



研究报告

远海 50 个站位沉积物中潜在木质素降解菌的分离与鉴定

黄一哲 任娜 徐莹 吴李园 董冰夏 朱四东 杨季芳 陈吉刚*

浙江万里学院生物与环境学院 浙江 宁波 315100

摘要:【背景】微生物在海洋木质素的降解过程中发挥了至关重要的作用,然而来源海洋环境的木质素降解菌的相关研究报道却很少。【目的】从远海沉积物环境分离潜在的木质素降解菌,为木质素的可再生化学物质转化提供菌种资源。【方法】利用以木质素为唯一碳源的培养基,对 50 个远海沉积物样品中的木质素降解菌进行富集培养与纯化,并利用含苯胺蓝的脱色培养基筛选潜在木质素降解菌,继而通过 16S rRNA 基因测序与序列比对初步确定潜在木质素降解菌的分类地位。【结果】从 50 个沉积物样品中共分离获得菌株 283 株,其中潜在木质素降解菌 263 株,它们隶属于 α -变形杆菌纲(*Alphaproteobacteria*)、 γ -变形杆菌纲(*Gamaproteobacteria*)、芽孢杆菌纲(*Bacilli*)、放线杆菌纲(*Actinobacteria*)和黄杆菌纲(*Flavobacteriia*)中的 32 个属。【结论】远海沉积物环境中蕴含着丰富的木质素降解菌,为海洋生物资源的开发利用提供了新的参考。

关键词: 远海, 木质素降解菌, 鉴定

Isolation and identification of potential lignin-degrading bacteria in sediments from 50 stations of the Pelagic Ocean

HUANG Yizhe REN Na XU Ying WU Liyuan DONG Bingxia ZHU Sidong
YANG Jifang CHEN Jigang*

College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo, Zhejiang 315100, China

Abstract: [Background] Microorganisms play a vital role in the degradation process of marine lignin, but there are few reports about the lignin-degrading bacteria that originate from the marine environment. [Objective] To isolate potential lignin-degrading bacteria from sediments of Pelagic Ocean, and to provide strain resources for the conversion of renewable chemical substances of lignin. [Methods] Enrichment and purification of lignin-degrading bacteria in 50 sediment samples from the Pelagic Ocean by using the medium with alkaline lignin as the sole carbon source, and then screen for potential lignin-degrading bacteria by using the decolorizing medium. The taxonomic status of potential lignin-degrading bacteria preliminarily determined by 16S rRNA gene sequencing and sequence identity comparison. [Results] A

Foundation items: Ningbo Public Welfare Technology Research Program (202002N3115); National Program on Global Change and Air-Sea Interaction (GASI-04-HYDZ-02); China Ocean Mineral Resources Research and Development Association Foundation (DY135-E2-2-07); First-Class Discipline of Biological Engineering of Zhejiang Province (CX2019004)

*Corresponding author: Tel: 86-574-88222552; E-mail: genomic@163.com

Received: 28-05-2020; Accepted: 08-09-2020; Published online: 18-11-2020

基金项目: 宁波市公益类科技计划(202002N3115); 全球变化与海气相互作用专项(二期)(GASI-04-HYDZ-02); 中国大洋矿产资源研究开发协会项目(DY135-E2-2-07); 浙江省生物工程一流学科创新基金(CX2019004)

*通信作者: Tel: 0574-88222552; E-mail: genomic@163.com

收稿日期: 2020-05-28; 接受日期: 2020-09-08; 网络首发日期: 2020-11-18

total of 283 strains were isolated from 50 sediment samples, including 263 potential lignin-degrading strains, which belonged to 32 genera in five class (*Alphaproteobacteria*, *Gamaproteobacteria*, *Bacilli*, *Actinobacteria* and *Flavobacteriia*). [Conclusion] The sediment environment in the Pelagic Ocean is rich in lignin-degrading bacteria, which provided new references for the development and utilization of marine biological resources.

Keywords: Pelagic Ocean, lignin-degrading bacteria, identification

木质素是一种复杂的芳香异质多聚体, 被发现是植物木质纤维素的主要成分(占干重的 20%–35%), 对微生物的分解具有极强的抵抗力^[1]。由于木质素的去除是木质纤维素向第 2 代生物燃料和可再生化学物质转化的关键问题, 因此木质素的分解引起了人们极大的兴趣^[2–4]。白腐真菌和褐腐真菌对木质素的降解已得到较为深入的研究, 它们利用胞外氧化机制来分解木质素聚合物^[5]。黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)产生胞外木质素过氧化物酶和锰过氧化物酶以催化木质素解聚, 其他真菌则主要通过胞外漆酶参与木质素分解^[6]。与真菌相比, 细菌在生物技术应用方面更有优势, 例如更加有效的大规模培养、更方便的分子遗传学操作和蛋白质表达体系^[7]。近年来, 有关木质素降解菌的研究逐渐增多, 但这些细菌主要为陆地来源^[8]。

海洋沉积物是地球上最大的有机碳库, 以木质素、纤维素和半纤维素为主的结构性聚合物是陆源有机质的重要组成成分, 约占海洋埋藏有机质的 1/3, 因此, 木质素的微生物降解被认为是全球碳循环的重要过程之一^[9]。本研究以来源于远海 50 个站位的沉积物样品为实验材料, 以木质素为唯一碳源开展潜在木质素降解菌的富集培养, 并在此基础上开展分离菌株的分子鉴定, 以期丰富木质素降解菌的菌种资源。

1 材料与方法

1.1 样品采集

实验样品来源于中国大洋科考 40 航次和 50 航次采集的 50 个站位的沉积物。40 航次 12 个站位位于西太平洋多金属结核区, 其上覆盖结核, 海

水深度位于 4 933–5 590 m (表 1)。50 航次 38 个站位位于东太平洋多金属结核区, 其上覆盖结核, 海水深度位于 4 715–5 526 m (表 2)。样品采集方式为箱式或重力柱采集。

1.2 主要试剂和仪器

Premix Ex Taq™ DNA 聚合酶, TaKaRa 公司; 蛋白胨, Oxoid 公司; 脱碱木质素和苯胺蓝, 梯希爱(上海)化成工业发展有限公司; UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 引物 27F 和 1492R, 上海桑尼生物科技有限公司。PCR 仪, 上海艾研生物科技有限公司; 低温摇床, New Brunswick Scientific 公司。

1.3 培养基

Marine Agar 2216 和 Marine Broth 2216 培养基, BD Difco 公司。

表 1 40 航次 12 个站位沉积物样本基本信息

Table 1 Basic information of sediment samples from 12 stations of 40th cruise

站位 Station	经度 Longitude (E, °)	纬度 Latitude (N, °)	水深 Depth (m)
40V-C1-BC1602	159.45	20.02	5 501
40V-C1-BC1603a	156.97	20.43	5 094
40V-C1-BC1604	157.20	20.43	5 403
40VI-C1-BC1606	158.47	20.39	5 574
40VI-C1-BC1607	160.41	20.46	5 123
40VI-C1-BC1608	160.34	20.24	4 933
40VI-C1-BC1610	160.85	20.93	4 993
40VI-C3-BC1613	158.98	22.15	5 293
40VI-C3-BC1615	160.55	22.88	5 590
40VI-C3-BC1617	161.09	23.18	5 371
40VI-C3-BC1618	160.13	22.88	5 528
40VI-C3-BC1621a	157.03	22.22	5 294

表 2 50 航次 38 个站位沉积物样本基本信息

Table 2 Basic information of sediment samples from 38 stations of 50th cruise

站位 Station	经度 Longitude (E, °)	纬度 Latitude (N, °)	水深 Depth (m)
50II-A6-S10-BC37	144.74	11.33	5 194
50II-A2-S01-GC02-380	138.56	12.61	5 021
50II-A2-S01-GC02-000	138.56	12.61	5 021
50II-A6-S03-BC38	144.70	11.27	5 147
50II-A8-S08-BC05	139.26	13.18	4 715
50II-A6-S06-BC31	144.64	11.17	5 526
50II-A6-S04-BC30	144.79	11.28	5 254
50II-A6-S05-BC29	144.91	11.28	5 396
50II-A6-S07-BC28	144.77	11.41	5 282
50II-A1-S01-BC26	142.59	12.10	5 107
50II-A1-S02-BC25	142.40	12.10	5 079
50II-A1-S05-BC22	141.86	12.10	4 954
50II-A1-S04-BC21	141.99	12.10	4 930
50II-A7-S04-BC20	139.45	11.25	4 919
50II-A7-S03-BC19	139.42	11.16	4 862
50II-A7-S02-BC18	139.17	11.25	4 838
50II-A7-S01-BC17	139.03	11.33	4 841
50II-A2-S05-BC15	138.57	12.28	4 907
50II-A2-S04-BC14	138.44	12.33	5 024
50II-A2-S06-BC13	138.81	12.21	5 079
50II-A2-S03-BC12	138.98	12.44	5 061
50II-A2-S02-BC11	138.79	12.52	4 970
50II-A2-S01-BC09	138.56	12.61	5 022
50II-A8-S05-BC08	139.39	13.17	4 848
50II-A8-S04-BC07	139.60	13.18	4 829
50II-A8-S06-BC06	139.72	13.17	4 777
50II-A8-S03-MC01	139.30	13.31	4 998
50II-A8-S03-BC04	139.30	13.31	4 997
50II-A8-S02-BC02	139.61	13.35	5 078
50II-A8-S01-BC01	139.61	13.44	4 846
50I-KW1-S10-BC23	154.07	9.25	5 070
50I-KW1-S20-BC22	153.81	9.11	5 219
50I-KW1-S06-BC21	154.18	9.24	5 121
50I-KW1-S18-BC17	153.94	9.13	5 154
50I-KW1-08-BC10	154.13	9.45	5 211
50I-A5-S02-BC07	156.42	9.65	5 293
50I-A5-S06-BC06	156.48	9.60	5 281
50I-A5-S04-BC01	156.23	9.38	5 174

富集培养基(g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.7, KNO_3 0.6, KH_2PO_4 0.4, K_2HPO_4 0.1, 脱碱木质素 1.0, 陈海水 1 000 mL, pH 7.2。灭菌后加入过滤除菌的维生素 2 mL 和微量元素 1 mL。

脱色培养基(g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.7, KNO_3 0.6, KH_2PO_4 0.4, K_2HPO_4 0.1, 脱碱木质素 1.0, 蛋白胨 0.05, 琼脂粉 15.0, 陈海水 1 000 mL, pH 7.2。灭菌后加入 100 mg 过滤除菌的苯胺蓝。

1.4 潜在木质素降解菌的富集培养及纯化

无菌称取沉积物表层样品 3 g 置于 50 mL 离心管中, 加入 27 mL 灭菌陈海水, 旋涡振荡 10 min, 将涡旋液置 8 °C 冰箱过夜。取 10 mL 涡旋液转移至含 90 mL 富集培养基的锥形瓶中, 20 °C、80 r/min 振荡培养 14 d。取 10 mL 富集培养物, 转接至 90 mL 新鲜富集培养基中, 重复上述培养条件继续培养 14 d。

取富集培养物 1 mL, 用无菌陈海水进行 5 倍系列梯度稀释。取各梯度稀释液 100 μL 涂布于 Marine Agar 2216 培养基, 20 °C 培养直至有明显菌落长出。挑取菌落特征存在明显差异的单菌落, 划线至新鲜的 Marine Agar 2216 培养基进行传代纯化 2–3 代。将纯化菌株接种至 Marine Broth 2216 培养基中培养, 收集菌液制成甘油菌后, 置 -80 °C 冰箱保存备用。

1.5 木质素过氧化物酶阳性菌株筛选

取处于对数生长期的菌液 2 μL 点接到脱色培养基上, 20 °C 培养 7 d, 观察菌落周围是否有透明圈。菌落周围出现透明圈的菌株判定为潜在木质素降解菌, 对其进行进一步鉴定。

1.6 菌株 16S rRNA 基因的 PCR 扩增和测序

取菌液 1 mL 移入 EP 管中, 4 °C、10 000 \times g 离心 3 min, 弃上清, 收集沉淀。沉淀中加入 100 μL 无菌水, 吹打混匀菌体后, 置于 95 °C 高温下煮 15 min, 即获得用于 PCR 扩增的基因组 DNA 模板。利用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-A

CGGCTACCTTGTTACGACTT-3')进行PCR扩增。

PCR 反应体系: *Premix Ex Taq*TM 25 μ L, 模板 2 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, 加无菌水至 50 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 75 s, 72 $^{\circ}$ C 10 min, 30 个循环。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 并用 DNA 胶回收试剂盒进行纯化。将 PCR 纯化产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行单端测序。

1.7 菌株的 16S rRNA 基因分析及系统进化树的构建

将测序获得的供试菌株的有效 16S rRNA 基因序列提交 NCBI 数据库, 获得 GenBank 登录号。将菌株的有效 16S rRNA 基因序列上传至 EzBioCloud 数据库中进行相似性比对(<http://www.ezbiocloud.net/identify>)。依据相似性比对结果, 按照属和种的 16S rRNA 基因相似性分类界限值(属 94.5%; 种 98.65%)^[10], 初步确定菌株的分类地位。选取并下载与比对菌株相似性最高的模式菌株序列, 利用 MEGA 7.0 构建系统发育树。序列比对采用 MEGA 7.0 中的 ClustalW 程序, 进化树构建采用邻接法(Neighbour-Joining Method)^[11]。

2 结果与分析

2.1 50 个站位潜在木质素降解菌多样性分析

采用以木质素为唯一碳源的富集培养基, 对远海的 50 个站位沉积物中的潜在木质素降解菌进行了富集培养与纯化, 共获得菌株 283 株, 其中潜在木质素降解菌 263 株。

从 40 航次 12 个站位共获得菌株 63 株, 其 16S rRNA 基因的 GenBank 登录号为 MT588424–MT588486。苯胺蓝筛选平板显示, 60 株菌为潜在木质素降解菌。EzBioCloud 数据库相似性比对显示, 潜在木质素降解菌隶属于 14 个属(图 1)。各个站位所分离到细菌所隶属的属的数量在 1–6 个之间, 其中分离到的属最多的站位是 40V-C1-BC1618, 最少的站位是 40V-C1-BC1610。

从 50 航次 38 个站位中共获得菌株 220 株, 其 16S rRNA 基因的 GenBank 登录号为 MT588489–MT588708。苯胺蓝筛选平板显示, 203 株菌为潜在木质素降解菌。EzTaxon 数据库相似性比较显示, 203 株潜在木质素降解菌隶属于 22 个属(图 2)。50 航次各个站位所分离到细菌所隶属的数量在 1–7 个之间, 其中站位 50II-A8-S04-BC07、50I-KW1-S20-BC22、50I-KW1-S10-BC23 和

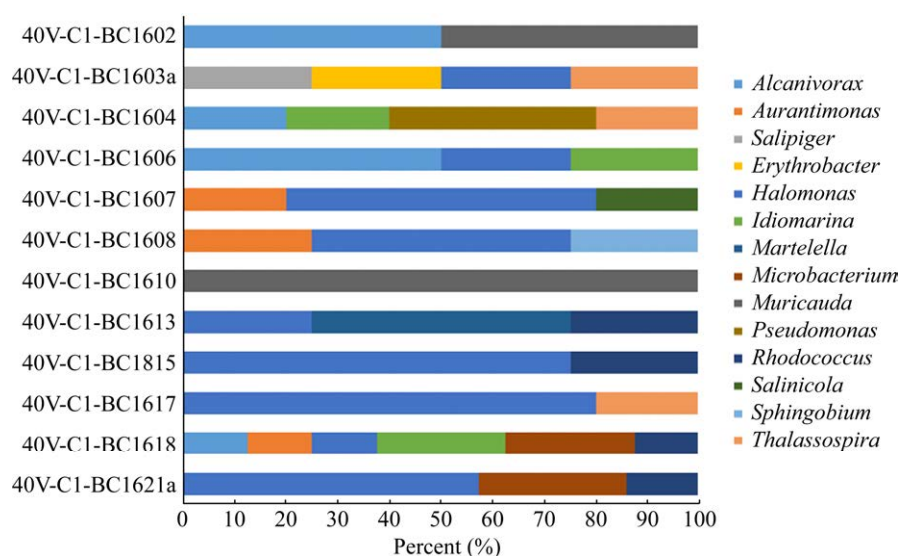


图 1 40 航次 12 个站位潜在木质素降解菌的种属分布

Figure 1 Species distribution of potential lignin-degrading bacteria from 12 stations of 40th cruise

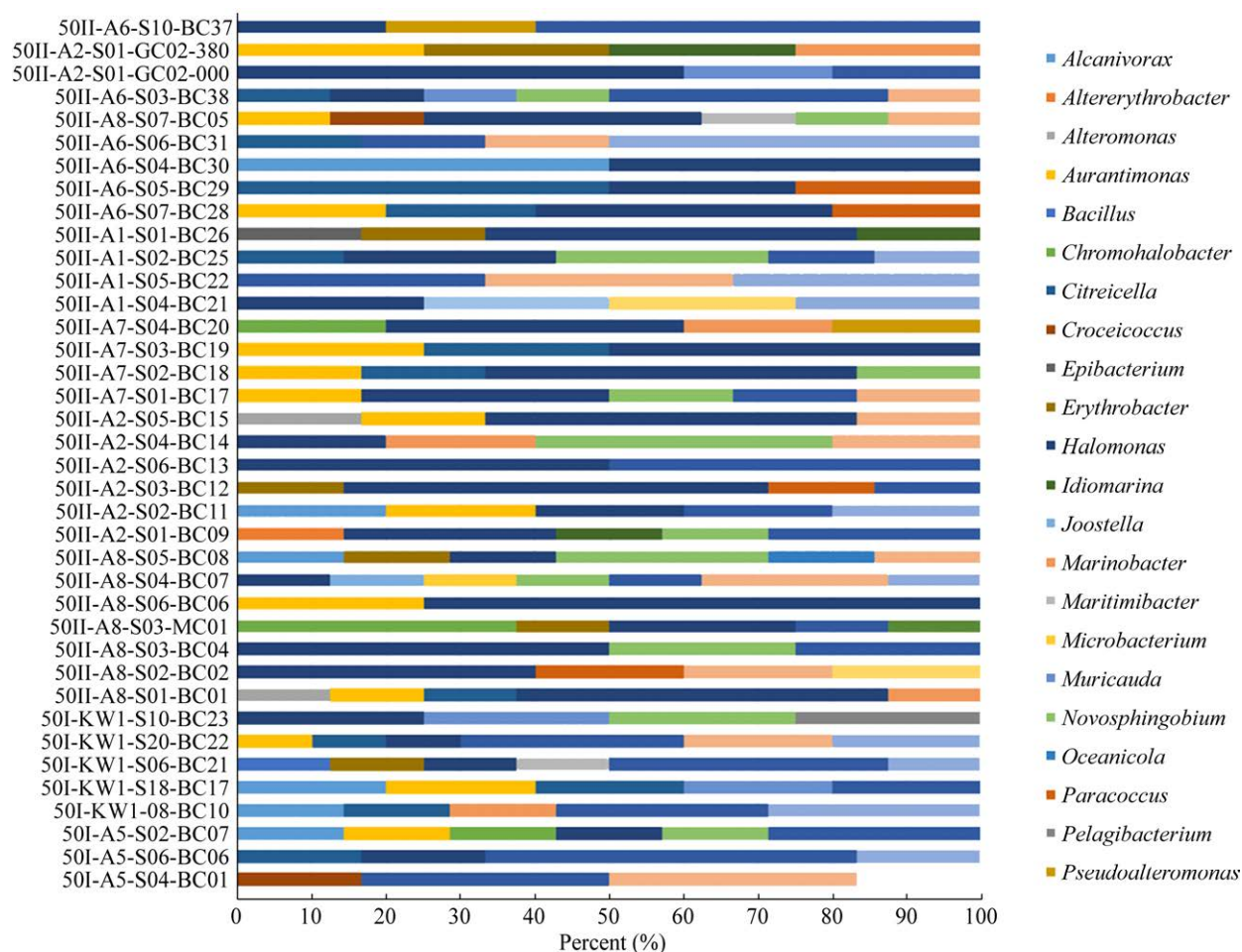


图 2 50 航次 38 个站位潜在木质素降解菌的种属分布

Figure 2 Species distribution of potential lignin-degrading bacteria from 38 stations of 50th cruise

50II-A6-S03-BC38 均获得 7 个属, 而站位 50II-A1-S05-BC22 仅获得 1 个属。

综合统计 2 个航次 50 个站位细菌的分类信息发现, 263 株潜在木质素降解菌分布于 α -变形杆菌纲 (*Alphaproteobacteria*)、 γ -变形杆菌纲 (*Gamaproteobacteria*)、芽孢杆菌纲 (*Bacilli*)、放线杆菌纲 (*Actinobacteria*) 和黄杆菌纲 (*Flavobacteriia*) 这 5 个纲中的 32 个属, 其中 γ -变形杆菌纲及该纲中的盐单胞菌属 (*Halomonas*) 为优势种群, 分别占潜在木质素降解菌的 54.1% 和 29.0% (图 3)。

2.2 潜在木质素降解菌的 16S rRNA 基因序列分析与遗传进化树构建

序列比对发现, 仅有 3 株细菌 (Voy50th8-6、Voy50th16-2、Voy50th15-5) 与 EzTaxon 数据库

中模式菌株的 16S rRNA 基因相似性位于 98.6%–96.3% 之间, 为潜在新种, 而其余 260 株细菌与模式菌株的 16S rRNA 基因相似性均高于 98.65%。根据 16S rRNA 基因相似性初步判断 263 株细菌隶属于 32 个属中的 80 个种 (不包含 3 个潜在新种)。遗传进化树显示, 整个进化树分为 5 个大支, 它们由 *Alphaproteobacteria*、*Gamaproteobacteria*、*Bacilli*、*Actinobacteria* 和 *Flavobacteriia* 纲中的细菌组成 (图 4)。纲水平上的 5 个进化支又由 10 个目水平的进化支组成, 其中 *Alphaproteobacteria* 含有的目数量最多 (4 个), 包括红细菌目 (*Rhodobacterales*)、根瘤菌目 (*Rhizobiales*)、鞘脂单胞菌目 (*Sphingomonadales*) 和红螺菌目 (*Rhodospirillales*), 其次为 *Gamaproteobacteria*

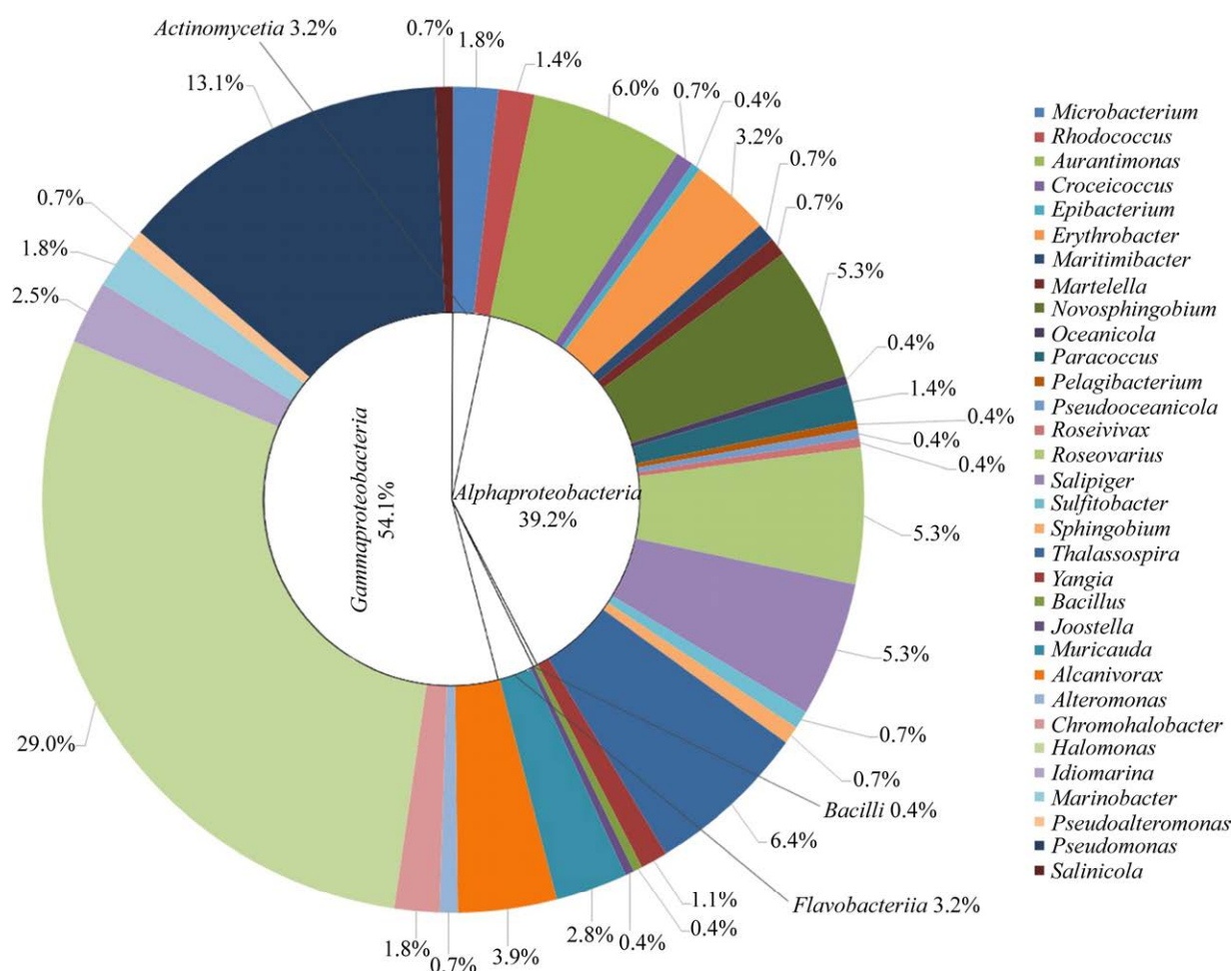


图 3 50 个站位潜在木质素降解菌纲和属群落结构组成

Figure 3 Distribution of bacterial phylum and genus phylogenetic groups of potential lignin-degrading bacteria isolated from 50 stations

(3 个), 包括海洋螺菌目(*Oceanospirillales*)、假单胞菌目(*Pseudomonadales*)和交替单胞菌目(*Alteromonadales*), 而 *Bacilli* 和 *Flavobacteriia* 均仅由 1 个目组成(图 4)。此外, 本实验分离到的潜在木质素降解菌在 *Alphaproteobacteria* 中的分布最为广泛, 它们隶属于 18 个属(图 5、图 6), 其次为 *Gammaproteobacteria* (9 个属) (图 7、图 8), 而它们在 *Bacilli*、*Actinobacteria* 和 *Flavobacteriia* 中的多样性不高(图 5)。在种水平上, 隶属于 *Halomonas* 和假单胞菌属(*Pseudomonas*)的种最多(8 个, 图 7), 其次为隶属于赤杆菌属(*Erythrobacter*) (4 个, 图 6)。

3 讨论与结论

目前报道的具有的木质素降解功能的细菌分离自土壤、腐木、白蚁肠道、牛瘤胃、植物根际和造纸废水等环境, 它们分布于 7 个纲中的 28 个属, 包括隶属于 α -变形杆菌纲的苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)和土壤杆菌属(*Agrobacterium*), 隶属于 β -变形菌纲的贪铜菌属(*Cupriavidus*)、丛毛单胞菌属(*Comamonas*)、霍尔德氏菌属(*Burkholderia*)和潘多拉菌属(*Pandora*), 隶属于 γ -变形杆菌纲的 *Pseudomonas*、固氮菌属(*Azotobacter*)、拉恩氏菌属(*Rahnella*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)、拉布斯菌

属(*Trabulsiella*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)和柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*), 隶属于放线菌纲的红球菌属(*Rhodococcus*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、微球菌属(*Micrococcus*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、拟无枝菌酸菌属(*Amycolatopsis*)、*Saccharomonaspora* 和高温双歧菌属(*Thermobifida*), 隶属于芽孢杆菌纲

的芽孢杆菌属(*Bacillus*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、赖氨酸芽孢杆菌属(*Lysinibacillus*)和地芽孢杆菌属(*Geobacillus*), 隶属于鞘脂杆菌纲(*Sphingobacteriia*)的鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium*), 以及隶属于拟杆菌纲(*Bacteroidia*)的 *Dysgonomonas*^[12-13]。

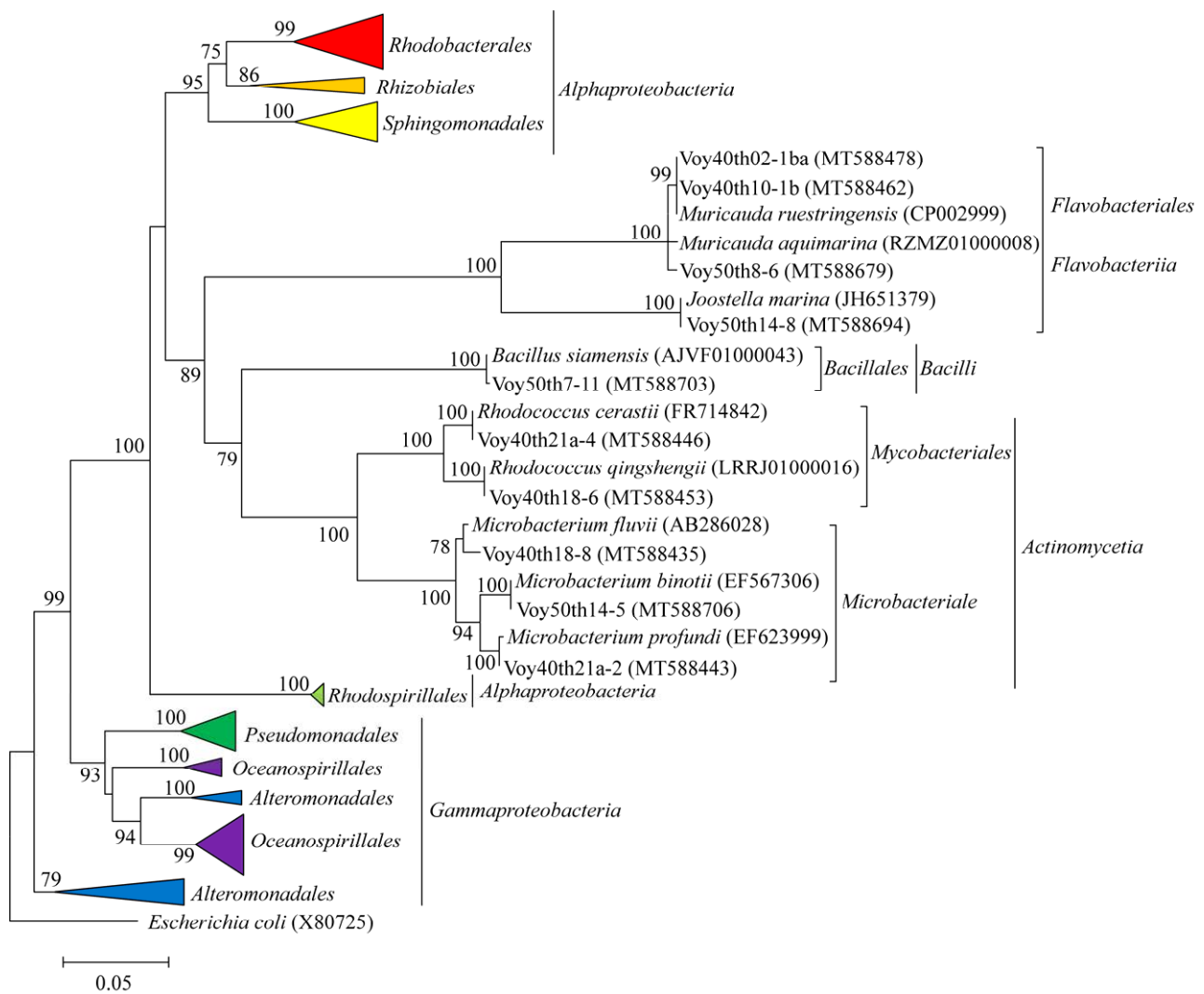


图4 纲和目水平潜在木质素降解菌 16S rRNA 基因系统发育树

Figure 4 Neighbor-joining tree of 16S rRNA gene sequences of potential lignin-degrading bacteria at the class and order level

注: 括号中数值为 GenBank 登录号; 分支处标注有自展值; 标尺 0.05 代表核苷酸替换率。下同

Note: Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; The bootstrap values are shown at the node; The scale bar indicates 0.05 substitutions per nucleotide position. The same below

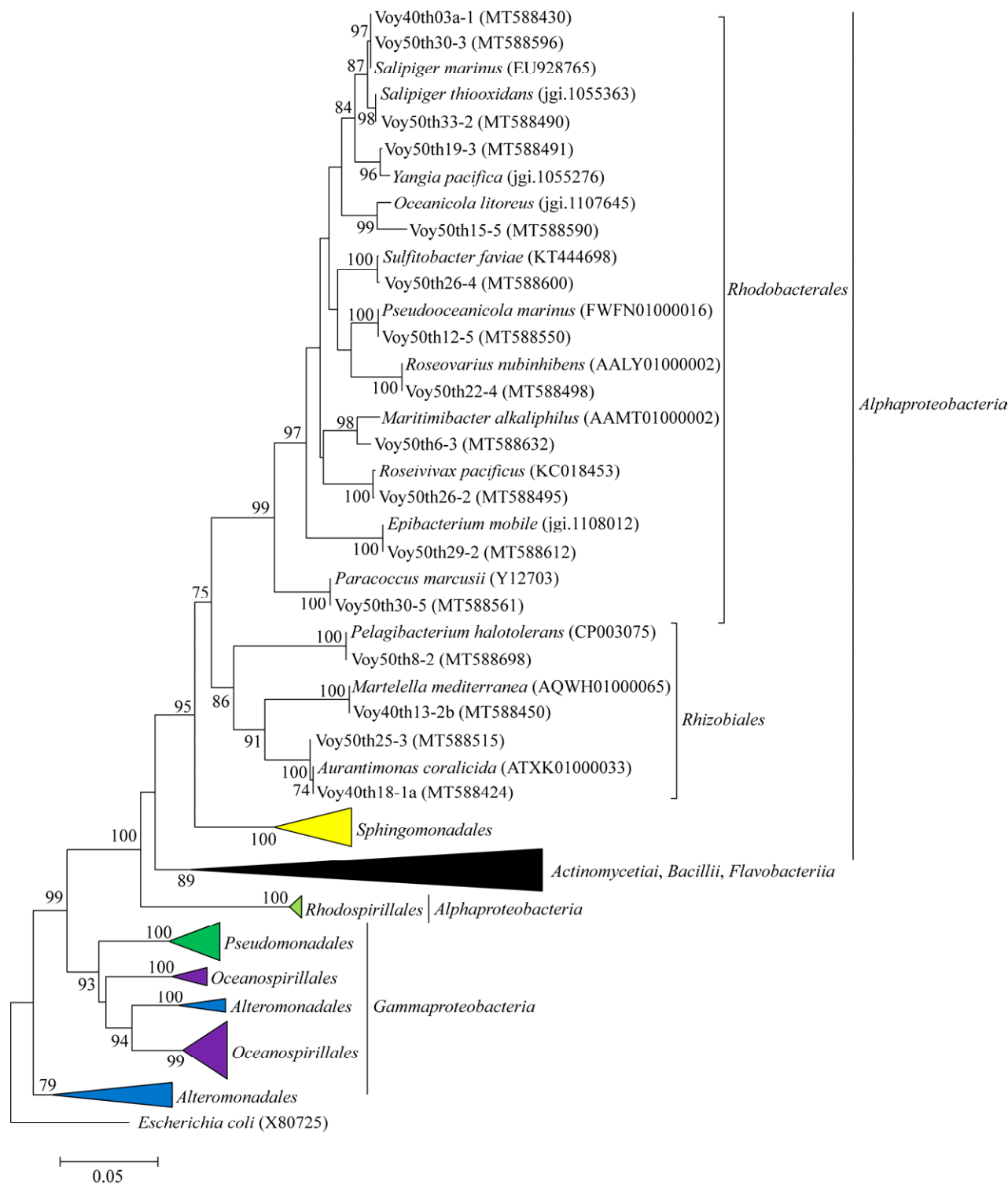


图 5 隶属于红细菌目和根瘤菌目 13 个属潜在木质素降解菌基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树
Figure 5 Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences of potential lignin-degrading bacteria belonged to 13 genera in Rhodobacterales and Rhizobiales

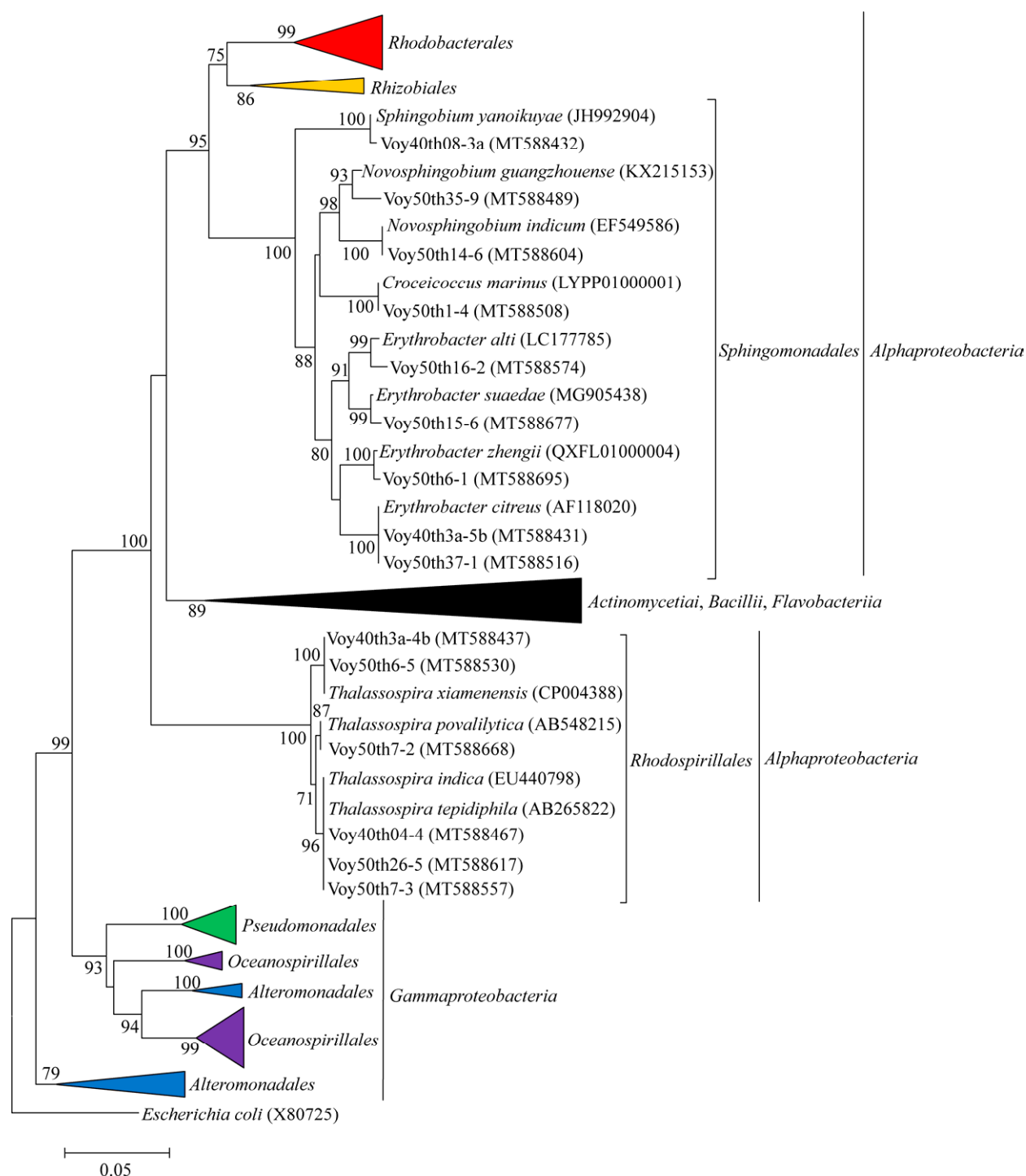


图 6 隶属于鞘脂单胞菌目和红螺菌目 5 个属潜在木质素降解菌基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Figure 6 Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences of potential lignin-degrading bacteria belonged to five genera in *Sphingomonadales* and *Rhodospirillales*

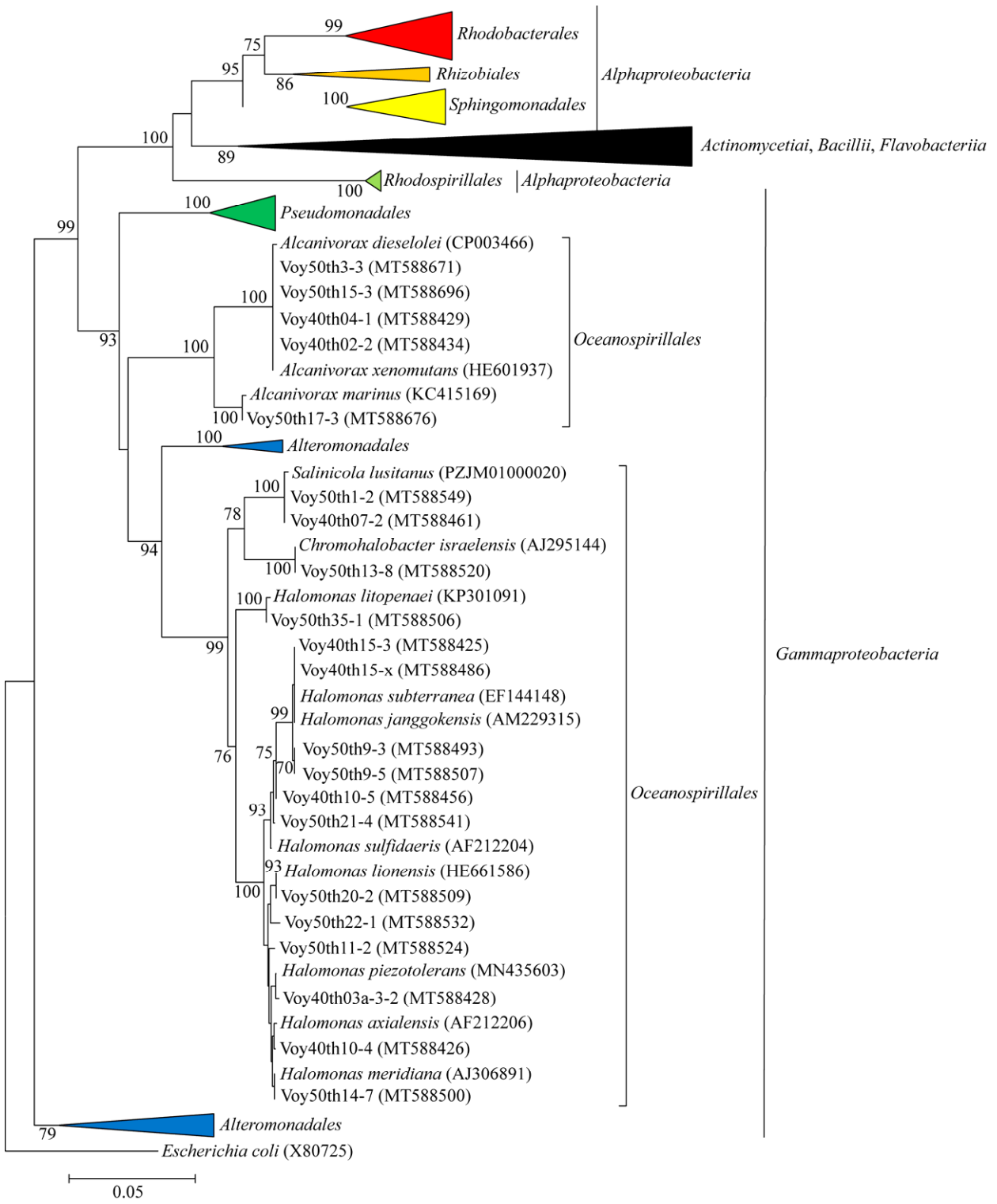


图 7 隶属于海洋螺菌目 4 个属潜在木质素降解菌基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树
Figure 7 Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences of potential lignin-degrading bacteria belonged to four genera in Oceanospirillales

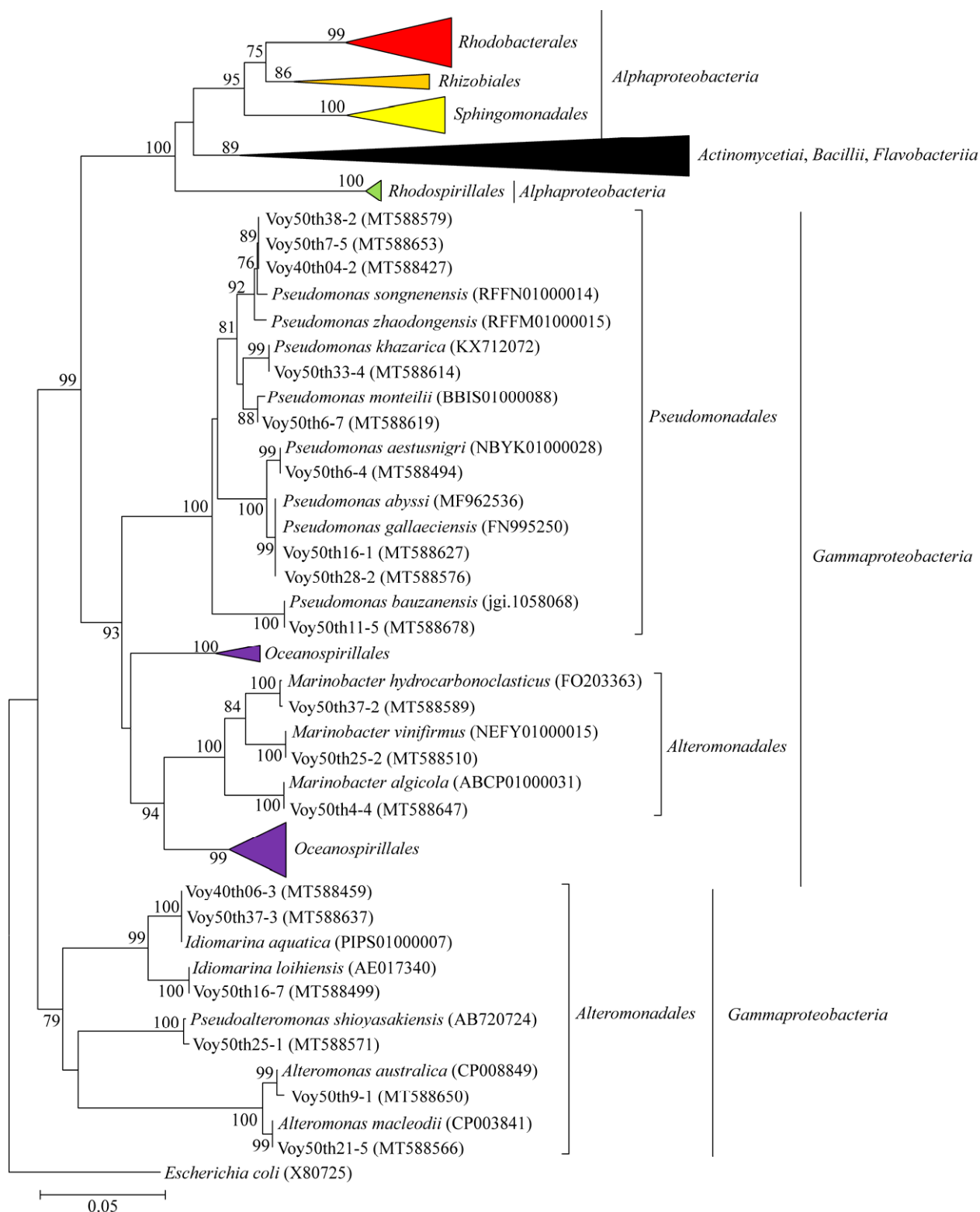


图 8 隶属于假单胞菌目和交替单胞菌目 5 个属潜在木质素降解菌基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Figure 8 Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences of potential lignin-degrading bacteria belonged to five genera in *Pseudomonadales* and *Alteromonadales*

截至目前, 有关来源于海洋环境的木质素降解菌鲜有报道。Woo 等^[14]用含木质素的培养基对来自东地中海表层海水(50 m)中的微生物进行富集, 实验发现: 经过 2 次连续孵育后, 适应木质素的微生物群落对木质素的矿化率提高了; 基于宏基因组测序表明, 响应木质素的芳香化合物降解基因的丰度更高, 特别是苯乙酰辅酶 A, 这可能是海洋微生物适应波动氧浓度的有效策略; 16S rRNA 基因扩增子测序表明, 在响应木质素的微生物群落中, γ -变形菌纲和 α -变形菌纲(如 *Idiomarinaceae*、*Alcanivoraceae* 和 *Alteromonadaceae*) 的丰度明显升高, 而子囊菌和担子菌的丰度仍很低。基于上述研究结果, Woo 等认为, 在环境条件不利于真菌生长的东地中海, 利用苯乙酰辅酶 A 途径的细菌是木质素的主要降解者^[14]。

太平洋多金属结核区地处热带海域, 平均水深在 4 000 m 以上, 除一般深海环境的高压、低温、黑暗等特点外, 多金属结核区沉积物还含有丰富的金属资源, 包括锰、铁、镍、钴和铜等几十种元素, 这些金属以结核的形式分布在深海沉积物的表面, 造就了该区域环境的特殊性。近年来, 我国科研工作者对东太平洋和西太平洋多金属结核区的微生物多样性进行了较为系统的分析, 然而尚未涉猎结核区木质素降解菌的研究工作。本实验对西太平洋和东太平洋 2 个结核区 50 个站位中的潜在木质素降解菌进行了筛选与鉴定, 结果发现: (1) 尽管同一结核区不同站位间地理位置非常接近, 但是其中潜在的木质素降解菌多样性则存在较大差异; (2) 虽然东太平洋和西太平洋 2 个多金属结核区站位间的地理距离远, 但仍存在一些共有的潜在木质素降解菌群; (3) 从 50 个站位分离到的潜在木质素降解优势种群也是所处环境的优势种群, 如变形菌门。

目前报道的参与木质素降解的酶类包括木质素修饰酶和木质素降解辅助酶两大类。其中修饰酶主要包括漆酶、木质素过氧化物酶、锰过氧化

物酶、多功能过氧化物酶以及最近发现的染料脱色型过氧化物酶^[15-16]。目前发现的木质素降解辅助酶主要有乙二醛氧化酶、芳醇氧化酶、纤维二糖脱氢酶、葡萄糖脱氢酶和吡喃糖 2-氧化酶^[5,17-21]。本实验利用含苯胺蓝的脱色培养基对 283 株细菌的木质素降解潜力进行了分析, 实验结果表明, 高达 93% 的菌株具有产木质素降解酶的能力。后续实验还需对这些菌株的木质素修饰酶和木质素降解辅助酶活性进行检测, 以便更加确切地掌握这些菌株的木质素降解潜力。

REFERENCES

- [1] Lee J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol[J]. *Journal of Biotechnology*, 1997, 56(1): 1-24
- [2] Rinaldi R, Jastrzebski R, Clough MT, Ralph J, Kennema M, Bruijninx PCA, Weckhuysen BM. Paving the way for lignin valorisation: recent advances in bioengineering, biorefining and catalysis[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2016, 55(29): 8164-8215
- [3] Beckham GT, Johnson CW, Karp EM, Salvachúa D, Vardon DR. Opportunities and challenges in biological lignin valorization[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2016, 42: 40-53
- [4] Xu ZX, Lei P, Zhai R, Wen ZQ, Jin MJ. Recent advances in lignin valorization with bacterial cultures: microorganisms, metabolic pathways, and bio-products[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12(1): 32
- [5] Martínez AT, Speranza M, Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, Martínez MJ, Gutiérrez A, Del Río JC. Biodegradation of lignocelluloses: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin[J]. *International Microbiology*, 2005, 8(3): 195-204
- [6] Bugg TDH, Ahmad M, Hardiman EM, Rahmanpour R. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi[J]. *Natural Product Reports*, 2011, 28(12): 1883-1896
- [7] Lee S, Kang M, Bae JH, Sohn JH, Sung BH. Bacterial valorization of lignin: strains, enzymes, conversion pathways, biosensors, and perspectives[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2019, 7: 209
- [8] Ravi K, Garcia-Hidalgo J, Gorwa-Grauslund MF, Lidén G. Conversion of lignin model compounds by *Pseudomonas putida* KT2440 and isolates from compost[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(12): 5059-5070
- [9] Yu TT, Wu WC, Liang WY, Lever MA, Hinrichs KU, Wang FP. Growth of sedimentary *Bathyarchaeota* on lignin as an energy source[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(23): 6022-6027
- [10] Kim M, Oh HS, Park SC, Chun J. Towards a taxonomic

- coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(Pt 2): 346-351
- [11] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406-425
- [12] Haq I, Mazumder P, Kalamdhad AS. Recent advances in removal of lignin from paper industry wastewater and its industrial applications: a review[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 312: 123636
- [13] Voß H, Heck CA, Schallmey M, Schallmey A. Database mining for novel bacterial β -etherases, glutathione-dependent lignin-degrading enzymes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(2): e02026-19
- [14] Woo HL, Hazen TC. Enrichment of bacteria from eastern Mediterranean sea involved in lignin degradation via the phenylacetyl-CoA pathway[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 922
- [15] Hammel KE, Cullen D. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2008, 11(3): 349-355
- [16] Liers C, Bobeth C, Pecyna M, Ullrich R, Hofrichter M. DyP-like peroxidases of the jelly fungus *Auricularia auricularjudae* oxidize nonphenolic lignin model compounds and high-redox potential dyes[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85(6): 1869-1879
- [17] Kersten PJ. Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: its characterization and activation by lignin peroxidase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87(8): 2936-2940
- [18] Ferreira P, Hernández-Ortega A, Herguedas B, Rencoret J, Gutiérrez A, Martínez MJ, Jiménez-Barbero J, Medina M, Martínez ÁT. Kinetic and chemical characterization of aldehyde oxidation by fungal aryl-alcohol oxidase[J]. *The Biochemical Journal*, 2010, 425(3): 585-593
- [19] Beeson WT, Vu VV, Span EA, Phillips CM, Marletta MA. Cellulose degradation by polysaccharide monooxygenases[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2015, 84: 923-946
- [20] Sygmond C, Staudigl P, Klausberger M, Pinotsis N, Djinić-Carugo K, Gorton L, Haltrich D, Ludwig R. Heterologous overexpression of *Glomerella cingulata* FAD-dependent glucose dehydrogenase in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2011, 10: 106
- [21] Pitsawong W, Sucharitakul J, Prongjit M, Tan TC, Spadiut O, Haltrich D, Divne C, Chaiyen P. A conserved active-site threonine is important for both sugar and flavin oxidations of pyranose 2-oxidase[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(13): 9697-9705