

园林废弃物木质素降解真菌的筛选、 鉴别及其能力研究

康跃, 李素艳*, 孙向阳, 龚小强, 余克非, 蔡琳琳, 王琳

(北京林业大学林学院, 北京 100083)

摘要: [目的] 为获得能够高效降解园林废弃物的真菌并研究其降解能力, 从经过堆肥处理的园林废弃物中分离和筛选出 1 株木质素降解能力较强的真菌。 [方法] 经过形态分析、ITS 分子序列分析, 构建系统发育树, 鉴定出该株木质素降解真菌种属, 并利用该菌株进行固态发酵实验, 研究其在固态发酵过程中漆酶、锰过氧化物酶的酶活力变化及其对不同园林废弃物中木质素的降解能力。 [结果] 从经过堆肥处理的园林废弃物中共挑选出真菌 18 株, 筛选出 1 株高效的木质素降解真菌, 编号为菌株 No. 11, 经鉴定该菌株为构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans* (Eidam) G. Winter)。以冬青卫矛叶、冬青卫矛枝、圆柏叶、圆柏枝、连翘枝叶为底物的模拟固态发酵的漆酶酶活力峰值分别为 388.7、326.3、461.4、342.7、588.5 $U \cdot L^{-1}$, 锰过氧化物酶酶活力峰值分别为 138.3、121.1、104.6、128.6、73.3 $U \cdot L^{-1}$ 。添加菌株 No. 11 使冬青卫矛叶、冬青卫矛枝、圆柏叶、圆柏枝、连翘枝叶 40 d 后木质素降解率分别提高了 20.40%、22.44%、29.90%、25.28%、15.77%。 [结论] 筛选出的构巢曲霉对北京地区常见园林废弃物冬青卫矛、圆柏和连翘枝叶中的木质素具有较好的降解能力, 在降解园林废弃物方面可能更具有优势。

关键词: 园林废弃物; 木质素降解真菌; 酶活力; 固态发酵

中图分类号: S718.8

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2019)03-0080-08

园林废弃物主要包括人工修剪的枝叶和草坪草、自然生长的杂草、自然掉落的枯枝落叶^[1], 其主要有机成分包括木质素、纤维素、半纤维素等^[2]。随着生态文明建设的开展和城市绿化覆盖率的提高, 城市中待处理的园林废弃物数量猛增, 已成为城市第二大固体废弃物^[3], 2017 年北京市年产园林废弃物已经达到 600 万吨^[4]。堆肥处理等园林废弃物资源化利用是解决该问题的重要途径, 堆肥处理可以将园林废弃物转化为有机肥料、栽培基质等产品, 同时这些产品对提高土壤肥力、改善土壤物理结构^[5]、促进植物生长^[6]以及延缓土壤重金属污染等方面有重要作用^[7]。有关堆肥的研究集中在调节 C/N^[8]、堆肥过程控制^[9]及外源添加物改良园林废弃物堆肥品质^[10]等方面; 但园林废弃物堆肥木质素降解周期长、木质素降解率不高等问题依旧存在, 如何加快木质素降解成为关键问题。木质素、纤维素及其二者的复合体是限制堆肥快速腐熟的关键因素, 其中, 木

质素的影响作用尤甚^[11]。漆酶、锰过氧化物酶^[12]和木素过氧化物酶^[13]是主要的降解酶类型, 酶系对木质素降解的机理已有报道^[14]。有研究表明, 细菌、真菌对木质素的降解^[15]及加速堆肥达到腐熟^[16]都具有重要影响。木质素降解细菌的菌种筛选研究较多, 然而, 目前对木质素降解真菌的研究主要集中在白腐菌类, 其他种属真菌的研究相对较少^[17], 菌种资源库亟待扩充。

本研究以北京地区收集的经过堆肥处理的园林废弃物为材料, 从中筛选高效的木质素降解菌, 对其进行分子生物学鉴定, 并对其降解不同种类的园林废弃物效果进行研究, 以期为提高园林废弃物利用率提供优质的菌株资源。

1 试验材料

1.1 园林绿化废弃物材料

前期筛选目标菌株所用堆肥材料和后期模拟固

收稿日期: 2018-09-26 修回日期: 2019-01-14

基金项目: 林业公益性行业科研专项(201504205)

* 通讯作者: 李素艳, 教授. E-mail: lisuyan@bjfu.edu.cn

态发酵材料均取自北京林业大学,包括冬青卫矛 (*Euonymus japonicas* Thunb.) 枝和叶、圆柏 (*Sabina chinensis* (L.) Ant.) 枝和叶及连翘 (*Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl) 枝叶。

1.2 培养基

马丁氏培养基、PDA 固体培养基、PDA 液体培养基^[18]。

1.2.1 PDA-苯胺蓝培养基 马铃薯浸提液 1 L (取去皮马铃薯 200 g,切成小块,加水 1 L 煮沸 30 min,滤去马铃薯块,加蒸馏水将滤液补足至 1 L),葡萄糖 20 g,琼脂 15 g,苯胺蓝 0.1 g,自然 pH。

1.2.2 PDA-愈创木酚培养基 马铃薯浸提液 1 L (同 1.2.1 节)、葡萄糖 20 g、琼脂 15 g、愈创木酚 0.1 mL,自然 pH。

1.2.3 液体培养基 KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g,蛋白胨 5 g,葡萄糖 10 g,水 1 000 mL,自然 pH。

2 试验方法

2.1 菌株的富集纯培养

取 1.0 g 前期用于筛选菌株的园林废弃物堆肥材料,置于装有 99 mL 无菌水的 250 mL 三角瓶中,在 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 28°C 的条件下振荡 30 min,使样品分散成均匀的悬液,悬液浓度为 $10^{-2} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。取 1 mL 悬液进行梯度稀释,得到浓度分别为 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 $10^{-6} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的稀释液,分别取每个浓度稀释液 1 mL 在马丁氏培养基上进行涂布培养,于恒温培养箱 28°C 培养 3 d,根据菌落的形态指标(包括颜色、大小、边缘规整程度、表面纹饰)挑取不同的菌落,用接种针挑取后划线培养于 PDA 培养基中,经多次平板划线分离后,获得某一菌株的纯培养菌株。

2.2 木质素降解菌株的筛选

分离得到的纯培养菌株以点接法分别接种到 PDA-愈创木酚和 PDA-苯胺蓝平板,设置 3 个重复,在 35°C 恒温培养箱中避光培养 5 d,观察记录有无显色圈和褪色圈产生及其产生时间和直径大小,推断漆酶、锰过氧化物酶的产生情况,以此判断菌株是否具有木质素降解能力。

2.3 木质素降解菌的种属鉴定

从上述具有木质素降解能力的菌株中选择一株单位时间内显色圈和褪色圈直径最大的菌株,进行 ITS 序列测序,将所得的 ITS 序列与 Genbank 中的核酸数据库序列进行 Blast 比对,采用 MEGA 5.0 软件

包使用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树^[19]。

2.4 配制菌液

500 mL 三角瓶中装入 250 mL 的 PDA 液体培养基, 121°C 下灭菌 30 min,用接种针将纯培养的微生物从 PDA 固体培养基中转移至 PDA 液体培养基中,在 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 28°C 的条件下摇瓶培养,培养 3 d 后使用平板计数法记录真菌的群落数,当菌液浓度达到 $10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$,则菌液配制完成。

2.5 固态发酵实验

为了更好地模拟自然条件下堆肥过程,固态发酵试验中园林废弃物没有进行完全灭菌处理,即将用于固态发酵的园林废弃物仅于 75°C 连续烘干 48 h。实际生产中由于连翘枝叶分离成本较高,一般不分开处理。因此,本研究中连翘枝叶未分开处理。圆柏与冬青卫矛的枝、叶分开粉碎,过 20 目筛。5 个 250 mL 锥形瓶中分别装入过筛的 5 种园林废弃物物料(冬青卫矛枝、冬青卫矛叶、圆柏叶、圆柏枝、连翘枝叶)80 g,加入含 0.6% 硫酸铵的无菌水,使含水量达到 60%,随后每组加入配置菌液 10 mL,充分混合后密封瓶口,置于 $25 \sim 30^\circ\text{C}$ 的培养箱中避光培养。固态发酵共 40 d,于第 1、3、5、7、9、11、13、15、18、21、25、30 天取样 1 g,加入无菌水以 $8\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心 10 min,上清液即为粗酶液,用于测定漆酶、锰过氧化物酶酶活力。于第 1、40 天取样,用以测定木质素降解率,另以不加菌处理为对照。5 个处理组和相对应的对照组实验均重复 3 次。

2.5.1 木质素降解酶活性测定 锰过氧化物酶采用 Wariishi 法进行活性测定,漆酶采用愈创木酚法进行活性测定^[20]。

2.5.2 木质素测定方法 使用浓硫酸法测定木质素。离心管中放入待测样品,不加样品的空白处理为对照组,随后加入醋酸、乙醇乙醚混合液浸泡 9 h,吸取上清液后水浴蒸干,加入浓硫酸静置 16 h。加入氯化钡溶液处理,随后加入 10% 硫酸和重铬酸钾,沸水浴 15 min,待冷却后加入碘化钾溶液、淀粉溶液,使用硫代硫酸钠滴定^[21]。

2.6 数据处理方法

使用 EXCEL2016 和 SPSS16 软件对处理前后木质素含量进行独立样本 t 检验,多重比较采用 Duncan 法 ($P < 0.05$) 对不同处理组的降解率提高值进行显著性分析。木质素降解率计算公式如下:

木质素绝对降解率提高值 = (堆肥后对照组木

质素含量 - 堆肥后处理组木质素含量) × 100%

木质素相对降解率 = (堆肥前木质素含量 - 堆肥后木质素含量) / 堆肥前木质素含量 × 100%

相对降解率提高值 = (处理 T 的相对降解率 - 对照 CK 的相对降解率) × 100%

3 结果与分析

3.1 木质素降解菌的筛选

从经过堆肥处理的园林废弃物材料中共筛选出真菌 18 株, 分别命名为菌株 1 ~ 18。采用 PDA-苯胺蓝平板显色法和 PDA-愈创木酚平板褪色法筛选其中具有产生降解木质素相关降解酶能力的菌株。由表 1 可看出: 有 4 种真菌在愈创木酚培养基中产生了变色圈, 8 种真菌在苯胺蓝培养基中产生褪色圈, 其中, 2 种真菌在 2 种平板中出现显色和褪色圈。愈创木酚培养基中产生变色圈说明真菌具有分泌锰过氧化物酶的能力, 苯胺蓝培养基中产生褪色圈说明真菌具有产生漆酶的能力, 菌株 No. 11 和 No. 12 可以同时分泌漆酶和锰过氧化物酶。图 1 可见: 菌株 No. 11 在 72 h 内于苯胺蓝培养基中出现了褪色圈, 且在愈创木酚培养基中出现了最大变色圈, 因此, 选取菌株 No. 11 进行种属鉴定及后续研究。

表 1 不同菌株在选择培养基中的显色和褪色结果

Table 1 The coloring and decoloring results of different strains on selective mediums

菌株 strains	愈创木酚显色时间 Culture time/h			苯胺蓝褪色时间 Culture time/h		
	24	48	72	24	48	72
菌株 No. 1	-	-	-	+	+	+
菌株 No. 2	-	-	-	+	++	+++
菌株 No. 3	-	+	+	-	-	-
菌株 No. 5	-	-	-	+	+	+
菌株 No. 7	-	-	-	+	+	+
菌株 No. 8	-	+	++	-	-	-
菌株 No. 9	-	-	-	-	-	+
菌株 No. 10	-	-	-	-	-	+
菌株 No. 11	+	++	+++	+	+	+
菌株 No. 12	+	+	+	+	+	+

注: - 表示不显色 (或不褪色); +, ++, +++, +++ 表示显色 (或褪色) 圈逐渐增大。

Note: “-” means no coloring (or no decoloring) zone; “+”, “++”, “+++”, “++++” means bigger coloring (or bigger decoloring) zone gradually.

3.2 菌株 No. 11 的菌种鉴定结果

3.2.1 菌株 No. 11 的形态特征 菌株 No. 11 在 PDA 培养基培养 24 h 的菌落为翠绿色 (图 2), 培养

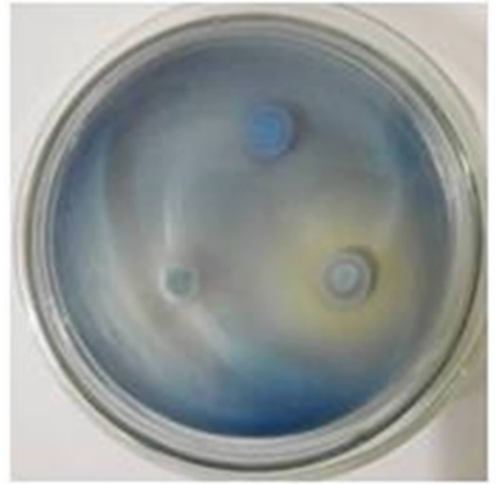


图 1 菌株 No. 11 在苯胺蓝培养基中褪色圈 (右下)

Fig. 1 Fading circle of Strain No. 11 in aniline blue medium (bottom right)

48 h 后出现黄褐色, 质地丝柔状, 表面有黄褐色絮状颗粒结构。平、薄或具不明显的放射状沟纹。菌落反面近于无色或黄褐色。

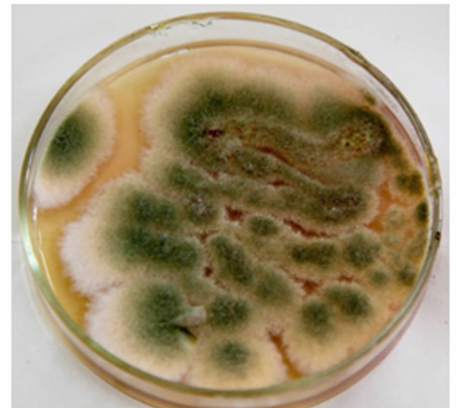


图 2 菌株 No. 11 的形态特征

Fig. 2 Morphological characteristics of Strain No. 11

3.2.2 菌株 No. 11 的 ITS 序列分析及系统发育树的构建 对菌株 No. 11 进行 ITS 序列测序, 测得菌株 No. 11 的 ITS 序列与 Genbank 数据库中已注册的相应序列使用 BLAST 程序进行序列相似性比较分析, 从比较结果中选取相似性为 99% 的已注册菌株, 采用 Mega5.0 软件构建系统进化树图 3。

图 3 显示: 与菌株 No. 11 同源性相似度较高的菌株属于曲霉属 (*Aspergillus* sp.) 和裸胞壳属 (*Emericella* sp.), 其中, 同源性最高的为构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans* (Eidam) G. Winter), 其次为 *Emericella omanensis* Y. Horie & Udagawa。结合系统发育树及形态特征, 最终确定菌株 No. 11 为构巢曲霉。

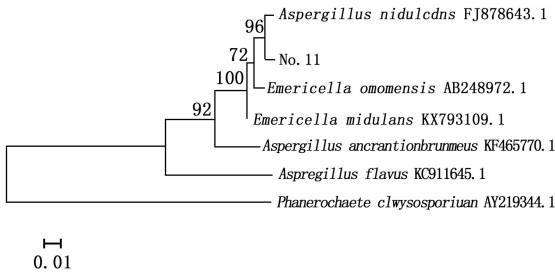


图3 依据 ITS 序列构建的菌株 No. 11 系统发育树
Fig.3 Phylogenetic tree of strain11 based on ITS sequences

3.3 菌株 No. 11 对 5 种底物中木质素的降解作用

3.3.1 木质素降解酶酶活力的变化

3.3.1.1 漆酶酶活力变化 图 4~6 表明:在固态发酵过程中,接菌处理的漆酶酶活力均高于对照,在固态发酵第 3 天,除连翘枝叶组外,其余 4 个接菌处理的漆酶酶活力仍处在较低水平。固态发酵第 9 天后,圆柏枝、冬青卫矛叶和连翘枝叶组漆酶酶活力开始逐渐升高。圆柏枝组在第 13 天漆酶酶活力到达峰值,为 $342.7 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 。冬青卫矛叶和连翘枝叶组在第 15 天酶活力达到峰值,分别为 388.7 和 $588.5 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 。冬青卫矛枝组和圆柏叶组在第 18 天酶活力达到峰值,分别为 326.3 和 $461.4 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 。酶活性在一定程度上可以反应真菌对木质素的降解能力。分析原因在于,微生物从繁殖到代谢产酶需要一段时间,在固态发酵初始阶段漆酶酶活力较低,随着菌体生长及代谢旺盛,漆酶酶活力也逐渐达到高峰期。总体来看,以叶片为底物的固态发酵中的漆酶酶活力峰值高于以树枝为底物的接菌处理。可能的原因在于树枝中的木质素与纤维素、半纤维素相

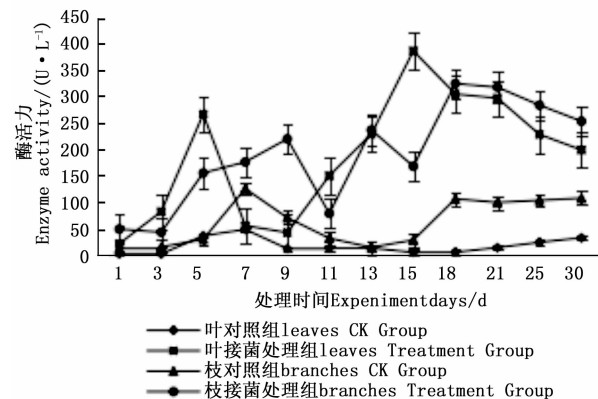


图4 固态发酵中冬青卫矛枝、叶的漆酶酶活力变化
Fig.4 Changes in laccase activity of *Euonymus japonicus* branches and leaves during composting

互结合形成木质纤维素,阻碍了微生物与木质素的接触,不利于木质素降解菌的利用^[22]。

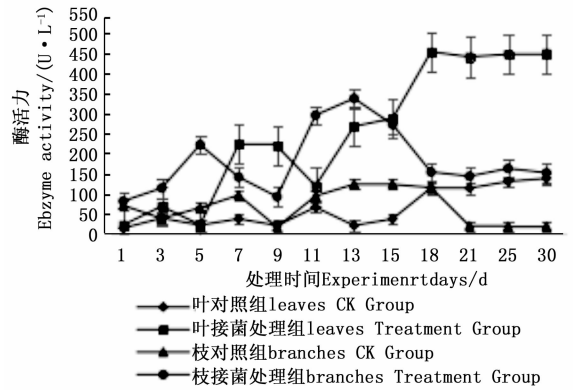


图5 固态发酵中圆柏枝、叶的漆酶酶活力变化
Fig.5 Changes in laccase activity of *Sabina chinensis* branches and leaves during composting

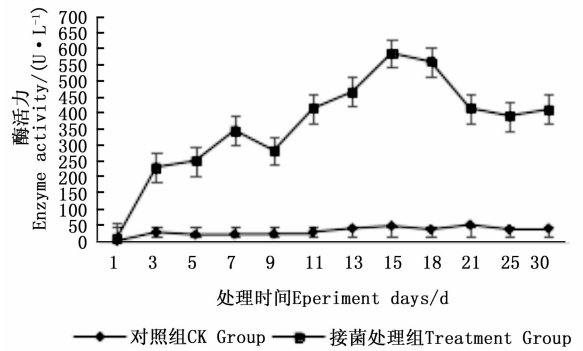


图6 固态发酵中连翘枝叶的漆酶酶活力变化
Fig.6 Changes in laccase activity of *Forsythia suspensa* branches and leaves during composting

3.3.1.2 锰过氧化物酶酶活力变化 图 7~9 表明:在固态发酵中,接菌处理组锰过氧化物酶酶活力均高于对照组,说明添加外源菌株在固态发酵中能够提高锰过氧化物酶的酶活力。固态发酵第 5 天,除圆柏枝接菌组锰过氧化物酶酶活力较之前有较高提升外,其他各组的酶活力仍处于较低水平。冬青卫矛叶组、连翘枝叶组第 5 天后酶活力开始逐渐升高,第 15 天酶活力达到峰值,分别为 138.3 、 $73.3 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 。圆柏枝组在第 15 天酶活力达到峰值 $128.6 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 。冬青卫矛枝组和圆柏叶组在第 21 天酶活力达到峰值,分别为 121.1 、 $104.6 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 。接菌处理组锰过氧化物酶酶活力随时间的变化趋势和漆酶酶活力的变化趋势基本相近,说明二者的产酶期基本一致,但是从峰值与平均值看,各个接菌处理的锰

过氧化物酶酶活力均低于漆酶酶活力,说明菌株主要通过分泌漆酶降解木质素,这与先前平板显色褪色实验得到结果吻合。

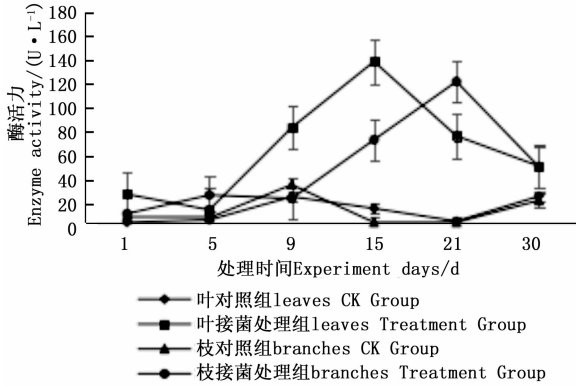


图7 固态发酵中冬青卫矛枝、叶的锰过氧化物酶酶活力变化

Fig. 7 Changes in Manganese peroxidase activity of *Euonymus japonicus* branches and leaves during composting

3.3.2 木质素含量变化 在以不同园林废弃物为底物的固态发酵实验中,接种菌株 No. 11 40 d 后各个接菌处理与对照组木质素降解率的测定结果见表2。使用 SPSS 软件独立样本 *t* 检验分析得出:接种菌株 No. 11 后,5 种底物处理组与其对照组的木质素含量差异显著,菌株 No. 11 显著降低了园林废弃物中木质素含量,降解木质素作用明显。以冬青卫

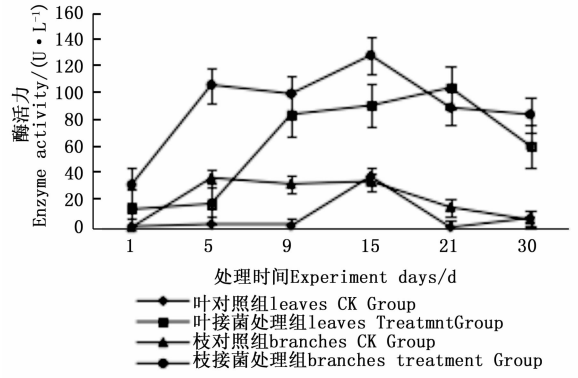


图8 固态发酵中圆柏枝、叶的锰过氧化物酶酶活力变化
Fig. 8 Changes in Manganese peroxidase activity of *Sabina chinensis* branches and leaves during composting

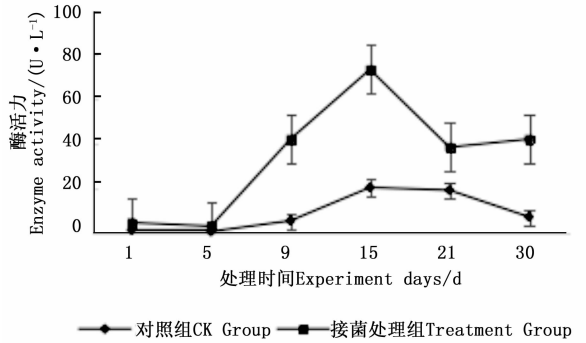


图9 固态发酵中连翘枝叶的锰过氧化物酶酶活力变化
Fig. 9 Changes in Manganese peroxidase activity of *Forsythia suspensa* branches and leaves during composting

表2 不同底物的木质素含量及其降解率变化

Table 2 Variation of lignin content and degradation rate during simulated composting with different substrates

试验材料 Experimental material	处理 Treatment	木质素含量 Lignin content/%		绝对降解率 提高值 Increment of absolute degradation rate/%	相对降解率 Relative degradation rate/%	相对降解率 提高值 Increment of relative degradation rate/%
		堆肥处理前 Before composting	堆肥处理后 After composting			
冬青卫矛叶 <i>Euonymus japonicus</i> leaves	处理 T	17.08 ± 0.79	10.69 ± 0.48A	3.47 ± 0.69a	37.40 ± 6.51	20.40 ± 4.56ab
	对照 CK	17.08 ± 0.79	14.17 ± 0.51B		16.74 ± 4.77	
冬青卫矛枝 <i>Euonymus japonicus</i> branches	处理 T	21.67 ± 0.87	12.22 ± 0.87A	4.90 ± 1.62a	43.59 ± 2.87	22.44 ± 6.67abc
	对照 CK	21.67 ± 0.87	17.12 ± 0.93B		20.74 ± 6.18	
圆柏叶 <i>Sabina chinensis</i> leaves	处理 T	12.92 ± 1.00	8.01 ± 0.13A	3.87 ± 0.56a	38.39 ± 4.12	29.90 ± 2.23c
	对照 CK	12.92 ± 1.00	11.88 ± 0.61B		8.12 ± 5.19	
圆柏枝 <i>Sabina chinensis</i> branches	处理 T	32.50 ± 0.33	16.81 ± 1.27A	8.22 ± 1.32b	48.29 ± 2.26	25.28 ± 3.84bc
	对照 CK	32.50 ± 0.33	25.03 ± 0.66B		23.03 ± 4.43	
连翘枝叶 <i>Forsythia suspensa</i> branches and leaves	处理 T	24.17 ± 0.81	11.60 ± 0.49A	3.82 ± 0.45a	52.17 ± 2.81	15.77 ± 1.39a
	对照 CK	24.17 ± 0.81	15.42 ± 0.38B		35.21 ± 3.64	

注:同列不同大写字母表示同一试验材料内处理与对照组间差异显著,同列不同小写字母表示材料间差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Different capital letters in same column mean significant difference between treatment and control among same material. Different lowercase letters in same column mean significant difference among those materials ($P < 0.05$).

矛叶为底物的固态发酵实验中,木质素相对降解率从模拟自然状态下的 16.74% 提高到了 37.40%。冬青卫矛枝与圆柏枝对照组的模拟自然状态下的相对降解率分别为 20.74% 和 23.03%,接菌处理的木质素相对降解率分别提升到 43.59% 和 48.29%。在圆柏叶为底物的处理中,添加菌液对其木质素相对降解率提升效果最好,相对降解率提高值达到了 29.90%。在连翘枝叶为底物的固态发酵中,木质素相对降解率从对照组的 35.21% 提高到 52.17%。与冬青卫矛和圆柏的叶、枝对照、连翘枝叶对照相比,堆肥接菌处理的木质素含量分别减少了 3.47%、4.90%、3.87%、8.22%、3.82%。多重比较结果表明,添加构巢曲霉对圆柏枝的处理效果与其他处理间差异显著,接菌处理对圆柏枝木质素绝对降解率有更明显的提升效果。对比添加菌液后各个处理组的木质素相对降解率提高值发现:添加菌液对圆柏枝与叶中木质素降解率的提升效果优于连翘枝叶,与冬青卫矛枝叶差异不显著。冬青卫矛枝叶和连翘枝叶的相对木质素降解率提高值间差异不显著,说明添加菌液对二者木质素的降解率提高效果相似。

4 讨论

固体发酵堆肥是农林牧业废弃物资源化利用的重要方式,除了调控堆体温度、C/N 等技术参数外,外加微生物也是调控堆肥化过程的措施之一。园林废弃物与农业废弃物(如畜禽粪便、农作物废弃物)相比,园林废弃物拥有更高的木质素含量,更难降解。目前,市场现有菌剂中所利用的微生物多为从农业堆肥体系中筛选,缺乏来自园林废弃物堆肥体系针对高木质素废弃物的微生物菌种。前人进行了大量筛选木质素降解微生物的研究,筛选出的菌种除细菌外^[23],真菌研究集中于担子菌纲中的白腐菌,如尹立伟等^[24]研究了属于白腐菌类的药用菌灰树花对木质素的降解能力,但对子囊菌纲中曲霉属真菌在木质素降解方面的研究有限。习兴梅等^[25]利用选择平板筛选法从农业废弃物稻草堆肥中筛选出曲霉属真菌黑曲霉(*Aspergillus niger* Tiegh),结果表明,黑曲霉具有木质素降解能力,且主要依靠漆酶、过氧化物酶、锰过氧化物酶、木聚糖酶降解木质素。本研究利用相同方法从园林废弃物处理物中筛选出多株分泌漆酶或锰过氧化物酶的真菌,显色褪色结果显示菌株 No. 11 的产酶效率更高,使用 ITS

测序构建系统发育树,鉴定菌株 No. 11 为曲霉属构巢曲霉。

在固态发酵前期,漆酶和锰过氧化物酶活力较低;随着微生物菌落增多,代谢开始旺盛,漆酶与锰过氧化物酶活力也逐渐上升。在堆肥第 15~18 天酶活力到达峰值。陈建军等^[26]从秸秆及造纸厂废水中筛选出黄孢原毛平革菌,其漆酶活性最高值仅为 $233.3 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$,而本研究筛选的菌株漆酶活力峰值为 $588.5 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$,有更强的产酶能力。张年磊^[27]从造纸废水污泥中筛选出同为曲霉属的真菌 *Aspergillus* sp. F-1,应用于造纸废水因高木质素所导致高色度及高 COD 等问题的处理,木质素降解率提高了 20%~40%,与本研究结果相近,即构巢曲霉使堆肥中圆柏枝叶等园林废弃物的木质素降解率提高了 15%~30%,筛选出的曲霉属真菌对于木质素降解率有较好的提升效果。

在实际处理中,园林废弃物的枝与叶通常分开处理,为了更好模拟自然条件下的堆肥过程,固态发酵中园林废弃物没有进行彻底的灭菌处理(仅为 75°C 连续烘干 48 h),同时明确了发酵底物的组成成分。结果表明,构巢曲霉对园林废弃物中的木质素表现出了较强的降解能力。圆柏及冬青卫矛枝与叶间的木质素降解率提高值差异不显著,该种曲霉对提高植物枝、叶的木质素降解率效果相似。绝对降解率提高值表明接菌处理对于圆柏枝的提升效果最明显,可能是因为圆柏枝初始的木质素含量较高,反应底物充足有利于微生物繁殖。从木质素相对降解率提高值看,构巢曲霉提高乔木枝叶木质素降解的能力可能优于灌木,但这仍需进一步研究验证。综合绝对、相对降解率提高值,构巢曲霉对圆柏枝和叶的木质素降解率提高效果更明显。

目前,堆肥中微生物添加剂的研制还处于实验室阶段,距离真正用于生产实践还存在一定的差距。主要问题在于实际生产的环境条件更加复杂^[28],堆体中的微生物类群十分庞大^[29],菌剂中的微生物很难占据良好的生态位,形成优势群落。曲霉的优势在于繁殖迅速,可以在一定程度上解决这个问题。通过初步考察该菌降解木质素的能力,为后续研究复合菌剂的制备及大规模工厂化生产奠定基础。

5 结论

从经过堆肥处理的园林废弃物中筛选出 1 株高效木质素降解菌株 No. 11。通过形态观察和 ITS 序

列分析,菌株 No. 11 鉴定为构巢曲霉,可用于探究真菌降解木质素原理和生产木质素降解菌剂。

构巢曲霉对于北京常见绿化园林树种所产生的园林废弃物中木质素降解效果较好,以冬青卫矛叶、冬青卫矛枝、圆柏叶、圆柏枝、连翘枝叶为底物的固态发酵中漆酶酶活力峰值分别为 388.7、326.3、461.4、342.7、588.5 $U \cdot L^{-1}$,锰过氧化物酶的酶活力峰值分别为 138.3、121.1、104.6、128.6、73.3 $U \cdot L^{-1}$ 。添加构巢曲霉使冬青卫矛叶、冬青卫矛枝、圆柏叶、圆柏枝、连翘枝叶 40 d 后木质素降解率分别提高了 20.40%、22.44%、29.90%、25.28%、15.77%。

参考文献:

- [1] 梁 晶,马光军,郝冠军,等.绿化植物废弃物对土壤中 Cu、Zn、Pb 和 Cd 形态的影响[J].农业环境科学学报,2010,29(3):492-499.
- [2] Nowak J, Nowak D, Chevallier P, et al. Analysis of composite structure and primordial wood remains in petrified wood. [J]. Applied Spectroscopy, 2007, 61(8):889-895.
- [3] 杨 晖.园林废弃物的资源化利用探讨[J].安徽农学通报(上半月刊),2010,16(15):181-182.
- [4] Reyes T M, Oviedo E R, Dominguer I, et al. A systematic review on the composting of green waste: Feedstock quality and optimization strategies[J]. Waste Management, 2018, 77:486-499
- [5] 刘景海,张 萍,吴春水,等.园林废弃物覆盖对北京市林地土壤养分和团聚体的影响[J].中国水土保持,2016(6):54-58,77.
- [6] 张登晓,周惠民,潘根兴,等.城市园林废弃物生物质炭对小白菜生长、硝酸盐含量及氮素利用率的影响[J].植物营养与肥料学报,2014,20(6):1569-1576.
- [7] 张 强,孙向阳,任忠秀,等.园林绿化废弃物堆肥用作花卉栽培基质的效果评价[J].中南林业科技大学学报,2011,31(9):7-13.
- [8] 张 强,孙向阳,任忠秀,等.调节 C/N 及添加菌剂与木酢液对园林绿化废弃物堆肥效果的影响[J].植物营养与肥料学报,2012,18(4):990-998.
- [9] Zhang, L, Sun Xiang-yang, Tian, Y et al. Biochar and humic acid amendments improve the quality of composted green waste as a growth medium for the ornamental plant Calathea insignis[J]. Scientia Horticulturae, 2014, 176:70-78.
- [10] 田 贇,王海燕,孙向阳,等.添加竹酢液和菌剂对园林废弃物堆肥理化性质的影响[J].农业工程学报,2010,26(8):272-278.
- [11] 李 超,李璐滨,杨 凯,等.竹伐桩促腐微生物的分离筛选[J].林业科学研究,2008,21(2):253-257.
- [12] Terhi K H, Lundell T, Galkin S, et al. Manganese peroxidases, laccases and oxalic acid from the selective white-rot fungus *Physiporus rivulosus* grown on spruce wood chips[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 36(4):461-468.
- [13] 吴晓丽,顾小平,苏梦云,等.离体毛竹笋纤维素和木质素含量及 POD 和 PAL 活性研究[J].林业科学研究,2008,21(5):697-701.
- [14] Songulashvili G, Elisashvili V, Wasser S P, et al. Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 41(1):57-61.
- [15] 张金萍,王敬文,姜景民,等.灵芝属木质素降解高效菌株筛选[J].林业科学研究,2005,18(1):106-108.
- [16] 晋果果,翁海波,李萍萍,等.高温木质素降解菌 *Geobacillus caldodoxylosilyticus* J16 的筛选及其产酶发酵性质研究[J].中国农学通报,2011,27(8):334-339.
- [17] 郭晓威,王秀然,解长睿,等.木质素降解菌株的分离及其降解玉米秸秆过程中产酶特点[J].微生物学报,2017,57(12):1806-1816.
- [18] 周宇光.菌种目录(第四版)[M].北京:科学技术文献出版社,2012:694.
- [19] 李雪玲,姚一建.基于 28S rDNA 序列构建侧耳属系统发育树[J].菌物报,2004,23(3):345-350.
- [20] 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.
- [21] Gong X Q, Li S Y, Sun X Y, et al. Maturation of green waste compost as affected by inoculation with the white-rot fungi *Trametes versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Environ. Technol, 2017, 38(1):872-879.
- [22] Alexander N K, Korneichik T V, Hatakka A, et al. Oxidizability of unsaturated fatty acids and of a non-phenolic lignin structure in the manganese peroxidase-dependent lipid peroxidation system[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2009, 46(2):136-140.
- [23] 刘海静.小麦秸秆高效降解菌的筛选及应用效果研究[D].北京:中国农业科学院,2012.
- [24] 尹立伟,池玉杰,王雪童.灰树花的系统发育分析和主要木质素降解酶的测定[J].林业科学研究,2010,23(4):574-580.
- [25] 习兴梅,曾光明,郁红艳,等.黑曲霉 *Aspergillus niger* 木质纤维素降解能力及产酶研究[J].农业环境科学学报,2007,26(4):1506-1511.
- [26] 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.
- [27] 张年磊.霉菌 *Aspergillus* sp. F-1 降解木质素化合物及其处理造纸废水的研究[D].湘潭:湘潭大学,2017.
- [28] 周莉娜,毛 晖,曲 东.全氟辛酸和雌二醇对黄孢原毛平革菌过氧化物酶活性的影响[J].农业环境科学学报,2013,32(6):1134-1142.
- [29] Stefan J. G, Frederick C. M, Yitzhak H, et al. Similarity of bacterial communities in sawdust- and straw-amended cow manure composts[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 233(1):115-123.

Study on Screening, Identification and Capability of Lignin-Degrading Fungi for Landscaping Waste

KANG Yue, LI Su-yan, SUN Xiang-yang, GONG Xiao-qiang, YU Ke-fei, CAI Lin-lin, WANG Lin

(College of Forestry, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: [**Objective**] To obtain a fungus that can efficiently degrade landscaping waste, to study its ability to decompose various landscaping waste, and to select the fungus strain from the composted landscaping waste by a series of isolation and culture. [**Method**] The species of lignin decomposition strain were identified by morphological analysis, ITS molecular sequence analysis and phylogenetic tree. Solid-state fermentation experiments were carried out for studying the changes of enzyme activity of laccase (Lac) and manganese peroxidase (MnP) of the strain and their ability to decompose lignin in landscaping waste. [**Result**] A total of 18 fungus were selected from the composted landscaping waste and a highly efficient lignin-decomposing fungus was selected. The strain was designated as strain No. 11, and was identified as *Aspergillus nidulans* (Eidam) G. Winter by morphological analysis and ITS molecular sequence analysis. The enzyme activity peaks of laccase and manganese peroxidase in solid canisters were determined using Japanese spindle leaves, Japanese spindle branches, juniper leaves, juniper branches and forsythia as the substrates were 388.7 and 138.3, 326.3 and 121.1, 461.4 and 104.6, 342.7 and 128.6, 588.5 and 73.3 $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$. The addition of strain 11 increased the lignin decomposition rate of Japanese spindle leaves, Japanese spindle branches, juniper leaves, juniper branches and forsythia after 40 days, respectively, by 20.40%, 22.44%, 29.90%, 25.28%, and 15.77%. [**Conclusion**] The lignin-decomposing fungus, *Aspergillus nidulans* (Eidam) G. Winter, has a strong ability to decompose the lignin in the branches and leaves of Japanese spindle, juniper and forsythia common to the landscaping waste in Beijing. *Aspergillus nidulans* (Eidam) G. Winter may have advantages in decomposing landscaping waste.

Keywords: landscaping waste; lignin-degradation fungi; enzyme activity; solid-state fermentation

(责任编辑:徐玉秀)