

文章编号: 1001-1498(2008)02-0253-05

竹伐桩促腐微生物的分离筛选

李超^{1,2}, 李潞滨², 杨凯^{3*}, 张利平¹, 彭镇华²

(1. 河北大学生命科学学院, 河北保定 071002; 2. 中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091; 3. 北京农学院农业应用新技术北京市重点实验室, 北京 102206)

摘要:以不同腐朽程度的毛竹伐桩为样品, 对其中的具有降解纤维素或木质素的竹腐微生物进行富集、分离、纯化。通过定性和定量筛选共得到 16 株具有较好纤维素降解能力或木质素降解能力的菌株, 包括 8 株真菌, 5 株细菌和 3 株放线菌。采用固态竹屑培养基测定各菌株对毛竹纤维素和木质素的降解能力, 真菌菌株 F2 和 F10 的降解效果最好, 15 d 对纤维素的降解率分别为 23.96% 和 24.31%, 优于参照菌株绿色木霉 YJ-3 的 19.59%; 对木质素的降解率分别为 16.92% 和 19.15%, 优于参照菌株黄孢原毛平革菌 ME-446 的 16.53%。

关键词:竹伐桩; 微生物降解; 分离筛选; 纤维素; 木质素

中图分类号: S718.8

文献标识码: A

Isolating and Screening of Microorganisms for Decomposing Bamboo Stump

LI Chao^{1,2}, LI Lu-bin², YANG Kai³, ZHANG Li-ping¹, PENG Zhen-hua²

(1. College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, Hebei, China; 2. Research Institute of Forestry, CAF, Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Beijing 100091, China;

3. Key Laboratory of New Technology in Agricultural Application of Beijing Agricultural College, Beijing 102206, China)

Abstract: Some microorganism strains which decompose cellulose or lignin were isolated from rotten bamboo material which were collected from *Phyllostachys edulis* forest. 16 strains including 8 fungi strains, 5 bacteria strains and 3 actinomycetes strains were screened using qualitative and quantitative methods. Bamboo material decomposing ability of those strains were tested through solid fermentation. Results showed that strain F2 and F10 were the most efficient decomposer. After 15 days of incubation, strain F2 could decompose 23.96% of bamboo cellulose and 16.92% of bamboo lignin and strain F10 could decompose 24.31% of bamboo cellulose and 23.15% of bamboo lignin. In test condition, the cellulose degradation rates of the two strains were both higher than that of the *Trichoderma viride* YJ-3, and their lignin degradation rates were both higher than that of the *Phanerochaete chrysosporium* ME-446.

Key words: bamboo stump; microbial degradation; isolation and screening; cellulose; lignin

毛竹 (*Phyllostachys edulis* (Carr.) Houz.) 占我国竹林面积的 70% 左右, 生长快、成材早, 是我国用途最广、利用价值最高的经济竹种。竹子采伐后的伐桩不易腐烂, 在自然状态可存活 10 a 或更长时

间。伐桩占用大量林地空间, 严重影响着出笋和成竹。采用人工挖掘的方法清理伐桩, 劳动强度大且易损伤竹鞭。翁甫金等^[1]报道将微生物、除草剂类农药或化学肥料单独或组合施于毛竹伐桩内腔, 都

收稿日期: 2007-08-16

基金项目: 国家林业局 948 项目“植物基因测序及功能改良技术引进”(2004-4-60)

作者简介: 李超 (1981—), 女, 河北保定人, 在读硕士生, 研究方向: 微生物学。

* 通讯作者: 杨凯, E-mail: yangkai8978@126.com

能有效提高竹桩腐烂速度。接种促腐微生物可以促进伐桩的腐烂,并可以改善土壤环境^[2]。人们对微生物降解稻草秸秆和木屑有了深入的研究,对竹材在此方面的研究报道相对较少^[3-4]。为此采集毛竹林地的腐朽伐桩为样品,从中分离筛选具有较好纤维素或木质素降解能力的微生物菌株,并初步测定各菌株对毛竹木质素和纤维素的降解率,旨在为毛竹伐桩的微生物促腐及竹纤维材料的生物处理提供优良菌株。

1 材料和方法

1.1 样品采集

6份分离样品来自浙江天目山林地不同腐朽程度的毛竹伐桩,采集时间为2006年6月份,样品于4℃冰箱保存。

1.2 参照菌株

参照菌株绿色木霉(*Trichoderma viride* Pers.) YJ-3为纤维素酶高产菌株,黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium* Burds) ME-446为木质素降解研究模式菌株,由中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室提供,使用前在PDA培养基上活化。

1.3 培养基

1.3.1 富集和分离培养基 (1) Dobus滤纸条培养基^[5]。(2) 羧甲基纤维素钠培养基^[5]。(3) 气爆麦草粉培养基:气爆麦草粉 20 g,琼脂 20 g,自来水 1 L,1%的孟加拉红水溶液 3.3 mL,1%链霉素溶液 0.3 mL,121℃,20 min。(4) 木质素培养基^[6]:木质素由过程工程研究所国家生化重点实验室提供。(5) 木质素培养基^[7]。培养基(1)~(3)用于纤维素分解菌的富集分离,培养基(4)用于木质素降解细菌、放线菌的富集分离,培养基(5)用于木质素降解真菌的富集分离。

1.3.2 初筛培养基 (1) 纤维素刚果红培养基^[8];(2) 木质素酶活检测培养基^[7]:酵母膏 10 g,葡萄糖 20 g,琼脂 18 g,蒸馏水 1 L,分别添加 0.1 g·L⁻¹的苯胺蓝或 0.1 g·L⁻¹愈创木酚制成。培养基(1)检测纤维素酶,培养基(2)苯胺蓝检测木质素过氧化物酶和锰过氧化物酶,愈创木酚检测漆酶。

1.3.3 复筛培养基 (1) 纤维素酶活测定培养基^[9]:竹屑 10 g,蛋白胨 3 g,硫酸 2 g,酵母膏 0.5 g, K₂HPO₄ 4 g, CaCl₂·2H₂O 0.3 g, MgSO₄·7H₂O 0.3 g, Tween-80 0.2 g,蒸馏水 1 L, 121℃, 20 min。竹屑

为从竹具加工厂收集的锯末状废弃物。(2) 漆酶酶活测定培养基:综合马铃薯培养基^[5]。(3) 水溶性木质素降解培养基:细菌降解培养基^[6],真菌降解培养基^[7],水溶性木质素以竹屑为材料制备。

1.3.4 竹屑固态培养基 竹屑 50 g, KH₂PO₄ 0.05 g, MgSO₄·7H₂O 0.025 g, (NH₄)₂SO₄ 1 g, 蒸馏水 2 倍, pH 值 7.0, 121℃, 1 h。采用竹屑固态培养基测定供试菌株纤维素、木质素降解率。

1.4 分离方法

1.4.1 样品预处理 将 1 g 样品放入三角瓶中,加入 100 mL 生理盐水, 30℃ 浸泡过夜, 恒温振荡 30 min。6份毛竹腐朽伐桩样品单独处理,或混合后处理。

1.4.2 直接稀释法 取经单独处理的 6份样品上清,直接采用稀释涂布平板法,用营养琼脂培养基分离细菌、高氏 1 号培养基分离放线菌,马丁氏培养基和气爆麦草粉培养基分离真菌。

1.4.3 富集分离法 (1) 纤维素降解菌的分离:取混合样品上清按 1% 比例接入 Dobus 试管培养基, 30℃ 静置共培养 3 周,转接 2~3 次,从平行处理中选择滤纸条崩溃程度较高、崩溃速度最快和效果稳定的培养液,采用稀释涂布平板法,用羧甲基纤维素钠培养基进行分离。

(2) 木质素降解菌的分离:取混合样品上清按 1% 比例接入液体木质素培养基和 中, 30℃, 160 r·min⁻¹ 恒温振荡驯化共培养 3 周,转接 2~3 次。从平行处理中选择变清澈的培养液采用稀释涂布平板法,分别用固体木质素培养基和 进行分离。

1.5 初筛

将菌株分别点种于纤维素刚果红培养基和两种木质素酶活检测培养基,于 30℃ 倒置培养 3~7 d,记录刚果红脱色情况,苯胺蓝脱色情况和愈创木酚平板上棕色氧化带产生情况。将能使刚果红脱色且脱色圈相对较大的菌株接种于 Dobus 滤纸条培养基,培养 7~20 d 观察滤纸分解情况,观察滤纸有无分解现象。以上实验均重复 2 次。

1.6 复筛

采用纤维素酶活测定、漆酶酶活性测定和水溶性木质素降解率测定的方法进行复筛。以下实验均重复 1 次。

1.6.1 纤维素酶活性测定 对初筛纤维素酶阳性菌株进行纤维素酶活测定,采用纤维素酶活测定培

培养基,500 mL 锥形瓶,200 mL 装液量,接种斜面菌种 1 支,180 r·min⁻¹,30 摇床培养。每天取样,将发酵液 3 000 r·min⁻¹,4 离心 10 min 获上清液,DNS 法^[10]测定菌株的纤维素酶活性,以 CMC-Na 为底物测定 CMC 酶活,以滤纸为底物测定滤纸酶活,以脱脂棉为底物测定棉花酶活,测定方法参照文献 [11]。规定 1 min 内分解底物生成 1 μmol 葡萄糖的酶量定义为 1 个酶活单位 U。

1.6.2 漆酶活性测定^[12] 采用综合马铃薯培养基,500 mL 锥形瓶,200 mL 装液量,接种活化斜面菌种 1 支,160 r·min⁻¹,30 摇床培养。每天取样 3 000 r·min⁻¹,4 离心 10 min 获上清液,愈创木酚法测定发酵液漆酶活性,10 mL 反应体系含 50 mmol·L⁻¹琥珀酸钠缓冲液 (pH 值 4.5),0.4 mmol·L⁻¹愈创木酚和适量酶液,在 465 nm 处测定吸光度在 30 min 内的增加,以每分钟光密度增加 0.01 为 1 个酶活力单位 U。

1.6.3 水溶性木质素降解率测定 采用木质素降解培养基,250 mL 锥形瓶,100 mL 装液量,调整种子悬液密度,使接种量在 10⁶个细菌细胞或真菌孢子,180 r·min⁻¹,30 摇床培养。每天取样 6 000 r·min⁻¹,常温离心 10 min 获得上清液,适当稀释后 340 nm 测定吸光度。据培养前后发酵液 OD 值变化程度判定菌种对木质素的降解能力。木质素含量标

准曲线参照文献 [7] 绘制。

1.7 纤维素和木质素降解能力测定

采用竹屑固态培养基,9 cm 无菌平皿,每板装入 5 g 固体培养基,5% 接种量接种,30 恒温培养 15 d,对照采用灭菌的竹屑固态培养基。参考薛惠琴^[13]的方法测定木质素、纤维素含量,平行测定同一个样品 3 次,计算降解率。重复实验 1 次。

2 结果与分析

2.1 菌种分离初筛结果

直接稀释分离和富集分离出的菌株经初步筛选共得到真菌 18 株 (F1 ~ F18),放线菌 3 株 (A1 ~ A3),细菌 10 株 (B1 ~ B10),菌株初筛结果详见表 1。其中只有纤维素酶反应的菌株有 8 株 (F1, F6, F13, A1 ~ A3, B1, B2),只有木质素酶反应的菌株有 11 株 (F7, F17, F18, B3 ~ B10),其余菌株既有纤维素酶反应,又有木质素酶反应。

富集分离结果表明木质素培养基 适于富集细菌、放线菌,木质素培养基 适于富集真菌,用 Do-bus 培养基富集供试样品,得到的是细菌菌株。从初筛结果看用气爆麦草粉培养基与马丁氏培养基相比,分离出的真菌菌株大部分都有分解滤纸的能力,该培养基对纤维素分解菌的选择性较好。

表 1 分离菌株初筛结果

菌株	苯胺蓝	愈创木酚	刚果红	滤纸分解	菌株	苯胺蓝	愈创木酚	刚果红	滤纸分解
F1	-	-	+++	+++	F17	-	++	+	-
F2	+++	-	+++	+++	F18	-	+++	+	-
F3	-	+++	+	+	A1	-	-	++	+
F4	+++	++	+	+	A2	-	-	++	+
F5	+++	-	+++	+++	A3	-	-	+++	++
F6	-	-	++	++	B1	-	-	+++	++
F7	++	-	+	-	B2	-	-	++	+
F8	+++	-	++	+++	B3	+++	-	-	-
F9	++	+++	++	+	B4	+++	-	-	-
F10	+++	-	++	+++	B5	-	+	+	-
F11	+++	-	++	+++	B6	++	-	+	-
F12	+++	+	+++	++	B7	++	-	-	-
F13	-	-	+++	+++	B8	++	-	-	-
F14	++	-	-	+	B9	+	-	-	-
F15	+++	-	++	+++	B10	++	-	-	-
F16	+++	-	+++	+++					

注:苯胺蓝脱色阳性菌株,愈创木酚显色反应阳性菌株,纤维素果红脱色阳性菌株,滤纸分解阳性菌株均用 (+) 表示,反之用 (-) 表示, (+) 越多反应现象越明显。

2.2 复筛

2.2.1 纤维素酶活性测定 将分解滤纸能力强的菌株接种于纤维素酶活性测定培养基中,各菌株第 4 天的 CMC 酶活、滤纸酶活以及棉花酶活的测定结果见图 1。测定结果显示初筛阳性菌株均有纤维素酶活性,真菌菌株 F2 和 F13 的 CMC 酶活性较其他菌株要高,分别为 $1.09 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0.96 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。菌株 F12 的滤纸酶活和棉花酶活相对较高,可能其纤维素酶系较齐全。

用液态发酵法或固态发酵法测定纤维素酶活性是通用方法,有时也存在一些问题,实验中发现绿色木霉 YJ-3 液态发酵时几乎没有纤维素酶活性, F13 的 CMC 酶活相对较高;固态发酵时 YJ-3 的 CMC 酶活、滤纸酶活、棉花酶活性却分别能达到 $15.52 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$, $9.13 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$, $3.67 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$, 而 F13 几乎没有检测到纤维素酶活性。两种方法结合测定可能会得到较准确的结果。

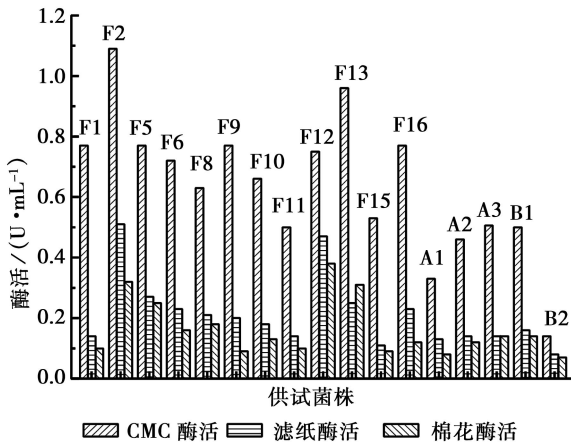


图 1 供试菌株纤维素酶活性比较

2.2.2 漆酶酶活测定 将平板实验中能与愈创木酚反应产生浓郁的棕色氧化圈的真菌菌株 F3, F4, F9, F17, F18 和细菌菌株 B5 接种液体综合马铃薯培养基,只有 F3 的发酵液可检测到漆酶活性,其酶活最高可达 $98.4 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。F3 的产酶曲线见图 2。

在培养到第 12 天时,大部分供试菌株的发酵液还没有检测到漆酶活性。在添加诱导物愈创木酚或竹粉后,发酵液中仍然检测不到漆酶活性,分泌漆酶的能力与培养条件密切相关,可能这些菌株在该实验条件下产酶能力较弱或产生的是其它类型的多酚氧化酶^[14-15]。

2.2.3 水溶性木质素降解率测定 初筛共选出 23 株具有木质素降解能力的菌株,将这些菌株接入木质素培养基和 中,培养一定时间测定菌株对水

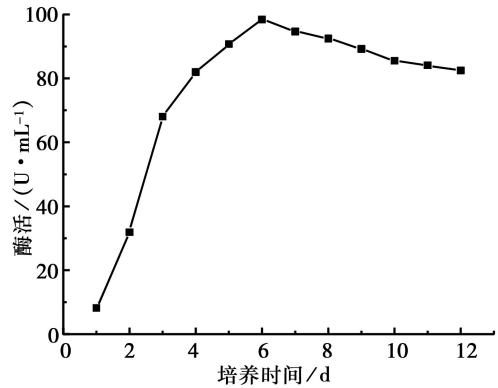


图 2 F3 的漆酶产酶曲线

溶性木质素的降解率。15 株真菌菌株在木质素培养基中生长良好,8 株供试细菌中,只有 B3、B4、B5 能在木质素培养基中生长情况稍好,供试菌株对水溶性木质素降解情况见图 3。

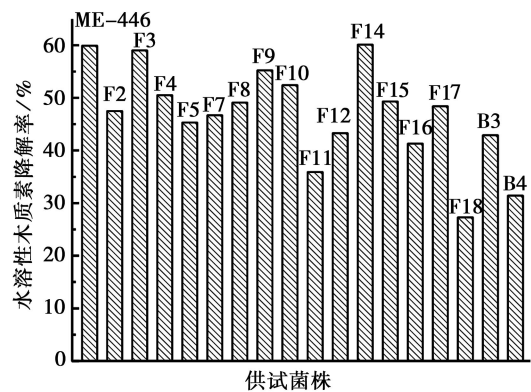


图 3 供试菌株的水溶性木质素降解率

由图 3 所示在培养条件下供试真菌菌株对水溶性木质素 7 d 的降解率均在 25% 以上,有 5 株真菌的降解率在 50% 以上,其中 F3 和 F14 培养 7 d 分别能降解水溶性木质素的 59.0% 和 60.1%,均接近于黄孢原毛平革菌 ME-446 的 59.9%。细菌菌株 B3、B4, 7 d 分别能降解水溶性木质素的 43% 和 32%, B5 的发酵液的 280 nm 吸光度值有先逐渐上升,后下降现象,培养 7 d 时对水溶性木质素几乎没有降解,可能与色素分泌有关。

2.3 降解率测定

将复筛得到的酶活性较高或者水溶性木质素降解率大于 50% 的 8 株真菌,以及活性较好的 5 株细菌和 3 株放线菌接种于竹屑固态培养基中,各供试菌株 15 d 的纤维素降解率和木质素降解率见图 4。

由图 4 所示,在竹屑固态培养基中培养 15 d,真菌菌株 F2 和 F10 对竹纤维的降解率分别为

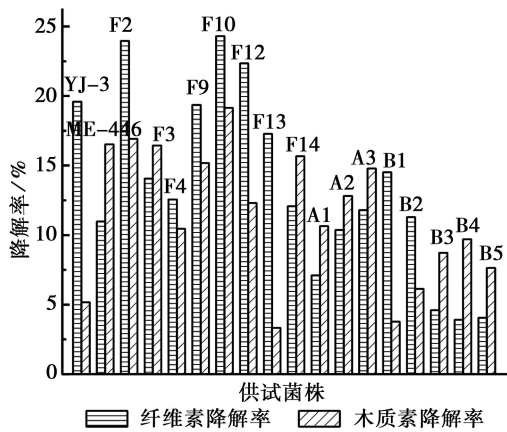


图 4 供试菌株的竹木质素/纤维素降解率

23.96%和 24.31%,均高于绿色木霉 YJ-3 的 19.59%;对竹木质素的降解率分别为 16.92%和 19.15%,均高于黄孢原毛平革菌 ME-446 的 16.53%。细菌菌株和放线菌菌株对竹纤维素和竹木质素也有一定降解能力。放线菌菌株的苯胺蓝脱色和愈创木酚显色实验没有检测到木质素降解酶活性,而在培养条件下放线菌对木质素的降解能力优于有木质素降解酶活性的细菌,可能与培养条件的差异有关或菌株产生其他类型的木质素降解酶^[15]。

3 结论

自然条件下植物纤维组织的完全降解是真菌、细菌、放线菌共同作用的结果。本实验以毛竹腐朽伐桩为样品,富集分离筛选出 16 株具有一定竹纤维素或木质素降解能力菌株,共有 8 株真菌,5 株细菌和 3 株放线菌。

微生物菌株对植物纤维材料的降解率同菌株本身特性及对环境条件的适应能力密切相关。与分离生境不同的参照菌株相比,在液体培养条件下,菌株 F2 和 F10 的纤维素酶活性及其对水溶性木质素的降解率虽然稍低,而在竹屑固体培养基上能更好地分解毛竹纤维材料。15 d 对竹纤维素和竹木质素的

降解率均优于参照菌株绿色木霉 YJ-3 和黄孢原毛平革菌 ME-446。说明分离自原生境的菌株在竹材纤维材料中具有更强的定植能力和底物的适应能力。在毛竹伐桩的促腐应用中,将会表现出更大的优势。

参考文献:

- [1] 翁甫金,汪宏宏,何奇江,等. 毛竹伐桩快速腐烂技术试验研究[J]. 竹子研究汇刊, 2001, 30(4): 47 - 51
- [2] 吴晓丽,顾小平,汪阳东. 竹林生物肥研制、施用方法及肥效研究[J]. 林业科学研究, 2004, 17(4): 465 - 471
- [3] 池玉杰. 木质素生物降解与生物制浆的研究现状分析[J]. 林业科学, 2004, 40(3): 167 - 174
- [4] 徐春燕,王宏勋,张晓昱. 白腐菌选择性降解竹基质中木质纤维素的研究[J]. 微生物学杂志, 2006, 26(3): 2014 - 2018
- [5] 中国科学院微生物研究所. 菌种保藏手册[M]. 北京: 中国科学出版社, 1980: 53 - 65
- [6] 孙先锋,张志杰,崔虹军. 造纸黑液木质素降解微生物的分离和降解特性研究[J]. 环境工程, 2006, 30(3): 78 - 80
- [7] 郁红艳,曾光明,黄国和,等. 木质素降解真菌的筛选及产酶特性[J]. 应用与环境生物学报, 2004, 10(5): 639 - 642
- [8] 叶姜瑜. 一种纤维素分解菌鉴别培养基. 微生物学通报[J]. 1997, 24(4): 251 - 252
- [9] 王晓芳,徐旭士,吴敏,等. 一株纤维素分解菌的分离与筛选[J]. 生物技术, 2001, 11(2): 28 - 30
- [10] Miller L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Anal Chem, 1959, 31: 426 - 428
- [11] Vallander L, Erik K E. Enzymic saccharification of pretreated wheat straw[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1985, 17: 639 - 650
- [12] 周金燕,张发群,桑原正章. 真菌产锰过氧化物酶和漆酶的研究. I 富氮培养基筛选产酶的真菌[J]. 微生物学报, 1993, 33(5): 387 - 391
- [13] 薛惠琴,杭恬琼,陈谊. 稻草秸秆中木质素、纤维素测定方法的研讨[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2001, 2: 15
- [14] Anora, P K Gill. Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi[J]. Bioresource Technol, 2001, 77: 89 - 91
- [15] 张辉,戴传超,朱奇,等. 生物降解木质素研究新进展[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(9): 1780 - 1784