



黑翅土白蚁菌圃共生菌对小麦秸秆的生物降解

李吴晗¹, 黄越², 余婷¹, 沈毅¹, 周琪欢¹, 陈翔³, 莫建初^{1*}

1 浙江大学 昆虫科学研究所, 农业农村部作物病虫害分子生物学重点实验室, 浙江 杭州 310058

2 杭州市农业技术推广中心, 浙江 杭州 310020

3 桐庐县农业技术推广中心, 浙江 杭州 311500

李吴晗, 黄越, 余婷, 沈毅, 周琪欢, 陈翔, 莫建初. 黑翅土白蚁菌圃共生菌对小麦秸秆的生物降解[J]. 微生物学报, 2024, 64(9): 3393-3408.

LI Wuhan, HUANG Yue, YU Ting, SHEN Yi, ZHOU Qihuan, CHEN Xiang, MO Jianchu. Biodegradation of wheat straw by symbiotic fungi and bacteria of *Odontotermes formosanus*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(9): 3393-3408.

摘要:【目的】探究黑翅土白蚁(*Odontotermes formosanus*)菌圃共生菌在木质纤维素降解上的应用潜力, 增加秸秆降解菌种资源并为秸秆资源产业化利用提供理论依据。【方法】以刚果红染色法、羧甲基纤维素钠平板分离筛选具有木质纤维素降解活性的黑翅土白蚁菌圃共生菌并测定共生菌产酶情况。在常温液态发酵条件下, 评估不同菌种以及复合菌群对小麦(*Triticum aestivum* L.)秸秆的降解效果, 利用傅里叶红外光谱、X射线晶体衍射和冷场扫描电镜分析降解前后小麦秸秆的理化性质。【结果】从黑翅土白蚁菌圃中分离得到具有木质纤维素降解活性的5种真菌和3种细菌, 经鉴定为青霉属(*Penicillium*)2种, 紫霉属(*Purpureocillium*)1种, 曲霉属(*Aspergillus*)1种, 弯孢聚壳霉属(*Eutypella*)1种, 芽孢杆菌属(*Bacillus*)1种, 埃希氏菌属(*Escherichia*)1种, 寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)1种。经酶活测定和单菌降解试验筛选出4种高效降解菌株[桔青霉(*Penicillium citrinum*)、红绶曲霉(*Aspergillus nomiae*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)]组成复合菌群。经常温液态发酵, 4种菌组成的复合菌群的综合降解能力最强, 在12 d内干物质降解率达到24.35%, 纤维素降解率达到47.24%, 半纤维素降解率达到35.75%, 木质素降解率达到32.72%。降解后小麦秸秆内部化学键和分子间作用力受到破坏, 木质纤维素复合结构受到破坏, 纤维素结晶度从37.40%降低至32.97%, 秸秆表面严重崩解, 结构蓬松。【结论】从黑翅土白蚁菌圃中分离得到的桔青霉、红绶曲霉、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌所组成的复合菌群对小麦秸秆有着优良的降解效果, 具备秸秆生物降解产业化的潜在开发价值。

关键词: 生物降解; 黑翅土白蚁; 共生菌; 木质纤维素; 秸秆资源利用

资助项目: 国家自然科学基金面上项目(32071771); 杭州市农业科技协作与创新攻关项目(202209SX17)

This work was supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (32071771) and the Hangzhou Agricultural Science and Technology Cooperation and Innovation Project (202209SX17).

*Corresponding author. E-mail: mojianchu@zju.edu.cn

Received: 2024-03-03; Accepted: 2024-05-21; Published online: 2024-05-24

Biodegradation of wheat straw by symbiotic fungi and bacteria of *Odontotermes formosanus*

LI Wuhan¹, HUANG Yue², YU Ting¹, SHEN Yi¹, ZHOU Qihuan¹, CHEN Xiang³,
MO Jianchu^{1*}

1 Ministry of Agriculture and Rural Affairs Key Laboratory of Molecular Biology of Crop Pathogens and Insect Pests, Institute of Insect Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China

2 Hangzhou Agricultural Technology Extension Center, Hangzhou 310020, Zhejiang, China

3 Tonglu Agricultural Technology Extension Center, Hangzhou 311500, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] This study explored the application potential of symbiotic fungi and bacteria of *Odontotermes formosanus* in the degradation of wheat (*Triticum aestivum* L.) straw resources, aiming to provide a theoretical basis and supplement strain resources for the industrialization of straw biodegradation. **[Methods]** The lignocellulose-degrading fungi and bacteria were isolated from *O. formosanus* and screened by Congo red staining and the agar plate supplemented with carboxymethyl cellulose sodium (CMC-Na), and the enzyme production of the strains screened out was examined. Liquid fermentation at room temperature was carried out to evaluate the degradation effects of different strains and strain combinations on wheat straw. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray crystal diffraction (XRD), and scanning electron microscopy (SEM) were employed to analyze the physical and chemical properties of wheat straw before and after degradation. **[Results]** Five species of fungi and three species of bacteria were isolated from the termite combs, including two species of *Penicillium*, one species of *Purpureocillium*, one species of *Aspergillus*, one species of *Eutypella*, one species of *Bacillus*, one species of *Escherichia*, and one species of *Stenotrophomonas*. Four efficient degrading strains were screened out and identified as *Penicillium citrinum*, *Aspergillus nomiae*, *Bacillus subtilis*, and *Escherichia coli*. In the liquid fermentation at room temperature, the combination of the four strains had the strongest comprehensive degradation performance, with the degradation rates of 24.35%, 47.24%, 35.75%, and 32.72% for dry matter, cellulose, hemicellulose, and lignin, respectively, in 12 days. The degradation destroyed the chemical bonds, the intermolecular force, and the composite structure of lignocellulose in wheat straw, and decreased the crystallinity of cellulose from 37.40% to 32.97%. **[Conclusion]** The combination of *P. citrinum*, *A. nomiae*, *B. subtilis*, and *E. coli* isolated from the combs of *O. formosanus* had a good degradation effect on wheat straw, demonstrating the application potential in the industrialization of straw biodegradation.

Keywords: biodegradation; *Odontotermes formosanus*; symbiotic bacteria and fungi; lignocellulose; straw resource utilization

我国是农业大国, 在农业生产中产出了大量的秸秆资源。据统计, 我国秸秆资源年均产量约 8.65 亿 t, 资源化利用率为 81.68%, 其中秸秆的主要来源为玉米、水稻、小麦三大作物^[1]。目前我国对秸秆利用的方法主要为肥料化、饲料化、基料化利用^[2], 无论何种利用方式, 对秸秆进行预处理都能有效提高秸秆利用率, 加速秸秆转化为需要的肥料或营养物质。因为秸秆中的木质纤维素特殊的“木质素-半纤维素-纤维素”三维网络结构、高度有序的氢键和木质素的难消化性, 使得其在自然状态下难以高效降解^[3-4], 阻碍了秸秆利用率和利用速度, 而预处理可以较好地打破该种复杂结构。目前已存在多种木质纤维素预处理方法, 例如机械/热法、无机溶剂法、有机溶剂法和微生物法等^[5]。其中微生物法由于条件温和, 耗能小, 污染少, 并且可以极大地促进木质纤维素的后续糖化和发酵过程而引起了广泛关注^[6], 成为当下的研究热点。在生物降解中, 真菌可以产生更多种的酶来有效解聚和修饰木质纤维素, 如纤维素酶、果胶酶、木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶、葡聚糖苷酶等协同降解木质纤维素^[7-8], 细菌往往能够产生纤维素酶、半纤维素酶, 减少木质纤维素的聚合^[9], 并通过聚酯化等方式使木质素改性, 便于水解和利用^[10]。目前开发的秸秆降解菌多采集自腐木或土壤腐殖层中的白腐菌或褐腐菌, 例如香菇(*Lentinus edodes*)、糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*)、黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)等^[11-13]。然而生物降解目前仍存在一些问题, 例如降解周期较长、降解环境要求较严格等。

培菌白蚁是自然界中著名的木质纤维素分解者, 其巢内存在菌圃, 由这种白蚁-共生菌所构成的体系能以极高的效率降解木质纤维素。据研究, 培菌白蚁能消化食物中 74%–99%的纤

维素和 65%–87%的半纤维素^[14]。在我国黑翅土白蚁(*Odontotermes formosanus*)分布广泛, 是培菌白蚁的一种, 其巢内菌圃共生真菌蚁巢伞(*Termitomyces*)在固体发酵的条件下可降解木质食料中 20.98%的纤维素、31.89%的半纤维素和 11.68%的木质素^[15]。目前, 国内外科技工作者均尝试从白蚁巢内取得优质木质纤维素降解菌, 如沈毅等^[16]曾从黑翅土白蚁肠道中分离得到黑曲霉与灰孔多年卧孔菌双菌(*Perenniporia tephropora*), Sijinamanoj 等^[17]曾从胖身土白蚁(*Odontotermes obesus*)的肠道和菌圃中分离得到红绶曲霉(*Aspergillus nomiae*)和哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*), 上述共生菌均对木质纤维素有良好的降解能力。

为进一步探究黑翅土白蚁共生菌在小麦(*Triticum aestivum* L.)秸秆资源利用上的应用潜力, 本研究从黑翅土白蚁菌圃中分离筛选高效木质纤维素降解菌, 并组合成复合菌群, 尝试发掘常温高效降解小麦秸秆的菌种资源, 为秸秆生物降解产业化提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料来源

供试黑翅土白蚁巢于 2022 年 4 月取自福建省三明市大田县, 26 °C 避光饲养。供试小麦秸秆购自江苏省连云港市, 烘箱干燥后粉碎过 80 目筛, 常温密封保存。

1.1.2 培养基

羧甲基纤维素钠(CMC-Na)固体培养基(g/L): 羧甲基纤维素钠 10.0, 氯化铵 2.0, 硝酸钠 2.000, 磷酸氢二钾 1.0, 磷酸二氢钾 1.0, 七水硫酸镁 0.5, 蛋白胨 1.0, 琼脂 17.5, pH 7.0。无碳源基础液体培养基(g/L): 氯化铵 2.0, 硝酸钠 2.0, 磷酸氢二钾 1.0, 磷酸二氢钾 1.0, 七水硫酸镁

0.5, 蛋白胨 1.0, pH 7.0。羧甲基纤维素钠液体培养基(g/L): 羧甲基纤维素钠 10.0, 无碳源基础液体培养基 990.0。小麦秸秆培养基(g/L): 小麦秸秆粉末(80 目筛) 62.5, 无碳源基础液体培养基 937.5。LB 液体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 氯化钠 10.0, pH 7.0。

1.2 菌圃菌种分离和鉴定

1.2.1 菌种分离和筛选

取 0.5 g 巢内上层菌圃、0.5 g 巢内中层菌圃置于研钵中, 加入 1 mL PBS 缓冲液, 研磨成匀浆, 将匀浆转移至离心管, 4 °C、1 500 r/min 离心 1 min 取上清液, 梯度稀释 10 000 倍, 取 15 μ L 在羧甲基纤维素钠固体培养基上涂布分离, 长成明显菌落后划线分离, 重复 3 次培养获得纯培养菌落。

纯培养菌落 26 °C 培养箱培养 7–14 d 后, 使用 1 g/L 的刚果红溶液染色 5 min 后使用 1 mol/L 的氯化钠溶液洗脱, 观察水解圈存在情况, 测量水解圈与菌落直径, 计算 D_c 值(水解圈直径/菌落直径比值)作为衡量菌株分解纤维素能力强弱的标准, 拍照记录。

1.2.2 菌种鉴定

初步鉴定: 将纯化后菌落送至浙江尚亚生物技术有限公司进行鉴定。DNA 提取方法: 真菌使用十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)法提取 DNA, 细菌使用重亚硫酸盐转化法提取 DNA。真菌利用 PCR 扩增单菌落的内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)基因序列, 引物为真菌 ITS 基因通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'); 细菌利用 PCR 扩增单菌落的 16S rRNA 基因序列, 引物为细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACG

ACTT-3')。PCR 反应体系(20 μ L): 2 \times Taq Plus Master Mix II 10 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, DNA 模板 0.2 μ L, ddH₂O 7.8 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 15 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环; 72 °C 终延伸 1 min。

载体测序鉴定: 待单菌降解实验完成后, 综合得到的数据, 选择降解能力优秀的纯培养菌落, 送至浙江尚亚生物技术有限公司。DNA 提取方法同初步鉴定的提取方法。真菌利用 PCR 扩增单菌落的 ITS 基因序列, 细菌利用 PCR 扩增单菌落的 16S rRNA 基因序列, 将扩增得到的片段插入 pTOPO-T 载体, 形成质粒后转进感受态细胞扩增。载体克隆反应体系(10 μ L): 10 \times pTOPO-T Buffer 1 μ L, pTOPO-T Vector 1 μ L, PCR 产物 1 μ L, ddH₂O 7 μ L。载体克隆反应条件: 混匀后室温连接 5 min。扩增感受态细胞的载体基因序列, 引物为载体扩增通用引物 M13F (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3')和 M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3')。PCR 反应体系和反应条件同初步鉴定的 PCR 反应体系和反应条件。

测序后使用 BLAST 在线比对菌种, 于 GenBank 登记序列号。

1.3 酶活测定

1.3.1 粗酶液制备

真菌取 3 个直径 6 mm 菌饼接种于 100 mL 羧甲基纤维素钠液体培养基, 细菌取 3 个直径 6 mm 菌饼接种于 100 mL LB 液体培养基, 于 26 °C、180 r/min 的摇床内避光培养 5 d 后, 取 1 mL 液体培养基, 在 4 °C、7 000 r/min 条件下离心 10 min, 上清液即为粗酶液。

1.3.2 酶活性测定

酶活性测定均使用苏州梦犀生物医药科技有限公司的试剂盒测定。其中内切- β -1,4-葡聚糖酶活性和外切- β -1,4-葡聚糖酶活性测定均采

用 3,5-二硝基水杨酸法, 来测定内切- β -1,4-葡聚糖酶/外切- β -1,4-葡聚糖酶催化羧甲基纤维素钠/微晶纤维素降解产生的葡萄糖含量; 酶活单位的定义为每升粗酶液每分钟催化产生 1 μmol 葡萄糖为 1 个酶活单位, 即 U/L。

木质素过氧化物酶活性测定采用木质素过氧化物酶催化天青脱甲基, 在 651 nm 处测定吸光值减少; 酶活单位的定义为每升粗酶液在反应体系中每分钟 A_{651} 变化 0.01 为 1 个酶活单位, 即 U/L。

锰过氧化物酶活性测定采用锰过氧化物酶在 Mn^{2+} 存在条件下, 将愈创木酚氧化为四邻甲氧基连酚, 在 465 nm 处有特征吸收峰; 酶活单位的定义为每升粗酶液每分钟氧化 1 μmol 底物愈创木酚所需的酶量为 1 个酶活单位, 即 U/L。

漆酶活性测定采用漆酶分解底物 2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS]产生 ABTS 自由基, 在 420 nm 处吸光系数远大于底物, 通过测定 ABTS 自由基增加速率可计算漆酶活性; 酶活单位的定义为每升粗酶液每分钟氧化 1 μmol 底物 ABTS 所需的酶量为 1 个酶活单位, 即 U/L。

1.4 单菌落小麦秸秆降解试验

1.4.1 小麦秸秆降解试验

将 6 个直径 0.6 cm 菌饼接入灭菌后的小麦秸秆培养基(秸秆质量记为 m), 26 $^{\circ}\text{C}$ 避光培养 12 d, 回收秸秆培养基, 过滤, 80 $^{\circ}\text{C}$ 烘干 12 h 后称量干质量(记为 M), 按照公式(1)计算干物质降解率(R_m)。

$$R_m = (m - M) / m \times 100\% \quad (1)$$

式中, R_m 为干物质降解率(%), m 为秸秆质量(g), M 为降解后秸秆烘干质量(g), 100% 为百分比换算系数。

1.4.2 木质纤维素组分降解率测定试验

木质纤维素组分质量分数测定方法参考美

国国家可再生能源实验室(National Renewable Energy Laboratory, NREL)方法^[18]和沈毅等^[16]方法做出的修改: 取 0.2 g 植物材料(记为 m_0), 加入 20 mL 无水乙醇, 60 $^{\circ}\text{C}$ 超声振荡萃取 2 h, 去上清后 80 $^{\circ}\text{C}$ 烘干 12 h。干燥后加入 3 mL 体积分数为 72% 的硫酸, 摇匀后 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h。加入 84 mL 蒸馏水, 稀释硫酸体积分数至 4%, 转移到聚四氟乙烯耐压瓶中, 烘箱中 121 $^{\circ}\text{C}$ 酸解 2 h。使用砂芯漏斗抽滤, 滤纸使用已烘干称量的无灰定量滤纸(滤纸灰分重记为 a_1)。滤渣与滤纸一并转移至陶瓷坩埚, 烘箱 80 $^{\circ}\text{C}$ 过夜烘干后称量(记为 m_1), 后置于马弗炉中 550 $^{\circ}\text{C}$ 煅烧 4 h, 冷却后称重(记为 m_2)。取 2 mL 滤液, 加入 2.5 mL 质量分数为 4% 的氢氧化钠, 5.5 mL 蒸馏水中和至中性后, 用葡萄糖试剂盒测定葡萄糖质量分数(记为 C_{glu}), 用 3,5-二硝基水杨酸法测定还原糖质量分数(记为 C_{rs}), 计算纤维素、半纤维素和木质素质量分数(分别记为 C_{cel} 、 C_{hem} 和 C_{lig}), 最后根据降解前组分质量分数(记为 C) 和降解后组分质量分数(记为 C_d) 计算组分降解率(记为 R_{lc})。计算如公式(2-5)所示。

$$C_{\text{cel}} = (C_{\text{glu}} \times 87 \times 0.90 \times 10^{-3}) / m_0 \times 100\% \quad (2)$$

$$C_{\text{hem}} = [(C_{\text{rs}} - C_{\text{glu}}) \times 87 \times 0.88 \times 10^{-3}] / m_0 \times 100\% \quad (3)$$

$$C_{\text{lig}} = (m_1 - a_1 - m_2) / m_0 \times 100\% \quad (4)$$

$$R_{\text{lc}} = [1 - (m \times C) / (M \times C_d)] \times 100\% \quad (5)$$

式中, C_{cel} 为纤维素质量分数(%), C_{glu} 为葡萄糖质量分数(%), m_0 为植物材料初始质量(g), C_{hem} 为半纤维素质量分数(%), C_{rs} 为还原糖质量分数(%), C_{lig} 为木质素质量分数(%), m_1 为滤渣滤纸烘干质量(g), a_1 为滤纸灰分质量(g), m_2 为煅烧后灰分质量(g), R_{lc} 为组分降解率(%), m 为降解前秸秆质量(g), C 为降解前组分质量分数(%), M 为降解后秸秆烘干质量(g), C_d 为降解后组分质量分数(%), 0.90 为纤维素单糖转化系数, 87×10^{-3} 为液体体积稀释倍数, 0.88 为半纤维素单糖转化系数, 100% 为百分比换算系数。

1.5 双菌互作试验

比对单菌落降解结果和酶活测定结果,挑选出具有相对较高的酶活性,并对木质纤维素不同组分具有优秀降解效果的4种菌(FU2、FU4、BA1、BA2)以分析菌株之间互相作用对木质纤维素降解的影响。4种菌株分别两两组合进行双菌互作试验,配比以接入菌饼计算,为1:1。试验条件和各组分降解率测定步骤同单菌落降解试验。

1.6 复合菌群小麦秸秆降解试验

根据酶活测定结果、单菌落降解结果和双菌互作结果,组成复合菌群,三菌组合为FU2 FU4 BA1、FU4 BA1 BA2,四菌组合为FU2 FU4 BA1 BA2。复合菌群配比以接入菌饼计算,三菌为1:1:1,四菌考虑到菌种数量较多且真菌生长速度较快,因此增加细菌初始比重,配比为FU2:FU4:BA1:BA2=1:1:2:2。

将6个直径0.6 cm菌饼接入灭菌后的小麦秸秆培养基(三菌各2个,四菌组合中真菌各1个细菌各2个),26 °C避光培养12 d。干物质降解率与木质纤维素组分降解率的测定与计算均与单菌落时一致。

1.7 降解前后小麦秸秆理化性质测定

1.7.1 傅里叶红外光谱分析

取降解前小麦秸秆样品和(FU2、FU4、BA1、BA2)4菌组成的复合菌群降解样品,烘干后磨成粉末,使用傅里叶红外光谱仪(ThermoFisher Scientific公司)分析。分辨率 4 cm^{-1} ,扫描次数32次,扫描波长 $400\text{--}4\,000\text{ cm}^{-1}$ 。

1.7.2 X射线衍射分析

取降解前小麦秸秆样品和四菌(FU2、FU4、BA1、BA2)组成的复合菌群降解样品,烘干后磨成粉末,使用X射线衍射仪(Bruker公司)分析。扫描范围 $5^{\circ}\text{--}90^{\circ}$,扫描速度 $5^{\circ}/\text{min}$ 。按照公式(6)计算纤维素结晶度。

$$D=(I_{002}-I_{am})/I_{002}\times 100\% \quad (6)$$

式中, D 为纤维素结晶度, I_{002} 为 $2\theta=22.5^{\circ}$ 衍射峰最大值(s^{-1}), I_{am} 为 $2\theta=18.0^{\circ}$ 衍射峰最小值(s^{-1}),100%为百分比换算系数。

1.7.3 冷场扫描电镜观察

取降解前小麦秸秆粉末样品和四菌(FU2、FU4、BA1、BA2)组成的复合菌群降解样品,烘干后磨成粉末后用冷场扫描电镜(Hitachi公司)观察。加速电压:3.0 kV;放大倍数:1 000倍、20 000倍。

1.8 数据处理

使用SPSS 27软件对不同菌株的酶活性和水稻秸秆降解率进行方差齐性检验和显著性分析。

2 结果与分析

2.1 菌株分离筛选和鉴定

2.1.1 菌株分离筛选

本研究经分离、刚果红染色筛选,从黑翅土白蚁菌圃中选出了5株真菌与3株细菌进行后续试验,分别记为FU1–FU5、BA1–BA3。这8株菌均能产生纤维素水解透明圈,其菌落形态与透明圈形态如图1所示,产生透明圈表明该菌落有产生纤维素酶的能力,从而降解纤维素、产生多糖类物质^[19]。根据高榕等^[20]的研究结果,以 D_c 值为标准的筛选方法,能初步地筛选出高纤维素酶生产率的菌株,8种菌 D_c 值如表1所示。

2.1.2 菌种鉴定

对分离、筛选得到的8株具有木质纤维素降解能力的菌株进行分子生物学鉴定,结果(表2)显示这8株菌分别是青霉属(*Penicillium*)2种、紫霉属(*Purpureocillium*)1种、曲霉属(*Aspergillus*)1种、弯孢聚壳霉属(*Eutypella*)1种、芽孢杆菌属(*Bacillus*)1种、埃希氏菌属(*Escherichia*)1种、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)1种。

2.2 酶活测定

八株菌的纤维素酶活性如表3、图2所示。结果表明,FU1、FU2、FU4、FU5的内切- β -1,4-葡

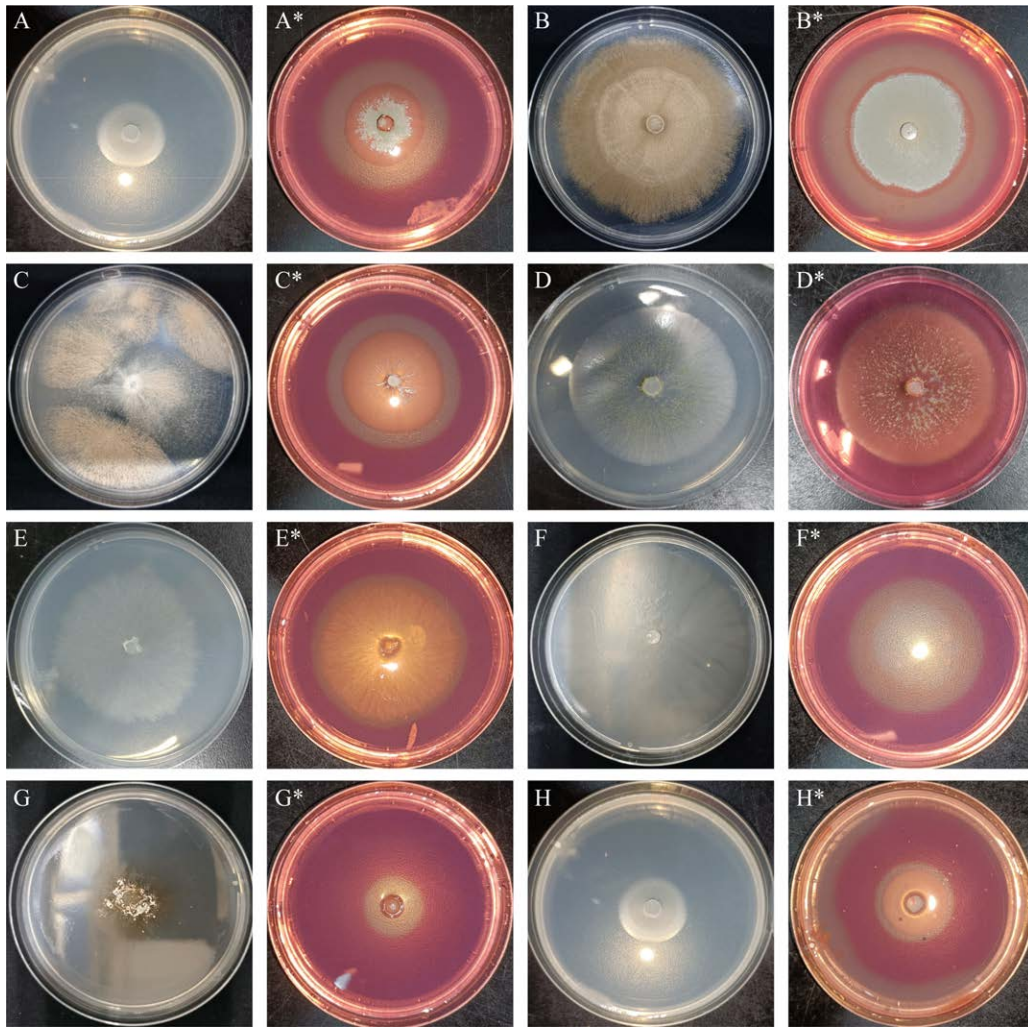


图 1 八株菌的菌落形态与透明圈形态 A: FU1. B: FU2. C: FU3. D: FU4. E: FU5. F: BA1. G: BA2. H: BA3. *图片为刚果红染色结果.

Figure 1 Morphologies of colony and transparent zone of eight strains. A: FU1. B: FU2. C: FU3. D: FU4. E: FU5. F: BA1. G: BA2. H: BA3. The image with * shows the results of Congo red staining.

表 1 八株菌的 D_c 值

Table 1 D_c values of eight strains

Strain number	D_c values
FU1	1.62±0.05
FU2	1.36±0.01
FU3	1.28±0.01
FU4	1.01±0.01
FU5	1.03±0.01
BA1	1.44±0.01
BA2	2.50±0.06
BA3	1.13±0.03

聚糖酶酶活显著高于其他菌株, 表明其具有较强的纤维素链切割能力; 而 BA2、BA1、FU4 的外切- β -1,4-葡聚糖酶酶活显著高于其他菌株, 表明其具有较强的纤维素末端水解能力。

八株菌的木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶和漆酶活性如表 4、图 3-5 所示。结果表明, FU1、FU2、FU4、BA2、BA3 木质素过氧化物酶活性显著高于其他菌株, 表明其具有较强的木质素降解能力; FU5、FU4、BA3 锰过氧化物

表 2 八株菌鉴定结果

Table 2 Identification results of eight strains

Strain number	GenBank accession number	Similar species (GenBank accession number)	Similarity (%)
FU1	PP140834	<i>Penicillium</i> sp. (MK246010)	99.10
FU2	PP126516	桔青霉 <i>Penicillium citrinum</i> (MN788102)	100.00
FU3	PP140833	<i>Purpureocillium</i> sp. (OR225858)	99.50
FU4	PP140832	红绶曲霉 <i>Aspergillus nomiae</i> (MH279419)	100.00
FU5	PP140835	<i>Eutypella</i> sp. (KT868952)	98.57
BA1	PP140842	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i> (KY766067)	99.74
BA2	PP140843	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i> (CP027449)	99.93
BA3	PP140844	<i>Stenotrophomonas</i> sp. (CP051467)	99.47

表 3 八株菌的纤维素酶活性

Table 3 Cellulase activities of eight strains

Strain number	Strain name	Endo-1,4- β -glucanases activity (U/L)	Exo-1,4- β -glucanases activity (U/L)
FU1	<i>Penicillium</i> sp.	30.33 \pm 0.24d	5.45 \pm 0.05d
FU2	<i>Penicillium citrinum</i>	52.37 \pm 0.17a	5.53 \pm 0.05d
FU3	<i>Purpureocillium</i> sp.	9.93 \pm 0.12e	5.35 \pm 0.00e
FU4	<i>Aspergillus nomiae</i>	31.89 \pm 0.00c	5.96 \pm 0.05c
FU5	<i>Eutypella</i> sp.	47.76 \pm 0.46b	5.27 \pm 0.08e
BA1	<i>Bacillus subtilis</i>	4.95 \pm 0.00g	8.29 \pm 0.08b
BA2	<i>Escherichia coli</i>	8.10 \pm 0.12f	10.09 \pm 0.09a
BA3	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	4.71 \pm 0.08g	5.16 \pm 0.05f

表中数值为平均值 \pm 标准差, 同列不同小写字母表示不同组间的酶活性差异($P<0.05$)

The values in the table are mean \pm standard deviation, different lowercase letters on the column indicate differences in enzyme activity ($P<0.05$).

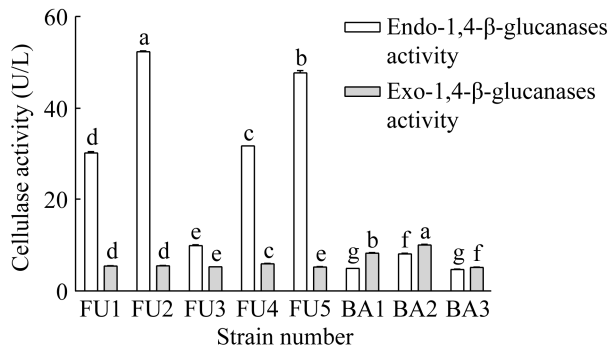


图 2 八株菌的纤维素酶活性 图中柱高度为平均值 \pm 标准差, 同颜色柱不同小写字母表示不同组间的酶活差异($P<0.05$)

Figure 2 Cellulase activities of eight strains. The column height in the figure is the mean \pm standard deviation, different lowercase letters on the same colored column indicate differences in enzyme activity between different groups ($P<0.05$).

酶活性显著高于其他菌株, 表明其具有较强的木质素、叠氮化合物、多环芳烃降解能力; FU5、BA1、BA3 漆酶活性显著高于其他菌株, 表明其具有较强的木质素等芳香族高分子化合物降解能力。

2.3 单菌落小麦秸秆降解试验

单独降解木质纤维素时, 8 株菌均表现出了一定的降解能力(表 5)。FU5 在干物质降解能力上显著高于其他菌株, 达到 20.95%; FU4、FU2、FU3 的纤维素降解率显著高于其他菌株, 其中 FU4 的降解率最高, 可以降解 47.03% 的纤维素; BA1、BA2、BA3 三株细菌在半纤维素降解率方面显著强于其他菌株, 其中 BA1 的降解率最高, 可降解 64.87% 的半纤维素; BA2、FU2、

表 4 八株菌的木质素相关酶活性

Table 4 Lignin correlated enzyme activities of eight strains

Strain number	Strain name	Lignin peroxidase activity (U/L)	Manganese peroxidase activity (U/L)	Laccase activity (U/L)
FU1	<i>Penicillium</i> sp.	1.50±0.25a	0.83±0.00ef	52.47±5.35d
FU2	<i>Penicillium citrinum</i>	1.58±0.14a	0.55±0.24f	37.04±8.12d
FU3	<i>Purpureocillium</i> sp.	0.75±0.25b	1.10±0.24de	86.43±5.35d
FU4	<i>Aspergillus nomiae</i>	1.33±0.14a	2.89±0.00b	27.78±0.00d
FU5	<i>Eutypella</i> sp.	0.92±0.14b	3.30±0.00a	125 380.40±24.35a
BA1	<i>Bacillus subtilis</i>	0.08±0.14c	1.38±0.24d	108 419.14±13.66b
BA2	<i>Escherichia coli</i>	1.42±0.29a	1.10±0.24de	9.26±0.00d
BA3	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	1.42±0.29a	2.07±0.41c	7 232.06±16.04c

表中数值为平均值±标准差, 同列不同小写字母表示不同组间的酶活性差异($P<0.05$)

The values in the table are mean ± standard deviation, different lowercase letters on the column indicate differences in enzyme activity ($P<0.05$).

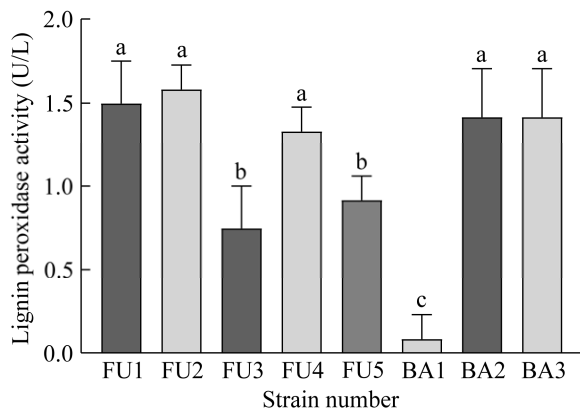


图 3 八株菌的木质素过氧化物酶活性 不同小写字母表示不同组间的酶活差异($P<0.05$)

Figure 3 Lignin peroxidase activities of eight strains. Different lowercase letters on the column indicate differences in enzyme activity ($P<0.05$).

BA3 在木质素降解率方面显著高于其他菌株, 其中最优秀的 BA2 可降解 26.20%的木质素。

2.4 双菌互作试验

以单菌落小麦秸秆干物质与木质纤维素组分的降解率作为主要依据, 参考酶活测定结果和水解圈 D_c 值, 选取 FU2、FU4、BA1、BA2 这 4 株菌进行共生菌互作试验。将上述 4 株菌两两组合进行试验, 结果如表 6 所示。4 种

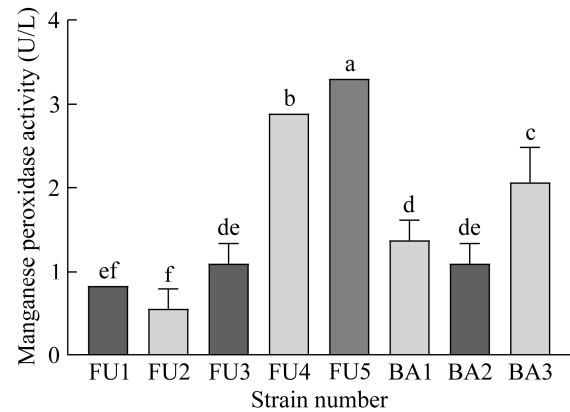


图 4 八株菌株的锰过氧化物酶活性 不同小写字母表示不同组间的酶活差异($P<0.05$)

Figure 4 Mn-dependent peroxidase activities of eight strains. Different lowercase letters on the column indicate differences in enzyme activity ($P<0.05$).

菌株之间的互相作用均对木质纤维素降解产生影响, 其中 1 种真菌加 1 种细菌的 4 种配比方式相对于其中各组分单独降解, 降解各组分的能力更为均衡, 干物质降解率显著升高; 2 种真菌组合和 2 种细菌组合木质素降解率显著升高。双菌互作试验证明, 筛选出的 4 种菌株之间能共同参与降解木质纤维素, 不同菌株之间产生的相互作用有利于木质纤维素不同组分的进一步降解。

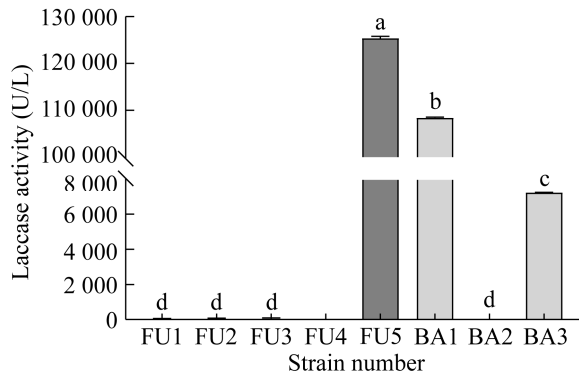


图 5 八株菌的漆酶活性 不同小写字母表示不同组间的酶活差异($P<0.05$)

Figure 5 Laccase activities of eight strains. Different lowercase letters on the column indicate differences in enzyme activity ($P<0.05$).

在各组合方式中, FU4+BA1 的组合干物质降解率和综合降解能力最优秀, 因此, 多菌组合降解木质纤维素应当考虑在 FU4+BA1 组合的基础上继续增加其他菌株来进一步提高木质纤维素降解率。

2.5 复合菌群小麦秸秆降解试验

组成复合菌群后(表 7), 所有多菌组合干物质降解率、木质素降解率相较单菌株降解均有了显著提升, 其中 FU4+BA1/2 三菌组合和 FU2/4+BA1/2

四菌组合干物质降解率相较双菌有显著提升。在所有组合中, 干物质降解率和纤维素降解率最高的是 FU2/4+BA1/2 组合, 干物质降解率达到 24.35%, 纤维素降解率达到 47.24%; 半纤维素降解率最高的仍为单菌株 BA1; 木质素降解率最高的是 FU4+BA1/2、FU2+BA2、FU2/4+BA1、FU4+BA1、FU2/4+BA1/2 这 5 个组合, 降解率达到 32.72%–35.48%。综合来看, FU2/4+BA1/2 四菌组合的小麦秸秆综合降解能力最为优秀, 存在潜在的开发价值。

2.6 四菌复合菌群组合降解前后小麦秸秆理化性质变化

2.6.1 傅里叶红外光谱分析结果

经四菌复合菌群组合降解后, 小麦秸秆木质纤维素红外光谱特征峰透过率出现明显上升(图 6)。

变化主要集中在 $1\ 000\text{--}3\ 700\ \text{cm}^{-1}$ 附近, 其中 $1\ 066\ \text{cm}^{-1}$ 附近红外吸收峰与半纤维素和纤维素中的 C–O 拉伸有关; $1\ 235\ \text{cm}^{-1}$ 附近红外吸收峰与木质素-半纤维素复合物中的 O=C–C 伸缩振动有关^[21–22], 说明小麦秸秆中纤维素、半纤维素与木质素复合结构被破坏, 纤维素、半纤维素与木质素产生分离。

表 5 小麦秸秆干物质与木质纤维素组分的单菌落降解率

Table 5 Single strain degradation rate of dry matter and lignocellulose components in wheat straw

Strain number	Strain name	Degradability of dry matter (%)	Degradability of cellulose (%)	Degradability of hemicellulose (%)	Degradability of lignin (%)
FU1	<i>Penicillium</i> sp.	17.15±0.70b	43.12±1.79bc	15.16±2.07d	9.46±2.29e
FU2	<i>Penicillium citrinum</i>	16.82±0.91b	44.16±1.74ab	8.33±2.51e	22.09±0.63b
FU3	<i>Purpureocillium</i> sp.	17.06±2.03b	44.27±1.60ab	5.48±2.29ef	16.01±0.74d
FU4	<i>Aspergillus nomiae</i>	18.00±0.78b	47.03±1.60a	3.56±0.94f	17.56±3.69cd
FU5	<i>Eutypella</i> sp.	20.95±1.10a	40.01±4.80c	4.10±1.96ef	11.23±1.55e
BA1	<i>Bacillus subtilis</i>	18.61±0.55b	35.36±0.72d	64.87±0.36a	10.45±1.23e
BA2	<i>Escherichia coli</i>	18.37±1.09b	31.87±0.48d	48.22±1.90b	26.20±3.23a
BA3	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	17.39±1.07b	31.80±2.54d	40.47±6.44c	20.01±1.23bc

表中数值为平均值±标准差, 同列不同小写字母表示不同组间的降解率差异($P<0.05$)

The values in the table are the mean ± standard deviation, different lowercase letters in the same column indicate differences in degradation rates between different groups ($P<0.05$).

表 6 双菌互作降解结果

Table 6 Degradation results of dual strains interaction

Strain number	Strain name	Degradability of dry matter (%)	Degradability of cellulose (%)	Degradability of hemicellulose (%)	Degradability of lignin (%)
FU2+BA1	/	21.09±0.19ab	46.88±2.40a	15.43±2.18f	26.73±0.65de
FU2+BA2	/	19.99±0.70bc	38.89±1.39c	27.21±3.27e	35.34±1.43a
FU4+BA1	/	21.90±0.68a	43.26±1.77b	34.56±4.05d	34.07±2.63ab
FU4+BA2	/	20.93±1.72ab	44.82±3.27ab	30.03±5.87de	31.27±2.14bc
FU2+FU4	/	19.66±0.48bcd	44.97±1.50ab	6.78±1.53gh	32.15±0.11bc
BA1+BA2	/	19.31±0.48cde	35.79±0.70d	58.07±3.71b	29.48±1.42cd
FU2	<i>Penicillium citrinum</i>	16.82±0.91f	44.16±1.74b	8.33±2.51g	22.09±0.63f
FU4	<i>Aspergillus nomiae</i>	18.00±0.78ef	47.03±1.60a	3.56±0.94h	17.56±3.69g
BA1	<i>Bacillus subtilis</i>	18.61±0.55cde	35.36±0.72d	64.87±0.36a	10.45±1.23h
BA2	<i>Escherichia coli</i>	18.37±1.09de	31.87±0.48e	48.22±1.90c	26.20±3.23e

表中数值为平均值±标准差, 同列不同小写字母表示不同组间的降解率差异($P<0.05$). /表示菌株组合, 不标注具体学名
The values in the table are the mean ± standard deviation, different lowercase letters in the same column indicate differences in degradation rates between different groups ($P<0.05$). / represents the combination of strains, not marked with specific scientific name.

表 7 小麦秸秆干物质与木质纤维素组分的复合菌群降解率

Table 7 Degradation rate of composite strains of dry matter and lignocellulose components in wheat straw

Strain number	Strain name	Degradability of dry matter (%)	Degradability of cellulose (%)	Degradability of hemicellulose (%)	Degradability of lignin (%)
FU2/4+BA1	/	23.19±0.88ab	41.66±1.97de	26.57±1.04ef	35.07±0.60ab
FU4+BA1/2	/	23.71±0.54a	42.21±1.43cd	22.42±2.97f	35.48±0.39a
FU2/4+BA1/2	/	24.35±0.92a	47.24±2.59a	35.75±2.43d	32.72±3.20abc
FU2	<i>Penicillium citrinum</i>	16.82±0.91i	44.16±1.74bcd	8.33±2.51h	22.09±0.63g
FU4	<i>Aspergillus nomiae</i>	18.00±0.78hi	47.03±1.60a	3.56±0.94i	17.56±3.69h
BA1	<i>Bacillus subtilis</i>	18.61±0.55ghi	35.36±0.72f	64.87±0.36a	10.45±1.23i
BA2	<i>Escherichia coli</i>	18.37±1.09hi	31.87±0.48g	48.22±1.90c	26.20±3.23f
FU2+BA1	/	21.09±0.19cd	46.88±2.40ab	15.43±2.18g	26.73±0.65ef
FU2+BA2	/	19.99±0.70def	38.89±1.39e	27.21±3.27e	35.34±1.43a
FU4+BA1	/	21.90±0.68bc	43.26±1.77cd	34.56±4.05d	34.07±2.63abc
FU4+BA2	/	20.93±1.72cde	44.82±3.27abc	30.03±5.87e	31.27±2.14cd
FU2+FU4	/	19.66±0.48efg	44.97±1.50abc	6.78±1.53hi	32.15±0.11bcd
BA1+BA2	/	19.31±0.48fgh	35.79±0.70f	58.07±3.71b	29.48±1.42de

表中数值为平均值±标准差, 同列不同小写字母表示不同组间的降解率差异($P<0.05$). /表示菌株组合, 不标注具体学名
The values in the table are the mean ± standard deviation, different lowercase letters in the same column indicate differences in degradation rates between different groups ($P<0.05$). / represents the combination of strains, not marked with specific scientific name.

1 160 cm^{-1} 附近红外吸收峰与碳链中的 C—O—C 伸缩振动有关^[21], 说明在复合菌群的降解作用下, 小麦秸秆中部分碳链结构受到破坏, 分子聚合度下降。

1 316 cm^{-1} 附近红外吸收峰与纤维素中的 CH_2 基团摇摆振动有关; 1 375 cm^{-1} 附近红外吸收峰与纤维素中的 C—H 弯曲振动相关^[21-22], 说明小麦秸秆中部分纤维素发生降解。

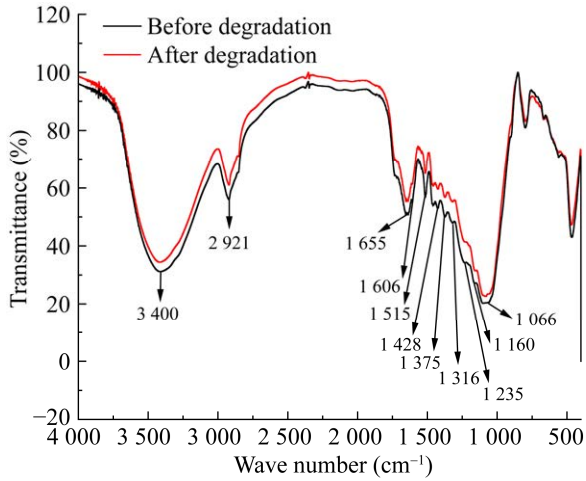


图 6 复合菌群组合降解前后小麦秸秆傅里叶红外光谱

Figure 6 FTIR spectra of wheat straw before and after composite strains combined degradation.

1 428 cm^{-1} 附近红外吸收峰与芳环拉伸引起的碳氢键平面变形有关；1 515、1 606、1 655 cm^{-1} 附近红外吸收峰与芳环 C-C 拉伸、芳香族骨架 C=C 与 C=N 的拉伸振动、O-H 共轭 C-O 基团的伸缩振动有关^[21-23]，说明复合菌群对小麦秸秆中木质素的芳香族骨架、木质素的主要化学键 $\beta\text{-O-4}$ 造成了破坏。

2 921 cm^{-1} 附近红外吸收峰与纤维素中的氢键和甲基与亚甲基中的碳氢键振动有关；3 400 cm^{-1} 附近红外吸收峰与-OH 基团伸缩振动有关^[22]，说明在复合菌群的降解作用下，小麦秸秆中的氢键受到破坏

2.6.2 X 射线衍射分析结果

经四菌复合菌群组合降解后，小麦秸秆木质纤维素 XRD 特征峰出现明显下降(图 7)。在纤维素结晶区衍射峰处($2\theta=22.5^\circ$)和纤维素无定形区衍射峰处($2\theta=18.0^\circ$)^[24]均存在明显下降；小麦秸秆纤维素结晶度从 37.40%降低至 32.97%，说明该复合菌群有较强的对纤维素降解利用能力。

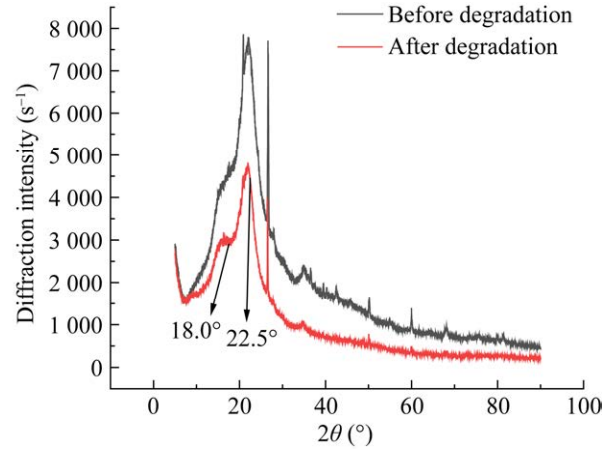


图 7 复合菌群组合降解前后小麦秸秆 X 射线衍射图谱

Figure 7 XRD patterns of wheat straw before and after composite strains combined degradation.

2.6.3 降解前后小麦秸秆微观结构分析

扫描电镜观察发现(图 8)，复合菌群降解后小麦秸秆表面由相对光滑变为相对粗糙多孔，纤维结构崩裂扭曲成絮状褶皱，产生大量裂缝和突起，并崩解为众多小碎片，推测在菌群释放的木质纤维素酶的化学催化作用和真菌菌丝深入秸秆内部所造成的物理破坏作用的联合影响下，秸秆的结构受到了严重破坏，从微观结构的变化上表明复合菌群对木质纤维素存在良好的降解能力。

3 讨论与结论

近年来，环境保护日益受到重视，充分利用农林废弃物、开发绿色生物质能源得到了广泛关注。其中，利用微生物处理小麦秸秆取得了一定的进展，但以往的研究多选择从腐木、土壤腐殖层筛选木质纤维素降解菌。例如，Knežević 等^[25]选取无柄林芝(*Ganoderma resinaceum*)作为麦秆聚合物的生物处理菌，发现在 15 d 时该菌对纤维素、半纤维素、木质素的降解率可分别达 33.8%、38.8%、37.9%，干物质降解率可达 17.3%；

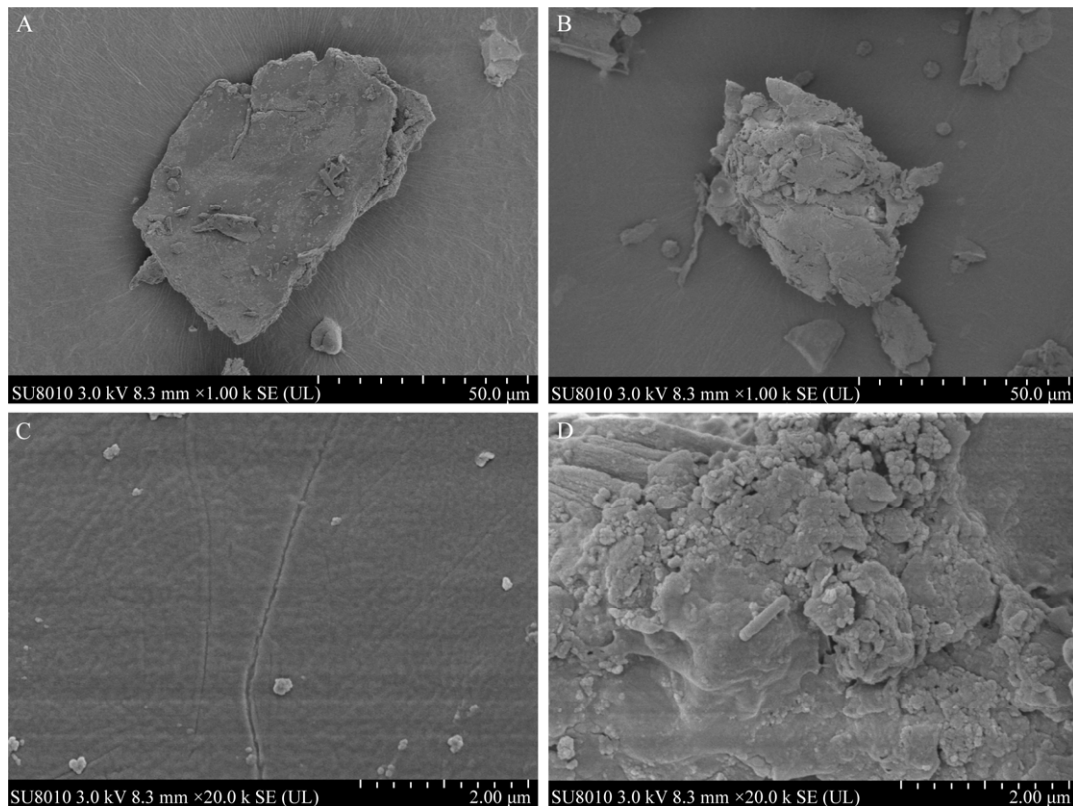


图 8 复合菌群组合降解前后小麦秸秆扫描电镜图像 A: 降解前小麦秸秆 1 000 倍放大. B: 降解后小麦秸秆 1 000 倍放大. C: 降解前小麦秸秆 20 000 倍放大. D: 降解后小麦秸秆 20 000 倍放大

Figure 8 SEM images of wheat straw before and after composite strains combined degradation. A: 1 000× magnification of wheat straw before degradation. B: 1 000× magnification of wheat straw after degradation. C: 20 000× magnification of wheat straw before degradation. D: 20 000× magnification of wheat straw after degradation.

任强等^[26]选取产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*)对麦秆粉末进行生物降解,发现在 10 d 时对半纤维素、木质素的降解效果显著,降解率分别为 39.9%和 21.8%。本研究从黑翅土白蚁菌圃内分离筛选木质纤维素降解菌构建复合菌群,发现它们对纤维素、半纤维素、木质素均具有较好的降解能力,在 12 d 内对纤维素、半纤维素、木质素的降解率分别达到了 47.24%、35.75%和 32.72%,由于小麦秸秆中纤维素占比较高,因此干物质降解率达到了 24.35%。其中,BA1 单菌对半纤维素的降解率达到了 64.87%。说明本研究所使用的复合菌群的纤维素降解率和干物

质降解率更高,BA1 菌株的半纤维素降解能力更高。

在自然环境中和常见的堆肥情况下,小麦秸秆的降解并非单菌落降解的结果,Wei 等^[27]通过向堆肥中接种放线菌,提高木质纤维素降解能力的研究表明,具备不同酶系的菌种组合能够利用不同碳源进行代谢,更好地打破木质素、纤维素、半纤维素聚合而成的复杂木质素屏障,以实现更均衡地对木质纤维素进行降解。Kolasa 等^[28]研究发现,将里氏木霉分别与黑曲霉等 3 种曲霉混合培养后,可以有效提升小麦秸秆降解率,效果相比单菌落有 80%左

右的提升。在本研究中,将产酶种类和产酶量不同、对木质纤维素有不同降解效果的菌种组合成复合菌群,发现FU2、FU4、BA1、BA2这4株菌组成的复合菌群显著地提高了干物质降解率、纤维素降解率和木质素降解率,而且木质纤维素各组分降解较为均衡,总体而言对木质纤维素有更好的降解能力。

通过红外光谱研究发现,复合菌群能够对小麦秸秆中木质素的芳香族骨架、木质素的部分重要化学键、木质素-半纤维素-纤维素复合结构和木质纤维素分子间作用力均有明显破坏。这些结构的破坏,说明木质素、半纤维素、纤维素本身受到降解的同时,也使纤维素、半纤维素和木质素之间的连接被破坏,即阻碍木质纤维素降解的“屏障”被破坏,使纤维素向外暴露,释放更多酶切位点供酶结合,从而实现更快速地降解^[29]。通过X射线衍射图谱研究发现,复合菌群能够降低小麦秸秆中的纤维素结晶度,说明复合菌群能够通过物理化学处理的方法将结晶纤维素转化为无定形纤维素并进一步降解,纤维素的无定形区域能够吸附水,降解速率更快,进一步有利于后续降解^[30]。通过扫描电镜所见的微观结构也证实复合菌群对小麦秸秆物理结构的破坏效果非常显著,降解后的秸秆表面粗糙且蓬松,不仅利于内部木质纤维素的暴露,也利于降解酶的附着^[31]。

综上所述,本研究从黑翅土白蚁巢内菌圃中分离筛选得到8株具有降解木质纤维素能力的菌株,并根据降解能力和产酶能力挑选部分菌株组合成复合菌群,其中由桔青霉、红绶曲霉、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌组成的复合菌群对小麦秸秆有着较强的降解能力,在12d内对纤维素、半纤维素、木质素的降解率分别达到了47.24%、35.75%和32.72%,干物质降解率达到了24.35%,并能在理化层面上显著破坏木质纤

维素结构,在生物降解秸秆上具有潜在的开发价值。

作者贡献声明

李吴晗:研究构思和设计、数据收集与处理、论文撰写;黄越:协助实验操作;余婷:参与论文讨论、协助实验操作;沈毅:研究构思和设计;周琪欢:参与论文讨论;陈翔:参与论文讨论;莫建初:研究构思和设计、论文修改。

参考文献

- [1] 张晓庆,王梓凡,参木友,白海花,塔娜.中国农作物秸秆产量及综合利用现状分析[J].中国农业大学学报,2021,26(9):30-41.
ZHANG XQ, WANG ZF, CAN MY, BAI HH, TA N. Analysis of yield and current comprehensive utilization of crop straws in China[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2021, 26(9): 30-41 (in Chinese).
- [2] 石祖梁,王飞,王久臣,李想,孙仁华,宋成军.我国农作物秸秆资源利用特征、技术模式及发展建议[J].中国农业科技导报,2019,21(5):8-16.
SHI ZL, WANG F, WANG JC, LI X, SUN RH, SONG CJ. Utilization characteristics, technical model and development suggestion on crop straw in China[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2019, 21(5): 8-16 (in Chinese).
- [3] AUER L, LAZUKA A, SILLAM-DUSSÈS D, MIAMBI E, O'DONOHUE M, HERNANDEZ-RAQUET G. Uncovering the potential of termite gut microbiome for lignocellulose bioconversion in anaerobic batch bioreactors[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2623.
- [4] WANG CG, ZHANG XH, LIU Q, ZHANG Q, CHEN LG, MA LL. A review of conversion of lignocellulose biomass to liquid transport fuels by integrated refining strategies[J]. *Fuel Processing Technology*, 2020, 208: 106485.
- [5] ZHOU M, TIAN XJ. Development of different pretreatments and related technologies for efficient biomass conversion of lignocellulose[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 202: 256-268.

- [6] SI MY, LIU D, LIU MR, YAN X, GAO CJ, CHAI LY, SHI Y. Complementary effect of combined bacterial-chemical pretreatment to promote enzymatic digestibility of lignocellulose biomass[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 272: 275-280.
- [7] WAN CX, LI YB. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass[J]. *Biotechnology Advances*, 2012, 30(6): 1447-1457.
- [8] COUTURIER M, NAVARRO D, OLIVÉ C, CHEVRET D, HAON M, FAVEL A, LESAGE-MEESSEN L, HENRISSAT B, COUTINHO PM, BERRIN JG. Post-genomic analyses of fungal lignocellulosic biomass degradation reveal the unexpected potential of the plant pathogen *Ustilago maydis*[J]. *BMC Genomics*, 2012, 13(1): 57.
- [9] ZHAO L, SUN ZF, ZHANG CC, NAN J, REN NQ, LEE DJ, CHEN C. Advances in pretreatment of lignocellulosic biomass for bioenergy production: challenges and perspectives[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 343: 126123.
- [10] SHI Y, YAN X, LI Q, WANG X, LIU MR, XIE SX, CHAI LY, YUAN J. Directed bioconversion of kraft lignin to polyhydroxyalkanoate by *Cupriavidus basilensis* B-8 without any pretreatment[J]. *Process Biochemistry*, 2017, 52: 238-242.
- [11] 高旭红, 毛磊, 徐立春, 熊丽萍, 梁小军. 平菇、香菇和杏鲍菇对小麦秸秆纤维物质降解能力最优菌株的筛选[J]. *中国饲料*, 2023(15): 148-152.
GAO XH, MAO L, XU LC, XIONG LP, LIANG XJ. Screening the best strains of *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes* and *Pleurotus eryngii* for the degradation of wheat straw fiber[J]. *China Feed*, 2023(15): 148-152 (in Chinese).
- [12] SUN ZJ, MAO YY, LIU SJ, ZHANG HW, XU Y, GENG RP, LU JQ, HUANG SY, YUAN Q, ZHANG SP, DONG Q. Effect of pretreatment with *Phanerochaete chrysosporium* on physicochemical properties and pyrolysis behaviors of corn stover[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 361: 127687.
- [13] XIONG L. Effects of adding different concentrations of *Aspergillus niger* inoculant on the quality of mixed rice straw silage[J]. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 2022, 59(2): 357-364.
- [14] OZBAYRAM EG, KLEINSTEUBER S, NIKOLAUSZ M. Biotechnological utilization of animal gut microbiota for valorization of lignocellulosic biomass[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(2): 489-508.
- [15] 王成盼, 梁世优, 殷学杰, 于保庭, 胡寅, 莫建初. 蚁巢伞对木质纤维素的降解作用[J]. *应用与环境生物学报*, 2019, 25(3): 729-735.
WANG CP, LIANG SY, YIN XJ, YU BT, HU Y, MO JC. Degradation of lignocellulose by *Termitomyces*[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2019, 25(3): 729-735 (in Chinese).
- [16] 沈毅, 漆梦雯, 羊桂英, 周琪欢, 余婷, 李吴晗, 莫建初. 黑翅土白蚁共生真菌对水稻秸秆生物降解研究[J]. *浙江农林大学学报*, 2023, 40(6): 1224-1231.
SHEN Y, QI MW, YANG GY, ZHOU QH, YU T, LI WH, MO JC. Biodegradation of rice straw by symbiotic fungi of *Odontotermes formosanus*[J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2023, 40(6): 1224-1231 (in Chinese).
- [17] SIJINAMANOJ V, MUTHUKUMAR T, MUTHURAJA R, RAYAPPAN K, KARMEGAM N, SAMINATHAN K, GOVARTHANAN M, KATHIRESWARI P. Lignolytic valorization of agricultural residues by *Aspergillus nomius* and *Trichoderma harzianum* isolated from gut and comb of *Odontotermes obesus* (Termitidae)[J]. *Chemosphere*, 2021, 284: 131384.
- [18] SLUITER JB, RUIZ RO, SCARLATA CJ, SLUITER AD, TEMPLETON DW. Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. 1. review and description of methods[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(16): 9043-9053.
- [19] 张超, 李艳宾, 张磊, 张琴, 魏世清. 真菌产纤维素酶培养基中刚果红转移机理研究[J]. *微生物学通报*, 2006, 33(6): 12-16.
ZHANG C, LI YB, ZHANG L, ZHANG Q, WEI SQ. Study on transition mechanism of congo-red in cellulase-producing fungi medium[J]. *Microbiology China*, 2006, 33(6): 12-16 (in Chinese).
- [20] 高榕, 邓迎达. 高生产效率纤维素酶菌株初筛方法的研究[J]. *纤维素科学与技术*, 2004, 12(3): 20-24.
GAO R, DENG YD. A new approach for selection a cellulase producing strain[J]. *Journal of Cellulose Science and Technology*, 2004, 12(3): 20-24 (in Chinese).
- [21] CHANG SS, SALMÉN L, OLSSON AM, CLAIR B. Deposition and organisation of cell wall polymers during maturation of poplar tension wood by FTIR microspectroscopy[J]. *Planta*, 2014, 239(1): 243-254.
- [22] WU L, CHE SH, QIN XT, XU YF, TIAN SQ, ZHU Y, SONG J, GUAN YP, WANG DC, WU MK, YANG X, WU ZH, YANG MY. Identification, characteristics and rice growth promotion of a highly efficient cellulolytic

- bacterial strain, *Cellulomonas iranensis* ZJW-6, isolated from paddy soil in central China[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1152966.
- [23] 庄培文, 张恺, 郑平, 凌铭煌, 张玉苍, 骆祝华. 深海真菌 *Chaetomium* sp. CS1 的木质素降解特征[J]. *菌物学报*, 2023, 42(12): 2442-2453.
ZHUANG PW, ZHANG K, ZHENG P, LING MH, ZHANG YC, LUO ZH. Lignin-degradation characteristics of deep-sea fungus *Chaetomium* sp. CS1[J]. *Mycosystema*, 2023, 42(12): 2442-2453 (in Chinese).
- [24] BENKO EM, CHUHCHIN DG, MALKOV AV, VYDRINA IV, NOVOZHILOV EV, LUNIN VV. Change in the crystallinity of wheat straw during ozone treatment[J]. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 2020, 94(6): 1149-1152.
- [25] KNEŽEVIĆ A, ĐOKIĆ I, TOSTI T, POPOVIĆ S, MILOJKOVIĆ-OPSENICA D, VUKOJEVIĆ J. White-rot fungal pretreatment of wheat straw: effect on enzymatic hydrolysis of carbohydrate polymers[J]. *Cellulose Chemistry and Technology*, 2023, 57(7/8): 815-828.
- [26] 任强, 焦志强, 葛世纪, 展文豪, 王洋洋. 木质纤维素高效降解菌株的筛选及其对小麦秸秆的强化降解[J]. *河南大学学报(自然科学版)*, 2023, 53(6): 671-680.
REN Q, JIAO ZQ, GE SJ, ZHAN WH, WANG YY. Isolation of high efficient lignocellulose degrading bacteria and its enhanced degradation of wheat straw[J]. *Journal of Henan University (Natural Science)*, 2023, 53(6): 671-680 (in Chinese).
- [27] WEI YQ, WU D, WEI D, ZHAO Y, WU JQ, XIE XY, ZHANG RJ, WEI ZM. Improved lignocellulose-degrading performance during straw composting from diverse sources with actinomycetes inoculation by regulating the key enzyme activities[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 271: 66-74.
- [28] KOLASA M, AHRING BK, LÜBECK PS, LÜBECK M. Co-cultivation of *Trichoderma reesei* RutC30 with three black *Aspergillus* strains facilitates efficient hydrolysis of pretreated wheat straw and shows promises for on-site enzyme production[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 169: 143-148.
- [29] MUSSATTO SI, FERNANDES M, MILAGRES AMF, ROBERTO IC. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2008, 43(2): 124-129.
- [30] KARIMI K, TAHERZADEH MJ. A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: composition, imaging, and crystallinity[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 200: 1008-1018.
- [31] XU XQ, XU ZQ, SHI S, LIN MM. Lignocellulose degradation patterns, structural changes, and enzyme secretion by *Inonotus obliquus* on straw biomass under submerged fermentation[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 241: 415-423.