

王瑞飞,孔盈利,魏艺璇,等. 菌剂对鸡粪-生物炭堆肥理化性质和微生物群落结构的影响[J].江苏农业学报,2023,39(4):966-977.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2023.04.006

菌剂对鸡粪-生物炭堆肥理化性质和微生物群落结构的影响

王瑞飞^{1,2}, 孔盈利¹, 魏艺璇¹, 白双¹, 展莉平¹, 张昊^{1,2}, 李明军¹, 杨清香^{1,2}
(1.河南师范大学生命科学学院,河南 新乡 453007; 2.河南省农业微生物生态与技术国际联合实验室,河南 新乡 453007)

摘要: 为了探讨菌剂[芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)BA、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)K1、巨大芽孢杆菌(*Bacillus magaterium*)J2和木霉(*Trichoderma* sp.)M1混合菌剂]在鸡粪-生物炭堆肥堆制过程中的作用,通过理化性质测定、高通量测序等方法研究菌剂对堆肥堆体理化性质、微生物群落演替的影响,评估菌剂处理的堆肥对植物生长的潜在作用。结果表明,菌剂处理组堆肥堆体的温度在堆肥堆制第4 d达到70℃以上(比对照早26 d),且臭味基本消失;在堆肥堆制第53 d,处理组有明显土腥味(对照仍有刺鼻臭味),总有机质、铵态氮含量分别比对照低76.30 g/kg、37.83 mg/kg,全氮、有效磷、速效钾含量分别比对照高6.02 g/kg、15.70 mg/kg、50.40 mg/kg。群落分析结果表明,厚壁菌门(Firmicutes)、子囊菌门(Ascomycota)分别为对照中占绝对优势的细菌门(相对丰度>80.00%)、真菌门(相对丰度>59.00%),但在堆肥堆制过程中,处理组放线菌门(Actinobacteria)在堆制第53 d取代厚壁菌门(Firmicutes)成为绝对优势菌门(相对丰度66.40%),子囊菌门(Ascomycota)的相对丰度在堆制第30~53 d明显高于对照。在属水平上,处理组堆肥的有机质转化细菌如假纤细芽孢杆菌(*Pseudogracilibacillus*)、布哈加瓦氏菌(*Bhargavaea*)等的相对丰度在堆制第14 d、30 d,生防链霉菌(*Streptomyces*)等的相对丰度在堆制第53 d显著高于对照;生防真菌枝顶孢霉(*Acremonium*)的相对丰度始终高于对照,其他真菌尤其是致病真菌如毛孢子菌(*Cutaneotrichosporon*)、镰刀霉(*Fusarium*)的相对丰度在堆制第53 d低于对照。在菌剂处理的堆肥浸提液培养下,上海青种子的发芽率、根长分别达到91.60%、1.59 cm,均高于对照。由此可见,菌剂能高效推动鸡粪-生物炭堆肥堆制过程中微生物群落变化,缩短腐熟进程,提升堆肥品质。

关键词: 鸡粪; 菌剂; 生物炭; 堆肥; 微生物群落

中图分类号: S141.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2023)04-0966-12

Effects of microbial agents on physicochemical properties and microbial community structure of chicken manure-biochar compost

WANG Rui-fei^{1,2}, KONG Ying-li¹, WEI Yi-xuan¹, BAI Shuang¹, ZHAN Li-ping¹, ZHANG Hao^{1,2},
LI Ming-jun¹, YANG Qing-xiang^{1,2}

(1.College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China; 2.Henan International Joint Laboratory of Agricultural Microbial Ecology and Technology, Xinxiang 453007, China)

收稿日期:2022-07-26

基金项目:国家现代农业产业技术体系项目(CARS-21);河南省科技攻关项目(202102110219);河南省高等学校重点科研项目(22B180006,20A180015);中原科技创新领军人才项目(224200510011)

作者简介:王瑞飞(1983-),男,河南汝州人,博士,副教授,主要从事农业微生物生态与技术研究。(E-mail)wsrff@163.com

通讯作者:杨清香,(E-mail)yangqx@htu.edu.cn

Abstract: In order to explore the role of *Bacillus* sp. BA, *Bacillus subtilis* K1, *Bacillus magaterium* J2 and *Trichoderma* sp. M1 in the composting of chicken manure-biochar, the effects of microbial agents on the physicochemical properties and microbial community succession of compost were studied by means of physical and chemical properties determination and high-throughput sequencing, and the potential effects of microbial agents on plant growth

were evaluated. The results showed that the composting temperature of the microbial agent treatment group reached more than 70 °C on the 4th day of composting (26 days earlier than the control), and the odor basically disappeared. On the 53rd day of composting, the treatment group had obvious soil odor (the control still had a pungent odor). Compared with the control, the total organic matter content and ammonium nitrogen content decreased by 76.30 g/kg and 37.83 mg/kg, respectively, and the total nitrogen content, available phosphorus content and available potassium content increased by 6.02 g/kg, 15.70 mg/kg and 50.40 mg/kg, respectively. The results of community analysis showed that Firmicutes and Ascomycota were the dominant bacterial phyla (relative abundance > 80.00%) and fungal phylum (relative abundance > 59.00%) in the control, respectively. During the composting process, Actinobacteria in the treatment group replaced Firmicutes as the absolute dominant phylum (relative abundance was 66.40%) on the 53rd day of composting, and the relative abundance of Ascomycota was significantly higher than that of the control on the 30th to 53rd day of composting. At the genus level, the relative abundance of organic matter-transforming bacteria such as *Pseudogracilibacillus* and *Bhargavaea* in the compost of the treatment group was significantly higher than that of the control on the 14th and 30th day of composting, and the relative abundance of *Streptomyces* was significantly higher than that of the control on the 53rd day of composting. The relative abundance of biocontrol fungus *Acremonium* in the treatment group was always higher than that in the control group, and the relative abundance of other fungi, especially pathogenic fungi such as *Cutaneotrichosporon* and *Fusarium*, was lower than that in the control group on the 53rd day of composting. Under the cultivation of compost extract treated with microbial agents, the seed germination rate and root length of *Brassica rapa* var. *chinensis* (Linnaeus) Kitamura reached 91.60% and 1.59 cm, respectively, which were higher than those of the control. The microbial agents could effectively promote the change of microbial community in the composting process of chicken manure-biochar, shorten the maturity process and improve the quality of compost.

Key words: chicken manure; microbial agents; biochar; composting; microbial community

禽畜粪便中含有大量营养成分,是一种潜在的生物质能源。中国每年的禽畜粪便产生量超过 3.0×10^9 t,但是其综合利用率不足 60%^[1]。禽畜粪便的不合理处置不仅造成大量养分流失,而且极易造成农业面源污染,给生态环境造成巨大压力^[2]。因此,禽畜粪便的资源化利用不仅能降低禽畜粪便的污染风险,而且能够实现禽畜粪便的再利用,对推动禽畜养殖业的可持续发展具有十分重要的意义。

目前,高温堆肥已经成为中国实现禽畜粪便资源化的最有效方式之一^[3],具有无害化处理彻底、附加值高、经济效益好等优点,但也存在腐熟周期长、营养流失多等问题。为了提高高温堆肥的效果,研究者主要围绕 2 个方面展开研究。一方面是高温堆肥过程中的条件(如物料成分、通风量、含水率等)的优化^[4-5],另一方面是开发推进禽畜粪便腐熟进程的微生物菌剂、硝酸钾等外源添加剂^[6]。研究发现,微生物是高温堆肥顺利进行的核⼼决定因素,其他条件和因素往往通过影响堆肥中的微生物来调控有机质转化和物料的腐殖化^[7-8]。由于接种微生物菌剂可以直接调节堆肥物料中的微生物种类和数量,提高微生物活性,加速有机质的分解,因此,研究微生物菌剂对堆肥过程中微生物群落变化的影响及其作用机制已经

成为目前堆肥研究中的热点^[9-11]。

鸡粪是中国重要的有机肥源之一,生物炭是固体废弃物在缺氧条件下热解产生的具有发达空隙结构、比表面积大的稳定富碳物质。已有研究结果表明,生物炭与鸡粪混合后使堆肥物料的堆体密度更小、透气性更好,有利于微生物的繁殖和活性发挥^[12]。近年来,伴随着高通量测序技术在各种环境微生物群落分析中的应用^[13],部分研究者已经应用高通量测序技术对生物炭禽畜粪便堆肥中的微生物群落结构、多样性和丰度进行了分析。例如,Jiang 等^[14]通过内转录间隔区(Internal transcribed spacer, ITS)测序发现,牛粪生物炭堆肥中主要真菌属的丰富度随着堆制进程的推进而变化,在堆制初期的真菌主要是曲霉属真菌(*Aspergillus*)和未分类真菌(Unclassified fungi),在堆制末期的真菌主要是 *Myriococcum*、未分类的小囊菌(Unclassified *Microascaceae*)和枝顶孢属真菌(*Acremonium*),且与不加生物炭的牛粪堆肥中的微生物群落变化有明显区别;Duan 等^[15]通过 16S rDNA、ITS 测序发现,羊粪苹果树生物炭混合能够增加堆制过程中细菌的多样性,减少真菌群落的多样性,与微生物相关的酶活性也随之改变,从而加快了腐熟进程;Zhai 等^[16]通过高通量

测序发现,在鸡粪生物炭混合堆肥堆制过程中, N_2O 释放相关微生物从 22 个下降到 19 个,从而削弱了反硝化进程,提升了堆肥质量。尽管目前相关研究已取得了一定进展,但是鲜有研究利用高通量测序技术全面评价菌剂对鸡粪-生物炭堆肥堆制过程中细菌、真菌群落演替的影响。

本研究首先分析微生物菌剂对鸡粪-生物炭堆肥理化性质的影响。随后,通过细菌 16S rDNA、真菌 ITS 高通量测序技术和信息学分析,探讨菌剂对堆肥堆制中细菌、真菌群落演替的影响。最后,利用种子萌发试验初步评估菌剂腐熟鸡粪-生物炭堆肥对植物生长的潜在促进作用,以期深入阐明菌剂促进禽畜粪便堆制过程中腐熟的微生物学机制提供理论借鉴,为堆肥腐熟菌剂的开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

上海青种子,购自河南省新乡市种子市场。2019 年 6 月,在河南省焦作市武陟县某生物有机肥厂进行鸡粪-生物炭堆肥堆制试验。鸡粪含水率 50%,总有机碳含量 28.62%,全氮含量 1.70%,碳氮质量比约 17:1;生物炭含水率 10%,总有机碳含量 30.11%,全氮含量 1.11%,碳氮比约 27:1。

菌剂菌种的制备。芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) BA、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) K1、巨大芽孢杆菌(*Bacillus magaterium*) J2 和木霉(*Trichoderma* sp.) M1,均为笔者所在课题组自行筛选并保藏。用无机盐培养基(4 g 磷酸氢二铵,2 g 硫酸钾,1 g 氯化钠,20 g 葡萄糖,10 ml 100倍浓缩的微量元素,0.6 g 七水合硫酸镁,1 000 ml 蒸馏水,pH 值 7.0)进行细菌发酵培养(37 °C,24 h),调整活菌数达 1×10^8 CFU/ml;用麸皮培养基(含有 40% 水分的麸皮)对木霉 M1 进行培养(28 °C,7 d),用无菌水冲洗收集孢子,调节孢子含量至 1×10^8 CFU/ml。堆肥堆制前将细菌和孢子等量混合。

1.2 试验设计和样品的采集

将鸡粪和生物炭混合均匀,调节含水率约为 50%,碳氮比约为 21:1,采集初始混合样品(CS),然后将混合物料分为对照组、处理组(各 5 t 混合物料),处理组接种细菌和真菌混合菌剂(1×10^6 CFU/kg);对照接入与处理组等量的无菌水。堆肥表面覆土,每周翻堆 1 次。堆肥堆制持续 64 d,在堆

肥堆制的第 4 d、14 d、30 d、53 d,于同一堆体 5 个不同点距堆体表面 20 cm 处分别取样,均匀混合作为 1 个样品,并分成 2 份,分别用于堆肥理化性质测定、DNA 提取(高通量测序)。根据采样时间,分别将对照组样品命名为 C4(4 d)、C14(14 d)、C30(30 d)、C53(53 d),分别将处理组样品命名为 T4(4 d)、T14(14 d)、T30(30 d)、T53(53 d)。

1.3 堆肥理化性质测定

每天 8:30–9:30 用温度计分别测定堆体中心面 3 个位置距表面 20 cm 处的温度,取其平均值作为堆体温度,同时记录环境温度;用 105 °C 烘干法测定堆体含水率,将堆肥样品与蒸馏水按照 1:10(质量体积比)混匀后测定 pH 值^[17];采用总有机碳(Total organic carbon, TOC)仪测定总有机碳含量^[18];用连续流动分析仪(AA3 型)测定全氮含量^[19];铵态氮、有效磷、速效钾含量的测定方法参考 NY525–2012《有机肥料》^[20]。

1.4 高通量测序

用 FastDNA[®] Spin Kit for Soil 试剂盒提取样品 DNA,用 NanoDrop2000 Spectrophotomete(美国赛默飞世尔科技公司)检测 DNA 纯度和浓度,用上海美吉公司的 Illumina MiSeq 平台进行细菌 16S rRNA 基因 V3、V4 区(338F: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'; 806R: 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')和真菌 ITS 区(ITS1F: 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'; ITS2R: 5'-GCTGCGTTCCTTCATCGA-3')的扩增测序^[21]。

1.5 种子萌发试验

种子萌发试验参考已有的方法^[22],并做适当修改,具体操作如下:将 5 g 腐熟后的鸡粪-生物炭堆肥与去离子水按 1:10(质量体积比)混合后浸提 30 min,获得浸提液,将上海青种子先用 1% 次氯酸钠溶液浸泡 15 min,再用蒸馏水清洗 3 遍。取 5 ml 浸提液,加入铺有滤纸的直径 90 mm 的培养皿中,每皿放置 30 粒种子(共 2 皿),25 °C 培养 48 h。记录种子发芽情况和根长,以去离子水代替浸提液的处理作为对照。

1.6 数据分析与处理

用 Graphpad prism 8.0、Origin 2018 和 Excel 2007 进行数据统计分析,借助上海美吉公司云平台(<https://cloud.majorbio.com/>)进行高通量数据分析。分别用 FLASH 1.2.11、QHIME 1.9.1 和 UCHIME 8.1 进行高通量测序数据原始读数合并、质量控制和数据优化,用 Uparse 7.0.1090、Bayesian 算法获得

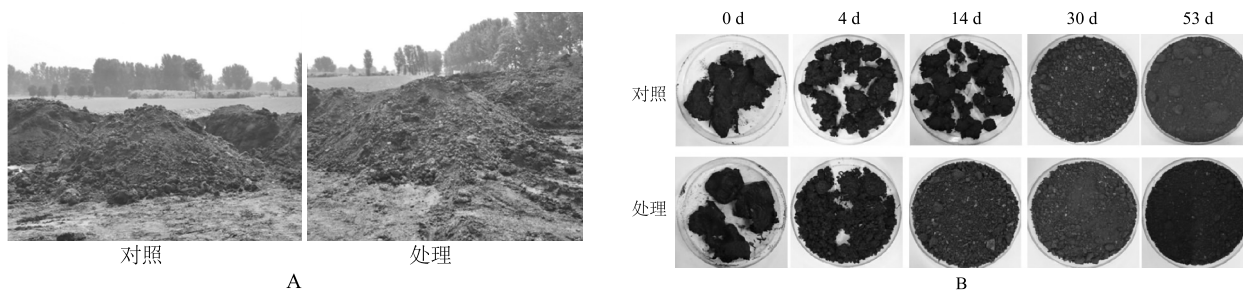
操作分类单元(OTU, 相似度 97%), 用 Silva 细菌 16S rRNA 数据库、真菌 ITS 数据库进行细菌、真菌分类, 用 Mothur 1.30.2 计算 Shannon 指数。

2 结果与分析

2.1 菌剂对鸡粪-生物炭堆肥堆制过程中理化特性的影响

2.1.1 菌剂对堆肥堆制过程中物料颜色、状态及气味的影响 颜色和状态是堆肥物料腐殖化的重要表观特征^[23]。随着堆肥堆制过程中水分、多糖类物质含量的变化, 物料通常由块状、易粘结、有恶臭味逐渐变得均匀松散且有土腥味。图 1 显示, 鲜鸡粪与

生物炭混合后, 堆体呈现粘结状, 内部呈黑色, 臭味明显。随着堆制过程的推进, 对照(未接种菌剂)和处理组(接种菌剂)堆体的颜色均渐变为褐色。但是, 处理组堆体的颜色变化早于对照。在堆肥堆制的第 4 d 时, 处理组的块状堆体物料团块已明显变小, 刺激性粪臭味基本消除, 蚊蝇聚集减少; 在堆肥堆制第 14 d 时, 堆体物料已呈现团粒状松散状态; 在堆肥堆制第 53 d, 堆体带有明显土腥味。但是, 对照在堆肥堆制第 30 d 才呈现团粒状松软状态, 直至堆肥堆制第 53 d 仍有刺激性臭味。上述表观特征的变化表明, 接种菌剂明显加快了堆肥堆体的腐熟进程。



A: 堆肥堆制的现场场景; B: 不同时间堆肥物料的形态、颜色变化。

图 1 菌剂对堆肥堆体颜色及形态的影响

Fig.1 Effects of microbial agents on compost color and morphology

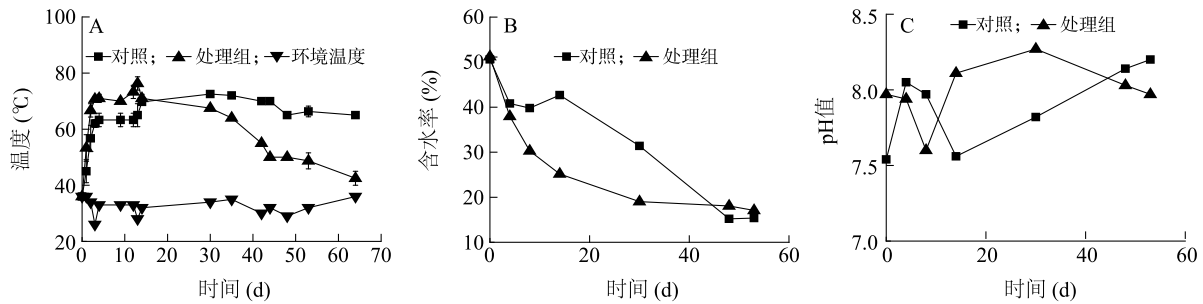
2.1.2 菌剂对堆肥堆制过程中温度、含水率和 pH 值的影响 温度、pH 值和含水率与微生物新陈代谢密切相关, 经常作为判断堆肥是否腐熟的重要指标^[24]。温度监测结果显示, 对照、处理组均能在堆肥堆制的 0~4 d 内快速升温, 其中处理组堆体的温度在堆肥堆制第 4~15 d 维持在 70 ℃ 以上, 最高温度达到 76 ℃, 之后温度开始下降, 在堆肥堆制第 64 d, 堆体温度降至 40 ℃ 左右。对照的温度虽然在堆肥堆制的第 4 d 升至 60 ℃ 以上, 但是在堆肥堆制第 4~64 d, 其温度长期维持在 60 ℃ 以上, 并且其最高温度(72 ℃)明显低于处理组(图 2A)。含水率监测结果显示, 物料的初始含水率约为 50%, 在堆肥堆制第 53 d, 对照、处理组的含水率分别为 15.39%、17.06%, 但是处理组含水率在堆肥堆制第 4~30 d 的下降速度明显快于对照(图 2B)。pH 值监测结果显示, 2 组堆肥堆体的 pH 值始终保持在 7.5~8.3, 在堆肥堆制第 53 d, 对照、处理组的 pH 值分别为 8.20、7.97, 均符合中国农业有机肥的标准, 但是 2 组堆肥 pH 值的变化趋势有所不同(图 2C)。以上结果表明, 接种微生物菌剂明显促

进了鸡粪-生物炭堆肥堆体的温度、水分和 pH 值的变化, 有利于堆肥堆体的腐熟。

2.1.3 菌剂对堆肥堆制过程中总有机质、全氮、铵态氮、有效磷和速效钾含量的影响 堆肥的腐熟本质上是微生物对物料中的有机质进行降解转化的过程^[8]。有机质含量测定结果表明, 物料中总有机质的平均初始含量为 383.70 g/kg, 随着堆肥堆制过程的推进, 处理组 and 对照有机质含量整体均呈下降趋势, 在堆肥堆制第 53 d, 对照和处理组的总有机质含量分别比堆肥初期降低了 18.9% (72.60 g/kg) 和 38.8% (148.90 g/kg) (图 3A)。全氮含量测定结果表明, 平均初始全氮含量为 21.50 g/kg, 随着堆肥堆制过程的推进, 处理组与对照的全氮含量均呈上升趋势, 在堆肥堆制第 53 d, 对照和处理组全氮含量分别增加了 36.05% (7.75 g/kg) 和 64.05% (13.77 g/kg) (图 3B)。铵态氮含量测定结果表明, 铵态氮的平均初始含量为 186.20 mg/kg, 在堆肥堆制过程中, 处理组的铵态氮含量始终低于对照, 在堆肥堆制第 53 d, 对照和处理组的铵态氮含量分别比堆肥初

期降低了 30.5% (56.70 mg/kg) 和 50.8% (94.53 mg/kg) (图 3C)。以上结果表明,菌剂能极大促进

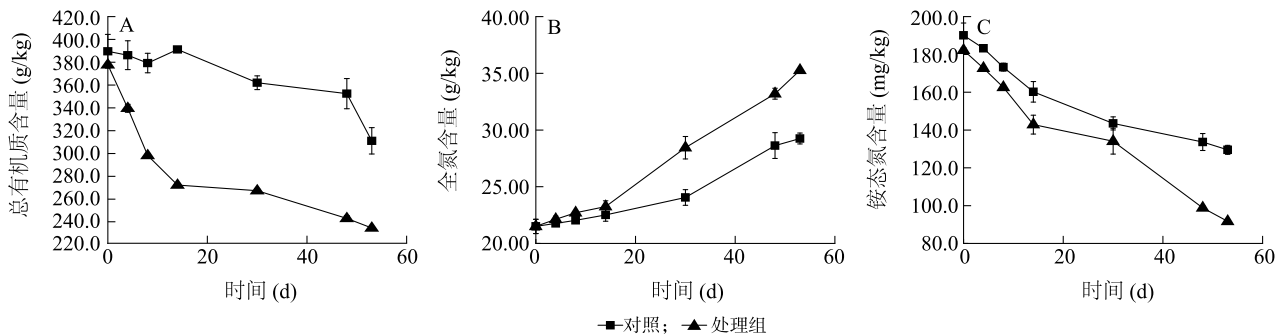
有机质分解,增加堆肥堆体的全氮含量,减少堆肥堆体中的铵态氮含量,从而产生明显的保氮效果。



A: 温度; B: 含水率; C: pH 值。

图 2 菌剂对堆肥堆体温度、含水率及 pH 值的影响

Fig.2 Effects of microbial agents on composting temperature, moisture content and pH



A: 总有机质含量; B: 全氮含量; C: 铵态氮含量。

图 3 菌剂对堆肥堆体中总有机质、全氮及铵态氮含量的影响

Fig.3 Effects of microbial agents on the contents of total organic matter, total nitrogen and ammonium nitrogen in compost

有效磷含量测定结果表明,物料中的有效磷初始含量为 71.00 mg/kg,在堆肥堆制过程中,处理组的有效磷含量始终高于对照(图 4A)。在堆肥堆制第 53 d,对照和处理组的有效磷含量分别比堆肥初期增加了 16.5% (11.75 mg/kg) 和 38.6% (27.45 mg/kg)。速效钾含量测定结果表明,物料中的速效钾初始含量为 224.10 mg/kg,其在堆肥堆制过程中的变化趋势与有效磷含量相似,在堆肥堆制第 53 d,对照和处理组的速效钾含量分别比堆肥初期增加 35.1% (78.74 mg/kg) 和 57.6% (129.14 mg/kg) (图 4B)。由此可见,菌剂能够促使物料中的磷元素、钾元素向更易被植物吸收的可利用态转变。

2.2 菌剂对堆肥堆制过程中细菌、真菌群落多样性的影响

高通量测序结果显示,不同样品产生的细菌高质量序列数为 45 189~56 038 条,这些序列聚类为 377~632 个分类操作单元 (Operational taxonomic unit, OTU);真菌高质量序列数为 55 390~73 234 条,

这些序列聚类为 128~637 个 OTU。处理组细菌 OTU 数量和 Shannon 指数在各个时期均明显高于对照,而真菌的相应数值总体上表现出相反趋势(表 1)。上述结果表明,菌剂促进了堆肥堆制过程中微生物群落结构的变化。

2.2.1 菌剂对堆肥堆制过程中细菌群落组成的影响 如图 5 所示,在门水平上,对照中厚壁菌门 (Firmicutes) 细菌的相对丰度维持在 80.0% 以上,为绝对优势菌门,放线菌门 (Actinobacteria) 细菌的相对丰度在堆肥堆制后期 (第 53 d) 明显提高,达到 16.00%。处理组中,厚壁菌门 (Firmicutes) 在堆肥堆制前 30 d 仍为绝对优势菌门,相对丰度 > 78.00%,但是放线菌门 (Actinobacteria) 细菌的相对丰度在堆肥堆制后期 (第 53 d) 提高到 66.40%,取代厚壁菌门 (Firmicutes) 细菌成为最丰富的细菌门细菌,变形菌门 (Proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和绿弯菌门 (Chloroflexi) 细菌的相对丰度也明显提高,分别达到为 4.80%、10.00% 和 6.00%。

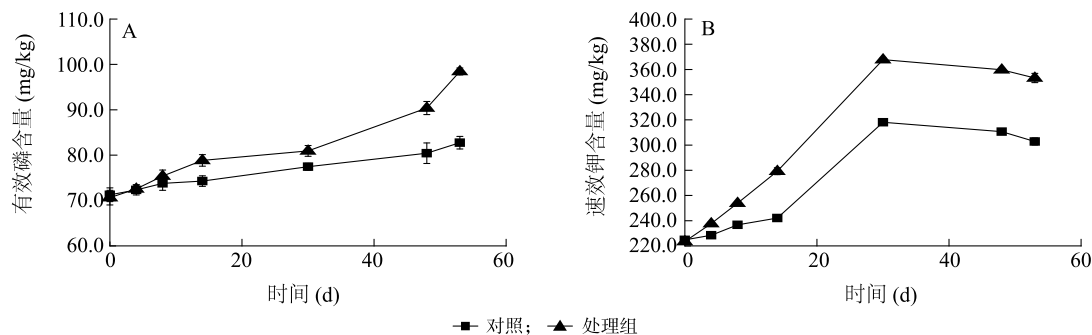
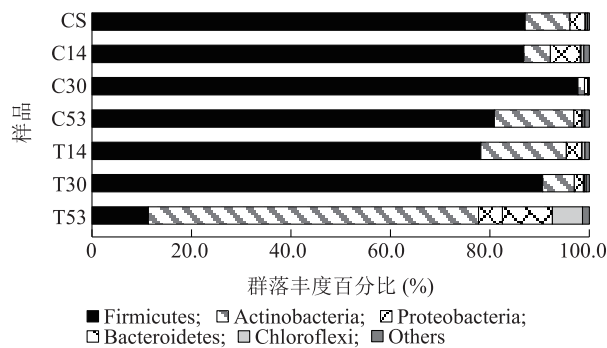


表 1 高温堆肥堆体样品中细菌、真菌的丰度与多样性

Table 1 Abundance and diversity of bacteria and fungi in high-temperature compost samples

样品	细菌				真菌			
	序列数 (个)	操作单元数 (个)	覆盖率	Shannon 指数	序列数 (个)	操作单元数 (个)	覆盖率	Shannon 指数
CS	45 189	418	0.996	2.90	69 360	267	0.999 8	3.82
C14	45 569	497	0.994	3.45	71 136	637	0.999 6	4.12
C30	45 408	377	0.996	1.64	69 547	206	0.999 9	4.30
C53	51 560	505	0.996	3.30	66 641	181	0.999 8	3.51
T14	45 889	632	0.994	3.88	55 390	221	0.999 7	3.20
T30	48 952	535	0.995	3.30	73 234	246	0.999 8	4.25
T53	56 038	616	0.996	3.79	61 187	128	0.999 5	0.37

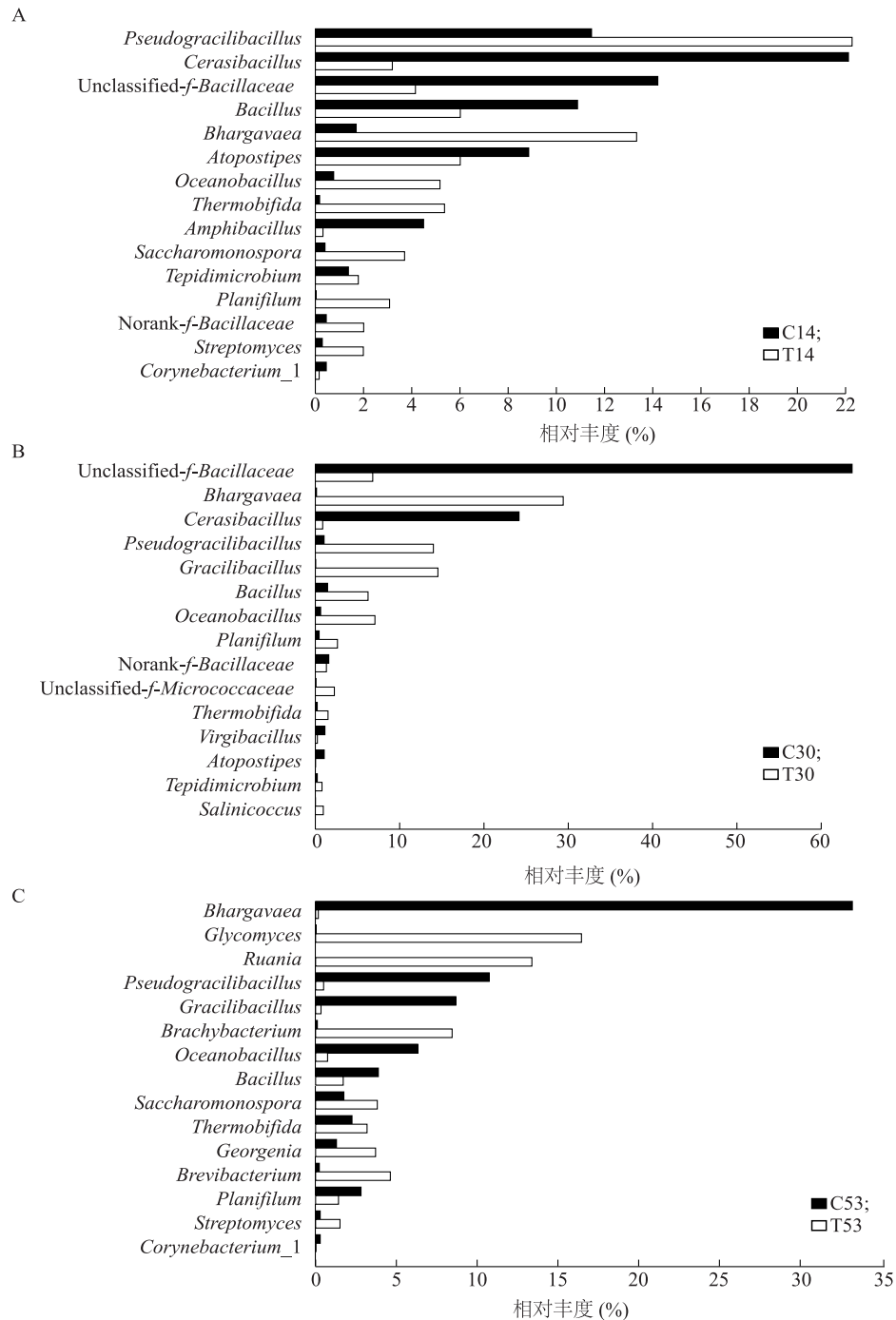
样品编号中,CS 代表鸡粪和生物炭的起始混合样品,C 表示对照,T 表示处理组,14、30、53 分别代表堆肥堆制时间为 14 d、30 d、53 d。



如图 6 所示,在堆肥堆制第 14 d,在属水平上,对照细菌相对丰度大于 1%的优势属主要为樱桃样芽孢杆菌 (*Cerasibacillus*)、未分类芽孢杆菌 (*Unclassified-f-Bacillaceae*)、假纤细芽孢杆菌 (*Pseudogracilibacillus*)、芽孢杆菌 (*Bacillus*) 和肉杆菌 (*Atopostipes*) 等。随着堆肥堆制过程的进行,上述属细菌的相对丰度不断发生变

化,如肉杆菌 (*Atopostipes*) 的相对丰度明显降低,樱桃样芽孢杆菌、未分类芽孢杆菌的相对丰度先升后降,在堆肥堆制第 53 d 接近 0;布哈加瓦氏菌 (*Bhargavaea*)、假纤细芽孢杆菌的相对丰度先降后升,在堆肥堆制第 53 d,相对丰度分别高达 33.23%、10.75%。在堆肥堆制第 14 d,处理组相对丰度大于 1.00%的优势菌属 (10 个) 与对照 (8 个) 有高度的相似性 (7 个一致),但是相对丰度存在显著差异,如樱桃样芽孢杆菌、假纤细芽孢杆菌在处理组的相对丰度分别为 3.20%、22.17%,但在对照中的相对丰度分别为 22.12%、11.40%。随着堆肥堆制过程的推进,处理组与对照中相对丰度大于 1.00%的共有属的组成成员逐渐减少,在堆肥堆制第 53 d,处理组只有 5 个相对丰度大于 1.00%的属与对照相同,并且这些属的相对丰度均低于 4.00%。进一步分析发现,处理组中糖霉菌 (*Glycomyces*)、阮继生氏菌 (*Ruania*)、布哈加瓦氏菌 (*Bhargavaea*) 的相对丰度较高,分别为 8.00%、13.39%、16.46%,而对照中这 3 个细菌的相对丰度则接近 0;布哈加瓦氏菌 (*Bhargavaea*)、假纤细芽孢杆菌、薄壁芽孢杆菌 (*Gracilibacillus*)、海洋芽孢杆菌 (*Oceanobacillus*) 表现出相反的趋势。由此可见,

在属水平上,处理组和对照的细菌群落结构在堆肥堆制进程中的变化有明显差异。

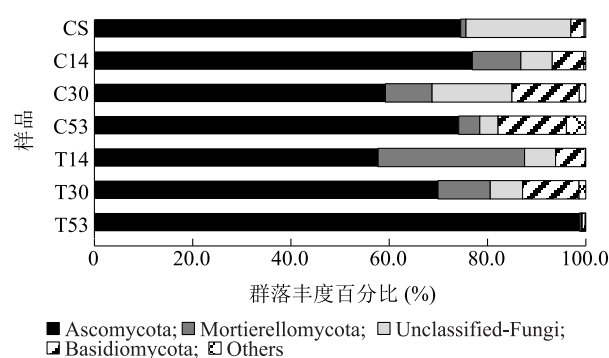


A: 第 14 d 相对丰度差异显著的细菌属; B: 第 30 d 相对丰度差异显著的细菌属; C: 第 53 d 相对丰度差异显著的细菌属。CS 代表鸡粪和生物炭的起始混合样品, C 表示对照, T 表示处理组, 14、30、53 分别代表堆肥堆制时间为 14 d、30 d、53 d。 *Pseudogracilibacillus*: 假纤芽孢杆菌; *Cerasibacillus*: 樱桃芽孢杆菌; Unclassified-*f-Bacillaceae*: 未分类芽孢杆菌; *Bacillus*: 芽孢杆菌; *Bhargavaea*: 布哈加瓦氏菌; *Atopostipes*: 肉杆菌; *Oceanobacillus*: 海洋芽孢杆菌; *Thermobifida*: 高温双歧菌属; *Amphibacillus*: 双芽孢杆菌属; *Saccharomonospora*: 糖单胞菌属; *Tepidimicrobium*: 热微菌属; *Planifilum*: 直丝菌属; *Streptomyces*: 链霉菌属; *Corynebacterium_1*: 棒状杆菌_1; *Glycomyces*: 糖霉菌; *Ruania*: 阮继生氏菌; *Gracilibacillus*: 薄壁芽孢杆菌属; Unclassified-*f-Micrococcaceae*: 未分类的微球菌科成员; *Virgibacillus*: 枝芽孢杆菌属; *Salinicoccus*: 盐水球菌属; *Brachybacterium*: 短状杆菌属; *Georgenia*: 乔治菌属; *Brevibacterium*: 短杆菌属; Norank-*f-Bacillaceae*: 未明确属的芽孢杆菌科成员。

图 6 属水平上细菌相对丰度有显著差异的群落

Fig.6 Communities with significant differences in relative abundance of bacteria at the genus level

2.2.2 菌剂对堆肥堆制过程中真菌群落组成的影响 如图 7 所示,在门水平上,子囊菌门(Ascomycota)、被孢霉门(Mortierellomycota)、未分类真菌门(Unclassified-Fungi)和担子菌门(Basidiomycota)为所有样品中的优势菌门,尤其是 Ascomycota 占有绝对优势地位,其在各样品中的相对丰度为 57.73%~98.76%。此外,对照样品中 Ascomycota 的相对丰度在堆肥堆制第 30 d、53 d 分别为 59.24%、74.14%,明显低于其在处理组第 30 d 的相对丰度(69.94%)和第 53 d 的相对丰度(98.76%)。



CS 代表鸡粪和生物炭的起始混合样品, C 表示对照, T 表示处理组, 14、30、53 分别代表堆肥堆制时间为 14 d、30 d、53 d。Ascomycota: 子囊菌门; Mortierellomycota: 被孢霉门; Unclassified_k_Fungi: 未分类真菌; Basidiomycota: 担子菌门; Others: 其他。

图 7 门水平上真菌群落组成

Fig.7 Composition of fungal community at phylum level

如图 8 所示,在属水平上,在堆制第 14 d 的堆肥样品中,对照、处理组中相对丰度>1.00%的属均包含被孢霉(*Mortierella*)、木霉(*Trichoderma*)、念珠菌(*Diutina*)、篮状菌(*Talaromyces*)和镰刀霉(*Fusarium*)等,但被孢霉(*Mortierella*)、木霉(*Trichoderma*)在处理组中的相对丰度均高于对照,而篮状菌属(*Talaromyces*)、德巴利氏酵母(*Debaryomyces*)则相反。随着堆肥堆制进程的推进,被孢霉(*Mortierella*)、念珠菌(*Diutina*)、篮状菌(*Talaromyces*)和镰刀霉(*Fusarium*)的相对丰度在对照中均出现显著下降,在堆肥堆制第 53 d 均低于 5.00%;毛孢子菌(*Cutaneotrichosporon*)的相对丰度则显著上升,在堆肥堆制第 53 d 达到 6.90%;德巴利氏酵母(*Debaryomyces*)的相对丰度先下降后上升,在堆肥堆制第 53 d 达到 13.45%。在处理组中,尽管上述菌的相对丰度随着堆肥堆制进程的推进也表现

出浮动,但是枝顶孢霉(*Acremonium*)在处理组中的相对丰度变化最为明显,呈现连续升高的趋势,在堆肥堆制第 53 d 高达 94.9%,成为处理组真菌群落中的绝对主导,其他菌的相对丰度均低于 1.00%,而对照中枝顶孢霉(*Acremonium*)的相对丰度则一直处于较低水平。因此可见,真菌群落成员的相对丰度在处理组和对照中表现出明显差异。

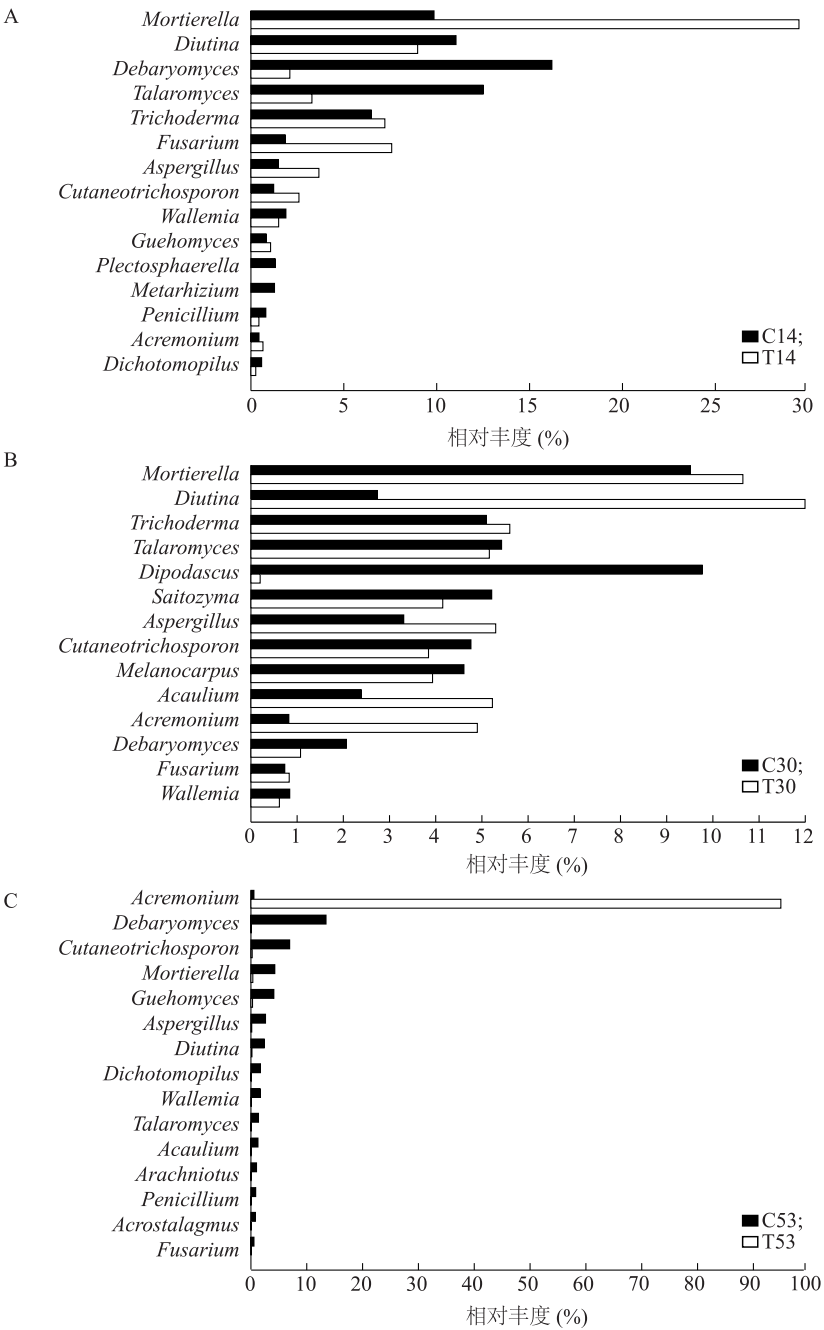
2.3 菌剂处理的堆肥促进上海青种子萌发和根生长的效果

在菌剂处理的堆肥浸提液培养下,上海青种子的萌发结果如图 9 所示,可以看出,处理组种子培养 48 h 的萌发率(91.60%)高于对照(83.30%),其平均根长(1.59 cm)是对照(1.25 cm)的 1.27 倍。因此可见,菌剂处理的堆肥有效刺激了种子萌发和根生长,对植物生长有潜在促进作用。

3 讨论

高温堆制是实现禽畜粪便资源化、无害化的重要手段,但是传统的高温堆制往往存在周期长、营养流失多等问题^[2]。接种微生物菌剂能够直接影响堆体中的微生物组成,从而有效促进堆肥腐熟,克服传统高温堆制的缺点。因此,开发高效腐熟菌剂,深入探讨其微生物学机制就显得尤为重要。

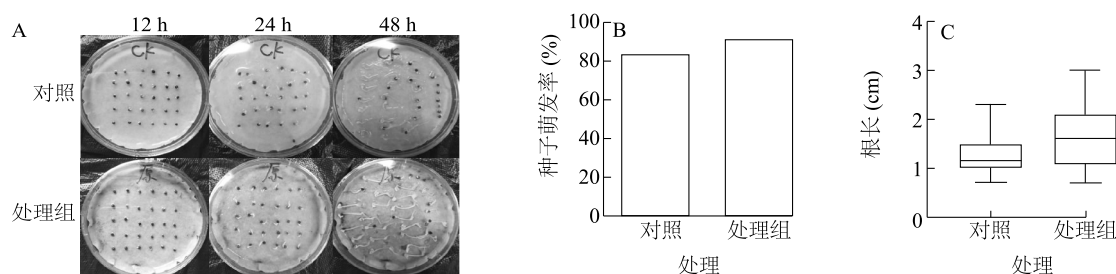
相关研究结果表明,堆肥是否腐熟不能用单一指标进行评价^[24]。因此,本研究首先综合评价菌剂对鸡粪-生物炭堆肥堆制过程中多个腐熟指标的影响。结果显示,菌剂显著促进鸡粪-生物炭堆肥堆制过程中温度、含水率、pH 值的变化和臭味的去除,并缩短腐熟时间,而且菌剂处理的堆肥最终全氮、有效磷和速效钾含量均高于对照。本研究结果也得到了其他研究结果的间接支持。例如, Xu 等^[25]研究发现,由部分高温和中温微生物组成的菌剂可使牛粪-秸秆堆肥中的氨气释放量减少 29.98%~46.94%; Li 等^[26]研究发现,由枯草芽孢杆菌等菌种组成的菌剂延长了猪粪-玉米芯堆肥的高温时间,使堆肥中的硝态氮含量比对照高 21 g/kg。尽管本研究中所用菌剂能高效促进鸡粪-生物炭堆肥堆体腐熟,但是在中国,猪、牛、禽、羊的粪污产生量分别占畜禽粪污总产量的 33.9%、48.3%、4.7%、13.1%^[27]。因此,本研究中所用菌剂能否在其他禽畜粪便堆肥中广泛应用值得进一步探讨。



A:堆肥堆制第 14 d 相对丰度差异显著的真菌属;B:堆肥堆制第 30 d 相对丰度差异显著的真菌属;C:堆肥堆制第 53 d 相对丰度差异显著的真菌属。CS 代表鸡粪和生物炭的起始混合样品,C 表示对照,T 表示处理组,14、30、53 分别代表堆肥堆制的第 14 d、30 d、53 d。*Mortierella*:被孢霉;*Diutina*:念珠菌;*Debaryomyces*:德巴利氏酵母;*Talaromyces*:篮状菌;*Trichoderma*:木霉;*Fusarium*:镰刀霉;*Aspergillus*:曲霉;*Cutaneotrichosporon*:毛孢子菌;*Wallemia*:节担菌属;*Guehomyces*:耐冷酵母属;*Plectosphaerella*:小不整球壳属;*Metarhizium*:绿僵菌属;*Penicillium*:青霉属;*Acremonium*:枝顶孢霉;*Dichotomopilus*:二分枝毛壳属;*Dipodascus*:双足囊菌属;*Saitozyma*:沙蜥属;*Acaulium*:无茎真菌属;*Acrostalagmus*:笋顶孢属;*Melanocarpus*:黑果球粉衣属。

图 8 属水平的真菌相对丰度存在显著差异的物种
Fig.8 Species with significant differences in relative abundance of fungi at genus level

微生物群落是影响堆肥腐熟的核心因素^[28-31], 程中微生物群落的变化。与对照相比,菌剂处理堆肥中的一些门如放线菌门(Actinobacteria)、子囊菌



A:不同时间点的根长;B:培养第48 h的发芽率;C:培养第48 h的根长。

图9 菌剂处理的堆肥对上海青种子萌发率和根长的影响

Fig.9 Effects of the compost treated with microbial agents on seed germination rate and root length of *Brassica rapa* var. *chinensis* (Linnaeus) Kitamura

门(Ascomycota)的相对丰度显著升高,可能由于菌剂处理的堆肥提前进入腐熟期,为这些微生物生长提供了良好的环境条件^[32]。属水平的分析结果表明,菌剂可能从2个方面促进鸡粪-生物炭堆肥中微生物群落的演替。一方面,接种菌剂提高了与有机质降解、同化相关微生物[如假纤细芽孢杆菌(*Pseudogracilibacillus*)、直丝菌(*Planifilum*)^[33-34]]的相对丰度,同时降低了与碳氮损失相关微生物[如樱桃样芽孢杆菌(*Cerasibacillus*)、肉杆菌(*Atopostipes*)^[35-36]]的相对丰度。上述结果与菌剂促进鸡粪-生物炭堆肥中总有机质含量减少和全氮含量增加的结果相呼应。另一方面,菌剂促进了生防真菌的生长。例如,枝顶孢霉(*Acremonium*)中的成员如*Acremonium* sp. Ld-03能够抑制病原真菌镰刀霉(*Fusarium*)的生长,可能通过产生多种肽类和环肽类抗生素实现^[37-38]。在本研究中,枝顶孢霉(*Acremonium*)在处理组堆肥堆制进程中相对丰度持续升高,最终高达94.9%。此外,菌剂处理能够明显降低一些潜在病原菌如毛孢子菌(*Cutaneotrichosporon*)^[39]、镰刀霉(*Fusarium*)的相对丰度。此外,在堆肥堆制第14 d、30 d,处理组堆肥中布哈加瓦氏菌(*Bhargavaea*)、假纤细芽孢杆菌(*Pseudogracilibacillus*)、薄壁芽孢杆菌(*Gracilibacillus*)的相对丰度均显著高于对照,然而在堆肥堆制第53 d,上述细菌在对照中的相对丰度却显著高于处理组。由此可见,布哈加瓦氏菌(*Bhargavaea*)、假纤细芽孢杆菌(*Pseudogracilibacillus*)、薄壁芽孢杆菌(*Gracilibacillus*)这3个菌在常规的鸡粪-生物炭堆肥堆制过程中也会随着堆肥堆制进程的推进而使相对丰度发生改变,但是接种菌剂则会加速这一过程。

综上,接种微生物菌剂可能通过影响堆肥堆

制过程中物质转化相关微生物的相对丰度、抑制病原微生物生长、加速高温堆肥堆制过程中微生物的演替等促进堆肥理化性质的变化,从而提高堆肥的腐熟速度和质量。本研究结果为阐明微生物菌剂在高温堆肥堆制过程中的微生物学机制及其应用提供了参考,在下一步研究中,将对菌剂接入量、菌剂中各菌种比例对堆肥堆制进程的影响及菌剂使用范围进行探究,以期开发出更为高效的堆肥腐熟菌剂。

4 结论

微生物菌剂能够高效促进鸡粪-生物炭堆肥过程中温度、水分、pH值的变化和臭味的去除,增加堆肥中的总氮、有效磷钾含量,减少堆肥中铵态氮含量,因此微生物菌剂能有效加快鸡粪-生物炭堆肥的腐熟进程,提高堆肥质量。微生物菌剂能够高效促进鸡粪-生物炭堆肥堆制过程中微生物群落的演替。在门水平上,菌剂能够促使堆肥堆体中绝对优势真菌子囊菌门(Ascomycota)真菌的相对丰度明显提高,而绝对优势细菌由厚壁菌门(Firmicutes)细菌变为放线菌门(Actinobacteria)细菌;在属水平上,菌剂能够刺激堆肥堆体中具有强有机质降解能力的假纤细芽孢杆菌(*Pseudogracilibacillus*)、布哈加瓦氏菌(*Bhargavaea*)等和具有生防潜力的链霉菌(*Streptomyces*)、枝顶孢霉(*Acremonium*)等相对丰度提高,降低一些致病性真菌属[如毛孢子菌(*Cutaneotrichosporon*)和镰刀霉(*Fusarium*)]真菌的相对丰度。处理组堆肥有效刺激了上海青种子萌发和根生长,种子培养48 h后的萌发率、根长分别达到91.60%、1.59 cm,均高于对照。

参考文献:

- [1] 尹萌,孙寓姣,李洁,等. 生物质废弃物发酵过程中菌群多样性及秸秆降解菌的筛选[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(3): 591-598.
- [2] CHEN H Y, AWASTHI S K, LIU T, et al. Effects of microbial culture and chicken manure biochar on compost maturity and greenhouse gas emissions during chicken manure composting[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 389:121908.
- [3] 杜婕,宋修超,马艳. 中药渣堆肥微生物群落结构及纤维素降解酶基因表达量变化特征[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(2):352-360.
- [4] DING S, HUANG W J, XU W J, et al. Improving kitchen waste composting maturity by optimizing the processing parameters based on machine learning model[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 360:127606.
- [5] BIAN B, HU X R, ZHANG S P, et al. Pilot-scale composting of typical multiple agricultural wastes: parameter optimization and mechanisms[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 287:121482.
- [6] ZHENG G D, LIU Y, LI Y J, et al. Inhibitory effects of the addition of KNO_3 on volatile sulfur compound emissions during sewage sludge composting[J]. *Bioengineering*, 2022, 9(6):258.
- [7] WANG M M, WU Y C, ZHAO J Y, et al. Comparison of composting factors, heavy metal immobilization, and microbial activity after biochar or lime application in straw-manure composting[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 363:127872.
- [8] RASTOGI M, NANDAL M, KHOSLA B. Microbes as vital additives for solid waste composting[J]. *Heliyon*, 2020, 6(2): e03343.
- [9] LU T, YANG Y, FENG W J, et al. Effect of the compound bacterial agent on microbial community of the aerobic compost of food waste[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2022, 74(1):32-43.
- [10] LI C N, LI H Y, YAO T, et al. Microbial inoculation influences bacterial community succession and physicochemical characteristics during pig manure composting with corn straw[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 289:121653.
- [11] SÁNCHEZ O J, OSPINA D A, MONTOYA S. Compost supplementation with nutrients and microorganisms in composting process[J]. *Waste Management*, 2017, 69:136-153.
- [12] 吴晓东,邢泽炳,何远灵,等. 添加生物炭对鸡粪好氧堆肥过程中养分转化的研究[J]. 中国土壤与肥料, 2019(5):141-146.
- [13] KARCZEWSKI K, RISS H W, MEYER E I. Comparison of DNA-fingerprinting (T-RFLP) and high-throughput sequencing (HTS) to assess the diversity and composition of microbial communities in groundwater ecosystems[J]. *Limnologia*, 2017, 67:45-53.
- [14] JIANG X, DENG L T, MENG Q X, et al. Fungal community succession under influence of biochar in cow manure composting[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2020, 27:9658-9668.
- [15] DUAN Y M, AWASTHI M K, WU H H, et al. Biochar regulates bacterial-fungal diversity and associated enzymatic activity during sheep manure composting[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 346:126647.
- [16] ZHAI W H, JIA L M, ZHAO R, et al. Response characteristics of nitrous oxide related microorganisms to biochar addition during chicken manure composting[J]. *Process Safety and Environmental Protection*, 2023, 169:604-608.
- [17] WANG K, YIN X B, MAO H L, et al. Changes in structure and function of fungal community in cow manure composting[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 255:123-130.
- [18] ZENG Z T, GUO X Y, XU P, et al. Responses of microbial carbon metabolism and function diversity induced by complex fungal enzymes in lignocellulosic waste composting[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 643: 539-547.
- [19] 毛红祥,桂素萍,肖植特. AA3型连续流动分析仪测定有机肥料全氮含量[J]. 中国土壤与肥料, 2015(3):116-119.
- [20] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国农业行业标准: 有机肥料: NY 525—2012[S]. 北京: 中国农业出版社, 2012.
- [21] XIE J, GU J, WANG X J. Insights into the beneficial effects of woody peat for reducing abundances of antibiotic resistance genes during composting[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 342: 125903.
- [22] 刘忠华,赵帅翔,刘会芳,等. 条垛堆肥-蚯蚓堆肥联合处理对堆肥产品性状的影响[J]. 中国土壤与肥料, 2019(4):200-207.
- [23] 孟国欣,查同刚,巩潇,等. 污泥添加园林废弃物堆肥过程参数变化及腐熟度综合评价[J]. 生态环境学报, 2018, 27(8): 1538-1546.
- [24] AMUAH E E Y, FEI-BAFFOE B, SACKEY L N A, et al. A review of the principles of composting: understanding the processes, methods, merits, and demerits[J]. *Organic Agriculture*, 2022, 12:547-562.
- [25] XU Z M, LI R H, LIU T, et al. Effect of inoculation with newly isolated thermotolerant ammonia-oxidizing bacteria on nitrogen conversion and microbial community during cattle manure composting[J]. *Journal of Environmental Management*, 2022, 317:115474.
- [26] LI C N, LI H Y, YU T, et al. Effects of microbial inoculation on enzyme activity, available nitrogen content, and bacterial succession during pig manure composting[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 306(3):123167.
- [27] 武淑霞,刘宏斌,黄宏坤,等. 我国畜禽养殖粪污产生量及其资源化分析[J]. 中国工程科学, 2018, 20(5): 103-111.
- [28] 张羽鑫,刘闯,黄殿男,等. 超高温菌好氧堆肥技术对人粪便的处理效果[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(4):179-185.
- [29] 黎妍妍,彭五星,张婷,等. 万寿菊秸秆堆肥在缓解烟草连作障碍中的作用[J]. 南方农业学报, 2022, 53(2):451-459.
- [30] 张霞,李健,潘孝青,等. 规模兔场污水异位发酵处理技术应用[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(6):1471-1475.
- [31] 王小兵,王海潮,汪晓丽,等. 厨余垃圾堆肥腐熟降解菌株的筛

- 选与鉴定[J].江苏农业科学,2021,49(23):213-218.
- [32] 邓 辉,王 成,吕豪豪,等.堆肥过程放线菌演替及其木质纤维素降解研究进展[J].应用与环境生物学报,2013,19(4):581-586.
- [33] YANG X C, HAN Z Z, RUAN X Y, et al. Composting swine carcasses with nitrogen transformation microbial strains: succession of microbial community and nitrogen functional genes[J]. Science of the Total Environment, 2019, 688:555-566.
- [34] MARYAM H, MUSHTAQ T S A, JAVAD F, et al. Isolation and characterization of denitrifying halophilic bacteria from Bahr Al-Milh Salt Lake, Karbala, Iraq[J]. Journal of Applied Biology and Biotechnology, 2018, 6(4):32-36.
- [35] ZHANG W M, YU C X, WANG X J, et al. Increased abundance of nitrogen transforming bacteria by higher C/N ratio reduces the total losses of N and C in chicken manure and corn stover mix composting[J]. Bioresource Technology, 2020, 297:122410.
- [36] DUAN Y M, AWASTHI S K, LIU T, et al. Positive impact of bio-char alone and combined with bacterial consortium amendment on improvement of bacterial community during cow manure composting [J]. Bioresource Technology, 2019, 280:79-87.
- [37] KHAN M S, GAO J L, MUNIR I, et al. Characterization of endophytic fungi, *Acremonium* sp., from *Lilium davidii* and analysis of its antifungal and plant growth-promoting effects[J]. BioMed Research International, 2021,2021:9930210.
- [38] LI Z Q, MA L, ZHANG Y, et al. Effect of wheat cultivars with different resistance to *Fusarium* head blight on rhizosphere *Fusarium graminearum* abundance and microbial community composition [J]. Plant and Soil, 2020, 448(1/2):383-397.
- [39] SAWASWONG V, CHANCHAEM P, KHAMWUT A, et al. Oral-fecal mycobiome in wild and captive cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) [J]. Fungal Genetics and Biology, 2020, 144:103468.

(责任编辑:徐 艳)