

一组纤维素-林丹分解菌复合系的稳定性研究

牛俊玲¹, 崔宗均², 李国学³

(1.郑州航空工业管理学院资源与环境研究所, 河南 郑州 450015; 2.中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100094; 3.中国农业大学资源与环境学院, 北京 100094)

摘 要:本试验通过对一组高效降解纤维素林丹的复合微生物菌系的性质、功能和菌种组成进行研究,以确定该菌系的稳定性。结果表明,该复合系能在较大的 pH 范围内保持高的纤维素林丹分解活性,不同培养代在培养过程中的 pH 均呈现先降后升的趋势;不同代次的复合系在培养第 3 d 时对滤纸的分解率均达到了 90%以上,在第 7 d 时对林丹的降解率均达到 50%以上,且差异很小,说明该复合菌系产酶及分解纤维素和林丹的能力也已经非常稳定;平板培养基培养证明该复合菌系全部由细菌组成,用变性梯度凝胶电泳(DGGE)法比较来源于不同培养代的 16S rDNA 条带,分析菌种组成的变化,结果显示,不同培养代的菌种组成的主要条带没有变化,在 DGGE 图上出现的菌种能够稳定存在。

关键词:纤维素;林丹;复合菌系;稳定性

中图分类号:X172 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2008)06-2489-05

Stability of A Composite Microbial System for Degrading Cellulose and Lindane

NIU Jun-ling¹, CUI Zong-jun², LI Guo-xue³

(1.Institute of Resources and Environmental Science, Zhengzhou Institute of Aeronautical Industry Management, Zhengzhou 450015, China; 2.College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 3.College of Resources and Environmental Science, China Agriculture University, Beijing 100094, China)

Abstract: The stability of a high-efficient composite microbial system for degrading cellulose and lindane was studied by testing its characters, function and composition of bacteria strains. The composite microbial system could keep a higher degrading capability in a wider range of pH, which helped to adapt the complex compost environment. The pH value change of each generation in the process of subculturing tended to be the same as decreasing earlier and then rising. The degradation ratios of the filter paper were all above 90% after cultivated 3 days for the different generations of the composite system, the degradation ratios of lindane were all reached to more than 50%, and there were little differences among them. The result showed that the composite microbial system was very stable in degrading cellulose and lindane and producing cellulase. Plate culture results showed that the composite microbial system was consisted of bacteria. The composition change of bacteria strain was studied by comparing the 16S rDNA bands from different generations through the technique of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). It showed that the main DNA bands of different generations were not be changed, the bacteria strains showed in the DGGE plate could exist stably.

Keywords: cellulose; lindane; composite microbial system; stability

木质纤维素占地球光合产物的 60%以上,是土壤有机质的重要来源。近几年虽然农作物的生物产量(尤其是秸秆)一直在增加,但一方面因农作制度的改

变使前后茬口之间的时间缩短,另一方面因秸秆中木质纤维素不易分解等原因限制着秸秆直接还田来补充土壤有机质,使得我国土壤有机质含量逐渐下降。而土壤有机质是土壤恢复地力不可缺少的因素^[1]。因此,人工加速分解木质纤维素不仅对及时处理农业废弃物补充土壤有机质,而且对环境治理和含木质纤维素生物质资源的开发利用也具有重要意义。同时,随着农药使用量的增加,土壤和农副产品中的农药残留

收稿日期:2007-12-13

基金项目:国家科技支撑计划课题(2006BAD10B05);河南省重点科技攻关项目(072102190009)

作者简介:牛俊玲(1972—),女,山西长治人,博士,副教授,研究方向为固体废弃物处理与资源化。E-mail: niujl72@163.com

问题已成为我国农业污染的重大隐患。因此,在处理秸秆类农业废弃物时同时分解农药成分,减少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。

笔者等曾从 4 种不同高温期的堆肥样品中,经两种驯化方法、多代淘汰及其不同系之间的优化组合,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(γ -666 是工业品六六六的活性组分,当其含量达到 99% 以上时成为林丹)^[2-3]。一组微生物群体的性质和组成稳定性是保证其功能持续稳定的关键,如果稳定性不能保持,就失去了其研究和应用价值^[4-5]。本文将从性质、功能和菌种组成三方面对其在传代过程中的稳定性研究结果进行报告。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

由笔者筛选驯化的纤维素林丹降解复合菌系。

1.2 培养条件

蛋白胨纤维素培养基(PCS):0.5%蛋白胨,0.5%滤纸,0.5%NaCl,0.3%CaCO₃,0.1%酵母粉,自然 pH。接种量为 5%。在 50 ℃ 静止培养,使溶氧量(DO)处于 0.02~0.4 mg·L⁻¹ 的微好氧条件。

1.3 不同初始 pH 条件下的 pH 变化

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·L⁻¹,培养条件如 1.2。接种后的 1~7 d 用日本产 HORIBA B-212 型微量 pH 计测定培养液中的 pH 变化。

1.4 不同培养代复合菌系 pH 变化

将保存的第 20、25、30 代的复合菌系,以 5% 的接种量分别接种于 100 mL PCS 中,培养液中林丹浓度为 100 mg·L⁻¹,培养条件如 1.2。每隔 12 h 测定一次培养液的 pH,连续测定 120 h。

1.5 不同培养代复合菌系对纤维素和林丹的降解

将保存的第 20、25、30 代的复合系菌液 5 mL 接种,培养条件如 1.4。在培养 1、3、5、7 d 后按氨基纤维素(CMC)糖化力法测定纤维素酶活,在第 3 d 测定滤纸失重率,第 7 d 测定林丹的降解率。

CMC 糖化力法:将培养液直接以 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 后,按文献[6]的方法测定。测定时,酶促反应的温度为 60 ℃,反应时间为 5 min,DNS(3,5 二硝基水杨酸)显色时间为 5 min,测定波长为 490 nm^[6]。使用仪器为 Varian 公司的 CARY100Bio 型分光

光度计。

滤纸失重率的测定:将培养液直接以 3 000 r·min⁻¹ 离心,倒上清液,用盐酸和硝酸的混合液冲洗而消除菌体^[7],离心,清水洗,离心,105 ℃ 烘干后称重,计算失重率。

林丹降解率的测定: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,柱温 120 ℃ 5 min,程序升温至 260 ℃,升温速度 20 ℃·min⁻¹,进样口温度 280 ℃,电子捕获检测器,温度为 280 ℃,保留时间 22 min^[8]。

林丹降解率%=

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

1.6 不同培养代复合菌系菌种组成的稳定性分析

将连续继代培养的 10 代的复合系菌液 5 mL 分别接种于 0.5 g 滤纸作为惟一碳源的 100 mL PCS 培养基中,培养液中林丹浓度为 100 mg·L⁻¹,培养条件同上。分别于接种 4 d 后取样,每次取 7 mL 培养液,在 8 000 r·min⁻¹、4 ℃ 条件下离心 20 min,弃去上清液,吸取 0.5 mL 的 Extraction Buffer 与沉淀充分混匀,置于-20 ℃ 冰箱中冷冻保存,用于变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析。

DGGE 实验方法:将保存菌样解冻后,用 Benzyl Chloride 法提取 DNA^[9],PCR 扩增 16S rDNA V3 区域。PCR 用引物 357F-GC 为 GCclamp^b-5-CCTACGGGAG-GCAGCAG-3 (GC-clamp 序列为 5-CGCCCCGC-CGCGCGCG GCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG-3);引物 517R 的序列为 5-GTGCCAGC(A/C)GC-CGCGG-3。PCR 反应体系为 50 μL,包括 dNTPs 1 μL,10×PCR buffer 5 μL,primer F 0.5 μL,primer R 0.5 μL,DNA 模板 1 μL,Tag 聚合酶 1.5 U。对 16SrRNA 基因的 V3 区进行 COMMUNITY PCR 扩增,PCR 扩增条件为:95 ℃ 预变性 5 min;93 ℃ 30 s,65 ℃ 退火 40 s,72 ℃ 延伸 1 min,共 9 个循环;93 ℃ 30 s,60 ℃ 退火 40 s,72 ℃ 延伸 1 min,共 9 个循环;93 ℃ 30 s,55 ℃ 退火 40 s,72 ℃ 延伸 1 min,共 9 个循环;最后在 72 ℃ 下延伸 5 min。PCR 产物经精制浓缩后点到变性梯度胶,以尿素作为变性剂,变性剂浓度范围设为 25%~60%。从变性胶板切取典型的条带,再扩增、浓缩后,进行碱基序列分析。根据此碱基序列,查询联网数据库 BLAST (DDBJ nucleotide sequence database)进行检索,根据亲缘关系进行相似性分析^[11]。

2 结果与分析

2.1 不同初始 pH 条件下的培养液 pH 变化

从图 1 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 pH 为 4~9 的培养液的 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 3 d 过后逐渐升高;而 pH4 和 pH5 处理的 pH 值此后又持续下降到 5.5 左右,3 d 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 3 d 降到最低值 7.2。培养液的 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 降到最低值时是培养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。pH4~6 的培养液的 pH 值先上升到 7 左右,然后略有下降,而后又上升,说明该复合菌系可以在很大的起始 pH 值范围内调节发酵过程中的 pH 值变化,从而可以保证在发酵过程中对纤维素的分解,在纤维素分解菌的发酵液中 pH 值的不稳定是抑制纤维素分解活性的主要原因之一^[5]。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^[12]所做的纤维素复合菌系培养液的 pH 变化情况不一样。在他们的实验中,不同初始 pH 处理培养液的 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,使得培养液的 pH 值没有稳定在 8.0 以上。

该复合菌系在不同初始 pH 培养条件下 3 d 内对滤纸的降解情况见图 2,从图 2 中可以看出,在 pH7~

9 条件下,3 d 内滤纸的降解率都达到了 90%以上,pH6 处理的次之,pH4、pH5 和 pH10 处理的滤纸降解率明显较低,均在 50%以下。对不同初始 pH 条件下林丹降解率的测定结果表明(图 2),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,在纤维素降解最佳的 pH7~9 范围内,也同样有利于林丹的降解。虽然该复合菌系可以在很大的起始 pH 值范围内调节发酵过程中的 pH 值变化,但在起始 pH4~6 条件下,对纤维素和林丹的降解率远远低于 pH7~9。

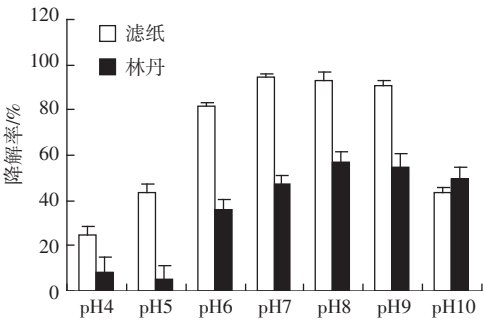


图 2 不同初始 pH 对滤纸和林丹降解能力的影响
Figure 2 Degradation of lindane and cellulose under different initial pH

2.2 不同代培养液的 pH 变化

将保存的第 20、25、30 代的复合菌系进行培养,对其培养液的 pH 值进行测定,结果表明(图 3),在接种后的 24 h 内,培养液的 pH 迅速由开始时的 8.7 下降到 7.0 以下,48 h 后 pH 回升到 7.0 以上,此时也是滤纸分解最旺盛的时期。pH 下降是由于纤维素分解产生大量的有机酸。到接种后 72 h,滤纸基本降解完毕,此时恢复到 8.0 左右。由此看出,复合系 pH 的变化与纤维素分解之间有着紧密的相关性,在培养 120 h 后,pH 恢复到接种前的水平。从图中可以看出,在整个发酵过程中,3 代培养液的 pH 变化趋势几乎没有差异,此特性非常稳定,从一定程度上反映了该复合菌系分解特性的稳定性。

2.3 不同培养代对滤纸和林丹的降解特性

从保存的第 20、25 和 30 代的复合菌系接种后的产酶情况来看(表 1),随着培养时间的延长,各代产生的酶活性逐渐增加,到接种后第 5 d 的纤维素酶活性最高,三代的酶活分别为 42.8 U、41.0 U 和 41.2 U,此后酶活性逐渐降低,到接种后第 7 d,酶活性与接种后的第 3 d 水平相当。复合系的产酶特性与滤纸的分

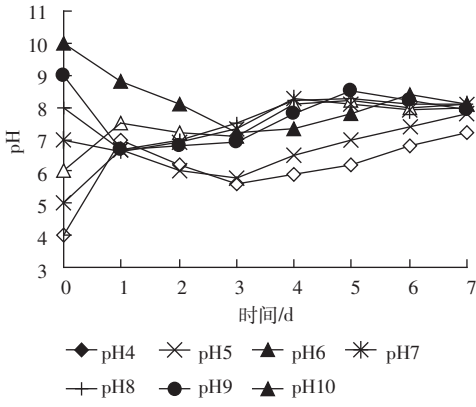


图 1 不同初始 pH 下接种后培养液中 pH 值的变化
Figure 1 Variation of pH after inoculation in different pH of culture media

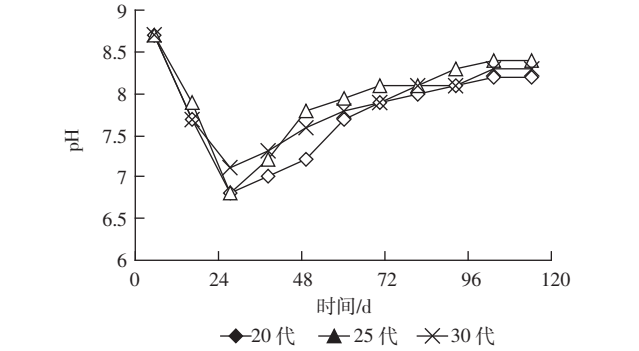


图 3 不同代复合菌系培养液的 pH 变化

Figure 3 Changes of pH in different subcultures fermentation

解情况吻合,前期滤纸量多,复合系产生的酶活高,此时滤纸旺盛分解。当滤纸大部分分解完毕后,由于碳源减少,加之代谢产物抑制、营养等方面的原因,酶活降低。三代复合系在第 3 d 的滤纸分解率均达到了 90%以上。从林丹的降解率来看,三代之间差异也不大,在发酵一周结束时,林丹降解率均达到 50%以上,说明复合系在产酶及分解纤维素-林丹能力方面已经非常稳定。

2.4 不同培养代复合菌系菌种组成的 DGGE 分析

提取不同培养代的菌系在生长旺盛期时培养物中的总 DNA,对 16S rDNA 的 V3 区域进行 PCR 扩增后,用 DGGE 法比较来源于不同培养代的 16S rDNA 条带,分析菌种组成的变化,结果如图 3 所示。从图中可以看出,不同培养代的主要条带没有大的改变,条带的亮度变化也很小,各培养代的菌种组成条带整体看来比较一致,这可以说明在该 DGGE 图上能够出现的菌种基本能够稳定存在。经平板分离培养证明,该复合系中没有发现真菌和放线菌,全部为细菌。图 3 中主要条带的近缘种微生物见表 2。

3 结论

本研究通过对复合菌系不同起始 pH 值及不同培养代培养过程中的 pH 值、物质分解能力及菌种组成进行测定,从性质、功能和组成三方面对该复合菌系在传代过程中的稳定性进行了评价。结果表明:

表 1 不同代复合菌的纤维素酶活变化及滤纸林丹分解率						
Table 1 Cellulase activity and degradation capability of filter paper and lindane in different subcultures fermentation						
传代次数	CMC 酶活/U				3 d 滤纸分解率/%	7 d 林丹降解率/%
	1 d	3 d	5 d	7 d		
20 代	12.7±0.75	27.5±2.68	42.8±2.23	36.5±2.36	94.20±1.892	52.20±5.049
25 代	15.4±1.20	26.6±0.97	41.0±1.94	34.7±2.51	92.72±3.557	50.36±4.169
30 代	13.7±1.41	28.0±1.16	41.2±2.07	37.7±1.83	91.58±3.742	54.80±5.472

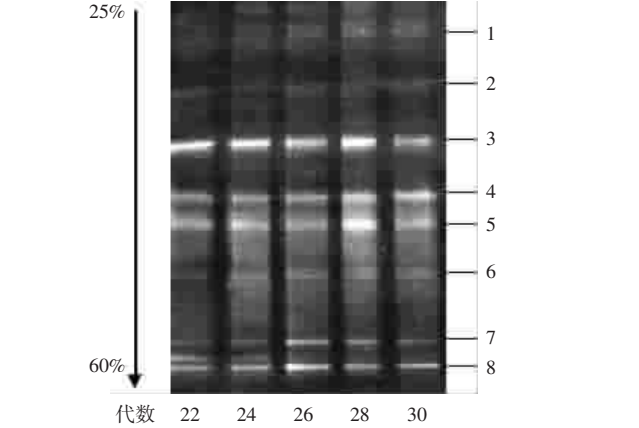


图 4 不同代复合菌系的 16S rDNA 的变性梯度胶电泳图片

Figure 4 DGGE Profile of bacterial components of different subcultures of microbial community

表 2 复合系的变性梯度胶电泳图中各条带的近缘菌株

Table 2 Identities of DGGE bands of microbial community in Fig.4

条带编号	近缘菌株名称(登记号)	相似率/%	备注
1	bacterium thr4-2(AF280827)	97.8	未分离
2	<i>Sphingobacterium</i> sp.7(AF427161)	96.4	已分离
3	<i>Benzene-decomposing bacterium</i> S5(AJ279495)	96.7	已分离
4	<i>Photorhabdus luminescens</i> (AY444555)	93.4	已分离
5	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. S7-07(AF530283)	97.6	已分离
6	<i>Pseudoxanthomonas taiwanensis</i> (AF427039)	98.0	已分离
7	<i>Clostridium algidicarnis</i> (X77676)	93.3	未分离
8	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> (AF512397)	98.4	已分离

(1)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,在培养结束时,除原 pH4 和 pH5 的处理始终未升到 8.0 外,其余的均升到 8.0 后又有所下降,这可能是由于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。

(2)在整个培养过程中,3 代发酵液的 pH 变化几乎没有差异,均呈现先降后升的趋势,此特性非常稳定;三代复合系的纤维素酶活随着发酵时间的延长逐渐增加,到接种后第 5 d 的纤维素酶活性最高,达到了 40 U 左右,此后酶活性逐渐降低,三代复合系在第 3 d 的滤纸分解率均达到了 90%以上,而从林丹的降

解率来看,三代之间几乎没有差异,在发酵第 7d 时,林丹降解率均达到 50%以上,说明复合系在产酶及分解纤维素-林丹能力方面的能力也已经非常稳定。

(3)用 DGGE 法比较来源于不同传代次数的复合菌系的 16S rDNA 条带,分析菌种组成的变化,结果表明,各代次的主要条带基本没有变化,说明在该 DGGE 图上出现的菌种能够持续稳定存在。

参考文献:

- [1] 汪维云,朱金华,吴守一. 纤维素科学及纤维素酶的研究进展[J]. 江苏理工大学学报, 1998, 19(3): 263-266.
WANG Wei-yun, ZHU Jin-hua, WU Shou-yi. Research progress of cellulose science and cellulase[J]. *Journal of Jiangsu University of Science and Technology*, 1998, 19(3): 263-266.
- [2] 牛俊玲,李国学,崔宗均,等. 堆肥中高效降解纤维素林丹复合菌系的构建及功能[J]. 环境科学, 2005, 26(4): 186-190.
NIU Jun-ling, LI Guo-xue, CUI Zong-jun, et al. Construction and function of a high-efficient complex microbial system to degrade cellulose and lindane in compost[J]. *Environmental Science*, 2005, 26(4): 186-190.
- [3] 牛俊玲,崔宗均,李国学,等. 高温堆肥中复合菌系对木质纤维素和林丹降解效果的研究[J]. 农业环境科学学报, 2005, 24(2): 375-379.
NIU Jun-ling, CUI Zong-jun, LI Guo-xue, et al. Degradation of ligno-cellulose and lindane by composite microbial system during thermophilic compost process[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2005, 24(2): 375-379.
- [4] 王伟东,崔宗均,王小芬,等. 快速木质纤维素分解菌复合系 MC1 对秸秆的分解能力及稳定性[J]. 环境科学, 2005, 26(5): 156-160.
WANG Wei-dong, CUI Zong-jun, WANG Xiao-fen, et al. Capability and stability of degrading rice straw of composite microbial system MC1[J]. *Environmental Science*, 2005, 26(5): 156-160.
- [5] 王伟东,崔宗均,杨洪岩,等. 高效稳定纤维素分解菌复合系 WSC-6 的稳定性[J]. 中国环境科学, 2005, 25(5): 567-571.
WANG Wei-dong, CUI Zong-jun, YANG Hong-yan, et al. Stability of a composite microbial system WSC-6 with efficient cellulose degrading[J]. *China Environmental Science*, 2005, 25(5): 567-571.
- [6] 朴哲,崔宗均,苏宝林,等. 高效稳定纤维素降解菌复合系 MC1 的酶活特性[J]. 中国农业大学学报, 2003, 8(3): 74-79.
PIAO Zhe, CUI Zong-jun, SU Bao-lin, et al. Characteristics cellulase activity of a composite microbial system-MC1 with efficient and stable cellulose degradation[J]. *Journal of China Agriculture University*, 2003, 8(3): 74-79.
- [7] Updegraff D M. Semimicro determination of cellulose in biological materials[J]. *Analytical Biochemistry*, 1969, 32: 420-424.
- [8] GB/T 14551—93, 六六六和滴滴涕的气相色谱测定法[S].
GB/T 14551—93. Gas chromatography of Benzene Hexachloride and Dichloro-diphenyltrichloroethane[S].
- [9] Zhu H, Qu F, Zhu L H. Isolation of genomic DNAs from plant, fungi and bacteria using benzyl chloride[J]. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21: 5278-5280.
- [10] Muyzer G, Wael E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59: 695-700.
- [11] Haruta S, Cui Z, Huang Z, et al. Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability[J]. *Appl Microbiol Biot*, 2002, 59: 529-534.
- [12] 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, 23(3): 36-39.
CUI Zong-jun, LI Mei-dan, PIAO Zhe, et al. Selection of a composite microbial system MC1 with efficient and stability cellulose degradation bacteria and its function[J]. *Environmental Science*, 2002, 23(3): 36-39.