

张煦尧,秦文杰,江洪,等.脲酶抑制剂对亮斑扁角水虻转化鸡粪中NH₃减排效果及氮素转化的影响[J].华中农业大学学报,2022,41(4):51-55.DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2022.04.007

脲酶抑制剂对亮斑扁角水虻转化鸡粪中NH₃减排效果及氮素转化的影响

张煦尧^{1,2},秦文杰^{1,2},江洪¹,谢劲松¹,李庆^{1,2},曹秀芳¹

1. 华中农业大学理学院,武汉430070; 2. 生猪健康养殖省部共建协同创新中心,武汉430070

摘要 为研究亮斑扁角水虻幼虫(black soldier fly larvae, BSFL)在添加脲酶抑制剂的处理下对鸡粪中氮素的利用情况,分别选用3种不同脲酶抑制剂N-丁基硫代磷酸三胺(NBPT)、乙酰氧肟酸(AHA)、氢醌(HQ)添加于处理组中,以不添加脲酶抑制剂的鸡粪作为对照组,每个处理组分别投入800头亮斑扁角水虻幼虫,比较不同组别NH₃排放量、亮斑扁角水虻幼虫生长、转化效率及底物物理化学性质变化等情况。结果显示,与对照组相比,添加脲酶抑制剂的处理组可以有效地减少亮斑扁角水虻转化鸡粪过程中NH₃的排放量并增加鲜虫质量,NBPT、AHA和HQ处理组虫体质量分别增加(64.75±3.46)、(71.33±3.38)、(78.84±1.84)g,虫体氮含量分别为(14.47±1.14)%、(15.92±0.34)%、(16.24±0.45)%。以上结果表明:3种处理组均可提升亮斑扁角水虻虫体质量和虫体蛋白含量,尤以HQ处理组效果最好,可以有效减少NH₃排放并显著增加鲜虫质量。

关键词 亮斑扁角水虻; 鸡粪; 脲酶抑制剂; NH₃排放; 氮素转化; 废弃物利用

中图分类号 X713 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2022)04-0051-05

随着我国畜禽养殖业集约化规模化进程的推进,养殖过程中产生的大量畜禽粪便造成了严重的农业面源污染,制约着畜禽养殖业的绿色可持续发展。因此,畜禽粪便处理方法需遵循三大原则:减量化、无害化和资源化。如今国内常用的畜禽粪便处理方法主要是好氧堆肥,通过微生物的作用,使畜禽粪便最终成为安全稳定的土壤改良剂^[1]。但在堆肥的过程中,16%~74%的初始氮会以气态氮(NH₃和N₂O)的形式损失,这既导致堆肥产品质量的下降,又会造成严重的空气污染^[2]。近年来利用亮斑扁角水虻处理有机废弃物已成为一种新兴的技术。亮斑扁角水虻(*Hermetia illucens* L.)又称黑水虻(black soldier fly, BSF),是双翅目水虻科(Stratiomyidae)扁角水虻属(*Hermetia latreille*)食腐性昆虫,广泛分布于热带和温带地区^[3],因此其能在中国广大地区养殖。亮斑扁角水虻幼虫能将畜禽粪便中的营养物质转化为自身生物物质,同时残留物可以用作土壤改良剂^[4]。相比于传统堆肥来说,亮斑扁角水虻将畜禽粪便中的一部分氮损失转移到自身,但在其转化畜禽粪便

过程中的NH₃排放仍然是氮损失的重要途径。脲酶抑制剂是一种传统的氮肥增效剂,其主要功效是通过抑制土壤中的脲酶活性,从而抑制土壤中尿素的水解,进一步降低土壤中的NH₄⁺的浓度,从而减少NH₃的排放^[5]。已有研究显示,在堆肥过程中添加脲酶抑制剂可以有效减少26.3%的NH₃排放,同时对氮转化相关的酶产生影响^[6],然而脲酶抑制剂对亮斑扁角水虻生物转化粪便的影响还未见文献报道。因此,本研究在亮斑扁角水虻转化鸡粪体系中添加不同脲酶抑制剂,分析其对NH₃排放以及底物中的氮分布的影响,旨在为后续水虻生产应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

亮斑扁角水虻幼虫(black soldier fly larvae, BSFL)来源于华中农业大学农业微生物学国家重点实验室食用昆虫与微生物研发团队。新鲜鸡粪收集于华中农业大学实验鸡场,稻谷壳购置于当地市场,原始材料的物理化学性质见表1。脲酶抑制剂N-丁

收稿日期:2022-03-28

基金项目:国家自然科学基金项目(42177100);湖北洪山实验室开放课题(2021hskf011)

张煦尧,E-mail:13682197168@163.com

通信作者:曹秀芳,E-mail:caoxiufang@mail.hazu.edu.cn

基硫代磷酰三胺(NBPT)、乙酰氧肟酸(AHA)、氢醌(HQ)购自武汉欣申试化工科技有限公司。

表1 试验材料基本理化性质

原材料 Raw materials	含水率/% Moisture	电导率/ (mS/cm) EC	pH	凯氏氮/% TKN
鸡粪 Chicken manure	77.91±0.31	3.49±0.01	5.78±0.01	1.65±0.25
稻谷壳 Rice husk	9.85±0.04	1.65±0.02	7.13±0.18	0.13±0.01

1.2 试验方法

将鸡粪与稻谷壳混合均匀,对照组不添加脲酶抑制剂,试验组加入不同脲酶抑制剂(以鸡粪湿质量0.1%计)N-丁基硫代磷酰三胺(NBPT)、乙酰氧肟酸(AHA)、氢醌(HQ),分别编号为CK、NBPT、AHA和HQ组。调节水分含量约为65%,分装在3L的玻璃瓶中,所有组别重复3次。向每瓶中投入800头在麦麸中喂养的5日龄亮斑扁角水虻幼虫,在30℃下进行培养。分别于第0、2、4、6、8、10天采集底物于密封袋中,保存于-20℃冰箱,用于后续理化性质测定。转化过程中每日用稀H₂SO₄吸收反应中释放的NH₃,然后用NaOH溶液进行滴定,并记录滴定体积。当处理组中出现水虻预蛹后,将幼虫与基质残渣分离,统计不同处理的幼虫总质量、存活率,基质残渣在50℃烘干,记录干质量。虫体氮计算公式如下:

$$\text{虫体氮} = \frac{\text{转换后虫体氮}}{\text{初始底物中氮}} \times 100\%$$

1.3 理化指标测定

残渣样品基本理化指标参照《土壤农化分析》的方法测定;底物pH值和电导率值采用pH计和电导率仪法测定(浸提比1:10);底物中NH₄⁺-N、NO₃⁻-N用2 mol/L的KCl溶液浸提,过滤后,用比色法测定NH₄⁺、NO₃⁻含量。残渣样品风干后,用H₂SO₄-H₂O₂消解残渣及虫体,用全自动凯氏定氮仪测定样品中凯氏氮含量。

1.4 数据统计与分析

试验数据通过Excel 2010软件进行统计分析,并用Origin 9.1进行绘图。使用SPSS(SPSS Statistics IBM)26.0,进行单因素方差分析(ANOVA)。P<0.05则认为比较值之间具有统计学差异。

2 结果与分析

2.1 不同脲酶抑制剂对转化过程中NH₃排放的影响

NH₃的排放是亮斑扁角水虻转化畜禽粪便的重要指标之一。本研究仅测定水虻转化鸡粪过程中

NH₃的排放量。如图1所示,在试验进行的前8d基本没有NH₃排放,从第9天开始,NH₃排放量逐渐增加,在第10天达到峰值。相比于对照组,所有添加脲酶抑制剂的处理组均降低了NH₃排放量,其中到第10天时,对照组排放量最高,达(189.31±17.71) mg, HQ组最低,为(63.65±8.60) mg。如图2所示,亮斑扁角水虻转化鸡粪过程中累计NH₃排放量CK组>AHA组>NBPT组>HQ组,累计NH₃排放量分别为(269.28±24.52)、(221.95±59.18)、(195.84±14.13)、(93.84±14.89) mg。其中添加脲酶抑制剂HQ对于NH₃减排的效果最好,相比于对照组减少了65.15%的NH₃排放量。

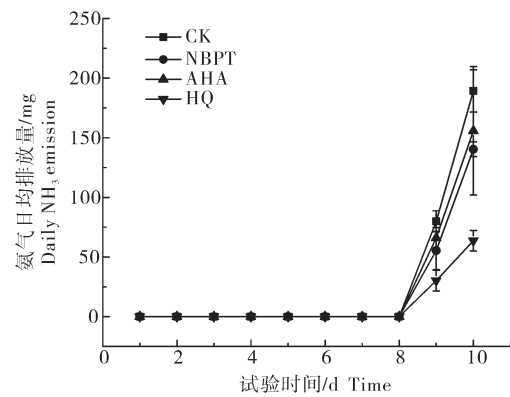


图1 亮斑扁角水虻转化过程中NH₃日均排放量

Fig.1 Daily NH₃ emission during BSFL bioconversion

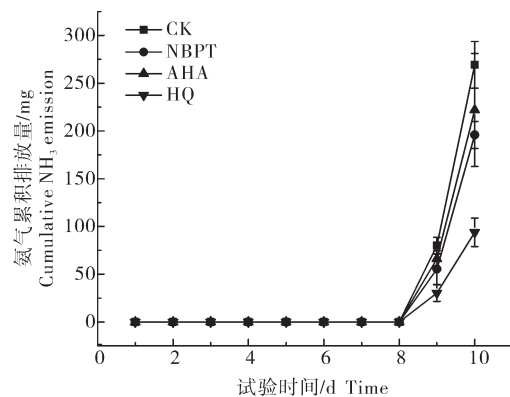


图2 亮斑扁角水虻转化过程中NH₃累计排放量

Fig.2 Cumulative NH₃ emission during BSFL bioconversion

2.2 不同脲酶抑制剂对水虻转化效率的影响

从表2可以看出,所有添加脲酶抑制剂处理组的亮斑扁角水虻存活率及虫体增加质量情况均高于对照组,其中HQ组效果最好,相比于对照组,虫体质量增加上升34.01%。如表2所示,HQ组获得的虫体氮占初始氮的(16.24±0.45)%,相比于对照组,HQ组虫体氮提高21.74%。说明水虻在转化鸡粪的过程中,添加脲酶抑制剂可以增加获取水虻虫体的生物质。

表2 不同脲酶抑制剂处理下亮斑扁角水虻生长情况

Table 2 Growth of BSFL under different urease inhibitors

组别 Group	水虻存活率/% BSFL survival rate	虫体质量增量/g BSFL weight gain	虫体氮/% BSFL nitrogen content
CK	78.17±3.07	58.83±3.40	13.34±1.29
NBPT	81.42±2.56	64.75±3.46	14.47±1.14
AHA	81.29±1.66	71.33±3.38	15.92±0.34
HQ	85.71±1.13	78.84±1.84	16.24±0.45

2.3 不同脲酶抑制剂对转化过程中pH值和EC值的影响

pH值随时间的变化如图3所示。在整个转化周期内,所有处理组的pH值的变化趋势保持一致,试验的前8 d保持在弱酸性,在试验第8~10天pH值快速上升到8以上。所有处理组的电导率值动态变化如图4所示,对照组与加入脲酶抑制剂的3个处理组表现出相近的变化趋势,都呈现先上升后下降的趋势。其中对照组与AHA组在试验的第6天出现峰值,NBPT组和HQ组的峰值则出现在第8天,转化结束时所有处理组的电导率值出现下降说明底物性质趋近于稳定。

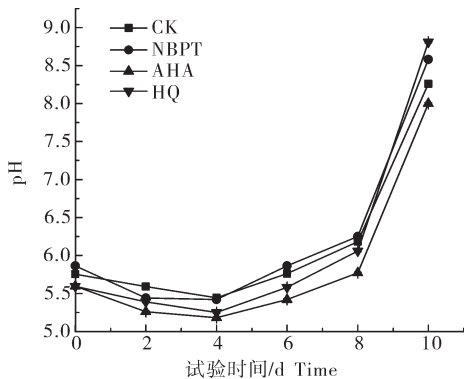


图3 亮斑扁角水虻转化过程中pH动态变化

Fig.3 Changes of pH during BSFL bioconversion

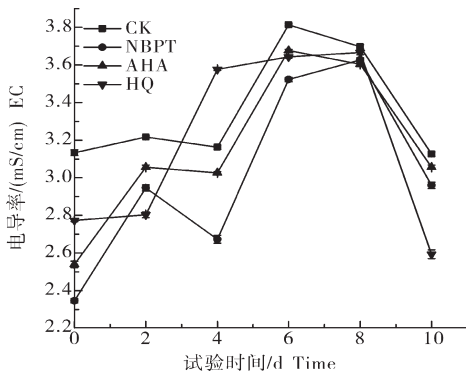


图4 亮斑扁角水虻转化过程中电导率值动态变化

Fig.4 Changes of EC during BSFL bioconversion

2.4 不同脲酶抑制剂对底物中NH₄⁺-N、NO₃⁻-N含量的影响

由图5所示,在亮斑扁角水虻转化鸡粪的过程中,NH₄⁺呈现先升高后降低再短暂升高的趋势。在0~4 d中NBPT组、AHA组、HQ组的NH₄⁺含量均低于对照组。但在6 d后,添加脲酶抑制剂的处理组中,NH₄⁺含量反超对照组。除NBPT组外,其他处理组都在试验进行的第6天出现峰值,CK组、AHA组和HQ组的峰值分别为(6.80±0.96)、(7.19±0.42)和(8.35±0.67) g/kg,NBPT组的峰值则出现在第10天,为(7.51±0.10) g/kg。由图6可见,在整个转化过程中,NO₃⁻呈现先下降后上升的趋势,与转化过程中的NH₄⁺动态变化呈现相反趋势。除对照组外,其他试验组都在试验进行的第4天出现最低值,NBPT组、AHA组和HQ组的峰值分别为(0.06±0.01)、(0.04±0.01)和(0.02±0.01) g/kg。对照组则在第8天出现最低值,为(0.07±0.01) g/kg。

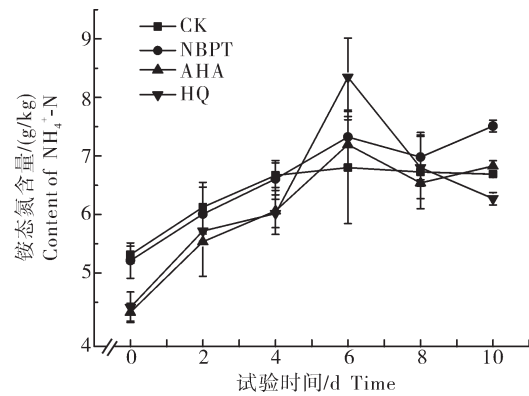


图5 转化过程中NH₄⁺-N动态变化

Fig.5 Changes of NH₄⁺-N during BSFL bioconversion

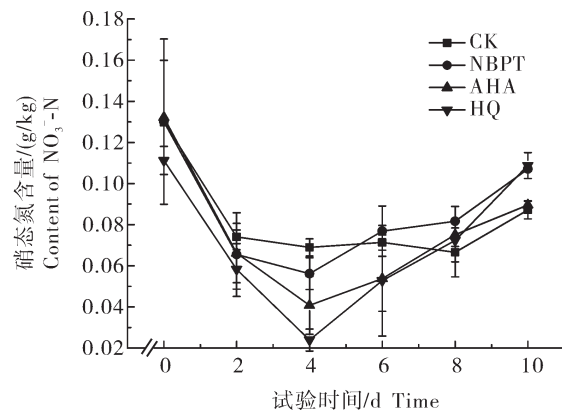


图6 转化过程中NO₃⁻-N动态变化

Fig.6 Changes of NO₃⁻-N during BSFL bioconversion

3 讨论

在亮斑扁角水虻转化鸡粪体系中,NH₃的产生

是多种因素共同作用的结果。本研究结果虽然无法证明亮斑扁角水虻是否与 NH_3 的排放直接相关,但据文献报道 NH_3 的产生可能是亮斑扁角水虻和微生物共同分解利用鸡粪中含氮有机物,发生氨化作用,从而产生 NH_4^+ , NH_4^+ 在一定条件下以 NH_3 的形式逸出^[7],我们将在后续试验设计中增加对于相关功能基因的测定,通过功能基因判断黑水虻与 NH_3 排放之间的具体关联。脲酶抑制剂是通过抑制转化过程中有机氮的分解,从而减少 NH_4^+ 的产生,进一步减少硝化、反硝化反应的发生^[8]。从转化过程中 NH_3 的排放情况可以看出,在转化前期,由于底物的pH值处于弱酸性,不利于 NH_3 从底物中排放,导致试验进行的前8 d没有检测到 NH_3 的排放;但随着亮斑扁角水虻在底物中不断的活动,使得转化过的底物pH值上升并呈现疏松的状态^[9],pH值达到中性甚至碱性, NH_3 的排放量逐渐上升;而脲酶抑制剂可以抑制转化过程中有机氮的分解,所以添加脲酶抑制剂的试验组 NH_3 排放量减少。由于本研究是以出现黑水虻的预蛹时即结束整个黑水虻转化过程,而这个过程只有10 d,故此研究取样时间段设定为10 d,所以 NH_3 的排放量数据检测也只针对于这个期间,不针对于转化后底物二次腐熟的阶段,后续会对残渣二次腐熟过程中 NH_3 的排放情况进行深入研究。而试验前8 d未能测得 NH_3 排放,可能是试验前期底物中pH值偏低,从而影响了 NH_3 的排放。

对于底物中的氮素组分而言,添加脲酶抑制剂的试验组在前期 NH_4^+ 含量较低,其原因可能是脲酶抑制剂可以延缓底物中有机氮向 NH_4^+ 转化^[10],但随着亮斑扁角水虻虫体的生长发育,幼虫对底物中营养物质的利用速率提高,从而加速底物中有机氮的矿化作用,使得底物中的 NH_4^+ 含量升高^[7],底物中的 NH_4^+ 累积,使各个处理组中的底物pH值逐渐升高,导致亮斑扁角水虻转化结束时底物呈碱性。对于转化过程中 NO_3^- 而言,转化过程前期添加脲酶抑制剂的试验组硝化速率低于对照组,但随着试验的进行,脲酶抑制剂活性减弱导致处理组底物中 NO_3^- 的加速产生,进而出现 NO_3^- 含量上升的趋势。脲酶抑制剂主要的作用对象是底物中的尿素,通过抑制尿素的分解减少 NH_4^+ 的产生,从而抑制硝化反应的发生,减少 NO_3^- 的含量;对于亮斑扁角水虻虫体而言,脲酶抑制剂的添加实现保氮作用,能够保留初始底物中营养物质,使亮斑扁角水虻虫体充分利用,可为后续亮斑扁角水虻相关产品的高值化利用提供实验依据。

本研究中,向亮斑扁角水虻转化畜禽粪便过程

中添加不同脲酶抑制剂,通过测定亮斑扁角水虻转化的过程中的气体排放情况以及残渣中氮组分等指标,可以证实脲酶抑制剂的添加能减少氮元素以 NH_3 的形式损失,同时使更多营养物质转移到虫体生物质,提高亮斑扁角水虻对于畜禽粪便的转化利用效率。但本研究只是初步探索脲酶抑制剂对亮斑扁角水虻转化鸡粪体系中氮素流向的影响,脲酶抑制剂作用的到底是黑水虻虫体肠道中的微生物菌落还是底物中的微生物菌落,本研究还无法得出结论,还需要进一步进行研究和验证,在后续的研究中将会关注脲酶抑制剂对氮转化和相关功能基因的影响。Jiang等^[11]的研究表明,在传统堆肥的初始阶段,脲酶抑制剂显著降低了氨单加氧酶、亚硝酸盐还原酶和氧化亚氮还原酶的丰度,而在成熟阶段观察到相反的趋势。但是在脲酶抑制剂影响硝化和反硝化反应过程中涉及的基因较多,基因间的联系紧密而复杂。反应关键酶的动态变化和相互影响还鲜有研究,后续将会对脲酶抑制剂对亮斑扁角水虻转化畜禽粪便过程中氮转化功能基因和细菌群落演替的作用机制进行深入研究。

总体而言,在亮斑扁角水虻转化鸡粪体系中,添加脲酶抑制剂能有效减少亮斑扁角水虻转化鸡粪中 NH_3 的排放量,其中HQ组相比于对照组 NH_3 减排量高达65.15%。并且脲酶抑制剂的添加有利于亮斑扁角水虻虫体的存活和生长,底物中的氮素更多地向虫体富集,其中HQ组中初始氮的16.24%转移到亮斑扁角水虻虫体。脲酶抑制剂的添加有助于亮斑扁角水虻转化鸡粪过程中 NH_3 的减排及氮素向昆虫蛋白的定向转化。

参考文献 References

- [1] MORAL R, PAREDES C, BUSTAMANTE M A, et al. Utilisation of manure composts by high-value crops: safety and environmental challenges [J]. *Bioresource technology*, 2009, 100 (22): 5454-5460.
- [2] YIN Y N, YANG C, LI M T, et al. Research progress and prospects for using biochar to mitigate greenhouse gas emissions during composting: a review [J/OL]. *Science of the total environment*, 2021, 798: 149294 [2022-04-21]. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149294>.
- [3] GOLD M, TOMBERLIN J K, DIENER S, et al. Decomposition of biowaste macronutrients, microbes, and chemicals in black soldier fly larval treatment: a review [J]. *Waste management*, 2018, 82: 302-318.
- [4] 李武, 郑龙玉, 李庆, 等. 亮斑扁角水虻转化餐厨剩余物工艺及资源化利用[J]. *化学与生物工程*, 2014, 31 (11): 12-17. LI W, ZHENG L Y, LI Q, et al. Conversion process and resource utili-

- zation of restaurant waste by black soldier fly [J]. *Chemistry & bioengineering*, 2014, 31 (11): 12-17 (in Chinese with English abstract).
- [5] 倪秀菊, 李玉中, 徐春英, 等. 土壤脲酶抑制剂和硝化抑制剂的研究进展[J]. *中国农学通报*, 2009, 25(12): 145-149. NI X J, LI Y Z, XU C Y, et al. Advance of research on urease inhibitor and nitrification inhibitor in soil [J]. *Chinese agricultural science bulletin*, 2009, 25 (12): 145-149 (in Chinese with English abstract).
- [6] JIANG J S, YU D, WANG Y, et al. Use of additives in composting informed by experience from agriculture: effects of nitrogen fertilizer synergists on gaseous nitrogen emissions and corresponding genes (*amoA* and *nirS*) [J/OL]. *Bioresource technology*, 2021, 319: 124127 [2022-04-21]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124127>.
- [7] CHEN J S, HOU D J, PANG W C, et al. Effect of moisture content on greenhouse gas and NH_3 emissions from pig manure converted by black soldier fly [J/OL]. *Science of the total environment*, 2019, 697: 133840 [2022-04-21]. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133840>.
- [8] 张震宇, 赵圣国, 郑楠, 等. 细菌脲酶抑制剂及其作用机理的研究进展[J]. *动物营养学报*, 2020, 32(8): 3496-3508. ZHANG Z Y, ZHAO S G, ZHENG N, et al. Research progress in urease inhibitors and its mechanism [J]. *Chinese journal of animal nutrition*, 2020, 32(8): 3496-3508 (in Chinese with English abstract).
- [9] PANG W C, HOU D J, CHEN J S, et al. Reducing greenhouse gas emissions and enhancing carbon and nitrogen conversion in food wastes by the black soldier fly [J/OL]. *Journal of environmental management*, 2020, 260: 110066 [2022-04-21]. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110066>.
- [10] KIRSCHKE T, SPOTT O, VETTERLEIN D. Impact of urease and nitrification inhibitor on NH_4^+ and NO_3^- dynamic in soil after urea spring application under field conditions evaluated by soil extraction and soil solution sampling [J]. *Journal of plant nutrition and soil science*, 2019, 182(3): 441-450.
- [11] JIANG J S, WANG Y, GUO F Q et al. Composting pig manure and sawdust with urease inhibitor: succession of nitrogen functional genes and bacterial community [J]. *Environmental science and pollution research international*, 2020, 27: 36160-36171.

Effect of urease inhibitor on NH_3 emission reduction and nitrogen transformation during bioconversion of chicken manure by black soldier fly

ZHANG Xuyao^{1,2}, QIN Wenjie^{1,2}, JIANG Hong¹, XIE Jinsong¹, LI Qing^{1,2}, CAO Xiufang¹

1. *College of Science, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;*

2. *The Cooperative Innovation Center for Sustainable Pig Production Co-Sponsored by Province and Ministry, Wuhan 430070, China*

Abstract To investigate the utilization of nitrogen in chicken manure by black soldier fly larvae (BSFL) under treatment with urease inhibitors, three different urease inhibitors, N-butylthiophosphoric triamide (NBPT), acetylhydroxamic acid (AHA) and hydroquinone (HQ) were added to the treatment groups, and chicken manure without urease inhibitors was used as the control group. All groups were inoculated with 800 BSFL, and the larvae growth and transformation efficiency, NH_3 emission, and changes in the physical and chemical properties of the substrate were compared among different groups. The results showed that compared with the control group, urease inhibitors could effectively reduce NH_3 emission and increase fresh larvae weight during bioconversion of chicken manure by BSFL. The BSFL body weight and protein content of NBPT, AHA and HQ groups increased by (64.75 ± 3.46) g, (71.33 ± 3.38) g, and (78.84 ± 1.84) g, respectively, and the BSFL nitrogen content was $(14.47 \pm 1.14)\%$, $(15.92 \pm 0.34)\%$ and $(16.24 \pm 0.45)\%$, respectively. The results indicated all three treatments could improve the body weight and protein content of BSFL, especially for the HQ treatment, which could effectively reduce NH_3 emission and significantly increase the fresh BSFL weight.

Keywords black soldier fly; chicken manure; urease inhibitor; NH_3 emission; nitrogen conversion; waste utilization

(责任编辑: 边书京)