

不同处理方式对奶牛粪细菌群落多样性及群落结构的影响

郑金伟, 李辉信, 胡 锋

(南京农业大学资源与环境科学学院, 江苏 南京 210095)

摘 要: 以腐熟牛粪、新鲜牛粪以及蚯蚓粪为材料, 提取其微生物总 DNA, 利用细菌 16S rDNA V3 区扩增及变性梯度凝胶电泳 (PCR-DGGE) 法, 分析了 3 种材料中细菌的多样性以及细菌群落结构的相似性。结果表明, 蚯蚓粪的细菌多样性最丰富, 腐熟牛粪次之, 新鲜牛粪的细菌多样性最小。蚯蚓粪和腐熟牛粪的细菌群落结构有 40% 的相似性; 蚯蚓粪和新鲜牛粪的细菌群落结构的相似性为 25%; 新鲜牛粪和腐熟牛粪的细菌群落结构的相似性则为 35%。

关键词: 奶牛粪; 蚯蚓堆制; 微生物群落结构

中图分类号: X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2009)03-0555-04

Effects of Different Treat Ways on Microbial Diversity and Microbial Community Structure of Dairy Manure

ZHENG Jin-wei, LI Hui-xin, HU Feng

(College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Effects of different treat ways on microbial diversity and microbial community structure of dairy manure were studied by PCR-DGGE profiles of bacterial 16S rDNA V3 region. In this research, composted dairy manure and vermicompost came from fresh dairy manure by composting and vermicomposting. The total genomic DNA of composted dairy manure, fresh dairy manure and vermicompost were extracted respectively by direct DNA extraction method. By analyzing the DGGE profiles, it was found that the microbial diversity of vermicompost was higher than that of fresh dairy manure, but lower than that of composted dairy manure. There were about 40% similarities of microbial community structure between vermicompost and composted dairy manure, 25% between vermicompost and fresh dairy manure, and 35% between fresh dairy manure and composted dairy manure. The research result indicates that different treat ways will result in the distinct change of microbial diversity and microbial community structure of dairy manure, moreover, the change arises from vermicomposting is more significant than that from composting. This study will help us to know the roles of microorganisms in the process of composting or vermicomposting of dairy manure.

Keywords: dairy manure; vermicomposting; microbial community structure

奶牛养殖场每天产生数以吨计的牛粪而成为重要污染源, 牛粪的安全处理处置问题已成为制约养殖场规模扩大的重要因素之一。近年来, 利用蚯蚓处理牛粪的方法得到越来越多的应用, 蚯蚓处理费用少、速度快, 而且使牛粪真正实现了无害化、减量化和资源化。牛粪经蚯蚓的消化和代谢作用转化为蚯蚓粪,

蚯蚓粪具有很高的养分含量^[1], 很多研究结果表明, 植物栽培基质中添加蚯蚓粪不但能够促进植物的生长而且可以抑制某些土传病害的发生^[2-4]。牛粪的这些变化被认为与牛粪在蚯蚓堆制处理过程中的微生物功能变化有关^[5], 但还没有得到更进一步的证据。生态系统中, 微生物功能是和微生物的种类、数量及其群落结构紧密相关的。目前, 关于蚯蚓粪微生物多样性、群落结构以及功能研究方面报道不是很多, 因此, 研究蚯蚓堆制处理过程中微生物的群落结构变化很有意义。而传统的土壤微生物研究方法如分离计数法、显微镜法往往会过低估价土壤微生物的群落结构组成^[6-7]。本论文通过从牛粪、自然腐熟牛粪和蚯蚓粪中

收稿日期: 2008-06-12

基金项目: 南京农业大学青年基金项目 (KJ08009); “863”项目专题, 村镇垃圾处理与资源化技术项目 (2002AA601012-2)

作者简介: 郑金伟 (1973—), 男, 浙江金华人, 讲师, 硕士, 主要从事土壤生态学的教学和研究工作。E-mail: zhengjw@njau.edu.cn

联系人: 胡 锋 E-mail: fenghu@njau.edu.cn

提取微生物总 DNA, 再进行细菌 16S rDNA PCR-DGGE 分析, 试图弄清牛粪蚯蚓堆制过程中细菌群落结构的变化。

1 材料与方法

1.1 供试材料

新鲜牛粪(DM)采自麒麟门西流奶牛公寓。在实验室内, 600 kg 新鲜牛粪平均分成 A、B 两堆, A 堆进行普通堆制, 牛粪在堆制初期释放的 NH_3 、 H_2S 等刺激性气体不利于蚯蚓的生存, 因此 B 堆在堆制 7 d 后接种 5 kg 蚯蚓, 20 d 后采取 A 堆的腐熟牛粪(CP)以及 B 堆上层蚯蚓粪(VC)用于后续试验。

采取的新鲜牛粪(DM)、腐熟牛粪(CP)和蚯蚓粪(VC)的 pH 值、容重、碳氮比、电导率(EC)、矿质养分等理化性质指标如表 1。

表 1 新鲜牛粪、腐熟牛粪和蚯蚓粪的理化性质

Table 1 Physical and chemical characteristics of CP, VC and DM

样品	pH 值	容重/ $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	碳氮比 C/N	电导率/ $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$	全 N/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	全 P/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	全 K/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
DM	8.9	1.32	25.7	4.78	11.88	5.18	0.44
CP	7.8	0.91	19.3	2.65	15.17	10.92	0.55
VC	7.4	0.74	14.8	3.45	15.59	11.57	0.54

1.2 微生物总 DNA 的提取

微生物总 DNA 的提取参考文献[8]的方法进行。取新鲜牛粪、腐熟牛粪及其蚯蚓粪各 0.6 g, 分别加入 5 mL 磷酸缓冲液 ($0.12 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸钠缓冲液 pH8.0, $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Na}_2\text{EDTA}$) 洗涤样品, $12\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 去上清, 如此反复洗涤 3 次。加入 3 mL 裂解缓冲液 ($0.15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{tris}$, $1.5\%\text{CTAB}$, $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{EDTA}$, $1.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaCl}$, pH8.0) 和 $500 \mu\text{L}$ 溶菌酶 ($20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 重悬样品沉淀, 37°C 水浴 2 h。加入 $15 \mu\text{L}$ 蛋白酶 K ($20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 37°C 水浴 0.5 h。加入 $125 \mu\text{L}$ $20\%\text{SDS}$ 和 0.15 g PVPP(固体), 65°C 水浴 2 h。 $4\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清, 用等体积苯酚:氯仿:异戊醇抽提 2 次, 再用氯仿:异戊醇抽提 1 次。加入 1/3 体积的 $40\%\text{PEG } 8000$, 使 $\text{PEG } 8000$ 的终浓度为 10% (并使 NaCl 浓度在 $0.8\sim 1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内), 4°C 沉淀 DNA 2 h, $12\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 收集 DNA 沉淀, 用 $200 \mu\text{L}$ TE 溶解。

1.3 PCR 扩增

将提取的微生物总 DNA 经过商品纯化试剂盒纯化后再稀释 50 倍, 用于后续 PCR 扩增模板。扩增片

断 V3 区为 16S rDNA338 到 518 位点的区域, 用于 DGGE 电泳的 PCR 扩增产物的引物序列为: 338F: $5'-\text{CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG}-3'$; 518R: $5'-\text{ATT ACC GCG GCT GCT GG}-3'$ (正向引物的 5'端连接 GC 环主要是为了增加 DNA 双链解链区的数量)。

1.4 PCR 反应产物的变性梯度凝胶电泳及染色

参考文献[9]进行, 采用 Bio-Rad 公司 Dcode TM 的基因突变检测系统对 PCR 反应产物进行分离。 10% 的聚丙烯酰胺凝胶变性范围为 $35\%\sim 52.5\%$ 。 150 V 电压下, 60°C 电泳 330 min。电泳结束后, 采用银染法染色, 最后利用 Bio-Rad 凝胶成像分析系统进行拍照并分析。

1.5 凝胶指纹图谱的生物信息学分析

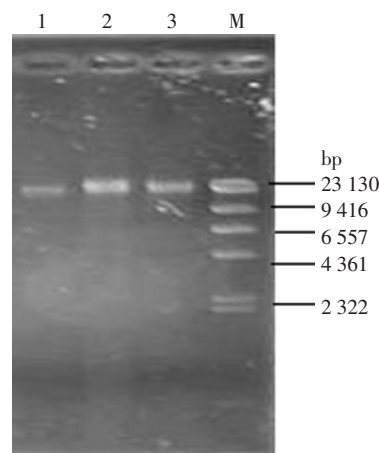
利用 Gel compar II 软件对 DGGE 图谱进行分析。

2 结果与讨论

2.1 微生物总 DNA 的提取和 16S rDNA V3 区 PCR 扩增

本论文采用 SDS-酚氯仿抽提法从腐熟牛粪、新鲜牛粪和蚯蚓粪中提取微生物总 DNA^[9], 考虑到牛粪中较高的腐殖质含量, 在提取过程中加入适量的十六烷基三甲基溴化胺(CTAB)。经电泳检测提取的 DNA 大小在 23 kb 左右, 并且杂质含量很少(见图 1)。

以提取到的新鲜牛粪、腐熟牛粪和蚯蚓粪中微生物总 DNA 作为模板, 用细菌 16S rDNA V3 区特异引物进行 PCR 扩增, 获得特异性 16S rDNA V3 区扩增片段, 大小为 240 bp 左右(图 2)。



M: marker, 1: CP, 2: VC, 3: DM

图 1 提取的细菌总 DNA 电泳图

Figure 1 Agrose gel electrophoresis of total DNA extracted from CP, VC and DM

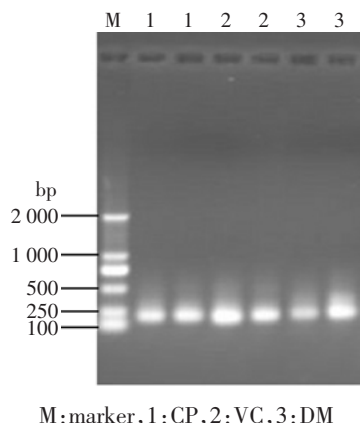


图 2 细菌 16S rDNA V3 区扩增产物电泳图

Figure 2 Agrose gel electrophoresis of 16S rDNA V3 region amplified from the total DNA of CP, VC and DM

从图 1、图 2 可以看出,本实验用 SDS-酚氯仿抽提法提取到的新鲜牛粪、腐熟牛粪和蚯蚓粪的微生物总 DNA 质量较好,通过 PCR 获得了较为理想的 16S rDNA V3 区扩增片段用于后续实验。

2.2 细菌群落多样性分析

通过对腐熟牛粪、新鲜牛粪和蚯蚓粪微生物 16S rDNA V3 可变区片段进行 DGGE 指纹图谱分析,结果显示腐熟牛粪、新鲜牛粪和蚯蚓粪中细菌群落的基因条带有较为明显的差别(如图 3),通过基因条带数量和排列结构分析,3、4 泳道中比较明显的基因条带数量(20 条)多于 5、6 泳道(16 条)以及 1、2 泳道(11 条),表明蚯蚓粪中细菌群落多样性>新鲜牛粪细菌群落多样性>腐熟牛粪细菌群落多样性。经过自然

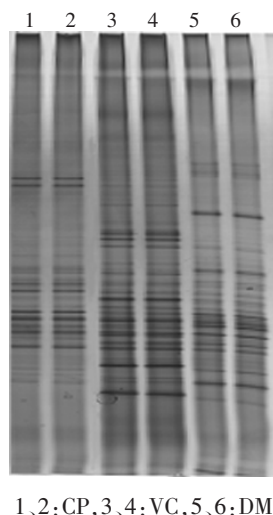


图 3 细菌 16S rDNA V3 区扩增产物 DGGE 图谱

Figure 3 DGGE profiles of 16S rDNA V3 variable region amplified from the total DNA of CP, VC and DM

堆制的腐熟牛粪的细菌多样性小于新鲜牛粪细菌多样性的原因可能是由于自然堆制过程中经历了 70~80 °C 的高温阶段^[11],很多中低温细菌可能不能承受如此高温而消亡,另外,自然堆制过程相对缺氧,好氧生长的细菌受到抑制。而经过了蚯蚓堆制处理的蚯蚓粪细菌群落多样性提高的原因可能是:(1)蚯蚓堆制处理过程中蚯蚓对细菌的捕食作用抑制了优势种群的增长,弱化了细菌群落中的种间竞争强度,从而促进了牛粪中细菌群落多样性的提高。(2)蚯蚓的活动增加了牛粪中的空隙度,增加了氧气供给,从而促进了好氧细菌的生长繁殖,提高了牛粪中细菌群落的多样性。(3)由于新鲜牛粪的 pH 为 8.9,而蚯蚓粪的 pH 为近中性的 7.3,有利于更多种细菌的生存。

2.3 细菌群落结构分析

利用 Gel compar II 软件对 DGGE 指纹图谱进行生物信息学分析,绘制腐熟牛粪、蚯蚓粪以及新鲜牛粪细菌群落的遗传簇关系(图 4),图中各泳道间条带所代表的遗传簇异同表示了各样品中细菌群落之间多样性亲缘关系远近。聚类分析表明,各重复样品聚于一簇,说明重复之间差别较小,重复性较好。从图 4 和表 2 可以看出,蚯蚓粪和腐熟牛粪的细菌群落结构有 40%左右的相似性;蚯蚓粪和新鲜牛粪的细菌群落结构的相似性为 25%左右;腐熟牛粪和新鲜牛粪的细菌群落结构的相似性则为 35%左右。说明牛粪在蚯蚓堆制过程中细菌的群落结构发生了很大的变化,其变化程度要大于自然堆制过程中细菌群落结构产生的变化,这可能是因为蚯蚓堆制处理改变了牛粪理化性质的程度大于自然堆制的结果^[12],另一个原因可能是牛粪进入蚯蚓消化道后,其中的分泌液对细菌生存起到了选择性作用。蚯蚓粪和腐熟牛粪的细菌群落结构相似性较大,说明牛粪在蚯蚓堆制处理和自然堆制过程中存在某些相似的变化过程,比如相似的理化性质的变化,而这些变化过程可能伴随着相似的细菌群落



图 4 腐熟牛粪、蚯蚓粪及新鲜牛粪细菌群落聚类分析图

Figure 4 Cluster anlysis of 16S rDNA V3 variable region amplified from the total DNA of CP, VC and DM

表 2 细菌群落结构相似性
Table 2 PCR-DGGE profile similarities of
bacterial community structure

编号	3(VC)	4(VC)	1(CP)	2(CP)	5(DM)	6(DM)
3	100.00					
4	96.91	100.00				
1	40.34	37.81	100.00			
2	41.52	39.64	97.62	100.00		
5	27.27	28.94	39.77	40.65	100.00	
6	18.36	22.63	29.73	31.83	95.02	100.00

结构变化趋向。其具体原因还有待于进一步研究。

3 结论

(1)奶牛粪的细菌多样性在自然堆制和蚯蚓堆制过程中都发生了很大的变化,蚯蚓堆制提高了奶牛粪的细菌多样性,而自然堆制降低了奶牛粪的细菌多样性。

(2)自然堆制和蚯蚓堆制使奶牛粪的细菌群落结构发生改变,蚯蚓粪和腐熟牛粪的细菌群落结构具有40%的相似性;蚯蚓粪和新鲜牛粪的细菌群落结构的相似性为25%;而腐熟牛粪和新鲜牛粪的细菌群落结构的相似性则为35%。

参考文献:

[1] 陈宝书, 陈本建. 蚯蚓粪营养成分的研究[J]. 四川草原, 1998(3):22-24.
CHEN Bao-shu, CHEN Ben-jian. The nutrient content research of vermicompost[J]. *Journal of Sichuan Grassland*, 1998(3):22-24.

[2] Atiyeh R M, Arancon N, Edwards C A. Influence of earthworm-processed pig manure on the growth and yield of greenhouse tomatoes[J]. *Bioresource Technology*, 2000, 75(3):175-180.

[3] 杨 山. 蚯蚓粪对菊花的肥效观察[J]. 生物学通报, 1996, 31(12):36-37.

YANG Shan. The nutrient effect of vermicompost to the chrysanthemum[J]. *Bulletin of Biology*, 1996, 31(12):36-37.

[4] Chaoui, Larry M Z. Effects of earthworm casts and compost on soil microbial activity and plant nutrient availability[J]. *Soil Biology and Biotechnology*, 2003, 35(2):295-302.

[5] 崔玉珍, 牛明芬. 蚯蚓粪对土壤的培肥作用及草莓产量和品质的影响[J]. 土壤通报, 1998, 29(4):156-157.
CUI Yu-zhen, NIU Ming-fen. The effect of vermicompost on the soil fertilization and on the output and quality of the strawberry[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 1998, 29(4):156-157.

[6] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. *Microbiol Rev*, 1995, 59(1):143-169.

[7] Brock T D. The study of microorganisms in situ: progress and problems[J]. *Symp Soc Gene Microbiol*, 1987,41:1-17.

[8] LaMontagne M G, Holden P A, Reddy C A, et al. Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR amplifiable DNA from compost for microbial community analysis[J]. *J Microbiol Methods*, 2002, 49(3):255-264.

[9] 姚晓华, 闵 航, 袁海平. 啮虫脉污染下土壤微生物多样性[J]. 生态学报, 2006, 26(9):3074-3080.
YAO Xiao-hua, MIN Hang, YUAN Hai-ping. Microbial diversity in an acetamiprid-polluted upland soil[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(9):3074-3080.

[10] Muyzer G, Ellen C W, Andre G U. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction genes coding for 16S rRNA [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59:695-700.

[11] Sharma S, Mathur R C, Vasudevan P. Composting silkworm culture waste[J]. *Compost Science & Utilization*, 1999, 7(2):74-81.

[12] 李辉信, 胡 锋, 仓 龙, 等. 蚯蚓堆制处理对牛粪性状的影响[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(3):588-593.
LI Hui-xin, HU Feng, CANG Long, et al. Effect of vermicomposting on characteristics of cattle manure[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2004, 23(3):588-593.