

稻秆纤维素降解菌的分离筛选和降解性能研究

顾 挺, 申卫收, 钟文辉

(南京师范大学 环境科学与工程系, 江苏 南京 210046)

[摘要] 从种稻红壤中分离微生物菌株,经紫外诱变后得到了 3 株高效的稻秆纤维素降解菌株,分别为细菌 YB20、真菌 F9 和 YF15。经鉴定,菌株 YB20 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* sp.),菌株 F9 和 YF15 均为绿色木霉(*Trichoderma viride* sp.)。对 3 株纤维素降解菌株产酶特性进行了初步研究,确定了菌株的最佳产酶条件,菌株 YB20、F9 和 YF15 的胞外羧甲基纤维素(CMC)酶活性高达 2.67、2.78 和 3.56 (mg/mL)·30 min。产酶稳定性试验表明,菌株 YB20、F9、YF15 的 CMC 酶活性均具有较好的稳定性。纤维素降解菌剂培养试验结果表明,3 株菌混合培养对秸秆腐解具有较好的协同效应,稻秆腐解率可达到 35.02%,比对照提高了 4.43 倍。大田应用试验显示,与不施用菌剂的对照相比,施用纤维素降解菌剂在一定程度上提高了晚稻产量。

[关键词] CMC 酶活性,稻秆,红壤,秸秆腐解,纤维素

[中图分类号] Q939.96; X712 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-4292(2011)01-0073-07

Isolation, Screening and Capability of Cellulose-Degrading Strains for Rice Straw

Gu Ting, Shen Weishou, Zhong Wenhui

(Department of Environmental Science and Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

Abstract: Three high-efficient cellulose-degrading strains were isolated and screened from the red soil of paddy field with the ultraviolet-induced mutation, including one bacterial strain named as YB20 and two fungal strains F9 and YF15. The strain of YB20 was characterized as a *Bacillus subtilis* sp, the strain F9 and YF15 were both characterized as *Trichoderma viride* sp. The optimum conditions for cellulase production by three strains were investigated, in which the highest carboxymethyl cellulose (CMC) enzyme activities of the strain YB20, the strain F9 and YF15 were 2.67, 2.78 and 3.56 (mg/mL)·30 min, respectively. The stability of CMC enzyme activities of three strains remained at a high level. There was obviously synergistic effect for straw decay, approximately 35.02% when three strains mixed together in the incubated experiment, with 5.43 times higher than the control. The application of cellulose-degrading microbial agents to the red soil of paddy field could to some extent improve rice yield compared with the control in a field plot experiment.

Key words: CMC enzyme activity, rice straw, red soil, straw decay, cellulose

我国红壤丘陵区水稻秸秆产量占该区作物秸秆总产量的 53.5%,比全国均值高出 21.4 个百分点^[1]。水稻秸秆含有大量的 C、N、P、K 以及丰富的 Ca、Mg、S、Cu、Zn 等营养元素,是极为重要的有机资源,合理还田可显著提高土壤肥力和土地生产力,例如秸秆还田能改善土壤物理、化学和生物学性状,增加土壤有机质含量,培肥土壤,增加作物产量等^[2-5]。但是,早稻秸秆还田存在腐熟速度较慢、影响晚稻插秧及根系生长等问题。秸秆的主要成分是纤维素,纤维素是葡萄糖以 β -1,4 糖苷键结合形成的高分子化合物,包括葡萄糖单位 2 000 至 10 000 个,须依靠纤维素酶类进行降解。秸秆腐熟的过程是秸秆中各类物质(尤其是纤维素)的酶解过程。解决问题的关键在于应用降解纤维素能力强的微生物,配合其他营养物质制成快速腐熟剂,在秸秆破碎、还田时施入快速腐熟剂,既能使秸秆在短时间内腐熟,不影响晚稻插秧、生长,又能节约化

收稿日期: 2010-11-02.

基金项目: 中国科学院知识创新工程重大项目(KSCX1-YW-09-08)、“十一五”国家科技支撑计划重点项目(2007BAD89B18, 2009BAD6B03)、南京师范大学“211 工程”重点学科建设项目(1843203623)。

通讯联系人: 钟文辉,博士,教授,研究方向: 环境微生物及生物技术。E-mail: zhongwenhui@njnu.edu.cn

肥用量、改善土壤性状、增加作物产量^[6]。

通过从江西鹰潭红壤稻田中采集土样、分离具有胞外羧甲基纤维素(CMC)酶活性的菌株,本研究旨在筛选到适用于红壤地区稻秆快速腐解的出发菌株,进一步制成稻秆快速腐熟剂,为实现早稻稻秆还田后快速腐熟提供理论和技术支撑;同时对这些高效降解菌株在实验室及田间的应用进行初步的评价。

1 材料与方 法

1.1 土壤样品采集

土壤样品采自位于江西鹰潭的中国科学院红壤生态实验站。取0~20 cm新鲜土样去除石子、植物根系等杂物后混匀并在4℃下保存。

1.2 培养基

本研究中用到的微生物培养基包括无机盐培养液^[7]、增殖培养基^[8]、分离筛选培养基^[9]、滤纸条培养基^[10]、稻秆液体发酵培养基配方^[11],均按照相关文献配制。

1.3 稻秆纤维素降解菌的分离、筛选与诱变

选取在分离筛选培养基上透明圈与菌落直径比值较大、且在滤纸条培养基中滤纸条溃烂显著的菌株,进行产酶发酵试验进一步复筛。选取复筛试验中纤维素降解酶活性较大的菌株进行紫外诱变^[12]。

1.4 纤维素降解酶活性测定

羧甲基纤维素(carboxymethyl cellulose, CMC)酶活性的测定采用3,5-二硝基水杨酸(DNS)法^[13],适用于细菌、真菌的纤维素降解活性的评价。纤维素酶水解纤维素产生的纤维二糖、葡萄糖等还原糖能将碱性条件下的3,5-二硝基水杨酸(DNS)还原,生成棕红色的氨基化合物,在520 nm波长处有最大光吸收,在一定范围内还原糖的量与反应液的颜色强度呈比例关系,利用比色法测定其还原糖生成的量就可测定纤维素酶的活力。滤纸酶(FPA酶)和天然纤维素酶活性的测定也采用DNS法,用于对经初筛后获得的活性较高的菌株进行进一步筛选(复筛)。

1.5 菌种鉴定

细菌生理生化指标测定与细菌DNA提取和纯化依据文献^[14]或生产商使用说明进行。以细菌16S rDNA的通用引物(BSF 8/20和BSR 1541/20)对菌株进行PCR扩增,将电泳获得的产物切胶纯化、测序。真菌首先从菌落、菌丝和孢子形态等特征进行初步鉴定;以真菌18S rDNA的通用引物(NS1 5'-GTAGT-CATATGCTTGCTC-3'和NS8 5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3')对菌株进行PCR扩增,将电泳获得的产物切胶纯化、测序^[15]。

1.6 菌株最佳产酶条件的研究

在稻秆液体发酵培养基中分别就培养时间、温度、培养基初始pH、接种量、碳源、氮源等不同条件对优势菌株产酶能力的影响进行研究,确定菌株的最佳产酶条件。

1.7 菌株产酶稳定性的研究

将菌株接种到斜面培养基(细菌斜面培养基为LB培养基,真菌斜面培养基为PDA培养基)上进行传代培养,连续传5代,5代菌株同时进行发酵产酶试验,每代菌株5个重复,检测菌株产酶活性的稳定性。

1.8 纤维素降解菌株接种培养实验

先将稻秆剪成5 cm左右的段,在烧杯底部(1 L)先加入约5 cm厚的细土,中间加入烘干后接菌、浸水的稻秆4 g,喷洒发酵菌悬液,再在稻秆上方加入约5 cm厚的细土,稍压后,置于37℃和30℃培养箱中培养,观察稻秆的腐解情况并于15 d后测定其干物质的质量变化^[16],主要通过观察稻秆颜色及拉伸强度的变化,判断稻秆的腐解程度,稻秆干物质的质量变化通过万分之一天平测定。接菌、浸水稻秆的配制过程如下:稻秆与水的质量比为1:2,加入1%的蔗糖、1%的尿素,再接入1%的菌种拌匀。

共设计8个处理,每个处理3个重复:(1)不灭菌红壤对照;(2)灭菌红壤对照;(3)灭菌红壤加菌株YB20发酵菌悬液;(4)灭菌红壤加菌株F9发酵菌悬液;(5)灭菌红壤加菌株YF15发酵菌悬液;(6)灭菌红壤加菌株YB20、F9发酵菌悬液;(7)灭菌红壤加菌株YB20、YF15发酵菌悬液;(8)灭菌红壤加菌株YB20、F9、YF15发酵菌悬液。

1.9 纤维素降解菌株大田应用实验

将筛选好的3株可降解稻秆纤维素的优良菌株制成菌剂,应用于试验田. 试验小区面积60.9 m²,水稻品种为淦鑫688. 在田间由收割机收获、翻耕作业后将早稻稻秆破碎直接还田. 稻秆纤维素降解菌剂施用量为82.5 kg/hm²,同时配合施用复合肥(尿素型,总养分≥30%,养分比例N:P₂O₅:K₂O=15:6:9),用量为328.5 kg/hm²,在晚稻抛秧前施用. 插秧、水肥及农药管理均为当地常规管理.

2 结果与分析

2.1 纤维素降解菌的初步分离

在分离培养基上初步分离得到20株细菌(代号B)和11株真菌(代号F),分别编号为菌株B1~B20和菌株F1~F11. 经测定,各初筛试验菌株均能不同程度地分解纤维素,其中菌株B2、B3、B4、B16、B17、F1、F5、F9的CMC酶活性较高,对该8株菌株进行复筛产酶试验,结果显示,菌株B3和F9的CMC酶、FPA酶和天然纤维素酶的活性(表1)均明显高于其他菌株,因此选择菌株B3和F9作为出发菌株,进行紫外诱变.

2.2 纤维素降解菌株诱变筛选

以菌株B3和F9为出发菌株,经紫外诱变后,分别筛选得到23株细菌(分别命名为YB1~YB23)和15株真菌(分别命名为YF1~YF15)突变菌株. 产酶发酵试验结果显示,菌株YB20、YF15的酶活性有较大提高,CMC酶活性分别为2.538、3.504(mg/mL)·30 min,比菌株B3和F9的CMC酶活性分别提高了26.3%和32.9%. 综合考虑,选择菌株YB20、F9、YF15为出发菌株,进行产酶条件的优化.

2.3 纤维素降解菌种鉴定

菌株YB20在LB平板上的菌落呈乳黄色,革兰氏阴性,细胞形态为杆状、无鞭毛、不运动、产芽孢. 测序结果表明,菌株YB20与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的16S rDNA序列的相似率达99%. 结合菌株形态和生理生化特性(表2),可初步鉴定该菌为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* sp.).

在30℃下菌株F9、YF15在PDA平板培养基上生长旺盛,菌丝较发达,有孢子,菌落外围为白色. 菌株F9菌落内部为绿色孢子,而菌株YF15菌落中间有白色菌丝,菌丝长3.05~12.25 mm,有分枝. 结合测序结果,鉴定菌株F9、YF15均为绿色木霉(*Trichoderma viride*).

2.4 纤维素降解菌性能和降解条件

2.4.1 培养对菌株产酶的影响

将菌株YB20、F9、YF15接入稻秆液体发酵培养基中,在37℃、180 r/min恒温振荡培养,菌株YB20每隔12 h,菌株F9、YF15每隔1 d取样测CMC酶活性,结果如图1、图2所示. 菌株YB20在前60 h内酶活性上升较快,而菌株F9、YF15的酶活性均在第3 d到第7 d期间快速上升. 菌株YB20、F9、YF15的酶活性分别在72 h、7 d、7 d达到最大值,随后活性略有降低.

2.4.2 培养温度、pH对菌株产酶的影响

调整菌株YB20、F9、YF15产酶的温度为20℃~45℃,pH为4.0~10.0,在稻秆液体发酵培养基上(菌株YB20培养72 h,菌株F9、YF15培养7 d),考察温度、pH对菌株产酶的影响. 由图3、图4可见,菌株YB20、F9、YF15产酶的最适温度均为30℃,最适pH分别为7.0、5.0和6.0.

2.4.3 接种量对菌株产酶的影响

选择接种量在1%~5%之间测定CMC酶活性,实验发现,菌株YB20、F9、YF15分别在接种量为3%、

表1 稻秆液体发酵培养基中各复筛试验菌株的酶活性

Table 1 Enzyme activities of re-screened strains in straw liquid ferment culture media

菌株	CMC 酶	FPA 酶	天然纤维素酶
	(mg/mL) · 30 min	(mg/mL) · h	(mg/mL) · d
B2	1.639	0.859	0.136
B3	2.009	1.719	0.425
B4	1.366	0.806	0.284
B16	1.486	0.780	0.108
B17	1.511	0.754	0.228
F1	1.490	0.743	0.238
F5	1.776	0.981	0.336
F9	2.636	2.124	0.673

表2 菌株YB20生理生化鉴定结果

Table 2 Physiological and biochemical identification result of YB20

项目	结果	项目	结果
甲基红	阴性	葡萄糖氧化发酵	发酵型
硫化氢	阳性	淀粉水解	阳性
V-P 试验	阳性	酒石酸盐利用	阳性
接触酶	阳性	柠檬酸盐利用	阴性
明胶液化	阴性	乙酸氧化	阳性

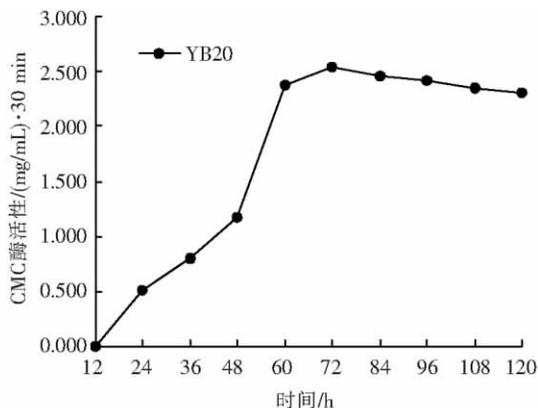


图 1 不同培养时间对菌株 YB20 产酶的影响

Fig.1 Effect of incubation time on CMC enzyme activities of strain YB20

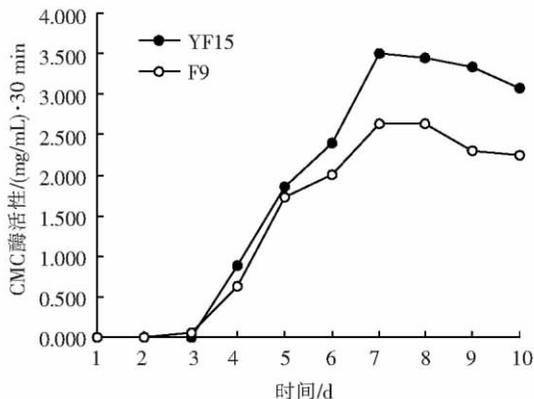


图 2 不同培养时间对菌株 F9、YF15 产酶的影响

Fig.2 Effect of incubation time on CMC enzyme activities of strain F9 and YF15

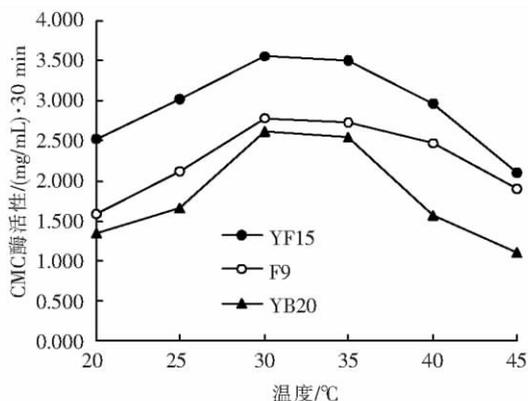


图 3 不同培养温度对菌株产酶的影响

Fig.3 Effect of incubation temperature on CMC enzyme activities of strains

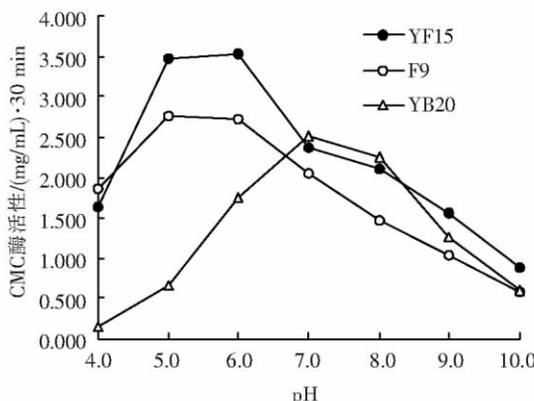


图 4 初始 pH 对菌株产酶的影响

Fig.4 Effect of initial pH on CMC enzyme activities of strains

2%、2%时最有利于产酶(如图 5 所示)。而过高或过低的接种量效果都不好,原因是接种量过低菌体繁殖慢,产酶量降低;接种量过高,由于菌体的快速繁殖,会导致营养物的竞争及溶解氧浓度低下,菌株活力下降,从而使产酶量降低。

2.4.4 碳源、氮源对菌株产酶的影响

菌株 YB20、F9、YF15 分别以 20 g/L 的葡萄糖、可溶性淀粉、大豆粉、木屑、CMC-Na、稻秆粉为不同的碳源;2 g/L 的牛肉膏、蛋白胨、酵母膏、硫酸铵、氯化铵、硝酸钾、硝酸铵和尿素为不同的氮源进行发酵产酶试验,于 37℃ 分别培养 72 h 与 7 d,测定菌株的产酶量。结果显示,所选 6 种碳源中,稻秆粉能促进菌株 CMC 酶的分泌(如图 6 所示);菌株 YB20、F9、YF15 均能较好地利用有机氮作为氮源,蛋白胨作氮源时菌株 YB20、YF15 的产酶能力最强,而菌株 F9 产酶能力最强时的氮源为牛肉膏(如图 7 所示)。

2.4.5 纤维素降解菌株产酶的稳定性

将菌株 YB20、F9 和 YF15 分别接种到 LB 斜面培养基与 PDA 斜面培养基上进行传代培养,连续转接 5 代,将 5 代菌株同时进行发酵产酶试验。结果表明,菌株 YB20、F9 和 YF15 的 CMC 酶活性没有随着传代次数的增加而出现明显降低,表现出具有较好的稳定性。

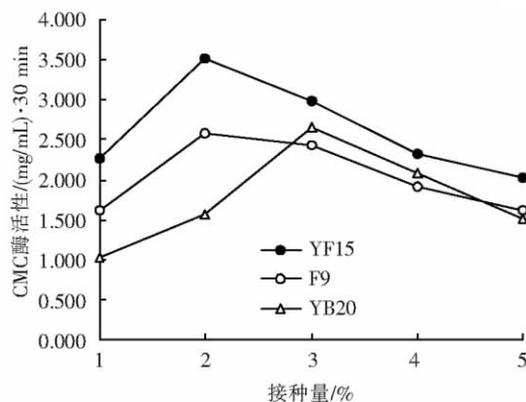


图 5 接种量对菌株产酶的影响

Fig.5 Effect of inoculation volume on CMC enzyme activities of strains

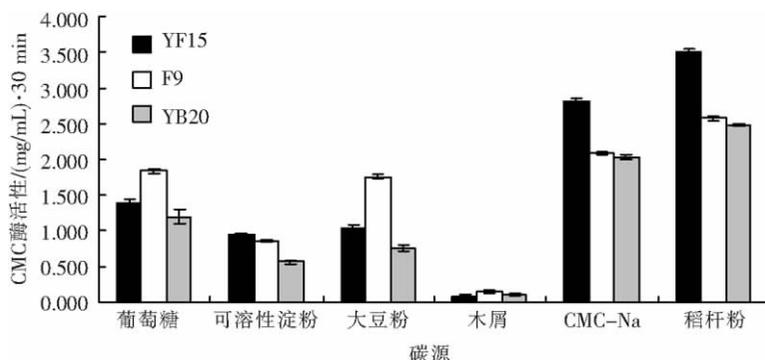


图 6 碳源对菌株产酶的影响

Fig.6 Effect of carbon sources on CMC enzyme activities of strains

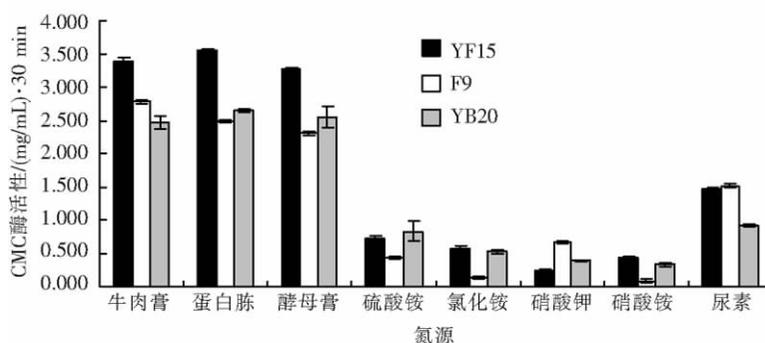


图 7 氮源对菌株产酶的影响

Fig.7 Effect of nitrogen sources on CMC enzyme activities of strains

2.5 纤维素降解菌株接种培养

以菌株 YB20、F9、YF15 为出发菌株,共设计 8 个处理:(1) 不灭菌红壤对照;(2) 灭菌红壤对照;(3) 灭菌红壤加菌株 YB20 发酵菌悬液;(4) 灭菌红壤加菌株 F9 发酵菌悬液;(5) 灭菌红壤加菌株 YF15 发酵菌悬液;(6) 灭菌红壤加菌株 YB20、F9 发酵菌悬液;(7) 灭菌红壤加菌株 YB20、YF15 发酵菌悬液;(8) 灭菌红壤加菌株 YB20、F9、YF15 发酵菌悬液.结果显示,与对照处理相比,在加入单菌和不同菌株组合的各处理中,稻秆的降解率均有不同程度的提高(如表 3 所示);稻秆降解率的变化趋势为三菌组合 > 两菌组合 > 单菌及未接种对照.不同处理中稻秆在 37℃ 时降解 15 d 之后的降解率均高于 30℃ 时的水平;各单菌处理中,37℃ 时真菌对稻秆的降解效果明显优于细菌,而在 30℃ 时以上 3 种处理的降解效果却差别不大;两菌组合处理中,菌株 YB20 + YF15 的降解效果优于 YB20 + F9.37℃ 时,3 株菌株混合培养发酵对稻秆的降解效果最为明显,稻秆颜色发黑,且表面有纤维类物质脱落,降解率分别是对照处理 1 和对照处理 2 的 5.43 倍和 5.90 倍,达到 35.02%. 此结果表明真菌与细菌的混合培养对稻秆降解具有更大的协同效应.

表 3 保温降解 15 d 后不同处理的稻秆降解率

Table 3 Degradation rate of straw under different treatments after 15 days

处理	37℃ 稻秆降解率/%	30℃ 稻秆降解率/%
1	6.45	6.16
2	5.94	4.42
3	7.38	6.07
4	10.56	6.67
5	15.08	6.00
6	18.39	7.75
7	20.12	10.58
8	35.02	17.15

2.6 纤维素降解菌剂大田应用实验

与对照相比,使用纤维素降解菌剂在一定程度上提高了水稻产量.施用商品化菌剂 A(北京市京圃园生物工程有限公司)、商品化菌剂 B(佛山金葵子科技有限公司)和菌剂 C(本试验),试验小区的晚稻产量分别比对照提高了 7.57%、6.61% 和 5.24%,但差异尚不显著(如图 8 所示),这可能是由于田间试验布置时间较短(第一季)的缘故.

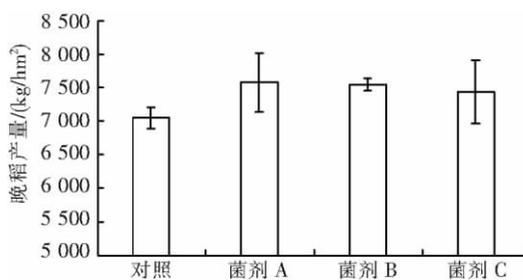


图 8 施用纤维素降解菌剂对晚稻产量的影响

Fig.8 Effect of cellulose-degrading microbial agents on late rice yield

3 讨论

一般红壤的pH值在4.5~5.5之间,作物收割的季节温度(30℃以上)较高,因此微生物分泌的降解稻秆的酶必须要有一定的耐热性.本研究所筛选得到的3株菌在酸性条件下均能很好生长,CMC酶学性质分析表明,该酶有较好的耐热性,与已有的研究结果相比^[17,18],这些菌株是适用于红壤地区的、研制高效快速稻秆降解剂的优良出发菌株.

自然状态下,纤维素的彻底降解是在微生物区系中多种微生物长期相互作用的结果,这一过程仅靠一种微生物是很难完全实现的.分解纤维素的酶是由多种组分组成的酶系.因此,在进行纤维素大分子降解的研究过程中要考虑到微生物产酶体系之间的协同效应,尤其是细菌与真菌之间具有较强的相互作用^[19].目前对降解纤维素能力较强的木霉及其酶活性的研究较多,筛选的优良纤维素降解菌几乎都是木霉属菌株,而木霉属菌株产生的 β -葡萄糖苷酶一般偏低^[20],这将使纤维二糖积聚,从而抑制酶活,降低酶解效率,影响纤维素水解为葡萄糖.近年来,许多研究者在改进纤维素酶系组成方面做了大量的工作,通过优化培养基的组成、改进菌种的配伍来提高 β -葡萄糖苷酶的活性^[21].例如,木霉与青霉的混合培养具有最大的协同效应;木霉同曲霉二者混合,木霉同曲霉、青霉三者混合的培养效果与木霉单独培养无明显差异,但比曲霉及青霉的单独培养效果显著;这也许是因为曲霉的降解产物可以抑制木霉的产酶效果,或与混合接种的时间、接种量有一定的关系^[22,23].混合菌分解纤维素的能力强于单一菌株,例如将3株菌株混合培养后对稻草的降解率为21.11%^[19].加入木霉与青霉混合菌培养的玉米秸秆在经过30d发酵后已降解至原来体积的32%,而单独加入曲霉和青霉的玉米秸秆则为原来体积的45%左右,说明加入混合菌株可以加速玉米秸秆的分解速度^[22].本研究显示,37℃条件下,保温降解15d后3株纤维素降解菌株混合培养发酵对稻秆的降解降解效果最为明显,降解率达到35.02%,表明真菌与细菌的混合培养对稻秆降解具有更大的协同效应.

对于稻秆纤维素降解菌剂,前人已经作了一些研究,其中多数是针对堆肥设计的,而本文所述稻秆纤维素降解菌剂是直接喷洒于红壤稻田,所要解决的关键问题是在短期内破坏稻秆的结构,不影响后季作物根系的发育及植株的正常生长.室内应用试验证明,本文所述稻秆纤维素降解菌剂基本达到了这一效果,15d内稻秆即沉底,表面有纤维类物质脱落,稻秆降解率达到35.02%.初步大田应用试验表明,由本研究筛选得到的一株枯草芽孢杆菌和两株绿色木霉制成的稻秆纤维素降解菌剂对晚稻有一定的增产效果,与商品化的纤维素降解菌剂效果相当,虽然与对照相比尚未达到统计上显著水平.明确影响稻秆纤维素降解菌剂发挥作用的各因子,不断优化改进已有的稻秆纤维素降解菌剂,随着田间试验时间的延长,水稻增产效果才会比较明显.

[参考文献](References)

- [1] 朱奇宏,黄道友,刘守龙,等.红壤丘陵区农作物秸秆综合利用现状与展望[J].生态学杂志,2005,24(12):1482-1486.
Zhu Qihong, Huang Daoyou, Liu Shoulong, et al. Status and prospects of crop straw comprehensive utilization in hilly red soil region [J]. Chinese Journal of Ecology, 2005, 24(12): 1482-1486. (in Chinese)
- [2] 谭德水,金继运,黄绍文,等.不同种植制度下长期施钾与秸秆还田对作物产量和土壤钾素的影响[J].中国农业科学,2007,40(1):133-139.
Tan Deshui, Jin Jiyun, Huang Shaowen, et al. Effect of long-term application of K fertilizer and wheat straw to soil on crop yield and soil K under different planting systems [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2007, 40(1): 133-139. (in Chinese)
- [3] 劳秀荣,孙伟红,王真,等.秸秆还田与化肥配合施用对土壤肥力的影响[J].土壤学报,2003,40(4):618-623.
Lao Xiurong, Sun Weihong, Wang Zheng, et al. Effect of matching use of straw and chemical fertilizer on soil fertility [J]. Acta Pedologica Sinica, 2003, 40(4): 618-623. (in Chinese)
- [4] 徐国伟,吴长付,刘辉,等.麦秸还田及氮肥管理技术对水稻产量的影响[J].作物学报,2007,33(2):284-291.
Xu Guowei, Wu Changfu, Liu Hui, et al. Effects of wheat residue incorporation and nitrogen management techniques on formation of the grain yield of rice [J]. Acta Agronomica Sinica, 2007, 33(2): 284-291. (in Chinese)
- [5] 韩宾,李增嘉,王芸,等.土壤耕作及秸秆还田对冬小麦生长状况及产量的影响[J].农业工程学报,2007,23(2):48-52.
Han Bin, Li Zengjia, Wang Yun, et al. Effects of soil tillage and returning straw to soil on wheat growth status and yield [J]. Transactions of the CSAE, 2007, 23(2): 48-52. (in Chinese)

- [6] 张世敏,汪伦记,贾新成,等. 秸秆降解菌制剂的研究初报[J]. 河南农业大学学报,2001,35(3):259-261.
Zhang Shimin, Wang Lunji, Jia Xincheng, et al. Preliminary study on the microbiological agent of straw degradation [J]. Journal of Henan Agricultural University, 2001, 35(3): 259-261. (in Chinese)
- [7] 郝月,杨翔华,张晶,等. 秸秆纤维素分解菌的分离筛选[J]. 中国农学通报,2005,21(7):58-60.
Hao Yue, Yang Xianghua, Zhang Jing, et al. Isolation and screening on straw cellulose-decomposing microorganisms [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2005, 21(7): 58-60. (in Chinese)
- [8] 叶姜瑜. 一种纤维素分解菌鉴别培养基[J]. 微生物学通报,1997,24(4):251-252.
Ye Jiangyu. A new differential medium for cellulose decomposing microorganisms [J]. Microbiology, 1997, 24(4): 251-252. (in Chinese)
- [9] 王晓芳,徐旭士,吴敏,等. 一株纤维素分解菌的分离和筛选[J]. 生物技术,2001,11(2):27-30.
Wang Xiaofang, Xu Xushi, Wu Min, et al. Isolation and screening of cellulose-decomposing microorganisms [J]. Biotechnology, 2001, 11(2): 27-30. (in Chinese)
- [10] 张丽青,吴海龙,姜红霞,等. 纤维素降解细菌的筛选及其产酶条件优化[J]. 环境科学与管理,2007,32(10):110-113.
Zhang Liqing, Wu Hailong, Jiang Hongxia, et al. Screening on bacteria capable of degrading cellulose and optimizing its conditions for cellulase production [J]. Environmental Science and Management, 2007, 32(10): 110-113. (in Chinese)
- [11] 杨静,袁振宏,易维明,等. 高酶活力甜高粱秸秆纤维分解菌株的筛选[J]. 农机化研究,2007(5):169-171.
Yang Jing, Yuan Zhenghong, Yi Weiming, et al. The characterization of the high enzyme activity cellulose-decomposing microorganisms of sweet sorghum stalk [J]. Journal of Agricultural Mechanization Research, 2007(5): 169-171. (in Chinese)
- [12] 章名春. 工业微生物诱变育种[M]. 北京: 科学出版社,1984: 108-112.
Zhang Mingchun. Industrial Microbial Strain Breeding [M]. Beijing: Science Press, 1984: 108-112. (in Chinese)
- [13] 吕淑霞. 基础生物化学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社,2003: 76-82.
Lü Shuxia. Guide to Basic Experimental on Biochemistry [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2003: 76-82. (in Chinese)
- [14] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社,2001.
Dong Xiuzhu, Cai Miaoying. Hackneyed Bacterium System Appraisal Manual [M]. Beijing: Science Press, 2001. (in Chinese)
- [15] 刘小勇,田素忠,秦国夫,等. 提取植物和微生物 DNA 的 SDS-CTAB 改进法[J]. 北京林业大学学报,1997,19(3):100-103.
Liu Xiaoyong, Tian Suzhong, Qin Guofu, et al. An improved method for extracting DNA from plants and microorganisms using SDS-CTAB [J]. Journal of Beijing Forestry University, 1997, 19(3): 100-103. (in Chinese)
- [16] 孙君社,李雪,董秀芹. 纤维素酶高产菌株的选育及产酶条件的研究[J]. 北京林业大学学报,2002,24(2):83-85.
Sun Junshe, Li Xue, Dong Xiuqin. Induced breeding and conditions of producing cellulase by *Trichoderma koningii* [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2002, 24(2): 83-85. (in Chinese)
- [17] Dorado J, Almendros G, Camarero S, et al. Transformation of wheat straw in the course of solid-state fermentation by four ligninolytic basidiomycetes [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1999, 25(3):605-612.
- [18] Youn H D, Kim K J, Maeng J S, et al. Single electron transfer by an extracellular laccase from the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* [J]. Microbiology, 1995,141(2):393-398.
- [19] 赵小蓉,林启美,孙炎鑫,等. 纤维素分解菌对不同纤维素类物质的分解作用[J]. 微生物学杂志,2000,20(3):12-14.
Zhao Xiaorong, Lin Qimei, Sun Yanxin, et al. Decomposition of different cellulose materials by some cellulose-decomposing microbes [J]. Journal of Microbiology, 2000, 20(3): 12-14. (in Chinese)
- [20] Nieves R A, Ehrman C I. Technical communication: survey and analysis of commercial cellulose preparations suitable for biomass conversion to ethanol [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 1998,14:301-304.
- [21] Canilha L, Carvalho W, Almeda J B, et al. Influence of medium composition on xylitol bioproduction from wheat straw hemicellulosic hydrolysate [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2005,21(6/7):1 087-1 093.
- [22] 宋颖琦,刘睿倩,杨谦,等. 纤维素降解菌的筛选及其降解特性的研究[J]. 哈尔滨工业大学学报,2002,34(2):197-200.
Song Yinqi, Liu Ruiqian, Yang Qian, et al. Study of screening of strains for degrading cellulose and mechanism of degrading ability [J]. Journal of Harbin Institute of Technology, 2002, 34(2): 197-200. (in Chinese)
- [23] 中科院植生所纤维素酶组. 纤维素分解菌与伴生菌的分离鉴定及其协同作用[J]. 微生物学报,1978,11(2):147-152.
Cellulase Lab of Institute of Plant Physiology, Chinese Academy of Sciences. Isolation, identification and synergetic effect of cellulose-decomposing microorganisms and companion bacteria [J]. Acta Microbiologica Sinica, 1978, 11(2): 147-152. (in Chinese)

[责任编辑: 严海琳]