

纤维素降解真菌 Y5 的筛选及其对小麦秸秆降解效果

殷中伟, 范丙全*, 任萍

(中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 北京 100081)

摘要:为了利用纤维素降解菌促进作物秸秆快速腐解还田, 解决秸秆资源浪费和污染环境问题, 进行了高效秸秆纤维素降解微生物的筛选和降解效果研究. 采用固体平板和液体摇瓶培养, 从黑龙江黑土样品中筛选出 1 株能够降解羧甲基纤维素、秸秆木质纤维素、高产纤维素酶的丝状真菌 Y5, 通过形态学观察和 ITS rDNA 序列分析对该真菌进行了初步鉴定. 利用 DNS 还原糖方法, 对菌株在不同的培养时间、纤维素类型、氮源种类以及初始 pH 值情况下纤维素酶活力进行了研究. 采用失重法、液体摇瓶法对菌株降解小麦秸秆的能力进行了研究. 结果表明, 筛选的秸秆降解菌株 Y5 经鉴定为赭绿青霉 (*Penicillium ochrochloron*). 菌株 Y5 液体培养 4 d 的全酶活 (FPA) 和内切酶活 (EG) 最高, 分别为 53 IU/mL 和 55 IU/mL, 比对照菌株 (绿色木霉 AS3.3711) 高出 22.6% 和 18.2%; Y5 菌株以小麦秸秆为作用底物时的酶活最高, 2 种酶活分别比对照菌株提高 27.5% 和 24.8%; 以 NaNO_3 为氮源时酶活性最大, FPA 和 EG 比菌株 AS3.3711 分别提高 35.7% 和 14.9%; 培养液初始 pH 为 6 时全酶活最大为 51.4 IU/mL. 菌株 Y5 培养 10 d 降解小麦秸秆纤维素、半纤维素、木质素分别达到了 43.5%、49.7% 和 9.3%, 对小麦秸秆纤维素与半纤维素降解能力强. 赭绿青霉 Y5 对小麦秸秆纤维素具有很强的降解能力, 其纤维素酶活高于已报道的菌株, 该菌株的获得为秸秆降解菌剂的研究与应用提供了具有较高潜力的菌种.

关键词: 筛选; 真菌; 赭绿青霉; 酶活力; 纤维素降解

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2011)01-0247-06

Isolation and Identification of a Cellulose Degrading Fungus Y5 and Its Capability of Degrading Wheat Straw

YIN Zhong-wei, FAN Bing-quan, REN Ping

(Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: In order to promote the decomposition of crop straw and return it to soil rapidly and solve the problems such as the waste of straw resources and pollution, we screened the bacterial or fungi with high-efficient degradation of straw lignocelluloses and studied its capability of degrading wheat straw. An isolate of filamentous fungus with higher cellulase activity and ability to decompose CMC and straw lignocellulose was screened from black soil samples taken from Heilongjiang province by using the soil dilution, plating and liquid culture methods. Morphological status on various media, and ITS rDNA sequences homology analysis were performed to identify the taxonomy of the isolate. The effects of different time, different N resources, different cellulose resources and different pH values on enzyme activities produced by fungus was analyzed, and The ability of wheat straw degradation of Y5 was determined by using weight loss method and liquid culture. The fungus was identified as *Penicillium ochrochloron* and named Y5. Filter paper activity (FPA) and endo-1,4- β -D-glucanase (EG) were both reached the maximum after the first fourth day inoculated, averaged 53 IU/mL and 55 IU/mL, respectively, which were 22.6% and 18.2% higher than that of strain *Trichoderma viride* (AS3.3711), respectively. Enzyme activities were the highest under the condition of wheat straw used as C resources, which were 27.5% and 24.8% higher than that of AS3.3711. The FPA and EG activities were 35.7% and 14.9% higher than the AS3.3711 strain with NaNO_3 as nitrogen source. The optimal pH value of liquid culture was 6. The cellulose, hemicellulose and lignin contents were degraded by 43.5%, 49.7% and 9.3% after the first 10 days inoculated, respectively, which indicated that Y5 had strong enzyme activities on degradation of cellulose and hemicelluloses of wheat straw. The *Penicillium ochrochloron* Y5 has strong ability of wheat straw cellulose degradation, and its cellulase activities are higher than some published researches. The *Penicillium ochrochloron* Y5 strain has the great potential in research and development for inoculant of crop straw decomposition.

Key words: isolation; fungi; *Penicillium ochrochloron*; cellulase activity; cellulose degradation

利用高效纤维木质素降解菌株和复合系研制新型高效的作物秸秆腐熟菌剂已成为国内外研究热点. 20 世纪 40 年代以来, 科学家筛选了大量降解纤维素的真菌, 尤以木霉属 (*Trichoderma*)、青霉属 (*Penicillium*)、漆斑霉属 (*Myrothecium*)、毛壳霉属 (*Chaetomium*)、曲霉属 (*Aspergillus*) 等为主^[1-5]. 其

中简青霉 (*Penicillium simplicissimum*)^[6-8]、赤霉菌 (*Gibberella fujikuroi*)^[9]、长柄木霉 (TB9702) 和康宁

收稿日期: 2010-03-30; 修订日期: 2010-06-17

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (2006AA10Z426)

作者简介: 殷中伟 (1984 ~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为环境生物技术, E-mail: yinzhongwei2002@163.com

* 通讯联系人, E-mail: bqfan@caas.ac.cn

木霉 (TB9704)^[10]、康氏木霉 (0143)^[11] 等高酶活性菌株的获得为秸秆生物降解提供了重要参考。

研究表明,小麦秸秆还田中应用纤维素分解菌剂可以改变腐解过程中温度与水解酶活性^[12];协调土壤酸碱度,增加有机质、全氮、速效氮、速效钾含量及脲酶、过氧化氢酶的活性^[13];此外小麦秸秆施菌剂处理能够显著提高作物的根系活力和叶绿素含量,影响作物的生育期,提高产量^[14]。因此,利用纤维素分解菌剂建立新型的生物秸秆还田技术将成为解决大量秸秆资源的一条重要途径。

本研究从建立新型生物秸秆还田技术的角度,筛选获得高酶活性的纤维素降解菌株,且对小麦秸秆纤维素具有较强的降解能力。通过研究其纤维素酶活力、降解纤维素效果以及影响条件,以期对秸秆高效降解还田提供菌种资源和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 样品来源

样品分别采于黑龙江省漠河县北极村森林林下腐殖层、腐烂木材,麦田、大豆田表层土壤,内蒙古呼伦贝尔草原表层土壤。

1.1.2 纤维素材料

(1)小麦、玉米秸秆纤维素:小麦秸秆、玉米秸秆用 2 mol/L 的 NaOH 溶液浸泡 12 h 后,水洗至 pH = 7.0,粉碎过 200 目筛。

(2)羧甲基纤维素钠(CMC)、滤纸、微晶纤维素(MCC),购于北京化学试剂公司。

1.1.3 试剂与引物

Taq 酶、dNTP 购自北京天根生化科技有限公司,ITS 通用引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。其他化学试剂购于北京化学试剂公司。

1.1.4 菌株与培养基

绿色木霉 AS3.3711 作为对照,购自中国普通微生物菌种保藏管理中心。

无机盐培养基(g/L):NH₄Cl 1.1, K₂HPO₄ 1.0, NaCl 0.5, KCl 0.2, MgSO₄·7H₂O 0.2, FeSO₄ 0.001, CaCl₂ 0.01, 微量元素混合溶液 1 mL。

微量元素混合溶液(mg/L): H₃BO₃ 57, MnSO₄·7H₂O 43, ZnSO₄·7H₂O 43, CuSO₄·5H₂O 40, (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 37, Co(NO₃)₂·6H₂O 25。

保藏真菌用 PDA 培养基。

1.2 实验方法

1.2.1 筛选方法

直接接种土壤样品或腐殖质于装无机盐培养基的试管。静止培养 5~7 d,将崩溃的滤纸部分转接到以秸秆木质纤维素(200 目)为唯一碳源的无机盐固体培养基平板上。30℃ 培养 2~3 d,待长出菌落后,挑取产生降解透明圈的单菌落牛肉膏或 PDA 培养基上纯化。

1.2.2 菌株鉴定

(1)表型特征鉴定

具体方法参照文献[15]。

(2)ITS 序列鉴定

将菌株 Y5 的孢子接入 PDA 液体培养基中,28℃ 摇床培养 24 h,无菌条件过滤获得菌丝,提取真菌基因组总 DNA^[16],用引物为 ITS1 (5'-GGAA GTAAAAGTCGTAACAAGG-3') 和 ITS2 (5'-TCCTC CGCTTATTGATATGC-3') 扩增 18S rDNA 和 5.8S rDNA 之间的序列^[17],PCR 扩增产物由上海生工生物技术有限公司测序,将获得的 DNA 序列输入 GenBank,用 Blast 程序与数据库中的所有序列进行比较分析。并利用 MEGA4.1 软件构建系统发育树。

1.2.3 液体培养产酶及其影响因素

挑取新鲜菌丝于固体斜面 PDA 培养基中得到纯培养,按 1% (10⁸ 个孢子)的接种量到 300 mL 无机盐培养基中,于 30℃,170 r/min 液体摇床培养 24 h,过滤,滤液再于 4℃,5 000 r/min 离心 10 min,取上清液即为制取的粗酶液。测定酶活力与时间、纤维素类型、氮源和 pH 值之间的关系。

内切酶活(EG)测定方法参照文献[18],全酶活(FPA)测定方法参照文献[19]。酶活力定义为 1 mL 酶液每 min 水解底物生成 1 μmol 还原糖的酶量为 1 个酶单位(IU/mL)。

1.2.4 小麦秸秆降解能力检测

准确称重 0.5 g 的小麦秸秆木质纤维素,按不溶性碳为 1% 的量配制无机盐液体培养基,将 Y5 连同对照菌株 AS3.3711 分别接入液体 PDA 振荡培养,36 h 后转接入无机盐培养基中,25℃,170 r/min 振荡培养,以不接菌的无机盐培养基作为对照 CK,分别在第 2、4、6、8 和 10 d 取出秸秆木质纤维素样品,采用改进的 Van Soest 洗涤法测定样品纤维素、半纤维素和木质素含量^[20,21]。

1.2.5 数据分析

所有数据使用 SAS 统计软件进行显著性分析(SAS Institute Inc.)

2 结果与分析

2.1 菌株筛选

经过 CMC 固体培养基培养 48 h 后,根据透明圈直径、透明圈直径与菌落直径比值 (D/d) 选出 12 株真菌.降解效果最好的为 Y5,且将 Y5 接种于含小麦秸秆粉为唯一碳源的无机盐培养基上时能够迅速生长产生降解圈,说明它具有较强的降解小麦秸秆纤维素的能力.

将 Y5 菌株置于 30℃ 恒温箱培养 2 d,菌株 Y5 菌丝体清晰可见,其菌丛密集,菌落生长局限,有明显的凹沟,绒状,产孢面灰色,背面近于橙红色;7 d 后可见大量的分生孢子结构,呈纯灰色,边缘变白.在显微镜下观察,分生孢子梗壁光滑;间枝分散,且短而粗;小梗 ($7 \sim 8$) $\mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$;分生孢子球呈亚球形.

利用 ITS 通用引物对 Y5 进行 PCR 扩增,得到 586 bp 的目的片段,利用 GenBank Blast 软件进行同源序列比较,结果显示 Y5 的 rDNA 序列与青霉属 (*Penicillium*) 的多株菌具有高度同源性.

从 GenBank 基因数据库中分别下载序列相似性 >96% 的菌株的 ITS 序列.用降解菌株 Y5 的序列和下载的 ITS 序列通过 ClusterW 进行聚类分析,利用 MEGA3.1 软件以 Neighbor-Joining 计算方式生成系统发育树(距离采用 Juke-Cantor 模式),系统树各分支的置信度经重抽样法(Bootstrap)1 000 次重复检测.根据遗传距离显示菌株 Y5 与青霉菌遗传距离最近,与赭绿青霉菌同源性高达 98%.

2.2 不同培养条件对菌株 Y5 纤维素酶活性的影响

2.2.1 菌株 Y5 的酶活力随时间变化

菌株 Y5 以小麦秸秆粉为唯一作用底物进行液体培养,以菌株 AS3.3711 作为对照,测定菌株 Y5、AS3.3711 的全酶活 (FPA) 和内切酶活 (EG),结果见图 1.数据显示二者差异显著 ($p=0.01$).培养 3 d 时,对照菌株 FPA 与 EG 同时达到最大,分别为 41.2 IU/mL 和 44.9 IU/mL,随后的 3 d 内 2 种酶活同时迅速下降,第 6 d、7 d 趋于平稳,保持在 20 IU/mL 左右.降解菌 Y5 在培养前 3 d 内 FPA 与 EG 活缓慢上升,第 3~4 d 全酶活和内切酶活迅速达到最大,分别为 53 IU/mL 和 55 IU/mL,比对照菌株的 2 种酶活分别高出 22.6% 和 18.2%.从第 4 d 到培养结束,Y5 酶活力持续下降,培养 7 d 时,FPA 与 EG 仍能分别保持在 28.5 IU/mL 和 33.7 IU/mL.比对照菌株分别高 32.4% 和 36.5%.而 Ahamed 等^[22]在研究瑞氏木霉 (*Trichoderma. reesei*) RUTC-30 在不同发酵条件时,FPA 最高能达到 5.02 IU/mL,EG 能达到 4.2 IU/mL.表明 Y5 能在以小麦秸秆纤维素为

碳源的培养基中生长,并在培养较短时间内达到和保持较高的纤维素酶活.

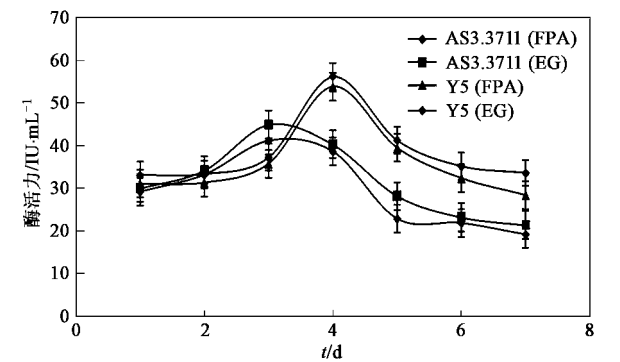


图 1 培养时间对菌株 Y5 与 AS3.3711 的全酶活、内切酶活的影响

Fig. 1 Effects of different time on FPA and EG produced from strain Y5 and AS3.3711

2.2.2 不同氮源对菌株 Y5 酶活性的影响

不同氮源对降解菌 Y5 和 AS3.3711 酶活具有显著影响(图 2、图 3).菌株 Y5 在 4 种不同氮源处理培养中的全酶活 (FPA) 和内切酶活 (EG) 差异显著 ($p=0.01$),其中以硝酸钠为氮源时 2 种酶活最高,FPA、EG 分别达到了 48.2 IU/mL 和 53.1 IU/mL,FPA 比以尿素、磷酸铵和硫酸铵为氮源时的酶活分别高出 28.8%、40% 和 29.5%,对照菌 AS3.3711 在这 4 种氮源的处理下全酶活分别为 31.7、35.5、23.0 和 31.1 IU/mL.Y5 的 EG 在 4 种氮源处理中分别达到 39.1、53.1、33.1 和 40.9 IU/mL,以硝酸钠为氮源时酶活力最高,与 AS3.3711 差异不显著,但显著高于其他氮源处理,分别比以尿素 (39.1 IU/mL)、磷酸铵 (33.1 IU/mL) 和硫酸铵 (40.9 IU/mL) 为氮源处理时高出 26.4%、37.6%

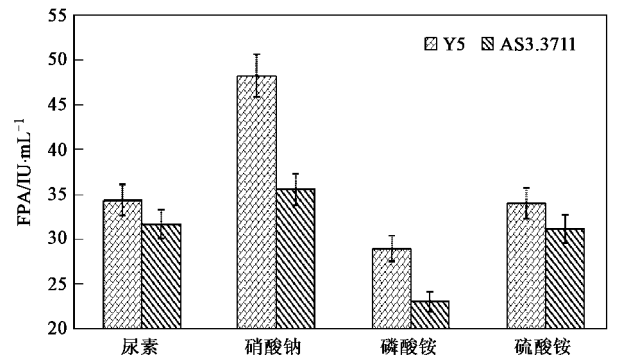


图 2 Y5 与参比菌株 AS3.3711 在不同氮源条件下的全酶活变化

Fig. 2 Effects of different N resources on FPA produced from strain Y5 and AS3.3711

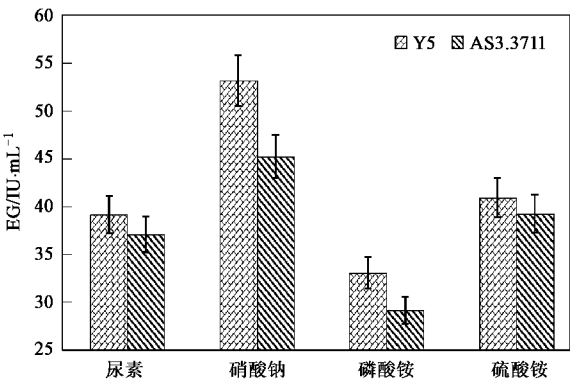


图 3 不同氮源对菌株 Y5 与 AS3.3711 内切酶活性的影响

Fig.3 Effects of different N resources on EG produced from strain Y5 and AS3.3711

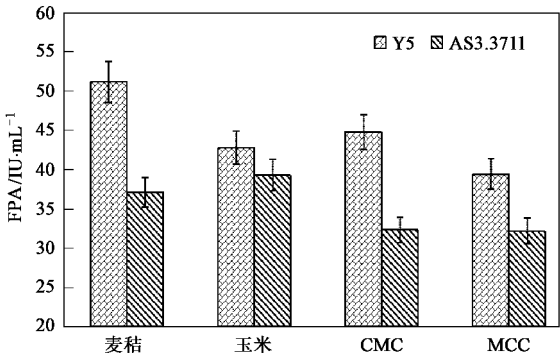


图 4 不同纤维素种对 Y5 与 AS3.3711 的全酶活的影响

Fig.4 Effects of different cellulose resources on FPA produced from strain Y5 and AS3.3711

和 22.9%。Y5 在 4 种氮源处理时的 EG 比对照菌分别提高 5.1%、14.9%、12.1% 和 4.2%。说明 4 种氮源中,硝酸盐是纤维素降解菌 Y5 产酶最佳氮源。徐昶等^[23]研究灰绿曲霉(*Aspergillus glaucus*)在不同氮源对酶活力的影响时,测得 FPA 与 EG 在无机氮为硝酸盐的存在下显著,与本实验的结果一致。

2.2.3 不同纤维素种类对菌株 Y5 酶活性的影响

以小麦秸秆,玉米秸秆,羧甲基纤维素钠(CMC)和微晶纤维素(MCC)4 种纤维素作为底物,菌株 Y5 与 AS3.3711 的全酶活(FPA)与内切酶活(EG),见图 4、图 5。结果显示,与对照菌株比降解菌 Y5 在各处理中显示出了较高的酶活性。尤其在以小麦秸秆纤维素为底物时 2 种酶活力都显著突出。Y5 在以小麦秸为作用底物时的全酶活为 51.2 IU/mL。分别比以玉米秸秆、CMC、MCC 为作用底物时高出 16.4%、12.5% 和 22.9%。而对照 AS3.3711 以这 4 种不同纤维素作为底物培养时的全酶活(FPA)分别是 37.1 IU/mL(小麦秸秆)、39.3 IU/mL(玉米秸秆)、32.3 IU/mL(CMC)和 32.2 IU/mL(MCC)。Y5 比对照菌株 AS3.3711 以这 4 种碳源为底物时的 FPA 分别高了 27.5%、8.1%、27.8% 和 18.4%。

Y5 在以小麦秸秆纤维素为底物时的 EG 为 55.2 IU/mL,比其他 3 种纤维素类型高了 19.7%(玉米秸秆)、11.0%(CMC)18.3%(MCC)。而内切酶(EG)的作用底物为 CMC 类纤维素。这足以证明降解菌 Y5 对小麦秸秆的降解特异性,这也反映了微生物降解作物秸秆需要不同的纤维素降解酶系间的协同作用。另外,菌株 Y5 以这 4 种纤维素为底物时比对照 AS3.3711 的内切酶(EG)分别高 24.8%、1.9%、23.5% 和 14.3%。

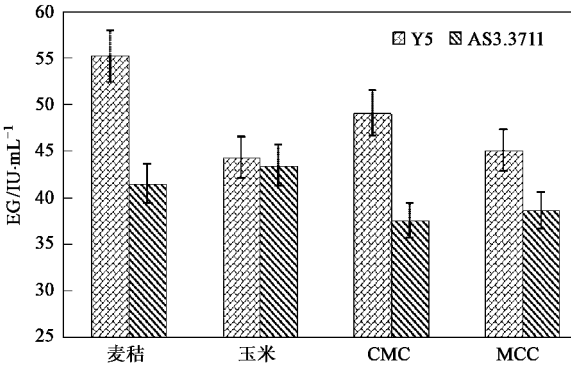


图 5 不同纤维素种类对 Y5 与 AS3.3711 内切酶活影响

Fig.5 Effects of different cellulose resources on EG produced from strain Y5 and AS3.3711

2.2.4 不同初始 pH 值对降解菌 Y5 酶活力的影响

不同 pH 值对降解菌 Y5 和对照菌 AS3.3711 全酶活(FPA)的影响显著($p = 0.01$)。结果显示(图 6),Y5 在整个 pH 变化范围内都能表现出较高酶活性。在初始 pH 4.5 时 FPA 为 43.4 IU/mL,在 pH 6.0 时全酶活达到最大为 51.4 IU/mL,随后下降速度较快,培养液 pH 7.0 时酶活为 44.1 IU/mL。而对照菌株 AS3.3711 从 pH 4.5(40.1 IU/mL)开始酶活力急剧上升,到 pH 5.5 达到最大为 50.2 IU/mL,pH 7 时二者全酶活相近。2 株菌的全酶活(FPA)在最高时,Y5 比对照菌株高出 1.2 IU/mL。证明 Y5 在液体培养条件下的酶活性最适 pH 为 6.0,属于微酸性。故与对照菌相比更适合土壤中秸秆转化作用的发挥。

2.3 菌株 Y5 降解小麦秸秆能力检测

在液体培养条件下,分别对菌株 Y5 的不同培养时间麦秸中的纤维素、半纤维素和木质素含量进行了测定,结果显示(图 7~9),与 CK 和对照菌

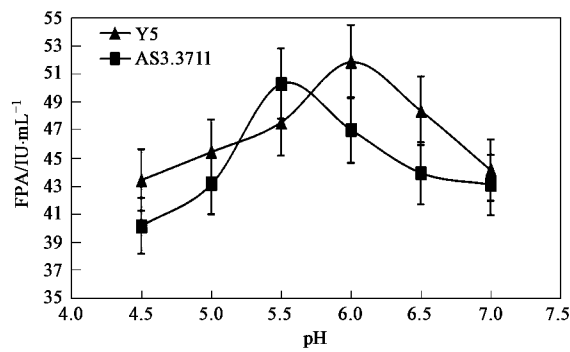


图 6 不同 pH 值对菌株 Y5 和 AS3.3711 产酶的影响

Fig. 6 Effects of different pH value on FPA produced from strain Y5 and AS3.3711

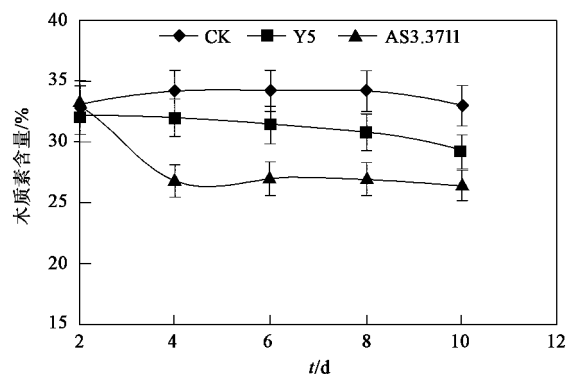


图 9 Y5 和 AS3.3711 对小麦秸秆木质素降解效果

Fig. 9 Effects of strain Y5 and AS3.3711 on lignin degradation in wheat straw

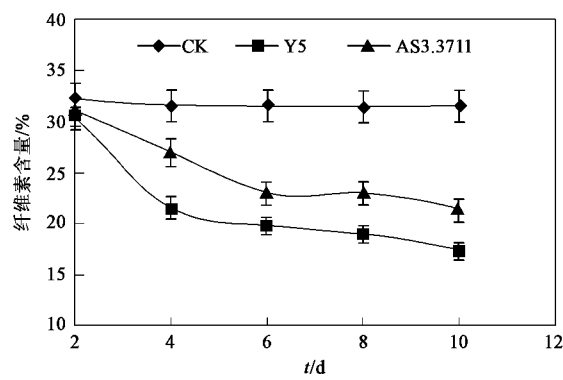


图 7 菌株 Y5 和 AS3.3711 对小麦秸秆纤维素降解效果

Fig. 7 Effects of strain Y5 and AS3.3711 on cellulose degradation in wheat straw

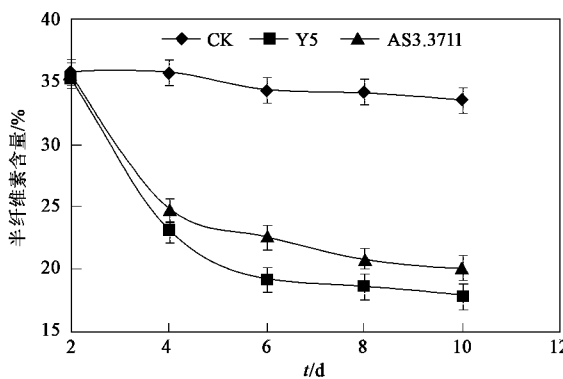


图 8 菌株 Y5 和 AS3.3711 对小麦秸秆半纤维素降解效果

Fig. 8 Effects of strain Y5 and AS3.3711 on hemicellulose degradation in wheat straw

AS3.3711 比较菌株 Y5 对纤维素、半纤维素的降解效果显著 ($p = 0.01$). 而且 Y5 对纤维素、半纤维素的降解期主要分布在第 2~4 d. 与 CK 相比 2 d 内纤维素含量下降了 10.6%; 半纤维素含量下降了

12.6%. 而对照菌在相应时间内纤维素、半纤维素含量分别减少了 3.2% 和 3.4%, 降解率前者大大高于后者. 培养结束时 Y5 对小麦秸秆纤维素、半纤维素分别减少了总重的 14.2% 和 15.7%, 而对照菌相应时间内二者的含量减少了总重的 10.2%、13.5%. 菌株 Y5 培养 10 d 降解纤维素、半纤维素、木质素分别达到了 43.5%、49.7% 和 9.3%. 吕育财等人筛选到复合菌系 WDC2 在 60℃ 时以小麦为碳源的 PCS 培养基中能够使小麦秸秆的分解率高达 64.47%, 纤维素、半纤维素分别分解了 44.7% 和 13.6%, 与本实验的降解效果相当^[24]. 实验结果说明 Y5 对小麦秸秆纤维素具有特殊的降解特性, 具有针对小麦秸秆纤维素降解还田技术的开发潜力.

Y5 在整个过程中其木质素含量共下降了总重的 3%, 变化较小, 略逊于对照. 表明 Y5 对木质素降解能力较弱.

3 结论

(1) 从黑龙江省土壤样品中筛选得到 1 株对小麦秸秆具有独特降解能力的纤维素降解菌株 Y5, 经过形态学观察和分子生物学鉴定为赭绿青霉 (*Penicillium ochrochloron*).

(2) 菌株 Y5 以小麦秸秆粉为唯一碳源, 全酶活 FPA 和内切酶活 EG 第 4 d 达到最大; 在以小麦秸秆粉为底物、 NaNO_3 为氮源的 FPA 与 EG 酶的活性最高. 故菌株 Y5 在小麦秸秆高效降解还田方面具有较大的应用潜力. 初始培养液的 pH 6 时全酶活力保持最高, 属微酸性, 故与对照菌株相比更适于土壤中秸秆转化作用的发挥.

(3) 菌株 Y5 对小麦秸秆纤维素降解能力较强,

液体振荡培养结束后纤维素和半纤维素含量分别减少了 43.5% 和 49.7% ,显示出了较高的纤维素降解能力,并且这一结果与 Y5 液体培养酶活力变化的时间规律有一致性. Y5 对木质素的降解能力很弱.

参考文献:

[1] Tomme P, Van Tilbeurgh H, Pettersson G, *et al.* Studies of the cellulolytic system of *Trichoderma reesei* QM 9414[J]. European Journal of Biochemistry, 2004, **170**(3):575-581.

[2] Singh R, Varma A J, Seeta-Laxman R, *et al.* Hydrolysis of cellulose derived from steam exploded bagasse by *Penicillium cellulases*: Comparison with commercial cellulose [J]. Bioresource Technology, 2009, **100**(24):6679-6681.

[3] Okunowo W O, Gbenle G O, Osuntoki A A, *et al.* Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by a phytopathogenic *Myrothecium roridum* and some avirulent fungal isolates from water hyacinth [J]. African Journal of Biotechnology, 2010, **9**(7):1074-1078.

[4] Geeraerts H A M, Vandamme E J. Cellulolytic properties of *Chaetomium crispatum* [J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2008, **33**(2):107-113.

[5] Gottschalk L M F, Oliveira R A, Barros R R O, *et al.* Synergistic enhancement of enzymatic hydrolysis of sugar cane bagasse by *Trichoderma* and *Aspergillus* cellulases and xylanases enzyme pools[C]. Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 2009. 5-95.

[6] 郁红艳,曾光明,黄国和,等. 木质素降解真菌的筛选及产酶特性[J]. 应用于环境生物学报, 2004, **10**(5):639-642.

[7] 郁红艳,曾光明,黄国和,等. 筒青霉 *Penicillium simplicissimum* 木质素降解能力[J]. 环境科学, 2005, **26**(2):167-171.

[8] 白洪志,杨谦,张鲁. 纤维素降解菌筒青霉 H-11 的筛选及酶学特性的研究[J]. 华北农学报, 2007, **22**(3):160-162.

[9] 曾青兰,洪玉枝,刘子铎. 纤维素降解菌 *Gibberella fujikuroi* 产酶条件的优化[J]. 华中农业大学学报, 2008, **27**(3):391-393.

[10] 陈庆森,刘剑虹,潘建阳,等. 利用多菌种共发酵技术转化玉米秸秆的研究[J]. 食品与发酵工业, 1999, **25**(5):1-6.

[11] 谢占玲,吴润,李秀萍,等. 青海高原产纤维素酶康氏木霉的

酶促动力学研究[J]. 中国兽医科技, 2003, **33**(9):45-49.

[12] 陈胜男,谷洁,高华,等. 微生物菌剂对小麦秸秆和尿素静态堆腐过程的影响[J]. 农业工程学报, 2009, **25**(3):198-201.

[13] 李玉春,刘瑞伟,皇传华,等. 微生物菌剂对小麦秸秆还田效果试验[J]. 山东农业科学, 2006, **6**:52-53.

[14] 刘起丽,张建新,徐瑞富,等. 外源菌剂处理秸秆还田对小麦形态及生理特性的影响[J]. 广东农业科学, 2009, **12**:84-86.

[15] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1979. 501-512.

[16] 吴志红,汪天虹,黄卫. 简便易行的丝状真菌染色体 DNA 提取法[J]. 菌物系统, 2001, **20**(4): 575-577.

[17] White T J, Bruns T, Lee S, *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics: A guide to methods and applications[M]. San Diego: Academic Press, 1990. 315-322.

[18] Mandels M, Sternberg D. Recent advances in cellulose technology [J]. Journal of Fermentation Technology, 1976, **54**(4):267-286.

[19] Mandels M, Andreotti R, Roche C. Measurement of saccharifying cellulose [C]. Symposium on Biotechnology and Bioengineering, 1976, 21-23.

[20] 杨胜. 饲料分析及饲料质量检测技术[M]. 北京:北京农业大学出版社,1993.

[21] 王玉万,徐文玉. 木质纤维素固体基质发酵物中半纤维素、纤维素和木质素的定量测定分析程序[J]. 微生物学报, 1987, **13**(2):82-84.

[22] Ahamed A, Vermette P. Effect of mechanical agitation on the production of cellulases by *Trichoderma reesei* RUT- C30 in a draft-tube airlift bioreactor [J]. Biochemical Engineering Journal, 2010, **15**(3):379-387.

[23] 徐昶,龙敏南,邹小兵,等. 高产纤维素酶菌株的筛选及产酶条件研究[J]. 厦门大学学报, 2005, **44**(1):107-111.

[24] 吕育财,朱万斌,崔宗均,等. 纤维素分解菌复合系 WDC2 分解小麦秸秆的特性及菌群多样性[J]. 中国农业大学学报, 2009, **14**(5):40-46.