

促进草酸青霉降解秸秆的表面活性剂效果研究

万文, 杨天杰, 樊晓腾, 郑海平, 王世梅, 韦中, 徐阳春, 沈其荣

引用本文:

万文, 杨天杰, 樊晓腾, 郑海平, 王世梅, 韦中, 徐阳春, 沈其荣. 促进草酸青霉降解秸秆的表面活性剂效果研究[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(7): 1582-1589.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-1453>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

降解水稻秸秆细菌-真菌复合菌系的构建与评价

梅新兰, 郑海平, 李水仙, 杨天杰, 江高飞, 韦中, 徐阳春, 沈其荣

农业环境科学学报. 2021, 40(10): 2217-2225 <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0051>

生物表面活性剂产生菌的筛选及产物性能研究

石金礼, 张言诚, 张力浩, 周静, 周丽娜, 李辉信, 胡锋, 徐莉

农业环境科学学报. 2016, 35(9): 1717-1726 <https://doi.org/10.11654/jaes.2016-0204>

固态发酵中2种微生物降解玉米秸秆效果的对比研究

李立波, 任晓冬, 窦森

农业环境科学学报. 2017, 36(10): 2136-2142 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-0336>

鼠李糖脂对餐厨垃圾厌氧发酵过程中水解酶活性的影响

牛俊玲, 秦莉, 郑宾国

农业环境科学学报. 2015, 34(8): 1589-1594 <https://doi.org/10.11654/jaes.2015.08.023>

高温秸秆降解菌的筛选及其纤维素酶活性研究

江高飞, 暴彦灼, 杨天杰, 郑海平, 梅新兰, 韦中, 徐阳春, 沈其荣

农业环境科学学报. 2020, 39(10): 2465-2472 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0958>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

万文, 杨天杰, 樊晓腾, 等. 促进草酸青霉降解秸秆的表面活性剂效果研究[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(7): 1582-1589.

WAN W, YANG T J, FAN X T, et al. Effects of surfactants on promotion of straw degradation by *Penicillium oxalicum*[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2022, 41(7): 1582-1589.



开放科学 OSID

促进草酸青霉降解秸秆的表面活性剂效果研究

万文¹, 杨天杰¹, 樊晓腾^{1,2}, 郑海平¹, 王世梅¹, 韦中¹, 徐阳春^{1*}, 沈其荣¹

(1. 南京农业大学资源与环境科学学院/江苏省固体有机废弃物资源化高技术研究重点实验室/江苏省有机固体废弃物资源化协同创新中心/资源节约型肥料教育部工程研究中心/国家有机类肥料工程技术研究中心, 南京 210095; 2. 河南师范大学, 河南 新乡 453000)

摘要: 为了提高秸秆降解效率, 本文探究了不同种类表面活性剂对秸秆降解菌降解秸秆的作用, 并筛选出效果最佳的表面活性剂。首先筛选获得一株降解玉米秸秆能力较强的菌株——草酸青霉 Z7-6; 其次在液体发酵条件下, 考察 4 种表面活性剂(两个浓度)对草酸青霉 Z7-6 降解玉米秸秆效果及产纤维素类酶的影响; 最终通过固体发酵验证表面活性剂的效果。结果表明: 筛选出的草酸青霉 Z7-6 对玉米秸秆具有较好的降解效果, 相对降解率达 40.58%。液体发酵条件下, 0.1% 表面活性剂处理下秸秆相对降解率较高, 0.1% Triton X-100(TR) 和 0.1% Tween 80(TW) 均可提升草酸青霉 Z7-6 降解玉米秸秆的效果, 两者间无显著差异。0.1% TR 处理中滤纸酶活性和羧甲基纤维素酶活性均显著高于其他处理。固体发酵条件下, 0.1% TR 的提升效果最佳。综合秸秆降解的效果和产酶情况, 发现 0.1% TR 促进草酸青霉 Z7-6 降解秸秆的效果最好, 也可提升该菌株纤维素类酶的活性。

关键词: 表面活性剂; 秸秆; 降解; 草酸青霉

中图分类号: X71 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2022)07-1582-08 doi:10.11654/jaes.2021-1453

Effects of surfactants on promotion of straw degradation by *Penicillium oxalicum*

WAN Wen¹, YANG Tianjie¹, FAN Xiaoteng^{1,2}, ZHENG Haiping¹, WANG Shimei¹, WEI Zhong¹, XU Yangchun^{1*}, SHEN Qirong¹

(1. College of Resources and Environmental Science, Nanjing Agricultural University, Jiangsu Provincial Key Lab of Organic Solid Waste Utilization, Jiangsu Collaborative Innovation Center for Solid Waste Resource Utilization, Educational Ministry Engineering Center of Resource-saving fertilizers, National Engineering Research Center for Organic-based Fertilizers, Nanjing 210095, China; 2. Henan Normal University, Xinxiang 453000, China)

Abstract: In order to improve degradation efficiency, effects of different types of surfactants on straw degradation by straw-degrading bacteria were explored and the best surfactant were screened out. We first isolated a strain, *Penicillium oxalicum* Z7-6, with strong ability to degrade corn straw. Under liquid fermentation, effects of four surfactants (with two concentrations) on the degradation of corn straw by *P. oxalicum* Z7-6 and the production of cellulosic enzymes were investigated. Finally, the effects of the surfactants were verified by solid fermentation. The isolated *P. oxalicum* Z7-6 could degrade corn straw with high efficiency at a relative degradation rate of 40.58%. Under liquid fermentation condition, the relative degradation rate of straw was higher after treated with surfactants at a concentration of 0.1%. Both 0.1% Triton X-100 (TR) and 0.1% Tween 80 (TW) could significantly promote degradation of corn straw by *P. oxalicum* Z7-6, and there was no significant differences between the effects of these two treatments. Activities of filter paper enzyme and carboxymethyl

收稿日期: 2021-12-15 录用日期: 2022-03-21

作者简介: 万文(1997—), 女, 江苏宜兴人, 硕士研究生, 从事秸秆降解及植物促生功能微生物研究。E-mail: wwen1027@163.com

*通信作者: 徐阳春 E-mail: ycxu@njau.edu.cn

基金项目: 中国博士后科学基金项目(2019M650116); 江苏省博士后科研资助计划(2018K200C); 江苏省研究生科研创新计划项目(KYCX17_0593)

Project supported: The China Postdoctoral Science Foundation (2019M650116); The Jiangsu Postdoctoral Research Funding Program (2018K200C); The Research and Innovation Program for Postgraduates of Jiangsu Province (KYCX17_0593)

cellulase were significantly higher under 0.1% TR compared with other treatments. Under solid fermentation, straw degradation was significantly higher under 0.1% TR compared with other treatments. Thus, the results for straw degradation and enzyme activities show that 0.1% TR has the strongest promotion effect on the degradation of straw by *P. oxalicum* Z7-6 and cellulosic enzyme activities.

Keywords: surfactant; straw; degradation; *Penicillium oxalicum*

我国每年产生各类作物秸秆近9亿t,而秸秆中含有丰富的有机物及氮、磷、钾等营养物质,具有很高的潜在利用价值^[1-2]。因此,对秸秆进行高效资源化利用成为我国发展绿色循环农业中亟待解决的问题。秸秆还田是其资源化利用的主要途径之一^[3],该方法有利于土壤腐殖质的更新和土壤有机质的积累,起到培肥地力、促进作物生长的作用^[4-5]。但秸秆直接还田的降解效率低、耗时长,常需要添加秸秆降解菌以提高秸秆的降解效率^[6]。由于秸秆表面存在蜡质层,秸秆降解菌难以接触和附着在秸秆上,无法产生大量纤维素类酶;蜡质层也阻碍了纤维素类酶与秸秆的接触,造成秸秆降解菌效率降低或施用效果不稳定^[7]。近年来,许多研究通过添加秸秆降解助剂(如表面活性剂)来提高秸秆降解菌产酶量,从而提高秸秆降解效率^[8-9]。

表面活性剂是指一类具有固定的亲水亲油基团、在溶液表面能定向排列,并能使表面张力显著下降的物质^[10]。与阴离子、阳离子表面活性剂相比,非离子表面活性剂稳定性更高,乳化、润湿和洗涤的能力更强^[11]。周梅芳^[12]发现表面活性剂能够提高筒青霉产漆酶的能力。孟杰等^[13]的研究表明表面活性剂能在一定程度上激发纤维素分解菌的活性,可改善堆肥环境,促进微生物生长和提高纤维素类酶活性。这些研究均表明,添加表面活性剂能够促进秸秆降解菌的产酶能力,从而提升秸秆的降解效率,但尚未有研究比较不同种类的表面活性剂对秸秆降解菌降解秸秆效果的影响,表面活性剂的浓度是否会影响纤维素类酶活性也有待进一步研究。

因此,为了提高降解菌秸秆降解的效率,本研究以玉米秸秆为研究对象,筛选出一株降解秸秆能力较强的菌株——草酸青霉Z7-6,研究4种不同非离子表面活性剂对其降解玉米秸秆的影响。首先利用液体发酵方法,考察不同浓度、不同种类的表面活性剂对秸秆降解菌利用玉米秸秆及产纤维素类酶的影响,筛选出表面活性剂的最佳浓度;再利用固体发酵体系进行效果验证,最终获得配合高效玉米秸秆降解菌的最佳表面活性剂种类及浓度。该研究可为表面活性剂作为降解秸秆助剂提供理论依据,并为提高秸秆降解效率提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 土样

供试土壤采自江苏省金坛区朱林镇秸秆直接还田地块,该地块为稻麦轮作,稻麦秸秆均全量还田。

1.1.2 玉米秸秆

秸秆采自江苏省宜兴市紫云山生态园。用清水将玉米秸秆表面尘土洗净并风干,除去叶片、叶鞘和根部后,切成1~3 cm的小段,65℃烘干至恒质量备用。

1.1.3 表面活性剂

吐温80(Tween 80, TW)、聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100, TR)、3-[甲氧基聚(乙氧基)丙基-甲基-双(三甲基硅氧基)硅烷(MT)购自国药化学集团试剂公司,聚醚硅氧烷(PP)购自江苏龙灯化学集团公司。

1.2 供试培养基

本研究主要采用以下4种培养基进行降解菌的筛选和活性检测:无机盐培养基用于秸秆降解菌的初筛^[14];马铃薯葡萄糖琼脂培养基(Potato dextrose agar, PDA)用于真菌的纯化培养^[15];产酶培养基^[16]和羧甲基纤维素(Carboxymethyl cellulose, CMC)-刚果红培养基^[17]用于秸秆降解菌酶活性的检测。其他培养基配方为:秸秆液体发酵培养基,每100 mL无机盐培养基中添加1.5 g玉米秸秆段;秸秆固体发酵培养基,每100 mL无机盐培养基中添加25.0 g玉米秸秆段,秸秆达到手握成团、落地即散的状态。

以上培养基均经过115℃高压灭菌30 min后备用。

1.3 秸秆降解菌的筛选

秸秆降解菌初筛:称取1.0 g秸秆样品至装有90 mL无菌水的三角瓶中,于170 r·min⁻¹、30℃下振荡30 min后,静置30 min。吸取上清液稀释后涂布于含有10.0 g玉米秸秆粉的无机盐固体培养基上,30℃静置培养3~5 d,直至出现单菌落。挑取在无机盐固体培养基上生长旺盛的真菌菌丝,转接至PDA培养基,连续划线培养后得到纯化的菌株,与40%甘油等体积混合并保存于-80℃冰箱。将初筛获得的6个菌株在PDA培养基上活化后,接种于PDA液体培养基中,

30 ℃、170 r·min⁻¹ 振荡培养 12 h,用无菌水调整各菌株孢子浓度至 10⁷ CFU·mL⁻¹,取 10 μL 菌液接种于 CMC-刚果红固体平板上,置于 30 ℃培养箱静置培养 3 d,测定菌落直径(*d*)和透明圈直径(*D*),计算 *D/d* 值,该比值越大表明菌株水解 CMC 的能力越强。每个菌株 3 个重复。

秸秆降解菌的复筛:将初筛获得的菌株接种至含 50 mL PDA 液体培养基的三角瓶中,30 ℃静置培养 7 d 至其表面产生大量孢子。加入 30 mL 无菌水后在摇床上振荡 30 min,用无菌纱布过滤培养物后,加入无菌水调节孢子浓度为 10⁷ CFU·mL⁻¹,即得孢子接种液。按 1%(*V:V*)接种量将各菌株孢子液接种至秸秆液体发酵培养基中,于 30 ℃、170 r·min⁻¹ 下振荡培养 7 d。每个菌株设 3 个重复。将降解后的秸秆残渣在网孔为 0.1 mm 的尼龙网袋内用大量清水冲洗,除去秸秆上附着的菌丝及其他可溶物,剩余秸秆残渣在 65 ℃下烘干至恒质量,称量秸秆残留物干质量,计算秸秆相对降解率(Relative degradation rate, *RDR*):

$$RDR=(m_0-m_1)/m_0 \times 100\%$$

式中:*m*₀为对照组秸秆剩余物干质量,g;*m*₁为处理组秸秆剩余物干质量,g。

秸秆降解菌株的鉴定:从平板上刮取真菌菌丝,加入液氮研磨,以加速细胞壁破碎。采用 OMEGA 真菌基因组提取试剂盒提取供试菌株的总 DNA。用 ITS 引物对菌株的 ITS 基因片段进行 PCR 扩增,引物分别为 ITS1(5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')^[18]。PCR 反应体系(50 μL)如下:DNA 模板 1 μL, dNTP (2.5 mmol·L⁻¹) 4 μL, 引物(1 mmol·L⁻¹)各 1 μL, 10× Loading Buffer 5 μL, MgCl₂(25 mmol·L⁻¹) 3 μL, Taq 酶(5 U·μL⁻¹) 0.5 μL, ddH₂O 34.5 μL。PCR 扩增程序为:94 ℃ 5 min, 94 ℃ 变性 30 s, 52 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 1 min, 共 30 个循环;72 ℃ 10 min。通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,将 PCR 产物送至上海美吉生物公司测序。测序结果在 NCBI(<https://ncbi.nlm.nih.gov/>)中进行 BLAST 比对,选取同源性大于 97% 的序列在 MEGA 7.0 软件中分析菌株同源性,采用邻近法(Neighbor-joining method)构建菌株系统发育树,确定菌株的分类地位。

1.4 添加表面活性剂试验

4 种表面活性剂 TW、TR、MT 和 PP 分别设置 0.1% (*V:V*)和 0.5% (*V:V*)两个浓度,以不添加表面活性剂为对照,共设置 9 个处理,每个处理 3 个重复。通过液

体发酵筛选表面活性剂的最佳浓度,考察不同表面活性剂在不同浓度下对秸秆降解菌降解玉米秸秆的效果,最后采用固体发酵进行验证。

添加表面活性剂的秸秆液体发酵试验:参照 1.3 中的方法制备浓度为 10⁷ CFU·mL⁻¹的孢子接种液。按 1% (*V:V*)接种量将降解菌孢子悬液接种于含有不同浓度表面活性剂的秸秆液体发酵培养基中,置于 30 ℃摇床中 170 r·min⁻¹振荡培养 7 d。参照 1.3 中的方法测定秸秆相对降解率。取发酵液经 10 000 r·min⁻¹离心 10 min 后取上清液,即为粗酶液。用 DNS 法^[19]测定粗酶液的滤纸酶(FPA)、羧甲基纤维素酶(CMCCase)和木聚糖酶(Xylanase)活性,将 1 min 内水解生成 1 μmol 还原糖所需的酶量定义为一个活力单位(U)。

添加表面活性剂的秸秆固体发酵试验:参照 1.3 中的方法制备浓度为 10⁷ CFU·mL⁻¹的孢子接种液。按 1% (*V:V*)接种量将降解菌孢子悬液接种于含有不同表面活性剂的秸秆固体发酵培养基中,控制固体培养基的含水量为 75%,在 30 ℃培养箱中静置培养 30 d 后取样测定秸秆相对降解率和滤纸酶、羧甲基纤维素酶、木聚糖酶活性。

1.5 数据处理

数据分析采用 R 4.0.2 版本(<https://www.r-project.org/>)。采用 agricolae 包进行数据的统计分析,通过 ggplot2 包进行数据的可视化。数据分析采用单因素方差分析(ANOVA),利用 Tukey HSD 检验法检验处理间的差异显著性(*P*<0.05)。

2 结果与分析

2.1 秸秆降解菌株 Z7-6 的筛选及鉴定

采用以玉米秸秆粉为唯一碳源的无机盐固体培养基,从秸秆直接还田的土壤样品中分离纯化得玉米秸秆降解菌共 6 株,在刚果红培养基上产透明降解圈的效果如表 1 和图 1a 所示。结果表明,菌株 Z7-6 在 CMC-刚果红平板上的脱色效果更为明显,相对降解率达 40.58%,显著高于其他 5 个菌株($F_{5,12}=129.3$, $P<0.001$),其 *D/d* 值显著高于其他菌株($F_{5,12}=13\ 988$, $P<0.001$)。对菌株 Z7-6 进行菌种鉴定,ITS 分析结果表明其为草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)(图 1b)。

2.2 表面活性剂对草酸青霉 Z7-6 液体发酵的影响

0.1% 浓度的表面活性剂处理下的秸秆相对降解率高于 0.5% 浓度,除 TW 处理外,其他 3 种表面活性剂均达到显著差异(MT: $F_{1,4}=103.8$, $P<0.001$; PP: $F_{1,4}=105.9$, $P<0.001$; TR: $F_{1,4}=87.4$, $P<0.01$, 图 2a)。

表1 秸秆降解菌的降解圈(D)与菌落直径(d)Table 1 The degradation circle(D) and colony diameter(d) of straw degrading microbes

菌株 Strain	降解圈直径 D /mm	菌落直径 d /mm	D/d
F4-3	40.43±0.49	34.37±0.26	1.16±0.01e
J2-5	37.03±0.41	35.93±0.60	1.03±0.01f
Z7-5	25.53±0.89	8.13±0.10	3.14±0.11b
Z5-1	28.43±0.68	9.78±0.21	2.91±0.08c
Z4-4	26.67±0.81	10.71±0.51	2.49±0.05d
Z7-6	33.47±0.54	9.17±0.27	3.65±0.05a

注:同列数据后的不同小写字母代表在 $P<0.05$ 水平差异显著。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant differences at the $P<0.05$ level.

不同表面活性剂处理下,0.1%TR处理的秸秆相对降解率最高,达61.36%,显著高于不加表面活性剂的对照处理($F_{3,8}=66.63, P<0.001$),较其提高了60%,但与0.1%TW相比差异不显著($P>0.05$)。以上结果表明,较低浓度(0.1%)的表面活性剂提升草酸青霉Z7-6降解秸秆的效果更佳,其中0.1%TR与0.1%TW处理的效果最好。

进一步检测各处理对草酸青霉Z7-6分泌纤维素类酶活的影响,结果表明,各表面活性剂对滤纸酶、羧甲基纤维素酶、木聚糖酶活性的影响基本一致,即0.1%浓度的表面活性剂处理下均显著高于0.5%浓度

处理($P<0.001$,图2b~图2d)。所有处理中,0.1%TR处理的滤纸酶和CMC酶活性均最高,滤纸酶活性为 $42.01 \text{ U}\cdot\text{gds}^{-1}$,CMC酶活性为 $174.30 \text{ U}\cdot\text{gds}^{-1}$,均显著高于其他处理(滤纸酶: $F_{8,18}=12\ 876, P<0.001$;CMC酶: $F_{8,18}=4\times 10^6, P<0.001$,图2b、图2c)。0.1%TW处理下木聚糖酶活性最高,但与0.1%TR处理无显著差异。与对照相比,0.1%TR处理的滤纸酶、CMC酶和木聚糖酶活性分别提高了213.74%、155.27%和115.24%。

以上结果表明,较低浓度的表面活性剂可提高滤纸酶、CMC酶和木聚糖酶的活性,其中0.1%TR处理效果最佳;而较高浓度的表面活性剂可降低部分纤维素类酶的活性,如0.5%MT和0.5%PP抑制了CMC酶活性和木聚糖酶活性。

为了分析液体发酵时表面活性剂种类、浓度以及3种产纤维素类酶活性对草酸青霉Z7-6相对降解率的交互作用,对其进行了广义线性分析。由表2可知,表面活性剂的种类和浓度对草酸青霉Z7-6的秸秆相对降解率均有显著影响($P<0.001$),且表面活性剂浓度与秸秆相对降解率间存在显著的负相关($P<0.001$),表明在本研究中表面活性剂浓度越高,秸秆相对降解率越低。但表面活性剂对菌株降解秸秆的影响是否存在浓度效应,需增加表面活性剂浓度梯度进一步验证。

3种产纤维素类酶活性与秸秆相对降解率的相关性结果表明,只有CMC酶活性与秸秆相对降解率

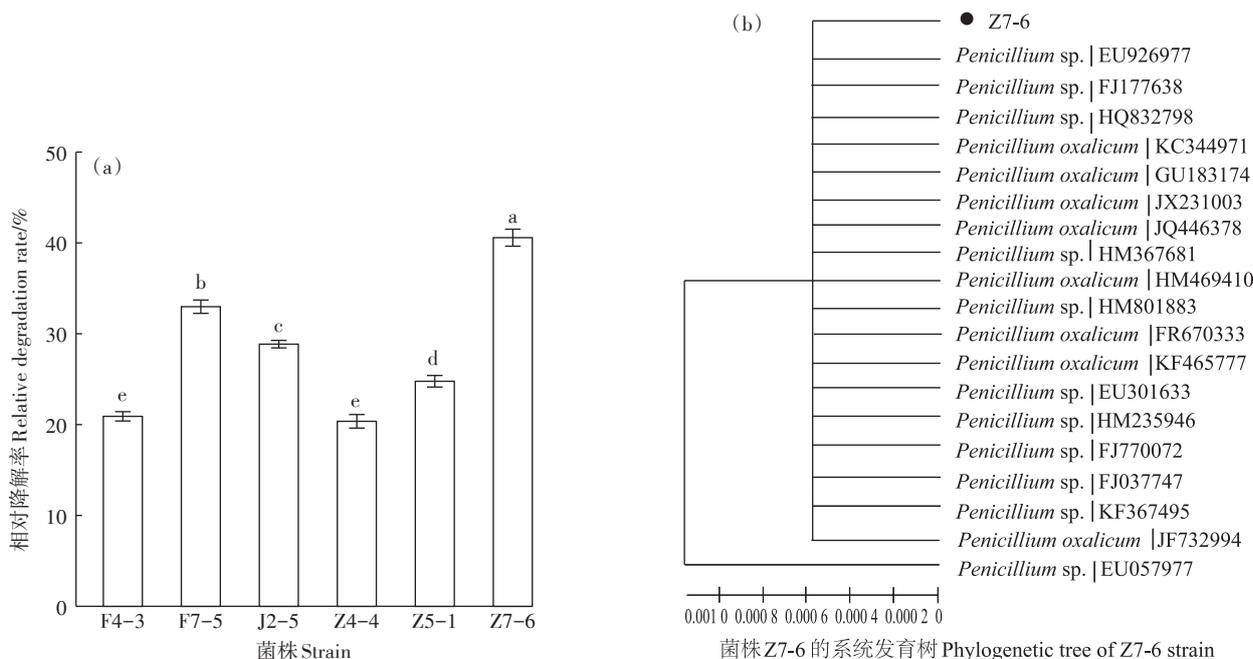


图1 秸秆降解菌对玉米秸秆的降解效果以及菌株鉴定结果

Figure 1 Degradation effects of straw degrading microbes and strain identification

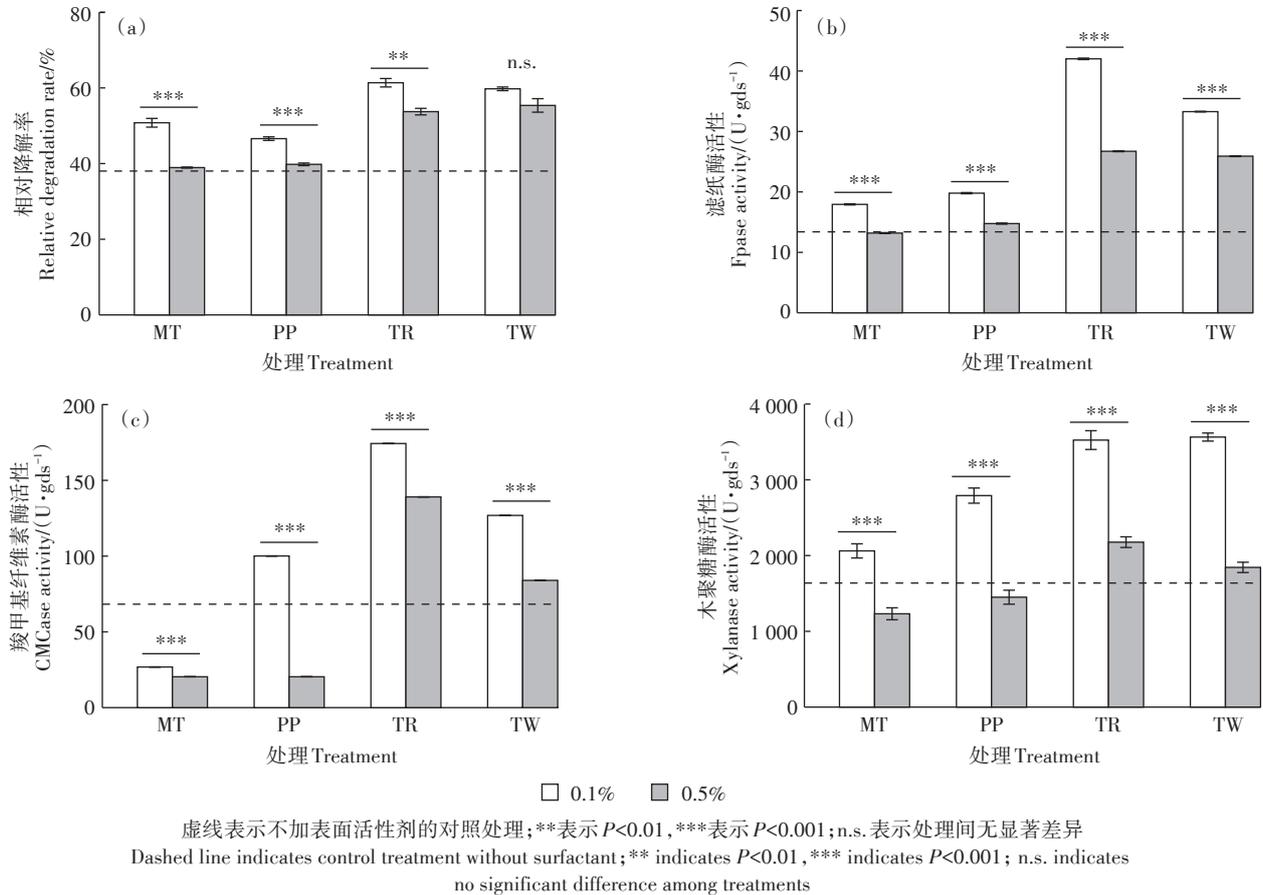


图2 液体发酵条件下表面活性剂对草酸青霉 Z7-6 降解秸秆及产酶能力的影响

Figure 2 Effects of surfactant on strain Z7-6 degradation and enzyme activities

表2 液体发酵条件下表面活性剂种类、浓度和酶活性的交互作用对秸秆相对降解率的影响

Table 2 Interactive effects of type and concentration of surfactants and enzyme activity on relative degradation rate under liquid fermentation condition

指标 Index	相对降解率 Relative degradation rate	
	F	P
表面活性剂种类 (Type)	152.72	<0.001
表面活性剂浓度 (Conc)	145.94	<0.001 ↓
滤纸酶活性 (FPA)	0.70	0.43
羧甲基纤维素酶活性 (CMCase)	8.28	0.028 ↑
木聚糖酶活性 (Xyl)	3.26	0.12
Type×Conc	2.96	0.13
Type×FPA	2.86	0.13
Type×CMCase	0.23	0.65
Conc×FPA	2.11	0.20
Type×Conc×FPA	0.19	0.90
残差 Residual		
模型总结 Model summary	$R^2=0.96, AIC=93.99$	

呈显著正相关关系 ($P=0.028$), 表明 CMC 酶活性可显著促进草酸青霉 Z7-6 降解玉米秸秆的能力。但表面活性剂种类、浓度和 3 种产纤维素类酶对秸秆相对降解率均无交互作用 ($P > 0.05$), 表明表面活性剂的种类和浓度并非通过线性关系影响产纤维素类酶活性, 进而影响秸秆降解能力。

2.3 表面活性剂对草酸青霉 Z7-6 固体发酵的影响

为了验证 0.1% 浓度的 4 种表面活性剂对草酸青霉 Z7-6 降解玉米秸秆的实际效果, 开展模拟秸秆还田时添加菌剂的固体发酵试验。研究表明, 0.1% TR 处理下草酸青霉 Z7-6 对玉米秸秆的降解能力最强, 达 69.67%, 0.1% TW 处理次之, 0.1% MT 和 PP 的效果最差, 但仍高于对照处理; 0.1% TR 处理的相对降解率显著高于其他 3 种表面活性剂, 与对照相比, 该处理秸秆的相对降解率提高了 41.87% (图 3a)。

0.1% 表面活性剂对 3 种纤维素类酶活性的影响相似 (图 3b~图 3d)。0.1% TR 处理下滤纸酶、CMC 酶以及木聚糖酶活性最高, 滤纸酶活性达 $3.51 \text{ U} \cdot \text{gds}^{-1}$,

CMC酶活性达 $25.55 \text{ U} \cdot \text{gds}^{-1}$,木聚糖酶活性达 $1429.00 \text{ U} \cdot \text{gds}^{-1}$;该处理的滤纸酶和木聚糖酶活性显著高于0.1%TW处理(图3b、图3d)。与对照相比,0.1%TR处理的滤纸酶、CMC酶和木聚糖酶的活性分别提高了70.39%、45.33%和75.10%。

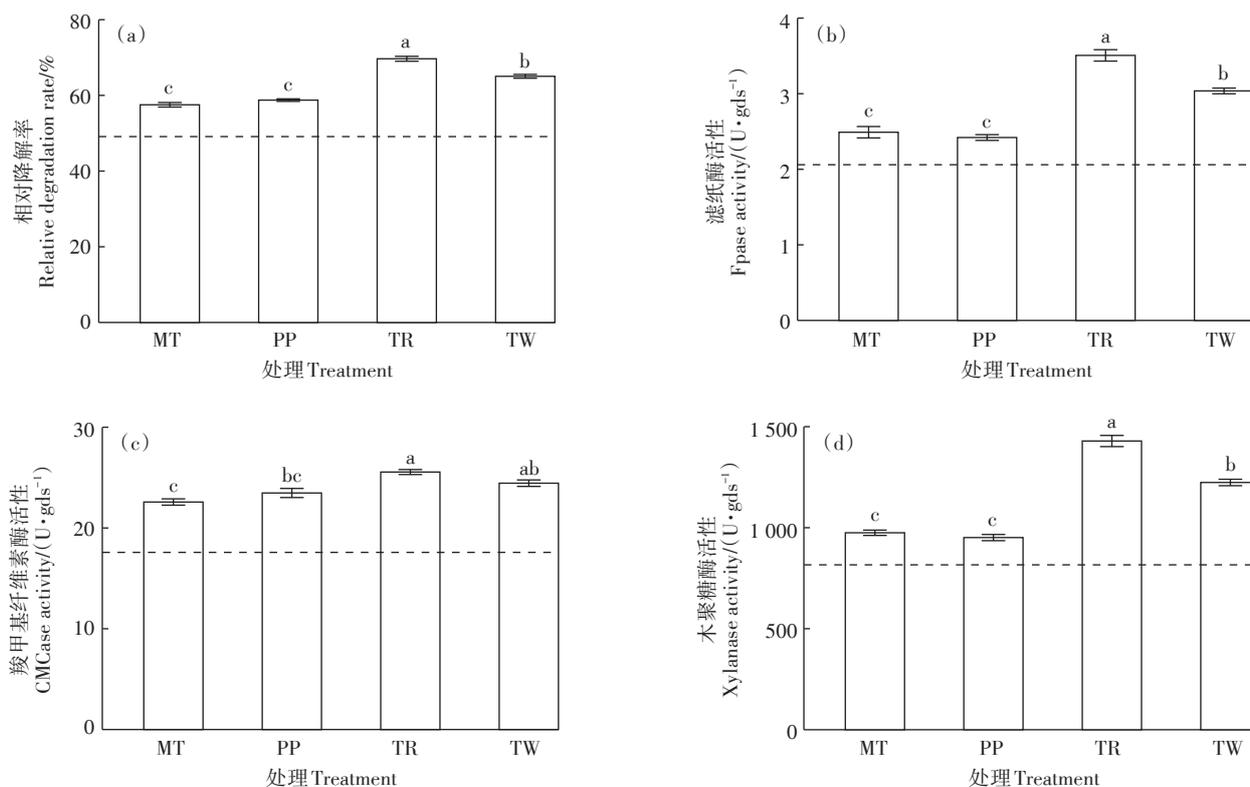
以上结果表明,0.1%浓度的4种表面活性剂均可提高草酸青霉Z7-6降解玉米秸秆的能力,其中0.1%TR效果最佳,对3种纤维素类酶的活性有显著的促进作用。

3 讨论

秸秆还田是目前秸秆资源化利用最常用的方式之一,但由于还田秸秆总量巨大且多为就地还田,即使施用秸秆降解菌,也会因秸秆表面的蜡质层阻碍菌株与秸秆的接触而降低秸秆降解效率。研究发现将表面活性剂用作助剂可以加速秸秆的降解^[20-21]。木质纤维素具有强疏水性,添加表面活性剂后,可改变其疏水特性,降低木质素对纤维素酶的无效吸附,使秸秆更好地与降解菌或酶相结合^[22]。非离子表面活性剂预处理能增大纤维素酶的可利用表面,增加纤维

素吸附酶的反应位点,有效稳定酶的性质,提高秸秆的糖化率^[23]。表面活性剂还可增加细胞膜的通透性,加速蛋白质类物质(如酶类)的跨膜运输,增加胞外纤维素酶的浓度,进而提高微生物降解秸秆的能力^[24]。本研究中,秸秆降解效果较好的处理,其纤维素酶活性更高,推测表面活性剂可能增加了草酸青霉Z7-6细胞的通透性,加大了秸秆对酶的吸附作用。后期可通过检测微生物细胞内外和秸秆表面的纤维素酶含量进行验证。

目前,已有非离子表面活性剂对秸秆降解影响的相关研究^[25-26],但尚未进行不同种类非离子表面活性剂效果的比较。本研究发现,不同种类的非离子表面活性剂对草酸青霉Z7-6降解玉米秸秆的影响不同。Triton X-100处理的秸秆降解效果最佳,草酸青霉Z7-6产纤维素类酶活性也显著增加;吐温80处理次之。与吐温系列的表面活性剂相比,Triton X-100亲水基团数更多,具有更高的临界胶束浓度(Critical micelle concentration),亲水性更强^[27],可更好地与木质素结合^[28];其特殊的结构可稳定水解酶结构,即使在低浓度下(0.02%)也能提升水解酶活性^[29]。多项研究



虚线表示不加表面活性剂的对照处理;小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)

Dashed line indicates control treatment without surfactant; lower case letters indicates significant differences among treatments ($P < 0.05$)

图3 表面活性剂对草酸青霉Z7-6降解秸秆能力以及产酶活性的影响

Figure 3 Effects of surfactants on straw degradation and enzyme activities ability of strain Z7-6

表明, Triton X-100 促进里氏木霉溶纤维素-木聚糖酶融合酶活性的能力优于吐温 20^[30]; Triton X-100 处理后对秸秆酶解的效果也优于吐温 80^[31]。

本研究还发现表面活性剂浓度较低时(0.1%), 玉米秸秆降解效果更好, 纤维素类酶的活性也更高。尤其是较高浓度的 MT 和 PP 反而抑制了草酸青霉 Z7-6 的部分纤维素类酶活性。这可能是由于发生了产物抑制作用, 即表面活性剂浓度增高, 降解菌分泌纤维素类酶增多, 产生更多的秸秆降解物, 反而抑制了相关酶的活性^[32]。也有研究表明, 高浓度的表面活性剂会显著抑制外切酶的活性, 破坏酶的活性构象而使其丧失活性; 同时酶解体系中形成胶束, 降低了纤维素酶的可及度, 抑制了总酶活性^[33-34]。此外, 表面活性剂含量过高可能会影响菌体的正常代谢, 从而影响菌株的产酶功能, 导致酶活性降低^[35]。因此, 在后期研究中可尝试更低浓度的表面活性剂, 确定每种表面活性剂的最佳使用浓度, 节省成本的同时也可提高秸秆降解效率。

近年来, 在秸秆降解领域对表面活性剂的研究逐渐增多^[36-37], 使用较多的主要是生物表面活性剂和非离子表面活性剂。虽然生物表面活性剂对秸秆降解的促进效果十分显著, 但其制得率较低, 难以规模化生产, 且在应用过程中受环境影响较大, 稳定性较低^[38]。本研究中所用的表面活性剂为化学纯品, 易配制、效果稳定, 因此, 非离子表面活性剂可作为秸秆降解预处理较为合理、高效的方式之一。本研究表明 0.1% Triton X-100 对草酸青霉 Z7-6 秸秆降解的提升作用最强, 其对纤维素类酶活性的促进效果最佳, 可作为潜在的秸秆降解表面活性剂。

4 结论

本研究筛选出一株对玉米秸秆降解能力较好的菌株——草酸青霉 Z7-6, 分别在液体和固体发酵条件下, 通过比较 4 种表面活性剂在不同浓度下对草酸青霉 Z7-6 降解秸秆的影响发现, 0.1% Triton X-100 提升草酸青霉 Z7-6 降解秸秆的效果最佳, 同时使滤纸酶、羧甲基纤维素酶、木聚糖酶的活性得到提升。

参考文献:

[1] 霍丽丽, 赵立欣, 孟海波, 等. 中国农作物秸秆综合利用潜力研究[J]. 农业工程学报, 2019, 35(13): 218-224. HUO L L, ZHAO L X, MENG H B, et al. Study on straw multi-use potential in China[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2019, 35(13): 218-224.

[2] 杨志臣, 吕贻忠, 张凤荣, 等. 秸秆还田和腐熟有机肥对水稻土培肥效果对比分析[J]. 农业工程学报, 2008, 24(3): 214-218. YANG Z C, LÜ Y Z, ZHANG F R, et al. Comparative analysis of effect of straw returning field and rotted organic fertilizer on paddy soil fertilization[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2008, 24(3): 214-218.

[3] 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.

[4] HUANG S, ZENG Y, WU J, et al. Effect of crop residue retention on rice yield in China: A meta-analysis[J]. *Field Crops Research*, 2013, 154: 188-194.

[5] 陈云峰, 夏贤格, 杨利, 等. 秸秆还田是秸秆资源化利用的现实途径[J]. 中国土壤与肥料, 2020(6): 299-307. CHEN Y F, XIA X G, YANG L, et al. Straw return is the realistic way of straw resource utilization[J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2020(6): 299-307.

[6] 王勇, 张育铭, 朱洪磊, 等. 高效纤维素降解菌的筛选及产酶活力测定[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(23): 255-260. WANG Y, ZHANG Y M, ZHU H L, et al. Screening of high-efficiency cellulose-degrading bacteria and determination of enzyme-producing activity[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2020, 48(23): 255-260.

[7] 孙万里, 陶文沂. 木质素与半纤维素对稻草秸秆酶解的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(1): 18-22. SUN W L, TAO W Y. Effect of lignin and hemicellulose on enzymatic hydrolysis of cellulose from rice straw[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2010, 29(1): 18-22.

[8] WANG H, FAN B, LI C, et al. Effects of rhamnolipid on the cellulase and xylanase in hydrolysis of wheat straw[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(11): 6515-6521.

[9] ZENG G, SHI J, YUAN X, et al. Effects of Tween 80 and rhamnolipid on the extracellular enzymes of *Penicillium simplicissimum* isolated from compost[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39(7): 1451-1456.

[10] 张秋卓. 稻草秸秆降解中生物表面活性剂的增效作用及发酵新工艺[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2008. ZHANG Q Z. Stimulatory effect of biosurfactant on rice straw degradation and new fermentation technology[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2008.

[11] 莫丹, 袁兴中, 曾光明, 等. Tween 80 和鼠李糖脂对稻草酶解的影响[J]. 环境科学, 2008, 29(7): 1998-2004. MO D, YUAN X Z, ZENG G M, et al. Effect of Tween 80 and rhamnolipid on enzymatic hydrolysis of straw[J]. *Environmental Science*, 2008, 29(7): 1998-2004.

[12] 周梅芳. 表面活性剂对固态发酵中筒青霉产漆酶及降解苯酚的影响[D]. 长沙: 湖南大学, 2011. ZHOU M F. Effect of surfactant on laccase production and phenol degradation of *Penicillium simpliciformis* in solid state fermentation[D]. Changsha: Hunan University, 2011.

[13] 孟杰, 王宏燕, 李涛. 生物表面活性剂混合纤维素分解菌分解秸秆的研究[J]. 东北农业大学学报, 2011, 42(2): 97-103. MENG J, WANG H Y, LI T. Research of bio-surfactants and cellulose-decom-

- posing bacteria mixture fertilizers in straw decomposition[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2011, 42(2):97-103.
- [14] LEE Y, KIM B, LEE B, et al. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull [J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(2):378-386.
- [15] 陈娜. 芽孢杆菌 AH-E-1 抗真菌肽的分离纯化、性质及产生条件研究[D]. 天津:天津大学, 2012. CHEN N. Isolation, purification, characterization and producing conditions of the antifungal peptides produced by *Bacillus* sp. AH-E-1[D]. Tianjin:Tianjin University, 2012.
- [16] 刘占英, 侯先志, 刘玉承, 等. 一株瘤胃纤维素降解菌的分离鉴定及其纤维素降解特性[J]. 微生物学通报, 2009, 36(3):459-464. LIU Z Y, HOU X Z, LIU Y C, et al. Isolation, identification and characterization of a cellulose-degrading bacterial strain from the rumen of sheep[J]. *Microbiology China*, 2009, 36(3):459-464.
- [17] 王洪媛, 范丙全. 三株高效秸秆纤维素降解真菌的筛选及其降解效果[J]. 微生物学报, 2010, 50(7):870-875. WANG H Y, FAN B Q. Screening of three straw-cellulose degrading microorganism[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(7):870-875.
- [18] LIU D, ZHANG R, YANG X, et al. Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes[J]. *International Biodegradation & Biodegradation*, 2011, 65(5):717-725.
- [19] LIAO H, FAN X, MEI X, et al. Production and characterization of cellulolytic enzyme from *Penicillium oxalicum* GZ-2 and its application in lignocellulose saccharification[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2015, 74:122-134.
- [20] QIN M, XU Q, SHAO Z, et al. Effect of bio-treatment on the lipophilic and hydrophilic extractives of wheat straw[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(12):3082-3087.
- [21] ZHANG Q, CAI W, WANG J. The stimulatory effects of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* BSZ-07 on rice straw decomposing[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2008, 20(8):975-980.
- [22] BALLESTEROS I, OLIVA J, CARRASCO J, et al. Effect of surfactants and zeolites on simultaneous saccharification and fermentation of steam-exploded poplar biomass to ethanol[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1998, 70:369-381.
- [23] KRISTENSEN J, BÖRJESSON J, BRUUN M, et al. Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40(4):888-895.
- [24] 付二红. 表面活性剂对生物催化木质纤维素影响及机制的研究[D]. 天津:天津大学, 2008. FU E H. Effect of surfactant on biocatalytic activity of lignocellulose and its mechanism[D]. Tianjin:Tianjin University, 2008.
- [25] ZHANG H, CHEN W, HAN X, et al. Intensification of sugar production by using Tween 80 to enhance metal-salt catalyzed pretreatment and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 339:125522.
- [26] 肖文静. 生物改性及表面活性剂结合策略对玉米秸秆生物质转化效率的影响[D]. 武汉:湖北大学, 2021. XIAO W J. Effects of biological modification and surfactant composite strategy on biomass conversion efficiency of corn stover[D]. Wuhan:Hubei University, 2021.
- [27] JOHNSON M. Detergents:Triton X-100, Tween-20, and more[J]. *Master Methods*, 2013, 3:163.
- [28] LEE S, AKEPRATHUMCHAI S, BUNDIDAMORN D, et al. Interplays of enzyme, substrate, and surfactant on hydrolysis of native lignocellulosic biomass[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1):5110-5124.
- [29] YOON S H, ROBYT J. Activation and stabilization of 10 starch-degrading enzymes by Triton X-100, polyethylene glycols, and polyvinyl alcohols[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, 37(5):556-562.
- [30] ZHANG W, LIU C, QU M, et al. Construction and characterization of a chimeric enzyme of swollenin and xylanase to improve soybean straw hydrolysis[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 156:558-564.
- [31] 张耿峻, 陈细妹, 韩业钜, 等. 表面活性剂辅助离子液体预处理稻秆的酶解动力学与结构变化分析[J]. 环境科学学报, 2017, 37(2):686-693. ZHANG G L, CHEN X M, HAN Y J, et al. Enzymatic kinetics and structure change analysis of rice straw by surfactant-assisted ionic liquid pretreatment[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2017, 37(2):686-693.
- [32] 王凤芹, 苏增平, 付晨青, 等. 表面活性剂降低烟碱对纤维素酶活性抑制作用的研究[J]. 河南农业大学学报, 2018, 52(3):412-417, 423. WANG F Q, SU Z P, FU C Q, et al. Effects of reducing nicotine on cellulase activity by surfactants[J]. *Journal of Henan Agricultural University*, 2018, 52(3):412-417, 423.
- [33] ZHOU Y, CHEN H, QI F, et al. Non-ionic surfactants do not consistently improve the enzymatic hydrolysis of pure cellulose[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 182:136-143.
- [34] LEU S, ZHU J. Substrate-related factors affecting enzymatic saccharification of lignocelluloses our recent understanding[J]. *Bioenergy Research*, 2013, 6(2):405-415.
- [35] 杨琼, 孙满吉, 黄立敏, 等. 玉米秸秆高效分解菌株的筛选、鉴定及产酶条件优化[J]. 中国饲料, 2012(19):31-33, 37. YANG Q, SUN M J, HUANG L M, et al. Screening, identification and cultural condition optimization of corn straw efficient decomposition strains[J]. *China Feed*, 2012(19):31-33, 37.
- [36] 何海燕, 陆秀青, 秦文芳, 等. 预处理及表面活性剂对米曲霉固体发酵产纤维素酶影响的研究[J]. 中国饲料, 2019(9):45-48. HE H Y, LU X Q, QIN W F, et al. Effect of pretreatment and surfactant on cellulase production by *Aspergillus oryzae* in solid fermentation[J]. *China Feed*, 2019(9):45-48.
- [37] PARNTHONG J, KUNGSANANT S, CHAVADEJ S. The influence of nonionic surfactant adsorption on enzymatic hydrolysis of oil palm fruit bunch[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2018, 186(4):895-908.
- [38] 陈逸桐. 生物表面活性剂的制备及其性能研究[D]. 大庆:东北石油大学, 2014. CHEN Y T. Preparation and performance evaluation of biosurfactants[D]. Daqing:Northeast Petroleum University, 2014.

(责任编辑:宋潇)