

研究报告

静态好氧高温牛粪堆肥中 *nirK* 型反硝化细菌群落动态变化

武晓桐 姜欣 盛思远 许本姝 门梦琪 孟庆欣 邓利廷 成利军 张文浩 许修宏*

东北农业大学资源与环境学院 黑龙江 哈尔滨 150030

摘要:【背景】堆肥过程中,不同反硝化微生物相互作用产生大量气态氮,不仅导致氮素流失使得堆肥肥效降低,而且造成环境污染。但是目前关于堆肥中反硝化细菌群落结构变化,尤其是群落结构与堆肥理化因子间相关性方面的报道较为欠缺。【目的】对堆肥中反硝化细菌进行研究,旨在揭示反硝化细菌群落动态变化,为深入理解堆肥氮循环机理提供科学数据。【方法】设计一种静态好氧高温堆肥技术处理牛粪和水稻秸秆,利用高通量测序技术研究堆肥中 *nirK* 型反硝化细菌群落组成的动态变化,并分析优势反硝化细菌菌属与理化指标之间的相关性。【结果】堆肥全程共 17 d,各项堆肥理化指标以及生物学指标表明堆肥已经基本腐熟。高通量测序结果表明,在堆肥的不同阶段 *nirK* 型反硝化细菌群落结构差异显著。门水平上,堆肥中反硝化细菌属于变形菌门(*Proteobacteria*)和未分类门;目水平上,优势类群主要属于根瘤菌目(*Rhizobiales*)、红杆菌目(*Rhodobacterales*)和伯克氏菌目(*Burkholderiales*),其中根瘤菌目(*Rhizobiales*)的种类最多,而伯克氏菌目(*Burkholderiales*)的相对丰度最高。Spearman 相关性分析表明未分类门的反硝化细菌和未分类科根瘤菌目的反硝化细菌与全碳、碳氮比、含水率以及 pH 呈显著负相关($P<0.05$),与凯氏氮和硝态氮呈显著正相关($P<0.05$);其他优势菌属与全碳、碳氮比、含水率以及 pH 呈显著正相关($P<0.05$),与凯氏氮和硝态氮呈显著负相关($P<0.05$);未分类科伯克氏菌目的反硝化细菌、未分类纲变形菌门的反硝化细菌、产碱杆菌科的 *Pseudomonas* 属和副球菌属(*Paracoccus*)与铵态氮显著相关($P<0.05$)。【结论】静态好氧高温堆肥技术可以缩短堆肥周期。在堆肥的不同阶段 *nirK* 型反硝化细菌群落结构差异显著,并且该菌群结构的变化受到堆肥理化因子的显著影响。本研究有助于揭示堆肥中氮素转化规律,并为改进堆肥工艺提供理论依据。

关键词: 牛粪,静态堆肥,高通量测序, *nirK* 型反硝化细菌,多样性

Dynamics of *nirK* type denitrifying bacterial community in static aerobic high temperature composting

WU Xiao-Tong JIANG Xin SHENG Si-Yuan XU Ben-Shu MEN Meng-Qi
MENG Qing-Xin DENG Li-Ting CHENG Li-Jun ZHANG Wen-Hao XU Xiu-Hong*

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

Abstract: [Background] In the process of composting, different denitrification microorganisms interact with each other to produce a large amount of gaseous nitrogen, which not only leads to nitrogen loss, but also

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31672469)

***Corresponding author:** Tel: 86-451-55191137; E-mail: xuxiuhong@neau.edu.cn

Received: 24-05-2018; **Accepted:** 01-08-2018; **Published online:** 09-08-2018

基金项目: 国家自然科学基金(31672469)

***通信作者:** Tel: 0451-55191137; E-mail: xuxiuhong@neau.edu.cn

收稿日期: 2018-05-24; **接受日期:** 2018-08-01; **网络首发日期:** 2018-08-09

reduces the compost efficiency. However, the current knowledge about the changes in the structure of denitrifying bacterial community, especially the correlation between the community structure and physicochemical factors is still lacking. **[Objective]** We studied the denitrifying bacteria in compost to reveal the dynamic changes of denitrifying bacterial communities and to provide scientific data of the mechanism of compost nitrogen cycle. **[Methods]** We designed a static aerobic high-temperature composting process to treat dairy manure and rice stalk. High throughput sequencing technique was used to unravel the dynamic changes of *nirK* type denitrifying bacteria community. Spearman was used to analyze the correlation between the dominant denitrifying bacteria and physicochemical indexes. **[Results]** The compost was matured as shown by physicochemical and biological indexes. The community structure of *nirK* type denitrifying bacteria was significantly different. The analysis of phylum classification level showed that the main denitrifying bacteria were *Proteobacteria* and unclassified denitrifying bacteria. The order classification level shows that the dominant genera mainly belong to *Rhizobiales*, *Rhodobacterales* and *Burkholderiales*. Among them, *Rhizobiales* species were the most, but the relative abundance of *Burkholderiales* was the highest. Spearman correlation analysis shows that unclassified_k_norank_d_Bacteria and unclassified_o_Rhizobiales were significantly negatively correlated with the pH, TOC (total organic carbon), C/N, water content ($P<0.05$). There was significantly positive correlation with TKN (total kjeldahl nitrogen) and NO_3^- -N ($P<0.05$), the other dominant genera were significantly positively correlated with the pH, TOC, C/N and water content ($P<0.05$), and significantly negatively correlated with the TKN and NO_3^- -N ($P<0.05$). It was found that only the unclassified_o_Burkholderiales, unclassified_p_Proteobacteria, *Pusillimonas* and *Paracoccus* were significantly related to NH_4^+ -N ($P<0.05$). **[Conclusion]** The static aerobic high-temperature composting technology used in this paper can shorten the composting cycle. At different stages of composting, the community structure of *nirK* type denitrifying bacteria was significantly different, and the change of the community structure was significantly affected by the physicochemical indexes. This study will be useful to reveal the nitrogen conversion law in compost and provide a theoretical basis for improving the composting process.

Keywords: Dairy manure, Static composting, High throughput sequencing, *nirK* type denitrifying bacteria, Diversity

堆肥化作为处理牛粪秸秆最有效的方法之一,已经得到广泛应用。但是传统自然堆肥需要通过翻堆和通风等方法调整堆体温度和溶氧量使堆肥发酵更均匀,不仅增加了能耗,还导致以 NH_3 为主的含氮化合物的挥发,降低了堆肥肥效^[1]。另外,由于堆体中温度和氧气分布不均,堆肥过程中会出现堆体表面温度低以及深层厌氧的现象,导致表层和深层堆肥效果不佳。本研究采用静态高温堆肥技术,通过人为控制环境温度,增加堆体与环境的接触表面积,在减少能耗的同时克服堆体表面温度低和深层厌氧等技术缺陷。

在堆肥过程中不同反硝化微生物相互作用产生大量气态氮,导致氮素流失致使肥效降低,同时造成环境污染^[2],因此,堆肥化进程中氮素转化规律及控制氮素损失成为研究热点。反硝化作用主要

反应过程为 $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$, 每一步都由特定的酶催化,依次是硝酸盐还原酶、亚硝酸盐还原酶、一氧化氮还原酶和一氧化二氮还原酶,每一种酶都有对应的编码基因,即 4 种反硝化功能基因,分别为 *Nar*、*Nir*、*Nor* 和 *Nos*^[3]。亚硝酸盐还原酶(*Nir*)将 NO_2^- 还原成 NO,是反硝化过程中第一个可以产生气体的过程,也是反硝化微生物研究过程中用得最多的功能基因产物^[4]。功能基因 *Nir* 主要分为两种,一种是可溶性含铜酶基因 *Cu-Nir*,即 *nirK*;另一种为细胞色素还原酶基因 *cd1-Nir*,即 *nirS*,虽然这两种基因的功能相同,但是两者酶的结构与催化点位完全不同,往往不能同时出现在一个细胞中^[5]。其中, *nirK* 存在于许多亲缘关系较远的菌群中,而含 *nirS* 的反硝化细菌主要为假单胞菌^[6]。Maeda 等^[7]利用 PCR-DGGE 技术研究牛粪堆

肥中反硝化细菌群落动态变化,结果表明 *nirS* 基因反硝化细菌群落较少, *nirK* 基因编码的亚硝酸还原酶在反硝化过程中具有决定性的作用。近年来 *nirK* 基因作为分子标记被广泛应用于不同生境中反硝化细菌群落结构的研究,例如森林土壤、河底沉积物和耕地土壤等^[8-10]。因此,将 *nirK* 功能基因作为分子标记可以真实反映堆肥环境中反硝化菌群结构。

本研究以 *nirK* 功能基因为标记,通过高通量测序技术分析牛粪秸秆堆肥过程中反硝化细菌的群落结构和多样性变化,揭示新型静态高温堆肥过程中反硝化细菌群落组成的动态变化,应用 Spearman 相关性热图分析堆肥中优势反硝化细菌类别与理化指标之间的相关性。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

DNA 提取试剂盒, Omega 公司; 凝胶回收试剂盒, Axygen 公司; QuantiFluor™-ST 蓝色荧光定量系统, Promega 公司。

连续流动分析仪, 水尔分析仪器(上海)有限公司; PCR 仪, Thermo Fisher Scientific 公司。

本试验装置的截面如图 1 所示。装置是由铁丝网编织成的同轴圆筒, 距离地面高 20 cm。其内筒

直径 60 cm, 外筒直径 180 cm, 高为 160 cm。堆肥原料填充在图 1 中的灰色区域, 形成一个中空圆柱体(可以容纳 3.62 m³ 堆肥原料), 利于堆肥原料的内表面和外表面都能接触空气, 保证堆体内的氧气充足。将该装置置于发酵仓内, 发酵仓内温度保持在 40 °C 左右并定期通风, 保持仓内空气新鲜。

1.2 堆肥原料及样品采集

实验堆肥材料为牛粪和水稻秸秆, 原料取自黑龙江省哈尔滨市阿城区畜牧业基地, 主要理化参数见表 1。将水稻秸秆切成 3 cm–5 cm 的小段与粉碎的牛粪按质量比 1:3.5 充分混合, 堆肥初始 C/N 约为 35:1。堆肥化过程采用静态好氧高温堆肥, 全程共 17 d, 分别在第 0、2、4、6、8、10、12、14、17 天时取样。取样方法为: 分别从装置的上层(距表面 10 cm–15 cm, A1 和 A2 点)、中层(距表面 80 cm–85 cm, A3 和 A4 点)、下层(距表面 145 cm–150 cm, A5 和 A6 点)三层取样(图 1), 每个位置都均匀地同层取 4 个点, 所有点的样品充分混匀后为这个时期的样品, 每个样品取 1 kg。另外, 第 0 天(初始期)、第 2 天(升温期)、第 6 天(高温期)、第 12 天(高温期后期)和第 17 天(腐熟期)混合后的样品置于 -80 °C 环境下保存, 用于后续分子实验分析, 并分别命名为 C0、C2、C6、C12 和 C17 样品。

1.3 堆肥理化指标以及种子发芽指数指标的测定

在堆体不同深度(距离堆体外表面 10 cm 和 30 cm)的上、中、下三层(距离堆体底部 15、80、145 cm)的 6 个不同位置, 每天使用精密温度计分别测其温度并取外层(距离堆体外表面 10 cm)及中心(距离堆

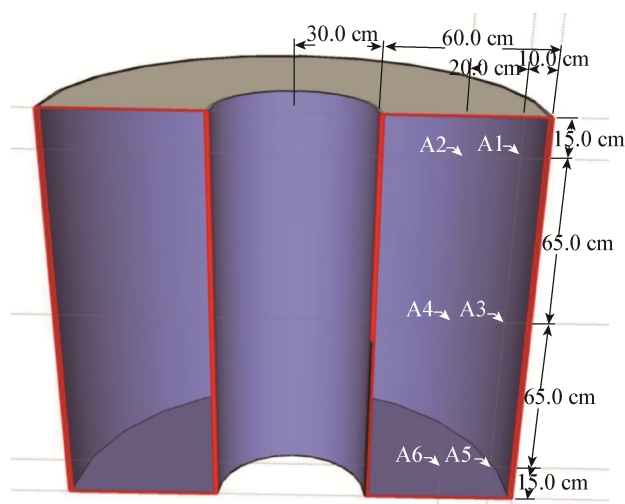


图 1 堆肥装置的横截面

Figure 1 Cross section of the composting system

表 1 堆肥材料的主要理化指标

Table 1 Physicochemical parameters of compost material

堆肥材料	牛粪	水稻秸秆
Compost material	Dairy manure	Rice stalk
含水率 WC (%)	48.26±1.34	11.93±0.45
总有机碳 TOC (%)	33.68±0.96	43.52±1.07
凯氏氮 TKN (%)	1.89±0.16	0.88±0.09
碳氮比 C/N	17.82±0.82	49.45±3.17

注: WC: 含水率; TOC: 总有机碳; TKN: 凯氏氮。

Note: WC: Water content; TOC: Total organic carbon; TKN: Total kjeldahl nitrogen.

体外表面 30 cm)不同层温度的平均值,同时记录上、中、下三层的环境温度。含水率(Water content, WC)的测定采用恒重法。pH 的测定是将堆肥样品按 1:10 (质量浓度比)比例加入去离子水,振荡过滤后的滤液用数字 pH 仪测定。总有机碳(Total organic carbon, TOC)和凯氏氮(Total kjeldahl nitrogen, TKN)分别采用重铬酸钾容量法和凯氏定氮法^[11]测定,两者的比值即为碳氮比(C/N)。水溶性铵态氮(NH₄⁺-N)和硝态氮(NO₃⁻-N)的含量采用连续流动分析仪测定。种子发芽指数(Germination index, GI)使用独行菜(*Lepidium sativum* L.)种子^[12]测定。将堆肥样品按 1:7.5 (质量浓度比)比例加入去离子水,取 5 mL 提取液滴入含有滤纸的培养皿中,并将 20 粒种子均匀分布在滤纸上,在 25 °C 黑暗条件下培养 48 h。根据计算公式:GI (%) = 处理平均发芽率 × 处理平均根长 / (对照平均发芽率 × 对照平均根长) × 100, 计算种子发芽指数。以上除温度外的其他指标,每个样品均进行 3 次重复测定。

1.4 样品总 DNA 提取

使用 Omega 的 Soil DNA Isolation Kit 提取堆肥样品总 DNA,利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的完整性,利用 NanoDrop 2000 检测基因组 DNA 的浓度和纯度,保存在-20 °C 待用。

1.5 *nirK* 型反硝化细菌高通量测序

分别以各样品总 DNA 为模板扩增 *nirK* 基因。引物为 *nirK*laCuF (5'-ATCATGGTCTGCCGCG-3')和 *nirK*R3CuR (5'-GCCTCGATCAGRTTGTGGTT-3')^[13]。PCR 扩增体系(20 μL):5×*FastPfu* buffer 4 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL, DNA 10 ng, BSA 0.2 μL, 正、反向引物(5 μmol/L)各 0.8 μL, *FastPfu* DNA polymerase (2.5 U/μL) 0.4 μL, 补足 ddH₂O 至 20 μL。PCR 反应条件:95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 35 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 停止反应。PCR 产物用 2%琼脂糖凝胶电泳检测,切胶使用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物, Tris-HCl 洗脱,再用 2%琼脂糖电泳检测。参照电泳初步定量结果,将 PCR 产物用 QuantiFluor™-ST 蓝色

荧光定量系统进行定量检测,按照各个样本的测序量要求进行相应比例的混合。最后进行 MiSeq 测序。原始数据提交至 NCBI 数据库,登录号为 SRP136699。

1.6 生物信息处理

测序的原始数据经过 Fast QC 软件进行质量控制, PRINSEQ 软件过滤小于 250 bp 序列,得到优化序列。将相似性大于 97%的优化序列划分为一个操作分类单元(Operational taxonomic unit, OTU);基于 OTU 计算覆盖度(Coverage)和 Shannon 多样性指数;以 R 语言统计物种并绘制 Venn 图;利用样本间距离 Heatmap 分析其 OTU 的相似性;对比 GenBank 的功能基因数据库(Release7.3, <http://fungene.cme.msu.edu/>),采用 RDP 分类器(Version 2.2 Release 11.1, <http://rdp.cme.msu.edu/>)和贝叶斯算法对 97%相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析,并在各个分类水平上统计每个样品的群落组成。利用 Spearman 相关性矩阵分析堆肥样品的理化指标与 *nirK* 型反硝化细菌群落的关系。

1.7 数据处理

基础数据利用 Excel 2013 进行分析,采用 SPSS 22.0 对堆肥不同时期理化参数进行单因素方差分析(One-way ANOVA, Tukey HSD 法)。

2 结果与分析

2.1 堆肥过程中理化参数及 GI 指标的变化

堆肥过程中,微生物快速分解有机质,产生 CO₂ 和水,并释放出大量的热,使堆肥物料的温度上升。堆肥过程中温度的变化可反映微生物活性的变化和有机质的降解程度,并影响最终堆肥产品的成熟度和质量^[14]。图 2 表示堆肥过程中温度的变化,从中可以看出,外层和中心温度在堆肥开始后均迅速升高,在第 3 天分别达到 55.8 °C 和 59.8 °C;然后温度保持上升趋势并都在第 6 天达到最高温度,分别为 56.9 °C 和 61.9 °C。外层和中心的温度从第 3 天直到第 12 天均保持在 55 °C 以上,在第 12 天后,温度呈缓慢降低趋势。堆肥过程中温度的变化表明了 3 个阶段:升温期(第 0-2 天)、高温期(第

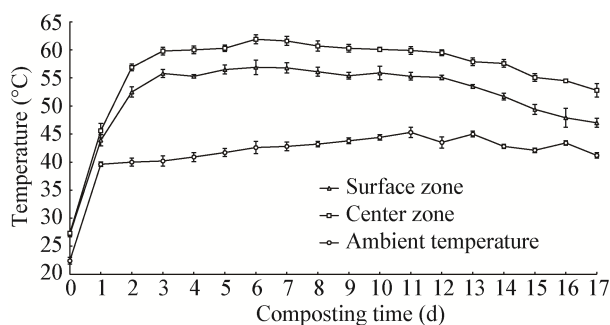


图2 堆肥过程中温度的变化

Figure 2 Changes of temperature during composting process

3–12 天, 大于 55 °C)、降温及腐熟期(第 13–17 天)。根据国家粪便无害化卫生标准(GB7959-87)规定, 堆肥过程的温度必须达 50–55 °C, 并持续 5–7 d。本研究中外层和中心温度连续 9 d 保持在 55 °C 以上, 所以无论堆肥物料的外层还是中心部分, 其温度均符合标准。

表 2 是其他理化参数的测定结果。从表 2 可以看出, 在堆肥过程中含水率整体呈下降趋势, 腐熟期达到 51.0%; pH 整体呈下降的趋势, 其变化范围为 8.32–8.77, 一直处于弱碱性的状态, 有利于微生物保持良好的活性^[15]。碳氮比(C/N)是评价堆肥产品腐熟程度的一项重要指标, 在表 2 中 C/N 从初始值 35.0 下降到 20.0 ($P<0.05$), 整体呈下降趋势。当 $C/N\leq 20.0$ 时, 认定堆肥已经达到腐熟^[16]。种子发芽指数(GI)是指示堆肥腐熟程度的生物学指标^[17], 当

$GI\geq 80.0\%$ 时表示堆肥产品已经达到腐熟, 其植物毒性已经丧失^[17-18]。从表 2 可以看到, GI 整体呈上升的趋势, 从堆肥前期的 37.63% 上升到 97.70% ($P<0.05$), 表明堆肥产品符合腐熟标准。随着堆肥的进程, 铵态氮含量变化呈先升后降的趋势。在第 0–2 天, 铵态氮含量从 864.8 mg/kg 上升至 932.2 mg/kg ($P<0.05$), 从第 4 天开始, 铵态氮含量呈显著下降趋势($P<0.05$), 并在堆肥结束后达到最低, 为 311.3 mg/kg。堆肥过程中硝态氮含量整体呈上升趋势, 由初始阶段的 55.8 mg/kg 上升至堆肥结束后的 95.5 mg/kg ($P<0.05$)。可能是由于过高的温度抑制了硝化微生物的活性^[19-20], 使硝态氮生成和积累的速度缓慢。根据以上所有指标综合判断, 利用堆肥装置来处理牛粪和水稻秸秆的混合物, 在堆肥第 17 天时达到腐熟要求。

2.2 堆肥中反硝化细菌群落的丰富度及多样性

所有堆肥样品通过高通量测序共获得 142 417 条高质量序列, 依次为 28 199、43 040、19 399、19 581 和 32 198 条。以 97% 相似度划分, 共得到 212 个 OTU。从图 3 中可以看出, 在堆肥过程中 5 个样品检测到的 OTU 数量先逐渐减少, 初始期样品(C0)中最多为 206, 在高温期后期样品(C12)中达到最小值为 146, 腐熟期样品(C17)中的 OTU 数量为 164 个, 说明本次堆肥中在堆肥初期的反硝化细菌群落丰富度最高, 随着堆肥的进行, 反硝化细菌群落丰富

表 2 堆肥过程中理化及 GI 指标的变化

Table 2 Changes of physicochemical and GI indices during composting process

样品 Samples	pH	含水率 WC (%)	铵态氮 NH ₄ ⁺ -N (mg/kg)	硝态氮 NO ₃ ⁻ -N (mg/kg)	碳氮比 C/N	种子发芽指数 GI (%)
0	8.77±0.09a	72.0±1.6a	864.8±11.4b	55.8±1.4f	35.0±0.5a	37.63±1.78f
2	8.70±0.03a	71.0±0.9a	932.2±12.7a	57.9±1.0f	32.2±1.3a	40.25±1.98f
4	8.68±0.07a	69.5±0.7ab	881.0±8.5b	62.6±1.0e	28.9±1.2b	50.74±1.78e
6	8.67±0.05ab	67.0±0.7b	774.1±2.4c	71.9±1.3d	25.7±0.8c	54.68±2.05e
8	8.62±0.09ab	63.4±2.2c	658.1±5.6d	81.3±0.5c	24.5±1.1cd	77.14±2.44d
10	8.59±0.02abc	59.0±1.0d	553.0±15.3e	85.1±1.4bc	23.5±0.6cd	85.85±1.22c
12	8.48±0.01bcd	55.0±0.6e	466.2±4.5f	88.7±1.5b	23.1±0.9cde	89.04±1.93bc
14	8.42±0.06cd	52.0±1.0ef	388.4±4.8g	89.7±0.6b	21.7±1.0de	92.84±1.33ab
17	8.32±0.01d	51.0±0.5f	311.3±2.5h	95.5±1.2a	20.0±0.4e	97.70±1.95a

注: 字母不同者差异显著($P<0.05$)。

Note: Different superscripts denote significant differences ($P<0.05$).

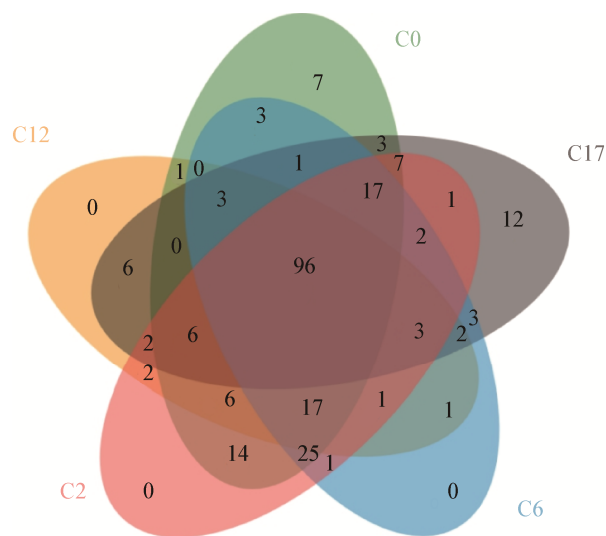


图 3 不同堆肥时期反硝化细菌群落韦恩图分析
Figure 3 Venn diagram of the denitrifier community in the different periods of composting
注: Cn 代表堆肥第 n 天.
Note: Cn represents nth day in composting.

度逐渐下降, 在高温期末期达到最低, 随后又升高。5 个样品中共 96 个相同的 OTU, 占总数的 39.67%, 其中 C0 中有 7 个特有 OTU, C17 中有 12 个特有 OTU, C2、C6 和 C12 没有特有 OTU, 说明在升温期和高温期堆肥中反硝化细菌的种类相似。在表 3 中

表 3 不同堆肥时期反硝化菌群的多样性指数(97%相似水平)

Table 3 Denitrifier community diversity index in the different periods of composting (97% similarity)

样品	优化序列	OTUs	覆盖率	Shannon 指数
Samples	Optimal sequence		Coverage	Shannon index
C0	28 199	206	0.999	3.32
C2	43 040	200	0.997	2.47
C6	19 399	175	0.999	2.44
C12	19 581	146	0.997	2.06
C17	32 198	164	0.998	1.86
Total	142 417			

各个样品文库的覆盖率均超过 99.7%, 说明测序结果能够代表堆肥中 *nirK* 型反硝化细菌群落的真实情况。

堆肥过程中 *nirK* 型反硝化细菌 α 多样性统计结果见表 3。Shannon 指数是用来估算样品中微生物多样性的指数之一, 从表 3 可知 Shannon 指数由大到小依次为 C0>C2>C6>C12>C17, 即堆肥初始期 *nirK* 型反硝化细菌群落多样性最高, 降温期和腐熟期较低。

根据 5 个堆肥样品中 OTU 的组成进行样品之间距离 Heatmap 分析(图 4), 在图 4 中样本之间的距

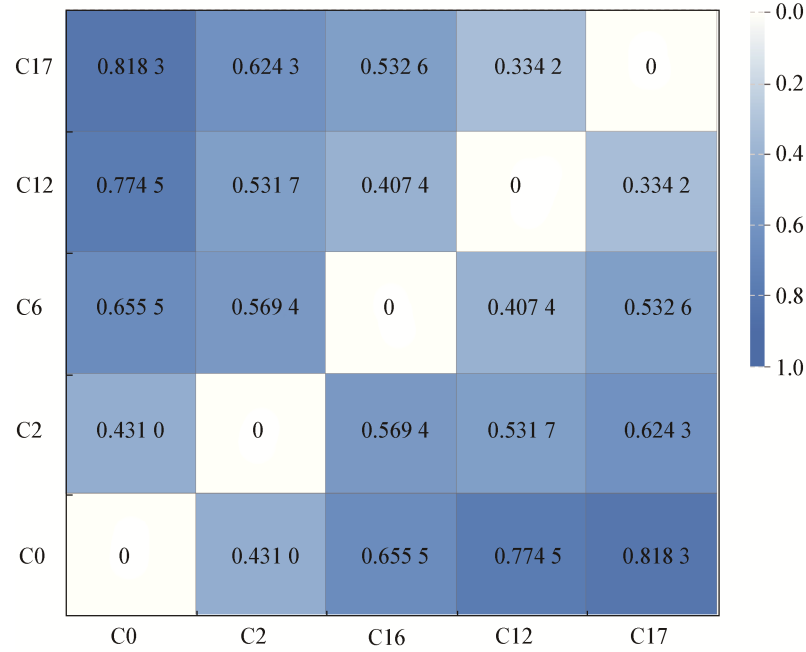


图 4 堆肥样品在 OTU 水平距离 Heatmap
Figure 4 Distances heatmap on OTUs level of composting sample

离用一定颜色梯度进行表示(图中右侧为颜色梯度代表的数值),颜色越深,样本之间距离越大,表示细菌群落结构差异性越大。从图4中分析得出,C12和C17之间的距离最近,为0.334 2,即两者OTU组成相近;C6与C12之间的距离次之,为0.407 4,即两者OTU组成也相似;C0与C2的OTU组成也相近,为0.431,但是差异性大于C12与C17,即两者之间的反硝化细菌群落结构差异性大于C12和C17的,说明在堆肥后期反硝化细菌群落结构趋于稳定;高温期C6与其他不同时期之间的距离从大到小依次为C0>C2>C17>C12,即*nirK*型反硝化细菌群落结构在堆肥高温期前后差异变化显著。

2.3 堆肥中*nirK*型反硝化细菌群落组成

在5个堆肥样品中的212条OTU分属于3门5纲8目15科17属20种。图5A为门分类水平的*nirK*型反硝化细菌组成变化(将相对丰度<0.1%的部分合并为Others在图中显示),主要为变形菌门(*Proteobacteria*)和未分类门的反硝化细菌(*Unclassified_k_norank_d_Bacteria*),在不同时期堆

肥样品C0、C2、C6、C12和C17中变形菌门所占比例分别为78.6%、71.1%、35.8%、41.3%和56.3%,变化趋势为先减少后增加,在堆肥前期相对丰度最高,高温期(C6期)最少;C0、C2、C6、C12和C17中未分类门的反硝化细菌所占比例分别为21.1%、28.8%、64.0%、58.7%和43.6%,变化趋势为先增多后减少,在高温期(C6期)相对丰度达到最高。

图5B为目分类水平的*nirK*型反硝化细菌分类(将相对丰度<1%的部分合并为Others在图中显示),主要包括:未分类门的反硝化细菌(*Unclassified_k_norank_d_Bacteria*)、伯克氏菌目(*Burkholderiales*)、根瘤菌目(*Rhizobiales*)、未分类纲的变形菌门的反硝化细菌(*Unclassified_p_Proteobacteria*)和红杆菌目(*Rhodobacterales*)。在C0中主要含有*Burkholderiales* (42.2%)、*Rhizobiales* (8.2%)、*Unclassified_p_Proteobacteria* (26.7%)和*Rhodobacterales* (1.2%)。堆肥升温期C2中主要含有*Burkholderiales* (47.9%)、*Rhizobiales* (5.2%)、*Unclassified_p_Proteobacteria*

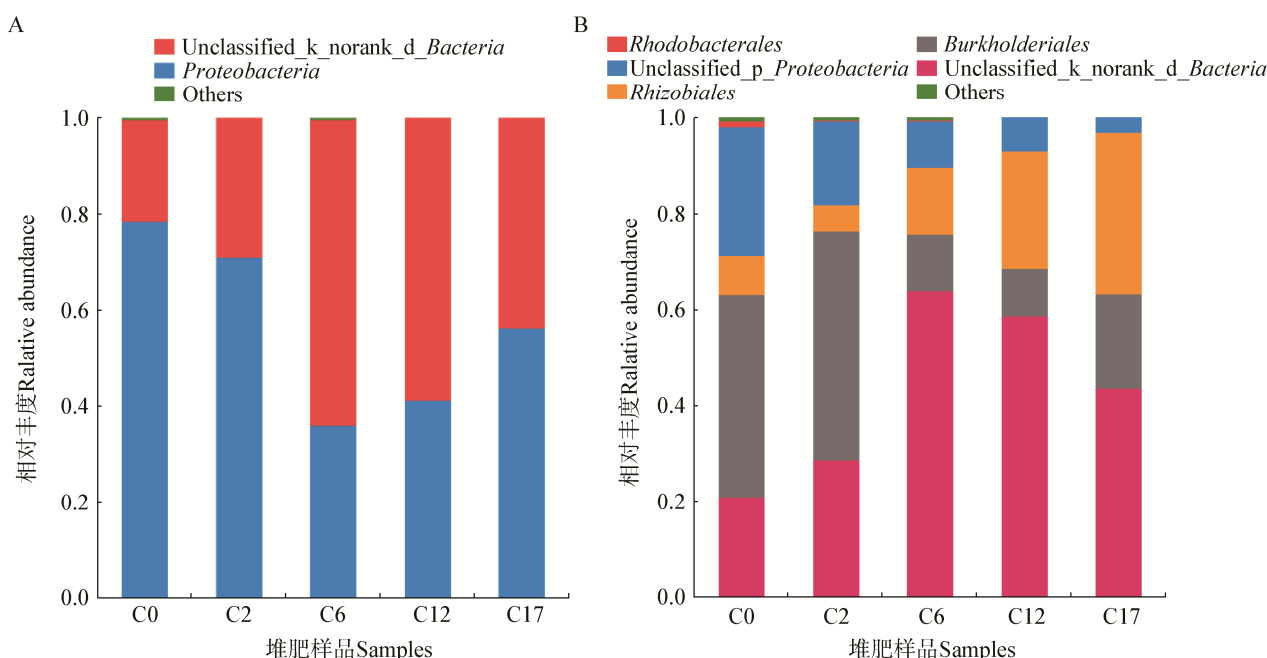


图5 堆肥样品中*nirK*型反硝化细菌在门(A)及目(B)分类水平上群落组成的动态变化

Figure 5 Dynamic changes of community composition of *nirK* type denitrifier community during composting process at the level of phylum (A) and order (B)

(17.4%)和 *Rhodobacterales* (0.3%); 堆肥高温期 C6 中主要含有 *Burkholderiales* (11.9%)、*Rhizobiales* (14.1%)、*Unclassified_p_Proteobacteria* (9.5%) 和 *Rhodobacterales* (0.19%); 堆肥高温期末期 C12 中主要含有 *Burkholderiales* (10.1%)、*Rhizobiales* (24.6%) 和 *Unclassified_p_Proteobacteria* (6.5%); 堆肥降温期和腐熟期 C17 中主要含有 *Burkholderiales* (19.6%)、*Rhizobiales* (33.9%) 和 *Unclassified_p_Proteobacteria* (2.7%)。*Burkholderiales*、*Rhizobiales*、*Unclassified_p_Proteobacteria* 和 *Rhodobacterales* 都是变形菌门。其中 *Burkholderiales* 属于 β -变形菌纲, *Rhizobiales* 和 *Rhodobacterales* 属于 α -变形菌纲。在图 5B 中基于目分类水平可以看出在堆肥不同时期 *nirK* 型反硝化细菌种类类似, 但是相对丰度存在差异, *Burkholderiales* 在堆肥初始期和升温期相对丰度较大, 并且是这两个时期的优势种群。随着温度的

升高, 其相对丰度逐渐降低, 进入腐熟期后又略微上升。*Rhizobiales* 随着堆肥的进行相对丰度整体呈逐渐上升的趋势, 在腐熟期达到最高值。*Unclassified_p_Proteobacteria* 的相对丰度变化趋势则相反, 在堆肥初始期相对丰度最高, 随着温度的升高逐渐减少, 在腐熟期达到最低。*Rhodobacterales* 主要存在于堆肥初始期, 随着堆体温度上升相对丰度逐渐减少, 在高温期达到 0.19%, 高温期末期其相对丰度更是低于 0.01%。

2.4 堆肥中 *nirK* 型反硝化细菌群落组成与理化指标的相关关系探讨

Spearman 相关性热图(Heatmap)表示的是微生物分类与环境变量比较, 评估微生物分类与环境变量之间的相关性, 基本输出的是一个距离矩阵, 表示群落中每个微生物与每个环境因子变量之间的相关系数。在图 6 中, *Unclassified_k_norank_d_Bacteria*

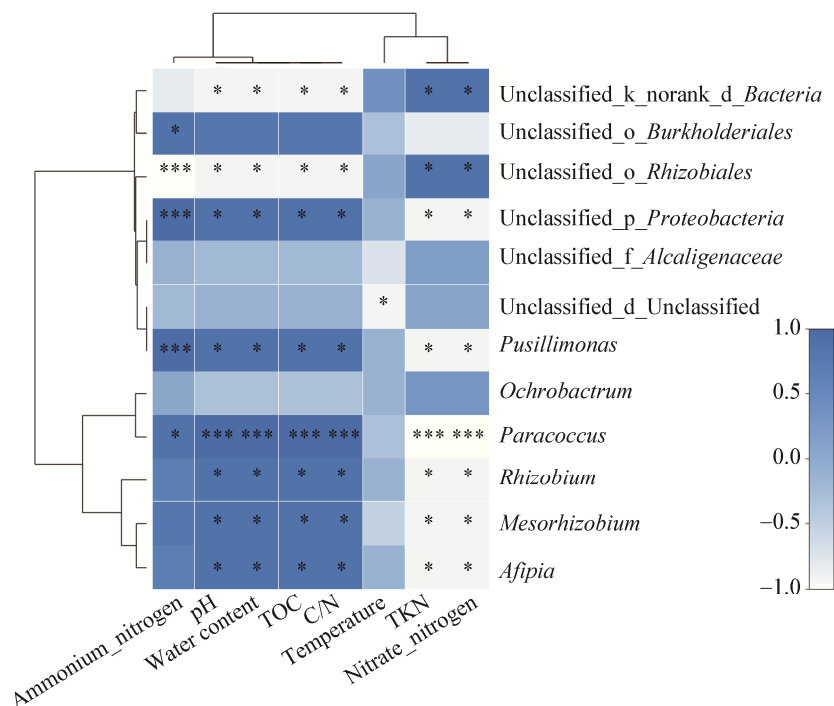


图 6 Spearman 相关性热图

Figure 6 Spearman correlation heatmap

注: 热图右侧色卡是不同 R 值的颜色分区, 蓝色代表正相关, $0 < R < 1$; 白色代表负相关, $-1 < R < 0$ 。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ 。

Note: The color card on the right side of the heatmap is a color partition with different R values. The blue color represents positive correlation, $0 < R < 1$, and white represents negative correlation, $-1 < R < 0$. Ammonium nitrogen: NH_4^+-N ; Nitrate nitrogen: NO_3^--N . *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

与 TOC、C/N、WC 和 pH 之间呈显著负相关($P<0.05$), 与 TKN 和 NO_3^- -N 之间呈显著正相关($P<0.05$)。Unclassified_o_Burkholderiales 只与 NH_4^+ -N 之间呈显著正相关($P<0.05$)。Unclassified_o_Rhizobiales 与 NH_4^+ -N 之间呈极显著负相关($P<0.001$), 与 WC、C/N、TOC 和 pH 之间呈显著负相关($P<0.05$), 与 TKN 和 NO_3^- -N 之间呈显著正相关($P<0.05$)。Unclassified_p_Proteobacteria 与 NH_4^+ -N 之间呈极显著正相关($P<0.001$), 与 TKN 和 NO_3^- -N 之间呈显著负相关($P<0.05$), 与 WC、C/N、TOC 和 pH 之间呈显著正相关($P<0.05$)。副球菌属(*Paracoccus*)与 TKN 和 NO_3^- -N 之间呈极显著负相关($P<0.001$), 与 WC、C/N、TOC 和 pH 之间呈极显著正相关($P<0.001$), 与 NH_4^+ -N 之间呈显著正相关($P<0.05$)。所有优势菌属与温度没有相关性。

3 讨论与结论

在堆肥过程中, 随着温度的升高, 堆体中微生物的活性也会增强^[21]。据文献[16,22-25]报道在高温期, 嗜热微生物在有机底物的降解中充当重要角色, 能够降解超过 2/3 的木质素, 而嗜温微生物主要降解易降解的有机底物, 说明在堆肥过程中维持较长的高温期可以促进有机底物的降解, 促进堆肥的进程, 缩短堆肥周期。本研究中堆肥全程共 17 d, 堆体温度高于 40 °C 以上就达到了 16 d, 在此高温条件下微生物的代谢加快, 降解有机物效率提高, 为缩短堆肥周期创造了良好的环境条件。通过分析各项堆肥理化参数以及生物学指标发现堆肥已经基本腐熟, 相比传统的一般为期 40–63 d 的自然堆肥周期^[22,26], 静态好氧高温堆肥技术缩短了堆肥周期。

利用高通量测序技术分析牛粪和水稻秸秆混合堆肥过程中 *nirK* 型反硝化细菌群落动态变化, 各样品的覆盖率和稀释曲线说明测序结果能够代表

堆肥中 *nirK* 型反硝化细菌群落的真实情况。韦恩图分析表明在堆肥各个时期 *nirK* 型反硝化细菌群落丰富度变化依次为 C0>C2>C6>C17>C12。 α 多样性分析表明堆肥前期 *nirK* 型反硝化细菌群落多样性最高, 堆肥后期较低, Shannon 指数变化范围为 1.86–3.32。 β 多样性分析结果表明堆肥不同时期样本间物种的丰度分布差异显著, 经过高温期后堆肥中 *nirK* 型反硝化细菌差异变化显著。陆彦宇利用牛粪和中药渣进行堆肥发现细菌在堆肥高温期前后种群发生了很大的变化^[27], 这与本研究结果相符。

针对各种环境样品的研究表明, 最常见的反硝化细菌都属于变形菌门, 近年来国内外有关农业废弃物堆肥中反硝化微生物种类报道也主要为变形菌门^[28], 本研究分别从门和目分类水平上对牛粪和水稻秸秆混合堆肥中 *nirK* 型反硝化细菌群落组成进行了分析, 结果表明在堆肥中反硝化细菌主要为变形菌门; 另外, 未分类反硝化细菌占比也比较大, 表明在堆肥中存在大量未知的反硝化细菌。康鹏亮等^[29]利用高通量测序技术分析西安市典型景观水体中反硝化细菌种群结构, 发现未分类反硝化细菌的占比较大, 这与本研究结果相符。在污水处理中 *nirK* 型反硝化细菌多是 α -变形菌纲^[30-31], 在稻田中 *nirK* 型反硝化细菌多是 α -变形菌纲根瘤菌目^[8,32-33], 在本研究中 α -变形菌纲的 *nirK* 型反硝化细菌占比也比较大。目分类水平 *nirK* 型反硝化细菌群落结构分析表明, 堆肥中反硝化细菌主要是 α -变形菌纲下的根瘤菌目和红杆菌目, 以及 β -变形菌纲下的伯克氏菌目。周唯采用 PCR-DGGE 技术分析农业废弃物好氧堆肥中反硝化细菌的多样性, 发现在农业废弃物堆肥过程中 *nirK* 基因主要集中于变形菌门, 其中包括 α -变形菌纲根瘤菌目中叶杆菌科、慢性根瘤菌科、根瘤菌科和布鲁氏菌科, 红杆菌目中红杆菌科, 以及 β -变形菌纲伯克氏菌目中产碱杆菌科^[28], 与本研究结果相符。

Spearman 相关性分析表明, 除了未分类属产碱

杆菌科的反硝化细菌(Unclassified_f_Alcaligenaceae)和苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)外,其余 10 个 *nirK* 型反硝化细菌菌属变化与环境因子相关,说明在堆肥过程中环境因素与反硝化细菌群落结构变化相关^[34]。在本研究中外温度控制在 40 °C 以上,使堆肥整个过程中温度的变化不是很明显,特别是在堆肥后期基本维持在 40 °C 左右,因此 *nirK* 型反硝化细菌群落结构变化与温度之间不相关。除了 Unclassified_k_norank_d_Bacteria 和 Unclassified_o_Rhizobiales 之外,剩余 8 个菌属都与 TOC、C/N、WC、pH 呈正相关,与 TKN、NO₃⁻-N 呈负相关,而 Unclassified_k_norank_d_Bacteria 和 Unclassified_o_Rhizobiales 正好相反。胡春晓等^[2]利用定量聚合酶链式反应技术分析农业废弃物好氧堆肥环境因子对 *nirK*、*nirS* 和 *nosZ* 数量的影响,结果表明 *nirK* 型反硝化细菌与 pH 显著正相关,与含水率有一定相关性,但不显著;与 NO₃⁻-N 没有相关性。含水率作为堆肥中微生物生理活动吸收营养物质重要的溶解和传输介质,对微生物活性有很大影响^[35]。有研究表明如果堆肥中含水率过高,堆体中的溶氧量就会减少,可能会形成局部厌氧环境,更有利于反硝化细菌生长繁殖,因为大多数反硝化细菌为厌氧微生物^[2,34]。NO₃⁻-N 作为反硝化过程的电子受体,对反硝化细菌群落变化有重要影响^[36-37]。马丽红等^[38]对牛粪堆肥过程中各类氮素形态物质与微生物群落结构变化的关系作了分析,结果表明反硝化细菌数量与 NO₃⁻-N 和全氮含量呈负相关,与本研究结果相符。

研究表明,静态好氧高温堆肥技术可以缩短堆肥周期。在堆肥过程中,*nirK* 型反硝化细菌群落结构变化显著且受到堆肥理化因子的影响。本研究为丰富堆肥氮素循环理论和改进堆肥工艺流程提供了一定的科学依据。

REFERENCES

- [1] Szanto GL, Hamelers HVM, Rulkens WH, et al. NH₃, N₂O and CH₄ emissions during passively aerated composting of straw-rich pig manure[J]. Bioresource Technology, 2007, 98(14): 2659-2670
- [2] Hu CX, Chen YN, Zhang JC, 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 (in Chinese)
- [3] 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
- [3] Borrerode-de Acuña JM, Rohde M, Wissing J, et al. Protein network of the *Pseudomonas aeruginosa* denitrification apparatus[J]. Journal of Bacteriology, 2016, 198(9): 1401-1413
- [4] Kandeler E, Deiglmayr K, Tschirko D, et al. Abundance of *narG*, *nirS*, *nirK*, and *nosZ* genes of denitrifying bacteria during primary successions of a glacier foreland[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(9): 5957-5962
- [5] Zhang SB, He XJ, Wu HL, et al. Advances in molecular ecology technologies for the study of denitrifier communities[J]. Environmental Science & Technology, 2017, 40(6): 120-126 (in Chinese)
- [5] 张盛博, 何小娟, 吴海露, 等. 分子生态学技术用于反硝化微生物群落研究的进展[J]. 环境科学与技术, 2017, 40(6): 120-126
- [6] Braker G, Zhou JZ, Wu LY, et al. Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in pacific northwest marine sediment communities[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(5): 2096-2104
- [7] Maeda K, Morioka R, Hanajima D, 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
- [8] Yoshida M, Ishii S, Otsuka S, et al. Temporal shifts in diversity and quantity of *nirS* and *nirK* in a rice paddy field soil[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2009, 41(10): 2044-2051
- [9] Keil D, Meyer A, Berner D, et al. Influence of land-use intensity on the spatial distribution of N-cycling microorganisms in grassland soils[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2011, 77(1): 95-106
- [10] Wang YY, Lu SE, Chen XM, et al. Analyzing the nitrate reductase gene (*nirK*) community in the peat soil of the Zoige Wetland of the Tibetan Plateau[J]. Acta Ecologica Sinica, 2017, 37(19): 6607-6615 (in Chinese)
- [10] 王莹燕, 卢圣鄂, 陈小敏, 等. 若尔盖高原湿地泥炭沼泽土亚硝酸盐还原酶(*nirK*)反硝化细菌群落结构分析[J]. 生态学报, 2017, 37(19): 6607-6615
- [11] Bao SD. Soil and Agricultural Chemistry Analysis[M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2000: 39-89 (in Chinese)
- [11] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2000: 39-89
- [12] Zucconi F, Pera A, Forte M, et al. Evaluating toxicity of immature compost[J]. Biocycle, 1981, 22(2): 54-57
- [13] Palmer K, Biasi C, Horn MA. Contrasting denitrifier communities relate to contrasting N₂O emission patterns from acidic peat soils in arctic tundra[J]. The ISME Journal, 2012, 6(5): 1058-1077
- [14] Ren GM, Xu XH, Qu JJ, 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 and Biotechnology, 2016, 32(6): 101
- [15] Masó MA, Blasi AB. Evaluation of composting as a strategy for managing organic wastes from a municipal market in Nicaragua[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(11): 5120-5124
- [16] Xiao Y, Zeng GM, Yang ZH, et al. Continuous thermophilic composting (CTC) for rapid biodegradation and maturation of organic municipal solid waste[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(20): 4807-4813
- [17] Wang X, Selvam A, Chan MT, et al. Nitrogen conservation and acidity control during food wastes composting through struvite formation[J]. Bioresource Technology, 2013, 147(8): 17-22
- [18] Paredes C, Cegarra J, Bernal MP, et al. Influence of olive mill wastewater in composting and impact of the compost on a Swiss chard crop and soil properties[J]. Environment International, 2005, 31(2): 305-312
- [19] Bernal MP, Albuquerque JA, Moral R, et al. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(22): 5444-5453
- [20] Tiquia SM, Tam NFY. Characterization and composting of poultry litter in forced-aeration piles[J]. Process Biochemistry, 2002, 37(8): 869-880
- [21] Tiquia SM. Microbial community dynamics in manure composts based on 16S and 18S rDNA T-RFLP profiles[J]. Environmental Technology, 2005, 26(10): 1101-1114
- [22] Liu DY, Zhang RF, Wu HH, et al. Changes in biochemical and microbiological parameters during the period of rapid composting of dairy manure with rice chaff[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(19): 9040-9049
- [23] Mayende L, Wilhelmi BS, Pletschke BI. Cellulases (CMCase) and polyphenol oxidases from thermophilic *Bacillus* spp. isolated from compost[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2006, 38(9): 2963-2966
- [24] Wang CM, Shyu CL, Ho SP, et al. Species diversity and substrate utilization patterns of thermophilic bacterial communities in hot aerobic poultry and cattle manure composts[J]. Microbial Ecology, 2007, 54(1): 1-9
- [25] Yu HY, Zeng GM, Huang HL, et al. Microbial community succession and lignocellulose degradation during agricultural waste composting[J]. Biodegradation, 2007, 18(6): 793-802
- [26] Zhang J, Sun ZY, Zhong XZ, et al. Maturity and microbial community structure dynamics during simulated windrow composting of solid fraction of dairy manure[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2016, 22(3): 423-429 (in Chinese)
张晶, 孙照勇, 钟小忠, 等. 奶牛粪条垛式模拟堆肥腐熟度及微生物群落结构变化[J]. 应用与环境生物学报, 2016, 22(3): 423-429
- [27] Lu YY. Study on the properties of dissolved organic matter and bacterial structure during composting of dairy manure and chinese herb residues[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University, 2017 (in Chinese)
陆彦宇. 牛粪和中药渣堆肥化过程中水溶有机质特性及细菌结构的研究[D]. 南宁: 广西大学硕士学位论文, 2017
- [28] Zhou W. Nitrite reductase genes as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria during agricultural waste composting[D]. Changsha: Master's Thesis of Hunan University, 2014 (in Chinese)
周唯. 农业废物好氧堆肥中反硝化细菌的多样性研究[D]. 长沙: 湖南大学硕士学位论文, 2014
- [29] Kang PL, Huang TL, Zhang HH, et al. Water quality and diversity of denitrifier community structure of typical scenic water bodies in Xi'an[J]. Environmental Science, 2017, 38(12): 5174-5183 (in Chinese)
康鹏亮, 黄廷林, 张海涵, 等. 西安市典型景观水体水质及反硝化细菌种群结构[J]. 环境科学, 2017, 38(12): 5174-5183
- [30] Heylen K, Gevers D, Vanparys B, et al. The incidence of *nirS* and *nirK* and their genetic heterogeneity in cultivated denitrifiers[J]. Environmental Microbiology, 2006, 8(11): 2012-2021
- [31] Heylen K, Vanparys B, Gevers D, et al. Nitric oxide reductase (*norB*) gene sequence analysis reveals discrepancies with nitrite reductase (*nir*) gene phylogeny in cultivated denitrifiers[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(4): 1072-1077
- [32] Saito T, Ishii S, Otsuka S, et al. Identification of novel betaproteobacteria in a succinate-assimilating population in denitrifying rice paddy soil by using stable isotope probing[J]. Microbes and Environments, 2008, 23(3): 192-200
- [33] Tsuneda S, Miyauchi R, Ohno T, et al. Characterization of denitrifying polyphosphate-accumulating organisms in activated sludge based on nitrite reductase gene[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005, 99(4): 403-407
- [34] Zhu LP, Xu XH, Zhang WH, et al. Correlationship between denitrifying bacteria and physicochemical factors in cow manure composting[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2016, 35(9): 1781-1787 (in Chinese)
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
- [35] Liang C, Das KC, McClendon RW. 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
- [36] Liu XD, Tiquia SM, Holguin G, et al. Molecular diversity of denitrifying genes in continental margin sediments within the oxygen-deficient zone off the pacific coast of Mexico[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(6): 3549-3560
- [37] Miao Y, Liao RH, Zhang XX, et al. Metagenomic insights into salinity effect on diversity and abundance of denitrifying bacteria and genes in an expanded granular sludge bed reactor treating high-nitrate wastewater[J]. Chemical Engineering Journal, 2015, 277: 116-123
- [38] Ma LH, Huang YM, Li XZ, 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 (in Chinese)
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落的动态变化和耦合关系[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(12): 2674-2679