

胡海红, 孙继颖, 高聚林, 等. 低温高效降解玉米秸秆复合菌系发酵条件优化及腐解菌剂的研究[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(8): 1602–1609.
HU Hai-hong, SUN Ji-ying, GAO Ju-lin, et al. Optimization of fermentation conditions for low-temperature and high-efficiency composite microbial system for corn stover degradation and preliminary development of microbial inocula[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2016, 35(8): 1602–1609.

低温高效降解玉米秸秆复合菌系发酵条件优化及腐解菌剂的研究

胡海红¹, 孙继颖^{1*}, 高聚林², 王 振¹, 包闹干朝鲁¹, 胡树平², 青格尔¹

(1. 内蒙古农业大学农学院, 呼和浩特 010018; 2. 内蒙古农业大学职业技术学院, 内蒙古 包头 014100)

摘 要:为解决北方低温条件下玉米秸秆降解难的问题, 利用筛选于锯末的一组玉米秸秆降解复合菌系 GF-S72, 通过单因素、正交试验及载体生物相容性试验, 研究了复合菌系的发酵条件、菌剂载体类型、用量及保存条件。结果表明, 复合菌系 GF-S72 最佳发酵条件为: 尿素 0.1%、碳氮比 20:1、培养温度 10 ℃、初始 pH 为 8.0、装液量 18 mL/150 mL、培养时间 6 d、接种量 2%。基于试验选取硅藻作为最佳载体, 在菌液:载体=3:1、菌剂与秸秆配比为 0.05 g/2 g, 制备低温高效降解玉米秸秆复合型菌剂。试验结果还表明, pH 值为 8.2、含水量为 1.42%、保藏湿度为 10%、保藏温度为 15 ℃时, 复合型菌剂降解玉米秸秆的效率最高。

关键词:玉米秸秆; 降解; 复合菌系; 发酵

中图分类号: X712 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2016)08-1602-08 doi:10.11654/jaes.2016-0110

Optimization of fermentation conditions for low-temperature and high-efficiency composite microbial system for corn stover degradation and preliminary development of microbial inocula

HU Hai-hong¹, SUN Ji-ying^{1*}, GAO Ju-lin², WANG Zhen¹, BAO Nao-gan-chao-lu¹, HU Shu-ping², QING Ge-er¹

(1. Agricultural College, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China; 2. Vocational and Technical College, Inner Mongolia Agricultural University, Baotou 014100, China)

Abstract: Straw-returning to fields is an effective way to increase soil organic matter content and soil fertility, stimulate soil microbial activity, enhance crop yields and quality, and improve the soil physical and chemical properties. It, therefore, plays a crucial role in promoting agricultural sustainable development. In the spring corn region of northern China, however, maize stover degradation is often slow and is even not fully complete in the fall and winter seasons because of low temperature, which causes wasting of resources. Thus, it is necessary to develop efficient stover-decomposing bacterium agent for low-temperature conditions. A low-temperature and high-efficiency composite microbial system, GF-S72, screened from sawdust and degraded corn stover, was developed for degrading corn stover. Result indicated that the best fermentation was urea of 0.1%, C/N ratio of 20:1, inoculating content of 2%, initial pH of culture medium at 8.0 and liquid medium volume of 18 mL/150 mL at 10 ℃ for 6 d. The experiment showed that diatomite was the best carrier, and high-efficient composite bacterium agent for degrading corn stover was prepared at low-temperature. The experiment also showed that the highest efficient microbial inoculants of corn stover degradation was at 3:1 of bacterial liquid/carrier, 0.05 g/2 g of microbial inoculants /corn stover ratio, 1.42% of moisture content, 10% of preservation humidity, 15 ℃ of preservation temperature, and pH 8.2.

Keywords: corn stover; degradation; composite microbial system; fermentation

收稿日期: 2016-01-23

基金项目: 国家玉米产业技术体系(CARS-02-63); 国家自然科学基金项目(31360304); 国家粮食丰产科技工程(2011BAD16B13, 2012BAD04B04, 2013BAD07B04, 2011BAD16B14); 内蒙古农业大学引进人才科研启动项目(YJ 2014-5)

作者简介: 胡海红(1990—), 女, 内蒙古赤峰人, 硕士研究生, 主要从事玉米生理生态研究。E-mail: huhaihong121@126.com

* 通信作者: 孙继颖 E-mail: nmsunjiying@163.com

秸秆通常占作物生物量的 50%以上,是极为丰富且能直接利用的可再生有机资源^[1]。据统计,我国约有 35.3%的秸秆在田间焚烧^[2],不仅造成大量秸秆资源的浪费而且污染环境,影响交通安全,也不利于土壤质量的培育和农业的可持续发展^[3-4]。秸秆还田是增加土壤有机质含量、全面提升地力的有效途径^[5-7],秸秆还田增加了土壤有机质的含量,改善了土壤理化性状^[8-11],对促进农业的可持续发展起到重要作用。但是在北方春玉米地区,由于秋冬季气温低,导致玉米秸秆腐解缓慢,甚至不能完全降解,对农田土壤整地播种质量产生不利影响^[12-15],因而北方地区秸秆还田比例仅为 30.9%,蒙新地区甚至仅为 7.4%和 5%。目前,秸秆腐解菌的研究主要集中在中高温或者常温条件下,这些菌株不适合在北方地区低温条件下应用,有关低温秸秆腐解菌的研究鲜有报道。因此,研发低温条件下高效快速分解秸秆的菌剂是推进北方春玉米地区玉米秸秆还田的重要措施。

研究证实,天然复合菌系对秸秆的腐解效果显著优于人工纯培养的微生物^[16-17]。Kato 等^[18]将天然复合菌系中分离的微生物重新组合后,发现复合菌系中非纤维素菌群对菌系纤维素的降解起了非常重要的作用。20 世纪中叶以来,科学家们获得了大量天然降解秸秆的真菌,尤以木霉属(*Trichoderma*)、青霉属(*Penicillium*)、漆斑霉属(*Myrothecium*)、毛壳霉属(*Chaetomium*)、曲霉属(*Aspergillus*)等为主^[19-23]。

国内外对高效秸秆菌剂及发酵条件的研发取得了一定进展。金海洋等^[24]使用经过芽孢杆菌属和分解脂肽梭菌属组合的菌剂处理的秸秆,在 30℃条件下秸秆降解率为 45.5%;张庆华等^[25]筛选出 4 株效果较好的纤维素腐解菌剂,在 50℃时秸秆腐解率达到 83.7%;Haruta 等^[26]通过多次组合筛选构建了一个稳定的复合菌系,在 50℃条件下,4 d 内可使水稻秸秆降解率高于 60%以上;Spela 等^[27]研究表明,在堆肥活跃期接种微生物菌剂能提高堆肥效率,有机质的矿化更为迅速,产生的堆肥品质更稳定。张丽青等从稻秆堆腐物及牛粪中分离筛选出一株分解纤维素能力较强的菌株 N-12,培养基 pH 设置为 8.0,接种量设置为 4%,蛋白胨作为氮源,在 37℃条件下培养 72 h,此时菌株的 CMC(Sodium carboxyl methyl cellulose 羧甲基纤维素)酶最高^[28];以腐解过程中秸秆失重率、CMC 酶活等指标评价玉米秸秆腐解效果可行,以腐熟终点 C/N 和 T 值作为评价玉米秸秆的腐熟度指标初步可行^[29]。

本研究利用从自然界低温腐殖锯末已分离高效秸秆降解复合菌系,研究发酵条件及液态发酵条件下菌剂对秸秆的降解能力,制成生物菌剂,并应用于大田试验。以期为解决低温秸秆田间降解难的难题提供微生物资源和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

复合菌系:筛选自锯末中的一组玉米秸秆降解复合菌系 GF-S72^[14]。

载体:白炭黑(Silica,成都艾科达化学试剂有限公司)、煅烧高岭土(Kaolin,国药集团化学试剂有限公司)、硅藻土(Diatomite,国药集团化学试剂有限公司)、滑石粉(Talc,天津风船化学试剂科技有限公司)、皂土(Bentonite,上海山浦化工有限公司)、凹凸棒土(Attapulgite,国药集团化学试剂有限公司)、轻质碳酸钙(Calcium carbonate,上海泗联化工有限公司)。

DNS 试剂:准确称取酒石酸钾钠($C_4H_4Na_2O_6$)185.0 g 溶于蒸馏水中(低于 50℃加热),待溶解后加入 3,5-二硝基水杨酸($C_7H_4N_2O_7$)6.313 g,全部溶解后加入氢氧化钠(NaOH)21 g、苯酚(C_6H_5OH)5.0 g、无水亚硫酸钠(Na_2SO_3)5.0 g,搅拌使之溶解,冷却至室温后加水定容到 1000 mL,贮存于棕色试剂瓶,室温放置一周后使用。

柠檬酸缓冲液(pH=4.8):A 液:取一水柠檬酸($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)21.014 g,定容到 1000 mL;B 液:称取二水柠檬酸钠($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$)29.412 g 定容至 1000 mL。取 A 液 271.2 mL、B 液 228.8 mL 定容至 1000 mL,于 4℃冰箱内保存。

1%羧甲基纤维素钠:称取 1.0 g 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)于烧杯中,加热溶解后用柠檬酸缓冲液(pH=4.8)定容至 100 mL。

基础培养基:硫酸铵 $[(NH_4)_2 \cdot SO_4]$ 1.0 g、磷酸氢二钾(K_2HPO_4)1.0 g、氯化钠(NaCl)0.2 g、硫酸镁($MgSO_4$)0.5 g、碳酸钙($CaCO_3$)2.0 g,加入蒸馏水 1000 mL。

1.2 菌株培养基的优化

1.2.1 不同氮源的优化

选用基础培养基,以玉米秸秆作为碳源,分别用蛋白胨、酵母粉、硝酸铵、硝酸钠、硫酸铵、尿素代替基础培养基中的氮源,加入量为 0.2%;培养条件为装液量 30 mL/150 mL,接种量为 10%,pH7,温度 15℃,转速 130 r·min⁻¹。每个处理设 3 次重复,培养 3 d 后测

量菌系纤维素酶活,进而选出最佳氮源。纤维素酶活包括滤纸酶活 FPA(Filter paper activity)、内切酶 Cx(Endoglucanases)、外切酶 Cl(Cellobiohydrolases)。纤维素酶活力是指在特定条件下,经酶的催化作用形成葡萄糖时每分钟所需该酶的量,为1个酶活国际单位“U”。

1.2.2 最佳尿素浓度、碳氮比的优化

选用基础培养基,尿素浓度为0.1%、0.2%、0.4%、0.8%、1.6%,设置碳氮比分别为0.1:1、5:1、10:1、20:1、40:1,共5个水平进行试验。培养条件为装液量30 mL/150 mL,接种量10%,pH7,温度15℃,在转速为130 r·min⁻¹的摇床中培养。每个处理设3次重复,3 d后测量菌系纤维素酶活,得出最佳尿素浓度和碳氮比。

1.3 复合菌系培养条件的优化

选用基础培养基,对培养温度、装液量、培养时间、初始pH、接种量进行单因素优化试验,每组试验设3次重复,3 d后测量菌系纤维素酶活,得出各单因素最佳指标。

1.4 复合菌系 GF-S72 正交试验

在以上试验的基础上,按正交试验 L₉(3⁴)四因素三水平对菌株摇瓶培养条件进行优化,3 d后测定菌系纤维素酶活,得出摇瓶培养复合菌系 GF-S72 的最优配比。

1.5 菌剂研制

1.5.1 筛选试验加工工艺

将复合菌系(GF-S72号复合菌系在pH8.0、10℃、C:N=20:1、装液量12%、接种量2%的条件下振荡培养6 d获得)摇瓶发酵液与填料按一定比例混合制成母液,置于冷冻干燥机干燥制成母粉。

1.5.2 初始制剂成分配比

初始制剂成分质量配比为发酵液50%,填料50%。

1.6 载体筛选试验

选择白炭黑、煅烧高岭土、硅藻土、皂土、凹凸棒土、滑石粉、轻质碳酸钙7种不同载体做填料,比较不同载体情况下制剂降解纤维素的差异。将制备的各制剂室温贮藏14 d后测定秸秆降解率和滤纸降解情况(在无菌条件下取1 g搭载不同载体的制剂接种到盛有基础培养基的三角瓶中,每个三角瓶放3条滤纸条,每处理设定3次重复,摇床130 r·min⁻¹振荡培养,10℃恒温培养2 d,检测滤纸降解情况),以此考察填料对复合菌系的生物相容性。综合秸秆降解率、滤纸降解情况、价格等因素,筛选出最适填料。以原菌液为CK。

1.7 质量指标测定

1.7.1 pH值的测定

取1 g自制菌剂置于100 mL烧杯中,加入100 mL蒸馏水,搅拌后静置1 min,用pH计测其pH值。平行测定3次,取其平均值。

1.7.2 含水量的测定

称取1 g自制菌剂置于托盘中,在105℃烘箱中烘干,24 h后取出测定前后质量差。

1.7.3 保藏参数的测定

选取含水量较高的低温高效降解玉米秸秆复合菌制剂3 g,于-109℃下采用冷冻干燥机(labogene-Scanvac冷冻干燥机系列,丹麦)冷冻干燥,然后在此冷冻干燥后菌剂基础湿度上加入相应质量的蒸馏水使菌剂密封“保藏湿度”为0%、10%、20%、40%和80%,并将样品分别抽真空密封保存。在无菌条件下取3 g密封菌剂接种到盛有基础培养基的三角瓶中,每个三角瓶放5条滤纸条,每处理设定3次重复,摇床130 r·min⁻¹振荡培养,10℃恒温培养2 d,检测滤纸降解情况,14 d后测定秸秆降解率,以原菌液为CK。选择制备的低温高效降解玉米秸秆复合菌制剂3 g,将样品分别密封后,分别存于4℃、15℃、25℃、35℃、45℃保温箱中,2 d后观察滤纸降解情况(方法同上),14 d后测定秸秆降解率。以原菌液为CK。

1.7.4 负载量的测定

载体与菌液最佳负载量配比测定:分别称取1 g载体与菌液按一定比例混合(具体配比见表4)。2 d后观察滤纸降解情况(方法同上),14 d后测定秸秆降解率,以原菌液为CK。

菌剂与秸秆负载量配比试验:分别称取0.002 g、0.01 g、0.05 g、0.25 g、1.25 g菌剂放入三角瓶中,每瓶放入2 g秸秆,每个处理重复3次,14 d后取样测定秸秆降解率。以原菌液为CK。

1.8 数据处理

利用IBM SPSS Statistics 19.0统计软件对试验结果进行统计分析,所有数据均采用3次重复的平均值±标准偏差表示。不同处理间的差异显著性采用配对样本进行评价。采用Sigmaplot 12.5进行数据分析和绘图。

2 结果与讨论

2.1 复合菌系 GF-S72 培养基优化

本试验中,采用纤维素酶活来表征微生物的生长状况。在供试的6种氮源中,GF-S72在以尿素为氮源

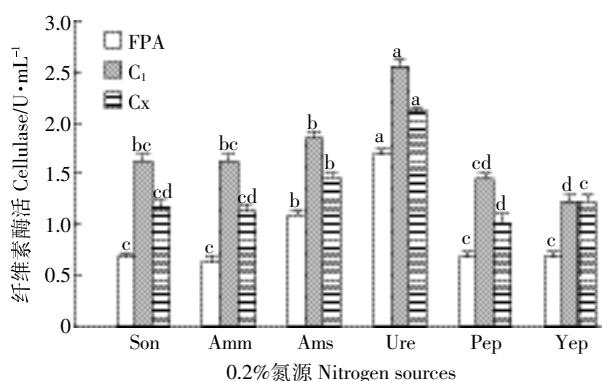
时生长最好,其次是硫酸铵,蛋白胨最差($P<0.05$,图1)。由此可以看出,GF-S72对无机氮的利用率好于有机氮。当选择尿素作为最佳氮源,其浓度为0.1%时,GF-S72的生长状况最好($P<0.05$,图2)。此外,在供试的5种碳氮比条件下,GF-S72在碳氮比为20:1时生长最好,其次是碳氮比10:1,碳氮比为0.1:1时生长最差($P<0.05$,图3)。当碳氮比为10:1时FPA酶活高于其他比例,因此需要做正交试验进一步验证。

2.2 复合菌系 GF-S72 培养条件优化

选择培养温度、装液量、培养时间、初始pH、接种量五个因素,每个因素设定合适的水平数,对复合菌系GF-S72进行培养条件单因素优化,并对所得数据进行单因素方差分析。由图4可知,装液量、培养时间三种酶活统一,培养温度、初始pH、接种量这三个因素三种酶活不统一。据此就这三个指标做了正交试验,进一步验证单因素试验。

2.3 复合菌系 GF-S72 正交试验

根据单因素试验结果,选择合适因素和水平(表1),按正交试验对GF-S72复合菌系培养条件(培养温度、初始pH、接种量、碳氮比)进行优化,每个处理3个重复,对所得数据进行分析,结果见表2。四个因素对试验结果影响强弱顺序为C(培养温度)>B(初始pH)>D(碳氮比)>A(接种量);C1酶活的正交试验结果与FPA和Cx酶活正交试验结果稍有不同。结合单因素结果可得,复合菌系GF-S72最佳摇瓶培养条件为:



不同小写字母表示同一酶活性在不同处理下差异极显著($P<0.05$)。

硝酸钠简写“Son”,硝酸铵简写“Amm”,硫酸铵简写“Ams”,
尿素简写“Ure”,蛋白胨简写“Pep”,酵母粉简写“Yep”。下同

Different lowercase letters in figure represent markedly significant differences in enzyme activity between different treatments ($P<0.05$). “Son”—sodium nitrate; “Amm”—ammonium nitrate; “Ams”—ammonium sulfate; “Ure”—Urea; “Pep”—Peptone; “Yep”—yeast powder. The same below

图1 不同氮源对菌株GF-S72生长的影响

Figure 1 Effects of nitrogen sources on growth of strain GF-S72

接种量2%,初始pH8,培养温度10℃,碳氮比20:1。

2.4 复合菌系 GF-S72 载体筛选试验

由表3可知,硅藻土效果最佳,白炭黑、滑石粉、轻质碳酸钙的滤纸降解情况优于凹凸棒土及皂土,低于硅藻土。但是硅藻土、凹凸棒土及皂土的玉米秸秆降解率明显优于白炭黑、滑石粉、轻质碳酸钙。该结果表明,白炭黑、滑石粉、轻质碳酸钙与GF-S72复合菌系的生物相容性较差。就硅藻土、凹凸棒土、皂土做方差分析显示,硅藻土明显优于后两种载体,因此选择硅藻土作为填料。

2.5 GF-S72 复合菌剂质量指标的测定

2.5.1 pH对复合菌剂生长的影响

GF-S72复合型菌剂pH值为8.2,与之前发酵条件测得的最适pH值相差不大,能很好满足复合菌系生存,符合标准。

2.5.2 含水量对复合菌剂降解率的影响

本试验测得复合型菌剂的含水量为1.42%。

含水量及保藏湿度测定结果表明,菌剂在不同储藏条件下对菌株存活率影响很大,水分过高,菌体代

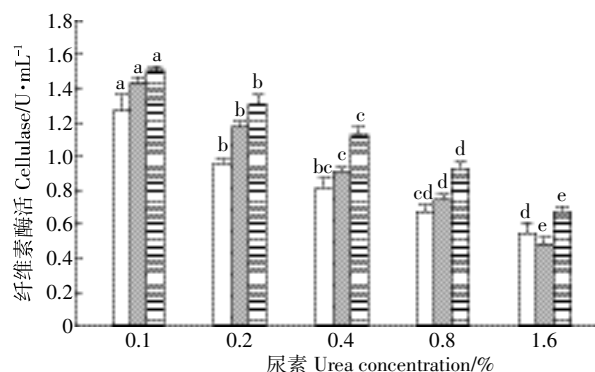


图2 不同尿素浓度对菌株GF-S72生长的影响

Figure 2 Effects of urea concentrations on growth of strain GF-S72

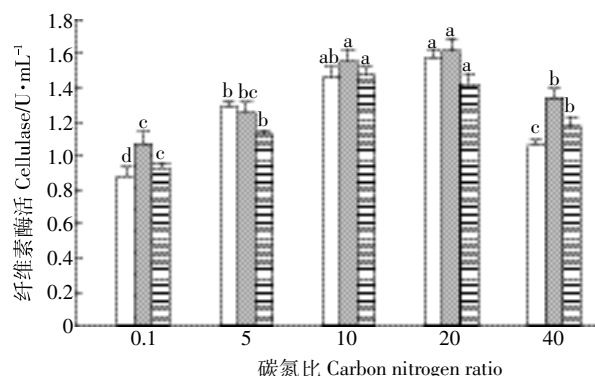


图3 不同碳氮比对菌株GF-S72生长的影响

Figure 3 Effects of carbon nitrogen ratios on growth of strain GF-S72

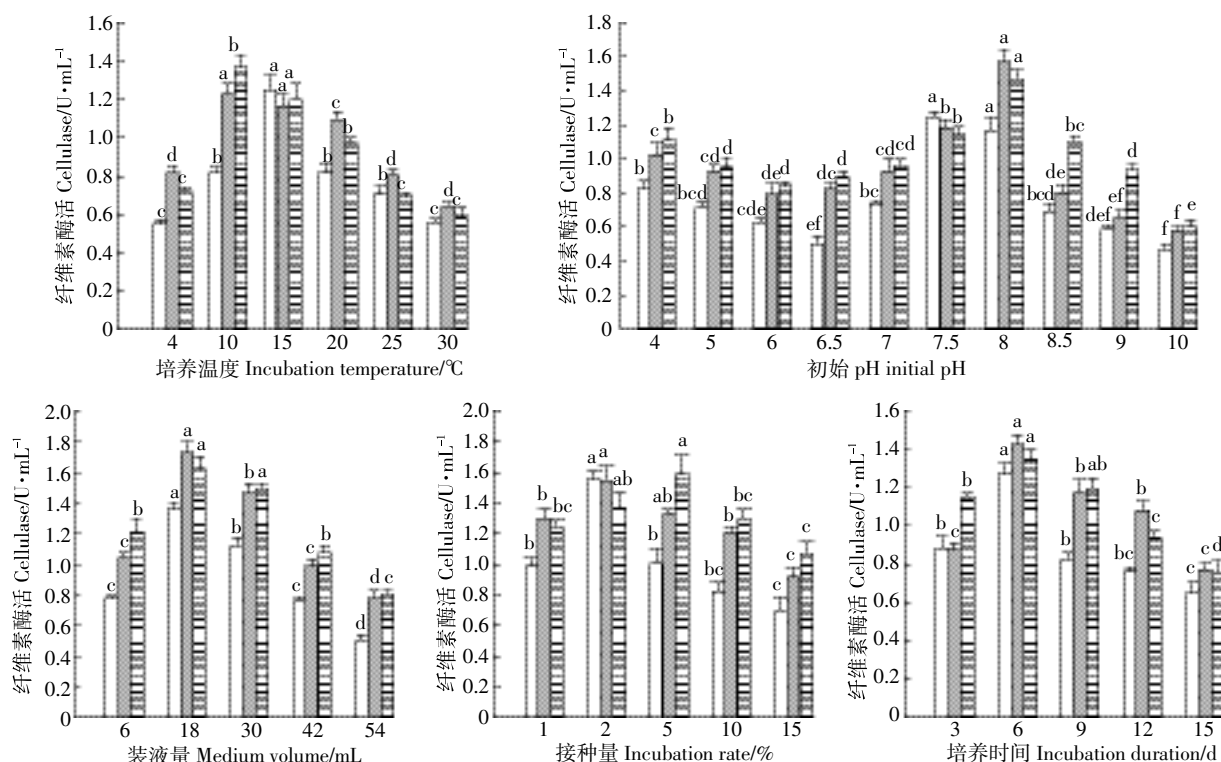


图4 不同培养条件对菌株 GF-S72 生长的影响

Figure 4 Effects of incubation conditions on growth of Strain GF-S72

表1 发酵条件正交试验的因素和水平的设计

Table 1 Factors and levels for orthogonal test of GF-S72 for incubation conditions

水平 Level	A 接种量 Incubation rate	B 初始 pH Initial pH	C 培养温度 Incubation temperature	D 碳氮比 Carbon/ nitrogen ratio
1	2%	7.5	10 °C	5:1
2	5%	8	15 °C	10:1
3	10%	8.5	20 °C	20:1

谢旺盛,死亡率高,还容易造成粘结成团,影响制剂使用。但菌剂含水量也不是越小越好,如果粉体过于干燥,含水量接近零点,则微粒对周围环境中水分吸收强,且因为干燥微粒间存在强静电,吸收的水分子与微粒会迅速结成稳定的晶体结构,造成粉体絮结成坚硬的块状,影响制剂的湿润性和分散性。因此,将菌剂中水分控制在合理范围内及选择合适保藏湿度对于菌剂加工和应用都具有非常重要的意义。

由表4可知,10%的湿度降解滤纸情况明显高于其他处理,其次是0%和20%,而40%和80%几乎无降解。在供试的5种比例中,GF-S72在保藏湿度为10%时,玉米秸秆降解率最高,菌株最活跃,说明在此湿度下,复合菌系可以最大程度地与载体相容,其次是保藏湿度20%,保藏湿度为80%时最差。

2.5.3 保藏温度对复合菌剂降解率的影响

保藏温度测定结果表明,GF-S72复合菌剂在贮藏温度为15 °C条件下,滤纸降解情况和秸秆降解率明显比其他条件高。其次是25 °C,最差为45 °C。这一结果也验证了低温降解菌系在高温条件下玉米秸秆降解能力下降的现象(表5),说明最适保存温度为15 °C。

2.5.4 负载量对复合菌剂降解率的影响

(1)当菌液与载体配比为3:1时,降解滤纸情况和秸秆降解率都明显高于其他条件,随着菌液稀释浓度越高,降解滤纸能力越低,玉米秸秆降解率也随之降低(表6)。在供试的14种比例中,GF-S72在菌液比载体比例为3:1时,玉米秸秆降解率最高,说明在此比例下,复合菌系可以最大程度地与载体相容,保持菌株之间的活跃性。S1:1次之,S7:1最差(表6)。

(2)当加入菌剂为0.05 g时,玉米秸秆降解率最高,因此最适菌剂量为0.05 g。在供试的5种比例中,GF-S72在菌剂为0.05 g时,玉米秸秆降解率最高,说明在此比例下,菌剂与玉米秸秆比例最佳。0.002 g次之,1.25 g最差(图5)。

3 结论

(1)采用单因素和正交试验,确定复合菌系 GF-

表 2 FPA、Cx、C₁ 正交试验的统计结果及极差分析
Table 2 Statistical results and range analysis of FPA, Cx and C₁ orthogonal test

所在列 Column		1	2	3	4	实验结果 Experimental result		
因素 Factor		A 接种量 Incubation rate	B 初始 pH Initial pH	C 培养温度 Incubation temperature	D 碳氮比 Carbon nitrogen ratio	FPA	Cx	C ₁
试验号	1	1	1	1	1	6.067	5.935	4.461
Test No.	2	1	2	2	2	6.543	7.135	3.826
	3	1	3	3	3	2.711	2.773	3.815
	4	2	1	2	3	5.930	6.194	4.583
	5	2	2	3	1	3.468	3.104	3.904
	6	2	3	1	2	5.517	6.212	4.280
	7	3	1	3	2	2.686	2.506	3.778
	8	3	2	1	3	7.986	8.227	4.598
	9	3	3	2	1	3.062	3.148	4.114
FPA	K ₁	5.106	4.894	6.523	4.199			
	K ₂	4.971	5.997	5.179	4.913			
	K ₃	4.579	3.765	2.954	5.544			
	R	1.025	2.731	4.068	1.843			
Cx	K ₁	5.281	4.879	6.791	4.063			
	K ₂	5.169	6.155	5.492	5.284			
	K ₃	4.627	4.045	2.795	5.732			
	R	0.902	2.358	4.245	1.919			
C ₁	K ₁	4.034	4.276	4.445	4.160			
	K ₂	4.256	4.110	4.176	3.961			
	K ₃	4.164	4.068	3.834	4.333			
	R	0.721	0.706	1.110	0.871			

表 3 不同载体处理下滤纸降解及玉米秸秆降解率
Table 3 Degradation of filter paper and stover degradation by different carriers

载体 Carrier	降解滤纸 Paper breakage	玉米秸秆降解率/% Degradation rate of corn stover
煅烧高岭土 Kaolin	-	6.2±0.37e
白炭黑 Silica	++++	3.7±0.67f
滑石粉 Tale	++++	14.2±0.52d
硅藻土 Diatomite	+++++	29.4±0.68a
凹凸棒土 Attapulgite	+++	22.7±0.59c
皂土 Bentonite	+++	24.4±0.68b
轻质碳酸钙 Calcium carbonate	++++	12.7±0.49d
CK	+++++	24.7±0.59b

注:无变化记为-;滤纸液界面变薄记为+;滤纸液界面变透明记为++;滤纸液界面断裂记为+++;培养液淡黄色记为++++;培养液颜色加深且液面下滤纸蓬松记为+++++。下同。

Note: No change was marked as -; thinning filter-liquid interface as +; transparent filter-liquid interface as ++; fractured filter-liquid interface as +++; yellow medium as ++++; darkened and fluffy culture liquor as +++++. The same below.

表 4 不同湿度处理下滤纸降解及玉米秸秆降解率
Table 4 Degradation of filter paper and corn stover degradation under different humidity

湿度/% Humidity	降解滤纸 Paper breakage	玉米秸秆降解率/% Degradation rates of corn stover
0	+++	11.46±0.68d
10	+++++	27.47±0.5a
20	++++	21.5±0.72c
40	++	6.2±0.43e
80	+	3.52±0.68f
CK	+++++	25.24±0.44b

表 5 不同温度处理下滤纸降解及玉米秸秆降解率
Table 5 Degradation of filter paper and corn stover degradation under different temperature

温度/℃ Temperature	降解滤纸 Paper breakage	玉米秸秆降解率/% Degradation rates of corn stover
4	++	10.48±0.77c
15	+++++	22.31±0.72a
25	+++	17.01±0.86b
35	+	6.1±0.20d
45	-	4.5±0.65d
CK	+++++	23.53±0.52b

表6 不同菌液:载体配比下滤纸降解及玉米秸秆降解率
Table 6 Degradation of filter paper and corn stover degradation at different ratios of bacterial solution:carrier

菌液:载体/mL:g Ratio of bacterial solution:carrier	降解滤纸 Paper breakage	玉米秸秆降解率/% Degradation rates of corn stover
1:1	++	6.48±0.39f
2:1	++	5.48±0.77fg
3:1	+++++	22.50±0.68b
4:1	++	5.34±0.55fg
5:1	+++	9.43±0.70e
6:1	+++	10.37±0.66de
7:1	++	6.82±0.42f
S1:1	++++	18.31±0.47c
S2:1	+++	11.37±0.57d
S3:1	+++	10.31±0.54de
S4:1	++	5.38±0.6efg
S5:1	+	4.58±0.52g
S6:1	+	4.65±0.57g
S7:1	-	2.47±0.65h
CK	+++++	24.29±0.54a

注:“S”代表稀释倍数。

Note:“S” represents dilution time.

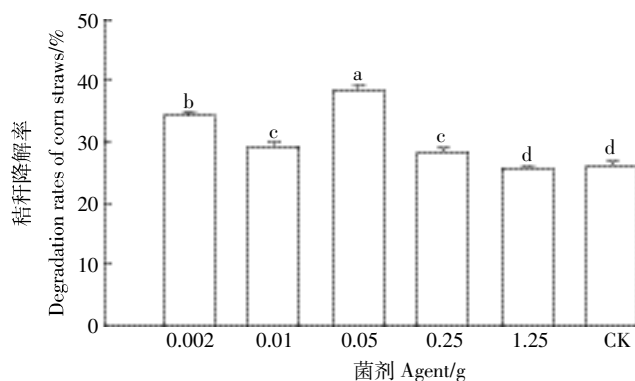


图5 不同菌剂配比玉米秸秆降解率

Figure 5 Corn stover degradation at different agent ratios

S72 最佳发酵条件为:尿素 0.1%、碳氮比 20:1、培养温度 10℃、初始 pH 为 8、装液量为 18 mL/150 mL、培养时间为 6 d、接种量 2%。

(2)通过试验选取硅藻作为最佳载体,且在菌液:载体=3:1、菌剂与秸秆配比为 0.05 g/2 g,制备低温高效降解玉米秸秆复合型菌剂。

(3)在 pH 值 8.2、含水量 1.42%、保藏湿度 10%、保藏温度 15℃时,复合型菌剂降解效率最好。

由于本试验并未考虑成本问题,菌株如果应用到实际生产,还应综合考虑各方面因素,在保证菌株降

解效果的前提下,选用廉价原料和合适的培养条件,使菌剂的生产效益最大化。

参考文献:

- [1] 李文革,李倩,贺小香. 秸秆还田研究进展[J]. 湖南农业科学, 2006(1):46-48.
LI Wen-ge, LI Qian, HE Xiao-xiang. Straw returned[J]. *Hunan Agricultural Science*, 2006(1):46-48.
- [2] 高利伟,马林,张卫峰,等. 中国作物秸秆养分资源数量估算及其利用状况[J]. 农业工程学报, 2009, 25(7):173-179.
GAO Li-wei, MA Lin, ZHANG Wei-feng, et al. Estimation of nutrient resource quantity of crop straw and its utilization situation in China[J]. *Transactions of the CSAE*, 2009, 25(7):173-179.
- [3] 曹国良,张小曳,王丹,等. 中国大陆生物质燃烧排放的污染物清单[J]. 中国环境科学, 2005, 25(4):389-393.
CAO Guo-liang, ZHANG Xiao-ye, WANG Dan, et al. Inventory of atmospheric pollutants discharged from biomass burning in China continent[J]. *China Environmental Science*, 2005, 25(4):389-393.
- [4] 赵伟,潘延欣,靳雯然,等. 低温菌剂降解秸秆还田对东北黑土微生物活性的影响[J]. 湖北农业科学, 2014, 53(17):4020-4024.
ZHAO Wei, PAN Yan-xin, JI Wen-ran, et al. Effects of low-temperature agent degrading straw and returning to field on microbial activity in black soil[J]. *Hubei Agricultural Science*, 2014, 53(17):4020-4024.
- [5] 匡恩俊. 不同还田方式下大豆秸秆腐解特征研究[J]. 大豆科学, 2010, 29(3):479-482.
KUANG En-jun. Decomposition characteristics of soybean stalk under different stalk returning method[J]. *Soybean Science*, 2010, 29(3):479-482.
- [6] 赵鹏,陈阜,李莉. 秸秆还田对冬小麦农田土壤无机氮和土壤脲酶的影响[J]. 华北农学报, 2010, 25(3):165-169.
ZHAO Peng, CHEN Fu, LI Li. Effects of straw mulching on inorganic nitrogen and soil urease in winter wheat field[J]. *Acta Agriculturae Sinica*, 2010, 25(3):165-169.
- [7] 武际,郭熙盛,鲁剑巍,等. 连续秸秆覆盖对土壤无机氮供应特征和作物产量的影响[J]. 中国农业科学, 2012, 45(9):1741-1749.
WU Ji, GUO Xi-sheng, LU Jian-wei, et al. Effects of continuous straw mulching on supply characteristics of soil inorganic nitrogen and crop yields[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45(9):1741-1749.
- [8] 钱海燕,杨滨娟,黄国勤,等. 秸秆还田配施化肥及微生物菌剂对水田土壤酶活性和微生物数量的影响[J]. 生态环境学报, 2012, 21(3):440-445.
QIAN Hai-yan, YANG Bin-juan, HUANG Guo-qin, et al. Effects of returning rice straw to fields with fertilizers and microorganism liquids on soil enzyme activities and microorganisms in paddy fields[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2012, 21(3):440-445.
- [9] 吴红艳,王智学,陈飞,等. 秸秆降解菌剂对秸秆还田土壤中细菌种群数量的影响[J]. 微生物学杂志, 2012, 32(2):79-82.
WU Hong-yan, WANG Zhi-xue, CHEN Fei, et al. Effect of stalk-degradable microbial preparation on the number of microbial population in the soil using stalks as fertilizer for the fields[J]. *Journal of Microbiol-*

- ogy, 2012, 32(2):79-82.
- [10] 黄继川, 彭智平, 于俊红, 等. 施用玉米秸秆堆肥对盆栽芥菜土壤酶活性和微生物的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2010, 16(2):348-353.
- HUANG Ji-chuan, PENG Zhi-ping, YU Jun-hong, et al. Impacts of applying corn-straw compost on microorganisms and enzyme activities in pot soil cultivated with mustard[J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2010, 16(2):348-353.
- [11] 李培培, 张冬冬, 王小娟, 等. 促分解菌剂对还田玉米秸秆的分解效果及土壤微生物的影响[J]. 生态学报, 2012, 32(9):2847-2854.
- LI Pei-pei, ZHANG Dong-dong, WANG Xiao-juan, et al. Effects of microbial inoculants on soil microbial diversity and degrading process of corn straw returned to field[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(9):2847-2854.
- [12] 青格尔, 高聚林, 于晓芳, 等. 玉米秸秆低温高效降解复合菌系 GF-20 的菌种组成及降解稳定性研究[J]. 中国农业科学, 2016, 49(3):443-454.
- QING Ge-er, GAO Ju-lin, YU Xiao-fang, et al. Function and composition stability of a composite microbial system GF-20 with efficient corn stalk decomposition under low temperature[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(3):443-454.
- [13] 萨如拉, 高聚林, 于晓芳, 等. 玉米秸秆低温降解复合菌系的筛选[J]. 中国农业科学, 2013, 46(19):4082-4090.
- SA Ru-la, GAO Ju-lin, YU Xiao-fang, et al. Screening of low temperature maize stalk decomposition microorganism[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(19):4082-4090.
- [14] 殷中伟, 范丙全, 任萍. 纤维素降解真菌 Y5 的筛选及其对小麦秸秆降解效果[J]. 环境科学, 2011, 32(1):247-252.
- YIN Zhong-wei, FAN Bing-quan, REN Ping, et al. Isolation and identification of a cellulose degrading fungus Y5 and its capability of degrading wheat straw[J]. *Environmental Science*, 2011, 32(1):247-252.
- [15] 赵旭, 王文丽, 李娟, 等. 低温秸秆降解微生物菌剂的研究进展[J]. 生物技术通报, 2014, 11:55-61.
- ZHAO Xu, WANG Wen-li, LI Juan, et al. Advanced in microbiological agent of straw degradation under low temperature[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2014, 11:55-61.
- [16] 刘长莉, 王小芬, 牛俊玲, 等. 一组纤维素分解菌复合系 NSC-7 的酶活表达特性[J]. 微生物学通报, 2008, 35(5):720-724.
- LIU Chang-li, WANG Xiao-fen, NIU Jun-ling, et al. Expression characteristics of enzyme activity of a multi-functional bacterial community NSC-7[J]. *Microbiology*, 2008, 35(5):720-724.
- [17] Lewis S M, Montgomery L, Garleb K A, et al. Effects of alkaline hydrogen peroxide treatment on *in vitro* degradation of cellulosic substrates by mixed ruminal microorganisms and bacteroides succinogenes S85[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54(5):1163-1169.
- [18] Kato S, Haruta S, Cui Z J, et al. Stable coexistence of five bacterial strains as a cellulose-degrading community[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(11):7099-7106.
- [19] Van T H, Loontjens F G, Engelborgs Y, et al. Studies of the cellulolytic system of trichoderma reesei QM 9414. binding of small ligands to the 1, 4-beta-glucan cellobiohydrolase II and influence of glucose on their affinity[J]. *European Journal of Biochemistry/FEBS*, 1989, 184(3):553-9.
- [20] Singh R, Varma A J, Seeta L R, et al. Hydrolysis of cellulose derived from steam exploded bagasse by *Penicillium cellulases*: Comparison with commercial cellulase[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(24):6679-6681.
- [21] Okunowo W O, Gbenle G O, Osuntoki A A, et al. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by a phytopathogenic yrothecium roridum and some avirulent fungal isolates from water hyacinth[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2010, 9(7):1074-1078.
- [22] Geeraerts H A M, Vandamme E J. Cellulolytic properties of haeto-mium crispatum[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2008, 33(2):107-113.
- [23] Tomme P, Van T H, Pettersson G, et al. Studies of the cellulolytic system of trichoderma reesei QM 9414[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2004, 170(3):575-581.
- [24] 刘海静, 任萍. 2 种还田模式下小麦秸秆腐解菌剂应用效果研究[J]. 中国农学通报, 2013, 29(3):166-172.
- LIU Hai-jing, REN Ping. Effects of biodegradation agents on straw degradation in two kinds of straw returning[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2013, 29(3):166-172.
- [25] 张庆华, 赵新海, 李莉, 等. 秸秆降解菌的筛选及模拟田间应用效果分析[J]. 微生物学杂志, 2010, 30(4):101-104.
- ZHANG Qing-hua, ZHAO Xin-hai, LI Li, et al. Screening of crops stalks degradable microbes and effect analysis of its simulated field application[J]. *Journal of Microbiology*, 2010, 30(4):101-104.
- [26] Haruta S, Cui Z J, Huang Z, et al. Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 59(4/5):529-534.
- [27] Spela V B, Rok M, Franc L, et al. Microbial community structure during composting with and without mass inocula[J]. *Compost Science & Utilization*, 2003, 11(1):6-15.
- [28] 张恒芳, 李林, 史喜林, 等. 玉米秸秆低温纤维素分解菌的筛选及分解效果测定[J]. 玉米科学, 2013, 21(5):147-150.
- ZHANG Heng-fang, LI Lin, SHI Xi-lin, et al. Screening of cellulose degradation bacteria decomposing maize straw under low temperature and the function determining[J]. *Journal of Maize Sciences*, 2013, 21(5):147-150.
- [29] 刘尧, 李力, 李俊, 等. 玉米秸秆高效腐解复合菌系 CSS-1 的选育及其组成分析[J]. 中国农业科学, 2010, 43(21):4437-4446.
- LIU Yao, LI Li, LI Jun, et al. Construction and composition analysis of the complex microbial system CSS-1 of high decomposition efficiency for corn stalks[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(21):4437-4446.