

木质素降解细菌的筛选及园林废弃物降解研究

张鹏飞¹, 李素艳^{1*}, 余克非¹, 姜新福²

(1. 北京林业大学林学院, 北京 100083; 2. 北京市通州区林业种子苗木管理站, 北京 101100)

摘要: 为获得能够高效降解园林废弃物的细菌, 采用苯胺蓝和愈创木酚平板法从高温期堆肥中初筛得到木质素降解酶活力较高的菌株, 再利用筛选出的菌株进行液态产酶和固态发酵试验, 对漆酶 (Lac)、锰过氧化物酶 (MnP) 和木质素过氧化物酶 (LiP) 的活力变化及菌株对园林废弃物的降解率进行测定。结果表明, 从高温期堆肥中初筛得到 3 株木质素降解酶活力较高的细菌 L-9、L-12 和 L-17; 液态产酶试验测得 L-9、L-12 和 L-17 的 Lac 活力分别为 8.61、12.26 和 2.20 U·mL⁻¹; MnP 活力分别为 11.16、14.75 和 16.24 U·mL⁻¹; LiP 活力分别为 40.48、42.41 和 37.52 U·mL⁻¹; 固态发酵试验测得接种 L-9、L-12 和 L-17 菌株 28 d 后, 园林废弃物的木质素降解率分别为 14.88%、20.10% 和 11.25%; 纤维素降解率分别为 25.64%、28.47% 和 30.03%。综合评价菌株 L-12 具有较强的木质素降解能力, 通过形态观察和 16S rDNA 序列分析, 将 L-12 鉴定为嗜热嗜脂肪地芽孢杆菌 (*Geobacillus stearothermophilus*), 可用于探究细菌降解木质素原理和工业化生产木质素降解菌剂。

关键词: 园林废弃物; 木质素降解细菌; 酶活力; 固态发酵

中图分类号: X172

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2018)04-0676-06

Screening of lignin-degrading bacteria and study on degradation of garden waste

ZHANG Pengfei¹, LI Suyan¹, YU Kefei¹, JIANG Xinfu²

(1. College of Forestry, Beijing Forestry University, Beijing 100083;

2. Tongzhou Seed and Seedling Management Station, Beijing 101100)

Abstract: In order to obtain the bacteria degrading garden waste efficiently, aniline blue and guaiacol plate methods were employed to select bacteria with high lignin-degrading enzyme activity from garden waste compost in high temperature stage. Then the selected strains were applied to the liquid fermentation experiment and solid-state fermentation experiment, and the changes of laccase (Lac), manganese peroxidase (MnP), lignin peroxidase (LiP) and degradation rate of garden waste were monitored. Results showed that 3 strains with higher lignin-degrading enzyme activity were isolated as L-9, L-12 and L-17. The Lac activities of L-9, L-12 and L-17 in liquid fermentation were 8.61, 12.26 and 2.20 U·mL⁻¹, respectively; the MnP activities of which were 11.16, 14.75 and 16.24 U·mL⁻¹, respectively; the LiP activity of which were 40.48, 42.41 and 37.52 U·mL⁻¹, respectively. After 28 days of solid-state fermentation, the degradation rates of lignin in garden waste with L-9, L-12 and L-17 were 14.88%, 20.10% and 11.25%, respectively; the degradation rates of cellulose were 25.64%, 28.47% and 30.03%, respectively. In conclusion, L-12 was the most excellent strain with high enzyme activity and lignin degradation rate and was identified as *Geobacillus stearothermophilus* by morphology and 16S rDNA sequence analysis, which has a great potential to investigate the theory of lignin-degrading and produce industrial inoculant.

Key words: garden waste; lignin-degradation bacteria; enzyme activity; solid-state fermentation

随着全国城市绿化的快速发展, 园林废弃物如乔灌木修剪物、枯枝落叶、杂草残花等的产生量也越来越大, 焚烧和填埋的处理方式易造成环境污染

和资源浪费^[1], 园林废弃物的高效降解及资源利用成为人们的研究热点。园林废弃物的主要成分为木质纤维素, 它是自然界中含量最多的可再生能源物

收稿日期: 2017-11-29

基金项目: 林业公益性行业科研专项 (201504205) 资助。

作者简介: 张鹏飞, 硕士生研究生。E-mail: 983331438@qq.com

* 通信作者: 李素艳, 博士, 副教授。E-mail: lisuyan@bjfu.edu.cn

质, 主要由木质素、纤维素和半纤维素相互嵌合组成, 其中木质素结构复杂而不规则, 又将纤维素分子包埋其中, 形成一种天然屏障^[2-3], 是园林废弃物降解的主要限制因素之一。

在众多针对木质素降解的方法中, 微生物法以其成本低、对环境友好的优点受到国内外学者的关注^[4]。目前研究以真菌和细菌为主, 对以白腐菌为代表的真菌研究最为广泛和深入, 在酶系调控和降解机制等方面已取得很大进展, 但由于真菌存在对环境敏感, 不耐高温等问题, 至今未见大规模应用的报道^[5-7]。大量研究证实细菌同样能够分泌木质素降解所需的酶系, 断开木质素联苯结构, 代谢 Kraft 木质素片断, 是木质素降解过程的重要参与者^[8]。细菌降解木质素的能力虽然普遍弱于真菌, 但细菌具有适应性强, 繁殖迅速, 易于大规模应用等优点^[9]。国内外学者从白蚁肠道、牛胃、土壤和堆肥等材料中分离筛选出多种能够降解木质素的细菌, 主要为芽孢杆菌属、环丝菌属和假单胞菌属等^[7, 10], 有研究发现, 在堆肥高温期出现的微生物主要是有木质素降解能力的细菌^[11]。目前已有细菌用于造纸厂、印染厂废水处理的报道^[12-13], 人工筛选高效木质素降解细菌越来越受到人们的重视。

本研究以园林废弃物高温期堆肥为材料, 从中分离、筛选产木质素降解酶能力较强的细菌, 测定其酶活力及对园林废弃物的降解效果, 以期对细菌在木质素降解方面的应用提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

园林废弃物取自北京市香山公园, 木质素、纤维素和半纤维素含量分别为 16.07%、48.05%和 25.24%; 原材料风干、粉碎后分为 1~3 cm 和 1 mm 2 种粒径, 用于堆肥和固态发酵试验。

培养基: (1) BM 培养基: 琼脂 20.0 g, 葡萄糖 20.0 g, 酵母膏 10.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 自然。(2) PDA 培养基: 去皮马铃薯 200 g, 蔗糖 20.0 g, 琼脂 20.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 自然。(3) PDA-愈创木酚培养基: 每升 PDA 培养基中加入 0.4 mL 愈创木酚。(4) PDA-苯胺蓝培养基: 苯胺蓝配置为浓度 1%的母液, 每升 PDA 培养基中加入 10.0 mL 母液。(5) 液态产酶培养基: 葡萄糖 5.0 g, 酒石酸铵 0.2 g, K_2HPO_4 1.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, $CaCl_2$ 0.1 g, $CaSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.007 g, $MnSO_4$ 0.035 g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.006 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005 g, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.001 g, 吐温-80 1.0 g, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乳

酸缓冲(pH=4.5)100 mL, $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ VB₁ 溶液 100 mL, 蒸馏水 800 mL。

1.2 方法

粒径 1~3 cm 的园林废弃物 100 kg, 采用槽式(长 1.2 m、宽 0.8 m、高 0.8 m)好氧堆肥方式, 添加尿素调节 C/N 在 25~30 之间, 每 7 d 翻堆 1 次, 堆肥过程中保持含水量在 65%~75%之间。在堆肥高温期每日取样, 进行菌株的分离和筛选。

1.2.1 菌株的分离和筛选 分离: 高温期堆肥 1.0 g 装入盛有 99 mL 无菌水的塑料瓶, $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡 15 min, 取 1.0 mL 上清液进行梯度稀释, 得到一系列不同浓度的稀释液。分别取 10^{-5} 、 10^{-6} 和 10^{-7} 浓度梯度的稀释液 0.1 mL 在 BM 培养基上进行涂布, 将平板置于 35℃ 恒温培养箱中避光培养 48 h, 挑选单个菌落转接至 BM 斜面培养基, 编号, 35℃ 培养 3 d 后, 在 4℃ 冰箱中保存。

筛选: 待测菌株以点接法接种到 PDA-愈创木酚和 PDA-苯胺蓝平板, 每处理重复 3 次, 在 35℃ 恒温培养箱中避光培养 5 d, 观察记录显色圈和褪色圈的产生时间及直径大小, 以此定性判断 Lac、MnP 和 LiP 的产生情况^[14-15]。筛选所得菌株在 4℃ 冰箱中保存。

1.2.2 液态产酶试验 待测菌株接种在 BM 培养基, 35℃ 活化 24 h 后转接至液态产酶培养基, 液态培养 18 d, 每 2 d 取样一次, 以 $8 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 4℃ 离心 10 min, 上清液即为粗酶液, 用于测定 Lac、Mnp 和 LiP 活力。

Lac 活力测定: $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸-乙酸钠缓冲液 (pH 4.5) 9.3 mL, 25℃ 预热 10 min, 加入 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 愈创木酚 0.2 mL 和粗酶液 0.5 mL, 25℃ 条件下, 测定最初 3 min 内 465 nm 处 OD 值的变化。酶活力单位定义为每分钟 OD 值增加 0.01 所需的酶量。MnP 活力测定: $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乳酸钠缓冲液 (pH 4.5) 3.4 mL, $1.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $MnSO_4$ 溶液 0.1 mL, 粗酶液 0.4 mL, 37℃ 预热 10 min, 加入 $1.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 溶液 0.1 mL 启动反应, 测定最初 3 min 内 240 nm 处 OD 值的变化, 酶活力单位定义为每分钟 OD 值增加 0.1 所需的酶量。LiP 活力测定: $125 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 酒石酸 (pH 3.0) 1.0 mL, $0.16 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯胺蓝溶液 0.5 mL, 粗酶液 0.5 mL, 在 30℃ 条件下加入 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 溶液 0.5 mL 启动反应, 测定最初 3 min 内 610 nm 处 OD 值的变化, 酶活力单位定义为每分钟 OD 值增加 0.1 所需的酶量^[9, 11]。

1.2.3 固态发酵试验 500 mL 锥形瓶中装入粒径 1 mm 的园林废弃物粉 40.0 g 和 BM 液态培养基 25.0

mL, 混合均匀, 121℃灭菌 30 min 备用。待测菌株 35℃活化 18 h, 以 5%接种量加入锥形瓶, 每处理重复 3 次, 静态发酵 28 d, 每 7 d 取样 1 次。参照范式洗涤纤维分析法^[16-17]进行木质素、纤维素和半纤维素含量的测定。另以不加菌处理为对照, 在第 1 d 和 28 d 取样, 用于测定各组绝对含量的变化。

木质素(纤维素、半纤维素)降解率=(原材料含量-测定时含量)/原材料含量×100%

1.2.4 菌株的鉴定 菌株鉴定采用形态观察结合 16S rDNA 序列分析的方法。通过个体形状、菌落颜色、形状等参照《常见细菌系统鉴定手册》^[18]进行初步鉴定。纯化菌株送往上海美吉生物医药科技有限公司测序, 所得 16S rDNA 序列通过 BLAST 与 GenBank 数据库进行同源性比对, 利用 MEGA 7.0 构建系统发育树。

1.3 数据处理

试验数据使用 Microsoft Office 2013 和 SPSS 18.0 处理。处理内各组分含量用单因素方差分析, 平均值多重比较用最小显著差数法(LSD法)。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离和筛选

愈创木酚具有与木质素相似的化学结构, 与菌株产生的 Lac 反应可形成棕红色氧化圈, 能够较好地反映 Lac 的活性, 苯胺蓝能够较好地反映 MnP 和 LiP 的活性^[19-20]。从园林废弃物高温期堆肥中, 筛选出能够产生显色圈和褪色圈的细菌 23 株, 编号为 L-1—L-23, 其中显色圈和褪色圈直径较大的前 12 个菌株见表 1。

从表 1 可以看出, 不同菌株显色圈和褪色圈出现时间及直径大小存在差异。根据显色圈出现时间及直径大小判断 L-4、L-9、L-12、L-17 和 L-22 有较强的产 Lac 能力; 根据褪色圈出现时间及直径大小判断 L-9、L-12、L-13、L-17 及 L-19 有较强的产 MnP 和 LiP 能力。综合考虑愈创木酚和苯胺蓝平板的试验结果, 选取 L-9、L-12 和 L-17 进行液态产酶和固态发酵试验。

表 1 不同菌株在选择培养基的显色和褪色结果

Table 1 The coloring and decoloring results of different strains on selective mediums

菌株 Strain	愈创木酚显色时间 / d Coloring time of guaiacol					苯胺蓝褪色时间 / d Decoloring time of aniline blue				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
L-1	-	+	++	++	+++	-	+	++	+++	+++
L-4	+	++	+++	++++	++++	+	++	++	+++	+++
L-5	-	+	++	++	+++	+	++	++	+++	++++
L-8	+	++	++	+++	+++	+	++	++	+++	+++
L-9	+	++	+++	++++	++++	+	++	+++	++++	++++
L-10	-	+	+	++	+++	+	++	+++	+++	++++
L-12	+	++	+++	++++	++++	+	++	+++	++++	++++
L-13	-	+	++	++	+++	+	++	+++	++++	++++
L-14	-	+	+	++	+++	-	+	++	++	+++
L-17	+	++	+++	++++	++++	+	++	+++	++++	++++
L-19	+	+	++	++	+++	+	++	+++	++++	++++
L-22	+	++	+++	++++	++++	+	++	++	+++	+++

注:“-”表示不显色(或不褪色);“+”、“++”、“+++”、“++++”表示显色(或褪色)圈逐渐增大。

Note:“-” means no coloring (or decoloring) zone; “+”, “++”, “+++” and “++++” mean bigger coloring (or decoloring) zone gradually.

2.2 菌株产木质素降解酶活力变化

对 3 个菌株 L-9、L-12 和 L-17 进行液态产酶试验, 测定发酵液中 Lac、MnP 和 LiP 活力变化(图 1—图 3)。

2.2.1 Lac 活力变化 Lac 是一种广泛存在于微生物中的多酚氧化酶, 可催化多种酚类和芳香胺类化合物的氧化, 降解多环芳烃^[21]。从图 1 可以看出, 随着培养时间的延长, L-9 和 L-12 的 Lac 活力呈现

出快速升高后显著下降的趋势; L-17 的 Lac 活力一直保持在较低水平, 最高仅为 2.2 U·mL⁻¹。在第 8 天, L-9 和 L-12 的 Lac 活力达到顶峰, 分别为 8.61 和 12.26 U·mL⁻¹, 是 L-17 最高值的 3.9 倍和 5.6 倍。第 8 天后, L-9 和 L-12 的 Lac 活力迅速下降, 在第 18 天降低至与 L-17 相近的水平。

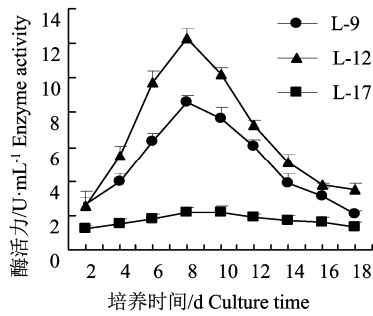


图 1 3 个菌株培养过程中漆酶的活力变化

Figure 1 The changes of laccase activity of different strains during the cultivation process

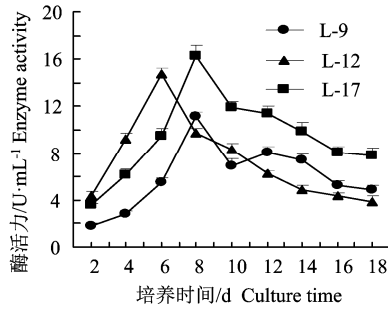


图 2 3 个菌株培养过程中锰过氧化物酶的活力变化

Figure 2 The changes of manganese peroxidase activity of different strains during the cultivation process

2.2.2 MnP 活力变化 MnP 是一种含铁血红素的糖基化过氧化物酶, 能够氧化分解芳香环多聚体, 被认为是木质素降解的关键酶之一^[20]。由图 2 可知, 3 个菌株都具有较强的分泌 MnP 的能力, 自第 2 天

起, 菌株的 MnP 活力迅速提高, 在第 6 天, L-12 的 MnP 活力达到顶峰, 为 $14.75 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$; 第 8 天, L-9 和 L-17 的 MnP 活力达到顶峰, 分别为 11.16 和 $16.24 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$; 之后各菌株的酶活力呈下降趋势并逐渐稳定。

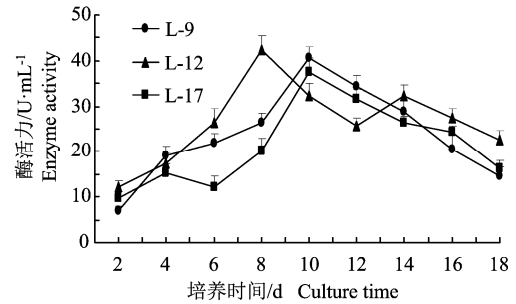


图 3 3 个菌株培养过程中木质素过氧化物酶的活力变化

Figure 3 The changes of lignin peroxidase activity of different strains during the cultivation process

2.2.3 LiP 活力变化 LiP 能够从酚类和非酚类芳香化合物的苯环上夺取一个电子, 将其氧化成自由基, 继而以链式反应产生许多不同的自由基, 达到降解有机物的目的^[9]。从图 3 可以看出, L-12 在第 8 天和第 14 天出现两个酶活力高峰, LiP 活力分别达到 $42.41 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $32.41 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$; L-9 和 L-17 的 LiP 活力在第 10 天达到顶峰, 分别为 $40.48 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $37.52 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。峰值过后, 各菌株的酶活力呈逐渐下降的趋势。

表 2 不同菌株对园林废弃物的降解

Table 2 Degradation of garden waste by different strains

菌株 Strain	时间/d Time	木质素 Lignin		纤维素 Cellulose		半纤维素 Hemicellulose	
		含量/% Content	降解率/% Degradation rate	含量/% Content	降解率/% Degradation rate	含量/% Content	降解率/% Degradation rate
L-9	7	16.13±0.75 ^a	-0.37	44.26±0.16 ^a	7.89	23.74±0.25 ^a	5.94
	14	15.51±0.31 ^b	3.48	40.75±0.13 ^b	15.19	22.35±0.89 ^a	11.45
	21	14.89±0.44 ^c	7.34	37.58±0.27 ^c	21.79	20.17±0.61 ^b	20.09
	28	13.68±0.86 ^c	14.88	35.73±1.05 ^c	25.64	18.12±0.32 ^c	28.21
L-12	7	16.05±0.20 ^a	0.12	44.28±0.43 ^a	7.85	22.83±0.81 ^a	9.55
	14	15.16±0.47 ^a	5.66	40.56±0.28 ^b	15.59	20.31±0.94 ^b	19.53
	21	13.97±0.53 ^b	13.07	37.22±0.12 ^c	22.54	17.97±0.31 ^c	28.80
	28	12.84±0.32 ^c	20.10	34.37±0.67 ^d	28.47	15.48±0.29 ^d	38.67
L-17	7	16.17±0.37 ^a	-0.62	43.58±1.18 ^a	9.30	21.99±0.75 ^a	12.88
	14	15.31±0.24 ^b	4.73	38.71±0.59 ^b	19.44	20.72±0.63 ^a	17.91
	21	14.67±0.34 ^c	8.71	35.64±0.74 ^c	25.83	17.25±0.36 ^b	31.66
	28	14.26±0.56 ^d	11.25	33.62±0.82 ^c	30.03	14.73±0.17 ^c	41.64

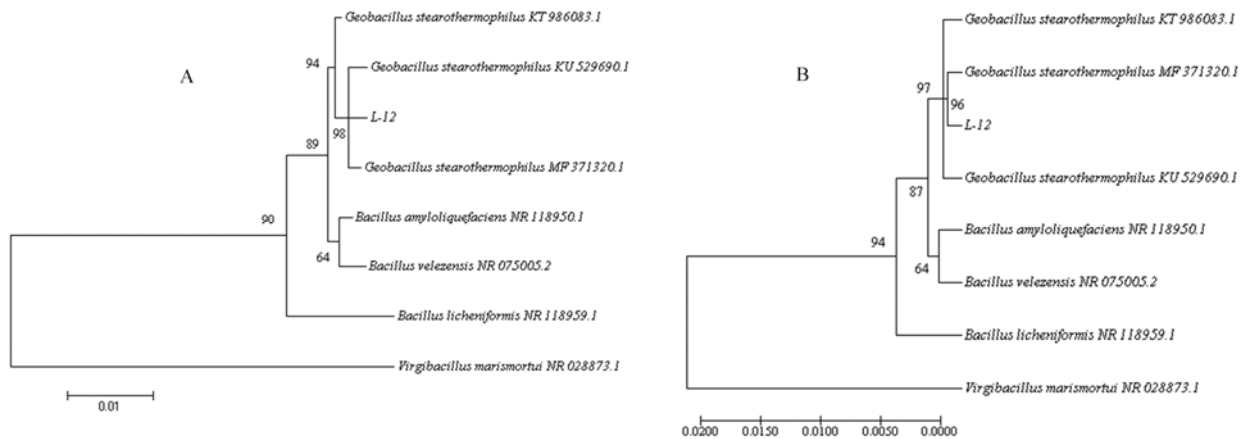
注: 同列数据后不同小写英文字母表示处理内差异达 5% 显著。

Note: Values followed by different letters in the same column are significant within treatments at the 5% level.

2.3 菌株对园林废弃物的降解

园林废弃物中木质素、纤维素和半纤维素初始含量分别为 16.07%、48.05%和 25.24%。固态发酵 28 d 后, 对照组木质素、纤维素和半纤维素含量降低至 15.75%、46.13%和 23.98%, 降解率分别为 2%、4%和 5%。接菌处理在不同发酵时间各组分含量及降解率见表 2。从表 2 可以看到, L-9 和 L-17 的木质素降解率在第 7 天出现负增长, 原因是纤维素和半纤维素的结构与木质素相比更加简单, 在前期被菌株较快降解, 园林废弃物总质量减少的速度大于木质素降解的速度, 进而导致木质素相对含量的

上升。发酵 28 d 后, L-9、L-12 和 L-17 的木质素降解率分别为 14.88%、20.1%和 11.25%, 与国内学者报道地衣芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌对稻草、麦秆等材料最高 17.03%的木质素降解率相比^[22-23], L-12 对木质素的降解能力更强。L-12 对木质素的降解主要发生在 14~28 d, 降解率达到 14.44%, 而液态培养过程中酶活力的高峰期为 6~8 d, 木质素降解的高峰期与酶活高峰期不一致的原因可能是环境改变影响细菌的生长繁殖, 进而影响木质素降解酶的产生^[19]。



A, B 分别为基于 Neighbor-Joining 法和 UPGMA 法构建的系统发育树

A, B is phylogenetic tree based on Neighbor-Joining method and the UPGMA method respectively

Geobacillus stearothermophilus 为嗜热嗜脂肪地芽孢杆菌; *Bacillus amyloliquefaciens* 为解淀粉芽孢杆菌; *Bacillus velezensis* 为贝莱斯芽孢杆菌; *Bacillus licheniformis* 为地衣芽孢杆菌; *Virgibacillus marismortui* 为枝芽孢菌

图 4 木质素降解菌 L-12 的系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of 16S rDNA sequences of the lignin degrading strain L-12

3 个菌株对纤维素和半纤维素同样具有一定的降解能力, 固态发酵 28 d 后, L-9、L-12 和 L-17 的纤维素降解率分别为 25.64%、28.47%和 30.03%, 对半纤维素的降解率均在 28%以上。

2.4 菌株的鉴定

2.4.1 菌株的形态特征 综合液态产酶和固态发酵试验, 选取 Lac 和 LiP 活力最高, 木质素降解率最高的菌株 L-12 进行种属鉴定。菌体形态特征: L-12 经染色后在显微镜下观察, 革兰氏染色呈阳性, 菌体为杆状, 长约 3.4 μm , 宽约 0.7 μm , 中生到端生椭圆形芽孢, 芽孢囊膨大; 菌落特征: 在 BM 培养基上 48 h 后的菌落为米黄色, 圆形, 表面粗糙。

2.4.2 菌株的 16S rDNA 序列分析及系统发育树 利用细菌通用引物进行 PCR 扩增, 获得菌株的 16S rDNA 序列, 将序列片段在 GenBank 数据库中通过 BLAST 程序进行比对, 分别采用 Neighbor-joining 法和 UPGMA 法, 利用 MEGA 7.0 绘制菌株的系统

发育树 (图 4)。两种方法构建的系统发育树结果基本一致, L-12 与嗜热嗜脂肪地芽孢杆菌 (*Geobacillus stearothermophilus*) 序列的同源性最高, 分别为 98% 和 96%, 结合其形态特征, 将菌株 L-12 鉴定为嗜热嗜脂肪地芽孢杆菌。

3 讨论与结论

利用微生物降解木质纤维素材料已成为生物质资源高效利用的研究热点, 与真菌相比, 细菌具有来源广泛、生长迅速和适应能力强等优点, 越来越受到国内学者的关注。王毅等^[22], 燕红和杨谦^[23]利用枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌对稻草木质素的降解率分别为 9.5%和 17.03%, 陈莹等^[24]从高温期堆肥中筛选出一株链霉菌, 以 10%接种量发酵 45 d 后, 对小叶榕枝条的木质素和半纤维素降解率分别为 21.63%和 26.60%, 几乎不降解纤维素。本试验筛选所得菌株 L-9、L-12 和 L-17 以 5%接种量发酵

28 d 后, 对园林废弃物木质素的降解率分别为 14.88%、20.1%和 11.25%, 3 个菌株的木质素降解能力均高于枯草芽孢杆菌, 与地衣芽孢杆菌和链霉菌相比, 菌株 L-12 对木质素的降解率更高, 所需周期更短。固态发酵过程中, 菌株 L-12 对木质素的降解主要发生在 14~28 d, 降解幅度达到 14.44%, 晚于液态培养过程中木质素降解酶活力的高峰期。李红亚等^[9]从牛粪中筛选出一株解淀粉芽孢杆菌 MN-8, 对玉米秸秆的降解集中在 6~8 d 和 10~12 d 2 个阶段, 与 MnP 及 LiP 的产酶高峰期对应, 该研究结果与本研究存在差异, 且微生物来源也不一致。综上所述, 菌株 L-12 对木质素表现出较强的降解作用, 为细菌在园林废弃物降解方面的应用提供了一定的理论基础, 但菌株产酶条件的优化及复合菌剂的制作仍需进一步研究。

从园林废弃物高温期堆肥中, 分离、筛选出 3 株木质素降解酶活力较强的细菌 L-9、L-12 和 L-17。

液态产酶和固态发酵试验结果表明, 菌株 L-12 的 Lac、LiP 活力较高, 分别达到 $12.26 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $42.41 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 园林废弃物经 L-12 处理 28 d 后, 木质素的降解率达到 20.1%。

通过形态观察和 16S rDNA 序列分析, 将 L-12 鉴定为嗜热嗜脂肪地芽孢杆菌 (*Geobacillus stearothermophilus*), 可用于探究细菌降解木质素原理和工业化生产木质素降解菌剂。

参考文献:

- [1] 魏乐, 李素艳, 李燕, 等. 园林废弃物堆肥替代泥炭用于天竺葵和金盏菊栽培[J]. 浙江农林大学学报, 2016, 33(5): 849-854
- [2] 闫智培, 李纪红, 李十中, 等. 木质素对木质纤维素降解性能的影响[J]. 农业工程学报, 2014, 30(19): 265-272.
- [3] RYCKEBOER J, MERGAERT J, VAES K, et al. A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes[J]. Ann Microbiol, 2003, 53(4): 349-410.
- [4] 付春霞, 付云霞, 邱忠平, 等. 木质素生物降解的研究进展[J]. 浙江农业学报, 2014, 26(4): 1139-1144.
- [5] HATAKKA A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation[J]. FEMS Microbiol Rev, 1994, 13(2/3): 125-135.
- [6] SÁNCHEZ C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi [J]. Biotechnol Adv, 2009, 27(2): 185-194.
- [7] 王垚, 韩燕峰, 梁宗琦. 两株戴氏霉对水稻秸秆的降解及产酶研究[J]. 菌物学报, 2017, 36(5): 598-603.
- [8] 谢长校, 孙建中, 李成林, 等. 细菌降解木质素的研究进展[J]. 微生物学通报, 2015, 42 (6): 1122-1132.
- [9] 李红亚, 李术娜, 王树香, 等. 产芽孢木质素降解菌 MN-8 的筛选及其对木质素的降解[J]. 中国农业科学, 2014, 47 (2): 324-333.
- [10] BUGG T D, AHMAD M, HARDIMAN E M, et al. The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation[J]. Curr Opin Biotech, 2011, 22(3): 394-400.
- [11] STROM P F. Identification of thermophilic bacteria in solid-waste composting[J]. Appl Environ Microb, 1985, 50(4): 906-913.
- [12] MENDES S, FARINHA A, RAMOS C G, et al. Synergistic action of azoreductase and laccase leads to maximal decolourization and detoxification of model dye- containing wastewaters[J]. Bioresource Technol, 2011, 102(21): 9852-9859.
- [13] LONČAR N, BOŽIĆ N, LOPEZ-SANTIN J, et al. Bacillus amyloliquefaciens laccase : From soil bacteria to recombinant enzyme for wastewater decolorization[J]. Bioresource Technol, 2013, 147: 177-183.
- [14] 王宜磊, 朱陶, 邓振旭. 愈创木酚法快速筛选漆酶产生菌[J]. 生物技术, 2007, 17(2): 40-42.
- [15] 马英辉, 李利军, 卢美欢, 等. 苯胺蓝脱色放线菌的分离及脱除特性研究[J]. 环境科学学报, 2016, 36(12): 4364-4366.
- [16] 苏同福, 高玉珍, 刘霞, 等. 木质素的测定方法研究进展[J]. 河南农业大学学报, 2007, 41(3): 356-362.
- [17] VAN SOEST P J, ROBERTSON J B, LEWIS B A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition[J]. J Dairy Sci, 1991, 74(10): 3583-3597.
- [18] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 349-388.
- [19] 文少白, 李勤奋, 侯宪文, 等. 微生物降解纤维素的研究概况[J]. 中国农学通报, 2010, 26(1): 231-236.
- [20] 杨晔, 李国辉, 高剑平, 等. 产锰过氧化物酶细菌的筛选及其对孔雀石绿脱色的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(11): 1180-1183.
- [21] 周稳, 管政兵, 蔡宇杰, 等. 芽孢杆菌漆酶的研究进展[J]. 微生物学通报, 2015, 42(7): 1372-1383.
- [22] 王毅, 刘云国, 习兴梅, 等. 枯草芽孢杆菌降解木质纤维素能力及产酶研究[J]. 微生物学杂志, 2008, 28(4): 1-6.
- [23] 燕红, 杨谦. 地衣芽孢杆菌对麦麸降解作用的研究[J]. 林产化学与工业, 2007, 27(4): 98-102.
- [24] 陈莹, 张俊涛, 阮琳. 园林废弃物堆肥中木质素降解菌的鉴定及其降解能力研究[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(6): 94-98.