

嗜冷假单胞菌 BYAU-6 的分离及低温秸秆降解能力解析

范寒雪¹, 邹世杰¹, 章圣龙^{1,4}, 王敬红¹, 程琰², 邴文荣², Aman Khan², 魏丹^{3*}, 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

2 东北林业大学 生命科学学院, 东北盐碱植被恢复与重建教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨

3 北京市农林科学院植物营养与资源环境研究所, 北京

4 黑龙江国宏节能环保有限公司, 黑龙江 哈尔滨

范寒雪, 邹世杰, 章圣龙, 王敬红, 程琰, 邴文荣, Aman Khan, 魏丹, 王伟东. 嗜冷假单胞菌 BYAU-6 的分离及低温秸秆降解能力解析[J]. 微生物学报, 2025, 65(8): 3273-3286.

FAN Hanxue, ZOU Shijie, ZHANG Shenglong, WANG Jinghong, CHENG Yan, BING Wenrong, Khan Aman, WEI Dan, WANG Weidong. Isolation of *Pseudomonas psychrophila* BYAU-6 capable of degrading straw at low temperatures[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(8): 3273-3286.

摘要: 【目的】针对寒地黑土区水稻秸秆还田时秸秆腐解速度慢的问题, 筛选低温木质素降解细菌以破除木质素的阻碍, 提升寒区秸秆还田后秸秆的降解效率。【方法】在冬季采集土壤样品, 以木质素磺酸钠为唯一碳源, 采用平板划线法分离纯培养菌株, 并通过单因素试验及响应面试验对木质素降解条件进行优化。【结果】获得了一株能在 15 °C 条件下降解木质素的细菌, 命名为嗜冷假单胞菌(*Pseudomonas psychrophila*) BYAU-6。该菌在 5–15 °C 范围内均具有较强的木质素降解能力。筛选培养条件为: 木质素磺酸钠添加量 0.5 g/L、蛋白胨与酵母粉质量比 5:1、初始 pH 7.0、装液量 80%。优化后的木质素降解条件为: 木质素磺酸钠添加量 0.3 g/L、蛋白胨与酵母粉质量比 3.2:2.8、初始 pH 5.3、装液量 80%。在此条件下, 木质素降解率由 12.33% 上升到 15.78%, 比优化前提高了 21.9%。盆栽试验研究结果显示, 添加菌剂对秸秆还田效率有显著影响。不接菌的对照组秸秆降解率为 27.0%, 而接种菌株 *P. psychrophila* BYAU-6 处理后秸秆降解率提升至 37.5%, 秸秆降解率提升了 38.89% ($P < 0.05$)。【结论】本研究为寒区秸秆降解提供了新的微生物资源, 并为后续低温木质素降解菌株的研究提供了数据参考。

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(2023YFD1500501-01); 中央高校基本科研业务费专项资金(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 (2023YFD1500501-01), and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2572023CT08).

*Corresponding authors. E-mail: WANG Weidong, wwdcyy@nefu.edu.cn; WEI Dan, wd2087@163.com

Received: 2025-01-06; Accepted: 2025-03-06; Published online: 2025-05-18

关键词：低温；木质素；秸秆；生物降解；降解条件优化

Isolation of *Pseudomonas psychrophila* BYAU-6 capable of degrading straw at low temperatures

FAN Hanxue¹, ZOU Shijie¹, ZHANG Shenglong^{1,4}, WANG Jinghong¹, CHENG Yan², BING Wenrong², Khan Aman², WEI Dan^{3*}, WANG Weidong^{1,2*}

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

2 Key Laboratory of Saline-alkali Vegetation Ecology Restoration of the Ministry of Education, College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang, China

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

4 Heilongjiang Guohong Energy Conservation and Environmental Protection Co., Ltd., Harbin, Heilongjiang, China

Abstract: [Objective] In view of the low decomposition rate of rice straw in black soil fields of cold regions, it is crucial to isolate lignin-degrading bacteria adaptive to low temperatures to enhance the straw degradation efficiency. [Methods] Soil samples were collected in winter, and the bacterial strains capable of degrading lignin were isolated by the streak-plate method with sodium lignosulfonate as a sole carbon source. The degradation conditions was carried out through optimized by single factor experiment and response surface methodology. [Results] *Pseudomonas psychrophila* BYAU-6 was isolated, exhibiting strong lignin-degrading activity in low-temperature environments (5 – 15 °C). The culture conditions for strain screening were as follows: sodium lignosulfonate addition amount of 0.5 g/L, a peptone-to-yeast powder mass ratio of 5:1, initial pH 7.0, and a liquid loading volume of 80%. The optimal culture conditions for lignin degradation were determined as follows: sodium lignosulfonate addition amount of 0.3 g/L, a peptone-to-yeast powder mass ratio of 3.2:2.8, initial pH 5.3, and a liquid loading volume of 80%. Under these conditions, the lignin degradation rate increased from 12.33% to 15.78%, representing an increase of 21.9%. The results of the pot experiment showed that the control group (without inoculation) achieved a straw degradation rate of 27.0%, while the inoculation with strain BYAU-6 achieved a straw degradation rate of 37.5%, an increase of 38.89% compared with the control ($P < 0.05$). [Conclusion] This study provides novel microbial resources for straw degradation in cold regions and valuable data for future research on lignin-degrading strains under low-temperature conditions.

Keywords: low temperature; lignin; straw; biodegradation; optimization of degradation conditions

秸秆是世界上储量最丰富的可再生资源之一^[1]。秸秆中含有氮、磷、钾等多种元素，具有多种用途^[2]。然而，目前大部分秸秆被用于燃烧以产生热能和电能，甚至还有部分被直接丢

弃^[3]。这种处理方式不仅会造成环境污染^[4]，还会导致有机物流失，进而使土壤肥力下降。秸秆还田能够为土壤中的微生物提供碳源，提升土壤肥力和质量，减少化肥的施用量，缓解土

地板结,从而达到保护黑土地的目的^[5]。然而,寒区秸秆的利用面临诸多挑战,其中最主要的是寒区作物收获集中在秋季。冬季寒冷且漫长,低温环境会抑制微生物的生长,限制微生物活性,减缓秸秆的自然降解过程。因此,提高低温条件下秸秆的降解效率意义重大。

在秸秆还田时,加入富含分解秸秆的微生物菌群可显著提高秸秆降解效率^[6]。木质素的高分子量和复杂的化学结构限制了微生物纤维素酶和半纤维素酶的可及性^[7],因此突破木质素的限制是加速秸秆分解的重要环节。据报道,有学者从腐木中筛选得到以类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)等为核心菌株组成的菌群 LDH,该菌群在 50 °C 的培养温度下培养 10 d,木质素降解率可达 32.4%^[8]。另有学者通过在芦苇湿地中筛选得到由厌氧支原体菌属(*Anaerocolumna*)、索氏菌属(*Thauera*)等构成的菌系 LDC,该菌系在 32 °C 下培养 7 d 后,木质素最大降解率为 44.5%^[9]。虽然这些菌群的木质素降解效率较高,但高温和常温微生物在低温下难以启动并发挥作用。低温木质素降解菌株能够在较低温度下保持活跃,通过筛选和利用低温木质纤维素分解菌可以显著提高秸秆的降解效率。例如,芽孢杆菌 SDB-20 在 10–16 °C 时酶活最高,而在 28 °C 和 37 °C 时酶活显著降低,在 16 °C 下培养 15 d 后秸秆降解率为 24.6%^[10]。嗜冷杆菌菌群 CHL-A 在 10–20 °C 条件下对玉米秸秆中纤维素的降解效果最佳,其中在 10 °C 下降解率达到 30.3%^[11]。芽孢八叠球菌在 15 °C 条件下培养 8 d 后,木质素降解率为 20.8%^[12]。嗜麦芽窄食单胞菌在 15 °C 时 Lip 和 Lac 酶活力最高,而 Mnp 在 20 °C 时酶活力最高,其次为 15 °C,在 15 °C 条件下固态发酵时,木质素降解率达 36.14%^[13]。这些低温菌株的低温适应性更强,使其在低温环境中仍能保持较高的活性,对于节约能源和降低成本具有潜在优势。在东北黑土区秸秆还田的研究中,使用低温菌剂能够增加土壤微生物多样性及碳、氮

含量^[14]。

低温木质素降解菌的研究和应用对于提高寒区秸秆的利用效率具有重要的科学和实践价值。尽管已有相关研究,但目前的研究仍存在一些不足。例如,大多数研究仅在实验室条件下测定降解率,未充分考虑实际还田场景中可能遇到的问题,如经过冷冻期后微生物是否具有活性,以及破除木质素障碍后对还田过程中秸秆降解率的实际提升效果如何等。本研究从冬季东北的土壤中分离低温木质素降解细菌,通过优化菌株的木质素降解条件,充分挖掘菌株潜力;通过适温性试验,证明嗜冷假单胞菌(*Pseudomonas psychrophila*) BYAU-6 在低温条件下降解木质素的能力;通过冷冻试验,证明该菌株在冷冻后仍能保持高效降解木质素的能力,并进行模拟秸秆还田试验,旨在为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 样品来源

于黑龙江省大庆市多年秸秆还田农田(125°14′7.521″E, 46°33′5.491″N;年平均气温 5.6 °C)进行样品采集,采用无菌密封袋带回实验室低温保存。

1.1.2 培养基

无机盐培养基(minimal salt medium, MSM)(g/L): NaNO₃ 2.5, KH₂PO₄ 1.0, NaCl 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.5, 琼脂 20, CaCl₂ 0.1, 木质素磺酸钠 0.5, 微量元素混合液 1 mL/L, pH 7.0。

蛋白胨纤维素(peptone-cellulose solution, PCS)培养基: 蛋白胨 5.0 g/L, NaCl 5 g/L, CaCO₃ 2.0 g/L, 酵母粉 1.0 g/L, 木质素磺酸钠 0.5 g/L。

1.2 木质素降解细菌的筛选

将 5 g 新鲜采集的土壤样品放入 MSM 培养基中, 15 °C、150 r/min 培养 1 h 得到土壤悬液, 将土壤悬液按 10% 接种量接入 MSM 培养基中,

15 °C、150 r/min 培养 7 d。将培养液梯度稀释至 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 后进行涂布，待菌落形成后挑选形态不同的菌落进行划线分离纯化，分离纯化 3 次后接入 PCS 培养基中进行液体培养^[12]。在 PCS 培养基中加入苯胺蓝，将培养好的菌液涂布于平板上，4 d 后观察苯胺蓝褪色情况。

1.3 木质素降解菌的形态学鉴定

1.3.1 木质素降解菌的革兰氏染色、形态学及生理生化特性研究

将筛选得到的菌种进行革兰氏染色^[15]，并置于电子显微镜下观察。

形态学及生理生化特性研究参考《伯杰细菌鉴定手册》^[16]和《常见细菌系统鉴定手册》^[17]的研究方法，对菌株分别进行淀粉水解试验、明胶液化试验、V-P 试验、甲基红试验、硫化氢产气试验、柠檬酸盐试验、葡萄糖氧化发酵试验、碳源利用试验、接触酶利用试验，对菌株进行生理生化特性研究。

1.3.2 扫描电镜

菌液经离心、漂洗、梯度脱水、干燥、喷金等操作^[18]后，置于扫描电子显微镜下观察，采集图像并进行分析。

1.4 分子生物学鉴定

利用 PCR 扩增单菌落的 16S rRNA 基因序列，引物为细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系(25 μ L): 2 \times Phanta Max Mix (p515) 12.5 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, DNA 模板 0.5 μ L, ddH₂O 10 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环; 72 °C 终延伸 5 min。将纯化后的产物送至上海派森诺生物科技股份有限公司进行测序。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 适温性试验

将 *Pseudomonas psychrophile* BYAU-6 分别置于 5、10、15、20、25、30 °C 条件下进行静置培养，7 d 后测定其木质素的降解率，选择降解率最高的温度进行后续试验。

1.6 菌株培养过程中木质素降解率测定

木质素磺酸钠在紫外光区 205 nm 和 280 nm 左右有较强的吸收峰，其中 280 nm 光区木质素磺酸钠的吸收相对稳定且干扰较少，其吸光值与木质素磺酸钠的浓度在一定范围内呈现良好的线性关系。因此，可在 280 nm 下测定其吸光值，绘制标准曲线($R^2 > 0.999$)，再根据标准曲线方程计算出样品中剩余木质素磺酸钠的浓度。每隔 24 h 取样，样品 12 000 r/min 离心 2 min 后取上清，通过紫外分光光度计测定浓度并记录数值，每次取样设置 3 个重复(下同)。

1.7 菌株培养过程中生长曲线测量

将紫外分光光度计波长设置为 600 nm，用无菌培养基作为对照，测定单菌生长量。每隔 24 h 在无菌状态下取样，取培养 0-7 d 的菌液测定吸光值，并绘制生长曲线。

1.8 菌株培养过程中 pH 变化动态

利用 pH 计(Horiba 公司)测定复合单菌在生长过程中 pH 的变化情况。取培养 0-7 d 的菌液，每次取样设置 3 个重复，测定其 pH 值，并绘制 pH 变化曲线。

1.9 菌株培养过程中酶活力测定

木质素过氧化物酶(lignin peroxidase, LiP)和锰过氧化物酶(manganese peroxidase, MnP)酶活性测定参照 Chen 等^[19]的方法。漆酶(laccase, Lac)酶活性测定参照 Nakagawa 等^[20]的方法。

1.10 低温木质素降解菌降解条件优化

1.10.1 单因素试验

菌株原培养条件：在 50 mL 锥形瓶中装入 40 mL 的 PCS 培养基，培养基中木质素磺酸钠浓度为 0.5 g/L，蛋白胨与酵母浸粉添加比例为

5:1, 将初始 pH 调至 7.0。在 121 °C 灭菌 30 min 后, 按 10% 的接种量进行接种, 最后在培养温度为 15 °C 下进行培养。

根据表 1 中的条件, 每次只改变一个因素, 培养 7 d 后测定其对木质素磺酸钠的降解率, 以此确定最佳蛋白胨与酵母粉的添加比例。

1.10.2 Plackett-Burman 筛选单因素试验

在单因素试验的基础上, 利用 Design Expert 8.0.6.1 软件, 选择其中的 Plackett-Burman 试验设计, 可快速从碳源添加量(0.1、0.5 g/L)、初始 pH (5.0、9.0)、接种量(10%、15%)、装液量(70%、90%)和蛋白胨与酵母浸粉添加比例(2:4、4:2) 5 个因素中筛选出对单菌木质素降解率影响最显著的因素。

1.10.3 响应面 Box-Behnken 试验

以 Plackett-Burman 试验筛选得到的对木质素降解率影响显著的因素: 培养温度(A)、初始 pH (B)、装液量(C)为设计因素, 以木质素降解率为响应值, 其范围见表 2 所示。利用 Design Expert 8.0.6.1 软件中的 Box-Behnken 试验设计进行响应面优化, 根据软件设计条件进行培养并测定木质素降解率, 最终确定最佳降解条件后进行验证。

1.11 添加菌剂对秸秆还田效率影响试验

1.11.1 菌株抗冻试验

将菌株装入 2 mL EP 管中, 首先将种子液放入 4 °C 进行适应性培养 24 h, 然后放入 -20 °C 进行耐冻实验培养 24 h, 再放入 4 °C 进行复苏

培养 24 h, 最后作为种子液接入 PCS+木质素培养基中, 在 15 °C 下培养 7 d, 测定降解率。

1.11.2 添加菌剂对秸秆还田效率影响试验

将玉米秸秆粉碎, 粒径为 2 cm。试验所用土壤自然晾晒, 过筛去除杂质(石子或植物残体等)。将粉碎后的玉米秸秆 20 g (模拟玉米秸秆全量还田 400 kg/667 m²) 装入涤纶布袋, 调节含水率为 30% 左右后, 用移液枪吸取与秸秆质量比为 10% 的菌液(2 mL)充分混合, 然后均匀放入涤纶布袋中。对照组不接种菌液, 直接放入涤纶布袋中。将装有秸秆和土壤的涤纶布袋垂直埋入盆栽土层中, 盆栽试验时间为 2023 年 9 月 15 日至 2024 年 9 月 15 日, 全年室外温度范围为 -27~31 °C, 其中温度在 5~20 °C 范围内的时段共 175 d。试验结束后取出秸秆, 使用失重法测定降解率。

2 结果与分析

2.1 低温木质素降解菌株的分离选育及鉴定

将土壤悬液通过浓度梯度稀释涂布的方法接种到 MSM+木质素磺酸钠培养基中, 在 15 °C 下培养 4 d 后, 挑选不同形态的菌落, 获得 1 株能够在筛选培养基上稳定传代的菌株, 命名为 F2。菌株降解木质素磺酸钠主要依靠产生锰过氧化物酶、漆酶和木质素过氧化物酶, 其中木质素过氧化物酶和锰过氧化物酶会使苯胺蓝褪色。将 F2 涂布至苯胺蓝培养基上培养, 观察到

表1 条件优化试验设计

Table 1 Experimental design for condition optimization

Loading of sodium lignosulfonate (g/L)	Initial pH	Inoculation amount (%)	Liquid loading volume (mL)	Peptone:Yeast extract powder
0.1	3.0	5.0	25	1:5
0.3	5.0	7.5	30	2:4
0.5	7.0	10.0	35	3:3
0.7	9.0	12.5	40	4:2
0.9	11.0	15.0	45	5:1

表2 Box-Behnken试验因素水平表

Table 2 Box-Behnken test factor level table

Component	Level		
	-1	0	+1
A The addition amount of carbon source (g/L)	0.1	0.3	0.5
B Peptone:Yeast extract powder	2:4	3:3	4:2
C pH	5.0	7.0	9.0

F2 可以使苯胺蓝培养基褪色(图 1), 初步推断其具有降解木质素磺酸钠的能力。

如图 2A 所示, F2 的单菌落呈圆形, 中间有圆形凹陷, 表面光滑, 直径为 4 mm。革兰氏染色结果为红色, 即革兰氏阴性细菌。如图 2B 所示, F2 为长度 0.3 μm 、宽度 0.1 μm 的杆菌。

菌株生理生化试验结果如表 3 所示, BYAU-6 可以利用葡萄糖, 水解淀粉和明胶, 过氧化氢酶反应、甲基红试验为阳性。菌株不能分解利用蔗糖、甘露醇、纤维素, 硫化氢产气试验、V-P 试验为阴性。

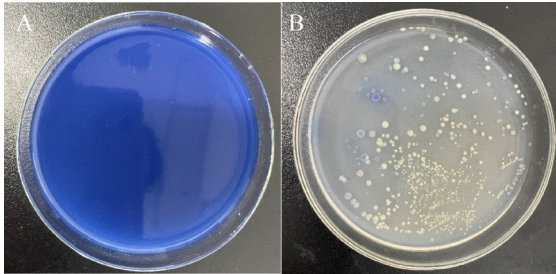


图1 苯胺蓝褪色反应

Figure 1 Aniline blue decolorization reaction. A: CK; B: F2.

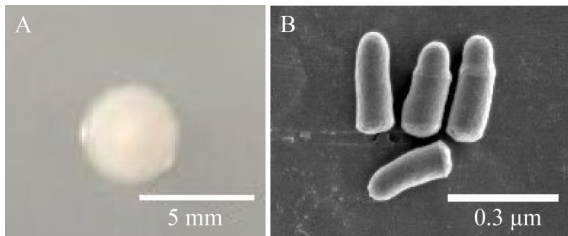


图2 单菌落形态(A)和电镜照片(B)

Figure 2 Single colony morphology (A) and electron microscopy (B).

表3 *Pseudomonas psychrophila* BYAU-6生理生化试验结果Table 3 Results of physiological and biochemical assays of *Pseudomonas psychrophila* BYAU-6

Test project	Results
Starch hydrolysis test	+
Glucose utilization test	+
Gelatin liquefaction test	+
Catalase test	+
Methyl red test	+
Cellulose utilization test	-
Hydrogen sulfide test	-
Sucrose utilization test	-
Mannitol utilization test	-
Voges-Proskauer (V-P) test	-

+: Positive; -: Negative.

根据测序结果, 将上述菌株的序列在 NCBI BLAST 数据库中进行比对, 并下载与各个菌株亲缘性相近的标准菌株序列, 使用 MEGA 11 软件构建菌株系统发育树(图 3)。将测序得到的序列在 NCBI BLAST 数据库中比对, F2 与 *Pseudomonas psychrophila* E-3 最为相似, 相似度为 99.45%。结合形态学和生理生化特性, 初步判断该菌株为假单胞菌属(*Pseudomonas*)。因此, 将 F2 命名为 *Pseudomonas psychrophila* BYAU-6。同时, 菌株 *Pseudomonas psychrophila* BYAU-6 的核酸序列已提交至 NMDC 数据库, 获得的核酸序列编号为 NMDCN0006LU0。

2.2 适温性试验

将 *Pseudomonas psychrophila* BYAU-6 接种至 PCS+木质素培养基中, 设置温度分别为 5、10、15、20、25、30 $^{\circ}\text{C}$ 进行静置培养, 7 d 后测定其木质素的降解率。如图 4 所示, *Pseudomonas psychrophila* BYAU-6 在 5 $^{\circ}\text{C}$ 和 10 $^{\circ}\text{C}$ 条件下的降解能力较强, 15 $^{\circ}\text{C}$ 时降解能力最强, 20 $^{\circ}\text{C}$ 时木质素降解能力减弱, 25–30 $^{\circ}\text{C}$ 时无降解能力。因此, 判断该菌为嗜冷木质素降解菌, 选择降解能力最强的 15 $^{\circ}\text{C}$ 进行后续试验。

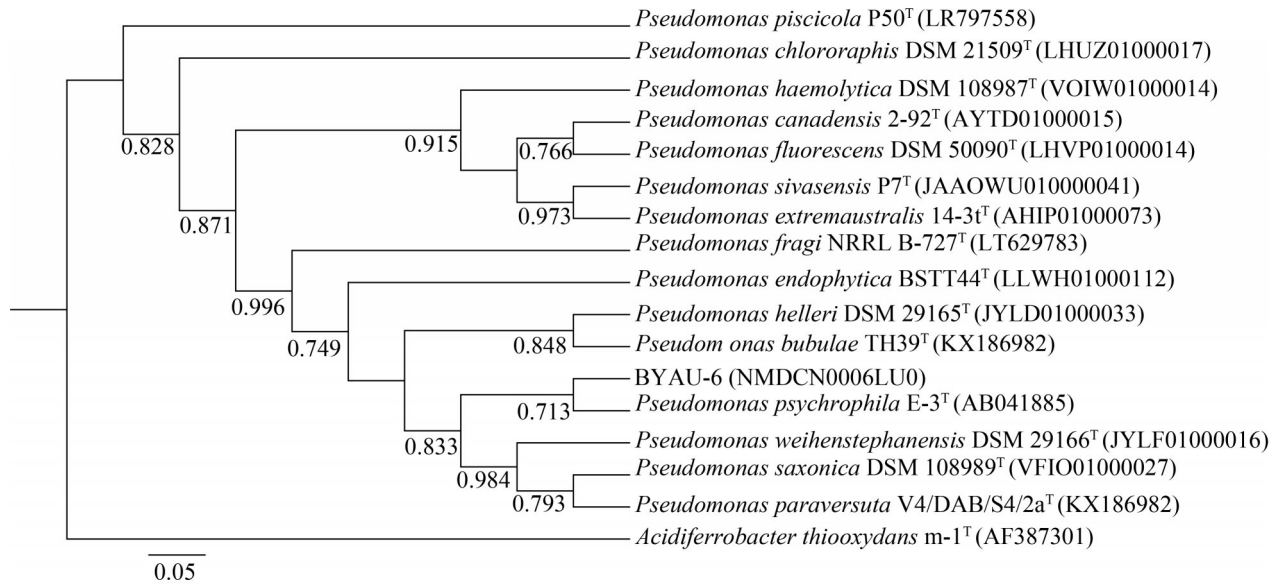


图3 BYAU-6菌株基于16S rRNA基因序列构建的系统发育树

Figure 3 The phylogenetic tree of BYAU-6 strain based on the 16S rRNA gene sequences.

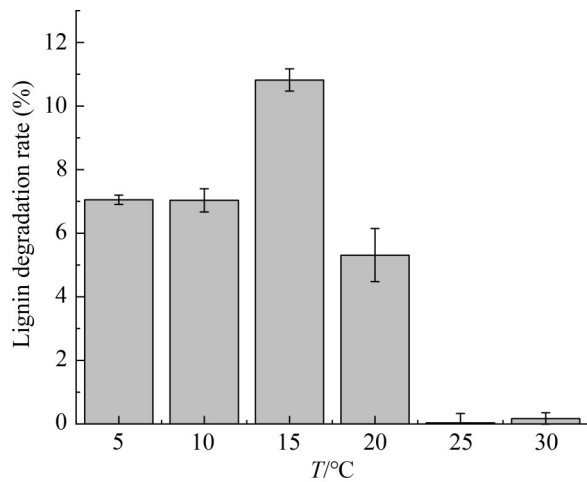


图4 适温性试验

Figure 4 The experiment of optimum temperature.

2.3 木质素降解率测定

如图 5 所示, 将 *Pseudomonas psychrophila* BYAU-6 置于 15 °C 条件下培养, 在 24 h 内几乎不降解木质素。第 5 天时, 木质素含量为 147.04 mg/L, 降解率为 12.33%。之后至第 7 天, 降解率基本不变, 木质素降解基本结束, 此时木质素含量为 146.86 mg/L, 而不接菌的纯培养

基中木质素含量基本不变。

2.4 菌株生长曲线测量

如图 6 所示, 将 *Pseudomonas psychrophila* BYAU-6 置于 15 °C 条件下, 在 PCS+木质素磺酸钠培养基中培养, CK 为不接种菌株的空白培养基。 *Pseudomonas psychrophila* BYAU-6 的 OD_{600} 值变化趋势为: 0-1 d 迅速升高至 0.84 后稳定,

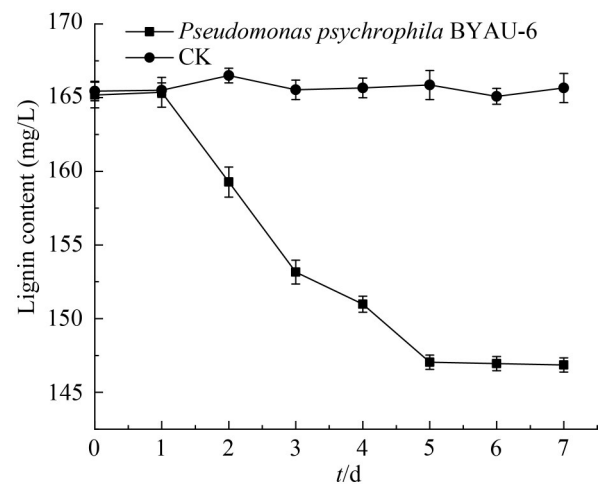


图5 木质素含量变化图

Figure 5 Changes in lignin content.

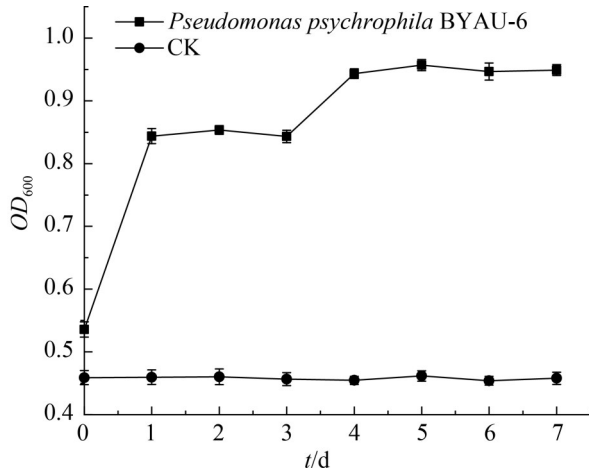


图6 生长曲线变化图

Figure 6 Change in growth curves.

第3天再次上升至0.94，之后趋于平稳。至第7天培养结束时， OD_{600} 值为0.95。由此表明，*Pseudomonas psychrophila* BYAU-6 可在低温环境下快速生长。

2.5 菌液 pH 变化测量

如图7所示，将 *Pseudomonas psychrophila* BYAU-6 置于 15 °C 条件下培养，CK 为不接种菌株的空白培养基，其 pH 值变化趋势为：0–3 d 缓慢上升至 7.99，3–5 d 快速上升至 8.32，之后趋于平稳，最终 pH 为 8.33，而不接菌的培养基

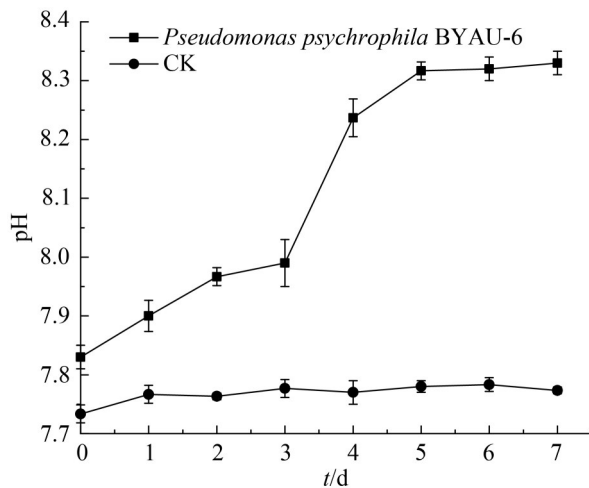


图7 pH变化图

Figure 7 pH change graph.

pH 基本不变。

2.6 低温木质素降解细菌酶活力测定

将 *Pseudomonas psychrophila* BYAU-6 置于 15 °C 条件下进行培养，3 种酶的活力达到峰值的时间不同，分别在 4–6 d 达到顶峰(图 8)。

Pseudomonas psychrophila BYAU-6 的漆酶活力在接种后的前 24 h 为 15.15 U/mL，第 3 天时达到最高值 36.63 U/mL，之后开始降低，至第 7 天培养结束时为 3.52 U/mL。木质素过氧化物酶在培养 24 h 时活力为 53.29 U/mL，到第 6 天达到最高值 164.47 U/mL，第 7 天培养结束时为 83.55 U/mL。锰过氧化物酶的变化趋势为先上升后下降，接种后的前 24 h 为 65.14 U/mL，第 5 天达到最高值 177.04 U/mL，第 7 天培养结束时为 47.07 U/mL。

2.7 菌株木质素降解条件优化

2.7.1 单因素试验结果

当木质素磺酸钠添加量在 0.1–0.3 g/L 之间时，降解率逐渐上升；当添加量在 0.3–0.9 g/L 之间时，降解率逐渐下降。在木质素磺酸钠添加量为 0.3 g/L 时，降解率最高，为 14.86%。因此，选择 0.1–0.5 g/L 碳源添加量进行后续试验。

当初始 pH 在 3.0–7.0 之间时，降解率逐渐

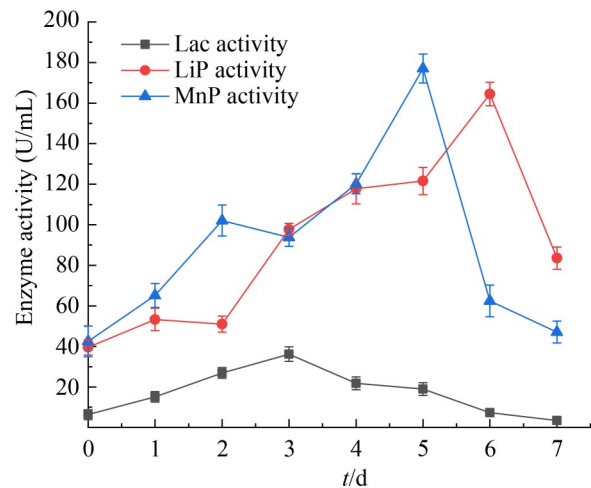


图8 酶活力变化图

Figure 8 Plot of changes in enzyme activity.

上升;当初始 pH 在 7.0–11.0 之间,降解率逐渐下降。在初始 pH 为 7.0 时,降解率最高,为 13.69%。因此,选择初始 pH 5.0–9.0 进行后续试验。

当接种量在 5%–12.5% 之间时,降解率逐渐上升;当接种量在 12.5%–15% 之间时,降解率逐渐下降。在接种量为 12.5% 时,降解率最高,为 11.74%。因此,选择接种量 10%–15% 进行后续试验。

当装液量在 25–40 mL 之间时,木质素降解率逐渐上升;当装液量在 40–45 mL 之间时,降解率稳定。在装液量为 40 mL 时,降解率最高,为 11.86%。因此,选择装液量 35–45 mL 进行后续试验。

蛋白胨与酵母粉添加比例在 2:4–4:2 时降解率较高,当比例为 3:3 时,降解率最高,为 14.58%。因此,选择蛋白胨与酵母粉添加比例 2:4、3:3、4:2 进行后续试验。

2.7.2 Plackett-Burman 筛选单因素试验

通过 Plackett-Burman 筛选单因素试验分析,相关系数 R^2 为 0.948 4,具有显著性影响($P < 0.05$)的因素为木质素磺酸钠添加量、蛋白胨与酵母粉添加比例、初始 pH、装液量。接种量对木质素磺酸钠降解率无显著性影响。由于装液量 90% 存在灭菌风险,因此排除。

根据 Plackett-Burman 试验设计结果,选择对木质素降解率影响较大的 3 个因素: *A* 木质素磺酸钠添加量(0.1、0.3、0.5 g/L)、*B* 初始 pH (5.0、7.0、9.0)、*C* 蛋白胨:酵母粉(2:4、3:3、4:2)为自变量,以木质素降解率为响应值。根据 Box-Behnken 试验设计进行三因素三水平试验分析,共 17 个试验点,试验结果见表 4。利用响应面软件进行分析,建立回归方程实际模型为:木质素降解率(%) = $-1.718 14 - (-11.872 81) \times A + 14.010 938 \times B + 3.089 96 \times C + 11.581 58 \times A \times B +$

表4 Box-Behnken试验设计与结果

Table 4 Box-Behnken trial design and results

Number	Factor affecting			Degradability (%)
	<i>A</i> The addition amount of carbon source (g/L)	<i>B</i> Peptone:Yeast extract powder	<i>C</i> Initial pH	
1	0.3	2:4	5.0	10.87
2	0.3	2:4	9.0	10.23
3	0.3	3:3	7.0	15.23
4	0.1	2:4	7.0	11.54
5	0.3	3:3	7.0	15.18
6	0.3	3:3	7.0	14.48
7	0.3	4:2	9.0	10.24
8	0.3	3:3	7.0	14.37
9	0.3	4:2	5.0	14.88
10	0.5	3:3	5.0	11.40
11	0.5	2:4	7.0	8.50
12	0.3	3:3	7.0	14.94
13	0.5	3:3	9.0	13.24
14	0.1	3:3	5.0	13.51
15	0.1	3:3	9.0	8.79
16	0.1	4:2	7.0	9.51
17	0.5	4:2	7.0	13.96

$4.100\ 00 \times A \times C - 0.694\ 737 \times B \times C - 45.854\ 53 \times A^2 - 4.572\ 64 \times B^2 - 0.289\ 170 \times C^2$ 。对回归模型进行方差分析, 结果如表 5 所示, 该模型的 P 值为 $0.000\ 2 < 0.05$, 说明该回归方程极显著且相关性较好。失拟项的 P 值为 $0.145\ 3 > 0.05$, 说明该方程与试验的拟合程度较好。因此, 该回归方程可用于分析单菌降解木质素的理论预测, 具有可靠性。

2.7.3 响应面分析

采用 Design-Expert 8.0.6.1 软件绘制响应面图, 分析木质素磺酸钠添加量、蛋白胨与酵母粉添加比例、初始 pH 之间的相互作用对低温木质素降解率的影响。图 9 为试验因素和响应值构成的等高线图和三维响应面图。等高线图为椭圆形, 三维响应面图倾斜的坡度较大, 说明各因素之间的相互作用对木质素降解率的影响较为显著。

2.7.4 条件优化结果验证

根据响应面软件分析, 木质素的最佳降解条件为: 木质素磺酸钠添加量 $0.308\ \text{g/L}$ 、初始 pH 5.337 、蛋白胨与酵母粉添加比例 $3.18:2.82$, 此时模型预测的木质素降解率为 15.09% 。将优化后的降解条件修正为: 木质素磺酸钠添加量

$0.3\ \text{g/L}$ 、蛋白胨与酵母粉添加比例 $3.2:2.8$ 、初始 pH 5.3 、装液量 $40\ \text{mL}$ 。在此条件下, 木质素降解率达到 15.78% , 比优化前 (12.33%) 提高了 21.9% , 说明模型预测合理, 具有实际应用价值。

2.8 添加菌剂对秸秆还田效率的影响

2.8.1 菌株抗寒抗逆性

经过 $24\ \text{h}$ 冷冻后活化的菌株接种于培养基中, 在 $15\ ^\circ\text{C}$ 下培养 $7\ \text{d}$ 后, 测得降解率为 10.76% 。结果表明, 该菌株经过冷冻后仍具备降解木质素的能力。该菌株在东北秋季秸秆还田时加入即可发挥作用, 经过冬季仍可存活, 第二年春天解冻后可继续降解秸秆, 具有实际应用价值。

2.8.2 添加菌剂对秸秆还田效率的影响

经 *Pseudomonas psychrophila* BYAU-6 处理后, 接菌处理和不接菌处理的秸秆降解率分别为 37.5% 和 27.0% 。接菌处理的秸秆降解率比对照组提升了 38.89% ($P < 0.05$, 降解率提升显著)。实际应用结果表明, 添加菌剂 *Pseudomonas psychrophila* BYAU-6 对秸秆还田具有显著的促进作用, 具有重要的实际应用价值。

表5 回归模型的方差分析

Table 5 ANOVA of the regression model

Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F	P
Model	88.06	9	9.78	23.59	0.000 2
A: Culture temperature ($^\circ\text{C}$)	4.37	1	4.37	10.54	0.014 1
B: Initial pH	6.47	1	6.47	15.59	0.005 5
C: Liquid loading volume (mL)	10.83	1	10.83	26.11	0.001 4
AB	12.74	1	12.74	30.72	0.009 0
AC	10.76	1	10.76	25.94	0.001 4
BC	4.59	1	4.59	11.05	0.012 7
A^2	14.14	1	14.14	34.08	0.000 6
B^2	21.67	1	21.67	52.24	0.000 2
C^2	5.62	1	5.62	13.55	0.007 8
Residual term	2.90	7	0.414 8		
Lack-of-fit term	2.44	4	0.609 3	3.92	0.145 3
Pure error	0.466 2	3	0.155 4		
Sum	90.97	16			

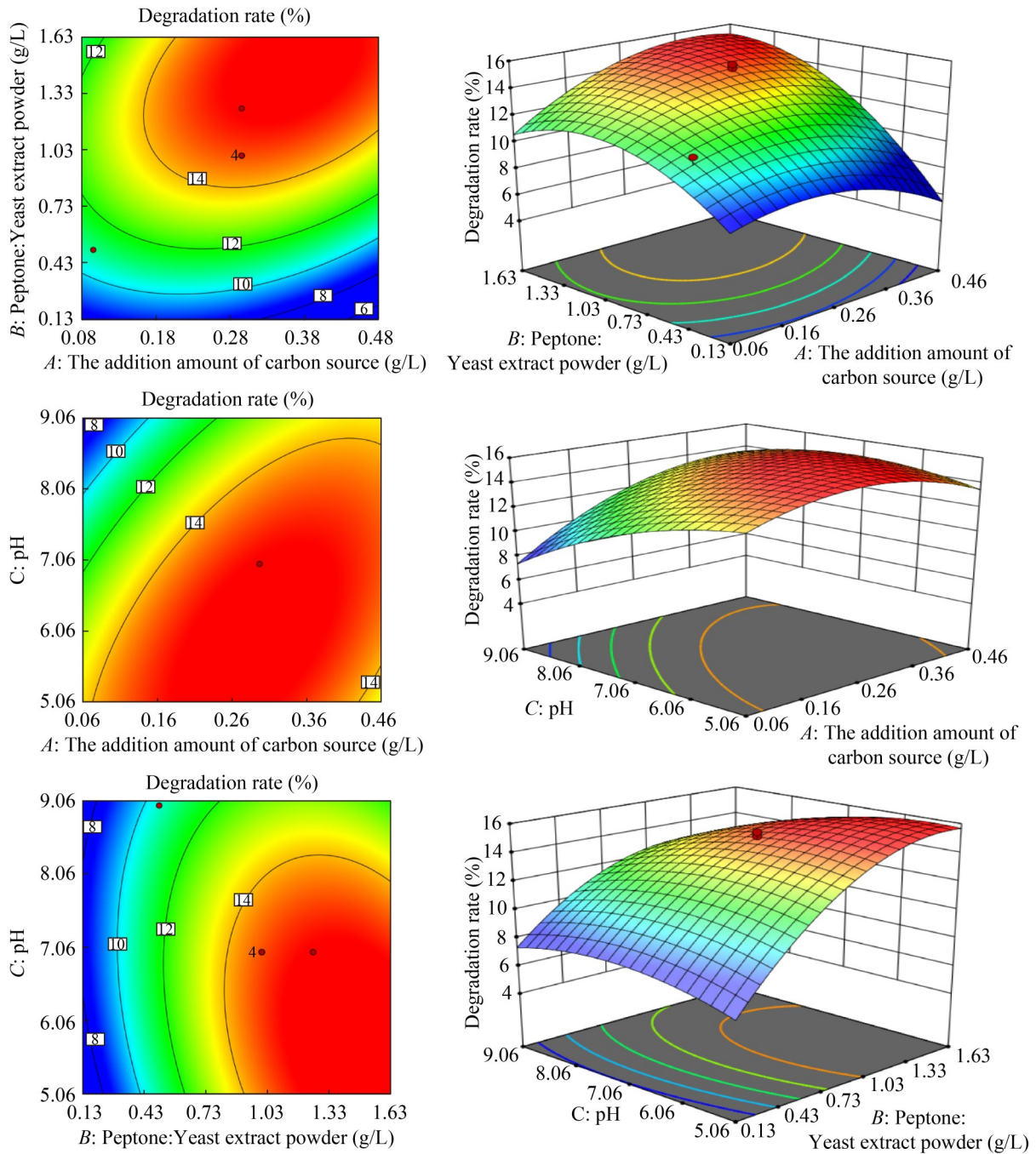


图9 木质素磺酸钠添加量、蛋白胨与酵母粉添加比例、初始pH的交互作用对木质素降解率影响图

Figure 9 Effect of interaction of sodium lignosulphonate addition, peptone and yeast powder addition ratio, and initial pH on lignin degradation rate.

3 讨论

为提高东北黑土区秸秆还田效率, 开展低

温秸秆降解菌的研究具有重要意义。以往研究表明, 添加秸秆降解菌剂可以促进秸秆中木质纤维素的降解^[21]。例如, 芽孢杆菌属(*Bacillus*)^[10]、

嗜冷杆菌属 (*Psychrobacter*)^[11] 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*)^[22] 等菌株均具有低温秸秆降解能力。然而, 这些研究均未探讨菌株经过低温冷冻后再复苏是否仍具有降解能力, 而这一点在实际应用中尤为重要。本研究从实际应用出发, 筛选获得了一株假单胞菌属的 *Pseudomonas psychrophila* BYAU-6。通过冷冻试验证明, 该菌株能够在东北冬季存活并保持活性。适温性试验结果表明, *Pseudomonas psychrophila* BYAU-6 在低温条件下可以快速生长, 在 5–20 °C 的温度范围内均表现出降解能力, 且在 15 °C 时降解能力最强, 说明该菌株对低温环境具有良好的适应性, 能够在较宽的低温范围内发挥降解作用, 这对于寒区秸秆降解具有重要意义。破除木质素的阻碍可以进一步提高秸秆利用效率。韩东晶^[23] 筛选出的 *R.ornithinolytica* RS-1 在 25 °C 条件下培养 3 d, 木质素降解率达到 24.21%; 尽管该研究针对木质素降解, 但秸秆中木质素含量较低, 降解木质素的目的是促进纤维素和半纤维素的降解从而加速秸秆还田过程。本研究通过在黑龙江省低温模拟还田中添加 *Pseudomonas psychrophila* BYAU-6, 结果显示添加菌剂的处理较 CK 秸秆降解率提升了 38.89%, 证明 *Pseudomonas psychrophila* BYAU-6 能够加速秸秆中木质素的降解, 促进秸秆的腐解, 可为寒区秸秆还田提供具有实际应用价值的菌种资源。

张亚莉等^[22] 从木质素降解复合菌系中、郭春生等^[24] 从玉米芯、玉米秸秆和葡萄梗中筛选得到同为假单胞菌属的 *Pseudomonas guguanensis*, 在 25–37 °C 的发酵中均表现良好, 证明该菌属对木质素具有较强的降解能力, 且培养条件简单、环境适应性强; 进一步说明筛选目标菌株应优先从自然富集的环境中进行, 本研究采样地点为多年秸秆还田农田, 该环境天然富集了大量的秸秆降解菌株, 且采样当年平均温度为 5.6 °C, 为低温木质素降解菌株的生长繁殖提供了有利条件, 也为筛选目标菌株创造了得天独

厚的优势, 最终成功筛选到所需菌株。在酶活力方面, *Pseudomonas guguanensis*^[22] 的锰过氧化物酶活性最高, 木质素过氧化物酶次之, 漆酶最弱。本研究中, *Pseudomonas psychrophila* BYAU-6 通过分泌漆酶、过氧化物酶和锰过氧化物酶对木质素进行降解, 从而促进秸秆降解。

4 结论

本研究筛选到一株低温木质素降解菌 *Pseudomonas psychrophila* BYAU-6, 对其降解条件进行优化后, 木质素降解率达到 15.78%, 比优化前提高了 21.9%。试验证明 *Pseudomonas psychrophila* BYAU-6 在冷冻后仍保持降解能力, 表现出极强的抗寒抗逆性。经过一年的添加菌剂对秸秆还田效率影响试验, *Pseudomonas psychrophila* BYAU-6 对秸秆还田降解具有显著的促进作用, 为后续相关研究提供了菌种资源。

作者贡献声明

范寒雪: 研究构思设计、实验实施与验证、数据收集处理、论文撰写和修改; 邹世杰: 协助试验操作、软件程序处理; 章圣龙: 协助试验操作、验证; 王敬红: 研究构思设计、文章审阅; 程琰: 协助试验操作、方法讨论; 邴文荣: 协助试验操作; Aman Khan: 论文讨论、文章审阅; 魏丹: 设计、论文讨论; 王伟东: 提出概念、研究构思与设计、论文修改与讨论、文章审阅。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] WU D, REN H, ZHA Y, WEI ZM, LI J, SONG CH. Effect of Fenton-like reactions on the hydrolysis efficiency of lignocellulose during rice straw composting based on genomics and metabolomics sequencing[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2023, 396: 136493.
- [2] ZHAO YQ, XUE L, HUANG ZY, LEI ZX, XIE SY, CAI

- ZZ, RAO XR, ZANG Z, XIAO N, ZANG XY, MA FY, YU HB, XIE SX. Lignin valorization to bioplastics with an aromatic hub metabolite-based autoregulation system[J]. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 9288.
- [3] WEILAND F, KOHLSTEDT M, WITTMANN C. Guiding stars to the field of dreams: metabolically engineered pathways and microbial platforms for a sustainable lignin-based industry[J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 71: 13-41.
- [4] WANG JH, XU CF, ZHANGW, HONG YH, SHEN GN, WANG WW, TANG HZ, ZHANG SL, PAN JT, WANG WD. Synergistic effect of two bacterial strains promoting anaerobic digestion of rice straw to produce methane[J]. *Environmental Research*, 2024, 252: 118974.
- [5] 刘淑军, 李冬初, 黄晶, 马常宝, 王慧颖, 于子坤, 曲潇林, 张璐, 韩天富, 都江雪, 柳开楼, 张会民. 1988-2018年中国水稻秸秆资源时空分布特征及还田替代化肥潜力[J]. *农业工程学报*, 2021, 37(11): 151-161.
- LIU SJ, LI DC, HUANG J, MA CB, WANG HY, YU ZK, QU XL, ZHANG L, HAN TF, DU JX, LIU KL, ZHANG HM. Temporal and spatial distribution characteristics of rice stalk resources and its potential of synthetic fertilizers substitution returning to farmland in China from 1988 to 2018[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2021, 37(11): 151-161 (in Chinese).
- [6] 马志梅, 吕卫光, 裴亚楠, 白娜玲, 王丹萱, 汤勇华, 郑宪清, 李双喜, 张娟琴, 张海韵, 张月, 张翰林. 秸秆还田配施促腐菌剂对稻田土壤理化性质与微生物数量的影响[J]. *土壤通报*, 2023, 54(4): 889-896.
- MA ZM, LÜ WG, PEI YN, BAI NL, WANG DX, TANG YH, ZHENG XQ, LI SX, ZHANG JQ, ZHANG HY, ZHANG Y, ZHANG HL. Effect of straw returning with decomposing inoculants to soil physico-chemical properties and the abundance of bacteria and fungi community[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2023, 54(4): 889-896 (in Chinese).
- [7] WU YJ, GE SB, XIA CL, MEI CT, KIM KH, CAI LP, SMITH LM, LEE J, SHI SQ. Application of intermittent ball milling to enzymatic hydrolysis for efficient conversion of lignocellulosic biomass into glucose[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2021, 136: 110442.
- [8] 王敬红. 高温木质素降解复合菌系的筛选及其代谢通路解析[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学硕士学位论文, 2021.
- WANG JH. Screening and metabolic pathway analysis of high temperature lignin degradation complex bacteria[D]. Daqing: Master's Thesis of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [9] 苏鑫, 王敬红, 张方政, 刘嘉乐, 巩光禄, 欧阳晓伦, 魏丹, 赵洪颜, 宋福强, 晏磊, 王伟东. 复合菌系降解玉米秸秆过程中群落演替与秸秆降解的关系[J]. *微生物学报*, 2020, 60(12): 2675-2689.
- SU X, WANG JH, ZHANG FZ, LIU LL, GONG GL, OUYANG XL, WEI D, ZHAO HY, SONG FQ, YAN L, WANG WD. Microbial community succession associated with corn straw degradation in a bacterium consortium[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(12): 2675-2689 (in Chinese).
- [10] 邢慧珍. 玉米秸秆低温降解菌的筛选及复合菌系构建[D]. 天津: 河北工业大学硕士学位论文, 2020.
- XING HZ. Screening of corn stalk low-temperature degrading bacteria and construction of compound bacteria[D]. Tianjin: Master's Thesis of Hebei University of Technology, 2020 (in Chinese).
- [11] CHENG Y, HUANG MY, SHEN XH, JIANG C. Enhanced cornstalk decomposition by a psychrotrophic bacterial consortium comprising cellulose, hemicellulose, and lignin degraders with biochar as a carrier for carbon neutrality[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 344: 126259.
- [12] 徐一鸣, 王敬红, 徐红敏, 邓常宇, 范寒雪, 邹世杰, Aman Khan, 李祥锴, 赵洪颜, 魏丹, 王伟东. 芽孢八叠球菌(*Sporosarcina* sp.) N2的分离与低温降解木质素的特征解析[J]. *微生物学通报*, 2024, 51(12): 5121-5140.
- XU YM, WANG JH, XU HM, DENG CY, FAN HX, ZOU SJ, KHAN A, LI XK, ZHAO HY, WEI D, WANG WD. *Sporosarcina* sp. N2: isolation and degradation of lignin at low temperatures[J]. *Microbiology China*, 2024, 51(12): 5121-5140 (in Chinese).
- [13] 韩月颖, 张喜庆, 曲云鹏, 高云航. 一株低温木质素降解菌的筛选、产酶优化及酶学性质[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(10): 3700-3713.
- HAN YY, ZHANG XQ, QU YP, GAO YH. Screening, enzyme-production optimization and enzymatic properties of a low-temperature lignin-degrading bacteria[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(10): 3700-3713 (in Chinese).
- [14] 潘延欣. 秸秆还田配施低温菌剂对黑土氮碳及细菌多样性的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2015.
- PAN YX. Effects of straw returning to field combined with low-temperature microbial agents on nitrogen, carbon and bacterial diversity in black soil[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [15] 赵敏, 钱程. 白腐菌木质素氧化酶系的检测及其漆酶诱导产生的研究[J]. *中国造纸学报*, 2005, 20(2): 101-105.
- ZHAO M, QIAN C. Study on the examination of oxidative system in white-rot fungi and its laccase production by induction[J]. *Transactions of China Pulp and Paper*, 2005, 20(2): 101-105 (in Chinese).
- [16] 布坎南. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组译[M]. 北京: 科学出版社, 1984.
- Buchanan RE. Translation of Berger's Manual for Identification of Bacteria' by Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences[M]. Beijing: Science Press, 1984.
- [17] 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8版. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组译. 北京: 科学出版社, 1984: 620-621.
- [18] 徐冉, 王海峰, 李凤亭. 溶菌酶脂质体的制备及其对生物膜的剥离作用[J]. *同济大学学报(自然科学版)*, 2011, 39(1): 90-93, 120.
- XU R, WANG HF, LI FT. Lysozyme-liposome synthesis and its capability in biofilm removal[J]. *Journal of Tongji University (Natural Science)*, 2011, 39(1): 90-93, 120 (in Chinese).

- Chinese).
- [19] CHEN YH, CHAI LY, ZHU YH, YANG ZH, ZHENG Y, ZHANG H. Biodegradation of kraft lignin by a bacterial strain *Comamonas* sp. B-9 isolated from eroded bamboo slips[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2012, 112(5): 900-906.
- [20] NAKAGAWA Y, SAKAMOTO Y, KIKUCHI S, SATO T, YANO A. A chimeric laccase with hybrid properties of the parental *Lentinula edodes* laccases[J]. *Microbiological Research*, 2010, 165(5): 392-401.
- [21] 魏蔚, 吴昊, 宋时丽, 管永祥, 张振华, 张勇, 戴传超. 复合菌剂对小麦秸秆降解速率、土壤酶和土壤微生物类群的影响[J]. *土壤*, 2019, 51(5): 955-963.
- WEI W, WU H, SONG SL, GUAN YX, ZHANG ZH, ZHANG Y, DAI CC. Effects of compound microbial agents on wheat straw degradation rate, soil enzyme activity and microbial community[J]. *Soils*, 2019, 51(5): 955-963 (in Chinese).
- [22] 张亚莉, 王敬红, 洪艳华, 晏磊, 章圣龙, 崔宗均, 王伟东. 一株木质素降解细菌的分离、鉴定与降解条件优化[J]. *黑龙江八一农垦大学学报*, 2024, 36(4): 71-79.
- ZHANG YL, WANG JH, HONG YH, YAN L, ZHANG SL, CUI ZJ, WANG WD. Isolation, identification and optimization of degradation conditions of lignin degrading strain[J]. *Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University*, 2024, 36(4): 71-79 (in Chinese).
- [23] 韩东晶. 白蚁菌圃优势菌群识别及木质纤维素降解菌筛选和降解特性分析[D]. 合肥: 合肥工业大学硕士学位论文, 2022.
- HAN DJ. Identification of dominant flora in termite orchard, screening of lignocellulose degrading bacteria and analysis of degradation characteristics[D]. Hefei: Master's Thesis of Hefei University of Technology, 2022 (in Chinese).
- [24] 郭春生, 叶亚军, 陈晨, 杨洪峰, 刘海龙, 宁小平, 刘高鹏, 柴颖. 一株木质素降解菌的筛选、鉴定及降解条件优化[J]. *饲料工业*, 2024, 45(15): 113-119.
- GUO CS, YE YJ, CHEN C, YANG HF, LIU HL, NING XP, LIU GP, CHAI Y. Screening and identification of a lignin-degrading strain and optimization of its degradation conditions[J]. *Feed Industry*, 2024, 45(15): 113-119 (in Chinese).