

# 好氧堆肥中 amoA 硝化细菌群落动态变化

徐莹莹,刘玉涛,王俊河,王宇先,杨慧莹,高盼,樊景胜

(黑龙江省农业科学院 齐齐哈尔分院,黑龙江 齐齐哈尔 161006)

**摘要:**为减少堆肥氮素损失,优化堆肥工艺,以牛粪和玉米秸秆为材料进行高温好氧堆肥,采用聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)和产物序列分析法,研究了堆肥不同阶段 amoA 硝化细菌群落结构组成和多样性的动态变化及与堆肥理化因子的相关性。结果表明:经高温期 amoA 硝化细菌类群发生明显演替,降温期检测到前期不存在硝化类群,属于  $\beta$ -变形菌纲( $\beta$ -Proteobacteria)中的亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)。堆肥过程始终存在的优势菌群属于  $\beta$ -变形菌纲( $\beta$ -Proteobacteria)中的亚硝化螺菌属(*Nitrospira*)和不可培养细菌(Uncultured bacteria)。堆肥不同时期 amoA 硝化细菌多样性指数发生变化,升温至高温期减小,降温期增大,腐熟期减小。冗余分析(RDA)结果表明,铵态氮含量和温度与 amoA 硝化细菌群落结构组成显著相关( $P<0.05$ ),是影响其动态变化的关键理化因子。

**关键词:**堆肥;amoA;硝化细菌;群落结构;多样性

**中图分类号:**X71 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2016)12-0044-05 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2016.12.0044

随着农业和畜牧业的逐步发展,我国每年都会产生大量作物秸秆和畜禽粪便。这些固体有机废物如果得不到及时有效处理,不仅侵占土地面积,还会造成环境污染<sup>[1]</sup>。因此,如何处理农、畜牧业废物成为现如今人们研究的焦点。好氧堆肥利用微生物代谢活动可将秸秆、粪便等转化成稳定的腐殖质,作为生物肥供植物利用,实现了资源的循环利用,目前已经成为处理固体有机废物最有效的方法之一<sup>[2]</sup>。

硝化细菌在堆肥过程中承担着重要角色,除了完成氮素间的转化外,也关系到产物质量的好坏。因此,对堆肥中硝化细菌的研究十分必要。之前的一些研究主要集中在硝化细菌数量上的变化,而堆肥理化因子对其群落动态变化影响的研究较少。本研究采用 PCR-DGGE 分子手段,检测好氧堆肥过程中 amoA 硝化细菌群落结构和多样性的动态变化及其与堆肥理化因子的相关性,为减少堆肥氮素损失,优化堆肥工艺提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以牛粪和玉米秸秆为堆肥材料,牛粪取自齐齐哈尔市梅里斯区奶牛养殖基地,玉米秸秆取自黑龙江省农业科学院齐齐哈尔分院院试验基地。材料基本性质见表 1。

表 1 堆肥材料性质

Table 1 Properties of composting materials

堆肥材料 Composting materials	总碳/% Total carbon	全氮/% Total nitrogen	含水率/% C/N Water content
牛粪 Cow manure	39.41	2.01	19.61
玉米秸秆 Maize stalk	45.26	0.81	55.88

### 1.2 方法

1.2.1 堆肥设计 将玉米秸秆铡成 5 cm 的小段,与牛粪按质量比 1:3 均匀混合,调节含水率约 63%,以此为堆肥材料,装入体积为 1.5 m×1.0 m×1.2 m 的堆肥装置中,定期翻堆并添加灭菌去离子水,保证含水率在 40%~65%。当堆肥温度接近环境温度时,堆肥结束。

1.2.2 取样 采用多点取样法在堆肥第 1、3、6、13、23、30、45 d 取样,四分法保留 300 g,部分鲜样用于理化指标的测定,部分封装后-80℃保存用于分子检测。

1.2.3 理化指标的测定 采用数字电子温度计(CX-WDZ200C)测定肥堆 30、60、90 cm 处温

收稿日期:2016-11-30

基金项目:公益性行业(农业)科研专项经费资助项目(201303125-21、201503116-02);齐齐哈尔市科技局农业公关资助项目(NYGG-201509)

第一作者简介:徐莹莹(1989-),女,黑龙江省齐齐哈尔市人,硕士,研究实习员,从事作物栽培和微生物研究。E-mail:ghdetongzhuo@163.com。

通讯作者:刘玉涛(1968-),男,黑龙江省尚志市人,学士,副研究员,从事作物栽培和旱作节水研究。E-mail:00681107@163.com。

度;pH 采用数显 pH 仪测定;含水率、总碳、全氮、铵态氮、硝态氮的测定方法参考文献[3]。

1.2.4 样品总 DNA 的提取 堆肥样品进行预处理,避免腐殖质的干扰。总 DNA 的提取采用蛋白酶 K-CTAB 法<sup>[4]</sup>;得到的 DNA 用 OMEGA 凝胶回收试剂盒进行纯化,1%琼脂糖凝胶电泳检测纯化后的 DNA。

1.2.5 硝化细菌 amoA 基因的 PCR 扩增 扩增引物:上游引物 amoA-1F (5'-GGGGTTTC-TACTGGTGGT-3')和下游引物 amoA-2R (5'-CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3')<sup>[5]</sup>, GC 夹<sup>[6]</sup>连接到 amoA-1F 的 5'端。反应体系:10×PCR Buffer 5 μL,dNTP 5 μL,DNA 模板 1 μL,Taq 酶 0.6 μL,上、下游引物各 0.8 μL,补充 ddH<sub>2</sub>O 至 50 μL。反应条件:94℃预变性 5 min,94℃变性 1 min,60℃退火 70 s,72℃延伸 50 s,35 个循环,72℃延伸 10 min,4℃保存。

1.2.6 DGGE 及条带测序 采用 Bio-Rad DcodeTM 检测仪对 PCR 扩增产物进行电泳分离。电泳条件:8%聚丙烯酰胺凝胶,变性梯度 30%~65%,1×TAE 缓冲液,电泳温度 60℃,120 V 电压下运行 13 h。电泳结束后对凝胶进行银染,在凝胶呈像系统下观察条带并拍照。选择 DGGE 胶上优势及特异性条带,在紫外灯下切割回收,溶于 30 mL 灭菌去离子水中,于 4℃保存 24 h 后用不带 GC 夹的 amoA-1F 和 amoA-2R 进行 PCR 扩增,反应体系及条件同 1.2.5。扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测并纯化,送测序公司测序。应用 NCBI Blast 程序将测得的序列与 Genebank 中已知序列进行比对,获得相似性较高序列。

1.2.7 群落多样性分析 采用 Quantity one 4.6.2 软件对 DGGE 图进行分析,通过条带亮度和数目来评估 amoA 硝化细菌数量及群落多样性。多样性指数 (Shannon-Weaver, H) 表达式为: $H=-\sum(P_i)\ln(P_i)$ ,其中  $P_i=N_i/N$ , $N_i$  为第  $i$  种的个体数, $N$  为种群总的个体数,用条带波峰面积表示<sup>[7]</sup>。

1.2.8 数据处理 应用软件 Canoco (version 4.5) 分析堆肥理化因子对 amoA 硝化细菌群落的影响。

## 2 结果与分析

### 2.1 堆肥温度变化

温度是影响堆肥有机质分解的重要因素之一,也是反映堆肥进程最直观的指标。由图 1 可

知,按照温度变化,整个堆肥过程分为 4 个时期:升温期(1~4 d)、高温期(5~13 d)、降温期(14~33 d)和腐熟期(34~45 d)。堆肥从第 5 天开始进入高温期(>50℃),第 6 天达到最高温度 62.9℃,高温期持续 9 d,符合堆肥卫生标准<sup>[8]</sup>。堆肥后期,温度逐渐降至接近环境温度并趋于稳定,表明堆肥达到腐熟。

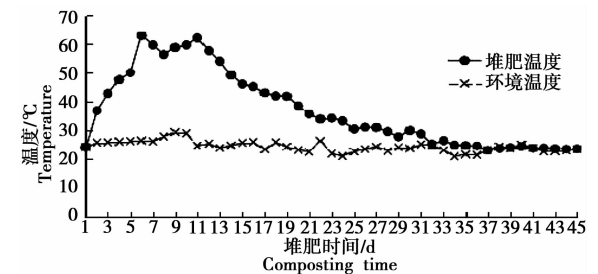


图 1 堆肥温度变化

Fig. 1 Change of temperature during composting

### 2.2 堆肥 pH、含水率、C/N 变化

由图 2 可知,堆肥 pH 先升高,第 6 天达到最大值 8.47,之后逐渐降低。主要是由于堆肥初期,堆料中的含氮有机质转化成铵态氮,使堆肥 pH 不断升高,随着堆肥进行,铵态氮减少 pH 逐渐下降。堆肥结束时 pH 为 7.89。

堆肥含水率变化情况如图 2 所示,堆肥中的有机质在分解过程中产生大量热,热量的释放导致水分蒸发散失,因此随着堆肥进行,含水率逐渐降低。由于对堆肥水分进行补充,使含水率始终保持在 40%~65%,保证微生物的生长代谢活动。

C/N 是评价堆肥腐熟程度最常用的方法之一,一般堆肥初始 C/N 为 25~32,当 C/N 小于 20 认为堆肥达到腐熟。由图 2 可知,堆肥初始 C/N 约为 30,堆肥结束时为 19.7,达到腐熟标准<sup>[8]</sup>。

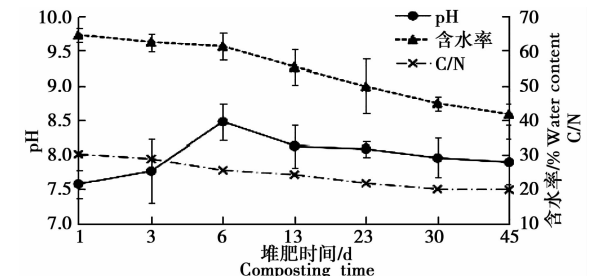


图 2 堆肥 pH、含水率、C/N 变化

Fig. 2 Change of pH, water content and C/N during composting

2.3 堆肥铵态氮、硝态氮含量变化

由图 3 可知,堆肥前期铵态氮含量逐渐增加,第 6 天达到最大值 1 540 mg·kg<sup>-1</sup>,之后含量呈下降趋势。这是由于堆肥前期有机氮在微生物的作用下大量分解,转化成氨及铵态氮,使铵态氮含量迅速增加。而到了堆肥后期,随着铵态氮向硝态氮等的转化,导致其含量下降,堆肥结束时铵态氮含量为 190 mg·kg<sup>-1</sup>。

堆肥初期硝态氮含量变化不大,而到了高温期含量降低,堆肥降温期含量迅速增加,至堆肥腐熟期出现最大值 1 480 mg·kg<sup>-1</sup>。这是由于堆肥初期氮素主要以有机氮、氨及铵态氮形式存在,硝态氮含量变化较小,而高温期硝化细菌生长受到抑制,硝态氮含量逐渐下降。到了堆肥降温期随着温度下降,硝化细菌快速生长,促进硝态氮的积累。

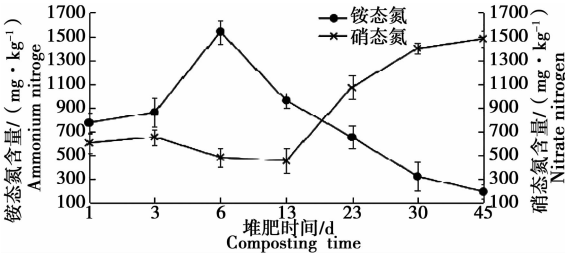


图 3 堆肥铵态氮、硝态氮含量变化  
Fig. 3 Change of ammonium nitrogen and nitrate nitrogen during composting

2.4 DNA 的提取及 PCR 产物检测

堆肥基因组 DNA 长度约为 23.1 kb,纯化后进行 PCR 扩增,各时期样品均得到含有 amoA 基因的特异性片段(490 bp)。

2.5 DGGE 图谱分析

堆肥不同时期 amoA 硝化细菌群落结构见图 4,其中数字和字母分别代表取样天数和条带编号。泳道上不同位置条带代表不同的硝化细菌类群,条带越多说明类群越丰富;同一位置的条带,条带越亮说明硝化细菌数量越多。由图 4 可知,堆肥升温到高温期条带数目减少,亮度减小,而到了降温期条带数目增加,亮度增大,说明随着堆肥进行,硝化细菌群落结构发生了动态变化。条带 l 在升温期出现,高温期消失,降温期再次出现;条带 e、f、i、k 和 m 在降温后期出现,说明硝化细菌群落经高温期发生了较为明显的演替。条带 a、b、d、g、h 和 j 在堆肥各个时期始终存在,说明这些条带代表的硝化细菌类群适应性较强,成为堆肥优势菌群,在堆肥过程中发挥重要作用。

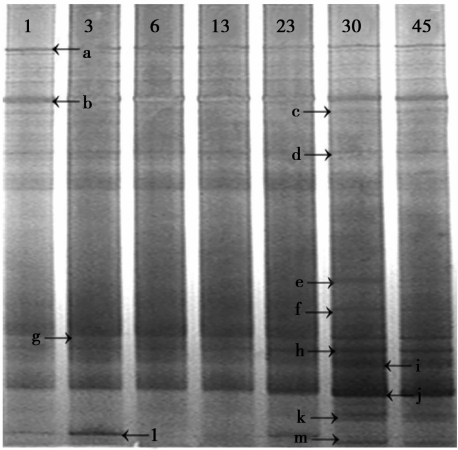


图 4 堆肥硝化细菌 DGGE 图谱  
Fig. 4 DGGE profile of nitrifying bacteria during composting

2.6 系统发育分析

条带 a~m 测序后与 NCBI 中序列进行比对,其结果见表 2。堆肥中的 amoA 硝化细菌类群主要包括  $\beta$ -变形菌纲( $\beta$ -Proteobacteria)和不可培养细菌(Uncultured bacteria)。其中条带 a、b、g 和 j 所代表的优势菌群属于  $\beta$ -变形菌纲( $\beta$ -Proteobacteria)中的亚硝化螺菌属(*Nitrosospira*),堆肥降温期出现的特异性条带 k 和 m 属于  $\beta$ -变形菌纲( $\beta$ -Proteobacteria)中的亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)。

2.7 多样性分析

由表 3 可知堆肥升温至高温期,硝化细菌多样性指数下降,到了降温期有所增加,腐熟期再次下降。这是由于堆肥初期堆料中的有机质较为丰富,硝化细菌生长良好,而随着堆肥温度升高,对高温耐受的硝化细菌类群得以保留,耐受性差的类群消失;到了降温期,随着温度下降,硝化细菌类群表现出新的活性;堆肥至腐熟后期,堆料中供硝化细菌生长的有机质减少,硝化细菌类群也逐渐减少。因此硝化细菌多样性指数总体上呈下降—上升—下降趋势。

2.8 硝化细菌群落与理化因子间关系分析

通过对样品进行去趋势对应分析(DCA),得到的梯度长度小于 3,因此选择冗余分析(RDA)研究 amoA 硝化细菌群落与堆肥理化因子间的关系,结果见图 5。各堆肥样品以温度、pH、含水率、C/N、铵态氮和硝态氮表征其理化性质,解释了 93.8% 的典范总特征值,前 2 个排序轴特征值分别为 0.701、0.188,合并解释了 89.0% 的样本总变异。图 5 中堆肥理化因子用带箭头的矢量线

表 2 条带测序相似菌株  
Table 2 Similar strain with band sequencing

条带编号 Band number	登录号 Accession number	相似菌株 Similar strain	相似性/% Similarity
a	EF175097.1	<i>Nitrosospira</i> sp. En13	97
b	AJ298690.1	<i>Nitrosospira</i> sp. B6	98
c	JF936570.1	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone BAOB-G12	98
d	JK955482.1	Uncultured bacterium clone AOB-N5.25-12	98
e	AJ298687.1	<i>Nitrosospira</i> sp. 40KI	98
f	AY123834.1	<i>Nitrosospira</i> sp. Nsp5	99
g	AF042170.1	<i>Nitrosospira</i> sp. Np39-19	98
h	EF204973.1	Uncultured ammonia-oxidizing beta proteobacterium clone 5-07	97
i	AF042170.1	<i>Nitrosospira</i> sp. Np39-19	98
j	Z97858.1	<i>Nitrosospira briensis</i> _C57	97
k	DQ228467.1	<i>Nitrosomonas</i> sp. IWT310	98
l	AY123836.1	<i>Nitrosospira</i> sp. Nsp58	99
m	DQ228468.1	<i>Nitrosomonas</i> sp. CNS332	97

表示,所在象限表示理化因子与排序轴间夹角大小,表示该因子与排序轴相关性大小,夹角越小相关性越大。由图 5 可知,铵态氮、温度、C/N(负相关)和硝态氮(正相关)与第一轴相关性较大,含水率(正相关)和 pH(负相关)与第二轴相关性较大。经蒙特卡洛检验,铵态氮含量( $P=0.004$ )和温度( $P=0.014$ )显著影响堆肥 amoA 硝化细菌群落结构变化( $P<0.05$ )。

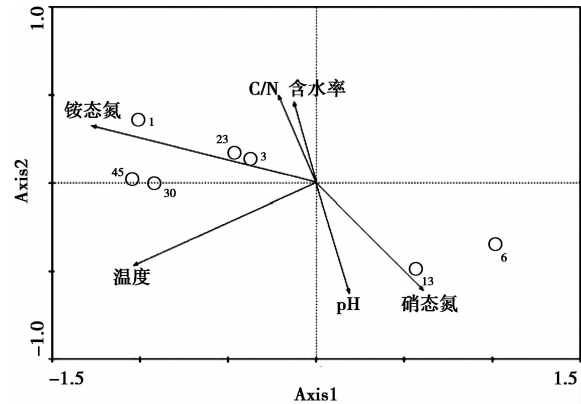


图 5 堆肥硝化细菌群落结构与理化因子间冗余分析  
Fig. 5 Redundancy analysis (RDA) of nitrifying bacterial community structure composition and physico-chemical factors

表 3 堆肥硝化细菌多样性指数  
Table 3 Diversity index of nitrifying bacteria during composting

堆肥时间/d Composting day	条带数目 Band numbers	多样性指数 H Diversity index H
0	9	1.64
3	8	1.68
6	7	1.50
13	7	1.53
23	8	1.74
30	12	2.12
45	10	2.06

3 讨论与结论

铵态氮含量和温度能够显著影响堆肥 amoA 硝化细菌群落结构组成,使其在堆肥不同阶段发生动态变化,这与陈雅娟等研究结果相似。陈雅娟等<sup>[9]</sup>认为铵态氮含量与 amoA 硝化细菌群落物种丰富度和稳定性有关,可能是铵态氮作为底物可诱发 amoA 硝化细菌生长。Marina<sup>[10]</sup>发现铵态氮、温度和 pH 对堆肥 amoA 硝化细菌群落变化有较大影响。虞泳等<sup>[11]</sup>研究结果表明堆体温度、铵态氮、硝态氮对 amoA 硝化细菌群落演替影响显著( $P<0.05$ ),其中温度和铵态氮的影响达到了极显著水平( $P<0.01$ )。之前的一些研究<sup>[12]</sup>

认为,硝态氮含量、C/N、pH 和含水率等与 amoA 硝化细菌群落变化显著相关,但本研究未发现这一现象,这不代表上述理化因子对 amoA 硝化细菌群落变化不重要,而是由于不同堆肥材料及环境对试验结果存在较大影响。因此,今后要进行更多的工作去研究堆肥过程中的硝化作用机理及硝化细菌群落结构变化,为堆肥氮素循环利用提供基础。

本研究得出堆肥不同阶段 amoA 硝化细菌群落组成发生动态变化,堆肥降温期检测到前期不存在的硝化类群,属于  $\beta$ -变形菌纲( $\beta$ -Proteobacteria)中的亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)。堆肥过程始终存在的优势菌群属于  $\beta$ -变形菌( $\beta$ -Proteobacteria)中的亚硝化螺菌属(*Nitrospira*)和不可培养细菌(Uncultured bacteria)。堆肥不同阶段 amoA 硝化细菌多样性指数发生动态变化,升温至高温期硝化细菌多样性指数减小,到了降温期增大,腐熟期再次减小。堆肥铵态氮含量( $P=0.004$ )和温度( $P=0.014$ )显著影响堆肥 amoA 硝化细菌群落结构变化( $P<0.05$ )。

#### 参考文献:

- [1] 毕于运,高春雨,王亚静,等. 中国秸秆资源数量估算[J]. 农业工程学报,2009,25(12): 211-217.
- [2] 伍兵,邓悟森,谭周进,等. 鸡粪堆肥的微生物变化规律研究[J]. 现代生物医学进展,2011,11(15):2858-2861.

- [3] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社,2000.
- [4] 杨朝晖,肖勇,曾光明,等. 用于分子生态学研究的堆肥提取方法[J]. 环境科学,2006,27(8):1613-1617.
- [5] Rotthauwe 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(12):4704-4712.
- [6] Zhou Z F, Zheng Y M, Shen J P, et al. Response of denitrification genes *nirS*, *nirK*, and *nosZ* to irrigation water quality in a Chinese agricultural soil[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2011,18(9):1644-1652.
- [7] 萨如拉,高聚林,于晓芳,等. 玉米秸秆深翻还田土壤氨氧化细菌 amoA 基因多样性分析[J]. 玉米科学,2015,23(3): 107-111.
- [8] 付龙,张淑芬,丁昕颖. 畜禽粪便好氧堆肥的影响因素[J]. 现代畜牧科技,2016(9):180-181.
- [9] 陈雅娟,霍培书,韩卉,等. 鸡粪锯末好氧堆肥过程中硝化细菌动态变化[J]. 中国农业大学学报,2014,19(2):100-107.
- [10] Marina A, Stephanie A K, Benjamin C S, et al. Characterization of heme protein expressed by ammonia-oxidizing bacteria under low dissolved oxygen conditions[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014,98(7):3231-3239.
- [11] 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.
- [12] 何贵伦,罗明,韩剑,等. 枣树棉花间作与单作土壤氨氧化细菌 amoA 基因多样性的比较与分析[J]. 新疆农业大学学报,2015,38(2):126-135.

## Dynamic Change of amoA Nitrifying Bacteria Community During Aerobic Composting

XU Ying-ying, LIU Yu-tao, WANG Jun-he, WANG Yu-xian, YANG Hui-ying, GAO Pan, FAN Jing-sheng  
(Qiqihar Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihar, Heilongjiang 161006)

**Abstract:** In order to reduce nitrogen loss during the composting, and to optimize the composting process, high temperature aerobic composting was conducted with cow manure and maize stalk as materials. Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) technique and sequence analysis method were used to analyze the dynamic change of the community composition and diversity of amoA-nitrifying bacteria during composting different periods, which correlated with composting physio-chemical parameters. The results showed that the nitrifying bacteria groups obviously changed after thermophilic period. Some new nitrifying bacteria groups were detected during cooling period. These groups belonged to *Nitrosomonas* sp. in the class of  $\beta$ -Proteobacteria. Dominant nitrifying bacteria during composting belonged to *Nitrospira* sp. in the class of  $\beta$ -Proteobacteria and uncultured bacteria. The diversity index of nitrifying bacteria changed during composting process, which decreased from mesophilic to thermophilic stage, increased at cooling stage and then decreased at mature stage. Redundancy analysis (RDA) results showed that the ammonium nitrogen content and temperature of compost were the keys to the physio-chemical factors significantly affected nitrifying bacteria community composition ( $P<0.05$ ).

**Keywords:** compost; amoA; nitrifying bacteria; community structure; diversity

(该文作者还有武琳琳,单位同第一作者)