

doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2018.02.033

# 1 株高寒草地土壤真菌的鉴定及产纤维素酶特性的研究

李 欣<sup>1</sup>, 芦光新<sup>1\*</sup>, 王军邦<sup>2\*</sup>, 姚世庭<sup>1</sup>, 党 宁<sup>1</sup>, 周华坤<sup>3</sup>, 张 英<sup>1</sup>, 谢永丽<sup>1</sup>

(1. 青海大学, 青海 西宁 810016; 2. 中国科学院地理科学与资源研究所生态系统网络观测与模拟重点实验室, 北京 100101; 3. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海省寒区恢复生态学重点实验室, 青海 西宁 810008)

**摘要:**为研究 1 株高寒草地土壤真菌的产纤维素酶特性,采用微生物培养法和液体摇瓶发酵法,对供试菌株的培养特性和产酶特性进行了研究。结果表明:经 ITS-rDNA 分子鉴定,供试菌株初步确定为 *Thielavia hyalocarpa*,供试菌株的最适生长温度为 25℃;对不同的碳、氮源利用能力不同,在供试的 5 种碳源和氮源中,葡萄糖和蛋白胨分别为最适碳源和氮源,对 5 种碳源的利用表现为:葡糖糖>糊精、麦芽糖和淀粉>蔗糖菌株, H 对 5 种氮源的利用表现为:蛋白质>硝酸钠>尿素>硫酸胺>磷酸胺;菌株 H 产的纤维素酶在 pH 5.5 和 50℃ 下有较高的催化活性,产的木聚糖酶在 pH 为 5 和 55℃ 温度下有较高的催化活性。

**关键词:**高寒草地;纤维素酶;木聚糖酶;培养特性

中图分类号:S154

文献标识码:A

文章编号:1007-0435(2018)02-0505-07

## Identification of a Soil Fungus Strain Isolated from an Alpine Grassland and Characteristics of Cellulase Production

LI Xin<sup>1</sup>, LU Guang-xin<sup>1\*</sup>, WANG Jun-bang<sup>2\*</sup>, YAO Shi-ting<sup>1</sup>, DANG Ning<sup>1</sup>,  
ZHOU Hua-kun<sup>3</sup>, ZHANG Ying<sup>1</sup>, XIE Yong-li<sup>1</sup>

(1. Qinghai University, Xining, Qinghai Province 810016, China; 2. Key Lab of Ecosystem Network Observation and Modeling of CAS Synthesis Research Center of Chinese Ecosystem Research Network, Institute of Geographic Sciences and Natural Resources Research, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 3. Key Laboratory of Cold Regions Restoration Ecology, Qinghai Province, Northwest Plateau Institute of Biology, Xining, Qinghai Province 810008, China)

**Abstract:** To study the cellulase-producing characteristics of a soil fungus isolated from an alpine meadow, the culture characteristics and enzyme production characteristics of the tested strains were studied by using the traditional microorganism culture method and liquid shake flask fermentation method. The results showed that the strain was identified as *Thielavia hyalocarpa* by ITS-rDNA molecular identification. The optimum growth temperature was 25°C. Five carbon sources and nitrogen sources were tested. Among the nitrogen sources, glucose and peptone were the most suitable carbon sources and nitrogen sources, respectively. The utilization of five carbon sources was as follows: glucosamine> dextrin, maltose and starch> sucrose. The performance of strain H on five nitrogen sources was as follows: protein> sodium nitrate> urea> amine sulfate> ammonium phosphate; cellulase produced by strain H has high catalytic activity at pH 5.5 and 50°C, and the pH value of produced xylanase is 5, it had a high catalytic activity at the temperature 55°C.

**Key words:** Alpine meadows; Cellulase; Xylanase; Biological characteristics

纤维素类物质是自然界中分布广、数量大、来源丰富的可再生性物质,纤维素酶和半纤维素酶是降解纤维素类物质酶系中的主要组份,其在医药、食

品、棉纺、环保及可再生资源利用等领域应用广泛<sup>[1]</sup>。自然界中真菌分布广泛、且种类繁多,尽管真菌数量不及细菌,甚至比放线菌还少,但其在生态系

收稿日期:2017-04-04;修回日期:2018-03-21

基金项目:国家自然科学基金项目 31460152;41261064;青海省创新平台建设专项(2017-ZJ-Y20)资助

作者简介:李欣(1993-),女,青海大通人,硕士研究生, E-mail:907434358@qq.com; \*通信作者 Author for correspondence, E-mail: lugx74@qq.com; jbwang@igsnr.ac.cn

统碳素循环中发挥着重要作用<sup>[2]</sup>,另外,真菌产生的纤维素酶多是胞外酶,且纤维素酶各组分齐全,分解能力较强<sup>[3]</sup>。因此,真菌在降解纤维素类物质方面具有更广阔的应用前景<sup>[4]</sup>。

高寒草地土壤纤维素分解真菌是草地生态系统的重要组成部分,查明其数量及其组成情况无疑是十分必要的。素有“世界屋脊”之称的青藏高原由于地理位置特殊、具有丰富的降解纤维素类物质的微生物物种和基因资源,是分离和筛选纤维素分解真菌的宝库和良好介质<sup>[5]</sup>。课题组在前期从高寒草地土壤中分离和筛选了大量的具有纤维素分解真菌菌株,为了进一步确定菌株的系统发育地位和产纤维素酶的特性,本文以初步筛选出具有优良性状的菌株(编号为 H)为研究对象,进行了 rDNA-ITS 分子鉴定、培养特性及粗酶液酶学性质的研究,旨在为进一步开发和利用奠定提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试菌株

由本课题组从东祁连山高寒草地土壤中分离获得,具有分解纤维素物质的功能,菌株编号为 H。

### 1.2 培养基

马铃薯葡萄糖培养基(potato dextrose agar, PDA)<sup>[6]</sup>,用于供试菌株菌株的转接和活化。

马铃薯蔗糖培养基(potato sugar agar, PS)<sup>[6]</sup>,用于供试菌株菌丝的培养。

察氏培养基<sup>[6]</sup>,用于供试菌株在不同温度条件下生长速度的测定。

供试碳、氮源培养基:在察氏培养基中,分别按培养基总体积 1% 的糊精、可溶性淀粉、麦芽糖、葡萄糖、蔗糖等 5 种碳源,配置不同碳源培养基;另外,分别按培养基总体积 0.25% 的蛋白胨、尿素、硫酸铵、磷酸胺、硝酸钠等 5 种氮源,配置不同氮源培养基,pH 调至 6~7,每组做 3 个重复。用于供试菌株在不同碳氮源条件下生长速度的测定。

液体产酶培养基<sup>[7]</sup>:NaNO<sub>3</sub> 2.5 g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g,CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.1 g,MgSO<sub>4</sub> 0.3 g,NaCl 0.1 g,FeCl<sub>3</sub> 0.01 g,秸秆(粉)0.5 g,蒸馏水 1 000 mL,pH

(用稀盐酸调制 6.0~7.0)。用于测定供试菌株产木聚糖酶的酶活力。

### 1.3 研究方法

1.3.1 菌株活化 将保存的供试菌种接种于 PDA 平板培养基,25℃ 恒温培养 7~8 d 后,连续转接 2~3 次,纯化、复壮。

1.3.2 菌株鉴定 经活化、纯化的菌株挑取少量菌丝接种于 PS 液体培养基中,于 25℃,150 r min<sup>-1</sup> 摇床振荡培养,过滤后收集菌丝体,采用试剂盒法提取基因组 DNA。以基因组 DNA 为模板,利用 1 对 rDNA-ITS 通用引物(ITS-1、ITS-4)进行 PCR 扩增,扩增产物纯化后,送样测定 DNA 序列。将测序获得的 ITS 序列通过与 GenBank 中的核酸数据库序列进行 Blast 分析,采用 CLUSTAL 软件进行多重序列比对<sup>[8]</sup>,并用 MEGA 4.0 软件采用 Neighbor-Joining 法和 UPGMA 法构建系统发育树<sup>[9-10]</sup>。ITS-1:5'-GTAGGTGAACCTGCGG-3', ITS-4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'。PCR 反应程序:预变性 95℃ 5 min,变性 95℃ 1 min,复性 50℃ 1 min,延伸 72℃ 1 min,35 个循环,最终 72℃ 延伸 10 min。基因组 DNA 提取试剂盒(SK1375)、引物合成、序列测定均由上海生工生物工程有限公司完成。

1.3.3 生物学特性 参照 Li 等<sup>[11]</sup>的方法,在 PDA 平板上将培养 7~10 d 的供试菌株用直径 6 mm 的打孔器切取菌饼,分别转接于不同测定内容的培养基中,25℃ 黑暗条件下培养(除温度处理实验),3 次重复,用十字交叉法测定菌落直径,以第 7 d 测定的菌落直径作为评定菌株生长速率的依据。温度对真菌生长的影响:分别于 15℃,20℃,25℃,30℃,35℃ 和 40℃ 等 6 种温度培养。碳、氮源对真菌生长的影响:分别转接于含 1% 的不同碳源和 0.25% 的不同氮源培养基上,培养。实验结束后测定供试菌株的菌落直径。

### 1.3.4 供试菌株产酶特性的研究

#### 1.3.4.1 绘制标准曲线

参照郑佐头等<sup>[12]</sup>和陆文清等<sup>[13]</sup>的方法,以吸光值(OD<sub>540</sub>)作横坐标,分别以对应的标准葡萄糖溶液和木糖溶液含糖的毫克数为纵坐标,列出直线回归方程,制作标准曲线(图 1,图 2)。

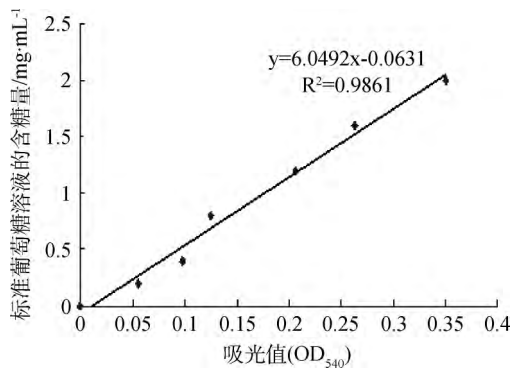


图 1 以葡萄糖为底物的标准曲线

Fig. 1 The standard curve using glucose as substrate

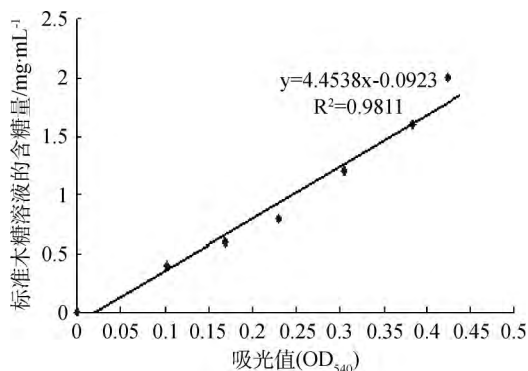


图 2 以木糖为底物的标准曲线

Fig. 2 The standard curve using xylcose as substrate

#### 1.3.4.2 粗酶液的制备

将活化的菌株分别接种于以 0.5 g 油菜秸秆粉为底物,盛有 50 mL 液体产酶培养基 150 mL 的锥形瓶中,以不接菌为对照,每个处理重复 3 次。在 25 °C,150 r·min<sup>-1</sup> 条件下,置于摇床震荡培养,试验周期为 7 d。实验结束后,经尼龙丝网过滤的发酵液,用灭菌的 1 000 μL 移液器枪头,吸取 2 mL 上清液,于 4 °C,10 000 r·min<sup>-1</sup>,离心 10 min,取上清液制备粗酶液。

#### 1.3.4.3 酶活力测定

酶活力测定方法参照文献<sup>[14]</sup>,稍有改进。吸取液体摇瓶发酵粗酶液 0.2 mL,以 1 mL 含 0.5% 的羧甲基纤维素钠(CMC-Na)和桦木木聚糖为反应底物的柠檬酸缓冲液(pH = 5.5,终浓度为 0.1 mol·L<sup>-1</sup>)组成反应体系,在 37 °C 恒温水浴锅中反应 30 min,采用 DNS 法(3,5-二硝基水杨酸)测定最终反应产物在 540 nm 波长下的吸光值<sup>[15]</sup>,空白对照用等体积热变性的粗酶液代替新鲜的粗酶液。酶活力的计算方法按照国际理论应用化学协会(IUPAC)推荐的国际标准方法,分别以每 mL 粗酶液每分钟产生 1 μmol 木糖为一个国际单位,计

IU·mL<sup>-1</sup>[16]。

计算公式如下:  $X = m / (M \times t) \times 1\,000 \times n$

式中: X 为酶活力单位,

m 为葡萄糖的含量,

M 为葡萄糖的摩尔质量,

T 为酶反应时间,

1000 为转化因子,1 mmol = 1 000 μmol,

n 为稀释倍数。

#### 1.3.4.4 粗酶液最适温度、pH 值的测定

按照上述酶活力测定的方法,分别在 4 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C 下测羧甲基纤维素酶和木聚糖酶的酶活力,以温度(T)为横坐标,相对羧甲基纤维素酶和木聚糖酶活力为纵坐标作图(以酶活最高者为 100%)。以酶活力最大时的反应温度为酶催化活性最适温度。按同样的方法,分别在 pH 2.0, pH 3.0, pH 3.5, pH 4.0, pH 4.5, pH 5.0, pH 5.5, pH 6.0, pH 6.5, pH 7.0, pH 7.5, pH 8.0, pH 8.5, pH 9.0, pH 9.5, pH 10.0 条件下羧甲基纤维素酶和木聚糖酶的酶活力,以 pH 为横坐标,相对羧甲基纤维素酶和木聚糖酶的酶活力为纵坐标作图(以酶活最高者为 100%)。以酶活力最大时的 pH 值为酶催化活性最适 pH。

#### 1.4 数据分析

所有数据均用 Microsoft Excel 录入并作图,采用 DPS 6.55 进行数据分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 供试菌株 H 的菌落形态及分子鉴定

供试菌株 H 在 PDA 培养基上为白色,菌落圆形,25 °C 培养培养 7 d 后菌落直径达 65.7 mm,菌丝疏松,表面为绒毛状。菌落反面为淡黄色(图 3)。子囊果球形,表面附属丝呈菌丝状,浅褐色;子囊近圆形或椭圆形,子囊孢子纺锤形或椭圆形,褐色(图 4)。

测序结果在 GenBank 中进行 BLAST 同源性比较,采用 Neighbor-Joining 法和 UPGMA 法分别构建系统发育树(图 5),结果如下:菌株 H 与登录号为 AB470856 的菌株的亲缘关系最近,支持率高达 100%。与菌株 H 最相似的菌株为: *Thielavia hyalocarpa*。

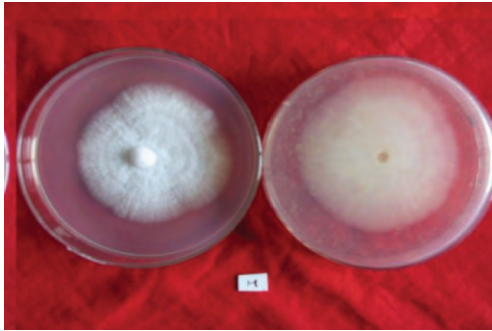


图 3 供试菌株 H 的菌落形态

Fig. 3 Colony morphology of of Strain H

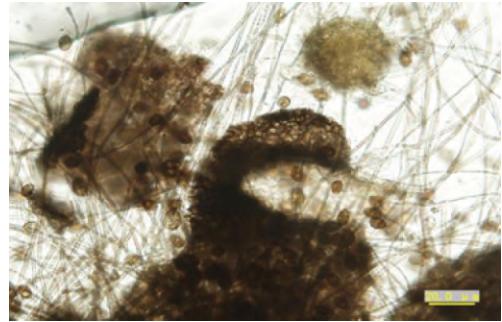


图 4 供试菌株 H 的菌体形态

Fig. 4 Ascus morphology of Strain H

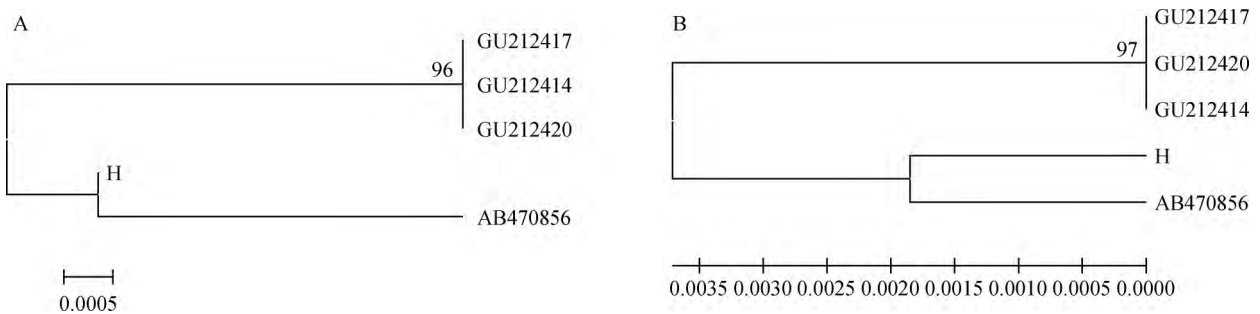


图 5 菌株 H 系统发育树的构建

Fig. 5 Construction of phylogenetic tree of strain H

注: A、B 分别为基于 Neighbor-Joining 法和 UPGMA 法的系统发育树

Note: A, B is phylogenetic tree based on Neighbor-Joining method and the UPGMA method respectively

## 2.2 温度对菌株生长的影响

供试菌株在 15~35℃ 温度范围内能够生长。由图 6 可以看出, 温度对生长速度的影响较为明显, 从 15~25℃ 范围内, 菌落直径随温度升高而逐渐增大, 从 25~30℃ 范围内, 菌落直径随温度升高而变小, 在 20℃ 的生长速度高于 30℃ 条件下的生长速度。从供试菌株生长速度随温度变化的曲线来看, 菌株 H 的最适生长温度为 25℃。

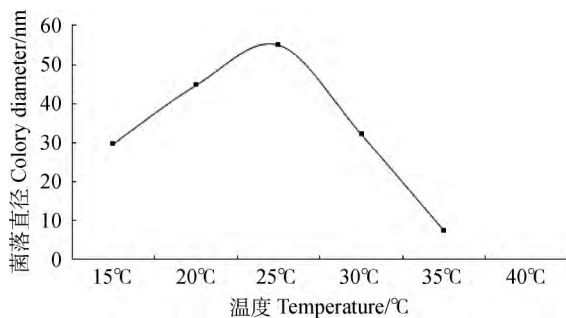


图 6 温度对菌株生长的影响

Fig. 6 Effects of temperature on the mycelial growth rate

## 2.3 不同碳、氮源对菌株生长的影响

由表 1 可以看出, 供试菌株不仅能利用单糖, 低聚糖等速效碳源, 而且还能利用淀粉等长效碳源, 对参试 5 种碳源的利用能力各不相同。供试菌株在糊精、蔗糖、麦芽糖、葡萄糖、可溶性淀粉等 5 种供试碳源的培养基上培养 7 d 后, 菌落直径大小不尽相同, 菌株在不同碳源的培养基上, 表现出不同的生长速度。供试菌株 H 对 5 种碳源的利用表现为: 葡萄糖 > 糊精、麦芽糖和淀粉 > 蔗糖。供试菌株在蛋白质、尿素、硫酸胺、磷酸胺、硝酸钠等 5 种供试氮源的培养基上培养 7 d 后, 菌落直径大小不尽相同, 每一种菌株在不同氮源培养基上, 表现出不同的生长速度。H 对 5 种氮源的利用表现为: 蛋白质 > 硝酸钠 > 尿素 > 硫酸胺 > 磷酸胺;

## 2.4 酶学性质

### 2.4.1 羧甲基纤维素酶和木聚糖酶的酶活力

酶活力结果表明, 菌株 H 既能产生羧甲基纤维素酶又能产木聚糖酶, 酶活力测定结果见表 2。

表 1 不同碳、氮源对菌落生长速度的影响

Table 1 Effects of N-source on the mycelial growth rate

氮源	H	碳源	H
蛋白胨 Peptone	50.500±1.756 <sup>a</sup>	糊精 Dextrin	47.667±0.601 <sup>b</sup>
尿素 Urea	35.500±1.258 <sup>c</sup>	淀粉 Starch	45.167±0.167 <sup>b</sup>
硫酸铵 Ammonium sulfate	23.500±1.323 <sup>d</sup>	麦芽糖 Maltos	47.667±1.764 <sup>b</sup>
磷酸胺 Phosphoric acid amine	11.667±1.481 <sup>e</sup>	蔗糖 Sucros	37.833±1.481 <sup>c</sup>
硝酸钠 Sodium nitrate	42.667±1.692 <sup>b</sup>	葡萄糖 Glucose	52.000±0.289 <sup>a</sup>

注:数据为平均值±标准误(n=3);不同小写字母表示差异显著(P<0.05)

Note: Mean±SD for 3 replicated tests. Different samll letters in same column indicate significant differences at the 0.05 level

表 2 酶活力测定结果

Table 2 The experimental results of enzyme activity

菌株编号 Strains number	酶活力 Enzyme activity/IU	
	羧甲基纤维素酶 CMCase	木聚糖酶 Xylanase
H	12.773±0.012	39.395±0.007

2.4.2 产羧甲基纤维素酶的酶学性质 图 7 可以看出,在 15~65℃ 范围内,能够监测到菌株 H 分泌的羧甲基纤维素酶的酶活力,并且在 50℃ 时达到最大值,且在不同温度下下放置 12 h,30℃ 左右保持的酶活力最大。由图 8 可以看出,在 pH 2.0~10 范围内,能够监测到菌株 H 分泌的羧甲基纤维素酶的酶活力,在 pH=5.5 时达到最大值,且在不同 pH 下放置 12 h 后,pH=5.5 时酶活力保持较高的活性。

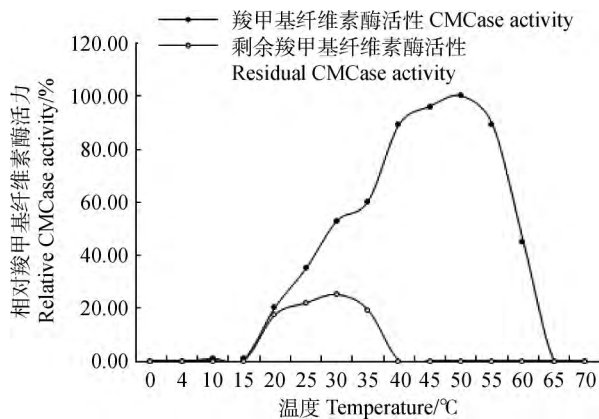


图 7 菌株 H 产 CMCase 的最适温度及热稳定性

Fig. 7 The optimum temperature and thermal stability of CMCase of strain H

2.4.3 产木聚糖酶的酶学性质 由图 9 可以看出,菌株 H 诱导分泌的木聚糖酶(Xylanase)在 55℃ 时酶的催化活性达到最大值,在不同温度下下放置 12 h,0~45℃ 之间保持较高的酶活力。由图 10 可以看出,菌株 H 在不同 pH 下的保持的酶活力大小不

同,pH 值为 5.0 时酶的催化活性较高,在不同 pH 下放置 12 h,pH=5.0 的范围内能够检测到木聚糖酶的酶活力。

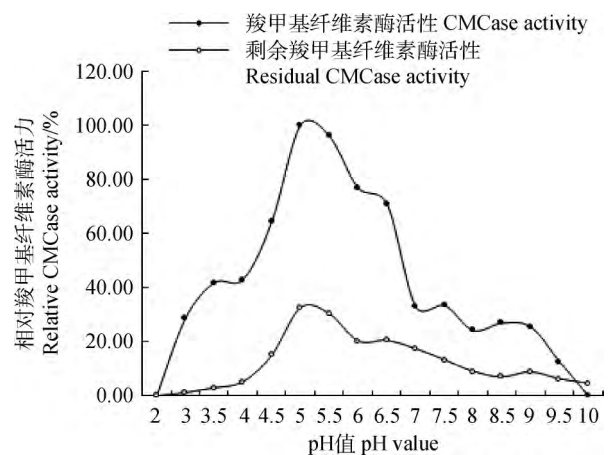


图 8 菌株 H 产 CMCase 的最适 pH 值和对 pH 值的稳定性

Fig. 8 The optimum pH value and stability of CMCase of strain H

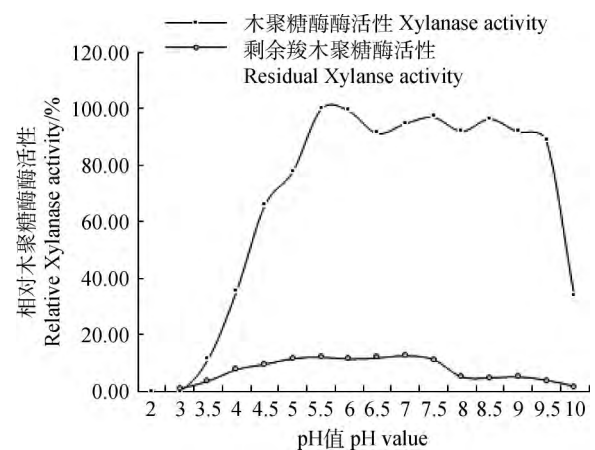


图 9 菌株 H 产 Xylanase 的最适温度及热稳定性

Fig. 9 The optimum temperature and thermal stability of Xylanase of strain H

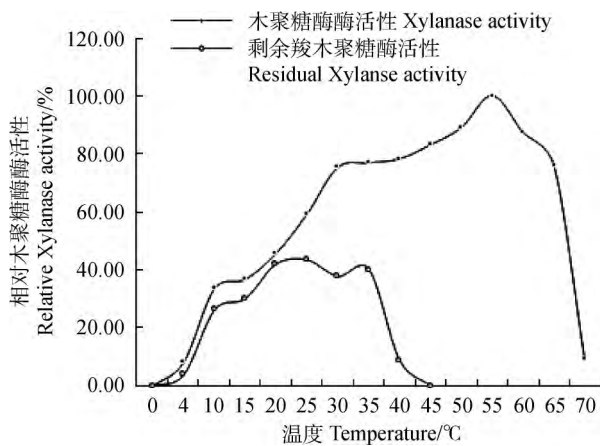


图 10 菌株 H 产 Xylanase 的最适 pH 值和对 pH 值的稳定性

Fig. 10 The optimum pH value and stability of Xylanase of strain H

### 3 讨论与结论

经 ITS-rDNA 分子鉴定,供试菌株初步确定为 *Thielavia hyalocarpa*,供试菌株的最适生长温度为 25°C;对不同的碳、氮源利用能力不同,在供试的 5 种碳源和氮源中,葡萄糖和蛋白胨分别为最适碳源和氮源。菌株 H 对 5 种碳源的利用表现为:葡萄糖 > 糊精、麦芽糖和淀粉 > 蔗糖菌株,菌株 H 对 5 种氮源的利用表现为:蛋白质 > 硝酸钠 > 尿素 > 硫酸胺 > 磷酸胺;菌株 H 产的纤维素酶在 pH 5.5, 50°C 下有较高的催化活性,产的木聚糖酶在 pH 为 5, 55°C 温度下有较高的催化活性。

已有研究表明具有纤维素降解能力的真菌主要有以下一些菌:曲霉(*Aspergillus*)、青霉(*Penicillium*)、葡萄状穗霉(*Stachybotrys*)、毛壳霉(*Chaetomium*)、木霉(*Trichoderma*)、葡萄孢霉(*Botrytis*)、白腐菌(*White rot fungi*)和褐腐菌(*Brown rot fungi*)等。杨涛等<sup>[17]</sup>从云南高黎贡山共分离到 15 个属 35 株真菌,其中曲霉(*Aspergillus*)、青霉(*Penicillium*)、葡萄状穗霉(*Stachybotrys*)、毛壳霉属(*Chaetomium*)的真菌共计 20 株,占总分离菌株数的 57.1%,它们是高黎贡山土壤中降解纤维素真菌的优势菌群。谢占玲等<sup>[18]</sup>从青海高原林区分离筛选 31 株降解纤维素的真菌,筛选出一株分离自互助北山森林的高产纤维素酶的真菌 NO 0143 菌株,根据其形态学及培养特征鉴定为康氏木霉(*Trichoderma koningii* Qudem)。由此可见,土壤环境中具有纤维素分解能力的真菌的种类较为丰富。

目前进行商业化生产纤维素酶的几乎都是中高温型纤维素酶,其最适作用温度多为 45~65°C<sup>[19-20]</sup>。研究发现,菌株 H 诱导分泌的羧甲基纤维素酶(CMCase)在 pH=5.5、50°C 时酶活性最高,分泌的木聚糖酶(Xylanase)在 pH=5.0、温度为 55°C 酶活性最高,酶的最适作用温度和 pH 值和大部分真菌类似。但菌株 H 分泌的羧甲基纤维素酶和木聚糖酶分别在 15~40°C、0~45°C 范围内相对稳定,与中高温型纤维素酶相比,在低温环境下可以高效反应,对减少工艺流程、降低生产成本以及节能等方面应用具有相当大的优势。因此,菌株 H 分泌的羧甲基纤维素酶和木聚糖酶在低温环境的反应条件下具有广阔的应用前景。

梭孢壳属(*Thielavia*)真菌隶属于毛壳菌科(Chaetomiaceae)、核菌纲(Pyrenomycetes)、粪壳菌目(Sordariales)<sup>[21]</sup>。陈庆涛<sup>[22]</sup>对中国毛壳菌科进行了研究,报道了 *Chaetomium* 和 *Thielavia*。目前对梭孢壳属(*Thielavia*)真菌报道较多的是一种病原菌,可引起向日葵黑茎病<sup>[23]</sup>,是杜仲和宁夏枸杞内生真菌的组成部分<sup>[24-25]</sup>。本研究供试菌株 H 来源于高寒草地土壤中,其 ITS 序列与数据库中已知菌株的序列相似性高达 100%,经 rDNA-ITS 基因序列的分子鉴定,为梭孢壳属(*Thielavia*)真菌。菌株 H 既能产生羧甲基纤维素酶又能产木聚糖酶,并且菌株 H 产生的羧甲基纤维素酶和木聚糖酶有一定的稳定性,在不同温度和 pH 值下,放置 12 小时后,仍能检测到酶活力,说明菌株 H 分泌的纤维素酶和木聚糖酶具有一定的稳定性。这一结果表明高寒草地土壤中存在多酶系真菌资源,对丰富高寒草地土壤纤维素分解真菌的物种多样性具有重要的意义。

土壤微生物作为地下生态学的研究对象之一,是维持生态系统平衡,揭示全球气候变化与生态系统 CO<sub>2</sub> 响应与反馈机制的关键过程之一<sup>[26-27]</sup>。微生物一方面直接分解和利用有机物质,降解所接触到的所有植物残体,利用植物残体分解产生的低分子量化合物,如核酸、脂类、蛋白质和碳水化合物等形成的微生物生物量,另一方面以代谢产物或者残留物(胞外酶,胞外多聚物,细胞壁大分子等)的形式贡献于土壤有机质,微生物自身的碳分配过程对有机质形成具有重要贡献<sup>[28]</sup>。除此之外,土壤中水分状态、黏土矿物吸附等外界因素会影响微生物群落的碳分配过程和速率<sup>[29]</sup>。在高寒草地生态系统中,相比于其它微生物生理功能类群,木质纤维素分解

功能群在参与碳素循环的过程中占重要位置,其数量占绝对优势<sup>[30]</sup>。因此,深入认识高寒草地土壤产纤维素酶真菌资源,对丰富高寒草地土壤碳循环理论,为调控退化高寒草地生态系统的恢复和治理提供科学依据。

### 参考文献

- [1] Lyndl R, Wymanc E, Gerngross T U. Biocommodity engineering[J]. *Biotechnology Progress*, 1999, 15: 777-793
- [2] Bardgett R D, Hobbs P J, Frostegard A. Changes in soil fungal; bacterial biomass ratios following reductions in the intensity of management of an upland grassland[J]. *Biology and Fertility of Soil*, 1996, 22(3): 261-264
- [3] Karboune S, Geraert P A, Kermasha S. Characterization of selected cellulolytic activities of multi-enzymatic complex system from *Penicillium funiculosum* [J]. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 2008, 56(3): 903-909
- [4] 芦光新, 陈秀蓉, 杨成德, 等. 真菌分泌纤维素酶与2种草坪草凋落物有机质降解相互关系的研究[J]. *草地学报*, 2011, 19(6): 954-959
- [5] 芦光新, 陈秀蓉, 王军邦, 等. 高寒草地土壤三色小皮伞菌产漆酶特性的研究[J]. *草地学报*, 2014, 22(5): 1080-1085
- [6] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 科学出版社, 1996: 122-154
- [7] 芦光新, 陈秀蓉, 杨成德, 等. 一株纤维素分解菌的鉴定及对两种草坪草凋落物分解活性的研究[J]. *草业学报*, 2011, 20(6): 170-179
- [8] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids research*, 1997, 25: 4876-4882
- [9] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24: 1596-1599
- [10] Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, et al. Clustal W and clustal X version 2.0 [J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(21): 2947-2948
- [11] Li C J, Nan Z B, Li F. Biological and physiological characteristics of *Neotyphodium gansuense* symbiotic with *Achnatherum inebrians* [J]. *Microbiological Research*, 2008, 163: 431-440
- [12] 郑佐头, 段明星, 徐文联, 等. 高活性纤维素酶菌株的筛选及其产酶条件的研究[J]. *微生物学杂志*, 1996, 16(1): 35-38
- [13] 陆文清, 何丽花, 曹云鹤. 饲料用木聚糖酶活力测定的研究[J]. *饲料工业*, 2009, 30(4): 16-20
- [14] Horikoshi K, Nakao M, Kurono Y, et al. Cellulase of an alkalophilic *Bacillus* strain isolated from soil [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1984, 30: 774-779
- [15] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars [J]. *Analytical Chemistry*, 1959, 31: 426-428
- [16] Ghose T K. Measurement of XXX cellulose activities international union of pure and applied chemistry [J]. *Chemphere*, 1987, 59(2): 257-268
- [17] 杨涛, 周慧, 张于光, 等. 云南高黎贡山土壤可培养降解纤维素真菌的多样性 [J]. *生态学报*, 2009, 29(4): 1971-1979
- [18] 谢占玲, 李秀萍, 杨家华. 青海高原降解纤维素微生物的调查、分离鉴定 [J]. *微生物学通报*, 2004, 2: 46-47
- [19] Leonardo Faria Martins, Daniel Kolling, Marli Camassola, et al. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates [J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(5): 1417-1424
- [20] Prasad S, Singh A, Joshi H C. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues [J]. *Resource Conservation Recycle*, 2007, 50: 1-39
- [21] 戴芳澜. 中国真菌总汇 [M]. 北京: 科学出版社, 1979
- [22] 陈庆涛. 毛壳菌和壳针孢属的新种 [J]. *微生物学报*, 1973, 13(2): 124-128
- [23] 张伟宏. 向日葵黑茎病和茎溃疡病菌生物学特征、分子检测及检疫处理 [D]. 重庆: 西南大学, 2013: 23-24
- [24] 孙微微. 杜仲内生真菌的分离鉴定及活性菌株在小麦中的定殖研究 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2014: 16-17
- [25] 谭悠久. 毛壳菌科分类及分子系统发育研究 [D]. 杨陵: 西北农林科技大学, 2005: 12-13
- [26] Brussaard L, De Ruyter P C, Brown G G. Soil biodiversity for agricultural sustainability [J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2007, 121(3): 233-244
- [27] Bissett A, Burke C, Cook P L M, et al. Bacterial community shifts in organically perturbed sediments [J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(1): 46-60
- [28] Schimel J, Balsler T, Wallenstein M. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function [J]. *Ecology*, 2007, 88(6): 1386-1394
- [29] Schimel J, Schaeffer S. Microbial control over carbon cycling in soil [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3(348): 1-11
- [30] He Z, Piceno Y, Deng Y, et al. The phylogenetic composition and structure of soil microbial communities shifts in response to elevated carbon dioxide [J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(2): 259-272

(责任编辑 贾婉)