

# 接种纤维素降解菌对牛粪堆肥微生物群落的影响

刘佳, 李婉, 许修宏\*, 李洪涛

(东北农业大学资源与环境学院, 哈尔滨 150030)

**摘要:**以牛粪和稻草为堆肥原料,利用传统培养法和 PCR-DGGE 技术相结合对接种纤维素降解菌后堆肥的微生物群落的动态变化进行了分析.结果表明,接种菌堆肥与自然堆肥相比,微生物数量的变化趋势快于自然堆肥,接种菌在堆肥初期能够激发微生物增殖,快速启动堆肥发酵,缩短堆肥进程.接种菌堆肥比自然堆肥的 DGGE 凝胶图谱条带的差异性大,接种菌后,加快了微生物群落的演替速度.通过自然堆肥与接种菌堆肥的特异性条带序列比对发现,自然堆肥的前期检测到假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.),高温期包含不动杆菌属 (*Acinetobacter* sp.)、黄杆菌 (*Flavobacteria*) 等细菌;接种菌堆肥高温期检测到 *Arthrobacter* sp. (节杆菌属),在自然堆肥和接种菌堆肥的中后期均检测到了芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.).自然堆肥初期检测到艾美虫科真菌,在自然堆肥和接种菌堆肥的高温阶段均检测到曲霉属和嗜热真菌属为优势菌株,自然堆肥和接种菌堆肥的末期分别检测到子囊菌门 (Ascomycota) 和担子菌类 (Basidiomycetes),而在整个接种菌堆肥化过程,黑曲霉一直存在.接种菌堆肥细菌多样性指数高于自然堆肥,真菌多样性指数均低于自然堆肥.通过接种菌改变堆肥微生物的群落结构,以期开展堆肥微生物群落功能多样性研究提供科学依据,也为进一步研究接种菌在堆肥物料降解机制中所发挥的重要作用奠定基础.

**关键词:**牛粪;堆肥;微生物群落;纤维素降解菌;变性梯度凝胶电泳 (DGGE)

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2011)10-3073-09

## Effect of Cellulose-decomposing Strain on Microbial Community of Cow Manure Compost

LIU Jia, LI Wan, XU Xiu-hong, LI Hong-tao

(College of Resources and Environmental Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** Taking the cow dung and straw as composting raw materials, effect of cellulose-decomposing strain on microbial community of cow manure compost was investigated with the traditional culture method and PCR-DGGE technique. The results showed that the microbiological inocula showed a more rapid rate of temperature elevation at the start of composting and prolonged the time of high-temperature process and increased the number of microbial. The DGGE map of cellulose-decomposing strain compost was different from natural compost, the succession of microbial community in cellulose-decomposing strain was faster than natural compost. Sequence comparison revealed that the *Pseudomonas* sp. of bacterial appeared at the initial stage and *Acinetobacter* sp., *Flavobacteria* were existed at the high-temperature process in natural compost; while *Arthrobacter* sp. was appeared at the high-temperature process in cellulose-decomposing strain compost. *Bacillus* sp. was dominant species at middle and later stage in natural compost and cellulose-decomposing strain compost. *Eimeriidae* of fungal appeared in compost materials, *Aspergillus* and thermophilic fungi were dominant species at the high-temperature process in natural compost and cellulose-decomposing strain compost. Ascomycota appeared at middle and later stage in natural compost; while Basidiomycetes in cellulose-decomposing strain compost. *Aspergillus* was found throughout the process. This result suggested that the microbiological inocula were able to facilitate the bacterial microbial diversity of the compost; reduced the fungal microbial diversity of the compost. The aims of this study were to provide a scientific basis to the diversity of microbial community by monitoring the dynamics of microbial community in cellulose-decomposing strain compost and represent an important step towards the understanding of microbiological inocula and its function in the degradation process of compost.

**Key words:** cow dung; compost; microbial community; cellulose-decomposing strain; denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

近年来,随着人口的增多和养殖业结构的调整,我国集约化养殖业迅猛发展,产生了巨大的经济效益和社会效益,同时也产生了大量的畜禽粪便废弃物.黑龙江省是农业大省,随着其畜禽养殖业的发展,尤其是奶牛业的快速发展,产生了大量的牛粪及污水并造成环境污染,治理工作迫在眉睫.因此,如果实现集约化农业和畜牧养殖业的可持续发展,就必须对有机固体废弃物进行无害化的处理,使其资源化.堆肥技术是目前普遍采用的一项农业废弃物

处理的方法,可以使农业废弃物实现无害化、减量化、资源化的目的<sup>[1]</sup>.

堆肥化是微生物作用于有机废物的生化降解过程<sup>[2]</sup>.因此研究微生物群落的动态变化对揭示整个堆肥过程的调控及腐熟具有重要意义<sup>[3-6]</sup>.堆肥微生物的来源主要有 2 个方面:一方面是来自有机废

收稿日期:2010-11-23;修订日期:2011-01-17

作者简介:刘佳(1983~),女,博士,主要研究方向为农业微生物.

\* 通讯联系人, E-mail: howard2857@ hotmail. com

物里面固有的大量的微生物种群;另一方面是人工加入的特殊菌种.这些菌种在一定条件下对某些有机废物具有较强的分解能力,具有活性强、繁殖快、分解有机物迅速等特点,因此能加速堆肥反应的进程,缩短堆肥反应的时间<sup>[7-10]</sup>.

大多对有机固体废弃物中微生物的研究仅限于传统的培养方法,基于分子水平上的堆肥过程中微生物动态变化的研究尚未透彻<sup>[11-15]</sup>.本课题拟在其他学者研究的基础上<sup>[16-18]</sup>,从鲜牛粪、堆肥样品以及土壤中分离获得纤维素降解菌组合,针对黑龙江省奶牛粪便的无害化处理,以牛粪和稻草为原料,进行堆肥试验.国内外所涉及的堆肥过程中微生物群落变化大部分只限于对细菌的研究<sup>[19,20]</sup>,由于真菌在堆肥过程中数量少难于分析,因此对其群落变化研究较少,本试验鉴于该领域未研究透彻,针对牛粪堆肥过程中真菌的群落演替做了较详尽的分析,并对细菌、真菌的多样性在添加菌剂和自然堆肥过程中进行了分析比较,为研究牛粪堆肥接种后真菌群落演替及多样性的分析提供一定的科学依据.通过接种菌改变堆肥微生物的群落结构,增加优势菌群的数量,以期开展堆肥微生物群落功能多样性研究提供科学依据,也为进一步研究接种菌在堆肥物料降解机制中所发挥的重要作用奠定基础.

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌种来源

将堆肥样、土样、鲜牛粪分别按 1:10 (质量比)均加入到以稻草为唯一碳源的发酵培养液中用来驯化纤维素降解菌,之后将稻草发酵液接入羧甲基纤维素培养液中,放入恒温振荡培养箱中 30℃ 和 50℃ 进行扩大培养.将稀释不同浓度梯度( $10^{-3}$  ~  $10^{-8}$ )的培养物菌悬液加入纤维素刚果红培养基中倒置在电热恒温培养箱 30℃ 和 50℃ 进行培养,观察菌落生长情况及菌落周围纤维素水解透明圈产生情况.将水解圈大的菌落反复平板划线纯化,直到没有异样菌落出现为止,结合镜检得到纯菌株,编号后放入冰箱保存,备用.

### 1.2 堆肥设置

堆肥试验在东北农业大学园艺站内进行,以牛粪和稻草为原料,基本性质见表 1.采用室内堆肥,通风状况良好,实行人工翻堆供氧,试验共设置 2 个堆体,每个堆体高约 1.3 m,直径约为 1.5 m,呈圆锥体.将稻草切成 5 ~ 10 cm 的小段来调节 C/N 为 30 左右,加水调节堆料初始含水率为 65% 左右.第一

堆自然堆肥(CK),第二堆接种 0.5% 的纤维素分解菌,纤维素分解菌的菌落形态:乳白色,凸起圆形菌落,边缘整齐,光滑,不透明,直径约 0.2 ~ 0.3 cm,无气味.最适生长 pH 值为 7.5 ~ 9.0;最适生长温度为 45 ~ 55℃,可耐 60℃ 以上的高温;为好氧菌.生理生化特征:革兰氏染色呈阳性,氧化酶试验呈阳性,可氧化分解葡萄糖,硝酸盐还原试验呈阳性,过氧化氢酶呈阳性,初步鉴定为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.),测序结果登录号为 GQ996406.堆肥时间控制在 1 个月左右,每天定时测定堆体温度.

表 1 堆肥材料的基本性质

Table 1 Basic properties of composting materials

堆肥材料	有机质/%	水分/%	全氮/%	C/N
牛粪	55	10.18	1.33	24:1
稻草	73	9.46	0.72	58.7:1

### 1.3 样品采集

分别在堆肥发酵的第 0、3、6、9、12、15、19、24、28 d 取样,分上、中、下层随机取样,分别距堆体顶端 30、60、100 cm 处分 5 点采集样品,取得的样品混合均匀,四分法保留 200 g,用保鲜袋密封、-20℃ 冷冻保存,以备分析测定用.在堆肥上层、中层、下层测温点分别为距堆顶 20、50、80 cm 处,每层取 3 点,每天早上 08:00 和下午 17:00 各测一次,以 3 点温度平均值作为该天堆体温度,同时记录周围环境温度.

### 1.4 试验方法

#### 1.4.1 堆肥可培养微生物计数<sup>[21]</sup>

采用平板菌落计数法 细菌培养用牛肉膏蛋白胨琼脂培养基,真菌培养用马丁氏琼脂培养基,放线菌培养采用高氏一号琼脂培养基.

#### 1.4.2 堆肥基因组 DNA 的提取

堆肥细菌基因 DNA 的提取参照文献<sup>[22,23]</sup>的 DNA 提取方法;堆肥真菌基因组的提取采用 OMEGA 真菌基因组 DNA 提取试剂盒.

#### 1.4.3 堆肥基因组 DNA 的纯化

堆肥基因组 DNA 采用 OMEGA 凝胶回收试剂盒进行纯化.

#### 1.4.4 堆肥基因组片段的 PCR 扩增

细菌 16S rDNA V3 可变区的 PCR 扩增采用通用型引物 F338-GC(5'-3' GC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG) 和 R518(ATT ACC GCG GCT GCT GG). PCR 反应体系为 2.5  $\mu$ L 10  $\times$  PCR buffer, 2.5  $\mu$ L dNTP, 引物各 0.5  $\mu$ L, 模板 0.5  $\mu$ L, 1  $\mu$ L DNA 聚

合酶,补灭菌水至 25  $\mu\text{L}$ . PCR 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min, 然后 94 $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 45 s, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$  保温 10 min.

真菌的 PCR 扩增引物采用 EF4 系列: EF4 (5'-3' GGA AGG GRT GTA TTT ATT AG), Fung5 (5'-3' GTA AAA GTC CTG GTT CCC C), NS<sub>2</sub>-GC\* (5'-3' GGC TGC TGG CAC CAG ACT TGC), NS<sub>2</sub>-seq § (5'-3' TGC TGG CAC CAG ACT TGC). \* R = A + G, \* GC-clamp, CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG G, 连接在 5' 末端. 第一轮 PCR 反应体系为 5  $\mu\text{L}$  10  $\times$  PCR buffer, 4  $\mu\text{L}$  dNTP, EF4 和 Fung5 引物各 0.5  $\mu\text{L}$ , 模板 1  $\mu\text{L}$ , 0.5  $\mu\text{L}$  DNA 聚合酶, 补灭菌水至 50  $\mu\text{L}$ . PCR 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min, 然后 94 $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 48 $^{\circ}\text{C}$  退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 90 s, 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$  保温 8 min. 第二轮 PCR 反应体系为 5  $\mu\text{L}$  10  $\times$  PCR buffer, 4  $\mu\text{L}$  dNTP, EF4 和 NS<sub>2</sub>-GC 引物各 0.5  $\mu\text{L}$ , 2 ~ 4  $\mu\text{L}$  第一轮 PCR 产物, 0.5  $\mu\text{L}$  DNA 聚合酶, 补灭菌水至 50  $\mu\text{L}$ . 第二轮 PCR 反应条件与第一轮相同. 细菌和真菌扩增所需引物均由大连宝生物工程有限公司合成.

#### 1.4.5 DGGE 图像分析及优势条带测序

采用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶, 其中尿素浓度 30% ~ 60%. 电泳采用 D-code DGGE 系统 (Bio-Rad), 电泳缓冲液为 1  $\times$  TAE, 在 220V 固定电压下电泳 5 h. 电泳结束后, 进行硝酸银染色.

细菌群落结构多样性指数可采用 Shannon-Weaver 指数来表示, Shannon-Weaver 指数由下式计算<sup>[24]</sup>:

$$D_{\text{sh}} = - \sum P_i \ln P_i = - \sum (N_i/N) \ln(N_i/N)$$

$$J_{\text{sh}} = D_{\text{sh}} / \ln s$$

式中,  $D_{\text{sh}}$  为 Shannon-Weaver 指数,  $P_i$  为第  $i$  个

DGGE 条带出现的概率,  $N_i$  为第  $i$  个 RAPD 条带的扩增量,  $N$  为土壤微生物群落 DNA 的 DGGE 条带的扩增总量 ( $N = \sum N_i$ ). 微生物多样性指数是度量生物多样性高低及空间分布特征的数值指标. 分析软件是 Tanon GIS 凝胶成像系统, 试验数据采用 Microsoft® Execl (2002) 作方差分析、相关分析和回归分析.

从 DGGE 胶中选择特异条带切下, 用去离子水洗净后放入灭菌离心管中, 加 20  $\mu\text{L}$  的去离子水, 放于 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱 12 ~ 14h; 用测序引物 (不带 GC 夹子) 再次扩增, 扩增条件同 1.4.4 节方法描述. DNA 序列测定由南京博亚生物科技有限公司完成.

## 2 结果与分析

### 2.1 堆肥过程中可培养微生物的变化分析

2 种堆肥升温期和降温期微生物数量较多, 高温期和腐熟期微生物数量相对较少. 细菌数量在堆肥的各个时期均占绝对优势, 在堆肥过程中起主要作用; 放线菌数量在堆肥中后期较多, 可能与堆肥中后期存在较难分解的木质素等物质有关; 真菌数量在堆肥前期较多, 堆肥后期较少, 可能是因为经过高温期大部分真菌不耐高温而被杀死, 真菌的存在对于堆肥的腐熟和稳定具有重要的意义 (表 2). 由表 2 还可以看出, 接种堆肥与自然堆肥相比, 在堆肥前期微生物数量上升较快, 微生物数量变化趋势快于自然堆肥. 说明接种菌在堆肥初期能够激发微生物增殖, 快速启动堆肥发酵, 缩短堆肥进程.

### 2.2 堆肥温度的分析

2 个堆体的温度变化都经历了快速升温、持续高温、降温 and 腐熟稳定 4 个阶段. 2 个堆体的不同层均在 3 d 内达到并超过了 50 $^{\circ}\text{C}$ , 自然堆肥和接种纤维素分解菌堆肥, 进入高温阶段 ( $\geq 50^{\circ}\text{C}$ ) 的时间分

表 2 堆肥过程中可培养微生物数量的变化

Table 2 Change in numbers of culturable microbes in composts

时间 /d	细菌 $\times 10^8$ /CFU $\cdot \text{g}^{-1}$		放线菌 $\times 10^5$ /CFU $\cdot \text{g}^{-1}$		真菌 $\times 10^3$ /CFU $\cdot \text{g}^{-1}$	
	对照组	接种菌组	对照组	接种菌组	对照组	接种菌组
0	3.52	3.52	5.35	5.35	3.67	3.67
3	4.01	4.62	6.04	6.32	4.01	4.6
6	5.5	6.21	6.44	6.64	5.23	4.22
9	5.8	4.72	8.87	9.35	4.33	3.5
12	4.3	4.5	9.5	9.98	3.5	1.84
15	4	4.3	9	9.23	2.51	1.26
19	4.5	4.8	8.53	8.89	1.43	0.55
24	4.8	4.9	8.76	8.97	1.53	0.8
28	2.87	3.4	6.54	6.78	0.78	0.4

别为第 3 d 和第 2 d, 中层达到的最高温度分别为 70℃ 和 71℃, 接种菌堆肥比自然堆肥进入高温阶段的速度快, 并且中层达到的最高温度也比较高, 说明接种菌对快速启动堆肥发酵有一定的促进作用. 自然堆肥和接种菌堆肥在整个发酵过程中中层持续高温阶段的时间分别为 22 d 和 27 d 左右, 接种菌堆肥持续高温期的时间比自然堆肥的时间长, 说明菌剂促进了微生物的生长和发酵产热, 提高了堆肥的分解效率.

### 2.3 堆肥基因组 DNA 的提取、纯化及 PCR 的扩增

堆肥细菌基因组 DNA 长度 > 23.1 kb, 均以获得较完整的基因组 DNA 片段, 但有拖尾现象, 说明片段中还有大量的杂质, 需要对粗提 DNA 进行纯化. 纯化后的基因组 DNA 杂质明显减少, 以纯化后基因组 DNA 作为模板进行 PCR 扩增, 获得长度约为 240 bp 的特异性片段 (图 1).

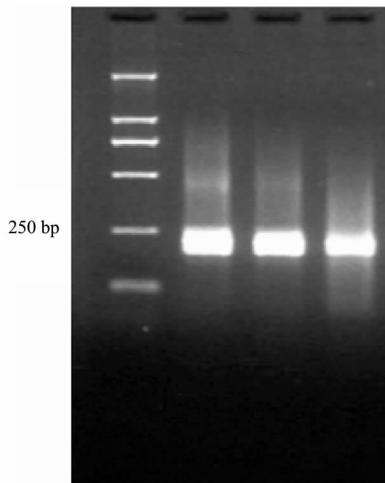


图 1 细菌 PCR 扩增电泳图

Fig. 1 PCR amplification of bacterial genomic DNA

从堆肥样品中提取的真菌基因 DNA 长度约为 23.1 kb, 表明已经获得较完整的堆肥真菌基因组 DNA, 由于真菌数量较少, 因此本试验没有选择用试剂盒对真菌 DNA 纯化, 而是选择了对总 DNA 样品进行稀释后作为 PCR 扩增的模板, 以减少 DNA 的损失. 真菌的 PCR 选择了扩增 18S rRNA 的部分片段 (图 2), 引物为 EF4 系列, 第一轮 PCR 用引物对 EF4/Fung5, 以粗提真菌 DNA 稀释 30 倍、50 倍为模板, 第二轮 PCR 以第一轮 PCR 产物为模板, 以 EF4/NS2-GC 为引物进行扩增, 图中结果为第二轮 PCR 扩增的产物, 获得长度为 400 bp 左右的特异性片段.

### 2.4 DGGE 图像分析

#### 2.4.1 细菌群落 DGGE 图像分析

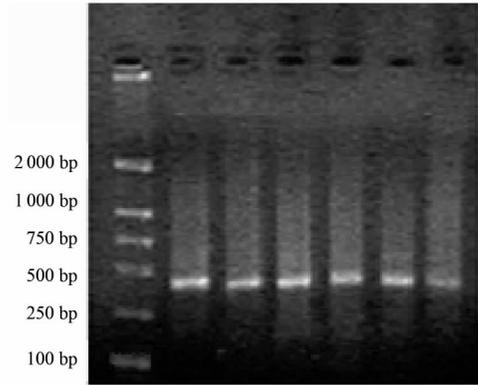


图 2 真菌 PCR 扩增电泳图

Fig. 2 PCR amplification of fungal genomic DNA

如图 3、4 所示, 自然堆肥和接种菌堆肥的基本带形和优势带基本相似, 说明在堆肥系统中, 微生物群落的结构保持一定相似性, 但是对比各泳道条带的数量及条带的亮度又有所差异, 说明了在不同的温度下, 伴随着新的微生物的出现和一些微生物的消失. 接种菌堆肥 DGGE 凝胶图谱比自然堆肥的 DGGE 凝胶图谱条带的差异性大, 分析原因有可能接种菌之后, 加快了微生物的演替速度, 导致差异带比较明显. 堆肥化的高温期条带数量减少, 表明高温阶段以嗜热细菌和耐高温的细菌为主要分解者, 堆肥的降温腐熟期, 群落种类变化不明显, 表明腐熟阶段代谢趋于缓慢. 自然堆肥样品的初期检测到了纤维素降解菌的存在, 分析原因是由于该纤维素分解菌本来就分离于堆肥样品, 而堆肥化的过程中本来就有该菌群的存在, 但该菌在堆肥的中后期没有检测到, 那么本研究通过接种试验后, 只是增加了该菌的数量, 增强并加速了有机质的分解速度, 因此分析将腐熟后的堆肥如果回接到堆肥的初期应该可以使其中的优势菌继续发挥作用, 可以减少接种菌的使用量. 从图 4 中可以看出, 纤维素降解菌条带 M1 在堆制的初始没有被发现, 而在升温期出现并且数量增多, 但是持续的高温会抑制 M1 的生长, 到堆制的后期, 其数量优势逐渐减弱.

进一步利用 Quantity One 软件 (Bio-Rad) 对 DGGE 图谱的条带数和亮度进行数字化处理, 并进行聚类分析, 可得各堆肥样品间微生物组成的聚类分析结果 (图 5 和图 6). 可以看出各泳道的相似性并不是很高, 分析原因可能是由于堆肥发酵本身是一个微生物快速演替的过程, 特别是在高温阶段, 由于温度的升高, 导致大量嗜热细菌快速繁殖. 虽然同属高温阶段, 但温度的变化也会引起嗜热细菌种类

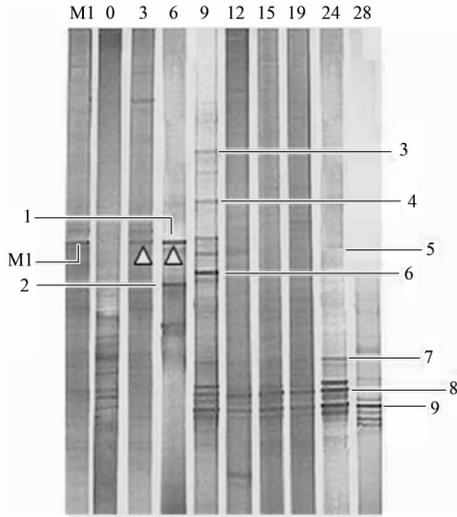


图 3 自然堆肥样品的 DGGE 图谱  
Fig. 3 Bacterial DGGE map of natural composting

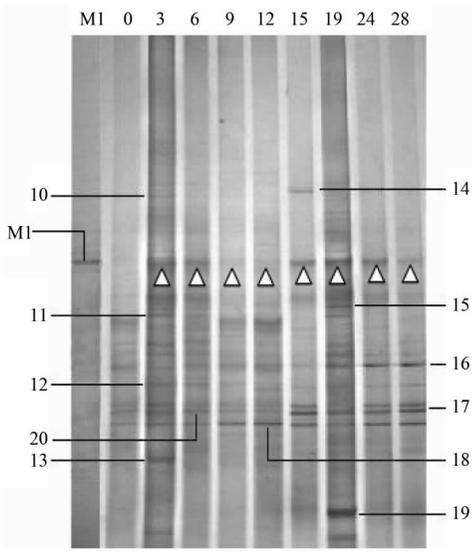


图 4 接种纤维素降解菌堆肥样品的 DGGE 图谱  
Fig. 4 Bacterial DGGE map of cellulose-decomposing strain compost

的变化,不同的温度对应着不同种类的嗜热细菌.其中自然堆肥中泳道 2 和 5、1 和 9、6 和 7 的相似性都达到了 56% (图 5);而在纤维素降解菌堆肥中,泳道 2 和 5 为 21.7%、1 和 9 为 52.1%、6 和 7 为 52.4% (图 6),说明接种菌之后,主体微生物群落组成和自然堆肥保持一定相似性的同时,又发生着一定的改变,并且这微生物演替的过程快于自然堆肥.

2.4.2 真菌群落 DGGE 图像分析

图 7 是自然堆肥的真菌 DGGE 图谱,从中可以看出条带数量明显少于细菌,与传统培养方法呈现了相同的结果.由于堆肥过程中取样的温度一直比

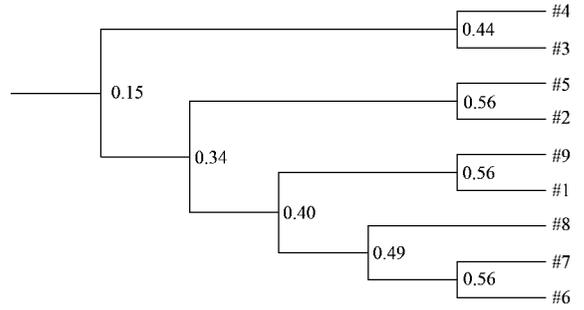


图 5 自然堆肥 DGGE 图谱聚类分析  
Fig. 5 Dendrogram of the DGGE banding patterns in natural composting

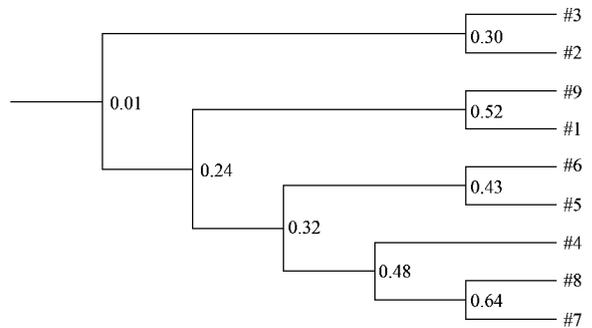


图 6 接种纤维素降解菌 DGGE 图谱聚类分析  
Fig. 6 Dendrogram of the DGGE banding patterns in cellulose-decomposing strain compost

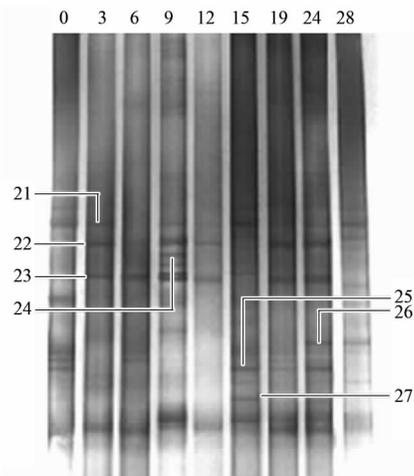


图 7 自然堆肥真菌 DGGE 图谱  
Fig. 7 Fungal DGGE map of natural composting

较高,抑制了真菌的生长,因此真菌的数量和种类都相对较少.接种菌堆肥真菌的变化和细菌类似,堆肥化的高温期条带数量略有减少,表明高温阶段以嗜热真菌为主要的分解者,堆肥的降温腐熟期,条带数

量有所增多,群落种类变化不明显,表明腐熟阶段代谢趋于缓慢(图8)。

## 2.5 特异性条带序列分析

在分析了堆肥过程中细菌和真菌群落多样性的同时,对细菌和真菌 DGGE 图谱中的大部分优势条带分别进行了切胶回收,用不带 GC 夹子的引物进行 PCR 扩增,产物片段克隆测序,标记号码如图 3、4、7 和 8 所示,在 GenBank 数据库中进行比对分析,找到最相似菌株,结果见表 3 所示。从表 3 可以看出,堆肥化过程中所出现的细菌种类较多,不同的温度有不同的细菌占有优势地位,在堆肥化过程中发挥重要的作用。在自然堆肥化的前期出现了假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.),这类细菌对淀粉多糖类有机物具有较强分解能力。通过序列比对发现,自然堆肥的高温期包含不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.)、

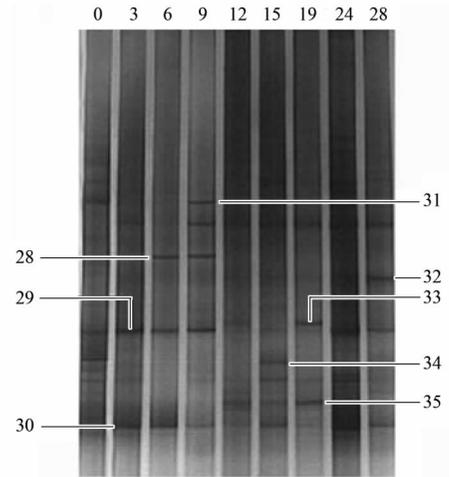


图8 接种纤维素分解菌堆肥真菌 DGGE 图谱

Fig.8 Fungal DGGE map of cellulose-decomposing strain compost

表3 部分条带测序结果

Table 3 Sequencing results of part bands

编码	登录号	最相似菌株	相似性/%
1	FJ499356	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band 15 16S ribosomal RNA	99
2	AM710608	<i>Pseudomonas</i> sp. 129(43zx) 16S rRNA gene, partial sequence.	100
3	AB244764	<i>Sphingobacterium</i> compost gene for 16S rRNA, partial sequence	96
4	EU276158	Uncultured bacterium clone TSL35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98
5	EF489017	Uncultured <i>Flavobacteria</i> bacterium clone 3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
6	FJ499360	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band 19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
7	FJ609992	Uncultured <i>Stenotrophomonas</i> sp. clone D10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95
8	AY803983	<i>Bacillus</i> sp. HPC40 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	98
9	AY803983	<i>Bacillus</i> sp. HPC40 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	100
10	AJ715799	Uncultured marine euryarchaeote partial 16S rRNA gene, clone SCS6A	100
11	EU551221	Uncultured archaeon isolate DGGE gel band 4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97
12	AJ582255	Uncultured <i>Escherichia</i> sp. partial 16S rRNA gene, clone AC24	100
13	EU555536	<i>Escherichia coli</i> strain CNM 477-02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95
14	EU551230	Uncultured archaeon isolate DGGE gel band 16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
15	AJ582252	Uncultured <i>Acinetobacter</i> sp. partial 16S rRNA gene, clone AC21	92
16	AB438005	Uncultured compost bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence	99
17	EU009381	Uncultured bacterium isolate DGGE band 8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
18	AY803983	<i>Bacillus</i> sp. HPC40 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	98
19	FM872863	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone FB03H07	100
20	AJ842255	<i>Arthrobacter</i> sp. Nj-75 partial 16S rRNA gene, isolate Nj-75.	100
21	EF024492	Eimeriidae environmental sample clone Elev_18S_791 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	92
22	AJ635572	Uncultured sordariomycete partial 18S rRNA gene, isolate pa136	97
23	DQ836901	<i>Doratomyces stemonitis</i> isolate AFTOL-ID 1380 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	99
24	DQ836901	<i>Doratomyces stemonitis</i> isolate AFTOL-ID 1380 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	99
25	DQ985959	<i>Aspergillus penicillioides</i> strain 987 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
26	DQ834846	Uncultured fungus clone 80-2-3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
27	DQ836901	<i>Doratomyces stemonitis</i> isolate AFTOL-ID 1380 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	99
28	AJ635572	Uncultured sordariomycete partial 18S rRNA gene, isolate pa136	97
29	AY222619	Uncultured eukaryote clone F1b 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
30	GQ228449	<i>Aspergillus niger</i> strain KBS4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
31	AB024045	<i>Basipetospora chlamydospora</i> gene for 18S ribosomal RNA	99
32	EU647017	Uncultured <i>Agaricomycotina</i> clone D0735_09_M small subunit ribosomal	97
33	AY857708	<i>Ascomycete</i> sp. ODP62903fg0 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100
34	AJ130850	Unidentified eukaryote 18S ribosomal RNA, clone LKM15, partial sequence	98
35	AJ635575	Uncultured ascomycete partial 18S rRNA gene, isolate pa139	98

黄杆菌 (*Flavobacteria*); 接种菌堆肥高温期出现了 *Arthrobacter sp.* (节杆菌属). 在自然堆肥过程的中后期出现了芽孢杆菌属 (*Bacillus sp.*), 在接种菌的图谱条带测序中, 也检测到了 *Bacillus sp.*, 说明芽孢杆菌在堆肥过程中普遍存在.

通过序列比对发现, 自然堆肥初始物料中存在艾美虫科真菌, 在自然堆肥和接种菌堆肥的高温阶段均检测到曲霉属和嗜热真菌属为优势菌株, 子囊菌门 (*Basidiomycetes*) 出现于自然堆肥的末期, 接种菌堆肥末期出现担子菌类 (*Basidiomycetes*). 而在整个接种菌堆肥化过程, 黑曲霉一直存在.

## 2.6 多样性指数分析

### 2.6.1 细菌多样性指数分析

由图 9 可以看出, 接种菌堆肥细菌多样性指数高于自然堆肥, 堆肥初期, 温度上升使微生物数量和种类增加, 尤其是细菌的数量和种类, 到了堆肥高温期, 2 个堆肥的多样性均有所回落, 原因是添加纤维素分解的平均取样温度已经达到了  $67^{\circ}\text{C}$ , 自然堆肥的平均取样温度也达到了  $62^{\circ}\text{C}$ , 高温抑制了微生物的大量繁殖, 因此其微生物多样性降低. 堆制的第 19d 以后, 温度逐渐下降, 2 个堆体多样性都呈现了升高趋势, 但幅度不明显, 原因是经过高温期, 在内源呼吸的后期, 堆肥中的有机物质基本分解完全, 只剩下部分较难分解的有机物, 大量的微生物已不能从周围环境中获得足够的能量以维持其生命活动, 于是开始代谢自身细胞内的营养物质, 此时, 细胞生长虽没有完全停止, 但被细胞的分解率所超过, 导致微生物生物量减少. 堆制第 28d, 温度下降稳定在  $40^{\circ}\text{C}$  左右, 堆肥进入腐熟阶段, 微生物多样性基本稳定.

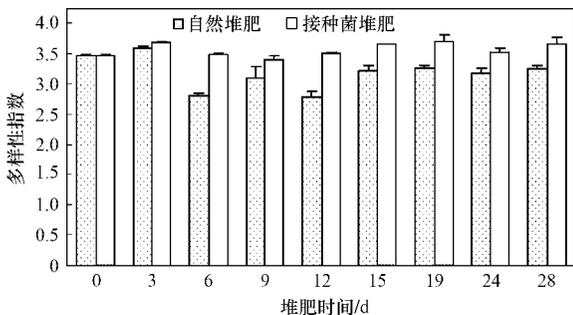


图 9 自然堆肥与接种菌堆肥多样性指数对比

Fig. 9 Comparison of bacterial diversity index of natural composting and cellulose-decomposing strain compost

### 2.6.2 真菌多样性指数分析

图 10 是真菌多样性指数分析图谱, 真菌的多样

性指数全部低于细菌的多样性指数, 自然堆肥和接种菌堆肥在初期真菌多样性指数都呈下降趋势, 而细菌则呈现上升趋势, 表明温度对于真菌的影响大于细菌, 嗜热性的真菌数量和种类远小于嗜热性的细菌. 真菌多样性指数基本呈现先下降后上升的趋势, 和温度的先上升后下降正好相反, 这也证明了高温期时多样性指数降低, 腐熟期时多样性指数升高. 接种菌堆肥的真菌多样性指数均低于自然堆肥的多样性指数, 分析原因可能是由于添加接种菌后细菌的大量繁殖吸收了更多的营养物质, 而对真菌的生长产生了一定的抑制作用.

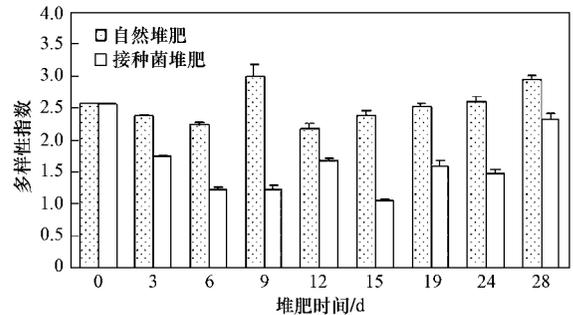


图 10 自然堆肥与接种菌堆肥多样性指数对比

Fig. 10 Comparison of fungal diversity index of natural composting and cellulose-decomposing strain compost

## 3 讨论

### 3.1 接种菌对堆肥温度的影响

接种菌堆肥比自然堆肥进入高温阶段的速度快, 并且中层达到的最高温度也比较高, 说明接种菌对快速启动堆肥发酵有一定的促进作用. 接种菌堆肥持续高温期的时间比自然堆肥的时间长, 说明菌剂促进了微生物的生长和发酵产热, 提高了堆肥的分解效率.

### 3.2 接种菌对堆肥可培养微生物数量的影响

细菌数量在堆肥的各个时期均占绝对优势, 在堆肥过程中起主要作用; 放线菌和真菌数量变化总体呈先增高后降低的趋势, 放线菌数量在堆肥中后期较多, 可能与堆肥中后期存在较难分解的木质素等物质有关; 真菌数量在堆肥前期较多, 堆肥后期较少, 可能是因为经过高温期大部分真菌不耐高温而被杀死, 真菌的存在对于堆肥的腐熟和稳定具有重要的意义. 接种菌堆肥与自然堆肥相比在堆肥前期微生物数量上升较快, 微生物数量变化趋势快于自然堆肥. 说明接种菌在堆肥初期能够激发微生物增殖, 快速启动堆肥发酵, 缩短堆肥进程.

### 3.3 接种菌对堆肥微生物种类的影响

在接种菌堆肥和自然堆肥高温阶段存在的嗜热菌群,大部分也都为不可培养,这说明传统培养法在分析微生物种群结构时,存在着一定的局限性.在自然堆肥化的前期出现了假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.),这类细菌对淀粉多糖类有机物具有较强分解能力.通过序列比对发现,自然堆肥的高温期包含不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.)、黄杆菌属(*Flavobacteria*);接种菌堆肥高温期出现了节杆菌属(*Arthrobacter* sp.).在堆肥高温期过程中87%的高温菌属于杆菌属,如:假单胞菌属、杆菌属中的芽孢杆菌、枯草杆菌等<sup>[25]</sup>,这也验证了本试验所选用的有纤维素降解功能的芽孢杆菌作为菌剂添加到堆肥过程中对有机物的降解会起到加速的作用.在自然堆肥过程的中后期出现了芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.),在接种菌的图谱条带测序中,也检测到了*Bacillus* sp.,说明芽孢杆菌在堆肥过程中普遍存在,这类菌群比较适应于生存在堆肥的复杂环境.

通过序列比对发现,自然堆肥初始物料中存在艾美虫科真菌,经资料显示它主要寄生于畜禽的肠上皮细胞,也有寄生于其他器官组织的,但是高温期已消失,说明其不耐高温,好氧堆肥的高温期可以杀死有害微生物,有效防止二次污染的产生.在自然堆肥和接种菌堆肥的高温阶段均检测到曲霉属和嗜热真菌属为优势菌株,子囊菌门(*Ascomycota*)出现于自然堆肥的末期,部分子囊菌门的菌株可降解木质素,这与木质素等难分解物质在堆肥后期分解的时间相吻合.接种菌堆肥末期出现担子菌类(*Basidiomycetes*),担子菌类可使降解木质素,该菌类常在环境样品中被检测到<sup>[26]</sup>.而在整个接种菌堆肥化过程,黑曲霉一直存在,只是颜色的深浅不同,表明随着环境条件的改变黑曲霉的数量一直在发生着变化,它在堆肥化有机物质的分解过程中一直扮演着十分重要的角色.

### 3.4 接种菌对堆肥微生物群落多样性指数的影响

接种菌堆肥细菌多样性指数高于自然堆肥,因此说明了本试验所分离的纤维素降解菌在堆肥过程中发挥了作用,添加接种菌增加了堆肥初始的微生物数量,使微生物活动剧烈.真菌的多样性指数全部低于细菌的多样性指数,这与传统培养方法所得到的结果相同.与细菌多样性指数形成鲜明的对比.

## 4 结论

(1) 在接种菌的堆肥中,堆体达到高温的速度

快,并且维持的时间比较长.在2个堆体的不同层中,中层温度最高,下层温度最低.

(2) 细菌接种菌堆肥 DGGE 凝胶图谱比自然堆肥的 DGGE 凝胶图谱条带的差异性大,接种菌之后,加快了微生物的演替速度,导致差异带比较明显.接种菌堆肥真菌的变化和细菌类似,真菌条带数量明显少于细菌.

(3) 细菌数量在堆肥的各个时期均占绝对优势,放线菌数量在堆肥中后期较多,真菌数量在堆肥前期较多,堆肥后期较少.与自然堆肥相比,接种菌堆肥在堆肥前期微生物数量上升较快,微生物数量变化趋势快于自然堆肥.

(4) 细菌在自然堆肥化的前期出现了假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.),高温期包含不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.)、黄杆菌(*Flavobacteria*);接种菌堆肥高温期出现了*Arthrobacter* sp.(节杆菌属).在自然堆肥过程的中后期及接种菌堆肥过程中均出现了芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.).自然堆肥初始物料中存在艾美虫科真菌,在自然堆肥和接种菌堆肥的高温阶段均检测到曲霉属和嗜热真菌属为优势菌株,子囊菌门(*Ascomycota*)出现于自然堆肥的末期,接种菌堆肥末期出现担子菌类(*Basidiomycetes*).而在整个接种菌堆肥化过程,黑曲霉一直存在.

(5) 接种菌堆肥细菌多样性指数高于自然堆肥;真菌多样性指数均低于自然堆肥.

参考文献:

- [1] 李国学,李玉春,李彦富. 固体废物堆肥化及堆肥添加剂研究进展[J]. 农业环境科学学报,2003, 22(2): 252-256.
- [2] Gray K R, Sherman K, Biddlestone A J. A review of composting—part 1[J]. Process Biochemistry 1971, 6: 32-36.
- [3] Raut M P, PrinceWilliam S P M, Bhattacharyya J K, et al. Microbial dynamics and enzyme activities during rapid composting of Municipal solid waste—a compost maturity analysis perspective [J]. Bioresource Technology, 2008, 99: 6512-6519.
- [4] Sullivan D M, Bary A I, Thomas D R, et al. Food waste compost effects on fertilizer nitrogen efficiency, available nitrogen, and tall fescue yield[J]. Soil Science Society of America Journal, 2002, 66: 154-161.
- [5] Tuomela M, Vikman M, Hatakka A, et al. Biodegradation of lignin in o compost environment are view [J]. Bioresource Technology, 2000, 72(2): 169-183.
- [6] Bernal M P, Alburquerque J A, Moral R. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review[J]. Bioresource Technology, 2009, 100: 5444-5453.
- [7] Kim T I, Jeong K H, Ham J S, et al. Isolation and characterization of cellulase secreting bacterium from cattle manure: application to Composting [J]. Compost Science

- Utilization, 2004, **12**: 242-248.
- [ 8 ] Wakase S, Sasaki H, Itoh K, *et al.* Investigation of the microbial community in a microbiological additive used in a manure composting process [ J ]. *Bioresource Technology*, 2008, **99**: 2687-2693.
- [ 9 ] Sasaki H, Kitazume O, Nonaka J, *et al.* Effect of a commercial microbiological additive on the beef manure compost in the composting process [ J ]. *Animal Science Journal*, 2006, **77**: 545-548.
- [10] Kato K, Miura N. Effect of matured compost as a bulking and inoculating agent on the microbial community and maturity of cattle manure compost [ J ]. *Bioresource Technology*, 2008, **99**: 3372-3380.
- [11] Klamer M, Baath E. Microbial community dynamics during composting of straw material studied using phospholipid fatty acid analysis [ J ]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1998, **27**: 9-20.
- [12] Tiquia S M, Wan J H C, Tam N F Y. Microbial population dynamics and enzyme activities during composting [ J ]. *Compost Science and Utilization*, 2002, **10** ( 2 ): 150-161.
- [13] Goyal S, Dhull S K, Kapoor K K. Chemical and biological changes during composting of different organic wastes and assessment of compost maturity [ J ]. *Bioresource Technology*, 2005, **96**: 1584-1591.
- [14] Tiquia S M. Microbial parameters as indicators of compost maturity [ J ]. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, **99**: 816-828.
- [15] Ros M, García C, Hernández T. A full-scale study of treatment of pig slurry by composting: kinetic changes in chemical and microbial properties [ J ]. *Waste Management*, 2006, **26**: 1108-1118.
- [16] Marshall M N, Cocolin L, Mills D A, *et al.* Evaluation of PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities in compost [ J ]. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, **95**: 934-948.
- [17] Poulsen P H B, Møller J, Magid J. Determination of a relationship between chitinase activity and microbial diversity in chitin amended compost [ J ]. *Bioresource Technology*, 2008, **99**: 4355-4359.
- [18] Smit E, Leeftang P, Glandorf B, *et al.* Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis [ J ]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65**: 2614-2621.
- [19] Alfreider A, Peters S, Tebbe C C, *et al.* Microbial community dynamics during composting of organic matter as determined by 16S ribosomal DNA analysis [ J ]. *Compost Science Utilization*, 2002, **10**: 303-312.
- [20] 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.
- [21] 李阜棣,喻子牛,何绍江.农业微生物学实验技术 [ M ]. 北京:中国农业出版社,1996. 32-36.
- [22] Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition [ J ]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62** ( 2 ): 316-322.
- [23] 张瑞福,曹慧,崔中利,等.土壤微生物总 DNA 的提取与纯化 [ J ]. *微生物学报*, 2003, **43**(2): 276-282.
- [24] Shannon C E, Weaver W. *The Mathematical Theory of Communication* [ M ]. Urbana: University of Illinois Press, 1949.
- [25] McCarthy A J. Lignocellulose-degrading actinomycetes [ J ]. *FEMS Microbiology Review*, 1987, **46**: 145-163.
- [26] Blancheete, R A. Degradation of lignocellulose complex in wood [ J ]. *Canadian Journal of Botany*, 1995, **73**: 999-1010.