农业废物好氧堆肥中氨氧化细菌的群落结构

虞泳[1,2],曾光明[1,2*],陈耀宁[1,2],张嘉超[1,2],余震[1,2],刘智峰[1,2],赵明杰[1,2],胡春晓[1,2]

(1. 湖南大学环境科学与工程学院,长沙 410082; 2. 环境生物与控制教育部重点实验室(湖南大学),长沙 410082)

摘要:应用聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)技术对农业废物好氧堆肥过程中氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria,AOB)种群结构随时间的变化情况进行了研究,结果表明,AOB 群落的 Shannon-Weaver 指数初始值为 2.58,堆肥结束时为 2.02,多样性整体呈下降趋势.通过对部分优势条带进行克隆测序,发现 *Nitrosospira* 和 *Nitrosomonas* 为堆肥中 AOB 的优势种属,其中 *Nitrosomonas* 存在于整个堆肥过程中,是耐受性较强的种属.使用 Canoco 4.5 软件对获得的氨氧化细菌种群数据与不同时期堆体温度、pH、含水率、NH_4^+-N、NO_3^--N等环境因子的相关性进行冗余分析(redundancy analysis,RDA).RDA 二维排序图显示堆肥前期样点分布较为集中,后期样点分布较为分散,表明 AOB 群落结构在堆肥高温期前期(4~9 d)变化较小,而在高温期后期(9~12 d)特别是降温期(12~25 d)演替尤为剧烈.基于手动选择的 RDA 分析结果表明,堆体温度、NH_4^+-N和 NO_3^--N对 AOB 群落演替有着显著的影响($P<0.05$),且前 2 个因子达到了极显著水平($P<0.01$).

关键词:堆肥;氨氧化细菌;16S rDNA;PCR-DGGE;冗余分析;

中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2011)10-3067-06

Succession of Ammonia-Oxidizing Bacteria Community Structure During Agricultural Waste Composting

YU Yong[1,2], ZENG Guang-ming[1,2], CHEN Yao-ning[1,2], ZHANG Jia-chao[1,2], YU Zhen[1,2], LIU Zhi-feng[1,2], ZHAO Ming-jie[1,2], HU Chun-xiao[1,2]

(1. College of Environmental Science and Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China; 2. Key Laboratory of Environmental Biology and Pollution Control (Hunan University), Ministry of Education, Changsha 410082, China)

Abstract: The dynamic succession of ammonia-oxidizing bacteria (AOB) community during the agricultural waste composting was investigated using the polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE). The changes of pile temperature, pH, moisture content, soluble NH_4^+-N and NO_3^--N were measured. DGGE results showed that the Shannon-Weaver index changed from 2.58 to 2.02 during the composting process, which reflected the diversity trends downward overall. *Nitrosospira* and *Nitrosomonas* were dominant species. *Nitrosomonas eutropha*, which was found throughout the whole composting process, was identified as a kind of well-tolerated species. Redundancy analysis (RDA) was applied to explore the correlation between the dynamic succession of AOB community and composting physic-chemical parameters. Compared with the slight change referring to its structure during the earlier phase of thermophilic period (4-9 d), the AOB community experienced a more significant change during the later phase of thermophilic period (9-12 d) as well as the following temperature falling phase (12-25 d). Significant relationships have been found between pile temperature, soluble NH_4^+-N ($P<0.01$) and NO_3^--N ($P<0.05$) with the dynamic succession of AOB community, which suggested those three parameters were likely to influence, or be influenced by AOB during the agricultural waste composting.

Key words: composting; ammonia-oxidizing bacteria (AOB); 16S rDNA; PCR-DGGE; redundancy analysis (RDA)

氮元素作为堆肥体系中构成微生物细胞结构的重要元素,既是合成含氮代谢产物的源泉,同时还是保证堆肥产品肥效的关键因素[1].然而,堆肥化过程中存在多种形式的氮素损失,使微生物降解有机物的速度大受影响,降低了堆肥产品的质量.因此,控制堆肥化过程中氮素的损失成为了关键问题.氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria,AOB)能将氨氧化为亚硝酸盐,这一反应是硝化过程的第一步,也是其中的限速步骤[2],在氮素循环过程中起着重要的作用.以 AOB 为研究对象,研究其群落结构的演替及其与环境因子之间的关系,对于揭示堆肥中氮素转移与转化规律具有重要的意义.

由于 AOB 的生长速率相当低,生物量很少,采用传统的细菌分离培养方法进行研究相当费时和繁琐[3~5],而且还有许多自然界存在的 AOB 种属未能在实验室纯培养获得[6].以聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)技术为代表的分子生物学技术的发展可以有效地弥补传统纯培养方法中的不

收稿日期:2010-12-21;修订日期:2011-04-05

基金项目:国家教育部长江学者和创新团队发展计划项目(IRT0719);湖南重大专项(2009FJ1010);湖南省研究生创新项目;湖南省自然科学创新研究群体基金项目(10JJ7005);国家自然科学基金项目(50978088)

作者简介:虞泳(1988~),女,硕士研究生,主要研究方向为固体废物资源化与环境微生物技术,E-mail:yuyongmiya@126.com

* 通讯联系人,E-mail:zgming@hnu.cn

足,并具有可重复性强、操作简单等优点,在复杂环境微生物群落结构动态变化的研究中起到了重要的作用[7~9]. 已有研究表明[10~12],土壤、淡水环境中AOB的优势种群为 *Nitrosomonas* 和 *Nitrosospira*,海洋沉积物中主要为 *Nitrosospira*-like 菌. AOB 的种群结构受温度、铵浓度、酸度等环境因素的影响较大.

本研究采用 PCR-DGGE 技术对农业废物好氧堆肥过程中 AOB 群落结构的变化进行分析. 同时,采用冗余分析(redundancy analysis,RDA)方法分析堆体温度、pH、含水率、NH_4^+-N、NO_3^--N等环境因子与 AOB 种群的相关性,以期为优化堆肥工艺,减少氮素损失提供理论指导.

1 材料与方法

1.1 堆肥材料与理化参数的测定

堆肥土壤取自长沙市岳麓山林间表层土,过 40 目筛后储存备用;将收集的稻草秸秆和易腐菜叶晒干,切成 1 ~2 cm 长的片段. 按照土壤、稻草、菜叶和风干麸皮 8∶11∶3∶2(质量比)均匀混合,调节含水率约为 63%,以此作为堆肥原料,于自制实验室堆肥模拟容器中堆置. 其中土壤用于丰富堆体初始微生物,麸皮用以调节初始 C/N 比. 为避免局部厌氧,在堆置的前 14 d 每周翻堆 2 次,之后每周翻堆 1 次. 为保证良好的微生物生活环境,定期添加灭菌去离子水以维持堆体含水率在 45% ~65% 的范围内. 每天 14∶00 采用多点混合法进行取样,样品混合均匀后分为两部分,一部分用于理化参数的实时测定,另一部分用取样袋封装编号并保存于 -20℃ 用于后续分析.

用精密温度计测定堆体中层取样位置处堆体温度. 样品在 105℃ 烘 24 h,采用衡重法测定含水率; 2.0 g 鲜样按 1∶20(质量浓度)加入去离子水, 200 r·min^{-1}振荡 40 min 后经滤纸过滤,采用电极电位法测定其 pH; 1.5 g 鲜样按 1∶50(质量浓度)加入 1 mol·L^{-1} KCl 溶液, 150 r·min^{-1}振荡 1 h 后,以 5 000 r·min^{-1}离心并取上清液,采用纳氏试剂比色法[13]测定水溶性NH_4^+-N;采用酚二磺酸比色法测定[13]水溶性NO_3^--N. 所有参数测定均重复 3 次,取其平均值,最大实验误差限 <5%.

1.2 DNA 提取及纯化

堆肥样品中含有大量腐殖质会干扰 DNA 的提取,因此在提取 DNA 前需对样品进行预处理. 取 0.5 g 样品于 5 mL 离心管中,加入 3 mL TENP 缓冲液[14]充分混合, 6 000 r·min^{-1}离心 10 min 后弃上清,重复上述操作 2 ~3 次,直至上清液颜色较为澄清,弃去上清液;之后用磷酸盐缓冲液[14]洗涤 1 ~2 次,操作同上. 预处理之后,采用改进的蛋白酶 K-CTAB 法[15]提取样品总 DNA,利用纯化试剂盒对粗提总 DNA 进行纯化. 采用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测粗提和纯化产物浓度.

1.3 PCR-DGGE-测序

基于 16S rDNA 的扩增采用巢式 PCR. 第一轮 PCR 选用 β-Proteobacteria 的特异性引物对,正向引物为 CTO189fAB 与 CTO189fC 的混合物,反向引物为 CTO654r[16],建立 50 μL 的 PCR 反应体系:2 × Power *Taq* PCR MasterMix(北京 BioTeke)25 μL,引物 CTO189fAB 0.6 μL, CTO189fC 0.3 μL[17], CTO654r 0.9 μL,DNA 模板 2 μL,无菌 Mili-Q 水补足 50 μL. PCR 反应在 MyCycler(Bio-Rad,USA)上进行,扩增条件为:94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 45 s, 56℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 7 min,停止于 4℃. 第二轮 PCR 选用细菌 16S rDNA V3 可变区特异性引物对 GC-338f 和 518r[18],以第一轮 PCR 产物为模板, 50 μL 体系:2 × Power *Taq* PCR MasterMix 25 μL,引物各 1 μL,模板 0.8 μL,无菌 Mili-Q 水补足 50 μL. 扩增条件为:94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 40 s, 55℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min,停止于 4℃. PCR 产物采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测.

采用美国 Bio-Rad 公司的 Dcode™ 基因突变检测系统对 PCR 扩增产物进行电泳分离,其电泳条件如下:以 1 ×TAE 作为电泳缓冲液,电泳所用变性胶浓度为 8%,变性梯度范围在 30% ~75%,电泳温度为 60℃, 120 V 电压下运行 12 h. 电泳结束后,采用 SYBR Green I 对 DGGE 凝胶染色 30 min,在 Gel Doc 2000(Bio-Rad, USA)凝胶成像系统下观察结果并拍照.

选择 DGGE 胶上部分优势条带,在紫外灯下进行切割,用 70% 的乙醇溶液洗涤,加入 30 μL 的灭菌 Mili-Q 水溶解. 进行 PCR 扩增,引物对为不带 GC 夹的 338f 和 518r,扩增程序与第二轮 PCR 相同. 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检验后纯化,送交上海美吉基因技术公司进行克隆测序. 使用 NCBI 网站中的 BLAST 将测序结果与数据库中已知序列进行同源性比对分析.

1.4 数据处理

采用 Quanitity One(version 4.6.2,Bio-Rad,USA)软件对 DGGE 图谱进行分析,去除背景值干扰后建立高斯模型对图像信息进行处理,可得到条带相对位置、相对亮度值等条带信息. AOB 群落多样性用 Shannon-Weaver 指数(H)[19]来表示,表达式为:

$$H = -\sum (N_i/N)\ln(N_i/N)$$

式中,N_i 为第 i 种的个体数,N 为种群中总的个体数,个体数用波峰面积表示. 建立物种数据矩阵和环境因子矩阵作为多元分析的基础,其中生物信息矩阵以氨氧化细菌种群在每条泳道中亮度峰值的百分含量为重要值[21]. 为减少稀有种属对排序的影响,需要对条带进行筛选,本研究用于排序的条带要满足下列 2 个条件:该条带在不同泳道出现的频度≥2;该条带在至少一个泳道的相对丰度≥1%. 为消除量纲不同对数据分析的干扰,各环境因子需要经过 SPSS 17.0 软件标准化处理后构造矩阵. 采用 Canoco 4.5 软件对生物信息矩阵进行除趋势对应分析(detrended correspondence analysis,DCA),结果表明,排序轴的梯度长度相对较短(第一排序轴长度为 1.756),因此,选用基于线性模型的冗余分析(RDA)方法进行分析[20]. 采用手动选择,找出对群落结构演替有显著影响($P<0.05$)和极显著影响($P<0.01$)的环境因子. 利用 Monte Carlo permutation test 检验 RDA 排序轴特征值的显著性,置换次数为 999. 将生成的数据文件应用 Canodraw 4.5 作图.

2　结果与讨论

2.1　理化参数的变化

图 1 为堆肥过程中各理化参数随时间的变化情况,由图 1(a)可知,堆体从堆肥第 4 d 开始进入高温期(> 50℃),并在第 6 d 达到最高温度 55.6℃,高温期持续 8 d,保证了堆肥的卫生学指标和堆肥腐熟条件. 堆肥过程中 pH 在 6.59 ~ 8.76 范围内波动,堆肥结束时呈碱性,这与堆肥体系微生物活动过程中有机氮的氨化作用和矿化作用密切相关. 由图 1(b)可知,堆肥前期NH_4^+-N含量波动上升,在第 6 d 达到最大值 1 628 mg·kg^{-1}(以干样计)之后含量呈下降趋势;而NO_3^--N含量在堆肥初期有短期上升,2 ~ 12 d 逐渐下降,整体处于较低水平,而在堆肥中后期逐渐增加,当堆肥结束时,达到 552.2 mg·kg^{-1}(以干样计). 这些变化主要与堆肥微生物的活性和堆肥状况有关:堆肥初期,堆料中存在有氨氮和硝态氮,由于硝化细菌的硝化作用存在,将氨和氨化物转化为硝酸根[1];随着堆肥的进行,有机氮被快速转化为NH_4^+-N并积累[22],氨氮的积累同时也造成了 pH 的升高[图 1(a)], 2 ~ 12 d 对应的阶段温度较高,硝化细菌多属嗜温菌,对温度尤为敏感,当温度高于 40℃时,硝化作用将受到严重的抑制[23]. 随着堆肥温度的降低,硝化细菌快速生长,NH_4^+-N转化为 NO_3^--N.

2.2　DGGE 指纹图谱分析

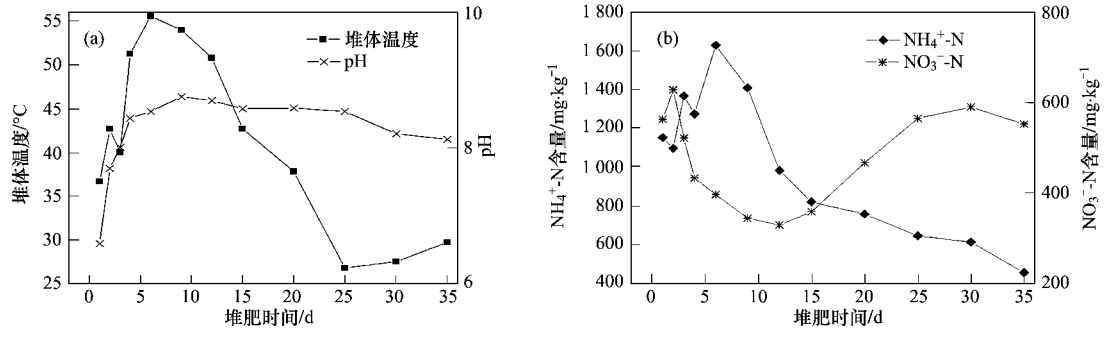
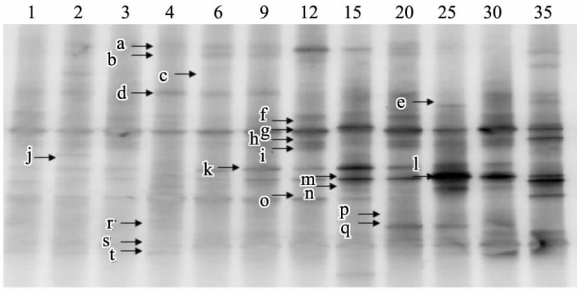


图 1　堆肥过程中理化参数的变化

Fig. 1　Changes of physic-chemical parameters during composting process

堆肥过程中不同时期 AOB 种群结构的 DGGE 分析结果如图 2 所示,其中数字和字母分别代表取样天数和条带编号,每条泳道上不同位置的条带代表着不同的氨氧化细菌种群,条带越多,说明种群越丰富,条带越亮,表示该条带所代表的相应的氨氧化细菌的数量越多[24]. 各时期氨氧化细菌 16S rDNA 序列得到了较好的分离,条带位置清晰,亮度明显. 12 个泳道上共识别出 20 条不同的条带,堆肥前期和高温期样品条带的差异较小,后期相对较高,说明氨氧化细菌的群落结构随着堆肥的进行发生较为明显的变化. 这些变化与温度、pH、氨氮和硝态氮浓度等细菌外界环境因素有着密切的联系[25]. 堆肥的不同阶段存在不同的氨氧化细菌优势种群,如堆肥的高温期主要有 a、b、d、g 和 o,堆肥后期主要有 g、k、m 和 n. 而部分条带(如条带 g)在堆肥过程的不同时期均有出现,说明这些氨氧化细菌对环境条件变化

的适应能力较强,可能在堆肥体系氨氮的氧化过程中发挥着重要的作用. 选择优势条带 d、g 和 l [图 2]进行切胶测序,将测序结果在 NCBI 网站中进行比对,比对结果见表 1. 根据同源性分析结果,并结合上述讨论可发现, *Nitrosospira* 和 *Nitrosomonas* 为堆肥中 AOB 的优势种属,其中 *Nitrosomonas* 存在于整个堆肥过程中,是耐受性较强的种属.



数字和字母分别代表取样天数和条带编号,下同

图 **2** 堆肥样品氨氧化细菌的 **DGGE** 图谱

Fig. 2 DGGE profiles of each composting sample

表 **1** 样品克隆测序序列的种属关系

Table 1 Phylogenetic relationship of different clone sequences

编号	GenBank 接受号	物种名	同源性/%
d	NC 007614.1	*Nitrosospira multiformis* ATCC 25196	98
g	NC 008344.1	*Nitrosomonas eutropha* C91	94
l	NC 004757.1	*Nitrosomonas eutropaea* ATCC 19718	100

2.3 多样性指数分析

不同时期 AOB 群落的 Shannon-Weaver 指数分布如图 3 所示. 从中可以看出,AOB 种群多样性在堆肥的不同时段存在一定差异性,整体呈下降趋势. 氨氧化细菌是严格的好氧自养型细菌,堆肥初期由于有机物含量相对比较丰富,氨氧化细菌生长良好. 随着堆肥过程的进行,堆体温度逐渐升高,不同种属的氨氧化细菌对环境因子的敏感程度不同[26],对高温耐受性较强的种属得以保留,耐受性差的种属活性降低甚至被淘汰,种群的多样性"减少". 在堆肥二次发酵阶段,温度下降,受高温影响活性降低的种属又表现出一定的活性. 然而随着作为电子供体的 NH_4^+ 浓度降低,易分解的有机物大部分分解,只剩下部分较难分解的有机物和新形成的腐殖质,微生物的活性整体下降[27].

2.4 环境因子对氨氧化细菌群落结构的影响

对堆肥过程中 AOB 群落与环境因子进行冗余分析,2 个种群排序轴近似垂直,相关系数为 -0.064 8, 2 个环境排序轴的相关系数为 0,说明排

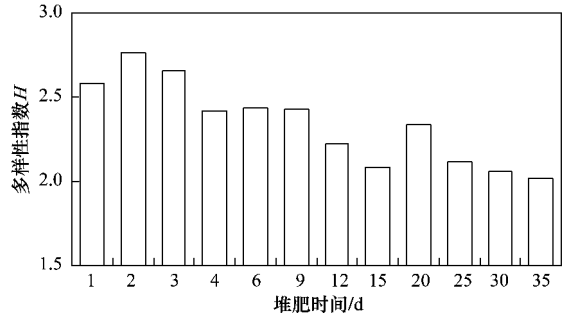


图 **3** 堆肥过程中氨氧化细菌多样性指数分布图

Fig. 3 Diversity index of AOB community during the composting process

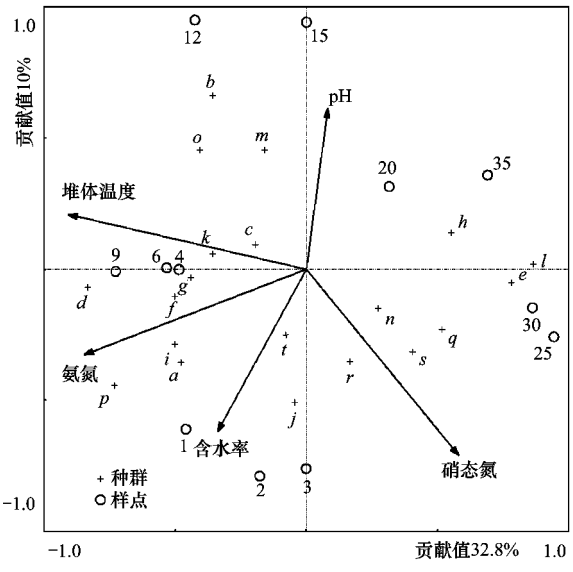
序轴与环境因子间线性结合的程度较好地反映了物种与环境之间的关系,排序的结果是可靠的[28]. 冗余分析结果见表 2,前 2 个排序轴分别解释了 32.8% 和 10.0% 的氨氧化细菌种群变化,分别对应 55.6% 和 17.0% 的氨氧化细菌种群与堆肥环境因子之间的关系, 4 个排序轴共解释了 55.8% 的氨氧化细菌变化和 94.7% 的种群-环境因子的关系. 所选的 5 个环境因子解释了 58.9% 的总特征值,说明这些环境因子对堆肥过程中氨氧化细菌群落结构的演替有着重要的影响.

表 **2** 氨氧化细菌与环境因子的 **RDA** 排序结果

Table 2 Redundancy analysis results of ammonia-oxidizing bacteria species and environmental parameters

结果	排序轴 1	排序轴 2	排序轴 3	排序轴 4
特征值	0.328	0.100	0.085	0.044
种群-环境因子相关系数	0.958	0.833	0.894	0.899
种群数据变化累积百分比/%	32.8	42.8	51.3	55.8
种群-环境因子关系变化的累积百分比/%	55.6	72.6	87.2	94.7
特征值总和			1	
典范特征值总和			0.589	

图 4 为堆肥过程中氨氧化细菌种群变化与环境因子关系的 RDA 二维排序图,带箭头的矢量线表示环境因子,线段的长短表示种群与该环境因子相关系数的大小,箭头连线与排序轴的夹角表示该因子与排序轴相关性的大小,夹角越小,相关性越大. 硝态氮、氨氮和堆体温度的连线较长,说明在堆肥过程中这些因素与氨氧化细菌种群的结构相关性较大,基于手动选择的 RDA 分析结果也表明这 3 种环境因子对氨氧化细菌群落结构的演替影响显著($P < 0.05$),其中堆体温度和氨氮更是达到了极显著水



数字和字母分别代表取样天数和条带编号

图 **4**　氨氧化细菌种群变化与环境因子关系的 **RDA** 二维排序图

Fig. 4　RDA biplot of AOB community and environmental variables during composting

平($P < 0.01$). 这与文献[29, 30]对类似堆肥体系中细菌群落结构变化与过程因子之间关系的研究结果相符. 图 4 中样点与样点之间距离的长短可反应出两者氨氧化细菌群落结构之间的差异性,长度越短,表示差异越小[20]. 由此可知,氨氧化细菌的群落结构在高温期前期(4 ~ 9 d)变化较小,而在高温期后期(9 ~ 12 d)特别是降温期(12 ~ 25 d)演替尤为剧烈.

温度能够影响微生物的生长速度、酶反应动力学以及化合物的溶解度等,从而对堆肥体系中氨氧化细菌种群结构产生影响[1]. 不同的氨氧化细菌种属对温度的适应情况不同,经过高温期的筛选,能够耐高温的种属得到保留. 本实验堆肥体系中氨氧化细菌群落结构在高温期并未发生剧烈的演替,说明 AOB 与其他硝化细菌不同,部分种属能够耐受高温. Yamamoto 等[25]的研究也表明,AOB 是堆肥高温期唯一存在的硝化微生物. 水溶性氨氮和硝态氮是微生物活性、堆体温度、通风状况等联合作用的结果,同时,也对氨氧化细菌和堆肥状况产生影响. 因此,两者对 AOB 群落结构的演替影响显著. 铵作为氨氧化细菌的间接底物,其浓度与 AOB 的数量和种类有直接关系[31]. Burrell 等[26]的研究表明,不同铵浓度的氨氧化菌富集培养物样品中检测出不同的氨氧化菌种属. 本实验结果表明氨氮对 AOB 群落结构的演替达到极显著水平.

水分提供了包括氨氧化细菌在内的堆肥基质中微生物生理活动所需营养物质的溶解和传输场所,甚至有研究表明,它对微生物活性的影响较堆体温度更大[32]. pH 通过影响酶的活性来影响微生物的生长,是微生物的种群结构的重要影响因素. 但在本堆肥体系中,氨氧化细菌的种群与含水率和 pH 的对应关系并未达到显著水平($P > 0.05$). 这可能是本农业废物堆肥体系含水率和 pH 波动较小,未产生显著性的影响.

3　结论

(1) 在农业废物堆肥过程中,随着堆肥化的进行,AOB 群落的多样性整体呈下降趋势. AOB 群落结构在高温期前期(4 ~ 9 d)变化较小,而在高温期后期(9 ~ 12 d)特别是降温期(12 ~ 25 d)演替尤为剧烈.

(2) *Nitrosospira* 和 *Nitrosomonas* 为堆肥中 AOB 的优势种属,其中 *Nitrosomonas* 存在于整个堆肥过程中,是耐受性较强的种属,在堆肥体系氨氮的氧化过程中发挥着重要的作用. 对其进行更深入的研究将显得十分必要.

(3) 对农业废物好氧堆肥过程中氨氧化细菌群落与环境因子的冗余分析结果表明,堆体温度、NH_4^+-N 和 NO_3^--N 对演替有着显著的影响($P < 0.05$),前 2 个因子更是达到了极显著水平($P < 0.01$). 这些参数的有效控制对农业废物好氧堆肥过程中氨氧化细菌活性的调控具有重要的意义.

(4) 以冗余分析为代表的多元梯度分析方法能够独立保持各个环境因子对生物群落变化的贡献率. 将其与 PCR-DGGE 技术相结合,应用于堆肥体系,可以更加直观地揭示微生物群落的多样性以及物种与环境间的复杂关系,为开展同类工作提供了方法和思路.

参考文献:

[1] 曾光明,黄国和,袁兴中,等. 堆肥环境生物与控制[M]. 北京:科学出版社, 2006.

[2] Jetten M S M, Wagner M, Fuerst J, *et al*. Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation ('anammox') process [J]. Environmental Biotechnology, 2001, **12**(2): 283-288.

[3] Chu H, Fujii T, Morimoto S, *et al*. Community structure of ammonia-oxidizing bacteria under long-term application of mineral fertilizer and organic manure in a sandy loam soil [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, **73**(2): 485-491.

[4] Freitag T E, Chang L, Prosser J I, *et al*. Changes in the community

structure and activity of betaproteobacterial ammonia-oxidizing sediment bacteria along a freshwater-marine gradient [J]. Environmental Microbiology, 2006, **8**(4): 684-696.

[5] Akarsubasi A T, Eyice O, Miskin I, *et al*. Effect of sludge age on the bacterial diversity of bench scale sequencing batch reactors [J]. Environmental Science and Technology, 2009, **43**(8): 2950-2956.

[6] Shimaya C, Hashimoto T. Improvement of media for thermophilic ammonia-oxidizing bacteria in compost [J]. Soil Science and Plant Nutrition, 2008, **54**(4): 529-533.

[7] Bano N, Hollibaugh J T. Diversity and distribution of DNA sequences with affinity to ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class *Proteobacteria* in the Arctic Ocean [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, **66**(5): 1960-1969.

[8] Ivanova I A, Stephen J R, Chang Y J, *et al*. A survey of 16S rRNA and *amoA* genes related to autotrophic ammonia-oxidizing bacteria of the beta-subdivision of the class *Proteobacteria* in contaminated groundwater [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2000, **46**(11): 1012-1020.

[9] Nicolaisen M H, Ramsing N B. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria [J]. Journal of Microbiological Methods, 2002, **50**(2): 189-203.

[10] Oved T, Shaviv A, Goldrath T, *et al*. Influence of effluent irrigation on community composition and function of ammonia-oxidizing bacteria in soil [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, **67**(8): 3426-3433.

[11] Freitag T E, Prosser J I. Community structure of ammonia-oxidizing bacteria within anoxic marine sediments [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, **69**(3): 1359-1371.

[12] 于健, 杨敏, 齐嵘, 等. 城市污水处理系统中氨氧化细菌种群结构研究[J]. 环境科学学报, 2009, **29**(3): 521-526.

[13] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1997.

[14] 杨恋, 杨朝晖, 曾光明, 等. 好氧堆肥高温期的嗜热真菌和嗜热放线菌群落结构[J]. 环境科学学报, **28**(12): 2514-2521.

[15] 杨朝晖, 肖勇, 曾光明, 等. 用于分子生态学研究的堆肥 DNA 提取方法[J]. 环境科学, 2006, **27**(8): 1613-1617.

[16] Kowalchuk G A, Stephen J R, Boer W D, *et al*. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class *Proteobacteria* in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, **63**(4): 1489-1497.

[17] Innerebner G, Knapp B, Vasara T, *et al*. Traceability of ammonia-oxidizing bacteria in compost-treated soils [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2006, **38**(5): 1092-1100.

[18] Li A J, Yang S F, Li X Y, *et al*. Microbial population dynamics during aerobic sludge granulation at different organic loading rates [J]. Water Research, 2008, **42**(13): 3552-3560.

[19] Wei D, Yang Q, Zhang J Z, *et al*. Bacterial community structure and diversity in a black soil as affected by long-term fertilization [J]. Pedosphere, 2008, **18**(5): 582-592.

[20] Lepš J, Šmilauer P. Multivariate Analysis of Ecological Data using CANOCO [M]. UK, Cambridge, Cambridge University Press, 2003.

[21] Gilbride K A, Frigon D, Cesnik A, *et al*. Effect of chemical and physical parameters on a pulp mill biotreatment bacterial community[J]. Water Research, 2006, **40**(4): 775-787.

[22] 张相锋, 王洪涛, 周辉宇, 等. 花卉废物和牛粪联合堆肥中的氮迁移[J]. 环境科学, 2003, **24**(3): 126-131.

[23] 逯延军, 吴星五. 城市生活垃圾和污泥混合堆肥中氮素变化规律研究[J]. 环境污染与防治, 2008, **30**(2): 56-63.

[24] Konstantinov S R, Zhu W Y, Williams B A, *et al*. Effect of fermentable carbohydrates on piglet faecal bacterial communities as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2003, **43**(2): 225-235.

[25] Yamamoto N, Otawa K, Nakai Y. Diversity and abundance of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea during cattle manure composting [J]. Microbial Ecology, 2010, **60**(4): 807-815.

[26] Burrell P C, Phalen C M, Hovanec T A. Identification of bacteria responsible for ammonia oxidation in freshwater aquaria [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, **67**(12): 5791-5800.

[27] 宁平. 固体废物处理与处置[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007.

[28] Ter Braak C J F. Canonical correspondence analysis: a new eigenvector method for multivariate direct gradient analysis [J]. Ecology, 1986, **67**(5): 1167-1179.

[29] 张嘉超, 曾光明, 喻曼, 等. 农业废物好氧堆肥过程因子对细菌群落结构的影响[J]. 环境科学学报, 2010, **30**(5): 1002-1010.

[30] Zhang J C, Zeng G M, Chen Y N, *et al*. Effects of physico-chemical parameters on the bacterial and fungal communities during agricultural waste composting [J]. Bioresource Technology, 2011, **102**(3): 2950-2956.

[31] 董莲华, 杨金水, 袁红莉. 氨氧化细菌的分子生态学研究进展[J]. 应用生态学报, 2008, **19**(6): 1381-1388.

[32] Liang C, Das K C, McClendon R W. The influence of temperature and moisture contents regimes on the aerobic microbial activity of a biosolids composting blend [J]. Bioresource Technology, 2003, **86**(2): 131-137.