

张嘉超, 曾光明, 喻曼, 等. 2010 农业废物好氧堆肥过程因子对细菌群落结构的影响 [J]. 环境科学学报, 30(5): 1002-1010
Zhang J C, Zeng G M, Yu M, *et al.* 2010. Succession of bacterial community structure in agricultural waste composting under different conditions [J].
Acta Scientiae Circumstantiae, 30(5): 1002-1010

农业废物好氧堆肥过程因子对细菌群落结构的影响

张嘉超^{1,2}, 曾光明^{1,2*}, 喻曼³, 陈耀宁^{1,2}, 黄红丽⁴, 李辉^{1,2}, 余震^{1,2}, 彭亿^{1,2}

- 1 湖南大学环境科学与工程学院, 长沙 410082
- 2 湖南大学环境生物与控制教育部重点实验室, 长沙 410082
- 3 浙江省农业科学院环境资源与土壤肥料研究所, 杭州 310021
- 4 湖南农业大学资源环境学院, 长沙 410128

收稿日期: 2009-08-30 修回日期: 2009-12-14 录用日期: 2010-03-03

摘要: 采用聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳 (PCR-DGGE) 技术研究了农业废物堆肥过程中细菌种群随时间的变化。同时, 应用 QuantityOne 2.0 和 Canoco 4.5 软件对获得的堆肥细菌种群数据与堆肥过程因子: 环境温度、堆体温度、pH、含水率、水溶性有机碳 (WSC)、C/N、水溶性氮 (NH_4^+-N) 和硝氮 (NO_3^--N) 进行冗余分析, 并做出样点、种群与堆肥过程因子的二维排序图。结果表明, 细菌群落 (样点) 以堆肥过程因子为梯度大体可划分为升温期 (1~2d)、高温期 (3~11d)、降温期 (12~18d) 和腐熟期 (19~36d) 4 个阶段, 每一阶段均有对应种群存在。不同的堆肥过程因子对细菌种群的影响大小依次为: NO_3^--N > 堆体温度 > WSC > C/N > NH_4^+-N > 含水率 > pH > 环境温度, 其中, 堆体温度、WSC、 NO_3^--N 、 NH_4^+-N 对细菌种群的影响极显著 ($p < 0.01$), C/N、pH 对细菌种群的影响显著 ($p < 0.05$), 含水率、环境温度对细菌种群的影响不显著。

关键词: 堆肥; 细菌群落; 变性梯度凝胶电泳 (DGGE); 冗余分析

文章编号: 0253-2468(2010)05-1002-09 中图分类号: X705 文献标识码: A

Succession of bacterial community structure in agricultural waste composting under different conditions

ZHANG Jiachao^{1,2}, ZENG Guangming^{1,2*}, YU Man³, CHEN Yaoning^{1,2}, HUANG Hongli⁴, LI Hu^{1,2},
YU Zhen^{1,2}, PENG Yi^{1,2}

- 1 College of Environmental Science and Engineering, Hunan University, Changsha 410082
- 2 Key Laboratory of Environmental Biology and Pollution Control (Hunan University), Ministry of Education, Changsha 410082
- 3 Environmental Resources and Soil Fertilizer Institute, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021
- 4 College of Resources and Environment, Hunan Agricultural University, Changsha 410128

Received 30 August 2009; received in revised form 14 December 2009; accepted 3 March 2010

Abstract PCR-DGGE (Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis) analysis was used to study the dynamic succession of bacterial communities during agricultural waste composting. The effects of ambient and pile temperature, pH, moisture content, water soluble organic carbon (WSC), carbon to nitrogen ratio (C/N) and soluble NH_4^+-N , NO_3^--N were measured during the same time frame. Redundancy analysis (RDA) was applied to explore the relationship between bacterial species and composting parameters by using QuantityOne 2.0 and Canoco 4.5 to determine which combination of variables could explain the differences in species composition. The relationships between the ecological distribution of bacterial species and communities with the 8 parameters were clearly revealed on the RDA biplots. The composting process could be divided into four phases: mesophilic phase (days 1~2), thermophilic phase (days 3~11), temperature falling phase (days 12~18) and maturation phase (days 19~36). Parameters that affect bacterial distribution and dynamic succession are in the following order: NO_3^--N > pile temperature > WSC > C/N > NH_4^+-N > moisture content > pH > ambient temperature. The most important parameters significantly affecting the variation of bacterial species in agricultural waste composting were pile

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (No. 50808072, 50608029); 国家杰出青年科学基金 (No. 50425927); 国家重点基础研究发展计划 (973) 项目 (No. 2005CB724203); 国家教育部长江学者和创新团队发展计划项目 (No. RT 0719)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 50808072, 50608029), the Natural Foundation for Distinguished Young Scholars (No. 50425927), the National Basic Research Program of China (973) (No. 2005CB724203) and the Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (No. RT 0719)

作者简介: 张嘉超 (1984—), 男, 博士, E-mail: jiachao_zhang@163.com; * 通讯作者 (责任作者), E-mail: zgming@hnu.cn

Biography: ZHANG Jiachao (1984—), male, Ph. D., E-mail: jiachao_zhang@163.com; * Corresponding author, E-mail: zgming@hnu.cn

temperature, WSC, $\text{NO}_3^- \text{-N}$ and $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ ($p < 0.01$) and C/N, pH ($p < 0.05$). Establishing the correlation between species data and composting performance will greatly enhance the understanding and optimization of the agricultural waste composting system.

Keywords composting; bacterial community; denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE); redundancy analysis (RDA)

1 引言 (Introduction)

好氧堆肥因具有运行周期短、成本低、操作简便等优点,在农业废物资源化利用方面得到广泛应用.细菌种群凭借其强大的比表面积,可快速将农业废物堆肥体系中可溶性底物吸收进行胞内代谢而促进堆肥的腐熟,已经成为堆肥体系研究中倍受关注的焦点之一.然而,绝大多数细菌纯培养的营养条件非常严格,且通过传统分离培养方法鉴定的细菌仅占环境总微生物的 0.1% ~ 10% (Aman *et al.*, 1995),甚至更低,这显然不足以反映堆肥细菌的真实分布情况.而聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳 (PCR-DGGE) 技术由于快速、简便、可重复性强及非培养性等优点,很好地弥补了传统方法的不足,已被广泛应用于堆肥体系中细菌、真菌群落结构及其动态变化的研究 (宋琳玲等, 2008; 于健等, 2009; 毛心慰等, 2009).

细菌种群的动态变化与堆肥各过程因子密切相关,不同过程因子对细菌种群的影响不同,哪些因子对细菌种群的影响最大,不同的研究者基于不同的堆肥方式得出了不同的结论 (Liang *et al.*, 2003; Hsu *et al.*, 1999). 而很多研究仅考虑单一因子,诸如温度、含水率等对细菌种群及堆肥效果的影响 (Fumihito *et al.*, 2005),有关同一堆肥体系在时间梯度变化下多元参数对细菌种群的影响研究尚未见报道.冗余分析 (Redundancy Analysis, RDA) 是基于排序技术的线性分析方法.它可以结合多个环境因子一起分析,并能够独立保持各个环境变量对生物群落变化的贡献率,其样方排序值既反映了物种组成及生态重要值对群落的作用,同时,也反映了环境因子的影响 (Ter Braak, 1986).

因此,本文采用 PCR-DGGE 技术研究农业废物堆肥过程中细菌种群随时间梯度的分布特征,并应用冗余分析方法研究细菌种群与堆体温度、环境温度、pH、含水率、C/N、水溶性有机碳含量 (WSC)、水溶性铵态氮 ($\text{NH}_4^+ \text{-N}$) 和硝态氮 ($\text{NO}_3^- \text{-N}$) 等过程因子的对应关系,以揭示它们对堆肥过程参数的响应规律,并为优化堆肥工艺,提高堆肥效率提供理论指导.

2 材料与方法 (Materials and methods)

2.1 堆肥材料、处理与采样

堆肥所需典型农业有机废物均取自长沙市郊,将稻草秸秆和易分解代谢的菜叶切割成 10 ~ 20mm 长片段;土壤取自岳麓山林间表层,为砂岩红壤腐殖土 (细菌放线菌真菌总数为 $5.62 \times 10^8 \text{ cells} \cdot \text{g}^{-1}$,以干重计,其中,革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌、放线菌、真菌数量比约为 35:15:6:1),过 40 目筛,用以丰富堆肥初始微生物;麸皮用以调节堆肥初始 C/N 比.风干麸皮、菜叶、稻草和土壤以 2:3:11:8 (质量比) 均匀混合,控制堆肥初始原料 C/N 约为 30,有机物含量约为 60%,适时调节含水率,保持一次发酵期含水率约为 55% ~ 60%,二次发酵期含水率为 45% ~ 50% 左右.将堆肥原料置于自制实验室堆肥模拟容器中,为避免局部厌氧,前 12d 每天翻堆 1 次,后期每 3d 翻堆 1 次,堆肥周期 36d 上午 8:00 采用多点混合法进行取样,以堆肥天数作为样品编号,所取样品在分析前于 -20°C 冷冻保存.

2.2 分析方法

用精密温度计测定堆体中层取样位置堆体温度,同时测定环境温度; 105°C 烘 24h 恒重法测定含水率;水溶性 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 采用 $2\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钾浸提-流动注射仪法测定 (赵瑞芬等, 2009); 2.0g 堆肥鲜样按 1:10 (质量比) 加入去离子水,浸提液在 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下震荡 40min,一部分经普通滤纸过滤,电极电位法测定 pH; 另一部分在 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下离心 15min, $0.45 \mu\text{m}$ 纤维树脂滤膜过滤后,用 TOC 仪 (TOC-5000A, 岛津) 测定水溶性有机碳 (WSC) (Huang *et al.*, 2004); 总有机碳 (TOC) 和总凯氏氮 (TKN) 分别采用马弗炉 550°C 灼烧法和凯氏消煮-流动注射仪法测定,全氮 (TN) 含量由总凯氏氮 (TKN) 与硝态氮加和得到 (彭亿等, 2009),单位堆肥干样 TOC 与 TN 的比值表示为 C/N.

2.3 PCR-DGGE

采用改进的蛋白酶 K-CTAB 法提取细菌总 DNA 并纯化 (刘有胜等, 2007),选用细菌 16S rDNA 通用引物对 GC-338F 和 518R 进行 PCR 扩增 (Li *et al.*, 2008). 50 μL 的 PCR 扩增体系为: Taq DNA

聚合酶 (北京 BioTeke) 2U, 10 × Buffer 5μL, dNTPs (10mmol L⁻¹, 北京 BioTeke) 1μL, 引物各 0.5μL (20μmol L⁻¹), BSA 2μL (10mg mL⁻¹), 模版 DNA 1μL, 加无菌 MilliQ 水补足 50μL. PCR 反应在 MyCycler (Bio-Rad USA) 上进行, 扩增条件为: 94℃ 预变性 4min, 94℃ 变性 45s, 55℃ 退火 40s, 72℃ 延伸 45s, 30 个循环; 72℃ 延伸 7min, 停止于 4℃.

应用 Dcode™ 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, 电泳电压为 140V, 电泳温度为 60℃, 电泳时间为 12h. 电泳结束后, SYBR Green I 染色 30min, 用 GelDoc 2000 凝胶成像系统 (Bio-Rad, USA) 观察凝胶上的条带并拍照.

2.4 数据处理

使用 QuantityOne 2.0 软件 (Bio-Rad, USA) 对 DGGE 图谱进行自动分析, 去除背景噪音 (rolling disk 40) 后, 确定样品电泳条带的多少和亮度峰值, 以细菌种群在每一泳道中亮度峰值的百分含量为重要值构造细菌矩阵 (Gilbride *et al.*, 2006). 为消除量纲不同对数据分析的干扰, 堆肥过程因子采用 SPSS 17.0 软件标准化构造过程因子矩阵. 为降低稀有种群对排序的影响, 用于排序的种群要同时满足该种群在各样点出现的频度 ≥ 2 和该种群在至少

一个样点的相对丰度 $\geq 1\%$ 的要求. 应用 Canoco 4.5 软件进行除趋势对应分析 (Detrended correspondence analysis DCA) 结果表明, 排序轴的长度相对较短 (第一排序轴长度为 2.222), 因此, 选用基于线性模型的冗余分析 (RDA) 方法进行排序分析 (Lep *et al.*, 2003). 本文分别进行了两种 RDA 分析, 一是选用所有的堆肥过程因子参与分析, 以描述细菌样点、种群与各堆肥过程因子的对应关系 (RDA 1), 将生成的数据文件应用 CanoDraw 做出细菌样点、种群与堆肥过程因子的二维排序图; 二是采用手动选择 (Manual selection), 找出显著影响 ($p < 0.05$) 细菌种群变化的主要堆肥解释因子. Monte Carlo permutation 检验两种 RDA 排序轴特征值的显著性, 置换次数均为 999 次.

3 结果 (Results)

3.1 堆肥化过程中各因子的变化

图 1 为堆肥过程各因子的变化图. 由图 1a 可知, 堆体温度在 50℃ 以上的时间超过 7d, 最高温度为 56℃, 超过 45℃ 的时间为 8d, 满足动植物病原菌杀灭的要求, 堆肥后期逐渐降到环境温度. 初始 pH 为 6.74, 最后波动上升至 8.27, 这与微生物活动过程中有机氮的氨化作用和矿化作用密切相关; C/N 由初始的 31.15 逐渐降低到堆肥结束的 16.62, 表

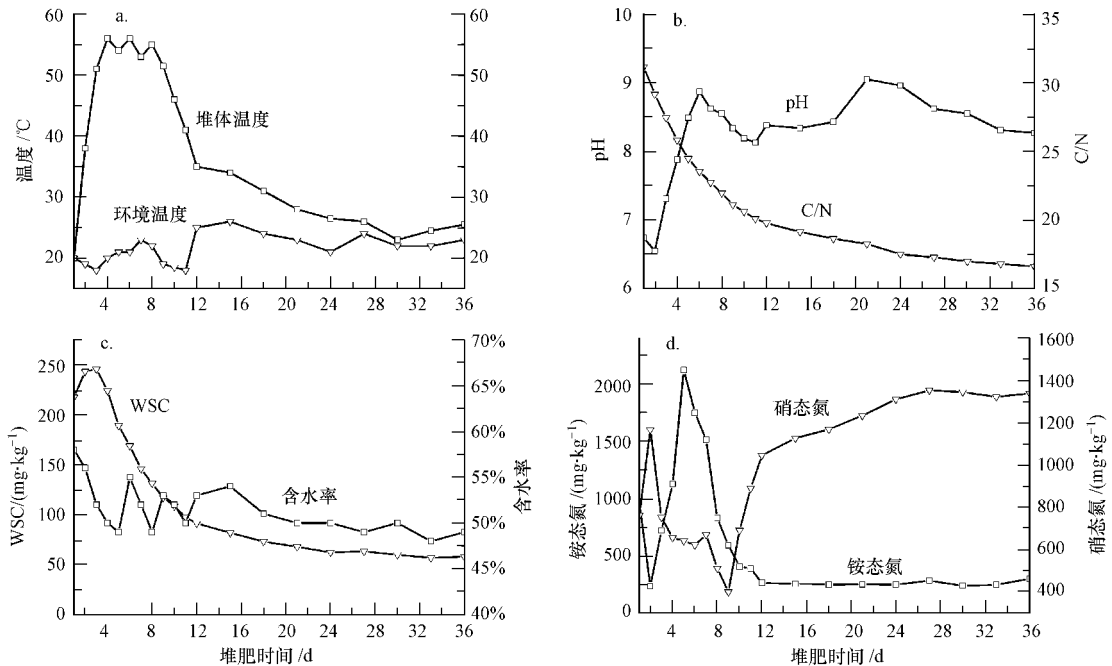


图 1 堆肥过程中各因子的变化

Fig. 1 Changes of different parameters during composting process

明堆肥基本腐熟(图 1b)。WSC在堆肥前期有一个短暂的上升过程,由开始的 $217.70\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (以干样计)上升到最高的 $245.60\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,然后迅速降低,堆肥结束时达到 $57.70\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$;含水率在整个堆肥进程中控制合理,基本满足试验设定要求(图 1c)。水溶性 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 由初始的 $970.9\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 降到 2d时的 $233.0\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,5d时达到最大值 $2122.2\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,随后逐渐降低,堆肥结束降为 $296.8\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 在堆体前期均维持较低水平,在后期逐渐上升,由初始的 $760.9\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 达到最后的 $1338.9\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (图 1d)。

3.2 堆肥细菌群落 DGGE 指纹图谱

在 Gel doc 2000 凝胶成像系统中,使用 QuantityOne 2.0 软件剔除成像照片(图 2)背景干

扰,基于高斯模型得出条带位置和亮度峰值,使得细菌种群条带即使靠的很近,甚至部分重叠,也能得出比普通条带检测更加精确的检测结果。部分泳道由于变性剂在电泳缓冲液中的扩散导致条带变形,但并不妨碍对细菌种群条带的分辨与定量。选用对大多数凝胶电泳均适用的误差允许值(4%)来区分条带,并进行条带自动匹配。20个泳道上经 QuantityOne 2.0 软件共分辨出 31种条带,这些条带均符合排序要求,图 2中数字和字母分别代表取样天数和种群编号。每个泳道均有不同的优势种群存在,随着堆肥条件的变化优势种群发生改变,其中,堆肥高温期样点的优势种群较为单一,但在后期种群均匀度较高,各种群丰度差异不大。

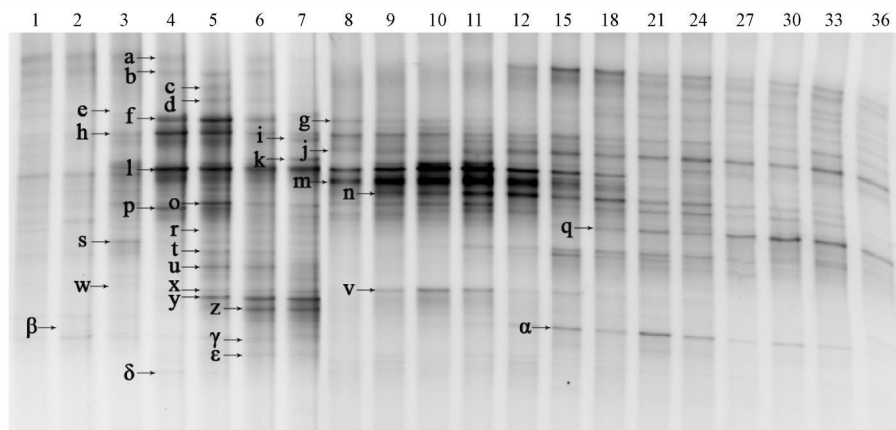


图 2 各样点 DGGE 图谱(数字和字母分别代表取样天数和种群编号)

Fig. 2 DGGE profiles of each composting sample (the numbers and letters represent the sampling days and species serial numbers respectively)

3.3 冗余分析

堆肥细菌群落与过程因子的冗余分析(RDA 1、RDA 2)结果(表 1)表明, Monte Carlo permutation 检

验所有排序轴均显著($p < 0.01$),说明排序效果理想。由表 1可知, RDA 1的前 2个排序轴特征值分别为 0.250、0.146,前 2个排序轴与堆肥过程因子之

表 1 细菌与堆肥过程因子的 RDA 排序结果

Table 1 Redundancy analysis results of bacterial species community and composting parameters

冗余分析	排序轴	特征值	种群-因子间的相关系数	种群数据变化累积百分比	种群与因子关系变化的累积百分比	特征值总和	典范特征值总和
RDA 1	排序轴 1	0.250	0.946	25.0%	36.5%	1	0.684
	排序轴 2	0.146	0.950	39.6%	57.9%		
	排序轴 3	0.102	0.885	49.8%	72.8%		
	排序轴 4	0.073	0.923	57.1%	83.5%		
RDA 2	排序轴 1	0.250	0.946	25.0%	41.6%	1	0.600
	排序轴 2	0.145	0.949	39.4%	65.7%		
	排序轴 3	0.100	0.888	49.4%	82.3%		
	排序轴 4	0.052	0.822	54.6%	91.0%		

间的相关系数为 0.946 和 0.950 分别解释了 25.0% 和 14.4% 的细菌种群变化, 对应 36.5% 和 21.4% 的细菌种群与堆肥过程因子之间关系. 4 个排序轴共解释了 57.1% 的细菌变化和 83.5% 的细菌种群-堆肥过程因子的关系. 所选的 8 个堆肥过程因子解释了 68.4% 的总特征值, 对细菌物种的梯度分布具有显著的影响.

样点-堆肥过程因子二维排序图 (图 3) 中的样点分布可划分为 4 个不同的区域, 大致对应于堆肥周期的升温期 (1~ 2d)、高温期 (3~ 11d > 45°C)、降温期 (12~ 18d) 和腐熟期 (19~ 36d) 4 个阶段. 由图 3 可知, 高温期的样点在排序图中的位置变动较大, 反映出这一时期细菌群落剧烈更替的特征, 在 DGGE 图谱中也可得出同样的结论. 而降温期与腐熟期分界不太明显, 表明堆肥后期细菌群落趋于稳定.

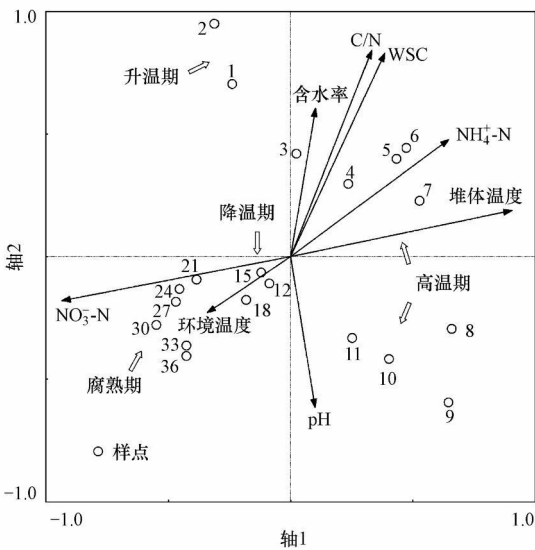


图 3 样点与堆肥过程因子的二维排序图 (RDA1 数字代表取样天数)

Fig 3 RDA biplot of composting samples and parameters (RDA1, the numbers represent the sampling days)

堆肥样点-过程因子的二维排序图中, 堆肥过程因子用带箭头的矢量线表示, 连线的长短表示样点或种群与该过程因子相关系数的大小, 箭头连线与排序轴的夹角表示该因子与该排序轴相关性的大小, 夹角越小, 相关性越大, 箭头所指方向则表示该堆肥因子的变化趋势. 从图 3 中箭头的连线长度可以明显看出, 选取的 8 个堆肥过程因子对细菌种群的梯度分布均有不同程度的影响, 其中, $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 、堆体温度、WSC 和 C/N 对细菌种群的分布影响最大,

环境温度的影响最小. 从箭头与排序轴的夹角分析, 过程因子与细菌种群第 2 排序轴的相关性明显地高于其与第 1 排序轴的相关性, 说明第 2 排序轴更好地反映了细菌种群与堆肥过程因子的相互关系. 过程因子与细菌种群的第 2 排序轴相关性大小为: $\text{C/N} > \text{WSC} > \text{含水率} > \text{NH}_4^+ \text{-N} > \text{堆体温度}$, 与第 2 排序轴正相关; $\text{pH} > \text{环境温度} > \text{NO}_3^- \text{-N}$, 与第 2 排序轴负相关. 根据各过程因子与细菌种群的前 2 个物种排序轴的相关系数 (表 2) 可以得出, 选取的 8 个堆肥过程因子与细菌种群相关性大小依次为: $\text{NO}_3^- \text{-N} > \text{堆体温度} > \text{WSC} > \text{C/N} > \text{NH}_4^+ \text{-N} > \text{含水率} > \text{pH} > \text{环境温度}$.

冗余分析手动选择 (RDA2) 表明, 所选堆体温度、WSC、 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 、 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 、C/N 和 pH 6 个过程因对细菌种群的影响显著 ($p < 0.05$), 其中, 堆体温度、WSC、 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 、 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 达到了极显著水平 ($p < 0.01$), 这 6 个因子共解释了 60.0% 的总特征值, 即这 6 个因子是影响本堆肥体系细菌群落变化的最主要过程因子. 从图 4 基本可以看出种群的分布与主要过程因子的对应关系.

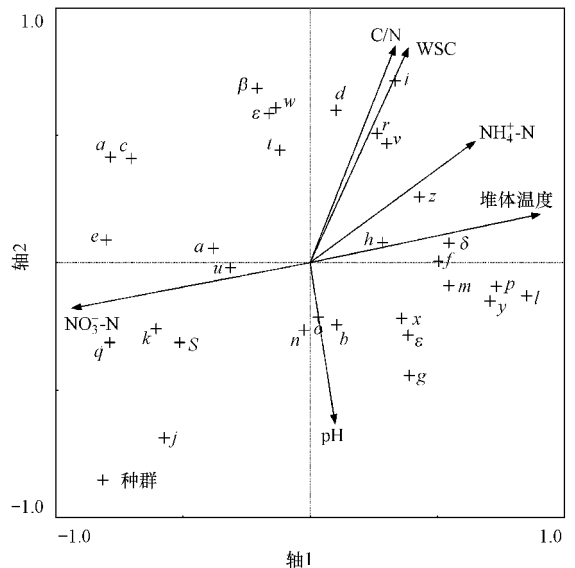


图 4 种群与主要堆肥过程因子的二维排序图 (RDA2 字母代表种群编号)

Fig 4 RDA biplot of bacterial species and manual selected parameters (RDA2 the letters represent the species serial number)

细菌种群与样点的二维排序图如图 5 所示, 结合图 3 图 4 可以看出, 农业废物好氧堆肥每个阶段均有对应的细菌种群存在, 堆体过程因子相似样点中的种群, 它们在二维排序图中的位置也比较接

表 2 细菌、过程因子前 2 个 RDA 排序轴与过程因子间的相关系数

Table 2 Correlation coefficients for bacterial species axis 1 and axis 2, composting parameters axis 1 and axis 2, and composting parameters

	生物轴 1	生物轴 2	环境轴 1	环境轴 2	含水率	pH	C/N	环境温度	WSC	堆体温度	NH ₄ ⁺ -N	NO ₃ ⁻ -N
生物轴 1	1											
生物轴 2	-0.0363	1										
环境轴 1	0.9463**	0	1									
环境轴 2	0	0.9498**	0	1								
含水率	0.0968	0.5746**	0.1023	0.6049**	1							
pH	0.0944	-0.5841**	0.0997	-0.6149**	-0.5870**	1						
C/N	0.3144	0.7996**	0.3323	0.8418**	0.6603**	-0.7729**	1					
环境温度	-0.3226	-0.2171	-0.3409	-0.2285	-0.1711	0.4867*	-0.5348*	1				
WSC	0.3644	0.7884**	0.3851	0.8301**	0.5215*	-0.7046**	0.9650**	-0.5661**	1			
堆体温度	0.8565**	0.1791	0.9051**	0.1886	0.0344	0.0398	0.4095	-0.3796	0.5498**	1		
NH ₄ ⁺ -N	0.6125**	0.4536*	0.6472**	0.4776*	0.1223	0.0520	0.5037*	-0.1938	0.5664**	0.6731**	1	
NO ₃ ⁻ -N	-0.8849**	-0.1709	-0.9351**	-0.1799	-0.2804	0.1289	-0.5684**	0.4777*	-0.5903**	-0.8473**	-0.6841**	1

注: ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

近, 反映出细菌种群在功能学上对于不同堆肥环境的适应性. 例如, 种群 w 、 β 、 ε 在堆肥前期丰度较高, 随着堆体温度的升高迅速灭活. 而种群 l 、 m 、 p 、 y 等在排序图中分布于高温期, 与堆体温度正相关, 比较适宜于高温期生存. 种群 d 、 i 、 r 、 v 与 C/N 和 WSC 相关性显著, 表明它们对堆肥营养的依赖很高. 有的种群 (如 q 、 j 、 a 等) 则生活在 NO₃⁻-N 含量较高的堆肥中后期. 另外, 有些种群则在整个堆肥进程中几乎均有存在, 表现出较高的适应性, 如种群 h 、 n 、 o 等.

4 讨论 (Discussion)

长期以来, 以冗余分析 (RDA)、典范对应分析 (CCA) 等为代表的多元梯度分析方法在陆地植被及湖泊、海洋浮游植物生态学等方面 (栾青杉等, 2007; 彭亿等, 2009) 得到了充分的应用, 也有部分研究者将其与核酸数据结合探究多种环境微生物群落对其体系影响因子或处理方式的响应 (Gibride *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2000), 但在结合 PCR-DGGE 技术在堆肥处理体系微生态方面的研究未见报道. 基于碱基序列组成差异, DGGE 能够对小于 500bp 的基因片段进行良好的电泳分离, 不同样品 PCR 产物经电泳后分离出数目、强度和迁移位置不同的条带. 虽然从这些较短的 DNA 片段获知的微生物群落多样性信息有一定局限性, 但 DGGE 技术在监测微生物群落组成和种群的动态变化方面的巨大优势是诸多其他分析技术所无法比拟的, 并越来越被广泛地应用于堆肥等污染物去除领域的分子生态学研究. DGGE 对微生物种群具有极高的分辨率, 图谱中每一条带由 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 (Konstantinov *et al.*, 2003), 电泳条带越多, 说明细菌种群数量越多. DGGE 图谱中不同种群的亮度虽然并不能作为其丰度的代表, 但不同泳道中同一条带相对百分含量增加或减少却可以表征该种群丰度的相对增加或减少 (Marschner *et al.*, 2001). 因此, 本研究采用每一条带亮度的百分含量表示该种群数量的多寡, 从而构造出细菌种群数据矩阵. DGGE 图谱产生的细菌种群数据矩阵, 对于通过多

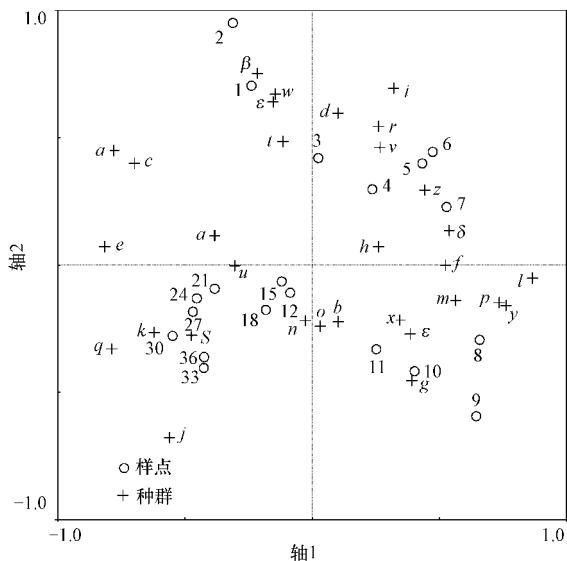


图 5 细菌种群与样点的二维排序图 (RDA I, 数字和字母分别代表取样天数和种群编号)

Fig 5 RDA biplot of composting species and samples (RDA I, the numbers and letters represent the sampling days and species serial numbers, respectively)

元分析方法评估不同过程因子对细菌群落组成的影响具有重要意义 (Yang *et al.*, 2000). 应用 RDA 等分析方法计算 16S rDNA 图谱的差异, 从而通过 Monte Carlo permutation 检验计算出每一参数因子的相对重要性.

研究表明, 农业废物好氧堆肥进程大体可划分为升温期、高温期、降温期和腐熟期 4 个阶段 (Zeng *et al.*, 2009), 本研究基于样点细菌种群组成和冗余分析方法所得的样点-过程因子排序图同样可将堆肥进程划分为这 4 个阶段, 每个阶段均有对应细菌种群存在, 与传统的分类方法结论一致. 而冗余分析的分类能同时结合多个堆肥过程因子的变化, 在样点、种群-过程因子二维排序图中更能直观地反映出样点、细菌种群在堆肥过程因子变化梯度下的分类特征, 因此, 更能反映堆肥进程的实际情况.

各堆肥过程因子对细菌群落的动态变化均有不同程度的影响, 在农业废物堆肥处理过程中, 所选取的过程因子对细菌群落的影响程度大小以及哪些因子对细菌的生长与分布的影响达到显著水平 ($p < 0.05$) 是本研究关注的重点. 冗余分析结果表明, 堆体温度、WSC、 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 、 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 、C/N 和 pH 6 个过程因子与细菌种群的对应关系达到显著水平 ($p < 0.05$), 因此, 这些参数的调控对于优化农业废物堆肥过程中细菌的降解活性以及促进堆肥的顺利完成具有重要意义.

堆体温度是细菌种群与堆肥系统相互适应的关键因素, 它的控制直接关系到堆肥过程中微生物的活性和堆肥无害化的效果, 它既是细菌等微生物活动的结果, 同时也决定着细菌的活动 (Agnew *et al.*, 2003). 温度能够影响细菌酶反应动力学、生长速度及化合物的溶解度等 (曾光明等, 2006), 进而影响堆肥细菌多样性的变化, 不同的细菌种群适应于不同的温度条件, 温度太高或太低均能抑制其生长繁殖. 作为细菌易利用营养物质的 WSC 同样被认为是堆肥过程中最为重要的因子, 适宜的 WSC 含量对细菌群落的正常生长起着决定作用, 含量不足就会抑制细菌的生长 (Hsu *et al.*, 1999). 本研究中, 该因子在堆肥前期有一个短暂的上升过程, 然后迅速降低, 直至稳定, 这可能是由于部分堆肥微生物迅速适应堆肥环境, 使得一些易降解有机物经过微生物酶的作用从载体上脱落并溶解, 而其水解与溶解作用超过微生物对其矿化作用和固定化作用 (Tremier *et al.*, 2005). 随着堆肥的进行, 细菌等

微生物对易利用碳源的需求越来越多, 但可利用纤维素类物质的大量消耗, 木质素等难降解物质含量的相对升高, 导致堆体中 WSC 含量逐渐下降 (戴芳等, 2005). 水溶性 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 与细菌等堆肥微生物的活性和堆肥状况密切相关, 大量的有机氮在堆肥前期被快速转化为 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 并累积, 反硝化作用使 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 保持较低水平, 而堆肥后期随着堆体温度的降低, 硝化细菌活性增强, 使得 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 逐渐减少, $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 逐步升高 (张相锋等, 2003). 因此, $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 是微生物活性、堆体温度、好厌氧条件、通风状况联合作用的结果. C/N 是细菌重要的营养平衡因子, 如果偏低会引起堆体可利用碳源的不足, 导致堆肥前期升温缓慢及高温期缩短, 不利于堆肥的腐熟 (Huang *et al.*, 2004). pH 虽不影响堆肥化过程中有机质的降解, 但其大小对细菌的生长有重要影响. 研究表明, 堆肥材料较低的 pH 与微生物活性的停滞有一定的一致性 (Day *et al.*, 1998), 为使微生物有效地发挥作用, pH 不宜太高或太低, 否则会影响堆肥的效率 (Fan *et al.*, 2004).

本试验模拟堆肥条件下, 堆体具有良好的保温效果, 因此, 环境温度对细菌群落的影响较小. 含水率作为一个重要的堆肥过程因子, 提供了包括细菌在内的堆肥微生物新陈代谢和生理活动所需溶解性营养物质的传输场所 (McCartney *et al.*, 1998), 进而直接影响堆肥细菌对农业废物的发酵速度与腐殖化程度, 甚至有研究表明, 它对微生物活性的影响较堆体温度大 (Liang *et al.*, 2003). 但在本研究中, 它与细菌群落的对应关系并未达到显著性水平 ($p > 0.05$), 这可能是由于本研究堆肥体系含水率调控得当, 均在细菌生长适宜范围, 并未显著促进或抑制细菌生长的缘故.

5 结论 (Conclusions)

1) RDA 是一种很有潜力的量化堆肥等污染处理系统中微生物群落与过程因子对应关系的分析方法. 结合 PCR-DGGE 技术, 堆肥进程细菌群落以堆肥过程因子为梯度大体可划分为升温期、高温期、降温期和腐熟期 4 个阶段, 每一阶段均有对应种群存在, 反映了各种群对不同堆肥环境的生态适应性. 种群、样点-因子二维排序图所得组成分类较传统方法取得更直观结果.

2) RDA 能对不同过程因子对农业好氧堆肥化中细菌种群的影响程度进行排序. 本农业废物堆肥

中, 过程因子与细菌前两个排序轴的相关性大小依次为: $\text{NO}_3^- - \text{N} > \text{堆体温度} > \text{WSC} > \text{C/N} > \text{NH}_4^+ - \text{N} > \text{含水率} > \text{pH} > \text{环境温度}$. 其中, 堆体温度、WSC、 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 和 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 对细菌种群的影响达到极显著水平 ($p < 0.01$), C/N、pH 为显著水平 ($p < 0.05$), 这些参数的有效控制对农业废物堆肥处理过程中细菌群落的活性调控具有重要意义.

责任作者简介: 曾光明 (1962—), 男, 国家教育部长江学者特聘教授、国家自然科学基金杰出人才基金获得者. 主要从事城市生活垃圾综合利用、清洁生产工艺和方法、环境系统工程、废水、废气的治理等方面的研究. E-mail: zgm@hnu.cn

参考文献 (References):

- Agnow JM, Leonard JJ. 2003. The physical properties of compost [J]. *Compost Science and Utilization*, 11(3): 238—264
- Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 59: 143—169
- 戴芳, 曾光明, 袁兴中, 等. 2005. 生物表面活性剂在农业废物好氧堆肥中的应用 [J]. *环境科学*, 26(4): 181—185
- Dai F, Zeng G M, Yuan X Z, et al. 2005. Application of biosurfactant in composting of agricultural waste [J]. *Environmental Science*, 26(4): 181—185 (in Chinese)
- Day M, Kozymien M, Shaw K, et al. 1998. An investigation of the chemical and physical changes occurring during commercial composting [J]. *Compost Science and Utilization*, 6: 44—66
- Fan Y, Li C, Lay J J, et al. 2004. Optimization of initial substrate and pH levels for germination of spore-forming hydrogen-producing anaerobes in cow dung compost [J]. *Bioresour Technol*, 91(2): 189—193
- Funahito M, Kazunori I. 2005. Effect of high compost temperature on enzymatic activity and species diversity of culturable bacteria in cattle manure compost [J]. *Bioresour Technol*, 96(16): 1821—1825
- Gilbride K A, Frigon D, Cesnik A, et al. 2006. Effect of chemical and physical parameters on a pulp mill biotreatment bacterial community [J]. *Water Research*, 40: 775—787
- Hsu J H, Lo S L. 1999. Recycling of separated pig manure: characterization of maturity and chemical fractionation of elements during composting [J]. *Water Science and Technology*, 40: 121—127
- Huang G F, Wong J W C, Wu Q T, et al. 2004. Effect of C/N on composting of pig manure with sawdust [J]. *Waste Management*, 24: 805—813
- Konstantinov S R, Zhu W Y, Williams B A, et al. 2003. Effects of fermentable carbohydrates on piglet faecal bacterial communities as revealed by 16S ribosomal DNA [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 43: 225—235
- Lepš J, Šmilauer P. 2003. *Multivariate Analysis of Ecological Data Using Canoco* [M]. United Kingdom, Cambridge: Cambridge University Press: 50—51
- Li A J, Yang S F, Li X Y, et al. 2008. Microbial population dynamics during aerobic sludge granulation at different organic loading rates [J]. *Water Research*, 42(13): 3552—3560
- Liang C, Das K C, McClendon R W. 2003. The influence of temperature and moisture contents regimes on the aerobic microbial activity of a biosolids composting blend [J]. *Bioresour Technol*, 86(2): 131—137
- 刘有胜, 杨朝晖, 曾光明, 等. 2007. 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*, 27(5): 1151—1156
- Liu Y S, Yang Z H, Zeng G M, et al. 2007. Application of PCR-DGGE to analyzing bacterial communities in culinary waste compost [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 27(5): 1151—1156 (in Chinese)
- 栾青杉, 孙军, 宋书群, 等. 2007. 长江口夏季浮游植物群落与环境因子的典范对应分析 [J]. *植物生态学报*, 31(3): 445—450
- Luan Q S, Sun J, Song S Q, et al. 2007. Canonical correspondence analysis of summer phytoplankton community and its environment in the Yangtze River Estuary, China [J]. *Acta Phytocologica Sinica*, 31(3): 445—450 (in Chinese)
- 毛心慰, 王慧, 赵百锁. 2009. BTEX 降解嗜盐菌群的多样性及其降解特性 [J]. *环境科学学报*, 29(4): 709—715
- Mao X W, Wang H, Zhao B S. Diversity and biodegradation characteristics of a halophilic bacterial consortium capable of degrading BTEX [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 29(4): 709—715 (in Chinese)
- Marschner P, Yang C H, Lieberei R, et al. 2001. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 1437—1445
- McCartney D, Tingley J. 1998. Development of a rapid moisture content method for compost materials [J]. *Compost Science and Utilization*, 6: 14—25
- 彭亿, 李裕元, 李忠武, 等. 2009. 亚热带稻田弃耕湿地土壤因子对植物群落结构的影响 [J]. *应用生态学报*, 20(7): 1543—1550
- Peng Y, Li Y Y, Li Z W, et al. 2009. Effects of soil factors on vegetation community structure in an abandoned subtropical paddy wetland [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 20(7): 1543—1550 (in Chinese)
- 宋琳玲, 曾光明, 陈耀宁, 等. 2008. 固态发酵过程中微生物总 DNA 提取方法比较 [J]. *环境科学学报*, 28(11): 2200—2205
- Song L L, Zeng G M, Chen Y N, et al. 2008. Comparison of methods for total microbial DNA extraction from solid-state fermentation [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 28(11): 2200—2205 (in Chinese)
- Ter Braak C J F. 1986. Canonical correspondence analysis: a new eigenvector method for multivariate direct gradient analysis [J]. *Ecology*, 67: 1167—1179
- Trenier A, Guardia A de, Massiani C, et al. 2005. A respirometric method for characterising the organic composition and biodegradation kinetics and the temperature influence on the biodegradation kinetics for a mixture of sludge and bulking agent to be co-

- composted [J]. *Bioresourcetchnology*, 96: 169—180
- Yang C H, Crowley D E. 2000. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron status [J]. *Applied Environmental Microbiology*, 66(9): 345—351
- 于健, 杨敏, 齐嵘, 等. 2009. 城市污水处理系统中氨氧化细菌种群结构研究 [J]. *环境科学学报*, 29(3): 521—526
- Yu J, Yang M, Qi R, *et al*. 2009. Community structures of ammonia-oxidizing bacteria in different municipal wastewater treatment systems [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 29(3): 521—526 (in Chinese)
- 曾光明, 黄国和, 袁兴中, 等. 2006. 堆肥环境生物与控制 [M]. 北京: 科学出版社. 121—122
- Zeng G M, Huang G H, Yuan X Z, *et al*. 2006. *Environmental Biology and Control in Composting* [M]. Beijing: Science Press. 121—122 (in Chinese)
- Zeng G M, Huang H L, Huang D L, *et al*. 2009. Effect of inoculating white-rot fungus during different phases on the compost maturity of agricultural wastes [J]. *Process Biochemistry*, 44: 396—400
- 张相锋, 王洪涛, 周辉宇, 等. 2003. 花卉废物和牛粪联合堆肥中的氮迁移 [J]. *环境科学*, 24(3): 126—131
- Zhang X F, Wang H T, Zhou H Y, *et al*. 2003. Nitrogen transformation during co-composting of flower wastes and cattle manure [J]. *Environmental Science*, 24(3): 126—131 (in Chinese)
- 赵瑞芬, 于志勇, 程滨, 等. 2009. 不同前处理条件对土壤 NO_3^- -N、 NH_4^+ -N 含量影响的研究 [J]. *中国农学通报*, 25(10): 174—177
- Zhao R F, Yu Z Y, Cheng B, *et al*. 2009. Effects of pretreatment on content of soil NO_3^- -N, NH_4^+ -N [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 25(10): 174—177 (in Chinese)