

邱珊莲, 张少平, 翁伯琦, 等. 鸡粪菌渣好氧堆肥过程中氨氧化古菌及氨氧化细菌群落的动态变化[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(3):573–583.
 QIU Shan-lian, ZHANG Shao-ping, WENG Bo-qi, et al. Dynamics of ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria during composting of chicken manure and mushroom cultural waste[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2016, 35(3):573–583.

鸡粪菌渣好氧堆肥过程中氨氧化古菌及氨氧化细菌群落的动态变化

邱珊莲¹, 张少平¹, 翁伯琦², 罗 涛³, 林霜霜¹, 何炎森^{1*}

(1.福建省农业科学院亚热带农业研究所,福建 漳州 363005; 2.福建省农业科学院,福州 350003; 3.福建省农业科学院土壤肥料研究所,福州 350003)

摘要:以 *amoA* 基因为标记,通过 Real-Time PCR 和限制性片段长度多态性(Restriction fragment length polymorphism, RFLP)法对鸡粪菌渣好氧堆肥过程中的氨氧化古菌(Ammonia-oxidizing archaea, AOA)和氨氧化细菌(Ammonia-oxidizing bacteria, AOB)进行了丰度及群落结构的分析。结果表明,在堆制初期、好氧发酵高温期及后熟期,AOB 的 *amoA* 基因丰度均占主导优势,是 AOA 的 38~992 倍。进入好氧发酵高温期,AOA *amoA* 基因丰度下降至发酵前的 0.9%,AOB 下降至 17.6%,后熟期 AOA 与 AOB 的 *amoA* 基因丰度与好氧发酵高温期相当。在上述 3 个阶段 AOA 与 AOB 各自存在一个绝对优势菌群,分别为 Cluster 3 和 *Nitrosomonas europaea*,其中 Cluster 3 克隆子数目分别占整个克隆文库的 70.73%、54.28%、72.45%,*Nitrosomonas europaea* 克隆子数目分别占整个克隆文库的 78.44%、93.20%、94.27%。堆肥 3 个阶段 AOA 的多样性指数变化不大,Shannon-Wiener 值维持在 1.53~1.60,但群落结构发生明显演替,随着堆肥温度升高,堆肥前期的一些菌群(Cluster 4、Cluster 5、Cluster 6)逐渐消失,新的菌群 Cluster 1 出现并成为堆肥中后期的第二大优势菌群。AOB 无论是多样性指数还是群落组成,都发生剧烈的变化。AOB 在堆肥前期 Shannon-Wiener 指数值最大(1.47),种群数最多(6 个基因簇, 分别为 *Nitrosomonas europaea* Cluster, *Nitrosomonas halophila* Cluster, *Nitrosomonas communis* Cluster, *Nitrosomonas nitrosa* Cluster, *Nitrosospira briensis* Cluster, *Nitrosospira multiformis* Cluster); 进入高温发酵期,Shannon-Wiener 下降至 0.45,群落结构单一,只有 *Nitrosomonas europaea* Cluster 和 *Nitrosomonas halophila* Cluster; 进入后熟期,AOB 多样性及种群数得到一定程度的回升。

关键词:堆肥;RFLP;氨氧化古菌;氨氧化细菌;丰度;群落结构

中图分类号:X713 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2016)03-0573-11 doi:10.11654/jaes.2016.03.022

Dynamics of ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria during composting of chicken manure and mushroom cultural waste

QIU Shan-lian¹, ZHANG Shao-ping¹, WENG Bo-qi², LUO Tao³, LIN Shuang-shuang¹, HE Yan-sen^{1*}

(1.Institute of Subtropical Agriculture, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Zhangzhou 363005, China; 2.Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China; 3.Soil and Fertilizer Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China)

Abstract: The transformation and loss of nitrogen in composting materials were affected profoundly by ammonia oxidizers during the composting process. The abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and ammonia-oxidizing archaea (AOA) during composting of chicken manure and mushroom cultural waste were examined employing Real-Time PCR and PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) techniques with the monooxygenase gene (*amoA*) as biomarker of ammonia oxidizers. Samples were collected at three representative stages, including mesophilic, thermophilic, and maturing stages. Results showed that the *amoA* gene abundance of AOB dominated and the gene copy numbers were about 38 to 992 times those of AOA at all three stages of composting. At the thermophilic stage, the

收稿日期:2015-10-12

基金项目:国家“十二五”科技支撑计划(2012BAD14B15);福建省农业科学院青年英才计划项目(YC2015-19)

作者简介:邱珊莲(1979—),女,福建武平人,博士,副研究员,主要从事环境微生物研究。E-mail:slqiu79@163.com

*通信作者:何炎森 E-mail:heyansen1968@126.com

amoA abundance of both AOA and AOB dropped to 0.9% and 17.6% of that at the mesophilic stage, respectively. The numbers of AOA and AOB at the maturing stage were similar to those at the thermophilic stage. Cluster 3 was the most dominant group of AOA at the three stages, and its amount of clones accounted for 70.73% of the clone library at the mesophilic stage of composting, 54.28% at the thermophilic stage, and 72.45% at the maturing stage. *Nitrosomonas europaea* was the most dominant species of AOB at the three stages, with clone amount representing 78.44%, 93.20% and 94.27% of all clones at mesophilic, thermophilic, and maturing stage, respectively. For AOA, the Shannon–Wiener index ranged from 1.53 to 1.60 at these three stages, showing no obvious changes, but the community composition revealed obvious succession. With increase in compost temperature, Cluster 4, Cluster 5 and Cluster 6 of AOA disappeared, but a novel member (Cluster 1) appeared and became the second dominant group. For AOB, both diversity and community structure showed dramatic changes. At the mesophilic stage, AOB gave the highest Shannon–Wiener index (1.47) and the richest number of species, with 6 clusters including *Nitrosomonas europaea*, *Nitrosomonas halophila*, *Nitrosomonas communis*, *Nitrosomonas nitrosa*, *Nitrosospira briensis*, and *Nitrosospira multiformis* clusters. However, with arrival of thermophilic stage, the Shannon–Wiener index of AOB sharply reduced to 0.45, and the community structure became simple, including *Nitrosomonas europaea* and *Nitrosomonas halophila* clusters. At the maturing stage, the diversity and species number of AOB recovered to some extent.

Keywords: compost; RFLP; ammonia-oxidizing archaea; ammonia-oxidizing bacteria; abundance; community structure

随着我国畜禽养殖业向规模化、集约化的快速转变,畜禽粪便排放量呈逐年上升的趋势,预计到2015年将达到60亿t^[1],给环境带来巨大的压力。同时,食用菌产业的发展会产生大量的菌渣,不加以利用也会造成环境污染和资源浪费。用上述两种农业废弃物生产有机肥既可实现废弃物的资源化利用又可避免环境污染。好氧堆肥是实现农业固体有机废弃物无害化、减量化和资源化利用的主要途径^[2]。但堆肥化过程会造成不同程度的氮素损失^[3-4],一般氮素损失量为初始总氮的16%~76%^[5],其损失途径包括氨气挥发、氧化亚氮和氮气排放、淋溶等形式,其中以氨气挥发形式损失的氮素可达氮素总损失量的44%~99%^[4]。氮素损失不仅降低了堆肥的质量,还导致二次污染。研究农业废弃物在堆肥过程的氮素循环及微生物种群特征,对于选择保护环境措施及提高堆肥质量至关重要。硝化作用是氮循环的一个重要过程,包括氨氧化和亚硝酸盐氧化作用,其中氨氧化是硝化作用的关键限速步骤^[6],主要由氨氧化细菌(AOB)和氨氧化古菌(AOA)完成。

近年来,国内外学者以16S rRNA基因或*amoA*基因为标记,对堆肥过程中AOB和AOA群落进行了研究。Zeng等^[7]发现在农业废弃物堆肥全过程中,AOA和AOB的*amoA*基因丰度与潜在的氨氧化作用都存在线性相关,表明AOA和AOB均活跃地参与了堆肥过程的硝化作用。Yamamoto等^[8]研究发现在牛粪、鸡粪及猪粪三种粪便堆肥过程中均检测到AOB数量明显高于AOA。Yamada等^[9]在铵含量较高的牛粪堆肥过程中未能检测到AOA。虞泳等^[10]在农业废物

好氧堆肥研究中发现AOB优势种群为*Nitrosospira*和*Nitrosomonas*,其中*Nitrosomonas*存在于堆肥全程,耐受性较强。研究堆肥环境中AOB和AOA的种群特征及动态变化对于理解堆肥中的氮素循环有着积极作用。本研究采用Real-Time PCR、RFLP技术,对菌–禽业废弃物堆肥化过程中物料混合后发酵前、翻堆发酵阶段、堆置后熟阶段3个时期的AOB和AOA群落结构进行分析,深入了解堆肥系统中微生物的演替规律,探析微生物与堆肥养分转化之间的关系,这将有助于通过改变工艺参数等方法调控AOA和AOB的群落结构,进而提高硝化速率,减少氮素损失。

1 材料与方法

1.1 堆肥过程及采样介绍

供试样品为菌–禽业废弃物堆肥,采自福建漳州龙海市农丰源肥料有限公司,堆肥物料由鸡粪(水分76%,重量占65%)、菌渣(袖珍菇渣、木耳渣混合物料,水分30%,重量占25%)和油土(制油下脚料,水分5%,重量占10%)组成。总混合发酵物料水分含量58.1%。鸡粪来源于龙海腾龙养鸡场,袖珍菇渣和木耳渣分别由漳州宝鸿生物科技有限公司和龙海市程溪镇建国食用菌场提供,油土来源于广东华美油脂有限公司。

堆肥工艺:根据上述配方,每批总物料重量70 t。用铲车搅拌混合各种物料后,输送到发酵槽(长54 m、宽3.65 m、高1.1 m)内,堆放0.8 m高。前8 d内每2 d翻堆1次,接着每天翻堆1次。采用自动翻料设备(电机功率30 kW,翻堆主轴转速为480 r·min⁻¹),翻

料机工作时,机器沿槽顶钢轨从出料口端向进料口方向行走翻动物料,每次翻料机往返用时1 h。翻料发酵15 d后全部移出,仓式静态二次发酵后熟化30 d。自物料混合始计时,堆肥总天数为45 d。

堆肥取样时间:(1)各种物料混合后发酵前(样品I),代表堆肥堆制起始阶段,还未进入发酵升温阶段;(2)发酵15 d后堆置熟化前(样品II),代表堆肥用翻料机翻料发酵阶段结束,即好氧动态发酵(一次发酵)末期,但还未进入仓式静态二次发酵阶段;(3)堆置熟化20 d后(样品III),代表堆肥静态二次发酵高温阶段后期(后熟阶段)。采用多点混合法进行取样,理化性质见表1。

1.2 样品理化指标分析

用针插式温度计测定堆体中层取样位置处堆体温度。肥料样品在105 °C烘干至恒重测定含水率。铵态氮($\text{NH}_4^+ \text{-N}$, ammonia nitrogen)和硝态氮($\text{NO}_3^- \text{-N}$, nitrate nitrogen)以靛酚蓝比色法和酚二磺酸比色方法进行测定^[11]。按1:10的质量比向堆肥样品中加入去离子水,180 r·min⁻¹室温振荡30 min,5000 r·min⁻¹离心5 min,测定上清液的pH值。有机质测定采用重铬酸钾氧化-容量法;全氮用凯氏法;全磷用NaOH熔融-钼蓝比色法;全钾用NaOH熔融-火焰光度法^[12]。

1.3 堆肥总DNA提取及基因扩增

堆肥总DNA的提取参见文献[13]。AOB的引物对为 $\text{amoA-1F/amoA-2R}^{[14]}$,AOA的引物对为 $\text{Arch-amoA F/Arch-amoA R}^{[15]}$ 。

反应体系:12.5 μL Premix TaqTM(TaKaRa),0.4 mg·mL⁻¹ BSA(TaKaRa),上下游引物各400 nmol·L⁻¹(AOB)/200 nmol·L⁻¹(AOA),1 μL总DNA模板,以灭菌的去离子水补足25 μL。

反应条件:预变性95 °C 30 s,40个循环的95 °C变性10 s,AOB 57 °C/AOA 63 °C退火25 s,72 °C延伸45 s,最后72 °C延伸3 min^[16]。

1.4 *amoA*的定量PCR

定量PCR采用SYBY Green法,AOA/AOB选用

引物同上。扩增体系及程序参见文献[17]。

1.5 *amoA*基因的克隆文库构建、RFLP分析、测序与系统发育分析

使用磁珠法DNA胶回收试剂盒(Sangon,上海)纯化试剂盒对PCR扩增产物进行切胶纯化,将PCR回收产物与pMD19-T载体(TaKaRa,大连)进行连接,转入JM109感受态细胞,进行蓝白斑筛选。采用菌落PCR鉴定阳性克隆,引物为载体引物RV-M和M13-47,每个样品选取约200个经鉴定为阳性克隆子的*amoA*基因PCR产物进行RFLP分析,分别用2种限制性内切酶Msp I和Hha I对PCR产物进行37 °C酶切60 min,综合双酶切图谱,将阳性克隆分成若干个操作分类单元(OTU),统计OTU种类和各OTU所含阳性克隆的数量,从每个样品所含的每个OTU类型中挑取1~3个阳性克隆进行测序(铂尚生物科技有限公司,上海)。应用Bioedit软件对测序结果进行编辑,去除载体序列后用BLAST在GenBank数据库中进行比对分析,选取相近序列,使用MEGA 5软件中Neighbor-Joining方法构建系统发育树。

*amoA*基因序列提交GenBank,AOA的*amoA*基因登录号为:KT595982-KT596043,AOB的*amoA*基因登录号为:KT595940-KT595981。

2 结果

2.1 堆肥养分在发酵过程中的变化

随着堆肥进入发酵期,堆体温度持续上升,堆肥中后期可达60 °C以上,高温期(>55 °C)时间有40 d(图1)。长时间的高温加速了堆肥水分的蒸发,进而导致堆肥的含水量呈下降趋势(表1),但堆肥pH值变化小,基本维持在弱碱性水平。随着堆肥的进行,有机质含量因微生物的不断分解而降低,前15 d下降幅度较小,至堆肥35 d后下降幅度很明显。总氮、总磷、总钾含量经发酵后有所提升, $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 含量在进入高温发酵阶段后急剧上升,由发酵阶段到后熟阶段含量略有提高。

表1 堆肥理化性质变化

Table 1 Changes in physical and chemical properties during composting

样品 Sample	温度 Temperature/°C	含水量 Water content/%	pH	铵态氮 $\text{NH}_4^+ \text{-N/g} \cdot \text{kg}^{-1}$	硝态氮 $\text{NO}_3^- \text{N/g} \cdot \text{kg}^{-1}$	有机质 Organic matter/%	总氮 Total N/%	总磷 Total P/%	总钾 Total K/%
I	44	54.0	8.6	0.43	0.19	63.2	0.93	1.98	1.93
II	62	48.1	8.5	0.99	0.35	61.5	1.64	2.53	2.06
III	66	43.2	8.5	1.10	0.36	46.7	1.87	2.72	2.14

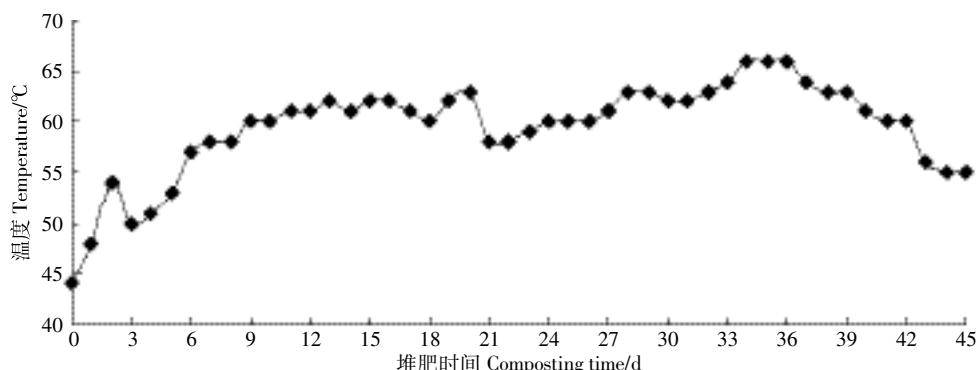


图1 堆肥过程中堆体温度的变化

Figure 1 Changes of temperature in compost pile during composting

2.2 AOA 和 AOB *amoA* 基因的相对丰度变化

如表2所示,在堆肥的3个阶段,样品中AOB的*amoA*基因拷贝数均远远大于AOA,是AOA的38~992倍,但两者进入一次发酵高温阶段时,丰度均急剧下降,且AOA *amoA*基因拷贝数减少幅度更大,AOA *amoA*基因丰度下降至原来的0.9%,AOB下降至原来的17.6%。后熟阶段AOA与AOB的*amoA*基因丰度与高温发酵期相差不明显。

表2 堆肥过程中AOA与AOB *amoA*基因拷贝数(个·g⁻¹ soil)

Table 2 *amoA* gene copy numbers of ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria during composting
(*amoA* gene copy number·g⁻¹ soil)

样品 Sample	氨氧化古菌(AOA) Ammonia-oxidizing archaea	氨氧化细菌(AOB) Ammonia-oxidizing bacteria
I	(6.99±1.51)×10 ⁵ a	(2.68±1.53)×10 ⁷ a
II	(6.48±2.83)×10 ⁵ b	(4.73±0.86)×10 ⁷ b
III	(4.99±1.21)×10 ⁵ b	(4.95±3.44)×10 ⁷ b

注:同列不同字母表示差异显著(*P*<0.05)。

2.3 AOA与AOB *amoA*基因的RFLP分析

I、II、III样品酶切所用的AOA阳性克隆子数目分别181、210、207,AOB阳性克隆子数目分别为204、206、192。综合双酶切图谱,将阳性克隆分成若干个操作分类单元(OTU),统计OTU种类和各OTU所含阳性克隆的数量及百分率,得到OTU的分布图。3个样品综合统计,AOA *amoA*基因共得到26个OTU(图2a),其中I样品含有14个OTU,II样品含有14个OTU,III样品含有12个OTU;AOB *amoA*基因共得到29个OTU(图2b),其中I样品含有20个OTU,II样品含有7个OTU,III样品含有12个OTU。对于AOA,I、II、III存在一个共同的优势类群,即A10,但随着发酵和熟化过程,A10优势效应减弱,从

堆肥前期的59.12%到发酵后的47.14%再到熟化后的36.71%,并且经发酵后新出现的OTU A5成为第二优势类群,占22.38%,再经过熟化阶段,A10、A3、A5分别成为第一、第二、第三优势类群,分别占36.71%、30.43%及19.81%。虽然AOA在堆肥发酵过程中其OTU类型也存在此消彼长的情况,但是总的OTU类型数较为稳定,数量范围维持在12~14,并且多样性变化不大,I、II、III阶段的Shannon-Wiener指数分别为1.53、1.60、1.55,Evenness指数分别为0.58、0.61、0.63(表3)。

对于AOB,堆制前期、一次发酵高温期及后熟期均以B4为优势类群,经发酵后这种集中优势更明显,并且经发酵后,发酵前的大多数OTU(17个)消失,新出现4个OTU:B13、B16、B21及B22。再经过腐熟阶段,AOB OTU的数量得到增加,与II阶段相比,新出现6个OTU类型,消失1个OTU类型。根据OTU分布特征,得到表3,堆肥I、II、III样品的AOB *amoA*文库覆盖率为94.61%、99.03%、97.92%,Shannon-Wiener指数分别为1.47、0.45、0.74(表3),表明AOB在发酵前具有最丰富的多样性,而在发酵后熟化前多样性最低。

2.4 AOA与AOB *amoA*系统发育树分析

从系统发育树可以看出,本研究所获得的AOA *amoA*功能基因分为6个簇(图3),样品I的14个OTU分布于5个簇(Cluster 2,3,4,5,6),样品II的14个OTU分布于4个簇(Cluster 1,2,3,6),样品III的12个OTU分布于2个簇(Cluster 1和3)。在6个簇中,Cluster 3含有最多的OTU(12种),3个样品中其克隆子数目占整个克隆文库的半数以上,其中样品I 70.73%,样品II 54.28%,样品III 72.45%(图4),Cluster 3是最大的优势菌群,根据BLAST结果,其包

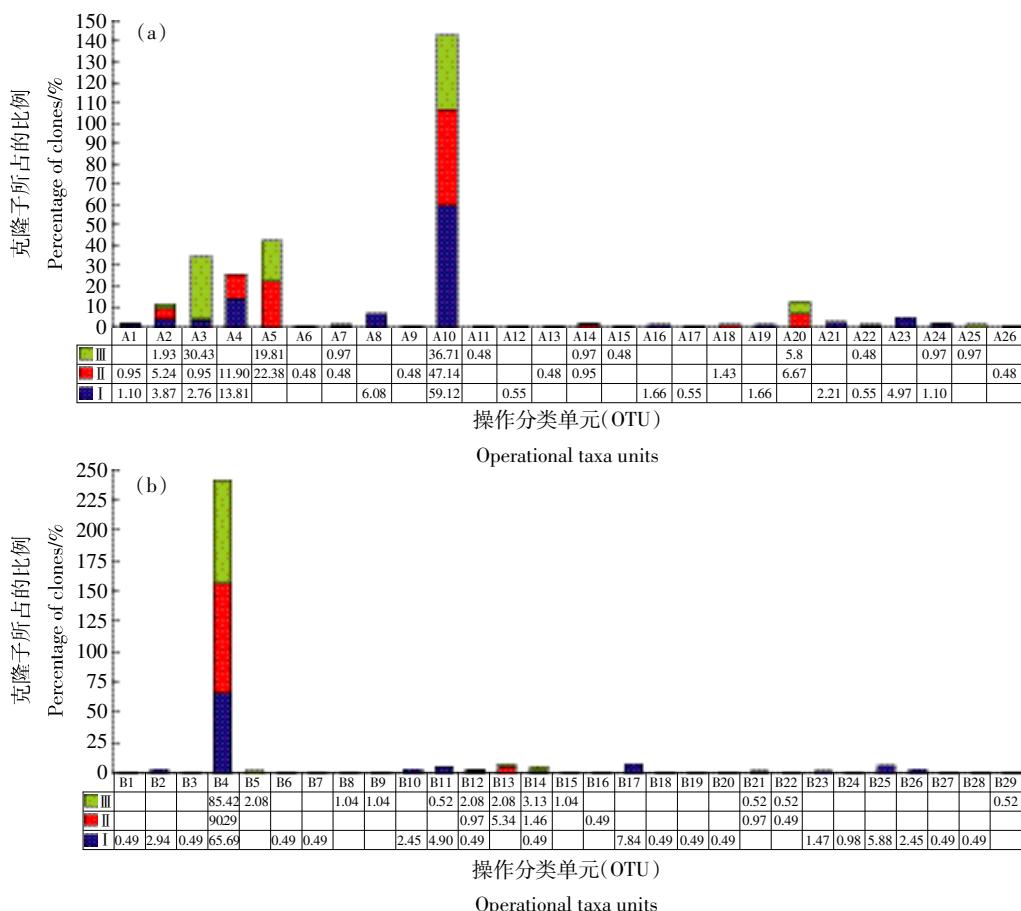


图2 各样品中 AOA(a) 及 AOB(b)amoA 克隆子的 OTU 分布

Figure 2 OTUs distribution of amoA clones of ammonia-oxidizing archaea(a) and ammonia-oxidizing bacteria(b) in samples

表3 AOA与AOB克隆文库的多样性

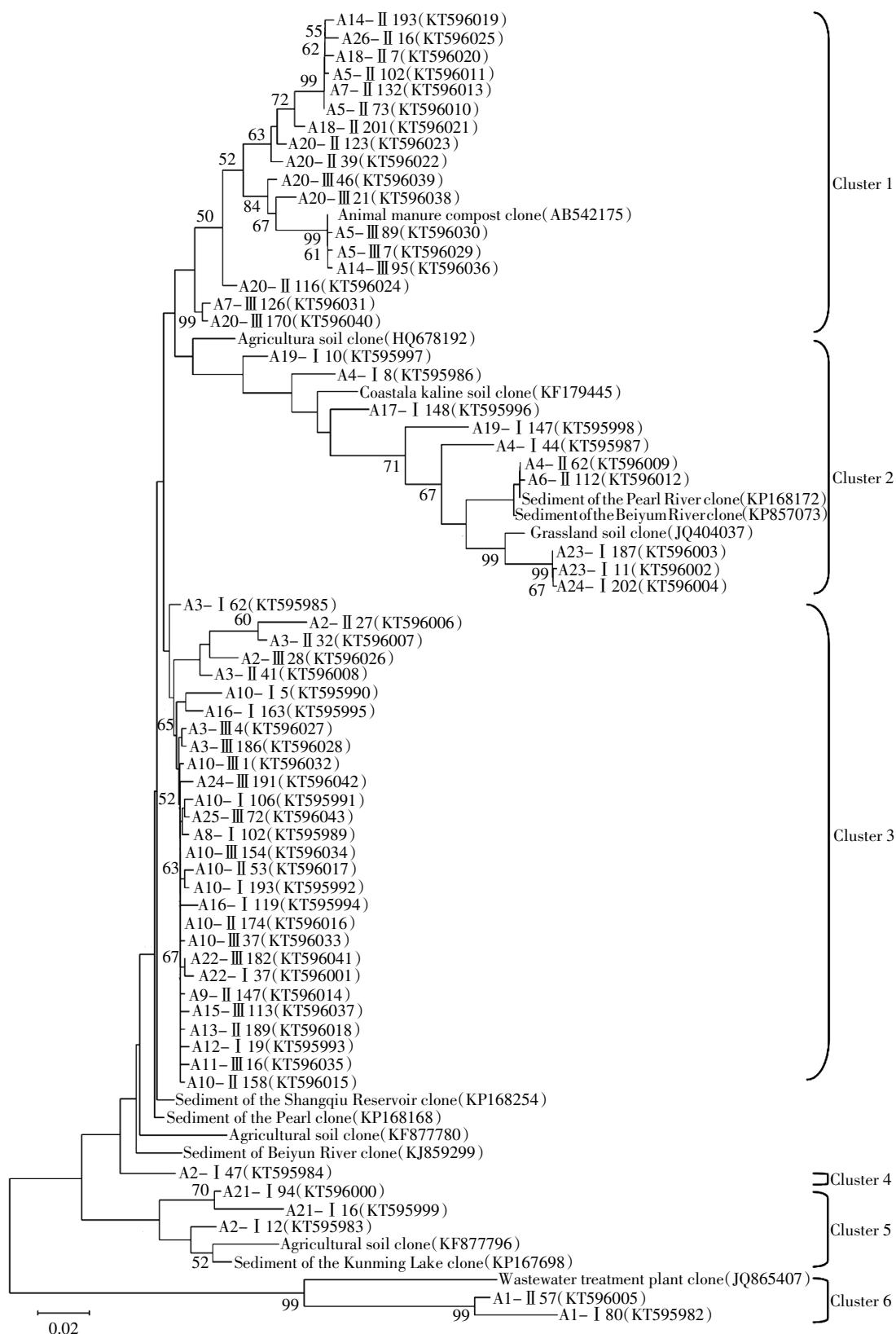
Table 3 Diversity of amoA clone library of ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria

样品 Sample	氨氧化古菌(AOA) Ammonia-oxidizing archaea				氨氧化细菌(AOB) Ammonia-oxidizing bacteria			
	操作分类单元 (OTU) Operational taxa units	文库覆盖率 Library coverage	Shannon-Wiener 指数 Shannon-Wiener index	Evenness 指数 Evenness index	操作分类单元 (OTU) Operational taxa units	文库覆盖率 Library coverage	Shannon-Wiener 指数 Shannon-Wiener index	Evenness 指数 Evenness index
I	14	98.34%	1.53	0.58	20	94.61%	1.47	0.49
II	14	97.62%	1.60	0.61	7	99.03%	0.45	0.23
III	12	98.55%	1.55	0.63	12	97.92%	0.74	0.30

含的序列与来自河流、水库、湖泊沉积物的 AOA amoA 基因序列相似性最高。Cluster 1 没有出现样品 I 的 OTU, 样品 II 和样品 III 分别有 6 种和 4 种 OTU 隶属于 Cluster 1(表4), 其克隆子数目分别占整个克隆文库的 32.39% 和 27.55%(图 4), 是发酵和熟化阶段的第二大优势菌群, 其包含的序列与来自动物粪便堆肥的 AOA amoA 基因序列同源性最高。

AOB amoA 功能基因分为 *Nitrosomonas* 和 *Nitrosospira* 2 个分支, *Nitrosomonas* 细分为 4 个簇(图 5), 分别为 *Nitrosomonas europaea* Cluster, *Nitrosomonas*

halophila Cluster, *Nitrosomonas communis* Cluster, *Nitrosomonas nitrosa* Cluster, *Nitrosospira* 细分为 3 个簇, 分别为 *Unkown Nitrosospira* Cluster, *Nitrosospira briensis* Cluster, *Nitrosospira multiformis* Cluster。AOB amoA 基因的 29 个 OTU 中有 16 个(55.17%) 分布在 *Nitrosomonas europaea* Cluster(表 5), I 、 II 、 III 3 个样品中其克隆子数目分别占整个克隆文库的 78.44% 、 93.20% 、 94.27%(图 6), 是堆肥 3 个阶段的绝对优势菌, 而且随着堆肥时间的延长, 优势效应更加明显和集中。堆肥各物料混合后发酵前 AOB 种类最为丰富,



引用的序列来源于 GenBank 数据库, 序列名称后括弧内的字母加数字代表 GenBank 登录号,
分支节点上的数字表示每 1000 次 bootstrap 分析所支持的次数, 小于 50 的未显示。下同

图 3 基于 amoA 功能基因序列构建的 AOA 系统发育树(邻接法)

Figure 3 Neighbour-joining tree of ammonia-oxidizing archaea based on amoA sequences

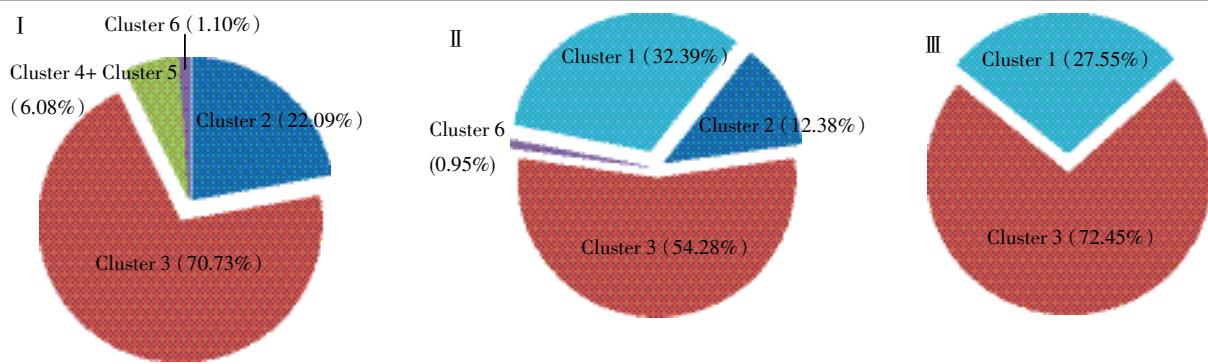


图4 各样品 AOA 群落组成

Figure 4 Composition of ammonia-oxidizing archaea communities in three samples

表4 AOA OTUs 在6个簇中的分布

Table 4 OTUs distribution in six clusters of ammonia-oxidizing archaea

样品 Sample	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4	Cluster 5	Cluster 6
I		A4, A17, A19, A23, A24	A3, A8, A10, A12, A16, A22	A2	A2, A21	A1
II	A5, A7, A14, A18, A20, A26	A4, A6	A2, A3, A9, A10, A13			A1
III	A5, A7, A14, A20		A2, A3, A10, A11, A15, A22, A24, A25,			
OTU	6	6	13	1	2	1

其含有的 20 个 OTUs 在 *Nitrosomonas* 所含的 4 个簇中均有分布, 在 *Nitrosospira* 所含的 *Nitrosospira briensis* Cluster 和 *Nitrosospira multiformis* Cluster 中也有分布(表 5、图 6),而经一次高温发酵后, *Nitrosospira* 消失, 只存在 *Nitrosomonas europaea* Cluster 及 *Nitrosomonas halophila* Cluster, 再到熟化阶段, 有少量的 *Unkown Nitrosospira* Cluster 出现。这些结果表明, *Nitrosomonas europaea* 与 *Nitrosomonas halophila* 对堆肥环境条件的变化较不敏感, 是耐受性较强的种属, 而 *Nitrosospira* 是对环境变化较敏感的种属。

3 讨论

随着堆肥时间的进行,除 pH 外,堆肥的理化性质变化明显。堆肥营养元素的变化与微生物的活动密不可分。随着堆肥升温,一些简单、易分解的有机质被微生物分解导致有机质含量略微下降,到高温的中后期,有机质被大量分解,引起有机质含量的明显下降。总氮、总磷、总钾均呈递增趋势,与有机质分解导致总干物质重量下降有关。总氮的升高表明由氨挥发、氧化亚氮及氮气排放(反硝化)造成的氮素损失并不大。堆肥中氨化微生物将有机含氮化合物不断分解产生氨,但大于 50 ℃高温下氨氧化微生物及亚硝酸盐氧化微生物被抑制且硝化作用基本停止^[18],因而引起

NH_4^+ -N 浓度持续上升,并引起 NO_3^- -N 浓度在堆肥升温阶段增加明显,但在高温期稳定。

在本研究堆肥的 3 个取样阶段, AOB 的 *amoA* 基因拷贝数均远远高于 AOA, 与 Yamamoto 等^[8]的研究结果一致, Yamamoto 等通过实时荧光定量 PCR 研究发现在牛粪、鸡粪、猪粪堆肥过程中 AOB 数量明显高于 AOA。这些结果表明, AOB 可能比 AOA 更适合生存于畜禽粪便堆肥的环境。科学家们总结发现在低有机质含量的环境中,如土壤、海洋/河流沉积物等, AOA 比 AOB 对硝化作用的贡献更大^[19-21],而在富含有机质的环境中,例如废水处理系统、动物粪便堆肥等, AOB 比 AOA 对硝化作用显得更为重要^[9, 19, 22]。这种分布差异可能与环境中的铵离子浓度有直接的关系^[23]。Di 等^[24]研究发现 AOB 可以在高铵离子浓度的土壤中生长,而 AOA 适于在较低铵离子浓度的土壤中生长; Wuchter 等^[25]研究结果表明, AOA 的 *amoA* 基因数量与海水中铵态氮的浓度显著负相关。在本研究中,高铵离子浓度可能是导致 AOA 丰度低的一个关键因素。当鸡粪菌渣好氧堆肥进入一次发酵高温期时,无论 AOA 还是 AOB, *amoA* 基因拷贝数均发生急剧的变化,均明显降低, AOA 数量减少更为显著。氨氧化微生物丰度的减少与温度、pH、 NH_4^+ -N 浓度、 NO_3^- -N 浓度等外界环境因素变化有着密切的联系。

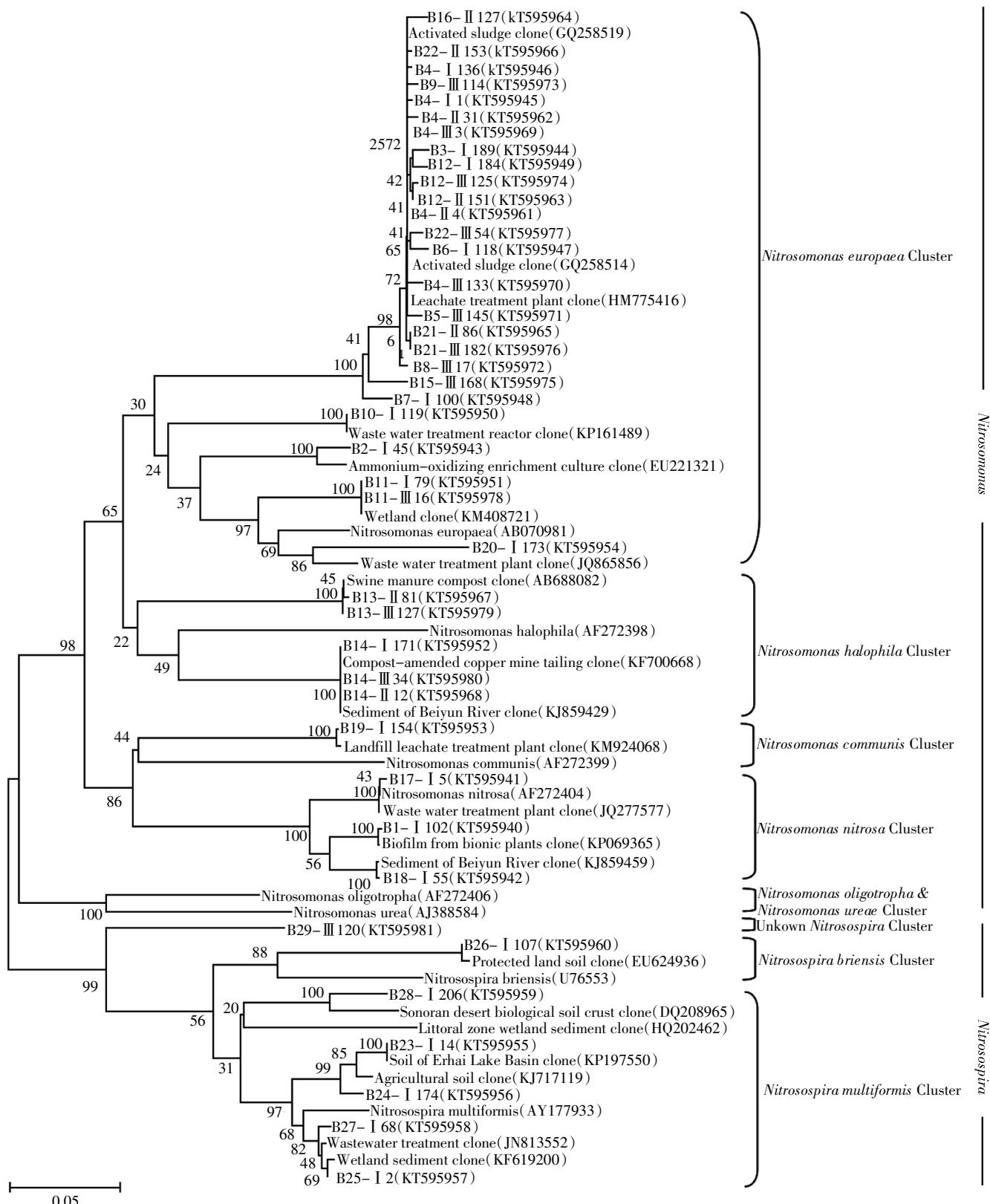


图5 基于 *amoA* 功能基因序列构建的 AOB 系统发育树(邻接法)
Figure 5 Neighbour-joining tree of ammonia-oxidizing bacteria based on *amoA* sequences

表 5 AOB OTUs 在 7 个簇中的分布

Table 5 OTUs distribution in seven clusters of ammonia-oxidizing bacteria

样品 Sample	<i>Nitrosomonas europaea</i> Cluster	<i>Nitrosomonas</i> <i>halophila</i> Cluster	<i>Nitrosomonas</i> <i>communis</i> Cluster	<i>Nitrosomonas</i> <i>nitroa</i> Cluster	Unknown <i>Nitrosospira</i> Cluster	<i>Nitrosospira</i> <i>briensis</i> Cluster	<i>Nitrosospira</i> <i>multiformis</i> Cluster
I	B2, B3, B4, B6, B7, B10, B11, B12, B20	B14	B19	B1, B17, B18		B23, B24, B25, B27, B28	B26
II	B4, B12, B16, B21, B22	B13, B14					
III	B4, B5, B8, B9, B11, B12, B15, B21, B22	B13, B14			B29		
OTU	16	2	1	3	1	5	1

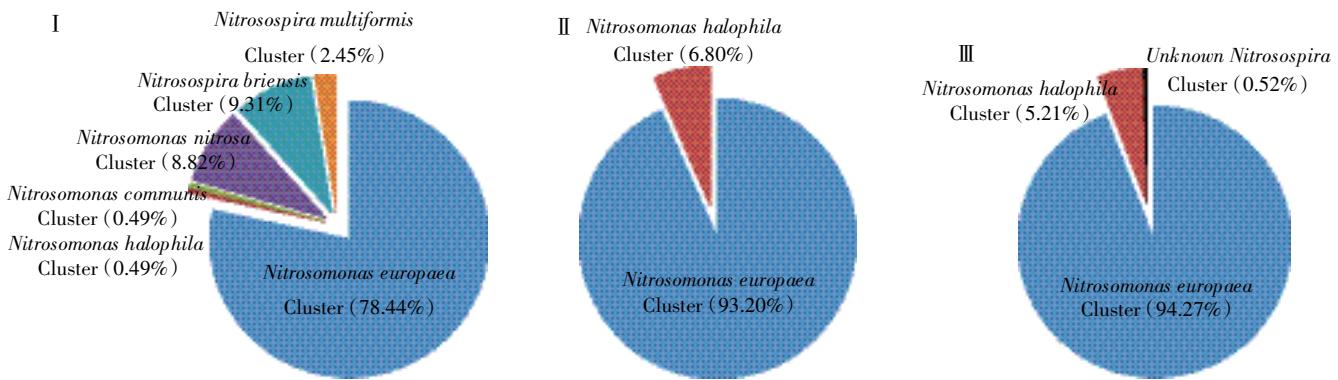


图 6 各样品 AOB 群落组成

Figure 6 Composition of ammonia-oxidizing bacteria communities in three samples

温度是影响微生物生长和生存的最主要的环境因素之一^[26],随着堆肥的发酵,堆体的温度持续上升,至采样时达到 60 ℃以上,此时只有对高温耐受性强的氨氧化微生物得以生存和繁殖,而对高温耐受性差的被高温所抑制和淘汰。另外,发酵过程中 NH₄⁺-N 浓度的大幅升高可能也是导致 AOA 比 AOB 数量降幅更大的一个重要因素。从一次发酵高温期进入后熟期,AOA 及 AOB 的丰度变化均不显著,AOA 丰度仍呈现下降趋势(22.99%),可能是由于 NH₄⁺-N 浓度仍在升高,而AOB 丰度变化甚微(上升 4.65%),可能与其耐铵性有关。

本研究堆肥过程不仅氨氧化微生物的丰度发生了急剧的变化,AOA 及 AOB 的群落结构也发生了明显的演替。AOA 的多样性指数虽然在堆肥前期、发酵期及后熟期变化不明显,但是群落组成在各个时期却明显不同,从堆制前期至一次发酵高温阶段,Cluster 4 和 Cluster 5 消失,但新增一个优势菌群 Cluster 1,该菌群与 GenBank 中来源于动物粪便堆肥的 *amoA* 序列相似性最高。这些结果表明 Cluster 1 可能是动物粪便堆肥高温期特有的优势菌。从一次发酵高温阶段至后熟阶段,Cluster 2 和 Cluster 6 也消失,群落组成只

剩 Cluster 1 和 Cluster 3。解开治等^[27]研究表明,堆体温度、总氮、NO₂⁻-N 和 NO₃⁻-N 这 4 种环境因子对 AOA 群落结构演替影响显著;Auguet 等^[28]研究表明,氨氧化过程中间接底物(铵)和产物(硝酸盐)浓度变化会导致 AOA 相对丰度和多样性的变化。结合本研究表 1、图 1 分析,AOA 群落结构的演替可能与长时间持续高温及 NH₄⁺-N 浓度升高密切相关,但具体与哪一个堆肥理化指标关系更大,还需要在堆肥过程中更多的时间点上采集更多的样品来测定及分析,这也将成为我们下一步的工作目标。

堆肥过程中 AOB 多样性变化很剧烈,在堆肥前期,OTUs、Shannon-Wiener 指数及 Evenness 指数值最高,其次为后熟期,高温发酵期多样性最低。群落结构的演替也表现很剧烈,堆制前期种群最丰富,由 *Nitrosomonas* 的 4 个簇和 *Nitrosospira* 的 2 个簇组成,到高温发酵 15 d 后只剩 *Nitrosomonas europaea* 及 *Nitrosomonas halophila* 2 个簇。群落物种数的大幅减少可能与堆肥理化性质的明显变化密切相关,从堆制前期到一次发酵高温期,堆体温度、铵态氮、硝态氮、总氮等均大幅提高,而一次发酵高温期与后熟期 AOB 的群落结构较相似,可能是由于这 2 个阶段堆肥的各

个理化性质相差并不大。在堆肥取样的3个阶段, *Nitrosomonas* 均占据主导地位, 样品Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ 分别有 88.24%、100%、99.48% 的 AOB 种群属于 *Nitrosomonas* (图 6), 在 *Nitrosomonas* 分支内又以 *Nitrosomonas europaea* 为优势种群。虞泳等^[10]发现 *Nitrosomonas* 和 *Nitrosospira* 是农业废物好氧堆肥 AOB 优势种属, 其中 *Nitrosomonas* 存在于堆肥全程, 是耐受性较强的种属, 并且通过冗余分析发现堆体温度、NH₄⁺-N、NO₃⁻-N 对 AOB 群落演替影响显著($P<0.05$), 其中温度、NH₄⁺-N 的影响达到了极显著水平($P<0.01$)。Yan 等^[29]研究表明, 在城市污泥堆肥全程 AOB 均以 *Nitrosomonas* 为优势种群; Yamamoto 等^[30]研究发现, 在牛粪堆肥过程中 AOB 的优势种群主要为 *Nitrosomonas europaea*; Gao 等^[31]研究发现 10 个废水处理系统也是以 *Nitrosomonas europaea* 为 AOB 的优势种群。许多研究结果表明, 在堆肥高温阶段, 均以 *Nitrosomonas europaea* 为优势种群^[8,30,32-33], 并且发现 *Nitrosomonas europaea* 是一个耐受高 NH₄⁺-N 浓度的菌群^[30,34-35]。本研究与以上的研究报道具有高度的一致性, 但是仍然需要进一步加强群落结构与环境因子的研究, 更深入揭示堆肥中氮循环规律, 以期减少氮的损失。

4 结论

(1) 在鸡粪菌渣堆肥化的堆制前期、一次发酵高温期、后熟期的三阶段, AOB 的丰度均远高于 AOA, 在发酵 15 d 后, 与物料混合后发酵前相比, AOA 及 AOB 丰度均急剧下降, AOA 下降幅度更大。

(2) 在堆肥的三个阶段, AOA 多样性指数变化不大, 群落结构发生明显演替, 但均以 Cluster 3 为绝对优势菌群, Cluster 1 成为发酵期和熟化期第二大优势菌群。

(3) AOB 多样性指数及群落组成均随发酵时间发生剧烈变化。在发酵前多样性指数最高, 种群最丰富, 发酵后熟化前多样性指数最低, 种群最少, 至后熟阶段, 多样性和种群得到一定程度恢复。*Nitrosomonas europaea* 是堆肥三个阶段的绝对优势菌。

参考文献:

- [1] 朱兆良, David Norse, 孙波. 中国农业面源污染控制对策[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2006.
- ZHU Zhao-liang, David Norse, SUN Bo. The countermeasures on the control of agriculture non-point sources pollution in China[M]. Beijing: China Environmental Science Press, 2006.
- [2] 李季, 彭生平. 堆肥工程实用手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 1-22.
- LI Ji, PENG Sheng-ping. A practical manual of composting engineering [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 1-22.
- [3] Gu W J, Zhang F B, Xu P Z, et al. Effects of sulphur and *Thiobacillus thioparus* on cow manure aerobic composting[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(11): 6529-6535.
- [4] 黄向东, 韩志英, 石德智, 等. 畜禽粪便堆肥过程中氮素的损失与控制[J]. 应用生态学报, 2010, 21(1): 247-254.
- HUANG Xiang-dong, HAN Zhi-ying, SHI De-zhi, et al. Nitrogen loss and its control during livestock manure composting[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2010, 21(1): 247-254.
- [5] Barrington S, Choinière D, Trigui M, et al. Effect of carbon source on compost nitrogen and carbon losses[J]. *Bioresource Technology*, 2002, 83(3): 189-194.
- [6] Kowalchuk G A, Naoumenko Z S, Derikx P J L, et al. Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β subdivision of the class *Proteobacteria* in compost and composted materials[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(2): 396-403.
- [7] Zeng G M, Zhang J C, Chen Y N, et al. Relative contributions of archaea and bacteria to microbial ammonia oxidation differ under different conditions during agricultural waste composting[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(19): 9026-9032.
- [8] Yamamoto N, Oishi R, Suyama Y, et al. Ammonia-oxidizing bacteria rather than ammonia-oxidizing archaea were widely distributed in animal manure composts from field-scale facilities[J]. *Microbes and Environments*, 2012, 27: 519-524.
- [9] Yamada T, Araki S, Ikeda-Ohtsubo W, et al. Community structure and population dynamics of ammonia oxidizers in composting processes of ammonia-rich livestock waste[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2013, 36(5): 359-367.
- [10] 虞泳, 曾光明, 陈耀宁, 等. 农业废物好氧堆肥中氨氧化细菌的群落结构[J]. 环境科学, 2011, 31(10): 3067-3072.
- YU Yong, ZENG Guang-ming, CHEN Yao-ning, et al. Succession of ammonia-oxidizing bacteria community structure during agricultural waste composting[J]. *Chinese Journal of Environmental Science*, 2011, 31(10): 3067-3072.
- [11] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000: 296-338.
- LU Ru-kun. Analytical methods of soil and agricultural chemistry[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000: 296-338.
- [12] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2000: 30-33, 42-48, 76-78, 101-102.
- BAO Shi-dan. Agricultural and chemical analysis of soil[M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2000: 30-33, 42-48, 76-78, 101-102.
- [13] 陈旭玉, 周亚奎, 余贤美, 等. 一种直接用于 PCR 的土壤微生物 DNA 提取方法[J]. 中国农学通报, 2008, 24(4): 33-36.
- CHEN Xu-yu, ZHOU Ya-kui, YU Xian-mei, et al. An affection method for DNA extraction from soil microorganisms[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2008, 24(4): 33-36.

- [14] Rothauwe J H, Witzel K P, Liesack W. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker; Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63:4704-4712.
- [15] Francis C A, Roberts K J, Beman J M, et al. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(41):14683-14688.
- [16] 王 奥, 吴福忠, 何振华, 等. 亚高山/高山森林土壤有机层氨氧化细菌和氨氧化古菌丰度特征[J]. 生态学报, 2012, 32(14):4371-4378.
WANG Ao, WU Fu-zhong, HE Zhen-hua, et al. Characteristics of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea abundance in soil organic layer under the subalpine/alpine forest[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(14):4371-4378.
- [17] 叶 磊, 祝贵兵, 王 雨, 等. 白洋淀湖滨湿地岸边带氨氧化古菌与氨氧化细菌的分布特性[J]. 生态学报, 2011, 31(8):2209-2215.
YE Lei, ZHU Gui-bing, WANG Yu, et al. Abundance and biodiversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in littoral wetland of Baiyangdian Lake, North China[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(8):2209-2215.
- [18] Brady N C. Nitrogen and sulfur economy of soils[M]//Brady N C, Weil R R. The nature and properties of soils. New Jersey: Prentice-Hall, Inc, 1999.
- [19] Maeda K, Hanajima D, Toyoda S, et al. Microbiology of nitrogen cycle in animal manure compost[J]. *Microbial Biotechnology*, 2011, 4(6):700-709.
- [20] Leininger S, Urich T, Schloter M, et al. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils[J]. *Nature*, 2006, 442(7104):806-809.
- [21] Santoro A, Casciotti K, Francis C. Activity, abundance and diversity of nitrifying archaea and bacteria in the central California Current[J]. *Environmental Microbiology*, 2010, 12:1989-2006.
- [22] Wells G, Park H, Yeung C, et al. Ammonia-oxidizing communities in a highly aerated full-scale activated sludge bioreactor; Betaproteobacterial dynamics and low relative abundance of Crenarchaea[J]. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(9):2310-2328.
- [23] 董莲华, 杨金水, 袁红莉. 氨氧化细菌的分子生态学研究进展[J]. 应用生态学报, 2008, 19(6):1381-1388.
DONG Lian-hua, YANG Jin-shui, YUAN Hong-li. Research advances in molecular ecology of ammonia oxidizing bacteria[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2008, 19(6):1381-1388.
- [24] Di H J, Cameron K C, Shen J P, et al. Ammonia-oxidizing bacteria and archaea grow under contrasting soil nitrogen conditions[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 72(3):386-394.
- [25] Wuchter C, Abbas B, Coolen M J, et al. Archaeal nitrification in the ocean[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(33):12317-12322.
- [26] 诸葛健, 李华钟. 微生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2009.
ZHU Ge-jian, LI Hua-zhong. *Microbiology*[M]. Beijing: Science Press, 2009.
- [27] 解开治, 徐培智, 张发宝, 等. 鸡粪好氧堆肥过程中氨氧化古菌群落结构的动态变化[J]. 植物营养与肥料学报, 2012, 18(6):1483-1491.
XIE Kai-zhi, XU Pei-zhi, ZHANG Fa-bao, et al. Dynamic changes of ammonia-oxidizing archaea community structure during aerobic composting of chicken manure[J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2012, 18(6):1483-1491.
- [28] Auguet J C, Nomokonova N, Camarero L, et al. Seasonal changes of freshwater ammonia-oxidizing archaeal assemblages and nitrogen species in oligotrophic alpine lakes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 166(5):1937-1945.
- [29] Yan L, Li Z G, Bao J, et al. Diversity of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea during composting of municipal sludge [J]. *Annals of Microbiology*, 2015, 65:1729-1739.
- [30] Yamamoto N, Otawa K, Nakai Y. Diversity and abundance of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea during cattle manure composting[J]. *Microbial Ecology*, 2010, 60(4):807-815.
- [31] Gao J F, Luo X, Wu G X, et al. Abundance and diversity based on *amoA* genes of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in ten wastewater treatment systems[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98:3339-3354.
- [32] Jarvis Å, Sundberg C, Milenković S, et al. Activity and composition of ammonia oxidizing bacterial communities and emission dynamics of NH₃ and N₂O in a compost reactor treating organic household waste[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 106:1502-1511.
- [33] Maeda K, Toyoda S, Shimojima R, et al. Source of nitrous oxide emissions during the cow manure composting process as revealed by isotopomer analysis of *amoA* abundance in betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(5):1555-1562.
- [34] Koops H P, Purkhold U, Pommerening-Röser A, et al. The lithotrophic ammonia-oxidizing bacteria[M]//Dworkin M, Falkow D, Rosenberg E, et al. The prokaryotes. 3rd ed. New York: Springer-Verlag New York, 2006:778-811.
- [35] Koops H P, Pommerening-Röser A. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 37(1):1-9.