

复合菌剂提高果树枝条堆肥过程中酶活性

史龙翔¹, 谷洁^{1*}, 潘洪加¹, 张凯煜², 殷亚楠¹,
赵听², 王小娟¹, 高华¹

(1. 西北农林科技大学资源环境学院, 杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学理学院, 杨凌 712100)

摘要:为了探讨接种复合菌剂对果树枝条堆肥过程的影响,以猪粪和果树枝条为试验材料,研究了复合菌剂对高温好氧堆肥过程的温度、酶活性及微生物群落功能多样性的影响。结果表明,接种复合菌剂在堆肥前期提高堆肥温度,比对照处理高温期(高于55℃)持续时间多3d,促进堆料的腐熟。接种菌剂还能有效地提高果树枝条堆肥过程中酶活性,纤维素酶、漆酶、锰过氧化物酶和木质素过氧化物酶活性在堆肥过程中分别比CK处理提高15.0%~19.8%、1.0%~11.0%、4.1%~26.8%、4.0%~22.2%。Biolog微平板法测定结果表明,接种复合菌剂显著提高了堆肥中微生物的平均每孔颜色变化率(average well color development),并改变了高温期和降温期微生物对6大类碳源的利用;主成分分析表明,复合菌剂主要在高温期发挥作用,对堆料中微生物起分异作用的碳源主要为糖类和氨基酸类。

关键词:堆肥;酶;菌;果树枝条;酶活性;微生物功能多样性

doi: 10.3969/j.issn.1002-6819.2015.05.034

中图分类号: X71

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2015)-05-0244-08

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]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2015, 31(5): 244—251. (in Chinese with English abstract)

0 引言

近年来,随着果品产业的大面积扩展,果树枝条的修剪量也逐年增加,果树枝条不仅堆放占用大面积的土地,焚烧造成环境污染,而且还浪费了宝贵的生物资源。目前,堆肥化处理是较为普遍且有效地处理有机固体废弃物以及畜禽粪便的方法之一^[1]。传统的堆肥方式存在发酵周期长、效率低,成品肥效低等缺点^[2-3]。寻求高效的腐解菌剂以促进有机质分解,缩短发酵周期,提高堆肥质量,成为当今的研究热点之一。匡石滋等^[4]发现通过在香蕉茎秆堆肥中接入复合菌剂可以增加堆体中微生物总数,加速堆体升温,并延长高温持续时间。王玉军等^[5]用鸡粪和玉米秸秆进行高温好氧堆肥发现添加复合菌剂有利于提高发酵温度和有机物料的分解速度,促进发酵腐熟。由于果树枝条中含有大量的较难降解的纤维素类和木质素类物质,目前有关微生物菌剂在果树枝条堆肥中的应用研究却鲜有报道。

堆肥过程中微生物通过分泌酶对较难降解的纤维

素、木质素类等大分子物质进行分解转化、合成腐殖质和产生植物生长生理活性的物质,其酶活性反映了堆肥中微生物数量、活动强度变化以及堆肥进程变化^[3]。有研究表明^[6-7],降解纤维素的生物酶主要是纤维素酶,木质素降解相关的生物酶主要包括细胞外过氧化物酶(锰过氧化物酶和木质素过氧化物酶)和细胞外酚氧化酶(漆酶),他们组成了一个木质素降解酶系。有研究发现^[8-9],在堆肥过程中添加有机物或接种微生物菌剂对碳源的利用有非常大的影响,然而,研究碳源的利用可以揭示木质素分解酶在堆肥过程中的效果,Biolog微平板法对分析堆肥过程中碳源的利用是有效的^[10],该方法可以通过测定微生物对不同碳源的利用情况,反映微生物群落结构和多样性的变化^[11]。因此,研究堆肥化过程中各种生物酶活性的变化以及微生物功能多样性的变化对于了解堆肥腐熟程度有着非常重要的价值。本文通过研究接种复合菌剂对果树枝条堆肥过程中纤维素酶、漆酶、锰过氧化物酶和木质素过氧化物酶活性及微生物群落功能多样性的影响,以期为微生物菌剂在果树枝条堆肥化的应用提供参考依据和理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

堆肥原料为苹果树枝条和猪粪,基本性质见表1。其中猪粪取自陕西省杨凌示范区五星村农户小型养殖场,果树枝条取自陕西省洛川县西北农林科技大学苹果试验站,粉碎果树枝条为1~2 cm的碎片。

收稿日期: 2014-11-19 修订日期: 2015-01-31

基金项目: 国家自然科学基金(No.4087119, 41171203); 公益性行业(农业)科研专项(201303094); 陕西省重大攻关项目(2011KTZB02-02)。

作者简介: 史龙翔,男,甘肃定西人,从事农业固体废弃物的资源化利用研究。杨凌 西北农林科技大学资源环境学院, 712100。

Email: 15109238060@163.com。

*通信作者: 谷洁,男,陕西周至人,研究员,博士生导师,主要从事环境微生物及农业固体废弃物的资源化利用研究。杨凌 西北农林科技大学资源环境学院, 712100。Email: gujoyer@sina.com。

表1 堆肥所用原材料的基本理化性质(烘干样)

Table 1 Physical and chemical properties of raw materials for composting (oven-dried base)

堆肥原料 Raw materials	含水率 Moisture content/%	总碳 Total carbon/(g·kg ⁻¹)	总氮 Total nitrogen/(g·kg ⁻¹)	C/N
猪粪 Pig manure	14.4	403.5	28	14.4
苹果树枝 条 Apple branches	16.9	502.9	3.4	147.9

1.2 微生物复合菌剂

复合菌剂由本课题组研制获得, 主要包括具有纤维素、木质素降解能力的罗尔斯通菌(*Ralstonia sp.*)、青霉菌(*Penicillium sp.*)、黄灰青霉菌(*Penicillium aurantioqriseum*)和支顶孢菌(*Acremonium alternatum*), 采用液态接种体, 将以上菌株等比例接种于50 mL蛋白胨纤维素液体培养基(peptone cellulose solution)(5 g/L蛋白胨, 5 g/L NaCl, 2 g/L CaCO₃, 1 g/L酵母粉, 1 cm×6 cm新华滤纸条, 蒸馏水1 000 mL), 30℃, 180 r/min摇床培养5 d, 制成活菌数达10⁸ CFU/mL数量级的菌液, 用于堆肥接种菌剂。

1.3 试验方法

试验于2014年4月29日至5月27日在西北农林科技大学资环学院堆肥试验场进行。把粉碎后长度为1~2 cm的果树枝条碎片与猪粪混匀, 调节初始C/N比为30:1, 含水率为60%。试验设2个处理, T处理是以质量比为2%的接种量接种复合菌剂, CK处理不添加菌剂。将堆料充分混匀后装入内长×宽×高为38 cm×33 cm×33 cm, 壁厚4 cm的塑料泡沫盒, 并定时进行翻堆以保证供氧和堆料腐熟一致。分别在堆肥的第1、2、7、10、16、22、29天从堆肥装置的上、中、下部采样混匀, 4℃保存, 用于测定酶活性及微生物群落功能多样性。

1.4 项目测定与方法

1.4.1 堆体温度

在塑料泡沫盒侧面开有通风孔, 并在上中下位置插有温度计。每日10:00时读取堆体各层温度, 取平均值作为堆体温度。

1.4.2 腐熟指标

种子发芽指数(germination index, GI)的测定: 样品与蒸馏水按1:10比例充分混合, 取10 mL滤液以3 000 r/min离心10 min, 吸取5 mL上清液于铺有滤纸的培养皿中, 放置30粒上海青种子, 用蒸馏水作为对照, 3个重复, 30℃培养2 d, 计算种子的发芽率, 并用游标卡尺测量种子的根长。根据下列公式, 计算种子的发芽指数(GI): GI(%)=[(堆肥浸提液种子发芽率×种子根长)/(蒸馏水种子发芽率×种子根长)]×100%。

pH值通过1:5固液比浸提液测定; 全氮采用凯氏定氮法; 有机碳采用重铬酸钾氧化法^[12]。

1.4.3 酶活性

纤维素酶活性的测定参照关松荫的方法^[13], 在样品中加入羧甲基纤维素钠后培养, 使羧甲基纤维素在纤维素酶作用下水解成葡萄糖, 测定葡萄糖生成量以表征纤维素酶

活性, 活性单位用mg/(g·d)表示。漆酶(laccase)测定采用ABTS法^[14], 将1 min氧化1 μmol ABTS所需的酶量定义为一个酶活单位。锰过氧化物酶(manganese peroxidase)测定采用二价锰氧化分光光度法^[15], 将1 min氧化1 μmol MnSO₄所需的酶量定义为一个酶活单位。木质素过氧化物酶(lignin peroxidase)测定采用黎芦醇法^[16], 将1 min氧化1 μmol黎芦醇所需的酶量定义为一个酶活单位。

1.4.4 微生物群落功能多样性

微生物群落功能多样性采用Biolog ECO生态测试板测定。分别从第1天(升温期)、第2天(高温期)、第16天(降温期)的各处理堆肥中多点取样, 具体操作步骤参照徐杰等的方法^[17]。

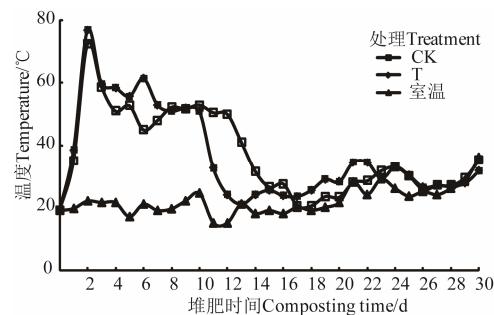
1.5 数据处理与分析

平均每孔颜色变化率(average well color development, AWCD)的计算公式为: AWCD=Σ(C_i-R)/31, 式中, C_i为各反应孔在590 nm下的光密度值; R为ECO板对照孔A1的光密度值; C_i-R小于0的孔, 计算中记为0, 即:C_i-R≥0。选取4 d的数据采用Microsoft Excel 2003进行处理与制图, 利用DPS v7.05进行差异性显著性分析, 差异显著性检验采用最小显著性差异检验法(LSD)(P<0.05)。主成分分析采用SPSS(16.0)软件完成。

2 结果与分析

2.1 复合菌剂对堆肥过程中温度的影响

温度在一定程度上可以直观反映堆肥的进程与腐熟程度, 同时也影响堆肥中微生物的数量和生物活性, 它是控制堆肥过程的一个重要参考指标^[18]。如图1所示, 堆体经历了快速升温、持续高温、降温和腐熟稳定4个阶段。堆肥第1天, 堆体温度均较低; 从第2天开始, 堆肥中微生物开始分解并利用堆料中的有机质进行增殖, 同时释放大量的热量, 堆体温度迅速升高, T处理和CK处理分别达到77.0和72.5℃, 且T处理在高温期(高于55.0℃)持续时间比CK处理长3 d; 从第10天开始, 随着堆肥的进行以及有机物的降解, 微生物数量逐渐减少, 代谢活动减弱^[19], 堆体温度不断下降, 堆肥到了降温期; 至堆肥第30天, 堆体温度达到室温, 堆肥进入腐熟阶段。



注: CK为没有接种复合菌剂处理, T为接种复合菌剂处理。

Note: CK is the treatment without compound microorganism agent, T is the treatment with compound microorganism agent.

图1 堆肥过程中温度的变化趋势

Fig.1 Changes of temperature during composting

2.2 堆肥腐熟指标

种子发芽指数被认为是最敏感、最可靠的堆肥腐熟

度评价指标。一般认为,当 GI 大于 80%时,就可以判定堆肥已腐熟^[20]。腐熟堆肥的 pH 值一般在 8.0~9.0^[21]。C/N 是评价堆肥腐熟度比较直观的化学指标,当堆肥产品的 C/N 低于 20 时堆肥可以被认为达到基本腐熟^[22]。由 GI、C/N 和 pH 值可知(表 2),在堆肥结束时,CK 处理和 T 处理均达到腐熟要求,且 T 处理的种子发芽指数显著高于 CK 处理($P<0.05$),说明添加微生物菌剂可以提高堆肥腐熟程度。CK 处理和 T 处理的 pH 值由初始的 9.1 和 9.0 降为 8.2 和 8.1,两处理间 pH 值的变化差异不显著。C/N 由初始的 30 分别降为 18.5 和 17.5,说明经过添加复合菌剂堆肥化处理后,使得堆肥的 pH 值和 C/N 降低,促进堆料的腐熟。

表 2 堆肥腐熟指标

Table 2 Compost maturity indicators

处理 Treatment	发芽指数 Germination index/%	C/N	pH 值 pH values
CK	83.3 ± 0.01b	18.5 ± 0.02a	8.2 ± 0.07a
T	89.8 ± 0.00a	17.3 ± 0.06b	8.1 ± 0.03a

2.3 堆肥过程中复合菌剂对酶活性的影响

2.3.1 堆肥过程中复合菌剂对纤维素酶活性的影响

纤维素是农业废弃物中一种较难分解的成分,它可在纤维素酶作用下水解为纤维二糖,进而水解为葡萄糖。纤维素酶是碳循环中的一个重要酶,其活性变化可以反映堆肥过程中碳素物质的降解情况^[19]。堆肥过程中纤维素酶活性变化如图 2 所示,T 处理和 CK 处理纤维素酶活性均呈现先升高后下降的趋势。其中堆肥初期,各类微生物活跃,纤维素酶活性不断上升,T 处理和 CK 处理均在第 7 天达到峰值,分别为 0.96 和 0.75 mg/(g·d);随着堆肥的进行,纤维素酶活性急剧下降,这可能是因为纤维素的主要分解菌真菌不耐高温,大量死亡所致^[18];进入降温期后,各处理酶活性随着温度的降低而降低,最终趋于稳定。CK 处理的纤维素酶活性在整个堆肥过程中均低于 T 处理,且在堆肥的第 7 天和第 29 天与 T 处理形成显著性差异。说明添加复合菌剂对纤维素酶活性具有提高作用。

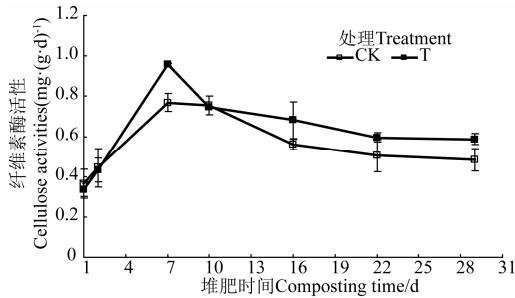


图 2 堆肥过程中纤维素酶活性的变化

Fig.2 Changes of cellulose activities during composting

2.3.2 堆肥过程中复合菌剂对漆酶活性的影响

漆酶是含铜的多酚氧化酶,在木质素降解中起氧化、脱甲基、解聚等作用^[23]。由图 3 可以看出,CK 处理和 T 处理的漆酶活性变化趋势一致,为先增大后减小的趋势。

在堆肥第 1 天,T 处理和 CK 处理的漆酶活性差异不显著($P>0.05$)且酶活性较低,这可能是因为堆料中本身存在较易降解的小分子有机质进行降解,使得其先于木质纤维素类难降解的大分子物质被微生物所降解利用^[23]。漆酶活性在进入高温期后,T 处理和 CK 处理漆酶活性不断地升高,均在第 7 天达到了最大值,分别为 72.6 和 70.0 U/g。随着堆肥时间的延续,接种菌剂处理的漆酶活性均显著高于 CK 处理($P<0.05$)。而降温期时,漆酶活性逐渐下降,这可能与堆肥后期有机质转化速度降低有关。

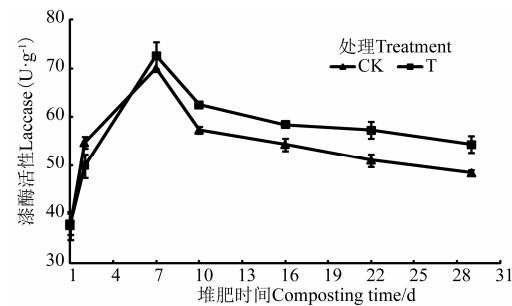


图 3 堆肥过程中漆酶活性的变化

Fig.3 Changes of Laccase activities during composting

2.3.3 堆肥过程中复合菌剂对锰过氧化物酶活性的影响

锰过氧化物酶在 O₂ 的参与下,依靠自身形成的 H₂O₂,触发启动一系列自由基链反应,对木质素进行氧化的过程^[24]。堆肥过程中锰过氧化物酶活性变化如图 4 所示,T 处理的锰过氧化物酶活性在堆肥升温期至高温初期不断上升,于第 2 天达到酶活峰值(927.2 U/g)且显著高于 CK 处理($P<0.05$),而 CK 处理在第 7 天达到峰值。然而随着堆肥的进行,两处理的锰过氧化物酶活性随着堆体温度的降低而降低。但是在堆肥第 22 天,两处理的锰过氧化物酶活性均有小幅的升高,可能与堆肥后期氮素含量增加有关^[23]。在整个堆肥过程中,除了第 1 天和第 29 天,添加菌剂堆体的锰过氧化物酶活性显著高于 CK 处理($P<0.05$),说明外加复合菌剂可以更有效地促进木质纤维素的降解。

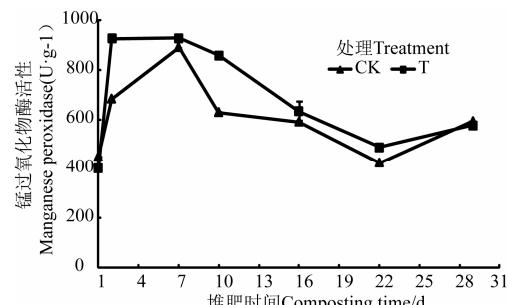


图 4 堆肥过程中锰过氧化物酶活性的变化

Fig.4 Changes of manganese peroxidase activities during composting

2.3.4 堆肥过程中复合菌剂对木质素过氧化物酶活性的影响

木质素过氧化物酶被称为木质素酶,是一类亚铁血红素的过氧化物酶,对木质素底物有催化氧化作用^[25]。由图

5 可知, 两处理木质素过氧化物酶的变化趋势和纤维素酶、漆酶活性的变化趋势一致, 即呈先增大后减小的趋势。其中在堆肥第 1 天, CK 处理的木质素过氧化物酶活性显著高于 T 处理 ($P<0.05$) ; 随着堆肥温度的升高, T 处理的木质素过氧化物酶活性在第 2、7、10、16、22 天显著高于 CK 处理 ($P<0.05$), 并且 T 处理和 CK 处理均在第 2 天达到最大值, 分别为 762.4 和 732.0 U/g; 在降温期, 木质素过氧化物酶活性逐渐降低。但在堆肥第 22 天, CK 处理的木质素过氧化物酶活性有所增加, 在第 29 天显著高于 T 处理 ($P<0.05$), 可能是因为堆肥后期 C/N 比的降低诱导木质素过氧化物酶的分泌所致^[26-27]。

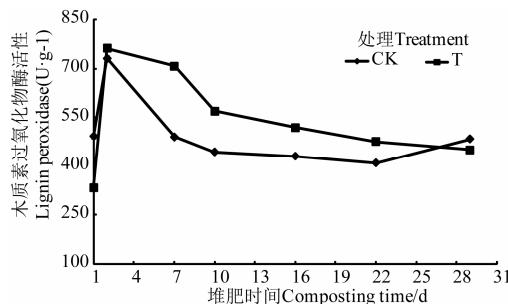


图 5 堆肥过程中木质素过氧化物酶活性的变化

Fig.5 Changes of lignin peroxidase enzyme during composting

2.4 堆肥过程中复合菌剂对微生物功能多样性的影响

2.4.1 平均每孔颜色变化率

AWCD 值代表微生物利用碳源的能力, 也是反映微生物活性的一个重要指标^[28]。由 96 h AWCD 值 (图 6) 可以看出, 两处理在堆肥的不同时期对微生物群落活性的影响存在一定的差别。T 处理的 AWCD 值在每个时期的都高于 CK 处理。在升温期和降温期, 均达到显著水平 ($P<0.05$), T 处理和 CK 处理在降温期的 AWCD 值达到了 3 个时期最大, 升温期两处理的 AWCD 值低于其他时期, 说明在堆肥初期, 微生物平均活性不高, 而进入高温期后, 由于微生物繁殖迅速, 生理代谢旺盛, 使得后期微生物平均活性显著增加^[17]。因此从 2 个处理不同时期的 AWCD 值变化可以看出, 接种复合菌剂可以显著增加堆肥过程中微生物的平均活性, 从而加快堆肥腐熟

进程。

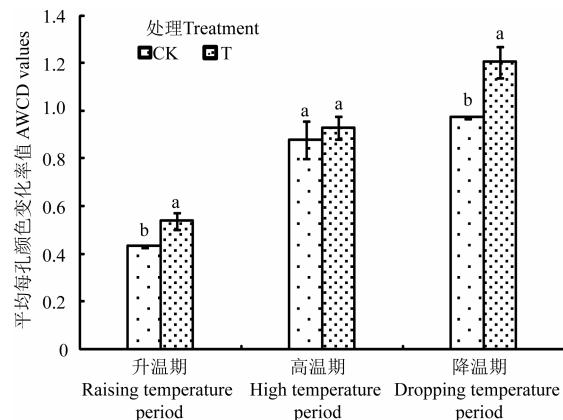


图 6 堆肥过程中不同特征时期堆料在培养 96 h 后的平均每孔颜色变化率变化

Fig.6 Values of average well color development (AWCD) after cultivated 96 h at different stages

2.4.2 堆肥过程中微生物对 6 大类碳源的利用

堆料中微生物对不同碳源的利用情况反映了土壤微生物的代谢功能类群。根据微生物对营养代谢物质的途径可以将 Biolog Eco 板上的 31 种碳源分为 6 大类: 糖类 (10 种)、氨基酸 (6 种)、羧酸类 (7 种)、多胺类 (2 种)、多酚化合物类 (2 种)、多聚物类 (4 种)^[29]。采用 96 h 的吸光值分析不同处理的微生物群落结构对 6 大类碳源的利用 (表 3), 在整个堆肥阶段, 不同堆肥阶段的微生物对 6 大类碳源的利用能力不同, 每个阶段 T 处理对糖类的利用能力均高于 CK 处理。这可能是在堆肥初期接入菌剂促进可溶性糖降解, 堆肥后期木质素纤维素等难降解物质的分解, 又重新产生可溶性糖类物质^[30]。在升温期, 两处理对 6 大类碳源的利用没有形成显著性差异。在高温期, T 处理对糖类和多胺类的利用显著高于 CK 处理, 分别提高了 50.0% 和 77.0%; 而对羧酸类、多聚物类和多酚化合物类的利用显著低于 CK 处理, 其利用率分别降低了 23.5%、44.7% 和 39.3%, 这可能是与纤维素的主要分解菌真菌不耐高温大量死亡有关^[18]。在降温期, 除多胺类以外, T 处理对其他 5 类碳源的利用均显著高于 CK 处理。

表 3 堆肥过程中不同特征时期不同处理对 6 大类碳源的利用
Table 3 Utilization of six groups of carbon sources in different treatments

时期 Period	处理 Treatment	96 h 吸光值 96 h absorption values					
		糖类 Saccharides	氨基酸类 Amino acids	羧酸类 Carboxylic acids	多聚物类 Polymer compound class	多酚化合物类 Polyphenols	多胺类 Polyamine
升温期 Raising temperature period	CK	0.54±0.01a	0.58±0.04a	0.47±0.02a	0.47±0.05a	0.39±0.06a	0.58±0.07a
	T	0.58±0.05a	0.64±0.03a	0.45±0.03a	0.44±0.05a	0.53±0.01a	0.52±0.03a
高温期 High temperature period	CK	0.52±0.01b	1.16±0.02a	1.15±0.08a	1.14±0.02a	1.12±0.04a	0.20±0.01b
	T	1.04±0.05a	1.09±0.07a	0.88±0.07b	0.63±0.06b	0.68±0.01b	0.87±0.01a
降温期 Cooling temperature period	CK	0.99±0.01b	1.14±0.04b	0.91±0.01b	1.09±0.03b	0.42±0.02b	0.93±0.08a
	T	1.55±0.01a	1.43±0.08a	1.36±0.06a	1.61±0.01a	0.94±0.05a	1.00±0.01a

注: 数值为平均值±标准误 (Mean ± SE, n=3); 同一列数据中不同字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。

Notes: Data were the means ± standard deviations (n=3); Different letters indicate significant differences in the same columns of the table ($P<0.05$)。

2.4.3 堆肥过程中微生物群落代谢功能主成分分析

为了清晰地了解添加复合菌剂对堆肥过程中微生物

群落代谢能力的影响, 进一步对 Biolog ECO 板培养 96 h 所得的数据进行主成分分析 (如图 7)。

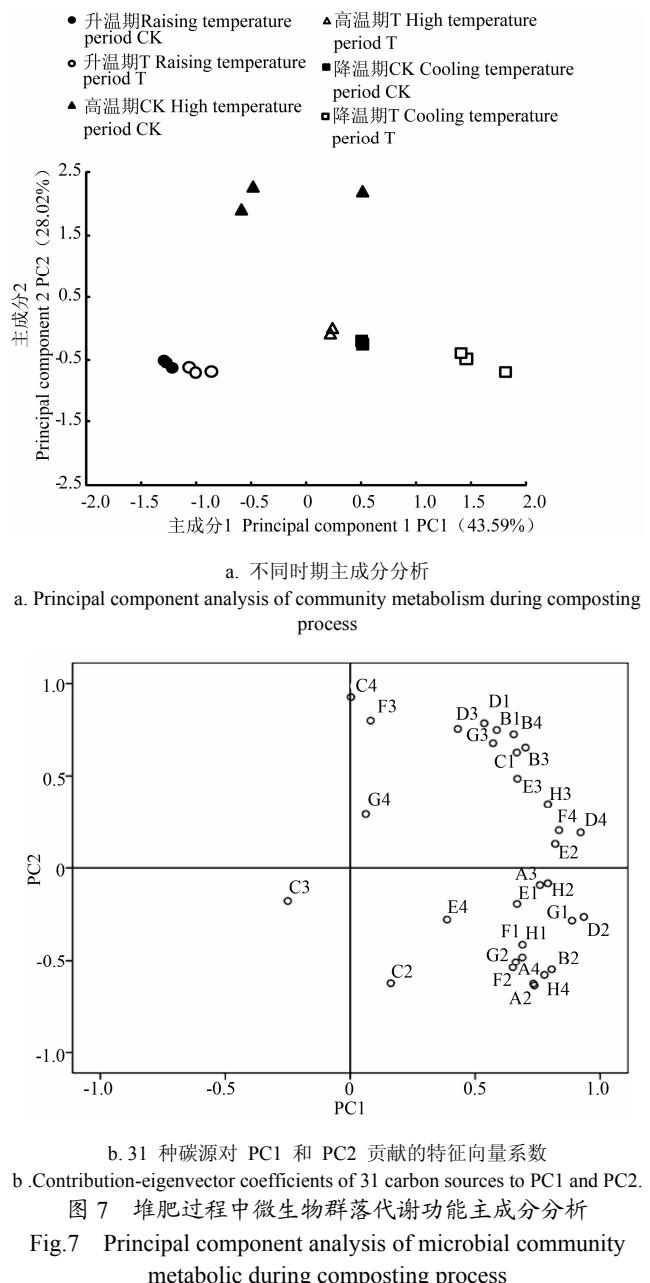


Fig.7 Principal component analysis of microbial community metabolic during composting process

由图 7a 可知, 在堆肥过程中 3 个时期在主成分坐标体系中分布差异十分明显, 添加复合菌剂在高温期发挥了主要的作用, 并且促进了堆肥腐熟的进程。升温期, T 处理在 PC1 上得分系数显著高于 CK 处理 ($F=19.20, P < 0.05$), 而在 PC2 上无显著差异; 高温期, T 处理在 PC2 上的得分系数显著高于 CK 处理 ($F=278.02, P < 0.01$); 降温期, PC1 和 PC2 上得分系数的差异均达到显著水平 ($F=69.12, P < 0.01; F=12.46, P < 0.05$)。

提取 31 种碳源在 2 个主成分上的因子载荷作图, 以分析 31 种碳源对 2 个主成分的贡献率(图 7)。由图 7b 可见, 对 PC1 贡献大的碳源(系数 >0.80)有 2 大类, 糖类占 4 种, 分别为 D-甘露醇、D-纤维二塘、N-乙酰-D 葡萄糖胺和 D-木糖; 氨基酸占 2 种, 分别为 L-丝氨酸和甘氨酰-L-谷氨酸, 可见影响 PC1 的主要为糖类和氨基酸类; 对 PC2 贡献大的碳源(系数 >0.80)只有 1 种, 为 L-苯丙氨酸, 即影响 PC2 的主要为氨基酸类。主成分分

析结果表明, 两处理微生物群落间的代谢特征随着堆肥过程的变化而变化, 而且这种变化主要体现在对糖类和氨基酸类碳源的利用上。

3 讨 论

果树枝条中含有大量的纤维素和木质素, 许多研究结果已经证实纤维素和木质纤维素的降解是限制堆肥腐熟进程, 影响堆肥产品品质的关键因素^[31]。温度是堆肥过程的宏观反映, 也是决定堆肥无害化的主要标志, 直接影响堆肥的进程。本研究结果显示利用苹果树枝和猪粪堆肥均可达到无害化处理要求, 且接种复合菌剂可提高堆肥温度, 延长高温期持续时间。这与田赟^[32]、李成学^[33]等的研究结果相似。

堆肥化过程是在一系列酶的作用下, 把大分子有机物转化成对环境无害、对作物安全的生物化学过程。Zeng 等^[24]通过对堆肥不同时期接种白腐真菌表明接入菌剂可以提高锰过氧化物酶、木质素过氧化物酶、漆酶、纤维素酶以及木聚糖酶活性, 且均在高温期达到了最大值。张晓倩等^[23]研究表明加入微生物菌剂后可使 β -葡萄糖苷水解酶、羧甲基纤维素酶、漆酶和锰过氧化物酶活性升高并加速堆料中各种有机质的降解, 提高微生物对底物的利用, 从而提高好氧堆肥的效率。刘月等^[31]通过研究功能菌剂对堆肥中羧甲基纤维素酶、滤纸酶、木质纤维素酶、木聚糖酶和漆酶活性的影响, 结果表明接菌处理堆肥中的酶活性在各时期均高于自然堆肥。本研究通过对堆肥过程中酶活性进行分析, 结果表明 T 处理和 CK 处理纤维素酶、漆酶、木质素过氧化物酶活性变化趋势一致, 锰过氧化物酶活性在堆肥后期有一定的回升, 并且 T 处理酶活性的最大值均高于 CK 处理, 在高温期酶活性达到了最大, 说明堆肥过程中添加复合菌剂处理能够提高酶活性, 此研究结果与上述学者的研究结果相类似。

堆肥的实质是微生物在适宜的条件下分解和转化有机废物的生化代谢过程, 在此过程中, 微生物群落的代谢能力是影响有机废物减量化、资源化的关键因素^[34-36], 本研究表明, 两处理在不同堆肥时期中对微生物群落功能多样性的影响不同, 接种复合菌剂可以显著增加堆肥过程中微生物的整体代谢活性。徐杰等^[17]研究了添加菌剂对肥化过程中微生物群落影响, Biolog 微平板法发现, 接种菌剂增加了堆肥高温期微生物的代谢能力, 本研究结果与之一致。冯宏等^[37]应用 Biolog 方法研究了堆肥中不同阶段微生物的群落多样性和微生物对 6 大类碳源的利用能力, 结果表明微生物在不同堆肥阶段对 6 大类碳源的利用能力不同, 每个阶段均对糖类碳源消耗最多, 并且接种菌剂提高了微生物群落功能多样性和群落均匀度。而本研究显示, 不同堆肥阶段的微生物对 6 大类碳底物的利用能力也不相同。其中每个阶段 T 处理对糖类的利用率均高于 CK 处理; 升温期两处理对 6 大类碳源的利用没有形成显著性差异, 但是对糖类、AA 酸类和多胺类的利用率比其他碳源略高; 高温期, T 处理对糖类和多胺类的利用率显著高于 CK 处理; 在降温期, T 处理

对糖类、氨基酸类、羧酸类、多聚物类和多酚化合物类碳源的利用显著高于 CK 处理。徐杰^[16]、冯冲凌^[17,38]等通过对 Biolog 数据进行主成分分析发现, 添加具有木质素降解能力的菌酶液提高了堆体中微生物对双亲化合物、聚合物、氨基酸和氨基化合物等碳源的代谢能力。本研究通过对堆肥过程中微生物群落代谢功能主成分分析表明, 在堆肥进程中, 添加复合菌剂在高温期发挥了主要的作用并且缩短了堆肥进程, 此结果与酶活性在堆肥中变化的研究结果一致, 导致 T 处理在 PC2 上与 CK 处理形成显著性差异, 这种变化主要体现在对糖类和氨基酸类碳源的利用上。

4 结 论

1) 接种复合菌剂处理可提高堆体的腐解温度, 延长高温腐解期, 促进堆料腐熟。接种复合菌剂处理有效地提高了纤维素酶、漆酶、锰过氧化物酶和木质素过氧化物酶的活性, 分别比 CK 处理提高 15.0%~19.8%、1.0%~11.0%、4.1%~26.8%、4.0%~22.2%。加快木质纤维素的降解以及有机质的分解转化。

2) 复合菌剂显著提高了堆肥中微生物的 AWCD 值, 并改变了高温期和降温期微生物对 6 大类碳源的利用。在高温期, 接种菌剂处理对糖类和多胺类的利用显著高于 CK 处理, 分别提高了 50.0% 和 77.0%; 在降温期, 除多胺类以外, 接种菌剂处理对其他 5 类碳源的利用均显著高于 CK 处理。

3) 主成分分析表明, 复合菌剂在高温期发挥主要作用, 导致接种复合菌剂处理在主成分 2 上与对照处理形成显著性差异。堆料中微生物起分异作用的碳源主要为糖类和氨基酸类。

[参 考 文 献]

- [1] He Xiaosong, Xi Beidou, Wei Zimin, et al. Spectroscopic characterization of water extractable organic matter during composting of municipal solid waste[J]. Chemosphere, 2011, 82(4): 541—548.
- [2] 黄懿梅, 曲东, 李国学. 调理剂在鸡粪锯末堆肥中的保氮效果[J]. 环境科学, 2003, 24(2): 156—160.
Huang Yimei, Qu Dong, Li Guoxue. Effect of adding amendments on preserving nitrogen during chicken manure and saw composting [J]. Environmental Sciences, 2003, 24(2): 156—160. (In Chinese with English abstract).
- [3] 李国学, 张福锁. 固体废物堆肥化与有机复混肥生产[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- [4] 匡石滋, 李春雨, 田世尧, 等. 复合菌剂对香蕉茎秆堆肥中微生物和养分含量的影响[J]. 中国农学通报, 2011, 27(6): 182—187.
Shizi Kuang, Chunyu Li, Shiyao Tian, et al. Effects of combining bacterial agents on microorganisms and nutrients contents in banana pseudostem compost[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27(6): 182—187. (In Chinese with English abstract).
- [5] 王玉军, 窦森, 崔俊涛, 等. 复合菌剂对农业废弃物堆肥过程中理化指标变化的影响[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(5): 1354—1358.
- [6] Wang Yujun, Dou Sen, Cui Juntao, et al. Effect of combined fungus on physical land chemical index during agricultural wastes composting [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2006, 25(5): 1354—1358. (In Chinese with English abstract).
- [7] 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(10): 13—15.
Tian Linshuang. Research on standard method for determining ligninolytic enzyme activity [J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2009(10): 13—15. (In Chinese with English abstract).
- [8] 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]. Journal of Agro-Environment Science, 2014, 33(3): 478—483. (In Chinese with English abstract).
- [9] Wei Zimin, Xi Beidou, Zhao Yue, et al. Effect of inoculating microbes in municipal solid waste composting on characteristics of humic acid[J]. Chemosphere, 2007, 68(2): 368—374.
- [10] Feng ChongLing, Zeng GuangMing, Huang DanLian, et al. Effect of ligninolytic enzymes on lignin degradation and carbon utilization during lignocellulosic waste composting[J]. Process Biochemistry, 2011, 46(7): 1515—1520.
- [11] Huang Danlian, Zeng Guangming, Jiang Xiaoyun, et al. Bioremediation of Pb-contaminated soil by incubating with *Phanerochaete chrysosporium* and straw[J]. Journal of Hazardous Materials, 2006, 134(1): 268—276.
- [12] 王强, 戴九兰, 吴大千, 等. 微生物生态研究中基于 BIOLOG 方法的数据分析[J]. 生态学报, 2010, 30(3): 817—823.
Wang Qiang, Dai Jiulan, Wu Daqian, et al. Statistical analysis of data from BIOLOG method in the study of microbial ecology[J]. Acta Ecologica Sinica, 2010, 30(3): 817—823. (In Chinese with English abstract).
- [13] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 中国农业科技出版社, 2000.
- [14] 关松荫. 土壤酶及其研究法[M]. 农业出版社, 1986.
- [15] Songulashvili Giorgi, Elisashvili Vladimir, Wasser Solomon 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.
- [16] Rogalski J, Szczodrak J, Janusz G. Manganese peroxidase production in submerged cultures by free and immobilized mycelia of *Nematoloma frowardii*[J]. Bioresource technology, 2006, 97(3): 469—476.
- [17] Tien Ming, Kirk T Kent. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H2O2-requiring oxygenase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1984, 81(8): 2280—2284.
- [18] 徐杰, 许修宏, 刘月, 等. 添加菌剂对堆肥化过程中微生物群落代谢影响的 Biolog 解析[J]. 南京理工大学学报: 自然科学版, 2014(1): 181—186.
Xu Jie, Xu Xiuhong, Liu Yue, et al. Analysis of effect of inoculation on microbial community metabolic profiles during composting using biology method[J]. Journal of Nanjing University of Science and Technology, 2014, 38(1): 181—186. (In Chinese with English abstract).

- [18] 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(11): 4215—4222. Han Lina, Wang Zehuai, Li Jianguo. Effects of inoculating microbes on banana pseudo stem composting[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2012(11): 4215—4222. (In Chinese with English abstract).
- [19] 顾文杰, 张发宝, 徐培智, 等. 接种菌剂对堆肥微生物数量和酶活性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2009(08): 1718—1722. Gu Wenjie, Zhang Fabao, Xu Peizhi, et al. Inoculum additions during composting; impacts on microbial populations and enzyme activity[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2009(08): 1718—1722. (In Chinese with English abstract).
- [20] 欧亚玲, 陈强, 邹宇, 等. 接种高温细菌复合菌剂对鸡粪堆肥的影响研究[J]. 四川农业大学学报, 2008, 26(1): 89—92. Ou Yaling, Chen Qiang, Zou Yu, et al. The effects of inoculating thermophilic bacterial mixture chicken manure composting[J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2008, 26(1): 89—92. (In Chinese with English abstract)
- [21] García Carlos, Hernández Teresa, Costa Francisco, et al. Phytotoxicity due to the agricultural use of urban wastes, germination experiments[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1992, 59(3): 313—319.
- [22] Yu Zhen, Zeng Guangming, Chen Yaoning, et al. Effects of inoculation with *Phanerochaete chrysosporium* on remediation of pentachlorophenol-contaminated soil waste by composting [J]. Process Biochemistry, 2011, 46(6): 1285—1291.
- [23] 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(4): 843—847. Zhang Xiaoqian, Xu Xiuhong, Wang Jing, et al. Effect of inoculating lignin degradation strains on enzymes activities in composting [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2012 (4): 843—847. (In Chinese with English abstract).
- [24] Zeng Guangming, Yu Man, Chen Yaoning, et al. Effects of inoculation with *Phanerochaete chrysosporium* at various time points on enzyme activities during agricultural waste composting [J]. Bioresource Technology, 2010, 101(1): 222—227.
- [25] 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]. Mycosistema, 2007, 26(1): 153—160. (In Chinese with English abstract).
- [26] Del Carmen Vargas-García M, Francisca Suárez-Estrella F, José López M, et al. Influence of microbial inoculation and co-composting material on the evolution of humic-like substances during composting of horticultural wastes[J]. Process Biochemistry, 2006, 41(6): 1438—1443.
- [27] Raut M P, Prince William S P M, Bhattacharyya J K, et al. Microbial dynamics and enzyme activities during rapid composting of municipal solid waste: A compost maturity analysis perspective[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(14): 6512—6519.
- [28] Zabinski Catherine A, Gannon James E. Effects of recreational impacts on soil microbial communities[J]. Environmental Management, 1997, 21(2): 233—238.
- [29] 张燕燕, 曲来叶, 陈利顶. Biolog EcoPlate-(TM)实验信息提取方法改进[J]. 微生物学通报, 2009(7): 1083—1091. Zhang Yanyan, Qu Laiye, Chen Liding. An amendment on information extraction of biology EcoPlate™[J]. Microbiology, 2009(7): 1083—1091. (In Chinese with English abstract).
- [30] 朴哲, 崔宗均, 苏宝林. 高温堆肥的物质转化与腐熟进度关系[J]. 中国农业大学学报, 2001(3): 74—78. Po Zhe, Cui Zongjun, Su Baolin. Relationship between the converse characteristics of substances and the decompose process in quick fermentation and compost system[J]. Journal of China Agricultural University, 2001(3): 74—78. (In Chinese with English abstract)
- [31] 刘月, 许修宏, 徐杰, 等. 功能菌剂对堆肥中木质纤维素降解的影响[J]. 中国土壤与肥料, 2014(04): 81—86. Liu Yue, Xu Xiuhong, Xu Jie, et al. Effects of adding functional inoculum on lignocellulose degradation in composting[J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2014(04): 81—86. (In Chinese with English abstract).
- [32] 田赟, 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(08): 272—278. Tian Yun, Wang Haiyan, Sun Xiangyang, et al. Effects of bamboo vinegar and bacterial reagent addition on physicochemical properties of green wastes compost [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2010, 26(8): 272—278. (In Chinese with English abstract).
- [33] 李成学, 郭建芳, 何忠俊, 等. 微生物菌剂对油枯堆肥过程中理化性质的影响研究[J]. 农业环境科学学报, 2011(02): 389—394. Li Chengxue, Guo Jianfang, He Zhongjun, et al. Microbial strains affect the physical and chemical properties when composting canola meal [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2011(2): 389—394. (In Chinese with English abstract).
- [34] Dignac M F, Houot S, Francou C, et al. Pyrolytic study of compost and waste organic matter[J]. Organic Geochemistry, 2005, 36(7): 1054—1071.
- [35] Sánchez Monedero M A, Roig A, Cegarra J, et al. Relationships between water-soluble carbohydrate and phenol fractions and the humification indices of different organic wastes during composting[J]. Bioresource Technology, 1999, 70(2): 193—201.
- [36] López M J, Elorrieta M A, Vargas-García A M C, et al. The effect of aeration on the biotransformation of lignocellulosic wastes by white-rot fungi[J]. Bioresource Technology, 2002, 81(2): 123—129.
- [37] 冯宏, 张新明, 李华兴, 等. 接种菌剂对堆肥微生物利用碳源能力的影响[J]. 华南农业大学学报, 2006, 26(4): 19—22. Feng Hong, Zhang Ximing, Li Huaxing, et al. Effect of microbial inoculum on capability of utilizing carbon sources by microbes in compost[J]. Journal of South China Agricultural University, 2006, 26(4): 19—22. (In Chinese with English abstract).

- [38] 冯冲凌, 曾光明, 黄丹莲, 等. 基于 Biolog 解析添加酶液对堆肥化过程中微生物群落代谢的影响[J]. 环境科学, 2009, 30(10): 3016—3021.
Feng Chongling, Zeng Guangming, Huang Danlian, et al.

Analysis of the effect of enzymes on microbial community metabolic profiles during composting using biology method [J]. Chinese Journal of Environment Science, 2009, 30(10): 3016—3021.(in Chinese with English abstract)

Improving enzyme activity by compound microbial agents in compost with mixed fruit tree branches and pig manure during composting

Shi Longxiang¹, Gu Jie^{1*}, Pan Hongjia¹, Zhang Kaiyu², Yin Yanan¹, Zhao Ting², Wang Xiaojuan¹, Gao Hua¹
(1. College of Resources and Environment, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;
2. College of Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100, China ;)

Abstract: The effects of compound microbial agents in compost with mixed fruit tree branches and pig manure during composting in a thermophilic aerobic state were examined. The research used the inoculants compound microbial agents and control compost. The changes of temperature, enzyme activity, and the microbial community functional diversity in compost materials during composting were determined. The results showed the temperature during the composting period was increased and the high temperature (above 55°C) maintaining period was three days longer. Besides, inoculation treatment and control treatment are all carried out to achieve compost maturity, what was more, when added to the compound microbial agents composting process, we can easily find that the number of the seed germination in inoculants treatment is obviously higher than it is in the control treatment ($P<0.05$), so we can find that this process caused the decrease of the pH value and the C/N ratio. Of course, they promoted the compost maturity. The activities of the enzymes were improved by adding compound microbial agents. The tested enzymes Cellulose, laccase (Lac), Manganese peroxidase (MnP), and lignin peroxidase (LiP) activities were higher in the treatment with microorganism agent than those in the control treatment by 15.0%-19.8%, 1.0%-11.0%, 4.1%-26.8%, and 4.0%-22.2%, respectively. The research showed that the activity of Cellulose, Laccase (Lac), and the lignin peroxidase (LiP) rose at the beginning of the experiment and then dropped gradually under the inoculants agent processing, and reached the peak value in the seventh day. Their numerical values were 0.96 mg/(g·d) and 72.6 U/g respectively. However, the Manganese peroxidase (MnP) and Lignin peroxidase (LiP) reached their peak in the second day. Their numerical peak values were 927.2 and 726.4 U/g respectively. In addition, the activity of Manganese peroxidase (MnP) which was dealt with the inoculation treatment and control treatment was rising a little at the last period, and it may be affected by the content of the nitrogen in the last period. The average well color development (AWCD) value of microbes in compost was improved significantly, and six kinds of carbon sources used by the microbes during the high temperature period and cooling period were also significantly changed by the inoculation compound microbial agents. The research showed that the use of the inoculation agent processing to sugar and polyamine is obviously higher than the control treatment in the high temperature period. They are improved by 50.0% and 77.0% respectively. However, the use of carboxylic acid, polymer, and the polyphenolic substance were obviously lower than the control treatment, and their utilization rates were reduced by 23.5%, 44.7%, and 39.3% respectively. In the cooling temperature period, the use of the inoculants agent processing to the other five carbon sources, except polyamine, were all higher than that in the control treatment ($P<0.05$). Principal component analysis clearly revealed that adding compound microbial agents plays a main role in the high temperature period during the composting, and the metabolic characteristics of micro flora during these two treatments were changing along with the composting process and the differentiation in the six utilizations of carbon sources were mainly sugars and amino acids.

Key words: composting; enzymes; bacteria; fruit tree branches; microbial community functional diversity