

一组多功能细菌复合系 NSC-7 的培养特性及稳定性

刘长莉^{1,2} 王小芬² 牛俊玲³ 李献梅² 沈海龙¹ 崔宗均^{2*}

(1. 东北林业大学生命科学院/林学院 哈尔滨 150040)

(2. 中国农业大学农学与生物技术学院/中国农业大学生物质工程中心 北京 100094)

(3. 郑州航空工业管理学院 郑州 450015)

摘要: 本研究探讨了一组具有分解纤维素和农药林丹双重功能的复合菌系 NSC-7 的培养特性和稳定性。NSC-7 在 14 d 的培养过程中, 使稻秆分解 73.6%; 用 GC-MS 测定结果发酵液中检测到 10 种化合物成分, 其中峰值较大的依次为乙酸、甘油、丁酸、丙酸; NSC-7 在 -80℃ 冷冻和冻干条件下保存 4 年后仍具有稳定的稻秆分解能力和纤维素内切酶活性; 经 90℃ 高温处理 30 min 后, 仍能够保持分解能力, 105℃ 处理 30 min 后转接 2 次就能恢复分解能力, 显示出很高的保存稳定性和热稳定性。利用 DGGE 分析多次继代接种过程的培养物结果条带基本没有变化, 表明 NSC-7 的菌种组成稳定。

关键词: 纤维素分解, 林丹分解, 细菌复合系 NSC-7, 稳定性

The Cultural Characteristics and Stability of the Dual-functional Bacteria Community NSC-7

LIU Chang-Li^{1,2} WANG Xiao-Fen² NIU Jun-Ling³ Li Xian-Mei²
SHEN Hai-Long¹ CUI Zong-Jun^{2*}

(1. College of Life Science/ School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040)

(2. College of Agronomy and Biotechnology, Center of Biomass Engineering, China Agricultural University, Beijing 100094)

(3. Zhengzhou Insitute of Aeronautical Industry Management, Zhengzhou 450015)

Abstract: The cultural characteristics and stability of the bacteria community NSC-7, which was capable of degrading cellulose and lindane with high efficiency was discussed in this study. NSC-7 could degrade 73.6% of rice straw within 14 d. 10 kinds of material were detected in volatile products by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS), and they were mainly acetic acid, glycerol, butyric acid, and propanoic acid. NSC-7 could retain stable degrading ability and high cellulase activity after preserved in -80℃ and freeze-drying for four years. It could remain its degrading ability after 90℃ of high temperature treating for 30 min, and resume its degrading ability after subcultured 2 times after 105℃ of high temperature treating for 30 min in autoclave. It suggested that NSC-7 had efficient conservation stability and thermo-stability.

DGGE analysis showed that the composition of NSC-7 remained stable after subcultured for several times.

Keywords: Cellulose degradation, Lindane degradation, Bacteria community NSC-7, Stability

木质纤维素占地球光合产物的 60% 以上, 是地球上取之不尽、用之不竭的重要可再生资源。由于木质纤维素不易分解, 我国年均有 5.5 亿吨的秸秆或纤维素只能就地丢弃或焚烧^[1], 这不仅浪费资源还引起环境污染。农药是人们投放于环境中数量最大、毒性最广的一类化学物质^[2], 农药的大规模应用与降解缓慢造成的环境问题已经危害到人类健康和生态环境的有序发展^[3]。如果能够利用微生物同时将以上两种物质分解, 将木质纤维素资源转化为人类紧缺的能源、食物和化工原料, 解决人类面临的环境污染、食物短缺和能源危机等问题, 同时将有有机氯农药分解, 降低污染, 这不仅对于资源有效利用和环境治理有重要作用, 而且对改善生态环境和实现人类可持续发展具有重要意义。

本研究组在 MC1^[4]基础上, 通过长期驯化、构建出一组既有降解木质纤维素又具降解农药林丹双重功能的微生物复合系 NSC-7, NSC-7 能够在 5 d 内分解天然稻秆干重 44.7%, 14 d 内分解 73.6%。在国内外报道的文献中除了 MC1 在 12 d 内能够分解稻草总重量的 81%^[4,5]以外, 目前未见培养的微生物比 NSC-7 更强分解能力的报道。因此探明该菌系的性质和稳定性对进一步的研究和应用尤其重要。鉴于此, 本文综合报告 NSC-7 在分解木质纤维素过程中的一些性质和菌种组成稳定性。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试菌种: 本实验室筛选的一组具有降解纤维素和林丹的细菌复合系 NSC-7^[6]。

1.1.2 木质纤维素材料: 用 1% NaOH 浸泡水稻秸秆 24 h 后, 流水冲洗至中性, 105 °C 烘至恒重。

1.1.3 培养基及培养条件: 采用 PCS(蛋白胨纤维素培养液)培养基(0.5% 蛋白胨, 0.5% NaCl, 0.2% CaCO₃, 1% 酵母粉, 0.5% 稻秆), 在 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min。接种量 0.5% (V/V), 50 °C 静止培养, 溶氧量控制在 0.01 mg/L~0.5 mg/L 左右微好氧条件。

1.2 分解能力及性质实验设置

500 mL 培养瓶内添加 400 mL 培养基和 2.2 g 稻秆, 将预培养 3 d 的菌种按 0.5% 体积比接种后,

50 °C 静止培养, 在 0 d(接种当天)、1 d、3 d、5 d、8 d、11 d 和 14 d 分别取样检测如下项目。设相同条件下不接菌的对照, 来消除培养条件对重量的影响; 设接种于无稻秆培养液(0.2% 蔗糖)的对照, 来消除培养基和菌体对减重的影响。每次取 3 个重复。

1.3 秸秆分解过程中总重量的变化

对定期取的培养物在 8000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 取沉淀于 105 °C 烘至恒重, 以同步的对照消除误差后的秸秆减少的重量作为分解量。

1.4 稻秆分解过程中 pH 值、生物量的测定

pH 值: 取培养液 0.5 mL 用 HORIBA B-212 型微量 pH 计测定。

微生物量: 取培养液 1.5 mL 用 Biospec-mini 分析仪(SHIMADZU Japan)测定 600 nm 波长下的吸光度作微生物生长量。

1.5 秸秆分解过程中挥发性发酵产物的测定

取培养液, 过 0.22 μm 的滤膜, 用气质联机(GC-MS model QP 2010, Shimadzu, Japan)分析。测定条件为: 分析柱: CP-Chirasil-Dex CB (25 m×0.25 mm) 毛细管柱; 柱箱升温程序: 50 °C 2 min 后以 5 °C/min 速度升至 100 °C, 再以 15 °C/min 速度升至 190 °C, 保持 2 min, 共 15 min; 进样口温度 190 °C; 检测器温度 190 °C; 载气 He (60 kPa); 流量 34 mL/min; 分流比 1/22; 检测器电压 1.5 kV; 进样量 1 μL。

1.6 菌系稳定性检测

1.6.1 连续继代培养及保存稳定性: 连续传代培养: 自 2003 年 4 月至 2007 年 10 月一直连续传代培养, 比较各年分解能力。

冰冻保存: 2003 年 4 月菌液中加入甘油至 20% 后, 于 -80 °C 冰冻保存, 每年取出活化传代 2 次后, 第 3 代培养物测定分解能力。

冷冻干燥保存: 自 2003 年 4 月将菌种冷冻干燥后在 -20 °C 保存, 每年取出活化传代 2 次后, 第 3 代培养物测定分解能力。

分解能力测定: 将连续培养的菌液和保存物活化 2 代的培养液, 按 5% (V/V) 的接种量接种于含 0.5% (W/V) 稻秆的 PCS 培养基中, 50 °C 静止培养, 在第 8 天以羧甲基纤维素钠为底物测定内切酶活性^[6], 第 12 天按 1.3 节的方法测定减重。

1.6.2 高温处理后热稳定性: 将培养 96 h 的 NSC-7 分别置于 90、100、105 和 110 的高压灭菌锅内, 处理 30 min, 待冷却后, 作为菌种, 按 10% (V/V) 的接种量, 接种于含 1 条滤纸(0.3%)PCS 培养基中, 50℃ 静止培养, 培养 4 d 后转接 1 次, 连续转接 3 次, 每隔 12 h 观察记录分解情况, 以第 3 代培养物的分解状况比较了解分解能力。

1.6.3 DGGE 检测菌种组成稳定性: 将筛选后连续传代培养的第 38~42 代培养 4 d 的培养液经 8000 r/min 离心 10 min, 弃上清收集菌体细胞, 用氯仿-苯酚抽提法提取总 DNA, PCR 扩增 16S rDNA 的 V3 可变区按文献[7]的方法做变性梯度凝胶电泳, 比较连续培养过程中菌群的变化。

2 结果与讨论

2.1 NSC-7 对秸秆木质纤维素的分解能力

分别在培养的 0 d、1 d、3 d、5 d、8 d、11 d 和 14 d 测定稻秆的分解剩余物, 结果如图 1 所示。经 14 d 的培养, 稻秆的干重由 2.0 g 减少到 0.52 g, 减重率为 73.6%。从图 1 可见, 稻秆重量的减少主要发生在培养的前 5 天, 培养到 5 d 剩余 1.106 g, 重量减少 44.7%, 相比 14 d 内分解 73.6% 的秸秆, 也说明复合系的旺盛降解主要发生在培养初期。

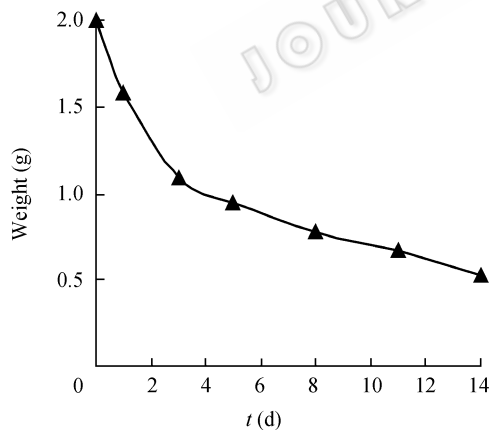


图 1 培养过程中秸秆减重

Fig. 1 Changes of rice straw weight in degradation

2.2 培养过程中 OD 和 pH 变化动态

NSC-7 在 14 d 的培养过程中微生物生长量(以 OD 表示)和 pH 值如图 2 所示。OD 值在培养的前 3 天直线上升, 到第 5 天仍上升迅速, OD 值由接种初期的 0.063, 第 5 天增加到 1.623, 从第 5 天到第 12

天期间缓慢上升, OD 值由 1.623 增加到最大值 1.890, 随后到 14 d 略有下降。与图 1 的结果相比可见, OD 值迅速增加的 5 d 期间正是秸秆重量下降最快的时间, 说明新增殖的微生物都参与了分解。而 5 d 后虽然微生物总数保持较高, 但分解速度并没有前期快。这期间的分解还会受到底物量的减少、产物积累的反馈抑制等的影响^[8]。因此要提高整体的分解速度, 应搞清其分解抑制因素, 消除其影响。

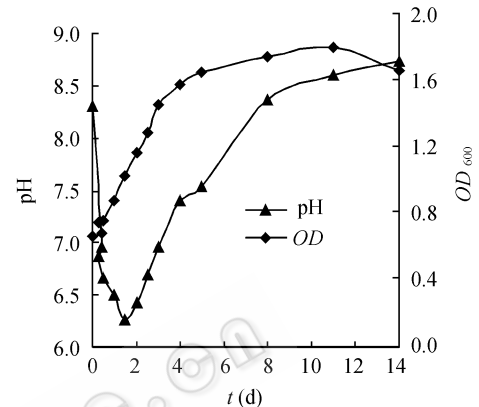


图 2 培养过程中菌系的生物量(OD)和 pH 变化

Fig. 2 Dynamic trends of OD and pH during degradation by NSC-7

pH 值总体上, 呈前 2 d 先下降后逐渐回升到最初的水平而稳定。培养液初始 pH 值为 8.4, 36 h 后迅速下降到 6.2, 2 d 到 8 d 间 pH 有一个快速回升的过程, 然后逐渐维持在 8.5 左右。结合图 1 的分解曲线和后文的产物测定可见, 培养初期分解速度直线加快, 1 d 开始出现可测的有机酸, 3 d 和 5 d 有机酸量最大, 培养液 pH 值仍较低。说明 pH 迅速下降是分解产生的有机酸所致。这种在分解过程中 pH 能够迅速下降到微酸性, 再恢复到微碱性并保持稳定的变化规律, 是细菌复合系分解木质纤维素时的特殊规律^[9], 也是复合系具有正常分解能力的体现。如果下降的 pH 无法回升就意味着失去分解能力^[10]。

2.3 水稻秸秆分解过程中发酵液中挥发性产物的变化

2.3.1 挥发性产物定性分析: 用 GC-MS 定期检测发酵液的成分, 经 NIST 数据库检索定性分析结果如图 3 所示。在峰中可检测到的有乙醇、乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、甘油、尿素、乙二酸乙二酯、2-甲基丙酸和乙二醇 10 种化合物, 其中按峰值大小依次为乙酸、甘油、丁酸、丙酸。培养 5 d 时产物种类最多, 5 d 以后发酵产物的种类和含量都明显减

少。由代谢产物定性分析结果可见, NSC-7 分解水稻秸秆的产物并不是简单的几种, 而是可测的仅挥发性产物就有 10 种, 化合物含碳 2 个到 5 个, 成分很复杂。

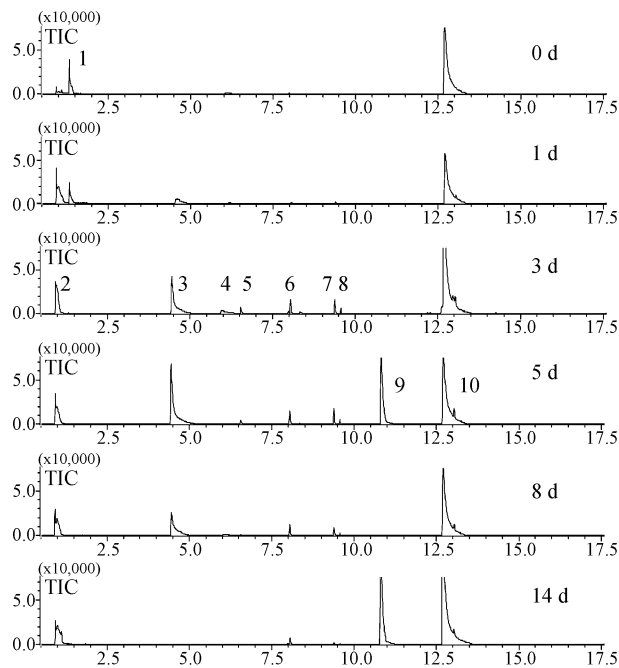


图3 水稻秸秆分解过程挥发性产物的动态变化
Fig. 3 The volatile products of rice straw degradation determined by GCMS

1: 乙醇; 2: 丙酸; 3: 乙酸; 4: 乙二酸乙二酯; 5: 2-甲基丙酸; 6: 尿素; 7: 戊醇; 8: 丁酸; 9: 2,2-氧代二乙醇; 10: 甘油
1: Ethanol; 2: Propionic acid; 3: Acetic acid; 4: Ethanedioic acid diethyl ester; 5: Propionic acid 2-methyl; 6: Urea; 7: Pentanol; 8: Butanoic acid; 9: Ethanol, 2,2-oxybis; 10: Glycerin

2.3.2 挥发性产物定量分析: 对 GC-MS 分析产物中量较大的 5 种产物进行定量分析结果如表 1 所示。培养初期产物变化不大, 从 3 d 产物量开始增多, 在 5 d 种类和数量都达到最高, 其中乙酸含量最高为

12.0 g/L, 其次为甘油 0.95g/L, 丙酸 0.25 g/L, 丁酸 0.04 g/L, 而尿素、戊酸、乙二酸乙二酯、2-甲基丙酸和乙二醇很少, 微量的存在已不足检测到具体浓度。甘油始终存在, 含量最高值出现在 3 d, 为 1.47 g/L。乙醇在前 3 d 出现, 并在 3 d 浓度最高 0.15 g/L。丁酸和丙酸都在培养中期才出现随后又消失。从表 1 可见, 随着微生物的降解, 产物的种类和浓度都不断变化。产物如此复杂, 若从中直接提取某种特定的物质有较大的困难, 但这些物质都可以作为甲烷发酵的底物^[11], 因此利用该菌系作为农业废弃物甲烷发酵的前发酵将是一个有效的途径。这有待进一步研究。

2.3.3 可溶性物质总量的动态变化: 在 NSC-7 分解稻秆过程中可溶性物质的变化如表 1 所示。可溶性物质由最初的 0.625 g 增加到 0.74 g。可溶性物质的量持续增加出现在前 3 d, 3 d 后逐渐降低。可溶性物质含量的外部表现是秸秆被分解产生的量积累和产生的可溶性物质被微生物进一步分解利用而消失的动态平衡值。结合微生物量的变化和上述有机酸量变化可知, 培养的前 3 d~5 d 可溶性物质的产生大于消耗, 而 5 d 后在微生物数量足够多的情况下消耗大于产生导致浓度逐渐下降。这种消耗对体系进一步分解木质纤维素是有利的, 但从人类利用可溶性物质的角度希望积累更高含量的可溶性物质。因此, 如何在提高分解能力的同时, 减少消耗是摆在我们面前的重大课题。

2.4 保存稳定性

连续继代培养: 自 2003 年 4 月以来已连续传代培养 4 年半, 在此期间对稻秆的分解能力始终保持不衰, 在 2 周内将培养液 1% 的稻秆分解 70%~80%。这种培养稳定性在纯培养微生物上未见报道。

表 1 水稻秸秆分解过程中可溶性物质及挥发性产物的动态
Table 1 Quantitative analysis of water-soluble and major volatile products

产物(Product g/L)	Control	0 d	1 d	3 d	5 d	8 d	14 d
可溶物(Water-soluble materials)	0.625	0.625	0.627	0.741	0.363	0.427	0.238
乙醇(Ethanol)	0.119	0.119	0.085	0.154	0	0	0
乙酸(Acetic acid)	0	0	0.124	7.697	12.033	0.777	0
丙酸(Propionic acid)	0	0	0	0	0.252	0.656	0
丁酸(Butanoic acid)	0	0	0	0	0.041	0.024	0.015
丙三醇(Glycerin)	0.758	0.758	0.700	1.465	0.942	0.865	0.528

冰冻保存和冷冻干燥保存: 将以 20% 甘油保存在 -80 的和冷冻干燥的菌种经 3 次传代活化之后, 两种方式保存的菌种在 96 h 内可完全崩解滤纸, 其重量减少能力都在 60%~70%, 经 4 年后分解能力仍然无大变化(表 2)。培养 96 h 的培养液 CMC 糖化活性也都在 4.21 U/mL 至 5.31 U/mL 之间, 分解木质纤维素的能力稳定, 并且经 3 次传代活化培养可完全恢复分解能力。

表2 80℃和冻干保存的NSC-7滤纸分解能力和酶活
Table 2 Degrading rate of rice straw and endoglucanase after NSC-7 preserved in -80℃ and freeze-drying

保存条件 Preserved condition	-80℃保存(年) Preserved in -80℃			冻干保存(年) Freeze-drying		
	2	3	4	2	3	4
Degradation ratio (%)	65.1	63.5	66.0	62.6	61.3	65.4
Endoglucanase (U/mL)	4.40	5.31	4.78	4.21	5.15	4.92

注: 活化后的第 4 代, 含 0.5% 滤纸, 50℃ 培养 96 h 后的测定数据

Note: The 4th generation NSC-7, the culture medium with 0.5% filter page, cultured 96 h at 50℃

2.5 高温处理后热稳定性

NSC-7 经 90、100、105 或 110 高温处理后, 50、90、100 处理分别在转接第 1 代培养 48 h、57.5 h 和 72 h 将滤纸崩解(表 3); 105 处理在转接第 2 代培养 58 h 后恢复分解能力, 将滤纸全部崩解; 110 处理在第 3 代 96 h 后从侧面看滤纸有微弱分解, 而一直没有恢复完全崩解能力, 图 4 是第 3 代不同时期滤纸分解情况。由此结果可见, NSC-7 具有相当强的热稳定性, 90 处理 30 min 分解能力受影响不大, 105 处理 30 min 后经 3 代转接, 可以恢复分解能力。

2.6 菌种组成稳定性

4 年期间多次对冰冻保存的 NSC-7 培养物进行 16S rDNA V3 区的 DGGE 分析结果表明, 主要条带基本无变化。如图 5 为将冰冻保存于 -20℃ 低温条件的 NSC-7 活化后, 将第 38 至 42 代的 96 h 培养物提取 DNA 进行的 16S rDNA DGGE 图谱。结果表明, 第 38~42 代间的 DGGE 图谱上的各个条带几乎没有变化。从胶上切出各列的条带测定 DNA 序列结果也表明, 列之间同一水平位置的条带没有变化(见图 5)。证明 NSC-7 经多年长期低温保存和多代培养后菌种

组成稳定。今后将进一步以克隆文库等方法细致分析 NSC-7 的菌种组成多样性, 为揭示其多种微生物的协同分解机理, 以及开发分解菌的应用技术提供依据。

表3 不同高温处理后NSC-7对滤纸崩解需要时间
Table 3 Time of collapse filter paper by NSC-7 treated in different high temperature (h)

代数 Generation	温度(℃) Temperature				
	50	90	100	105	110
The 1 st generation	48	57.5	72	96	96
The 2 nd generation	48	52	54	58	96
The 3 rd generation	48	48	50	50	96

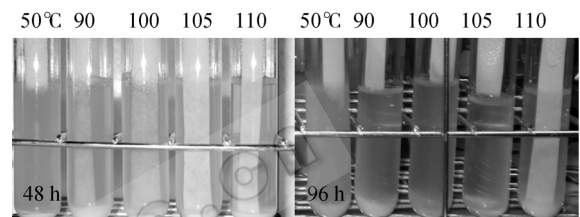


图4 高温处理第3代48 h和96 h的分解滤纸情况

Fig. 4 The 3rd generation in the 48 h and 96 h degrading filter paper after high temperature treated

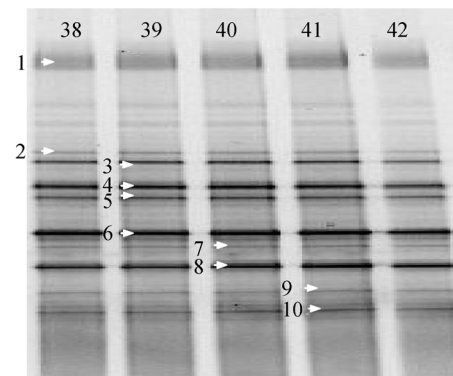


图5 NSC-7 复合系不同代 DGGE 图谱

Fig. 5 Changes of DGGE patterns in different generation

各条带近缘种依次为: 1. Uncultured bacterium(AF280825, 96%); 2. *Clostridium* sp. FG43(AB207248, 94%); 3. Uncultured bacterium tbr1-10(AF280825, 97%); 4. Uncultured bacterium(AF280825, 96%); 5. Uncultured bacterium(AF280825, 97%); 6. *Clostridium stercorarium* subsp(AF266461, 93%); 7. *Clostridium* sp. PML14(EF522948, 96%); 8. *Clostridium* sp. PML3-1(EF165015, 92%); 9. *Clostridium* strain XB90(AJ229234, 90%); 10. *Proteobacterium* HMD444(AB015328, 99%)

3 结论

(1) NSC-7 在 5 d 和 14 d 分别分解稻秆的

44.7%和 73.6%重量,其分解能力在冰冻保存和冷冻干燥保存 4 年后,转接培养 3 次即能完全恢复分解能力。

(2) NSC-7 经 105 °C 高温处理 30 min 后,转接培养 3 次也能恢复分解能力,说明 NSC-7 具有相当高的热稳定性。

(3) DGGE 分析结果证明 NSC-7 经长期冷冻保存之后菌种组成仍然稳定。

参 考 文 献

- [1] 高祥照, 马文奇, 马常宝. 中国作物秸秆资源利用现状分析. 华中农业大学学报, 2002, 21(3): 242-247.
- [2] Barriada PM, Gonzalez MJ, Muniategui S. Comparison of pressurized liquid extraction and microwave assisted extraction for the determination of organochlorine pesticides in vegetables. *Talanta*, 2006, 7(12): 1-7.
- [3] Natalia C, Rosa P, Manuel H, *et al.* Pesticide analysis in herbal infusions by solid-phase microextraction and gas chromatography with atomic emission detection. *Talanta*, 2006, 7(14): 1-7.
- [4] 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. 环境科学, 2002, 23(3): 36-39.
- [5] 王伟东, 崔宗均, 王小芬, 等. 快速纤维素分解菌复合系 MC1 对秸秆的分解能力及稳定性. 环境科学, 2005, 26(5): 156-160.
- [6] 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. 环境科学, 2005, 26(4): 186-190.
- [7] Guo P, Wang XF, Zhu WB, *et al.* Degradation of corn stalk by the composite microbial system of MC1. *Journal of Environmental Sciences*, 2008, 20(1): 1-6.
- [8] Atif HA, Yasmeen MI. Induction, production, repression, and de-repression of exoglucanase synthesis in *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 2004, 94(3): 311-319.
- [9] 王伟东, 王小芬, 刘长莉, 等. 木质纤维素分解菌复合系 WSC-6 分解秸秆过程中的产物及 pH 动态. 环境科学, 2008, 29(1): 219-224.
- [10] Liu JB, Wang WD, Yang HY, *et al.* The process of rice-straw degradation and dynamic trend of pH by the microbial community of MC1. *Journal of Environmental Sciences*, 2006, 18(6): 1142-1146.
- [11] Tomoyuki H, Shin H, Yoshiyuki U, *et al.* Dynamic transition of a methanogenic population in response to the concentration of volatile fatty acids in a thermophilic anaerobic digester. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(2): 1623-1630.

新辟栏目介绍

教学科研单位及成果展示

为了更好地宣传我国生命科学领域取得的成绩,总结和交流我国微生物学研究和开发的新成果,增强学术刊物与科研、教学和开发等各界同仁的广泛合作与联系,共谋发展,决定开设“教学科研单位及成果展示”栏目,现诚邀有关单位参加。具体安排如下:

- 1、在《微生物学通报》显著位置开辟精美彩色专版,刊登科研、开发、教学单位介绍,展示科研成果、学科建设成就、生物技术新产品等,图文并茂,生动活泼,每页内容要求:图片 2~5 张,文字 1000 字以内。
- 2、参加单位将获赠刊有本单位宣传内容的本期《微生物学通报》刊物 5 本;获赠《微生物学通报》杂志全文检索数据光盘版(1974~2006)一张。
- 3、参加单位提供的简介、科研及教学成果、学科建设成就、新产品新技术展示、招生信息、人才引进及招聘启事、优秀人才推介等内容均可在本刊网站的“科研单位成果展示”等栏目免费发布一年,并可将主页网址与我刊友情链接。
- 4、参加单位应保证宣传材料真实客观、数据翔实、文责自负,来稿请加盖公章,以示负责。
- 5、本栏目将适当收取版面制作及网页维护费。
- 6、本栏目联系方式:

电话/传真:(010)64117524 联系人:李平 胡丹
E-mail: wswxtb@163.com