

堆肥化过程中微生物群落的动态

王伟东¹, 王小芬², 朴哲³, 刘长莉², 高秀芝², 崔宗均^{2*}

(1. 黑龙江八一农垦大学生命科技学院, 大庆 163319; 2. 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100094; 3. 扬州大学环境科学与工程学院, 扬州 225009)

摘要:通过变性梯度凝胶电泳(DGGE)和平板计数法对堆肥化过程中微生物的区系动态变化进行了研究. 结果表明, 在堆肥化过程中, 微生物数量总的趋势是细菌的数量最多, 放线菌次之, 真菌的数量最少, 中温微生物的数量始终高于高温微生物. 当发酵结束后, 中温微生物的数量低于发酵初始水平, 高温放线菌和高温真菌的数量试验结束后高于初始水平, 高温细菌的数量在整个堆肥化过程中变化不大. 通过 DGGE 分析表明, 发酵过程中细菌的种类发生了明显的更迭现象. 发酵初期 *Bdellovibrio*、*Clostridia* bacterium、*Bacillus*、*Clostridium* 等占优势, 中期 *Beta proteobacterium*、*Petrobacter succinimandens*、*Nitrospirae* bacterium、*Clostridium* 等占优势, 后期 *Clostridium*、*Beta proteobacterium*、*Paenibacillus* 等占优势, 而在整个堆肥化过程中 *Clostridium* 都是优势种.

关键词:堆肥化; 微生物区系; 变性梯度凝胶电泳

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)11-2591-07

Microbial Dynamics During the Composting Process

WANG Wei-dong¹, WANG Xiao-fen², PIAO Zhe³, LIU Chang-li², GAO Xiu-zhi², CUI Zong-jun²

(1. College of Biological Science and Technology, Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing 163319, China; 2. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 3. College of Environmental Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: Microbial dynamics of microbial community during the composting process was investigated with the methods of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and plating. The results showed that the most of microorganism count was bacterium, the second was actinomycete and the least was fungi. At the same time, the count of the thermophilic microorganism was always less than that of the mesophilic during the composting process. The count of mesophilic microorganism at later stage was less than that at the initial stage. However, the count of thermophilic actinomycete and fungi at later stage were more than that at initial stage, and the count of thermophilic bacterium was stable throughout the composting process. The bands pattern of DGGE and 16S rDNA analyses indicated that bacterial succession was presented during the composting process. The genera of *Bdellovibrio*, *Clostridia* bacterium and *Bacillus* were dominant species at initial stage (before the first 15 days), and *Beta proteobacterium*, *Petrobacter succinimandens*, *Nitrospirae* bacterium and *Paenibacillus* were dominant species at middle and later stage. Moreover, *Clostridium* was found throughout the process.

Key words: composting; microbial community; denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

堆肥化是有机固体废弃物无害化、减量化、资源化的根本途径. 因此, 有机固体废弃物的堆肥化研究一直是环境科学领域研究的热点之一^[1-3]. 堆肥化过程是以微生物为主导的物理化学和生物学过程, 是由群落结构演替迅速的多个微生物群落共同作用而实现的动态过程, 在该过程中的每一个微生物群落在一定的时间内有适合自身生长繁殖的条件, 对某一种或某一类特定物质的分解起作用^[4]. 因此, 研究微生物区系的变化对于揭示整个堆肥化过程中的物质转化规律、腐熟度进程等非常重要. 堆肥原料的性质决定了其中微生物群体结构的复杂性和多样性, 要研究微生物群落的动态变化非常困难, 主要受到研究方法的限制, 因为传统的微生物分离及鉴定技术只能得到自然状态下微生物群落的一小部

分^[5]. 一些研究者主要采用以真菌、细菌和放线菌等分类方法进行研究堆肥过程中的微生物动态变化, 或者按照 G⁻ 菌、G⁺ 菌、嗜热菌、嗜温菌、氨化细菌、硝化细菌等分类方法进行研究^[6-9], 这些方法受到依赖纯培养的限制, 结果不够全面、充分, 得到的结论也各不相同. 近年来, 分子生态学技术被广泛应用于环境微生物的研究中, 得到了许多关于堆肥化过程中微生物区系变化的直接证据, 但是在堆肥化过

收稿日期: 2006-09-10; 修订日期: 2007-05-22

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD04A09); 黑龙江省博士后基金项目(LDH-Z05009); 黑龙江省农垦总局科技攻关项目(HNKXIV-02-03-03)

作者简介: 王伟东(1970~), 男, 博士, 副教授, 主要研究方向有机废弃物资源再利用, E-mail: wwdcy@sohu.com

* 通讯联系人, E-mail: acuijz@163.com

程中微生物区系是存在频繁的更替、还是微生物群体占据优势后不再更替等方面存在分歧^[4,10~12]。本研究采用传统的平板分离法与 DGGE 技术相结合,研究堆肥化过程中不同微生物群落的动态变化,揭示堆肥化过程中微生物区系的变化规律,为有机固体废物堆肥化利用的生产实践提供理论依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 堆肥体系的构建

堆肥原料采用新鲜的鸡粪、牛粪及干枯麦秸。将鸡粪、切碎成 5 cm 左右的麦秸、牛粪按 1:3:6 质量比例均匀混合,使 C/N 为 25~30,水分含量在 55%~60%。

堆制试验是在自建的水泥发酵槽内进行。在宽 1.5 m,深 1.0 m,长 20 m 的发酵槽内堆成上部长 2 m、下部长 3 m、高 1 m 的堆体。堆体温度上升到 50℃ 开始人工翻堆,高温期每 2 d 翻堆 1 次,温度下降到 35℃ 后每 5 d 翻 1 次,试验时间为 60 d。每天测定堆体的上(0.2 m)、中(0.5 m)、下部(0.7 m)的温度和堆制现场的环境温度。

1.2 堆肥化过程中微生物数量的测定方法

1.2.1 培养基

细菌分离采用牛肉膏蛋白胨培养基,放线菌分离用淀粉硝酸钾培养基,真菌分离用马丁孟加拉红-链霉素培养基,培养基的组成和配制方法见文献[13]。

1.2.2 取样及分离方法

在堆制当天和堆制后第 3、10、15、25、35、45 及 60 d,从堆体的上、中、下部位多点取样,混匀后一部分样品用固定缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, 40 mmol/L EDTA,见参考文献[4]) - 20℃ 冰冻保存,用于 DNA 提取,一部分样品用于直接平板稀释法微生物分离培养。在 30℃ 和 55℃ 恒温下,细菌、真菌、放线菌在分别培养 2、4 和 6 d,观察记录微生物种类和数量。

1.3 堆肥样品的 C/N、木质素、纤维素和半纤维素含量的测定

各个时期的样品的全碳含量采用重铬酸钾氧化法测定^[14],全氮含量测定采用凯氏法,半纤维素、纤维素和木质素含量的测定采用范氏洗涤法^[15]。

1.4 堆肥样品 DNA 提取、PCR 反应及样品中细菌的 DNA 序列分析

1.4.1 样品 DNA 提取

DNA 提取采用文献[16]提供的氯苯法,DNA 提

取及后续纯化过程见参考文献[4]。

1.4.2 变性梯度凝胶电泳(DGGE)所需 PCR 反应

PCR 用 AmpliTaqGold™ 反应系统(Perkin Elmer, Applied Biosystems, NJ, USA)。引物为 357F 和 517R,在引物 357F 上加了“GC 夹子”,357F 的序列为 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3',“GC 夹子”的序列为 5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGCGGGGCACGGG GGG-3';引物 517R 的序列为 5'-ATTACCGCGCTGCT GG-3'。PCR 反应程序为:95℃ 10 min, 93℃ 1 min, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 5 min; 93℃ 0.5 min, 55℃ 0.5 min, 72℃ 2 min, 30 个循环; 93℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 5 min。扩增产物以 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4.3 DGGE

使用 Dcode™ Universal Mutation Detector System (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA)。步骤按照 Muyzer 等^[17]方法基础上改良,1-mm-thicker, 6%~12%, polyacrylamide gradient gels, 0.5 × TAB electrophoresis buffer (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 10 mmol/L acetic acid, 0.5 mmol/L EDTA), 35%~50% 的梯度胶(具有 40% 的 formamide 的 7 mol/L Urea 确定为 100%)。电源采用 DIO CRAFT Real Power (Model BP-3), 电压 200 V, 温度为 61℃, 时间 5 h。电泳结束后胶用 SYBR Green I (Molecular Probes, Eugene, Ore.) 染色,观察和照相用 TOYOBO FAS-III 型凝胶成像仪。

1.4.4 DGGE 条带 DNA 的序列分析

从 DGGE 胶上切下清晰的条带,回收 DNA 后,进行 16S V3 区域序列扩增,扩增条件同 1.4.2 方法描述。DNA 序列分析由北京三博远志生物技术责任有限公司进行。

2 结果与分析

2.1 堆肥化过程中的温度动态

从图 1 的温度变化曲线可以看出,在整个堆肥化过程中,温度变化分为 3 个阶段。第 1 个阶段为升温期,时间为 0~2 d,此时堆体温度从开始的 19℃ 迅速升高到 50℃ 以上。第 2 阶段为高温期,时间为 3~25 d,此阶段的温度一直维持在 50℃ 以上,其中 70℃ 以上温度维持了 5 d(9~14 d)。因此,高温期可以完全杀灭病原菌、虫卵、草籽,卫生指标可以达到国标。第 3 阶段为降温期,时间为 26~60 d,此阶段堆体温度迅速降低,逐渐达到环境温度。

2.2 堆肥化过程中 C/N, 半纤维素、纤维素和木质

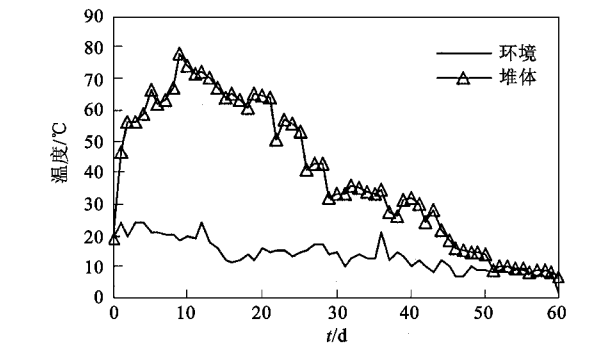


图 1 堆肥化过程中温度的变化曲线

Fig.1 Changes in temperature during composting process

素含量的变化

堆肥材料的 C/N 是评价堆肥腐熟度的主要指标之一,一般认为如果堆肥原料的 C/N 在 25 以上, C/N 下降到 17 以下时堆肥已经腐熟.材料开始的 C/N 为 25.2/1,随着发酵的进行, C/N 逐渐下降.在 35 d 时堆肥的碳氮比下降到 18 以下,45 d 时 C/N 下降到 17 以下(表 1).此时堆体的温度也基本与环境一致,堆肥已经基本腐熟,60 d 试验结束时的 C/N 为 15.7,已经完熟.

表 1 堆肥发酵过程中 C/N 比变化

Table 1 Changes of C/N during composting

时间/d	0	10	15	25	35	45	60
C/N	25.2	20.3	19.2	18.9	17.8	16.4	15.7

半纤维素、纤维素和木质素等难分解物质的分解是堆肥化进程中的关键环节,这些成分的分解状态可以作为堆肥腐熟度的指标^[2].堆肥化过程中,半纤维素一直处于旺盛的分解状态下,尤其在发酵第 5~20 d,分解最快.半纤维素含量从发酵开始时的 13.86% 下降到试验结束时的 7.99%.纤维素的分解从发酵开始,一直到第 35 d,纤维素快速分解,这个时期正是高温期,说明在微好氧和 50~60℃ 高温是纤维素分解的适宜条件,高温期后纤维素分解较少,最终纤维素的含量由发酵开始时的 21.45% 下降到结束时的 16.07%(图 2).木质素的含量在发酵前后分别为 9.47% 和 10.8%.木质素的含量增加是因为木质素很少分解,而其它物质的分解量很大,造成木质素的含量增加.已有很多研究者证明木质素在自然条件下很难分解或基本不分解^[18].在堆肥化过程中,木质素不分解对于将来堆肥应用于农业生产,改善土壤理化性状具有积极的意义.

2.3 堆肥化过程中中温微生物和高温微生物数量

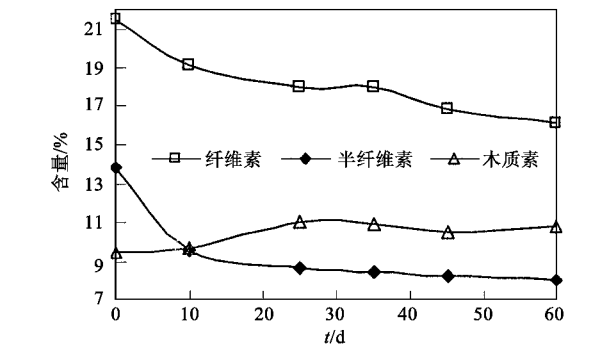


图 2 堆肥化过程中原料的半纤维素、纤维素、木质素变化

Fig.2 Changes of hemicellulose, cellulose and lignin concentration during composting process

的变化

在快速升温阶段(0~3 d)堆体中的细菌、真菌、放线菌的数量迅速下降,其中真菌下降幅度大,第 3 d 堆体中已分离不到真菌.相比之下,细菌下降幅度小于放线菌和真菌,且在随后的堆肥化进程中变化不大,基本趋于稳定,但其绝对量始终高于真菌和放线菌.升温阶段迅速下降的放线菌和真菌,在持续高温阶段随着堆肥进程数量缓缓上升,当发酵进行到第 25 d 时基本趋于稳定(图 3).这段时期放线菌总数仅次于细菌,绝对量始终高于真菌.

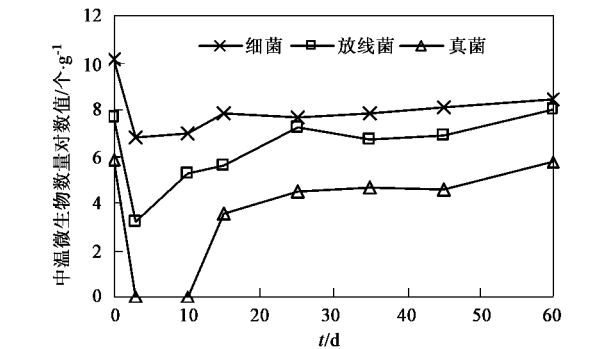


图 3 堆肥化过程中中温微生物的数量

Fig.3 Changes in mesophilic microorganism count during composting process

堆制前期高温微生物数量变化和中温微生物有明显的区别(图 4).首先,堆制前堆料中的高温微生物总数显著小于中温微生物,其中细菌总数小 2~3 个数量级;放线菌小 4~5 个数量级,而堆制前至高温阶段前期(0~10 d),没有出现高温真菌.其次,在快速升温阶段,不同种类高温微生物数量随着堆肥进程呈上升趋势,堆肥中后期所有不同种类高温微生物数量没有明显变化,基本稳定在某一水平上.其中,细菌上升速度最快,堆制第 10 d 稳定.放线菌和

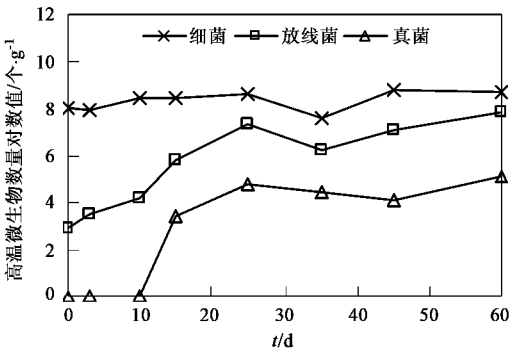


图 4 堆肥化过程高温微生物的数量

Fig.4 Changes in thermophilic microorganism count during composting process

真菌降温阶段初期(25 d 左右)达到稳定.

2.4 堆肥化过程中细菌的 DGGE 分析

各个时期样品的 16S rDNA 的 V3 区域进行变性梯度凝胶电泳, DGGE 条带图谱见图 5. 明显的典型

的 DNA 条带测序后, 经过与数据库比较, 相应条带代表的细菌近源种如表 2 所示.

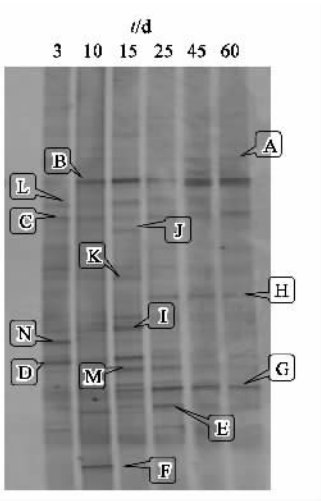


图 5 堆肥化过程中细菌的 DGGE 图谱

Fig.5 DGGE profile of the sample during composting

表 2 堆肥化过程中 DGGE 胶上切下条带及其测序所对应的近源种细菌

Table 2 Percentage homology of sequences from bands of DGGE during composting process compared to BLAST sequences			
条带	登陆号	相似菌株(来源)	16S rDNA 相似率/%
A	EU025072	<i>Ureibacillus thermosphaericus</i> (AY299517)	99.5
B	EU025073	<i>Clostridium thermosuccinogenes</i> (Y18180)	95.3
		Uncultured bacterium clone M1-54(AY096133)	92.9
		<i>Clostridium thermopalmarium</i> (AF286862)	96.3
C	EU025074	<i>Clostridium</i> sp. B40-2(AB059472)	96.3
		Uncultured bacterium (AB179691)	92.0
		<i>Bdellovibrio</i> sp. ETA(AY294225)	92.1
D	EU025075	<i>Petrobacter succinimandens</i> BON4(AY219713)	98.1
		Uncultured bacterium(AB187679)	98.5
		Uncultured <i>Nitrospirae</i> bacterium (AJ534688)	95.5
E	EU025076	Uncultured bacterium isolate DGGE gel (AY780781)	94.6
		<i>Beta proteobacterium</i> (AB015328)	98.9
		Uncultured <i>Gamma proteobacterium</i> (AJ640195)	100
F	EU025077	<i>Paenibacillus</i> sp.(AY167814.1)	99.8
		Uncultured forest soil bacterium clone DUNssu205 (AY913410)	90.6
		Uncultured bacterium clone rc5-14(AY239431)	97.8
G	EU025078	<i>Clostridium</i> sp. IrT-R5M2-31(AJ291836)	92.1
		Uncultured <i>Clostridium</i> sp. clone A1-3(AY675969)	97.0
		Uncultured bacterium clone p-217-α5(AF371581)	97.0
H	EU025081	<i>Bacillus thermoamylovorans</i> (AB121094.1)	99.5
		Uncultured <i>Clostridia</i> bacterium clone (AY607211)	93.0
		Uncultured soil bacterium clone ABS-173 (AY289454)	92.6
I	EU025082	Uncultured bacterium(AB187679)	98.0
		Uncultured <i>proteobacterium</i> (AY711533)	98.2
		<i>Clostridiales</i> bacterium NS4-2 (AY466713)	92.6
J	EU025083	<i>Clostridium</i> sp. clone Pz507(AF095565)	93.4
K	EU025084		
L	EU025085		
M			
N			

第 1 种类型的代表为条带 B 和 C,这 2 个条带代表的细菌在整个堆肥化过程中始终存在,而且数量变化不显著.条带 B 代表菌的数量要比 C 代表菌

的数量明显多,因为 B 的条带亮度显著高于 C.条带 B 代表的近源种为 *Clostridium thermosuccinogene* 或 Uncultured bacterium clone,条带 C 代表的近源种为

Clostridium thermopalmarium 或 *Clostridium* sp., 说明这几个种是堆肥化过程中的重要的细菌类群, 它们对于环境和温度的适应性最强, 在堆肥化过程中发挥重要作用.

第 2 种类型的代表为条带 D, I, J, K, L 和 N, 它们都是在发酵的第 15 d 以前的优势菌群. D 代表的为 Uncultured bacterium 或 *Bdellovibrio* sp. ETA; I 代表的为 Uncultured bacterium clone 或 *Clostridium* sp. IrT-R5M2-31; J 代表的为 Uncultured *Clostridium* sp. Clone 或 Uncultured bacterium clone; K 代表的为 *Bacillus thermoamylovorans*; L 代表的为 Uncultured *Clostridia* bacterium clone 或 Uncultured soil bacterium clone; N 代表的为 *Clostridiales* bacterium 或 *Clostridium* sp. Clone. 这一类群的微生物在堆肥的启动及其高温阶段发挥重要作用, 因为它们是堆肥化中前期的优势菌群, 而且大都是耐热的产芽孢的细菌.

第 3 种类型的代表条带为 G 和 H, 在发酵进行到第 15 d 以后明显增加, 并成为了以后的优势菌群. G 代表的近源种为 *Beta proteobacterium* 或 Uncultured bacterium; H 代表的近源种为 *Paenibacillus* sp. 或 Uncultured forest soil bacterium clone DUNssu205.

第 4 种类型的代表条带为 E, F 和 M, 其中 E 出现在发酵第 10 d, 25 d 以后基本检测不到它的存在, F 也只出现在第 10 d, M 出现在第 15 ~ 25 d, 以后基本消失. E 代表的近源种为 *Petrobacter succinimandens* 或 Uncultured bacterium; F 代表的近源种为 Uncultured *Nitrospirae* bacterium 或 Uncultured bacterium isolate DGGE gel; M 代表的为 Uncultured bacterium 或 Uncultured *proteobacterium*.

从总的 DGGE 条带代表的各类群细菌情况分析, 发酵初期 *Bdellovibrio*、*Clostridia* bacterium、*Bacillus*、*Clostridium* 等占据优势, 中期 *Beta proteobacterium*、*Petrobacter succinimandens*、*Nitrospirae* bacterium、*Clostridium* 等占据优势, 后期 *Clostridium*、*Beta proteobacterium*、*Paenibacillus* 等占据优势, 而在整个堆肥化过程中 *Clostridium* 都是优势种.

3 讨论

堆肥化过程中微生物的群体结构受到原料成分、温度、通气、和水份含量等因素的影响, 平板法、测定 ATP 含量的方法、生物量法及 BIOLOG 方法等都被用于研究堆肥化过程中微生物的变化^[1]. 然而, 以上方法都依赖于微生物培养的方法, 已经证明, 纯培养的方法只能培养到自然界微生物总量的 1% 左

右^[5]. 因此, 需要不依赖于微生物培养的技术来研究堆肥化过程中的微生物动态, 而 DGGE 技术被证明是目前最好的研究环境样品中微生物多样性的分子生态技术之一^[19].

研究表明, 堆肥过程中数量最大、最主要、最普遍的就是细菌^[8, 20, 21], *Thermus thermophilic*、*Thermophilic baacillus*、*Hydrogenobacter* spp.、*Saccharococcus thermophilus*、*Rhodothermus marinus*、*Aneurinibacillus*、*Brevibacillus*、*Actinobacteria*、*Saccharomonospora*、*Gordonia*、*Rhodococcus*、*Corynebacterium*、*Clostridium*、*thermolacticum*、 γ -*Proteobacteria*、*Xanthomonas campestris*、*Pseudomonas*、*Lactobacillus* 等在堆肥化过程中都曾被检测到^[22 ~ 24]. 堆肥化开始时放线菌的数量较多, 但数量上不如细菌多, 差别可多达 3 个数量级; 随着堆肥温度的升高, 直到达到堆温的最高值时, 放线菌的数量减少; 当堆温开始下降时, 放线菌的数量又有所回升^[1]. 中温真菌在堆肥化过程中逐渐减少, 此后嗜热真菌逐渐达到最大值, 大部分真菌在温度达到 50℃ 时就不存在了, 而当温度超过 60℃ 时, 真菌几乎完全消失; 当堆肥温度开始下降, 温度低于 45℃ 时, 真菌的数量又回升^[21]. 总的来说, 细菌、真菌和放线菌的数量在堆肥化过程中都遵循高-低-高的变化趋势. 有的研究者认为在堆肥化过程中微生物的种类更替不大^[10], 而有的认为在堆肥化过程中的不同阶段微生物区系变化巨大^[22].

在本研究中发现, 细菌的数量在所有的微生物种类中是最多的, 而且在笔者其他的相关研究中发现, 细菌分解木质纤维素的能力也明显高于其他微生物种类; 而在以木质纤维素含量极高的畜禽粪便、农业有机固体废弃物为原料的堆肥化过程中, 木质纤维素的分解状况决定着堆肥化的进程^[2, 25, 26]. 因此, 本试验着重研究了细菌群落在堆肥化过程的动态. 在本试验的条件下, 除了少数的细菌始终占据一定的优势外(*Clostridium thermosuccinogene*、*Clostridium thermopalmarium*、Uncultured bacterium), 细菌群体发生了更替. 一些难以分离培养或者可培养的 *Bacillus* 和 *Clostridium* 属的菌株在发酵开始的阶段占据了明显的优势, 它们对于堆体温度的升高起到了重要的作用. 随着发酵的进行, 它们的数量逐渐减少, 被 *Proteobacterium*、*Petrobacte* 属等的菌株取代. 虽然发酵过程的细菌种变化较大, 但是堆肥化过程中细菌属的变化很小, 主要集中在 *Clostridium*、*Bacillus*、*Petrobacter*、*Paenibacillus* 等几个属中, 试验没有检测

到大量的乳酸菌属等的菌株,这些结果与一些人的研究结果不同^[10].就细菌群体在整个堆肥化过程中的演替来看,中前期的细菌的多样性和数量明显高于后期,说明中前期细菌发挥着重要的作用,尤其在高温期,温度高于 50℃,这些耐高温的细菌对于木质纤维素等难分解物质的分解发挥着重要的作用.高温期真菌的数量很少,低于 10⁴ 数量级,真菌可能在堆肥化后期发挥较大的作用.

DGGE 技术也有它的局限性,如受到 DNA 提取方法、PCR 的条件和效率的影响.但是,到目前为止,DGGE 技术是研究堆肥化过程中微生物多样性最好的分子生态技术之一,它可以揭示堆肥化过程中好氧的和厌氧的、可分离培养的和目前不可分离培养的微生物的动态及多样性.把 DGGE 等分子生态技术与传统的微生物培养技术相结合,是研究堆肥化过程中微生物动态有效的方法.

4 结论

(1)通过平板法计数得知,在堆肥化过程中,微生物数量总的趋势是细菌的数量最多,放线菌次之,真菌的数量最少.其中在发酵初期中温细菌、中温放线菌和中温真菌的数量大约依次相差 2 个数量级,当发酵结束后,中温微生物的数量低于发酵初始水平.发酵初期高温微生物的数量少于中温微生物,并且很难检测到高温真菌的存在;高温细菌的数量在整个堆肥化过程中变化不大,而高温放线菌和高温真菌在高温期逐渐增多,实验结束后高于初始水平.细菌在整个堆肥化过程中数量是最大的,因此应该尤其重视细菌在堆肥化过程中的作用.

(2)通过 DGGE 分析表明,发酵过程中细菌的种类发生了明显的更迭现象.发酵初期 *Bdellovibrio*、*Clostridia* bacterium、*Bacillus*、*Clostridium* 等占据优势,中期 *Beta proteobacterium*、*Petrobacter succinimandens*、*Nitrospirae* bacterium、*Clostridium* 等占据优势,后期 *Clostridium*、*Beta proteobacterium*、*Paenibacillus* 等占据优势,整个堆肥化过程中, *Clostridium* 都是优势菌.

参考文献:

- [1] 王伟东,刘建斌,牛俊玲,等.堆肥化过程中微生物群落的动态及接菌剂的应用效果[J].农业工程学报,2006,22(4):148~152.
- [2] 王伟东,王小芬,刘建斌,等.供氧方式及供氧量对堆肥发酵进程的影响[J].环境科学,2006,27(3):594~598.
- [3] 王伟东,崔宗均,王小芬,等.快速纤维素分解菌复合系 MC1 对秸秆的分解能力及稳定性[J].环境科学,2005,26(5):156~160.

- [4] 王伟东.木质纤维素快速分解复合系及有机肥微好氧新工艺[D].北京:中国农业大学,2005.3~30.
- [5] Amann R I, Ludwig W, Schleiffer K H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiol Rew, 1995, 59: 143~146.
- [6] Klammer M, Bääth E. Microbial community dynamics during composting of straw material studied using phospholipid fatty acid analysis[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1998, 27: 9~20.
- [7] 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.
- [8] Bolta S V, Mihelic R, Lobnik F, *et al.* Microbial community structure during composting with and without mass inocula[J]. Compost Science and Utilization, 2003, 11(1): 6~15.
- [9] Hermann R F, Shann J F. Microbial community changes during the composting of municipal solid waste[J]. Microbial Ecology, 1997, 33: 78~85.
- [10] Pedro M S, Haruta S, Hazaka M, *et al.* Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analyses of Microbial Community from Field-Scale Composter[J]. J Biosci Bioeng, 2001, 91(2): 159~165.
- [11] Alfreider A, Peters S, Christoph C, *et al.* Microbial community dynamics during composting of organic matter as determined by 16S Ribosomal DNA analysis[J]. Compost Science and Utilization, 2002, 10(4): 303~312.
- [12] Peters S, Kohlasky F, Schwleger F, *et al.* Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single-strand-conformation polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66: 930~936.
- [13] 李卓棣,喻子牛,何少江.农业微生物学实验技术[M].北京:中国农业出版社,1996.305~306.
- [14] 徐静安.分析测试方法[M].北京:化学工业出版社,2000.376~379.
- [15] Watanabe A, Katoh K, Kimura M. Effect of Rice Straw Application on CH₄ Emission from Paddy Field[J]. Soil Sci Plant Nutr, 1993, 39(4): 707~712.
- [16] Zhu H, Qu F, Zhu L H. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride[J]. Nucleic Acids Res, 1993, 21: 5279~5280.
- [17] Muyzer G, Waal E C D, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59: 695~700.
- [18] Iiyama K, Stone B A, Macauley B J. Compositional changes in compost during composting and cropping of *Agaricus bisporus* [J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60: 1538~1546.
- [19] Muyzer G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystem[J]. Current Opinion in Microbiology, 1999, 2: 317~322.
- [20] 冯明谦,刘德明.滚筒式高温堆肥中微生物种类数量的研究[J].中国环境科学,1999,19(6):490~492.
- [21] Khalil A I, Beheary M S, Salem E M. Monitoring of microbial population and their cellulolytic activities during the composting of municipal solid waste[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2001, 17: 155~161.

- [22] Blanc M, Marilley L, Beffa T, *et al.* Thermophilic bacterial communities in hot composts as revealed by most probable number counts and molecular (16S rDNA) methods [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, **28**: 141 ~ 149.
- [23] Dees P M, Ghiorse W C. Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolates and extracted DNA [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, **35**: 207 ~ 216.
- [24] Peters S, Koschinsky S, Schwieger F, *et al.* Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-Single-Strand-Conformation Polymorphism-Based genetic profiles of small-subunit rRNA genes [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**: 930 ~ 936.
- [25] 崔宗均, 李美丹, 朴哲, 等. 一组高效稳定纤维素分解菌复合系 MC1 的筛选及功能[J]. *环境科学*, 2002, **23**(3): 36 ~ 39.
- [26] 王伟东, 崔宗均, 杨洪岩, 等. 高效稳定纤维素分解菌复合系 WSC-6 的稳定性研究[J]. *中国环境科学*, 2005, **25**(5): 567 ~ 571.

欢迎订阅 2008 年《环境科学》

《环境科学》创刊于 1976 年,由中国科学院主管,中国科学院生态环境研究中心主办,是我国环境科学学科中最早创刊的学术性期刊。

《环境科学》自创刊以来,始终坚持“防治污染,改善生态,促进发展,造福人民”的宗旨,报道我国环境科学领域内具有创新性高水平,有重要意义的基础研究和应用研究成果,以及反映控制污染,清洁生产和生态环境建设等可持续发展的战略思想、理论和实用技术等。

《环境科学》在国内外公开发行,并在国内外科技界有较大影响,被国内外一些重要检索系统收录,如美国医学索引 MEDLINE;美国工程索引 EI;美国化学文摘 CA;俄罗斯文摘杂志 AJ;美国生物学文摘预评 BP;美国医学索引 IM;日本科学技术情报中心数据库 JICST;英国动物学记录 ZR;剑桥科学文摘(CSA): Environmental Sciences;剑桥科学文摘(CSA): Pollution Abstracts;剑桥科学文摘(CAS): Life Sciences Abstracts 等;国内的检索系统有中国科技论文统计与引文数据库(CSTPCD);中文科技期刊数据库(维普);中国期刊全文数据库(CNKI);数字化期刊全文数据库(万方);中国科学引文数据库(CSCD);中国生物学文摘等。

全国各地邮局均可订阅,如有漏订的读者可直接与编辑部联系,办理补订手续。

《环境科学》2007 年为 16 开本,60 元/册,全年 12 期。

国内统一刊号: CN11-1895/X 国际标准刊号: ISSN 0250-3301

国外发行代号: M 0205 国内邮发代号: 2-821

编辑部地址: 北京市海淀区双清路 18 号(2871 信箱) 邮编: 100085

电话: 010-62941102; 传真: 010-62849343; E-mail: hjkx@rcees.ac.cn; 网址: www.hjkx.ac.cn