

固定化木质素降解菌对园林废弃物堆肥的影响

孟童瑶¹, 李素艳¹, 邹荣松^{2,3}, 余克非¹, 付冰妍¹, 揭阳¹

(1. 北京林业大学林学院, 北京 100083; 2. 国家林业和草原局盐碱地研究中心, 北京 100091; 3. 中国林业科学研究院天津林业科学研究所, 天津 300270)

摘要: 【目的】以生物质炭和米糠为载体, 将木质素降解菌 No.11 通过固定化的方式制备促进园林废弃物堆肥腐熟的固体菌剂。【方法】通过单因素试验探究接菌量 (5%、10%、15%、20%、25%)、保护剂体积分数 (0、4%、8%、12%、16%、20%)、含水率 (5%、10%、15%、20%、25%) 的优化范围, 再通过正交试验在该范围内寻找固体菌剂的最佳制备条件。以市售常见有效微生物复合菌 (EM 菌) 菌剂为对比, 将制得的菌剂添加到园林废弃物堆肥中, 探究其对木质素、纤维素降解和相关酶活力的影响。【结果】木质素降解菌 No.11 的最佳固定化条件为: 接菌量 10%、保护剂体积分数 8%、含水率 15%, 制得的菌剂中有效活菌数达 1.26×10^{11} CFU·g⁻¹。园林废弃物堆肥中添加自制菌剂后木质素降解相关酶 (漆酶、锰过氧化物酶、木质素过氧化物酶) 的活力均得到提高。与添加 EM 菌相比, 木质素降解率提高 8.69%; 与不添加菌剂相比, 木质素降解率提高 23.91%, 纤维素降解率提高 8.34%, 堆肥产品达到腐熟标准。【结论】通过固定化木质素降解菌制备的固体菌剂, 其有效活菌数符合 GB 20287-2006《农用微生物菌剂》的相关要求, 将菌剂添加到园林废弃物堆肥中可提高木质素和纤维素降解率, 促进堆肥产品腐熟。图 3 表 3 参 36

关键词: 园林废弃物; 堆肥; 固定化菌剂; 木质素; 酶活力

中图分类号: S606 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2021)01-0038-09

Effect of immobilized lignin-degrading bacteria on green waste composting

MENG Tongyao¹, LI Suyan¹, ZOU Rongsong^{2,3}, YU Kefei¹, FU Bingyan¹, JIE Yang¹

(1. College of Forestry, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. Research Center of Saline and Alkali Land of National Forestry and Grassland Administration, Beijing 100091, China; 3. Tianjin Forestry Research Institute, Chinese Academy of Forestry, Tianjin 300270, China)

Abstract: [Objective] The purpose of this research is to prepare a kind of solid microbial inoculant to promote green waste composting by immobilizing lignin-degrading bacteria No.11, with biochar-rice bran as a carrier. [Method] Through single factor experiment, the optimal range of inoculation amount (5%, 10%, 15%, 20%, 25%), volume fraction of protective agent (0, 4%, 8%, 12%, 16%, 20%) and water content (5%, 10%, 15%, 20%, 25%) were explored, and the best preparation conditions of solid microbial inoculant were found by orthogonal test. Taking a common commercially available microbial inoculant (EM) as an example, the microbial agent was added to the composting process of green waste to explore its effects on lignin and cellulose degradation and related enzyme activities. [Result] The optimal immobilization conditions of lignin-degrading bacteria No.11 were as follows: 10% inoculation amount, 8% protectant volume fraction and 15% water content. The amount of the effective living bacteria in the prepared fungus reached 1.26×10^{11} CFU·g⁻¹. Enzyme activities related to lignin degradation (laccase, manganese peroxidase, and lignin peroxidase) were promoted after adding self-made microbial inoculant. Lignin degradation rate increased by 8.69% compared

收稿日期: 2020-03-19; 修回日期: 2020-08-19

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目 (6202021); 国家林业和草原局林业公益性行业科研专项 (201504205)

作者简介: 孟童瑶, 从事农林废弃物处理与资源化利用研究。E-mail: mengty95@163.com。通信作者: 李素艳, 教授, 博士, 从事农林废弃物处理与资源化利用研究。E-mail: lisuyan@bjfu.edu.cn

with the addition of EM bacteria. Compared with the control (without inoculant), the degradation rate of lignin and cellulose increased by 23.91% and 8.34%, respectively, and the compost products reached the maturity standard. [Conclusion] The number of effective viable bacteria of the solid microbial inoculant prepared by immobilizing lignin-degrading bacteria complies with the requirements in *Microbial Inoculants in Agriculture* (GB 20287-2006). Adding the inoculant to green waste compost can improve the degradation rate of lignin and cellulose and promote the maturity of compost products. [Ch, 3 fig. 3 tab. 36 ref.]

Key words: green waste; compost; immobilized bacteria; lignin; enzyme activity

城市园林绿化事业的快速发展导致园林废弃物的数量日益增多^[1]。堆肥已成为园林废弃物资源化利用的主要方式之一^[2-5]。园林废弃物中的木本植物残体存在大量难降解的木质素。这些木质素溶解性差,没有任何易被水解的键,分子结构复杂且不规则,含有各种稳定的复杂键型,微生物及其分泌的酶不易与之结合^[6]。这些木质素还包裹着纤维素,即使微生物可分解单独存在的纤维素,但细胞壁中木质素对纤维素起到保护作用,纤维素的降解仍受到限制^[7-8],严重影响堆肥进程,因此促进木质素降解是加快堆肥进程和提高堆肥产品品质的重要环节^[9]。自然界中的真菌、细菌及相应微生物群落可通过产生分解木质素的酶系统(漆酶、锰过氧化物酶和木质素过氧化物酶)将木质素完全降解,且大多数真菌降解效果强于细菌^[6,10]。堆肥中添加微生物菌剂可显著提高木质素降解率,加快堆肥进程^[8,11]。YU 等^[12]通过二次回归正交设计研制出了一种园林废弃物专用复合菌剂,其木质素降解能力强于有效微生物复合菌(EM 菌)。何慧中等^[13]开发出一种复合功能菌剂,添加到桉树 *Eucalyptus* 皮堆肥中,木质素降解效果显著,与对照相比木质素含量下降了 78.78%。目前,有关木质素降解的菌剂研究多集中在液体菌剂,但液体菌剂存在生产工序复杂,易污染,易失活,不便于保存等缺点。因此,有必要将木质素降解菌制成固体菌剂,弥补液体菌剂的不足。微生物固定化技术是指通过物理或化学的手段将游离的微生物限定在一定的空间区域,保持其生物活性并能反复利用的方法^[14]。将菌株运用固定化方式制成的固体菌剂,具有生产成本低,耐储存,不易失活,便于运输等优点,有利于菌剂在更大范围内推广和应用^[15]。然而,固体菌剂的产品质量受多种因素影响,如接菌量、保护剂浓度和含水率可直接影响菌剂产品的稳定性和应用效果,而且国内外关于木质素降解菌固定化的研究尚不充分,有关园林废弃物堆肥的报道更为鲜见。鉴于此,本研究将 1 株木质素降解菌通过固定化的方式制成固体菌剂,以有效活菌数为评价指标,对菌剂制作过程中的主要影响因素进行优化,再通过正交试验获得最佳固体菌剂的制备条件,将其应用到园林废弃物堆肥中进行效果检验,以期为该菌剂的研制与应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

菌种为曲霉属 *Aspergillus* sp. 真菌 No.11^[1], 目前保存于北京林业大学林学院土壤生物学实验室。堆肥原料来源于北京植物园,主要为花草树木的人工修剪物和自然生长产生的枯枝落叶,粉碎成 1~2 cm 粒径。培养基:马铃薯葡萄糖肉汤(PDB)培养基和马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基。载体与保护剂:通过预实验确定生物质炭和米糠为固定化载体,海藻糖为保护剂,载体混合质量比为 1:1。

1.2 方法

1.2.1 种子液的制备 将 4 ℃ 保存的菌株 No.11 接种到 PDA 培养基上,28 ℃ 下培养 3 d 完成活化。将活化后的菌株 No.11 挑取至装有 100 mL PDB 培养基的摇瓶中,置于 28 ℃、200 r·min⁻¹ 的摇床中培养 48 h(对数生长期末)获得种子液备用。

1.2.2 单因素优化试验 接菌量试验:按照载体质量的 5%、10%、15%、20% 和 25% 接种种子液,调节料水质量比为 1.0:0.8,搅拌均匀,28 ℃ 培养 48 h。培养完成后放在 40 ℃ 烘箱中完全烘干,在室温下干燥密封保存 30 d 后,测定有效活菌数。

保护剂体积分数试验:种子液中分别添加体积分数为 0、4%、8%、12%、16% 和 20% 的保护剂,按载体质量的 10% 接种到载体中,调节料水质量比为 1.0:0.8,混匀后,28 ℃ 培养 48 h。培养完成后放

在 40 ℃ 烘箱中完全烘干，在室温下干燥密封保存 30 d 后，测定有效活菌数。

含水率试验：向载体中接种质量分数为 10% 的种子液，调节料水质量比为 1.0:0.8，混合均匀，28 ℃ 培养 48 h 之后，放在 40 ℃ 烘箱中烘至含水率为 5%、10%、15%、20% 和 25%，在室温下干燥密封保存 30 d 后，测定有效活菌数。

1.2.3 正交试验设计 根据 1.2.2 节试验结果确定优化范围，其中接菌量为 5%、10%、15%，保护剂体积分数为 0、4%、8%，含水率为 10%、15%、20%，进行 3 因素 3 水平正交试验设计。具体方案见表 1。根据表 1，向载体中接种相应水平的种子液和保护剂，调节料水质量比为 1.0:0.8，混合均匀，28 ℃ 培养 48 h，之后放在 40 ℃ 烘箱中烘至该处理对应的含水率。将制备好的固体菌剂在室温环境下干燥密封保存 30 d，测定有效活菌数，确定最佳菌剂的制备条件。

表 1 正交试验设计

水平	因素		
	接菌量/%	保护剂/%	含水率/%
1	5	0	10
2	10	4	15
3	15	8	20

1.2.4 固体菌剂堆肥效果验证 堆肥模拟试验。将粉碎后的园林废弃物分别装入 500 mL 锥形瓶，装 80 g·瓶⁻¹，调节含水率达 60%，共 4 组处理，分别为不添加菌剂 (ck)、添加质量分数为 0.5% 市售 EM 菌剂 (T₁)、添加质量分数为 0.5% 自制固体菌剂 (T₂)、添加质量分数为 1.0% 自制固体菌剂 (T₃)。各组处理 3 次重复。搅拌均匀后用 8 层纱布封好瓶口，置于恒温培养箱中避光培养。为模拟堆肥过程中的升温、高温和降温阶段，弥补堆肥模拟试验中因堆体较小，无法自主升温的缺陷，人工进行培养箱温度的调节：温度从 25 ℃ 逐渐上升至 50 ℃，再逐渐降至 30 ℃。各阶段经历时间分别为 5、30、5 d。

样品采集。采集第 1、8、16、24、32、40 天的堆肥样品鲜样 1 g，测定木质素降解相关酶的酶活力；采集第 1 天和第 40 天堆肥样品测定 pH、电导率 (E_C)、D(465)/D(665)[样品滤液在 465 nm 处吸光度 D(465) 和 665 nm 处吸光度 D(665) 的比值]、种子发芽指数 (I_G)、木质素质量分数和纤维素质量分数等指标。

木质素降解相关酶活力测定。漆酶、锰过氧化物酶和木素过氧化物酶活力测定参照田林双^[16]的木质素降解相关酶类测定标准方法。

堆肥腐熟指标测定。pH 和 E_C 测定：称取待测样品 5 g，置于 100 mL 塑料瓶中，加入 50 mL 蒸馏水，200 r·min⁻¹ 振荡 1 h，过滤其上清液，用 pH 400 防水型笔式 pH 计和 EC 400 防水型笔式电导率/TDS/盐度计分别测定各样品的 pH 和 E_C；样品滤液在 465 nm 处吸光度 D(465) 和 665 nm 处吸光度 D(665) 测定：用 UV-6100 紫外可见分光光度计 (上海元析仪器有限公司) 测定样品滤液在 465 nm 处吸光度 D(465) 和 665 nm 处吸光度 D(665)；I_G 测定：取 5 g 鲜样置于 100 mL 塑料瓶中，加入 50 mL 蒸馏水，振荡 1 h 后获取上清液，将 2 张滤纸平铺到直径为 9 cm 的培养皿中，滤纸上加入 5 mL 上清液，以蒸馏水为空白对照，播撒白菜 *Brassica chinensis* 种子 20 粒·皿⁻¹，置于 25 ℃ 培养箱中培养 48 h 后记录发芽率和根长。计算 I_G，I_G=(上清液处理的发芽率×根长)/(空白组的发芽率×根长)×100%。木质素、纤维素降解率测定：木质素、纤维素质量分数分别用硝酸-乙醇法和 72% 硫酸法进行测定^[17]。

1.2.5 数据分析 采用 Excel 2010 和 SPSS 22.0 软件对数据进行分析处理。

2 结果与讨论

2.1 单因素优化试验结果

接菌量可直接影响固体菌剂的质量。接菌量过少会延长菌株的生长停滞期，过大会增加生产成本，也会增强微生物之间的竞争作用^[18]。由图 1A 可知：固体菌剂中的有效活菌数随接菌量的增加呈先增加后减少的趋势，接菌量为 10% 时有效活菌数最高，达 3.73×10¹⁰ CFU·g⁻¹；其次是接菌量为 5% 和 15% 时，有效活菌数达 2.50×10¹⁰ CFU·g⁻¹ 以上；当接菌量超过 15% 时，菌剂中的有效活菌数逐渐降低，低于 2.50×10¹⁰ CFU·g⁻¹。因此，选用接菌量 5%、10% 和 15% 作为正交试验的 3 个水平。

微生物菌剂中添加一定量的保护剂可以增强其耐储藏性和稳定性，能直接影响菌剂的产品质量与应用效果^[19]。由图 1B 可看出：当保护剂体积分数为 8% 时，活菌数最高达 7.10×10¹⁰ CFU·g⁻¹，保护剂体积

分数 $<8\%$ 时,有效活菌数随保护剂体积分数升高而增多;当保护剂体积分数 $>8\%$ 后,随着保护剂体积分数的升高,有效活菌数显著($P<0.05$)降低,低于 4.00×10^{10} CFU \cdot g $^{-1}$ 。因此,选用 0、4% 和 8% 作为正交试验的 3 个水平。

含水率对固体菌剂的储存有很大影响。含水率过高容易滋生杂菌,使固体菌剂受到污染影响应用效果,含水率过低不利于菌株的生存,一段时间后有效活菌数会大幅度降低^[20]。由图 1C 可知:随着含水率的提高,固体菌剂中有效活菌数呈先升高后降低的趋势,含水率为 15% 时有效活菌数最高,可达 5.17×10^{10} CFU \cdot g $^{-1}$;含水率为 10% 和 20% 时,固体菌剂中有效活菌数可达 4.00×10^{10} CFU \cdot g $^{-1}$ 以上;含水率为 5% 和 25% 时,固体菌剂的储存效果最差,有效活菌数仅为 2.00×10^{10} CFU \cdot g $^{-1}$ 左右。综上可知,当固体菌剂含水率为 10%~20% 时,有效活菌数较高,因此,选用 10%、15%、20% 作为正交试验中的 3 个水平。

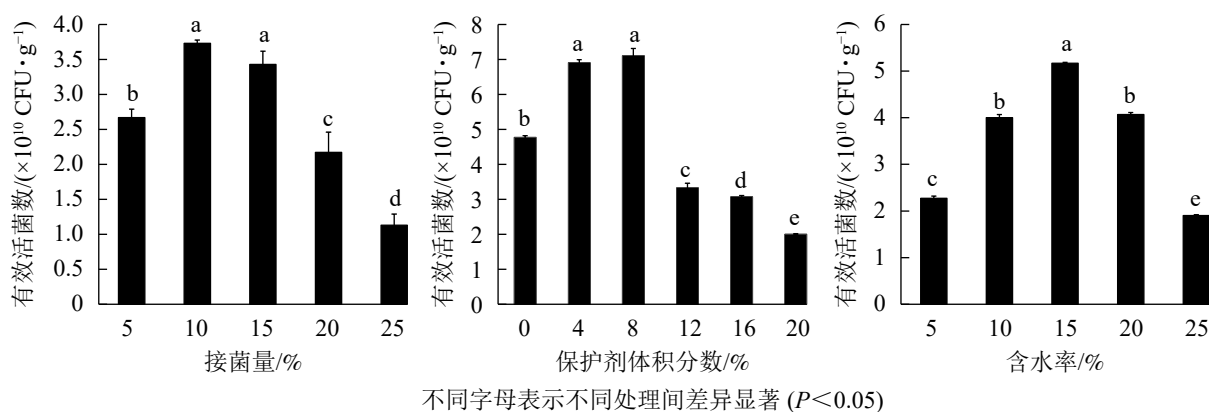


图 1 接菌量、保护剂体积分数和含水率对有效活菌数的影响

Figure 1 Effect of inoculation amount, protective agent concentration and water content on living bacteria count

2.2 正交设计试验结果

由表 2 可知:在接菌量、保护剂体积分数和含水率等 3 种因素中,影响程度最大的是接菌量,其次是含水率,影响程度最小的是保护剂体积分数。固体菌剂制备的最佳配方为 A2B3C2,即:接菌量 10%、保护剂体积分数 8%、含水率 15%。该条件下,菌剂中有效活菌数达 1.26×10^{11} CFU \cdot g $^{-1}$,符合 GB 20287-2006《农用微生物菌剂》的标准 ($>0.50\times 10^8$ CFU \cdot g $^{-1}$)。

2.3 堆肥试验结果

2.3.1 堆肥腐熟指标 pH 是评价堆肥腐熟程度的指标之一。堆肥腐熟后, pH 一般为 7.0~8.5^[21]。由表 3 可知:堆肥结束时各处理 pH 均在 8.0 左右,符合 NY 525-2002《有机肥料》标准。

E_C 可以表示堆肥中可溶性总盐的含量,其大小能影响植物的生长, E_C 过高的堆肥产品可以影响土壤理化性质,使植物生长受到毒害。 E_C 小于 4.00 mS \cdot cm $^{-1}$,表明堆肥已达到腐熟,对植物生长无毒害^[22]。由表 3 可知:ck 处理 E_C 为 0.35 mS \cdot cm $^{-1}$,各处理的 E_C 相近,均小于 4.00 mS \cdot cm $^{-1}$,在腐熟标准之内。

$D(465)/D(665)$ 能反映出胡敏酸分子的稳定程度, $D(465)/D(665)$ 较大说明胡敏酸相对稳定,较

表 2 正交试验的极差分析

处理	接菌量 (A)/%	保护剂 (B)/%	含水率 (C)/%	有效活菌数/ ($\times 10^{10}$ CFU \cdot g $^{-1}$)
1	5	0	10	5.87 \pm 0.17 b
2	5	4	15	1.03 \pm 0.09 d
3	5	8	20	2.23 \pm 0.12 c
4	10	0	20	0.53 \pm 0.05 e
5	10	4	10	6.23 \pm 0.17 b
6	10	8	15	12.57 \pm 0.05 a
7	15	0	15	2.30 \pm 0.36 c
8	15	4	20	0.50 \pm 0.08 e
9	15	8	10	1.17 \pm 0.31 d
K_1	9.13	8.70	13.27	
K_2	19.33	7.76	15.90	
K_3	3.97	15.97	3.26	
平均 K_1	3.04	2.90	4.42	
平均 K_2	6.44	2.59	5.30	
平均 K_3	1.32	5.32	1.09	
极差R	5.12	2.74	4.21	

说明:不同小写字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$)

表3 堆肥腐熟指标测定结果

Table 3 Determination results of composting maturity index

处理	pH	E_C ($mS \cdot cm^{-1}$)	$D(465)/D(665)$	$I_G/\%$
ck	7.89±0.04 a	0.35±0.00 a	5.85±0.53 a	106.00±15.31 a
T ₁	8.01±0.13 a	0.34±0.02 a	6.22±0.06 a	114.00±21.44 a
T ₂	8.01±0.03 a	0.34±0.01 a	6.26±0.11 a	118.00±3.55 a
T ₃	7.97±0.06 a	0.32±0.01 a	6.46±0.09 a	112.00±10.93 a

说明：相同小写字母表示不同处理间差异不显著($P>0.05$)

小说明胡敏酸结构简单，因此可用来分析评价堆肥的腐殖化作用大小^[9]。由表3可知：堆肥结束时，各处理的 $D(465)/D(665)$ 均为6.0左右。

I_G 是判断堆肥产品是否腐熟的生物学指标。堆肥产品未腐熟时会产生对植物生长有毒有害的物质，抑制植物的生长。一般情况下，当 I_G 大于80%就可认为产品已达到腐熟^[23]。由表3可知：各处理的 I_G 均超过80%，堆肥产品对植物无毒。

综上所述，堆肥进行40 d后，各处理的pH和 E_C 均达到腐熟标准且无显著差异，但添加菌剂后可以缩短堆肥腐熟的时间^[24]。各处理的 $D(465)/D(665)$ 均为6.0左右，说明其缩合度和芳构化仍很低，这也从另一方面表明腐殖质活性较强^[9]。各处理的 I_G 均超过80%，这与ZHANG等^[25]测定的园林废弃物堆肥产品 I_G 一致。

2.3.2 木质素酶活力测定结果 堆肥过程中微生物会分泌各种酶，从而将木质素类大分子物质转化成腐殖质等促进植物生长的物质^[26]。与木质素降解相关的生物酶主要包括漆酶、锰过氧化物酶和木质素过氧化物酶^[27]。

在堆肥过程中，漆酶对木质素的降解起着非常重要的作用，研究漆酶活力的变化对评价堆肥进程及微生物活动强度至关重要^[28]。由图2A可看出：除T₃外，其余处理漆酶活力在初始阶段相差不大，呈现先降后升趋势，与陈建军等^[29]研究结果一致。可能是堆肥材料中某些小分子物质先降解，之后微生物再降解木质素类难降解的大分子物质。T₃酶活力先升后降，可能与其开始微生物数量较多，分解速率较高有关。堆肥进行到24 d时，T₁、T₂和T₃漆酶活力远超过ck，说明添加自制菌剂与市售菌剂都可大大增强堆肥中微生物的活动强度，随着微生物菌落增多，产酶能力也增加。第24天之后，T₃酶活力下降，ck酶活力上升，T₁与T₂酶活力变化不大，且大小相当，均达80 U·L⁻¹(1 U=16.67 nkat)左右。菌株No.11的研究结果也显示：与可高效降解木质素的黄孢原毛平革菌 *Phanerochaete chrysosporium* 相比，此菌株有更强的产酶能力，也进一步说明自制固体菌剂有更大的应用潜力。

锰过氧化物酶是一种酚氧化物酶，可与其他酶共同作用提高对木质素的降解作用^[10]。由图2B可看出：添加菌剂的处理组锰过氧化物酶活力均高于ck，说明添加菌剂可以提高堆肥中锰过氧化物酶的酶活力。堆肥初始阶段，所有处理组的锰过氧化物酶活力均出现先降后升趋势，可能与堆肥中的氮素含量有关，氮素含量会影响微生物分泌锰过氧化物酶^[27]。第8天后所有处理组酶活力又出现了上升趋势，说明

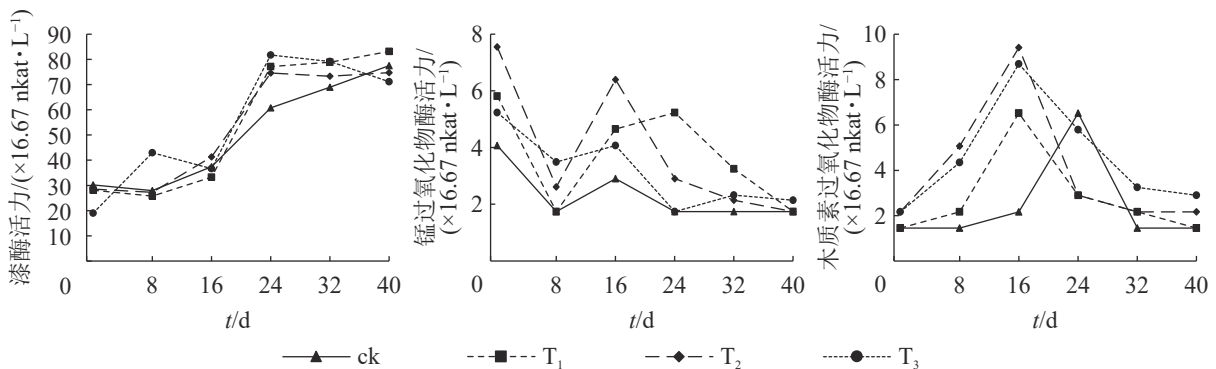


图2 堆肥过程中漆酶、锰过氧化物酶和木质素过氧化物酶酶活力变化

Figure 2 Changes of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase activity during composting

微生物代谢活动增强，开始分泌锰过氧化物酶， T_2 与 T_3 在第 16 天时达到峰值， T_1 的峰值出现在第 24 天左右。这表明添加自制固体菌剂后菌株可较快适应环境分泌锰过氧化物酶。有研究表明：锰过氧化物酶在限氮高锰培养基中产量较高^[10]，因此制备此类菌剂时，可通过优化含氮量提高产锰过氧化物酶的能力。

木质素过氧化物酶是一种含亚铁血红素的过氧化物酶，可直接与芳香底物发生反应，也可通过氧化低分子量的中介体而间接地发挥作用^[30]。由图 2C 可看出：所有处理组木质素过氧化物酶活力均呈现先升后降趋势，添加菌剂的处理组酶活力的峰值出现时间均早于 ck，且峰值高于 ck，表明加入菌剂后可明显提高微生物分泌木质素过氧化物酶的速率^[31]。堆肥的后期，木质素过氧化物酶显著降低，分析原因可能与此时碳氮比的变化有关。

2.3.3 木质素和纤维素降解率测定结果 木质素是一种在自然界中广泛存在的有机高分子化合物，多存在于植物的细胞壁中^[32]。木质素的完全降解由细菌、放线菌和真菌共同参与，其中真菌起重要作用^[33]。由图 3 可看出：添加菌剂的处理木质素与纤维素降解率均高于 ck， T_3 木质素降解率达 46.65%，其次是 T_2 ，木质素降解率为 30.43%，而 T_1 的木质素降解率仅为 21.74%。

纤维素是植物细胞壁的主要结构成分，通常与半纤维素和木质素结合在一起^[34]。自然界中有许多微生物可以通过酶的作用分解植物残体中的纤维素，但细胞壁中木质素对纤维素起到保护作用，所以木质素和纤维素的分解都受到限制^[6]。由图 3 可知：添加菌剂后可提高园林废弃物堆肥中纤维素降解率，其中 T_1 降解率为 18.33%， T_2 降解率为 16.67%， T_3 纤维素降解率最高，达 30.00%。

综上所述， T_2 木质素降解率高于 T_1 ，说明自制固体菌剂对园林废弃物中木质素的降解效果较好。纤维素降解率结果显示： T_1 略强于 T_2 ，这可能是因为市售菌剂中的菌株对纤维素降解能力较好，而自制固体菌剂中的菌株主要产生木质素降解相关酶，对木质素的降解效果较好。 T_3 的木质素降解率与纤维素降解率均高于 T_2 ，说明在考虑成本的前提下，需进一步研究自制固体菌剂的添加量，以获得最大经济效益。与王顺利等^[35] 制备出堆肥菌剂 CC-1 相比，接菌量相当的情况下添加自制固体菌剂可使纤维素降解率提高 11.68%，木质素降解率提高 46.65%。这可能与菌株 No.11 的特殊菌丝结构有关，同时说明自制固体菌剂可高效降解木质素和纤维素。与尹爽等^[36] 研制的复合菌剂相比，添加自制固体菌剂木质素降解率较高，可能是因为自制固体菌剂更易于微生物在堆肥中均匀生长，能极大程度地发挥降解作用。自制固体菌剂可以较好地分解园林废弃物中的木质素，并能提高纤维素降解率。

3 结论

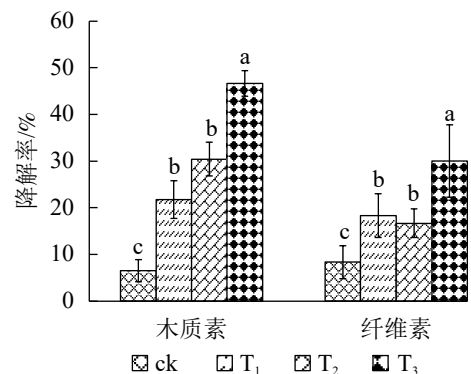
木质素降解菌 No.11 的最佳固定化条件为：接菌量 10%、保护剂体积分数 8%、含水率 15%。在此条件下，获得的固体菌剂成品保存 30 d 后，其有效活菌数达 1.26×10^{11} CFU·g⁻¹，符合 GB 20287-2006《农用微生物菌剂》的要求。

添加自制固体菌剂的堆肥产品 pH 为 8.01，达到 NY 525-2002《有机肥料》标准， E_C 为 $0.34 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ ， $D(465)/D(665)$ 为 6.26， I_G 达 118%，对植物无毒。

堆肥中添加自制木质素降解固体菌剂有利于木质素降解酶系的产生，漆酶、锰过氧化物酶和木质素过氧化物酶的酶活力均得到提升。与不添加菌剂相比，木质素降解率提高 23.91%，纤维素降解率提高 8.34%；0.5% 接种比例下，与 EM 菌相比，纤维素降解率未提高，木质素降解率提高 8.69%。

4 参考文献

[1] 康跃, 李素艳, 孙向阳, 等. 园林废弃物木质素降解真菌的筛选、鉴别及其能力研究[J]. 林业科学研究, 2019, 32(3):



不同字母表示不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)

图 3 不同处理的木质素和纤维素降解率

Figure 3 Degradation rate of lignin and cellulose in different treatments

80 – 87.

KANG Yue, LI Suyan, SUN Xiangyang, *et al.* Study on screening, identification and capability of lignin-degrading fungi for landscaping waste [J]. *For Res*, 2019, **32**(3): 80 – 87.

- [2] SHI Yan, GE Ying, CHANG Jie, *et al.* Garden waste biomass for renewable and sustainable energy production in China: potential, challenges and development [J]. *Renewable Sustainable Energy Rev*, 2013, **22**: 432 – 437.
- [3] 肖超群, 郭小平, 刘玲, 等. 绿化废弃物堆肥配制屋顶绿化新型基质的研究[J]. *浙江农林大学学报*, 2019, **36**(3): 598 – 604.
- XIAO Chaoqun, GUO Xiaoping, LIU Ling, *et al.* Greening waste compost as a new substrate for green roofs [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2019, **36**(3): 598 – 604.
- [4] 王琳, 李素艳, 孙向阳, 等. 不同配比园林绿化废弃物和蘑菇渣混合蚯蚓堆肥的效果[J]. *浙江农林大学学报*, 2019, **36**(2): 326 – 334.
- WANG Lin, LI Suyan, SUN Xiangyang, *et al.* Mixing garden wastes and spent mushroom compost of different ratios for vermicomposting [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2019, **36**(2): 326 – 334.
- [5] 蔡琳琳, 李素艳, 龚小强, 等. 好氧堆肥-蚯蚓堆肥结合法处理绿化废弃物与牛粪[J]. *浙江农林大学学报*, 2018, **35**(2): 261 – 267.
- CAI Linlin, LI Suyan, GONG Xiaoqiang, *et al.* Composting-vermicomposting of green waste processing spiked with cow dung [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2018, **35**(2): 261 – 267.
- [6] 陈芙蓉, 曾光明, 郁红艳, 等. 堆肥化中木质素的生物降解[J]. *微生物学杂志*, 2008, **28**(1): 88 – 93.
- CHEN Furong, ZENG Guangming, YU Hongyan, *et al.* Biodegradation of lignin in compost environment [J]. *J Microbiol*, 2008, **28**(1): 88 – 93.
- [7] 胡笑峰, 张朵朵, 周云横, 等. 1株木质素降解菌的鉴定及其降解特性[J]. *生物技术通报*, 2019, **35**(9): 172 – 177.
- HU Xiaofeng, ZHANG Duoduo, ZHOU Yunheng, *et al.* Identification of a lignin degrading bacterium and its degrading characteristics [J]. *Biotechnol Bull*, 2019, **35**(9): 172 – 177.
- [8] 陈莹, 张俊涛, 阮琳. 园林废弃物堆肥中木质素降解菌的鉴定及其降解能力研究[J]. *华南农业大学学报*, 2014, **35**(6): 94 – 98.
- CHEN Ying, ZHANG Juntao, RUAN Lin. Identification and degradation ability of lignin degradation isoaltes from landscaping waste compost [J]. *J South China Agric Univ*, 2014, **35**(6): 94 – 98.
- [9] 于鑫. 北京市园林绿化废弃物再利用调查及堆肥实验研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2010.
- YU Xin. *Survey on the Recycling Status of Beijing Garden Waste and Study on Garden Waste Composting*[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2010.
- [10] 池玉杰, 伊洪伟. 木材白腐菌分解木质素的酶系统: 锰过氧化物酶、漆酶和木质素过氧化物酶催化分解木质素的机制[J]. *菌物学报*, 2007, **26**(1): 153 – 160.
- CHI Yujie, YI Hongwei. Lignin degradation mechanisms of ligninolytic enzyme system, manganese peroxidase, laccase and lignin peroxidase, produced by wood white rot fungi [J]. *Mycosystema*, 2007, **26**(1): 153 – 160.
- [11] 王帅, 王楠, 窦森, 等. 真菌及混合菌对锯木屑类腐殖质形成和转化的影响[J]. *水土保持学报*, 2012, **26**(1): 227 – 231.
- WANG Shuai, WANG Nan, DOU Sen, *et al.* Effect of fungi and mixed strains on the formation and transformation of the humic-like substances of the sawdust [J]. *J Soil Water Conserv*, 2012, **26**(1): 227 – 231.
- [12] YU Kefei, SUN Xiangyang, LI Suyan, *et al.* Application of quadratic regression orthogonal design to develop a composite inoculum for promoting lignocellulose degradation during green waste composting [J]. *Waste Manage*, 2018, **79**: 443 – 453.
- [13] 何慧中, 孙映波, 刘可星, 等. 桉树皮木质素降解复合功能菌的构建及效果研究[J]. *农业环境科学学报*, 2014, **33**(3): 484 – 489.
- HE Huizhong, SUN Yingbo, LIU Kexing, *et al.* Construction of a microbial consortium for lignin degradation and its effect on composting of *Eucalyptus* bark [J]. *J Agro-Environ Sci*, 2014, **33**(3): 484 – 489.
- [14] 梁宏, 王新, 孙宏, 等. 1种固定化复合菌剂的特性及净水性能研究[J]. *华北水利水电大学学报(自然科学版)*, 2019, **40**(5): 24 – 30, 82.
- LIANG Hong, WANG Xin, SUN Hong, *et al.* Research on characteristics and water purification performance of an

- immobilized composite bacteria [J]. *J North China Univ Water Resour Electr Power Nat Sci Ed*, 2019, **40**(5): 24 – 30, 82.
- [15] FU Nan, CHEN Xiaodong. Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes [J]. *Food Res Int*, 2011, **44**(5): 1127 – 1149.
- [16] 田林双. 木质素降解相关酶类测定标准方法研究[J]. *畜牧与饲料科学*, 2009, **30**(10): 13 – 15.
TIAN Linshuang. Research on standard method for determining ligninolytic enzyme activity [J]. *Animal Husbandry Feed Sci*, 2009, **30**(10): 13 – 15.
- [17] GONG Xiaoqiang, LI Suyan, SUN Xiangyang, *et al.* Maturation of green waste compost as affected by inoculation with the white-rot fungi *Trametes versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *Environ Technol*, 2016, **38**(7): 1 – 8.
- [18] 张安龙, 王晔, 王雪青, 等. 1 株高效苯酚降解真菌的分离鉴定及其菌剂的制备[J]. *微生物学通报*, 2018, **45**(7): 1450 – 1461.
ZHANG Anlong, WANG Ye, WANG Xueqing, *et al.* Isolation and identification of a high-efficiency phenol-degrading fungi and the preparation of its microbial inoculum [J]. *Microbiol China*, 2018, **45**(7): 1450 – 1461.
- [19] 何文, 刘金龙, 寇娟妮, 等. 黄赭色链霉菌固体菌剂的研制及其对小麦幼苗生长的影响[J]. *生物技术通报*, 2017, **33**(12): 119 – 124.
HE Wen, LIU Jinlong, KOU Juanni, *et al.* Development of microbial inoculum of *Streptomyces silaceus* and its effect on wheat seedling growth [J]. *Biotechnol Bull*, 2017, **33**(12): 119 – 124.
- [20] 张志红, 李华兴, 冯宏, 等. 堆肥作为微生物菌剂载体的研究[J]. *农业环境科学学报*, 2010, **29**(7): 1382 – 1387.
ZHANG Zhihong, LI Huaxing, FENG Hong, *et al.* Compost as a carrier for microbial inoculants [J]. *J Agro-Environ Sci*, 2010, **29**(7): 1382 – 1387.
- [21] GONG Xiaoqiang, LI Suyan, CARSON M A, *et al.* Spent mushroom substrate and cattle manure amendments enhance the transformation of garden waste into vermicomposts using the earthworm *Eisenia fetida* [J]. *J Environ Manage*, 2019, **248**: 1 – 12.
- [22] SMÅRS S, GUSTAFSSON L, BECK-FRIIS B, *et al.* Improvement of the composting time for household waste during an initial low pH phase by mesophilic temperature control [J]. *Bioresour Technol*, 2002, **84**(3): 273 – 241.
- [23] ZHANG Lu, SUN Xiangyang. Effects of rhamnolipid and initial compost particle size on the two-stage composting of green waste [J]. *Bioresour Technol*, 2014, **163**: 112 – 122.
- [24] 韩丽娜, 王泽槐, 李建国. 接种外源微生物菌剂对香蕉茎秆堆肥的影响[J]. *环境工程学报*, 2012, **6**(11): 4215 – 4222.
HAN Lina, WANG Zehuai, LI Jianguo. Effects of inoculating microbes on banana pseudostem composting [J]. *Chin J Environ Eng*, 2012, **6**(11): 4215 – 4222.
- [25] ZHANG Lu, SUN Xiangyang. Using cow dung and spent coffee grounds to enhance the two-stage co-composting of green waste [J]. *Bioresour Technol*, 2017, **245**: 152 – 161.
- [26] 侯宪文, 李勤奋, 陈炫, 等. 木薯皮和鸡粪的堆肥化利用研究[J]. *农业环境科学学报*, 2014, **33**(3): 478 – 483.
HOU Xianwen, LI Qinfen, CHEN Xuan, *et al.* The study on composting utilization of cassava bark and chicken manure [J]. *J Agro-Environ Sci*, 2014, **33**(3): 478 – 483.
- [27] 史龙翔, 谷洁, 潘洪加, 等. 复合菌剂提高果树枝条堆肥过程中酶活性[J]. *农业工程学报*, 2015, **31**(5): 244 – 251.
SHI Longxiang, GU Jie, PAN Hongjia, *et al.* Improving enzyme activity by compound microbial agents in compost with mixed fruit tree branches and pig manure during composting [J]. *Trans Chin Soc Agric Eng*, 2015, **31**(5): 244 – 251.
- [28] 张晓倩, 许修宏, 王晶, 等. 添加木质素降解菌对堆肥中酶活性的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2012, **31**(4): 843 – 847.
ZHANG Xiaoqian, XU Xiuhong, WANG Jing, *et al.* Effect of inoculating lignin degradation strains on enzymic activities in composting [J]. *J Agro-Environ Sci*, 2012, **31**(4): 843 – 847.
- [29] 陈建军, 刘梁涛, 曹香林. 高效木质素降解菌的筛选及产漆酶条件的研究[J]. *甘肃农业大学学报*, 2018, **53**(4): 130 – 136.
CHEN Jianjun, LIU Liangtao, CAO Xianglin. Study on screening of efficient lignin degrading bacteria and the conditions for laccase production [J]. *J Gansu Agric Univ*, 2018, **53**(4): 130 – 136.
- [30] HARVEY P J, SCHOEMAKER H E, PALMER J M. Veratryl alcohol as a mediator and the role of radical cations in lignin biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *FEBS Lett*, 1986, **195**(1): 242 – 246.
- [31] RAUT M, WILLIAM S P M P, BHATTACHARYYA J K, *et al.* Microbial dynamics and enzyme activities during rapid

- composting of municipal solid waste: a compost maturity analysis perspective [J]. *Bioresour Technol*, 2008, **99**(14): 6512 – 6519.
- [32] PARDO I, VICENTE A I, MATE D M, *et al.* Development of chimeric laccases by directed evolution [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2012, **109**(12): 2978 – 2986.
- [33] 刘梁涛. 高效木质素降解菌菌株的筛选、鉴定及漆酶性质的研究[D]. 新乡: 河南师范大学, 2018.
LIU Liangtao. *Screening and Identification of Efficient Lignin-degrading Bacterial Strains and Study of Laccase Properties*[D]. Xinxiang: Henan Normal University, 2018.
- [34] GILBERT H J. The biochemistry and structural biology of plant cell wall deconstruction [J]. *Plant Physiol*, 2010, **153**(2): 445 – 455.
- [35] 王顺利, 刘克锋, 李荣旗, 等. 木质纤维素分解复合菌剂强化牛粪堆肥工艺[J]. *农业机械学报*, 2014, **45**(4): 201 – 207.
WANG Shunli, LIU Kefeng, LI Rongqi, *et al.* Enhanced technology of cattle manure compost by microbial inoculum with high lignocellulose degradation ability [J]. *Trans Chin Soc Agric Mach*, 2014, **45**(4): 201 – 207.
- [36] 尹爽, 王修俊, 马桂英, 等. 复合菌剂对玉米秸秆的生物降解作用[J]. *福建农业学报*, 2016, **31**(5): 532 – 537.
YIN Shuang, WANG Xiujun, MA Guiying, *et al.* Multi-microorganisms for cornstalk biodegradation [J]. *Fujian J Agric Sci*, 2016, **31**(5): 532 – 537.