

基于 Biolog 解析添加酶液对堆肥化过程中微生物群落代谢的影响

冯冲凌, 曾光明*, 黄丹莲, 胡霜, 苏峰峰, 赵美花, 赖翠

(湖南大学环境科学与工程学院, 湖南 410082)

摘要: 以 Biolog 方法为主要监测手段, 结合聚类分析以及 PCA 分析方法, 考察了添加酶液对农业废物堆肥中木质纤维素降解及微生物群落代谢能力的影响。结果表明, 添加酶液使得堆料中有机质的降解率提高了 4.90%; 微生物群落代谢聚类结果表明, 添加酶液可以改善堆肥微生物对中间代谢产物类碳源的代谢能力。通过 PCA 发现, 添加酶液提高了堆体中微生物对双亲化合物、聚合物、氨基酸和氨基化合物等碳源的代谢能力, 由此可导致有机质被更高效降解; 此外, 堆肥各时期群落代谢聚类结果表明, 酶液对堆肥进程的影响主要表现在一次发酵的第 6 d 和二次发酵的第 30 d, 从而有效地加速了堆肥进程。

关键词: 堆肥; 微生物群落代谢; Biolog 方法; 聚类分析; PCA 分析

中图分类号: X705; X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)10-3016-06

Analysis of the Effect of Enzymes on Microbial Community Metabolic Profiles During Composting Using Biolog Method

FENG Chong-ling, ZENG Guang-ming, HUANG Dan-lian, HU Shuang, SU Feng-feng, ZHAO Mei-hua, LAI Cui

(College of Environmental Science and Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract: The effects of enzymes on organic material degradation and microbial communities metabolic profiles during composting process were studied using Biolog method, and together with cluster analysis and PCA. The results showed that, adding the enzyme solution in the composting could increase the degradation rate of organic material by 4.90%. The microbial community metabolic results of cluster analysis showed that when the enzyme solution was added into the compost, the carbon metabolic capability of intermediate metabolite was improved. The results of PCA indicated that when the enzyme solution was added, microbial communities enhanced the metabolic capability of miscellaneous, polymers, amino acids and amides carbon substrates, which results in the efficient degradation of organic substance. In addition, cluster analysis of each composting phase showed that the effects of the enzymes solution on microbial community metabolism were mainly observed on 6 d and 30 d, which promoted the composting process.

Key words: compost; microbial community metabolism; Biolog method; cluster analysis; PCA

堆肥化被认为是有效处理固体废物的一种环境友好型技术^[1,2]。有机固体废物, 尤其是农业秸秆, 城市绿化废物中含有 60% 以上的木质纤维素; 由于木质纤维素不易降解的特性导致难以被大多数微生物直接作为碳源物质而转化利用, 阻碍了堆肥技术的发展^[3]。酶作为一种高效的生物催化剂, 已广泛地应用于轻工业的各个生产领域。近几十年来, 随着酶工程的技术性突破, 其在工业、农业、医药卫生、能源开发及环境工程等方面的应用越来越广泛。研究表明^[4], 木质素降解酶可以促进木质纤维素类物质的有效降解, 因此被应用到造纸工业与饲料生产中, 而在堆肥中添加木质素降解酶可以促进难降解物质如木质纤维素类物质的降解, 国内外关于这方面的研究却鲜见报道。

堆肥的实质是微生物在适宜的条件下分解和转化有机废物的生化代谢过程, 在此过程中, 微生物群落的代谢能力是影响有机废物减量化、资源化的关

键因素^[5~7], 同时微生物群落的代谢能力也是堆肥基质中微生物活性的重要表征^[8,9], 因此研究堆肥过程微生物群落代谢特征对揭示堆肥化过程中的有机物降解机制及堆肥技术条件的优化具有重要的理论意义和实践价值。Biolog 法可以通过测试微生物对单一碳源的利用程度来反映微生物群落代谢能力, 从而可以评估不同环境下微生物群落的代谢特征^[10~12]。目前, 该方法已经被广泛应用于土壤、水体、生物反应器及堆肥等不同生态系统中微生物群落的鉴定与分析^[13~15]。冯宏等^[16]应用 Biolog 法考察了接种菌剂对堆肥过程中微生物群落代谢能力的影

收稿日期: 2008-11-16; 修订日期: 2009-03-16

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2005CB724203); 湖南省研究生科研创新项目; 国家教育部长江学者和创新团队发展计划项目(IRT0719); 国家自然科学基金青年科学基金项目(50808073); 湖南省环境保护科技项目(2007185)

作者简介: 冯冲凌(1982~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为堆肥中微生物技术, E-mail: fengchongling09@163.com

* 通讯联系人, E-mail: zgning@hnu.cn

响, 结果表明接种菌剂可以提高微生物对各类有机碳源的利用能力. 故本试验以 Biolog 法为研究手段, 采用液态深层发酵产酶法制备富含木质素降解酶的粗酶液并将其添加到传统堆肥中, 考察添加酶液对堆肥不同阶段微生物群落代谢能力的影响, 并利用多种多元统计方法分析实验结果, 以期酶制剂应用于堆肥, 加速堆肥化进程、缩短堆肥周期提供理论依据和技术参考.

1 材料与方法

1.1 堆肥原料及酶液制备

供试有机废物为长沙市近郊的农业废物, 主要包括蔬菜残余、麸皮及稻草. 蔬菜残余风干后切至 10~20 mm; 稻草洗净风干后剪至 10~20 mm; 供试腐殖土为长沙市近郊山林间表层腐土(可为堆肥基质提供丰富的微生物).

酶液的制备: 将黄孢原毛平革菌孢子悬液接种于优化后的 Tien&Kirk 液态培养基, 37℃ 下, 以 160 r/min 振荡培养 7 d, 培养液经离心(9 000 r/min, 10 min)所得上清液即为据有较佳木质素降解能力的粗酶液^[17,18](含木质素过氧化物酶和锰过氧化物酶).

1.2 堆制方法及取样

堆肥实验共设 2 个处理, 其中未添加粗酶液的处理为 A 处理, 添加酶液的处理为 B 处理(酶液的添加量为堆肥原料重量的 1%). 堆置方法为: 将上述堆肥原料充分混合, 调节 C/N 为 30, 含水率控制为 65%, 其中处理样先添加酶液, 之后补水以控制堆体含水率; 堆肥前 2 周每 3 d 翻堆 1 次, 以后每周翻堆 1 次. 分别于堆肥不同时期(第 0、3、6、15、30、40、50 d)采用多点采样的方法进行采样, 均匀混合样品后, 一部分用于测定化学指标, 另一部分用于 Biolog 检测. 所有分析取样均采集 3 个平行样.

1.3 木质纤维素测定

利用 FOSS 半自动纤维素测定仪测定^[19]. 分别测定出样品中性洗涤纤维(NDF)、酸性洗涤纤维(ADF)和酸性洗涤木质素(ADL)含量, 并测定出灰分的含量. 半纤维素含量为 NDF 与 ADF 的质量差, 纤维素含量为 ADF 与 ADL 的质量差, 木质素含量为 ADL 与灰分的质量差.

1.4 堆肥中微生物群落代谢检测

取 4 g 堆肥样品加 36 mL 无菌生理盐水, 160 r/min 下振荡 1 h, 静置片刻后取上清液并将其用无菌生理盐水, 使接种液稀释度为 10⁻³. 将稀释后的上清液接种于 Biolog ECO 板中, 每孔 150 μL. 每个样品

3 个重复. 28℃ 培养箱中培养 10 d, 每 12 h 在 Biolog 自动鉴定仪上读数以采集数据.

1.5 数据分析方法

常规的 Biolog 数据分析主要采用平均色度变化(AWCD)来表征^[20]. 但为了避免由于系统自身干扰, 需要将 AWCD 进行标准化处理:

$$\overline{A_k} = \frac{A_k - A_0}{\frac{1}{31} \sum_{i=1}^{31} (A_i - A_0)}$$

式中, A₀ 为对照孔吸光度值; A_i 为除对照孔外的吸光度值; A_k = A_i.

采用 Biolog 微平板培养 72 h 的数据进行数据统计, 数据标准化后分别用于聚类分析和主成分分析. 所有多元统计分析均由 SPSS 13.0 统计软件完成.

2 结果与分析

2.1 添加酶液对有机质及木质纤维素降解能力的影响

有机质是微生物生长代谢的碳源和能源, 观测堆肥过程中有机质含量的变化可以了解堆料中微生物群落代谢能力的变化趋势.

由图 1 可以看出, 2 个处理在堆置过程中有机质一直呈下降趋势, 其中 A 处理中有机质含量从 61.2% 下降到 35.7%, B 处理中有机质含量则从 61.2% 下降到 30.8%, 降幅分别为 25.5% 和 30.4%. 对 A 处理与 B 处理的有机质降解率进行差异显著性检验, 结果表明添加酶液可显著促进堆肥化中有机质的降解(*p* < 0.05), 降解率提高了 4.90%. 这表明添加酶液可以提高堆肥中微生物对有机物的降解能力, 其实质表明添加酶液提高了堆体中微生物对总有机碳的代谢能力.

木质素的降解是堆肥过程中的限速因素, 也是影响堆肥质量的重要因素之一. 由有机质中木质纤

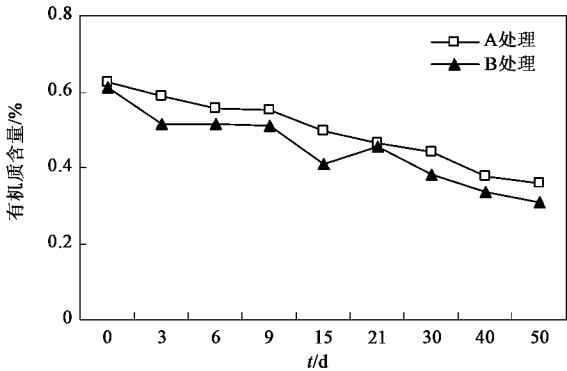


图 1 有机质含量变化

Fig. 1 Changes of the organic substances

纤维素降解率(表 1)可知,添加酶液后 B 处理中木质素的降解率比 A 处理中提高了 11.74%,同时半纤维素的降解率也提高了 5.24% ($p < 0.05$).说明添加酶液可以有效提高有机质中木质素的降解能力,这可能于由于酶液中的木质素降解酶能促进木质素的催化氧化;同时由于有机质中木质素的屏障作用被破坏,因此 B 处理中半纤维素的降解率也被提高,这也可能是导致 B 处理中微生物群落对总有机碳的代谢能力提高的原因.

表 1 堆肥过程木质纤维素相对降解率

Table 1 Changes of lignocellulose degradation rate in composting phase						
堆肥 时间 /d	木质素 降解率/%		半纤维素 降解率/%		纤维素 降解率/%	
	A 处理	B 处理	A 处理	B 处理	A 处理	B 处理
3	2.312	4.321	8.104	14.19	7.503	15.46
6	12.38	9.69	28.55	31.62	13.46	21.66
15	26.54	38.11	38.67	50.52	51.09	49.96
30	40.73	44.00	51.44	64.49	67.92	67.16
40	51.55	59.70	70.03	68.96	75.57	72.30
50	53.38	65.12	73.03	78.27	80.54	78.38

2.2 添加酶液对微生物群落代谢能力的影响

堆肥化过程是通过堆肥中微生物的生命活动即合成和分解过程,因此,了解微生物群落代谢能力有

助于了解堆肥过程中有机质降解和转化发生的路径和机制.

通常研究者习惯于把 Biolog 微平板中的碳源分为聚合物、糖类、羧酸、氨基酸、胺及其它六大类碳源而进行分别研究.但郁红艳等^[21]对 Biolog 数据进行聚类分析后发现传统分类方法所得到的信息与实际生物信息有很大的误差,该研究指出堆肥化过程中微生物群落结构变化复杂,传统的分类方法无法准确反映群落对不同碳源相似的代谢能力,而聚类分析可以将有相似消耗特性的碳源进行重新分类从而可准确地反映群落代谢功能特征,故本实验将 2 个堆肥处理中微生物群落对 31 种碳源的代谢特征进行聚类分析(图 2).

由图 2 可以看出,当聚类距离 ≤ 10 时,微生物群落代谢方式可以被合并为 6 类.从聚类结果可以看出,在 2 个堆体中 D-半乳糖内酯、丙酮酸甲脂、D-木糖、D-半乳糖醛酸、L-天冬酰胺酸、D-甘露醇、N-乙酰基-D-葡萄糖胺、肝糖、D-纤维二糖均被聚为同一类,因此可以推断出这类碳源应该是堆肥过程中供微生物代谢的基础碳源,其中基础碳源以糖类(4 种)为主,这也与微生物的常规代谢特征相符合.

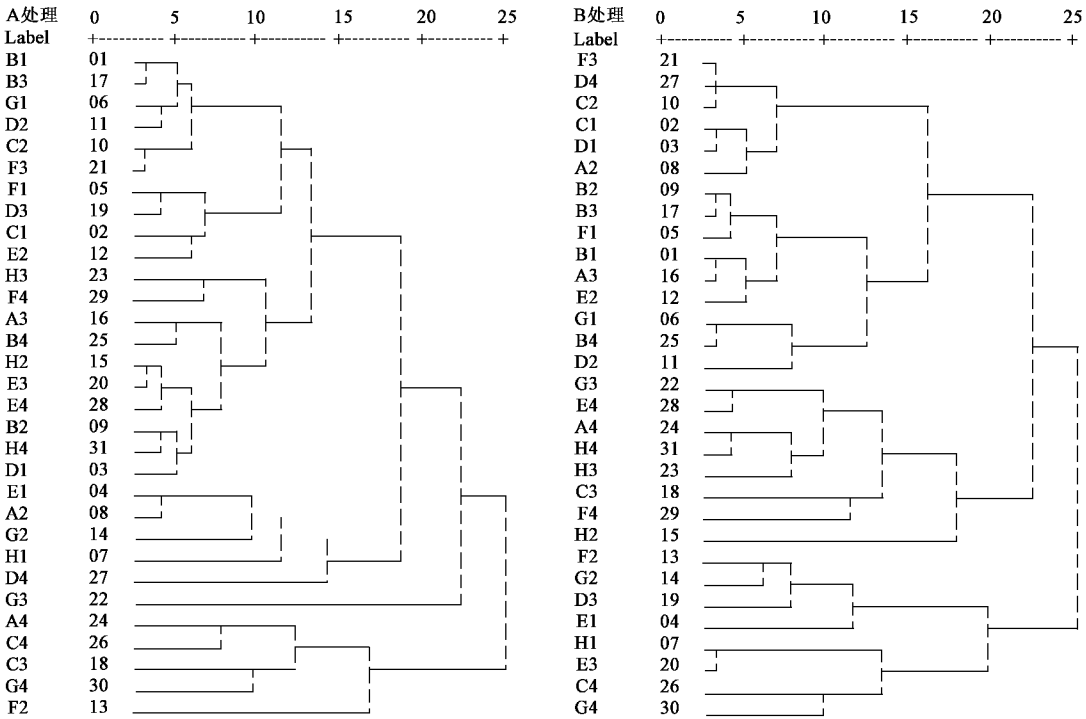


图 2 堆肥过程中 31 种碳源的聚类分析图

Fig.2 Dendrogram from average linkage cluster between the 31 carbon substrates

由聚类结果还可以看出, A 处理与 B 处理在碳源的利用能力上有明显的差异. 本研究发现, 当聚类距离 ≤ 10 时, 被合并为 6 大类的 31 种碳源中, A 处理中有 3 种碳源分别被单独聚为一类, 它们是 α -丁酮酸、D-葡萄糖胺酸及 L-丝氨酸; 而 B 处理中仅有 D, L- α -磷酸甘油被单独聚为一类, 它们均是氨基酸代谢及糖代谢过程的中间代谢物. 张海涵等^[22]在利用 Biolog 法研究不同生态条件下根际土壤微生物群落代谢能力时指出, 与微生物生理代谢途径相关碳源的差异利用是影响微生物群落碳源代谢能力的重要因素之一. 结合 2.1 中有机质降解能力分析结果可以推测, 添加酶液可以改善堆肥化过程中微生物对中间代谢产物的转化和利用能力, 从而导致有机质的有效降解. 这可能是提高堆肥过程中有机物降解能力的主要因素之一, 但最终的结论还有待进一步研究和证实.

2.3 添加酶液对微生物群落代谢能力影响的 PCA 分析

Biolog 微平板数据统计结果表明堆肥中微生物对 Biolog 微孔板上的碳源均有代谢能力, 然而对比后可以发现不同碳源的吸光度值有着明显的差异, 这表明在堆肥过程中微生物对碳源利用的能力是不相同的. 为了更加清晰地了解添加酶液对堆肥过程中微生物碳源代谢能力的影响, 同时为了将 Biolog 微孔板复杂的数据信息进行简化, 故对 Biolog 测试所得数据进行标准变换后, 实施主成分分析(PCA). 提取 2 个堆体中主元向量的前 2 个主成分(PC1/PC2), 它们的累积贡献率分别为 67.00% 和 65.10%, 由此可以认为这 2 个主成分可以表征堆肥化过程中微生物群落代谢能力的基本轮廓. 故提取 31 种碳源在 2 个主成分中的因子载荷做图以表征这 31 个变量(31 种碳源)的代谢特征(图 3).

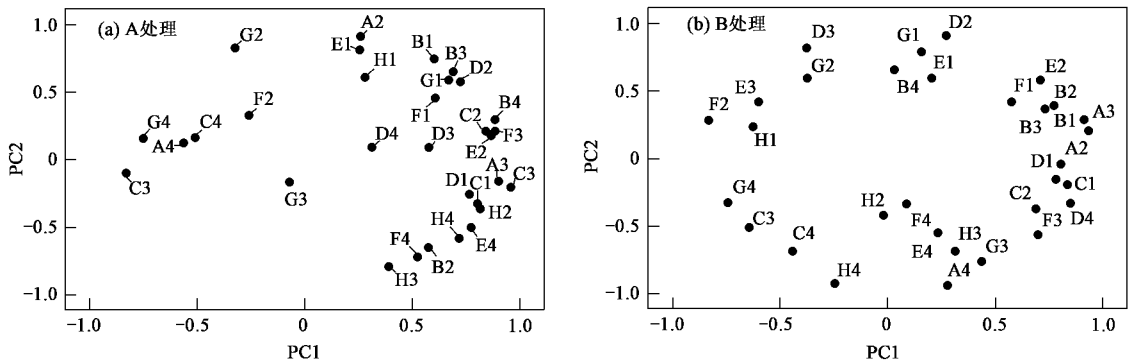


图 3 堆肥化过程碳源代谢特性的主成分分析

Fig.3 Principal component analysis of microbial community metabolism during composting process

由图 3 可以看出, 添加酶液后各种碳源对 PC1 和 PC2 的贡献率均有改变. A 处理中 PC1 在糖类(*i*-赤藓糖醇、*N*-乙酰基-D-葡萄糖胺)和羧酸类(D-半乳糖 γ -内酯、 α -羟基苯甲酸)等碳源种类上有较高载荷, 这表明在堆肥过程中微生物群落比较偏好糖类碳源的代谢, 此结果与聚类分析中糖类碳源是堆肥过程中微生物代谢的基础碳源的结果相吻合; B 处理中 PC1 主要在羧酸类(D-半乳糖 γ -内酯、D-葡萄糖胺酸)、双亲化合物(丙酮酸甲酯)和聚合物(吐温 40)等碳源种类上有较高载荷, 这表明添加酶液后微生物群落对双亲化合物及聚合物类碳源的代谢能力明显提高, 这可能与添加的木质素降解酶能催化降解堆料中木质素类物质有关. 木质素降解酶可以通过催化氧化木质素单元结构侧链断裂或促使木质素单体、二聚体或低聚体中芳香结构发生开环反应从

而导致木质素降解甚至矿化^[23,24].

A 处理中影响 PC2 的仍然以糖类碳源(β -甲基-D-葡萄糖苷)和羧酸类碳源(D-苹果酸)为主, 而 B 处理中影响 PC2 的除了糖类碳源和羧酸类碳源, 还增加了氨基酸类碳源(L-精氨酸)和氨基化合物类碳源(腐胺), 这表明添加酶液提高了微生物群落对与中间代谢产物的碳源类物质的利用能力, 结合 2.1 中有机质降解情况分析可以看出, 添加粗酶液后堆体中微生物对氨基酸及氨基化合物类碳源代谢能力的提高可能是导致处理堆体中有机质被更高效降解的原因之一, 这与聚类分析的结论相一致.

2.4 添加酶液对堆肥各时期群落代谢影响聚类分析

对 A 处理与 B 处理中各时期微生物群落碳源代谢数据进行聚类分析, 如图 4 所示.

A 处理中, 根据各时期的堆肥样品中微生物群

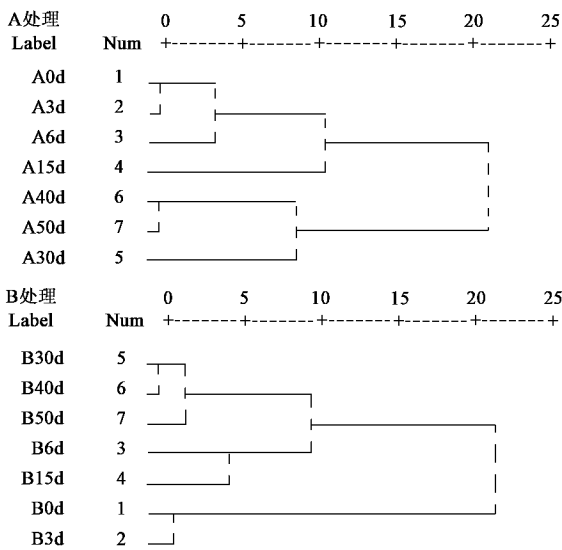


图 4 堆肥各时期群落碳源代谢特征聚类分析

Fig. 4 Cluster analysis of each composting phase microbial community metabolism during composting

落对不同碳源代谢能力相似程度,可将堆肥过程分为堆肥初期、一次发酵期和二次发酵期,其中 0~6 d 为堆肥初期,第 15~30 d 为一次发酵期,30~50 d 为二次发酵期.而 B 处理的聚类分析图显示,原来在 A 处理中属于堆肥初期组的第 6 d 的样品在 B 处理中被列为一次发酵期的类别中;同时,通过相似度比较可以看出,尽管 A 处理中第 30 d 样品同第 40 d 和第 50 d 的样品均被列为二次发酵期的类别中,但它与后两者的聚类距离却相距较远;而在 B 处理中,第 30 d 的样品与第 40 d、第 50 d 的样品聚类距离却相距较近,表现出了较高的相似度.此外由聚类结果还可以看出, A 处理中一次发酵样品与堆肥初期样品更相似;而 B 处理中一次发酵样品与二次发酵样品更相似,这表明添加酶液可以使堆体中的微生物群落水平提前达到稳定.以上结果均说明,添加酶液对堆肥进程有明显的促进作用,其效应主要表现在一次发酵和二次发酵期间,这可能与木质素过氧化物酶可以催化氧化木质素有关.

3 结论

(1)在堆肥中添加酶液可以显著提高微生物对有机质的降解能力($p < 0.05$).木质纤维素的变化趋势表明,添加酶液可以有效提高堆肥过程中木质素的降解,同时由于木质素的屏障作用被破坏,因此 B 处理中半纤维素的降解率也被提高.

(2)Biolog 数据聚类结果表明添加酶液可以改

善堆肥中微生物对中间代谢物的利用能力;PCA 分析结果表明添加酶液可以影响各类碳源对主成分的贡献率,主因子载荷变化表明添加酶液提高了微生物对难降解有机物及微生物中间代谢产物有关碳源的利用能力.

(3)堆肥各时期群落代谢聚类分析表明酶液对堆肥进程的影响主要表现在一次发酵的第 6 d 和二次发酵的第 30 d,它有效地促进了堆肥进程,加速堆肥腐熟并使得堆体中的微生物群落水平提前达到稳定.

参考文献:

[1] Abdelmajid J, Soumia A, Mohamed E G, *et al.* Chemical and spectroscopic analysis of organic matter transformation during composting of sewage sludge and green plant waste [J]. *Int Biodeter Biodeg*, 2005, **56**(2): 101-108.

[2] Jiang X Y, Zeng G M, Huang D L, *et al.* Degradation of pentachlorophenol in soil by composting with immobilized *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *World J Microb Biot*, 2006, **22**: 909-913.

[3] 戴芳,曾光明,袁兴中,等.生物表面活性剂在农业废物好氧堆肥中的应用[J]. *环境科学*, 2005, **26**(4): 181-185.

[4] 毕鑫,路福平,杜连祥.白腐菌木素过氧化物酶发酵条件及其酶液对稻草降解的研究[J]. *纤维素科学与技术*, 2002, **10**(4): 41-48.

[5] Sánchez-Monedero M A, Roig A, Cegarra J, *et al.* Relationships between water-soluble carbohydrate and phenol fractions and the humification indices of different organic wastes during composting [J]. *Bioresour Technol*, 1999, **70**: 193-201.

[6] López M J, Elorrieta M A, Vargas-García M C, *et al.* The effect of aeration on the biotransformation of lignocellulosic wastes by white-rot fungi [J]. *Bioresour Technol*, 2002, **87**: 123-129.

[7] Dignac M F, Houot S, Francou C, *et al.* Pyrolytic study of compost and waste organic matter [J]. *Org Geochem*, 2005, **36**: 1054-1071.

[8] Yu H Y, Zeng G M, Huang H L, *et al.* Microbial community succession and lignocellulose degradation during agricultural waste composting [J]. *Biodegradation*, 2007, **18**: 793-802.

[9] Zeng G M, Huang D L, Huang G H, *et al.* Composting of lead-contaminated solid waste with inocula of white-rot fungus [J]. *Bioresour Technol*, 2007, **98**(2): 320-326.

[10] Glimm E, Heuer H, Engelen B, *et al.* Statistical comparisons of community catabolic profiles [J]. *J Microbiol Meth*, 1997, **30**: 71-80.

[11] Graham M H, Haynes R J. Catabolic diversity of soil microbial communities under sugarcane and other land uses estimated by Biolog and substrate-induced respiration methods [J]. *Appl Soil Ecol*, 2005, **29**: 155-164.

[12] Howard P J A. Analysis of data from biolog plates: comments on the method of Garland and Mills [J]. *Soil Biol Biochem*, 1997, **29**: 1755-1757.

[13] Raphaël C, Karine L, Sylvie B. Analysis of the potential functional diversity of the bacterial community in soil: a reproducible procedure

- using sole-carbon-source utilization profiles [J]. Eur J Soil Biol, 2005, **41**: 11-20.
- [14] Andrea K B, Péter V, Gábor C, *et al.* Bacterial activities in the sediment of Lake Velencei, Hungary [J]. Hydrobiologia, 2003, **506** (3): 721-728.
- [15] 席劲瑛, 胡洪营, 姜健, 等. 生物过滤塔中微生物群落的代谢特性[J]. 环境科学, 2005, **26**(7): 165-170.
- [16] 冯宏, 张新明, 李华兴, 等. 接种菌剂对堆肥微生物利用碳源能力的影响[J]. 华南农业大学学报, 2005, **26**(4): 19-22.
- [17] Tien M, Kiek T K. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Method Enzymol, 1988, **161**(2): 238-249.
- [18] 高大文, 文湘华, 钱易. 白腐真菌木质素降解酶的反应器发酵[J]. 环境科学, 2006, **27**(2): 333-337.
- [19] Huang D L, Zeng G M, Feng C L, *et al.* Degradation of lead-contaminated lignocellulosic waste by *Phanerochaete chrysosporium* and the reduction of lead toxicity [J]. Environ Sci Technol, 2008, **42** (13): 4946-4951.
- [20] Kela P W, Jason A G, Matthias G, *et al.* Data transformations in the analysis of community-level substrate utilization data from microplates [J]. J Microbiol Meth, 2007, **69**: 461-469.
- [21] 郁红艳, 曾光明, 习兴梅, 等. 蔬菜-秸秆废物堆肥化中细菌群落变化研究[J]. 微生物学报, 2007, **47**(1): 98-102.
- [22] 张海涵, 唐明, 陈辉, 等. 不同生态条件下油松 (*Pinus tabulaeformis*) 菌根根际土壤微生物群落[J]. 生态学报, 2007, **27**(12): 5463-5470.
- [23] Guerra A, Mendonça R, Ferraz A, *et al.* Structural Characterization of Lignin during *Pinus taeda* Wood Treatment with *Ceriporiopsis subvermispora* [J]. Appl Environ Microbiol, 2004 **70** (7): 4073-4078.
- [24] Kersten P, Cullen D. Extracellular oxidative systems of the lignin degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Fungal Genet Biol, 2007, **44**(2): 277-287.