

利用 PCR-DGGE 方法研究添加复合菌剂对堆肥微生物群落的影响

王 晶, 许修宏 *

(东北农业大学资源与环境学院, 哈尔滨 150030)

摘 要:为研究接种复合菌剂对堆肥微生物群落变化的影响,以奶牛粪便和稻草为原料进行堆肥试验,设添加复合菌剂 BLD(由 3 株木质纤维素降解细菌组成,经测序鉴定分别为枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、假单胞菌属中未鉴定种)和不加菌剂两个处理,利用传统平板培养与聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)方法相结合研究两种堆肥处理对微生物群落演替的影响。结果表明,基于传统培养方式,微生物数量呈升高-降低-升高-降低的趋势,且细菌数量明显大于真菌数量;DGGE 图谱显示,两种堆肥处理的条带数呈现与传统培养相似的变化趋势。接种菌株在堆肥初期成功定殖,高温期成为优势菌株,降温期优势逐渐减弱。接种菌剂增加了堆肥中细菌数量,提高了堆肥微生物群落多样性,从而促进堆肥微生物群落演替,缩短堆肥腐熟时间。

关键词:堆肥;微生物群落;PCR-DGGE

中图分类号:S141.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2011)12-2602-06

Effects of Adding to Complex Bacteria on Microbial Community of Compost Assessed by PCR-DGGE Techniques

WANG Jing, XU Xiu-hong *

(College of Resources and Environment, Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China)

Abstract: In order to study the influence of inoculated strains on composting microbial community structure, composting experiment was conducted, which used the cow dung and straw as raw materials. Two groups were designed, bacterial strains were added to one group (code name as BLD, which were composed of three kinds of strains, and sequencing showed that they were *B. subtilis*, *B. licheniformis* and *Pseudomonas*), the other was the control. Variation of microbial communities in inoculation and natural composts was studied with the traditional plate-count method and the PCR-DGGE technology. Results indicated that: based on the traditional method, the population of microbes showed wave-like fluctuation: up-down-up-down, and the total bacterial count was significantly more than fungi. The DGGE graphs showed similar trend. And the inoculated strains colonized successfully in the early stage of compost, they became the superior strains in the high temperature phase, the strength of bands reduced in the cooling and maturation phases. Inoculation could increase the total count of bacterial, enhance microbial diversity and accelerate microbial succession, and then shorten the maturation phase.

Keywords: compost; microbial community; PCR-DGGE

好氧性高温堆肥是由群落结构演替非常迅速的多个微生物群体共同作用而实现的动态过程。微生物是堆肥过程中最关键、最活跃的因素,向堆料中接种

微生物菌剂,能够增加堆层中微生物数量,调节堆肥菌群结构,提高微生物活性^[1-2]。因此,堆肥菌剂的研发一直备受关注。目前,在堆肥微生物学研究中,传统的微生物学研究方法(即分离纯化和培养选育方法)仍是主要的研究手段。据国外研究报道,环境中存在的大量微生物中,仅有 1%甚至不到 1%可通过传统的培养方法进行培养和分离,绝大多数细菌要求非常严格的营养条件或难以培养^[3-6];另一方面,从系统中分离纯化得到的微生物,在存在的状态和数量上可能与堆肥中不尽一致,已不能真实地反映堆肥过程中微生物

收稿日期:2010-12-20

基金项目:科技部十一五科技支撑项目(2008BAD95B06-02-04, 2008BADA1B01);哈尔滨市科技攻关计划项目(2007AA6CN105);东北农业大学创新团队发展计划项目(CXT003-2-1)

作者简介:王 晶(1982—),女,黑龙江海林人,在读博士,研究方向为农业微生物学。E-mail: wgfq2003@163.com

* 通讯作者:许修宏 E-mail: howard2857@hotmail.com

物群落的种群组成及其动态变化规律。

变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)是使用一对特异性引物(一般情况下,其中一条引物附加一个 40 bp 左右的 GC clamp)扩增从堆肥提取的 DNA 或 rRNA 得到长度相同但序列有异的 16S rDNA 产物,然后在添加一定浓度线性梯度变性剂的聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离。同一温度下,在同一浓度变性剂的凝胶中,因序列不同的 16S rDNA 其部分解链程度不同而影响电泳迁移率,导致不同的 16S rDNA 在凝胶上分离成不同的条带,由此实现了分析微生物群落结构和动态变化情况^[6]。1993 年 Myuzer 等首先将 DGGE 技术应用于分子微生物生态学研究,由于 DGGE 在研究微生物群落多样性和研究微生物种群动态变化方面的优越性,近年来,开始有研究者利用 DGGE 对堆肥中微生物遗传多样性进行研究。

本文利用 PCR-DGGE 技术研究牛粪稻草堆肥过程中细菌种群随时间梯度的分布特征,旨在明确堆肥过程中微生物群落的组成和变化,为优化堆肥工艺和在堆肥中的应用复合菌剂提供一定的分子生态学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

牛粪取自哈尔滨市完达山奶牛场。稻草取自哈尔滨市香坊农场,用前切成 2~4 cm 小段。原料理化性质见表 1。堆肥各原料用量为牛粪约 250 kg,稻草约 100 kg。

表 1 堆肥原料基本性质

Table 1 Physicochemical properties of raw materials for composting

堆肥原料	含水率/%	总有机碳/%	总氮/%	碳氮比
牛粪	20.53	35.70	1.74	20.52
稻草	11.25	43.85	0.82	53.48

复合菌剂 BLD:由东北农业大学资源环境学院微生物实验室选育、保藏,复合菌剂中 3 株主要功能菌经测序分别为:芽孢杆菌属(*Bacillus*)中的枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)(代号 A),最适生长温度 55 ℃;芽孢杆菌属中的地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)(代号 B),最适生长温度 52 ℃;假单胞菌属(*Pseudomonas*)中未鉴定种(代号 C),最适生长温度 56 ℃。

1.2 堆肥试验方法

堆肥试验于 2010 年 3 月 1 日至 4 月 1 日在东北

农业大学资源与环境学院堆肥室进行(室内堆肥,自然通风)。将预湿的稻草平铺,将牛粪均匀撒在草上,以此类推直至建成高约 120 cm,直径为 150 cm 的圆锥型料堆。调节初始含水率为 65%左右,共堆制 31 d,分别于第 5、13、20、28 d 进行 4 次人工翻堆以保证供氧并促使堆内外材料腐熟一致。堆体无覆盖,顶部削平。每日 20:00 测定堆温,每次均在堆心 20、60、100 cm 深度处分别测量温度,取平均值作为堆体温度。

设计在堆制初期添加 1.2% 经液体发酵罐搅拌培养的 BLD 液体菌剂(培养基为牛肉膏蛋白胨培养基),3 种菌的接种量分别为 0.4%(以下简称为堆肥 I)和不加菌剂对照,加入等量灭菌的牛肉膏蛋白胨培养基(以下简称为堆肥 CK)两个处理。堆制时间为 31 d。

1.3 样品采集

采用多点取样法,每隔 2~4 d 从堆体上、中、下层分布取样,混合均匀,-30 ℃保存。

1.4 堆肥可培养微生物计数

细菌培养采用牛肉膏蛋白胨培养基混菌法;真菌培养采用马丁氏培养基混菌法^[7]。

1.5 堆肥样品分析方法

1.5.1 有机碳含量测定

堆肥样品于 105 ℃烘 8 h,称重后转入马弗炉中 550 ℃下灼烧 5 h。通过计算灼烧前后样品质量差可得灰分含量和有机物含量,用下式计算总有机碳百分含量:

$$\text{碳的百分含量} = (100 - \text{灰分百分含量}) / 1.8$$

1.5.2 总氮测定

采用凯氏定氮法。

1.5.3 堆肥细菌基因组 DNA 提取和纯化

总 DNA 提取方法采用蛋白酶-CTAB 法^[8-9],使用 DNA 纯化试剂盒(OMEGA, USA)对粗提 DNA 进行纯化。

1.5.4 细菌 16S rDNA V3 区扩增

选择细菌 16S rDNA 扩增通用引物对 F338-GC 和 R518^[10],引物由上海生物工程有限公司合成,扩增片段长度约为 250 bp。

PCR 反应体系:10×PCR buffer 2.5 μL, dNTP 2.5 μL,上下游引物各 0.5 μL,模板 0.5 μL, DNA 聚合酶 0.5 μL,补灭菌水至 25 μL。

PCR 反应条件:94 ℃预变性 3 min, 94 ℃变性 1 min, 65 ℃退火 1 min, 72 ℃延伸 45 s, 35 个循环, 72 ℃最终延伸 10 min, 4 ℃保存。

1.5.5 DGGE 分析

采用 Bio-Rad 公司 Dcode™ 基因突变检测系统对 PCR 产物进行 DGGE 电泳。DGGE 胶浓度为 8%, 变性剂浓度为 30%~60%, 上样量为 20 μL PCR 产物。电泳缓冲液为 1×TAE。60 ℃条件下 60 V 运行 12 h。电泳完成后采用硝酸银法染色^[11]。然后用 Bio-Rad Gel Doc2000 凝胶成像系统观察结果并拍照。

1.5.6 DGGE 数据分析

DGGE 图谱泳道和条带分析都采用 Bio-Rad Quantity One4.5.2 软件进行处理。按 UPGMA 算法对堆肥样品条带图谱进行细菌群落相似性聚类分析。

2 结果与讨论

2.1 堆肥过程中温度的变化

由图 1 可知, 堆肥 I 和堆肥 CK 都经历了升温期、高温期、降温期和腐熟期 4 个过程。堆肥 I 和堆肥 CK 分别在第 3 d 和第 5 d 使堆温升至 50 ℃以上, 为堆肥升温期。其中堆肥 I 在第 5 d 达到最高温度为 70 ℃, 堆肥 CK 在第 8 d 达到最高温度 64 ℃。可见, 接种微生物促进最初堆料中微生物大量繁殖, 使堆温迅速升至理想高度。堆肥 I 和堆肥 CK 高温期(大于 50 ℃)分别维持 23 d 和 19 d, 并分别在第 26 d 和第 24 d 开始逐渐降温, 第 31 d 后稳定保持在 40 ℃以下, 到达腐熟期。堆制第 5、13、20、28 d 时, 温度有所下降, 此时采用人工翻堆的方法, 以促进供氧并使堆肥外围部分未完全腐熟的物料继续反应。这也解释了在这 4 个时间点, 堆温相对大幅度上升的现象。

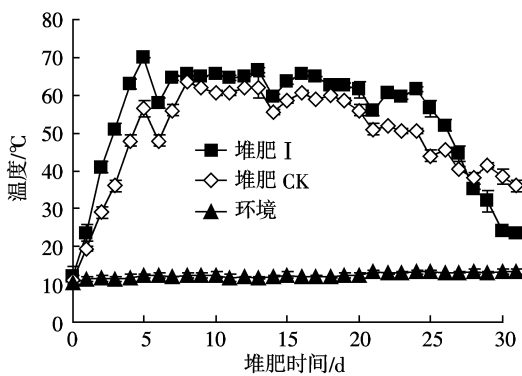


图 1 堆肥过程中温度变化

Figure 1 Change of temperature during compost I and CK processes

2.2 堆肥过程中碳氮比变化

C/N 是堆肥腐熟度评价的重要指标之一, 通常堆肥物料的 C/N 小于 20 时, 可以认为堆肥已经达到腐

熟, 并可直接施用于土壤或田间。堆制初期初始 C/N 在 30 左右(表 2)。处理 I 的 C/N 在第 25 d 降到 20 以下, 处理 CK 的 C/N 在第 30 d 接近 20, 可初步判定已达到腐熟所要求的指标。处理 I 比处理 CK 早 4~5 d 即达到腐熟要求。

表 2 堆肥碳氮比变化

Table 2 Change of C/N in composting

堆制时间/d	0	5	10	15	20	25	30
堆肥 I 碳氮比	32.1	29.5	26.3	23.5	22.2	19.7	17.6
堆肥 CK 碳氮比	32.1	30.2	28.7	27.1	25.4	24.1	20.5

2.3 堆肥过程中可培养微生物区系变化

堆肥过程中可培养微生物数量变化见图 2 和图 3。堆肥 I 和堆肥 CK 中细菌和真菌的数量都呈现“升高-降低-升高-降低”的变化趋势, 且真菌的数量远远小于细菌。两种堆肥处理升温期和降温期微生物数量较多, 高温期和腐熟期微生物数量相对较少。细菌数量在堆肥各个时期均占绝对优势, 在堆肥过程中起主要作用; 真菌数量在堆肥后期较前期锐减, 可能是因为大部分真菌不耐高温而在高温期被杀死; 堆肥后期, 真菌在堆肥 I 中的数量明显少于堆肥 CK, 推测其原因可能是添加菌剂促进细菌大量繁殖, 从而抑制了真菌的生长。此外, 与堆肥 CK 相比, 堆肥 I 在堆肥前期微生物数量上升较快, 微生物数量变化趋势快于堆肥 CK。说明接种菌剂在堆肥初期能够激发微生物繁殖。快速启动堆肥发酵, 缩短堆肥进程。

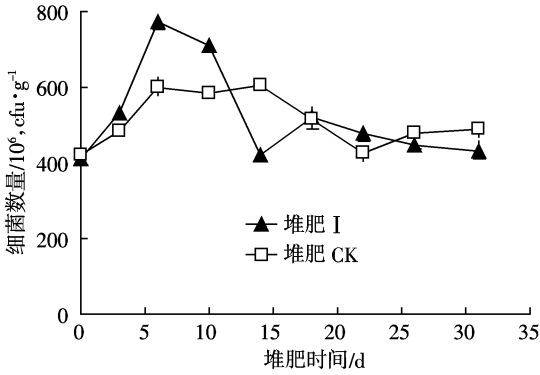


图 2 堆肥过程中细菌数量变化

Figure 2 Change of bacterial total counts

2.4 堆肥细菌群落的 DGGE 分析

2.4.1 总 DNA 的提取、纯化与 PCR 扩增

从堆肥中提取的细菌基因组 DNA 片段长度大于 23 kb, 说明已经获得了完整的基因组 DNA。但粗提 DNA 含有大量杂质, 如腐植酸等, 影响后续 PCR 扩

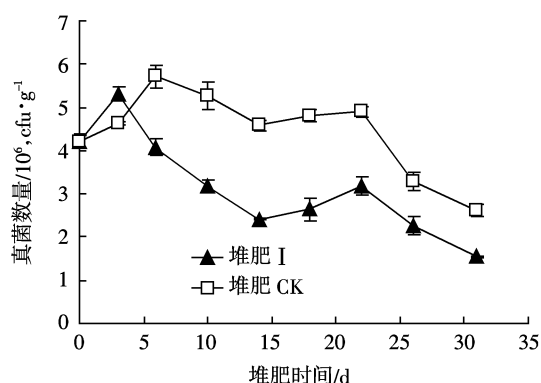


图 3 堆肥过程中真菌数量变化

Figure 3 Change of fungus total counts

增。故使用纯化试剂盒对粗提 DNA 进行纯化处理。纯化后的 DNA 作为 PCR 扩增的模板,获得长约 250 bp 的特异性目的片段,产物清晰无杂带,可用于后续 DGGE 分析。结果如图 4 所示。

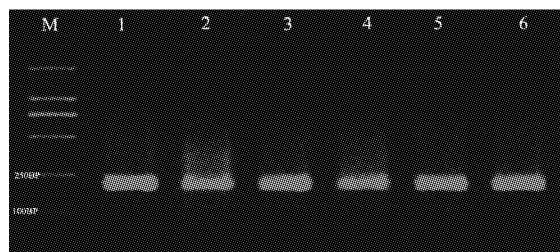


图 4 16S rDNA PCR 产物电泳图

Figure 4 Gel electrophoresis of 16S rDNA PCR products

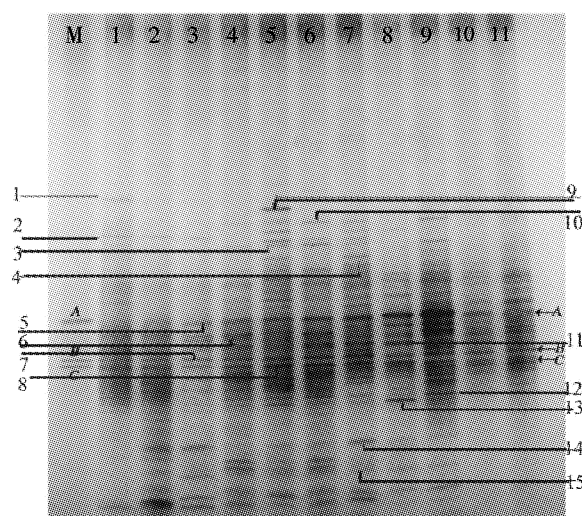
2.4.2 DGGE 图谱分析

堆肥处理 I 和 CK 细菌区系变化的 DGGE 图谱见图 5 和图 6, 其中泳道 1~11 分别代表第 0、2、5、8、11、14、17、21、25、28、31 d 的堆肥样品。以 BLD 菌群中主要功能菌 A、B、C 的 16S rDNA V3 区 PCR 产物作为 DGGE 图谱对照条带。

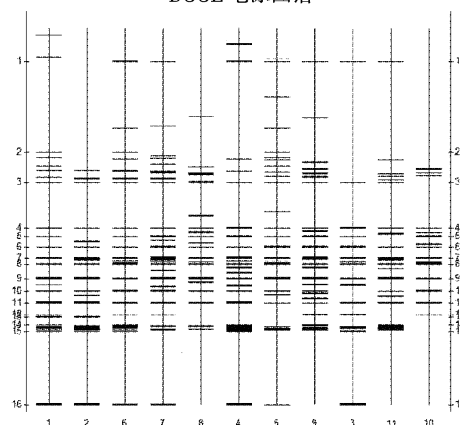
从图 5 和图 6 可知,DGGE 图谱条带数量与可培养微生物数量呈相似的变化趋势,堆肥 I 和堆肥 CK 中 DGGE 图谱条带呈相似的变化趋势。堆肥升温期条带较多,但优势条带不明显;堆肥高温期条带减少,但出现了较亮条带,表明高温期阶段出现了以嗜热菌或耐高温菌为主体的优势菌群;堆肥降温期条带再次增多,表明降温阶段微生物种群数量再次增加;堆肥腐熟期条带数量少且无较亮条带,说明腐熟阶段微生物种群数量少且代谢强度趋于平缓。

堆肥 I 中对照条带 A、B、C 在堆肥初期升温期存在,但条带较弱,在高温期逐渐形成优势,在降温期、腐熟期逐渐变弱(条带 5、7、8)。而在堆肥 CK 中对照

条带在整个堆肥过程中并未出现,表明添加高温菌剂 A、B、C 在堆肥初期成功定殖,高温期成为优势菌株,进入降温期后其数量优势逐渐减弱。堆肥 I 中 DGGE 图谱条带数量总体多于堆肥 CK,且 DGGE 图谱条带变化快于堆肥 CK,说明接种菌剂增加了堆肥微生物种群多样性,促进了堆肥菌群演替。复合菌剂组成菌株为耐高温木质纤维素分解细菌,对木质纤维素、半纤维素等有机大分子物质具有快速的分解作用,产生易于被其他种类细菌利用的小分子降解产物,堆肥中其他种类微生物利用这些降解产物大量繁殖,使微生物种类增多,有机物质进一步加速分解,堆肥温度快速升高。同时,堆肥快速升温又促使耐高温细菌或嗜热细菌迅速生长繁殖。所以,人工接种提高了堆肥菌群多样性,促进了堆肥微生物菌群的演替,从而缩短了堆肥腐熟时间。



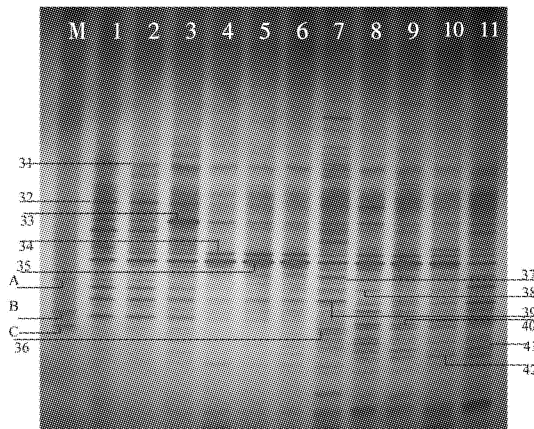
DGGE 电泳图谱



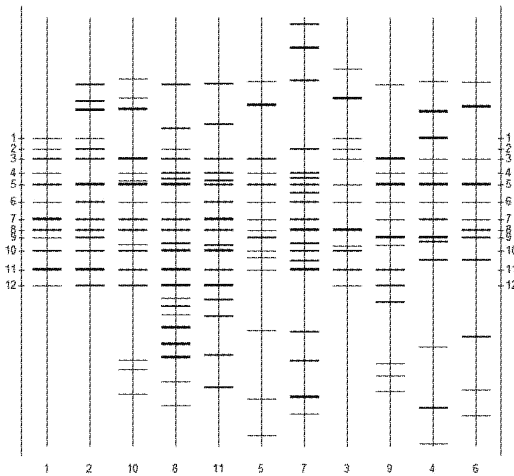
DGGE 条带示意图

图 5 堆肥处理 I 细菌 16S rDNA DGGE 电泳图谱和 DGGE 条带示意图

Figure 5 DGGE patterns and DGGE band intensity of compost I



DGGE 电泳图谱



DGGE 条带示意图

图 6 堆肥处理 CK 细菌 16S rDNA DGGE 电泳图谱和 DGGE 条带示意图

Figure 6 DGGE patterns and DGGE band intensity of compost CK

2.4.3 聚类分析

图 7 和图 8 为堆肥 I 和 CK 的聚类分析图。可以看出两组堆肥处理各泳道条带相似性普遍不高,可能是由于堆肥本身是一个微生物区系快速演替的过程。堆肥 I 中泳道 4 和 6 相似性达到 0.73;堆肥 CK 中,条带 1 和 2 相似性最高,为 0.80。在堆肥 I 中,泳道 10 和 11、2 和 3、7 和 8 分别聚于同一分支,且相似性相对较高;在堆肥 CK 中,泳道 1 和 2 以及泳道 4、5、6 分别聚于同一分支。说明取样时间越相近,堆肥中微生物群落的相似性相对更高,在堆肥达到腐熟期后,微生物区系逐渐成熟,代谢趋于稳定。

3 结论

(1)堆肥温度变化分析结果表明,复合微生物菌剂加快了堆肥温度的升高,提高了堆肥所能达到的最

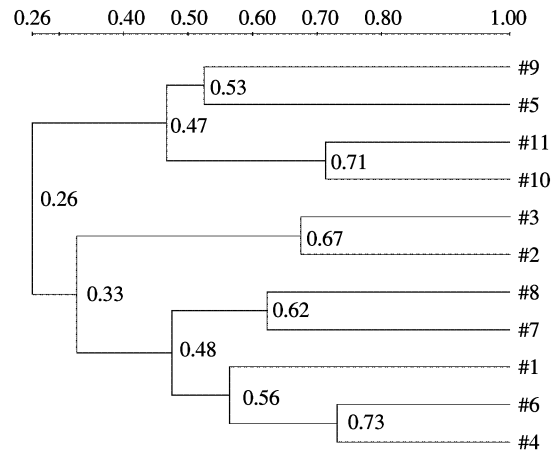


图 7 堆肥处理 I 细菌 DGGE 条带图谱聚类分析

Figure 7 Clustering analysis of bacterial DGGE patterns of compost I

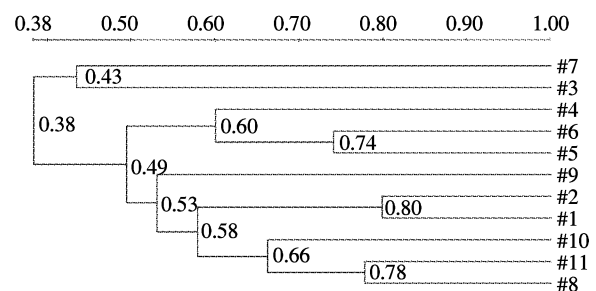


图 8 堆肥处理 CK 细菌 DGGE 条带图谱聚类分析

Figure 8 Clustering analysis of bacterial DGGE patterns of compost CK

高温度,使堆肥高温期提前 2 d。

(2)微生物数量变化及碳氮比分析结果表明,接种复合微生物菌剂增加了堆肥中有益微生物的总数,通过各菌种之间的相互作用,快速分解有机物,维持高温时间长,缩短堆肥的腐熟时间,从而加速了堆肥进程。

(3)DGGE 图谱和聚类分析结果表明,添加复合微生物菌剂增加了堆肥中微生物多样性,促进了微生物群落演替。

参考文献:

- [1] Vanderghenst J S, Vanderghenst G B, Walker L P. Measuring oxygen in composting piles[J]. *Biocycle*, 1997, 38(10):72-84.
- [2] Chen Z, Huang G H, Chakma A. A screening approach for decision analysis of composting actions: A Canadian case study[C]. Saskatoon Canada: The 49th Annual CSCHE Conference, 1999.
- [3] Torsvik V, Sorheim R, Goksoyr J. Total bacterial diversity in soil and sediment communities[J]. *J Ind Microbiol Biot*, 1996, 17(3):170-178.
- [4] Ward D M, Bateson M M, Weller R, et al. Ribosomal RNA analysis of

- microorganisms as they occur in nature[J]. *Adv Microb Ecol*, 1992, 12(2):219-286.
- [5] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. *Microbiol Rev*, 1995, 59(1):143-169.
- [6] 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.
- YU Man, XU Yu-xin, ZENG Guang-ming, et al. Effect of inoculation on the diversity of microbial community during agriculture waste composting analyzed by RFLP method[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(2):396-399.
- [7] 曾光明, 黄国和, 袁兴中, 等. 堆肥环境生物与控制[M]. 北京: 科学出版社, 2006:72-74.
- ZENG Guang-ming, HUANG Guo-he, YUAN Xing-zhong, et al. Composting environmental biology and control [M]. Beijing: Science Press, 2006:72-74.
- [8] 李卓楦, 喻子牛, 何绍江. 农业微生物学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996:32-36.
- LI Fu-di, YU Zi-niu, HE Shao-jiang. Experimental technique of agricultural microbiology[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1996:32-36.
- [9] Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(2):316-322.
- [10] 张瑞福, 曹慧, 崔中利, 等. 土壤微生物总DNA的提取与纯化[J]. 微生物学报, 2003, 43(2):276-282.
- ZHANG Rui-fu, CAO Hui, CUI Zhong-li, et al. Total DNA extraction and purification of soil microbio[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2003, 43(2):276-282.
- [11] Li A J, 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.
- [12] Sangu Inetti C J, Neto E D, Smpson A J G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels[J]. *Biotechniques*, 1994, 17(5):914-921.

欢迎订阅 2012 年《农业环境与发展》

《农业环境与发展》创刊于1984年,是农业部主管、农业部环境保护科研监测所与中国农业生态环境保护协会联合主办的国家级综合指导类科技期刊,为中国科技核心期刊。传播农业可持续发展新思想、新观点、新方略,倡导农业生产、农民生活、农村生态协调发展理念,多视角、多层次、多学科地反映食品安全与健康、资源开发与利用、环境污染与防治、农业清洁生产与农村循环经济等热点问题,直接面向农业、环保、食品、能源、卫生等领域的科研、教学、生产、管理、技术推广人员与大众读者。同时,《农业环境与发展》将在重要版面上宣传各地农业环境保护成就。欢迎大家踊跃投稿,欢迎刊登广告。

《农业环境与发展》为双月刊,大16开,逢双月25日出版,刊号ISSN 1005-4944, CN 12-1233/S, 全国发行,各地邮电局(所)均可订阅,邮发代号6-40,2012年每册定价12.00元,全年72.00元。有漏订者可直接与编辑部联系订阅。本刊现有过刊合订本,需订购者请与本刊编辑部联系。

编辑部地址:天津市南开区复康路31号

邮政编码:300191

电话:022-23611149

传真:022-23674336

电子信箱:caed@vip.163.com

网址:www.aed.org.cn