

高效木质素降解菌的筛选及降解性能研究*

Screening of High Active Lignin-degrading Strains and the Measurement of Their Lignin Degradation

司梦莹¹, 师德强², 戴友芝¹, 陈跃辉^{1**}

SI Meng-ying¹, SHI De-qi², DAI You-zhi¹, CHEN Yue-hui¹

(1. 湘潭大学化工学院环境科学与工程系, 重金属污染控制湖南省高校重点实验室, 湖南湘潭 411105; 2. 广西科学院, 广西南宁 530007)

(1. Key Laboratory of Heavy Metal Pollution Control, College of Hunan Province, Department of Environmental Science and Engineering, College of Chemical Engineering, Xiangtan University, Xiangtan, Hunan, 411105, China; 2. Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China)

摘要:【目的】筛选纯化及鉴定木质素降解菌,对其降解性能进行初步研究。【方法】从某制浆造纸厂的造纸废水污泥中,筛选获得2株具有木质素降解能力的细菌LD-1和LD-2。通过形态观察和16S rRNA序列分析对菌株进行鉴定;采用苯胺蓝平板脱色法及以TC为指标分别定性定量测定2株细菌的木质素降解能力。【结果】LD-1和LD-2分别被鉴定为*Sphingobacterium*属和*Bacillus*属的菌株,命名为*Sphingobacterium* sp. LD-1和*Bacillus* sp. LD-2。通过苯胺蓝平板脱色实验,发现LD-1和LD-2均具有良好的木质素降解能力。经测定,两株菌种发酵7d对木质素的降解率分别达到52.23%和50.36%。【结论】成功筛选到2株能高效降解木质素的菌株LD-1和LD-2。

关键词:木质素 造纸废水 细菌 生物降解

中图分类号:X172,Q93-331 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2015)01-0048-05

Abstract:【Objective】This study focused on screening, isolating and identifying lignin-degrading strains, and studying on their lignin degradation. 【Methods】Two lignin-degrading bacterial strains (LD-1, LD-2) were isolated from the effluent sludge of a pulp paper mill, and identified by morphological observation and 16S rRNA sequence analysis. Their activity of lignin degradation were measured qualitatively and quantitatively by using plate culture medium with Azure-B and TC index, respectively. 【Results】LD-1 and LD-2 were characterised as Gram negative small rod and Gram positive rod. Further, 16S rRNA sequencing showed 99% base sequence homology to *Sphingobacterium* and *Bacillus*, and the two strains were finally designated as *Sphingobacterium* sp. LD-1 and *Bacillus* sp. LD-2, respectively. LD-1 and LD-2 showed potential of lignin degradation by using plate culture medium with Azure-B. Moreover, the lignin degradation by these two bacterial strains reached 52.23% and 50.36%, respectively, within 7 days. 【Conclusion】LD-1 and LD-2 showed high activity of lignin degradation.

potential of lignin degradation by using plate culture medium with Azure-B. Moreover, the lignin degradation by these two bacterial strains reached 52.23% and 50.36%, respectively, within 7 days. 【Conclusion】LD-1 and LD-2 showed high activity of lignin degradation.

Key words: lignin, papermaking wastewater, bacteria, biodegradation

收稿日期:2014-10-10

修回日期:2014-10-20

作者简介:司梦莹(1989-),女,硕士,主要从事木质纤维生物转化相关研究。

* 广西科技开发计划项目(桂科攻14124004-3-4),广西科学院基本科研业务费资助项目(11YJ24SW13)和湖南省教育厅高校科技经费一般项目(14C1085)资助。

** 通讯作者:陈跃辉(1982-),男,博士,讲师,主要从事有机生物降解研究,E-mail:yuehuichen@yahoo.com。

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20150126.005

0 引言

【研究意义】造纸工艺是我国的重要产业之一,近年来,随着造纸工业的持续发展,废水排放量及 COD 排放量也在我国各类工业排放量中居高不下,分别达到全国工业污水排放量和 COD 排放量的 15%~17%和 40%^[1]。日本和美国分别将造纸工业废水列为六大公害和五大公害之一^[2]。造纸工业废水中的污染物主要来自碱法制浆过程,产生黑液的污染负荷占造纸废水总负荷的 90%左右。为引导造纸工业生产工艺和污染治理的发展方向,我国在 2008 年 8 月 1 日颁布了新的造纸工业水污染排放标准(GB 3544—2008),并于 2011 年起全面实行新的标准。除了提高各类型造纸企业的排放标准,同时增加色度、可吸附有机卤素、氨氮、总氮和总磷等新标准,经传统二级工艺处理后废水的色度和 COD 仍很难达标,主要原因是废水中残留有一些可溶性的木质素小分子及其衍生物,这些木质素小分子也是造纸废水产生色度和 COD 负荷的主要成分,用传统方法难以去除。因此,去除木质素小分子及其衍生物,是造纸废水达到新的排放标准要解决的首要问题。【前人研究进展】在各种造纸废水深度处理技术中,生物处理是一种经济环保的手段,包括真菌、放线菌和细菌等都对降解木质素和纸浆脱色有很好的效果^[3]。20 世纪 80 年代,针对木质素微生物降解的研究主要集中在真菌类,尤其是以黄孢原毛平革菌为代表的一类白腐真菌,为最主要的研究对象。相对于真菌,细菌生长速度快,对 pH 值和含氧量等都有较高的耐受性,因此利用细菌降解木质素的潜能不可低估^[4]。在目前报道的具有木质素降解能力的细菌种类中,放线菌的降解能力较强,非丝状细菌对木质素的降解能力较弱,国内外对非丝状细菌降解木质素方面的研究较少。在 2000 年以前的报道中,非丝状细菌的木质素降解率都小于 10%,且只能降解低分子量的木质素片段^[5]。20 世纪 90 年代,Perestelo 等^[6]及 Morii 等^[7]开始研究单细菌对木质素的降解。Morii 等^[7]从堆肥土壤中分离出具有良好的木质素降解能力及废水脱色能力的固氮菌(*Azotobacter*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megatarium*)和灵杆菌(*Serratia marcescens*)。近 10 年来,越来越多能够降解木质素聚合物的非丝状细菌被发现,且降解效率越来越高,其中,*Acinetobacter* 属和 *Bacillus* 属的菌株占据大部分。在 *Bacillus* 属中,Chandra 等^[8]从造纸废水中筛选出的菌株 ITRC S₈,发酵 6 d 对木质素的降解效率达到 30%;王纳贤等^[9]从牛粪中筛选出菌株 N13,广西科学 2015 年 2 月 第 22 卷第 1 期

培养 8 d 对木质素的降解效率为 39.41%。Wang 等^[10]从活性污泥中分离出 1 株能以木质素磺酸盐作为唯一碳源和能源进行生长的细菌 *Sphingobacterium* sp. HY-H,该菌发酵 5 d 后的木质素降解效率达到 31%,这是第 1 篇关于 *Sphingobacterium* 属菌株降解木质素的报道。Chandra 和 Raj 的科研团队在几年的时间里,从造纸废水中分离出超过 10 株具有良好木质素降解能力的细菌(木质素降解率达到 40%左右),并且对这些细菌的木质素降解性能及降解产物进行了细致的研究^[8,11~16]。【本研究切入点】目前,造纸废水的深度处理很难去除木质素小分子及其衍生物,因而很难达到新的排放标准,至今所研究的木质素降解菌在种类和降解效果上还存在不足之处,仍需筛选具有高效降解效果和良好应用前景的木质素降解菌。【拟解决的关键问题】从造纸废水活性污泥中筛选出具有高效木质素降解性能的菌株,并对该菌株的生理特性及进化分类关系进行鉴定,初步探究其木质素的降解性能,为其将来应用于造纸废水的深度处理提供依据。

1 材料与方法

1.1 样品来源

取湖南某制浆造纸厂造纸废水 A/O 处理工艺二沉池中的活性污泥。

1.2 培养基

LB 液体培养基:胰蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g, NaCl 10 g,蒸馏水 1 L,pH=7.0。

富集培养基:碱木质素 1 g,(NH₄)₂SO₄ 2 g,K₂HPO₄ 1 g,MgSO₄ 0.2 g,CaCl₂ 0.1 g,FeSO₄ 0.05 g,MnSO₄ 0.02 g,KH₂PO₄ 1 g,蒸馏水 1 L,pH=7.0;固体培养基增加 15 g 琼脂。

木质素无机盐培养基(L-MSM):液体培养基在富集培养基的基础上增加 2 g 碱木质素;固体培养基在液体培养基的基础上增加 15 g 琼脂。

BM 培养基:酵母膏 10 g,葡萄糖 20 g,琼脂 15 g,蒸馏水 1 L,自然 pH 值。

1.3 菌种纯化

采用选择性营养富集技术,对木质素降解菌进行富集培养(5 g 污泥加入 100 mL 富集培养基中,30℃,120 r/min 条件下培养 7 d),然后采用稀释平板法将培养 7 d 后的富集培养液接种至固体富集培养基平板上,置于生化培养箱中在 30℃下静置培养,观察平板上菌落的生长情况。

1.4 菌种筛选

采用选择性营养富集技术,将培养菌落转接至木

质素浓度更高的 L-MSM 平板上(木质素浓度分别为 3 g/L, 4 g/L, 5 g/L), 以筛选出能够耐受高浓度木质素的菌株。

1.5 菌株鉴定

根据《常见细菌系统鉴定手册》^[17], 对分离到的菌株的菌落形态特征、菌体形态特征、革兰氏染色性状进行鉴别试验^[18]; 应用 16S rRNA 作为分子指标对菌株进行分子分类鉴定, 并对其系统发育进行分析。

1.5.1 基因组提取及 PCR 扩增

取 LB 液体培养基培养至对数期的菌液约 30 mL(所取的体积视细菌的具体浓度而定), 12000 r/min 离心 6 min, 收集菌体沉淀, 采用天根公司的细菌基因组提取试剂盒提取细菌基因组 DNA, 以所提的 DNA 为模板, 进行 16S rRNA 片段的 PCR 扩增。引物为 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R(5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3')^[19]; 扩增体系为 50 μ L(10 \times Taq mix Buffer 25 μ L, 10 μ M 引物 27F 和 1492R 各 1 μ L, 模板 2 μ L, 去离子无菌水 21 μ L)。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 30 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 冷却至 4 $^{\circ}$ C。

1.5.2 基因测序及分析

PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离, 用天根 DNA 回收试剂盒切胶回收后, 送上海生物工程有限公司测序。测序结果上传到 GenBank 进行比对, 用 Clustal X^[20] 软件进行同源性分析, 并用 MEGA 4^[21] 构建系统发育树, 为菌株鉴定提供依据。

1.6 木质素降解性能测定

1.6.1 脱色平板定性测定

采用苯胺蓝脱色平板法, 将筛选得到的菌株分别接种至含有 0.1 g/L 苯胺蓝染料的 BM 培养基中, 30 $^{\circ}$ C 培养箱中静置培养, 以平板培养基中菌落周围脱色圈有无来定性检测木质素降解菌的降解能力。

1.6.2 木质素降解率及降解曲线测定

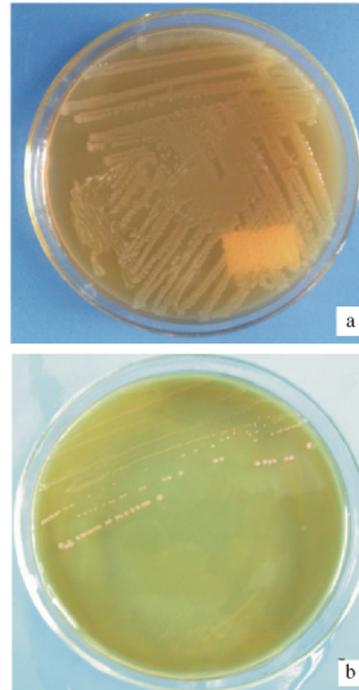
以 LB 培养基活化培养细菌至对数期, 以体积分数 1% 接种量接种于 L-MSM 液体培养基中, 菌种每隔 1 d 取样 1 次, 连取 4 d, 样品经过 12000 r/min 离心及 0.22 μ m 微孔膜过滤后测定 TC 值。根据碱木质素-TC 标准曲线计算样品的木质素降解率, 绘制碱木质素-时间曲线, 即得碱木质素降解曲线。

2 结果与分析

2.1 分离筛选结果

经过 7 d 的液体富集培养后, 在固体富集培养基

平板上共长出 8 种不同形态的细菌, 在碱木质素浓度为 5 g/L 的 L-MSM 平板上进一步筛选, 获得两株生长良好的细菌 LD-1 和 LD-2。在 L-MSM 平板上, 细菌 LD-1(图 1a) 的菌落较小, 表面光滑, 呈乳白色, 圆形且边缘整齐; 细菌 LD-2(图 1b) 的菌落稍大, 表面光滑, 呈淡红色, 扁平圆形, 边缘整齐。



a: LD-1; b: LD-2

图 1 木质素降解菌筛选

Fig 1 Screening of lignin degradation microorganisms

2.2 菌株鉴定

从菌株的扫描电镜图可看出, LD-1 菌体细胞为短杆状, 长度为 1 μ m 左右(图 2a); LD-2 菌体细胞为椭圆形, 长度为 3 μ m 左右(图 2b)。革兰氏染色实验结果显示, LD-1 为短杆状革兰氏阴性菌, LD-2 为椭圆形革兰氏阳性菌。

将 LD-1 和 LD-2 的 16S rRNA 序列与 NCBI 核酸数据库进行 BLAST 比对, 发现其分别与菌属 *Sphingobacterium* 和 *Bacillus* 的相似性最高, 达到 99%。基于 LD-1 和 LD-2 的 16S rRNA 序列构建系统发育树(图 3), 分析结果进一步表明 LD-1 和 LD-2 分别与菌属 *Sphingobacterium* 和 *Bacillus* 的亲缘关系最近。结合菌落形态、细胞形态、16S rRNA 序列分析以及系统发育树分析, 菌株 LD-1 为 *Sphingobacterium* 属, LD-2 为 *Bacillus* 属, 分别命名为 *Sphingobacterium* sp. LD-1 和 *Bacillus* sp. LD-2。

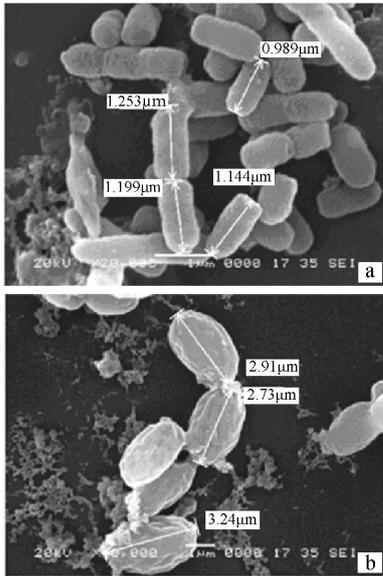


图2 细菌 LD-1(a)及 LD-2(b)菌体形态

Fig.2 Cell morphology of LD-1 (a)and LD-2(b)

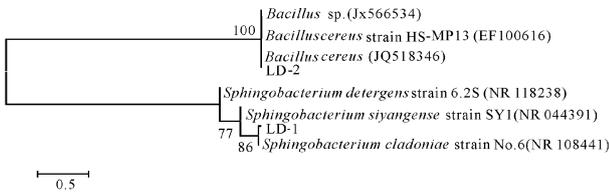


图3 菌株 LD-1 及 LD-2 16S rRNA 序列构建的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of LD-1 and LD-2 based on 16S rRNA sequence comparisons.

2.3 木质素降解性能

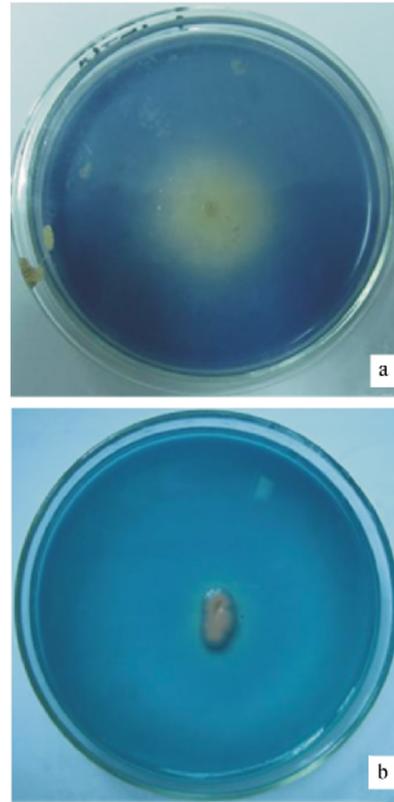
2.3.1 平板脱色

木质素降解菌通过分泌相关降解酶(如漆酶、锰过氧化物酶、木质素过氧化物酶)降解碱木质素,菌株产酶活性越高,降解木质素的能力越强。苯胺蓝染料的脱色与锰过氧化物酶、木质素过氧化物酶的产生有关,因此利用染色平板脱色法可以定性检测菌株降解木质素的能力^[22]。从图4可以看出,2株细菌培养12h后在菌落周围均出现明显的脱色圈,其中LD-1所产生的脱色圈尤为明显(图4a),直径达到1cm以上,而LD-2所产生的脱色圈相对较小(图4b),只在菌落外圈形成一个很小的脱色圈。由此可见,两株细菌均能产生木质素降解酶,有一定的木质素降解能力,且LD-1降解木质素的能力比LD-2强。

2.3.2 木质素降解率

由图5可知,碱木质素-TC标准曲线具有很好的线性关系,因此可以根据这一标准曲线测定木质素的降解率。从图6可以看出,LD-1和LD-2在发酵前4d降解速率明显较快,在第4天时均达到40%以上,分别为48.56%和43.34%;在接下来的3d中,降解速率有所减慢,在第7天时2株菌的降解效率分别达到52.23%和50.36%。表明2株菌对木质素的降解

主要发生在初级代谢阶段,这与 Ramachandra 等^[23]的研究结论一致。



a:LD-1;b:LD-2

图4 苯胺蓝平板定性检测

Fig.4 Azure-B medium plates for detecting

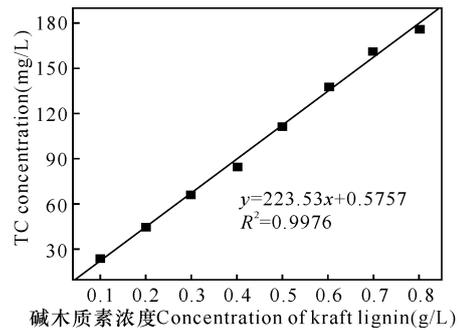


图5 碱木质素-TC标准曲线

Fig.5 Standard curve of Kraft lignin-TC

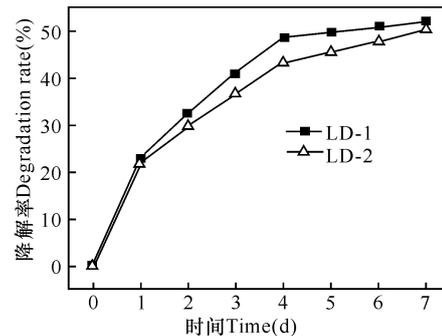


图6 LD-1及LD-2的TC去除率

Fig.6 TC removal during incubation of LD-1 and LD-2

3 结论

将可再生的木质纤维素有效地转化成乙醇燃料是目前全球新能源研究的热点^[24],木质素的降解是木质纤维素类生物转化为可发酵糖和生物燃料中至关重要的一步,相对于高温蒸汽法和化学法,采用生物处理法降解木质纤维素中的木质素具有成本更低、不产生二次污染等优势^[25]。本文从造纸废水污泥中筛选分离得到2株高效木质素降解菌 LD-1 和 LD-2,发酵7 d后木质素降解效率均达到50%以上,经鉴定菌株 LD-1 为 *Sphingobacterium* 属,LD-2 为 *Bacillus* 属,均属于非丝状细菌。因其高效的木质素降解能力,LD-1 和 LD-2 在造纸废液污染的环境治理及生物质能源预处理方面具有广阔的研究前景。近年来,造纸废水生物处理技术的研究方向主要为生物基因工程、复合仿生物酶处理以及“物化-生化”组合等方面^[26]。本文筛选得到的高效木质素降解菌在生物基因工程和复合仿生物酶处理技术中具有很高的应用潜力,因此,其产酶特性及分子生物学特性值得进一步探究。

参考文献:

- [1] 刘俊华,张美云,陆赵情,等. 造纸工业废水深度处理技术的研究[J]. 湖北造纸,2013,3:33-37.
Liu J H, Zhang M Y, Lu Z Q, et al. Study on the advanced treatment technology of papermaking wastewater [J]. Hubei Paper, 2013, 3: 33-37.
- [2] 肖建红,施国庆,毛春梅,等. 中国造纸工业废水排放强度降低的因素分析[J]. 中国造纸,2006,25(10):59-61.
Xiao J H, Shi G Q, Mao C M, et al. Cause analysis of the reduction of wastewater discharge intensity of China's paper industry[J]. China Pulp & Paper, 2006, 25(10): 59-61.
- [3] Perestelo F, Falcon M, Carnicero A, et al. Limited degradation of industrial synthetic and natural lignins by *Serratia marcescens* [J]. Biotechnology Letters, 1994, 16: 299-302.
- [4] Chandra R, Raj A, Purohit H, et al. Characterisation and optimisation of three potential aerobic bacterial strains for kraft lignin degradation from pulp paper waste[J]. Chemosphere, 2007, 67: 839-846.
- [5] Toumela M, Vikman M, Hatakka A, et al. Biodegradation of lignin in a compost environment: A review[J]. Bioresource Technology, 2000, 72: 169-183.
- [6] Perestelo F, Rodriguez A, Perez R, et al. Isolation of a bacterium capable of limited degradation of industrial and labeled natural and synthetic lignins[J]. 1996, 12: 111-112.
- [7] Morii H, Nakamiya K, Kinoshita S. Isolation of lignin-decolouring bacterium[J]. Ferment Bioeng, 1995, 80: 296-299.
- [8] Chandra R, Abhishek A, Sankhwar M. Bacterial decolorization and detoxification of black liquor from rayon grade pulp manufacturing paper industry and detection of their metabolic products[J]. Bioresource Technology, 2011, 102: 6429-6436.
- [9] 王纳贤,郭晓军,李术娜,等. 产芽孢木质素降解菌 N13 的分离与鉴定[J]. 畜牧与饲料科学, 2009, 9: 7-10.
Wang N X, Guo X J, Li S N, et al. Screening and identification on bacteria N13 with spore and capability of degrading cellulose[J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2009, 9: 7-10.
- [10] Wang D, Lin Y, Du W, et al. Optimization and characterization of lignosulfonate biodegradation process by a bacterial strain, *Sphingobacterium* sp. HY-H[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2013, 85: 365-371.
- [11] Raj A, Chandra R, Reddy M M K, et al. Biodegradation of kraft lignin by a newly isolated bacterial strain, *Aneurinibacillus aneurinilyticus* from the sludge of a pulp paper mill [J]. Microbiology and Biotechnology, 2007, 23: 793-799.
- [12] Raj A, Reddy M M K, Chandra R, et al. Biodegradation of kraft-lignin by *Bacillus* sp. isolated from sludge of pulp and paper mill [J]. Biodegradation, 2007, 18: 783-792.
- [13] Raj A, Reddy M M K, Chandra R. Identification of low molecular weight aromatic compounds by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) from kraft lignin degradation by three *Bacillus* sp. [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2007, 59: 292-296.
- [14] Raj A, Reddy M M K, Chandra R. Decolourisation and treatment of pulp and paper mill effluent by lignin-degrading *Bacillus* sp. [J]. Chemical Technology and Biotechnology, 2007, 82: 399-406.
- [15] Chandra R, Singh S, Reddy M M K, et al. Isolation and characterization of bacterial strains *Paenibacillus* sp. and *Bacillus* sp. for kraft lignin decolorization from pulp paper mill waste [J]. General and Applied Microbiology, 2008, 54: 399-407.
- [16] Chandra R, Abhishek A. Bacterial decolorization of black liquor in axenic and mixed condition and characterization of metabolites [J]. Biodegradation, 2011, 22: 603-611.
- [17] 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.
Chen J, Liu H, Li X F. The Experimental Technique of Environmental Microbiology[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2008.
- [18] 谢家仪,董光军,刘振英. 扫描电镜的微生物样品制备方法[J]. 电子显微学报, 2006, 24(4): 440-440.
Xie J Y, Dong G J, Liu Z Y. Microbial sample preparation for scanning electron microscopy [J]. Journal of Chinese Electron Microscopy Society, 2006, 24(4): 440-440.

(下转第 59 页 Continue on page 59)

(41):589-592.

- [5] 王农,王兴权,杨利娟,等. 添加剂对纳米碳酸钙形貌与粒度的影响[J]. 无机盐工业,2013,45(2):23-26.
Wang N,Wang X Q,Yang L J, et al. Influence of additives on morphology and size of nano-sized calcium carbonate[J]. Inorg Chem Ind,2013,45(2):23-26.
- [6] 朱万诚,王玉红,陈建峰. 超重力反应结晶法合成微细针状碳酸钙研究[J]. 高校化学工程学报,2002,16(5):560-564.
Zhu W C,Wang Y H,Chen J F. Synthesis of ultra-fine needle-like calcium carbonate particles by high-gravity reactive precipitation [J]. J Chem Eng of Chinese Univ, 2002,16(5):560-564.
- [7] 赵东清,刘家祥. 碳化工艺参数对纳米碳酸钙形貌和颗粒尺寸的影响[J]. 非金属矿,2007,30(2):5-7.
Zhao D Q,Liu J X. Effect of experimental parameters on shape and particle size of nano-CaCO₃ [J]. Non-Met Mines,2007,30(2):5-7.
- [8] 成居正,陈雪梅,邓婕. NaHCO₃对纳米碳酸钙粉末形貌的修饰作用[J]. 材料科学与工程学报,2013,31(3):404-408.
Cheng J Z,Chen X M,Deng J. NaHCO₃ modification of morphology of nanosized calcium carbonate powder[J]. J Mater Sci Eng,2013,31(3):404-408.
- [9] 乔叶刚,陈刚,吴秋芳. 立方形纳米碳酸钙的制备工艺研究[J]. 海湖盐与化工,2005,34(1):17-19.
Qiao Y G,Chen G,Wu Q F. The study of nano-CaCO₃ preparing craft[J]. Sea-Lake Salt ChemInd,2005,34(1):17-19.

- [10] 梁锦,刘华彦,陈银飞. 碳化参数对纳米碳酸钙粒径与形貌的影响[J]. 无机盐工业,2009,41(12):22-24.
Liang J,Liu H Y,Chen Y F. Effect of carbonation parameters on particle size and morphology of nano-sized calcium carbonate[J]. Inorg Chem Ind,2009,41(12):22-24.
- [11] 陈建峰,刘润静,沈志刚,等. 超重力反应沉淀法制备碳酸钙的过程与形态控制[J]. 过程工程学报,2002,2(4):309-313.
Chen J F,Liu R J,Shen Z G, et al. High-gravity reactive precipitation process and morphology control for precipitated calcium carbonate[J]. Chin J Process Eng, 2002,2(4):309-313.
- [12] 姜鲁华,张瑞社,杜芳林,等. 针状纳米碳酸钙的制备研究[J]. 功能材料,2002,33(5):545-547.
Jiang L H,Zhang R S,Du F L, et al. Study on synthesis of needle-like nanometer calcium carbonate[J]. Journal of Functional Materials,2002,33(5):545-547.
- [13] 林荣毅,张家芸,张培新. 纳米CaCO₃的生长和控制机理[J]. 中国有色金属学报,2002,12(2):358-362.
Lin R Y,Zhang J Y,Zhang P X. Growth characteristics and controlling mechanism of nanometer CaCO₃ [J]. Chin J Nonferrous Met,2002,12(2):358-362.
- [14] Bang J H,Jang Y N, Kim W B, et al. Precipitation of calcium carbonate by carbon dioxide microbubbles[J]. Chem Eng J,2011,174:413-420.

(责任编辑:陆雁)

(上接第52页 Continue from page 52)

- [19] Polz M F,Cavanaugh C M. Bias in template to product ratios in multitemplate PCR[J]. Applied and Environmental Microbiology,1998,64(10):3724-3730.
- [20] Thompson J D,Gibson T J,Plewniak F, et al. The CIUSTAL_X windows interface:Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research,1997,25(24):4876-4882.
- [21] Kumar S,Tamura K,Nei M. MEGA3:Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. Briefings in Bioinformatics, 2004,5(2):150-163.
- [22] 蔡磊,尹峻峰,杨丽萍,等. 几种简便的木质素降解真菌定性筛选方法[J]. 微生物学通报,2002,29(1):67-69.
Cai L, Yin J F, Yang L P, et al. Several qualitative methods for the screening of Fungi to decompose lignin [J]. Microbiology,2002,29(1):67-69.
- [23] Ramachandra M,Crawford D L,Hertel G. Characterization of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulolytic actinomycete *Streptomyces viridosporus* [J].

Applied and Environmental Microbiology,1998(54):3057-3063.

- [24] 彭木,王秋玉,訾晓雪. 褐腐菌在木质纤维素降解中的研究进展[J]. 中国农学通报,2014,30(10):287-293.
Peng M, Wang Q Y, Zi X X. Research progress of brown rot Fungi in lignocellulose degradation[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin,2014,30(10):287-293.
- [25] Wan C X,Li Y B. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass[J]. Biotechnology Advances,2012,30:1447-1457.
- [26] 谢益民,瞿方,王磊,等. 制浆造纸废水深度处理新技术与应用进展[J]. 中国造纸学报,2012,27(3):56-61.
Xie Y M,Qu F,Wang L, et al. Development and application of new technology of pulping & papermaking wastewater treatment[J]. Transactions of China Pulp and Paper,2012,27(3):56-61.

(责任编辑:陆雁)