

一株产纤维素酶真菌的筛选及其对秸秆的降解效果研究

刘起丽^{1,2}, 张建新³, 葛文娇², 王小慧², 李春喜⁴, 张嫣紫¹, 余晓凤¹

(1. 河南科技学院资源与环境学院, 河南新乡 453003) (2. 华南理工大学制浆造纸工程国家重点实验室, 广东广州 510640) (3. 河南师范大学水产学院, 河南新乡 453007) (4. 河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453007)

摘要: 为了筛选新的降解玉米秸秆的高产纤维素酶真菌, 本研究从全国不同区域采集了大量的半腐秸秆、半腐木材和富含腐殖质的土壤。通过常规分离方法共分离得到 120 株真菌分离物。利用纤维素刚果红培养基培养、测定滤纸酶活和羧甲基纤维素 (CMC) 酶活、玉米秸秆粉降解实验对分离到的 120 株真菌进行了三重筛选, 获得了一株高产纤维素酶的真菌 MC-1, 并对比了 MC-1、产纤维素酶木霉菌对照菌株及二者混合发酵液 HJ-1 对玉米秸秆室内降解效果。结果表明, MC-1 在纤维素刚果红培养基上培养 72h 后水解圈直径达到 8.52 cm; 培养 48h MC-1 的 CMC 酶活为 96.31 U/g, 滤纸酶活为 8.68 U/g, 室内秸秆腐解试验表明, 秸秆失重率和纤维素分解率均在 15 d 内迅速升高, 之后升高速度放缓。MC-1 在处理 45 d 后秸秆失重率达到了 46.84%, HJ-1 处理的秸秆失重率和纤维素分解率高于单一菌剂处理。

关键词: 秸秆; 纤维素降解; 真菌; 筛选

文章编号: 1673-9078(2014)6-82-86

The Screening and Identification of a Cellulose Degrading Fungus and Its Straw Degrading Capability

LIU Qi-li^{1,2}, ZHANG Jian-xin³, GE Wen-jiao², WANG Xiao-hui², LI Chun-xi⁴, ZHANG Yan-zi¹, YU Xiao-feng¹

(1. College of Resource and Environment Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China) (2. State Key Laboratory of Pulp and Paper Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China) (3. College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China) (4. College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: Numerous semi-decomposed straws, half decayed wood and soil with rich humus collected from different regions of China were studied to screen and characterize novel fungus with powerful cellulose degradation capability on corn straws. 120 strains were isolated from these resources by standard separation methods. A fungus (CM-1) with high-yield cellulase was obtained after a three-step screening by cellulose congo red medium culturing, evaluation of FPA and carboxymethyl cellulose (CMC) activities and weight loss rate of straws powder degraded. The corn straw degradation capabilities of MC-1, the control strain *Trichoderma* spp. and their mixed fermentation liquor HJ-1 were compared. Results showed that the cellulose hydrolysis circle diameter of MC-1 cultivated in Congo red culture medium for 72 h was 8.52 cm. After cultivated for 48 h, the CMC enzyme activity of MC-1 was 96.31 U/g and filter paper enzyme activity was 8.68 U/g. The results of indoor straw decay test showed that straw weightlessness rate and cellulose decomposition rate rose rapidly within the starting 15 days, and then the speed began to reduce. After 45 days, the straw weightlessness rate of MC-1 reached 46.84 %. The weightlessness rate and cellulose decomposition rate of straw treated with HJ-1 was higher than single fungus agent.

Key words: straws; cellulose degradation; fungi; screening

收稿日期: 2013-12-13

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目 (2012BAD14B08); 国家自然科学基金项目 (51103046)

作者简介: 刘起丽 (1979-), 女, 讲师, 在读博士, 主要从事资源微生物方面的研究

通讯作者: 王小慧 (1979-), 女, 博士, 副教授, 主要从事天然多糖化学生物学方面的研究

纤维素是地球上储量最丰富的天然多糖资源,农作物秸秆是一种非竞争性的纤维素资源,具有数量大、分布广、种类多等特点^[1-2]。我国每年农作物秸秆产量在6亿t以上,其中玉米秸秆年总产量2.2亿t^[3],但却长期没有得到合理开发,秸秆还田方式不当、利用结构不合理、利用深度不够,无效焚烧现象仍然存在^[3-4]。秸秆还田大体可分为直接还田和间接还田两种^[5]。不同作物秸秆不同还田方式对改良土壤物理性质、化学性质及增产效果各异,合理的农作物秸秆还田能够增加土壤有机质,改善土壤结构,培肥地力^[6]。

近年来,秸秆的有效利用和可持续发展问题已经倍受世界各国关注,并逐渐成为发展可持续农业的重要方面^[7]。目前秸秆直接还田依然是我国秸秆利用的主要途径,但是由于我国大部分地区复种指数高,倒茬间隔短,而且秸秆C/N高,自然条件下被微生物分解转化的周期长、降解慢,难以作为当季作物的肥源^[8]。因此加速秸秆降解的微生物筛选方面的研究不断开展起来。降解秸秆的菌种类别已有很多报道,其降解条件各有不同^[8-10]。秸秆降解还田后对土壤性状有明显改善作用^[11]。但所报道的菌种数量和种类有限,酶活力也参差不齐,难以满足不同地区不同生态条件下秸秆腐解的实际需要。为了给玉米秸秆的直接还田提供加快秸秆腐解速度的高产纤维素酶菌株,本研究利用试纸条诱捕法、土壤微生物分离法、半腐秸秆微生物分离法等分离技术对采自全国不同纬度、海拔高度及气候类型的土壤、半腐秸秆和木材进行了菌株的分离、筛选和鉴定,旨在为我国的秸秆快速还田提供技术保证。由于采集地域广,生态环境多样,为目的菌株的获得提供了更加丰富的来源;菌株降解的对象主要限定在北方地区降解难度较大的玉米秸秆,通过选取田间常用的秸秆破碎机破碎过的秸秆碎段,在模拟大田土壤条件下研究菌株的降解效果,具有更实际的应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 分离材料

采自河南省、北京市、新疆维吾尔自治区、海南省、广西省等不同纬度、海拔高度及气候类型的土壤和半腐的玉米秸秆、半腐的木材;采用滤纸条诱捕法^[10]从河南省不同地区农田中取出的半腐的滤纸条。

1.1.2 对照菌株

从中国农业科学院菌种保存中心购得的绿色木霉(菌株保藏编号30552)。

1.2 各类培养基

1.2.1 PDA培养基、马丁氏培养基^[10]

1.2.2 刚果红培养基^[12]

称取 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.20 g, MgSO_4 0.05 g, KH_2PO_4 0.10 g, NaCl 0.05 g, 纤维素粉2.00 g, 刚果红0.02 g, 琼脂2.00 g, 按顺序依次加入煮沸的蒸馏水(1000 mL)中,同时用玻璃棒不停搅拌,待琼脂完全溶化后分装,灭菌备用。

1.2.3 液体培养基^[9]

KH_2PO_4 1.00 g, NaCl 1.00 g, NaNO_3 2.50 g, FeCl_3 0.01 g, MgSO_4 0.30 g, CaCl_2 0.10 g, 秸秆粉(玉米秸秆磨碎后过60目筛)0.50 g, 蒸馏水40 mL (pH 7.2)。

1.2.4 液体发酵培养基^[9]

KH_2PO_4 1.00 g, NaCl 1.00 g, NaNO_3 2.50 g, FeCl_3 0.01 g, MgSO_4 0.30 g, CaCl_2 0.10 g, 麸皮10.00 g, 蒸馏水1000 mL, pH7.2左右。

1.3 方法

1.3.1 菌株的分离与纯化

1.3.1.1 对滤纸条、半腐玉米秸秆和半腐木材的微生物进行分离

在超净工作台内,用0.10%的升汞溶液浸泡1 min,无菌水冲洗2~3次;将组织剪成5 mm的小方块,品字形放入培养基平板上,倒置于25℃的培养箱中培养3~4 d,然后挑选单菌落接种于相应的琼脂平板上,直至纯化得到单菌落。

1.3.1.2 对采集到的土壤采用土壤微生物常规分离方法进行分离

取土样20 g,在无菌条件下加入装有30 mL无菌水的摇瓶中。将摇瓶置于摇床上,在30℃下振荡培养5 min。取土壤浸出液,取上清液1 mL加入到9 mL无菌水中,梯度稀释成 10^{-1} 至 10^{-6} 浓度梯度,常规划线法接种于PDA培养基和马丁氏培养基上,于37℃恒温培养1 d。对培养后的分离平板进行菌落计数后挑选形态差异明显的菌落,重复划线接种于相应的琼脂平板上,直至纯化得到单菌落^[10]。

1.3.2 具有产纤维素酶能力菌株的筛选

1.3.2.1 初筛方法

以绿色木霉(菌株保藏编号30552)为对照菌株,采用纤维素刚果红培养基水解圈大小的指标对纯化出的菌株进行初筛^[12]。28℃下于PDA培养基上培养72 h活化菌种,于纤维素刚果红培养基上点接菌株,48 h

后检测水解圈直径。

1.3.2.2 复筛方法

将初筛获得的菌株接种到液体发酵培养基中进行发酵培养,以绿色木霉(菌株保藏编号 30552)为对照,48 h 取样测定其滤纸酶活(FPA)和羧甲基纤维素钠(CMC)酶活^[9],选出酶活较高的菌株。

1.3.2.3 三筛方法

针对降解对象玉米秸秆的成分特点,对比筛选出的菌株、对照菌株及其组合对秸秆粉 5 d 的降解失重量筛选出对秸秆降解效果相对较好的菌株或菌株组合。活化菌株,待产孢后制备筛选获得的菌株的孢子悬浮液、对照绿色木霉菌株的孢子悬浮液 CK-1、二者的混合孢子悬浮液 HJ-1,孢子浓度均控制在 1.0×10^7 pcs/mL,取各 5 mL 孢子悬浮液加入液体培养基(1.2.3)中处理玉米秸秆粉,以不加菌剂做对照,置于 30 °C、200 r/min 的恒温震荡培养箱中培养。培养 7 d 后取出,离心去上清液,60 °C 烘干至恒重后称重计算失重率,同时用重铬酸钾-碘容量法测定纤维素的分解率。

1.3.3 室内秸秆腐解试验

取田间秸秆破碎机破碎后的玉米秸秆 250 g 装入透气的尼龙袋中,再每 3 袋埋入口径 20 cm,高 30 cm 的盛土花盆中,筛选获得的菌株和对照绿色木霉菌株在液体发酵培养基分别培养 4 d 后制成不同孢子浓度的菌剂及混合菌剂 HJ-1,以无菌水作对照,均匀喷洒到秸秆(秸秆湿度以用手轻拽,秸秆能出水为宜)上,在秸秆上盖一薄层塑料布,上覆土 200 g,在 30 °C 培养箱进行腐解试验。分别于处理 15 d、30 d、45 d 取样,测定秸秆失重率和秸秆纤维素分解率。

1.3.4 菌株的鉴定

1.3.4.1 形态学鉴定方法

将筛选到的菌株接种到 PDA 培养基上,在不同时间观察菌落生长性状,待产孢后取菌丝制作临时玻片在透视显微镜下观察菌丝、分生孢子梗、分生孢子并描述其形态特征;用透视显微镜观察菌丝自然生长和分支状况。根据形态特征对菌株进行分类鉴定。

1.3.4.2 分子生物学鉴定方法

采用通用引物:(ITS1:5'-TCCGTAGGTGAACCTG CGG-3')和(ITS4:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')检测 18S rDNA 序列确定菌株分类地位^[13]。PCR 反应体系 50 μ L, DNA 模板 10 ng, 1 mmol 引物, 1.2 mmol dNTP, 1.5 mmol MgCl₂, 2.5 Utaq DNA 聚合酶, PCR 反应条件:95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 40 s, 56 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 45 s, 30 个循环,最后 72 °C 延长 10 min。PCR 产物经电泳分离后回收目的片段测序。

1.3.5 数据分析

用 SPSS 软件和 EXCEL 软件进行数据分析和作图。ITS 区测序结果在 NCBI 数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov)里 BLAST, 选取相近的和有代表性的真菌 ITS 区序列用 DNAMAN 6.0 软件进行序列比对,并用 MEGA 5.0 软件做进化树。

2 结果与分析

2.1 真菌分离纯化结果

通过滤纸条诱捕法、土壤真菌分离法,共分离纯化到真菌 120 株。

2.2 产纤维素酶真菌的筛选结果

2.2.1 初筛结果

将分离纯化得到的 120 株真菌接种于纤维素刚果红培养基上,共初筛到 37 株出现明显水解圈的菌株。其中有 6 株的水解圈直径较为稳定和明显。5 次重复的各菌株和对照绿色木霉(CK)的水解圈平均直径见表 1。其中分离自新疆库尔勒地区半腐香梨树皮的真菌 MC-1 的水解圈直径显著大于其他供试菌株。

表 1 6 株真菌的水解圈直径及差异显著性

Table 1 The hydrolysis circle diameters and the significance

levels of six fungi	
菌株	水解圈平均直径/cm
MC-1	8.52±0.06 ^{aA}
TU-2	7.61±0.03 ^{bAB}
JG-1	7.55±0.04 ^{bAB}
JG-34	7.32±0.01 ^{bB}
MC-3	5.94±0.05 ^{cC}
TU-16	5.78±0.03 ^{cC}
CK	7.73±0.03 ^{bAB}

注:数据后小写、大写英文字母分别表示 0.05 水平、0.01 水平的差异显著性。

2.2.2 复筛结果

从图 1 可知,培养 48 h 后,MC-1 的 CMC 酶活达到了 96.31 U/g,滤纸酶活达到了 8.68 U/g,CK 的 CMC 酶活达到了 90.42 U/g,滤纸酶活达到了 8.13 U/g。不同菌株的 CMC 酶活和滤纸酶活两者没有必然联系,CMC 酶活高的菌株滤纸酶活不一定高,二者只是反映出该菌株产酶的不同特性。

2.2.3 三筛结果

从图 2 中可以看出,在液体培养基里,玉米秸秆被磨成粉状的培养条件下,混合菌株发酵液 HJ-1 的降解效果最好,用 HJ-1 菌剂处理小麦秸秆粉 7 d 后玉米秸秆粉失重率达到了 39.73%,秸秆纤维素分解率达到

了 44.32%，与对照水处理的差异达到了极显著水平。这说明加纤维素分解菌 MC-1 和 CK-1 的处理比不加菌的分解效果好，加混合菌剂 HJ-1 的分解效果较单菌好。秸秆被磨成粉状，加大了纤维素分解菌与秸秆纤维的反应接触面；试验在液体环境下恒温振荡进行，保证了秸秆粉的湿度和纤维素分解菌的快速生长，使秸秆的分解失重率达到了理想的效果。分解过程中各处理三角瓶中反应物的颜色差异显著：对照为近白色的秸秆粉悬浮液，7 d 后颜色略有变黄；加菌剂的处理反应液颜色逐渐变绿，这与木霉生长和产孢有关。

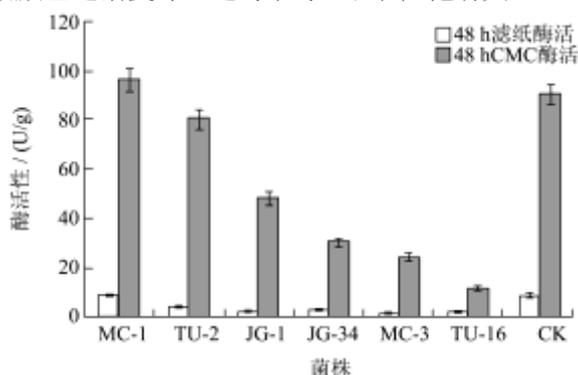


图 1 培养 48 h 后各菌株发酵液的滤纸酶活和 CMC 酶活

Fig.1 The filter paper enzyme activity and CMC enzyme activity of every strain-fermented liquid after 48 h

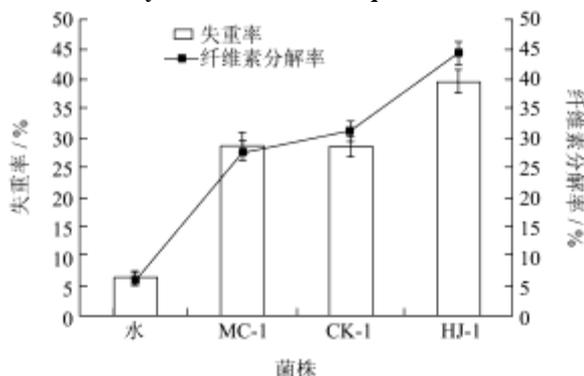


图 2 培养 5 d 后各处理的秸秆失重率和纤维素分解率

Fig.2 The rate of weight loss and decomposition of cellulose in straws after 5 d treatment

2.3 室内秸秆腐解试验结果

对于大田里玉米秸秆破碎机破碎过的秸秆碎段，在模拟大田土温（30 ℃）条件下，喷洒不同的菌剂腐解效果不同。MC-1 在处理 45 d 后秸秆失重率达到了 46.84%，秸秆失重率和秸秆纤维素分解率最高的处理是混合了 MC-1 和 CK-1 两种木霉的混合菌剂 HJ-1。在室内控温、秸秆含水量充足的条件下，秸秆失重率和纤维素分解率随着处理天数的增加而升高；处理 45 d 后施菌剂 HJ-1 处理的秸秆失重率为 56.33%。玉米秸秆纤维素分解率与秸秆失重率呈正相关，各处理的秸秆

纤维素分解率均在 15 d 内迅速升高，以后随着腐解时间的延长升高速度放缓。腐解效果最差的是无菌水处理，这说明通过人为添加秸秆腐解菌能够缩短有益菌群的富集与生长、大大加快秸秆腐解进程。

2.4 产纤维素酶真菌 MC-1 的鉴定结果

2.4.1 形态学鉴定结果

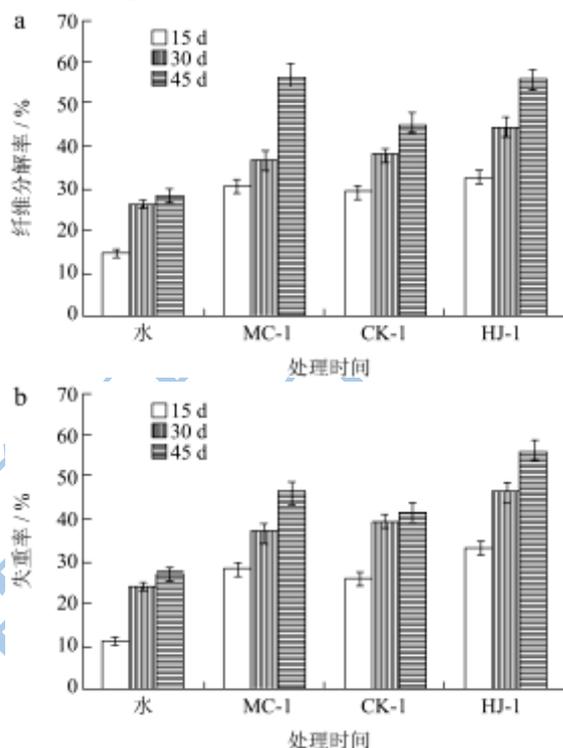


图 3 不同处理对玉米秸秆的降解能力的影响

Table 3 Decomposition of corn straw by different treatments

注：a：纤维素分解率；b：失重率。

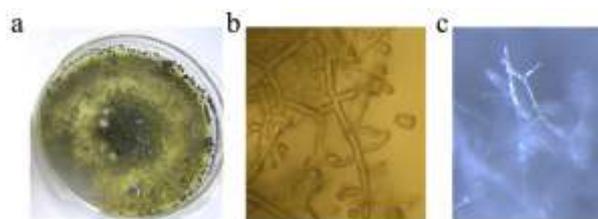


图4 MC-1菌株在平板上的形态

Fig.4 The shape of strain MC-1 on the plates

注：a：菌落形态；b：菌丝、分生孢子梗、分生孢子显微形态(透视显微镜)；c：菌丝自然生长和分支形态(体视显微镜)。

MC-1菌株在PDA培养基上菌落生长快，30 ℃培养72 h，菌落直径达4 cm，在CMC平板上培养1 d即出现明显菌落。菌落质地疏松、干燥、不透明。菌丝初为白色绒毛状，后转为深绿色，菌丝体有隔膜，产孢层菌丝及分生孢子梗茂密，白色，草绿色或深绿色。分生孢子梗侧向分枝，分枝上轮生或对生短的产孢细胞，无色，具隔膜。产孢细胞长瓶形，与孢子梗呈直

角分枝(图4)。综合菌落培养形态和菌丝及孢子显微特征,初步断定MC-1为木霉属(*Trichoderma Persoon*)真菌。

2.4.2 分子生物学鉴定结果

利用DNAMAN软件比对MC-1的18S rDNA基因测序结果,结果表明MC-1与*Trichoderma atroviride*有99.36%的相似性,结合形态学特征,鉴定MC-1属于*Trichoderma*,且与*Trichoderma atroviride*最为接近。进化树关系也证明了MC-1与*Trichoderma atroviride*亲缘关系较近。(图5)。

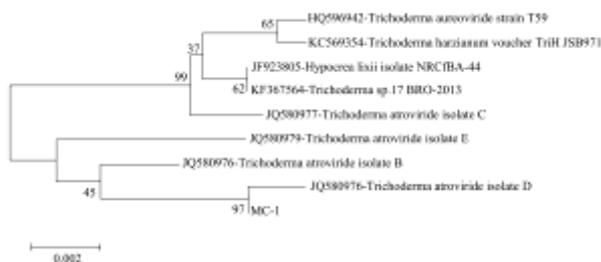


图5 基于真菌ITS核苷酸序列构建的系统关系树

Fig.5 Dendrograms showing the phylogenetic relationship among fungi based on multiple alignments of ITS sequences

3 结论

3.1 关于降解秸秆的产纤维素酶真菌的研究近年来多有报道。李江颂等人研究表明,固态发酵玉米秸秆的最佳菌株组合为青霉(*Penicillium sp.*)和葱色串孢(*Torula allii*)^[9]。王帅等人则研究了木霉属(*Trichoderma viride*)、青霉属(*Penicillium*)和黑曲霉属(*Aspergillus niger*)、枯草芽孢杆菌(*Brevibacterium sp.*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、孢囊链霉菌(*Streptosporangium sp.*)和链霉菌(*Streptomyces sp.*)7种微生物在液体培养条件下对玉米秸秆类腐殖质形成和转化的影响,揭示了真菌、细菌和放线菌在降解玉米秸秆时的相互作用效果^[4]。真菌是秸秆降解的主要微生物,不同真菌的配合及细菌、放线菌的加入都能够改变秸秆的腐解效果。本研究选取经过秸秆破碎机破碎后的玉米秸秆直接喷洒菌剂进行腐解试验,有机粪肥或化学肥料对降解过程作用尚需进一步研究。

3.2 本研究中室内秸秆腐解试验结果显示:无菌水处理的秸秆纤维素水解率和失重率在45 d后也超过了20%,其原因可能是:作为其他含菌接种物处理的对照,无菌水处理保证了该处理下接种物的无菌,但选取的秸秆是并未灭菌的取自田间秸秆粉碎机破碎后的秸秆,是为了模拟自然环境下秸秆粉碎机破碎的秸秆的降解效。在湿度和温度合适的条件下,未灭菌秸秆上自然存在的微生物必然会发酵和降解,这种降解效

果具有一定偶然性,与秸秆上天然存在的微生物菌群有关。本试验中筛选到的菌株MC-1与对照绿色木霉混合后对秸秆的降解效果最好,这说明复合菌系较单一菌株有更大的优势。分解纤维素类物质的酶均是多酶体系,酶组分之间存在明显的协同作用,混合菌株可以相互补充进而促进对纤维素类物质的分解。但是双菌作用决不是简单的加和效应,也并不是菌群越大越好,菌株之间的拮抗作用也是制约分解纤维素能力的重要原因^[10]。因此,在本研究的基础上应进一步研究复合型微生物菌群的降解效果,为研制最佳秸秆速腐剂提供微生物资源。

参考文献

- [1] Pauly M, K Keegstra. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels [J]. Plant J., 2008, 54: 559-568
- [2] Zhang G S, Chan K Y, Li G D, et al. Effect of straw and plastic film management under contrasting tillage practices on the physical properties of an erodible loess [J]. Soil Till. Res., 2008, 98: 113-119
- [3] 韩鲁佳,闫巧娟,刘向阳,等.中国农作物秸秆资源及其利用现状[J].农业工程学报.2002,3:87-91
HAN Lu-jia, YAN Qiao-juan, LIU Xiang-yang, et al. Straw resources and their utilization in China [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2002, 3: 87-91
- [4] 张鹤,佟心洁,庞春生,等.纤维素酶降解玉米秸秆新型蒸煮浆的工艺研究[J].现代食品科技,2012,28(2):182-186
ZHANG He, TONG Xin-jie, PANG Chun-sheng, et al. Research of enzymatic hydrolysis of com stalk pulp with new cooking method [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(2): 182-186
- [5] 刘世平,聂新涛,张洪程,等.稻麦两熟条件下不同土壤耕作方式与秸秆还田效用分析[J].农业工程学报,2006,22(7):48-51
LIU Shi-ping, NIE Xin-tao, ZHANG Hong-cheng, et al. Effects of tillage and straw returning on soil fertility and grain yield in a wheat rice double cropping system [J]. Transaction of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2006, 22(7): 48-51
- [6] Humberto B C, Lal R. Com stover removal impacts on micro-scale soil physical properties [J]. Geoderma, 2008, 145: 335-346
- [7] Law ford H G, Rousseau J D. Cellulosic fuel ethanol-alternative fermentation process designs with wild-type and recombinant zymomonas mobilis [J]. Appl.

- Biochem. Biotechnol., 2003, 105: 457-469
- [8] Dinis M J, Rui M F Bezerra, Nunes F, et al. Modification of wheat straw lignin by solid state fermentation with white-rot fungi [J]. Bioresour. Technol., 2009, 100(20): 4829-4835
- [9] 李江颂,李日强,王爱英,等.固态发酵玉米秸秆的菌株组合和发酵条件研究[J].农业环境科学学报,2010,29(8):1601-1605
LI Jiang-song, LI Ri-qiang, WANG Ai-ying, et al. Combination of the multiple -strains and the fermentation conditions of solidstate fermentation of com straw [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2010, 29(8): 1601-1605
- [10] 史央,蒋爱芹,戴传超,等.秸秆降解的微生物学机理研究及应用进展[J].微生物学杂志,2002,1:22
SHI Yang, JIANG Ai-qin, DAI Chuan-chao, et al. Advanced in microbiological mechanism and application of straw degradation [J]. Journal of Microbiology, 2002, 1: 22
- [11] Wuest S B. Surface versus incorporated residue effects on water-stable aggregates [J]. Soil Till Res, 2007, 96: 124-130
- [12] 陈敏.一种改进的纤维素分解菌鉴别培养基[J].杭州师范学院学报,2001,18(5):11-12
CHEN Min. An improved differential medium for cellulose decomposing microorganisms [J]. Journal of Hangzhou Teachers College (Natural Science), 2001, 18(5): 11-12
- [13] Olmos J, Paniagua J, Contreras R. Molecular identification of *Dunaliella* sp. utilizing the 18S rDNA gene [J]. Lett. Appl. Microbiol., 2000, 30: 80-84
- [14] 王帅,窦森,王晓平,等.真菌及混合菌对玉米秸秆类腐殖质形成和转化的影响[J].农业环境科学学报,2012,31(4):773-779
WANG Shuai, DOU Sen, WANG Xiao-ping, et al. Effect of fungi and mixed strains on the formation and transformation of humic-like substances of the corn stalks [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2012, 31(4): 773-779