

王明月,毕荣璐,王金华,等.板栗苞壳纤维素降解真菌的筛选及降解效果[J].江苏农业科学,2014,42(5):290-293.

# 板栗苞壳纤维素降解真菌的筛选及降解效果

王明月,毕荣璐,王金华,熊智

(西南林业大学/西南山地森林资源保育与利用省部共建教育部重点实验室,云南昆明 650224)

**摘要:**为了利用纤维素降解菌促进板栗苞壳快速腐解还田,解决资源浪费和污染环境问题,进行板栗苞壳纤维素降解微生物的筛选和降解效果研究。结果表明,从板栗苞壳发酵堆积物中筛选到4株具有降解纤维素的真菌菌株,通过羧甲基纤维素钠水解圈的测定、滤纸降解试验、板栗苞壳失重试验,4株真菌均有一定降解纤维素的能力,其中菌株 SWFU-xws4 的降解能力最强,纤维素水解强度为 12.96,滤纸降解为团糊状,秸秆失重率为 28.47%;通过菌株形态特征和 ITS 保守序列鉴定表明,初步将高效降解纤维素菌株 SWFU-xws4 确定为卷枝毛霉(*Mucor circinelloides*)。

**关键词:**板栗苞壳;纤维素降解菌;筛选;降解效果

**中图分类号:** Q939.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)05-0290-03

板栗苞壳别称栗蓬,是板栗(*Castanea mollissima* Blume)坚果外面球形的密被针刺的总苞<sup>[1]</sup>。由于我国板栗栽培规模与产量迅速增加,栗园废弃物产生量也随之大幅增加。目前,全国板栗年产量已达到 8 万 t 以上,年产生废弃栗苞约 150 万 t,年产生废弃栗壳 20 万 t 以上<sup>[2]</sup>,不但造成资源极大浪费,而且还污染了环境,造成治理、处理的再投入。近几年,随着生物有机肥的快速发展,板栗苞壳成为生物有机肥堆制原料而受到重视,并配置成有机肥在农业上得到应用。由于板栗苞壳含有大量的木质纤维素<sup>[3]</sup>,降解速度慢、堆肥时间长,造成严重环境污染,成为肥料化利用的制约因素和研究重点。因此,板栗苞壳纤维素的降解研究具有重要的现实意义。

近年来,秸秆纤维素的生物转化受到了广泛关注,大规模纤维素生物转化工艺的发展能有效解决或减轻食品和动物饲料的不足、废弃物处理、矿石燃料依赖性等一系列问题<sup>[4]</sup>。因此,研究农田秸秆、林副产品的人工快速促腐技术具有重要意义。目前,利用高效纤维木质素降解菌株和复合系研制新型高效的作物秸秆腐熟菌剂已成为国内外研究热点<sup>[5]</sup>。20 世纪 40 年代以来,科学家筛选出了大量的纤维素降解真菌,主要包括木霉属(*Trichoderma*)、青霉属(*Penicillium*)、漆斑霉属(*Myrothecium*)、毛壳霉属(*Chaetomium*)、曲霉属(*Aspergillus*)、毛霉属(*Mucor*)等<sup>[6-9]</sup>,这些菌株的获得为秸秆生物降解提供了重要条件。因此,板栗苞壳纤维素降解真菌的筛选,可以使板栗苞壳纤维素在生物堆肥中得到有效降解,提高生物堆肥的利用价值。近年来,国内外关于纤维素降解菌和酶的报道较多,但大部分研究集中在对秸秆的降解上<sup>[10-12]</sup>,对

于苞壳类物质降解的报道甚少。

本试验从板栗苞壳堆肥中筛选到 1 株高效纤维素降解菌,可以高效降解板栗苞壳,对苞壳类农副产品的促腐具有较好的应用前景。

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料

板栗苞壳与 2011 年采自云南省昌宁县,经粉碎机粉碎成 1~3 mm 粒径,堆肥 1 个月使板栗苞壳充分腐烂。

### 1.2 试剂

化学试剂均为分析纯,购自上海生工生物工程技术服务有限公司,分子生物学试剂购自天根生化科技(北京)有限公司,引物合成及测序由上海生工完成。

### 1.3 培养基

刚果红培养基:  $K_2HPO_4$  0.5 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.25 g/L、蛋白胨 2 g/L、酵母膏 1.0 g/L、琼脂粉 1.5 g/L、刚果红 0.2 g/L。

PDA 培养基: 马铃薯 200 g/L、葡萄糖 20 g/L、 $KH_2PO_4$  3.0 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1.5 g/L, pH 值自然。

羧甲基纤维素钠(CMC-Na)平板培养基: CMC-Na 10.0 g/L、200 g 去皮马铃薯汁 1 000 mL、琼脂 18 g/L, pH 值 7.2 左右。

赫奇逊氏无机盐培养基:  $KH_2PO_4$  1.0 g/L、NaCl 0.1 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.3 g/L、 $NaNO_3$  2.5 g/L、 $FeCl_3$  0.01 g/L、 $CaCl_2$  0.1 g/L, pH 值 7.2 左右。

液体发酵培养基: 蛋白胨 3 g/L、 $NH_4NO_3$  2 g/L、酵母粉 0.5 g、 $KH_2PO_4$  4 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.3 g/L、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.3 g/L、吐温-80 0.2 g/L、CMC-Na 10 g/L, pH 值 6.0。

### 1.4 试验方法

1.4.1 菌株分离与纯化 称取 1.0 g 充分腐烂的板栗苞壳样品溶于无菌水中,在摇床振荡 30 min,取样品悬液,用无菌水稀释成  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$  的浓度梯度,吸取稀释浓度为  $10^{-3}$  的稀释液,涂布于纤维素刚果红培养基上,放置于 30 ℃ 的恒温箱中培养 48 h,菌落呈红色并且能在周围形成透明水解圈的菌株,即能产纤维素酶的菌株。将有明显水解圈的菌株在

收稿日期:2013-09-25

基金项目:云南省自然科学基金(编号:2009CD073);云南省中青年学术技术带头人后备人才培养项目(编号:2010CI016);西南林业大学大学生创新基金(编号:1138、1146);云南省西南林业大学生物技术特色专业建设项目(编号:50116001)。

作者简介:王明月(1987—),女,硕士研究生,主要从事微生物生理学研究。E-mail:mingyue1118@gmail.com。

通信作者:熊智,教授。Tel:(0871)3863022;E-mail:zhix65.swfc@gmail.com。

PDA 培养基中进行分离纯化,置 4 ℃ 冰箱冷藏、待用。

1.4.2 CMC - Na 水解圈测定试验 将初筛菌株接种至 CMC - Na 平板培养基上,培养 2 ~ 5 d,用 0.1% 刚果红水溶液浸染 30 min,弃染液,再用 1 mol/L NaCl 水溶液脱色 1 h,测菌落直径  $d$  (cm)、水解圈直径  $D$  (cm),采用  $D_p$  表示水解能力:  $D_p = (D/d)^2$ 。

1.4.3 滤纸降解试验 将初筛获得的菌株接种到液体 PDA 培养基中制备菌液,30 ℃、160 r/min 摆床培养 5 d,在装有 1 cm × 6 cm 的滤纸条的赫奇逊氏无机盐培养基(30 mL)中接入 1 mL 菌液,30 ℃、160 r/min 摆床培养 10 d,根据滤纸条的断裂程度判断降解效果: + 为滤纸边缘膨胀; ++ 为滤纸整齐膨胀并弯曲; +++ 为滤纸不定形; ++++ 为成团糊状; +++++ 为半清状。

1.4.4 板栗苞壳失重试验 接种筛选菌株到液体 PDA 培养基中制备菌液,30 ℃、160 r/min 摆床培养 5 d。将板栗苞壳在 105 ℃ 烘至恒重,以烘干的 1 g 板栗苞壳为唯一碳源配制液体发酵培养基,接入 1 mL 菌液,30 ℃、160 r/min 摇培 7 d,将发酵液过滤并将残留纤维素烘干称重,用减重法计算失重率。

1.4.5 菌株形态学鉴定 观察菌落和菌种形态特征,并参照文献[13]进行菌种鉴定。

1.4.6 菌株的 ITS rDNA 序列鉴定 菌株 DNA 的提取采用真菌基因组 DNA 快速提取试剂盒(溶液型)。提取菌株基因组 DNA 后进行 PCR 扩增,PCR 扩增引物为:ITS1, 5' - TCCG-TAGGTGAACCTGCCG - 3'; ITS4, 5' - TCCTCCGCTTATT-GATATGC - 3'<sup>[14]</sup>。

PCR 采用 50 μL 反应体系: 2 × Taq PCR Master Mix 25 μL,各引物(10 μmol/L)2.5 μL,1 μL DNA(20 ng 左右),补足灭菌双蒸水至 50 μL。PCR 扩增条件:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,54 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min,30 个循环;72 ℃ 7 min。PCR 产物检测:经质量分数为 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后 4S 核酸染料染色观察,用凝胶成像仪照相。将 PCR 产物进行测序,根据测序结果,从 GenBank 数据库中,利用 Blast 软件搜索并选取同源性较高的相似序列,用 MEGA 4 软件构建系统发育树。

## 2 结果与分析

### 2.1 纤维素分解菌的初筛

通过纤维素刚果红培养基,最终得到 4 株在分离培养基上生长速度快且生长旺盛的真菌菌株。将初筛获得的 4 株真菌进行 CMC - Na 水解圈的测定,发现菌株 SWFU - xws4 的降

解能力最强,水解能力为 12.96(表 1)。

表 1 4 株真菌的 CMC - Na 水解情况

菌株编号	菌落直径 (cm)	水解圈直径 (cm)	水解能力
SWFU - xws4	0.5	1.8	12.96
SWFU - xws5.1	0.7	1.0	2.04
SWFU - xws5.2	0.5	0.9	3.24
SWFU - xws6	0.8	1.5	3.52

### 2.2 滤纸降解试验

对初筛的 4 株真菌进行滤纸条降解试验,菌株 SWFU - xws4 将滤纸条降解为团糊状(++++),菌株 SWFU - xws5.1,SWFU - xws6 将滤纸条降解为不定形(+++),菌株 SWFU - xws5.2 使滤纸变为整齐膨胀并弯曲(++)。说明 4 株真菌均有一定的滤纸降解能力,其中降解能力最强的是菌株 SWFU - xws4,最弱的是菌株 SWFU - xws5.2。

### 2.3 板栗苞壳失重试验

由表 2 可以看出,对初筛的 4 株真菌进行板栗苞壳失重试验,结果表明,4 株真菌对板栗苞壳均有一定的降解能力,其中 SWFU - xws4 的失重率最大,为 28.47%;SWFU - xws5.2 最小,为 17.04%。

表 2 4 株真菌的板栗苞壳降解测定结果

菌株编号	板栗苞壳质量 (g)	降解后质量 (g)	失重率 (%)
SWFU - xws4	0.987 ± 0.02	0.706 ± 0.025	28.47
SWFU - xws5.1	1.006 ± 0.04	0.786 ± 0.037	21.87
SWFU - xws5.2	0.992 ± 0.02	0.823 ± 0.016	17.04
SWFU - xws6	1.012 ± 0.03	0.778 ± 0.002	23.12

### 2.4 菌株的形态鉴定

菌落呈灰色,生长快速,可以长至数厘米;菌丝无隔、多核、分枝状,在基物内外能广泛蔓延,无假根或匍匐菌丝;菌丝体上生出不同形状的孢囊梗,有单生、总状分枝或假轴状分枝;各分枝顶端着生球形孢子囊,内有形状各异的囊轴,无囊托(图 1)。

### 2.5 菌株的 ITS rDNA 序列鉴定

根据以上降解试验,4 株真菌中菌株 SWFU - xws4 的降解纤维素能力最强,以菌株 SWFU - xws4 基因组 DNA 为模板,用引物 ITS1 和 ITS4 进行扩增,通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,扩增出约 550 bp 大小的条带(图 2)。

将菌株 SWFU - xws4 的 ITS 保守序列与从 GenBank 中获

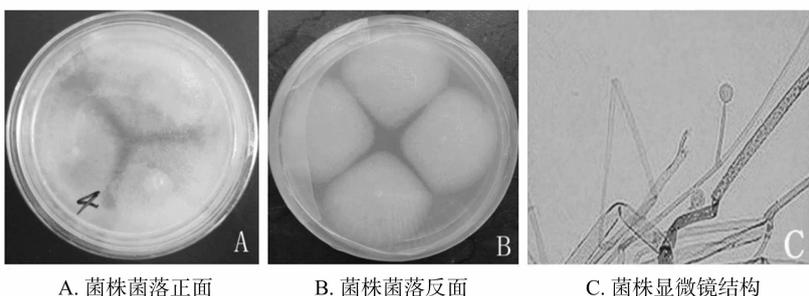


图 1 菌株 SWFU-xws4 的形态特征

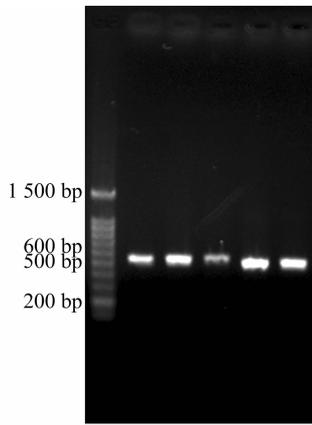


图2 菌株SWFU-xws4的ITS序列扩增结果

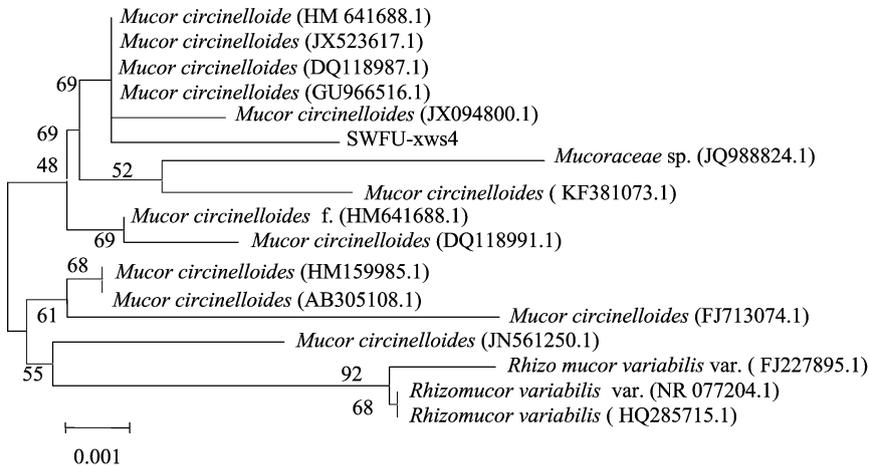


图3 菌株 SWFU-xws4 基于 ITS 序列的系统发育树

通过菌株形态特征和 ITS 保守序列鉴定表明,初步将高效降解纤维素菌株 SWFU-xws4 鉴定为卷枝毛霉。

本研究分离鉴定的纤维素降解菌为毛霉属的卷枝毛霉,目前对纤维素降解菌研究较多的菌属是曲霉属、根霉属(*Rhizopus*)、青霉属等<sup>[15]</sup>,毛霉属真菌降解纤维素的能力也得到了证实,刘淑霞等对黑土玉米田土壤纤维素分解真菌的研究发现毛霉属的冻土毛霉(*M. hiemalis*)具有纤维素的降解能力<sup>[16]</sup>;王舒等分离鉴定出 1 株产纤维素酶的真菌为毛霉属真菌 *M. amphibiorum*<sup>[17]</sup>,目前,对毛霉属降解纤维素菌研究较少,本研究丰富了纤维素降解菌菌种资源。

近年来,国内外关于秸秆纤维素降解菌的报道较多,但关于苞壳类物质降解的报道甚少,本研究以板栗苞壳为研究材料,筛选出 1 株对苞壳物质纤维素具有高效降解能力的菌株,为进一步提高纤维素酶活力,还需进行优化培养条件,或通过驯化、诱变、基因工程等手段提高其降解能力,生产上具有广阔的应用前景。

#### 参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1979:1819-1820.
- [2] 牛俊玲,梁丽珍,兰彦平. 板栗苞和牛粪混合堆肥的物质变化特性研究[J]. 农业环境科学学报,2009,28(4):824-827.
- [3] 牛俊玲,梁丽珍,兰彦平. 不同化学预处理对板栗苞生物降解特

取与该菌株序列同源性较高的部分菌株序列,以 ITS 保守序列同源性为基础构建系统发育树,确定该菌株的系统发育地位。系统发育树状(图 3)表明,菌株 SWFU-xws4 与卷枝毛霉(*Mucor circinelloides*)的多株菌在同一系统发育分支,与卷枝毛霉(GU966516.1)的同源性最高,为 99.14%,根据该菌株形态学及系统发育分析,鉴定该菌为卷枝毛霉。

#### 3 结论与讨论

筛选到 4 株具有降解纤维素的真菌菌株,CMC-Na 水解圈的测定、滤纸降解试验、板栗苞壳失重试验结果均表明,4 株真菌均有一定的降解纤维素能力,其中菌株 SWFU-xws4 的降解能力最强,纤维素水解强度为 12.96,滤纸降解为团糊状,秸秆失重率为 28.47%。

性的影响[J]. 现代化工,2008,28(增刊):431-433.

- [4] Adsul M G, Bastawde K B, Varma A J, et al. Strain improvement of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 for increased cellulase production[J]. Bioresource Technology, 2007, 98(7):1467-1473.
- [5] 殷中伟,范丙全,任萍. 纤维素降解真菌 Y5 的筛选及其对小麦秸秆降解效果[J]. 环境科学,2011,32(1):247-252.
- [6] Tomme P, van Tilbeurgh H, Pettersson G, et al. Studies of the cellulolytic system of *Trichoderma reesei* QM 9414[J]. European Journal of Biochemistry, 2004, 170(3):575-581.
- [7] Singh R, Varma A J, Seeta L R, et al. Hydrolysis of cellulose derived from steam exploded bagasse by *Penicillium cellulases*; comparison with commercial cellulase [J]. Bioresource Technology, 2009, 100(24):6679-6681.
- [8] Okunowo W O, Gbenle G O, Osuntoki A A, et al. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by a phytopathogenic *Myrothecium roridum* and some avirulent fungal isolates from water hyacinth [J]. African Journal of Biotechnology, 2010, 9(7):1074-1078.
- [9] Geeraerts H M, Vandamme E J. Cellulolytic properties of *Chaetomium crispatum* [J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2008, 33(2):107-113.
- [10] 陈洪章,邱卫华. 秸秆发酵燃料乙醇关键问题及其进展[J]. 化学进展,2007,19(7):1116-1121.
- [11] 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.

徐鹏程,冷翔鹏,刘更森,等. 盐碱土改良利用研究进展[J]. 江苏农业科学,2014,42(5):293-298.

# 盐碱土改良利用研究进展

徐鹏程<sup>1</sup>,冷翔鹏<sup>1</sup>,刘更森<sup>2</sup>,宋长年<sup>1</sup>,房经贵<sup>1</sup>

(1. 南京农业大学园艺学院,江苏南京 210095; 2. 青岛农业大学园艺学院,山东青岛 266109)

**摘要:**土壤盐渍化使得植物根区积累过多的可溶性盐,影响了植物水分吸收,甚至能够引发盐中毒,从而降低植物活力,延缓植物生长。采用适当的措施进行盐碱改良是十分必要的。本文从生物措施、物理措施、化学措施等方面对盐碱土改良研究情况进行了综述,并展望了今后进一步的研究问题。

**关键词:**盐碱土;改良措施;研究进展

**中图分类号:** S156.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)05-0293-06

根据中国科学院的统计,分布在我国西北、东北及滨海地区的盐碱荒地和盐碱障碍耕地总面积超过3 333.3万 $\text{hm}^2$ ,其中具有农业利用潜力的近1 333.3万 $\text{hm}^2$ ,占我国耕地总面积的10%以上,挖掘潜力巨大。合理利用我国的盐碱地资源有利于保障国家的耕地面积,这关乎国家粮食安全问题,十分重要。我国在盐碱地改良利用技术的研究和推广方面已取得众多的成果。在盐碱地发展的果树种植等产业,利用了众多土壤改良的关键技术,实现了经济发展与环境保护的可持续发展<sup>[1]</sup>。为了更好地研究盐碱土壤改良的改良措施,本文综述了国内外盐碱土改良措施的研究,以期对盐碱土改良研究提供借鉴。

## 1 土壤水盐运动的研究

盐碱土壤的改良在很大程度上是对水盐运动的调节。研究溶质在土壤中的移动过程和规律,对于解决土壤盐渍化、改善盐碱土壤有重要作用。土壤水盐运动的研究开始于Lapidus和Amundson提出的一个类似于对流-弥散方程的模拟模型。Nielson首先推导出了溶质运移的基本方程,即对流弥散方程。之后,美国加州大学Jury教授提出随机传输函数模型,也称为“黑箱模型”,可较好地揭示溶质在均质多孔介质中的运移机理及时间、空间对溶质运移的影响。另外,美国国家盐改中心的van Genuchten教授提出了考虑土壤中不动水体影响的可动水-不动水体模型,分析了可动水、不动水体的作用及相互影响。目前,对流-弥散方程模型、黑箱模型、可动水-不动水体模型构成了当今世界上溶质运移研究的三

大学派<sup>[2]</sup>。

我国研究人员利用已有的水盐运动的方程模型,对土壤盐碱问题进行了深入的研究,并取得了丰富的成果。陈雨湘等模拟盐渍化土壤水盐运动状态,分析得出在水分迁移速度极低的情况下,盐分的水动力弥散成为盐分迁移的主要形式,验证了深层土壤中地下水蒸发对于土壤水盐运动是一个十分重要的影响因素,对盐分的运移速度有直接影响<sup>[3]</sup>。在土壤水盐平衡的潜水“临界深度”方面,研究表明当潜埋深大于临界深度,地面潜水蒸发停止,地下水和土壤中的盐分不再积累于地表,土壤积盐与潜埋深呈负相关<sup>[4]</sup>。研究还表明在潜埋深小于2 m的情况下,只要土体中有淡水向上运动蒸发,就会产生盐分的向上移动;在潜埋深大于2 m的情况下,潜水并不能直接参与上层土体的水盐运动过程<sup>[5]</sup>。徐力刚等建立了小麦种植条件下土壤水盐运移的数学模型,并应用数学模型自主开发了模拟软件SWSTM,模拟变化天气和变化地下水位条件下农田土壤中冬小麦水盐运移过程,以实现对小麦实际生产可能遇到的问题进行预报的目的<sup>[6]</sup>。

## 2 盐碱改良措施

科学家们针对盐碱土壤的理化性质,已经相继尝试了多种改良方法来改良盐碱土,并取得了许多成功经验。研究人员根据取得的经验总结了主要改良措施的改良原理:第1步是将可交换性 $\text{Na}^+$ 从土壤胶体上替换下来,这是改良苏打盐碱土的根本,一般用 $\text{CaSO}_4$ 提供 $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{CaSO}_4 + 2\text{Na}^+ \text{X}^- \rightarrow 2\text{Na}^+ + \text{SO}_4^{2-} + \text{Ca}^{2+} + \text{X}^-$ ,X表示可交换性离子;第2步是要有良好的排水设施,排水通畅是改良盐碱土的前提;第3步是用大量的灌溉水移除过量的盐分,洗盐排盐是改良盐碱土的重要途径<sup>[7]</sup>。现在使用的改良措施大多是遵循这一原理的。

### 2.1 化学改良

化学改良盐碱土壤主要有两方面作用。一、凝聚土壤颗

收稿日期:2013-09-14

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(12)2013]。

作者简介:徐鹏程(1988—),男,山东淄博人,主要研究方向为果树耐盐栽培。E-mail:2012104016@njau.edu.cn。

通信作者:房经贵,教授。E-mail:fanggg@njau.edu.cn。

[12]宋安东,王磊,王风芹,等. 微生物处理对秸秆结构的影响[J]. 生物加工过程,2009,7(4):72-76.

[13]魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979.

[14]彭浩,邓百万,陈文强,等. 虎杖内生真菌产白藜芦醇苷菌株的分离鉴定[J]. 微生物学通报,2011,38(6):889-894.

[15]路鹏. 纤维素分解菌复合系MC1的发酵特性及其调控[D].

北京:中国农业大学,2003.

[16]刘淑霞,吴海燕,吴海文,等. 黑土玉米田土壤纤维素分解真菌物种鉴定及分解能力测定[J]. 玉米科学,2008,16(3):112-116.

[17]王舒,李汉骏,查美玲,等. 一株产纤维素酶真菌 *Mucor amphibiorum* RSC1的分离鉴定及其产酶培养基的初步优化[J]. 安徽农业科学,2012,40(23):11595-11597.