

姜立春,赵丽萍,王 婷,等. 木质素降解菌 BPO1 的筛选、鉴定及其产酶特性[J]. 江苏农业科学,2018,46(9):241-246.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.09.058

木质素降解菌 BPO1 的筛选、鉴定及其产酶特性

姜立春,赵丽萍,杨 萍,王 婷,李小芳,朱 静,阮期平

(绵阳师范学院分子生物学与生物制药重点实验室,四川绵阳 621000)

摘要:以长有子实体的腐木和长期堆积的竹枝为材料,从中分离并筛选出 1 株能有效降解木质素的菌株,命名为 BPO1。通过形态观察、生理生化及 16S rDNA 序列分析对菌株进行鉴定,结果显示,菌株 BPO1 在系统发育树上与类芽孢杆菌 B538 (*Paenibacillus xinjiangensis*) 聚集在同一个分支中,属于类芽孢杆菌属。产酶特性结果表明,菌株 BPO1 在碳源(葡萄糖)15 g/L、氮源(酵母粉)6 g/L、温度为 37 ℃、pH 值 7.0、装液量 100 mL/250 mL 条件下培养 72 h,其产过氧化物酶(Lip)活性达到最高,为 6.47 U/mL。本结果将为深入研究木质素的生物降解及其开发利用提供参考依据。

关键词:木质素;产酶特性;降解菌 BPO1;16S rDNA;筛选;鉴定;系统发育树

中图分类号:S182 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)09-0241-05

木质素(lignin)是一种广泛存在于植物体中的、无定形的、分子结构中含有氧代苯丙醇或其衍生物结构单元的芳香性高聚物,是由松柏醇、香豆素、芥子醇 3 种醇单体通过羟基或甲氧基取代的苯丙烷单体经无序聚合而成的三维复杂结构^[1]。木质素主要填充于纤维素构架中,以增强植物体的机械强度,避免生物侵害和水的侵蚀,具有抗菌、抗氧化、抗吸收紫外线和阻燃等功能,同时具有较高的稳定性,因而自然降解速率缓慢。在木本植物中,木质素含量仅次于纤维素,是世界上第 2 位最丰富的有机物。

我国是秸秆资源最丰富的国家之一。据报道,我国农作物秸秆年产量为 6 亿~7 亿 t,约占世界总产量的 1/3。木质纤维素是农作物秸秆的主要成分,也是地球上数量最大的可再生能源物质。植物体内木质素将纤维素紧紧包围,一般的微生物很难进入,因此很难分解纤维素,进而导致秸秆资源开发利用困难^[2]。数据表明,造纸工业每年要从植物中分离出约 1.4 亿 t 纤维素,同时得到 5 000 万 t 左右的木质素副产品,但超过 95% 的木质素以“黑液”直接排入江河或浓缩直接烧掉,不符合建设节约型经济体系的思路。木质素的科学利用决定木质素经济效益的可持续发展。现今,环境污染和资源匮乏等问题不断深化,天然高分子所具有的可再生、可降解等性质也日益受到重视。因此,木质素的高效降解成为国内外的研究热点。

国内外已有的降解方法包括物理降解、化学降解、物理-化学降解、物理-生物降解、物理-化学-生物降解以及生物

降解^[3]。其中,生物降解法使用最多且效果最明显。降解木质素的微生物主要是真菌、细菌和放线菌,其中真菌占主导作用^[4-5]。木质素降解酶的研究主要集中在白腐菌酶系,最为重要的酶有 3 种,即木质素过氧化物酶(lignin peroxidases, Lip)、锰依赖过氧化物酶(manganese peroxidases, Mnp)和漆酶(laccase)^[6]。目前,白腐真菌是唯一已知的在纯培养条件下可将木质素彻底分解的微生物,它能分泌胞外氧化酶来降解木质素,其降解木质素的能力优于分解纤维素的能力,被认为是迄今最有价值的木质素降解微生物。其类属中的虫拟蜡菌(*Ceriporiopsis subvermispora*)^[7]、产芽孢木质素降解菌 MN-8^[8]、高温木质素降解菌(*Geobacillus caldioxysilyticus* J16)^[9]和绿色木霉 Bax^[10]等菌对木质素的降解具有较强的选择性。国内外已有许多关于白腐菌筛选及其降解木质素的研究,但因筛选方法具有局限性,造成优良菌株漏筛甚至错筛,不利于寻找新的木质素高效降解菌株^[10]。且在研究过程中大多数白腐菌在降解木质素时选择性较差,所以分离筛选优良木质素降解菌及其优化发酵条件提高酶活性具有重要的现实意义。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源 校园周边竹林地表土壤、地表下 5 cm 土壤及长有子实体的腐木。

1.1.2 培养基 初筛培养基:K₂HPO₄ 0.5 g、KH₂PO₄ 0.5 g、NaCl 0.2 g、NH₄NO₃ 1.0 g、MgSO₄ 0.2 g、CaCl₂ 0.2 g、FeSO₄·7H₂O 0.01 g、MnSO₄·H₂O 微量、竹粉 10 g(鲜竹磨粉,过 40 目筛,65 ℃烘 16 h)、琼脂粉 20 g,加蒸馏水定溶至 1 L,121 ℃高压灭菌 20 min,倒平板,备用。

复筛培养基 1:马铃薯 200 g、酵母粉 15~20 g、蛋白胨 5 g、葡萄糖 10 g、氯化钠 5 g、愈创木酚 0.2 mL,蒸馏水定容到 1 L,pH 值为 7.0,琼脂粉 20 g,121 ℃高压灭菌 20 min,倒平板,备用。

复筛培养基 2:马铃薯 200 g、酵母粉 15~20 g、蛋白胨 5 g、葡萄糖 10 g、氯化钠 5 g、苯胺兰 0.1 g,蒸馏水定容到 1 L,

收稿日期:2016-12-06

基金项目:四川省科技项目(编号:2016JY0038);四川省绵阳市科技局项目(编号:17YFNY007);川西北生态农牧业研究中心项目(编号:075019);绵阳师范学院校级项目(编号:PY-2016-A03);四川省大学生创新创业训练项目(编号:201610639034)。

作者简介:姜立春(1977—),男,吉林梨树人,博士,副教授,主要从事微生物学与分子生物学研究。E-mail:jiang_lichun@126.com。

通信作者:阮期平,博士,教授,主要从事微生物学与生化药学研究。E-mail:qpruan20141230@163.com。

pH 值为 7.0, 琼脂粉 20 g, 121 °C 高压灭菌 20 min, 倒平板, 备用。

产酶发酵培养基: K_2HPO_4 2 g、 $(NH_4)_2SO_4$ 2 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 g、木质素 10 g, pH 值 6.0, 蒸馏水定容到 1 L。

1.2 试验方法

1.2.1 初筛 将采集的样品各称取 1 g 于 10 mL 生理盐水中洗涤, 取洗涤液, 共得到 5 种待用样品。将上述 1~5 菌液分别进行梯度稀释 10^{-3} ~ 10^{-6} 并涂布于初筛培养基上, 每个平板涂布 100 μ L。将上述得到的菌落挑于复合营养初筛培养基中, 30 °C 恒温培养箱培养, 逐次分离直到得到单菌落, 将分离纯化出的菌株保存、备用。

1.2.2 复筛 将初筛得到的单菌落, 用灭过菌的牙签挑取, 并分别接种于上述复筛培养基 1 平板中和复筛培养基 2 平板中, 根据培养基产生的现象筛选出菌株。

1.2.3 酶活性的测定

1.2.3.1 木质素过氧化物酶活性测定 选用藜芦醇作为底物, 反应体系如下: 125 mmol/L 酒石酸钠缓冲液 (pH 值为 3.0) 3.2 mL, 10 mmol/L 藜芦醇 0.1 mL, 酶液 0.6 mL, 加入 10 mmol/L H_2O_2 溶液 0.1 mL 启动反应, 测反应最初 3 min 内 310 nm 处 D 值的变化。以煮沸灭活 15 min 酶液反应混合液作对照。酶活性定义为 1 min 使得反应液吸光值变化 0.1 的酶量为 1 个酶活性单位 (U)^[11]。

1.2.3.2 锰过氧化物酶活性测定 50 mmol/L 乳酸钠缓冲液 (pH 值为 4.5) 3.4 mL, 1.6 mmol/L $MnSO_4$ 溶液 0.1 mL, 0.4 mL 的培养基滤出液, 预热至 32 °C 加入 1.6 mmol/L H_2O_2 溶液 0.1 mL 启动反应, 测反应最初 3 min 内 240 nm 处吸光度变化。酶活性定义为 1 min 内 1 mL 培养基滤液增加 0.1 个 D 值为 1 个酶活性单位^[12]。

1.2.3.3 漆酶的酶活测定 取 1.5 mL 浓度为 50 mmol/L 的乙酸 - 乙酸钠缓冲液 (pH 值为 4.5), 1 mL 浓度为 0.4 mmol/L 的愈创木酚和 1 mL 粗酶液, 放在 25 mL 试管中振荡混匀, 预热至 32 °C 反应 5 min, 反应结束 100 °C 煮沸灭活 5 min, 立即冷却, 然后加蒸馏水至 20 mL, 混匀, 测定 470 nm 下 10 min 内 ΔD , 470 nm 消光系数 $\epsilon = 49\ 600$ mol/(L · cm)。酶活性定义 1 L 反应液 1 min 使 $\Delta D_{470\text{nm}}$ 值改变 0.1 为 1 U^[13]。

1.2.4 菌株鉴定

1.2.4.1 形态观察 菌株在高氏一号培固体培养基上 28 °C 培养 36 h 后进行菌落形态观察, 放于 4 °C 冰箱中保存。挑取单一菌落进行革兰氏染色, 显微镜下观察其菌体形态结构。

1.2.4.2 生理生化鉴定 参照文献[14]中的方法对菌株 BP01 进行生理生化试验检测。依据《常见细菌系统鉴定手册》, 对分离到的菌株 BP01 进行初步鉴定^[15]。

1.2.4.3 基因组提取和 16S rRNA 基因扩增 参考 Rainey 等的方法^[16]提取细菌总 DNA, 略有修改, 用 1.0% 琼脂糖电泳检测。

PCR 反应体系: 16.25 μ L、dd H_2O 、2.5 μ L 10 × PCR buffer、2 μ L dNTPs (各 2.5 mmol/L)、1.0 μ L F27 正向引物 (5' - AG AGTTTGATCCTGGCTCAG - 3') (10 μ mol/L)、1.0 μ L R1492 反向引物 (5' - GGTTACCTTGTTACGACTT - 3') (10 μ mol/L)、2 μ L 模板、0.25 μ L *Taq*DNA 聚合酶

(5 μ g/ μ L), 反应总体积为 20 μ L。扩增循环体系: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 40 s, 58 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 80 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增产物经电泳检测后, 其产物回收纯化后与 pMD - 19T 载体连接, 转入感受态细胞 DH5 α , 筛选阳性重组子, 邮寄至上海英俊生物技术公司测序, 核酸序列用于构建系统发育树。

1.2.4.4 16S rRNA 序列分析与构建系统发育树 通过测序获得的 16S rRNA 序列用 NCBI 中 BLAST 搜索与 GenBank 数据库进行相似性分析, 从而获得相应菌株 16S rRNA 序列, 在 Clustal X (1.8) 程序包中进行多重序列比对排列分析。利用 MEGA 6.0 软件中的 Neighbor - Joining 法构建系统发育树^[17]。

1.2.5 菌株产酶条件的优化

1.2.5.1 时间 将待优化菌种接入液体产酶培养基中, 接种量为 5%。置于 32 °C、160 r/min 摇床上进行培养, 观察并记录其生长状况, 待菌液培养至其菌丝一定量时, 开始测定木质素降解酶系中的 Lip 活性, 并每过 12 h 测定记录 1 次, 测定 5~7 d。作出 Lip 活性随培养时间变化的变化曲线, 找出 Lip 最佳产酶活时间, 并综合确定优化的最佳培养时间。

1.2.5.2 碳源及浓度 分别以葡萄糖、麦麸、蔗糖、马铃薯浸出液、可溶性淀粉和玉米粉作为液体产酶培养基中的唯一碳源, 碳源的质量浓度为 20 mg/mL, 于 32 °C、160 r/min 下摇床培养上述已经确定的最佳培养时间, 后进行 Lip 活性的测定, 综合比较选择酶活性较大的碳源。将已经选出的最佳碳源分别设置浓度为 5、10、15、20、30、40 mg/mL, 于上述条件下进行摇床培养, 测定最佳培养时间的 Lip 活性, 综合比较选出最佳碳源的最适酶活性浓度。

1.2.5.3 氮源及浓度 分别以牛肉膏、蛋白胨、硫酸铵、硝酸铵、酵母粉和尿素作为液体产酶培养基中的唯一氮源, 氮源的质量浓度为 1 g/L, 于 32 °C、160 r/min 下摇床培养上述已经确定的最佳培养时间, 后进行 Lip 活性的测定。其中培养基碳源选择笔者已经确定的最佳碳源及其浓度, 综合比较选择酶活性较大的氮源。将已经选出的最佳氮源分别设置浓度为 0.5、1、2、4、6、8 g/L, 于上述条件下进行摇床培养, 测定最佳培养时间的 Lip 酶活性, 综合比较选出最佳氮源的最适酶活性浓度。

1.2.5.4 不同 pH 值对产酶条件的影响 分别设定 pH 值为 5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5, 将菌株于 160 r/min 的摇床上进行培养。碳源、氮源分别选择已优化出的最佳碳源、氮源及其相应的浓度, 于确定的最佳培养时间进行 Lip 活性的测定, 综合比较选择酶活性最高时的 pH 值。

1.2.5.5 温度 分别设定温度为 20、25、32、37、40、45 °C, 将菌株于 160 r/min 的摇床上进行培养。碳源、氮源和 pH 值分别选择已优化的最佳碳源、氮源及其相应的浓度和 pH 值, 于确定的最佳培养时间进行 Lip 活性的测定, 综合比较选择酶活性最高时的温度。

1.2.5.6 不同装液量对产酶条件的影响 于 250 mL 的三角瓶中分别装液 30、50、80、100、120 mL 液体产酶培养基, 置于最佳温度 160 r/min 下进行摇床培养。其中, 碳源、氮源、温度、pH 值分别选择已优化的最佳碳源、氮源、温度和 pH 值, 并于确定的最佳培养时间进行 Lip 活性的测定, 综合比较选

择酶活性最高时的装液量。

1.2.5.7 综合最佳条件进行培养测定 在确定的最佳碳源和氮源及其最佳浓度、温度、pH 值、装液量下,将菌恒温 160 r/min 下摇床培养相应时间后测定 Lip 活性,与上各单因素测定酶活性比较在综合条件下其酶活性是否有大的改进,从而可以了解菌产酶条件的优化情况。

2 结果与分析

2.1 筛选结果

2.1.1 初筛 通过平板稀释法初步筛选出有木质素降解作用的菌株 18 株进行复筛,其中苯胺蓝脱色圈直径 ≥ 30 mm

的 2 株,脱色圈直径在 20~30 mm 的 3 株,其余 13 株菌脱色圈相对较小,可能降解作用较低,其中 BP01 的降解能力最强,其脱色圈直径为 35.0 mm,且愈创木酚苯胺蓝脱色圈直径也达到了 20 mm(表 1)。因此,选 BP01 进行形态观察、生理生化试验与 16S rDNA 的序列测定来确定该菌株的分类地位。

2.1.2 复筛 通过对初筛得到的 18 株菌进行木质素过氧化物酶活性测定,其中菌株 BP01 木质素过氧化物酶与锰过氧化物酶活性为 266.33、58.12 U/L,为 18 株菌中最高的;漆酶活性相对较低(表 2)。因此,随后的木质素的降解条件优化以木质素过氧化物酶作为指标。

表 1 木质素降解菌初筛结果

菌株编号	脱色圈直径(mm)		菌株编号	脱色圈直径(mm)		菌株编号	脱色圈直径(mm)	
	苯胺蓝	愈创木酚		苯胺蓝	愈创木酚		苯胺蓝	愈创木酚
BP01	35.0	20.0	BP07	9.6	3.2	XM01	31.0	15.3
BP02	12.6	8.1	BP08	7.6	4.2	XM02	9.8	8.6
BP03	15.8	10.2	BP09	4.3	6.2	XM03	12.9	10.1
BP04	21.5	15.2	BP10	3.2	5.3	XM04	22.2	14.3
BP05	26.8	18.6	BP11	10.5	6.2	XM05	8.6	6.5
BP06	11.2	5.3	BP12	18.5	11.2	XM06	5.3	8.3

表 2 18 株菌木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶和漆酶活性

菌株	酶活性(U/L)			菌株	酶活性(U/L)			菌株	酶活性(U/L)		
	木质素过氧化物酶	锰过氧化物酶	漆酶		木质素过氧化物酶	锰过氧化物酶	漆酶		木质素过氧化物酶	锰过氧化物酶	漆酶
BP01	266.33	58.12	11.23	BP07	138.23	14.23	7.56	XM01	178.60	49.23	21.23
BP02	130.36	26.32	12.31	BP08	80.29	21.32	8.56	XM02	139.19	10.28	16.24
BP03	140.31	12.36	25.34	BP09	51.25	4.25	12.59	XM03	149.52	15.09	8.47
BP04	173.65	28.16	12.15	BP10	30.68	3.26	8.65	XM04	176.32	48.12	11.02
BP05	188.95	36.32	28.56	BP11	90.12	5.36	15.31	XM05	76.21	8.21	11.14
BP06	115.15	12.25	19.63	BP12	142.50	10.23	18.69	XM06	70.36	6.26	7.28

2.2 鉴定结果

2.2.1 形态观察 菌株在含有木质素的营养琼脂固体平板上生长,出现了透明圈,无可溶性色素。有臭味,乳白色,湿润,菌落大而扁平,边缘不整齐呈锯齿状,表面粗糙,半透明,正反面颜色相同,生长快,易挑起,不产生色素。通过形态观察,初步判定为细菌。经革兰氏染色后发现,细胞呈杆状,革兰氏染色为紫色,呈阳性。

2.2.2 生理生化反应 该菌株能分解葡萄糖,产酸但不产气,V.P 试验为阳性反应,甲基红试验为阴性,吡啶试验阳性反应,有吡啶生成,淀粉水解呈阳性,过氧化氢酶检测呈阳性,有气泡生成,不能利用明胶,硝酸盐还原试验呈阳性,不产硫化氢。根据 BP01 菌株的形态特征和生理生化特征鉴定的结果,对照《伯杰氏细菌鉴定手册》,初步得出菌株 BP01 与类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*) 细菌很相近。

2.2.3 菌株 BP01 序列测定 测序后得到菌株 BP01 序列长度为 1 516 bp,其序列如下:

ACGGTACCTTGTTACGACTTCACCCCAATCATCTACCCACCTTCGACGGCTGGCTCCTTTCGGTTACCCACCGGCTTCGGTGTTGTAAACTCTCGTGGTGTGACGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCGCATGCTGATCCGCGATTAC TAGCAATTCCGACTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAAT

CCGAACTGAGACCCGACTTTGTTGGGATTGGCTCCACCTCGCGGTTTCGCGACCCGTTGTATCGGCCATTGTAGTACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACTTCTCCTCCGTTTGTACCCGGCAGTCATCCTAGAGTGCCACCAAAGTGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCCTTGC GGGACTTAACCAACATCTCAGGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCTCCTCTGTCCCGAAGGAAAGTCCTATCTCTAGGACGGTCAGAGGGATGTCAAGACCTGGTAAGTTCTTCGCGTTGCTTCAATTAACCACATACTCCACTGCTTGTGCGGTCGCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTTCGACCCGTA CTCCCCAGGCGGAATGCTTAATGTGTTAACTTCGGCACCAAGGGTATCGAAACCCCTAACACCTAGCATTATCGTTTACGGCGTGGAATTCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCACGCTTTCCGCGCTCAGCGTCAGTTACAGCCCAGAAAGTCGCCTTCGCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTTCACCGCTACACGTGGAATTCACCTTCTCTTCTGTACTCAAGCTTTGCAGTTTCCATTGCGACTCGAAGTTGAGCTCCGAGTTTAAACAACAGACTTACAAGGCCGCTGCGCGGCTTTACGCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCTTACCTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGGGCTTTCTTCTCAGGTACCGTCACCTATGAGCAGTTACTCTCCATAGCGTTCTTCCCTGGCAACAGAGCT

TTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCG
 TCAGACTTTCCTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTC
 CCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCACTCCAGTGTGGCCGA
 TCACCCTCTCAGGTCCGCTATGCATCGTCCGCTTGGTGAGCC
 GTTACCCACCAACTAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCATA
 AGTGGCAGATTGCTCCGCCTTTCCCAACTCGGCCATGCGACC
 AAATTGCGTATCCGGTATTAGCATCCGTTTCCGAATGTTATC
 CCAGTCTTATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCC
 GCCGTAACCACGCGTTTCCCGAAGGAAACGCTAGGTCCGC
 TCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTCTGA
 GCCATGATCAAACCTCT

2.2.4 16S rDNA 系统发育树的构建 测序获得的菌株 BP01 的 16S rDNA 序列,将测得的序列与数据库中已注册的

16S rDNA 序列用 BLAST 搜索进行序列相似性比较分析。将 Genbank 中与菌株 BP01 相似性较高的 12 个菌株进行系统发育树的构建(图 1),供试菌株的 16S rDNA 序列与芽孢杆菌属的标准菌株同源相似度大部分在 97% 以上。通常当 2 个细菌的 16S rDNA 的相似性大于 95% 时,可将其归为同一属^[18],而同源性大于 96% 的序列均来自类芽孢杆菌属,初步将此菌株归为类芽孢杆菌属。同时 BP01 在系统发育树上与类芽孢杆菌(*Paenibacillus xinjiangensis* strain B538) B538(登录号为 NR_043221)聚集在同一个分支中,且 16S rDNA 序列的同源性最为 99%。结合其形态特征及生理生化特性与类芽孢杆菌属较为一致,因此菌株 BP01 为类芽孢杆菌属,命名为 *Paenibacillus* sp. BP01。

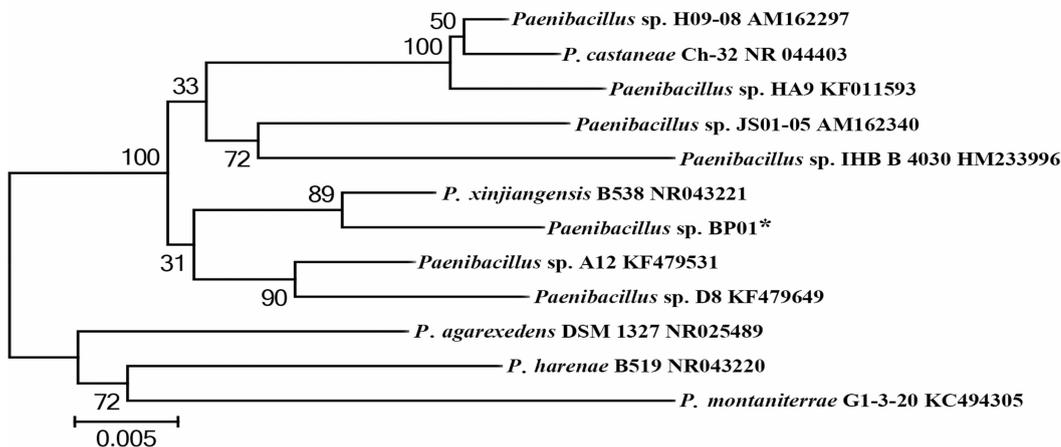


图1 基于 16S rDNA 序列建立 PB-01 和相关菌的系统发育树

2.3 产酶优化结果

2.3.1 BP01 培养时间 将 BP01 接入产酶发酵培养基中(接种量为 2%),置于 32 ℃、160 r/min 摇床上进行培养,观察并记录其生长状况,每 12 h 测定记录 1 次,共 5 d。结果发现,BP01 的酶活性在 0~72 h 逐渐增大,在 72 h 时达到最大,当培养时间超过 72 h 其酶活性随着时间的增大而减小(图 2)。因此,确定培养时间确定为 72 h。

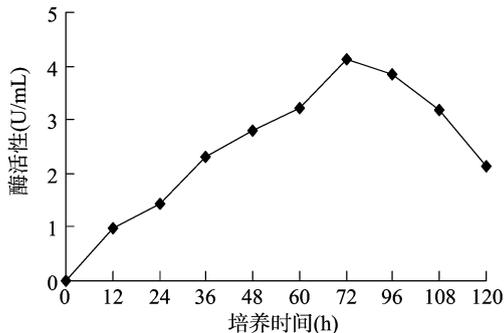


图2 培养时间对酶活的影响

2.3.2 BP01 最佳碳源的确定 以葡萄糖、麦麸、蔗糖、马铃薯浸出液、可溶性淀粉(质量浓度为 2 g/100 mL)作为唯一碳源,将 BP01 接种后的三角瓶于 32 ℃、160 r/min 摇床上培养 2 d,对酶活性进行测定。结果发现,BP01 是在葡萄糖作为唯一碳源条件下培养,具有最大的酶活性(4.21 U/mL,图 3)。因此,葡萄糖为 BP01 产酶最佳碳源。

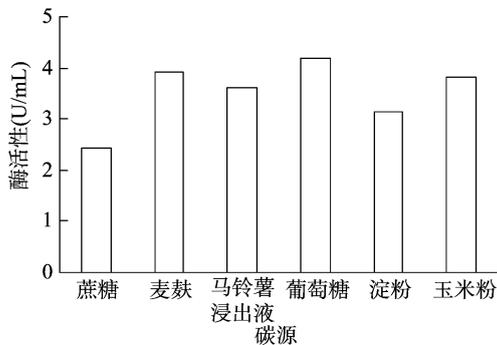


图3 碳源对产酶的影响

将最佳碳源葡萄糖分别设置浓度为 10、15、20、30、40 mg/mL 于上述条件下进行摇床培养,测定培养 2 d 后的 Lip 活性。结果发现,当葡萄糖的浓度为 15 mg/mL 时,其酶活性达到最大,为 4.49 U/mL(图 4)。因此,选择 15 mg/mL 作为最佳碳源葡萄糖的最适浓度。

2.3.3 BP01 最佳氮源的选择 以牛肉膏、蛋白胨、硫酸铵、硝酸铵、酵母粉、尿素作为产酶发酵培养基中的唯一氮源,氮源的质量浓度为 1 g/L;碳源选择 15 g/L 葡萄糖将接种 BP01 的三角烧瓶于 32 ℃、160 r/min 下摇床培养 2 d,对 Lip 活性进行测定。结果发现,BP01 在酵母粉为氮源的条件培养,酶活性最大时为 4.32 U/mL(图 5)。因此,将酵母粉作为产酶培养的最佳氮源。

将最佳氮源酵母粉分别设置浓度为 0.5、1、2、4、6、

8 mg/mL,于上述条件下进行摇床培养 2 d,测定 Lip 的活性。结果发现,当酵母粉浓度为 6 mg/mL 时,其酶活性最大为 5.

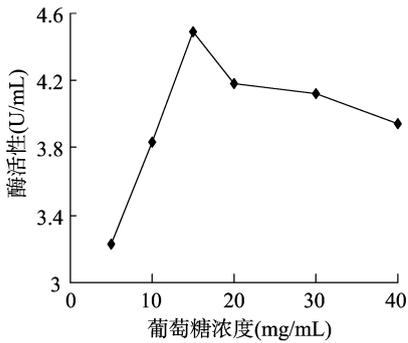


图4 不同浓度的葡萄糖对产酶的影响

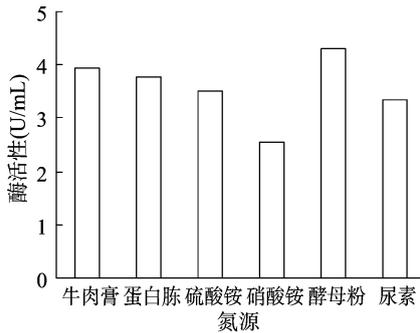


图5 不同氮源对产酶的影响

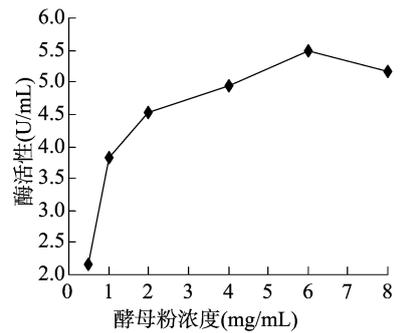


图6 不同浓度酵母粉对产酶的影响

2.3.4 BP01 pH 值的选择 将产酶发酵培养基的 pH 值分别调至 5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5,加入 15 g/L 葡萄糖、6 g/L 酵母粉,将 BP01 接种后的三角瓶于 32 ℃、160 r/min 下摇床培养 2 d,培养基相应成分及浓度使用前面已经优化出来的结果,测定 Lip 活性。结果发现,当 pH 值 = 7 时 BP01 的酶活性最大,为 4.93 U/mL(图 7)。因此,选择 pH 值 = 7 作为产酶最佳的 pH 值,过酸过碱对产酶都有一定的影响。

2.3.5 BP01 温度的选择 将恒温摇床的温度分别设置为 28、32、37、40、45 ℃,加入 15 g/L 葡萄糖、6 g/L 酵母粉,培养基的 pH 值调至为 7,将 BP01 接种后的三角瓶于 160 r/min 下

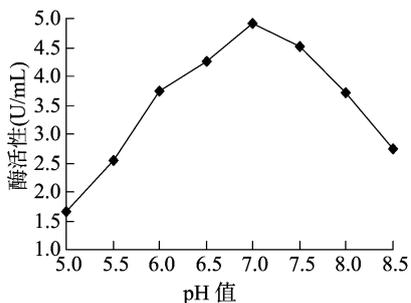


图7 pH 值对产酶的影响

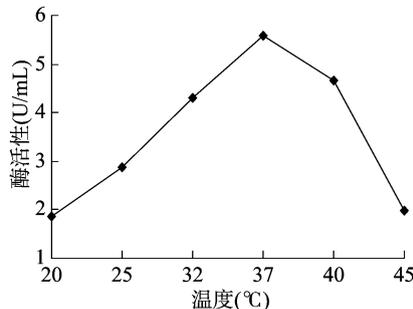


图8 温度对产酶的影响

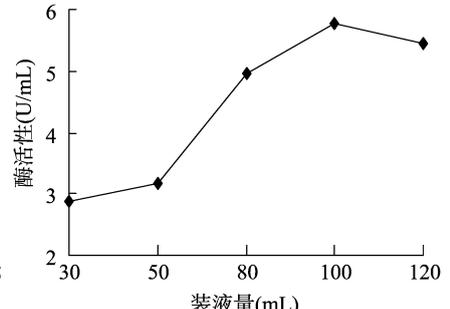


图9 装液量对产酶的影响

2.3.7 BP01 综合最佳条件培养 综合前面的优化结果,即在 15 g/L 葡萄糖、6 g/L 酵母粉、pH 值 = 7、37 ℃ 和装液量为 100 mL 的条件下,将接种 BP01 后的三角瓶置于 160 r/min 摇床上进行摇床培养 3 d,取部分 6 000 r/min 离心 10 min 得到取上清液为粗酶液。测定 Mnp 活性达到了 6.47 U/mL,对于所测的这个酶活性虽然不是在整个试验过程中酶活性最高的数据,但是对于试验之初还是较大的提高,起到了一定的优化作用。

3 结论

从腐木上的子实体筛选出菌株能选择性降解木质素的菌株 BP01,通过生理生化鉴定试验及 16S rDNA 序列分析对菌株进行鉴定试验确定菌株 BP01 为类芽孢杆菌属。在 BP01 产酶特性研究中,对其产酶条件进行研究及条件优化,经测定,菌株 BP01 在碳源(葡萄糖)15 g/L、氮源(酵母粉)6 g/L、温度为 37 ℃、pH 值 = 7.0、装液量 100 mL 的条件下培养 72 h,其产过氧化物酶(Lip)活性达到最高,为 6.47 U/mL。这将为深入研究木质素的生物降解及其开发利用提供试验

依据。48 U/mL(图 6)。因此选择 6 mg/mL 作为最佳氮源酵母粉的最佳浓度。

摇床培养 2 d,测定 Lip 活性。结果发现,当温度为 37 ℃ 时,其酶活性最大,为 5.57 U/mL(图 8)。因此,选择 37 ℃ 作为最佳的产酶温度。

2.3.6 BP01 装液量选择 于 250 mL 的三角瓶中分别装 40、60、80、120 mL 液体产酶培养基,加入 15 g/L 葡萄糖、6 g/L 酵母粉,pH 值调至 7,将 BP01 接种后的三角瓶置于 37 ℃、160 r/min 下进行摇床培养 2 d,测定 Lip 活性。结果发现,当装液量为 100 mL 时,其酶活性最大(图 9)。因此,选择 100 mL 作为产酶的最佳装液量。

依据。

参考文献:

- [1] 宋晓雪. 嗜碱木质素降解菌株筛选鉴定与生长条件优化[D]. 大连:大连理工大学,2013:1-10.
- [2] 石倩. 农作物秸秆木质素降解研究现状[J]. 农业科技与装备,2013(3):73-74.
- [3] 李轶,刘雨秋,谷士艳,等. 玉米秸秆纤维降解的预处理工艺条件筛选[J]. 沈阳农业大学学报,2013,44(1):99-103.
- [4] 王敏. 白腐菌降解木质素研究进展[J]. 衡水学院学报,2011,13(1):51-53.
- [5] 胡雪竹. 木质素降解酶的研究进展[J]. 安徽农业科学,2011,39(11):6326-6328,6363.
- [6] 张宇,许敬亮,李东,等. 木质素降解菌 *Ceriporiopsis subvermispora* 的研究进展[J]. 武汉理工大学学报,2009(10):104-108.
- [7] 李红亚,李术娜,王树香,等. 产芽孢木质素降解菌 MN-8 的筛选及其对木质素的降解[J]. 中国农业科学,2014,47(2):324-333.

韦至激,方泽涛,李伏生,等. 不同灌溉模式和施氮量下稻田 N_2O 排放与有机氮组分的关系[J]. 江苏农业科学,2018,46(9):246-251.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.09.059

不同灌溉模式和施氮量下稻田 N_2O 排放与有机氮组分的关系

韦至激¹, 方泽涛¹, 李伏生¹, 黄忠华², 谭文艳², 罗维钢²

(1. 广西大学农学院/广西喀斯特地区节水农业新技术院士工作站/广西高校作物栽培学与耕作学重点实验室,广西南宁 530005;
2. 南宁市灌溉试验站,广西南宁 530001)

摘要:为探讨不同灌溉模式和施氮水平下,稻田 N_2O 排放与有机氮组分的关系,通过2季水稻田间试验,研究了不同时期稻田 N_2O 排放通量和有机氮组分的变化。田间试验设3种灌溉模式(常规灌溉 CIR、“薄浅湿晒”灌溉 TIR、干湿交替灌溉 DIR)和2种施氮处理(N1 施氮量 120 kg/hm²、N2 施氮量 150 kg/hm²)。TIR 和 DIR 模式下,稻田 N_2O 平均排放通量较 CIR 模式提高;CIR 和 DIR 模式下,N2 处理稻田整个生育期 N_2O 平均排放通量高于 N1 处理。DIR 模式土壤酸解氨态氮和氨基糖态氮含量均大于 CIR 模式,而土壤氨基酸态氮含量小于 CIR 模式;N2 处理土壤酸解氨态氮和氨基糖态氮含量较 N1 处理显著增加。稻田 N_2O 排放通量与氨基糖态氮和酸解氨态氮含量之间呈显著正相关,与氨基酸态氮含量呈显著负相关。干湿交替灌溉和增施氮肥提高稻田 N_2O 排放通量、土壤酸解氨态氮和氨基糖态氮含量。此外,稻田 N_2O 排放通量受到氨基糖态氮、酸解氨态氮和氨基酸态氮含量的综合影响。

关键词:“薄浅湿晒”灌溉;干湿交替灌溉;有机氮组分; N_2O 排放

中图分类号: S274.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)09-0246-06

稻田生态系统是大气中氧化亚氮(N_2O)的重要来源之一,土壤 N_2O 排放与水肥管理有较大关系^[1-2]。灌溉方式不同,土壤 N_2O 排放不同,长期淹水降低土壤 N_2O 的排放^[3],间歇灌溉早晚稻田 N_2O 排放通量高于淹灌稻田,其稻田 N_2O 累积排放量也显著高于淹灌稻田^[4];控制灌溉稻田 N_2O 排放通量在水稻全生育期大部分时间都要大于淹灌稻田^[5]。“薄浅湿晒”和

常规灌溉稻田 N_2O 排放通量一般低于干湿交替稻田^[6-7]。不同施氮量对土壤 N_2O 排放通量的影响结论基本一致。稻田 N_2O 排放量随氮肥用量的增加呈增加趋势^[8];就水稻生长全季而言,高施氮量下,稻田 N_2O 排放总量显著增加^[9]。

土壤中90%以上的氮是以有机态化合物存在的^[10]。按 Bremner 提出的划分方法,土壤有机氮可分为氨态氮、氨基酸氮、氨基糖氮、酸解未知氮等形态^[11]。土壤有机氮各组分含量受到土壤类型、土壤层次、耕作方式和氮肥管理等因素的影响^[12]。研究表明,施用无机肥和有机肥均能显著提高土壤酸解有机氮及非酸解氮含量^[13-14],施用尿素能提高土壤酸解氨态氮含量,降低土壤氨基酸态氮含量^[15-16],土壤中残留的化肥氮主要转化为酸解未知氮和氨基酸氮^[17]。施用氮肥对土壤铵态氮和土壤氨基糖氮含量的影响较小,而对土壤氨基酸

收稿日期:2017-08-28

基金项目:国家自然科学基金(编号:51469003)。

作者简介:韦至激(1993—),女,广西南宁人,硕士研究生,主要从事水土资源利用与环境方面的研究。E-mail:276872736@qq.com。
通信作者:李伏生,博士,教授,主要从事水土资源利用与环境方面的研究。E-mail:zhenz@gxu.edu.cn。

[8] 晋果果,翁海波,李萍萍,等. 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.

[9] 姜明国,黎海菲,陆冠颖,等. 木质素降解菌 Bax 的筛选及特性研究[J]. 生物技术通报,2011(3):200-203.

[10] 王茂成. 木质素降解真菌的筛选鉴定及相关酶活性研究[D]. 重庆:西南大学,2013:1-9.

[11] Ming T, Kirk T K. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *Methods in Enzymology*, 1988, 161(1):238-249.

[12] 谢君,任路,李维,等. 白腐菌液体培养产木质纤维素降解酶的研究[J]. 四川大学学报(自然科学版),2000,37(期缺失):161-166.

[13] 崔艳红,张海荣,孟庆辉,等. 白腐真菌产木质素降解酶的条件及酶学性质的研究[J]. 吉林农业科学,2008,33(2):43-47.

[14] 陈坚,刘和,李秀芬. 环境微生物实验技术[M]. 北京:化学工业出版社,2008:19-59.

[15] 黎满香,林荣高,薛立群,等. 湖南猪源粪肠球菌的分离鉴定及16S rDNA 系统进化分析[J]. 中国兽医学报,2011,31(9):1290-1294.

[16] Rainey F A, Wardrainey N, Kroppenstedt R M, et al. The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of *Nocardiopsaceae* fam nov [J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1996, 46(4):1088-1092.

[17] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12):2725-2729.

[18] 杨苏声. 细菌分类学[M]. 北京:中国农业出版社,1997:1-7.