



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20230176

数字出版日期: 2024-06-21; 数字出版网址: <http://link.cnki.net/urlid/12.1355.N.20240621.1013.001>

棘孢木霉降解纤维素能力评价及其对玉米秸秆的降解效果

王珊珊, 万博文, 王皓郁, 连启睿, 朱振元

(天津科技大学食品科学与工程学院, 天津 300457)

摘要: 秸秆在自然条件下降解速度慢, 容易造成环境污染及资源浪费。为了提高玉米秸秆的还田率和土壤肥力, 本研究利用刚果红染色法、滤纸崩解实验等多种方法对实验室分离鉴定保藏的菌株棘孢木霉 (*Trichoderma asperellum*) ZZY 的降解纤维素能力进行综合评价。结果表明: 棘孢木霉中的羧甲基纤维素酶 (CMCase)、 β -葡萄糖苷酶 (β -Gase) 和滤纸酶 (FPA) 的酶活力分别为 (22.67 ± 1.95) U/mL、 (14.96 ± 1.11) U/mL 和 (14.56 ± 0.79) U/mL。随后利用盆栽实验将其孢子粉制备的可湿性粉剂施用在玉米秸秆上, 与对照组相比, 在 15~120 d 内显著加快了玉米秸秆的降解速度, 菌剂组在 120 d 时达到了最好的降解效果, 玉米秸秆的干质量、半纤维素、纤维素、木质素的降解率分别达到 $(82.87 \pm 5.12)\%$ 、 $(81.96 \pm 5.02)\%$ 、 $(86.75 \pm 4.72)\%$ 、 $(65.11 \pm 6.21)\%$; 土壤中的营养成分也显著提高, 有机质、全氮、有效磷、速效钾的含量分别达到 (30.83 ± 0.22) g/kg、 (3.03 ± 0.12) g/kg、 (21.82 ± 0.13) mg/kg、 (410.30 ± 0.84) mg/kg。这说明棘孢木霉 ZZY 具有良好的降解纤维素的能力, 其制备的可湿性粉剂能有效降解玉米秸秆, 提高秸秆还田率, 提升土壤肥力。

关键词: 棘孢木霉; 玉米秸秆; 纤维素降解; 土壤养分变化

中图分类号: S144.9

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2024)05-0022-09

Evaluation of Cellulose Degradation Ability of *Trichoderma asperellum* and Degradation Effect on Corn Straw

WANG Shanshan, WAN Bowen, WANG Haoyu, LIAN Qirui, ZHU Zhenyuan

(College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The degradation rate of corn straw is slow under natural conditions, which is easy to cause environmental pollution and waste of resources. In order to improve the return rate of corn straw and improve soil fertility, in our current study we used a variety of methods such as Congo red staining method and filter paper disintegration test to comprehensively evaluate the cellulose degradation ability of *Trichoderma asperellum* ZZY, the strain isolated and identified in the laboratory. The results showed the three cellulase including carboxymethylcellulase (CMCase), β -glucosidase (β -Gase) and filter paper enzyme (FPA) produced by *Trichoderma asperellum* were (22.67 ± 1.95) U/mL, (14.96 ± 1.11) U/mL and (14.56 ± 0.79) U/mL respectively. Subsequently, a pot experiment was conducted to apply the hygroscopic powder of *Trichoderma asperellum* to corn straw. The results showed, compared with the control group, that the degradation rate of corn straw accelerated significantly within 15-120 days. After the degradation of 120 days, the dry weight, hemicellulose, cellulose and lignin degradation rates of corn straw reached $(82.87 \pm 5.12)\%$, $(81.96 \pm 5.02)\%$, $(86.75 \pm 4.72)\%$ and $(65.11 \pm 6.21)\%$, respectively. Moreover, the nutrient of soil was also improved significantly, with organic matter, total nitrogen, available phosphorus and available potassium reaching (30.83 ± 0.22) g/kg, (3.03 ± 0.12) g/kg, (21.82 ± 0.13) mg/kg and (410.30 ± 0.84) mg/kg, respectively. The results suggest that *Trichoderma asperellum* ZZY has a good ability to degrade cellulose, and the prepared wettable powder can significantly degrade corn straw and improve the return rate of corn straw.

Key words: *Trichoderma asperellum*; corn straw; cellulose degradation; changes in soil nutrients

收稿日期: 2023-09-25; 修回日期: 2024-01-22

基金项目: 天津市重点研发计划项目 (20YFZCSN00210)

作者简介: 王珊珊 (1999—), 女, 山东人, 硕士研究生; 通信作者: 朱振元, 教授, zhuazhu@tust.edu.cn

引文格式:

王珊珊, 万博文, 王皓郁, 等. 棘孢木霉降解纤维素能力评价及其对玉米秸秆的降解效果[J]. 天津科技大学学报, 2024, 39(5): 22-30.

WANG S S, WAN B W, WANG H Y, et al. Evaluation of cellulose degradation ability of *Trichoderma asperellum* and degradation effect on corn straw[J]. Journal of Tianjin university of science and technology, 2024, 39(5): 22-30.

秸秆是小麦、玉米等多种农作物在种植过程中产生的副产物。我国每年大约会产生 7~8 亿吨秸秆, 随着近年来秸秆禁止焚烧的政策不断推广以及秸秆高效利用研究的增多, 2021 年我国秸秆综合利用率已达到 88.1%, 其中占比最大的利用方式是秸秆还田^[1]。秸秆还田不仅能够有效解决农业废弃物污染的问题, 而且能增加土壤中有有机碳、有机氮、钾等成分的含量^[2]。但是, 目前我国秸秆还田的主要方式仍是直接还田, 鉴于秸秆由纤维素、半纤维素、木质素等大分子物质组成, 它们易结合形成晶体致密结构^[3-4]。这导致在自然条件下秸秆长时间难以降解, 直接还田效率低, 因此提高秸秆中纤维素、木质素的降解率是关键。

与传统化学物理方法相比, 微生物法处理具有成本低、反应温和、过程绿色等优点^[5-6]。自然界存在多种可产纤维素酶的微生物, 较为典型的有木霉属、青霉属、曲霉属等真菌和芽孢杆菌属等细菌以及放线菌, 可以利用这些微生物加速秸秆的降解^[7-8]。目前木霉属真菌是公认产纤维素酶最高的菌种之一^[9], 被广泛应用到秸秆还田研究中。Chen 等^[10]在产酶最优条件下, 先在稻草上接种黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) 培养 4 d, 再接种绿色木霉 (*Trichoderma viride*) 培养 4 d, 稻草中木质素和纤维素的降解率分别达到 26.38% 和 33.29%, 表明绿色木霉和黄孢原毛平革菌具有较好的降解纤维素能力。Wang 等^[11]发现用棘孢木霉 (*Trichoderma asperellum*) T-1 降解不同农业废弃物时的滤纸酶活力及多种酶的酶活力均优于里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) QM6a, 对于农业废弃物的降解效果更好。随着研究的不断深入, 菌剂降解秸秆后土壤养分、土壤酶、土壤微生物群落的研究也越来越多。黄亚丽等^[12]筛选获得一株在低温下能降解秸秆的长枝木霉 (*Trichoderma longibrachiatum*) 菌株, 接种 15 d 和 45 d 时的秸秆降解率分别为 43.89% 和 56.73%, 且经测定土壤中土壤全氮、碱解氮、有效磷、速效钾等指标都显著高于空白对照。常洪艳等^[13]的研究表明, 施用菌剂能明显加快秸秆的降解, 且处理后土壤的碱解氮、速效磷、有机质、速效钾、硝态氮等随着培养时间

的增加均呈现稳定上升趋势。

以上研究表明木霉属真菌普遍具有较好的纤维素降解能力, 因此对木霉属真菌进行纤维素降解方向的研究具有可行性。前期本课题组从土壤中筛选到一株新菌, 结合 ITS rDNA 序列同源性分析方法鉴定其为棘孢木霉 (*Trichoderma asperellum*)^[14]。本研究对该株棘孢木霉降解纤维素的能力进行评价, 并将其孢子粉制备的可湿性粉剂及配制的营养包^[15]应用到土壤里玉米秸秆的降解中, 测定其在土壤中的降解效果及对土壤养分的影响, 旨在为高效降解秸秆提供菌株资源和技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与原料

棘孢木霉 (*Trichoderma asperellum*) 菌株为实验室成员从土壤中分离获得, 并通过纯化培养进行观察, 结合 ITS rDNA 序列同源性分析方法鉴定为棘孢木霉 (*Trichoderma asperellum*), 现保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏号 12071。

米糠、麦麸购自河南省商丘市农郊; 玉米秸秆取自山东省菏泽市农田; 土壤取自天津市宝坻区郊区农田, 供试土壤基本理化性质见表 1。

表 1 供试土壤基本理化性质

Tab. 1 Basic physical and chemical properties of tested soil

有机质含量/ (g·kg ⁻¹)	全氮含量/ (g·kg ⁻¹)	有效磷含量/ (mg·kg ⁻¹)	速效钾含量/ (mg·kg ⁻¹)	pH
23.38 ± 0.25	1.82 ± 0.03	10.59 ± 0.24	306.80 ± 2.13	7.36 ± 0.01

1.1.2 培养基

主要培养基: PDA 培养基、PDB 培养基、羧甲基纤维素培养基、赫奇逊氏培养基、发酵产酶培养基参照文献^[16-17]配制。

真菌液体产酶培养基 (g/L): 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 5, (NH₄)₂SO₄ 1.4, KH₂PO₄ 2, MgSO₄·7H₂O 0.3, FeSO₄·7H₂O 0.005, MnSO₄ 0.001 6, CaCl₂ 0.3, ZnSO₄·7H₂O 0.001 4, CoCl₂ 0.002, pH 7.0。

固体发酵培养基:米糠与麸皮的质量比为 2:3, 每个培养盒中米糠 40 g、麸皮 60 g; 配制营养液, 其中蔗糖 1.5%、蛋白胨 1%、硫酸锌 2‰; 营养液按加水量 75% 加入米糠麸皮中, 搅拌均匀, 装入密封袋中, 用棉塞封口。

1.1.3 试剂与仪器

酒石酸钾钠、蛋白胨, 北京奥博星生物技术有限公司; 3,5-二硝基水杨酸、苯酚、蔗糖、无水氯化钙、结晶氯化镁, 天津北方天医化学试剂厂; 磷酸氢二钠、磷酸二氢钾, 天津鼎国生物技术有限责任公司; 刚果红、无水葡萄糖、硫酸铵、氯化钠、硫酸镁、硫酸锌、硫酸亚铁、水杨苷、柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, 天津市江天化工技术有限公司; 十二烷基硫酸钠、乙二胺四乙酸(EDTA)、硼酸钠、乙二醇单乙醚, 国药集团化学试剂有限公司; 羧甲基纤维素钠(97%), 上海毕得医药科技股份有限公司。

TGL-16B 型台式离心机、TGL-160-A 型冷冻离心机, 上海安亭科学仪器厂; ESJ205-4 型电子天平, 沈阳龙腾电子称量仪器有限公司; SP-2102UV 型紫外-可见分光光度计, 上海光谱仪器有限公司; SU1510 型扫描电子显微镜, 日本日立公司; 900T 型原子吸收分光光度, PE 公司; SPX-150BSH 型生化培养箱, 上海新苗医疗器械制造有限公司; PB-10 型 pH 计, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司。

1.2 棘孢木霉 ZZY 菌株降解纤维素能力评价

1.2.1 刚果红实验

挑取驯化后的棘孢木霉 ZZY 菌株, 接种到羧甲基纤维素钠固体培养基的中心, 在恒温培养箱中 26 °C 倒置培养 3 d, 分别于 1~4 d 取样; 用 10 mL 刚果红溶液染色 30 min, 倒掉染色液后, 用 1 mol/L NaCl 溶液洗涤 45 min 并多次冲洗, 记录透明圈直径及菌落直径, 并计算透明圈直径与菌落直径的比值^[18]。

1.2.2 滤纸崩解实验

将羧甲基纤维素固体培养基上培养的棘孢木霉孢子刮下, 梯度稀释至 7.8×10^6 CFU/mL, 制成菌悬液备用。制备羧甲基纤维素液体培养基, 每瓶接入 5 mL 菌悬液, 26 °C、160 r/min 恒温振荡培养 3 d。培养结束后, 吸取 5 mL 菌液, 接入制备好的赫奇逊氏培养基中, 在 26 °C、160 r/min 条件下恒温振荡培养, 分别于 1、3、6、9、12 d 观察滤纸降解情况^[19]。

1.2.3 纤维素酶的酶活力测定

葡萄糖标准曲线的绘制: 取 9 支洁净试管, 编号

0~8。配制 1 mg/mL 葡萄糖标准溶液, 稀释成 0~0.8 mg/mL 梯度质量浓度的葡萄糖溶液。取 3 mL 各质量浓度的葡萄糖溶液置于对应试管中, 加 1.5 mL DNS 显色剂, 沸水浴 10 min 后立即用冷水终止反应, 用蒸馏水定容至 25 mL, 以 0 号试管作为空白对照调零, 在 540 nm 波长处测定溶液的吸光度。

粗酶液的制备: 分别吸取 5 mL 羧甲基纤维素液体培养基中培养的菌液, 将其接入真菌液体产酶培养基中培养, 在 1~7 d 取样, 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min, 所得上清液即为粗酶液。采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定羧甲基纤维素酶(CMCase)^[20]、 β -葡萄糖苷酶(β -Gase)、滤纸酶(FPA)的酶活力^[21-22]。

酶活力单位(U)定义: 在 50 °C、pH 4.8 条件下, 每分钟从底物溶液中分解产生 1 μ mol 还原糖所需要的酶量为 1 个酶活力单位。

1.3 棘孢木霉可湿性粉剂的制备

1.3.1 棘孢木霉固态发酵

取活化好的棘孢木霉菌株, 用无菌水制成孢子浓度为 4×10^8 CFU/mL 的菌悬液。按 2% 接种量将菌悬液接种到 100 mL PDB 培养基中, 26 °C、160 r/min 振荡培养 2 d, 得到种子液备用。

棘孢木霉的固体发酵: 配制固体发酵培养基, 121 °C 高压灭菌 20 min。将种子液按 17.5% 的接种量接种到灭菌后的固体发酵培养基中, 将培养盒封口后, 置于 26 °C 下恒温光照培养 7~9 d, 在培养过程中每 3 d 翻动一次。待发酵完全后, 撤去密封袋, 自然风干 3~4 d。

1.3.2 棘孢木霉孢子粉的收获

用超微粉碎机将风干后的棘孢木霉固体发酵产物进行粉碎, 振荡筛分过 200 目筛, 即得到棘孢木霉孢子粉。

1.3.3 棘孢木霉可湿性粉剂的复配

经过前期单因素实验筛选载体的种类, 正交实验优化载体配比, 得到孢子萌发率最高时的可湿性粉剂的配方^[15]。按照配方进行配制, 将各组分混合均匀后, 装入不透光铝箔袋, 密封包装, 制成棘孢木霉可湿性粉剂。

1.4 棘孢木霉可湿性粉剂的稳定性实验

PDB 培养基每瓶 100 mL, 灭菌后接入 0.01 g 棘孢木霉孢子粉, 在振荡培养箱中 26 °C、160 r/min 培养 16 h, 在显微镜下观察萌发情况, 芽管长度大于孢子直径即视为孢子萌发, 实验设置 3 组重复, 计算平均值。已萌发的孢子数占孢子总数的百分比即为孢

子萌发率。

将棘孢木霉可湿性粉剂分别在常温和 4℃下保存,在4个月、8个月、12个月时测定孢子萌发率,从而确定其萌发稳定性。

1.5 棘孢木霉可湿性粉剂对玉米秸秆的降解

1.5.1 棘孢木霉可湿性粉剂对玉米秸秆降解能力初测

称取磨碎过筛的 5 g 玉米秸秆代替真菌液体产酶培养基中的羧甲基纤维素作为碳源,对棘孢木霉可湿性粉剂的酶活力进行测定,推断其降解玉米秸秆的能力。

葡萄糖标准曲线绘制、粗酶液的制备方法与 1.2.3 节中的方法相同。采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定羧甲基纤维素酶^[20]、β-葡萄糖苷酶、滤纸酶的酶活力^[21-22]。

1.5.2 棘孢木霉可湿性粉剂降解玉米秸秆效果评价

秸秆与土壤的准备:选取粗细相近的玉米秸秆,将其裁剪成 3~5 cm 的小段,烘干后放在干燥器中保存,将处理后的秸秆称取 2 g 分别装入 15 cm×10 cm 的 40 目尼龙网袋中。将土壤在自然条件下晾干,准确称量,每个花盆放入 4 kg 土样,保持土壤含水量,稳定 7 d 后备用。

实验组设计:A组为 0.5 g 菌剂+100 mL 无菌水,B组 0.5 g 菌剂+100 mL 营养液,C组为营养液,D组为蒸馏水;分别量取 10 mL 均匀喷洒至 2 g 秸秆上,尼龙袋扎紧,将其深埋到花盆中 5~8 cm 处,保持土壤持水量,分别于 15、30、60、120 d 取样。每个处理重复 3 次。

1.5.3 秸秆干质量及纤维素、半纤维素、木质素降解率的测定

采用 Van Soest 洗涤法^[23-24]测定降解前后玉米秸秆的干质量、纤维素、半纤维素、木质素的降解率。

(1)将样品加入装有中性洗涤剂的三角瓶中,放入 100℃高压锅中,持续 50 min,取出过滤,蒸馏水洗涤滤渣 pH 至 6.5~7。用 95%乙醇、无水乙醇和丙酮各洗涤 2 次,秸秆烘干,质量记为 m_{G0} 。以未经降解的秸秆为空白对照,质量记为 m_0 。秸秆干质量降解率(R_1)按照式(1)计算。

$$R_1 = \frac{m_0 - m_{G0}}{m_0} \times 100\% \quad (1)$$

(2)剩余秸秆干样放入三角瓶中,加入 70 mL 2 mol/L 盐酸,摇匀,重复操作(1)后,样品烘干,质量记为 m_{G1} 。以未经降解且经过步骤(1)处理的秸秆为空白对照,质量记为 m_1 。半纤维素降解率(R_2)按照式

(2)计算。

$$R_2 = \frac{m_{G0} - m_{G1}}{m_0 - m_1} \times 100\% \quad (2)$$

(3)上步残余干样放入三角瓶中,加入 10 mL 72%的硫酸,摇匀后静置 4 h,加入 90 mL 蒸馏水,静置 12 h。蒸馏水洗涤 pH 至 6.5,烘干,质量记为 m_{G2} 。以未经降解且经过步骤(1)和(2)处理的秸秆为空白对照,质量记为 m_2 。纤维素降解率(R_3)按照式(3)计算。

$$R_3 = \frac{m_{G1} - m_{G2}}{m_1 - m_2} \times 100\% \quad (3)$$

(4)用马弗炉 550℃灰化残余干样,4 h 后取出冷却,灰分质量记为 m_{G3} 。以未经降解且经过步骤(1)、(2)、(3)处理的秸秆为空白对照,灰分质量记为 m_3 。木质素降解率(R_4)按照式(4)计算。

$$R_4 = \frac{m_{G2} - m_{G3}}{m_2 - m_3} \times 100\% \quad (4)$$

1.5.4 扫描电子显微镜观察

对 B 组在不同时间点取出的样品以及未经处理的玉米秸秆进行扫描电子显微镜观察,从玉米秸秆降解前后的结构变化分析其组织降解情况。

1.6 土壤营养成分含量变化

土壤理化性质测定方法:土壤有机质、全氮含量参照 NY/T 1121.6—2006^[25]进行测定,速效钾含量参照 NY/T 889—2004^[26]中性乙酸铵溶液浸提-火焰光度计法进行测定,有效磷含量参照 NY/T 1121.7—2014^[27]进行测定,pH 参照 NY/T1377—2007^[28]进行测定。

1.7 数据处理

使用 DPS 9.5.0 软件进行数据分析,用 Duncan 新复极差法进行多重比较。结果以“平均值±标准差”表示,不同字母表示组间差异显著($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 棘孢木霉降解纤维素能力评价

2.1.1 刚果红实验结果

对 1~3 d 的菌落直径和透明圈直径进行测量,菌落直径和透明圈直径的比值分别为 2.42、3.86、3.89,由此可初步判断,棘孢木霉 ZZY 菌株具有一定的纤维素降解能力。

2.1.2 滤纸崩解实验结果

滤纸条完全崩解所需的时间可反映菌株降解纤维素能力的高低^[29]。菌株培养 3~15 d 滤纸条形态变

化如图 1 所示。

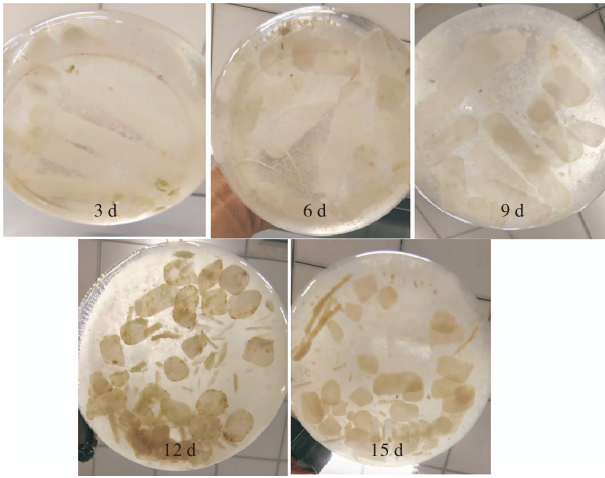


图 1 菌株培养 3 ~ 15 d 滤纸条形态变化

Fig. 1 Morphological changes of filter strips after strain cultured 3-15 days

由图 1 可以观察到在培养 3 d 时,滤纸条的边缘开始出现破损,开始有菌丝体附着;培养 6 d 时,滤纸条边缘降解明显,培养基中出现菌丝体;到 9 d 时,部分滤纸条断裂,呈短条状,培养基逐渐浑浊;12 d 时,滤纸条全部断裂成小段,呈深黄色,部分滤纸条降解为糊状;培养 15 d 时,大量滤纸条降解为糊状,培养基浑浊呈黄褐色,菌丝体生长显著。这进一步证明棘孢木霉 ZZY 菌株能够降解纤维素,可应用于后期秸秆降解的研究。

2.1.3 棘孢木霉 ZZY 产纤维素酶的酶活力

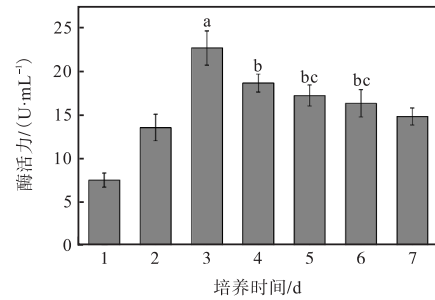
绘制葡萄糖标准曲线,其拟合方程为 $y = 1.423 6x + 4 \times 10^{-5}$, 决定系数 $R^2 = 0.999$, 符合使用标准要求,可用于后续酶活力测定实验。不同培养时间棘孢木霉产酶的酶活力变化如图 2 所示。

由图 2 可知,在 7 d 内,棘孢木霉产 3 种酶均呈先上升后下降的趋势,且 3 种酶的酶活力在培养 3 d 时与其他培养时间酶活力有显著差别,其中羧甲基纤维素酶(CMCCase)酶活力最高为 $(22.67 \pm 1.95) \text{ U/mL}$, β -葡萄糖苷酶(β -Gase)酶活力最高为 $(14.96 \pm 1.11) \text{ U/mL}$, 滤纸酶(FPA)酶活力最高为 $(14.56 \pm 0.79) \text{ U/mL}$ 。这证明棘孢木霉 ZZY 菌株具有良好的产纤维素酶的能力,有利于后续秸秆降解研究。

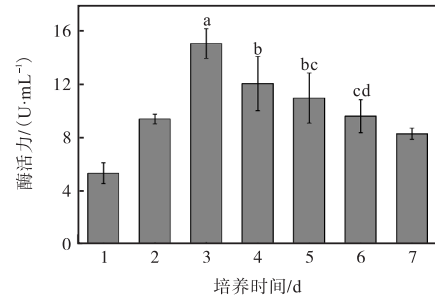
2.2 棘孢木霉可湿性粉剂的稳定性评价

经过 12 个月的检测,在 20 °C 条件下,棘孢木霉可湿性粉剂的孢子萌发率在 4 个月、8 个月、12 个月时均高于棘孢木霉孢子粉,放置 12 个月后菌剂的孢子萌发率仍保持在 $(94.67 \pm 1.24)\%$, 而孢子粉的萌发

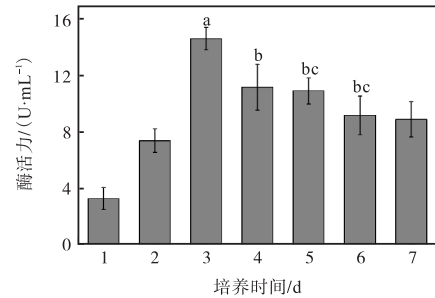
率降至 $(88.33 \pm 2.01)\%$ 。在 4 °C 条件下,孢子萌发更加稳定,棘孢木霉可湿性粉剂的孢子萌发率仍高于棘孢木霉孢子粉,放置 12 个月后菌剂的孢子萌发率为 $(95.67 \pm 1.52)\%$, 孢子粉的萌发率降至 $(91.33 \pm 1.73)\%$ 。结果表明,棘孢木霉可湿性粉剂能够更好地保障孢子的萌发,延长货架期。



(a) CMCCase



(b) beta-Gase



(c) FPA

图 2 不同培养时间棘孢木霉产酶的酶活力变化

Fig. 2 Changes in *Trichoderma asperellum* activity on different culture days

2.3 玉米秸秆的降解效果应用研究

2.3.1 棘孢木霉可湿性粉剂降解玉米秸秆能力评价

将真菌液体产酶培养基中的碳源换成玉米秸秆,测定在发酵过程中纤维素酶的变化可推测其对玉米秸秆的降解能力。不同培养时间棘孢木霉可湿性粉剂的酶活力如图 3 所示。相比于真菌液体产酶培养基,在以玉米秸秆作为培养基时,3 种酶的酶活力均明显上升,其中羧甲基纤维素酶(CMCCase)的酶活力

在 2 d 时达到最高值, 为 (45.61 ± 1.27) U/mL, 增加约 1 倍; β -葡萄糖苷酶 (β -Gase) 的酶活力在 4 d 时达到最高值, 为 (17.17 ± 1.34) U/mL, 提高约 15%; 滤纸酶 (FPA) 的酶活力在 4 d 达到最高值, 为 (25.32 ± 1.84) U/mL, 提高约 74%。这表明棘孢木霉可湿性粉剂在以玉米秸秆为基质情况下产酶能力提高, 推测其能较好地降解玉米秸秆, 可将该菌剂用于后续玉米秸秆降解实验。

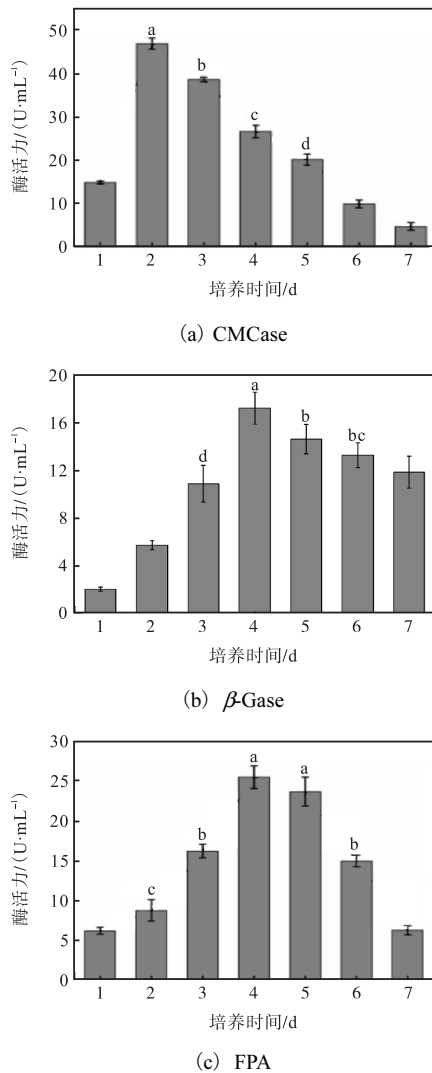


图3 不同培养时间棘孢木霉可湿性粉剂的酶活力

Fig. 3 Enzyme activity of *Trichoderma asperellum* wettable powder for different culture days

2.3.2 玉米秸秆干质量变化

玉米秸秆干质量变化如图 4 所示。由图 4 可知, 各组降解率在 15 ~ 30 d 内增长最快, B 组的干质量降解率明显高于其他 3 组, 在 30 d 时干质量降解率已经达到 $(65.03 \pm 2.86)\%$, 而作为对照 D 组干质量降解率仅为 $(46.80 \pm 4.37)\%$ 。这与杨艳铭^[30]的研究

结果类似, 其制备的复合菌剂加入水稻秸秆中进行 40 d 室外降解, 其秸秆干质量降解率快速升高, 40 d 时降解率为 63.83%, 略低于本实验结果。这说明本研究中菌剂能够有效增强玉米秸秆降解效果。在 120 d 时, B 组玉米秸秆干质量降解率为 $(82.87 \pm 5.12)\%$, 优势明显, 说明加入营养物质能够有效激活棘孢木霉孢子的萌发, 从而提高秸秆的降解速度。

此外有研究^[31]表明添加外源有机物可促进土壤中微生物对土壤中有机的降解, 这可以解释研究中 C 组干质量降解率高于对照 D 组的现象。

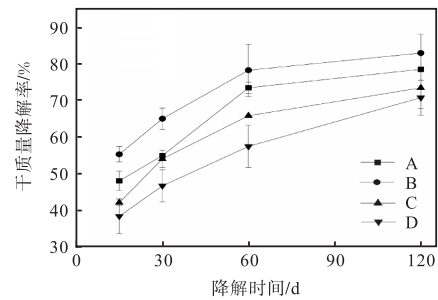


图4 玉米秸秆干质量变化

Fig. 4 Changes in dry weight of corn straw

2.3.3 半纤维素含量变化

玉米秸秆中半纤维素降解率如图 5 所示。

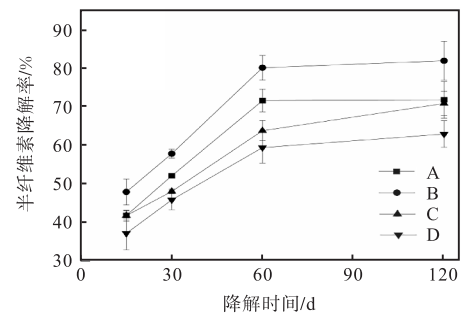


图5 玉米秸秆中半纤维素降解率

Fig. 5 Degradation rate of hemicellulose in corn straw

在前 60 d 降解过程中, A 组、B 组、C 组、D 组半纤维素的降解率均呈上升趋势, 其中 B 组的半纤维素降解率始终高于 A 组、C 组、D 组, 在 60 d 时分别达到 $(80.16 \pm 3.18)\%$ 、 $(71.63 \pm 2.94)\%$ 、 $(60.83 \pm 2.60)\%$ 和 $(59.44 \pm 4.02)\%$ 。在 120 d 时, B 组玉米秸秆中半纤维素降解率为 $(81.96 \pm 5.02)\%$, 在 60 ~ 120 d 的降解过程中, 各组对半纤维素的降解率没有显著提升, 趋于稳定。宋志伟等^[32]在研究中将 3 种市售菌剂作用于秸秆与果皮混合垃圾, 得到了与本研究相似的结果, 在 45 d 的降解过程中, 半纤维素降解率

先快速上升,后趋于稳定,其中 VT1000 菌剂降解效果最好,降解率为 60.09%。

2.3.4 纤维素含量变化

玉米秸秆中纤维素降解率如图 6 所示。根据图 6 可知,在全部降解过程中,各组分纤维素降解速率始终为 B>A>C>D;在 30 d 时纤维素降解率差异显著,加入菌剂的 B 组和 A 组降解率已达 (68.47 ± 4.18)%、(64.87 ± 3.43)% ,而 D 组降解率仅为 (50.42 ± 4.67)% ;随降解时间增加,各组分降解率差距缩小,在 120 d 时, B 组玉米秸秆中纤维素降解率为 (86.75 ± 4.72)% ,各组差距不大,均已达到 80%。与本研究结果类似,魏蔚等^[33]将其研制的复合菌剂与市售的腐熟菌剂进行对比,在降解的前 30 d 纤维素降解率升高迅速,在 60 d 时降解率分别达 56.57%和 49.53%。这说明施用菌剂对于秸秆中纤维素的降解有明显效果,尤其是在降解过程早期,可显著加快纤维素的降解,加快秸秆还田的速度。

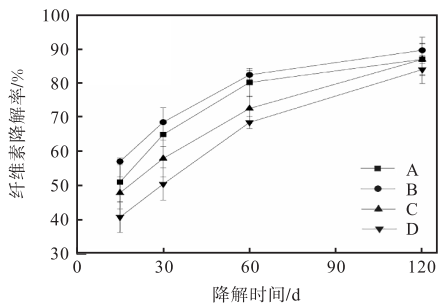


图 6 玉米秸秆中纤维素降解率

Fig. 6 Cellulose degradation rate in corn straw

2.3.5 木质素含量变化

玉米秸秆中木质素降解率如图 7 所示。

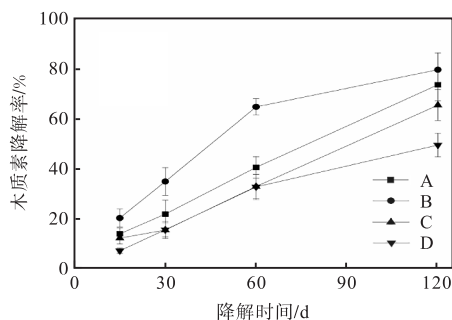


图 7 玉米秸秆中木质素降解率

Fig. 7 Lignin degradation rate in corn straw

对图 7 分析可知,木质素作为秸秆中最难降解的成分^[34],其降解速度要明显慢于半纤维素和纤维素。与秸秆中其他成分相同,在实验过程中,加入了营养

包的 B 组降解率始终高于 A 组、C 组、D 组,这在前 60 d 的早期降解中尤为明显。经测定在 60 d 时 B 组降解率达到 (64.42 ± 3.27)% ,显著高于 A 组的 (40.21 ± 10.29)%、C 组的 (32.54 ± 4.85)%和 D 组的 (32.36 ± 5.73)%。在 120 d 时, B 组玉米秸秆中木质素降解率最高,为 (65.11 ± 6.21)%。这再次证明了施用棘孢木霉可湿性粉剂对于秸秆降解的良好效果。在魏蔚等^[33]的研究中,木质素降解速度同样较慢,经过 120 d 的降解,加入的菌剂对于木质素的降解率最高,为 43.61%。

2.3.6 扫描电子显微镜观察玉米秸秆结构变化

在扫描电子显微镜下观察未处理的玉米秸秆和 B 组在不同降解时间的玉米秸秆,如图 8 所示。

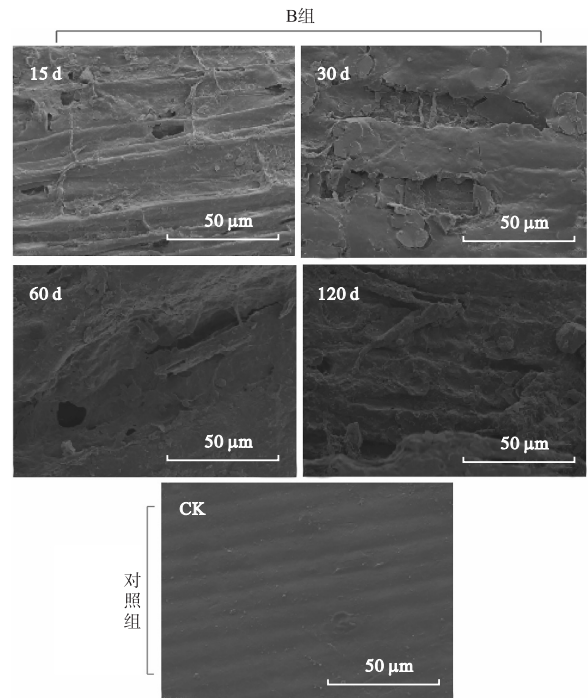


图 8 B 组和未经处理组玉米秸秆的 SEM 图

Fig. 8 SEM plot of corn stover in the B group and the untreated group

未经处理的玉米秸秆表面完整,结构排列紧密且无明显破损,纤维组织条纹清晰有序,无明显孔隙。B 组降解 15 d 后,玉米秸秆的结构仍较为完整,但已经出现明显的破损,结构不再致密,表面出现纤维素和半纤维素的溶出物,且出现少量孔隙;降解 30 d 后,玉米秸秆结构破坏显著,纹理破碎加深,表面粗糙,溶出物开始增多,出现碎片化结构,孔隙加深;降解 60 d 后,玉米秸秆已无成形的排列结构,孔隙很深,结构边缘柔软出现卷曲;降解 120 d 后,结构已经柔软,呈卷曲散乱状,大部分纤维素、半纤维素

和木质素结构已经被降解,失去结构支撑,这证明棘孢木霉可湿性粉剂对玉米秸秆降解效果较好。

2.4 施用棘孢木霉可湿性粉剂降解玉米秸秆后土壤的变化

不同处理对盆栽中土壤理化性质的影响见表 2。由表 2 可知有机质含量在降解过程中一直呈上升趋势,而 B 组在整个降解过程中都显著优于未处理对照组和其他处理组,在 120 d 时达到最优值(30.83 ± 0.22)g/kg。全氮在含量降解过程中呈上升趋势,在 15~30 d 内各组间全氮含量差异明显,A 组、B 组土壤全氮量显著高于其他两组,而在后期各组之间差异不显著,在 120 d 时 B 组土壤全氮含量最高,为(3.03 ± 0.12)g/kg。对于土壤中有效磷含量,B 组和 A 组在降解过程对于其含量的增加效果显著优于 C 组、D 组,B 组 120 d 时有效磷含量达到(21.82 ± 0.13)

mg/kg,提高约 106.04%。在整个降解过程中,B 组速效钾含量一直显著高于其他各组,120 d 时速效钾含量为(410.30 ± 0.84)mg/kg,增加约 33.98%。将 4 组数据对比可知,施用了营养物质激活剂和菌剂的 B 组能更好地对玉米秸秆进行降解,持续增加土壤养分含量。

土壤经过处理后,除了各种营养物质含量发生改变,其 pH 也会发生一定的变化。有研究表明加入混合菌剂后,土壤的 pH 会由于初期降解产生大量的有机酸和 CO₂ 而下降,而后随着时间的延长,微生物分解蛋白质等有机物质,产生 NH₃,土壤 pH 又回升并逐渐稳定^[35-36]。这与实验中 A 组、B 组、C 组 pH 在降解初期略有下降,而在后期 pH 上升,后趋于稳定的变化趋势一致,D 组在降解过程中 pH 变化较大。

表 2 不同处理对盆栽中土壤理化性质的影响

Tab. 2 Effects of different treatments on soil physicochemical properties in potted plants

时间/d	处理	有机质含量/(g·kg ⁻¹)	全氮含量/(g·kg ⁻¹)	有效磷含量/(mg·kg ⁻¹)	速效钾含量/(mg·kg ⁻¹)	pH
15	未处理	23.38 ± 0.25 ^c	1.82 ± 0.03 ^c	10.59 ± 0.24 ^c	306.80 ± 2.13 ^c	7.36 ± 0.01 ^b
	A	24.52 ± 0.13 ^b	2.03 ± 0.07 ^{abc}	14.11 ± 0.30 ^{ab}	356.50 ± 0.43 ^c	7.20 ± 0.00 ^d
	B	27.37 ± 1.01 ^a	2.31 ± 0.14 ^a	15.10 ± 0.52 ^a	374.00 ± 0.58 ^a	7.31 ± 0.02 ^c
	C	25.57 ± 0.87 ^{bc}	2.19 ± 0.32 ^{ab}	13.63 ± 0.47 ^b	359.70 ± 1.43 ^b	7.22 ± 0.01 ^d
	D	24.32 ± 0.23 ^c	1.98 ± 0.11 ^{bc}	13.14 ± 1.2 ^b	320.20 ± 1.21 ^d	7.78 ± 0.04 ^a
30	未处理	23.38 ± 0.25 ^c	1.82 ± 0.03 ^a	10.59 ± 0.24 ^c	306.80 ± 2.13 ^d	7.36 ± 0.01 ^a
	A	25.01 ± 1.12 ^b	2.34 ± 0.34 ^{ab}	16.47 ± 0.64 ^b	365.40 ± 0.34 ^b	7.01 ± 0.00 ^b
	B	28.13 ± 0.06 ^a	2.49 ± 0.08 ^a	18.33 ± 1.72 ^a	383.80 ± 0.21 ^a	7.38 ± 0.02 ^a
	C	25.16 ± 0.43 ^b	2.39 ± 0.17 ^{ab}	16.24 ± 0.07 ^b	364.90 ± 1.86 ^b	7.00 ± 0.01 ^b
	D	24.91 ± 0.75 ^b	2.11 ± 0.14 ^{bc}	14.83 ± 0.55 ^b	327.30 ± 1.03 ^c	6.95 ± 0.03 ^c
60	未处理	23.38 ± 0.25 ^c	1.82 ± 0.03 ^b	10.59 ± 0.24 ^c	306.80 ± 2.13 ^d	7.36 ± 0.01 ^a
	A	27.31 ± 1.29 ^b	2.67 ± 0.23 ^a	17.59 ± 0.35 ^{ab}	375.60 ± 0.51 ^b	7.03 ± 0.02 ^b
	B	30.20 ± 2.21 ^a	2.77 ± 0.15 ^a	19.61 ± 1.32 ^a	396.40 ± 0.63 ^a	7.40 ± 0.04 ^a
	C	27.62 ± 0.35 ^b	2.61 ± 0.63 ^a	17.86 ± 1.76 ^a	373.80 ± 0.37 ^b	7.00 ± 0.00 ^{bc}
	D	26.10 ± 0.34 ^b	2.37 ± 0.17 ^{ab}	15.69 ± 0.84 ^b	354.40 ± 1.13 ^c	6.96 ± 0.02 ^c
120	未处理	23.38 ± 0.25 ^c	1.82 ± 0.03 ^b	10.59 ± 0.24 ^c	306.80 ± 2.13 ^c	7.36 ± 0.01 ^b
	A	28.55 ± 0.81 ^b	2.84 ± 0.18 ^a	18.79 ± 0.26 ^b	385.20 ± 0.56 ^b	7.26 ± 0.03 ^c
	B	30.83 ± 0.22 ^a	3.03 ± 0.12 ^a	21.82 ± 0.13 ^a	410.30 ± 0.84 ^a	7.41 ± 0.01 ^a
	C	28.64 ± 1.57 ^b	2.80 ± 0.34 ^a	18.70 ± 0.56 ^b	376.90 ± 0.24 ^d	7.25 ± 0.03 ^c
	D	27.79 ± 0.62 ^b	2.69 ± 0.07 ^a	17.99 ± 1.04 ^b	379.40 ± 1.67 ^c	7.21 ± 0.02 ^d

3 结 语

本研究对实验室前期在农田土壤中分离筛选到的棘孢木霉产纤维素酶的能力进行了综合评价,测得该菌株刚果红实验菌落直径与透明圈直径比值最大为 3.89,15 d 内对滤纸崩解较完全,羧甲基纤维素酶、β-葡萄糖苷酶、滤纸酶的酶活力在 3 d 时均达到最大值,分别为 (22.67 ± 1.95)U/mL、(14.96 ± 1.11)U/mL 和 (14.56 ± 0.79)U/mL,表明棘孢木霉

ZZY 具有良好的产纤维素酶的能力。

将棘孢木霉的孢子粉制成的可湿性粉剂配合营养激活包应用到玉米秸秆降解中,结果表明该粉剂与营养激活包配合施用对于玉米秸秆降解效果良好,在 120 d 时降解率达到最高,干质量、半纤维素、纤维素、木质素的降解率分别达到 (82.87 ± 5.12)%、(81.96 ± 5.02)%、(86.75 ± 4.72)%、(65.11 ± 6.21)%,表明棘孢木霉可湿性粉剂对于秸秆的降解效果较好。经测定,施用该菌剂后土壤的养分、pH 也发生了

变化,施用菌剂组土壤中的有机质、全氮、有效磷、速效钾含量在降解过程中的增长速度均比未施用组快,且在 120 d 时其含量均高于未施用组;施用菌剂组 pH 呈先上升后下降再趋于平稳的趋势,而未施用组 pH 波动较大。这说明施用菌剂可加快玉米秸秆的降解,从而提高土壤肥力,且具有一定的稳定土壤 pH 的作用。本研究所使用的棘孢木霉菌株降解纤维素的能力良好,降解玉米秸秆的效果显著,可为秸秆高效降解提供菌种资源和应用参考。

参考文献:

- [1] 石祖梁,贾涛,王亚静,等. 我国农作物秸秆综合利用现状及焚烧碳排放估算[J]. 中国农业资源与区划, 2017, 38(9): 32-37.
- [2] 于美婷,李春雅,李华泰,等. 秸秆还田对土壤理化性质影响的研究进展[J]. 江西农业学报, 2021, 33(1): 33-39.
- [3] HAVE R T, TEUNISSEN P J M. Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi[J]. Chemical reviews, 2001, 101(11): 3397-3414.
- [4] CHU X, AWASTHI M K, LIU Y, et al. Studies on the degradation of corn straw by combined bacterial cultures[J]. Bioresource technology, 2021, 320: 124174.
- [5] ZHENG Y, ZHAO J, XU F, et al. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production[J]. Progress in energy and combustion science, 2014, 42: 35-53.
- [6] LIANG Y S, YUAN X Z, ZENG G M, et al. Biodelignification of rice straw by *Phanerochaete chrysosporium* in the presence of dirhamnolipid[J]. Biodegradation, 2010, 21(4): 615-624.
- [7] 杨茜,李维尊,鞠美庭,等. 微生物降解木质纤维素类生物质固废的研究进展[J]. 微生物学通报, 2015, 42(8): 1569-1583.
- [8] 许从峰,艾士奇,申贵男,等. 木质纤维素的微生物降解[J]. 生物工程学报, 2019, 35(11): 2081-2091.
- [9] 李春冬,徐伟良,多拉娜,等. 两株野生木霉的鉴定及其产漆酶和纤维素酶研究[J]. 东北农业科学, 2022, 47(5): 67-71.
- [10] CHEN K J, TANG J C, XU B H, et al. Degradation enhancement of rice straw by co-culture of *Phanerochaete chrysosporium* and *Trichoderma viride*[J]. Scientific reports, 2019, 9(1): 19708.
- [11] WANG Q, CHEN L, YU D, et al. Excellent waste biomass-degrading performance of *Trichoderma asperellum* T-1 during submerged fermentation[J]. The science of the total environment, 2017, 609: 1329-1339.
- [12] 黄亚丽,黄媛媛,马慧媛,等. 低温秸秆降解真菌的筛选及在秸秆还田中的应用[J]. 中国农学通报, 2020, 36(21): 53-60.
- [13] 常洪艳,王天野,黄梓源,等. 秸秆降解菌对秸秆降解率、土壤理化性质及酶活性的影响[J]. 华北农学报, 2019, 34(S1): 161-167.
- [14] ZHU Z, SONG Q, DONG F. Taxonomy characterization and plumbum bioremediation of novel fungi[J]. Journal of basic microbiology, 2018, 58(4): 368-376.
- [15] 万博文. 棘孢木霉可湿性粉剂的制备及其降解玉米秸秆研究[D]. 天津:天津科技大学, 2022.
- [16] 马欣雨,孙丽娜,卢姗,等. 秸秆降解菌的筛选及对秸秆的降解效果[J]. 生态学杂志, 2020, 39(4): 1198-1205.
- [17] HE Z, DING B, ALI Q, et al. Screening and isolation of cold-adapted cellulose degrading bacterium: a candidate for straw degradation and *De novo* genome sequencing analysis[J]. Frontiers in microbiology, 2023, 13: 1098723.
- [18] 张鹏飞,孟会生,井国雁,等. 纤维素降解菌的筛选及对玉米秸秆降解的影响[J]. 安徽农业科学, 2022, 50(22): 52-55.
- [19] 王伟,郑大浩,杨超博,等. 高效纤维素分解菌的分离及秸秆降解生物效应[J]. 中国农业科技导报, 2019, 21(8): 36-46.
- [20] GHOSE T K. Measurement of cellulase activities[J]. Pure and applied chemistry, 1987, 59(2): 257-268.
- [21] SILVA J C R, SALGADO J C S, VICI A C, et al. A novel *Trichoderma reesei* mutant RP698 with enhanced cellulase production[J]. Brazilian journal of microbiology, 2020, 51(2): 537-545.
- [22] 张爽. 低温纤维素降解菌的筛选及其玉米秸秆降解效果研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2018.
- [23] 王玉万,徐文玉. 木质纤维素固体基质发酵物中半纤维素、纤维素和木素的定量分析程序[J]. 微生物学通报, 1987(2): 81-84.
- [24] POLY N, MAMTAZ S, KHAN M, et al. Isolation, documentation and biochemical characterization of cellulolytic bacteria from rumen fluid of cattle[J]. Journal of advanced biotechnology and experimental therapeutics, 2022, 5(2): 433.
- [25] 中华人民共和国农业部. 土壤检测 第5部分:土壤有 (下转第 55 页)

- [8] SWETHA K T, REDDY V, ROBINSON A. An innovative grey wolf optimizer with Nelder-Mead search method based MPPT technique for fast convergence under partial shading conditions[J]. Sustainable energy technologies and assessments, 2023, 59: 103412.
- [9] KORANY E, YOUSRI D, ATTIA H A, et al. A novel optimized dynamic fractional-order MPPT controller using hunter pray optimizer for alleviating the tracking oscillation with changing environmental conditions[J]. Energy reports, 2023, 10: 1819–1832.
- [10] LI H T, ZHANG C X, WANG R. Modeling and simulation of marine PV inverter system based on MPPT algorithm[J]. Journal of physics: conference series, 2023, 2584(1): 012123.
- [11] BAATIAH A O, ELTAMALY A M, ALOTAIBI M A. Improving photovoltaic MPPT performance through PSO dynamic swarm size reduction[J]. Energies, 2023, 16(18): 6433.
- [12] REZK H, ALY M, GHONIEM R M. Robust fuzzy logic MPPT using gradient-based optimization for PEMFC power system[J]. Sustainability, 2023, 15(18): 13368.
- [13] ŞEHIRLI E. Comparison of the input filter effect to PV panel by SEPIC MPPT converter[J]. Energy reports, 2023, 9: 34–50.
- [14] RAJ R D A, NAIK K A. Priority queue-based switching matrix algorithm for adaptive neuro-fuzzy inference system assisted MPPT controlled PV system[J]. Energy conversion and management, 2023, 293: 117519.

责任编辑:周建军

(上接第30页)

- 机质的测定: NY/T 1121.6—2006[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [26] 中华人民共和国农业部. 土壤速效钾和缓效钾含量的测定: NY/T 889—2004[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [27] 中华人民共和国农业部. 土壤检测 第7部分: 土壤有效磷的测定: NY/T 1121.7—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- [28] 中华人民共和国农业部. 土壤 pH 的测定: NY/T 1377—2007[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [29] 马欣雨. 秸秆降解菌的筛选及其降解效果研究[D]. 沈阳: 沈阳大学, 2019.
- [30] 杨艳铭. 秸秆降解多功能复合菌剂筛选、降解效果研究及 *Catellatospora tritici* 多相分类鉴定[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2022.
- [31] 李娜, 滕培基, 雷琬莹, 等. 外源有机物添加种类对农田黑土有机碳激发效应的影响及作用机理[J]. 中国生态农业学报(中英文), 2023, 31(10): 1588–1601.
- [32] 宋志伟, 陈露露, 潘宇, 等. 3种菌剂对水稻秸秆降解性能的影响[J]. 生态环境学报, 2018, 27(11): 2134–2141.
- [33] 魏蔚, 宋时丽, 吴昊, 等. 复合菌剂对玉米秸秆的降解及土壤生态特性的影响[J]. 土壤通报, 2019, 50(2): 323–332.
- [34] VAN KUIJK S J A, SONNENBERG A S M, BAARS J J P, et al. Fungal treated lignocellulosic biomass as ruminant feed ingredient: a review[J]. Biotechnology advances, 2015, 33(1): 191–202.
- [35] 李鹤. 低温秸秆降解菌的酶活、降解效果及对土壤养分、酶活的影响[D]. 长春: 吉林农业大学, 2015.
- [36] 陆水凤, 王呈玉, 王天野, 等. 玉米秸秆配施菌剂还田对土壤养分及腐殖质组成的影响[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(4): 834–840.

责任编辑:郎婧