

PCR-DGGE 技术用于猪场沼气池细菌群落分析的条件优化

魏 勇^{1,3}, 王红宁^{2*}, 廖党金³, 伍志伟², 管仲斌²

(1. 四川农业大学动物医学院, 四川 雅安 625014; 2. 四川大学 生命科学学院, 成都 610064; 3. 四川省畜牧科学研究院, 成都 610066)

摘 要: 本研究采用变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)技术研究猪场沼气池细菌群落, 对基于 16S rDNA V3 区的 PCR-DGGE 电泳的最佳变性剂梯度范围、电泳时间、染色时间进行优化。研究结果表明, 最佳变性剂梯度范围为 35%~60%, 电泳时间为 12 h, SYBR® Green Fluorescent Dye 染料的染色时间是 30 min, 优化后的 PCR-DGGE 确保了实验的准确性、灵敏度和可重复性。运用此优化后的 PCR-DGGE 技术对 5 个猪场沼液细菌群落进行了研究, 获得了较丰富的多样性。该实验为深入研究畜禽养殖粪污治理的菌种筛选奠定了基础。

关键词: PCR-DGGE; 猪场; 沼气池; 细菌群落

中图分类号: X830.2 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2011)03-0599-06

Optimization of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis for Bacterial Communities in Biogas Slurry of Pig Farm

WEI Yong^{1,3}, WANG Hong-ning^{2*}, LIAO Dang-jin³, WU Zhi-wei², GUAN Zhong-bin²

(1. College of Animal Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China; 2. College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China; 3. Sichuan Animal Science Academy, Chengdu 610066, China)

Abstract: Polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) technique was used to reveal the bacterial community composition and diversity associated with biogas slurry of pig farm. In order to improve the accuracy, sensitivity and repeatability of DGGE based on 16S rDNA V3 region, the running parameters of DGGE were optimized by level electrophoresis, electrophoresis time and dyeing time, respectively. The results showed that the best range of denaturing gradients was 35%~60% in 8% polyacrylamide gels, running time was 12 hours, and the dyeing time was 30 min using SYBR Green Fluorescent Dye. Furthermore, bacterial community from 5 biogas digesters of pig farms was also performed by using these optimized reaction conditions. It was found that the 5 samples exhibited effective separation and rich microbial diversity. This indicated that different samples would result in the distinct change of microbial diversity and microbial community structure of biogas slurry. PCR-DGGE was proven to be a powerful tool for describing the bacterial flora in biogas slurry of pig farms. The results provide a basis for studying the bacterial community in livestock manure treatment.

Keywords: PCR-DGGE; pig farm; biogas slurry; bacteria communities

养猪业是我国畜牧养殖的支柱产业, 猪场粪污既是污染物又是很好的有机肥资源。沼气系统作为养殖场粪污治理及其资源化利用相结合的重要方式, 已成为国内外“农牧结合”的关键技术纽带。沼气池产气效

率和运行稳定性的关键是需要高效且恒定的微生物生态系统。因此, 开展沼气发酵过程的微生态系统结构与功能研究, 了解沼气微生态系统行为动态及其相互作用, 有助于合理调控各发酵功能菌群的活性, 促进沼气发酵在养殖粪污治理中的科学应用^[1-2]。

沼气发酵微生态系统是涉及多菌群相互作用的复杂系统, 采用传统纯培养方法很难准确反映群落结构和代谢关系, 而且其中绝大部分的微生物是不可培养的。目前, 传统的分离培养技术已难以对复杂微生物群落进行系统的研究。而基于 rDNA 的指纹图谱技

收稿日期: 2010-11-21

基金项目: 四川省畜牧科学研究院基本科研业务费专项 (SASA2009 A06); 四川生猪产业技术体系创新团队项目 (scctxtd-001); 省财政良种繁育专项 (SASA2009YZ001)

作者简介: 魏 勇 (1974—), 男, 四川南充人, 副研究员, 研究方向为兽医卫生与环境控制。E-mail: smiling0616@yahoo.cn

* 通讯作者: 王红宁

术——变性梯度凝胶电泳 (Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 指纹图谱技术, 因其具有简单快速、无需细菌分离培养、能直观有效地再现环境样品中复杂微生物群落结构及其多样性等优越性, 现已被广泛用于评估、监测各种水体、废水处理生物反应器^[3-4]、临床样品^[5-6]等样品中微生物群落结构及动态变化研究。

变性梯度凝胶电泳(DGGE)的分辨率会直接影响实验结果的准确性与可靠性。影响 DGGE 分辨率的因素较多, 如变性剂梯度范围、电泳时间、染色时间等, 因此, 针对具体的实验条件及样品, 则需对 DGGE 的各关键环节的相应实验条件进行优化, 否则难以达到预期的效果。本文基于 16S rDNA V3 区, 对 DGGE 的变性剂梯度范围、电泳时间和染色时间进行了一系列的优化, 建立基于 16S rDNA V3 区的 PCR-DGGE 方法, 并运用优化后的方法研究了猪场沼气池内细菌群落结构及多样性, 这为深入研究养殖粪污治理的微生物生态系统等奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验沼气池

在嘉陵江上游 10 km 长的一段无支流区, 连续选取饲养管理规范的 5 个大型猪场, 均具有“出粪口-沼气池-氧化塘-灌溉利用”这种粪污处理模式。将每个猪场的核心沼气池参试, 要求其粪污处理沼气池稳定运行 1 年以上, 并一直处于良好使用状态。

1.1.2 沼液样品采集

每个沼气池选取 5 个均匀分布的采样点, 每个采样点采集沼气池底层的活性污泥样品约 50 mL 于无菌密封瓶; 连续采集 1 周, 同一沼气池样品混合在一起, 装入 500 mL 无菌密封瓶, 迅速放入 -20 ℃ 保存备用。从上到下 5 个不同的猪场沼液样品依次编号为 S1、S2、S3、S4、S5。

1.1.3 主要试剂与仪器

TEMED、QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit 等均购于 TIANGEN 公司, 16S rDNA 基因通用引物由上海生工合成, 凝胶成像系统(Gene Company Limited)、高速冷冻离心机(Thermo Fisher)、高速台式离心机(TGL-16B)、HH.S11-2 型电热恒温水浴锅、WH-851 旋涡混合器; Power300 稳压稳流电泳仪、SmartSpecTM plus 核酸蛋白质测定仪、PCR 仪、DYY-II 恒压恒流电泳仪和 D-codeTM 通用突变检测系统等均为 Bio-Rad

产品。

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 提取

采用 QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit 试剂盒提取沼液样品的细菌总 DNA, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.2.2 16S rDNA V3 区扩增

选用细菌 16S rDNA V3 区通用引物扩增沼液菌群, 引物序列为: V3F-5'-GCC GCC CGC CGC GCG CGG CGG GCG GGG CGG GCG CAC GGG GGG CCT ACG GAG GCA GCA G-3', V3B-5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'; 而为了提高 DGGE 电泳的分辨率, 在 V3 区上游通用引物 5' 端上加入约 40 bp 的 GC 发夹(CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGGG^[7-9])。Touchdown PCR 扩增条件: 95 ℃, 5 min; 94 ℃, 30 s; 58 ℃, 30 s (每个循环降低 0.5 ℃); 72 ℃, 30 s 10 个循环的降落 PCR 扩增, 接着再进行 25 个循环的 94 ℃, 30 s; 53 ℃, 30 s; 72 ℃, 30 s 的常规 PCR 扩增, 最后 72 ℃, 延伸 8 min。阴性对照用 ddH₂O 作为模板。扩增结束后, 用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 以凝胶成像系统采集图片并进行结果分析。

1.2.3 变性剂梯度的优化

采用水平变性梯度凝胶电泳分析沼气池细菌群落的多样性之前, 首先利用垂直变性梯度电泳(DGGE)了解待测 DNA 片段的电泳迁移率与变性剂之间的关系, 从而确定 DGGE 凝胶中变性剂的梯度范围, 以提高分析结果的准确性与可靠性。

垂直 DGGE 凝胶的配制: 制备 8% 聚丙烯酰胺凝胶, 变性梯度浓度为 0~100%, 呈线性增加, 梯度方向与电泳方向垂直, 加约 300 μL 含有适量上样缓冲液的 PCR 扩增产物。电泳时, 温度为 60 ℃, 先 60 V 预电泳 30 min, 随后 160 V 运行约 11 h。电泳后用 SYBR[®] Green Fluorescent Dye 进行染色, 用凝胶成像系统分析 DGGE 图谱, 以确定待测样品 PCR 产物进行水平 DGGE 电泳的最适变性剂梯度范围。

1.2.4 电泳时间的优化

采用时间间歇法(time-interval), 即每隔 2 h 上样 1 次, 每次加入 50 μL 含有适量上样缓冲液的 PCR 产物, 进行电泳时间的优化, 以确定最佳的电泳时间。

1.2.5 染色时间的优化

采用新型低毒核酸染料 SYBR[®] Green Fluorescent Dye 作为 DGGE 凝胶染色剂; 由于缺乏使用 SYBR[®] Green Fluorescent Dye 对 DGGE 凝胶染色时

间的参考文献,因此,对 SYBR® Green Fluorescent Dye 染色的时间进行了摸索,设定不同的染色时间(10、30、60 min),分别观察 DGGE 凝胶的染色结果,从而判断 SYBR® Green Fluorescent Dye 的最佳染色时间。

1.2.6 猪场沼液样品的 DGGE 分析

运用 D-code™ 系统 (Bio-Rad)、采取优化后的 DGGE 反应条件,分别对 5 个猪场沼液样品的 V3 区扩增产物进行 DGGE 电泳分析;用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶,其变性剂梯度范围为 35%~60% (100% 的变性剂中含有 $7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的尿素和 40% 的去离子甲酰胺)。电泳缓冲液为 $1 \times \text{TAE}$,于 60°C 下 60 V 预电泳 30 min,然后于 110 V,电泳 12 h,用 SYBR® Green Fluorescent Dye (Tiangen) 染色 30 min;最后,用凝胶成像系统进行图谱扫描,保存图片结果以待分析。

采用 Quantity one 4.6.1 软件 (Bio-Rad) 对 DGGE 图谱进行相似性及聚类分析,了解猪场沼液菌群间的相关性,评价猪场沼液菌群的多样性及相似性。

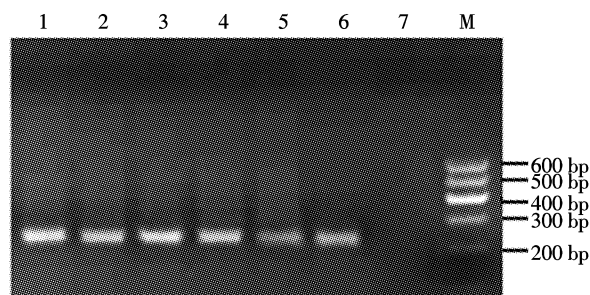
2 结果与分析

2.1 16S rDNA V3 区扩增

各样品总 DNA 的 V3 区扩增结果如图 1 所示,各样品的 V3 区扩增条带与预期相符,条带清晰,特异性高,未发现非特异性的扩增条带,表明各样品的 V3 区扩增效果良好,适于 DGGE 电泳分析。

2.2 变性剂梯度的优化

垂直 DGGE 对变性剂梯度范围的优化结果见图 2,图谱上呈现出了清晰的大“S”型曲线,在大约 35%~60% 变性剂梯度范围内出现了大量细小的“S”型曲线,表明变性剂梯度为 35%~60% 时是最适于进行猪



Lane.1~5.Different sample; 6. Positive control; 7. Negative control;
M.DNA Marker

图 1 16S rDNA V3 区 PCR 扩增结果

Figure1 PCR amplification of V3 region from
biogas slurry of pig farm

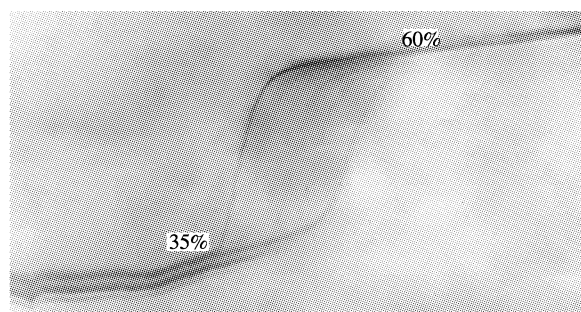


图 2 变性剂梯度范围的优化结果

Figure 2 The profiles of denaturing gel concentration optimization

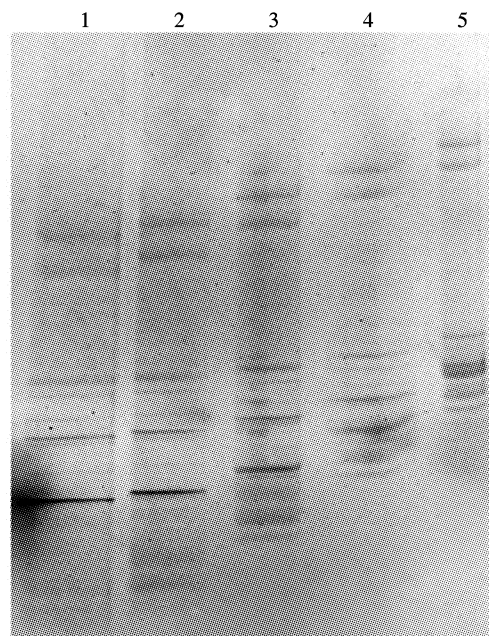
场沼液菌群多样性的 DGGE 电泳分析。因此,判定 35%~60% 为水平 DGGE 的最适变性剂梯度范围。

2.3 电泳时间的优化

DGGE 电泳时间的优化结果见图 3。结果表明:电泳时间为 12 h 与 14 h 时,所得的电泳条带从数量上难以辨别出差异,且条带清晰度几乎完全相同,因此,判定最佳的电泳时间为 12 h。

2.4 染色时间的优化

染色剂 SYBR® Green Fluorescent Dye 分别染色 10、30 min 和 60 min 后的实验结果见图 4。结果表明:SYBR® Green Fluorescent Dye 适用于进行 DGGE 凝胶染色,在染色为 30 min 时,条带明亮、胶面干净而无明显背景颜色,效果显著。但染色时间过短时 (图 4



Lane1:14 h; 2:12 h; 3:10 h; 4:8 h; 5:6 h.

图 3 DGGE 电泳时间优化结果

Figure 3 The profiles of time optimization

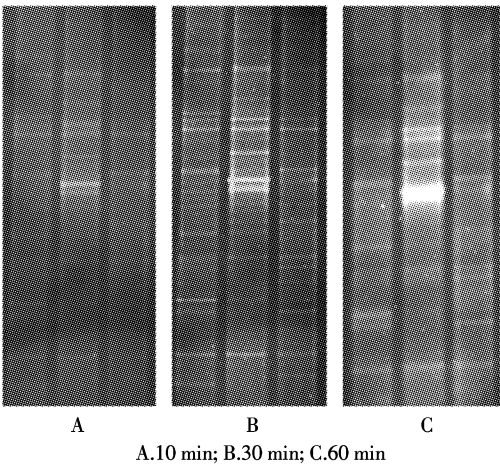


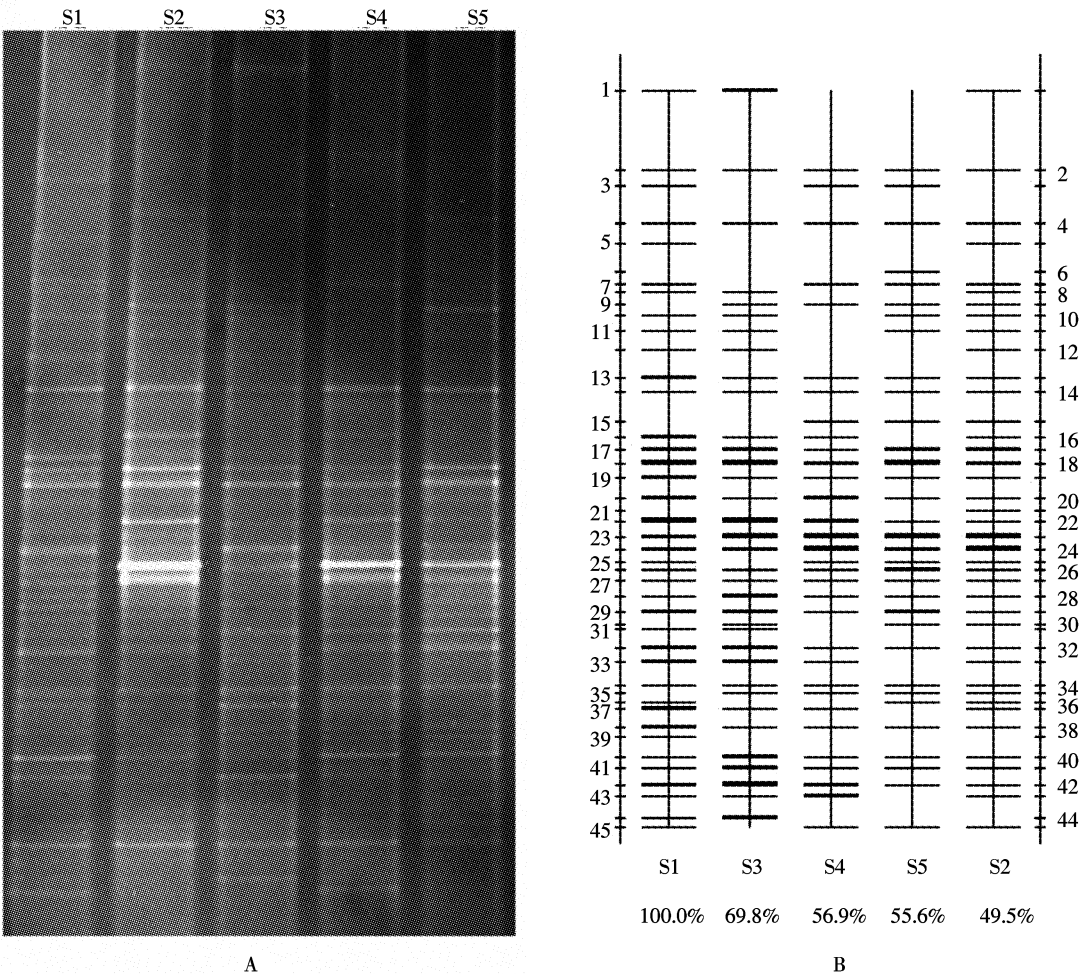
图 4 DGGE 凝胶染色时间优化
Figure 4 Optimization of DGGE gel dyeing time

A), 则效果很差, 条带显示暗淡, 大多数条带未能显示出来; 而时间过长 (图 4C) 则会导致凝胶条带因长

时间受染色缓冲液的浸泡而发生扩散、模糊, 严重影响结果的准确判读。因此, SYBR® Green Fluorescent Dye 的最佳染色时间为 30 min。

2.5 猪场沼液样品中细菌的多样性

应用优化得到的 PCR-DGGE 电泳条件, 对 5 个不同猪场的沼液样品中的细菌群落情况进行分析, 结果如图 5 所示。结果表明: 各样品的 PCR 产物经过 DGGE 分离后, 所得到的条带数目、强度及迁移位置不尽相同, 图中不同位置条带代表着不同的细菌种群; 电泳条带越多表明分离的细菌种属越多, 条带信号越强表示该条带代表的相应细菌数量越多。图 5B 为用 Quantity one 软件对图 5A 进行分析所得到的 DGGE 图谱条带强度示意图, 图 5B 能直观地反映各样品的细菌种属的多样性及分布程度。其中 1 号样品的可见条带数最多共 39 条, 4 号样品中的最少共 34 条, 但 2 号样品中优势菌的数量较其他的样品多。



A is the DGGE gel showing diversity of banding patterns present in each pond; B is the schematic representation of the DGGE gel

图 5 沼气样品的 DGGE 图谱及 DGGE 图谱条带强度示意图
Figure 5 PCR-DGGE profile generated from biogas slurry of pig farm

从图5可以看出,优势条带在不同样品中的强弱程度有所不同,如编号为22、23的条带,在1号、3号和4号样品中的强度比2号和5号中的大,表明该种/属的细菌在前3个样品中的数量更多。从整体来说,各样品所包含的细菌种/属数量相似性较高,但不同细菌在不同样品的分布数量则存在较明显的差异。另外,根据图5A中每个样品不同条带的强度及迁移率,按照 complete linkage 算法对每个电泳样品的条带图谱进行细菌群落相似性程度聚类分析,结果见图6;聚类结果表明,5个样品被分成了两大类,其中,1号样品细菌群落与3号样品的相似性较高,聚集在一起;而2号、4号、5号3个样品聚成一类。这一结果与各样品间细菌群落的差异性结果相符合,1号样品与3号样品的细菌群落差异为31.2%,1号样品与2号样品细菌群落差异为50.5%。

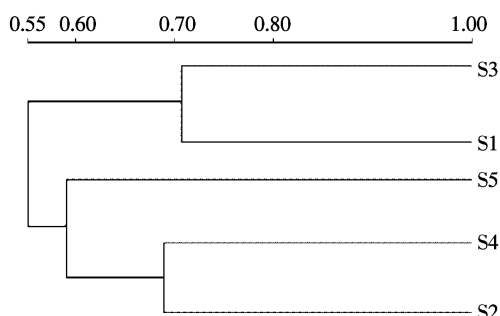


图6 不同DGGE指纹图谱聚类分析的树状图

Figure 6 Dendrogram calculated on the basis of the Dice coefficients of similarity with clustering algorithm of UPGMA

3 讨论

PCR-DGGE的原理是聚丙烯酰胺凝胶中含有浓度呈线性递增的变性剂,而序列不同的DNA分子有着不同的解链行为,解链的双链DNA分子的电泳迁移速率就会明显地降低,使其在凝胶的不同位置上停止迁移,从而使长度相同而序列不同的双链DNA分子得到区分。由于各类微生物(如细菌和古细菌)的16S rDNA基因序列中可变区的碱基顺序相差较大,因此,不同的DNA分子就代表了不同的微生物类群,所以选择与可变区配对的引物扩增出的不同微生物的16S rDNA基因的部分序列就能在电泳中得到分离,应用Quantity one软件,即可根据电泳条带的多少和条带的位置及亮度,分辨出样品中微生物的种类和数量等信息^[10-11]。因此,PCR-DGGE技术能直观再现环境样品中微生物区系的种群结构及多样性。目前,该技术已被广泛用于活性污泥、生物膜、土壤等环境

样品中的微生物遗传多样性和种群演替的研究^[12-14]。

DGGE指纹图谱技术理论上可以区分一个碱基差异的DNA片段,但在实际操作中因引物、PCR扩增、电泳条件等因素均可能造成分析结果的偏差。其中16S rDNA不同可变区通用引物的选择对实验结果的影响至关重要,采用PCR-DGGE对16S rDNA不同保守区的引物进行对比分析,发现不同引物所得到的结果差异明显,其中V1、V3区分析效果最好,得到的条带数量最多,其次是V6~V8和V3~V5区;V3区条带丰度明显地高于V6~V8区,更适合于微生物菌群多样性的比较研究^[15-16]。本实验选用V3区进行扩增,条带分离效果良好,利于深入分析。

DGGE分辨率和准确性受到较多因素的影响,如凝胶浓度、电泳时间、变性剂梯度、染色方法、PCR扩增效果等。在进行PCR-DGGE时,由于不同样品的解链性质各不相同,要得到清晰且条带丰富的DGGE图谱则必须对电泳条件进行优化^[8,17]。本研究中,对PCR-DGGE的变性剂浓度梯度范围、电泳时间等进行优化,确定了最适变性梯度范围为35%~60%,电泳缓冲液的温度为60℃,电泳时间约12h,即能获得高灵敏、高重复性的实验结果。当前常用的DGGE染色方法主要有溴化乙锭、银染和SYBR green I。其中银染的灵敏度较高,但染色后DGGE条带的DNA片段无法进行回收鉴定,溴化乙锭则属于致癌物质,而SYBR Green I染色的背景色低,可以观察到尽可能多的条带^[18],因此本实验选用新型DNA染料SYBR® Green Fluorescent Dye作为DGGE凝胶染色剂。为了得到理想的染色效果,对染色时间进行了优化。结果表明SYBR® Green Fluorescent Dye适用于DGGE凝胶显色,价格较便宜,灵敏度高,且无明显的背景颜色;另外染色时间对实验结果具有显著影响,实验筛选的最适染色时间为30min。对实验样品DGGE图谱分析表明,不同猪场沼气样品细菌群落的多样性不同,1号猪场沼气样品细菌群落中优势种/属菌的数量最多,并且与其他样品具有一定的差异性。因此,可以推断出不同猪场沼气样品微生物中定植的细菌种/属、分布数量的不同,这可能与猪场的养殖品种、抗生素残留、粪污处理过程等有关^[19]。这些因素之间的相互作用关系还需要更加深入地系统研究。

4 结论

(1)本实验优化了PCR-DGGE的电泳参数,最佳变性剂梯度范围为35%~60%,电泳时间为12h,

SYBR® Green Fluorescent Dye 染料的染色时间为 30 min。建立了适用于猪场沼液菌群多样性分析的 PCR-DGGE 技术。

(2)运用优化的 PCR-DGGE 技术研究了 5 个猪场沼气池细菌群落,获得了较丰富的多样性。表明采用 PCR-DGGE 技术对猪场沼气系统内微生物种群分布的研究是可行的。

参考文献:

- [1] 林代炎,叶美锋,吴飞龙,等. 规模化养猪场粪污循环利用技术集成与模式构建研究[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29 (2):386-391.
LIN Dai-yan, YE Mei-feng, WU Fei-long, et al. Recycling model construction and technology integration of feces from large-scale pig farm [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29 (2):386-391.
- [2] 翁伯琦,雷锦桂,江枝和,等. 集约化畜牧业污染现状分析及资源化循环利用对策思考[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29 (增刊): 294-299.
WENG Bo-qi, LEI Jin-gui, JIANG Zhi-he, et al. Present situation analysis of intensive livestock pollution and countermeasures consideration of resource recycling[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29 (suppl): 294-299.
- [3] O'Reilly J, Lee C, Chinalia F, et al. Microbial community dynamics associated with biomass granulation in low-temperature (15 °C) anaerobic wastewater treatment bioreactors[J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101 (16):6336-6344.
- [4] Lee C, Kim J, Shin S G, et al. Quantitative and qualitative transitions of methanogen community structure during the batch anaerobic digestion of cheese-processing wastewater[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010, 87(5):1963-1973.
- [5] Santos T M, Gilbert R O, Bicalho R C. Metagenomic analysis of the uterine bacterial microbiota in healthy and metritic postpartum dairy cows [J]. *J Dairy Sci*, 2011, 94(1):291-302.
- [6] JAbell G C, Christophersen C T, McOrist A L, et al. Dietary resistant and butyrylated starches have different effects on the faecal bacterial flora of azoxymethane-treated rats[J]. *Br J Nutr*, 2011, 24:1-6.
- [7] Muyzer G, Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59:695-701.
- [8] Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1998, 73: 127-141.
- [9] Holmfeldt K, Dzialis C, Titelman J, et al. Diversity and abundance of freshwater *Actinobacteria* along environmental gradients in the brackish Northern Baltic Sea[J]. *Environ Microbiol*, 2009, 11(8):2042-2054.
- [10] Deng W, Xi D, Mao H, et al. The use of molecular techniques based on ribosomal RNA and DNA for rumen microbial ecosystem studies: A review[J]. *Mol Biol Rep*, 2008, 35(2):265-274.
- [11] Xing D F, Ren N Q, Gong M L, et al. Succession of bacterial community structure in biohydrogen producing reactor as monitored using denaturing gradient gel electrophoresis[J]. *Sci China (Ser C)*, 2005, 48(2): 155-162.
- [12] Zhou S, Wei C, Ke L, et al. PCR-DGGE as a supplemental method verifying dominance of culturable microorganisms from activated sludge[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2010, 20 (11):1592-1596.
- [13] Shen S M, Hwang H Y, Fang H Y. Tracking biological pollution sources using PCR-DGGE technology at Ta-An Beach[J]. *Water Sci Technol*, 2010, 62(10):2235-2245.
- [14] Mrázek J, Koppová I, Kopečný J, et al. PCR-DGGE-based study of fecal microbial stability during the long-term chitosan supplementation of humans[J]. *Folia Microbiol (Praha)*, 2010, 55 (4):352-358.
- [15] Yu Zhongtang, Mark Morrison. Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 4800-4806.
- [16] 邢德峰,任南琪,宋佳秀,等. 不同 16S rDNA 靶序列对 DGGE 分析活性污泥群落的影响[J]. 环境科学, 2006, 7 (7):1424-1428.
XING De-feng, REN Nan-qi, SONG Jia-xiu, et al. Community of activated sludge based on different targeted sequence of 16S rDNA by denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *Environmental Science*, 2006, 7 (7):1424-1428.
- [17] 宋业颖,赵丽华,邢德峰,等. 利用时间进程法优化活性污泥 DG-DGGE 图谱[J]. 生物技术, 2006, 16(2):43-45.
SONG Ye-ying, ZHAO Li-hua, XING De-feng, et al. Optimization of profiles of denaturing gradient gel electrophoresis for activated sludge by time travel[J]. *Biotechnology*, 2006, 16(2):43-45.
- [18] Song Z, Pan Y, Zhang K, et al. Effect of seed sludge on characteristics and microbial community of aerobic granular sludge[J]. *J Environ Sci*, 2010, 22(9): 1312-1318.
- [19] 黄 灿,唐新燕,彭绪亚,等. 猪粪尿中添加不同底物对挥发性脂肪酸和本土菌群的影响研究[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(2):388-392.
HUANG Can, TANG Xin-yan, PENG Xu-ya, et al. Effect of adding different substrates to swine waste slurries on volatile fatty acids and indigenous bacterial genera[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(2):388-392.