

纤维素降解菌株的分离与筛选*

赖国栋 秦长生 赵丹阳 邱华龙
杨 华 田龙艳 练 涛 徐金柱

(广东省森林培育与保护利用重点实验室/广东省林业科学研究院, 广东 广州 510520)

摘要 从实验室已有的木腐菌与土壤中分离获得的菌株中筛选出具有较高纤维素降解能力的菌株。利用羧甲基纤维素钠为唯一碳源的选择培养, 利用刚果红染色进行初筛, 选择透明圈与菌落直径比值较大的菌落进行酶活测定再次进行复筛。同时, 利用分子学手段对高效产胞外纤维素酶的菌株进行鉴定。最终, 筛选出4株高效产胞外纤维素酶的菌株, 其中菌株HF-3在28℃、180 r/min条件下发酵培养5 d后, 胞外纤维素酶活性最高, 高达67.772 U/mL, 经鉴定为密褐褶孔菌 *Gloeophyllum trabeum*; 另外Y5、Y6、Y2共3株菌株酶活较高, 分别为37.714 U/mL、30.694 U/mL、25.336 U/mL, 属于链霉菌, 依次鉴定为浅灰白链霉菌 *Streptomyces griseolobus*、丝状链霉菌 *Streptomyces filamentosus* 和威德摩尔链霉菌 *Streptomyces wedmorensis*。试验筛选得到HF-3、Y5、Y6以及Y2菌株具有较高纤维素降解能力, 可为复合菌系的研制提供材料。

关键词 纤维素; 纤维素降解菌; 鉴定; 筛选

中图分类号: S718.81 **文献标志码:** A **文章编号:** 2096-2053 (2021) 04-0024-09

Isolation and Screening of Cellulose Degrading Strains

LAI Guodong QIN Changsheng ZHAO Danyang QIU Hualong
YANG Hua TIAN Longyan LIAN Tao XU Jinzhu

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Silviculture, Protection and Utilization/Guangdong Academy of Forestry, Guangzhou, Guangdong 510520, China)

Abstract Screening strains with high cellulose degradation ability from wood rotting fungi in laboratory and humus layer available. Sodium carboxymethyl cellulose was used as the sole carbon source for selective culture, and Congo red staining was used for primary screening. Colonies with larger ratio of transparent circle to colony diameter were selected for enzyme activity determination for re-screening. Finally, strains with high enzyme activity were identified by molecular method. Four strains with strong cellulose-degrading ability were screened out from the existing wood rotting fungi and strains from humus layer. Among them, HF-3 strain had CMC enzyme activity of 67.772 U/mL after 5 days of fermentation at 28 °C for 180 r/min, which was identified as *Gloeophyllum trabeum*. The other three strains with higher enzyme activities were identified as *Streptomyces griseolobus*, *Streptomyces filamentosus*, and *Streptomyces wedmorensis*, which were 37.714, 30.694, and 25.336 U/mL, respectively. In this experiment, HF-3, Y5, Y6, and Y2 strains showed high cellulose degradation ability, which could provide materials for the development of composite strains. The results of this study are of great significance for accelerating the decomposition of green garbage.

Key words cellulase; fungi; identification; screen

* 基金项目: 广东省林业科技计划项目 (2019-16)。

第一作者: 赖国栋 (1992—), 男, 助理工程师, 主要从事林业有害生物防治研究工作, E-mail: lagordon@163.com。

通信作者: 徐金柱 (1978—), 男, 教授级高级工程师, 主要从事林业病虫害研究工作, E-mail: 282272693@qq.com。

纤维素是地球上含量多、分布广的可再生资源,其以木质纤维形式存在,主要由纤维素、半纤维素和木质素构成^[1],其主要来源于高等植物^[2]。纤维素以其独特的化学结构在自然界难以被降解^[3]。目前纤维素的降解主要有物理法、化学法和生物法3种方法,生物法相比其它两种方法,具有安全性高、能耗低、经济环保等优势^[4],逐渐被人们重视。生物法降解纤维素,主要依靠纤维素酶,自从1906年 Seilliere 首次在蜗牛肠胃消化液中发现的纤维素酶能降解纤维素以来^[5],纤维素酶就引起了国内外研究人员重视。

纤维素酶的来源相当广泛,但目前仍然以产酶微生物为主,自1912年 Pringsheim 等人成功从土壤中筛选出第一批纤维素降解菌以来^[6],至今已从不同环境中分离获得超过200种可以产纤维素酶的微生物,其中不乏具有耐低温、耐高温、耐碱等特殊功能的微生物^[7-10]。纤维素降解菌主要有真菌、细菌和放线菌,真菌产纤维素酶多为胞外酶,细菌产纤维素酶多为胞内酶,放线菌因产酶量低于真菌和细菌研究相对较少^[11-12]。在我国绿化垃圾种类繁多,其主要成分以木质纤维素为主^[13-19],但我国对纤维素的利用水平相对较低,本研究旨在筛选出能高效生产纤维素酶的菌株并鉴定,为提高我国纤维素利用率提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 土样及菌株来源

土样采自广东省林业科学研究院枯枝落叶堆腐的土壤;菌株:木腐菌7株,保存于广东省林业科学研究院。

1.2 培养基

(1) 富集培养基:羧甲基纤维素钠(CMC-Na)15 g,硝酸铵(NH_4NO_3)1 g,酵母膏1 g,七水硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)0.5 g,磷酸二氢钾(KH_2PO_4)1 g,蒸馏水1 000 mL。

(2) 筛选培养基:羧甲基纤维素钠(CMC-Na)20 g,磷酸二氢钾(KH_2PO_4)2 g,七水硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)0.3 g,硫酸铵(NH_4)₂SO₄1.4 g,氯化钙(CaCl_2)0.3 g,氯化锌(ZnCl_2)0.001 7 g,硫酸锰(MnSO_4)0.001 6 g,氯化钴(CoCl_2)0.002 g,硫酸亚铁(FeSO_4)0.000 5 g,蒸馏水1 000 mL, pH7.0~7.2。

(3) 发酵产酶培养基:蛋白胨3 g,硫酸

铵2 g,酵母膏0.5 g,磷酸二氢钾(KH_2PO_4)4 g,氯化钙(CaCl_2)0.3 g,七水硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)0.3 g, Tween-80 0.2 mL,羧甲基纤维素钠(CMC-Na)20 g,蒸馏水1 000 mL。

(4) SDY 培养基:蛋白胨10 g,酵母粉10 g,葡萄糖40 g,蒸馏水1 000 mL。

(5) LB 培养基:胰蛋白胨10 g,酵母粉5 g,氯化钠(NaCl)10 g,蒸馏水1 000 mL。

1.3 主要试剂

(1) 1 mg/mL 刚果红溶液:称取0.5 g 刚果红,加蒸馏水溶解并定容至500 mL,室温、避光保存。

(2) 1 mol/L 氯化钠溶液:称取58.5 g NaCl,加蒸馏水溶解并定容至1 000 mL。

(3) 1.0 mg/mL 葡萄糖标准液:称取烘干至恒重的葡萄糖0.10 g,加蒸馏水溶解并定容至100 mL,4℃保存。

(4) 柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液(0.05 mol/L, pH4.5):A液:称取柠檬酸10.507 g用蒸馏水溶解后定容至500 mL;B液:称取柠檬酸三钠14.705 g用蒸馏水溶解后定容至500 mL;取230 mL A液和270 mL B液混合后即为柠檬酸缓冲液。

(5) DNS 试剂:称取6.3 g 3,5-二硝基水杨酸($\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7$),21 g 氢氧化钠(NaOH),182 g 酒石酸钾钠($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$),5 g 苯酚($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$)(在50℃水溶化),5 g 偏重亚硫酸钠(NaS_2O_5),搅拌至完全溶解,定容至1 000 mL,避光储存于棕色试剂瓶中,4℃保存,放置一周后使用。

(6) 1% CMC-Na:称取1.0 g CMC-Na 溶解于100 mL 柠檬酸缓冲液中,4℃保存。

(7) DNA 提取试剂盒:M5 Fungal Genomic DNA Kit (50T)。

(8) 菌株保存液:30%甘油与无菌水1:1混合。

1.4 主要实验仪器

超净工作台、水浴锅、紫外分光光度计、搅拌器、高压灭菌锅、PCR 仪、pH 计、离心机、振荡器、电子天平、恒温振荡培养箱等。

1.5 富集培养

将采集的土壤过筛处理,称取土样10 g,放入装有100 mL 富集培养基的250 mL 三角瓶中,加入3颗无菌玻璃珠,30℃,150 rpm 振荡培养

3~4 d^[9-10]。

1.6 菌株分离

取 1 mL 富集培养液, 梯度稀释至 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 和 10^{-6} 共 6 个梯度浓度, 每个梯度各取 0.1 mL, 涂布于筛选培养基平板上, 30 ℃ 培养, 每个浓度涂布 10 块板。待菌落长出后, 挑选不同形态的菌株划线, 获得单菌株, 纯化菌株^[9-10]。

1.7 纤维素降解能力测定初筛 (刚果红染色法)

分别将纯化得到的菌株和实验室保存的 7 株木腐菌点接到筛选培养基平板中央, 每菌株 3 个重复, 30 ℃ 恒温培养 3~6 d, 根据菌落生长速度确定染色时间 (菌落直径不超过培养皿半径前进行染色)。取 1 mg/mL 刚果红溶液 3 mL, 均匀布于平板, 染色 30 min, 用 1 mol/L 氯化钠溶液冲洗 30~60 min, 利用十字交叉法测量菌落直径 d (mm) 和菌落外围透明圈直径 D (mm), 根据 Hc 值 ($Hc=D/d$), 确定供试菌株分解纤维素能力, 筛选比值较大的菌株, 进行酶活测试^[9-10]。

1.8 CMC 酶活测定复筛 (DNS 法)

1.8.1 粗酶液的制备 将初筛目标菌株接种至种子培养基 (SDY 培养基), 28 ℃, 180 rpm 培养 3 d, 按 10% 接种量接种至装有 100 mL 发酵产酶培养基的三角瓶中, 每株菌设 3 个重复, 28 ℃, 180 rpm 培养 5 d, 取 10 mL 发酵液, 4 ℃, 5 000 rpm 离心 10 min, 所得上清液即为粗酶液^[9-10]。

1.8.2 标准曲线绘制 参考相关文献^[19], 绘制葡萄糖标准曲线。取一系列 25 mL 具刻度试管并进行标号, 根据表 1 内容依次加入葡萄糖标准液、蒸馏水和 DNS 溶液。混匀后, 沸水浴 10 min, 迅速冷却加蒸馏水定容至 25 mL, 在 540 nm 波长

下, 以 1 号管调零测量各管的光密度值。以光密度值为纵坐标, 葡萄糖浓度为横坐标, 绘制标准曲线。

1.8.3 纤维素酶 (CMCase) 活力测定 取 4 支 25 mL 试管, 设置 1 个空白对照管和 3 个试验管分别加入 1 mL 粗酶液, 将空白对照管进行沸水灭活 10 min, 试验管不作沸水灭活处理。然后 4 支试管均加入 1.5 mL 1% CMC-Na, 混匀, 50 ℃ 保温 30 min 后沸水浴灭活 10 min。再分别加入 3 mL DNS 溶液沸水浴反应 10 min 后迅速冷却, 加蒸馏水定容至 25 mL, 于 540 nm 波长下, 以空白对照管调零, 测定试验管的 OD 值, 并计算酶活力。

酶活力定义: 在 50 ℃ 条件下, 1 mL 粗酶液 1 min 产生 1 μ g 葡萄糖为一个酶活单位, 用 U/mL 表示。酶活计算公式如下:

$$\text{酶活力 } E = 1\,000 \times S \times N / (T \times V)$$

其中, E : 样品的酶活力 (U/mL); S : 由样品的平均吸光值在标准曲线上相对应的葡萄糖含量 (mg); N : 粗酶液的稀释倍数; 1 000: mg 与 μ g 之间的换算倍数; T : 反应时间 (min); V : 参与反应的粗酶液体积 (mL)^[9-10]。

1.9 高产酶菌株的鉴定

采用 M5 Fungal Genomic DNA Kit (50T) 试剂盒提取供试菌株总 DNA, 并以此为模板进行 PCR 扩增分析。以 ITS1/ITS4 和 ITS4/ITS86 为引物, 进行 PCR 扩增 (表 2)。扩增体系为 25 μ L (Premix Taq 12.5 μ L, DNA 模板 2 μ L, 引物 0.5 μ L, ddH₂O 15 μ L)。扩增条件为: 95 ℃ 3 min; 95 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 循环 32 次; 72 ℃ 10 min, 4 ℃ 保存。细菌以 27F/1492R

表 1 葡萄糖标准曲线绘制
Table 1 Draw a standard curve of glucose

编号 Number	1.0 mg/mL 葡萄糖标准液 /mL Glucose standard solution	蒸馏水 /mL Distilled water	DNS 溶液 /mL DNS solution	葡萄糖浓度 / (mg · mL ⁻¹) Glucose concentration
1	0.00	2.50	3.00	0.00
2	0.25	2.25	3.00	0.10
3	0.50	2.00	3.00	0.20
4	0.75	1.75	3.00	0.30
5	1.00	1.50	3.00	0.40
6	1.25	1.25	3.00	0.50
7	1.50	1.00	3.00	0.60
8	1.75	0.75	3.00	0.70

表 2 高产酶菌株鉴定所用引物
Table 2 Primers for strain identification

引物名称 Primer name	用途 Purpose	序列 (5'-3') Sequence	产物 /bp Product size
ITS1	真菌鉴定	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	578
ITS4		TCCTCCGCTTATTGATATGC	
ITS4		TCCTCCGCTTATTGATATGC	
ITS86		GTGAATCATCGAATCTTTGAAC	
27F	细菌鉴定	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1 465
1492R		GGTTACCTTGTACGACTT	
357F		CCTACGGGAGGCAGCAG	
907R		CCGTCAATTCCTTTRAGTTT	

和 357F/907R 为引物进行 PCR 扩增。扩增条件为 95 ℃ 3 min; 95 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃延伸 90 s/30 s, 循环 32 次; 72 ℃ 10 min, 4 ℃保存。PCR 产物送上海生工生物工程公司测序。测序结果在 NCBI 上进行同源性比较和聚类分析, 确定菌株种类 [9-10]。

2 结果与分析

2.1 菌株分离

从同一批次土壤中挑选 1~2 株培养性状 (菌落形态、生长速率、色素分泌等) 差异显著的菌株进行分离纯化。经富集培养分离, 从 3 批腐殖质土壤中共分离获得 47 个菌株 (表 3)。

2.2 纤维素降解性能测试初筛

采用刚果红染色法对土壤中分离的 47 株菌和实验室保存的 7 株木腐菌进行纤维素降解能力测试。结果表明: 供试菌株对纤维素钠的降解能力存在明显差异 (Hc = 0-3.87), 根据 Hc 的大小, 最终将供试菌株分为高产酶、低产酶、不产酶 3 类。再次利用刚果红染色, 筛选出 Y2、Y5、Y6 和 HF-3 共 4 个菌株菌落外围形成较大透明圈, Y5 的 Hc 值最大, 为 3.87; Y2 的次之, Hc 值为 2.54; Y6 的 Hc 值 1.86; HF-3 的生长速率最快, Hc = 1.35。初步筛选出 Y2、Y5、Y6 和 HF-3 高产纤维素酶的菌株共 4 株 (图 1、表 4)。

表 3 土壤微生物形态特征
Table 3 Morphological characteristics of soil microorganisms

菌株编号 Strain number	培养时间 /d Cultivation time	菌落形态 Colony morphology	颜色 Color	菌落直径 d/mm Colony diameter	透明圈直径 D/mm Diameter of transparent zones	Hc
W1	4	圆形、湿润、粘稠、凸起、表面光滑	乳白色	4.97	-	-
W2	4	圆形、湿润、粘稠、凸起、表面光滑	黄色	4.89	-	-
W3	4	圆形、湿润、粘稠、凸起表面光滑	黄色	2.97	-	-
W4	3	圆形、湿润、粘稠、凸起、表面光滑	黄色	4.63	-	-
W5	3	圆形、湿润、粘稠、扁平、表面光滑	淡黄色	11.69	-	-
W6	3	圆形、湿润、粘稠、扁平、表面光滑	淡黄色	18.99	-	-
W7	3	圆形、湿润、粘稠、扁平、表面光滑	淡黄色	16.85	-	-
W8	3	圆形、湿润、粘稠、扁平、表面光滑	淡黄色	13.6	-	-
W9	3	圆形、湿润、粘稠、扁平、表面光滑	黄色	8.16	-	-
W10	4	圆形、湿润、粘稠、凸起、表面光滑	黄色	8.01	-	-

菌株编号 Strain number	培养时间 /d Cultivation time	菌落形态 Colony morphology	颜色 Color	菌落直径 d/mm Colony diameter	透明圈直径 D/mm Diameter of transparent zones	Hc
W11	4	圆形、湿润、粘稠、凸起、表面光滑	黄色	3.66	-	-
W12	4	圆形、湿润、粘稠、凸起、表面光滑	黄色	4.41	-	-
W13	3	圆形、湿润、粘稠、凸起、表面光滑	淡黄色	4.95	-	-
W14	3	圆形、湿润、粘稠、凸起、表面光滑	淡黄色	10.85	-	-
W15	3	圆形、湿润、粘稠、凸起、表面光滑	乳白色	5.04	-	-
W16	4	圆形、湿润、粘稠、凸起、表面光滑	黄色	4.08	-	-
W17	4	圆形、湿润、粘稠、凸起、表面光滑	黄色	3.47	-	-
W18	4	圆形、湿润、粘稠、凸起、表面光滑	淡黄色	4.13	-	-
W19	4	圆形、湿润、粘稠、凸起、表面光滑	淡黄色	4.66	-	-
W20	4	圆形、湿润、粘稠、凸起、表面光滑	淡黄色	4.35	-	-
W21	4	圆形、湿润、粘稠、扁平、表面光滑	淡黄色	12.98	-	-
W22	4	圆形、湿润、粘稠、凸起、表面光滑	黄色	3.78	-	-
W23	4	圆形、湿润、粘稠、扁平、表面光滑	淡黄色	11.46	-	-
W24	4	圆形、湿润、粘稠、凸起、表面光滑	黄色	3.79	-	-
W25	4	圆形、湿润、粘稠、凸起、表面光滑	黄色	3.64	-	-
W26	4	圆形、湿润、粘稠、凸起、表面光滑	黄色	4.75	-	-
W27	4	圆形、湿润、粘稠、扁平、表面光滑	黄色	15.36	-	-
W28	4	圆形、湿润、粘稠、凸起、表面光滑	淡黄色	5.5	-	-
W29	4	圆形、湿润、粘稠、凸起、表面光滑	黄色	7.77	-	-
L1	4	圆形、湿润、粘稠、凸起、表面光滑	黄色	4.12	-	-
L2	2	棉絮状、表面粉粒	绿色	35.67	-	-
L3	4	圆形、湿润、粘稠、凸起、表面光滑	黄色	4.71	-	-
L4	4	圆形、湿润、粘稠、凸起、表面光滑	乳白色	2.48	-	-
L5	4	圆形、湿润、粘稠、凸起、表面光滑	乳白色	2.71	-	-
L6	4	圆形、湿润、粘稠、扁平、表面光滑	淡黄色	11.73	-	-
L7	5	蜘蛛网状、菌丝细长	白色	12.54	-	-
L8	4	圆形、湿润、粘稠、凸起、表面光滑	黄色	7.21	-	-
L9	4	圆形、湿润、粘稠、凸起、表面光滑	淡黄色	4.96	-	-
L10	4	圆形、湿润、粘稠、凸起、表面光滑	黄色	12.7	-	-
L11	4	圆形、湿润、粘稠、扁平、表面光滑	黄色	8.04	-	-
L12	4	圆形、湿润、粘稠、凸起、表面光滑	淡黄色	3.81	-	-
Y1	5	蜘蛛网状、菌丝细长	白色	8.22	-	-
Y2	5	圆形、干燥、表面粉粒	白色	5.85	14.86	2.54
Y3	5	蜘蛛网状、菌丝细长	白色	8.39	-	-
Y4	5	圆形、干燥、表面粉粒	白色	6.22	14.43	2.32
Y5	5	圆形、干燥、表面粉粒	灰绿色	4.61	17.83	3.87
Y6	5	圆形、干燥、表面粉粒	白色	8.01	14.92	1.86

2.3 纤维素降解菌株酶活测定复筛

试验以葡萄糖含量为横坐标，OD 值 540 nm 的吸光度为纵坐标，绘制的葡萄糖标准曲线如图 2 所示，线性回归方程为： $y=0.9021x+0.0904$

($R^2=0.9585$)，拟合效果良好，可用于酶活测定。
将初筛获得的 4 株高产纤维素酶菌株在 28 ℃，180 rpm 发酵培养 5 d，测定各菌株 CMC 酶活力。菌株 HF-3 的 CMC 酶活力最高，为

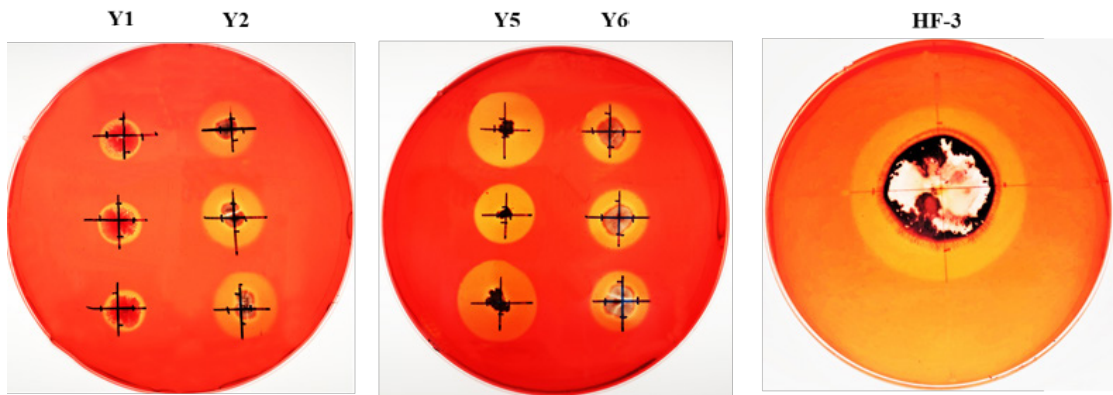


图 1 高产纤维素酶的菌株刚果红染色结果
Fig. 1 Congo red staining results of high cellulase producing strain

表 4 高产纤维素酶菌株的 Hc 值
Table 4 Hc value of high cellulase producing strain

菌株编号 Strain numbe	菌落直径 /mm Colony diameter	透明圈直径 /mm Diameter of transparent zones	Hc
Y5	4.61 ± 0.95	17.83 ± 2.14	3.87
Y2	5.85 ± 0.41	14.86 ± 0.97	2.54
Y6	8.01 ± 0.19	14.92 ± 0.31	1.86
HF-3	32.10 ± 0.27	43.23 ± 0.05	1.35

注：表中数据为平均值 ± 标准误。Note: values in table are means ± SE.

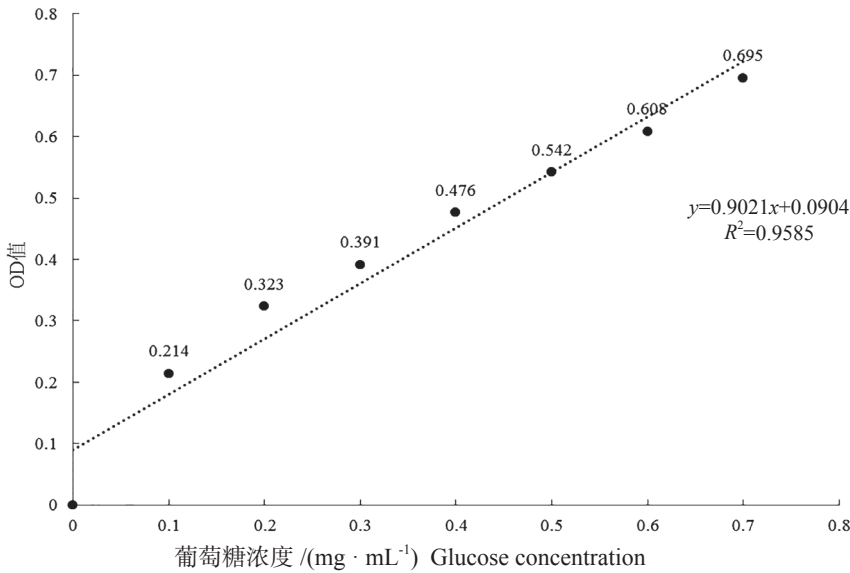


图 2 葡萄糖标准曲线
Fig. 2 Glucose standard curve

67.722 U/mL；其次为菌株 Y5，为 37.714 U/mL；菌株 Y6，为 30.694 U/mL；菌株 Y2 的 CMC 酶活力最低，为 25.336 U/mL（表 5）。

2.4 菌株鉴定结果

通过分离纯化，培养 4 个菌株的菌落特征（生长速率、菌落质地、颜色、气味）等特征，初步确定 Y2、Y5、Y6 为放线菌 (Actinomycete)，HF-3 为真菌，菌落形态如图 3 所示。

采用试剂盒提取菌株 DNA，分别以各菌株 DNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增产物送上海生工生物工程公司测序，利用 SeqMan 进行序列拼接剪

切，将结果输入 NCBI 网站，进行同源性比对，同时下载同源序列，利用 MEGA7 构建系统发育树（图 4~7），确定菌株种类，具体鉴定结果如表 6 所示，HF-3 为密褐褶孔菌 *Gloeophyllum trabeum*，Y5 为浅灰白链霉菌 *Streptomyces griseoloalbus*、Y6 为丝状链霉菌 *Streptomyces filamentosus* 和 Y2 为威德摩尔链霉菌 *Streptomyces wedmorensis*。

3 结论与讨论

在自然界中的纤维素主要靠细菌、放线菌、真菌都产生的胞外纤维素酶进行降解，而高效降

表 5 高产纤维素酶菌株 CMC 酶活力
Table 5 CMC enzyme activity of the strain

菌株编号 Strain number	酶活 / (U · mL ⁻¹) Enzyme activity
Y5	37.714 ± 0.996
Y2	25.336 ± 0.958
Y6	30.694 ± 1.132
HF-3	67.722 ± 1.339

注：表中数据为平均值 ± 标准误。Note:values in table are means ± SE.

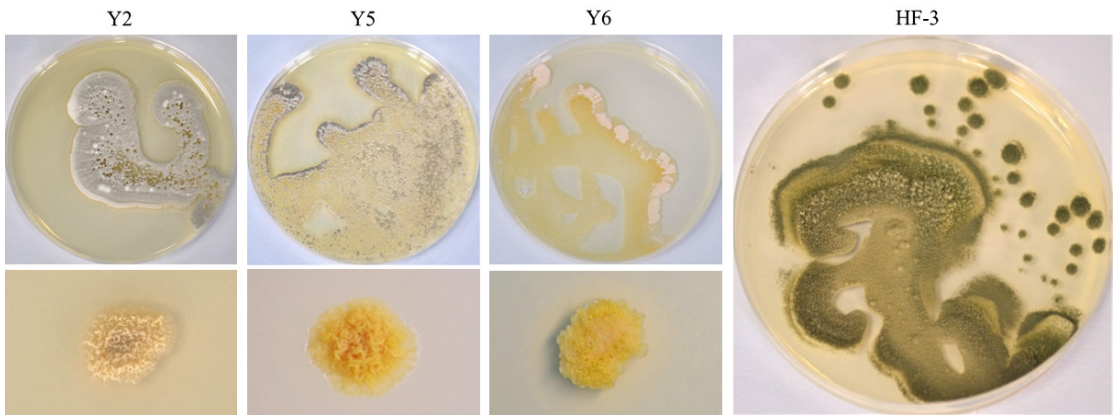


图 3 高产纤维素酶菌株菌落形态
Fig. 3 Morphological characteristic of strain

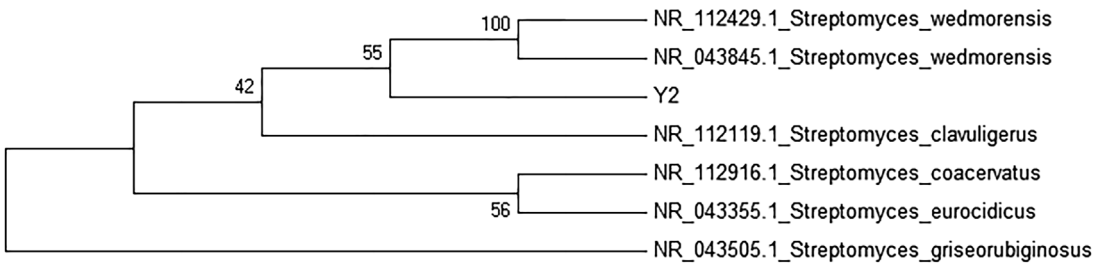


图 4 Y2 系统发育树
Fig. 4 Phylogenetic tree of Y2

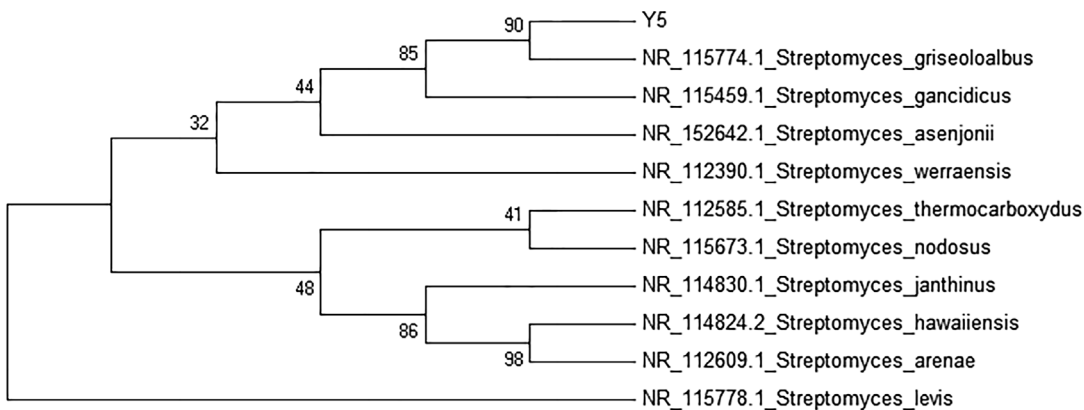


图 5 Y5 系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of Y5

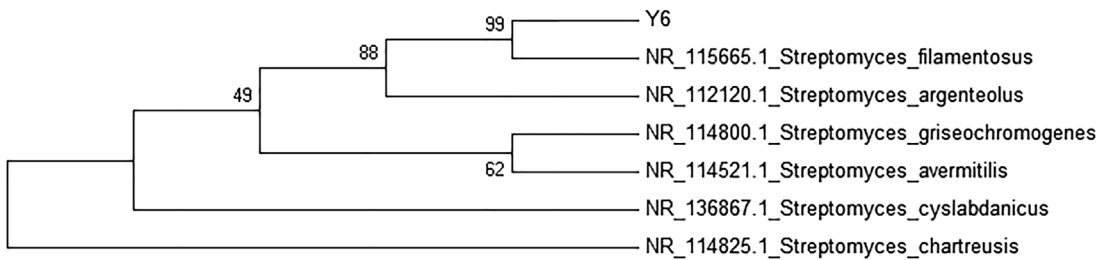


图 6 Y6 系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree of Y6

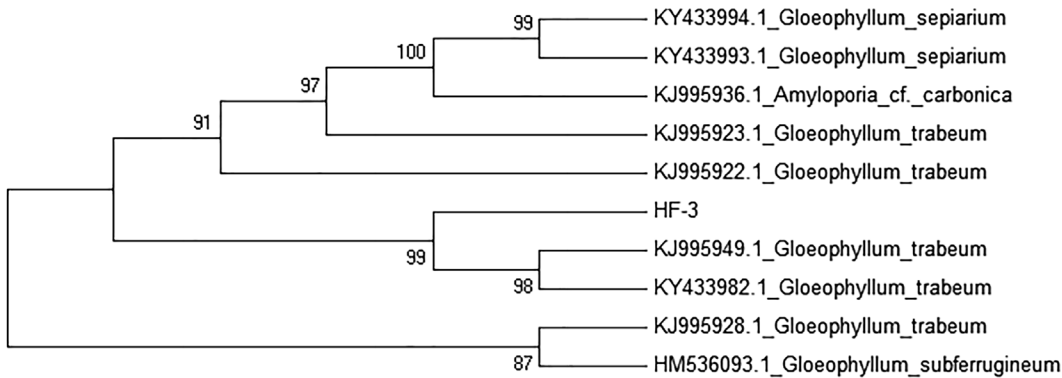


图 7 HF-3 系统发育树

Fig. 7 Phylogenetic tree of HF-3

表 6 纤维素降解菌种类

Table 6 The specie of cellulose degrading strain

菌株编号 Strain number	引物 Primer	种类 Species
Y2	ZF03 与 ZF04	<i>Streptomyces wedmorensis</i>
Y5	ZF03 与 ZF04	<i>Streptomyces griseoloalbus</i>
Y6	ZF03 与 ZF04	<i>Streptomyces filamentosus</i>
HF-3	LY01 与 LY02	<i>Gloeophyllum trabeum</i>

解菌株的筛选是纤维素开发和利用的关键,本研究利用羧甲基纤维素钠培养基和刚果红透明圈染色法,从土壤和实验室已有的木腐菌种中初步筛选出4株较高产酶的纤维素降解菌株,4株菌株在28℃、180 r/min条件下培养5 d后,孢外纤维素酶活性 HE-3 菌株最高为 67.772 U/mL,其它3个菌株相对较高,Y5为37.714 U/mL、Y6为30.694 U/mL、Y2为25.336 U/mL。通过菌落特征以及DNA分子比对,对4株菌株进行了鉴定,HF-3为密褐褶孔菌,Y5为浅灰白链霉菌、Y6为丝状链霉菌和Y2为威德摩尔链霉菌。

邵帅等^[20]研究发现,在不同的培养基中,菌株产生的纤维素酶的活性存在差异,因此优化产酶条件是提高纤维素降解率的关键。Kato等^[21]研究表明CSK1单独培养后进行木质纤维素降解时,其效率显著低于混合菌系;夏强^[22]对3株具有木质纤维素降解功能的菌株进行复配后得到的复合菌剂,对小麦秸秆中纤维素的降解率达到63.59%;由此可知复配是提高菌株降解的另一途径。受此启发,本研究后续将对4个菌株的产酶条件进行优化,获得高效产酶条件,并将4个菌株进行复配研究,进一步提高其对纤维素的降解能力。

参考文献

- [1] 高婕,李腊梅,谢桂军,等.热处理对马尾松木材霉变环境的影响[J].林业与环境科学,2021,37(2): 32-39.
- [2] 付时雨.纤维素的研究进展[J].中国造纸,2019,38(6): 54-64.
- [3] 潘知乐,杨鸿,时佳旭,等.纤维素降解菌的筛选鉴定及其特性研究概况[J].环境科学与管理,2019,44(4): 102-105.
- [4] 张爽.低温纤维素降解菌的筛选及其玉米秸秆降解效果研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2018.
- [5] SEILLIERE G N. Sur un cas d'hydrolyse diastasique de la cellulose du coton, après dissolution dans la liquer de Schweitzer[J]. C R Soc Biol, 1906, 61: 205-206.
- [6] Pringsheim, Hans. Ber den fermentativen Abbau der Cellulose[J]. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, 1912, 78(3-4): 266-291.
- [7] 许从峰,艾士奇,申贵男,等.木质纤维素的微生物降解[J].生物工程学报,2019,35(11): 2081-2091.
- [8] 何楠,令利军,冯蕾,等.1株产纤维素酶细菌的筛选、鉴定及生长特性[J].微生物学杂志,2017,37(1): 43-49.
- [9] 雅男.纤维素降解菌的筛选及酶学性质的研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2017.
- [10] 薛藩.纤维素降解微生物的筛选及高效纤维素酶活条件研究[D].扬州:扬州大学,2019.
- [11] 王晓涛,魏佩玲,胡波,等.纤维素降解酶研究进展[J].草食家畜,2019(3): 13-18.
- [12] 王盼星,陶施,薛藩.纤维素降解菌研究进展[J].绿色科技,2018(12): 161-163.
- [13] 史龙翔.纤维素降解菌的筛选及其在果树枝条腐解中的应用[D].杨凌:西北农林科技大学,2015.
- [14] 石军.德州市城市绿化垃圾处理利用现状与无害化对策[J].陕西林业科技,2018,46(2): 82-84.
- [15] 王素梅.佛山市顺德区城市垃圾处理技术选择研究[J].广东化工,2016,43(11): 183-184; 165.
- [16] 张玉山,梁伟杰,杨森,等.绿化废弃物资源化利用促进绿色农业循环发展[J].广西植物,2018,38(8): 1070-1080.
- [17] 许鹏,王银,梁勇.城市园林绿化垃圾产业化发展思考[J].中国市场,2019(14): 67-68.
- [18] 章志琴,高跃雯.园林绿化废弃物处理研究进展[J].上饶师范学院学报,2016,36(6): 87-92.
- [19] 蒋玉俭.竹林中纤维素降解菌的筛选及其产酶条件优化[D].杭州:浙江农林大学,2015.
- [20] 邵帅,王玲玲,林剑,等.产纤维素酶真菌分离及高效菌株筛选[J].河南农业科学,2020,49(4): 55-61.
- [21] KATO S, HARUTA S, CUI Z J, et al. Effective cellulose degradation by a mixed-culture system composed of a cellulolytic clostridium and aerobic non-cellulolytic bacteria[J]. FEMS Microbiology Ecology. 2004, 51(1): 133-142.
- [22] 夏强.纤维素降解混合菌剂的构建及降解效能[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2018.