

饵料对蚯蚓粪细菌群落结构多样性的影响

陈 浩^{1,2}, 赵海涛¹, 姚振飞³, 孙红军⁴, 胡 健^{1*}

(1. 扬州大学环境科学与工程学院, 江苏 扬州 225127; 2. 江苏省农业科学院食品质量与安全检测研究所, 农业部农产品质量安全控制技术与标准重点实验室, 江苏 南京 210014; 3. 昆山市土壤肥料站, 江苏 昆山 215300; 4. 江苏东宝生物科技有限公司, 江苏 扬州 225231)

摘 要:以牛粪、猪粪和污泥等有机废弃物作为蚯蚓饵料,利用细菌 16S rDNA V3 区特异扩增及变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)技术,比较了不同饵料及饵料改变对蚯蚓粪细菌群落结构多样性的影响。结果表明:(1)与所取食的饵料相比,蚯蚓粪细菌群落结构多样性均有不同程度的下降,蚯蚓粪与对应饵料之间细菌群落结构相似性范围为 15.3%~37.7%;(2)来自不同饵料的蚯蚓粪细菌群落结构相似性范围为 17.2%~39.1%,其中以牛粪和猪粪为饵料时,蚯蚓粪细菌群落结构相似性最高,与对应的饵料细菌群落结构相似性相比,提高了近 1 倍;(3)当饵料由猪粪改为牛粪后,随着时间延长,蚯蚓粪细菌群落结构多样性逐渐下降并趋于稳定,并且蚯蚓粪与饵料牛粪的细菌群落结构相似性由 0 d 的 33.2%逐渐下降到 21 d 的 14.8%并趋于稳定。由此可知,饵料的种类及转换可以影响蚯蚓粪细菌群落结构多样性。

关键词:饵料;蚯蚓粪;PCR-DGGE;细菌群落多样性

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2012)12-2500-06

Characterization of Bacterial Community Diversity in Various Vermicomposts Produced from Feedstocks

CHEN Hao^{1,2}, ZHAO Hai-tao¹, YAO Zhen-fei³, Sun Hong-jun⁴, HU Jian^{1*}

(1.College of Environmental Science and Engineering, Yangzhou University, Jiangsu Yangzhou 225127; 2.Institute of Food Quality Safety and Detection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Control Technology and Standard for Agro-product Safety and Quality, Ministry of Agriculture, P.R.China, Jiangsu Nanjing 210014; 3.Kunshan Soil and Fertility Station, Jiangsu Kunshan 215300; 4.Jiangsu DongBao Bio-tech Ltd. Jiangsu Yangzhou 225231)

Abstract:The earthworms were fed with different feedstocks, such as cattle manure, pig manure and sludge. Then the bacterial community diversity between feedstock and vermicompost were determined by DGGE analysis of PCR-amplified bacterial 16S rDNA V3 region. The results showed that:(1)The diversities of bacterial community in various vermicomposts were all decreased as compared with different feedstocks. The similarity coefficients of the bacterial community between vermicompost and feedstock were different among all the tested samples, which were from 15.3% to 37.7%;(2)Feeding with different kind of feedstocks resulted in the different similarity coefficient of bacterial community among all the types of vermicomposts, but some vermicompost samples showed similar bacterial community diversity. The highest similarity value was found between two vermicomposts derived from cattle manure and pig manure, respectively, both of which were about one fold higher than their corresponding feedstocks;(3)The bacterial community diversity of fresh vermicomposts declined and tended to be stable with the extension of feeding time after changing the feedstock from pig manure to cattle manure. The bacterial community diversity in feedstock could be changed after feeding by earthworm. The similarity coefficient between cattle manure and its corresponding vermicomposts was decreased from 33.2% on 0 d to 14.8% on 21 d, and then tended to be stable after 21 d. In sum, our data suggested that the bacterial community diversity in vermicomposts could be influenced by the types and conversion of feedstocks. This work will help our understanding of the mechanism for disposal of organic wastes using earthworm bioreactor.

Keywords:feedstock; vermicompost; PCR-DGGE; bacterial community diversity

收稿日期:2012-05-25

基金项目:农业部十二五公益性农业行业科研专项(201103004);国家自然科学基金(31000939);江苏省农业科技支撑项目(BE2011361)

作者简介:陈 浩(1981—),男,江苏南京人,硕士研究生,研究方向为微生物资源农业利用。E-mail:tenchy2010@gmail.com

* 通信作者:胡 健 E-mail:huj@yzu.edu.cn

随着畜禽集约化生产的快速发展,我国畜禽粪便产生量大幅提升,已成为农村环境的主要污染源^[1]。据中国环境科学研究院估算,2010 年我国各城市污水处理厂产生的湿污泥达 3000 多万吨,约占我国年总固体废弃物排放量的 5%以上。当前,畜禽粪便及城市污泥无害化处置及资源化利用已成为我国环境保护领域十分重要的研究课题。

近年来,有关蚯蚓生物反应器对有机废弃物消解及资源化利用的研究及其应用受到越来越多的关注^[2]。与其他处理方式相比,利用蚯蚓消解牛粪、猪粪和污泥来生产有机肥和基质,具有高效、安全、低成本等优点,是现阶段大规模低成本处理有机废弃物行之有效的方法^[3]。与此同时,有关蚯蚓粪资源化利用的研究也在不断深入,蚯蚓粪不仅成功用作土壤有机质调理剂^[4]及有机肥,明显提高作物产量^[5],抑制作物病虫害^[6-7],还用于污染土壤修复^[8]、生物屏障(Biobarriers)^[9]、生物覆盖物(Biocovers)^[10]和生物过滤器(Biofilters)^[11]。很显然,上述多种生态功能的实现,与蚯蚓粪中功能性微生物的存在及其微生物群落结构关系密切。目前已从蚯蚓粪中分离出具有预防植物病原菌等功能的多种微生物^[12-14],并开始尝试研究蚯蚓粪微生物群落结构特征^[15-17]。因此,随着蚯蚓消化废物技术的日益推广,深入开展蚯蚓粪微生物群落结构特征及形成规律的研究,不仅可为解析蚯蚓粪生态功能机制提供理论基础,同时对于蚯蚓粪商品标准化生产以及产品质量指标体系形成具有重要的实践意义。

本文采用 PCR-DGGE 的方法,首次针对国内来源及利用最为普遍的牛粪、猪粪及城市生活污水等废弃物,初步研究了饵料以及不同培养时间对蚯蚓粪中细菌群落多样性和群落结构的影响,为进一步系统开展蚯蚓粪微生物群落结构形成规律以及蚯蚓粪商品化微生物质量控制研究提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 供试材料

新鲜牛粪和猪粪均采自扬州大学实验农牧场,污泥采自扬州污水处理厂底泥,理化性质见表 1。蚯蚓

品种为大平 2 号,在牛粪中孵化。

1.2 试验方法

1.2.1 来自不同饵料的蚯蚓粪细菌群落结构比较

所有试验于 2011 年 7—10 月在扬州大学实验农牧场江苏省农业环境安全技术服务中心有机固体废物消解基地进行。用 3 个周转箱(底部及四周为通透栅栏),分别加入牛粪、污泥和猪粪等饵料 50 kg(同时采集各样品-80℃保存),在饵料上覆盖遮阳网,接入 1 kg 蚯蚓(另加少量孵化基质),蚯蚓体长 4~6 cm,个重 0.16~0.22 g。所有周转箱上加盖不透明的防雨布,放于钢管大棚内(大棚只覆盖遮阳网)。培养至第 42 d,取各周转箱遮阳网下面表层 5~15 cm 处蚯蚓粪,多点采样混合后取 10 g,放入无菌离心管中,-80℃保存。

1.2.2 不同培养时间蚯蚓粪细菌群落结构比较

取扬州大学实验农牧场处理猪粪的蚯蚓 1 kg,蚯蚓体长 4~6 cm,个重 0.16~0.22 g,无菌水洗净,取其中 50 条蚯蚓放入垫有无菌滤纸的灭菌培养皿中(每皿放 1~2 条蚯蚓,滤纸用无菌水润湿),阴暗环境下 8 h 后采集蚯蚓粪 1 g 于灭菌 2 mL 离心管中^[18],记为 0 d,-80℃保存;其余蚯蚓接入 50 kg 牛粪中(放置于周转箱内,牛粪和环境条件同 1.2.1,同时采集牛粪样),每隔 7 d 在遮阳网下收集体长粗细较一致的 50 条蚯蚓,按以上方法收集蚯蚓粪,收集完蚯蚓粪的蚯蚓放回周转箱中,共收集 35 d,-80℃保存。

1.2.3 样品微生物总 DNA 提取

采用试剂盒(FastDNA[®] SPIN Kit for soil,MP Biomedicals,US)提取各样品微生物总 DNA,经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后,-20℃保存。

1.2.4 PCR 扩增

采用细菌通用引物 P2,P3 扩增 16S rDNA V3 区特异片段^[19]。P2:5'-ATTACCGCGGCT GCTGG-3';P3:5'-CGCCCGCCGCGCGCGCG GCGGGGCGGGGGC ACGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3'。

50 μL 的 PCR 扩增体系为:Taq DNA 聚合酶(大连 Takara)0.25 U,10×Buffer 5 μL,dNTP(2.5 mmol each,大连 Takara)4 μL,引物各 1 μL(20 μmol·L⁻¹),

表 1 不同饵料的理化性质

Table 1 Physical and chemical characteristics of different feedstocks

饵料	pH 值	含水率/%	有机质/%	全氮/g·kg ⁻¹	全磷/g·kg ⁻¹	全钾/g·kg ⁻¹
牛粪	7.72	72.58	33.28	13.11	26.28	25.99
猪粪	7.07	65.61	35.17	19.38	11.09	9.71
污泥	7.22	78.14	47.11	37.23	14.63	5.74

BSA 5 μL (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 模板 DNA 2 μL , 无菌水 Milli-Q 补足 50 μL 。

扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s; 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min; 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检验后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.5 DGGE 条件

采用 Bio-Rad 公司 Dcode™ 的基因突变检测系统对 PCR 产物进行电泳分离。电泳条件: 8% 的聚丙烯酰胺凝胶, 变性梯度 20%~60%, 电泳缓冲液 1× TAE, 130 V 电压, 60 $^{\circ}\text{C}$ 电泳 720 min。电泳结束后用 EB 染色 30 min, 无菌水 Milli-Q 褪染 20 min, 最后用 Bio-Rad 凝胶成像分析系统观察结果并拍照。

1.2.6 凝胶指纹图谱的生物信息学分析

PCR-DGGE 图谱采用 Quantity One 4.6 (Bio-Rad) 软件分析, 去除背景噪音 (Rolling disk 40) 后, 确定样品电泳条带数目和亮度峰值。凝胶图像数字化后, 通过上述分析软件分析 16S rDNA 的指纹图谱, 对样品采用不加权平均连锁聚类 (UPGMA) 的方式进行簇群归类, 计算相似性系数 (C_s) 和群落多样性 Shannon-Weaver 指数 (H')。所有数据处理与统计由 Microsoft Excel 和 SPSS 实现。

Shannon-Weaver 指数计算公式:

$$H' = -\sum_{i=1}^s \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N}$$

式中: n_i 为每个峰的面积; N 为所有峰的面积和; s 为条带数。

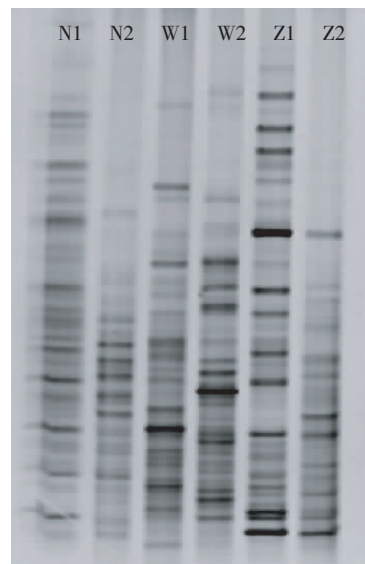
2 结果与分析

2.1 不同饵料的蚯蚓粪细菌群落结构比较

3 种饵料及相应的蚯蚓粪微生物总 DNA 的 PCR 扩增产物凝胶电泳结果显示, 扩增出的 16S rDNA V3 区特异片段长度约为 200 bp, 适于后续 DGGE 分析。

不同饵料及相应蚯蚓粪总 DNA PCR-DGGE 电泳图谱见图 1, 其对应的条带数目分别为 29、16、26、25、28 和 18; 均匀度指数分别为 0.93、0.95、0.89、0.89、0.88 和 0.90; Shannon-Weaver 指数分别为 3.12、2.63、2.91、2.88、2.92 和 2.61。由图 1 可知, 相对于饵料, 蚯蚓粪条带集中于谱图的中下部, 这种现象在以牛粪和猪粪为饵料的蚯蚓粪中更加明显。牛粪、污泥及猪粪经蚯蚓消化后蚯蚓粪中细菌条带数比饵料分别减少 13、1、10 条, 其中以牛粪及猪粪为饵料的蚯蚓粪条带数下降较多; Shannon 指数也呈相应下降趋

势。这一结果说明, 蚯蚓消解作用不同程度地降低了饵料细菌群落种类的多样性, 并且下降的程度受饵料种类的影响。



N1, 牛粪; N2, 牛粪蚯蚓粪; W1, 污泥; W2, 污泥蚯蚓粪; Z1, 猪粪; Z2, 猪粪蚯蚓粪。下同

N1, cattle manure; N2, cattle manure vermicompost;

W1, sludge; W2, sludge vermicompost;

Z1, pig manure; Z2, pig manure vermicompost. The same below

图 1 不同饵料蚯蚓粪细菌 16S rDNA 的 PCR-DGGE 指纹图谱
Figure 1 16S rDNA PCR-DGGE profiles of bacterial communities in the vermicomposts from the different feedstocks

各样品细菌群落相似性系数见表 2。由表 2 可知: (1) 牛粪、猪粪和污泥 3 种饵料细菌群落之间相似性范围仅为 19.3%~25.6%, 差异较大; (2) 分别以牛粪、猪粪和污泥为饵料时, 所产生的蚯蚓粪细菌群落结构相似性分别为 23.0%、37.7% 和 15.3%, 蚯蚓粪与相应饵料间相似性差异为污泥蚯蚓粪 > 牛粪蚯蚓粪 > 猪粪蚯蚓粪; (3) 不同饵料所产蚯蚓粪细菌群落结构相似性范围为 17.2%~39.1%, 其中以牛粪和猪粪为饵料的蚯蚓粪细菌群落结构相似性最高, 与相应饵料间细菌群落结构相似性相比提高近 1 倍, 而饵料为污泥的蚯蚓粪与饵料为牛粪或猪粪的蚯蚓粪细菌群落结构相似性较低, 且与相应饵料间相似性相比差异较小。上述结果说明, 饵料经蚯蚓消化后细菌群落结构发生了明显变化, 即蚯蚓取食过程对饵料细菌群落具有较强的改造能力, 且以猪粪和牛粪为饵料的蚯蚓粪细菌群落出现了一定程度的趋同现象。

2.2 不同培养时间蚯蚓粪细菌群落动态变化

牛粪及不同培养时间的蚯蚓粪微生物总 DNA

表 2 不同饵料蚯蚓粪细菌 DGGE 图谱相似性 C_s 值分析

Table 2 Pairwise similarity coefficient of the DGGE profile of the bacteria in the vermicomposts from the different feedstocks

样品	C_s 值/%					
	N1	N2	W1	W2	Z1	Z2
N1	—	23.0	19.3	23.5	19.8	16.1
N2	23.0	—	7.4	17.2	12.9	39.1
W1	19.3	7.4	—	15.3	25.6	14.6
W2	23.5	17.2	15.3	—	9.3	23.1
Z1	19.8	12.9	25.6	9.3	—	37.7
Z2	16.1	39.1	14.6	23.1	37.7	—

注: N1, 牛粪; N2, 牛粪蚯蚓粪; W1, 污泥; W2, 污泥蚯蚓粪; Z1, 猪粪; Z2, 猪粪蚯蚓粪。

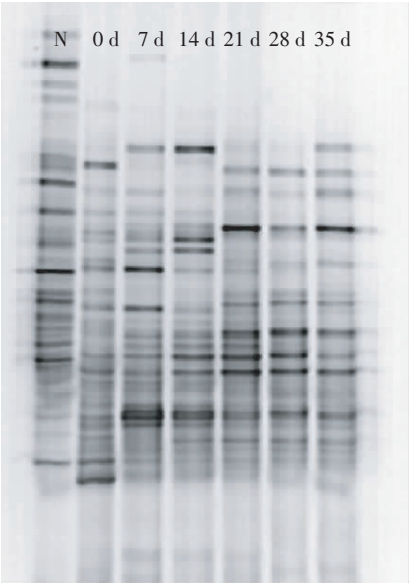
的 PCR 扩增产物凝胶电泳结果显示, 扩增得到的 16S rDNA V3 区特异片段长度为 200 bp 左右, 适于后续 DGGE 分析。

不同培养时间蚯蚓粪样细菌 16S rDNA 的 PCR-DGGE 指纹图谱如图 2 所示, 其条带数目分别为 29、27、25、22、22、21、21; 均匀度指数分别为 0.92、0.92、0.91、0.91、0.87、0.89、0.85; Shannon-Weaver 指数分别为 3.10、3.03、2.92、2.80、2.68、2.71、2.59。饵料牛粪条带数目为 29 条, 处理猪粪的蚯蚓最开始产生的蚯蚓粪(0 d)为 27 条, 随着培养时间的延长, 条带数逐渐减少到 21 条, 对应的 Shannon 指数也逐渐减小, 说明细菌种群数逐渐减少。而整个培养过程中, 细菌群落均匀度指数变化不大, 说明群落细菌数量没有大的改变。

细菌群落相似性聚类分析结果见图 3。由图 3 可知, 牛粪为单独一族, 所有蚯蚓粪分为一族, 说明蚯蚓粪与牛粪细菌群落结构存在明显差异; 在蚯蚓粪这一族中, 培养 0 d 与后期各时间点分列为两个族, 说明蚯蚓前期取食猪粪形成的蚯蚓粪(0 d)细菌群落结构与后期各时间点存在明显差异; 随着培养时间的延长又分为两个族, 7 d 和 14 d 归为一类, 而 21、28 d 及 35 d 归为一类, 说明培养 21 d 后蚯蚓粪细菌群落结构与前期差异明显, 而后期趋于稳定。上述结果说明, 当饵料由猪粪改为牛粪后, 随着培养时间的延长, 蚯蚓粪细菌群落多样性逐渐下降并趋于稳定, 细菌群落结构与饵料牛粪的相似性逐渐下降, 群落结构发生演替并趋于稳定。

3 讨论

随着蚯蚓消解有机废物技术的日益推广, 蚯蚓粪资源化利用不断深入, 蚯蚓粪的多种有益功能促使人们开始对蚯蚓粪微生物群落结构特征产生兴趣。郑金



N, 牛粪; 0~35 d, 蚯蚓粪收集时间点。下同
N, cattle manure; 0~35 d, different times of collecting vermicomposts.
The same below

图 2 不同培养时间蚯蚓粪细菌 16s rDNA 的 PCR-DGGE 指纹图谱

Figure 2 16s rDNA PCR-DGGE profiles of the bacterial communities in the vermicomposts at different incubation times

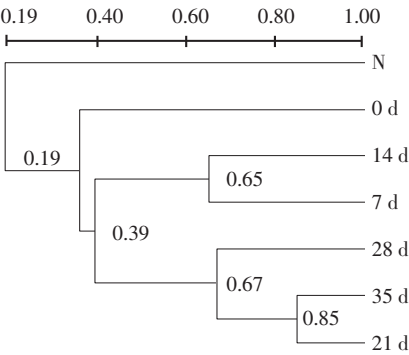


图 3 不同培养时间蚯蚓粪细菌群落聚类分析图
Figure 3 Cluster analysis of bacterial DGGE profiles of vermicomposts at different incubation times

伟等^[17]发现,蚯蚓粪与新鲜牛粪的细菌群落相似性为25%;Fernández-Gómez等^[16]以不同植物混合废弃物为饵料饲喂蚯蚓,发现不同废弃物细菌群落平均相似系数为42%,而形成的蚯蚓粪细菌群落平均相似系数达到了73%;Manuel等^[15]发现,分别以牛粪和3种植物混合废弃物为饵料产生的蚯蚓粪细菌群落平均相似系数达到80%。从本文研究结果看,供试的牛粪、猪粪和污泥3种饵料细菌群落平均相似系数为21.57%,形成的蚯蚓粪平均相似系数为26.47%,其中牛粪和猪粪形成的蚯蚓粪细菌群落相似系数达到了39.1%,比相应饵料牛粪和猪粪的相似系数提高近1倍,尽管污泥形成的蚯蚓粪与牛、猪粪形成的蚯蚓粪之间细菌群落相似性较低,但与相应饵料相比,污泥蚯蚓粪细菌群落结构变化最大。结合前人及本文研究结果可以看出,蚯蚓对饵料细菌群落具有明显的改造能力,尤其以猪粪和牛粪为饵料时蚯蚓粪细菌群落出现了一定程度的趋同。

从有关细菌群落多样性来看,本研究结果表明,蚯蚓取食后形成的蚯蚓粪比相应饵料均有不同程度的下降,其原因可能是由于蚯蚓体液及消化道内存在抑菌物质^[24-27],饵料在蚯蚓消化道这一特定环境中,微生物种类组成发生定向选择。但此前有文献报道表明,蚯蚓粪中细菌群落多样性比饵料牛粪丰富^[17,28],也有报道表明,蚯蚓粪比饵料细菌群落多样性差异略小^[22]。笔者认为,造成试验结果不一致可能与以下两方面因素有关:

(1)蚯蚓粪样新鲜程度和受环境影响的程度:蚯蚓粪排出后,蚓粪微生物系统受环境影响可能发生演化,也极易与饵料混杂,从而对粪样细菌群落多样性产生影响。本试验取样一个是在半封闭的周转箱遮阳网下,一个是蚯蚓最初的排泄物,与以上文献中开放的环境相比,受环境影响小,因此能较为真实地反映蚯蚓粪本身微生物多样性特征。

(2)饵料的理化性质及其微生物系统特征:作为蚯蚓的食料,不同饵料在有机质含量、碳氮比等营养及有关理化性质上存在差异,从而可能影响蚯蚓消化道细菌群落结构及其多样性的形成,同时,不同的饵料存在不同的微生物系统,这些微生物在蚯蚓消化系统内的适应性可能存在差异;从本文研究结果可以看出,牛粪和猪粪经蚯蚓消化后,细菌群落多样性指数由3.12和2.92分别下降至2.69和2.61,DGGE条带数分别由29条和28条下降至16条和18条,饵料与相应蚯蚓粪之间差异明显;而污泥经蚯蚓消化后,细

菌群落多样性指数由2.91下降至2.88,DGGE条带数由26条下降至25条,饵料与相应蚯蚓粪之间差异很小,其原因是否与3种不同饵料的理化性质及微生物特性的差异性有关,值得进一步研究。

有关饵料变化对蚯蚓粪微生物群落结构影响的研究,至今尚未见报道,本研究结果表明,当饵料由猪粪改为牛粪后,随着培养时间的延长,蚯蚓粪细菌多样性逐渐下降并趋于稳定,并且蚯蚓粪与饵料牛粪的细菌群落结构相似性也逐渐下降并趋于稳定。这一结果说明,当蚯蚓取食新饵料时,消化道微生物群落构建及蚯蚓粪微生物群落结构稳定需要一个过程。

综上所述,虽然蚯蚓的消化作用可以明显改造废弃物资源的细菌群落结构,但所产生的蚯蚓粪细菌群落结构可能因饵料种类及有关环境因素的不同存在明显差异。因此,深入开展饵料微生物特征、理化特性以及相关环境因素对蚯蚓粪微生物群落结构影响的研究,对于蚯蚓粪产品的标准化生产及其质量控制,有效实现蚯蚓粪功能微生物及其群落生态学机制的开发与利用,具有十分重要的理论和实践意义。

4 结论

(1)与相对应的饵料相比,蚯蚓粪中细菌群落多样性下降;但分别以牛粪和猪粪为饵料时,所获蚯蚓粪的细菌群落结构相似性升高。

(2)当蚯蚓饵料由猪粪变为牛粪后,蚯蚓粪中细菌群落需要一段时间才能趋于稳定。

参考文献:

- [1] 孙国栋,吕桂英,张天平,等.解决畜禽粪便污染探索生态农业发展之路[J].吉林畜牧兽医,2011,32(1):47-48.
SUN Guo-dong, LÜ Gui-ying, ZHANG Tian-ping, et al. Solving the pollution of animal excrement to investigate the development of eco-agriculture[J]. *Jilin Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2011, 32(1):47-48.
- [2] Edwards C A, Arancon N Q, Sherman R L. Vermiculture technology: Earthworms, organic wastes, and environmental management[M]. Boca Raton: CRC Press Taylor and Francis Group, 2010.
- [3] 胡艳霞,孙振钧,程文玲.蚯蚓养殖及蚓粪对植物土传病害抑制作用的研究进展[J].应用生态学报,2003,14(2):296-300.
HU Yan-xia, SUN Zhen-jun, CHENG Wen-ling. Advances in vermiculture and inhibition of vermicompost to soil-borne disease[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2003, 14(2):296-300.
- [4] Kale R D, Mallesh B C, Kubra B, et al. Influence of vermicompost application on the available macronutrients and selected microbial populations in a paddy field[J]. *Soil Biology Biochemistry*, 1992, 24:1317-

- 1320.
- [5] Arancon N Q, Edwards C A, Bierman P, et al. Effects of vermicomposts produced from cattle manure, food waste and paper waste on the growth and yield of peppers in the field[J]. *Pedobiologia*, 2005a, 49:297-306.
- [6] Arancon N Q, Galvis P A, Edwards C A. Suppression of insect pest populations and damage to plants by vermicomposts[J]. *Bioresource Technology*, 2005b, 96:1137-1142.
- [7] Szczech M M. Suppressiveness of vermicompost against *Fusarium* wilt of tomato[J]. *Journal of Phytopathology*, 1999, 147:155-161.
- [8] Delgado-Moreno L, Peña A. Compost and vermicompost of olive cake to bioremediate triazines-contaminated soil[J]. *Science of the Total Environment*, 2009, 407:1489-1495.
- [9] Moreno B, Vivas A, Nogales R, et al. Restoring biochemical activity and bacterial diversity in a trichloroethylene-contaminated soil: The reclamation effect of vermicomposted olive wastes[J]. *Environment Science and Pollution Research*, 2009, 16:253-264.
- [10] Moon K E, Lee S Y, Lee S H, et al. Earthworm cast as a promising filter bed material and its methanotrophic contribution to methane removal [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 176:131-138.
- [11] Fu Y, Shao L, Liu H, et al. Ethylene removal evaluation and bacterial community analysis of vermicompost as biofilter material[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 192:658-666.
- [12] Yasir M, Aslam Z, Kim S W, et al. Bacterial community composition and chitinase gene diversity of vermicompost with antifungal activity[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100:4396-4403.
- [13] Zambare V P, Nilegaonkar S S, Kanekar P P. A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: Enzyme production and its partial characterization[J]. *New Biotechnology*, 2011, 28:173-181.
- [14] 胡艳霞, 孙振钧, 王东辉, 等. 蚯蚓粪中拮抗微生物分析[J]. 应用与环境生物学报, 2004, 10(1):99-103.
HU Yan-xia, SUN Zhen-jun, WANG Dong-hui. Analysis of antagonistic microorganism in vermicompost[J]. *Chinese Journal of Applied Environment Biology*, 2004, 10(1):99-103.
- [15] Manuel J, Fernández-Gómez, Rogelio Nogales, et al. Use of DGGE and COMPOCHIP for investigating bacterial communities of various vermicomposts produced from different wastes under dissimilar conditions[J]. *Science of the Total Environment*, 2012, 414:664-671.
- [16] Fernández-Gómez M J, Romero E, Nogales R. Feasibility of vermicomposting for vegetable greenhouse waste recycling[J]. *Bioresource Technology*, 2010b, 101:9654-9660.
- [17] 郑金伟, 李辉信, 胡 锋. 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[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(3):555-558.
ZHENG Jin-wei, LI Hui-xin, HU Feng. Effects of different treat ways on microbial diversity and microbial community structure of dairy manure[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(3):555-558.
- [18] Dinishi Jayasinghe B A T, Dennis Parkinson. Earthworms as the vectors of actinomycetes antagonistic to litter decomposer fungi[J]. *Applied Soil Ecology*, 2009, 43:1-10.
- [19] Muyzer G, de Wnial E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3):695-700.
- [20] Domínguez J, Aira M, Gómez-Brandón M. Vermicomposting: Earthworms enhance the work of microbes[M]//Insam H, Franke-Whittle I, Goberna M, editors. *Microbes at work*. Berlin: Springer, 2010:93-114.
- [21] Edwards C A, Fletcher K E. Interactions between earthworms and microorganisms in organic-matter breakdown[J]. *Agriculture Ecosystem Environment*, 1988, 24:235-247.
- [22] Sen B, Chandra T S. Do earthworms affect dynamics of functional response and genetic structure of microbial community in a lab-scale composting system[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100:804-811.
- [23] Klammer S, Dell'Abate M T, Ros M, et al. Bacterial community patterns and thermal analyses of composts of various origins[J]. *Waste Management Research*, 2008, 26:173-187.
- [24] Anderson R S. Bacteriostatic factor in the coelomic fluid of *Lumbricus terrestris*[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 1988(12):189-194.
- [25] Lassegeus M, Roch P, Valembois P. Antibacterial activity of *Eisema letida andreii* coelomic fluid: Evidence, induction and animals protection[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1989, 53:1-6.
- [26] Vilembois P, Seymour J, Roch P. Evidence and cellular localization of an oxidative activity in the coelomic fluid of the earthworm *Eisenia fetida andreii*[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1991, 57:177-183.
- [27] Pedersen J C, Hendriksen N R. Effect of passage through the intestinal tract of detritivore earthworm (*Lumbricus* spp.) on the number of selected Gram negative and total bacteria[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1993, 16:227-232.
- [28] 尚丽勤, 白 林, 谭 兵, 等. 采用 PCR-SSCP 技术分析蚯蚓粪便的微生物群落结构[J]. 家畜生态学报, 2008, 29(2):25-29.
SHANG Li-qin, BAI Lin, TAN Bing, et al. Study on microbial community structure in earthworms faecal by single strand conformation polymorphism (SSCP) technique[J]. *Acta Ecologiae Animalis Domastici*, 2008, 29(2):25-29.