植物营养与肥料学报 2012,18(6):1483-1491
Plant Nutrition and Fertilizer Science

鸡粪好氧堆肥过程中氨氧化古菌群落结构的动态变化

解开治[1,2],徐培智[1]*,张发宝[1],唐拴虎[1],顾文杰[1],
黄 旭[1],蒋瑞萍[1],卢钰升[1]
(1 广东省农业科学院土壤肥料研究所,广州 510640;2 中山大学环境科学与工程学院,广州 510275)

摘要:应用聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)技术,研究了好氧堆肥过程氨氧化古菌(ammonia-oxidizing archaea, AOA)的群落结构和多样性变化。结果表明,不同堆肥时期鸡粪好氧堆肥 AOA 菌群的群落结构发生了明显的变化。与 AOA HH-2(GU225872.1)亲缘关系较近的 b 条带(相似性 96%)和未培养泉古菌属[uncultured *crenarchaeote* NM-152(HQ875225.1)]的 m 条带(相似性 99%)是堆肥过程一直存在的 AOA 菌属。条带 c、b、f、i 和条带 m、k、l、n 代表的种属分属两个大类。AOA 群落的 Shannon-Weiner 指数(H)、均匀度指数(E_H)均表现为第 30 d > 第 5 d > 第 25 d ≈ 第 45 d > 第 3 d ≈ 第 12 d > 第 1 d ≈ 第 15 d。对 AOA 种群数据与不同时期堆体温度、pH、全氮、铵态氮、亚硝态氮和硝态氮等环境因子的冗余分析表明,堆体温度、全氮、亚硝态氮和硝态氮对氨氧化古菌群落演替有着显著的影响($P < 0.05$),AOA 的群落结构在堆肥第 1 d、第 5 d、第 25 d、第 30 d、第 45 d 变化较大。说明这些参数能有效控制鸡粪好氧堆肥过程中 AOA 的群落结构。

关键词:好氧堆肥;氨氧化古菌;PCR-DGGE;群落结构
中图分类号:X172　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1008-505X(2012)06-1483-09

Dynamic changes of ammonia-oxidizing archaea community structure during aerobic composting of chicken manure

XIE Kai-zhi[1,2], XU Pei-zhi[1]*, ZHANG Fa-bao[1], TANG Shuan-hu[1], GU Wen-jie[1],
HUANG Xu[1], JIANG Rui-ping[1], LU Yu-sheng[1]
(*1 Soil and Fertilizer Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China;*
2 Department of Environmental Science, School of Environmental Science and Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) was used to investigate the community structure and species diversity of ammonia-oxidizing archaea (AOA) during poultry species composting. The results show that the AOA community structure and species diversity at different stages of chicken manure composting are markedly changed, and the band b, which shows 96% similarity to the AOA HH-2 (GU225872.1) and band m, which shows 99% similarity to the uncultured *Crenarchaeote* NM-152 (HQ875225.1), represent the major AOA bacterial species during the composting. The bands c, b, f and i, and the bands m, k, l and n represent the species of the two populations of bacteria, respectively. Shannon-Weiner index (H) and evenness index (E_H) of the AOA colonies are different at different stages of the composting, and the following order is: day 30 > day 5 > day 25 ≈ day 45 > day 3 ≈ day 12 > day 1 ≈ day 15. The redundancy analysis of the AOA colonies at different stages of the composting shows that the AOA colony evolution is all significantly affected by the composting temperature, whole nitrogen, ammonia nitrogen and nitrate nitrogen ($P <$

收稿日期:2012-04-05　　**接受日期**:2012-08-26
基金项目:中央农业科技成果转化资金项目(2010E00079);广东省重点科研基地建设项目(2009A060800026);广东省现代农业产业技术体系专项资助。
作者简介:解开治(1977—),男,甘肃民勤人,博士研究生,主要从事废弃物生物处理和环境微生物方向的研究。
E-mail:xiekzgsau@163.com。　*通讯作者 E-mail:pzxu007@163.com

0.05), while pH is not affected. The AOA community structure is changed markedly on days 1, 5, 15, 30 and 45 of the composting. These results indicate that several parameters could control AOA community structure during composting of chicken manure.

Key words: aerobic compost; ammonia-oxidizing archaea(AOA); PCR-DGGE(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE); community structure

好氧堆肥化技术作为有机固体废弃物无害化、资源化和稳定化的一种经济高效技术被广泛应用于畜禽粪便处理[1]。然而,在堆肥化过程中氮素的损失是相当惊人的[2-4],一般在堆肥过程中氮损失量约为进料总氮的16%～76%[5-6],不仅会降低其成品的农用价值,还会产生恶臭、酸雨等新的环境问题[6-8]。堆肥过程中畜禽粪便所含有机氮不仅易于被微生物分解转化为氨气,并在反硝化过程中产生温室气体N_2O(N_2O的增温潜势为CO_2的296倍),造成氮素的大量损失,加剧了温室效应[9]。作为硝化作用的限速步骤,与氨氧化作用相关的微生物学研究在氮素生物地球化学循环过程中一直倍受关注[10-11]。长期以来,变形菌纲的氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)被普遍认为是地球氮素循环过程中最主要的承担者[12]。然而,近年来随着现代分子生物学技术的应用与发展,另一类具有氨氧化能力的微生物—氨氧化古菌(ammonia-oxidizing archaea, AOA)被研究者发现[13],它含有AOB的关键酶—氨单加氧酶(ammonia monooxygenase, amoA)的全部亚基[14],是一类完全独立于AOB的进化类群,广泛分布于海洋、土壤和湿地等多种生态系统中,且在数量上较AOB占明显优势,在氮循环中可能起着非常重要的作用[15-16]。国内虞泳和董莲华等研究报道了农业废物好氧堆肥中AOB群落结构随时间的变化情况[17-18],但对堆肥过程中AOA的群落结构变化未见报道。Yamamoto等[19]近期的研究表明,在堆肥过程中的氨氧化方面AOA起着重要的作用。

本研究采用不依赖于纯培养的PCR-DGGE技术,分析鸡粪好氧堆肥过程中AOA群落结构变化,并采用冗余分析(redundancy analysis,RDA)方法分析堆体温度、pH、TN、NH_4^+-N、NO_3^--N等环境因子与AOA群落的相关性,探明不同堆肥时期堆肥AOA群落结构与多样性,以期为揭示堆肥中氮素转移与转化规律,优化堆肥工艺,提高硝化速率,减少氮素损失提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 堆肥原料

堆肥原料主要有鸡粪、稻壳、米糠和蘑菇渣。鸡粪来源于广东省农业科学院畜牧研究所规模化肉鸡养殖场,稻壳和米糠来源于广东省农业科学院水稻研究所稻米加工厂,蘑菇渣来源于广东东莞市星河生物科技公司食用菌厂。新鲜鸡粪、稻壳、米糠和蘑菇渣按5∶1∶1∶3的体积比混合均匀后作为堆肥混合原料,并调整水分为55%～60%。各种堆肥原料的理化性质见表1。

表1 堆肥原料的理化性质(干基计)

Table 1 Physical-chemical characters of the composting raw material(dry weight basis)

堆肥物料 Composting material	含水量 Moisture content (%)	有机质 Organic matter (g/kg)	C/N	EC (mS/cm)	Total N (g/kg)	Total P (g/kg)	Total K (g/kg)
新鲜鸡粪 Fresh chicken feces	75.35	485.8	11.50	6.15	24.5	28.8	39.6
稻壳 Rice husk	10.57	362.5	37.57	2.85	5.6	2.3	10.7
稻糠 Rice bran	18.8	631.9	35.96	2.40	10.2	16.9	15.2
蘑菇渣 Mushroom residue	8.93	805.4	38.00	1.55	12.3	16.0	14.4
混合发酵物 Mixed fermentation	56.30	449.2	21.80	3.10	13.5	16.2	20.5

注(Note):数据为3次重复的平均值 Data are the average of triplicate samples.

1.2 堆肥工艺

试验于2011 年5 月12 日～7 月15 日在广东省农业科学院土壤肥料研究所有机肥生产基地进行。堆肥工艺采用槽式强制好氧堆肥，堆肥槽总长 25 m、宽 2 m、高 1.5 m。供氧方式为堆底管道强制通风，通风量为3000 L/min，通风频率为每间隔 13 min 通风 17 min。配置一台提升式翻料机，为全进全出发酵方式，正常发酵周期为 15 d，即物料一次投入发酵槽，发酵 15 d 后一次性移出至二次发酵仓后熟 30 d。翻料机工作时，机器沿槽顶部钢轨从出料口端向进料口方向行走，同时翻动物料。在翻动过程中物料被翻料机的翻料斗刮起，由物料输送带斜向上输送至提升机后端，在离地面 2 m 高处自由下落，下落点与刮取点的水平距离为 2.6 m，即物料在每次翻动时自进料口向出料口方向水平移动 2.6 m 的距离，每次翻堆机往返共需 6 h。

1.3 样品采集

在堆肥槽 3 ～9 m、10 ～16 m、17 ～23 m 三个槽长范围内，采用五点法分别在堆肥系统正常运行的第 1、3、5、12、15、25、30、45 d 上午 10：00 左右采样，采样深度为 0.7 m，三个槽长范围样品单独混合均匀后组合成试验的 3 次重复。每次取样 500 g 左右，取样时间样品编号为 1 d、3 d、5 d、12 d、15 d、25 d、30 d、45 d。所有采集的堆肥样品分为 2 份，一份于 4℃保存，用于 pH 和 NH_4^+-N、NO_2^--N、NO_3^--N 分析；一份将同一时间点的 3 次重复样品混合均匀于 -80℃保存用于 DNA 提取。

1.4 样品测定

pH 测定：堆肥水浸提液按鲜样：水为 1：10（W/V）的比例混合，室温振荡 30 min，静止 30 min 后，用上清液测定 pH。NH_4^+-N、NO_2^--N、NO_3^--N 测定：用 2 mol/L KCl（样品：KCl = 1∶4）浸提 1 h，然后用流动分析仪分析测定（TRAACS 2000）。堆肥物料中有机碳用重铬酸钾法，全氮用 H_2SO_4 - H_2O_2 消煮法测定。用温度测试仪器（TES1310，台湾泰仕）探头测定三个槽长范围内翻堆前堆体深 0.7 m 处的温度；第 1 ～6 d 每天记录 10：00、22：00 时的温度，第 8 ～12 d 每隔 1 d 记录 10：00 时的温度，第 15 ～45 d 每隔 4 d 记录 10：00 时的温度，同时测定室温。

DNA 提取与纯化　采用 ZR Fecal DNA MidiPrep 提取试剂盒（ZYMO RESEARCH，USA）和 Fast Prep FP220（BIO 101 Systems，USA）核酸提取仪提取堆肥 DNA。利用纯化试剂盒对粗提总 DNA 进行纯化。采用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测粗提和纯化产物浓度，纯化的 DNA 保藏于 -20℃备用。

1.5 聚合酶链式反应（PCR）和变性梯度凝胶电泳（DGGE）

1.5.1 PCR 扩增　AOA 的扩增采用 *amoA* 功能基因的特异引物，分别为 Arch-amoAR/Arch-amoAF[15]。其中正向引物 5′端连接有 GC（5′ - CGCCCG CCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCCC - 3′）夹板，以提高在后期 DGGE 电泳时的解链范围[20]。引物由上海英骏生物工程技术服务有限公司合成。PCR 扩增的 50 μL 体系配置如下：5 μL 10 ×PCR buffer（含 Mg^{2+}），4 μL dNTPs（2.5 mM），0.5 μL Ex Taq HS polymerase（5 U/μL，Takara Biotechnology，Japan），1.0 μL 正反向引物（浓度为 10 mmol/L），2.0 μL DNA 模板，dd H_2O 补足至 50 μL。反应条件：95℃预变性 4 min，95℃变性 30 s，58℃退火 20 s，72℃延伸 35 s，35 个循环，最后 72℃下延伸 5 min，扩增产物用 0.8% 的琼脂糖电泳进行检测。

1.5.2 变性梯度凝胶电泳（DGGE）　利用 DCode™ Universal Mutation Detection System（Bio-Rad Laboratories，Hercules，CA，USA）进行变性梯度凝胶电泳。DGGE 条件：制备变性剂浓度从 25% 到 55%（100% 的变性剂溶液包含体积浓度为 40% 的甲酰胺与 7 mol/L 的尿素）的 8% 聚丙烯酰胺凝胶，其中变性剂的浓度从胶的上方向下方依次递增[21]，在 60℃，100 V 恒定电压下持续电泳 15 h，用 Goldview 染色 20 ～30 min，Bio-Rad 凝胶成像系统进行拍照并分析。

1.5.3 克隆、测序　选取 DGGE 胶上代表性的条带，在紫外灯下进行切割并装入 1.5 mL 离心管中，用 70% 的乙醇溶液洗涤，加入 30 μL 的灭菌 Mili-Q 水溶解。取以上模板梯度稀释后作 PCR，引物序列为 F338：5′ - ACTCCTACGGGAGGCAGCAG - 3′，R518：5′ - ATTACCGCGGCTGCTGG - 3′。50 μL 体系配置如下：5 μL 10 × Buffer（含 2.0 mmol/L $MgCl_2$），1.0 μL dNTPs（10 mmol/L），0.25 μL Taq（5 U/μL），1.0 μL 正反向引物（10 mmol/L），1.0 μL 模板 DNA，ddH_2O 补足至 50 μL。反应程序：94℃ 4 min 预变性，94℃ 0.5 min，58℃ 1 min，72℃ 0.5 min，30 Cycles，72℃ 7 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检验后纯化，产物送 Invitrogen 上海分公司完成测序。使用 NCBI 网站中的 BLAST 将测序结果与数据库中已知序列进行同源性比对分析。并用

MEGA4.0.1 软件进行系统发育树分析。

1.5.4 凝胶指纹图谱的生物信息学分析 所得图像电泳条带用 QUANTITY ONE 4.3.0 软件(Bio-Rad)进行处理,对各样品条带的迁移率、灰度及数量进行定量分析。根据各样品在 DGGE 图谱中的表现,分析比较群落多样性的香农 - 威纳指数(Shannon-Weiner index)和均匀度指数[22]。

$$H = -\sum_{i=1}^{s}\frac{n_i}{N}\ln\frac{n_i}{N} = -\sum_{i=1}^{s}P_i\ln P_i$$

$$E_H = \frac{H}{H_{max}} = \frac{H}{\ln S}$$

式中:H 为香农 - 威纳多样性指数;E_H 为均匀度指数;P_i 为第 i 个 DGGE 条带出现的概率;n_i 为第 i 个条带的扩增量;N 为 AOA 群落 DGGE 条带的扩增总量($N = \sum n_i$);S 为群落丰度;H 最小值为 0;H 最大值为 $\ln S$。

1.6 数据分析

应用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,应用生态统计分析软件 CANOCO 4.5 对微生物群落结构进行冗余分析(redundancy analysis, RDA)。

2 结果与分析

2.1 堆肥主要参数的变化

2.1.1 温度 堆温是反映堆肥进程较为直观的参数之一。堆制初期,物料中有机物在好氧微生物的作用下快速分解,并释放出大量热能,导致堆制后温度迅速升高。从图 1 的温度变化曲线可以看出,在整个过程中,保持 55℃以上温度达 11 d,较快达到了堆肥无害化目的,保证了堆肥的卫生学指标和堆肥腐熟的条件[23]。

2.1.2 pH 与 C/N 堆肥过程中 pH 的变化表现为先上升后降低的趋势(图 2)。堆肥初期 pH 值迅速上升,主要是因为堆肥物料中易降解的含氮化合物在相关微生物作用下氨化,氨气的大量累计造成;堆肥后期 pH 值下降可能是由于氨氧化细菌和 AOA 数量的增多,硝化作用增强所致[24]。有研究表明,有机物分解产生的有机酸也是造成 pH 值下降的原因[25]。在整个堆肥过程中 pH 值始终保持在 7.5 ~ 9.0 之间,不会对堆肥微生物的活动产生较大危害,有利于堆肥顺利进行。堆肥过程中 C/N 的变化表现为先降低后上升的趋势(图 2)。碳氮比降低主要是碳素减少较多,氮素次之引起[26]。

2.2 堆肥过程中氮素形态的转化

由图 3 和图 4 可知,全氮、硝态氮、亚硝态氮含量在堆肥过程中呈增加的趋势,尤其是在堆肥前、后期增加明显,这与 Said-Pullicino 等[27]报道的结果一致。铵态氮呈波浪式变化趋势,0 ~ 12 d 铵态氮明显增加,12 ~ 15 d 显著降低,15 ~ 25 d 又明显增加,之后呈现降低趋势。这可能是因为堆肥初期的氨化作用及有机氮的矿化作用引起,中后期由于高温导致铵态氮的挥发,硝化作用及部分铵态氮在细胞组织合成过程中被利用而使铵态氮含量逐渐减少[28]。

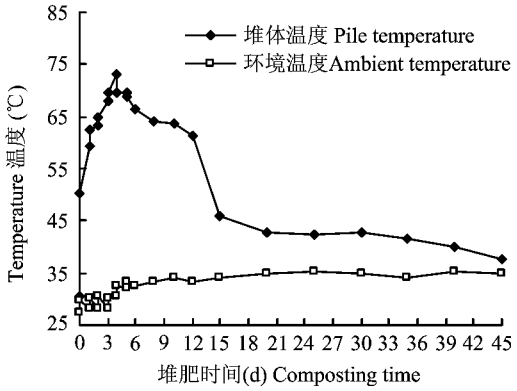

图 1 堆肥过程中堆体温度的变化

Fig. 1 Changes of pile temperature during the composting process

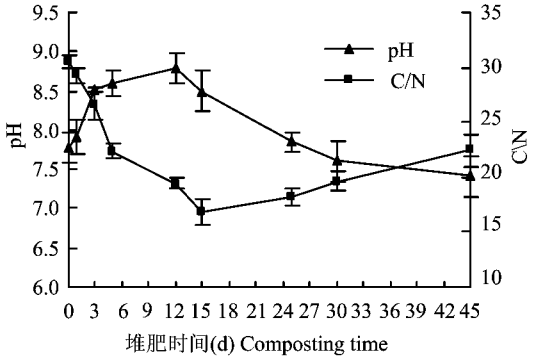

图 2 堆肥过程中 pH 和 C/N 的变化

Fig. 2 Changes of the pH and C/N during the composting process

2.3 堆肥过程中 AOA 群落的动态变化

堆肥过程中不同时期 AOA 群落结构的 DGGE 分析结果(图 5)表明,8 个泳道上共识别出 12 条不同的条带,条带 b、m 是堆肥过程一直存在的 AOA 菌属,并且条带 m 的菌群丰度最高,说明这些 AOA 对环境条件变化的适应能力较强,可能在堆肥体系氨氮的氧化过程中发挥着重要的作用。其余条带出

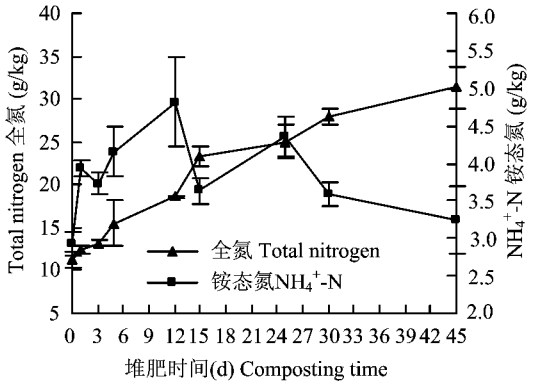

图 3　堆肥过程中全氮和铵态氮的变化

Fig. 3　Changes of the total nitrogen (TN) and molecular nitrogen during the composting process

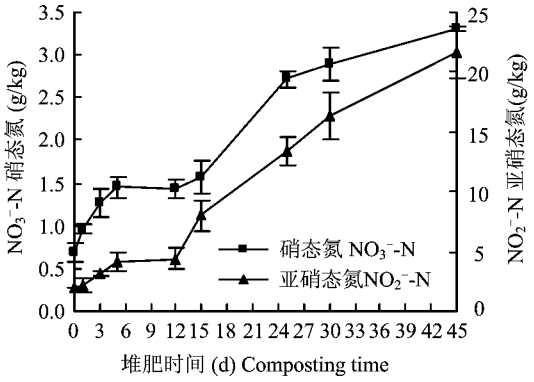

图 4　堆肥过程中硝态氮和亚硝态氮的变化

Fig. 4　Changes of the nitrate nitrogen and nitrite nitrogen during the composting process

现在堆肥的不同时期，在 5 ～ 15 d 的堆肥高温期，条带 f 是其中的优势菌，而条带 k、l 则是堆肥后期腐熟阶段的优势菌群。

选择的优势条带进行切胶测序，将测序结果在 NCBI 网站中进行比对并进行系统发育分析（图 6），根据系统发育树相似性分析结果，多重序列比对中 12 个条带与参照序列之间的相似性为 83.62%，而在 GenBank 中样品序列与参照序列两两比对显示其相似性在 94% ～ 99% 之间，其中整个堆肥过程中的优势菌群条带 b 与 AOA HH－2（GU225872.1）亲缘关系较近，相似性达到 96%，条带 m 与泉古菌 NM－152（HQ875225.1）亲缘关系较近，相似性达到 99%。从聚类来看，条带 b、c、f、i 分属一个大类，条带 k、l、m、n 分属一个大类，e、d 分属一类，a 和 j 自成一类，这表明整个堆肥过程中可能有多种 AOA 菌落参与对氮素的转移和转化。

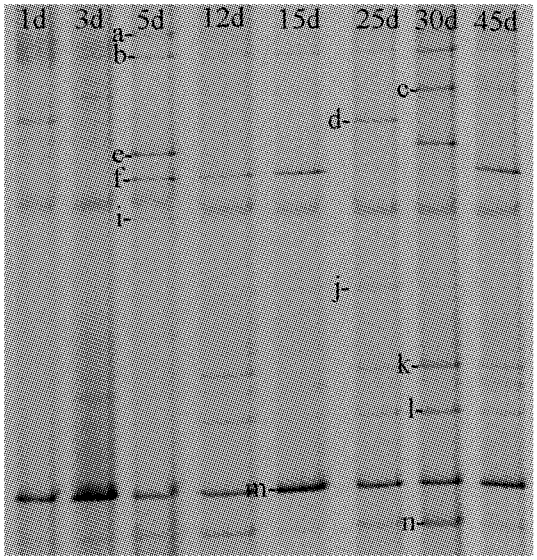

图 5　堆肥样品 AOA 的 DGGE 图谱

Fig. 5　DGGE profiles of the composting samples

2.4　堆肥过程中 AOA 群落多样性的变化

2.4.1 堆肥过程中 AOA 群落多样性分析　香农－威纳指数（H）是用来估算群落多样性高低的指数，而均匀度指数（E_H）则是表征物种分布的均匀程度。根据堆肥样品的 DGGE 图谱，可计算出堆肥 AOA 的多样性指数（图 7），结果表明，不同堆肥阶段 AOA 的香农－威纳指数、均匀度指数均存在差异，且均表现为第 30 d > 第 5 d > 第 25 d ≈ 第 45 d > 第 3 d ≈ 第 12 d > 第 1d ≈ 第 15 d。第 30 d 的香农－威纳指数、均匀度指数分别是第 5 d、第 25 d、第 3 d、第 1 d 的 1.16 倍、1.32 倍、1.71 倍和 2.07 倍。从总体变化趋势来看，香农－威纳指数和均匀度指数从第 1 ～ 5 d、15 ～ 30 d 均表现逐渐上升，可见 AOA 菌群随着堆肥时间的推进，不断丰富和变化，在 5 ～ 15 d 的堆肥高温阶段则表现出下降的变化。

2.4.2 堆肥过程中 AOA 群落的相似性分析　DGGE 图谱和条带的数据标准化处理采用 Bio-Rad Quantity One 4.5.2 软件进行。按照 UPGMA 算法，对样品的条带图谱进行 AOA 群落相似性聚类分析。Jaccard 遗传相似性系数表示条带之间的遗传关系，由图 8 可知，第 30 d 和第 45 d 堆肥 AOA 群落组成相似性最高，Jaccard 相似系数为 0.75。从堆肥过程中 AOA 群落结构的演替规律为随堆肥时间的延长，Jaccard 相似系数越大，群落结构的相似性越高。这可能表明堆肥前期和中期 AOA 菌群丰富、变化大，是氨氧化作用活跃的时期，对于堆肥物料有机物分

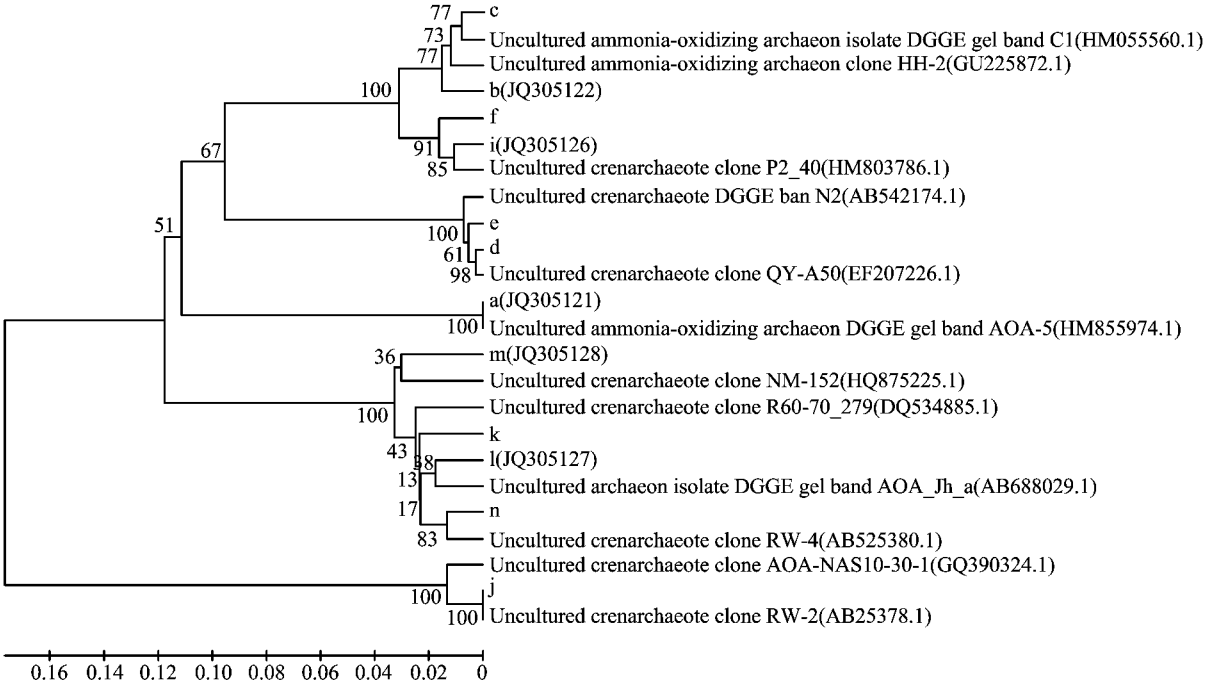

图6 依据 *amoA* 功能基因序列构建的 AOA 的系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree of ammonia-oxidizing archaea targeted on *amoA* gene

[注(Note)：本文中的参照序列引自 GenBank 数据库,序列名称后括号内的字母加数字代表登录号,分支节点上的数字表示每 1000 次 bootstrap 分析所支持的百分数；线段表示5%序列差异的分支长度 All reference sequences in this paper are quoted from GenBank date base. The number after sequences represents the GenBank accession number, and the number on branch node means Bootstrap value (1000 replicates). The line at the bottom of figure represents 5% sequence differences branch length.]

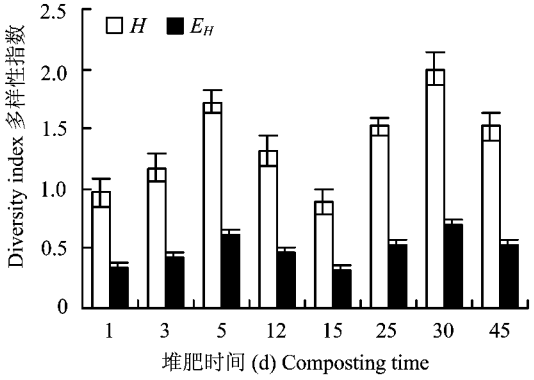

图7 堆肥过程中 AOA 的多样性分析

Fig. 7 Analysis of ammonia-oxidizing archaea diversity during the composting process

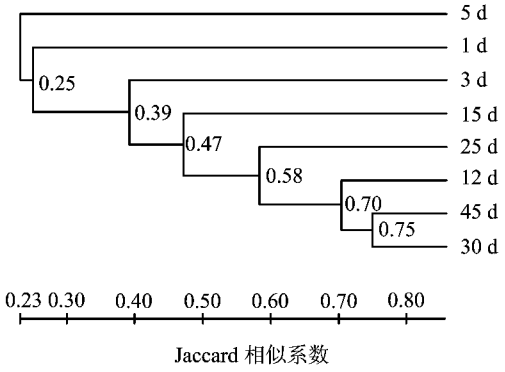

图8 堆肥过程中 AOA 菌群 DGGE 带谱的聚类分析结果

Fig. 8 Clustering analysis results of ammonia-oxidizing archaea DGGE patterns during the composting process

解转化十分重要。图 4 表明,硝态氮、亚硝态氮挥发量在 1 ～15 d 的逐渐爬升,15 ～25 d 的出现一个跃升,并且这个跃迁持续到 30 d,30 ～45 d 则上升缓慢,这也正反映了这一堆肥前中期的氨氧化作用活跃程度高于后期。

2.5 环境因子对 AOA 群落结构的影响

冗余分析(RDA)是研究特定因素对生物群落所造成的影响的生态学分析工具,其二维排序图表征不同因子对生物群落分布的影响。由堆肥过程中 AOA 群落变化与环境因子关系的 RDA 二维排序图(图9)可知,堆肥过程中温度、全氮、亚硝态氮和硝

态氮的连线较长，pH 和铵态氮的连线较短。堆肥第 1 d、第 5 d、第 25 d、第 30 d、第 45 d 时间样点之间距离较远，第 3 d、第 15 d 和第 12 d 的距离较近。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[17]。而时间样点的远近则表明不同堆肥阶段的 AOA 菌群的变化强弱，距离越远则变化越大。结合图 1 至图 4 可知，温度、全氮、亚硝态氮和硝态氮 4 个变量因子对 AOA 菌群影响较大，而且第 1 d、第 5 d、第 25 d、第 30 d、第 45 d 的变化较大。

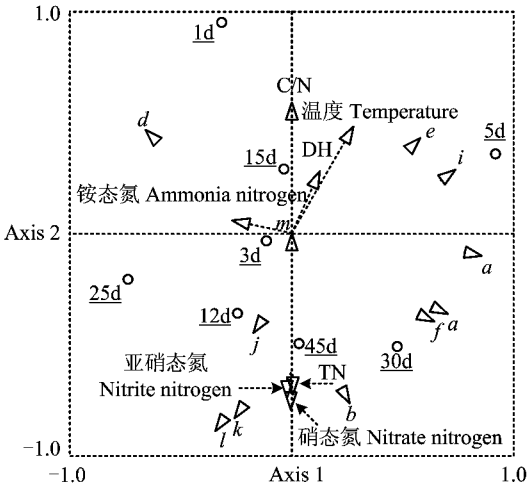

图 9　AOA 群落变化与环境因子关系的 RDA 二维排序图

Fig. 9　RDA biplot of AOA community and environmental variables during the composting process

3　讨论

温度能够影响微生物的生长速度、酶反应动力学以及化合物的溶解度等，从而对堆肥体系中 AOA 种群结构产生影响。Urakawa 等[29]研究表明，温度会影响 AOA 的遗传多样性和群落结构。然而，基于 AOA 特异脂类的研究表明，部分土壤、海洋的 AOA 种群数量受温度影响较小[16]。本试验堆肥体系中，AOA 一直存在且群落结构在高温期(5 d)和堆肥后期(25 ~ 45 d)发生剧烈的演替，说明 AOA 与其他硝化细菌一样，易受温度的影响。这一结果也与 Yamamoto 等研究表明 AOB 是堆肥高温期唯一存在的硝化微生物有所不同[24]。全氮、亚硝态氮和硝态氮是微生物活性、堆体温度、通风状况等联合作用的结果，同时也对 AOA 和堆肥状况产生影响。因此，这三者对 AOA 群落结构的演替影响显著。Wuchter 等研究表明，AOA 的 *amoA* 基因数量与海水中铵态氮浓度呈显著的负相关[30]。Auguet 等研究发现，氨氧化过程中反应物(铵)和产物(硝酸盐)的变化可导致 AOA 相对丰度和多样性的变化[31]。而本试验结果表明，铵态氮对 AOA 群落结构的演替影响不显著。

由于微生物分子生态学技术的发展和广泛运用，近年来发现在各种自然环境中均存在许多未培养的古菌，PCR-DGGE 技术被广泛应用于微生物群落多样性和种群动态监测，它不依赖于纯培养的手段为微生物群落多样性研究提供了更为丰富的信息。每条泳道上不同位置的条带代表着不同的 AOA 种群，条带越多，说明种群越丰富，条带越亮，表示该条带所代表的相应 AOA 数量就越多[32]。本试验 DGGE 图谱表明，各时期含 AOA *amoA* 功能基因的序列得到了较好的分离，条带位置清晰，亮度明显。8 个泳道上共识别出 12 条不同的条带，堆肥高温期和堆肥后期样品条带的差异较大，说明不同堆肥时期 AOA 菌群的数量和种类发生了明显的变化。这些变化可能与温度、pH、铵氮和硝态氮浓度等外界环境因素对 AOA 菌群产生一定的影响有关[24]。选择优势条带进行切胶测序，将测序结果在 NCBI 网站中进行比对发现，GenBank 中有匹配的 12 个样品 *amoA* 功能基因序列均被鉴定为未培养的 AOA，与相关菌落的相似性达到 94% ~ 96%。

近 20 年来，基于免培养的分子生态学技术，运用 16S rRNA 分析古菌的系统进化，均将 AOA 归为中温泉古菌(*non-thermophilic Crenarchaeota*)，隶属泉古菌门。但随着越来越多的宏基因组学对这一菌种的遗传组成进行研究，最终于 2008 年将 AOA 等中温泉古菌独立为古菌的第三个主要的门，即奇古菌门(*Thaumarchaeota*)[33]。因而，前人对于多数运用分子手段获得的 AOA 菌群序列信息多命名为 Uncultured ammonia-oxidizing archaeon 或者 Uncultured *crenarchaeote* 等。尽管环境中存在大量的 AOA，但由于难于在实验室进行培养和富集，其生理学特征仍然未能阐明[34]。目前只有少数 AOA 菌群被鉴定出来[33]，由于 GenBank 比对结果显示与样品序列相似的 AOA 均为未培养古菌，对于这些菌群的生理特征以及其菌属分类仍有待进一步的研究。

堆肥过程中 AOA 群落变化与堆体温度、pH 值、TN、C/N、NH_4^+-N、NO_3^--N 含量等环境因子关

系的 RDA 二维排序图中,堆肥过程中温度、全氮、亚硝态氮和硝态氮的连线较长,说明在堆肥过程中这些因素与 AOA 种群的结构相关性较大。采用手动选择,找出对群落结构演替有显著影响($P < 0.05$)的环境因子。利用 Monte Carlo permutation test 检验 RDA 排序轴特征值的显著性,置换次数为 999,RDA 分析结果也表明这 4 种环境因子对 AOA 群落结构的演替影响显著($P < 0.05$)。RDA 二维排序图中时间样点之间距离的远近可反应出两者 AOA 群落结构之间的差异性,距离越近,表示差异越小[35]。AOA 的群落结构在堆肥第 1、5、25、30、45 d 的变化较大,这一结果与 AOA 群落多样性分析的结果具有很好的一致性。

4 结论

1)不同堆肥时期鸡粪好氧堆肥 AOA 菌群的数量和种类发生了明显的变化。条带 b、m 是堆肥过程一直存在的 AOA 菌属,其中条带 b 与 AOA HH-2(GU225872.1)亲缘关系较近,相似性达到 96%,条带 m 与泉古菌 NM-152(HQ875225.1)亲缘关系较近,相似性达到 99%。说明这些 AOA 对环境条件变化的适应能力较强,可能在堆肥体系氨氮的氧化过程中发挥着重要的作用,有待进一步深入的研究。

2)不同堆肥阶段 AOA 的香农-威纳指数、均匀度指数均存在差异,第 5 d 和第 30 d 的香农-威纳指数、均匀度指数最大,多样性较为丰富。

3)对鸡粪好氧堆肥过程中 AOA 群落与环境因子的冗余分析结果表明,堆体温度、全氮、亚硝态氮和硝态氮对 AOA 群落演替有着显著的影响($P < 0.05$)。说明这些参数能有效控制鸡粪好氧堆肥过程中 AOA 的群落结构,可以通过优化堆肥工艺,调控 AOA 的多样性,提高硝化速率,减少氮素损失。

参 考 文 献:

[1] Wei Y S, Fan Y B, Wang M J *et al*. Composting and compost application in China [J]. Resour., Cons. Recycl., 2000, 30(4): 277-300.

[2] Eklind Y, Kirchmann H. Composting and storage of organic household waste with different litter amendments. Ⅱ: nitrogen turnover and losses [J]. Bioresour. Technol., 2000, 74: 125-133.

[3] Gu W J, Zhang F B, Xu P Z *et al*. Effects of sulphur and Thiobacillus thioparus on cow manure aerobic composting [J]. Bioresour. Technol., 2011, 102: 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 X D, Han Z Y, Shi D Z *et al*. Nitrogen loss and its control during live stock manure composting [J]. Chin. J. Appl. Ecol., 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]. Bioresour. Technol., 2002, 83: 189-194.

[6] 顾文杰, 张发宝, 徐培智, 等. 堆肥反应器中硫磺对牛粪好氧堆肥的保氮效果研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2011, 17(1): 224-230.
Gu W J, Zhang F B, Xu P Z *et al*. Nitrogen conservation by adding sulfur to dairymanure in compost bioreactors [J]. Plant Nutr. Fert. Sci., 2011, 17(1): 224-230.

[7] Wigley T M, Raper S C B. Interpretation of high projections for global-mean warming[J]. Science, 2001, 293: 451-454.

[8] Myles R A, Peter A S, John F B M *et al*. Quantifying the uncertainty in forecasts of anthropogenic climate change [J]. Nature, 2000, 407: 617-620.

[9] Fukumoto Y, Osada T, Hanajima D *et al*. Patterns and quantities of NH_3, N_2O and CH_4 emissions during swine manure composting without forced aeration-effect of compost pile scale[J]. Bioresour. Technol., 2003, 89(2): 109-114.

[10] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A *et al*. Bergey's manual of determinative bacteriology [M]. Baltimore: The Williams and Wilkins Company, 1994.

[11] Oved T, Shaviv A, Goldrath T. Influence of effluent irrigation on community composition and function of ammonia-oxidizing bacteria in soil [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2001, 67: 3426-3433.

[12] Purkhold U, Pommering-Röser A, Juretschko S *et al*. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: Implications for molecular diversity surveys[J]. Appl. Environ. Microbiol., 2000, 66: 5368-5382.

[13] Könneke M, Bernhard A E, De la Torre J R *et al*. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon [J]. Nature, 2005, 437: 543-546.

[14] Venter J C, Remington K, Heidelberg J F *et al*. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea [J]. Science, 2004, 304: 66-74.

[15] Francis C A, Beman J M, Kuypers M M. New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation[J]. Multidiscipl. J. Microbial. Ecol., 2007, 1(1): 19-27.

[16] Leininger S, Urich T, Schloter M *et al*. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils [J]. Nature, 2006, 442(7104): 806-809.

[17] 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 Y, Zeng G M, Chen Y N *et al*. Succession of ammonia-oxidizing bacteria community structure during agricultural waste composting[J]. Environ. Sci., 2011, 32(10): 3067-3072.

[18] 董莲华, 李宝珍, 袁红莉, 等. 褐煤腐植酸对土壤氨氧化古菌群落结构的影响[J]. 微生物学报, 2010, 50(6): 780-787.
Dong L H, Li B Z, Yuan H L *et al*. Effect of lignite humic acid on soil ammonia oxidizing archaea community[J]. Acta Microbiol. Sin., 2010, 50(6): 780-787.

[19] Yamamoto N, Asano R, Yoshii H *et al*. Archaeal community dynamics and detection of ammonia-oxidizing archaea during composting of cattle manure using culture-independent DNA analysis[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2011, 90: 1501-1510.

[20] 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 Ecol., 2010, 59: 25-36.

[21] Watanabe K, Kodama Y, Harayama S. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting[J]. J. Microbiol. Method., 2001, 44: 253-262.

[22] Luo H F, Qi H Y, Zhang H X. Assessment of the bacterial diversity in fenvalerate-treated soil [J]. World J. Microbiol. Biotechnol., 2004, 20: 509-515.

[23] 李艳霞, 王敏健, 王菊思. 有机固体废弃物堆肥的腐熟度参数及指标[J]. 环境科学, 1999, 20(2): 98-103.
Li Y X, Wang M J, Wang J S. The maturity indexes and standard of organic solid waste composting [J]. Chin. J. Environ. Sci., 1999, 20(2): 98-103.

[24] Yamamoto N, Otawa K, Nakai Y. Diversity and abundance of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea during cattle manure composting[J]. Microbial Ecol., 2010, 60(4): 807-815.

[25] Atchley S H, Clark J B. Variability of temperature, pH and moisture in aerobic composting process [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1979, 38: 1040-1044.

[26] 李吉进, 郝晋珉, 邹国元, 等. 高温堆肥碳氮循环及腐殖质变化特征研究[J]. 生态环境, 2004, 13(3): 332-334.
Li J J, Hao J M, Zou G Y *et al*. Carbon and nitrogen circulation and humus charac teristics of high-temperature composting[J]. Ecol. Environ., 2004, 13(3): 332-334.

[27] Said-Pullicino D, Erriquens F G, Gigliotti G. Changes in the chemical characteristics of water - extractable organic matter during composting and their influence on compost stability and maturity[J]. Bioresour. Technol., 2007, 98(9): 1822-1831.

[28] 吴银宝, 汪植三, 廖新俤, 等. 猪粪堆肥腐熟指标的研究[J]. 农业环境科学学报, 2003, 22(2): 189-193.
Wu Y B, Wang Z S, Liao X D *et al*. Study on mature index of composting swine manure[J]. J. Agro-Environ. Sci., 2003, 22(2): 189-193.

[29] Urakawa H, Tajima Y, Numata Y *et al*. Low temperature decreases the phylogenetic diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in aquarium biofiltration systems [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2008, 73: 3440-3445.

[30] Wuchter C, Abbas B, Coolen M J *et al*. Archaeal nitrification in the ocean[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006, 103: 12317-12322.

[31] 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]. Appl. Environ. Microbiol., 2011, 166(5): 1937-1945.

[32] Konstantinov S R, Zhu W Y, Williams B A *et al*. Effect of fermentable carbohydrates on piglet faecal bacterial communities as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA [J]. FEMS Microbiol. Ecol., 2003, 43(2): 225-235.

[33] 张丽梅, 贺纪正. 一个新的古菌类群—奇古菌门(*Thaumarchaeota*)[J]. 微生物学报, 2012, 52(4): 411-421.
Zhang L M, He J Z. A novel archaeal phylum: *Thaumarchaeota*—A review [J]. Acta Microbiol. Sin., 2012, 52(4): 411-421

[34] Konneke M, Bernhard AE, de la Torre J R *et al*. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon [J]. Nature 2005, 437 (7058): 543-546.

[35] Lepš J, Šmilauer P. Multivariate analysis of ecological data using CANOCO[M]. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2003.