# 雷竹林存留有机覆盖物高效降解菌株分离及产酶条件优化

可 晓1,2、陈双林1、张小平2、郭子武1

(1. 中国林业科学研究院 亚热带林业研究所,浙江 富阳,311400; 2. 四川农业大学 资源与环境学院,四川 雅安 625014)

摘要:有机覆盖物林地大量存留是雷竹 Phyllostachys violascens 林退化的主要原因之一。为人工促进有机覆盖物高效腐解,为有机覆盖物促腐制剂研制提供前期研究基础,采用稀释涂平板法和富集培养法从雷竹林地覆盖有机材料 (砻糠、稻草)和雷竹林土壤中,初选出具有较强纤维素酶活力的菌株 7 株,其中,真菌 4 株,放线菌 3 株,复选出有机覆盖物高效降解菌株 1 株(菌株 2.1)。经菌落形态和生物学特性分析,菌株 2.1 属青霉属 Penicillium,最佳产酶条件为起始 pH 5.0,培养温度 30 ℃,培养时间 5 d,碳源为稻草秸秆粉 25.00 g·L<sup>-1</sup>,氮源为牛肉膏 2.50 g·L<sup>-1</sup>,无机盐为氯化铁(FeCl<sub>3</sub>)0.01 g·L<sup>-1</sup> 和磷酸二氢钾(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)1.50 g·L<sup>-1</sup>。图 4 表 3 参 20

关键词: 微生物学; 雷付; 有机覆盖物; 降解菌株; 纤维素降解酶; 产酶条件

中图分类号: S795.7 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2012)02-0244-07

Selection of strains used to degrade organic mulching materials from *Phyllostachys violascens* forest and optimization of its enzyme production

KE Xiao<sup>1,2</sup>, CHEN Shuang-lin<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-ping<sup>2</sup>, GUO Zi-wu<sup>1</sup>

(1. Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, Zhejiang, China; 2. College of Resources and Environment, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, Sichuan, China)

Abstract: Severe degradation of a *Phyllostachys violascens* forest has occurred from organic mulch residues for years. To artificially promote decomposition of organic mulching material and promote regeneration of bamboo forest, seven cellulase-producing strains, including 4 fungi and 3 actinomycetes, from organic matter and soil of a *Ph. violascens* forest were chosen using a Congo red cellulose identification culture medium. A filter paper enzyme activity (FPA) as well as colony morphology and biological characteristics were used for the analysis. Re sults showed that among all selected strains, the FPA of *Penicillium* spp. (Strain 2.1) was highest. Optimal fer mentation conditions were as follows: an initial pH 5.0, a cultivation temperature of 30 °C, and a fermentation time of 5 d. The optimal cultivation medium for Strain 2.1 was chosen as: straw powder (25.00 g·L<sup>-1</sup>) for the C source, beef extract (2.50 g·L<sup>-1</sup>) for the N source, and FeCl<sub>3</sub> (0.01 g·L<sup>-1</sup>) and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.50 g·L<sup>-1</sup>) for important inorganic salts. [Ch, 4 fig. 3 tab. 20 ref.]

Key words: microbiology; *Phyllostachys violascens*; organic mulching material; decomposing strain; cellulase; enzyme production

雷竹 Phyllostachys violascens 林地有机材料(主要为砻糠、稻草、锯木屑等)覆盖竹笋早出技术的推广应用始于20世纪90年代初,满足了市场供应淡季对鲜笋的大量需求,显著地提高了笋用竹林的经济效益<sup>[1]</sup>。然而,长期连年覆盖会导致雷竹林地土壤理化性质劣变,竹林地上和地下部分结构失衡<sup>[2-6]</sup>,致使雷竹林大面积衰败,如雷竹笋用竹主产区浙江省临安市太湖源镇超过1万 hm² 雷竹林中重度、中度、轻度退化

收稿日期: 2011-07-07; 修回日期: 2011-09-29

基金项目: 浙江省林业科技推广项目(2011B01); 杭州市科研院所专项(20090332N01)

作者简介:可晓,从事竹林生态研究。E-mail: kexiaoxiao@foxmail.com。通信作者:郭子武,助理研究员,从事竹林有机农药污染及生物修复技术研究。E-mail: hunt-panther@163.com

竹林所占比例分别达 13.34%, 26.66%和 46.67%, 未退化竹林仅占 13.33%, 重度退化竹林几乎无经济产出 高。而存留于雷竹林土壤中短期内难以自然腐解且高碳氮比 (C/N), 富含纤维素和木质素的有机覆盖物, 是导致林地土壤发生物理、化学和生物性劣变重要原因之一。因此,从维护林地覆盖笋用竹林高效可持续经营目标出发,必须采取高效、无二次污染的林地存留有机覆盖物促腐措施。目前,具有生物质材料降解活性的微生物已广泛应用于高碳氮比材料的工业发酵(替代能源的生产)<sup>[8]</sup>、饲料生产<sup>[9]</sup>和秸秆还田土壤培肥<sup>[10]</sup>等方面,而对于笋用竹林存留有机覆盖物降解微生物筛选、降解活性及产酶条件的相关研究尚未见有报道。本研究从长期堆放有机覆盖物场所的不同腐解程度的稻草、砻糠及覆盖雷竹林土壤中筛选培养具有高纤维素降解酶活性的微生物,并对其产酶条件进行优化,旨在为笋用竹林林地存留有机覆盖物高效促腐制剂的研制提供前期理论基础。

# 1 材料和方法

#### 1.1 供试材料

供试材料采自浙江省临安市太湖源镇(30°24′N, 119°32′E)雷竹林林地覆盖的不同腐解程度的砻糠、稻草及覆盖雷竹林土壤。砻糠、稻草采用多点取样法,取混合样品 200.00 g,土壤采用五点取样法,取 0~10 cm 土壤混合样品 500.00 g。样品采集后放入无菌袋内,置于冰壶中带回实验室 4 ℃保存。

对照菌株哈茨木霉(HC)Trichoderma harzianum,绿色木霉(LS)Trichoderma viride 购自广东省微生物研究所菌种保藏中心。

### 1.2 培养基

富集培养基(赫奇逊滤纸液体培养基):  $1 \text{ cm} \times 6 \text{ cm}$  新华定量滤纸、磷酸二氢钾(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 1.00 g, 氯化钠(NaCl) 0.10 g, 硫酸锰(MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) 0.30 g, 硝酸钠(NaNO<sub>3</sub>) 2.50 g, 氯化铁(FeCl<sub>3</sub>) 0.01 g, 氯化钙(CaCl<sub>2</sub>) 0.10 g。水 1 000 mL,pH  $7.2^{[11]}$ 。

初筛培养基(刚果红羧甲基纤维素平板培养基): 羧甲基纤维素钠(CMC-Na) 2.00 g, 刚果红 0.40 g, 硫酸铵[(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] 2.00 g, 硫酸锰(MgSO4·7H<sub>2</sub>O) 0.50 g, 磷酸二氢钾(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 1.00 g, 氯化钠(NaCl) 0.50 g, 琼脂 20.00 g。水 1 000 mL, 自然 pH 值(不进行人为的调节)[12]。

复筛培养基(赫奇逊秸秆液体培养基):用稻草取代富集培养基中的滤纸。

#### 1.3 菌株筛选

分别取腐烂的砻糠、稻草及雷竹林土壤样品各 10.00 g, 加入装有 90.0 mL 无菌水和玻璃珠的 150.0 mL 三角瓶中, 180 r·min<sup>-1</sup> 振荡 30 min 使样品充分分散, 取悬浊液 5.0 mL 接种于 45.0 mL 富集培养基中, 28 ℃下 120 r·min<sup>-1</sup> 振荡培养 2 d。再取培养液接种到新鲜无菌富集培养基中, 反复培养 3 次。

取第 3 次富集培养液  $100~\mu$ L 均匀涂布在刚果红羧甲基纤维素平板培养基上, $28~\Gamma$ F培养,挑取水解圈出现时间早,水解圈直径与菌落直径之比大的菌株进行纯化并保存。将初筛获得的菌株分别在马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)(真菌)、高氏一号(放线菌)培养基上活化,用直径  $1~\mathrm{cm}$  打孔器在菌落生长均匀处取菌块接种于复筛培养基中, $28~\Gamma$ F  $120~\mathrm{r\cdot min^{-1}}$  振荡培养  $5~\mathrm{d}$ ,测定发酵液中滤纸酶活力,筛选具有高纤维素酶活性的菌株。

## 1.4 滤纸酶(filter paper activity, FPA)活力测定

滤纸酶活力测定采用 3,5-二硝基水杨酸显色法<sup>[13-16]</sup>。发酵液于 10 kg·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上清液即为粗酶液。将新华定量滤纸裁剪成 1 cm × 6 cm 的小条,放入 25.0 mL 刻度试管中,加入 1.0 mL 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH 4.8)和稀释酶液 0.5 mL,50 ℃水浴中反应 1 h,加入 3.0 mL 3,5-二硝基水杨酸(DNS)试剂沸水浴 5 min,定容到 25.0 mL 后测定 540 nm 波长吸光度,计算还原糖量,同时测定发酵液中的还原糖量,以酶解反应液中还原糖量与发酵液中还原糖量之差计算酶活力。实验设 3 个重复。以 1 h 1.0 mL 原酶液催化底物(滤纸)转化为 1 μmol 葡萄糖的酶量为 1 个酶活力单位(16.67 nkat)。

#### 1.5 产酶条件优化

1.5.1 单因素实验 采用赫奇逊液体培养基。选择不同培养时间(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7d),pH(3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0),培养温度(20, 25, 30, 35, 40 %),碳源[淀粉、葡萄糖、微晶纤维素粉、稻草秸秆粉、淀粉和微晶纤维素粉(m: m=1:1)和葡萄糖和微晶纤维素粉(m: m=1:1)],氮源(酵

母膏、蛋白胨、牛肉膏、硫酸铵和尿素为氮源)及无机盐(氯化铁为  $0.01g \cdot L^{-1}$ , 氯化钙  $0.10 g \cdot L^{-1}$ , 磷酸二氢钾  $1.00 g \cdot L^{-1}$ , 硫酸锰  $0.30 g \cdot L^{-1}$  和氯化钠  $0.10 g \cdot L^{-1}$ )进行单因素实验,分别确定目标菌株的最佳产酶条件。

1.5.2 正交实验 根据以上的各单因素实验结果,对菌株产酶的最佳碳源、氮源及无机盐进行正交实验  $[L_9(3^4)]$ ,确定目标菌株最佳培养条件。

# 2 结果与分析

## 2.1 有机覆盖物高效降解菌株筛选

经过富集培养,从常年堆积的不同腐解程度的砻糠、稻草及覆盖雷竹林土壤中初步筛选获得 38 株在刚果红羧甲基纤维素平板上能够产生透明水解圈的菌株,再经反复筛选出透明水解圈出现时间早,水解圈直径与菌落直径比值(HC值)较大的菌株 7 株(表 1),其中,真菌 4 株(分别编号为 1.1,2.1,YQ1和 YQ9),放线菌 3 株(分别编号为 1.2,2.2 和 3.1)。

Table 1 The values of 7 strains after 5 days cultivation							
菌株编号	直径比值	菌株编号	直径比值				
1.1	2.74	1.2	3.12				
2.1	2.83	2.2	2.18				
YQ1	1.67	3.1	3.58				
YQ9	1.65						

表 1 菌株培养 3 d 透明水解圈与菌落直径比值

Table 1 HC values of 9 strains after 3 days cultivation

培养 5 d 后,从 7 个菌株滤纸酶活性分析表明:真菌 1.1, 2.1, YQ1 酶活力极显著地高于放线菌、真菌 YQ9 及对照菌株哈茨木霉( $3.93 \times 16.67$  nkat)与绿色木霉( $4.64 \times 16.67$  nkat),且以 2.1 菌株的滤纸酶活力最高,达  $10.80 \times 16.67$  nkat(图 1),确定菌株 2.1 为高效目标菌株。

#### 2.2 菌株 2.1 生物学特性

从菌株 2.1 的菌落培养特征(表 2)及显微结构特征(图 2a)表明,菌株 2.1 分生孢子梗发生于基质,壁平滑,帚状枝双轮生,偶有 3 轮生或单轮生;梗基每轮 2~3 个,13.0~20.0 μm×3.2~3.7 μm,彼此通常较紧贴;瓶梗幼龄时呈现瓶状至披针状,充分成熟时近圆柱形,梗颈明显,分生孢子椭圆形,4.5~5.5 μm×3.0~4.0 μm,壁平滑。依据 2.1 菌落形态(图 2b)及菌株显微结构特征,查《中国真菌志》(青霉及其相关有性型属)[17]、《真菌的形态和分类》[18]等相关资料可确定菌株 2.1 属青霉属 Penicillium。

# 2.3 菌株 2.1 培养时间、起始酸碱度(pH值)和温度条件优化

2.3.1 培养时间 培养初期菌株 2.1 发酵液滤纸酶活力随培养时间的延长缓慢升高, 第1, 2 天发酵液

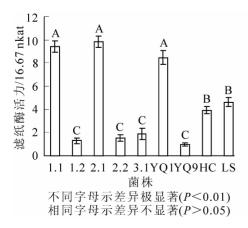


图 1 分离菌株的滤纸酶活力

Figure 1 Filter paper activity of 9 strains

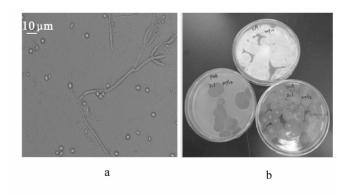


图 2 菌株 2.1 的菌落形态(a)及显微结构(b)

Figure 2 Colony morphology and microstructure of Strain 2.1

± 0	## O	4 # '	マナ T/ ナールナ /丁	٠
表 2	菌株 2	.	落形态特征	

Table 2	The	colony	morphology	of	strain	2.1

培养基	菌落直径/cm	形状	质地	菌丝体	分生孢子	可溶性色素
察氏培养基	2.0	平坦	绒状	白色	少,灰绿色	无
麦芽汁培养基	1.5	脐状突起	绒状,少量絮状	白色	大量,灰绿色	无
PDA	2.5	平坦	绒状	白色	大量,灰绿色	无

滤纸酶活力分别为  $2.72 \times 16.67$  nkat,  $3.32 \times 16.67$  nkat, 增幅仅为 22.51%。第 3 天酶活力迅速提高,  $4.95 \times 16.67$  nkat, 较第 2 天增加了 49.01%。第 3 天以后,酶活力增加趋势减缓,至第 5 天时发酵液酶 活力达峰值( $5.62 \times 16.67$  nkat),其后酶活力虽能维持在较高水平,但较第 5 天有所下降(图 3a)。说明 菌株 2.1 产酶的最佳培养时间为 5 d。

2.3.2 起始酸碱度(pH值) 菌株 2.1 发酵液滤纸酶活力随起始酸碱度(pH值)的变化呈先升高后降低的趋势(图 3b)。起始酸碱度为 pH 3.0~5.0 时,菌株酶活力缓慢上升,且较为平稳,当起始酸碱度为 pH 5.0 时,发酵液滤纸酶活力达到峰值(4.90×16.67 nkat),其后随酸碱度(pH值)的升高酶活力缓慢降低,当起始酸碱度超过 pH 8.0 时,酶活力开始迅速下降,至起始酸碱度为 pH 10.0 时,发酵液滤纸酶活力仅为 2.22×16.67 nkat,为峰值的 45.31%。说明菌株 2.1 培养的最佳起始酸碱度为 pH 5.0。

2.3.3 培养温度 随着培养温度的升高,菌株 2.1 产酶能力呈先升高后降低的变化规律(图 3c)。在 25~30℃区间内酶活力急剧升高,由 2.36 × 16.67 nkat 提高到 3.67 × 16.67 nkat,增幅达 55.51%,而后酶活力趋于平稳,当温度 35 ℃时,酶活力为 3.83 × 16.67 nkat,其后酶活力略有降低,40 ℃时酶活力下降为 3.68 × 16.67 nkat。虽然 35 和 40 ℃时菌株 2.1 的酶活力均高于 30 ℃的酶活力,但结合菌株培养及竹林生产实践,确定 30 ℃为菌株 2.1 的最佳培养温度。

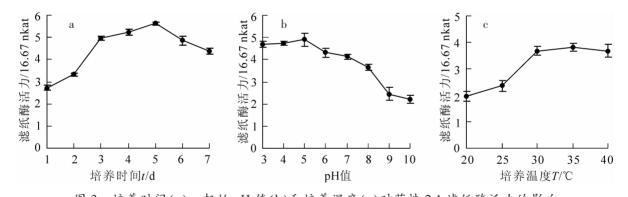


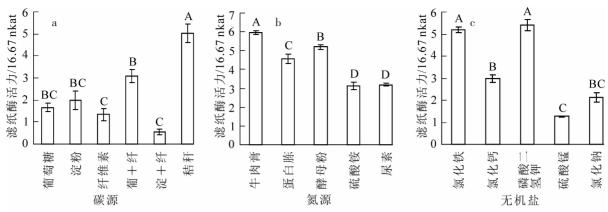
图 3 培养时间(a),起始 pH 值(b)和培养温度(c)对菌株 2.1 滤纸酶活力的影响

Figure 3 Effect of time, pH and temperature on FPA of Strain 2.1

# 2.4 培养基组合优化

2.4.1 碳源 菌株 2.1 在不同碳源的培养基中均能正常生长,但在不同碳源条件下酶活力存在较大差异 (图 4a)。以葡萄糖、淀粉、纤维素为单一碳源时,发酵液滤纸酶活力分别为 1.67 × 16.67 nkat,1.98 × 16.67 nkat 和 1.35 × 16.67 nkat。当用葡萄糖和纤维素 (m:m=1:1) 共同作为碳源时,发酵液滤纸酶活力达到3.08 × 16.67 nkat,分别比葡萄糖或纤维素作单一碳源时增加了 84.43%和 128.15%。淀粉与纤维素 (m:m=1:1) 共同作为碳源时,发酵液滤纸酶活力仅为 0.56 × 16.67 nkat,远低于任一单一碳源的处理。在供试碳源中,以稻草秸秆粉做碳源时发酵液中滤纸酶活力最高(5.03 × 16.67 nkat)。

2.4.2 氮源 菌株 2.1 在多种氮源条件下均能正常生长,在有机氮源条件下发酵液滤纸酶活力均远高于无机氮源(图 4b)。其中,牛肉膏为氮源时菌株发酵液滤纸酶活力最高(5.95 × 16.67 nkat),其次是酵母粉(5.19 × 16.67 nkat),蛋白胨为氮源时发酵液酶活(4.59 × 16.67 nkat)略低于牛肉膏和酵母粉为氮源的处理。以硫酸铵和尿素为氮源时酶活力较低,分别为 3.13 × 16.67 nkat 和 3.18 × 16.67 nkat,仅为牛肉膏为氮源时的 52.60%和 53.44%。



不同字母示差异极显著(P<0.01),相同字母示差异不显著(P>0.05)

图 4 碳源(a), 氮源(b)和无机盐(c)对菌株 2.1 酶活力的影响 Figure 4 Effect of C (a), N (b) source and inorganic salt (c) on FPA of Strain 2.1

2.4.4 培养基最佳组合 从表 3 的菌株 2.1 培养基碳源(稻草秸秆)、氮源(牛肉膏)及无机盐(FeCl<sub>3</sub>),磷酸二氢钾添加量正交实验分析表明,9 号培养基配方的菌株酶活力最高(11.19 × 16.67 nkat)。稻草秸秆和牛肉膏对菌株酶活力影响较大,极值分别为 5.69 和 1.00,氯化铁和磷酸二氢钾对菌株酶活力影响较小,极值分别为 0.41 和 0.27。稻草秸秆、牛肉膏、氯化铁、磷酸二氢钾均值最大水平分别为  $A_3$ ,  $B_3$ ,  $C_1$ ,  $D_2$ 。经方差分析,各因素对菌株 2.1 滤纸酶活力影响均达极显著水平。表明菌株 2.1 产酶最适培养基组合为  $A_3B_3C_1D_2$ ,即秸秆 25.00  $g \cdot L^{-1}$ ,牛肉膏 2.50  $g \cdot L^{-1}$ ,氯化铁 0.01  $g \cdot L^{-1}$ ,磷酸二氢钾 1.50  $g \cdot L^{-1}$ 。

表 3  $L_9(3^4)$ 正交实验设计及培养基组合菌株 2.1 酶活力

Table 3 Design and results of  $L_9(3^4)$  experiment and FPA of Strain 2.1

试验号	A 秸秆/(g·L <sup>-1</sup> )	B 牛肉膏/(g·L-1)	$C\ FeCl_3/(g\boldsymbol{\cdot} L^{1})$	$\mathrm{D}\ KH_2\mathrm{PO}_4/(g\boldsymbol{\cdot}\mathrm{L}^{-1})$	酶活/nkat
1	1 (15)	1 (1.5)	1 (0.010)	1 (1.0)	4.92 × 16.67
2	1 (15)	2 (2.0)	2 (0.015)	2 (1.5)	4.80 × 16.67
3	1 (15)	3 (2.5)	3 (0.020)	3 (2.0)	5.84 × 16.67
4	2 (20)	1 (1.5)	2 (0.015)	3 (2.0)	5.68 × 16.67
5	2 (20)	2 (2.0)	3 (0.020)	1 (1.0)	5.56 × 16.67
6	2 (20)	3 (2.5)	1 (0.010)	2 (1.5)	$7.12 \times 16.67$
7	3 (25)	1 (1.5)	3 (0.020)	2 (1.5)	$10.55 \times 16.67$
8	3 (25)	2 (2.0)	1 (0.010)	3 (2.0)	$10.87 \times 16.67$
9	3 (25)	3 (2.5)	2 (0.015)	1 (1.0)	11.19 × 16.67
$k_1$	5.18	7.05	7.64	7.22	
$k_2$	6.12	7.08	7.22	7.49	
$k_3$	10.87	8.05	7.32	7.46	
R	5.69	1.00	0.41	0.27	
优化方案	$A_3$	$\mathrm{B}_3$	$C_1$	$\mathrm{D}_2$	

# 3 结论与讨论

本研究通过稀释涂平板法和富集培养法,从雷竹林地覆盖材料砻糠、稻草及覆盖雷竹林土壤中初步筛选得到了38个对林地有机覆盖物具有分解活性的菌株,经反复筛选得7株在刚果红羧甲基纤维素培养基上水解圈直径较大,且出现时间早的菌株(真菌4株,放线菌3株),其中,菌株1.1,2.1,YQ1在仅有羧甲基纤维素为唯一碳源的刚果红羧甲基纤维素平板上生长旺盛,滤纸酶活力较高,而且以菌株2.1酶活力最高,远高于对照的绿色木霉和哈茨木霉。由于滤纸是聚合度和结晶度都居"中等"的纤维性材料,滤纸酶活综合反映了纤维素酶系统中3类酶的综合效果[19]。因此,可以推断菌株2.1可能具有较全面的酶系,将其定为目标菌株。经菌落培养特征和显微结构特征观察,菌株2.1属青霉属。

随培养时间的延长,菌株 2.1 滤纸酶活呈先升高而后降低的趋势,培养 5 d 后酶活力最高。菌株 2.1 在起始酸碱度为 pH 3.0~5.0 范围内滤纸酶活较高,酸碱度超过 pH 5.0 后滤纸酶活力开始下降,这与普遍认为的酸性条件有利于真菌产纤维素酶的结论一致 $^{[16]}$ 。浙江省的笋用竹林土壤大多为红壤或黄红壤、黄壤,呈酸性 $^{[20]}$ ,适宜菌株 2.1 的产酶潜力发挥。温度对微生物生长发育有着重要影响,菌株 2.1 在 30  $^{\circ}$  左右时产酶活力较高,而浙江省雷竹主栽区夏季最高气温 40  $^{\circ}$  左右,菌株 2.1 适合浙江省雷竹林生境,能够应用于竹林存留有机覆盖物的生物降解。氦、碳及无机盐均为降解菌株生长的必需养分因子,菌株 2.1 的最佳氮源为牛肉膏,添加量为 2.50 g·L<sup>-1</sup>,最佳碳源为稻草秸秆,添加量为 25.00 g·L<sup>-1</sup>,对菌株产酶活性有较大影响的无机盐为氯化铁和磷酸二氢钾,添加量分别为 0.01 g·L<sup>-1</sup> 和 1.50 g·L<sup>-1</sup>。

## 参考文献:

- [1] 方伟,何钧潮,卢学可,等.雷竹早产高效栽培技术[J]. 浙江林学院学报,1994, 11 (2): 121 128. FANG Wei, HE Junchao, LU Xueke, *et al.* Cultivation techniques of early shooting and high yielding for Lei bamboo sprout [J]. *J Zhejiang For Coll*, 1994, 11 (2): 121 128.
- [2] 余树全,姜春前,周国模,等.雷竹林生态系统健康的研究[J]. 北京林业大学学报,2003, **25** (5): 15 19. YU Shuquan, JIANG Chunqian, ZHOU Guomo, *et al.* Study on *Phyllostachys praecox* forest ecosystem health [J]. *J Beijing For Univ*, 2003, **25** (5): 15 19.
- [3] 胡超宗,金爱武,郑建新. 雷竹地下鞭的系统结构[J]. 浙江林学院学报,1994,11 (3): 264 268. HU Chaozong, JIN Aiwu, ZHENG Jianxin. Composition of Lei bamboo rhizomatic system [J]. *J Zhejiang For Coll*, 1994,11 (3): 264 268.
- [4] 何钧潮, 方伟, 卢学可, 等. 雷竹双季丰产高效笋用林的地下结构[J]. 浙江林学院学报, 1995, **12** (3): 247 252
  - HE Junchao, FANG Wei, LU Xueke, et al. Rhizome structure of Lei bamboo shoot-stand with high yield and good benefit [J]. J Zhejiang For Coll, 1995, 12 (3): 247 252.
- [5] 金爱武,周国模,郑炳松,等. 覆盖保护地栽培对雷竹地下鞭的影响[J]. 竹子研究汇刊,1998, 17 (4): 36 39. JIN Aiwu, ZHOU Guomo, ZHENG Bingsong, et al. An effect of cultivation in mulched and protected *Phyllostachys praecox* plantations on its rhizome [J]. *J Bamboo Res*, 1998, 17 (4): 36 39.
- [6] 张卓文,汤景明,熊艳平,等. 雷竹引种后地下鞭生长规律研究[J]. 华中农业大学学报, 2001, **20** (1): 77 80. ZHANG Zhuowen, TANG Jingming, XIONG Yanping, *et al.* Studies on the bamboo rhizome growth after introduction of *Phyllostachys praecox* f. *preveynalis* [J]. *J Huazhong A gric Univ*, 2001, **20** (1): 77 80.
- [7] 刘丽, 陈双林, 李艳红, 等. 基于林分结构和竹笋产量的有机材料覆盖雷竹林退化程度评价[J]. 浙江林学院学报, 2010, **27** (1): 15 21.
  - LIU Li, CHEN Shuanglin, LI Yanhong, et al. Stand structure and bamboo shoot number production based assessment of degradation degree of *Phyllostachys praecox* covered with organic materials [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2010, 27 (1): 15 21.
- [8] 奚立民,曹树,柯中炉.木质纤维素类生物质制备燃料乙醇的微生物研究进展[J].化工进展,2009,28 (11):2003 2008.
  - XI Limin, CAO Shu, KE Zhonglu. Research progress in microorganisms for the conversion of lignocellulosic biomass

- to fuel ethanol [J]. Chem Ind Eng Prog, 2009, 28 (11): 2003 2008.
- [9] 刁治民, 张雄伟, 吴保锋, 等. 微生物纤维素酶在饲料工业中的生产现状及应用[J]. 青海草业, 2006, **15** (3): 15 20.
  - DIAO Zhimin, ZHANG Xiongwei, WU Baofeng, et al. The research on the productive status and applied of microbial cellulose [J]. Qinghai Pratac, 2006, 15 (3): 15 20.
- [10] 肖春玲,徐常新. 微生物纤维素酶的应用研究[J]. 微生物学杂志,2002, **22** (2): 33 35. XIAO Chunling, XU Changxin. Application study on microbial cellulose [J]. *J Microbiol*, 2002, **22** (2): 33 35.
- [11] 湛方栋,何永美,陈建军,等.3 种培养基分离高温纤维素分解菌及其酶活测定[J]. 安徽农业科学,2008, **36** (15):6171-6172,6232.
  - ZHAN Fangdong, HE Yongmei, CHEN Jianjun, *et al.* Study on the isolation of thermophilic cellulolytic bacteria by using 3 kinds of medium and the determination of its enzyme activity [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2008, **36** (15): 6171 6172, 6232.
- [12] 张宇昊, 王颉, 张伟, 等. 一种改进的纤维素分解菌鉴别培养基[J]. 纤维素科学与技术, 2004, 12(1): 33-36
  - ZHANG Yuhao, WANG Jie, ZHANG Wei, et al. An improved differential medium for cellulose decomposing microorganisms [J]. J Cellul Sci Technol, 2004, 12 (1): 33 36.
- [13] 管斌,丁友昉,谢来苏,等. 还原糖测定方法的规范[J]. 无锡轻工大学学报,1999, **18** (3): 74 79. GUAN Bin, DING Youfang, XIE Laisu, *et al.* The modification of the DNS method for the determination of reducing sugar [J]. *J Wuxi Univ Light Ind*, 1999, **18** (3): 74 79.
- [14] 唐冰,夏秋瑜,李从发,等. NAG 含量测定中常见的 3 种 DNS 试剂使用效果比较研究[J]. 热带农业科学,2006, **26** (2): 33 35.
  - TANG Bing, XIA Qiuyu, LI Congfa, et al. Comparison of three DNS reagents in determination of N-acetylglucosamine [J]. Chin J Trop Agric, 2006, 26 (2): 33 35.
- [15] SHARROCK K R. Cellulase assay methods: a review [J]. Biochem Biophys Methods, 1988, 17 (2): 81 105.
- [16] 姜心,陈伟,周波,等. 纤维素酶活测定影响因素的研究[J]. 食品工业科技, 2010, **31** (5): 65 68. JIANG Xin, CHEN Wei, ZHOU Bo, *et al.* Study on impact factors of determination of cellulase activity [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2010, **31** (5): 65 68.
- [17] 孔华忠. 中国真菌志:青霉属及其相关有性型属[M]. 北京:科学出版社,2007.
- [18] 戴芳澜. 真菌的形态和分类[M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- [19] 庞良伟. 纤维素分解菌的混合培养及互生特性研究[D]. 成都:四川大学, 2003. PANG Liangwei. *The Study of Mixed Culture and the Mutualsitic Characteristics of Cellulolytic Strains* [D]. Chengdu: Sichuan University, 2003.
- [20] 孙晓,庄舜尧,刘国群,等.集约经营下雷竹林土壤酸化的初步研究[J].土壤通报,2010, **14** (6): 1339 1343. SUN Xiao, ZHUANG Shunyao, LIU Guoquan, *et al*. A preliminary study of soil acidification under Lei bamboo plantation with intensive management [J]. *Chin J Soil Sci*, 2010, **14** (6): 1339 1343.