

## 耐低温降解纤维素菌株的筛选及复合菌系构建

路垚<sup>1</sup>, 刘雅辉<sup>2</sup>, 孙建平<sup>2</sup>, 何宗均<sup>1\*</sup>, 赵琳娜<sup>1</sup>, 戴相林<sup>2</sup>, 赵子婧<sup>2</sup>

(1.天津市农业科学院农业资源与环境研究所, 天津 300384; 2.河北省农林科学院滨海农业研究所, 河北唐山 063299)

**摘要** [目的] 筛选适合我国北方冬春季秸秆降解的高效低温纤维素降解菌株。[方法] 在低温地区采集土壤, 10 ℃初筛耐低温菌株, 通过刚果红染色液法进行复筛, 利用 DNS 法测定 CMC 酶活性。将筛得菌株和实验室自存菌株结合拮抗试验构建复合菌系, 测定复合菌系 CMC 酶活性, 测定秸秆降解率, 并对代表性菌株进行产酶条件优化, 对最终确定的复合菌系中的菌株进行分子生物学鉴定。[结果] 10 ℃低温培养初筛得到 55 株耐低温菌株, 刚果红染色法复筛得到 8 株具有明显水解圈的单菌株, 其中包括细菌 3 株、真菌 2 株、放线菌 3 株, 其中纤维素酶活性最高达到 47.0 U/mL; 根据拮抗试验构建了 2 个复合菌系, 其纤维素酶活性分别达到 31.0 和 53.0 U/mL; 秸秆降解试验中, 实验室和沙袋法的复合菌系 2 对秸秆的降解率分别达 31.8% 和 45.1%, 显著高于复合菌系 1 和对照组; 对 JGDZTX3 进行产酶条件优化, 确定最佳氮源为牛肉膏, 培养温度为 10 ℃, 培养时间为 4 d, 初始 pH 为 7, 在此条件下 CMC 酶活性达到 66.5 U/mL, 这 4 个条件对产酶均有显著影响 ( $P < 0.05$ ); 对复合菌系 2 的 4 个未知菌株进行鉴定, 鉴定结果分别为白蚁菌、葡萄球菌、长柄木霉、芥菜氏链霉菌。[结论] 通过该试验筛选得到的耐低温可降解纤维素复合菌系有较强的纤维素分解能力, 在北方低温地区有良好的应用前景。

**关键词** 纤维素降解菌; 复合菌系; 低温; 纤维素酶; 筛选; 菌株鉴定

中图分类号 S 182 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)10-0006-05

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.10.002



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

### Screening of Low Temperature Cellulose Degradation Strains and Construction of Complex Microbial System

LU Yao<sup>1</sup>, LIU Ya-hui<sup>2</sup>, SUN Jian-ping<sup>2</sup> et al (1. Institute of Agricultural Resources and Environment Sciences, Tianjin Academy of Agricultural Sciences, Tianjin 300384; 2. Institute of Coastal Agriculture, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Tangshan, Hebei 063299)

**Abstract** [Objective] In order to screen the high efficiency low temperature cellulose degradation strains suitable for winter and spring straw degradation in north China. [Method] Soil samples were collected in low temperature area, low temperature strains were screened at 10 ℃, the isolated strains were screened by Congo red staining solution, and CMC enzyme activity was determined by DNS method. The complex microbial system was constructed by combining the screened strain and the laboratory self-existing strain with antagonistic test. CMC enzyme activity of the complex microbial system was determined, and the straw degradation rate was determined. The enzyme production conditions of the representative strain was optimized, and the strains in the final determined complex microbial system were identified by molecular biology. [Result] A total of 55 low temperature strains were obtained by initial screening at 10 ℃, and 8 strains were obtained by Congo red staining after screening, including 3 strains of bacteria, 2 strains of fungi and 3 strains of actinomycetes with obvious hydrolytic circles. The highest cellulase activity reached 47.0 U/mL. According to the antagonistic test, the cellulase activity of two complex microbial systems reached 31.0 and 53.0 U/mL, respectively. In the straw degradation test, the degradation rates of the compound strain 2 in the laboratory and the sandbag method were 31.8% and 45.1%, respectively, which were significantly higher than those of the compound strain 1 and the control group. The optimum conditions for JGDZTX3 enzyme production were optimized, and the optimal nitrogen source was beef paste, culture temperature was 10 ℃, culture time was 4 d, and initial pH was 7. Under the optimum conditions, CMC enzyme activity reached 66.5 U/mL, all the four conditions had significant effects on enzyme production ( $P < 0.05$ ). The four unknown strains of the complex microbial system were identified, and the identification results were *Isoptericola* sp., *Staphylococcus* sp., *Trichoderma longibrachiatum* and *Streptomyces finlayi*. [Conclusion] The low temperature cellulose-degradable complex microbial system screened by this experiment has strong cellulose-decomposing ability, and has a good application prospect in the low temperature area of north China.

**Key words** Cellulose degradation strains; Complex microbial system; Low temperature; Cellulase; Screening; Strain identification

我国有大量秸秆, 每年各类秸秆产生量高达 8 亿 t, 如果能合理利用, 将会是很重要的生物资源<sup>[1-2]</sup>。秸秆的资源化处理有多种方式, 其中微生物降解的方法具有安全性高、能耗低等优点被广泛应用<sup>[3]</sup>。但是自然条件下土壤中纤维素分解菌的数量较少, 降解效率低, 秸秆直接还田后不能被快速分解, 因此通常人工添加一些纤维素分解菌加快秸秆的降解<sup>[4-5]</sup>。已发现的纤维素分解菌有很多种, 涵盖了细菌、真菌、放线菌等各类菌株<sup>[6]</sup>, 国内外也有很多人在自然界中进行了纤维素分解菌菌株的筛选和应用。郑丽等<sup>[7]</sup>在木薯生境里分离筛选得到 57 株纤维素分解菌株; 姜立春等<sup>[8]</sup>从绵

阳湿地朽木和土样中, 筛选得到 28 株产纤维素酶的细菌菌株; 赵旭等<sup>[9]</sup>在土壤中筛选的 *Penicillium* sp.D5 菌株, 以玉米秸秆为碳源发酵 10 d, 可使玉米秸秆减重 29.8%; Selvam 等<sup>[10]</sup>研究表明纤维素降解是菌株间相互协同作用产生的结果; 王天生等<sup>[11]</sup>研究发现复合菌系的纤维素分解能力好于单一菌株; 王垚等<sup>[12]</sup>研究表明 H57.1 和 H08.1 菌株复合后具有较高的秸秆分解能力, 其秸秆降解率可达到 55.7%。

微生物降解受环境影响较大, 很多纤维素分解菌在低温环境下不能生长代谢, 不能正常发挥降解作用。我国北方地区冬春季温度低, 常温条件下筛选的纤维素分解菌难以发挥作用。目前, 对纤维素分解菌的研究主要集中在常温环境的筛选, 对低温环境下纤维素分解菌的研究相对较少<sup>[13-14]</sup>。该研究通过从河北滨海区低温土壤中分离筛选纤维素酶活性较高的菌株, 构建复合菌系, 以期对北方低温地区秸秆的资源化利用提供菌种资源。

**基金项目** 河北省省级科技计划项目(19227307D); 天津市农业科技成果转化与推广项目(201701090)。

**作者简介** 路垚(1989—), 女, 山东临沂人, 助理研究员, 硕士, 从事农业微生物研究。\* 通信作者, 副研究员, 从事农业微生物研究。

**收稿日期** 2021-12-06; **修回日期** 2022-01-18

## 1 材料与方 法

### 1.1 样品和培养基

**1.1.1 样品来源。**河北省唐山市曹妃甸区河北省农林科学院研究基地土样,分别为水稻田秸秆还田 2 年土、水稻田秸秆还田 3 年土、水稻秸秆还田咸水土、秸秆堆置土。存放于自封袋中,封口,于 4 ℃ 保存备用。

#### 1.1.2 培养基。

(1) CMC 分离培养基。CMC-Na 10 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g, 蛋白胨 1 g, 酵母膏 1 g, H<sub>2</sub>O 1 000 mL, pH 7.0~7.2。

(2) 种子培养基。(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.0 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 5.0 mg, MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 1.6 mg, CaCl<sub>2</sub> 0.1 g, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.7 mg, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5 g, CoCl<sub>2</sub> 2.0 mg, NaCl 0.1 g, 葡萄糖 20 g, 蛋白胨 5 g, 酵母膏 1 g, H<sub>2</sub>O 1 000 mL, pH 7.0~7.2。

(3) 牛肉膏蛋白胨培养基。牛肉膏 5 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 琼脂 15~20 g, H<sub>2</sub>O 1 000 mL, pH 7.0~7.2。

(4) PDA 培养基。马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 15~20 g, H<sub>2</sub>O 1 000 mL, pH 自然。

(5) 高氏一号培养基。可溶性淀粉 20 g, KNO<sub>3</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.01 g, NaCl 0.5 g, 琼脂 20 g, H<sub>2</sub>O 1 000 mL, pH 7.4~7.6。

(6) 秸秆降解培养基。秸秆 3 g, CMC-Na 10 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g, 蛋白胨 1 g, 酵母膏 1 g, H<sub>2</sub>O 1 000 mL, pH 7.0~7.2。

### 1.2 菌株分离筛选

**1.2.1 菌株的初筛。**将采集到的土壤样品用无菌水制成 10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup> 稀释度的菌悬液,在 CMC 培养基上涂布,放置生化培养箱 10 ℃ 培养 5 d。将初筛得到的菌株在固体平板上分别编号,并分别划线纯化,然后每个平板倒入 15 mL 刚果红溶液(1 mL/mg)染色 30 min,用 1 mol/L 氯化钠溶液脱色 2~3 次,只保留有透明圈的对应标号菌株,将得到的细菌保存至牛肉膏蛋白胨试管斜面培养基,真菌保存至 PDA 试管斜面培养基,放线菌存放至高氏一号试管斜面培养基,放置 4 ℃ 冰箱保存。

**1.2.2 菌株的复筛。**将保存的菌株接种于 CMC 培养基,放至摇床 10 ℃ 恒温振荡培养 5 d,在 CMC 固体平板上放置牛津杯,在牛津杯中加入 100 μL 菌液,10 ℃ 恒温培养箱培养 5 d,取出牛津杯,测量菌落直径(*d*),每个平板倒入 15 mL 刚果红溶液(1 mL/mg)染色 30 min,然后用 1 mol/L 氯化钠溶液清洗脱色 2~3 次,测量透明圈的直径(*D*),每个菌株做 3 个重复。

### 1.3 DNS 法测定酶活

**1.3.1 原样酶液的制备。**将待测菌株接种到种子培养基,10 ℃ 恒温振荡培养 3 d,转接至 CMC 分离培养基培养 5 d,取菌液 10 mL,3 000 r/min 离心 10 min,离心后的上清液即为原样酶液,供测试用。

**1.3.2 测定步骤。**每个样品取 2 支大试管,1 支作为空白对照。样品管中加 1.0 mL 原样酶液,然后 2 支试管中分别加入

4.0 mL 已预热至 60 ℃ 的 CMC 缓冲液,在 60 ℃ 的水浴锅中反应 20 min 取出,每管立即加入 3.0 mL DNS 显色液,摇匀后在对照管中再加入 1.0 mL 原样酶液。将 2 支试管放入沸水浴中,显色 5 min 后立即取出,流水冷却,用分光光度计于 490 nm 处测其 OD 值,与标准葡萄糖曲线对照,计算出样品和对照的葡萄糖量,通过公式计算酶活性: $U = k(m_1 - m_0) / 20$ ,式中,*U* 为样品的酶活,1 个酶活单位代表 1 mL 原样酶液 1 min 产生 1 μg 葡萄糖;*k* 为样品稀释倍数;*m*<sub>1</sub> 为样品葡萄糖量;*m*<sub>0</sub> 为对照葡萄糖量;20 为酶与底物反应时间。

**1.4 耐低温复合菌系的构建** 将筛选得到的菌株与天津市农业科学院农业资源与环境研究所土壤微生物研究室自存可低温降解纤维素的菌株(枯草芽孢杆菌 KC、胶胨样芽孢杆菌 GSY),根据细菌、真菌、放线菌的合理搭配以及各菌株间的拮抗作用,构建 2 组复合菌系。

**1.5 实验室秸秆降解率测定** 在 250 mL 三角瓶中加入 90 mL 秸秆降解培养基,玉米秸秆的处理方法为粉碎过 40 目筛,50 ℃ 烘干至恒重,灭菌后,2 个试验组每个三角瓶中加入 10 mL 复合菌剂,对照组加入 10 mL 灭菌蒸馏水,10 ℃ 恒温振荡培养,15 d 后用滤纸过滤收集秸秆,用蒸馏水清洗 3 次,80 ℃ 烘干至恒重,计算失重率,每个处理设置 3 次重复。

**1.6 沙袋法秸秆降解率测定** 试验在 2019 年 11—12 月进行,开始前先称取 3 份 1 kg 的秸秆,切割成 3~5 cm 段状,85 ℃ 烘干至恒重并称量记录。称取 1 kg 秸秆,切割成 3~5 cm 段状,试验组加入 10 mL 复合菌剂混合均匀,对照组加入 10 mL 灭菌蒸馏水,装入长 110 cm、宽 60 cm、孔径为 0.18 mm 的尼龙袋中,埋入土壤 25~35 cm 的土层中,温度 6~10 ℃,60 d 后取出尼龙袋,用自来水将秸秆冲洗干净,然后 85 ℃ 烘干至恒重并称量记录。计算失重率,每个处理设置 3 次重复。

**1.7 菌株的产酶条件优化** 选取最具代表性的菌株,即纤维素酶活性最高的菌株,将菌株以接种量 10% 接种到种子培养基中,分别设置不同的氮源(硫酸铵、酵母膏、牛肉膏)、不同的培养温度(4、10、15、20、30 ℃)、不同的培养时间(2、3、4、5 d)、不同的初始 pH(6、7、8),测定菌株的 CMC 酶活性,以确定菌株最佳的产酶条件。在最佳产酶条件下进行优化试验,测定菌株 CMC 酶活性。

**1.8 菌株的分子生物学鉴定** 将秸秆降解效果较好的复合菌剂各菌株进行分子生物学的鉴定。鉴定方法为用引物 27F/1492R 或 ITS1/ITS4 进行 PCR 扩增,然后将 PCR 产物切胶纯化回收,用引物 27F/1492R 或 ITS1/ITS4 测序,将测序结果序列在 NCBI 上 Blast 比对完成菌种鉴定。

## 2 结果与分析

**2.1 纤维素降解菌的筛选** 初步筛选得到可以 10 ℃ 低温生长的菌株 55 株,进一步通过透明圈在秸秆堆置土中筛选得到低温纤维素降解细菌 3 株、低温纤维素降解真菌 2 株,水稻田秸秆还田土中筛选得到低温纤维素降解放线菌 3 株。3 株细菌分别编号 JGDZTX1、JGDZTX2、JGDZTX3,2 株真菌分别编号 JGDZTZ2、JGDZTZ3,3 株放线菌分别编号 SDT2NF1、SDT2NF2、SDT2NF3。

**2.2 透明圈直径** 3株细菌和3株放线菌均测得透明圈直径,2株真菌因长得过大,未测出透明圈直径。透明圈结果见表1和图1。

表1 单一菌株的水解圈大小

Table 1 The size of the hydrolysis circle of a single strain

菌株编号 Strain number	透明圈直径 Transparent circle diameter( <i>D</i> )//cm	菌落直径 Colony diameter( <i>d</i> )//cm	<i>D/d</i>
JGDZTX1	1.83±0.07 d	0.53±0.04 c	3.45±0.43 d
JGDZTX2	5.27±0.27 a	0.52±0.04 c	10.13±1.33 a
JGDZTX3	2.37±0.13 c	0.65±0.08 b	3.65±0.74 d
SDT2NF1	2.07±0.27 cd	1.20±0.10 a	1.73±0.50 e
SDT2NF2	4.30±0.20 b	0.73±0.06 b	5.89±0.83 c
SDT2NF3	4.30±0.20 b	0.60±0.02 bc	7.17±0.59 b

注:同列不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant differences( $P<0.05$ )

从表1可以看出,JGDZTX2的透明圈直径最大,达5.27 cm,JGDZTX1、JGDZTX2、JGDZTX3、SDT2NF2、SDT2NF3的*D/d*值均大于2.00,均具有较强的纤维素分解能力。

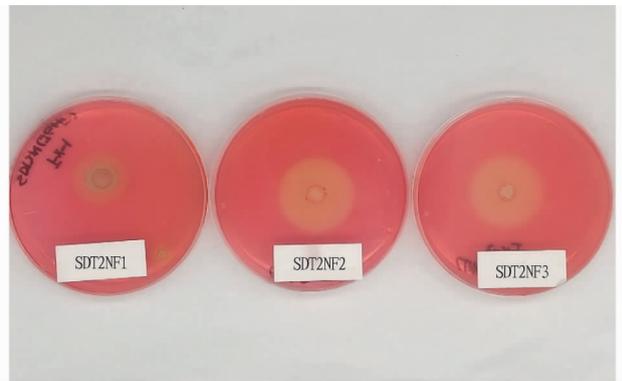
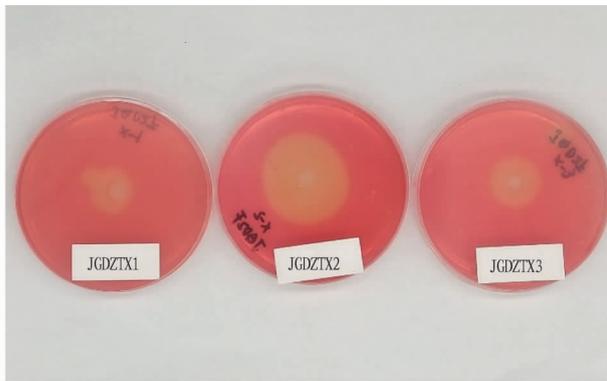


图1 菌落透明圈

Fig.1 Colony transparent circle

表2 菌株间拮抗试验

Table 2 Antagonism test between strains

菌株编号 Strain number	JGDZTX1	JGDZTX2	JGDZTX3	SDT2NF1	SDT2NF2	SDT2NF3	JGDZTZ2	JGDZTZ3
JGDZTX1	/	有	有	无	无	无	无	无
JGDZTX2	有	/	无	无	无	无	无	无
JGDZTX3	有	无	/	无	无	无	无	无
SDT2NF1	无	无	无	/	无	无	有	无
SDT2NF2	无	无	无	无	/	无	无	无
SDT2NF3	无	无	无	无	无	/	无	无
JGDZTZ2	无	无	无	有	无	无	/	有
JGDZTZ3	无	无	无	无	无	无	有	/

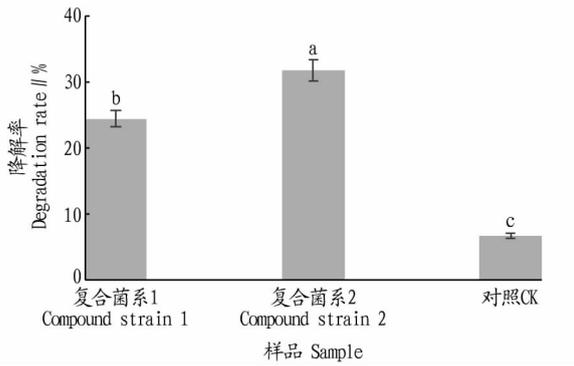
**2.5 实验室秸秆降解率测定** 为了得到秸秆降解能力强的复合菌系,进一步在实验室培养条件下测定了2组复合菌系对秸秆的降解率。由图2可知,复合菌系1对秸秆的降解率为24.4%,复合菌系2对秸秆的降解率为31.8%,与空白对照相比,2个复合菌系在低温条件下的秸秆降解率均显著高于对照( $P<0.05$ ),2个复合菌系相比于对照组的增幅分别达264.18%和374.63%;复合菌系2的降解率也显著高于复合菌

**2.3 CMC 酶活性** 对JGDZTX1、JGDZTX2、JGDZTX3、JGDZTZ2、JGDZTZ3、SDT2NF1、SDT2NF2和SDT2NF3共8株筛选菌株进行CMC酶活性测定,结果发现,其CMC酶活性分别为17.5、31.5、47.0、34.0、13.5、4.0、2.0、33.0 U/mL。其中JGDZTX2、JGDZTX3、JGDZTZ2、SDT2NF3的CMC酶活性均大于30.0 U/mL,有较好的纤维素分解能力。实验室自存菌株枯草芽孢杆菌(KC)、胶胨样芽孢杆菌(GSY)的CMC酶活性分别为28.0、25.0 U/mL。

**2.4 复合菌系构建** 综合考虑筛选得到的8株菌的CMC酶活性和拮抗作用(表2),将这8个菌株分为2组,分别与天津市农业科学院农业资源与环境研究所土壤微生物研究室自存的2株菌株混合,构建2组复合菌系。各菌株均按照菌:锆石=1:2的比例吸附于锆石上。其中复合菌系1的复合方法为JGDZTX1:JGDZTZ3:SDT2NF1:SDT2NF2:KC:GSY=3:3:3:3:2:1,复合菌系2的复合方法为JGDZTX3:JGDZTZ2:SDT2NF3:JGDZTX2:KC:GSY=3:3:3:3:2:1。2组复合菌系的CMC酶活性分别达到31.0和53.0 U/mL,均高于单一菌CMC酶活性。

系1。说明2组复合菌系对秸秆的降解能力都较强,并且复合菌系2的降解效果更好。

**2.6 沙袋法秸秆降解率测定** 为了更接近于田间应用效果,通过沙袋法模拟田间试验条件,测定2组复合菌系对秸秆的降解率。由图3可知,复合菌系1对秸秆的降解率为28.7%,复合菌系2对秸秆的降解率为45.1%,空白对照组虽然没有添加菌剂,但是土壤环境中也存在纤维素分解菌,会有一定



注:不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )

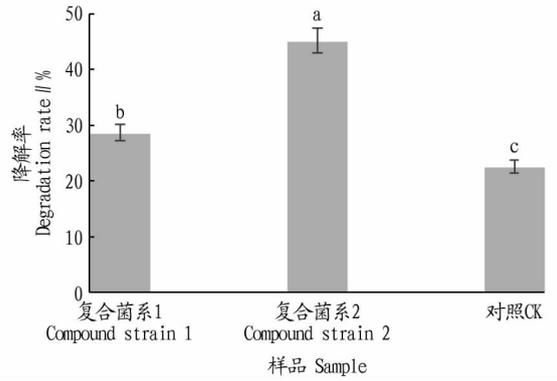
Note: Different lowercase letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ )

图 2 实验室秸秆降解率

Fig.2 Degradation rate of straw in laboratory

的秸秆降解作用,秸秆降解率为 22.6%。2 个复合菌系的秸秆降解率均显著高于对照( $P < 0.05$ ),2 个复合菌系相比于对照组的增幅分别达 26.99% 和 99.56%;复合菌系 2 的降解率也显著高于复合菌系 1。说明 2 组复合菌系对秸秆的降解能力都较强,并且复合菌系 2 的降解效果更好。该试验结果与实验室秸秆降解试验结果相一致,复合菌系 2 的秸秆降解能

力更强。



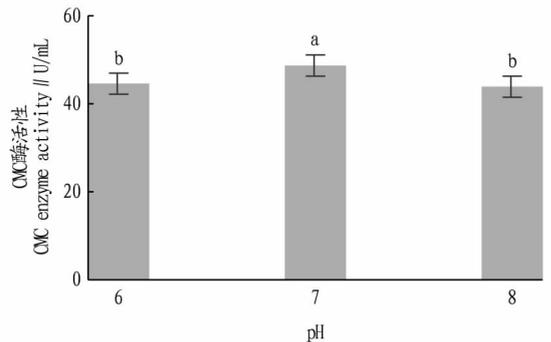
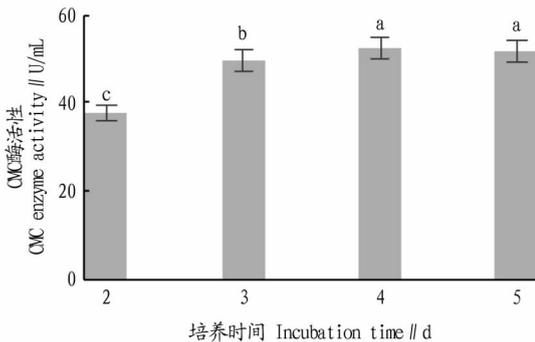
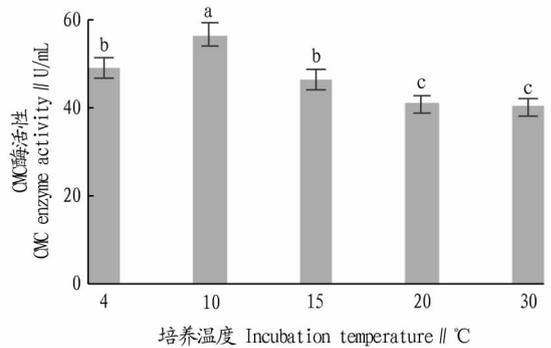
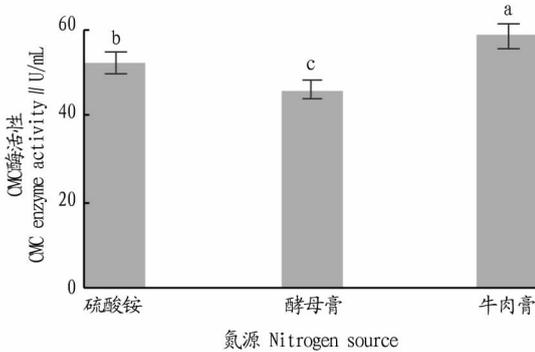
注:不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )

Note: Different lowercase letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ )

图 3 沙袋法秸秆降解率

Fig.3 Degradation rate of straw by sandbag method

2.7 菌株的产酶条件优化 筛选菌株中 JGDZTX3 的 CMC 酶活性最强,以 JGDZTX3 为代表进行产酶条件优化,通过试验可以看出不同氮源、温度、培养时间、pH 对该菌株产酶均具有较大影响,结果如图 4 所示。



注:不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )

Note: Different lowercase letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ )

图 4 不同培养条件下 CMC 酶活性

Fig.4 CMC enzyme activity under different culture conditions

在不同氮源的试验中,设置培养温度为 10 °C,培养时间为 3 d,初始 pH 为 7,结果显示,以牛肉膏作为唯一氮源时 CMC 酶活性最高,可达到 58.5 U/mL,该试验条件下 CMC 酶活性显著高于硫酸铵和酵母膏。

在不同温度的试验中,设置氮源为硫酸铵 3 g 和酵母膏

1 g,培养时间为 3 d,初始 pH 为 7,结果显示,随着温度升高 CMC 酶活性呈现出先增后降的趋势,温度为 10 °C 时 CMC 酶活性达到最大值(56.5 U/mL),该温度下 CMC 酶活性显著高于其他温度水平。

在不同培养时间的试验中,设置氮源为硫酸铵 3 g 和酵

母膏 1 g, 培养温度为 10 ℃, 初始 pH 为 7, 结果显示, 随着培养天数增加 CMC 酶活性呈现逐渐增高后趋于平稳的趋势, 2~3 d 的增长较快, 3~4 d 的增长较缓, 4 d 时 CMC 酶活性达到最大值 (52.6 U/mL), 该时间下 CMC 酶活性显著高于 2 d 和 3 d 时的值。

在不同初始 pH 的试验中, 设置氮源为硫酸铵 3 g 和酵母膏 1 g, 培养温度为 10 ℃, 培养时间为 3 d, 结果显示, 随着 pH 增加 CMC 酶活性呈现出先增后降的趋势, pH 为 7 时 CMC 酶活性达到最大值 (48.5 U/mL), 该 pH 水平下 CMC 酶活性显著高于其他 pH 水平。

综上所述, 通过单因素试验确定了最佳氮源为牛肉膏, 最适培养温度为 10 ℃, 最佳培养时间为 4 d, 最佳初始 pH 为 7。以此条件对菌株 JGDZTX3 进行了一次优化培养, 得到 CMC 酶活性为 66.5 U/mL。

**2.8 菌株的鉴定** 通过前面试验, 复合菌剂 2 的实验室秸秆降解效果和沙袋法秸秆降解效果均较好, 因此对复合菌系 2 中未知的 4 个菌株进行分子生物学鉴定。鉴定结果 (表 3) 显示, JGDZTX2 是葡萄球菌 (*Staphylococcus* sp.), JGDZTX3 是白蚁菌 (*Isoptericola* sp.), JGDZTZ2 是长柄木霉 (*Trichoderma longibrachiatum*), SDT2NF3 是芬莱氏链霉菌 (*Streptomyces finlayi*)。

表 3 菌种鉴定结果

Table 3 Identification results of bacterial species

菌株 Strain	扩增序列 Amplified sequence	参考物种 Reference species	序列编号 Sequence number	分类(门纲目科属) Classification	相似度 Similarity // %
JGDZTX2	16S	葡萄球菌 <i>Staphylococcus</i> sp.	MN519627.1	Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Staphylococcaceae; <i>Staphylococcus</i>	100
JGDZTX3	16S	白蚁菌 <i>Isoptericola</i> sp.	MN446724.2	Actinobacteria; Actinobacteria; Micrococcales; Promicromonosporaceae; <i>Isoptericola</i>	99.86
JGDZTZ2	ITS	长柄木霉 <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	MT102396.1	Ascomycota; Sordariomycetes; Hypocreales; Hypocreaceae; <i>Trichoderma</i>	100
SDT2NF3	16S	芬莱氏链霉菌 <i>Streptomyces finlayi</i>	MN640848.1	Actinobacteria; Actinobacteria; Streptomycetales; Streptomycetaceae; <i>Streptomyces</i>	100

### 3 讨论与结论

利用纤维素降解微生物处理秸秆是一种安全高效的秸秆资源化处理方式<sup>[15]</sup>。杨娜等<sup>[16]</sup>从自然发酵堆肥中筛选得到一株高效降解纤维素的菌株 SC2, 其滤纸酶活性为 17.70 U/mL, 对玉米秸秆的降解率可达到 33.07%。孟建宇等<sup>[17]</sup>从内蒙古西部地区筛选得到 23 株常温纤维素降解菌, 纤维素酶活性在 4~88 U/mL。这些筛选得到的常温菌株均有较强的纤维素分解能力, 但是在低温环境下就很难发挥作用。我国北方地区冬春季温度低, 低温纤维素降解菌将有更广的适用范围。然而, 目前国内外的研究多集中在常温菌株, 对于土壤中低温纤维素降解菌的研究很少<sup>[18]</sup>, 且低温筛选的条件一般是在 15 ℃ 以上, 不适用于北方冬春季 10 ℃ 以下的土壤环境。张必周等<sup>[19]</sup>为筛选低温菌株, 在 15 ℃ 下筛选得到 11 株具有纤维素分解能力的菌株。黄亚丽等<sup>[20]</sup>为了筛选适用于黄淮海北部秋冬季节的菌株, 在 16 ℃ 下进行了秸秆降解真菌的筛选, 筛选得到一株长枝木霉, 接种 45 d 的秸秆降解率可达到 56.73%。以上筛选出的低温菌株, 在 15 ℃ 左右可以发挥出较好的降解能力, 但不一定能适用于更低的温度条件。该研究在 10 ℃ 条件下筛选得到 55 株耐低温菌株, 进一步从中筛选出 8 株有明显透明圈的菌株并测定了纤维素酶活性, 最高可达 47.0 U/mL, 所有的培养条件均是在 10 ℃ 进行, 保证了所筛菌株在 10 ℃ 条件下具有较强的 CMC 酶活性, 能够在低温环境发挥较好的秸秆降解效果。

单一菌株的纤维素酶也相对单一, 多种纤维素分解菌株复配在一起, 纤维素酶也相对丰富, 并且菌株之间协同作用有利于纤维素酶活性的提高<sup>[21-22]</sup>。该研究筛选出 8 株低温纤维素降解菌株, 加上实验室自存的 2 株纤维素降解菌株,

共同进行复配。第一组为 JGDZTX1 (17.5 U/mL)、JGDZTZ3 (13.5 U/mL)、SDT2NF1 (4.0 U/mL)、SDT2NF2 (2.0 U/mL)、KC (28.0 U/mL)、GSY (25.0 U/mL), 复合菌剂的 CMC 酶活性为 31.0 U/mL; 第二组为 JGDZTX3 (47.0 U/mL)、JGDZTZ2 (34.0 U/mL)、SDT2NF3 (33.0 U/mL)、JGDZTX2 (31.5 U/mL)、KC (28.0 U/mL)、GSY (25.0 U/mL), 复合菌剂的 CMC 酶活性为 53.0 U/mL。此次试验中复合菌剂 CMC 酶活性均高于单一菌株, 说明没有拮抗作用的纤维素分解菌菌株复配后, 有助于 CMC 酶活性的提高。

菌株在生长代谢过程中会产生一些具有特定作用的代谢产物, 在不同的生长条件刺激下, 代谢产物的量会有较大差异。为了获得需要的特定产物, 要对菌株的生长条件进行优化。邢慧珍等<sup>[14]</sup>筛选出一株纤维素降解的真菌, 并进行了产酶条件优化, 证明接种量、初始 pH、培养温度菌对产酶量具有显著影响。孟建宇等<sup>[17]</sup>筛选了 59 株纤维素分解细菌, 并对代表性菌株进行了产酶条件优化, 结果表明培养温度、氮源、培养时间和初始 pH 均对菌株产酶有显著影响。此次试验中, 共筛选出包括高效低温纤维素分解菌 8 株, 包括细菌 3 株、真菌 2 株、放线菌 3 株, 其中 CMC 酶活性最高的菌株为 JGDZTX3, 酶活达到 47.0 U/mL。对该菌株进行产酶条件优化, 测定了不同氮源、不同培养温度、不同培养时间、不同初始 pH 对其产酶量的影响, 最终确定最佳氮源为牛肉膏, 培养温度为 10 ℃, 培养时间为 4 d, 初始 pH 为 7, 试验证明这 4 个条件对产酶均有显著影响 ( $P < 0.05$ ), 在最佳产酶条件下 CMC 酶活性值达到 66.5 U/mL。

综上所述, 该研究在河北滨海区低温土壤中筛选出低温 (下转第 27 页)

沉淀值变异幅度较大,这可能是由于选取的小麦材料品质参差不齐。

#### 4 结论

对 62 份供试材料进行高分子量麦谷蛋白亚基分析,共发现 8 种等位变异和 11 种亚基组合类型。Glu-A1 位点出现 2 种亚基类型,亚基 1 和亚基 Null。Glu-B1 位点出现 4 种亚基类型,亚基 14+15、7+8、7+9、17+18。Glu-D1 位点出现 2 种亚基类型,亚基 2+12 和亚基 5+10。品质性状分析结果表明,62 个小麦品系的蛋白质含量为 12.53%~16.56%,湿面筋含量为 26.95%~37.95%,沉淀值为 21.20~42.86 mL。

#### 参考文献

- [1] 孙其信.作物育种学[M].北京:高等教育出版社,2011:20.
- [2] LAWRENCE G J, MACRITCHIE F, WRIGLEY C W. Dough and baking quality of wheat lines deficient in glutenin subunits controlled by the *Glu-A1*, *Glu-B1* and *Glu-D1* loci [J]. *Journal of cereal science*, 1988, 7 (2): 109-112.
- [3] SHEWRY P R, HALFORD N G, TATHAM A S. High molecular weight subunits of wheat glutenin [J]. *Journal of cereal science*, 1992, 15 (2): 105-120.
- [4] PAYNE P I, NIGHTINGALE M A, KRATTIGER A F, et al. The relationship between HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality of British-grown wheat varieties [J]. *Journal of science of food and agriculture*, 1987, 40 (1): 51-65.
- [5] NAKAMURA H. Allelic variants on at high molecular weight glutenin subunit loci *Glu-A1*, *Glu-B1* and *Glu-D1* in Japanese and Chinese hexaploid wheats [J]. *Euphytica*, 2000, 112: 187-193.
- [6] 程国旺,徐风,马传喜,等.小麦高分子量麦谷蛋白亚基组成与面包烘烤品质关系的研究[J].安徽农业大学学报,2002,29(4):369-372.
- [7] 朱金宝,刘广田,张树榛,等.小麦籽粒高、低分子量谷蛋白亚基及其与品质关系的研究[J].中国农业科学,1996,29(1):34-39.
- [8] 赵和,卢少源,李宗智.小麦高分子量麦谷蛋白亚基遗传变异及其与品质和其它农艺性状关系的研究[J].作物学报,1994,20(1):67-75.
- [9] D'OVIDIO R, MASCI S. The low-molecular-weight glutenin subunits of wheat gluten [J]. *Journal of cereal science*, 2004, 39 (3): 321-339.
- [10] PAYNE P I, LAWRENCE G J. Catalogue of alleles for the complex gene

loci, *Glu-A1*, *Glu-B1*, and *Glu-D1* which code for high-molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat [J]. *Cereal research communications*, 1983, 11 (1): 29-35.

- [11] PAYNE P I, CORFIELD K G. Subunit composition of wheat glutenin proteins, isolated by gel filtration in a dissociating medium [J]. *Planta*, 1979, 145 (1): 83-88.
- [12] 庞斌双,张学勇,王兰芬,等.小麦 *Glu-B1* 位点 1Bx14 + 1By18 新亚基对材料的创制及其对加工质量的影响分析 [J]. *作物学报*, 2007, 33 (10): 1582-1586.
- [13] 张莉丽,张延滨,宋庆杰,等.龙辐麦 3 号小麦品种 HMW-GS Null 和 1 近等基因系间品质差异的研究 [J]. *中国农业科学*, 2007, 40 (9): 1864-1870.
- [14] HE Z H, PEÑA R J, RAJARAM S. High molecular weight glutenin subunit composition of Chinese bread wheats [J]. *Euphytica*, 1992, 64 (1/2): 11-20.
- [15] WANG G, SNAPE J W, HU H, et al. The high-molecular-weight glutenin subunit compositions of Chinese bread wheat varieties and their relationship with bread-making quality [J]. *Euphytica*, 1993, 68 (3): 205-212.
- [16] 张学勇,董玉琛,游光侠,等.中国小麦大面积推广品种及骨干亲本的高分子量谷蛋白亚基组成分析 [J]. *中国农业科学*, 2001, 34 (4): 355-362.
- [17] 张学勇,庞斌双,游光霞,等.中国小麦品种资源 *Glu-1* 位点组成概况及遗传多样性分析 [J]. *中国农业科学*, 2002, 35 (11): 1302-1310.
- [18] 董永梅,杨欣明,柴守诚,等.中国小麦代表性地方品种高分子量谷蛋白亚基组成分析 [J]. *麦类作物学报*, 2007, 27 (5): 820-824.
- [19] 朱炎辉,吉万全,王亚娟,等.西南冬麦区地方品种 HMW-GS 组成遗传多样性研究 [J]. *植物遗传资源学报*, 2007, 8 (4): 401-405.
- [20] 王亮,穆培源,徐红军,等.新疆小麦品种高分子量麦谷蛋白亚基组成分析 [J]. *麦类作物学报*, 2008, 28 (3): 430-435.
- [21] 杨宝菊,王亚娟,吉万全.长江中下游麦区小麦地方品种 HMW-GS 遗传多样性分析 [J]. *西北农业学报*, 2009, 18 (2): 59-63.
- [22] 张自阳,姜小琴,王智煜,等.不同来源小麦种质高分子量谷蛋白亚基多样性及其与加工品质的关系 [J]. *华北农学报*, 2019, 34 (3): 75-81.
- [23] LUO C, GRIFFIN W B, BRANLARD G, et al. Comparison of low-and high molecular-weight wheat glutenin allele effects on flour quality [J]. *Theoretical and applied genetics*, 2001, 102: 1088-1098.
- [24] 张勇,何中虎,王美芳,等.我国春麦区部分小麦品种品质状况分析 [J]. *麦类作物学报*, 2002, 22 (1): 27-32.
- [25] 王晓民,王咪,武林琳,等.运旱系列小麦品种 HMW-GS 组成和品质分析 [J]. *河南农业科学*, 2018, 47 (10): 27-30.

(上接第 10 页)

纤维素分解菌,并与实验室自存菌株进行复配,最终得到了一组复合菌剂,具有较高的 CMC 酶活性,并已在实验室秸秆降解试验和低温田间试验中,证明其具有高效加快秸秆降解的作用,为北方低温地区秸秆的资源化利用提供了菌种来源。但是由于微生物是活体,菌株发挥作用受到多方面条件的制约,作用效果不稳定,在提高纤维素分解菌对秸秆降解的稳定性方面还有待进一步深入研究。

#### 参考文献

- [1] 刘晓东,李书田.中国秸秆养分资源及还田的时空分布特征 [J]. *农业工程学报*, 2017, 33 (21): 1-19.
- [2] 张海艳,王文磊,韩钰.纤维素分解菌的筛选与鉴定 [J]. *安徽农业科学*, 2020, 48 (15): 1-3, 8.
- [3] 王伟,郑大浩,杨超博,等.高效纤维素分解菌的分离及秸秆降解生物效应 [J]. *中国农业科技导报*, 2019, 21 (8): 36-46.
- [4] 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.
- [5] 李海燕,苏媛,齐立志,等.多功能土壤添加剂对小麦土传病害的防控及对玉米秸秆的降解作用 [J]. *河南农业科学*, 2015, 44 (6): 84-89.
- [6] 高星爱,王鑫,解娇,等.低温秸秆降解复合微生物菌剂的研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2020, 36 (4): 144-150.
- [7] 郑丽,张海鹏,宋艳培,等.纤维素降解菌的筛选、鉴定和糖化水平研究 [J]. *广东农业科学*, 2017, 44 (2): 104-111.
- [8] 姜立春,赵丽萍,林寿露,等.纤维素降解菌的筛选、鉴定与产酶条件优化试验 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2017 (11): 166-172.

- [9] 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.
- [10] SELVAM K, SENBAGAM D, SELVANKUMAR T, et al. Cellulase enzyme: Homology modeling, binding site identification and molecular docking [J]. *Journal of molecular structure*, 2017, 1150: 61-67.
- [11] 王天生,李传博,王宁,等.纤维素降解菌的筛选与复合菌系的初步构建 [J]. *中国微生物学杂志*, 2018, 30 (1): 19-21.
- [12] 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.
- [13] 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, 2017.
- [14] 邢慧珍,宋水山,黄媛媛,等.一株低温玉米秸秆降解真菌的筛选、鉴定及降解特性 [J]. *微生物学通报*, 2020, 47 (9): 2923-2933.
- [15] 尹蕾,王伟航,陈子璇,等.水稻秸秆高效降解菌株的筛选鉴定及其降解产物分析 [J]. *江苏农业科学*, 2018, 46 (19): 292-296, 305.
- [16] 杨娜,何鑫,杜春梅.一株纤维素降解菌的筛选与鉴定 [J]. *中国农学通报*, 2021, 37 (17): 26-31.
- [17] 孟建宇,陈勿力吉玛,郭慧琴,等.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.
- [18] 胡海红,孙继颖,高聚林,等.低温高效降解玉米秸秆复合菌系发酵条件优化及降解菌剂的研究 [J]. *农业环境科学学报*, 2016, 35 (8): 1602-1609.
- [19] 张必周,高聚林,于晓芳,等.玉米秸秆低温降解菌的分离与鉴定及复配菌降解效果研究 [J]. *玉米科学*, 2020, 28 (6): 168-175.
- [20] 黄亚丽,黄媛媛,马慧媛,等.低温秸秆降解真菌的筛选及在秸秆还田中的应用 [J]. *中国农学通报*, 2020, 36 (21): 53-60.
- [21] 闫敏,李磊,庞金梅,等.玉米秸秆降解复合系的构建 [J]. *山西农业科学*, 2014, 42 (3): 257-259.
- [22] 刘青海,潘虎,朱兆静,等.高效纤维素降解复合菌系 M6 的构建及堆肥效果初探 [J]. *河南农业科学*, 2019, 48 (12): 56-62.