

低温降解玉米秸秆的木霉菌株筛选

曾叶¹, 庄文颖², 余知和^{*1}, 曾昭清^{*2}

1 长江大学生命科学学院, 湖北 荆州 434025

2 中国科学院微生物研究所 真菌学国家重点实验室, 北京 100101

曾叶, 庄文颖, 余知和, 曾昭清. 低温降解玉米秸秆的木霉菌株筛选[J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 3939-3951.

ZENG Ye, ZHUANG Wenying, YU Zhihe, ZENG Zhaoqing. Screening of *Trichoderma* strains for maize straw degradation at low temperature[J]. Microbiology China, 2023, 50(9): 3939-3951.

摘要:【背景】木霉是自然界中常见的纤维素和半纤维素降解菌, 在农业废弃物降解中具有重要应用潜力。【目的】筛选可在低温环境降解玉米秸秆的木霉菌株。【方法】测定 31 种木霉 111 个菌株在低温下的生长状况、水解纤维素和木聚糖产生的透明圈直径及部分菌株对玉米秸秆的相对降解率(relative degradation rate, RDR); 利用 DNS 法测定不同 RDR 代表菌株的纤维素滤纸酶(filter paper cellulase, FPase)、羧甲基纤维素酶(carboxymethyl cellulase, CMCCase)和木聚糖酶(xylanase)活性, 并分析它们在不同发酵阶段的酶活与秸秆降解率的关系。【结果】在 10 °C 和 5 °C 培养分别有 100 株和 42 株供试菌株能够生长, 在 15 °C 均能生长, 其中 19 个菌株培养 6 d 产生的水解纤维素和木聚糖产生的透明圈直径大于 60 mm、培养 10 d 对玉米秸秆的 RDR 为 0.45%–8.09%; 菌株 9145、TC425、TC505 和 8987 的 FPase、CMCase 和 xylanase 活性随着培养时间呈现动态变化, 其中前两者的活性变化趋势基本一致, 与 RDR 的关系密切。【结论】钩状木霉、西蒙斯木霉、深绿木霉和深褐木霉菌株在低温条件下对玉米秸秆具有较高的降解能力, 将为后续玉米秸秆腐熟剂开发、降解机理研究及秸秆资源化利用提供种质资源。

关键词: 丝状真菌; 生物降解; 纤维素酶; 木聚糖酶; 水解透明圈; 相对降解率

资助项目: 中国科学院战略性先导科技专项(XDA28030401); 国家自然科学基金(32270009)

This work was supported by the Strategic Priority Research Program of Chinese Academy of Sciences (XDA28030401) and the National Natural Science Foundation of China (32270009).

*Corresponding authors. E-mail: YU Zhihe, zhiheyu@hotmail.com; ZENG Zhaoqing, zengzq@im.ac.cn

Received: 2022-12-13; Accepted: 2023-02-15; Published online: 2023-03-07

Screening of *Trichoderma* strains for maize straw degradation at low temperature

ZENG Ye¹, ZHUANG Wenyong², YU Zhihe^{*1}, ZENG Zhaoqing^{*2}

¹ College of Life Sciences, Yangtze University, Jingzhou 434025, Hubei, China

² State Key Laboratory of Mycology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: [Background] Species of *Trichoderma* are common cellulose and hemicellulose-degrading fungi in nature and play an important role in the degradation of agricultural wastes. [Objective] To screen out *Trichoderma* strains that can degrade maize straw under low temperature. [Methods] This study determined the growth rates and the diameter of hydrolytic transparent circle produced by cellulase and xylanase of 111 strains belonging to 31 *Trichoderma* species under low temperature, as well as the relative degradation rate (RDR) of the representative strains on maize straw. The cellulose filter paper enzyme (FPase), carboxymethyl cellulase (CMCase), and xylanase activities of the representative strains with different RDR values were determined by the DNS method, and the relationship between their enzyme activities and RDR in different fermentation stages were further analyzed. [Results] All the tested strains were able to grow at 15 °C, whereas, 100 and 42 out of them could grow at 10 °C and 5 °C, respectively. Among them, 19 strains produced hydrolytic both cellulose and xylan transparent circles with diameters more than 60 mm after 6 days, and their RDRs on maize straw after 10 days were 0.45%–8.09%. The activities of FPase, CMCase, and xylanase of the strains 9145, TC425, TC505, and 8987 showed a dynamic change with the cultivation time, of which the tendency of FPase and CMCase was basically identical and closely related to the RDR. [Conclusion] The strains of *T. atrobrunneum*, *T. atroviride*, *T. hamatum*, and *T. simmonsii* show high degradation rates of maize straw at low temperatures, which will provide germplasm resources for subsequent development of ripening agent, degradation mechanism research, and resource utilization of maize straw.

Keywords: filamentous fungi; biodegradation; cellulase; xylanase; hydrolytic transparent circle; relative degradation rate

黑土地被喻为“耕地中的大熊猫”，是我国粮食安全的“压舱石”^[1]。多年来，由于过度开发利用，黑土地品质退化严重^[2]，如何保护和治理黑土地退化问题迫在眉睫^[3-4]。秸秆还田能在一定程度上增加土壤有机质含量、改善土壤理化性状、提高土壤养分有效性，同时可促进土壤微生物活动，为农作物根系创造良好的生存环境，减轻病害发生，是黑土地保护和治理的

有效方式之一^[5]。

由于作物秸秆的主要成分是木质纤维素，其晶体结构由半纤维素、纤维素和木质素组成，难于自然降解^[6]。通过高效无污染的生物法处理纤维素资源被认为是有潜力的处理方式，具有广阔的应用前景，符合可持续发展战略^[7-8]。相关的研究表明，木霉、曲霉、毛霉、根霉、青霉等真菌及部分细菌类群有较强的秸秆降解

能力^[7-10]。如农业废弃物堆肥接种哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)后,能将发酵周期从 23 d 缩短至 14 d^[11];经蒸汽爆破预处理的玉米秸秆添加康宁木霉(*T. koningii*)发酵 6 d 后,纤维素和半纤维素含量分别降低 19.37%和 63.54%^[12]。由于木霉属真菌具有较高的产纤维素酶能力且酶系较全,目前已广泛应用于秸秆还田的微生物复合菌剂研究^[13-15]。

木霉属真菌种类多、分布广泛,部分成员具有较强的低温适应性^[16]。本研究旨在利用课题组保藏的丰富木霉资源,通过测定菌株在低温下的生长、水解纤维素和木聚糖能力,以及发酵过程中纤维素滤纸酶、羧甲基纤维素酶和木聚糖酶活性及其对玉米秸秆的相对降解率,初步评价供试木霉菌株降解玉米秸秆的应用潜力,研究结果将对推进农作物秸秆的资源化利用及减少农业废弃物污染具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株与培养基

供试菌株包括 31 种木霉属[非洲哈茨木霉(*Trichoderma afroharzianum*)、深褐木霉(*T. atrobrunneum*)、深绿木霉(*T. atroviride*)、色精木霉(*T. chromospermum*)、盖姆斯木霉(*T. gamsii*)、球形孢木霉(*T. globoides*)、贵州木霉(*T. guizhouense*)、钩状木霉(*T. hamatum*)、河北木霉(*T. hebeiense*)、康宁木霉(*T. koningii*)、拟康宁木霉(*T. koningiopsis*)、光孢木霉(*T. laevisporum*)、新中国木霉(*T. neosinense*)、近深绿木霉(*T. paratroviride*)、近渐绿木霉(*T. paraviridescens*)、墨绿木霉(*T. perviride*)、彼得森木霉(*T. petersenii*)、假密梗木霉(*T. pseudodensum*)、垫状木霉(*T. pulvinatum*)、塔梗木霉(*T. pyramidale*)、俄罗斯木霉(*T. rossicum*)、四川木霉(*T. sichuanense*)、西蒙斯木霉(*T. simmonsii*)、弯梗木霉(*T. sinuosum*)、

球孢木霉(*T. sphaerosporum*)、里氏木霉(*T. reesei*)、直毛木霉(*T. strictipile*)、喜温木霉(*T. thermophilum*)、绒毛木霉(*T. tomentosum*)、中国热带木霉(*T. tropicosinense*)和绿木霉(*T. virens*)]的 111 个菌株,现保藏于中国科学院微生物研究所。

所用培养基包括马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、羧甲基纤维素钠培养基(CMC-Na)、木聚糖培养基(Xylan)和基础元素培养基(CBM)等,其配制参照文献[17-19]。玉米秸秆液体培养基是在 CBM 培养基中加入 5% (质量体积分数)自然风干后粉碎过 8 目筛的玉米秸秆粉。所有培养基制备后,121 °C 灭菌 20 min 备用。

1.2 主要试剂和仪器

DNS 试剂: NaOH 19.8 g, C₇H₄N₂O₇ 10.6 g, Na₂S₂O₅ 8.3 g, NaKC₄H₄O₆·4H₂O 306 g, C₆H₆O 7.6 mL,溶于 1 416 mL 去离子水,避光保存 7 d 备用。

50 mmol/L 柠檬酸缓冲液:柠檬酸 10.5 g 溶于 750 mL 去离子水,NaOH 调 pH 至 4.8,定容至 1 000 mL。

酒石酸钾钠、无水亚硫酸钠、3,5-二硝基水杨酸、木聚糖和刚果红,上海麦克林生化科技股份有限公司;苯酚、一水柠檬酸、柠檬酸三钠和羧甲基纤维素钠,国药集团化学试剂有限公司;滤纸,广州市云天实验室科技有限公司;紫外分光光度计,上海佑科仪器仪表有限公司;高压灭菌锅,致微(厦门)仪器有限公司。

1.3 菌株低温生长速率及水解纤维素和木聚糖透明圈直径测定

将保藏于 PDA 斜面的木霉菌株转接至 PDA 平板 25 °C 培养 3-5 d,取活化的菌落边缘直径 5 mm 菌块接种至 90 mm 的 PDA 平板,分别置 5、10 和 15 °C 光照培养箱(L12 h/D12 h)培养 6 d,用游标卡尺测量菌落生长半径(精确到小数点后两位)。

同样取活化的菌落边缘直径 5 mm 菌块分别接种至 CMC-Na 或 Xylan 平板, 置 15 °C 光照培养箱(L12 h/D12 h)培养 6 d。在培养皿中央加入刚果红溶液(2.5 g/L) 10 mL, 静置 15 min 后弃去染液, 再加入 1 mol/L 氯化钠溶液 10 mL 静置 20 min。用游标卡尺测量菌株水解纤维素和木聚糖产生的透明圈直径(精确到小数点后两位)。上述所有测定均设置 3 个重复。

1.4 孢子悬浮液制备

选取水解纤维素和木聚糖产生的透明圈直径大于 60 mm 的菌株转接至 PDA 平板, 室温培养至产生分生孢子, 用无菌水冲洗菌落表面, 将孢子悬浮液转移至无菌含玻璃珠的三角瓶, 充分振荡, 经灭菌的脱脂棉过滤后, 用血细胞计数板计数, 调整孢子悬浮液浓度至 10^7 CFU/mL。

1.5 玉米秸秆相对降解率测定

将孢子悬浮液按 1:15 (体积比)比例接种于玉米秸秆液体培养基, 15 °C、150 r/min 培养 10 d。将秸秆残渣 15 °C、4 000 r/min 离心 10 min, 65 °C 烘干, 测定玉米秸秆的相对降解率(relative degradation rate, RDR)。以添加等量无菌水作为对照组。

$RDR(\%) = (\text{对照干重 } W_0 - \text{处理干重 } W) / \text{对照干重 } W_0 \times 100$ 。

1.6 酶活测定

选取 RDR 不同的 4 个木霉菌株, 利用 DNS 法^[20]分别测定不同发酵阶段的纤维素滤纸酶(filter paper cellulase, FPase)、羧甲基纤维素酶(carboxymethyl cellulase, CMCCase)和木聚糖酶(xylanase)活性, 探究玉米秸秆降解过程中菌株的酶活动态变化。

1.6.1 粗酶液制备

按 1.4 制备孢子悬浮液, 接种于装有 150 mL 玉米秸秆液体培养基的 250 mL 锥形瓶, 15 °C、150 r/min 培养 35 d。每隔 7 d 取样 3 mL, 将发

酵液置 4 °C、8 000 r/min 离心 5 min, 上清液即为粗酶液。

1.6.2 FPase 与 CMCCase 活性测定

FPase 活性测定参照文献[20]: 将 1.5 mL 柠檬酸缓冲液(50 mmol/L)和 1 cm×6 cm (50 mg) 滤纸置于 25 mL 高硼硅螺口试管, 加入 0.5 mL 粗酶液, 对照组加等量 100 °C 灭活粗酶液, 50 °C 水浴 1 h; 随后加入 3 mL DNS 试剂摇匀, 沸水浴 10 min, 冷却后加 ddH₂O 至 25 mL, 测定 OD_{540} 。

CMCase 活性测定参照文献[20]: 将 1% (质量体积分数)羧甲基纤维素钠置于 25 mL 试管作为底物, 加入 0.5 mL 粗酶液, 对照组加等量 100 °C 灭活粗酶液, 50 °C 水浴 30 min; 随后加入 3 mL DNS 试剂摇匀, 沸水浴 10 min, 冷却后加 ddH₂O 至 25 mL, 测定 OD_{540} 。

葡萄糖标准曲线绘制: 称取 1 g 无水 C₆H₁₂O₆ 溶于 ddH₂O, 100 mL 定容, 将其稀释为 0、0.8、1.2、1.6、2.0、2.4、2.8、3.2 mg/mL 等系列浓度。加入等量柠檬酸缓冲液(50 mmol/L)和 DNS 试剂, 测定 OD_{540} , 以葡萄糖浓度为横坐标、光吸收值为纵坐标绘制标准曲线。

FPase 与 CMCCase 酶活定义: 每分钟催化水解生成 1 μmol 葡萄糖的酶量为 1 个酶活力单位(IU)。

1.6.3 Xylanase 活性测定

Xylanase 活性测定参照文献[20]: 将 1.5 mL 木聚糖溶液(1 mg/mL)置于 25 mL 试管作为底物, 加入 0.5 mL 粗酶液, 对照组加等量 100 °C 灭活粗酶液, 50 °C 水浴 30 min; 随后加入 3 mL DNS 试剂摇匀, 沸水浴 10 min, 冷却后加 ddH₂O 至 25 mL, 测定 OD_{540} 。

木聚糖标准曲线绘制: 参照 1.6.2, 配制 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.6 mg/mL 等系列浓度的木聚糖溶液, 分别测定 OD_{540} , 以木聚

糖浓度为横坐标、光吸收值为纵坐标绘制标准曲线。

Xylanase 酶活定义同 1.6.2。

1.7 数据分析

用 SPSS 26 进行显著性分析,采用 SigmaPlot 12.5 作图。

2 结果与分析

2.1 供试菌株在低温下的生长情况

供试 111 个菌株在 5、10 和 15 °C 的培养结果显示,5 °C 条件下有 42 个菌株生长,培养 6 d

的菌落半径为 5.45–23.43 mm; 10 °C 条件下有 100 个菌株生长,培养 6 d 的菌落半径为 3.76–31.24 mm; 15 °C 条件下全部菌株均生长,其中 13 株培养 6 d 的菌落半径超过 60 mm,最大菌落半径达 82.25 mm (表 1)。

2.2 供试菌株水解纤维素和木聚糖能力初评

由于刚果红溶液能将 CMC-Na 和 Xylan 染色,根据菌落的水解透明圈直径大小初步评价菌株水解纤维素和木聚糖的能力,即无水解能力($D=0$ mm)、弱水解能力($0\text{ mm}<D<30$ mm)、中等水解能力($30\text{ mm}\leq D<60$ mm)和强水解能力

表 1 木霉菌株低温生长速率和水解透明圈直径

Table 1 Growth rates at low temperature and hydrolytic zone diameter of *Trichoderma* strains

菌株编号 Strain No.	菌落生长半径 Colony growth radius (mm)			水解羧甲基纤维素钠和木聚糖透明圈直径 Hydrolyzed by CMC-Na and xylan transparent circle diameter (mm)	
	5 °C	10 °C	15 °C	CMC-Na	Xylan
11338	0.00±0.00	10.09±0.37	48.55±3.67	37.45±2.09	33.12±1.97
TC515	0.00±0.00	7.97±0.51	31.56±0.32	36.35±1.94	34.11±1.15
TC688	0.00±0.00	16.02±0.36	54.06±0.57	74.30±3.01	90.00±0.00
TC685	0.00±0.00	18.21±0.78	56.46±1.10	73.48±3.66	90.00±0.00
11328	0.00±0.00	6.16±1.22	44.84±5.40	29.95±1.14	27.18±1.03
11331	10.47±0.64	17.03±1.89	43.29±0.26	23.33±0.95	21.92±0.69
10088	9.13±0.68	14.43±2.08	70.80±0.79	27.27±0.13	44.66±1.07
8989	0.00±0.00	7.54±0.48	34.03±1.00	15.42±0.84	39.46±9.17
8234	0.00±0.00	9.55±0.35	62.34±1.21	39.89±1.12	27.12±4.58
TC621	0.00±0.00	14.26±1.60	60.71±1.96	43.57±1.33	41.69±14.01
7985	0.00±0.00	10.55±1.22	69.06±0.65	69.02±2.16	90.00±0.00
9027	7.81±0.52	13.48±1.01	46.34±6.61	50.98±4.75	69.16±1.20
TC689	0.00±0.00	14.72±0.49	50.16±0.38	34.90±1.54	40.50±14.52
8704	13.81±0.53	24.06±1.55	46.71±0.72	50.18±0.77	70.31±1.78
9869	10.85±1.45	17.94±0.40	50.19±1.57	37.68±5.50	66.57±2.77
9792	10.33±1.55	14.69±1.21	59.65±1.13	35.06±0.89	40.02±2.08
10173	0.00±0.00	14.20±1.82	33.11±1.81	39.18±0.82	56.66±3.94
11537	9.16±1.38	9.04±0.74	60.24±1.10	35.16±2.01	26.27±2.28
11166	10.31±0.80	18.37±1.26	49.63±1.02	55.15±2.77	88.33±2.89
TC966	0.00±0.00	7.59±0.56	59.03±1.78	52.21±7.37	18.25±3.05
9244	0.00±0.00	0.00±0.00	28.01±1.53	16.82±0.47	16.82±0.47
7932	10.10±1.26	15.86±0.43	40.85±0.84	0.00±0.00	0.00±0.00
8019	0.00±0.00	14.33±0.55	29.06±1.09	0.00±0.00	0.00±0.00
8085	8.95±0.95	15.30±1.11	33.99±1.13	37.38±2.29	59.64±5.51
9278	0.00±0.00	0.00±0.00	33.43±1.12	0.00±0.00	14.81±0.62
7896	0.00±0.00	12.03±0.75	29.21±1.23	0.00±0.00	14.09±0.27

(待续)

(续表 1)

菌株编号 Strain No.	菌落生长半径 Colony growth radius (mm)			水解羧甲基纤维素钠和木聚糖透明圈直径 Hydrolyzed by CMC-Na and xylan transparent circle diameter (mm)	
	5 °C	10 °C	15 °C	5 °C	10 °C
9704	8.10±0.62	14.54±0.72	23.18±0.79	0.00±0.00	14.26±1.79
10178	9.73±0.86	13.17±0.28	33.00±0.37	0.00±0.00	0.00±0.00
TC789	0.00±0.00	0.00±0.00	53.36±0.71	56.24±2.55	90.00±0.00
10648	0.00±0.00	0.00±0.00	26.36±0.90	39.97±4.18	56.32±3.24
TC680	0.00±0.00	10.80±0.42	36.58±0.73	36.59±0.76	27.68±0.72
TC810	0.00±0.00	11.79±0.26	43.92±0.59	46.61±1.98	35.14±1.55
TC521	0.00±0.00	16.41±1.29	43.00±1.56	50.92±11.66	32.43±1.32
8881	11.82±1.36	9.62±0.76	44.85±1.16	38.51±1.76	32.73±1.44
TC484	0.00±0.00	8.68±0.75	43.27±0.82	46.09±1.06	24.64±1.68
TC505	0.00±0.00	17.88±0.28	47.64±1.87	64.63±4.51	66.13±3.28
TC96	0.00±0.00	7.64±0.95	40.87±1.19	41.47±1.46	48.00±1.63
TC110	0.00±0.00	13.06±0.64	48.17±0.47	54.56±2.80	58.31±1.10
TC800	0.00±0.00	9.32±1.25	44.41±0.57	52.27±5.26	58.95±0.82
TC292	0.00±0.00	19.82±1.05	51.83±0.57	68.34±2.51	60.17±0.28
TC835	0.00±0.00	14.02±2.02	44.40±0.86	51.50±6.52	80.42±1.92
TC425	0.00±0.00	13.92±0.36	58.08±1.24	65.04±3.19	77.65±0.88
TC777	0.00±0.00	0.00±0.00	9.86±0.08	26.52±0.30	31.87±1.04
7723	12.09±1.33	16.44±0.81	61.99±1.79	49.21±0.96	27.44±1.38
9065	9.50±1.79	18.12±0.48	50.88±2.45	48.37±1.46	71.77±1.54
9024	16.89±0.95	15.16±0.35	46.68±0.53	24.04±4.29	52.56±2.51
11818	0.00±0.00	0.00±0.00	34.71±2.12	0.00±0.00	66.68±0.67
8985	0.00±0.00	9.48±0.41	40.51±0.43	53.85±0.46	46.65±0.44
7819	0.00±0.00	12.72±0.73	52.44±0.50	38.99±0.78	37.64±2.84
8706	0.00±0.00	0.00±0.00	40.97±1.74	67.64±1.69	70.43±1.78
9052	19.22±6.03	14.83±0.36	57.28±1.55	73.53±0.81	66.91±1.59
9107	0.00±0.00	8.79±0.37	48.57±1.35	44.78±1.59	41.50±0.36
9715	14.60±1.25	13.60±1.54	40.12±1.46	41.43±36.26	48.27±5.58
9708	10.01±1.31	25.81±1.48	49.35±2.93	49.57±1.06	58.79±4.89
9769	10.78±0.78	21.35±0.93	54.30±2.80	43.18±12.25	68.47±4.81
8942	0.00±0.00	12.15±0.80	57.68±5.33	33.05±3.25	46.62±1.42
8979	0.00±0.00	13.34±0.99	69.71±1.81	53.07±2.37	69.19±3.03
TC670	0.00±0.00	17.96±0.90	64.47±6.73	47.62±2.22	42.50±1.99
9868	0.00±0.00	9.24±1.64	49.56±5.15	33.05±1.09	49.25±0.80
9929	0.00±0.00	10.68±1.15	43.78±5.07	24.90±0.76	29.50±0.97
11401	0.00±0.00	8.78±0.27	68.30±5.82	39.80±2.61	17.05±3.72
10066	0.00±0.00	0.00±0.00	41.26±0.79	58.49±1.27	90.00±0.00
10089	0.00±0.00	0.00±0.00	47.55±1.41	68.92±0.08	90.00±0.00
9195	15.05±0.99	23.53±0.33	43.39±1.23	0.00±0.00	0.00±0.00
8932	10.03±2.78	21.76±0.40	63.81±2.94	65.59±1.49	71.95±1.87
9758	13.93±0.43	18.85±0.26	41.63±1.52	45.55±1.51	47.91±7.49
11174	23.43±5.95	31.24±0.49	82.25±8.23	90.00±0.00	90.00±0.00
10783	10.78±0.78	22.71±0.56	48.49±0.91	41.23±1.46	44.89±3.75
TC275	0.00±0.00	16.22±0.38	34.27±4.73	36.27±1.33	42.75±5.33

(待续)

(续表 1)

菌株编号 Strain No.	菌落生长半径 Colony growth radius (mm)		水解羧甲基纤维素钠和木聚糖透明圈直径 Hydrolyzed by CMC-Na and xylan transparent circle diameter (mm)		
	5 °C	10 °C	5 °C	10 °C	
11257	12.77±0.95	15.57±0.93	41.17±2.34	51.81±2.13	64.94±2.89
9152	0.00±0.00	8.55±0.14	52.90±1.91	0.00±0.00	63.85±1.54
9371	0.00±0.00	7.44±0.77	30.77±1.43	47.15±3.24	53.30±2.67
11351	0.00±0.00	7.49±0.70	22.52±1.16	11.41±1.40	48.24±1.39
TC272	0.00±0.00	8.15±0.67	47.85±1.69	43.76±2.25	49.27±0.62
TC223	0.00±0.00	31.07±0.22	59.96±3.70	43.92±0.96	73.98±2.83
10887	0.00±0.00	17.50±1.46	27.82±2.09	55.10±3.01	90.00±0.00
7921	0.00±0.00	15.63±0.37	39.20±1.97	61.42±1.73	90.00±0.00
8987	10.94±0.99	14.47±0.21	46.02±1.11	67.73±2.28	62.18±2.03
TC84	0.00±0.00	15.54±0.36	35.36±1.64	42.01±1.67	49.55±0.32
9360	10.51±2.12	17.50±0.45	37.86±2.42	58.71±2.10	52.44±14.03
8931	0.00±0.00	11.05±1.14	37.84±0.85	49.72±0.59	44.36±1.62
QM9414	0.00±0.00	0.00±0.00	6.68±2.71	5.64±4.89	27.72±0.84
9754	11.56±0.55	16.40±0.49	41.38±0.30	0.00±0.00	73.65±0.92
9761	0.00±0.00	0.00±0.00	39.40±1.69	49.66±3.88	52.10±0.62
TC143	0.00±0.00	3.76±0.15	32.83±1.22	13.80±1.34	15.40±0.56
TC772	0.00±0.00	3.85±0.46	33.55±1.17	9.19±0.12	13.56±0.53
TC774	7.79±0.96	12.98±0.49	34.12±0.22	70.74±2.02	90.00±0.00
10094	0.00±0.00	13.89±0.37	42.95±0.32	42.68±0.49	42.35±2.40
9154	8.92±1.71	17.95±0.22	47.55±1.28	75.69±2.50	77.98±2.15
9145	0.00±0.00	13.41±0.96	41.26±2.39	90.00±0.00	90.00±0.00
8798	0.00±0.00	12.00±0.65	49.65±0.59	60.71±3.23	60.88±0.61
10125	12.31±1.89	14.86±0.62	45.61±0.65	50.16±0.85	53.60±1.32
10132	0.00±0.00	4.16±0.15	21.77±0.37	10.99±0.75	0.00±0.00
11532	0.00±0.00	15.13±0.12	73.75±1.54	61.58±2.27	90.00±0.00
TC168	0.00±0.00	5.18±0.10	21.23±0.48	24.11±0.37	33.36±0.45
11667	5.51±0.25	5.12±0.14	35.29±1.94	28.64±0.38	33.77±0.85
11681	5.45±0.37	6.81±0.30	35.97±0.08	38.31±3.23	35.43±0.76
9947	9.10±0.79	16.85±0.32	39.70±1.17	0.00±0.00	0.00±0.00
8056	0.00±0.00	11.28±1.52	45.00±1.42	35.46±1.17	67.87±2.31
10129	24.36±2.16	27.65±1.27	58.74±2.14	0.00±0.00	19.28±1.94
TC422	0.00±0.00	16.78±1.01	52.31±1.45	0.00±0.00	33.44±6.18
10363	0.00±0.00	11.91±0.13	61.52±1.21	10.02±1.17	22.24±0.25
TC420	0.00±0.00	17.66±1.62	57.00±1.40	13.40±0.66	32.49±13.12
TC335	0.00±0.00	24.38±0.71	47.74±0.36	0.00±0.00	90.00±0.00
11350	12.34±1.08	15.50±0.85	42.67±0.64	53.84±2.96	43.82±2.20
11590	9.68±0.93	17.68±0.32	47.15±0.50	58.89±1.23	29.53±1.81
8082	12.21±0.40	16.30±2.26	32.33±0.74	33.63±2.12	42.64±6.21
9304	0.00±0.00	11.91±0.69	28.39±0.84	0.00±0.00	0.00±0.00
TC12	10.71±0.61	20.90±2.35	44.85±1.67	44.35±1.59	74.93±0.92
TC923	9.53±0.29	29.17±0.69	56.41±0.79	90.00±0.00	90.00±0.00
TC897	10.70±0.94	20.52±3.39	49.50±5.00	55.01±1.02	90.00±0.00

加粗字体表示对纤维素和木聚糖具有强水解能力

Numbers in bold indicate strong hydrolysis capacity for cellulose and xylan.

($D \geq 60$ mm)。结果显示,透明圈直径大于 60 mm 的菌株有 19 株(表 1, 菌株编号加粗), 其中, 菌株 9145、11174 和 TC923 的水解 CMC-Na 和 xylan 透明圈直径均达 90 mm。

2.3 木霉菌株对玉米秸秆的相对降解率

玉米秸秆降解率测定结果表明, 水解 CMC-Na 和 xylan 透明圈直径大于 60 mm 的 19 个菌株对玉米秸秆 10 d 的相对降解率为 0.45%–8.09% (图 1), 其中西蒙斯木霉(*Trichoderma simmonsii*) 9145 的 RDR 最高, 达 8.09%, 深褐木霉(*T. atrobrunneum*) TC688、深绿木霉(*T. atroviride*) 7985、钩状木霉(*T. hamatum*) TC425、西蒙斯木霉(*T. simmonsii*)

8798 和 9154 的 RDR 分别为 6.28%、5.67%、6.23%、6.10%和 5.87%。

2.4 纤维素滤纸酶、羧甲基纤维素酶和木聚糖酶活性

酶活性测定结果显示, 菌株 9145、TC425、TC505 和 8987 的 FPase 和 CMCase 活性随着培养时间呈现动态变化, 变化趋势基本一致(图 2A、2B)。

FPase 活性方面, 在第 14–28 天期间, 菌株 TC425 和 9145 不断增加, 第 28 天达到最大值(分别为 0.378 IU/mL 和 0.196 IU/mL); 在第 14–35 天期间, 8987 和 TC505 持续下降, 第 35 天为最低值(分别为 0.094 IU/mL 和 0.050 IU/mL)。

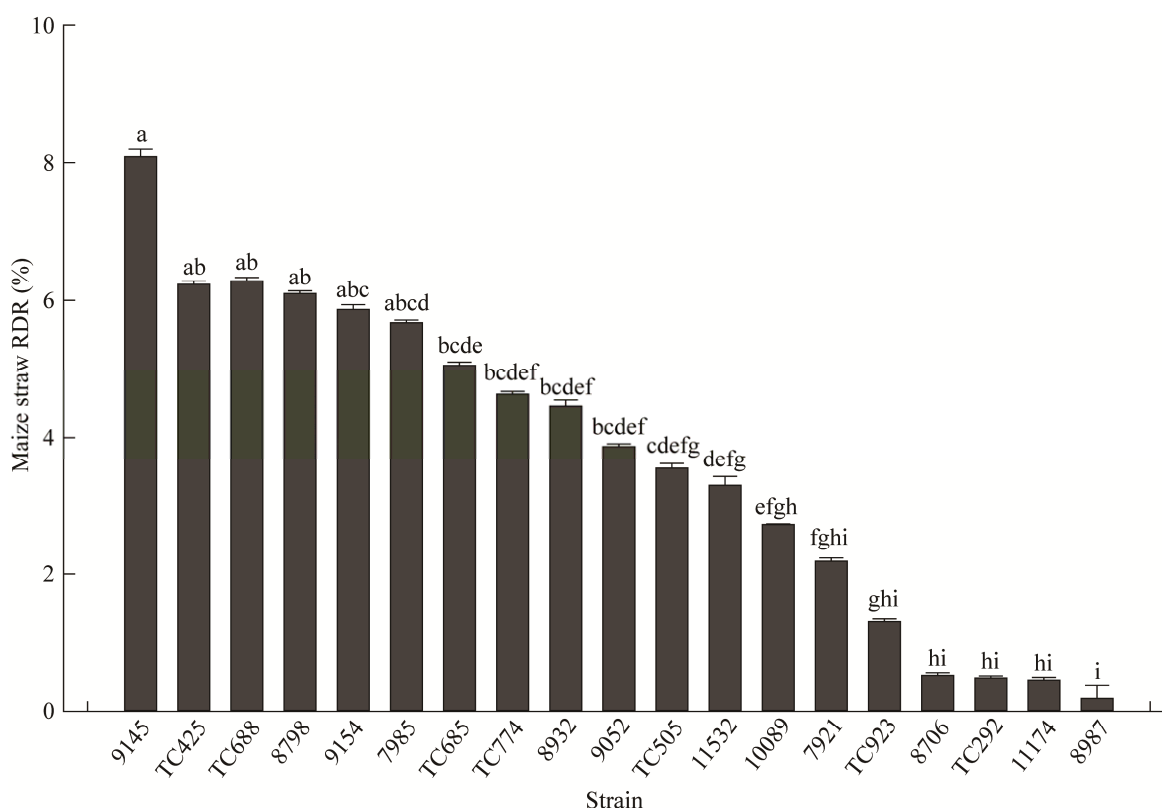


图 1 水解透明圈直径大于 60 mm 的木霉菌株对玉米秸秆 10 d 的相对降解率 不同小写字母表示处理间存在显著性差异($P < 0.05$). 下同

Figure 1 RDR of maize straw by *Trichoderma* strains with the diameter of hydrolytic transparent circles more than 60 mm for 10 days. Different lowercase letters above the bars indicate significant differences among isolates according to Duncan's test at $P < 0.05$. The same below.

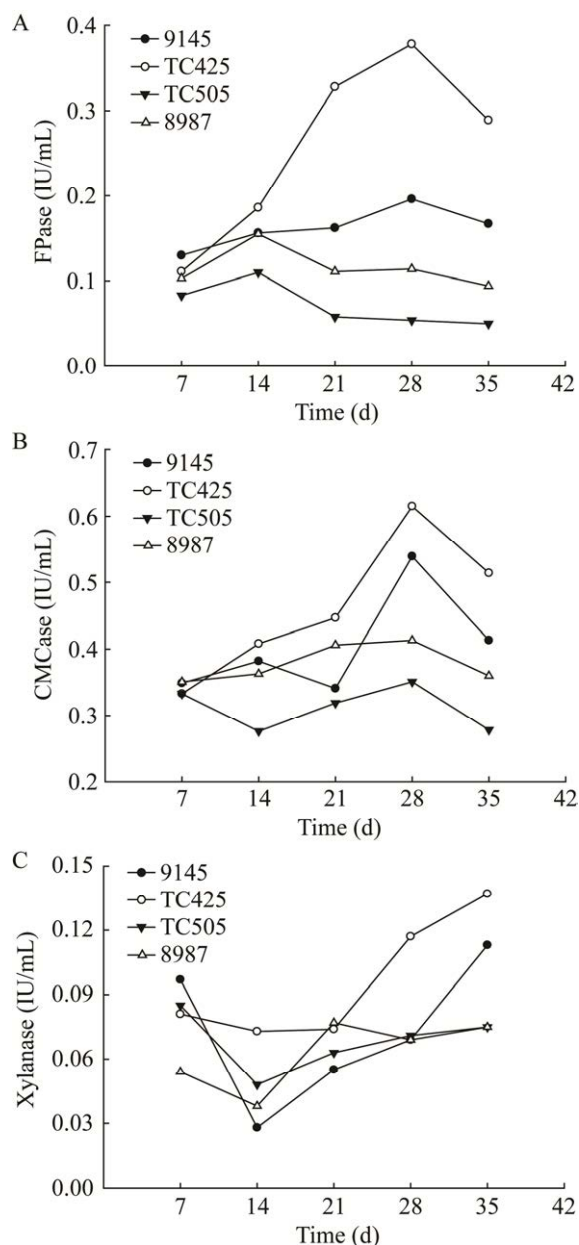


图2 代表菌株在第7–35天的纤维素滤纸酶(A)、羧甲基纤维素酶(B)和木聚糖酶(C)活性

Figure 2 FPase (A), CMCCase (B), xylanase (C) activities of the representative strains at the 7–35th day.

CMCase 活性方面, 菌株 TC425 和 8987 在第 7–28 天持续升高, 在第 28 天达到最大值(分别为 0.615 IU/mL 和 0.413 IU/mL); 9145 在第 7–35 天呈反复上升、下降趋势, 在第 28 天达最大值(0.539 IU/mL); TC505 在第 7–35 天呈先

下降后上升再下降的趋势, 在第 28 天达最大值(0.351 IU/mL)。

Xylanase 活性方面, 菌株 9145、TC425 和 TC505 在第 7–14 天先下降, 随后又逐渐上升; 第 35 天, 9145 和 TC425 的活性达到最高, 分别为 0.113 IU/mL 和 0.137 IU/mL (图 2C)。

2.5 酶活与降解率的关系

菌株 9145、TC425、TC505 和 8987 在第 7–35 天对玉米秸秆的 RDR 见图 3。菌株 TC425 和 9145 的 RDR 在第 0–14 天和 21–28 天增长较快, 基本上与菌株 FPase 和 CMCCase 酶活快速增长的时间一致。第 35 天, 菌株 TC425 和 9145 的 RDR 值达 18.95% 和 16.82%。

3 讨论与结论

黑土地通常指具有黑色或暗黑色腐殖质表土层、肥力高、土壤保水性好、适宜农耕的土地^[21]。秸秆还田是保护黑土地的重要技术模式之一, 包括深翻、碎混、堆沤、覆盖和制沼后沼渣还田等, 其中深翻还田是目前最主要的方式。我国东北地区拥有大面积的黑土地, 由于秋冬季的低温不利于微生物生长, 使得还

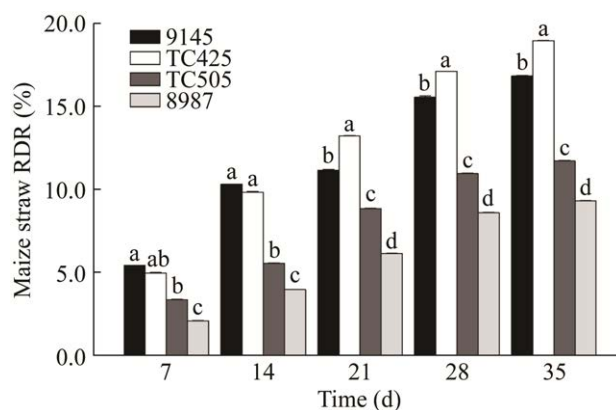


图3 代表菌株在第7–35天对玉米秸秆的相对降解率

Figure 3 RDR of maize straw by the representative strains at the 7–35th day.

田秸秆的自然降解周期变长、不彻底,从而导致土壤保水性下降、土地退化等问题。因此,发掘耐低温、高效降解秸秆的微生物资源能有效解决黑土地秸秆直接还田过程中的低温降解障碍^[22]。

研究表明,木霉、青霉、曲霉、酵母菌、芽孢杆菌、梭菌和枝孢菌等微生物在低温条件下具有良好的秸秆降解能力^[23-24]。其中,木霉由于能分泌酶系较全的纤维素水解酶和半纤维素水解酶,在秸秆降解应用方面备受关注^[25-26]。同时,该属成员环境适应性强,部分种类具有耐低温特性,曾被报道存在于南极等寒冷地区^[27]。因此,从课题组前期积累的大量木霉资源中筛选耐低温、高效降解秸秆的菌株,评价不同种、同种不同菌株对低温的耐受性,并分析它们在不同发酵阶段的酶活与秸秆降解率的关系,具有重要的理论意义和实践应用价值。

本研究对木霉属 31 种 111 个菌株开展低温耐受和玉米秸秆降解能力评价,结果表明,所有菌株均能在 15 °C 生长,部分能在 5 °C 和 10 °C 生长,一些能高效降解玉米秸秆,这些菌株主要属于钩状木霉、西蒙斯木霉、深绿木霉和深褐木霉等,其中钩状木霉和西蒙斯木霉曾用于生防研究^[28-32]。钩状木霉在亚洲、欧洲、北美洲和南美洲广泛分布,是土壤中木霉的优势种^[33]。我国木霉资源丰富,评价这些菌株在低温条件下对秸秆的降解能力十分必要,后续菌株筛选工作可集中于钩状木霉和西蒙斯木霉等种,同时有必要对初筛菌株进一步开展大田秸秆降解测试^[34]。

关于微生物秸秆降解能力的评价方法存在不同观点。李鹏^[35]认为,根据水解圈与菌落圈的比值来计算纤维素酶活力指数可以评价菌株的产纤维素酶能力。Baskaran 等^[36]提出刚果红染色透明水解圈大小可用于评价木霉产纤维素

酶的能力。本研究结果表明,经刚果红染色法产生的水解透明圈直径可用于初步评价菌株的产纤维素酶能力,如菌株 9145 形成的透明圈直径达到 90 mm,其对玉米秸秆 10 d 的相对降解率也最高(图 1)。因此,通过刚果红染色法产生的水解透明圈大小可用于秸秆降解菌株的快速初筛。

前期已有混合菌剂对秸秆降解效果的研究报道,如萨如拉等^[37]筛选到由木霉、青霉和芽孢杆菌等组成的复合菌系,在 15 °C 条件下对玉米秸秆的降解率为 32.21%。张鑫等^[38]筛选到 M44 复合菌系于 15 °C 培养 20 d,对玉米秸秆的降解率比对照组高 12.25%。王一如等^[39]的研究表明,优化后的菌群对玉米秸秆的降解潜力显著升高。本研究初步评价了木霉属 31 种 111 个菌株的水解纤维素和木聚糖透明圈直径、19 个菌株对玉米秸秆的相对降解率及 RDR 不同的 4 个菌株在不同发酵阶段的纤维素酶和木聚糖酶酶活,筛选到的钩状木霉 TC425 于 15 °C 培养 21 d 对玉米秸秆的 RDR 为 13.21%,培养 35 d 的 RDR 可达 18.95%,以上均为单菌株的降解结果,尚未探讨菌株复配的作用效果。然而,自然界中不同的微生物具有自身的优势,如细菌和真菌分别在秸秆降解的不同阶段发挥作用,若将它们搭配使用,使其发挥各自优势,降解效果应该会优于单一菌株,后续有必要进一步通过菌株复配实验进行验证。

筛选具有高降解能力的原始菌株是进行菌株改造、菌剂复配、机理探究的基础,今后的研究应关注低温下微生物降解秸秆的机制,明确温度、pH 及金属离子对菌株产纤维素酶能力的影响^[40],揭示降解秸秆时纤维素酶、木聚糖酶等相关酶系的启动机制,根据不同微生物对温度的耐受能力和产酶类型的差异,搭配 2-3 株细菌和真菌为腐熟剂研发奠定基础,跟踪测定腐

熟剂对土壤理化性质、土著微生物群落及作物生长的影响等, 为解决低温地区秸秆提供更多的理论技术支持。

REFERENCES

- [1] 于浩. 保护好“耕地中的大熊猫”: 黑土地保护法诞生记[J]. 中国人大, 2022(13): 20-22.
YU H. Protect the ‘giant panda in cultivated land’—the birth of the black land protection law[J]. The People’s Congress of China, 2022(13): 20-22 (in Chinese).
- [2] 魏孔明. 改善耕地资源利用与保护“南北失衡”状况研究[J]. 黑龙江粮食, 2022(6): 10-12.
WEI KM. Study on improving the ‘north-south imbalance’ in the utilization and protection of cultivated land resources[J]. Heilongjiang Grain, 2022(6): 10-12 (in Chinese).
- [3] 王天一, 黄善林, 李冬梅. 资源禀赋对农户黑土地保护行为的影响研究[J/OL]. 中国农业资源与区划, 2022. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3513.S.20220920.1023.002.html>.
WANG TY, HUANG SL, LI DM. Research on the influence of resource endowment on farmers’ black land protection behavior[J/OL]. Chinese Journal of Agricultural Resources and Regional Planning, 2022. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3513.S.20220920.1023.002.html> (in Chinese).
- [4] 谢淑娟, 匡耀求, 黄宁生. 中国发展碳汇农业的主要路径与政策建议[J]. 中国人口·资源与环境, 2010, 20(12): 46-51.
XIE SJ, KUANG YQ, HUANG NS. Main paths and policy proposals for the development of carbon-sinking agriculture in China[J]. China Population, Resources and Environment, 2010, 20(12): 46-51 (in Chinese).
- [5] 霍丽丽, 姚宗路, 赵立欣, 罗娟, 张沛祯. 秸秆综合利用减排固碳贡献与潜力研究[J]. 农业机械学报, 2022, 53(1): 349-359.
HUO LL, YAO ZL, ZHAO LX, LUO J, ZHANG PZ. Contribution and potential of comprehensive utilization of straw in GHG emission reduction and carbon sequestration[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2022, 53(1): 349-359 (in Chinese).
- [6] ZABED HM, AKTER S, YUN JH, ZHANG GY, AWAD FN, QI XH, SAHU JN. Recent advances in biological pretreatment of microalgae and lignocellulosic biomass for biofuel production[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2019, 105: 105-128.
- [7] KUMARI D, SINGH R. Pretreatment of lignocellulosic wastes for biofuel production: a critical review[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2018, 90: 877-891.
- [8] 张新杰, 周兴瑞, 孙慧颖, 孟亚南, 曾凡力. 拮抗植物病原真菌的纤维素/木质素降解菌株的筛选及鉴定[J]. 微生物学通报, 2023, 50(1): 251-261.
ZHANG XJ, ZHOU XR, SUN HY, MENG YN, ZENG FL. Screening and identification of cellulose/lignin-degrading strains against plant pathogenic fungi[J]. Microbiology China, 2023, 50(1): 251-261 (in Chinese).
- [9] BEHERA BC, SETHI BK, MISHRA RR, DUTTA SK, THATOI HN. Microbial cellulases-diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: a review[J]. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 2017, 15(1): 197-210.
- [10] AWASTHI MK, PANDEY AK, KHAN J, BUNDELA PS, WONG JWC, SELVAM A. Evaluation of thermophilic fungal consortium for organic municipal solid waste composting[J]. Bioresource Technology, 2014, 168: 214-221.
- [11] CUEVAS VC, SAMULDE SN, PAJARO PG. *Trichoderma harzianum* Rifai as activator for rapid composting of agricultural wastes[J]. The Philippine Agriculturist, 1988, 71: 461-469.
- [12] CHANG J, YIN QQ, REN TB, SONG AD, ZUO RY, GUO HW. Effect of steam explosion pretreatment and microbial fermentation on degradation of corn straw[J]. Advanced Materials Research, 2011, 343-344: 809-814.
- [13] WANG RX, TAO DX, LI J, CHEN SN, FAN JX, BI WS, BOBOUA SYB, ZHENG GX. Screening and characterization of a low-temperature-resistant cellulose-degrading strain, *Trichoderma harzianum* L-8, from a primitive forest[J]. BioResources, 2022, 17(2): 3303-3319.
- [14] 张晨敏. 低温纤维素降解菌的筛选及复合菌剂在秸秆还田中的应用[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2014.
ZHANG CM. Screening of bacteria decomposing low-temperature cellulose and the application of composite microbial inoculants in straw returning to field[D]. Nanjing: Master’s Thesis of Nanjing Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- [15] 赵欣. 耐低温稻秆降解复合菌系的培养基组分优化及产酶分析[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2017.

- ZHAO X. Medium component optimization and enzyme composition analysis of a straw-decomposing microbial system with low-temperature tolerance capacity[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [16] 冯欣欣, 李凤兰, 徐永清, 李磊, 贺付蒙, 冯艳忠, 袁强, 刘娣. 新疆寒冷地区腐木中产纤维素酶菌株的筛选与低温产酶特性[J]. 浙江农业学报, 2021, 33(8): 1468-1476.
- FENG XX, LI FL, XU YQ, LI L, HE FM, FENG YZ, YUAN Q, LIU D. Screening of cellulase producing strains from rotten wood in Xinjiang cold area and analysis of their characteristics of enzyme production at low temperature[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2021, 33(8): 1468-1476 (in Chinese).
- [17] TEATHER RM, WOOD PJ. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1982, 43(4): 777-780.
- [18] 曹慧, 张会会, 张腾月, 苏奎源, 张镗, 刘真, 杨迪, 刘紫祎. 产低温纤维素酶和木聚糖酶真菌的筛选鉴定及酶学性质[J]. 饲料研究, 2022, 45(3): 85-88.
- CAO H, ZHANG HH, ZHANG TY, SU KY, ZHANG Z, LIU Z, YANG D, LIU ZY. Screening and enzymatic properties of cold-adapted cellulose-xylanase degradation fungus[J]. Feed Research, 2022, 45(3): 85-88 (in Chinese).
- [19] JIANG GF, CHEN PJ, BAO YZ, WANG XF, YANG TJ, MEI XL, BANERJEE S, WEI Z, XU YC, SHEN QR. Isolation of a novel psychrotrophic fungus for efficient low-temperature composting[J]. Bioresource Technology, 2021, 331: 125049.
- [20] GHOSE TK. Measurement of cellulase activities[J]. Pure and Applied Chemistry, 1987, 59(2): 257-268.
- [21] 孙佑海. 为黑土地保护提供有力法律保障: 《黑土地保护法》解读[J]. 环境保护, 2022, 50(16): 39-44.
- SUN YH. Provide strong legal protection for black land protection—interpretation of black land protection law[J]. Environmental Protection, 2022, 50(16): 39-44 (in Chinese).
- [22] 宋显伟, 张保才, 白洋, 潘多峰, 邓向东, 王竑晟, 孙波, 曹晓风. 生物技术助力黑土地保护性利用的应用与思考[J]. 中国科学院院刊, 2021, 36(12): 1488-1496.
- SONG XW, ZHANG BC, BAI Y, PAN DF, DENG XD, WANG HS, SUN B, CAO XF. Application and review of biotechnology in promoting protective utilization of black soil[J]. Bulletin of Chinese Academy of Sciences, 2021, 36(12): 1488-1496 (in Chinese).
- [23] WANG JJ, ZHU D, ZHAO SQ, XU S, YANG R, ZHAO W, ZHANG XX, HUANG ZY. Effect of liquid volume and microflora source on degradation rate and microbial community in corn stover degradation[J]. AMB Express, 2021, 11(1): 80.
- [24] 梅新兰, 郑海平, 李水仙, 杨天杰, 江高飞, 韦中, 徐阳春, 沈其荣. 降解水稻秸秆细菌-真菌复合菌系的构建与评价[J]. 农业环境科学学报, 2021, 40(10): 2217-2225.
- MEI XL, ZHENG HP, LI SX, YANG TJ, JIANG GF, WEI Z, XU YC, SHEN QR. Construction and evaluation of bacterial-fungal consortia for rice straw degradation[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2021, 40(10): 2217-2225 (in Chinese).
- [25] ORGANO ND, GRANADA SMJM, PINEDA HGS, SANDRO JM, NGUYEN VH, GUMMERT M. Assessing the potential of a *Trichoderma*-based compost activator to hasten the decomposition of incorporated rice straw[J]. Scientific Reports, 2022, 12(1): 448.
- [26] LÜ JL. Optimal conditions for maximizing production of reducing sugars from microwave-assisted FeCl₃ pretreated rice straw degraded by *Trichoderma viride* and *Bacillus pumilus*[J]. African Journal of Microbiology Research, 2011, 5(31): 5757-5764.
- [27] OGAKI MB, TEIXEIRA DR, VIEIRA R, LÍRIO JM, FELIZARDO JPS, ABUCHACRA RC, CARDOSO RP, ZANI CL, ALVES TMA, JUNIOR PAS, MURTA SMF, BARBOSA EC, OLIVEIRA JQ, CERAVOLO IP, PEREIRA PO, ROSA CA, ROSA LH. Diversity and bioprospecting of cultivable fungal assemblages in sediments of lakes in the Antarctic Peninsula[J]. Fungal Biology, 2020, 124(6): 601-611.
- [28] ALFANO G, IVEY ML, CAKIR C, BOS JB, MILLER SA, MADDEN LV, KAMOUN S, HOITINK HJ. Systemic modulation of gene expression in tomato by *Trichoderma hamatum* 382[J]. Phytopathology, 2007, 97(4): 429-437.
- [29] CARPENTER MA, RIDGWAY HJ, STRINGER AM, HAY AJ, STEWART A. Characterisation of a *Trichoderma hamatum* monooxygenase gene involved in antagonistic activity against fungal plant pathogens[J]. Current Genetics, 2008, 53(4): 193-205.
- [30] 赵兴丽, 陶刚, 赵玳琳, 卯婷婷, 王廿, 顾金刚. 钩状木霉 ACCC31649 的 GFP 标记及其对辣椒定殖和促生作用[J]. 植物营养与肥料学报, 2017, 23(5):

- 1276-1285.
- ZHAO XL, TAO G, ZHAO DL, MAO TT, WANG N, GU JG. GFP-labeled transformation of *Trichoderma hamatum* ACCC31649 and its promotion on colonization and growth of pepper plants[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 2017, 23(5): 1276-1285 (in Chinese).
- [31] KOVÁCS C, CSÓTÓ A, PÁL K, NAGY A, FEKETE E, KARAFFA L, KUBICEK CP, SÁNDOR E. The biocontrol potential of endophytic *Trichoderma* fungi isolated from Hungarian grapevines. part I. isolation, identification and *in vitro* studies[J]. Pathogens (Basel, Switzerland), 2021, 10(12): 1612.
- [32] PEDRERO-MÉNDEZ A, INSUASTI HC, NEAGU T, ILLESCAS M, RUBIO MB, MONTE E, HERMOSA R. Why is the correct selection of *Trichoderma* strains important? the case of wheat endophytic strains of *T. harzianum* and *T. simmonsii*[J]. Journal of Fungi (Basel, Switzerland), 2021, 7(12): 1087.
- [33] 庄文颖. 中国真菌志第六十卷肉座菌科[M]. 北京: 科学出版社, 2020
- ZHUANG WY. Flora Fungorum Sinicorum Vol: LX *Hypocreaceae*[M]. Beijing: Science Press, 2020 (in Chinese).
- [34] 纪程, 孙玉香, 孟圆, 刘耀斌, 徐聪, 张永春, 谷益安, 汪吉东. 稻麦轮作体系长期秸秆还田对土壤真菌群落结构及秸秆降解潜力的影响[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(4): 819-825.
- JI C, SUN YX, MENG Y, LIU YB, XU C, ZHANG YC, GU YA, WANG JD. Effects of long-term straw incorporation on soil fungal community structure and straw decomposition potential in a rice-wheat rotation system[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2022, 41(4): 819-825 (in Chinese).
- [35] 李鹏. 筛选产纤维素酶的木霉及菌株 8985 产酶的固态发酵条件优化[D]. 北京: 中国科学院大学硕士学位论文, 2021.
- LI P. Screening *Trichoderma* sp. producing cellulase and optimization of solid-state fermentation conditions of strain 8985 producing cellulase[D]. Beijing: Master's Thesis of University of Chinese Academy of Sciences, 2021 (in Chinese).
- [36] BASKARAN R, KRISHNAN C. Enhanced production of cellulase from a novel strain *Trichoderma gamsii* M501 through response surface methodology and its application in biomass saccharification[J]. Process Biochemistry, 2020, 99: 48-60.
- [37] 萨如拉, 高聚林, 于晓芳, 胡树平. 玉米秸秆低温降解复合菌系的筛选[J]. 中国农业科学, 2013, 46(19): 4082-4090.
- SARULA, GAO JL, YU XF, HU SP. Screening of low temperature maize stalk decomposition microorganism[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2013, 46(19): 4082-4090 (in Chinese).
- [38] 张鑫, 青格尔, 高聚林, 于晓芳, 胡树平, 张必周, 韩升才, 冯彪. 玉米秸秆低温降解复合菌的筛选及其菌种组成[J]. 农业环境科学学报, 2021, 40(7): 1565-1574.
- ZHANG X, QINGGEER, GAO JL, YU XF, HU SP, ZHANG BZ, HAN SC, FENG B. Screening and composition of the microbial consortium with corn straw decomposition under low temperature[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2021, 40(7): 1565-1574 (in Chinese).
- [39] 王一然, 康志超, 朱国鹏, 王洋, 其格其, 于洪文. 耐低温玉米秸秆降解菌群的优化及其效果[J]. 浙江农业学报, 2022, 34(12): 2720-2727.
- WANG YR, KANG ZC, ZHU GP, WANG Y, QI GQ, YU HW. Optimization of low temperature resistant corn stalk degrading bacterial community and its effect[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2022, 34(12): 2720-2727 (in Chinese).
- [40] 李鹏, 庄文颖. 液态发酵条件下拟康宁木霉 8985 产纤维素酶能力初探[J]. 菌物学报, 2022, 41(2): 281-290.
- LI P, ZHUANG WY. Cellulase production by *Trichoderma koningiopsis* 8985 under liquid state fermentation[J]. Mycosystema, 2022, 41(2): 281-290 (in Chinese).