

竹材木质素降解菌的筛选与鉴定*

刘 剑 李南林

(肇庆市林业局森林病虫害防治检疫站, 广东 肇庆 526040)

摘要 竹材木质素的降解一直是制约竹材资源利用的重要影响因素。文章通过对49份腐烂的竹材样品进行平板划线分离纯化得到74株真菌, 利用PDA-愈创木酚变色及PDA-苯胺蓝退色反应, 初步筛选出具有木质素降解酶能力的4株木质素降解菌, 通过酶活力测定对初筛得到的4株木质素降解菌进行复筛, 发现FG-22菌株具有较好木质素降解能力, 对FG-22降解菌株进行形态学和分子生物学鉴定, 确定FG-22为杂色云芝(*Trametes versicolor*)。

关键词 木质素降解菌; 竹材; 筛选; 鉴定

中图分类号: S784 文献标志码: A 文章编号: 2096-2053(2020)01-0030-06

Screening and Identification of Bamboo Lignin Degradation Fungus

LIU Jian LI Nanlin

(Zhaoqing Forestry Bureau Forest Pest Control and Quarantine Station, Zhaoqing, Guangdong 526040, China)

Abstract The degradation of bamboo lignin has always been an important factor influencing the utilization of bamboo resources. Seventy-four fungi were isolated by streaking and purifying 49 samples of rotten bamboo. The lignin-degrading fungi producing lignin-degrading enzyme activity were screened by PDA-guaiacol phenol discoloration and PDA-aniline blue fading reaction. Four strains of lignin-degrading fungi were screened by enzyme activity assay. It was found that FG-22 fungus had better lignin degradation ability, and the FG-22-degrading fungus was identified by morphological identification and molecular biology to determine FG-22 is *Trametes versicolor*.

Key words lignin-degrading fungus; bamboo; screen; identification

我国作为世界上竹林面积最大、竹类资源最为丰富的国家, 竹材资源的利用始终受到木质素降解的影响, 导致竹类资源一直难以实现综合利用^[1-3]。竹材木质素因木质素化学结构复杂, 常同纤维等物质结合紧密, 难于降解^[4]。因此, 竹材木质素的降解一直受到研究者的关注, 而天然竹材木质素的降解是在自然条件下, 通过多种微生物共同作用完成的, 而微生物对竹材木质素的降解不仅有降解率高的优点, 而且还能实现竹材资源的再利用, 筛选具有良好降解能力的木质素降解菌一直是研究者关注的问题^[5-6]。文章以天然竹林中腐烂的竹材为材料, 通过筛选得到一株具有竹材木质素降解能力的菌株, 利用形态学和分子生物学对菌株进行鉴定, 为解决竹材木质素降解及竹纤维提取等竹资源应用方面提供参考。

* 第一作者: 刘剑(1986—), 男, 工程师, 主要从事林业有害生物及林业微生物应用研究, E-mail: nmgsword@126.com。

通信作者: 李南林(1969—), 男, 高级工程师, 主要从事林业有害生物应用研究, E-mail: 7763844@163.com。

1 材料与方法

1.1 材料

分离样品采集于广东省肇庆市广宁县市属葵垌国有林场天然竹林中腐烂的竹材。

1.2 培养基

真菌培养基采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基（以下简称：PDA 培养基）；PDA 基础培养基中分别加入愈创木酚（0.5 g/L）和苯胺蓝（0.1 g/L）制作 PDA- 愈创木酚培养基和 PDA- 苯胺蓝培养基；液态产酶培养基（g/L）：葡萄糖 20 g/L，酒石酸铵 0.2 g/L， KH_2PO_4 0.5 g/L， K_2HPO_4 0.5 g/L， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L， CaCl_2 0.1 g/L，硫胺素 (VB1) 0.1 g/L， $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.007 g/L， MnSO_4 0.035 g/L， $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g/L， $\text{COCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.001 g/L，吐温 -80 1.0 g/L^[7]。

1.3 方法

1.3.1 筛选竹材木质素降解菌 通过平板稀释法、平板划线法对竹材木质素降解菌进行分离纯化，将分离纯化的菌株通过 PDA- 愈创木酚变色及 PDA- 苯胺蓝褪色反应进行初筛，将初筛得到的菌株进行酶活力复筛，主要测定 3 种木质素降解酶活力，其中漆酶（Lac）活性测定采用愈创木酚法^[8]；木质素过氧化物酶（Lip）活性测定采用黎芦醇法^[9]；锰过氧化物酶（Mnp）活性测定采用微量法^[10]。

1.3.2 菌株的鉴定

（1）菌落的形态观察鉴定

将 FG-22 菌株在 PDA 培养基上进行培养，对平板上菌落形态和菌丝进行观察并根据魏景超著真菌分类学手册《真菌鉴定手册》^[11]进行鉴定分类。

（2）菌株的分子生物学鉴定

对 FG-22 菌株的基因组总 DNA 提取方法采用 CTAB 法^[12]；以 ITS1（5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3'）和 ITS4（5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'）为引物对提取的 DNA 进行 PCR 扩增^[13]，PCR 扩增条件参照文献^[14]，并将 PCR 扩增产物委托铂尚生物技术（上海）有限公司进行基因测序；通过将所测得的 18SrDNA 序列与 NCBI 的 GenBank 数据库中的基因序列进行相似性比较分析，再通过 MEGA 软件构建系统进化发育分析，构建菌株的系统进化发育树。

2 结果与分析

2.1 木质素降解菌株的筛选分离

利用腐烂的竹材，根据不同的菌落形态通过平板划线法分离纯化得到 74 株真菌菌株。

2.2 木质素降解菌的初筛

2.2.1 PDA- 愈创木酚平板显色的筛选结果 将 2.1 筛选分离得到的 74 株真菌接种到 PDA- 愈创木酚平板培养基上进行显色反应，其中 19 株菌株产生明显的显色反应。显色反应结果详见表 1。显色反应见图 1。

表 1 PDA- 愈创木酚平板显色初筛 19 个菌株的显色结果

Tab.1 Primary screening of 19 strains by PDA-Guaiacol plate chromatography

菌株 Strains	显色时间/d Chromogenic time					
	1	2	3	4	5	6
FG-04	-	-	-	-	+	+
FG-08	-	+	++	++	+++	++++
FG-10	-	-	±	+	+	++
FG-17	-	-	-	-	+	+
FG-19	-	+	++	++	+++	++++
FG-22	±	+	++	+++	++++	++++
FG-23	-	-	-	±	+	++
FG-27	-	-	+	++	++	+++
FG-30	-	-	+	+	+	++

菌株 Strains	显色时间/d Chromogenic time					
	1	2	3	4	5	6
FG-33	-	+	+	+	++	++
FG-34	-		+	+	++	+++
FG-38	-	-	-	±	+	+
FG-45	-	+	++	+++	++++	++++
FG-51	-	-	+	+	++	++
FG-63	-	+	++	++	+++	++++
FG-69	-	±	+	++	+++	++++
FG-72	-	-	-	+	++	++
FG-78	-	-	+	+	++	+++
FG-79	-	-	±	+	+	++

注: - 表示不显色; ± 代表开始显色; +、++、+++、++++ 显色圈逐渐增大

Note: - indicates no color rendering; ± indicates start of color rendering; +, ++, +++, +++++ color developing circles increase gradually

通过表 1 可以得出, 19 个菌株都可在 PDA-愈创木酚平板培养基上产生显色反应, 颜色随着时间的延长不断增强。而不同的菌株在显色时间和显色圈大小有差异, FG-08、FG-19、FG-22、FG-45、FG-63 和 FG-69 等 6 个菌株显色反应较快, 并且显色圈较大。由此可判断出 FG-08、FG-19、FG-22、FG-45、FG-63 和 FG-69 这 6 株菌具有较强的产漆酶 (Lac) 能力。

2.2.2 PDA-苯胺蓝平板退色的筛选结果 根据 PDA-愈创木酚平板显色反应结果, 将在 PDA-愈创木酚平板显色的 19 种菌株接种在 PDA-苯胺蓝中进行退色反应。

表 2 菌株的 PDA-苯胺蓝平板退色反应结果
Tab.2 Discoloration of fungi by PDA-Aniline Blue Plate

菌株 Strains	褪色时间/d Chromogenic time					
	1	2	3	4	5	6
FG-04	-	±	+	++	+++	++++
FG-08	-	-	+	+	+	+
FG-10	-	-	-	+	+	++
FG-17	-	-	-	-	-	-
FG-19	-	+	++	+++	++++	++++
FG-22		++	++	+++	+++	++++
FG-23	-	-	-	+	+	+
FG-27	-	-	±	+	+	++
FG-30	-	-	-	-	-	-
FG-33	-	-	-	+	+	++
FG-34	-	-	-	+	+	++
FG-38	-	-	-	-	-	-
FG-45	-	+	++	++	+++	++++
FG-51	-	-	+	++	++	++
FG-63	-	-	+	+	+	+
FG-69	-	±	+	++	+++	++++
FG-72	-	-	-	+	++	++
FG-78	-	-	-	-	-	-
FG-79	-	-	+	+	+	+

注: - 代表不退色; ± 代表开始退色; +、++、+++ 代表退色能力逐渐增强; +++++ 全退色

Note: - represents non fading; ± represents beginning fading; +, ++, +++ represents gradual enhancement of fading ability; +++++ represents total fading

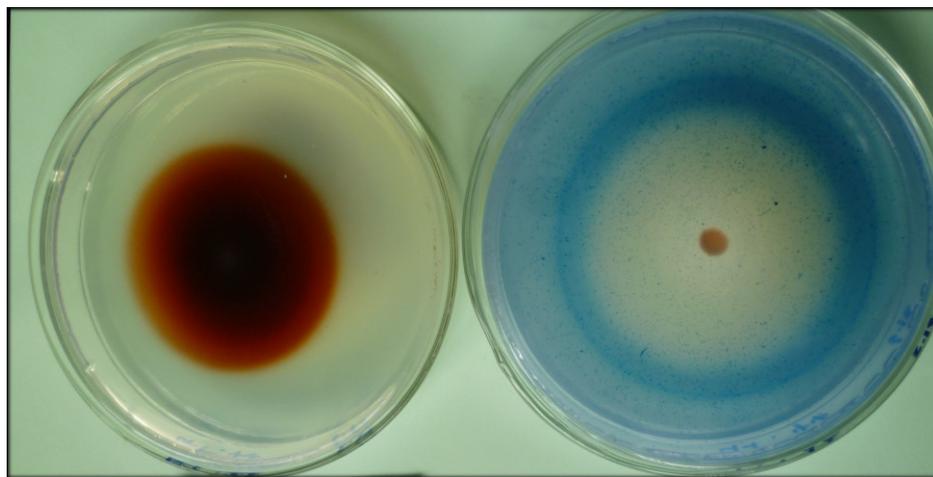


图 1 菌株 FG-22 愈创木酚变色及苯胺蓝退色

Fig.1 Discoloration of guaiacol and decolorization of aniline blue by fungus FG-22

通过表 2 可以看出, 19 种菌株中发现有 7 株菌 (FG-04、FG-19、FG-22、FG-27、FG-33、FG-45 和 FG-69) 在 PDA- 苯胺蓝平板上发生明显退色反应, 并且在第 4-6 天退色较为明显的为 FG-19、FG-22、FG-45、FG-69, 并且出现全退色现象。由此初步表明这 4 株菌株有产过氧化物酶类 (Mnp 和 Lip) 的能力, 而其他菌株未发生退色反应或退色反应不明显, 表明不产生降解木质素的过氧化物酶类。PDA- 苯胺蓝退色反应详见图 1。

2.3 4 个菌株的复筛

根据以上 PDA- 愈创木酚平板显色反应及 PDA- 苯胺蓝平板退色反应的初筛结果, 对 FG-19、FG-22、FG-45、FG-69 菌株进行液态产酶复筛, 测定其各自发酵液中漆酶 (Lac) 及过氧化物酶类 (Mnp 和 Lip) 的酶活力, 结果见图 2 和图 3。

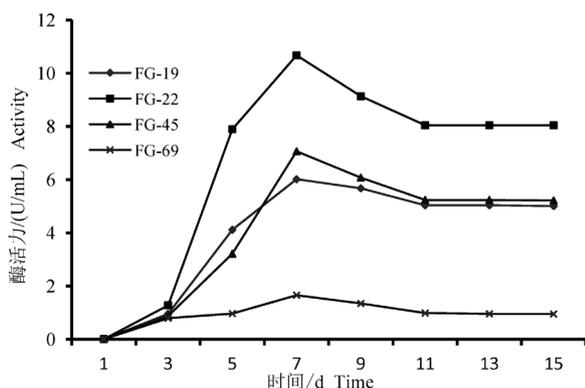
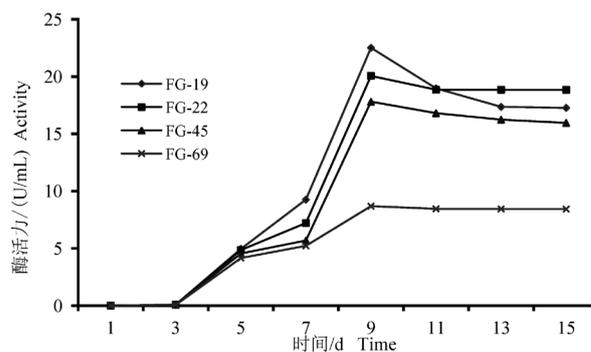


图 2 4 个菌株的 Lac 酶活变化

Fig.2 Breakdown charts of laccase activities of four fungi

图 3 4 个菌株的过氧化物酶类 (Mnp 和 Lip) 酶活变化
Fig.3 Breakdown charts of peroxidase (Mnp and Lip) activities in four fungi

从图 2 可以看出, 4 个菌株均可出产 Lac, 随着培养时间的延长酶活力不断发生变化。从第 5 天起各菌株的酶活明显增高, 在 7~9 d 时分别达到产酶高值。在第 7 天, FG-22 具有最高的产酶值, 其酶活可达到 $10.8 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 是 FG-69 的 7.14 倍。FG-19 和 FG-45 的产酶能力比较接近。在酶活达到最高峰后, 各菌株酶活开始逐渐下降直至趋于稳定。

从图 3 可以看出, 4 个菌株均有一定产生过氧化物酶类 (MnP 和 LiP) 的能力。在第 9 天, FG-22 达到最大产酶高峰, 酶活力为 $20.16 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 为 FG-69 的 2.2 倍。酶活力不断达到高峰后恢复至稳定, 酶活力始终维持在 $19 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。而 FG-19 的过氧化物酶类最高酶活力虽然达到 $21.87 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 但 FG-19 的漆酶活力明显小于 FG-22。因此, 综合以上结果, 菌株 FG-22 具有较高的产木质素降解酶的综合能力。

2.4 菌株 FG-22 的鉴定

2.4.1 形态学鉴定 菌株 FG-22 的鉴定: FG-22 菌株在平板上快速呈现出菌落特征, 菌落呈白色、圆形, 菌落生长较快, 在平板培养 7~9 d 就覆盖平板, 菌落新生长区的菌丝分布均匀, 呈分散、有序的絮状, 菌落, 表面较为平滑, 新生长的菌丝无色, 呈节状分隔。

2.4.2 菌株 FG-22 的 rDNAITS 区 PCR 扩增结果 根据分子生物学的测序结果, 所测得的序列如下所示:

AGTTGTA CTGCGGAGACATTAACGAGTTTTGAACGAGTTGTAGCTGGCCTTCCGGGGCATGTG-CACGCTCTGCTCATCCACTCTACCCCTGTGCACTTACTGTAGGTTGGCGTGGGCTCCTTTGCGGGAG-CATTCTGCCGGCCTATGTATACTACAAACACTTTAAAGTATCAGAATGTAAACGCGTCTAACGCATC-TATAATACTACTTTTAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA-AGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGCTCCTTGGTATTC-CGAGGAGCATGCCTGTTTGTGAGTGTGATGGAATTCTCAACTTATAAATCCTTGTGATCTATAAGCTTG-GACTTGGAGGCTTGTGGCCCTTGTGGTTCGGCTCCTCTTGAATGCATTGGCTCGATTCCGTACG-GATCGGCTCTCAGTGTGATAATTGTCTACGCTGTGACCGTGAAGTGTGTTTGGCGAGCTTCTAACCGTC-CATTAGGACAACCTTTTAAACATCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATC-AATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATCCCCTAGTAACTGCGAGTGAAGCGGGAAAAGCT-CAAATTTAAAATCTGGCGGTCTTTGGCCGTCCGAGTTGTAGTCTGGAGAAGCGTCTTCCGCGCTG-GACCGTGTACAAGTCTCCTGA

2.4.3 系统发育树 利用 MEGA 软件构建系统发育树 (图 4), 通过基因序列相似性对比和系统进化发育分析, 菌株 FG-22 与接收号为 AY840585 (*Trametes versicolor*) 的 ITS 序列最为接近, 相似度达到 98%, 结合 FG-22 菌落的形态特征, 初步确定 FG-22 属多孔科、云芝属的杂色云芝 (*Trametes versicolor*)。

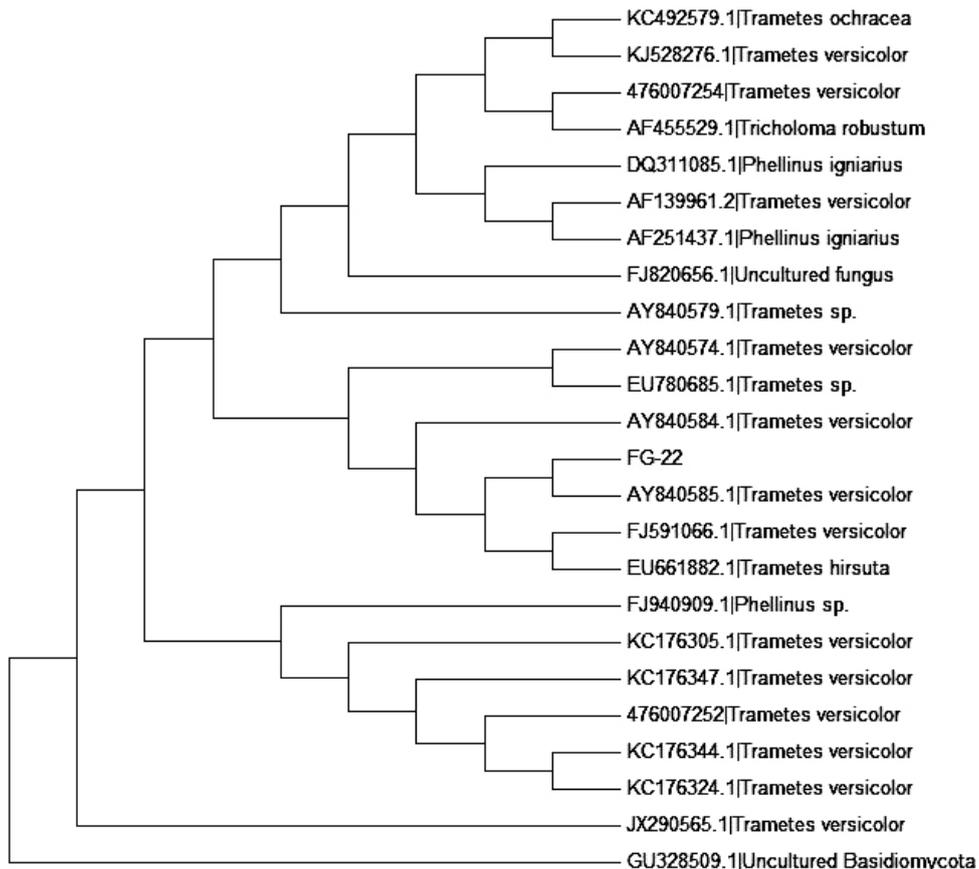


图 4 基于菌株 FG-22 及来自 GenBank 的 ITS 序列构建的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic trees based on FG-22 fungi and ITS sequences from GenBank

3 结论与讨论

3.1 通过平板划线法对 49 份腐烂的竹材样品中分离纯化得到 74 株真菌, 并对 74 株真菌进行木质素降解筛选, 经过 PDA- 愈创木酚平板变色初筛得到 19 株变色明显的菌株, 并对这 19 株进行 PDA- 苯胺蓝退色筛选, 其中 FG-19、FG-22、FG-45、FG-694 株菌退色较为明显, 并对这 4 株菌进行酶活力测定复筛, 通过酶活力测定发现菌株 FG-22 具有较好的降解木质素的综合酶活力。

3.2 通过对 FG-22 进行菌落形态和构建系统发育树等分子生物学鉴定, 确定 FG-22 菌株属多孔科、云芝属的杂色云芝 (*Trametes versicolor*)。

3.3 自然界中, 木质素的降解主要是通过真菌、细菌和微生物的共同作用, 其中真菌在降解木质素中扮演着非常重要的作用, 而研究者也将研究的重点侧重于真菌对木质素的降解, 目前, 研究较多的有黄孢原毛平革菌、变色栓菌、烟管菌、彩绒革盖菌等白腐菌^[15]。而文章通过从天然腐烂的竹材中新分离筛选得到一株新的木质素降解菌——杂色云芝 (*Trametes versicolor*), 对竹材木质素的降解更有效, 为竹材木质素降解的进一步研究提供借鉴和参考。

参考文献

- [1] 江泽慧.世界竹藤[M].沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2002.
- [2] 杨开良.我国竹产业发展现状与对策[J].经济林研究, 2012, 30(2): 140-143.
- [3] 刘惠兰.发展低碳经济做大做强竹产业[N].经济日报, 2010-07-27.
- [4] 王裕霞, 马红霞, 潘文, 等.广东不同区域麻竹林分生长性状调查及其竹材基本密度初步研究[J].林业与环境科学, 2019, 35(2): 43-47.
- [5] 吴坤, 张世敏, 朱显峰.木质素生物降解研究进展[J].河南农业大学学报, 2000, 34(4): 349-352.
- [6] 陶用珍, 管映亭.木质素的化学结构及其应用[J].维生素科学与技术, 2003, 11(1): 42-55.
- [7] 刘剑, 刘君昂, 周国英, 等.竹材木质素高效降解菌的分离筛选及鉴定[J].中南林业科技大学学报, 2014, 34(8): 48-52.
- [8] 吴坤等.杂色云芝漆酶的分离、纯化和酶学特性研究[J].高校化学工程学报, 2003, 2(17): 173-179.
- [9] 杜海萍, 宋瑞清, 王钰祺.几种真菌产木质素降解酶的比较研究[J].林业科技, 2006, 31(4): 20-24.
- [10] 周金燕, 张发群, 桑原正章.真菌产生的锰过氧化物酶和漆酶的研究[J].微生物学报, 1993, 33(5): 387-391.
- [11] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [12] HILLIS D M, MORITZ C M, MABLE B K. Molecular Systematics[M].Massachusetts: Sinauer Associates, 1996: 407-514.
- [13] Sambrook J, Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M].3rd.NewYork: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 304-331.
- [14] 李河, 周国英, 周德明.用于提取可纺性竹原纤维菌株的选育[J].中南林学院学报, 2006, 26(1): 48-52.
- [15] 董亮, 谢冰, 黄民生, 等.白腐真菌酶学与分子生物学研究进展[J].环境科学与技术, 2005, 28(5): 102-104.