

文章编号: 1004-4353(2021)04-0319-05

## 超高温堆肥过程中微生物群落及其理化性质研究

王艳成<sup>1</sup>, 黄升日<sup>1</sup>, 董巍巍<sup>1</sup>, 申鹏飞<sup>2</sup>, 朴春香<sup>1</sup>

( 1. 延边大学 农学院, 吉林 延吉 133000; 2. 吉林省和龙市工商业联合会, 吉林 和龙 133400 )

**摘要:** 为了研究微生物在超高温堆肥过程中的变化及其对堆肥的影响, 利用聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳 (polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE) 技术分析了超高温堆肥畜禽粪便中微生物的组成结构, 并检测了其理化性质 (温度、含水率、碳氮比 (C/N) 和 pH) 随时间的变化情况. 研究表明: 不同堆肥阶段其主要含有的微生物不同, 其中优势菌门为 Firmicutes; 在超高温堆肥过程中, 温度、含水率和 C/N 随堆肥时间总体呈逐渐下降趋势, 而 pH 随堆肥时间总体变化趋势不大且 pH 值大于 8; 腐熟 35 d 后发酵基质趋于稳定. 该研究结果可为超高温堆肥畜禽粪便发酵菌种的筛选和功能菌剂的制备提供理论基础.

**关键词:** 超高温堆肥; 微生物多样性; 畜禽粪便; 变性梯度凝胶电泳

**中图分类号:** S182

**文献标识码:** A

## Study on the microbial community and its physicochemical properties in the process of ultra-high temperature composting

WANG Yancheng<sup>1</sup>, HUANG Shengri<sup>1</sup>, DONG Weiwei<sup>1</sup>, SHEN Pengfei<sup>2</sup>, PIAO Chunxiang<sup>1</sup>

( 1. College of Agriculture, Yanbian University, Yanji 133000, China;

2. Helong City Federation of Industry and Commerce, Helong 133400, China )

**Abstract:** In order to study the changes of microorganisms in the process of ultra-high temperature composting and their effects on the composting, furthermore, polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) technology was used to analyze the compositional structure of microorganisms from livestock manure in ultra-high temperature composting, and the changes of physicochemical properties (temperature, moisture content, carbon nitrogen ratio (C/N) and pH) with time were detected. The results showed that the main microorganisms in different composting stages were different, and the dominant bacteria were Firmicutes during the ultra-high temperature composting process, the overall trend of temperature, moisture content and C/N is gradually decreasing, however, their variable trends of pH (greater than 8) have no great difference with composting time. Last, after 35 days composting become thoroughly decomposed, the fermentation substrate tended to be stable. In summary, the above results can provide a theoretical foundation for the screening of fermentation strains from livestock manure in ultra-high-temperature composting and the preparation of functional bacteria.

**Keywords:** ultra-high temperature composting; microbial diversity; livestock manure; DGGE

收稿日期: 2021-11-12

基金项目: 吉林省教育厅“十三五”规划科研项目(JJKH20191131KJ, JJKH20200518KJ); 高等学校学科创新引智计划资助 111 项目(D20034)

第一作者: 王艳成(1994—), 男, 在读硕士, 研究方向为微生物资源开发与利用.

通信作者: 朴春香(1979—), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为微生物学.

超高温堆肥作为一种新型堆肥技术,因其可加速有机物分解和缩短堆肥腐熟时间而受到广大学者的关注<sup>[1-2]</sup>.研究表明,微生物在堆肥过程中对堆肥品质具有决定性作用<sup>[3-5]</sup>.廖汉鹏等将极端嗜热微生物菌剂添加在脱水污泥的超高温堆肥中,经过 15~20 d 超高温好氧发酵处理实现了污泥(初始含水率为 80%)的生物干化和高温腐熟<sup>[6]</sup>.Peng 等利用极端的嗜热菌剂显著降低了堆体(新鲜鸡粪和稻壳)中的  $N_2O$  排放<sup>[7]</sup>.由于超高温堆肥环境(堆肥过程中的温度高于 100 °C,堆肥时间超过 6 周)与普通环境不同,因此超高温堆肥所产生的微生物种类、数目及其理化性质(温度、pH、含水率和 C/N)与普通环境下产生的微生物种类、数目及其理化性质有很大区别.目前,对超高温堆肥过程中微生物类群变化的相关研究较少<sup>[8-10]</sup>,因此本文采用聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)方法对微生物群落组成进行探讨,并测定了超高温堆肥过程中温度、pH、含水率以及 C/N 等理化指标的变化情况,以期超高温生境下畜禽类便的微生物资源的开发和利用提供参考.

## 1 材料与方法

### 1.1 堆置装置与材料

自引发式堆肥装置主体由两层不锈钢材料制成,如图 1 所示.该装置长、宽、高为 5.5 m、4.2 m、2.0 m,装置中层(保温层)添加的是厚度为 50 mm 的聚氨酯.发酵过程中采用底部加压通风的方式(通风管道直径  $\Phi=0.38$  m),利用重型设备移动和混合料堆.试验材料采用有机废弃物(由牛粪、羊粪、马粪、木屑组成)和全发酵堆肥,并按质量比 1:1 混合接种.

### 1.2 试验设计

利用图 1 中的实验装置设计高温堆肥实验.实验采用每周翻堆混匀工艺.实验中采用活性白土将堆体的含水率调整至 60%,采用尿素将 C/N 调整至 30,并进行强制通风供氧(曝气量控制在 0.1 L/min 左右).采样点设置为 3 个(图 1 中 a、b、c 点),采样时间为发酵的第 7、14、21、28 d 和 35 d.在每个采样点随机采集 3 份样品,且将采集的样品混合均匀后再分装 3 份,以此保证样品的代

表性.采集后的样品立即放入液氮中并带回实验室中保存(-70 °C)备用.

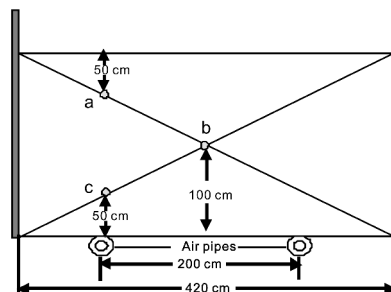


图 1 自引发式堆肥装置及采样点示意图

### 1.3 样品分析

#### 1.3.1 堆体理化指标的检测

按文献[11]中的方法测定 a、b、c 采样点样品的温度、pH 值、含水率和 C/N.

#### 1.3.2 样品的 DNA 提取及 PCR 扩增

取堆肥样品各 0.3 g,采用强力土壤 DNA 提取试剂盒(美国,MOBIO)提取基因组 DNA,并将提取好的 DNA 用超纯水稀释 20 倍后继续作扩增实验.采用引物 GC-341F(5'-CGC-CCG-CCG-CGC-GCG-GGC-GGG-GCG-GGG-GCA-CGG-GGG-GCC-TACGGGAGG-CAG-CAG-3')和 907R(5'-CCG-TCA-ATT-CMT-TTR-AGT-3')对样品的微生物 DNA 进行 PCR 扩增.PCR 反应体系为:2×Taq Master Mix 25  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L 上下游引物各 1  $\mu$ L, DNA 1  $\mu$ L, 双蒸水 22  $\mu$ L, 共计 50  $\mu$ L.扩增反应程序为:95 °C 初始变性 10 min, 93 °C 变性 30 s, 65 °C 退火 30 s, 60 °C 退火 30 s, 55 °C 退火 30 s, 25 个循环, 72 °C 延伸 8 min, 于 4 °C 保存.扩增目标基因片段大小约为 576 bp.

#### 1.3.3 变性梯度凝胶电泳(DGGE)的检测

利用变性梯度凝胶电泳分离 PCR 扩增产物,使用 DCode™ 通用突变检测系统(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)评估 DGGE<sup>[12]</sup>.变性梯度凝胶的制备方法为:在 pH 7.4 的 20 mmol/L Tris 缓冲液中加入 0.5 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)和 10 mmol/L 醋酸钠,制备过程所用的试剂为聚丙烯酰胺(质量分数为 8%~12%)、尿素(1.4~4.9 mol/L)和变性剂(质量分数为 30%~70%).制备出的变性梯度凝胶的长、宽、高分别为 160 mm、60 mm、1 mm.凝胶制备完成后,将其放在 20

mmol/L Tris 缓冲液(pH 8.0)中电泳 850 min(电压为 100 V,温度为 60 ℃),然后利用 SYBR Green I 对凝胶染色 30 min. 染色完成后,利用凝胶影像分析系统观察凝胶并拍照. 采用 Quantity One 软件分析所拍摄的图像.

### 1.3.4 条带回收及测序方法

将清晰单一的条带进行切割后溶于 50  $\mu$ L 超纯水(4 ℃)放置 24 h,然后继续 PCR 扩增、DGGE 电泳、切胶,直到条带清晰并单一. 切下处理好后的代表性条带装入 1.5 mL 离心管中,并按 SK8131 试剂盒方法回收目的 DNA 片段. 取适量回收的 DNA 做模板并进行 PCR 扩增(扩增条件及步骤同 1.3.2 方法),然后将产物送至日本三岛信息生物学中心进行测序. 利用 DNA 数据库提供的 DDBJ-Blast 程序对所得条带进行系统发育分析.

### 1.4 数据处理

采用 OriginPro 2021 软件对数据进行计算、作图.

## 2 结果与分析

### 2.1 堆体温度的变化情况

微生物生长繁殖的最适温度为 30~60 ℃. 当温度高于 65 ℃时,大多数微生物转变为芽孢休眠,只有少部分嗜热菌可以继续存活<sup>[13]</sup>. 由图 2 可知,堆体的温度变化趋势主要分为 2 个阶段. 第 1 阶段为快速升温期(0~7 d),3 个采样点的堆体温度均在第 7 d 达到峰值,分别为 91.0 ℃、104.0 ℃和 50.0 ℃. 其原因是好氧微生物能够快速分解物料中的可降解有机物,并释放能量,进而快速提高堆体温度. 第 2 阶段为缓慢降温期(7~35 d),该阶段堆体温度从峰值缓慢下降至略高于室温. 其原因是堆体中的有机物含量减少,使得微生物活性和热量下降所致.

### 2.2 堆体的 pH 变化情况

图 3 为堆肥过程中 pH 的变化. 由图 3 可以看出:在 0~7 d,堆体的 pH 呈升高趋势. 其原因是在此过程中微生物进行的是有氧呼吸,物料中的蛋白质、尿素、尿酸等高氮有机物能够快速降解,并产生大量铵态氮所致. 在 7~14 d,堆体的 pH 呈下降趋势. 其原因是在该阶段嗜热微生物进行的是厌氧呼吸,由此产生了大量有机酸所致.

在 14~35 d,堆体的 pH 再次呈升高趋势. 其原因是在该阶段嗜热微生物代谢的是蛋白质,进而使堆肥的氨氮的含量不断增加所致. 在第 35 d,各采样点的 pH 值均高于 8.0.

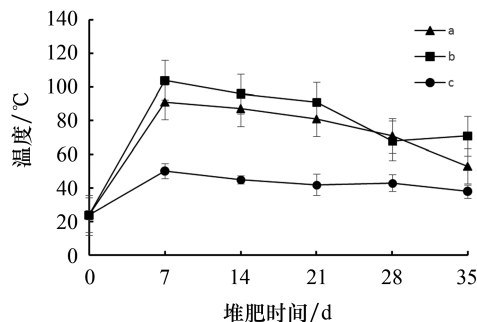


图 2 堆肥过程中的温度变化情况

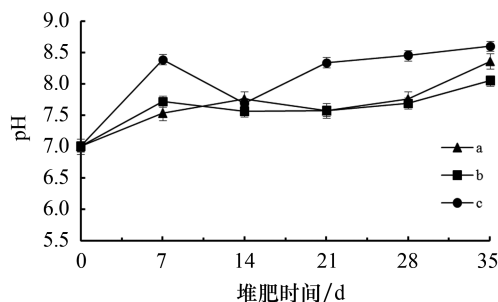


图 3 堆肥过程中的 pH 变化情况

### 2.3 堆体含水率的变化情况

由于微生物只能利用水溶性有机物进行生长、代谢和繁殖,所以堆肥过程中需保持合适的含水率. 由于含水率 $>65\%$ 时,含水率会影响堆料空隙中的空气扩散,进而易形成厌氧环境(不利于堆肥发酵),因此本试验用活性白土将堆体的含水率调整至 60%. 由图 4 可以看出:在堆肥的整个过程中堆体的含水率总体呈逐渐下降趋势,其中堆肥在 7~14 d 时堆体的含水率下降得最快,其主要原因是微生物在堆肥过程中产生了大量热量,进而加速了水分的蒸发所致. 而在 21~35 d 时含水率下降得相对较为缓慢,其原因是温度逐渐降低,水分蒸发变得缓慢. 另外,3 个采样点的含水率为 b 点 $>$ a 点 $>$ c 点.

### 2.4 堆体 C/N 的变化情况

C/N 变化通常用于衡量堆肥腐熟度. 堆肥腐熟时堆体的 C/N 值趋向于微生物菌体的 C/N 值(12 左右). 由图 5 可以看出:堆体的 C/N 值随堆肥时间呈逐渐下降趋势,其中在 0~7 d 时下降得

最快,且此时温度和含水率均较高.当堆肥时间为第 35 d 时 C/N 值达到 12 左右,由此可认定堆肥发酵基本完成.

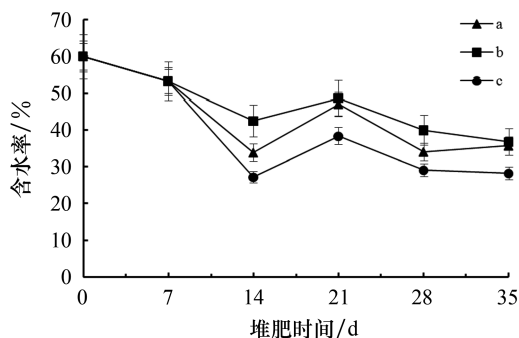


图 4 堆肥过程中的含水率变化情况

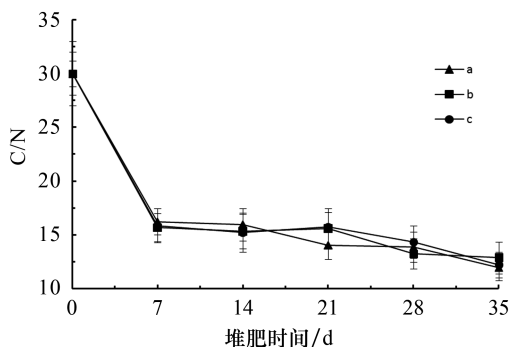


图 5 堆肥过程中的 C/N 值变化情况

## 2.5 条带序列的 DGGE 谱图分析

微生物总 DNA 的 DGGE 图谱如图 6 所示.图中,条带的数量越多表示样品中微生物的种类越丰富,条带越亮表示种类数量越多.从图 6 可以看出:在整个堆肥过程中,条带 k、o、p、q 为共有的优势菌群,表明这些菌群可能对堆肥起关键作用;条带 f、h、k、l、m 的亮度随着堆肥进程的推进而明显增加,说明这几种菌种的含量随堆肥时间而逐渐提高;条带 a、b、c、e 出现在 28~35 d,说明

这些菌种不适应前期的超高温环境,而适应堆肥后期的堆体环境.另外,不同采样点的菌群组成和数量也存在差异.在采样点 a 和 c,条带 q 在发酵前期含有的微生物数量较多,但在末期含有的微生物数量降低;在采样点 b,在 7~14 d 范围内无条带 q 产生.

将图 6 中的不同条带切割后回收并对其 DNA 进行测序.测序后的分析结果见表 1.由表 1 可知,堆肥过程中共检测出 6 个细菌门、8 个纲(或者目)、17 种不同种属的细菌,其中在条带 h、m、o、p 和 q 上检测出的细菌与未培养堆肥细菌属(Uncultured compost bacterium)、嗜热盐菌属(*Rhodothermus* sp.)、热杆菌属(*Thermaerobacter composti*)、嗜热栖热菌属(*Thermus thermophilus*)和嗜热球形杆菌(*Sphaerobacter thermophilus*)的相似性达到 100%,其余条带 a、b、c、d、e、f、g、i、j、k、l、n 分别与鞘脂杆菌(*Sphingobacteriaceae bacterium*)、类芽胞杆菌(*Paenibacillus* sp.)、高温放线菌(*Thermoactinomycetaceae bacterium*)、*Alviniconcha hessleri gill endosymbiont*、鸟氨酸芽胞杆菌(*Ornithinibacillus* sp.)、土芽胞杆菌(*Geobacillus* sp.)、酸微菌(*Acidimicrobiaceae bacterium*)、*Planifilum fimeticola*、*Planifilum yunnanense*、马氏酵母菌株(*Rhodothermus marinus strain*)和未培养的堆肥细菌(Uncultured compost bacterium)检测出的微生物相似性均达 90%以上.由以上可以看出,高温堆肥过程中微生物呈多样性,且有明显的差异动态演替性.本文检测出的上述微生物与文献[14-15]中检测到的微生物相类似,由此进一步表明上述种类的微生物对极端环境具有较强的耐受性.

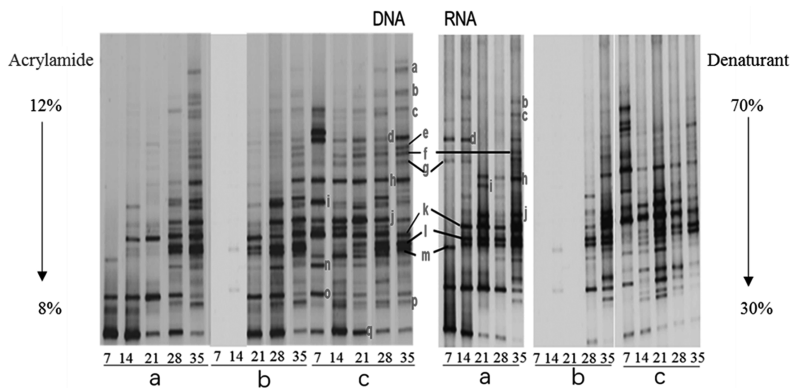


图 6 堆肥过程中微生物总 DNA 的 DGGE 图谱



表 1 DGGE 条带细菌 16S rDNA 部分基因序列比对分析

Band	Identification	Accession No.	Similarit/%	Phylum	Order or Class
a	<i>Sphingobacteriaceae bacterium gsoil</i> 524	EU370954	99	Bacteroidetes	Sphingobacteriales
b	<i>Paenibacillus</i> sp. SH-55	AB162693	94	Firmicutes	Bacillales
c	<i>Paenibacillus</i> sp. SBK-15	AB366356	95	Firmicutes	Bacillales
d	<i>Thermoactinomyetaceae bacterium</i> CNR873 PL04	DQ448805	92	Firmicutes	Bacillales
e	<i>Alviniconchahessleri gill endosymbiont</i>	AB214932	93	Proteobacteria	Gammaproteobacteria
f	<i>Ornithinibacillus</i> sp. XJSL10-7	GQ903476	90	Firmicutes	Bacillales
g	<i>Geobacillus</i> sp. TC-W7	GQ866911	97	Firmicutes	Bacillales
h	Uncultured compost bacterium	AB437982	100	—	—
i	<i>Acidimicrobiaceae bacterium</i> IC-180	AB517669	91	Actinobacteria	Acidimicrobiales
j	<i>Planifilum fimeticola</i>	AB088364	99	Firmicutes	Bacillales
k	<i>Planifilum yunnanense</i>	DQ119659	99	Firmicutes	Bacillales
l	<i>Rhodothermus marinus strain</i> yb43	EU214605	99	Bacteroidetes	Sphingobacteria
m	<i>Rhodothermus</i> sp.	AB252420	100	Bacteroidetes	Sphingobacteria
n	Uncultured compost bacterium	FN667400	98	—	—
o	<i>Thermaerobacter composti</i>	AB454087	100	Firmicutes	Clostridiales
p	<i>Sphaerobacter thermophilus</i> DSM 20745	CP001824	100	Chloroflexi	Sphaerobacteria
q	<i>Thermus thermophilus</i>	DQ119659	100	Deinococcus-thermus	Deinococci

3 结论

对超高温堆肥过程中的微生物类群变化和堆体的理化性质(含水率、pH、温度、C/N)进行研究显示:堆肥在 35 d 完成,堆肥过程中微生物呈多样性,且不同微生物的相对含量有所差异;在堆肥过程中共测出 6 个细菌门(其中 Firmicutes 菌门为主要优势菌门)和 17 种不同种属的细菌(其中嗜热菌为主要优势菌属)。堆体的理化性质随微生物的类群变化而变化,其中除 pH 外其他指标均随堆肥时间呈下降趋势。本研究结果可为超高温堆肥畜禽粪便发酵菌种的筛选和功能菌剂的制备提供理论基础。在今后的研究中,我们将对超高温堆肥过程中出现的嗜热菌种进行筛选和纯化,以制备出更为优良的超高温堆肥复合工程菌剂。

参考文献:

[1] 余震,周顺桂.超高温好氧发酵技术:堆肥快速腐熟与污染控制机制[J].南京农业大学学报,2020,43(5):781-789.

[2] 李清飞,刘冰.微生物调控对有机废物堆肥的理化性质影响研究[J].环境科学与管理,2016,41(8):39-41.

[3] 刘东明,孟繁华,郝艳,等.微生物菌剂对堆肥功能微生物重构的影响[J].环境科学研究,2020,33(9):2011-2019.

[4] 黄国锋,吴启堂,黄焕忠.有机固体废弃物好氧高温堆肥化处理技术[J].中国生态农业学报,2003,11(1):165-167.

[5] 刘子乐,白林,胡红文.超高温堆肥及其资源化与无

害化研究进展[J].中国农业科技导报,2021,23(1):119-127.

[6] 廖汉鹏,陈志,余震,等.有机固体废物超高温好氧发酵技术及其工程应用[J].福建农林大学学报(自然科学版),2017,46(4):439-444.

[7] PENG C A, ZHI C A, QIAN Z A, et al. Hyperthermophilic composting significantly decreases N<sub>2</sub>O emissions by regulating N<sub>2</sub>O-related functional genes[J]. Bioresource Technology, 2019,272:433-441.

[8] 崔鹏,艾超凡,廖汉鹏,等.超高温堆肥微生物群落强化产热功能特征分析[J/OL].土壤学报:1-11(2021-08-09)[2021-10-16].<http://pedologica.is-sas.ac.cn/trxb/article/abstract/trxb202102050077>.

[9] 陈雅娟,霍培书,程旭艳,等.物料 C/N 对鸡粪锯末高温堆肥腐熟过程主要指标的影响研究[J].中国农业大学学报,2012,17(5):118-123.

[10] 王成.堆肥过程 N<sub>2</sub>O 减排控制与木质纤维素降解微生物学机理研究[D].杭州:浙江大学,2014.

[11] 潘攀.不同初始温度对人粪便好氧堆肥过程的影响[D].西安:西安建筑科技大学,2014.

[12] MUYZER G, DEWAAL E C, UITTERLINDEN A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(3):695-700.

[13] 李恕艳,李吉进.高温堆肥温度变化及无害化效果试验[J].蔬菜,2013(2):52-56.

[14] 王秀红,史向远,张纪涛,等.鸡粪好氧堆肥腐熟度、重金属残留及微生物菌群分析[J].山西农业科学,2021,49(9):1094-1099.

[15] 董浩,吕育财,任立伟,等.硫酸新霉素废水活性污泥的微生物群落结构解析[J].化学与生物工程,2021,38(8):25-31.