

屈海泳,刘连妹,吴 纯. 木霉菌液体发酵对秸秆的降解作用[J]. 江苏农业科学,2014,42(7):283-285.

木霉菌液体发酵对秸秆的降解作用

屈海泳¹, 刘连妹², 吴 纯²

(1. 青岛农业大学园艺学院, 山东青岛 266109; 2. 淮阴工学院生命科学与化学工程学院, 江苏淮安 223002)

摘要:以小麦秸秆为唯一碳源,从发酵液中一代一代提取木霉菌,通过测定秸秆降解率,残余秸秆有机质含量,发酵液中氮、磷、钾含量,研究木霉菌对秸秆的降解作用。结果表明:通过一代一代的从发酵液中提取木霉菌,其降解能力有所提高,提取到第 4 代时,降解能力最高,第 4 代后,木霉菌的降解能力下降。

关键词:木霉菌;液体发酵;秸秆;纤维素降解

中图分类号: S141.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)07-0283-02

农作物秸秆是农业生产的副产品。近年来,随着农村经济的发展,传统的秸秆利用方式逐渐被弱化和淘汰,大量剩余秸秆的处理成为农业生产中凸显的问题,一些农民采取最简单的处理方式——焚烧或随意堆弃,这样既污染了环境,又浪费了资源。据报道,我国年产各类农作物秸秆达 6.5 亿 t,占世界秸秆总产量的 20%~30%^[1]。目前,有效利用率只占 50%,其余部分大多被付之一炬,造成了大量的社会、经济和生态问题,成为政府关心、社会关注的热点和难点。充分地利用秸秆是农业生产面临的一个难题。近几十年来,国内外一直在探索利用物理、化学和生物方法来降解农作物秸秆,其中采用微生物来降解秸秆被认为是一种简单、经济、有效的方法,可克服机械粉碎法、热处理法^[2]、化学处理法的不足,成为秸秆降解领域的研究热点^[3]。自然界中,许多细菌、放线菌和真菌能分解纤维素。秸秆中的纤维素含量占绝大部分,想要有效降解秸秆,先要有效分解其中的纤维素。真菌降解纤维素已得到广泛认可,已报道的对纤维素作用较强的菌株多是木霉属、曲霉属、青霉属、枝顶孢霉属、漆斑霉属的。由于木霉属真菌能分泌完整的纤维素酶系,可完全水解天然纤维素,所以有关专家更倾向研究木霉。姚强用液体摇瓶法从碱性土壤中筛选到降解纤维素的哈茨木霉^[4]。木霉菌属真菌门,广泛存在于不同环境条件下的土壤中。木霉在生物防治上的抑菌防病特性及其在有机污染生物修复上的作用,使得木霉的研究引起重视。本试验通过木霉菌液体发酵促进秸秆的降解,由于直接从田间分离或实验室保存的木霉菌存在着菌种退化现象,达不到理想降解秸秆的目的,所以笔者希望通过一代接着一代的发酵培养,提高木霉菌对秸秆的降解能力。

1 材料与方法

1.1 材料

试验菌种:木霉菌实验室筛选保藏, PDA 培养基,孟加拉红培养基, pH 值均自然, 121 ℃、0.1 MPa 高压灭菌 30 min。

秸秆样品:小麦秸秆来源于农户,风干,剪成 2~3 cm,经

粉碎机粉碎成过 40 目左右的秸秆粉,烘干至恒重。

1.2 主要仪器与设备

超净工作台、自动电热压力蒸汽灭菌锅、电子分析天平、恒温摇床、恒温培养箱、电热恒温鼓风干燥箱、微型植物粉碎机、可见分光光度计、火焰光度计、扩散皿、微量滴定管。

1.3 方法

1.3.1 菌种培养 取置于实验室冰箱中的木霉菌,接种到固体培养基上进行种子活化,置于 28 ℃恒温培养箱中培养 7 d。

1.3.2 孢子液配制 取培养 5 d 的木霉菌平板,加入 5 mL 无菌水将孢子刮下,取 100 μL 此悬液,加蒸馏水稀释一定倍数,在 600 nm 下测其吸光度,根据吸光度加入适量无菌水稀释调节至同一水平,备用。

1.3.3 秸秆发酵培养 取 5 个 250 mL 锥形瓶,分别称取 2 g 小麦秸秆粉末置于其中,再加入 60 mL 蒸馏水,混匀,经 121 ℃高温灭菌 20 min,待其冷却,调节 pH 值为 6,然后用移液枪接种上述 1 mL 孢子液置于其中 4 个锥形瓶中,剩下一个作为空白不接种孢子液,置于 30 ℃、120 r/min 的恒温摇床下发酵培养 7 d。发酵结束,用移液枪移取 100 μL 此发酵液,均匀涂于平板上,置于上述相同环境下培养,将第 1 次从发酵液中提取出培养的菌称为 1 代菌;将锥形瓶充分摇匀,取适量发酵液,待测定其中养分含量。再次取 5 个上述相同容量锥形瓶,加入同样质量的新的秸秆和蒸馏水,相同处理,将 1 代菌种接入其中发酵培养,如此一直继续培养,依次将得到 2、3、4、5、6 代菌,以冰箱中取出的木霉菌作为对照。

1.3.4 测定项目与方法 发酵结束后残余秸秆有机质含量的测定采用 $K_2Cr_2O_7-H_2SO_4$ 外加热法;发酵液中氮含量(以铵态氮含量计,下同)的测定采用碱解扩散法;发酵液中磷含量的测定采用钼酸铵-分光光度法;发酵液中钾含量的测定采用火焰光度计测定法;秸秆降解率的测定:将降解过的秸秆粉过滤冲洗,除去菌体,105 ℃烘干至恒重,以不接菌的为对照,失重法计算秸秆降解率。

1.3.5 数据处理 数据处理与统计分析用 Excel 2003 和 SPSS 软件进行。

2 结果与分析

2.1 秸秆发酵前后颜色变化

经高温灭菌后,于锥形瓶中接种 1 mL 孢子液,结果

收稿日期:2013-07-17

基金项目:江苏省黄河故道农业资源开发项目。

作者简介:屈海泳(1972—),男,安徽宿州人,博士,副教授,从事园艺生理学研究。Tel:(0517)83591025;E-mail:quhaiyong@126.com。

(图 1-A)发现,该锥形瓶中上层溶液具有一定透明度,且颜色呈红棕色。发酵后 7 d(图 1-b),静置一段时间后发现,该发酵样品的上层溶液颜色变成土黄色,且溶液浑浊。与加入木霉菌溶液相比,对照(不加木霉菌)上层溶液仍具有一定透明度,浑浊度相对较低。

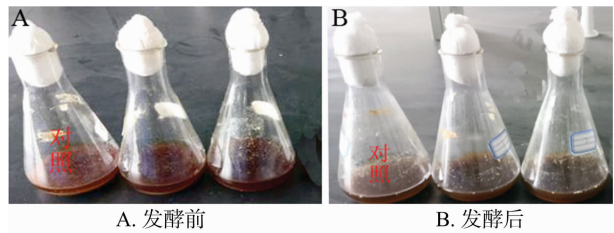


图1 秸秆发酵前后的颜色变化

2.2 各代木霉菌对秸秆降解率的影响

从表 1 可以看出,木霉菌液体发酵对秸秆的降解具有一定的显著效果,只是各代菌种的降解效果不同。从发酵液中提取出的木霉菌降解效果显著好于对照,当提取到第 3、第 4 代时,其降解率到达最大,为 19.35%;再提取到第 5、第 6 代时,其降解率略有下降,其中 6 代菌下降最明显。

表 1 各代木霉菌对秸秆的降解情况

菌种	降解率(%)
对照	12.36 ± 1.56eF
1 代菌	15.59 ± 1.48dE
2 代菌	16.13 ± 1.12cdD
3 代菌	19.35 ± 2.01aA
4 代菌	19.35 ± 1.86aA
5 代菌	18.28 ± 1.43bB
6 代菌	16.67 ± 1.72cC

2.3 各代木霉菌对秸秆有机质含量的影响

在秸秆降解过程中,有机质是微生物赖以生存和繁殖的基本条件,因此有机质含量变化能在一定程度上反映秸秆的降解进程^[5]。各代木霉菌经 7 d 的发酵,残余秸秆粉末有机质含量变化情况如图 2 所示。从图 2 可以看出,对照菌到 4 代菌残余秸秆中的有机质含量一直在下降,4 代菌残余秸秆有机质含量最低,是 72.11%;到第 5、第 6 代时,残余秸秆的有机质含量略有上升。残余秸秆粉末有机质含量的变化趋势与秸秆降解率变化趋势基本一致,反映了秸秆降解的趋势。

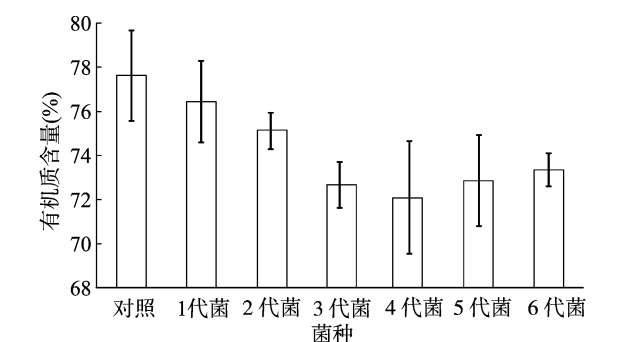


图2 各代木霉菌对秸秆有机质含量的影响

2.4 各代木霉菌发酵液中氮含量变化情况

由图 3 可以看出,小麦秸秆降解结束后,各代菌种发酵液中的氮含量发生了一定程度的变化。其中,对照菌种的氮含量最低,为 58.2 mg/L;1~4 代菌的氮含量依次为 72.94、78.93、84.17、89.95 mg/L;5 代菌的氮含量略有下降,但不明显;6 代菌氮含量下降较为明显。说明 4 代菌或 5 代菌的氮含量较高。

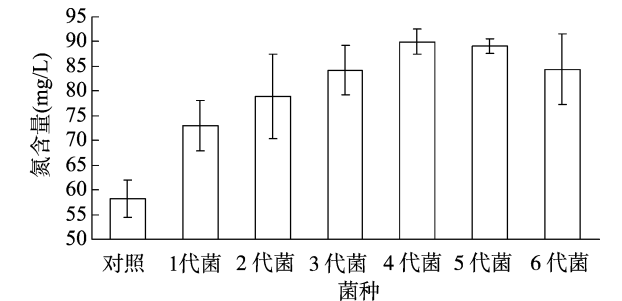


图3 各代木霉菌对秸秆氮含量的影响

2.5 各代木霉菌发酵液中磷含量变化情况

植物中的磷主要以磷脂、核酸、植素等有机态存在,一般含量在 0.2%~0.5% 之间。各代木霉菌液体发酵结束后,发酵液中的磷含量如图 4 所示。降解结束后,1 代菌与对照菌磷含量并没有明显差异。2~6 代菌磷的含量与对照菌相比明显提高,其中 4 代菌发酵液中磷含量最高,为 49.29 mg/L;5、6 代菌的磷含量有所下降,其中 6 代菌发酵液中的磷含量较 4 代菌下降最明显。

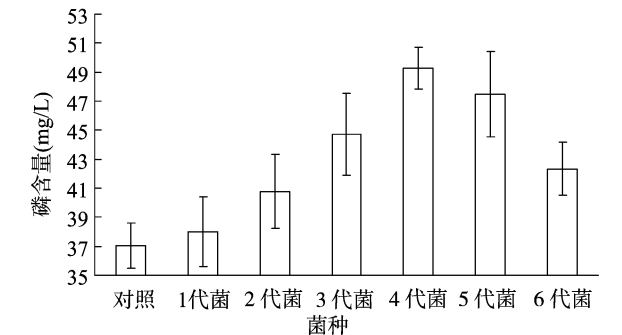


图4 各代木霉菌对秸秆磷含量的影响

2.6 各代木霉菌发酵液中钾含量变化情况

小麦秸秆中的钾几乎都以无机离子态存在。各代木霉菌液体发酵结束后,发酵液中的钾含量如图 5 所示。由图 5 可知,各代菌种发酵液中的钾含量较对照菌都有明显的提高。

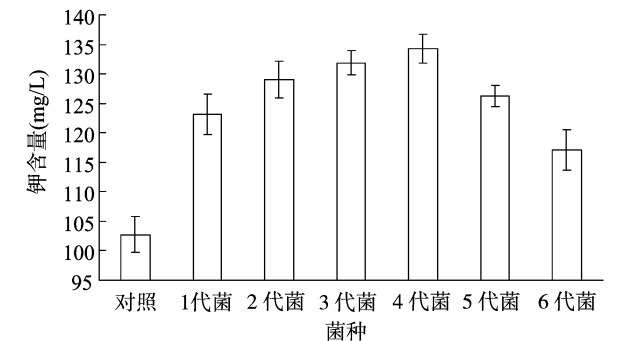


图5 各代木霉菌对秸秆钾含量的影响

孙传伯,曹佩佩,杨有兰,等. 乳酸球菌 RL-68 生产菌株工业培养基优化工艺研究[J]. 江苏农业科学,2014,42(7):285-287.

乳酸球菌 RL-68 生产菌株工业培养基优化工艺研究

孙传伯,曹佩佩,杨有兰,黄 莉

(皖西学院生物与制药工程学院,安徽六安 237012)

摘要:将工业生产产生的副产品饼干渣加入发酵培养基中,通过单因素和正交试验对乳酸球菌 RL-68 生产菌株工业培养基进行优化,确定发酵优化条件为:饼干渣 105 g/L、番茄汁 3%、最适碳氮比 7,在培养温度 35 ℃、发酵初始 pH 值 6.5~6.8 条件下培养,这时乳酸球菌 RL-68 活菌数最高,可达 7.32×10^9 CFU/mL。

关键词:乳酸球菌;工业培养基;优化;配方;发酵工艺;正交试验

中图分类号: TQ920.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)07-0285-03

乳酸菌是指发酵糖类主要产物为乳酸的一类无芽孢、革兰氏染色阳性细菌的总称,凡是能从葡萄糖或乳糖的发酵过程中产生乳酸的细菌统称为乳酸菌^[1-5]。乳酸菌是一群相当庞杂的细菌,目前至少可分为 18 个属,共有 200 多种,除极少数外,绝大部分都是人体内必不可少且具有重要生理功能的菌群,广泛存在于人体的肠道中。目前,已被国内外生物学家所证实,肠内乳酸菌与健康长寿有着非常密切的直接关系。乳酸球菌是乳酸菌的一种,是工业上尤其是食品工业上的常用菌种,存在于乳制品、发酵植物食品(如泡菜、酸菜)、青贮饲料及人的肠道尤其是乳儿肠道中,具有发酵温度高、产酸率

相对较高、对糖利用率高、发酵时不需通氧气等优点,在工业生产上具有非常广阔的应用前景。目前,世界上对于生产乳酸球菌的培养基有很多研究,但使用的多是实验室试剂,成本较大。本试验运用工业生产产生的副产品饼干渣和玉米浆来代替生产乳酸球菌的碳源和氮源,探索简单、低成本、高产量的适用于实际工业生产的发酵培养基^[6]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌种与材料 乳酸球菌 RL-68,由皖西学院生物质炼制技术工程研究中心提供;饼干渣,由桐城双武食品厂提供;番茄、香蕉、白菜、橘子、苹果,均购自安徽省六安市南门菜市场。

1.1.2 主要仪器 722 分光光度计,上海精密科学仪器有限公司生产;250B 恒温培养箱,江苏金坛精达仪器制造厂生产;PHS-3C pH 计,上海仪电科学仪器有限公司生产;SW-CJ-1D

收稿日期:2013-10-14

基金项目:国家级大学生创新创业计划(编号:201210376003、201310376006);皖西学院研究性学习项目(编号:wxyx2013062、wxyx2013074);安徽省高校自然科学基金(编号:KJ2011B216)。

作者简介:孙传伯(1978—),男,安徽桐城人,硕士,讲师,研究方向为生物质能工程。E-mail:scb19781979@126.com。

1~4 代菌发酵液中的钾含量逐渐上升,而 5、6 代菌钾含量比 4 代菌有所下降。说明 4 代菌发酵液中的钾含量最高,达到 134.26 mg/L。

3 结论与讨论

本试验采用木霉菌降解秸秆,秸秆在发酵 7 d 之后,量均有减少,说明木霉菌能有效降解秸秆。其中,3、4 代菌的降解率较高,比对照高 6.99%,通过一代一代的从发酵液中提取木霉菌,提高了秸秆降解能力,但也不是次数越多越好,当提取到第 5 代时,秸秆降解率略有下降,到第 6 代时下降更明显。从本试验结果可知木霉菌提取一定次数后,其降解能力会下降,这与杨小丽的试验结果^[6]类似,通过对菌种一直继代培养,淘汰培养过程中降解能力下降的菌株,选择降解能力强的菌株。卢松通过研究微生物对玉米秸秆的腐解,得出秸秆的发酵过程是有机质不断分解的过程的结论^[7],与本研究结果一致,即有机质含量变化与秸秆降解率变化基本一致。

通过具体分析各代菌发酵液中氮、磷、钾含量的变化趋势可以得出,整体养分含量通过对木霉菌的多次提取有所提高,提高的趋势虽不同,但是当提取到第 4 代时各养分含量都达到最大值,分别为 89.95、49.29、134.26 mg/L。与对照相比,

养分含量分别提高了 31.75、12.26、31.53 mg/L,但是当继续提取下去时,各养分含量均略有下降,与秸秆降解率的变化趋势相同。本研究结合各养分含量与秸秆降解率的变化趋势得出,4 代菌的降解率最高,且其各养分含量均达到最高。

参考文献:

- [1]曹玉凤,李 英,刘荣昌,等. 生物技术在处理农作物秸秆饲料中的应用[J]. 饲料研究,1999,22(1):27-28.
- [2]杨雪霞,陈洪章,李佐虎. 玉米秸秆氨化汽爆处理及其固态发酵[J]. 过程工程学报,2001,1(1):86-89.
- [3]王淑军,扬从发,陈 静. 用于降解秸秆的纤维素酶产生菌的筛选研究[J]. 粮食与饲料工业,2001(12):21-23.
- [4]姚 强,黄 琰,陈冠军. 哈茨木霉 SDU3.87 耐碱性纤维素酶液体发酵条件的研究[J]. 山东大学学报:理学版,2005,40(3):110-115.
- [5]史 央,戴传超,吴耀春,等. 植物内生真菌强化还田秸秆降解的研究[J]. 环境科学学报,2004,24(1):144-149.
- [6]杨小丽. 秸秆降解菌的选育及复配研究[D]. 郑州:郑州大学,2009.
- [7]卢 松. 微生物处理玉米秸秆的腐解特征研究[D]. 重庆:西南大学,2010.