

## 黑翅土白蚁共生真菌对水稻秸秆生物降解研究

沈毅, 漆梦雯, 羊桂英, 周琪欢, 余婷, 李吴晗, 莫建初

(浙江大学昆虫科学研究所 农业农村部作物病虫害分子生物学重点实验室, 浙江 杭州 310058)

**摘要:** 【目的】挖掘黑翅土白蚁 *Odontotermes formosanus* 共生真菌在秸秆资源利用上的应用潜力, 为实现秸秆生物降解产业化补充菌种资源并提供理论依据。【方法】以羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 平板为分离培养基, 采用刚果红染色法筛选, 从黑翅土白蚁肠道中分离筛选具有木质纤维素降解活性的真菌, 并测定纤维素酶活性。在液态发酵条件下, 评估不同真菌以及真菌组合对水稻 *Oryza sativa* 秸秆的降解效果, 利用傅立叶红外光谱、X 射线晶体衍射和扫描电镜分析降解前后水稻秸秆的理化性质。【结果】从黑翅土白蚁肠道中共分离到 4 种具有木质纤维素降解活性的真菌, 经鉴定分别为安拉阿巴德篮状菌 *Talaromyces allahabadensis*、刺孢篮状菌 *T. aculeatus*、黑曲霉 *Aspergillus niger* 和灰孔多年卧孔菌 *Perenniporia tephropora*。纤维素酶活结果显示: 黑曲霉的内切葡聚糖酶和外切葡聚糖酶活性最高, 安拉阿巴德篮状菌的  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性最高。水稻秸秆降解试验表明: 黑曲霉与灰孔多年卧孔菌双菌组合具有最强的秸秆降解能力, 20 d 内可降解秸秆中 38.27% 的干物质、62.59% 的纤维素和 51.75% 的半纤维素。降解后水稻秸秆内部化学键和分子间作用力被破坏, 结晶度由 22.44% 上升至 32.53%, 秸秆表面崩解碎裂, 结构蓬松化。【结论】从黑翅土白蚁肠道分离得到的黑曲霉和灰孔多年卧孔菌在组合降解水稻秸秆时表现出极强的降解能力, 在秸秆生物降解产业化上具有潜在的开发价值。

图 6 表 2 参 30

**关键词:** 黑翅土白蚁; 共生真菌; 纤维素酶; 秸秆资源利用

中图分类号: S216.2 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2023)06-1224-08

## Biodegradation of rice straw by symbiotic fungi of *Odontotermes formosanus*

SHEN Yi, QI Mengwen, YANG Guiying, ZHOU Qihuan, YU Ting, LI Wuhan, MO Jianchu

(Ministry of Agriculture and Rural Affairs Key Laboratory of Molecular Biology of Crop Pathogens and Insect Pests, Institute of Insect Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China)

**Abstract:** [Objective] This study aims to explore the application potential of symbiotic fungi of *Odontotermes formosanus* in the utilization of straw resources, so as to provide a theoretical basis for the industrialization of straw biodegradation and supplement strain resources. [Method] Using CMC-Na plate as isolation medium and Congo red staining method for screening, the fungi with lignocellulose degrading activity were isolated and screened from the gut of *O. formosanus* and cellulase activities were measured. The degradation effect of different fungi and fungal combinations on *Oryza sativa* (rice) straw was evaluated under liquid fermentation. The physicochemical properties of rice straw before and after degradation were analyzed using FTIR, XRD and SEM. [Result] 4 fungi with lignocellulose degrading activity were isolated from the gut of *O. formosanus*, identified as *Talaromyces allahabadensis*, *T. aculeatus*, *Aspergillus niger* and *Perenniporia tephropora*. Cellulase activity results showed that *A. niger* had the highest activity of endoglucanase and exoglucanase, while *T. allahabadensis* had the highest activity of  $\beta$ -glucosidase. The rice straw degradation test showed that

收稿日期: 2023-02-06; 修回日期: 2023-04-23

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目 (32071771)

作者简介: 沈毅 (ORCID: 0000-0002-9533-1632), 从事白蚁肠道微生物研究。E-mail: 961058115@qq.com。通信作者: 莫建初 (ORCID: 0000-0001-5066-0734), 教授, 博士, 从事城市昆虫学与害虫综合治理研究。

E-mail: mojianchu@zju.edu.cn

the combination of *A. niger* and *P. tephropora* had the strongest straw degradation ability. Within 20 days, 38.27% of dry matter, 62.59% of cellulose and 51.75% of hemicellulose in rice straw could be degraded. After degradation, the internal chemical bonds and intermolecular forces in rice straw were destroyed, and crystallinity increased from 22.44% to 32.52%. The straw surface disintegrated and smashed, and the structure became fluffy. [Conclusion] *A. niger* and *P. tephropora* isolated from the gut of *O. formosanus* show strong degradation ability in the combined degradation of rice straw, and have potential development value in the industrialization of straw biodegradation. [Ch, 6 fig. 2 tab. 30 ref.]

**Key words:** *Odontotermes formosanus*; symbiotic fungus; cellulase; utilization of straw resources

中国作为农业大国之一，具有丰富的秸秆资源。据统计，中国秸秆年生产量达8.65亿t，但每年有1亿t秸秆废置，造成资源浪费和环境污染<sup>[1]</sup>。秸秆主要成分为木质纤维素，其特殊的“纤维素-半纤维素-木质素”三维网络结构在自然状态下难以降解，严重限制了秸秆资源利用<sup>[2]</sup>。随着技术不断发展，目前已开发出多种秸秆处理方法，如高温热解、蒸汽爆破、酸碱处理等<sup>[3]</sup>。微生物降解法以成本低、耗能小、环境友好等优点受到广泛关注<sup>[4]</sup>。相较于细菌和放线菌，真菌能产生更多种类的酶，如纤维素酶、木聚糖酶、果胶酶、过氧化物酶、糖苷酶等来协同降解木质纤维素<sup>[5-7]</sup>，成为当前研究热点。目前，已开发的秸秆降解真菌主要有黄孢原毛平革菌 *Phanerochaete chrysosporium*、黑曲霉 *Aspergillus niger*、草酸青霉 *Penicillium oxalicu*、糙皮侧耳 *Pleurotus ostreatus* 等<sup>[8-11]</sup>，但部分真菌仍存在降解周期长、生长条件严格、降解不稳定等缺点<sup>[12]</sup>，难以实现产业化，因此，仍需进一步挖掘高效稳定的木质纤维素降解真菌。

白蚁是自然界中高效的木质纤维素分解者，其特殊的白蚁-共生菌降解系统可消化植物中74%~99%的纤维素和65%~87%的半纤维素<sup>[13]</sup>，降解效率为瘤胃动物的3倍以上<sup>[14]</sup>。有研究表明：白蚁的共生真菌具有较强的木质纤维素降解能力，如王成盼等<sup>[15]</sup>研究发现：黑翅土白蚁 *Odontotermes formosanus* 菌圃共生真菌蚁巢伞 *Termitomyces* 在固体发酵条件下可降解木质食料中20.98%的纤维素、31.89%的半纤维素和11.68%的木质素。SIJINAMANOJ等<sup>[16]</sup>从胖身土白蚁 *O. obesus* 菌圃和肠道中分离得到红绶曲霉 *A. nomius* 和哈茨木霉 *Trichoderma harzianum*，分别使不同农业废弃物纤维素降低10.83%~15.53%和8.50%~36.30%。

为进一步挖掘白蚁共生真菌在秸秆资源利用上的应用潜力，本研究从黑翅土白蚁肠道中分离筛选木质纤维素降解真菌，挖掘高效降解水稻 *Oryza sativa* 秸秆的真菌菌种资源，为秸秆生物降解产业化提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 材料来源 供试黑翅土白蚁蚁巢采自福建省三明市大田县，26℃避光饲养。供试水稻秸秆收集自江苏省连云港市，烘干粉碎后过100目筛，常温保存。

1.1.2 培养基配方 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)培养基：CMC-Na 1.000 g、硝酸钠 0.200 g、氯化铵 0.200 g、磷酸二氢钾 0.100 g、磷酸氢二钾 0.100 g、蛋白胨 0.100 g、七水硫酸镁 0.050 g、氨苄青霉素 0.005 g、卡那霉素 0.005 g、琼脂 4.000 g、蒸馏水 100 mL，pH 7。

水稻秸秆培养基：水稻秸秆粉(100目) 2.000 g、硝酸钠 0.200 g、氯化铵 0.200 g、蛋白胨 0.200 g、磷酸二氢钾 0.100 g、磷酸氢二钾 0.100 g、七水硫酸镁 0.050 g、蒸馏水 100 mL，pH 7。

### 1.2 真菌分筛鉴定

1.2.1 真菌分筛 肠道匀浆制备：取黑翅土白蚁成熟工蚁25只，在无菌超净台中用体积分数为75%的乙醇浸泡消毒5 min，无菌水清洗3次后用解剖针压住腹部末端，拉出白蚁肠道，于5 mL质量分数为0.9%的无菌生理盐水中研磨成匀浆。

分离：肠道匀浆液稀释100倍后，取100 μL均匀涂布于CMC-Na平板上，37℃避光培养至单菌落，长成后划线分离，重复3次后获纯培养菌株。

筛选：将直径 5 mm 菌饼接种于 CMC-Na 平板，37 ℃ 避光培养 5 d 后加入 20 mL  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的刚果红溶液，染色 1 h 弃去染色液，加入  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的氯化钠溶液 20 mL 脱色 30 min，观察菌株是否产生透明圈。

1.2.2 菌种鉴定 将纯化后菌株送至浙江尚亚生物技术有限公司，提取分离真菌 DNA 后，选取通用引物 ITS1 与 ITS4 扩增真菌 ITS 序列，将扩增产物连接至 pTOPO-T 载体并转入感受态细胞，使用 M13F/13R 引物扩增载体序列，测序后通过 BLAST 在线比对菌种，同时于 GenBank 登记序列号。

### 1.3 纤维素酶活性测定

1.3.1 粗酶液制备 取直径 5 mm 菌饼接种于 100 mL CMC-Na 液体培养基 (配方同 CMC-Na 培养基，不加琼脂)，于 27 ℃、 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  的摇床内避光培养 9 d 后，取 2 mL 液体培养基，4 ℃  $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  条件下离心 5 min，上清液即为粗酶液。

1.3.2 内切葡聚糖酶活性测定 取 200  $\mu\text{L}$  粗酶液 (对照组取无菌 CMC-Na 液体培养基)，加入 800  $\mu\text{L}$  质量分数为 1% CMC-Na 溶液，50 ℃ 反应 60 min 后加入 1 mL 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 溶液，沸水浴反应 10 min，冷却后稀释至 5 mL，于 540 nm 波长下测定吸光度值，计算酶活性。

1.3.3 外切葡聚糖酶活性测定 取 200  $\mu\text{L}$  粗酶液 (对照组取无菌 CMC-Na 液体培养基)，加入 800  $\mu\text{L}$  质量分数为 1% 微晶纤维素溶液，50 ℃ 反应 60 min 后加入 1 mL 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 溶液，沸水浴反应 10 min，冷却后稀释至 5 mL，于 540 nm 波长下测定吸光度值，计算酶活性。

1.3.4  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性测定 取 100  $\mu\text{L}$  粗酶液 (对照组取无菌 CMC-Na 液体培养基)，加入 200  $\mu\text{L}$   $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  对硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖 (p-NPG) 溶液，50 ℃ 反应 30 min 后加入 2 mL  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  碳酸钠溶液终止反应并显色，于 400 nm 波长下测定吸光度，计算酶活性。

1.3.5 酶活性单位 本研究酶活性单位定义：在 50 ℃，pH 7 条件下，1 L 酶液在 1 s 内水解底物生成 1  $\mu\text{mol}$  还原产物所需的酶量为 1 个酶活性单位 ( $\mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ )。

### 1.4 真菌对峙试验

将 CMC-Na 平板分为 2 个半圆区域，分别在 2 个半圆区域内接种直径为 0.5 cm 的不同真菌菌饼，37 ℃ 黑暗条件下对峙培养 7~15 d，观察真菌间拮抗反应。

### 1.5 水稻秸秆降解试验

1.5.1 水稻秸秆降解试验 将直径 0.5 cm 真菌菌饼 (双菌组合各 1/2，加入直径为 0.5 cm 菌饼) 接入灭菌后水稻秸秆培养基 (秸秆干质量记为  $m$ )，37 ℃ 避光培养 20 d，使用 20 目筛分离真菌菌丝和秸秆，秸秆 80 ℃ 烘干 12 h 后称干质量 (记为  $m_d$ )，计算干物质降解率 ( $R_{dm}$ )： $R_{dm} = (m - m_d) / m \times 100\%$ 。

1.5.2 木质纤维素组分降解率测定 木质纤维素组分质量分数测定参考美国国家可再生能源实验室 (NREL) 方法<sup>[17]</sup>，并有所简化：取 0.2 g 干燥植物材料 (记为  $m_0$ )，加入 3 mL 体积分数为 72% 的硫酸，摇匀，30 ℃ 水浴 1 h。稀释酸体积分数至 4% (体积记为  $v$ )，转移至聚四氟乙烯耐压瓶中，于烘箱中 121 ℃ 酸解 2 h。使用砂芯漏斗抽滤，滤纸采用已烘干并称量的无灰定量滤纸 (记为  $m_1$ )。滤渣连同滤纸转移至陶瓷坩埚，80 ℃ 过夜烘干后称量 (记为  $m_2$ )，随后于马弗炉中 550 ℃ 煅烧 4 h，冷却后称量 (记为  $m_3$ )。滤液以质量分数为 4% 的氢氧化钠中和至中性后 (稀释倍数记为  $k$ )，用葡萄糖试剂盒测定葡萄糖质量分数 (记为  $C_{glu}$ )，用 DNS 法测定还原糖质量分数 (记为  $C_{rs}$ )，计算纤维素、半纤维素和木质素质量分数 (分别记为  $C_{cel}$ 、 $C_{hem}$  和  $C_{lig}$ )，最后根据降解前组分质量分数 (记为  $C$ ) 和降解后组分质量分数 (记为  $C_d$ ) 计算组分降解率 (记为  $R_{lc}$ )。计算公式如下： $C_{cel} = C_{glu} \times v \times k \times 0.90 / m_0 \times 100\%$ ； $C_{hem} = (C_{rs} - C_{glu}) \times v \times k \times 0.88 / m_0 \times 100\%$ ； $C_{lig} = (m_2 - m_1 - m_3) / m_0 \times 100\%$ ； $R_{lc} = [1 - (m \times C) / (m_d \times C_d)] \times 100\%$ 。其中：0.90 为纤维素单糖转化系数，0.88 为半纤维素单糖转化系数。

### 1.6 降解前后水稻秸秆理化性质测定

1.6.1 傅立叶红外光谱分析 取降解前后水稻秸秆样品，烘干后研磨成粉末，使用傅立叶红外光谱仪 (Thermo Scientific NICOLET iS50FT-IR) 分析。分辨率  $4 \text{ cm}^{-1}$ ，扫描次数 32 次，扫描波长 500~4000  $\text{cm}^{-1}$ 。

1.6.2 X 射线衍射分析 取降解前后水稻秸秆样品，烘干后研磨成粉末，使用 X 射线衍射仪 (Bruker D8 Advance) 分析。扫描范围  $5^\circ \sim 90^\circ$ ，扫描速度  $5^\circ \cdot \text{min}^{-1}$ ，计算纤维素结晶度 ( $D$ )： $D = (I_{002} - I_{am}) / I_{002} \times 100\%$ 。其



中： $I_{002}$  表示  $2\theta = 22.5^\circ$  衍射峰最大值； $I_{\text{am}}$  表示  $2\theta = 18.0^\circ$  衍射峰最小值。

1.6.3 扫描电镜观察 取降解前后水稻秸秆样品，烘干后研磨成粉末后用扫描电镜 (Hitachi SU8010) 观察。加速电压：3.0 kV；放大倍数：1 000 倍。

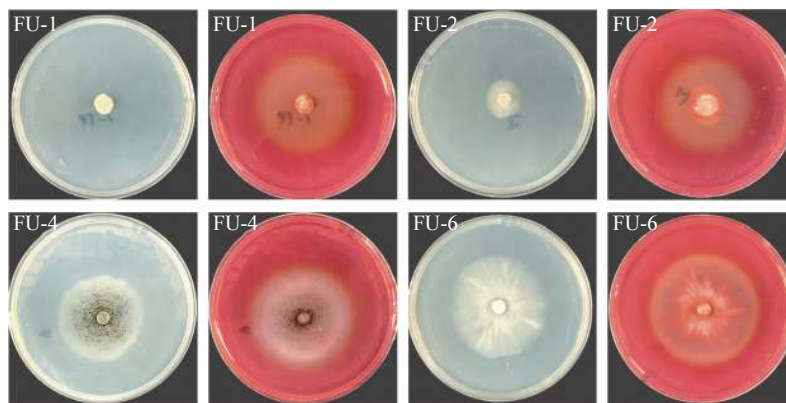
### 1.7 数据处理

使用 SPSS 29 对不同真菌的纤维素酶活性和水稻秸秆降解率进行方差齐性检验与显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 真菌分离筛选与鉴定

2.1.1 分离筛选 本研究共从黑翅土白蚁肠道中分离出 6 株真菌，分别记为 FU-1~FU-6。经刚果红染色后筛选出 FU-1、FU-2、FU-4 和 FU-6 共 4 株产生明显透明圈的真菌，其菌落形态与透明圈形态如图 1 所示，其中产生透明圈初步表明其能将纤维素降解为多聚糖类物质，具有潜在的木质纤维素降解活性<sup>[18]</sup>。



同一菌株编号的图片中，左图为染色前菌落形态图，右图为染色后透明圈形态图。

图 1 4 株真菌菌落形态及透明圈形态

Figure 1 Morphologies of colony and transparent zone of four fungal strains

2.1.2 菌种鉴定 对 4 株具备木质纤维素降解活性的真菌进行分子生物学鉴定，其中 FU-1、FU-2 属于篮状菌属 *Talaromyces*，分别鉴定为安拉阿巴德篮状菌 *T. allahabadensis* 和刺孢篮状菌 *T. aculeatus*。FU-4 属于曲霉属 *Aspergillus*，鉴定为黑曲霉 *A. niger*。FU-6 属于多年卧孔菌属 *Perenniporia*，鉴定为灰孔多年卧孔菌 *P. tephropora*(表 1)。

### 2.2 纤维素酶活性测定

图 2 结果表明：黑曲霉的内切葡聚糖酶和外切葡聚糖酶活性显著高于其他真菌 ( $P < 0.05$ )，分别达 4.361 和 1.893  $\mu\text{kat}\cdot\text{L}^{-1}$ ，表明其具有较强的纤维素链切割和末端水解能力。安拉阿巴德篮状菌的  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性显著高于其他真菌 ( $P < 0.05$ )，达 11.133  $\mu\text{kat}\cdot\text{L}^{-1}$ ，说明具有较强的纤维二糖水解能力。

### 2.3 真菌对峙结果

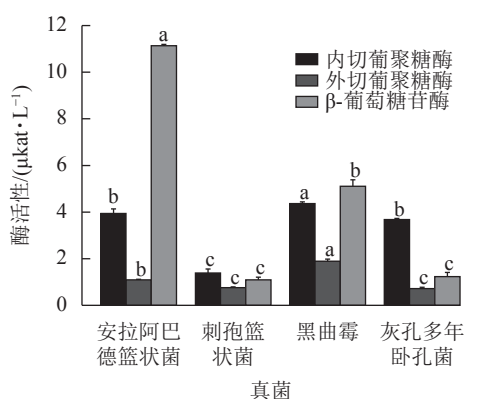
将筛选得到的 4 株真菌两两组合对峙，发现安拉阿巴德篮状菌与刺孢篮状菌 (图 3A)、刺孢篮状菌与黑曲霉 (图 3B) 和刺孢篮状菌与灰孔多年卧孔菌 (图 3C) 菌落之间产生抑菌圈，表现出相互拮抗。而安拉阿巴德篮状菌与黑曲霉 (图 3D)、安拉阿巴德篮状菌与灰孔多年卧孔菌 (图 3E) 和黑曲霉与灰孔多年卧孔菌 (图 3F) 菌落之间可接触生长，具备共生协作降解木质纤维素的潜能。

### 2.4 水稻秸秆降解率

单独降解时，4 株真菌均表现出一定降解能力 (表 2)，其中刺孢篮状菌和黑曲霉具有显著较高的纤维素降解率，分别达 38.49% 和 40.72%，灰孔多年卧孔菌具有极高的半纤维素降解率，达 59.77%，同时

表 1 4 株真菌鉴定结果

Table 1 Identification results of four fungal strains			
菌株编号	GenBank 登记号	相似菌株 (GenBank 登记号)	相似度/%
FU-1	OQ804643	<i>Talaromyces allahabadensis</i> (MH727608)	100.00
FU-2	OQ804660	<i>T. aculeatus</i> (HQ392496)	100.00
FU-4	OQ804669	<i>Aspergillus niger</i> (MG228418)	100.00
FU-6	OQ804677	<i>Perenniporia tephropora</i> (MW077095)	99.84



相同颜色数据柱上不同小写字母表示不同真菌酶活性之间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图2 4种真菌不同纤维素酶活性

Figure 2 Different cellulase activities of four fungal species

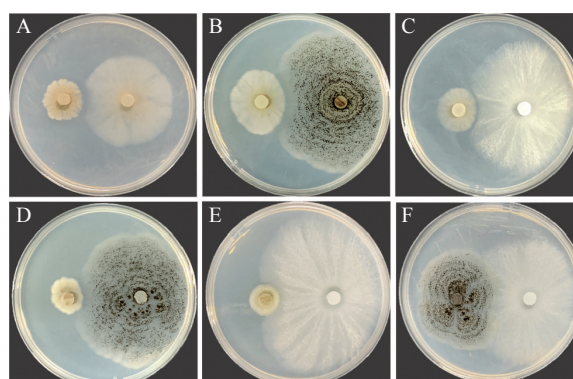


图3 不同真菌组合对峙培养结果  
A. 安拉阿巴德篮状菌(左)与刺孢篮状菌(右); B. 刺孢篮状菌(左)与黑曲霉(右); C. 刺孢篮状菌(左)与灰孔多年卧孔菌(右); D. 安拉阿巴德篮状菌(左)与黑曲霉(右); E. 安拉阿巴德篮状菌(左)与灰孔多年卧孔菌(右); F. 黑曲霉(左)与灰孔多年卧孔菌(右)。

Figure 3 Antagonistic culture results of different fungal combinations

这3种真菌的木质素降解率也达到最高水平。组合降解时,部分真菌组合表现出更强的降解能力,其中当黑曲霉与灰孔多年卧孔菌“强强联合”后,其干物质降解率和纤维素降解率进一步提高,达38.27%和62.59%,同时半纤维素降解率仍保持较高水平,达51.75%。尽管其木质素降解率有所降低,但综合来看,该真菌组合表现出最强的水稻秸秆降解能力,具有潜在的开发价值。

表2 水稻秸秆干物质与木质纤维素组分的降解率

Table 2 Dry matter and lignocellulose components degradation rates of rice straw

处理组	干物质降解率/%	纤维素降解率/%	半纤维素降解率/%	木质素降解率/%
安拉阿巴德篮状菌	26.38±0.33 e	27.86±0.49 e	19.44±2.05 d	13.06±2.56 c
刺孢篮状菌	33.79±1.16 bc	38.49±0.93 c	21.75±2.20 d	28.96±2.79 a
黑曲霉	32.18±0.13 cd	40.72±1.71 bc	30.45±1.40 c	26.87±2.13 a
灰孔多年卧孔菌	36.61±1.02 ab	33.96±0.67 d	59.77±0.90 a	29.66±1.91 a
安拉阿巴德篮状菌+黑曲霉	33.66±1.07 bc	39.91±2.99 bc	33.68±2.34 c	24.38±1.36 ab
安拉阿巴德篮状菌+灰孔多年卧孔菌	29.21±1.57 de	45.60±2.98 b	50.41±1.94 b	14.69±2.33 c
黑曲霉+灰孔多年卧孔菌	38.27±1.32 a	62.59±0.70 a	51.75±2.56 b	17.39±0.36 bc

说明:数值为平均值±标准差。同列不同小写字母表示不同处理组的降解率之间差异显著( $P < 0.05$ )。

## 2.5 黑曲霉与灰孔多年卧孔菌组合降解前后水稻秸秆理化性质

2.5.1 傅立叶红外光谱分析 经黑曲霉与灰孔多年卧孔菌组合降解后,水稻秸秆部分红外吸收峰明显下降(图4),其中 $3400\text{ cm}^{-1}$ 附近吸收峰与—OH伸缩振动相关<sup>[19]</sup>,说明秸秆部分氢键被破坏,分子间作用力减弱; $1460\text{ cm}^{-1}$ 附近吸收峰与半纤维素中亚甲基( $\text{CH}_2$ )弯曲振动相关<sup>[19]</sup>,表明真菌组合能有效破坏半纤维素结构; $1370$ 和 $1315\text{ cm}^{-1}$ 附近吸收峰分别与纤维素中 $\text{CH}_2$ 摇摆振动和C—H弯曲振动相关<sup>[20]</sup>,证明真菌组合具有一定的纤维素分解能力; $1235\text{ cm}^{-1}$ 附近吸收峰与半纤维素-木质素复合物中O=C—C伸缩振动相关<sup>[19]</sup>,说明部分复合结构被瓦解,半纤维素与木质素发生分离; $1160\text{ cm}^{-1}$ 附近吸收峰与碳链中C—O—C伸缩振动相关<sup>[19]</sup>,表明在酶作用下,秸秆中部分碳链结构被破坏,分子聚合度下降。

2.5.2 X射线衍射分析 经黑曲霉与灰孔多年卧孔菌组合降解后,水稻秸秆纤维素非结晶区衍射峰( $2\theta = 18.0^\circ$ )明显下降,纤维素结晶区衍射峰( $2\theta = 22.5^\circ$ )无明显变化,水稻秸秆纤维素结晶度由22.44%上升至32.53%(图5)。说明相较于纤维素结晶区,真菌组合分泌的纤维素酶能够更容易分解纤维素非结晶区。但随着纤维素结晶度不断升高,纤维素整体晶体结构变为更加紧凑,推测对于进一步降解利用纤维素产生一定阻碍作用<sup>[20]</sup>。

2.5.3 降解前后水稻秸秆微观结构 通过扫描电镜观察(图6),发现黑曲霉与灰孔多年卧孔菌组合降解

后水稻秸秆表面由紧密光滑变为粗糙隆起，纤维结构崩解断裂，结构蓬松化，并产生大量孔隙和碎片，推测真菌菌丝可能通过孔隙深入秸秆内部，在内外双重降解下加速破坏秸秆结构。

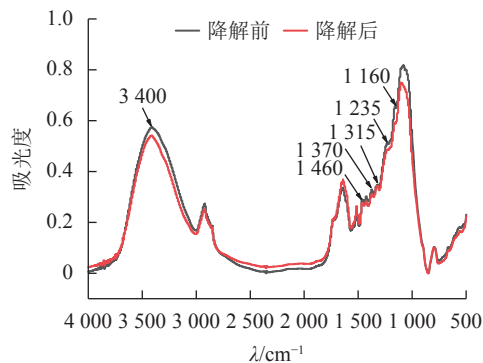


图 4 黑曲霉与灰孔多年卧孔菌组合降解前后水稻秸秆傅立叶红外光谱

Figure 4 FTIR spectra of rice straw before and after *A. niger* and *P. tephropora* combined degradation

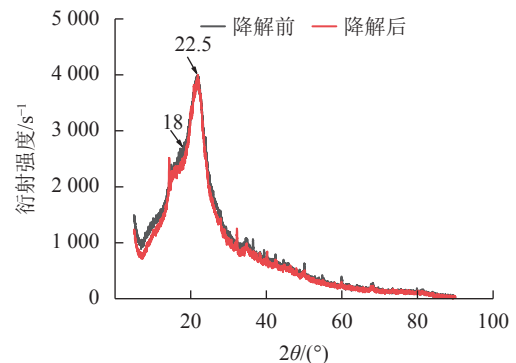


图 5 黑曲霉与灰孔多年卧孔菌组合降解前后水稻秸秆 X 射线衍射图谱

Figure 5 XRD patterns of rice straw before and after *A. niger* and *P. tephropora* combined degradation

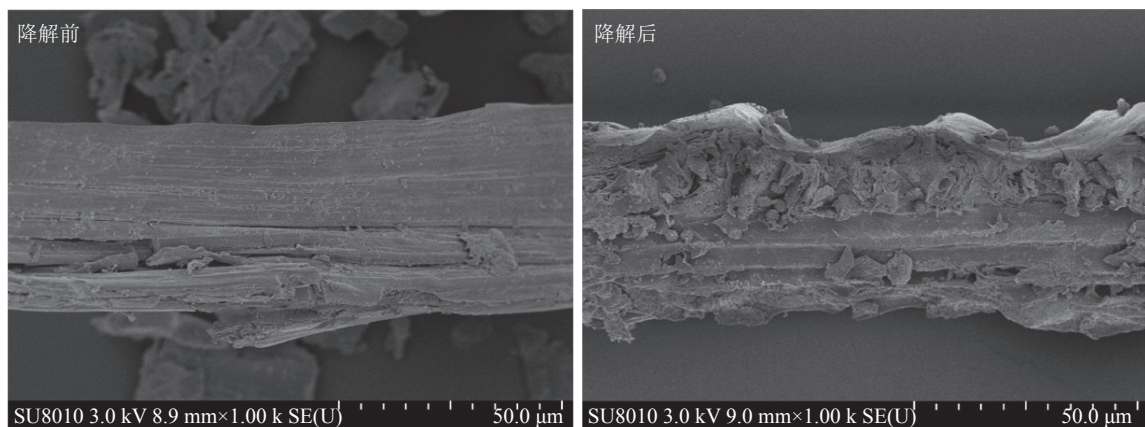


图 6 黑曲霉与灰孔多年卧孔菌降解前后水稻秸秆扫描电镜图像 ( $\times 1\ 000$  倍)  
Figure 6 SEM images of rice straw before and after *A. niger* and *P. tephropora* combined degradation ( $\times 1\ 000$  times)

### 3 讨论

随着分子生物学与环境生物学技术不断成熟，近年来利用真菌绿色降解水稻秸秆已取得了一定进展。MUSTAFA 等<sup>[21]</sup>研究发现：糙皮侧耳和里氏木霉 *T. reesei* 对水稻秸秆纤维素、半纤维素和木质素降解率可分别达 13.1%、23.7%、35.3% 和 20.1%、23.3%、23.6%。尹蕾等<sup>[22]</sup>从土壤中分离出的枝孢菌 *Cladosporium* sp. BD-19 可降解水稻秸秆中 26.42% 的纤维素、16.64% 的半纤维素和 11.43% 的木质素。SHENG 等<sup>[23]</sup>利用逆型金钱菌 *Gymnopus contrarius* 降解水稻秸秆后，去除了 22.9% 的纤维素、22.7% 的半纤维素和 41.9% 的木质素。与上述研究相比，本研究从黑翅土白蚁肠道分离筛选的部分真菌具有更强的降解能力，其中刺孢篮状菌和黑曲霉具有更强的纤维素降解能力，降解率分别达 38.49% 和 40.72%，灰孔多年卧孔菌具有更强的半纤维素降解能力，降解率达 59.77%，推测这些共生真菌在白蚁消化木质食料过程中发挥一定协同降解作用。

在自然状态下，秸秆腐解往往是多种微生物共同参与的结果，将具有酶系互补作用的真菌组合培养不仅弥补部分菌种酶系不完整或个别酶活低的缺陷，同时还能减缓反馈抑制，从而提高降解效果<sup>[24]</sup>。江高飞等<sup>[25]</sup>研究发现：将草酸青霉等 5 种真菌复配后，复合菌系的秸秆降解能力和纤维素酶活性随着菌株种类增多而逐步升高。KOLASA 等<sup>[26]</sup>将里氏木霉分别与黑曲霉等 3 种曲霉混合培养后，小麦 *Triticum aestivum* 秸秆降解率效果相较于单独降解均提升 80% 左右。本研究发现：当黑曲霉与灰孔多年卧孔菌“强强联合”后，水稻秸秆干物质降解率和纤维素降解率进一步提高，分别达 38.27% 和 62.59%，同时



半纤维素降解率仍保持较高水平, 达 51.75%, 表现出极强的降解能力。进一步研究发现: 两者组合能有效破坏水稻秸秆中半纤维素-木质素复合物内部化学键并减弱分子间作用力, 推测在降解过程中纤维素、半纤维素和木质素三者间失去“黏性”, 纤维素向外暴露, 释放更多酶切位点供以降解<sup>[27-28]</sup>。本研究也证实: 真菌组合更偏好分解纤维素非结晶区, 推测是由于非结晶区吸水性更强, 更容易与酶结合<sup>[29]</sup>。秸秆化学结构被破坏的同时, 其物理结构也显著改变, 降解后的秸秆表面崩解碎裂, 结构蓬松化, 产生大量碎片和孔隙, 不仅有利于酶的渗透和吸附, 真菌菌丝也更易探入内部“破坏”<sup>[30]</sup>。

## 4 结论

本研究从黑翅土白蚁肠道分离筛选得到的安拉阿巴德篮状菌、刺孢篮状菌、黑曲霉和灰孔多年卧孔菌均具有水稻秸秆降解活性, 其中黑曲霉和灰孔多年卧孔菌在组合降解水稻秸秆时表现出极强的降解能力, 20 d 内可降解水稻秸秆中 38.27% 的干物质、62.59% 的纤维素和 51.75% 的半纤维素, 并显著破坏秸秆理化结构, 在秸秆生物降解产业化上具有潜在的开发价值。

## 5 参考文献

- [1] 张晓庆, 王梓凡, 参木友, 等. 中国农作物秸秆产量及综合利用现状分析[J]. *中国农业大学学报*, 2021, **26**(9): 30–41. ZHANG Xiaoqing, WANG Zifan, CAN Muyou, *et al.* Analysis of yield and current comprehensive utilization of crop straw in China [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2021, **26**(9): 30–41.
- [2] NIU Wenjuan, HAN Lujia, LIU Xian, *et al.* Twenty-two compositional characterizations and theoretical energy potentials of extensively diversified China's crop residues [J]. *Energy*, 2016, **100**(1): 238–250.
- [3] YU Qiong, LIU Ronghou, LI Kun, *et al.* A review of crop straw pretreatment methods for biogas production by anaerobic digestion in China [J]. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 2019, **107**: 51–58.
- [4] KUMAR B, BHARDWAJ N, AGRAWAL K, *et al.* Current perspective on pretreatment technologies using lignocellulosic biomass: an emerging biorefinery concept [J/OL]. *Fuel Processing Technology*, 2020, **199**: 106244[2023-01-06]. doi:10.1016/j.fuproc.2019.106244.
- [5] RAVALASON H, JAN G, MOLLÉ D, *et al.* Secretome analysis of *Phanerochaete chrysosporium* strain CIRM-BRFM41 grown on softwood [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, **80**(4): 719–733.
- [6] TIAN Chaoguang, BEESON W T, IAVARONE A T, *et al.* Systems analysis of plant cell wall degradation by the model filamentous fungus *Neurospora crassa* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, **106**(52): 22157–22162.
- [7] COUTURIER M, NAVARRO D, OLIVÉ C, *et al.* Post-genomic analyses of fungal lignocellulosic biomass degradation reveal the unexpected potential of the plant pathogen *Ustilago maydis* [J/OL]. *BMC Genomics*, 2012, **13**(1): 57[2023-01-06]. doi:10.1186/1471-2164-13-57.
- [8] SUN Zhenjie, MAO Yanyong, LIU Shanjian, *et al.* Effect of pretreatment with *Phanerochaete chrysosporium* on physicochemical properties and pyrolysis behaviors of corn stover [J/OL]. *Bioresource Technology*, 2022, **361**: 127687[2023-01-06]. doi:10.1016/j.biortech.2022.127687.
- [9] LI Xiong, YI Kangle, LEI Hong, *et al.* Effects of adding different concentrations of *Aspergillus niger* inoculant on the quality of mixed rice straw silage [J]. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 2022, **59**(2): 357–364.
- [10] ZAHARI N I, SHAH U K M, ASA'ARI A Z M, *et al.* Selection of potential fungi for production of cellulase-poor xylanase from rice straw [J]. *Bioresources*, 2016, **11**(1): 1162–1175.
- [11] AN Qi, LI Congsheng, YANG Jing, *et al.* Evaluation of laccase production by two white-rot fungi using solid-state fermentation with different [J]. *Bioresources*, 2021, **16**(3): 5287–5300.
- [12] SHIRKAVAND E, BAROUTIAN S, GAPES D J, *et al.* Combination of fungal and physicochemical processes for lignocellulosic biomass pretreatment: a review [J]. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 2016, **54**: 217–234.
- [13] BRUNE A. Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, **12**(3): 168–180.
- [14] OZBAYRAM E G, KLEINSTEUBER S, NIKOLAUSZ M. Biotechnological utilization of animal gut microbiota for

- valorization of lignocellulosic biomass [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, **104**(2): 489 – 508.
- [15] 王成盼, 梁世优, 殷学杰, 等. 蚁巢伞对木质纤维素的降解作用[J]. 应用与环境生物学报, 2019, **25**(3): 729 – 735.  
WANG Chengpan, LIANG Shiyu, YIN Xuejie, *et al.* Degradation of lignocellulose by *Termitomyces* [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2019, **25**(3): 729 – 735.
- [16] SIJINAMANOJ V, MUTHUKUMAR T, MUTHURAJA R, *et al.* Ligninolytic valorization of agricultural residues by *Aspergillus nomius* and *Trichoderma harzianum* isolated from gut and comb of *Odontotermes obesus* (Termitidae) [J/OL]. *Chemosphere*, 2021, **284**: 131384[2023-01-06]. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.131384.
- [17] SLUITER J B, RUIZ R O, SCARLATA C J, *et al.* Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks (1) review and description of methods [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, **58**(16): 9043 – 9053.
- [18] 张超, 李艳宾, 张磊, 等. 真菌产纤维素酶培养基中刚果红转移机理研究[J]. 微生物学通报, 2006, **33**(6): 12 – 16.  
ZHANG Chao, LI Yanbin, ZHANG Lei, *et al.* Study on transition mechanism of congo-red in cellulase-production fungi medium [J]. *Microbiology China*, 2006, **33**(6): 12 – 16.
- [19] CHANG Shanshan, SALMÉN L, OLSSON A M, *et al.* Deposition and organisation of cell wall polymers during maturation of poplar tension wood by FTIR microspectroscopy [J]. *Planta*, 2014, **239**(1): 243 – 254.
- [20] BENKO E M, CHUHCHIN D G, MALKOV A V, *et al.* Change in the crystallinity of wheat straw during ozone treatment [J]. *Russian Journal of Physical Chemistry*, 2020, **94**(6): 1149 – 1152.
- [21] MUSTAFA A M, POULSEN T G, SHENG K. Fungal pretreatment of rice straw with *Pleurotus ostreatus* and *Trichoderma reesei* to enhance methane production under solid-state anaerobic digestion [J]. *Applied Energy*, 2016, **180**: 661 – 671.
- [22] 尹蕾, 王伟舵, 陈子璇, 等. 水稻秸秆高效降解菌株的筛选鉴定及其降解产物分析[J]. 江苏农业科学, 2018, **46**(19): 292 – 296.  
YI Lei, WANG Weiduo, CHEN Zixuan, *et al.* Screening, identification and degradation product analysis of rice straw [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2018, **46**(19): 292 – 296.
- [23] SHENG Tao, ZHAO Lei, GAO Lingfeng, *et al.* Enhanced biohydrogen production from nutrient-free anaerobic fermentation medium with edible fungal pretreated rice straw [J]. *RSC Advances*, 2018, **8**(41): 22924 – 22930.
- [24] WEI Yuquan, WU Di, WEI Dan, *et al.* Improved lignocellulose-degrading performance during straw composting from diverse sources with actinomycetes inoculation by regulating the key enzyme activities [J]. *Bioresource Technology*, 2019, **271**: 66 – 74.
- [25] 江高飞, 杨天杰, 郑海平, 等. 降解玉米秸秆真菌复合菌系的构建及其降解效果评价[J]. 植物营养与肥料学报, 2021, **27**(2): 284 – 292.  
JIANG Gaofei, YANG Tianjie, ZHEN Haiping, *et al.* Construction and evaluation of fungal consortia effect on maize straw degradation [J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2021, **27**(2): 284 – 292.
- [26] KOLASA M, AHRING B K, LÜBECK P S, *et al.* Co-cultivation of *Trichoderma reesei* RutC30 with three black *Aspergillus* strains facilitates efficient hydrolysis of pretreated wheat straw and shows promises for on-site enzyme production [J]. *Bioresource Technology*, 2014, **169**: 143 – 148.
- [27] PENTTILA P A, IMAI T, HEMMING J, *et al.* Enzymatic hydrolysis of biomimetic bacterial cellulose-hemicellulose composites [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, **190**: 95 – 102.
- [28] MUSSATTO S I, FERNANDES M, MILAGRES A M F, *et al.* Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2008, **43**(2): 124 – 129.
- [29] KARIMI K, TAHERZADEH M J. A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: composition, imaging, and crystallinity [J]. *Bioresource Technology*, 2016, **200**: 1008 – 1018.
- [30] TAN Xuesong, ZHANG Quan, WANG Wen, *et al.* Comparison study of organosolv pretreatment on hybrid pennisetum for enzymatic saccharification and lignin isolation [J]. *Fuel*, 2019, **249**: 334 – 340.