

# PLFA 法和 DGGE 法分析堆肥细菌群落变化

喻 曼<sup>1</sup>, 肖 华<sup>1</sup>, 张 棋<sup>1</sup>, 曲云欢<sup>2</sup>, 许育新<sup>1\*</sup>

(1.浙江省农业科学院环境资源与土壤肥料研究所, 杭州 310021; 2.环境保护部环境保护对外合作中心, 北京 100035)

**摘 要:**同时采用 PLFA(Phospholipid fatty acid)谱图分析法和 DGGE(Denaturing gradient gel electrophoresis)法分析农业废物堆肥化过程中细菌群落的变化。结果表明:(1)单体 PLFA 数据显示样品之间的群落结构有明显差异,随着堆肥进程的进行,群落在不断演替,PLFA 数据可以较为明确地表征微生物生物量的变化,但不能给出具体的物种变化信息;(2)DGGE 分析显示堆肥过程中的样点和 DGGE 条带数据都存在 3 大主要类别,堆肥过程中细菌群落结构至少经历了 3 个阶段的演替,即嗜温细菌群落、高温细菌群落和腐熟期细菌群落。堆肥过程是微生物群落结构与堆肥温度相互制约的过程;(3)虽然两类方法显示的信息并不完全一致,但也因此说明了不同方法显示的信息并不是绝对的,采用各类方法组合研究堆肥微生物的信息变化是很有必要的。

**关键词:**PLFA 法;DGGE 法;堆肥;细菌群落

**中图分类号:**S141.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2011)06-1242-06

## Changes of Bacterial Communities in Composting by PLFA and DGGE Methods

YU Man<sup>1</sup>, XIAO Hua<sup>1</sup>, ZHANG Qi<sup>1</sup>, QU Yun-huan<sup>2</sup>, XU Yu-xin<sup>1\*</sup>

(1.Environmental Resources and Soil Fertilizer Institute, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; 2. Foreign Economic Cooperation Office, Ministry of Environmental Protection, Beijing 100035, China)

**Abstract:** Microbial community structure is little known at different stages during the composting process due to difficult to culture microbes present in composting. Culture-independent methods including phospholipid fatty acid(PLFA) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) had been employed to characterize the changes of bacterial community during the composting of agricultural waste. The results showed that: (1) The structure of microbial community from samples was discrete by the PLFA profile method, which suggested each sample owned independent characteristic pattern, and samples selected were representative. The data was comprehensive to characterize the changes of microbial community structure and much specific to evaluate microbial biomass. However, the species could not be determined by the PLFA profile method. (2) The succession of the bacterial community included at least three different stages, i.e. mesophilic microbial community, thermophilic microbial community and maturation microbial community, by the DGGE method. Also, the result showed the temperature played a key role to changes of microbial community during the composting process. (3) The differences revealed by PLFA profile and DGGE methods indicated that observing biological characteristics in composting with just one method should not be considered absolute. Thus it was necessary to develop different methods to study the changes of microbial community structure during the composting process.

**Keywords:** PLFA method; DGGE method; composting; bacterial community

堆肥化是一个复杂的过程,研究其中微生物群落结构和动态变化更是一项艰巨的任务。在堆肥微生物群落结构和动态变化研究中引入非培养生物技术,既能克服传统培养过程带来的困难,又能提高科

研结果的真实性。PLFA 法和分子生物学方法虽然都能较好地解决堆肥化中大部分微生物不可培养的问题,但每种方法还是有其一定的局限性。PLFA 法不能从种的水平上鉴定微生物,只能鉴定到属,也就是说 PLFA 谱图并不能给出一个实际的微生物种类组成,仅是菌落结构的概图<sup>[1-3]</sup>,因此,通常只能用 PLFA 给出的数量和种类来初步分析不同样品间的群落结构差异和变化。另外,分子生物学技术易受环境微生物生理状态影响<sup>[4-6]</sup>。

将不同方法组合应用可以取长补短,避免由于方

收稿日期:2010-12-13

基金项目:浙江省自然科学基金(Y5100234, Y507284);浙江省农科院  
创新能力提升项目

作者简介:喻 曼(1982—),女,博士,助理研究员,主要从事固体废物  
资源化及微生物技术研究。

E-mail: yuman20030703@yahoo.com.cn

\* 通讯作者:许育新 E-mail: lux\_xu@yahoo.com.cn

法原理本身所带来的不可避免的偏差。因此,将各种方法组合应用已成为分析堆肥微生物群落结构变化的一种趋势,本文分别采用的 PLFA 方法和 DGGE 方法研究了堆肥细菌群落结构的变化,旨在从不同的角度对堆肥细菌群落结构和群落动态进行分析研究,提供更为全面客观的细菌群落组成及变化的信息,为非培养生物技术在堆肥细菌群落结构研究的组合应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品来源

堆肥取自一个有效容积为 22 L 的实验室规模的堆肥装置,堆肥材料为:(1)难降解有机物:稻草,切碎至 10~20 mm;(2)易降解有机物:不同种类的菜叶,剁碎至 10~20 mm;(3)腐殖土:取自岳麓山林间表层富含木质纤维素降解微生物的腐土,过 100 目筛;(4)麸皮,用以调节适宜的 C/N 比。上述堆肥原料按照一定的配比(11:3:2:8,鲜重)充分混合,使堆体初始 C/N 为 30 左右,一次发酵期含水率控制在 55%左右,二次发酵期含水量控制在 45%左右。前 2 周每周翻堆 2 次,以后每周翻堆 1 次。

采样点为堆肥表面以下 5 cm,分别在第 1、6、11、16、21、28 d 和 42 d 采集样品,对应编号依次为 1#~7#。

### 1.2 PLFA 分析

PLFA 提取主要参考 Jiasong Fang 等<sup>[7-8]</sup>的方法,称取 1.00 g 样品(干重)于带聚四氟乙烯盖子的玻璃管中,分别加入二氯甲烷、甲醇、磷酸盐缓冲溶液 5、1、5 mL,超声匀化 10 min 后,在 4℃下避光静置过夜;再加入二氯甲烷和纯水,使得二氯甲烷:甲醇:缓冲液=1:1:0.9,静置 24 h;去水相,将有机相用 4#纤维滤膜过滤;取滤液用 N<sub>2</sub> 干燥后加正己烷溶解(溶解效果不好可以加一滴二氯甲烷),过硅胶柱(1 g, 100~200 目),依次用正己烷、氯仿、丙酮、甲醇洗涤柱子;收集甲醇洗涤液, N<sub>2</sub> 干燥;用 0.5 mL 甲醇-甲苯(1:1, 体积分数比例, 含内标物 19:0)溶解吹干的脂类物质,加入 0.5 mL 2.0 mol·L<sup>-1</sup> KOH, 37℃水浴加热 15 min; 冷却至室温, 加入 5 mL 0.2 mol·L<sup>-1</sup> 醋酸, 摇匀后加 2 mL 氯仿, 去水相, 加去离子水洗涤后, 取底部有机物进行 GC-MS 测试。

GC-MS 条件: 仪器型号 TRACE2000, PalariS Q, 毛细管柱 CP-Sil 5CB Low Bleed/MS (30 m×0.25 mm×0.25 μm)。不分流进样, 进样口温度 250℃, 检测器温度 200℃。升温程序: 初始温度 60℃, 以 5℃·min<sup>-1</sup> 升

至 230℃, 保持 20 min。氦气作载气, 流量为 1.00 mL·min<sup>-1</sup>。

### 1.3 DGGE 分析

采用改进的蛋白酶 K-CTAB 法提取细菌总 DNA 并纯化<sup>[9-10]</sup>, 选用细菌 16S rDNA 通用引物对 GC-338F 和 518R 进行 PCR 扩增<sup>[11]</sup>。50 μL 的 PCR 扩增体系为: Taq DNA 聚合酶(北京 BioTeke) 2U, 10×Buffer 5 μL, dNTPs (10 mmol·L<sup>-1</sup> each, 北京 BioTeke) 1 μL, 引物各 0.5 μL (20 μmol·L<sup>-1</sup>), BSA (10 mg·mL<sup>-1</sup>) 2 μL, 加无菌的 Mili-Q 水补足 50 μL。PCR 反应在 MyCycler (Bio-Rad, USA) 上进行, 扩增条件为: 94℃预变性 4 min; 94℃变性 45 s, 55℃退火 40 s, 72℃延伸 45 s, 30 个循环; 72℃延伸 7 min, 停止于 4℃。

应用 DcodeTM 基因突变检测系统 (Bio-Rad, USA) 对 PCR 扩增产物进行电泳分离。电泳条件: 凝胶变性梯度 35%~60%, 电泳缓冲液为 1×TAE, 电泳电压 140 V, 电泳温度 60℃, 电泳时间 12 h。电泳结束用 SYBR Green I 染色 30 min, 用 Gel Doc2000 凝胶成像系统 (Bio-Rad, USA) 观察凝胶上的条带并拍照。

### 1.4 数据分析

PLFA 的定性根据质谱标准图和相关文献报道, 以 PLFA 19:0 做内标物进行定量计算<sup>[1-2,7-8]</sup>。DGGE 图谱采用 Quantity One2.0 软件 (Bio-Rad, USA) 进行自动分析, 确定样品电泳条带的多少和亮度峰值, 以细菌种群在每一取样时间点泳道中亮度峰值的百分含量为重要值构造细菌矩阵<sup>[12]</sup>。主成分分析 (principal component analysis PCA) 应用国际通用软件 Canoco for windows 4.5 (Centre for Biometry Wageningen, The Netherlands) 进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 堆肥微生物 PLFA 信息分析

堆肥化过程中, 共分离到 30 种碳链长度在 13~23 的 PLFA。各个样品之间的主峰分布大体一致, 其中样品 3#、4# 的主峰数较其他样品多些, PLFA 种类和含量的变化趋势与温度显著相关, 这两个样品都取自堆肥高温期, 微生物生长较为活跃, 可能对应的微生物种类较为丰富<sup>[2]</sup>, 因此分离出的单体 PLFA 较多。

细菌的生物量通过以下 PLFA 的总含量估算: i15:0, a15:0, i16:0, 16:1ω9, 16:1ω7t, i17:0, a17:0, 17:0 和 18:1ω7。革兰氏阳性菌的生物量通过以下 PLFA 的总含量估算: 10Me16:0, 10Me17:0, 10Me18:0, i15:0, a15:0, i16:0, i17:0, a17:0。革兰氏阴性菌的生物量通过

以下 PLFA 的总含量估算:16:1 $\omega$ 5,16:1 $\omega$ 7t,16:1 $\omega$ 9,cy17:0,18:1 $\omega$ 5,18:1 $\omega$ 7,cy19:0<sup>[7-8]</sup>。

图 1 是根据 PLFA 含量表征的细菌含量变化图,分别表征了革兰氏阳性菌( $G^+$ ),革兰氏阴性菌( $G^-$ )和总细菌量的变化。从图 1 可以看出,本次研究中华兰氏阴性菌的含量较低,革兰氏阳性菌的含量较高,且与总的细菌含量变化大体一致,这可能跟革兰氏阳性菌的细胞结构有关<sup>[13]</sup>。

以每个样点所含单体 PLFA 含量作为每个样点的物种信息进行主成分分析,结果如图 2 所示。可以看出单体 PLFA 较均匀的分布在主成份载荷图的 4 个区域:左上区单体 PLFA 较少且碳链长度不一;左下区主要是 C15 和 C16 的 PLFA,其中 a16:0,a17:0 是革兰氏阳性菌中常见的 PLFA,cy17:0 和 16:1 $\omega$ 5t 是革兰氏阴性菌中常见的 PLFA;右上区主要是表征真菌的 PLFA,如 18:2 $\omega$ 6,9 和 18:3,18:0,另外植物秸秆中常见的脂肪酸片段 16:0 也出现在这一区<sup>[8]</sup>;右下区分布的单体 PLFA 多样性较高,碳链长度不一,且

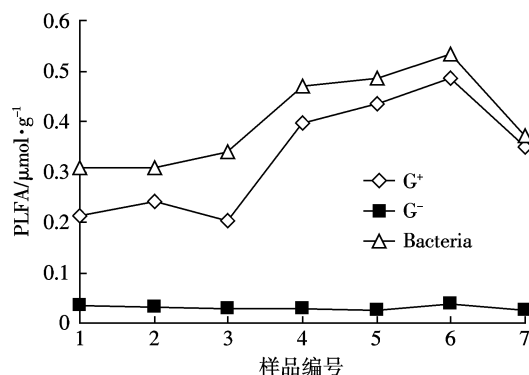


图 1 PLFA 法表征的堆肥微生物群落结构变化

Figure 1 Change of microbial community during agricultural waste composting analysed by PLFA method

数量较多。

## 2.2 堆肥微生物 DGGE 信息分析

在 Gel doc2000 凝胶成像系统中,DGGE 成像照片经 Quantity One2.0 软件分析后得出条带位置和相对含量,其中相对含量的变化如表 1 所示,条带用字

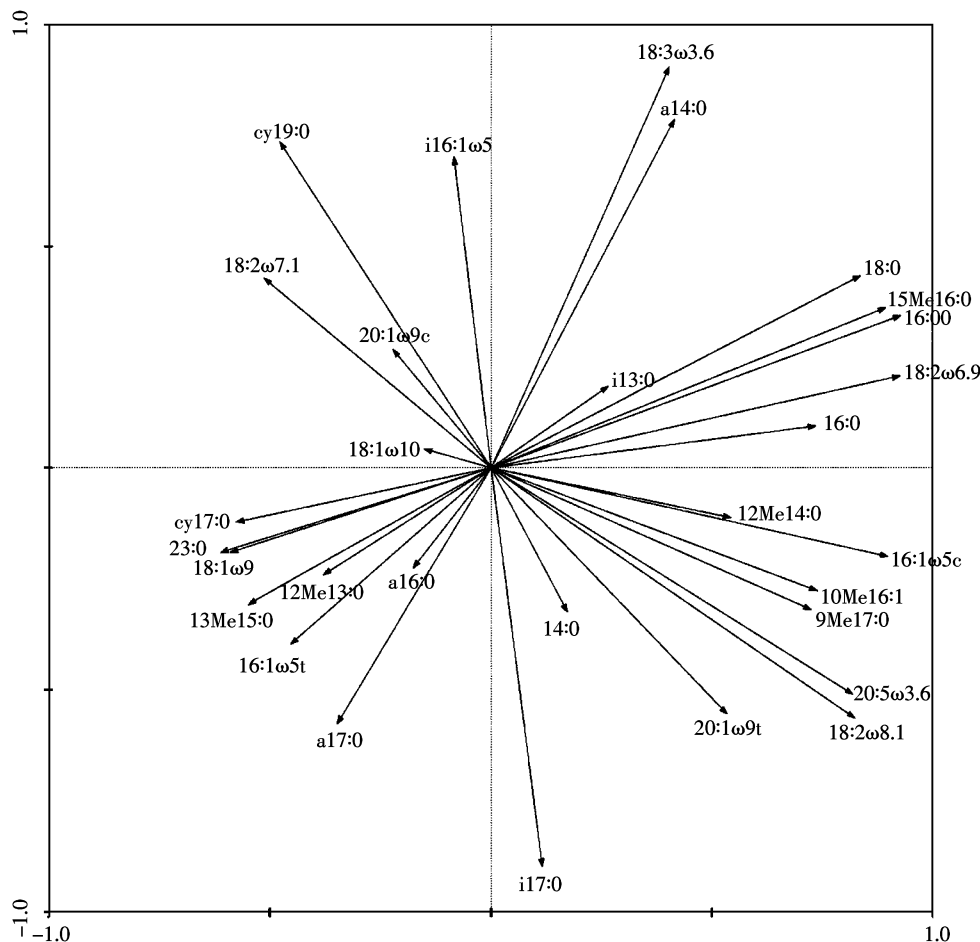


图 2 堆肥微生物 PLFA 信息主成分分析图

Figure 2 Distributed plot of PLFA fingerprints from composting microorganism analyzed by PCA

表 1 堆肥样品 DGGE 条带相对含量

Table 1 DGGE bands relative intensity of each composting samples

| 条带编号 | DGGE 条带相对丰度/%  |                |                |                |                |                |                |
|------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|      | 1 <sup>#</sup> | 2 <sup>#</sup> | 3 <sup>#</sup> | 4 <sup>#</sup> | 5 <sup>#</sup> | 6 <sup>#</sup> | 7 <sup>#</sup> |
| a    | 3.16           | 41.222         | 20.789         | 0              | 0              | 0              | 0              |
| b    | 1.198          | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              |
| c    | 6.712          | 3.407          | 6.305          | 10.749         | 9.852          | 0              | 6.869          |
| d    | 7.747          | 3.288          | 5.973          | 0              | 0              | 0              | 0              |
| e    | 0              | 2.136          | 0              | 10.781         | 13.47          | 2.478          | 8.905          |
| f    | 4.186          | 3.764          | 1.645          | 0              | 0              | 2.911          | 0              |
| g    | 6.118          | 0.855          | 3.746          | 0              | 0              | 0              | 0              |
| h    | 0.371          | 0              | 1.395          | 0              | 0              | 0              | 0              |
| i    | 3.959          | 0              | 4.372          | 4.466          | 3.963          | 3.665          | 2.535          |
| j    | 42.169         | 0.577          | 33.88          | 0              | 0              | 0              | 0              |
| k    | 24.38          | 0.035          | 14.908         | 11.947         | 9.031          | 15.736         | 0              |
| l    | 0              | 22.872         | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              |
| m    | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              | 19.499         | 3.622          |
| n    | 0              | 0              | 4.038          | 2.613          | 1.636          | 0              | 5.694          |
| o    | 0              | 3.452          |                | 0              | 0              | 0              | 4.784          |
| p    | 0              | 15.989         | 2.949          | 0              | 0              | 0              | 12.073         |
| q    | 0              | 2.403          | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              |
| r    | 0              | 0              | 0              | 9.309          | 0              | 12.86          | 15.454         |
| s    | 0              | 0              | 0              | 16.209         | 16.84          | 20.151         | 19.368         |
| t    | 0              | 0              | 0              | 10.705         | 22.211         | 0              | 0              |
| u    | 0              | 0              | 0              | 7.542          | 7.152          | 0              | 17.459         |
| v    | 0              | 0              | 0              | 15.679         | 15.844         | 22.701         | 0              |

母编号代表, 不满足排序要求的条带未编号。由于 DGGE 对微生物种群具有极高的分辨率, PCR 产物经电泳后分离出数目、强度和迁移位置不同的条带, 每一条带由 16S rDNA 序列解链特性相近的细菌物种组成, 代表不同的细菌种群<sup>[4]</sup>, 电泳条带越多说明细菌种群数量越多<sup>[5]</sup>, 条带信号越强表示该细菌种群相对数量越多。

从表 1 可以看出, 7 个堆肥样品中总共出现了 22 个 DGGE 条带, 但是没有 1 个条带是贯穿堆肥始终的, 这说明堆肥体系在不断发生变化, 与之对应的微生物群落也在不断变化, 因此也很难有某种细菌可以在堆肥整个过程中持续生长的。在本次研究中没有发现具有较广的温度适应范围的细菌种群。样品 1<sup>#</sup> 的优势条带有 j 和 k; 样品 2<sup>#</sup> 的优势条带有 a、l 和 p; 样品 3<sup>#</sup> 的优势条带有 a、j 和 k; 样品 4<sup>#</sup> 中丰度较高的条带比较多, 其中以条带 k、s 和 v 最高; 样品 5<sup>#</sup> 的优势条带有 e、s、t 和 v; 样品 6<sup>#</sup> 中条带数不多, 但是大部分条带的丰度都比较高, 其中优势条带有 m、s 和 v; 样品 7<sup>#</sup> 的优势条带有 p、r、s 和 u。

只在一次发酵期间出现的条带有 a、b、d、g、h、j 和 l; 只在二次发酵期间出现的条带有 m、r、s、t、u 和 v。这说明细菌群落明显随着堆肥进程在发生改变, 在堆肥的每个阶段都有其特有的细菌群落组成。

为了进一步了解 DGGE 条带信息的分布, 本研究以 DGGE 条带相对含量为物种信息进行主成分分析, 结果如图 3 所示。图 3a 是样点的主成分分布图, 从图上可以看出 7 个样点大概可以分为 3 类: 第一类样点 1<sup>#</sup> 和 3<sup>#</sup>, 第二类样点 2<sup>#</sup>, 第三类样点 4<sup>#</sup>~7<sup>#</sup>。说明堆肥细菌微生物群落相似性和堆肥温度及堆肥进程是密切相关的, 即取样温度越接近或取样时间间隔越短的样品之间的相似性越高。第一类样点取自堆肥的中低温阶段(30~45 ℃), 第二类样点取自堆肥的高温期(>55 ℃), 第三类样点取自堆肥的腐熟期。

图 3b 是 DGGE 条带主成分分布图, 从图上可以看出, 条带也有 3 大类分布。其中分布在载荷图左区中部的大部分是只在二次发酵期间出现的条带 m、r、s、t、u 和 v; 分布在载荷图右上区的主要是出现次数较少的条带; 分布在载荷图右下区的大部分是只在一

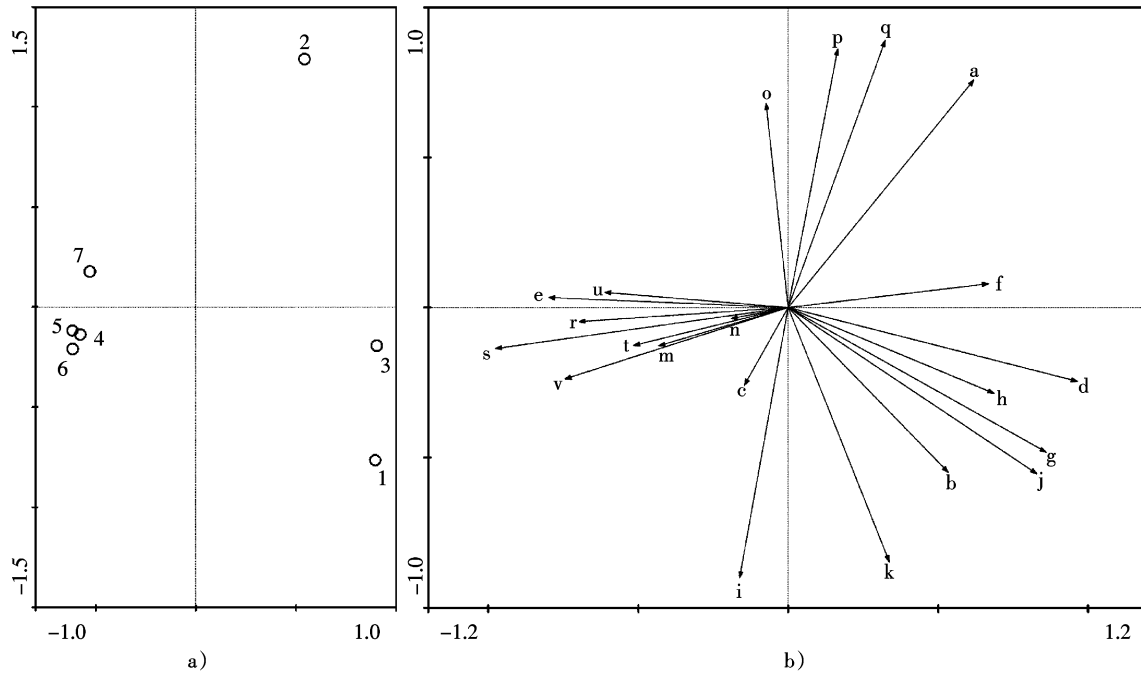


图 3 堆肥微生物 DGGE 图谱主成分分析图

Figure 3 Distributed plot of DGGE fingerprints from composting microorganism analyzed by PCA

次发酵期间出现的条带 b、d、g、h、j。

### 3 讨论

堆肥化的特点是利用自然界中广泛分布的细菌、放线菌、真菌等微生物的活动降解吸收垃圾中有机物。生物是堆肥化处理的重要因素,要使其更有效地降解有机物以控制堆肥过程,提高堆肥效率,研究堆肥过程中各种微生物的数量、组成及其相互作用非常必要,同时分析堆肥过程中微生物的群落结构对于了解堆肥过程也有着非常重要的意义。研究表明,通过传统的分离培养方法鉴定的微生物仅占环境总微生物的 0.1%~10%<sup>[3]</sup>,这显然不足以反映环境微生物的真实分布情况。非培养生物技术是一项不依赖于传统微生物培养的生物技术。近年来基于生物化学、生理学和分子生物学发展起来的 PLFA 法、Biolog 法、rRNA 法都力图克服这一难点,对微生物生态学发展产生了极大的促进作用。本文综合采用 PLFA 法和 DGGE 法分析堆肥过程中细菌群落的变化,研究结果表明,PLFA 和 DGGE 数据显示样品之间的群落结构有明显差异,随着堆肥进程的进行,群落在不断演替。

由于 PLFA 在死亡微生物中很快被分解,根据不同类群微生物的指示性 PLFA 不同,测定它们的含量,可以定量反映可繁殖或有潜在繁殖能力的不同类群微生物生物量和总生物量。本次堆肥的 PLFA 数据

显示样品之间的群落结构有明显差异,随着堆肥进程的进行,群落在不断演替。另外,本研究发现农业废物堆肥化过程中,表征细菌的 PLFA 种类较多,且有部分影响程度较高。细菌通常是单细胞的,大小介于 0.5~3.0  $\mu\text{m}$ ,由于体积小,细菌具有较大的比表面积,能使物质快速进入细胞。因此,细菌往往比真菌多得多,一些芽孢杆菌由于能产生较厚的孢子,可以抵御高温、辐射及化学灭菌作用<sup>[13]</sup>。大量研究证明,在堆肥高温期,主要微生物是链霉菌和微单胞杆菌,其中 87% 的高温菌属于杆菌属<sup>[16]</sup>,一些细菌如假单胞菌属、杆菌属中的芽孢杆菌、枯草杆菌、地衣球菌。另外,深黄纤维弧菌、普通纤维弧菌、纤维杆菌、荧光假单胞杆菌、瘤胃球菌等均具有纤维素分解能力。

DGGE 分析方法通过条带测序可以直接与日益丰富的数据库中的序列直接进行比较,从而较为精确地了解微生物种群结构<sup>[17]</sup>。本次研究堆肥过程中的细菌群落结构至少经历了 3 个阶段的演替,即嗜温细菌群落、高温细菌群落和腐熟期细菌群落。堆肥升温期,堆层基本呈中温,嗜温细菌较为活跃,利用堆肥原料中的有机物繁殖并产生大量热量,使堆体温度不断上升,当达到 50  $^{\circ}\text{C}$  以上后,嗜温细菌生长受到抑制甚至死亡,如条带 b、h 所代表的细菌,而嗜热细菌则大量繁殖,表现为优势种群。高温期持续一段时间后,由于有机物的消耗,堆肥产生的热量不足以维持高温,于

是温度开始下降,基本维持在中温(20~40℃),部分嗜热细菌死亡,如条带 l、o、q 所代表的细菌,部分嗜温细菌又开始生长,如条带 h、i、n 所代表的细菌。可以说堆肥过程是微生物群落结构与堆肥温度相互制约的过程,温度无疑是堆肥过程的最佳控制参数。

与传统的分离培养方法相比,非培养生物技术更能准确全面地反映堆肥微生物群落结构组成。在本次研究中以组合 PLFA 法和 DGGE 法分析堆肥微生物群落结构的变化,虽然两类方法显示的信息并不完全一致,但也因此说明了不同方法显示的信息并不是绝对的,采用各类方法组合研究微生物的信息变化是很有必要的。

## 4 结论

(1)单体 PLFA 数据显示样品之间的群落结构有明显差异,随着堆肥进程的进行,群落在不断演替,PLFA 数据可以表征较完整的微生物群落结构变化并较为明确地表征微生物生物量的变化,但是 PLFA 法不能给出具体的物种变化信息。

(2)DGGE 方法主成分分析数据显示本次研究堆肥过程中的样点和 DGGE 条带数据都有 3 大主要类别,同时指示堆肥过程中细菌群落结构至少经历了 3 个阶段的演替,即嗜温细菌群落、高温细菌群落和腐熟期细菌群落。堆肥过程是微生物群落结构与堆肥温度相互制约的过程。

(3)虽然两类方法显示的信息并不完全一致,但也因此说明了不同方法显示的信息并不是绝对的,采用各类方法组合研究堆肥微生物的信息变化是很有必要的。

## 参考文献:

- [1] Steger K, Jarvis A, Sven S, et al. Comparison of signature lipid methods to determine microbial community structure in compost[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 55(2):371-382.
- [2] Klammer M, Bååth E. Microbial community dynamics during composting of straw material studied using phospholipid fatty acid analysis[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1998, 27(1):9-20.
- [3] Widmer F. Assessing soil biological characteristics: A comparison of bulk soil community DNA-, PLFA-, and Biolog<sup>TM</sup>-analyses[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2001, 33:1029-1036.
- [4] Howeler M, Ghiorse W C, Walker Larry P. A quantitative analysis of DNA extraction and purification from compost[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 54(1):37-45.
- [5] 喻曼, 许育新, 曾光明, 等. RFLP 法研究接种对农业废物堆肥微生物多样性的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2010, 29(2):396-399.
- [6] YU Man, XU Yu-xin, ZENG Guang-ming, et al. Effect of inoculation on during agriculture waste composting analyzed by RFLP method[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(2):396-399.
- [7] Ishii K, Fukui M, Takii S, et al. Microbial succession during a composting process as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 89(5):768-777.
- [8] Fang J, Barcelona M J, Alvarez P J. A direct comparison between fatty acid and intact phospholipid profiling for microbial identification[J]. *Organic Geochemistry*, 2000, 31(9):881-887.
- [9] Yu M, Zeng GM, Chen YN, et al. Microbial communities responsible for the solid-state fermentation of rice straw estimated by phospholipid fatty acid (PLFA) analysis[J]. *Process Biochemistry*, 2009, 44:17-22.
- [10] LaMontagne M G, Michel Jr F C, P. A. Holden1, et al. Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2002, 49(3):255-264.
- [11] 刘有胜, 杨朝晖, 曾光明, 等. PCR-DGGE 技术对城市餐厨垃圾堆肥中细菌种群结构分析[J]. *环境科学学报*, 2007, 27(5):1-6.
- [12] LIU Y S, YANG Z H, ZENG G M, et al. Application of PCR-DGGE to analyzing bacterial communities in culinary waste compost [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2007, 27(5):1-6.
- [13] Li A J, Yang S F, Li X Y, et al. Microbial population dynamics during aerobic sludge granulation at different organic loading rates[J]. *Water Research*, 2008, 42(13):3552-3560.
- [14] Gilbride K A, Frigon D, Cesnik A, et al. Effect of chemical and physical parameters on a pulp mill biotreatment bacterial community[J]. *Water Research*, 2006, 40:775-787.
- [15] Beffa T, Blanc M, Lyon P F, et al. Isolation of thermus strains from hot composts 60-80℃[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 1996, 62:1723-1727.
- [16] Yang C H, Crowley D E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron status[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 2000, 66(9):345-351.
- [17] Konstantinov S R, Zhu W Y, Williams B A, et al. Effects of fermentable carbohydrates on piglet faecal bacterial communities as revealed by 16S ribosomal DNA[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 43:225-235.
- [18] Strom P F. Identification of thermophilic bacteria in solid waste composting[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, 50(4):906-913.
- [19] Tiedje J M, Asuming B S, Nüsslein K, et al. Opening the black box of soil microbial diversity[J]. *Applied Soil Ecology*, 1999, 13(1):109-112.