

尹 蕾, 王伟舵, 陈子璇, 等. 水稻秸秆高效降解菌株的筛选鉴定及其降解产物分析[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(19): 292–296, 305.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.19.075

水稻秸秆高效降解菌株的筛选鉴定及其降解产物分析

尹 蕾¹, 王伟舵², 陈子璇², 贵爱玲², 吴雨龙², 黄 和¹

(1. 南京工业大学生物与制药工程学院, 江苏南京 211816; 2. 南京晓庄学院食品科学学院, 江苏南京 211171)

摘要:由南京地区稻麦轮作农田中采集植物根围 50 多份土样, 通过羧甲基纤维素钠(CMC-Na)单一碳源培养、CMC 酶活性和滤纸酶活性的测定, 筛选获得高产纤维素酶菌株; 以改进的 Van Soest 洗涤法为基础, 采用差质量法测定供试菌株处理和对照处理的水稻秸秆失质量率及纤维素降解率、半纤维素降解率、木质素降解率, 综合评价高产纤维素酶菌株对水稻秸秆的降解效果, 筛选出其中降解效果较突出的枝孢菌 BD-19 菌株。通过内转录间隔区(internal transcribed spacer, 简称 ITS)序列分析结合菌株生长形态特征的鉴定方法对 BD-19 菌株进行鉴定。最后, 利用秸秆作为唯一碳源的基础培养基进行培养, 选取 3、5、10、20、30 d 等 4 个时间点进行取样, 对样品衍生化后利用 GC-MS(气相色谱-质谱联用仪)分析枝孢菌 BD-19 处理水稻秸秆后产生的有机物, 同时分析不同时间段的样品中有机物种类的变化。由结果可知, 枝孢菌 BD-19 具有较好的秸秆降解能力, 目前对于枝孢菌作为秸秆降解菌株的研究还不够广泛, 该菌株的获得为秸秆降解菌剂的研究与应用提供了具有较高潜力的菌种。

关键词: 秸秆降解; 菌株筛选; 酶活性; 降解产物分析

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)19-0292-05

相关统计表明, 全球每年约产出 20 亿 t 的农作物秸秆, 而我国产秸秆数量高达 9 亿 t, 占全世界范围内秸秆产量的 20%~30%^[1]。水稻秸秆主要是由纤维素、半纤维素、木质素、粗蛋白、低分子碳水化合物及无机盐等构成的^[2]。秸秆中含有多种化学微量元素, 其中硅是含量最多的矿物元素^[3]。水稻秸秆中纤维素和半纤维素含量相当, 均在 30% 左右, 两者是维持水稻秸秆形态结构的主要物质, 木质素含量较低, 仅为 4%, 粗蛋白、结构蛋白含量分别为 5%、4%, 硅化合物含量为 9%^[4]。细菌、真菌、放线菌主要负责分解秸秆中的纤维素与半纤维素, 部分细菌和真菌也可用于分解木质素^[5]。可以降解纤维素的真菌种类较多, 分解能力较强的真菌主要分为木霉属、曲霉属、镰刀菌属。木质素可以被黄单胞菌、假单胞菌、不动杆菌等菌种分解, 一般情况下真菌的分解能力比细菌强得多^[6]。

本研究主要筛选高效降解秸秆纤维素的微生物菌株。通过土壤微生物的富集与分离, 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)单一碳源筛选, 羧甲基纤维素(简称 CMC)酶活性和滤纸酶活性的测定, 筛选获得高产纤维素菌株, 并采用改进的 Van Soest 洗涤法测定供试菌株处理后水稻秸秆的失质量率与纤维素、半纤维素、木质素的含量^[7]。从菌株对秸秆进行降解的培养

基中提取有机物质, 其中包括微生物分泌出的具有挥发性的有机化合物及其降解秸秆所产生的不同有机产物, 探讨枝孢菌 BD-19 的秸秆生物降解能力, 为秸秆高效降解提供菌种资源和技术支撑。

1 材料与方法

试验于 2015 年 9 月至 2016 年 9 月在南京晓庄学院农产品质量与安全重点实验室内进行。

1.1 材料与仪器

供试土样: 试验土样取自南京市江宁区稻麦轮作农田, 共 50 份。

主要仪器有 7890A/5975C 气相色谱-质谱联用仪(gas chromatography-mass spectrometer, 简称 GC-MS), 由美国 Agilent 公司提供。

主要供试药品与试剂有: A, 3, 5-二硝基水杨酸(3, 5-dinitrosalicylic acid, 简称 DNS)试剂, 称量 6.3 g DNS, 加少量蒸馏水溶解后加入 262 mL 2 mol/L NaOH 溶液; B, 称取 185 mg 酒石酸钾钠, 加 500 mL 蒸馏水加热溶解。混合 A、B 后, 加入 5 g 结晶苯酚和亚硫酸钠, 冷却后, 加入蒸馏水至 1 000 mL, 用棕色磨砂广口瓶储存, 保存 1 周后再使用。

0.05 mol/L 柠檬酸缓冲液(pH 值 = 4.5): 取 271.2 mL 溶液 A, 与 228.8 mL 溶液 B 混合, 加入蒸馏水至 1 000 mL。

0.05 mol/L 柠檬酸缓冲液(pH 值 = 5.0): 取 205 mL 溶液 A、295 mL 溶液 B 混匀后, 向其中加入蒸馏水定容至 1 000 mL, 即得。溶液 A(0.1 mol/L 柠檬酸): 21 g C₆H₈O₇ · H₂O, 加蒸馏水至 1 000 mL。溶液 B(0.1 mol/L 柠檬酸钠): 称取 29.4 g Na₃C₆H₅O₇ · 2H₂O, 加入蒸馏水定容至 1 000 mL。

0.51% CMC-Na 溶液: 称取 5.1 g CMC-Na, 加入少量蒸馏水后加热溶解, 向其中加入 5 mL pH 值为 5.0 的柠檬酸

收稿日期: 2017-05-21

基金项目: 江苏省高校特殊生物质废弃物资源化利用重点实验室(编号: 苏教科[2016]8); 江苏省青蓝工程中青年学术带头人项目; 江苏省大学生创新训练计划(编号: 201511460014Z); 江苏省高校自然科学研究面上项目(编号: 16KJD180004); 南京晓庄学院农产品质量与安全重点实验室(编号: 2231503)。

作者简介: 尹 蕾(1990—), 女, 江苏南京人, 硕士研究生, 研究方向为微生物生物防治。E-mail: 15195908868@163.com。

通信作者: 黄 和, 博士, 教授, 研究方向为生物基化学品的先进生物制造。E-mail: huangh@njtech.edu.cn。

缓冲液后混合均匀,并加蒸馏水定容至 1 000 mL。

中性洗涤剂。A:称取 18.6 g 乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt,简称 EDTA)、6.8 g 硼酸钠,加入少量蒸馏水后,适当加热溶解。B:30 g 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate,简称 SDS)、10 mL 乙二醇醚、4.56 g 无水磷酸氢二钠(Na_2HPO_4),加少量蒸馏水并加热溶解。将 A、B 混匀后加蒸馏水定容至 1 000 mL,调节 pH 值至 7.0 左右。

2.0 mol/L 盐酸溶液:量取 800 mL 蒸馏水于 1 L 容量瓶中,加入密度为 1.19 g/mL 的浓盐酸 167 mL,加入蒸馏水定容至刻度。

72% 硫酸溶液:取 300 mL 蒸馏水于 1 L 容量瓶中,缓慢加入密度为 1.84 g/mL 的浓硫酸 665 mL,待冷却至室温后,加蒸馏水定容至刻度。

DNA 提取液:将 2.42 g Tris(三羟甲基氨基甲烷)、2.92 g NaCl、0.372 g EDTA-Na、1 g SDS 溶于 100 mL 去离子水中,将 pH 值调至 8.0。

主要培养基有:(1)LB 固体培养基。5 g 酵母提取物、10 g 蛋白胨、5 g NaCl、15~20 g 琼脂,1 000 mL 超纯水,pH 值为 7.4。不添加琼脂的为 LB 液体培养基。(2)PDA 培养基。称取 200 g 马铃薯切成小块,煮沸 20~30 min,加 20 g 蔗糖、16 g 琼脂粉,用纯水定容至 1 000 mL,pH 值为 7.4。不添加琼脂粉的为 PDA 液体培养基。(3)羧甲基纤维素钠培养基。0.5 g NH_4NO_3 、0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1 g 酵母提取物、15 g CMC-Na,用纯水定容至 1 000 mL。(4)赫奇逊氏无机盐培养基。1.0 g KH_2PO_4 、0.1 g NaCl、0.3 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2.5 g NaNO_3 、0.01 g FeCl_3 、0.1 g CaCl_2 ,用去离子水定容至 1 000 mL,pH 值为 7.2。(5)秸秆液体发酵培养基。取 1.0 g 经 NaOH 溶液浸泡并水洗至中性的秸秆于三角瓶中,再加入 100 mL 赫奇逊氏无机盐培养基。(6)秸秆粉末培养基。取经 NaOH 溶液浸泡并水洗至中性的秸秆于干燥箱,于 80 ℃烘干至恒质量,粉碎过 60 目筛,于培养皿中加入 5 g 秸秆粉和 25 mL 混合溶液[0.5 g/L NaCl、0.5 g/L MgSO_4 、3 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、1 g/L KH_2PO_4 、0.3 g/L CaCl_2 、0.01 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.015 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.015 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.01 g/L CoCl_2],121 ℃灭菌 20 min。

1.2 试验方法

1.2.1 秸秆降解菌的初步筛选 称取 5.0 g 稻麦轮作农田土样,倒入含有 45 mL 无菌水的三角瓶中,在温度为 28 ℃的条件下摇床振荡 30 min 后取出,为 10^{-1} 浓度,用无菌水分别稀释至 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 等 3 个浓度梯度用于涂布,分别涂布于 LB 培养基、PDA 无菌平板,放置于温度为 28 ℃的恒温培养箱内培养 2~3 d。将得到的单菌落进行分离纯化。将上述分离得到的单菌落摇瓶发酵菌液接种至 CMC-Na 平板培养基上,28 ℃恒温条件下培养 2~3 d,观察平板上水解圈并比较其大小,选取水解圈较大、较明显的菌株。

1.2.2 纤维素酶活性测定

1.2.2.1 纤维素酶活性的测定 纤维素的酶活性主要由滤纸酶活性和内切酶活性表示。用 DNS 法测定还原糖含量,反应底物为非淀粉新华滤纸和羧甲基纤维素钠(CMC 钠),酶活性单位定义:1 mL 酶溶液在温度为 50 ℃、pH 值为 4.8 条件

下,1 min 水解底物生成 1.0 μmol 葡萄糖的量为 1 个酶单位(U)。

1.2.2.2 滤纸酶活性(FPA)的测定 在 5 支试管中加入 0.5 mL 酶溶液和浓度为 0.05 mol/L、pH 值为 4.5 的柠檬酸缓冲液,并向对照试管中加入 1.5 mL DNS,放在 50 ℃水浴锅中预热 5~10 min,各加入 1.0 cm \times 6.0 cm 无淀粉新华滤纸条,在温度为 50 ℃条件下保温 60 min,取出后立刻向非对照试管中加入 1.5 mL DNS 停止反应。在 540 nm 处记录测定的其他各试管的 $D_{540\text{ nm}}$ 。根据葡萄糖标准曲线计算得出相应的葡萄糖含量,并计算出相应的滤纸酶活性。

1.2.2.3 内切酶活性的测定 在 5 支试管中加入 0.5 mL 粗酶液和 1.0 mL 0.51% CMC-Na 溶液,方法同滤纸酶活性测定。根据葡萄糖标准曲线得出相应的葡萄糖含量,并计算出其对应的内切酶活性。

1.2.3 秸秆液态发酵降解能力测定 将初步筛选出的菌株在 PDA 平板上培养,待其长满平板时于超净工作台中用涂布器及无菌水冲洗出菌丝及孢子,将其全部转入液体发酵培养基中,在温度为 25 ℃、转速为 170 r/min 条件下于摇床振荡培养 10 d 后取出。秸秆失质量率的测定采用差质量法,通过改进的 Van Soest 方法测定样品中的纤维素、半纤维素、木质素的降解率。

1.2.4 高效秸秆降解菌 DNA 的 ITS(内转录间隔区)鉴定 从筛选出的菌株中,选取酶活性及降解效果均较为突出的菌株进行鉴定。将菌株在 PDA 培养基上于温度为 25 ℃的条件下培养 5 d,转接到马铃薯液体培养基中,振荡培养 7 d,收集子实体,提取 DNA。以提取菌株的 DNA 为模板,分别以 ITS1、ITS5 为引物来 PCR 扩增 ITS 序列。PCR 反应程序:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 60 s,35 个循环;72 ℃ 5 min。PCR 产物经过纯化后送到南京钟鼎生物技术有限公司进行测序。供试菌株的 ITS 测序拼接序列与 NCBI(美国国立生物技术信息中心)中 Blast 数据进行比对,并利用 MEGA4.1 软件构建发育进化树。

1.2.5 菌株降解秸秆产物测定 先进行菌株接种,菌株接种 3 d 后可进行菌丝取样,分别于接种 3、5、10、20、30 d 时取菌丝和培养基作为待分析样品。衍生化反应后,每个样品用于 GC-MS 分析后丢弃。利用 AMDIS 软件(NIST, v2.69, Gaithersburg, MD, USA)和 MSD Chemstation 软件(G1701 EAE.02.00.493,美国安捷伦科技有限公司)进行质谱峰的定性分析。将代谢物的质谱图中质量碎片峰位置和信息与标准数据库进行比对,从而对色谱图中的各个峰数据进行分析。所用谱库主要是 NIST2005、Wiley。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选

将来自稻麦轮作农田的土样在 LB 和 PDA 固体培养基中进行分离与纯化,共得到 163 株细菌,18 株真菌。选用刚果红染色法和 CMC-Na 水解圈测定试验,根据得到的菌株菌落直径(d ,cm)和水解圈直径(D ,cm),可得水解能力 D_p ,相关公式: $D_p = (D/d)^2$,由此选出 15 株真菌。

2.2 纤维素酶活性的测定

纤维素的降解是多种酶体系共同作用的结果,本试验主

要测定供试菌株的 CMC 酶活性以及滤纸酶活性,作为菌株复筛的依据。通过液体发酵方式,筛选得到酶活性较高的 12 株真菌。将试验真菌添加到 PDA 液体培养基中,在温度为 25 ℃、转速为 150 r/min 条件下摇床培养 72 h 后测定其酶活性,结果如表 1 所示。

2.3 秸秆液态发酵降解能力的测定

采用液态发酵的方式研究以上试验得到的 12 株真菌。以改进的 Van Soest 洗涤法测定供试菌株对水稻秸秆中半纤维素、纤维素、木质素的降解效果。

在液态培养条件下,经各菌株处理,其中 BD-19 菌株处理后的降解效果与其他菌株相比明显较好,其秸秆的失质量率达到 44.51%,半纤维素、纤维素、木质素的降解率分别为 16.64%、26.42%、11.43%(表 2)。

2.4 高效秸秆降解菌的鉴定

如图 1 所示,将真菌 BD-19 的 ITS 测序拼接序列与

表 1 不同菌株的酶活性测定结果

菌株编号	CMC 酶活性 (U/mL)	FPA 酶活 (U/mL)
BD-8	66.57±0.46f	31.86±0.79f
BD-9	73.19±0.68c	38.02±0.61cd
BD-10	74.91±0.38abc	38.78±0.13bc
BD-14	73.62±0.62bc	36.25±0.33e
BD-15	76.12±0.60a	40.36±0.10ab
BD-16	72.76±0.46cd	37.16±0.17de
BD-19	75.60±0.31ab	40.79±0.13a
BD-20	76.80±0.15a	41.60±0.17a
BD-22	67.26±0.59f	33.33±0.41f
BD-23	70.10±0.45e	36.25±0.17e
BD-24	73.10±0.45cd	37.92±0.13cd
BD-25	70.78±0.52de	36.25±0.22e

注:数据后不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著,下表同。

表 2 秸秆降解后各组分含量变化

菌株编号	失质量率 (%)	半纤维素降解率 (%)	纤维素降解率 (%)	木质素降解率 (%)
BD-4	33.10±0.12de	10.78±0.12i	12.68±0.09ef	11.40±0.17d
BD-6	32.57±0.44def	12.57±0.08efg	14.95±0.13cd	9.43±0.09fg
BD-9	30.13±0.23hij	11.72±0.50ghi	14.96±0.38cd	10.87±0.12de
BD-10	35.43±0.24c	13.97±0.19hi	16.87±0.16b	11.30±0.06d
BD-14	33.57±0.24d	12.54±0.16efgh	14.78±0.04cd	11.60±0.06bcd
BD-15	31.03±0.43fgh	16.11±0.42a	13.91±0.18de	12.47±0.12ab
BD-19	44.51±0.53a	16.64±0.65a	26.42±0.72a	11.43±0.22cd
BD-20	42.99±0.12b	15.24±0.09bed	26.48±0.06a	13.03±0.12a
BD-25	28.90±0.35j	12.27±0.32fghi	14.43±0.47cd	10.73±0.17de
BD-38	28.97±0.23ij	15.77±0.20ab	12.48±0.23ef	11.37±0.26d
BD-43	30.63±0.28gh	13.82±0.27def	15.91±0.30bc	8.90±0.32g
BD-69	32.37±0.38def	14.42±0.11abc	11.57±0.12f	12.33±0.27abc
BD-99	30.53±0.22ghi	13.70±0.13abcd	12.64±0.35ef	11.40±0.20d
BD-155	30.13±0.28hij	13.03±0.07cde	15.39±0.11bed	10.10±0.21ef

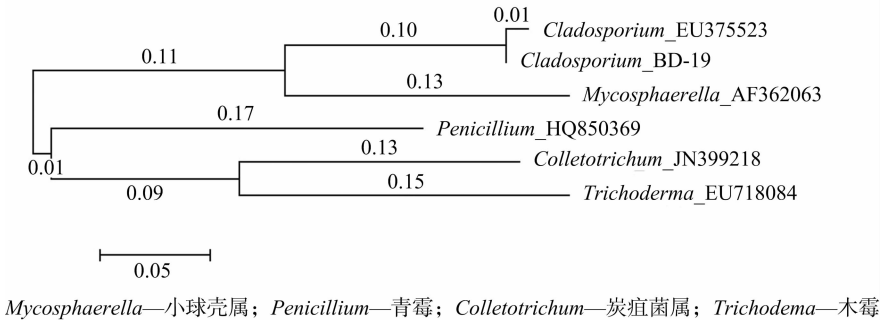


图 1 枝孢菌 BD-19 的发育进化树

NCBI 中 Blast 数据进行比对, BD-19 与枝孢属菌 (*Cladosporium* sp.) EU-375523 的 ITS 序列同源性的 99%^[8],结合供试菌株的菌落形态特征,可初步将其鉴定为 *Cladosporium* sp. BD-19。

2.5 菌株降解秸秆产物的测定

将枝孢菌 BD-19 接种到秸秆粉末液体培养基中摇瓶培养,分别于 3、5、10、20、30 d 采样,进行降解秸秆所得产物的 GC-MS 测定,测定结果见图 2 至图 6。

在降解过程中,检测到有机化合物如烷、醇、酚、羧酸、硅

氧烷、卤代烃等。醇、酚、羧酸、硅氧烷等物质表明木质纤维素得到有效降解^[9]。由表 3 可知,接种 3 d 获得 6 种降解物,5 d 后获得 13 种降解物,10 d 后获得 17 种降解物,20 d 后获得 5 种产物,30 d 后获得 3 种产物。可看出菌株在 10 d 之前降解所得有机产物逐渐增多,在 10 d 之后降解所得产物明显减少。其中,以接种 10 d 所得降解产物最多。

半纤维素是不同类型单糖构成的异质多聚体,主要由包括木糖、阿拉伯糖、半乳糖等的五碳糖、六碳糖构成^[10]。构成半纤维素的糖基主要有 D-木糖基、D-甘露糖基、D-葡萄

表 3 枝孢菌 BD-19 在不同时间降解秸秆的代谢产物

时间(d)	降解秸秆的代谢产物
3	$C_{24}H_{64}O_6$ (D -甘露酸, 分子量为 448)、 $C_{24}H_{61}NO_6$ (半乳糖肟六胺, 分子量为 459)、 $C_{18}H_{45}NO_5Si_4$ (D -核糖, 分子量为 467)、 $C_{12}H_{36}O_4Si_5$ (五硅氧烷, 分子量为 384)、 $C_9H_{22}O_3Si_2$ (丙酸, 分子量为 234)、 $C_8H_{20}O_3Si_2$ (乙酸, 分子量为 220)
5	$C_{24}H_{63}NO_6$ (D -甘露醇, 分子量为 461)、 $C_{24}H_{64}O_6$ (葡萄糖醇, 分子量为 448)、 $C_{21}H_{44}O_2$ (十八烷酸, 分子量为 356)、 $C_{19}H_{40}O_2$ (十六烷酸, 分子量为 300)、 $C_{18}H_{45}NO_5Si_4$ (D -核糖, 分子量为 467) $C_{18}H_{30}O_2$ (1,4-二氢苯乙酸, 分子量为 278)、 $C_{17}H_{42}O_5Si_4$ (阿拉伯吡喃糖, 分子量为 438)、 $C_{17}H_{26}O_3$ (3,5-二叔丁基-4-羟基苯甲酸乙酯, 分子量为 278)、 $C_{13}H_{33}O_4$ (D -戊二酸呋喃糖, 分子量为 253)、 $C_{12}H_{36}O_4Si_5$ (五硅氧烷, 分子量为 384)、 $C_{12}H_{33}O_3$ (甘油三甲基硅烷基醚, 分子量为 225)、 $C_{11}H_{21}NO_3Si$ (环己烷, 分子量为 243)、 $C_{10}H_{30}O_3Si_4$ (四硅氧烷, 分子量为 310)
10	$C_{24}H_{63}NO_6$ (半乳糖, 分子量为 461)、 $C_{24}H_{61}NO_6$ (半乳糖肟六胺, 分子量为 459)、 $C_{22}H_{55}NO_6Si$ (D -果糖, 分子量为 459)、 $C_{21}H_{44}O_2$ (十八烷酸, 分子量为 356)、 $C_{19}H_{40}O_2$ (十六烷酸, 分子量为 300)、 $C_{18}H_{38}$ (十八烷, 分子量为 254)、 $C_{17}H_{26}O_3$ (3,5-二叔丁基-4-羟基苯甲酸乙酯, 分子量为 278)、 $C_{17}H_{26}O_3$ (3,5-二叔丁基-4-羟基苯甲酸乙酯, 分子量为 278)、 $C_{12}H_{36}O_4Si_5$ (五硅氧烷, 分子量为 384)、 $C_{12}H_{33}O_3$ (甘油三甲基硅烷基醚, 分子量为 225)、 $C_{11}H_{21}NO_3Si$ (环己烷, 分子量为 243)、 $C_{11}H_{32}NO$ (硅烷胺, 分子量为 194)、 $C_{10}H_{26}O_3Si_2$ (硅烷, 分子量为 250)、 $C_9H_{21}NO_3Si_2$ (甘氨酸, 分子量为 247)、 $C_9H_{28}O_4P$ (硅烷醇, 分子量为 231)、 $C_8H_{17}NO_3Si$ [甘氨酸, N -(1-氧代丙基)-三甲基甲硅烷基酯, 分子量为 203]、 $C_8H_{25}O_2$ (三硅氧烷, 分子量为 153)
20	$C_{18}H_{38}$ (十八烷, 分子量为 254)、 $C_{17}H_{26}O_3$ (3,5-二叔丁基-4-羟基苯甲酸乙酯, 分子量为 278)、 $C_{16}H_{36}NO_6$ (葡萄糖酸, 分子量为 338)、 $C_{10}H_{26}O_2Si$ (硅烷, 分子量为 234)、 $C_{10}H_{26}O_3Si$ (2,3-丁二醇, 分子量为 250)
30	$C_{24}H_{63}NO_6$ (葡萄糖醇, 分子量为 278)、 $C_{16}H_{36}NO_6$ (葡萄糖酸, 分子量为 338)、 $C_9H_{28}O_4P$ (硅烷醇, 分子量为 231)

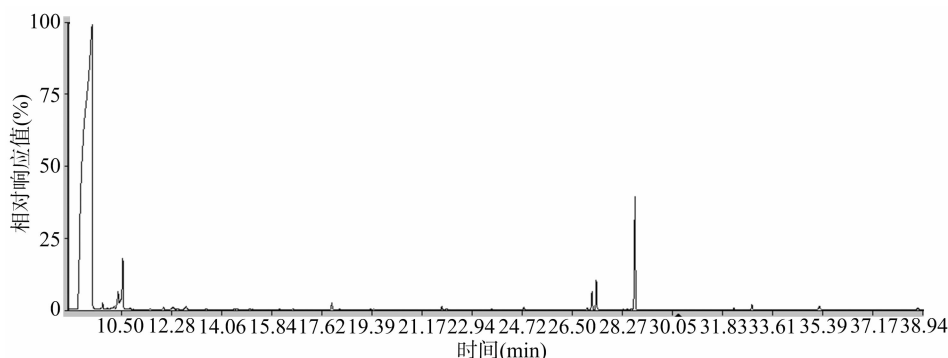


图2 枝孢菌 BD-19 降解秸秆 3 d 所得产物的 GC-MS 测定图谱

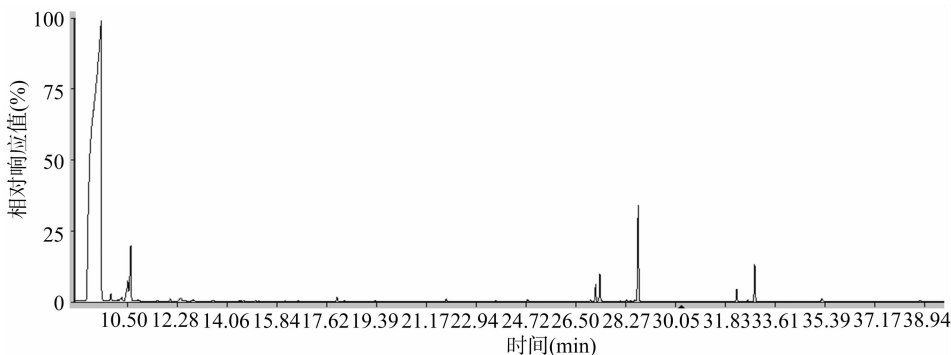


图3 枝孢菌 BD-19 降解秸秆 5 d 所得产物的 GC-MS 测定图谱

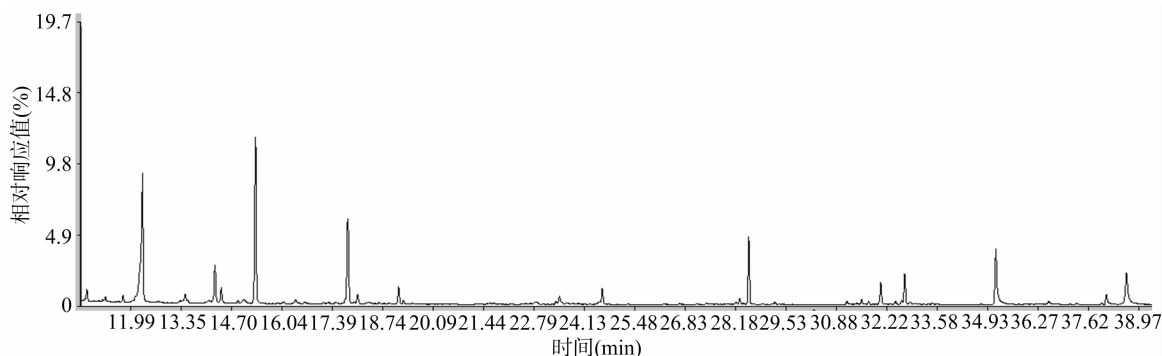


图4 枝孢菌 BD-19 降解秸秆 10 d 所得产物的 GC-MS 测定图谱

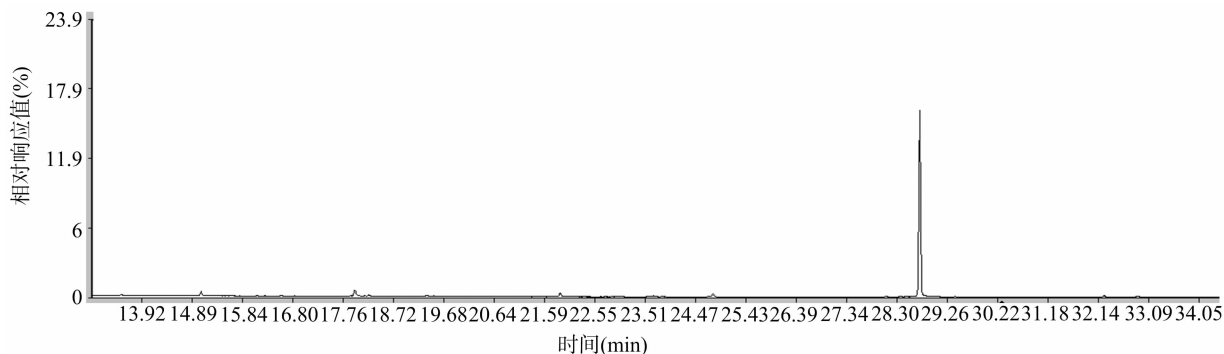


图5 枝孢菌 BD-19 降解秸秆 20 d 所得产物的 GC-MS 测定图谱

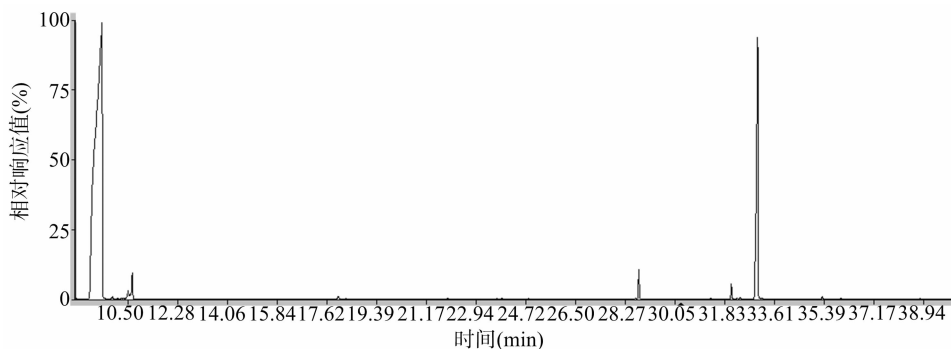


图6 枝孢菌 BD-19 降解秸秆 30 d 所得产物的 GC-MS 测定图谱

糖基、*D*-半乳糖基、*L*-阿拉伯糖基、4-*O*-甲基-*D*-葡萄糖醛酸基、*D*-半乳糖醛酸基、*D*-葡萄糖醛酸基等^[11]。由表 3 可知,在接种 3 d 产物中有 *D*-甘露酸;接种 5 d 产物中有葡萄糖醇;接种 10 d 产物中有 *D*-果糖、半乳糖;接种 20 d 的产物中有葡萄糖酸;接种 30 d 产物中含有葡萄糖醇和葡萄糖酸。由此可知,本试验所用的枝孢菌 BD-19 菌株对秸秆中的半纤维素中所含的糖基类物质有降解作用。

半纤维素主要分为 3 类,即聚木糖类、聚葡萄糖甘露糖类、聚半乳糖葡萄糖甘露糖类,其中聚木糖类主要是以 1,4- β -*D*-吡喃型木糖构成主链,以 4-氧甲基-吡喃型葡萄糖醛酸为支链的多糖,其主要由 β -*D*-吡喃型木糖基、4-氧甲基-吡喃型葡萄糖醛酸基、 α -*L*-呋喃型阿拉伯糖构成^[12]。由表 3 可知,在菌株降解秸秆的 5 d 生成了 *D*-戊二酸呋喃糖、阿拉伯吡喃糖,由此说明,枝孢菌 BD-19 对半纤维素中的聚木糖有降解作用。

构成半纤维素的 3 种糖类中的聚葡萄糖甘露糖是由 *D*-吡喃型葡萄糖基、呋喃型甘露糖基以 1,4- β 型连接成主链^[13]。另一类聚半乳糖葡萄糖甘露糖还有 *D*-呋喃型半乳糖基用支链形式以 1,6- α 型连接到此主链上的若干 *D*-呋喃型半乳糖基、*D*-吡喃型葡萄糖基上^[14],由表 3 可知,在菌株降解秸秆的 3 d,产物中有 *D*-甘露酸出现;在 5 d 时,产物中有葡萄糖醇出现;30 d 时,产物中有葡萄糖醇、葡萄糖酸。由此可知,枝孢菌 BD-19 对半纤维素中的聚葡萄糖甘露糖具有一定的降解作用。

分析表 3 中物质结构可以看出,接种 3 d 时碳原子数在 20 个以上的物质有 2 种,5 d 时有 3 种,10 d 时有 4 种,20 d 时没有碳原子数在 20 个以上的物质,30 d 时有 1 种。由此可见,碳链在 10 d 后有明显的断裂,初步推断,枝孢菌 BD-19 在 10 d 左右对秸秆的降解作用较为明显。

计算表 3 中物质的分子量可知,接种 3 d 时物质的分子量为 220~467;5 d 物质的分子量为 225~467;10 d 时物质的分子量为 153~461;20 d 时物质的分子量为 234~338;30 d 时物质的分子量为 231~338。由此可见,枝孢菌 BD-19 在 10 d 后对秸秆的降解作用较明显。

枝孢菌 BD-19 接种后 5~7 d 菌落生长最旺盛,之后菌落直径不再扩大,在其生长期,由于该菌细胞内纤维素酶、内切葡聚糖酶、 β -葡萄糖苷酶等没有大量产生,所以在 3~5 d 时枝孢菌 BD-19 可能对秸秆降解的速度较慢,因而所得产物较少;在 5~10 d 时推测,枝孢菌 BD-19 能产出较多的纤维素酶、内切葡聚糖酶、 β -葡萄糖苷酶等,从而提高了菌株对秸秆的降解速率。

在菌株生长的后期,随着秸秆培养基中提供的糖类、碳源、氮源、无机盐等菌株生长所必需的物质逐渐减少,影响了菌株的正常生长以及现有菌株的活性,从而导致 3 种纤维素、木质素降解酶的产生量越来越少。与本研究显示的结果一致,在菌株生长平稳期过后的衰亡期,有机物含量越来越少。

3 结论与讨论

本研究主要从稻麦轮作农田土样中以稀释涂平板的方法分离出各菌株,并进行纯化。选用刚果红染色法以及 CMC-Na 水解圈测定法,将所得菌株进行初次筛选后得到具有秸秆降解能力的 15 株真菌。测定这些菌株的 CMC 及 FPA 酶活性后,进一步得到酶活性较高的 12 株真菌。

在液态发酵条件下,将秸秆作为唯一碳源的培养基于摇床振荡培养 10 d 后,秸秆的形态明显发生了变化,以差质量法测定其失质量率与半纤维素、纤维素、木质素的降解率。其中,真菌 BD-19 降解秸秆的失质量率达到 44.51%,半纤维

(下转第 305 页)

表 2 基本控制项目最高允许排放浓度(日均值) mg/L

序号	基本控制项目	一级标准 A 标准
1	化学需氧量	50
2	悬浮物(SS)	10
3	总氮(以 N 计)	15
4	氨氮(以 N 计)	5(水温>12℃)/8(水温≤12℃)
5	总磷(以 P 计)	1(2005 年 12 月 31 日前建设的污水处理厂) 0.5(2006 年 1 月 1 日起建设的污水处理厂)

到了一级标准 A 标准;而稻草-狐尾藻处理的废水除了 COD 和 SS 未达到最高允许排放浓度标准,其余 $\text{NH}_3\text{-N}$ 、TN、TP 均已达到一级标准 A 标准。

3 讨论与结论

3.1 狐尾藻治理废水的效率

从本模拟试验结果可以看出,无稻草覆盖组的狐尾藻处理废水中 COD、SS、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 、TN 和 TP 效果最好,且效率最高,在 29~43 d,废水中各项指标均已降至最低浓度,且水质指标均已达到 GB/8918—2002《城镇污水处理厂污染物排放标准》一级标准 A 标准;而在覆盖稻草组的狐尾藻处理废水中,除 COD 和 SS 浓度升高外,其余指标也均在 29~43 d 时降至最低浓度,且都达到 GB/8918—2002《城镇污水处理厂污染物排放标准》一级标准 A 标准。相比较而言,无稻草覆盖的狐尾藻处理废水效率更高,效果更好。

3.2 狐尾藻治理废水的效果

在罗开武等的研究中, $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度、TP 浓度、COD 在沼液池、生物池(稻草降解池)通过 4 级绿狐尾藻湿地净化后均降低 90% 以上^[10]。本试验中覆盖稻草组中 COD 与 SS 浓度有升高的趋势,6 号桶中自来水的 COD 和 SS 浓度也呈现升高趋势,在试验中覆盖稻草的处理桶内水逐渐变为黑色,而无稻草覆盖组的水是透明的,是否因为稻草在废水中降解从

而导致 COD 和 SS 浓度升高,有待进一步验证。此外,本试验为室内模拟试验,处理时间为 75 d,而罗开武等的处理时间为半年^[10],因此,若本模拟试验延长处理时间,COD 和 SS 浓度在后期是否会下降也有待进一步验证。

参考文献:

- [1] 苏小东,李 艳,原金海,等. 不同水生植物对水体中氮磷吸收去除效果的试验[J]. 净水技术,2014,33(2):48-51.
- [2] 柏 祥,陈开宁,任奎晓,等. 不同水深条件下狐尾藻生长对沉积物氮磷的影响[J]. 生态环境学报,2011,20(6/7):1086-1091.
- [3] 孙 伟. 简述畜禽养殖废水处理研究方法研究进展[J]. 环境研究与监测,2014,27(2):68-69.
- [4] 陈金发,杨 平,聂琦珊,等. 大藻对不同质量浓度畜禽废水的净化作用及生物学效应[J]. 重庆大学学报,2014,37(3):87-94.
- [5] 程 燕,龙 峥,姜无边,等. 水葫芦对猪场废水的净化作用[J]. 养猪,2014(4):86-87.
- [6] 蒙宽宏,刘延滨,张 玲,等. 芦苇与香蒲对水中总磷总氮净化能力研究[J]. 环境科学与管理,2014,39(11):38-40.
- [7] 贾一非,袁 涛,马映东. 狐尾藻对园林水景污染水体的净化作用[J]. 西北林学院学报,2015,30(6):250-254.
- [8] 厉金炳,徐小燕,袁金钱,等. 利用狐尾藻综合治理规模养殖场污水的原理及效果分析[J]. 浙江畜牧兽医,2014(5):72-73.
- [9] 陈 鸿,黄世洋,黎庶凯,等. 绿狐尾藻人工湿地治理污水污染模式及其在广西的应用[J]. 亚热带植物科学,2016,45(4):386-390.
- [10] 罗开武,邹爱华,邹均华,等. 绿狐尾藻治理猪场废水效果观察[J]. 湖南畜牧兽医,2016(1):22-24.
- [11] 国家环保局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法[M]. 4 版. 北京:中国环境科学出版社,2002.
- [12] 国家环境保护总局. 城镇污水处理厂污染物排放标准:GB 18918—2002[S]. 北京:中国标准出版社,2002.

(上接第 296 页)

素、纤维素、木质素的降解率分别为 16.64%、26.42%、11.43%。BD-19 菌株经过形态特征及 ITS 的系统发育分析,鉴定其属于枝孢菌属。

利用 GC-MS 对筛选出的高效降解秸秆菌株 BD-19 降解秸秆的能力进行进一步研究。通过对其降解秸秆产生有机物的分析表明,产物中除了含有少量烷烃类物质外,还含有 32 种有机物,从有机物的种类及含量变化上可以判断,枝孢菌 BD-19 对纤维素、木质素均有降解作用。

参考文献:

- [1] 毕于运,高春雨,王亚静,等. 中国秸秆资源数量估算[J]. 农业工程学报,2009,25(12):211-217.
- [2] 张蕴琦,徐凤花,张书敏,等. 水稻秸秆降解菌系的筛选及其菌群组成分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(8):257-260.
- [3] 陈 坚. 环境生物技术[M]. 北京:中国轻工业出版社,1999.
- [4] 张雪松,朱建良. 影响纤维素类物质厌氧发酵产氢因素的研究[J]. 生物技术通报,2005(2):7-15.
- [5] 封 莉,刘俊峰,冯晓静,等. 秸秆生物质资源利用途径及相应技术[J]. 农机化研究,2004(6):8-11.
- [6] 张 燕. 中国秸秆资源利用方式的效益对比探析[J]. 中国农学通报,2009,25(23):45-51.

- [7] 李慧君. 秸秆纤维素降解菌的筛选及其利用研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2010:1-51.
- [8] Deacon J W. Fungal growth[M]. New York:Blacwell Science Inc, 1997:50-59.
- [9] He X S, Xi B D, Jiang Y H, et al. Bai SG structural transformation study of water-extractable organic matter during the industrial composting of cattle manure[J]. Microchemical Journal, 2013(106):160-166.
- [10] Chi Y, Hatakka A, Maijala P. Can co-culturing of two white-rot fungi increase lignin degradation and the production of lignin-degrading enzymes? [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2007, 59(1):32-39.
- [11] 徐 忠,汪群慧,姜兆华. 氨处理对大豆秸秆纤维素酶产糖影响的研究[J]. 高校化学工程学报,2004,18(6):773-776.
- [12] Juhász T, Kozma K, Szengyel Z, et al. Production of β -glucosidase in mixed culture of *Aspergillus niger* BKM-1305 and *Trichoderma reesei* RUT C30 [J]. Food Technology and Biotechnology, 2003(41):49-53.
- [13] 许 凤,钟新春,孙润仓,等. 秸秆中半纤维素的结构及分离新方法综述[J]. 林产化学与工业,2005,25(21):179-182.
- [14] 全桂静,赵 航. 半纤维素酶高产菌株的筛选及产酶条件的研究[J]. 沈阳化工大学学报,2010,4(1):50-57.