

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

王萌萌, 范博文, 赵立琴, 孙宁, 杨凤军, 田丽美, 吴瑕

引用本文:

王萌萌, 范博文, 赵立琴, 孙宁, 杨凤军, 田丽美, 吴瑕. 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.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2023-0019>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

牛粪稻秸新型静态堆肥中真菌群落组成的动态特征

张文浩, 门梦琪, 许本姝, 许修宏, 成利军, 孟庆欣, 邓利廷, 姜欣, 武晓桐, 盛思远
农业环境科学学报. 2018, 37(9): 2029–2036 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-1579>

牛粪堆肥过程中nosZ型反硝化细菌动态变化

许本姝, 门梦琪, 武晓桐, 姜欣, 盛思远, 韩悦, 朱海峰, 孟庆欣, 邓利廷, 许修宏
农业环境科学学报. 2019, 38(9): 2210–2218 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-1540>

添加菌糠对猪粪渣堆肥过程及氨排放的影响

吴飞龙, 叶美锋, 吴晓梅, 林代炎, 翁伯琦
农业环境科学学报. 2017, 36(3): 598–604 <https://doi.org/10.11654/jaes.2016-1261>

木薯渣堆肥的生物酶活性与有机组分降解的关系

许黎明, 成春燕, 卢汉浪, 莫祺晖, 韦星明
农业环境科学学报. 2017, 36(1): 198–204 <https://doi.org/10.11654/jaes.2016-0908>

鸡粪-堆肥中重金属残留、抗生素耐药基因及细菌群落变化研究

邓雯文, 陈姝娟, 何雪萍, 晋蕾, 杨盛智, 余秀梅, 刘书亮, 邹立扣
农业环境科学学报. 2019, 38(2): 439–450 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-0716>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

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.

WANG M M, FAN B W, ZHAO L Q, et al. Effects of cattle manure on carbon and nitrogen transformation and fungal communities during composting of *Agaricus bisporus* fungus residues[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2024, 43(1): 162–173.



开放科学 OSID

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

王萌萌, 范博文, 赵立琴, 孙宁, 杨凤军*, 田丽美, 吴瑕

(黑龙江八一农垦大学园艺园林学院, 黑龙江 大庆 163000)

摘要:为揭示牛粪对双孢菇菌渣堆肥过程中真菌群落动态及其对碳氮转化的影响,使用高通量测序技术探索了牛粪和菌渣堆肥过程中真菌群落组成、结构的变化,利用生物信息学的方法分析了真菌群落及其与碳、氮组分间的相互作用关系。以牛粪和菌渣作为研究对象,采用条垛式堆肥的方法共堆肥42 d,设CK(100%双孢菇菌渣)和CD(双孢菇菌渣:牛粪=7:3)两个处理。结果表明:CD处理比CK堆肥总有机碳(TOC)降低2.17%,腐熟期碳、氮分别提高48.69%和4.01%,发芽指数(GI)提高49.33%。添加牛粪提高了菌渣堆肥中真菌群落丰富度和多样性,堆体温度高且高温期延长23 d;子囊菌门和担子菌门是两处理的优势菌门;CD处理食线虫菌属(*Duddingtonia*)、*Coprinellus*、鬼伞属(*Coprinopsis*)、细粒嗜热菌属(*Thermomyces*)的相对丰度均高于CK,有利于碳氮转化。利用Pearson相关系数构建网络模型,分析筛选出与碳氮转化相关的核心真菌属,CD处理有2个与TOC相关的核心真菌属(50%正相关),CK处理中有7个属与TOC相关(28.6%正相关)。菌渣牛粪联合堆肥真菌共现网络的关联性和复杂性更高,真菌群落间竞争减弱,平均路径长度较低,网络更敏感。菌渣堆肥添加牛粪可改变核心真菌与TOC和总氮(TN)间的关系,在CD处理中TOC核心菌与TOC呈正相关,而在CK处理中呈负相关。两处理TN核心菌与TN间均呈显著正相关关系,与TOC负相关。研究表明,菌渣与牛粪联合可使堆体快速升温,延长堆体的高温期,核心真菌通过增加与其他微生物的相互作用,影响碳氮转化,降低TOC损失率,提高堆肥品质。

关键词:堆肥;菌渣;牛粪;真菌群落;碳氮转化;核心真菌

中图分类号:S141.4 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2024)01-0162-12 doi:10.11654/jaes.2023-0019

Effects of cattle manure on carbon and nitrogen transformation and fungal communities during composting of *Agaricus bisporus* fungus residues

WANG Mengmeng, FAN Bowen, ZHAO Liqin, SUN Ning, YANG Fengjun*, TIAN Limei, WU Xia

(College of Horticulture and Landscape Architecture, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163000, China)

Abstract: This study aimed to reveal the effect of cattle manure on fungal community dynamics and its effect on carbon and nitrogen transformation during the composting process of *Agaricus bisporus* fungus residues. The changes in the composition and structure of fungal communities during the composting of cattle manure and fungus residues were explored using high-throughput sequencing, and the relationships between fungal communities and their carbon and nitrogen fractions were analyzed using bioinformatics. Cattle manure and *A. bisporus* fungus residues were employed as the research objects. The method of strip composting was used for 42 days. Two treatments, CK (100% *A. bisporus* residue) and CD (*A. bisporus* residue: cattle manure=7:3) were used in this study. Compared with the CK, the CD

收稿日期:2023-01-11 录用日期:2023-05-10

作者简介:王萌萌(1999—),女,硕士研究生,研究方向为园艺作物生理生态及微生物。E-mail:2528896828@qq.com

*通信作者:杨凤军 E-mail:yangfengjun@byau.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(31801905);黑龙江省蔬菜现代农业产业技术协同创新体系资助项目(HNWXJTX202001);黑龙江省自然科学基金联合引导项目(LH2021C066)

Project supported: Young Scientists Fund of the National Natural Science Foundation of China (31801905); Modern Vegetable Agriculture Industrial Technology Collaborative Innovation System of Heilongjiang Province(HNWXJTX202001); Natural Science Foundation Joint Guide of Heilongjiang Province(LH2021C066)

treatment reduced the total organic carbon (TOC) by 2.17%, increased carbon and nitrogen during the decomposition period by 48.69% and 4.01%, respectively, and raised the germination index (GI) by 49.33%. The addition of cattle manure increased the abundance and diversity of fungal communities in the compost, with high pile temperatures and an extended high temperature period of 23 days. *Cysticercus* and *Stenotrophomonas* were the dominant phyla in both treatments; the relative abundance of *Duddingtonia*, *Coprinellus*, *Coprinopsis*, and *Thermomyces* in the CD treatment was higher than that of CK, favoring carbon and nitrogen transformation. Pearson correlation coefficient was used to construct a network model, analyze and screen out the core fungi related to carbon and nitrogen conversion, with two core fungal genera associated with TOC in the CD treatment (50% positive correlation) and seven genera associated with TOC in the CK treatment (28.6% positive correlation). The co-occurrence network of fungal residue-cattle manure co-composting was more associative and complex, with reduced competition between fungal communities, lower mean pathway lengths, and more sensitive networks. The addition of cattle manure to fungus residue compost altered the relationships among core fungi, TOC, and total nitrogen (TN) exhibiting a positive correlation between TOC core fungi and TOC in the CD treatment and a negative correlation in the CK treatment. There was a significant positive correlation of TN core bacteria with TN in both treatments and a negative correlation with TOC. The combination of fungus residue and cattle manure can quickly heat the compost pile, thereby prolonging its high temperature period. By increasing the interaction with other microorganisms, the core fungi can influence carbon and nitrogen transformation, reduce total organic carbon loss rate, and improve compost quality.

Keywords: composting; spent mushroom substrate; cattle manure; fungal community; carbon and nitrogen transformation; core fungus

食用菌栽培过程中会形成大量的食用菌残渣,随着食用菌产业的发展,菌渣产量持续增加。菌渣中富含氮、磷、钾等矿质元素,是宝贵的可再生资源^[1]。但由于菌渣中木质纤维素含量高,并携带植物病原菌,直接施用于土壤会造成环境污染。将菌渣进行高温堆肥处理,可以减少菌渣中植物病原菌含量,并提高菌渣肥效^[2]。大量研究表明,菌渣与动物粪便联合堆肥能够显著提高堆体温度,加快物质转化和腐殖化进程,改善堆肥产品质量^[3],添加牛粪的效果好于鸡粪和猪粪^[4]。余文娟等^[5]的研究表明堆肥后的菌渣电导率(EC)显著降低,更适合作为育苗基质。单洪涛等^[6]发现金针菇菌渣堆肥中的放线菌具有富集 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等离子的能力,其可使菌渣中可溶性盐含量大幅降低。

菌渣堆肥过程中,微生物的代谢活动会消耗碳、氮营养。降低堆肥过程中碳、氮损失率对提高堆肥质量具有重要意义。真菌可利用多种碳源,在物质的循环过程中发挥着重要作用。真菌是纤维素、木质素等难降解有机化合物的主要分解菌,能通过分泌纤维素、半纤维素水解酶和漆酶等胞外酶分解木质纤维素,同时真菌菌丝体的机械穿插作用,对堆肥原料起一定的物理破坏作用,促进生化反应^[7-8]。Maji等^[9]和Organo等^[10]的研究表明木霉能加速水稻秸秆的降解和堆肥的腐殖化进程。Monteiro等^[11]发现*Duddingtonia*能促进有机物的降解,并捕食植物寄生线虫。Gong等^[12]发现在堆肥中接种*Phanerochaete chrysosporium*能显著促进木质素和纤维素的降解,提高堆肥温度,延长高温阶段,提高堆肥效率和最终堆肥质量。

许多研究表明,真菌参与有机氮的矿化、生物固氮作用、硝化和反硝化过程^[13-16]。Bello等^[17]发现在牛粪-玉米秸秆堆肥过程中,*Ciliophora*和*Pleosporales*介导总氮(TN)转化,*Scedosporium*和*Microasaceae*决定 NO_3^- 转化,*Coprinopsis cinerea*和*Penicillium oxalicum*影响 NH_4^+ 转化。微生物的反硝化作用使氮以 N_2 和 NO 等气体形式排入大气,从而导致氮素损失^[18], N_2O 是真菌反硝化过程的唯一产物,*Fusarium*、*Penicillium*、*Monographella*、*Acremonium*、*Gibberella*、*Eurotium*、*Pseudallescheria*是 N_2O 最主要的潜在生产者^[18]。细菌是固氮微生物的主体,但是真核生物可以与细菌建立共生关系共同参与生物固氮^[15]。Berry等^[19]证明了无论丰度如何,关键菌群在有机物转化过程中都发挥着重要作用。然而从真菌角度探讨堆肥过程中畜禽粪便添加对碳氮转换影响的研究还较少,菌渣堆肥中添加牛粪对于养分转换的微生物学机制尚不清楚。

为了进一步解析畜禽粪便在双孢菇菌渣堆肥过程中的促进作用,探究畜禽粪便对堆肥过程中营养转化及真菌群落结构的影响,本研究以牛粪作为双孢菇菌渣堆肥的添加剂,探究牛粪对菌渣堆肥过程中真菌群落动态、真菌群落及核心真菌对碳氮转化的影响,为控制堆肥进程、减少氮素损失、提高双孢菇菌渣堆肥质量和效率提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验设计与采样

本研究在黑龙江八一农垦大学试验基地进行。

双孢菇菌渣取自大庆恒瑞食用菌有限公司,牛粪取自安达畜牧业基地,其基本理化性状见表1。采用条垛式堆肥的方法,堆体为梯形,下底长2.5 m、宽1.5 m,顶长1.9 m、宽0.9 m,高1.5 m。试验设两个处理,将双孢菇菌渣和牛粪以7:3体积比充分混合均匀作为CD处理,以双孢菇菌渣单独堆肥作为对照(CK)。初始含水率约为60%,堆肥过程中每天测量堆体温度和环境温度,根据温度变化在第10、20、29天人工翻堆3次,当堆体温度稳定趋近于室温时认为堆肥腐熟完全。分别于升温期(第1天)、高温期(第3天)、降温期(第17天)和腐熟期(第36天)进行样品采集,在距离堆顶20、70、120 cm的每个位置随机采样5点,采集的样品质量约0.5 kg,混匀后将样品一式两份,一份保存于-80℃超低温冰箱中用于高通量测序,另一份风干磨碎用于理化指标分析。CK和CD 4个时期分别标记为CK1、CK3、CK17、CK36和CD1、CD3、CD17、CD36。

1.2 理化指标的测定

采用自动温度记录仪(DS192X,上海发泰精密仪器仪表有限公司,中国)测量堆肥过程中堆肥温度和环境温度,每天下午3:00记录堆体顶部、中部和底部的温度,取其平均值作为当天的温度。理化指标的测定参照鲍士旦^[20]的方法进行,每个样品重复测定3次。含水量采用烘干法测定;总有机碳(TOC)采用重铬酸钾容量法测定;TN采用凯氏定氮法测定;NH₄⁺-N和NO₃⁻-N采用2 mol·L⁻¹ KCl溶液提取,分别采用靛酚蓝比色法和双波长紫外分光光度法测定;pH和EC采用pH计和电导仪测定(液固比10:1)。

1.3 高通量测序

选择第1、3、17天和第36天的样本进行高通量测序。按照说明书,使用土壤DNA试剂盒(飞净Phygene,福建)进行DNA提取,提取后的DNA经过纯化、扩增后进行高通量测序。高通量测序在北京奥维森基因科技有限公司的Illumina MiSeq300平台上进行,扩增ITS1区测定真菌ITS序列,引物为ITS1-F(CTTGGTCAATTTAGAGGAAGTAA)和ITS2(TGC-

GTTCTTCATCGATGC)。原始数据通过序列拼接、过滤和去嵌合体后得到优质序列,然后进行OTUs聚类及物种注释。基于OTUs聚类结果,进行Alpha多样性、Beta多样性分析,基于物种注释结果进行真菌群落结构差异分析。

1.4 生物信息学和统计分析

真菌多样性指数和OTUs丰度使用R的“vegan”包计算。为探索真菌群落组成和功能与非生物因素的关系,利用R的“ggcor”包(0.9.8.1)对环境因子与微生物(OTUs水平)之间的关系进行Mantel分析,用OmicShare tools绘图(<https://www.omicstudio.cn/tool/62>)。采用R的“plot(g)”包进行核心真菌筛选和共线网络分析,利用Gephi软件可视化并计算拓扑属性。使用AMOS软件(IBM;SPSS AMOS 20.0.0)构建结构方程模型,评估真菌群落、核心真菌对菌渣堆肥过程中碳氮转化的贡献。

2 结果与讨论

2.1 理化参数变化

2.1.1 温度的变化

堆肥过程中堆体温度和环境温度的变化见图1。前3 d两处理堆体温度均迅速上升,CD处理堆体温度在第3天达到54℃,在第5天达到最高温(56℃),高温期(>50℃)共持续了20 d。CK处理堆体温度在第3天达到最高值(47℃)并持续4 d,但始终未超过50℃。CD处理升温快,堆体温度高可能是由于牛粪中含有大量的可利用碳源和氮源(表1),微生物活动旺盛,可有效消除原材料中的病原体和杂草种子,使堆肥符合安全标准^[21]。CK堆肥物料100%为双孢菇菌渣,菌渣中缺乏微生物可利用的有效碳源和氮源,微生物生长发育受阻,导致堆体温度不高。另外,也可能与物料本身所含的微生物丰度差异有关。微生物分解有机物产生热量是堆体温度变化的主要原因,双孢菇菌渣与牛粪联合堆肥提高了堆体温度及微生物活性,加速了堆肥进程。

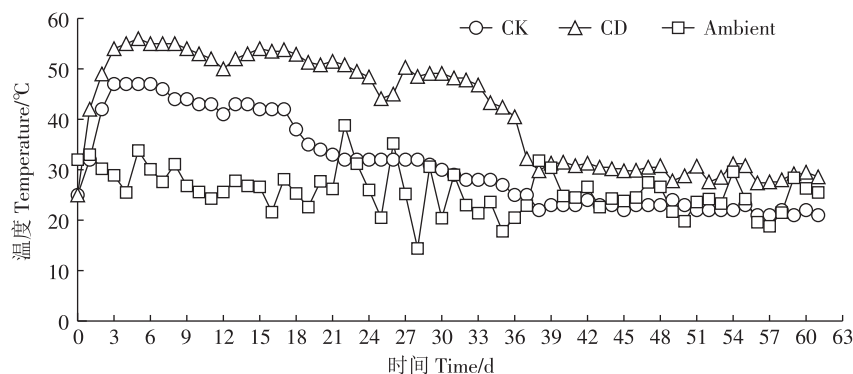
表1 原材料理化性状

Table 1 The physicochemical characteristics of the raw materials

材料 Material	总有机碳 TOC/(g·kg ⁻¹)	总氮 TN/(g·kg ⁻¹)	五氧化二磷 P ₂ O ₅ /(g·kg ⁻¹)	氧化钾 K ₂ O/(g·kg ⁻¹)	含水率 MC/%	pH	电导率 EC/(mS·cm ⁻¹)
双孢菇菌渣	206.05	15.34	9.35	10.21	42.08	8.013	3.31
牛粪	283.85	26.01	13.41	16.53	67.63	7.038	4.43

注:TOC、TN、P₂O₅、K₂O基于干质量测定。

Note: TOC, TN, P₂O₅, K₂O based on dry weight determination.



CK: 菌渣堆肥处理; CD: 菌渣和牛粪堆肥处理; Ambient: 环境温度。

CK, Mushroom residue compost; CD, Mushroom residue and cow manure compost; Ambient: The environment temperature.

图1 堆肥过程中温度随时间的变化

Figure 1 Temperature change with time during composting

2.1.2 碳氮组分含量的变化

TOC是微生物本身所依赖的碳源与能源^[22]。两个处理堆肥TOC含量总体呈下降趋势(图2a),但CD处理始终高于CK,到堆肥结束时CD处理TOC损失率(11.96%)较CK处理低(14.13%)。这可能与CD处理原材料中含有大量的TOC有关。CD处理微生物活动旺盛,堆体温度高,但TOC损失率较低,表明菌渣与

牛粪联合堆肥在加速有机物料降解的同时有利于TOC的保存,提高了堆肥质量^[23]。

TN可以为微生物生长提供氮源^[24]。两个处理TN含量总体呈降低趋势(图2b),CD处理TN含量一直下降,但始终高于CK;CK处理TN含量在0~3 d降低较快,3 d之后逐渐升高,这与郭夏丽等^[25]和刘林培等^[26]的研究结果一致。这可能与堆肥前期微生物繁殖需

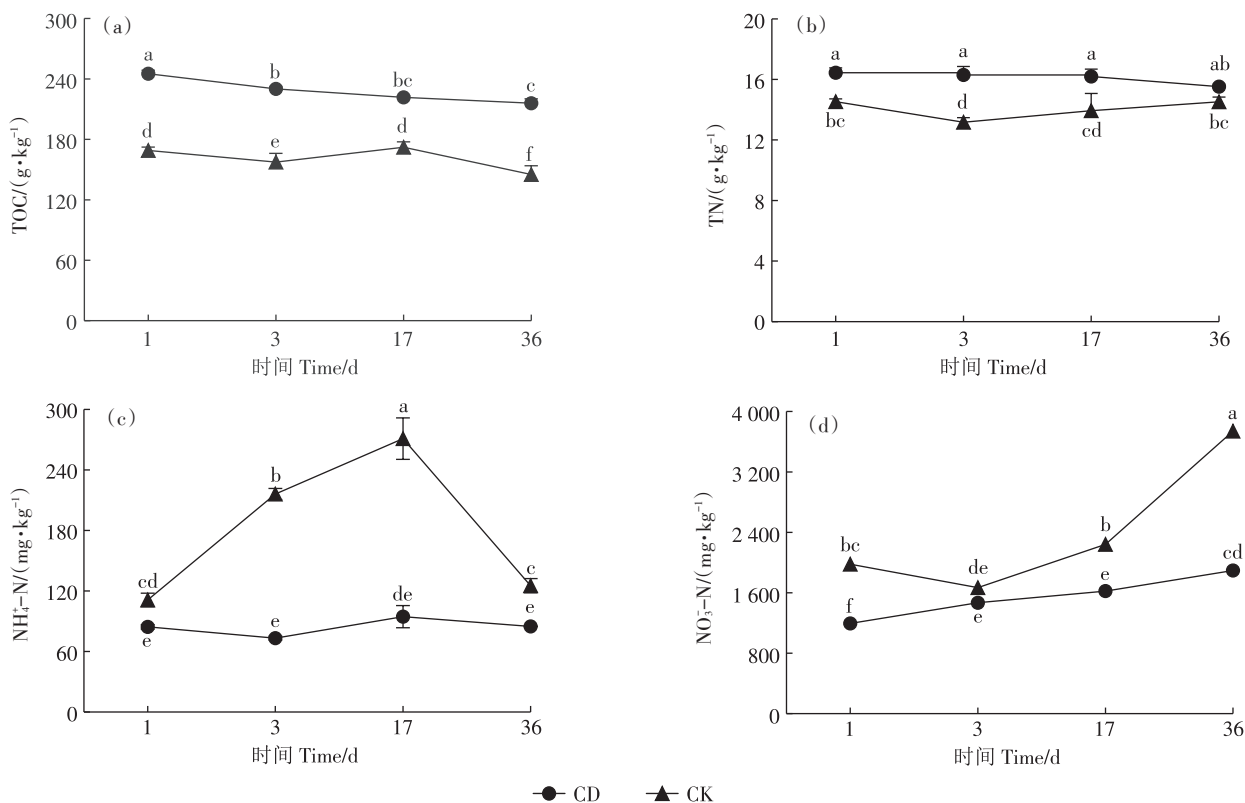


图2 堆肥碳氮组分含量的变化

Figure 2 The change of carbon and nitrogen content during composting

要大量的氮素营养有关,CK处理中微生物可直接利用的有效氮源较CD少,需要消耗营养和能量来分解难降解有机物,从而导致升温期消耗TN较多^[27]。CK处理后期TN含量升高可能有两方面的原因:一是有机物大量分解产生的“浓缩效应”;二是微生物的生物固氮作用^[28]。

CK处理 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (图2c)和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ (图2d)含量始终高于CD处理。CK处理 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量呈现前期快速升高后期迅速降低的趋势,降温期 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量达到峰值;CK处理 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量呈现先降后升的趋势,高温期含量最低,腐熟期含量最高,约为CD处理的2倍;CD处理 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量总体呈增加趋势,但增加的幅度相对较小。以上结果说明菌渣-牛粪联合堆肥有利于降低 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量。 NH_3 挥发往往受到 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度、pH和温度的影响^[29]。CK处理 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量均高于CD,可能导致氮的大量损失。

2.2 真菌群落组成及多样性

本研究共聚类出114个真菌OTUs,其中CD处理

91个,CK处理58个,两个处理共有OTUs为35个,两处理OTUs随堆肥进程均呈现先升高后降低的趋势(图3a)。用Chao1和Shannon指数来评价真菌群落丰富度和多样性,CD处理的真菌群落丰富度和多样性均高于CK处理(图3b)。真菌群落的多样性和丰富度越高,越有利于有机成分的转化^[17]。

用PCoA进一步阐明CD和CK处理真菌群落组成的变化(图3c),PCoA1和PCoA2分别解释了总变异的34.0%和22.3%。所有样本被分为两个集群,两个处理之间存在分散趋势,说明不同堆肥处理真菌群落组成差异较大。前人的研究强调了粪肥中的化学和有机成分对土壤细菌群落组成具有重要影响^[30]。Banerjee等^[31]的研究显示了营养添加对细菌和真菌的总体微生物生物量和丰度的积极影响。本研究表明,菌渣中的真菌群落主要受牛粪的化学和有机成分的影响。理化性质的结果进一步支持了这一点。牛粪施入后,TOC和TN均出现升高趋势。CD处理各样品间距离矩阵比CK处理更小,说明CD处理在堆肥不

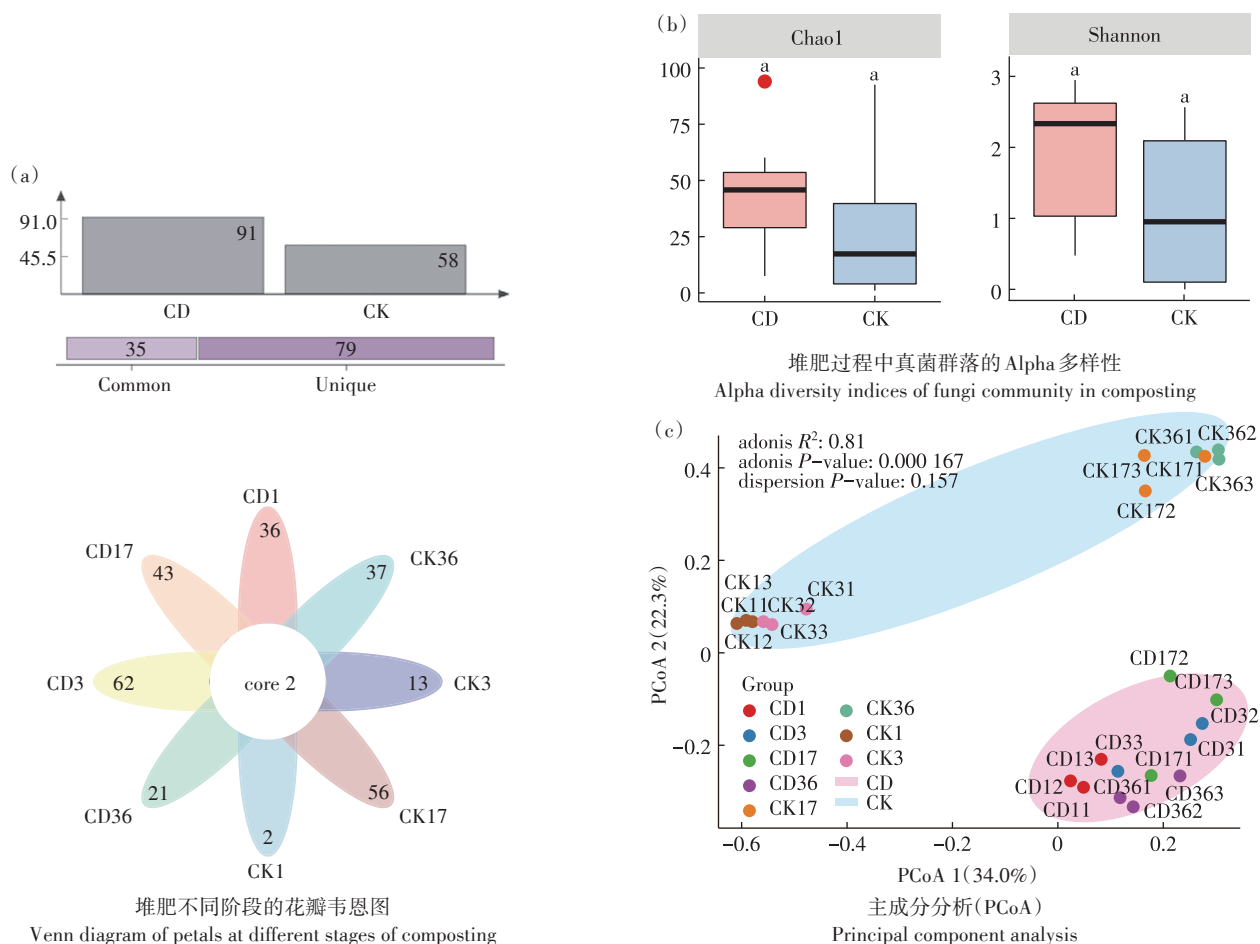


图3 真菌群落组成及多样性

Figure 3 Fungal community composition and diversity

同阶段的真菌群落组成是相似的。

选择相对丰度前5的真菌门和前10的真菌属绘制桑基图(图4)。发现子囊菌门(*Ascomycota*)和担子菌门(*Basidiomycota*)是堆肥过程中的两个优势真菌门。子囊菌门和担子菌门是有机物降解的主要真菌,能够参与木质纤维素等惰性碳的分解^[32]。担子菌门在CD处理堆肥的前期相对丰度较高,特别是高温阶段,它可以利用多种碳源,产生特殊的抗逆结构,能在极端的条件下生存(比如高温)。而子囊菌门是堆肥后期的优势菌门。

位于前10的真菌属大多属于子囊菌门和担子菌门。子囊菌门中相对丰度最高的属是食线虫真菌属(*Duddingtonia*),其次是毛霉菌属(*Elaphomyces*)、*Hyalorbilia*、木霉属(*Trichoderma*)和细粒嗜热菌(*Thermomyces*)。食线虫真菌属是一种腐生真菌,能够促进有机化合物的降解。鬼伞属(*Coprinopsis*)来自于甲基营养酵母,其产生的漆酶可以降解多种有机化学污染物,如氯酚和多环芳烃类物质^[33],同时其还能促进木质素氧化^[34]。细粒嗜热菌是一种嗜热的分解纤维素的子囊菌,能够产生耐热木聚糖酶^[35],在聚合碳水化合物降解中起重要作用。从堆肥中分离出的细粒

嗜热菌可分泌超过60种不同的纤维素酶、半纤维素酶和其他糖基水解酶^[36]。这类真菌在堆肥中能够去除游离养分并吸收氮^[37],已被广泛作为促进堆肥制备和加速蘑菇生长的接种物^[38]。木霉属在两个处理中均存在,有报道指出木霉对纤维素的分解起着至关重要的作用^[39],它可以通过产生纤维素水解酶促进纤维素的水解。*Coprinellus*和鬼伞属是担子菌门中相对丰度较高的属,在CD处理高温期相对丰度显著高于CK。*Elizabeth*等^[40]的研究表明*Coprinellus radians*能促进二苯并噻吩等大分子物质的转化。

2.3 真菌群落与环境因子之间的关系

环境因素是影响微生物群落动态和物质转化的主要影响因素^[41]。为了解真菌群落和环境变量之间的相关性,使用R软件进行了Mantel分析,以评估堆肥条件与真菌OTU丰度之间的相关性(图5)。前人研究发现^[42],堆肥环境因素(如温度、C/N和pH)会显著影响真菌群落的组成。本研究结果表明,真菌群落丰度与理化因子间存在相关性,其中温度、pH、EC、TN和TOC对真菌群落丰度有显著影响($P<0.05$)。在两个处理中,真菌的相对丰度均与TOC、TN显著正相关,说明菌渣堆肥过程中真菌群落参与碳、氮的转化,

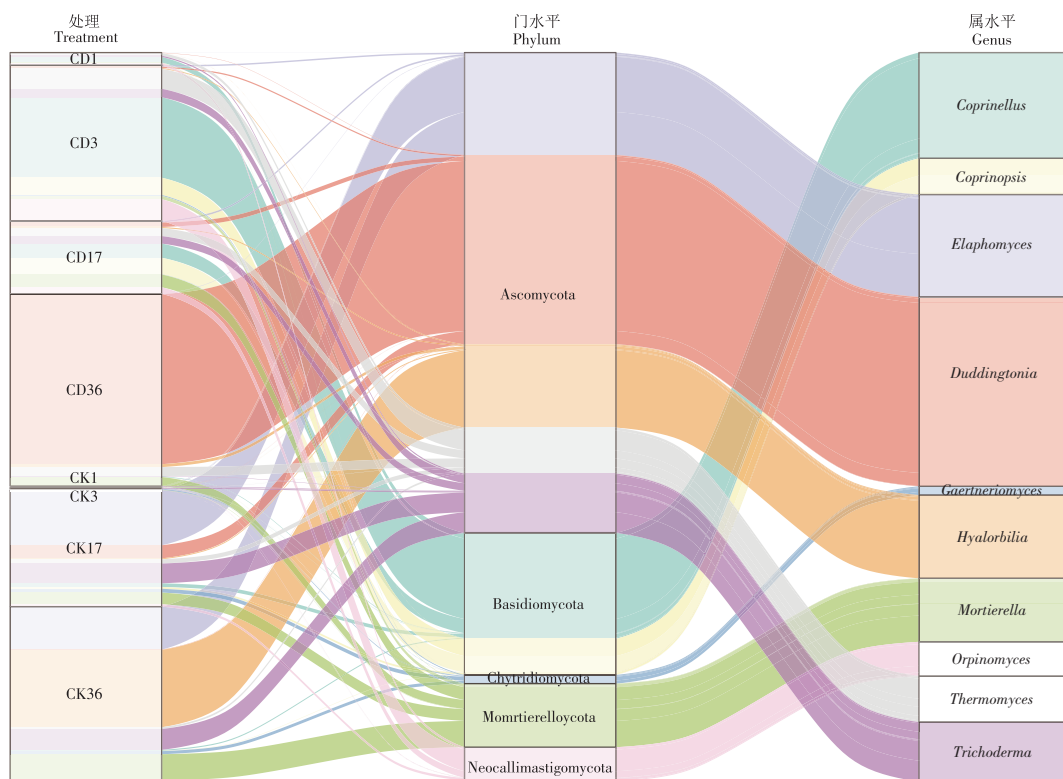
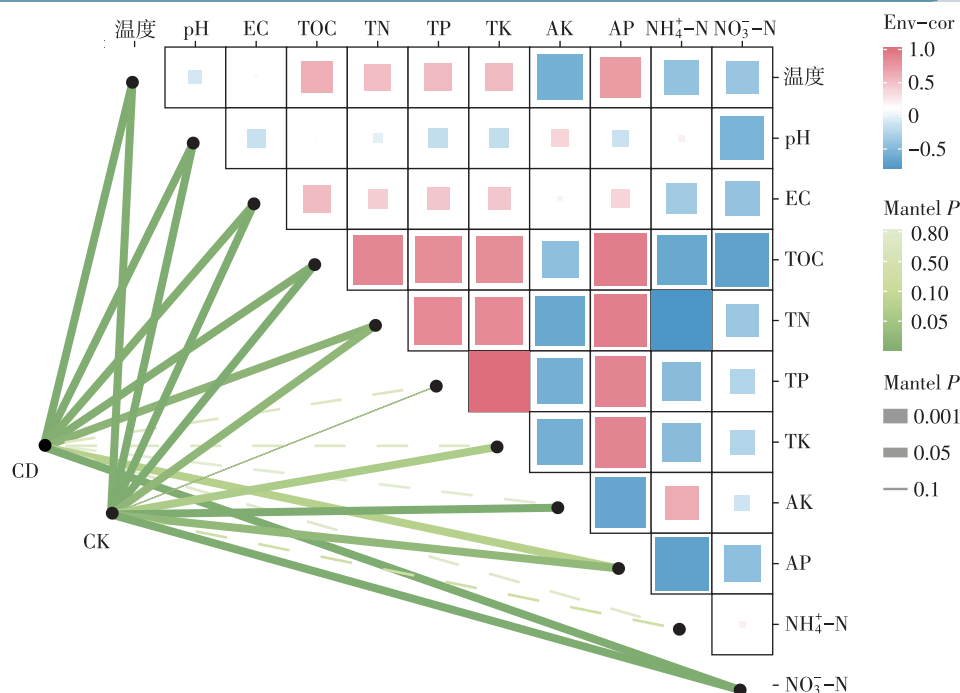


图4 堆肥不同阶段真菌门、属水平的群落组成桑基图

Figure 4 Sankey of fungal community composition at phylum and genus level



方块用来表示理化指标之间的相关性,连线用来表示理化指标与真菌 OTU 丰度之间的相关性, P -value 通过颜色的深浅变化表示,实线和虚线表示正负相关。

The squares were used to represent the correlation between physical and chemical indexes, and the lines were used to represent the correlation between physical and chemical indexes and fungal OTU abundance. P -value was represented by the change of color shades, and the solid and dashed lines represented positive and negative correlations.

图5 真菌 OTUs 丰度与环境因素间的关联性热图

Figure 5 Heat map of the association between OTUs abundance of fungi and environmental factors

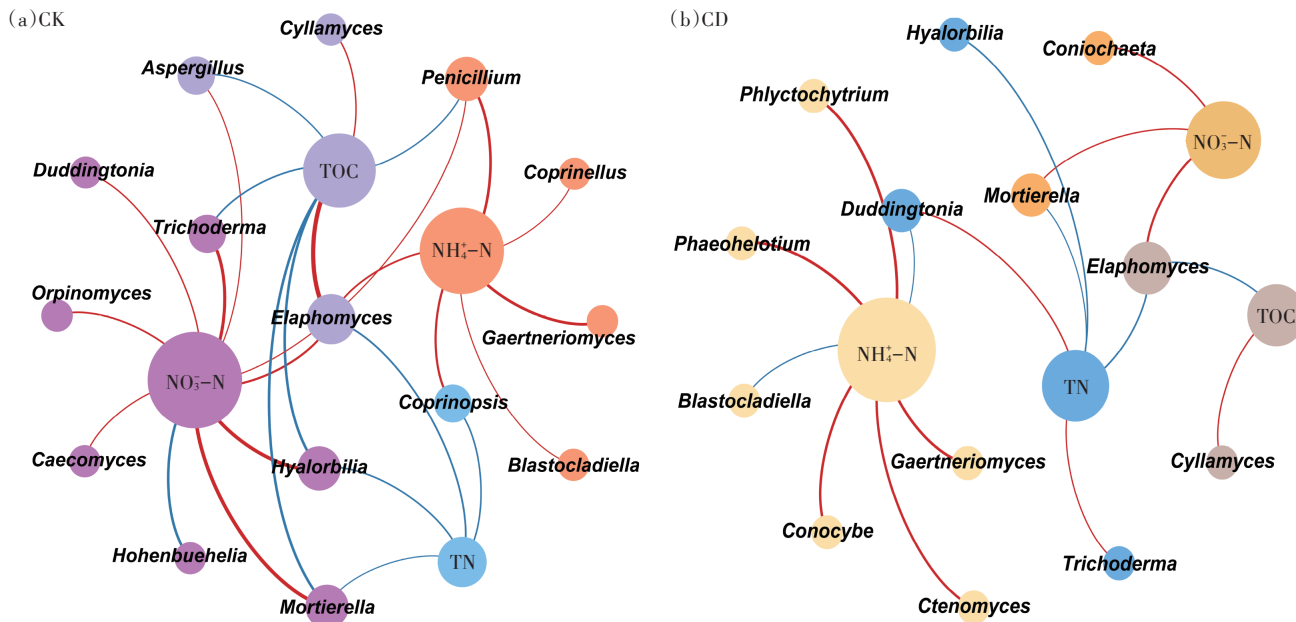
不同堆肥处理真菌的群落组成不同,对碳、氮转化的影响也不相同。

2.4 核心真菌筛选及真菌群落间关系网络分析

微生物间的相互关系及环境因子均影响微生物群落的结构和功能,进而影响碳、氮的转化过程。本研究利用网络分析筛选出参与碳、氮转化的核心真菌属(图6)。网络中有较多真菌属与 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 相关,表明真菌的生长对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的变化更加敏感。这可能是由于 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 是大多数微生物的有效氮源^[43-44]。CK和CD网络分别包含15个和13个节点(核心真菌属)、26条和17条边,平均度分别为2.375和2.000,网络密度分别为0.158和0.125,说明CD处理的网络复杂度比CK低,但平均路径长度大于CK处理。有报道指出,平均路径较短的网络,存在密集连接的节点,并且网络可以在节点之间快速传播。这可能使网络对扰动更加敏感,比如病原菌的传播^[45],说明添加牛粪使菌渣堆肥的网络更稳定。碳、氮相关的真菌属主要由Ascomycota、Basidiomycota和Chytridiomycota组成,分别占比47.2%、16.6%、16.6%。Ascomycota和Basidiomycota既是重要

的纤维素降解菌,同时又是重要的反硝化真菌。它们一方面通过分泌多种水解酶将木质纤维素降解为单体后参与碳代谢过程,另一方面其具有很强的 NO_3^- 同化能力,将 NO_3^- 中的氮掺入微生物生物质中,从而减少 NO_3^- 的浸出或反硝化造成的损失^[46]。

在CK网络中,与TOC相关的核心菌属共有7个(28.6%正相关);在CD处理中,与TOC相关的核心菌属共有2个(50%正相关)。CK网络中与TOC负相关的核心菌属较多,且有更多菌属参与TOC分解,这可能是CK处理TOC损失率较高的一个原因。*Elaphomyces*和*Cyllumyces*在两个网络中都是TOC的核心菌属;*Cyllumyces*在两个网络中均为正相关;*Elaphomyces*在CK网络中正相关,在CD网络中负相关,但*Elaphomyces*在CD处理中相对丰度小于CK处理,这也可能是CD处理碳损失率较低的一个原因。*Duddingtonia*、*Elaphomyces*和*Trichoderma*在CD网络中是TN核心真菌,并且在网络中作为hub菌起到枢纽的作用,这进一步说明它们参与堆肥的碳氮循环。研究表明*Trichoderma*可以通过产生多种酶来降解木质纤维素,同时参与反硝化过程,在厌氧条件下能够将硝酸



节点表示不同的属(节点大小用与之相连的节点个数——“连接度”来表示),边表示微生物之间的相互作用关系(线的粗细表示相关性强弱,红线表示正相关,蓝线表示负相关)。

Nodes represent different genera (node size is expressed by the number of nodes connected to it - "degree of connectivity"), and edges are used to indicate the interaction between microorganisms (the thickness of the line indicates the strength of the correlation, the red line indicates the positive correlation, and the blue line indicates the negative correlation).

图6 核心真菌属与堆肥环境因素的网络

Figure 6 The networks between core fungal genus and composting micro-environment

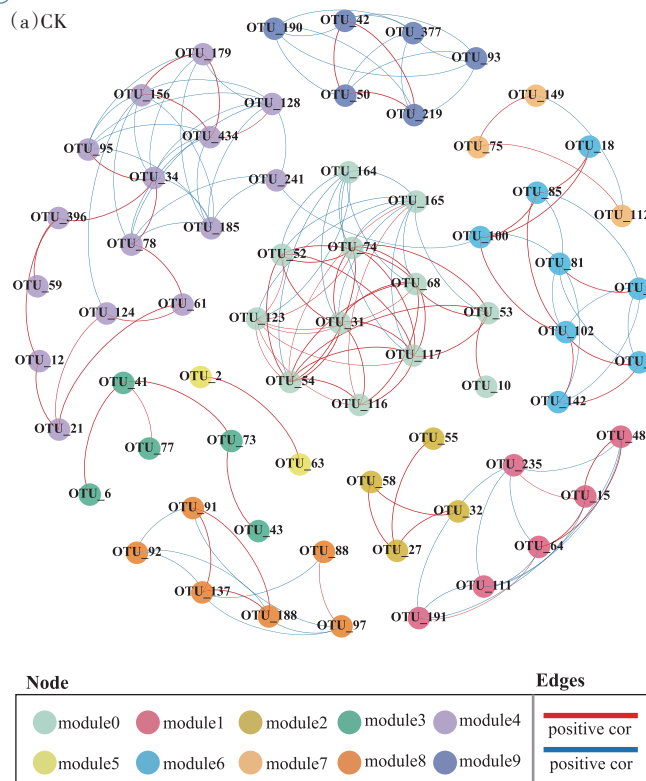
盐或亚硝酸盐还原为 NO 、 N_2O 和 N_2 ^[47]。在CK网络中 *Trichoderma* 是连接 TOC 与 $\text{NO}_3\text{-N}$ 的 hub 菌,与 TOC 显著负相关,与 $\text{NO}_3\text{-N}$ 正相关。在CD网络中 *Trichoderma* 与 TN 显著正相关,通过 *Elaphomyces* 与 TOC 和 $\text{NO}_3\text{-N}$ 相连接。结果说明菌渣-牛粪联合堆肥改变了真菌属参与碳、氮转化的途径。

利用网络对CK和CD处理中真菌群落在OTU水平上的共现模式进行分析。2个处理在共现网络拓扑结构上存在显著差异(图7a)。CK和CD处理的共现网络分别由67个节点、157条边和75个节点、228条边组成。与CK相比,CD处理的共现网络边、点、平均度、网络密度都有所提升。已有研究表明,有机物输入可以增强土壤细菌共现网络的复杂性^[48],本研究表明牛粪施入后可用养分的增加使真菌的功能发生改变,真菌间的相互作用增强,真菌群落间的关联性和复杂性增强。网络中的正相关表示共生关系,负相关表示竞争或捕食关系^[49],联合堆肥减轻了竞争关系,而加强了物种之间的共生和互惠^[50]。CD处理相较于CK处理正相关的比例增加,负相关的比例降低,这可能归因于真菌群落在较长时期的共同进化过程中的共生作用^[51]。这一结论正好验证了PCoA分析中

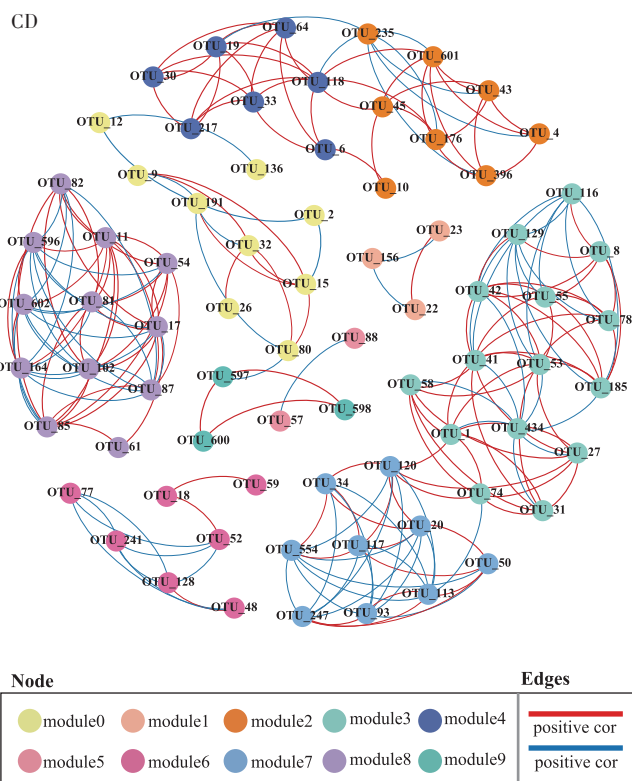
CD处理样本间距离矩阵更加紧密的原因。网络内部各成员间存在明显的聚集关系,整个网络被划分为不同的模块(Module)。CD和CK网络均包含10个模块,在CD处理中,module2、module3与 TOC 含量显著正相关(图7b),其中 *Elaphomyces* (OTU_4) 存在于 module2 中, *Elaphomyces* 是 TOC 的核心菌属,猜测以 *Elaphomyces* 为中心与 module2 中的其他菌相互作用,共同影响 TOC 代谢。module3 中大多数能注释到的真菌均与木质纤维素降解有关,如:新丽鞭菌科(*Neocallimastigaceae*)、盲肠鞭菌属(*Caecomyces*)、被孢霉属(*Mortierella*)等,并且 module3 中的新美鞭菌属(*Neocallimastix*)、棘孢霉属(*Spizellomyces*)、木霉属(*Trichoderma*)均为互惠共生微生物^[52]。猜测 module3 主要是由具有降解木质纤维素的功能菌组成,通过功能菌间互惠共生影响有机碳降解。

此外,丛枝菌根真菌对于碳氮循环的影响不容忽视,它对团聚体中的碳形成和稳定起到关键作用^[53]。研究表明,丛枝菌根分泌的球囊霉素可以通过增强团聚体的稳定性来调节碳汇过程,它既可以保持肥力^[54],又可以加强碳捕获能力^[55]。在CD处理中发现较高丰度的丛枝菌根真菌(OTU_396)。AMF(OTU_

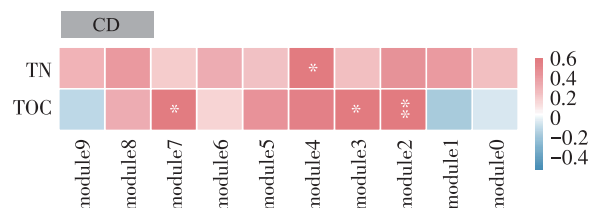
(a) CK



CD



(b)



a. 节点表示不同的 OTU, 边表示节点间的联系 (红线表示正相关, 蓝线表示负相关); 根据节点间的联系程度将网络划分为不同的模块, 用不同的颜色表示。b. 网络模块与主要环境因素的关联热图。

a. Nodes represent different OTUs, and edges represent connections between nodes (red lines indicate positive correlation, blue lines indicate negative correlation); According to the degree of connection between nodes, the network is divided into different modules, which are represented by different colors.
b. Heat map of the association of network modules with major environmental factors.

图7 真菌 OTU 水平的共现网络图

Figure 7 Co-occurrence network diagram at fungi OTU level

396)所在的 module2 与 module4 联系较为紧密, 且多为正相关, 这两个模块既参与碳代谢又参与氮代谢。以上说明联合堆肥激活了 AMF 真菌的互作效应, 从而驱动更多真菌参与碳氮代谢。

2.5 真菌群落和核心真菌对堆肥碳氮转化的贡献

结构方程模型用来评估真菌群落、核心真菌对碳、氮循环过程的直接或间接影响, 结果见图 8。在两个处理中, 碳氮核心真菌均能显著影响 TN。这可能与碳氮循环彼此相连有关。两个处理中 TN 和 TOC 间显著的正相关关系也证实了这一点。在 CK 处理中, Chao1 直接显著影响 TN, 但在 CD 处理中并无显著影响, 说明真菌丰富度影响堆肥 TN 的转化因条件而

异。在 CK 处理中, module2 和 module3 可直接显著影响 TN, 但两个模块内的菌属多与碳循环有关, 说明核心真菌属间存在互作效应^[56]。module2 中 *Caecomyces* 和 *Orpinomyces* 均是 NO_3^- -N 的核心真菌; module3 中的 *Coprinellus* 是 NH_4^+ -N 的核心真菌。可能是通过这些核心菌属与模块内部其他菌属相互作用来影响 TN。在 CD 处理中, TOC 核心真菌、N 核心真菌与 TOC 和 TN 显著相关, 是碳转化的主要贡献者。这也可能是 CD 处理 TOC 损失率降低的主要原因。

3 结论

(1) 双孢菇菌渣堆肥过程中添加牛粪可以提高堆

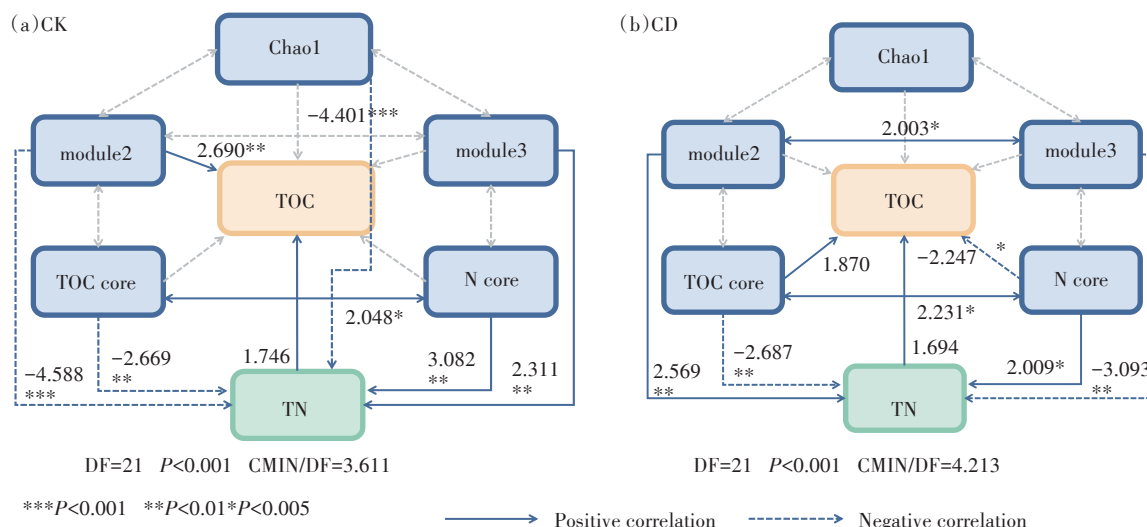


图8 真菌对碳、氮转化影响的结构方程模型

Figure 8 Structural equation modeling (SEM) of the influence of fungi on carbon and nitrogen conversion

体温度和初始碳氮含量,降低总有机碳损失率,提高堆肥产品品质。

(2)菌渣堆肥中添加牛粪可以提高真菌多样性和丰富度,缩小各时期距离矩阵,使真菌群落组成更相似。Ascomycota、Basidiomycota 和 Chytridiomycota 是促进碳氮转化的主要真菌门,核心菌属 *Elaphomyces*、*Cyllumyces*、*Duddingtonia*、*Elaphomyces* 和 *Trichoderma* 对碳、氮转化起至关重要的作用。添加牛粪后真菌群落共线网络的复杂性降低,促进真菌群落之间的互惠共生关系。

(3)结构方程模型分析表明总有机碳核心真菌、氮核心真菌及关键真菌群落是影响堆肥碳、氮转化的关键因素,真菌群落丰富度对碳、氮转化的影响因堆肥条件不同而异。

参考文献:

- [1] ZHANG X, ZHONG Y H, YANG S D, et al. Diversity and dynamics of the microbial community on decomposing wheat straw during mushroom compost production[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 170: 183–195.
- [2] 郭远, 宋爽, 高琪, 等. 食用菌菌渣资源化利用进展[J]. *食用菌学报*, 2022, 29(2): 103–114. GUO Y, SONG S, GAO Q, et al. Progress in utilization of spent mushroom substrate[J]. *Acta Edulis Fungi*, 2022, 29(2): 103–114.
- [3] LOU Z, ZHU J, WANG Z, et al. Release characteristics and control of

nitrogen, phosphate, organic matter from spent mushroom compost amended soil in a column experiment[J]. *Process Safety and Environmental Protection*, 2015, 98: 417–423.

- [4] 王定美, 麦力文, 杨霞, 等. 粪便对食用菌渣堆肥中碳氮转化的影响[J]. *环境污染与防治*, 2020, 42(11): 1368–1374. WANG D M, MAI L W, YANG X, et al. Effect of animal manures on the conversion of carbon and nitrogen in edible fungi residue compost[J]. *Environmental Pollution and Control*, 2020, 42(11): 1368–1374.
- [5] 余文娟, 陈昱晓, 牛庆良. 不同类型菇渣发酵前后理化性质的变化[J]. *上海农业学报*, 2014, 30(5): 74–80. YU W J, CHEN G X, NIU Q L. Changes of physical and chemical properties of different type wastes of mushroom culture before and after fermentation[J]. *Acta Agriculturae Shanghai*, 2014, 30(5): 74–80.
- [6] 单洪涛, 官志远, 张昌爱, 等. 杏鲍菇渣降盐处理及降盐菇渣基质育苗试验[J]. *蔬菜*, 2017(10): 56–59. SHAN H T, GONG Z Y, ZHANG C A, et al. Salt reduction treatment of oyster mushroom residue and substrate seedling breeding test of salt reducing mushroom residue[J]. *Vegetables*, 2017(10): 56–59.
- [7] DE GANNES V, EUDOXIE G, HICKEY W J. Insights into fungal communities in composts revealed by 454-pyrosequencing: implications for human health and safety[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4: 00164.
- [8] JIROUT J, SIMEK M, ELHOTTOVA D. Fungal contribution to nitrous oxide emissions from cattle impacted soils[J]. *Chemosphere*, 2013, 90(2): 565–572.
- [9] MAJI D, SINGH M, WASNIK K, et al. The role of a novel fungal strain *Trichoderma atroviride* RVF3 in improving humic acid content in mature compost and vermicompost via ligninolytic and cellulolytic

- activities[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2015, 119:1584–1596.
- [10] ORGANO N D, GRANADA S M J M, PINEDA H G S, et al. Publisher correction: assessing the potential of a trichoderma-based compost activator to hasten the decomposition of incorporated rice straw[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12:1–2.
- [11] MONTEIRO T, BALBINO H, DE M I, et al. *Duddingtonia flagrans* preying a plant parasitic nematode[J]. *Brazilian Journal of Biology*, 2019, 80:197–198.
- [12] GONG X, LI S, SUN X, et al. Maturation of green waste compost as affected by inoculation with the white-rot fungi *Trametes versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Environmental Technology*, 2017, 38:872–879.
- [13] LONG A, HEITMAN J, TOBIAS C, et al. Co-occurring anammox, denitrification, and codenitrification in agricultural soils[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79:168–176.
- [14] REX D, CLOUGH T J, RICHARDS K G, et al. Impact of nitrogen compounds on fungal and bacterial contributions to codenitrification in a pasture soil[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9:13371.
- [15] FANG J, LIAO S, ZHANG S, et al. Characteristics of a novel heterotrophic nitrification-aerobic denitrification yeast, *Barnettozyma californica* K1[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 339:125665.
- [16] KOCH R A, YOON G M, ARYAL U K, et al. Symbiotic nitrogen fixation in the reproductive structures of a basidiomycete fungus[J]. *Current Biology*, 2021, 31:3905–3914.
- [17] BELLO A, HAN Y, ZHU H, et al. Microbial community composition, co-occurrence network pattern and nitrogen transformation genera response to biochar addition in cattle manure-maize straw composting[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 721:137759.
- [18] 黄华, 黄懿梅, 刘学玲, 等. 覆盖处理对猪粪秸秆堆肥中氮素转化和堆肥质量的影响[J]. *环境科学学报*, 2013, 33(3):780–786.
- HUANG H, HUANG Y M, LIU X L, et al. Effect of covering on nitrogen transformation and the quality of pig manure-straw compost[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2013, 33(3):780–786.
- [19] BERRY D, WIDDER S. Deciphering microbial interactions and detecting keystone species with co-occurrence networks[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5:219.
- [20] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2005.
- BAO S D. Soil agrochemical analysis[M]. 3rd Edition. Beijing: China Publishing House Press, 2005.
- [21] LI R H, WANG J J, ZHANG Z Q, et al. Nutrient transformations during composting of pig manure with bentonite[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 121:362–368.
- [22] ZMORA-NAHUM S, MARKOVITCH O, TARCHITZKY J, et al. Dissolved organic carbon (DOC) as a parameter of compost maturity[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2005, 37(11):2109–2116.
- [23] CUI P, LIAO H P, BAI Y D, et al. Hyperthermophilic composting reduces nitrogen loss via inhibiting ammonifiers and enhancing nitrogenous humic substance formation[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 692:98–106.
- [24] 孟利强. 碳源调控污泥堆肥氮素转化与含氮气体释放生物机制研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2019:45–48.
- MENG L Q. Study on biological mechanism of nitrogen transformation and nitrogen gas release from sewage sludge composting regulated by carbon[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2019:45–48.
- [25] 郭夏丽, 张静晓, 王静, 等. 菌渣和牛粪联合堆肥中的氮素转化研究[J]. *郑州大学学报(工学版)*, 2012, 33(1):71–74.
- GUO X L, ZHANG J X, WANG J, et al. Nitrogen transformation in composting of spent mushroom dreg and cow manure[J]. *Journal of Zhengzhou University(Engineering Science)*, 2012, 33(1):71–74.
- [26] 刘林培, 管秀琼, 王洪, 等. 食用菌菌渣和白酒丢糟共堆肥过程中氮素变化及腐熟进程[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(21):188–194.
- LIU L P, GUAN X Q, WANG H, et al. Nitrogen changes and maturity in the co-composting process of edible fungal residues and Baijiu's waste spent grains[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(21):188–194.
- [27] 李云蓓. 碳源调控对污泥堆肥过程氮素损失的影响及其作用机制[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2014:18–20.
- LI Y B. Effect of carbon regulation on nitrogen losses and its mechanism during sewage sludge composting[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2014:18–20.
- [28] 贾程, 张增强, 张永涛. 污泥堆肥过程中氮素形态的变化[J]. *环境科学学报*, 2008, 28(11):2269–2276.
- JIA C, ZHANG Z Q, ZHANG Y T. Transform of nitrogen forms during co-composting of sewage sludge and wheat straw[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2008, 28(11):2269–2276.
- [29] BERNAL M P, SOMMER S G, CHADWICK D, et al. Current approaches and future trends in compost quality criteria for agronomic, environmental, and human health benefits[J]. *Advances in Agronomy*, 2017, 144:143–233.
- [30] LI F, CHEN L, ZHANG J, et al. Bacterial community structure after long-term organic and inorganic fertilization reveals important associations between soil nutrients and specific taxa involved in nutrient transformations[J]. *Front Microbiol*, 2017, 8:187.
- [31] BANERJEE S, KIRKBY C A, SCHMUTTER D, et al. Network analysis reveals functional redundancy and keystone taxa amongst bacterial and fungal communities during organic matter decomposition in an arable soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 97:188–198.
- [32] YANG S, LI L, PENG X, et al. Eukaryotic community composition and dynamics during solid waste decomposition[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2022, 106(8):3307–3317.
- [33] GARCIA-DELGADO C, D'ANNIBALE A, PESCIAROLI L, et al. Implications of polluted soil biostimulation and bioaugmentation with spent mushroom substrate (*Agaricus bisporus*) on the microbial community and polycyclic aromatic hydrocarbons biodegradation[J]. *Science of the Total Environment*, 2015, 508:20–28.
- [34] KONTRO J, LYRA C, KOPONEN M, et al. Production of recombinant laccase from *coprinopsis cinerea* and its effect in mediator promoted lignin oxidation at neutral pH[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 9:767139.
- [35] SINGH S, MADLALA A M, PRIOR B A. *Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases[J]. *Fems Microbiology Letters*, 2003, 27(1):3–16.

- [36] BASOTRA N, KAUR B, DI FALCO 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.
- [37] ROSS R C, HARRIS P J. The significance of thermophilic fungi in mushroom compost preparation[J]. *Scientia Horticulturae*, 1983, 20(1):61–70.
- [38] SANCHEZ J E, MEJIA L, ROYSE D J. Pangola grass colonized with *Scytalidium thermophilum* for production of *Agaricus bisporus*[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(3):655–662.
- [39] STRAKOWSKA J, BLASZCZYK L, CHELKOWSKI J. The significance of cellulolytic enzymes produced by *Trichoderma* in opportunistic lifestyle of this fungus[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2014, 54: S2–S13.
- [40] ELIZABET A, MATTHIAS K, MARTIN K, et al. Conversion of dibenzothiophene by the mushrooms *Agrocybe aegerita* and *Coprinellus radians* and their extracellular peroxxygenases[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 82:1057–1066.
- [41] TIQUIA S M, TAM N F Y, HODGKISS I J. Effects of turning frequency on composting of spent pig-manure sawdust litter[J]. *Bioresource Technology*, 1997, 62(1/2):37–42.
- [42] DUAN Y M, WASTHI S K, CHEN H Y, et al. Evaluating the impact of bamboo biochar on the fungal community succession during chicken manure composting[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 272: 308–314.
- [43] JOHN B T, JOHN S T. Bacterial community changes during composting of municipal crop waste using low technology methods as revealed by 16S rRNA[J]. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 2018, 12(6):209–221.
- [44] GEISSELER D, HORWATH W R, JOERGENSEN R G, et al. Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms: a review[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, 42(12):2058–2067.
- [45] WIEGAND T, REVILLA E, KNAUER F. Dealing with uncertainty in spatially explicit population models[J]. *Biodiversity and Conservation*, 2004, 13(1):53–78.
- [46] SLOT J C, HIBBETT D S. Horizontal transfer of a nitrate assimilation gene cluster and ecological transitions in fungi: a phylogenetic study [J]. *PLoS One*, 2007, 2(10):e1097.
- [47] JIANG J S, PAN Y W, YANG X L, et al. Beneficial influences of peolith and dicyandiamide on gaseous emissions and the fungal community during sewage sludge composting[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2019, 26(9):8928–8938.
- [48] NING L, CHEN Z, CHAO X, et al. Insight into how organic amendments can shape the soil microbiome in long-term field experiments as revealed by network analysis[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 99:137–149.
- [49] FAUST K, RAES J. Microbial interactions: from networks to models [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2012, 10(8):538–550.
- [50] QIU X W, ZHOU G X, ZHANG J B, et al. Microbial community responses to biochar addition when a green waste and manure mix are composted: a molecular ecological network analysis[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 273:666–671.
- [51] ZHANG Y, ZHAO Z H, DAI M H, et al. Drivers shaping the diversity and biogeography of total and active bacterial communities in the South China Sea[J]. *Molecular Ecology*, 2014, 23(9):2260–2274.
- [52] 蔡昕悦, 刘耀臣, 解志红, 等. 互惠共生微生物多样性研究概况[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(11):3899–3917. CAI X Y, LIU Y C, XIE Z H, et al. Research advances in mutualistic symbiotic microbes diversities[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(11):3899–3917.
- [53] WRIGHT S F, UPADHYAYA A. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi[J]. *Plant and Soil*, 1998, 198(1):97–107.
- [54] SINGH A K, RAI A, SINGH N. Effect of long term land use systems on fractions of glomalin and soil organic carbon in the Indo-Gangetic plain[J]. *Geoderma*, 2016, 277:41–50.
- [55] LOVELOCK C E, WRIGHT S F, CLARK D A, et al. Soil stocks of glomalin produced by arbuscular mycorrhizal fungi across a tropical rain forest landscape[J]. *Journal of Ecology*, 2004, 92(2):278–287.
- [56] 刘红梅. 氮沉降对贝加尔针茅草原土壤碳氮转化及微生物学特性的影响[D]. 北京:中国农业科学院, 2019:45–50. LIU H M. Effects of nitrogen deposition on soil carbon and nitrogen transformation and microbial characteristics in stipa baicalensis steppe[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019:45–50.