

筛选两株稻秆降解放线菌

顾文杰¹, 张发宝^{*}, 徐培智, 解开治, 唐拴虎

广东省农业科学院土壤肥料研究所, 农业部南方植物营养与肥料重点实验室, 广东省养分资源循环利用与耕地保育重点实验室 510640

摘要: 【目的】筛选能够同时降解纤维素、半纤维素、木质素的微生物菌株, 并研究其对稻秆的降解效果。【方法】采用羧甲基纤维素钠、半纤维素平板水解圈法、苯胺蓝平板脱色法进行初筛; 利用 DNS 法测定胞外酶活性; 在含有 2% 稻秆的液体发酵培养基中摇瓶培养 10 天后, 洗去菌体测定稻秆失重率、木质纤维素类物质降解率, 同时测定稻秆断裂拉力进行复筛。【结果】筛选出两株能够同时高效降解木质纤维素的放线菌 A3 和 A6, 其纤维素和半纤维素酶活较高, 最高纤维素全酶活、 β -葡萄糖苷酶活、外切酶活和内切酶活分别为: 12.84 和 12.85、6.23 和 6.53、24.56 和 17.80、14.00 和 18.80 U/mL; 最高半纤维素酶活分别为: 83.05 和 52.98 U/mL; 木质素酶活较低, 菌株 A3 和 A6 的木素过氧化物酶最大值为: 12.72 和 14.67 U/mL, 锰过氧化物酶最大值为: 22.48 和 24.67 U/mL, 漆酶最大值为: 28.40 和 33.04 U/mL。经形态学、培养特征和分子生物学分析, 两株菌株鉴定为链霉菌, 对稻秆均有较好的降解效果, 在第 10 d 后稻秆断裂拉力测定值分别比初始时降低 62.67% 和 66.67%; 稻秆失重率在 31.50% 和 35.83%; 菌株 A3 对纤维素、半纤维素、木质素降解率为 38.73%、33.16% 和 20.68%, 菌株 A6 为 47.69%、28.64 和 22.59%。【结论】放线菌 A3 和 A6 对纤维素、半纤维素、木质素均具有降解作用, 且酶活较高, 具有较好的应用前景。

关键词: 稻秆, 降解菌, 筛选, 纤维素酶, 半纤维素酶, 木质素酶

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012)09-1085-09

农作物秸秆是一种重要的可再生资源, 全世界每年秸秆产量约为 22 亿吨^[1-2]。我国是一个农业大国, 据粗略统计, 每年约产农作物秸秆约 7 亿吨, 占世界秸秆总产量的 20% – 30%^[3-6]。虽然农业作物秸秆资源巨大, 但目前对此资源的利用很不充分, 在广大农村除少部分用作燃料、畜禽饲料外, 大部分被丢弃, 不仅造成自然资源的极大浪费, 而且污染了环境。农作物秸秆不能被充分利用的主要原因

是秸秆中木质纤维素含量较高难以利用。近几十年来, 国内外科研人员研究利用物理、化学和生物方法处理秸秆, 其中物理和化学方法都存在着利用不充分、成本高等问题^[7-9]。生物法因为具有降解率高, 安全环保, 成本低等优点成为国内外的研究热点。

木质纤维素组分包括纤维素、半纤维素和木质素, 其中纤维素是纤维的骨骼物质, 而木质素与半纤维素以包容物质的形式分散在纤维之中及其周

基金项目: 广东省教育部产学研结合项目 (2011B090400277); 公益性行业 (农业) 科研专项经费 (201003016)

*** 通信作者:** Tel: +86-20-85161460; E-mail: fabaozhang@163.com

作者简介: 顾文杰 (1982 -), 黑龙江鹤岗人, 助理研究员, 硕士, 主要从事环境微生物和有机固体废弃物生物处理的研究。E-mail: irisgu0818@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-03-31; **修回日期:** 2012-05-14

围,它们之间主要靠共价键紧密连结,同时也存在一定程度的化学键连结^[10]。目前研究的具有木质素降解能力的微生物主要是真菌,其中白腐菌和褐腐菌对木质素的降解效果明显。国内外对分解纤维素的微生物的研究较多,主要有好氧菌如嗜纤维菌属(*Cytophaga*)、纤维弧菌属(*Cellvibrio*)、纤维单胞菌属(*Cellulomonas*)等,真菌中的木霉(*Trichoderma*)、曲霉(*Aspergillus*)、青霉(*Penicillium*)等^[11-14]。半纤维素降解菌的研究也主要集中在真菌的木霉(*Trichoderma*)、曲霉(*Aspergillus*)以及细菌的芽孢杆菌(*Bacillus*)^[15-17]。放线菌很少利用纤维素,但它们易于利用半纤维素,并能在一定程度上改变木质素的分子结构,继而分解溶解的木质素^[18]。虽然对能够降解木质纤维素的微生物做了大量研究,但是所研发的菌株仍然存在产酶活力低,效果不稳定等问题,并且大多数研究者在筛选过程中只单一的针对木质素、纤维素或者半纤维素中的某一种成分,因此在实际应用中效果并不十分理想。本文通过在大量含有木质纤维素的样品中采集样品,分离出2株能够同时降解纤维素、半纤维素和木质素的高效微生物菌株,并对其进行鉴定,结果二者均为放线菌。目前,木质纤维素物质的降解主要集中在真菌和细菌的研究,对于放线菌的研究比较少见,本研究丰富了木质纤维素物质降解的菌群,并为其在今后的应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品:采集自广东省增城市周边水稻田的土壤,腐烂的水稻秸秆,博罗县果园、罗浮山森林,广州市番禺区珠江奶牛场牛粪,广东省农业科学院土壤肥料研究所堆肥厂。

1.1.2 主要试剂和仪器:DNS 试剂,柠檬酸缓冲液,酒石酸缓冲液,水杨酸,苯胺蓝,愈创木酚,羧甲基纤维素钠(CMC-Na),黎芦醇,2,2'-连氮-3-乙基苯并噻唑-6-磺酸(ABTS);稻秆:将水稻秸秆截成1-2 cm大小,烘干后粉碎过80目筛。半纤维素的制备:用4%的NaOH浸泡水稻秸秆粉2 h(90℃),离心得滤液,用浓盐酸调pH值至4.5后,加入与滤液等体积的乙醇(95%)以沉淀半纤维素,离心得沉淀,用无水乙醇洗涤沉淀2次,再将沉淀于45℃下烘干,即

得浅黄色,粉末状半纤维素。7200可见分光光度计(尤尼柯(上海)仪器有限公司),UV-1240紫外分光光度计(岛津(香港)有限公司),3K15型台式高速离心机(北京思达兴业仪器有限公司),PTC0200 PCR仪(Bio-RAD Laboratories Inc.),044BR3749电泳仪(Bio-RAD Laboratories Inc.),720BR紫外凝胶成像系统(Bio-RAD Laboratories Inc.)

1.1.3 培养基:(1)富集培养基: NH_4NO_3 0.5 g, KH_2PO_4 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, FeCl_3 0.01 g, NaCl 1.0 g, 蛋白胨5.0 g, 酵母浸膏3.0 g, 稻秆粉20.0 g, 水1000 mL, pH自然;(2)纤维素降解菌分离筛选培养基: CMC-Na 平板^[2];(3)半纤维素分离降解菌筛选培养基^[19];(4)木质素降解菌分离培养基: 愈创木酚平板^[20];木质素降解菌筛选培养基: 苯胺蓝平板^[20];(5)液体种子培养基: 高氏一号培养基;(6)发酵产酶培养基: NaCl 0.2 g, KH_2PO_4 3.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0 g, 尿素0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, CaCl_2 0.5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.025 g, ZnSO_4 0.02 g, 稻秆粉20.0 g, 蛋白胨2.0 g, 酵母浸膏5.0 g, 水1000 mL, pH自然^[21]。

1.2 菌株的分离和筛选

将10.0 g样品放入含90 mL富集培养基的三角瓶中,在30℃,150 r/min下,振荡培养3-5 d后适当稀释涂布于CMC-Na平板上,30℃倒置培养2-5 d后挑取单菌落。将初筛菌株点接到CMC-Na平板上,培养5 d后,CMC-Na平板用1%的刚果红溶液染色30 min,再用蒸馏水清洗,最后用1 mol/L的NaCl溶液脱色30 min,出现水解圈的菌株为纤维素降解菌。将纤维素降解菌点接到半纤维素筛选培养基上,培养5 d后,半纤维素筛选培养基上产生水解圈的菌株即纤维素、半纤维素降解菌。将纯化后的纤维素、半纤维素降解菌株点种到木质素筛选培养基上,培养5 d后,选择能使苯胺蓝平板脱色产生水解圈的菌株即为可同时降解纤维素、半纤维素和木质素的菌株。

以水解圈的直径(D, cm)和菌落直径(d, cm)比值平方(D_p)大小作为筛选的标准,即 $D_p = (D/d)^2$ ^[12]。

1.3 菌株鉴定

1.3.1 形态与培养特征观察:采用平皿插片法观察菌株的镜下形态特征;肉眼观察菌株A3和A6在放

线菌鉴定常规培养基上的培养特征^[22]。

1.3.2 生理生化特性分析:明胶液化、牛奶凝固与胨化、淀粉水解、纤维素分解、硝酸盐还原、黑色素和 H₂S 的产生等生理生化试验参照瓦克斯曼的方法^[23]。

1.3.3 16S rDNA PCR 序列测定及系统发育分析:菌株 A3 和 A6 的 DNA 提取按照细菌基因组提取试剂盒(天根生化科技有限公司)的方法。以总 DNA 为模板,采用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGCTACCTGTTACGACTT-3'), PCR 扩增菌株的 16S rDNA 序列^[24]。50 μL PCR 反应体系中含有 *Premix EX Taq* 25 μL, 模板 1 μL, 引物 27F 和 1492R (20 μmol/L) 各 1 μL, ddH₂O 22 μL。PCR 反应程序为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 56℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 3 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 5 min, 4℃ 保存^[25]。测序由广州瑞真生物科技有限公司完成。获得的 16S rDNA 序列提交到 GenBank 数据库获得登录号, 并利用 Blast 程序搜索同源序列, 以 Clustal X 软件进行多重序列比对^[26], 再用 MEGA4.0 软件构建系统发育树^[27]。

1.4 酶活测定

1.4.1 粗酶液的制备:挑取高氏一号培养基上的孢子接种于液体种子培养基, 30℃, 150 r/min 培养 3 d, 观察孢子生长情况, 按 1% (10⁸ 个孢子量) 的接种量接种到 300 mL 发酵产酶培养基。分别于第 3、5、7、9、11、13 和 15 d 取样测定酶活。将培养好的菌液用滤纸过滤, 得滤液于 4℃, 10000 × g 离心 10 min, 取上清液即为粗酶液。

1.4.2 纤维素酶活测定:全酶活 (FPase) 的测定; 外切酶活 (exo-1, 4-β-D-glucanase, CBH/Cex) 的测定; 内切酶活 (endo-1, 4-β-D-glucanase, EG/Cen) 的测定均采用 DNS 法, 参照王洪媛测定方法^[12]。

1.4.3 半纤维素酶测定:取适当稀释的酶液 0.5 mL, 0.5% 的半纤维素磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 1.5 mL 于试管中, 50℃ 水浴保温 30 min, 取出立即按 DNS 法测定还原糖含量^[28]。

1.4.4 木质素酶活测定:木素过氧化物酶 (LiP) 活测定: 采用藜芦醇法^[29]; 锰过氧化物酶 (MnP) 活测定参照 Hiroyuki W 的测定方法^[30]。漆酶 (Lac) 酶活测定: 采用 ABTS 法^[31]。

1.5 稻秆降解效果

1.5.1 稻秆失重率:接种筛选菌株到液体培养基中

制备菌液, 然后以 5% 接种量将菌液接入到含有 2% 稻秆粉的液体发酵培养基中, 30℃ 振荡培养 10 d, 用滤纸过滤培养液, 用去离子水洗掉残留菌体, 95℃ 烘干称重, 用减量法计算稻秆失重率。

$$\text{稻秆失重率} = \frac{\text{对照样品稻秆含量} - \text{处理样品残留稻秆含量}}{\text{对照样品稻秆含量}}$$

1.5.2 稻秆断裂拉力测定:称取稻秆 100 g, 按稻秆: 水 (质量比) = 1: 5 进行浸泡, 分别接种 1% 的 A3 和 A6 菌液, 在 30℃ 恒温箱中进行腐解, 腐解时间 10 d, 测定稻秆断裂拉力值。以不接菌液作空白对照。测定稻秆断裂拉力值的操作为: 在腐解第 10 d 取样, 取相同部位的稻秆测定 10 次, 取其平均值 (采用山度 SH-500 型数字显示拉力计测定稻秆断裂的拉力值, 单位牛顿 (N))。

1.5.3 纤维素、半纤维素和木质素降解率的测定:木质纤维素各组分含量测定参考王玉万等^[32]的定量分析方法。

2 结果和分析

2.1 稻秆降解菌的分离筛选

通过分离筛选得到在纤维素、半纤维素和木质素分离筛选培养基上均能快速生长, 并且水解圈均较大的 2 株菌株, 命名为 A3 和 A6。菌株 A3 和 A6 在筛选培养基上生长迅速, 尤其是半纤维素筛选培养基上培养 1 d 后就出现较大的水解圈, 第 3 d 已经产生大量孢子。在 CMC-Na 平板、苯胺蓝平板上第 2 d 产生较小的水解圈, 随后菌株适应了培养基营养条件后, 水解圈迅速增加。本试验所测得的水解圈为接种后第 3 d 的结果。由表 1 可知菌株 A3 和 A6 纤维素的水解能力最强, 其次是半纤维素, 最弱的为木质素。图 1 为菌株 A3 和 A6 水解纤维素和半纤维素的图片。

表 1 菌株 A3 和 A6 水解木质纤维素情况

Table 1 Lignocellulose hydrolytic ability of A3 and A6			
Strain	Cellulose D _p value	Hemicellulose D _p value	Lignin D _p value
A3	13.89a	10.95a	3.66 a
A6	16.30 b	10.00 a	3.85 a

Significance $P = 0.05$.

2.2 菌株鉴定

2.2.1 形态及培养特征:菌株 A3 和 A6 在高氏一号等 6 种培养基上均可生长, 菌株 A3 在克氏一号培养基和蔗糖察氏培养基上生长不产生气生菌丝,

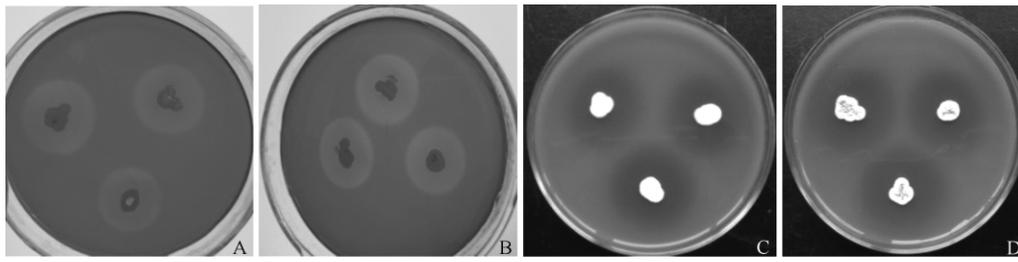


图1 菌株 A3 水解纤维素(A)、半纤维素(C)和 A6 水解纤维素(B)、半纤维素(D)

Fig.1 Cellulose (A) and hemicellulose (C) hydrolytic ability of A3; cellulose (B) and hemicellulose (D) hydrolytic ability of A6.

菌株 A6 在蔗糖察氏培养基和葡萄糖天门冬素培养基上生长不产生气生菌丝。菌株 A3 和 A6 气生菌丝颜色、基内菌丝颜色和可溶性色素特征见表 2。经插片法观察菌株 A3 和 A6 的镜下形态: 菌株 A3 菌丝无隔, 树根状, 无断裂, 孢子丝单生或丛生, 孢子丝顶端形成长孢子链, 孢子链螺旋或钩形, 轮生

或非轮生, 孢子椭圆形。菌株 A6 菌丝无隔, 树枝状, 无断裂, 孢子丝单生, 波曲或钩状, 孢子长链状排列, 圆形。

2.2.2 生理生化特征: 菌株 A3 和 A6 具有相同的生理生化特征(表 3)。结合形态、培养特征及生理生化特征, 初步推测菌株 A3 和 A6 属于链霉菌。

表 2 菌株 A3 和 A6 在不同培养基上的培养特征

Table2 Cultural characteristics of A3 and A6 on different media

Media	A3				A6			
	Growth status	Aerial mycelium color	Substrate mycelium color	Soluble pigment	Growth status	Aerial mycelium color	Substrate mycelium color	Soluble pigment
Gause (No. 1) agar	+	Grey white	Pale orange	-	+	Yellow	Grayish brown	-
Christensen (No. 1) agar	+	-	Milky white	-	+	Pale yellow	White	-
Czapek's agar	+	-	Milky white	-	+	-	Milky white	-
Glucose asparagine agar	+	Grey white	Pale yellow	-	+	-	Milky white	-
Starchammonium-salt agar	++	Grey white	Nankeen	-	++	Grey white	Nankeen	-
Potato glucose agar	+++	Chestnut brown	Tan	Tan	+++	Grayish brown	Nankeen	Tan

+: Sparse growth, ++: Poor growth, +++: Moderate growth; -: none.

表 3 菌株 A3 和 A6 的生理生化特性

Table 3 Physiological and biochemical characteristics of A3 and A6

Item tested	A3	A6
Oxidase	-	-
Catalase	+	+
Urease	+	+
Gelatin liquefaction	+	+
Milk coagulation and peptonization	+	+
Starch hydrolysis	+	+
Cellulose decomposition	+	+
Nitrate reduction	-	-
Methy red	-	-
Voges-Prokauer	-	-
Tryptophan decomposition	+	+
Melanin formation	-	-
H ₂ S production	-	-

“+”: Positive reaction “-”: Negative reaction

2.2.3 16S rDNA 序列测定及系统发育分析: 对菌株 A3 和 A6 的 16SrDNA 序列进行 PCR 扩增, 产物经纯化后测序, 菌株 A3 和 A6 序列长度均为 1466 bp, 在 GenBank 的序列登录号分别为 JQ388676 和 JQ388677; 测序结果利用 Blast 程序与 GenBank 中已登录的基因序列进行比对, 获得已定名的与之相似的属、种的相关信息, 为了进一步确定菌株 A3 和菌株 A6 之间的亲缘关系, 我们进行了这两个菌株的同源序列比对发现菌株 A3 和 A6 同源性达到 99%, 均与链霉菌属 (*Streptomyces*) 菌株高度相关, 但是这两个菌株分别处于独立的两个分支。构建发育树和同源性分析结果显示(图 2), 菌株 A3 与链霉菌中的 *Streptomyces* sp. 1A01654 (EF012118.1) 单独构成一个分支, 进化上的距离最近, 反映出它们之间

亲缘关系最近,二者同源率为 99%。菌株 A6 与链霉菌 *Streptomyces* sp. LY18 (JN181242.1) 的同源性

达 99.9%。因此,可以确定菌株 A3 和 A6 均属于链霉菌属。

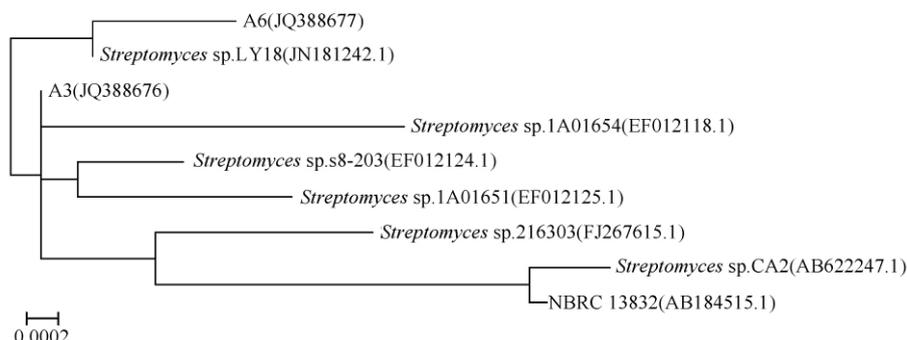


图2 菌株 A3 和 A6 与其在 GenBank 数据库中相关属种构建的以 16S rDNA 序列为基础的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strains A3, A6 and other related strains downloaded from GenBank.

2.3 酶活检测

2.3.1 纤维素酶活: 由图 3 可知,菌株 A3 和 A6 的纤维素酶活高低不同,而四种酶活的变化趋势相同,均是随着发酵时间的延长酶活不断升高,达到最高点后开始下降,但四种酶的产生时间不同。菌株 A3 和 A6 的纤维素全酶活和 β-葡萄糖苷酶活最佳产酶时间均为第 11 d,最高全酶活分别为: 12.84 和

12.85 U/mL, β-葡萄糖苷酶活分别为: 6.23 和 6.53 U/mL,二者差异不显著 ($P > 0.05$)。纤维素外切酶活分别在发酵的第 7 d 和第 9 d 达到最高,最大值为: 24.56 和 17.80 U/mL,二者差异显著 ($P < 0.05$)。纤维素内切酶活均是在第 5 d 达到最高,分别为: 14.00 和 18.80 U/mL,二者差异显著 ($P < 0.05$),这与在刚果红平板上的数据相符合。

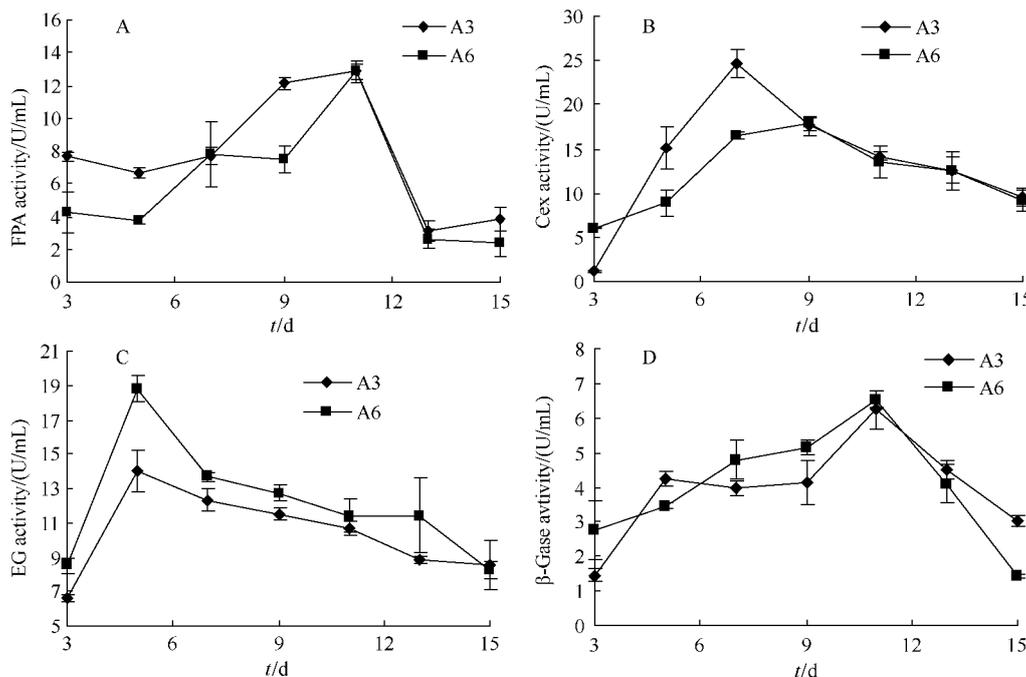


图3 菌株 A3 和 A6 全酶活(A)、外切酶活(B)、内切酶活(C)和 β-葡萄糖苷酶活(D)变化

Fig.3 Holozyme (A), endonuclease (B), exonuclease (C) and β-Glucosidase (D) activity of A3 and A6.

2.3.2 半纤维素酶活: 菌株 A3 和 A6 的半纤维素酶活变化如图 4 所示。菌株 A3 的半纤维素酶活在发酵的 3-9 d 基本保持稳定, 第 9 d 后迅速上升, 在第 11 d 达到最高, 半纤维素酶活为 83.05 U/mL。菌株 A6 的半纤维素酶活在发酵过程中的 3-7 d 比较稳定, 第 7 d 后有所上升, 在第 9 d 达到最高, 半纤维素酶活为 52.98 U/mL, 与 A3 相比差异显著 ($P < 0.05$)。

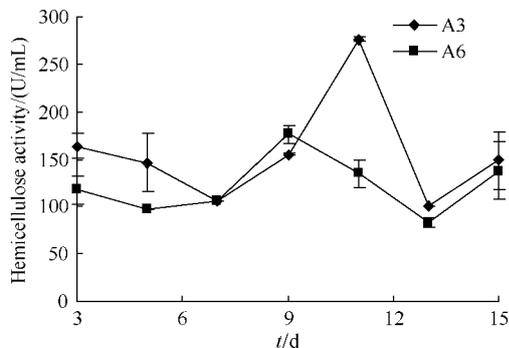


图 4 菌株 A3 和 A6 半纤维素酶活变化

Fig. 4 Hemicellulose activity of A3 and A6.

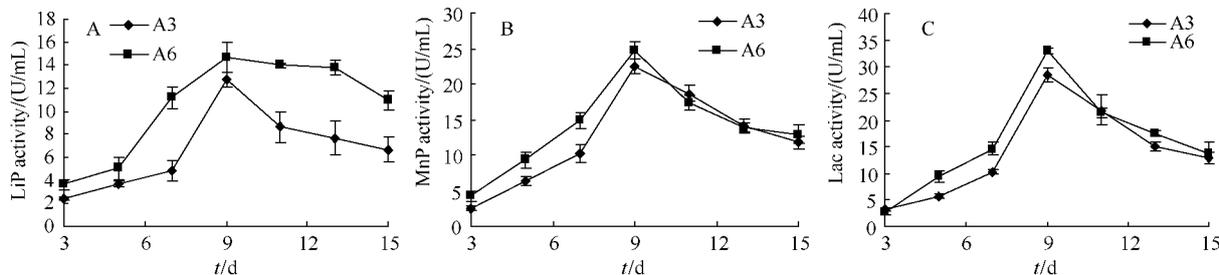


图 5 菌株 A3 和 A6 木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶和漆酶酶活变化

Fig. 5 Lignin peroxidase (A), manganese peroxidase (B) and laccase (C) activity of A3 and A6.

表 4 放线菌 A3 和 A6 对稻秆的降解效果

Table 4 Degradation ability of straw of A3 and A6

Strain	Traction force /N	Weight loss percentage of straw /%	Degradation rate of cellulose /%	degradation rate of Hemicellulose /%	Degradation rate of Lignin /%
A3	28a	31.50a	38.73a	33.16b	20.68a
A6	25a	35.83ab	47.69c	28.64a	22.59a

素的降解率要低于菌株 A3。

3 讨论

目前, 秸秆降解速度慢、降解效果不理想已成为限制秸秆资源化利用的瓶颈。因此, 筛选理想的秸秆快速降解微生物菌株已成为研究热点。过去研究的具有木质素降解能力的微生物主要是真菌和部分

2.3.3 木质素酶活: 菌株 A3 和 A6 的 3 种木质素酶活均呈现先上升后下降的趋势见图 5。菌株 A3 和 A6 的木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶和漆酶均是在发酵的第 9 d 达到最高。菌株 A3 和 A6 的木质素过氧化物酶最大值为: 12.72 和 14.67 U/mL, 锰过氧化物酶最大值分别为: 22.48 和 24.67 U/mL, 漆酶最大值分别为: 28.40 和 33.04 U/mL, 菌株 A3 和 A6 的 3 种木质素酶活差异均不显著 ($P > 0.05$)。

2.4 稻秆降解效果

通过稻秆断裂拉力测定、稻秆失重率和木质纤维素类物质降解率测定结果表明: 菌株 A3 和 A6 对稻秆的降解具有一定效果。未处理前的稻秆断裂拉力测定值为 75 N, 经过 10 d 的处理, CK 稻秆断裂拉力测定值下降至 47 N, 降低幅度为 37.33%, 而经 A3 和 A6 菌液处理的稻秆断裂拉力测定值分别下降至 25 N 和 28 N, 降低幅度分别为: 62.67% 和 66.67%, 比 CK 多下降了 25.34 个百分点和 29.34 个百分点。经菌株 A6 菌液处理后的稻秆失重率、纤维素降解率以及木质素降解率均高于菌株 A3, 而半纤维

细菌, 少见放线菌的报道。本试验筛选出两株能够降解秸秆的菌株 A3 和 A6, 他们均能在 CMC-Na 平板, 半纤维素平板和愈创木酚平板上迅速生长。菌株 A3 和 A6 第 3 d 时对 CMC-Na 的 Dp 值分别达到 13.89 和 16.30, 这个结果要显著高于徐杰, 杨谦 (2008) [6] 所筛选的放线菌。菌株 A3 和 A6 第 3 d 时对半纤维素水解 Dp 值为 10.95 和 10.00, 这也有利于魏国成 [33] 的研究结果。菌株 A3 和 A6 第 3 d 时

对苯胺蓝的水解 Dp 值为 3.66 和 3.85。菌株 A3 和 A6 经形态学、生理生化和分子生物学鉴定为链霉菌属。目前,木质素降解菌的研究主要集中在真菌,特别是白腐菌。李成翠等^[34]筛选到了一株解淀粉芽孢杆菌对木质素具有较好的降解效果,然而很少见放线菌对木质素的降解研究。徐杰,杨谦(2008)^[6]曾报道过一株链霉菌可降解木质素,但是未作详细测定。

经酶活的测定结果表明菌株 A3 和 A6 可产生较高的纤维素酶活,高于许多已报道的菌株^[2-3,35]。菌株 A3 和 A6 纤维素内切酶活最高分别为:14.00 和 18.80 U/mL,而宋波,羊键^[36](2005)所筛选的一株 *Streptomyces* spp. 经培养条件优化后最高纤维素内切酶活为 4.5 U/mL。吴祥等^[37]所筛选的 *Streptomyces* spp. 经培养条件优化后最高纤维素内切酶活为 11.52 U/mL。菌株 A3 和 A6 半纤维素酶活为 24.94 和 15.91 U/mL,要低于全桂静,赵航(2010)^[15]和虢国成^[33](2008)所筛选出的菌株,但是与沈进军等^[38]所筛选的菌株酶活力相当,并高于翟倩等^[39]所筛选的菌株。菌株 A3 和 A6 均可产生木质素酶,但其酶活相对于其他研究者^[29,40]所筛选的菌株要低。菌株 A3 和 A6 对稻秆均有较好的降解效果,在第 10 d 后稻秆断裂拉力测定值分别比初始时降低 62.67% 和 66.67%; 稻秆失重率在 31.50% 和 35.83%,这与王洪媛,范丙全(2010)^[12]筛选的菌株以及李文学等^[41]组配的复合菌剂效果相当,稻秆木质纤维素物质的降解率也高于现有的研究水平^[2-3,5,12]。

本实验筛选出的菌株 A3 和 A6 对纤维素、半纤维素和木质素均有降解效果,尤其是纤维素和半纤维素酶活较高,对水稻秸秆能达到较好的降解效果。无需进行多种微生物的组配,简化了菌剂生产工艺,节约研发和生产成本,具有较好的应用前景。但是由于放线菌生长速度较慢,要经过较长时间才能达到产酶高峰,因此,在今后的研究中应对其培养基进行优化,使其产酶高峰期提前到来。

参考文献

- [1] Kim S, Dale BE. Global potential bicethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy*, 2004, (26): 361-375.
- [2] 郝月, 杨翔华, 张晶, 周东凯, 金贤子. 秸秆纤维素分解菌的分离筛选. *中国农学通报 (Chinese Agricultural Science Bulletin)*, 2005, 21 (7): 58-60.
- [3] 刘甲锋, 沈德龙, 李力, 陈慧君, 关大伟, 姜昕, 李俊. 复合菌系 RSS-4 传代对水稻秸秆腐解的影响. *微生物学杂志 (Journal of microbiology)*, 2010, 30 (4): 30-35.
- [4] 孙永明, 李国学, 张夫道, 施晨璐, 孙振钧. 中国农业废弃物资源现状与发展战略. *农业工程学报 (Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering)*, 2005, 21 (8): 169-171.
- [5] 黄茜, 黄凤洪, 江木兰, 万楚筠, 刘睿. 木质素降解菌的筛选及混合菌发酵降解秸秆的研究. *中国生物工程杂志 (China Biotechnology)*, 2008, 28 (2): 66-70.
- [6] 徐杰, 杨谦. 水稻秸秆降解优良放线菌的筛选和鉴定. *林产化学与工业 (Chemistry and Industry of Forest Products)*, 2008, 28 (5): 55-58.
- [7] Gould JM. Studies on the mechanism of alkaline peroxide delignification of agricultural residues. *Biotechnology and Bioengineering*, 1985, 26: 46-72.
- [8] El Mastry HG. Utilization of Egyptian rice straw in production of cellulases and microbial protein: effect of various pretreatments on yields of protein and enzyme activity. *Journal Science Food Agriculture*, 1983, 34: 725-732.
- [9] 张木明, 徐振林, 张兴秀, 孙远明. 预处理对稻草秸秆纤维素酶解产糖及纤维素木质素含量的影响. *农产品加工·学刊 (Academic Periodical of Farm Products Processing)*, 2006, 58 (3): 4-6.
- [10] 王毅, 刘云国, 习兴梅, 陈芙蓉. 枯草芽孢杆菌降解木质纤维素能力及产酶研究. *微生物学杂志 (Journal of microbiology)*, 2008, 28 (4): 1-6.
- [11] 杨晓宸, 卢雪梅, 黄峰. 木质纤维素微生物转化机理研究进展. *纤维素科学与技术 (Journal of Cellulose Science and Technology)*, 2007, 15 (1): 52-58.
- [12] 王洪媛, 范丙全. 三种高效秸秆纤维素降解真菌的筛选及其降解效果. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2010, 50 (7): 870-875.
- [13] Magalhaes PO, Ferraz A, Milagres AFM. Enzymatic properties of two beta-glucosidases from *Ceriporiopsis subvermispota* produced in biopulping condition. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 101: 480-486.
- [14] Petr Baldrian VVK. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 2008, 32 (3): 501-521.

- [15] 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. 沈阳化工大学学报 (*Journal of Shenyang University of chemical technology*), 2010, 24 (1): 50-57.
- [16] Panbangred W, Shinmyo A, Kinoshita S, Okada, H. Purification and properties of endoxylanase produced by *Bacillus pumilus*. *Agriculture Biology Chemical*, 1983, 47: 957-963.
- [17] Beg Q, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal. Microbiol xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2001, 56: 326-338.
- [18] Tuomela M, Vikman M, Hatakka A, Itävaara M. Biodegradation of lignin in a compost environment a Review. *Bioresource Technology*, 2000, 72 (2): 169-183.
- [19] Yan Kangpei, Lilian LP, Vrijmoed, Feng Minguang. Survey of coastal mangrove fungi for xylanase production and optimized culture and assay conditions. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2005, 45 (1): 92-96.
- [20] 吴薇, 顿宝庆, 姜训鹏, 吕程序, 高振江, 路明. 高效木质素降解菌的分离筛选. 食品科技 (*Food Science and Technology*), 2008, 3: 22-25.
- [21] 燕红, 杨谦, 潘忠诚. 一株地衣芽孢杆菌对稻草降解作用的研究. 浙江大学学报 (农业与生命科学版) (*Journal of Zhejiang University (Agriculture&Life Science)*), 2007, 33 (4): 360-366.
- [22] Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1966, 16 (3): 313-340.
- [23] Watt Mann SA. 放线菌 (第二卷) 属和种的分类、鉴定和描述. 北京: 科学出版社, 1974.
- [24] Cao LX, Qiu ZQ, Dai X, Tan HM, Lin YC, Zhou SN. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of banana (*Musaacuminata*) plants and their activities against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2004, 20: 501-504.
- [25] 黎志坤, 朱红惠. 一株番茄青枯病生防菌的鉴定与防病、定殖能力. 微生物学报 (*Microbiologica Sinica*), 2010, 50 (3): 342-349.
- [26] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22 (22): 4673-4680.
- [27] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24 (8): 1596-1599.
- [28] Nanmori T, Watanabe T, Shinke R, Kohno A, Kawamura Y. Purification and properties of thermos table xylanase and β -xy-losidase produced by a newly isolated *Bacillus stearother mophilus* strain. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172: 6669-6672.
- [29] Tien M, Kirk TK. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Method in Enzymology*, 1988, 161 (2): 238-249.
- [30] Hiroyuki W, Khadar V, Michael HG. Manganese (II) Oxidation by Manganese Peroxidase from the Basidiomycete *Phanerochaete Chrysosporium*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267 (33): 23688-23694.
- [31] Childs R E, Bardsley W G. The steady-state kinetics of peoxidase with 2, 2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-Sulphonic acid) as chromogen. *Biochemistry Journal*, 1975, 145: 93-103.
- [32] 王玉万, 徐文玉. 木质纤维素固体基质发酵物中半纤维素、纤维素和木质素的定量分析程序. 微生物学通报 (*Microbiology China*), 1987, 14 (2): 81-84.
- [33] 魏国成. 高产木聚糖酶菌株的筛选及其产酶特性研究. 食品与机械 (*Food&Machinery*), 2008, 24 (2): 22-25.
- [34] 李成翠, 李术娜, 朱宝成. 高活性木质素降解菌株 T-8 的分离、筛选与鉴定. 河北农业大学学报 (*Journal of Agriculture University of Hebei*), 2010, 33 (6): 57-60.
- [35] 郭夏丽, 杨小丽, 李顺义. 秸秆降解菌的筛选及菌种组合. 郑州大学学报 (工学版) (*Journal of Zhengzhou University (Engineering Science)*), 2010, 31 (1): 74-77.
- [36] 宋波, 羊键. 一株降解纤维素的放线菌的筛选及其产酶条件的研究. 微生物学杂志 (*Journal of Microbiology*), 2005, 25 (5): 36-39.
- [37] 吴翔, 陈强, 徐丽华, 陈晓琴, 赵芯, 赵珂. 一株降解纤维素的高温放线菌的筛选及其产酶条件研究. 农业环境科学学报 (*Journal of Agro-Environment Science*) 2007, 26 (增刊): 101-104.
- [38] 沈进军, 王建军, 朱逸涵, 张顺萍, 黄志伟. 木聚糖酶高产菌株的筛选及产酶条件. 亚热带农业研究 (*Subtropical Agriculture Research*), 2010, 6 (2): 115-120.

- [39] 翟倩, 江正强, 闫巧娟, 邓伟. 链霉菌 Z18 产木聚糖酶的发酵条件. 中国农业大学学报 (*Journal of China Agricultural University*), 2007, 12 (3): 75-80.
- [40] 宋安东, 薛仁军, 谢慧, 王风芹, 张百良. 不同微生物降解木质纤维素效率和过程的对比研究. 安全与环境学报 (*Journal of safety and Environment*), 2009, 9 (2): 1-6.
- [41] 李文学, 李力, 李俊, 沈德龙, 姜昕. 小麦秸秆高效腐解菌复合系 WSS-1 的选育及其菌群分析. 生态学报 (*Acta Ecologica Sinica*), 2010, 30 (3): 0759-0764.

Screening of two straw-cellulose degrading actinomycetes

Wenjie Gu, Fabao Zhang, Peizhi Xu, Kaizhi Xie, Shuanhu Tang

Soil and Fertilizer Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Plant Nutrition and Fertilizer in South Region / Guangdong Key Laboratory of Nutrient Cycling and Farmland Conservation, Guangzhou, 510640 China

Abstract: [Objective] The aim of this study was to screen microorganisms that could degrade rice straw. [Methods] We used selective medium to screen strains and determined straw fracture tension strength, weight loss, lignocellulose decomposition rate and extracellular enzyme activity as re-screening methods after 10 days shake flask culture. [Results] We isolated two actinomycetes (A3 and A6), the highest cellulose enzyme activity of holoenzyme, β -Glucosidase, endonuclease and exonuclease for A3 were 12.84, 6.23, 24.56 and 14.00 U/mL, and for A6 12.85, 6.53, 17.80 and 18.80 U/mL. The hemicelluloses enzyme activity was 83.05 for A3 and 52.98 U/mL for A6. Both strains belonged to *Streptomyces*. With 10 days' treatment, inoculated straws showed a decrease of straw fracture tension strength by 62.67% (A3) and 66.67% (A6), while weight loss of straw was 31.50% (A3) and 35.83% (A6). A3's decomposition rate of cellulose, hemicellulose and lignin was 38.73%, 33.16% and 20.68%, and 47.69%, 28.64% and 22.59% for A6. [Conclusion] Actinomycetes A3 and A6 could degrade cellulose, hemicellulose and lignin.

Keywords: Straw degrading microorganism, screening cellulose enzyme, hemicellulose enzyme, lignin enzyme

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Cooperation Project in Production, Education and Research from Guangdong Province Department of Education (2011B090400277) and by the Special Funds of Scientific Research for Public Welfare Industry (Agriculture) (201003016)

* Corresponding author. Tel: +86-20-85161460; E-mail: zhangfabao@163.com

Received: 31 March 2012/Revised: 14 May 2012