

低温产纤维素酶菌株的筛选、鉴定及 纤维素酶学性质

穆春雷^{1,2} 武晓森¹ 李术娜¹ 马鸣超² 李俊² 沈德龙^{2*} 朱宝成¹

(1. 河北农业大学 生命科学学院 河北 保定 071000)

(2. 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所 北京 100081)

摘要: 【目的】筛选一株低温产纤维素酶菌株并进行鉴定,初步探索其酶学性质,为微生物肥料生产筛选菌种资源。【方法】常温条件下,采用 CMC-刚果红染色法初筛纤维素降解菌株。采用低温条件诱导的方法,筛选耐低温且产纤维素酶能力最强的菌株,经形态学、生理生化特征试验、ITS 序列等方面分析系统分类地位。单因素试验确定温度、pH 及金属离子对纤维素酶活力的影响。【结果】从秸秆还田土壤中分离出一株在 13 °C 低温环境下高效分解纤维素的真菌 M11,鉴定 M11 为草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)。发酵试验表明:以玉米秸秆粉为唯一碳氮源,13 °C、200 r/min 摇床发酵培养 9 d 时,纤维素酶活力最高为 33.08 U/mL。对其酶学性质初步研究表明:该酶最适 pH 为 5.0,最适反应温度为 20 °C,在 5 °C–20 °C 间酶活力仍能保持在 90% 以上。【结论】*Penicillium oxalicum* M11 是一株高效的纤维素降解菌株,在低温条件下可分泌纤维素酶且活性显著,具有潜在的开发价值。

关键词: 低温, 诱导, 筛选, 鉴定, 纤维素酶

Screening and identification of a cold-adapted cellulase-producing strains and characterization of cellulase

MU Chun-Lei^{1,2} WU Xiao-Sen¹ LI Shu-Na¹ MA Ming-Chao² LI Jun²
SHEN De-Long^{2*} ZHU Bao-Cheng¹

(1. College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000, China)

(2. Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, CAAS, Beijing 100081, China)

Abstract: [Objective] In order to prepare strains for microbial fertilizer production, a cold-adapted cellulase-producing strain was screened and identified, and its characterization of cellulase was analyzed preliminarily. [Methods] CMC-Congo red staining was used to screen the cellulose-degrading strains initially under the condition of normal temperature. Low temperature induction was followed to screen the strain with low temperature resistance and favorable cellulase activity. Then the strain mentioned above was identified by its morphological, the physiological and biochemical properties and ITS sequence analysis. Single factor test based on temperature, pH and metal ions was used to determine the influence of the cellulase activity. [Results] Strain M11 producing extracellular cellulase under 13 °C was isolated from the straw returned soil. It was identified as a *Penicillium oxalicum*. The results of fermentation tests showed that, when corn straw was taken as the only carbon and nitrogen sources, the activity of cellulase was maximum as 33.08 U/mL in the ninth day, under the fermentation conditions of 13 °C, 200 r/min. The results of its cellulase characterization revealed that, the optimum pH was 5.0 and reaction temperature was 20 °C. The relative cellulase activity still reached to 90% in the range of 5 °C–20 °C. [Conclusion] The cellulose-degrading strain *Penicillium oxalicum* M11 could secrete cellulase under the low temperature, and was tremendous potential valuable for microbial fertilizer.

Keywords: Low temperature, Inducing, Screening, Identification, Cellulase

农作物秸秆是重要的有机物和能源资源,其主要成分是纤维素。我国是农业大国,每年农作物秸秆和纤维素废弃物产量达到7亿多吨,然而由于难以被动物分解利用,绝大部分以堆积、荒烧等形式直接倾入环境,造成极大的环境污染和浪费^[1]。

自1906年在蜗牛消化道发现纤维素酶以来,纤维素的微生物降解问题就引起了足够的关注。

利用微生物降解纤维素可有效提高其综合利用率,有效解决或减轻食品和动物饲料的不足、废弃物处理等一系列问题^[2],进而成为近年来研究的热点^[3-4]。

目前,能够降解纤维素的微生物有很多,其中研究较多的真菌,如木霉属(*Trichoderma*)、曲霉属(*Aspergillus*)、青霉属(*Penicillium*)^[5-7]和漆斑霉属^[8]等,然而大多数研究集中在常温、高温纤

纤维素酶方面,对低温纤维素酶的研究相对较少。北方地区秸秆资源丰富,但气候干燥、温度偏低,普通纤维素酶的最适作用温度多为 45 °C–65 °C,而低温纤维素酶的最适作用温度可低至 20 °C^[9],由于反应温度较低,不但在低温条件下可以高效反应,而且在生产工艺中可以通过较低温度的热处理使酶失活,节约能量与费用,这就使得低温纤维素酶的研究具有广阔的发展前景。

本试验从秸秆还田土壤中筛选分离得到一株低温条件下高产纤维素酶的真菌 M11,从形态学、生理生化特性和 ITS 序列分析等方面对其进行鉴定,并对 M11 菌株产纤维素酶的条件进行初步研究,为低温纤维素酶生产菌株的研究提供了理论和实际应用价值。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 土壤样品: 山东省德州市德城区哨马营村试验田 0–20 cm 处土样。

1.1.2 对照菌株: 里氏木霉 *Trichoderma reesei* DSM768 (南京农业大学赠送)。

1.1.3 试剂: DNS 试剂(3,5-二硝基水杨酸)、葡萄糖标准溶液、柠檬酸缓冲液、羧甲基纤维素钠购自国药集团化学试剂有限公司。玉米秸秆粉的制备:将玉米秸秆剪成 2 cm–3 cm 小段,烘干、粉碎后过 40 目筛。

1.1.4 培养基: 分离培养基分别用牛肉膏蛋白胨琼脂培养基、马丁氏-孟加拉红培养基和改良高氏 1 号培养基^[10]; PDA 培养基; 驯化培养基(g/L): 玉米秸秆粉 10.0; (NH₄)₂SO₄ 1.2; NaCl 5.0; CaCl₂ 2.0; pH 自然。CMC 鉴别培养基: CMC-Na 7.5; KH₂PO₄ 1.0; 蛋白胨 1.0; 酵母膏 0.5; MgSO₄ 0.5; NaCl 1.5; 琼脂 20.0; pH 为 7.0–7.2。种子培养基: 不加琼脂的 PDA 培养基。液体发酵培养基: Mandels 营养盐液^[11], 玉米秸秆粉 20.0, pH 自然。

上述试验所需培养基均 1.0×10⁵ Pa 灭菌 20 min。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株筛选: 称取 10.0 g 土样置于 90.0 mL 带有玻璃珠的无菌水中,摇床振荡 30 min,取 1.0 mL 菌液至驯化培养基(100 mL/250 mL), 30 °C、200 r/min 条件下富集培养 24 h, 稀释涂布法分离细菌、真菌、放线菌; 所得菌株点种 CMC 鉴别培养基平板, 30 °C 恒温培养, 倒入 1.0 g/L 刚果红溶液^[12]染色 1 h 后弃之, 用 1.0 mol/L 的 NaCl 浸泡 1 h 脱色, 观察菌落周围有无纤维素水解圈, 并测量水解圈直径, 将具有分解纤维素能力的菌株编号保存备用。

1.2.2 温度梯度诱导: 将筛选的菌株与对照菌株接入种子培养基中扩大培养后按 8% (V/V) 的接种量接于液体发酵培养基(100 mL/250 mL), 以不接菌液的液体发酵培养基作空白对照, 依次在温度为 30 °C、28 °C、23 °C、18 °C, 转速均为 200 r/min 条件下培养 2 d, 最后置于 13 °C、200 r/min 条件下培养, 在 13 °C 培养 3、5、7、9、11 d 时分别取上述菌株的发酵液 5.0 mL, 4 000 r/min 离心 10 min 取上清即粗酶液^[13], 测定发酵液中纤维素酶活力, 筛选耐低温且纤维素酶活力最高的菌株。

1.2.3 酶活力测定: CMC 酶活力测定参照文献[14], 稍作改动。

向 25.0 mL 具塞试管中加入 2.0 mL 以 0.05 mol/L pH 4.8 的柠檬酸缓冲液配制的 1% CMC-Na 溶液, 50 °C 水浴预热 5 min。加 0.5 mL 适当稀释的酶液, 摇匀, 50 °C 准确反应 30 min 后取出, 迅速加入 DNS 试剂 3.0 mL, 放入沸水浴显色 10 min, 取出后立即冷却至室温, 定容至 25.0 mL, 摇匀, 在 540 nm 波长下测定其吸光度值, 通过查标准曲线求出还原糖的含量。酶活力单位的定义: 在上述条件下, 每毫升酶液在 1 min 内催化底物生成 1 μmol 葡萄糖所需要的酶量, 即 1 U/mL。

纤维素酶活力计算公式: $X=(5.56 \times M \times n)/V \times t$ 。
式中 X : CMC 酶活力(U/mL); M : 吸光度在标准曲线上查得(或计算出)的葡萄糖量(mg); n : 酶液的稀释倍数; V : 酶液体积(mL); t : 时间(min); 5.56 为 1 mg 葡萄糖的 μmol 数($1\ 000/180=5.56$)。

1.2.4 形态结构及生理生化特征: 参照《真菌鉴定手册》和《中国真菌志》, 采用点种法在 PDA 培养基上观察菌落形态; 采用插片、结晶紫染色法观察菌体形态; 采用 Biolog 分析菌株生理生化特性。

1.2.5 ITS 序列鉴定: 刮取适量新鲜斜面培养物于 Bead-beater 管中, 采用物理振荡、酚-氯仿-异戊醇抽提等方法提取菌体的基因组 DNA^[15]。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA, 采用 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 引物扩增 ITS 序列。PCR 反应体系为 25.0 μL , 包括 10 \times Buffer (Mg²⁺ free) 2.5 μL , 2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μL , 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ ITS1 和 ITS4 各 1.0 μL , 5 U/ μL *Taq* 酶 0.3 μL , 模板 1.0 μL , ddH₂O 15.7 μL (引物 ITS1 和 ITS4 由上海生工合成, 其他 PCR 材料购于大连宝生物有限公司)。扩增反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

1.2.6 系统发育学分析: PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后送至上海生工测序, 测得序列与 NCBI 数据库比对分析, 选取同源性较高的模式菌株进行系统发育分析, 借助 MEGA 5.0 软件构建系统发育树。

1.2.7 M11 菌株生长特性: 吸取 5.0 mL 无菌水至 M11 菌株斜面制成菌悬液, 血球计数板检测孢子浓度为 10⁸ 个/mL, 用移液枪吸取 0.5 mL 至种子培养基中, 空白对照接入等量的无菌水, 13 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养, 在 1、2、3、4、5、6、7、8 d 时分别取样(每次 3 个平行), 过滤获得

菌丝体, 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘干至恒重, 称量菌丝干重。以时间为横坐标, 菌丝干重为纵坐标绘制 M11 菌株生长曲线。

1.2.8 M11 菌株酶学性质初步研究: 用 pH 分别为 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 的柠檬酸缓冲溶液配制 1% 的 CMC 底物溶液, 加入粗酶液反应, 在 13 $^{\circ}\text{C}$ 下测定 CMC 酶活力, 研究 pH 对 CMC 酶活力的影响。温度对 CMC 酶活力的影响: 调节温度分别为 5 $^{\circ}\text{C}$ 、10 $^{\circ}\text{C}$ 、15 $^{\circ}\text{C}$ 、20 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 、40 $^{\circ}\text{C}$ 、50 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$, 在最适 pH 条件下反应 30 min, 测定不同温度下的 CMC 酶活力。金属离子对酶活力的影响: 在最适温度和 pH 条件下, 向酶反应体系中各加入 0.5 mL、0.01 mol/L 的 Cu²⁺、Fe²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺、Mn²⁺ 金属离子, 然后测定纤维素酶活力。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选

从土壤中分离到水解纤维素的细菌 5 株、真菌 4 株、放线菌 6 株, 纤维素水解圈及直径见图 1 和表 1。X20 菌株纤维素水解圈直径最大为 3.21 cm。在某种程度上纤维素水解圈的大小代表了菌株产纤维素酶能力的强弱, 但还需液体发酵培养进一步验证菌株的纤维素酶活力。

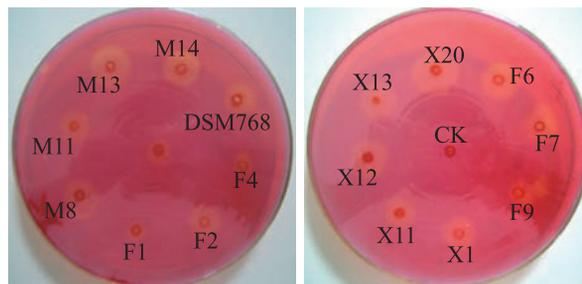


图 1 菌株纤维素水解圈照片

Fig. 1 Cellulose hydrolysis photos of strains

注: X: 细菌; M: 真菌; F: 放线菌; DSM768: 对照菌; CK: 空白。

Note: X: Bacteria; M: Fungi; F: Actinomyces; DSM768: Control strain; CK: Blank control.

表 1 各菌株纤维素水解圈直径
Table 1 The diameter of cellulose hydrolysis circle for each strain

菌株 Strains	直径 Diameter (cm)	菌株 Strains	直径 Diameter (cm)
X1	2.26	M14	2.46
X11	2.12	DSM768	2.08
X12	2.78	F1	1.42
X13	2.69	F2	2.23
X20	3.21	F4	1.13
M8	2.17	F6	2.15
M11	2.41	F7	1.72
M13	3.02	F9	1.34

2.2 纤维素酶活力测定

采用 DNS 法测定 13 °C 下不同时间发酵产物中纤维素酶活力，绘制的酶活力曲线见图 2 (图中仅列出 OD 值大于 0.1 的菌株纤维素酶活力曲线)。由图 2 可知 X20 菌株酶活力曲线趋势比较平缓，纤维素酶活力较低，可能因为菌株不适应低温环境，而菌株 M11 较其他菌株更能耐受低温环境，在 13 °C 时仍能保持较高的纤维素酶活力，且 OD₅₄₀ 值随着发酵时间的延长而逐渐增大，在发酵培养第 9 天时达最大值，纤维素酶活力最高，而后可能由于培养环境不利、营养物质减少等原

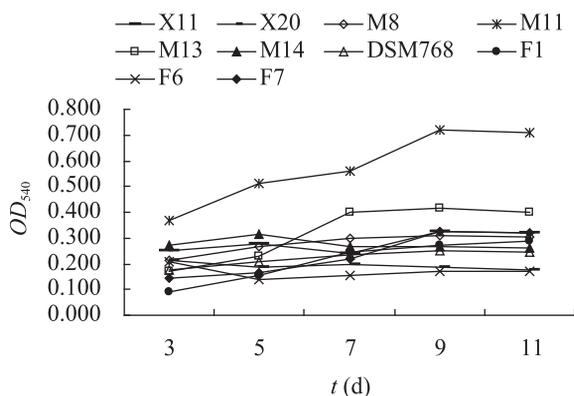


图 2 13 °C 时各菌株纤维素酶活力曲线
Fig. 2 The cellulase activity curve of strains at 13 °C

因，酶活力呈降低的趋势。根据纤维素酶活力计算公式和葡萄糖含量标准曲线，计算得 M11 的酶活力最高为 33.08 U/mL。

为了探索不同温度条件对菌株 M11 发酵产纤维素酶能力的影响，菌株 M11 与对照菌株 DSM768 进行温度梯度发酵试验，试验方法同 1.2.2，每个温度条件下培养 3 d 后取 5.0 mL 发酵液测定纤维素酶活力，试验结果如图 3 所示。试验表明，DSM768 是常温纤维素降解菌株，在 30 °C–23 °C 时酶活力逐渐增强，而后随着温度的降低酶活力逐渐下降，可能因为菌株的代谢活动受到抑制，为了生存消耗了发酵液中的还原糖。M11 菌株的酶活力曲线比较平缓，在常温条件(30 °C–23 °C)也能正常生长、代谢，甚至在 13 °C 低温环境下仍保持较高的纤维素酶活力，它是一株高效的耐低温纤维素降解菌株。

2.3 菌株形态学与生理生化特性

光学显微镜观察菌株 M11 菌丝有横隔，顶囊分生小梗，小梗顶端生分生孢子串，呈扫帚形状，成熟后脱落形成单个孢子，见图 4。M11 菌株在 PDA 培养基平板上菌落呈圆形，边缘整齐，初为白色，成熟后逐渐变为绿色，菌落表面呈粉粒状，见图 5。

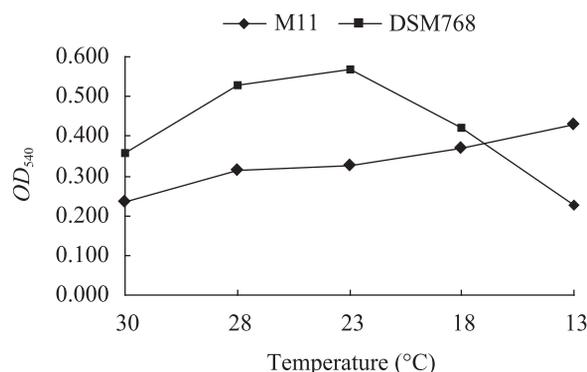


图 3 不同温度下菌株纤维素酶活力曲线
Fig. 3 The cellulase activity curve of strains under different temperature

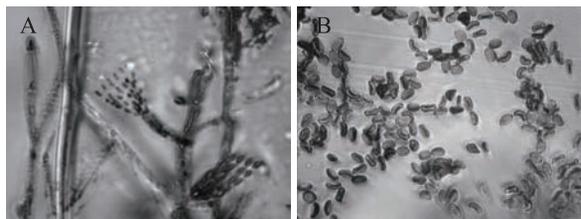


图4 菌株 M11 显微形态特征

Fig. 4 The micromorphology of strain M11

注: A: M11 的菌丝形态; B: 菌株的孢子形态.

Note: A: Mycelial morphology of M11; B: Spore morphology of M11.



图5 菌株 M11 的菌落形态

Fig. 5 The colony morphology of strain M11

将 M11 菌株的孢子悬液接种到 95 种碳源的 Biolog 板微孔中, 培养 72 h 后, 经 Biolog 真菌鉴定系统分析 M11 菌株的代谢指数, M11 菌株属草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)。

2.4 菌株的 ITS 序列鉴定及系统发育分析

提取 M11 菌株的基因组 DNA, PCR 扩增其 ITS 序列(图 6)后送上海生工测序, 测得核苷酸序列长度为 566 bp, 与 NCBI 数据库进行比对, 发现 ITS 序列与 M11 相似性最高的菌株均属于 *Penicillium* 属, 其中与 *Penicillium oxalicum* 相似性达到 99%, 利用 MEGA 5.0 的 Neighbor-Joining 构建系统发育树(图 7), 遗传距离显示菌株 M11 与草酸青霉遗传距离最近, 再结合生理生化鉴定结果, 因此可以将菌株 M11 定为草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)。

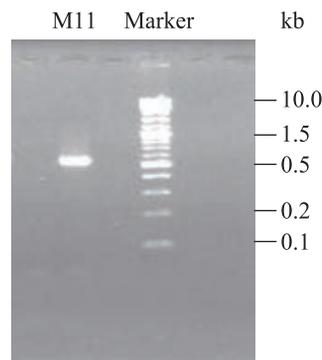


图6 M11 菌株 ITS 序列扩增电泳图

Fig. 6 The electrophoresis figure of ITS amplification of strain M11

2.5 菌株 M11 生长曲线

根据菌丝干重差量法绘制菌株 M11 的生长曲线(图 8), 生长曲线呈“S”型。在 3–6 d 时, 菌丝干重变化较显著, 菌丝生长繁殖较快, 该曲线有助于在发酵培养时菌种种龄的确定, 为发酵培养奠定了重要的理论基础。

2.6 菌株 M11 纤维素酶学性质

2.6.1 温度对酶活力的影响: 由图 9 可以看出, 纤维素酶的最适作用温度为 20 °C, 在 60 °C 以后酶活力迅速下降, 在 5 °C–20 °C 条件下酶活力都比较高, 相对酶活力保持在 90% 以上, 符合低温酶的特性。

2.6.2 pH 对酶活力的影响: 由图 10 可知该纤维素酶最适反应的 pH 为 5.0; 在 pH 3.0–5.0 之间酶活力逐渐增强, 在 pH 5.0–7.0 之间具有 80% 以上的酶活力。

2.6.3 金属离子对酶活力的影响: 在 pH 5.0、20 °C 反应条件下, 加入 0.01 mol/L 的 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 金属离子各 0.5 mL, 测定的纤维素酶活力如图 11 所示, Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 对酶活力有促进作用, 其中 Cu^{2+} 的促进作用较显著; Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 对酶活力有抑制作用, Mg^{2+} 对酶活力并无太大影响。

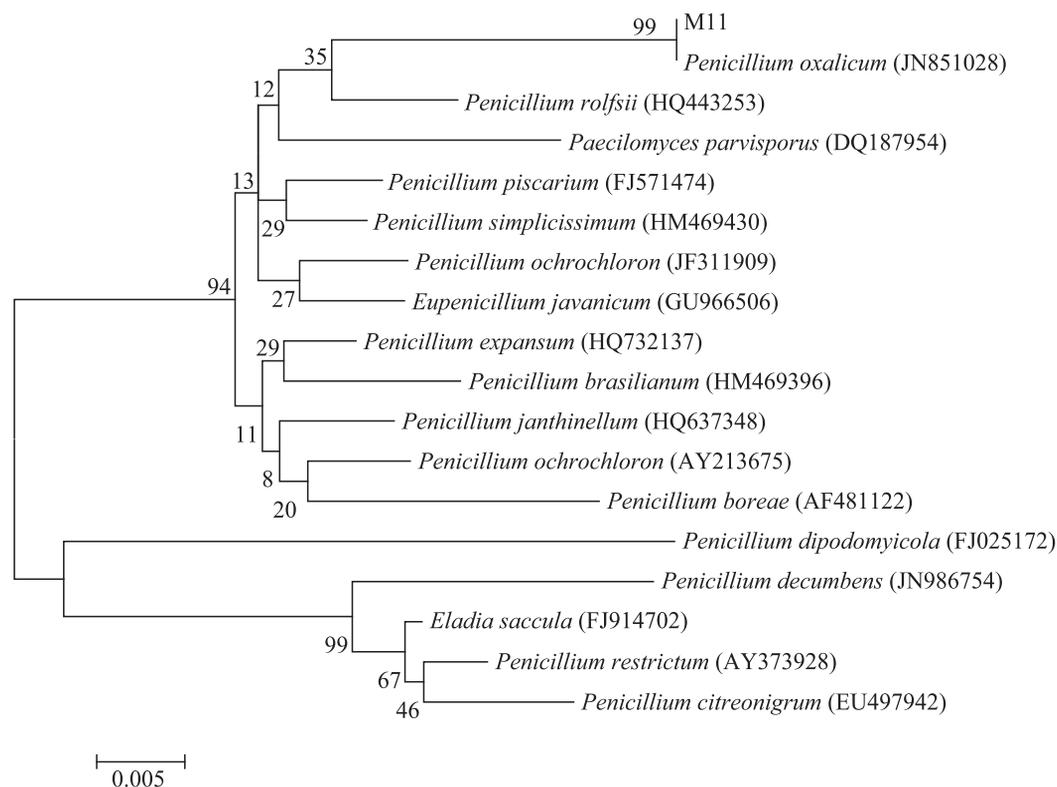


图7 菌株 M11 基因系统发育进化树

Fig. 7 Phylogenetic trees for ITS sequence of M11

注: 发育树节点的数字表示 Bootstrap 值; 括号内的数字是在 GenBank 上的序列登录号; 图例为遗传距离。

Note: Numbers at nodes present bootstrap percentages (based on 1 000 sampling). The numbers are accession numbers of sequences in GenBank. Bar "0.005" sequence divergence.

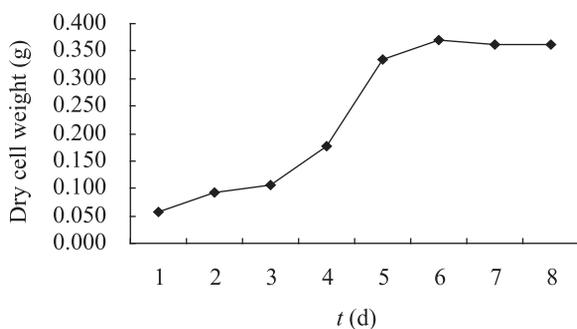


图8 菌株 M11 生长曲线

Fig. 8 The growth curve of strain M11

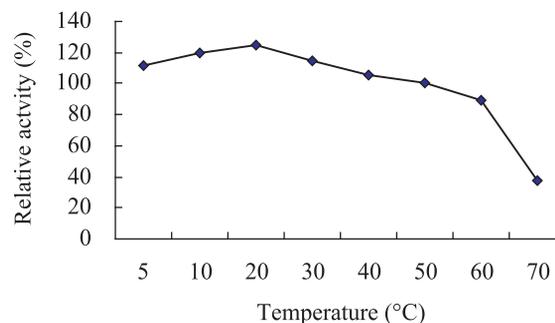


图9 反应温度对酶活的影响

Fig. 9 The effect of temperature on relative activity

3 讨论

我国北方地区平均气温较低、气候干燥, 而小麦、玉米、大豆等秸秆作物的种植面积较广, 为了纤维素资源的合理利用, 低温纤维素酶的研究

已成为国内热点。然而文献报道的低温产纤维素酶菌株大都是从一些高寒地区和海洋中筛选到的, 而且种类主要是细菌和放线菌, 有关真菌的报道则较少。黄玉兰等^[9]从若尔盖高寒湿地距表层 80 cm 处土壤中筛选出一株缺陷短波单胞菌

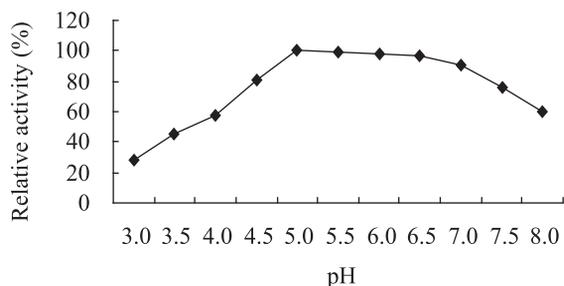


图 10 pH 对酶活力的影响

Fig. 10 The effect of pH on relative activity

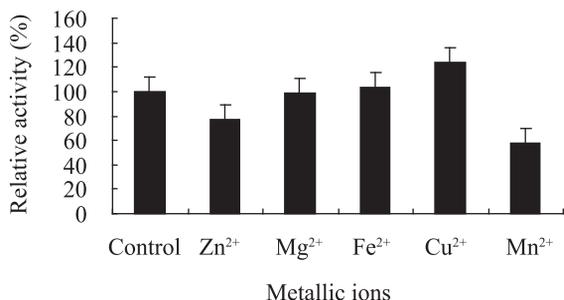


图 11 金属离子对酶活力的影响

Fig. 11 Effect of metallic ions on enzyme activity of M11

(*Brevundimonas* sp.) XW-1; 李师翁等^[16]从青藏高原采集的牦牛粪中分离得到一株产低温纤维素酶能力较强的链霉菌属(*Streptomyces* sp.) Tibet-YD5227-2; 张淑红等^[17]从青藏高原冰川雪样中筛选出一株降解纤维素能力比较高的假单胞菌属菌株 LHG-C-9。

本研究打破常规方式, 通过常温筛选和温度梯度诱导, 从土壤中分离出一株在低温环境下高效分解纤维素的草酸青霉(*Penicillium oxalicum*) M11。目前草酸青霉的研究主要在生物防治领域: 彭霞薇等^[18]从草酸青霉菌固态发酵物中提取果胶酶诱导黄瓜抗黑星病; 王勇等通过室内及田间药效试验证明 20% 草酸青霉水剂对玉米小斑病有良好的防治效果。此外还有些重金属吸附及溶磷方面的研究, 但还未有秸秆纤维素降解方面的报道。

对照菌株里氏木霉(*Trichoderma reesei*

DSM768)是目前生产纤维素酶常用菌株, 产酶能力强, 但在低温条件下草酸青霉 M11 较里氏木霉存在很大优势。相比其他研究如: 王洪媛等^[2]在 28 °C 条件下筛选到具有较强纤维素降解能力的真菌菌株草酸青霉(*Penicillium oxalicum*) 98MJ, 纤维素酶活力为 2.89–5.78 U/mL; 刘爽等^[19]从小兴安岭原始林区及黑龙江农垦集团多年秸秆还田的土壤中筛选到一株产纤维素酶菌株草酸青霉 QSH3-3, 在 30 °C 条件下培养 4 d 时纤维素酶活力最高为 33.0 U/mL, M11 菌株不仅产酶能力强, 而且耐低温, 因此它是一株十分具有研究开发潜力的低温纤维素酶生产菌株。下一步需要研究草酸青霉 M11 菌株最佳发酵工艺。

参 考 文 献

- [1] 孟建宇, 冯福应, 刘向红, 等. 1株纤维素降解菌的筛选及产酶条件研究[J]. 微生物学杂志, 2011, 31(4): 47–51.
- [2] 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.
- [3] Nogawa M, Goto M, Okada H, et al. L-Sorbose induces cellulase gene transcription in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*[J]. Current Genetics, 2001, 38(6): 329–334.
- [4] 史央, 蒋爱芹, 藏传超. 秸秆降解的微生物学机理研究及应用进展[J]. 微生物学杂志, 2002, 22(1): 47–50.
- [5] Zhang Q, Lo CM, Ju LK. Factors affecting foaming behavior in cellulase fermentation by *Trichoderma reesei* Rut C-30[J]. Bioresource Technology, 2007, 98(4): 753–760.
- [6] Ikeda Y, Park EY, Okuda N. Bioconversion of waste office paper to gluconic acid in a turbine blade reactor by the filamentous fungus *Aspergillus niger*[J]. Bioresource Technology, 2006, 97(8): 1030–1035.
- [7] Solov'eva IV, Okunev ON, Vel'kov VV, et al. The

- selection and properties of *Penicillium verruculosum* mutants with enhanced production of cellulases and xylanases[J]. *Microbiology*, 2005, 74(2): 172-178.
- [8] 陈阿娜, 汤斌. 纤维素酶高产菌株选育研究进展[J]. *安徽农学通报*, 2006, 12(10): 64-65.
- [9] 黄玉兰, 李征, 刘晓宁, 等. 一株耐低温纤维素酶高产菌株的筛选、鉴定和产酶的初步试验[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(5): 637-644.
- [10] Zhang JE. Normal methods and techniques of ecological experiment, 2007[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007.
- [11] Mandels M, Weber J. Production of cellulases[J]. *Advances in Chemistry Series*, 1969(95): 391-414.
- [12] 刘洁, 李宪臻, 高培基. 纤维素酶测定方法评述[J]. *工业微生物*, 1994, 24(4): 27-32.
- [13] 伍时华, 徐雅飞, 黄翠姬. 降解纤维素菌株的筛选[J]. *食品科技*, 2006(8): 50-52.
- [14] 甄静, 王继雯, 谢宝恩, 等. 一株纤维素降解真菌的筛选、鉴定及酶学性质分析[J]. *微生物学通报*, 2011, 38(5): 709-714.
- [15] 高平平, 赵立平. 可用于微生物群落分子生态学研究的活性污泥总 DNA 提取方法研究[J]. *生态学报*, 2002, 22(11): 2015-2019.
- [16] 李师翁, 孔凯, 冯佳丽, 等. 产低温纤维素酶放线菌的筛选、鉴定及酶学性质初步研究[J]. *生物技术通报*, 2010(7): 216-220.
- [17] 张淑红, 刘秀花, 梁峰, 等. 低温纤维素降解菌的筛选及其酶学性质初步研究[J]. *微生物学杂志*, 2009, 29(3): 97-100.
- [18] 彭霞薇, 张洪勋, 白志辉. 草酸青霉菌果胶酶诱导黄瓜抗黑星病研究[J]. *植物病理学报*, 2004, 34(1): 69-74.
- [19] 刘爽, 范丙全. 秸秆纤维素降解真菌 QSH3-3 的筛选及其特性研究[J]. *植物营养与肥料学报*, 2012, 18(1): 218-226.

稿件书写规范

高校教改纵横栏目简介及撰稿要求

“高校教改纵横”栏目,是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教学类栏目,也是中国自然科学核心期刊中为数不多的教学栏目。该栏目专为微生物学及其相关学科领域高校教师开辟,一方面为高校微生物学学科的教师提供一个发表论文的平台,同时微生物关联学科的一部分确实优秀的论文也可以在此发表,是微生物学及相关领域教学研究、交流、提高的园地。

本栏目的文章有别于其他实验类研究报告,特色非常鲜明。要求作者来自教学第一线,撰写的稿件内容必须要有新意、要实用,不是泛泛地叙述教学设计与过程,而是确实有感而发,是教学工作中的创新体会,或者在教学中碰到的值得商榷的、可以与同行讨论的有价值的论题。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性,做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教学思路应与时俱进,注意将国内外新的科技成果和教学理念贯穿到教学之中,只有这样才能真正起到教与学的互动,促进高校生物学教学的发展,更多更好地培养出国家需要的高科技创新人才。这也是本栏目的目的所在。

同时,为了给全国生物学领域的教学工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台,本栏目还开辟了“名课讲堂”版块,邀约相关生命科学领域,如微生物学、分子生物学、生物医学、传染病学、环境科学等的教学名师、知名科学家就教学和学生培养发表观点,推荐在教学改革、教学研究、引进先进教学手段或模式以及学生能力培养等方面有突出成绩的优秀论文,为高校教师以及硕士、博士研究生导师提供一个可资交流和学习的平台,促进高校教学和人才培养水平的提高。

欢迎投稿! 欢迎对本栏目多提宝贵意见!