

郑雪芳, 刘波, 林营志, 等. 2009 利用磷脂脂肪酸生物标记分析猪舍基质垫层微生物亚群落的分化 [J]. 环境科学学报, 29(11): 2306– 2317
Zheng X F, Liu B, Lin Y Z, et al. 2009. Using phospholipid fatty acid biomarkers for analysis of the microbial subcommunity in pigsty litter[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 29(11): 2306– 2317

利用磷脂脂肪酸生物标记分析猪舍基质垫层微生物亚群落的分化

郑雪芳, 刘波^{*}, 林营志, 蓝江林, 刘丹莹

福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福州 350003
收稿日期: 2009-02-05 修回日期: 2009-04-22 录用日期: 2009-08-14

摘要: 采用磷脂脂肪酸 (PLFA) 生物标记法, 分析不同使用时间猪舍基质垫层微生物群落结构的动态变化及其亚群落的分化. 结果表明, 不同使用时间猪舍基质垫层中的微生物脂肪酸生物标记分布差异显著, 一些微生物的脂肪酸生物标记在不同使用时间不同层次的基质垫层中均有分布, 为完全分布, 而另外一些微生物的脂肪酸生物标记只在特定层次分布, 为不完全分布. 此外, 不同微生物的脂肪酸生物标记在不同使用时间不同层次的基质垫层中的分布量也不同, 如生物标记 *il7: 0 3OH* 仅分布于使用时间为 1 个月的基质垫层的第 1、2、3 层中, 而在使用时间为 1 个月的基质垫层的第 4 层以及使用时间为 6、24 个月的基质垫层的各层分布量均极低. 对猪舍基质垫层中的微生物亚群落分化的研究结果表明, 当马氏距离为 56.62 时, 可将不同使用时间的猪舍基质垫层微生物分为 3 个亚群落: 初始亚群落、过渡亚群落和稳定亚群落. 对各亚群落的特征分析表明, 当欧氏距离为 12.70 时, 可将初始亚群落 (垫层使用时间为 1 个月) 的脂肪酸生物标记继续分化为 2 类群; 当欧氏距离为 71.10 时, 可将过渡亚群落 (垫层使用时间为 6 个月) 的脂肪酸生物标记分化为 2 个类群; 当欧氏距离为 22.22 时, 可将稳定亚群落 (垫层使用时间为 24 个月) 的脂肪酸生物标记分为 3 个类群.
关键词: 猪舍; 基质垫层; 亚群落分化; 磷脂脂肪酸 (PLFA)
文章编号: 0253-2468 (2009) 11-2306-12 中图分类号: X171 文献标识码: A

Using phospholipid fatty acid biomarkers for analysis of the microbial subcommunity in pigsty litter

ZHENG Xuefang, LIU Bo^{*}, LIN Yingzhi, LAN Jianglin, LIU Danying
Agricultural Bio-Resources Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003
Received 5 February 2009; **received in revised form** 22 April 2009; **accepted** 14 August 2009

Abstract The diversity of phospholipid fatty acid (PLFA) biomarkers was analyzed to investigate the microbial subcommunity in pigsty litter. The litter was treated with Luodong enzymes (*Bacillus subtilis* provided by Fujian Luodong Biology Technology Co., Ltd.) for 1 month, 6 months and 24 months. The results showed that PLFA biomarker distributions were significantly different among the three different treatments and in different layers (20–40–60–80 cm depth) of the litter in the non-polluting pigsty. Some PLFA biomarkers were distributed in all layers of the litter system after all treatments, which is called complete distribution. However, some PLFA biomarkers were only distributed in limited layers of the litter system, called incomplete distribution. The distribution of individual PLFA biomarkers was also remarkably different in the litter layers in each treatment month. For example, the biomarker *il7: 0 3OH* was distributed in the upper layers but only minimally present in the 80 cm layer after 1 month of treatment, while it showed complete distribution in the 6 and 24 month treatments. In the cluster analysis, when the Mahalanobis distance was 56.62, the PLFA biomarkers in the litter system of pigsty were grouped into three microbial subcommunities named initial, transitional, and stable subcommunities. Analysis of the characteristics of each subcommunity showed that the initial subcommunity with 12.70 euclidean distance and transitional subcommunity with 71.10 euclidean distance could be divided into two groups containing different PLFA biomarkers; however, the stable subcommunity could be divided into three groups when the euclidean distance was 22.22.
Keywords pigsty; litter system; subcommunity polarization; phospholipid fatty acids

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项 (No. 2008ZX07425-002); 福建省财政专项 – 福建省农业科学院科技创新团队建设基金 (No. STIF-Y03)
Supported by the National Key Technology Program for Water Body Pollution Control and Rectification (No. 2008ZX07425-002) and the Financial Department of Fujian Government – Science & Technology Innovation Foundation of FAAS (No. STIF-Y03)
作者简介: 郑雪芳 (1977—), 女, 助理研究员, E-mail: zhengxuefang2003@yahoo.com.cn; * 通讯作者 (责任作者), E-mail: fzliub@163.com
Biography: ZHENG Xuefang (1977—), female, assistant professor, E-mail: zhengxuefang2003@yahoo.com.cn; * **Corresponding author**, E-mail: fzliub@163.com
© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 引言 (Introduction)

养猪产生的大量猪粪已引起了严重的环境污染问题。近年来, 有研究者利用微生物分解猪粪, 以解决养猪过程中的臭味和污染排放问题, 并取得了很好的效果 (孔凡真, 2005)。研究猪舍基质垫层微生物亚群落的变化对于揭示整个微生物发酵过程中猪粪尿的降解、转化规律等具有重要意义 (Tam *et al.*, 1993)。但是, 目前对猪舍基质垫层微生物群落动态的研究十分薄弱, 一方面是由于许多功能微生物都处于存活但不可培养状态 (Amann *et al.*, 1995 McCarthy *et al.*, 1996 White *et al.*, 1997); 另一方面, 传统分离微生物的方法繁琐耗时, 不能用于监测微生物种群结构的动态变化。

利用磷脂脂肪酸 (phospholipids fatty acid, PLFA) 生物标记分析环境微生物群落的变化在国内外已有报道。White 等 (1979) 最先利用 PLFA 生物标记法研究了河口沉积物中微生物群落数量的变化; 随后, 在堆肥样品 (Medeiros *et al.*, 2006)、海河沉积物 (Hack *et al.*, 2005 Syakti *et al.*, 2006) 和土壤微生物群落结构 (Puglisi *et al.*, 2005) 等的研究中, PLFA 生物标记得到了广泛应用。Cahlon 等 (2000) 曾利用 PLFA 生物标记法模拟研究了耕种行为对微生物群落的影响, 发现其对长期耕种土地的影响比对荒地的影响要小的多; Murata 等 (2005) 用 PLFA 生物标记法研究了受多种金属污染土壤中微生物群落结构的变化; Zelles 等 (1992) 比较了 8 个耕地土壤的 PLFA, 发现每个土壤都有特异的 PLFA 图谱, 称之为土壤指纹图谱。前人的研究表明, PLFA 是用于分析生态环境中微生物群落的有效工具 (Yao *et al.*, 2000)。笔者在前期的研究中发现, PLFA 生物标记能很好地反映猪舍基质垫层中微生物结构及其多样性 (刘波等, 2008), 而利用 PLFA 生物标记进一步分析猪舍基质垫层猪粪分解微生物亚群落分化的相关研究还未见报道。

因此, 本文通过引入磷脂脂肪酸 (phospholipids fatty acid, PLFA) 作为微生物的脂肪酸生物标记, 通过采集不同使用时间、不同层次的猪舍基质垫层, 利用 PLFA 生物标记法分析不同使用时间、不同层次基质垫层中脂肪酸生物标记的分布特点, 并根据脂肪酸生物标记的聚类结果, 揭示猪舍基质垫层微生物亚群落的分化, 以探讨猪粪尿分解过程微生物群落结构的变化规律。

2 材料与方法 (Materials and methods)

2.1 取样方法

猪舍基质垫层取样于“零排放”养猪示范基地莆田优利可农牧发展有限公司, 示范基地均按照日本洛东生物发酵舍养猪操作规程进行垫层配比和管理。基质垫层由 40% 谷壳和 60% 锯末构成 (即谷壳与锯末的体积比为 2:3), 并加入生猪粪 (5 kg m^{-3})、米糠 (3 kg m^{-3}) 以及日本洛东微生物菌种 (主要是枯草芽孢杆菌和酵母菌) (200 g m^{-3}), 基质垫层厚度为 80cm, 基质垫层最长的使用周期为 2 年。取样方法: 选择饲养猪 1 个月、6 个月和 24 个月的猪舍, 每个猪舍进行 4 层取样 (第 1 层 10~20cm, 第 2 层 20~40cm, 第 3 层 40~60cm, 第 4 层 60~80cm), 每层取样方法为五点取样, 每层的样本充分混合后取出小样 (10g), 进行磷脂脂肪酸生物标记分析, 每个小样设 3 个重复。

2.2 磷脂脂肪酸生物标记分析方法

PLFA 的提取方法参考 Frostegård (1993) 和 Kourtev (2002) 等并略做修改。提取过程分 4 个步骤: 脂肪酸的释放与甲酯化、溶液的中和、脂肪酸的萃取、脂肪酸溶解。具体操作如下: 在 50mL 离心管中分别加入 10g 基质垫层和 20 mL 0.2 mol L^{-1} 的 KOH 甲醇溶液, 充分混匀, 并于 37℃ 水浴 1h (每 10min 旋转样品 1 次); 加入 3 mL 1.0 mol L^{-1} 的醋酸溶液调节 pH 值, 充分摇匀; 加入 10 mL 正己烷, 充分摇匀, 在 2000 r min^{-1} 条件下离心 15min 将上层正己烷相转入干净玻璃试管中, 吹干; 加入 0.6mL 体积比为 1:1 的正己烷和甲基叔丁基醚混合溶液, 充分溶解, 转入 GC 小瓶, 用于脂肪酸测定。

PLFA 成份采用美国 Agilent6890N 型气相色谱仪测定。在下述色谱条件下平行分析脂肪酸甲酯混合物标样和待检样本: 色谱柱 HP-ULTRA2 ($25 \text{ m} \times 0.2 \text{ mm} \times 0.33 \mu \text{m}$), 分流进样, 进样量 1 μL , 分流比为 100:1, 载气 (H_2) 流速为 2 mL min^{-1} , 尾吹气 (N_2) 流速为 30 mL min^{-1} 。二阶程序升高柱温: 以 $5 \text{ }^\circ \text{C min}^{-1}$ 的速率使柱温由 170℃ 升至 260℃; 再以 $40 \text{ }^\circ \text{C min}^{-1}$ 的速率升温至 310℃, 保持 90s 汽化室温度为 250℃, 检测器温度为 300℃, 柱前压 10.00 psi (1psi = 6.895kPa)。脂肪酸成份采用微生物自动分析仪 (Sherlock MS 美国 MIDI 公司生产) 分析, 系统根据各组保留时间计算等链长 (ECI) 值以确定目标组分的存在, 采用峰面积归一化法计算各组分的

相对含量.

2 3 微生物群落磷脂脂肪酸生物标记的统计分析

2 3 1 微生物磷脂脂肪酸生物标记分布分析 以1个月、6个月、24个月的基质垫层为单位, 统计含量最高的前3个生物标记, 代表特征微生物, 并作图分析其在不同使用时间不同层次猪舍基质垫层中的分布量变化.

2 3 2 猪舍基质垫层微生物群落特征聚类分析 以不同使用时间、不同层次的垫层为样本, 以脂肪酸生物标记量为指标, 将不同使用时间、不同层次的猪舍基质垫层中的磷脂脂肪酸生物标记数据, 构建矩阵, 数据经过规格化转换, 以马氏距离为尺度, 用可变类平均法进行系统聚类(何晓群, 2004), 划分微生物亚群落.

2 3 3 磷脂脂肪酸生物标记微生物亚群落特征分析 以亚群落为单位, 统计出各磷脂脂肪酸生物标记总量、各磷脂脂肪酸生物标记在猪舍基质垫层的分布频次、分布的多样性指数 (Garland *et al* , 1991) SMPSON(J)、SHANNON(H)、BRILLOU N、McIntosh (Dm c)和均匀度指数, 并以其为指标, 以脂肪酸生物标记为样本, 构建矩阵; 将矩阵数据中心化处理, 以欧氏距离为聚类尺度, 用类平均法进行系统聚类(何晓群, 2004), 分析猪舍基质垫层微生物亚群落的变化特征.

在做统计分析时, 所有数据经整理后, 采用 DPS

3 01软件进行聚类分析.

3 结果 (Results)

3 1 猪舍基质垫层微生物磷脂脂肪酸生物标记分析

猪舍基质垫层的微生物磷脂脂肪酸生物标记分析结果见表 1. 由表 1可知, 猪舍基质垫层中脂肪酸生物标记共 40个, 不同的磷脂脂肪酸生物标记代表着不同类型的微生物, 这些磷脂脂肪酸生物标记在不同使用时间的猪舍基质垫层中的分布差异明显. 其中一些微生物的磷脂脂肪酸生物标记分布在全部样品中, 为完全分布, 如 14 00 而另外一些微生物的磷脂脂肪酸生物标记只分布在特定的取样层次内, 如 10Me 18 Q 为不完全分布. 将不同使用时间、不同层次的基质垫层中磷脂脂肪酸生物标记总含量最高的前 9个生物标记作图 (图 1), 这 9个磷脂脂肪酸生物标记分别为 18 1 ω9c(真菌)、16 00(假单胞杆菌 G-)、i17 0 3OH(细菌 G-)、18 1 ω7c(假单胞杆菌 G-)、i18 0(细菌 G+)、a15 0(好氧细菌 G+)、18 00(嗜热解氢杆菌)、i16 0(细菌 G+)、i15 0(好氧细菌 G+) (Tunlid *et al* , 1992 Hill *et al* , 2000 White *et al* , 1996 Wilkinson *et al* , 2002), 磷脂脂肪酸生物标记含量总和分布在 151280~1125570之间, 其中, 以磷脂脂肪酸生物标记 18 1 ω9c、16 00和 i17 0 3OH 含量最高.

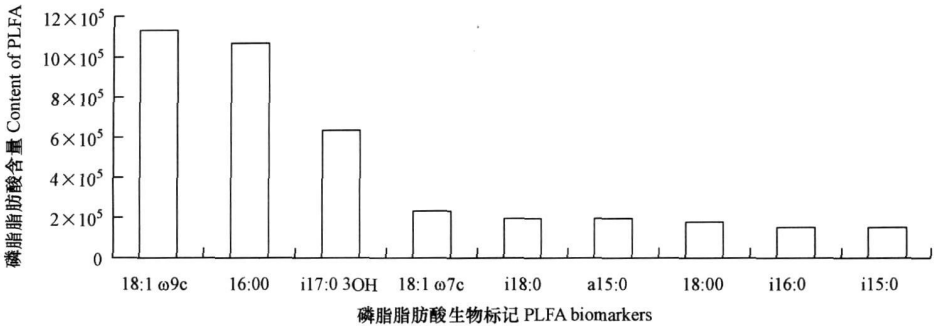


图 1 总含量最高的前 9个磷脂脂肪酸生物标记的含量
Fig 1 The nine most abundant PLFA biomarkers

3 2 不同使用时间的基质垫层中特征微生物磷脂脂肪酸生物标记的分布

将磷脂脂肪酸生物标记总含量最高的前 3个生物标记作图 (图 2), 磷脂脂肪酸生物标记 18 1 ω9c 指示真菌 (White *et al* , 1996; Wilkinson *et al* , 2002)、16 00指示革兰氏阴性细菌 G- (假单胞杆菌) (White *et al* , 1996)、i17 0 3OH 指示革兰氏阴

性细菌 G- (Tarah *et al* , 2006); 这 3种微生物在不同使用时间、不同层次的猪舍基质垫层中的分布总量最大, 为优势菌群, 它们对猪粪尿的降解起主要作用. 从总体上看, 磷脂脂肪酸生物标记 18 1 ω9c (标识真菌) 和 16 00(标识革兰氏阴性细菌) 在不同饲养时间、垫层不同层次分布的数量趋势相近, 而与 i17 0 3OH (标识革兰氏阴性细菌) 分布差异很

表 1 猪舍基垫层磷脂脂肪酸生物标记的分析

序号 No.	磷脂脂肪酸 生物标记 PLFA biomarkers	微生物类型 Microbial group	Analysis of PLFA biomarkers in the litter system of a pigsty												磷脂脂肪酸生物标记量 Content of biomarker	
			基垫层 1 个月 1 month litter system				基垫层 6 个月 6 months litter system				基垫层 24 个月 24 months litter system				总含量 Total content	平均含量 Average content
			第 1 层 Layer 1	第 2 层 Layer 2	第 3 层 Layer 3	第 4 层 Layer 4	第 1 层 Layer 1	第 2 层 Layer 2	第 3 层 Layer 3	第 4 层 Layer 4	第 1 层 Layer 1	第 2 层 Layer 2	第 3 层 Layer 3	第 4 层 Layer 4		
1	i11:0 3OH	细菌 G + Gram-positive bacteria	0	0	0	0	0	0	0	4072	0	0	0	0	4072	339.3
2	12:00	细菌 Bacteria in general	3278	5019	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8297	691.4
3	12:0 3OH	细菌 G + Gram-positive bacteria	0	0	0	0	0	0	0	0	1291	701	1385	0	3377	281.4
4	a14:0	好氧细菌 G + Aerobes G +	0	0	0	0	0	0	0	5143	0	0	0	0	5143	482.6
5	14:00	细菌 Bacteria in general	5720	5896	2744	3008	6329	4564	1348	4088	2473	1908	2941	16134	57153	4762.5
6	i14:0	好氧细菌 G + Aerobes G +	0	0	0	0	5212	3318	0	5208	2257	1795	1645	8015	27450	2287.5
7	14:1 ω5c	假单胞杆菌 Pseudomonas sp.	0	0	3592	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3592	299.3
8	15:0 2OH	好氧细菌 G + Aerobes G +	0	0	0	0	0	0	0	0	1470	0	0	0	1470	122.5
9	15:0 3OH	好氧细菌 G + Aerobes G +	0	0	0	0	0	0	0	0	3206	1772	2731	0	7709	642.4
10	a15:0	好氧细菌 G + Aerobes G +	6819	5171	3734	3106	32078	23789	1964	17923	13315	8904	13696	64908	195407	16283.9
11	i15:0	好氧细菌 G + Aerobes G +	8529	5768	7247	0	20208	17052	2108	8806	12713	10234	13130	45485	151280	12606.7
12	i15:0 3OH	细菌 G- Gram-negative bacteria	4313	0	0	0	2339	1875	0	0	4720	1775	2969	0	17991	1499.3
13	a15:1	细菌 G + Gram-positive bacteria	0	0	0	0	1992	1975	0	0	0	0	0	0	3967	330.6
14	16:00	假单胞杆菌 Pseudomonas sp.	127501	172904	57794	118449	73547	60080	49893	118068	35480	24827	43070	182446	1064059	88671.6
15	10Me 16:0	硫酸盐还原细菌 (G +) Sulfate-reducing bacteria	0	0	0	0	0	0	0	0	8139	6207	7543	0	21889	1824.1
16	16:0 3OH	细菌 G- Gram-negative bacteria	0	0	0	0	0	2882	0	0	6336	1373	5096	0	15687	1307.3
17	a16:0	细菌 G + Gram-positive bacteria	0	0	0	0	0	0	0	0	1433	798	0	0	2231	185.9
18	i16:0	细菌 G + Gram-positive bacteria	5554	5763	3894	0	20816	19198	6623	23121	18016	12644	14697	21261	151587	12632.3
19	16:1 ω5c	甲烷氧化菌 Methane-Oxidizing bacterial	0	0	0	0	3028	0	0	0	0	1441	3163	7727	15359	1279.9
20	16:1 ω9c	细菌 G- Gram-negative bacteria	0	0	0	0	2459	1722	0	0	0	0	0	0	4181	348.4
21	17:00	节杆菌 Arthrobacter	4136	0	0	2725	3314	3044	2011	5147	2041	1909	2910	9782	37019	3084.9
22	10Me 17:0	放线菌 Actinobacteria	0	0	0	0	0	0	0	0	1507	1092	1508	0	4107	342.3
23	a17:0	细菌 G + Gram-positive bacteria	3631	0	0	0	12333	14188	3276	11924	15671	9574	12264	16931	99792	8316
24	cy 17:0	细菌 G- Gram-negative bacteria	8912	10553	8460	3079	10307	10743	2315	6374	2482	1800	2958	7173	75156	6263

续表 1

序号 No.	磷脂脂肪酸 生物标记 PLFA biomarkers	微生物类型 Microbial group	基质垫层 1 个月 1 month litter system				基质垫层 6 个月 6 months litter system				基质垫层 24 个月 24 months litter system				磷脂脂肪酸生物标记量 Content of biomarker	
			第 1 层 Layer 1				第 1 层 Layer 1				第 1 层 Layer 1				总含量 Total content	平均含量 Average content
			Layer 1	Layer 2	Layer 3	Layer 4	Layer 1	Layer 2	Layer 3	Layer 4	Layer 1	Layer 2	Layer 3	Layer 4		
25	i17:0	细菌 G + Gram-positive bacteria	0	0	0	0	5180	6440	2924	6017	8238	7864	9792	13531	59986	4998.8
26	i17:0 30H	细菌 G- Gram-negative bacteria	92858	169051	243906	13201	7351	6371	13252	82847	0	0	2820	0	631657	52638.1
27	a17:1 ω 9c	假单胞杆菌 Pseudomonas sp.	0	0	0	0	0	2446	0	0	0	0	0	0	2446	203.8
28	i17:1 ω 9c	细菌 G + Gram-positive bacteria	4814	0	3243	0	5933	4962	1808	4708	0	0	0	11369	36837	3069.8
29	i17:1 ω 8c	细菌 G- Gram-negative bacteria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9501	791.8
30	10Me 18:0	放线菌 Actinobacteria	0	0	0	0	7076	6692	0	0	13783	4213	6663	0	38427	3202.3
31	18:00	嗜热解氢杆菌 Hydrogenobacter	14589	19774	5847	27874	10135	8463	7007	19222	10423	7476	12403	33026	176239	14586.6
32	i18:0	细菌 G + Gram-positive bacteria	26214	35816	56557	5173	4826	0	8080	49398	3931	1594	4786	0	196375	16364.6
33	11Me 18:1 ω 7c	纤维菌属 Cellulomonas	21525	26268	0	0	4384	0	0	0	0	0	0	0	52177	4348
34	18:1 ω 7c	假单胞杆菌 Pseudomonas sp.	22114	20163	14146	0	22842	17701	0	19981	10679	5730	11253	84868	229477	19123.1
35	18:1 ω 9c	真菌 Fungi	137796	202729	62911	174154	50487	37067	61127	142106	34228	20177	34882	167906	1125570	93797.5
36	18:3 ω 6c (6,9,12)	真菌 Fungi	13361	9498	3429	23191	0	0	0	0	0	0	3370	0	52849	4404.1
37	cy 19:0 ω 8c	伯克霍尔德菌 Burkholderia	9180	10566	9866	0	16735	14102	2442	11074	2561	5180	8416	6395	96517	8043.1
38	20:00	细菌 Bacteria in general	5216	7618	0	3313	2595	1916	1879	6351	0	0	0	0	28888	2407.3
39	20:1 ω 9c	嗜热解氢杆菌 Hydrogenothermus marinus	0	0	0	3782	0	2867	1514	7738	0	0	0	0	15901	1325.1
40	20:4 ω 6,9,12,15c	原生生物 Protozoa	0	0	3968	0	0	0	0	0	0	0	1460	0	5374	447.8

注: i, a, cy 和 Me 分别表示异、反、环丙基和甲基脂肪酸端、顺式空间构造和反式空间构造。Note: i, a, cy and Me refer to iso, anteiso, cyclopropyl and methyl branching fatty acids, respectively; ω , c and t refer to the aliphatic end, cis configuration and trans configuration, respectively.

大. 真菌 18 1 ω9c和革兰氏阴性细菌 16 00可分布于 1、6、24个月的基质垫层的不同层次, 由于不同层次基质垫层氧气通透量不同, 表明这 2种微生物为兼性厌氧微生物; 而革兰氏阴性细菌 i17: 0 3OH 仅分布于使用时间为 1个月的基质垫层的第 1、2、3层中, 在使用时间为 1个月基质垫层的第 4层和基质垫层使用时间为 6、24个月的基质垫层的各层分布量极低, 表明其为好氧微生物. 从图 2可以看出, 磷脂脂肪酸生物标记 18 1 ω9c在使用时间为 1个月的基质垫层中第 3层分布较少, 在第 1、2、4层分布较多; 在使用时间为 6个月的基质垫层中, 它的分布随着层次的增加而增加; 在使用时间为 24个月的基质垫层中, 它的分布规律与使用时间为 6个月相近, 说明 6个月, 磷脂脂肪酸生物标记 18 1 ω9c指示的真菌在基质垫层的分布趋稳定.

的分布规律与磷脂脂肪酸生物标记 18 1 ω9c相似. 在使用时间为 1个月的基质垫层第 3层中分布较少, 第 1、2、4层分布较多; 在使用时间为 6个月的基质垫层中, 在第 4层的分布较多, 第 1、2、3层的分布量相当, 且较少; 在使用时间为 24个月的基质垫层中, 其分布规律与 6个月时相近, 说明 6个月, 该生物标记指示的革兰氏阴性细菌 (假单胞杆菌) 在基质垫层的分布趋稳定.

脂肪酸生物标记 i17: 0 3OH 在使用时间为 1个月的基质各垫层中分布最多, 其次是使用时间为 6个月的基质垫层; 在使用时间为 24个月的基质垫层中, 除第 3层有少量分布外, 其余各层次没有分布. 这说明脂肪酸生物标记 i17: 0 3OH 指示的革兰氏阴性细菌只分布在新的基质垫层中, 在旧的基质层中几乎不分布.

磷脂脂肪酸生物标记 16 00在基质垫层各层次

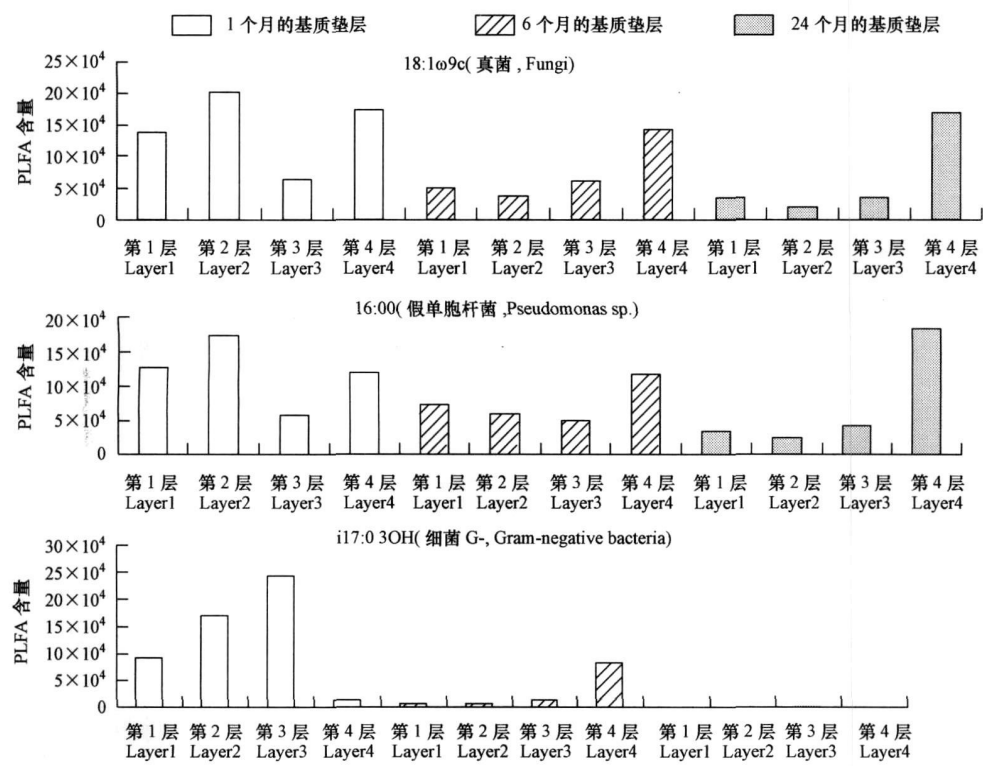


图 2 猪舍基质垫层中脂肪酸生物标记量最高的 3 个标记在不同层次的分布

Fig 2 Distribution of three maximum content PLFA biomarkers in the four layers of the litter system of pigsty

3.3 猪舍基质垫层微生物亚群落的分化

以不同使用时间、不同层次的基质垫层为样本, 以脂肪酸生物标记量为指标, 数据经过规格化转换, 以马氏距离为尺度, 用可变类平均法进行系统聚类, 结果如图 3 所示. 当马氏距离为 56.62 时,

不同时间猪舍基质垫层微生物可分为 3 个亚群落, 亚群落 I 包括了使用时间为 1 个月的基质垫层的第 1~4 层和使用时间为 6 个月的基质垫层的第 1 层, 其特征为革兰氏阴性细菌含量高, 革兰氏阳性细菌含量低; 如标记革兰氏阴性细菌的磷脂脂肪酸生物

标记 *i17:0 3OH* 在 1 个月的基质垫层各层次的平均分布量为 129754, 而标记革兰氏阳性细菌的磷脂脂肪酸生物标记 *a15:0* 在 1 个月的基质垫层各层次的平均分布量只有 4707.5 亚群落 II 包括了使用时间为 6 个月基质垫层的第 2~4 层和使用时间为 24 个月基质垫层的第 2 层, 其特征为革兰氏阴性细菌和革兰氏阳性细菌含量中等. 亚群落 III 包括了使用时

间为 24 个月基质垫层的第 1、3 和 4 层, 其特征为革兰氏阳性细菌含量高, 革兰氏阴性细菌含量低. 为方便亚群落特征的分析, 将使用时间为 1 个月的基质垫层第 1~4 层定义为初始期亚群落, 使用时间为 6 个月基质垫层的第 1~4 层定义为过渡期亚群落, 使用时间为 24 个月基质垫层的第 1~4 层归为稳定期亚群落.

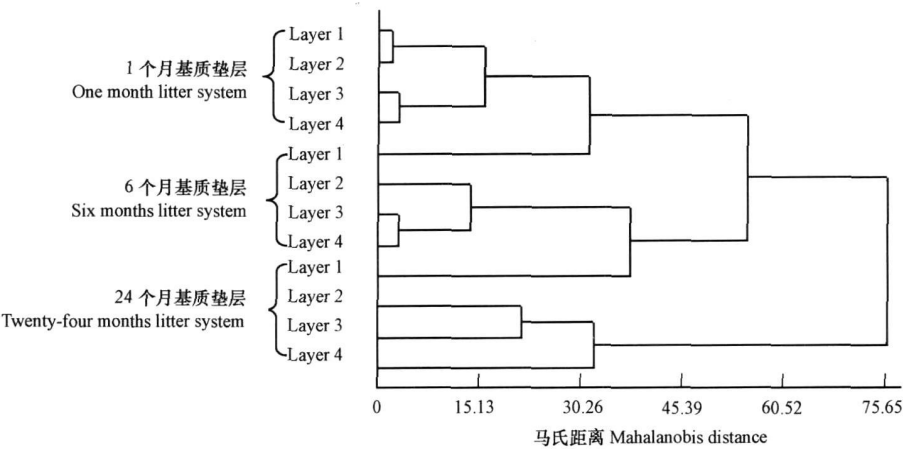


图 3 猪舍基质垫层磷脂脂肪酸生物标记的聚类分析

Fig 3 Cluster analysis of PLFA biomarkers in the litter system of pigsty

3.4 猪舍基质垫层微生物亚群落的磷脂脂肪酸生物标记分布特征

3.4.1 初始亚群落的磷脂脂肪酸生物标记分布特征 (垫层使用时间为 1 个月) 初始亚群落的磷脂脂肪酸生物标记分布特征分析结果见表 2 和图 4.

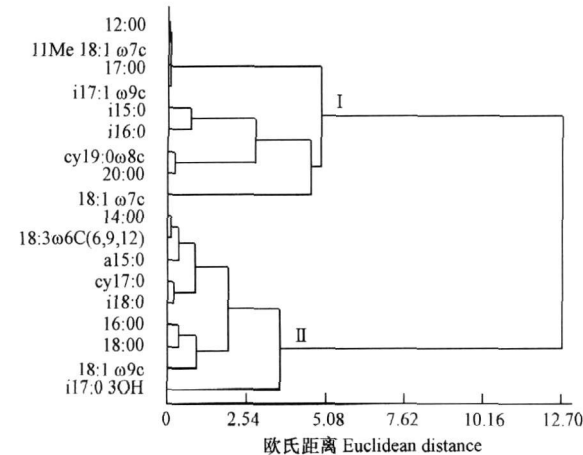


图 4 猪舍基质垫层微生物初始亚群落的磷脂脂肪酸生物标记聚类分析

Fig 4 Cluster of PLFA biomarkers for the microbial initial subcommunity in the litter system of non-pollution pigsty

由表 2 和图 4 可知, 当欧氏距离为 12.70 时, 可将使用时间为 1 个月基质垫层脂肪酸生物标记分为两个类群. 类群 I 包含了 9 条磷脂脂肪酸生物标记, 它们是 12:00, i15:0 (细菌 G+), i16:0 (细菌 G+), 17:00, i17:1 ω9c, 11Me 18:1 ω7c (纤维菌属), 18:1 ω7c (假单胞杆菌属), cy19:0 ω8c (伯克霍尔德菌属), 20:00 其特征为: 特征磷脂脂肪酸生物标记在基质垫层的层次分布小于 3 层, 为不完全分布; 磷脂脂肪酸总量的平均值为 23327.22, 分布多样性指数中香农指数 SHANNON (H) 为 1.30 较小.

类群 II 包括了 9 条磷脂脂肪酸生物标记, 它们是 14:00 (细菌), a15:0 (好氧细菌 G+), 16:00 (假单胞杆菌 G-), cy17:0 (细菌 G-), i17:0 3OH (细菌 G-), 18:00 (嗜热解氢杆菌), i18:0 (细菌 G+), 18:1 ω9c (真菌), 18:3 ω6C (6,9,12) (真菌). 其特征为: 磷脂脂肪酸生物标记在基质垫层层分布的层数多于类群 I, 磷脂脂肪酸总量的平均值小于类群 I, 香农指数的值大于类群 I; 特征磷脂脂肪酸生物标记在基质垫层的层次分布皆为 4 层, 为完全分布; 磷脂脂肪酸总量的平均值为 209086.56 香农指数 SHANNON (H) 为 1.83

表 2 猪舍基质垫层微生物初始亚群落的磷脂脂肪酸生物标记分布特征

Table 2 Characteristics of PLFA biomarkers for the microbial initial subcommunity in the litter system of pigsty

类别 Type	磷脂脂肪酸 生物标记 PLFA biomarkers	频次 Freq	总量 Total content	磷脂脂肪酸生物标记生态学指数 Ecology index of PLFA biomarkers				
				SIMPSON (J)	SHANNON (H)	均匀度 Pielou	BRILLOUIN	McIntosh (Dm c)
类群 I Group I	12:00	2	8297.00	0.48	0.97	0.97	0.97	0.28
	i15:0	3	21544.00	0.66	1.57	0.99	1.57	0.42
	i16:0	3	15211.00	0.66	1.56	0.99	1.56	0.42
	17:00	2	6861.00	0.48	0.97	0.97	0.97	0.28
	i17:1ω9C	2	8057.00	0.48	0.97	0.97	0.97	0.28
	10Me18:1ω7C	2	47793.00	0.50	0.99	0.99	0.99	0.29
	18:1ω7C	3	56423.00	0.66	1.56	0.98	1.56	0.42
	cy19:0ω8C	3	29612.00	0.67	1.58	1.00	1.58	0.42
	20:00	3	16147.00	0.63	1.51	0.95	1.51	0.40
	总和 total value		209945.00	5.22	11.68	8.81	11.68	3.21
类群 II Group II	14:00	4	17368.00	0.72	1.92	0.96	1.91	0.48
	a15:0	4	18830.00	0.73	1.93	0.97	1.93	0.48
	16:00	4	476648.00	0.72	1.91	0.95	1.91	0.47
	cy17:0	4	31004.00	0.72	1.89	0.94	1.89	0.47
	i17:0 3OH	4	519016.00	0.64	1.62	0.81	1.62	0.40
	18:00	4	68084.00	0.69	1.83	0.91	1.83	0.45
	i18:0	4	123760.00	0.66	1.70	0.85	1.70	0.42
	18:1ω9C	4	577590.00	0.72	1.89	0.95	1.89	0.47
	18:3ω6C (6, 9, 12)	4	49479.00	0.67	1.75	0.87	1.75	0.42
	总和 total value		1881779.00	6.27	16.44	8.21	16.43	4.06
	平均值 average value		209086.56	0.70	1.83	0.91	1.83	0.45

3.4.2 过度亚群落的磷脂脂肪酸生物标记分布特征 (垫层使用时间为 6 个月) 过渡亚群落的磷脂脂肪酸生物标记分布特征分析结果见表 3 和图 5。由表 3 和图 5 可知, 当欧氏距离为 71.10 时, 可将使

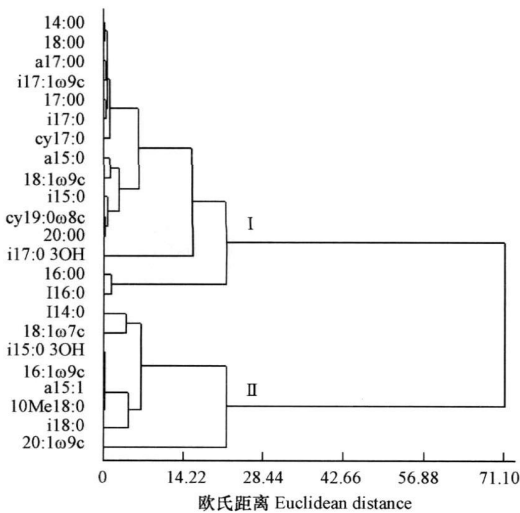


图 5 猪舍基质垫层微生物过渡亚群落的磷脂脂肪酸生物标记聚

类分析

Fig 5 Cluster of PLFA biomarkers for the microbial transitional subcommunity in the litter system of pigsty

用时间为 6 个月的基质垫层磷脂脂肪酸生物标记分为两个类群, 这两个类群与使用时间为 1 个月基质垫层中的两个类群 (初始亚群落) 的分化比较有很大的差异, 使用时间为 1 个月的基质垫层分布两层以上的磷脂脂肪酸生物标记共有 18 条, 而使用时间为 6 个月的基质垫层则有 23 条; 此外, 6 个月基质垫层中两个类群的磷脂脂肪酸生物标记的组成存在很大差异。

类群 I 包含了 15 条脂肪酸生物标记, 它们是 14:00、a15:0、i15:0、16:00、i16:0、17:00、a17:0、cy17:0、i17:0、i17:0 3OH、i17:1ω9C、18:00、18:1ω9C、cy19:0ω8C、20:00。其特征为磷脂脂肪酸生物标记在基质垫层中 4 层都有分布为主; 脂肪酸总量的平均值较高, 为 75805.33, 香农指数 SHANNON (H) 为 1.79。

类群 II 包括了 8 条磷脂脂肪酸生物标记, 它们是 i14:0、i15:0 3OH、a15:1、16:1ω9C、10Me18:0、i18:0、18:1ω7C、20:1ω9C。其特征为磷脂脂肪酸生物标记在基质垫层分布 2~3 个层次为主; 脂肪酸总量的平均值、分布香农指数的值较类群 I 小, 磷脂脂肪酸总量平均值为 21851.88, 香农指数 SHANNON (H) 为 1.17。

表 3 猪舍基质垫层微生物过渡亚群落的磷脂脂肪酸生物标记的特征
Table 3 Characteristics of PLFA biomarkers for the microbial transitional subcommunity in the litter system of pigsty

类别 Type	磷脂脂肪酸 生物标记 PLFA biomarkers	频次 Freq	总量 Total content	磷脂脂肪酸生物标记生态学指数 Ecology index of PLFA biomarkers				
				SIMPSON	SHANNON	均匀度	BRILLOUIN	McIntosh
				(J)	(H)	Pielou		(Dm c)
类群 I Group I	14:00	4	16329.00	0.70	1.84	0.92	1.84	0.46
	al5:0	4	75754.00	0.67	1.68	0.84	1.68	0.42
	il5:0	4	48174.00	0.66	1.70	0.85	1.70	0.42
	16:00	4	301588.00	0.72	1.92	0.96	1.92	0.47
	il6:0	4	69758.00	0.72	1.88	0.94	1.88	0.47
	17:00	4	13516.00	0.72	1.92	0.96	1.92	0.48
	al7:0	4	41721.00	0.71	1.85	0.93	1.85	0.46
	cy17:0	4	29739.00	0.70	1.82	0.91	1.82	0.45
	il7:0	4	20561.00	0.73	1.94	0.97	1.94	0.49
	il7:0 3OH	4	109821.00	0.41	1.17	0.59	1.17	0.23
	il7:1 ω 9C	4	17411.00	0.72	1.89	0.95	1.89	0.47
	18:00	4	44827.00	0.70	1.88	0.94	1.88	0.46
	18:1 ω 9C	4	290787.00	0.67	1.80	0.90	1.80	0.43
	cy19:0 ω 8C	4	44353.00	0.69	1.79	0.89	1.79	0.45
	20:00	4	12741.00	0.67	1.79	0.89	1.78	0.43
总和 total value			1137080.00	10.19	26.87	14.40	26.86	6.59
平均值 average value			75805.33	0.68	1.79	0.96	1.79	0.44
类群 II Group II	il4:0	3	13738.00	0.65	1.56	0.98	1.56	0.42
	il5:0 3OH	2	4214.00	0.49	0.99	0.99	0.99	0.29
	al5:1	2	3967.00	0.50	1.00	1.00	1.00	0.30
	16:1 ω 9C	2	4181.00	0.48	0.98	0.98	0.98	0.29
	10Me18:0	2	13768.00	0.50	1.00	1.00	1.00	0.30
	il8:0	3	62304.00	0.35	0.93	0.59	0.93	0.19
	18:1 ω 7C	3	60524.00	0.66	1.58	1.00	1.58	0.42
	20:1 ω 9C	3	12119.00	0.52	1.28	0.81	1.28	0.31
	总和 total value		174815.00	4.15	9.32	7.35	9.32	2.52
平均值 average value			21851.88	0.52	1.17	0.92	1.17	0.32

3.4.3 稳定亚群落的磷脂脂肪酸生物标记分布特征 (垫层使用时间为 24 个月) 稳定亚群落的磷脂脂肪酸生物标记分布特征分析结果见表 4 和图 6。由表 4 和图 6 可知,当欧氏距离为 22.22 时,可将使用时间为 24 个月的基质垫层脂肪酸生物标记分为 3 个类群。24 个月基质垫层的亚群落特征与使用时间为 1 个月和 6 个月的基质垫层亚群落特征比较有很大的差异,前者分化为 3 个类群,后者只有两个类群;同时,24 个月基质垫层中分化的类群与 1 个月和 6 个月的基质垫层磷脂脂肪酸生物标记类群分化比较有很大的差异,1 个月基质垫层磷脂脂肪酸生物标记共有 18 条,6 个月基质垫层则有 23 条,而 24 个月基质垫层有 25 条;不同使用时间的猪舍基质垫层微生物亚群落的磷脂脂肪酸生物标记组成也有很大差异。

类群 I 包含了 12 条磷脂脂肪酸生物标记,它们是 12:0 3OH、14:00、al5:0、15:0 ISO、il5:0 3OH、16:00、

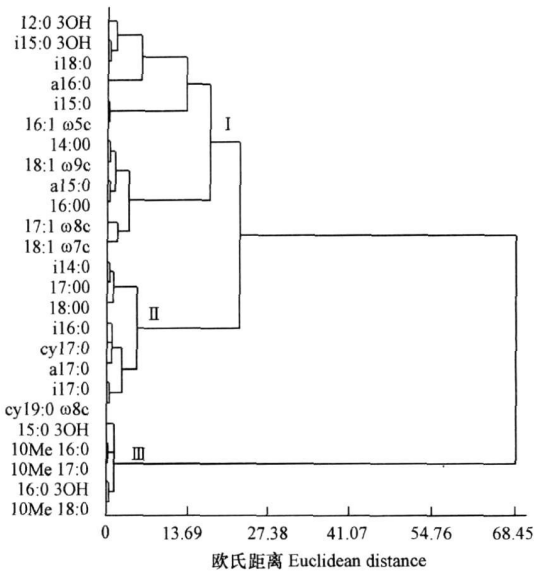


图 6 猪舍基质垫层微生物稳定亚群落的磷脂脂肪酸生物标记聚类分析

Fig 6 Cluster of PLFA biomarkers for the microbial stable subcommunity in the litter system of pigsty

a16 Q 16 1 ω5C、17: 1 ω8C、i18 Q 18 1 ω7C、18 1 ω9C. 其特征为磷脂脂肪酸生物标记分布的 2~ 4个层, 磷脂脂肪酸总量的平均值较高, 为 75716.83. 香农指数 SHANNON (*H*) 为 1.34.

类群 II 包括了 8 条磷脂脂肪酸生物标记, 它们是 i14 Q i16 Q 17: 0Q a17 Q cy17 Q i17 Q 18 0Q cy19 0 ω8C. 其特征为磷脂脂肪酸生物标记分布在基质垫层的 4 个层次; 磷脂脂肪酸总量的平均值、香农指数的值较类群 I 小, 磷脂脂肪酸总量的平均值

为 36391.25. 分布香农指数 SHANNON (*H*) 为 1.82. 类群 III 包括了 5 条磷脂脂肪酸生物标记, 它们是 15 0 30H、10Me 16 Q 16 0 30H、10Me 17 Q 10Me 18 0. 其特征为磷脂脂肪酸生物标记在基质垫层分布 3 个层次为主, 磷脂脂肪酸总量的平均值较类群 I 和类群 II 小, 而香农指数的值较类群 I 和类群 II 大, 磷脂脂肪酸总量的平均值为 23723.0Q. 香农指数 SHANNON (*H*) 为 2.49.

表 4 猪舍基质垫层微生物稳定亚群落的磷脂脂肪酸生物标记的特征
Table 4 Characteristics of PLFA biomarkers for the microbial stable subcommunity in the litter system of pigsty

类别 Type	磷脂脂肪酸 生物标记 PLFA biomarkers	频次 Freq	总量 Total content	磷脂脂肪酸生物标记生态学指数 Ecology index of PLFA biomarkers				
				SIMPSON (<i>J</i>)	SHANNON (<i>H</i>)	均匀度 Pielou	BRILLOUIN	McIntosh (<i>Dm</i>)
类群 I Group I	12 0 30H	3	3377.00	0.64	1.53	0.96	1.53	0.41
	14 00	4	23456.00	0.49	1.38	0.69	1.38	0.29
	a15: 0	4	100823.00	0.54	1.50	0.75	1.49	0.32
	i15 0	4	81562.00	0.62	1.69	0.84	1.69	0.39
	i15 0 30H	3	9464.00	0.62	1.48	0.93	1.48	0.39
	16 00	4	285823	0.55	1.50	0.75	1.50	0.33
	a16 0	2	2231.00	0.46	0.94	0.94	0.94	0.27
	16 1ω5C	3	12331.00	0.53	1.29	0.81	1.29	0.32
	17 1ω8C	2	9501.00	0.26	0.62	0.62	0.62	0.14
	i18 0	3	10311.00	0.62	1.46	0.92	1.46	0.38
	18 1ω7C	4	112530.00	0.41	1.18	0.59	1.18	0.23
	18 1ω9C	4	257193.00	0.53	1.47	0.73	1.47	0.32
总和 total value			908602.00	6.27	16.04	9.53	16.03	3.79
平均值 average value			75716.83.00	0.52	1.34	0.79	1.34	0.32
类群 II Group II	i14 0	4	13712.00	0.60	1.63	0.82	1.63	0.37
	i16 0	4	66618.00	0.74	1.97	0.99	1.97	0.49
	17 00	4	16642.00	0.60	1.62	0.81	1.62	0.37
	a17: 0	4	54440.00	0.74	1.97	0.98	1.97	0.49
	cy17 0	4	14413.00	0.66	1.78	0.89	1.78	0.42
	i17 0	4	39425.00	0.74	1.96	0.98	1.96	0.49
	18 00	4	63328.00	0.65	1.74	0.87	1.74	0.41
	cy19 0ω8C	4	22552.00	0.71	1.89	0.95	1.89	0.47
总和 total value			291130.00	5.44	14.56	7.29	14.56	3.51
平均值 average value			36391.25	0.68	1.82	0.91	1.82	0.44
类群 III Group III	15 0 30H	3	7709.00	0.65	1.54	0.97	1.54	0.41
	10Me16 0	3	21889.00	0.66	1.58	0.99	1.58	0.42
	16 0 30H	3	12805.00	0.59	1.38	0.87	1.38	0.36
	10Me17: 0	3	4107.00	0.66	1.57	0.99	1.57	0.42
	10Me 18 0	3	24659.00	0.59	1.41	0.89	1.41	0.36
总和 total value			71169.00	3.15	7.48	4.71	7.48	1.97
平均值 average value			23723.00	1.05	2.49	1.57	2.49	0.66

4 讨论 (Discussion)

Klaner等 (1998)和 Stegera等 (2003)的研究指出, 磷脂脂肪酸含量与其所指示的微生物量相对应, 磷脂脂肪酸量的增减能很好地反映微生物种群

的兴衰. 因此, 通过磷脂脂肪酸方法可以对微生物进行定性和定量描述. 本研究中应用 PLFA 法分析不同使用时间猪舍基质垫层微生物的种群结构, 检测出 C₁₁~C₂₀共 40个磷脂脂肪酸生物标记, 其含量和分布在不同使用时间和不同层次的基质垫层中

有明显的差异.如指示革兰氏阴性细菌的磷脂脂肪酸生物标记 $i17:0\ 3OH$,在使用时间为 1个月的基质垫层中分布最多,在使用时间为 24个月的基质垫层中,除第 3层有少量分布外,其余各层次均无分布;这说明磷脂脂肪酸生物标记 $i17:0\ 3OH$ 所指示的那类革兰氏阴性菌在使用时间为 24个月的基质垫层中已经衰亡或不存在,这也揭示了这类革兰氏阴性菌对营养需求的敏感性.而指示真菌的磷脂脂肪酸生物标记 $18:1\ \omega 9c$ 在新、旧基垫层中分布量相当,说明脂肪酸生物标记 $18:1\ \omega 9c$ 所指示的真菌对营养需求的敏感性较低或更能适应逆境条件.这与白震等 (2007) 认为真菌对养分的依赖性小于细菌的结论相一致,王曙光等 (2004) 在研究尿素肥斑扩散对土壤微生物群落结构的影响时也得出真菌抗、耐逆境能力强的结论.

猪舍生物发酵是一个复杂的生物化学过程,而此过程是通过基质垫层微生物群落的演替来完成的,在该过程中,每一个微生物群落一定的时间有适合自身生长繁殖的条件,从而对某一种或某一类特定物质的降解起作用 (Diaz-Ravina *et al*, 1996). 本研究发现,不同使用时间的猪舍基质垫层微生物群落结构不同,即存在亚群落的分化.其中,初始亚群落 (垫层使用时间为 1个月) 主要以革兰氏阴性菌为优势菌,在过渡亚群落 (垫层使用时间为 6个月) 中革兰氏阴性菌 (G^-) 和革兰氏阳性菌 (G^+) 含量相当,而稳定亚群落 (垫层使用时间为 24个月) 则以革兰氏阳性菌为优势菌.这表明不同的微生物发酵阶段有不同的微生物组成,以适应猪舍基质垫层环境的变化,因此,可以通过不同饲养时间基质垫层中 G^+ / G^- 比值的大小来判别生物发酵的进程和作为基质垫层利用的一个指标值 (刘波等, 2008).

猪舍在利用基质垫层微生物发酵分解猪粪的过程,使用 1个月的基质垫层建立起的微生物初始亚群落对猪粪具有较高的分解能力,微生物初始亚群落磷脂脂肪酸生物标记的结构特征指示亚群落的特性;使用 6个月左右的基质垫层建立起微生物过渡亚群落是猪粪分解微生物分解能力旺盛、效率稳定的时期,该时期持续的时间较长;使用 24个月左右的基质垫层建立起微生物稳定亚群落,该时期微生物对猪粪的分解能力下降,是研究垫层更换的微生物指标的关键时期.微生物发酵猪舍垫层中磷脂微生物亚群落的研究为猪粪发酵过程微生物群

落指标提供了理论基础.

5 结论 (Conclusions)

1) 本研究分析出猪舍基质垫层中脂肪酸生物标记共 40个,其中,总含量最高的前 3个生物标记分别是 $18:1\ \omega 9c$ (指示真菌)、 $16:00$ (指示革兰氏阴性细菌) 和 $i17:0\ 3OH$ (指示革兰氏阴性细菌). 各磷脂脂肪酸生物标记在不同饲养时间猪舍基质垫层的分布差异显著.

2) 猪舍基质垫层存在 3个微生物亚群落: 初始亚群落、过渡亚群落和稳定亚群落. 对各亚群落的磷脂脂肪酸生物标记分布特征研究表明,各亚群落的脂肪酸生物标记组成、数量、分布存在的明显差异,可作为亚群落分化的依据.

责任作者简介: 刘波 (1957—), 男, 博士, 研究员, 主要从事微生物生物技术和生物防治研究.

参考文献 (References):

- Aman R L, Ludwig W, Schleiffer K H. 1995 Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. *Microbiol Rev*, 59: 143—146
- 白震, 张旭东, 何红波, 等. 2007 长期氮肥施用对农田黑土 NLFA 与 PLFA 特性的影响 [J]. *土壤学报*, 44(4): 709—716
- Bai Z, Zhang X D, He H B, *et al*. 2007. Effects of long-time nitrogen fertilizer application on NLFA and PLFA in mollisol farmland [J]. *Acta Pedologica Sinica* 44(4): 709—716 (in Chinese)
- Calderon F J, Jackson L E, Scow K M, *et al*. 2000 Microbial responses to simulated tillage in cultivated and uncultivated soil [J]. *Soil Biology & Biochemistry* 32(11): 1547—1559
- Diaz-Ravina M, Bååth E. 1996. Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels [J]. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 2970—2977
- Frostegård A, Tunlid A, Bååth E. 1993 Phospholipid fatty acid composition, biomass and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals [J]. *Appl Environ Microbiol* 59: 3605—3617
- Garland J L, Mills A L. 1991 Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole carbon-source utilization [J]. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 2351—2359
- Hackl E, Pfeiffer M, Donat C, *et al*. 2005. Composition of the microbial communities in the mineral soil under different types of natural fores [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 37(4): 661—671
- 何晓群. 2004 多元统计分析 [M]. 北京: 中国人民大学出版社, 218—241
- He X Q. 2004. *Multivariate Statistical Analysis* [M]. Beijing: China

- Rem in University Press 218—241(in Chinese)
- Hill G T, Mikowski N A, Aldrich W L, *et al*. 2000 Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities [J]. *Appl Soil Ecol* 15 25—36
- Klamer M, Balth E. 1998. Microbial community dynamics during composting of straw material studied using phospholipid fatty acid analysis[J]. *FEMS Microbiology Ecology* 27(1): 9—20
- 孔凡真. 2005 日本发酵床养猪技术简介[J]. *国际信息*, (2): 40—42
- Kong F Z. 2005 Technique of pig-raising on the ferment bed in Japan [J]. *International Information* (2): 40—42 (in Chinese)
- Kourtev P S, Ehrenfeld J G, Heggelmann M. 2002. Exotic plant species alter the microbial community structure and function in the soil[J]. *Ecology* 83(11): 3152—3166
- 刘波, 郑雪芳, 朱昌雄, 等. 2008 脂肪酸生物标记法研究猪舍基质垫层微生物群落多样性[J]. *生态学报*, 28(11): 5488—5498
- Liu B, Zheng X F, Zhu C X, *et al*. 2008 The diversity of PLFA biomarkers for the microbial community in the litter system of non-pollution pigsty[J]. *Acta Ecologica Sinica* 28(11): 5488—5498 (in Chinese)
- McCarthy C M, Murray L. 1996. Viability and metabolic features of bacteria indigenous to a contaminated deep aquifer[J]. *Microbial Ecol* 32: 305—321
- Medeiros P M, Fernandes M F, Dick R P, *et al*. 2006. Seasonal variations in sugar contents and microbial community in a ryegrass soil[J]. *Chemosphere* 65(5): 832—839
- Murata T, Kanao K M, Takamatsu T. 2005 Effects of Pb, Cu, Sb, In and Ag contamination on the proliferation of soil bacterial colonies, soil dehydrogenase activity, and phospholipids fatty acid profiles of soil microbial communities[J]. *Water Air Soil Poll* 164(1/4): 103—118
- Puglisi E, Nicelli M, Capri E, *et al*. 2005 A soil alteration index based on phospholipid fatty acid[J]. *Chemosphere* 6(11): 1548—1557
- Segera K, Jarvis A, Smars S, *et al*. 2003 Comparison of signature lipid methods to determine microbial community structure in compost [J]. *Journal of Microbiological Methods* 55(2): 371—382
- Syakti A D, Mazzella N, Nerini D, *et al*. 2006. Phospholipid fatty acid of a marine sedimentary microbial community in a laboratory microcosm: Response to petroleum hydrocarbon contamination[J]. *Organic Geochemistry* 37(11): 1617—1628
- Tam N F Y, Vrijmoed L L P. 1993 Effects of the inoculum size of a commercial bacterial product and the age of sawdust bedding on pig waste decomposition in a pig-on-litter system [J]. *Water Management & Research* 11(2): 107—115
- Tarah S S, Mary E S, Mark W P. 2006. Parallel shifts in plant and soil microbial communities in response to biosolids in a semi-arid grassland[J]. *Soil Biology & Biochemistry* 38 449—459
- Tunlid A, White D C. 1992 Biochemical analysis of biomass community structure, nutritional status, and metabolic activity of microbial community in soil//Sotzky G, Bollag J M. *Soil Biochem* [M]. New York: Dekker Press 229—262
- 王曙光, 侯彦林. 2004 尿素肥斑扩散对土壤微生物群落结构的影响[J]. *生态学报*, 24(10): 2270—2274
- Wang S G, Hou Y L. 2004 Effect of diffusion of urea patch on microbial communities in soil[J]. *Acta Ecologica Sinica* 24(10): 2270—2274(in Chinese)
- White D C, Pinkart H C, Ringelberg A B. 1997 Biomass measurements: Biochemical approaches /Hurst C J, Knudson G R, Mcheney M J, *et al*. *Manual of Environmental Microbiology* [M]. Washington DC: ASM Press 91—101
- White D C, Davis W M, Nickels J S, *et al*. 1979. Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate[J]. *Oecologia* 40 51—62
- White D C, Stair J Q, Ringelberg D B. 1996 Quantitative comparisons of in situ microbial biodiversity by signature biomarker analysis[J]. *J Ind Microbiol* 17 185—196
- Wilkinson S, Anderson J, Scardelis S, *et al*. 2002. PLFA profiles of microbial communities in decomposing conifer litters subject to moisture stress[J]. *Soil Biol Biochem* 34 189—200
- Yao H, He Z, Wilson M J, *et al*. 2000 Microbial biomarker and community structure in a sequence of soil with increasing fertility and changing land use[J]. *Microb Ecol* 40 223—237
- Zelles L, Rai Q Y, Reck T, *et al*. 1992 Signature fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agricultural soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry* 24(4): 317—323