

解淀粉芽孢杆菌产纤维素酶及其酶解能力相关研究进展

戴圻霏, 张斯童, 孙旻*, 陈光, 沈丽君, 曲嘉毅

(吉林农业大学生命科技学院, 吉林长春 130118)

摘要 纤维素是地球上丰富的天然生物聚合物, 是重要的可再生有机资源, 在农作物秸秆中尤为丰富。纤维素、半纤维素和木质素混合组成木质纤维素, 木质纤维素结构的复杂性限制自然界中大量秸秆的降解。纤维素酶是将纤维素降解成葡萄糖的一类酶的总称, 主要作用于纤维素及其衍生物, 在木质纤维素转化利用方面发挥核心作用。解淀粉芽孢杆菌是一类具有纤维素酶合成能力的细菌, 其合成的纤维素酶具有产酶条件简单, 培养周期短, 酶活力高的特点, 因此具有广泛的应用价值和前景。对近年来产纤维素酶解淀粉芽孢杆菌的筛选与发酵工艺及其特性进行综述, 以期对纤维素酶的生产 and 应用提供理论帮助。

关键词 解淀粉芽孢杆菌; 木质纤维素; 纤维素酶

中图分类号 TQ 925 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)10-0014-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.10.004



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Research Progress on Cellulase Production by *Bacillus amyloliquefaciens* and Its Enzymatic Efficacy

DAI Qi-fei, ZHANG Si-tong, SUN Yang et al (College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

Abstract Cellulose is a rich natural biopolymer on the earth. It is an important renewable organic resource and is especially abundant in crop straw. Lignocellulose consists of a mixture of cellulose, hemicellulose and lignin. But the complexity of lignocellulosic structure limits the degradation of large amounts of straw in nature. Cellulase is a general term for a class of enzymes that degrade cellulose into glucose. It mainly acts on cellulose and its derivatives and plays a central role in the conversion and utilization of lignocellulose. *Bacillus amyloliquefaciens* is a kind of bacteria with cellulase synthesis ability. Its synthesized cellulase has the characteristics of simple enzyme production conditions, short culture period and high enzyme activity. So it has wide application value and prospect. In this paper, the screening, fermentation process and characteristics of cellulase-producing *Bacillus amyloliquefaciens* were reviewed in order to provide theoretical help for the production and application of cellulase.

Key words *Bacillus amyloliquefaciens*; Lignocellulose; Cellulase

秸秆是由纤维素、半纤维素和木质素混合组成的。由于秸秆茎叶表皮角质层和硅细胞的阻抑、纤维素链分子结晶结构的高抗蚀性等限制因素的存在, 使其难以利用。纤维素是植物秸秆的三大重要成分之一, 其主要的成分是由葡萄糖组成的大分子多糖^[1]。纤维素在自然界中分布十分广泛, 并且是含量最多的一种多糖, 占植物界碳含量的 50% 以上^[2]。目前, 纤维素是全球最为丰富的可再生生物资源, 其开发利用被认为是对秸秆能源回收再利用方面问题重要关键点。21 世纪以来, 能源问题越来越得到重视并且日益严峻, 所以纤维素的开发和利用也成为目前研究的热点, 降解纤维素的方法很多, 一般采用物理、化学、微生物法, 但是物理和化学法因为生产成本低、环境污染等问题导致效果并不是十分理想。与之相比, 具有反应条件温和和易控等优点的生物降解法就备受青睐, 纤维素酶能够有效降解纤维素, 纤维素酶在分解纤维素时起生物催化作用, 纤维素是 800~1 200 个葡萄糖分子聚合而成, 它可以将纤维素分解成寡糖或单糖的蛋白质。因此, 可通过微生物发酵产纤维素酶降解秸秆中的纤维素, 用于提高畜禽生产性能, 提高秸秆利用率, 改善饲料的营养价值, 降低能源成本和提高经济效益, 具有广阔的开发前

景, 今后应进一步加强纤维素酶研究和开发工作^[3]。因此, 筛选出高产纤维素酶菌株成为开发利用纤维素资源的核心工作。

解淀粉芽孢杆菌是一种与枯草芽孢杆菌亲缘性很高的细菌, 属革兰阳性芽孢杆菌^[4], 菌落在多种固体培养基上均不产生荧光素。在 LB 培养基上呈淡黄色不透明菌落, 可以合成多种纤维素酶, 酶活力较高的是羧甲基纤维素酶和滤纸酶活, 并且具有促进木质纤维素分解的能力。并且该细菌生长速度快, 繁殖能力强, 培养方式单一, 产纤维素酶能力较强^[5]。解淀粉芽孢杆菌对秸秆中纤维素再利用具有潜在的前景和价值。

1 纤维素酶

1.1 纤维素酶的来源与应用 关于纤维素酶的研究^[6], 早在 1906 年从蜗牛消化液中被发现, 20 世纪 50 年代 Reese 等提出 C1-Cx 假说来解释对纤维素酶的作用方式, 80 年代中后期开始利用基因工程的方法对纤维素酶的基因进行克隆并测定出一级结构, 90 年代初开始探究厌氧细菌纤维小体超分子, 并更深一层的探究其复合体结构功能, 现如今已经进入分子时代, 开始探究纤维素酶的基因以及氨基酸^[7]。一些产纤维素酶微生物和一些分泌纤维素酶原生动植物是纤维素酶主要来源, 真菌是目前工业生产更是纤维素酶的主要菌种, 其中丝状真菌以木霉属、曲霉属和青霉属为主, 纤维素酶产量高于其他微生物, 所以被广泛使用于纤维素酶产业化生产。其他的真菌、细菌和放线菌也可以产纤维素酶^[8]。产纤维素酶的细菌主要有梭状芽孢杆菌、白色瘤胃球菌, 所产纤

基金项目 吉林省高等学校秸秆综合利用高端科技创新平台[吉高平合字(2014)C-1]; 玉米秸秆资源循环利用关键技术研究(20180201067SF); 玉米秸秆饲料化利用关键技术研究(20170203009NY)。

作者简介 戴圻霏(1994—), 女, 吉林吉林人, 硕士研究生, 研究方向: 生物物理学。* 通信作者, 副教授, 博士, 从事酶工程研究。

收稿日期 2018-12-21; 修回日期 2019-03-13

纤维素酶是胞内酶或吸附于细胞壁上,但是其酶活力与真菌相比较低一些,所以细菌产纤维素酶产业化开发受到一定的影响^[9]。放线菌产纤维素酶主要包括链霉菌和弯曲高温单孢菌等,其中链霉菌属、高温放线菌属等酶活较高,但因产酶量相对较低且生长缓慢,所以近国内外详细研究较为困难。纤维素酶的主要应用是生物抛光、生物石料、生物整理等纺织工业,食品工业中的淀粉加工、谷物酒精发酵、啤酒和酿酒业酿造、麦芽、提取和加工等,在农业上主要用于控制植物病原体和疾病在农业上,还有在家里洗衣服的洗涤剂,改善织物的柔软度和亮度等^[10-12]。

1.2 纤维素酶的成分与作用机制 纤维素酶是 3 种酶混合在一起的总称:①内切葡聚糖酶(endo-1,4- β -D-glucanase, EC.3.2.1.4,来自真菌的简称 EG,来自细菌的简称 Cen),作用

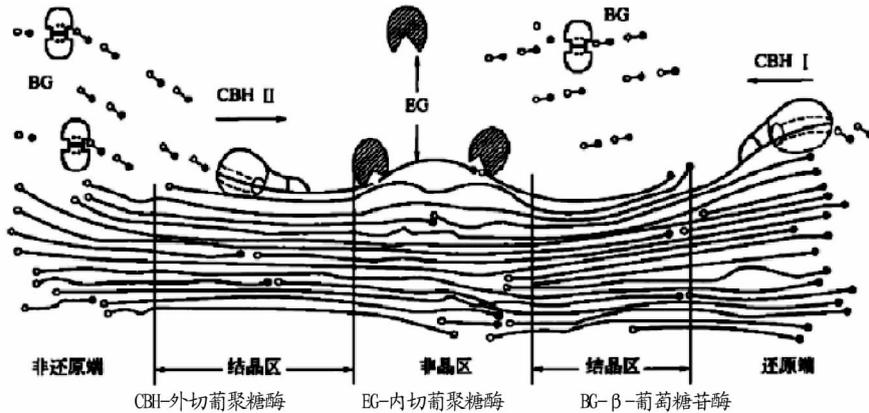


图 1 纤维素酶的成分和协同作用

Fig.1 Composition and synergy of cellulase

2 解淀粉芽孢杆菌

最早由 Priest 发现并鉴定出解淀粉芽孢杆菌,其经典模式菌株为 ATCC23350,自然界分布十分广泛,在堆肥、土壤、植物表面和动物体内、青贮玉米秸秆饲料、海洋赤潮甚至污水湖泊的底泥中均可发现并分离得到,并且根据国内外不断完善菌种鉴定技术和鉴定方法和各种各样的生理生化特征从而得到不同种的解淀粉芽孢杆菌。该菌基本特征是在 LB 固体培养基上形成圆形、扁平、湿润有粘性的小菌落;在血琼脂平板上呈现比较明显透明溶血;在种子液中混浊生长,震荡后管底沉淀生长^[15],经革兰染色,呈阳性。在显微镜下可见两端钝圆并且长短不一的杆菌,形状状呈直或接近直,约有(0.3~2.2) μm ×(1.2~7.0) μm ,并有大于菌体的次末端芽胞。解淀粉芽孢杆菌在 90%乙醇中 72 h、1 000 mg/L 的 84 消毒液中 18 h、20 g/L 戊二醛中 60 min 仍可以存活。但是通过紫外线照射 30 min,121 $^{\circ}\text{C}$ 压力蒸汽灭菌 20 min,100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 5 min 都可以完全消灭其菌。此属菌的模式菌为枯草芽孢杆菌,其最高生长温度为 45~55 $^{\circ}\text{C}$,最低生长温度为 5~20 $^{\circ}\text{C}$ ^[16],严格好氧可兼性厌氧。利用基因序列进行鉴定和分类的方法鉴定出其基因包括 16S rDNA 和部分保守管家基因。目前,在 NCBI 中公布了大量解淀粉芽孢杆菌核糖体 16S rDNA 序列,可以作为参考序列进行种间的比较鉴定^[17-19],特别是近年来随着测序成本的降低,所以利用全基

于纤维素的非结晶区,主要水解纤维素长链中的 β -1,4 糖苷键,把纤维素大链分解成大量不同聚合程度的并且还带有非还原端的纤维素短链^[13];②外切葡聚糖酶(exo-1,4- β -D-glucanase, EC.3.2.1.91,又称纤维二糖水解酶,来自真菌简称 CBH,来自细菌简称 Cex),与内切葡聚糖酶相辅相成,作用于纤维素的结晶区,水解微晶纤维素分子中的还原端和非还原端的 β -1,4 糖苷键并且释放出大量的二糖;③ β -葡萄糖苷酶(β -D-glucosidase, EC3.2.1.21,又称 β -D-葡萄糖苷葡萄糖水解酶,别名龙胆二糖酶、纤维二糖酶,简称 BG),主要水解纤维二糖和可溶性寡糖,生成葡萄糖^[14],这是按照催化功能把纤维素酶分成了三大类。这 3 种酶相互协调共同作用在纤维素上,使纤维素长链最终水解成葡萄糖,如图 1 所示。

因组测序方法开展解淀粉芽孢杆菌的比较鉴定更为准确和清晰。

3 解淀粉芽孢杆菌产纤维素酶的研究

结合国内外对解淀粉芽孢杆菌的研究,发现该菌可以降解秸秆,并可以作为分解纤维素能力较高的细菌,所以就目前来看解淀粉芽孢杆菌的选育是提高其纤维素酶酶活力研究的重点,利用合理的方法提高解淀粉芽孢杆菌的产纤维素酶和提高纤维素酶的稳定性是目前研究的热点,综合目前国内外的研究成果,对提高解淀粉芽孢杆菌产纤维素酶活力的方法进行概括,以期对纤维素酶的生产提供技术指导。

3.1 产纤维素酶解淀粉芽孢菌的分离与突变 目前国内外针对解淀粉芽孢杆菌产纤维素酶特异性的筛选方法已经非常成熟。李衡香等^[20]从沼气的秸秆堆肥中分离筛到 1 株常温下产纤维素酶的菌株,经鉴定为解淀粉芽孢杆菌 CEL-1,采用 Plackett-Burman 试验设计使其纤维素酶酶活力达 161.34 U/mL,比优化前提高了 2.71 倍。刘宇等^[21]从饲料样品中筛选产纤维素酶益生菌,并通过形态学和系统进化树方法鉴定分离菌。同时对培养时间、pH 和温度等酶促反应条件进行了实验,最后经过 16S rRNA 鉴定其为解淀粉芽孢杆菌,该菌粗酶液的滤纸酶活为 1.5 U/mL,林晓琼等^[22]以玉米秸秆中的土壤里分离出的解淀粉芽孢杆菌为出发菌株,采用

常压室温等离子体诱变系统(atmospheric and room temperature plasma, ARTP)进行物理诱变,用96孔板高通量筛选法细筛产纤维素酶活力高的突变菌株,找出了一株遗传稳定性良好的突变菌株T-16。产纤维素酶活力达到1.759 U/mL,比出发菌株提高了41.8%。综上所述,产纤维素酶的解淀粉芽孢杆菌多在土壤、饲料中以及秸秆表面容易发现并分离,同时不定向进化较为效果显著。

3.2 解淀粉芽孢杆菌产纤维素酶发酵条件优化 解淀粉芽孢杆菌根据培养基配方及其比例的改变,从而改变该菌生长活力,也可以导致产纤维素酶的能力也有所改变。培养基中碳源、氮源、金属离子、接种量、培养时间、温度、pH、表面活性剂及转速等等因素都可以影响解淀粉芽孢杆菌的产纤维素酶的能力,所以可以通过试验进行优化提高其纤维素酶活力,从而适合大规模生产。姜军坡等^[23]对解淀粉芽孢杆菌Tu-115菌株产纤维素酶液体发酵条件进行优化,使其发酵液中羧甲基纤维素活力达到最高值为18.43 U/mL,比优化前提高26.5倍。李红亚等^[24]前期获得2株具有木质素和纤维素降解能力的解淀粉芽孢杆菌菌株的基础上,采用均匀设计法对解淀粉芽孢杆菌FJAT-8754产纤维素酶进行三因素四水平优化试验,在初始的发酵条件进行重新发酵,24 h后,玉米秸秆中木质素、纤维素和半纤维素的降解率分别达48.4%、30.5%和41.4%,优于单株解淀粉芽孢杆菌降解秸秆能力。所以解淀粉芽孢杆菌产纤维素酶的能力,对于秸秆饲草化利用中极具应用前景,对降解秸秆方面有一定的开发价值,对保护环境做出贡献。

3.3 对解淀粉芽孢杆菌纤维素酶基因的分子改造 早在20世纪90年代,Arnold提出指定性进化技术,通过试管作为载体,并通过某种手段快速改造酶基因,从而达到目标酶某些理想性状大量提高的目的^[25-27]。自定向进化技术发展以来,国内外许多研究者通过PCR技术改造目标酶,后期通过建立一定的筛选方法,筛选得到目标酶目标性状有所提高的酶基因^[28]。陈玉娟等^[29]通过PCR扩增获得 β -葡聚糖酶的基因,用电转化的方法将其导入解淀粉芽孢杆菌B4801中,得到了能高效表达 β -葡聚糖酶的重组菌株。该重组菌株在摇瓶发酵条件下的 β -葡聚糖酶最高酶活为303 U/mL,是原始菌株酶活水平的11.84倍。15 L发酵罐发酵条件下胞外 β -葡聚糖酶最高酶活为2 023 U/mL,是摇瓶发酵条件下酶活水平的6.67倍。苗会^[30]从解淀粉芽孢杆菌克隆得到内切葡聚糖酶基因,成功在大肠杆菌BL21(DE3)中表达,通过易错PCR改造内切葡聚糖酶,通过高通量筛选,筛选出一株高产内切葡聚糖酶的菌株,其酶活测定显示,相比原始菌株高17%,其最适pH由原来的5.6偏移到6.5,在pH 7.0~9.0时仍保持70%以上。目前已克隆得到多种纤维素酶的基因,很多都源于细菌,且解淀粉芽孢杆菌是革兰氏阳性细菌,相比真菌更容易进行基因的改造。

4 解淀粉芽孢杆菌益生特性

解淀粉芽孢杆菌不仅可以产纤维素酶,还具有其他诸多益生特性,很多学者根据不同益生特性的解淀粉芽孢杆菌菌

株做出相关特异性试验。如对很多病菌具有抑制活性的抑菌蛋白ba-ciamin,Wong等^[31]从解淀粉芽孢杆菌NK10中通过分离纯化得到此抑菌蛋白,使病原真菌生物膜通透性同时还得到增加。解淀粉芽孢杆菌还可以通过自身分泌的次生代谢物质来促进和保护菌体在植物体内的丛集运动、生物膜形成、定殖和繁殖等^[32-33]来实现对植物的相互作用。有些具有能够抑制使棉花枯萎病菌的生长特殊能力解淀粉芽孢杆菌,其菌株粗提液能够造成棉花枯萎病的病原菌的菌丝消融、变细,菌丝膜发生破裂,原生质体凝集渗漏,菌丝体扭曲变形,形成孢囊结构,孢子的产生受到严重抑制,从而使病原菌无法正常生长^[34]。并且根据上文所述,解淀粉芽孢杆菌具有很强的生长能力和适应能力,并且广泛生存在土壤中和在植物中,该菌有多种优点,比如无不良反应、无残留、无污染、不产生耐药性等,所以解淀粉芽孢杆菌应用于益生菌制剂应用价值巨大,潜力无穷。

5 展望

我国农作物的秸秆蓄积量非常高,是极为丰富且能直接利用的可再生有机资源,但是我国秸秆的综合利用仅在很小的一部分,大多数的秸秆都被人为就地点燃焚烧或直接丢弃在田间地头,造成大量秸秆资源的浪费并且还污染环境^[35-36]。在众多的秸秆利用技术中,微生物发酵技术因其能耗低,副产物少的优点,被广泛应用。由于秸秆中含有大量的木质纤维素,微生物发酵技术在木质纤维素的降解、菌体蛋白的富集以及有益代谢物的积累等方面就具有更为突出作用,其对环境友好及能源再生等优点近年来受到国内外科学工作者的广泛关注。

解淀粉芽孢杆菌作为可以产纤维素酶的细菌,在自然界分布广泛,易分离培养且易改造等优点,可以有助于改善环境,减少秸秆的焚烧。通过不同方法在提高解淀粉芽孢杆菌的酶活力的同时也降低产酶成本,并且借鉴国内外已有的研究成果,提高其产纤维素酶的酶活力,从而形成一个比较完善的木质纤维素利用系统,最终实现木质纤维素的分级利用,以达到节能减排和经济可持续发展的目标。

纤维素酶作为一种高分子复合酶,具有复杂的空间结构且不易分离、纯化的特点,生产工艺需要不断的研究和进一步的完善,所以选择优良的菌株是提高纤维素酶活力关键。解淀粉芽孢杆菌繁殖能力强且增殖速度快,容易筛选与分离,发酵周期短,在工业生产上可以通过液态发酵工艺产酶。解淀粉芽孢杆菌作为细菌提高产纤维素酶活力的方法众多,容易改造,在工业方面可以实现大规模生产。解淀粉芽孢杆菌不光具有产纤维素酶的特性,还具备其他诸多的益生特性,所以解淀粉芽孢杆菌应用于秸秆降解和畜牧养殖业,不仅能提高秸秆回收利用率,还可以在医疗方面防虫治病,促进动植物生长,同时缓解能源方面具有巨大的压力,二次能源回收再利用具有很大的前景和应用价值。并且根据国内外目前所使用的方法可以提高解淀粉芽孢杆菌生产纤维素酶能力,为降低粮食加工副产物中纤维素含量、提高其利用率提供了参考。

参考文献

- [1] 张斯童, 兰雪, 李哲, 等. 微生物降解玉米秸秆的研究进展[J]. 吉林农业大学学报, 2016, 38(5): 517-522.
- [2] 王华, 何玉凤, 何文娟, 等. 纤维素的改性及在废水处理中的应用研究进展[J]. 水处理技术, 2012, 38(5): 1-6.
- [3] 武林芝. 香菇纤维素酶基因 *exg1* 的克隆及其表达[D]. 太原: 山西大学, 2011.
- [4] 洪鹏, 安国栋, 胡梅英, 等. 解淀粉芽孢杆菌 HF-01 发酵条件优化[J]. 中国生物防治学报, 2013, 29(4): 569-578.
- [5] 梁艳玲. 产纤维素酶细菌的分离、鉴定及地类芽孢杆菌 ME27-1 产酶条件优化[D]. 南宁: 广西大学, 2014.
- [6] 高颀. 纤维素酶在黄酒酿造中的应用[J]. 中国食品, 2011(5): 59-61.
- [7] 吴斌, 胡肆珍. 产纤维素酶放线菌的研究进展[J]. 中国酿造, 2008, 27(1): 5-8.
- [8] 曹平, 李敏, 周非帆, 等. 瘤胃纤维降解细菌的发酵和纤维降解特性研究[J]. 家畜生态学报, 2015, 36(9): 36-39.
- [9] 钱文佳. 南极细菌产低温纤维素酶的研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2009.
- [10] TAKASHIMA S, IIKURA H, NAKAMURA A, et al. Isolation of the gene and characterization of the enzymatic properties of a major exoglucanase of *Humicola grisea* without a cellulose-binding domain[J]. *Biochemistry*, 1998, 124(4): 717-725.
- [11] BNASAL N, TEWARI R, SONI R, et al. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues[J]. *Waste Manag*, 2012, 32(7): 1341-1346.
- [12] SÁNCHEZ C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi[J]. *Biotechnol Adv*, 2009, 27(2): 185-194.
- [13] 威耀之. 基于 C-端氨基酸突变改造提高内切型纤维素酶活性和稳定性的研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2013.
- [14] 唐开宇, 张全, 佟明友. β -葡萄糖苷酶发酵技术的进展[J]. 纤维素科学与技术, 2009, 17(3): 65-70.
- [15] 孙建义, 许梓荣. 芽孢杆菌的分离、鉴定及应用研究[J]. 浙江农业学报, 1999, 11(1): 47-50.
- [16] 罗明坤. 解淀粉芽孢杆菌在对虾养殖中的应用[J]. 科学养鱼, 2015, 31(11): 92.
- [17] KUMAR P N, SWAPNA T H, KHAN M Y, et al. Statistical optimization of antifungal iturin A production from *Bacillus amyloliquefaciens* RHNK22 using agro-industrial wastes[J]. *Saudi journal of biological sciences*, 2017, 24(7): 1722-1740.
- [18] GUPTA R, VAKHLU J, AGARWAL A, et al. Draft genome sequence of plant growth-promoting *Bacillus amyloliquefaciens* strain W2 associated with *Crocus sativus* (Saffron)[J]. *Genome announcements*, 2014, 2(5): 1.
- [19] 彭研. 拮抗解淀粉芽孢杆菌的筛选鉴定及其产胞外抗菌物质的初步研究[D]. 曲阜: 曲阜师范大学, 2013.
- [20] 李藜香, 王凤学, 钟超, 等. 1 株解淀粉芽孢杆菌 CEL-1 发酵产纤维素酶的条件优化[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(12): 379-382.
- [21] 刘宇, 李阳, 尹碧伊, 等. 一株产纤维素酶的解淀粉芽孢杆菌的分离鉴定及其酶促反应适宜条件初步研究[J]. 家畜生态学报, 2017, 38(4): 58-62.
- [22] 林晓琼, 孙扬, 陈光, 等. 常压室温等离子体快速诱变筛选高产纤维素酶生产菌株[J]. 吉林农业大学学报, 2016, 38(5): 543-547.
- [23] 姜军坡, 朱宝成, 王世英. 以滤纸酶活力为指标优化解淀粉芽孢杆菌 Tu-115 菌株产纤维素酶液体发酵条件[J]. 饲料工业, 2014, 35(20): 43-47.
- [24] 李红亚, 李文, 李木娜, 等. 解淀粉芽孢杆菌复合菌剂对玉米秸秆的降解作用及表征[J]. 草业学报, 2017, 26(6): 153-167.
- [25] 邓小燕. 抗寒基因表达载体构建及遗传转化研究[D]. 重庆: 西南农业大学, 2003.
- [26] CHEN S, PU H M, ZHANG J F, et al. Transformation of *Brassica napus* L. with an *ihpRNA* vector targeting the A-12 desaturase gene to achieve high oleic acid germplasm[C]// 第三届植物分子育种国际会议论文集. 北京: 中国农学会, 2010.
- [27] 陈小玲, 张穗生, 黄俊, 等. 里氏木霉纤维二糖水解酶基因 *cbh1* 的分子改造[J]. 南方农业学报, 2014, 45(10): 1739-1743.
- [28] 熊小龙. 应用于宏基因组纤维酶基因钓取的新 PCR 方法的构建[D]. 杭州: 杭州师范大学, 2012.
- [29] 陈玉娟, 沈微, 陈献忠, 等. 解淀粉芽孢杆菌 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的高效表达[J]. 生物技术, 2011, 21(2): 22-26.
- [30] 苗会. 耐碱内切葡聚糖酶的定向进化[D]. 长春: 吉林农业大学, 2017.
- [31] WONG J H, HAO J, CAO Z, et al. An antifungal protein from *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. *J Appl Microbiol*, 2008, 105(6): 1888-1898.
- [32] 邓建良, 刘红彦, 刘玉霞, 等. 解淀粉芽孢杆菌 YN-1 抑制植物病原真菌活性物质鉴定[J]. 植物病理学报, 2010, 40(2): 202-209.
- [33] 胡忠亮, 郑催云, 田兴一, 等. 解淀粉芽孢杆菌在环境保护和农业生产中的应用[J]. 农药, 2016(4): 241-245.
- [34] 孙玲红. 鹅盲肠产纤维素酶细菌的分离鉴定及酶学性质研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2016.
- [35] 胡聪, 李仲玄, 斯大勇, 等. 解淀粉芽孢杆菌在畜禽养殖中的应用[J]. 饲料工业, 2018(6): 56-60.
- [36] 高灵芳. 木质纤维素降解菌产糖特性及作用机制[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2013.
- [62] 梁丽珍, 牛俊玲. 改性碎砖对磷的吸附性能研究[J]. 环境工程, 2014, 32(10): 38-40, 132.
- [63] 王振, 刘超翔, 李鹏宇, 等. 废砖块作为人工湿地填料的除磷能力研究[J]. 环境科学, 2012, 33(12): 4373-4379.
- [64] 殷小锋, 胡正义, 周立祥, 等. 滇池北岸城郊农田生态沟渠构建及净化效果研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(22): 9676-9679, 9689.
- [65] WU C D, WANG L, HU B, et al. Influential factors of formation kinetics of flocs produced by water treatment coagulants[J]. *Journal of environmental sciences*, 2013, 25(5): 1015-1022.
- [66] 周婷, 袁世斌, 张小平, 等. 沟渠式生物接触氧化法对有机物和氨氮的去除研究[J]. 环境污染与防治, 2008, 30(6): 41-44.
- [67] 袁世斌, 周婷, 董微, 等. 沟渠式生物接触氧化工艺对面源生活污水中磷的去除[J]. 科技资讯, 2007(36): 169-170, 172.

(上接第 13 页)

- [58] DING W G, XIAN Y R, TAO L, et al. A research on purification effect of the substrate of constructed wetlands with FS-G-CD-S-SS model on phosphorus pollution[J]. *Procedia environmental sciences*, 2011, 10: 2645-2653.
- [59] BLANCO I, MOLLE P, DE MIERA L E S, et al. Basic oxygen furnace steel slag aggregates for phosphorus treatment. Evaluation of its potential use as a substrate in constructed wetlands[J]. *Water research*, 2016, 89: 355-365.
- [60] 张修稳, 李锋民, 卢伦, 等. 10 种人工湿地填料对磷的吸附特性比较[J]. 水处理技术, 2014, 40(3): 49-52, 56.
- [61] 王功, 魏东洋, 方晓航, 等. 基于新型有机多孔复合基质的生物系统去除污染水体中的氮磷[J]. 环境工程学报, 2013, 7(1): 119-124.