



混菌发酵对产纤维素酶的影响及菌剂在大豆秸秆降解中的应用

孙冬梅, 文安宇, 李响, 林志伟, 肖翠红, 朱栗伟

(黑龙江八一农垦大学 寒区环境微生物与农业废弃物资源化利用重点实验室, 黑龙江 大庆 163319)

摘要:为提高秸秆还田过程中的腐解效率,减轻还田产生的病害加重现象,以稻草、麸皮为基本培养基,以黄绿木霉菌(拮抗真菌)、角毛壳菌及绿色木霉菌(纤维素高效降解微生物)为研究材料,测定3种不同菌种及混合菌发酵液处理下滤纸酶、棉花酶与羧甲基纤维素酶的活性变化。通过秸秆翻埋试验测定混菌发酵液和商业菌剂处理大豆秸秆发酵前后纤维素、半纤维素含量变化并探讨最适秸秆翻埋长度和深度。探讨混菌培养对纤维素酶产生能力及对大豆秸秆纤维素与半纤维素降解速率的影响。结果表明:滤纸酶活性、棉花酶活性与羧甲基纤维素酶活性均为黄绿木霉菌、角毛壳菌和绿色木霉菌3株菌混菌发酵的产酶能力最强,混合菌发酵的3种纤维素酶活性分别为385.12、454.30和495.12 U。混菌发酵液处理与商业菌剂处理的大豆秸秆粉纤维素与半纤维素含量与空白对照差异显著,混菌发酵液处理的纤维素与半纤维素降解率分别可达66%和76%。大豆秸秆降解率与秸秆强度的变化说明:在大豆秸秆长度为3 cm,翻埋深度为10 cm时,秸秆降解率最高。添加混合菌剂的处理的秸秆降解率较对照提高50%以上,同时秸秆的强度降低约5倍,穿刺力降低。结果证实了3株不同真菌在秸秆降解中复合应用的可行性,可作为大豆秸秆还田中有效的腐解微生物资源。

关键词:黄绿木霉菌;角毛壳菌;绿色木霉菌;产纤维素酶;混合发酵液;大豆秸秆;降解

Cellulase Production by Mixed Fungi Solid Fermentation and the Application in Soybean Straw Degradation

SUN Dong-mei, WEN An-yu, LI Xiang, LIN Zhi-wei, XIAO Cui-hong, ZHU Li-wei

(Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Environmental Microbiology and Recycling of Argo-Waste in Cold Region, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract: In order to improve the decomposition efficiency of straw returning to field and reduce the diseases aggravation, antagonistic fungi *Trichoderma aureoviride*, *Chaetomium cupreum* and cellulose-decomposing fungus *T. viride* were used to study the cellulase production ability of different strains in mixed culture and its effect on the degradation rate of cellulose and hemicellulose from soybean straw. The results showed that the cellulase activity, cotton enzyme activity and carboxymethyl cellulase activity of three different strains and mixed fermentation at different fermentation time were measured on rice straw and bran as basic medium. The cellulase activity of these three strains mixed fermentaton was the strongest. The cellulase activity was 385.12, 454.30 and 495.12 U, respectively. The changes of cellulose and hemicellulose contents before and after fermentation showed that there were significant differences between the two treatments, and the degradation rates of cellulose and hemicellulose were 66% and 76% respectively. We also found that the degradation rate of soybean straw was the highest when the length of soybean straw was 3 cm and the buried depth was 10 cm by the burying experiment. The degradation rate of soybean straw was increased by more than 50%, the strength of soybean straw was reduced by about 5 times and the puncture force was decreased by adding mixed microbial agent. The results showed that the three strains mixed could be used in the degradation of soybean straw, which could provide effective microbial resources for decomposition of soybean straw.

Keywords: *Trichoderma aureoviride*; *Chaetomium cupreum*; *Trichoderma viride*; Cellulase; Mixed fungi; Soybean Straw; Degradation

在农业生产过程中,秸秆是一种重要的生物质资源,同时也是农业生产中主要的农业废弃物来源^[1]。我国作物秸秆资源丰富,2017年各类秸秆年产量约为 1×10^9 t。秸秆中含有丰富的氮、磷、钾等植物营养元素与有机能源^[2],长期以来秸秆资源的合理利用一直是亟待解决的重要问题之一。秸秆用途广泛,可用作饲料、燃料、有机肥料及工业原料

等^[3],但由于缺乏切实可行的处理与利用技术,每年超过 2×10^8 t 秸秆焚烧,由此导致的氮、磷、钾损失约相当于全国化肥总用量的60%^[4-6]。

作物秸秆种类不同,秸秆的C/N比值及养分含量均有差别,在一定程度上影响秸秆腐解的速度与养分归还程度。秸秆中较难分解的成分为植物通过光合作用产生的纤维素生物质^[7],微生物是其降

收稿日期:2018-08-29

基金项目:寒区环境微生物与农业废弃物资源化利用重点实验室项目(201707);黑龙江农垦总局项目(HNK135-02-06-04);大庆市指导项目(zd-2017-63);黑龙江省大学生创新项目(201710223040);黑龙江八一农垦大学创新项目(xc2017033)。

第一作者简介:孙冬梅(1970-),女,博士,教授,主要从事微生物资源与开发研究。E-mail: 7981004@qq.com。

解的主要推动力,添加纤维素高效降解菌的方法不失为一种经济、有效的手段,受到国内外学者的广泛关注^[8-12]。也有实验证实秸秆不完全腐解归还土壤可能造成与植物争氮及植物病害加重现象^[13-15],因而合理选择纤维素降解微生物作为腐解菌剂对减轻秸秆还田过程中病害的发生意义重大。

纤维素酶是将纤维素水解成纤维二糖和葡萄糖的复合酶系,是微生物发挥代谢作用的催化剂^[16]。试验证实真菌对纤维素的降解强,纤维素酶系比较完全,且可分泌到细胞外,但不同菌株降解效果存在一定差异。在降解真菌中应用较为广泛的有青霉属、曲霉属和木霉属等。孙美娜等^[17]在棉花秸秆上分离到了降解能力较强的黑曲霉, Baldrian 等^[18]分离到了降解的担子菌类真菌, Adsul 等^[19]获得了降解能力强的青霉菌,高星星^[20]对里氏木霉与黑曲霉混合发酵产纤维素酶能力的研究时证实混菌发酵优于单菌株。在产纤维素酶微生物研究中,很少有人关注纤维素降解菌的生物防治能力。

黄绿木霉菌是本实验室分离到的具有良好降解能力与抑菌能力的微生物菌株,该菌株产纤维素酶能力较强,且对大豆根腐病与菌核病具有良好的防治效果^[21-23],角毛壳菌与绿色木霉也是常用的纤维素产生菌与生物防治微生物^[24-26]。鉴于不同菌株具有的相似特点,通过混合培养提高其纤维素酶产生能力,这样既可解决秸秆还田中的病害问题又提高了还田后秸秆纤维素降解效率低的问题。因而,本试验研究黄绿木霉菌、绿色木霉菌与毛壳菌菌株混合培养后不同纤维素酶的变化以及对降解大豆秸秆粉纤维素、半纤维素的影响,明确混合培养的可行性与降解能力,以期为大豆秸秆还田中纤维素降解复合菌的具体应用提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 黄绿木霉(*Trichoderma aureoviride*)和绿色木霉(*Trichoderma viride*),实验室保存;角毛壳菌(*Chaetomium cupreum*),哈尔滨工业大学惠赠;商业菌剂购自淘宝网。

1.1.2 培养基 马铃薯蔗糖培养基(PDA):马铃薯 200 g,蔗糖 20 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 自然,121℃灭菌 20 min。

固体产酶培养基:3 g 稻草粉,2 g 麸皮,以豆饼为氮源,1.0%硫酸铵溶液 10 mL,121℃灭菌 20 min。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化与孢悬液制备 将不同菌株接种 PDA 平板,培养 4~5 d 产孢后,用无菌水洗下孢子,

制成孢悬液,浓度约为 5×10^6 个 \cdot mL⁻¹,待用。

1.2.2 固体发酵不同菌株酶活测定 将上述不同菌株与 3 菌株同体积的混合孢悬液均按照 3% 的比例接入到固体发酵培养基中,每处理 5 次重复,27℃ 恒温培养箱发酵后 540 nm 处检测不同纤维素酶活。

(1)粗酶液获得

将培养好不同处理三角瓶中加入 50 mL 蒸馏水,于 37℃ 恒温水浴 1 h,每隔 15 min 摇动一次,4 000 r \cdot min⁻¹离心 5 min,上清液即为粗酶液。

(2)酶活测定方法

适当稀释后利用 DNS 法分别测定滤纸酶(FPA 酶)活性,棉花酶(CI 酶)活性,羧甲基纤维素钠(CMC-Na)酶(Cx 酶)活性。

FPA 酶活力的测定:于预热后的试管中加入滤纸条 50 mg(新华定量滤纸,约 1 cm \times 6 cm),50℃ 水浴中保温 1 h 后取出立即加入 1.5 mL DNS 溶液以终止酶反应,充分摇匀后沸水浴 5 min,取出冷却后用蒸馏水定容至 20 mL,充分混匀,以灭活的粗酶液为空白对照调零,测定 OD 值。

CI 酶活力的测定:于预热后的试管中加入脱脂棉 50 mg,45℃ 水浴中保温 24 h 后立即终止酶反应,测定 OD 值(具体操作方法同 FPA 酶的活力测定)。

Cx 酶活力的测定:于预热后的试管中加入 1 mL 利用缓冲液配置的 1% CMC-Na,50℃ 水浴中保温 30 min 后取出,立即终止酶反应,测定 OD 值(具体操作方法同 FPA 酶的活力测定)。

酶活力单位(U):采用国际酶活单位,与葡萄糖标准曲线对照,以 1 mL 酶液每分钟转化底物生成 1 μ g 葡萄糖所对应的酶活定义为一个酶活单位。

1.2.3 混合菌剂在大豆秸秆降解中的应用

(1)对降解秸秆中纤维素、半纤维素的影响

大豆秸秆粉的处理:取茎秆基部第一节粗细相当的烘干大豆秸秆,用剪枝剪剪成 5 cm 小段后,利用粉碎器打碎,取出粉末过 40 目筛后混匀,待用。

将混合菌孢悬液和商业菌剂按 2% 比例接种于装有 5.0 g 大豆秸秆粉的三角瓶中,含水量为 60%~70%,发酵 30 d。设置不添加菌剂的对照组(CK),每处理 3 次重复。采用差重法^[27]测定发酵前后大豆秸秆粉中纤维素、半纤维素含量的变化。

(2)大豆秸秆翻埋试验

试验于赵光农场试验地进行,于当年 5 月埋入秸秆袋。利用剪枝剪将粗度相对均匀的大豆秸秆剪成长度为 3 和 5 cm 的两种长度,分别混合均匀后,装入 30 cm \times 35 cm 的尼龙袋中,进行浸渍混合菌剂(孢子含量为 3.5×10^6 cfu \cdot mL⁻¹)与浸渍水处理(CK),然后分别埋入地下 10,20 与 25 cm。其中

翻埋 10 cm 的秸秆装量为 30.0 g,翻埋 20 cm 的秸秆装量为 15.0 g,翻埋 25 cm 的秸秆装量为 8.0 g,翻埋地处理方法如下:

人工挖出距地面 10,20 与 25cm 的长方形地块,交错排列。将装好秸秆并经腐解剂处理的尼龙袋随机排布,每处理 3 次重复(图 1)。



图 1 大豆秸秆翻埋处理

Fig. 1 Treatment of bury soybean straw

处理后 10 月末取出翻埋的秸秆经水浸泡 48 h 并烘干,利用烘干前后重量变化测定秸秆降解率,利用茎秆强度测定仪(YD-1)对大豆秸秆的抗折强度与穿刺强度进行测定,以 Kg 为剂量单位,并利用

显微镜观察秸秆表面状态。
$$\text{秸秆降解率}(\%) = (\text{翻埋前重量} - \text{翻埋后并浸泡的重量}) / \text{翻埋前重量} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 混合发酵对固体培养条件下产纤维素酶的影响

2.1.1 混合发酵对 Cl 酶的影响 由图 2 可知,不同处理的 Cl 酶活性变化趋势较一致,均为先升高后下降,且以发酵 3 d 后的酶活性为最高;混合菌发酵该酶活性为 454.3 U,高于其它 3 种菌单独发酵;单独发酵中的绿色木霉菌处理组显著高于黄绿木霉和毛壳菌处理,以毛壳菌处理的酶活性最低但相对稳定。混合发酵处理的 Cl 酶活性提高效果显著,发酵 1 d 后混合菌发酵的 Cl 酶活性较绿色木霉单独发酵可提高 1.03 倍,尽管发酵 4 与 6 d 后酶活性稍有下降,但混合菌发酵仍高于单独培养,较绿色木霉菌单独培养时 Cl 酶活性分别提高 10.1% 和 9.8%。

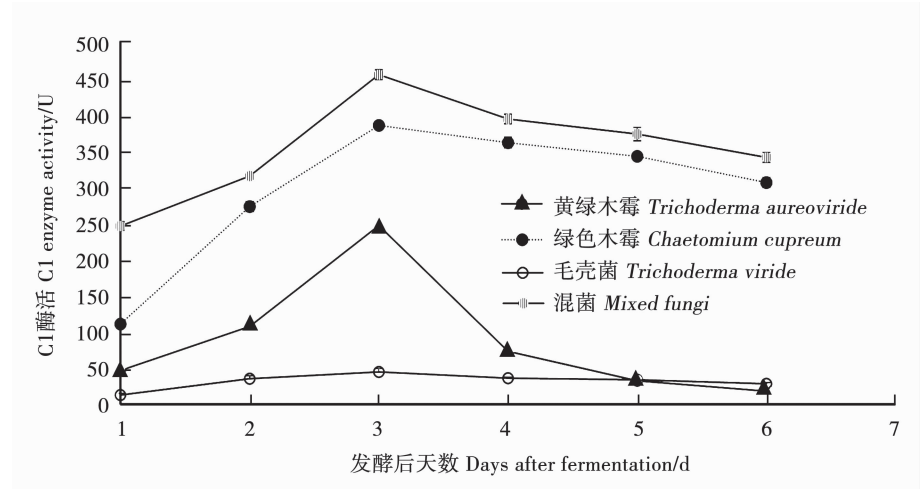


图 2 不同菌株发酵棉花酶活性

Fig. 2 Cl enzyme activity of different strain after fermentation

2.1.2 混合发酵对 Cx 酶的影响 由图 3 可知,混菌与黄绿木霉菌及绿色木霉菌处理的 Cx 酶活性均是先升高后下降的变化趋势,但不同处理酶活性高峰出现时间不完全一致,混菌与黄绿木霉菌处理的出现在发酵 4 d 后,绿色木霉菌处理的出现在 3 d 后;相对的毛壳菌处理从发酵 2 d 后开始升高,随后几天的酶活性变化比较稳定。不同处理中,混合菌发酵的 Cx 酶活性显著高于单独菌种发酵处理,发酵 4 d 后混合发酵该酶活性为 495.12 U,较黄绿木霉菌处理高 58.3%;不同菌株单独发酵产酶能力不同,单独发酵的菌种中以黄绿木霉菌能力较强,而绿色木霉和毛壳菌能力均较弱,结果证实混合培养

后可明显提高 Cx 酶活性(图 3)。
2.1.3 混合发酵对 FPA 酶的影响 从图 4 可以看出,不同处理间 FPA 酶变化趋势与 Cx 酶相似,仍以混合发酵处理该酶活性最高,为 385.1 U,同时相对维持高酶活性时间较长,即在发酵后 2~4 d 时该酶活性相对稳定。不同菌株单独发酵该酶活性测定结果与上述两种酶活稍有不同,其中绿色木霉与黄绿木霉的产酶能力均较强,绿色木霉处理该酶在发酵后 2 d 产酶能力开始提升,黄绿木霉处理该酶产酶高峰出现在发酵后 4 d,但毛壳菌产酶能力相对较弱且平稳。

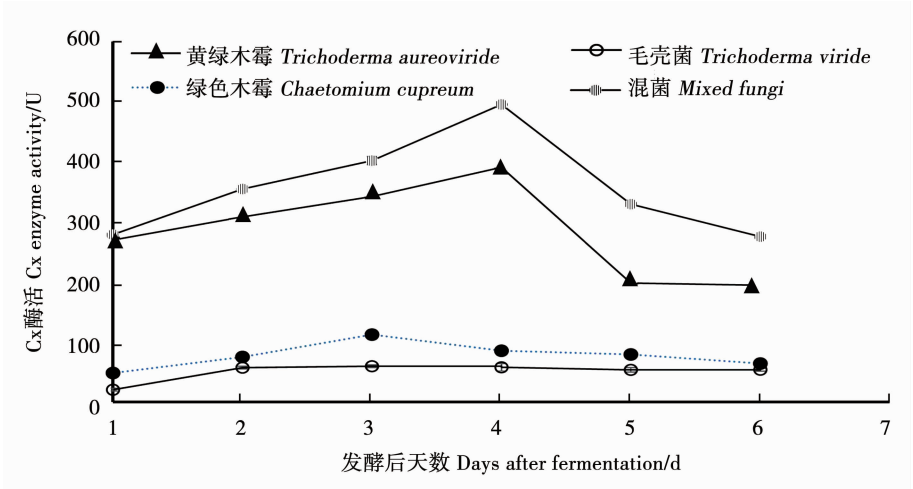


图3 不同菌株发酵羧甲基纤维酶活性

Fig. 3 Cx enzyme activity of different strain after fermentation

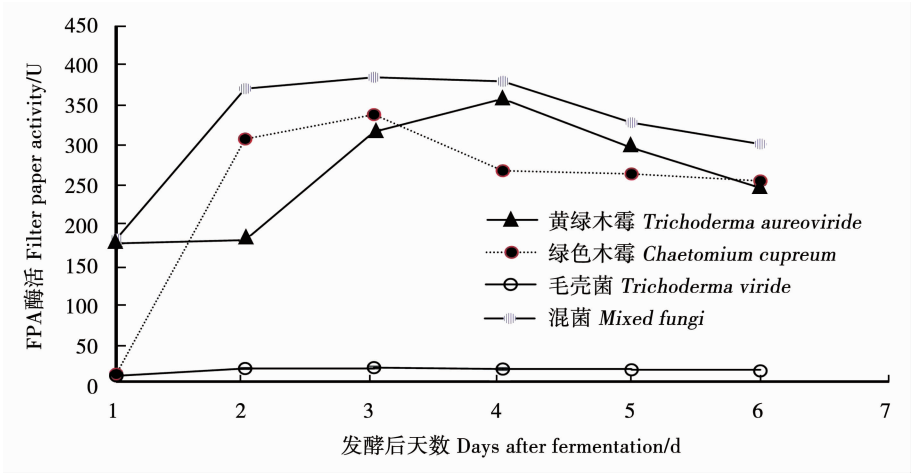


图4 不同菌株发酵滤纸酶活性

Fig. 4 FPA enzyme activity of different strain after fermentation

2.2 混合发酵对降解大豆秸秆纤维素、半纤维素的影响

由表1可知,处理30 d后混菌处理与商业菌剂处理的大豆秸秆粉纤维素与半纤维素含量均较低,分别为16.25%、18.56%和10.45%、12.34%,二者

无显著差异,但与空白对照处理下纤维素与半纤维素含量(44.56%和44.52%)相比均差异显著;混菌处理的纤维素与半纤维素降解率分别为66.71%与76.53%,高于市售腐解剂的61.98%与72.28%。

表1 发酵前后纤维素、半纤维素含量

Table 1 Cellulose and hemicellulose content before and after fermentation						(%)
处理 Treatment	纤维素含量 Cellulose content		纤维素降解率 Cellulose degradaton rate	半纤维素含量 Hemicellulose content		半纤维素降解率 Hemicellulose degradation rate
	0 d	30 d		0 d	30 d	
	混菌 Mixed bacteria		16.25 ±0.15 b	66.71 b		10.45 ±0.45 b
商业菌剂 Commercial inoculants	48.82 ±0.15	18.56 ±0.21 b	61.98 b	44.52 ±0.42	12.34 ±0.52 b	72.28 b
CK		44.56 ±0.96 a	8.73 a		38.76 ±0.79 a	12.94 a

不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。下同。
Different lowercase indicates significant difference(P<0.05). The same below.

2.3 腐解剂翻埋试验结果

2.3.1 翻埋不同深度及秸秆长度对降解率的影响

由表 2 可知,翻埋后的大豆秸秆不同处理间质量差别较大。不同翻埋深度中,以 10 和 20 cm 降解效果较好,25 cm 降解能力较弱。长度为 3 cm 的秸秆降解率高于长度为 6 cm 的秸秆。其中翻埋 10 cm

且长度 3 cm 的秸秆降解率最高。添加浸渍混合菌剂处理的大豆秸秆降解率高于浸渍水处理,不加菌剂的降解率不到 40%,添加菌剂后降解率可达 60% 以上;而翻埋深度为 25 cm 时,无论菌剂添加与否秸秆降解均未受到影响。

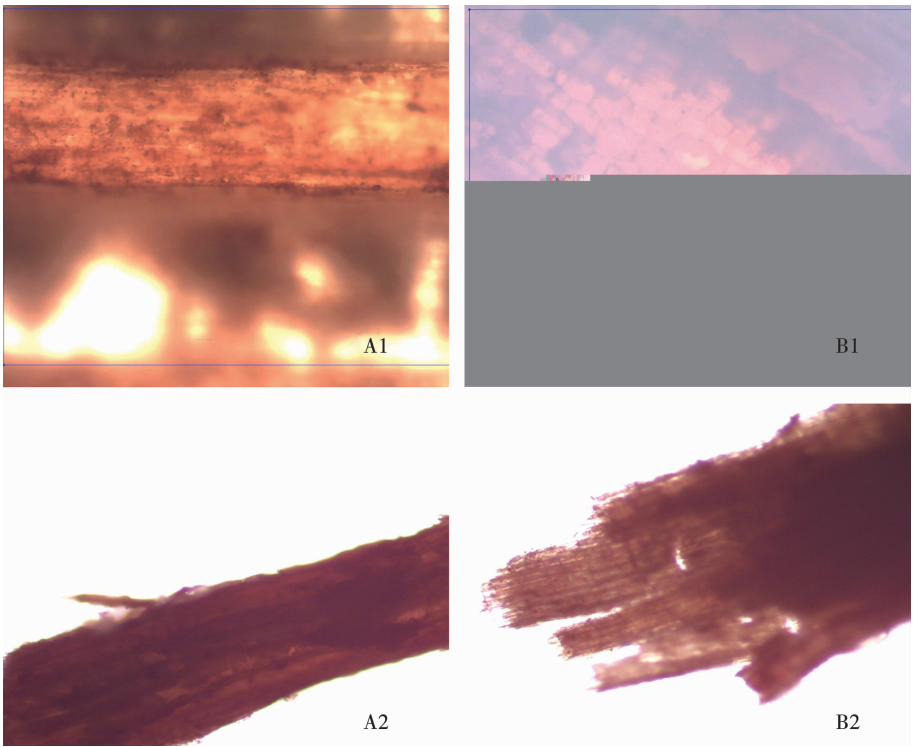
表 2 翻埋样品处理后秸秆重量及降解率

Table 2 Weight and degradation rate of bury straw after treatment

翻埋深度 Bury depth /cm	秸秆长度 Straw length/cm	混合菌剂处理 Treated by mixed fungi		CK	
		重量 Weight /g	降解率 Degradaton rate /%	重量 Weight /g	降解率 Degradaton rate /%
10	3	11.5 ±0.3 b	61.7 b	18.4 ±0.6 b	38.7 b
	6	12.3 ±0.5 a	59.0 a	20.1 ±0.7 a	33.0 a
20	3	6.5 ±0.3 b	56.7 b	10.5 ±0.5 b	30.0 b
	6	7.4 ±0.3 a	50.7 a	11.2 ±0.5 a	25.3 a
25	3	5.6 ±0.4 b	30.0 b	7.1 ±0.2 a	11.3 a
	6	6.5 ±0.4 a	18.8 a	7.2 ±0.3 a	10.0 a

2.3.2 翻埋处理对秸秆强度的影响 由图 5 可知,混合菌剂处理的秸秆颜色更深,且秸秆经手捻搓后变得非常易碎,已经很难有大的纤维存在,表明秸秆机械强度变弱,柔韧度变小,脆性较大且易碎。显微观察发现菌剂处理的秸秆组织清晰可见,经

YYD-1 茎秆强度测定仪对不同腐解的秸秆抗折强度与穿刺力进行测定,也证实了腐解剂处理后的秸秆强度与穿刺力均下降,且下降幅度可达 500% 以上(表 3),而穿刺力由于纤维结构破坏,埋在 10 和 20 cm 且添加菌剂的处理已经无法测量。



A1 和 A2:未处理的秸秆;B1 和 B2:菌剂处理的秸秆。
A1 and A2: Untreated straw; B1 and B2: The straw treated by mixed fungi.

图 5 豆秸翻埋处理与对照显微照片(40×10 倍)

Fig. 5 Micrograph of soybean straw with the treatment and control (40×10 times)

表3 翻埋样品处理后秸秆强度与穿刺力

Table 3 Strength and piercing force of bury straw after treatment

翻埋深度 Bury depth /cm	秸秆长度 Straw length /cm	翻埋前 Before bury		菌剂处理后 Microbial agent treatment		CK	
		强度	穿刺力	强度	穿刺力	强度	穿刺力
		Strength/Kg	Piercing force/Kg	Strength/Kg	Piercing force/Kg	Strength/Kg	Piercing force/Kg
10	3	25.38±0.54 a	9.25±0.32 a	2.35±0.16 a	—	10.4±0.27 a	3.56±0.25 a
	6	26.59±0.49 a	8.42±0.35 a	3.12±0.21 a	—	11.5±0.34 a	4.13±0.28 a
20	3	26.47±0.58 a	8.43±0.28 a	4.57±0.23 b	—	13.97±0.26 ab	6.63±0.32 bc
	6	24.29±0.59 a	8.52±0.36 a	4.74±0.25 b	—	14.45±0.32 b	6.42±0.31 c
25	3	26.63±0.48 a	8.21±0.22 a	14.3±0.32 c	1.74±0.22 a	20.32±0.35 c	7.52±0.41 c
	6	24.39±0.53 a	9.16±0.32 a	16.7±0.22 c	2.56±0.31 b	22.65±0.31 c	7.33±0.39 c

“—”表示数据无法测量。
“—” indicates the data can not be measured.

3 讨论

天然纤维素有结晶区和非结晶区,结构致密难被水解,而自然界中存在种类繁多的纤维素降解微生物,其中的好氧真菌可以分泌胞外纤维素酶实现纤维素降解^[28]。真菌的纤维素酶系复杂,主要的研究模型以里氏木霉为主,研究证实主要酶类有内切酶(*EG I-EG V*)、外切酶(*CBH I*和*CBH II*)和β-葡糖苷酶(*BGL I*和*BGL II*)^[29-30]。不同真菌不同纤维素酶系的含量不完全一致,同属真菌不同种的菌株之间纤维素酶活性差异也较大,在对曲霉属、青霉属、木霉属等的研究中已经证实,不同菌株对不同底物降解能力不同,在纤维素降解中可通过不同酶协同水解完成降解过程^[7,10-11,28]。试验中在对3种不同菌株测定纤维素酶活时也证实了这一点,且相对的毛壳菌的几种酶活性均较低,但考虑到黄绿木霉与毛壳菌对不同病原微生物的拮抗能力不完全一致,在后续试验中将3种不同菌进行混合发酵。

秸秆是主要的农业废弃物,也是可再生的资源,因而一直是研究的热点。在秸秆纤维素降解方面的研究主要集中于高纤维素酶活力菌株的选育、发酵工艺的优化及混合发酵等方面^[12-17,31]。不同学者对黑曲霉与木霉、多种纤维降解复合菌系的混菌发酵等进行了研究,证实混菌与传统的利用单一菌种发酵纤维素材料相比,具有降解率高、发酵时间短等特点^[16,20],这与试验中获得的结果较一致,本研究通过复合黄绿木霉、绿色木霉与毛壳菌,测定棉花酶活性、滤纸酶活性与羧甲基纤维素酶活性证实混菌的3种纤维素酶活性均高于单一菌株发酵,且相对高酶活维持时间有延长的趋势。

为了更好地完成秸秆的有效降解,一些学者在分离降解微生物时从秸秆本体出发选择合适的微生物来源^[17],并通过进一步测定纤维素、半纤维素含量变化研究腐解菌的降解效果^[31]。本研究的3

株菌主要特性为具有生物防治能力,尽管并非来源于大豆秸秆,但已证实具有纤维素分解能力,故又采用大豆秸秆为材料,研究混菌发酵对其纤维素与半纤维素含量的影响,结果进一步证实了混菌对大豆秸秆的降解效率,为混合菌株的进一步应用提供了技术支持。

4 结论

黄绿木霉、绿色木霉和角毛壳菌以麸皮、稻草为固体发酵基质进行混菌发酵产生纤维素酶能力优于单菌株单独发酵,混菌发酵液处理下其滤纸酶活性、棉花酶活性与纤维素酶活性均最高,且在大豆秸秆粉降解中纤维素、半纤维素含量下降较大,添加混合菌剂的翻埋后大豆秸秆的茎秆强度和穿刺力均下降,降解率提高,证明黄绿木霉、绿色木霉、角毛壳菌的混菌发酵液在秸秆降解中复合应用的可行性,此研究结果的获得可以为大豆秸秆还田提供有益微生物资源。

参考文献

[1] 宋大利,侯胜鹏,王秀斌,等. 中国秸秆养分资源数量及替代化肥潜力[J]. 植物营养与肥科学报, 2018, 24(1): 1-21. (Song D L, Hou S P, Wang X B, et al. Nutrient resource quantity of crop straw and its potential of substituting[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizers, 2018, 24(1): 1-21.)

[2] 李逢雨,孙锡发,冯文强,等. 麦秆、油菜秆还田腐解速率及养分释放规律研究[J]. 植物营养与肥科学报, 2009, 15(2): 374-380. (Li F Y, Sun X F, Feng W Q, et al. Nutrient release patterns and decomposing rates of wheat and rapeseed straw[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2009, 15(2): 374-380.)

[3] 唐萍. 秸秆综合利用方案评价—以肥东县为例[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2010. (Tang P. Evaluation of mproposals of straws comprehensive utilization; For example of county of Feidong[D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2010.)

[4] 花莉,张成,马宏瑞,等. 秸秆生物炭土地利用的环境效益研究[J]. 生态环境学报, 2010, 19(10): 2489-2492. (Hua L, Zhang C, Ma H R, et al. Environmental benefits of biochar

- made by agricultural straw when applied to soil[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2010, 19(10): 2489-2492.)
- [5] 曹志宏, 黄艳丽, 郝晋珉. 中国作物秸秆资源利用潜力的多适宜性综合评价[J]. 环境科学研究, 2018, 31(1): 179-186. (Cao Z H, Huang Y L, Hao J M. Multi-suitability comprehensive evaluation of crop straw resource utilization in China[J]. Research of Environmental Sciences, 2018, 31(1): 179-186.)
- [6] Madari B, Machado P L O A, Torres E, et al. No tillage and crop rotation effects on soil aggregation and organic carbon in a Rhodic Ferralsol from southern Brazil[J]. Soil and Tillage Research, 2005, 80(1-2): 185-200.
- [7] Zhang Y H P, Himmel M E, Mielenz J R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies[J]. Biotechnology Advances, 2006, 24(5): 452.
- [8] Abdulla H M, El-Shatoury S A. Actinomycetes in rice straw decomposition[J]. Waste Management, 2007, 27(6): 850-853.
- [9] Ma H, Liu W W, Liu P, et al. Enhanced enzymatic saccharification of rice straw by microwave pretreatment[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(3): 1279-1284.
- [10] Lundell T K, Mkel M R, Hildén K. Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes: Ecological, functional and phylogenetic review[J]. Journal of Basic Microbiology, 2010, 50: 5-20.
- [11] Fang X, Qin Y Q, Li X Z, et al. Progress on cellulase and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass[J]. Biotechnology, 2010, 26(7): 864-869.
- [12] 张国秀. 里氏木霉纤维酶高产菌株遗传改造及新型糖苷水解酶的挖掘[D]. 上海: 华东理工大学, 2017. (Zhang G X. Genetic modification of trichoderma reesei Hyper-cellulolytic mutant and mining for new glycoside hydrolases[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2017.)
- [13] 李洪林, 刘凤艳, 龚振平, 等. 稻秆还田对水稻主要病害发生的影响[J]. 作物研究, 2012, 26(1): 7-10. (Li H L, Liu F Y, Gong Z P, et al. Effect of straw return back to paddy field on occurrence of rice major disease[J]. Crop Research, 2012, 26(1): 7-10.)
- [14] 张雪松, 曹全胜, 曹克强. 保护性耕作与小麦主要土传病害问题和治理对策[J]. 西北农林科技大学学报, 2005, 33(S1): 47-48. (Zhang X S, Cao Y S, Cao K Q. Management of wheat soil-borne diseases under the conservative farming system [J]. Journal of Northwest Science and Technology University of Agricultural and Forestry (Natural Science Edition), 2005, 33(S1): 47-48.)
- [15] 孙秀娟. 稻秆集中掩埋还田对赤霉病菌(*Fusarium graminearum* Sehwa)和二化螟(*Chilo suppressalis* Walker)幼虫存活的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2012. (Sun X J. Effects of straw centralize-buried in soil on suetval dynamics of phytoalexin (*Fusarium graminearum* Sehwa) and stem-borer (*Chilo suppressalis* Walker) larvae[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012.)
- [16] 方诩, 秦玉琪, 李雪芝, 等. 纤维素酶与木质纤维素生物降解转化的研究进展[J]. 生物工程学报, 2010, 26(7): 864-869. (Fang X, Qin Y Q, Li X Z, et al. Progress on cellulase and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2010, 26(7): 864-869.)
- [17] 孙美娜, 张凡凡, 王永强, 等. 棉花秸秆纤维素降解菌的筛选鉴定与降解棉秆效果研究[J]. 新疆农业科学, 2018, 55(1): 16-23. (Sun M N, Zhang F F, Wang Y Q, et al. Screening and identification of cellulolytic strains from cotton straw and its effect on degradation of cotton stalk[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2018, 55(1): 16-23.)
- [18] Baldrian P, Valof P. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2008, 32(3): 501-502.
- [19] Adsul M, Bastawde K, Varma A, et al. Strain improvement of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 for increased cellulose production[J]. Bioresource Technol, 2007, 98(7): 1467-1473.
- [20] 方星星. 里氏木霉与黑曲霉混合发酵产纤维素酶的研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2012. (Fang X X. Study on cellulase production by mixed fermentation of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger*[D]. HeFei: Hefei University of Technology, 2012.)
- [21] 孙冬梅, 杨谦, 宋金柱, 等. 黄绿木霉固定化生产纤维素酶及酶学特性的研究[J]. 林产化学与工业, 2006, 26(2): 79-82. (Sun D M, Yang Q, Song J Z, et al. Studies on cellulase production by immobilized cells and characteristics of cellulase [J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2006, 26(2): 79-82.)
- [22] 孙冬梅, 杨谦, 张军政. 黄绿木霉诱变菌株对大豆根腐病镰刀菌的拮抗[J]. 大豆科学, 2005, 24(3): 171-175. (Sun D M, Yang Q, Zhang J Z. Antagonism of *Trichoderma aureoviride* mutant strain against *Fusarium* spp. the pathogen of soybean root rot[J]. Soybean Science, 2005, 24(3): 171-175.)
- [23] 孙冬梅, 杨谦, 宋金柱. 黄绿木霉菌对大豆根腐病镰刀菌的拮抗作用[J]. 中国油料作物学报, 2005, 27(3): 59-63. (Sun D M, Yang Q, Song J Z. Antagonism of *Trichoderma aureoviride* against *Fusarium* spp which causes soybean root rot [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2005, 27(3): 59-63.)
- [24] 张海燕, 杨谦. 角毛壳菌产纤维素酶条件的研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2006, 27(4): 15-18. (Zhang H Y, Yang Q. Study on cellulase ferment production of *Chaetomium cupreum*[J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2006, 27(4): 15-18.)
- [25] 张海燕, 杨谦. 角毛壳菌生物防治相关基因的筛选[J]. 中国生物防治, 2007, 23(2): 191-194. (Zhang H Y, Yang Q. Selection of biocontrol-related genes from *Chaetomium cupreum* [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2007, 23(2): 191-194.)
- [26] Lan T Q, Wei D, Yang S T, et al. Enhanced cellulase production by *Trichoderma viride* in a rotating fibrous bed bioreactor[J]. Bioresource Technology, 2013, 133: 175-182.
- [27] 唐国涛, 邢沙沙, 黄榕彬, 等. 脂麻秆中纤维素与半纤维素的含量测定[J]. 作物研究, 2012, 26(1): 53-55. (Tang G T, Xing S S, Huang R B, et al. Determination of content of cellulose and hemicellulose in stem of *Sesamum indicum* [J]. Crop Research, 2012, 26(1): 53-55.)
- [28] 杨腾腾, 周宏, 王霞, 等. 微生物降解纤维素的新机制[J]. 微生物学通报, 2015, 42(5): 928-935. (Yang T T, Zhou H, Wang X, et al. A new microbial strategy for cellulose degradation [J]. Microbiology China, 2015, 42(5): 928-935.)
- [29] Beguin P, Aubert J P. The biological degradation of cellulose[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1994, 13(1): 25-58.
- [30] Dashthban M, Schraft H, Qin W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues, opportunities & perspectives [J]. International Journal of Biological Sciences, 2009, 5(6): 578-595.
- [31] 石娜娜, 顾颖慧, 郑颖, 等. 大豆秸秆纤维素降解菌的筛选及鉴定[J]. 农技服务, 2016, 33(1): 95-81. (Shi N N, Gu Y H, Zheng Y, et al. Screening and identification of cellulose degrading strains of soybean straw [J]. Agricultural Service, 2016, 33(1): 95-81.)