张文浩,门梦琪,许本妹,等.牛粪稻秸新型静态堆肥中真菌群落组成的动态特征[J]. 农业环境科学学报, 2018, 37(9): 2029-2036. ZHANG Wen-hao, MEN Meng-qi, XU Ben-shu, et al. Dynamic characteristics of the composition of the fungal community in a novel static composting system of dairy manure and rice straw[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2018, 37(9): 2029-2036.

牛粪稻秸新型静态堆肥中真菌群落组成的动态特征

张文浩,门梦琪,许本妹,许修宏*,成利军,孟庆欣,邓利廷,姜 欣,武晓桐,盛思远 (东北农业大学资源与环境学院,哈尔滨 150030)

摘 要:为克服传统静态堆肥的缺点,本研究设计了一种新型堆肥装置并进行了牛粪和秸秆静态堆肥试验。利用高通量测序技术研究堆肥中真菌群落组成的动态变化,并探讨真菌群落组成与理化指标以及种子发芽指数(GI)之间的相关关系。通过对堆肥过程中温度、pH、碳氮比(C/N)和种子发芽指数等指标进行分析判断,堆肥进行第17d后达到腐熟。高通量测序结果显示,真菌群落结构在堆肥的不同时期发生了显著变化,堆肥初始期和升温期节担菌属(Wallemia)和毛孢子属(Trichosporon)占优势,高温期时嗜热链球菌属(Mycothermus)成为优势类群,鬼伞属(Coprinus)和未分类的子囊菌门(Unclassified Ascomycota)在腐熟期时相对丰度较大。Spearman相关性分析表明,节担菌属(Wallemia)、散孢霉属(Scedosporium)和毛孢子属(Trichosporon)与含水率、全碳、碳氮比和铵态氮之间呈显著正相关,与全氮、硝态氮和种子发芽指数呈显著负相关;相反,鬼伞属(Coprinus)和钡色霉属(Mycothermus)和拟鬼伞属(Coprinopsis)与温度呈极显著正相关。本研究对堆肥微生物群落的深化理解及完善堆肥工艺具有一定的理论和实践意义。 关键词:牛粪;静态堆肥;种子发芽指数;高通量测序;真菌群落

中图分类号:X71 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2018)09-2029-08 doi:10.11654/jaes.2017-1579

Dynamic characteristics of the composition of the fungal community in a novel static composting system of dairy manure and rice straw

ZHANG Wen-hao, MEN Meng-qi, XU Ben-shu, XU Xiu-hong^{*}, CHENG Li-jun, MENG Qing-xin, DENG Li-ting, JIANG Xin, WU Xiaotong, SHENG Si-yuan

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

Abstract: In this study, a novel static composting system was designed to deal with the disadvantages of traditional composting, in which dairy manure and rice straw were mixed to prepare the compost. A high-throughput sequencing technique was used to investigate the dynamic changes in the composition of the fungal community during composting. In addition, correlations between the composition of the fungal community during composting. In addition, correlations between the composition of the fungal community and the physicochemical and germination index(GI) indices were explored. Analyses of temperature, pH, C:N ratio and GI during composting indicated that the compost reached maturity after 17 days of composting. The results of high-throughput sequencing showed that the fungal community structure and composition varied significantly at the different stages of the composting process. *Wallemia* and *Trichosporon* were dominant in the initial and mesophilic samples, and the genus *Mycothermus* was predominant in the thermophilic stage. *Coprinus* and Unclassified Ascomycota were most abundant in the maturation stage. Analysis of Spearman correlation coefficients showed that the relative abundances of *Wallemia, Scedosporium*, and *Trichosporon* were positively correlated with the moisture content, TOC, C:N ratio, and NH⁴₄-N(P<0.05), but negatively correlated with TN, NO⁵₃-N, and GI(P<0.05) and negatively correlated with the moisture content, the moisture content, TN, NO⁵₄-N, and GI(P<0.05) and negatively correlated with the moisture content.

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

收稿日期:2017-11-16 录用日期:2018-03-12

作者简介:张文浩(1992—),男,黑龙江牡丹江人,硕士研究生,研究方向为生物质资源化利用。E-mail:631895479@qq.com

基金项目:国家自然科学基金项目(31372351,31672469)

Project supported : The National Natural Science Foundation of China (31372351, 31672469)

tent, TOC, C:N ratio, and NH⁺₄-N(P<0.05). The populations of *Mycothermus* and *Coprinopsis were* positively correlated with the temperature (P<0.001). This study may contribute to a better understanding of the microbial community in composting and lead to the improvement of composting technology.

Keywords: cow manure; novel static composting system; germination index (GI); high-throughput sequencing; fungal community

静态堆肥由于不需要扰动堆体结构,不仅可以减 少机械能(翻堆、通风等)的消耗,还可以减少以铵态 氮为主的含氮化合物的挥发,提高堆肥肥效¹¹。但是, 由于自然状态下静态堆肥的堆体中温度和氧气分布 不均一,堆肥过程中会出现堆体表面温度低、堆体深 层厌氧的现象,导致表层和深层堆肥效果不佳。本研 究针对这一现象,设计了一种静态发酵装置(如图1 所示),通过人为地提高环境温度,同时降低堆体的厚 度,旨在保持静态堆肥固有优点的同时,克服其"堆体 表面温度低、堆体深层厌氧"等技术缺陷。

堆肥实质上是一个微生物演替过程,其微生物类 群和丰度决定了堆肥的质量^[2]。细菌在堆肥过程中种 类繁多,数量庞大,相关报道较多^[3]。真菌作为堆肥微 生物群落的重要组成部分,在堆肥过程中也起着重要 的作用^[4]。但是,目前国内外对堆肥过程中真菌群落 变化规律的研究报道还比较少^[5]。

近年来,研究者采用T-RFLP^[6]、PCR-DGGE^[7-10]、 16S rRNA 克隆文库^[11]等方法分析了堆肥过程中微生 物群落结构的变化,但是这些分子生物学方法分辨率 较低,不能全面和准确地反映堆肥微生物群落结构。 高通量测序技术的出现,可以使人们更准确地描述微 生物群落的动态变化及多样性、研究高度复杂的微生 物类群^[12]。

本研究采用一种新型的静态堆肥技术处理奶牛 粪污,通过测定堆肥过程中温度、pH、碳氮比和种子 发芽指数(GI)等指标评价堆肥产品的腐熟程度。利 用高通量测序技术分析堆肥过程中真菌的群落结 构,揭示新型静态堆肥过程中真菌群落组成的动态 变化,并探讨群落组成与堆肥理化指标及GI指标之 间的相关关系。

1 材料与方法

1.1 试验装置

本试验装置的截面如图1所示。装置由两个拼 接在一起的由铁丝网编织成的同轴圆筒组成,距离地 面高20 cm。其内筒直径60 cm,外筒直径180 cm,高 为160 cm。堆肥原料填充在两个圆筒的夹层中间(堆



图1 堆肥装置的横截面 Figure 1 Cross section of the composting system

肥物料厚度为60 cm),形成一个中空的圆柱体(可以 容纳3.62 m³堆肥原料),这样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℃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

堆肥的原料为充分混匀的新鲜牛粪与切碎至长 度为3 cm 左右的水稻秸秆(表1),其初始碳氮比为 35:1。堆肥持续17 d。分别在第0、2、4、6、8、10、12、 14 d和17 d时进行取样。取样时,分别从堆体的三个 不同层(分别为:距离堆体底部15 cm—A5和A6点; 距离堆体底部 80 cm—A3和A4点;距离堆体底部 145 cm—A1和A2点),以及每一层的两个不同深度 (外层:距离堆体外表面10 cm—A1、A3和A5点;中 心:距离堆体外表面30 cm—A2、A4和A6点)进行取 样(图1),每个取样点三次重复,所有点的样品充分 混匀后,为这个时期的样品。另外,第0 d(初始期)、 第2 d(升温期)、第6 d(高温期)、第12 d(高温期后 期)和第17 d(腐熟期)不同层及不同深度的混合后样 品置于-80℃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。

表1 堆肥材料的主要成分

Table 1	Properties	of raw	materials	for	composting
rante r	1 IODUILIUS	01 100	matoriais	101	composing

堆肥材料	含水率/%	TOC/%	TN/%	C/N
牛粪	48.26±1.34	33.68±0.96	1.89±0.16	17.82±0.82
秸秆	11.93±0.45	43.52±1.07	0.88±0.09	49.45±3.17

1.3 堆肥理化以及 GI 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 cm和145 cm)的6个不同位置,每日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 堆体外表面30 cm)的不同层温度的平均值,同时记录 上、中、下三层的环境温度。含水率的测定采用恒重 法,将混匀后的堆肥样品在105℃下烘干至恒质量, 然后进行计算,得出含水率数值。pH的测定是将堆 肥样品按1:10(质量浓度)比例加入去离子水,振荡 过滤后的滤液用数字pH仪测定。全碳和全氮分别采 用重铬酸钾容量法和凯氏定氮法[13]测定,两者的比值 即为碳氮比(C/N)。水溶性铵态氮和硝态氮的测定是 将堆肥样品以2 mol·L⁻¹氯化钾溶液浸提,采用连续流 动分析仪(SAN⁺⁺ SYSTEM,荷兰)测定其含量。种子 发芽指数使用独行菜(Lepidium sativum L.)种子[14]测 定。方法为将堆肥样品按1:7.5(质量浓度)比例加入 去离子水,取5mL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℃黑暗条件 下培养48h。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,每个样品均进行三次重复测定。

1.4 真菌 ITS 基因测序

使用 OMEGA 的 Soil DNA Isolation Kit (Omega Bio-Tek, Inc., GA, USA)提取堆肥样品总DNA,利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组 DNA。然后 进行堆肥真菌总 DNA-ITS 序列的 PCR 检测。ITS 序 列引物[15]为ITS1F: 5' - CTTGGTCATTTAGAGGAAG-TAA-3'; ITS2R:5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3' o 扩增条件为:95 ℃预变性3 min,接着进行35个循 环,包括95℃变性30s,55℃退火30s,72℃延伸45 s,循环结束后72℃最终延伸10 min。PCR产物用2% 琼脂糖凝胶电泳检测。高通量测序在上海美吉生 物医药科技有限公司的Illumina Miseq PE300平台进 行。原始数据提交至 NCBI 数据库, 登录号为: SRP121517.

1.5 生物信息处理

利用 Mothur(V.1.36.1) 对原始 DNA 序列进行过 滤处理,去除嵌合体,得到优化序列;按照97%相似 性将优化序列划分可操作分类单元(OTU, Operational Taxonomic Units);基于OTU进行稀释性曲线分析, 并计算Chao1丰富度指数,覆盖度(Coverage)和Shannon多样性指数等。利用主成分分析(PCA)分析各样 间 OTU 相似性。对比 Unite(Release 6.0 http://unite. ut.ee/index.php)的真菌数据库,采用RDP分类器(Version 2.2 https://rdp.cme.msu.edu/)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相关性矩阵研究堆肥样品的理化及GI指标与真 菌群落的关系。

1.6 统计分析

采用 Microsoft Excel 2016 软件对数据进行处理 和分析。用 SPSS 22.0 软件的单因素方差分析(ANO-VA)进行差异显著性检验(Tukey HSD法),差异显著 性水平为0.05。

结果与讨论 2

2.1 堆肥过程中理化及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[16]。图2表示堆肥过程中温度的变化,从图中可 以看出,外层和中心温度在堆肥开始后均迅速升高, 在第3d分别达到55.8℃和59.8℃;然后温度保持上 升趋势并都在第6d达到最高温度,分别为56.9℃和 61.9 ℃。外层和中心的温度从第3d直到第12d均保 持在55℃以上,在第12d后,温度呈缓慢降低趋势。 堆肥过程中温度的变化表明了三个阶段:(1)升温期 (第0~2 d);(2) 高温期(第3~12 d,>55 ℃);(3) 降温 及腐熟期(第13~17d)。根据国家粪便无害化卫生标 准(GB 7959—1987)规定,堆肥过程的温度必须达 50~55 ℃,并持续5~7 d。本研究中,外层和中心温度

连续9d保持在55℃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。

堆肥过程中除温度外的其他指标如表2所示。随着堆肥的进程,pH保持下降的变化趋势,与堆肥初始阶段的8.77相比,堆肥结束后,pH显著下降至8.32 (P<0.05),主要由于堆肥中的微生物的代谢作用造成有机酸的大量积累^[17]。有报道称,腐熟堆肥的pH范围在7.0~8.5^[18]。本实验最终堆肥产物的pH在此范围内,故其pH符合腐熟堆肥的标准;堆肥过程中含水率保持降低的趋势,堆料水分由最初的72.0%显著降低至51.0%(P<0.05),但是一般腐熟的堆肥产品含水量为40%左右^[19-20]。这是由于本研究使用新型静态好氧堆肥,在堆肥过程中无需进行翻堆,水分损失较少,因此最终堆肥产物含水率相对略高。

随着堆肥的进程,铵态氮含量变化呈现先升后降 的趋势。在第0~2 d,铵态氮含量从864.8 mg·kg⁻¹显 著上升至932.2 mg·kg⁻¹(*P*<0.05),从第4 d开始,铵态

农业环境科学学报 第37卷第9期

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⁻¹。这是由于在堆肥前期,微 生物氨化作用及矿化作用加速了氮素的分解,所以铵 态氮含量不断上升。而堆肥后期由于硝化作用,部分 铵态氮转化为硝态氮,加之氨气挥发和转化导致铵态 氮含量的下降^[21]。堆肥过程中硝态氮含量呈上升的 趋势,由初始阶段55.8 mg·kg⁻¹的硝态氮含量呈上升的 趋势,由初始阶段55.8 mg·kg⁻¹的硝态氮含量显著上 升至堆肥结束后的95.5 mg·kg⁻¹(P<0.05)。可能是由 于过高的温度抑制了硝化微生物的活性^[22-23],使硝态 氮生成和积累的速度缓慢。

碳氮比(C/N)是评价堆肥腐熟的重要指标^[21],并 且可以影响堆肥过程中微生物群落的组成^[24]。本研 究中初始C/N为35.0,堆肥结束时显著降低至20.0(*P* <0.05),依据Xiao等^[25]提出的堆肥腐熟度C/N标准,此 堆肥产物达到腐熟堆肥的碳氮比的标准。种子发芽 指数(GI)是指示堆肥腐熟程度的直接指标^[21]。一般 认为,GI达到80.0%意味着植物毒性的丧失和堆肥的



图2 堆肥过程中温度的变化

Figure 2 Changes of temperature during composting process

表2	堆肥过程中	中理化及	GI指标	的变化
----	-------	------	-------------	-----

Table 2 Changes of physicochemical and GI indices during composting process

时间/d	pH	含水率/%	$\mathrm{NH}_{4}^{+}-\mathrm{N/mg}\cdot\mathrm{kg}^{-1}$	$NO_3^N/mg \cdot kg^{-1}$	C/N	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	$881.0{\pm}8.5{\rm b}$	62.6±1.0e	$28.9 \pm 1.2 \mathrm{b}$	$50.74 \pm 1.78 e$
6	8.67±0.05ab	$67.0\pm0.7\mathrm{b}$	774.1±2.4c	71.9±1.3d	25.7±0.8c	$54.68 \pm 2.05 e$
8	8.62±0.09ab	63.4±2.2c	$658.1 \pm 5.6 \mathrm{d}$	81.3±0.5c	24.5±1.1cd	$77.14{\pm}2.44\mathrm{d}$
10	$8.59{\pm}0.02{\rm abc}$	$59.0{\pm}1.0{\rm d}$	553.0±15.3e	85.1±1.4bc	23.5 ± 0.6 cd	85.85±1.22c
12	$8.48 \pm 0.01 \text{bcd}$	55.0±0.6e	466.2±4.5f	88.7±1.5b	$23.1{\pm}0.9{\rm cde}$	$89.04{\pm}1.93{\rm bc}$
14	8.42 ± 0.06 cd	$52.0{\pm}1.0{\rm ef}$	$388.4\pm4.8g$	89.7±0.6b	$21.7{\pm}1.0{\rm de}$	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:同列数字后字母不同者差异显著(P<0.05)。

Note: Different small letters within the same column denote significant differences (P < 0.05).

腐熟^[21.26]。本实验中GI从37.63%显著上升至 97.70%(P<0.05),表明最终堆肥产物已经丧失植物毒性,并符合腐熟堆肥的GI标准。

根据堆肥过程中温度、pH、碳氮比(C/N)和种子 发芽指数(GI)等指标综合推断,本实验中采用的新型 静态堆肥技术处理牛粪+稻草秸秆,在堆肥17d可以 使牛粪堆肥达到腐熟。该技术采用中空网状的圆柱 体装载堆肥物料,可以保证空气从内外两个表面进 入堆体,在控制堆体厚度的前提下(60 cm),保证了 堆体中氧气的供应。同时通过提高环境温度,避免 了堆体表面低温层的出现。这样,就保证了整个堆体 处于高温和好氧的状态,可以加速堆肥的进程。另 外,每个堆体(空心圆柱体)的容积为3.62 m³,在实际 生产中可以通过增加堆体的数量来增加该技术的处 理能力。因此,该技术在生产实践中具有一定的使用 价值。

2.2 静态堆肥过程中真菌群落的丰富度及多样性

表3为5个堆肥样品中的优化序列、OTU数量及 覆盖率。5个堆肥样品的高通量测序共获得191499 条高质量序列。其中,C0、C2、C6、C12和C17样品高质 量序列分别有35854、40426、39689、41227条和 34303条。以97%相似度划分,共得到301个OTUs。其 中,C2样品的OTU数量最高(216),其次为C0(168), C12(126)和C6(120),C17(44)最低。以上数据表明随 着堆肥的进程,检测到OTU的数量呈先增加后减少的 趋势。各样品文库的覆盖率(Coverage)均超过99.9%, 说明堆肥样品中基因序列被检出的概率很高,本次测 序结果能够代表堆肥中真菌群落的真实情况。

表3 堆肥样品中真菌丰富度与多样性 Table 3 Fungal richness and diversity in composting samples

	0		1 0 1
样品	序列 Reads	OTUs	覆盖率(Coverage)
CO	35 854	168	0.999 3
C2	40 426	216	0.999 9
C6	39 689	120	0.999 2
C12	41 227	121	0.999 8
C17	34 303	44	0.999 5
总数	191 499	301	

根据5个堆肥样品中OTU的组成进行样本聚类分析(图3),堆肥初始样本(C0)与升温期样本(C2)之间的距离最近,表明两者OTU组成相近;高温期样本(C6)与高温期末期样本(C12)的OTU组成也相近,差异性略大于C0与C2;C0、C2与C6、C12样本间差异较



图3 不同堆肥时期样品中真菌群落组成的聚类图



大,但差异性远小于堆肥腐熟期样本(C17)与其他四 个样本。结果表明堆肥初始样本(C0)与升温期样本 (C2)OTU水平相似,腐熟期样本(C17)与其他样本真 菌菌群的相似性较低。

2.3 静态堆肥过程中真菌群落组成的动态变化

本研究共获得4门17纲43目72科118属。在门 分类水平上属于4个类群(图4A),主要包括:子囊菌 门(Ascomvcota)、担子菌门(Basidiomvcota)、接合菌门 (Zygomycota)和未分类真菌界(Unclassified Fungi)。 其中,子囊菌门在所有样本中的相对丰度为6.25%~ 90.83%。从堆肥的初始阶段(C0)至升温期(C2),子 囊菌门的相对丰度由 6.25% 增加至 47.42%, 成为最优 势类群:在高温期时(C6)达到最高(90.83%),并且随 着堆肥进程的推进,其相对丰度一直保持在75.00% 以上。随着堆肥进程,子囊菌门逐渐成为最优势类群, 其主要原因是子囊真菌能够分泌多种纤维素、半纤维 素降解酶,能高效地利用堆肥中的营养元素[27-28]。担 子菌门的相对丰度变化与子囊菌门相反,其在堆肥 初始阶段(CO)相对丰度最高(83.13%),当堆肥进程 达到高温期(C6)时,下降至7.97%。从高温期末期 (C12)开始,其相对丰度有所上升并保持在22.00%方 右。此结果表明,担子菌门真菌受温度影响较大,随 着堆体温度升高,担子菌门相对丰度下降。接合菌门 仅在升温期(C2)和高温期末期(C12)被检测到,其相 对丰度分别为0.06%和0.04%。

在属分类水平上(图4B),优势类群主要包括(至 少在一个样品中相对丰度>1.0%):嗜热链球菌属 (Mycothermus)、未分类的子囊菌门(Unclassified Ascomycota)、节担菌属(Wallemia)、毛孢子属(Trichosporon)、鬼伞属(Coprinus)、未分类的真菌(Unclassified Fungi)、拟鬼伞属(Coprinopsis)、团丝核属(Myriococcum)、散孢霉属(Scedosporium)、曲霉属(Aspergillus)、

2033



Figure 4 Dynamic changes of community composition of fungi during composting process at the level of phylum(A) and genus(B)

Remersonia(粪壳菌纲中地位未定的属)、毁丝霉属 (Myceliophthora)、未分类的角担菌科(Unclassified Ceratobasidiaceae)、枝顶孢属(Acremonium)和未分类 的毛球壳科(Unclassified Lasiosphaeriaceae)。其中, 嗜热链球菌属的相对丰度在堆肥进程的前期随温度 的升高而增加,在高温期达到了83.15%,随后其相对 丰度逐渐降低,腐熟期时仅占2.39%。嗜热链球菌属 是一种嗜热真菌,能产生具有热稳定性的木质纤维素 酶^[29]。它耐热的特性使其在堆肥的高温期占据绝对 优势,并起着降解木质纤维素的作用。节担菌属是一 种广泛存在于农业环境中的半知菌,可能导致人类患 病^[30]。毛孢子属也被认为是人类致病真菌^[3]。在堆肥 的初始样品(C0)中,节担菌属与毛孢子属的相对丰 农业环境科学学报 第37卷第9期

度分别占57.41%和22.29%;升温期(C2)时,节担菌 属下降至16.08%,毛孢子属几乎没有变化;当堆肥进 程进行到高温期(C6),节担菌属和毛孢子属仅分别 含有 0.17%、0.63%;在堆肥进程结束时,这两个属几 乎检测不到。鬼伞属在堆肥的高温期(C6)开始出 现,相对丰度仅为0.62%,到高温期末期(C12)急剧增 加至12.39%,随后在腐熟期(C17)达到19.50%。 Klamer 和 Bååth 在马粪与稻草堆肥的后期发现了鬼伞 的子实体^[31]。Novinscak 等也报道称在堆肥的中后期 发现了鬼伞属^[5]。根据本研究结果与这些报道推测, 堆肥后期物料的养分、pH和水分等理化参数适合鬼 伞属的生长。未分类的子囊菌门在腐熟期相对丰度 较大,说明其在堆肥进程的后期发挥着重要作用。未 分类的真菌在堆肥进程的各个时期均有分布,表明堆 肥中的营养成分、含水率、pH等条件适宜其生长,并 且其对于堆肥腐熟起到至关重要的作用。综上所述, 节担菌属和毛孢子属在堆肥的初期占据优势,当堆肥 进程到达高温期时,嗜热链球菌属成为最优势类群, 随着温度的降低,鬼伞属和未分类的子囊菌门成为腐 孰期优势类群。

2.4 堆肥过程中真菌群落组成与理化及 GI 指标的相关关系探讨

15个优势属(至少在一个样品中相对丰度> 1.0%)与理化及GI指标之间的Spearman相关性热图 如图5所示。结果表明节担菌属、未分类的真菌和毛 孢子属与含水率、全碳(TOC)、C/N 和铵态氮之间呈显 著正相关(P<0.05),但与全氮(TN)、硝态氮和种子发 芽指数(GI)呈显著负相关(P<0.05)。鬼伞属和未分 类的子囊菌门与这3个属相反,它们与全氮、硝态氮 和种子发芽指数呈显著正相关,与含水率、全碳、C/N 和铵态氮呈显著负相关。节担菌属和毛孢子属同属 于担子菌门中的伞菌亚门,它们与理化指标以及GI 指标之间的相关性一致。鬼伞属属于担子菌门中的 盘菌亚门,与各指标的相关性却与节担菌属和毛孢子 属相反。此结果表明相同门水平中的真菌对于各指 标的响应可能相反。嗜热链球菌属与温度呈极显著 正相关(P<0.001),这与本文中相对丰度部分研究结 果一致。

研究表明,特殊类群的微生物可以作为堆肥腐熟 度的生物标记。Tortosa 等^[32]依据堆肥过程中细菌属 的相对丰度变化及其与理化参数之间的相关性,发现 了两个细菌属可作为堆肥达到腐熟的生物标记。但 是,作为堆肥达到腐熟标准的真菌生物标记却鲜有报



图5 堆肥中真菌群落组成与理化及GI指标的相关性热图

Figure 5 Correlation heatmap between community composition of fungi and physicochemical and GI indices in composting

道。本研究中,鬼伞属的相对丰度在堆肥过程结束时 达到了19.50%,成为优势类群。其他学者研究表明, 该属也在堆肥的腐熟期出现频率较高^[5,31]。此外, 根据 Spearman 相关系数得到,鬼伞属与多数理化及 GI 指标的相关性较大(*R*²>0.80)。综上,推测鬼伞属 可能作为堆肥达到腐熟期的真菌生物标记。但是,仍 需通过进一步研究加以证实。

3 结论

(1)堆肥进程结束后,物料性质满足腐熟堆肥的 各项指标。堆肥过程中理化及GI指标表明,新型静态 堆肥技术下,堆肥达到腐熟的时间缩短至17 d左右。

(2)真菌群落结构分析表明堆肥过程中真菌群落 变化明显,节担菌属和毛孢子属在堆肥的初始期和升 温期占优势,嗜热链球菌属为堆肥高温期的优势类 群,鬼伞属和未分类的子囊菌门在腐熟期时相对丰度 较大。 (3) Spearman 相关性分析表明,鬼伞属与全氮、 硝态氮和种子发芽指数呈显著正相关(P<0.05),与含 水率、全碳、碳氮比和铵态氮呈显著负相关(P<0.05), 其与多数理化及GI指标的相关性较大(R²>0.80)。

参考文献:

- Szanto G L, Hamelers H V, Rulkens W H, 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] Hss S, Lyons G, Chambers J. Comparison of the changes in mushroom (Agaricus bisporus) compost during windrow and bunker stages of phase I and II[J]. Annals of Applied Biology, 2015, 136(1):59-68.
- [3] Bonito G, Isikhuemhen O S, Vilgalys R. Identification of fungi associated with municipal compost using DNA-based techniques[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(3):1021-1027.
- [4] Adrian L, Urooj Z, Alan H, et al. Fungal succession in an in-vessel composting system characterized using 454 pyrosequencing[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2014, 88(2):296-308.
- [5] Novinscak A, Decoste N J, Surette C, et al. Characterization of bacterial

农业环境科学学报 第37卷第9期

and fungal communities in composted biosolids over a 2 year period using denaturing gradient gel electrophoresis[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2009, 55(4):375–387.

- [6] Tiquia S M. Using Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) analysis to assess microbial community structure in compost systems[M]//Bioremediation: Humana Press, 2010:89-102.
- [7] Wang S L, Liu Y Q, Liu Y, et al. PCR-DGGE analysis of the bacterial community in composting of agriculture and forestry wastes with different microbial agents[J]. Advanced Materials Research, 2014, 1010– 1012(4):966–972.
- [8] Shemekite F, Frankewhittle I H, Praehauser B, et al. Coffee husk composting: An investigation of the process using molecular and non-molecular tools[J]. Waste Management, 2014, 34(3):642-652.
- [9] Asano R, Otawa K, Ozutsumi Y, et al. Development and analysis of microbial characteristics of an acidulocomposting system for the treatment of garbage and cattle manure[J]. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, 2010, 110(4):419-425.
- [10] Knerr A, Tripepi R R. Changes in bacterial communities in dairy manure during nine months of composting as determined by denaturing gradient gel electrophoresis[J]. International Environmental Agreements Politics Law & Economics, 2012, 12(4):327-342.
- [11] Lee Y H, Kim S K, Yong H K, et al. Archaeal diversity during composting of pig manure and mushroom cultural waste based on 16S rRNA sequence[J]. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 2010, 53(2):230-236.
- [12] De G V, Eudoxie G, Hickey W J. Prokaryotic successions and diversity in composts as revealed by 454-pyrosequencing[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 133(2):573-580.
- [13] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 三版. 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.

- [14] Zucconi F, Pera A, Forte M, et al. Evaluating toxicity of immature compost[J]. *Biocycle*, 1981, 22(2):54–57.
- [15] Bokulich N A, Mills D A. Improved selection of internal transcribed spacer-specific primers enables quantitative, ultra-high-throughput profiling of fungal communities[J]. *Applied & Environmental Microbiol*ogy, 2013, 79(8):2519-2526.
- [16] Ren G M, Xu X H, Qu J 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.
- [17] López-González J A, Suárez-Estrella F, Vargas-García M C, et al. Dynamics of bacterial microbiota during lignocellulosic waste composting: Studies upon its structure, functionality and biodiversity[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 175:406-416.
- [18] Aulinas M M, Bonmatí B A. Evaluation of composting as a strategy for managing organic wastes from a municipal market in Nicaragua[J].

Bioresource Technology, 2008, 99(11):5120-5124.

- [19] Abdel-Rahman M A, El-Din M N, Refaat B M, et al. Biotechnological application of thermotolerant cellulose-decomposing bacteria in composting of rice straw[J]. Annals of Agricultural Sciences, 2016, 61(1): 135-143.
- [20] Azeem M, Chaudhry A N, Faheem M, et al. Nutrients release pattern during co-composting of poultry litter and different sources of fast food wastes[J]. *International Journal of Biosciences*, 2014, 5:105–115.
- [21] Wang X, Selvam A, Chan M, et al. Nitrogen conservation and acidity control during food wastes composting through struvite formation[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 147(8):17-22.
- [22] Bernal M P, Alburquerque J A, 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.
- [23] Tiquia S M, Tam N F Y. Characterization and composting of poultry litter in forced-aeration piles[J]. *Process Biochemistry*, 2002, 37(8): 869-880.
- [24] Li H, Duan M, Gu J, et al. Effects of bamboo charcoal on antibiotic resistance genes during chicken manure composting[J]. *Ecotoxicology & Environmental Safety*, 2017, 140:1–6.
- [25] Xiao Y, Zeng G M, Yang Z H, et al. Continuous thermophilic composting(CTC) for rapid biodegradation and maturation of organic municipal solid waste[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100 (20) : 4807– 4813.
- [26] Paredes C, Cegarra J, Bernal M P, 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.
- [27] Salar R K, Aneja K R. Thermophilic fungi: Taxonomy and biogeography[J]. Journal of Agricultural Technology, 2007, 3(1):77-107.
- [28] Singh S, Madlala A M, Prior B A. Thermomyces lanuginosus: Properties of strains and their hemicellulases[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2003, 27(1):3-16.
- [29] Natvig D O, Taylor J W, Tsang A, et al. Mycothermus thermophilus gen. et comb. nov. a new home for the itinerant thermophile Scytalidium thermophilum (Torula thermophila) [J]. Mycologia, 2015, 107(2): 319-327.
- [30] Zeng Q Y, Westermark S O, Rasmusonlestander A, et al. Detection and quantification of Wallemia sebi in Aerosols by Real-Time PCR, conventional PCR, and cultivation[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2004, 70(12):7295-7302.
- [31] Klamer M, Bååth E. Microbial community dynamics during composting of straw material studied using phospholipid fatty acid analysis[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1998, 27(1):9–20.
- [32] Tortosa G, Castellano-Hinojosa A, Correa-Galeote D, et al. Evolution of bacterial diversity during two-phase olive mill waste ("alperujo") composting by 16S rRNA gene pyrosequencing[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 224:101-111.