

张一枫, 窦森, 叶淑芬, 等. 里氏木霉利用玉米秸秆形成类胡敏酸(HAL)的特异性研究[J]. 农业环境科学学报, 2019, 38(9): 2184–2192.

ZHANG Yi-feng, DOU Sen, YE Shu-fen, et al. Specificity of humic acid-like (HAL) substance from *Trichoderma reesei*-inoculated corn straw[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2019, 38(9): 2184–2192.

里氏木霉利用玉米秸秆形成类胡敏酸(HAL)的特异性研究

张一枫, 窦森*, 叶淑芬, 张丹丹

(吉林农业大学资源与环境学院, 长春 130118)

摘要:为探明里氏木霉(*Trichoderma reesei*)在腐殖化过程中,不同培养时间下利用玉米秸秆得到的培养产物(HLS)的碱提取物——类胡敏酸(HAL)的结构特征是否具有与土壤胡敏酸相似的特异性,通过固体培养的方式模拟秸秆堆肥,在玉米秸秆中添加里氏木霉进行为期30 d的腐殖化培养,并以灭菌后不添加微生物的处理作为对照,在培养的0、15、30 d采样观察研究。通过元素组成、红外光谱及差热的技术手段对里氏木霉利用玉米秸秆形成的类胡敏酸(HAL)进行分析,与土壤的胡敏酸(HA)比较观察其特异性。对比CK,在模拟腐殖化的过程中,接种里氏木霉可以显著改变其HAL的结构特征,其芳香性/脂族性的比例变化符合多酚学说。里氏木霉可以在30 d内将HAL的元素结构集中在O/C=0.528、H/C=1.322左右,与土壤HA的O/C值、H/C值差异缩减了71.08%、49.25%,使其更加接近土壤HA的结构特征。总体来看,里氏木霉在分解矿化玉米秸秆中纤维素和木质素的同时,可以有效促进玉米秸秆向腐殖质的转化,其形成的HAL的结构变化支持了多酚学说。里氏木霉培养下的HAL可随着腐殖化培养时间的增加,与土壤HA的结构特征差异持续缩小,逐渐具有特异性。

关键词:腐殖化;玉米秸秆;里氏木霉;腐殖质特异性;类胡敏酸

中图分类号:X712 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2019)09-2184-09 doi:10.11654/jaes.2019-0360

Specificity of humic acid-like (HAL) substance from *Trichoderma reesei*-inoculated corn straw

ZHANG Yi-feng, DOU Sen*, YE Shu-fen, ZHANG Dan-dan

(College of Resources and Environment, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: To investigate the structural features of humic acid-like (HAL) substance from corn straw during the humification process of *Trichoderma reesei*, the alkaline extract of the culture product (Humic-like substances, HLS) was obtained. The extract demonstrated similar specificities to soil HA. Corn straw composting was simulated using solid culture. The humification process of corn straw was simulated for a period of 30 d using two treatments: (1) adding *T. reesei* and (2) uninoculated control after sterilization (CK). Samples were collected at 0, 15 d, and 30 d for observation. The HAL substance formed by *T. reesei* using corn straw were analyzed using elemental composition, infrared spectroscopy, and differential thermal techniques, and the specificity was determined from comparison with soil HA. The results showed that, compared with CK, inoculation with *T. reesei* significantly changed the structural characteristics of HAL substances and the ratio of aromatics/aliphatics during humification, which is in accordance with polyphenol theory. *T. reesei* concentrated the elemental structure of the HAL substance at O/C=0.528 and H/C=1.322 on day 30, and the difference between HAL and HA was reduced by 71.08% and 49.25%, with the HAL displaying similarity with the structural characteristics of HA. In general, *T. reesei* can effectively promote the conversion of corn straw to humus through cellulose and lignin decomposition and structural changes in HAL substances. The differences between the structural characteristics of soil HA and HAL from *T. reesei* culture decrease significantly during the humification process.

Keywords: humification; corn straw; *Trichoderma reesei*; specificity of humic substance; humic acid-like (HAL)

收稿日期:2019-04-02 录用日期:2019-05-13

作者简介:张一枫(1992—),女,吉林长春人,硕士研究生,从事土壤生物化学研究。E-mail:495575720@qq.com

*通信作者:窦森 E-mail:dousen1959@126.com

基金项目:国家重点研发计划项目(2016YFD0200304);国家自然科学基金项目(41571231);吉林省秸秆综合利用平台项目(2014C-1)

Project supported: The National Key Research Projects of China(2016YFD0200304); The National Natural Science Foundation of China(41571231); The Jilin Provincial Straw Platform for Comprehensive Utilization, China(2014C-1)

玉米秸秆作为普遍存在的农业固体废弃物,是研究腐殖化的原材料的重点对象,而其作为木质纤维素材料有着可再生且成本低的优势。玉米秸秆的分解及有效转化在全球碳循环中起着重要作用。而腐殖物质(Humus substances, HS)是腐殖化过程的最终产物,秸秆好氧堆肥的腐殖化过程与土壤腐殖化过程相近,是最典型的腐殖化过程^[1]。作为一种环境友好型技术,堆肥也是农业残留物处理的最佳方法之一,可以实现高效的生物转化^[2],是农业副产品可持续管理的重要解决方案^[3]。

土壤HS具有不同于其形成前体的化学组成与结构特征的“特异性”^[4],是经腐殖化作用形成的、具有特异性的、多相分布的类高分子化合物^[5]。在最为广泛认可的Schulten等^[6]提出的模型中,土壤胡敏酸(Humic acid, HA)是由长链脂族结构链接多个芳香环而形成,在芳香环和脂族侧链上还存在许多由羟基和羧基所构成的活性官能团^[7]。但与长期腐殖化的土壤相比,堆肥腐殖化的水平是较低的,相较于土壤中“成熟”的胡敏酸,秸秆堆肥中的类胡敏酸相对“稚嫩”^[8-9],但其中含有大量含氧基团,如羧基、酚羟基、醇羟基、甲氧基和醌基等^[10]。在类胡敏酸的分析中, Genevini等^[11]曾提出类胡敏酸通常分为类胡敏酸(Humic acid-like, HAL)和核心类胡敏酸(Core-humic acid-like, cHAL)2种。cHAL相比HAL是去除了脂类物质后得到的胡敏酸。关于腐殖质的形成过程,比较盛行的是多酚理论,即土壤有机质首先经微生物作用,分解为简单的有机化合物,例如保留原来芳香结构的多元酚类,成为腐殖质组成的结构单元,在酶的作用下,将多元酚氧化为醌^[12],醌与含氮化合物等缩合成为腐殖质。许多学者曾对此进行试验,发现真菌可以有效将木质素与纤维素降解转化,并进一步形成醌型化合物^[13]。

玉米秸秆主要由纤维素、半纤维素、木质素构成,上述三种成分之间存在各种化学键,共同构成植物细胞壁,最终变为难降解物质^[14]。通常在秸秆堆肥过程中,真菌对上述三种成分都有较为强力的分解作用,对玉米秸秆的矿化分解起着重要作用。在土壤有机质中,真菌作为K策略的微生物主要分解难降解的有机质,而细菌作为r策略微生物更喜欢利用活性有机质^[15]。微生物的死亡残体、代谢产物(如胞外酶、胞外多聚物等)或残留物(如几丁质、肽聚糖等)也均属于较难分解的有机质^[16],植物残体可以这些形式彻底被转化为土壤有机质。真菌的生物体因更难分解而对

土壤的有机库贡献更高。故使用真菌进行模拟腐殖化,对达到植物残体的利用效益最大化更加值得研究。木霉菌是有益真菌,可以促进有机废物利用,且对环境无危害性^[17]。里氏木霉(*Trichoderma reesei*)具有出色的木质纤维素酶的生产能力^[18-19]。如果选用里氏木霉这种对玉米秸秆分解矿化表现卓越的真菌,进行腐殖化培养,腐殖化进程是否能够被高效促进?其培养产物类腐殖质(Humic-like substances, HLS)的碱提取物——类胡敏酸的结构特征与土壤胡敏酸有着怎样的差异呢?是否同样具有特异性?

针对上述疑问,本研究选择了对玉米秸秆的木质纤维素综合利用能力较强的真菌:里氏木霉(*Trichoderma reesei*),通过固体好氧发酵的方式进行为期30 d的腐殖化培养,在培养的0、15、30 d采样观察研究。通过元素组成、红外光谱及差热手段进行分析真菌利用玉米秸秆得到的类腐殖质的碱提取物——类胡敏酸,与土壤的胡敏酸的结构进行比较。以期阐明真菌培养玉米秸秆得到的HAL的结构特异性以及真菌能否高效促进腐殖化进程提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 玉米秸秆样品概况

采样地点:吉林农业大学试验田玉米连作耕地(43°48'43.57"N, 125°23'38.50"E)。采样地点属于北温带大陆性半湿润季风性气候,春秋干旱多风,夏短多雨,冬长寒冷。温度最高月份为7月,平均23℃,年均温度为4.8℃,年均日照时间为2678 h,年均降水量为618 mm,多集中在7、8月。采样地点的土壤为半湿温半淋溶土亚纲黑土类,也就是所谓的黏淀湿润软土(Argiudolls),含碳量为12.31 g·kg⁻¹, C/N为9.84,于2017年10月4日采集土壤样品,且研究对比所用的土壤HA由该土壤制备。

采样的玉米秸秆植株品种为中金368(采购来源为北京金粒粒金种子有限公司),玉米种子于2017年4月底播种,10月初收获,基本性质为:秸秆有机碳376.4 g·kg⁻¹,全氮为7.44 g·kg⁻¹,全磷7.7 g·kg⁻¹,全钾4.5 g·kg⁻¹, C/N为61.8。实验用玉米秸秆于2017年10月4日采集,然后自然晾干并粉碎至0.5 cm。

1.1.2 供试微生物及微生物菌液的制备

里氏木霉(*T. reesei*)MCG77购买于ATCC(American Type Culture Collection)。

首先制取菌丝,将里氏木霉接种在固体斜面试管

中,内含30 mL培养基。培养基采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)。将接种好的试管放在28℃的培养箱中培养72 h,即制备成功,得到成熟菌丝。向试管中加入2 mL无菌水,振荡2 min,制取菌液,将上述液体转移到灭菌试管中。通过血球计数板计数,计算浓度并稀释,制成孢子浓度为 1×10^7 个 \cdot mL⁻¹的孢子悬液,最后将菌液加入至PDA液体培养基中,以1:10的比例接种,在温度30℃,转速为100 r \cdot min⁻¹的振荡培养箱中振荡培养6 d,得到含有孢团菌丝体的菌液。

PDA培养基:马铃薯(去皮)200 g \cdot L⁻¹,煮沸30 min并过滤,葡萄糖:20 g \cdot L⁻¹,琼脂:20 g \cdot L⁻¹。

PDA液体培养基:马铃薯(去皮)200 g \cdot L⁻¹,煮沸30 min并过滤,葡萄糖:20 g \cdot L⁻¹。

1.2 试验设计

1.2.1 腐殖化培养

培养组:将25 g秸秆粉末加入到三角瓶中后密封。置于灭菌锅中进行灭菌处理,参数设定:温度121℃,时间40 min。经过灭菌处理后,待温度下降至30℃开始加入菌液和无机矿物盐培养液(菌液10 mL、无机盐62.5 mL),用无菌透气性封口膜封口(能够保证空气交换且不会有外界粉尘进入),置于恒温振荡摇床上进行好氧发酵培养。

对照组:以灭菌后加入无机盐、不添加菌液的处理作为空白对照CK。

试验采用G-G 17三角瓶,容积为500 mL。

恒温振荡摇床设定参数:温度30℃;转速180 r \cdot min⁻¹(以达到充分振荡通气的目的)。

无机盐培养液含有:(NH₂)₂CO 4.2 g \cdot L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 19.6 g \cdot L⁻¹, CaCl₂ 0.028 g \cdot L⁻¹, KH₂PO₄ 28 g \cdot L⁻¹, MgSO₄ 4.2 g \cdot L⁻¹, FeSO₄·7H₂O 0.07 g \cdot L⁻¹, MnSO₄ 0.021 g \cdot L⁻¹, ZnSO₄ 0.019 g \cdot L⁻¹, CoCl₂ 4.2 g \cdot L⁻¹, 酵母膏 7 g \cdot L⁻¹, pH=5。

1.2.2 样品采集

将腐殖化培养时间设置为0、15、30 d,共3组,每组时间设3个重复。

到培养时间后,分别将样品取出,在55℃条件下干燥、粉碎并混匀,全部过0.25 mm筛后备用。

1.3 测定项目与方法

1.3.1 类腐殖质的提取分组

参照土壤腐殖质组成修改法^[20],从玉米秸秆培养样品中提取类富里酸(FAL)、类胡敏酸(HAL)和类胡敏素(HLM)。通过重铬酸钾氧化法^[21]对玉米秸秆的总有机碳含量(TOC)及各组分的含碳量进行测定,并

计算HAL的相对含量以及其在类腐殖质中所占比例(PQ值)。

HAL组分相对含量为该组分的有机碳含量占玉米秸秆TOC的百分比:

$$HAL = HAL(g \cdot kg^{-1}) / TOC(g \cdot kg^{-1}) \times 100\%$$

PQ值的计算公式:

$$PQ = HAL(g \cdot kg^{-1}) / [HAL(g \cdot kg^{-1}) + FAL(g \cdot kg^{-1})] \times 100\%$$

比较所用的土壤腐殖质提取分组方法同上。

1.3.2 类胡敏酸的提取与纯化

腐殖化产物HLS中的碱提取物HAL:提取纯化根据国际腐殖质协会推荐方法操作^[22],具体步骤为:将烘干后的秸秆样品称量2.5 g加入离心管中,加入1 mol \cdot L⁻¹ HCl溶液静置1 h后用浓度为0.1 mol \cdot L⁻¹的HCl调节固液比为1:10。在25℃室温条件下振荡离心管6次,每次约10 min,然后低速离心弃上清液,在离心管中加入0.1 mol \cdot L⁻¹ NaOH溶液至固液比为1:10,用1 mol \cdot L⁻¹ NaOH调节pH为13~14,立即向离心管中充大约30 s N₂并密封。在25℃室温下振荡,1次 \cdot h⁻¹,12次后静置过夜。静置过夜后低速离心保留上清液HLE(Humus-like extracted),以上碱提取过程重复3次。用6 mol \cdot L⁻¹ HCl将HLE调节至pH为1~2,静置过夜后低速离心沉淀即为HAL。用较少量的0.1 mol \cdot L⁻¹ KOH溶解沉淀,加入KCl使K离子浓度达到0.3 mol \cdot L⁻¹,静置1 h后高速离心去除悬浮物,用6 mol \cdot L⁻¹ HCl调节pH=1.0,静置12~16 h,高速离心弃上清液得到沉淀为HAL,用0.1 mol \cdot L⁻¹ HCl与0.3 mol \cdot L⁻¹ HF混合溶液酸洗HAL,次日经高速离心弃掉上清液,上述混合酸洗过程共重复3次。酸洗完成后,将离心管中沉淀电渗析至无Cl⁻(AgNO₃检测),经旋转蒸发,冻干,得到最终纯化的HAL干样品。

比较所用的土壤HA的提取纯化方法同上。

1.3.3 结构特征分析测定方法

元素组成:采用德产Vario ELIII型元素分析仪测定,在C/H/N模式下进行测量,用差热分析中计算出的水分和灰分对数据进行校正,其中C、H、N元素含量为实测值,O+S元素含量采用差减法计算。

热稳定性:采用日本岛津TA-60型热重分析仪测定,称取样品量为5~7 mg,在60 mL \cdot min⁻¹的空气流量条件下,以15℃ \cdot min⁻¹的升温速率由35℃升至700℃。使用仪器自带软件来进行差热分析(Differential Thermal Analysis, DTA)和热重分析(Thermo Gravimetric Analysis, TG或TGA)。

红外光谱:采用KBr压片法,在美国 Nicolet AV-360 傅里叶变换红外光谱仪上进行测定,波数范围为4000~500 cm^{-1} ,分辨率为4 cm^{-1} ,扫描次数为6,图谱采用Omic Version 8.2软件包分析,对红外谱图的特征吸收峰进行峰面积计算,并对相对应的特征基团进行半定量分析。

1.4 数据处理

使用Excel 2017进行数据处理,SPSS 22.0用作试验后结果的统计分析和差异显著性检验,用Origin 8.6绘制图谱。

2 结果与分析

2.1 不同培养时间 HAL 的外观及含量变化

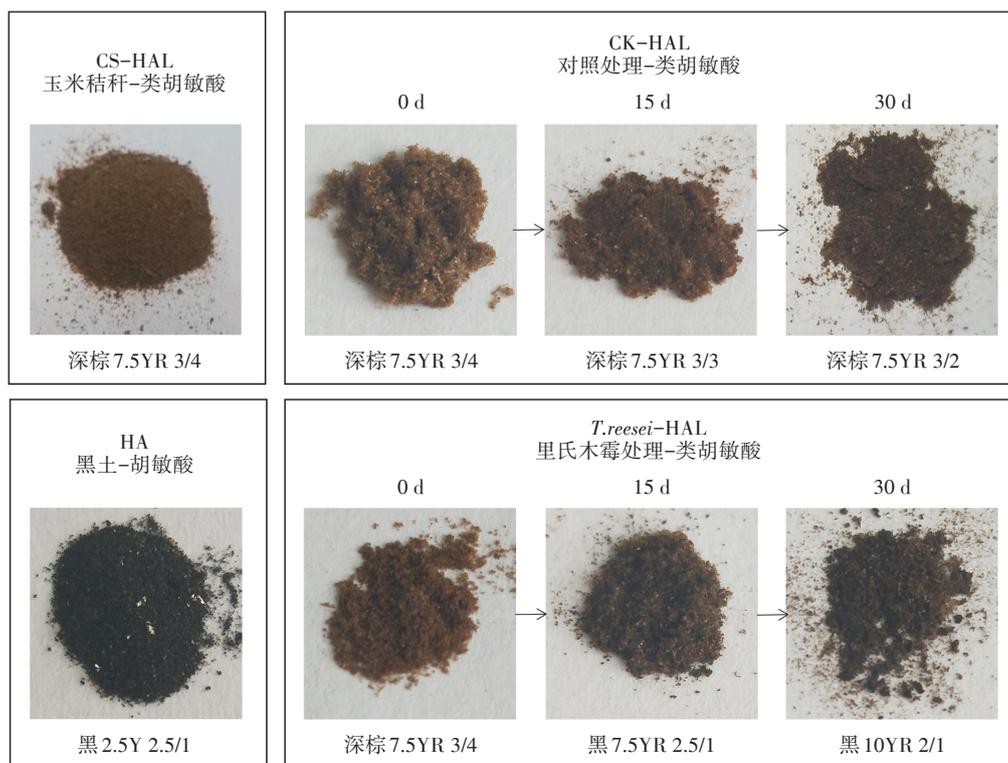
通过图1对于HAL的外观观察,可以发现秸秆中提取的HAL是深棕色的,土壤中提取的HA是黑色的,二者在颜色上有很大差异。但无论是 *T. reesei* 处理还是CK,HAL的颜色均会随着腐殖化培养时间的增加而变深,而 *T. reesei* 处理在30 d的颜色比同期CK处理的颜色要更深,与土壤HA更加相近。

在30 d的腐殖化过程中2种处理的TOC呈下降

趋势, *T. reesei* 处理差异显著,HLM的下降是引起TOC下降的主要因素。通过表1和图2均可以发现2种处理的HAL的相对含量均随着腐殖化时间的增加而提高, *T. reesei* 处理差异显著。在0 d时,类腐殖质组分中FAL有机碳含量高而HAL有机碳含量低;但在15 d时, *T. reesei* 处理的HAL有机碳含量已超越了同期的FAL;30 d时 *T. reesei* 处理的HAL有机碳含量与CK相比增幅更大且差异显著,其HAL的相对含量在30 d高达21.49%,是CK处理2倍左右,其PQ值在此时也是CK处理的近2倍,非常接近土壤的PQ值。但土壤HA的相对含量为28.54%,仍高于HAL的相对含量很多。

2.2 不同培养时间 HAL 的元素组成变化

表2为不同时间里氏木霉对HAL元素组成的影响情况。HAL在腐殖化期间呈现C高O低的状态,C元素占HAL元素组成的50%以上。2种处理的HAL的C/N在培养一开始均在18.3左右,随着腐殖化时间的增加均呈现不同程度的下降趋势, *T. reesei* 处理的下降幅度大于CK处理,并在30 d时接近土壤HA的C/N比值;2种处理的HAL在30 d内H元素均



图片下方文字为每个样品所对应的门塞尔土壤比色卡颜色标记

The text below the image is the color number of the *Munsell Soil Color Charts* for each sample

图1 土壤HA与不同培养时间下HAL的外观比较

Figure 1 Comparison of the appearance between the HAL in different culture times and soil HA

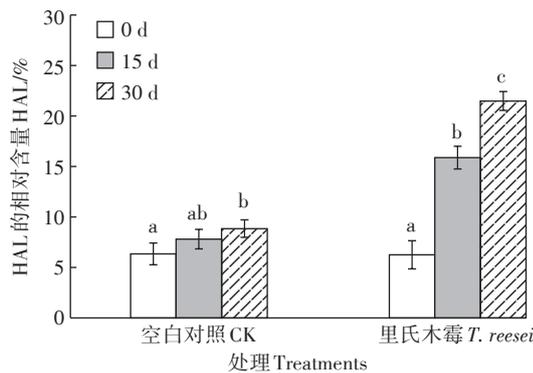
表1 里氏木霉对玉米秸秆类腐殖质组分有机碳含量的影响

Table 1 Effect of *T. reesei* of corn straw on composition and PQ value of soil humus

处理 Treatments	培养时间 Culture time/d	总有机碳 TOC/g·kg ⁻¹	类胡敏酸 HAL/g·kg ⁻¹	类富里酸 FAL/g·kg ⁻¹	类胡敏素 HLM/g·kg ⁻¹	PQ值 PQ/%
空白对照 CK	0	376.4a	23.86a	41.44a	224.4a	36.54a
	15	373.7a	29.17ab	46.64ab	218.9a	38.80a
	30	366.3a	32.37b	48.81b	216.4a	39.87a
里氏木霉 <i>T. reesei</i>	0	376.4a	23.54a	41.25b	223.6c	36.90a
	15	331.0b	52.55b	43.29c	158.5b	54.83b
	30	316.6c	62.03c	35.27a	133.7a	63.75c
土壤 Soil	—	12.31	3.513	1.964	5.282	64.14

注:小写字母不同代表各处理中差异显著($P<0.05$)。下同。

Note: Different lowercase letters indicate significant differences among treatments ($P<0.05$). The same below.



不同小写字母代表处理间差异显著($P<0.05$)。下同
Different lowercase letters indicate significant differences among treatments ($P<0.05$). The same below

图2 里氏木霉处理下不同培养间的HAL相对含量

Figure 2 Relative contents of HAL under *T. reesei* treatment in different culture time

下降,O元素均增高,*T. reesei*处理的变化幅度更大。

通过对元素组成分析,可以简单分析和判断样品中分子结构的变化情况。H/C可以直观地表征HA的缩合度,O/C可以表征氧化度强弱,与含氧基团数量成正比^[23]。根据分析结果采用H/C和O/C原子比绘制出图3,即范氏图(Van Krevelen图)。

在腐殖化培养开始时,无论是*T. reesei*还是CK处理,其碱提取物HAL都处于O/C=0.482、H/C=1.471附近的位置上;培养15d以后,CK处理的位置仅有微小变化,而*T. reesei*处理的O/C升高,H/C下降;培养30d时,CK处理的位置更加集中在O/C=0.494、H/C=1.452的附近,而*T. reesei*处理的位置却更加集中在O/C=0.531、H/C=1.330的附近,在30d内与土壤HA的O/C差异缩减了71.08%,H/C比值差异缩减了49.25%,更加接近土壤HA的结构特征。

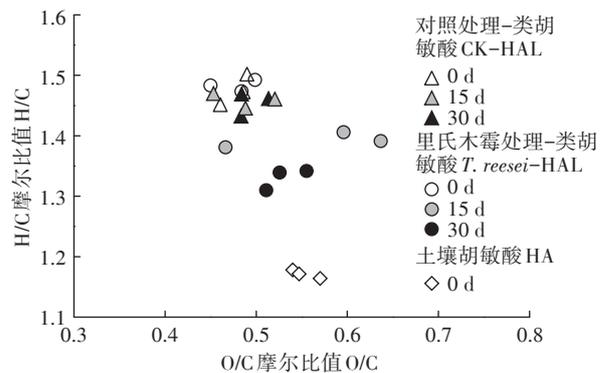


图3 不同培养时间下HAL中H/C和O/C的相关性
Figure 3 Correlation of H/C and O/C in HAL in different culture time

表2 不同培养时间下里氏木霉对HAL元素组成的影响

Table 2 Effect of *T. reesei* on the elemental composition of HAL in different culture time

处理 Treatments	培养时间 Culture time/d	C/g·kg ⁻¹	N/g·kg ⁻¹	H/g·kg ⁻¹	O/g·kg ⁻¹	C/N
对照-类胡敏酸 CK-HAL	0	548.0a	34.90b	67.27a	349.8b	18.32a
	15	545.3b	34.74b	66.19b	354.8a	18.31a
	30	542.3c	35.15a	65.62c	356.9a	18.00a
里氏木霉-类胡敏酸 <i>T. reesei</i> -HAL	0	548.3a	34.91b	67.84a	349.0c	18.33a
	15	517.2c	34.70b	60.01b	388.1a	17.39b
	30	530.2b	35.86a	58.77c	375.2b	17.25b
土壤胡敏酸 HA	—	525.8	35.76	51.31	387.2	17.16

2.3 不同培养时间HAL的红外光谱

不同腐殖化培养时间的 *T. reesei*、CK 处理的 HAL 与土壤 HA 的 FTIR 如图 4 所示。*T. reesei* 与 CK 处理相比在官能团区的吸收峰强度变化较大,而在指纹区仅略有变化,特征峰的相对影响强度的半定量分析见表 3。

官能团区中 3400 cm^{-1} 处的宽峰是由酚类 Ar-OH、羟基或羧基的 O-H 振动引起。相比于 CK, *T. reesei* 处理可随着模拟腐殖化时间的增加,增加 HAL 的羟基含量。 2920 cm^{-1} 代表不对称脂族- CH_3 的 C-H 伸缩振动峰, 2850 cm^{-1} 代表- CH_2 -对称脂族 C-H 伸缩振动峰^[24], 1720 cm^{-1} 则由羧基、醛或酮的 C=O 振动所致^[25], I_{2920}/I_{1720} 的值可以衡量脂族含量^[26]。2 种处理的 HAL 在 2920 cm^{-1} 的吸收峰的相对强度在整个培养期间均随时间而增加,*T. reesei* 的增幅大于 CK;*T. reesei*、CK 处理在 1720 cm^{-1} 的吸收峰相对强度在 0~15 d 均增加,但在 15~30 d 时 CK 仍保持增加的同时 *T. reesei* 却下降了。*T. reesei* 处理的 I_{2920}/I_{1720} 值在 0~15 d 下降了 0.58,而 CK 在此期间仅降了 0.05;在 15~30 d 时 *T. reesei* 处理的 I_{2920}/I_{1720} 值回升,较同期仍保持下降的 CK 处理小 0.22。 1620 cm^{-1} 及 1500 cm^{-1} 处来自芳香烃的 C=C 骨架振动(呼吸),在确定是否有芳核的存在时有重要意义。因此 I_{2920}/I_{1620} 值可以衡量芳香性的强弱。*T. reesei* 处理的 HAL 的 I_{2920}/I_{1620} 值在 0~15 d 降低了 0.46,在 15~30 d 时下降了 0.07,而同期的 CK 处理在 30 d 内仅下降了 0.06。*T. reesei* 处理的 HAL 的 2 项比值在培养的 30 d 过程中更接近土壤 HA,但仍与土壤 HA 有很大差距。

指纹区中 1230 cm^{-1} 的峰归属于芳香基团的 C-OH 振动或芳基醚和酚类的 C-O-C 振动,脂族的 C-OH 振动可引起 1122 cm^{-1} 处峰^[27]。2 种处理在上述 2

处的吸收峰相对强度在 30 d 内持续增加,其中 *T. reesei* 处理的增幅更大。 1034 cm^{-1} 处的峰可代表多糖与类多糖物质中 C-O 的存在。*T. reesei* 处理的 HAL 在 1034 cm^{-1} 处的相对强度随培养时间增加而持续降低,而 CK 在此处无明显变化。

2.4 不同培养时间 HAL 的热稳定性变化

图 5 是 HAL 的 DTA 及 TG 曲线,HAL 样品在分解过程中表现为中温放热 ($326\sim 352\text{ }^\circ\text{C}$) 和高温放热 ($394\sim 535\text{ }^\circ\text{C}$),且 HAL 始终较土壤 HA 多一个 ($394\sim 455\text{ }^\circ\text{C}$) 高温放热峰。值得注意的是 CK 处理在 0 d 时 DTA 曲线与 *T. reesei* 处理相似,但其从左至右的高温放热峰较同期 *T. reesei* 处理的分别低 $24、45\text{ }^\circ\text{C}$;15 d 时,*T. reesei* 处理的高温放热峰发生明显变化,而 CK 处理的 DTA 曲线线型仍与 0 d 相似;在 30 d 时 CK 处理的高温峰发生了分峰现象,而 *T. reesei* 处理在 30 d 时的 DTA 曲线线型则与土壤 HA 更加接近。*T. reesei* 处理的高温峰随着培养时间的增加发生了左移,并逐

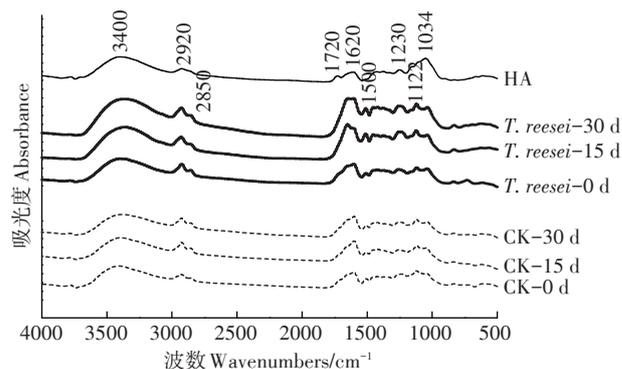


图 4 不同培养时间 *T. reesei*、CK 处理下的 HAL 与土壤 HA 的 FTIR 谱图

Figure 4 FTIR spectras of HA of soil, HAL of *T. reesei* and CK treatments in different culture time

表 3 不同培养时间下 *T. reesei*、CK 处理下的 HAL 与土壤 HA 的 FTIR 光谱主要吸收峰相对强度比较

Table 3 Effects of relative intensity of the main absorption peaks in the FTIR spectrum of HA of soil, HAL by *T. reesei* and CK treatments in different culture time

处理 Treatments	培养时间 Culture time/d	相对强度 Relative intensity/%									比值 Ratio	
		3400	2920	2850	1720	1620	1500	1230	1122	1034	I_{2920}/I_{1720}	I_{2920}/I_{1620}
对照-类胡敏酸 CK-HAL	0	46.94	3.14	0.55	1.96	2.18	0.75	2.67	1.29	2.32	1.60	1.38
	15	47.05	3.21	0.69	2.06	2.34	0.93	2.70	1.34	2.29	1.55	1.37
	30	47.13	3.34	0.64	2.38	2.52	1.16	2.79	1.37	2.26	1.40	1.32
里氏木霉-类胡敏酸 <i>T. reesei</i> -HAL	0	47.11	3.72	1.00	2.32	2.72	0.93	2.72	1.30	2.38	1.60	1.37
	15	47.70	3.96	1.24	3.88	4.35	1.37	3.41	1.49	2.14	1.02	0.91
	30	48.18	4.05	1.44	3.44	5.04	1.43	3.58	1.54	1.89	1.18	0.80
土壤胡敏酸 HA	—	52.40	2.90	1.23	4.74	6.58	0.10	2.12	0.56	0.94	0.61	0.44

渐接近土壤HA放热峰的分布位置。

表4为HAL的半定量分析,*T. reesei*、CK处理均随着模拟腐殖化时间的增加,其HAL的热量高/中、失重高/中比值在0~15 d不同程度地增加,*T. reesei*在30 d时的失重高/中比值有微小下降,30 d内其2项比值分别提升了1.539、0.378;CK处理的2项比值在30 d内仅提升了0.103、0.037。

3 讨论

仅通过外观变化便可以判定,HAL与成熟土壤中的HA仍存在着很大的差别,但伴随着腐殖化过程中*T. reesei*对玉米秸秆的转化合成与利用,使其在外观上更加接近了HA,缩小了原本的差异。不仅是外观的变化,HAL的相对含量在30 d时已经是同期CK的2倍。Juradom等^[28]发现半纤维素、纤维素和木质素降解率比未接种微生物的堆体分别高28%、21%和25%,接种微生物可以增加HS的数量从而加快腐殖化进程。李国平等^[29]认为放入微生物菌剂能够较为显著增加胡敏酸含量。

通过对不同腐殖化时间下HAL元素组成分析,发现接种*T. reesei*可以有效降低HAL的C/N值。在腐殖化的过程中C和N是最重要的2种元素,C为微生物提供能源,N可以提供微生物建造细胞结构^[30]。Eneji等^[31]通过元素分析得出秸秆堆肥过程中类胡敏酸的结构是C高O低的,表明其氧化程度较低,同时堆肥过程中有机物含量、总C含量一般呈减少的趋势,但腐殖酸的相对含量是增加的。Amir等^[32]通过元素分析得出,在好氧发酵过程中HA的H含量减少,H/C值和C/N值下降。而在本实验中,C元素在HAL中表现为先下降后升高的变化趋势。这可以归因于在15~30 d的高分解阶段,释放出了一些来自其他顽固结构(如木质素)中的一些脂族化合物。Sánchez-Monedero等^[33]曾研究表明,在堆肥过程中一些其他物质如木质素的降解残留物被释放出来,其表现的特征与HA类似,并会在pH=2时沉淀。

通过分析范氏图的分布状况,结合FTIR谱图,可以得出接种*T. reesei*处理的HAL的O/C呈现出均值增加又略有下降的趋势,可以归因于在15~30 d新被释

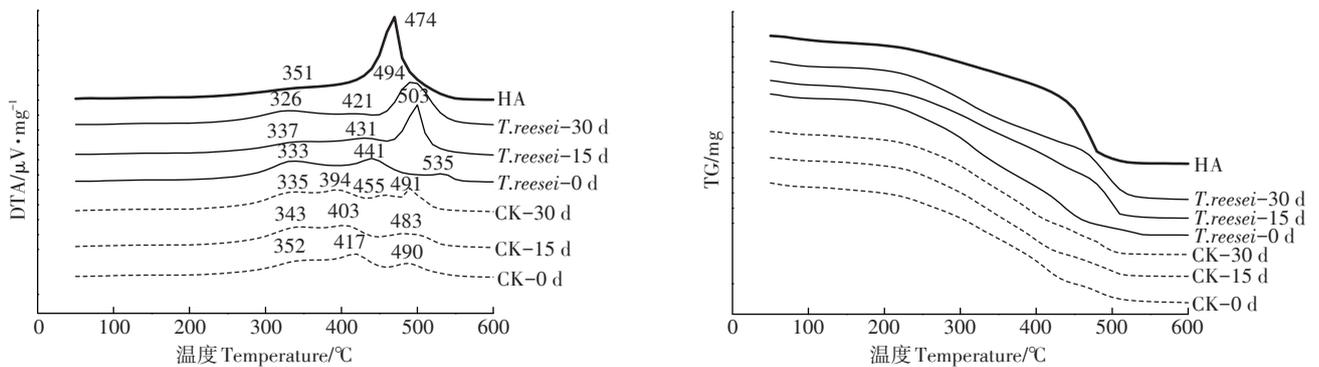


图5 里氏木霉对HAL的DTA与TG曲线的影响

Figure 5 Effects of *T. reesei* on DTA and TG curves of HAL

表4 不同培养时间里氏木霉HAL及土壤HA的放热与失重比较分析

Table 4 Exothermic heat and mass loss of *T. reesei*'s HAL in different culture times and soil HA

处理 Treatments	时间 Time/d	放热量 Exothermic heat/kJ·g ⁻¹		热量高/中比值 High/Medium ratio of exothermic heat	失重 Mass loss/mg·g ⁻¹		失重高/中比值 High/Medium ratio of mass loss
		中温 Medium	高温 High		中温 Medium	高温 High	
对照-类胡敏酸 CK-HAL	0	1.636	2.304	1.408	432.0	177.9	0.412
	15	1.587	2.270	1.431	425.5	180.5	0.424
	30	1.611	2.434	1.511	409.2	183.9	0.449
里氏木霉-类胡敏酸 <i>T. reesei</i> -HAL	0	1.645	2.319	1.410	431.4	178.6	0.414
	15	1.250	3.042	2.434	368.6	251.4	0.682
	30	1.303	3.843	2.949	345.9	274.1	0.792
土壤胡敏酸HA	—	0.479	4.036	8.421	204.5	439.0	2.147

放出的氧化度较低的脂族化合物致使 O/C 值下降,这与 HAL 在 30 d 时的 I_{2920}/I_{1720} 值和中温放热回升、失重下降变缓的结果相符。*T. reesei* 处理下的 HAL 的 H/C 却能持续降低,且在 FTIR 和 DTA、TG 的分析结果中显示前 0~15 d 时 HAL 的芳香性增加速度高于 15~30 d。促成这种现象的原因是 0~15 d 的腐殖化过程中, HAL 中的脂族碳易被利用,而芳香碳较稳定在此期间被保留,即核心胡敏酸(cHAL)在此期间逐渐暴露,致使 H/C 下降,这一结果符合多酚学说。Adani 等^[34]将 HAL 分为不易被生物利用的稳定组分(芳香碳)和易被微生物降解的不稳定组分(脂肪族碳)研究,他提出 HAL 的形成是通过不稳定部分的降解和更稳定部分的保存而进行。但 HAL 的降解与合成是同时进行的,很显然在 15~30 d 时,伴随着降解过程中脂族性物质的不断释放增多,芳香族/脂肪族的比例仍在显著提升,这要归功于 *T. reesei* 的合成作用。Jouraihy 等^[35]通过傅里叶红外光谱分析,发现 HS 在好氧发酵后芳香结构增多,其来源于发酵原料和微生物合成。Awasthi 等^[36]研究表明,接种真菌处理的 HAL 芳香化程度比未接种处理更高。在本研究的 FTIR 的半定量分析中,*T. reesei* 处理下的 HAL 在 1620 cm^{-1} 处和 1500 cm^{-1} 处来自芳香烃的 C=C 骨架振动的吸收峰强度持续增加、 I_{2920}/I_{1620} 比值持续降低也均可证明 HAL 的结构在模拟腐殖化的过程中芳香性持续增加。在 HAL 和 HLS 的 DTA 与 TG 分析中也可以发现接种 *T. reesei* 可以在 30 d 内大幅改变芳香性与脂族性物质的比例分布,增加热稳定性。

通过观察 FTIR 谱图中 1034 cm^{-1} 处的相对强度变化,可以判断在 *T. reesei* 处理下的 HAL 中,多糖类物质在 30 d 内大幅下降,相对于 HAL 中的其他碳源,多糖更容易被 *T. reesei* 消耗和利用,González-Pérez 等^[37]认为多糖在 HA 中的含量可以表征该土壤有机质组成与植物残体的接近程度。HA 中的多糖类物质含量越低,其腐殖质越成熟, 1034 cm^{-1} 处影响强度的降低预示着 *T. reesei* 可以在 30 d 内有效促进 HAL 向成熟的 HA 转化。

4 结论

(1) 在 30 d 的腐殖化过程中,接种里氏木霉(*T. reesei*)可以显著改变其培养产物的碱提取物——类胡敏酸(HAL)的结构特征,其芳香性/脂族性的比例变化支持了多酚学说。

(2) HAL 在整个过程中随着模拟腐殖化时间的

增加,与土壤 HA 的特征差异持续缩小。里氏木霉可以在 30 d 内将 HAL 的元素结构集中在 O/C=0.528、H/C=1.322 左右,与土壤 HA 的 O/C 比值、H/C 比值差异缩减了 71.08%、49.25%。

(3) 里氏木霉在降低 HAL 的脂族性、增强芳构化程度和热稳定性方面能力很强,可以高效促进玉米秸秆的腐殖化进程。虽然里氏木霉处理下的 HAL 并不具备与土壤 HA 完全相同的特异性,但其可随着模拟腐殖化时间的增加,与土壤 HA 的结构特征差异持续缩小,逐渐具有特异性。为利用里氏木霉与玉米秸秆腐殖化的应用提供参考。

参考文献:

- [1] 唐景春,孙青,王如,等.堆肥过程中腐殖酸的生成演化及应用研究进展[J].环境污染与防治,2010(5):73-77,88.
TANG Jing-chun, SUN Qing, WANG Ru, et al. Progress in the formation, evolution and application of humic acid during composting[J]. *Environmental Pollution and Prevention*, 2010(5):73-77, 88.
- [2] Zhang L, Zhang H, Wang Z, et al. Dynamic changes of the dominant functioning microbial community in the compost of a 90 m³ aerobic solid state fermentor revealed by integrated meta-omics[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 203:1-10.
- [3] Zhang X, Zhong Y, Yang S, et al. Diversity and dynamics of the microbial community on decomposing wheat straw during mushroom compost production[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 170:183-195.
- [4] 窦森,李艳,关松,等.腐殖物质特异性及其产生机制[J].土壤学报,2016(4):821-831,53.
DOU Sen, LI Yan, GUAN Song, et al. The structural distinctiveness of humic substances and its formation mechanism in simulated incubation[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2016(4):821-831, 53.
- [5] Rodríguez F J, Schlenger P, García-Valverde M. A comprehensive structural evaluation of humic substances using several fluorescence techniques before and after ozonation. Part I: Structural characterization of humic substances[J]. *Science of the Total Environment*, 2014, 476/477:718-730.
- [6] Schulten H R, Schnitzer M. A state of the art structural concept for humic substances[J]. *Naturwissenschaften*, 1993, 80:29-30.
- [7] Kelleher B P, Simpson A J. Humic substances in soils: Are they really chemically distinct? [J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40:4605-4611.
- [8] Kawasaki S, Maie N, Watanabe A. Composition of humic acids with respect to the degree of humification in cultivated soils with and without manure application as assessed by fractional precipitation[J]. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2008, 54(1):57-61.
- [9] Camiatelli P, Ceppi S. Effects of composting technologies on the chemical and physicochemical properties of humic acids[J]. *Geoderma*, 2008, 144(1/2):325-333.
- [10] Quagilto P L, Montonoeri E, Tambone F, et al. Chemicals from

- wastes: Compost-derived humic acid-like matter as surfactant[J]. *Environment Science Technology*, 2006, 40(5): 1686-1692.
- [11] Genevini P, Adani F, Veecken A H, et al. Qualitative modifications of humic acid-like and core-humic acid-like during high-rate composting of pig faeces amended with wheat straw[J]. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2002b, 48(2): 143-150.
- [12] 付丽丽. 作为秸秆纤维素降解菌的分离与筛选[D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
FU Li-li, Separation and screening of straw cellulose degrading bacteria[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2012.
- [13] Bahri H, Rasse D P, Rumpel C, et al. Lignin degradation during a laboratory incubation followed by ^{13}C isotope analysis[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40(7): 1916-1922.
- [14] Sánchez C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi[J]. *Biotechnology Advances*, 2009, 27(2): 185-194.
- [15] Grover M, Maheswari M, Desai S, et al. Elevated CO_2 : Plant associated microorganisms and carbon sequestration[J]. *Applied Soil Ecology*, 2015, 95: 73-85.
- [16] Liang C, Schimel J P, Jastrow J D. The importance of anabolism in microbial control over soil carbon storage[J]. *Nature Microbiology*, 2017: 2(8): 17105.
- [17] 宋仅星. 新型稻草还田多功能复合菌系的构建及其功能研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2011.
SONG Jin-xing. Construction and functional study of a novel multi-functional compound strain of straw returning to the field[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2011.
- [18] Reynaldo D C, Felipe R P, Cristóbal N A, et al. Forced aeration influence on the production of spores by *Trichoderma* strains[J]. *Waste Biomass Valorization*, 2017, 8: 2263-2270.
- [19] Gasto'n E O, Mari'a E G, et al. Characterization, optimization, and scale-up of cellulases production by *Trichoderma reesei* cbs 836. 91 in solid-state fermentation using agro-industrial products[J]. *Bioprocess Biosystems Engineering*, 2015, 38: 2117-2128.
- [20] Kumada K, Sato O, Ohsumi Y, et al. Humus composition of maintain soil in central Japan with special reference to the distribution of P-type humic acid[J]. *Soil Science and Plant Nutrition*, 1967, 13(5): 151-158.
- [21] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000: 30-34.
LU Ru-kun. Soil agricultural chemical analysis method[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000: 30-34.
- [22] Kuwatsuka S, Watanabe A, Itoh K, et al. Comparison of two methods of preparation of humic and fulvic acids, IHSS method and NAGOYA method[J]. *Soil Science and Plant Nutrition*, 1992, 38(1): 23-30.
- [23] 窦森. 土壤有机质[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 95-98.
DOU Sen. Soil organic matter[M]. Beijing: Science Press, 2010: 95-98.
- [24] Filip Z, Tesarová M. Microbial degradation and transformation of humic acids from permanent meadow and forest soils[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2004, 54: 225.
- [25] Zhang Y L, Du J Z, Zhang F F, et al. Chemical characterization of humic substances isolated from mangrove swamp sediments: The Qinglan area of Hainan Island, China[J]. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2011, 93: 220.
- [26] 肖彦春, 窦森. 土壤腐殖质各组分红外光谱研究[J]. 分析化学, 2007, 11(35): 1596.
XIAO Yan-chun, DOU Sen. Infrared spectroscopy study on various components of soil humus[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2007, 11(35): 1596.
- [27] Zhang J J, Hu F, Li H X, et al. Effects of earthworm activity on humus composition and humic acid characteristics of soil in a maize residue amended rice-wheat rotation agroecosystem[J]. *Applied Soil Ecology*, 2011, 51: 1-8.
- [28] Juradom M, Suárez-estrella F, López M J, et al. Enhanced turnover of organic matter fractions by microbial stimulation during lignocellulosic waste composting[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 186: 15-24.
- [29] 李国平, 杨鹭生, 王宇晴, 等. 不同微生物菌剂对芒萁秸秆腐熟过程中腐殖质构成的影响[J]. 热带作物学报, 2015, 36(4): 719-723.
LI Guo-ping, YANG Lu-sheng, WANG Yu-qing, et al. Effects of several microorganisms on humus formation in stalk decomposition of *Dicranopteris dichotoma*[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2015, 36(4): 719-723.
- [30] Iqbal M K, Shafiq T, Hussain A, et al. Effect of enrichment on chemical properties of MSW compost[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(15): 5969-5977.
- [31] Eneji A E, Honna, T, Yamamoto S, et al. Changes in humic substances and phosphorus fractions during composting[J]. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 2003, 34: 15-16.
- [32] Amir S, Jouraiphy A, Meddich A, et al. Structural study of humic acids during composting of activated sludge-green waste: Elemental analysis, FTIR and ^{13}C NMR[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 177(1/2/3): 524-529.
- [33] Sánchez-Monedero M, Roig A, Cegarra J, et al. Relationships between water-soluble carbohydrate and phenol fractions and the humification indices of different organic wastes during composting[J]. *Bioresource Technology*, 1999, 70(2): 193-201.
- [34] Adani F, Ricca G. The contribution of alkali soluble (humic acid-like) and unhydrolyzed-alkali soluble (core-humic acid-like) fractions extracted from maize plant to the formation of soil humic acid[J]. *Chemosphere*, 2004, 56(1): 13-22.
- [35] Jouraiphy A, Amir S, Winterton P, et al. Structural study of the fulvic fraction during composting of activated sludge-plant matter: Elemental analysis, FTIR and ^{13}C NMR[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(5): 1066-1072.
- [36] Awasthi M K, Pandey A K, Khan J, et al. Evaluation of thermophilic fungal consortium for organic municipal solid waste composting[J]. *Bioresource Technology*, 168: 214-221.
- [37] González-Pérez M, Torrado P V, A Colnaga L A, et al. ^{13}C NMR and FTIR spectroscopy characterization of humic acids in spodosols under tropical rain forest in southeastern Brazil[J]. *Geoderma*, 2008, 146: 425.