

程旺开,吕丹丹.竹笋壳降解复合菌剂的筛选及降解特性[J].江苏农业科学,2018,46(12):271-274.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.12.064

竹笋壳降解复合菌剂的筛选及降解特性

程旺开¹,吕丹丹²

(1.芜湖职业技术学院,安徽芜湖 241000; 2.合肥工业大学生物与食品工程学院,安徽合肥 230009)

摘要:为加速农业废弃物竹笋壳的降解及腐殖化进程,拟从腐烂的竹笋壳中分离木质纤维素降解菌株,通过不同菌株的搭配组合构建竹笋壳降解复合微生物菌剂,并考察其降解竹笋壳的工艺条件。结果表明,在分离筛选出的 6 株微生物中,由黑曲霉 A-3、粉孢霉 A-1、芽孢杆菌 A-4 和放线菌 A-5 搭配组成的复合微生物菌剂降解竹笋壳的能力最强,其合适的降解条件为含水率 70%、温度 30℃、pH 值 2~4。扫描电镜观察结果表明,经微生物菌剂降解后的竹笋壳表面附满微生物,表面粗糙度大幅增加,有明显的裂纹,表明所筛选的复合菌剂对笋壳有一定的分解作用,可用于竹笋壳的废物处理。

关键词:竹笋壳;复合菌剂;纤维素酶;降解特性;扫描电镜

中图分类号: Q93-331; S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)12-0271-04

中国是产竹大国,竹的种类、面积、蓄积量及竹笋、竹材的产量均位居世界首位^[1],在竹笋加工过程中及竹笋成竹后都会产生大量的笋壳,未经处理堆放于野外,腐烂后会产生恶臭,严重影响周边农林植被的生长并污染城乡环境^[2-3]。

收稿日期:2017-09-26

基金项目:安徽省高校质量工程(编号:2015zy086);安徽省大学生创客实验室建设计划(编号:2016ckjh231);安徽省高校卓越人才教育培养计划(编号:2016zjzh073);芜湖职业技术学院校级质量工程项目(生物发酵名师工作室)。

作者简介:程旺开(1972—),男,安徽休宁人,硕士,副教授,主要从事现代生物发酵技术研究。Tel:(0553)5777156;E-mail:ahwhcw@163.com。

竹笋壳的主要成分为纤维素、半纤维素及木质素,约占笋壳干质量的 70%~85%。除此之外,竹笋壳还含有一定量的蛋白质、黄酮、酚酸、茶多酚等物质^[4]。目前已有从竹笋壳中提取黄酮、木聚糖等生理活性物质的报道,但同时反映了生理活性物质提取后竹笋壳的处理问题^[5-6]。

生物处理法是处理农业废弃物比较常用的方法,即利用微生物分解纤维素和半纤维素,使农业废弃物得到降解^[7]。常用的生物处理方法就是对有机物废弃物进行堆肥处理,有机物在微生物的作用下分解矿化、腐殖化,形成腐殖质,从而改良土壤,促进作物生长^[8-10]。由多种微生物构成的复合微生物菌剂能充分发挥群体联合作用优势,可以大大缩短腐熟时间、增加肥效、减少环境污染和安全隐患,被广泛应用于农

[34]陶 蓓.山东鲁北企业集团总公司 建设生态工业园区[J].WTO 经济导刊,2006(3):74-75.

[35]冯久田.鲁北绿色产业战略:资源、生态、环境与经济发展的统一[J].中国人口·资源与环境,2000,10(1):76-77.

[36]包海岩,邵 蓬,张 勤,等.北方地区盐田生态养殖技术[J].河北渔业,2012(9):13-17.

[37]胡为明.对开发海水资源并进行综合利用的初步设想——一滩多能,一水多用[J].海洋开发与管理,1992,9(4):38-40.

[38]马志珍,王素平,陈汇远,等.盐田生物资源开发利用的研究[J].海洋与海岸带开发,1992,9(3):1-8.

[39]李岩然,白 洁,李永祺,等.盐田生态系统的生物调控[J].海洋科学,1998,22(6):38-40.

[40]王晓珍,罗家豪.生态旅游的概念及实现[J].长春大学学报,2005,15(6):68-70.

[41]徐 成.论苏北沿海滩涂资源的旅游经济开发[J].特区经济,2009(12):164-165.

[42]王加连,吕士成.盐城滩涂野生动物保护与自然保护区建设[J].湿地科学与管理,2008,4(1):44-47.

[43]齐 琳.浅谈江苏省沿海旅游资源开发与保护[J].黑龙江科技信息,2010(32):150.

[44]梁 帅,张 瑶.临港产业发展规律研究[J].合作经济与科

技,2011(10):23-24.

[45]刘志强,宋炳良.港口与产业集群[J].上海海事大学学报,2004,25(4):22-26.

[46]彭传圣.建立绿色港口认证体系 推动港口发展转型[J].港口经济,2012(1):10-13.

[47]朱明君.我国滩涂资源可持续利用战略研究[J].中国土地科学,2000,14(2):8-12.

[48]丁金海,吴 春,洪立洲,等.加快农业科技创新 促进沿海滩涂开发可持续发展[J].农业科研经济管理,2005(1):39-41.

[49]袁江海.浅论新围滩涂立体开发模式[J].浙江水利科技,2005(6):19-20,22.

[50]何书金,李秀彬,刘盛和.环渤海地区滩涂资源特点与开发利用模式[J].地理科学进展,2002,21(1):25-34.

[51]薛 妍.黄河三角洲沿海滩涂开发模式选择[J].湖北农业科学,2010,49(6):1510-1512.

[52]凌 申.江苏沿海滩涂开发生态化的思考[J].海洋开发与管理,2006,23(5):177-179.

[53]袁江海.生态优先与生态围垦评价体系的构想[J].浙江水利科技,2006(1):11-13.

[54]袁江海.我国滩涂资源可持续利用对策研究[J].水利发展研究,2005,5(6):33-36.

业堆肥生产中^[11-12]。宿贤超等曾在竹笋加工废弃物笋壳中接种微生物菌剂进行堆肥化处理,结果显示,该处理可以加速笋壳堆肥腐熟的进程^[13]。但是,关于高效处理竹笋壳的微生物筛选及复合微生物菌剂的构建尚未见报道。

本试验拟从腐烂的竹笋壳中筛选分离获得竹笋壳降解菌株,搭配组合构建竹笋壳降解菌群,并确定其降解条件,以期作为竹笋壳的生物处理提供一定理论基础。

1 材料与方法

本试验于 2016 年 3—9 月在合肥工业大学食品科学与工程学院的实验室中进行。

1.1 主要培养基

PDA 平板;刚果红平板;虎红平板;竹笋壳平板培养基,含 2% 竹笋壳,2% 琼脂;种子培养基:5 g 麸皮,按料液比 1 g : 1 mL 加水;竹笋壳发酵培养基:5 g 笋壳粉粒,按料液比 1 g : 1 mL 加水。

1.2 试验方法

1.2.1 竹笋壳分解微生物的分离筛选 将采集的腐烂笋壳样品通过稀释涂布平板法接种到 PDA 平板、刚果红平板、虎红平板和竹笋壳平板培养基上,于 30 ℃ 培养 4~5 d,挑选菌落特征明显的菌落,在 PDA 平板上划线纯化,并回接到竹笋壳发酵培养基上,观察微生物的生长状况并测定纤维素酶活性及腐殖酸量。

1.2.2 竹笋壳降解复合菌剂的筛选 将筛选出来的菌株按一定的组合接种于竹笋壳发酵培养基中,于 30 ℃ 培养 4 d 并测定纤维素酶活性及腐殖酸量,选出较优组合菌群。

1.2.3 复合菌剂产酶条件优化 (1) 竹笋壳粉碎程度对其降解的影响。将风干的竹笋壳分别剪碎成大小为 1 cm × 1 cm,3 mm × 3 mm 的碎块,用小型粉碎机粉碎后分别过 10、40 目成粗粒、粉粒,置于锥形瓶中,与水按料液比 1 g : 1 mL 比例混合后接入 1% 复合菌剂种子,于 30 ℃ 培养 4 d 后测定纤维素酶活性及腐殖酸含量。

(2) 不同加水量对竹笋壳降解的影响。称取 5 g 竹笋壳粉粒置于锥形瓶中,加水使笋壳含水率分别为 40%、50%、60%、70%、80%,再接入 1% 复合菌剂种子混匀,于 30 ℃ 培养 4 d 后测定纤维素酶活性及腐殖酸含量。

(3) 不同温度对竹笋壳降解的影响。称取 5 g 竹笋壳粉粒于锥形瓶中,加入 5 mL 水及 1% 复合菌剂种子混匀,分别

于 20、25、30、35、40 ℃ 培养 4 d,测定纤维素酶活性及腐殖酸含量。

(4) 不同初始 pH 值对竹笋壳降解的影响。分别称取 5 g 竹笋壳粉粒置于 6 个锥形瓶中,分别加入 5 mL pH 值为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 的水,接入 1% 复合菌剂种子,于 30 ℃ 培养 4 d,测定纤维素酶活性及腐殖酸含量。

1.3 试验测定

1.3.1 纤维素酶活性的测定^[14] 准确称取 1.0 g 样品,加入由 0.2 mol/L 磷酸钠缓冲液(pH 值 6.0)配制的 1% 羧甲基纤维素钠(CMC)溶液 4.0 mL,60 ℃ 酶解 20 min,然后立即加入 1.0 mL 2.0 mol/L 氢氧化钠溶液和 2.0 mL 二硝基水杨酸(DNS)试剂,沸水煮 5 min 后取出,流水冷却,定容至 25.0 mL,于 540 nm 处测定其 $D_{540\text{ nm}}$,以灭活酶液为对照。

纤维素酶酶活性单位的定义:在温度为 60 ℃、pH 值为 6.0 条件下,以 1 min 催化羧甲基纤维素钠水解生成 1 μg 还原糖所需要的酶量定义为 1 个酶活性单位(U)。

1.3.2 腐殖酸含量的测定 准确称取 2.0 g 发酵基质,加 40 mL 浸提剂(0.1 mol/L 焦磷酸钠与 0.1 mol/L 氢氧化钠混合液),振荡,静置过夜,过滤得浸出液,按重铬酸钾氧化-外加热法^[15]测腐殖酸有机碳量。

2 结果与分析

2.1 竹笋壳分解微生物的分离筛选

经过反复的分区分划,分离纯化,筛选出 6 株微生物,分别命名为 A-1、A-2、A-3、A-4、A-5、A-6。菌落形态及显微观察如图 1 所示,可初步鉴定 A-1 菌株为粉孢霉属,A-2 菌株为毛霉属,A-3 菌株为黑曲霉属,A-4 菌株为芽孢杆菌属,A-5 菌株为诺卡氏菌属,A-6 菌株为酵母菌属。将筛选出的菌株在竹笋壳发酵培养基上培养 3 d 后,测定纤维素酶活性及腐殖酸含量,详见图 2。

由图 2 可知,A-3 的纤维素酶活性最高,产生的腐殖酸也最多,其次为 A-4、A-2、A-1、A-5 菌株,A-6 菌株的纤维素酶活性最低,产生的腐殖酸也最少。

2.2 分解竹笋壳复合菌剂的筛选

在复合微生物菌剂中以 A-3、A-4、A-5 菌株为基本菌株,按表 1 设计 4 种微生物组合,将其接种在竹笋壳发酵培养基中培养,测得的纤维素酶活性见图 3。

由图 3 可知,复合菌剂 1 与复合菌剂 2 的纤维素酶活性

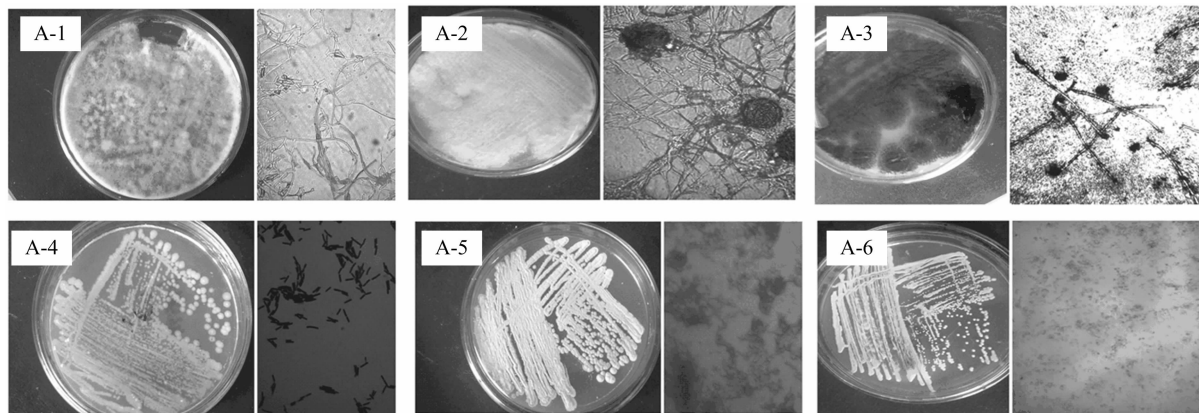


图1 菌落形态及显微观察结果

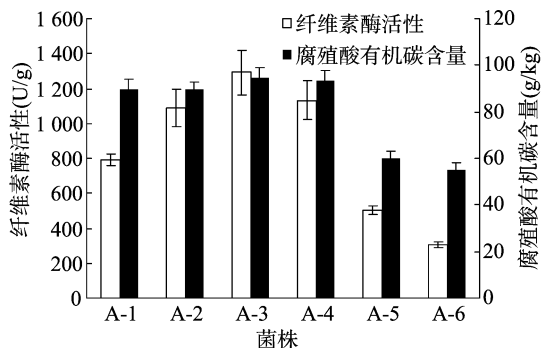


图2 不同微生物降解竹笋壳产纤维素酶活性及腐殖酸含量

表1 不同菌株组合

菌剂	菌株组合
复合菌剂 1	所有菌株
复合菌剂 2	A-3 菌 + A-1 菌 + A-2 菌 + A-4 菌 + A-5 菌
复合菌剂 3	A-3 菌 + A-1 菌 + A-4 菌 + A-5 菌
复合菌剂 4	A-3 菌 + A-2 菌 + A-4 菌 + A-5 菌

及腐殖酸含量相差不大,因此,A-6 菌株可以不添加在复合菌剂中;而组合 3 的纤维素酶活性比组合 4 的高,因此选择 A-1 菌株添加在复合菌剂中。即筛选出优良的微生物复合菌剂由 A-3、A-1、A-4、A-5 菌株组成,即为复合菌剂 3,在后面的试验中将以复合菌剂 3 作为竹笋壳降解微生物菌群。

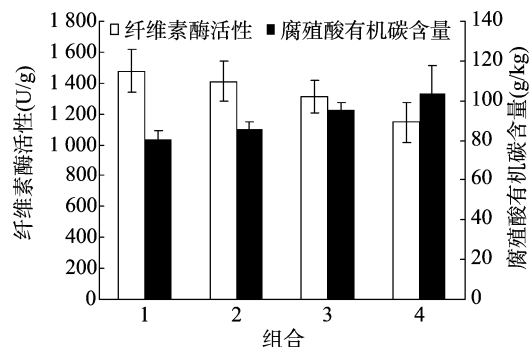


图3 不同复合菌剂降解竹笋壳产纤维素酶活性及腐殖酸含量

2.3 微生物降解竹笋壳条件的优化

2.3.1 竹笋壳粉碎程度对其降解的影响 从图 4 可以看出,将不同粉碎度的竹笋壳接入复合菌剂 3 种子后,竹笋壳粉碎程度的大小对产酶活性及腐殖酸有机碳含量的高低有很大的影响,竹笋壳粉碎程度越高,越容易被微生物降解。因此,利用微生物降解竹笋壳时原料应粉碎成粉粒。

2.3.2 竹笋壳含水率对其降解的影响 从图 5 可以看出,在不同含水率的竹笋壳粉粒中添加复合菌剂 3 后,随着竹笋壳

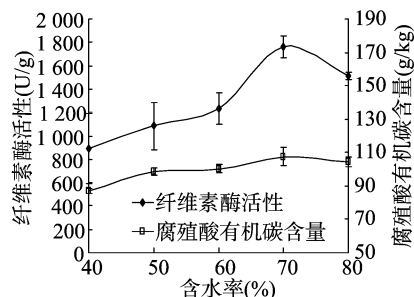


图5 含水率对复合菌剂 3 产纤维素酶活性及腐殖酸含量的影响

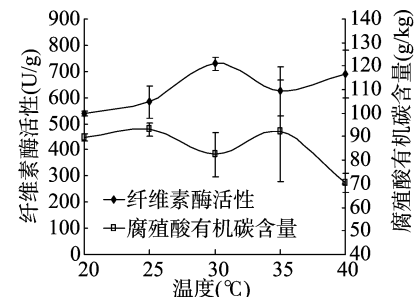


图6 温度对复合菌剂 3 产纤维素酶活性及腐殖酸含量的影响

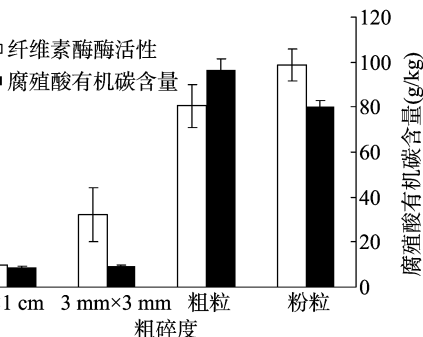


图4 粉碎度对复合菌剂3产纤维素酶活性及腐殖酸含量的影响

含水率的提高,纤维素酶活性逐渐提高,当含水率达到 70% 时,酶活性达最高值,且产生的腐殖酸也最多;随着含水率的进一步提高,纤维素酶活性反而逐渐降低,因此可知,合适的含水率为 70%。

2.3.3 不同温度对竹笋壳降解的影响 从图 6 可以看出,将添加复合菌剂 3 的竹笋壳粉粒在不同温度下进行发酵试验,在低温范围内,随着温度的升高,其纤维素酶活性也逐渐提高,在 30 °C 达峰值;随着温度的进一步升高,纤维素酶活性降低,但当温度升高至 35 °C 以上时,纤维素酶活性又开始升高。结果显示,低温时温度越高,微生物越活跃,所产生的纤维素酶活性越高,在 30 °C 时,嗜温微生物最活跃,产生的纤维素酶活性最高;随着温度继续升高,嗜温微生物开始受到抑制,活性降低;温度达到 35 °C 以后,嗜温微生物严重受到抑制,嗜热微生物开始生长,并成为竹笋壳分解的主体,所产生的纤维素酶活性也提高。随着温度升高,腐殖酸有机碳含量呈波动下降趋势。

2.3.4 不同初始 pH 值对竹笋壳降解的影响 添加复合菌剂 3 的竹笋壳粉粒在不同初始 pH 值下发酵,由图 7 产纤维素酶的酶活性可知,在 pH 值为 2.0 ~ 4.0 时,其样品的纤维素酶活性处于很平稳的趋势,pH 值超过 4.0 之后,纤维素酶活性开始下降,并在 5.5 左右开始回升。当 pH 值为 2.0 ~ 4.0 时,微生物降解竹笋壳产生的纤维素酶活性并没有明显变化,可能是因为 A-3 菌的产酸作用,使其 pH 值始终维持在 2.0 左右,于是对微生物生长的影响相同,没有太大区别;当 pH 值超过 4.0 后,A-3 菌的产酸作用不足以抵消 pH 值的变化,于是有了明显的变化,纤维素酶活性降低,降解竹笋壳的微生物受到抑制;在 pH 值达到 5.5 之后,纤维素酶活性开始回升,可能是因为此时一些微生物受到抑制,从而使另一些生长受到抑制的微生物开始活跃起来,纤维素酶活性才有些微的回升。在不同 pH 值条件下,腐殖酸有机碳含量的变幅较小。

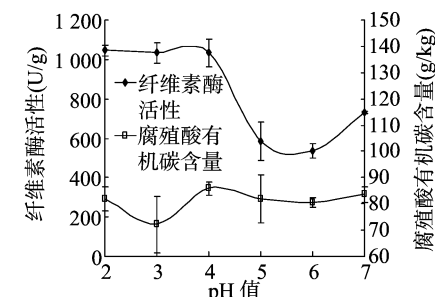
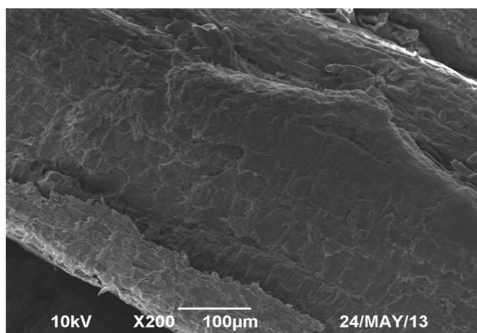


图7 不同初始 pH 值对复合菌剂 3 产纤维素酶活性及腐殖酸含量的影响

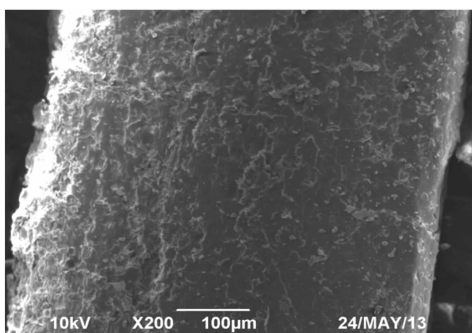
2.4 竹笋壳微生物降解前后扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, 简称 SEM) 分析

由图 8 对酶解前后的笋壳扫描电镜观察结果可知, 常温风干笋壳表面光滑, 有鳞片状结构, 高温烘干笋壳表面粗糙, 无鳞片状结构, 但均结构紧致, 木质纤维没有受到破坏; 而经

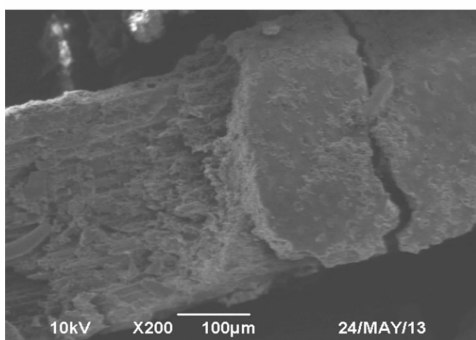
微生物降解后笋壳表面粗糙度大幅增加, 受破坏程度严重, 有明显的裂纹。放大 2 000 倍的扫描电镜照片显示, 竹笋壳表面附满微生物, 表明筛选出的复合菌剂对笋壳有一定的分解作用, 可用于竹笋壳的废物处理。



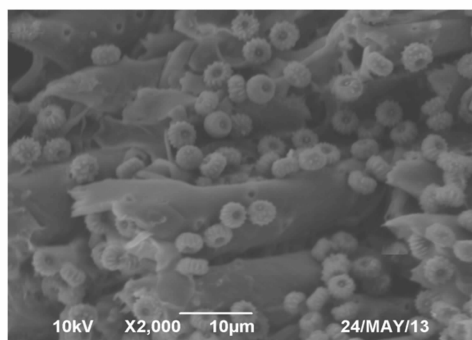
A. 常温风干笋壳 SEM 结果(200×)



B. 高温烘干笋壳 SEM 结果(200×)



C. 微生物降解后笋壳 SEM 结果(200×)



D. 微生物降解后笋壳 SEM 结果(2 000×)

图8 竹笋壳微生物降解前后电镜扫描结果

3 结论

从腐烂的竹笋壳中筛选出 6 株能分解纤维素与半纤维素的微生物, 分别为粉孢霉 A-1、毛霉 A-2、黑曲霉 A-3、芽孢杆菌 A-4、放线菌 A-5、酵母菌 A-6。通过不同菌株组合比较其产酶及产腐殖酸能力大小, 筛选出优良的微生物复合菌剂 3, 由黑曲霉 A-3、粉孢霉 A-1、芽孢杆菌 A-4 和放线菌 A-5 组成。

通过对复合菌剂 3 降解竹笋壳产酶条件的研究表明, 在粉碎为粉粒的竹笋壳中加 70% 的水, 于温度 30 ℃、pH 值 2~4 的条件下进行发酵, 复合菌剂降解竹笋壳的能力最强。

对竹笋壳微生物降解前后样品进行电镜扫描分析, 发现降解前的笋壳结构紧致, 木质纤维没有受到破坏。降解后的笋壳表面有明显的裂纹, 受破坏程度严重, 表明复合菌剂对笋壳有一定的分解作用, 可用于竹笋壳的废物处理。

参考文献:

- [1] 吴协保, 吴健, 但新球, 等. 竹类资源在我国石漠化防治中的应用研究[J]. 世界林业研究, 2015, 28(3): 37-41.
- [2] 王兴菊, 李周权, 唐正菊, 等. 大叶麻竹笋壳饲用价值的研究[J]. 四川畜牧兽医, 2010, 37(12): 30-32.
- [3] 辜夕容, 邓雪梅, 刘颖旋, 等. 竹废弃物的资源化利用研究进展[J]. 农业工程学报, 2016, 36(1): 236-242.
- [4] 周晓洁, 李建强, 陈延兴. 竹笋壳化学成分分析[J]. 武汉科技学

- 院学报, 2010, 23(3): 1-3.
- [5] 林珊, 林梅芳, 吴娇瑜, 等. 竹笋壳黄酮类化合物的提取及其抗氧化活性的研究[J]. 应用化工, 2012, 41(3): 465-468.
- [6] Huang C X, Chu Q L, Xie Y H, et al. Effect of kraft pulping pretreatment on the chemical composition, enzymatic digestibility, and sugar release of mono bamboo residues[J]. Bioresources, 2015, 10(1): 240-245.
- [7] 劳德坤, 张陵利, 李永斌, 等. 不同接种量的微生物秸秆腐熟剂对蔬菜副产物堆肥效果的影响[J]. 环境工程学报, 2015, 9(6): 2979-2985.
- [8] 吴翔, 甘炳成, 刘本洪, 等. 一个降解纤维素的复合菌剂对秸秆堆肥催腐熟效果[J]. 四川农业大学学报, 2010, 28(2): 205-210.
- [9] 陈迪, 赵洪颜, 葛长明, 等. 中药渣堆肥化过程中腐殖酸的动态变化研究[J]. 延边大学农学报, 2015, 37(4): 292-295.
- [10] 付保东. 腐殖酸在土壤改良中的应用研究进展[J]. 防护林科技, 2016, 150(3): 83-84.
- [11] 赵恺凝, 赵国柱, 国辉, 等. 园林废弃物堆肥化技术中微生物菌剂的功能与作用[J]. 生物技术通报, 2016, 32(1): 41-48.
- [12] 金敬红, 吴素玲, 孙晓明. 复合微生物菌剂生产沙棘生物饲料的研究[J]. 中国野生植物资源, 2015, 34(6): 65-67.
- [13] 宿贤超, 赵薇, 钱嘉文, 等. 笋壳废弃物的发酵效果研究[J]. 现代农业, 2013(8): 32-33.
- [14] 陈丽园, 夏伦志, 吴东, 等. 油菜秸秆分解菌的筛选与产酶特性初探[J]. 中国草食动物, 2007, 27(5): 9-12.
- [15] 李西开. 土壤农业化学常规分析法[M]. 北京: 科技出版社, 1993: 67-119.