

几种双孢蘑菇菌株对稻草降解能力的研究

李燕荣^{1,2}, 周国英¹, 胡清秀¹, 赵亮亮³

(1. 中南林业科技大学 生命科学学院, 湖南 长沙 410004; 2. 中国农业科学院 农业资源与农业区划研究所, 北京 100081;

3. 广西师范大学 环境与资源学院, 广西 桂林 541004)

摘要:以蘑菇属的5个菌株为试材, 采用 Bavendamm 显色反应、RB 亮蓝平板变色反应、Eriksson 变色圈试验及木质降解试验等方法, 研究双孢蘑菇对稻草的降解能力。结果表明: 通过 Bavendamm 平板和 RB 亮蓝平板显色试验, 初步判断 2796 及 A₅, 优于其它菌种, 有较高的木质素降解相关酶系(木质素降解酶; 木质素过氧化物酶; 锰依赖过氧化物酶)活力; 这2种菌种进一步通过变色圈和降解试验, 表明 2796 为选择性降解纤维素的菌种, 而 A₅ 为选择性降解木质素的菌种, 但 2796 对木质素的降解率为 39.82%, A₅ 仅为 20.91%, 说明菌种对木质素的选择性降解与否与其降解率之间没有相关性。

关键词: 双孢蘑菇; Bavendamm 显色; RB 亮蓝平板变色; Eriksson 变色圈试验; 木质降解

中图分类号: S 646.1⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)10-0207-04

我国是一个农业大国, 各类农作物秸秆年总产量达 7 亿 t 以上, 其中稻草 2.3 亿 t。传统上, 农作物秸秆被作为农户生活燃料或用于牲畜的粗饲料, 少量用于造纸。近年来, 由于农户用其作生活燃料的数量锐减, 除部分秸秆直接还田或腐熟还田外, 一部分弃置在路边田间, 一部分在田间直接焚烧, 全国每年约有 2/3 的秸秆被直接焚烧。这样不仅造成资源浪费, 其燃烧产生的有害气体进入大气还造成严重的环境污染。对此国家于 2006 年提出要大力发展建设资源节约、环境友好型循环农业^[1]。

蘑菇是一种典型的腐生真菌, 在其整个生长发育过程中, 通过代谢、分解植物有机物而从中获得所需的全部营养, 将农作物秸秆转化为可供人们食用的菇体蛋白、脂肪和碳水化合物等营养成分, 同时起到平衡自然生态、促进自然界物质大循环的作用^[2]。稻草是人工栽培双孢蘑菇的主要基质成分。蘑菇产生的胞内纤维素酶、漆酶、木聚糖酶等生物酶, 将基质中纤维素分解为纤维二糖, 进一步降解为六磷酸葡萄糖; 将木质素分解为丙醇等小分子物质, 成为蘑菇生长发育的营养成分^[3]。因此, 蘑菇对稻草中木质素和纤维素的降解能力直接影

响其菌丝体生长和子实体的发育, 同时还影响稻草的降解率。

目前, 人工栽培蘑菇菌种主要是 3 种: 双孢蘑菇 (*Agaricus bisporus*)、棕色蘑菇(又名褐菇, *Agaricus cro-copelus*)和高温蘑菇(*Agaricus bitorquis*)。针对此 3 种蘑菇的人工腐熟堆肥及栽培过程中, 不同蘑菇菌种对稻草中木质素、纤维素降解的差异性, 以及这种差异性与双孢蘑菇产量的相关性, 目前尚无报道。

该研究的主要目的是以不同来源的菌种为试验材料, 采用 Bavendamm 显色反应、RB 亮蓝平板变色反应、Eriksson 变色圈试验及木质降解试验等方法^[4-5], 研究不同蘑菇菌株对稻草中木质素、纤维素的降解性状, 筛选出具有高效降解木质素的蘑菇菌种, 为促进稻草资源的高效利用及蘑菇栽培提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种 菌株共 5 株(2796, A₅, A₁, A₃, A₂), 其中: 2796: 来自福建食用菌研究所; A₅: 来自于山东省某双孢蘑菇生产基地, 该菌株从美国引进; A₁: 从日本市场上采集的双孢蘑菇并分离得到的菌种; A₃: 新登 96 高温蘑菇; A₂: 棕色蘑菇。

1.1.2 稻草粉 稻草来自北京市郊区。稻草风干后用粉碎机粉碎后, 并经 60 目筛过筛。

1.1.3 培养基 PDA 培养基: 马铃薯 200 g/L、葡萄糖 20 g/L、琼脂 20 g/L; PDA-Bavendamm 培养基: 在纯培养基加入 0.4 mmol/L pH 5.5 的鞣酸; PDA-RB 亮蓝培养基: 将 625 mg/LRB 亮蓝单独灭菌后, 与 PDA 培养基混匀; 愈创木酚培养基: 20 g/L 60 目稻草粉, 1 g/L 蔗

第一作者简介: 李燕荣(1984), 女, 江西抚州人, 在读硕士, 研究方向为应用微生物学。

通讯作者: 胡清秀(1963), 女, 博士, 副研究员, 现主要从事食(药)用菌的栽培及推广应用工作。E-mail: hqx9758@126.com。

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划资助项目(2007BAD89B1)。

收稿日期: 2010-03-01

糖 0.2 mL/L 愈创木酚, 20 g/L 琼脂; 麦芽浸膏培养基: 麦芽浸膏 10 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, $FeSO_4$ 0.01 g/L, K_2HPO_4 1.0 g/L, 蒸馏水 1 000 mL; 无机盐培养基: 葡萄糖 20 g/L, NH_4NO_3 0.5 g/L, KH_2PO_4 1.0 g/L, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 0.4 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, VB_1 0.1 mg/L, $CaCl_2$ 0.1 mg/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 mg/L, 用 H_2SO_4 调 pH 至 5.0。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种活化和平板培养 将斜面菌种于 25℃活化培养后, 转接到 PDA 试管斜面, 并于 25℃温箱中培养, 待菌丝长好后, 转接到 PDA 平板, 25℃培养 6~8 d, 用无菌打孔器将平板菌种制成直径 7 mm、厚 2 mm 的菌种塞, 备用。

1.2.2 双孢蘑菇产木质素降解酶试验—Bavendamm 显色反应 取 1 块菌塞点接于 PDA-Bavendamm 培养基平板, 25℃条件下培养, 观察记录菌落周围有无褐色轮环出现, 有棕褐色轮环记为(+); 无棕褐色轮环记为(-)。

1.2.3 双孢蘑菇产木质素降解酶试验—RB 亮蓝显色反应 取 1 块菌塞点接于 PDA—RB 亮蓝培养基平板上, 培养方法同上, 观察记录菌落周围有无黄色轮环产生, 有黄色轮环为(+); 无黄色轮环记为(-)。

1.2.4 双孢蘑菇选择性降解试验—变色圈试验 5 种菌种于 PDA 培养基培养, 用直径 7 mm 打孔器制菌塞, 取 1 块分别点接于愈创木酚平板, 25℃恒温培养 7 d, 测定菌落直径(d_1), 变色圈直径(d_2), 并计算比值(d_1/d_2)。

1.2.5 双孢蘑菇选择性降解试验—木质素、纤维素降解试验 菌株纯培养后, 用直径 7 mm 的无菌打孔器制菌塞, 并接入麦芽浸膏培养基中, 于 30℃, 150 r/min 摇床培养 7 d, 制得液体菌种。准确称取 2 g 过 60 目筛的稻草粉, 经苯醇抽提后, 放入 250 mL 三角瓶中, 加入无机盐培养基 10 mL, 充分浸润后, 于 120℃下灭菌 30 min, 再用无菌注射器吸取 10 mL 液体菌种均匀地加入到上述三角瓶中, 并于 25℃培养 15 d, 于 105℃烘箱中烘干, 研碎待测。以抽提后未经培养的稻草粉作为空白对照。

1.2.6 降解率的测定及选择性指数(SF)的计算 分别按照 GB/T 2677.8-1994^[6] 及 GB/T 2677.10-1995^[7] 进行 klason 木质素和综纤维素含量的测定。SF 指数=Klason 木素降解率/综纤维素降解率。

2 结果与分析

2.1 平板显色反应结果

Bavendamm 显色反应判断微生物是否能分泌漆酶并降解木质素的一种方法, 其原理是: 菌株如果能产该酶, 则会与培养基中的酚类化合物起反应, 菌落的周围会形成棕褐色轮环, 呈现阳性反应^[11]。RB 亮蓝平板变色反应用来判断微生物是否能分泌过氧化物酶并降解木质素的原理是: 菌株如果能产该酶, 则会与 RB 亮蓝反

应, 使得 RB 亮蓝转变成橙黄色, 呈现阳性反应^[8]。

该试验中, 5 种菌株的 Bavendamm 显色反应及 RB 变色反应的结果, 如表 1 所示。

表 1 5 种菌株平板显色反应结果

菌株	Bavendamm 显色反应				RB 显色反应			
	3 d	5 d	7 d	10 d	3 d	5 d	7 d	10 d
2796	—	+	+	++++	—	+	++	++++
A ₅	—	+	++	++	—	++	+++	++++
A _r	—	—	+	+	—	++	++	+++
A ₃	—	—	+	+	—	+	+	++
A _z	—	—	+	+	+	+++	+++	+++

注: “+”显色程度较弱, “++”颜色较浅, “+++”颜色较深, “++++”深色, “—”不显色。

从表 1 可知, 5 种双孢蘑菇菌种, 在 Bavendamm 显色反应及 RB 变色反应中, 均呈现阳性反应, 说明均具有一定的产漆酶和过氧化物酶(木质素过氧化物酶; 锰依赖过氧化物酶)能力, 但显色程度和显色时间存在显著差异。

Bavendamm 显色反应中, A₅ 显色最早, 第 5 天已经呈现出显色圈, 紧接着是 2796, 反应到第 10 天, 2796 的颜色最深, 其次为 A₅, 其它 3 个菌种都在第 7 天开始才陆续出现显色圈, 且颜色深度均次于 A₅ 和 2796。依上述试验结果, 可初步推测, 相较于试验中的其它菌种, A₅ 和 2796 具有较强的漆酶活力。RB 变色反应中, A_z 变色最早, 在第 3 天就呈现出变色圈, A₅ 和 A_r 均迟 1 d 出现变色反应, 反应到第 10 天, A₅ 和 2796 的变色圈最为明显, 变色圈颜色最深, 其次是 A_r, A₃。

因此, 可初步判定, A₅ 和 2796 这 2 个菌种的漆酶和过氧化物酶活性均较强, 可以考虑用做高效降解稻草木质素的优势菌种。

2.2 变色圈试验结果

Ander 和 Eriksson 变色圈试验表明, 菌落直径(d_1) 和变色圈直径(d_2) 的比值可作为判定该菌是否具有选择性降解木质素能力的依据之一, 如果该比值小于 1, 则为选择性降解木质素菌; 若比值大于 1, 则为选择性降解纤维素菌^[9]。该试验结果如表 2 所示。

表 2 A₅ 和 2796 变色圈试验结果

菌株	菌落直径 d_1 /cm	变色 * 直径 d_2 /cm	d_1/d_2
2796	2.45	1.43	1.71
A ₅	1.03	2.36	0.44
A _r	2.11	2.45	0.86
A ₃	4.43	4.16	1.06
A _z	1.03	1.45	0.71

由表 2 可知, 2796 和 A₃, d_1/d_2 分别为 1.71>1, 1.06>1, 表明 2 个菌株均为选择性降解纤维素的菌种。其它 3 种菌种 d_1/d_2 <1, 则均为选择性降解木质素菌种。但各个菌株对于木质素和纤维素的降解率, 需要通过降解试验来加以确定。

2.3 降解试验结果

由表 3 可知,供试菌株对稻草的降解能力存在一定差异,所选菌株都有不同程度的木质素降解能力,同时也会使综纤维素发生降解。

从降解木质素来看,2796 对木质素的降解率为 39.82%,降解率最高;其次为 A₅ 和 A_z 分别为 20.91% 和 14.29%;A₃ 对木质素降解率最低。

从降解纤维素来看,A₃ 对纤维素的降解率为供试菌种最大的,是 10.52%,其余 4 种菌种对纤维素的降解率相当。

各菌株 SF 指数计算结果表明,2796 选择性指数最高,达 7.5 其次是 A_z 达 6.55, A₃ 菌株 SF 指数最低,仅为 0.48。可见供试的 5 种蘑菇菌株木质素降解能力差异性大。从高效木质素降解菌的角度考虑,选择 2796 应是理想的菌株。

表 3 不同菌株处理前后木质素、综纤维素含量的变化

菌株	木质素			综纤维素			SF 指数
	L ₁ /g	L ₂ /g	L×100%	F ₁ /g	F ₂ /g	F ₃ ×100%	
2796	0.98	0.59	39.82	0.19	0.18	5.3	7.5
A ₅	0.98	0.78	20.91	0.19	0.18	5.3	3.9
A _r	0.98	0.90	8.16	0.19	0.18	5.3	1.54
A ₃	0.98	0.93	5.10	0.19	0.17	10.52	0.48
A _z	0.98	0.84	14.29	0.19	0.18	5.3	6.55

注: L₁ 表示培养前木质素的含量;L₂ 表示培养后木质素的含量;L×100%表示木质素的降解率;F₁ 表示培养前综纤维素的含量;F₂ 表示培养后综纤维素的含量;F₃×100%表示综纤维素的降解率。

3 讨论

农作物秸秆结构特殊,其外表面附着有矿物质、角质和栓质等物质,主要组成成分为纤维素、半纤维素和木质素,木质素是聚酚化合物组成的大分子聚合物,木质素与半纤维素以共价键形式结合,将纤维素分子包埋在其中,形成一种天然屏障,使微生物不易与纤维素分子接触,可增加秸秆的坚韧性,起抗倒伏和抵御病虫害的作用。而木质素的非水溶性、化学结构的复杂性,导致了这类物质的难降解性。因此,可以说农业秸秆的降解利用过程中,木质素的降解是限速步骤,木质素的降解与否是能否有效利用纤维素的关键^[10]。

蘑菇以腐熟的秸秆,即堆肥为营养源。Waksman (1969),Dey S(1994)在研究蘑菇堆肥时发现,蘑菇营养生长阶段主要消耗木质素和蛋白质,子实体形成期则利用纤维素和半纤维素^[11-12]。该试验结果也表明了蘑菇具有木质素降解的功能,但不同菌株间存在显著差异。

供试的 5 个菌株在菌株筛选的定性试验中,通过 Bavendamm 变色反应和 RB 变色反应,比较显色发生时间和颜色深浅,初步判断各菌株对木质素降解能力的高

低,并初步筛选出 A₅,2796 为降解稻草木质素的高效菌种。在此基础上,进行变色圈试验,表明双孢蘑菇 2 个菌株 2796 和 A₃ 为选择性降解纤维素,而其它菌种选择性降解木质素。

在定量试验中,以木质素降解试验测定这 5 种菌种分别对木质素、综纤维素降解的能力,并通过计算一定时间内 klason 木质素和综纤维素失重的比值(SF 指数),作为筛选高效木质素降解菌的依据。试验结果表明,各菌株对稻草的降解能力相差较大,2796 为选择性降解纤维素的菌种,但表现出很强的木质素降解能力,降解率达 39.82%,但选择性降解木质素的菌株 A₅,其对木质素的降解率仅为 20.91%,说明菌种对木质素的降解能力与选择性无关,此结果与林玲,王宜磊,鞠洪波等研究结果一致^[13-14]。根据降解率可以推断木质素的降解率高低排序依次为:2796> A₅> A_z> A_r> A₃,即双孢蘑菇> 棕色蘑菇> 高温蘑菇。

参考文献

[1] 杨德荣. 秸秆综合利用技术及应用[J]. 农村实用工程技术, 2004(8): 58-59.

[2] 桥本一哉. 蘑菇栽培法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994: 55-56.

[3] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法与技术[M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 1997: 22-23.

[4] 宋安东, 梁振普, 周利霞, 等. 平菇产木质素降解酶类研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2005, 26(2): 28-30.

[5] 鞠洪波, 朗子健. 食用菌对山杨木质素及纤维素的降解[J]. 东北林业大学学报, 2007, 35(12): 41-42.

[6] GB/T 2677.8-1994 造纸原料酸不溶木素含量的测定. 中国轻工业标准汇编造纸卷(上)[M]. 北京: 中国标准出版社, 1999.

[7] GB/T 2677.8-1995 造纸原料综纤维素含量的测定. 中国轻工业标准汇编造纸卷(上)[M]. 北京: 中国标准出版社, 1999.

[8] 刘尚旭, 董佳里, 张义正. 糙皮侧耳菌木质素降解酶的比较研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2000, 37(4): 594-598.

[9] 张业录, 赵华, 孙希雯, 等. 木质素降解菌的筛选和氯酚生物降解研究[J]. 天津轻工业学院学报, 2000(4): 17-21.

[10] 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.

[11] Waksman S A, Nissen W. On the nutrition of the cultivated mushroom and the chemical changes brought about by their organisms in manure compost[J]. Am J Bot, 1932 19: 514-537.

[12] Dey S, Maiti T K, Bhattacharyya B C. Production of some extracellular enzymes by a lignin peroxidase producing brown rot fungus Polyporus ostreiformis and its comparative abilities for lignin degradation and dye decolorization[J]. Appl. Environ. Microbiol. 1994 60: 4216-4218.

[13] 林玲, 林志伟. 木质素降解菌的筛选及其纤维素酶基因克隆表达研究[J]. 中国生态农业学报, 2009, 17(5): 938-943.

[14] 王宜磊, 孙迅, 邓振旭. 木质素生物降解研究进展[J]. 微生物学杂志, 1998, 18(1): 48-51.

五种羊肚菌液体培养过程胞外酶活性变化研究

陈国梁, 张向前, 贺晓龙, 任桂梅, 陈宗礼

(延安大学 生命科学学院, 陕西省区域生物资源保育与利用工程技术研究中心, 陕西 延安 716000)

摘要: 检测了编号为 M1、M2、M7、M8、10 羊肚菌菌丝体在液体培养基中生长时胞外酶的活性及培养液中糖与蛋白质的含量, 同时观察了菌丝体生长情况。结果表明: 菌丝体生长情况各不相同, 10 羊肚菌菌丝片的产生及菌丝成团最早, 依次为 10 羊肚菌 > M8 > M7 = M2 > M1; 与碳水化合物降解相关的酶(纤维素酶、淀粉酶)活性变化趋势基本相同, 在发酵的第 2~3 天出现第 1 个峰值, 并于第 6 天出现第 2 个峰值, 且第 1 个峰值大于第 2 个峰值; 在整个培养期内漆酶、愈创木酚酶、蛋白酶均有活性, 产酶高峰也不尽相同; 蛋白质、糖含量随时间变化且与酶活力相关。

关键词: 羊肚菌; 菌丝体; 液体培养; 胞外酶

中图分类号: S 646 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)10-0210-04

羊肚菌属于子囊亚纲(Acomycotina)盘菌目(Pezizales)羊肚菌科(Morchellaceae)羊肚菌属(*Morchella* spp.), 又称羊肚蘑, 羊肚菜, 具有很高的营养和药用价值, 风味鲜美, 深受国内外消费者的喜爱。由于羊肚菌

野生资源匮乏, 满足不了市场需求, 许多食用菌工作者对其进行了人工栽培方面的研究, 但至今羊肚菌子实体仍不能进行生产化的人工栽培^[1]。该研究以编号为 M1、M2、M7、M8、10 羊肚菌为材料, 采用液体培养的方法, 研究其在液体培养基中培养时胞外酶活性变化规律与生长发育之间的关系, 旨在探讨其营养生理特性, 为羊肚菌的人工驯化培养及开发利用提供理论依据和技术指导。

1 材料与方法

1.1 试验材料

第一作者简介: 陈国梁(1974), 男, 陕西定边县人, 讲师, 研究方向为植物生物技术。E-mail: gl9359@163.com。

通讯作者: 陈宗礼(1952), 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向为遗传学。E-mail: zongli_chen@yahoo.com.cn。

基金项目: 延安大学专项科研基金资助项目(YDK2008-17)。

收稿日期: 2010-02-10

Studies on the Property of Some *Agaricus* spp. Strains in Degradation Rice Straw

LI Yan-rong^{1,2}, ZHOU Guo-ying², HU Qing-xiu¹, ZHAO Liang-liang³

(1. College of Life Science, Central South University of Forest and Technology, Changsha, Hunan 410006; 2. Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; 3. College of Environmental and Resources, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004)

Abstract: To promote the yield of *Agaricus bisporus* and improve efficiently using of farmland straw, 5 *Agaricus bisporus* strains(2796, A5, Az, A3 and Ar) was investigated about the function of degradation rice straw. In this experiment, Bavendamm chromogenic reaction, RB bright blue flat color reaction, Eriksson discoloration circle test and Woodiness degradation test was finished. The results showed that A5 and 2796 had higher relevant lignin degrading enzymes including lignin degradation enzyme, lignin peroxidase, manganese dependence peroxidase vitality through the Bavendamm chromogenic reaction and RB bright blue flat color test; then all the strains by Eriksson discoloration circle test and Woodiness degradation test appeared that 2796 and A3 strains were selective degradation of cellulose in the beginning of the experiment, however the others was selective degradation of lignin, and the highest degradation rate of lignin of 2796 was 39.82%, A5 was 20.91% just only, those results explained to us that there was no correlation between the selectivity of lignin and degradation rate of it. Finally we can selected that 2796 and A5 were the most efficient degradation of rice straw stains.

Key words: *Agaricus bisporus*; Bavendamm chromogenic reaction; RB bright blue flat color test; Eriksson discoloration circle test; degradation of rice straw