

利用植物农药残渣生产绿色木霉孢子的研究

张双玺,张 兴

(西北农林科技大学 无公害农药研究服务中心 陕西省生物农药工程技术研究中心, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】研究利用植物农药残渣作为生产绿色木霉(*Trichoderma viride*)制剂培养基质的可行性。【方法】利用植物农药沙地柏、川楝和雷公藤的残渣作为培养基主要成分,采用平皿筛选法筛选出最佳组合,然后利用固体发酵法生产绿色木霉孢子制剂。【结果】沙地柏:麦麸:鸡粪:硫酸铵的最佳质量组合比例为 12:4:3:1。利用该组合进行 28℃ 恒温培养箱固体发酵培养,绿色木霉产孢量第 8 天达到最高,沙地柏、雷公藤和川楝残渣的产孢量分别为 4.87×10^7 , 1.43×10^8 和 8.45×10^7 g⁻¹。利用沙地柏残渣进行大体量室温固体发酵,第 9 天产孢量为 2.9×10^7 g⁻¹,第 12 天产孢量达到最高,为 3.6×10^8 g⁻¹,最适培养时间为 8~12 d。固体发酵生产的两种孢子有着明显的分布规律,分生孢子主要分布在有光照的表层,厚垣孢子则分布在培养基质的深层。【结论】植物农药沙地柏、雷公藤和川楝的残渣可以用作生产绿色木霉孢子的培养基质。

【关键词】 植物农药残渣;固体发酵;绿色木霉;拮抗菌;分生孢子

【中图分类号】 S482.2⁺8 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-9387(2008)04-0175-06

Study on producing spores of *Trichoderma viride* with
plant-pesticide residues

ZHANG Shuang-xi,ZHANG Xing

(Shaanxi Research Center of Biopesticide Technology and Engineering or Biorational Pesticide R & D Center,
Northwest A & F University,Yangling,Shaanxi 712100, China)

Abstract:【Objective】 The research was to study the feasibility of producing spore preparation of *Trichoderma viride* with plant-pesticide residues.【Method】 The residues of *Sabina vulgaris*, *Tripterygium wilfordii* and *Melia toosendan* were used as major components of the medium for plate screening test and solid fermentation,mixed with some other materials.【Result】 The orthogonal combination experiment indicated that the optimal mix of *S. vulgaris*,wheat bran,chook dung and ammonium sulfate was 12:4:3:1. The spore quantity of *T. viride* grown in the solid fermentation media made with *S. vulgaris*,*T wilfordii* and *M. toosendan* respectively achieved the highest on 8th day and the spore densities were 4.87×10^7 , 1.43×10^8 and 8.45×10^7 g⁻¹ respectively. During the solid fermentation with the *S. vulgaris* mixes,spore density was 2.9×10^7 g⁻¹ on the 9th day and achieved the peak on the 12th day, 3.6×10^8 g⁻¹. It was found that there were two kinds of spores in the media fermented,conidium mainly distributed in the surface layer,but chlamydospore distributed in the culture medium in-depth.【Conclusion】 The results showed that the plant-pesticide residues such as *S. vulgaris*,*T. wilfordii* and *M. toosendan* mixed with some other materials can be used as a medium to produce spore preparation of *T. viride*.

* 【收稿日期】 2007-10-10
【基金项目】 国家西部开发重大项目(2004BA901A14)
【作者简介】 张双玺(1962—),男,陕西西安人,在读博士,主要从事农药及病虫害防治研究。E-mail:zhangsx0401@hotmail.com
【通讯作者】 张 兴(1952—),男,陕西周至人,教授,博士生导师,主要从事植物化学保护和农药学研究。

Key words: plant-pesticide residue; solid fermentation; *Trichoderma viride*; antagonist; conidium

植物农药残渣是指具有杀虫杀菌活性的植物材料,经过有机溶剂或水提取有效成分后的残余部分,这一部分通常占植物材料干重的 90% 以上。目前,已有烟碱、苦参碱、楝素、茵蒿素和茶皂素等 34 种植物源农药登记注册^[1],年产量约 8 000 t,年产植物农药残渣约 15 000 t。在实际生产中,各生产企业通常对这些残渣的处理方法有 3 种:一是露天堆放,这不仅造成环境污染而且影响环境美观。二是挖坑填埋,挖坑填埋是一种简单易行的废弃物处理方法,但对土地占用量大。填埋后随着植物材料的分解,产生大量的有害气体以及渗滤液,会引起土壤、水和大气污染。三是焚烧,伴随焚化灰分的产生,排放出大量的有害物质,造成二次污染。研究开发植物源农药的终极目标之一是降低化学农药对农作物产品及环境的污染,但是随着植物农药的研究和生产,植物农药残渣逐渐成为一种潜在的污染源。植物农药残渣属于固体有机废弃物,目前对于固体有机废弃物处理方法的研究报道较多^[2],但对于植物农药残渣处理尚未见研究报道。因此,研究植物农药残渣处理对减少环境污染、资源再利用、降低植物农药生产成本,以及使植物农药成为真正的无公害农药都具有重要意义。

植物农药残渣中含有大量的木质素、纤维素和半纤维素,这些都是重要的再生资源。通过物理、化学、生物或者三者联合的方法处理后,这些物质可以用于生产有机肥^[3]、饲料添加物^[4]、糖和燃料乙醇^[5]以及化工原料等^[6-7]。绿色木霉(*Trichoderma viride*)菌含有可以降解植物材料的酶系,包括纤维素酶^[8-9]、半纤维素酶^[10]、果胶酶^[11]等,其可以分解利用木质纤维材料^[12-13]。而且,绿色木霉菌又是一种重要的生防真菌,在植物病害中具有重要的应用价值,其生长周期内可产生分生孢子与厚垣孢子,对多种植物叶面病害和土传病害都有极高的生物活性^[13-14]。这些为利用植物农药残渣发酵生产绿色木霉孢子以及堆制有机生物药肥提供了理论依据。

本研究以植物农药残渣作为绿色木霉菌培养基质,利用平皿组合试验法筛选出最佳配方,通过固体发酵生产可以用于植物病害防治的绿色木霉菌孢子制剂,以期为植物农药残渣减量化、无害化和资源化处理,降低植物农药的生产和使用成本,以及解决环境污染问题提供参考依据及技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物农药残渣 沙地柏残渣、雷公藤残渣和川楝残渣,均由西北农林科技大学无公害农药研究服务中心中试基地提供。3 种材料均为在 75 ℃ 条件下用酒精提取 4 h,滤渣自然风干所得。试验用植物农药残渣、豆饼及麸皮均在 120 ℃ 烘干粉碎,鸡粪在 150 ℃ 烘干粉碎,分别装入塑料袋密封待用。各种材料平皿试验用均过孔径 1.25 mm 筛,固体发酵试验用均过孔径 2.5 mm 筛。

1.1.2 菌株 绿色木霉 Tv-2,由西北农林科技大学无公害农药研究服务中心筛选,保存。

1.2 方法

1.2.1 绿色木霉孢子液的制备 利用 PDA 培养基平板(50 皿)培养绿色木霉菌,待菌丝长满培养皿并变为绿色后,每皿加入 10 mL 灭菌水,用接种环搅拌使孢子悬浮在水中,用移液管吸出悬浮液移入灭菌三角瓶中,孢子数量用血球计数板计数,然后用灭菌水将孢子浓度调整为 $1 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$,4 ℃ 保存待用。

1.2.2 化学营养添加试验(平皿) 取过孔径 1.25 mm 筛的植物农药残渣 5 g,分别加硫酸铵 0,0.5,1.0,1.5 和 2.0 g,自来水 100 mL,琼脂 1.6 g,装入三角瓶中,121 ℃ 灭菌 30 min,摇匀,每处理倒平板 5 皿。接 $1 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ 绿色木霉孢子悬浮液 0.5 mL,28 ℃ 培养箱培养。于培养的第 6 天用蒸馏水洗脱分生孢子,用血球计数板计数,求 5 皿产孢量的平均值。

1.2.3 绿色木霉菌对植物农药残渣的分解作用

(1)绿色木霉菌发酵液的制备。取过孔径 1.25 mm 筛的植物农药残渣 5 g,硫酸铵 1 g,蒸馏水 100 mL,调 pH 6.5,121 ℃ 灭菌 30 min。各处理接 $1 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ 绿色木霉孢子悬浮液 10 mL,28 ℃、150 r/min 摇床恒温培养 5 d,以不接绿色木霉孢子悬浮液作为对照。离心发酵液(5 000 r/min,30 min),取上清液保存待用。(2)测定方法。上清液中总还原糖含量的测定采用 DNS 法,以葡萄糖作为标准。酶活性测定参照文献[15]的方法,以上清液作为粗酶液,采用 DNS 比色法测定滤纸酶活性(FPA)。以 1 mL 酶液 1 min 产生 1 μg 葡萄糖为 1 个酶活单位(U)。

1.2.4 平皿组合配方的筛选 共设 8 个处理,每处

理 5 皿。对照组为沙地柏残渣 12 g+硫酸铵 1 g,其他处理组在对照组配方的基础上分别添加豆饼 2 g,麦麸 4 g,鸡粪 2 g,豆饼 1 g+麦麸 3 g,豆饼 1 g+鸡粪 1 g,豆饼 1 g+麦麸 2 g+鸡粪 1 g 和鸡粪 1 g+麦麸 3 g。混匀后,各组准确称取 5 g,培养基制备方法、接种量、培养条件等均与 1.2.2 相同。

表 1 平皿培养基优选的 $L_9(3^4)$ 正交试验设计因素和水平
Table 1 Orthogonal combination experiment $L_9(3^4)$

水平 Level	因素 Factor				g
	沙地柏(A) <i>S. vulgaris</i>	麦麸(B) Wheat bran	鸡粪(C) Chook dung	硫酸铵(D) A. S	
1	11	3	1	1	
2	12	4	2	2	
3	13	5	3	3	

1.2.6 培养箱固体发酵试验 按 1.2.5 筛选出的最优组合,分别用沙地柏残渣、雷公藤残渣和川楝残渣作为培养基质,称 200 g 置入大烧杯(1 000 mL)中,用牛皮纸封口,各种材料均重复 4 次,121 ℃灭菌 30 min。接种绿色木霉孢子悬浮液 1×10^8 mL⁻¹,接种量为 60 mL,搅拌均匀,置 28 ℃培养箱培养 11 d,从培养的第 6 天开始每天取样测定产孢量。测定方法:取发酵物 5 g,放入 50 mL 含有玻璃珠的无菌水中,震荡 35 min,梯度稀释后用血球计数板计数,求平均值。

1.2.7 大体量室温固体发酵试验 利用自制的小型发酵桶(直径 35 cm,高 50 cm),其内部盘有直径 0.35 cm 的 PVC 管,每隔 2 cm 设置 1 个通气孔。按 1.2.5 筛选出的最优组合,选取产孢量最低的沙地柏残渣作为培养基质,称取 25 kg,经高温灭菌,在无菌条件下接入绿色木霉孢子制剂并搅拌均匀后,装入预先用酒精消毒的发酵桶中,每 12 h 强制通风 1 次,室温(27~30 ℃)下发酵培养 13 d,从第 5 天开始每天分别在表层、中心和基底取样 5 g 测定产孢

1.2.5 平皿配方优选试验 在上述试验的基础上,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,研究沙地柏、硫酸铵、鸡粪和麸皮的最佳组合。每种材料取 3 个水平(表 1)。培养基制备方法、接种量、培养条件等均与 1.2.2 相同。

量,并镜检厚垣孢子和分生孢子比例。孢子检测方法同 1.2.6。

2 结果与分析

2.1 硫酸铵添加量对绿色木霉产孢量的影响

绿色木霉菌在 3 种植物农药残渣制成的平板培养基上生长极为缓慢,培养第 6 天的产孢量均少于 100 g⁻¹。添加硫酸铵后,3 种植物农药残渣培养基上绿色木霉菌菌丝生长良好,培养第 6 天菌丝均布满整个平皿。随着硫酸铵添加量的增加,产孢量也明显增加。添加 1 g 硫酸铵的产孢量可以达到 10⁵ 以上,此后随着硫酸铵添加量的增加,产孢量虽有所增加,但增加幅度明显减小。添加 2 g 硫酸铵时,沙地柏、雷公藤和川楝的产孢量分别为 1.9×10^6 , 2.8×10^6 和 2.5×10^6 g⁻¹(表 2)。试验结果表明,以 3 种植物农药残渣作为绿色木霉菌的主要碳源,添加一定量的氮源,完全可以用作生产分生孢子的基质。

表 2 添加硫酸铵对绿色木霉产孢量的影响(平皿)

Table 2 Effect of nutrimental chemicals on quantity of spore (plate)

硫酸铵/g A. S	沙地柏 <i>Sabina vulgaris</i>	雷公藤 <i>Tripterygium wilfordii</i>	川楝 <i>Melia toosendan</i>
0.0	5.1×10^1	5.8×10^1	7.1×10^1
0.5	1.5×10^2	1.5×10^2	2.8×10^2
1.0	1.8×10^5	3.3×10^5	2.9×10^5
1.5	4.8×10^5	5.5×10^5	5.2×10^5
2.0	1.9×10^6	2.8×10^6	2.5×10^6

2.2 绿色木霉菌对植物农药残渣的分解作用

由表 3 可见,3 种植物农药残渣的发酵液中均含有大量的总还原糖,沙地柏、雷公藤和川楝农药残渣发酵液的总还原糖含量分别为 3.518,4.626 和 4.365 mg/mL,说明绿色木霉菌对沙地柏、雷公藤和川楝农药残渣具有分解作用。从发酵液总还原糖含

量来看,绿色木霉菌更容易分解利用雷公藤农药残渣,而对沙地柏农药残渣的分解活性较低。发酵液滤纸酶活性(FPA)测定结果证明,绿色木霉菌在发酵过程中向细胞外分泌纤维素降解酶。由于纤维素酶是诱导性酶,酶活性的不同说明这 3 种农药残渣的诱导作用不同。雷公藤发酵液酶活性最高,为

2.54 U/mL,说明雷公藤残渣对绿色木霉纤维素酶诱导能力高。

2.3 平皿组合配方筛选试验结果

由表 4 可以看出,沙地柏残渣中添加硫酸铵、麦麸与鸡粪组产孢量最高,达到 $3.572\times10^8\text{ g}^{-1}$,其次为添加鸡粪组和麦麸组,产孢量分别为 $2.846\times10^8\text{ g}^{-1}$ 和 $2.819\times10^8\text{ g}^{-1}$ 。结果表明,在沙地柏+硫酸铵的基础上加入一些有机物质都可明显提高绿色木

霉的产孢量。

表 3 绿色木霉发酵液中总还原糖含量及滤纸酶活性(FPA)

Tabel 3 Reducing sugar quantity and cellulase activity in zymotic fluid		
植物农药残渣 Plant-pesticide residues	总还原糖/(mg·mL ⁻¹) Seducing suger	FPA/ (U·mL ⁻¹)
沙地柏 <i>S. vulgaris</i>	3.518	1.95
雷公藤 <i>T. wilfordii</i>	4.626	2.54
川楝 <i>M. toosendan</i>	4.365	2.25

表 4 不同材料培养基组合平皿筛选试验结果

Table 4 Screening Tests of culture media (plate) with the mixes		$\times10^8\text{ g}^{-1}$	
组合 Compounding	产孢量 Spore density	组合 Compounding	产孢量 Spore density
沙地柏+硫酸铵(CK) <i>S. vulgaris</i> +A. S	0.004	沙地柏+硫酸铵+豆饼+麦麸 <i>S. vulgaris</i> +A. S+wheat bran+bean cake	2.725
沙地柏+硫酸铵+豆饼 <i>S. vulgaris</i> +A. S+bean cake	2.658	沙地柏+硫酸铵+豆饼+鸡粪 <i>S. vulgaris</i> +A. S+bean cake+chook dung	2.757
沙地柏+硫酸铵+麦麸 <i>S. vulgaris</i> +A. S+wheat bran	2.819	沙地柏+硫酸铵+豆饼+麦麸+鸡粪 <i>S. vulgaris</i> +A. S+bean cake+chook dung+wheat bran	2.395
沙地柏+硫酸铵+鸡粪 <i>S. vulgaris</i> +A. S+chook dung	2.846	沙地柏+硫酸铵+鸡粪+麦麸 <i>S. vulgaris</i> +A. S+chook dung+wheat bran	3.572

2.4 绿色木霉平皿培养配方的优选试验结果

从表 5 可以看出, $R_A>R_C>R_D>R_B$,说明对绿色木霉产孢量影响最大的是沙地柏残渣,其次是鸡粪,影响最小的是麦麸。由于 $A\ K_2>K_1>K_3$, $BK_2>K_1>K_3$, $C\ K_3>K_2>K_1$, $D\ K_1>K_3>K_2$,所以

$A_2B_2C_3D_1$ 为最佳组合,即沙地柏 12 g,麦麸 4 g,鸡粪 3 g,硫酸铵 1 g,即沙地柏:麦麸:鸡粪:硫酸铵的最佳质量组合比例为 12:4:3:1,其产孢量达到 $7.4\times10^9\text{ g}^{-1}$,其次为组合 4 和组合 3,其产孢量分别为 $5.5\times10^9\text{ g}^{-1}$ 和 $1.6\times10^9\text{ g}^{-1}$ 。

表 5 绿色木霉平皿培养基 $L_9(4^3)$ 正交组合试验结果

Table 5 Orthogonal combination $L_9(4^3)$ experiment					
编号 Code	沙地柏(A)/g <i>S. vulgaris</i>	麦麸(B)/g Wheat bran	鸡粪(C)/g Chook dung	硫酸铵(D)/g A. S	产孢量/($\times10^8\text{ g}^{-1}$) Spore density
1	1(11)	1(3)	1(1)	1(1)	3.4
2	1(11)	2(4)	2(2)	2(2)	5.7
3	1(11)	3(5)	3(3)	3(3)	16.0
4	2(12)	1(3)	2(2)	3(3)	55.0
5	2(12)	2(4)	3(3)	1(1)	74.0
6	2(12)	3(5)	1(1)	2(2)	6.1
7	3(13)	1(3)	3(3)	2(2)	5.3
8	3(13)	2(4)	2(2)	3(3)	5.1
9	3(13)	3(5)	1(1)	1(1)	2.9
K_1	8.367	21.233	4.867	26.767	
K_2	45.033	28.267	21.200	5.700	
K_3	4.433	8.333	31.767	25.367	
R	40.600	19.934	26.900	21.067	

2.5 培养箱固体发酵试验结果

试验观察发现,培养箱固体发酵培养 3 d 后,基质中有大量白色菌丝体出现,随着培养时间的推移,菌丝逐渐布满整个基质,基质成团块状。团块表面从第 5 天开始变绿,说明有分生孢子形成。第 8 天产孢量达到最高,此后各材料的产孢量逐渐降低。雷公藤残渣的产孢量最高,达到 $1.43\times10^8\text{ g}^{-1}$,其次为川楝残渣,为 $8.45\times10^7\text{ g}^{-1}$,沙地柏残渣产孢量最低,为 $4.87\times10^7\text{ g}^{-1}$ (图 1)。最佳培养时间为

8~10 d。

2.6 大体量室温固体发酵试验结果

镜检发现,所取样品中含有大量的厚垣孢子,统计时将分生孢子和厚垣孢子合并计算。大体量室温固体发酵培养第 5~8 天,产孢量增加较为缓慢,第 8 天后产孢量增长速度明显加快,第 9 天产孢量达到 $2.9\times10^7\text{ g}^{-1}$ 以上,第 12 天产孢量达到峰值 $3.6\times10^8\text{ g}^{-1}$ (图 2)。在培养后期,厚垣孢子的数量增加明显快于分生孢子。同时发现,分生孢子和厚

垣孢子在培养基中的分布明显不同,分生孢子主要分布在培养基有光照的表层,而厚垣孢子主要分布在培养基的深层(表 6)。

以上结果表明,该复合培养基质完全可以用于绿色木霉制剂的生产,绿色木霉菌孢子培养的最佳时间为 8~12 d。

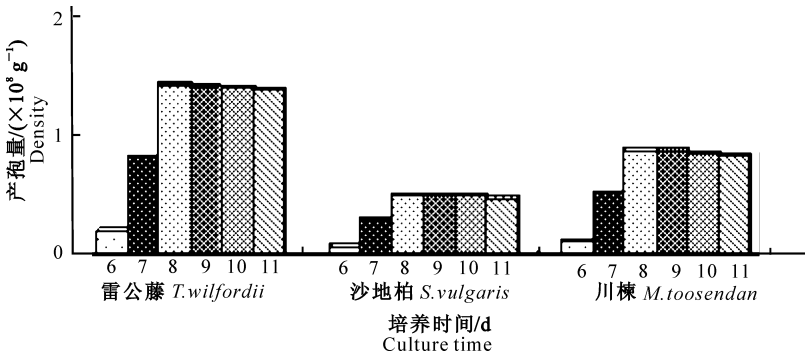


图 1 绿色木霉固体发酵试验结果
 Fig.1 Solid formation experiment

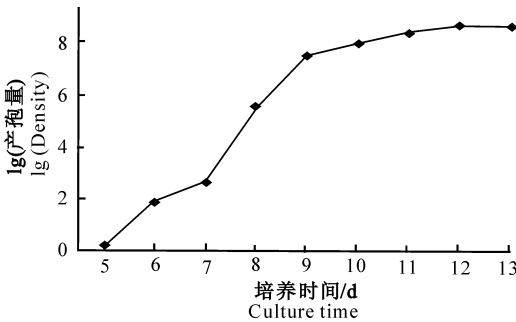


图 2 大体量室温固体发酵产孢量与培养时间的关系
 Fig.2 Spore quantity logarithmic Growth tendency of solid fermentation

表 6 绿色木霉菌分生孢子和厚垣孢子在培养基质中的分布
 Table 6 Distribution of conidium and chlamydospore in medium g⁻¹

部位 Position	分生孢子 Conidium	厚垣孢子 Chlamydospore
基质表层 Surface	1.5×10 ¹⁴	—
基质中心 Center	2.1×10 ²	3.5×10 ⁶
基质底层 Base	1.6×10 ³	4.2×10 ⁵

3 结论与讨论

(1)用植物农药残渣生产绿色木霉制剂是处理植物农药残渣的有效方法之一,符合固体有机废弃物处理的减量化、无害化和资源化的终极目标。绿色木霉能将植物农药残渣中的木质纤维素物质降解成生物可以利用的营养物质,并生成大量的菌丝体和分生孢子及厚垣孢子。因此,该制剂施入土壤中,一方面可以防治一些真菌性土传病害,另一方面具有改良土壤结构和微生物种类结构的作用。

(2)本研究所制备的绿色木霉制剂完全可以用

于农作物病害防治。绿色木霉制剂可以用于叶面喷洒,种子处理,还可以使用到土壤中,对作物种子、根系以及幼苗起到保护作用^[5]。通常使用的孢子浓度达到 10⁵ g⁻¹时,对一些植物真菌病害有明显的防治效果^[16],而本研究所制备的绿色木霉制剂绿霉孢子(分生孢子+厚垣孢子)含量超过了 10⁸ g⁻¹,说明本试验所制备的多功效绿色木霉制剂完全可以用于农作物病害防治。在后续试验中也已得到证实。

(3)以植物农药残渣为材料,采用固体发酵生产绿色木霉制剂的后续工艺非常简单,只需将发酵后的材料晾晒或烘干即可。液体发酵采用的培养基多以淀粉类物质作为发酵培养介质,发酵后通过浓缩喷粉制成孢子粉^[17]。因此,与液体发酵生产的绿色木霉菌制剂相比,利用植物农药残渣,采用固体发酵生产的多功效绿色木霉制剂,生产工艺简单、成本低,而且基质中含有数量可观的厚垣孢子。厚垣孢子耐干燥等不良环境条件的能力较分生孢子强,因此大量的厚垣孢子更有利于制剂的干燥储藏。

利用植物农药残渣固体发酵生产绿色木霉制剂,仍存在很多问题,如发酵过程温度难以控制,且易受到杂菌的污染使产孢量降低等,需要做进一步研究。

[参考文献]

[1] 张一宾. 我国生物农药发展概况及具发展前景的生物农药品种[J]. 山东农药信息, 2007, 4: 14-18.
 Zhang Y B. Bio-pesticide development survey and varieties with prospect for development [J]. Shandong Pesticide News, 2007, 4: 14-18. (in Chinese).
 [2] 高志强, 朱启红. 有机固体废物的生物处理技术研究[J]. 农机

- 化研究,2007,3:216-217.
- Gao Z Q,Zhu Q H. Study on biological treatment process of organic solid wastes[J]. Journal of Agricultural Mechanization Research,2007,3:216-217. (in Chinese)
- [3] 蒋应梯,庄晓伟,王衍彬. 利用农作物秸秆开发生物能源和有机肥初探 [J]. 生物质化学工程,2006,6:51-53.
- Jiang Y T,Zhuang X W,Wang Y B. An initial discussion on developing bio-energy and organic fertilizer from crops straw [J]. Biomass Chemical Engineering,2006,6:51-53. (in Chinese)
- [4] 王成华,丁云桥,肖朝峰,等. 利用纤维质原料生产高酶活单细胞蛋白 [J]. 工业微生物,2001,31 (1):30-33.
- Wang C H,Ding Y Q ,Xiao C F,et al. Production of high enzyme activity SCP from cellulose material [J]. Industrial Microbiology,2001,31(1):30-33. (in Chinese)
- [5] 曲音波. 纤维素乙醇产业化 [J]. 化学进展,2007,19 (7/8):1098-1108.
- Qu Y B. Industrialization of cellulosic ethanol [J]. Progress in Chemistry,2007,19(7/8):1098-1108. (in Chinese)
- [6] 张毅民,杨 静,吕学斌,等. 木质纤维素类生物质酸水解研究进展 [J]. 世界科技研究与发展,2007(1):48-54.
- Zhang Y M,Yang J,Lu X B,et al. Research processes in acid hydrolysis of lignocellulosic biomass [J]. World Sci-Tech R & D,2007(1):48-54. (in Chinese)
- [7] 杨晓宸,卢雪梅,黄 峰. 木质纤维素微生物转化机理研究进展 [J]. 纤维素科学与技术,2007,15(1):52-58.
- Yang X C,Lu X M,Huang F. Advance of lignocelluloses bio-conversion [J]. Journal of Cellulose Science and Technology,2007,15(1):52-58. (in Chinese)
- [8] 孙东平,陈 敏,张小雪,等. 绿色木霉 NUST-996 发酵产纤维素酶的提纯和性质分析 [J]. 南京理工大学学报:自然科学版,2001,25(3):295-298.
- Sun D P,Chen M,Zhang X X,et al. The purification and quality analysis of cellulase from *Trichoderma viride* NUST-996 fermentation[J]. Journal of Nanjing University of Science and Technology:Nature Science Edition,2001,25(3):295-298. (in Chinese)
- [9] 冯培勇,常 迪,杨立红. 一株绿色木霉产纤维素酶的性质研究 [J]. 食品科学,2006,27(12):185-187.
- Feng P Y,Chang D,Yang L H. Properties of cellulase activity from *Trichoderma viride* [J]. Food Science,2006,27(12):185-187. (in Chinese)
- [10] 吴 克,刘 斌,张 洁,等. 绿色木霉木聚糖酶的纯化和性质 [J]. 生物学杂志,2001,18(6):15-16.
- Wu K,Liu B,Zhang J,et al. *Trichoderma viride* xylanase purification and properties [J]. Journal of Biology,2001,18(6):15-16. (in Chinese)
- [11] 徐春厚. 绿色木霉 X-13 株固态发酵产酶优化条件的研究 [J]. 云南农业大学学报,2003,18(3):286-288.
- Xu C H. Studies on the optimum conditions of *Trichoderma viride* X-13 colid state fermentation to produce enzymes [J]. Journal of Yunnan Agricultural University,2003 ,18(3):286-288. (in Chinese)
- [12] 鄢永奇,张素琴. 绿色木霉 T-99 株产纤维素酶的研究 [J]. 应用与环境微生物学报,1999,5:201-203.
- Yan Y Q,Zhang S Q. Studies on the cellulose producer *Trichoderma viride* T-99 [J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology,1999,5:201-203. (in Chinese)
- [13] 葛文中,李 楠. 绿色木霉应用的研究进展 [J]. 黑龙江八一农垦大学学报,2005,17(2):75-78.
- Ge W Z, Li N. The advance of application of *Trichoderma viride* [J]. Journal of Heilongjiang August First Land Reclamation University,2005,17(2):75-80. (in Chinese)
- [14] 杨合同,唐纪华,李纪顺,等. 绿色木霉 LTR-2 菌株的紫外线诱变改良 [J]. 中国生物防治,2004,20(3):182-186.
- Yang H T,Tang J H,Li J S,et al. Improvement of *Trichoderma viride* LTR-2 by ultraviolet mutation [J]. Chinese Journal of Biological Control,2004,20(3):182-186. (in Chinese)
- [15] Mandelsm,Andreotti R,Roche C. Measurement of saccharifying cellulose [J]. Biotechnol Bioeng Symp,1976,6:21-23.
- [16] Harman G E,Chet I,Baker R. Factors affecting *Trichoderma hamatum* applied to seeds as a biocontrol agent [J]. Phytopathology,1981,71:569-572.
- [17] Papavizas G C,Dunn T,Lewis J A. Liguide fermentation technology for experimental production of biocontrol fungi [J]. Phytophology,1984,74:1171-1175.