

鸡粪锯末好氧堆肥过程中硝化细菌动态变化

陈雅娟 霍培书 韩卉 李季*

(中国农业大学 资源与环境学院,北京 100193)

摘要 用鸡粪与锯末为原料进行高温好氧堆肥试验,研究不同初始含水率及堆肥方式下鸡粪锯末堆肥中铵态氮及硝化细菌动态变化,以期减少堆肥过程中氮素的损失,为优化堆肥提供理论依据。结果表明:1)硝化细菌存在于整个堆肥过程,且在堆肥腐熟期硝化细菌群落结构均发生了较大的变化。2)铵态氮浓度与硝化细菌群落物种丰富度与稳定性有关,可能是铵态氮会诱发硝化细菌生长。3)含水率是导致硝化细菌群落结构变化的关键因素。4)通过分析 T-RF150、169 和 343 bp 对堆肥环境的适应性较强,且多数属于是不可培养的细菌菌属。5)通过分析可知 T3 处理有助于硝化细菌群落生长与稳定。

关键词 鸡粪; 堆肥; 铵态氮; 硝化细菌

中图分类号 X 705

文章编号 1007-4333(2014)02-0100-08

文献标志码 A

Dynamic change of nitrifying bacteria in chicken manure sawdust aerobic composting process

CHEN Ya-juan, HUO Pei-shu, HAN Hui, LI Ji*

(College of Resources and Environmental Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract High-temperature aerobic composting was conducted with chicken manure and sawdust as materials. The aim was to study the effect of different initial moistures and composting on ammonium nitrogen and nitrifying bacteria dynamic changes. The results showed that nitrifying bacteria existed among the entire composting process. The community structure of nitrifying bacteria greatly changed at the compost maturity stage. The concentration of ammonium nitrogen was related to nitrifying bacteria species richness and their stability. Ammonium nitrogen might induce in the growth of nitrifying bacteria. The moisture content of the compost was the key factor leading the change of nitrifying bacteria community structure. The data of T-RF150, 169 and 343 bp showed the strong adaptability, in which most belonged to the genus and unculturable bacteria. The T3 treatment was benefit to the growth and stability of nitrifying bacteria community.

Key words chicken manure; composting; $\text{NH}_4^+\text{-N}$; nitrifying bacteria

随着社会经济、人口和收入的不断增加及城市的加速发展,传统养殖方式很难满足人们的生活需求,因而传统养殖方式向着规模化、集约化的方向发展^[1]。家禽粪便的排放量也逐年增加,根据畜禽养殖相关资料的统计,我国 2002、2003、2009 和 2010

年的畜禽粪便排放量粪便为 27.5、31.9、32.6 和 40.3 亿 $\text{t}^{[2]}$,呈逐年上升的趋势,预计到 2015 年将达到 60 亿 $\text{t}^{[3]}$ 。畜禽粪便对我国农业面源、点源氮元素方面的污染已达到 23%,严重污染生态环境^[4]。如何解决和处理这些有机废弃物已成为环境

收稿日期:2013-05-13

基金项目:农业废弃物高效循环利用关键技术研究(2012BAD14Ba);2008 粤港关键领域重点突破项目(2009205200031);广东省 2008 年省部产学研结合项目(2008A090400001);农业部公益性行业科研专项(200803033) Chinese University Scientific Fund (2009TD15);吉林省科技发展计划项目(20115030)

第一作者:陈雅娟,硕士研究生,Email:yaya576@126.com

通讯作者:李季,教授,主要从事生态工程与废弃物利用研究,Email:liji@cau.edu.cn

科学研究者面临的重大难题与紧急问题。微生物生化好氧堆肥处理是对禽畜粪便进行处理的最佳方式之一,堆肥过程中的微生物可降解粪便中的有机质,同时可利用生物热杀灭堆肥中虫卵和病菌等有毒有害物质^[5-6],堆肥过程也是微生物群落生长与演替的动态过程,微生物群落随着堆肥的进程而发生变化^[7]。本研究通过 T-RFLP 分子生物学技术的应用检测堆肥腐熟过程中的硝化细菌同时研究堆肥过程中铵态氮变化规律,通过分析研究硝化细菌群落在堆肥过程中的动态变化规律,以期减少堆肥过程中氮素的损失,为优化堆肥提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 装 置

堆肥反应器(沃土公司提供)包有保温作用外壁以保证堆肥的快速升温 and 温度保持;反应器罐体内配有 3 个呈 120°夹角的搅拌桨,且等距离分布在搅拌轴上以便堆肥的自动翻堆;同时反应器配备通风

和排风系统以保证堆肥的供氧需求。堆肥反应器的反应室容积为 100 L,其工作电压为 AC 380 V±10% 50 Hz,搅拌转速为 6.4 r/min 图 1。

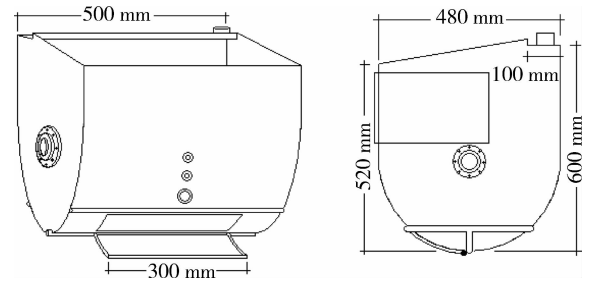


图 1 堆肥反应器反应示意图

Fig. 1 Schematic drawing of compost reaction diagram

1.2 试 验 材 料

以新鲜鸡粪和锯末为堆肥基本原料,其中新鲜鸡粪取自中国农业大学动物科技学院养鸡场,锯末取自北京市海淀区上庄木器厂。物料的基本性质见表 1。

表 1 堆肥原料的基本性质

Table 1 Properties of composting materials

堆肥原料	总碳/%	全氮/%	C/N	含水率/%
Composting materials	Total carbon	Total nitrogen	Carbon nitrogen ratio	Moisture content
鸡粪 Chicken manure	24.37	4.22	5.77	69.51
锯末 Sawdust	37.82	1.81	20.90	37.36

1.3 试 验 方 案

供氧量对堆肥过程中硝化作用的影响很大,但在不同处理堆肥堆制进程中供氧量不容易控制,而堆肥的通风、搅拌及含水率与堆肥的溶氧浓度有关,因此可通过调节堆肥的初始含水率、通风及搅拌方式来间接的调控堆肥的供氧量从而研究不同处理下堆肥进程中铵态氮变化规律及硝化细菌的变化^[8-10]。在堆肥发酵前,参照堆肥物料性质,按一定的比例调节堆肥物料的 C/N 比在 22~37,充分混合均匀后,分别装入发酵反应器中,共设置 5 个处理,分别为 T1 处理:初始含水率=60%,通风加搅拌;T2 处理:初始含水率=65%,通风加搅拌;T3 处理:初始含水率=70%,通风加搅拌;T4 处理:初始含水率=65%,只通风;T5 处理:初始含水率=65%,只搅拌。每个处理重复 3 次,堆肥周期设定为 45 d,每 3 天搅拌 1 次,5 个处理的设置如表 2 所示。

从堆肥开始每 3 d 取样 1 次到堆肥第 45 天结束时,每个处理分别取了 16 次样。

1.4 铵态氮测定及 T-RFLP 技术

氨氮的测定采用氯化钾浸提-靛酚蓝比色法^[11],硝化细菌的分析采用 T-RFLP 技术^[12-15]。末端标记限制性片段长度多态性(T-RFLP)是基于 PCR 的基础上利用荧光标记技术和 DNA 限制性酶切技术通过检测 DNA 片段长度多样性来分析微生物群落组成的方法。虽然 T-RFLP 技术有其自身的缺陷,即对群落的多样性低估,但对于分析堆肥复杂环境微生物群落来说,T-RFLP 可以检测到堆肥中所有的菌,包括活菌(可培养的和不可培养的)和未降解的死菌,试验结果数据输出快速具有直接的参考意义,且与 DGGE 相比具有更高的灵敏度,是一种研究堆肥微生物群落的理想分析对比方法^[16]。

表2 不同处理下堆肥的试验方案

Table 2 Different Treatments of Compost Experimental Program

处理 Treatment	堆肥原料 Composting materials	初始含水率/%(预期值/实际值) Initial moisture content (Expected value / actual value)	堆肥方式 Composting	通风时间/(min/h) Ventilation time	通风量/ (m ³ /(min·m ³)) Ventilation rate
1	鸡粪+锯末	60/61.72	通风+搅拌	2	0.03
2	鸡粪+锯末	65/65.48	通风+搅拌	2	0.03
3	鸡粪+锯末	70/69.49	通风+搅拌	2	0.03
4	鸡粪+锯末	65/65.48	只通风	2	0.03
5	鸡粪+锯末	65/65.48	只搅拌	0	0

1.5 堆肥样品总 DNA 的提取

如 1.3 所述取样后于一 70 °C 保存待用。DNA 的提取使用天根生化科技(北京)有限公司的粪便基因组提取试剂盒。

1.6 硝化细菌 amoA 基因 PCR 扩增及 PCR 产物纯化

利用硝化细菌中的 amoA 基因来研究硝化细菌在堆肥过程中的动态变化过程,通过文献的查阅与 Primer5 软件的使用,本研究使用 amoA-1F, amoA-2R 这对引物^[17]。其中正向引物 amoA-1F 的 5' 端修饰为 5'-Cy5(5-羧基荧光素染料,上海生工生物工程技术有限公司),引物序列:

正向引物序列 amoA-1F5'-Cy5 标记(5' to 3'): 5'-GGGGTTTCTACTGGTGGT

反向引物序列 amoA-2R (5' to 3'): 5'-CCTCKGSAAAGCCTTCTTC [K=G or T; S=G or C]

扩增条件为:94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 60 s, 60 °C 退火 90 s, 72 °C 延伸 90 s, 35 个循环; 60 °C 退火 90 s, 72 °C 延伸, 10 min。4 °C 保存^[17]。

反应体系:2×Golden TapMix 12.5 μL, amoA-1F 1 μL, amoA-2R 1 μL, DNA 基因组模板 0.2 μL, ddH₂O 补足 25 μL。

硝化细菌 PCR 产物采用 DNA 纯化试剂盒(Omega)纯化,纯化步骤见说明书。纯化后制备 0.8% 琼脂糖凝胶并用凝胶成像仪来检查硝化细菌 PCR 及纯化后的目的基因。

1.7 堆肥样品中硝化细菌目的基因酶切

将纯化后的目的基因用 *Hha* I (TaKaLa) 内切

酶进行限制性酶切反应,反应体系:10 μL PCR 产物, 5 μL 10×buffer, 2.5 μL *Hha* I 内切酶, ddH₂O 补足 50 μL。在 37 °C 的条件下,在 PCR 仪中酶切 40 min。将所得酶切产物进行处理后,在 DNA 测序仪(ABI 3730 DNA Analyzer, 美国)上进行毛细管电泳检测(北京基诺莱普生物技术有限公司)。

2 结果与分析

2.1 总 DNA 提取

DNA 提取完成后制备 0.8% 琼脂糖凝胶,使用 GV(Gold view)染色,跑胶后用凝胶成像仪来检查 DNA 的提取结果(图 2)。总 DNA 长度为 23 kbp 左右,经检测其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值均在 1.7 左右, DNA 纯度均较高,说明 DNA 提取结果可用于后续试验的进行。

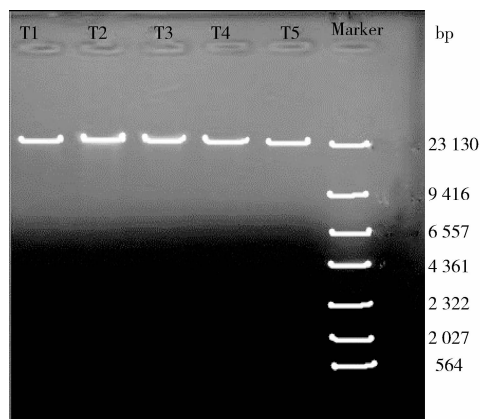


图2 堆肥样品总 DNA 电泳照片

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of total DNA from composting samples

2.2 硝化细菌 amoA 目的基因 PCR

如图 3 所示硝化细菌 amoA 目的基因 PCR 扩增后,制备 0.8%琼脂糖凝胶,使用 GV(Gold view)染色,跑胶后用凝胶成像仪来检查其 PCR 扩增结

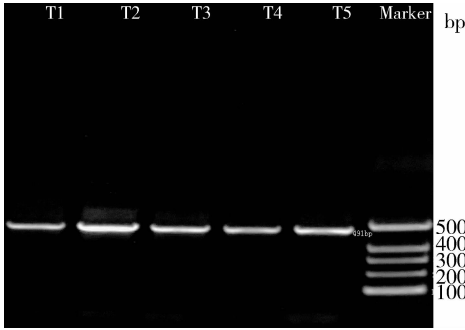


图 3 硝化菌 PCR 产物的电泳照片

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of PCR products of nitrifying bacteria

果。使用 amoA-1F,amoA-2R 这对引物进行扩增后 amoA 目的基因的片段长度约为 491 bp。

2.3 堆肥过程中铵态氮的变化

堆肥过程中水溶性 NH₄⁺-N 会在硝化作用下转化为 NO₃⁻-N 而减少,因此通过研究堆肥过程中铵态氮的变化 NH₄⁺-N 间接反应堆肥中的硝化作用。如图 4 所示,堆肥开始时,T1~T5 处理的 NH₄⁺-N 浓度迅速增加,是因为在氨化作用下含氮有机物被降解转化为水溶性 NH₄⁺-N,T1~T5 处理 NH₄⁺-N 浓度达到峰值时间分别为第 9、15、18、12 和 18 天,随后 NH₄⁺-N 浓度开始下降。堆肥结束时,T1~T5 处理铵态氮的含量分别是 0.963 9、1.312 4、0.959 5、1.491 4 和 1.391 8 g/kg,其中 T4 处理的 NH₄⁺-N 浓度较其他处理的 NH₄⁺-N 浓度高,这和 T4 只通风不搅拌有关。

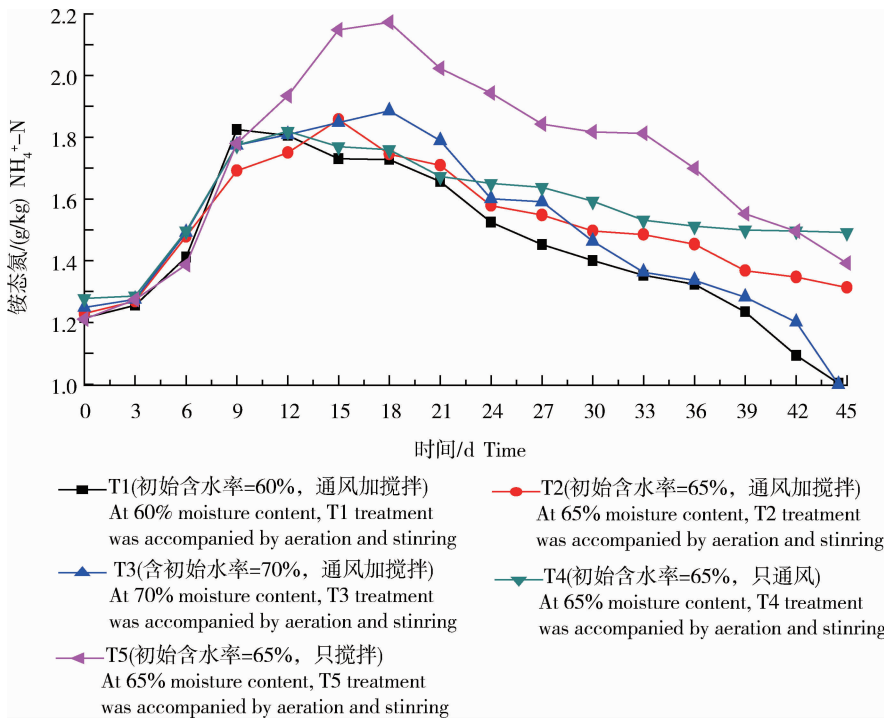


图 4 堆肥过程中铵态氮的变化

Fig. 4 Changes of NH₄⁺-N during composting

2.4 堆肥中硝化细菌群落的聚类分析

对 T1~T5 处理分别的 16 次取样样品的硝化细菌群落采用 T-RLFP 技术来检测其在堆肥过程中的动态变化,采样时间和采样方法同 1.3 所述于堆肥第 0 天取样每 3 d 取样 1 次,每个处理取 16 次取样。使用 SPSS 18.0 对每个处理的 16 次样品的硝化细菌群落做聚类分析。

如图 5 所示 T1 处理第 9 和 16 次取样与其余 14 次取样的距离较远,表明第 9 和 16 次取样硝化细菌群落发生了较大的变化。同样 T2 处理第 4、14 和 16 次取样硝化细菌群落发生了较大的变化。T3 处理第 1、13 和 14 次取样硝化细菌群落结构发生了较大的变化。T4 处理第 12 次取样硝化细菌群落结构发生了较大的变化。T5 处理第 13 次取样硝化细

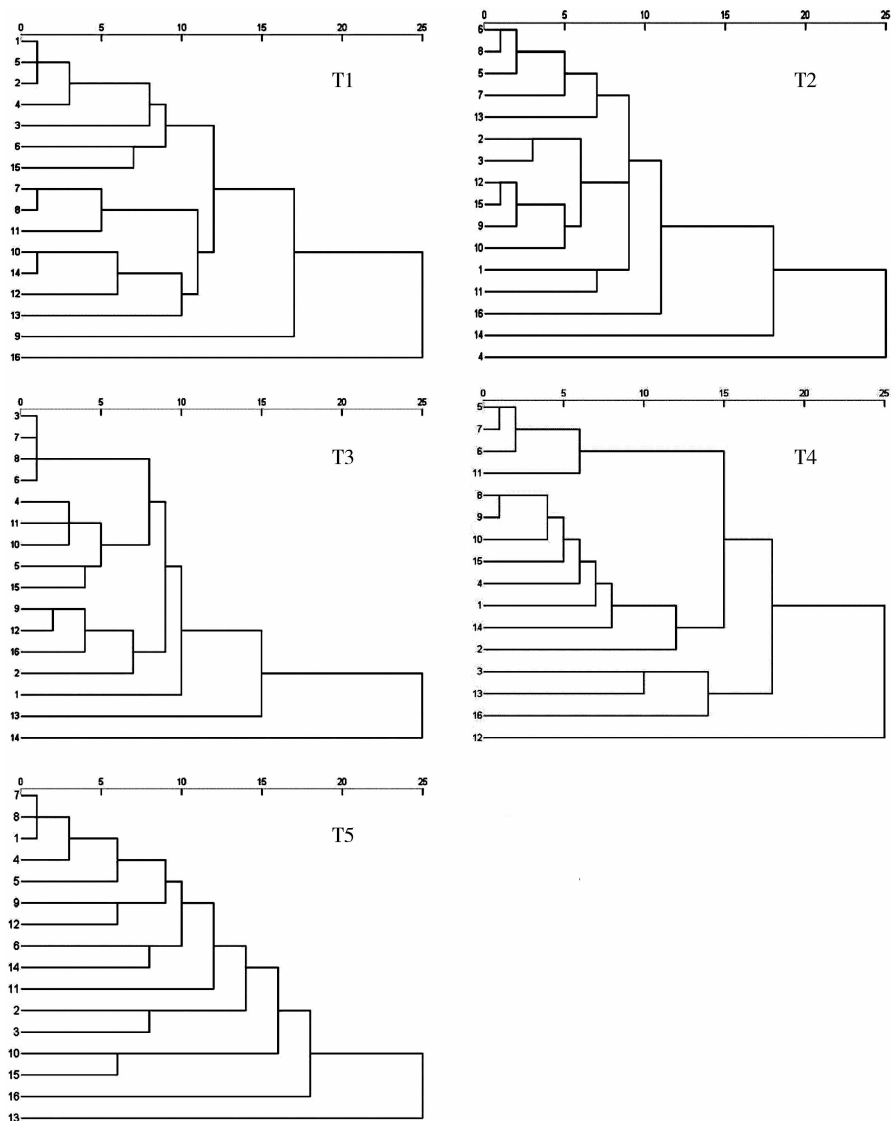


图5 基于 T-RFLP 图谱的硝化细菌群落聚类分析

Fig. 5 Dendrogram of hierarchical cluster analysis based on the T-RFLP profiles of nitrifying bacteria communities

菌群落结构发生了较大的变化。

2.5 堆肥中硝化细菌群落的多样性指数

通过 GeneMarker 对 T-RFLP 图谱进行分析可得到硝化细菌群落限制性片段大小及相对含量的相关信息,并利用这些信息来计算香依-威多样性指数^[18]。

H (香依-威纳多样性指数 Shannon-Weiner):
 $H = -\sum p_i \ln p_i$ (p_i 表示第 i 个峰的峰面积占 T-RFLP 图谱中所有峰总面积的比例)。此数值表明了堆肥样品中硝化细菌物种总数与各物种的分布情形,香依-威纳多样性指数值越大说明堆肥样品中硝化细菌群落的物种越丰富且越趋于稳定。

通过计算 T1~T5 处理的多样性指数选出 T1~T5 每个堆肥处理过程中的最优的硝化细菌群落结构来进一步分析。由表 3 可知 T1~T5 各处理 H 指数的最大值分别为 7、12、16、15 和 14 次取样,说明 T1~T5 各处理硝化细菌群落的物种最丰富也最趋于稳定分别是 7、12、16、15 和 14 次取样。因此在 T1~T5 个处理中选 7、12、16、15 和 14 次取样的硝化细菌群落作为最优硝化细菌群落结构来进行 CCA 分析。

2.6 T1~T5 处理中最优硝化细菌群落 T-RFLP 图谱

如图 6 所示, T-RFs150 bp 是 T2、T3 和 T4 所

共有的, T-RFs169 bp 为 T1、T2、T3 和 T4 所共有, T-RFs177 bp 为 T3 和 T5 所共有, T-RFs179、198、218、238、259 和 280 bp 为 T2 和 T4 所共有, T-RFs249、271 和 292 bp 为 T1 和 T5 所共有, T-RFs343 bp 为 T2、T3 和 T4 所共有, T-RFs383、425

和 469 bp 为 T3 和 T4 所共有。其中 T-RFs150、169 和 343 bp 是 3 个处理的共有, 可知 T-RFs150、169 和 343 bp 对复杂堆肥环境适应性较强, 利用 Mica III: T-RFLP Analysis (<http://mica. ibest. uidaho. edu/>) 在线工具分析。

表 3 T1~T5 各处理硝化细菌香依-威纳多样性指数

Table 3 Diversity indexes of the nitrifying bacteria at T1-T5 treatment

取样次数 Sampling number	T1	T2	T3	T4	T5
1	2.45	2.29	2.14	2.54	2.55
2	2.39	2.69	2.47	2.31	2.64
3	2.31	2.55	2.55	2.23	2.62
4	2.52	1.08	2.38	2.54	2.54
5	2.50	2.58	2.69	2.69	2.55
6	2.47	2.62	2.62	2.55	2.69
7	2.55	2.55	2.55	2.63	2.55
8	2.53	2.55	2.54	2.39	2.63
9	1.90	2.55	2.63	2.55	2.38
10	2.39	2.46	2.55	2.39	2.21
11	2.52	2.49	2.85	2.69	2.35
12	2.17	2.73	2.60	2.03	2.65
13	2.29	2.27	2.07	2.25	1.84
14	2.59	1.81	1.11	2.59	2.88
15	2.29	2.55	2.39	2.74	2.10
16	1.42	2.06	2.72	2.26	1.91

注:表中取样次数 1~16 标号是指堆肥从开始到堆肥第 45 天结束每 3 d 去一次样, 共取 16 次样, 表中的数值是香依-威纳多样性指数数值

Note: Sampling number 1-16 in the table refers to 16 samples which were taken from 0 day at start of the composting to 45 day at the end of the composting, and sampled once every three days. The values in the table is the Shannon-Wiener diversity index numerical

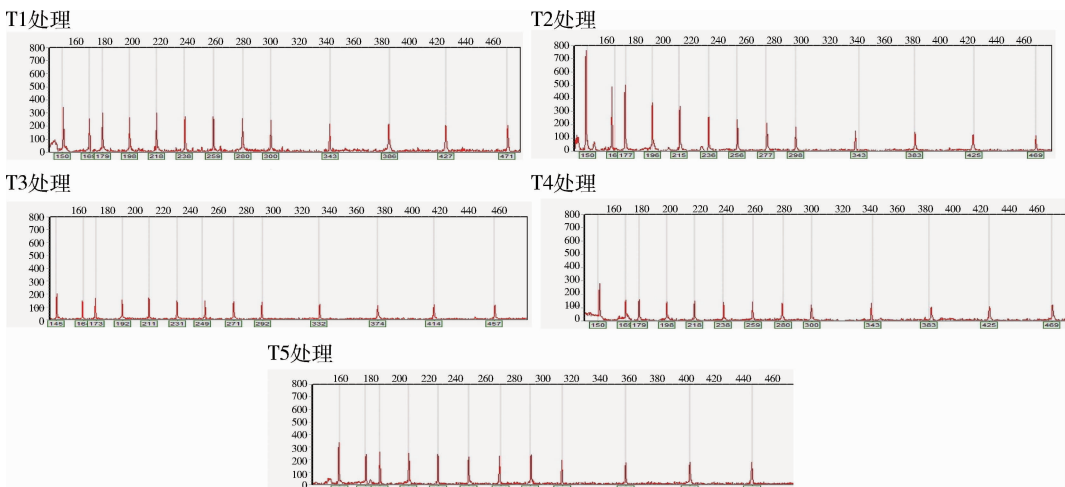


图 6 硝化细菌 T-RFLP 图谱

Fig. 6 T-RFLP patterns of Nitrifying bacteria

2.7 堆肥中硝化细菌群落的 CCA 分析

典型对应分析 (Canonical correspondence analysis, CCA) 可以结合多个环境因子分析堆肥中硝化细菌群落与环境之间的关系, 从而研究堆肥中硝化细菌群落对堆肥复杂环境的适应性。本研究用 Canoco for Windows 4.5 软件结合堆肥的理化指标^[19-22]包括温度、含水率、pH、全碳、全氮、C/N、硝态氮、铵态氮和 T1~T5 处理的最优硝化细菌群落 (如 2.3 所述, T1 处理的第 7 次取样、T2 处理的第 12 次取样、T3 处理的第 11 次取样、T4 的第 15 次

取样、T5 的第 14 次取样) 及 T1~T5 处理最优硝化细菌群落中共有硝化细菌 T-RFs (如 2.4 所述) 进行 CCA 分析。如图 7 所示堆肥理化因子用带箭头的线段表示, 箭头所处的象限表示环境因子与排序轴之间的正负相关性, 从某一处理做理化因子箭头线的垂线, 其相交点离箭头越近, 表示该处理与该理化因子正相关性越大, 说明个环境因子对这一处理的硝化细菌群落影响越大。箭头连线与排序轴的夹角代表这某个环境因子与排序轴的相关性大小, 夹角越小, 相关性越高。

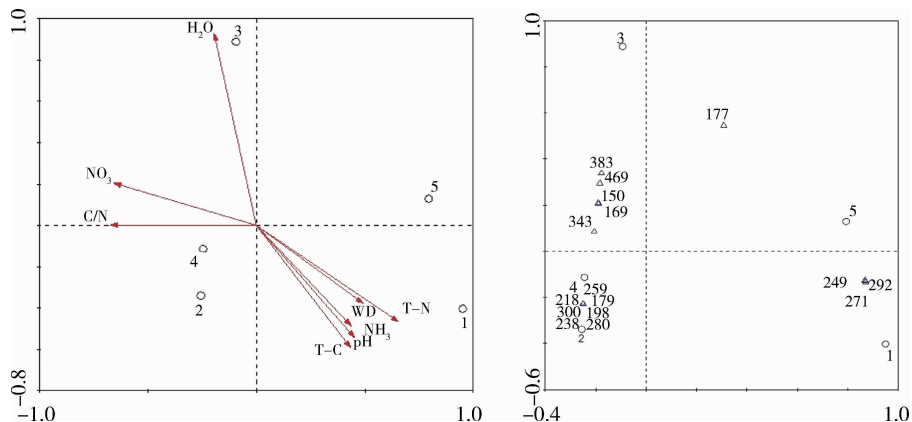


图 7 硝化细菌群落与环境因子的典型对应分析 (CCA)

Fig. 7 Canonical correspondence analysis biplot of the nitrifying bacterial communities in relation to the environmental factors by T-RFLP

如图 7 第一排序轴、第二排序轴解释度分别为 83% 和 62%。与第一轴相关性高的为 C/N (-0.69)、硝态氮 (-0.68)、全氮 (0.63); 与第二轴相关性高的为含水率 (0.92)。T1 (0.98)、T4 (-0.43) 和 T5 (0.82) 处理和第一轴相关性高, T3 (0.90)、T2 (-0.38) 和第二轴相关性高。由图可知 C/N 和硝态氮对 T2 和 T4 处理硝化细菌的分布有较大影响且 T2 与 T4 的共有 T-RFs 较多; 含水率对 T3 处理硝化细菌的分布有较大影响且 T3 处理与其他处理的共有 T-RFs 较少; 全氮对 T1、T5 处理硝化细菌群落结构影响大且 T1 和 T5 之间的共有 T-RFs 较多。综上所述, 全碳、C/N、硝态氮对硝化细菌群落结构稳定有重要的作用, 含水率将导致硝化细菌群落组成种类发生变, 在 T1~T5 处理中 T3 处理的含水率最大而 T3 处理与其他处里的共有 T-RFs 最少, 说明含水率是影响硝化细菌群落组成种类的关键因素。

3 讨论

通过 T-RFLP 分子生物学技术对 T1~T5 处理分别的 16 次样品中硝化细菌群落进行分析得到的实验结果进行分析可知: 在堆肥结束时, 铵态氮浓度为 T4>T5>T3>T2>T1。通过对 T1~T5 处理分别 16 次取样的硝化细菌群落计算其 H 指数平均值, 得知 T1~T5 硝化细菌群落的 H 指数平均值分别为: 2.33、2.36、2.43、2.46 和 2.44, 说明在 T1~T5 处理中硝化细菌群落的物种丰富度与稳定性分别是 T4>T5>T3>T2>T1。在 T1~T5 处理中 T3 处理的含水率最大而 T3 处理与其他处里最优硝化细菌群落的共有 T-RFs 最少。

从含水率梯度变化 (T1~T3 处理) 角度可知初始含水率的提高有利于硝化细菌群落物种丰富度与稳定性的提高; 初始含水率不同, T1~T3 处理堆肥中 T-RFs 片段多样性差异较大。从堆肥方式 (T2、T4 和 T5) 角度可知只通风不搅拌的堆肥方式下硝

化细菌群落物种丰富度与稳定性最高,只搅拌不通风的堆肥方式次之,通风加搅拌的堆肥方式下硝化细菌群落物种丰富度与稳定性最低;且堆肥方式不同对硝化细菌 T-RFs 片段多样性影响较小。

4 结论

1) T1~T5 各处理硝化细菌存在于整个堆肥过程,且后期即堆肥腐熟期硝化细菌群落结构均发生了较大的变化。

2) 铵态氮浓度与硝化细菌群落物种丰富度与稳定性有关,可能是铵态氮会诱发硝化细菌生长。

3) 堆肥含水率是导致硝化细菌群落结构变化的关键因素。

4) T-RF150、169 和 343 bp 对堆肥环境的适应性较强,且多数属于是不可培养的细菌菌属。

5) 综上所述分析比较可知 T3(含水率=70%,通风加搅拌)处理有助于硝化细菌群落生长与稳定。

参 考 文 献

- [1] 张维里,武淑霞,冀宏杰,等. 中国农业面源污染形势估计及控制对策 I: 21 世纪初中国面源污染形势估计[J]. 中国农业科学,2004,35(7):1008-1017
- [2] 伍兵,邓梧森,谭周进,等. 鸡粪堆肥的微生物变化规律研究[J]. 现代生物医学进展,2011,11(15):2858-2861
- [3] 朱兆良,孙波. 中国农业面源污染控制对策[M]. 北京:北京环境出版社,2006
- [4] 钱承梁,鲁如坤. 农田养分再循环研究 III: 粪肥的氮挥发[J]. 土壤,1994,26(4):169-174
- [5] 夏炜林,黄宏坤,杨尧,等. 粪肥高温堆肥及其施用效果研究综述[J]. 四川环境,2007,26(4):102-106
- [6] 赵晨曦,肖波,禹逸君. 畜禽粪便污染和处理技术现状与发展趋势[J]. 湖南农业科学,2003,6:52-55
- [7] 李季,彭生平. 堆肥工程实用手册[M]. 北京:化学工业出版社,2011:11
- [8] 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
- [9] Kapetanios E G, Loizidou M, Valkanas G. Compost production

- from Greek domestic refuse[J]. *Bioresource Technology*,1993,44(1):13-16
- [10] 聂永丰. 三废处理工程技术手册: 固废卷[M]. 北京: 化学工业出版社,2000:225
- [11] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社,2000
- [12] Tovar A, Moreno C, Manuel-Vez M P, et al. Environmental impacts of intensive aquaculture in marine waters[J]. *Water Research*,2000,34(1):334-342
- [13] Poly F, Wertz S, Brothier E, et al. First exploration of Nitrobacteria diversity in soils using functional gene nxrA encoding nitrite oxido-reductase [J]. *FEMS Microbiology Ecology*,2008,63:132-140
- [14] Marsh T L, Liu W T, Forney L J, et al. Beginning a molecular analysis of the eukaryal community in activated sludge [J]. *Wat Sci Tech*,1998,37(4):455-460
- [15] Lüdemann H, Arth I, Liesack W. Spatial changes in the bacterial community structure along a vertical oxygen gradient in flooded paddy soil cores [J]. *Appl Environ Microbiol*,2000,66(2):754-762
- [16] 席劲瑛,胡洪营,钱易. Biolog 方法在环境微生物群落研究中的应用[J]. 微生物学报,2003,43(1):138-141
- [17] Horz H P, Rotthauwe J H, Lukow T, et al. Identification of major subgroups of ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples by T-RFLP analysis of amoA PCR products [J]. *Journal of Microbiological*,2000,39(3):197-204
- [18] Dunbar J, Ticknor L O, Kuske C R. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis [J]. *Appl Environ Microbiol*,2000,66(7):2943-2950
- [19] 贺琪,李国学,张亚宁,等. 高温堆肥过程中的氮素损失及其变化规律[J]. 农业环境科学学报,2005,24(1):169-173
- [20] Meunchang S, Panichsakpatana S, Weaver R W. Co-composting of filter cake and bagasse; by-products from a sugar mill[J]. *Bioresource Technology*,2005,96(4):437-442
- [21] Meijide A, Diez J A, Sanchez-Martin L, et al. Nitrogen oxide emissions from an irrigated maize crop amended with treated pig slurries and composts in a Mediterranean climate [J]. *Agriculture, Ecosystems and Environment*,2007,121(4):383-394
- [22] Cordovil C M S, Cabral F, Coutinho J. Potential mineralization of nitrogen from organic wastes to ryegrass and wheat crops [J]. *Bioresource Technology*,2007,98(17):3265-3268

责任编辑: 王燕华