



研究报告

一株低温玉米秸秆降解真菌的筛选、鉴定及降解特性

邢慧珍^{1,2} 宋水山² 黄媛媛² 黄亚丽^{*3}

1 河北工业大学化工学院 天津 300131

2 河北省科学院生物研究所 河北 石家庄 050051

3 河北科技大学 河北 石家庄 050018

摘要:【背景】在我国北方地区玉米秸秆还田时期地温低、秸秆降解慢,如何加速玉米秸秆低温降解成为研究热点。【目的】从冷凉地区土壤中筛选具有高效降解纤维素能力的低温菌株,为秸秆的有效利用奠定基础。【方法】在低温培养条件下,采用稀释涂布平板法、羧甲基纤维素钠(sodium carboxymethyl cellulose, CMC-Na)水解圈测定法、胞外酶活测定法、秸秆失重法进行低温秸秆降解菌株的初筛、复筛和秸秆降解性能的测定;根据菌株形态学特征及 ITS rDNA 序列分析对筛选菌株进行鉴定;利用 3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)法和秸秆失重法对菌株在不同接种量、培养基初始 pH、温度情况下的纤维素酶活力和玉米秸秆降解能力进行研究。【结果】以 16 °C 为筛选温度,获得一株在刚果红-羧甲基纤维素钠平板上 *D/d* 值为 2.17、CMC 酶活力为 703 U/mL 的高产纤维素酶低温真菌 SDF-25;该菌株在 4 °C 可以生长,10–16 °C 为最适生长温度,37 °C 条件下仍能生长;综合菌株的形态学和分子生物学测定结果,菌株 SDF-25 为草酸青霉菌(*Penicillium oxalicum*);该菌株最佳产纤维素酶的培养条件为接种量 2%、初始 pH 为 7.0、培养温度为 10 °C,在该培养条件下菌株 SDF-25 的 CMC 酶活为 993.3 U/mL。失重法测定接种 SDF-25 于 10 °C 培养 15 d 时秸秆降解率为 39.5%,16 °C 时为 44.9%。【结论】草酸青霉菌 SDF-25 可在低温条件下生长并具有较强的纤维素酶生产能力,在秸秆还田方面具有良好的应用前景。

关键词: 纤维素降解真菌, 低温, 秸秆还田, 产酶特性, 菌株鉴定

Screening, identification and characterization of a low-temperature maize straw degradation fungus

XING Hui-Zhen^{1,2} SONG Shui-Shan² HUANG Yuan-Yuan² HUANG Ya-Li^{*3}

1 College of Chemical Engineering, Hebei University of Technology, Tianjin 300131, China

2 Institute of Biology, Hebei Academy of Sciences, Shijiazhuang, Hebei 050051, China

3 Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, Hebei 050018, China

Abstract: [Background] Due to the low-temperature at maize straw returning time, the straw degradation is slow in the northern part of China. The acceleration of straw decomposition is thus important.

Foundation item: National Key Research and Development Program of China (2017YFD0300905)

***Corresponding author:** Tel: 86-311-83014618; E-mail: huangyali2291@163.com

Received: 23-01-2020; **Accepted:** 20-04-2020; **Published online:** 09-05-2020

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0300905)

***通信作者:** Tel: 0311-83014618; E-mail: huangyali2291@163.com

收稿日期: 2020-01-23; **接受日期:** 2020-04-20; **网络首发日期:** 2020-05-09

[Objective] To isolate strains with high cellulose degradation ability at low temperature from soil sample collected from cold region. **[Methods]** Dilution and plating method was used to isolate strains from soil sample at low temperature culture. The sodium carboxymethyl cellulose (CMC-Na) hydrolysis circle assay, extracellular enzyme activity assay and straw weight loss method were used to screen fungi with cellulose degradation ability at low cultural temperature. Strains were identified based on method of morphological characteristics and ITS rDNA sequence analysis. Using the reducing sugar method of DNS, the cellulase activity of the strains under different inoculation volumes, initial pH of the medium and culture temperature was studied. The straw degradation ability of the strain was studied by sandbag method. **[Results]** A cold adapted fungus SDF-25 with higher cellulase activity was screened and identified as *Penicillium oxalicum*. It could grow from 4 to 37 °C. The optimal cultural condition for cellulase production was determined as follow: inoculation quantity 2%, initial pH 7.0, the optimal temperature 10 °C. The enzyme activity at the optimal cultural condition was 993.3 U/mL. The straw degradation rate of SDF-25 was 39.5% and 44.9% with cultural temperature at 10 °C and 16 °C respectively. **[Conclusion]** *P. oxalicum* SDF-25 is a fungus with strong cellulase production ability at low temperature and has a good application prospect in straw returning.

Keywords: Cellulose-degrading fungi, Low temperature, Straw returning, Enzyme production characteristics, Identification

我国农作物秸秆年产量超过 8 亿 t, 是一种重要的生物质资源, 所以秸秆能否有效利用直接影响现代农业的可持续发展^[1-2]。秸秆还田是秸秆利用的有效方式, 对降低土壤水势、提高土壤温度和土壤酶的活性、提高土壤有机质含量、增强土壤微生物功能多样性等方面具有重要作用^[3-5]。然而, 对于我国华北地区来说, 由于光热资源不足, 造成玉米-小麦种植茬口紧、小麦种植季气温低, 玉米秸秆还田后不能较快降解, 导致小麦出苗、扎根困难、越冬受阻。

秸秆降解微生物是秸秆降解过程必不可少的原动力, 但是由于土壤原生态环境下秸秆降解微生物数量较少, 使得秸秆的降解效率低、所需时间长, 在作物茬口紧张的情况下秸秆的自然降解不能满足农作物种植的需求, 因此, 为了加速秸秆在土壤中的腐解, 需要进行高效秸秆降解菌的添加。截至目前, 国内外研究者进行了大量纤维素降解菌的筛选和应用。刘最等从稻田、菜园等土壤中富集培养得到一株 *Penicillium donki*, 接种该菌株 28 °C 培养 21 d 后稻草纤维素含量由接种前的 30.30% 减少至 26.36%^[6]; 赵旭等从土壤中分离出的 *Penicillium* sp. D5, 在玉米秸秆为唯一碳源的培

养基里发酵 10 d 后, 玉米秸秆的失重率为 29.8%^[7]; 于慧娟等在所筛选的 4 种真菌中, z-5 菌株在 28 °C 的降解率最高, 为 47%^[8]; 王垚等研究发现丝状真菌组合 H57.1 和 H08.1 在 28 °C 具有较高的秸秆降解能力, 其秸秆降解率为 55.7%^[9]; Ahamed 等研究表明纤维素酶生产菌 *Trichoderma reesei* RUT-C30 产生的滤纸酶活(filter paper enzyme activity, FPA)为 5.02 U/mL, 羧甲基纤维素钠(sodium carboxymethyl cellulose, CMC-Na)酶活为 4.2 U/mL^[10]。目前, 对纤维素降解菌的研究主要集中在常温 and 高温环境, 对低温降解纤维素菌的研究^[11-12]相对较少。张洪源等^[13]研究发现, 虽然土壤中微生物对温度的适应范围很广, 但在土壤温度低于 16 °C 时, 微生物对秸秆的降解效果很差。因此, 加强低温纤维素降解菌的研究对于这些冷凉地区生物质资源的有效利用具有重要意义。

我国华北地区主要为温带季风气候, 夏季高温多雨, 冬季寒冷干燥, 年平均气温在 8-13 °C 左右, 年降水量在 400-1 000 mm 左右。东北地区纬度较高, 种植制度多为一年一熟制; 江淮地区气候温暖湿润, 主要作物为水稻、油菜等, 种植制

度为一年两熟制。在地域气候特点、种植制度、秸秆种类上, 华北地区与东北和江淮地区存在明显差异。所以, 适合这种气候特点的低温秸秆降解菌剂的研制及应用对促进玉米秸秆快腐还田、提高土壤肥力具有重要的作用。本研究从低温条件下分离出一株可以高效降解纤维素的低温真菌, 并对其进行鉴定和产酶条件优化, 以期为华北地区玉米秸秆高效合理利用提供优质菌种资源。

1 材料与方法

1.1 样品和培养基

1.1.1 样品来源

样品采集自我国内蒙、黑龙江、河北坝上等气候冷凉地区的土壤, 去除土壤表面的动植物残体等杂质后, 取 5–10 cm 的土壤样品, 将样品置入灭菌袋中, 冰盒运回实验室, 4 °C 冰箱保存。

1.1.2 培养基

PDA 培养基(g/L): 马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂 20.0。

纤维素-刚果红培养基(g/L)^[14]: CMC-Na 5.0, (NH₄)₂SO₄ 2.0, KH₂PO₄ 1.0, MgSO₄·7H₂O 0.5, NaCl 0.5, NaNO₃ 1.0, 蛋白胨 0.5, 酵母粉 0.5, 刚果红 0.2, 琼脂 20.0, pH 7.0。

液体产酶培养基(g/L): 马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, CMC-Na 10.0。

玉米秸秆培养基(g/L)^[15]: 玉米秸秆(粉碎过 40 目筛, 50 °C 烘干至恒重) 2.0, 营养液 0.03; 营养液: 尿素 3.0, (NH₄)₂SO₄ 6.0, 蛋白胨 3.0, CaCl₂ 0.1, MgSO₄·7H₂O 0.5, K₂HPO₄ 1.0, NaCl 0.1, FeSO₄·7H₂O 0.05, MnSO₄·7H₂O 0.016, ZnSO₄·7H₂O 0.014, CoCl₂·6H₂O 0.037。

1.1.3 主要试剂和仪器

DNS、CMC-Na 购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 真菌基因组 DNA 提取试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; 其余均为国产分析纯。荧光显微镜, 莱卡仪器(中国)有限公司; PCR 仪,

Eppendorf 公司; 分光光度计, Shimadzu Corporation 公司。

1.2 低温真菌的分离、纯化

称取土样 5 g 置于 45 mL 无菌水中, 200 r/min 充分振荡 30 min, 然后用灭菌生理盐水逐级稀释为 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴, 分别吸取 100 μL 稀释梯度为 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴ 的土壤稀释液涂布在 PDA 加庆大霉素培养基上, 每个稀释度 3 个平板。将平板置于 16 °C 恒温培养箱中培养 3 d 后挑取不同形态的菌落, 进行 3 次划线纯化。挑取纯培养菌落接种于 PDA 试管斜面培养基上, 16 °C 培养至长满斜面, 4 °C 保存备用。

1.3 低温纤维素降解菌的筛选

1.3.1 初筛

将保存的低温菌株接种到 PDA 平板上在 16 °C 下进行活化, 然后用直径为 5 mm 的打孔器打取菌落边缘生长旺盛的菌块, 接种于纤维素-刚果红培养基上, 16 °C 恒温培养 3 d, 观察菌落附近有无水解圈, 测量、记录菌落和水解圈直径, 计算 D/d 值。每个菌株 3 次重复。

1.3.2 复筛

将初筛得到的菌株在 PDA 平板上活化, 接种环挑取新鲜菌丝于 PDA 培养基中, 16 °C、200 r/min 培养 48 h, 按 2% 的接种量接种于 50 mL 的液体产酶培养基中, 继续恒温振荡培养进行液体发酵, 3 d 后取样 10 mL 于离心管中, 10 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为粗酶液。用 3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)法对菌株的 CMC 活性进行测定: 取 1.0 mL 的粗酶液加入 4.0 mL CMC 缓冲液, 在 50 °C 的水浴锅中反应 20 min 取出, 然后加入 3.0 mL DNS 显色液沸水浴显色 10 min 后冷却, 490 nm 处比色, 测其光密度值(OD_{490}), 与标准葡萄糖曲线对照, 由 OD_{490} 值计算出葡萄糖量(m_1)。对照管中粗酶液在水浴 20 min 后再加入, 测得粗酶液的葡萄糖量(m_2)。通过公式计算纤维素分解菌在上述条件下的酶活力: $U (U/mL) = (m_1 - m_2) / 20 \times \text{稀释倍数}$ ^[16]。

1.4 菌株在不同温度下的生长情况

将直径为 5 mm 的供试菌株菌块接种到 PDA 培养基上, 分别置于 6、10、16、28、37 °C 的恒温培养箱中静置培养 7 d 后, 测定并记录各菌株的生长情况。

1.5 秸秆降解率测定

将复筛得到的菌株在 PDA 平板上活化, 接种环挑取新鲜菌丝于 PD 培养基中, 16 °C、200 r/min 培养 48 h, 按 2% 的接种量接入玉米秸秆培养基中(对照加等量无菌水), 继续培养 15 d 后, 用滤纸过滤收集秸秆, 蒸馏水反复清洗 3 次, 80 °C 烘至恒重, 计算失重率。每个处理 3 次重复。

1.6 菌株的鉴定

1.6.1 形态学观察

将直径为 5 mm 的菌株菌块接种到 PDA 培养基上, 16 °C 培养 5 d, 观察菌落生长状况及其形态特征; 采用插片培养法进行菌株分生孢子梗形态的观察; 用无菌镊子夹取适量培养好的菌丝于载玻片上, 拨动菌丝使其均匀散开, 盖上盖玻片置于显微镜下观察分生孢子的显微特点。

1.6.2 分子生物学鉴定

采用真菌基因组 DNA 提取试剂盒提取供试菌株 DNA, 利用真菌通用引物 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')和 ITS6 (5'-GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG-3')^[17] 通过 PCR 扩增菌株的 ITS rDNA 序列。PCR 反应体系(25 μ L): 10 \times Buffer 2 μ L, DNA 模板 2 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μ L, ITS4 和 ITS6 引物(1 mmol/L)各 1 μ L, *rTaq* 酶 0.2 μ L, ddH₂O 11.8 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 53 °C 1 min, 72 °C 1 min, 33 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增产物由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 测序结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对, 最后借助 MEGA 5.1 的 Neighbor-Joining 法构建系统发育树, 确定该菌株的系统发育学地位。

1.7 DF-25 产酶特性研究

将菌株 SDF-25 接种到 50 mL 产酶培养基中, 依次对接种量、培养基初始 pH 及温度进行优化(其余培养条件不变), 测定菌株 3 d 后的产酶情况。接种量分别选择 1%、2%、3%、4%; 初始 pH 分别选择 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0; 温度分别选择 6、10、16、28、37 °C。

1.8 SDF-25 对玉米秸秆降解率的研究

将菌株 SDF-25 接种到秸秆降解培养基中, 依次对接种量、培养基初始 pH 及温度进行优化(其余培养条件不变), 静置培养 15 d 后, 按 1.5 所示方法测定菌株的秸秆降解率。接种量分别选择 1%、2%、3%、4%; 初始 pH 分别选择 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0; 温度分别选择 6、10、16、28、37 °C。

1.9 数据处理及分析

利用 Excel 2003 进行数据处理, 利用 DPS 数据处理系统对试验数据进行方差分析和显著性检验, 处理间的比较分析采用 Duncan 新复极差法 ($P < 0.05$), 利用 GraphPad Prism 5 作图。

2 结果与分析

2.1 低温纤维素降解菌的分离及初筛

通过低温 PDA 培养基分离, 共纯化获得 16 °C 快速生长菌株 40 株, 依次编号为 SDF-1-SDF-40, 经纤维素-刚果红培养基初筛, 其中 21 株具有纤维素降解能力, SDF-2、SDF-4、SDF-15、SDF-21 等 13 株菌的水解圈与菌落直径比值(D/d)均大于 2.0 (表 1)。初筛分离结果表明, 在分离的 40 株真菌中, 具有纤维素酶产生活性的菌株占 1/3 以上, 这可能与采集样品的生态环境主要以草原为主、多年的草本植物秸秆还田使纤维素降解菌株特异性富集有关。因此, 选择初筛得到的 13 株低温真菌进行产酶能力的复筛。

表 1 菌株在纤维素-刚果红培养基上的水解圈大小
Table 1 Hydrolytic diameter of strains on Congo red medium

Strain No.	<i>D</i> (mm)	<i>d</i> (mm)	<i>D/d</i>
SDF-2	21.5±0.71	9.0±0.00	2.388±0.07
SDF-3	21.5±3.54	10.0±1.41	2.146±0.05
SDF-4	41.5±10.61	17.0±4.24	2.439±0.01
SDF-9	15.2±0.35	7.2±0.35	2.105±0.05
SDF-13	21.5±0.71	10.0±1.41	2.166±0.23
SDF-15	27.0±4.24	11.5±2.12	2.354±0.06
SDF-17	23.0±1.41	10.5±0.70	2.191±0.01
SDF-18	30.6±5.46	12.8±1.92	2.391±0.22
SDF-21	24.3±0.58	9.6±0.57	2.522±0.13
SDF-22	25.5±0.71	12.2±0.35	2.081±0.01
SDF-25	25.5±0.71	11.7±0.35	2.170±0.00
SDF-30	29.5±2.12	13.0±1.41	2.273±0.08
SDF-31	39.0±1.41	17.2±1.06	2.262±0.05

注: *D*: 水解圈直径; *d*: 菌落直径。
Note: *D*: Hydrolysis circle diameter; *d*: Colony diameter.

2.2 低温纤维素降解菌的复筛

将初筛到的菌株在 16 °C 下培养 3 d,采用 DNS 法测定初筛菌株的羧甲基纤维素酶(CMCase)活性,结果如表 2 所示,初筛到的 13 株低温真菌的 CMC 活性在 233.3–703.3 U/mL 之间。其中以菌株

表 2 各菌株纤维素酶活力
Table 2 The cellulase activity of all the strains

菌株编号 Strain No.	CMC 酶活 CMCase (U/mL)
SDF-2	362.7±0.35i
SDF-3	416.7±0.70f
SDF-4	600.3±0.37c
SDF-9	388.3±0.12g
SDF-13	285.0±0.32k
SDF-15	565.3±0.18d
SDF-17	313.3±0.62j
SDF-18	383.3±0.16h
SDF-21	233.3±0.54m
SDF-22	636.3±0.67b
SDF-25	703.3±0.23a
SDF-30	281.7±0.19l
SDF-31	486.7±0.21e

注: 表中同列中不同的小写字母代表各菌株之间具有显著性差异。
Note: The different small letters in the same column represent significant differences between strains.

SDF-25 的羧甲基纤维素酶(CMCase)活性最高,之后依次为 SDF-4、SDF-15 和 SDF-22,4 个菌株的 CMCase 酶活力分别为 600.3、565.3、636.3、703.3 U/mL,显著高于其他 9 个菌株的纤维素酶活性($P<0.05$)。

2.3 低温纤维素降解菌的温度适应性研究

采用菌株生长速率测定法,比较了 4 株低温秸秆降解真菌在 6、10、16、28、37 °C 培养条件下的生长速率。由表 3 可得,4 株低温秸秆降解菌株在 16 °C 生长速率最快,在 10–37 °C 均可生长,其中 SDF-25 菌株 16 °C 生长速率最高。由此表明,菌株 SDF-25 更具有低温适应性,具有促进秋冬低温季节的秸秆快速还田潜力。

2.4 低温纤维素降解菌的玉米秸秆降解率分析

为了获得秸秆降解能力活性高的菌株,进一步测定了低温静置培养条件下 SDF-4、SDF-15、SDF-22、SDF-25 这 4 个菌株的玉米秸秆降解能力。由图 1 可知,15 d 时 SDF-4、SDF-15、SDF-22、SDF-25 的秸秆降解率分别为 29.4%、25.7%、24.6%、33.6%,与空白对照相比,4 个菌株的低温秸秆降解率均显著高于对照($P<0.05$),降解率比对照的增加幅度分别为 93.4%、69.1%、61.8%和 121%。说明菌株 SDF-25 有助于玉米秸秆的降解,具有较强的实际应用价值。4 株菌的纤维素酶活性和秸秆降解率两个指标之间没有直接相关关系,其中菌株 SDF-25 的纤维素酶活力和玉米秸秆降解率均最高,显著高于其他 3 株菌的秸秆降解率。

表 3 菌株低温的适生性(生长速度 mm/d)
Table 3 Low temperature suitability of strains (growth rate mm/d)

菌株编号 Strain No.	6 °C	10 °C	16 °C	28 °C	37 °C
SDF-4	0.714	1.171	3.224	3.128	3.083
SDF-15	0.714	1.114	3.112	3.015	3.117
SDF-22	0.714	1.785	3.267	3.243	3.216
SDF-25	1.071	2.314	3.392	3.341	3.329

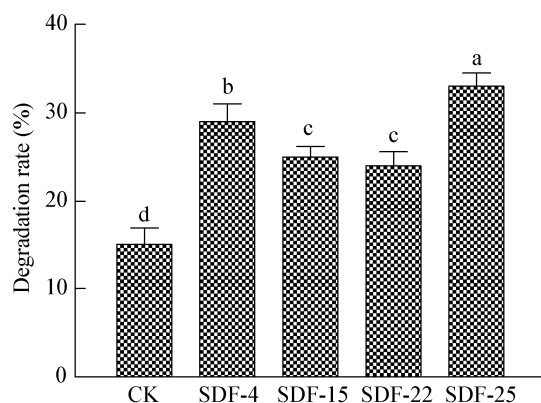


图1 不同菌株对玉米秸秆的降解率

Figure 1 Degradation rate of corn straw by different strains

注：图中不同的小写字母代表各菌株之间具有显著性差异。下同。

Note: The different small letters in the figure represent significant differences between strains. The same below.

2.5 低温玉米秸秆降解菌株 SDF-25 的鉴定

2.5.1 形态学鉴定

菌株 SDF-25 在 PDA 培养基上 16 °C 培养，初始为白色、近圆形菌落，5 d 后逐渐变为青绿色，菌丝变稠密，有同心环纹，边缘齐整，菌落表面呈粉末状并伴随菌丝绒毛，出现透明分泌液 (图 2A)。在显微镜下观察该菌的分生孢子梗，如图 2B 所示，该菌分生孢子梗多次分枝，呈分散状或串联的孢子链，成熟后脱落形成单个孢子，分生孢子呈近圆形，光滑，大小为 2.2–3.0 μm (图

2C)。根据菌落形态和分生孢子结构特征，参照《真菌鉴定手册》^[18]和《中国真菌志》^[19]进行比对分析，初步确定菌株 SDF-25 为青霉属(*Penicillium* sp.)。

2.5.2 菌株系统发育学分析

以菌株 SDF-25 的 DNA 为模板进行 ITS 序列的 PCR 扩增，测序获得 ITS rDNA 片段的长度为 616 bp。测序结果与 NCBI 数据库进行 BLAST 比对，发现菌株 SDF-25 与 *P. oxalicum* (登录号为 KP911357.1)、*P. oxalicum* (登录号为 KC278189)、*Penicillium* sp. (登录号为 MH752505.1)等菌株的相似性>99%，初步推测菌株 SDF-25 为青霉属(*Penicillium* sp.)。为进一步确定菌株 SDF-25 的分类学地位，利用 MEGA 5.1 的 Neighbor-Joining 法构建系统发育树(图 3)，发现菌株 SDF-25 与 *P. oxalicum* (登录号为 MH911357.1)、*P. oxalicum* (登录号为 MK163534.1)等菌株均处于同一分支。综合菌落特征及系统发育分析，可以确定菌株 SDF-25 为草酸青霉(*P. oxalicum*)，提交序列后获得的登录号为 MN841785。

2.6 低温玉米秸秆降解菌株 SDF-25 的产酶特性

将 SDF-25 菌液按照不同接种量接入到液体产酶培养基中，16 °C 下振荡培养 72 h，16 °C、200 r/min 离心 10 min 取上清测定粗酶液酶活力。结果如图 4A 所示，接种量对酶活的影响比较显著，随着接种量的增加，酶活呈现出先增加后降低的趋势，在接

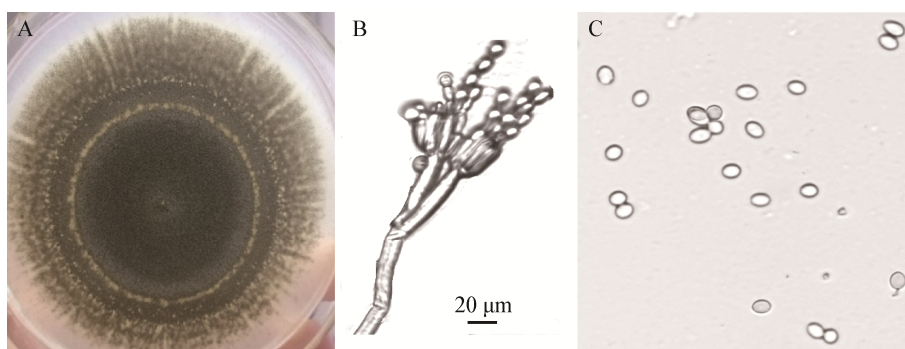


图2 菌株 SDF-25 的形态学特征

Figure 2 Morphological characteristics of SDF-25

注：A：SDF-25 菌落；B：分生孢子梗；C：分生孢子。标尺：20 μm。

Note: A: Colony of strain SDF-25; B: Conidia of strain SDF-25; C: Conidiophores of strain SDF-25. Scale bar: 20 μm.

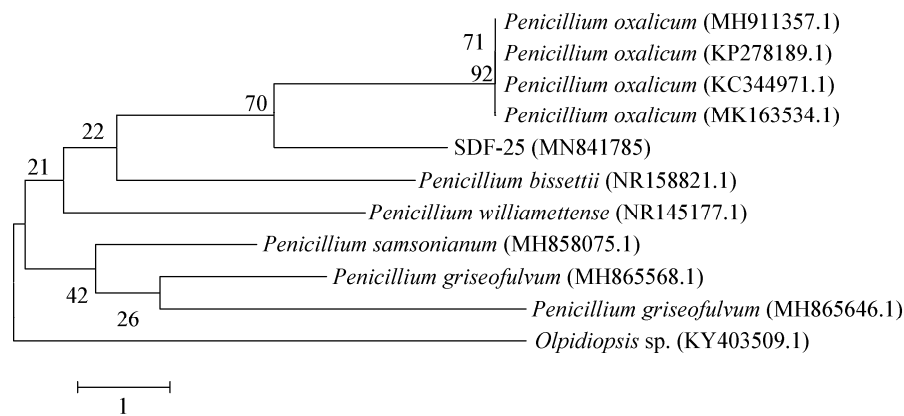


图 3 基于 ITS 基因序列相似性构建的菌株 SDF-25 的系统发育树
Figure 3 Phylogenetic tree of strain SDF-25 and its related strains based on ITS gene sequences

注: GenBank 登录号列于括号中, 分支处标注有自展值, 标尺所示长度为 1 核苷酸置换率。
Note: GenBank accession numbers are shown in the brackets. The bootstrap values are shown at the node. Bar 1 means the nucleotide substitution rate of 1.

种量为 2% 时酶活最高, 为 644.5 U/mL。接种量过低或过高都会显著影响酶活力。通过单因素方差分析, 不同的接种量对 SDF-25 的酶活影响显著, 2% 的接种量处理显著高于其他 3 个处理的酶活性 ($P < 0.05$)。

不同的初始 pH 对菌株 SDF-25 产酶特性的研究结果如图 4B 所示, 在不同的初始 pH 值下, SDF-25 的羧甲基纤维素酶活性也不同, 说明初始 pH 值对菌株的产酶能力有明显的影响 ($P < 0.05$),

菌株 SDF-25 的酶活性随 pH 的增加呈现出先增加后降低的趋势, 在初始 pH 为 7.0 时酶活力达到最高点, 为 655.7 U/mL。分析该菌在 pH 5.0–10.0 范围内的产酶活性发现, 该菌在偏酸环境下的产酶活性高于偏碱环境下的产酶活性。与 pH 为 7.0 时相比, pH 8.0、9.0、10.0 的产酶活性急剧降低, 这可能与真菌较适合偏酸环境生长存在一定的相关性。

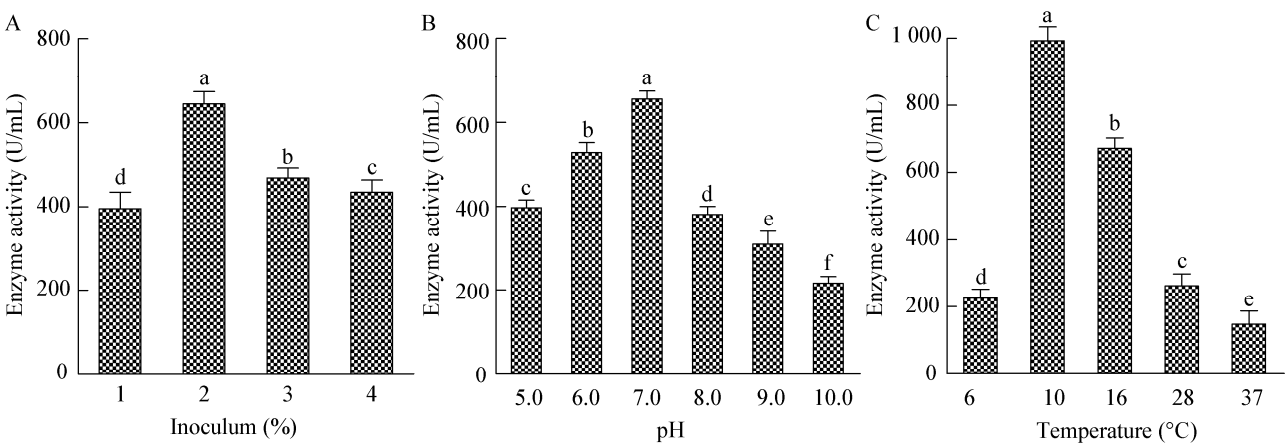


图 4 菌株 SDF-25 产酶条件的优化
Figure 4 Optimization of SDF-25 enzyme production conditions

注: A: 接种量; B: 培养基初始 pH; C: 温度。
Note: A: Inoculation; B: Initial pH of the medium; C: Temperature.

另外,对不同温度下菌株 SDF-25 的产酶特性进行研究发现(图 4C),温度对酶活的影响也非常显著,酶活力随培养温度的升高先增大后减小。在温度为 10 °C 时,酶活力达到最大值 993.3 U/mL, 16 °C 其次,28 °C 和 37 °C 酶活显著降低,而且在 6 °C 低温时 SDF-25 仍能生长并产酶,因此说明 SDF-25 菌株属于耐冷菌。通过单因素方差分析,不同的温度对 SDF-25 的酶活影响显著,但是 10 °C 比其他处理对酶活的影响更显著($P<0.05$)。

2.7 菌株 SDF-25 对玉米秸秆的降解率

将菌株 SDF-25 按不同接种量接种在秸秆降解培养基中,静置培养 15 d 后,结果如图 5A 所示,随着接种量的增加降解率呈现出先增加后降低的趋势。在接种量为 2% 时降解率最高,为 45.6%。通过单因素方差分析,不同的接种量对 SDF-25 秸秆降解率的影响显著($P<0.05$)。

不同的初始 pH 对菌株 SDF-25 的秸秆降解结果如图 5B 所示,随着 pH 的增加降解率呈现出先增加后降低的趋势,在初始 pH 7.0 降解率最高,为 43.2%,其次为 pH 6.0 时的降解率。分析不同初始 pH 处理的秸秆降解率,发现菌株 SDF-25 在偏酸条件下比偏碱条件下的降解率高。方差分析表明,

不同 pH 值对 SDF-25 秸秆降解率存在显著影响($P<0.05$)。

测定了不同培养温度对菌株 SDF-25 的秸秆降解率(图 5C)。结果表明,温度对秸秆降解率的影响比较显著。在温度为 16 °C 时,秸秆降解率达到 44.9%;在温度为 10 °C 时,也能达到 39.5%。10 °C 和 16 °C 下秸秆降解率均显著高于其他温度下的秸秆降解率,说明 SDF-25 菌株具有较强的低温秸秆降解能力。

总之,接种量、初始 pH 和温度对 SDF-25 的羧甲基纤维素酶活性和秸秆降解率均存在显著的影响,二者对比分析发现产酶活性高的处理其秸秆降解率也相对较高。研究表明,通过测定菌株的羧甲基纤维素酶产生活性可以在一定程度上反映该菌对秸秆的降解能力。

3 讨论与结论

我国北方地区低温持续时间长,寒冷的环境使得大量的纤维素资源未能得到及时有效的利用^[20],因此低温成为影响作物秸秆降解的主要因素,低温纤维素降解菌也成为了研究热点。目前已经报道的产纤维素酶低温微生物主要包括细菌中假单胞菌属、芽孢杆菌属、节杆菌属和真菌中的木

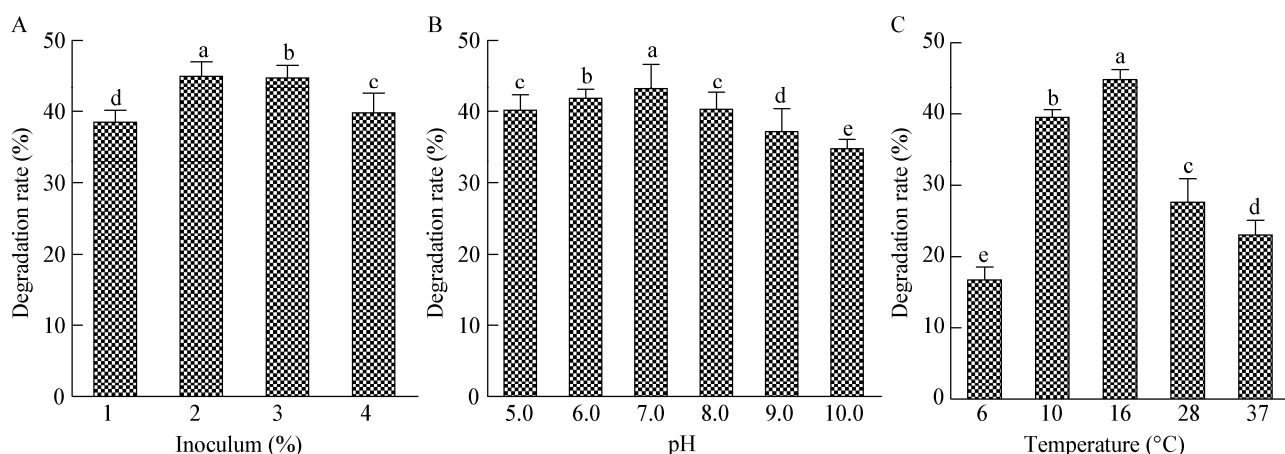


图 5 菌株 SDF-25 对秸秆降解率的优化

Figure 5 Optimization of straw degradation by SDF-25

注: A: 接种量; B: 培养基初始 pH; C: 温度。

Note: A: Inoculation; B: Initial pH of the medium; C: Temperature.

霉属、青霉属、根霉属, 以及放线菌门的多种菌属^[21-24]。

本研究从多个冷凉地区的土壤样品中共计分离出 40 株可在 16 °C 正常生长的真菌, 通过刚果红显色反应发现了 13 株具有纤维素降解潜力的低温真菌。为了确定低温真菌的产纤维素酶潜力, 在 16 °C 的低温环境下对这 13 株菌株进行了产酶液体培养, 复筛出了 4 株产酶能力较强的菌株; 其后探讨了这 4 株菌对玉米秸秆的降解作用及其在低温条件下的生长状况, 结果表明: 菌株 SDF-25 的 CMCase 酶活力为 703.3 U/mL; 秸秆降解率为 33.6%, 是对照组的 2.2 倍, 表现出较高的秸秆降解效果。综合形态学特征及 ITS 基因序列的系统发育分析结果, 将菌株 SDF-25 确定为草酸青霉(*P. oxalicum*)。其在温度为 16 °C 时秸秆降解率高达 44.9%。刘爽^[25]的研究表明, 在 10–25 °C 范围内的 4 种菌剂处理中, 菌株 DSH2-3 对小麦秸秆的降解效果较好, 50 d 后秸秆降解率达 45%–53%; 萨如拉等^[26]筛选到的两组玉米秸秆降解复合菌系 1 号和 8 号在玉米秸秆培养基中 15 °C 培养 15 d, 玉米秸秆分解率分别达到 30.21% 和 32.21%。在同等温度范围内, 我们的研究比前人报道的降解时间短很多, 降解率高出 10% 左右, 为相关制剂的研制与应用奠定了基础。菌株 SDF-25 的最佳产酶温度为 10 °C, 酶活为 993.3 U/mL, 在温度为 10 °C 时降解率也能达到 39.5%。说明该菌株在低温产纤维素酶方面具有较好的应用前景。

分离高效降解纤维素菌的研究已有较多报道, 从这些报道中可以看出研究较多的是真菌。在降解纤维素的过程中, 真菌不但可以分泌胞外酶, 从分子结构上破坏纤维素的稳定性, 而且真菌菌丝穿插在纤维素之间, 从宏观角度上拉扯纤维素, 为酶发挥作用提供空间。青霉菌是自然界中分布极广的一类真菌, 因其具有产青霉素的能力而广为人知。近年来, 青霉菌也被认为是纤维素酶的重要来源, 其分泌的纤维素酶组分比里氏木霉更丰富、更合

理^[27], β -葡萄糖苷酶酶活力更高^[28], 已成为纤维素降解研究的热点^[29]。国内已有许多研究报道了草酸青霉菌在秸秆降解方面的研究, 比如石文卿等^[30]以 *P. oxalicum* D1 为试验菌株, 在培养 3 d 时内切葡聚糖酶为 30.08 U; 许玉林等^[31]在 28 °C 筛选到纤维素酶高产菌株 *P. oxalicum* SJ1, 滤纸酶活和 CMC 酶活分别为 25.15 U/mL 和 740.42 U/mL。前人已经对草酸青霉如何有效地降解纤维素, 包括纤维素酶的产生、纤维素酶的诱导、基因表达调控以及纤维素酶的合成、转运和分泌等诸多方面进行了深入的研究^[32], 但是截至目前对于草酸青霉在低温条件下降解纤维素的原理仍不清晰, 所以后续的工作将在此优化的基础上, 进一步研究其低温产酶的分子调控机理。

REFERENCES

- [1] Ragauskas AJ, Williams CK, Davison BH, et al. The path forward for biofuels and biomaterials[J]. Science, 2006, 311(5760): 484-489
- [2] Fan XT. Construction of composite consortia FC1 and its characteristics of decomposing stalk[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2014 (in Chinese) 樊晓腾. 复合菌系 FC1 的构建及降解玉米秸秆的效果研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2014
- [3] Yang HS, Feng JX, Zhai SL, et al. Long-term ditch-buried straw return alters soil water potential, temperature, and microbial communities in a rice-wheat rotation system[J]. Soil and Tillage Research, 2016, 163: 21-31
- [4] Ji BY, Hu H, Zhao YL, et al. Effects of deep tillage and straw returning on soil microorganism and enzyme activities[J]. The Scientific World Journal, 2014, 2014: 451493
- [5] Zhao SC, Li KJ, Zhou W, et al. Changes in soil microbial community, enzyme activities and organic matter fractions under long-term straw return in north-central China[J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2016, 216: 82-88
- [6] Liu Z, He LF, Chen XH, et al. Study on screening cellulose-degrading fungi and its enzyme activity and the effect on the degradation of rice straw[J]. Journal of Cellulose Science and Technology, 2018, 26(2): 46-52 (in Chinese) 刘最, 何丽芳, 陈晓华, 等. 纤维素降解菌的筛选、酶活及对稻草秸秆的降解研究[J]. 纤维素科学与技术, 2018, 26(2): 46-52
- [7] Zhao X, Wang WL, Li J. Isolation and identification of

- low-temperature degrading strains for corn stubble[J]. *Soils and Crops*, 2017, 6(3): 192-198 (in Chinese)
- 赵旭, 王文丽, 李娟. 玉米秸秆低温降解菌的分离筛选及鉴定[J]. *土壤与作物*, 2017, 6(3): 192-198
- [8] Yu HJ, Guo XL. Screening of straw-degrading bacteria and study on their cellulose-degrading performances[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2019, 35(2): 58-63 (in Chinese)
- 于慧娟, 郭夏丽. 秸秆降解菌的筛选及其纤维素降解性能的研究[J]. *生物技术通报*, 2019, 35(2): 58-63
- [9] Wang Y, Han YF, Liang ZQ. Rice straw degradation and enzyme production of two *Taifanglania* strains[J]. *Mycosystema*, 2017, 36(5): 598-603 (in Chinese)
- 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
- [10] Ahamed A, Vermette P. Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2008, 40(3): 399-407
- [11] Zhang CM. Screening of low-temperature cellulose-degrading bacteria and application of compound bacteria in returning straw to the field[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2014 (in Chinese)
- 张晨敏. 低温纤维素降解菌的筛选及复合菌剂在秸秆还田中的应用[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2014
- [12] Zhao X. Medium component optimization and enzyme composition analysis of a straw-decomposing microbial system with low-temperature tolerance capacity[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2017 (in Chinese)
- 赵欣. 耐低温秸秆降解复合菌系的培养基组分优化及产酶分析[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2017
- [13] Zhang HY, Liu MZ, Zhang JJ. Study on the decomposition of organic materials in dryland soil[J]. *Soil Fertilizer*, 1986(4): 7-11 (in Chinese)
- 张洪源, 刘明钟, 张家建. 有机物料在旱地土壤中分解规律的研究[J]. *土壤肥料*, 1986(4): 7-11
- [14] Wang HY, Fan BQ. Screening of three straw-cellulose degrading microorganism[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(7): 870-875 (in Chinese)
- 王洪媛, 范丙全. 三株高效秸秆纤维素降解真菌的筛选及其降解效果[J]. *微生物学报*, 2010, 50(7): 870-875
- [15] Qing GE, Gao JL, Yu XF, et al. Function and composition stability of a composite microbial system GF-20 with efficient corn stalk decomposition under low temperature[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(3): 443-454 (in Chinese)
- 青格尔, 高聚林, 于晓芳, 等. 玉米秸秆低温高效降解复合菌系 GF-20 的菌种组成及降解稳定性研究[J]. *中国农业科学*, 2016, 49(3): 443-454
- [16] Ministry of Light Industry of the People's Republic of China. QB/T 1803-1993 General methods of determination for industrial enzymes[S]. Beijing: China Light Industry Press, 1994 (in Chinese)
- 中华人民共和国轻工业部. QB/T 1803-1993 工业酶制剂通用试验方法[S]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994
- [17] Montenegro D, Aguin O, Pintos C, et al. A selective PCR-based method for the identification of "*Phytophthora hibernalis*" carne[J]. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2008, 1: 78-84
- [18] Wei JC. Fungal Identification Manual[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1979 (in Chinese)
- 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979
- [19] Shen YH, Ye DH. Flora Fungorum Sinicorum[M]. Beijing: Science Press, 2006 (in Chinese)
- 沈亚恒, 叶东海. 中国真菌志[M]. 北京: 科学出版社, 2006
- [20] Fan ZY. Isolation and degradation characterization of cellulose-degrading microorganisms under low temperature[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2012 (in Chinese)
- 樊兆阳. 低温降解纤维素的微生物的分离及其降解特性分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2012
- [21] Brady SK, Sreelatha S, Feng YN, et al. Cellobiohydrolase 1 from *Trichoderma reesei* degrades cellulose in single cellobiose steps[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 10149
- [22] Sakon J, Adney WS, Himmel ME, et al. Crystal structure of thermostable family 5 endocellulase E1 from *Acidothermus cellulolyticus* in complex with cellotetraose[J]. *Biochemistry*, 1996, 35(33): 10648-10660
- [23] Garsoux G, Lamotte J, Gerday C, et al. Kinetic and structural optimization to catalysis at low temperatures in a psychrophilic cellulase from the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis*[J]. *Biochemical Journal*, 2004, 384(2): 247-253
- [24] Kang ZJ, Yuan N, Wang YY, et al. Characteristics of fungus community structure and cold-adapted cellulose-degrading strains in Zoige Plateau Wetland[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2017, 48(4): 830-836 (in Chinese)
- 亢宗静, 袁楠, 王莹燕, 等. 若尔盖高原湿地的真菌群落结构及低温纤维素降解真菌特征[J]. *土壤通报*, 2017, 48(4): 830-836
- [25] Liu S. Screening of straw degradation strains under medium-low temperature and their degradation effects on crop straw[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese

- Academy of Agricultural Sciences, 2011: 1-61 (in Chinese)
刘爽. 中低温秸秆降解菌的筛选及其秸秆降解效果研究[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2011: 1-61
- [26] Sa RL, Gao JL, Yu XF, et al. Screening of low temperature maize stalk decomposition microorganism[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(19): 4082-4090 (in Chinese)
萨如拉, 高聚林, 于晓芳, 等. 玉米秸秆低温降解复合菌系的筛选[J]. *中国农业科学*, 2013, 46(19): 4082-4090
- [27] Liu GD, Zhang L, Qin YQ, et al. Long-term strain improvements accumulate mutations in regulatory elements responsible for hyper-production of cellulolytic enzymes[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3: 1569
- [28] Yao GS, Wu RM, Kan QB, et al. Production of a high-efficiency cellulase complex via β -glucosidase engineering in *Penicillium oxalicum*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9(1): 78
- [29] Vaishnav N, Singh A, Adsul M, et al. *Penicillium*: the next emerging champion for cellulase production[J]. *Bioresource Technology Reports*, 2018, 2: 131-140
- [30] Shi WQ, Tao NG, Liu YJ, et al. Isolation of an effective cellulase-producing fungus and study of its enzyme-production characteristics[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2011, 5(6): 1435-1440 (in Chinese)
石文卿, 陶能国, 刘跃进, 等. 一株高产纤维素酶真菌的分离及产酶特性研究[J]. *环境工程学报*, 2011, 5(6): 1435-1440
- [31] Xu YL, Zheng YX, Ye BY, et al. Isolation and identification of a cellulose degrading fungi[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(2): 220-227 (in Chinese)
许玉林, 郑月霞, 叶冰莹, 等. 一株纤维素降解真菌的筛选及鉴定[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(2): 220-227
- [32] Su D. Deciphering the role of membrane proteins in the production of cellulases in *Penicillium oxalicum*[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University, 2019 (in Chinese)
苏丹. 影响草酸青霉纤维素酶合成的膜蛋白鉴定及其功能研究[D]. 南宁: 广西大学硕士学位论文, 2019

编辑部公告

邀请您关注《微生物学通报》公众微信号

为了更好地与读者、作者、审稿专家和编委朋友们及时沟通、方便服务,《微生物学通报》已开通公众微信服务号。作者通过微信能及时收到稿件各流程通知,第一时间了解稿件进程并及时处理;审稿专家和编委可通过微信及时收到审稿邀请,还可通过手机审稿;读者通过微信可了解《微生物学通报》文章目录,查找阅读感兴趣的文章。

关注办法:

- 1、在微信公众号搜索“微生物学通报”或“wswxtb”;
- 2、用微信扫右边二维码:

