

# 鸡粪好氧堆肥过程中细菌群落结构和功能分析

赵阳阳<sup>1</sup>, 刘银双<sup>1</sup>, 牛宏进<sup>1</sup>, 贾振华<sup>2</sup>, 李再兴<sup>1</sup>, 陈晓波<sup>1\*</sup>, 黄亚丽<sup>1\*</sup>

1 河北科技大学环境科学与工程学院, 河北 石家庄 050018

2 河北省科学院生物研究所, 河北 石家庄 050081

赵阳阳, 刘银双, 牛宏进, 贾振华, 李再兴, 陈晓波, 黄亚丽. 鸡粪好氧堆肥过程中细菌群落结构和功能分析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 1175-1187.

ZHAO Yangyang, LIU Yinshuang, NIU Hongjin, JIA Zhenhua, LI Zaixing, CHEN Xiaobo, HUANG Yali. The structure and function analysis of bacterial community during aerobic composting of chicken manure[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 1175-1187.

**摘要:** 为了明确鸡粪好氧堆肥过程中细菌群落结构和功能的变化, 采用高通量测序技术测定了好氧堆肥前、中、后 3 个时期样品的 16S rRNA 基因序列, 并进行了生物信息学分析。结果表明, 3 个堆肥阶段中仅有 10%左右的分类操作单元(operational taxonomic units, OTUs)具有阶段特异性; 不同发酵阶段细菌  $\alpha$  多样性指数 ACE、Chao1 和 Simpson 均呈现先升高后降低的趋势, 但各阶段间差异不显著( $P < 0.05$ )。3 个发酵阶段优势菌门类相同, 但丰度存在差异。线性判别分析[line discriminant analysis (LDA) effect size, LEfSe]法对细菌生物标志分析表明, 从门到属水平共有 49 个物种, 堆肥前期样品组中显著富集的物种最多, 后期最少。原核分类群功能注释(functional annotation of prokaryotic taxa, FAPROTAX)对细菌功能多样性分析表明, 堆肥前期细菌功能多样性最高, 而随着发酵进行细菌功能富集程度增加、多样性降低。该研究为畜禽粪污好氧堆肥过程调控提供理论支撑和技术指导。

**关键词:** 鸡粪; 好氧堆肥; 细菌群落; 微生物功能; 高通量测序

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFD1901004-5); 河北省重点研发计划(20327507D)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFD1901004-5) and the Key Research and Development Program of Hebei Province (20327507D).

\*Corresponding authors. E-mail: CHEN Xiaobo, zzschenxiaobo@163.com; HUANG Yali, huangyali2291@163.com

Received: 2022-07-21; Accepted: 2022-10-05; Published online: 2022-10-11

# The structure and function analysis of bacterial community during aerobic composting of chicken manure

ZHAO Yangyang<sup>1</sup>, LIU Yinshuang<sup>1</sup>, NIU Hongjin<sup>1</sup>, JIA Zhenhua<sup>2</sup>, LI Zaixing<sup>1</sup>, CHEN Xiaobo<sup>1\*</sup>, HUANG Yali<sup>1\*</sup>

1 School of Environmental Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, Hebei, China

2 Institute of Biology, Hebei Academy of Sciences, Shijiazhuang 050081, Hebei, China

**Abstract:** In order to determine the changes of bacterial community structure and function in the early, middle and late stage of aerobic composting of chicken manure, high-throughput sequencing and bioinformatics methods were used to determine and analyze the 16S rRNA sequence of samples at different stages of composting. Wayne analysis showed that most of the bacterial OTUs in the three composting stages were the same, and only about 10% of the operational taxonomic units (OTUs) showed stage specificity. The diversity indexes including Ace, Chao1 and Simpson showed a trend of increasing at first, followed by decreasing. However, there was no significant difference among different composting stages ( $P < 0.05$ ). The dominant bacteria groups in three composting stages were analyzed at the phylum and genus levels. The dominant bacteria phyla at three composting stages were the same, but the abundances were different. LEfSe (line discriminant analysis (LDA) effect size) method was used to analyze the bacterial biological markers with statistical differences among three stages of composting. From the phylum to genus level, there were 49 markers with significant differences among different groups. The markers included 12 species, 13 genera, 12 families, 8 orders, 1 boundary, and 1 phylum. The most biomarkers were detected at early stage while the least biomarkers were detected at late stage. The microbial diversity was analyzed at the functional pathway level. The function diversity was the highest in the early stage of composting. Following the composting, the microbial function was enriched relatively while the diversity decreased. This study provides theoretical support and technical guidance for the regulation of livestock manure aerobic composting process.

**Keywords:** chicken manure; aerobic composting; bacterial community; microbial function; high-throughput sequencing

好氧堆肥是畜禽粪便资源化利用最主要的方式<sup>[1]</sup>,也是我国当前“双碳”目标下减少农业排放的重要途径。好氧堆肥是微生物与堆体环境相互影响和作用的结果,其实质是微生物驱动的物质转化过程<sup>[2]</sup>,堆肥过程的调控实际上是对微生物种群结构和功能的调控<sup>[3]</sup>。因此,明确好氧发

酵过程中微生物群落结构和功能对于研制高效稳定的腐熟菌剂和堆肥过程的定向调控具有重要的意义。

好氧堆肥涉及的微生物菌群庞杂、演替迅速,采用可培养方法对堆肥高温期微生物进行分析,发现腐熟菌群包括细菌、真菌、放线菌(与

其他细菌分别计数), 涉及纤维素、淀粉、脂肪等大分子的降解和转化<sup>[4-6]</sup>。但是, 环境中大多数菌系不能分离培养, 因而基于常规可培养方法对堆肥过程中微生物的认识, 难以全面、真实地反映腐熟微生物群落的结构和功能。基于液相色谱法的磷脂脂肪酸分析(phospholipid fatty acid, PLFA)和基于分子生物学方法的变性梯度凝胶电泳技术(denatured gradient gel electrophoresis, DGGE)等检测技术的发展及在粪污堆肥菌群分析中的应用, 能够使研究者在属或种的水平上分析好氧堆肥微生物菌群的结构<sup>[7-8]</sup>。但是, 这些方法还是不能精确评价样品中微生物菌群的丰度、结构和演替<sup>[9]</sup>。而高通量测序技术通过测定样品中的 16S rRNA 基因序列进行微生物的群落分析, 能够更加全面和准确地分析环境中微生物的群落结构、多样性、丰度和功能<sup>[10]</sup>。许修宏等采用高通量测序技术分析牛粪和秸秆腐熟发酵过程不同发酵阶段细菌群落的变化情况, 不同发酵阶段部分微生物在门及属、种水平上均存在差异<sup>[11]</sup>。堆体温度和有机碳对发酵菌群丰度与组成存在较大影响<sup>[12-13]</sup>。Liang 等的研究发现, 含水率也对发酵微生物活性具有显著的影响<sup>[14]</sup>。堆肥基质 pH<sup>[15]</sup>和初始 C/N<sup>[16]</sup>对整个堆肥过程中的微生物群落同样影响显著, 嗜热裂孢菌属(*Thermobifida*)、嗜热链球菌属(*Mycothermus*)和嗜热丝孢菌属(*Thermomyces*)等的微生物丰度与 pH 呈正相关<sup>[2]</sup>。发酵原料的成分也是影响微生物群落结构的重要因素, 在木质素含量较高的堆体中寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和中华芽孢杆菌属(*Sinibacillus*)等与木质素降解有关的微生物高度富集<sup>[17]</sup>。总之, 好氧堆肥是由多种微生物驱动的有机物质降解和转化的过程, 其微生物菌群结构受发酵原料组成<sup>[17-19]</sup>、堆体环境<sup>[2,10]</sup>等诸多因素的影响。因此, 针对好氧堆肥过程进行微生物菌群结构和功

能分析, 有利于明确腐熟发酵的微生物机制、为好氧堆肥的有效控制提供理论指导。

鸡粪是我国最为重要有机肥源, 但是针对鸡粪好氧堆肥过程中微生物菌群的研究相对较少, 堆肥不同阶段细菌菌群结构及功能的演替研究还未见系统报道。因此, 本研究采用高通量测序技术与生物信息学分析相结合的方法, 以鸡粪堆肥中占微生物群落 90%以上的细菌为研究对象, 探究鸡粪不同腐熟发酵阶段细菌的群落结构及功能, 确定不同阶段的细菌标志菌群, 为鸡粪好氧堆肥过程的调控及高效资源化利用提供理论依据, 这对于好氧堆肥过程中微生物菌群的精准调控、降低碳氮等养分损失具有重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

堆肥试验在河北瑞安康生物科技有限公司(位于石家庄市赵县南柏舍村)进行, 采用条垛式进行鸡粪的好氧堆肥, 以小麦秸秆作为辅料, 调节碳氮比为 30:1, 堆垛底宽 2.0 m, 高度约为 1.5 m, 长度 20.0 m。微生物腐熟菌剂(功能菌为枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌, 有效活菌数 $\geq 2 \times 10^8$  CFU/g, 购自沧州旺发生物技术研究有限公司), 按照 0.2%进行接种。实验设置 3 次重复。从建堆第 3 天开始, 采用翻抛机翻堆 1 次/d, 堆温降至 45 °C 后停止翻堆, 堆肥周期为 30 d。利用数显温度计测量和记录空气环境和堆体的温度, 每天测定 3 次取平均值(图 1)。分别于 a: 堆肥前期[建堆第 2 天, 堆体温度(30±3) °C]、b: 堆肥中期[建堆第 10 天, 堆体温度(62±2) °C]、c: 堆肥后期[建堆第 25 天, 堆体温度(39±3) °C]采集样品。样品取自距堆体表层 50 cm 处, 5 点取样法取样, 将 5 点的样品混合为 1 个样品, -80 °C 保存备用。

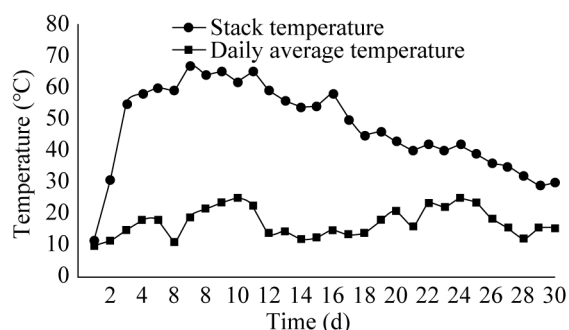


图1 堆体和环境温度变化

Figure 1 Changes of the temperature of compost pile and environment.

## 1.2 堆肥样品总 DNA 的提取和 16S rRNA 基因序列的扩增

采用天根生化科技(北京)有限公司 DNA 提取试剂盒(型号:DP812, TGuide S96 磁珠法)进行样品 DNA 的提取。以提取的 DNA 为模板进行 16S rRNA 基因序列的扩增, 扩增上游引物序列为 338F: 5'-ACTCCTACGGAGGCAGCA-3', 下游引物序列为 806R: 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'<sup>[20]</sup>。PCR 扩增体系: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 40 s, 共 25 个循环; 72 °C 7 min, 4 °C 结束反应; 采用 1.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 反应产物。

## 1.3 PCR 产物的高通量测序

将符合要求的 PCR 产物使用 VAHTSTM DNA Clean Beads 磁珠进行纯化, 采用 TruSeq DNA Kit (Illumina 公司)进行文库构建。使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 对文库的片段范围及浓度进行检测, 检测合格的文库送至北京百迈客生物科技有限公司采用 Illumina NovaSeq 6000 测序平台进行高通量测序。

## 1.4 数据分析

高通量测序得到原始图像数据文件, 经碱基识别分析转化为原始测序序列后, 数据经拼接、过滤、比对处理, 得到有效数据。利用 Uparse

(version 10.0)软件 Python 语言工具在相似性 97% (默认)的水平上对有效序列进行聚类, 默认以测序序列数的 0.005%作为阈值过滤分类操作单元(operational taxonomic units, OTUs)。用 Mother (v.1.31.2)软件与 SILVA 的 SSUrRNA 数据库对 OTUs 代表序列进行物种注释分析, 获得对应物种信息及在各个分类水平物种丰度情况。

使用 QIIME 软件计算  $\alpha$  多样性指数。使用 R 软件绘制 PCoA 图, 对不同样品和分组的群落结构差异进行分析。使用 LEfSe 软件对不同堆肥时期的微生物种群进行线性判别分析[line discriminant analysis (LDA) effect size, LEfSe], 并绘制 LEfSe 图, 默认设置 LDA Score 的筛选值为 4, 获得不同分组间物种差异。菌群的基本功能预测使用原核分类群功能注释(functional annotation of prokaryotic taxa, FAPROTAX)软件进行分析, 并生成描述具有特征性状类群相对丰度的贡献图 (<https://international.biocloud.net/zh/dashboard>)。

采用 SPSS 软件进行单因素方差分析(analysis of variance, ANOVA), 采用 Duncan 新复极差法进行多重比较和显著性检验。表中同列中不同字母表示在  $P < 0.05$  水平上差异显著。图中, \*:  $P < 0.05$  水平上差异显著; \*\*:  $P < 0.01$  水平上差异显著; \*\*\*:  $P < 0.001$  水平上差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 鸡粪不同好氧堆肥阶段细菌菌群的 OTUs 注释结果分析

对鸡粪好氧堆肥前期、中期和后期的样本进行高通量测序, 共计获得 645 861 条有效序列, 3 个时期平均有效序列依次为 68 499、72 073 和 74 714 条。利用 RDP classifier 对每个 OTUs 的代表序列进行物种注释分析, 共计注释得到

OTUs 948 个, 其中前期、中期和后期样本分别为 759、824 和 799 个 OTUs。韦恩图分析表明(图 2A), 3 个时期共有细菌 OTUs 585 个, 占注释 OTUs 总数的 61.71%, 前、中、后期独有 OTUs 分别为 12、17、70 个。由此可知, 鸡粪中存在着复杂多样的原初细菌菌群, 鸡粪堆肥过程仅是有少数的细菌菌群发生了变化并驱动着物质的转化。

## 2.2 鸡粪不同好氧堆肥阶段细菌菌群的 $\alpha$ 多样性分析

对不同好氧堆肥阶段鸡粪样品中细菌菌群的  $\alpha$  多样性指数进行分析, 如表 1 所示, ACE、Chao1 和 Shannon 指数均为发酵中期最高, 其次为前期, 后期最低。结果表明, 随着发酵过程的进行、物

质转化的加速, 堆体中的细菌活动增加、多样性升高。随着物质转化完成, 发酵过程的结束, 细菌活动减少, 部分嗜热微生物休眠或死亡, 另有不耐热细菌菌群也在高温阶段后死亡, 导致堆肥后期细菌多样性降低。对 3 个不同堆肥阶段的细菌多样性指数进行显著性分析, 发现 3 个阶段细菌多样性指标均不存在显著差异, 说明 3 个阶段共有细菌菌群居多, 这与韦恩分析结果较为一致。

## 2.3 鸡粪不同好氧堆肥阶段细菌菌群的 $\beta$ 多样性分析

由鸡粪不同发酵阶段微生物菌群的 UPGMA 聚类结果分析可知(图 2B), 鸡粪好氧堆肥前期、中期和后期样本分别聚集于 3 个独立小

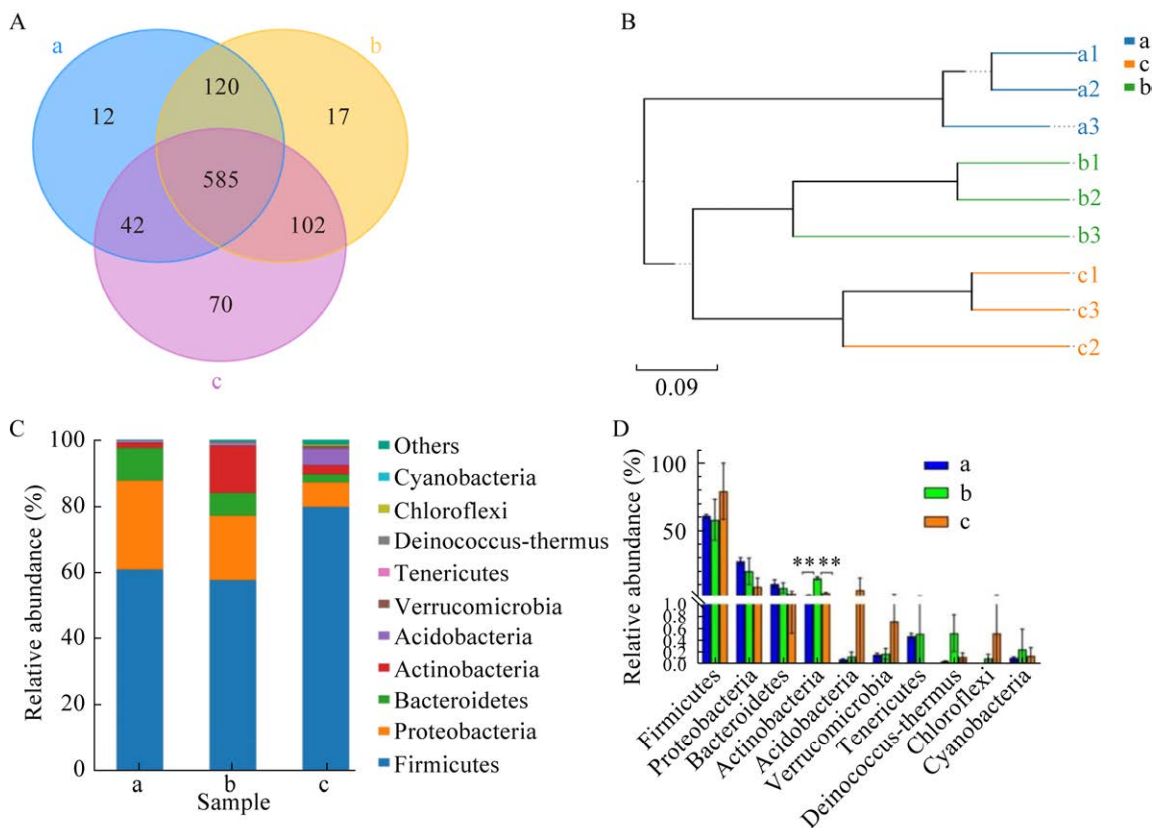


图 2 鸡粪不同好氧堆肥阶段样品细菌菌群的韦恩图分析(A)、UPGMA 聚类树(B)和门水平菌群丰度(C, D)

Figure 2 Venn diagram analysis, UPGMA cluster tree and community structure of bacteria flora at different stages of chicken manure composting. A: Venn diagram. B: UPGMA cluster tree. C: Bacterial community structure. D: Difference analysis. a: Early stage of composting; b: Middle stage of composting; c: Late stage of composting. The same below.

表 1 鸡粪不同好氧堆肥阶段样品中细菌菌群的  $\alpha$  多样性

Table 1 Alpha diversity of bacterial communities at different stages of chicken manure composting

Groups	ACE index	Chao1 index	Simpson index	Shannon index
Early stage	716.82±8.29a	728.02±2.39a	0.95±0.01a	6.01±0.16a
Middle stage	767.92±32.86a	774.33±39.55a	0.95±0.05a	6.59±1.14a
Later stage	681.66±86.69a	708.51±90.00a	0.94±0.03a	5.79±1.11a

The same letters in the same column represent no significant difference between groups ( $P>0.05$ ).

支,说明同一发酵阶段微生物菌群相似性和均一性较高,不同阶段微生物菌群存在明显的差异性。其中,中期和后期发酵样品的菌群聚集于一个大支,表明发酵中期和后期的细菌群落结构更为相似,与鸡粪中原始菌群相比发生了较为明显的变化。

## 2.4 鸡粪不同好氧堆肥阶段细菌菌群组成分析

### 2.4.1 鸡粪不同好氧堆肥阶段门水平上细菌群落构成及差异分析

在门水平上分析了鸡粪发酵前期、中期和后期样品中细菌群落构成,3个时期的细菌均为18个相同的菌门,但丰度存在差异。图2C为相对丰度前10位的菌门,3个发酵阶段居第1、2位的优势菌门均为厚壁菌门(Firmicutes)和变形菌门(Proteobacteria)。其中,厚壁菌门(Firmicutes)发酵前、中、后期的丰度分别为60.76%、57.73%和79.63%,呈现先降低后升高的趋势;变形菌门(Proteobacteria)的丰度依次为26.88%、19.36%和7.48%,丰度随发酵而逐渐降低。3个发酵阶段居第3和第4位的优势菌门存在差异,其中前期分别为拟杆菌门(Bacteroidetes)和放线菌门(Actinobacteria);中期放线菌门(Actinobacteria)丰度由前期的1.44%增加为14.14%,居第3位;后期酸杆菌门(Acidobacteria)丰度上升,居第3位。显著性分析表明,发酵中期放线菌门(Actinobacteria)丰度与前期和后期均呈现显著差异( $P<0.01$ ),后期厚壁菌门(Firmicutes)、酸杆

菌门(Acidobacteria)、绿湾菌门(Chloroflexi)菌群丰度升高(图2D)。

### 2.4.2 鸡粪不同好氧堆肥阶段属水平上细菌群落构成及差异分析

在属水平上分析鸡粪不同好氧堆肥阶段细菌菌群结构发现,前期、中期、后期分别有299、319和253个属,以堆肥中期微生物属最丰富(图3A)。对不同阶段优势菌群进行显著性分析,其中前期样本中丰度居前5位的优势菌群依次为栖鸡球菌属(*Gallicola*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、埃希氏菌属(*Escherichia*)、拟杆菌属(*Bacteroides*),相对丰度分别为12.85%、11.61%、11.04%、8.07%和6.56%(图3B),其中前4个菌属的丰度均极显著高于中期和后期( $P<0.01$ 或 $P<0.001$ )。发酵中期丰度居前5位的优势属依次为芽孢杆菌属(*Bacillus*)、依格纳季氏菌属(*Ignatzschineria*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、嗜蛋白脲菌属(*Peptoniphilus*)和棒杆菌属(*Corynebacterium\_1*),其中,芽孢杆菌属(*Bacillus*)的丰度为18.30%,是发酵前期的124.93倍,依格纳季氏菌属(*Ignatzschineria*)和棒杆菌属(*Corynebacterium\_1*)属的丰度与前期和后期均存在极显著差异( $P<0.01$ )(图3C)。发酵后期优势菌群均属于芽孢杆菌科,丰度前五位的依次为芽孢杆菌科未培养菌(*uncultured\_bacterium\_f\_Bacillaceae*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假纤细芽孢杆菌属(*Pseudogracilibacillus*)、中华芽孢杆菌属

(*Sinibacillus*)和新芽孢杆菌属(*Novibacillus*), 其中芽孢杆菌属(*Bacillus*)和中华芽孢杆菌属(*Sinibacillus*)在中后期均丰度较高, 而芽孢杆菌科未培养菌(*uncultured\_bacterium\_f\_Bacillaceae*)、假纤细芽孢杆菌属(*Pseudogracilibacillus*)和新芽孢杆菌属(*Novibacillus*)的菌群丰度极显著高于前期和中期( $P<0.01$  或  $P<0.001$ ), 为后期富集的菌属(图 3D)。

## 2.5 鸡粪不同好氧堆肥阶段细菌菌群的 LEfSe 分析

采用 LEfSe 分析获得了 3 个堆肥阶段的生物标记(图 4), 从门到种水平, 3 个时期共筛选获得 49 个生物标记物种, 包括 1 界、1 门、2 纲、8 目、12 科、13 属、12 种。其中, 发酵前期具有统计学差异的生物标记最多, 分布包括 1 界、2 纲、4 目、6 科、5 属、6 种, 主要属于 3 大类:

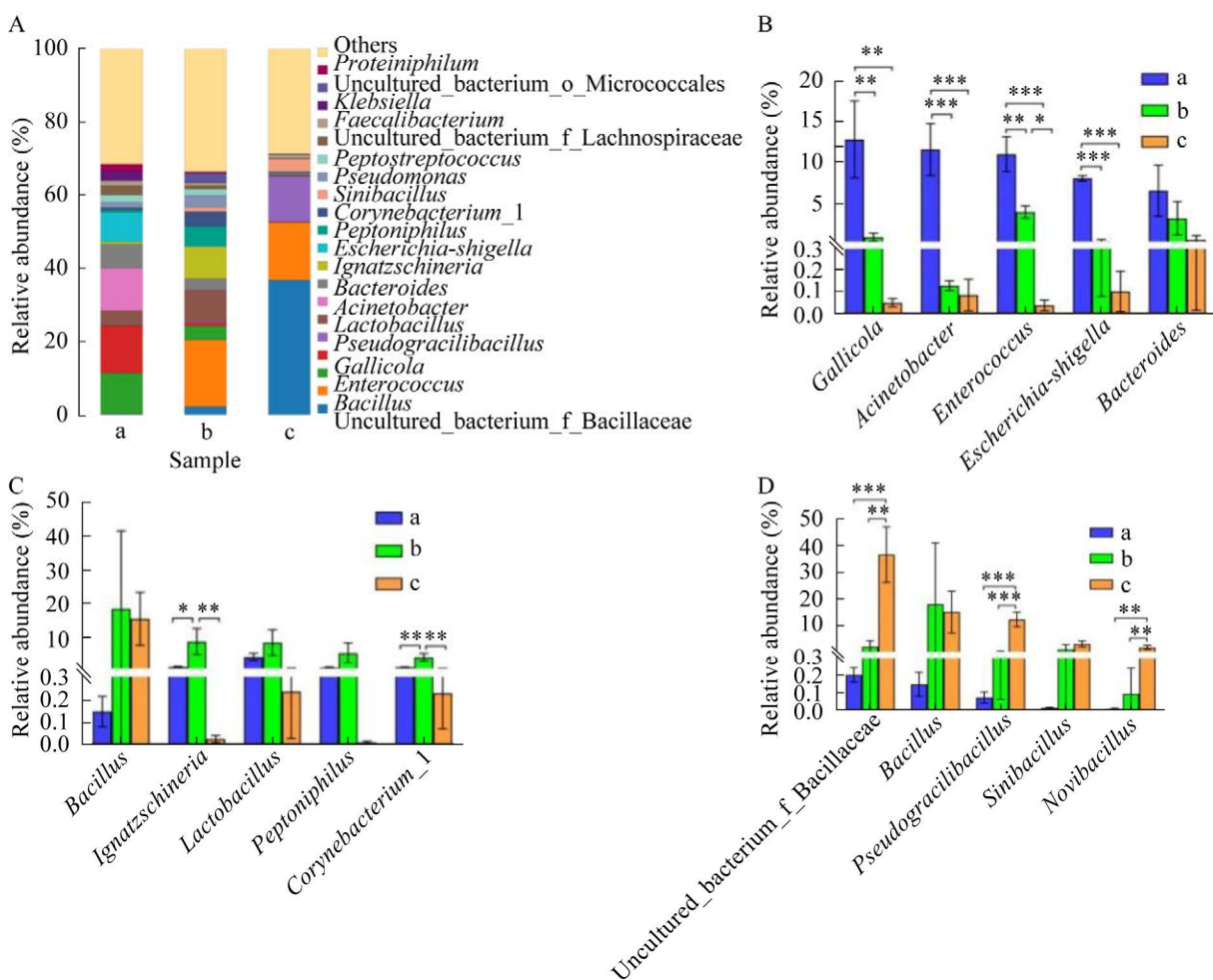


图 3 鸡粪不同好氧堆肥阶段样品中属水平细菌菌群结构(A)及差异分析(B, C, D)

Figure 3 Bacterial community structure and difference analysis at the genus level of different stages of chicken manure composting. A: Microflora structure at the genus level. B: Difference analysis of the top 5 dominant genera at the early stage with the middle and late stages of composting. C: Difference analysis of the top 5 dominant genera at the middle stage with the early stage and late stages of composting. D: Difference analysis of the top 5 dominant genera at the late stage with the early stage and middle stage of composting. \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ; \*\*\*:  $P<0.001$ . a: Early stage of composting; b: Middle stage of composting; c: Late stage of composting. The same below.

梭菌纲(Clostridia)中梭菌目(Clostridiales)栖鸡球菌属(*Gallicola*)及其包含的未培养细菌种; 乳杆菌目(Lactobacillales)中的肉杆菌科(Carnobacteriaceae)、气球菌科(Aerococcaceae)

和肠球菌科(Enterococcaceae)及其包含的肠球菌属(*Enterococcus*)及其下属的未培养细菌种;  $\gamma$ 变形菌纲(Gammaproteobacteria)的假单胞菌目(Pseudomonadales)及莫拉氏菌科(Moraxellaceae)、

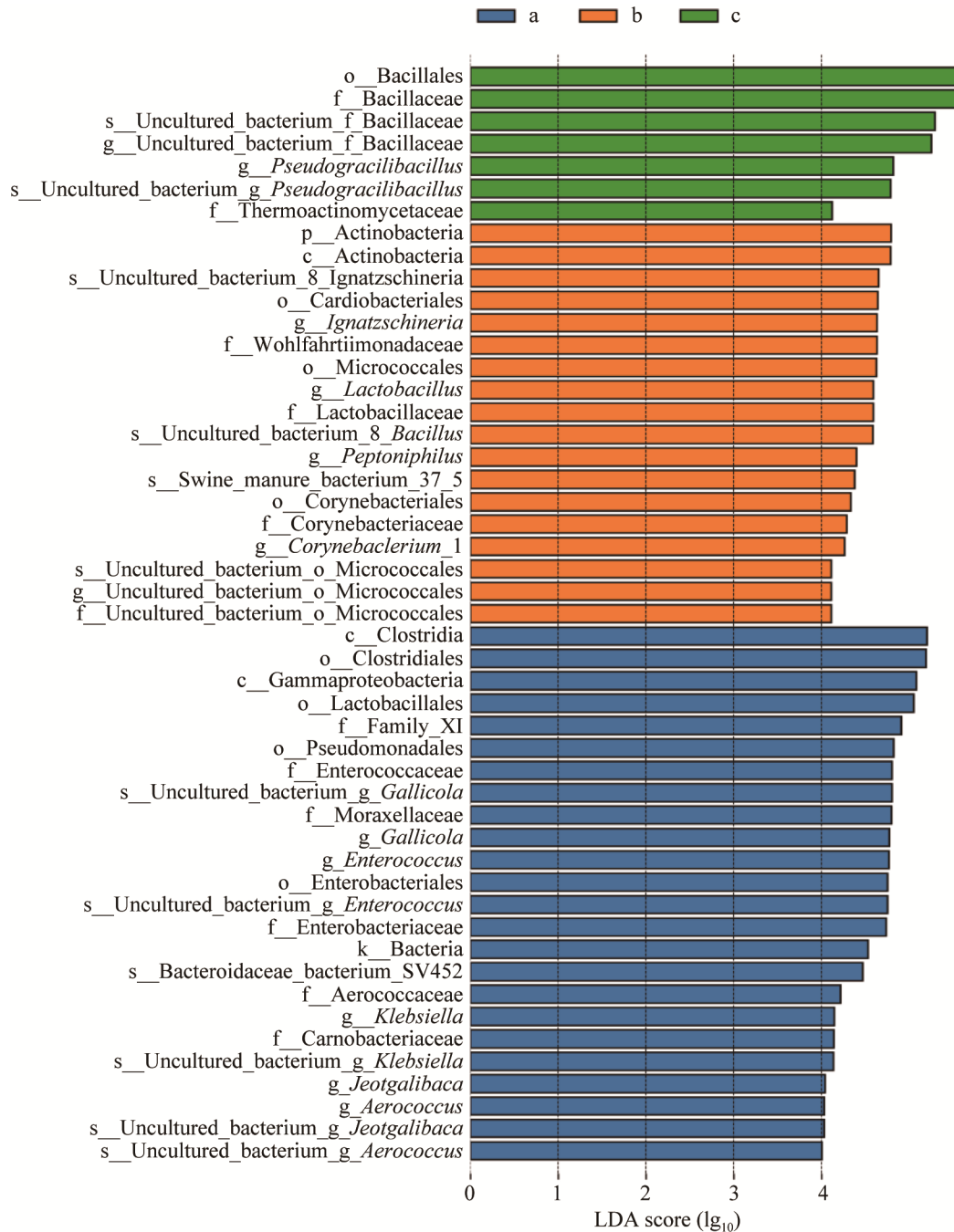


图4 鸡粪不同好氧堆肥阶段样品中生物标志菌的 LEfSe 分析图

Figure 4 LEfSe analysis figure of biomarker bacteria at different stages of chicken manure composting. a: Early stage of composting; b: Middle stage of composting; c: Late stage of composting. The same below.



肠杆菌目 (Enterobacteriales)、肠杆菌科 (Enterobacteriaceae) 和克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*) 等, 这些菌以动物常见肠道菌群或动物病原菌群为主。发酵中期显著富集的物种共计 18 个, 其中以放线菌门 (Actinobacteria) 最多, 包括放线菌纲 (Actinobacteria) 的微球菌目 (Micrococcales) 和棒杆菌目 (Corynebacteriaceae), 其中微球菌目 (Micrococcales) 中显著富集的包括乳杆菌科 (Lactobacillaceae)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*), 棒杆菌目 (Corynebacteriaceae) 显著富集的包括棒杆菌科 (Corynebacteriales)、棒杆菌属 (*Corynebacterium\_1*), 共计 1 门、1 纲、2 目、2 科、2 属、1 种等 9 个富集菌群, 占中期富集菌群的 50%。发酵后期样品中生物标记的物种最少, 仅 7 个, 其中 6 个属于芽孢杆菌目 (Bacillales), 包括芽孢杆菌科 (Bacillaceae) 及其下属的假纤细芽孢杆菌属 (*Pseudogracilibacillus*) 和其他的芽孢杆菌类的未培养菌, 所有后期富集菌群均为耐热细菌。

## 2.6 鸡粪不同好氧堆肥阶段细菌功能途径分析

采用 FAPROTAX 方法对好氧堆肥阶段样品中细菌菌群进行代谢通路富集分析 (Kyoto encyclopedia of genes and genome pathway, KEGG pathway) (level-2) (图 5)。结果显示, 3 个发酵阶段细菌的功能途径存在明显差异。其中, 堆肥前期以微生物的化能异养和发酵功能为主, 丰度分别为 29.92% 和 22.86%, 其他细菌功能为动物寄生和共生、硝酸盐还原、人类病原菌、芳香化合物降解、人类肠道和动物肠道等。堆肥前期, 堆体中有机物种类和含量丰富, 细菌组成多样, 因此, 细菌菌群的 KEGG 途径多样性最大。与发酵前期比较, 堆肥中期细菌功能富集程度高、构成简单, 丰度前 3 位的功能类型依次为化能异氧、发酵和锰氧化, 其丰度分别为 35.15%、

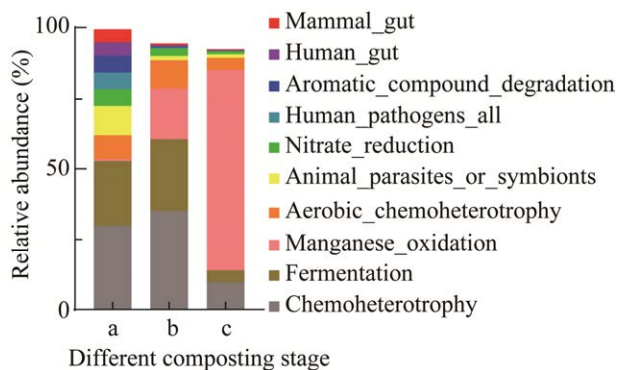


图 5 鸡粪不同好氧堆肥阶段样品中微生物功能分析图

Figure 5 Gene function figure at different composting stage of chicken manure. a: Early stage of composting; b: Middle stage of composting; c: Late stage of composting. The same below.

25.40% 和 18.18%, 说明该阶段化能异养、发酵及锰氧化相关的微生物活动频繁、丰度较高。堆肥后期, 由于有机物含量降低、微生物活动减少, 细菌功能富集程度增加、多样性降低。与前期和中期相比, 后期化能异养和发酵功能的丰度均降低, 锰氧化功能成为堆肥后期丰富度最高的 KEGG 途径, 相对丰度达 71.13%。锰氧化功能主要分布于厚壁菌门 (Firmicutes) 和放线菌门 (Actinobacteria) 的细菌中<sup>[21]</sup>, 该功能在堆肥中、后期的富集与中后期厚壁菌门 (Firmicutes) 和放线菌门 (Actinobacteria) 的细菌丰度增加相符。

## 3 讨论与结论

好氧堆肥的本质是复杂微生物群体协同作用于有机基质的生化过程<sup>[3,22]</sup>。细菌作为微生物中含量最多、丰度最高的类群, 是好氧发酵过程中的优势菌群, 控制了堆肥发酵过程中 70%–80% 的生化反应<sup>[23]</sup>, 在畜禽粪污堆肥过程中起着不可或缺的作用。加强粪便好氧堆肥过程中细菌群落结构分析, 对腐熟过程的高效调控具有重要的意义, 因此引起了世界上许多学者的关注<sup>[24-25]</sup>。

本研究采用 Illumina NovaSeq 6000 平台进行了堆肥样品中细菌 16S rRNA 基因序列的高通量测序,从 3 个时期的样品中共获得 948 个 OTUs。Sun 等<sup>[26]</sup>以牛粪为发酵原料的研究发现,共计得到 OTUs 991 个。OTUs 的总量在不同研究中差异较小,说明对于堆肥系统来说,均含有庞杂的细菌类群。对不同堆肥阶段的细菌 OTUs 进行韦恩分析,仅有 10%左右的 OTUs 具有阶段特异性,说明鸡粪腐熟发酵过程中仅有少数菌群发生变化。菌群在 OTUs 水平上的差异导致了细菌 ACE、Chao1、Simpson 等  $\alpha$  多样性指数均呈现先升高后降低的趋势。堆肥后期细菌多样性指数最低,主要是随着微生物对堆体中养分物质的转化、速效养分含量消耗殆尽,导致了后期微生物多样性的降低;另外,堆肥中期高温对部分微生物的杀灭作用,也是堆肥后期细菌多样性降低的重要因素。王晶等<sup>[7]</sup>采用 DGGE 图谱方法对奶牛粪便和稻草混合堆肥过程中 0、2、5、8、11、14、17、21、25、28、31 d 的堆肥样品进行细菌多样性分析,细菌多样性在发酵过程中呈现出先上升后下降再上升的趋势,具体分析其多样性上升的时间点为高温期结束后(堆肥时间 21 d),该堆肥时间的微生物多样性较堆肥 17 d 时略有升高,但是仍低于堆肥 0-14 d 时的细菌多样性,从整个堆肥时期分析微生物多样性与本研究的趋势相同,均为堆肥中期(5-14 d)多样性最高、其次为堆肥前期(0-2 d)、堆肥后期(17-31 d)最低,且不同时期微生物也具有一定程度的相似性,最小的相似性也为 38%。Ren 等<sup>[10]</sup>采用 Illumina MiSeq 测序平台分析牛粪堆肥样品中的 16S rRNA 基因序列,结果表明堆肥过程中细菌多样性也呈现升温腐熟阶段>堆肥初期>腐熟期的趋势,与本研究一致。总体来说,堆肥前期和中期细菌可利用底物丰富、环境条件适合,因此微生物多样性丰富。堆肥后期细菌可利用底物减

少,大部分不易被微生物分解转化,限制了微生物的生长繁殖,多样性降低。

在门水平上分析了 3 个好氧堆肥阶段的细菌菌群构成,3 个堆肥阶段 18 个菌门类均相同,优势菌门均为厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)等,但各优势菌门丰度存在较大差异。3 个发酵阶段中丰度最高的菌门均为厚壁菌门,丰度在 50%-80%之间,且以堆肥后期丰度最高。厚壁菌门(Firmicutes)在自然界中生态位较广,能够在逆境环境中形成抗逆性极强的芽孢,因此在不同的环境和堆肥时期均占据优势。许多研究报道了芽孢杆菌在堆肥过程中的重要性,这也是目前有机物料腐熟菌剂多以芽孢杆菌为功能菌的研究基础<sup>[27-28]</sup>。尽管对厚壁菌门(Firmicutes)在腐熟发酵过程中的重要性已经达成共识,但不同的好氧堆肥细菌菌群多样性研究中,厚壁菌门(Firmicutes)的丰度却存在较大的差异。Sun 等<sup>[26]</sup>研究牛粪发酵过程中厚壁菌门(Firmicutes)的丰度时发现,厚壁菌门(Firmicutes)中细菌的丰度随发酵过程呈现先上升后下降的趋势,在后熟阶段丰度较小。而本研究结果表明,厚壁菌门(Firmicutes)随堆肥进程逐渐升高,以堆肥后期丰度最高,进一步说明不同发酵原料对细菌菌群的影响。另外,本研究接种了含芽孢杆菌的腐熟菌剂,也是影响堆肥过程细菌菌群结构的重要因素。

变形菌门(Proteobacteria)由于其生长快速和代谢多样,在自然界中分布最为广泛,不仅包括固氮菌等有益微生物还包括很多病原菌。前人研究发现在不同的好氧堆肥系统中均有丰度较高的变形菌门存在<sup>[17]</sup>,Sun 等<sup>[26]</sup>的研究结果显示,变形菌门(Proteobacteria)丰度在发酵过程中呈现先升高后降低的趋势,且在发酵第 7 天之前均丰度最大。本研究结果也表明,变形菌门是鸡粪腐

熟发酵过程中的优势菌门,但随着发酵的进行丰度逐渐降低,这种趋势的不一致有可能来源于本研究取样设定的时间间隔较大,从而没有呈现出前期的丰度上升的过程。

3个阶段丰度占第3位的细菌门类存在差异,前、中和后期分为拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria),其中拟杆菌门(Bacteroidetes)是肠道以及多种厌氧消化反应器的优势菌门,与有机物吸收、利用密切相关,能够分解碳水化合物,将纤维素、半纤维素及其他多糖类物质成为小分子物质<sup>[29]</sup>。拟杆菌门(Bacteroidetes)在本研究中,丰度随发酵过程而逐渐降低,这与堆体中养分含量及转化过程相符,许修宏等<sup>[11]</sup>的研究结果与本研究结果相一致。放线菌是一种呈菌丝状生长和以孢子繁殖为主的原核生物,能够忍受较高的温度环境条件,是堆肥高温期分解木质纤维素的优势菌群,也是目前我国有机物料腐熟剂的常用功能菌株,堆肥过程中放线菌数量变化动态可反映腐熟程度和效果<sup>[5]</sup>。本研究发现,放线菌门(Actinobacteria)丰度以发酵中期丰度最高,丰度由前期的1.44%增加为14.14%,说明其在高温堆肥阶段发挥着重要的作用。另外,放线菌门(Actinobacteria)的丰度还受含氧量、pH等环境因素的影响,含氧量高的堆体放线菌门(Actinobacteria)丰度高,为发酵过程的调控提供了依据。酸杆菌门(Acidobacteria)是土壤环境中最常见的细菌门之一,在土壤物质循环、活性代谢产物的产生方面起着非常重要的作用<sup>[30]</sup>。该菌的相对丰度在堆肥过程中逐渐增多,其丰度在好氧堆肥后期达到最高,这归因于该菌为一种寡营养菌,能够在相对较为严峻的条件下实现纤维类残体的降解<sup>[19]</sup>。但是,由于该菌培养较难,对其的应用研究还较少。

属分类水平细菌群落结构分析表明,好氧堆

肥前期各属的丰度较为相近,优势菌群以肠道菌群为主,部分为厌氧或兼性厌氧菌,这些菌群的丰度均与中期和后期呈现显著差异,说明这些菌群随着腐熟发酵过程快速演替,部分菌群死亡。到发酵中期,细菌菌群呈现较为明显的富集现象。其中,芽孢杆菌属(*Bacillus*)的丰度达到19.8%,在好氧堆肥过程中占有主导地位。芽孢杆菌能形成较厚的孢子壁以抵抗高温、辐射等不良环境,在碳水化合物代谢中起着重要的作用<sup>[24]</sup>,是堆肥高温阶段的代表性细菌,并作为腐熟菌剂的有效菌株广泛应用。但是,徐修宏等<sup>[11]</sup>的研究表明,芽孢杆菌菌群不是牛粪堆肥发酵过程的优势菌群,而该研究中高温发酵阶段的优势菌属肠杆菌属(*Enterobacter*)、玫瑰弯菌属(*Roseiflexus*)在本研究中的丰度却非常低,说明堆肥中细菌菌群受发酵原料的影响较大。堆肥后期,属水平上细菌菌群呈现高度富集状态,主要为芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假纤细芽孢杆菌属(*Pseudogracilibacillus*)、中华芽孢杆菌属(*Sinibacillus*)和新芽孢杆菌属(*Novibacillus*)等产芽孢类微生物,具有高耐性特征<sup>[25]</sup>。Liu等<sup>[19]</sup>研究了桑葚枝条、蚕沙、猪粪、牛粪堆肥产品中富集的细菌菌群发现,芽孢杆菌属(*Bacillus*)、中华芽孢杆菌属(*Sinibacillus*)和寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)高度富集。

本研究通过分子生物学技术分析了鸡粪好氧堆肥不同阶段样品中细菌群落结构多样性及其功能,为认识和理解细菌群落在鸡粪好氧堆肥过程中的作用提供了理论参考,同时也为开发高效的腐熟发酵菌剂奠定了一定基础。

## REFERENCES

- [1] WEI YS, FAN YB, WANG MJ, WANG JS. Composting and compost application in China[J]. Resources, Conservation and Recycling, 2000, 30(4): 277-300.
- [2] GE MS, SHEN YJ, DING JT, MENG HB, ZHOU HB,

- ZHOU J, CHENG HS, ZHANG X, WANG J, WANG HH, CHENG QY, LI R, LIU J. New insight into the impact of moisture content and pH on dissolved organic matter and microbial dynamics during cattle manure composting[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 344: 126236.
- [3] 魏彦红, 郁继华, 颀建明, 张国斌. 不同添加剂对牛粪高温堆肥的影响[J]. *甘肃农业大学学报*, 2012, 47(3): 52-56, 61.  
WEI YH, YU JH, XIE JM, ZHANG GB. Effects of different additives on high temperature composting of cow dung[J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2012, 47(3): 52-56, 61 (in Chinese).
- [4] 王立群, 张晓东, 吴邵萍, 顾文杰, 张传富, 彭科峰, 张宝涛, 耿宏伟. 禽粪好氧堆肥发酵高温阶段微生物的分离及其作用[J]. *东北农业大学学报*, 2008, 39(2): 204-206.  
WANG LQ, ZHANG XD, WU SP, GU WJ, ZHANG CF, PENG KF, ZHANG BT, GENG HW. Isolation and effect of thermophilic microbes in the poultry aerobic composting[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2008, 39(2): 204-206 (in Chinese).
- [5] 何惠霞, 徐凤花, 赵晓锋, 万书明. 低温下牛粪接种发酵剂对堆肥温度与微生物的影响[J]. *东北农业大学学报*, 2007, 38(1): 54-58.  
HE HX, XU FH, ZHAO XF, WAN SM. Effects of inoculated complex microbial agent to cattle manure on compost temperature and microorganism under low temperature[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2007, 38(1): 54-58 (in Chinese).
- [6] 牛俊玲, 高军侠, 李彦明, 李国学. 堆肥过程中的微生物研究进展[J]. *中国生态农业学报*, 2007, 15(6): 185-189.  
NIU JL, GAO JX, LI YM, LI GX. Evaluation of the role of microorganisms in composting[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2007, 15(6): 185-189 (in Chinese).
- [7] 王晶, 许修宏. 利用 PCR-DGGE 方法研究添加复合菌剂对堆肥微生物群落的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2011, 30(12): 2602-2607.  
WANG J, XU XH. Effects of adding to complex bacteria on microbial community of compost assessed by PCR-DGGE techniques[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30(12): 2602-2607 (in Chinese).
- [8] JIANG JS, HUANG H, HUANG YM, LIU XL, LIU D. Relationship between maturity and microbial communities during pig manure composting by phospholipid fatty acid (PLFA) and correlation analysis[J]. *Journal of Environmental Management*, 2018, 206: 532-539.
- [9] GALITSKAYA P, BIKTASHEVA L, SAVELIEV A, GRIGORYEVA T, BOULYGINA E, SELIVANOVSKAYA S. Fungal and bacterial successions in the process of co-composting of organic wastes as revealed by 454 pyrosequencing[J]. *PLoS One*, 2017, 12(10): e0186051.
- [10] REN GM, XU XH, QU JJ, ZHU LP, WANG TT. 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 and Biotechnology*, 2016, 32(6): 101.
- [11] 许修宏, 成利军, 许本姝, 门梦琪, 孙瑜, 张文浩, 邓利廷, 姜欣, 武晓桐, 盛思远. 基于高通量测序分析牛粪堆肥中细菌群落动态变化[J]. *东北农业大学学报*, 2018, 49(3): 10-20.  
XU XH, CHENG LJ, XU BS, MEN MQ, SUN Y, ZHANG WH, DENG LT, JIANG X, WU XT, SHENG SY. Analysis of bacterial community dynamics in cow manure composting using high throughput sequencing[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2018, 49(3): 10-20 (in Chinese).
- [12] ISHII K, TAKII S. Comparison of microbial communities in four different composting processes as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 95(1): 109-119.
- [13] TANG JC, SHIBATA A, ZHOU QX, KATAYAMA A. Effect of temperature on reaction rate and microbial community in composting of cattle manure with rice straw[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2007, 104(4): 321-328.
- [14] LIANG C, DAS KC, MCCLENDON RW. The influence of temperature and moisture contents regimes on the aerobic microbial activity of a biosolids composting blend[J]. *Bioresource Technology*, 2003, 86(2): 131-137.
- [15] LEI F, van der GHEYNST JS. The effect of microbial inoculation and pH on microbial community structure changes during composting[J]. *Process Biochemistry*, 2000, 35(9): 923-929.
- [16] EILAND F, KLAMER M, LIND AM, LETH M, BÅÅTH E. Influence of initial C/N ratio on chemical and microbial composition during long term composting of straw[J]. *Microbial Ecology*, 2001, 41(3): 272-280.
- [17] 王慧丽, 江娟. 锯末牛粪堆肥微生物多样性的宏基因组学分析[J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(7): 28-32.  
WANG HL, JIANG J. Metagenomics analysis of microbial diversity in sawdust cow manure composting[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2017,

- 45(7): 28-32 (in Chinese).
- [18] ZHOU GX, XU XF, QIU XW, ZHANG JB. Biochar influences the succession of microbial communities and the metabolic functions during rice straw composting with pig manure[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 272: 10-18.
- [19] LIU QM, HE XY, LUO GW, WANG KL, LI DJ. Deciphering the dominant components and functions of bacterial communities for lignocellulose degradation at the composting thermophilic phase[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 348: 126808.
- [20] 黄家庆, 叶菁, 李艳春, 林怡, 刘岑薇, 王义祥. 生物炭对猪粪堆肥过程中细菌群落结构的影响[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(5): 1477-1491.
- HUANG JQ, YE J, LI YC, LIN Y, LIU CW, WANG YX. Effect of biochar on bacteria community structure of pig manure composting[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(5): 1477-1491 (in Chinese).
- [21] 段国文, 耿新燕, 魏绪宇, 赵国琰. 锰氧化细菌的生理生态功能与作用机制研究进展[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(9): 3039-3053.
- DUAN GW, GENG XY, WEI XY, ZHAO GY. Advances in physiological and ecological functions of manganese oxidizing bacteria and the underlying molecular mechanisms[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(9): 3039-3053 (in Chinese).
- [22] 卢秉林, 王文丽, 李娟, 马忠明. 牛粪与小麦秸秆混合高温堆肥的腐熟进程研究[J]. *环境污染与防治*, 2010, 32(1): 30-34.
- LU BL, WANG WL, LI J, MA ZM. Maturing process of cattle manure high temperature composting with mixing different ratio of wheat straw[J]. *Environmental Pollution & Control*, 2010, 32(1): 30-34 (in Chinese).
- [23] 康健. 畜禽粪便堆肥过程中物质转化和微生物种群演变规律及酶活性机理研究[D]. 兰州: 兰州理工大学博士学位论文, 2019.
- KANG J. Substances transformation and microbial populations evolution during the composting of cattle manure, and mechanistic insights into enzymatic activity[D]. Lanzhou: Doctoral Dissertation of Lanzhou University of Technology, 2019 (in Chinese).
- [24] ANTUNES LP, MARTINS LF, PEREIRA RV, THOMAS AM, BARBOSA D, LEMOS LN, SILVA GMM, MOURA LMS, EPAMINO GWC, DIGIAMPIETRI LA, LOMBARDI KC, RAMOS PL, QUAGGIO RB, de OLIVEIRA JCF, PASCON RC, CRUZ JBD, da SILVA AM, SETUBAL JC. Microbial community structure and dynamics in thermophilic composting viewed through metagenomics and metatranscriptomics[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 38915.
- [25] WEI HW, WANG LH, HASSAN M, XIE B. Succession of the functional microbial communities and the metabolic functions in maize straw composting process[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 256: 333-341.
- [26] SUN Y, MEN MQ, XU BS, MENG QX, BELLO A, XU XH, HUANG XN. Assessing key microbial communities determining nitrogen transformation in composting of cow manure using illumina high-throughput sequencing[J]. *Waste Management*, 2019, 92: 59-67.
- [27] ZHANG YC, RONIMUS RS, TURNER N, ZHANG YI, MORGAN HW. Enumeration of thermophilic *Bacillus* species in composts and identification with a random amplification polymorphic DNA (RAPD) protocol[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2002, 25(4): 618-626.
- [28] ALFREIDER A, PETERS S, TEBBE CC, RANGGER A, INSAM H. Microbial community dynamics during composting of organic matter as determined by 16S ribosomal DNA analysis[J]. *Compost Science & Utilization*, 2002, 10(4): 303-312.
- [29] MARTIN M, BARBEYRON T, MARTIN R, PORTETELLE D, MICHEL G, VANDENBOL M. The cultivable surface microbiota of the brown *Alga Ascophyllum nodosum* is enriched in macroalgal-polysaccharide-degrading bacteria[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1487.
- [30] 王光华, 刘俊杰, 于镇华, 王新珍, 金剑, 刘晓冰. 土壤酸杆菌门细菌生态学研究进展[J]. *生物技术通报*, 2016, 32(2): 14-20.
- WANG GH, LIU JJ, YU ZH, WANG XZ, JIN J, LIU XB. Research progress of acidobacteria ecology in soils[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(2): 14-20 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)