 王珂. 三峡库区鱼类时空分布特征及与相关因子关系分析[D]. 北京: 中国水利水电科学研究院, 2013.
- [60] 杨峰. 三峡库区蓄水后大宁河鱼类资源状况及主要经济鱼类摄食生态学的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2013.
- [61] 彭成荣, 陈磊, 毕永红, 等. 三峡水库洪水调度对香溪河藻类群落结构的影响[J]. *中国环境科学*, 2014, 34(7): 1863-1871.
- [62] 崔玉洁. 三峡水库香溪河藻类生长敏感生态动力学过程及其模拟[D]. 武汉: 武汉大学, 2017.
- [63] 郭劲松, 李哲, 张呈, 等. 三峡小江回水区藻类集群与主要环境要素的典范对应分析研究[J]. *长江科学院院报*, 2010, 27(10): 60-64, 87.

- [64] 张磊, 夏志强, 周伟, 等. 三峡水库春季营养盐和浮游植物空间分布及其影响机制[J]. *环境科学研究*, 2015, 28(7): 1069-1077.
- [65] 贡丹丹, 刘德富, 张佳磊, 等. 周期性的温度扰动对藻类群落结构演替的影响[J]. *环境科学*, 2016, 37(6): 2149-2157.
- [66] 严广寒. 脉冲式添加营养盐对藻类群落结构的影响[D]. 宜昌: 三峡大学, 2018.
- [67] 王娣娟. 几种我国常见鱼类对经典生物操纵的影响研究[D]. 武汉: 华中师范大学, 2012.
- [68] 李优迈. 大亚湾中型浮游动物的摄食生态学研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2018.
- [69] 解崇友, 胡佐灿, 蔡瑞钰, 等. 三峡库区重要支流 8 种优势鱼类生长及其资源开发现状评估[J]. *中国水产科学*, 2019, 26(3): 504-511.
- [70] 徐耀阳. 基于生态同步性概念的大型水库富营养化与春季藻类水华研究: 以三峡水库为例[D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2010.