

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2018.07.027

水稻秸秆堆肥发酵粗制肥料中微生物多样性研究

朱琳¹ 曾椿淋¹ 高凤¹ 施爱平² 毛罕平² 魏巍²

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 镇江 212013; 2. 江苏大学农业装备工程学院, 镇江 212013)

摘要: 研究基于 Illumina 平台的高通量测序技术,初步解析等量的、不同氮源添加(尿素和牛粪)的水稻秸秆经堆肥发酵后制得粗制肥料中细菌和真核微生物群落结构和多样性。添加尿素和牛粪发酵成的粗制肥料中分别得到 897 个和 954 个细菌可操纵分类单元(Operational taxonomic unit, OTU),以及 508 个和 585 个真核微生物 OTU,且添加牛粪处理的细菌和真核微生物群落丰富度和多样性均高于添加尿素处理。添加尿素制得粗制肥料以放线菌门(Actinobacteria,71.9%)的 *Streptomyces* (40.9%) 和 *Cellulosimicrobium* (22.2%) 菌属为最优势的细菌类群,以真菌子囊菌门(Ascomycota,70.0%)的 *Pichia* (46.1%) 菌属为主要优势的真核微生物类群。添加牛粪制得粗制肥料以变形菌门(Proteobacteria,58.5%)的 *Pseudomonas* (47.8%) 菌属为最优势的细菌类群,以真菌子囊菌门(Ascomycota,42.5%)的 *Aspergillus* (23.9%) 菌属和接合菌门(Zygomycota,20.5%)的 *Mucor* (9.4%) 菌属为主要优势的真核微生物类群。研究结果表明,不同的氮源添加可导致水稻秸秆堆肥发酵制得粗制肥料中形成具有不同优势种群结构的细菌和真核微生物群落,并会导致腐熟各阶段发挥作用的微生物类群的差异。

关键词: 水稻秸秆; 堆肥; 细菌; 真核微生物; 高通量测序

中图分类号: S144; S141.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2018)07-0228-07

Characteristic Analysis of Microbial Diversity in Crud Fertilizer from Compost of Rice Straw

ZHU Lin¹ ZENG Chunlin¹ GAO Feng¹ SHI Aiping² MAO Hanping² WEI Wei²

(1. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

2. School of Agricultural Equipment Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: Based on the high-throughput DNA sequencing of Illumina, the microbial community composition of the compost of rice straw added with urea or cow dung as the nitrogen source was entirely clarified, respectively. Totally 897 and 954 bacterial operational taxonomic unit (OTU) was obtained from the treatment applied with urea and manure, targeting the V4 region of bacterial 16S rRNA partial gene. The richness index and diversity index of bacterial community in the treatment applied with manure were higher than that in the treatment applied with urea. In the treatment applied with urea, the bacterial phylum Actinobacteria was the most dominant group (71.9%), and the genus *Streptomyces* and *Cellulosimicrobium* were the main genus of 40.9% and 22.2%, respectively. In the treatment applied with manure, the bacterial phylum Proteobacteria was the most dominant group (58.5%), and the genus *Pseudomonas* was the main genus of 47.8%. Totally 508 and 585 eukaryotic microbial operational taxonomic unit (OTU) was obtained from the treatment applied with urea and manure, targeting the V4 region of eukaryotic 18S rRNA partial gene. The richness index and diversity index of eukaryotic community in the treatment applied with manure were higher than that in the treatment applied with urea. In the treatment applied with urea, the fungal phylum Ascomycota was the most dominant group (70.0%), and the genus *Pichia* was the main genus of 46.1%. In the treatment applied with manure, the fungal phylum Ascomycota was still the most dominant group (42.5%), following by the fungal

收稿日期: 2017-12-12 修回日期: 2018-01-19
基金项目: 国家自然科学基金项目(41503068、31770543)、江苏省自然科学基金项目(BK20150496、BK20150497)和江苏省高校自然科学研究面上项目(15KJB550002)
作者简介: 朱琳(1982—),女,副教授,主要从事微生物发酵研究,E-mail: zhulin19820402@ujs.edu.cn
通信作者: 魏巍(1984—),男,副研究员,主要从事农业废弃物综合利用研究,E-mail: weiwei7096@ujs.edu.cn

phylum Zygomycota (20.5%) . The genus *Aspergillus* (23.9%) and *Mucor* (9.4%) were the main genus. The results showed that different nitrogen sources could lead to the formation of bacterial and eukaryotic microbial communities with different predominant population structures in crude fertilizers from rice straw compost fermentation, which may lead to the differences of microbial groups that played a role in the stages of composting. Isolation and compounding of the above dominant microbial populations, together with the application of appropriate urea and manure, was likely to make the process of fermenting rice straw to crude fertilizers more rapid.

Key words: rice straw; compost; bacteria; eukaryotic microorganism; high-throughput DNA sequencing

0 引言

农作物秸秆具有丰富的氮、磷、钾及有机质养分,是我国传统的有机肥料源^[1-2],但需通过微生物发酵腐熟后才适合大田使用^[3-4]。农作物秸秆腐熟过程是微生物在好氧或厌氧条件下,将秸秆中有机物质分解成为 CO₂、H₂O、NH₃以及腐殖质的过程^[5]。发酵腐熟农作物秸秆的微生物种类繁多,包括细菌和多种类型的真核微生物^[5-7]。这些微生物在秸秆发酵过程中进行迅速的群落结构演替,完成秸秆的腐熟过程^[8]。同时,秸秆中的碳、氮含量也影响着腐解微生物的生长代谢过程^[5]。作物秸秆碳氮比过高会导致微生物分解速度降低、堆肥升温缓慢、成肥周期长^[7]。有研究表明秸秆中碳氮比控制在 25~30 较为适合微生物发酵腐熟^[9]。水稻秸秆碳氮比在 60~70 之间,因此其堆肥发酵前必须补充适量的氮源以降低碳氮比。尿素和粪肥是秸秆堆肥发酵时常用的补充氮源。其中,尿素作为无机氮源成分单一且稳定,可直接被化能自养微生物代谢利用;粪肥作为有机氮源营养丰富,富含蛋白质、游离氨基酸、糖类等,可促使化能异养微生物生长旺盛。由此可见,秸秆发酵前氮源补充的种类不同可能会引起腐解微生物群落的结构差异,进而造成秸秆堆肥发酵过程和质量的差异。因此,有必要对经不同氮源补充制得的秸秆粗制肥料中微生物群落进行解析。

近年来,研究者已采用末端限制性片段长度多态性分析(Terminal restriction fragment length polymorphism,T-RFLP)、聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis,PCR-DGGE)、克隆文库等分子方法分析了发酵堆肥内微生物群落^[10-12],但仍难以全面监测多样的微生物类群^[13],使解析农作物秸秆腐解过程中微生物类群结构演替过程受到极大的限制。新一代基于 Illumina 平台的高通量测序技术的出现,可以更全面和准确地描述秸秆腐熟堆肥内微生物群落信息,为探究秸秆腐熟堆肥中微生物群落构成及功能提供了有效手段^[14]。本文运用高通量测序技术对添加无机氮源(尿素)和有机氮

源(牛粪)的水稻秸秆,经堆肥发酵后制得粗制肥料中细菌和真核微生物(真菌、藻类和原生动物)的群落结构多样性和差异进行研究,为进一步揭示水稻秸秆腐熟堆肥中微生物群落演替及其功能性提供数据基础。

1 材料与方法

1.1 秸秆堆肥

水稻秸秆来源于江苏省镇江市新区水稻田,新鲜无霉变,切成长度 2~3 cm 的秸秆段备用。为了探讨不同氮源添加对水稻秸秆发酵制得粗制肥料中微生物群落结构的影响,试验设计了 2 种等氮素含量的秸秆物料发酵处理,分别为:处理 1,秸秆段(140 kg)+尿素(2.9 kg);处理 2,秸秆段(140 kg)+干牛粪(12.1 kg)。尿素等为市售肥料。牛粪取自江苏省镇江市郊区牛场的新鲜粪肥(含水率为 85%),经过高压灭菌去除自带微生物对堆肥发酵作用的影响,再经干燥备用。供试水稻秸秆、尿素和牛粪经干燥后用球磨仪粉碎,应用 Vario MAX 型碳氮元素分析仪对其碳氮含量进行测定,并计算碳氮比。水稻秸秆碳氮质量分数分别为 42% 和 0.6% (碳氮比为 70),尿素碳氮质量分数分别为 18% 和 42% (碳氮比为 0.4),干牛粪碳氮质量分数分别为 75% 和 10% (碳氮比为 7.5)。

在堆肥场地制备两处水稻秸秆物料堆,尺寸约 1.5 m×1.5 m×1.5 m。每铺垫约 30 cm 厚的秸秆段添加一次氮源。其中,牛粪均匀加入到物料表面并洒水,尿素则溶于水后均匀洒于物料表面。物料最终含水率控制在 60%。物料堆制作完毕后覆盖塑料膜,自然发酵 30 d 后,形成粗制有机肥供后续试验。经处理 1 和处理 2 得到的粗制有机肥 pH 值分别为 7.9 和 8.0。应用浓酸水解法测量^[15]处理 1 和处理 2 的纤维素质量分数分别为 1.2% 和 1.4%,半纤维素质量分数分别为 6.2% 和 5.9%,木质素质量分数分别为 22.7% 和 25.6%。

1.2 样品采集和 DNA 提取

本试验没有关注堆肥温度及腐熟时间对微生物的影响,仅对堆肥制备得到的粗制肥料中微生物群

落进行初步研究。因此应用自制的取样器,分别对每个处理得到的粗制肥料进行 6 个采样点(包括堆肥的内部和外部各 3 个位点)的随机取样,再将 6 个采样点的样品充分混合成一份,以其中的微生物来代表该粗制肥料所有微生物类群。采用大剂量 DNA 提取试剂盒进行微生物基因组 DNA 的提取。取 5 g 混合后的粗制肥料,应用日本和光公司的 DNA 提取试剂盒 Large ISOIL Beads Beating,按照操作说明进行微生物基因组总 DNA 的提取。提取后的 DNA 应用 Nanodrop one 进行浓度的测定。两样品 DNA 质量浓度分别为 1 330 ng/μL 和 1 450 ng/μL。

1.3 PCR 扩增及高通量测序

本试验采用细菌 16S rRNA 和真核微生物 18S rRNA 的 V4 区域作为目标 DNA 序列进行 PCR(聚合酶链式反应)扩增。以通用引物 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'),并各自添加不同的条形码标记(Barcode 序列)后对 2 个处理粗制肥料中细菌 16S rRNA 的 V4 区域^[16]进行扩增。以通用引物 528F (5'-GCGGTAATTCCAGCTCCAA-3') 和 706R (5'-AATCCRAGAATTTACCTCT-3'),并各自条形码标记后对 2 个处理粗制肥料中真核微生物 18S rRNA 的 V4 区域^[17]进行扩增。

PCR 扩增均采用 Takara 试剂公司的 HS Taq 酶进行,反应条件均为:95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 40 s,25 个循环;72℃ 延伸 10 min。扩增结束后,PCR 扩增产物使用 2% 琼脂糖进行凝胶电泳,检查扩增效果。将样品的 PCR 产物送至北京诺禾至源科技有限公司,在 Illumina-HiSeq 平台上进行高通量测序。

1.4 数据分析处理

对高通量测序初始数据进行质量控制,以获得更为精准、高质量的 DNA 序列信息,采用 Mothur 软件将得到的 16S rDNA 基因序列在 RDP(Ribosomal database project)数据库中、18S rDNA 基因序列在 Silva 数据库中进行嵌合体检验,充分去除嵌合体序列。为了得到每个 OTU(操作分类单元)对应的物种分类信息,采用 RDP classifier 贝叶斯算法对 97% 相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析,用 Mothur 软件构建稀释性曲线^[18-19]。

利用 QIIME 软件计算样品 Chao1 丰富度指数以及 Shannon 多样性指数和 Simpson 多样性指数^[19]。其中群落丰富度指数,其值越高表明群落物种的丰富度越高;而多样性指数可以反映样品的多样性程度,其值越大表明样品群落多样性越高。

2 结果与分析

2.1 两种粗制肥料中细菌和真核微生物群落多样性

通过对细菌 16S rRNA 的 V4 区测序,加入尿素和牛粪的两个粗制肥料处理分别得到原始序列 52 949 条和 46 124 条,经去除低质量、条形码标记(Barcode 序列)和引物序列后,2 个样品分别得到 52 535 条和 45 748 条有效序列,分别获得 897 个和 954 个细菌 OTU(表 1)。

通过对真核微生物 18S rRNA 的 V4 区测序,加入尿素和牛粪的两个粗制肥料处理分别得到原始序列 56 396 条和 75 399 条,经去除低质量、条形码标记和引物序列后,2 个粗制肥料处理分别得到 55 713 条和 74 116 条有效序列,分别获得 508 个和 585 个真核微生物 OTU(表 1)。

表 1 两种粗制肥料的高通量测序文库质量汇总
Tab.1 Information of high-throughput DNA sequencing library of two treatments

	处理	原始序列数	有效序列数	OTU 数量	Chao1 丰富度	Simpson 多样性	Shannon 多样性
					指数	指数	指数
细菌	秸秆段+尿素	52 949	52 535	897	907.959	0.852	4.555
	秸秆段+牛粪	46 124	45 748	954	916.143	0.803	4.953
真核微生物	秸秆段+尿素	56 396	55 713	508	563.125	0.772	4.073
	秸秆段+牛粪	75 399	74 116	585	602.456	0.919	5.340

根据细菌 16S rRNA 测序稀释性曲线(图 1a),当测序序列数量超过 40 000 条时,虽然仍有新的 OTU 被发现,但是整个曲线已经趋于平缓,说明更深的测序几乎不会产生更多的 OTU,该测序文库已经达到饱和。从图中也可以看出相同序列数时,添加牛粪的处理细菌群落 OTU 多于添加尿素的堆肥处理,说明添加牛粪造成的细菌群落丰富度高于添加尿素处

理。此外,通过比较 2 个处理的 Chao1 丰富度指数和 Shannon 多样性指数同样可以发现,添加牛粪堆肥处理的细菌群落的丰富度和多样性均高于添加尿素的堆肥处理(表 1)。

根据真核微生物 18S rRNA 测序的稀释性曲线(图 1b),当测序序列数量超过 50 000 条时,整个曲线已经趋于平缓,说明更深的测序不会产生更多的

OTU,该测序文库已经达到饱和。与细菌测序结果一样,添加牛粪的处理真核微生物群落 OTU 多于添加尿素的堆肥处理,说明添加牛粪造成的真核微生物群落丰富度高于添加尿素的处理。此外,通过比

较 2 个处理的 Chao1 丰富度指数、Simpson 多样性指数和 Shannon 多样性指数同样可以发现,添加牛粪的堆肥处理真核微生物群落的丰富度和多样性均高于添加尿素的堆肥处理(表 1)。

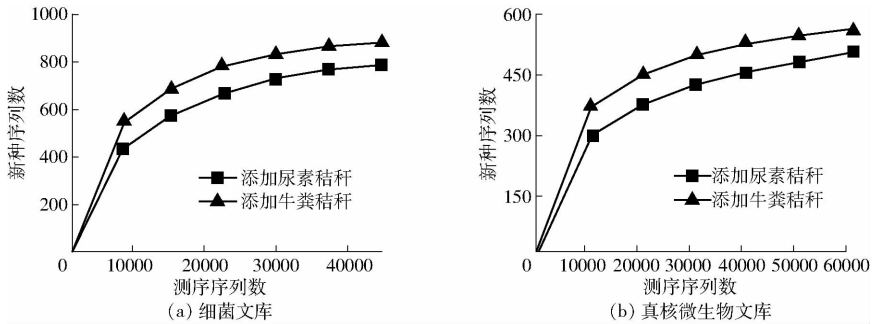


图 1 细菌和真核微生物群落高通量测序文库稀释性曲线

Fig.1 Rarefaction curves of high-throughput DNA sequencing library of bacterial and eukaryotic microbial community

2.2 两种粗制肥料中细菌群落组成

两个样品细菌群落在门和属分类水平上的相对丰度结果如图 2 所示。在门的分类水平上,两个样品中细菌群落结构组成情况相似,但各细菌类群所占比例有较大差异。如图 2a 所示,两个处理中细菌群落主要隶属于 4 个门(比例大于总序列量的 1%),其中放线菌门(Actinobacteria,71.9%)在尿素处理中占主要优势,随后是厚壁菌门(Firmicutes,20.9%)、变形菌门(Proteobacteria,3.7%)、拟杆菌门(Bacteroidetes,1.7%)。而在牛粪中,变形菌门(Proteobacteria,58.5%)占主要优势,随后是厚壁菌门(Firmicutes,20.0%)、拟杆菌门(Bacteroidetes,

15.8%)、放线菌门(Actinobacteria,2.8%)。

在属的分类水平上,两个样品中细菌群落结构组成和主要优势属所占比例均有较大差异(图 2b)。其中尿素处理中占优势的细菌菌属分别为 Streptomyces(放线菌属,40.9%)、Cellulosimicrobium(纤维菌属,22.2%)、Pediococcus(小球菌属,3.9%)、Paenibacillus(类芽孢杆菌属,3.2%)、Lactobacillus(乳酸菌属,2.7%)、Nonomuraea(野野村菌属,2.0%)。牛粪处理中占优势的细菌菌属分别为 Pseudomonas(假单胞杆菌属,47.8%)、Carnobacterium(肉食杆菌属,3.6%)、Mobilitalea(无中文名称,3.0%)、Marinospirillum(海螺菌属,2.2%)。

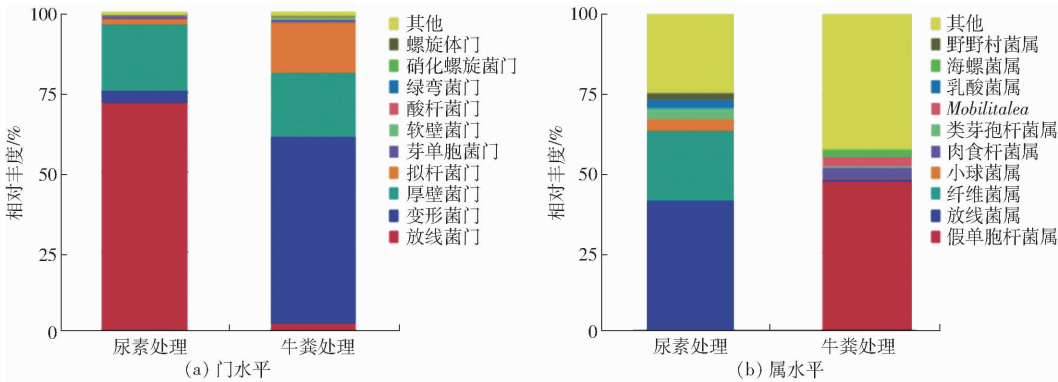


图 2 两种粗制肥料中细菌在门和属分类水平的 TOP10 群落结构

Fig.2 Composition of bacterial microbial community at phylum and genus level in two treatments

2.3 两种粗制肥料中真核微生物群落组成

两个样品真核微生物群落在门和属分类水平上的相对丰度结果如图 3 所示。在门的分类水平上,两个处理中真核生物群落主要隶属于 7 个门,其中真菌均占据优势地位(图 3a)。子囊菌门(Ascomycota,70.0%)在尿素处理中占主要优势,随后是绿藻门(Chlorophyta,6.6%)、接合菌门(Zygomycota,3.8%)、虫霉菌亚门(Entomophthoromycotina,

2.3%)、球囊菌门(Glomeromycota,1.4%)。而在牛粪处理中,子囊菌门(Ascomycota,42.5%)仍占据优势,随后是接合菌门(Zygomycota,20.5%)、绿藻门(Chlorophyta,2.7%)、担子菌门(Basidiomycota,2.1%)、褐藻菌门(Ochrophyta,1.3%)、虫霉菌亚门(Entomophthoromycotina,1.3%)、球囊菌门(Glomeromycota,1.0%)。

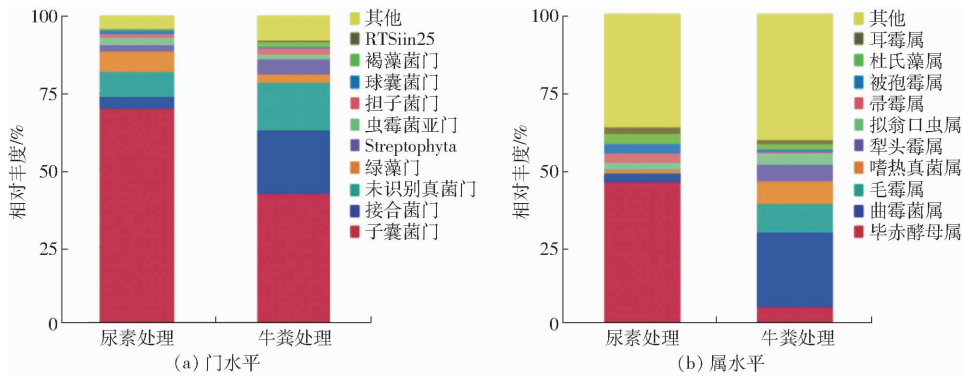


图 3 两种粗制肥料中真核微生物在门和属分类水平的群落结构

Fig. 3 Composition eukaryotic community at phylum and genus level in two treatments

在属的分类水平上,如图 3b 所示,两个样品中真核微生物群落结构组成较为相似,均以真菌菌属为绝对优势,但主要优势属所占比例均有较大差异。其中尿素处理中占优势的真核微生物属分别为 *Pichia* (毕赤酵母属,46.1%)、*Scopulariopsis* (帚霉属,3.1%)、*Mortierella* (被孢霉属,3.1%)、*Dunaliella* (杜氏藻属,2.9%)、*Aspergillus* (曲霉菌属,2.5%)、*Conidiobolus* (耳霉属,2.3%)、*Thermomyces* (嗜热真菌属,1.1%)。牛粪处理中占优势的真核微生物属分别为 *Aspergillus* (曲霉菌属,23.9%)、*Mucor* (毛霉属,9.4%)、*Thermomyces* (嗜热真菌属,7.4%)、*Pichia* (毕赤酵母属,5.6%)、*Absidia* (犁头霉属,5.4%)、*Dunaliella* (杜氏藻属,1.7%)、*Conidiobolus* (耳霉属,1.3%)。

2.4 不同处理微生物群落相似性分析

通过维恩图可以直观地表现两种堆肥处理的细菌和真核微生物群落的 OTU 数目组成相似性、重叠情况以及特异性(图 4)。添加尿素和牛粪制得的两种粗制肥料之间共有的细菌 OTU 数量为 689 (图 4a)。其中,添加牛粪制得的粗制肥料中特异性细菌 OTU 数量为 219,是添加尿素制得肥料中的 1.7 倍。同时,两种粗制肥料之间共有的真核微生物 OTU 为 416 (图 4b)。其中,添加牛粪制得的粗制肥料中特异性真核微生物 OTU 数量为 155,同样是添加尿素制得肥料中的 1.7 倍。因此,添加牛粪制得的粗制肥料较添加尿素制得的肥料具有更多的特异性细菌和真核微生物生物类群。

3 讨论

本文较已有关于水稻秸秆堆肥粗制肥料的相关研究获得了更多关于粗制肥料中微生物群落结构的信息。RATRI 等^[20]应用变性梯度凝胶电泳(DGGE)检测方法,研究了水稻秸秆堆肥处理中微生物群落的结构,并确定了 12 个属的细菌优势类群。FUENTES 等^[21]应用焦磷酸测序方法,研究了

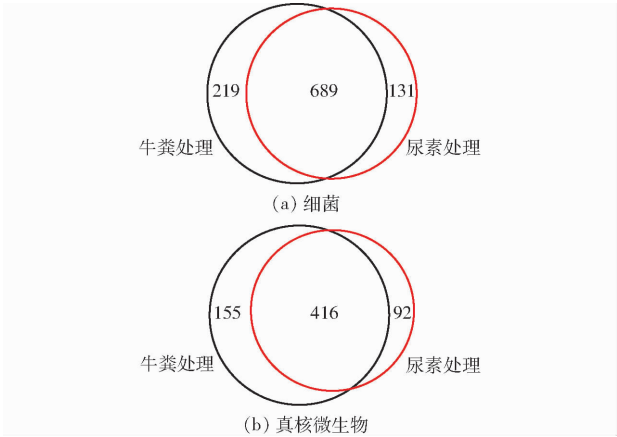


图 4 两种粗制肥料中细菌和真核微生物群落 OTU 的维恩图

Fig. 4 Venn diagrams of bacterial and eukaryotic microbial OTUs among two treatments

堆肥不同时期的真菌群落结构,并获得了 20 个属的真菌类群信息。而本文应用基于 Illumina 平台的高通量测序方法,通过微生物物种注释共获得细菌 292 个属、真菌 67 个属、原生动物 55 个属和藻类 35 个属,为水稻秸秆堆肥制得的粗制肥料中微生物群落结构的解析提供了更加全面的数据。

添加尿素的水稻秸秆经堆肥发酵后,其粗制肥料中细菌群落分布在 19 个门、49 个纲、99 个目、179 个科、257 个属。添加牛粪制得的粗制肥料中,细菌群落分布在 22 个门、53 个纲、104 个目、187 个科、276 个属。然而,两种粗制肥料中细菌群落中的优势菌群构成并不同,具有明显的差异。在细菌的属分类水平上,所占比例大于 1% 的类群中,添加尿素制得的粗制肥料中有 6 个细菌属,占总细菌群落 75%,包括 *Streptomyces*、*Cellulosimicrobium*、*Pediacoccus*、*Paenibacillus*、*Lactobacillus* 和 *Nonomuraea*。而添加牛粪制得的粗制肥料中也有 6 个细菌属所占比例大于 1%,占总细菌群落的 60%,包括 *Pseudomonas*、*Carnobacterium*、*Mobilitalea*、*Marinospirillum*、*Proteiniphilum* 和 *Advenella*。由此可

见,两种粗制肥料中并不存在共有的、所占比例大于 1% 的细菌类群。该结果说明水稻秸秆堆肥发酵过程中,无机氮素和有机氮素的添加虽然可以使水稻秸秆堆肥达到相似的腐熟效果,但是不同的氮源彻底地改变了水稻秸秆堆肥制得肥料中细菌群落的构成。尿素可以促使细菌群落放线菌门中的 *Streptomyces* 和 *Cellulosimicrobium* 两个属绝对优势的生长,占总细菌群落的 62%。而牛粪可以促使细菌群落变形菌门中的 *Pseudomonas* 属绝对优势的生长,占总细菌群落的 47%。

已有研究指出,在秸秆堆肥腐熟初期细菌放线菌门已经存在,但它们的数量和种类相对较少。而随着堆肥腐熟的进行,特别进入高温期后堆肥腐熟料中的放线菌门细菌种类和数量均明显增多,是主要的纤维素和木质素降解者^[22-23]。本文中,添加尿素样品中所占比例大于 1% 的 6 个细菌属中,有 3 个细菌属属于放线菌门 (*Streptomyces*、*Cellulosimicrobium*、*Nonomuraea*),且占总细菌群落的 64%。这说明尿素添加的秸秆堆肥在高温发酵期可能促进细菌放线菌门的发酵,从而更好地降解木质素,因此添加尿素的秸秆腐熟后木质素含量较低。而假单胞菌 *Pseudomonas* 是经常被分离到的具有高效纤维素分解能力的细菌,但是其最适生长温度低于 40℃^[24]。因此,堆肥物料在腐熟的初期和后期,经常可以分离该细菌属菌株。本文中,添加牛粪样品中假单胞菌 *Pseudomonas* 的比例高达 47.8%,这很可能表明添加牛粪处理在腐熟的初期和后期是其进行纤维素分解的主要时期。

添加尿素的水稻秸秆经堆肥发酵后,其粗制肥料中真核微生物类群分布在 28 个门、61 个纲、99 个目、105 个科、143 个属。添加牛粪的样品中真核微生物类群分布在 26 个门、66 纲、104 目、115 科、152 个属。两种粗制肥料真核微生物中的优势类群并不相同。在真核微生物的属分类水平上,所占比例大于 1% 的类群中,添加尿素制得的粗制肥料样品中有 7 个属,占总的真核微生物类群的 61%,包括 *Pichia*、*Scopulariopsis*、*Mortierella*、*Dunaliella*、*Aspergillus*、*Conidiobolus* 和 *Thermomyces*。而添加牛粪制得的粗制肥料中也有 7 个属所占比例大于 1%,占真核微生物类群的 55%,包括 *Aspergillus*、*Mucor*、*Thermomyces*、*Pichia*、*Absidia*、*Dunaliella* 和 *Conidiobolus*。在大于 1% 比例上,两种粗制肥料样品中共有的真核微生物类群包括 *Pichia*、*Dunaliella*、*Aspergillus*、*Conidiobolus* 和 *Thermomyces* 5 个属,占真核微生物类群总数的 47.4%。该结果说明水稻秸秆发酵过程中,无机氮素和有机氮素的添加不会改

变粗制肥料中优势真核微生物的群落结构,因此两种不同的堆肥处理中真核微生物可能发挥着相同且固定的作用。

RATRI 等^[20]研究了水稻稻秆堆肥过程中不同阶段的真菌类群,结果表明,堆肥初期、高温期以及腐熟期均以真菌子囊菌门 Ascomycota 为主,而高温期发现了担子菌门 Basidiomycota、接合菌门 Zygomycota 和藻类。本研究中添加尿素和牛粪两种氮素制得的粗制肥料中真核微生物类群以真菌子囊菌门 Ascomycota 为主,分别占 56.3% 和 40.2%;其次是接合菌门 Zygomycota,分别占 3.8% 和 20.3%;藻类在两处理中分别占 5.4% 和 2.3%;担子菌门 Basidiomycota 含量较低,在两处理中分别占 0.3% 和 1.5%。而原生动物在两种处理中仅占 0.3% 和 0.4%。由此可见,真菌子囊菌门 Ascomycota 是两种粗制肥料中真核微生物的主要类群,而牛粪处理中出现了占较大比例的接合菌门 Zygomycota。同时,藻类、担子菌门 (Basidiomycota) 真菌和原生动物在稻麦秸秆发酵堆肥中并不占优势,且不同氮源的摄入对这些真核微生物类群的影响也并不大。

已有研究结果表明,堆肥过程中真菌群落变化随时间的变化规律明显^[25]。与细菌群落相比,真菌耐受温度较低^[26]。因此,真菌群落在堆肥经历了高温腐熟期后才会变得更为丰富。在堆肥发酵过程中,丝状真菌菌丝的机械穿插作用可以对物料施加一定的物理破坏作用,促进进一步的物质分解^[26]。比如在添加牛粪制得的粗制肥料中较为优势的 *Aspergillus*、*Mucor*、*Thermomyces* 和 *Absidia* 属真菌,均具有发达的菌丝。同时,真菌分泌胞外酶,加快有机物水解,在物理化学作用下,难降解有机物的分解效率提高^[27]。比如在添加牛粪制得的粗制肥料中较为优势的 *Aspergillus*,具有非常强的细胞外酶分解能力^[27-28]。其大量的存在很可能会促进添加牛粪制得的粗制肥料中水解纤维素酶、木质素酶、蛋白质酶、脂酶等胞外酶的产生,进而促进水稻秸秆的腐熟发酵。

4 结束语

添加不同的氮源均可以使水稻秸秆充分地腐熟发酵,但也导致粗制肥料中发挥作用的微生物群落构成的差异。无机氮形式的尿素可以促进秸秆堆肥中的链霉菌属 *Streptomyces* 细菌大量的繁殖,进而促进该堆肥在高温期的腐熟发酵,使纤维素和木质素充分发酵。有机氮源形式的牛粪添加促使假单胞菌属 *Pseudomonas* 细菌的大量繁殖,进而会促进该堆肥在堆置初期和发酵后期进行腐熟;同时牛粪造成

的真核微生物多样性分化,使真菌子囊菌门 Ascomycota 和接合菌门 Zygomycota 中的丝状真菌大量繁殖,其菌丝的物理作用以及各种胞外酶均会促进堆肥的发酵。

参 考 文 献

1 王金武,唐汉,王金峰. 东北地区作物秸秆资源综合利用现状与发展分析[J/OL]. 农业机械学报, 2017, 48(5):1-21. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?flag=1&file_no=20170501&journal_id=jcsam. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2017.05.001.
WANG Jinwu,TANG Han,WANG Jinfeng. Comprehensive utilization status and development analysis of crop straw resource in Northeast China [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2017, 48(5):1-21. (in Chinese)

2 边炳鑫,赵由才. 农业固体废物的处理与综合利用[M]. 北京:化学工业出版社,2005.

3 毕于运,王亚静,高春雨. 中国主要秸秆资源数量及其区域分布[J]. 农机化研究,2010, 32(3):1-7.
BI Yuyun,WANG Yajing,GAO Chunyu. Straw resource quantity and its regional distribution in China[J]. Journal of Agricultural Mechanization Research, 2010, 32(3):1-7. (in Chinese)

4 孙星,刘勤,王德建,等. 长期秸秆还田对剖面土壤肥力质量的影响[J]. 中国生态农业学报,2008, 16(3):587-592.
SUN Xing,LIU Qin,WANG Dejian,et al. Effect of long-term application of straw on soil fertility [J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2008, 16(3): 587-592. (in Chinese)

5 LYND L R, WEIMER P J, ZYL W H V, et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology [J]. Microbiology & Molecular Biology Reviews, 2002, 66(3):506-577.

6 OOSHIMA H, BURNS D S, CONVERSE A O. Adsorption of cellulase from *Trichoderma reesei* on cellulose and lignacious residue in wood pretreated by dilute sulfuric acid with explosive decompression[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1990, 36(5): 446-452.

7 SARRIA-ALFONSO V, SÁNCHEZ-SIERRA J, AGUIRRE-MORALES M, et al. Culture media statistical optimization for biomass production of a ligninolytic fungus for future rice straw degradation[J]. Indian Journal of Microbiology, 2013, 53(2): 199-207.

8 GUO H, CHANG J, YIN Q, et al. Effect of the combined physical and chemical treatments with microbial fermentation on corn straw degradation[J]. Bioresource Technology, 2013, 148: 361-365.

9 HARUTA S, CUI Z, HUANG Z, et al. Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2002, 59(4-5): 529-534.

10 吴金水,林启美,黄巧云,等. 土壤微生物量测定方法及其应用[M]. 北京:气象出版社,2006.

11 SZÉKELY A J, SIPOS R, BERTA B, et al. DGGE and T-RFLP analysis of bacterial succession during mushroom compost production and sequence-aided T-RFLP profile of mature compost[J]. Microbial Ecology, 2009, 57(3): 522-533.

12 TIAN W, SUN Q, XU D, et al. Succession of bacterial communities during composting process as detected by 16S rRNA clone libraries analysis[J]. International Biodegradation & Biodegradation, 2013, 78(2): 58-66.

13 DE G V, EUDOXIE G, HICKEY W J. Prokaryotic successions and diversity in composts as revealed by 454-pyrosequencing[J]. Bioresource Technology, 2013, 133: 573-580.

14 滑留帅,王璟,徐照学,等. 16S rRNA 基因高通量测序分析牛粪发酵细菌多样性[J]. 农业工程学报,2016,32(增刊2): 311-315.
HUA Liushuai,WANG Jing,XU Zhaoxue,et al. Analysis of bacterial diversity during cattle manure fermentation with 16S rRNA gene high-throughput sequencing[J]. Transactions of the CSAE, 2016, 32(Supp.2): 311-315. (in Chinese)

15 熊素敏,左秀凤,朱永义. 稻壳中纤维素、半纤维素和木质素的测定[J]. 粮食与饲料工业,2005(8):40-41.
XIONG Sumin,ZUO Xiufeng,ZHU Yongyi. Determination of cellulose, hemi-cellulose and lignin in rice hull[J]. Cereal & Feed Industry, 2005(8): 40-41. (in Chinese)

16 CAPORASO J G, LAUBER C L, WALTERS W A, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms[J]. The ISME Journal Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology, 2012, 6(8): 1621-1624.

17 CHEUNG M K, AU C H, CHU K H, et al. Composition and genetic diversity of picoeukaryotes in subtropical coastal waters as revealed by 454 pyrosequencing[J]. The ISME Journal Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology, 2010, 4(8): 1053-1059.

18 HAAS B J, GEVERS D, EARL A M, et al. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons[J]. Genome Research, 2011, 21(3): 494-504.

19 EDGAR R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. Nature Methods, 2013, 10(10): 996-998.

20 RATHI C V, KAZUO M, SUSUMU A, et al. Succession and phylogenetic composition of bacterial communities responsible for the composting process of rice straw estimated by PCR-DGGE analysis[J]. Soil Science & Plant Nutrition, 2003, 49(4):619-630.

21 FUENTES A L, 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.

22 EL F L, HAFIDI M, OUHDOUCH Y. Date palm and the activated sludge co-composting actinobacteria sanitization potential[J]. Environmental Technology, 2016, 37(1): 129-135.

23 KAUSAR H, SARIAH M, SAUD H M, et al. Isolation and screening of potential actinobacteria for rapid composting of rice straw [J]. Biodegradation, 2011, 22(2): 367-375.

24 GIBELLO A, VELA A I, MARTÍN M, et al. *Pseudomonas composti* sp. nov. isolated from compost samples[J]. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 2011, 61(12): 2962-2966.

25 ERIKSEN J, GOKSÖYR J. The effect of temperature on growth and cellulase (β -1,4-endoglucanase) production in the compost fungus *Chaetomium thermophile*, var. *dissitum*[J]. Archives of Microbiology, 1976, 110(2): 233-238.

26 WRIGHT C, GRYGANSKYI A P, BONITO G. Fungi in composting[M]//PURCHASE D. Fungal applications in sustainable environmental biotechnology. Switzerland: Springer International Publishing, 2016: 3-28.

27 WANG S L, CHEN L G, CHEN C S, et al. Cellulase and xylanase production *Aspergillus* sp. G-393[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1994, 44: 231-242.

28 ZHU L, MARUYAMA J, KITAMOTO K. Further enhanced production of heterologous proteins by double-gene disruption (Δ Aosd2 Δ Aoops10) in a hyper-producing mutant of *Aspergillus oryzae*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(14): 6347-6357.