

许本姝, 门梦琪, 武晓桐, 等. 牛粪堆肥过程中 *nosZ* 型反硝化细菌动态变化[J]. 农业环境科学学报, 2019, 38(9): 2210–2218.

XU Ben-shu, MEN Meng-qi, WU Xiao-tong, et al. Dynamic community structure of *nosZ*-type denitrifying bacteria during cow manure composting[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2019, 38(9): 2210–2218.

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*

(东北农业大学资源与环境学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 采用高通量测序技术, 研究牛粪堆肥过程中不同时期与不同深度的 *nosZ* 型反硝化细菌群落组成的动态变化与多样性, 并通过冗余分析(Redundancy analysis, RDA)和Spearman相关性分析, 揭示了堆肥过程中 *nosZ* 型反硝化细菌与理化指标之间的相关关系。结果表明, 堆肥不同时期 *nosZ* 型反硝化细菌群落结构差异显著, 反硝化细菌群落多样性和丰富度均呈先降低后升高的趋势, 在堆肥降温期不同深度的反硝化细菌群落结构和多样性指数差异显著。此外, 理化因素显著影响堆肥反硝化菌群的群落结构与多样性, 螯合球菌属(*Chelatococcus*)与温度呈极显著正相关($P < 0.01$), *Polymorphum* 与硝态氮呈极显著正相关($P < 0.01$), 生根瘤菌属(*Mesorhizobium*)与含水率和 C/N 呈极显著负相关($P < 0.01$)。反硝化细菌的多样性与温度、pH、氨态氮呈极显著负相关($P < 0.01$), 与硝态氮呈极显著正相关($P < 0.01$)。反硝化细菌的丰富度与温度呈极显著负相关($P < 0.01$)。综上所述, 堆肥时间和深度均为影响 *nosZ* 型反硝化细菌群落结构的重要因素, 且该菌群群落结构变化受理化因子的显著影响。

关键词: 动态好氧堆肥; 高通量测序; *nosZ* 型反硝化细菌; 冗余分析

中图分类号: X713 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2019)09-2210-09 doi:10.11654/jaes.2018-1540

Dynamic community structure of *nosZ*-type denitrifying bacteria during cow manure composting

XU Ben-shu, MEN Meng-qi, WU Xiao-tong, JIANG Xin, SHENG Si-yuan, HAN Yue, ZHU Hai-feng, MENG Qing-xin, DENG Li-ting, XU Xiu-Hong*

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

Abstract: This study examined the dynamic nature and diversity of the community structure of the *nosZ*-type denitrifying bacteria with varying periods and layers during cow manure and rice straw composting. This was done via high throughput sequencing. The relationship between the denitrifying bacteria and physicochemical parameters was investigated using redundancy analysis (RDA) and Spearman correlation analysis. The results indicated that the community structure of the *nosZ*-type denitrifying bacteria varied significantly through the composting stages. Further, both the diversity and richness of the denitrifying bacteria displayed a declining tendency at the beginning and an increasing trend in late phase of composting. The denitrifying bacterial community structure and diversity index were greatly affected by composting depth in the late thermophilic stage. In addition, physicochemical parameters significantly affected the community structure. Significantly positive correlations were observed between *Chelatococcus* and temperature ($P < 0.01$), and *Polymorphum* and nitrate nitrogen ($P < 0.01$). Significantly negative correlations were seen between *Mesorhizobium* and moisture content and C/N ($P < 0.01$). The diversity of the denitrifying bacterial communities was significantly negatively correlated with temperature, pH, and ammonium nitrogen ($P < 0.01$) and significantly positively correlated with nitrate nitrogen ($P < 0.01$). The richness of the denitrifying bacteria was significantly negatively correlated with temperature ($P < 0.01$). In conclusion, our results indicate that time and depth are both factors influencing the *nosZ*-type denitri-

收稿日期: 2018-12-06 录用日期: 2019-04-10

作者简介: 许本姝(1994—), 女, 黑龙江绥化人, 硕士研究生, 研究方向为生物质资源化利用。E-mail: 530192667@qq.com

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

基金项目: 国家自然科学基金项目(31672469)

Project supported: The National Natural Science Foundation of China(31672469)

fying bacterial community structure, and the community structure is significantly affected by physicochemical parameters. This study provides an insight into the theory of the role of the nitrogen cycle in composting and thus promotes the improvement of composting technology.

Keywords: dynamic aerobic compost; high throughput sequencing; *nosZ*-type denitrifying bacteria; RDA

随着畜牧养殖业与农业的发展,家畜粪便、农作物秸秆等有机废弃物已成为主要的环境污染物,影响生态平衡和人类健康^[1]。堆肥是将上述有机废弃物混合,经生化降解而制成的一种有机肥料,能够使有限的资源得到二次利用。制造堆肥必须先收集适当的材料,以秸秆与粪便作为堆肥原料不仅能够减小有机废物对环境带来的压力,同时能调节能源结构,促进农业、畜牧业的协调发展,对实现环境资源的可持续发展具有重要意义^[2]。

氮素是堆肥过程中的重要营养元素,影响堆肥的进程及堆肥质量。在反硝化作用过程中,氮元素以气体的形式释放到大气中,影响堆肥的质量^[3-4]。反硝化反应的过程为 $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$,氧化亚氮还原酶基因(*nosZ*)参与其过程中最后一步,并将 N_2O 转化为 N_2 ,使反硝化过程得到完全反应的同时又能够减少温室气体的产生。因此,学者们常以 *nosZ* 功能基因为标记研究反硝化细菌^[5-6]。

堆肥反应是一个复杂的生物过程,不同深度堆肥中理化参数差异较大,对微生物群落组成也会产生不同的影响^[7-8]。国外学者对细菌、真菌在堆肥不同区域的群落结构变化进行了研究^[9-10]。然而动态堆肥过程中不同深度的反硝化细菌群落动态变化则鲜见报道,且关于理化参数与反硝化细菌之间关系的研究也相对欠缺。

本试验以牛粪和稻草为原料,以 *nosZ* 功能基因为标记,通过高通量测序技术研究好氧堆肥过程中不同时期与深度的 *nosZ* 型反硝化细菌群落结构与多样性的变化,并且分析理化参数对反硝化细菌群落结构以及多样性的影响。对理解堆肥氮循环理论和促进堆肥技术的改进具有科学价值。

1 材料与方法

1.1 试验材料 with 处理

在哈尔滨市香坊农场实验基地于2016年7月1日进行堆肥试验,堆肥中的牛粪与水稻秸秆来自黑龙江省哈尔滨市阿城区畜牧业基地。堆肥材料的主要成分见表1。将秸秆干燥后切成3~5 cm小段后与牛粪混合均匀,调节起始C/N值为30:1,建成约3 m×1.5

表1 堆肥材料的主要成分

Table 1 Properties of raw materials for composting

堆肥材料 Composting material	含水率 Moisture content/%	全碳 Total carbon/%	全氮 Total nitrogen/%	碳氮比 C/N
牛粪	62.57±1.21	38.75±0.52	1.97±0.01	19.26±0.42
秸秆	9.30±0.56	47.67±0.59	0.84±0.01	56.43±2.74

m×1.5 m的堆体,堆肥全程共50 d,在堆肥的第8、23 d和41 d进行翻堆处理。

1.2 样品采集

堆体高1.5 m。在堆肥试验开始的第0、2、18、39 d和50 d进行取样,取样时将堆体分为上(距堆体顶部20 cm)、中(距堆体顶部75 cm)、下(距堆体底部20 cm)三层,在各层均匀地取三个点分别采集500 g样品,并按层次充分混匀,重复三次,整个堆肥过程共采集39份样品,按堆肥天数与深度分类并分别命名为I0(第0 d)、T1(第2 d上层)、M1(第2 d中层)、B1(第2 d下层)、T2(第18 d上层)、M2(第18 d中层)、B2(第18 d下层)、T3(第39 d上层)、M3(第39 d中层)、B3(第39 d下层)、T4(第50 d上层)、M4(第50 d中层)、B4(第50 d下层)。采集后的部分样品经干燥、粉碎并过100目筛后常温储存,其余样品置于-80℃冰箱中用于后期分析。

1.3 测定内容与方法

在堆肥过程中,每日用精密数字温度计测定每个层次(由上到下20、75、130 cm)与环境的温度。含水率(WC)采用恒重法测定。将新鲜堆肥样品与去离子水以1:10(W/V)混合,用电导仪和pH数字仪分别测量pH值与EC值。全碳(TC)和全氮(TN)分别采用重铬酸钾容量法和凯氏定氮法测定^[11],碳氮比(C/N)为TC与TN的比值。氨态氮(NH_4^+-N)与硝态氮(NO_3^--N)的含量利用流动分析仪进行测定。种子发芽率(Germination index, GI)是判断堆肥腐熟程度的重要指标,利用独行菜(*Lepidium sativum* L.)种子^[12]测定种子发芽率。堆肥样品与去离子水的比例为1:10(质量浓度比),振荡24 h后取5 mL提取液注入有滤纸的培养皿中,并将20粒独行菜种子分布均匀地放置于滤纸上,在培养箱中25℃遮光培养48 h,并用蒸馏水代替堆肥

提取液作为对照组。计算方法:

$$GI = (\text{堆肥浸提液的种子发芽率} \times \text{种子根长}) / (\text{对照组种子发芽率} \times \text{种子根长}) \times 100\%$$

除温度以外的所有指标均进行三次重复测定。

1.4 样品 DNA 的提取与 PCR 扩增

用 CTAB 法从堆肥样品中提取总 DNA^[13], 使用 Omega 凝胶回收试剂盒 (Omega Bio-Tek, Inc., GA, USA) 并根据说明书提示将提取粗 DNA 进行纯化。纯化后的 DNA 存储在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下以减少样本的变化。以各个样品的 DNA 为模板, 以 *nosZ*-1F (5'-CGY TGT TCM TCG ACA GCC AG-3') 和 *nosZ*-1622R (5'-CGS ACC TTS TTG CCS TYG CG-3') 为引物扩增 *nosZ* 基因^[14]。PCR 反应体系与条件为: 共 $75\text{ }\mu\text{L}$ PCR 体系包含 $37.5\text{ }\mu\text{L}$ Taq-HS PCR Forest Mix (2X), 模板 $1\text{ }\mu\text{L}$, 上下游引物各 $0.6\text{ }\mu\text{L}$, 补充 dd H₂O 到 $75\text{ }\mu\text{L}$ 。94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 7 min, 最后 4 $^{\circ}\text{C}$ 反应终止。PCR 产物利用 2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 并使用 Omega 凝胶回收试剂盒纯化 PCR 产物。

1.5 *nosZ* 型反硝化细菌高通量测序

将纯化后的 PCR 产物在四川贝博特生物科技有限公司 Illumina Miseq 平台进行测序。原始数据提交至 NCBI 数据库, 登录号为 SUB4856116。

1.6 生物信息处理

根据 PE reads 之间的重叠关系进行拼接过滤并去除嵌合体, 在 97% 的相似度水平下进行聚类获得可操作分类单元 (OTU, Operational taxonomic units), 使用 Mothur (Version v.1.30) 软件, 对样品 alpha 多样性指数进行评估 (Simpson 指数、ACE 指数), 基于 Silva 数据库对 OTU 进行分类学注释。利用 QIIME 软件 (Version 1.8.0) 生成物种丰度表, 利用 R 语言 Vegan 包

中的 RDA 分析来反应各样品微生物群落结构与理化参数之间的相关性。

1.7 数据处理

试验数据利用 SPSS 22.0 软件对堆肥的理化参数进行单因素方差分析 (One way-ANOVA, Tukey HSD 法), 对反硝化细菌的多样性与丰富度进行 Spearman 相关性分析, 概率值 $P < 0.05$ 代表相关关系显著。

2 结果与讨论

2.1 堆肥过程中理化参数及 GI 指标的变化

堆体高 1.5 m。堆肥各层的温度分布如图 1 所示, 箭头表示翻堆时间。在整个过程中, 堆肥经历了升温 (0~12 d)、高温 (13~27 d)、降温 (28~46 d) 和腐熟 (47~50 d) 四个时期, 堆体的温度在堆肥开始后立即升高, 堆体上层与中层的温度在堆肥开始的第 4 d 即达到了 55 $^{\circ}\text{C}$, 而下层的温度在第 11 d 才达到 55 $^{\circ}\text{C}$, 这种现象是由于堆肥下层的通风较差, 氧气含量较低, 微生物代谢缓慢, 导致下层温度升高较慢^[15-16]。堆肥过程中, 各层温度均达到了 55 $^{\circ}\text{C}$ 并持续了 5 d 以上, 足以杀死堆体中的病原菌而使堆肥达到无害化^[17]。堆肥进行到第 28 d, 堆体的上中下层的温度同时开始下降, 并在第 47 d 达到了腐熟期。整个堆肥过程中, 上层和中层的温度基本上高于下层, 并且翻堆会造成堆体温度明显波动。

在堆肥过程中的升温与高温阶段, pH 值缓慢升高, 这可能是由于随着堆肥的进行, 通过氨化作用使有机酸分解^[18], 使 pH 值从 7.93 增加到 8.90 (见表 2)。而到了降温期, 堆肥的 pH 值开始下降, 最终达到了有机肥料可施用标准的微碱性环境 (pH 值范围 7.5~9.0)^[19]。在堆肥的高温阶段, 上层与中层的 pH 值分别达到了 8.9 和 8.62, 而下层只达到了 8.20 ($P < 0.05$),

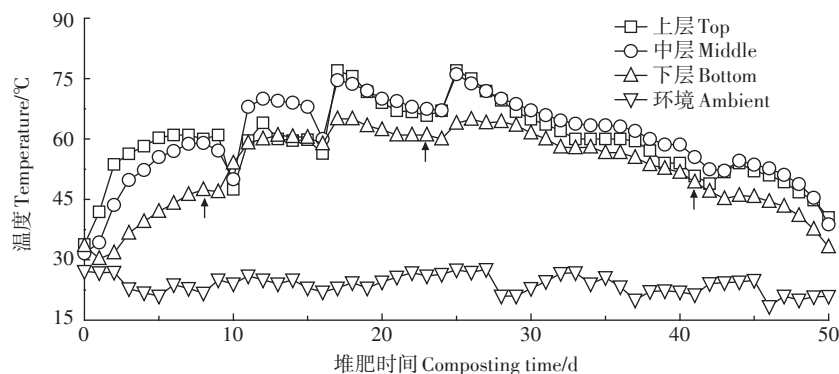


图1 堆肥过程中温度的变化

Figure 1 Changes of temperature during composting process

这可能是由于堆肥上层相对于堆体其他层次通风量较大,参与氨化作用的微生物大多为好氧微生物,因此在堆肥上层的活动相对剧烈^[20]。电导率(EC)与堆肥中的含盐量有着十分紧密的关系,EC值超过4.3 mS·cm⁻¹时会不利于作物的正常生长^[21]。从表1数据得知,堆肥过程中EC最高值为2.14 mS·cm⁻¹,因此符合要求标准。含水率(WC)在堆肥过程中呈下降趋势,在堆肥的第50 d含水率下降至45.21%~53.44%,且下层的含水率较上层和中层稍高,这可能是由于上层和中层的通风条件加速了含水量的降低^[15]。NH₄⁺-N在堆肥过程中先升高再减低,这是由于堆肥前期氨化细菌通过氨化作用使堆肥中的氮素分解为NH₄⁺-N,导致NH₄⁺-N含量逐渐增加,而到了堆肥后期,硝化作用使堆体中的NH₄⁺-N转化为NO₃⁻-N,另外由于NH₃的挥发,NH₄⁺-N含量开始下降^[22]。在堆肥的高温期与降温期,NH₄⁺-N上层和中层的含量显著高于下层($P<0.05$)。且上层的NH₄⁺-N含量持续高于中层和下层的现象持续至堆肥结束,这可能是由于堆体上层具有相比底层较高的温度环境和相比中层较好的通风条件,因此有利于氨化细菌的繁殖与氨化反应的进行^[23]。而NO₃⁻-N含量在堆肥升温期过后急速上升。这与以往的研究结果相一致,过高的温度会抑制硝化细菌的活性,随着堆体温度的降低,硝化细菌活性增强,氨态氮经硝化作用转化为硝态氮,导致NO₃⁻-N含量升高^[24]。C/N是判断堆肥腐熟度的指标之一,一般情况下,C/N

小于20即可判定堆肥基本腐熟^[25],通过表2可知,除中层的C/N值稍高于腐熟标准(20.14),其他各层的C/N值均达到了要求。种子发芽率(GI)是判断堆肥腐熟程度的重要指标,当发芽率大于80.0%时证明堆肥的毒性已经丧失并腐熟^[26]。本实验上中下层的种子发芽率均达到了标准值,证明堆肥各层均已达到腐熟标准并对植物失去毒性。

2.2 堆肥中 *nosZ* 型反硝化细菌群落的丰富度及多样性

在所有堆肥样品中共获得了872 502个序列(见表3),各个样品序列条数在12 717~55 863。在97%相似度的基础上划分共获得449个OTU,序列长度范围为200~500 bp。所有样品基因文库的覆盖率指数均高于0.99,表明获得的测序结果足以代表堆肥中 *nosZ* 型反硝化细菌群落结构的真实情况。测序结果表明在不同采样地点的OTU数量和分布各不相同。*nosZ* 型反硝化基因的OTU数量在堆肥开始时最高,随着堆肥的推进OTU数量逐渐减少,在腐熟阶段达到最低。这可能是在堆肥的最初阶段,堆体中的营养物质浓度较高,利于反硝化细菌的生长^[18]。此外,在整个堆肥过程中,上层的OTU数量始终高于中层和底层。Alpha多样性统计结果见表3,样品内物种Simpson指数代表样品中物种组成的多样性,数值大小与物种多样性呈反比,数值越大代表多样性越低^[27]。本研究的堆肥体系中Simpson指数先增大后减小,说明反硝化细菌的多样性先降低后升高,并且

表2 堆肥过程中理化及GI指标的变化

Table 2 Changes of physic-chemical and GI indices during composting process

样品 Samples	pH	电导率EC/ mS·cm ⁻¹	含水率 Moisture content/%	氨态氮 Ammoniacal nitrogen/mg·kg ⁻¹	硝态氮 Nitrate nitrogen/mg·kg ⁻¹	碳氮比 C/N	种子发芽率 GI/%
I0	7.93±0.02de	1.27±0.02bc	71.25±2.02a	588.7±16.3bc	80.2±12.1d	29.92±0.49b	44.2±2.1d
T1	8.51±0.07b	1.06±0.07bc	69.87±1.04ab	597.9±12.5bc	83.7±21.4cd	34.61±0.22a	51.8±1.4d
T2	8.90±0.02a	1.41±0.10b	63.59±0.48bcd	975.8±20.4a	91.3±15.2cd	24.51±0.59c	76.5±2.6bc
T3	8.0±0.06d	1.83±0.05a	56.72±1.36de	552.8±10.3bc	136.6±9.4bcd	18.94±0.63e	87.5±1.3ab
T4	7.70±0.02f	2.14±0.11a	49.68±0.91fg	512.8±19.4cd	343.9±4.9a	17.77±0.11e	94.8±2.9a
M1	8.5±0.04b	1.20±0.03bc	67.27±1.42abc	640.8±6.7bc	79.8±12.5d	32.13±0.28ab	49.7±2.1d
M2	8.62±0.03b	1.35±0.06bc	62.65±0.80cd	911.1±10.9a	104.2±9.4cd	24.85±0.34c	73.1±1.4c
M3	7.93±0.02de	2.01±0.04a	52.09±0.92efg	534.1±16.2bc	152.6±17.9bc	20.54±0.54de	88.7±2.1a
M4	7.81±0.04ef	2.10±0.06a	45.21±0.14g	347.5±12.8de	339.9±6.7a	20.14±0.35de	93.1±1.6a
B1	8.03±0.03d	1.02±0.04c	67.67±1.43abc	679.5±5.7b	95.5±14.5cd	32.25±0.97ab	48.3±1.5d
B2	8.20±0.01c	1.15±0.06bc	63.03±1.88bcd	593.8±23.9bc	84.5±9.1cd	22.28±0.72cd	70.4±1.9c
B3	7.82±0.07ef	1.95±0.09a	53.87±0.41ef	364.4±15.8de	198.5±15b	18.87±0.81e	86.7±2.3ab
B4	7.69±0.06f	1.89±0.01a	53.44±1.57ef	311.4±27.4e	296±8.1a	17.52±0.85e	88.5±2.0a

注:同列数字字母不同者表示差异显著($P<0.05$),氨态氮与硝态氮含量均为干质量。下同。

Note: Different lowercase letters within the same column indicate significant differences ($P<0.05$). The units of NH₄⁺-N and NO₃⁻-N are both dry weights. The same below.

表3 堆肥过程中 MiSeq 测序结果及多样性指数
Table 3 MiSeq sequencing results and diversity indices during composting process

样品 Samples	OTUs	优化序列 Optimal sequence	Simpson 指数 Simpson index	ACE 指数 ACE index	覆盖率 Coverage
I0	237±20	52 157±3705	0.047 0±0.002 0c	258.017 7±8.221 8ab	0.999 2±0.000 3
T1	217±12	23 014±4299	0.067 8±0.003 5a	248.580 2±8.491 5ab	0.996 3±0.002 3
T2	198±18	17 629±4162	0.071 7±0.002 2a	238.418 6±8.683 5ab	0.995 2±0.002 5
T3	203±28	35 194±7224	0.068 4±0.001 4a	227.350 6±4.485 9b	0.998 5±0.000 8
T4	189±11	21 865±2574	0.037 1±0.001 8c	252.197 7±7.877 0ab	0.997 1±0.001 9
M1	211±23	17 290±887	0.060 9±0.002 1ab	246.198 4±9.523 7ab	0.996 1±0.001
M2	204±9	15 352±2807	0.066 3±0.001 2a	230.529 2±7.984 2ab	0.996 3±0.000 7
M3	204±5	23 272±3967	0.060 6±0.002 6ab	230.459±4.274 2ab	0.997 9±0.001 3
M4	197±6	13 944±1227	0.044 9±0.002 2c	237.427 3±1.848 1ab	0.995 2±0.001 2
B1	221±25	16 867±1580	0.043 8±0.002 8c	257.054 5±6.654 4ab	0.995±0.002 9
B2	219±18	19 543±653	0.066 2±0.002 9a	244.721±5.760 4ab	0.996 6±0.001 1
B3	211±12	18 348±1659	0.048 8±0.002 1bc	258.961 7±6.655 4ab	0.996 2±0.001 1
B4	226±5	16 359±637	0.039 4±0.002 2c	267.517 8±6.638 2a	0.996 2±0.000 8
Total	449	872 502			

在堆肥的降温期,上层与下层的多样性呈显著性差异($P<0.05$)。ACE 指数表示样品中反硝化细菌的丰富度,ACE 指数越高,反硝化细菌的丰富度越高^[28]。ACE 指数在堆肥过程中先减小后增大,表明反硝化细菌的丰富度与多样性趋势相似,先降低后升高。堆肥过程中丰富度的变化可能是由于溶解有机碳(DOC)浓度引起的,有研究表明 *nosZ* 基因丰富度与溶解有机碳浓度显著相关^[29]。此外在堆肥过程中,堆体各层的丰富度并没有体现出显著性差异。

2.3 堆肥中 *nosZ* 型反硝化细菌的群落组成

39 个堆肥样品中的 449 条 OTU 分属于 1 门 3 纲 8 目 12 科 14 属 15 种。图 2 为 *nosZ* 型反硝化细菌在属水平上群落组成的动态变化,图中显示了过滤掉 unclassified 后丰度水平前 10 的物种,并将其他丰度水平物种合并为 Others。假单胞菌属(*Pseudomonas*)、鲍特氏菌属(*Bordetella*)、陶厄氏菌属(*Thauera*)、无色杆菌属(*Achromobacter*)、*Polymorphum*、卡斯特兰尼氏菌属(*Castellaniella*)、生根瘤菌属(*Mesorhizobium*)、盐单胞菌属(*Halomonas*)、螯台球菌属(*Chelatococcus*)、红假单胞菌属(*Rhodopseudomonas*)为各样品中主要的反硝化细菌。堆肥第 0 d,假单胞菌属(54%)、鲍特氏菌属(17%)、陶厄氏菌属(12%)、生根瘤菌属(11%)为优势菌属。当堆肥进行到升温期,陶厄氏菌属的相对丰度显著上升,成为升温期的优势菌属,且上层与下层其相对丰度相比中层较高。这是由于陶厄氏菌属是 β -变形菌门下的革兰氏阴性细菌,大多数为杆状且具有反硝化能力,并适合在中性 pH 和中温环境中

生长^[30-31],与此同时无色杆菌属的相对丰度在升温阶段也稍有增加。堆肥高温期各层反硝化细菌群落结构开始出现明显的差异,堆肥上层和下层的假单胞菌属含量上升并分别达到了 83% 和 66%。有研究表明土壤 N_2O 的排放量与温度呈正相关,并且在 N_2O 排放量较高的阶段检测到了大量假单胞菌的 *nosZ* 基因片段^[32-33]。而中层的假单胞菌属的相对丰度仅为 38%,这可能是中层与下层氧气含量的差异引起的。此外,无色杆菌属在中层的相对丰度也迅速增加。在堆肥开始的第 39 d,假单胞菌属含量降低,上层与中层的螯台球菌属、卡斯特兰尼氏菌、无色杆菌属的相对丰度增加,鲍特氏菌属在堆肥下层的相对丰度迅速增加并达到了 68%。堆肥的腐熟期,三层之间的群落组成相似,鲍特氏菌属依然为优势细菌,有研究表明鲍特氏菌属更适合在中温与中性的环境下生长^[34]。假单胞菌属在堆肥过程中的初始、升温及高温阶段相对丰度均为最高,为堆肥过程中的优势菌属。有研究表明假单胞菌属具有生长速度快及高效脱氮的特点^[35]。因此根据该菌属的生长习性调节堆肥理化参数能够有效控制堆肥反硝化反应的进程并可减少温室气体 N_2O 的排放。

2.4 堆肥中 *nosZ* 型反硝化细菌群落组成与理化指标的相关性

堆肥中的群落结构主要是受环境因素(温度、pH、氮、含水率等)和堆肥基质的影响^[36]。了解理化参数与微生物之间的关系,找出影响微生物群落的主要因素,可以有效地调控微生物群落,从而改善堆肥

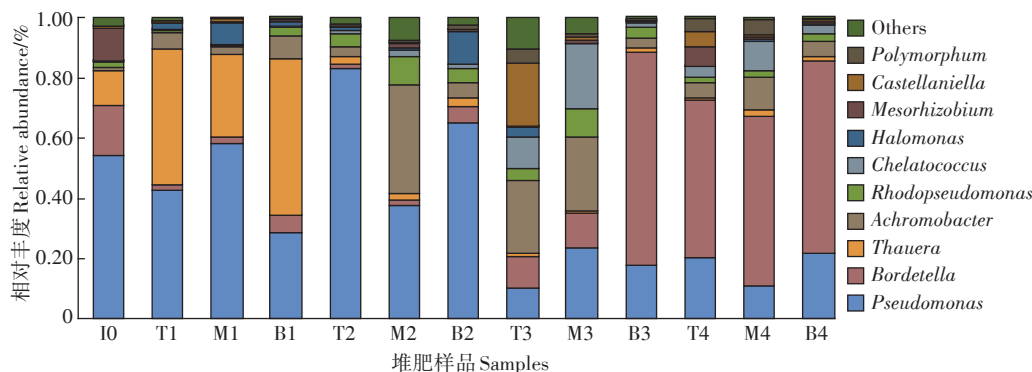


图2 堆肥样品中 *nosZ* 型反硝化细菌在属分类水平上群落组成的动态变化

Figure 2 Changes of community composition of *nosZ* type denitrification bacteria during composting process at the level of genus

过程^[37]。因此,采用冗余分析(RDA)方法分析堆肥过程中理化因素对反硝化细菌群落结构的影响,本实验对堆肥丰度前10的反硝化细菌属与理化因素之间的关系进行了分析。如图3a所示,前两个排序轴分别解释了40.15%和21.24%的变化,因此理化因素显著影响堆肥过程中反硝化细菌的群落结构。箭头的矢量线长短表示着不同理化参数与样品之间的相关性大小,矢量线越长相关性越大^[38]。因此根据箭头连线的长度可看出,各理化因素中C/N(CN)、含水率(WC)、pH为影响样品反硝化细菌群落结构最为显著的环境因子,其次为EC、温度(Temp)、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (AN)、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ (NN)。含水率是影响堆肥中微生物活性关键的影响因素^[39]。有研究指出若堆肥中含水率过高会导致堆体内部形成厌氧环境,更有利于大部分为厌氧菌的反硝化细菌生长繁殖^[26]。Meng等^[40]利用PCR-DGGE技术分析反硝化细菌群落结构,结果表明pH和温度显著影响 *nosZ* 型反硝化细菌群落结构。图中各点代表堆肥样品,点与点之间的关系由点之间的距离表示,距离越近代表样品组成越相似,从图3a可以观察到,堆肥前期(0~2 d)的样品汇聚在第一象限,而堆肥后期(18~50 d)的样品集中在第四象限内,堆肥升温期中层的样品与同时期其他两层样品之间的连线以及降温期的各样品之间连线距离较远,因此这两个时期反硝化细菌的群落结构受层次影响较大。图3b显示了堆肥过程中的 *nosZ* 型反硝化细菌优势菌属(相对丰度前10)与理化参数之间的关系。螯台球菌属与温度呈极显著正相关($P<0.01$), *Polymorphum* 与 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量呈极显著正相关($P<0.01$),卡斯特兰尼氏菌属与C/N呈显著负相关($P<0.05$),生根瘤菌属与 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量呈显著负相关,与 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和温度呈显著正相关($P<0.05$),与含水率和C/N呈极显著性负相关

($P<0.01$),无色杆菌属与温度呈显著正相关($P<0.05$),红假单胞菌属与温度和 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 呈显著正相关($P<0.05$),盐单胞菌属和陶厄氏菌属均与C/N呈显著正相关($P<0.05$),与 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量呈显著负相关($P<0.05$)。

2.5 理化参数对 *nosZ* 型反硝化细菌群落多样性与丰富度的影响

堆肥过程中的反硝化细菌的多样性与温度、pH、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 之间呈极显著相关性($P<0.01$)(见表4),与C/N、含水率之间呈显著相关性($P<0.05$)。并且影响程度由大到小依次为:温度>pH> $\text{NO}_3^-\text{-N}$ > $\text{NH}_4^+\text{-N}$ >C/N>含水率,其中温度、pH、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、含水率、C/N与反硝化细菌的多样性呈反比, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 与反硝化细菌的多样性呈正比。表明在本研究的堆肥过程中,反硝化细菌对温度和pH敏感性较强。堆肥过程中反硝化细菌的丰富度仅与温度呈极显著相关性($P<0.01$),丰富度随着温度升高而减小。这与以往研究结果一致,过高的温度和pH值会影响微生物的活性,抑制微生物的生长^[17,40]。

3 结论

(1)在牛粪稻草堆肥过程中,不同时期的 *nosZ* 型反硝化细菌群落结构差异显著,反硝化细菌的多样性和丰富度在堆肥过程中均先降低后升高。假单胞菌属、陶厄氏菌属为堆肥升温期的反硝化优势菌属,假单胞菌属、无色杆菌属为高温期的优势菌属,鲍特氏菌属为堆肥腐熟期的优势菌属。除此之外,堆肥降温期不同深度堆肥中菌群结构与多样性指数差异显著,各层次优势菌属各不相同。可见, *nosZ* 型反硝化细菌群落结构与多样性在堆肥不同阶段和不同深度均存在差异。

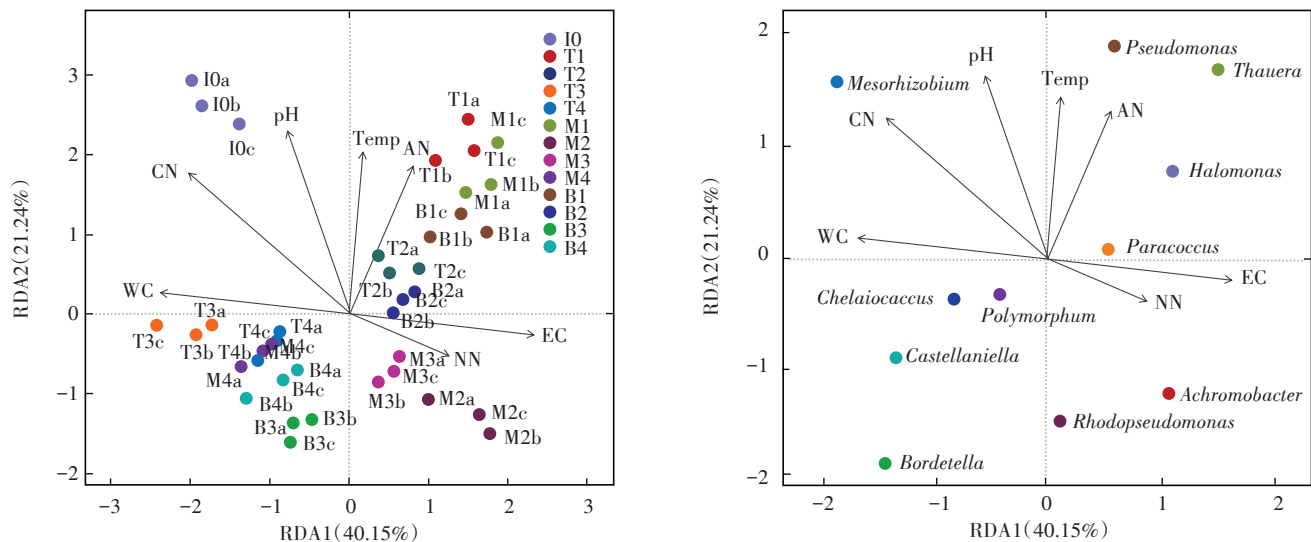


图3 理化参数与样品(a)及 *nosZ* 型反硝化细菌(b)在属水平上的RDA分析

Figure 3 RDA analysis of physic-chemical parameters between samples(a) and denitrifying bacteria(b) at the genus level

表4 理化参数与反硝化细菌群落 Simpson和ACE指数的Spearman相关性系数

Table 4 Spearman correlations coefficient between physic-chemical parameters and denitrifying bacteria Simpson as well as ACE indices

项目 Project	温度 Temperature	pH	氨态氮 Ammoniacal nitrogen	硝态氮 Nitrate nitrogen	碳氮比 C/N	含水率 Moisture content	电导率 EC
Simpson指数	0.802**	0.795**	0.609**	-0.519**	0.478*	0.420*	-0.339
ACE指数	-0.598**	-0.307	-0.175	0.149	0.060	0.253	-0.096

注: *代表显著相关($P<0.05$); **代表极显著相关($P<0.01$)。
Note: *indicates significant differences($P<0.05$); **indicates significant differences($P<0.01$).

(2)理化因素对反硝化细菌有着不同程度的影响,C/N、含水率、pH对反硝化细菌群落结构影响最为显著,螯台球菌属与温度呈极显著正相关($P<0.01$), *Polymorphum* 与硝态氮含量呈极显著正相关($P<0.01$),生根瘤菌属与含水率和C/N呈极显著负相关($P<0.01$)。温度、pH、氨态氮与反硝化细菌多样性呈极显著负相关($P<0.01$),硝态氮与反硝化细菌的多样性呈极显著正相关($P<0.01$),温度与反硝化细菌丰富度呈显著负相关($P<0.01$)。

参考文献:

[1] 马溪曼, 郭晓博, 李群良. 添加纤维素降解菌对牛粪堆肥特性的影响[J]. 环境工程, 2014, 32(10): 98-103.
MA Xi-man, GUO Xiao-bo, LI Qun-liang. Effect of adding cellulose degrader on the characteristics of cattle manure composting[J]. *Environmental Engineering*, 2014, 32(10): 98-103.
[2] 王旭辉, 徐鑫, 宝哲, 等. 高通量测序分析玉米秸秆与牛粪联合发酵阶段微生物多样性变化[J/OL]. 食品与发酵工业: 1-11.[2019-01-22]. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.018491>.
WANG Xu-hui, XU Xin, BAO Zhe, et al. High-throughput sequencing

analysis of microbial diversity in the combined fermentation stages of cow dung and corn straw[J/OL]. *Food and Fermentation Industries*: 1-11.[2019-01-22]. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.018491>.
[3] 朱丽平, 许修宏, 张文浩, 等. 牛粪堆肥中反硝化细菌与理化参数的关系[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(9): 1781-1787.
ZHU Li-ping, XU Xiu-hong, ZHANG Wen-hao, et al. Correlationship between denitrifying bacteria and physicochemical factors in cow manure composting[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2016, 35(9): 1781-1787.
[4] 胡春晓, 陈耀宁, 张嘉超, 等. 农业废物好氧堆肥中环境因子对 *nirK*、*nirS* 和 *nosZ* 数量的影响[J]. 环境科学, 2013, 34(3): 1196-1203.
HU Chun-xiao, CHEN Yao-ning, ZHANG Jia-chao, et al. Effects of physico-chemical parameters on the abundance of the denitrification-associated genes *nirK*, *nirS* and *nosZ* during agricultural waste composting[J]. *Environmental Science*, 2013, 34(3): 1196-1203.
[5] 徐莹莹, 许修宏, 任广明, 等. 接种菌剂对牛粪堆肥反硝化细菌群落的影响[J]. 农业环境科学学报, 2015, 34(3): 570-577.
XU Ying-ying, XU Xiu-hong, REN Guang-ming, et al. Effect of microbial inoculum on denitrifying bacterial communities in cow manure compost[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2015, 34(3): 570-

- 577.
- [6] 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.
- [7] Guo Y, Zhang J, Yan Y, et al. Molecular phylogenetic diversity and spatial distribution of bacterial communities in cooling stage during swine manure composting[J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2015, 28(6):888-895.
- [8] 唐 聪. 农业废物好氧堆肥中不同位置微生物群落分布特征的驱动机制响应研究[D]. 长沙:湖南大学, 2013. TANG Cong. The driving mechanism of the spatial distribution of bacterial and fungal communities within a pile during agricultural waste composting[D]. Changsha: Hunan university, 2013.
- [9] M aeda koki, Hanajima D, Morioka R, et al. Characterization and spatial distribution of bacterial communities within passively aerated cattle manure composting piles[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(24):9631-9637.
- [10] Gu W, Lu Y, Tan Z, et al. Fungi diversity from different depths and times in chicken manure waste static aerobic composting[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 239:447.
- [11] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3版. 北京:中国农业出版社, 2008:39-89. BAO Shi-dan. Soil and agriculture chemistry analysis[M]. 3rd edition. Beijing: China Agriculture Press, 2008:39-89.
- [12] Zucconi F, Pera A, Forte M, et al. Evaluating toxicity of immature compost[J]. *Biocycle*, 1981, 22(2):54-57.
- [13] Yang Z H, Xiao Y, Zeng G M, et al. Comparison of methods for total community DNA extraction and purification from compost[J]. *Apply Microbiology Biotechnology*, 2007, 74(4):918-925.
- [14] Troback I N, Enwall K, Jarvis A, et al. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK*, and *nosZ*, genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 49(3):401-417.
- [15] 郑国砥, 高 定, 陈同斌, 等. 通过分层堆肥提高城市污泥堆肥处理效果的研究[J]. 中国给水排水, 2009, 25(11):114-116. ZHENG Guo-di, GAO Ding, CHEN Tong-bin, et al. Layered composting for improving composting effect of municipal sludge[J]. *China Water & Wastewater*, 2009, 25(11):114-116.
- [16] Luangwilai T, Sidhu H S, Nelson M I. One-dimensional spatial model for self-heating in compost piles: Investigating effects of moisture and air flow[J]. *Food & Bioprocesses Processing*, 2017:108.
- [17] 田 伟. 牛粪高温堆肥过程中的物质变化、微生物多样性以及腐熟度评价研究[D]. 南京:南京农业大学, 2012. TIAN Wei. Evaluation of material change, microbial diversity and spoilage degree in high-temperature composting of cow manure[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012.
- [18] Ren G, Xu X, Qu J, et al. Evaluation of microbial population dynamics in the co-composting of cow manure and rice straw using high throughput sequencing analysis[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2016, 32(6):1-11.
- [19] 于子旋. 畜禽粪便堆肥理化特征及腐熟度评价研究[D]. 合肥:安徽农业大学, 2016. YU Zi-xuan. Physical and chemical characteristics and maturity evaluation of livestock and poultry manure compost[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2016.
- [20] 王国兴. 通风量对牛粪堆肥化过程中微生物菌群及氨氧化活性的影响[D]. 大庆:黑龙江八一农垦大学, 2016. WANG Guo-xing. Effect of ventilation volume on microbial flora and ammonia-oxidation activity in the composting process of cow manure [D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural Reclamation University, 2016.
- [21] 张婷婷. 餐厨垃圾不同模式堆肥化处理效果及产品应用研究[D]. 泰安:山东农业大学, 2016. ZHANG Ting-ting. Effect of different composting modes of food and kitchen waste and application of products[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2016.
- [22] Xuan W, Ammaiyappan S, et al. Nitrogen conservation and acidity control during food wastes composting through struvite formation[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 147(8):17-22.
- [23] 鲁耀雄, 高 鹏, 崔新卫, 等. 中药渣堆肥过程中氮素转化及相关微生物菌群变化的研究[J]. 农业现代化研究, 2018, 39(3):527-534. LU Yao-xiong, GAO Peng, CUI Xin-wei, et al. Study on nitrogen transformation and related microbial community changes during the composting process of Chinese medicinal herbal residues[J]. *Research of Agricultural Modernization*, 2018, 39(3):527-534.
- [24] Jiang J, Liu X, Huang Y, et al. Inoculation with nitrogen turnover bacterial agent appropriately increasing nitrogen and promoting maturity in pig manure composting[J]. *Waste Management*, 2015, 39:78-85.
- [25] 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. LI Yang, XI Bei-dou, ZHAO Yue, et al. Study of maturity parameter characteristics in composting process using different materials[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2014, 27(6):623-627.
- [26] 武晓桐, 姜 欣, 盛思远, 等. 静态好氧高温牛粪堆肥中 *nirK* 型反硝化细菌群落动态变化[J/OL]. 微生物学通报: 1-14. [2018-11-22]. <https://doi.org/10.13344/j.microbiol.china.180403>. WU Xiao-tong, JIANG Xin, SHENG Si-yuan, et al. Dynamics of *nirK* type denitrifying bacterial community in static aerobic high temperature composting[J/OL]. *Microbiology China*: 1-14. [2018-11-22]. <https://doi.org/10.13344/j.microbiol.china.180403>.
- [27] 许 晴, 张 放, 许中旗, 等. Simpson 指数和 Shannon Wiener 指数若干特征的分析及“稀释效应”[J]. 草业科学, 2011, 28(4):527-531. XU Qing, ZHANG Fang, XU Zhong-qi, et al. Some characteristics of Simpson index and the Shannon-Wiener index and their dilution effect[J]. *Pratacultural Science*, 2011, 28(4):527-531.
- [28] Chao A, Yang M. Stopping rules and estimation for recapture debugging with unequal failure rates[J]. *Biometrika*, 1993, 80(1):193-201.

- [29] Zhi E, Song Y, Duan L, et al. Spatial distribution and diversity of microbial community in large-scale constructed wetland of the Liao River Conservation Area[J]. *Environmental Earth Sciences*, 2015, 73(9): 5085–5094.
- [30] 杨 华, 黄 钧, 赵永贵. *Thauera* sp. strain TN9的鉴定及特性[J]. 应用与环境生物学报, 2013(2): 318–323.
YANG Hua, HUANG Jun, ZHAO Yong-gui, et al. Identification and characterization of *Thauera* sp. Strain TN9[J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2013, 19(2): 318–323.
- [31] Mechichi T, Stackebrandt E, Gad'On N, et al. Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria degrading aromatic compounds under denitrifying conditions, and description of *Thauera phenylacetica* sp. nov. *Thauera aminoaromatica* sp. nov. and *Azoarcus buckelii* sp. nov. [J]. *Archives of Microbiology*, 2002, 178(1): 26.
- [32] 王 良, 徐 旭, 叶桂香. 夏玉米农田NO排放影响因素的模拟分析[J]. 植物营养与肥料学报, 2016, 22(2): 346–352.
WANG Liang, XU Xu, YE Gui-xiang, et al. Simulation of the factors influencing NO emission in summer corn farmland[J]. *Journal of Plant Nutrition & Fertilizer*, 2016, 22(2): 346–352.
- [33] Koki M, Riki M, Dai H, et al. The impact of using mature compost on nitrous oxide emission and the denitrifier community in the cattle manure composting process[J]. *Microbial Ecology*, 2010, 59(1): 25–36.
- [34] Weiss A. The genus *bordetella*[M]. New York: Springer, 2006.
- [35] 刘春梅, 盛 荣, 刘 毅, 等. 一株兼性氧化亚氮还原菌的还原N₂O能力[J]. 微生物学报, 2018, 58(8): 1431–1438.
- LIU Chun-mei, SHENG Rong, LIU Yi, et al. Capability of N₂O reduction of a facultative N₂O reducer[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(8): 1431–1438.
- [36] 张嘉超. 基于分子生物学的堆肥功能微生物种群与体系基质特性关系研究[D]. 长沙: 湖南大学, 2013.
ZHANG Jia-chao. Research on the relationship between compost functional microbial population and system matrix characteristics based on molecular biology[D]. Changsha: Hunan university, 2013.
- [37] Zhang L, Zhang J, Zeng G, et al. Multivariate relationships between microbial communities and environmental variables during co-composting of sewage sludge and agricultural waste in the presence of PVP-AgNPs[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 261: 10–18.
- [38] 朱 琳, 尹立红, 浦跃朴. 荧光原位杂交法检测环境硝化细菌实验条件优化及应用[J]. 东南大学学报, 2005, 35(2): 266–270.
ZHU Lin, YIN Li-hong, PU Yue-piao, et al. Optimization and application of fluorescence in situ hybridization assay for detecting nitrifying bacteria in environmental samples[J]. *Journal of Southeast University*, 2005, 35(2): 266–270.
- [39] Liang C, Das K C, McClendon R W. The influence of temperature and moisture contents regimes on the aerobic microbial activity of a biosolids composting blend[J]. *Bioresource Technology*, 2003, 86(2): 131–137.
- [40] Meng Q X, Xu X H, Zhang W H, et al. Diversity and abundance of denitrifiers during cow manure composting[J]. *Revista Argentina de Microbiología*, 2018, doi: 10.1016/j.ram.2018.08.003.