

# 堆肥过程多阶段强化接种对细菌群落多样性的影响

党秋玲<sup>1,2</sup>, 李鸣晓<sup>2</sup>, 席北斗<sup>1\*</sup>, 魏自民<sup>2</sup>, 刘驰<sup>1</sup>, 夏训峰<sup>1</sup>, 杨天学<sup>1</sup>, 李晔<sup>2</sup>

(1. 中国环境科学研究院水环境系统工程研究室, 北京 100012; 2. 东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030)

**摘要:** 以生活垃圾为原料进行好氧堆肥, 采用多阶段的方式强化接种功能微生物菌剂, 利用 PCR-DGGE 方法并结合聚类分析和 Shannon-Weaver 指数变化来研究堆肥过程中多阶段强化接种对细菌群落多样性的影响, 同时监测木质纤维素降解率的变化. 结果表明, 多阶段接种堆肥能有效提高堆体降温期和二次发酵期的温度; 和普通接种堆肥相比可使半纤维素、纤维素和木质素的降解率分别提高 7.19%、10.89% 和 8.98%. 细菌群落多样性分析表明, 2 种接种方式的多样性指数表现出极显著差异, 采用多阶段的方式进行接种能使接种菌剂更好地定植于堆体之中, 有效避免不同功能的接种菌剂之间、接种菌剂和土著菌之间的竞争性抑制作用, 提高堆体中特别是堆肥腐熟阶段的细菌群落多样性, 加快堆肥的稳定化进程.

**关键词:** 堆肥; 多阶段接种; 接种菌剂; PCR-DGGE; 细菌群落多样性

中图分类号: X705 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2011)09-2689-07

## Effects of Multi-stage Strengthening Inoculation on Bacterial Community Diversity During Composting

DANG Qiu-ling<sup>1,2</sup>, LI Ming-xiao<sup>2</sup>, XI Bei-dou<sup>1</sup>, WEI Zi-min<sup>2</sup>, LIU Chi<sup>1</sup>, XIA Xun-feng<sup>1</sup>, YANG Tian-xue<sup>1</sup>, LI Ye<sup>2</sup>

(1. Laboratory of Water Environmental System Engineering, Chinese Research Academy of Environmental Science, Beijing 100012, China; 2. College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** Effects of multi-stage strengthening inoculation on bacterial community diversity were analyzed using PCR-DGGE method in municipal solid waste composting combined with Cluster analysis and changes of Shannon-Weaver index, and the changes of lignocellulose's degradation rate were also detected during the process. The results showed that Multi-stage inoculation of composting can improve the temperature of cooling and the secondary fermentation period. And the hemicellulose, cellulose and lignin degradation rate increased by 7.19%, 10.89% and 8.98% compared to general inoculation composting. The analysis of bacterial community diversity indicated that the diversity index of the two inoculation showed significant differences, the microbial inoculation could live well in the pile. It could avoid competition between different inoculated agents and competition between inoculated and indigenous microorganisms, and could improve bacterial community diversity during composting especially for maturity stage. It could speed up the composting process of stabilization.

**Key words:** composting; multi-stage inoculation; microbial inoculation agents; PCR-DGGE; diversity of bacteria community

好氧堆肥是实现有机废弃物资源化利用的一种重要方式, 其本质是由群落结构演替非常迅速的多个微生物群体共同作用的动态过程<sup>[1-3]</sup>. 有研究表明<sup>[4-6]</sup>, 在堆肥过程中接种高效微生物菌剂可以增加堆体中的微生物数量, 利用微生物菌群间的相互协同作用加速垃圾中有机物的分解, 促进堆肥材料的腐熟, 提高堆肥效率. 也有研究认为<sup>[7,8]</sup>, 由于堆肥物料成分复杂, 接种外源微生物菌剂与堆肥土著微生物之间存在竞争, 致使二者均不能充分地发挥其作用. 因此, 如何能更好地发挥外源微生物菌剂与土著菌之间的协同作用成为国内外学者关注的焦点. 研究表明<sup>[7,9-12]</sup>, 微生物菌剂的添加时期是其能否有效发挥作用的关键, 为充分发挥接种菌剂的优势作用, 降低土著微生物与接种菌剂之间的竞争, 本研究遵循堆肥过程中的温度变化和物质转化特性<sup>[13-16]</sup>, 提出在堆肥过程中多阶段接种不同的功能

菌剂.

由于堆肥过程是由微生物主导的生理生化过程, 对堆肥过程中微生物群落多样性及其动态变化进行研究是了解堆肥过程中微生物作用机制的必要前提. 基于 16S rDNA 的 PCR-DGGE 技术可以通过图谱特征来分析系统中微生物的群落变化规律, 克服了传统微生物研究方法的局限性, 目前已被广泛应用于环境样品的研究中<sup>[17-22]</sup>. 本研究利用 PCR-DGGE 技术, 从分子生态学的角度研究多阶段强化接种堆肥过程中的细菌群落多样性, 并将接种菌剂

收稿日期: 2010-10-07; 修订日期: 2010-12-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(50878201); 国家科技支撑计划课题项目(2006BAC06B04, 2008BAD4B00, 2009BAD2B04); 农业科技成果转化资金项目(2008GB24420470)

作者简介: 党秋玲(1982~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为微生物学和固体废物处理设置, E-mail: dangling819@126.com  
\* 通讯联系人, E-mail: xibeidou@263.net

制作成 marker, 以示踪接种菌剂在堆肥中的生长过程, 以期为堆肥接种工艺参数的优化及堆肥过程中微生物的作用机制研究提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 堆肥原料

将从北京市某生活垃圾综合处理厂取回的生活垃圾进行分拣, 剔除难降解物质, 如塑料(所占质量分数 6.5%) 和玻璃、砖石(所占质量分数 4.2%) 等, 并将剩余的可降解有机生活垃圾进行粉碎, 粒径控制在 5 cm 以内。将从中国环境科学研究院收割的杂草晾干, 并剁碎至 2 ~ 3 cm, 用以调节堆肥碳氮比。有机成分的理化性质见表 1。

表 1 堆肥材料基本理化参数

Table 1 Some basic characteristics of composting materials

原料	C/N	有机质含量/%	含水率/%
生活垃圾	15	50.9	58.5
杂草	106.7	80.08	4.24
堆肥原料	26.1	54.6	60.11

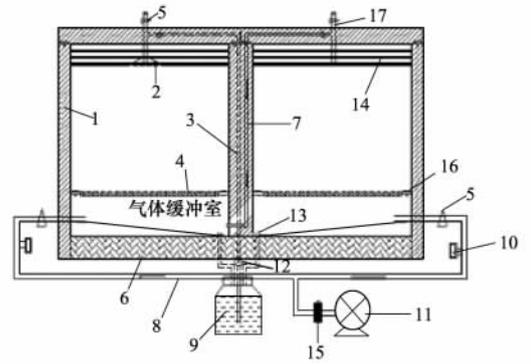
接种菌剂为课题组从高温堆肥和牛粪中筛选得到的 AND 复合菌剂(包括具有氨氧化功能的菌株 A-03、硝化菌 N-24 和除臭功能的菌株 D-05)、具有纤维素降解功能的复合菌剂(含有菌株 X-B1、X-B7、X-11 和 X-32) 和具有木质素降解功能的复合菌剂(含有菌株 M-B1、M-21、和 M-31)。其中 X-11、X-32、M-21、和 M-31 为真菌, 其余全部为细菌。

### 1.2 堆肥装置

堆肥的实验装置为二室堆肥反应器, 结构示意图见图 1。该装置主体由 2 个结构相同的内室组成, 可以同时进行两组平行实验。反应器内室结构为圆柱型, 高 0.4 m, 底面直径 0.5 m, 有效容积为 0.078 5 m<sup>3</sup>, 散热表面积为 1.020 5 m<sup>2</sup>, 外附保温材料, 配有智能控制系统、温度探头、在线气体检测系统等实验附属配件。

### 1.3 堆肥试验设计及样品采集

调节堆肥物料初始含水率为 60.11%, 碳氮比为 26.1, pH 为 7.13, 通风量 0.5 L·(min·kg)<sup>-1</sup>。堆肥设计 2 个处理: T1 为多阶段接种堆肥, 即在堆肥的升温阶段接种硝化细菌与除臭菌(AND 复合菌剂), 以减少氨气的挥发和硫化氢等恶臭气体的产生, 同时起到减少堆肥氮素损失的功效; 在堆肥的高温持续阶段(>55℃), 微生物活性受到极大抑制, 此阶段不接种; 而在高温阶段中后期(<55℃), 由于堆肥物料中结构简单的有机物消耗殆尽, 微生物



1. 保温层; 2. 喷头; 3. 渗滤液回灌管; 4. 布气板; 5. 阀门; 6. 底座; 7. 废气回收管; 8. 供气管; 9. 渗滤液收集桶; 10. 气体流量计; 11. 空气压缩机; 12. 蠕动泵; 13. 渗滤液收集管; 14. 顶盖; 15. 热交换机; 16. 法兰; 17. 顶部排气管

图 1 二室堆肥反应器示意

Fig. 1 Schematic figure of device structure of two room

主要利用纤维素等作为能源物质, 此阶段接种纤维素降解菌; 堆肥降温阶段和二次发酵阶段(<40℃) 是腐殖质类物质快速形成与稳定化阶段, 此阶段接种木质素降解菌。T2 为普通接种堆肥(对照组), 即在堆肥开始同时接种上述 3 种复合菌剂。2 组实验中 3 种复合菌剂的接种比例为 1:1:1, 接种总量(以干重计)为 5 mL·kg<sup>-1</sup>, 接种菌剂的细胞浓度为 10<sup>8</sup> 个/mL。

从堆肥开始每隔 48 h 在堆心 15、20、25 cm 深度处分别取等量样品 200 g 进行混匀, 平均分为 2 份, 1 份样品用来进行理化指标的测定, 1 份保存于 -20℃ 冰箱用于后续分析。

### 1.4 测定项目及方法

#### 1.4.1 理化指标分析

温度: 在线监测; 木质纤维素含量测定参照文献 [23] 的方法。

#### 1.4.2 细菌群落多样性分析

基于 16S rDNA 的 PCR-DGGE 方法对堆肥过程中的细菌群落多样性进行研究, 并对 DGGE 图谱中的优势条件进行测序分析, 结合聚类分析和多样性指数分析的方法共同表征多阶段接种堆肥过程中的细菌群落多样性。

#### (1) PCR-DGGE 分析

堆肥样品经脱腐缓冲溶液洗涤去除腐殖质后, 用 omega 土壤 DNA 提取试剂盒进行总基因组 DNA 的提取及纯化。然后以此 DNA 为模板对 16S rDNA 的 V3 区进行 PCR 扩增。扩增引物采用细菌通用引物 534r (ATTACCGCGGCTGCTGG) 和 341f (CCTAC

GGGAGGCAGCAG)<sup>[24]</sup>,由上海生工合成,其中正向引物 5' 端连接有 GC 夹板 (CGCCCGGGGCGCCGCCCCGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGG),以提高在后期 DGGE 电泳时的解链范围<sup>[25]</sup>. PCR 扩增体系为:10 μmol/L 正反向引物各 1 μL, premix Taq 25 μL (TaKaRa), 模板 DNA 2 μL, 无菌去离子水补足至 50 μL. 扩增条件:94℃ 预变性 5 min, 之后采用降落式 (touchdown) PCR, 退火温度从 60℃ 到 51℃ 每循环依次降 1℃, 每个温度 1 个循环, 每个循环 94℃ 变性 30 s, 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 72℃ 终延伸 10 min, 最后 4℃ 保温. PCR 扩增产物采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测.

DGGE 条件参考 Ferrism 等<sup>[26]</sup> 的实验并进行了改进. 采用 Bio-Rad 公司 Dcode™ 的基因突变检测系统对 PCR 产物进行电泳分离. DGGE 聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8%, 变性梯度 35% ~ 60%, 电泳缓冲液为 1 × TAE, 电压 80 V, 60℃ 条件下电泳 16 h. 电泳结束后用 SYBR Green I (1:10 000) 染色 30 min, 用 UVP 凝胶成像系统观察结果并拍照. 利用 quantity one 软件将 DGGE 图谱数字化后, 按照 UPGAMA 算法对各泳道群落进行聚类分析, 同时按照 Jolanda 等<sup>[27]</sup> 的方法对 DGGE 图谱中各泳道微生物进行 Shannon-Weiner 多样性指数 ( $H'$ ) 分析,  $H'$  通过公式  $H' = - \sum P_i \ln P_i$  计算, 其中  $P_i$  是泳道中条带的相对信号强度.

## (2) 优势条带的切胶回收和测序分析

用无菌的手术刀在 345 nm 波长下将优势条带切下, 放在 2 mL 无菌离心管中, 并用 tip 头捣碎, 加入 60 μL TE 缓冲溶液, 4℃ 放置 24 h, 取 10 ng DNA 进行第二轮 PCR 扩增, 引物和扩增条件同上, 扩增产物交由北京三博远志公司测序. 将测序结果提交到 GenBank 中利用 BLAST 软件与 GenBank 数据库中的序列进行比对, 获得同源性最大的菌属 16S rDNA 序列.

## 2 结果与讨论

### 2.1 堆肥过程中理化参数的动态变化

#### 2.1.1 堆肥过程中温度的动态变化

堆肥过程中温度的变化情况如图 2 所示, 2 个处理在第 2 d 都进入高温期, 50℃ 以上维持的时间都超过 5 d (T1 为 8 d, T2 为 7 d), 都能满足堆肥无害化处理的要求. 2 种接种方式在堆肥进行的前 9 d 对温度的变化影响不大; 第 9 d 向 T1 中接种纤维素分解菌, 从第 10 d 起 T1 处理堆体温度和对照组相比

下降的趋势较缓慢; 第 13 d 一次发酵结束, 对 2 个堆体进行翻堆, 同时向 T1 处理中接种木质素降解菌复合菌剂, 堆体温度在第 15 d 时迅速升高开始进行二次发酵, 二次发酵最高温度达到 51℃, 说明新接种的微生物菌剂逐渐适应堆体环境后开始作用于堆料中难降解的纤维素和木质素, 使堆体温度上升. 由于 T2 处理中容易利用的有机物质消耗殆尽, 堆肥初期接种的木质纤维降解菌在耐受长达 7 d 的 50℃ 以上的高温作用后其微生物活性已基本消失, 所以在高温期末期堆体温度一直呈现下降的趋势. 说明根据堆肥过程中有机物质的降解特性和温度变化进行有针对性地分阶段接种能更好地发挥接种菌剂的微生物活性, 提高接种菌剂的利用效率, 加快堆肥进程.

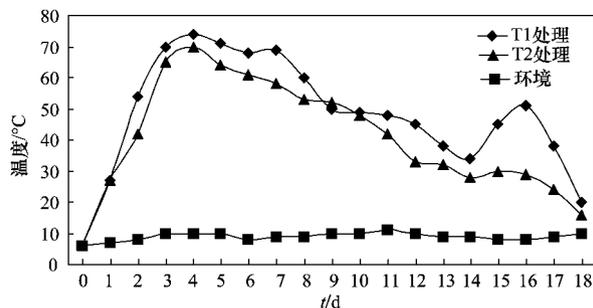


图 2 堆肥过程中的温度变化

Fig. 2 Changes of temperature during composting

#### 2.1.2 堆肥过程中木质纤维降解率的动态变化

木质纤维素等大分子物质的降解速率是决定堆肥腐熟进程的一个关键因素<sup>[28]</sup>. 如图 3 所示, 2 个处理的半纤维素降解伴随着堆肥的整个过程; T1 处理的纤维素降解从堆肥的高温期开始直至堆肥结束, 对照组 T2 则主要发生在堆肥的高温期, 后期降解缓慢; T1 处理的木质素降解从堆肥的高温期末期开始直至堆肥的二次发酵结束, 对照组的主要发生在堆肥的降温期, 从第 12 d 开始 T1 的降解速率明显

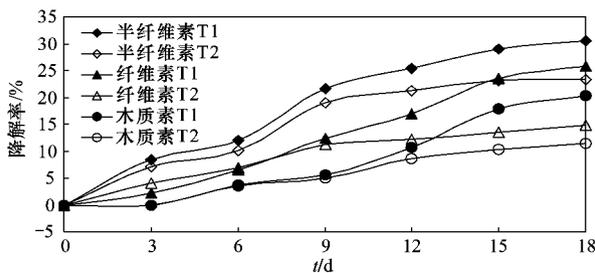


图 3 堆肥化过程中半纤维素、纤维素、木质素变化

Fig. 3 Changes of hemicellulose, cellulose and lignin concentration during composting

大于对照组;堆肥结束后多阶段接种处理的半纤维素降解率、纤维素降解率和木质素降解率比对照组分别提高了 7.19%、10.89% 和 8.98%。说明采用多阶段接种的方式进行堆肥能有效提高堆肥过程中木质纤维的降解速率,使堆肥充分腐熟。

## 2.2 多阶段接种堆肥过程中细菌群落多样性分析

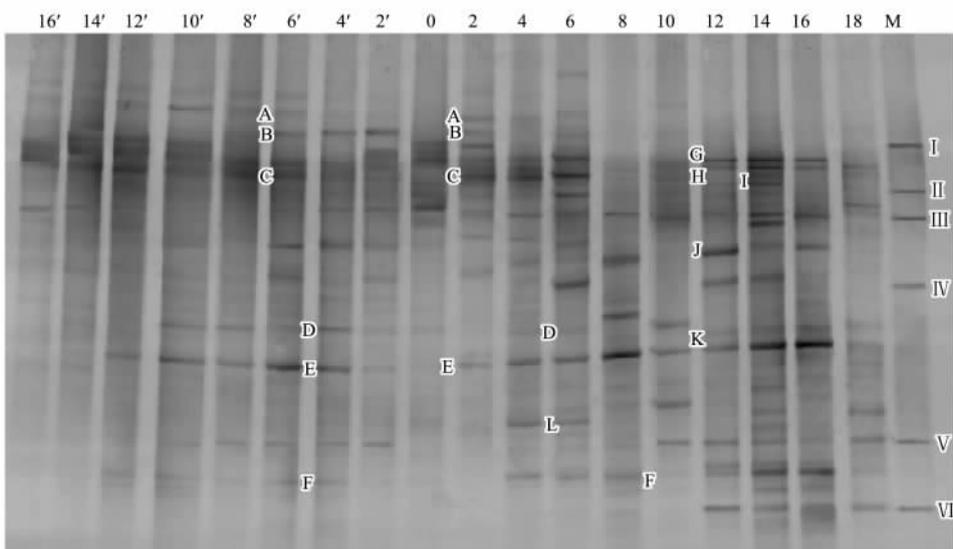
### 2.2.1 DGGE 图谱分析

从图 4 和图 5 可以看出,多阶段接种和普通接种堆肥处理的 DGGE 条带种类和分布表现出了明显的差异,多阶段接种处理中的细菌种类和数目多于对照组,尤其是在堆肥降温期以后多阶段接种处理的微生物种类和数目明显高于对照组,表现出了较高的多样性。条带 A~L 所代表的微生物为堆体中的土著微生物,其中条带 A、B、C、D、E、F 为 2 个处理的共有条带,但在 2 个处理中持续的时间和条带的亮度都有所不同,条带 E、F 在 2 个处理中都持续了较长的时间,为堆肥过程中的优势菌群,但在多阶段接种处理中的亮度要明显高于对照组。条带 G、H、I、J、K、L 只出现在多阶段接种处理的 DGGE 图谱上,且条带亮度较高,然而在对照组中没能监测到,说明多阶段接种工艺能有效提高堆体中土著微生物的种类和数量,使其作为优势菌群促进堆肥的腐熟。

接种菌剂的 16S rDNA V3 区 PCR 扩增产物作为 DGGE 图谱中的对照条带,在图谱上标记为条带 I~VI。条带 I 只出现在 T1 处理的前 2 d,之后便在

DGGE 图谱上消失,在 T1 和 T2 处理的图谱上没有发现条带 IV,可能与条带 I 和 IV 所代表的微生物对复杂的堆肥环境的适应能力差,不能很好地利用体系中的营养物质,另外还与菌剂的耐高温能力不强有关,当堆温逐渐升高时其活性受到抑制。条带 II 出现在 T1 的第 6 d 和第 12~14 d,条带 III 出现在 T1 的第 4~16 d,说明条带 II 和 III 所代表的接种菌剂能够很快适应堆肥环境迅速定植于多阶段接种的高温期。条带 V 和 VI 分布在凝胶的下方,所代表的微生物是 G+C 含量较高的纤维素分解菌,在 T1 处理的第 9 d 接种,在 DGGE 图谱上的第 10~18 d 一直为优势条带,条带较亮。说明在此阶段接种的菌剂能够有效地作用于堆料中的纤维素类物质,将其降解成微生物容易利用的小分子物质,供其它微生物吸收利用<sup>[29]</sup>。然而在对照组的图谱上只有条带 III 和 V 出现,且条带的亮度要低于多阶段接种处理。

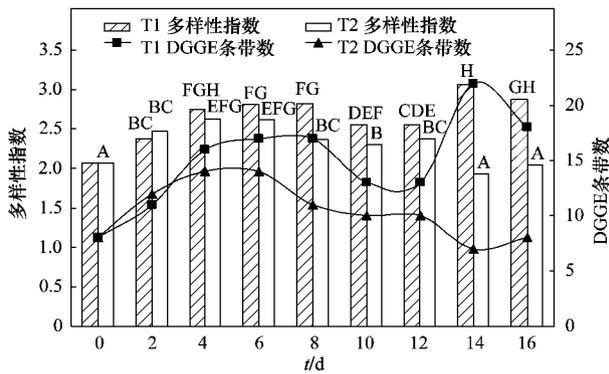
分析以上现象出现的原因可能是在 T2 处理中将多种具有不同生理功能的微生物菌剂混合接种会出现菌剂之间的相互抑制作用,使接种菌剂不能很好地生长,同时由于接种菌剂与土著菌之间存在竞争,使堆体中的微生物量降低。然而,采用多阶段的方式进行接种可以更好的避免接种菌剂之间的竞争,使接种菌剂都能有效地利用堆体中的营养物质,同时少量分批次的接种能有效地避免接种菌剂和土著微生物之间竞争,使堆肥过程中的微生物多样性提高。



M 为接种菌剂 marker,编号 2、4、6、8、10、12、14、16、18 为多阶段接种处理对应天数的样品,编号 2'、4'、6'、8'、10'、12'、14'、16'、18' 为对照组对应天数的样品,编号 0 为两个处理的初始堆肥样品

图 4 DGGE 凝胶电泳图像

Fig. 4 DGGE patterns produced from different sample



图中不同大写字母表示 Duncan 多重比较差异极显著 ( $P < 0.01$ )

图 5 堆肥过程中多样性指数演替

Fig. 5 Change of Shannon-Winner

对不同时期的堆肥样品的相似性指数和条带的聚类分析(图 6)可以看出, T1 处理从第 10 d 开始到堆肥结束的样品聚为一类, 对照组的第 12 d 到堆肥结束的样品聚为一类, 两类间相似性只有 34%, 说明 2 个处理在降温期及二次发酵期的菌群组成差异较大. 对于同一堆肥处理的不同时期的微生物种群相似性较低, 同一堆肥时期的相似性较高, 如 T1 处理的高温期和降温期的相似性系数为 48%, 高温期最大相似性为 79%, 二次发酵期的最大相似性为 76%. 说明除了接种菌剂的影响外温度变化是导致微生物群落结构跃迁的另一个至关重要的因素.

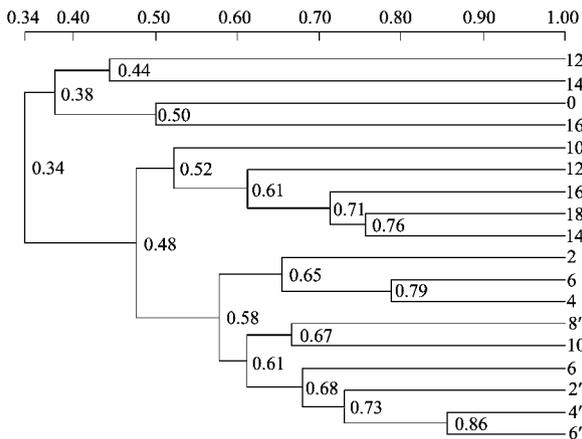


图 6 DGGE 图谱的聚类分析图

Fig. 6 Clustering analysis for DGGE patterns

### 2.2.2 细菌群落多样性分析

生物多样性指数是有效表征生态环境中物种丰富度及分布均匀性的一个重要指标<sup>[30]</sup>. 通过计数 DGGE 图谱中的条带数和计算 Shannon-Weaver 指数来分析多阶段接种堆肥和普通接种堆肥过程中的细

菌多样性, 从图 5 可以看出: 2 个处理的 Shannon-Weaver 指数表现出极显著差异. 在堆肥的升温期 T1 处理的条带数和多样性指数略低于 T2 处理, 此时 T2 处理接种的微生物种类和数量要多于 T1 处理, 然而在进入高温期后 T1 处理的条带数和多样性指数一直远大于 T2 处理, 说明采用多阶段接种进行堆肥的方法能有效地避免接种菌剂和土著微生物之间的竞争性抑制作用, 提高堆体中的微生物多样性. 尤其是在堆肥进入二次发酵期时多样性指数差别更为明显. 在堆肥的第 14 d, T1 的多样性指数骤增至 3.07, 而 T2 处理处于极低水平(1.93), 分析原因可能是分阶段接种的纤维素分解菌和木质素分解菌逐渐适应堆体环境后, 将堆体中的木质纤维类大分子物质降解为容易被其它微生物利用的小分子物质, 致使二次发酵过程中的微生物多样性大大提高, 而普通接种法由于一次发酵结束后容易利用的营养物质消耗殆尽, 接种的微生物不能较长时间地耐受堆肥高温而使微生物活性下降, 多样性降低. 从 2 种接种方式下的多样性指数变化情况可以看出多阶段接种堆肥能明显提高堆肥过程中的细菌多样性.

### 2.2.3 多阶段接种堆肥过程中优势群落分析

表 2 和图 7 是对堆肥过程中的优势条带测序并将测序结果提交到 GenBank 中进行比对后获得的比对结果. 在生活垃圾多阶段接种堆肥过程中检测到了变形菌门细菌、厚壁菌门细菌和大量的用传统方法不能培养但在堆肥过程中发挥了重要作用的细菌, 其中具有纤维素降解功能的嗜热微生物 *Clostridium thermocellum* 一直是整个堆肥过程中的优势细菌, 说明该菌对生活垃圾中纤维素的降解起到重要作用, 这与解开治<sup>[31]</sup>和 Niisawa<sup>[32]</sup>等分别在研究猪粪堆肥和海洋动物资源堆肥过程中检测到的结果相似.

表 2 条带序列的比对结果

Table 2 Blast results of the band sequences

编号	登录号	相似性最大的种属	相似性 /%
A	GU996482.1	Uncultured bacterium clone MNO302B8	97
B	X58198.1	<i>H. obtusa</i> 16S rRNA gene	95
C	DQ413143.1	<i>Hydrogenophaga</i> sp. EMB 7	98
D	HM830860.1	Uncultured bacterium clone nby485e03c1	96
E	FJ599513.1	<i>Clostridium thermocellum</i> strain CTL-6	98
F	AB084065.1	<i>Bacillus</i> sp. MSP06G gene	99
G	AB298562.1	Uncultured compost bacterium	99
H	AY466703.1	<i>Bacillaceae</i> bacterium NS1-3 16S	98
I	AM268424.1	<i>Bacillus</i> sp. HB5	97
J	DQ839147.1	<i>Clostridium</i> sp. enrichment clone Lace	95
K	AB507775.1	Uncultured Firmicutes bacterium	96
L	FN563151.1	Uncultured bacterium	96

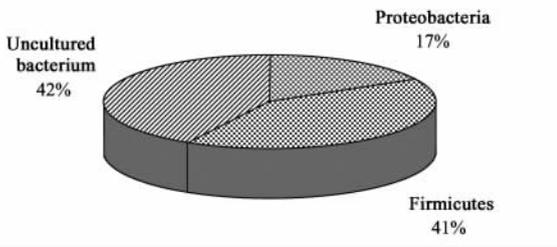


图 7 DNA 测序中检测到的微生物门类

Fig. 7 Proportion of bacteria recovered from DNA sequence analysis during composting

### 3 结论

(1) 多阶段接种堆肥对堆肥高温期末期和二次发酵期的堆体温度影响较大,能提高堆体中木质纤维素的降解速率。

(2) 采用多阶段接种的方式进行堆肥能显著提高堆肥腐熟阶段的细菌群落多样性,加快堆肥的腐熟进程。

(3) 采用多阶段接种的方式进行堆肥能够有效避免接种菌剂之间、接种菌剂和土著微生物之间的竞争,提高堆体中的细菌群落多样性,促进细菌群落结构演替。

参考文献:

[ 1 ] Cho K M, Lee S M, Math R K, *et al.* Culture-independent analysis of microbial succession during composting of swine slurry and mushroom cultural wastes [ J ]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, **18**(12): 1874-1883.

[ 2 ] Partanen P, Hultman J, Paulin L, *et al.* Bacterial diversity at different stages of the composting process [ J ]. *BMC Microbiology*, 2010, **10**: 94.

[ 3 ] 王伟东,王小芬,朴哲,等.堆肥化过程中微生物群落的动态[J].环境科学,2007,**28**(11):2591-2597.

[ 4 ] 徐智,张隍利,张发宝,等.堆肥反应器中2种微生物接种剂的堆肥效果研究[J].环境科学,2009,**30**(11):3409-3413.

[ 5 ] 席北斗,刘鸿亮,孟伟,等.高效复合微生物菌群在垃圾堆肥中的应用[J].环境科学,2001,**22**(5):122-125.

[ 6 ] Xi B D, Liu H L, Zeng G M, *et al.* Composting MSW and sewage sludge with effective complex microorganisms [ J ]. *Journal of Environmental Sciences*, 2002, **14**(2): 264-268.

[ 7 ] 席北斗,孟伟,刘洪亮,等.三阶段控温堆肥过程中接种复合微生物菌群的变化规律研究[J].环境科学,2003,**24**(2):152-155.

[ 8 ] 徐智,张隍利,张发宝,等.接种内外源微生物菌剂对堆肥效果的影响[J].中国环境科学,2009,**29**(8):856-860.

[ 9 ] 喻曼,许育新,曾光明,等.RFLP法研究接种对农业废物堆肥微生物多样性的影响[J].农业环境科学学报,2010,**29**

(2): 396-399.

[ 10 ] Mitali D, Todd V R, Laura G L. Diversity of fungi, bacteria, and actinomycetes on leaves decomposing in a stream [ J ]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, **73**(3): 756-767.

[ 11 ] 陈耀宁,曾光明,黄国和,等.两次接种微生物复合菌剂堆肥法[P].中国:03118137.6,2005.2.6.

[ 12 ] 王一鸣,林先贵.梯次循环接种温控堆肥法[P].中国:200710190996,2008.05.28.

[ 13 ] 魏自民,席北斗,赵越,等.城市生活垃圾外源微生物堆肥对有机酸变化及堆肥腐熟度的影响[J].环境科学,2006,**27**(2):376-380.

[ 14 ] 席北斗,赵越,魏自民,等.三阶段温度控制堆肥接种法对有机氮变化规律的影响[J].环境科学,2007,**28**(1):220-224.

[ 15 ] 魏自民,李英军,席北斗,等.三阶段温度控制接种法对堆肥有机物质变化影响[J].环境科学,2008,**29**(2):540-544.

[ 16 ] Tang J C, Atsushi S, Zhou Q X, *et al.* 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.

[ 17 ] Callia B, Mertoglua B, Roestb K, *et al.* Comparison of long-term performances and final microbial compositions of anaerobic reactors treating landfill leachate [ J ]. *Bioresource Technology*, 2006, **97**(4): 641-647.

[ 18 ] Philips S, Verstraete W. Effect of repeated addition of nitrite to semi-continuous activated sludge reactors [ J ]. *Bioresource Technology*, 2001, **80**(1): 73-82.

[ 19 ] Wang G H, Jin J. Bacterial community structure in a mollisol under long-term natural restoration, cropping, and bare fallow history estimated by PCR-DGGE [ J ]. *Soil Science Society of China*, 2009, **19**(2): 156-165.

[ 20 ] Bonito G, Isikhuemhen O S, Vilgalys R, *et al.* Identification of fungi associated with municipal compost using DNA-based techniques [ J ]. *Bioresource Technology*, 2010, **101**: 1021-1027.

[ 21 ] Hansgate A M, Schloss P D, Hay A G, *et al.* Molecular characterization of fungal community dynamics in the initial stages of composting [ J ]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, **51**(2): 209-214.

[ 22 ] 曾炜,曾光明,黄丹莲,等.铅污染对垃圾堆肥中微生物群落演替规律的影响[J].中国环境科学.2007,**27**(6):727-732.

[ 23 ] 王玉万,徐文玉.木质纤维素固体基质发酵物中半纤维素、纤维素和木素的定量分析程序[J].微生物学通报,1987,**13**(2):82-84.

[ 24 ] Muyzer G, Waal E C, Uitterlinden A G, *et al.* Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA [ J ]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, **59**: 695-700.

[ 25 ] Nubel U, Engelen B, Felske A, *et al.* Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected

- by temperature gradient gel electrophoresis [J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, **178**(19): 5636-5643.
- [26] Ferrism M J, Muyzer G, Ward D M, *et al.* Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**(2): 340-346.
- [27] Brons J K, Van Elsas J D. Analysis of bacterial communities in soil by use of denaturing gradient gel electrophoresis and clone libraries as influenced by different reverse primers [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, doi: 10.1128/AEM.02195-07.
- [28] 王伟东, 王小芬, 王彦杰, 等. 接种木质纤维素分解复合菌系对堆肥发酵进程的影响 [J]. *农业工程学报*, 2008, **24**(7): 193-198.
- [29] 魏自民, 席北斗, 赵越. 生活垃圾微生物强化堆肥技术 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2008. 115-116.
- [30] Zehr J P, Mellon M, Braun S, *et al.* Diversity of heterotrophic nitrogen fixation genes in a marine cyanobacterial mat [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, **61**(2): 527-532.
- [31] 解开治, 徐培智, 张发宝, 等. 接种微生物菌剂对猪粪堆肥过程中细菌群落多样性的影响 [J]. *应用生态学报*, 2009, **20**(8): 2012-2018.
- [32] Niisawa C, Oka S, Kodama H, *et al.* Microbial analysis of a composted product of marine animal resources and isolation of bacteria antagonistic to a plant pathogen from the compost [J]. *Journal of General and Applied Microbiology*, 2008, **54**(3): 149-158.