

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2020.01.033

蚯蚓堆制花生壳的微生物群落结构特征研究

陈玉香¹ 姚月¹ 赵婷婷¹ 杜召振² 徐立新²

(1. 吉林大学生物与农业工程学院, 长春 130022; 2. 吉林大学生命科学学院, 长春 130012)

摘要: 针对花生壳因木质素含量高而限制其利用的问题, 选择添加赤子爱胜蚓堆制花生壳。试验处理分为接种蚯蚓组和未接种蚯蚓的对照组, 堆制处理 48 d。初始混合底物的碳氮比约为 37.00, 第 48 天时, 蚯蚓处理组物料的碳氮比低于 15.00, 而对照组则为 23.17, 表明蚯蚓加速了花生壳的分解。试验结束时, 赤子爱胜蚓的死亡率为 19%。在蚯蚓堆制过程中, 观察到蚓茧和幼蚓, 表明蚯蚓能够逐步适应高木质素含量的花生壳。初始底物中真菌的 Shannon - Wiener 指数为 1.33, 堆制结束时, 蚯蚓处理组和对照组的 Shannon - Wiener 指数分别为 2.59 和 1.66, 表明蚯蚓的存在增加了真菌的多样性。蚯蚓处理组中 *Rhodococcus*、*Arthrobacter*、*unclassified_f_Peptostreptococcaceae*、*Sporosarcina*、*Cercophora*、*unclassified_c_Dothideomycetes*、*Preussia* 和 *unclassified_f_Lasiosphaeriaceae* 的相对丰度显著增加。

关键词: 花生壳; 蚯蚓; 微生物群落; 木质素

中图分类号: S816.44; S899.8 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2020)01-0303-10

OSID:



Characterization of Microbial Community Structure of Vermicomposting in Peanut Shells

CHEN Yuxiang¹ YAO Yue¹ ZHAO Tingting¹ DU Zhaozhen² XU Lixin²

(1. College of Biological and Agricultural Engineering, Jilin University, Changchun 130022, China

2. College of Life Science, Jilin University, Changchun 130012, China)

Abstract: The ever-increasing worldwide production of peanuts has led to a large accumulation of shells. The usage of these residues has been limited due to their high lignin content. Vermicomposting was used to stabilize the peanut shells (PS). Chopped PS was mixed with cow dung at a ratio of 60:40 (on a dry weight basis). *Eisenia fetida* was selected. The experiment was classified into two treatments: the control, which contained 1 000 g of the mixed substrates without earthworms, and the treatment with earthworms, which contained the mixed substrates and 120 individuals of *Eisenia fetida*. The duration of the experiment was 48 days. The C/N ratio of the initial substrate was approximately 37.00. The C/N ratio in the treatment with earthworms was less than 15.00 on day 48, whereas it was 23.17 in the control. This suggested that earthworms stimulated the decomposition of shells. The mortality rate of *Eisenia fetida* was 19% by the end of the experiment. Cocoons and juvenile earthworms were observed during vermicomposting, indicating that the earthworms adapted to the high lignin content of the shells. The Shannon - Wiener index of fungi in the initial mixed material was 1.33. By the end of the vermicomposting, the values were 2.59 and 1.66 in the treatment with earthworms and in the control, respectively. This indicated that the diversity of fungi was promoted by the presence of earthworms. A significant increase in the abundance of *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *unclassified_f_Peptostreptococcaceae*, *Sporosarcina*, *Cercophora*, *unclassified_c_Dothideomycetes*, *Preussia* and *unclassified_f_Lasiosphaeriaceae* in the treatment with earthworms was observed.

Key words: peanut shell; vermicomposting; microbial community; lignin

收稿日期: 2019-06-13 修回日期: 2019-07-02

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31872178)

作者简介: 陈玉香(1970—),女,教授,博士,主要从事生物质转化研究,E-mail: chen@jlu.edu.cn

通信作者: 徐立新(1978—),男,高级工程师,博士,主要从事农业副产物综合利用研究,E-mail: xlx626@jlu.edu.cn

0 引言

世界各地广泛种植花生,年产量约为4 600万 t^[1]。中国是世界上最大的花生生产国,每年生产大约1 300万 t花生,占世界总产量的28.3%。花生产量的增加导致生产地区积累了大量花生壳。据统计,每生产1 kg花生可产生230~300 g花生壳^[2],全世界每年生产大约1 370万 t花生壳^[1]。目前,研究者正努力寻求回收利用这种农业残余物的有效途径。例如,用花生壳制作发酵产氢的辅助底物^[3]、生物活性低聚糖^[4]、土壤改良剂^[5]。花生壳粉末可用于增强环氧复合材料的机械性能和热性能^[6],花生壳也用作固体燃料^[7]或者饲料^[4]。但只有少部分花生壳用于燃料等用途,其余几乎全部作为废弃物处理^[8]。丢弃的花生壳易发生微生物腐败,造成严重环境污染。因此,合理利用花生壳不仅有利于保护环境,还可以开发农业废弃物资源化的新途径。

花生壳主要由多糖和木质素组成,与其他农业残余物不同,花生壳中木质素质量分数通常高于40%^[4],增大了降解难度,严重限制了其应用。作为分解和利用有机废弃物的环境友好方式,堆肥受到越来越多的关注^[9]。与无机肥相比,堆肥具有促进腐殖质(土壤有机质的主体部分)形成、改善植物生长并有效抑制植物病原体等优点^[10-11]。由于花生壳具有高木质素含量,难于被降解,通过传统堆肥方式降解稳定花生壳不容易实现。蚯蚓堆制是一种广泛使用的降解稳定有机废弃物的方法,得到的堆制物氮、磷和腐殖酸含量适合用于土壤改良剂^[12]。堆制过程涉及到微生物和蚯蚓的共同作用。微生物在有机废弃物的分解和稳定中起主要作用,蚯蚓具有促进作用。蚯蚓堆制成功用于各种木质纤维素类废弃物,如甘蔗渣^[13]、落叶^[14]和中药渣^[15]等。迄今为止,关于蚯蚓堆制花生壳的研究很少。据报道,大多数蚯蚓不喜食富含木质素的有机废弃物,在无其他食物情况下,蚯蚓被迫取食富含木质素的物质,严重时会导致蚯蚓体重下降甚至死亡^[16]。

本文探索蚯蚓堆制花生壳的可行性,揭示蚯蚓堆制花生壳过程中的微生物群落结构特征。

1 材料和方法

1.1 底物和蚯蚓物种

花生壳收集自山东省菏泽市某农场,并经400Y型多功能粉碎机粉碎处理。牛粪从吉林大学农学部养殖场收集。将物料风干至含水率为15%,然后储存在干燥的塑料容器中。物料的化学特征如表1所示。供试蚯蚓为赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*),购自当

地市场。选择成年蚯蚓进行试验研究。将蚯蚓置于含有牛粪、粉碎的花生壳混合底物中,25℃,15 d,使其适应底物。

表1 初始底物的化学特征

Tab.1 Chemical characteristics of initial substrates

特征参数	花生壳	牛粪
pH 值	6.51 ± 0.02	6.37 ± 0.02
总有机碳质量比/(g·kg ⁻¹)	570.08 ± 0.24	367.28 ± 1.09
总有机氮质量比/(g·kg ⁻¹)	10.83 ± 0.08	11.20 ± 0.11
碳氮比	52.66 ± 0.38	32.79 ± 0.37
纤维素质量分数/%	16.92 ± 0.11	
半纤维素质量分数/%	11.84 ± 0.09	
木质素质量分数/%	27.42 ± 0.04	

注:数据为平均值 ± 标准差,试验次数为3次。

1.2 蚯蚓堆制体系和取样方法

在开始堆制时向花生壳中添加牛粪,以降低花生壳的碳氮比,使其适于蚯蚓堆制。将粉碎的花生壳与牛粪以60:40的比例混合(基于干质量)。蚯蚓堆制在塑料花盆(上口内径为18 cm,下口内径为10 cm,盆高为22 cm)中进行。每个花盆中放入1 000 g混合物料。分为两种处理:对照组(CK),为不接种蚯蚓的混合底物;接种蚯蚓处理组(T),每个花盆接种120条赤子爱胜蚓成蚓(平均体质量为0.3 g),每个处理3个重复。在接种蚯蚓之前,将盛有底物的塑料花盆室温(25℃)下放置15 d,隔天喷水以进行预堆制。初始混合底物标记为T0。所有花盆都用纱网覆盖并放置实验室中,室温保持约25℃。通过定期喷洒足量的无菌水,使基质含水率保持在55%~65%^[15]。试验持续时间为48 d。将蚯蚓接种于底物后,每隔12 d取样一次(保证取样前后各花盆中蚯蚓接种率不变)。CK1、CK2、CK3、CK4和T1、T2、T3、T4均分别表示在第12、24、36、48天取样。在每个采样日,对成年蚯蚓(成蚓)、幼蚯蚓(幼蚓)和蚓茧进行人工分选并记录数量。将堆制底物样品在-70℃下冷冻保存,以进行化学成分和微生物群落结构分析。

1.3 化学成分分析

采用重铬酸钾和浓硫酸氧化法测定总有机碳(TOC)含量^[17]。总氮(TN)含量采用半微量凯氏定氮法测定^[18]。用对应的TOC和TN计算各采样日期的碳氮比。使用数字pH计测定pH值。将堆制物以1:10(质量比)的比例置于双蒸水中,振荡20 min,定性滤纸过滤,收集滤液用于测定pH值^[19]。纤维素、半纤维素和木质素的含量通过Van Soest方法测定^[20]。

1.4 微生物群落结构分析

采用E. Z. N. A. DNA提取试剂盒(OMEGA

Biotek., 美国), 按照说明书步骤, 分离提取 DNA。从 0.2 g 样品中提取基因组 DNA, 设置 3 个平行试验, 采用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 DNA 纯度, 用于后续微生物群落分析。细菌引物序列为 V338F (5'-ACTCCTA CGGGAGGCAGCA-3') 和 V806R (5'-ATGC AGGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'), 扩增细菌 16S rRNA 基因的 V3 ~ V4 区^[21]。真菌引物序列为 ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') 和 ITS2R (5'-GCTGCGTCTTCATCGATGC-3'), 扩增真菌 18S rRNA 基因的 ITS 序列^[22]。所有 PCR 反应均按文献[23]进行。纯化的 PCR 产物用于高通量测序, 由上海美吉生物医药科技有限公司完成。采用微生物生态学定量分析方法^[24]进行序列分析。使用 SILVA 数据库进行物种注释, 按照序列一致性为 97% 将序列聚类成操作分类单元 (OTUs)^[25], 计算丰度和多样性指数 (ACE、Chao 1 和 Shannon - Wiener)。

1.5 统计分析

使用 SPSS 16.0 进行数据分析。两因素方差分析用于确定采样日期和蚯蚓接种对底物碳氮比变化的影响。单因素方差分析用于分析采样日期对成年蚯蚓、幼蚯蚓和蚓茧数量的影响。采用 *T* 检验比较细菌和真菌组成在属水平上的差异。所有结果表示为平均值 ± 标准差。当 $p < 0.05$ 时, 认为结果具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 蚯蚓堆制过程中 TOC、TN 含量和碳氮比的变化

蚯蚓堆制过程中 TOC、TN 含量的变化如表 2 所示。初始物料 TOC 质量比为 412.69 g/kg。在蚯蚓堆制结束时, 蚯蚓处理组和对照组的 TOC 质量比分别为 328.63、359.81 g/kg。在整个蚯蚓堆制过程中 TOC 含量呈下降趋势, 同一处理组不同时间的样品间有显著性差异 ($p < 0.05$)。蚯蚓处理组与对照组

之间也存在显著差异 ($p < 0.05$)。蚯蚓处理组 TOC 含量下降速度明显快于对照组。许多研究也报道了堆制过程中 TOC 含量的减少情况^[26-27], 这主要是由于有机碳在分解过程中以 CO₂ 的形式释放, 一方面是蚯蚓以及微生物呼吸作用; 另一方面是因为 TOC 的矿化作用。TN 含量在蚯蚓堆制过程中呈上升趋势。最初底物的 TN 质量比为 10.92 g/kg。堆制结束时, 蚯蚓堆制组和对照组的 TN 质量比分别为 24.77、15.54 g/kg。在初始阶段, 蚯蚓处理组与对照组之间的 TN 含量没有显著差异。从第 36 天开始, 蚯蚓处理组与对照组的 TN 含量存在显著差异 ($p < 0.05$)。ARUMUGAM 等^[26]报道, TN 含量的增加可能与蚯蚓分泌粘液、含氮排泄物质、促生长激素和酶有关。在蚯蚓处理组观察到更高的 TN 含量, 这与 ARUMUGAM 等观点一致。在整个堆制过程中碳氮比呈下降趋势 (图 1)。初始底物的碳氮比约为 37.00。第 12 天 CK 和 T 处理的碳氮比分别为 34.12 和 31.91。第 36 天, CK 和 T 处理的碳氮比分别为 25.01 和 19.77。第 48 天, 相应的值分别为 23.17 和 13.28。碳氮比降低是由于在蚯蚓堆制过程中 TOC 含量的降低和 TN 含量的增加^[26], 碳氮比降低也归因于有机氮的矿化速率低于有机碳的矿化速率^[28]。接种蚯蚓显著降低碳氮比 ($F_{(1,20)} = 409.795, p < 0.001$)。此外, 蚯蚓的作用与采样时间有关 ($F_{(4,20)} = 1.271 \times 10^3, p < 0.001$), 蚯蚓处理与采样时间之间存在显著的交互作用 ($F_{(4,20)} = 85.210, p < 0.001$)。可以用碳氮比表征堆制物料的成熟度。对于堆制物, 碳氮比低于 20 是可接受的^[29]。第 36 天时, 蚯蚓堆制物料的碳氮比低于 20.00。然而在对照组中该比率大于 20.00, 表明堆制物料不稳定。第 48 天, 蚯蚓处理组的碳氮比小于 15.00, 而对照组中则为 23.17。堆制物碳氮比为 15 或更低, 则适合于农业生产^[30]。本结果表明, 蚯蚓对花生壳的降解稳定具有促进作用。

表 2 堆制过程中 TOC、TN 含量的变化

Tab.2 Changes in TOC and TN during vermicomposting

g/kg

堆制时间/d	T 处理		CK 处理	
	TOC	TN	TOC	TN
0	(412.69 ± 0.70) ^a	(10.92 ± 0.08) ^c	(412.47 ± 0.96) ^a	(11.19 ± 0.14) ^d
12	(371.58 ± 0.71) ^b	(11.65 ± 0.24) ^c	(393.58 ± 0.76) ^b	(11.54 ± 0.05) ^d
24	(351.60 ± 0.74) ^c	(12.95 ± 0.12) ^c	(386.39 ± 0.60) ^c	(12.68 ± 0.15) ^c
36	(343.93 ± 0.48) ^d	(17.44 ± 0.96) ^b	(371.46 ± 0.67) ^d	(14.58 ± 0.16) ^b
48	(328.63 ± 0.49) ^e	(24.77 ± 1.11) ^a	(359.81 ± 0.39) ^e	(15.54 ± 0.40) ^a

注: 同一列不同小写字母表示差异显著 ($p < 0.05$), 下同。

2.2 蚯蚓堆制过程中蚯蚓数量的变化

在堆制期间每次取样时, 将蚓茧和幼蚓取出并

置于另外的容器中培养。在每个采样日记录成蚓、幼蚓和蚓茧的数量 (表 3)。在堆制过程中, 发现有

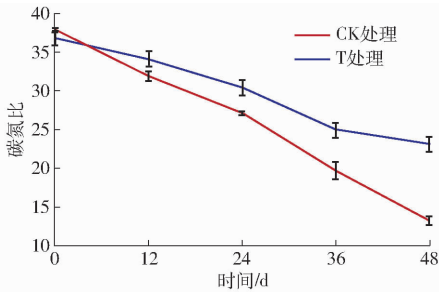


图1 蚯蚓堆制过程中底物的碳氮比变化曲线

Fig.1 C/N ratios of substrates during vermicomposting

蚯蚓死亡,到蚯蚓堆制结束时,死亡率为19%。一般来说,堆制系统中,蚯蚓的存活主要取决于其所能获得底物化学成分^[31]。此外,有机物的分解产物如氨、氮氧化物、二氧化碳、有机酸和其他中间化合物也可能导致蚯蚓死亡^[32]。除了上述原因外,花生壳中高含量木质素也可能导致蚯蚓死亡。木质素含量对蚯蚓存活的不利影响已被报道^[16]。尽管有少量蚯蚓死亡,蚯蚓处理组中花生壳的分解速率仍比对照组快得多。在蚯蚓堆制过程中,蚓茧和幼蚓的出现表明该蚯蚓品种对花生壳类底物具有一定适应性,可以采用蚯蚓堆制降解稳定花生壳。

表3 蚯蚓堆制期间成蚓、幼蚓和蚓茧的数量

Tab.3 Number of adult earthworms, juvenile earthworms and cocoons during vermicomposting

堆制时间/d	成蚓	幼蚓	蚓茧
0	(120 ± 0.01) ^a		
12	(117 ± 1.00) ^a	(19 ± 1.15) ^c	(71 ± 3.79) ^a
24	(111 ± 2.89) ^b	(26 ± 1.53) ^b	(49 ± 2.65) ^b
36	(106 ± 1.53) ^c	(37 ± 2.31) ^a	(35 ± 0.58) ^c
48	(97 ± 2.65) ^d	(20 ± 0.58) ^c	(26 ± 1.53) ^d

2.3 微生物群落的丰富性和多样性

每个处理组的细菌和真菌稀释曲线表明,样本量足以表征两种处理方式下微生物多样性的差异(图2)。为分析样品微生物群落的丰富性和多样性,设置97%相似度水平下,每种处理的OTUs数量如表4所示。在初始混合底物中,细菌和真菌的OTUs数量分别为1 154和111。在第12天采集的样本中,对照组和蚯蚓堆制组中细菌的OTUs数量分别为1 354和1 382,真菌的OTUs数量分别为104和165。这表明与对照组相比,蚯蚓处理组的OTUs数量增加。在第2次采集样品中,蚯蚓处理组真菌的OTUs数量远高于对照组。然而,蚯蚓处理组中细菌的OTUs数量略低于对照组。这与MOODY等^[33]的观点不同:MOODY等认为,蚯蚓可以选择性地以某些真菌为食,从而导致堆制物中真菌多样性有一定下降。在蚯蚓堆制过程中,ACE指数和Chao 1指数的变化趋势与OTUs数量变化趋势一致

(表4)。对于细菌,Shannon - Wiener指数在堆制期间随时间没有显著变化,该值约为5。然而对于真菌,蚯蚓处理组的Shannon - Wiener指数远高于相应对照组。初始底物中真菌的Shannon - Wiener指数为1.33,在第1次采样时,蚯蚓处理组的Shannon - Wiener指数为2.56,对照组中为1.42。在堆制结束时,蚯蚓处理组和对照组的Shannon - Wiener指数分别为2.59和1.66。这表明蚯蚓的存在增加了真菌的多样性。本研究结果与中药渣蚯蚓堆制获得的结果不同^[34],文献[34]中蚯蚓堆制物料的细菌Shannon - Wiener指数高于6。然而,在本研究中,观察到细菌活性受到些许抑制,这可能是由于所使用的底物不同。

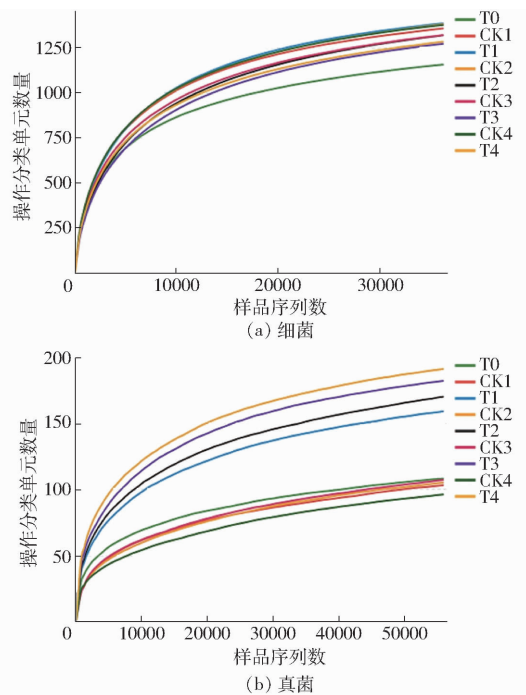


图2 细菌16S rRNA和真菌18S rRNA序列的稀释曲线

Fig.2 Rarefaction curves of sequences of bacterial 16S rRNA and fungal 18S rRNA depicting effect of 3% dissimilarity on number of OTUs identified in samplings

2.4 微生物群落的相似性

采用聚类分析可更好地了解每种处理组微生物群落结构的相似性(图3)。在树状图中分离出2个分支,第1个分支代表蚯蚓处理组的细菌或真菌群落,第2个分支是对照组和初始混合底物中的细菌或真菌群落。蚯蚓处理的细菌相似度为82%(图3a),初始底物的细菌组成更接近于对照组。对于真菌(图3b),初始底物与对照组相似度达到88%,蚯蚓处理组为87%。该结果表明初始底物的微生物组成与对照组的微生物组成更为相似,蚯蚓在改变微生物的组成中起重要作用。

非度量多维尺度(NMDS)分析表明,蚯蚓堆制

表 4 97% 相似水平下 16S rRNA 和 18S rRNA 基因文库的操作分类单元数及群落丰富度和多样性指数的比较
 Tab. 4 Comparison of operational taxonomic units (OTUs) richness and diversity indices of 16S rRNA and 18S rRNA gene libraries for clustering at 97% identity

处理	细菌				真菌			
	OTUs 数量	ACE 指数	Chao 1 指数	Shannon - Wiener 指数	OTUs 数量	ACE 指数	Chao 1 指数	Shannon - Wiener 指数
T0	1 154	1 300.13	1 346.08	5.72 (5.70, 5.73)	111	144.20	152.36	1.33 (1.31, 1.34)
		(1 264.40, 1 347.41)	(1 288.54, 1 428.23)			(130.03, 175.03)	(131.39, 206.16)	
CK1	1 354	1 487.61	1 518.63	5.87 (5.85, 5.88)	104	134.09	133.21	1.42 (1.41, 1.43)
		(1 455.59, 1 529.73)	(1 470.72, 1 586.21)			(121.15, 162.05)	(118.91, 170.47)	
T1	1 382	1 505.23	1 505.29	5.71 (5.70, 5.73)	165	208.49	213.16	2.56 (2.55, 2.57)
		(1 475.31, 1 544.73)	(1 468.68, 1 557.36)			(190.62, 241.86)	(189.72, 264.43)	
CK2	1 377	1 538.49	1 546.90	5.83 (5.82, 5.85)	105	136.20	140.77	1.45 (1.44, 1.46)
		(1 501.58, 1 586.33)	(1 499.14, 1 613.32)			(119.91, 170.30)	(119.60, 192.61)	
T2	1 316	1 485.42	1 489.88	5.35 (5.33, 5.37)	165	205.51	200.80	2.48 (2.47, 2.49)
		(1 447.45, 1 534.35)	(1 442.00, 1 555.96)			(191.73, 232.20)	(187.34, 231.76)	
CK3	1 317	1 479.26	1 495.87	5.72 (5.71, 5.74)	107	156.76	157.40	1.30 (1.29, 1.31)
		(1 442.04, 1 527.55)	(1 445.67, 1 565.66)			(138.33, 193.72)	(135.89, 208.04)	
T3	1 269	1 430.00	1 429.29	5.18 (5.16, 5.20)	183	215.50	209.00	2.46 (2.45, 2.47)
		(1 393.20, 1 477.69)	(1 384.07, 1 492.28)			(204.82, 236.71)	(200.14, 230.67)	
CK4	1 373	1 509.75	1 513.06	5.79 (5.77, 5.81)	96	117.65	108.55	1.66 (1.65, 1.68)
		(1 477.31, 1 552.29)	(1 472.34, 1 570.46)			(106.33, 142.73)	(101.09, 129.65)	
T4	1 280	1 444.13	1 482.24	5.47 (5.45, 5.49)	188	229.70	227.96	2.59 (2.57, 2.60)
		(1 406.31, 1 493.27)	(1 425.56, 1 560.99)			(215.26, 256.97)	(211.86, 264.22)	

注：括号中的数据表示置信区间。

组的微生物群落结构与初始底物、对照组不同(图 4)。细菌(图 4a)和真菌(图 4b)均分为两组,一个是蚯蚓处理组,另一个是对照组与初始底物。NMDS1 显示蚯蚓处理组微生物群落与对照组和初始底物的不同。此外,对照组中的 NMDS2 比蚯蚓处理组的变异性更大。图 4a 中,蚯蚓堆制组中的 T1 远离 T2、T3 和 T4,这一现象表明,蚯蚓堆制初期与后期的细菌组成有差异,这也说明了蚯蚓对花生壳分解的促进作用与时间有关。这些发现进一步证实了树状图所显示的结果。

2.5 微生物群落的组成

表 5 显示了门分类水平的微生物组成。对于细菌,在两种处理组优势微生物门类是 Proteobacteria、Actinobacteria、Bacteroidetes、Firmicutes 和 Chloroflexi,占细菌总量的 88% ~ 95%。其中以 Proteobacteria 最多,其次为 Actinobacteria。在其他堆制体系中,Proteobacteria、Actinobacteria、Bacteroidetes 和

Firmicutes 也经常作为优势微生物出现^[35-36]。PARTANEN 等^[37]认为在堆制过程中占主导地位的细菌通常是 Chloroflexi。Actinobacteria 是成熟堆制物的一类代表性细菌^[38],并且被认为是重要的木质纤维素降解物^[39]。在本研究蚯蚓处理组中,Actinobacteria 的相对丰度随着时间的推进而增加,蚯蚓处理组底物的降解速度快于对照组,并且在堆制过程结束时达到峰值,这表明堆制物成熟。Bacteroidetes 能够降解包括纤维素和几丁质在内的大分子^[40]。在许多研究中证明了 Proteobacteria、Actinobacteria 和 Bacteroidetes 在有机物的降解,硫、氮和碳循环中也起到了重要作用^[41]。但是 PENG 等^[42]证实,Bacteroidetes 不利于好氧堆肥,因为它可以将木质纤维素转化为小分子脂肪酸链,从而降低堆肥的 pH 值。与对照组相比,Firmicutes 的丰度在蚯蚓处理组呈现增加趋势。据报道,Firmicutes 可产生纤维素酶、脂肪酶、蛋白酶和其他胞外酶,并代谢

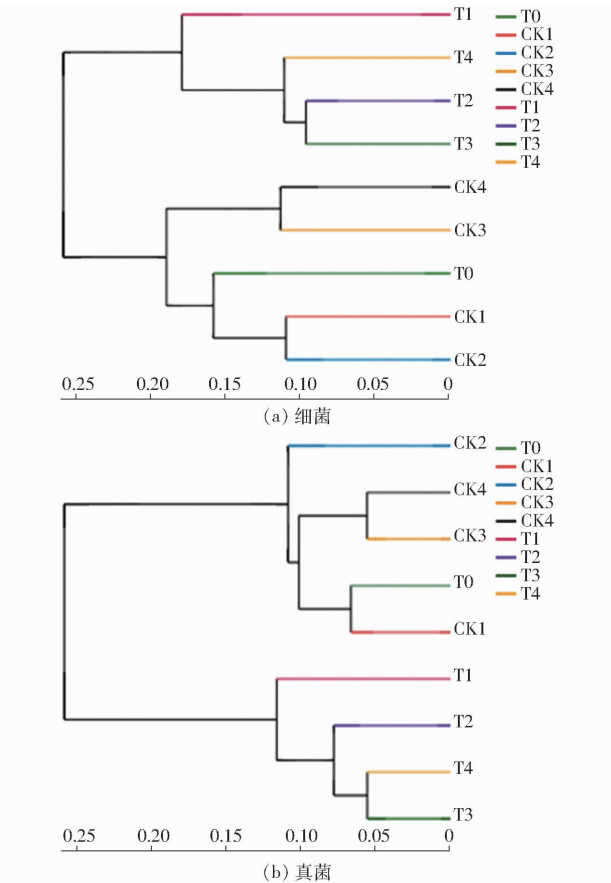


图 3 细菌和真菌测序结果的聚类分析
Fig. 3 Cluster analysis based on sequencing taxonomy of bacteria and fungi

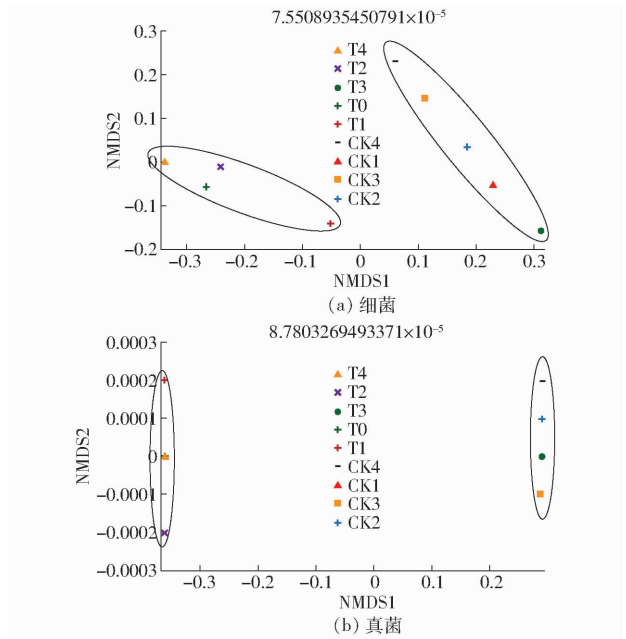


图 4 细菌和真菌测序结果的 NMDS 维度分析
Fig. 4 NMDS dimension analysis based on sequencing taxonomy of bacteria and fungi

多种底物,包括蛋白质、脂质、木质素、纤维素、糖和氨基酸^[43]。值得注意的是,与对照组相比,堆制初期蚯蚓处理组 Saccharibacteria 的相对丰度迅速增加。AWASTHI 等^[44]在堆制明胶工业污泥过程中添加高剂量生物炭发现 Saccharibacteria 的存在,认为

生物炭与初始堆制底物混合,可以确保有效的孔隙率和通风状况,提高微生物活性。在本研究中,蚯蚓在堆制物料内的爬行改善了氧的通透性,其作用类似于生物炭的添加。因此,蚯蚓处理组 Saccharibacteria 的相对丰度迅速增加。对于真菌,在蚯蚓处理组和对照组中,Ascomycota 和 unclassified_k_Fungi 是主要的微生物门类。这些结果与 AWASTHI 等^[44]研究结果一致。据报道,Ascomycota 在好氧堆制过程中普遍存在^[45]。Ascomycota 的丰度随着时间的推进而减少,而 unclassified_k_Fungi 呈现出增加的趋势。

表 5 门分类水平微生物相对丰度

Tab. 5 Relative abundance of microbes at phylum level

门	T0	CK1	T1	CK2	T2	CK3	T3	CK4	T4	%
Proteobacteria	48.17	37.97	32.48	37.32	27.83	31.96	21.21	25.79	24.55	
Actinobacteria	15.64	20.57	31.76	22.07	37.44	26.79	44.85	27.98	36.04	
Bacteroidetes	13.70	10.90	7.21	12.12	8.41	12.82	6.94	8.69	10.81	
Firmicutes	10.00	12.45	14.01	16.29	18.33	17.58	17.58	18.69	16.48	
Chloroflexi	6.15	9.65	6.71	5.26	3.33	4.17	3.77	6.86	4.41	
细菌	Saccharibacteria	1.65	1.93	2.19	1.96	2.40	2.78	2.58	3.91	3.35
Verrucomicrobia	1.32	1.07	1.26							
Acidbacteria		1.85	1.32		2.26			1.73		
Parcubacteria				1.02		1.05		1.74		
Gemmatimonadetes				1.12				1.09		
Others	3.37	3.61	3.06	2.84		2.85	3.07	3.52	4.36	
Ascomycota	97.11	98.39	95.02	98.72	85.94	89.41	91.95	81.42	85.44	
真菌	unclassified_k_Fungi	2.43	1.47	4.13	1.18	12.52	10.47	7.15	18.46	13.66
Zygomycota					1.32					
Others	0.46	0.14	0.85	0.10	0.21	0.12	0.90	0.12	0.90	

图 5 显示了属分类水平的微生物组成。在初始混合底物中,优势细菌是 *Devosia*、unclassified_f_Phy11obacteriaceae、norank_o_Anaerolineaceae、norank_f_BIrii41、*Cellulomonas* 和 *Bacillus*,其相对丰度分别为 7.50%、3.94%、3.56%、3.08%、3.01% 和 2.52%。*Devosia* 被认为是有机废弃物堆肥过程中早期阶段的可能生物标志物^[46]。优势真菌为 unclassified_p_Ascomycota、*Cercophora* 和 unclassified_c_Sordariomycetes,相对丰度分别为 68.06%、16.67% 和 3.26%。接种蚯蚓改变了细菌的组成。在蚯蚓堆制组第 12 天采集的样品中,优势菌属是 *Rhodococcus*、*Devosia*、norank_f_Anaerolineaceae、*Bacillus*、*Cellulomonas*、*Arthrobacter* 和 norank_p_Saccharibacteria,这些属的相对丰度分别为 9.03%、3.67%、3.17%、2.44%、2.33%、2.30% 和 2.17%。对照组中,优势菌属是 *Devosia*、norank_f_Anaerolineaceae、*Cellulomonas* 和 *Bacillus*,其相对丰度分别为 5.07%、4.79%、4.70% 和 3.34%。堆肥过程中,*Cellulomonas* 可以加速有机物的降解,接种蚯蚓增加了堆肥早期 *Cellulomonas* 的相对丰度。在对照组未观察到 *Rhodococcus*。在蚯蚓堆制组初期阶段,*Rhodococcus* 的相对丰度呈增加趋势,在后期开始出现减少现象,在第 24、36、48 天时相对丰度分别为 15.13%、17.76% 和 13.42%。蚯蚓堆制组第

24 天采集的样品中,优势细菌是 *Rhodococcus*、*Bacillus*、unclassified_f_Planococcaceae 和 norank_p_Saccharibacteria。对照组中,优势细菌是 *Bacillus*、*Cellulomona*、*Devosia* 和 norank_f_BIrii41。*Bacillus* 的相对丰度在堆制初期增加,证明 *Bacillus* 具有较强的分解复杂有机物作用。使用 *T* 检验进行蚯蚓处理组和对照组中微生物组成的比较。图 6a(图中***、**、* 分别表示处理间在 0.001、0.01、0.05 水平上差异显著)显示了两种处理之间细菌组成的差异。在蚯蚓处理组中观察到 *Rhodococcus* 的相对丰度显著增加 ($p < 0.001$),*Arthrobacter*、unclassified_f_Peptostreptococcaceae 和 *Sporosarcina* 的相对丰度也显著增加。微生物的组成与分解速率直接相关。结果表明,接种蚯蚓可能促进堆肥过程中有机物的分解和改变细菌群落的组成。据报道,一些 *Rhodococcus* 属的微生物有转化某些木质纤维素或芳香烃的潜力^[47]。*Rhodococcus* 在蚯蚓处理组显著增加可能是花生壳分解更快的一个原因。在蚯蚓堆制橄榄油加工废弃物的过程中也观察到了 *Rhodococcus*^[38]。该属在蚯蚓堆制过程中并不常见,其存在可能与底物的化学组成有关。一些种类的 *Bacillus* 和 *Cellulomonas* 因其分解纤维素和半纤维素活性而众所周知^[48]。据报道,节杆菌可降解单环芳香族化合物,其在降解由真菌产生的小分子量中间

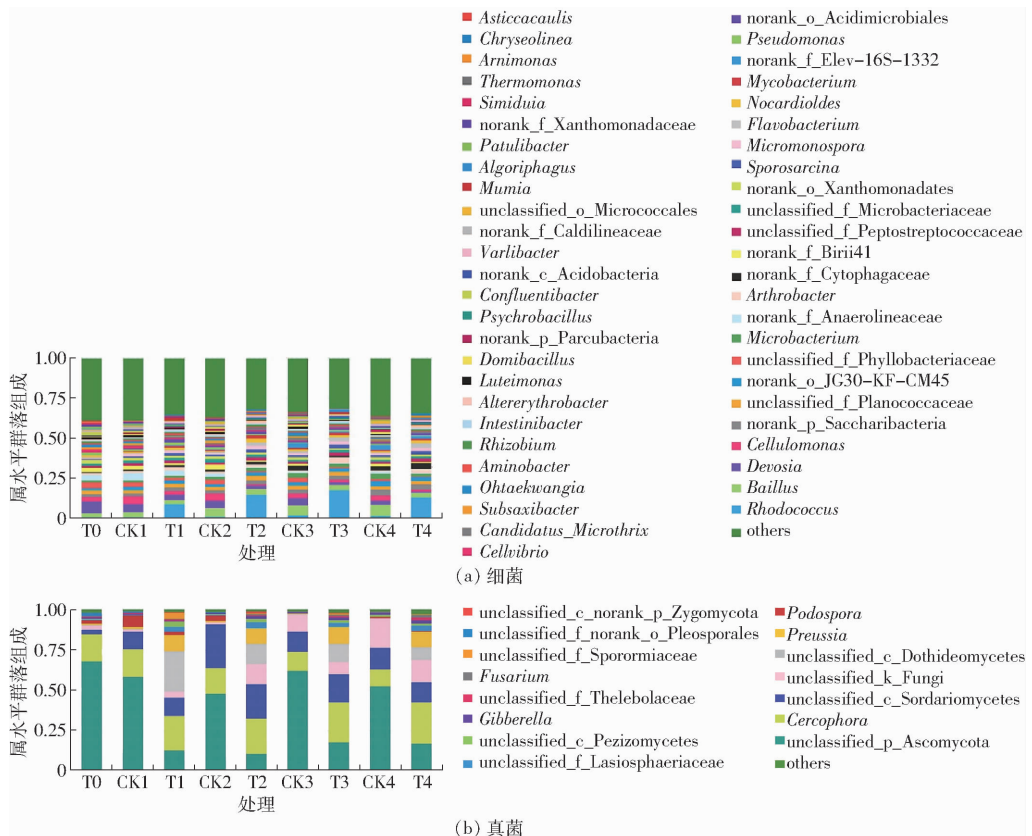


图 5 细菌和真菌属的组成

Fig. 5 Composition of bacterial and fungal communities at genus level

产物中起重要作用^[39]。对于真菌,蚯蚓处理组第12天采集的样本中,优势属是 *Cercophora*、unclassified_c_Dothiseomycetes、unclassified_p_Ascomycota、unclassified_c_Sordariomycetes 和 *Preussia*,其相对丰度分别为 24.94%、21.50%、12.58%、10.94% 和 10.45%。在对照组,优势属是 unclassified_p_Ascomycota、*Cercophora*、unclassified_c_Sordariomycetes 和 *Podospira*,相对丰度分别为 58.31%、17.32%、10.81% 和 7.32%。这表明蚯蚓的存在影响了真菌的组成。在对照组未观察到 unclassified_c_Dothiseomycetes。据报道,*Dothiseomycetes* 和 *Sordariomycetes* 具有分解木质纤维素的能力^[49]。*Cercophora* 的大多数种类也是木质纤维素分解者,能够产生各种木质纤维素分解酶^[50]。*Preussia* 一些种类可以在植物残枝或牛粪上生长^[51]。在蚯蚓处理组第24天采集的样品中,优势真菌属是 *Cercophora*、unclassified_c_Sordariomycetes、unclassified_k_Fungi、unclassified_c_Dothiseomycetes、unclassified_p_Ascomycota 和 *Preussia*,其相对丰度分别为 21.85%、21.45%、12.54%、12.48%、10.52% 和 9.64%。同期对照组的优势属为 unclassified_c_Ascomycota、unclassified_c_Sordariomycetes 和 *Cercophora*,相对丰度分别为 47.71%、27.52% 和 16.04%。这表明在堆制过程中蚯蚓的存在增加了真菌多样性。在第36天和第48天采集的样品的优势属和第24天的优势属相似。在堆制后期,对照组的优势菌属相对丰度减小,认为是底物逐渐耗尽导致。与对照组相比,蚯蚓堆制组的优势真菌相对丰度在堆制后期变化较小,可能是由于蚯蚓的分泌粘液和排泄物以及死亡的蚯蚓提供了养分维持微生物生长。图6b显示了蚯蚓处理组和对照组之间的真菌组成的差异。在蚯蚓处理组,*Cercophora*、unclassified_c_Dothiseomycetes、*Preussia* 和 unclassified_f_Lasiosphaeriaceae 相对丰度显著增加。结果表明,蚯蚓的存在和堆制时间均对堆制底物的群落组成有一定的影响。

3 结束语

将花生壳与牛粪混合后,利用接种赤子爱胜蚓

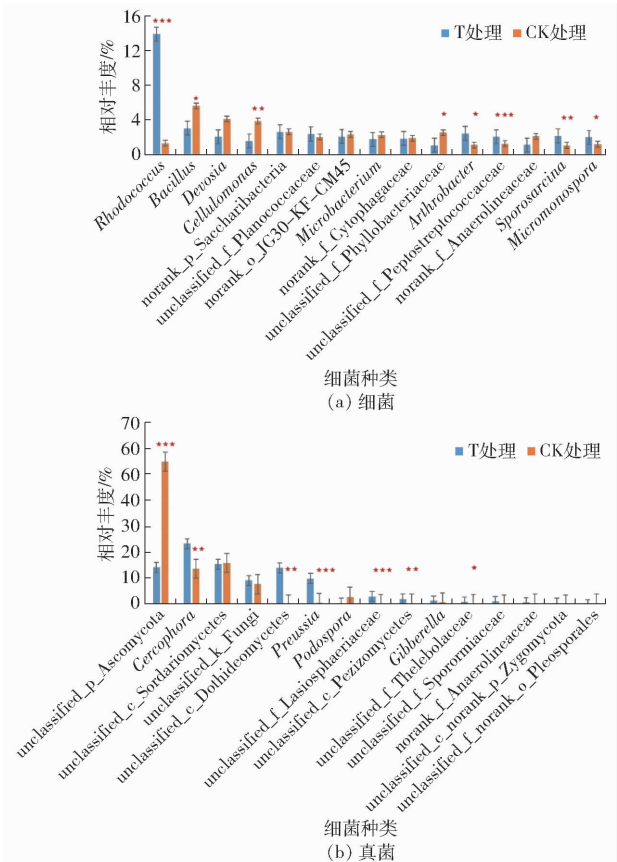


图6 细菌和真菌组成的 *T* 检验

Fig. 6 *T*-test for bacterial and fungal composition at genus level

进行堆制。在蚯蚓堆制过程中观察到蚓茧和幼蚓,在堆制结束时,赤子爱胜蚓的死亡率为19%,表明蚯蚓在一定程度上适应了高木质素含量的花生壳类底物。堆制结束时,蚯蚓处理组的碳氮比小于15.00,表明蚯蚓降低了有机碳含量,提高了全氮含量,从而降低了碳氮比,促进了花生壳的稳定降解。蚯蚓处理组中 *Rhodococcus*、*Arthrobacter*、unclassified_f_Peptostreptococcaceae、*Sporosarcina*、*Cercophora*、unclassified_c_Dothiseomycetes、*Preussia* 和 unclassified_f_Lasiosphaeriaceae 的相对丰度显著增加,表明蚯蚓能够改变堆制底物微生物群落结构,加快矿化、腐殖化过程和有机质的分解。蚯蚓堆制可以作为一种利用花生壳的生物学方法,且能够提高堆制终产物的真菌多样性。

参 考 文 献

- [1] DAHUNSI S O, ORANUSI S, EFEVOBOKHAN V E. Optimization of pretreatment, process performance, mass and energy balance in the anaerobic digestion of *Arachis hypogaea* (peanut) hull[J]. *Energy Convers Manag.*, 2017, 139: 260–275.
- [2] ZHAO X, CHEN J, DU F. Potential use of peanut by-products in food processing: a review[J]. *Journal of Food Science & Technology*, 2012, 49(5): 521–529.
- [3] QI N, HU X, ZHAO X, et al. Fermentative hydrogen production with peanut shell as supplementary substrate: effects of initial substrate, pH and inoculation proportion[J]. *Renewable Energy*, 2018, 127: 559–564.

- [4] XIANA R, BEATRIZ G, JOSÉ L, et al. Valorization of peanut shells; manufacture of bioactive oligosaccharides [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 183: 21–28.
- [5] STELK T, WEST D, BAUMERT J L, et al. Peanut protein contamination in peanut hulls/shells used in compost and other lawn service applications[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2012, 129(2): AB236.
- [6] PRABHAKAR M N, SHAH A U R, RAO K C, et al. Mechanical and thermal properties of epoxy composites reinforced with waste peanut shell powder as a bio-filler[J]. *Fibers & Polymers*, 2015, 16(5): 1119–1124.
- [7] GE L, XIA F, SONG Y, et al. Solubility of luteolin in several imidazole-based ionic liquids and extraction from peanut shells using selected ionic liquid as solvent[J]. *Separation and Purification Technology*, 2014, 135: 223–228.
- [8] 沈达, 周晓燕, 韩书广. 花生壳综合利用研究进展[J]. *木材加工机械*, 2017, 28(1): 43–46.
- SHEN Da, ZHOU Xiaoyan, HAN Shuguang. Research progress on comprehensive utilization of peanut shell [J]. *Wood Processing Machinery*, 2017, 28(1): 43–46. (in Chinese)
- [9] 王顺利, 刘克锋, 李荣旗, 等. 木质纤维素分解复合菌剂强化牛粪堆肥工艺[J/OL]. *农业机械学报*, 2014, 45(4): 201–207.
- WANG Shunli, LIU Kefeng, LI Rongqi, et al. Lignocellulosic decomposition composite fungicide to strengthen cow manure composting process[J/OL]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2014, 45(4): 201–207. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?file_no=20140432&flag=1&journal_id=jcsam. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2014.04.032. (in Chinese)
- [10] ONWOSI C O, IGBOKWE V C, ODIMBA J N, et al. Composting technology in waste stabilization; on the methods, challenges and future prospects[J]. *Journal of Environmental Management*, 2017, 190: 140–157.
- [11] 井大炜, 王明友, 张红, 等. 蚯蚓粪配施尿素对豇豆根系特征与根际土腐殖质的影响[J/OL]. *农业机械学报*, 2017, 48(1): 212–219.
- JING Dawei, WANG Mingyou, ZHANG Hong, et al. Effects of vermicompost co-applied with urea on root characteristics and humus in rhizosphere soil of cowpea[J/OL]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2017, 48(1): 212–219. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?file_no=20170128&flag=1&journal_id=jcsam. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2017.01.028. (in Chinese)
- [12] BAOYI L, DI Z, YUXUE C, et al. Effects of C/N ratio and earthworms on greenhouse gas emissions during vermicomposting of sewage sludge[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 268: 408–414.
- [13] BHAT S A, SINGH J, VIG A P. Potential utilization of bagasse as feed material for earthworm *Eisenia fetida* and production of vermicompost[J]. *Springerplus*, 2015, 4(1): 11.
- [14] SUTHAR S, GAIROLA S. Nutrient recovery from urban forest leaf litter waste solids using *Eisenia fetida* [J]. *Ecological Engineering*, 2014, 71: 660–666.
- [15] SINGH D, SUTHAR S. Vermicomposting of herbal pharmaceutical industry waste: earthworm growth, plant-available nutrient and microbial quality of end materials[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 112: 179–185.
- [16] GANESH P S, GAJALAKSHMI S, ABBASI S A. Vermicomposting of the leaf litter of acacia (*Acacia auriculiformis*): possible roles of reactor geometry, polyphenols, and lignin[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(5): 1819–1827.
- [17] 崔思远, 曹光乔, 朱新开. 耕作方式对稻麦轮作区土壤碳氮储量与层化率的影响[J/OL]. *农业机械学报*, 2018, 49(11): 275–282.
- CUI Siyuan, CAO Guangqiao, ZHU Xinkai. Effects of tillage on stocks and stratification of soil carbon and nitrogen in rice-wheat system[J/OL]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2018, 49(11): 275–282. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?file_no=20181132&flag=1&journal_id=jcsam. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2018.11.032. (in Chinese)
- [18] JACKSON M L. Soil chemical analysis[M]. New Delhi: Prentice Hall of India, 1973: 7–33.
- [19] KUMARI M, KUMAR S, CHAUHAN R S, et al. Bioconversion of herbal industry waste into vermicompost using an epigeic earthworm *Eudrilus eugeniae* [J]. *Waste Management & Research*, 2011, 29(11): 1205–1212.
- [20] VAN SOEST P J, ROBERTSON J B, LEWIS B A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition[J]. *Journal of Dairy Science*, 1991, 74(10): 3583–3597.
- [21] XU N, TAN G, WANG H, et al. Effect of biochar additions to soil on nitrogen leaching, microbial biomass and bacterial community structure[J]. *European Journal of Soil Biology*, 2016, 74: 1–8.
- [22] ADAMS R I, MILETTO M, TAYLOR J W, et al. Dispersal in microbes: fungi in indoor air are dominated by outdoor air and show dispersal limitation at short distances[J]. *The ISME Journal*, 2013, 7(7): 1262–1273.
- [23] CHEN Y, ZHANG Y, ZHANG Q, et al. Earthworms modify microbial community structure and accelerate maize stover decomposition during vermicomposting[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22(21): 17161–17170.
- [24] CAPORASO J G, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335–336.
- [25] QUAST C, PRUESSE E, YILMAZ P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(D1): D590–D596.
- [26] ARUMUGAM K, RENGANATHAN S, OLUBUKOLA O B, et al. Investigation on paper cup waste degradation by bacterial consortium and *Eudrilus eugeniae* through vermicomposting[J]. *Waste Management*, 2017, 74: 185–193.

- [27] PATTNAIK S, REDDY M V. Assessment of municipal solid waste management in puducherry (pondicherry), India [J]. Resources, Conservation and Recycling, 2010, 54(8): 512 – 520.
- [28] YANG F, LI G, SHI H, et al. Effects of phosphogypsum and superphosphate on compost maturity and gaseous emissions during kitchen waste composting [J]. Waste Management, 2015, 36: 70 – 76.
- [29] MORAIS F M C, QUEDA C A C. Study of storage influence on evolution of stability and maturity properties of MSW composts [C] // Proceedings of the Fourth International Conference of ORBIT Association on Biological Processing of Organics: Advances for a Sustainable Society Part II, 2003.
- [30] SUTHAR S, MUTIYAR P K, SINGH S. Vermicomposting of milk processing industry sludge spiked with plant wastes [J]. Bioresource Technology, 2012, 116: 214 – 219.
- [31] BUTT K R. Utilisation of solid paper-mill sludge and spent brewery yeast as a feed for soil-dwelling earthworms [J]. Bioresource Technology, 1993, 44(2): 105 – 107.
- [32] SUTHAR S. Vermistabilization of wastewater sludge from milk processing industry [J]. Ecological Engineering, 2012, 47(10): 115 – 119.
- [33] MOODY S A, BRIONES M J I, PIEARCE T G, et al. Selective consumption of decomposing wheat straw by earthworms [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1995, 27(9): 1209 – 1213.
- [34] CHEN Y, CHANG S K C, CHEN J, et al. Characterization of microbial community succession during vermicomposting of medicinal herbal residues [J]. Bioresource Technology, 2017, 249: 542 – 549.
- [35] WANG X, PAN S, ZHANG Z, et al. Effects of the feeding ratio of food waste on fed-batch aerobic composting and its microbial community [J]. Bioresource Technology, 2016, 224: 397 – 404.
- [36] ZHANG L, JIA Y, ZHANG X, et al. Wheat straw: an inefficient substrate for rapid natural lignocellulosic composting [J]. Bioresource Technology, 2016, 209: 402 – 406.
- [37] PARTANEN P, HULTMAN J, PAULIN L, et al. Bacterial diversity at different stages of the composting process [J]. BMC Microbiology, 2010, 10(1): 94.
- [38] VIVAS A, MORENO B, GARCIA-RODRIGUEZ S, et al. Assessing the impact of composting and vermicomposting on bacterial community size and structure, and microbial functional diversity of an olive-mill waste [J]. Bioresour Technol., 2009, 100(3): 1319 – 1326.
- [39] TUOMELA M, VIKMAN M, HATAKKA A, et al. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review [J]. Bioresource Technology, 2000, 72(2): 169 – 183.
- [40] MANZ W, AMANN R, LUDWIG W, et al. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment [J]. Microbiology, 1996, 142(5): 1097 – 1106.
- [41] YANG Y, MUKESH K A, REN X, et al. Effect of bean dregs on nitrogen transformation and bacterial dynamics during pig manure composting [J]. Bioresource Technology, 2019, 288: 121430.
- [42] PENG S, LI H, SONG D, et al. Influence of zeolite and superphosphate as additives on antibiotic resistance genes and bacterial communities during factory-scale chicken manure composting [J]. Bioresource Technology, 2018, 263: 393 – 407.
- [43] LIM J W, CHIAM J A, WANG J Y. Microbial community structure reveals how microaeration improves fermentation during anaerobic co-digestion of brown water and food waste [J]. Bioresour Technol., 2014, 171: 132 – 138.
- [44] AWASTHI M K, LI J, KUMAR S, et al. Effects of biochar amendment on bacterial and fungal diversity for co-composting of gelatin industry sludge mixed with organic fraction of municipal solid waste [J]. Bioresource Technology, 2017, 246: 214 – 223.
- [45] LANGARICA-FUENTES A, ZAFAR U, HEYWORTH A, et al. Fungal succession in an in-vessel composting system characterized using 454 pyrosequencing [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2014, 88(2): 296 – 308.
- [46] AWASTHI M K, ZHANG Z, WANG Q, et al. New insight with the effects of biochar amendment on bacterial diversity as indicators of biomarkers support the thermophilic phase during sewage sludge composting [J]. Bioresource Technology, 2017, 238: 589 – 601.
- [47] WELLS T J, ZHEN W, RAGAUSKAS A. Bioconversion of lignocellulosic pretreatment effluent via oleaginous *Rhodococcus opacus* DSM 1069 [J]. Biomass & Bioenergy, 2015, 72(4): 200 – 205.
- [48] ZAINUDIN M H M, HASSAN M A, TOKURA M, et al. Indigenous cellulolytic and hemicellulolytic bacteria enhanced rapid co-composting of lignocellulose oil palm empty fruit bunch with palm oil mill effluent anaerobic sludge [J]. Bioresource Technology, 2013, 147: 632 – 635.
- [49] YU C, HARROLD D R, CLAYPOOL J T, et al. Nitrogen amendment of green waste impacts microbial community, enzyme secretion and potential for lignocellulose decomposition [J]. Process Biochem., 2017, 52: 214 – 222.
- [50] MILLER A N, MUGAMBI G K, HUHNDRORF S M. *Cercophora rubrotuberculata* sp. nov. a new pyrenomycete from the Great Smoky Mountains National Park [J]. Mycologia, 2007, 99(3): 488 – 491.
- [51] GUARRO J, ABDULLAH S K, GENÉ J, et al. A new species of *Preussia* from submerged plant debris [J]. Mycological Research, 1997, 101(3): 305 – 308.