

## 研究报告

## 餐厨垃圾高温好氧生物减量菌种的筛选及特性

吉雨霁<sup>1,2</sup>, 王娜<sup>1,2</sup>, 杨宁<sup>1,2</sup>, 史吉平<sup>1,3</sup>, 刘莉<sup>\*1,3</sup>

1 中国科学院上海高等研究院, 上海 201210

2 中国科学院大学, 北京 100049

3 上海有机固废生物转化工程技术研究中心, 上海 200241

吉雨霁, 王娜, 杨宁, 史吉平, 刘莉. 餐厨垃圾高温好氧生物减量菌种的筛选及特性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(11): 4513-4524

Ji Yuji, Wang Na, Yang Ning, Shi Jiping, Liu Li. Screening of bacteria for thermophilic aerobic biodegradation of food waste and the degradation characteristics[J]. Microbiology China, 2022, 49(11): 4513-4524

**摘要:**【背景】随着餐厨垃圾产生量的逐步提高, 如何实现其快速降解, 成为餐厨垃圾处理亟待解决的问题。餐厨垃圾的高温好氧生物减量技术是一种可以快速降解餐厨垃圾的有效方法。【目的】筛选能够适应餐厨垃圾环境且具有高效降解餐厨垃圾中有机物能力的菌株, 以提高餐厨垃圾的降解效率和减量效果。【方法】采用温度梯度耐受性实验和餐厨垃圾浸出液高油高盐耐受性实验进行菌种初筛, 并利用产酶培养基复筛及餐厨垃圾生物减量实验验证。【结果】通过初筛、复筛和功能验证, 最终获得 4 株生物减量效果优良的菌株 N3-1、C7、N3-3 和 G6-1, 其对餐厨垃圾挥发性固体(volatile solid, VS)的降解率分别为 36.95%、33.23%、32.83%和 31.91%, 是对照组的 3.02、2.71、2.68 和 2.61 倍。经鉴定, 这 4 株菌分别属于嗜油地芽孢杆菌(*Geobacillus thermoleovorans*)、史氏芽孢杆菌(*Bacillus smithii*)、热解木糖地芽孢杆菌(*Geobacillus caldxylosilyticus*)和立陶宛地芽孢杆菌(*Geobacillus lituanicus*)。【结论】筛选出的 4 株菌均具有较强的餐厨垃圾原料适应性和高效的生物降解能力, 为开发餐厨垃圾高温好氧复合菌剂奠定了基础, 并为实现餐厨垃圾减量化、无害化处理和资源化利用提供了技术支持。

**关键词:** 餐厨垃圾; 生物减量; 高温好氧菌; 地芽孢杆菌; 芽孢杆菌

基金项目: 上海市浦东新区科技发展基金(PKC2020-C003); 上海有机固废生物转化工程技术研究中心开放课题(SERC2021C03)

Supported by: Shanghai Pudong District Science and Technology Development Program (PKC2020-C003); the Shanghai Engineering Research Center of Biotransformation of Organic Solid Waste Program (SERC2021C03)

\*Corresponding author: E-mail: liul@sari.ac.cn

Received: 2022-03-11; Accepted: 2022-04-06; Published online: 2022-04-21

# Screening of bacteria for thermophilic aerobic biodegradation of food waste and the degradation characteristics

JI Yuji<sup>1,2</sup>, WANG Na<sup>1,2</sup>, YANG Ning<sup>1,2</sup>, SHI Jiping<sup>1,3</sup>, LIU Li<sup>\*1,3</sup>

1 Shanghai Advanced Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201210, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 Shanghai Engineering Research Center of Biotransformation of Organic Solid Waste, Shanghai 200241, China

**Abstract: [Background]** Food waste tends to increase and thus it is an urgent task to rapidly digest it. The thermophilic aerobic biodegradation technology turns to be an effective solution. **[Objective]** To screen the thermophilic aerobic bacteria which can adapt to food waste and decompose the organic matter in the waste and thereby to improve the degradation efficiency and reduce the waste. **[Methods]** Experiments on the temperature tolerance in casamino acids, yeast extract, salts (CYS) medium and high-oil and high-salt tolerance in food waste leachate medium were conducted for the primary screening of strains. The enzyme production test was used for re-screening of strains, and food waste biodegradation test for functional verification. **[Results]** Strains N3-1, C7, N3-3 and G6-1 were finally screened out. The degradation rate of volatile solid (VS) was 36.95%, 33.23%, 32.83% and 31.91%, respectively, 3.02, 2.71, 2.68 and 2.61 times that of the control group. They were identified as *Geobacillus thermoleovorans*, *Bacillus smithii*, *G. caldxylosilyticus* and *G. lituanicus*, separately. **[Conclusion]** The 4 strains have strong adaptability to food waste and high efficiency of degrading the waste. This study lays a foundation for the development of thermophilic aerobic microbial agent and provides technical support for the reduction, harmlessness treatment and resource utilization of food waste.

**Keywords:** food waste; biodegradation; thermophilic aerobic bacteria; *Geobacillus*; *Bacillus*

餐厨垃圾是食品加工生产过程中所产生的残渣混合物, 由蔬果果皮、剩饭、剩菜和碎骨等物质组成。据统计, 2018 年我国餐厨垃圾的产生量达 1.08 亿 t<sup>[1]</sup>。2019 年垃圾分类政策实施后, 餐厨垃圾的产生量达到 1.21 亿 t<sup>[2]</sup>。随着全国各城市垃圾分类的逐步推进, 餐厨垃圾的数量将持续增长。目前常见的餐厨垃圾处理技术可分为直接处理技术、饲料化技术、厌氧消化技术、好氧堆肥技术、生物干化技术和生物减量技术等<sup>[3-5]</sup>。

餐厨垃圾生物减量技术与好氧堆肥、生物干化技术类似, 也是利用微生物来分解餐厨垃圾中的有机物<sup>[6]</sup>。餐厨垃圾生物减量技术通常是在高温好氧条件下进行, 与好氧堆肥和生物

干化不同的是, 生物减量更加注重餐厨垃圾干化物质的减量化, 其目的在于使餐厨垃圾达到减量最大化。由于餐厨垃圾的有机物含量高、成分复杂, 如何实现其快速降解, 成为餐厨垃圾高温好氧生物减量技术亟待解决的问题。研究结果表明, 在餐厨垃圾的生物降解过程中, 接种微生物后有机物降解速度更快、降解程度更高<sup>[7]</sup>。Awasthi 等证明接种含有嗜热菌株的菌剂可以增强餐厨垃圾中油脂的降解, 最大降解量为 65.12%<sup>[8]</sup>。阳小宇等证明, 添加优势菌种可以提高餐厨垃圾中有机物的降解效率, 接种这些菌剂的实验组 TOC 含量从 8.53%降低到 2.49%, 降解率可达到 70.81%, 比未添加菌剂的对照组降解率(43.5%)高<sup>[9]</sup>。因此, 有必要寻

找能够适应高温好氧发酵系统环境的菌株, 以提高餐厨垃圾的降解效率。目前, 关于筛选餐厨垃圾高温好氧生物减量菌株的报道较少。

本研究筛选了餐厨垃圾高温好氧生物减量菌株, 以期提高餐厨垃圾干物质的降解效率, 为餐厨垃圾减量化提供技术支持和理论依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

菌株来源: 样品取自上海某工厂餐厨垃圾高温好氧生物处理过程中的物料和处理后的产品, 取回的样品置于 4 °C 冰箱保存备用。该样品用于高温好氧生物减量菌株的分离及筛选。

餐厨垃圾: 取自中国科学院上海高等研究院的食堂, 其中主要包含米饭、面条、蔬菜、肉类和其他餐后产生的废弃物。首先将餐厨垃圾原料中的骨头、餐巾纸和塑料制品拣出, 然后将其打碎备用。木屑购于上海创净生物环境科技有限公司, 餐厨垃圾和木屑的理化性质如表 1 所示。

### 1.2 培养基

#### 1.2.1 分离纯化培养基

Casamino acids, yeast extract, salts (CYS) 培养基<sup>[10]</sup>: 固体培养基加入 17 g/L 琼脂, 80 °C 培养时需将琼脂更换为结冷胶。

#### 1.2.2 初筛及复筛培养基

餐厨垃圾浸出液培养基(1 L): 餐厨垃圾浸出液 100.00 mL, 蛋白胨 3.00 g, 酵母提取物 2.00 g, 可溶性淀粉 1.00 g, NaCl 3.00 g, MgCl<sub>2</sub> 0.13 g, CaCl<sub>2</sub> 0.50 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01 g, 100 μL 微量元素液(Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 12.00 g, MnCl<sub>2</sub> 5.00 g, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.60 g, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.15 g, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 8.00 g, NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.20 g)。固体培养基加入 17 g/L 琼脂。

产酶筛选培养基参照文献[11-14]配制 (g/L),

表 1 材料理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of experimental materials

理化指标 Physical and chemical indicators	餐厨垃圾 Food waste	木屑 Sawdust
含水率 Moisture content (%)	72.29±0.05	8.76±0.01
酸碱度 pH	6.23±0.03	7.03±0.02
总有机碳 TOC (g/kg-TS)	492.11±2.73	447.80±1.29
总氮 TN (g/kg-TS)	32.2±0.02	3.69±0.01
蛋白质 Protein (% TS)	20.13±0.56	2.44±0.04
淀粉 Starch (% TS)	53.54±1.32	0
脂肪 Lipid (% TS)	29.70±0.61	5.80±0.05
粗纤维 Crude fiber (% TS)	7.42±0.28	76.64±0.54
可溶性盐 Soluble salt (% TS)	7.68±0.19	-

注: TS: 总固体, 即样品在 105 °C 下蒸发至恒重所余固体物的总量

Note: TS: Total solid, which means the total amount of solid remaining when the sample is evaporated to constant weight at 105 °C.

4 种产酶培养基分别为: 以 10 g 酪蛋白为底物的产蛋白酶筛选培养基; 以 10 g 可溶性淀粉为底物的产淀粉酶筛选培养基; 以 10 g 羧甲基纤维素钠为底物的产纤维素酶筛选培养基; 以 15 mL 橄榄油与聚乙烯醇(1:3)为底物的产脂肪酶筛选培养基。以上 4 种培养基除添加的底物不同, 其他成分都一样。其他成分为: 蛋白胨 3.00 g, 酵母提取物 2.00 g, 可溶性淀粉 1.00 g, NaCl 3.00 g, MgCl<sub>2</sub> 0.13 g, CaCl<sub>2</sub> 0.50 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01 g, 100 μL 微量元素液(Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 12.00 g, MnCl<sub>2</sub> 5.00 g, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.60 g, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.15 g, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 8.00 g, NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.20 g)。固体培养基加入 17 g/L 琼脂。

以上培养基均于 1×10<sup>5</sup> Pa 高温灭菌 15 min。

### 1.3 菌株分离与纯化

取 1 g 低温保存的餐厨垃圾样品于 25 mL 的无菌水中, 放置于恒温振荡培养箱(30 °C、150 r/min)中振荡 14 h, 取出后静置 10 min, 取悬浮液 100 μL, 用无菌水稀释成 10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup> 和 10<sup>-5</sup> 五个浓度梯度, 吸取 100 μL

$10^{-5}$  稀释度的稀释液, 均匀涂布于 CYS 固体培养基上。将固体培养基置于  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  的恒温培养箱中培养 16 h, 选取菌落直径较大且形态差异明显的菌株进行多次分离与纯化, 直至形成形态均一的单菌落, 并将其种子液以甘油管的形式保藏于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中备用。

#### 1.4 菌株初筛

将分离纯化后的菌株在 CYS 固体培养基上培养, 并将培养基分别置于  $50$ 、 $55$ 、 $60$ 、 $65$ 、 $70$ 、 $75$ 、 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  的培养箱内培养, 24 h 后取出, 记录其生长情况(包括是否生长及菌落大小), 每个处理设置 3 个平行, 筛选能够在  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  以上温度条件下生长的菌株。将筛选后的耐高温菌株在餐厨垃圾浸出液培养基上培养, 设置温度为  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 每个处理设置 3 个平行, 16 h 后记录其生长情况, 筛选可在餐厨垃圾高油高盐环境下生长的菌株。

#### 1.5 菌株复筛

将初筛后的单个菌株分别点接到 4 种产酶筛选培养基固体平板上, 于  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  的恒温培养箱中培养 24–48 h, 对不同的产酶筛选平板进行观察, 记录其菌落大小和产生相应透明圈的大小。

#### 1.6 餐厨垃圾生物减量验证实验

称取餐厨垃圾 90 g, 木屑 40 g, 置于 500 mL 的试剂瓶中。将复筛后的菌株在 100 mL CYS 液体培养基中于  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 16 h, 取培养后的各菌株菌液  $7\ 000\ \text{r}/\text{min}$  离心 5 min, 重悬至 50 mL, 保持相同的  $OD_{600}$  值( $OD_{600}=4.0$ )。随后往实验组混合物料中加入 50 mL 各菌株的重悬菌液, 对照组加入 50 mL 无菌蒸馏水, 搅拌均匀。每组实验设置 3 个平行。实验过程接通气泵进行通气, 保证其好氧环境。过程中每 12 h 补充物料水分并进行人工搅拌, 处理时间为 5 d, 分别测量各实验组菌株的餐厨垃圾挥发性固体(volatile

solid, VS)的降解率。餐厨垃圾 VS 降解率的计算公式为:

$$\text{VS 降解率}(\%) = (\text{初始餐厨垃圾 VS 含量} - \text{处理后餐厨垃圾 VS 含量}) / \text{初始餐厨垃圾 VS 含量} \times 100 \quad (1)$$

#### 1.7 菌株种属鉴定

参照《伯杰细菌鉴定手册(第 8 版)》<sup>[15]</sup>和《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[16]</sup>及革兰氏染色法, 对菌株进行形态学鉴定。采用 PCR 扩增并测序的方法, 将验证得到的优势菌株采用 16S rRNA 基因序列分析的方法进行鉴定, 具体步骤为: 使用 AxyPrep 细菌基因组 DNA 小量制备试剂盒提取相关的原核微生物基因组<sup>[17]</sup>, 扩增引物对使用 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGAC TT-3')。PCR 反应体系:  $2 \times \text{Rapid Taq Master Mix}$  10  $\mu\text{L}$ , 模板 1  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物(10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 各 0.6  $\mu\text{L}$ , 补 ddH<sub>2</sub>O 至 20  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件:  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  5 min;  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s,  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  1 min 30 s, 30 次循环;  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  10 min;  $16\text{ }^{\circ}\text{C}$  5 min。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测后, 由上海杰李生物技术有限公司进行纯化测序。测序得到的菌株 DNA 序列去掉两端杂序列, 将处理后的序列在 NCBI 中进行 BLAST 序列比较分析。用 MEGA X 构建菌株基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树<sup>[18]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 生物减量菌株的分离与纯化

在 CYS 固体培养基上, 根据菌落的大小、颜色及形态的区别, 挑取分离后的单个菌落, 利用相同的培养基, 通过反复纯化后得到 41 株纯菌株。通过基因测序, 并将其基因序列与 GenBank 数据库中的标准菌株进行同源比对, 得到 20 株不同种类的菌株, 各菌株的名称及序列相似性信息如表 2 所示。

表 2 分离得到的菌株相似性信息

Table 2 Similarity information of isolated strains

菌株编号 Strain No.	比对序列对应物种信息(拉丁名及菌株编号) Species information of the aligned sequences (Latin name and strain No.)	GenBank 登录号 GenBank accession No.	相似性 Similarity (%)
C3	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> KY433303.1	ON140196	99.7
C7	<i>Bacillus smithii</i> MW802807.1	ON000818	100.0
C11	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> JX673949.1	ON140197	100.0
F2-3	<i>Bacillus velezensis</i> MT626060.1	ON140198	100.0
F2-4	<i>Bacillus</i> sp. KU159247.1	ON140199	100.0
F3-1	<i>Methylobacterium</i> sp. AB698698.1	ON140200	99.5
F3-3	<i>Bacillus subtilis</i> HM631833.1	ON140201	99.9
F3-4	<i>Franconibacter helveticus</i> KX146474.1	ON140202	98.9
F3-5	<i>Pantoea</i> sp. KR780434.1	ON140203	100.0
F4-2	<i>Acinetobacter pittii</i> CP049806.1	ON140211	100.0
F5-2	<i>Acinetobacter baumannii</i> MT367824.1	ON140204	100.0
F5-3	<i>Acinetobacter</i> sp. JQ408701.1	ON140205	100.0
G4-1	<i>Geobacillus kaustophilus</i> NR_115285.2	ON140206	99.9
G4-2	<i>Geobacillus</i> sp. GQ140232.1	ON140207	99.9
G5-1	<i>Geobacillus subterraneus</i> subsp. GQ140232.1	ON140208	99.9
G5-3	<i>Geobacillus vulcani</i> CP061470.1	ON140209	99.9
G6-1	<i>Geobacillus lituanicus</i> FN666246.1	ON000819	99.9
N3-1	<i>Geobacillus thermoleovorans</i> CP014335.1	ON000817	100.0
N3-3	<i>Geobacillus caldxylosilyticus</i> AJ564618.1	ON000822	99.9
S3-1	<i>Geobacillus</i> sp. CP008903.1	ON140210	99.5

## 2.2 生物减量菌株的初筛

将分离纯化得到的 20 株菌在 CYS 固体培养基上划线, 并将其分别置于 50、55、60、65、70、75、80 °C 的培养箱内, 通过菌株的生长情况首先筛选出能够在高温( $\geq 50$  °C)条件下生长的好氧菌株。这 20 株菌的温度梯度初筛实验结果如表 3 所示。其中, “+”表示菌株生长, “-”表示菌株不生长, 每组设置 3 个平行实验。由结果可知, 分离纯化得到的 20 株菌均能在 50 °C 以上的温度生长, 说明这些菌首先具有耐高温的能力。高温有利于提高餐厨垃圾中有机物的降解效率, 一般餐厨垃圾生物减量工艺中温度控制在 50–80 °C, 因此, 筛选温度耐受性更强的菌株可适应不同温度下的餐厨垃圾生物减量

工艺。20 株菌中能够在 60 °C 以上温度稳定生长的菌株有 16 株, 能够在 70 °C 以上温度稳定生长的菌株有 10 株, 20 株菌的最高生长温度为 75 °C, 在 75 °C 稳定生长的菌有 4 株, 分别为 C3、G4-1、N3-1 和 S3-1。

将最高生长温度在 60 °C 以上的 16 株菌接种至餐厨垃圾浸出液固体培养基上, 通过考察菌株在餐厨垃圾浸出液固体培养基上的生长情况, 筛选能够耐受餐厨垃圾高油、高盐环境的高温好氧菌。结果如图 1 所示, 这 16 株菌中有 10 株菌可在餐厨垃圾浸出液固体培养基上生长且长势较好, 菌株编号分别为 C7、C11、F3-4、F4-2、G4-1、G5-1、G6-1、N3-1、N3-3 和 S3-1。餐厨垃圾浸出液中含有大量的油和盐, 因此培养基中

表 3 菌株在温度梯度初筛实验中的生长情况

Table 3 Growth status of strains in temperature gradient primary screening test

Strain No.	50 °C	55 °C	60 °C	65 °C	70 °C	75 °C	80 °C
C3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---
C7	+++	+++	+++	++-	---	---	---
C11	+++	+++	+++	+++	+++	---	---
F2-3	+++	---	+--	---	---	---	---
F2-4	+++	---	---	---	---	---	---
F3-1	+++	+++	+++	---	---	---	---
F3-3	+++	+++	+++	---	---	---	---
F3-4	+++	---	---	---	---	---	---
F3-5	+++	+++	+++	---	---	---	---
F4-2	+++	+++	+++	---	---	---	---
F5-2	+++	---	---	---	---	---	---
F5-3	+++	+++	+++	---	---	---	---
G4-1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---
G4-2	+++	+++	+++	+++	+++	---	---
G5-1	+++	+++	+++	+++	+++	---	---
G5-3	+++	+++	+++	+++	+++	---	---
G6-1	+++	+++	+++	+++	+++	---	---
N3-1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---
N3-3	+++	+++	+++	+++	+++	---	---
S3-1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---

注：+：平板上菌株生长；-：平板上菌株不生长

Note: +: The strain grows on the plate; -: The strain does not grow on the plate.

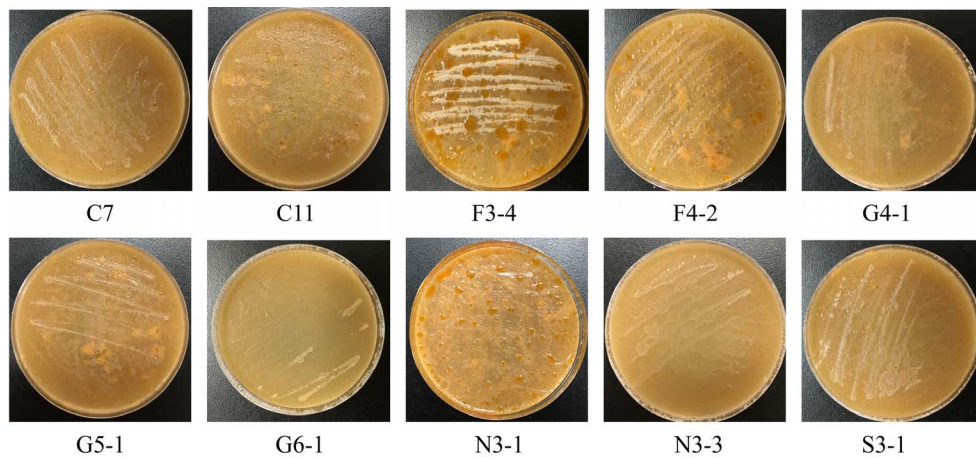


图 1 菌株在餐厨垃圾浸出液固体培养基上的生长情况

Figure 1 Growth status of strains on food waste leachate medium.

有该成分可模拟餐厨垃圾体系高油高盐的环境。添加餐厨垃圾浸出液后培养基中的含油量达到 2.8%，含盐量达到 1.2%，若菌株可在该培养基上生长，说明菌株具有耐高油、高盐的特点。

### 2.3 生物减量菌株的复筛

由表 1 可知，餐厨垃圾的主要有机组分为蛋白质、淀粉、脂肪和纤维素，因此进一步筛选对上述 4 种组分有降解能力的菌株，可获得有潜力的餐厨垃圾高温好氧生物减量菌。将初筛获得的 10 株菌分别接种至 4 种产酶培养基平板上，筛选可产蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶及纤维素酶的菌株，并以其透明圈直径与菌落直径的比值( $H/D$ )来反映其相对的产酶能力。部分菌株在产酶平板上未出现对应的透明圈。菌株的产酶情况及透明圈直径与菌落直径的比值见表 4。结果表明，在这 10 株菌中有 9 株菌具有产酶能力，其中产生酶的种类最多的菌株是 C7、F4-2 和 N3-1，这 3 株菌可产生 3 种酶。G4-1、N3-3 和 S3-1 这 3 株菌可产生 2 种酶。从产酶种类来看，有 7 株菌可产蛋白酶，其中 N3-1 的  $H/D$  最大，二者之比达到了 3.00；有 3 株菌可产生淀粉酶，其中 F4-2 的  $H/D$  最大，二者之比达到

了 1.00；有 4 株菌可产生脂肪酶，其中 N3-3 的  $H/D$  最大，二者之比达到了 1.50；有 4 株菌可产生纤维素酶，其中 F4-2 的  $H/D$  最大，二者之比达到了 3.50。部分菌株的产酶情况如图 2 所示。由于产酶平板可反映出菌株产酶的情况，该产酶平板的结果将作为参考依据用于下一步餐厨垃圾生物减量的验证实验。

### 2.4 餐厨垃圾生物减量实验验证

餐厨垃圾组分复杂，除了含有蛋白质、淀粉、脂肪和纤维素等大分子有机物以外，还包含大量大分子有机物的中间代谢产物及盐分，这些物质的存在都可能影响餐厨垃圾的降解。因此，我们将上述筛选获得的 9 株菌应用到餐厨垃圾生物减量实验中，验证其对餐厨垃圾 VS 降解率的影响。从图 3 可以看出，不添加菌的对照组 VS 降解率为 12.24%，在这 9 株菌中，有 8 株菌的 VS 降解率大于对照组，其菌株编号和 VS 降解率分别为：C7 (33.23%)、F4-2 (25.84%)、G4-1 (20.96%)、G5-1 (25.36%)、G6-1 (31.91%)、N3-1 (36.95%)、N3-3 (32.83%)、S3-1 (21.58%)。与对照组相比，实验组的 VS 降解率分别是对照组的 2.71 倍(C7)、2.11 倍(F4-2)、1.71 倍

表 4 菌株在 4 种产酶培养基上的透明圈与菌落直径比值

Table 4 The ratio of transparent circle to colony diameter of strains on four enzyme-producing media ( $H/D$ )

菌株编号 Strain No.	产蛋白酶培养基 Protease production medium	产淀粉酶培养基 Amylase production medium	产脂肪酶培养基 Lipase production medium	产纤维素酶培养基 Cellulase production medium
C7	1.05	0.60	—	2.00
F3-4	0.60	—	—	—
F4-2	1.67	1.00	—	3.50
G4-1	1.75	—	0.40	—
G5-1	—	0.43	—	—
G6-1	0.80	—	—	—
N3-1	3.00	—	0.25	0.33
N3-3	—	—	1.50	0.67
S3-1	1.00	—	0.50	—

注：—：未产生透明圈

Note: —: No transparent ring is generated.

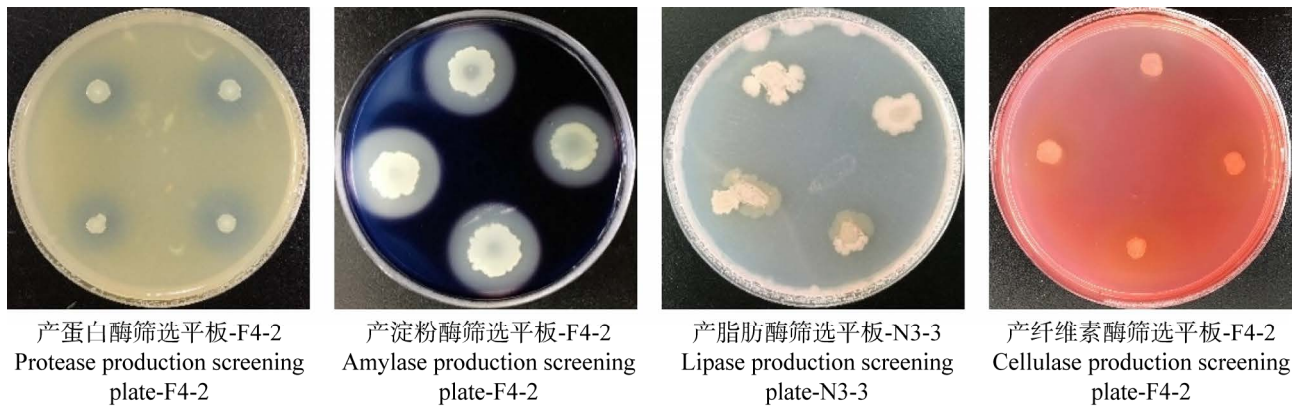


图 2 产酶筛选固体培养基上部分菌株产生透明圈的情况

Figure 2 Status of transparent circles on solid enzyme-producing screening medium.

(G4-1)、2.07 倍(G5-1)、2.61 倍(G6-1)、3.02 倍(N3-1)、2.68 倍(N3-3)、1.76 倍(S3-1)。其中菌株 N3-1 的 VS 降解率最高, 达到了 36.95%, 是对照组的 3.02 倍。

结合菌株初筛的温度耐受性和菌株复筛的产酶情况, 菌株 N3-1、C7、N3-3 和 G6-1 这 4 株菌被认为是非常有潜力的餐厨垃圾高温好氧生物减量菌株。

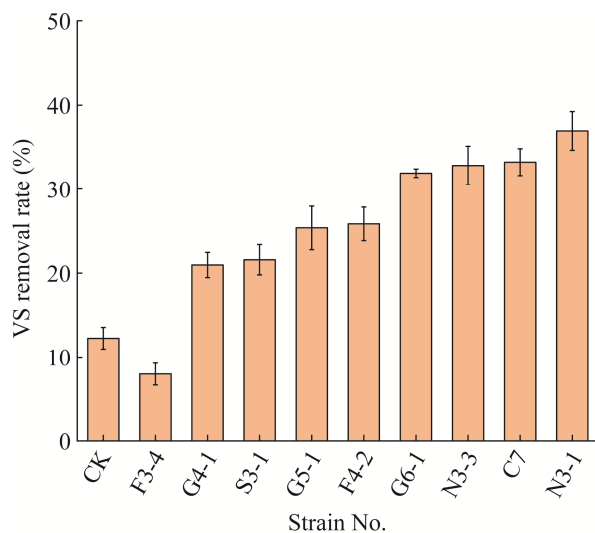


图 3 复筛菌株的餐厨垃圾 VS 降解率

Figure 3 VS degradation rate of food waste with rescreened strains.

## 2.5 菌株形态学特征和鉴定

通过菌株温度耐受性实验和餐厨垃圾渗滤液高油高盐耐受性实验初筛, 以及菌株产酶平板复筛和餐厨垃圾生物减量实验验证, 最终选出 4 株菌 N3-1、C7、N3-3 和 G6-1 进行下一步菌株形态学的鉴定, 结果见表 5。

## 2.6 菌株鉴定

为了确定菌株 N3-1、C7、N3-3 和 G6-1 的分类学地位, 将 4 株菌测序得到的 16S rRNA 基因序列提交到 NCBI 进行 BLAST 比对, 利用 MEGA X 软件中的邻接法构建 4 株菌的系统发育树。系统发育树构建时使用嗜碱甲烷杆菌 (*Methanobacterium alcaliphilum*, AB496639.1) 作为外类群, 其他近源物种的选择通过 BLAST 以及 NCBI Taxonomy 数据库确定。经过系统发育树比对, 菌株 N3-1、C7、N3-3 和 G6-1 分别属于热嗜油地芽孢杆菌(*Geobacillus thermoleovorans*)、史氏芽孢杆菌(*Bacillus smithii*)、热解木糖地芽孢杆菌(*Geobacillus caldoxylosilyticus*)和立陶宛地芽孢杆菌(*Geobacillus lituanicus*)。在 NCBI 上提交菌株序列后获得 4 株菌的 GenBank 登录号, 分别为 ON000817 (N3-1)、ON000818 (C7)、ON000822 (N3-3)和 ON000819 (G6-1)。4 株菌的系统发育树如图 4 所示。从系统发育树来看, N3-1、



表 5 菌株菌落形态特征及革兰氏染色结果

Table 5 Morphological characteristics and Gram staining results of strains

菌株编号 Strain No.	菌落形态 Colony morphology	革兰氏菌分类 Gram classification
N3-1	圆形, 淡黄色, 表面光滑有光泽, 边缘整齐, 不透明 Round, light yellow, smooth and shiny surface, neat edge, opaque	革兰氏阴性 Gram negative
C7	近似圆形, 淡黄色, 表面不光滑, 边缘不整齐, 不透明 Approximate round, light yellow, rough surface, irregular edges, opaque	革兰氏阳性 Gram positive
N3-3	近似圆形, 淡黄色, 表面不光滑, 边缘不整齐, 不透明 Approximate round, light yellow, rough surface, irregular edges, opaque	革兰氏阴性 Gram negative
G6-1	圆形, 淡黄色, 表面光滑有光泽, 边缘整齐, 不透明 Round, light yellow, smooth and shiny surface, neat edge, opaque	革兰氏阴性 Gram negative

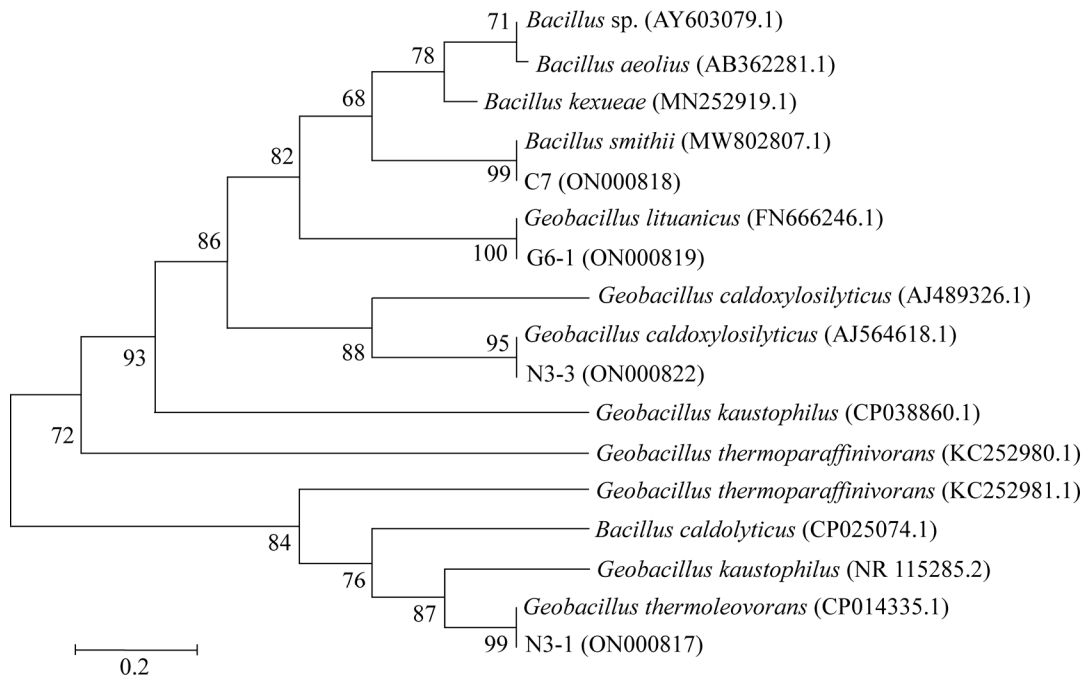


图 4 菌株 N3-1、C7、N3-3 和 G6-1 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号中序号表示对应菌株的 GenBank 登录号; 分支点上的数字表示不同支在进化学上的亲缘关系; 距离标尺表示序列间差异数值的单位长度

Figure 4 Phylogenetic tree of strain N3-1, C7, N3-3 and G6-1 based on 16S rRNA gene sequence. The serial number in parentheses represents the GenBank accession number of the corresponding strains; the number on the branch point represents the phylogenetic relationship of different branches; the distance scale represents the unit length of the difference between sequences.

C7、N3-3 和 G6-1 属于地芽孢杆菌(*Geobacillus*) 和芽孢杆菌(*Bacillus*), 其中菌株 N3-1 与嗜油地芽孢杆菌(*Geobacillus thermoleovorans* KCTC 3570, CP014335.1)聚在同一支; 菌株 C7 与史氏

芽孢杆菌(*Bacillus smithii* MAL61, MW802807.1)聚在同一支; 菌株 N3-3 与热解木糖地芽孢杆菌(*Geobacillus caldoxylosilyticus* partial 16S rRNA gene isolate Tj, AJ564618.1)聚在同一支; 菌株

G6-1 与立陶宛地芽孢杆菌(*Geobacillus lituanicus* partial 16S rRNA gene strain AE8, FN666246.1) 聚在同一支。

### 3 讨论与结论

目前已有的研究表明, 从餐厨垃圾中可以筛选出耐高温的微生物用于提高餐厨垃圾的降解率, 但添加菌剂后常出现菌株对环境适应能力差、餐厨垃圾降解率低的现象。本研究首先采用温度梯度耐受性实验和餐厨垃圾浸出液高油高盐耐受性实验, 对从餐厨垃圾高温好氧处理样品中分离纯化的菌株进行初筛, 得到耐高温高盐环境的高温好氧菌; 其次采用产酶培养基复筛, 进一步得到具有降解蛋白质、淀粉、脂肪、纤维素能力的耐高温高盐环境的高温好氧菌; 最后以餐厨垃圾生物减量实验验证, 最终获得 4 株能够高效降解餐厨垃圾的高温好氧生物减量菌。这 4 株菌具有较强的餐厨垃圾原料适应性和高效的有机物降解能力。

通过初筛选出的 10 株菌均可在高温( $\geq 50$  °C) 及含有餐厨垃圾浸出液的高油高盐环境下生长, 说明各菌株可适应餐厨垃圾高温好氧生物减量的高温环境及高油高盐的原料。在产酶平板复筛中, 有 9 株菌具有产蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、纤维素酶中的 1-3 种酶的能力, 表明这些菌株具有高效降解餐厨垃圾中大分子有机物的潜力。在连续 5 d 的餐厨垃圾高温好氧生物减量验证实验中, 有 8 株菌的餐厨垃圾 VS 降解率高于不添加菌的对照组, 进一步证实了添加这 8 株菌可促进餐厨垃圾高温好氧生物减量中有机物的降解; 其中有 4 株菌 N3-1、C7、N3-3 和 G6-1 对餐厨垃圾的生物减量效果表现突出, 其 VS 降解率分别为 36.95%、33.23%、32.83%和 31.91%, 分别是对照组的 3.02、2.71、2.68 和 2.61 倍。

经鉴定, 菌株 N3-1、C7、N3-3 和 G6-1 分别属于嗜热油地芽孢杆菌 (*Geobacillus thermoleovorans*)、史氏芽孢杆菌 (*Bacillus smithii*)、热解木糖地芽孢杆菌 (*Geobacillus caldxylosilyticus*) 和立陶宛地芽孢杆菌 (*Geobacillus lituanicus*)。在筛选获得的 4 株菌中, 地芽孢杆菌(*Geobacillus*)和芽孢杆菌(*Bacillus*) 为重要的高温菌株。菌株 N3-1 属于嗜热油地芽孢杆菌(*Geobacillus thermoleovorans*), 该菌株是地芽孢杆菌中的一个新种, 属于革兰氏阴性菌, 形成内生孢子, 耐高温, 对热和其他致死因子抗性较强<sup>[19]</sup>, 并且地芽孢杆菌具有较好的油脂降解效果, 这与 Druteika 等的研究结果一致<sup>[20]</sup>。菌株 C7 属于史氏芽孢杆菌(*Bacillus smithii*), 该菌株是芽孢杆菌中的一个新种, 属于革兰氏阳性菌。目前关于史氏芽孢杆菌的研究主要集中在食品加工、生产蛋白酶及脂肪酶等方面<sup>[21-23]</sup>, 餐厨垃圾高温好氧生物减量方面的研究报道较少。Sakai 等从堆肥样品中分离得到一株史氏芽孢杆菌(*Bacillus smithii*), 而且证实其可产生脂肪酶, 对脂质具有降解能力; 在 55 °C 下, 分离到的菌株 3 d 后脂质降解率可达到 35.6%<sup>[24]</sup>。菌株 N3-3 属于热解木糖地芽孢杆菌(*Geobacillus caldxylosilyticus*), 该菌株同样为地芽孢杆菌中的一个新种。晋果果等从朽木及落叶中分离纯化获得了一株高温木质素降解菌(*Geobacillus caldxylosilyticus*)可用于降解木质素<sup>[25]</sup>。菌株 G6-1 属于立陶宛地芽孢杆菌(*Geobacillus lituanicus*), 该菌株也属于地芽孢杆菌菌属。Kuisiene 等从立陶宛的一个高温油田中分离得到一株地芽孢杆菌, 该菌株具有嗜热好氧的特点, 同时该菌株具有水解蛋白的能力<sup>[26]</sup>。以上关于这 4 株菌的研究均表明, 该 4 株菌具有高效降解有机物的能力, 因此, 将其应用于餐厨垃圾高温好氧生物减量中具有一定的有机物降解潜力。

餐厨垃圾高温好氧生物减量菌的研究将为餐厨垃圾减量化、无害化处理和资源化利用提供技术支持。

## REFERENCES

- [1] 国家统计局. 中国统计年鉴[M]. 北京: 中国统计出版社, 2018  
National Bureau of Statistics. China Statistical Yearbook[M]. Beijing: China Statistics Press, 2018 (in Chinese)
- [2] 国家统计局. 中国统计年鉴[M]. 北京: 中国统计出版社, 2019  
National Bureau of Statistics. China Statistical Yearbook[M]. Beijing: China Statistics Press, 2019 (in Chinese)
- [3] 王义文, 周丽杰, 宋锦东, 付鹏强. 餐厨垃圾处理技术综述[J]. 现代制造技术与装备, 2020(6): 173-175  
Wang YW, Zhou LJ, Song JD, Fu PQ. Review on the treatment technology of kitchen waste[J]. Modern Manufacturing Technology and Equipment, 2020(6): 173-175 (in Chinese)
- [4] Uçkun Kiran E, Trzcinski AP, Ng WJ, Liu Y. Bioconversion of food waste to energy: a review[J]. Fuel, 2014, 134: 389-399
- [5] Xu FQ, Li YY, Ge XM, Yang LC, Li YB. Anaerobic digestion of food waste-challenges and opportunities[J]. Bioresource Technology, 2018, 247: 1047-1058
- [6] 吕凡, 何晶晶, 邵立明, 李国建. 餐厨垃圾高温好氧生物消化工艺控制条件优化[J]. 同济大学学报(自然科学版), 2003, 31(2): 233-238  
Lü F, He PJ, Shao LM, Li GJ. Optimum operation parameters of aerobic thermophilic process for food wastes[J]. Journal of Tongji University: Natural Science Edition, 2003, 31(2): 233-238 (in Chinese)
- [7] Li TY, Liu L, Wei XH, Zhang HY, Fang P. Comparison of the food waste degradation rate and microbial community in the matrix between two biodegradation agents in a food waste disposer[J]. Waste Management, 2014, 34(12): 2641-2646
- [8] Awasthi MK, Selvam A, Chan MT, Wong JWC. Bio-degradation of oily food waste employing thermophilic bacterial strains[J]. Bioresource Technology, 2018, 248: 141-147
- [9] 阳小宇, 梁彦杰, 吴新华, 谢炜平. 优势菌种对餐厨垃圾高温好氧消化的促进[J]. 环境工程学报, 2014, 8(7): 3035-3040  
Yang XY, Liang YJ, Wu XH, Xie WP. Acceleration of thermophilic aerobic digestion of food residue by effective strains[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2014, 8(7): 3035-3040 (in Chinese)
- [10] Robinson TP, Wimpenny JW, Earnshaw RG. pH gradients through colonies of *Bacillus cereus* and the surrounding agar[J]. Journal of General Microbiology, 1991, 137(12): 2885-2889
- [11] 胡朝阳, 韦晗宁, 李春苑, 武波. 产脂肪酶菌株的筛选及酶学特性研究[J]. 广西农业生物科学, 2006, 25(3): 261-264, 268  
Hu ZY, Wei HN, Li CY, Wu B. Screening of lipase producing strains and studying on properties of lipase[J]. Journal of Guangxi Agricultural and Biological Science, 2006, 25(3): 261-264, 268 (in Chinese)
- [12] 林祥木, 童金秀, 陈汉清, 庞杰. 产纤维素酶菌株的筛选及产酶条件的选择[J]. 福建农业大学学报(自然科学版), 2003, 32(4): 510-513  
Lin XM, Tong JX, Chen HQ, Pang J. The isolation of strains producing cellulases and the conditions of enzyme production[J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University: Natural Science Edition, 2003, 32(4): 510-513 (in Chinese)
- [13] 徐建国, 田呈瑞, 胡青平, 罗季阳. 高产蛋白酶菌株的筛选及产酶条件优化[J]. 中国粮油学报, 2010, 25(10): 112-115  
Xu JG, Tian CR, Hu QP, Luo JY. Proteinase producing strains: screening and condition optimization[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2010, 25(10): 112-115 (in Chinese)
- [14] 张应玖, 朱学军, 关键, 李吉平, 薛雁, 郝黎明, 赵文斌. 一种新型淀粉酶的鉴定及其产酶菌株的筛选[J]. 微生物学通报, 2002, 29(5): 38-41  
Zhang YJ, Zhu XJ, Guan J, Li JP, Xue Y, Hao LM, Zhao WB. Identification of a new type of amylase and mutagenesis of strain zx99 secreting the enzyme for production of isomaltooligosaccharide[J]. Microbiology, 2002, 29(5): 38-41 (in Chinese)
- [15] Buchanan RE, Gibbons NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所, 译. 8版. 北京: 科学出版社, 1984  
Buchanan RE, Gibbons NE. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, trans. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984 (in Chinese)
- [16] 蔡妙英, 东秀珠. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001  
Cai MY, Dong XZ. Handbook for Identification of

- Common Bacterial Systems[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)
- [17] 余培斌, 杜晶, 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  
Yu PB, Du J, Chen JX. Study on screening and identification of *Bacillus* in the process of high-temperature aerobic composting and its application[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(12): 199-205, 212 (in Chinese)
- [18] 王小兵, 王海潮, 汪晓丽, 陈悦, 程通, 付宽宽. 厨余垃圾堆肥腐熟降解菌株的筛选与鉴定[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(23): 213-218  
Wang XB, Wang HC, Wang XL, Chen Y, Cheng T, Fu KK. Screening and identification of degradation strains of kitchen waste compost[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2021, 49(23): 213-218 (in Chinese)
- [19] Soliman NA, Knoll M, Abdel-Fattah YR, Schmid RD, Lange S. Molecular cloning and characterization of thermostable esterase and lipase from *Geobacillus thermoleovorans* YN isolated from desert soil in Egypt[J]. Process Biochemistry, 2007, 42(7): 1090-1100
- [20] Druteika G, Sadauskas M, Malunavicius V, Lastauskiene E, Statkeviciute R, Savickaite A, Gudiukaite R. New engineered *Geobacillus lipase* GD-95RM for industry focusing on the cleaner production of fatty esters and household washing product formulations[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2020, 36(3): 41
- [21] Gao W, Bao YM, Liu Y, Zhang XL, Wang JY, An LJ. Characterization of thermo-stable endoinulinase from a new strain *Bacillus smithii* T7[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2009, 157(3): 498-506
- [22] Lailaja VP, Chandrasekaran M. Detergent compatible alkaline lipase produced by marine *Bacillus smithii* BTMS 11[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2013, 29(8): 1349-1360
- [23] EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Ricci A, Allende A, Bolton D, Chemaly M, Davies R, Girones R, Herman L, Koutsoumanis K, Lindqvist R, et al. Scientific opinion on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA[J]. EFSA Journal, 2017, 15(3): e04664
- [24] Sakai KJ, Kawano H, Iwami A, Nakamura M, Moriguchi M. Isolation of a thermophilic poly-l-lactide degrading bacterium from compost and its enzymatic characterization[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2001, 92(3): 298-300
- [25] 晋果果, 翁海波, 李萍萍, 孙武举, 覃勉. 高温木质素降解菌 *Geobacillus caldxylosilyticus* J16 的筛选及其产酶发酵性质研究[J]. 中国农学通报, 2011, 27(8): 334-339  
Jin GG, Weng HB, Li PP, Sun WJ, Qin M. Isolation of lignin degraded thermophilic *Geobacillus caldxylosilyticus* strain J16 and characteristics of its enzymes and fermentation[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27(8): 334-339 (in Chinese)
- [26] Kuisiene N, Raugalas J, Chitavichius D. *Geobacillus lituanicus* sp. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54(Pt 6): 1991-1995