

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.

# 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

陈莹, 张俊涛, 阮琳

(广州市园林科学研究所, 广东 广州 510405)

**摘要:**【目的】筛选出具有木质素降解功能的菌株,用于园林废弃物降解.【方法】通过对从园林废弃物高温好氧发酵堆体中筛选得到的菌株进行分子生物学鉴定,得出目标菌,并将该菌接种在灭菌的小叶榕枝条上,测定小叶榕枝条的木质素、纤维素和半纤维素含量.【结果和结论】结果表明,目标菌为一株链霉菌 *Streptomyces* sp.;在小叶榕枝条上接种不同用量(5%、10%、15%)的该菌一级发酵液,培养 45 d 后,与对照相比,木质素质量分数可降低 22.48%,半纤维素质量分数可降低 26.60%.

**关键词:**园林废弃物;堆肥;木质素降解菌;DNA 鉴定  
**中图分类号:**S182                      **文献标志码:**A                      **文章编号:**1001-411X(2014)06-0094-05

## Identification and degradation ability of lignin degradation isoaltes from landscaping waste compost

CHEN Ying, ZHANG Juntao, RUAN Lin

(Guangzhou Institute of Landscape Gardening, Guangzhou 510405, China)

**Abstract:**【Objective】A strain with the ability of lignin degradation was screened from landscaping waste compost. 【Method】The obtained isolates were identified by molecular identification; the lignin degradation isolates were inoculated into sterilized *Ficus microcarpa* var. *pusillifolia* wattle to study the degradation ability, including analyses of the content of lignin, cellulose and hemicellulose of the wattle respectively. 【Result and conclusion】The results showed that the lignin degradation isolates were identified as *Streptomyces* sp. Compared with non-inoculated treatments, samples inoculated with different dosages (5%, 10%, 15%) of the bacteria fermentation liquid into *Ficus microcarpa* broken branches, respectively, the lignin content could be reduced by 22.48%, hemicellulose content could be reduced by 26.60% after 45 d incubation.

**Key words:**landscaping waste; compost; lignin degradation strain; DNA identification

近年来,全国各地城市绿化发展迅速,2012 年, 35.3%<sup>[1]</sup>,而且呈逐年增加的趋势.但随之也产生了我国城市建成区绿化覆盖率达 39.2%,绿地率达 大量的园林废弃物,包括枯枝落叶、乔木灌木修剪

收稿日期:2013-09-02      优先出版时间:2014-10-03  
优先出版网址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20141003.1116.006.html>  
作者简介:陈莹(1983—),女,助理研究员,硕士,E-mail:fanchuanyu2006@163.com;通信作者:张俊涛(1981—),男,助理研究员,硕士,E-mail:zjt811027@sohu.com  
基金项目:广东省科技计划项目(2011A030600002,2012A030600009);广州市科技和信息化局民生科技重大专项(201300000128)

物、草坪修剪物、残花等。利用传统的焚烧和填埋处理手段处理此类有机质含量高、营养元素齐全、污染成分少的废弃物资源,不仅会造成气体或水体污染,也会造成资源浪费,不符合循环经济和建设节约型社会的思路<sup>[2-5]</sup>。堆肥资源化是利用物理、化学及生物技术,通过高温好氧发酵降解园林废弃物进而生产土壤改良剂、营养基质、有机肥等产品,实现园林废弃物在城市绿化生态系统内的循环利用,并具有广阔应用前景的处置方式<sup>[6-8]</sup>。然而,园林废弃物尤其是木本植物残体的结构复杂,木质素包围着纤维素,两者结合形成极难降解的“木质纤维素”,难以被大多数微生物直接作为能源物质转化,严重限制了园林废弃物降解的效率<sup>[9-10]</sup>。因此,破坏木质纤维素结构是加快园林废弃物降解、提高其资源化利用的前提条件,目前的方法主要包括物理法、化学法和生物法<sup>[11-12]</sup>,其中,生物法以其降解率高、能耗低、环保等优点而备受推崇。

自然界参与降解木质素的微生物有真菌、放线菌和细菌。目前,国际上以真菌的研究居多,如白腐真菌<sup>[13-16]</sup>。我国在木质素降解微生物方面的研究起步较晚,具有较强木质素降解能力的菌种匮乏,而且目前研究最多的木质素降解菌,如白腐菌中的黄孢原毛平革菌 *Phanerochaete chrysosporium* 等,是低温木质素降解菌,环境的改变会影响其木质素降解率<sup>[10]</sup>,因此,筛选适于园林废弃物堆肥的微生物菌株具有重要意义。本研究从园林废弃物高温好氧发酵堆体中分离出菌株并进行分子生物学鉴定,得到对木质素具有降解能力的菌株,为培育适于园林废弃物高温好氧堆肥的木质素降解菌提供科学依据,也为提高园林废弃物堆肥资源化效率提供一条可行的途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 试验菌株 由广州市绿风生物技术有限公司园林废弃物高温好氧发酵堆体中筛选得到。

1.1.2 培养基 LB培养基:酵母浸出物5.0 g,胰蛋白胨10.0 g,氯化钠10.0 g,琼脂18~20 g,蒸馏水1 000 mL。

高氏一号培养基:可溶性淀粉20 g,氯化钠0.5 g,硝酸钾1.0 g,磷酸氢二钾0.5 g,硫酸镁0.5 g,硫酸亚铁0.01 g,琼脂18~20 g,蒸馏水1 000 mL。

虎红培养基:胰蛋白胨5.0 g,磷酸二氢钾1.0 g,硫酸镁0.5 g,葡萄糖10.0 g,孟加拉红(虎红)0.033

g,氯霉素0.1 g,琼脂18~20 g,蒸馏水1 000 mL。

1.1.3 小叶榕碎枝条 取自广州市绿风生物技术有限公司,粒径 $\leq 3$  cm,含水量42.32%。

### 1.2 试验方法

1.2.1 菌株的采集、分离、纯化 于园林废弃物高温好氧发酵堆体5个不同点位取堆肥样品,并将其混匀。称取样品10.0 g,根据逐级稀释法<sup>[17]</sup>得 $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-7}$ 系列稀释度的菌悬液。根据LB培养基、高氏一号培养基和虎红培养基配方依次配制成细菌培养基(简称LB)、放线菌培养基(简称G)和真菌培养基(简称H)。将 $1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-6}$ 稀释度的菌悬液涂平板于LB培养基表面,每种稀释度重复3次;将 $1 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^{-5}$ 稀释度的菌悬液涂平板于G培养基表面,每种稀释度重复3次;将 $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-3}$ 稀释度的菌悬液涂平板于H培养基表面,每种稀释度重复3次;每种培养基以涂无菌水为对照(CK),各重复3次。将 $1 \times 10^{-6}$ 稀释度的LB培养基、 $1 \times 10^{-5}$ 稀释度的G培养基和 $1 \times 10^{-3}$ 稀释度的H培养基上生长的菌,根据外观形态用划线法进行分离、纯化(培养温度为50℃)。

1.2.2 菌株的鉴定 将分离纯化得到的11株菌株(编号分别为H1、H2、G1、G2、LB1~LB7),经过DNA序列分析结果进行鉴定。基因组DNA的提取参考江晓等<sup>[18]</sup>的方法。菌株LB1~LB5的DNA采用细菌的16S rRNA通用引物PCR扩增细菌16S rDNA,其引物序列为:27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'); 1492R(5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')。菌株H1、H2、G1、G2、LB6和LB7的DNA采用真菌的ITS通用引物PCR扩增真菌,其引物序列为:27F(ITS4:TC-CTCCGCTTATTGATATGC); ITS5:GGAAGTAAAAGT-CGTAACAAGG)。DNA序列测定由上海英骏生物技术有限公司进行。

1.2.3 木质素降解能力测定 在无菌条件下,用接种环挑成熟的木质素降解菌,将其接入装有高氏一号培养液的三角瓶中,置旋转式摇床(30℃,160 r/min),培养5~7 d,即得一级发酵液。

称取10.00 g的小叶榕碎枝条于培养皿中,在160℃的烘箱内灭菌2.5 h。在无菌条件下,向装有小叶榕碎枝条的培养皿中分别加入5 mL无菌水润湿,放置过夜。本试验设置4个处理,其中:T1、T2、T3处理分别为接种木质素降解菌一级发酵液5 mL(接菌量为5%)、10 mL(接菌量为10%),和15 mL(接菌量为15%),以添加灭菌的高氏一号营养液10 mL为对照(CK),每个处理重复3次。于30℃的培养箱中

培养,45 d 后,取样进行纤维素、半纤维素和木质素含量测定<sup>[19]</sup>.

1.3 数据处理

试验数据用 SAS 软件进行分析.

2 结果与分析

2.1 菌株的采集、分离和纯化

经过菌种的采集、分离和纯化,从园林废弃物高温好氧发酵堆体中筛选得到 8 株菌株,编号分别为 H1、LB1 ~ LB7.

2.2 菌株的序列测定

菌株 LB1 ~ LB5 的 DNA 采用 16S rRNA 通用引

物 PCR 扩增;菌株 H1、LB6 和 LB7 的 DNA 采用真菌的 ITS 通用引物 PCR 扩增,分别进行 DNA 电泳测序,扩增片段进行纯化, DNA 片段大小见表 1;16S rDNA 电泳图和 PCR 扩增电泳图以菌株 LB4 为例(图 1);PCR 产物经过上海英骏生物技术有限公司测序,分别将各菌种的测序结果在国际互联网(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)基因库(Gene bank)上用 BLAST 对菌株序列进行搜索,其中菌株 LB3 相似性为 93%,不足以鉴定到属名,为未知名菌;菌株 LB7 与编号 AM930339.1 和 JF227580.1 的菌株相似度最高,相似性为 99%,但这两株菌株均未知属名,故菌株 LB7 也为未知名菌;其余菌株比对结果详见表 1.

表 1 基因库中序列比对结果  
Tab.1 The DNA sequence alignment from GenBank

| 菌株<br>编号 | DNA 片段<br>大小/bp | 基因库<br>编号  | 描述                                                                       | DNA 相似性/% |
|----------|-----------------|------------|--------------------------------------------------------------------------|-----------|
| LB1      | 1 510           | AB039330.1 | <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. M1-3 gene for 16S rRNA                      | 99        |
|          |                 | AB039329   | <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. M1-2gene for 16S rRNA                       | 99        |
| LB2      | 1 507           | CP001836.1 | <i>Dickeya dadantii</i> Ech586, complete qenome                          | 98        |
| LB3      | 1 505           | FN436077.1 | Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone HAW-R60-B-727d         | 93        |
| LB4      | 1 493           | AF345862.1 | <i>Streptomyces</i> sp. KACC 20159 ribosomal                             | 98        |
| LB5      | 1 519           | AB066342.1 | <i>Bacillus</i> sp. TAT105 gene for 16S rRNA, partial sequence           | 99        |
|          |                 | AB066341.1 | <i>Bacillus</i> sp. TAT112 gene for 16S rRNA, partial sequence           | 99        |
| LB6      | 570             | FN868470.1 | <i>Fusarium proliferatum</i> qenomic DNA containing ITS1, 5.8S rRNA gene | 99        |
| LB7      | 1 526           | AM930339.1 | Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone SMQ103                 | 99        |
|          |                 | JF227580.1 | Uncultured bacterium clone ncd2598b04c1 16S ribosomal RNA gene           | 99        |
| H1       | 621             | HQ631021.1 | <i>Asperqillus</i> sp. TMS-2011 voucher BGd1p19-4 18S ribosomal RNA      | 100       |

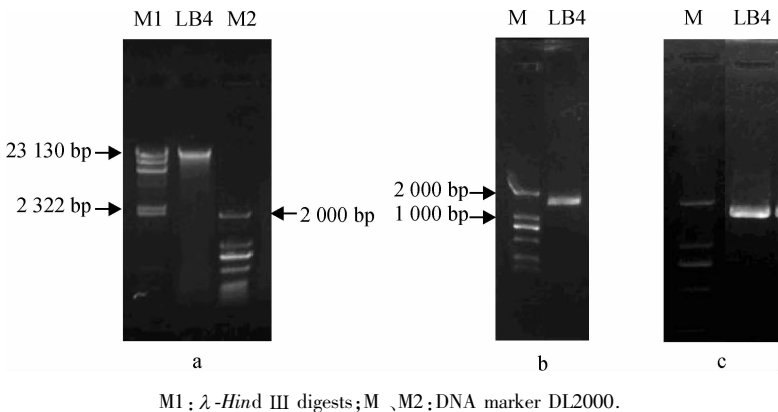


图 1 菌株 LB4 的 16S rDNA 电泳图(a)、PCR 扩增电泳图(b)和扩增片段的克隆电泳图(c)

Fig.1 16S rDNA electrophoragram (a), the electrophoresis results of PCR segment(b) and the electrophoresis of the cloned fragment (c) on strain LB4

通过 DNA 序列比对,各菌株的鉴定结果见表 2.大量研究表明<sup>[20-33]</sup>:菌株 LB1 ~ LB7 和 H1 分别具有不同功能,仅菌株 LB4 具有降解木质素、纤维素、废水、

原油等的能力<sup>[24-27]</sup>,故在鉴定结果中选择菌株 LB4(链霉菌 *Streptomyces* sp.)作为目标菌,对其木质纤维素降解能力进行测定,其菌落形态见图 2,显微镜图见图 3.

表2 菌株的DNA序列鉴定结果

Tab.2 Results of 16S rDNA sequence analysis of the strains

| 菌株编号 | 拉丁名                          | 中文名                                                 | 所属类别 |
|------|------------------------------|-----------------------------------------------------|------|
| LB1  | <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. | 假单胞杆菌                                               | 细菌   |
| LB2  | <i>Dickeya dadantii</i>      | 原属于欧氏杆菌属 <i>Erwinia</i> 细菌,后来新立了一个属为 <i>Dickeya</i> | 细菌   |
| LB4  | <i>Streptomyces</i> sp.      | 链霉菌属                                                | 放线菌  |
| LB5  | <i>Bacillus</i> sp.          | 芽胞杆菌                                                | 细菌   |
| LB6  | <i>Fusarium</i> sp.          | 镰刀菌                                                 | 真菌   |
| H1   | <i>Aspergillus fumigatus</i> | 烟曲霉                                                 | 真菌   |

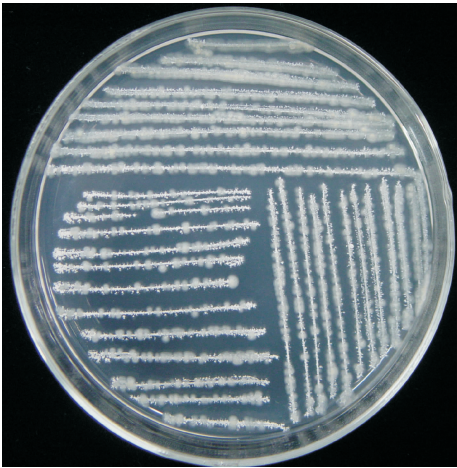


图2 LB4菌株的平板菌落

Fig.2 The flat colonies of strain LB4

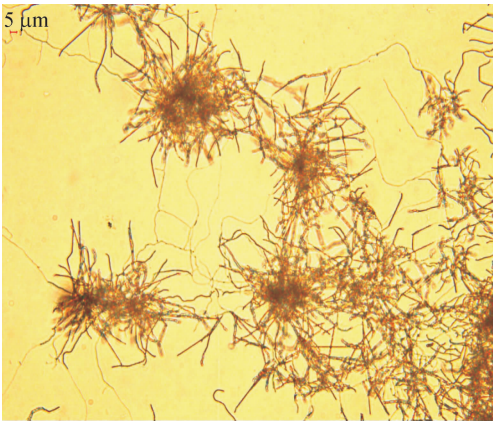


图3 LB4菌株的显微形态(标尺=5 μm)

Fig.3 The microphone of strain LB4 (scale bar =5 μm)

2.3 木质素降解能力测定

接种菌株LB4培养45 d后,小叶榕枝条中的木质素和半纤维素含量降低(表3). 菌株LB4接种量不同,小叶榕枝条中的木质素和半纤维素含量降幅不同. 与对照相比,接种量5%、10%、15%的3个处理木质素含量降幅依次为3.79%、21.63%和22.48%,半纤维素含量降幅依次为23.55%、26.60%和22.56%. 总体上,菌株LB4接种量为10%和15%时,木质素含量和半纤维素含量降幅均达显著性水平,但10%和15%的接种量间并无显著

差异,综合性价比等因素考虑,菌株LB4用于降解园林废弃物的适宜用量为10%.

表3 LB4菌株各处理样品中木质素、半纤维素、纤维素含量<sup>1)</sup>

Tab.3 The determinated contents of lignin, cellulose and hemi-cellulose in each treatment of strain LB4

| 处理 | 接种量/% | w/%           |               |               |
|----|-------|---------------|---------------|---------------|
|    |       | 木质素           | 半纤维素          | 纤维素           |
| CK | 0     | 17.66 ± 0.62a | 23.27 ± 0.06a | 54.95 ± 1.82a |
| T1 | 5     | 16.99 ± 1.51a | 17.79 ± 0.67b | 52.64 ± 0.06a |
| T2 | 10    | 13.84 ± 0.64b | 17.08 ± 0.50b | 55.27 ± 2.32a |
| T3 | 15    | 13.69 ± 0.28b | 18.02 ± 1.07b | 56.67 ± 1.15a |

1) 表中数据为3次重复的平均值±标准误,同列数据后凡具有一个相同字母者表示差异不显著( $P>0.05$ , Duncan's法).

3 讨论与结论

园林废弃物高温好氧堆肥是实现其循环利用的理想途径,而利用生物方法加速园林废弃物降解又是提高园林废弃物资源化效率的有效方法<sup>[34]</sup>. 目前,国际上关于木质素降解菌的研究以真菌居多<sup>[35-37]</sup>,如白腐真菌,但此类菌属低温木质素降解菌,高温的园林废弃物堆体环境会影响其木质素降解率. 本研究应用原位筛选从园林废弃物高温好氧堆体中提取出具有木质素降解功能的菌株,通过分子学鉴定,该菌为链霉菌 *Streptomyces* sp., 不仅开拓了筛选高温木质素降解菌的途径,而且将木质素降解菌的研究对象拓展至放线菌<sup>[38]</sup>. 木质素降解能力测定试验也表明该菌可显著降低小叶榕枝条木质素和半纤维素含量,当该菌发酵液接种量达到10%时,经45 d培养,小叶榕枝条中木质素含量降幅达21.63%,半纤维素含量降幅达26.60%.

本研究通过试验证实了从园林废弃物高温好氧堆体中提取的链霉菌 *Streptomyces* sp. 具有一定的木质素降解能力,但该菌的特性、降解机理和接种量等都有待进一步研究.

参考文献:

[1] 全国绿化委员会办公室. 2012年中国国土绿化状况公报  
<http://xuebao.scau.edu.cn>

- [N]. 人民日报, 2013-03-12[2013-03-12]. [http://news.xinhuanet.com/fortune/2013-03/12/c\\_124446087.htm](http://news.xinhuanet.com/fortune/2013-03/12/c_124446087.htm).
- [2] 孙克君, 阮琳, 林鸿辉. 园林有机废弃物堆肥处理技术及堆肥产品的应用[J]. 中国园林, 2009(4): 12-14.
- [3] 白婧, 沈洪艳, 董世魁, 等. 高速公路绿化废弃物的生态利用与处理[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(34): 19488-19490.
- [4] 田赞, 王海燕, 孙向阳, 等. 添加竹酢液和菌剂对园林废弃物堆肥理化性质的影响[J]. 农业工程学报, 2010, 26(8): 272-278.
- [5] 杨曾奖, 曾杰, 徐大平, 等. 森林枯枝落叶分解及其影响因素[J]. 生态环境, 2007, 16(2): 649-654.
- [6] 张俊涛, 陈莹, 叶少萍. 园林绿化废弃物堆肥资源化技术探讨[J]. 园林, 2012(2): 18-21.
- [7] 刘聪, 叶少萍, 陈莹, 等. 园林废弃物堆肥对宫粉紫荆袋苗生长的影响[J]. 广东园林, 2012(4): 18-20.
- [8] 张强, 孙向阳, 任忠秀, 等. 园林绿化废弃物堆肥用作花卉栽培基质的效果评价[J]. 中南林业科技大学学报, 2011, 31(9): 7-13.
- [9] 杨金水, 刘葳, 倪晋仁. 木质素降解菌的分离鉴定及木素过氧化物酶的纯化[J]. 环境科学, 2006, 27(5): 981-985.
- [10] 晋果果, 翁海波, 李萍萍, 等. 高温木质素降解菌 *Geobacillus caldoolysilyticus* J16 的筛选及其产酶发酵性质研究[J]. 中国农学通报, 2011, 27(8): 334-339.
- [11] 张荫雷, 李莉, 戴天纭, 等. 预处理方法对玉米秸秆利用的影响[J]. 纤维素材料与科学, 2009, 17(3): 35-38.
- [12] SUN Kejun, ZHANG Juntao, CHEN Ying, et al. Accelerating the degradation of green plant waste with chemical decomposition agents[J]. J Environ Manage, 2011(92): 2708-2713.
- [13] 刘庆玉, 陈志丽, 张敏. 木质素降解菌的筛选[J]. 太阳能学报, 2010, 31(2): 269-272.
- [14] 梁军锋, 张洪生, 张克强, 等. 木质素降解菌的筛选及对秸秆的降解研究[J]. 华北农学报, 2009, 24(5): 206-209.
- [15] 张宇, 许敬亮, 李东, 等. 木质素降解菌 *Ceriporiopsis subvermispora* 的研究进展[J]. 武汉理工大学学报, 2009, 31(10): 104-108.
- [16] STEPANOVA E V, KOROLEVA O V. Fungal decomposition of oat straw during liquid and solid-state fermentation[J]. Appl Biochem Microbiol, 2003, 39(1): 65-74.
- [17] 农业部. GB 20287—2006 农用微生物菌剂[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [18] 江晓, 贾力敏, 张磊, 等. 双歧杆菌基因组 DNA 提取几种方法的比较[J]. 中国卫生检验杂志, 2004, 14(5): 641-642.
- [19] 王玉万, 徐文玉. 木质纤维素固体基质发酵物中半纤维素、纤维素和木质素的定量分析程序[J]. 微生物学通报, 1987, 14(2): 81-84.
- [20] O'SULLIVAN D J, O'GARA F. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogen[J]. Microbiol Rev, 1992, 56(4): 662-676.
- [21] 杨海君, 谭周进, 肖启明, 等. 假单胞菌的生物防治作用研究[J]. 中国生态农业学报, 2004, 12(3): 163-166.
- [22] 冯成玉, 孟爱中, 于宝富, 等. 水稻细菌性基腐病调查初报[J]. 植物保护, 2008, 34(1): 153-155.
- [23] 吴志毅, 方媛, 陈曦, 等. 浙江省蝴蝶兰细菌性软腐病病原鉴定[J]. 浙江林学院学报, 2010, 27(4): 635-639.
- [24] 李路军, 游银伟, 任鹏飞, 等. 一株具有纤维素降解能力的链霉菌 LLJ\_03 的鉴定及初步研究[J]. 西南农业学报, 2010, 23(4): 1253-1256.
- [25] 司美茹, 江翠翠, 刘飞, 等. 一株降解原油链霉菌的分离鉴定与降解特性研究[J]. 生态与农村环境学报, 2010, 26(5): 508-512.
- [26] 黄红丽, 曾光明, 郁红艳, 等. 栗褐链霉菌 *Streptomyces badius* 对木质纤维素的降解研究[J]. 环境科学与技术, 2006, 29(6): 3-5, 26.
- [27] 张聪恪. 蓝色链霉菌对麦秸秆的降解和酶活性测定[J]. 实用预防医学, 2004, 11(6): 1164-1166.
- [28] 张晓舟, 徐剑宏, 李顺鹏. 植病生防芽孢杆菌的分离筛选与初步鉴定[J]. 土壤, 2005, (1): 85-88.
- [29] 陶荣霞, 梁运祥. 17 株芽孢杆菌产酶特性及益生特性的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.
- [30] 刘国红, 林乃铨, 刘波. 芽孢杆菌的分类鉴定及其相关属的分类系统演变研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2009.
- [31] 张卫娜, 贾谏, 陆晓宇. 镰刀菌属真菌毒素的研究进展[J]. 广东农业科学, 2013, 40(15): 129-133.
- [32] 张岳平. 镰刀菌真菌毒素产生与调控机制研究进展[J]. 生命科学, 2011(3): 311-316.
- [33] 王迎华, 曹郁生, 高丹丹, 等. 烟曲霉检测技术研究进展[J]. 食品饲料, 2007(4): 197-200.
- [34] 李芳, 勇伟, 白雪薇, 等. 微生物菌剂对园林绿化废弃物堆肥养分的影响[J]. 中国农学通报, 2012, 28(7): 307-311.
- [35] STEPANOVA E V, KOROLEVA O V. Fungal decomposition of oat straw during liquid and solid-state fermentation[J]. Appl Biochem Microbiol, 2003, 39(1): 65-74.
- [36] 李慧蓉. 白腐真菌的研究进展[J]. 环境科学进展, 1996(6): 69-77.
- [37] 张力, 邵喜霞, 韩大勇. 白腐真菌木质素降解酶系研究进展[J]. 吉林畜牧兽医, 2009, 30(2): 9-12.
- [38] 席北斗, 刘鸿亮, 白庆中. 堆肥中纤维素和木质素的生物降解研究现状[J]. 环境污染治理技术与设备, 2002, 3(3): 19-23.

【责任编辑 李晓卉】