接种菌剂对牛粪堆肥反硝化细菌群落的影响

徐莹莹, 许修宏*, 任广明, 孙 瑜, 李洪涛

(东北农业大学资源与环境学院,哈尔滨 150030)

摘 要:将具有木质纤维素降解能力的菌剂,接种到以牛粪和水稻秸秆为材料的堆肥中,通过测定温度、pH、C/N、种子发芽率、NH₄-N、NO₃-N相关指标,考察了接种菌剂堆肥和自然堆肥的腐熟情况;采用传统培养与 PCR-DGGE 技术相结合的方法,研究了接种菌剂对牛粪堆肥中反硝化细菌数量及 nosZ-反硝化细菌群落结构多样性的影响。结果表明:两种堆肥都已完全腐熟,达到无害化标准,且接种菌剂堆肥更利于有机质分解,腐熟度更好;接种菌剂使可培养的反硝化细菌数量减少,nosZ-反硝化细菌多样性增加;自然堆肥中样品间相似性在 50%~75%之间,接种菌剂堆肥样品间相似性在 27%~76%之间,接种菌剂加快了反硝化细菌群落的演替。堆肥中 nosZ-反硝化细菌包括 γ-变形菌纲(γ-proteobacteria)、β-变形菌纲(β-proteobacteria)、未培养细菌(Uncultured bacteria)和 α-变形菌纲(α-proteobacteria);接种菌剂堆肥中检测到自然堆肥不存在的反硝化细菌类群,这些类群分别属于盐单胞菌属 (*Halomonas*)、固氮螺菌属(*Azospirillum*)、副球菌属(*Paracoccus*)、草螺菌属(*Herbaspirillum*)和产碱菌属(*Alcaligenes*),其中,产碱菌属、副球菌属中某些菌株的反硝化终产物为 N₂、减少了温室气体 N₂O 的排放。

关键词:自然堆肥;接种菌剂堆肥;腐熟;反硝化细菌数量;反硝化细菌多样性

中图分类号:X713 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2015)03-0570-08 doi:10.11654/jaes.2015.03.021

Effect of Microbial Inoculum on Denitrifying Bacterial Communities in Cow Manure Compost

XU Ying-ying, XU Xiu-hong*, REN Guang-ming, SUN Yu, LI Hong-tao

(College of Resources and Environment, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Aerobic composting is an effective method to dispose solid organic wastes. In this study, cow manure with rice straw was used to investigate the effect of lignocelluloses-degrading microbial inoculum on denitrifying bacterial communities. Composting maturity was assessed by temperature, pH, C/N, seed germination index(GI), NH₄⁺-N and NO₃⁻-N contents. Both natural and microbes-inoculated composts were completely mature, with the inoculated compost more mature than natural one. Microbial inoculation decreased denitrifying bacterial population, but increased the diversity of nosZ-denitrifying bacterial community. The similarity of natural compost samples ranged from 50% to 75%, while that among microbe-inoculated samples was between 27% and 76%, indicating an accelerated succession of denitrifying bacterial communities by inoculated microbes. NosZ-denitrifying bacteria in compost included γ -proteobacteria, β -proteobacteria, uncultured bacteria and α -proteobacteria. Microbes-inoculated compost contained some denitrifying bacteria taxas that were not present in the natural compost. These taxas were *Halomonas*, *Azospirillum*, *Paracoccus*, *Herbaspirillum* and *Alcaligenes*. Among them, the final denitrifying product of *Alcaligene* and *Paracoccus* was N₂, thus decreasing N₂O emissions.

Keywords: natural compost; microbes-inoculated compost; maturity; denitrifying bacterial population; denitrifying bacterial diversity

随着农业和畜牧业的不断发展,农田秸秆和禽畜 粪便大量积累,造成环境污染^[1-2]。堆肥化处理具有安 全性和可持续性,将秸秆与粪肥按适宜比例混合制成 肥堆,便可在微生物作用下将有机物降解为稳定腐殖 质,从而减少有机废物对环境造成的压力^[3]。目前,堆 肥已经成为处理有机固体废物最有效的方法之一^[4]。

反硝化作用在土壤氮素循环中承担着重要角色, 在酶的催化下将硝酸盐还原成 N₂O 或 N₂^[5-6]。其中, N₂O 还原酶(nosZ 基因)参与反应最后一步,可检测反 硝化作用是否完全^[7]。同时,可催化 N₂O 转化成 N₂,减 少了温室气体 N₂O 的产生^[8]。因此,应用 nosZ 基因检 测反硝化细菌得到广泛关注^[9-10]。

虽然目前已有不少关于反硝化细菌群落结构方

收稿日期:2014-11-06

基金项目:国家自然科学基金(31372351,31272484)

作者简介:徐莹莹(1989—),女,硕士,研究方向:微生物。

E-mail:ghdetongzhuo@163.com

^{*} 通信作者:许修宏 E-mail:xuxiuhong@neau.edu.cn

面的研究,但接种菌剂对反硝化细菌群落影响的报道 很少见。本实验采用传统培养与 PCR-DGGE 技术相 结合的方法,研究了接种菌剂对牛粪堆肥中反硝化细 菌数量及以 nosZ 基因为标记的反硝化细菌群落结构 和多样性的影响,旨在明确堆肥过程中反硝化细菌群 落的组成与动态变化,为进一步深入研究反硝化细菌 与氮素间的相互关系及其在堆肥氮素循环中的作用 提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试牛粪采自哈尔滨市幸福乡奶牛养殖厂,水稻 秸秆采自哈尔滨香坊农场东北农业大学实验基地。堆 肥材料主要成分见表1。外源菌剂由东北农业大学实 验室配制,包括有降解木质素的模式菌株——黄孢原 毛平革菌(Phanerochaete chrysosporium)和兼具木质 素、纤维素、半纤维素三种酶活性的灰略红链霉菌 (Streptomyces griseorubens)C-5。

表 1 堆肥材料的主要成分

Table 1 Properties of raw materials for composting

堆肥材料 Materials	含水率 Water content/%	TOC/%	TN/%	C/N
牛粪	24.9	38.89	2.07	18.79
秸秆	11.52	44.31	0.76	58.30

1.2 试验设计

自然堆肥:将水稻秸秆铡成 5 cm 左右的小段,与 牛粪按质量比 1:3.5 混合,调节含水率在 65%左右,建 成 1 m×1 m×1.2 m 的发酵堆,定期翻堆,发酵 45 d,堆 肥初始 C/N 约为 30:1。

接种菌剂堆肥:在堆肥初期添加菌剂,接种量为 1%,接种菌剂后均匀混合堆肥材料。堆制方式同自然 堆肥。

1.3 样品采集

在堆肥的第 0、3、7、15、21、36、45 d 取样,每次从 堆体的上、中、下层各取 300 g 样品,混合均匀后用四 分法保留 500 g,部分冷藏,部分用于相关指标的测定。 1.4 测定内容与方法

※用INI_T IIT325 ≥

采用 LNI-T UT325 数字电子温度计测量堆体 30 cm 处温度,pH 值采用数显 pH 仪测定。全碳和全氮分别采用重铬酸钾容量法和凯氏定氮法,铵态氮采用 靛酚蓝比色法,硝态氮采用紫外分光光度法^[11]测定。种子(大豆)发芽率测定方法见参考文献[12]。反硝化 细菌数量采用最大或然数计数(MPN)法,采用反硝化

细菌培养基^[13-14],在 30 ℃条件下培养 14 d,培养基成 分及检测方法见表 2^[13]。

表 2 反硝化细菌培养基成分及检测方法

Table 2 Medium composition and detection method for

1	
denitrity	zing hacteria
uumum	ing Datitina

微生物	培养基成分	检测方法	
Microbe	Medium composition	Detection method	
反硝化细菌 Denitrifying bacteria	KNO3 2.0 g, MgSO4 · 7H2O 0.2 g, K2HPO4 1.0 g, KH2PO4 1.0 g, 柠檬酸钠 5.0 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.2	有气泡,溶液变浑浊, 加入 Griess 试剂显红 色;加入浓硫酸及二苯 胺试剂显蓝色	

1.5 堆肥样品总 DNA 的提取

堆肥样品总 DNA 的提取方法参考文献[15]。用 OMEGA 凝胶回收试剂盒对粗提基因组 DNA 进行纯 化,1%琼脂糖凝胶电泳检测纯化结果。

1.6 反硝化细菌 nosZ 基因的 PCR 扩增

引物采用 nosZ-F 和 nosZ1622R^[16-17]。GC 夹(5-GGC GGC GCG CCG CCC GCC CCG CCC CCG TCG CCC-3)添加到 nosZ1622R 的 5'端^[18]。反应体系及条 件:50 μL PCR 体系(10×PCR Buffer 5 μL, dNTP 5 μL, 模板 1 μL, Taq 酶 0.6 μL, nosZ-F 0.8 μL, nosZ1622R 0.8 μL, 补充 ddH₂O 到 50 μL) 94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 50 s, 63.5 ℃(每循环降 0.1 ℃)退火 1 min, 72 ℃延伸 40 s, 35 个循环;72 ℃再延伸 10 min。

1.7 DGGE 及条带测序

变性梯度凝胶电泳(DGGE 仪器为 Bio-RAD DCode[™])采用 8%的聚丙烯酰胺凝胶(丙烯酰胺:双丙烯酰胺= 37.5:1 m·V⁻¹),其中尿素浓度范围为 30%~70%。电泳条件:1×TAE 电泳缓冲液,130 V 电压,60 ℃恒温、恒压电泳 12 h。电泳结束后用硝酸银染色,将 DGGE 图谱上的主要条带切胶回收,溶于无菌去离子水中^[19-20],用引物 nosZ-F 和 nosZ1622R 进行PCR 扩增,反应条件同 1.6。将所得产物送到测序公司进行测序。

1.8 DGGE 图谱分析

应用 Quantity One 4.6.2 软件对 DGGE 图谱条带 进行分析,根据公式 $H=-\Sigma P_i \ln P_i$ 计算出反硝化细菌 的多样性指数 $H(式中 P_i=N_i/N, N_i$ 为各泳道上第 i 个 条带吸收峰面积, N 为各泳道上所有条带的总吸收峰 面积^[21-22])。

1.9 系统发育分析

通过 Blast 程序将所得序列与 GenBank 数据库中数据进行比对,获得相近已知序列,用 MEGA 4 中

NJ(Neighbor-Joining)法构建基因系统进化树并对其进行系统发育分析。

2 结果与讨论

2.1 堆肥温度变化

温度变化能够比较直观地反映堆肥进程,也是评 价堆肥腐熟度的重要检测指标之一^[23]。从图1可以看 出,两组堆肥温度变化趋势相同,都经历了升温、高 温、降温和腐熟四个时期。接种菌剂堆肥 0~3 d 为升 温期,在第3d堆体温度升至 50℃以上;3~15 d 为高 温期,其中,第9d达到最高温度 66℃,温度在 50℃ 以上共持续 13 d;15~36 d 为降温期;36~45 d 温度下 降到 40℃以下并趋于稳定,为腐熟期。自然堆肥 0~7 d 为升温期,第7 d 温度达到 50℃以上;7~15 d 为高 温期,在第13 d 达到最高温度 59℃,温度在 50℃以 上共持续9 d;15~36 d 为堆肥降温期;36~45 d 为腐熟 期。一般认为堆肥温度在 50℃以上并维持 5~10 d 就 可达到无害化^[12],两组堆肥都符合无害化标准。



Figure 1 Temperature changes during composting

温度变化表明接种外源菌剂堆肥比自然堆肥进 入高温期更快,持续时间更长,可见接种外源菌剂加 速了堆肥过程的启动,提高了堆肥温度^[20],能够更加 有效地杀死堆肥中病原微生物,达到无害化目的。

2.2 pH 值变化

从图 2 可以看出,两组堆肥的 pH 值都呈先上升 后下降的变化趋势。在接种菌剂堆肥第 7 d、自然堆肥 第 15 d,pH 分别达到最大值 8.71 和 8.66。这是因为 堆肥初期随着温度升高,含氮物质降解,产生的 NH; 不断积累,从而使 pH 值不断升高。堆肥后期产生的 氨类物质减少,pH 值逐渐下降,接种菌剂和自然堆肥 在堆制结束时的 pH 值分别为 8.05 和 8.13,符合腐熟 堆肥pH 值在 8.0~9.0(呈弱碱性)的标准^[24]。



Figure 2 pH changes during composting

2.3 C/N 变化

C/N 是最常用的堆肥腐熟度评价方法之一,为了 有利于微生物的正常生长繁殖和有机物的快速分解, 一般调节堆肥初始 C/N 在 25~30 为最佳,随着堆肥 进行,当 C/N 小于 20 时可认为堆肥已基本达到腐熟^[25]。 从图 3 可以看出,堆肥结束时,两组堆肥 C/N 都在 20 以下,达到腐熟标准。接种菌剂堆肥 C/N 低于自然堆 肥,说明接种菌剂堆肥有机质分解率更高,腐熟效果 更好。



2.4 种子发芽率变化

未腐熟的堆肥对植物具有毒害作用,会抑制植物 生长,因此种子发芽率(GI)被认为是评价堆肥腐熟程 度最敏感且最有效的生物方法。GI>50 可认为堆肥基 本达到腐熟,GI≥85 则认为堆肥已完全腐熟^[24]。从图 4 可以看出,两组堆肥种子发芽率变化规律相同,堆 肥初期,种子发芽率较低,表明堆肥未腐熟,生物毒性 较强。第 15 d 种子发芽率都达到 50%以上,堆肥基本 腐熟,到第 21 d 种子发芽率都在 85%以上,堆肥完全 腐熟。堆肥结束时接种菌剂堆肥 GI 大于自然堆肥 GI,说明接种菌剂堆肥腐熟度更好,更利于农作物



of composting



2.5 铵态氮含量变化

从图 5 可以看出,在整个堆肥过程中,铵态氮含量呈现出升高-降低趋势。堆肥初期,氮素含量相对较高,随着微生物的生长和繁殖作用,微生物氨化作用及有机氮的矿化分解加剧了有机氮的分解,铵态氮含量增加。接种菌剂堆肥和自然堆肥铵态氮最大值分别出现在第 3 d 和第 7 d,分别为 2595、2410 mg·kg⁻¹。堆肥后期,由于氨气的挥发以及部分铵态氮转化为硝态氮,导致其含量逐渐下降。堆肥结束时,接种菌剂堆肥和自然堆肥铵态氮含量分别为 189、342 mg·kg⁻¹,前者低于后者,可能是因为接种菌剂堆肥促进了微生物的生长,更多铵态氮为微生物菌体所利用^[26]。



Figure 5 Changes of NH⁺₄-N contents during composting

2.6 硝态氮含量变化

堆肥初期氮素主要以铵态氮等形式存在,硝态氮 含量变化不大,随着堆肥进行,铵态氮逐渐向硝态氮 转化,进入降温期硝态氮含量迅速增加,至堆肥腐熟 期出现最大值(图 6)。接种菌剂堆肥硝态氮含量(478



Figure 6 Changes of NO₃-N contents during composting

mg·kg⁻¹)是自然堆肥(324 mg·kg⁻¹)的 1.5 倍,与初始 相比,分别增加了 248、209 mg·kg⁻¹。堆肥初始至结束 阶段,接种菌剂堆肥硝态氮含量始终高于自然堆肥, 与马丽红等^[27]研究结果一致,表明接种菌剂可增加硝 化细菌数量,促进铵态氮向硝态氮的转化,从而使硝 态氮含量较高。

2.7 反硝化细菌数量变化

从图 7 可以看出,堆肥初始阶段反硝化细菌数量 相对较少,堆肥中后期数量逐渐增多。这可能是由于 堆肥前期其他微生物大量生长,与之竞争,同时受到 氧气及底物浓度等影响,从而抑制了反硝化细菌的 生长;而堆肥后期存在部分厌氧区域,导致反硝化作 用增强。接种菌剂堆肥中反硝化细菌数量与自然堆 肥差异显著(P<0.05),前者始终少于后者,与徐大勇 等^[28]研究结果一致。堆肥第 21 d 反硝化细菌数量达到 最大,其对数值分别为 4.51、4.84。在降温期至腐熟期 反硝化细菌数量逐渐下降。

2.8 反硝化细菌与氮素相关性分析

两组堆肥中,反硝化细菌数量均与铵态氮呈负相



573

关关系,与硝态氮呈显著正相关关系(表 3)。这与刘 学玲等^[29]研究结果一致,与马丽红等^[29]结果不一致,可 能是由于堆肥中存在好氧反硝化细菌,兼具反硝化和 硝化作用,能够将 NH;转化成 NO₂甚至 NO₃^[29-30]。和自 然堆肥相比,接种菌剂堆肥中各相关系数均有所增 加,可能与接种菌剂堆肥中存在更多好氧反硝化细菌 有关。

表 3 堆肥反硝化细菌与铵态氮和硝态氮间相关系数

Table 3 Correlation coefficients between denitrifying bacteria and $NH^{+}_{-}N$ and $NO_{-}^{-}N$

反硝化细菌	铵态氮	硝态氮
Denitrifying bacteria	NH_4^+-N	NO_3^N
自然堆肥 Natural compost	-0.194	0.761*
接种菌剂堆肥 Microbes-inoculated compost	-0.658	0.831*

注:* 表示相关性显著(P<0.05)。

2.9 基因组 DNA 的提取、纯化及 PCR 扩增

本研究堆肥基因组 DNA 长度在 23.1 kb 左右,均 已获得较完整的基因组 DNA 片段。粗提 DNA 含有较 多杂质,不利于之后的 PCR 反应,因此需要进一步纯 化^[31]。以纯化后的 DNA 作为模板进行 PCR 扩增,堆 肥样品均得到长度为 453 bp 的特异性片段。接种的 复合菌剂中未检测到 nosZ 基因,说明添加的菌剂中 不含有 nosZ-反硝化细菌。

2.10 DGGE 图谱分析

DGGE 图谱上条带亮暗强度及条带数量反映了 微生物数量多少及多样性情况,从图 8 可以看出,自 然堆肥各泳道条带较为相似,而接种菌剂堆肥各泳道 条带差异性较大,可能是由于接种菌剂加速了微生物 间的群落演替,从而使条带差异明显。自然堆肥过程





图 8 反硝化细菌 nosZ 基因的 DGGE 图谱

Figure 8 DGGE profile of nosZ gene of denitrifying bacteria in composts

农业环境科学学报 第 34 卷第 3 期

中,条带A、B、C、D、E、F始终出现,是堆肥中的优势 类群。G和I在降温期出现,成为该时期的特异性条 带。接种菌剂堆肥各个时期,也同样检测到了条带B、 C、E、F。A、D只在堆肥前期出现,到后期消失,为堆肥 前期优势类群。降温至腐熟期,自然堆肥中的条带H 也被检测到,但亮度较暗,说明在接种菌剂堆肥中该 种反硝化细菌数量较少,同时出现了新的特异性条 带,分别为J、K、L、M和N。

利用 Quantity one 软件对 DGGE 图谱进行聚类 分析(UPGAMA),结果如图 9 和图 10 所示。可以看 出,在自然堆肥中,相邻泳道间相似性较高,泳道 1 和 2、3 和 4、6 和 7 的相似性系数分别达到 66%、70%、 75%,说明取样时间越接近,相似性越高。接种菌剂堆 肥中,泳道 2 和 3、6 和 7 聚在一起,2 和 3 相似性系 数为 68%,6 和 7 的为 76%。自然堆肥各泳道相似性 在 50%~75%之间,接种菌剂堆肥泳道相似性在 27%~ 76%之间,说明接种菌剂加速了反硝化细菌群落的演 替,最终形成稳定的群落类型。

2.11 反硝化细菌 nosZ 多样性分析

堆肥过程中,反硝化细菌多样性指数整体呈增加 趋势(图 11)。堆肥初期,反硝化细菌多样性指数变化



图 9 自然堆肥 DGGE 图谱聚类分析

Figure 9 Cluster analysis of DGGE profile in natural compost



图 10 接种菌剂堆肥 DGGE 图谱聚类分析 Figure 10 Cluster analysis of DGGE profile in microbes-inoculated compost



较小,到了后期多样性指数有所增加。这是由于堆肥 后期反硝化底物 NO5逐渐累积或存在部分厌氧区域, 利于厌氧反硝化细菌生长,从而提高了多样性。接菌 菌剂堆肥各时期反硝化细菌多样性指数均大于自然 堆肥,可能是因为堆肥初期添加的外源菌剂能够更好 地分解堆料中的有机质,为微生物生长提供更多碳、 氮源,使反硝化细菌种类增加。

2.12 系统发育分析

在 GenBank 中选取和条带 A~N 序列相似性较高 的 nosZ 基因序列,通过软件 Mega4 将这些序列构建 系统发育树。从图 12 可以看出,堆肥中含 nosZ 基因的 反硝化细菌类群包括 γ -变形菌纲(γ -proteobacteria)、 β-变形菌纲(β-proteobacteria)、未培养细菌(Uncultured bacteria)和 α -变形菌纲(α -proteobacteria)。自 然堆肥中,条带 A~F 在各个时期始终出现,其中 E、F 属于未培养细菌,B~D 属于 γ-变形菌纲,且均为假单 胞菌属,是自然堆肥整个过程中的优势菌属,条带 A 所测得序列虽然和未培养细菌同源性最高,但与产碱 菌属(Alcaligenes)也有较高的相似性,可归属于 β -变 形菌纲。H 在降温和腐熟期被检测到,与无色杆菌属 (Achromobacter) 同源性达到 99%。在接种菌剂堆肥 中,同样能检测到条带 A~F 和 H,且 B、C、E、F 在整 个堆肥过程中始终出现,成为堆肥反硝化细菌优势菌 属。而A和D只在堆肥前期出现,后期消失。高温和 降温期还分别检测到 J、K、L、M, 其中:J 与盐单胞菌 属(Halomonas)同源性达98%;K在高温后期开始出 现,一直到堆肥腐熟期仍然存在,成为接种菌剂堆肥



图 12 反硝化细菌 nosZ 基因系统发育树

Figure 12 Phylogenetic tree based on nosZ sequences of denitrifying bacteria

后期的优势类群,与它同源性较高的为固氮螺菌属 (Azospirillum);L和M都只在堆肥降温初期出现,与 它们同源性较高的分别为副球菌属(Paracoccus)和草 螺菌属(Herbaspirillum)。N与产碱菌属同源性为 99%。接种菌剂堆肥中出现的K和J均属于α-变形 菌纲。

接种菌剂堆肥中出现自然堆肥中不存在的反硝 化菌属,包括盐单胞菌属、固氮螺菌属、副球菌属、草 螺菌属和产碱菌属。有研究发现,其中的产碱菌属、副 球菌属存在好氧反硝化现象^[32-35],且这些菌属中某些 菌株的反硝化终产物为 N^{2[36]},避免了 N₂O 的产生。而 自然堆肥中并未检测到这些反硝化细菌类群,可见接 种菌剂加速了反硝化细菌的演替过程,增加了 nosZ-反硝化细菌群落多样性。

3 结论

(1)接种菌剂可提高堆肥温度,延长高温期,更利 于微生物生长,促进堆肥腐熟,达到无害化标准。

(2)在整个堆肥过程中,接种菌剂堆肥中可培养 反硝化细菌数量始终少于自然堆肥,且其与铵态氮和 硝态氮间相关性也较自然堆肥更为显著。

(3)通过对 DGGE 图谱泳道间聚类分析可知,自 然堆肥各泳道相似性在 50%~75%之间,接种菌剂堆 肥泳道相似性在 27%~76%之间。和自然堆肥相比,接 种菌剂堆肥加速了反硝化细菌群落演替,使 nosZ-反 硝化细菌多样性有所增加。

(4)通过序列比对及系统发育分析得出,堆肥中 的反硝化细菌类群主要属于 γ-变形菌纲和 β-变形 菌纲,假单胞菌属和一些未培养的细菌。接种菌剂堆 肥在高温和降温期检测到了自然堆肥中不存在的 nosZ-反硝化类群,这些新的类群分别属于盐单胞菌 属、固氮螺菌属、副球菌属、草螺菌属和产碱菌属。

参考文献:

- Jusoh M L C, Manaf L A, Latiff P A, et al. Composting of rice straw with effective microorganisms(EM) and its influence on compost quality[J]. *Iranian Journal of Environmental Health Sciences and Engineering*, 2013, 10(1):1–9.
- [2] 李清飞,何新生,孙震宁,等.农村生活垃圾好氧堆肥技术探讨[J].农 机化研究,2011,33(6):186-189.

LI Qing-fei, HE Xin-sheng, SUN Zhen-ning, et al. Aerobic composting technology for rural domestic waste[J]. *Journal of Agricultural Mecha-nization Research*, 2011, 33(6):186–189.

[3] 田 旸, 杨凤林, 柳丽芬, 等. 堆肥技术处理有机污染土壤的研究进展[J]. 环境污染治理技术与设备, 2002, 3(12):31-37.

TIAN Yang, YANG Feng-lin, LIU Li-fen, et al. Advances in the research of composting technology for soil contaminated by organic pollutants[J]. *Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control*, 2002, 3(12):31–37.

- [4] Jiang T, Schuchardt F, Li G X, et al. Effect of C/N ratio, aeration rate and moisture content on ammonia and greenhouse gas emission during the composting[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2011, 23 (10): 1754–1760.
- [5] 宋亚娜,林智敏,林 艳. 氮肥对稻田土壤反硝化细菌群落结构和丰度的影响[J]. 中国生态农业学报, 2012, 20(1):7-12. SONG Ya-na, LIN Zhi-min, LIN Yan. Response of denitrifying bacteria community structure and abundance to nitrogen in paddy fields[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2012, 20(1):7-12.
- [6] Chen Z, Liu J B, Wu M N, et al. Differentiated response of denitrifying communities to fertilization regime in paddy soil[J]. *Microbial Ecology*, 2012, 63(2):446–459.
- [7] 郭丽芸,时 飞,杨柳燕. 反硝化菌功能基因及其分子生态学研究进展[J]. 微生物学通报, 2011, 38(4):583-590.
 GUO Li-yun, SHI Fei, YANG Liu-yan. Advances in functional genes and molecular ecology in denitrifiers[J]. *Microbiology China*, 2011, 38 (4):583-590.
- [8] Barrett M, Jahangir M M, Lee C, et al. Abundance of denitrification genes under different peizometer depths in four Irish agricultural groundwater sites[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2013, 20(9):6646-6657.
- [9] 王晓君, 陈少华, 张兆基, 等. 利用氧化亚氮还原酶基因(nosZ)评价 人工湿地系统中的反硝化菌[J]. 环境科学, 2012, 33(4):1306-1312. WANG Xiao-jun, CHEN Shao-hua, ZHANG Zhao-ji, et al. Denitrifying bacteria of constructed wetland system based on nitrous oxide reductase gene(nosZ)[J]. Environmental Science, 2012, 33(4):1306-1312.
- [10]方 芳, 王淑梅, 冯翠杰, 等. 好氧条件下复合生物膜-活性污泥反应器中的反硝化菌群结构[J]. 生态学杂志, 2011, 30(3):430-437.
 FANG Fang, WANG Shu-mei, FENG Cui-jie, et al. Community structure of denitrifying bacteria in a hybrid AS-biofilm process under aerobic condition[J]. Chinese Journal of Ecology, 2011, 30(3):430-437.
- [11] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 三版. 北京:中国农业出版社, 2000.
 BAO Shi-dan. Soil and agricultural chemistry analysis[M]. 3rd edition.
 Beijing: China Agriculture Press, 2000.
- [12] 钱晓雍, 沈根祥, 黄丽华, 等. 畜禽粪便堆肥腐熟度评价指标体系研究[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(3):549-554.
 QIAN Xiao-yong, SHEN Gen-xiang, HUANG Li-hua, et al. An index system for evaluating the maturity of animal manure composting[J]. Journal of Agro-Environmental Science, 2009, 28(3):549-554.
- [13] 马丽红, 黄懿梅, 李学章, 等. 两种添加剂对牛粪堆肥中氮转化及相 关微生物的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2010, 28(1):76-82, 110. MA Li-hong, HUANG Yi-mei, LI Xue-zhang, et al. Effect of two amendments on nitrogen transformation and its related microbial during cow manure composting[J]. A gricultural Research in the Arid Areas, 2010, 28(1):76-82, 110.
- [14] 张玉芹, 刘开启, 王 革, 等. 反硝化细菌的筛选及培养条件的研究
 [J]. 农业环境科学学报, 2005, 24(1): 165–168.
 ZHANG Yu-qin, LIU Kai-qi, WANG Ge, et al. Screening of denitrify-

2015年3月

徐莹莹,等:接种菌剂对牛粪堆肥反硝化细菌群落的影响

ing bacteria and determination of the culture conditions[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2005, 24(1):165-168.

- [15] Petric I, Philippot L, Abbate C, et al. Inter-laboratory evaluation of the ISO standard 11063 "Soil quality—Method to directly extract DNA from soil samples" [J]. Journal of Microbiological Methods, 2011, 84 (3):454-460.
- [16] Zhou Z F, Zheng Y M, Shen J P, et al. Response of denitrification genes nirS, nirK, and nosZ to irrigation water quality in a Chinese agricultural soil[J]. *Environmental Science Pollution Research*, 2011, 18(9): 1644–1652.
- [17] 梁丽华, 左剑恶. 反硝化功能基因——检测反硝化菌种群结构的 分子标记[J]. 微生物学通报, 2009, 36(4):627-633.
 LIANG Li-hua, ZUO Jian-e. Denitrifying functional Genes: The molecular marker for detection of denitrifying community structure[J]. *Microbiology China*, 2009, 36(4):627-633.
- [18] Zhou Z F, Zheng Y M, Shen J P, et al. Responses of activities, abundances and community structures of soil denitrifiers to short-term mercury stress[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2012, 24(3):369– 375.
- [19] Chong C W, Annie Tan G Y, Wong R C W, et al. DGGE fingerprinting of bacteria in soils from eight ecologically different sites around Casey Station, Antarctica[J]. *Polar Biology*, 2009, 32(6):853–860.
- [20] 袁 飞,冉 炜,胡 江,等.变性梯度凝胶电泳法研究我国不同土 壤氨氧化细菌群落组成及活性[J]. 生态学报, 2005, 25(6):1318-1324.

YUAN Fei, RAN Wei, HU Jiang, et al. Ammonia –oxidizing bacteria communities and their influence on the nitrification potential of Chi– nese soils measured by denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE) [J]. *Acta Ecologica Sinica*(*International Journal*), 2005, 25(6):1318– 1324.

- [21] 刘 佳,李 婉,许修宏,等. 接种纤维素降解菌对牛粪堆肥微生物 群落的影响[J]. 环境科学, 2011, 32(10):3073-3081.
 LIU Jia, LI Wan, XU Xiu-hong. Effect of cellulose-decomposing strain on microbial community of cow manure compost[J]. *Environmental Science*, 2011, 32(10):3073-3081.
- [22]肖玉军. 黄龙风景区水体细菌多样性研究[D]. 四川农业大学, 2013.

XIAO Yu-jun. Study of the water bacterial diversity from Huanglong [D]. Sichuan Agricultural University, 2013.

[23] 吴银宝, 汪植三, 廖新俤, 等. 猪粪堆肥腐熟指标的研究[J]. 农业环境科学学报, 2003, 22(2):189-193.
WU Yin-bao, et al. Study on mature index of composting swine manure[J]. Journal of Agro-Environmental Science, 2003, 22(2):189-

193. [24] 张亚宁. 堆肥腐熟度快速测定指标和方法的建立[D]. 北京:中国农 业大学. 2004.

ZHANG Ya-ning. Studies on the foundation of simple indexes and mensuration of compost maturity[D]. Beijing: China Agriculture University, 2004.

[25] 廖新俤, 吴银宝, 汪植三, 等. 堆体大小对猪粪堆肥影响和袋装堆肥的研究[J]. 农业工程学报, 2003, 19(4):287-290.

LIAO Xin-di, WU Yin-bao, WANG Zhi-san, et al. Effects of pile size and packaging on swine manure composting[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2003, 19(4):287–290.

- [26] 徐大勇, 黄为一.人工接种堆肥和自然堆肥微生物区系与分子多态性的变化[J]. 生态与农村环境学报, 2006, 22(1):29-33. XU Da-yong, HUANG Wei-yi. Variation of microflora and molecular polymorphism in inoculated and natural composts[J]. Journal of Ecology and Rural Environment, 2006, 22(1):29-33.
- [27] 马丽红, 黄懿梅, 李学章, 等. 牛粪堆肥化中氮素形态与微生物生理 群的动态变化和耦合关系[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(12): 2674-2679.

MA LI-hong, HUANG Yi-mei, LI Xue-zhang, et al. Changes of nitrogen forms and microbial physiological group diversity and their relations during composting of cow manure[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(12):2674–2679.

- [28] 徐大勇, 黄为一. 人工接种堆肥和自然堆肥微生物区系变化的比较[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(23):7219-7220, 7223.
 XU Da-yong, HUANG Wei-yi. Comparison study on dynamics of microbial population in inoculated and natural composts[J]. *Journal of Anhui Agri Sci*, 2007, 35(23):7219-7220, 7223.
- [29] 刘学玲, 黄懿梅, 姜继韶, 等. 微生物生理群在猪粪秸秆高温堆肥碳 氮转化中的作用[J]. 环境工程学报, 2012, 6(5): 1713–1720. LIU Xue-ling, HUANG Yi-mei, JIANG Ji-shao, et al. Function of microbial physiological group in carbon and nitrogen transformation during a swine manure-straw compost[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2012, 6(5): 1713–1720.
- [30] 吴晓冰. 好氧反硝化菌的分析与研究[J]. 广东化工, 2011, 38(4):5-6, 139.

WU Xiao-bing. Analysis and research on aerobic denitrifier[J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2011, 38(4):5-6, 139.

- [31] Yang Z H, Xiao Y, Zeng G M, et al. Comparison of methods for total community DNA extraction and purification from compost[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2007, 74(4):918–925.
- [32] Joo H S, Hirai M, Shoda M. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification –aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* No.4[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005, 100(2): 184–191.
- [33] Patureau D, Zumstein E, Delgenes J, et al. Aerobic denitrification isolation from diverse natural and managed ecosystems[J]. *Microbial Ecolo*gy, 2000, 39(2):145–152.
- [34] Rezić T, Šantek T, Novak S, et al. Heterotrophic cultivation of Paracoccus denitrificans in a horizontal rotating tubular bioreactor[J]. World Journal Microbiology Biotechnology, 2007, 23(7):987–996.
- [35] Lukow T, Diekmann H. Aerobic denitrification by a newly isolated heterotrophic bacterium strain TL1[J]. *Biotechnology letters*, 1997, 19 (11):1157-1159.
- [36] 李 平, 张 山, 刘德立. 细菌好氧反硝化研究进展[J]. 微生物学杂志, 2005, 25(1):60-64.

LI Ping, ZHANG Shan, LIU De-li. Study progress of bacterial aerobic denitrification[J]. *Journal of Microbiology*, 2005, 25(1):60–64.