

一株高温放线菌及其在造纸污泥堆肥过程中的应用

施庆珊¹, 梁文涛², 疏秀林¹, 赵京斌², 李诚斌¹, 麦 行², 林小平¹, 冯 静¹,
欧阳友生¹, 陈仪本¹

(1. 广东省微生物研究所, 广东省微生物应用新技术公开实验室, 广东 广州 510070; 2. 广州天河奥特农化新技术有限公司, 广东 广州 510620)

摘 要: 高温放线菌是堆肥过程中微生态环境的重要组成成分, 在好氧堆肥的升温期对有机物的分解发挥重要的作用。在造纸污泥堆肥过程的高温期分离到一株高温放线菌 AO-III, 其形态和主要生理生化特征与高温放线菌属的典型种相似, 但该菌株能耐受 80℃ 以上的高温。菌株 AO-III 16S rDNA 序列经校对、拼接后与 GenBank 数据库中相关种的序列进行比对, 并通过 MEGA 3 构建进化树进行分析, 该菌株与甘蔗兰希氏菌(曾用名: 普通高温放线菌, 登录号: AY114169.1) 高度同源, 同源率为 99.9%, 因此, 菌株 AO-III 鉴定为甘蔗兰希氏菌(*Laceyella sacchari*)。以该菌株为外源微生物添加到造纸污泥与味精废液的混合物中进行堆肥试验。结果表明, 在高温好气性堆肥发酵过程中达到高温阶段(80℃ 以上)的时间由原来的 3 d 缩短为 1 d, 高温好气性发酵周期由 20 d 缩短至 10 d, 水份由 55% 降至 40% 以下。该菌株能够维持较长的高温期时间及缩短堆肥发酵周期。

关键词: 造纸污泥; 堆肥; 高温放线菌; 甘蔗兰希氏菌; 鉴定

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2008)01-0368-04

A Thermophilic Actinomycete Strain and Its Application on Composting of Pulp and Paper Mill Sludges

SHI Qing-shan¹, LIANG Wen-tao², SHU Xiu-lin¹, ZHAO Jing-bin², LI Cheng-bin¹, MAI Hang², LIN Xiao-ping¹, FENG Jing¹, OUYANG You-sheng¹, CHEN Yi-ben¹

(1. Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou 510070, China; 2. Guangzhou Outer Environmental Resource Co. Ltd., Guangzhou 510620, China)

Abstract: Thermophilic actinomycetes are well known components of the microflora of composts and play an important role in habitats where decomposition of organic matter takes place at elevated temperatures and under aerobic conditions. A thermophilic actinomycete strain AO-III was isolated from the composting process of pulp and paper mill sludge at the thermophilic stage. The main biochemical and physiological features, and morphological characters of this strain resembled those of some strains of species belonging to the genus 'thermoactinomycetes', except AO-III could grow aerobically at over 80℃ on a solid medium. The 16S rDNA gene sequences of AO-III were aligned and corrected and then were compared with the corresponding sequences of standard strains obtained from the GenBank database to evaluate taxonomic position by using MEGA 3. The strain AO-III showed highest similarity of 99.9% to *Laceyella sacchari* (former name: *Thermoactinomyces sacchari*, accession numbers: AY114169.1). So it was nominated *Laceyella sacchari*. Composting experiments of pulp and paper mill sludge mixed with monosodium glutamate wastewater by inoculating strain AO-III showed that AO-III could shorten the time of reaching the high temperature stage (over 80℃) from three days to one day, and the cycle of the aerobic thermophilic fermentation was from 20 days to 10 days. The moisture content in the raw mixture was degraded from 55% to 40%. The strain could maintain long-term high temperature and shorten the composting fermentation cycle.

Keywords: pulp and paper mill sludge; composting; thermophilic actinomycetes; *thermoactinomyces sacchari*; identification

造纸污泥是一种重要的城市污泥, 过去处置造纸污泥采用的是两种方法, 一种是焚烧法, 但设备投

资大、耗能高, 还产生大量废气; 另一种是目前普遍采用的填埋法, 但浪费土地资源, 地下水也将受污染。近 10 多年来, 欧盟各国、美国、澳大利亚等发达国家普遍有将城市污泥进行堆肥处理后实现农用的趋势^[1]。

广州造纸集团有限公司纸及纸板年生产能力 50 万 t, 是南方重要的制浆造纸基地, 但每年产生的造纸

收稿日期: 2007-01-05

基金项目: 广州市科技攻关重大项目(2004Z1-E0071)

作者简介: 施庆珊(1966—), 男, 副研究员, 主要从事微生物菌种选育及发酵工艺研究。E-mail: jigan@gdas.ac.cn

污泥量也达到 20 多万 t。为解决大量造纸污泥的出路问题,广州奥特农化新技术有限公司在广东肇庆建立占地 20 hm² 的工业废弃物处理场,利用广纸集团的造纸污泥和食品厂生产过程中排放的高浓度有机废水进行堆肥发酵,从而实现变废为宝。广州造纸集团污水处理厂提供的造纸污泥含水量超过 70%,不利于好气性高温发酵。造纸污泥经天然堆晒后水分降至 55% 以下,与氮含量超过 7% 的味精废液按一定比例混合,并适当添加少量营养物质、调节合理的碳氮比和 pH 值,通过自行设计的通风系统在发酵槽进行好氧堆肥发酵(一次堆肥发酵),同时,每天利用翻堆机翻堆两次,堆肥的最高温度可达 80 ℃ 以上,在这高温期中分离筛选到一株耐高温放线菌,将此微生物做成菌剂后再添加到发酵物料中,24 h 内堆肥温度可达到 80 ℃ 以上,明显加快达到高温期的时间,一次堆肥发酵时间由原来的 20 d 缩短为 10 d 以内,80 ℃ 以上堆肥高温期可维持 5 d 以上,发酵后水分由 55% 降至 40% 左右,成为有机肥半成品。

1 材料与方法

1.1 样品来源

于广州奥特农化新技术有限公司在广东肇庆的工业废弃物处理场,在用造纸污泥和味精废水及其他辅料进行堆肥的样品中,当温度上升到 80 ℃ 以上时取样。

1.2 培养基^[2]

所用培养基有高氏合成 1 号琼脂、燕麦琼脂、马铃薯葡萄糖琼脂、GYM 琼脂、酵母淀粉琼脂、伊莫松琼脂培养基、天门冬素培养基等。

1.3 筛选过程

取上述样品,用无菌水混合后,按不同稀释度分别涂布 LB、马铃薯、高氏培养基,45 ℃ 培养 18 h 后,在 LB、马铃薯平皿上有菌落长出,从 LB 平皿菌落颜色上可以看出为乳白色(与培养基颜色相近)和白色两种菌,另外,从颜色质地看,还有一种乳白色边缘不规则、生长较稀薄的菌株,其中挑选出数量最多、生长最快的菌株,可以初步判断为高温时期的主导菌,编号 AO-III。

1.4 形态学观察

采用压印法,即倒平板——划线接种——挑取菌落——加盖玻片——镜检——记录绘图,60 ℃ 培养。用光学显微镜观察记录菌丝形态、气生菌丝和基内菌丝生长情况,菌丝体是否产生孢子丝及孢子丝的排列

方式、形状;孢子形状和大小;孢囊的有无、形状、大小及形成方式等。

1.5 培养特征

将菌株 AO-III 分别接种到高氏合成一号、淀粉琼脂、马铃薯和蔗糖查氏琼脂培养基恒温培养,于 2~3 d 观察并记录培养特征:一般指基内菌丝的颜色和是否产生可溶色素等。颜色记录参考《链霉菌鉴定手册》^[3]。

1.6 生理生化特征

参照《放线菌的分类与鉴定》^[4]和《伯杰细菌鉴定手册(第八版)》^[5]的相关内容进行生理生化鉴定。

1.7 遗传特性鉴定

16S rDNA 序列分析:用溶菌酶法从新鲜菌体提取基因组 DNA,采用通用引物进行 16S rDNA 扩增,PCR 产物经检测、纯化后直接用 Tag Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit 测序,电泳及数据收集用 Applied Biosystems DNA Sequencing (model 377) 自动进行。所测得 16S rDNA 序列经校对、拼接后与 GenBank 数据库中相关种属的序列进行 BLAST 比较,以确定该菌株分类地位。

1.8 堆肥试验过程

整个堆肥过程分为一次发酵(高温好氧发酵)和二次发酵(嫌气性发酵),一次堆肥发酵在发酵槽内进行,每条堆肥发酵槽的长、宽和高 56 m、3.3 m、和 1.2 m),上面装有自行设计自走式生物有机肥翻堆机,每天翻堆 2 次,发酵槽底铺设通风管,每天通气 2 次,每次 1 h,通气量为 100 L·min⁻¹·m⁻³。堆肥原料的组成配比如下:造纸污泥 1 000 kg,味精废液 50 kg,过磷酸钙 38 kg,氯化钾 11 kg。

2 结果

2.1 形态特征

基内菌丝不发达、无隔膜;气生菌丝发达,多分化为孢子;孢子球形,成串或分散成单个,侧生于菌丝体两侧。

2.2 培养特征

在马铃薯糖琼脂、GYM 琼脂、酵母淀粉琼脂等培养基上生长良好,菌落大而扁平、易挑起。但在合成培养基生长较弱。见表 1。

2.3 主要生理生化特征

主要生理生化特征见表 2。

2.4 分子鉴定

将得到的 16S rDNA 序列送 GenBank 做 Blast 比

表 1 菌株 AO-III 的培养特征
Table 1 The culture characters of AO-III

培养基	生长情况	气生菌丝	基内菌丝	可溶色素
高氏合成 1 号琼脂	差	白色	黄色	无
燕麦琼脂	好	米色	黄褐	无
马铃薯葡萄糖琼脂	好	米色	橙色	无
GYM 琼脂	好	白色	黄褐	无
酵母淀粉琼脂	好	白色	浅橙	无
伊莫松琼脂培养基	好	白色	黄褐	无
天门冬素培养基	差	白色	乳白色	无

表 2 AO-III 的主要生理生化试验结果
Table 2 The main biochemical and physiological features of strain AO-III

特征	结果	特征	结果
生长及其它	3% NaCl +	碳源利用	葡萄糖 +
	5% NaCl -		木糖 -
	7% NaCl -		果糖 +
	35 °C -		乳糖 +
	40 °C +		半乳糖 +
	50 °C +		阿拉伯糖 W*
	60 °C +		核糖 -
黑色素产生	-	鼠李糖	-
纤维素分解	W*	棉子糖	-
淀粉水解	+	蔗糖	-
牛奶凝固	+	甘露糖	+
牛奶胨化	+	山梨糖	+
明胶液化	-	肌醇	-

注: *W 为弱阳性。

对, 根据 GenBank 中提供的基因系列比对结果, AO-III 与 *Thermoactinomyces thalpophilus* KCTC 9789^[6] (登录号: AF138738.1) 和 *Thermoactinomyces sacchari* strain RVH210302A^[7] (登录号: AY114169.1) 高度同源, 但无论是 *Thermoactinomyces thalpophilus* KCTC 9789 或 *Thermoactinomyces sacchari* strain RVH210302A, 已于 2005 年正式转入一个新属——兰希氏菌属, 更名为甘蔗兰希氏菌(*Laceyella sacchari*)^[8]。

2.5 鉴定结果

菌株 AO-III 的表型特征与高温放线菌相符; 其培养特征、生理生化特征和 16S rDNA 序列分析表明, 该菌与已更名为甘蔗兰希氏菌的原“甘蔗高温放线菌”(*Thermoactinomyces sacchari*) 高度相似, 故菌株 AO-III 定名为甘蔗兰希氏菌(*Laceyella sacchari*)。

2.6 堆肥试验结果

高温放线菌 AO-III 在 LB 液体培养基 60 °C 培养 30 h 后, 收集培养好的菌液, 以 5% 的接种量 (菌浓度约 10^9 cfu·L⁻¹) 添加到堆肥一次发酵 (高温好氧发酵) 中进行试验, 并于无添加外源微生物的堆肥发酵进行比较, 结果见表 3。

表 3 高温放线菌 AO-III 在好氧堆肥发酵中的应用效果
Table 3 Application effects of strain AO-III on aerobic composting process of pulp and paper mill sludges

	添加 AO-III	无添加 AO-III
好氧堆肥发酵周期/d	10	20
堆肥温度达到 80 °C 所需时间/h	1	3
发酵结束时水份含量	40% 以下	40% 以下
堆肥温度维持 80 °C 以上的时间/d	5	2

在添加外源微生物 AO-III 的堆肥一次 (好氧) 发酵中, 发酵周期为 10 d 左右, 经 1 d 堆肥, 温度上升到 80 °C 以上, 并可维持 5 d, 一次发酵结束后, 水分由最初的 55% 降至 40% 以下; 而无添加 AO-III 的对照组堆肥一次发酵周期为 20 d 左右, 温度上升到 80 °C 以上的时间需要 3 d, 其他指标相似, 二次 (厌氧) 发酵时间两组均为 30~40 d。因此, 添加外源微生物 AO-III 可以增强微生物的降解活性和加速有机物的分解, 缩短堆肥达到高温期的时间和发酵周期, 使水分快速下降。

3 讨论

韩国学者 Yoon 等^[6,8] 根据高温放线菌属的 8 个典型种进行 16S rDNA 全序列进化分析及 DNA-DNA 杂交实验, 认为高温放线菌属的 *Thermoactinomyces vulgaris* 和 *Thermoactinomyces candidus*, *Thermoactinomyces sacchari* 和 *Thermoactinomyces thalpophilus* 虽然形态特征和部分生理学特性有所不同, 但分子鉴定结果表明以上 4 个种实质上应为同一种。从这些结果可明显看出, 对高温放线菌属种的确定仅仅依据形态特征和生理学特性是不够的, 必须结合分子鉴定。如本文中的 AO-III 菌株虽然某些生长特性与 *Laceyella sacchari* 有些不同, 如 *Laceyella sacchari* 超过 65 °C 不能生长, 而 AO-III 在 80 °C 以上的堆肥发酵中仍然生长良好, 但分子鉴定结果表明 AO-III 与 *Laceyella sacchari* 高度同源, 仍为同一个种。

高温放线菌属从其建立至今已有一百多年的历史, 其存在数量多, 分布非常广泛, 如 1971 年 Williams 等^[9] 曾报道从两份酸性土壤中分离到数株中度嗜酸的高温放线菌菌株, 齐云等^[10] 在堆肥过程中分离到一株能分解纤维素的高温耐碱放线菌, 说明发现新的高温放线菌的潜力还是非常大的。高温放线菌用途也比较广, 除了是堆肥过程升温期的一种重要微生物, 在有机物质的分解方面也起着重要的作用外^[11]。近年来, 陆续发现高温放线菌无论在生物降解^[11,12] 还

是在产生生物活性物质如抗生素或酶^[11,13-15]等方面均有一定的用途,具有一些商业应用价值。某些变种还能引起外源性变应性肺泡炎(extrinsic allergic alveolitis)(一种过敏性肺炎),包括农民肺(farmer's lung)、蔗尘肺(bagassosis)^[16]等。到目前为止,仅有为数不多的几个种被发现并生效描述,因此,高温放线菌已引起微生物学家越来越多的关注。

高温对污泥堆肥化是极为重要的,一方面,高温对快速腐熟起着重要作用,另一方面,高温有利于杀死病原性微生物和寄生虫卵。采用耐高温微生物菌株进行工农业废弃物的堆肥发酵以提高肥效的研究国内外均有不少研究。胡菊等^[17]发现接种 VT 菌剂可促进堆肥有机物质分解及利用,有效杀灭病原菌,加快堆肥腐熟,提高堆肥产品质量;李宇庆等^[18]通过改进污泥堆肥试验装置和堆肥原料及堆料配比时加入适量的强化菌剂,堆肥含水率分别从初期的 60%左右下降到了堆肥周期结束时的 30%~40%,其 14 d 内基本达到腐熟;王德汉等^[19]在 1 m³ 小型发酵池通过调节造纸污泥水分与 C/N 比,在强制通风与定期翻堆情况下,经过 2 个月左右高温堆肥,转化为高效的有机肥料;许晓英等^[20]在污泥高温好氧堆肥中接种复合微生物菌剂,发现高温持续时间相对较长,且提前 3 d 达到腐熟,且应根据不同物料及配方,筛选驯化针对性强的菌株,同时配合合适的堆肥工艺,才能达到理想的效果。总的来看,国内外对降解纤维素的真菌、细菌的研究较多,对放线菌的研究较少。而本研究针对造纸污泥与味精废液的各自特性,以液态味精废液作为发酵氮源、以造纸污泥作为发酵物料通过接种高温放线菌在 150 t 发酵槽进行有氧好气性发酵试验,发酵物料温度可在 24 h 之内上升至 80 ℃左右,发酵物料发酵过程中最高温度可达 87 ℃,发酵周期缩短至 10 d 以内,并实现大规模商品化生产。由于造纸污泥中植物营养成分比猪粪高,无重金属污染的风险,且数量大又易集中,而味精废液的含水量小且发酵物料中味精废液的添加量也少,水分不会对发酵物料的发酵产生大的影响,因此,味精废液可以作为造纸污泥发酵所需的氮源。因此,该堆肥工艺在农业上具有良好的开发前景。

参考文献:

- [1] 周少奇,林云琴,李端. 造纸污泥交替式好氧厌氧堆肥实验[J]. 中国造纸,2005,24(6): 25-28.
- [2] 陈天寿. 微生物培养基的制造与运用[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999.
- [3] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社,1975.
- [4] 阎逸初. 放线菌的分类与鉴定[M]. 北京: 科学出版社,1992.
- [5] 布坎南 R E,吉本斯 N E. 中国科学院微生物研究所译. 伯杰氏细菌鉴定手册(第八版)[M]. 北京: 科学出版社,1984.
- [6] Yoon J H, Shin Y K, and Park Y H. DNA-DNA relatedness among *Thermoactinomyces* species: *Thermoactinomyces candidus* as a synonym of *Thermoactinomyces vulgaris* and *Thermoactinomyces thalophilus* as a synonym of *Thermoactinomyces sacchari* [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50(5): 1905-1908.
- [7] Xu J, Rao J R, Millar B C, et al. Improved molecular identification of *Thermoactinomyces* spp. associated with mushroom worker's lung by 16S rDNA sequence typing[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2002, 51(12): 1117-1127.
- [8] Yoon J H, Kim In-Gi, Shin Y K, et al. Proposal of the genus *Thermoactinomyces* sensu stricto and three new genera, *Laceyella*, *Thermoflavimicrobium* and *Seinonella*, on the basis of phenotypic, phylogenetic and chemotaxonomic analyses[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(1): 395-400.
- [9] Williams S T, Davies F L, Mayfield C I, et al. Studies on the ecology of actinomycetes in soil II. The pH requirements of streptomycetes from two acid soils[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1971, 3(3): 187-192.
- [10] 齐云,陈飞,袁月祥,等. 一株能分解纤维素的高温耐碱放线菌[J]. 应用与环境生物学报, 2003, 9(3): 322-325.
- [11] Song J, Weon H Y, Yoon S H, et al. Phylogenetic diversity of thermophilic actinomycetes and *Thermoactinomyces* spp. isolated from mushroom composts in Korea based on 16S rRNA gene sequence analysis[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2001,202(1): 97-102.
- [12] Kleeberg I, Hetz C, Kroppenstedt R M, et al. Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyesters by *Thermomonospora fusca* and other thermophilic compost isolates[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64: 1731-1735.
- [13] Al-Khudary R, Hashwa F, Mrueh M. A novel olive oil degrading *Thermoactinomyces* species with a high extremely thermostable lipase activity[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2004, 4(1): 78-82.
- [14] Kohilu U, Nigam P, Singh D, et al. Thermostable, alkalophilic and cellulase free xylanase production by *Thermoactinomyces thalophilus* subgroup C[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2001, 28(7): 606-610.
- [15] Goshev I, Gousterova A, Vasileva-Tonkova E, et al. Characterization of the enzyme complexes produced by two newly isolated thermophilic actinomycete strains during growth on collagen-rich materials[J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40(5):1627-1631.
- [16] Van den Bogart H G, Van den Ende G, Van Loon P C, et al. Mushroom worker's lung: Serologic reactions to thermophilic actinomycetes present in the air of compost tunnels[J]. *Mycopathologia*, 1993, 122(1): 21-28.
- [17] 胡菊,秦莉,吕振宇,等. VT 菌剂接种堆肥的作用效果及生物效应[J]. 农业环境科学学报,2006,25(增刊): 604-608.
- [18] 李宇庆,陈玲,赵建夫,等. 城市污水厂污泥快速高效堆肥技术研究[J]. 农业环境科学学报,2005,24(2): 380-383.
- [19] 王德汉,彭俊杰,戴苗. 造纸污泥好氧堆肥处理技术研究[J]. 中国造纸学报,2003,118(11): 135-140.
- [20] 许晓英,李季. 复合微生物菌剂在污泥高温好氧堆肥中的应用[J]. 中国生态农业学报,2006,14(3): 64-66.