

## 酸性土壤中高效半纤维素降解菌的筛选与鉴定

顾文杰<sup>1</sup>, 徐有权<sup>2</sup>, 徐培智<sup>1</sup>, 解开治<sup>1</sup>, 卢钰升<sup>1</sup>, 唐拴虎<sup>1</sup>, 张发宝<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>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, 广州 510640

<sup>2</sup>东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030

**摘要:** 【目的】筛选能够适应南方酸性土壤的高效半纤维素降解菌株, 并进行鉴定, 确定菌株的安全性。【方法】采用半纤维素平板水解圈法和胞外酶测定法进行菌株筛选, 通过拮抗实验构建复合微生物菌系。利用培养特征、形态学、生理生化特征和分子生物学方法进行菌株鉴定。【结果】筛选出效果稳定, 互不拮抗的高效半纤维素降解放线菌 4 株 (NA9、NA10、NA12 和 NA13), 半纤维素酶活分别为: 217.6、229.8、221.1 和 211.8 U/mL。真菌 2 株 NF1 和 NF7, 半纤维素酶活为 217.7 和 244.2 U/mL。复合微生物菌系半纤维素酶活可达 299.0 U/mL。经鉴定菌株 NA9、NA10、NA12 和 NA13 为链霉菌中的哥斯达黎加链霉菌 (*Streptomyces costaricanus*)。菌株 NF1 为亮白曲霉 (*Aspergillus candidus*), 菌株 NF7 为黄蓝状菌 (*Tarlaromyces flavus*)。

**关键词:** 酸性土壤, 半纤维素降解菌, 筛选, 鉴定

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 10-1251-09

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<sup>[1-2]</sup>。我国每年约产农作物秸秆约 7 亿吨<sup>[3-4]</sup>。对于秸秆再利用的难点是木质纤维素类物质的降解。目前, 国内外大多数学者的研究主要集中在木质素和纤维素的降解<sup>[5-9]</sup>。半纤维素是秸秆中除纤维素和木质素以外的一种重要多糖。存在于木质素和纤维素之间, 起着黏合剂的作用, 把木质素和纤维素紧紧拉在一起, 共同构成细胞壁的支持体系<sup>[10]</sup>。因此, 半纤维素的降解对于打开纤维素和木质素的连接, 降解秸秆具有重要意义。木聚糖是半纤维素的重要组成部分, 对于木聚糖酶产生菌的研究较多<sup>[11-14]</sup>。然而半纤维素结构与组

成十分复杂, 除木聚糖外还包括甘露聚糖、阿拉伯聚糖、阿拉伯半乳聚糖和木葡聚糖等多种组分<sup>[15]</sup>。同样半纤维素酶也是一个由  $\beta$ -葡聚糖酶、半乳聚糖酶、木聚糖酶和甘露聚糖酶等组成的复杂酶系。因此, 只有筛选得到半纤维素酶活高的菌株才能彻底降解半纤维素<sup>[16]</sup>。国内外学者对半纤维素降解菌做了大量研究, 发现可以降解半纤维素的菌株多为放线菌和真菌<sup>[11-16]</sup>。

本研究针对南方水稻种植早、晚造之间间隔时间短、土壤 pH 较低等问题, 从有秸秆还田的水稻土中筛选高效降解半纤维素的土著微生物, 保证其在土壤中具有较好的定植能力。对所筛菌株进行了鉴

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: zhangfabao@163.com

作者简介: 顾文杰 (1982-), 黑龙江鹤岗人, 助研, 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: 2012-04-17; 修回日期: 2012-06-07

定以确保菌株的安全性,为秸秆腐熟剂的构建提供良好基础。

## 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,土壤 pH 为 5.5 左右。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**DNS 试剂,真菌鉴定 PCR 试剂盒 D317,微生物 PCR 裂解液和 16SrDNA 细菌鉴定 PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司。Tris, Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O, 琼脂糖及其它试剂均为国产分析纯。

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<sup>[15]</sup>, pH 5.5;(2) 半纤维素降解菌分离筛选培养基<sup>[17]</sup>, pH 5.5;(3) 斜面培养基:牛肉膏蛋白胨培养基(NA),高氏 1 号培养基,马铃薯-蔗糖(PDA)培养基;(4) 发酵产酶培养基同富集培养基。

**1.1.4 半纤维素的制备:**参照王雪鹏的半纤维素制备方法<sup>[18]</sup>。

### 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 后适当稀释涂布于半纤维素分离筛选培养基上,培养 5 d 后产生水解圈的菌株即半纤维素降解菌。将纯化后的半纤维素降解菌株点种到半纤维素分离筛选培养基上,培养 3 d 后测定菌落及水解圈大小。以水解圈的直径(D,cm)和菌落直径(d,cm)比值 D/d 大小作为筛选的标准<sup>[19]</sup>。将水解圈在平均值以上的菌株进行继代培养,筛选出 D/d 值稳定的菌株进行半纤维素酶活测定。

### 1.3 半纤维素酶活测定

**1.3.1 粗酶液的制备:**挑取斜面培养基上的菌体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% (10<sup>8</sup> 个孢子量)的接种量接种到 300 mL 发酵产酶培养基。每隔 24 h 取样测定

酶活。将培养好的菌液用滤纸过滤,得滤液于 4℃,11180 × g 离心 10 min,取上清液即为粗酶液。

**1.3.2 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<sup>[15]</sup>。

### 1.4 菌株拮抗试验

细菌采用打孔法,真菌和放线菌采用琼脂块法<sup>[20]</sup>。两株菌之间存在拮抗作用,记为“+”,反之,无拮抗作用,记为“-”。保留产酶活高并无拮抗的菌株进行鉴定。

### 1.5 复合微生物菌系酶活测定

根据拮抗实验结果,选取无拮抗菌株(NA9、NA10、NA12、NA13、NF1 和 NF7)按等孢子量进行混合成复合微生物菌系,将复合微生物菌系按 1% 接种量接入 300 mL 发酵产酶培养基,30℃ 培养,每 24 h 测定复合微生物菌系产半纤维素酶活,方法同 1.3.2。

### 1.6 菌株鉴定

**1.6.1 形态与培养特征观察:**放线菌采用平皿插片法观察菌株的镜下形态特征;肉眼观察菌株在放线菌鉴定常规培养基上的培养特征<sup>[21]</sup>。真菌采用载片培养法进行镜下形态观察;肉眼观察菌株在真菌鉴定常规培养基上的培养特征<sup>[22]</sup>。

**1.6.2 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 H<sub>2</sub>S 的产生等生理生化试验参照瓦克斯曼的方法<sup>[23]</sup>。

**1.6.3 16S rDNA 和 ITSrDNA PCR 序列测定及系统发育分析:**(1) 16S rDNA PCR 序列测定:菌株 DNA 按照细菌基因组提取试剂盒提取(天根生化科技有限公司)。以总 DNA 为模板,采用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3'), PCR 扩增菌株的 16S rDNA 序列<sup>[24]</sup>。50 μL PCR 反应体系中含有 Premix EX Taq25 μL,模板 1 μL,引物 27F 和 1492R (20 μmol·L<sup>-1</sup>) 各 1 μL,ddH<sub>2</sub>O 22 μL。PCR 反应程序为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 1 min,56℃ 复性 1 min,2℃ 延伸 3 min,30 个循环;72℃ 延伸 5 min,1% 琼脂糖凝胶电泳检测,4℃ 保存<sup>[25]</sup>。

(2) ITS 序列测定与系统发育分析:提取真菌基因组 DNA。扩增 18SrDNA 和 5.8S rDNA 之间的保守序列,PCR 引物为 ITS1:(5'-TCCGTAGGGAACC

TGCGC-3'), ITS2: (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'). 50 μL 反应体系: 模板 DNA 5 μL, PCR Premix 25 μL, 引物 ITS1 和 ITS 2 各 0.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足至 50 μL. PCR 反应条件: 94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 5 min. 1% 琼脂糖凝胶电泳检测. 测序由广州瑞真生物科技有限公司完成.

将测序结果提交到 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<sup>[26]</sup>, 再用 MEGA5.0 软件构建系统发育树<sup>[27]</sup>.

## 2 结果和分析

### 2.1 半纤维素分解菌的筛选

通过富集培养, 共获得 38 株可在半纤维素分离筛选培养基上生长并产生水解圈的菌株. 其中细菌 16 株, 命名为 NB1-NB16, 放线菌 13 株, 命名为 NA1-NA13, 真菌 9 株, 命名为 NF1-NF9. 将这 38 株菌株纯化后接种于半纤维素分离筛选培养基上进行筛选, 根据水解圈产生时间、清晰度和 D/d 值大小来初步筛选半纤维素降解菌. 结果表明: 细菌菌株 NB1-NB10, 放线菌菌株 NA9、NA10、NA12 和 NA13, 真菌菌株 NF1-NF9 水解圈产生迅速并且清晰, D/d 值较大, 确定为初筛菌株. 将上述菌剂进行继代培养, 连续传代 7 次后, 菌株 NB5、NB8、NA9、NA10、NA12、NA13、NF1 和 NF7 无论生长状态还是 D/d 值均未有退化现象, 见表 1. 因此, 将这些菌株用于酶活的测定, 进一步研究其降解半纤维素的能力.

表 1 各菌株水解圈

Table 1 The diameter of hydrolyzed circle of different strains

Strian	NB5	NB8	NA9	NA10	NA12	NA13	NF1	NF7
d (mm)	4.51 ± 0.11	3.49 ± 0.27	2.07 ± 0.07	5.11 ± 0.26	4.57 ± 0.21	1.86 ± 0.06	9.01 ± 0.35	11.53 ± 1.13
D (mm)	22.38 ± 3.17	28.51 ± 4.25	11.76 ± 1.36	22.01 ± 2.89	20.06 ± 3.01	10.42 ± 2.19	30.08 ± 4.11	25.37 ± 0.69
D/d	4.96	8.17	5.68	4.31	4.39	5.60	3.34	2.20

### 2.2 半纤维素酶活测定

通过测定上述所筛选菌株半纤维素酶活力, 结果表明 (图 1): 细菌和放线菌产酶较快, 第 24 h 已经具有较高酶活. 真菌产酶速度较慢. 随着时间变

化细菌和放线菌菌株酶活缓慢上升, 而真菌菌株产酶活力迅速增加. 细菌菌株 NB5 和 NB8 均在第 168 h 酶活达到最大, 分别为: 108.1 和 105.7 U/mL. 放线菌菌株 NA9 和 NA10 在第 72 h 酶活达到最大,

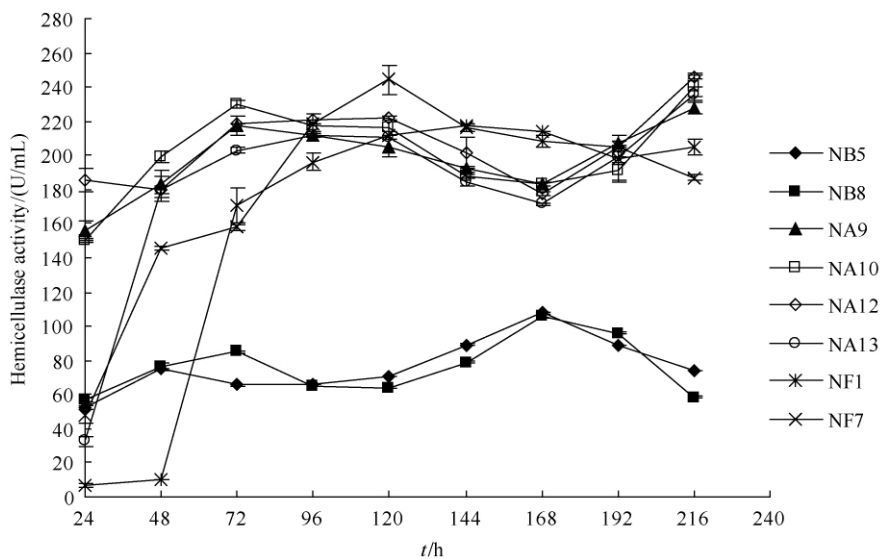


图 1 菌株半纤维素酶活变化

Fig. 1 Hemicellulose activity of strains.

分别为:217.6 和 229.8 U/mL;放线菌菌株 NA12 和 NA13 在第 96 h 酶活达到最大,分别为:221.1 和 211.8 U/mL。真菌菌株 NF1 和 NF7 分别在 144 h 和 120 h 酶活达到最高,为 217.7 和 244.2 U/mL。菌株 NB5 和 NB8 虽然产酶较快,但是酶活力较低,与其他菌株间存在显著差异 ( $P < 0.01$ )。

### 2.3 菌株拮抗试验结果

采用平板对峙法观察菌株是否产生拮抗,由表 2 可知菌株 NA9 和 NA12 与菌株 NB5 和 NB8 间均产生拮抗作用,菌株 NF7 与菌株 NB5 和 NB8 也产生拮抗作用,而其他菌株间共同生长在同一培养基上生长状态良好,均无拮抗作用。综合考虑菌株的酶活高低和菌株间的拮抗作用,将菌株 NB5 和 NB8 淘汰,保留其余 6 株菌株构建半纤维素降解复合菌剂。

表 2 各菌株间拮抗作用

Table 2 The antagonism among the strains

Strain	NB <sub>5</sub>	NB <sub>8</sub>	NA9	NA10	NA12	NA13	NF1	NF7
NB <sub>5</sub>	/	-	+	-	+	-	+	+
NB <sub>8</sub>	-	/	+	-	+	-	+	+
NA9	+	+	/	-	-	-	-	-
NA10	-	-	-	/	-	-	-	-
NA12	+	+	-	-	/	-	-	-
NA13	-	-	-	-	-	/	-	-
NF1	-	-	-	-	-	-	/	-
NF7	+	+	-	-	-	-	-	/

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

### 2.4 复合微生物菌系半纤维素酶活

由图 2 可知,复合微生物菌系半纤维素酶活产酶迅速,在第 24 h 酶活已达到 200.0 U/mL 以上。在第 120 h 酶活达到最大,为 299.0 U/mL,显著大于单株菌半纤维素酶活 ( $P < 0.05$ )。而后复合微生

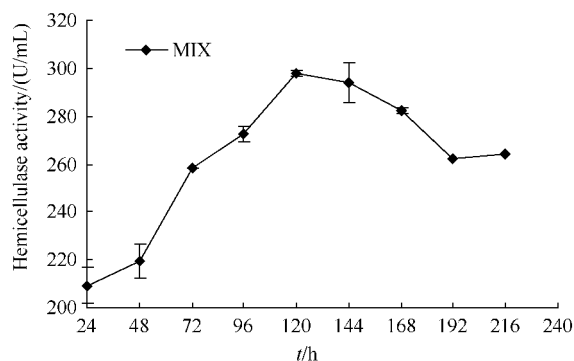


图 2 复合微生物菌系半纤维素酶活变化

Fig. 2 Hemicellulose activity of complex microbial system.

物菌系半纤维素酶活开始下降,在 192 h 后稳定在 260.0 U/mL 左右。

### 2.5 放线菌鉴定

**2.5.1 形态及培养特征:**菌株 NA9、NA10、NA12 和 NA13 均可在高氏 1 号等 6 种培养基上生长。4 株菌株在克氏 1 号培养基生长均不产生气生菌丝。菌株 NA9 和 NA10 在蔗糖察氏培养基上生长不产生气生菌丝。菌株 NA10 在葡萄糖天门冬素培养基上生长同样不产生气生菌丝。菌株 NA9、NA10、NA12 和 NA13 气生菌丝颜色、基内菌丝颜色和可溶性色素特征见表 3。经插片法观察菌株 NA9、NA10、NA12 和 NA13 的镜下形态:菌株 NA9 菌丝无隔,无断裂,气生菌丝直或波曲,孢子丝钩状、螺旋或非螺旋,孢子链状排列,孢子圆柱型或椭圆形。菌株 NA10 菌丝无隔,无断裂,气生菌丝直或波曲,较纤细,少分枝,孢子丝直或弯曲,孢子链状排列,圆形。菌株 NA12 菌丝无隔,无断裂,气生菌丝树枝状伸展,波曲或钩状,孢子丝螺旋,孢子链状排列,椭圆形。菌株 NA13 菌丝无隔,无断裂,气生菌丝树枝状,孢子丝螺旋或钩状,孢子链状排列,椭圆形。

**2.5.2 生理生化特征:**除菌株 NA13 的 M. R 试验反应为弱阳性外,菌株 NA9、NA10、NA12 和 NA13 具有相同的生理生化特征(表 4)。结合形态、培养特征及生理生化特征,初步推测菌株 NA9、NA10、NA12 和 NA13 属于链霉菌。

**2.5.3 16SrDNA 序列分析:**对菌株 NA9、NA10、NA12 和 NA13 的 16SrDNA 序列进行 PCR 扩增,产物经纯化后测序,分别得到 1466、1471、1467 和 1466 bp 长度的序列,在 GenBank 的序列登录号分别为 JQ768261, JQ768262, JQ768263 和 JQ768264; 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 NA9、NA10、NA12 和 NA13 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 NA9、NA10、NA12 和 NA13 同源性达到 99%,均与链霉菌属 (*Streptomyces*) 菌株高度相关。构建发育树和同源性分析结果显示(图 3),菌株 NA9、NA10、NA12 和 NA13 与链霉菌中的哥斯达黎加链霉菌 (*Streptomyces costaricanus* NBRC100773) 之间亲缘关系最近,二者同源性为 99%。因此,可以初步确定菌株 NA9、NA10、NA12 和 NA13 均属于 *Streptomyces costaricanus*。

表 3 菌株 NA9、NA10、NA12 和 NA13 在不同培养基上的特征如下表  
Table 3 Cultural characteristics of NA9、NA10、NA12 and NA13 on different media

Medium		Gause (No. 1) agar	Christensen (No. 1) agar	Czapek's agar	Glucose asparagines agar	Starch ammonium-salt agar	Potato glucose agar
Growth status	NA9	+ -	+ -	+ -	+	+ +	+ + +
	NA10	+ -	+ -	+ -	+	+ +	+ + +
	NA12	+ -	+ -	+ -	+	+ +	+ + +
	NA13	+ -	+ -	+ -	+	+ +	+ + +
Aerial mycelium color	NA9	Pale yellow	Pale yellow	White	Pale yellow	Pale yellow	Tan
	NA10	Yellow	Yellow	White	Yellow	Golden yellow	Golden yellow
	NA12	Pale yellow	Yellow	White	Yellow	Tan	Tan
	NA13	Pale yellow	Yellow	White	Yellow	Golden yellow	Tan
Substrate mycelium color	NA9	Grey white	-	-	Brown grey	Brown grey	White
	NA10	Grey white	-	-	-	Grayish brown	White
	NA12	Grey white	-	Brown	Grayish brown	Grey white	Grayish brown
Soluble pigment	NA9	-	-	-	-	-	Grey yellow
	NA10	-	-	-	-	-	Grey yellow
	NA12	-	-	-	-	-	Tan
	NA13	-	-	-	-	-	Tan

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

表 4 菌株 NA9、NA10、NA12 和 NA13 生理生化特征  
Table 4 Physiological and biochemical characteristics of  
NA9、NA10、NA12 and NA13

Item	Result			
	NA9	NA10	NA12	NA13
Oxidase	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+
Urease	+	+	+	+
Gelatin liquefaction	+	+	+	+
Milk coagulation and peptonization	+	+	+	+
Starch hydrolysis	+	+	+	+
Cellulose decomposition	+	+	+	+
Nitrate reduction	-	-	-	-
Methy red	-	-	-	±
Voges-Prokauer	-	-	-	-
Tryptophan decomposition	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S production	-	-	-	-
Melanin formation	-	-	-	-

“+” : Positive reaction “-” : Negative reaction “±” : weak positive reaction.

## 2.6 真菌鉴定

2.6.1 形态及培养特征：菌株 NF1 和 NF7 在 PDA 等 3 种培养基上的生长特征见表 4。采用载片培养法进行镜下形态观察：菌株 NF1 菌丝有

隔，气生菌丝长直，透明，分支形成孢子梗，孢子梗顶端分枝形成串珠状孢子，孢子表面光滑，圆形。菌株 NF7 菌丝有隔，树枝状，分生孢子梗垂直生于菌丝体上，底部细、上端粗，顶端 3 叉分枝，膨大形成单排链状孢子，孢子圆形，表面光滑。根据形态特征初步确定菌株 NF1 和 NF7 为曲霉属和蓝状菌属。

2.6.2 ITS 序列分析：对菌株 NF1 和 NF7 的 ITS 序列进行 PCR 扩增，产物经纯化后测序，分别得到 607 和 596 bp 长度的序列，在 GenBank 的序列登录号分别为 JQ768265 和 JQ768266；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。构建发育树和同源性分析结果显示（图 4），菌株 NF1 与亮白曲霉 (*Aspergillus candidus* NRRL303) 聚于一支，二者同源性为 99%。菌株 NF7 与黄蓝状菌 (*Tarlaromyces flavus* qw12) (无性世代为 *Penicillium vermiculatum*) 聚于一支，二者同源性为 99%。综合以上培养和形态特征，可以判断菌株 NF1 为亮白曲霉 *Aspergillus candidus*，菌株 NF7 为黄蓝状菌 *Tarlaromyces flavus*。

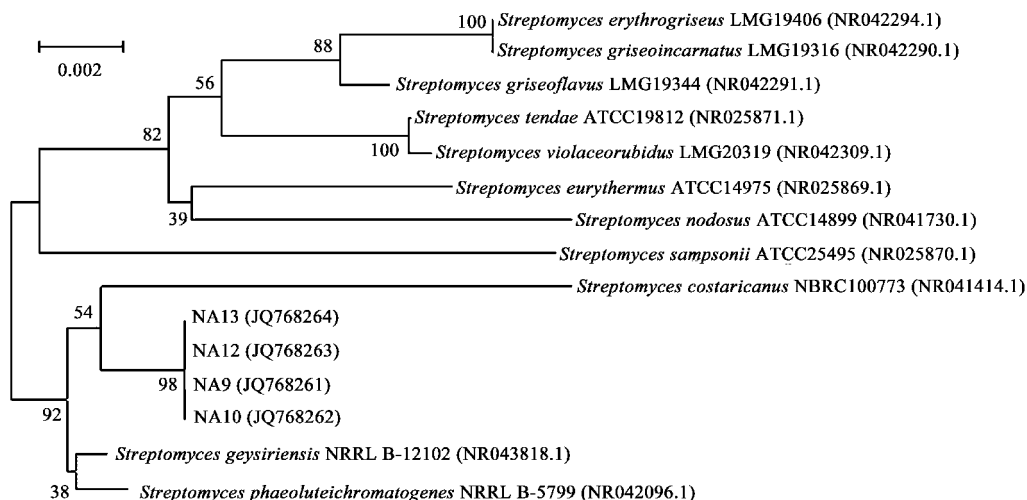


图 3 菌株 NA9、NA10、NA12 和 NA13 的 16S rDNA 序列系统发育树

Fig. 3 The phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence of strain NA9, NA10, NA12 and NA13. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 0.002 sequence divergence.

表 5 菌株 NF1 和 NF7 的培养特征

Table 5 Cultural characteristics of NF1 and NF7 on different media

Medium	Growth status		Aerial mycelium color		Substrate mycelium color	
	NF1	NF7	NF1	NF7	NF1	NF7
PDA agar	+++	+++	Bright white	White	Grey yellow	Pale yellow
Martun agar	++	++	Red	Pale yellow	Pink white	Red
Czapek sucrose agar	+	+	Pale yellow	White	Milky white	Milky white

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

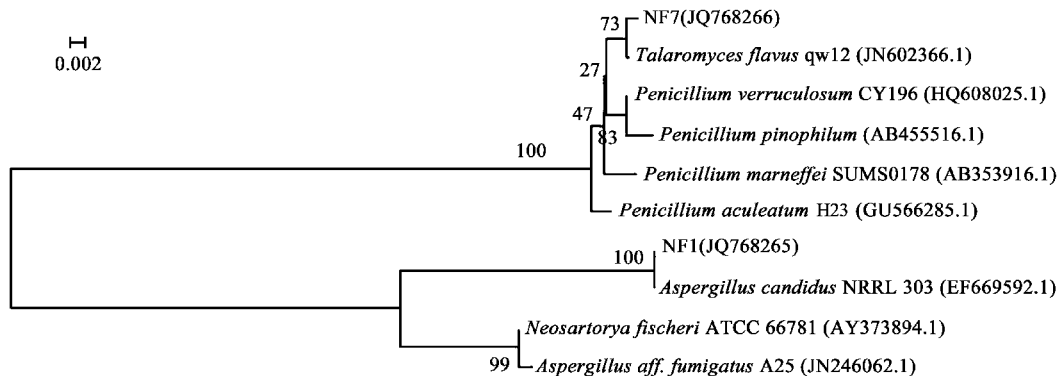


图 4 菌株 NF1 和 NF7 的 ITS 序列系统发育树

Fig. 4 The phylogenetic tree based on ITS sequence of strain NF1 and NF7. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 0.002 sequence divergence.

### 3 讨论

本文利用自制的半纤维素制成半纤维素分离筛

选培养基,在酸性条件下分离筛选适合生长于南方酸性土壤的高效半纤维素降解菌。分离结果表明,能够分解半纤维素的细菌较多,放线菌次之,真菌最少。经过水解圈测定发现细菌和放线菌 D/d 值较

大,而真菌 D/d 值较小。这主要是由于细菌和放线菌菌落较小,而真菌菌落较大导致的。

全桂静,赵航(2010)<sup>[15]</sup>在以半纤维素为唯一碳源的培养基上筛选得到 5 株半纤维素降解菌,在与本实验相同培养条件下测定 5 株菌的半纤维素酶活为 90.0–989.0 U/mL,本实验所筛选的菌株半纤维素酶活均在 200 U/mL 以上。刘多涛<sup>[28]</sup>等筛选的耐酒精半纤维素降解菌在为优化的培养条件下其酶活小于 30.0 U/mL。因为半纤维素中木聚糖的含量最高,因此关于木聚糖酶高产菌株的研究比较多。Kusakabe 等<sup>[29]</sup>报道 *Streptomyces olivaceovirdis* 产木聚糖酶活性为 116.0 U/mL。孙晓霞等<sup>[30]</sup>报道白色链霉菌(*Streptomyces albus*)产木聚糖酶活性为 45.6 U/mL,李里特等<sup>[31]</sup>报道卷须链霉菌(*Streptomyces cirratu5*)产木聚糖酶活性达 623.0 U/mL。翟倩等<sup>[32]</sup>报道的链霉菌 Z18 在未优化的培养条件下其酶活仅为 1.8 U/mL。陈红歌等<sup>[33]</sup>筛选了一株酸性木聚糖酶产生菌黑曲霉 146 在未优化的培养条件下其酶活为 162.0 U/mL。本实验所筛选 6 株菌的半纤维素酶活基本在 230 U/mL 上下。由于半纤维素成分复杂,需多种酶共同作用才能充分降解,因此,将所筛菌株进行复合,复合微生物菌系最高酶活可达 299.0 U/mL,产酶活性较高。这可能是由于不同菌株所产酶系不同所致。为了进一步提高菌体酶活,增强降解效果,下一步工作应对其发酵条件进行优化,研究不同碳、氮源和培养条件对半纤维素酶活的影响,并研究不同菌株所产酶的组分。

目前国内外报道<sup>[34]</sup>降解半纤维素和木聚糖的主要菌株中放线菌主要是:卷须链霉菌(*Streptomyces cirratus*),青紫链霉菌(*Streptomyces lividans*),橄榄绿链霉菌(*Streptomyces olivaceovirdis*);真菌主要是:曲霉(*Aspergillus*)和木霉属(*Trichoderma*)。本实验筛选的菌株经形态学、生理生化及分子生物学鉴定:菌株 NA9、NA10、NA12 和 NA13 为哥斯达黎加链霉菌(*Streptomyces costaricanus*)。菌株 NF1 为亮白曲霉(*Aspergillus candidus*),菌株 NF7 为黄蓝状菌(*Tarlaromyces flavus*),少见报道。

## 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] 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.
- [3] 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 (*Transctions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*), 2005, 21 (8): 169–171.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Magalhaes PO, Ferraz A, Milagres AFM. Enzymatic properties of two beta-glucosidases from *Ceriporiopsis subvermispora* produced in biopulping condition. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 101: 480–486.
- [8] Petr Baldrian VVK. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 2008, 32 (3): 501–521.
- [9] Beg Q, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal, G. Microbiol xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2001, 56: 326–338.
- [10] 许凤,钟新春,孙润仓,詹怀宇. 秸秆中半纤维素的结构及分离新方法综述. 林产化学与工业 (*Chemistry and Industry of Forest Products*). 2005, 25 (z1): 179–182.
- [11] Subramaniyan S, Prema P. Biotechnology of microbial xylanase: enzymology, molecular biology and application. *Critical Reviews in Bitechology*, 2002, 22 (1): 33–64.
- [12] 许正宏,白云玲,孙微,陶文沂. 细菌木聚糖酶高产菌的选育及产酶条件. 微生物学报 (*Acta*

- Microbiologica Sinica*), 2000, 40 (4) : 440-443.
- [13] Kulkarni N, Shendye A, Rao M. Molecular and Biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 1999, 23 : 411-456.
- [14] 李秀婷. 微生物木聚糖酶及在食品工业中的应用. 农业机械学报 (*Journal of Agricultural Machinery*), 2008, 39 (2) : 175-179.
- [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] 张晓军, 沈佳佳, 王浩, 孙新宇. 半纤维素在饲料工业中的应用研究. 饲料工业 (*Feed Industry*), 2005, 26 (20) : 22-23.
- [17] 王宜磊, 邓振旭. 透明圈法快速筛选半纤维素分解菌. 生物技术 (*Biotechnologies*), 2000, 10 (1) : 37-39.
- [18] 王雪鹏, 管斌, 汤海青. 半纤维素制备方法的改进及其应用. 无锡轻工大学学报 (*Journal of Wuxi University of Light Industry*), 2003, 22 (6) : 86-88.
- [19] Yan Kangpei, Lilian L. P. 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] 黄明媛, 顾文杰, 张发宝, 徐培智, 杨少海, 王立群, 解开治. 番茄青枯病拮抗菌筛选鉴定及其发酵条件初探. 微生物学通报 (*Microbiology China*), 2011, 38 (2) : 214-220.
- [21] Shirling E B, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1966, 16 (3) : 313-340.
- [22] 魏景超. 真菌鉴定手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [23] Watt Mann SA. 放线菌 (第二卷) 属和种的分类、鉴定和描述. 瓦克斯曼, 北京: 科学出版社, 1974.
- [24] Cao L X, Qiu Z Q, Dai X, Tan H M, Lin Y C, Zhou S N. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of banana (*Musa acuminata*) 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 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2010, 50 (3) : 342-349.
- [26] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. 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] 刘多涛, 杨谦, 王艳君, 张向东. 耐酒精半纤维素降解菌的筛选、鉴定及产酶分析. 太阳能学报 (*Acta Energetica Solaris Sinica*) 2010. 31, (1) : 107-112.
- [29] Kusakabe I, Kawaguchi M, Yasui T. Purification and some properties of extracellular xylanase from *Streptomyces olivaceoviridis* B86. *Journal Agriculture Chemistry Society of Japan*, 1997, 51 : 429-437.
- [30] 孙晓霞, 谢响明, 吴玉英, 刘亚杰, 何晓青. 白色链霉菌产木聚糖酶规律及其耐热碱性的初步研究. 北京林业大学学报 (*Journal of Beijing Forestry University*), 2005, 27 (3) : 72-75.
- [31] 李里特, 丁长河, 江正强, 石波. 一株产木聚糖酶链霉菌的鉴定及发酵. 微生物学通报 (*Microbiology China*), 2003, 30 (6) : 59-64.
- [32] 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, 2007. 12 (3) : 75-80.
- [33] 陈红歌, 朱静, 梁改芹, 严自正, 张树政. 酸性木聚糖酶产生菌的筛选及产酶条件. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 1999, 39 (4) : 350-354.
- [34] Karen Mine Harada, Keiko Tanaka, Wataru Hashimoto. Yasuki Fukuda Paenibacillus sp. strain HC1 xylanases responsible for degradation of rice bran hemicellulose. *Microbiological Research* 2008, 163 : 293-298.



# Screening and identification of hemicellulose degrading microorganisms in acid soil

Wenjie Gu<sup>1</sup>, Youquan Xu<sup>2</sup>, Peizhi Xu<sup>1</sup>, Kaizhi Xie<sup>1</sup>, Yusheng Lu<sup>1</sup>, Shuanhu Tang<sup>1</sup>, Fabao Zhang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Soil and Fertilizer Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences Key Laboratory of Plant Nutrition and Fertilizer in South Region, Ministry of Agriculture, Guangdong Key Laboratory of Nutrient Cycling and Farmland Conservation Guangzhou 510640, China

<sup>2</sup>College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

**Abstract:** [Objective] The aim of this study was to screen hemicellulose degrading microorganisms. [Methods] The methods used to screen the effective strains included hydrolysis spot diameter measurement of hemicellulose plate and extracellular enzyme activity. The methods used to identify the strains included culture characteristics, morphological, physiological-biochemical characteristics and molecular biological methods. [Results] We isolated 4 actinomycetes (NA9, NA10, NA12 and NA13), 2 fungi (NF1 and NF7) with hemicellulose degrading ability and no antagonistic effect among them. The hemicellulose degrading activity of 4 actinomycetes (NA9, NA10, NA12 and NA13) was 217.6, 229.8, 221.1 and 211.8 U/mL. The hemicellulose degrading activity of 2 fungi (NF1 and NF7) was 217.7 and 244.2 U/mL. The hemicellulose degrading activity of complex microbial system was 299.0 U/mL. NA9, NA10, NA12 and NA13 were *Streptomyces costaricanus*; NF1 was *Aspergillus candidus* and NF7 was *Tarlaromyces flavus*. [Conclusion] the 4 actinomycetes and 2 fungi screened have high hemicelluloses enzyme activity. These strains have good application value and more research value.

**Keywords:** acid soil, hemicellulose degrading microorganisms, screen, identification

(本文责编:王晋芳)

---

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: 17 April 2012/Revised: 7 June 2012