

RFLP 法研究接种对农业废物堆肥微生物多样性的影响

喻 曼^{1,2}, 许育新¹, 曾光明², 肖 华¹, 张 棋¹, 陈耀宁², 张嘉超², 黄红丽^{2,3}, 蒋荣清²

(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.湖南大学环境科学与工程学院, 长沙 410082; 3.湖南农业大学资源环境学院, 长沙 410128)

摘 要:用限制性片段长度多态性(Restriction fragment length polymorphism, RFLP)方法研究了在农业废物堆肥一次发酵和二次发酵期间添加黄孢原毛平革菌(*P. chrysosporium*)对微生物多样性的影响。结果表明,在不同发酵期接种 *P. chrysosporium* 对堆肥进程的影响不同。3 种典型的限制性内切酶 *Alu* I、*Hae* III 和 *Taq* I 在分析堆肥细菌微生物多样性的灵敏性上,*Hae* III 效果最好,*Alu* I 次之,*Taq* I 则并不很适用于分析堆肥细菌微生物多样性。接种黄孢对堆肥细菌群落的影响非常显著且迅速,二次接种可起到巩固一次接种效果的作用。

关键词:农业废物堆肥; 接种; 微生物多样性; 限制性片段长度多态性分析

中图分类号:S141.4 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2010)02-0396-04

Effect of Inoculation on the Diversity of Microbial Community During Agriculture Waste Composting Analyzed by RFLP Method

YU Man^{1,2}, XU Yu-xin¹, ZENG Guang-ming², XIAO Hua¹, ZHANG Qi¹, CHEN Yao-ning², ZHANG Jia-chao², HUANG Hong-li^{2,3}, JIANG Rong-qing²

(1.Environmental Resources and Soil Fertilizer Institute, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; 2.College of Environmental Science and Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China; 3.College of Resources and Environment, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: The lignocellulolytic microorganism, *P. chrysosporium* was inoculated during different phases of agricultural waste composting and the effect on the diversity of microbial community was observed. The results of the present investigation revealed that inoculation during different phases had different effects on these parameters. Three kinds of restriction enzymes, *Alu* I, *Hae* III and *Taq* I were used to analyse the change of microbial community diversity. The results showed that restriction enzyme *Hae* III was the most sensitive to the change of microbial community, restriction enzyme *Alu* I was the second, and restriction enzyme *Taq* I was the last. Restriction enzyme *Taq* I was not much suitable for analyzing composting samples. *P. chrysosporium* inoculated to composting system acted on certain microorganisms selectively and made them be the dominant species in order to promote the degradation of compost materials. The effect of inoculation on bacteria community was significant and rapid, the inoculation in the second fermentation was able to advance the effects of the inoculation in the first fermentation.

Keywords: agricultural waste composting; inoculation; microbial community diversity; RFLP

关于接种微生物对堆肥进程及堆肥产物质量的影响历来众说纷纭。如黄丹莲等^[1]发现接种白腐菌在一

定程度上降低 Pb 的生物活性及潜在危害,改善了堆体中微生物的活性;黄得扬等^[2]的研究结果表明用纤维素降解复合菌剂进行二次接种,能够提高二次发酵阶段堆温,提高堆肥品质。还有研究表明,接种微生物对加快堆肥进程或提高堆肥产品质量没有促进作用^[3],其主要原因是:(1)堆腐条件的影响,堆腐条件稍有变化对堆肥进程会造成很大的影响;(2)微生物的添加时期,添加时期不同对其能否有效发挥作用很关键。如果对接种菌剂微生物种类或接种时间、控制条件选择不当的话,

收稿日期:2009-09-20

基金项目:浙江省农科院创新能力提升项目;国家自然科学基金(50808072);长江学者和创新团队发展计划资助(IRT0719);浙江省自然科学基金(Y507284)

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

可能对堆肥没有明显改进作用。因此,在本次实验中采用木质素降解模式菌黄孢原毛平革菌为接种菌剂,重点考察了菌种添加时期对微生物多样性的影响。

由于堆肥中的微生物种类繁多,且种类随着温度的变化常处于动态变化状态,传统纯培养方法难以真实反映系统中微生物多样性的原始状态及动态变化^[4]。限制性片段长度多态性(RFLP)方法由于其检测手段简单、快捷,自动化程度高、准确率高等优点,目前广泛应用于各种反应体系中微生物群落结构多样性及其动态变化的检测。因此,本文采用限制性片段长度多态性(RFLP)方法分析农业固体废物堆肥过程中的微生物多样性变化及其动态变化。

1 材料与方法

1.1 实验设计

选择具有代表性的农业有机废物进行实验。(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。前两周每周翻堆两次,以后每周翻堆 1 次。

黄孢原毛平革菌(*P. chrysosporium*)是本次实验的接种菌体,一次发酵期间采用液态接种体,菌悬液浓度为 1×10^9 CFU·mL⁻¹,接种量为 5 mL·kg⁻¹;为防止二次发酵期间含水量上升,在二次发酵期间采用固态接种体,浓度为 1×10^9 CFU·g⁻¹,接种量为 10 g·kg⁻¹。每次接种后均匀混合堆体材料。实验堆体采用 1 个空白 3 个处理,具体设置如表 1 所示。其中堆体 A 是空白样,堆体 B、C、D 是处理样。

表 1 不同堆体的实验条件设置

Table 1 Experiment conditions for different runs

堆体	接种剂	
	一次发酵期间(第 6 d)	二次发酵期间(第 16 d)
A	0.5% 无菌水	1% 灭菌固态接种剂
B	0.5% 黄孢孢子悬液	1% 灭菌固态接种剂
C	0.5% 无菌水	1% 固态接种剂
D	0.5% 黄孢孢子悬液	1% 固态接种剂

1.2 参数测定

1.2.1 理化参数的测定

采用电子温度计测定堆肥堆体每天的温度,同时

测定记录当天堆体的环境温度;采用烘干失重法测定含水率;采用精密 pH 计测定 pH。含水率和 pH 值前 2 周每隔 3 d 测定 1 次,以后每隔 6 d 测定 1 次。测定种子发芽指数用以反映堆肥生物毒性的大小,根据种子的发芽率及种子根长计算发芽率:

发芽率=[(浸提液中的种子发芽率×种子根长)/(蒸馏水中的种子发芽率×种子根长)]×100%

前 21 d 每 3 d 监测 1 次,之后 1 周检测 1 次。

1.2.2 RFLP 分析

总 DNA 提取方法参照文献[5]。使用 DNA 纯化试剂盒纯化(Tiagen, 北京),纯化后加入了核糖核酸酶 A(RNase A, 终浓度 0.5 mg·mL⁻¹), 37 °C 恒温消化 2 h 后于 4 °C 保存。

PCR 扩增,选择细菌 16S rDNA 扩增通用引物对 27F(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')^[6-7]和 1495R(5'-CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA-3')^[7], 扩增片段长度约为 1 507 bp。PCR 产物经切胶回收纯化后,分别用限制性内切酶 *Alu* I, *Hae* III 和 *Taq* I 进行酶切。

实验选取第 11、15、18、28 和 42 d 的样品进行分析,对应编号分别为 1、2、3、4 和 5 号。

凝胶图像数字化后,通过图像分析软件 Quantity One 分析 RFLP 指纹图谱,对样品进行分析并计算群落多样性指数^[8-10]。计算公式如下^[11]:

Simpson 指数: $D=1-\sum(n_i/N)^2$

Shannon 指数: $H=-\sum[n_i/N \ln(n_i/N)]$

式中: n_i 为第 i 个条带的峰面积; N 为所有条带峰面积之和。

2 结果与分析

2.1 堆肥过程中 pH 的变化

本堆肥实验过程中 pH 的变化曲线如图 1 所示。4 个堆体的 pH 在堆制过程中呈波动上升趋势,最终值在 8.3 左右。在堆肥的一次发酵和二次发酵阶段接种黄孢的堆体 pH 值一定程度上有提高,但最终 pH 趋于相同,4 个堆体间 pH 变化不大。

2.2 堆肥过程中种子发芽指数的变化

4 个堆体的种子发芽指数变化如图 2 所示。

可以看出,种子发芽指数在整个堆肥过程中呈上升趋势,但堆体 C 和 D 的种子发芽指数(GI)增长较快,在堆肥第 42 d 最后均超过 80%,达到腐熟。一般研究表明,当种子发芽指数达到 80% 即可认为堆肥已腐熟。堆体 A 和 B 的种子发芽指数到第 42 d 缓慢增

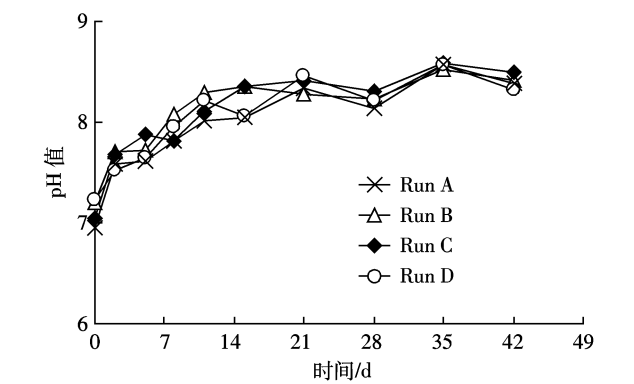


图1 堆肥过程中不同堆体pH的变化
Figure 1 Change of pH during composting in different treatments

加到80.09%,而堆体D从84.84%增加到110.58%。由此可见,在堆肥中添加黄孢对于缩短堆肥进程是有一定作用的。

2.3 多样性指数分析

表2是3种限制性酶酶切条带的Simpson指数和Shannon指数的变化,对比两组数据发现两大指数计算出来的结果具有一致性。

限制性酶Alu I酶切的细菌多样性显示一次发酵期间接种黄孢对其有影响,但是影响不显著。

限制性酶Hae III是判断细菌多样性的一种通用酶^[5]。从限制性酶Hae III酶切条带对应的多样性指数变化可以看出,堆体A中的细菌多样性在整个过程中呈下降趋势,且在堆肥后期急剧下降,这可能是在堆肥后期以木质素类难降解物质为主,可供细菌群落分解的营养物质浓度下降,另大部分研究表明以真菌为降解木质素的主要群体^[12]。与之相反的是,堆体D

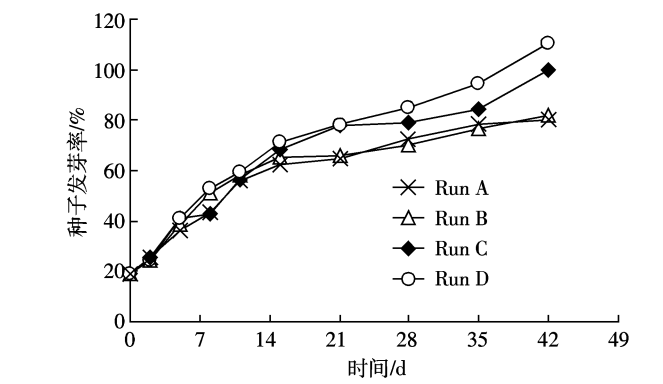


图2 堆肥过程中不同堆体种子发芽指数(GI)的变化
Figure 2 Change of germination index(GI) during composting in different treatments

中的细菌多样性一直呈上升状态,这说明黄孢并不是对细菌多样性持续有抑制作用的。有研究表明黄孢与大部分纤维素降解细菌菌株在混合培养时,体系内的酶系都能得到加强和完善,尤其是木质素降解酶系最为明显^[13]。对比4个堆体的多样性指数也有显著差别:编号1和2样品明显分成两类,其中A1和C1多样性相似,B1和D1多样性相似,但A1和C1的多样性高于B1和D1的多样性,说明一次发酵期间添加的黄孢对能被Hae III酶切的细菌多样性产生了一定的抑制作用。编号3的样品间多样性差异不大。编号4和5的样品多样性差异更为显著,编号3的样品中堆体C对应的多样性指数为0,编号4的样品中只有堆体D对应的多样性指数大于0。这说明在二次发酵期间接种,对细菌多样性的影响非常显著。各种菌株之间发生协同作用是需要一定时间的,可能刚开始存在一定的抑制,本实验中的二次接种实际上起到了一个

表2 堆肥过程中不同堆体多样性指数的变化											
Table 2 Change of microbial diversity during composting in different treatments											
项目		1		2		3		4		5	
		Simpson	Shannon	Simpson	Shannon	Simpson	Shannon	Simpson	Shannon	Simpson	Shannon
Alu I	堆体 A	0.842	1.95	0.813	1.732	0.831	1.857	0.823	1.825	0.784	1.647
	B	0.796	1.679	0.737	1.465	0.831	1.857	0.823	1.825	0.784	1.647
	C	0.899	2.377	0.872	2.118	0.775	1.55	0.819	1.819	0.758	1.516
	D	0.796	1.679	0.737	1.465	0.745	1.481	0.828	1.844	0.75	1.493
Hae III	堆体 A	0.891	2.3	0.814	1.805	0.705	1.298	0.795	1.677	0	0
	B	0.377	0.565	0.426	0.617	0.705	1.298	0.795	1.677	0	0
	C	0.873	2.128	0.866	2.095	0.707	1.302	0	0	0	0
	D	0.377	0.565	0.426	0.617	0.571	0.956	0.738	1.47	0.846	1.961
Taq I	堆体 A	0.839	1.878	0.86	2.018	0.76	1.501	0.767	1.529	0.977	1.538
	B	0.782	1.564	0.855	1.998	0.76	1.501	0.833	1.859	0.772	1.538
	C	0.813	1.728	0.86	2.018	0.877	2.14	0.885	2.222	0.833	1.859
	D	0.783	1.563	0.855	1.998	0.807	1.71	0.756	1.5	0.836	1.873

强化接种效果的作用。

限制性内切酶 *Taq* I 对应条带多样性数据显示样品间的多样性差异不是很大,说明该酶的选取在本次实验样品中没有代表性。

3 结论

(1) 本实验研究了在堆肥一次发酵与二次发酵阶段接种黄孢原毛平革菌对堆肥的影响,总体上接种黄孢原毛平革菌能够促进种子发芽指数的升高,缩短堆肥进程,提高堆肥效率。

(2) 三种典型的限制性内切酶 *Alu* I、*Hae* III 和 *Taq* I 在分析堆肥细菌微生物多样性的灵敏性上,*Hae* III 效果最好,*Alu* I 次之,*Taq* I 则不是很适用于分析堆肥细菌微生物多样性。

(3) 接种黄孢对堆肥细菌群落的影响是非常显著且非常迅速的,直接添加黄孢对细菌群落可能有抑制作用,但当黄孢与细菌群落发生协同作用后,再添加黄孢反而能刺激相应细菌的生长。

参考文献:

- [1] Zeng G M, Huang D L, Huang G H, et al. Composting of lead-contaminated solid waste with inocula of white-rot fungus[J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98: 320-326.
- [2] 黄得扬, 陆文静, 王洪涛, 等. 高效纤维素分解菌在蔬菜-花卉秸秆联合好氧堆肥中的应用[J]. 环境科学, 2004, 25(2): 145-149.
HUANG De-yang, LU Wen-jing, WANG Hong-tao, et al. Application of high efficient cellulose utilization microorganisms in co-composting of vegetable wastes and flower stalk[J]. *Environmental Science*, 2004, 25(2): 145-149.
- [3] 许晓英, 李 季. 复合微生物菌剂在污泥高温好氧堆肥中的应用[J]. 中国生态农业学报, 2006, 14(3): 64-66.
XU Xiao-ying, LI Ji. Application of complex microbial inoculants in the high-temperature and aeration composting sewage sludge[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2006, 14(3): 64-66.
- [4] 张洪勋, 王晓谊, 齐鸿雁. 微生物生态学研究方法进展[J]. 生态学报, 2003, 23: 988-995.
ZHANG Hong-xun, WANG Xiao-yi, QI Hong-yan. Development in research methods of microbial ecology[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23: 988-995.
- [5] 杨朝晖, 肖 勇, 曾光明, 等. 用于分子生态学研究的堆肥 DNA 提取方法[J]. 环境科学, 2006, 27(8): 1613-1618.
YANG Zhao-hui, XIAO Yong, ZENG Guang-ming, et al. DNA extraction methods of compost for molecular ecology analysis[J]. *Environmental Science*, 2006, 27(8): 1613-1618.
- [6] Adachi M, Matsubara T, Okamoto R, et al. Inhibition of cyst formation in the toxic dinoflagellate *Alexandrium* (Dinophyceae) by bacteria from Hiroshima Bay, Japan[J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 2001, 26(2): 223-233.
- [7] Hoti S L, Sridhar A, Das P K. Presence of wuchereria endosymbionts in microfilariae of wuchereria bancrofti (Spirurida: Onchocercidae) from different geographical regions in India[J]. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2003, 98: 1017-1019.
- [8] 傅以钢, 王 峰, 何培松, 等. DGGE 污泥堆肥工艺微生物种群结构分析[J]. 中国环境科学, 2005, 25(增刊): 98-101.
FU Yi-gang, WANG Feng, HE Pei-song, et al. Analysis of microbial community structure with DGGE sludge compost technology[J]. *China Environmental Science*, 2005, 25(Suppl): 98-101.
- [9] Gillian D C, Speksnijder A G C L, Zwart G, et al. Genetic diversity of the biofilm covering *Montacuta ferruginosa* (Mollusca, Bivalvia) as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and cloning of PCR amplified gene fragment coding for 16S rDNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(9): 3464-3472.
- [10] Murray A E, Hollibaugh J T, Orrego C. Phylogenetic composition of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(7): 2676-2680.
- [11] 吴展才, 余旭胜, 徐源泰. 采用分子生物学技术分析不同施肥土壤细菌多样性[J]. 中国农业科学, 2005, 38(12): 2474-2480.
WU Zhan-cai, XU Xu-sheng, XU Yuan-tai. Analysis on microbial diversity of different agricultural soils by using molecular biology technique[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38(12): 2474-2480.
- [12] 席北斗, 刘鸿亮, 白庆中, 等. 堆肥中纤维素和木质素的生物降解研究现状[J]. 环境污染治理技术与设备, 2002, 3(3): 19-23.
XI Bei-dou, LIU Hong-liang, BAI Qing-zhong, et al. Study on current status of lignin and cellulose biodegradation in composting process[J]. *Techniques and Equipment for Environ Poll Cont*, 2002, 3(3): 19-23.
- [13] 陈耀宁, 曾光明, 喻 曼, 等. 与黄孢原毛平革菌协同降解稻草的混合菌筛选[J]. 中国环境科学, 2007, 27(2): 189-193.
CHEN Yao-ning, ZENG Guang-ming, YU Man, et al. Screening of compatible strains with *Phanerochaete chrysosporium* for biodegradation of straw[J]. *China Environmental Science*, 2007, 27(2): 189-193.