

## 雷竹林土壤染料降解真菌筛选与脱色效果初步研究

陈梦扬<sup>1</sup>, 姚泽秀<sup>1</sup>, 李永春<sup>1</sup>, 吴涵韬<sup>2</sup>, 徐秋芳<sup>1</sup>, 魏 健<sup>1</sup>, 秦 华<sup>1</sup>

(1. 浙江农林大学 环境与资源学院/浙江省土壤污染生物修复重点实验室, 浙江 临安 311300; 2. 浙江农林大学 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300)

**摘要:** 应用平板分离培养和内转录间隔区(internal transcribed spacers, ITS)序列分析的方法, 筛选鉴定集约栽培雷竹 *Phyllostachys violascens* 林土壤中染料降解真菌菌株, 并通过摇瓶发酵研究其染料脱色效果。结果表明: 土壤样品中分离频次最高的真菌种类为木霉菌属 *Trichoderma*, 对 5 株接种到苯胺蓝平板上能形成明显水解圈的真菌分离物, 测试它们对偶氮和三苯甲烷类染料的降解能力。综合脱色效果较好的菌株为 P7-2-3 和 P12-2-4, ITS 序列比对和形态学观察表明菌株分别是卷枝毛霉 *Mucor circinelloides* 和木霉菌 *Trichoderma* sp., 接种不超过 500.0 mg·L<sup>-1</sup> 质量浓度结晶紫染料液体发酵脱色均可获得较高的脱色率; 但染料质量浓度为 300.0 mg·L<sup>-1</sup> 和 400.0 mg·L<sup>-1</sup> 时分别对 2 菌株的脱色能力产生明显抑制, 降解染料质量与菌丝生物量之间存在显著的正相关性。图 4 表 2 参 31

**关键词:** 土壤学; 土壤真菌; 染料降解; 筛选; 雷竹林; 脱色效果

**中图分类号:** S718.8      **文献标志码:** A      **文章编号:** 2095-0756(2016)03-0418-09

## Decolorizing synthetic dyes with fungi screened from a *Phyllostachys violascens* stand

CHEN Mengyang<sup>1</sup>, YAO Zexiu<sup>1</sup>, LI Yongchun<sup>1</sup>, WU Hantao<sup>2</sup>, XU Qiufang<sup>1</sup>, WEI Jian<sup>1</sup>, QIN Hua<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Soil Contamination Bioremediation of Zhejiang Province, School of Environmental and Resource Sciences, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

**Abstract:** This study aimed to screen high efficiency decolorizing fungi for degradation of structurally different synthetic dyes. Fungal strains were isolated and screened from soil of bamboo plantation (*Phyllostachys violascens*) using conventional separation, cultivation methods, and sequence alignment analysis of nuclear ribosomal internal transcribed spacers (ITS). The bamboo plantation for isolating soil fungi consisted of bamboo forests aged 1, 7, 12, and 15 years, which applied no heavy fertilization and organic mulch until year 5. Result showed that *Trichoderma* sp. had the highest isolation frequency in the cultured fungi from topsoil based on morphological identification and phylogenetic analysis. Decolorization capacity of the five isolated fungi ((P7-2-1, P7-2-2, P1-2-2, P7-2-3, P12-2-4) to the five different synthetic dyes (Congo red, orange G, crystal violet, fuchsin acid, and methyl orange) showed that P7-2-3 (identified as *Mucor circinelloides*) and P12-2-4 (identified as *Trichoderma* spp.) had the strongest capacity to decolorize the five kinds of dyes. The decolorization efficiency of P7-2-3 and P12-2-4 to crystal violet was similar at different crystal violet concentrations below 500.0 mg·L<sup>-1</sup>; however, crystal violet inhibited the decolonization reaction at concentrations of 300.0 mg·L<sup>-1</sup> for strain P7-2-3 and 400.0 mg·L<sup>-1</sup> for strain P12-2-4. The fungal biomass and dye decolorization had a positive relationship for different concentrations of crystal violet, and strains of P7-2-3 and P12-2-4 have potential value for application

收稿日期: 2015-06-03; 修回日期: 2015-11-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31200473); 浙江省教育厅资助项目(Y201225759); 国家级大学生创新训练项目(201410341015)

作者简介: 陈梦扬, 从事土壤微生物学研究。E-mail: ChenMY1993@126.com。通信作者: 李永春, 副教授, 博士, 从事土壤与环境微生物学研究。E-mail: ycli@zafu.edu.cn

in decolorization and degradation of dyes wastewater. [Ch, 4 fig. 2 tab. 31 ref.]

**Key words:** soil science; soil fungi; dyes decolorization; screen; *Phyllostachys violascens* stand; decolorizing effect

雷竹 *Phyllostachys violascens* 是中国长江以南地区广泛分布的优良笋用竹种, 自 20 世纪 90 年代初以来, 以冬季覆盖和大量施肥为主要特征的集约栽培技术已在生产上大面积推广<sup>[1]</sup>。长期集约栽培导致土壤 pH 值大幅下降、养分比例失调、酶活性异常、土壤微生物量碳和微生物区系发生改变等<sup>[2]</sup>。林地覆盖竹林由于环境条件的改变, 尤其是土壤温度的变化和有机覆盖物及其腐解过程的吸引集聚作用, 也使土壤真菌数量与比例明显提高<sup>[3-4]</sup>。真菌是土壤中重要的微生物资源, 在分解纤维素、半纤维素、木质素、果胶及还原氮、溶解磷等生态过程中起重要作用。土壤真菌有着形态、基因以及功能上的多样性, 且无法在地理上划分界限, 因此, 土壤真菌的研究对调查方法的依赖更大<sup>[5]</sup>。长期覆盖雷竹林地高碳氮比的有机覆盖物输入, 有利于分解木质素纤维素能力强的微生物富集<sup>[6]</sup>。合成染料广泛应用于纺织印染和皮革处理等行业, 由于能够抵抗光、水、许多化合物和生物攻击, 很难被常规污水处理系统中的微生物所分解<sup>[7]</sup>。如果印染废水不加以处理就直接排放到河流, 势必造成严重的环境污染。许多物理和化学方法虽然可以从废水中获得较好的染料脱色效果, 但价格昂贵、需要耗费大量的能源, 并且常常产生一些有毒的分解产物等, 从而大大限制了这些方法在工业印染废水处理中的实际应用<sup>[8]</sup>。生物学方法去除染料颜色跟物理化学方法相比, 有许多优势, 比如成本低、生态友好等<sup>[9]</sup>。近年来, 陆续报道了一些细菌、真菌能够去除不同种类染料的颜色<sup>[10-13]</sup>。细菌在无氧的条件下脱色通常只能去除一种类型的偶氮染料, 同时又常常产生一些有害的分解产物, 这些不利因素限制了细菌在处理混合种类染料工业废水中的应用。因此, 越来越多的研究人员把注意力投向了真菌脱色研究, 人们也已经从单一的研究白腐真菌开始转向对更多样的脱色真菌的研究<sup>[14-16]</sup>。包括白腐真菌、霉菌、酵母菌等大批真菌, 业已被发掘出来用于染料的脱色与降解<sup>[17]</sup>。真菌降解染料主要是由于它具有非特异性和非选择性的胞外酶系<sup>[12]</sup>。白腐真菌是目前研究最多、染料脱色过程中最有效的真菌资源, 其菌丝体靠降解木质素—纤维素材料的能力穿入木质细胞腔内, 释放的木质素降解酶系为非底物专一性酶, 分泌到细胞外对多种木质素成分和染料具有广谱的氧化降解作用<sup>[18]</sup>。由于合成染料的结构与木质素组分的结构相似, 具有分解木质素能力的微生物同样具有分解染料的能力<sup>[9]</sup>。目前, 已有从雷竹林土壤中分离并筛选到分解合成染料<sup>[6]</sup>和纤维素降解真菌<sup>[9]</sup>的报道, 但前述研究中仅限于在固体培养基上进行分解染料测试或只测定酶活性, 对雷竹林土壤染料降解真菌的筛选特别是脱色效果的研究报道较少。为此, 本研究以不同种植年限的雷竹林土壤为材料, 采用基于平板分离培养和内转录间隔区(internal transcribed spacers, ITS)序列分析的方法, 解析雷竹林土壤真菌种群特征并筛选染料降解功能菌株, 通过摇瓶发酵发掘具有染料脱色潜力的真菌资源, 为印染废水的微生物降解奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 土壤样品采集

土壤样品采自浙江省临安市太湖源镇(30°16'N, 119°34'E)。土壤为粉砂岩母质上发育的红壤土类。在研究区内选择立地条件基本一致, 栽培历史分别为 1, 7, 12, 15 a 的雷竹林样地。集约栽培模式为: 雷竹定植后的第 1~5 年基本不施肥或施少量复合肥, 从雷竹栽培的第 6 年起开始实施集约栽培; 每年 11 月下旬至 12 月上旬在雷竹林地表先覆盖 15.0 cm 稻草作为发酵增温层, 再覆盖 20.0 cm 的砻糠作为保温层以利于竹笋早发。自然出笋时撤去上层的覆盖物砻糠, 而下层的稻草则已基本腐烂入土。不同年份雷竹林随机选取 3 个经营措施一致的重复样地, 共建立 12 个 20.0 m × 20.0 m 的样地, 各个样地用五点取样法采集 0~20.0 cm 土壤样品。同一样地新鲜土样充分混匀后, 去除大的石块和植物残体, 过 2.0 mm 钢筛后形成 1 个混合样品, 共计 12 个土样装入密封袋, 放入冰桶带回实验室。采集样品分为 2 份, 1 份冷藏于 4 °C 用于真菌分离等; 另外 1 份于室内自然风干, 研磨过筛后用于土壤基本理化性质分析。土壤 pH 值采用水浸提酸度计法 [ $m(\text{土}):m(\text{水})=1.0:2.5$ ]; 土壤有机碳用重铬酸钾外加热法测定; 土壤全氮采用凯氏定氮法测定; 有效磷采用 Bray 法测定; 速效钾先用乙酸铵浸提, 后在火焰光度计上测定<sup>[20]</sup>;

土壤粒径分布用比重计法<sup>[21]</sup>。不同栽培年限雷竹林土壤的基本理化性质如表1。

表1 不同栽培年限雷竹林土壤基本理化性质

Table 1 Soil physical and chemical properties of *Phyllostachys violascens* stand with different culture years

栽培年限/a	pH 值	有机碳/(g·kg <sup>-1</sup> )	全氮/(g·kg <sup>-1</sup> )	碳氮比	有效磷/(mg·kg <sup>-1</sup> )	速效钾/(mg·kg <sup>-1</sup> )	砂粒/%	粉粒/%	黏粒/%
1(—)	6.66 a	18.60 bc	1.71 a	11.03 b	39.87 b	74.67 c	38.49 a	25.64 a	35.88 a
7(1)	4.93 b	20.07 b	1.74 a	11.72 b	107.93 b	273.67 b	42.13 a	24.81 a	33.06 a
12(4)	4.40 bc	28.14 a	2.00 a	14.14 a	207.27 a	286.33 b	35.67 a	30.38 a	33.95 a
15(10)	4.01 c	29.09 a	2.03 a	14.20 a	211.00 a	346.00 a	44.12 a	23.37 a	32.51 a

说明：同列不同字母代表差异达显著水平( $P < 0.05$ )。

## 1.2 土壤真菌的分离

采用稀释平皿法<sup>[22]</sup>在孟加拉红培养基上分离真菌。取 10.0 g 新鲜土壤样品加入到 100.0 mL 灭菌去离子水中，225 r·min<sup>-1</sup>，30 min 摇匀倍比稀释制成土壤稀释液，吸取 0.1 mL 梯度稀释液( $10^{-1}$ ~ $10^{-5}$ )涂布于孟加拉红固体培养基上，3 次重复，置于 28 ℃避光培养 5~7 d。培养过程中及时观察，挑取形态学特征不一致的单菌落接种于马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)固体培养基上纯化，真菌形态学特征鉴别依据《真菌鉴定手册》。纯化后的真菌定期转接于 PDA 平板上，4 ℃ 保藏备用。

## 1.3 真菌种属特征鉴定

ITS 分子鉴定具体过程参照 Schoch 等<sup>[23]</sup>的方法，聚合酶链式反应(PCR)扩增引物为：ITS5：5'-TC-CTCCGCTTATTGATATGC-3'，ITS4：5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'。扩增产物利用 pMD 18-T 载体进行克隆后测序(上海生工)，将得到的序列输入 GenBank，与已收录的真菌基因序列进行序列比对(BLAST)比较，找出其最高相似性序列。利用 ClustalX 软件对供试菌株和参比菌株先进行 ITS 基因的多序列对齐，再利用 Mega 4.0 软件，采用邻接法(neighbor-joining)构建系统发育树。分离真菌 ITS 序列的 GenBank 登录号为 KP027644-KP027648。

## 1.4 真菌脱色能力测试

使用打孔器(直径 6.0 mm)沿真菌菌丝(菌落)边缘打孔，取直径 6.0 mm 的菌片接种到含有 100.0 mg·L<sup>-1</sup> 苯胺蓝的 PDA 固体培养基上，28 ℃ 避光培养观察各分离菌的脱色能力。能形成明显水解圈的真菌接种于含有 100.0 mg·L<sup>-1</sup> 其他染料(刚果红、橙黄 G、结晶紫、酸性品红、甲基橙)的 PDA 固体培养基上，进一步观察对其他染料的脱色能力。对脱色染料的种类较多、能力较强的真菌进行形态学鉴别及 ITS 序列分子鉴定，并用于后续的脱色效果研究。

## 1.5 不同的染料浓度对真菌脱色效果的影响

向 250.0 mL 锥形瓶中加入 100.0 mL 纤维素钠-结晶紫液体培养基，实验设置 3 次重复，培养基具体配方为：磷酸二氢钾(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 1.0 g；氯化钠(NaCl) 0.1 g；七水合硫酸镁(MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) 0.3 g；硝酸钠(NaNO<sub>3</sub>) 2.5 g；氯化铁(FeCl<sub>3</sub>) 0.01 g；氯化钙(CaCl<sub>2</sub>) 0.1 g；结晶紫质量浓度梯度为 0, 100.0, 200.0, 300.0, 400.0, 500.0 mg·L<sup>-1</sup> 共 6 个；每个结晶紫梯度的培养基最后用双蒸水(ddH<sub>2</sub>O)定容至 1 000.0 mL。用棉塞和牛皮纸封装，121 ℃高温高压灭菌后备用。将筛选出的菌株平板培养 4.0 d 后，刮取培养皿中的菌丝放入无菌水中匀浆(3 次，6~8 s·次<sup>-1</sup>)，接种液体培养基，接种量为 10.0 mL。空白对照加入 10.0 mL 无菌水，不接菌。置于 28 ℃，140 r·min<sup>-1</sup> 振荡培养 8.0 d，每天取样并检测各处理的吸光度  $D(\lambda)$  变化。绘制结晶紫的吸光度—质量浓度标准曲线，将记录的吸光度  $D(\lambda)$  值换算为相应浓度，统计一定时间内培养基中染料的浓度变化，同时观察菌体的生长情况。将每次检测样品的初始吸光度  $D(\lambda)$  值依照标准曲线换算成浓度  $c_0$ ，终浓度为  $c_1$ ，按如下公式计算脱色率。染料脱色率= $[(c_0-c_1)/c_0] \times 100\%$ 。

菌丝生物量测定参照袁海生等<sup>[13]</sup>的方法，在吸光度测量结束后，将培养液过滤并用蒸馏水冲洗数次，真空抽滤后放至烘箱烘干(140 ℃，100 min)至恒量，称量即为菌丝生物量。



## 2 结果与分析

### 2.1 竹林土壤真菌分离物的基本种属特征

依据分离出真菌菌落的颜色、生长速度、孢子形态等特征，从竹林土壤中共分离得到形态特征明显不同的真菌分离物 61 株。将各真菌分离物归类后提取基因组 DNA，PCR 扩增获得约 550~650 bp 的 ITS 序列，通过 BLAST 比对进行初步的种属鉴定。结果表明：与真菌分离物 ITS 序列最为相似的种属，分别为木霉属 *Trichoderma* sp.，绿木霉 *T. virens*，*T. crassum*，棘孢木霉 *T. asperellum*，钩状木霉 *T. hamatum*，*Hypocrea flaviconidia*，*Hypocrea cordyceps*，黑酵母菌 *Aureobasidium pullulans*，真菌 1 种，卷枝毛霉 *Mucor circinelloides* 等，分属于半知菌亚门 Deuteromycotina，子囊菌亚门 Ascomycotina 和接合菌亚门 Zygomycotina。

### 2.2 染料脱色真菌筛选

将上述真菌分离物以平皿培养的方式，接种到苯胺蓝培养基上进行初步筛选，发现有 5 株真菌分离物能形成明显的水解圈。进一步测试这 5 株真菌对 5 种结构不同的合成染料—刚果红/橙黄 G(偶氮类)、结晶紫/酸性品红(三苯甲烷)、甲基橙等的分解能力。在固体培养基上，该 5 株分离物对结晶紫、橙黄 G、刚果红、甲基橙脱色能力和速度均有差异(表 2)。对 3 种不同类型共 5 种合成染料脱色效果表明：5 株真菌分离物对酸性品红脱色效果最好，其次是结晶紫，对刚果红、橙黄 G 和甲基橙脱色能力一般。由于结晶紫和酸性品红同属三苯甲烷类染料，说明这 5 株真菌分离物对三苯甲烷类染料有较好的脱色效果，但这些菌株起初筛选时接种到苯胺蓝培养基上都能形成明显的水解圈，也表明真菌脱色效果与生长时间有一定关系。

表 2 5 株真菌分离物对合成染料的脱色效果

Table 2 Decolorization screening of synthetic dyes by five isolate fungi in agar media

菌株	不同染料(20.0 mg·L <sup>-1</sup> )脱色效果				
	刚果红	橙黄 G	结晶紫	酸性品红	甲基橙
P7-2-1	-(+)	+	+	++	+
P7-2-2	-	-(+)	+++	+++	-(+)
P1-2-2	+	-(+)	++	+	-(+)
P7-2-3	+++	++	+	+++	-(+)
P12-2-4	+	+	++	++	++

说明：-，无脱色现象或不确定；-(+)，几乎不脱色或微脱色；+，轻度脱色；++，中度脱色；++(+)，重度脱色；+++，完全脱色。

### 2.3 脱色真菌分子种属鉴定

上述 5 株真菌分离物 ITS 序列 BLAST 比对结果表明：分离物 P7-2-1，P7-2-3，P12-2-4 分别与黑酵母菌 *Aureobasidium pullulans*，卷枝毛霉 *Mucor circinelloides*，木霉菌属 *Trichoderma* sp. 相似度最高，相似度为 99%~100%；而 P7-2-2 和 P1-2-2 与真菌 1 种相似度较高，分别为 97% 和 90%。

根据上述基因序列比对的结果，从 GenBank 数据库中获取了 8 个参比菌株的序列，得到反映待测真菌菌株与参比菌株之间进化与发育关系的系统发育树(图 1)。由 ITS 序列所构成的系统发育树表明，P7-2-1，P7-2-3，P12-2-4 与黑酵母菌、卷枝毛霉、木霉菌属位于同一个进化枝上，结合形态鉴定结果，该 3 株真菌可分别鉴定为黑酵母菌、卷枝毛霉菌、木霉菌属。而 P7-2-2 和 P1-2-2 菌株自身相似性较高，与草酸青霉菌 *Penicillium oxalicum* 亲缘关系相对较近，但分子种属特性不够明确尚需进一步鉴定，由此也暗示集约经营雷竹林土壤具有挖掘染料降解真菌资源的潜力。

### 2.4 染料质量浓度对菌株脱色效果的影响

基于 5 株真菌分离物对合成染料脱色的效果，选择综合脱色能力较好的菌株 P7-2-3 和 P12-2-4(图 2)，分别接种到不同质量浓度梯度结晶紫染料中进行液体发酵脱色研究。菌株 P7-2-3 接种 10.5 d 内染料的脱色效果如图 3 所示，接种 4.5 d 后，100.0 mg·L<sup>-1</sup> 和 200.0 mg·L<sup>-1</sup> 质量浓度的脱色率明显高于其余 3 个浓度梯度，且 100.0 mg·L<sup>-1</sup> 和 500.0 mg·L<sup>-1</sup> 等 2 个质量浓度的脱色率基本趋于稳定(图 3a)，显示低

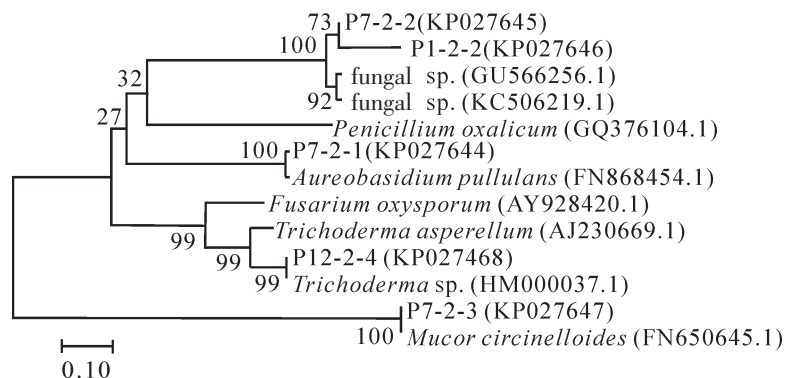
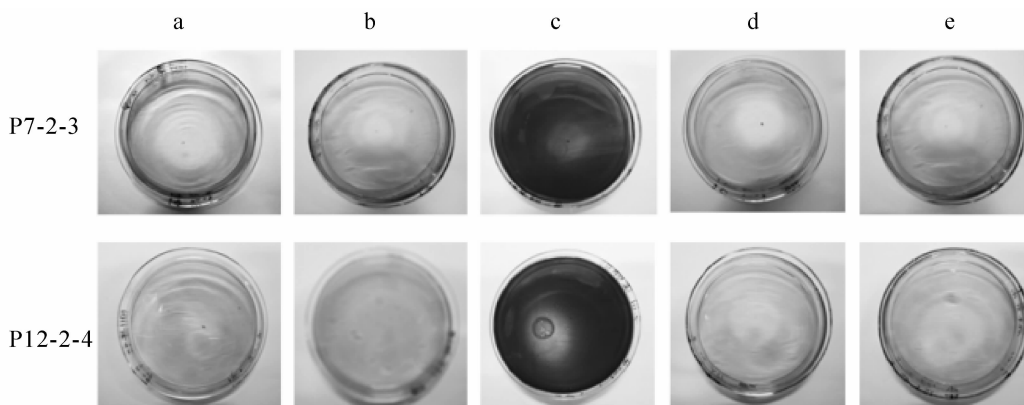


图1 部分分离真菌菌株 ITS 序列及其系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of isolate fungi and reference strains based upon aligned sequences of ITS sequence

质量浓度染料条件下菌株呈现出较高的脱色率的趋势。接种 10.5 d 后菌株 P7-2-3 对  $100.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $200.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  质量浓度梯度结晶紫染料的脱色率分别为 94.1% 和 83.0%，而对  $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ， $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  质量浓度的脱色率分别只达到 46.0%，41.0% 和 33.0% 左右。由此可见：结晶紫染料质量浓度达到  $300.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  以上时对菌株 P7-2-3 的脱色能力起到明显的抑制作用，而质量浓度低于  $200.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时其抑制作用并不明显。



a. 刚果红 Congo red; b. 橙黄G orange G; c. 结晶紫 crystal violet;  
d. 酸性品红 fuchsin acid; e. 甲基橙 methyl orange.

图2 P7-2-3 和 P12-2-4 菌株对 5 种合成染料( $100.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )的脱色效果

Figure 2 Decolorization effect of synthetic dyes ( $100.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) by P7-2-3 and P12-2-4

菌株 P12-2-4 对不同质量浓度梯度的结晶紫染料脱色率随培养时间的延长而提高，接种 4.5 d 时对不同质量浓度梯度染料的脱色率表现出与菌株 P7-2-3 相似的趋势；但接种 6.0 d 后  $300.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  质量浓

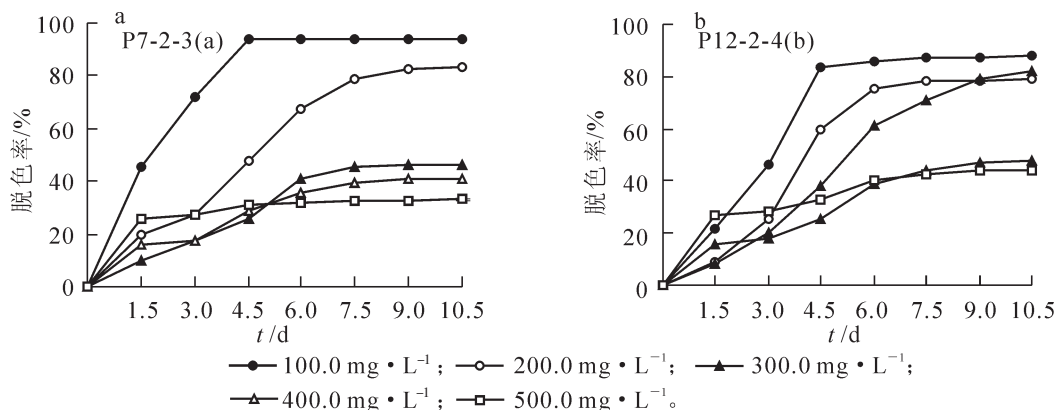


图3 菌株 P7-2-3(a)和 P12-2-4(b)对不同质量浓度结晶紫的脱色率

Figure 3 Decolorizing rate of crystal violet with different concentrations by P7-2-3(a) and P12-2-4(b)

度梯度的染料脱色率随培养时长而不断提高，并在接种 9.0 d 时与  $200.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  质量浓度的脱色率接近，虽然接种 10.5 d 时脱色率略高于  $200.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  质量浓度的处理但并无显著差异(图 3b)。接种 10.5 d 后 P12-2-4 菌株对  $100.0$ ,  $200.0$  和  $300.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  等 3 个质量浓度结晶紫染料脱色率分别达到 88.1%，78.8% 和 82.0%，但对  $400.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $500.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  质量浓度的染料脱色率分别只达到 47.3% 和 44.3%，可见结晶紫染料浓度达到  $400.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  以上对菌株 P12-2-4 的脱色能力起到明显的抑制作用。

## 2.5 染料脱色效果与菌丝生物量的关系

上述菌株液体发酵培养 10.5 d 后，对不同结晶紫染料质量浓度下的菌丝生物量进行测定，染料脱色率与菌株 P7-2-3, P12-2-4 生物量的关系如图 4 所示。菌株 P7-2-3 经过 10.5 d 培养后脱色率随结晶紫质量浓度增加而下降(图 4a)，菌丝生物量则呈现一定程度的上升。菌株 P12-2-4 经过 10.5 d 培养后脱色率在结晶紫浓度达到  $400.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  后明显下降(图 4b)，而菌丝生物量在染料质量浓度达到  $300.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时达到最大。为准确描述染料不同质量浓度下菌株脱色效果与菌丝生物量之间的关系，计算了每个质量浓度下最终降解结晶紫染料的总质量，并与对应质量浓度下菌丝生物量进行相关分析表明，菌株 P7-2-3 降解染料质量与对应菌丝生物量之间 Pearson 相关系数为 0.972 ( $P < 0.01$ ,  $n = 15$ )，而菌株 P12-2-4 两者之间 Pearson 相关系数为 0.983 ( $P < 0.01$ ,  $n = 15$ )，表明菌株降解结晶紫的质量与菌丝生物量之间存在显著的正相关关系。

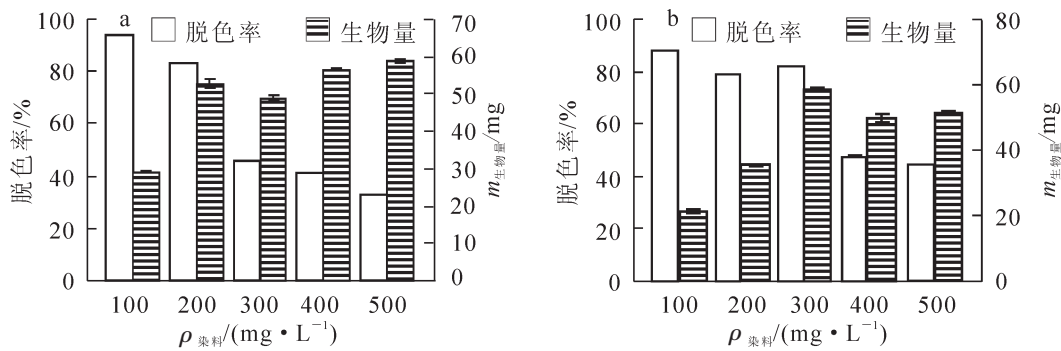


图 4 不同质量浓度下结晶紫降解率与菌株 P7-2-3(a)及 P12-2-4(b)生物量的关系

Figure 4 Dye-decolorizing rate of P7-2-3(a), P12-2-4(b) and its biomass under different concentration of crystal violet

## 3 讨论

长期林地覆盖经营势必导致雷竹林表层土壤酸化和主要养分的过量积累，真菌数量总体上随林地覆盖年限的增加呈显著升高趋势<sup>[4]</sup>。而富含纤维素和木质素且高碳氮比的有机覆盖物，留存于雷竹林土壤中短期内难以自然腐解，也是导致林地土壤发物理、化学和生物性劣变的重要原因之一<sup>[9]</sup>。本研究采集了 4 个年份的雷竹林表层土壤，理化性质分析表明，土壤 pH 随栽培年限的增加而显著下降，土壤有机碳、全氮、有效磷和速效钾随栽培年限延长而显著增加，同时集约栽培 4 a(12 a)和 10 a(15 a)后土壤碳氮比显著提高，印证了前人的研究结果。通过对真菌分离物初步的形态分类和分子种属鉴定表明，分离频次最高的真菌种类为木霉属。木霉属真菌广泛分布于土壤、植物根际、腐烂的木材和其他基质中，环境适应性强<sup>[24]</sup>，易于分离纯化和培养，可利用各种简单或复杂的碳源和氮源生长繁殖<sup>[25]</sup>。目前，国内外对木霉属真菌功能的研究表明，木霉可产生拮抗物质和溶菌酶从而抑制其他病原菌的生长，还可产生纤维素酶和其他水解酶类<sup>[26-27]</sup>。长期覆盖经营雷竹林有机覆盖物残留和表层土壤碳氮比显著提高，也为筛选具有高效降解能力的真菌菌株奠定了基础。

微生物在自然界的纤维素降解过程中起关键和主要作用，其中真菌的贡献最大，典型代表有木霉属 *Trichoderma* sp.<sup>[28]</sup>和青霉属 *Penicillium* sp.<sup>[29]</sup>等。本研究对分离、纯化得到的真菌分离物进行降解合成染料的功能筛选。结果表明：5 株真菌对 3 类共 5 种染料脱色能力和速度有所差异，对同属三苯甲烷类的酸性品红和结晶紫有较好的脱色效果。经形态与基于 ITS 序列的分子鉴定结果表明：对 5 种染料综合脱色效果较好的 P7-2-3 和 P12-2-4 菌株分别为卷枝毛霉菌 *Mucor circinelloides*，木霉菌 *Trichoderma* sp.。党宏波等<sup>[30]</sup>从大庆油田长期被石油污染的土壤中，分离出具有高效原油降解能力的丝状真菌卷枝毛霉菌。

而以雷竹林覆盖材料苍糠、稻草及覆盖雷竹林土壤为材料,韩国民等<sup>[6]</sup>分离并筛选到1株冷杉附毛孔菌 *Trichaptum abietinum*,该真菌能够在固体培养基上分解所测试的全部9种合成染料。可晓等<sup>[19]</sup>分离出1株滤纸酶活力高的菌株,经菌落培养特征和显微结构特征观察属青霉属 *Penicillium*,可见长期覆盖经营林地中的高效降解真菌具有多样性。系统发育分析表明:菌株 P7-2-2 和 P1-2-2 与草酸青霉菌 *Penicillium oxalicum* 亲缘关系相对较近,但其种属特性需要进一步鉴定。已有的研究表明:草酸青霉菌作为丝状真菌,对染料具有高效吸附作用<sup>[31]</sup>,也为进一步深入发掘特定竹林生境中具有高效生物降解潜力的有益真菌提供了科学依据。

为定量验证所筛选到菌株的脱色能力,选择在培养皿上对5种染料综合脱色能力较好的菌株 P7-2-3 和 P12-2-4,进行10.5 d内不同质量浓度结晶紫染料液体发酵脱色研究。结果表明:菌株 P7-2-3 和 P12-2-4 分别接种  $200.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $300.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  结晶紫染料,摇瓶10.5 d后脱色率分别可以达到83.0%和82.0%;而染料质量浓度分别达到  $300.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $400.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  以上时,此2株菌的脱色能力明显被抑制。由此可见:结晶紫染料质量浓度对菌株 P12-2-4 抑制作用相对稍弱,也证实其脱色能力比菌株 P7-2-3 更强。相关分析表明:不同质量浓度下菌株降解结晶紫的总质量与菌丝生物量存在显著的正相关关系,这也证实了袁海生等<sup>[13]</sup>菌丝生物量与脱色率具有明显正相关性的结论。本研究中菌株对不同质量浓度结晶紫染料的脱色效果与菌丝生物量之间的关系,也说明培养基中染料过多是导致真菌对高质量浓度染料脱色率降低的原因之一。可以通过增加液体发酵脱色染料的种类和优化脱色条件等,将筛选获得菌株应用于环保废水处理等环保产业。

## 5 参考文献

- [1] 秦华,刘卜榕,徐秋芳,等.长期集约种植对雷竹林土壤氨氧化古菌群落的影响[J].生态学报,2012,32(19):6067-6084.  
QIN Hua, LIU Burong, XU Qiufang, et al. Effects of long-term intensive management on soil ammonia oxidizing archaea community under *Phyllostachys praecox* stands [J]. *Acta Ecol Sin*, 2012, 32(19): 6076 - 6084.
- [2] 杨芳,吴家森,钱新标,等.不同施肥雷竹林土壤微生物量碳的动态变化[J].浙江林学院学报,2006,23(1):70-74.  
YANG Fang, WU Jiasen, QIAN Xinbiao, et al. Dynamic changes of soil microbial biomass carbon in *Phyllostachys praecox* stand with different fertilizers [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2006, 23(1): 70 - 74.
- [3] 董林根,姜小娟,方茂盛.雷竹覆盖栽培林地土壤微生物的初步研究[J].浙江林学院学报,1998,15(3):236-239.  
DONG Lingen, JIANG Xiaojuan, FANG Maosheng. Primary study of soil microorganism in Lei bamboo forest of protected cultivation [J]. *J Zhejiang For Coll*, 1998, 15(3): 236 - 239.
- [4] 郭子武,俞文仙,陈双林,等.林地覆盖对雷竹林土壤微生物特征及其与土壤养分制约性关系的影响[J].生态学报,2013,33(18):5623-5630.  
GUO Ziwu, YU Wenxiang, CHEN Shuanglin, et al. Influence of mulching management on soil microbe and its relationship with soil nutrient in *Phyllostachys praecox* stand [J]. *Acta Ecol Sin*, 2013, 33(18): 5623 - 5630.
- [5] 陈晓,刘勇,李国雷,等.土壤真菌研究方法及人为干扰对森林土壤真菌群落影响研究进展[J].世界林业研究,2011,24(5):7-12.  
CHEN Xiao, LIU Yong, LI Guolei, et al. Progress on research method of soil fungi and human disturbances to forest soil fungi [J]. *World For Res*, 2011, 24(5): 7 - 12.
- [6] 韩国民,何兴兵,张鹏,等.多孔菌 *Trichaptum abietinum* 1302BG 自然条件下对合成染料刚果红和酸性品红的高效降解[J].微生物学通报,2011,38(4):603-614.  
HAN Guomin, HE Xingbing, ZHANG Peng, et al. Efficient degradation of polyporus fungus *Trichaptum abietinum* 1302BG on the synthetic dyes congo red and fuchsin acid under non-sterile condition [J]. *Microbiol China*, 2011, 38(4): 603 - 614.
- [7] SENAN R C, ABRAHAM T E. Bioremediation of textile azo dyes by aerobic bacterial consortium aerobic degradation of selected azo dyes by bacterial consortium [J]. *Biodegradation*, 2004, 15(4): 275 - 280.
- [8] NIGAM P, ARMOUR G, BANAT I M, et al. Physical removal of textile dyes from effluents and solid-state fermentation



- by dye-absorbed agricultural residues [J]. *Bioresour Technol*, 2000, **72**(3): 219 – 226.
- [9] FU Yuzhu, VIRARAGHAVAN T. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review [J]. *Bioresour Technol*, 2001, **79**(3): 251 – 262.
- [10] 尹亮, 陈章和, 赵树进. 微生物对偶氮染料的脱色及其基因工程研究进展[J]. 生物技术, 2007, **17**(6): 86 – 89.
- YIN Liang, CHEN Zhanghe, ZHAO Shujin. Progress of studies in decolorization of azo dyes by microorganisms and gene engineering for decoloring bacteria of azo dyes [J]. *Biotechnology*, 2007, **17**(6): 86 – 89.
- [11] 余燧, 郑平, 金仁村, 等. 印染废水生物处理技术进展[J]. 化工进展, 2008, **27**(11): 1724 – 1727.
- YU Yi, ZHENG Ping, JIN Rencun, *et al.* Biotechnology for dyeing and printing wastewater treatment [J]. *Chem Ind Eng Prog*, 2008, **27**(11): 1724 – 1727.
- [12] 靳奇峰, 时胜男, 焦庆祝, 等. 真菌在染料脱色中的应用及其酶学研究进展[J]. 辽宁师范大学学报: 自然科学版, 2009, **32**(4): 480 – 483.
- JIN Qifeng, SHI Shengnan, JIAO Qingzhu, *et al.* Research advances in fungal enzymes and their application to dyedecolorization [J]. *J Liaoning Norm Univ Nat Sci*, 2009, **32**(4): 480 – 483.
- [13] 袁海生, 戴玉成, 曹云, 等. 白腐真菌染料脱色菌株的筛选及一色齿毛菌脱色条件的研究[J]. 菌物学报, 2010, **29**(3): 429 – 436.
- YUAN Haisheng, DAI Yucheng, CAO Yun, *et al.* Screening of white-rot fungi for decolorizing synthetic dyes and investigation on factors affecting decolorizing capacity of *Cerrena unicolor* [J]. *Mycosystema*, 2010, **29**(3): 429 – 436.
- [14] 梁红昌, 千英花, 张庆华, 等. 一株脱色真菌的鉴定及脱色特性的初步探讨[J]. 微生物学通报, 2009, **36**(7): 956 – 961.
- LIANG Hongchang, QIAN Yinghua, ZHANG Qinghua, *et al.* Preliminary discuss on identification and characterization of one decolorizing fungus [J]. *Microbiol China*, 2009, **36**(7): 956 – 961.
- [15] 张培培, 任随周, 许玫英, 等. 微生物对三苯基甲烷类染料脱色的研究进展[J]. 微生物学通报, 2009, **36**(9): 1410 – 1417.
- ZHANG Peipei, REN Suizhou, XU Meiyong, *et al.* Recent advances in microbial decolorization of triphenylmethane dyes [J]. *Microbiol China*, 2009, **36**(9): 1410 – 1417.
- [16] 朱林, 洪宇植, 方泽民, 等. 真菌漆酶对蒽醌和偶氮类活性染料的脱色[J]. 中国科技论文在线, 2010, **5**(3): 224 – 227.
- ZHU Lin, HONG Yuzhi, FANG Zemin, *et al.* Decolorization of reactive dyes of anthraquinone and azo by fungal laccase [J]. *Sciencepaper Online*, 2010, **5**(3): 224 – 227.
- [17] 王慧, 郑小伟, 王宾香, 等. 真菌对染料的脱色研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2009, **15**(1): 147 – 151.
- WANG Hui, ZHENG Xiaowei, WANG Binxiang, *et al.* Advance in decolorization of dye by fungi [J]. *Chim J Appl Environ Biol*, 2009, **15**(1): 147 – 151.
- [18] BUMPUS J A. Perspectives on the use of white rot fungi in bioremediation technologies [G]//SIKDAR S K, IRVINE R L. *Bioremediation: Principles and Practices*. Lancaster P A: Technomic Publishing Company, 1998: 67 – 109.
- [19] 可晓, 陈双林, 张小平, 等. 雷竹林存留有机覆盖物高效降解菌株分离及产酶条件优化[J]. 浙江农林大学学报, 2012, **29**(2): 244 – 250.
- KE Xiao, CHEN Shuanglin, ZHANG Xiaoping, *et al.* Selection of strains used to degrade organic mulching materials from *Phyllostachys violascens* forest and optimization of its enzyme production [J]. *J Zhejiang A & F Univ*, 2012, **29**(2): 244 – 250.
- [20] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1999.
- [21] ZHANG Tao, LI Yongfu, CHANG S X, *et al.* Converting paddy fields to Lei bamboo (*Phyllostachys praecox*) stands affected soil nutrient concentrations, labile organic carbon pools, and organic carbon chemical compositions [J]. *Plant Soil*, 2013, **367**(1/2): 249 – 261.
- [22] JAROSZUK-ŚCISEL J, KUREK E, SLOMKA A, *et al.* Activities of cell wall degrading enzymes in autolyzing cultures of three *Fusarium culmorum* isolates: growth-promoting, deleterious and pathogenic to rye (*Secale cereale*) [J]. *Mycologia*, 2011, **103**(5): 929 – 945.
- [23] SCHOCH C L, SEIFERT K A, HUHDORF S, *et al.* Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a



- universal DNA barcode marker for fungi [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2012, **109**(16): 6241 – 6246.
- [24] MELO I S, FAULL J L. Parasitism of *Rhizoctonia solani* by strains of *Trichoderma* spp. [J]. *Sci Agric*, 2000, **57**(1): 55 – 59.
- [25] VINALE F, SIVASITHAMPARAM K, GHISALBERTI E L, *et al.* *Trichoderma*-plant-pathogen interactions [J]. *Soil Biol Biochem*, 2008, **40**(1): 1 – 10.
- [26] ALTOMARE C, NORVELL W, BJÖRKMAN T, *et al.* Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(7): 2926 – 2933.
- [27] 田晔, 滕应. 木霉属真菌在重金属污染土壤生物修复中的应用潜力分析[J]. 科学技术与工程, 2013, **13**(36): 10877 – 10882.
- TIAN Ye, TENG Ying. Application potential of *Trichoderma* sp. in bioremediation of soil contaminated with heavy metals [J]. *Sci Technol Eng*, 2013, **13**(36): 10877 – 10882.
- [28] KALRA M K, SIDHU M S, SANDHU D K, *et al.* Production and regulation of cellulases in *Trichoderma harzianum* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1984, **20**(6): 427 – 429.
- [29] JØRGENSEN H, MØRKEBERG A, KROGH K B, *et al.* Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulase adsorption by capillary electrophoresis [J]. *Enzyme Microbial Technol*, 2005, **36**(1): 42 – 48.
- [30] 党宏波, 马双, 王秋玉. 原油降解丝状真菌的分子鉴定及降解效果分析[J]. 环境科学与技术, 2011, **34**(5): 61 – 64.
- DANG HongBo, MA Shuang, WANG Qiuyu. Molecular identification of petroleum degrading filamentous fungus and analysis of the oil-contaminant degradation [J]. *Environ Sci Technol*, 2011, **34**(5): 61 – 64.
- [31] 黄榕德, 豆小敏, 张书军, 等. 染料高效吸附菌 *Penicillium oxalicum* 表面特征解析[J]. 环境污染治理技术与设备, 2006, **7**(7): 34 – 37.
- HUANG Rongde, DOU Xiaomin, ZHANG Shujun, *et al.* Surface characteristic analysis of high efficiency dye removal fungi *Penicillium oxalicum* [J]. *Tech Equip Environ Poll Control*, 2006, **7**(7): 34 – 37.