

利用杂草培养料栽培双孢蘑菇的可行性*

高晓静¹ 张昊琳¹ 桑羽希¹ 蔡盼盼¹ 张国庆² 陈青君^{1**}

¹北京农学院植物科学技术学院农业应用新技术北京市重点实验室 北京 102206

²北京农学院生物科学与工程学院农业部都市农业(北方)重点实验室 北京 102206

摘要 充分利用当地杂草资源生产双孢蘑菇对于降低生产成本和环境保护具有重要意义。在密云库区杂草多样性调查和配方工艺调整的基础上,对3个批次库区杂草的双孢蘑菇(*Agaricus bisporus*)生产进行全程监测,包括堆肥期和出菇期的培养料理化性质、物质变化、相关降解酶活性和培养料发酵过程中细菌菌群变化,统计产量等。结果显示,库区杂草种类繁多,株高茎粗,茎秆坚硬紧实,打捆后的杂草饱和吸水量为76.78%。堆肥期培养料的含水量、含碳量和碳氮比逐渐下降,出菇期变化不大;培养料的含氮量在培养料一次发酵结束(PI)均有下降的现象,二次发酵结束(PII)含氮量升高。培养料二次发酵过程中纤维素和半纤维素的利用率均介于40%-60%之间;木质素利用率介于20%-30%。在双孢蘑菇菌丝生长和出菇过程中木质素的利用率为16%-21%。培养料纤维素和半纤维素的含量变化与相关降解酶变化情况相一致。堆肥期样品Illumina测序得到432 595条有效序列,序列平均长度为441 bp;分类分析表明,堆肥时期优势菌群为拟杆菌门(Bacteroidetes)的普氏菌属(*Prevotella*),厚壁菌门(Firmicutes)的芽孢杆菌属(*Bacillus*),栖热菌门(Deinococcus-Thermus)的*Thermus*属、*Truepera*属、*Caldicoprobacter*属(一种木聚糖降解菌),放线菌门(Actinobacteria)的热多孢菌属(*Thermopolyspora*),变形菌门(Proteobacteria)的假黄单胞菌属(*Pseudoxanthomonas*)。3个批次产量在17.1-19.7 kg/m²范围。本研究表明库区杂草取代麦草进行双孢蘑菇工厂化生产是可行的,结果可为其合理利用和工艺改进提供理论依据。(图3 表4 参30)

关键词 培养料;木质纤维素;木质纤维素降解酶;细菌菌群

CLC S646

Feasibility of weeds-based compost-cultivated *Agaricus bisporus**

GAO Xiaojing¹, ZHANG Haolin¹, SANG Yuxi¹, CAI Panpan¹, ZHANG Guoqing² & CHEN Qingjun^{1**}

¹Beijing Key Laboratory for Agricultural Application and New Technique, College of Plant Science and Technology, Beijing University of Agricultural, Beijing 102206, China

²Key Laboratory of Urban Agriculture of Ministry of (North) Agriculture, College of Biological Sciences and Engineering, Beijing University of Agricultural, Beijing 102206, China

Abstract Making full use of local weed resources to produce *Agaricus bisporus* is of great importance in reducing production costs and protecting the environment. In this paper, three trial experiments were conducted on the basis of weed diversity investigation around the Miyun Reservoir and the adjustment of formulation and technology in the industrial production of *A. bisporus*. Compost samples from different phases of the composting process and at various cultivation stages were collected for the determination of their physical-chemical properties, lignocellulose content, lignocellulolytic enzyme activities, and bacterial communities enrichment by 16S rRNA gene sequencing. The yield of mushrooms in each different trial was also calculated. The results showed several types of reservoir weeds with high, thick and hard stems. The saturated moisture of weeds was 76.78% after baling. The water content, carbon content, and C/N ratio of the samples decreased gradually during composting, but had little change during cultivation. The nitrogen content decreased at the end of phase I and increased at the end of phase II. During composting, the loss rates of hemicellulose and cellulose were both between 40% and 60%, and the loss rate of lignin was between 20% and 30%. During cultivation, instead, the loss rate of lignin was between 16% and 21%. The changes in the content of cellulose and hemicellulose of compost were consistent with that of the activity of the related degradation enzymes. A total of 432 595 valid sequences were obtained by Illumina sequencing for the samples derived from the three composting trials, and the average length of the sequences was 441 bp. Taxonomic analysis showed that the dominant bacteria were *Prevotella* (phylum Bacteroidetes), *Bacillus* (phylum Firmicutes), *Thermus*, *Truepera*, and *Caldicoprobacter*

收稿日期 Received: 2018-01-22 接受日期 Accepted: 2018-02-11

*北京市农委农业科技项目(PXM 2016_014207_000052)、2017年现代农业产业技术体系北京市食用菌创新团队建设经费(BAIC05-2018)资助 Supported by the Agricultural Science and Technology Project of Beijing Municipal Commission of Rural Affairs (PXM 2016_014207_000052) and the Beijing Innovation Consortium of Agriculture Research System (BAIC05-2018)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: cqj3305@126.com)

(phylum *Deinococcus-Thermus*), *Thermopolyspora* (phylum *Actinobacteria*), and *Pseudoxanthomonas* (phylum *Proteobacteria*). The yield of the three trials was in the range of 17.1-19.7 kg/m². It is thus feasible to use reservoir weeds compost instead of wheat straw compost for the cultivation of *A. bisporus*.

Keywords compost; lignocellulose; lignocellulase; bacterial community

双孢蘑菇 (*Agaricus bisporus*) 因其担子上通常仅着生2个担孢子而得名, 中文别名为蘑菇、口蘑、白蘑菇、洋蘑菇等, 分类学上隶属于真菌界担子菌门 (*Basidiomycete*) 担子菌纲伞菌目伞菌科蘑菇属^[1]. 双孢蘑菇是一种高蛋白、低脂肪、低热能的健康食品, 深受世界各国人民的喜爱, 是世界范围内栽培规模最大食用菌之一^[2]. 双孢蘑菇工厂化栽培的培养料是由作物秸秆 (如麦草、稻草和玉米秸秆等)、动物粪便 (如马粪、牛粪和鸡粪)、石膏和水等通过二次发酵制成的, 培养料的发酵过程是多种堆肥微生物作用下的生物转化过程^[3-4].

培养料木质纤维素成分主要来源于秸秆资源, 根据秸秆种类的不同, 木质纤维素组成、结构和各成分的比例也存在较大差异^[5]. 麦秸的木质纤维素构成包括纤维素 (33%-40%, w)、半纤维素 (20%-25%, w) 和木质素 (15%-20%, w), 是堆肥微生物和双孢蘑菇生长的理想材料^[6], 也是目前国内外蘑菇工厂化生产的首选原料. 培养料发酵过程中的微生物可以产生一系列木质纤维素降解相关的胞外酶, 促进秸秆复杂的木质纤维素结构软化, 可以更好地为双孢蘑菇生长提供营养^[7]. 关于双孢蘑菇堆肥微生物的研究大致划分为两个大的阶段: 20世纪50年代至90年代主要以常规微生物分离培养为主要手段, 常规微生物培养表明, 在不同的堆肥阶段, 微生物种类出现更替^[8]. 20世纪90年代之后, 随着分子生物学的迅速发展, 微生物分子生态学方法成为研究双孢蘑菇堆肥微生物的重要方法. 微生物分子生态学常用技术包括高通量测序、宏基因组、PCR-DGGE、T-RFLP、16S rDNA文库技术等^[9-12]. 荷兰CNC堆肥公司的麦草培养料二次发酵过程中优势菌群主要属于拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、厚壁菌门 (*Firmicutes*)、变形菌门 (*Proteobacteria*)、栖热菌门 (*Deinococcus-Thermus*)、放线菌门 (*Actinobacteria*)、绿弯菌门 (*Chloroflexi*)^[13].

中国是一个农业大国, 秸秆种类和资源非常丰富, 除了麦草和稻草, 其他秸秆材料如芦苇秸、玉米秸、狼尾草等也被用于双孢蘑菇栽培的探索^[14-16]. 北京农业用地极少, 当地秸秆资源不足, 麦秸和稻草运输成本居高. 密云水库是北京主要的饮水来源地之一, 为了保护水库水源和生态涵养, 周边约32.6万亩 (约2.17万hm²) 面积退耕, 但野生杂草繁茂, 秋冬及时收集这些杂草用于制作双孢蘑菇的培养料, 有利于库区防火、水源保护和当地杂草资源的循环利用. 本研究对库区杂草作为双孢蘑菇培养料的性状和特性进行探讨, 以评价库区杂草取代麦草进行双孢蘑菇工厂化生产是否可行, 为其合理利用和工艺改进提供理论依据.

1 材料与方 法

1.1 密云库区杂草种类调查

采用样方法对库区杂草的主要种类进行野外实地调查.

在水库周边区域选择5个区域设置样方, 样方大小为5 m × 5 m. 对样方内的杂草种类和数量进行鉴定和统计.

1.2 堆肥和双孢蘑菇栽培

2016年9月至2017年1月在北京密云太师庄种植专业合作社 (T1) 和河北省滦平承德兴春和农业股份有限公司 (T2和T3) 进行堆肥, 3个批次总播种面积2 400 m². 参照 Van Griensven的方法^[17], 培养料依次经过预湿、混料、一次发酵 (17 d)、二次发酵 (9 d) 和出菇生产, 菌种使用A15 (Sylvan). 密云实验基地T1批次配方为杂草30 t (含水量低于10%)、鸡粪36 t (含水量70%-80%)、豆粕1.2 t、石膏2.9 t, 豆粕在建堆期加入; 滦平的T2和T3批次配方为杂草43 t、鸡粪45 t、豆粕3.6 t、石膏4 t, 豆粕在建堆期和一次发酵隧道时各加入1.8 t.

1.3 取 样

使用网袋装料取样的方法^[18], 对堆肥期的培养料进行取样. 原料混合建堆 (BM) 后, 在料堆中随机选取10个点, 每个点取样500 g充分混匀后, 从中取500 g样品平均分成10份, -80 °C保存. 将建堆期培养料装入5个尼龙网袋, 每袋6.5 ± 0.5 kg, 将尼龙网袋分别置于一次发酵隧道水平方向的不同位置, 距离料表层约50 cm. 一次发酵结束 (PI), 对5个尼龙网袋培养料分别称重, 然后从每袋料中取样约100 g样品充分混匀, 平均分成10份每份50 g, -80 °C保存; 二次发酵结束 (PII), 取样和称重方法同上.

接入双孢蘑菇菌种后, 在栽培床上放置30个塑料栽培箱 (45 cm × 32 cm × 23 cm), 每个栽培箱装料约15 kg, 栽培面积0.144 m². 在菌丝长满期 (Filling)、原基形成期 (Pinning)、一潮菇结束期 (1st flush)、二潮菇结束期 (2nd flush) 和三潮菇结束期 (3rd flush) 取样. 每个时期从5个栽培箱中分别取出100 g培养料, 充分混匀, 平均分为10份, 每份50 g, -80 °C保存.

培养料样品用于理化性质、细菌菌群以及木质纤维素相关降解酶活性分析. 测定各时期培养料含水量和尼龙袋、栽培箱中培养料的鲜重, 计算培养料干物质的质量和木质纤维素各组分的含量.

1.4 培养料的理化性质测定

使用pH/电导率仪 (PHH-7200, OMEGA) 测定培养料pH和电导率 (EC) 值. 采用干燥称重法^[19]测定样品的含水量; 使用凯氏定氮仪 (KJELTEC 8400, FOSS) 测定样品的含氮量; 采用灼烧法^[20]计算样品的含碳量和灰分; 采用滤袋法^[21]测定样品的纤维素和半纤维素含量; 木质素的含量参照Edita Jurak的方法测定^[18]; 每个样品3个重复.

1.5 培养料木质纤维素降解相关酶活测定

粗酶液的制备: 取-80 °C条件下保存的新鲜培养料样品3 g, 加入30 mL的生理盐水, 常温条件下220 r/min振荡悬摇2 h, 4层纱布过滤后, 4 000 r/min 4 °C离心10 min, 上清即为粗提酶液, 分装后保存于-80 °C备用. 分别以滤纸和木聚糖作

为降解底物,采用DNS法^[22]测定粗酶液的纤维素酶和木聚糖酶活性.以ABTS为降解底物测定粗酶液的漆酶活性^[23].

1.6 堆肥期培养料细菌群落分析

对堆肥阶段每个时期多点取的样品分别研磨后混合,采用PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio) 试剂盒提取样品的总DNA.质检符合要求的DNA使用引物338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')对细菌16S rRNA基因的V3-V4区域进行扩增. PCR反应体系为0.8 μ L $\times$ 2引物 (5 μ mol/L)、10 ng模板、4 μ L buffer (5 $\times$)、2 μ L dNTPs (2.5 mmol/L)、0.4 μ L polymerase、0.2 μ L BSA,加ddH₂O至20 μ L. PCR反应参数:预变性95 $^{\circ}$ C 3 min, 27 $\times$ (95 $^{\circ}$ C变性30 s, 55 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸45 s), 72 $^{\circ}$ C延伸10 min. PCR产物检测符合上机要求后,采用Illumina MiSeq PE300进行测序,采用RDP classifier贝叶斯算法对97%相似水平的序列进行分类学分析.

1.7 产量与生物学效率

分别统计每个生产批次每潮菇的产量,并计算密云库区杂草栽培双孢蘑菇的生物学效率.生物学转化效率等于每平方米蘑菇的鲜重与培养料干重的比值.

2 结果与讨论

2.1 库区杂草主要种类分布

对样方库区杂草的种类和数量进行鉴定和统计(图1)发现,库区杂草种类主要集中分布于禾本科 (Gramineae)、菊科

(Compositae)、豆科 (Fabaceae)、藜科 (Chenopodiaceae)、茄科 (Solanaceae) 和大麻科 (Cannabaceae). 禾本科的主要种类为狗尾草和虎尾草,豆科的主要种类为苜蓿,这些杂草虽然个体数量最多,但在回收的杂草中体积所占的比例低于10%;菊科的主要种类为豚草 (*Ambrosia artemisiifolia* L.)、柳叶蒿 (*Artemisia integrifolia* L.) 和苍耳 (*Xanthium strumarium* L.), 藜科的主要种类为灰条菜 (*Chenopodium album* L.), 还有锦葵科的苘麻 (*Abutilon theophrasti*), 这些杂草虽然数量较少,但株型高大,在回收的杂草中体积所占比例大约有70%. 这些杂草茎秆坚硬紧实,保水能力差. 杂草的饱和吸水量为76.78 %.

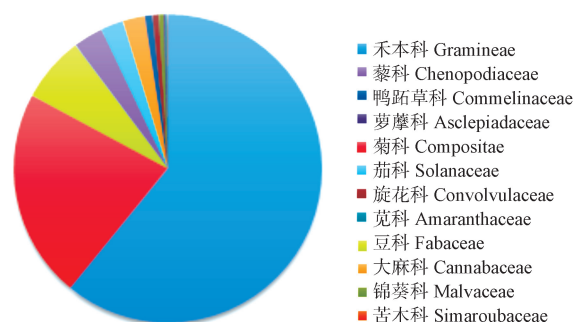


图1 库区杂草组成种类.

Fig. 1 The species of reservoir weeds.

2.2 培养料理化性状

3个批次密云库区杂草培养料理化性质结果如表1. 各

表1 库区杂草培养料理化性质

Table 1 The physicochemical properties of reservoir weed composts

样品名称 Sample		含碳量 Carbon content (w/%)	含氮量 Nitrogen content (w/%)	灰分 Ash (w/%)	pH	含水量 Moisture (w/%)	碳氮比 C/N
BM	T1	39.22 $\pm$ 0.55	1.59 $\pm$ 0.02	36.73 $\pm$ 0.39	8.01 $\pm$ 0.06	74.46 $\pm$ 1.25	28.29 $\pm$ 0.82
	T2	45.00 $\pm$ 0.00	1.39 $\pm$ 0.02	19.00 $\pm$ 0.00	8.02 $\pm$ 0.10	73.64 $\pm$ 0.60	32.46 $\pm$ 0.55
	T3	45.28 $\pm$ 0.00	1.65 $\pm$ 0.03	18.50 $\pm$ 0.00	7.70 $\pm$ 0.03	77.95 $\pm$ 1.34	27.38 $\pm$ 0.53
PI	T1	33.33 $\pm$ 0.28	1.56 $\pm$ 0.02	40.00 $\pm$ 0.50	8.45 $\pm$ 0.03	70.15 $\pm$ 0.26	22.12 $\pm$ 0.34
	T2	44.44 $\pm$ 0.56	1.34 $\pm$ 0.09	20.00 $\pm$ 1.00	8.47 $\pm$ 0.01	74.95 $\pm$ 2.76	33.22 $\pm$ 2.40
	T3	42.59 $\pm$ 0.32	1.40 $\pm$ 0.03	23.33 $\pm$ 0.58	7.93 $\pm$ 0.15	74.38 $\pm$ 0.59	30.53 $\pm$ 0.63
PII	T1	34.26 $\pm$ 0.58	1.64 $\pm$ 0.04	38.33 $\pm$ 1.04	7.61 $\pm$ 0.05	69.75 $\pm$ 0.62	20.85 $\pm$ 0.70
	T2	42.65 $\pm$ 0.24	2.13 $\pm$ 0.01	23.23 $\pm$ 0.43	8.35 $\pm$ 0.04	70.53 $\pm$ 0.81	20.03 $\pm$ 0.08
	T3	42.69 $\pm$ 0.59	2.10 $\pm$ 0.03	23.16 $\pm$ 1.06	8.61 $\pm$ 0.04	69.86 $\pm$ 0.79	20.34 $\pm$ 0.01
Filling	T1	31.30 $\pm$ 0.16	1.56 $\pm$ 0.11	43.67 $\pm$ 0.29	7.72 $\pm$ 0.02	65.29 $\pm$ 0.52	20.08 $\pm$ 1.47
	T2	41.25 $\pm$ 0.48	2.00 $\pm$ 0.03	25.75 $\pm$ 0.86	7.28 $\pm$ 0.05	72.92 $\pm$ 0.34	20.61 $\pm$ 0.36
	T3	39.17 $\pm$ 0.48	2.29 $\pm$ 0.02	29.50 $\pm$ 0.87	6.81 $\pm$ 0.04	63.15 $\pm$ 0.51	17.11 $\pm$ 0.28
Pinning	T1	27.22 $\pm$ 0.83	1.58 $\pm$ 0.03	51.00 $\pm$ 1.50	7.56 $\pm$ 0.07	64.87 $\pm$ 0.96	17.24 $\pm$ 0.49
	T2	40.91 $\pm$ 0.21	1.94 $\pm$ 0.01	26.36 $\pm$ 0.39	6.54 $\pm$ 0.04	73.86 $\pm$ 0.29	21.03 $\pm$ 0.23
	T3	38.33 $\pm$ 0.28	2.28 $\pm$ 0.03	31.00 $\pm$ 0.50	6.89 $\pm$ 0.01	64.27 $\pm$ 0.27	16.81 $\pm$ 0.11
1st flush	T1	24.44 $\pm$ 0.48	1.66 $\pm$ 0.01	56.00 $\pm$ 0.87	7.22 $\pm$ 0.02	62.74 $\pm$ 0.83	14.71 $\pm$ 0.19
	T2	39.89 $\pm$ 0.18	2.09 $\pm$ 0.05	28.20 $\pm$ 0.33	6.99 $\pm$ 0.01	72.50 $\pm$ 0.15	19.10 $\pm$ 0.23
	T3	37.22 $\pm$ 0.28	2.31 $\pm$ 0.05	33.00 $\pm$ 0.50	6.64 $\pm$ 0.02	59.01 $\pm$ 0.73	16.07 $\pm$ 0.26
2nd flush	T1	24.54 $\pm$ 0.58	1.65 $\pm$ 0.04	55.83 $\pm$ 1.04	7.13 $\pm$ 0.04	62.48 $\pm$ 0.62	14.88 $\pm$ 0.40
	T2	39.16 $\pm$ 0.32	1.97 $\pm$ 0.05	29.51 $\pm$ 0.58	6.71 $\pm$ 0.01	69.60 $\pm$ 0.24	19.93 $\pm$ 0.56
	T3	36.67 $\pm$ 0.28	2.34 $\pm$ 0.08	34.00 $\pm$ 0.50	6.64 $\pm$ 0.01	57.84 $\pm$ 0.47	15.63 $\pm$ 0.68
3rd flush	T1	24.81 $\pm$ 0.16	1.59 $\pm$ 0.02	55.33 $\pm$ 0.29	8.71 $\pm$ 0.04	63.14 $\pm$ 0.14	15.65 $\pm$ 0.12
	T2	38.40 $\pm$ 0.57	2.06 $\pm$ 0.04	30.89 $\pm$ 1.03	6.79 $\pm$ 0.04	67.82 $\pm$ 0.62	18.63 $\pm$ 0.64
	T3	36.02 $\pm$ 0.16	2.28 $\pm$ 0.04	35.17 $\pm$ 0.29	6.58 $\pm$ 0.01	56.41 $\pm$ 0.60	15.78 $\pm$ 0.24

TI、T2、T3代表3个不同的实验批次. BM: 建堆期; PI: 一次发酵结束期; PII: 二次发酵结束期; Filling: 菌丝长满; Pinning: 原基形成; 1st flush: 一潮菇清床; 2nd flush: 二潮菇清床; 3rd flush: 三潮菇清床.

T1, T2 and T3 represent different trials of experiments. BM: Basic mixture; PI: End of phase I compost; PII: End of phase II compost; Filling: Mycelium covered; Pinning: Primordial initiation. 1st flush: At the end of the first flush; 2nd flush: At the end of the second flush; 3rd flush: At the end of the third flush.

时期的培养料理化性质变化规律一致, pH在堆肥期变化不大, 出菇期逐渐降低; 含水量、含碳量和碳氮比堆肥期逐渐下降, 出菇期变化不大, 其中密云的T1批次含碳量明显低于滦平T2和T3批次; 灰分含量逐渐升高, 其中T1批次灰分的含量明显高于T2和T3批次, 这可能与两地使用的鸡粪质量有关; 培养料的含氮量在一次发酵结束均有下降的现象, 二次发酵结束含氮量升高, 其中T1批次二次发酵结束含氮量为1.64%, 而T2和T3批次二次发酵结束含氮量达到2.00%以上.

2.3 培养料物质变化

如表2所示, 培养料发酵过程中纤维素、半纤维素和木质素均被利用, 其中纤维素和半纤维素的利用率介于40%-60%之间; 木质素利用率介于20%-30%. 以上结果表明培养料发酵过程中的微生物主要转化利用了纤维素和半纤维素.

双孢蘑菇菌种接入培养料后纤维素、半纤维素和木质素持续被利用. 纤维素的利用主要集中在营养菌丝生长和出菇期; 原基形成期除密云的T1批次有4.8%的纤维素被利用, 滦平的两个批次几乎未被利用; 半纤维素的利用贯穿在双孢蘑菇营养生长和出菇的整个过程, 除密云的T1批次菌丝长满时半纤维素的利用率高于10%, 其他时期半纤维素的利用率均低于10%; 木质素的利用主要集中在菌丝生长和原基形成阶段, 出菇期木质素几乎未被利用, 除滦平的T3批次以外木质素的利用率均低于1%.

2.4 木质纤维素降解酶活变化

如图2所示, 3个批次培养料不同时期的纤维素酶活、木聚糖酶活和漆酶酶活变化趋势大体一致. 以滤纸为降解底物测定纤维素酶活, 结果显示都在一潮菇结束达到高值; 双孢蘑菇接种到原基形成时, 培养料的酶活呈上升趋势; 开始出菇后, 酶活保持在较高的活性水平, 表现出较小范围的波动.

木聚糖酶酶活变化情况与滤纸纤维素酶相似. 漆酶在堆肥阶段, 酶活趋近于零, 菌丝长满时漆酶酶活增长至600 U/g左右, 原基形成时变化不大, 一潮菇结束时该酶活又迅速下降.

2.5 堆肥期培养料微生物16S rRNA基因测序

对3个批次9个样品进行了细菌菌群分析, 测序共计得到432 595条有效序列, 序列平均长度为441 bp.

为了得到样本测序结果中的细菌种、属等数目信息将测序得到的序列按照相似性为97%进行聚类, 得到各样品的Operational taxonomic units (OTU) 信息, 共得到806条OTU, 采用RDP classifier贝叶斯算法对97%相似水平的OTU代表序列进行分类学分析, 在门、纲、目、科、属、种各分类水平统计样本的群落组成见表3. 从3个取样时期获得的有效序列数来看, 建堆期和一次发酵结束各批次之间序列数目差异较大, 二次发酵结束3个批次有效序列数目比较接近. 覆盖度指数 (Coverage) 反映样本文库的覆盖率, 其数值越高, 则样本中序列被测出的概率越高, 结果表明本次测序结果可以代表样本中微生物的真实情况.

如图3A所示, 在门水平上, 样品细菌菌群丰度排名前10位的门有厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门、栖热菌门、绿弯菌门、放线菌门、酸杆菌门、芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes)、浮霉菌门 (Planctomycetes)、柔膜菌门 (Tenericutes) 等. 建堆期, 培养料中拟杆菌门和厚壁菌门所占比例最大, 其次是变形菌门, 密云样品 (T1) 和滦平样品 (T2、T3) 的菌群存在一定差异; 一次发酵结束期, 拟杆菌门显著下降, 栖热菌门、放线菌门比例增大, 密云样品 (T1) 厚壁菌门丰度增加, 占最大比例, 滦平样品 (T2、T3) 栖热菌门占最大比例; 二次发酵结束时, 厚壁菌门丰度显著下降, 绿弯菌门显著增加, 变形菌门和拟杆菌门的丰度相对于一次发

表2 不同时期培养料物质变化
Table 2 The mass balance of composts at different phases

样品名称 Sample		培养料干重 Dry matter (m/kg)	纤维素 Cellulose		半纤维素 Hemicellulose		木质素 Lignin	
			质量 Weight (m/kg)	利用率 Loss rate (r/%)	质量 Weight (m/kg)	利用率 Loss rate (r/%)	质量 Weight (m/kg)	利用率 Loss rate (r/%)
BM	T1	1000	208	—	186	—	175	—
	T2	1000	208	—	176	—	233	—
	T3	1000	202	—	189	—	217	—
PII	T1	563	93	55.3	76	59.1	122	30.3
	T2	578	117	43.8	72	59.1	169	27.5
	T3	588	97	52.0	74	60.8	164	24.4
Filling	T1	502	66	13.0	51	13.5	97	14.3
	T2	523	88	13.9	58	7.9	150	8.1
	T3	549	79	8.9	69	2.7	148	7.4
Pining	T1	468	56	4.8	46	2.7	85	6.8
	T2	483	88	0.0	52	3.5	130	8.6
	T3	516	78	0.5	55	7.4	127	9.7
1st Flush	T1	467	39	8.2	35	5.9	84	0.6
	T2	465	68	9.6	43	5.1	129	0.4
	T3	457	51	13.4	42	6.9	120	3.2
3rd Flush	T1	444	36	1.4	31	2.1	83	0.6
	T2	445	54	6.7	35	4.5	128	0.5
	T3	451	44	3.4	35	3.7	112	3.7

TI、T2、T3代表3个不同的实验批次. BM: 建堆期; PII: 二次发酵结束期; Filling: 菌丝长满; Pining: 原基形成; 1st flush: 一潮菇清床; 3rd flush: 三潮菇清床.

T1, T2 and T3 represent different trials of experiments. BM: Basic mixture; PII: End of phase II compost; Filling: Mycelium covered; Pining: Primordial initiation. 1st flush: At the end of the first flush; 3rd flush: At the end of the third flush.

表3 有效序列数、各分类水平物种数及测序的覆盖度指数
Table 3 The effective sequence numbers, species numbers at each classification level and coverage indexes

样品 Sample	序列数 Sequence	门 Phylum	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus	覆盖度指数 Coverage
BM	T1	56893	18	33	72	128	0.998
	T2	51555	16	32	70	129	0.998
	T3	40528	15	29	64	115	0.998
PI	T1	41803	15	32	68	119	0.997
	T2	44181	16	35	79	141	0.997
	T3	50686	17	35	78	136	0.997
PII	T1	50022	18	37	75	147	0.998
	T2	48428	15	34	80	148	0.998
	T3	48499	16	33	69	124	0.998

T1、T2、T3代表3个不同的实验批次。BM：建堆期；PI：一次发酵结束期；PII：二次发酵结束期。
T1, T2, T3 represent different trials of experiments. BM: Basic mixture; PI: End of phase I compost; PII: End of phase II compost.

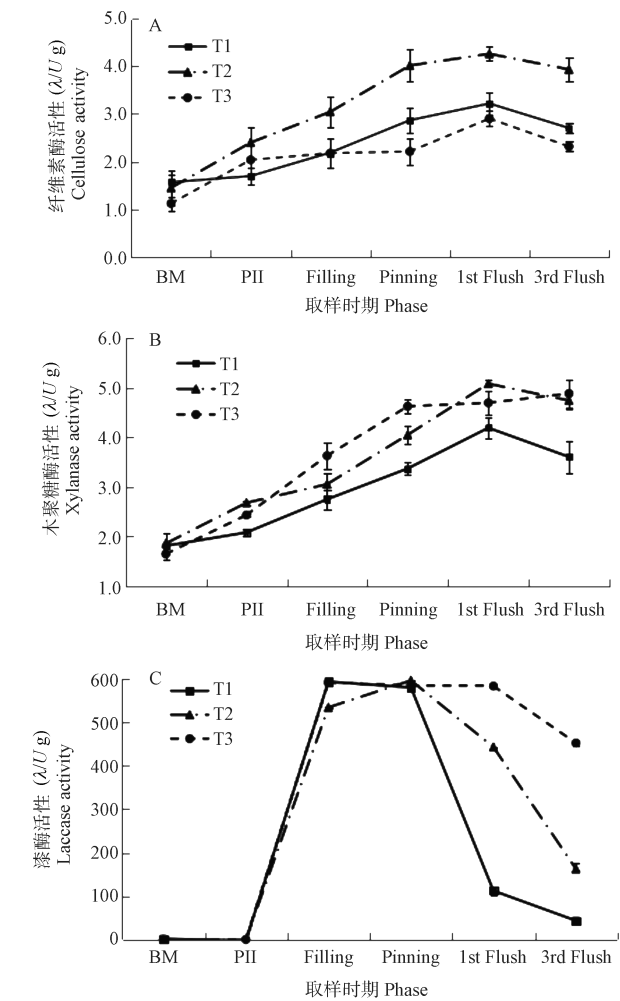


图2 杂草培养料各时期木质纤维素降解相关酶活性。T1、T2、T3代表3个不同的实验批次。A：纤维素酶；B：木聚糖酶；C：漆酶。BM：建堆期；PII：二次发酵结束期；Filling：菌丝长满；Pinning：原基形成；1st flush：一潮菇清床；3rd flush：三潮菇清床。
Fig. 2 The activities of lignocellulosic enzymes in weed-based compost at different phases. T1, T2, T3 represent different trials of experiments. A: Cellulose enzyme; B: Xylanase; C: Laccase. BM: Basic mixture; PII: End of phase II compost; Filling: Mycelium covered; Pinning: Primordial initiation; 1st flush: At the end of the first flush; 3rd flush: At the end of the third flush.

酵结束时期显著增加。

根据所有样品在属水平的物种注释及丰度信息，选取丰度排名前20的属及其在每个样品中的丰度信息绘制热

图，并从分类信息和样品间差异两个层面进行聚类，便于结果展示和信息发现，从而找出研究样品中聚集较多的物种或样品。结果如图3B所示，堆肥过程中3个取样时期的样品优势菌群分别聚为一类，对于建堆期，丰度较高的有拟杆菌门的普氏菌属 (*Prevotella*) 和厚壁菌门的芽孢杆菌属 (*Bacillus*)；对于一次发酵结束期，优势菌集中在栖热菌门的 *Thermus*、*Truepera* 和 *Caldicoprobacter* 属等，其中 *Caldicoprobacter* 属的细菌具有降解木聚糖的功能；对于二次发酵结束期，丰度较高的优势菌有绿弯菌门的厌氧绳菌属 (*Anaerolineaceae*)、噬纤维素菌门 *Chryseolinea* 属、放线菌门热多孢菌属 (*Thermopolyspora*) 和变形菌门的假黄单胞菌属 (*Pseudoxanthomonas*)。堆肥期的优势菌属多具有木质纤维素降解功能。

2.6 产量与生物学效率

3个批次密云库区杂草培养料的单位面积产量结果表明，一潮菇产量占总产比例最高，二潮菇次之，其总产量分别为17.1、19.7、19.3 kg/m² (表4)。T1批次的产量最低，这可能与培养料二次发酵结束时含氮量偏低有关，另外，也与蘑菇场采用的鸡粪质量、管理条件不完全一致有关。

表4 蘑菇产量与生物学效率
Table 4 The yield and biological efficiency (BE) of mushroom

批次 Trial	产量 Yield (Y/kg m ⁻²)			总产量 Total yield (Y/kg m ⁻²)	生物转化率 BE (r/%)
	一潮菇 1st flush	二潮菇 2nd flush	三潮菇 3rd flush		
T1	6.8	6.3	4.0	17.1	52.7
T2	7.3	7.0	5.4	19.7	52.0
T3	9.7	5.3	4.3	19.3	53.0

3 讨论与结论

本研究是在2015年以来密云杂草料连续在生产上使用的基础上，在2个基地系统测定的结果。从培养料理化性质结果分析，T1批次培养料的含碳量、含氮量和灰分含量与T2和T3批次存在明显差异。原因可能与杂草原料组成的稳定性、均一性有关，但更重要的可能是鸡粪的质量，T1的灰分明显高于T2、T3，试验中对两基地鸡粪原料均有测定，T1所用鸡粪质量较差。含氮量指标还表明库区杂草一次发酵结束时含氮量下降，出现这种现象可能与杂草本身结构有关，杂草的饱和吸水量低于麦秸，在其自身没有充分软化时不易

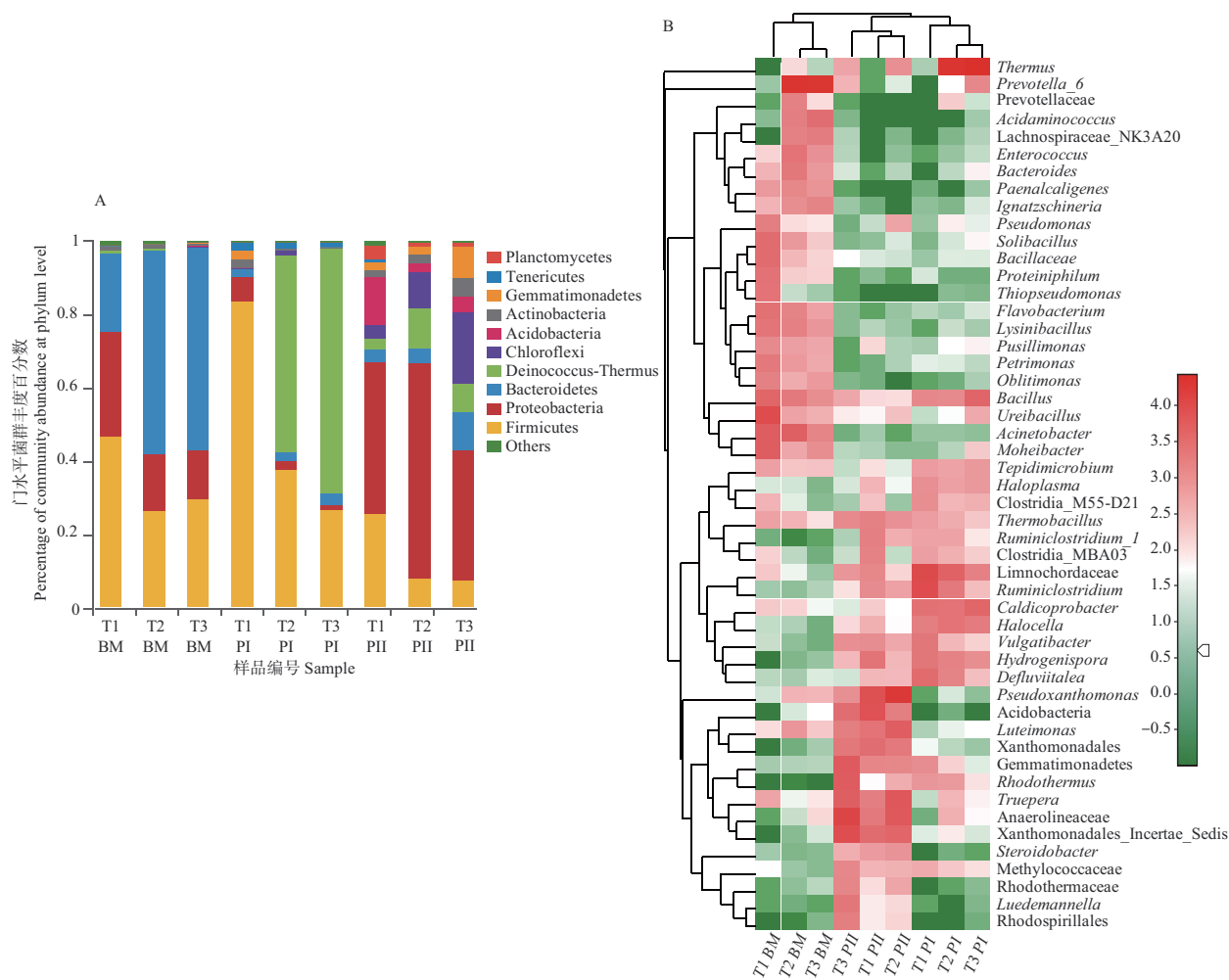


图3 堆肥期培养料门水平物种组成相对丰度 (A) 和属水平物种组成Heatmap (B). T1、T2、T3代表3个不同的实验批次. BM: 建堆期; PI: 一次发酵结束期; PII: 二次发酵结束期.

Fig. 3 Relative abundance of bacterial communities at phylum level (A) and Heatmap at genus level (B). T1, T2, T3 represent different trials of experiments. BM: Basic mixture; PI: End of phase I compost; PII: End of phase II compost.

留住氮源; 通常二次发酵结束后麦草鸡粪培养料含氮量在2.0%-2.4%, 含水量在67%-70%^[24-25]. 为了使二次发酵结束的杂草培养料达到该指标, 漆平的T2和T3批次在混料和一次发酵转隧道的过程中分次添加了豆粕, 二次发酵结束含氮量分别达到了2.13%、2.10%, 但T1批次仅在混料时一次性添加豆粕, 二次发酵结束含氮量偏低, 为1.64%, 最终产量统计T1批次也低于T2和T3. 堆肥期间含水量也是一个非常关键的因素^[19], 3个批次二次发酵结束的含水量分别是69.75%、70.53%、69.86%, 符合培养料制作完成时的水分要求.

荷兰麦草配方在二次发酵结束后培养料中含有大约13%的纤维素和大约13%的半纤维素, 大约26%(w)的木质素^[4]. 本研究数据显示, 二次发酵结束后纤维素的含量在16-20%, 高于荷兰的麦草数据; 半纤维素的含量在13%左右, 接近荷兰麦草的测定结果; 木质素的含量在27%-30%, 高于麦草培养料. 从培养料的物质利用来看, 荷兰的麦草配方二次发酵结束与原料预混建堆期相比, 已经有50%-60%的半纤维素和纤维素被利用, 木质素在很大程度上仍然是完整的^[18], 本研究中半纤维素和纤维素的利用情况与之一致, 但木质素

在堆肥期有25%-30%被利用, 这可能与国内的发酵时间和工艺有关. 二次发酵结束后的培养料接入双孢蘑菇菌种到子实体形成之前的过程中, 也就是本研究中的菌丝长满和原基形成两个阶段, 荷兰麦草配方有15%的半纤维素和10%的纤维素、50%的木质素被利用^[18], 而本研究中纤维素和半纤维素的利用均低于10%, 木质素的利用率只有16%-21%, 培养料发酵过程和菌丝生长过程中木质素总的利用率在50%左右, 木质素的利用情况与麦草配方不尽一致, 这种现象与原料本身的组成差异、培养料的发酵工艺、菇房管理差异等有关.

培养料物质变化与木质纤维素降解相关酶变化情况相一致. 三潮菇出菇结束T2批次纤维素的利用率明显高于其他两个批次, 滤纸纤维素酶活性也明显高于另外两个批次; 同样, 半纤维素利用率与木聚糖酶活性的变化情况相一致. 培养料发酵阶段漆酶的活性几乎检测不到, 在菌丝长满和原基形成阶段迅速增加, 该变化规律与前人研究报道^[26]一致. 培养料发酵阶段没有检测到木质素降解相关酶漆酶的活性, 仍有30%左右的木质素被利用, 有研究表明培养料发酵阶段木质素降解相关酶活性极低的原因与取样时间有关, 培养料发

酵过程中翻堆时酶活性最高,而发酵结束期酶活性会明显下降^[27],也可能是木质素降解其他的相关酶如锰过氧化物酶、木素过氧化物酶在起作用,这有待于今后研究。

木质纤维素降解相关酶主要来自于培养料中的微生物,本研究中发现堆肥时期优势菌群为拟杆菌门的普氏菌属,厚壁菌门的芽孢杆菌,栖热菌门的*Thermus*属、*Truepera*属、*Caldicoprobacter*属(一种木聚糖降解菌),噬纤维素菌门*Chryseolinea*属,放线菌门的热多孢菌属,变形菌门的假黄单胞菌属,各优势细菌多具有纤维素与半纤维素降解功能^[28]。有研究表明,假黄单胞菌属是二次发酵料中主要的细菌^[29]。Agnolucci等在以橄榄废料为主要原料的工厂化堆肥中添加芽孢杆菌和假黄单胞菌菌剂,提高了对原料的降解能力,从而促堆肥促进原料的充分利用,由此推测,双孢蘑菇堆肥过程中发现的*Bacillus*和*Pseudomonas*可能会对后期双孢蘑菇的生长和产量形成产生重要影响^[30]。另外,本研究发现在不同实验基地的3个实验批次采用杂草料堆肥时,建堆期和一次发酵结束期培养料优势菌群均存在一定差异,这些差异可能是由发酵原料如水、鸡粪等的差异造成,但二次发酵结束后两个蘑菇场样品菌群的相对丰度分布差异变得不再明显,而且与W. de Boer等研究报道的群落^[13]相近,由此表明以杂草为原料采用当前的堆制发酵工艺可以达到双孢蘑菇菌丝生长的菌群环境。3批料产量可达到17-19 kg/m²,表明利用杂草培养料代替麦草培养料栽培双孢蘑菇是可行的。密云库区杂草每年产量千吨以上,本研究结果可为其合理利用和工艺改进提供理论依据。

参考文献 [References]

- 刘建凤, 吉春明, 陆玉荣, 张春梅, 苏建坤, 张洪海. 双孢蘑菇生产研究进展及生产技术体系组建的理想[J]. 江西农业学报, 2014, **26** (2): 118-121 [Liu JF, Ji CM, Lu YR, Zhang CM, Su JK, Zhang HH. Research progress in production of *Agaricus bisporus* and ideas about establishing its production technology system [J]. *Acta Agric Jiangxi*, 2014, **26** (2): 118-121]
- Sonnenberg AS, Baars JJ, Gao W, Visser RG. Developments in breeding of *Agaricus bisporus* var. *bisporus*: progress made and technical and legal hurdles to take [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, **101** (5): 1819-1829
- Gerrits JPG. Nutrition and Compost: The Cultivation of Mushrooms [M]. Rustington, UK: Darlington Mushroom Laboratories, 1988: 206-223
- Jurak E, Kabel MA, Gruppen H. Carbohydrate composition of compost during composting and mycelium growth of *Agaricus bisporus* [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, **101**: 281-288
- Kabel MA, Jurak E, Makela MR, de Vries RP. Occurrence and function of enzymes for lignocellulose degradation in commercial *Agaricus bisporus* cultivation [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, **101**: 4363-4369
- Prasad S, Singh A, Joshi HC. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues [J]. *Resour Conserv Recy*, 2007, **50** (1): 1-39
- Moretti MMS, Bocchini-Martins DA, Da Silva R, Rodrigues A, Sette LD, Gomes E. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation [J]. *Braz J Microbiol*, 2012, **43** (3): 1062-1071
- Griensven LJLDV. The Cultivation of Mushrooms [M]. Rustington, UK: Darlington Mushroom Laboratories Ltd., 1988
- Chatelier L, Nielsen T, Qin J. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers [J]. *Nature*, 2013, **500**: 541-546
- Tang Y, Underwood A, Gielbert A, Woodward MJ, Petrovska L. Metaproteomics analysis reveals the adaptation process for the chicken gut microbiota [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2014, **80** (2): 478-485
- von Bergen M, Jehmlich N, Taubert M, Vogt C, Bastida F, Herbst FA, Schmidt F, Richnow HH, Seifert J. Insights from quantitative metaproteomics and protein-stable isotope probing into microbial ecology [J]. *ISME J*, 2013, **7**: 1877-1885
- Peng J, Zhang Y, Su J, Qiu Q, Jia Z, Zhu YG. Bacterial communities predominant in the degradation of 13C(4)-4,5,9,10-pyrene during composting [J]. *Bioresour Technol*, 2013, **143** (1): 608-614
- de Boer W, Kuramae E, Klein Gunnewiek P, Baars JJP, van der Horst HC, Klijn N. Varieties in bacterial communities in compost during composting and cultivation [C]. Proceedings of the 19th Congress of the International Society for Mushroom Science, Amsterdam, 2016: 152-155
- 鲁丽鑫. 双孢蘑菇新基质的筛选及营养生理的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2014 [Lu LX. Study on screening of new cultivation substrates and nutritional physiology of *Agaricus bisporus* [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2014]
- 梁枝荣, 张清文, 周志强, 郭生. 应用玉米秸秆栽培双孢蘑菇新技术[J]. 微生物学通报, 2000, **27** (6): 443-457 [Liang ZR, Zhang QW, Zhou ZQ, Guo S. The new technology of cultivation of *Agaricus bisporus* by using corn stalks [J]. *Microbiol Chin*, 2000, **27** (6): 443-457]
- 陈钟佃, 黄秀声, 刘明香, 郭仲杰, 黄勤楼. 杂交狼尾草栽培双孢蘑菇初探[J]. 食用菌学报, 2011, **18** (01): 9-11 [Chen ZD, Huang XS, Liu MX, Guo ZJ, Huang QL. Cultivation of *Agaricus bisporus* using hybrid *Pennisetum* [J]. *Acta Edulis Fungi*, 2011, **18** (1): 9-11]
- Van Griensven LJLD. The Cultivation of Mushrooms [M]. Horst, The Netherlands: Mushroom Experimental Station, 1988: 515-518
- Jurak E, Punt AM, Arts W, Kabel MA, Gruppen H. Fate of carbohydrates and lignin during composting and mycelium growth of *Agaricus bisporus* on wheat straw based compost [J]. *PLoS ONE*, 2015, **10** (10): e0138909
- Kariaga MG, Nyongesa HW, Keya NCO, Tsingalia HM. Compost physico-chemical factors that impact on yield in button mushrooms, *Agaricus bisporus* (Lge) and *Agaricus bitorquis* (Quel) Saccardo [J]. *J Agric Sci*, 2012, **3** (1): 49-54
- Stoknes K, Beyer DM, Norgaard E. Anaerobically digested food waste in compost for *Agaricus bisporus* and *Agaricus subrufescens* and its effect on mushroom productivity [J]. *J Sci Food Agric*, 2013, **93** (9): 2188-2200
- Ahmadi F. Chemical composition and protein enrichment of orange peels and sugar beet pulp after fermentation by two *Trichoderma* species [J]. *Ira J Vet Res*, 2014, **16** (1): 25-30
- 叶云霞, 金宁, 杨杰, 孟俊龙, 常明昌. 不同培养料对元蘑胞外酶活性

- 的影响[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2011, **31** (2): 172-175 [Ye YX, Jing N, Yang J, Meng JL, Chang MC. Effect of different composts on extracellular enzyme activity of *hohenbuehelia serotina* [J]. *Shanxi Agric Univ (Nat Sci Ed)*, 2011, **31** (2): 172-175]
- 23 王珊珊, 孙健, 陈青君, 朱孟娟, 王贺祥, 张国庆. 丁香桑黄胞外漆酶的分离纯化与性质研究[C]. 第十届全国食用菌学术研讨会. 北京: 中国菌物学会, 2014: 205-213 [Wang SS, Sun J, Chen QJ, Zhu MJ, Wang HX, Zhang GQ. Purification and characterization of an extracellular laccase from *Inonotus baumii*, sanghuang mushroom on *Syringa* [C]. The 10th National Symposium on Edible Fungi. Beijing: Mycological Society of China, 2014: 205-213]
- 24 黄建春. 荷兰双孢蘑菇培养料堆制发酵先进技术[J]. 食药菌, 2015, **23** (1): 8-11 [Huang JC. Advanced fermentation technology of Dutch *Agaricus bisporus* compost [J]. *Edible Med Mushrooms*, 2015, **23** (1): 8-11]
- 25 秦改娟, 王晓, 陈青君, 张国庆. 不同配方培养料生产双孢蘑菇过程中主要木质纤维素降解酶及物料组分的变化[J]. 应用与环境生物学报, 2017, **23** (6): 1035-1041 [Qin GJ, Wang X, Chen QJ, Zhang GQ. Changes of lignocellulolytic enzymes and material components in different compost formulas during the production of *Agaricus bisporus* [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2017, **23** (6): 1035-1041]
- 26 Arce-Cervantes O, Saucedo-García M, Leal Lara H, Ramírez-Carrillo R, Cruz-Sosa F, Loera O. Alternative supplements for *Agaricus bisporus* production and the response on lignocellulolytic enzymes [J]. *Sci Hort*, 2015, **192**: 375-380
- 27 鲁丽鑫, 姚方杰, 张友民. 对双孢蘑菇培养料在发酵过程中胞外酶活性变化和木质纤维素降解的研究[C]//第十届全国食用菌学术研讨会论文汇编. 北京: 中国菌物学会, 2014: 8 [Lu LX, Yao FJ, Zhang YM. Study on extracellular enzyme activity and lignocellulose degradation of *Agaricus bisporus* on different cultivation formulas at the stage of fermentation [C]//The 10th National Symposium on Edible Fungi. Beijing: Mycological Society of China, 2014: 8]
- 28 贾洋洋. 利用宏基因组方法分析堆肥生境中微生物区系的变化[D]. 济南: 山东大学, 2012 [Jia YY. Microbial diversity analysis in composting environment by metagenomic method [D]. Jinan: Shandong University, 2012]
- 29 Kertesz M, Safianowicz K, Bell T. New insights into the microbial communities and biological activities that define mushroom compost [C]. Proceedings of the 19th Congress of the International Society for Mushroom Science, Amsterdam, 2016: 161-165
- 30 Agnolucci M, Cristani C, Battini F, Palla M. Microbially-enhanced composting of olive mill solid waste (wet husk): bacterial and fungal community dynamics at industrial pilot and farm level [J]. *Bioresour Technol*, 2013, **134**: 10-16