

葡萄枝堆肥腐殖化的微生物养分限制机理探讨

齐熙平, 黄懿梅, 贾鹏辉, 刘一帆, 谢健宇, 傅彬欣, 李建波

引用本文:

齐熙平, 黄懿梅, 贾鹏辉, 刘一帆, 谢健宇, 傅彬欣, 李建波. 葡萄枝堆肥腐殖化的微生物养分限制机理探讨[J]. 农业环境科学学报, 2023, 42(4): 901-911.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2022-0895>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

猪粪辅料促进茄果类蔬菜废弃物堆肥品质的微生物机理

陆晓林, 杨玉欣, 洪春来, 朱为静, 朱凤香, 姚燕来, 洪磊东, 王卫平

农业环境科学学报. 2022, 41(5): 1097-1022-1 <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0834>

麦秸秸秆花盆堆肥化研究及评价

黄红英, 孙恩惠, 武国峰, 曲萍, 常志州, 徐跃定

农业环境科学学报. 2015(12): 2386-2393 <https://doi.org/10.11654/jaes.2015.12.019>

外源添加磷石膏对堆肥碳组分及腐殖质品质的影响

刘媛媛, 徐智, 陈卓君, 汤利

农业环境科学学报. 2018, 37(11): 2483-2490 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-0377>

餐厨垃圾生化尾渣蚯蚓堆肥中矿物的调节效应

缪丽娟, 王依凡, 张明月, 应雨瑾, 张承业, 冯宇宁, 王浪, 朱维琴

农业环境科学学报. 2022, 41(2): 425-433 <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0623>

华北不同利用强度潮土酶生态化学计量特征比较

李胜君, 盛美君, 李刚, 杨昕玥, 王蕊, 李洁, 张贵龙, 修伟明

农业环境科学学报. 2022, 41(12): 2733-2741 <https://doi.org/10.11654/jaes.2022-1017>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

齐熙平, 黄懿梅, 贾鹏辉, 等. 葡萄枝堆肥腐殖化的微生物养分限制机理探讨[J]. 农业环境科学学报, 2023, 42(4): 901-911.

QI X P, HUANG Y M, JIA P H, et al. Exploring the microbial nutrient limitation mechanisms of grape branch compost humification[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2023, 42(4): 901-911.

葡萄枝堆肥腐殖化的微生物养分限制机理探讨

齐熙平, 黄懿梅*, 贾鹏辉, 刘一帆, 谢健宇, 傅彬欣, 李建波

(西北农林科技大学资源环境学院, 农业农村部西北植物营养与农业环境重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

摘要:胞外酶活性及其化学计量变化可以反映微生物的养分限制类型, 调理剂添加或超高温预处理可促进好氧堆肥腐殖化效果, 为研究其对葡萄枝堆肥养分限制及其调节机制, 本研究以葡萄枝+鸡粪(CK)为基本堆肥原料, 另设置添加15%(m/m)菇渣组(M)和进行高温预处理组(H)两个处理, 在60 L强制曝气好氧发酵罐中进行45 d的堆肥化试验, 测定不同阶段堆肥理化指标及参与C、N、P转化的功能酶活性和化学计量比, 旨在从微生物养分限制的角度探讨这两种措施对葡萄枝高温堆肥腐殖化的影响机理。结果表明: 添加菇渣和高温预处理改变了堆肥基质的特性, 加速有机质降解, 提升养分含量, 并促进了腐殖化。CK、M、H的高温期(>50 °C)分别保持了19、15、19 d, 均能满足种子发芽指数≥70%, pH值在5.5~8.5之间等腐熟标准指标。堆肥结束时, M和H相比CK分别提升了9.81%、12.44%的TN含量和9.84%、9.04%的TP含量。M和H使堆肥中胡敏酸碳含量在第14~44天分别较CK提升7.64%~37.62%和9.26%~36.96%; 第0~7天, M的碱性磷酸酶(AP)、β-1, 4-葡萄糖苷酶(BG)、β-1, 4-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(NAG)的酶活性显著高于CK($P<0.05$), 第14~21天, H的AP、BG、NAG的酶活性显著高于其他两组($P<0.05$)。M和H中的微生物受到N和P养分的限制, 结构方程模型显示, 这两个处理的微生物群落会分泌较多的N和P获取酶来对有机氮和有机磷进行矿化以应对养分限制, 提升TN、TP的含量, 促进胡敏酸的生成。研究表明, 在葡萄枝鸡粪堆肥中添加菇渣以及使用高温预处理可以增强胞外酶活性、提升养分含量, 促进胡敏酸的形成。

关键词:好氧堆肥; 葡萄枝; 菇渣; 超高温预处理; 胞外酶; 化学计量

中图分类号: S141.4 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2023)04-0901-11 doi:10.11654/jaes.2022-0895

Exploring the microbial nutrient limitation mechanisms of grape branch compost humification

QI Xiping, HUANG Yimei*, JIA Penghui, LIU Yifan, XIE Jianyu, FU Binxin, LI Jianbo

(Key Laboratory of Plant Nutrition and Agri-environment in Northwest China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, College of Natural Resource and Environment, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: This study aims to explore the mechanism of influence of these measures on the humification of grape branch compost from the perspective of microbial nutrient limitation. Extracellular enzyme activity and its stoichiometric changes can reflect the type of nutrient limitation of microorganisms. Conditioner addition or hyperthermophilic temperature pre-treatment can promote an aerobic compost humification effect. In order to study the nutrient limitation of grape branch composting and its regulation mechanisms, this study used grape branch and chicken manure (CK) as raw material for compost, added 15% (m/m) mushroom substrate (M) and hyperthermophilic pre-treatment (H) and performed a composting experiment for 45 days in a 60 L forced aerobic fermentation tank. Physicochemical indicators, functional enzyme activities, and stoichiometric ratios involved in C, N, and P conversion in compost at different stages were all determined. The results showed that the addition of mushroom residue and hyperthermophilic pre-treatment changed the characteristics of

收稿日期: 2022-09-06 录用日期: 2022-10-18

作者简介: 齐熙平(1998—), 女, 陕西西安人, 硕士研究生, 从事农业废弃物资源化利用研究。E-mail: XipingQi@163.com

*通信作者: 黄懿梅 E-mail: ymhuang1971@nwsuaf.edu.cn

基金项目: 国家科技支撑计划课题(2012BAD15B04-4-3); 陕西省大学生创新创业训练计划项目(X202210712075)

Project supported: The National Key Technology Research and Development Program of the Ministry of Science and Technology of China (2012BAD15B04-4-3); Shaanxi University Student Innovation and Entrepreneurship Training Program (X202210712075)

the compost substrate, accelerated organic matter degradation, enhanced nutrient content, and promoted humification. CK, M and H were maintained for 19, 15, and 19 days, respectively, during the high temperature period ($>50\text{ }^{\circ}\text{C}$). All three met the decomposition standards, namely seed germination index $\geq 70\%$ and pH value between 5.5 and 8.5, etc. At the end of composting, M and H enhanced the total nitrogen (TN) and total phosphorus (TP) contents by 9.81%, 12.44%, and 9.84%, 9.04%, respectively, compared with CK. M and H elevated the humic acid content of the compost by 7.64%–37.62% and 9.26%–36.96% on days 14–44, respectively, compared to CK. On days 0–7, the alkaline phosphatase (AP), β -1, 4-glucosidase (BG), and β -1, 4-N-acetylglucosidase (NAG) activities of M were significantly higher than that of CK ($P < 0.05$), and on days 14–21, the AP, BG, and NAG enzyme activities of H were significantly higher than those of the other two groups ($P < 0.05$); Microorganisms in M and H were limited by N and P nutrients. The structural equation model showed that the microbial communities secreted more N and P acquisition enzymes to mineralize organic nitrogen and organophosphorus to cope with nutrient restrictions, increased the content of TN and TP, and promoted the production of humic acid. The addition of mushroom residue and the use of hyperthermophilic pre-treatment in the compost of grape branch–chicken manure can enhance extracellular enzyme activity, increase nutrient content, and promote the formation of humic acid.

Keywords: aerobic composting; grape branch; mushroom residue; hyperthermophilic pretreatment; extracellular enzyme; stoichiometry

我国的葡萄种植面积已达 8.7 亿 hm^2 , 每年冬季修剪下的枝条可达 604 万 $\text{t}^{[1]}$, 这些枝条含有丰富的物质能源、常量元素和微量元素^[2], 其经过堆肥化处理可转化为含腐殖质的有机肥料或土壤调理剂, 用于提高土壤肥力^[3]。但葡萄枝含有大量难以降解的木质素和纤维素, 致使堆肥时间长、质量低^[4]。高温预处理可以破坏物料中木质纤维素的结构, 增加堆肥中挥发性脂肪酸、氨基酸、多糖等营养物质的含量^[5–6], 促进放线菌富集以及醌类再生和缩合, 增强胡敏酸聚合^[7]; 菇渣具有相对较高的比表面积、发达的微孔结构, 含有丰富的腐殖质前体物质和胞外酶, 添加至堆肥中有利于有机物的降解和腐殖质的形成^[8], Meng 等^[9]的研究表明, 添加 15% 菇渣处理使污泥堆肥中胡敏酸含量增幅显著高于未添加菇渣处理。

好氧堆肥实质上是一个由微生物主导的有机物分解并生成稳定腐殖物质的过程^[10], 微生物分泌的多种胞外酶可以分解复杂底物中最具限制性的养分, 将高分子量有机化合物降解成可同化的分子从而促进系统中微生物养分循环和能量流动^[11]。最常见的参与 C、N、P 循环的相关胞外酶包括 β -1, 4-葡萄糖苷酶 (BG)、 β -1, 4-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶 (NAG)、亮氨酸氨基多肽酶 (LAP) 和碱性磷酸酶 (AP)^[12]。胞外酶化学计量比, 即与 C、N、P 等营养物质获取相关的胞外酶比率, 可以反映微生物的营养需求和对有限资源的可用性^[11]。Wang 等^[12]发现添加沼渣和生物炭的稻草堆肥中参与 C、N 和 P 转化的 4 种胞外酶的活性都显著提高, 有机质分解加快, BG:AP 和 (NAG+LAP):AP 比值相比对照显著降低, 微生物对 P 的需求增加, 受到 P 的限制, 微生物会分泌更多的碱性磷酸酶来维持内稳态。然而, 从胞外酶活性及其化学计量变化的

微生物养分限制的角度探讨堆肥过程中影响腐植酸形成的机理研究还较少, 葡萄枝中添加菇渣和使用高温预处理之后的堆肥腐殖化效果及其微生物养分限制机理尚不清楚。

因此, 本研究以葡萄冬剪枝条为试材, 鸡粪为调理剂, 探讨添加菇渣以及高温预处理对堆肥过程中理化参数、腐植酸含量、胞外酶活性及其化学计量变化的影响, 揭示堆肥过程中微生物胞外酶活性及其化学计量与腐植酸形成之间的关系, 为丰富堆肥腐殖化机理和促进葡萄枝的高效肥料化利用提供理论依据和数据支撑。

1 材料与amp;方法

1.1 堆肥材料及其基本性质

新鲜鸡粪取自杨凌永顺养鸡场; 葡萄枝和香菇菇渣分别来自西北农林科技大学葡萄酒学院葡萄教学标本圃和陕西省杨凌知君菌业科技公司, 使用前将其粉碎至 2~3 cm。物料基本理化性质见表 1。

1.2 堆肥方法及样品采集

试验共设 3 个处理: 对照组 (CK), 葡萄枝与新鲜鸡粪按鲜质量比约 1:1 混合后添加适量水, 调节堆肥初始含水率为 50%~60%, C/N 为 30:1~35:1, 总质量 18 kg; 添加菇渣组 (M), 在 CK 基础上添加 15% (湿质量) 的菇渣; 高温预处理组 (H), 按照 CK 的比例, 将原料混合加热至 $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 且持续 4 h 后, 转入堆肥反应器堆肥。3 组物料混合均匀后置于 3 个 60 L 密闭强制通风好氧发酵装置中堆肥 45 d, 装置外使用保温棉进行保温以减少热量损失。采用机械强制间歇曝气, 每 1 h 曝气 5 min, 曝气速率为 $73\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。堆制期间不补充水分。每日 9:00 和 17:00 用电子温度计于堆体上、

表1 堆肥原料的理化性质

Table 1 Physicochemical properties of compost raw materials

堆肥原料 Raw material	pH ^①	电导率 ^① Electrical conductivity/(mS·cm ⁻¹)	含水率 ^① Moisture content/%	总有机碳 ^② Total organic carbon/(g·kg ⁻¹)	总氮 ^② Total nitrogen/(g·kg ⁻¹)
鸡粪 Chicken manure	8.45±0.01	6.65±0.24	80.85±0.00	403.62±0.00	46.30±1.72
葡萄枝 Grape branch	6.24±0.12	1.29±0.04	8.91±0.02	507.09±5.61	9.21±0.05
菇渣 Mushroom residue	4.21±0.02	2.03±0.01	41.39±0.02	488.99±0.00	6.55±0.11

注:①湿基测定;②干基测定。

Note:① Wet basis determination;② Dry basis determination.

中、下部测定温度(T),取其平均值作为当日的堆温,同时测定环境温度。根据温度变化分别在第0、7、14、21、28、35、44天取样,取样后手动翻堆,分别于堆肥物料上、中、下部采集样品,每份样品约200 g,样品混匀之后分为两份:一份于-20℃储存用于测定含水率、pH、电导率(EC)、种子发芽指数、溶解性有机碳(DOC)、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 以及胞外酶活性;另一份风干后用球磨机研磨,过1 mm筛,用于测定总有机碳(TOC)、总氮(TN)、总磷(TP)、腐植酸碳及其组分。

1.3 测定指标及其方法

称取新鲜样品2 g,将样品含水率折算后,按照干物质质量与液体体积比1:10加入相应体积的去离子水,180 r·min⁻¹振荡1 h,过滤得浸提液。使用配有pH Intelli CAL电极和EC Intelli CAL电极的HQ11d电位仪测定浸提液的pH和EC。将10颗萝卜种子均匀散布在垫有滤纸的9 cm培养皿中,吸取5 mL浸提液浸润,在25℃避光条件下培养72 h后测定发芽率和根长,计算种子发芽指数,种子发芽指数=(试验样种子发芽数×试验样种子平均根长)/(对照样种子发芽数×对照样种子平均根长)×100%。

含水率采用烘干法测定;TN采用凯氏定氮法测定;TP采用钒钼黄比色法测定。DOC用TOC仪(日本岛津TOC-L)测定。样品经KCl(2 mol·L⁻¹)浸提稀释后采用流动分析仪测定 $\text{NH}_4\text{-N}$ 与 $\text{NO}_3\text{-N}$ ^[13]。有机质采用马弗炉灼烧减重法测定(550℃,6 h),测定值除以系数1.724得TOC含量^[14]。腐植酸碳、胡敏酸碳(HA-C)及富里酸碳(FA-C)采用科诺诺娃法测定^[15]。腐殖化率=腐植酸碳含量/总有机碳含量×100;腐殖化指数=胡敏酸碳含量/总有机碳含量×100。

胞外酶活性使用多功能酶标仪(瑞士Tecan Infinite M200 PRO型)通过96微孔板荧光法测定^[16]。测定指标包括1种参与C循环的酶: β -1,4-葡萄糖苷酶(BG),通过4-MUB- β -D-葡萄糖苷的释放量来表示;2种参与N循环的酶: β -1,4-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(NAG)和亮氨酸氨基多肽酶(LAP),分别通过4-

MUB-N-乙酰基- β -D-葡萄糖苷和L-亮氨酸-7-氨基-4-甲基香豆素盐酸盐的释放量来表示;1种参与P循环的酶:碱性磷酸酶(AP),通过4-MUB-磷酸的释放量来表示。

1.4 数据处理与分析

试验数据采用Excel 2019进行统计与分析;采用SPSS 22.0中的单因素方差分析(One-way ANOVA)进行组间的显著性检验;采用OriginPro 2021制图。冗余分析采用Canoco 5完成;采用Amos 24.0构建结构方程模型,并使用Powerpoint 2019绘制转化关系图。

2 结果与分析

2.1 堆肥温度、含水率、EC、pH、种子发芽指数的变化

堆肥过程中高温期维持时间长有助于杀灭寄生虫和病原体^[17],提高堆肥效率。如图1所示,CK、M、H分别于第3、8、4天达到高温期(>50℃),且高温期分别保持了19、15、19 d,符合《粪便无害化卫生要求》(GB 7959—2012)。添加菇渣推迟了堆体进入高温期的时间,其原因可能是菇渣中存留的菌丝以及某些致病菌或污染物影响了堆体土著微生物的生长^[18]。

含水率变化如图2a所示,H的含水率降低,略低于其他两组。各组进入高温期后由于有机物降解产水,含水率稍有提升,随后逐渐下降。如图2b所示,第7~14天,M和H的EC值显著高于CK($P<0.05$),可能是相比CK,M和H中有机物分解产生的 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、挥发性脂肪酸、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2\text{-N}$ 较多所致。14 d之后,3组的EC值逐渐升高,可能是由于堆体水分降低引发了盐离子的富集浓缩^[19]。堆肥结束时,CK、M、H的EC值分别为3.46、3.12、3.42 mS·cm⁻¹,差异不显著。如图2c所示,堆肥过程中3组pH呈现先升后降的趋势,这主要是由于微生物在分解有机氮过程中产生了碱性氨,14 d之后, $\text{NH}_4\text{-N}$ 以气体的形式挥发导致pH下降,堆肥结束时,CK、M、H的pH分别为8.53、8.45、8.59,差异不显著。CK、M、H的种子发芽指数分别为103.15%、100.02%和91.00%(图2d),差异不显著,均

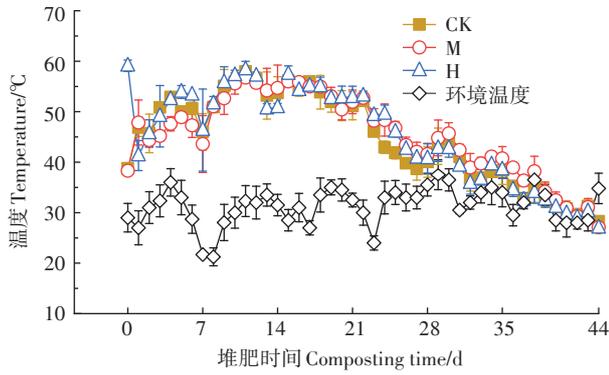


图1 堆肥过程中温度的变化

Figure 1 Changes of temperature during composting

达到70%以上,符合《有机肥料》(NY/T 525—2021)的要求。

2.2 堆肥中腐植酸碳、HA-C、FA-C含量的变化

如图3a所示,第0天,H的腐植酸碳含量较CK高7.99%。第0~14天,有机物降解剧烈,各组腐植酸碳含量迅速下降,之后逐渐上升。第14天和第28天,M和H的腐植酸碳含量显著高于CK($P<0.05$)。最终CK、M、H的腐植酸碳含量分别为93.03、100.81、100.90 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,M和H显著高于CK($P<0.05$)。如图3b所示,第14天,M和H的HA-C含量开始同时高于

CK,直至堆肥结束。总体来说,M和H在第14~44天分别较CK提高了7.64%~37.62%和9.26%~36.96%的HA-C含量。其中M和H在第21~28天的HA-C含量较CK增加了7.64%~37.62%和9.47%~36.96%,增速较快,这反映了M和H在降温阶段促进了HA-C的形成。最终CK、M、H的HA-C含量分别为42.71、51.70、49.29 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,M和H显著高于CK($P<0.05$)。FA-C的变化趋势与腐植酸碳的相似,至堆肥结束,CK、M、H的FA-C含量分别为50.32、49.11、51.61 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,差异不显著,与初期相比分别降低了35.77%、34.81%和40.74%。当腐殖化率 ≥ 7.0 、腐殖化指数 ≥ 3.5 时堆体达到腐熟^[17]。堆肥过程中腐殖化指标变化情况如表2所示,最终CK、M、H的腐殖化率和腐殖化指数分别为21.87、23.91、23.96和10.04、12.26、11.71,均达到腐熟。相比CK,H的腐殖化率提升了9.56%,M的腐殖化指数提高了22.11%。

2.3 堆肥中养分及化学计量的变化

如图4a至图4c所示,3组的TOC含量呈下降趋势,TN和TP含量呈上升趋势。堆肥第14~21天,H的TOC含量下降速率最快,为4.35%,而CK和M只有1.39%和1.14%。堆肥结束时,CK、M、H的TOC含量分别较初始下降了8.06%、10.00%、9.19%,M和H的

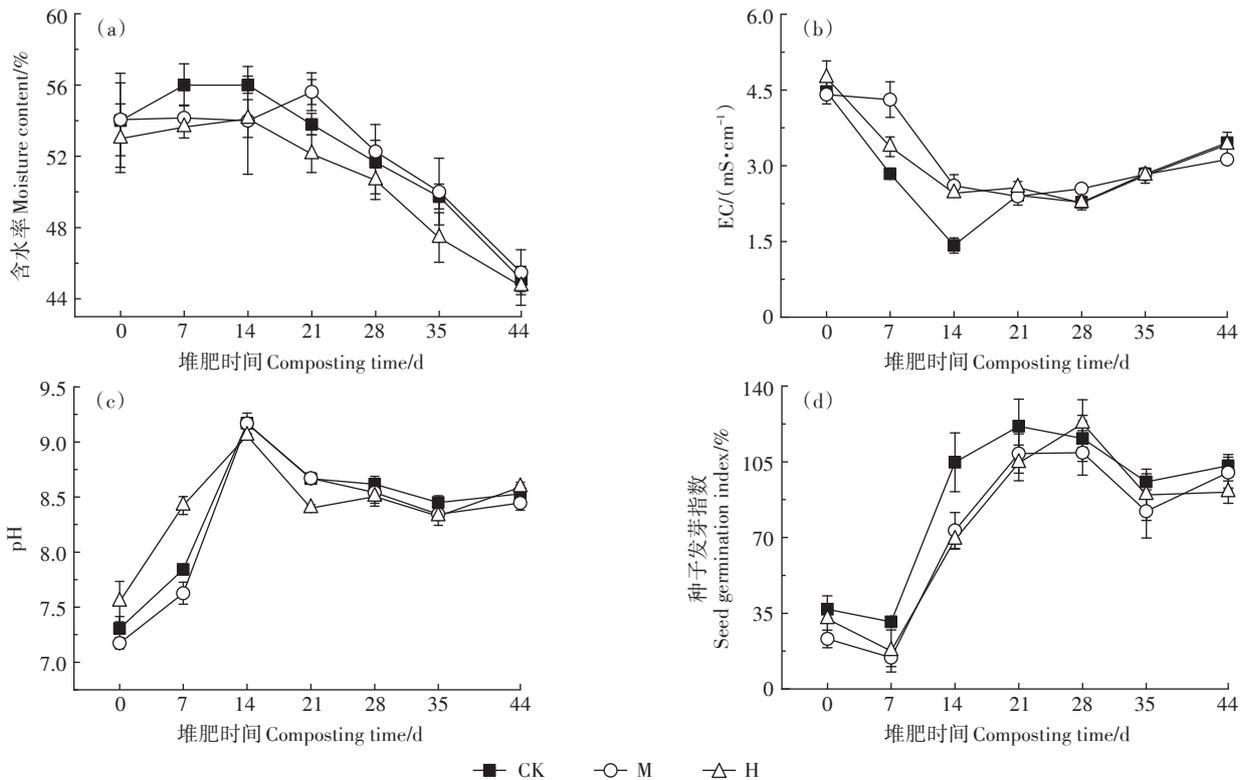


图2 堆肥过程中含水率、pH、EC、种子发芽指数的变化

Figure 2 Changes of moisture content, pH, EC and seed germination index during composting

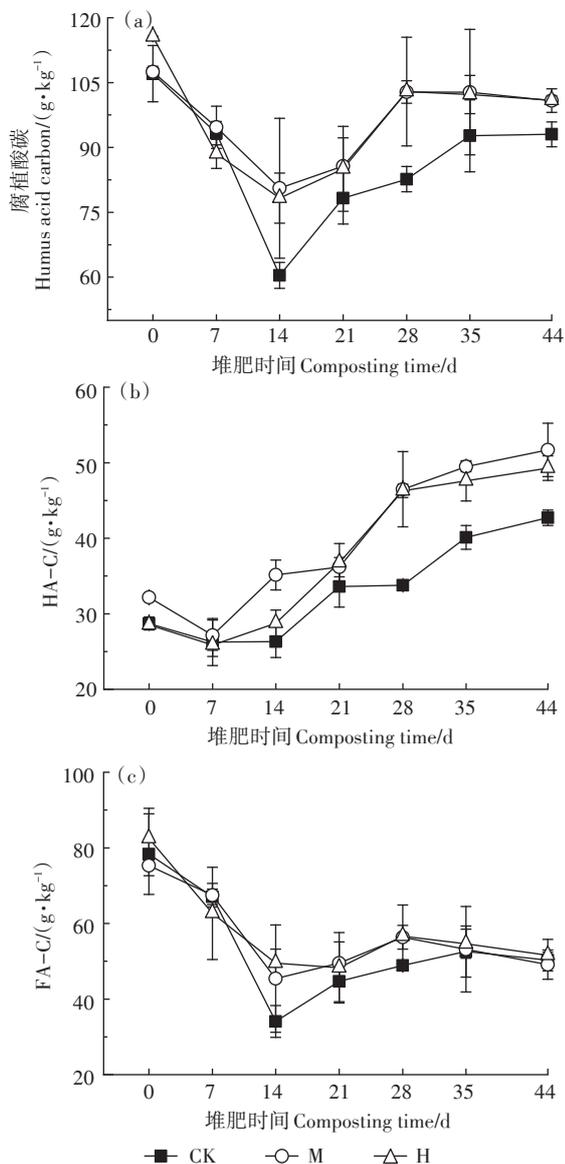


图3 堆肥过程中腐植酸碳及其组分的变化

Figure 3 Changes of humus acid carbon and its components during composting

TOC降解率相比CK分别提高了1.94个和1.13个百分点。CK、M、H初始TN含量分别为15.31、13.50、13.21 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, M和H显著低于CK ($P<0.05$), 7 d后, M和H的TN含量开始高于CK。堆肥结束时, CK、M、H的TN含量较初始分别提升了66.44%、107.28%、116.85%, M和H的TN提升率比CK分别高出40.84个和50.41个百分点, TN含量较CK分别提高了9.81%和12.44%。CK、M、H的TP含量较初始分别提升了54.09%、95.47%、125.49%, M和H的提升速率明显高于CK ($P<0.05$), 分别高出41.38个和70.40个百分点, 最终TP含量较CK分别提高了9.84%和9.04%。

DOC是堆肥中微生物合成自身生命体最直接的

表2 堆肥过程中腐殖化指标变化情况

Table 2 Changes of humification indicators during composting

时间 Time/d	腐殖化率 Humification rate			腐殖化指数 Humification index		
	CK	M	H	CK	M	H
0	23.14	22.94	24.93	6.20	6.86	6.15
7	20.43	20.34	19.30	5.75	5.84	5.64
14	13.39	17.67	17.13	5.83	7.71	6.29
21	17.60	19.01	19.46	7.55	8.02	8.42
28	18.68	23.09	23.92	7.63	10.44	10.76
35	21.52	23.73	24.06	9.32	11.43	11.20
44	21.87	23.91	23.96	10.04	12.26	11.71

碳源,因此容易发生微生物降解^[3]。各组DOC含量在0~14 d内快速下降(图4d),其原因是微生物对易利用碳的快速分解利用,第14~28天, M和H的DOC含量显著高于CK ($P<0.05$),可能与M和H中难降解有机物被降解为小分子可溶性有机物有关。堆肥结束时,各组DOC稳定在11 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 左右,差异不显著。由于有机氮的降解,各组 $\text{NH}_4\text{-N}$ 在第7天稍有提升,之后随着堆肥的进行逐渐降低,最终稳定在0.15 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 左右(图4e),且各组间差异不显著。各组的 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量呈降低趋势(图4f),主要是堆肥中反硝化作用使 $\text{NO}_3\text{-N}$ 转化为 N_2O 挥发所致,35 d之后硝化作用增强, M和H的 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量上升,且显著高于CK ($P<0.05$)。

如图5a所示,第0天,CK、M、H的C:N分别为30.22、34.71、35.10, M和H显著高于CK ($P<0.05$),原因是菇渣本身C:N较高以及高温预处理期间会使一部分氮素以气体形式损失。随着堆肥进行,有机碳的降解速率高于有机氮的降解速率, C:N逐渐降低。第14天,CK、M、H的C:N分别是29.33、27.63、25.25, H下降最快,较第0天下降了28.06%。堆肥结束时各组C:N稳定在15左右, M和H显著低于CK ($P<0.05$)。如图5b所示,第0天, M和H的C:P显著高于CK ($P<0.05$),第21~35天, M的C:P高于其他两组。最终3组的C:P稳定在50左右,且差异不显著。如图5c所示,3组的N:P比值从堆肥开始到结束变化较小,都在3左右, M和H的N:P在整个堆肥期间都高于CK。

2.4 堆肥中胞外酶活性及其化学计量的变化

BG可将寡糖水解成单糖,为微生物提供可利用的底物和能源^[20];NAG可以催化细胞壁主要成分几丁质和肽聚糖的水解^[21],主要用于获取微生物容易利用的N^[22]。LAP能切割蛋白质中的肽键,在蛋白水解中起重要作用^[12]。AP是堆肥过程中参与P循环的主要

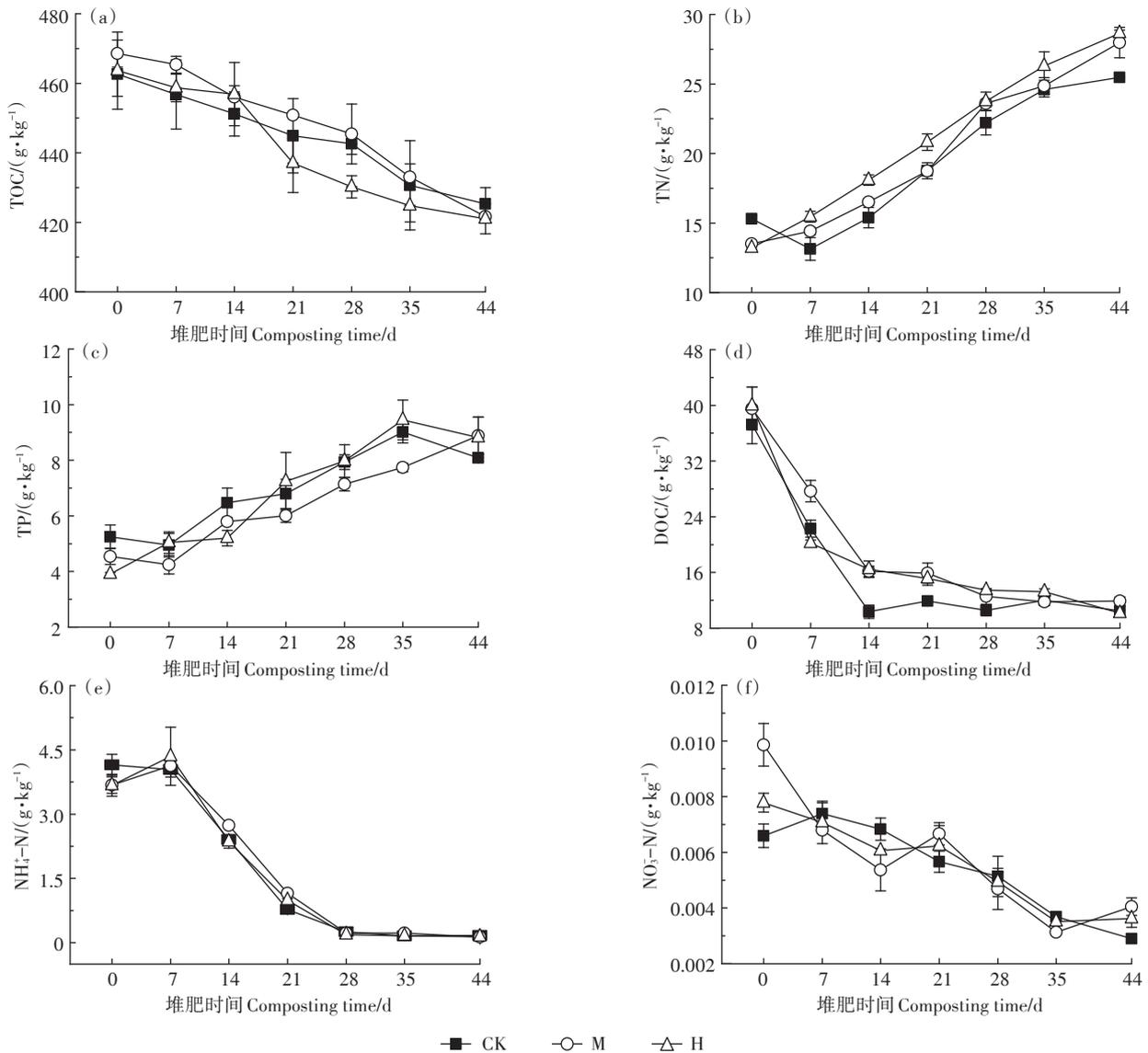


图4 堆肥过程中TOC、TN、TP、DOC、NH₄⁺-N、NO₃⁻-N的变化

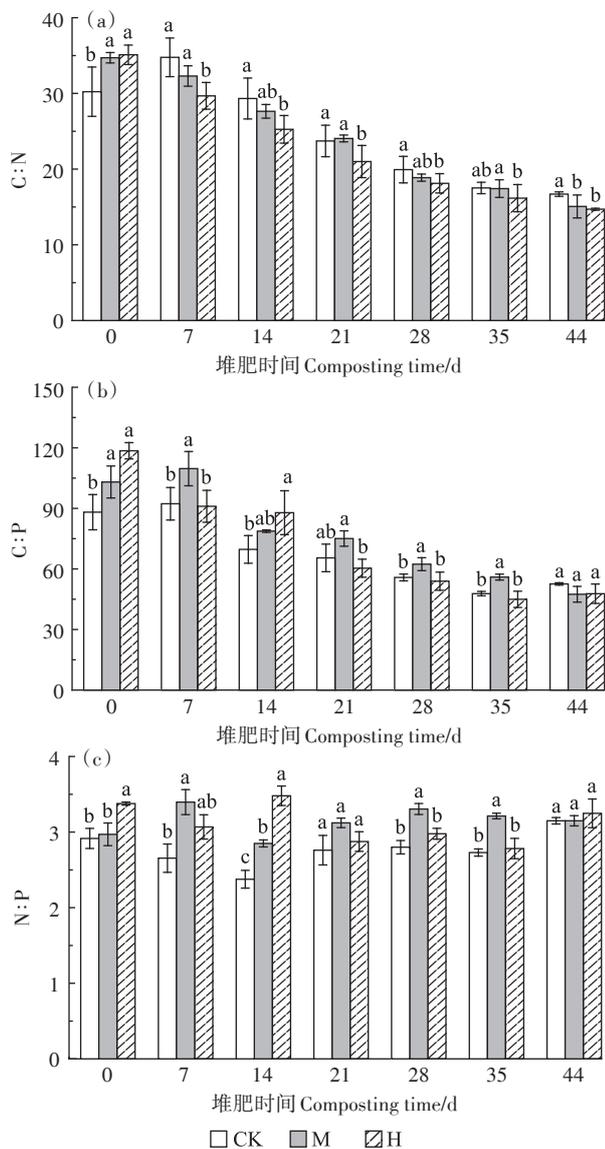
Figure 4 Changes of TOC, TN, TP, DOC, NH₄⁺-N, NO₃⁻-N during composting

磷酸酶,可将有机磷水解成可被植物吸收和代谢的不同形式的磷酸盐^[23]。

从图6可以看出,第0~7天,高温预处理导致H的各种酶活性较CK显著降低($P < 0.05$),而添加菇渣可显著提升各种酶的活性($P < 0.05$)。第14天,CK和M中的AP活性受高温影响较前期略微下降,而H中的不降反升,并从此时到堆肥结束H的AP活性一直高于CK。第14天直至堆肥结束,H的BG活性显著高于其他两组($P < 0.05$),且在高温期时也有较大的活性($1\ 540.15\ \text{nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$),比CK和M分别高8.97%~13.07%和9.82%~44.87%。第14天温度达到56~58℃,各组的NAG活性急剧下降,而LAP活性同时升高,CK、M、H的LAP活性较第0天分别提升了

176.33%、128.48%、368.76%,M和H的LAP活性显著高于CK($P < 0.05$)。第21天直至堆肥结束,3组的NAG活性都较高,除第28天外,其他时间下H的NAG活性显著高于CK($P < 0.05$)。第28~44天,M的LAP活性高于另外两组。

如图7所示,堆肥第0天,CK、M、H的BG:(NAG + LAP)比率分别为1.00、0.74、0.55,BG:AP比率分别为8.63、6.83、4.40,(NAG + LAP):AP比率分别为8.69、9.15、7.96,相比CK,M和H中的微生物受到N和P养分的限制。第14天,M的BG:(NAG+LAP)显著低于CK,(NAG + LAP):AP显著高于CK,与CK相比M中的微生物受到N的限制;H的BG:AP和(NAG+LAP):AP显著低于CK,与CK相比H中的微



不同小写字母表示同一时间的处理间差异显著($P < 0.05$)。下同。
Different letters mean significant difference among different treatments on the same day. The same below.

图5 堆肥过程中化学计量的变化

Figure 5 Changes of stoichiometry during composting

生物受到P的限制。从第21天开始到堆肥结束,3组的BG:(NAG + LAP)、BG:AP、(NAG + LAP):AP比值变化无较大起伏,第44天,CK、M、H的酶促C:N:P活性比为1.00:3.22:0.45、1.00:3.22:0.47、1.00:2.78:0.40,各组间无显著差异。

2.5 腐植酸组分与理化性质、胞外酶活性之间的关系

堆肥理化性质、化学计量、胞外酶活性(蓝色箭头)和腐植酸组分(红色箭头)的冗余分析(RDA)结果如图8所示:HA-C与AP、NAG、LAP呈正相关,与TN、TP、N:P、pH呈正相关,与FA-C、BG、DOC、TOC、C:N、C:P、T、EC、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 呈负相关。

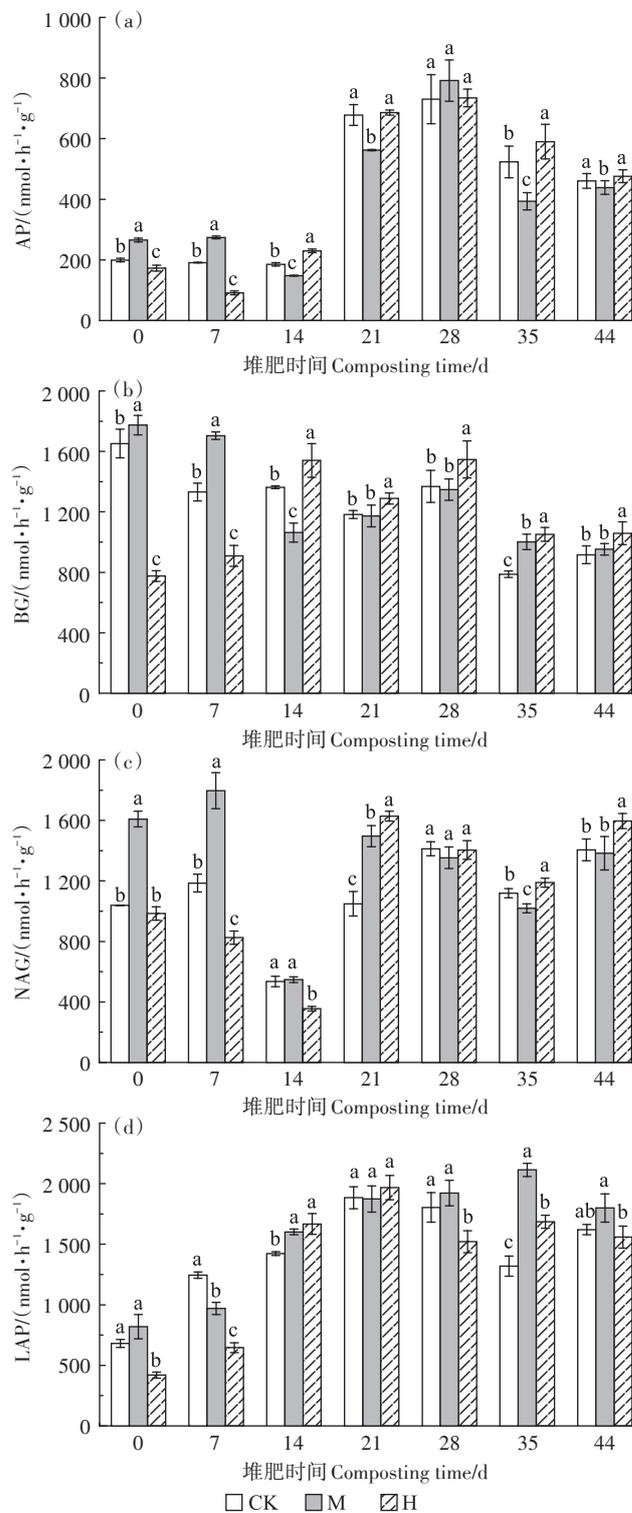


图6 堆肥过程中酶活性的变化

Figure 6 Changes of enzyme activity during composting

根据RDA相关性分析结果构建的结构方程模型(SEMs)如图9所示,可以看出3组化学计量影响相关胞外酶活性进而影响HA-C的形成,3个模型的拟合指数已经满足完美拟合指标的标准($\chi^2/df < 2$, $P > 0.05$, $GFI > 0.950$, $CFI > 0.900$ 以及 $RMSEA < 0.05$)^[24]。3组影

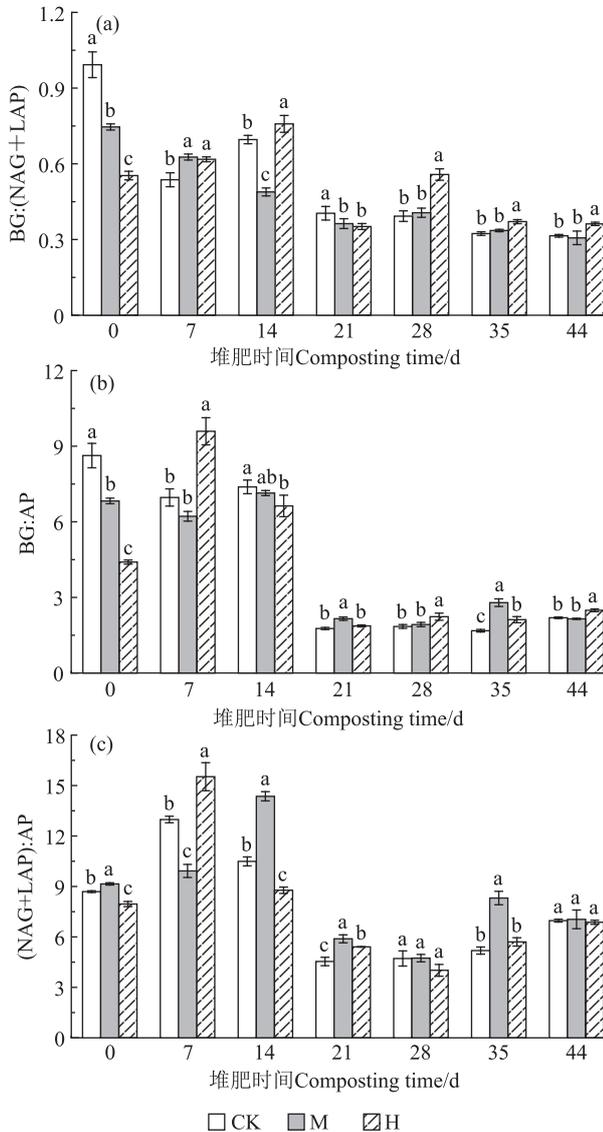


图7 酶化学计量在不同时期的变化

Figure 7 Enzyme stoichiometry in different periods

响HA-C形成的关键胞外酶不同:在CK中,C:N调节BG和AP的活性,从而影响HA-C的生成,C:N、BG和AP都与HA-C的生成呈负相关;在M中,随着堆肥的进行,C:N逐渐降低,LAP活性增强,促进HA-C的生成;同理,在H中,随C:N的降低,AP活性增强,进而促进了HA-C的生成。

3 讨论

3.1 添加菇渣和高温预处理对葡萄枝堆肥腐殖化的影响

本研究3个处理的堆肥在堆制45 d后都达到了无害化卫生标准要求,且添加菇渣和高温预处理促进了葡萄枝堆肥胡敏酸的生成。在堆肥过程中,糖类和氨基酸等腐殖质前体可被微生物降解和转化成腐植

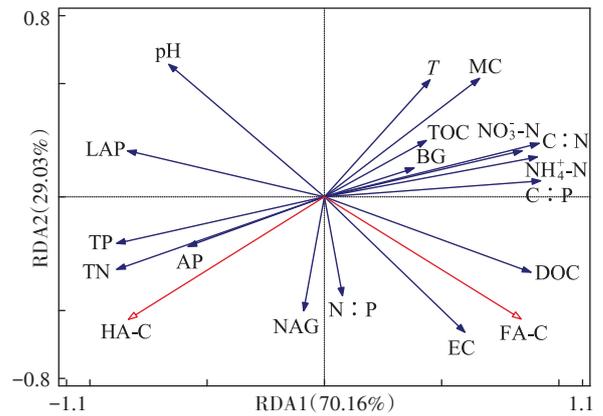
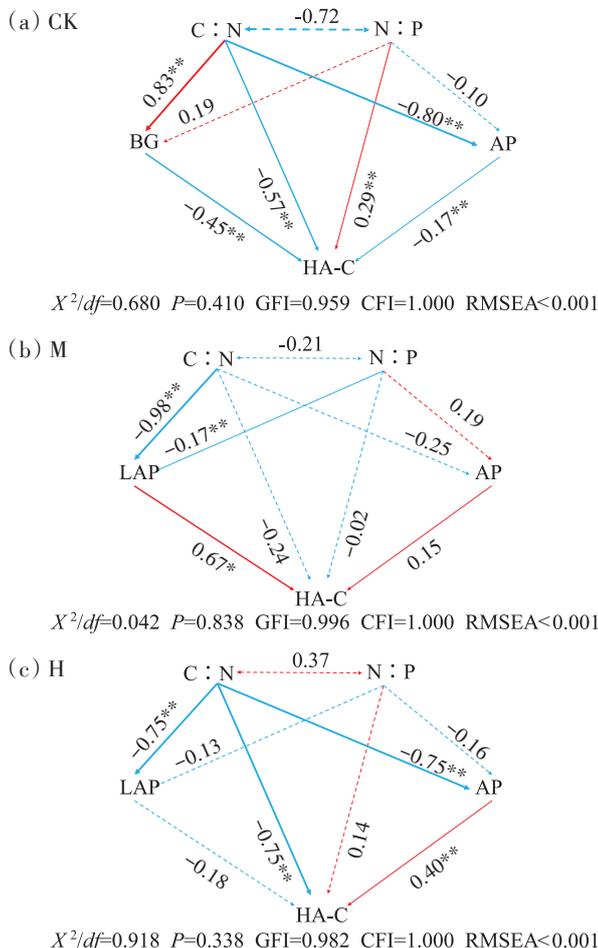


图8 堆肥过程中基本理化性质与腐植酸碳组分的冗余分析

Figure 8 Redundancy analysis of basic physicochemical properties and carbon components of humic acid in composting process

酸,当可利用的有机物不足时,不稳定的腐植酸会被微生物降解,以提供微生物所需的能量^[25]。本研究堆肥化的第7~14天,温度较高,CK的腐植酸碳含量陡降,下降速率为35.26%,而M和H只下降了14.89%和11.57%,且腐植酸中较稳定的组分胡敏酸开始升高,上升速率较CK快,说明在M和H中一些有机碳更多地是转化为胡敏酸而不是被降解,从而提高了堆肥的腐植酸含量。高温预处理可促进堆体中多糖与类蛋白反应产生类腐殖质物质,羧基、羟基和芳核等腐殖质物质也会增多^[26],因此,高温预处理初始和最终的腐植酸含量都较高。菇渣为芳构化和氧化反应提供了丰富的底物,底物中含有大量的纤维结构成分,而且菇渣本身含有较多的腐植酸^[27],因此添加菇渣的堆肥中最终HA-C含量最多。堆肥化第7天,M和H的TN就已经高于CK,说明添加菇渣和高温预处理可以减少堆肥中的N损失,加速TN的浓缩效应。菇渣中的易降解有机物较多,其快速分解导致较多短链脂肪酸累积^[28],从而可中和一部分NH₄-N,减少N素损失,这与Meng等^[9]在污泥堆肥中添加菇渣的研究结果一致。高温预处理会抑制反硝化细菌生长以及产生有机酸降低物料pH而起到保N作用^[29]。研究表明,部分腐植酸的形成是通过含N和含P化合物与其他腐殖质前体的缩合实现的^[30-31]。本试验中,TN、TP与HA-C的含量都是随着堆肥的进行逐渐增加,三者之间存在正相关关系(图8),说明一些有机物分解产生的N、P离子以与其他前体整合的形式被回收,并存在于HA-C中。TN、TP和HA-C的含量同时有效提升,与Jia等^[25]在菇渣堆肥中添加园林废弃物的研究结果一致。这也是添加菇渣和高温预处理可促进胡敏酸



图中的红色和蓝色箭头分别代表正相关和负相关的途径(* $P<0.05$, ** $P<0.01$), 箭头上的数字是标准化的路径系数, 数字大小表示对因果关系的影

响大小。箭头的粗细与标准化路径系数大小成比例。
 The red and blue arrows in the figure represent positively correlated and negatively correlated pathways(* $P<0.05$, ** $P<0.01$), respectively, and the numbers on the arrows are standardized path coefficients, and the number size indicates the magnitude of the effect on causation. The thickness of the arrows is proportional to the size of the normalized path coefficients.

图9 化学计量和胞外酶对HA-C形成的影响

Figure 9 Effects of stoichiometry and extracellular enzymes on the formation of HA-C

生成的原因之一。

3.2 添加菇渣和高温预处理对胞外酶活性的影响

胞外酶是微生物释放的可以降解复杂大分子的蛋白质,参与养分循环并具有重要作用,其活性强弱可以表示养分转化能力的大小^[32]。添加菇渣在堆肥初期可显著提升4种胞外酶的活性。香菇菇渣富含降解纤维素及木质素的真菌^[4],可增加堆肥中有机物的含量,为真菌、细菌等微生物的生长提供了更多更易利用的碳源和氮源,从而使堆肥初期酶活性较高。M的NAG酶活性在堆肥初始达到峰值,可能是由于菇渣中富含真菌菌丝,微生物残余积累的肽聚糖丰

富,死亡的真菌菌丝体通过微生物演替而分解^[33]。由于90℃的高温预处理,H的AP、BG、LAP活性在堆肥初期显著低于其他两组($P<0.05$),可能是因为超高温堆肥衍生出的芳烃比例较高,且酚基碳的强度更高^[34],而酚类物质的浓度增加会导致和养分循环相关的微生物活性的降低^[12]。有机物的分解速率可以用胞外酶活力来表征^[32],各组高温时期只有BG和LAP的活性没有因为高温而明显下降,可能由于此时微生物大量繁殖,纤维素、蛋白质等碳源、氮源快速分解,微生物的同化吸收更需要这两种酶参与,H的4种胞外酶活性在高温期和腐熟期都显著高于CK($P<0.05$),表明高温预处理有助于大分子有机物的降解。各组4种酶的活性都是在第28天开始下降并逐渐稳定,原因是在升温 and 高温阶段,易代谢底物较多,微生物大量繁殖,大分子有机物迅速分解;而在后期,大部分容易利用的有机物已被降解完全,堆体稳定,微生物活性减弱,酶活性降低。此外,酶和腐殖质之间形成的复合物也破坏了酶与底物的相互作用,导致在堆肥后期胞外酶活性降低^[12]。

3.3 堆肥养分和胞外酶活性的化学计量与HA-C生成的关系

化学计量能够有效说明养分限制类型,是反映C、N、P循环以及养分平衡的重要参数^[35]。堆肥C:N是体现堆肥有机物分解速率的指标,比值越高表明有机物的矿化分解速率越慢^[16]。本研究中,从第7天开始到堆肥结束,H的C:N比其他两组都低,尤其在高温期迅速下降,下降速率相比CK高247.41%,也是在同一时期,H的HA-C含量较CK显著上升,表明高温预处理有利于有机物降解矿化和胡敏酸的快速形成。C:P也能在一定程度上反映有机质的矿化速率,通常C:P越低,越利于微生物对有机物的分解,同时提高堆肥全P的含量^[36]。与C:N相同,H的C:P下降速率快,也显示出高温预处理有利于有机物矿化。第14天之前,M和H的C:P高于CK,第14天之后,H的C:P开始低于CK,第44天,M和H的C:P都低于CK。整个堆肥期间,M和H的N:P一直高于CK,M在第7天到第14天的C:P显著高于其他两组($P<0.05$),结合相应时期M的BG:AP较小以及N:P较大,说明M组微生物受环境影响需要分泌更多的AP来满足生长需求,在此期间M中的微生物受到P养分的限制。研究证明,微生物会最大限度地优化自己的储备资源,易利用的底物是提升微生物生物量和分泌胞外酶的基础^[37]。堆肥过程中,当可用的能量和营养物质变得有

限时,微生物就会释放该元素的获取酶,以应对养分供应的变化,从而改变生态酶的化学计量特征^[37]。SEM_s显示(图9),在整个过程中,各组的HA-C含量受不同胞外酶的影响:CK的HA-C含量与BG和AP都呈显著负相关($P < 0.01$)。当BG酶分泌较多时,纤维素和木质素逐渐被分解,而它们的类衍生物是构成腐植酸的核心骨架和主要成分^[17],因此不利于胡敏酸聚合。M的HA-C含量与LAP呈显著正相关($P < 0.05$),在H中HA-C含量和AP呈显著正相关($P < 0.01$)。即在M和H中产生的微生物N和P限制会提高蛋白质、有机磷降解酶的活性,导致N和P矿化增加,以应对N、P限制,矿化后的物质有利于合成胡敏酸:如 $\text{NH}_4\text{-N}$ 可通过非生物途径作为前体直接参与胡敏酸的生成^[38];P和腐植酸、胡敏酸之间可以整合,整合产物还能促进P的溶解度和生物利用率^[31]。从图7可以看出,BG:(NAG + LAP)、BG:AP、(NAG + LAP):AP的值都是在第21天之前变化较大,与CK相比此时M和H中的微生物受到的养分限制较大,第21天之后比值减小并稳定,也是因为前期有机质降解,组分变化快,难以降解的大分子有机物需要微生物分泌相应的胞外酶来降解。

4 结论

(1)葡萄枝鸡粪好氧堆肥高温期($>50\text{ }^\circ\text{C}$)持续10 d以上,种子发芽指数均达到70%以上,满足堆肥无害化和腐熟标准。添加菇渣(M)和高温预处理(H)改变了堆肥基质的特性,加速了有机质降解,提升了养分含量,促进了腐殖化。堆肥第44天,M和H的TN提升率相比CK提高了40.84个和50.41个百分点,TP含量提升率相比CK提高了41.38个和71.40个百分点、TOC含量的降解率分别比CK提高了1.94个和1.13个百分点;相比CK,H的腐殖化率提升了9.56%,M的腐殖化指数提升了22.11%。

(2)添加菇渣和高温预处理影响了参与C、N、P循环功能的酶的活性和化学计量,显著提升了4种胞外酶的活性:M组在第0~7天胞外酶活性较高,H组在第14~44天胞外酶活性较高,以应对N和P养分的限制,降解更多的大分子有机物,提升N和P的含量,有利于胡敏酸的生成,进而提升了胡敏酸的含量。

参考文献:

[1] SUN X Y, WEI X F, ZHANG J X, et al. Biomass estimation and physicochemical characterization of winter vine prunings in the Chinese and global grape and wine industries[J]. *Waste Management*, 2020, 104:

119-129.
 [2] ÇETIN E S, ALTINÖZ D, TARÇAN E, et al. Chemical composition of grape canes[J]. *Industrial Crops and Products*, 2011, 34(1):994-998.
 [3] 姜继韶, 党森, 王攀, 等. 过磷酸钙和腐烂苹果联合添加对猪粪堆肥过程中碳素转化和腐熟的影响[J]. *环境科学学报*, 2018, 38(11):4422-4430. JIANG J S, DANG S, WANG N, et al. Influences of calcium superphosphate, rotten apples and their mixture on organic matter transformation and compost maturity during pig manure composting[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2018, 38(11):4422-4430.
 [4] 夏金利, 王岩, 董春玲, 等. 不同促腐菌剂对园林废弃物堆肥理化性质和优势微生物群落的影响[J]. *河南农业大学学报*, 2021, 55(3):551-560. XIA J L, WANG Y, DONG C L, et al. Effects of different microbial inoculants on the physical and chemical properties and dominant microbial communities in the composting process of garden waste[J]. *Journal of Henan Agricultural University*, 2021, 55(3):551-560.
 [5] HUANG Y, L D, SHAH G M, et al. Hyperthermophilic pretreatment composting significantly accelerates humic substances formation by regulating precursors production and microbial communities[J]. *Waste Management*, 2019, 92:89-96.
 [6] WILSON C A, NOVAK J T. Hydrolysis of macromolecular components of primary and secondary wastewater sludge by thermal hydrolytic pretreatment[J]. *Water Research*, 2009, 43(18):4489-4498.
 [7] TANG Y F, DONG B, DAI X H. Hyperthermophilic pretreatment composting to produce high quality sludge compost with superior humification degree and nitrogen retention[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 429:132247.
 [8] MENG L Q, LI W G, ZHANG X C, et al. Influence of spent mushroom substrate and molasses amendment on nitrogen loss and humification in sewage sludge composting[J]. *Heliyon*, 2020, 6(9):e04988.
 [9] MENG L Q, ZHANG S M, GONG H N, et al. Improving sewage sludge composting by addition of spent mushroom substrate and sucrose[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 253:197-203.
 [10] WANG H Y, FAN B Q, HU Q X, et al. Effect of inoculation with *Penicillium expansum* on the microbial community and maturity of compost[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(24):11189-11193.
 [11] YANG Y, LIANG C, WANG Y Q, et al. Soil extracellular enzyme stoichiometry reflects the shift from P- to N-limitation of microorganisms with grassland restoration[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2020, 149:107928.
 [12] WANG N Y, REN L H, ZHANG J C, et al. Activities of functional enzymes involved in C, N, and P conversion and their stoichiometry during agricultural waste composting with biochar and biogas residue amendments[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 345:126489.
 [13] 李旺旺, 刘燕, 李国学, 等. 菌剂和含磷添加剂联合添加对污泥堆肥污染气体排放及堆肥品质的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2022, 41(4):878-887. LI W W, LIU Y, LI G X, et al. The effect of microbial agent and phosphorus-containing additives on compost maturity and pollutant gas emissions during sewage sludge composting[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2022, 41(4):878-887.
 [14] CHEN M L, HUANG Y M, WANG C, et al. The conversion of organic nitrogen by functional bacteria determines the end-result of ammonia in compost[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 299:122599.
 [15] WU J Q, ZHAO Y, ZHAO W, et al. Effect of precursors combined with bacteria communities on the formation of humic substances during different materials composting[J]. *Bioresource Technology*, 2017,

- 226:191-199.
- [16] 姚宏佳, 王宝荣, 安韶山, 等. 黄土高原生物结皮形成过程中土壤胞外酶活性及其化学计量变化特征[J]. 干旱区研究, 2022, 39(2): 456-468. YAO H J, WANG B R, AN S S, et al. Variation in soil extracellular enzyme activities stoichiometry during biological soil crust formation in the Loess Plateau[J]. *Arid Zone Research*, 2022, 39(2): 456-468.
- [17] BERNAL M P, ALBURQUERQUE J A, MORAL R. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment: a review[J]. *Biorescience Technology*, 2009, 100(22): 5444-5453.
- [18] HUANG B, WANG J, HAN X B, et al. The relationship between material transformation, microbial community and amino acids and alkaloid metabolites in the mushroom residue-prickly ash seed oil meal composting with biocontrol agent addition[J]. *Biorescience Technology*, 2022, 350: 126913.
- [19] 陈文旭, 李国学, 马若男, 等. Fe_2O_3 对鸡粪堆肥过程中含硫臭气排放的影响[J]. 农业环境科学学报, 2021, 40(11): 2465-2471. CHEN W X, LI G X, MA R N, et al. Effect of Fe_2O_3 on the emission of sulfur-containing odor during chicken manure composting[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2021, 40(11): 2465-2471.
- [20] 梁超, 朱雪峰. 土壤微生物碳泵储碳机制概论[J]. 中国科学: 地球科学, 2021, 51(5): 680-695. LIANG C, ZHU X F. The soil microbial carbon pump as a new concept for terrestrial carbon sequestration [J]. *Scientia Sinica(Terrae)*, 2021, 51(5): 680-695.
- [21] 刘力睿, 潘杰, 李猛. 微生物几丁质酶的研究进展、应用及展望[J]. 生物资源, 2020, 42(5): 494-504. LIU L R, PAN J, LI M. Recent research progress, application and future perspectives on microbial chitinases[J]. *Biotic Resources*, 2020, 42(5): 494-504.
- [22] 吴秀芝, 阎欣, 王波, 等. 荒漠草地沙漠化对土壤-微生物-胞外酶化学计量特征的影响[J]. 植物生态学报, 2018, 42(10): 1022-1032. WU X Z, YAN X, WANG B, et al. Effects of desertification on the C:N:P stoichiometry of soil, microbes, and extracellular enzymes in a desert grassland[J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2018, 42(10): 1022-1032.
- [23] ALBRECHT R, PETIT J L, CALVERT V, et al. Changes in the level of alkaline and acid phosphatase activities during green wastes and sewage sludge co-composting[J]. *Biorescience Technology*, 2010, 101(1): 228-233.
- [24] CHEN M L, WANG C, WANG B R, et al. Enzymatic mechanism of organic nitrogen conversion and ammonia formation during vegetable waste composting using two amendments[J]. *Waste Management*, 2019, 95: 306-315.
- [25] JIA P H, HUANG Y M, CHEN M L, et al. Comprehensive evaluation of spent mushroom substrate-chicken manure co-composting by garden waste improvement: physicochemical properties, humification process, and the spectral characteristics of dissolved organic matter[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2023, 30(4): 8987-8997.
- [26] 曹云, 黄红英, 吴华山, 等. 畜禽粪便超高温堆肥产物理化性质及其对小白菜生长的影响[J]. 农业工程学报, 2018, 34(12): 251-257. CAO Y, HUANG H Y, WU H S, et al. Physico-chemical properties of hyperthermophilic composting from livestock manures and its effects on growth of Chinese cabbage[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2018, 34(12): 251-257.
- [27] KONG Y L, MA R N, LI G X, et al. Impact of biochar, calcium magnesium phosphate fertilizer and spent mushroom substrate on humification and heavy metal passivation during composting[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 824: 153755.
- [28] 李永双, 孙波, 陈菊红, 等. 纳米膜覆盖对畜禽粪便好氧堆肥进程及恶臭气体排放的影响[J]. 环境科学, 2021, 42(11): 5554-5562. LI Y S, SUN B, CHEN J H, et al. Effects of nano-membrane on aerobic composting process and odor emission of livestock manure[J]. *Environmental Science*, 2021, 42(11): 5554-5562.
- [29] 曹云, 黄红英, 孙金金, 等. 超高温预处理对猪粪堆肥过程碳氮素转化与损失的影响[J]. 中国环境科学, 2018, 38(5): 1792-1800. CAO Y, HUANG H Y, SUN J J, et al. Effect of hyperthermophilic pretreatment on transformation and losses of C and N during pig manure composting[J]. *China Environmental Science*, 2018, 38(5): 1792-1800.
- [30] WU J Q, WEI Z M, ZHU Z C, et al. Humus formation driven by ammonia-oxidizing bacteria during mixed materials composting[J]. *Biorescience Technology*, 2020, 311: 123500.
- [31] ZHANG T, WU X S, SHAHEEN S M, et al. Improving the humification and phosphorus flow during swine manure composting: a trial for enhancing the beneficial applications of hazardous biowastes[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 425: 127906.
- [32] 左宜平, 张馨月, 曾辉, 等. 大兴安岭森林土壤胞外酶活力的时空动态及其对潜在碳矿化的影响[J]. 北京大学学报(自然科学版), 2018, 54(6): 1311-1324. ZUO Y P, ZHANG X Y, ZENG H, et al. Spatiotemporal dynamics of soil extracellular enzyme activity and its influence on potential mineralization rate of soil organic carbon in forests of Daxing'an Mountain range[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis*, 2018, 54(6): 1311-1324.
- [33] CHEN R R, BLAGODATSKAYA E, SENBAYRAM M, et al. Decomposition of biogas residues in soil and their effects on microbial growth kinetics and enzyme activities[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2012, 45: 221-229.
- [34] CAO Y, WANG J D, HUANG H Y, et al. Spectroscopic evidence for hyperthermophilic pretreatment intensifying humification during pig manure and rice straw composting[J]. *Biorescience Technology*, 2019, 294: 122131.
- [35] 高丽倩, 赵允格, 许明祥, 等. 生物土壤结皮演替对土壤生态化学计量特征的影响[J]. 生态学报, 2018, 38(2): 678-688. GAO L Q, ZHAO Y G, XU M X, et al. The effects of biological soil crust succession on soil ecological stoichiometry characteristics[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2018, 38(2): 678-688.
- [36] WANG H, HU G Q, XU W H, et al. Effects of nitrogen addition on soil organic carbon mineralization after maize stalk addition[J]. *European Journal of Soil Biology*, 2018, 89: 33-38.
- [37] LUO L, MENG H, GU J D. Microbial extracellular enzymes in biogeochemical cycling of ecosystems[J]. *Journal of Environmental Management*, 2017, 197: 539-549.
- [38] WU J Q, ZHAO Y, WANG F, et al. Identifying the action ways of function materials in catalyzing organic waste transformation into humus during chicken manure composting[J]. *Biorescience Technology*, 2020, 303: 122927.

(责任编辑:李丹)