DOI:10.16861/j.cnki.zggc.2025.0052

草腐菌培养料发酵过程中理化性质和微生物群落的变化

郝刘斌,孙　悦,冯　璠,盖赵鹏,安金璐,王雅暄,杨　瑶,郑素月,王春霞

（河北工程大学园林与生态工程学院　河北邯郸　056038）

摘　要:为优化草腐菌培养料发酵工艺,提高草腐菌出菇效率、出菇质量,分别从草腐菌培养料未发酵(C0)、四次翻堆后(C1、C2、C3、C4)、一次发酵完成(C5)和二次发酵完成(C6)7个发酵阶段取样,测定培养料的理化性质及木质纤维素降解酶活性,并通过高通量测序技术,检测培养料的微生物群落演替情况及在OTU水平上评估培养料理化性质与微生物群落间的相关性。结果表明,在发酵过程中,培养料的含水量(*w*,后同)和pH均呈降-升-降趋势,最终分别为65.14%和7.15;电导率呈升-降-升的趋势,最终为2.47 mS·cm^{-1};总有机碳含量(TOC)C0~C1阶段略微上升,后逐渐下降,最终为45.04%;总氮含量(TN)呈升-降-升趋势,最终为0.63%;纤维素酶和木聚糖酶活性呈降-升-降的趋势,而漆酶活性整体持续下降,发酵结束时分别为2.08、3.58、13.19 U·g^{-1}。细菌群落中栖热菌属(*Thermus*)在C1~C6时期均为优势菌属,而norank_f__norank_o__SBR1031在C2~C6时期为优势菌属。真菌群落中嗜热链球菌属(*Mycothermus*)在C1~C6时期均为优势菌属。TOC和TN分别为影响细菌和真菌群落结构最显著的理化因子。

关键词:草腐菌;培养料;理化性质;微生物群落演替

中图分类号:S646　　**文献标志码:**A　　**文章编号:**1673-2871(2025)09-187-12

Changes in physicochemical properties and microbial community during fermentation of grass rot fungus culture material

HAO Liubin, SUN Yue, FENG Fan, GE Zhaopeng, AN Jinlu, WANG Yaxuan, YANG Yao, ZHENG Suyue, WANG Chunxia

(*School of Landscape and Ecological Engineering, Hebei University of Engineering, Handan 056038, Hebei, China*)

Abstract: To optimize the fermentation process of grass-decaying fungus culture medium and improve the efficiency and quality of mushroom production, samples were collected at 7 fermentation stages: unfermented (C0), after 4 turnings (C1, C2, C3, C4), completion of primary fermentation (C5), and completion of secondary fermentation (C6) of grass rot fungus culture substrate. The physicochemical properties and lignocellulase activity of the culture medium were measured, and high-throughput sequencing technology was used to detect the succession of microbial communities in the culture medium. The correlation between physicochemical properties and microbial communities was assessed at the OTU level. The results showed that during fermentation, the moisture (*w*, the same below) and pH of the substrate first decreased, then increased, and finally decreased again, reaching 65.14% and 7.15, respectively; the electrical conductivity showed a trend of increasing, then decreasing and then increasing, and finally was 2.47 mS·cm^{-1}; the total organic carbon content (TOC) slightly increased in the C0-C1 stage, and then gradually decreased, and finally was 45.04%; and the total nitrogen content (TN) increased, then decreased and then increased, and finally was 0.63%; Cellulase and xylanase activities were in the trend of decreasing, then increasing and then decreasing, while laccase activity as a whole continued to decrease, remaining at 2.08, 3.58, and 13.19 U·g^{-1}, respectively, at the end of fermentation. In the bacterial community, *Thermus* was the dominant genus in the C1-C6 period, while norank_f__norank_o__SBR1031 was the dominant genus in the C2-C6 period. *Mycothermus* was the dominant genus at C1-C6 stage. TOC and TN were the most significant physicochemical factors affecting bacterial and fungal community structure, respectively.

Key words: Grass rot fungi; Cultivation substrates; Physicochemical properties; Microbial community succession

收稿日期:2025-01-21;**修回日期:**2025-03-20

基金项目:河北省现代农业产业技术体系食用菌创新团队建设专项(HBCT2023090207);河北省自然科学基金(C2024402046)

作者简介:郝刘斌,男,硕士,研究方向为食药用真菌。E-mail:hlb0112@163.com

通信作者:王春霞,女,讲师,研究方向为食用菌分子育种与栽培。E-mail:wangchunxia@hebeu.edu.cn

食用菌有草腐菌和木腐菌2种，属于草腐菌的双孢蘑菇、姬松茸和鸡腿菇生产上以发酵料进行栽培。草腐菌培养料一般以作物秸秆、玉米芯和畜禽粪等为主料，经过二次堆制发酵而成[1]。培养料发酵过程中微生物的新陈代谢可改变基质的理化性质，将大分子有机物分解，从而使培养料中的养分更容易被食用菌吸收利用[2]。

培养料的质量直接决定食用菌的品质和产量。培养料发酵是一个极其关键且复杂的过程，受酸碱度、温度、含水量等因素的影响，这些理化指标决定培养料的发酵时间和最终质量[3-5]。孔维丽等[6]以不同粒径的玉米芯为主料进行平菇培养料发酵，发现小粒径玉米芯培养料发酵结束时培养料各理化性质适宜，染菌率低。Kariaga等[7]研究表明，培养料发酵过程中的生物因素和理化因素会影响菌丝的生长。桑羽希等[8]研究表明，以废棉为主的草菇菌渣培养料，发酵结束时各项理化指标均处于正常范围，且其中氮含量较高，最终取得了较高的产量。于建光等[9]通过测定不同批次的秸秆堆制基料的理化性质，探究了理化性质与双孢蘑菇产量和品质之间的关系，表明培养料总有机碳含量与双孢蘑菇的蛋白质、多糖、灰分含量和产量均呈负相关，与粗脂肪和粗纤维含量均呈正相关，培养料的总氮含量与双孢蘑菇蛋白质、多糖含量和产量均呈正相关，与粗脂肪、粗纤维和灰分含量均呈负相关。

发酵过程中培养料中的微生物群落不断变化，通过自身繁殖、代谢活动，从多方面调控培养料理化性质、促进堆肥成熟，并为后续栽培创造优质条件，也降低了污染风险。微生物菌群演替显著影响发酵进程，不同发酵原料及方式下微生物群落的变化规律也相差很大。赵彬涵等[10]研究表明，培养料发酵前期微生物快速繁殖，代谢产生大量的热量，使培养料温度快速上升，从而抑制或杀灭培养料中的病原微生物，减少后续污染风险，同时为发酵进入高温阶段奠定基础，推动培养料腐熟进程。常路路等[11]认为，细菌的数量随着发酵时间延长，呈逐渐上升趋势，可加速培养料中木质纤维素的降解，释放养分；并且细菌代谢活动能产热、调节pH，为后续草腐菌生长创造适宜条件。姚琴[12]以麦草和牛粪组合进行发酵，发现中层培养料的发酵程度最好，保水性能较高，pH适宜，能分解大分子的微生物含量最多，大分子分解速率最快。刘芹等[13]、刘皓皓等[14]以玉米芯为主料进行平菇培养料发酵，发现培养料发酵过程中微生物代谢产物具有显著差异，并含有丰富的抑菌物质和植物生长调节剂。抑菌物质可抑制病原微生物的繁殖；植物生长调节剂可在培养料腐熟后，促进菌丝定殖与子实体发育，提高栽培效果。这些从侧面反映了微生物在发酵过程中对培养料理化性质和成熟程度的重要作用。食用菌种植户通常是靠长期生产经验摸索培养料配方及发酵工艺，因技术水平的差异导致培养料发酵质量参差不齐，食用菌减产、品质下降等问题层出不穷，给菇农和企业造成了严重的经济损失。目前对草腐菌培养料堆制腐熟过程中的理化性质和微生物变化规律的研究鲜见报道，因此本研究对草腐菌培养料发酵过程中不同时期的理化指标进行测定，并结合高通量测序技术对微生物群落演替情况进行分析，为后续改进发酵工艺提供技术支撑和科学理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

培养料配方（以质量百分比计）为干牛粪34.4%，棉秆26.0%，玉米芯17.2%，过磷酸钙8.6%，石膏8.6%，石灰4.3%，尿素0.9%。干牛粪、棉秆、玉米芯、过磷酸钙、石膏、石灰、尿素均购于河北省邯郸市曲周县当地市场。

1.2 方法

试验于2023年7－8月分别在河北省邯郸市曲周县利翔农业科技有限公司与河北省邯郸市河北工程大学园林与生态工程学院进行。整个发酵周期为37 d，发酵前在发酵仓对原料进行充分混匀及预湿处理，分别在发酵的第7天、第12天、第17天、第22天进行翻堆，在第29天一次发酵完成后，将培养料转移至菇房进行第二次发酵，在第37天完成二次发酵。

分别在培养料未发酵（C0）、四次翻堆后（C1、C2、C3、C4）、一次发酵完成（C5）和二次发酵完成（C6）7个阶段进行取样。每次翻堆后取样2000 g，3次重复，将部分新鲜样品置于−80 ℃冰箱保存用于含水量、pH、EC和酶活性测定，部分样品送至上海美吉生物医药科技有限公司进行微生物多样性测序，剩余样品烘干粉碎后过筛处理用于总有机碳和总氮含量测定。

1.3 培养料理化性质的测定方法

1.3.1 含水量的测定 采用烘干称质量法测定含水量[15]，每组试验3次重复。

含水量/%$=\frac{W1-W2}{W1}\times 100$。

$W1$为新鲜培养料样品质量，$W2$为烘至恒质量后的培养料质量。

1.3.2　pH和EC的测定　取5 g新鲜培养料于50 mL蒸馏水中，振荡浸提1 h（120 r·min^{-1}），然后5000 r·min^{-1}离心10 min，取上清液，采用pH仪（雷磁PHS-3C，上海仪电科学仪器有限公司）和EC仪（DDSJ-308F，上海仪电科学仪器有限公司）分别测定培养料pH和EC。每组试验重复3次。

1.3.3　总有机碳含量的测定　采用重铬酸钾法测定培养料总有机碳含量（TOC），具体操作步骤参照NY525—2021[16]。每组试验3次重复。

1.3.4　总氮含量的测定　采用凯氏定氮法测定培养料总氮含量（TN），具体操作步骤参照NY525—2021[16]。每组试验3次重复。

1.3.5　酶活性的测定　取10 g新鲜样品于装有50 mL蒸馏水的离心管中，20 ℃浸提4 h，5000 r·min^{-1}离心10 min，取上清液备用。采用ABTS法[17]测定培养料漆酶活性，采用DNS法[18]测定纤维素酶和木聚糖酶活性。每组试验3次重复。

1.4　DNA提取、PCR扩增和高通量测序

将培养料样品送至上海美吉生物医药科技有限公司进行测序。培养料样品DNA提取使用试剂Fast DNA SPIN Kit for Soil（MP Biomedical，USA），利用1%的琼脂糖凝胶电泳检测DNA的质量和浓度。使用Illumina Miseq平台进行16S和ITS rRNA基因测序。细菌和真菌测序的引物分别为338F（ACTCCTACGGGAGGCAGCAG）、806R（GGACTACHVGGGTWTCTAAT）和ITS1F（CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA）、ITS2R（GCTGCGTTCTTCATCGATGC）。

1.5　微生物多样性分析

1.5.1　测序质量评估　稀释曲线是从样本中随机抽取一定数量的序列，统计这些序列对应样本的Alpha多样性指数，以抽取的数据量为横坐标，以Alpha多样性指数值为纵坐标，使用R语言vegan包计算、ggplot2包绘制稀释曲线，根据曲线是否达到平缓来判断本次测序数据量是否足够。

1.5.2　不同发酵阶段培养料微生物的OTU聚类分析

基于各样本质控后去嵌合体的有效序列，按97%序列相似性聚类获得OTU并构建OTU丰度矩阵，使用R语言VennDiagram包统计不同样本组间共有及特有OTU数量，绘制Venn图以分析样本间OTU组成的重叠与差异情况。

1.5.3　不同发酵阶段微生物群落结构组成分析　基于物种注释获得的各样本微生物群落物种相对丰度数据，使用R语言circlize包，以环形图内圈代表样本分组、外圈对应物种分类及丰度占比，通过连接线可视化样本与物种的关联，分析不同样本组间的微生物群落结构组成差异及物种分布特征。

1.5.4　环境因子关联冗余分析（RDA）/典范对应分析（CCA）　采用冗余分析（RDA）和典范对应分析（CCA）探究微生物群落结构与环境因子的关联性，通过蒙特卡洛置换检验评估环境因子对群落变异的解释度及显著性，依据环境因子膨胀因子筛选关键驱动因子。RDA是基于线性模型，CCA是基于单峰模型，细菌物种多样性高、丰度差异大、生态位分化精细，体型小且扩散能力强，易形成“陡峭环境梯度”与“清晰生态位分化”，呈“高异质性、单峰关系”，适配CCA的单峰模型；真菌则相反，更符合RDA的线性模型。

1.6　数据分析

采用Microsoft Excel 2016进行试验数据计算及制图，采用SPSS 26软件进行差异显著性分析。采用Illumina Miseq平台进行16S和ITS rRNA基因测序。

2　结果与分析

2.1　不同发酵阶段培养料含水量、pH、EC的变化

不同发酵阶段培养料的含水量如图1-A所示，C0~C3时期含水量持续下降，C4时期含水量略微升高，为69.33%。C5~C6时期含水量继续呈下降趋势，最终为65.14%。含水量总体下降可能是由于发酵过程中微生物代谢释放热量，使水分蒸发。C4时期含水量上升可能是因为每次翻堆过程中都会进行人工补水，因此含水量略微升高。

由图1-B可以看出，由C0~C2时期，pH由7.66显著下降至6.93，C3时期pH显著上升，可能是因为在C3时期进行翻堆时撒了大量的石灰，导致pH上升至最高，为9.37。C4~C6时期pH显著下降，最终降为7.15。

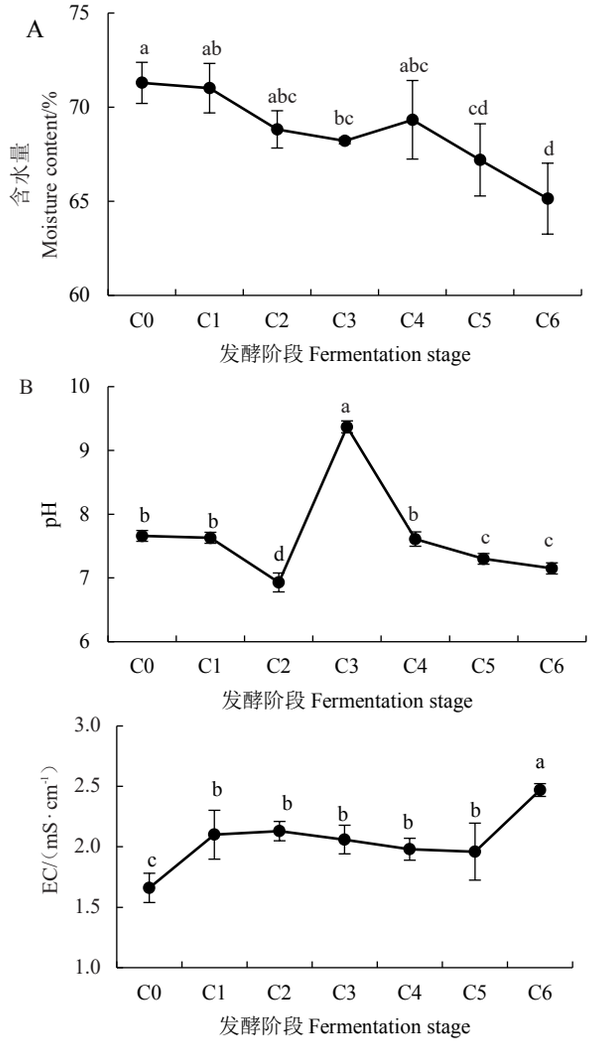
EC变化取决于多种因素，包括有机物的分解速率、微生物活动、可溶性盐的浓度以及水分蒸发等。发酵过程中EC的变化如图1-C所示，起始阶段EC最低，随着发酵的进行，EC逐渐升高，C2时期升至2.13 mS·cm^{-1}，这可能是由于微生物分解有机物释放可溶性盐，EC升高。有机物随着发酵的进行进一步分

解，C2~C5 时期 EC 逐渐下降至 1.96 mS·cm^{-1}。二次发酵阶段（C5~C6）EC 显著上升，发酵结束时 EC 为 2.47 mS·cm^{-1}。

2.2　不同发酵阶段培养料TOC、TN的变化

草腐菌生长所需营养主要来源于碳源，如图 2-A 所示，培养料 TOC 在发酵过程中整体呈下降趋势。TOC C0~C1 时期略微上升，C2~C6 时期持续下降，最终下降至 45.04%。

由图 2-B 可知，草腐菌培养料发酵过程中，TN 整体呈上升趋势。C0~C2 时期 TN 显著提高，可能由于干物质损失率大于氮素损失率，导致 TN 增加。随着发酵时间增加，氮以氨气形式挥发，C2~C3 时期 TN 略微下降。发酵后期 TN 持续升高，最终达 0.63%。



注：图中不同小写字母表示差异显著（P<0.05）。下同。

Note: Different lowercase letters in the figure indicate significant differences（P<0.05）.The same below.

图 1　培养料不同发酵阶段含水量（A）、pH（B）和 EC（C）的变化

Fig. 1　Changes in moisture（A）、pH（B）and EC（C）of culture materials at different stages of fermentation

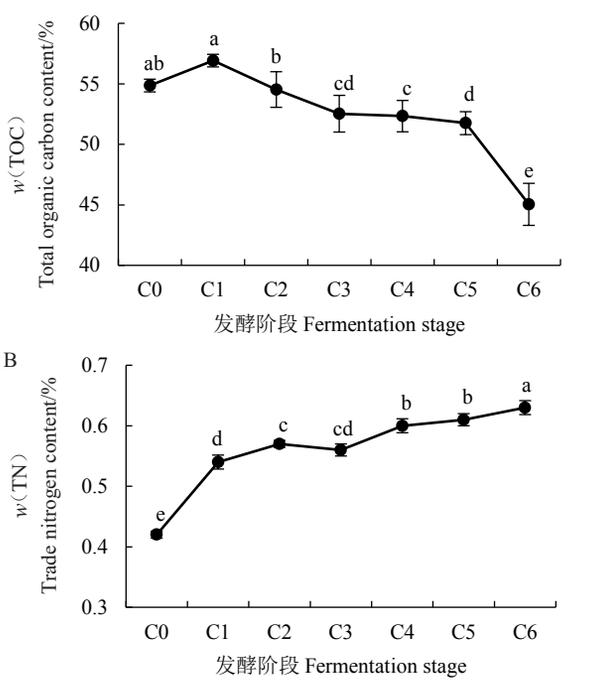


图 2　培养料不同发酵阶段 TOC（A）和 TN（B）的变化

Fig. 2　Changes in total organic carbon content（A）and total nitrogen content（B）in different fermentation stages of the culture materials

2.3　不同发酵阶段培养料中相关酶活性的变化

由图 3-A 可知，纤维素酶活性呈降-升-降的变化趋势。C0~C2 时期变化不显著，可能是发酵初期微生物利用简单的有机物，酶活性较低。随着发酵的进行，在 C2~C4 时期显著上升，可能是在此期间培养料温度较高，微生物快速代谢消耗纤维素，导致纤维素酶活性增强。C4~C6 时期纤维素酶活性显著下降，最终下降至 2.08 U·g^{-1}，可能是后期纤维素已经被大量分解，酶活性下降。木聚糖酶是降解半纤维素的关键酶，其酶活性变化也呈降-升-降的变化趋势，最终下降至 3.58 U·g^{-1}。C3 时期酶活性最高，为 4.18 U·g^{-1}（图 3-B）。漆酶是降解木质素的一种关键酶。C0~C3 时期漆酶活性显著下降，低至 13.11 U·g^{-1}，C4 时期显著上升，C5~C6 时期逐渐下降至 13.19 U·g^{-1}（图 3-C）。

2.4　不同发酵阶段培养料中微生物菌群测序质量评估

稀释曲线可直接反映测序数据量的合理性，并间接反映样品中物种的丰富程度，当曲线趋向平稳时，说明测序数据量渐进合理。如图 4 所示，细菌

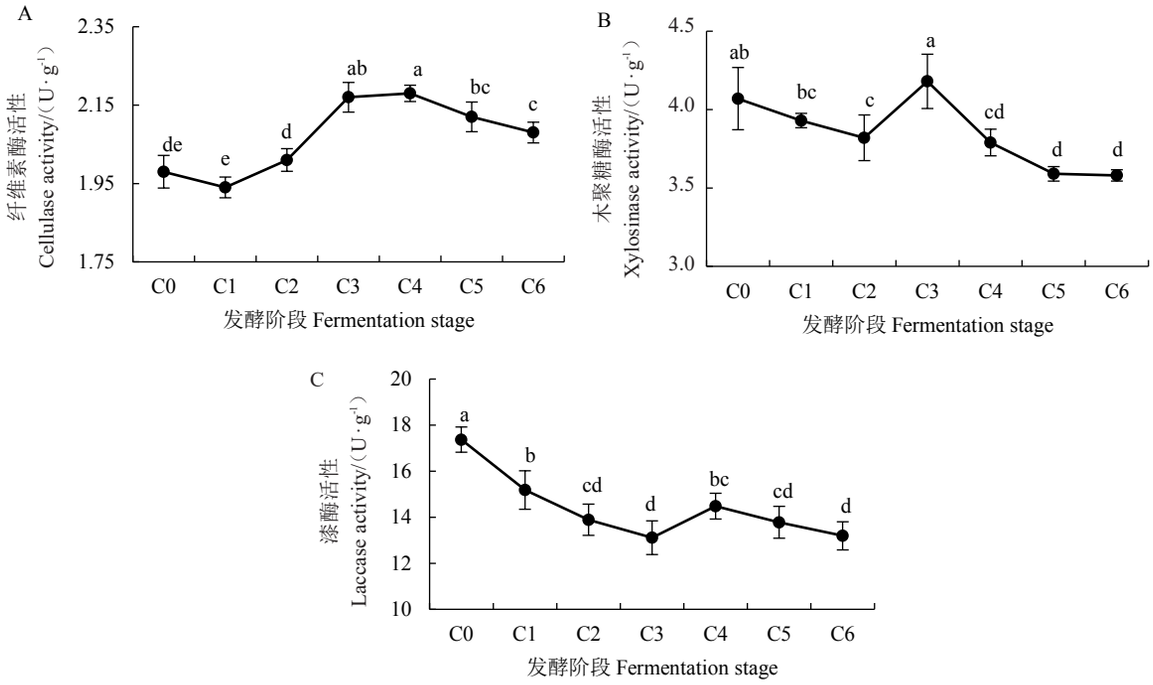
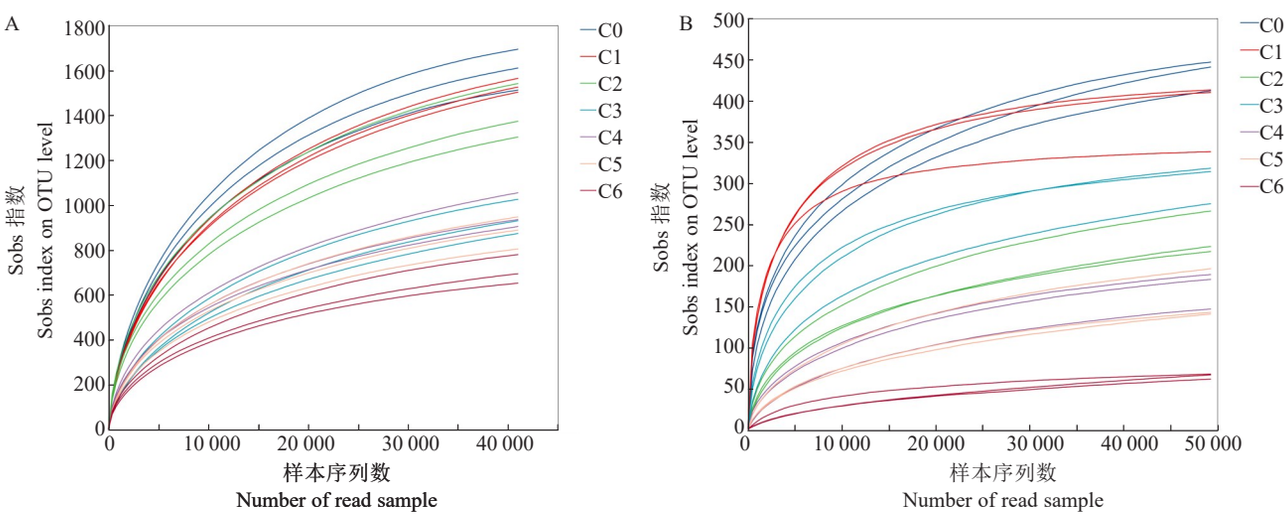


图 3　培养料不同发酵阶段纤维素酶(A)、木聚糖酶(B)和漆酶(C)酶活性的变化

Fig. 3　Changes in the enzyme activities of cellulase(A)、xylanase(B)and laccase(C)in different fermentation stages of culture materials



注：A. 细菌；B. 真菌。

Note: A. Bacteria; B. Fungi.

图 4　培养料微生物 OTU 稀释曲线

Fig. 4　Microbial OTU dilution curve of culture material

和真菌的稀释曲线在末端逐渐均趋于平稳，说明增加样本量时微生物多样性不会再发生显著变化，因此测序结果可靠，可用于进一步分析。

2.5　不同发酵阶段培养料微生物OTU的聚类分析

按照 97%相似度对微生物标记基因的非重复序列进行 OTU 聚类，细菌总获得 3359 个 OTU，细菌在 C0~C6 时期独有的 OTU 数分别为 977、517、585、226、278、217 和 263 个，7 个时期共有的 OTU 数为 296 个(图 5-A)。真菌检测到有 426 个 OTU，真菌在 C0~C6 时期独有的 OTU 数分别为 147、113、24、41、5、13 和 7 个，7 个时期共有的 OTU 数为 76 个(图 5-B)。细菌的 OTU 数多于真菌，发酵过程中整体呈下降的趋势。

2.6　不同发酵阶段微生物群落结构组成分析

选取细菌和真菌在属水平上相对丰度前 50 的微生物群落进行比较分析，如图 6-A 所示，在 C0 时

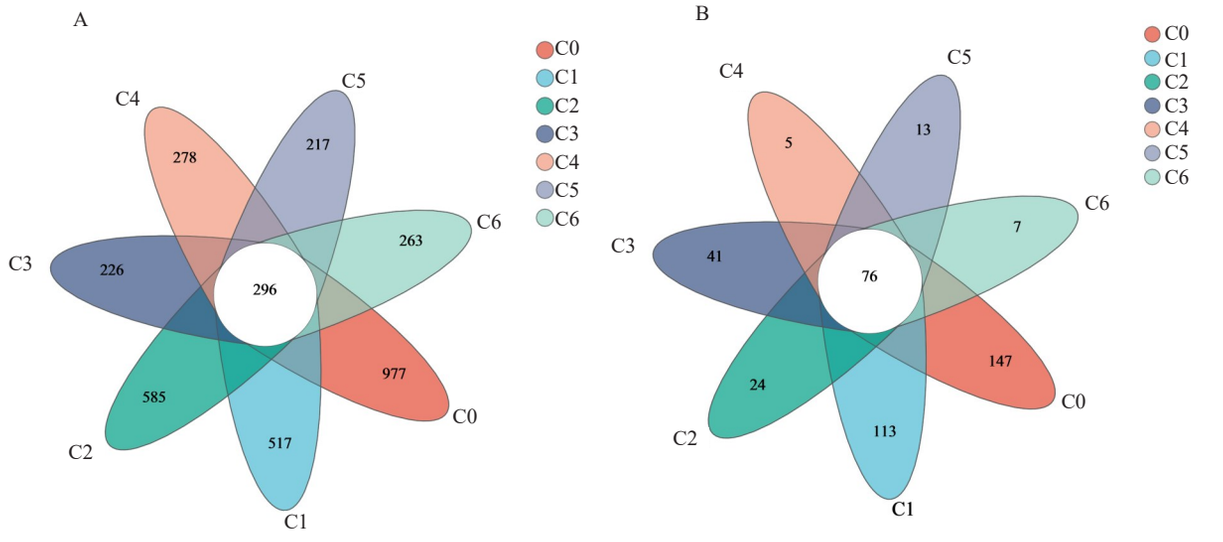


图 5　培养料不同发酵阶段细菌（A）和真菌（B）的 OTU 分布 Venn 图

Fig. 5　Venn plot of OTU distribution of bacteria（A）and fungi（B）at different stages of fermentation in culture material

期不动杆菌属（*Acinetobacter*）、芽孢杆菌属（*Solibacillus*）、龙包茨氏菌属（*Romboutsia*）、棒状杆菌属（*Corynebacterium*）、瘤胃沉积菌属（*Ruminofilibacter*）、*DMER6* 和产乙酸嗜蛋白菌属（*Proteiniphilum*）为优势菌属。相对丰度分别为 17.99%、6.40%、6.01%、5.21%、3.18%、3.09%、1.77%。随着发酵的进行，发酵料开始升温，C1 时期嗜热菌脲芽胞杆菌属（*Ureibacillus*）、栖热菌属（*Thermus*）、氢孢菌属（*Hydrogenispora*）、热嗜丙酸菌属（*Caldicoprobacter*）相对丰度升高并属于优势菌属，相对丰度分别为 18.51%、17.91%、5.81%、2.24%。C1 时期栖热菌属（*Thermus*）的相对丰度开始升高，并在 C3 时期达到最高，为 51.30%。C2 时期栖热菌属（*Thermus*）、norank_f__norank_o__SBR1031、热梭菌属（*Thermoclostridium*）、氢孢菌属（*Hydrogenispora*）和脲芽胞杆菌属（*Ureibacillus*）为优势菌属，相对丰度分别为 14.43%、10.40%、9.59%、5.96%、2.77%。热梭菌属（*Thermoclostridium*）、氢孢菌属（*Hydrogenispora*）相对丰度均在 C2 时期达到最高。C3 时期栖热菌属（*Thermus*）、norank_f__norank_o__SBR1031、热耐丙酸菌属（*Caldicoprobacter*）、脲芽胞杆菌属（*Ureibacillus*）为优势菌属，相对丰度分别为 51.30%、13.42%、4.22%、2.35%。C4 时期 norank_f__norank_o__SBR1031、微小杆菌属（*Exiguobacterium*）、球形杆菌属（*Sphaerobacter*）、栖热菌属（*Thermus*）为优势菌属，相对丰度分别为 43.59%、5.06%、3.92%、3.62%。C5 时期 norank_f__norank_o__SBR1031、栖热菌属（*Thermus*）、红热菌属（*Rhodothermus*）、unclassified_f__Roseiflexaceae 为优势菌属，相对丰度分别为 37.80%、15.55%、3.15%、3.10%。C6 时期 norank_f__norank_o__SBR1031、unclassified_f__Roseiflexaceae、norank_f__A4b、红热菌属（*Rhodothermus*）、栖热菌属（*Thermus*）为优势菌属，相对丰度分别为 48.57%、6.49%、5.54%、3.35%、1.02%。norank_f__norank_o__SBR1031 和栖热菌属（*Thermus*）在 C2~C6 时期均为主要的优势菌属，相对丰度分别为 10.4%~48.57%、1.02%~51.3%。

真菌在属水平上的群落演替情况如图 6-B 所示，在 C0 时期曲霉属（*Aspergillus*）、念珠菌属（*Candida*）、克恩菌属（*Kernia*）、丛毛菌属（*Lophotrichus*）为优势菌属，相对丰度分别为 27.64%、8.44%、7.07%、6.52%。C1 时期曲霉属（*Aspergillus*）、陶索尼亚菌属（*Tausonia*）、踝节菌属（*Talaromyces*）、嗜热链球菌属（*Mycothermus*）、念珠菌属（*Candida*）、青霉属（*Penicillium*）为优势菌属，相对丰度分别为 11.08%、10.75%、9.95%、9.45%、9.21%、8.65%。C2 时期嗜热链球菌属（*Mycothermus*）相对丰度上升，曲霉属（*Aspergillus*）逐渐下降。C3 时期嗜热链球菌属（*Mycothermus*）依然是丰度最高的菌属，其次是克恩菌属（*Kernia*）、曲霉属（*Aspergillus*），相对丰度分别为 74.09%、7.10%、3.67%。C4、C5 时期 unclassified_k__Fungi 和嗜热链球菌属（*Mycothermus*）均为优势菌属，C4 时期相对丰度分别为 4.73%、92.34%，C5 时期相对丰度分别为 1.26%、95.69%。C6 时期

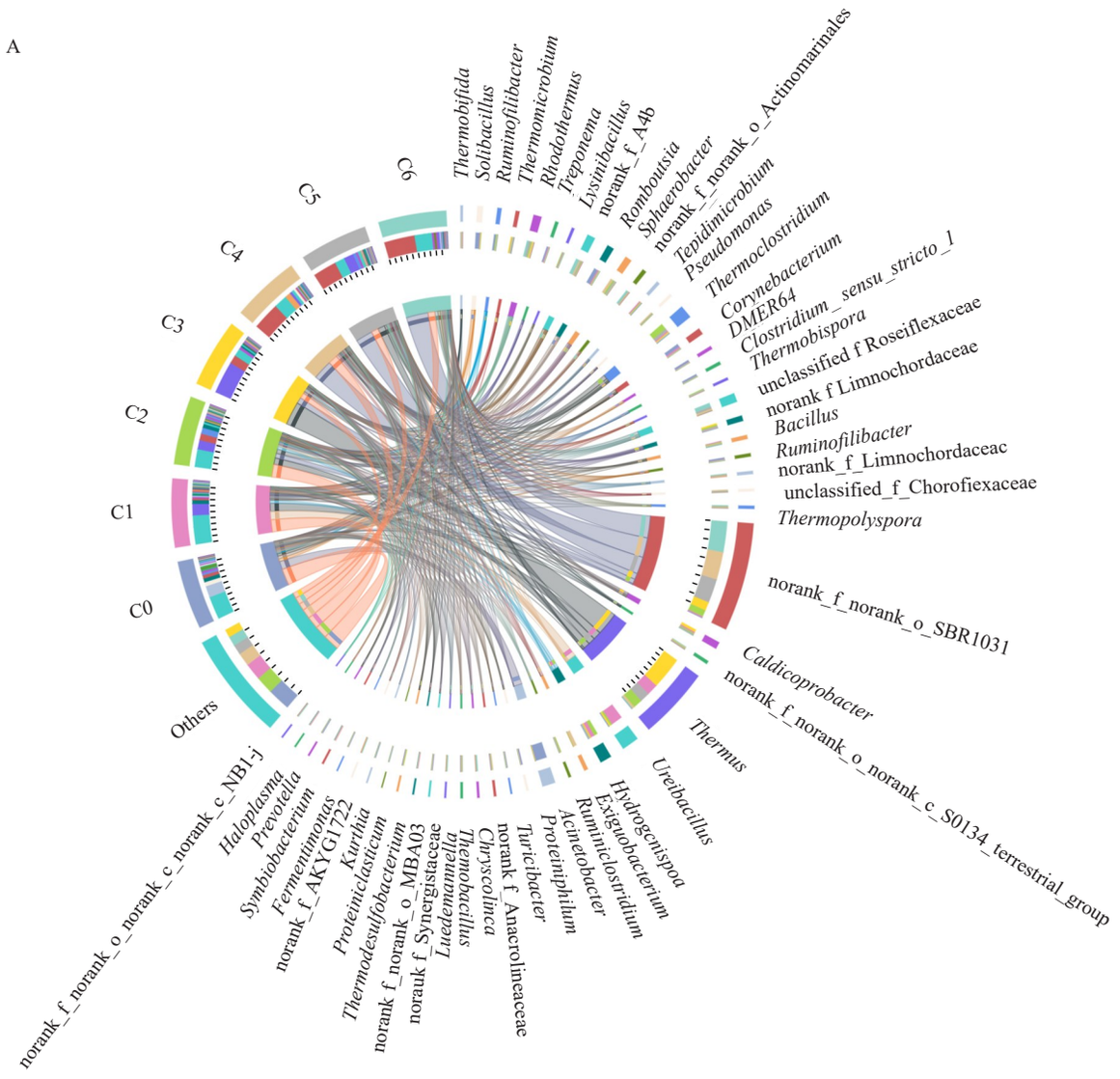


图 6　培养料不同发酵阶段细菌（A）和真菌（B）在属水平上的相对丰度变化

Fig. 6　Changes in the relative abundance of bacteria（A）and fungi（B）at the genus level at different fermentation stages of culture

优势菌属只有嗜热链球菌属（*Mycothermus*），相对丰度为 99.06%。

2.7　环境因子关联冗余分析（RDA）/典范对应分析（CCA）

利用 RDA-CCA 在 OTU 水平上评估发酵料理化性质（含水量、pH、EC、TOC 和 TN）与微生物群落之间的相关性。由图 7-A 可知，发酵料理化性质与细菌群落的相关性依次为 TOC > TN > 含水量> pH > EC，细菌群落 C0 时期与含水量呈正相关，与其他因子均呈负相关。C1、C2、C3 时期与 pH、TOC、含水量呈正相关，C1 时期与 TN、EC 均呈负相关。C4、C5、C6 时期与 TN、EC 均呈正相关，与其他因子均呈负相关。由图 7-B 可知，发酵料理化性质与真菌群落的相关性依次为 TN>含水量>TOC> EC>pH，C0、C1 时期与含水量、TOC 和 pH 均呈正相关，与 EC 和 TN 均呈负相关；C2~C6 时期与 EC 和 TN 均呈正相关，与 TOC、pH 和含水量均呈负相关。

3　讨论与结论

培养料发酵是一个非常复杂的过程，培养料理化性质及微生物群落是影响发酵进程的重要因素，直接决定发酵质量。本研究对草腐菌培养料不同发酵阶段的理化指标及降解酶活性进行测定，并对培养料微生物进行高通量测序分析，旨在了解培养

B

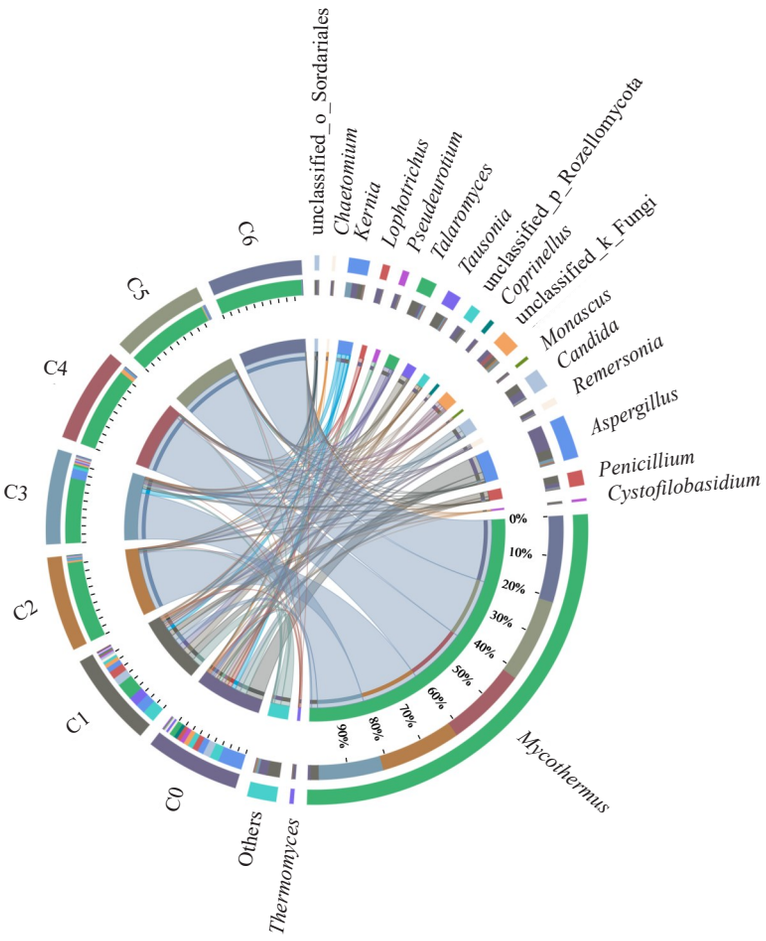


图 6（续）

Fig. 6 （Continued）

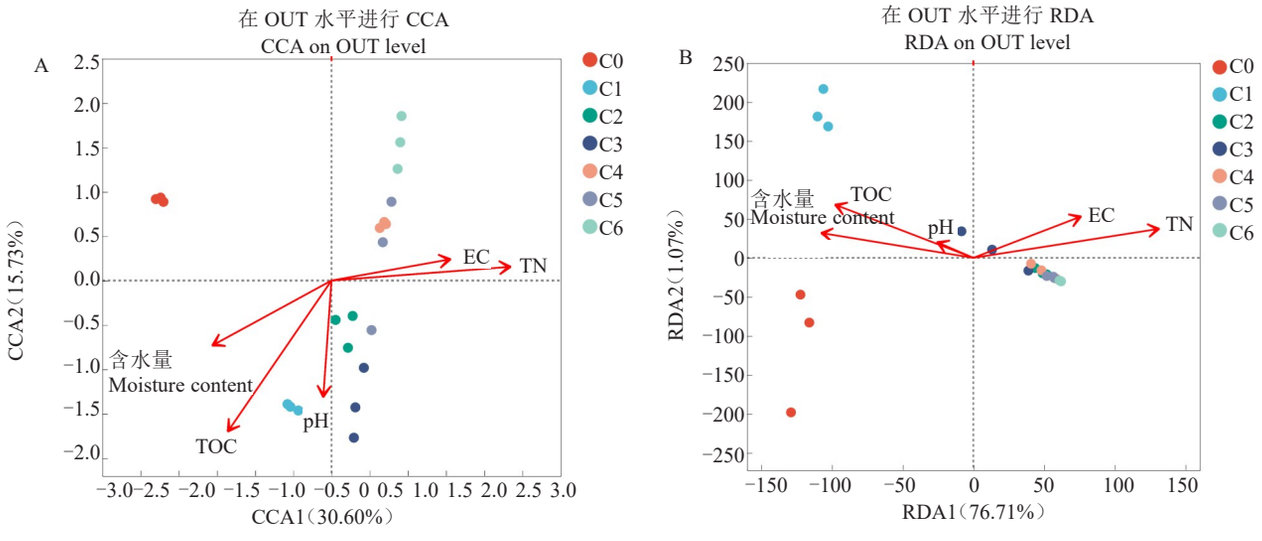


图 7　培养料不同发酵阶段理化性质与细菌（A）和真菌（B）群落的 RDA/CCA 分析

Fig. 7　RDA/CCA analysis of physicochemical properties at different fermentation stages of culture media and bacterial（A）and fungal（B）communities and physicochemical properties

料理化性质及酶活性的变化情况，掌握微生物多样性及群落演替规律，为实际生产上优化草腐菌培养料发酵工艺提供数据支撑。

微生物只有利用水溶性有机物才能正常进行生长代谢和繁殖，含水量过低不利于微生物生长代谢，过高又会容易形成厌氧环境[19]。本研究中，随着发酵的进行，含水量总体呈下降趋势，这与孔维丽等[6]和许修宏等[20]的研究结果一致，可能是由于微生物大量繁殖产生热量，培养料温度不断上升，导致水分蒸发加快。培养料 pH 是影响微生物生长活动的重要因素之一，pH 为中性或略偏碱性时，有利于微生物活动与后期菌丝的生长[21]。C0~C2 时期 pH 下降，随着发酵进行，C3 时期 pH 上升至最高，为 9.38，pH 升高可能是 C3 时期翻堆时加入了大量石灰所致，C4~C6 时期 pH 逐渐下降，可能是由于微生物分解发酵料中的有机物质、产生大量有机酸所致[22]。根据 NY/T3442—2019[23]可知，堆肥最佳 pH 在 6.5~8.0 之间，本研究中最终 pH 为 7.15，在最佳范围之内。EC 反映了培养料中可溶性盐的含量，过高的盐含量会抑制菌丝生长[24]。在本试验中，培养料 EC 整体呈上升趋势。C0~C2 时期上升，可能是由于微生物的生长代谢，分解有机物，释放可溶性盐，导致 EC 升高[25]，也可能是高温环境水分蒸发加快，EC 上升。C2~C5 时期 EC 缓慢下降，可能是随着发酵进行，有机物进一步分解，同时氨气挥发和翻堆时向培养料补水都可能导致 EC 下降。碳和氮均是微生物生长代谢的主要营养来源。发酵过程中，TOC 整体呈下降趋势，可能是由于嗜热微生物生长代谢，导致部分碳以 CO_2 形式释放[26]，也可能是因为大分子物质降解后，为微生物生长代谢所利用[27]。氮对食用菌菌丝生长至关重要，适量的氮可以提高产量和品质，特别是粗蛋白含量[28]。TN 在 C0~C2 时期显著上升，可能由于微生物生长代谢加快，有机物被分解利用，并且水分逐渐下降产生浓缩效应，使总干物质损失率大于氮素损失率[29]，TN 增加。C3 时期 TN 略微下降，在取样过程中能闻到刺激性气味，可能与氨气挥发有关[30]，也可能与氮在 NO^-_3、NO_2-N、NO、N_2 之间的转化有关[31]。C4~C6 时期 TN 显著上升，可能是因为此时硝化细菌比较活跃，发生硝化作用，将铵态氮转化为硝态氮，硝态氮含量持续升高，减少了氮损失[32]，Zhang 等[33]和 Meng 等[34]的研究均与该趋势一致。

培养料发酵过程中酶活性影响纤维素、半纤维素和木质素的降解[8]，木质纤维素必须经过酶分解成葡萄糖、果糖等小分子物质之后才能被草腐菌吸收利用，酶活性越高，木质纤维素降解速度越快[35]。在本研究中纤维素酶、木聚糖酶活性均呈降-升-降的变化趋势。初期两种酶活性下降可能是由于发酵初期微生物利用简单有机物，致使活性较低。随着发酵的进行，微生物逐渐适应环境，分泌纤维素酶的微生物数量增加[36]，在第 4 次翻堆时纤维素酶活性达到峰值，纤维素酶活性在 C3 和 C4 时期均处于较高水平，且无显著差异，可能是微生物群落结构达到一个相对稳定的阶段。木聚糖酶活性在 C3 时期达到峰值，可能是由于第 3 次翻堆时，微生物代谢旺盛，分泌木聚糖酶的微生物数量及酶活性均最高。本研究中优势菌属热耐丙酸杆菌属（*Caldicoprobacter*）可在高温环境下利用木聚糖和阿拉伯木聚糖等半纤维素，该菌在 C3 时期相对丰度最高，可能导致木聚糖酶活性升高。另外，C3 和 C4 时期培养料处于高温阶段，培养料温度升高可以增强木质纤维素降解酶（如木聚糖酶和纤维素酶）的活性，从而加速纤维素和半纤维素的分解[37]。而发酵后期，由于能被微生物利用的可降解有机化合物减少[38]，因此纤维素酶和木聚糖酶活性逐渐下降，直到发酵完成，这与田伟等[39]研究的牛粪高温堆肥的结果相似。漆酶是与木质素降解有关的生物酶。在本研究中漆酶活性整体呈下降趋势，初期活性最高，说明木质素在初期被大量分解。降解木质素的微生物主要是真菌和细菌[40]。微生物能够分泌漆酶来分解木质素等复杂有机物，从而获取能量和营养，这种代谢活动在堆肥初期尤为显著，导致漆酶活性较高[41]。漆酶作为一种多酚氧化酶，广泛存在于多种微生物中。当培养料进入发酵初期，丰富的微生物类群为漆酶合成与分泌提供了庞大的生物基础，从而导致漆酶活性初期较高。之后随着培养料温度升高，产漆酶微生物生长被抑制，导致漆酶活性下降，这与刘元栋[42]在平菇培养料发酵中的研究结果相似。

培养料发酵过程中微生物群落组成结构和多样性都会发生显著变化[43]。本研究中细菌群落在 C0 时期的优势菌属较多，随着堆肥开始升温，优势菌属数量减少并逐渐被其他菌属取代。其中不动杆菌属（*Acinetobacte*r）、瘤胃纤毛杆菌属（*Ruminofilibacter*）、产乙酸嗜蛋白菌属（*Proteiniphilum*）都可在牛瘤胃和牛粪中分离得到[44-46]，说明发酵初期优势菌属的种类与原料有很大关系。C1 时期栖热菌属（*Thermus*）、脲芽胞杆菌属（*Ureibacillus*）、热耐丙

酸杆菌属（*Caldicoprobacter*）、氢孢菌属（*Hydrogenispora*）为优势菌属，属于嗜热菌，热耐丙酸杆菌属（*Caldicoprobacter*）多为从动物粪便或热泉中分离的极端嗜热细菌[47]。C2时期氢孢菌属（*Hydrogenispora*）和脲芽胞杆菌属（*Ureibacillus*）的相对丰度最高。C3时期栖热菌属（*Thermus*）和热耐丙酸杆菌属（*Caldicoprobacter*）的相对丰度上升并达到最高，而氢孢菌属（*Hydrogenispora*）和脲芽胞杆菌属（*Ureibacillus*）相对丰度开始下降。C1~C3时期优势菌属有重复，可能是因为持续的高温环境适宜它们生长繁殖。Beffa等[48]也在废弃物堆肥中发现了大量的栖热菌属（*Thermus*）细菌，该类细菌能够适应堆肥的高温环境，是主要的降解微生物。C4时期新出现了球形杆菌属（*Sphaerobacter*）和微小杆菌属（*Exiguobacterium*）两类优势菌属，球形杆菌属（*Sphaerobacter*）是具有底物特异性和高热稳定性的新型菌属[49]，微小杆菌属（*Exiguobacterium*）可以产蛋白酶并具有一定的酶学性质[50]。在发酵后期也新出现了两种优势菌属，分别为unclassified_f__Roseiflexaceae和红热菌属（*Rhodothermus*），可能是由于即将腐熟，温度开始下降，导致嗜热菌变少，嗜温菌相对丰度开始增加。

在真菌属水平上，发酵初期的微生物群落多样性主要取决于原料[51]。本研究中C0、C1时期的优势菌属较多，王秀红等[52]研究发现，鸡粪堆肥初期的优势菌属也包含曲霉属（*Aspergillus*）、念珠菌属（*Candida*）。随着堆肥温度逐渐升高，C2时期嗜热链球菌属（*Mycothermus*）相对丰度急剧上升，其他优势菌属相对丰度逐渐下降，如曲霉属（*Aspergillus*）和*Thermomuces*，说明它们是热敏真菌[53]。C3时期只有嗜热链球菌属（*Mycothermus*）、曲霉属（*Aspergillus*）、unclassified_k__Fungi和克恩菌属（*Kernia*）相对丰度较高。C4、C5时期unclassified_k__Fungi相对丰度降低，但是嗜热链球菌属（*Mycothermus*）相对丰度增高，并在C6时期为仅有的优势菌属，相对丰度达到最高。嗜热链球菌属（*Mycothermus*）在C1~C6时期始终是优势菌属，可通过产生多种水解酶分解大分子物质，为堆肥提供能量[54]，因此推测嗜热链球菌属（*Mycothermus*）为判断牛粪堆肥腐熟的典型菌属。有研究表明，曲霉属（*Aspergillus*）和嗜热链球菌属（*Mycothermus*）与堆肥过程中木质纤维素降解有关[55]，念珠菌属（*Candida*）也可以参与木质纤维素的降解[56]，表明本研究的3个优势真菌属参与了培养料中木质纤维素的降解。

环境因子关联冗余分析（RDA）/典范对应分析（CCA）表明，TOC是对细菌群落组成影响最大的理化因子，其次是TN。苏鹏伟[57]研究表明，碳在所有营养元素里最为重要，与微生物生长代谢密切相关。秦改娟等[58]研究中，将玉米秸秆和杏鲍菇菇渣替代麦草栽培双孢蘑菇，结果表明菇渣配方含氮量高，其堆肥3个时期的优势细菌种类、多样性指数均与传统麦草配方有明显差异，表明总氮含量对食用菌培养料中细菌群落具有影响。TN与细菌活性密切相关，细菌活性直接影响氮素转化和培养料的腐熟[59]。TN是对真菌群落组成影响最为显著的理化因子，其次是含水量，含水量直接影响溶解性有机物含量和酶活性。赵玉阳等[60]研究表明，总氮含量是影响姬松茸培养料真菌群落的主要因素之一，并通过冗余分析发现含水量和总氮含量对真菌群落有显著影响。王萌萌等[61]研究表明，在双孢菇菌渣堆肥中添加牛粪，可提高堆肥中真菌群落丰富度和多样性，构建网络模型分析发现，总氮核心菌与总氮含量呈显著正相关。Lin等[62]研究表明，含水量可通过调节真菌的酶活性和孢子萌发条件，与氮源协同作用，共同影响堆肥真菌群落结构。

在本试验条件下，不同阶段培养料的理化指标均呈不同的变化趋势，因此导致了微生物群落演替和多样性的变化。培养料发酵结束时含水量为65.14%，pH为7.15；EC达2.47 $mS \cdot cm^{-1}$；TOC为45.04%；TN为0.63%；纤维素酶、木聚糖酶和漆酶活性分别为2.08、3.58、13.19 $U \cdot g^{-1}$。微生物群落组成方面，细菌群落中的栖热菌属（*Thermus*）在C1~C6时期均为优势菌属，norank_f__norank_o__SBR1031在C2~C6时期均为优势菌属。真菌群落中C0时期优势菌属较丰富，而嗜热链球菌属（*Mycothermus*）在C1~C6时期为主要的优势菌属。环境因子关联性分析方面，TOC和TN分别是影响细菌和真菌群落结构的最显著理化因子。综上所述，本研究明确了草腐菌培养料发酵过程中理化指标、微生物群落演替情况及两者关联特征，为优化培养料配方、改进发酵技术提供了重要的理论支撑，对提高草腐菌培养料品质具有实践指导意义。

参考文献

[1] 边银丙．食用菌栽培学[M]．北京：高等教育出版社，2017.

[2] 李晓，李晓博，李玉．草腐菌生产在农业废弃物污染防治中的作用[J]．北方园艺，2009（2）：120-122.

[3] 王亚飞．不同畜禽粪便堆肥过程中可培养微生物数量及腐殖

质含量和酶活性的变化[D]. 兰州：甘肃农业大学，2016.
[4] 李洋，席北斗，赵越，等．不同物料堆肥腐熟度评价指标的变化特性[J]. 环境科学研究，2014，27(6)：623-627.
[5] LIN C. A negative-pressure aeration system for composting food wastes[J]. Bioresource Technology，2008，99（16）：7651-7656.
[6] 孔维丽，郭家稳，刘芹，等．平菇培养料发酵度快速测定指标的建立[J]. 中国瓜菜，2021，34(2)：54-60.
[7] KARIAGA M G，NYONGESA H W，KEYA N C O，et al. Compost physico-chemical factors that impact on yield in button mushrooms，*Agaricus bisporus*（Lge）and *Agaricus bitorquis*（Quel）saccardo[J]. Journal of Agricultural Sciences，2012，3(1)：49-54.
[8] 桑羽希，张昊琳，高晓静，等．草菇菇渣栽培双孢蘑菇过程中的理化性状和木质纤维素分解利用研究[J]. 中国农学通报，2019，35(8)：152-157.
[9] 于建光，李瑞鹏，陆建刚，等．秸秆牛粪堆制基料理化性状对双孢蘑菇产量和品质的影响[J]. 食用菌，2013，35(1)：21-23.
[10] 赵彬涵，孙宪昀，黄俊，等．微生物在有机固废堆肥中的作用与应用[J]. 微生物学通报，2021，48(1)：223-240.
[11] 常路路，申进文．平菇培养料发酵过程理化因素及微生物变化研究[J]. 中国食用菌，2012，31(4)：34-36.
[12] 姚琴．双孢蘑菇培养料配方及发酵过程中物质变化规律研究[D]. 南京：南京农业大学，2016.
[13] 刘芹，胡素娟，孔维丽，等．粒径对平菇栽培用玉米芯发酵料代谢物的影响[J]. 中国瓜菜，2021，34(3)：59-65.
[14] 刘皓皓，刘芹，崔筱，等．基于代谢组学分析平菇栽培用培养料发酵过程中代谢物的变化[J]. 中国瓜菜，2021，34(4)：21-30.
[15] 童斌，杨薇红．园艺产品营养与品质分析[M]. 陕西杨凌：西北农林科技大学出版社，2006.
[16] 中华人民共和国农业农村部．有机肥料：NY 525－2021[S]. 北京：中国农业出版社，2021.
[17] 王强．降解木质纤维素的侧耳属菌株的筛选及酶学特性研究[D]. 河北邯郸：河北工程大学，2019.
[18] 王琳，刘国生，王林嵩，等．DNS 法测定纤维素酶活力最适条件研究[J]. 河南师范大学学报（自然科学版），1998，26(3)：66-69.
[19] 王艳成，黄升日，董微巍，等．超高温堆肥过程中微生物群落及其理化性质研究[J]. 延边大学学报（自然科学版），2021，47(4)：319-323.
[20] 许修宏，成利军，许本姝，等．基于高通量测序分析牛粪堆肥中细菌群落动态变化[J]. 东北农业大学学报，2018，49(3)：10-20.
[21] 李月明．以玉米芯和牛粪为主要发酵基质优化巴西菇发酵料的研究[D]. 哈尔滨：黑龙江大学，2015.
[22] ZHOU G X，XU X F，QIU X W，et al. Biochar influences the succession of microbial communities and the metabolic functions during rice straw composting with pig manure[J]. Bioresource Technology，2019，272：10-18.
[23] 中华人民共和国农业农村部．畜禽粪便堆肥技术规范：NY/T 3442－2019[S]. 北京：中国农业出版社，2019.
[24] 候玉勇．菌糠对猪粪好氧堆肥理化性质的影响及对腐熟特性的评价研究[D]. 新疆阿拉尔：塔里木大学，2021.
[25] 曹云，常志州，黄红英，等．畜禽粪便堆肥前期理化及微生物性状研究[J]. 农业环境科学学报，2015，34(11)：2198-2207.
[26] NADA W M. Stability and maturity of maize stalks compost as affected by aeration rate，C/N ratio and moisture content[J]. Journal of soil Science and Plant Nutrition，2015，15（3）：751-764.
[27] 周金看，赵玉阳，夏会楠，等．平菇培养料发酵过程中理化性质及物质变化研究[J]. 食药用菌，2023，31(5)：338-343.
[28] KUMLA J，SUWANNARACH N，SUJARIT K，et al. Cultivation of mushrooms and their lignocellulolytic enzyme production through the utilization of agro-industrial waste[J]. Molecules，2020，25(12)：2811.
[29] HUANG G F，WU Q T，WONG J W C，et al. Transformation of organic matter during co-composting of pig manure with sawdust[J]. Bioresource Technology，2006，97(15)：1834-1842.
[30] ZHAO Y，LU Q，WEI Y Q，et al. Effect of actinobacteria agent inoculation methods on cellulose degradation during composting based on redundancy analysis[J]. Bioresource Technology，2016，219：196-203.
[31] SHI M Z，ZHAO X Y，ZHU L J，et al. Elucidating the negative effect of denitrification on aromatic humic substance formation during sludge aerobic fermentation[J]. Journal of Hazardous Materials，2020，388：122086.
[32] CACERES R，FLOTATS X，MARFA O. Changes in the chemical and physicochemical properties of the solid fraction of cattle slurry during composting using different aeration strategies[J]. Waste Management，2006，26(10)：1081-1091.
[33] ZHANG C，GAO Z，SHI W C，et al. Material conversion，microbial community composition and metabolic functional succession during green soybean hull composting[J]. Bioresource Technology，2020，316：123823.
[34] MENG Q X，YANG W，MEN M Q，et al. Microbial community succession and response to environmental variables during cow manure and corn straw composting[J]. Frontiers in Microbiology，2019，10：529.
[35] ANDRÉ I，POTOCKI-VÉRONÈSE G，BARBE S，et al. CAZyme discovery and design for sweet dreams[J]. Current Opinion in Chemical Biology，2014，19：17-24.
[36] LU X L，YANG Y X，HONG C L，et al. Optimization of vegetable waste composting and the exploration of microbial mechanisms related to fungal communities during composting[J]. Journal of Environmental Management，2022，319：115694.
[37] MENG L X，XU C X，WU F L，et al. Microbial co-occurrence networks driven by low-abundance microbial taxa during composting dominate lignocellulose degradation[J]. Science of the Total Environment，2022，845：157197.
[38] CASTALDI P，GARAU G，MELIS P. Maturity assessment of compost from municipal solid waste through the study of enzyme activities and water-soluble fractions[J]. Waste Management，2008，28(3)：534-540.
[39] 田伟，张振华，汪贞，等．牛粪高温堆肥过程中木质纤维素降解及相关生物学特性研究[J]. 浙江农业学报，2014，26(2)：432-438.
[40] 曾光明，黄国和，袁兴中，等．堆肥环境生物与控制[M]. 北

京：科学出版社，2006.
[41] 孟童瑶，李素艳，邹荣松，等．固定化木质素降解菌对园林废弃物堆肥的影响[J]．浙江农林大学学报，2021，38（1）：38-46.
[42] 刘元栋．培养料发酵时间对平菇栽培的影响研究[D]．郑州：河南农业大学，2021.
[43] 郭艳，张进良，邓昌彦，等．利用 PCR-DGGE 技术分析猪粪堆肥细菌群落结构[J]．河南师范大学学报（自然科学版），2010，38（5）：159-162.
[44] JOSE V L，MORE R P，APPOOTHY T，et al. In depth analysis of rumen microbial and carbohydrate-active enzymes profile in Indian crossbred cattle[J]. Systematic and Applied Microbiology，2017，40（3）：160-170.
[45] SAMARAJEEWA A D，HAMMAD A，MASSON L，et al. Comparative assessment of next-generation sequencing，denaturing gradient gel electrophoresis，clonal restriction fragment length polymorphism and cloning-sequencing as methods for characterizing commercial microbial consortia[J]. Journal of Microbiological Methods，2015，108：103-111.
[46] FAN Z J，KE X L，JIANG L J，et al. Genomic and biochemical analysis reveals fermented product of a putative novel *Romboutsia* species involves the glycometabolism of tilapia[J]. Aquaculture，2024，581：740483.
[47] WIDYASTI E，SHIKATA A，HASHIM R，et al. Biodegradation of fibrillated oil palm trunk fiber by a novel thermophilic，anaerobic，xylanolytic bacterium *Caldicoprobacter* sp. CL-2 isolated from compost[J]. Enzyme and Microbial Technology，2018，111：21-28.
[48] BEFFA T，BLANC M，LYON P F，et al. Isolation of thermus strains from hot composts（60 to 80 degrees C）[J]. Applied Environmental Microbiology，1996，62（5）：1723-1727.
[49] KWON S，LEE J H，KIM C M，et al. Structural insights into the enzyme specificity of a novel ω-transaminase from the thermophilic bacterium *Sphaerobacter thermophilus*[J]. Journal of Structural Biology，2019，208（3）：107395.
[50] LEI F F，CUI C，ZHAO Q Z，et al. Evaluation of the hydrolysis specificity of protease from marine *Exiguobacterium* sp. SWJS2 via free amino acid analysis[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology，2014，174（4）：1260-1271.
[51] HARINDINTWALI J D，ZHOU J L，YU X B. Lignocellulosic crop residue composting by cellulolytic nitrogen-fixing bacteria：A novel tool for environmental sustainability[J]. Science of the Total Environment，2020，715：136912.
[52] 王秀红，史向远，张纪涛，等．鸡粪好氧堆肥腐熟度、重金属残留及微生物菌群分析[J]．山西农业科学，2021，49（9）：1094-1099.
[53] MAO H L，WANG K，WANG Z，et al. Metabolic function，trophic mode，organics degradation ability and influence factor of bacterial and fungal communities in chicken manure composting[J]. Bioresource Technology，2020，302：122883.
[54] BASOTRA N，KAUR B，FALCO D M，et al. *Mycothermus thermophilus*（Syn. *Scytalidium thermophilum*）：Repertoire of a diverse array of efficient cellulases and hemicellulases in the secretome revealed[J]. Bioresource Technology，2016，222：413-421.
[55] ZHU N，ZHU Y Y，LI B Q，et al. Increased enzyme activities and fungal degraders by *Gloeophyllum trabeum* inoculation improve lignocellulose degradation efficiency during manure-straw composting[J]. Bioresource Technology，2021，337：125427.
[56] HERNÁNDEZ-LARA A，ROS M，CUARTERO J，et al. Bacterial and fungal community dynamics during different stages of agro-industrial waste composting and its relationship with compost suppressiveness[J]. Science of the Total Environment，2022，805：150330.
[57] 苏鹏伟，罗瑾，狄亚鹏，等．牛粪堆肥中细菌群落结构变化及与理化因子的相关性[J]．山西农业科学，2021，49（11）：1317-1323.
[58] 秦改娟，郭亚萍，张国庆，等．秸秆与菇渣堆肥用于双孢蘑菇栽培的理化性状和细菌群落分析[J]．农业工程学报，2016，32（增刊 2）：285-291.
[59] SUN N，FAN B，YANG F，ZHAO L，et al. Effects of adding corn steep liquor on bacterial community composition and carbon and nitrogen transformation during spent mushroom substrate composting[J]. BMC Microbiol. 2023，23（1）：156.
[60] 赵玉阳，冯璠，郝刘斌，等．姬松茸发酵培养料的理化性质及微生物群落研究[J]．北方园艺，2024（9）：70-77.
[61] 王萌萌，范博文，赵立琴，等．牛粪对双孢菇菌渣堆肥过程中碳氮转化及真菌群落的影响[J]．农业环境科学学报，2024，43（1）：162-173.
[62] LIN WR，LI HY，LIN LC，et al. Dynamics of microbial community during the co-composting of swine and poultry manure with spent mushroom substrates at an industrial scale[J]. Microorganisms. 2022，10（10）：2064.