

研究报告

低温纤维素降解细菌 *Duganella* sp. 的分离及降解能力解析陈昭¹, 王敬红¹, 邓常宇¹, 邹世杰¹, 范寒雪¹, 魏丹³, 孙宇峰⁴, 王伟东^{*1,2}

1 黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院, 黑龙江 大庆 163319

2 东北林业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150400

3 北京市农林科学院植物营养与资源环境研究所, 北京 100097

4 黑龙江省科学院大庆分院, 黑龙江 大庆 163319

陈昭, 王敬红, 邓常宇, 邹世杰, 范寒雪, 魏丹, 孙宇峰, 王伟东. 低温纤维素降解细菌 *Duganella* sp. 的分离及降解能力解析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(6): 2158-2169.

CHEN Zhao, WANG Jinghong, DENG Changyu, ZOU Shijie, FAN Hanxue, WEI Dan, SUN Yufeng, WANG Weidong. Isolation of a *Duganella* sp. of degrading cellulose bacterium at low temperatures and analysis of its degradation capacity[J]. Microbiology China, 2024, 51(6): 2158-2169.

摘要: 【背景】低温是寒区秸秆还田后微生物降解的主要限制因素之一。【目的】获得低温纤维素降解细菌以提高寒区秸秆资源化利用率低的问题。【方法】取冬季土壤样品进行富集, 以羧甲基纤维素钠(sodium carboxymethyl cellulose, CMC-Na)为唯一碳源, 采用稀释涂布等方法分离纯培养菌株, 通过单因素试验及正交试验对菌株产酶条件进行优化。【结果】获得一株 15 °C 条件下降解纤维素的细菌, 初步归类为杜辮氏菌属(*Duganella*)。其最佳产酶条件为: 培养温度 15 °C, 初始 pH 值 7.0, 装液量 50/100 mL, 接种量 12.5%, 此时的 CMC 酶活最高为 398.2 U/mL, 比优化前提高了 40.45%。菌株在最佳培养条件下对滤纸、水稻秸秆和玉米秸秆的降解率分别为 19.24%、9.48% 和 7.30%。【结论】本研究为寒区秸秆降解微生物资源提供了新的菌种资源, 同时为后续低温纤维素降解菌株的研究提供了数据参考。

关键词: 低温; 纤维素降解; 产酶条件优化

资助项目: 国家自然科学基金区域创新发展联合基金(U22A20444); 国家重点研发计划(2023YFD1500501); 中央高校基本科研业务费专项基金(2572023CT08)

This work was supported by the Joint Funds of the National Natural Science Foundation of China (U22A20444), the National Key Research and Development Program of China (2023YFD1500501), and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2572023CT08).

*Corresponding author. E-mail: wwdeyy@126.com

Received: 2023-12-31; Accepted: 2024-01-22; Published online: 2024-03-11

Isolation of a *Duganella* sp. of degrading cellulose bacterium at low temperatures and analysis of its degradation capacity

CHEN Zhao¹, WANG Jinghong¹, DENG Changyu¹, ZOU Shijie¹, FAN Hanxue¹, WEI Dan³, SUN Yufeng⁴, WANG Weidong^{*1,2}

1 College of Life Science and Biotechnology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, Heilongjiang, China

2 College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150400, Heilongjiang, China

3 Institute of Plant Nutrition, Resources and Environment, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China

4 Daqing Branch of Heilongjiang Academy of Sciences, Daqing 163319, Heilongjiang, China

Abstract: [Background] Low temperatures are one of the main factors limiting microbial degradation of straw returned to the field in cold regions. [Objective] To obtain the bacterial strains capable of degrading cellulose at low temperatures to improve the straw reutilization in cold regions. [Methods] The soil samples were collected in winter for strain enrichment with sodium carboxymethyl cellulose (CMC-Na) as the sole carbon source. The pure culture of the strain was obtained by the dilution-plate coating method, and the enzyme production conditions of the strain were optimized by single factor and orthogonal tests. [Results] A cellulose-degrading strain was obtained at 15 °C and identified as *Duganella* sp. The optimal enzyme production conditions of the strain were incubation with the liquid loading volume of 50/100 mL and inoculum volume of 12.5% at 15 °C and initial pH 7.0, under which the highest CMC enzyme activity was 398.2 U/mL, 40.45% higher than that before optimization. The degradation rates of filter paper, rice straw, and maize straw by the strain were 19.24%, 9.48%, and 7.30%, respectively, under optimal culture conditions. [Conclusion] This study provides new strain resources for straw degrading microbial resources in cold regions, as well as data reference for subsequent research on low temperature cellulose-degrading strains.

Keywords: low temperature; cellulose degradation; optimization of enzyme production conditions

纤维素是秸秆的主要成分之一，约占秸秆成分的 30%–40%^[1]。我国秸秆产量大、种类繁多，每年因秸秆产生的资源浪费、环境污染等问题引起了广泛的关注。据统计，东北地区秸秆产量占全国秸秆总产量的 21.63%，秸秆利用率仅为 63.43%^[2]。东北地区由于具有冬季气温低、持续时间长等特点，作物收获后秸秆降解速度慢，很难在春季耕作前全部腐解^[3]。生产中常使用秸秆分解菌剂加速秸秆的降解^[4]。获取低温纤维素降解微生物资源是促进还田秸秆

加速降解的关键方法之一。

目前，已被筛选出的纤维素降解菌株的种类很多，如真菌、细菌、放线菌。相较于真菌和放线菌，细菌对极端环境的适应能力较强且产生的纤维素酶活性较高^[5]。孟建宇等^[6]从内蒙古西部地区偏碱性土壤中共分离出 5 株低温 (4 °C) 嗜碱性纤维素降解细菌，其酶活最高的菌株为类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*)。单建荣等^[7]从黑龙江省哈尔滨牛场的冻牛粪和辽宁省凤凰山冻土中共分离得到 11 株低温 (9 °C) 纤维素降

解纯培养菌株, 刚果红降解圈最大的菌株为假单胞菌属(*Pseudomonas*)。Thakur 等^[8]从喜马拉雅山不同地点共获得低温(10 °C)细菌 355 株、嗜冷(4 °C)细菌 35 株; 其中, 假单胞菌属(*Pseudomonas*)最多, 其次为芽孢杆菌属(*Bacillus*)、地芽孢杆菌属(*Geobacillus*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)和黄杆菌属(*Flavobacterium*); 这些细菌都可以在 pH 5.0–10.0、NaCl 浓度为 2% 下生长, 并且 70% 以上都具有纤维素降解能力。由此可见, 细菌在低温环境中依然具有分布广泛、种类繁多的特点, 是当前纤维素类物质降解研究的首选。由于样品的地理位置不同导致获得的微生物资源种类各不相同, 对纤维素的降解能力也存在差异。然而, 已获得的低温纤维素降解细菌类型较少, 降解能力不能满足实际的需求, 需要扩充低温高效纤维素降解菌种资源。

为了获得适宜东北黑土区的秸秆降解和纤维素酶产酶能力较强的纯培养菌株, 扩展低温纤维素降解微生物资源, 本研究从冬季东北黑土区的土壤中分离低温纤维素降解细菌, 通过优化菌株的产酶条件并分析其对滤纸、水稻秸秆和玉米秸秆的降解能力, 以期寒冷地区秸秆快速降解提供新的菌种资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

取冬季乌苏里江边农田(134°18.51'E, 48°22.10'N)土壤样品, 取样时气温为 9 °C, 使用取样器采集 5–10 cm 深的土壤于自封袋内冰袋箱保存, 返回实验室于 4 °C 冰箱保存备用。

1.1.2 培养基

初筛培养基(g/L): CMC-Na 10.0, (NH₄)₂SO₄

1.0, MgSO₄·7H₂O 0.5, KH₂PO₄ 1.0, NaCl 0.3, 琼脂粉 20.0。

产酶培养基(g/L): 在初筛培养基的基础上, 添加 1.0 酵母浸粉。

纤维索材料降解培养基: 在产酶培养基的基础上, 将 10.0 g/L CMC-Na 分别替换为 5.0 g/L 滤纸、5.0 g/L 水稻秸秆和 5.0 g/L 玉米秸秆。

不同纤维材料的处理: 使用前将滤纸剪成 1 cm×1 cm 的正方形, 水稻秸秆和玉米秸秆剪成 2 cm 的小段, 在 105 °C 烘干 8 h 后加入培养基中。

1.1.3 主要试剂和仪器

CMC-Na, 西陇科学股份有限公司; (NH₄)₂SO₄, 福晨(天津)化学试剂有限公司; MgSO₄·7H₂O 和 NaCl, 天津市鼎盛鑫化工有限公司; 酵母浸粉, 北京奥博星生物技术有限责任公司; 刚果红, 天津市科密欧化学试剂有限公司; 革兰氏染色试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司; TIANamp Bacteria DNA Kit, 天根生化科技(北京)有限公司。

紫外分光光度计, 北京普析通用仪器有限公司; 扫描电镜, 日立科学仪器(北京)有限公司; 微型 pH 计, Horiba 公司。

1.2 低温纤维素降解菌株的筛选

1.2.1 菌株的初筛

取 5 g 土壤样品置于装有 50 mL 灭菌蒸馏水的 100 mL 锥形瓶中, 15 °C、160 r/min 振荡培养 1 h 后静置 30 min。取上清液进行稀释涂布, 分别选取 10⁻³–10⁻⁶ 稀释液于初筛培养基内进行涂布, 每个梯度 3 个重复, 15 °C 静置培养。待有菌落长出后分别挑取不同形态的菌落进行划线培养, 反复划线后得到纯培养菌株。

1.2.2 菌株的复筛

将得到的纯培养菌株点种于初筛培养基中

间位置, 15 °C 培养 7–10 d 后用 1.0 g/L 刚果红溶液浸染 1 h, 弃掉溶液, 再加入 1 mol/L NaCl 溶液脱色 1 h, 选取有透明圈出现的菌株进行后续试验。测定菌株水解圈直径(D , cm)和菌落直径(d , cm), 并根据水解圈直径与菌落直径的比值(D/d)判断菌株产纤维素酶的能力。

1.3 纤维素酶活力测定

CMC 酶活和滤纸酶活的测定方法参照文献[9]并稍作改动。

将菌株接种于液体产酶培养基中 15 °C 静置培养 18 d, 每 48 h 取 2 mL 菌液, 3 个重复, 15 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 将上清液分别加入以 1% 的 CMC 溶液和滤纸条为反应底物的试管中, 以未接菌培养基的上清液作为对照, 15 °C 反应 30 min 后立即加入 2 mL DNS 试剂终止反应。在紫外分光光度计波长为 540 nm 下测定菌株的吸光值, 并通过标准曲线分别计算出 CMC 和滤纸酶活力大小。

1.4 菌种鉴定

1.4.1 形态学鉴定

将菌株接种于初筛培养基中, 固体培养基用于观察革兰氏染色和芽孢染色, 液体培养基用于扫描电镜观察。革兰氏染色方法参照文献[10]。芽孢染色方法参照文献[11]。在无菌环境下, 取 1 mL 菌液在 10 000 r/min 下离心 5 min, 倒掉上清加入 2.5% 的戊二醛固定液过夜; 用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)漂洗 3 次, 每次 15 min; 用 1% 钼酸溶液固定样品, 1–2 h 后倒掉废液并漂洗 3 次; 用 30%、50%、70%、90%、100% 的乙醇进行梯度脱水, 每个梯度脱水 2 次, 每次 15 min; 最后将处理好的样品置于扫描电镜下观察并拍照。

1.4.2 生理生化鉴定

参照《常见细菌与古菌系统分类鉴定手册》^[12]

和《伯杰氏系统细菌学手册》^[13]的研究方法, 通过淀粉水解试验、明胶液化试验、甲基红试验、V-P 试验、硫化氢产气试验、碳源(葡萄糖、蔗糖、乳糖、半乳糖和甘露醇)利用试验, 对菌株生理生化特性进行鉴定。

1.4.3 分子生物学鉴定

利用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TAGGGTTACCTTGTTACGACTT-3')对菌株进行 16S rRNA 基因序列扩增。PCR 反应体系(50.0 μ L): 基因组 DNA (20 ng/ μ L) 1.0 μ L, 10 \times Buffer (含 2.5 mmol/L Mg^{2+}) 5.0 μ L, *Taq* 聚合酶(5 U/ μ L) 1.0 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 1.0 μ L, 27F 引物(10 μ mol/L) 1.5 μ L, 1492R 引物(10 μ mol/L) 1.5 μ L, ddH₂O 39.0 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 35 个循环; 72 °C 7 min。将纯化后的产物送至上海派森诺生物科技有限公司进行测序。使用 NCBI BLAST 程序将测序结果与数据库中的序列进行比对, 确定与目标菌株相似性最高的菌属, 并构建系统发育树。

1.5 产酶条件优化

1.5.1 单因素试验设计

在产酶培养基中其他成分不变的情况下, 选取初始 pH、装液量、接种量、温度、酵母添加量 5 个因素进行产酶条件优化。分别设置初始 pH 值为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0, 装液量为 40/100、50/100、60/100、70/100、80/100 (mL/mL), 接种量为 5.0%、7.5%、10.0%、12.5%、15.0%, 培养温度为 5、10、15、20、25 °C, 酵母添加量为 0.50、0.75、1.00、1.25、1.50 g/L, 测定以上条件下菌株 CMC 酶活力。

1.5.2 正交试验设计

在单因素试验的基础上, 选取初始 pH、装液量、接种量和培养温度 4 个因素的显著范围,

如表 1 所示。使用 SPASSAU 在线软件设计四因素三水平试验方案,以 CMC 酶活为响应值,对菌株的培养条件进行优化。

1.5.3 产酶条件验证试验

将菌株接种于最佳培养条件下进行培养,传代稳定后,测定其 CMC 酶活力大小,并与优化前的酶活进行对比。

1.6 对不同纤维材料的降解

采用优化后的培养条件,将菌株分别接种于已灭菌且含有 60 mL 产酶培养基的 100 mL 锥形瓶中,瓶内分别加入 0.3 g 烘干后的滤纸片、剪成 2 cm 小段的水稻秸秆及玉米秸秆,15 °C 静置培养,每 48 h 取样 1 次,每次 3 个重复,使用失重法^[14]测定菌株在生长过程中对不同纤维材料的降解能力,并利用 Origin 8.5 软件对数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离与筛选

使用初筛培养基反复划线培养共获得 7 株单菌,经刚果红染色及 NaCl 溶液脱色后有 1 株单菌出现较明显的透明圈,如图 1 所示,将其命名为 BYAU-LC3。产生的水解圈直径为 3.5 cm,菌落直径为 0.8 cm。菌株 BYAU-LC3 在生长过程中纤维素酶活力变化如图 2 所示。在第 0–2 天滤纸酶活和 CMC 酶活快速升高,分别为 129.58 U/mL 和 125.35 U/mL,之后滤纸



图 1 菌株 BYAU-LC3 产生透明圈

Figure 1 Strain BYAU-LC3 produces hyaline circles.

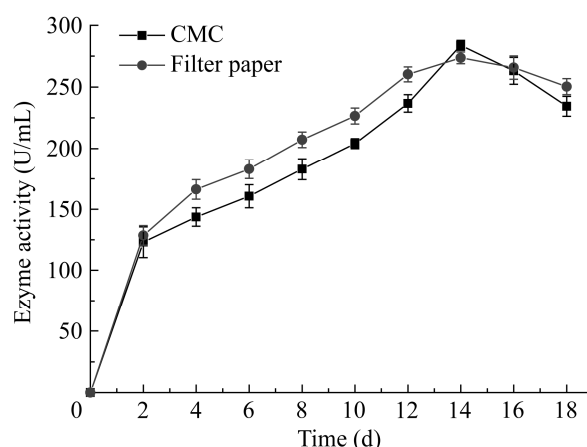


图 2 菌株 BYAU-LC3 纤维素酶活力变化

Figure 2 Changes in cellulase activity of strain BYAU-LC3.

酶活一直高于 CMC 酶活,在第 14 天 CMC 酶活超过滤纸酶活达到最高值为 283.51 U/mL,因此,选择 CMC 酶活作为后续试验的响应值。

2.2 鉴定结果

2.2.1 形态学鉴定结果

菌株 BYAU-LC3 在初筛培养基上呈不规则形状,乳白色不透明,表面有褶皱,质地如胶一样黏稠,单个菌落易挑起、不易分离,如图 3 所示。经扫描电镜观察,菌株 BYAU-LC3 为革兰

表 1 正交因素水平设计

Table 1 Orthogonal factor level design

序号 Number	初始 pH Initial pH	培养温度 Culture temperature (°C)	装液量 Liquid loading volume (mL)	接种量 Inoculum volume (%)
1	6.0	5	40	10.0
2	7.0	10	50	12.5
3	8.0	15	60	15.0

氏阴性,无孢子产生。扫描电镜结果显示,菌体长度约为 $0.93\ \mu\text{m}$,直径约为 $0.53\ \mu\text{m}$,呈短杆状且两端钝圆,表面粗糙有颗粒感,如图 4 所示。

2.2.2 生理生化鉴定结果

菌株 BYAU-LC3 的生理生化试验结果如表 2 所示,淀粉水解试验和明胶液化试验结果呈阳性,说明菌株 BYAU-LC3 能够水解淀粉和明胶;甲基红试验、V-P 试验、硫化氢产气试验结果呈阴性,说明菌株 BYAU-LC3 不能产生酸性物



图 3 菌株 BYAU-LC3 形态观察

Figure 3 Morphological observation of strain BYAU-LC3.

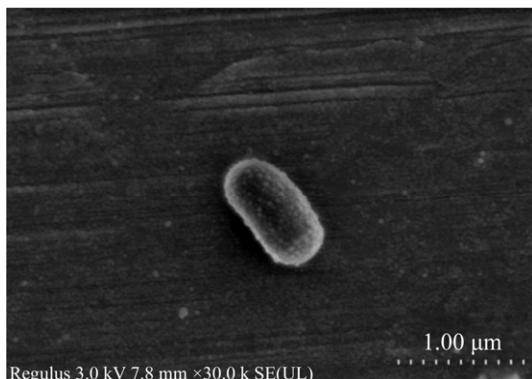


图 4 菌株 BYAU-LC3 电镜观察(3 000×)

Figure 4 Electron microscopic observation of strain BYAU-LC3 (3 000×).

表 2 菌株 BYAU-LC3 生理生化特性

Table 2 Physiological and biochemical properties of strain BYAU-LC3

Item	Result
淀粉水解试验	+
Starch hydrolysis test	
明胶液化试验	+
Gelatin liquefaction test	
甲基红试验	-
Methyl red test	
V-P 试验	-
V-P test	
硫化氢产气试验	-
Hydrogen sulfide gas production test	
葡萄糖利用试验	+
Glucose utilization test	
蔗糖利用试验	+
Sucrose utilization test	
乳糖利用试验	+
Lactose utilization test	
半乳糖利用试验	+
Galactose utilization test	
甘露糖利用试验	-
Mannitol utilization test	

+: 反应为阳性; -: 反应为阴性

+: Reactions are positive; -: Reactions are negative.

质;碳源利用试验中的葡萄糖、蔗糖、乳糖、半乳糖利用试验结果呈阳性,甘露醇利用试验结果呈阴性,说明菌株 BYAU-LC3 能利用葡萄糖、蔗糖、乳糖和半乳糖。

2.2.3 分子生物学鉴定结果

将测序得到的序列在 NCBI BLAST 数据库进行比对,下载与菌株 BYAU-LC3 亲缘性最相似的 7 个标准菌株序列,并利用 MEGA 11 软件构建系统发育树,如图 5 所示。菌株 BYAU-LC3 与 *Duganella dendranthematis* 在同一个分支上,且一致性为 100%,结合形态学、生理生化特性初步判断为杜擗氏菌属(*Duganella*)。同时,菌株 BYAU-L3 的核酸序列已提交至 NCBI 数据库,获得的 GenBank 登录号为 PP448179。

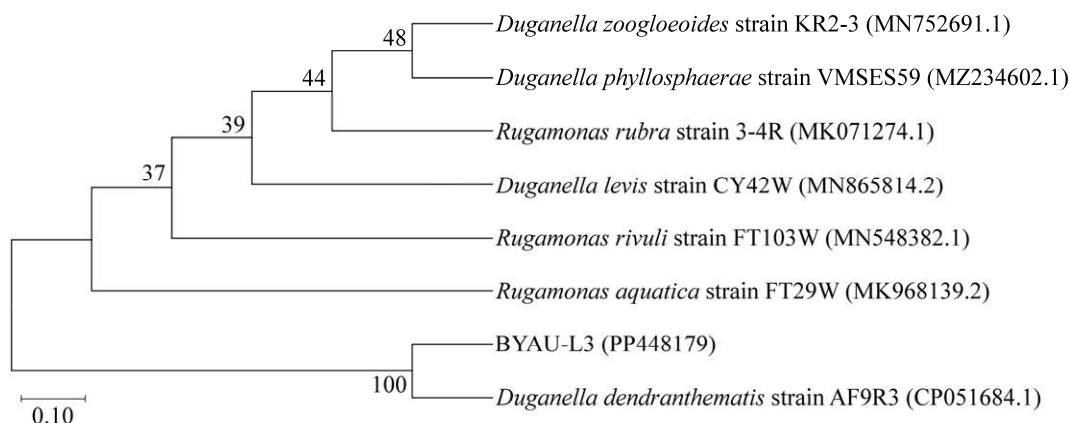


图 5 菌株 BYAU-LC3 的系统发育树 参与对比的标准菌株登录号列于括号中；分支位置的数字代表自展值；标尺长度为 0.1 核苷酸置换率

Figure 5 Phylogenetic tree of strain BYAU-LC3. Preservation numbers of standard strains involved in the comparison are listed in parentheses; Numbers in branch positions represent self-expansion values; Scale lengths are 0.1 nucleotide substitution rates.

2.3 单因素试验结果

2.3.1 培养温度对 CMC 酶活力的影响

不同培养温度对菌株 BYAU-LC3 CMC 酶活力的影响如图 6 所示。当培养温度为 10 °C 时，酶活最高为 421.33 U/mL；当培养温度为 25 °C 时，酶活力最低为 313 U/mL；说明菌株 BYAU-LC3 适合在较低的温度下生长，因此，选择培养温度在 5–15 °C 区间进行后续试验。

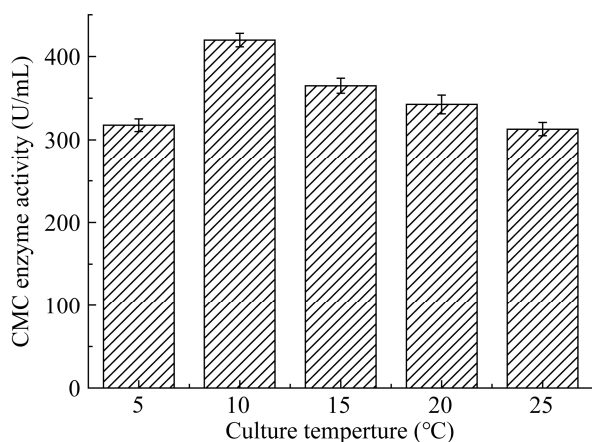


图 6 培养温度对 CMC 酶活的影响

Figure 6 Effect of culture temperature on CMC enzyme activity.

2.3.2 初始 pH 对 CMC 酶活力的影响

不同初始 pH 对菌株 BYAU-LC3 CMC 酶活力的影响如图 7 所示。当初始 pH 值为 6.0 时，酶活最高为 382.67 U/mL；当初始 pH 值为 9.0 时，酶活最低为 213.83 U/mL；说明菌株 BYAU-LC3 适合在偏酸性环境下生长，因此，选择初始 pH 值在 5.0–7.0 区间进行后续试验。

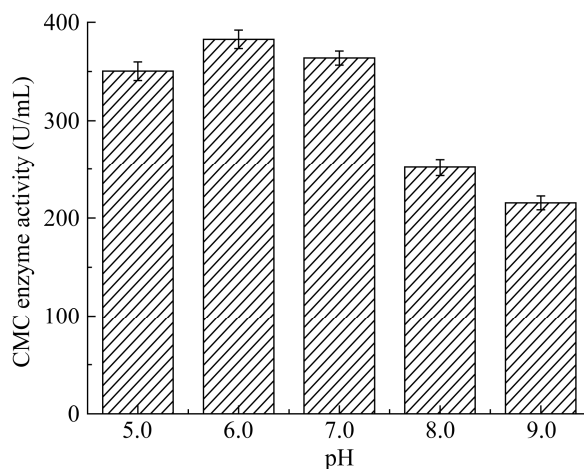


图 7 初始 pH 值对 CMC 酶活的影响

Figure 7 Effect of initial pH on CMC enzyme activity.

2.3.3 装液量对 CMC 酶活力的影响

不同装液量对菌株 BYAU-LC3 CMC 酶活力的影响如图 8 所示。当装液量为 50 mL 时, 酶活最高为 433.13 U/mL; 当装液量为 80 mL 时, 酶活最低为 331 U/mL; 说明菌株 BYAU-LC3 适合在氧气含量较高的环境下生长, 因此, 选择装液量在 40–60 mL 区间进行后续试验。

2.3.4 接种量对 CMC 酶活力的影响

不同接种量对菌株 BYAU-LC3 CMC 酶活力的影响如图 9 所示。当接种量为 12.5% 时, 酶活最高为 474.2 U/mL; 当接种量为 5.0% 时, 酶活最低为 252.98 U/mL; 说明菌株 BYAU-LC3 在接种量较高的环境下生长最快, 因此, 选择接种量在 10.0%–15.0% 区间进行后续试验。

2.3.5 酵母添加量对 CMC 酶活力的影响

氮源是微生物生长所必需的元素之一, 与无机氮源相比, 有机氮源不仅含有氮元素, 还包含其他生长所需要的营养。不同酵母添加量对菌株 BYAU-LC3 CMC 酶活力的影响, 如图 10 所示。当酵母添加量为 0.75 g/L 时, 酶活最高为 417.33 U/mL; 当酵母添加量为 1.50 g/L 时, 酶活最低为 301.33 U/mL; 说明酵母的添加量过

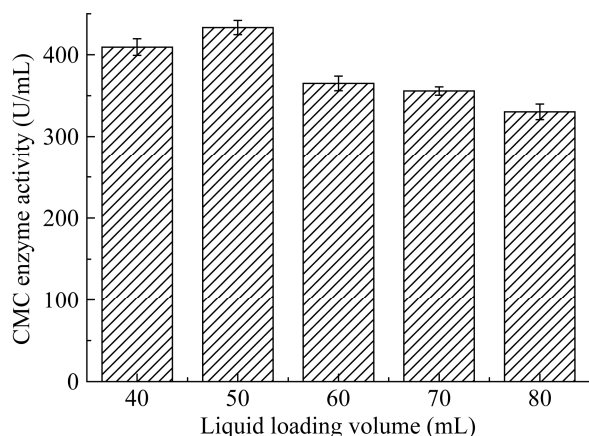


图 8 装液量对 CMC 酶活力影响

Figure 8 Effect of liquid loading volume on CMC enzyme activity.

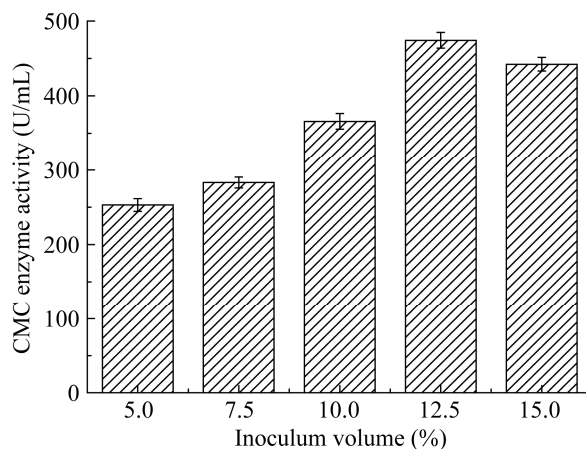


图 9 接种量对 CMC 酶活的影响

Figure 9 Effect of inoculum volume on CMC enzyme activity.

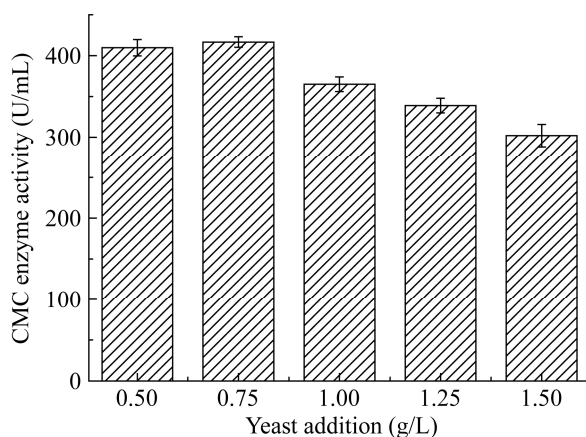


图 10 酵母添加量对 CMC 酶活的影响

Figure 10 Effect of yeast addition on CMC enzyme activity.

多会抑制微生物的活性, 因此, 选择酵母添加量在 0.50–1.00 g/L 区间进行后续试验。

2.4 正交试验结果

根据正交试验设计进行四因素三水平试验分析, 共 9 个试验点, 将最终获得的 CMC 酶活结果填入表 3 并对其进行方差分析。 K 代表 3 个水平结果的总和, k 代表 3 个水平结果总和的平均数。 R 是极差分析, 数值越大因素越显著。从 R 值可以看出, 因素的显著性大小依次为:

表 3 正交试验结果与方差分析

Table 3 Orthogonal test results and analysis of variance

序号 Number	A 初始 pH A Initial pH	B 培养温度 B Culture temperature (°C)	C 装液量 C Liquid loading volume (mL)	D 接种量 D Inoculum volume (%)	CMC 酶活 CMC enzyme activity (U/mL)
1	6.00	5.00	40.00	10.00	171.91
2	6.00	10.00	60.00	12.50	267.63
3	6.00	15.00	50.00	15.00	396.04
4	7.00	15.00	60.00	10.00	411.52
5	7.00	5.00	50.00	12.50	308.32
6	7.00	10.00	40.00	15.00	324.84
7	8.00	10.00	50.00	10.00	329.40
8	8.00	15.00	40.00	12.50	351.90
9	8.00	5.00	60.00	15.00	185.86
K_1	825.58	666.09	848.65	912.83	
K_2	1 044.68	911.87	1 033.76	917.85	
K_3	867.16	1 159.46	855.01	906.74	
k_1	275.19	222.03	282.89	304.28	
k_2	348.23	303.96	344.59	305.95	
k_3	289.05	386.49	285.00	302.25	
R	73.03	164.46	61.70	3.70	
离差平方和 Sum of squares	9 027.45	40 569.17	7 361.97	20.64	
自由度 Degree of freedom	2.00	2.00	2.00	2.00	
均方 Mean square	4 513.73	20 284.59	3 680.98	10.32	
F 值 F value	437.47	1 965.98	356.76	1.00	
P 值 P value	0.002 3	0.000 5	0.002 8	0.500 0	
最优培养条件 Optimal culture conditions	$B_3A_2C_2D_2$				

培养温度>初始 pH>装液量>接种量。根据 k 值最大水平得出菌株 BYAU-LC3 最佳培养条件为：培养温度 15 °C、初始 pH 值 7.0、装液量 50/100 mL、接种量 12.5%。 $P<0.05$ 说明得到的显著因素具有理论科学性。

2.5 优化条件验证

采用优化后的条件对菌株 BYAU-LC3 进行培养，得到 CMC 酶活力为 398.2 U/mL，比优化前的酶活力提高了 40.45%，说明正交试验优化的结果存在实际应用价值。

2.6 不同纤维材料的降解情况

菌株 BYAU-LC3 对滤纸、水稻秸秆和玉米秸秆的降解率变化如图 11 所示。滤纸在 0~2 d

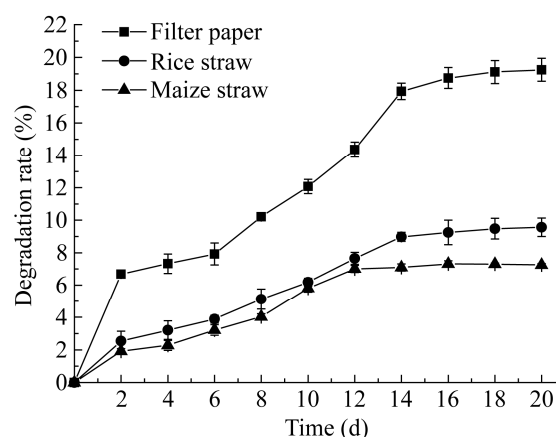


图 11 菌株 BYAU-LC3 对不同纤维素材料的降解情况

Figure 11 Degradation of different cellulosic materials by strain BYAU-LC3.

开始变黄, 2–6 d 大部分变黄, 6–14 d 逐渐崩解, 之后趋于平稳; 水稻秸秆的降解率在 2–14 d 逐渐升高, 14–18 d 缓慢上升, 18 d 后趋于平稳; 玉米秸秆的降解率在 2–8 d 缓慢上升, 8–12 d 快速升高到最高点后趋于平稳。在第 18 天, 滤纸、水稻秸秆和玉米秸秆的降解率分别为 19.24%、9.48%、7.30%。相较于水稻秸秆和玉米秸秆, 菌株 BYAU-LC3 对滤纸的降解效果最好。

3 讨论

目前, 已获得的低温纤维素降解细菌的种类多集中在变形菌门(*Proteobacteria*)^[15]、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)^[16]、厚壁菌门(*Firmicutes*)^[17]等, 本研究得到的杜擗氏菌属(*Duganella*)是已有研究中具有纤维素降解能力的新的菌属。李春艳等^[18]对筛选得到的低温纤维素降解细菌 FLX-1 的产酶条件优化后, 在 10 °C 下 CMC 酶活为 13.67 U/mL。本研究得到的菌株 BYAU-LC3 在 10 °C 下 CMC 酶活为 421.33 U/mL, 远高于李春艳等的研究结果。酶活差距较大的原因可能是采集的样品、所用培养基及菌种的理化性质不同。然而, 根据 Morita^[19]对嗜冷菌和耐冷菌的定义, 菌株 BYAU-LC3 被认为是耐冷菌。培养基中的成分以及 pH 值变化均是影响微生物活性的重要条件。王敬红等^[20]以硝酸铵、酒石酸铵、硝酸钠、氯化铵、酵母浸粉、尿素和蛋白胨为氮源种类进行条件优化, 最终得到硝酸钠为单一氮源的降解效果最好。本研究是通过改变酵母浸粉的添加量得到菌株的最佳产酶条件。孟建宇等^[21]分离出的常温纤维素降解细菌 CB04 最适产酶 pH 值为 7.0, 这与本研究的结果一致。综合以上研究, 菌株 BYAU-LC3 具有耐低温、产酶活性高的特性, 在一定的 pH 范围内能够产生纤维素酶。经过产酶条件优化后, 菌株 BYAU-LC3 的 CMC 酶活提高了 40.45%。

以往的研究表明, 通过固态发酵^[22]以及复合菌系的构建^[23]可以提高低温纤维素降解纯培养菌株对秸秆的降解能力。本研究分别测定了菌株 BYAU-LC3 在静置状态下对滤纸、水稻秸秆及玉米秸秆的降解率变化。结果表明, 菌株 BYAU-LC3 对玉米秸秆的降解率要低于水稻秸秆, 原因可能是玉米秸秆中木质素的含量较高^[24]或玉米秸秆角质层结构较复杂^[25], 使微生物很难穿透其表面对纤维素进行分解。然而, 菌株 BYAU-LC3 对滤纸的降解率高于水稻秸秆和玉米秸秆, 主要是滤纸的成分相对简单、对水的亲和力较强且表面有无数的小孔可供菌液通过。因此, 通过比较菌株 BYAU-LC3 对不同纤维材料的降解能力, 得出菌株 BYAU-LC3 对秸秆类纤维材料的降解能力与其呈现出的纤维素酶活力存在一定差异。

本研究主要从冬季土壤样品中获得一株纤维素酶活较高的纯培养菌株, 其对不同纤维材料具有一定的降解能力, 后续可以与其他具有纤维素降解能力的菌株构建成低温秸秆降解复合菌系, 以便更好地应用于寒区秸秆还田中。

4 结论

(1) 本试验筛选得到一株低温纤维素降解细菌 BYAU-LC3, 其 CMC 酶活最高为 283.51 U/mL。

(2) 最佳产酶条件为: 温度 15 °C、初始 pH 值 7.0、装液量 50/100 mL、接种量 12.5%, 此时的 CMC 酶活为 398.2 U/mL, 比优化前提高了 40.45%。

(3) 在最佳培养条件下, 菌株 BYAU-LC3 对滤纸、水稻秸秆和玉米秸秆的降解率分别为 19.24%、9.48%、7.30%。

(4) 该菌株在低温环境下的生长状态良好且具有一定的纤维素降解能力, 为寒区秸秆降解微生物资源提供了新的菌种资源。

REFERENCES

- [1] MENG LX, XU CX, WU FL. Microbial co-occurrence networks driven by low-abundance microbial taxa during composting dominate lignocellulose degradation[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 845: 157197.
- [2] 石祖梁, 贾涛, 王亚静, 王久臣, 孙仁华, 王飞, 李想, 毕于运. 我国农作物秸秆综合利用现状及焚烧碳排放估算[J]. *中国农业资源与区划*, 2017, 38(9): 32-37.
- SHI ZL, JIA T, WANG YJ, WANG JC, SUN RH, WANG F, LI X, BI YY. Comprehensive utilization status of crop straw and estimation of carbon from burning in China[J]. *Chinese Journal of Agricultural Resources and Regional Planning*, 2017, 38(9): 32-37 (in Chinese).
- [3] GONG M, WANG Y, BAO DP, JIANG S, CHEN HY, SHANG JJ, WANG XJ, YU HH, ZOU G. Improving cold-adaptability of mesophilic cellulase complex with a novel mushroom cellobiohydrolase for efficient low-temperature ensiling[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 376: 128888.
- [4] XU CF, SU X, WANG JH, ZHANG FZ, SHEN GN, YUAN Y, YAN L, TANG HZ, SONG FQ, WANG WD. Characteristics and functional bacteria in a microbial consortium for rice straw lignin-degrading[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 331: 125066.
- [5] DHAULANIYA AS, BALAN B, KUMAR M, AGRAWAL PK, SINGH DK. Cold survival strategies for bacteria, recent advancement and potential industrial applications[J]. *Archives of Microbiology*, 2019, 201(1): 1-16.
- [6] 孟建宇, 丁雪敏. 低温嗜碱性纤维素降解细菌的分离与鉴定[J]. *中国饲料*, 2020(11): 31-33.
- MENG JY, DING XM. Isolation and identification of cold-adapted basophilia cellulose-degrading bacteria[J]. *China Feed*, 2020(11): 31-33 (in Chinese).
- [7] 单建荣, 全鑫, 朱用哲, 邢宇, 张旭, 王宏燕, 范金霞. 一株低温纤维素降解菌的筛选与产酶条件优化[J]. *生态学杂志*, 2021, 40(4): 1128-1136.
- SHAN JR, QUAN X, ZHU YZ, XING Y, ZHANG X, WANG HY, FAN JX. Screening of a low-temperature cellulose-degrading bacterium and optimization of cellulase production conditions[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2021, 40(4): 1128-1136 (in Chinese).
- [8] THAKUR V, KUMAR V, KUMAR S, SINGH D. Diverse culturable bacterial communities with cellulolytic potential revealed from pristine habitat in Indian trans-Himalaya[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2018, 64(11): 798-808.
- [9] 张悦, 季静, 关春峰, 金超, 李倩, 闫豹, 王罡, 王昱蓉. 秸秆纤维素降解菌的筛选及其产酶特性研究[J]. *纤维素科学与技术*, 2018, 26(4): 28-38.
- ZHANG Y, JI J, GUAN CF, JIN C, LI Q, YAN B, WANG G, WANG YR. Screening of straw-degrading strains and their enzyme-producing conditions[J]. *Journal of Cellulose Science and Technology*, 2018, 26(4): 28-38 (in Chinese).
- [10] TRIPATHI N, SAPRA A. Gram staining[M]. *Treasure Island (FL): StatPearls Publishing*, 2023.
- [11] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2018.
- SHEN P, CHEN XD. Experiments in Microbiology[M]. *Beijing: Higher Education Press*, 2018 (in Chinese).
- [12] 东秀珠, 周宇光, 朱红慧, 蔡曼, 崔恒林, 戴欣, 高喜燕, 姜成英, 李爱华, 梁宗林, 刘洪灿, 刘庆, 刘阳, 刘志培, 宋磊, 辛玉华. 常见细菌与古菌系统分类鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2023.
- DONG XZ, ZHOU YG, ZHU HH, CAI M, CUI HL, DAI X, GAO XY, JIANG CY, LI AH, LIANG ZC, LIU HC, LIU Q, LIU Y, LIU ZP, SONG L, XIN YH. Handbook of Systematic Classification and Identification of Common Bacteria and Archaea[M]. *Beijing: Science Press*, 2023 (in Chinese).
- [13] BUCHANAN RE, GIBBONS NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所, 译. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.
- BUCHANAN RE, GIBBONS NE. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*[M]. Translated by Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, 8th ed. *Beijing: Science Press*, 1984 (in Chinese).
- [14] 王伟东, 王小芬, 刘长莉, 李玉花, 吕育财, 崔宗均. 木质纤维素分解菌复合系 WSC-6 分解稻秆过程中的产物及 pH 动态[J]. *环境科学*, 2008, 29(1): 219-224.
- WANG WD, WANG XF, LIU CL, LI YH, LÜ YC, CUI ZJ. Productions analyses and pH dynamics during rice straw degradation by the lignocellulose degradation bacteria system WSC-6[J]. *Environmental Science*, 2008, 29(1): 219-224 (in Chinese).
- [15] JANG J, ANDERSON EL, VENTEREA RT, SADOWSKY MJ, ROSEN CJ, FEYEREISEN GW, ISHII S. Denitrifying bacteria active in woodchip bioreactors at low-temperature conditions[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 635.
- [16] MA LL, WANG X, ZHOU JW, LÜ X. Degradation of switchgrass by *Bacillus subtilis* 1AJ3 and expression of a beta-glycoside hydrolase[J]. *Frontiers in Microbiology*,

- 2022, 13: 922371.
- [17] DHAR H, SWARNKAR MK, GULATI A, SINGH AK, KASANA RC. Draft genome sequence of a cellulase-producing psychrotrophic *Paenibacillus* strain, IHB B₃₄₁₅, isolated from the cold environment of the Western Himalayas, India[J]. Genome Announcements, 2015, 3(1): e01581-e01514.
- [18] 李春艳, 于琦, 冯露, 成毅, 成小松, 王雪, 张平根. 低温纤维素降解菌分离鉴定及产酶条件优化[J]. 东北农业大学学报, 2015, 46(10): 74-81.
- LI CY, YU Q, FENG L, CHENG Y, CHENG XS, WANG X, ZHANG PG. Isolation and identification of low-temperature cellulose-degrading bacteria and optimization of enzyme production conditions[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2015, 46(10): 74-81 (in Chinese).
- [19] MORITA RY. Psychrophilic bacteria[J]. Bacteriological Reviews, 1975, 39(2): 144-167.
- [20] 王敬红, 李灵灵, 申贵男, 袁媛, 曹迪, 高亚梅, 晏磊, 王伟东. 木质素降解真菌菌群 LDFC 产酶条件优化[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2022, 34(2): 75-80, 115.
- WANG JH, LI LL, SHEN GN, YUAN Y, CAO D, GAO YM, YAN L, WANG WD. Optimization of enzyme-producing conditions of lignin-degrading fungal flora LDFC[J]. Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2022, 34(2): 75-80, 115 (in Chinese).
- [21] 孟建宇, 陈勿力吉玛, 郭慧琴, 冯福应, 陈玉萍. 常温和低温纤维素降解菌的分离及其降解特性[J]. 农业生物技术学报, 2021, 29(1): 73-84.
- MENG JY, CHEN WLJM, GUO HQ, FENG FY, CHEN YP. Isolation and degradation characteristics of cellulose-degradation bacteria at room and low temperature[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2021, 29(1): 73-84 (in Chinese).
- [22] WANG Y, CAI JL, LI DM. Efficient degradation of rice straw through a novel psychrotolerant *Bacillus cereus* at low temperature[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2023, 103(3): 1394-1403.
- [23] ZHANG SN, HAN SC, GAO JL, YU XF, HU SP. Low-temperature corn straw-degrading bacterial agent and moisture effects on indigenous microbes[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2023, 107(16): 5241-5255.
- [24] 赵文霞, 杨朝旭, 刘帅, 任爱玲. 典型农作物秸秆组成及燃烧动力学分析[J]. 农业环境科学学报, 2019, 38(4): 921-927.
- ZHAO WX, YANG CX, LIU S, REN AL. Composition and combustion dynamics analysis of typical crop straws[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2019, 38(4): 921-927 (in Chinese).
- [25] BOURGAULT R, MATSCHI S, VASQUEZ M, QIAO PF, SONNTAG A, CHARLEBOIS C, MOHAMMADI M, SCANLON MJ, SMITH LG, MOLINA I. Constructing functional cuticles: analysis of relationships between cuticle lipid composition, ultrastructure and water barrier function in developing adult maize leaves[J]. Annals of Botany, 2020, 125(1): 79-91.