

王国兴, 董桂军, 艾士奇, 等. 通风量对堆肥化过程中氮素转化及 *nirK* 基因多样性和数量的影响[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(3): 565–572.

WANG Guo-xing, DONG Gui-jun, AI Shi-qi, et al. Effects of ventilation on nitrogen transformation and *nirK* gene diversity and abundance during composting process[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2016, 35(3): 565–572.

通风量对堆肥化过程中氮素转化及 *nirK* 基因多样性和数量的影响

王国兴¹, 董桂军², 艾士奇¹, 熊志强¹, 晏磊¹, 高亚梅¹, 王彦杰¹, 王伟东^{1*}

(1.黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院, 黑龙江 大庆 163000; 2.黑龙江省农垦总局植保植检站, 黑龙江 哈尔滨 150000)

摘要:通过研究不同通风量对堆肥化过程中 *nirK* 基因多样性和丰度的影响, 阐明通风量与氮素转化和氮损失之间的关系。堆肥共设置 3 个处理, 即对照不通风(静态堆肥 CK)、通风量 $0.05 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ (微好氧堆肥 TF1) 和通风量 $0.2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ (好氧堆肥 TF4), 分析不同时期堆肥样品的铵态氮、硝态氮、全氮等理化指标, 以及不同时期堆肥样品中反硝化功能基因 *nirK* 基因数量和 63 d 样品中 *nirK* 基因多样性的变化规律。结果表明, 堆肥过程中, CK、TF1、TF4 三个处理的氨气速率和氮素总损失量随着通风量增大而增大, $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 含量和总氮在堆肥结束时均达到最大, 与通风量呈正相关。通过对堆肥样品中 *nirK* 基因多样性和数量分析发现, CK、TF1、TF4 三个处理堆肥 63 d 样品中 *nirK* 基因克隆文库中 OTU 数量分别为 9、5、3 个; 在堆肥高温期和腐熟期, *nirK* 基因拷贝数与通风量呈现负相关。实验结果证明通风量显著影响堆肥化过程中各种形态氮的转化以及 *nirK* 基因多样性和数量, 并增加了总氮和硝态氮含量。

关键词:通风量; 堆肥; *nirK*; 氮素转化

中图分类号: X705 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2016)03-0565-08 doi:10.11654/jaes.2016.03.021

Effects of ventilation on nitrogen transformation and *nirK* gene diversity and abundance during composting process

WANG Guo-xing¹, DONG Gui-jun², AI Shi-qi¹, XIONG Zhi-qiang¹, YAN Lei¹, GAO Ya-mei¹, WANG Yan-jie¹, WANG Wei-dong^{1*}

(1. College of Life Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163000, China. 2. Plant Protection and Inspection Station, Heilongjiang Land Reclamation Bureau, Harbin 150000, China)

Abstract: Ventilation is one of the most important parameters affecting composting process. In this study, the effects of ventilation on nitrogen transformation and loss and *nirK* gene diversity and abundance during composting process were examined. Three treatments, CK: $0 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ (Static compost), TF1: $0.05 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ (Microaerobic compost) and TF4: $0.2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ (Aerobic compost), were designed. The content of ammonium-nitrogen, nitrate nitrogen, and total nitrogen during different periods were measured. The abundance of *nirK* gene during different periods and the diversity of *nirK* gene on the 63rd day of composting were analyzed. Results showed that the NH_3 emissions and total nitrogen losses in three treatments increased with increasing amount of ventilation. The highest content of $\text{NO}_3^- \text{-N}$ and TN was observed in CK, TF1, and TF4 on the 63rd day, and was significantly affected by ventilation. The OTU number of *nirK* gene clone library of the 63rd day samples from CK, TF1 and TF4 was 9, 5, and 3, respectively. During the thermophilic and maturity periods, the abundance of *nirK*

收稿日期: 2015-10-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(31270536); “十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD12B05-3, 2013BAD21B01); 黑龙江省高校科技创新团队计划项目(2012TD006); 黑龙江八一农垦大学研究生创新科研项目(YJSCX2015-Y60)

作者简介: 王国兴(1989—), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为生物质资源与利用。E-mail: wangguoxing@126.com

* 通信作者: 王伟东 E-mail: wwdcyy@126.com

gene was negatively correlated with ventilation amount. The present results showed that ventilation significantly affects the transformation of nitrogen, and the diversity and abundance of *nirK* gene during composting, and increases TN and $\text{NO}_3\text{-N}$ content.

Keywords: ventilation; composting; *nirK*; nitrogen transformation

根据环境保护部和国土资源部 2014 年公布的《全国土壤污染状况调查公报》,农业已超过工业成为中国最大面源污染产业。2010 年我国畜禽粪便年排放量约 19 亿 t, 其中总污染量达到 2.27 亿 t, 预计 2020 年全国畜禽粪便总污染量将达 2.98 亿 t^[1]。随着养殖业的快速发展,畜禽粪便排放量不断增加,对环境的压力越来越大。堆肥化作为处理农业废物的有效途径之一,已经得到了广泛的应用,但由于堆肥化过程中氮素损失和排放温室气体,导致堆肥产品质量下降,污染空气。因此研究堆肥化过程中氮素的转化规律具有实际意义。

反硝化作用是堆肥过程中参与氮素循环的一个重要过程。反硝化细菌在厌氧条件下,通过酶催化还原反应将氮化合物 NO_3^- 、 NO_2^- 转化成气态氮(NO 、 N_2O 、 N_2)^[2]。 N_2O 作为一种典型的温室气体,是人类排放的首要消耗臭氧层的物质^[3],而堆肥过程产生的 N_2O 是其重要来源之一^[3]。亚硝酸还原酶(Nir)是反硝化细菌驱动反硝化作用的关键酶^[4]。许多研究将 *nirK* 和 *nirS* 基因作为环境样品中反硝化细菌群落的分子标记物,并且发现 *nirK* 基因对环境因子的响应更敏感^[5]。近期,研究人员发现 *nirK* 型的反硝化细菌存在于农田、草地、森林、水体以及沉积物等环境中^[6-10]。同时还发现,环境性质的改变可以影响反硝化细菌的群落结构和种群丰度,如全氮含量、 NO_3^- 含量、含水量、pH 等^[11],而反硝化细菌的群落结构和种群丰度又能反映这些调控因子的综合作用。

在强制通风堆肥过程中 N_2O 排放量与通气量有关。当通气量较低时,堆体内存在较多缺氧和厌氧的环境,导致反硝化作用进而产生大量 N_2O ;当通气量较高时,氮素在堆肥初期以 NH_3 挥发的形式大量损失,降低后期甚至整个堆肥过程中 N_2O 排放量^[12-13]。Osada 等^[14]研究了通风率($19.2\sim 96.1\text{ L}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{min}^{-1}$)对猪粪堆肥过程中 N_2O 排放的影响,结果表明当堆体通风率大于 $40\text{ L}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{min}^{-1}$ 时,可基本控制堆肥过程 N_2O 排放。因此,研究反硝化细菌群落及其对环境的响应,对降低堆肥过程中反硝化作用有重要的意义。

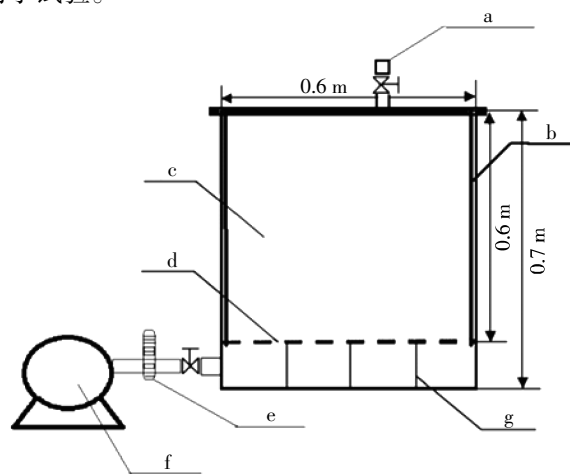
本研究模拟好氧堆肥过程,以草坪草与牛粪为原料,对堆肥过程中理化指标、反硝化功能基因 *nirK* 基

因多样性和数量随着堆肥时间的变化情况进行了研究,以期优化堆肥工艺及减少氮素的损失提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 堆肥试验材料与处理

试验材料为牛粪和草坪草,牛粪取自大庆市周边农村,草坪草取自黑龙江八一农垦大学校内草坪。将牛粪与草坪草按 1:1(体积比)均匀混合,调节含水率至 65%~70%,C/N 至 24~30,置入 3 个尺寸为 $0.6\text{ m}\times 0.6\text{ m}\times 0.6\text{ m}$ 的发酵箱中,堆体原料的起始重量和体积分别为 70 kg 和 0.18 m^3 ,混合后含水率和 C/N 分别为 67.10%和 26.83。堆肥试验装置是由发酵箱和控制系统组成,发酵箱由钢铁材料制成,底部加有通风筛,内壁加有保温层(图 1)。装置放置于自建铁皮板房中用于试验。



(a)空气检测器与阀门;(b)保温板;(c)发酵室;
(d)空气孔筛;(e)流量计;(f)空气压缩机;(g)隔栏

图 1 堆肥装置

Figure 1 Construction for manure composting

设置 3 种处理条件的堆肥发酵系统:处理 CK, $0\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}\text{ TS}$ (总固体含量),静态堆肥;处理 TF1, $0.05\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}\text{ TS}$,微好氧堆肥;处理 TF4, $0.2\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}\text{ TS}$,好氧堆肥。均为 3 次重复。在堆肥第 9 d 翻堆 1 次,进一步混合物料。

将堆肥开始时设置为第 0 d,堆肥至 63 d 结束,在第 0、3、5、7、14、21、28、35、42、63 d 取样。采用多点

混合法取样(上中下3层,每层前、后、左、右、中五点取样),样品充分混合后带回实验室,一部分直接测定理化参数,另一部分用缓冲液-20℃保存,用于分子生物学分析。所有测量重复3次。

1.2 堆肥理化参数的测定

堆体温度测定:在试验进行期间,于每天14:00定时测定各处理堆体中间位置的温度(优利德UT325数字测温仪),同时测定环境温度。

O₂含量测定:每天14:00,采用氧气含量测定仪(GT 901,China)现场插入各处理堆体的上、中、下、左、右五个位点,测量O₂含量,取其平均值作为堆体中O₂的实时含量。

含水率测定:样品在105℃烘16h,利用称重法测定含水率。

pH测定:取2.0g鲜样按1:10加入去离子水,200 r·min⁻¹振荡30 min,真空过滤,采用小型pH检测器B-212(HORIBA,Japan)测定滤液pH。

氨气释放速率测定:用箱体设置的密封盖密封箱体,顶部留有出气孔。每天14:00,释放的气体利用0.05%硼酸吸收液吸收1h后,加入2~3滴甲基红-亚甲基蓝混合指示剂,采用0.025 mol·L⁻¹ H₂SO₄标准溶液滴定。由于实验通气量大,缺少有效的收集装置,选择其中一个时间段,计量氨气释放速率。

总有机碳和总氮测定:采用总有机碳/总氮分析仪(multi N/C® 2100,德国耶拿)分析样品总有机碳和总氮。

水溶性NO₃⁻-N和水溶性NH₄⁺-N测定:分别采用酚二磺酸比色法和纳氏试剂比色法测定^[15-16]。

以上所有参数测定均重复3次,取其平均值,最大实验误差限<5%。

1.3 克隆文库构建

1.3.1 总DNA的提取

使用PowerSoil DNA Isolation Kit提取样品DNA(Mobio,USA),-20℃保存,具体步骤参考厂商说明书。

1.3.2 细菌 *nirK* 基因扩增

样品中 *nirK* 基因扩增引物为F1aCu(5'-ATCATG-GTCTGCCGCG-3')/R3Cu(5'-GCCTCGATCAGRTTG TGGTT-3')^[17],PCR试剂购于博凌科为PCR mix(含染料)。PCR反应体系为50 μL体系:2×buffer 25 μL, F1aCu(50 μmol·L⁻¹)0.5 μL, R3Cu(50 μmol·L⁻¹)0.5 μL,模板DNA 1 μL,加ddH₂O补至50 μL。反应条件:95℃变性3 min,95℃20 s,57℃30 s,72℃40 s(30个循环),72℃延伸10 min。扩增5管重复,将扩增产

物均匀混合以消除单次扩增的偏向性。PCR扩增产物用AXYGEN DNA凝胶回收试剂盒纯化,具体步骤参考厂商说明书。

1.3.3 *nirK* 基因克隆文库的构建

使用全式金pEASY-T1 Cloning Kit构建克隆文库,具体步骤参考厂商说明书。随机挑取80~100个克隆子送至华大基因测序,测序获得的 *nirK* 基因序列利用NCBI Blast数据库进行同源性分析和相关信息检索,并将获得的 *nirK* 基因序列提交到GenBank数据库。

1.3.4 核苷酸序列接受号

本研究获得的 *nirK* 基因核苷酸序列在NCBI数据库中的序列接受号为KR857239-KR857247。

1.4 定量PCR

扩增 *nirK* 基因引物为F1aCu:R3Cu,所用仪器为ABI 7500 荧光定量PCR仪(ABI,USA)。反应体系为20 μL:2×SYBR Green 荧光定量PCR Mix(博凌科为,北京)10 μL,上下游引物各0.5 μL,DNA模板1 μL,用Mili-Q无菌水补足20 μL。 *nirK* 扩增条件:95℃预变性3 min,95℃变性30 s,57℃退火1 min,72℃延伸1 min,40个循环。定量扩增得到的数据均在72℃进行采集,所有的样品重复3次。每次反应结束后会得到一条溶解曲线,用以判断扩增子的特异性。 *nirK* 基因标准曲线是将每种目标基因分别连接到质粒中,然后提取质粒DNA并测定其浓度,计算出拷贝数,再进行10倍系列梯度稀释,作为标准品。目标基因标准曲线的稀释范围均为1.0×10³~1.0×10⁸。

1.5 数据处理

采用SPSS 19.0软件对堆体不同位置的功能基因数目进行显著性差异分析(One-way ANOVA,Student-Newman-Keuls检验)。采用Canoco 4.5软件对生物信息矩阵进行基于线性模型的冗余分析(RDA)方法^[18]分析每种环境因子与 *nirK* 基因的关系,将生成的数据文件用Canodraw4.5作图。

2 结果与分析

2.1 堆肥过程中主要参数的变化

2.1.1 堆体温度与环境温度

温度是判断堆肥产品能否达到无害化条件的重要指标之一^[19]。处理TF1和TF4的堆体温度分别在第4d和第5d迅速升高到50℃以上,并且超过50℃的高温期分别达到9d和5d(图2);而处理CK始终没有达到50℃。处理TF4由于带走了大量的热量^[20-21],高温

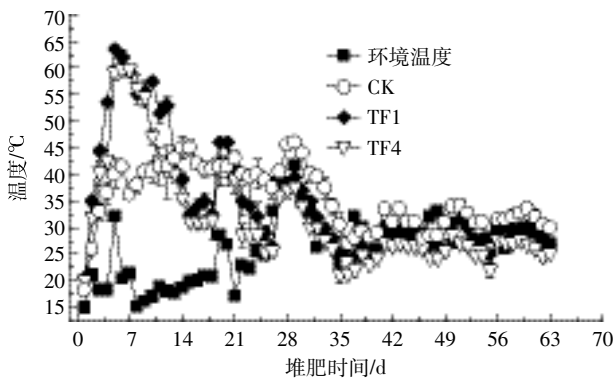


图2 堆肥过程中堆体温度和环境温度的变化

Figure 2 Changes of pile temperature and environmental temperature during composting

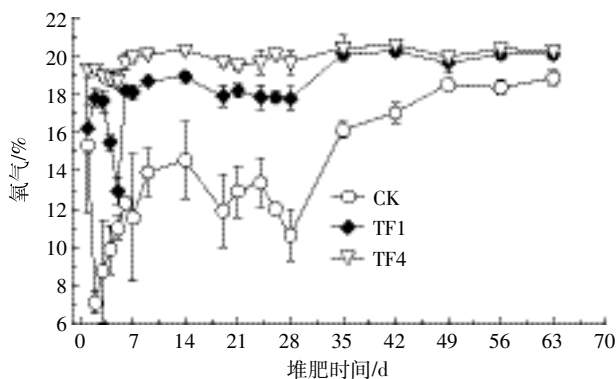
期持续时间较短,但基本可以达到堆肥的卫生学指标(GB 7959—1987)^[22]。在降温期各处理的温度差异不显著。由以上结果可以看出,高温期持续的时间,处理TF1要优于其他两个处理。

2.1.2 通风量对堆体 O₂ 含量的影响

各处理的堆体 O₂ 含量随时间的变化趋势基本一致,堆肥开始时 O₂ 含量先降低,随着堆肥的进行,各处理 O₂ 含量逐渐升高,并维持稳定(图3)。处理TF1和TF4的最低 O₂ 含量出现在第5 d,分别为12.94%和18.72%,随后上升,至稳定时为20%左右。而对照CK最低 O₂ 含量出现在第2 d,为7.1%,随后上升,腐熟期稳定在18%左右。方差分析显示,通风处理较不通风处理变化显著($P<0.05$)。由结果可以看出,处理TF1和TF4均能满足堆肥过程中微生物对氧的需求。

2.1.3 通风量对堆体 pH 与含水率的影响

在升温的过程中木质纤维素等有机物,会产生大量水溶性氮促使堆体升温期各处理的 pH 上升,随后下降(图4)。翻堆处理后,各处理的 pH 均上升;随着

图3 堆肥过程中堆体 O₂ 含量的变化Figure 3 Changes of O₂ content in compost pile during composting

堆肥高温期的持续进行,各处理的 pH 升至 8.4 以上;随后各处理的 pH 均下降,并且通风量越大, pH 下降越快。到堆肥结束后, TF1 和 TF4 处理的 pH 维持在 7.5 左右。统计分析结果表明,通风处理(TF1 和 TF4)的好氧堆肥样品 pH 与静止堆肥(CK)之间的差异显著($P<0.05$)。

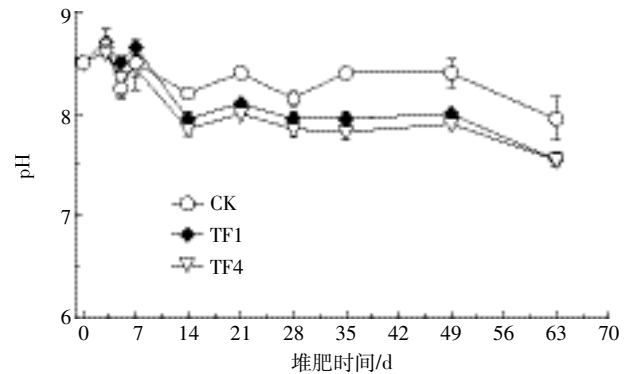


图4 堆肥化过程 pH 的变化

Figure 4 Changes of pH in compost pile during composting

在整个堆肥过程中各处理的含水率均呈下降趋势。堆肥初期各处理堆体的含水率为69.86%,处理TF1和TF4的含水率下降较快,堆肥结束后含水率分别下降至51.75%和47.08%,而CK的含水率下降至54.88%(图5),整个堆肥过程中各处理的含水率分别下降了14.98%、18.11%和22.78%。统计分析结果表明,堆肥结束时,通风处理对堆体含水率的影响差异显著($P<0.05$),通风量的大小与堆体中的含水率呈负相关。

2.2 堆肥过程中氮素形态的转化

2.2.1 铵态氮与硝态氮含量

堆肥水溶性 NH_4^+-N 和 NO_3^--N 含量与堆肥条件及各种微生物活性的相关关系,是堆肥腐熟度评价的

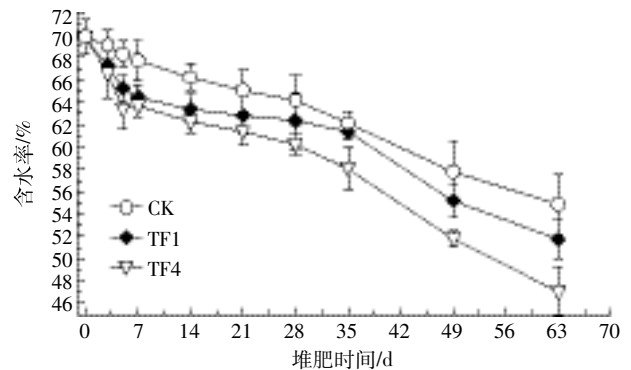


图5 堆肥过程中含水率的变化

Figure 5 Changes of water content in compost pile during composting

重要指标。随着堆体温度的升高,氨化作用增强,大量有机氮被微生物快速转化为 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 并积累,处理 TF1 在第 5 d 可达到最大值 $80.12 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 处理 TF4 和 CK 在第 7 d 分别达到最大值 $39.02 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $38.12 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (图 6)。在堆肥降温期和腐熟期,由于挥发损失与微生物的固化作用, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量逐渐降低,到 63 d 堆肥结束后各处理的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量下降到 $3\sim 4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。根据 Bernal 等^[23]研究的结果,3 种处理在堆肥结束后 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量均低于 $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,达到肥料的腐熟指标。堆肥结束时各处理堆体的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量差异并不显著($P>0.05$)。

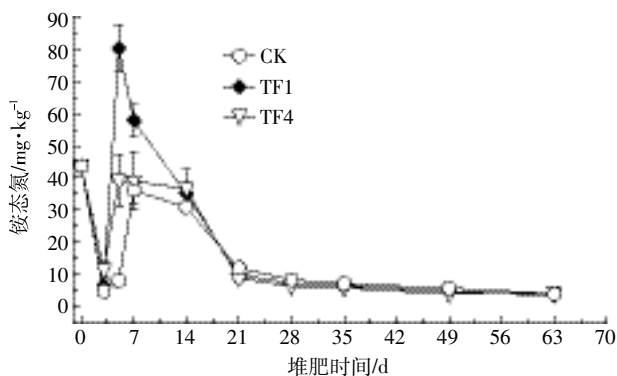


图 6 堆肥过程中铵态氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$)的变化

Figure 6 Changes of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ content in compost pile during composting

堆肥开始时 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量为 $369.45 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,在升温期 and 高温期, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量处于较低水平,在第 14 d,各处理堆体的 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量降至最低,各处理(CK、TF1、TF4)分别为 62.81 、 54.54 、 $61.41 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。在堆肥后期,各处理堆体的 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量逐渐上升,到堆肥结束后,各处理(CK、TF1、TF4)的 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量分别达到 1793.26 、 2649.63 、 $2811.50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。处理 TF1 和处理 TF4 由于氧气的供应较稳定,更有利于 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的生成。统计分析结果表明,堆肥结束后通风处理的 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量与 CK 差异显著($P<0.05$),通风可以有效增加 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量,但是两通风处理间差异不显著。

2.2.2 通风处理对堆体 NH_3 释放速率的影响

堆肥过程中 NH_3 的释放速率随时间的变化如图 8。处理 TF4 和处理 TF1 的 NH_3 释放速率变化趋势一致, NH_3 释放速率均在高温期达到最大值,分别为 3.825 、 $1.02 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}$ 。随着堆肥进行, NH_3 释放速率下降,翻堆后 NH_3 的释放速率有短暂的升高,随后又降低,在堆肥后期, NH_3 释放速率接近于零。处理 CK 在整个堆肥过程中的 NH_3 释放速率低,高温期 NH_3 释放

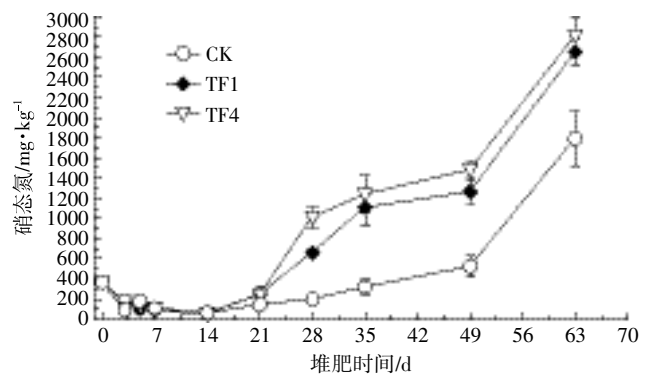


图 7 堆肥过程中硝态氮($\text{NO}_3^-\text{-N}$)的变化

Figure 7 Changes of $\text{NO}_3^-\text{-N}$ content in compost pile during composting

速率最高为 $0.48 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}$ 。

Frederick 等^[24]研究了不同 O_2 补充速率(0 、 0.1 、 1 、 $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$)对堆肥的影响,发现随着 O_2 供量的增加, NH_3 的释放速率增加,与本试验研究的结果一致。 pH 对堆肥过程中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的挥发具有较大影响^[25]。有研究认为,高的 pH 值和堆肥温度会造成 NH_3 的逸出^[26],本研究中处理 CK 的 pH 高于处理 TF4 和处理 TF1,但其 NH_3 的释放速率最低。本研究中通风量对 NH_3 挥发的影响较大,较高的通风量导致 NH_3 的释放速率增大。

2.2.3 总氮含量

总氮含量是衡量堆肥产品肥效的重要指标,合理控制堆肥过程中的通风量,对于减小氮素的损失具有重要作用。由图 9 可知,除了处理 CK 的堆体总氮含量变化趋势为先降低后升高,再次降低的趋势以外,处理 TF1 和 TF4 的堆体总氮含量变化趋势均为先降低后升高。堆肥过程中,由于微生物矿化有机物及 CO_2 的损失,造成干物质含量降低速率高于总氮的损

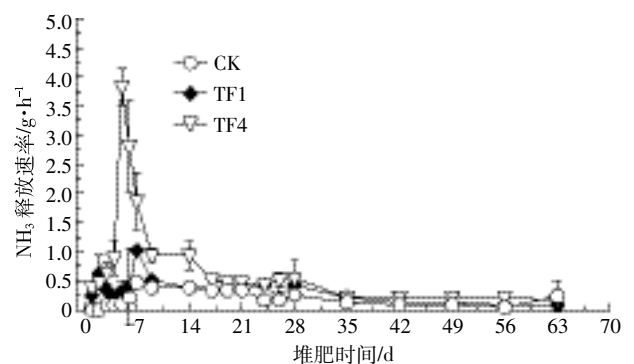


图 8 堆肥过程中 NH_3 释放速率的变化

Figure 8 Changes of NH_3 volatilization rates in compost pile during composting

失速率,总氮含量在堆肥结束后有所增加^[27]。到高温期,处理 TF4 的总氮含量下降幅度最小,由 16.55 g·kg⁻¹ 下降至 16.43 g·kg⁻¹,而处理 TF1 与处理 CK 均由 16.55 g·kg⁻¹ 下降至 15.5 g·kg⁻¹ 左右。随后处理 TF1 和 TF4 总氮含量一直上升,到 63 d 堆肥结束后其总氮含量分别为 19.40、20.29 g·kg⁻¹,而 CK 的总氮含量在第 14 d 达到最高值 18.41 g·kg⁻¹,随后下降,堆肥结束时处理 CK 的总氮含量为 18.04 g·kg⁻¹。由此可以看出,通风处理虽然增加了前期氨气的挥发,但是通风处理的 TN 均较 CK 的高,这可能是由于处理 CK 局部厌氧而导致的反硝化作用所造成的。运用方差分析发现,在堆肥腐熟期,通风处理对 TN 的影响显著,呈正相关($P<0.05$)。

2.2.4 不同堆肥处理氮素的损失

3 种堆肥处理的氮素损失情况如表 1。处理 TF4 的总氮损失最大为 501.14 g,氮损失率也最大为 43.23%;处理 CK 氮损失量与氮损失率最小,分别为 317.80 g 和 27.41%;处理 TF1 较小的通风量使 NH₃

挥发导致的氮损失较小,总氮损失小于处理 TF4。由此可见,总氮损失与通风量大小相关,通风量越大越容易导致氮素损失。统计结果表明,不同通风量对牛粪堆肥过程中总氮的损失有显著的影响($P<0.05$)。

2.3 通风处理对 nirK 基因多样性与数量的影响

堆肥结束时,CK、TF1 和 TF4 中 nirK 基因多样性结果见表 2。通过 NCBI Blast 比对共发现 9 种 OTU, CK、TF1 和 TF4 分别为 9、5、3 个 OTU,样品 CK 的 Simpson、Shannon、Brillouin 和 McIntosh (Dmc)指数分别为 0.856 5、2.927 4、2.687 9、0.680 8,均为所有处理中最大值(表 3),而样品 TF4 的多样性指数均最低。该结果说明 CK 处理堆肥 63 d 样品中的 nirK 基因多样性最高,nirK 基因的多样性随着通风量的增大而减小。由此可知,通风处理可以减少堆肥过程中的反硝化细菌 nirK 基因的多样性。

利用荧光定量 PCR 对各个时期的堆肥样品进行 nirK 基因的定量分析,结果见图 10。在堆肥的降温期,所有处理均达到了最高 nirK 基因拷贝数,分别为 CK 2.56×10⁷ copy·g⁻¹、TF1 1.71×10⁷ copy·g⁻¹ 和 TF4 1.47×10⁷ copy·g⁻¹。nirK 基因最小拷贝数出现在 TF4 高温期

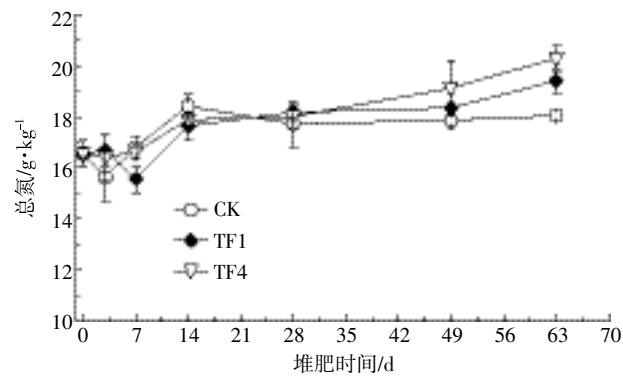


图 9 堆肥过程中总氮(TN)的变化

Figure 9 Changes of TN content in compost pile during composting

表 1 不同通风处理氮素损失情况
Table 1 Lose of nitrogen under different ventilation during composting

处理	初始物料/kg	结束物料/kg	初始总氮/g	结束总氮/g	总氮损失/g	氮损失率/%
CK	70	46.62	1 159.09	841.29	317.80	27.41
TF1	70	41.04	1 159.09	796.38	362.71	31.29
TF4	70	32.43	1 159.09	657.95	501.14	43.23

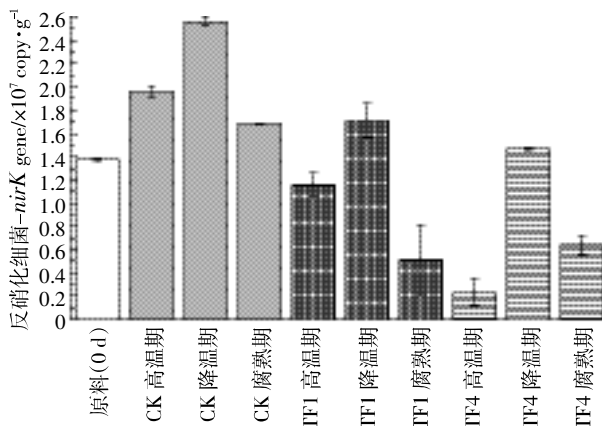
注:氮素损失情况为整个堆体的氮素损失情况。
Note: Nitrogen loss was the one in the whole compost pile.

表 2 堆肥样品(63 d)中反硝化细菌 nirK 基因序列统计结果
Table 2 Statistical results of nirK gene of denitrifying bacteria from different compost samples(on 63rd day)

OTU	近源种(登录号)Nearest Species(Accession Number)	相似率 Similarity rate/%	克隆子数量 Number of clones		
			CK	TF1	TF4
1	<i>Alcaligenes</i> sp.(AB046603)	78	8		
2	Uncultured bacterium clone ISA00543(FJ204479)	84	14		
3	<i>Rhizobium</i> sp.(HM060300)	84	14	27	
4	Uncultured bacterium clone S2T4Fu451(JN122989)	87	8	18	
5	Uncultured denitrifying bacterium(KJ498968)	86	6	22	
6	Uncultured bacterium(HQ162041)	90	4	16	
7	Uncultured bacterium clone KEP26(DQ182206)	99	7		34
8	Uncultured bacterium clone KRF71(DQ182218)	88	4	8	12
9	Uncultured bacterium clone 10S2T0(JN123010)	88	24		42
			89	91	88

表3 堆肥样品(63 d)中 *nirK* 基因多样性指数表Table 3 Diversity index of *nirK* gene of denitrifying bacteria from different compost samples(on 63 day)

样品 Sample	Simpson	Shannon	Brillouin	Mcintosh(Dmc)
CK	0.856 5	2.927 4	2.687 9	0.680 8
TF1	0.784 4	2.227 1	2.092 1	0.588 1
TF4	0.611 3	1.431 4	1.357 8	0.415 3

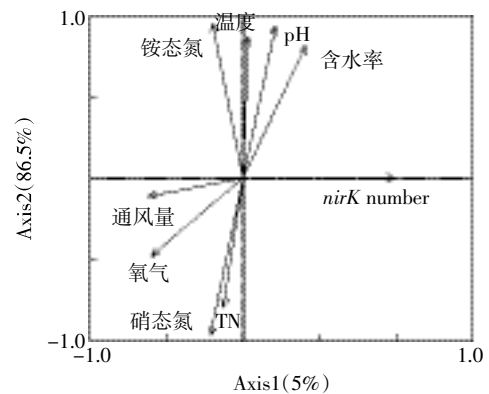
图10 堆肥过程中反硝化细菌 *nirK* 基因数量的变化图Figure 10 Changes of *nirK* gene number of denitrifying bacteria during composting

的样品中,为 $2.32 \times 10^6 \text{ copy} \cdot \text{g}^{-1}$ 。在高温期、降温期和腐熟期,通风处理的样品中 *nirK* 基因显著低于不通风处理的样品,并且在高温期和降温期,堆肥样品中 *nirK* 基因的数量随着通风量的增大而减小。

冗余分析(Redundancy analysis, RDA)是研究特定因素对生物群落造成影响生态学分析工具,其二维排序图表征不同因子对生物群落分布的影响。RDA 二维排序图中,带箭头的矢量线表示环境因子,线段的长短表示种群与该环境因子相关系数的大小,箭头连线与排序轴的夹角表示该因子与排序轴相关性的大小,夹角越小,相关性越大。由堆肥过程中反硝化细菌 *nirK* 基因的数量与环境因子关系的 RDA 二维排序图(图 11)可知,通风量是影响 *nirK* 基因数量的最显著因素,其次是氧气。尽管通风处理中堆肥氧气浓度高,特别是在 TF4 处理中氧气浓度始终在 20%左右,但是在整个堆肥过程中却始终存在 *nirK* 基因,说明高浓度氧气并不能完全抑制反硝化细菌的生长,而仅能抑制其活动,减少 *nirK* 基因拷贝,降低反硝化作用造成的氮素损失。

3 讨论

硝化作用是硝化细菌在有氧条件下,将铵态氮转化为硝态氮的过程。相反,反硝化作用是反硝化细菌

图11 反硝化细菌 *nirK* 基因数量与环境因子关系的 RDA 二维排序图Figure 11 Two-dimensional ordination diagram of RDA of *nirK* gene number and environmental factors

在厌氧条件下,通过酶催化还原反应将氮氧化物 $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 转化成气态氮 (NO 、 N_2O 、 N_2)^[2]。从实验结果可知,在堆肥过程的降温期和腐熟期,不同处理的铵态氮和氨气释放速率变化不显著(图 6 和图 8),硝态氮和总氮含量随着通风量的增加而增高(图 7 和图 9)。在堆肥过程的高温期,铵态氮和氨气释放速率变化剧烈,可能是由于通风量增加,改变堆体内供氧环境所致,引起了堆体微生物活性的变化,并且随着温度升高,微生物剧烈活动而快速消耗有机质产生氨气,通过气体的流动被带走。硝态氮随通风量的增加而增加的结果,说明通风处理抑制了由 NO_3^- 向气态氮 (NO 、 N_2O 、 N_2) 转化的途径。通过荧光定量分析和克隆文库分析(图 10 和表 2)发现, *nirK* 基因数量和多样性随着通风量的增加而减少。冗余分析结果同样得出,通风量显著影响 *nirK* 基因数量,其次是氧气。通风量的增加,改变了堆体内的供氧环境,并通过气体的流动带走更多的水分和挥发性物质,改变了硝态氮和总氮含量。这表明,理化环境的变化引起了堆体微生物活性的变化,影响了反硝化微生物的活性,抑制了反硝化作用,减小反硝化作用所造成的氮素损失。

4 结论

(1)在整个堆肥化过程中,通风处理对 pH、含水率、氧气和氮素损失的影响显著。堆肥结束时 NH_4^+-N 的含量随通风量变化差异不显著,但总氨气释放速率、 NO_3^--N 的含量和总氮含量随着通风量的增大而增加,并且影响显著。

(2)通风处理可以显著降低样品中 *nirK* 基因多样性和数量,减少反硝化作用造成氮素的损失,并且增加总氮和硝态氮含量。

(3)通过合理的通风处理降低反硝化作用,可以为优化堆肥工艺及减少氮素的损失提供理论指导。

参考文献:

- [1] 仇焕广, 廖绍攀, 井月, 等. 我国禽畜粪便污染的区域差异与发展趋势分析[J]. 环境科学, 2013, 34(7): 2766–2774.
QIU Huan-guang, LIAO Shao-pan, JING Yue, et al. Regional differences and development tendency of livestock manure pollution in China [J]. *Environmental Science*, 2013, 34(7): 2766–2774.
- [2] Maeda K, Hanajima D, Toyoda S, et al. Microbiology of nitrogen cycle in animal manure compost[J]. *Microbial Biotechnology*, 2011, 4(6): 700–709.
- [3] 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.
- [4] Rosch C, Mergel A, Bothe H. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(8): 3818–3829.
- [5] Smith J M, Ogram A. Genetic and functional variation in denitrifier populations along a short-term restoration chronosequence[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(18): 5615–5620.
- [6] Wertz S, Goyer C, Zebbarth B J, et al. Effects of temperatures near the freezing point on N_2O emissions, denitrification and on the abundance and structure of nitrifying and denitrifying soil communities[J]. *FEMS Microbiology and Ecology*, 2013, 83(1): 242–254.
- [7] Hartmann A A, Barnard R L, Marhan S, et al. Effects of drought and N-fertilization on N cycling in two grassland soils[J]. *Oecologia*, 2013, 171(3): 705–717.
- [8] Jung J, Yeom J, Han J, et al. Seasonal changes in nitrogen-cycle gene abundances and in bacterial communities in acidic forest soils[J]. *Journal of Microbiology*, 2012, 50(3): 365–373.
- [9] Steven A W, Paul N N, John D A, et al. Bacterial community structure and denitrifier (*nir*-gene) abundance in soil water and groundwater beneath agricultural land[J]. *Soil Research*, 2011, 49(1): 65–76.
- [10] Huang S, Chen C, Wu Q, et al. Distribution of typical denitrifying functional genes and diversity of the *nirS*-encoding bacterial community related to environmental characteristics of river sediments[J]. *Biogeosciences Discussions*, 2011, 8(3): 5251–5280.
- [11] Robertson G P, Paul E A, Harwood R R. Greenhouse gases in intensive agriculture: Contributions of individual gases to the radiative forcing of the atmosphere[J]. *Science*, 2000, 289(5486): 1922–1925.
- [12] 吴伟祥, 李丽劫, 吕豪豪, 等. 畜禽粪便好氧堆肥过程氧化亚氮排放机制[J]. 应用生态学报, 2012, 23(6): 1704–1712.
WU Wei-xiang, LI Li-jie, LÜ Hao-hao, et al. Mechanisms of nitrous oxide emission during livestock manure aerobic composting[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2012, 23(6): 1704–1712.
- [13] Sommer S G, Møller H B. Emission of greenhouse gases during composting of deep litter from pig production effect of straw content[J]. *Journal of Agricultural Science*, 2000, 134(3): 327–335.
- [14] Osada T, Kuroda K, Yonaga M. Determination of nitrous oxide, methane, and ammonia emissions from a swine waste composting process[J]. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, 2000, 2(1): 51–56.
- [15] 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, 32(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]. *Environmental Science*, 2011, 32(10): 3067–3072.
- [16] 杨恋, 杨朝晖, 曾光明, 等. 好氧堆肥高温期的嗜热真菌和嗜热放线菌群落结构[J]. 环境科学学报, 2008, 28(12): 2514–2521.
YANG Lian, YANG Zhao-hui, ZENG Guang-ming, et al. Succession of the thermophilic fungi and actinomycetes communities during the thermophilic period of aerobic composting[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2008, 28(12): 2514–2521.
- [17] Hallin S, Lindgren P E. PCR detection of genes encoding nitrile reductase in denitrifying bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(4): 1652–1657.
- [18] Wei D, Yang Q, Zhang J Z, et al. Bacterial community structure and diversity in a black soil as affected by long-term fertilization[J]. *Pedosphere*, 2008, 18(5): 582–592.
- [19] Atlas R M, Bartha R. Microbial ecology: Fundamentals and applications[M]. Massachusetts: Addison Wesley Publishing Reading, 1981.
- [20] 魏源送, 李承强, 樊耀波, 等. 不同通风方式对污泥堆肥的影响[J]. 环境科学, 2001, 22(3): 54–59.
WEI Yuan-song, LI Cheng-qiang, FAN Yao-bo, et al. Effect on sewage sludge composting with different aeration modes[J]. *Environmental Science*, 2001, 22(3): 54–59.
- [21] 徐红, 樊耀波, 贾智萍, 等. 时间温度联合控制的强制通风污泥堆肥技术[J]. 环境科学, 2000, 21(6): 51–55.
Xu H, Fan Y B, Jia Z P, et al. Forced aeration composting of sewage sludge controlled by time and temperature controller[J]. *Environmental Science*, 2000, 21(6): 51–55.
- [22] Yu H, Zeng G, Huang H, et al. Microbial community succession and lignocellulose degradation during agricultural waste composting[J]. *Biodegradation*, 2007, 18(6): 793–802.
- [23] Bernal M P, Paredes C, Sánchez-Monedero M A, et al. Maturity and stability parameters of composts prepared with a wide range of organic wastes[J]. *Bioresource Technology*, 1998, 63(1): 91–99.
- [24] Frederick C, Michel Jr, C A Reddy. Effect of oxygenation level on yard trimmings composting rate, odor production and compost quality in bench-scale reactors[J]. *Compost Science and Utilization*, 1998, 6(4): 6–14.
- [25] 刘宁, 赵义武, 史春梅. 覆盖、翻堆对堆肥过程中 N_2O 、 NH_3 排放规律的研究[J]. 环境卫生工程, 2013, 21(1): 53–57.
LIU Ning, ZHAO Yi-wu, SHI Chun-mei. Effects of covering and turning on emission regularity of N_2O and NH_3 during composting process [J]. *Environmental Sanitation Engineering*, 2013, 21(1): 53–57.
- [26] 杨延梅, 刘鸿亮, 杨志峰, 等. 控制堆肥过程中氮素损失的途径和方法综述[J]. 北京师范大学学报(自然科学版), 2004, 41(2): 213–216.
YANG Yan-mei, LIU Hong-liang, YANG Zhi-feng, et al. Methods and techniques in the control of nitrogen loss during the composting: A review[J]. *Journal of Beijing Normal University (Natural Science)*, 2004, 41(2): 213–216.
- [27] Fang M, Wong J W C, Ma K K, et al. Co-composting of sewage sludge and coal fly ash: Nutrient transformations[J]. *Bioresource Technology*, 1999, 67(1): 19–24.