



研究报告

木质素降解菌 BYL-7 的筛选及降解条件优化

李灵灵¹ 王敬红¹ 赵铎¹ 刘嘉乐¹ 申贵男¹ 袁媛¹ 高亚梅¹ 晏磊¹ 魏丹²
王伟东^{*1}

1 黑龙江省寒区环境微生物与农业废弃物资源化利用重点实验室 黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院
黑龙江 大庆 163319

2 北京市农林科学院植物营养与资源研究所 北京 100081

摘要: 【背景】微生物降解木质素因其具有降解效率高和环保等特点而备受关注。【目的】筛选高效木质素降解真菌,并对其降解条件进行优化。【方法】通过愈创木酚-马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)和苯胺蓝平板法筛选高效木质素降解菌株,利用单因素筛选及响应面试验对培养条件进行优化。【结果】筛选到一株高效木质素降解菌 BYL-7,经形态和多序列分析初步确定为 *Trametes versicolor*。单因素试验证明初始 pH、温度和接种量为降解木质素显著影响因子,响应面试验确定降解木质素最优条件为:初始 pH 6.7,温度 25 °C,接种量 8%。在此条件下,碱性木质素降解率为 36.5%,比未优化前提高 54.0%;水稻秸秆木质素、半纤维素和纤维素降解率分别为 32.8%、21.5%、13.2%,其中木质素降解率比未优化前提高 36.1%;漆酶活性在第 6 天达到峰值 120.0 U/L,比未优化前提高 25.0%;木质素过氧化物酶活性在第 6 天达到峰值 1 343.8 U/L,比未优化前提高 36.0%;锰过氧化物酶活性在第 5 天达到峰值 463.8 U/L,比未优化前提高 31.7%。【结论】研究结果为木质素的降解提供了良好的菌种资源,同时也为后续木质素的研究积累了相关数据。

关键词: 变色栓菌,木质素,筛选,降解条件优化

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2018YFD0800906-03); Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (ZD2018005); Local Science and Technology Development Program Supported by the Central Government (ZY16A06-02); Program of Science and Technology Innovation Team of Heilongjiang Province (2012TD006); Research and Development Plan of Heilongjiang Agricultural Company (HKKY190404); Program of Scientific Research Team and Platform of Heilongjiang Bayi Agricultural University (TDJH201809); Research Innovation Program for Graduates of Heilongjiang Bayi Agricultural University (YJSCX2019-Y62)

***Corresponding author:** Tel: 86-459-6819298; E-mail: wwdcyy@126.com

Received: 05-02-2020; **Accepted:** 09-04-2020; **Published online:** 28-05-2020

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0800906-03); 黑龙江省自然科学基金重点项目(ZD2018005); 中央财政支持地方发展科技项目(ZY16A06-02); 黑龙江省高校科技创新团队项目(2012TD006); 黑龙江农垦总局科技攻关项目(HKKY190404); 黑龙江八一农垦大学科技创新团队项目(TDJH201809); 黑龙江八一农垦大学研究生创新项目(YJSCX2019-Y62)

***通信作者:** Tel: 0459-6819298; E-mail: wwdcyy@126.com

收稿日期: 2020-02-05; **接受日期:** 2020-04-09; **网络首发日期:** 2020-05-28

Screening of lignin degrading strain BYL-7 and optimization of degradation conditions

LI Ling-Ling¹ WANG Jing-Hong¹ ZHAO Duo¹ LIU Jia-Le¹ SHEN Gui-Nan¹
YUAN Yuan¹ GAO Ya-Mei¹ YAN Lei¹ WEI Dan² WANG Wei-Dong^{*1}

¹ Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Environmental Microbiology and Recycling of Argo-Waste in Cold Region, College of Life Science and Biotechnology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319, China

² Institute of Plant Nutrition and Resources, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: [Background] Microbial degradation lignin has attracted more attention due to its characteristics of high degradation efficiency and environmental protection. [Objective] Screening highly efficient lignin degradation fungi and optimizing their degradation conditions. [Methods] High efficiency lignin degradation strains were screened by guaiacol-PDA and aniline blue plate methods, and the culture conditions were optimized by single-factor screening and response surface experiment. [Results] An efficient lignin degradation strain BYL-7 was screened and initially identified as *Trametes versicolor* by morphological and multi-sequence analysis. The single factor test proved that the initial pH, temperature and inoculum amount were the significant influencing factors for lignin degradation, and the response surface test determined that the optimal conditions for degradation lignin were initial pH 6.7, temperature 25 °C, and inoculum amount 8%. Under these conditions, the alkaline lignin degradation rate was 36.5%, which was 54.0% higher than before; the degradation rates of rice straw lignin, hemicellulose, and cellulose were 32.8%, 21.5%, and 13.2%, respectively. Among them, the lignin degradation rate was enhanced by 36.1% compared with before. Laccase activity peaked at 120.0 U/L in the 6th day, which was 25.0% higher than before; the lignin peroxidase activity reached a peak of 1 343.8 U/L in the 6th day, which was 36.0% higher than before; the manganese peroxidase activity peaked at 463.8 U/L in the 5th day, which was 31.7% higher than before. [Conclusion] The experimental results provided a useful fungus resource for lignin degradation, but also accumulated relevant data for subsequent research on lignin.

Keywords: *Trametes versicolor*, Lignin, Screening, Degradation condition optimization

木质素是由苯丙烷基团组成的酚醛复合物,具有非常稳定的各类化学键,是目前公认的难降解复杂化合物之一^[1-2]。木质素是农作物秸秆的主要成分之一,与纤维素和半纤维素等物质紧密结合形成木质纤维素结构^[3-6],约占总生物质干重的15%–30%^[7]。我国每年秸秆产量超过8亿t,其中30%左右被焚烧或直接被丢弃,既浪费了资源,又造成严重的环境污染^[7]。但是,如果把木质素降解成低聚体或者单体化合物,然后再通过生物工程技术把木质素转化为生物质产品,可实现废弃物的资源化利用^[8]。因此,木质素的微生物转化对木质纤维素类废弃物资源化利用和环境保护意义重大。

生物法降解木质素由于具有低能耗和环境友好等优点而备受关注,其降解原理是微生物产生多种木质素降解酶系,通过酶系之间的协同作用降解木质素,将大分子的木质素聚合物降解为小分子化合物或者单体化合物,彻底降解的产物主要为CO₂和H₂O^[9-10]。大多数具有木质素降解功能的菌株均能产生漆酶和锰过氧化物酶,极少数菌株能产生木质素过氧化物酶^[11-12]。焦有宙等^[13]通过比较细菌、放线菌和真菌对木质素的降解效果发现,真菌尤其是白腐真菌的木质素降解能力最强。已知白腐真菌可将木质素彻底分解成CO₂和H₂O,被认为是最有效的木质素降解微生物^[14]。变色栓菌是白腐菌

的一类,具有较强的木质素降解能力^[15-18],研究表明变色栓菌降解木质素主要是因为其能够产生漆酶和锰过氧化物酶^[18-20]。Zhu 等^[18]通过优化变色栓菌产漆酶条件,优化后漆酶活性提高 20 倍,木质素降解率达到 34.8%。Erden 等^[19]通过优化变色栓菌的发酵时间、pH、转速等条件,漆酶和锰过氧化物酶活性均明显提高,同时木质素降解率也显著提高。已有变色栓菌降解木质素的研究主要是优化菌株产漆酶和锰过氧化物酶的条件来提高酶活^[18,20],但是关于产木质素过氧化物酶的报道特别是对于液相体系中木质素降解的研究报道较少^[21]。

本研究筛选分离高效降解木质素的变色栓菌菌株,通过分子生物学和形态学方法确定其分类地位,并通过单因素和响应面试验结合的方法优化菌株的培养条件,以提高其木质素降解率,从而为后续的应用研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

使用无菌取样铲采集黑龙江省伊春市新青区林场(48.32°N, 129.29°E)森林地表下 2–5 cm 处土壤,用无菌袋包装,冰袋保存带回实验室,4 °C 冰箱保存备用。

1.1.2 培养基

PDA 培养基(g/L): 去皮马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, KH_2PO_4 3.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5, 琼脂 15.0; PDA 液体培养基: PDA 培养基不添加琼脂; 愈创木酚-PDA 培养基: PDA 培养基中加入 0.4% 的愈创木酚; 苯胺蓝培养基(g/L): 去皮马铃薯 200.0, 酵母粉 15.0, 蛋白胨 5.0, 葡萄糖 10.0, 氯化钠 5.0, 苯胺蓝 0.1, 琼脂 15.0; 木质素降解培养基(g/L): 碱性木质素 2.0, KH_2PO_4 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0, 蛋白胨 1.0; 固态发酵培养基: 取成熟后的水稻秸秆去皮留茎,剪成 1.0–2.0 cm 的小段,80 °C 烘干,将处理过的水稻秸秆 6.0 g 装入 250 mL 的锥形瓶中,以 1:10 的料液比加入营养液摇匀。营养

液(g/L): KH_2PO_4 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0, 蛋白胨 1.0。以上所有培养基均需 1×10^5 Pa 灭菌 30 min 后冷却待用。

1.1.3 主要试剂和仪器

葡萄糖、酵母粉、蛋白胨,天津市祥瑞鑫化工科技有限公司;愈创木酚、碱性木质素,上海麦克林生化科技有限公司;苯胺蓝,天津市鲁鑫化工科技有限公司。

微型 pH 计,Horiba 公司;超净工作台,北京东联哈尔仪器制造有限公司;紫外分光光度计,中国北京普析通用仪器有限公司;超高速离心机,Eppendorf 公司;恒温振荡器、生化培养箱,哈尔滨市东联电子技术开发有限公司;纤维素测定仪,Velp 公司;扫描电镜,日立公司。

1.2 方法

1.2.1 木质素降解菌株的筛选

取混合土样 1.0 g,置于含 100 mL 灭菌蒸馏水的锥形瓶中,30 °C、200 r/min 摇床复苏 1 h,静置 30 min,吸取上清液后采用稀释涂布平板法^[22],取梯度稀释液 1 mL 均匀涂布于愈创木酚-PDA 培养基上,30 °C 恒温培养 3 d,挑取周边有暗红色显色圈(产漆酶)的菌落,反复划线分离。将获得的各个纯培养菌株采用点种法分别点种在愈创木酚-PDA 和苯胺蓝培养基中心,待菌株生长 5 d 后,用直尺测量出愈创木酚-PDA 培养基上菌落及菌株显色圈直径,苯胺蓝培养基上菌落及菌株脱色圈(产过氧化物酶)直径,3 次重复取平均值,筛选显色圈大、脱色圈明显的菌株保藏备用。

1.2.2 菌株鉴定

(1) 显微形态特征

采用扫描电镜观察所筛菌株 BYL-7 的显微形态。样品预处理参照韩燕燕等^[23]的方法,取 PDA 培养基上 30 °C 培养 5 d 的菌丝,置于 2.5% 的戊二醛固定液中 4 °C 过夜;用 0.2 mol/L 的磷酸缓冲液(pH 7.2)漂洗 3 次,10 min/次;用 30%、50%、70%、90%、100% 的乙醇进行梯度脱水,每个梯度脱水 2 次,每次 15 min;最后将处理样品转移至装有

100%乙醇的 2 mL 无菌 EP 管, 3 次重复, 送至沈阳高科材料分析检测服务有限公司进行电镜扫描。

(2) 分子鉴定

参照 Zhu 等^[24]的方法提取菌株 BYL-7 的基因组 DNA, 经 NanoDrop 检测, 选择浓度大于 10 ng/μL、总量大于 500 ng、 $OD_{260/230}$ 大于 1、 $OD_{260/280}$ 在 1.8–2.2 间的 DNA。采用真菌通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAAGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 进行 PCR 扩增^[25]。PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖电泳检测和纯化后, 由上海派森诺基因科技有限公司完成测序。测序结果在 NCBI 中进行 BLAST 比对, 然后通过 MEGA 6.0 软件构建系统发育树, 分析分离菌的分类地位。

1.2.3 制备菌悬液

将菌株 BYL-7 在 PDA 培养基上 30 °C 培养 5 d, 用打孔器取直径 8 mm 的 BYL-7 菌落 3 块置于含 100 mL PDA 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中, 30 °C、120 r/min 摇床培养 3 d 后, 采用平板计数法记录菌落数, 当菌液浓度达到 1×10^7 CFU/mL 时菌悬液配制完成。以下实验不作特殊说明, 接种量的菌悬液浓度均为 1×10^7 CFU/mL, 所用锥形瓶均为 250 mL, 装液量均为 100 mL, 接菌量为 3%。

1.2.4 木质素降解率测定

配制不同浓度碱性木质素水溶液, 测定 OD_{280} 值, 并制作木质素标准吸收曲线^[2], 得回归方程: $Y=7.272\ 2X+0.019\ 4$, $R^2=0.999\ 2$ 。

将菌悬液按 3% 接种量接入含 100 mL 木质素降解培养基的锥形瓶中, 30 °C、120 r/min 培养, 每隔 24 h 取样一次, 准备 3 个 2 mL 无菌 EP 管, 摇匀培养基后, 分别吸取 1 mL 液体于 2 mL 无菌 EP 管, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 将上清液用滤膜过滤, 滤液用不含碱性木质素成分的木质素降解培养基(对照)稀释 30 倍, 测定 OD_{280} 值, 3 次重复, 将 OD_{280} 值代入回归方程用于计算碱性木质素降解率(以下实验中木质素降解率不做特殊说明均指碱性木质素降解率)。

$$\text{木质素降解率}(\%) = \frac{C_1 - 30 \times C_2}{C_1} \times 100$$

其中, C_1 表示原始木质素降解培养基中碱性木质素的浓度(对照); C_2 (即上述回归方程中的自变量 X) 表示待测样品中碱性木质素的浓度。

1.2.5 菌株 BYL-7 降解木质素条件的单因素试验

(1) 最适初始 pH

将菌悬液按 3% 接种量接入含有木质素降解培养基的锥形瓶中, 调节初始 pH 分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0, 在 30 °C、120 r/min 条件下培养 5 d 后测定木质素降解率, 3 次重复, 确定最适 pH。

(2) 最适培养温度

将菌悬液按 3% 接种量接入含有木质素降解培养基的锥形瓶中, 调节初始 pH 为 7.0, 设置培养温度分别为 10、20、30、40、50、60 °C, 在 120 r/min 条件下培养 5 d 后测定木质素降解率, 3 次重复, 确定最适培养温度。

(3) 最适转速

将菌悬液按 3% 接种量接入含有木质素降解培养基的锥形瓶中, 调节初始 pH 为 7.0, 在 30 °C 和转速分别为 100、120、140、160、180、200 r/min 条件下培养 5 d, 测定木质素降解率, 3 次重复, 确定最适转速。

(4) 最适接种量

将菌悬液分别按 3%、6%、9%、12%、15%、18% 接种量接入含有木质素降解培养基的锥形瓶中, 调节初始 pH 为 7.0, 在 30 °C、120 r/min 条件下培养 5 d 后测定木质素降解率, 3 次重复, 确定最适接种量。

(5) 最适碱性木质素浓度

调整木质素降解培养基碱性木质素浓度分别为 1、2、3、4、5、6 g/L, 将菌悬液按 3% 接种量接入含有该培养基的锥形瓶中, 调节初始 pH 为 7.0, 在 30 °C、120 r/min 条件下培养 5 d 后测定木质素降解率, 3 次重复, 确定最适碱性木质素浓度。

1.2.6 菌株 BYL-7 发酵条件的优化

(1) Plackett-Burman 试验设计

在单因素试验的基础上,利用 Plackett-Burman 试验可以快速地从初始 pH (6.0、8.0)、温度(20、30 ℃)、转速(120、160 r/min)、接种量(6%、9%)和碱性木质素浓度(2、4 g/L) 5 个因素中筛选出对菌株 BYL-7 降解木质素影响最重要的几个因素。

(2) Box-Behnken 试验设计

以 Plackett-Burman 试验筛选对木质素降解影响显著的因素: 初始 pH (A)、培养温度(B)、接种量(C)为设计因素, 采用 Design-Expert 8.0 设计试验进行 3 因素 3 水平, $N=17$ 次试验, 以木质素降解率为响应值对培养条件进行优化, 确定最佳培养条件并验证。

1.2.7 秸秆固态发酵试验

(1) 木质纤维素的测定

采用固态发酵培养基, 分别将菌株 BYL-7 在优化前(接种量 3%, pH 7.0, 30 ℃)和碱性木质素降解优化后条件下于恒温保湿箱中静置培养 10 d。每隔 2 d 取样一次(0.5 g/次), 参照范氏纤维素测定法^[1], 利用 FIWE 3/6 纤维素测定仪测定水稻秸秆中木质纤维素的降解率, 试验重复 3 次。

(2) 木质素降解酶活性测定

发酵培养方式同上述 1.2.7(1)步骤, 每隔 1 d 取样一次(0.5 g/次), 加入无菌水, 12 000 r/min 离心 10 min 取上清, 上清液即酶液^[26]。采用 ABTS 法^[27]测定漆酶活性; 参照池玉杰等^[12]的方法测定木质素过氧化物酶活性; 参照 Kuwahara 等^[28]的方法测定锰过氧化物酶活性。设置 3 个平行样品, 最后取平均值。

2 结果与分析

2.1 木质素降解菌的筛选

由表 1 可知, 所筛选的 8 株木质素降解菌均能产生漆酶和过氧化物酶。其中, 菌株 BYL-7 在愈创木酚-PDA 培养基上显色圈最大为 2.00 cm, 同时在苯胺蓝培养基上褪色圈最大为 2.10 cm, 相比其他菌株差异显著, 证明其产漆酶和过氧化物酶能力较强, 可作为后续试验菌株。

2.2 菌株 BYL-7 鉴定结果

2.2.1 菌株 BYL-7 形态观察

菌株 BYL-7 的菌丝生长迅速, 菌管长度均大于 50 μm , 菌丝细长、无隔中空且多有分枝, 孢子是由菌丝逐渐断裂形成的节孢子, 孢子呈长方形,

表 1 各菌株在愈创木酚-PDA 培养基上形成的显色圈和在苯胺蓝培养基上形成的脱色圈
Table 1 Coloration circle formed on guaiacol-PDA medium and decolorization circle formed on aniline blue medium by each strain

菌株	显色圈直径	菌落直径	显色圈实际直径	脱色圈直径	菌落直径	脱色圈实际直径
Strain	Coloration circle diameter	Colony diameter	Coloration circle actual diameter	Decolorization circle diameter	Colony diameter	Decolorization circle actual diameter
	(d_1 , cm)	(d_2 , cm)	(d_1-d_2 , cm)	(d_3 , cm)	(d_4 , cm)	(d_3-d_4 , cm)
BYL-1	5.00	4.80	0.20	7.00	6.80	0.20
BYL-2	4.70	4.50	0.20	6.70	6.50	0.20
BYL-3	4.80	4.20	0.60	6.70	6.20	0.50
BYL-4	4.50	4.50	0.00	6.50	6.40	0.10
BYL-5	4.10	4.10	0.00	6.10	6.00	0.10
BYL-6	4.90	4.50	0.40	6.90	6.50	0.40
BYL-7	5.10	3.10	2.00	7.10	5.00	2.10
BYL-8	4.50	3.40	1.10	6.40	5.30	1.10

注: d_1 : 愈创木酚-PDA 培养基上菌株显色圈直径; d_2 : 愈创木酚-PDA 培养基上菌落直径; d_3 : 苯胺蓝培养基上菌株脱色圈直径; d_4 : 苯胺蓝培养基上菌落直径。

Note: d_1 : Diameter of strain coloration circle on guaiacol-PDA medium; d_2 : Diameter of colony on guaiacol-PDA medium; d_3 : Diameter of strain decolorization circle on aniline blue medium; d_4 : Diameter of colony on aniline blue medium.

大小为 $(2-3) \times (3-5) \mu\text{m}$ (图 1)。据魏景超《真菌鉴定手册》^[29]描述, 菌丝断裂产生节孢子是栓菌属的典型特征。

2.2.2 菌株 BYL-7 系统发育树的构建

经测序得知菌株 BYL-7 的 ITS 序列为 580 bp, 在 NCBI 中的 GenBank 数据库登录号为 MN947224。在 NCBI 上进行 BLAST 比对, 所获得相似性很高的序列均属于变色栓菌(*Trametes*

versicolor), 且一致性均大于 96%, 结合形态学特征, 初步确定菌株 BYL-7 为变色栓菌(*Trametes versicolor*), 命名为 *Trametes versicolor* BYL-7。使用软件 MEGA 6.0 将 BYL-7 与 16 株菌进行 Neighbor-Joining 系统发育树的构建, 见图 2。

2.3 木质素降解条件的单因素试验结果

当 pH 处于 4.0–9.0 范围内时, 菌株 BYL-7 都能够正常生长并保持降解木质素的能力; 当 pH 在

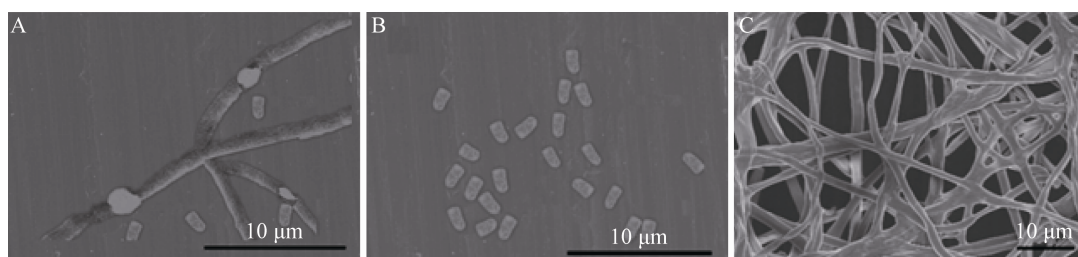


图 1 菌株 BYL-7 在扫描电镜下的菌丝和孢子形态

Figure 1 Mycelium and spore morphology of strain BYL-7 under SEM

注: A: 正在断裂的菌丝; B: 孢子; C: 菌丝。标尺=10 μm 。

Note: A: The mycelium being broken; B: Spore; C: Mycelium. Bar=10 μm .

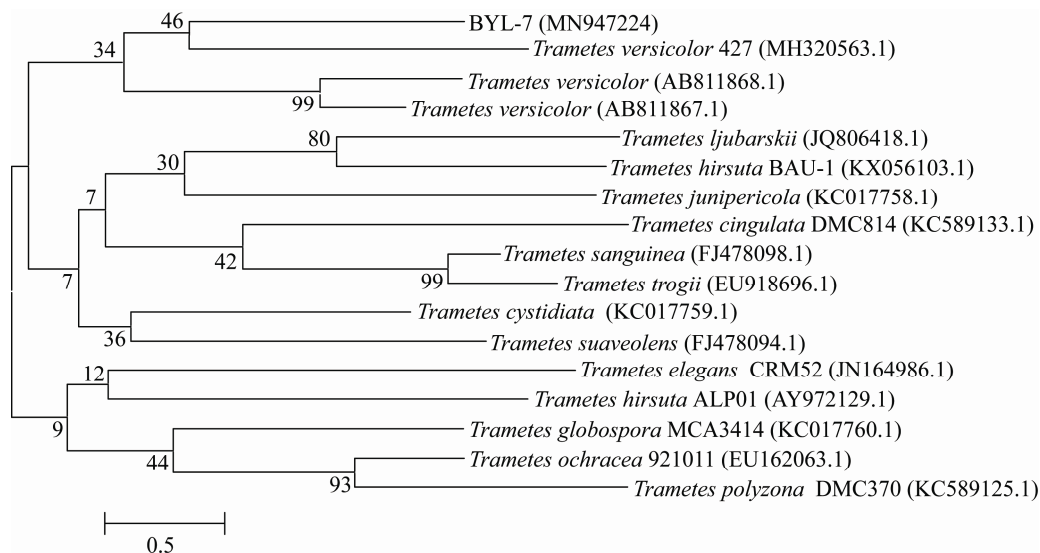


图 2 基于菌株 BYL-7 及相关菌株 rDNA ITS 序列通过邻接法构建的系统发育树

Figure 2 The phylogenetic tree based on rDNA ITS sequences of strain BYL-7 and other related strains, constructed by neighbor-joining method

注: 参与比对序列的 GenBank 登录号列于括号中; 分支位置中的数字表示 Bootstrap 支持率; 标尺所示长度为 0.5 核苷酸置换率。

Note: The GenBank accession numbers of aligned sequences are shown in the brackets; The numbers in each branch points denote the percentages supported by bootstrap; Bar 0.5 means the nucleotide substitution rate of 0.5.

6.0–8.0 之间时, 木质素降解率均较高, pH 为 7.0 时木质素降解率最大, 为 22.6% (图 3A)。因此, 选择 pH 为 6.0–8.0 这一区间进行后续试验。

培养温度在 10–60 °C 之间时菌株 BYL-7 对木质素的降解情况差别很大。在 20–40 °C 之间, 木质素降解率较高, 尤其是在 30 °C 时降解率最高 (图 3B)。因此, 选择温度为 20–30 °C 这一区间进行后续试验。

转速对菌株 BYL-7 降解木质素也有较大影响 (图 3C)。随着转速的增加, 木质素降解率呈现先增加后减少的趋势。转速为 120–160 r/min 时, 木质素降解率较高。因此, 选择转速 120–160 r/min 这一区间进行后续试验。

接种量对菌株 BYL-7 降解木质素的影响见图 3D。当接种量为 6% 时, 木质素降解率最大, 为 26.9%。之后随着接种量的增加, 木质素降解率

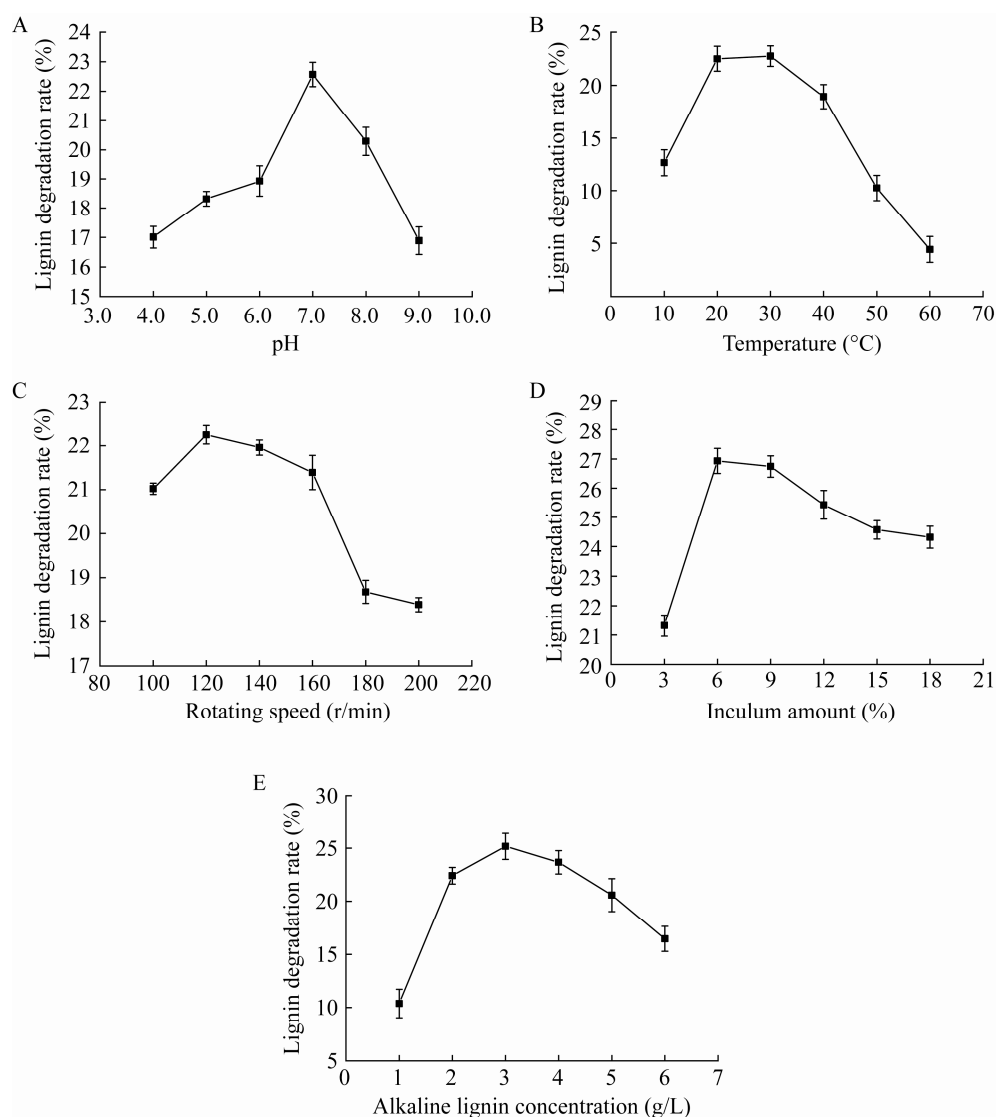


图 3 初始 pH (A)、温度(B)、转速(C)、接种量(D)和碱性木质素浓度(E)对木质素降解率的影响

Figure 3 Effect of initial pH (A), temperature (B), rotating speed (C), inoculum amount (D) and alkaline lignin concentration (E) on lignin degradation rate

反而有所下降。当接种量为 6%–9% 时, 木质素降解率相对较高且并无明显差异。因此, 选择接种量 6%–9% 这一区间进行后续试验。

底物碱性木质素浓度对菌株 BYL-7 降解木质素也存在较大影响(图 3E)。在一定范围内(1–3 g/L), 菌株对底物碱性木质素的降解率随着底物浓度的增加而升高; 但当底物浓度超过 3 g/L 时, 菌株对木质素的降解能力有所下降。当碱性木质素浓度为 3 g/L 时, 木质素降解率最大, 为 25.2%; 碱性木质素浓度在 2–4 g/L 时, 木质素降解率较高且差异不显著。因此, 选择碱性木质素浓度 2–4 g/L 这一区间进行后续试验。

2.4 Plackett-Burman 筛选单因素试验

由表 2 可知, R^2 为 97.88%, 说明初始 pH、温度、转速、接种量、碱性木质素浓度对菌株 BYL-7 降解木质素影响显著, 彼此之间关联性强, 根据影响大小依次排序为: 初始 pH=温度>接种量>转速>碱性木质素浓度。从 P 值看, 初始 pH、温度、接种量为极显著影响因素($P<0.01$)。

2.5 响应面优化试验

2.5.1 Box-Behnken 试验结果

根据 Plackett-Burman 试验设计结果, 选择对菌株 BYL-7 降解木质素影响较大的 3 个重要因素: 初始 pH (6.0、7.0、8.0) (A)、温度(20、25、30 °C) (B)、接种量(6%、7.5%、9%) (C) 为自变量, 采用 Box-Behnken 试验设计对降解木质素的发酵培养基进行优化, 设计 17 个试验组, 各因素水平选择结果与分析见表 3。利用 Design Expert 8.0 软件进行回归拟合, 得木质素降解回归方程: 木质素降解率(%)=35.43–3.06 A –1.73 B +0.73 C –1.22 AB +0.69 AC –0.81 BC –5.14 A^2 –8.07 B^2 –6.01 C^2 。

由模型回归方程方差分析可知, 该模型 $P<0.001$, 表明该回归方程达到极显著, 模型的失拟项 F 值为 6.45 ($F>0.05$), 表明该方程失拟不显著, 说明所选的模型拟合程度好。确定系数 R^2 为 0.987 2 和调整确定系数 R^2_{Adj} 为 0.970 6 基本接近, 表明模型的回归方程和相关性都很好。因此,

表 2 Plackett-Burman 试验设计与结果

Table 2 Design and results of Plackett-Burman experiment

序号 No.	因素水平 Factor level					木质素降解率 Lignin degradation rate (%)
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	
1	–1	1	1	1	–1	26.4
2	1	1	1	–1	–1	28.0
3	–1	–1	–1	–1	–1	23.6
4	1	1	–1	1	1	28.8
5	1	1	–1	–1	–1	26.7
6	–1	–1	–1	1	–1	24.8
7	–1	–1	1	–1	1	24.7
8	1	–1	1	1	1	27.9
9	–1	1	1	–1	1	26.2
10	1	–1	1	1	–1	27.1
11	1	–1	–1	–1	1	26.0
12	–1	1	–1	1	1	26.1
效应 Effect	2.096 7	1.366 7	0.763 3	0.990 0	0.513 3	
系数 Coef	1.048 3	0.683 3	0.381 7	0.495 0	0.256 7	
T	12.28	8.01	4.47	5.80	3.01	
P	0.000	0.000	0.004	0.001	0.024	
R^2	0.978 8					

注: X_1 (–1, 1): 初始 pH (6.0, 8.0); X_2 (–1, 1): 温度(20、30 °C); X_3 (–1, 1): 转速(120、160 r/min); X_4 (–1, 1): 接种量(6%、9%); X_5 (–1, 1): 碱性木质素浓度(2、4 g/L)。

Note: X_1 (–1, 1): Initial pH (6.0, 8.0); X_2 (–1, 1): Temperature (20, 30 °C); X_3 (–1, 1): Rotating speed (120, 160 r/min); X_4 (–1, 1): Inoculum amount (6%, 9%); X_5 (–1, 1): Alkaline lignin concentration (2, 4 g/L)。

Box-Behnken 设计是可靠的, 该模型可更好地应用于 BYL-7 降解木质素的理论预测。模型一次项 A 、 B 对响应值木质素降解率的影响达到极显著水平 ($P<0.01$), 一次项 C 对响应值木质素降解率影响不显著 ($P>0.05$); 交互项 AB 、 AC 、 BC 对响应值木质素降解率影响不显著 ($P>0.05$); 平方项 A^2 、 B^2 、 C^2 对响应值木质素降解率影响达到极显著水平 ($P<0.01$); 3 个因素对木质素降解率的影响大小依次为: $A>B>C$, 即 pH>温度>接种量。

2.5.2 响应面分析

采用 Design-Expert 8.0 软件对试验结果进行响应面图绘制, 通过响应面可直观地分析各因素及因素相互之间的交互作用对响应值的影响。图 4 是由响应值和试验因素构成的等高线图和三维响应面图。

表 3 Box-Behnken 试验设计结果与分析
Table 3 Design results and analysis of Box-Behnken experiment

序号 No.	因素水平 Factor level			木质素降解率 Lignin degradation rate (%)	方差来源 Source	平方和 Sum of mean square	自由度 Free degree	均方差 Mean square	F value	Pr>F 显著性 Significant
	A	B	C							
1	-1	0	1	26.3	A	74.97	1	74.97	56.72	0.000 1
2	-1	-1	0	27.1	B	24.05	1	24.05	18.19	0.003 7
3	0	1	1	20.1	C	4.29	1	4.29	3.25	0.114 5
4	0	0	0	34.5	AB	5.95	1	5.95	4.50	0.071 5
5	1	0	1	23.3	AC	1.89	1	1.89	1.43	0.270 6
6	-1	1	0	25.3	BC	2.64	1	2.64	2.00	0.200 4
7	0	-1	1	24.4	A ²	111.05	1	111.05	84.01	<0.000 1
8	0	1	-1	19.9	B ²	274.24	1	274.24	207.47	<0.000 1
9	0	0	0	35.6	C ²	151.98	1	151.98	114.98	<0.000 1
10	0	0	0	36.2	模型 Model	711.07	9	79.01	59.77	<0.000 1
11	0	-1	-1	20.9	误差 Residual	9.25	7	1.32		
12	1	-1	0	21.6	失拟项 Lack of fit	7.67	3	2.56	6.45	0.051 7
13	1	1	0	14.9	纯误差 Pure error	1.58	4	0.40		
14	0	0	0	35.2	总和 Total	720.32	16			
15	0	0	0	35.7	R ²	0.987 2				
16	-1	0	-1	26.6	R ² _{Adj}	0.970 6				
17	1	0	-1	20.9						

由图 4A、B 可知,当接种量控制在 0 水平时, pH 和温度的等高线近似圆形,表明 pH 和温度的交互作用对木质素降解率的影响不显著;固定 pH 为定值,木质素降解率随着温度的升高先增大后减小,温度在 22–24 °C 之间时木质素降解率最大。

由图 4C、D 可知,当温度控制在 0 水平时, pH 和接种量的等高线近似圆形,表明 pH 和接种量的交互作用对木质素降解率的影响不显著;固定接种量为定值,木质素降解率随着 pH 的升高先增大后减小, pH 在 6.5–7.0 之间时木质素降解率最大。

由图 4E、F 可知,当 pH 控制在 0 水平时,温度和接种量的等高线近似圆形,表明温度和接种量的交互作用对木质素降解率的影响不显著;固定温度为定值,木质素降解率随着接种量的升高先增大后减小,接种量在 7.2%–7.8%之间时木质素降解率最大。

2.6 发酵条件的优化及验证结果

应用 Design-Expert 8.0 软件对所建立的数学

模型进行最优化分析,得出 pH 6.72、温度 24.56 °C、接种量 7.58%为最佳条件,此时模型预测的菌株 BYL-7 对木质素的降解率为 36.0%。在最优条件下进行验证试验,试验重复 3 次,因考虑试验中现实操作情况,将优化条件修正为: pH 6.7、温度 25 °C、接种量 8%,木质素降解率为 36.5%,比未优化前(23.7%)提高 54.0%,与预测值相比相对误差较小,说明响应面法优化的木质素降解条件具有真实性,在一定程度上存在实际应用价值。

2.7 秸秆固态发酵试验验证结果

利用已优化的碱性木质素降解的最佳条件进行水稻秸秆发酵,结果见表 4。条件优化后,菌株 BYL-7 对水稻秸秆木质素、纤维素、半纤维素降解率分别为 32.8%、21.5%、13.2%,其中木质素降解率比未优化前(24.1%)提高 36.1%;秸秆失重率为 47.0%,比未优化前(30.8%)提高 52.6%。菌株 BYL-7 对木质素、纤维素和半纤维素降解率均比优化前有所提高,其中木质素降解率提高比率最

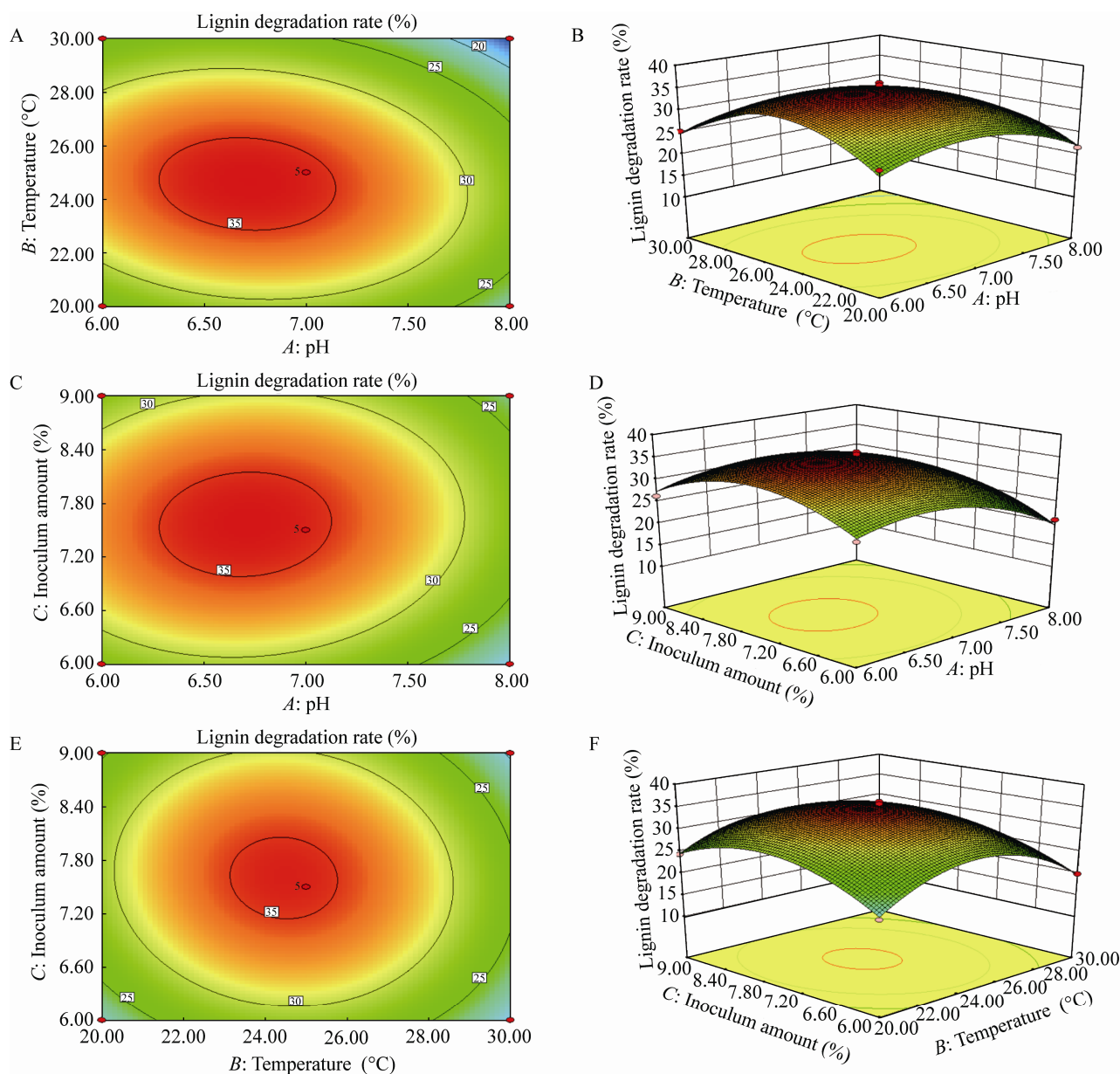


图4 pH、温度和接种量对木质素降解率的影响

Figure 4 Effects of pH, temperature and inoculum amount on lignin degradation rate

注: A 和 B、C 和 D、E 和 F 分别表示 pH 和温度、pH 和接种量、温度和接种量对木质素降解率的影响。

Note: A and B, C and D, and E and F respectively indicate the effect of pH and temperature, pH and inoculum amount, and temperature and inoculum amount on lignin degradation rate.

大,纤维素降解率提高比率最小。白腐菌降解木质素主要是产生木质素降解酶发挥作用,通过酶活性的变化可以反映出木质素降解率的变化情况。由图5可知,优化后漆酶、木质素过氧化物酶和锰过氧化物酶酶活均相对提高,而且锰过氧化物酶酶活峰值较优化前提前1d;优化后漆酶活性在第6天

达到峰值120.0 U/L,比未优化前(96.0 U/L)提高了25.0%;优化后木质素过氧化物酶活性也在第6天达到峰值1343.8 U/L,比未优化前(988.3 U/L)提高了36.0%;锰过氧化物酶活性在第5天达到峰值463.8 U/L,比未优化前(352.1 U/L)提高了31.7%;说明此时间段内木质素降解速度最快。

表 4 优化前后秸秆固态发酵结果

Table 4 Results of straw solid state fermentation before and after optimization

菌株	未优化				优化			
Strain	Unoptimized				Optimized			
	木质素降解率	纤维素降解率	半纤维素降解率	秸秆失重率	木质素降解率	纤维素降解率	半纤维素降解率	秸秆失重率
	Lignin degradation rate (%)	Cellulose degradation rate (%)	Hemicellulose degradation rate (%)	Straw weight loss rate (%)	Lignin degradation rate (%)	Cellulose degradation rate (%)	Hemicellulose degradation rate (%)	Straw weight loss rate (%)
BYL-7	24.1±2.1	12.0±1.9	17.9±2.2	30.8±1.3	32.8±2.1	13.2±1.9	21.5±2.2	47.0±1.6

注：数据为 3 次重复的平均值±标准差。

Note: The data is the mean ± standard deviation of 3 replicates.

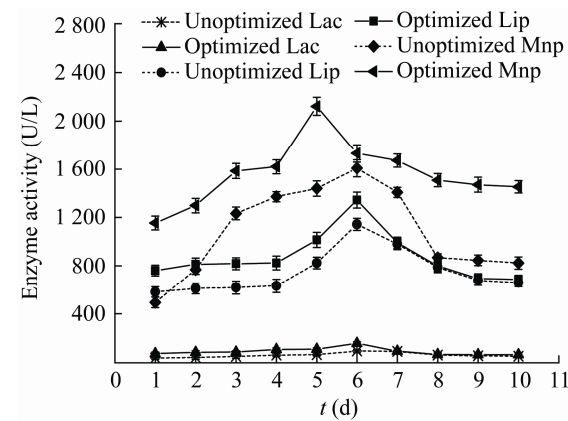


图 5 优化前、后木质素降解酶活性变化
Figure 5 Changes of lignin degradation enzyme activity before and after optimization

3 讨论与结论

吴薇等^[30]将变色栓菌 Sp1 在 28 °C 下静置培养，其在第 12 天漆酶和锰过氧化物酶酶活最高分别约为 520 U/L 和 500 U/L，在第 6 天木质素过氧化物酶酶活最高约为 40 U/L。董旭杰等^[31]将变色栓菌在 30 °C、160 r/min 条件下培养，其在第 8 天漆酶酶活最高为 136.5 U/L，在第 10 天锰过氧化物酶酶活最高为 781.6 U/L。本研究分离筛选的菌株 BYL-7 不仅能产生漆酶和锰过氧化物酶，还能产生高活性的木质素过氧化物酶，其在 25 °C 下静置培养，漆酶和木质素过氧化物酶酶活均在第 6 天达到峰值，分别为 120.0 U/L 和 1 343.8 U/L，锰过氧化物酶活性在第 5 天达到峰值为 463.8 U/L。与吴薇等的研究结果相比，菌株 BYL-7 的漆酶和锰过氧化物酶酶活达到峰值所用时间明显缩短，虽漆酶

和锰过氧化物酶酶活比其低，但木质素过氧化物酶酶活是其 33 倍；与董旭杰等^[31]的研究结果相比，菌株 BYL-7 漆酶和锰过氧化物酶酶活达到峰值所用时间也明显缩短，虽漆酶和锰过氧化物酶酶活比其低，但其与大多数变色栓菌一样没有菌株 BYL-7 所特有的高活性木质素过氧化物酶。

本实验所采用的木质素降解真菌 BYL-7 对水溶性碱性木质素和天然木质素(水稻秸秆)均具有较强的降解能力。李超^[32]筛选的木霉 F2 和恶尖镰孢 F10 发酵 7 d 对水溶性木质素的降解率分别为 32.3%和 29.5%，而菌株 BYL-7 发酵 5 d 对碱性木质素降解率为 36.5%，比其分别提高 13.0%和 23.7%。Zhu 等^[18]以变色栓菌为木质素降解实验菌株，优化后培养 21 d，秸秆木质素降解率为 34.8%，而菌株 BYL-7 培养 8 d 对秸秆木质素降解率为 32.8%，虽秸秆木质素降解率比其低 6.0%，但发酵周期明显缩短。

此外，菌株 BYL-7 与前人筛选的其他菌株相比，在短时间、低能耗的条件下能高效降解秸秆木质素。杜海萍^[33]采用糙皮侧耳、白色韧革菌、松木层孔菌、稀硬木层孔菌降解稻草秸秆，15 d 秸秆失重率分别为 18.65%、17.83%、17.03%、27.71%，木质素降解率分别为 16.42%、4.41%、9.63%、2.09%。刘爽^[34]采用草酸青霉 QSH3-3 和毛壳霉 YSH3-3 降解玉米秸秆，15 d 秸秆失重率分别为 58%、52%，木质素降解率分别为 16%、26%。菌株 BYL-7 降解水稻秸秆，8 d 秸秆失重率和木质素

降解率分别为 47%、32.8%，与杜海萍研究结果相比，秸秆失重率和木质素降解率显著高于其研究所用菌株。与刘爽研究结果相比，菌株 BYL-7 秸秆失重率虽低于草酸青霉 QSH3-3 和毛壳霉 YSH3-3，但木质素降解率却明显高于二者。

综上所述，本研究分离筛选的菌株 BYL-7 具有较强的木质素降解能力，对其进行发酵条件优化，初始 pH 6.7、温度 25 °C、接种量 8% 可明显提高其木质素降解率，在一定程度上为降解木质素提供了新的微生物资源。

REFERENCES

- [1] Wang YX, Liu Q, Yan L, et al. A novel lignin degradation bacterial consortium for efficient pulping[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 139: 113-119
- [2] Li Y, Dong GJ, Fang X, et al. Dynamics of microbial community in process of cellulose decomposed by simplified bacterial community F1[J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 39(8): 35-39,76 (in Chinese)
李莹, 董桂军, 方旭, 等. 简化的纤维素分解复合菌系 F1 的菌株组成动态[J]. *环境科学与技术*, 2016, 39(8): 35-39,76
- [3] Ai SQ, Zhao YQ, Sun ZY, et al. Change of bacterial community structure during cellulose degradation by the microbial consortium[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2018, 34(11): 1794-1808 (in Chinese)
艾士奇, 赵一全, 孙志远, 等. 复合菌系降解纤维素过程中微生物群落结构的变化[J]. *生物工程学报*, 2018, 34(11): 1794-1808
- [4] Xu CF, Ai SQ, Shen GN, et al. Microbial degradation of lignocellulose[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2019, 35(11): 2081-2091 (in Chinese)
许从峰, 艾士奇, 申贵男, 等. 木质纤维素的微生物降解[J]. *生物工程学报*, 2019, 35(11): 2081-2091
- [5] Zhang MJ, Qiu CH, Chai LW, et al. Screening, identification and fermentation optimization cold-adapted fungi with high efficiency of cellulose degradation[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(10): 2494-2503 (in Chinese)
张梦君, 邱晨浩, 柴立伟, 等. 高效降解纤维素低温真菌的筛选、鉴定及发酵优化[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(10): 2494-2503
- [6] Xie CX, Sun JZ, Li CL, et al. Exploring the lignin degradation by bacteria[J]. *Microbiology China*, 2015, 42(6): 1122-1132 (in Chinese)
谢长校, 孙建中, 李成林, 等. 细菌降解木质素的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(6): 1122-1132
- [7] Milczarek G, Inganas O. Renewable cathode materials from biopolymer/conjugated polymer interpenetrating networks[J]. *Science*, 2012, 335(6075): 1468-1471
- [8] Beckham GT, Johnson CW, Karp EM, et al. Opportunities and challenges in biological lignin valorization[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2016, 42: 40-53
- [9] Li JH, Zhang Y, Liu ZQ. Influence of chemical pretreatment technology on the digestibility of lignocellulose[J]. *Current Biotechnology*, 2011, 1(6): 421-425 (in Chinese)
李建华, 张越, 刘仲齐. 化学处理方法对木质纤维素降解效率的影响评述[J]. *生物技术进展*, 2011, 1(6): 421-425
- [10] Liu Y. Research progress on biodegradable lignin[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2014(10): 3047-3051 (in Chinese)
刘云. 生物降解木质素的研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2014(10): 3047-3051
- [11] Zhou JY, Zhang FQ. Studies on the Mn-peroxidase and laccase from fungus II. The Mn-peroxidase produced by a basidiomycete, *Pycnoporus sanguineus* K-2352[J]. *Microbiology China*, 1994, 21(3): 152-156 (in Chinese)
周金燕, 张发群. 真菌产生的锰过氧化物酶和漆酶研究 II. 一株产锰过氧化物酶的担子菌——血红密孔菌 K-2352[J]. *微生物学通报*, 1994, 21(3): 152-156
- [12] Chi YJ, Yi HW. Lignin degradation mechanisms of ligninolytic enzyme system, manganese peroxidase, laccase and lignin peroxidase, produced by wood white rot fungi[J]. *Mycosystema*, 2007, 26(1): 153-160 (in Chinese)
池玉杰, 伊洪伟. 木材白腐菌分解木质素的酶系统-锰过氧化物酶、漆酶和木质素过氧化物酶催化分解木质素的机制[J]. *菌物学报*, 2007, 26(1): 153-160
- [13] Jiao YZ, Gao Z, Li G, et al. Effect of different indigenous microorganisms and its composite microbes on degradation of corn straw[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2015, 31(23): 201-207 (in Chinese)
焦有宙, 高赞, 李刚, 等. 不同土著菌及其复合菌对玉米秸秆降解的影响[J]. *农业工程学报*, 2015, 31(23): 201-207
- [14] Li AM, Li GQ, Chang Y, et al. Research progress on lignin degradation by white rot fungi[J]. *Edible and Medicinal Mushrooms*, 2015, 23(2): 95-101 (in Chinese)
李阿敏, 李国庆, 常艳, 等. 白腐菌降解木质素的研究进展[J]. *食药菌*, 2015, 23(2): 95-101
- [15] Jin J, Kang WL, Zhang YX, et al. Effects of Cu²⁺ and pH on degradation of lignin and cellulose in straw by *Coriolor versicolor*[J]. *Food Science*, 2009, 30(20): 173-177 (in Chinese)
金剑, 康文丽, 张焱鑫, 等. 不同 Cu 离子浓度和 pH 值对云芝降解秸秆中木质素和纤维素的影响[J]. *食品科学*, 2009, 30(20): 173-177

- [16] Song LL, Zhang YL, Zhang ZP, et al. Study on the degradation of lignin in tobacco stem by liquid fermentation with white rot fungi[J]. Journal of Light Industry, 2019, 34(1): 36-42 (in Chinese)
宋丽丽, 张永良, 张志平, 等. 白腐菌液体发酵降解烟梗木质素的研究[J]. 轻工学报, 2019, 34(1): 36-42
- [17] Liu T. Effects of stalk granularity, inoculate carrier on value of straw nutrition by *Pleurotus ostreatus*[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2008 (in Chinese)
刘坦. 秸秆粒度、接种载体对侧耳菌提高玉米秸秆营养价值的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2008
- [18] Zhu YS, Zhang HB, Zhang YL, et al. Lignocellulose degradation, enzyme production and protein enrichment by *Trametes versicolor* during solid-state fermentation of corn stover[J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(45): 9182-9192
- [19] Erden E, Ucar MC, Kaymaz Y, et al. New and different lignocellulosic materials from Turkey for laccase and manganese peroxidase production by *Trametes versicolor*[J]. Engineering in Life Sciences, 2009, 9(1): 60-65
- [20] Zhang LH, Liu WX, Ge KS, et al. The optimization of manganese peroxidase production by *Trametes versicolor*[J]. Microbiology China, 2005, 32(5): 98-102 (in Chinese)
张连慧, 刘卫晓, 葛克山, 等. 变色栓菌产锰过氧化物酶的条件优化[J]. 微生物学通报, 2005, 32(5): 98-102
- [21] Zhang NL, Fu GY, Xu YZ, et al. Study on the water-soluble lignin degradation by *Aspergillus* sp. F-1[J]. Environmental Science & Technology, 2019, 42(2): 38-44 (in Chinese)
张年磊, 付广义, 许友泽, 等. *Aspergillus* sp. F-1 降解水溶性木质素的研究[J]. 环境科学与技术, 2019, 42(2): 38-44
- [22] Zhao SL, Ren FE, Liu JL, et al. Screening, identification and optimization of fermentation conditions of an antagonistic actinomycetes strain to *Setosphaeria turcica*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(10): 1228-1236 (in Chinese)
赵淑莉, 任飞娥, 刘金亮, 等. 玉米大斑病生防放线菌的筛选鉴定及发酵条件优化[J]. 微生物学报, 2012, 52(10): 1228-1236
- [23] Han YY, Zhang GP, Zhang PF, et al. Isolation and identification of culturable fungi on the walls and winejar in Lujiu winery of Changzhi[J]. Mycosystema, 2019, 38(1): 39-47 (in Chinese)
韩燕燕, 张桂萍, 张鹏飞, 等. 露酒酒窖壁及酒缸上可培养真菌的分离和鉴定[J]. 菌物学报, 2019, 38(1): 39-47
- [24] Zhu H, Qu F, Zhu LH. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride[J]. Nucleic Acids Research, 1993, 21(22): 5279-5280
- [25] Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi[J]. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 2012, 109(16): 6241-6246
- [26] Kang Y, Li SY, Sun XY, et al. Study on screening, identification and capability of lignin-degrading fungi for landscaping waste[J]. Forest Research, 2019, 32(3): 80-87 (in Chinese)
康跃, 李素艳, 孙向阳, 等. 园林废弃物木质素降解真菌的筛选、鉴别及其能力研究[J]. 林业科学研究, 2019, 32(3): 80-87
- [27] Couto SR, Rodríguez A, Paterson RRM, et al. Laccase activity from the fungus *Trametes hirsuta* using an air-lift bioreactor[J]. Letters in Applied Microbiology, 2006, 42(6): 612-616
- [28] Kuwahara M, Glenn JK, Morgan MA, et al. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*[J]. FEBS Letters, 1984, 169(2): 247-250
- [29] Wei JC. Handbook of Fungal Identification[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1979: 493-500 (in Chinese)
魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 493-500
- [30] Wu W, Dun BQ, Jiang XP, et al. Separation and filtration of high effective lignin-degradation fungi[J]. Food Science and Technology, 2008, 33(3): 22-25 (in Chinese)
吴薇, 顿宝庆, 姜训鹏, 等. 高效木质素降解菌的分离筛选[J]. 食品科技, 2008, 33(3): 22-25
- [31] Dong XJ, Cao FX, Chen J, et al. Comparison of lignin degradation enzymes produced by three white-rot fungi[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2007, 27(3): 131-135 (in Chinese)
董旭杰, 曹福祥, 陈静, 等. 3 种白腐菌木质素降解酶的比较[J]. 中南林业科技大学学报, 2007, 27(3): 131-135
- [32] Li C. Study on screening and culture conditions of bamboo cutting piles for promoting rotten microbes[D]. Baoding: Master's Thesis of Hebei University, 2008 (in Chinese)
李超. 竹伐桩促腐微生物的筛选及培养条件的研究[D]. 保定: 河北大学硕士学位论文, 2008
- [33] Du HP. Study on biodegradation of straw by several fungi[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Forestry University, 2006 (in Chinese)
杜海萍. 几种真菌对稻草生物降解的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学硕士学位论文, 2006
- [34] Liu S. Screening of straw degradation strains under medium-low temperature and their degradation effects on crop straw[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2011 (in Chinese)
刘爽. 中低温秸秆降解菌的筛选及其秸秆降解效果研究[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2011