

不同形态氮素对黑曲霉降解小麦秸秆的影响

管浩, 王利妍, 金梦灿, 田达, 郜红建

引用本文:

管浩, 王利妍, 金梦灿, 田达, 郜红建. 不同形态氮素对黑曲霉降解小麦秸秆的影响[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(10): 2298–2306.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2022-0227>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

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

纪程, 孙玉香, 孟圆, 刘耀斌, 徐聪, 张永春, 谷益安, 汪吉东

农业环境科学学报. 2022, 41(4): 819–825 <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0537>

小麦秸秆还田条件下钾肥减量对水稻产量及养分利用的影响

朱远芃, 史燕捷, 管浩, 叶新新, 郜红建, 华胜, 王宜坤

农业环境科学学报. 2020, 39(11): 2596–2605 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0289>

小麦秸秆还田量对土壤Cd有效性及水稻Cd亚细胞分布的影响

黄界颖, 武修远, 佟影影, 曹森, 高越, 杨卉艳

农业环境科学学报. 2020, 39(7): 1503–1511 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0051>

秸秆集中沟埋还田对土壤氮素分布及微生物群落的影响

许明敏, 冯金侠, 陈卫平, 杨海水, 刘建, 卞新民, 陆巍

农业环境科学学报. 2016, 35(10): 1960–1967 <https://doi.org/10.11654/jaes.2016-0533>

生物炭原位添加对养殖池塘底泥中微生物群落结构的影响

赵汉胤, 陈潘毅, 唐欣哲, 陈以芹, 李娟英

农业环境科学学报. 2021, 40(12): 2770–2778 <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0434>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

管浩, 王利妍, 金梦灿, 等. 不同形态氮素对黑曲霉降解小麦秸秆的影响[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(10): 2298–2306.

GUAN H, WANG L Y, JIN M C, et al. Impacts of different forms of nitrogen on the decomposition of wheat straw by *Aspergillus niger*[J].
Journal of Agro-Environment Science, 2022, 41(10): 2298–2306.



开放科学 OSID

不同形态氮素对黑曲霉降解小麦秸秆的影响

管浩, 王利妍, 金梦灿, 田达*, 郜红建*

(安徽农业大学资源与环境学院/农田生态保育与污染防控安徽省重点实验室/自然资源部江淮耕地资源保护与生态修复重点实验室/安徽省绿色磷肥智能制造与高效利用工程研究中心/长江经济带磷资源高效利用与水环境保护研究中心, 合肥 230036)

摘要:为探究外源添加不同形态氮素对黑曲霉降解小麦秸秆的影响,采用室内摇瓶培养法研究不同形态氮素对小麦秸秆降解过程中残留质量、微生物生物量和胞外酶活性变化的影响。设置小麦秸秆(W)、小麦秸秆+黑曲霉(WA)、小麦秸秆+黑曲霉+硫酸铵(WAA)、小麦秸秆+黑曲霉+尿素(WAU)、小麦秸秆+黑曲霉+硝酸钾(WAP)五个处理。结果表明,培养至30 d时,小麦秸秆降解率呈现WAP(21.87%)>WAU(21.08%)>WAA(17.29%)>WA(14.23%)>W(7.86%)的规律,而降解速率常数则表现为 $K_{WAU}(0.222)>K_{WAP}(0.184)>K_{WAA}(0.126)>K_{WA}(0.072)>K_W(0.059)$ 的规律。添加不同形态氮素处理的微生物生物量增加了36.63%~65.16%, β -葡萄糖苷酶活性提高了10.42%~38.89%,酸性木聚糖酶活性提高了13.28%~58.75%,锰过氧化物酶活性提高了2.80%~26.60%,漆酶活性提高了22.86%~44.57%,其中酰胺态氮和硝态氮的效果最佳。结构方程模型结果表明,添加氮素通过影响微生物生物量($SPC=0.45$)提高秸秆降解酶活性,进而促进小麦秸秆降解。综上,黑曲霉能促进小麦秸秆降解($P<0.05$),而外源添加不同形态氮素能显著加快黑曲霉对小麦秸秆的降解,以酰胺态氮和硝态氮的效果较好。从投入成本和实际应用角度考虑,尿素是促进黑曲霉降解小麦秸秆的理想氮源。

关键词:黑曲霉;氮素形态;小麦秸秆降解;酶活性;结构方程模型

中图分类号:S141.4;X71 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2022)10-2298-09 doi:10.11654/jaes.2022-0227

Impacts of different forms of nitrogen on the decomposition of wheat straw by *Aspergillus niger*

GUAN Hao, WANG Liyan, JIN Mengcan, TIAN Da*, GAO Hongjian*

(College of Resources and Environment, Anhui Agricultural University / Anhui Province Key Laboratory of Farmland Ecological Conservation and Pollution Prevention/Key Laboratory of Jianghuai Arable Land Resources Protection and Eco-restoration, Ministry of Natural Resources / Anhui Engineering and Technology Research Center of Intelligent Manufacture and Efficient Utilization of Green Phosphorus Fertilizer/Research Center of Phosphorous Efficient Utilization and Water Environment Protection Along the Yangtze River Economic Zoner, Hefei 230036, China)

Abstract: The effect of exogenous addition of different forms of nitrogen on the decomposition of wheat straw by *Aspergillus niger* was assessed. The effects of different forms of nitrogen on residue mass, microbial biomass, and extracellular enzyme activity during the decomposition of wheat straw were studied by an indoor shaking culture method. The five treatments conducted in the laboratory were as follows: wheat straw (W), wheat straw + *A. niger* (WA), wheat straw + *A. niger* + ammonium sulfate (WAA), wheat straw + *A. niger* + urea (WAU), and wheat straw + *A. niger* + potassium nitrate (WAP). The treatment order of the decomposition rate of wheat straw was WAP (21.87%) > WAU (21.08%) > WAA (17.29%) > WA (14.23%) > W (7.86%), and the order of the decomposition rate constant was $K_{WAU}(0.222) > K_{WAP}(0.184) > K_{WAA}(0.126) > K_{WA}(0.072) > K_W(0.059)$.

收稿日期:2022-03-08 录用日期:2022-04-25

作者简介:管浩(1997—),男,安徽六安人,硕士研究生,从事养分资源高效利用研究。E-mail:guanhao0721@163.com

*通信作者:郜红建 E-mail:hjgao@ahau.edu.cn; 田达 E-mail:tianda@ahau.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金项目(41877099,42007030);安徽省科技重大专项(202103a06020012);安徽省自然资源厅科技项目(2021-K-11)

Project supported: The National Natural Science Foundation of China(41877099,42007030); The Special Fund for Key Program of Science and Technology of Anhui Province, China(202103a06020012); The Program at Department of National Resources of Anhui Province, China(2021-K-11)

(0.222)> K_{WAP} (0.184)> K_{WAA} (0.126)> K_{WA} (0.072)> K_W (0.059) after 30 days incubation. With the addition of different forms of nitrogen, the microbial biomass increased from 36.63% to 65.16%, β -glucosidase activity increased from 10.42% to 38.89%, acidic xylanase activity increased from 13.28% to 58.75%, manganese peroxidase activity increased from 2.80% to 26.60%, and laccase activity increased from 22.86% to 44.57%. Amide nitrogen and nitrate nitrogen produced the best results. A structural equation model also revealed that nitrogen addition increased the activity of straw-degrading enzymes by affecting the microbial biomass ($SPC=0.45$), thereby promoting the decomposition of wheat straw. The findings indicate that *A. niger* can promote decomposition of wheat straw ($P<0.05$). Exogenous addition of different forms of nitrogen, especially amide nitrogen and nitrate nitrogen, can significantly accelerate the decomposition of wheat straw by *A. niger*. Considering the input cost and practical application, urea is an ideal nitrogen source for promoting the decomposition of wheat straw by *A. niger*.

Keywords: *Aspergillus niger*; nitrogen form; wheat straw decomposition; enzyme activity; structural equation modeling

农作物秸秆是农业生产中主要的副产物之一^[1],也是主要的农业废弃物^[2]。据统计,我国2020年农作物秸秆资源产量可达8.5亿t^[3]。秸秆含有丰富的氮、磷、钾等营养元素,秸秆还田能够将其所含养分归还到土壤,提高土壤肥力和养分利用效率^[4],是实现秸秆资源化利用的重要举措^[5]。木质纤维素是秸秆的主要组分,约占秸秆质量的80%~90%^[6-7]。木质纤维素是由纤维素、半纤维素和木质素等物质通过共价键、氢键和蜡键等分子作用力连接组成不溶于水的高分子化合物^[8],大部分木质纤维素难以降解^[9],是秸秆还田降解速率慢的重要原因。

秸秆降解会受到特定功能微生物介导的生物化学作用影响^[10-11],如芽孢杆菌属、曲霉属、链霉菌属等是较好的纤维素降解菌^[12],白腐菌和褐腐菌等对木质素降解效果较好^[13]。微生物通过分泌水解酶和氧化酶促进秸秆木质纤维素降解^[14],如 β -葡萄糖苷酶可将纤维二糖水解为葡萄糖^[15],木聚糖酶可将半纤维素降解为木寡糖^[16],锰过氧化物酶和漆酶等可将木质素降解为小分子化合物^[17]。研究表明,黑曲霉能够分泌纤维素分解酶、半纤维素分解酶等秸秆降解酶,进而加快纤维素、半纤维素组分的降解^[18-20]。在秸秆还田条件下,为避免作物生长前期与微生物争氮现象,一般需要添加外源氮素^[21]。陆欢等^[22]发现,不同氮源对微生物胞外酶活性具有显著影响。李晓韦等^[23]研究表明,尿素硝酸铵对油菜秸秆腐解的效果最显著。石琳等^[24]研究则表明,施用谷氨酸和硫酸铵有利于玉米秸秆腐解。另外,秸秆还田配施微生物菌剂能促进秸秆降解^[25]。杨帆等^[26]发现,微生物促腐剂能提高纤维素酶活性和纤维素、半纤维素的降解率,促进水稻秸秆的腐解。高日平等^[27]研究表明,秸秆腐熟剂可提高秸秆腐解速率,其纤维素酶和木质素过氧化物酶活性分别提高4.87%和48.05%,缩短了秸秆腐解时间。勉有明等^[28]研究发现,秸秆还田配施腐熟剂可有效促进

玉米秸秆腐解,改善土壤理化性质,显著提高作物产量与经济效益。已有研究表明,黑曲霉可以促进作物秸秆降解,但外源添加不同形态氮素对黑曲霉降解秸秆的影响及其作用机制尚不清楚。

本研究采用摇瓶培养试验法,探究外源添加不同形态氮素(铵态氮、酰胺态氮和硝态氮)对黑曲霉降解小麦秸秆的影响,分析小麦秸秆降解过程中的残留质量及相关酶活性的变化规律,为加速还田秸秆降解提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株:供试菌株为安徽省宿州市玉米根际土壤中分离出的黑曲霉(AH-F-1-2,CGMCC No.23272)。

供试秸秆:为冬小麦成熟期秸秆,取自安徽农业大学皖北综合试验站。

蒙金娜(PVK)培养基:葡萄糖10 g,硫酸铵0.5 g,氯化钠0.2 g,七水合硫酸镁0.25 g,七水合硫酸铁0.03 g,氯化钾0.2 g,四水硫酸锰0.03 g,去离子水1 000 mL。

1.2 试验设计与样品采集

将自然风干的小麦成熟期秸秆剪成1 cm长度烘干备用。配制试验所需的PVK培养基,并根据不同试验处理添加不同形态氮素,铵态氮、酰胺态氮和硝态氮源分别使用硫酸铵、尿素和硝酸钾作为试验试剂,以PVK培养基中硫酸铵添加量作为标准使不同处理为同等氮量,试剂添加量分别为0.50、0.23 g·L⁻¹和0.77 g·L⁻¹。前期预试验表明,本研究中1%的秸秆添加量^[29]最适宜。培养时每个锥形瓶加PVK培养基50 mL,高温灭菌锅121℃灭菌30 min后添加黑曲霉孢子液(10⁷ cfu·mL⁻¹)与0.5 g小麦烘干秸秆,摇床30℃恒温培养。

试验共设置5个处理,分别是小麦秸秆(wheat

straw, W)、小麦秸秆+黑曲霉(wheat straw+*A. niger*, WA)、小麦秸秆+黑曲霉+硫酸铵(wheat straw+*A. niger*+ ammonium sulfate, WAA)、小麦秸秆+黑曲霉+尿素(wheat straw+*A. niger*+urea, WAU)、小麦秸秆+黑曲霉+硝酸钾(wheat straw+*A. niger*+potassium nitrate, WAP)。本试验为破坏性取样,分4个时期,每个处理设置3个重复。分别于摇床培养的第5、10、20、30天取样,培养结束后,用灭菌水反复冲洗秸秆至表面干净,60℃烘至恒质量后测量秸秆质量,将PVK培养基过滤,滤液用于测量酶活性,菌丝冷冻干燥后测微生物量。

1.3 指标计算

小麦秸秆降解率^[25]:

$$R_{\text{wst}} = (M_0 - M_t) / M_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中: R_{wst} 为小麦秸秆残留率,%; M_0 为小麦秸秆降解前的初始质量,g; M_t 为降解 t d后的秸秆质量,g; t 为降解时间,d。

小麦秸秆残留质量随时间的变化规律用带常数项的一阶指数衰减方程^[30]进行拟合:

$$y = y_0 + a \times e^{-kt} \quad (2)$$

式中: y 为小麦秸秆残留质量,g; k 为降解速率常数, d^{-1} ,其数值大小表明秸秆降解的速度快慢; t 为降解时间,d; a 为损失的量占初始量的比例; y_0 为 y 趋向的值。

1.4 酶活性测定方法

β -葡萄糖苷酶(β -Glucosidase, β -GC)和酸性木聚糖酶(Acidic Xylanase, ACX)活性采用DNS法^[31-32]测定,锰过氧化物酶(Manganese peroxidase, MnP)活性采用愈创木酚氧化速率法^[33]测定,漆酶(Laccase, Lac)活性采用ABTS法^[34]测定。

1.5 数据分析

本研究采用Excel 2016进行数据处理,SPSS 25.0软件进行显著性分析,多重比较采用Duncan法($P < 0.05$)分析。采用Origin 2021进行图形绘制及一阶指数方程拟合,采用Amos 17.0进行结构方程模型(Structural equation modeling, SEM)分析。

2 结果与分析

2.1 小麦秸秆质量变化

添加不同形态氮素条件下,小麦秸秆降解率随着培养时间的增加呈逐渐上升趋势,且均表现为前期上升快,后期上升慢的规律(图1)。在培养前期(0~5 d),WA处理的小麦秸秆降解率高于W处理($P > 0.05$),WAU和WAP处理的小麦秸秆降解率显著高于W处

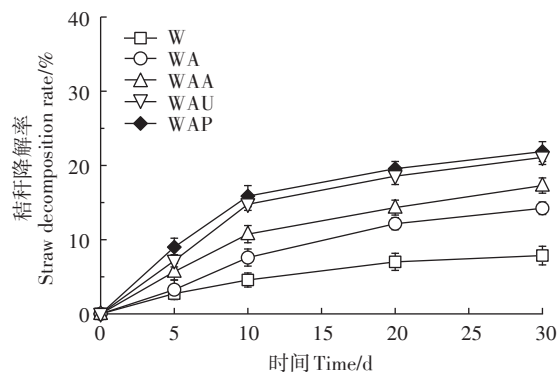


图1 不同形态氮素对小麦秸秆降解的影响

Figure 1 Impacts of different forms of nitrogen on wheat straw decomposition

理($P < 0.05$),其中以WAP处理的小麦秸秆降解率最高,达9.00%。培养至第30天时,WA、WAA、WAU和WAP处理的小麦秸秆降解率分别为14.23%、17.29%、21.08%和21.87%,分别比W处理高6.37%、9.43%、13.22%和14.01%。在不同培养时期,WA处理的小麦秸秆降解率均高于W处理,而显著低于WAA、WAU和WAP处理($P < 0.05$)。这表明添加不同形态氮素均能够促进黑曲霉对小麦秸秆的降解。

小麦秸秆降解过程中残留质量随时间的变化趋势可用一阶指数衰减模型进行拟合(表1),拟合度均较高, R^2 在0.958~0.992之间。结果显示,WA处理的 k 值(0.072 d^{-1})显著高于W处理的(0.059 d^{-1}),表明添加黑曲霉能提高小麦秸秆降解速率;WAU处理的小麦秸秆降解速率常数 k 值最大,达到 0.222 d^{-1} ,表明同时添加黑曲霉与酰胺态氮时小麦秸秆降解速率最快。

2.2 微生物生物量变化

随着培养时间的增加,添加不同形态氮素处理的微生物生物量均呈增加趋势(图2)。培养前期(0~10 d),以WAA和WAP处理的微生物生物量较高,分别为77.4 mg和81.8 mg,分别比WA处理高23.4 mg和

表1 不同形态氮素影响小麦秸秆降解的方程拟合

Table 1 Fitting equation of different forms of nitrogen on wheat

straw decomposition

处理 Treatment	$y = y_0 + a \times e^{-kt}$			
	y_0	a	k	R^2
W	0.903	0.097	0.059	0.976
WA	0.817	0.187	0.072	0.980
WAA	0.834	0.161	0.126	0.958
WAU	0.813	0.186	0.222	0.992
WAP	0.793	0.205	0.184	0.973

27.8 mg,比W处理高28.5 mg和32.9 mg;培养至第20天时,WAU和WAP处理的微生物生物量最高,分别为137.7 mg和146.1 mg,分别比WA处理高49.8 mg和58.2 mg,比W处理高65.2 mg和73.5 mg;培养至第30天时,微生物生物量呈现WAP>WAU>WAA>WA>W的规律,其中WAP处理的微生物生物量最大,达175.4 mg,分别比WAU、WAA、WA和W处理高5.6、30.3、69.2 mg和77.0 mg。添加不同形态氮素处理的微生物生物量在不同培养时期均显著高于W和WA处理,且培养后期(20~30 d)微生物生物量的差异大于培养前期(0~10 d)。在不同培养时期,WAP处理的微生物生物量均最高,而WAU处理的微生物生物量在培养前期(0~10 d)低于WAA处理,而在培养后期(20~30 d)显著高于WAA处理($P<0.05$)。这表明添加氮素促进了微生物生长,以酰胺态氮和硝态氮的效果最显著。

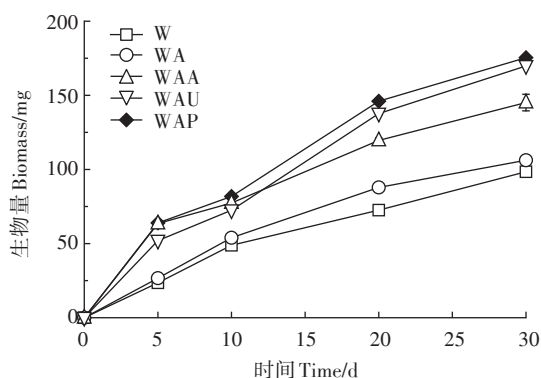


图2 不同形态氮素对微生物生物量的影响

Figure 2 Impacts of different forms of nitrogen on microbial biomass

2.3 胞外酶活性变化

由图3a可知,不同处理的 β -葡萄糖苷酶(β -GC)活性随着培养时间的增加呈现波动变化。在不同培养时期,WA处理的 β -GC活性均大于W处理。培养至第5天时,WAA处理的 β -GC活性为 $1.71 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$,比W处理高42.50%,也显著高于其他处理($P<0.05$)。培养至第10天时,WAP处理的 β -GC活性最高,达 $1.42 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。培养至第20天时,不同处理的 β -GC活性均比第10天有所上升,以WAU处理 β -GC活性最高,达 $1.70 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$,W处理酶活性最低,为 $1.39 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。培养至第30天时,不同处理的 β -GC活性整体呈现WAA>WAU>WAP>WA>W的规律,其中WAA处理的 β -GC活性最高,达 $1.04 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

不同处理的酸性木聚糖酶(ACX)活性均随培养时间的增加呈下降趋势(图3b)。培养至第5天时,WAA处理的ACX活性达到 $480.45 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$,分别比W、WA处理高181.94、177.81 $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$;WAU处理的ACX活性则显著低于WAA和WAP处理($P<0.05$)。培养至第10天时,不同处理的ACX活性均比培养初期有一定程度下降,其中以WAP处理的ACX活性最高,为 $218.92 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。培养20 d后,不同处理的ACX活性呈WAU>WAP>WA>WAA>W的规律;培养至第30天时,WAU处理的ACX活性最高达 $213.70 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$,比WAP处理高12.85%。不同培养时期WA处理的ACX活性均大于W处理的。

不同处理的锰过氧化物酶(MnP)活性随着培养时间的增加变化较小(图3c)。培养至第5天时,不同处理的MnP活性无显著差异。在培养第10天,MnP活性以WAU处理最高,达 $5.10 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$,比W处理高1.75 $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$;培养至第20天时,W处理的MnP活性最低,不同处理之间的MnP活性无显著性差异;培养第30天时,WAU处理的MnP活性最高,达 $4.91 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$,比W处理的MnP活性高51.04%,其余处理的MnP活性相比于第20天均呈下降趋势。在不同培养时期,WA处理的MnP活性高于W处理的。

不同处理的漆酶(Lac)活性随着培养时间的增加均呈现逐渐下降的趋势(图3d)。不同处理的Lac活性均在第5天达到最高,其中以WAU处理的Lac活性最高,达 $234.28 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$,分别比W、WA、WAA和WAP处理的高81.48、72.23、35.19 $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ 和24.08 $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ 。培养第10天时,WAP处理的Lac活性最大,为 $162.05 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$,比W处理高33.18%;培养至第20天时,不同处理的Lac活性呈WAP>WAA>WA>WAU>W的规律;培养至第30天时,不同处理的Lac活性无显著差异($P>0.05$),以WAA处理的Lac活性最高,达 $126.86 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.4 氮素影响小麦秸秆降解的结构方程模型分析

添加氮素影响小麦秸秆降解的结构方程模型(SEM)分析结果(图4)显示,添加氮素与小麦秸秆降解率以及微生物生物量和酶活性之间的拟合度较高($\chi^2=4.661$, $df=2$, $P=0.097$)。氮素(Nitrogen)与微生物生物量(Biomass)之间呈显著正相关关系($SPC=0.45$, $P<0.05$),与秸秆降解率(Straw decomposition rate)及酸性木聚糖酶(ACX)、锰过氧化物酶(MnP)、漆酶

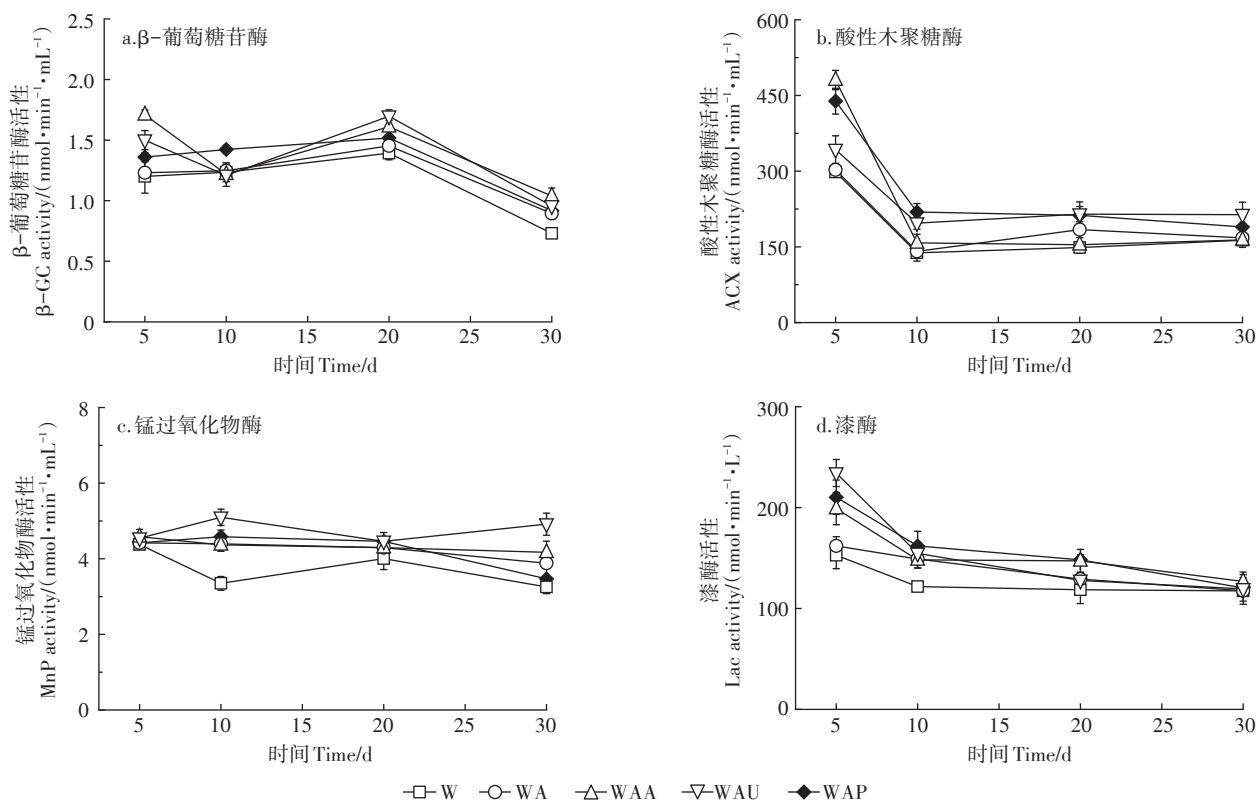


图3 不同形态氮素对酶活性的影响

Figure 3 Impacts of different forms of nitrogen on enzyme activities

(Lac)等酶活性呈正相关关系,而与 β -葡萄糖苷酶(β -GC)活性呈负相关关系;微生物生物量与 β -GC($SPC=0.72, P<0.001$)、ACX($SPC=0.58, P<0.01$)、MnP($SPC=0.12$)和Lac($SPC=0.42, P<0.05$)呈正相关关系;秸秆降解率与 β -GC($SPC=0.21$)、MnP($SPC=0.25$)、Lac($SPC=0.66, P<0.01$)酶活性之间呈正相关关系,而与ACX活性呈负相关关系($SPC=-0.11$)。这表明添加氮素可通过影响微生物生物量来提高 β -葡萄糖苷酶、酸性木聚糖酶和漆酶活性,进而加快小麦秸秆降解速率。

3 讨论

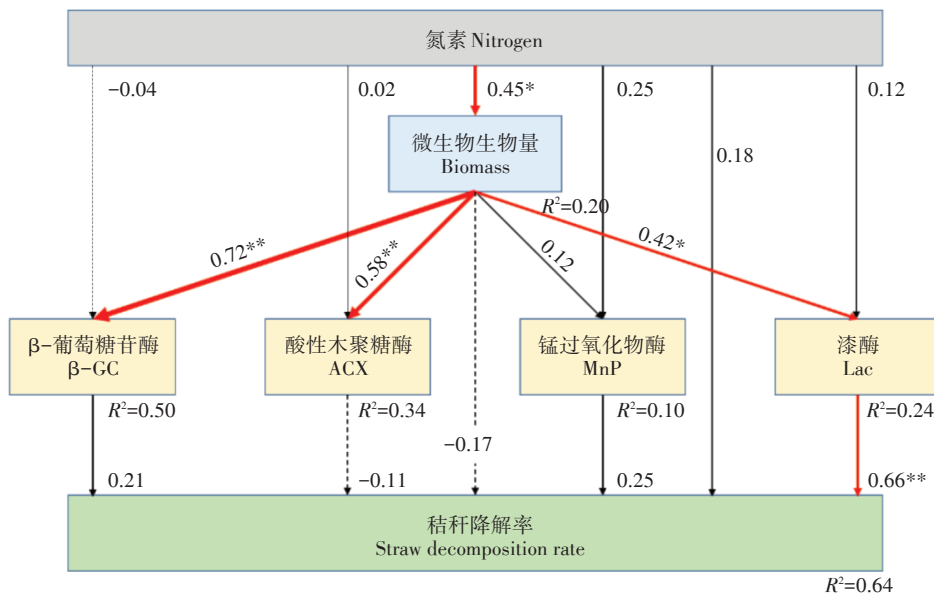
3.1 黑曲霉对小麦秸秆降解的影响

黑曲霉是一种常见的霉菌^[35],能够分泌纤维素酶和半纤维素酶^[36-37],常用于纤维素的分解^[38],可作为秸秆促腐剂的潜力菌种。根据行业标准 NY/T 2722—2015 和国家标准 GB 20287—2006,微生物菌剂具有促进秸秆腐解效果的条件是微生物分泌秸秆降解酶,如纤维素酶,使秸秆腐解度具有显著性差异。本试验表明,添加黑曲霉能显著提高小麦秸秆降解率($P<0.05$),且 β -葡萄糖苷酶和酸性木聚糖酶活性均显著

高于对照处理。 β -葡萄糖苷酶作为典型的纤维素分解酶,主要功能是水解结合于底物末端非还原性的 β -D-葡萄糖苷键,释放出 β -D-葡萄糖和相应的配基^[39],进而实现小麦秸秆中纤维素的分解。木聚糖酶是包括多种内切酶和外切酶的复合酶系,能将半纤维素的主要成分木聚糖降解为低聚木糖和木单糖^[40]。研究发现,黑曲霉在以葡萄糖为碳源的纤维素培养基上分泌的 β -葡萄糖苷酶活性最高^[41],在小麦秸秆培养基上分泌的木聚糖酶活性较高^[42]。ISMAIL等^[43]也发现,从土壤分离出的纤维素降解菌中黑曲霉产纤维素酶活最高。这些与本研究结果一致,即添加黑曲霉显著增加 β -葡萄糖苷酶和木聚糖酶活性,进而促进小麦秸秆降解。

3.2 外源添加氮素对黑曲霉降解小麦秸秆的影响

外源添加氮素是调节秸秆C/N、加快秸秆降解的重要途径^[24]。高海燕等^[44]发现,添加适量的氮素有利于草原凋落物分解。刘仁等^[45]研究表明,外源添加氮素通过影响相关酶活进而调控毛竹细根的分解速率。周书玉等^[46]研究表明,添加适宜的外源氮素对促进青椒剩余物分解具有重要作用。本研究结果表明,外源添加不同形态氮素提高了小麦秸秆的降解率($P<$



(1) 结构方程模型的 $\chi^2=4.661$, $df=2$, $P=0.097$, $GFI=0.95$, $NFI=0.948$, $CFI=0.961$, Akaike Information Criteria (AIC)=56.661。(2) 箭头旁对应的值为标准化路径系数 (SPC); *表示其显著性; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; R^2 为 SEM 对变量的解释量。(3) 红色代表显著, 黑色代表不显著, 实线代表正相关, 虚线代表负相关, 线条粗细表示路径系数的大小

(1) The structural equation model $\chi^2=4.661$, $df=2$, $P=0.097$, $GFI=0.95$, $NFI=0.948$, $CFI=0.961$, Akaike Information Criteria (AIC)=56.661. (2) Values associated with arrows represent standardized path coefficients (SPC) and asterisks mark their significance: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; R^2 is the explanatory amount of the variable by SEM. (3) Red represents significant, black represents insignificant, solid line represents positive correlation, dotted line represents negative correlation, and line thickness indicates the size of path coefficient

图4 添加氮素条件下微生物量、酶活性与降解速率之间的关系

Figure 4 Relationship between wheat straw decomposition rate and microbial biomass as well as enzyme activity after different forms of nitrogen addition

0.05), 这与前人研究结果一致。这可能是因为: 一方面外源添加氮素促进了微生物的生长, 提高了微生物生物量 (36.63%~65.16%)。结构方程模型的分析结果表明, 添加氮素对微生物生物量的标准化路径系数为 0.45, 达显著水平 ($P<0.05$)。另一方面, 外源添加氮素促进微生物生物酶的分泌, 提高了 β -GC (10.42%~38.89%)、ACX (13.28%~58.75%)、MnP (2.80%~26.60%) 和 Lac (22.86%~44.57%) 等木质纤维素降解酶的活性。结构方程模型的分析结果表明, 添加氮素后微生物生物量对 β -GC、ACX、MnP 和 Lac 活性的标准化路径系数分别为 0.72 ($P<0.001$)、0.58 ($P<0.01$)、0.12 ($P>0.05$) 和 0.42 ($P<0.05$)。这说明添加氮素可通过提高生物酶的活性进而促进小麦秸秆降解。

3.3 不同形态氮素对黑曲霉降解小麦秸秆的影响

在不同形态氮素处理中, 添加尿素 (WAU) 和硝酸钾 (WAP) 处理的小麦秸秆降解效果最显著 ($P<0.05$), 添加硫酸铵 (WAA) 处理小麦秸秆降解效果次之, 即酰胺态氮和硝态氮更有利于黑曲霉降解小麦秸秆。麦逸辰等^[47]也发现, 在水稻秸秆腐解前期 (0~30 d) 添加尿素处理的促腐效果最佳。丛日环等^[48]研究

也表明, 添加尿素能显著提高秸秆降解速率。这与本研究结果一致。这一方面可能与酰胺态氮可以通过脲酶快速水解成 NH_4^+ , 促进黑曲霉生长有关; 另一方面, 酰胺态氮作为氮源在培养前期有利于木聚糖酶的积累^[49], 并且能提高 β -葡萄糖苷酶活性^[50]。本研究结果显示, 添加尿素处理 (WAU) 的微生物生物量比单独添加黑曲霉处理高 59.89%, 比对照高 72.47%; 同时添加尿素处理 (WAU) 的 β -GC 和 ACX 活性在培养前期 (0~5 d) 分别比对照处理高 42.35% 和 60.95%。而添加硝酸钾处理 (WAP) 的微生物生物量比单独添加黑曲霉处理高 65.16%, 比对照高 78.16%; 同时添加硝酸钾处理 (WAP) 的 ACX 和 Lac 活性在培养前期 (0~5 d) 分别比对照高 46.97% 和 37.57%, 进而促进小麦秸秆降解。这可能是因为硝酸钾作为一种高溶解性的氮钾无机化合物, 其含有的氮和钾均能为黑曲霉生长提供营养, 加快黑曲霉生长; 并且硝态氮可显著提高秸秆降解酶活性。前人研究表明, 硝酸钾可以显著增加木聚糖酶的产量^[51-52]; CHMELOVÁ 等^[53]研究发现, 硝酸钾作为氮源时木聚糖酶活性最高。这与本研究结果一致。此外, 添加硝态氮条件下, 漆酶活性的提

高可能与芳香族氨基酸的刺激作用有关^[53]。DHA-KAR等^[54]也发现,添加硝酸钾处理的漆酶活性显著提高。

当前(2022年2月),尿素市场价按照2 650元·t⁻¹,硝酸钾市场价按照6 300元·t⁻¹计算,在保证等氮量情况下,使用1 kg氮素需要尿素2.14 kg,需要硝酸钾7.21 kg,其价格成本分别为5.68、45.45元,即尿素价格成本远低于硝酸钾。另外,尿素的普及度更高。因此,从投入成本和秸秆降解的实际应用情况综合考虑,尿素是促进黑曲霉降解小麦秸秆的理想氮源。

4 结论

(1)添加黑曲霉显著提高小麦秸秆培养前期的锰过氧化物酶和漆酶活性及培养后期的 β -葡萄糖苷酶、酸性木聚糖酶和锰过氧化物酶活性,加快小麦秸秆降解。

(2)外源添加不同形态氮素均能促进黑曲霉对小麦秸秆的降解,其中以酰胺态氮和硝态氮的效果较好,铵态氮效果次之。外源添加不同形态氮素处理显著增加了微生物生物量,提高了 β -葡萄糖苷酶、酸性木聚糖酶、锰过氧化物酶和漆酶等秸秆降解酶活性,进而加速小麦秸秆降解。

(3)从实际应用和经济效益角度分析,尿素是促进黑曲霉降解小麦秸秆的理想氮源。

参考文献:

- [1] 张卫建,严圣吉,张俊,等.国家粮食安全与农业双碳目标的双赢策略[J].中国农业科学,2021,54(18):3892-3902. ZHANG W J, YAN S J, ZHANG J, et al. Win-win strategy for national food security and agricultural double-carbon goals[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2021, 54(18):3892-3902.
- [2] 宋大利,侯胜鹏,王秀斌,等.中国秸秆养分资源数量及替代化肥潜力[J].植物营养与肥料学报,2018,24(1):1-21. SONG D L, HOU S P, WANG X B, et al. Nutrient resource quantity of crop straw and its potential of substituting[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2018, 24(1):1-21.
- [3] 国家统计局.中国统计年鉴(2021)[M].北京:中国统计出版社,2021:389. National Bureau of Statistics. China statistical yearbook (2021)[M]. Beijing: China Statistics Press, 2021:389.
- [4] 柴如山,徐悦,程启鹏,等.安徽省主要作物秸秆养分资源量及还田利用潜力[J].中国农业科学,2021,54(1):95-109. CHAI R S, XU Y, CHENG Q P, et al. Nutrient resource quantity of main crop straw and utilization potential under straw returning in Anhui Province[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2021, 54(1):95-109.
- [5] 李泽媛,郑军.我国农作物秸秆还田的研究脉络和趋势探析:基于CiteSpace知识图谱[J].中国农业资源与区划,2021,42(9):16-26.

- LI Z Y, ZHENG J. The research evolution road and trend of crop straw returning in China: Based on the CiteSpace knowledge map[J]. *Chinese Journal of Agricultural Resources and Regional Planning*, 2021, 42(9):16-26.
- [6] 赵蒙蒙,姜曼,周祚万.几种农作物秸秆的成分分析[J].材料导报,2011,25(16):122-125. ZHAO M M, JIANG M, ZHOU Z W. The components analysis of several kinds of agricultural residues[J]. *Materials Reports*, 2011, 25(16):122-125.
- [7] COLLINS S R, WELLNER N, MARTINEZ B I, et al. Variation in the chemical composition of wheat straw: The role of tissue ratio and composition[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7(1):121-134.
- [8] 高星爱,王鑫,解娇,等.低温秸秆降解复合微生物菌剂的研究进展[J].生物技术通报,2020,36(4):144-150. GAO X A, WANG X, XIE J, et al. Research progress on low temperature straw-degrading compound microbial agent[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 36(4):144-150.
- [9] ANDLAR M, REZIC T, MARDETKO N, et al. Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2018, 18(11):768-778.
- [10] ZHAO S, QIU S, XU X, et al. Change in straw decomposition rate and soil microbial community composition after straw addition in different long-term fertilization soils[J]. *Applied Soil Ecology*, 2019, 138:123-133.
- [11] FUJII K, UEMURA M, HAYAKAWA C, et al. Environmental control of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase activities in forest floor layers in humid Asia[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2013, 57:109-115.
- [12] 宫秀杰,钱春荣,于洋,等.近年纤维素降解菌株筛选研究进展[J].纤维素科学与技术,2021,29(2):68-77. GONG X J, QIAN C R, YU Y, et al. Progress on screening of cellulose degrading strains in recent years[J]. *Journal of Cellulose Science and Technology*, 2021, 29(2):68-77.
- [13] 杨静,蒋剑春,张宁,等.微生物降解木质素的研究进展[J].生物质化学工程,2021,55(3):62-70. YANG J, JIANG J C, ZHANG N, et al. Research progress on lignin degradation by microorganism[J]. *Biomass Chemical Engineering*, 2021, 55(3):62-70.
- [14] 于海霞,方崇荣,于文吉.木质素光降解机理研究进展[J].西南林业大学学报,2015,35(1):104-110. YU H X, FANG C R, YU W J. Research progress on lignin photo degradation mechanism[J]. *Journal of Southwest Forestry University*, 2015, 35(1):104-110.
- [15] 徐晓,程驰,袁凯,等.里氏木霉产纤维素酶研究进展[J].中国生物工程杂志,2021,41(1):52-61. XU X, CHENG C, YUAN K, et al. Research progress of cellulase production in *Trichoderma reesei*[J]. *China Biotechnology*, 2021, 41(1):52-61.
- [16] 杨阳,王松涛,许正宏,等.半纤维素的微生物酶促降解及其在酿造中的应用[J].食品与发酵工业,2020,46(23):255-262. YANG Y, WANG S T, XU Z H, et al. Degradation of hemicellulose by microbial enzymes and its application in brewing industry[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(23):255-262.
- [17] 崔堂武,袁波,凌晨,等.木质素降解酶的酶活测试方法的评价与

- 分析[J]. 化工进展, 2020, 39(12):5189-5202. CUI T W, YUAN B, LING C, et al. Evaluation and analysis of activity assays of ligninolytic enzymes[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2020, 39(12):5189-5202.
- [18] DAYAL P, SINGH A N, SHARAN A K. Production of cellulase enzyme by *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Penicillium* sp. isolated from soil[J]. *Annals of Plant Sciences*, 2020, 9(9):3991-3998.
- [19] INFANZON-RODRIGUEZ M I, RAGAZZO-SANCHEZ J A, MORAL S D, et al. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass using native cellulase produced by *Aspergillus niger* ITV02 under liquid state fermentation[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2022, 69(1):198-208.
- [20] OLIVEIRA F D, MELO M R D, BUZATO J B. Effect of agro-industrial residues mixtures on the production of endoglucanase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation[J]. *Acta Scientiarum Technology*, 2020, 42(1):41358.
- [21] 韩上, 武际, 李敏, 等. 秸秆还田条件下氮肥运筹对作物产量和氮肥利用效率的影响[J]. 中国土壤与肥料, 2020(3):23-28. HAN S, WU J, LI M, et al. Effects of nitrogen fertilization managements on crops yield and nitrogen nutrient use efficiency under straw returning [J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2020(3):23-28.
- [22] 陆欢, 王小艳, 尚晓冬, 等. 不同碳氮源对花脸香蘑胞外酶活性的影响[J]. 菌物学报, 2021, 40(21):3286-3303. LU H, WANG X Y, SHANG X D, et al. Effects of different carbon and nitrogen sources on extracellular enzyme activities of *Lepista sordida*[J]. *Mycosystema*, 2021, 40(12):3286-3303.
- [23] 李晓韦, 韩上, 雷之萌, 等. 氮素形态对油菜秸秆腐解及养分释放规律的影响[J]. 中国生态农业学报(中英文), 2019, 27(5):717-725. LI X W, HAN S, LEI Z M, et al. Effects of nitrogen forms on decomposition and nutrient release of rapeseed straw[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2019, 27(5):717-725.
- [24] 石琳, 金梦灿, 单旭东, 等. 不同形态氮素对玉米秸秆腐解与养分释放的影响[J]. 农业资源与环境学报, 2021, 38(2):277-285. SHI L, JIN M C, SHAN X D, et al. Influences of different forms of nitrogen fertilizer on the decomposition and release of nutrients from corn straw residue[J]. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2021, 38(2):277-285.
- [25] 朱远芄, 金梦灿, 马超, 等. 外源氮肥和腐熟剂对小麦秸秆腐解的影响[J]. 生态环境学报, 2019, 28(3):612-619. ZHU Y P, JIN M C, MA C, et al. Impacts of exogenous nitrogen and effective microorganism on the decomposition of wheat straw residues[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2019, 28(3):612-619.
- [26] 杨帆, 赵坤, 郭永霞, 等. 微生物促腐剂配施固氮蓝藻对水稻秸秆腐解的影响[J]. 南方农业学报, 2019, 50(11):2421-2428. YANG F, ZHAO K, GUO Y X, et al. Effects of microbial promoting-decomposing agent combined with fixing-nitrogen cyanobacteria on rice straw decomposition[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2019, 50(11):2421-2428.
- [27] 高日平, 刘小月, 潘遵天, 等. 生物菌剂对玉米秸秆堆沤过程水热状况及酶活性的影响[J]. 中国农业科技导报, 2022, 24(4):1-8. GAO R P, LIU X Y, PAN Z T, et al. Effects of biological agents on hydrothermal status and enzyme activity during composting of corn straw [J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2022, 24(4):1-8.
- [28] 勉有明, 李荣, 侯贤清, 等. 秸秆还田配施腐熟剂对砂性土壤性质及滴灌玉米生长的影响[J]. 核农学报, 2020, 34(10):2343-2351. MIAN Y M, LI R, HOU X Q, et al. Effects of straw returning combined with decomposition agents on sandy soil properties and growth of maize under drip irrigation[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2020, 34(10):2343-2351.
- [29] 江高飞, 暴彦灼, 杨天杰, 等. 高温秸秆降解菌的筛选及其纤维素酶活性研究[J]. 农业环境科学学报, 2020, 39(10):2465-2472. JIANG G F, BAO Y Z, YANG T J, et al. Screening of thermophilic cellulolytic bacteria and investigation of cellulase thermostability[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2020, 39(10):2465-2472.
- [30] 王景, 陈曦, 张雅洁, 等. 好气和厌氧条件下小麦秸秆的腐解特征研究[J]. 中国农业大学学报, 2015, 20(3):161-168. WANG J, CHEN X, ZHANG Y J, et al. Characteristic of wheat straw decomposition under aerobic and anaerobic condition in soil[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2015, 20(3):161-168.
- [31] MARTINS L F, DANIEL K, MARLI C, et al. Comparison of penicillium echinulatum and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(5):1417-1424.
- [32] QI Y, GAO Y, HUANG Y, et al. Identification of three important amino acid residues of xylanase afxyna from *Aspergillus fumigatus* for enzyme activity and formation of xylobiose as the major product[J]. *Process Biochemistry*, 2015, 50(4):571-581.
- [33] ANDERSON A J, KWON S, CARNICERO A, et al. Two isolates of *Fusarium proliferatum* from different habitats and global locations have similar abilities to degrade lignin[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 249(1):149-155.
- [34] LING Z, WANG S, ZHU M, et al. An extracellular laccase with potent dye decolorizing ability from white rot fungus *Trametes* sp. LAC-01 [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 81:785-793.
- [35] AZZOUZ Z, BETTACHE A, BOUCHERBA N, et al. Optimization of beta-1, 4-endoxylanase production by an *Aspergillus niger* strain growing on wheat straw and application in xylooligosaccharides production[J]. *Molecules*, 2021, 26(9):2527-2546.
- [36] PEL H J, WINDE D, ARCHER D B, et al. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88[J]. *Nature Biotechnology*, 2007, 25(2):221-231.
- [37] 周林芳, 江波, 张涛, 等. 糖苷水解酶第3家族 β -葡萄糖苷酶的研究进展[J]. 食品工业科技, 2017, 38(14):330-335. ZHOU L F, JIANG B, ZHANG T, et al. Research progress of β -glucosidases of glycoside hydrolase family 3[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(14):330-335.
- [38] CAMACHO N A, AGUILAR O G. Production, purification, and characterization of a low-molecular-mass xylanase from *Aspergillus* sp. and its application in baking[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2003, 104(3):159-171.
- [39] 潘利华, 罗建平. β -葡萄糖苷酶的研究及应用进展[J]. 食品科学,

- 2006, 27(12):803-807. PAN L H, LUO J P. Advance in research and application of β -D-glucosidase[J]. *Food Science*, 2006, 27(12): 803-807.
- [40] 李阳阳, 刘松, 尹小强, 等. 黑曲霉木聚糖酶在大肠杆菌中的胞外表达和酶学性质研究[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(6):1-7. LI Y Y, LIU S, YIN X Q, et al. Extracellular expression of *Aspergillus niger* xylanase in *Escherichia coli* and enzymatic property characterization[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2022, 48(6):1-7.
- [41] GAUTAM S P, BUNDELA P S, PANDEY A K, et al. Effect of different carbon sources on production of cellulases by *Aspergillus niger*[J]. *Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation*, 2010, 5(3): 295-300.
- [42] WANG J H, CHEN X T, CHIO C L, et al. Delignification overmatches hemicellulose removal for improving hydrolysis of wheat straw using the enzyme cocktail from *Aspergillus niger*[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 274:459-467.
- [43] ISMAIL S, GOPINATH S M, MANASA S, et al. Isolation and identification of cellulose degrading microbes[J]. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 2015, 4(8):6788-6793.
- [44] 高海燕, 红梅, 霍利霞, 等. 外源氮输入和水分变化对荒漠草原凋落物分解的影响[J]. 应用生态学报, 2018, 29(10):3167-3174. GAO H Y, HONG M, HUO L X, et al. Effects of exogenous nitrogen input and water change on litter decomposition in a desert grassland [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2018, 29(10):3167-3174.
- [45] 刘仁, 张宇飞, 金志芳, 等. 温度调控外源氮添加对毛竹细根分解及其养分释放的影响[J]. 生态学杂志, 2019, 38(12):3617-3625. LIU R, ZHANG Y F, JIN Z F, et al. Incubation temperature modulates the effects of exogenous nitrogen addition on decomposition and nutrient release of *Phyllostachys edulis* fine roots[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2019, 38(12):3617-3625.
- [46] 周书玉, 袁川, 王景燕, 等. 菌剂和外源氮素添加对青花椒采收剩余物分解的影响[J]. 四川农业大学学报, 2019, 37(6):799-806. ZHOU S Y, YUAN C, WANG J Y, et al. Effects of microbial inoculants and nitrogen addition on green prickly ash harvest residues decomposition[J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2019, 37(6):799-806.
- [47] 麦逸辰, 卜容燕, 韩上, 等. 添加不同外源氮对水稻秸秆腐解和养分释放的影响[J]. 农业工程学报, 2021, 37(22):210-219. MAI Y C, PU R Y, HAN S, et al. Effects of adding different exogenous nitrogen on rice straw decomposition and nutrient release[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2021, 37(22): 210-219.
- [48] 丛日环, 张丽, 鲁艳红, 等. 添加不同外源氮对长期秸秆还田土壤中氮素转化的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2019, 25(7):1107-1114. CONG R H, ZHANG L, LU Y H, et al. Effect of adding different exogenous nitrogen sources on nitrogen transformation in long-term straw incorporated soil[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2019, 25(7):1107-1114.
- [49] GOTTSCHALK L M F, PAREDES R D S, TEIXEIRA R S S, et al. Efficient production of lignocellulolytic enzymes xylanase, β -xylosidase, ferulic acid esterase and β -glucosidase by the mutant strain *Aspergillus awamori* 2B. 361 U2/1[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2013, 44(2):569-576.
- [50] MALLERMAN J, PAPINUTTI L, LEVIN L. Characterization of β -glucosidase produced by the white rot fungus *Flammulina velutipes* [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2015, 25(1):57-65.
- [51] RAY R R, DUTTA W, SUR D, et al. Optimization of fermentation parameters for the production of extracellular endoglucanase, β -glucosidase and endoxylanase by a chromium resistant strain of *Trichoderma pseudokoningii*[J]. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021, 3(1):54-58.
- [52] SZENDEFY J, SZAKACS G, CHRISTOPHER L. Potential of solid-state fermentation enzymes of *Aspergillus oryzae* in biobleaching of paper pulp[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39(6):1354-1360.
- [53] CHMELOVÁ D, ONDREJOVIČ M, ONDÁŠ V, et al. Influence of cultivation conditions on production of lignocellulolytic enzymes by *Ceriporiopsis subvermispota*[J]. *Biologia*, 2011, 66(5):748-754.
- [54] DHAKAR K, JAIN R, TAMTA S, et al. Prolonged laccase production by a cold and pH tolerant strain of *Penicillium pinophilum* (MCC 1049) isolated from a low temperature environment[J]. *Enzyme Research*, 2014, 2014:120708.

(责任编辑:叶飞)