

农业有机废物与城市生活垃圾堆肥高温期 微生物种群结构比较

李 凤^{1,2} 曾光明^{1,2*} 范长征^{1,2} 李 贞^{1,2} 肖 勇^{1,2}

(1. 湖南大学环境科学与工程学院 湖南 长沙 410082)

(2. 湖南大学环境生物与控制教育部重点实验室 湖南 长沙 410082)

摘 要: 通过 PCR、克隆文库方法分析了农业有机废物和城市垃圾堆肥高温期间细菌和真菌种群的多样性。提取堆肥高温期的 DNA, PCR 扩增, 构建各高温期的 16S rDNA 和 18S rDNA 克隆文库, 结果表明: 农业有机废物和城市生活垃圾 16S rDNA 克隆文库中分别共有 18 个、21 个 OTUs, 分别属于细菌域的 14 个、15 个不同属, 其 18S rDNA 克隆文库中分别共有 8 个、9 个 OTUs, 分别属于细菌域的 8 个、9 个不同属, 推断农业有机废物堆体的优势菌为 *Bacillus megaterium*、*Rhizobium* sp.、*Phanerochaete chrysosporium*、*Penicillium* sp. 同属或同种的菌株; 城市生活垃圾堆体的优势菌为 *Bacillus megaterium*、*Azospirillum* sp.、*Phanerochaete chrysosporium* 同种或同属的菌株。
关键词: 堆肥, 克隆文库, 细菌种群结构, 真菌种群结构

Comparison Microbial Communities During High Temperature Period of Composting of Organic Agriculture Wastes and Municipal Domestic Waste

LI Feng^{1,2} ZENG Guang-Ming^{1,2*} FAN Chang-Zheng^{1,2} LI Zhen^{1,2} XIAO Yong^{1,2}

(1. College of Environmental Science and Engineering, Hunan University, Changsha, Hunan 410082, China)

(2. Key Laboratory of Environmental Biology and Pollution Control, Hunan University, Changsha, Hunan 410082, China)

Abstract: Microbial diversity of composting of agriculture organic wastes (AOW) and municipal domestic waste (MDW) in the thermophilic (T) phase was analysed by Polymerase Chain Reaction (PCR) combined with constructing of clone library. The polymerase chain reaction-amplified 16S rDNA and 18S rDNA fragments with universal eubacterial primers (27F, 1495R) and fungal primers (EF4, Fung5) were subjected to constructing of clone library, and the results of clone library indicated: there were 18 OTUs and 21 OTUs in the 16S rDNA clone library of AOW and MDW composting sample, and they belonged to 14 and 15 different genera respectively; in the 18S rDNA clone library of AOW and MDW composting sample, there were 8 OTUs and 9 OTUs, and they belonged to 8 and 9 different genera respectively. The dominant microbes in the T phase of composting of AOW were related to *Bacillus megaterium*, *Rhizobium* sp., *Phan-*

基金项目: 国家杰出青年科学基金(No. 50425927); 国家 973 计划项目(No. 2005CB724203); 国家教育部长江学者和创新团队发展计划项目(No. IRT 0719); 国家自然科学基金青年科学基金项目(No. 50808073)

* 通讯作者: Tel: 86-731-8823701; E-mail: zgming@hnu.cn

收稿日期: 2009-04-27; 接受日期: 2009-06-22

erochaete chrysosporium, *Penicillium* sp., and the dominant microorganisms in the T phase of composting of MDW were related to *Bacillus megaterium*, *Azospirillum* sp. and *Phanerochaete chrysosporium*.

Keywords: Composting, Clone library, Bacterial communities, Fungal communities

有机废物包括农业有机废物、林业有机废物、城市生活垃圾等,其中林业有机废物所占比重相对较低,而农业有机废物和城市生活垃圾所占比重则相对较高。农业有机废物包括稻草、谷物秸秆、动物粪便等,特点是木质纤维素含量高;城市生活垃圾包括餐厨垃圾、废纸以及其他废物,木质纤维素含量比农业废物低,这些原料用于生产肥料或土壤改良剂,越来越受到人们关注^[1,2]。堆肥化是有机固体废物无害化、减量化、资源化的根本途径。有机固体废弃物的堆肥化研究一直是环境科学领域研究的热点之一。产品中含有有机质、P、K等多种植物所需的养分,可以提高农林等产品的产量,改善土壤结构,提高土壤肥力^[3]。微生物是堆肥过程的工作主体,早期对堆肥中微生物的研究主要采用分离培养的方法,局限性是自然界中90%以上微生物不能被分离培养,不能很好地反映自然环境中微生物多样性的原始状态^[4]。基于rDNA基因序列分析的分子生物学方法为研究堆肥中微生物群落的多样性和动态变化提供了先进的技术手段,已有研究者将分子生态学技术引入堆肥微生物生态研究^[5,6]。本文对农业有机废物和城市生活垃圾进行堆肥化处理,通过克隆文库(Clone library)方法对堆肥高温期细菌和真菌种群多样性和群落结构做了进一步深入研究,以期对堆肥工艺革新提供更多理论指导。

1 材料与方法

1.1 实验材料

将从长沙市郊区采集的稻草、菜叶、树叶与麸皮和采自岳麓山枯树下的土壤以一定比例(稻草1.074 kg、菜叶0.9 kg、树叶0.216 kg、麸皮0.24 kg、土壤0.721 kg)混匀(A堆体);将采集来的城市餐厨垃圾烘干后(2.4 kg)与土壤(0.6 kg)混匀(B堆体),调节含水率为55%作为堆肥原料。将混合物分别放在约20 L的器皿内,堆体中加入曝气设备,置于培养箱,堆肥过程中培养箱温度为25℃保存堆肥原始料。

1.2 堆肥化过程中微生物数量的测定方法

1.2.1 培养基:细菌分离采用牛肉膏蛋白胨培养基,真菌分离用马丁孟加拉红-链霉素培养基,培养基的

组成和配制方法见文献[7]。

1.2.2 取样及分离方法:堆肥当天设为0号,从堆肥开始到第16天每天取1次样,16 d以后到堆肥结束每2 d取1次样,堆肥持续28 d,上午9:00取样,并测量温度、木质纤维素含量参数的变化,使堆体含水率保持在50%~60%,所取样品一部分于-20℃冰箱保存待分析;一部分用于直接平板稀释法微生物分离培养。30℃恒温下,细菌、真菌分别培养2 d、4 d观察记录微生物种类和数量。

1.2.3 纤维素、半纤维素和木质素含量:参照文献[8],采用FOSS2010半自动纤维测定仪进行测定。

1.3 研究方法

1.3.1 基因组总DNA的提取、纯化与PCR-DGGE分析:DNA提取采用Protocol PL^[9]方法。用普通DNA纯化试剂盒(Tiagen)纯化粗提DNA,溶于100 μL无菌、去离子水。采用由上海生工合成细菌16S rDNA通用引物27F(5'-AGAGTTTGATCCTGG CTCAG-3')和1495R(5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3')^[10]对高温期堆肥样品的总DNA进行PCR扩增。扩增程序:94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35个循环; 72℃ 10 min。PCR反应体系: *Taq* DNA聚合酶(Tiagen) 2 U, 10×PCR反应缓冲液(With MgCl₂) 5 μL, dNTPs溶液(10 mmol/L) 2 μL, 引物(10 μmol/L) 1.0 μL, DNA模板5 μL, 用无菌Milli-Q水补至总体积50 μL。扩增片段长约1500 bp。

真菌18S rDNA通用引物EF4(5'-GGAAGGGRT GTATTTATTAG-3')和Fung5(5'-GTAAAAGTCCTGG TTCCCC-3')^[11]对高温期堆肥样品的总DNA进行PCR扩增。扩增程序:94℃ 2 min; 94℃ 30 s, 48℃ 45 s, 72℃ 90 s, 30个循环; 72℃ 5 min。PCR反应体系: *Taq* DNA聚合酶(Tiagen) 2 U, 10×PCR反应缓冲液(With MgCl₂) 5 μL, dNTPs溶液(10 mmol/L) 4 μL, 引物(40 μmol/L) 0.6 μL, DNA模板2 μL, 用无菌Milli-Q水补至总体积50 μL。扩增片段长约400 bp。

1.3.2 克隆文库(Clone library)的构建:将PCR产物与pMD18-T载体连接,连接产物转入感受态细胞*E. coli* DH5α^[12],用Amp/X-gal/IPTG抗性筛选平板选择具有氨苄青霉素抗性的白色转化子构建16S

rDNA 和 18S rDNA 克隆文库。

DNA 序列测定与分析: 从高温期 16S rDNA 和 18S rDNA 克隆文库中分别随机挑取 109 和 67 个含正确插入序列的转化子, 用限制性内切酶 *Hae*、*Hha* 分型, 每个酶切类型挑取 1 个代表菌株测序 (上海生工公司)。DNAMAN 软件对测序结果编辑, 剔除其中人工嵌合序列, 然后将编辑好的序列在 GenBank 数据库中进行 Blast 同源性检索, 并提交到 GenBank 获得登录号。

2 结果与分析

2.1 堆肥过程中温度变化

由图 1 可知, 堆肥初期温度迅速上升, A、B 堆体分别于第 8 天、6 天达到最高温度 59°C、64°C, 然后下降, 最终温度与环境一致, 整个过程 55°C 以上时间 A、B 堆体为 5 d、6 d, 能有效杀死堆肥中的致病菌。

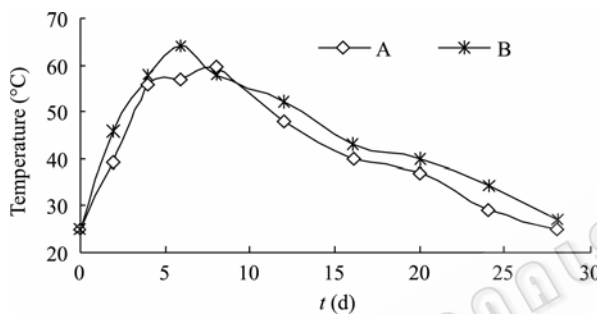


图1 堆肥化过程中温度的变化曲线
Fig. 1 Changes in temperature during composting process

2.2 堆肥过程中微生物数量的变化

用平板法计数堆体中细菌和真菌的数量。在堆肥升温阶段, 堆肥中细菌、真菌明显减少。真菌减少幅度更明显。到腐熟期细菌、真菌的数量趋于平稳。总体来说, 两个堆体的细菌总数比真菌总数高出几个数量级。A 堆体的细菌总数比 B 堆体少, 真菌总数比 B 堆体多 (图 2)。

2.3 堆肥过程中木质纤维素含量变化

纤维素、半纤维素和木质素等难分解物质的分解是堆肥化进程中的关键环节, 这些成分的分解状态可以作为堆肥腐熟度的指标^[13]。堆肥开始木质纤维素的降解很少, 到达堆肥高温期, 木质纤维素降解较快, A 堆体降解效率比 B 堆体高, A、B 堆体的木质素降解率为 12.84%、8.47%; 纤维素降解率为

19.76%、11.02%; 半纤维素降解率为 22.29%、14.09%。A 堆体的木质纤维素降解率均高于 B 堆体 (图 3)。

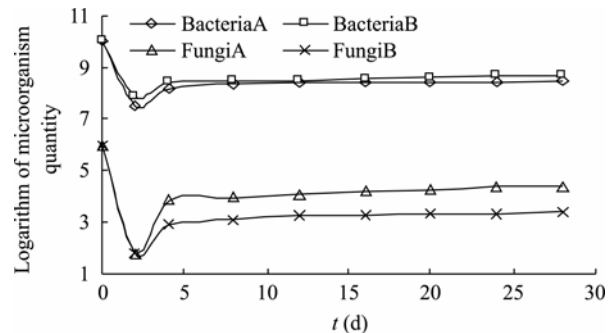


图2 堆肥化过程高温微生物的数量
Fig. 2 Changes in microorganism quantity during composting process

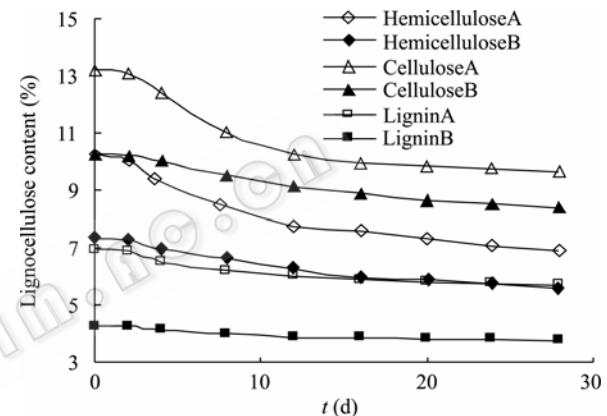


图3 堆肥化过程中原料的半纤维素、纤维素、木质素变化
Fig. 3 Changes of hemicellulose, cellulose and lignin concentration during composting process

2.4 堆肥样基因组总 DNA 的提取与 PCR 扩增

电泳结果显示采用文中的提取和纯化方法可顺利地提取出堆肥样品中总 DNA, 长度约 23 kb 左右, 条带清晰, 没有 DNA 的严重断裂。用于构建克隆文库的 16S rDNA 和 18S rDNA 被 PCR 扩增出来, 长度分别约为 1500 bp 和 400 bp。

2.5 16S rDNA 克隆文库 DNA 测序与相似性分析

高温期是堆肥过程比较重要的阶段, 在这个阶段中病原菌被杀死, 细菌演替活跃。研究高温期微生物种群的多样性有利于人们更加深入地了解堆肥过程中微生物种群特点, 还能为堆肥工艺的革新提供更加具体的指导。本文选择了堆肥高温期构建其细菌 16S rDNA 和真菌 18S rDNA 的克隆文库。

从 A 堆体的细菌 16S rDNA 克隆文库随机挑选

109 个克隆, 鉴定得到 96 个阳性克隆。用限制性内切酶 *Hae*、*Hha* 酶切分型, 每个酶切类型挑取 1 个代表性克隆转化子测序。测序结果在 GenBank 数据库中进行 Blast 比对, 整理后得到 18 个操作分类单元(Operational taxonomic unit, OTU)。

由表 1 知: A 堆肥样品克隆文库的 OTUs 与 GenBank 数据库中已知细菌 16S rDNA 序列相似性最高为 100%, 最低为 92%。OTU22、OTU18 是克隆文库的优势菌株, 分别占克隆文库的 36.45%、13.54%, 同源性分析表明它们与 *Bacillus*

megaterium、*Rhizobium* sp. 相关, 相似度都在 98% 以上, 推断堆肥高温期的优势菌为 *Bacillus megaterium*、*Rhizobium* sp. 同种或同属的菌株。18 个 OTUs 分属于细菌域 14 个不同属, *Bacillus* 属、*Rhizobium* 属在克隆文库中比例最高, 所占克隆文库库容分别为 36.45%、36.45%、21.88%。克隆文库中大多数克隆子能在 GenBank 中找到与其相似的已知细菌序列, 也有少数克隆子(8.33%)在 GenBank 中找不到与其相似的可培养的已知细菌序列, 是自然界中的未知类群。另外还有 9 个 OTUs 在克隆文库

表 1 堆肥细菌 16S rDNA 克隆文库结果								
Table 1 Bacterial 16S rDNA cloning results of the composting sample								
操作单元 Operational taxonomic unit	插入列长度(bp) Length of insert fragment (bp)	GenBank 登录号 GenBank accession No.	最相似菌(GenBank 登录号) Species with most similar sequence (GenBank accession No.)	同源性 (%) Identity (%)	每种 OTU 所含克隆子数 Number, percentage of clone		每种 OTU (%) Ratio of OTUs (%)	
					A 堆体 A	B 堆体 B	A 堆体 A	B 堆体 B
OTU1	985	EU372800	<i>Streptomyces</i> sp. (EF034030)	99	0	3	0	3.33
OTU2	1014	EU372801	<i>Mesorhizobium</i> sp. (AY490105)	95	5	2	5.21	2.22
OTU3	992	EU372815	<i>Mesorhizobium</i> sp. (AF229877)	98	1	3	1.04	3.33
OTU4	995	EU372802	<i>Paenibacillus amylolyticus</i> (AB115960)	98	7	0	7.29	0
OTU5	966	EU372823	<i>Paenibacillus granivorans</i> (AF237682)	92	4	1	4.17	1.11
OTU6	921	EU372805	<i>Paenibacillus daejeonensis</i> (AF290916)	99	0	4	0	4.44
OTU7	955	EU372803	<i>Planctomyces</i> sp. (X81956)	95	5	0	5.21	0
OTU8	967	EU372804	<i>Alpha proteobacterium Shinshu-a h2</i> (AB100409)	94	1	3	1.04	3.33
OTU9	939	EU372806	<i>Caulobacter</i> sp. (AJ227774)	99	1	2	1.04	2.22
OTU10	941	EU372807	<i>Devosia</i> sp. (EF575560)	94	1	0	1.04	0
OTU11	996	EU372808	Uncultured <i>Achromobacter</i> sp. (AY635878)	98	3	1	3.13	1.11
OTU12	988	EU372810	Uncultured <i>Bacterium</i> (AB240360)	98	0	1	0	1.11
OTU13	985	EU372811	<i>Rhizobium soli</i> strain DS-42 (EF363715)	93	8	4	8.33	4.44
OTU14	984	EU372812	Uncultured <i>Alcaligenes</i> sp. (AJ306836)	92	4	6	4.17	6.67
OTU15	986	EU372813	Uncultured <i>Bacterium</i> clone KD7-38 (AY218709)	93	0	1	0	1.11
OTU16	930	EU372819	Uncultured <i>Bacterium</i> clone (EU134278)	94	0	1	0	1.11
OTU17	986	EU372825	Uncultured <i>gamma proteobacterium</i> (AB074648)	95	1	0	1.04	0
OTU18	965	EU372809	<i>Rhizobium</i> sp. (DQ202284)	100	13	5	13.5	5.56
OTU19	955	EU372814	<i>Azospirillum</i> sp. (X92464)	99	3	11	3.13	12.2
OTU20	987	EU372816	<i>Azospirillum</i> sp. (X92464)	93	1	5	1.04	5.56
OTU21	960	EU372821	<i>Azospirillum</i> sp. (X92464)	98	0	7	0	7.78
OTU22	982	EU372817	<i>Bacillus megaterium</i> . (EU109501)	99	35	27	36.5	30.0
OTU23	917	EU372818	<i>Devosia</i> sp. (EF433462)	98	0	1	0	1.11
OTU24	954	EU372820	<i>Brevundimonas lenta</i> . (EF363713)	98	2	1	2.08	1.11
OTU25	949	EU372822	<i>Brevundimonas nasdae</i> (AM412000)	98	0	1	0	1.11
OTU26	974	EU372824	<i>Verrucomicrobia bacterium</i> (AB331895)	97	1	0	1.04	0

中仅含有 1 个克隆子。文库的 coverageC^[14]达到 92.71%, coverageC 理论上表示 16S rDNA 克隆文库中所包含微生物种类(OTU)占样品中全部微生物种类的比例, 计算公式: $(a)C=1-n1/N$, N 为 16S rDNA 克隆文库的库容, n1 为在 16S rDNA 克隆文库出现一次的 OTU 数量。coverageC 如果很高或者达到 100% 说明库容已经足够。该克隆文库能全面反映该堆体高温期的细菌多样性。

由表 1 可知: B 堆肥样品克隆文库的 OTUs 与 GenBank 数据库中已知细菌 16S rDNA 序列相似性最高为 100%, 最低为 92%。OTU22、OTU19 是克隆文库中的优势菌株, 占克隆文库的 30.00%、12.22%, 同源性分析表明它们与 *Bacillus megaterium*、*Azospirillum* sp. 相关, 相似度在 98% 以上, 推断堆肥高温期的优势菌为 *Bacillus megaterium*、*Azospirillum* sp. 同种或同属的菌株。21 个 OTUs 属于细菌域的 15 个不同属, *Bacillus* 属和 *Azospirillum* 属在克隆文库中比例最高, 占克隆文库库容 30.00%、25.56%。克隆文库中大多数克隆子能在 GenBank 中找到与其相似的已知细菌序列, 也有少数克隆子(8.89%)是自然界中的未知类群。文库的 coverageC 达到 91.11%, 该克隆文库能较全面反映该堆体高温期的细菌多样性。

2.6 18S rDNA 克隆文库 DNA 测序与相似性分析
A 堆肥样品的克隆文库的 OTUs 与 GenBank 数

据库中已知真菌的 18S rDNA 序列相似性最高为 99%, 最低为 95%。OTU9、OTU7 是克隆文库中的优势菌株, 分别占克隆文库比例为 38.64%、20.45%, 同源性分析表明它们与 *Phanerochaete chrysosporium*、*Penicillium* sp. 相关, 相似度都在 98% 以上, 推断堆肥高温期的优势菌为 *Phanerochaete chrysosporium*、*Penicillium* sp. 同种或同属的菌株。8 个 OTUs 分属于真菌域的 8 个不同属, *Phanerochaete* 属、*Penicillium* 属在克隆文库中比例最高。克隆文库中大多数克隆子能在 GenBank 中找到与其相似的已知真菌序列(表 2)。文库的 coverageC 达到 93.18%, 该克隆文库能够全面反映该堆体高温期的真菌多样性。

B 堆肥样品克隆文库的 OTUs 与 GenBank 数据库已知真菌 18S rDNA 序列相似性最高为 99%, 最低为 95%。OTU9 是克隆文库的优势菌株, 所占比例为 34.69%, 同源性分析表明它与 *Phanerochaete chrysosporium* 相关, 且相似度在 98% 以上, 故推断堆肥高温期的优势菌为 *Phanerochaete chrysosporium* 同种或同属的菌株。9 个 OTUs 分属于真菌域的 9 个不同属, *Phanerochaete* 属在克隆文库中比例最高。克隆文库中大多数克隆子能在 GenBank 中找到与其相似的已知真菌序列(表 2)。文库的 coverageC 达到 92.59%, 该克隆文库能够全面反映该堆体高温期的真菌多样性。

表 2 堆肥真菌 18S r DNA 克隆文库结果
Table 2 Fungal 18S rDNA cloning results of the composting sample

操作单元 Operational Taxonomic Unit	插入序列 长度(bp) Length of insert frag- ment(bp)	GenBank 登录号 GenBank accession No.	最相似菌(GenBank 登录号) Species with most similar se- quence(GenBank accession No.)	同源性 (%) Identity (%)	每种 OTU 所 含克隆子数 Number, percentage of clone		每种 OTU (%) Ratio of OTUs (%)	
					percentage of clone		Ratio of OTUs (%)	
					A 堆体 A	B 堆体 B	A 堆体 A	B 堆体 B
OTU1	517	FJ804157	<i>Anguillospora longissima</i> (AY204598)	96	0	1	0	3.70
OTU2	520	FJ804158	<i>Aspergillus niger</i> (FJ517755)	99	7	3	15.9	11.1
OTU3	519	FJ804159	<i>Babesia</i> sp. (FJ608738)	96	1	2	2.27	7.41
OTU4	518	FJ804160	<i>Ceriporiopsis</i> sp. (EU670846)	96	1	0	2.27	0
OTU5	517	FJ804161	<i>Macentina</i> sp. (AM495006)	95	3	2	6.82	7.41
OTU6	520	FJ804162	<i>Marchandiomyces marsonii</i> (EU622838)	97	0	4	0	14.8
OTU7	516	FJ804163	<i>Penicillium</i> sp. (DQ810191)	98	9	3	20.5	11.1
OTU8	520	FJ804164	<i>Phaeoacremonium sphinctrophorum</i> (DQ173149)	97	0	2	0	7.41
OTU9	519	FJ804165	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (U59084)	99	17	9	38.6	33.3
OTU10	516	FJ804166	<i>Pseudoplectania nigrella</i> (AF104345)	98	5	0	11.4	0
OTU11	516	FJ804167	<i>Pulchromyces fimicola</i> (EF442001)	97	1	1	2.27	3.70

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

3 讨论

微生物种群多样性研究方法主要分 2 种, 一种是传统纯分离培养方法, 对环境样品中“可计数、可培养”的微生物提供信息; 一种是不依赖分离培养的分子生物学方法, 通过分析环境样品 16S rDNA 克隆文库的序列实现^[15], 对环境样品中“可培养、非培养”微生物提供信息。一般认为, 16S rDNA 序列同源性小于 98%, 可认为属于不同种; 同源性小于 93%~95%, 可认为属于不同属^[16]。对 A 堆体和 B 堆体 16S rDNA 和 18S rDNA 克隆文库系统发育分析结果表明, 这两个时期细菌多样性很丰富, 且有自己的优势种群。*Bacillus* sp.、*Rhizobium* sp.、*Phanerochaete* sp.、*Penicillium* sp. 是 A 堆体的优势菌种。*Bacillus* sp.、*Azospirillum* sp.、*Phanerochaete* sp. 是 B 堆体的优势菌种。堆肥初期升温迅速, 很快由升温期进入高温期。在升温期, 温度、PH 值等条件适合 *Rhizobium* sp. 和 *Azospirillum* sp. 生长、繁殖^[17,18]。在高温期初始阶段, 大量 *Rhizobium* sp. 和 *Azospirillum* sp. 还没有被高温杀死。

Bacillus sp. 有木质素降解的能力^[19], 这对堆肥化过程中木质素的有效降解是非常有利的; *Bacillus* sp. 可以产生生物表面活性剂, *Bacillus* sp. 和其生物表面活性剂增强对垃圾的分解和利用, 改良微生物和介质的相互作用以及直接促进微生物对难降解有机物的分解, 还可提高堆肥效率、缩短堆肥周期^[20]。*Rhizobium* sp. 可以提高堆肥分解速率, 缩短堆肥料制作时间, 提高堆肥多元化目标^[21]。研究表明^[22,23], *Phanerochaete* sp. 是降解木质素一类芳香化合物能力最强的微生物, 降解对象不需进入细胞内代谢, 因而 *Phanerochaete* sp. 不易受到有毒、有害物质的伤害。另外 *Phanerochaete* sp. 能产生对其他微生物产生抗性的自由基, 具有旺盛的生命力^[24]。

克隆文库分析菌群有独特优势, 能较准确反映样品中微生物的存在情况。分子生物学方法通常不需要测定 16S rDNA 和 18S rDNA 全序列, 只要获得包含一个以上高变区和保守区的 500 bp 序列片段, 即可判断该序列所属的系统类^[25], 能更系统和全面地了解各种生态环境中微生物多样性^[26]。RFLP(Restriction fragment length polymorphism, 限制性片段长度多态性)、DGGE 与克隆文库相互补充, 但仍

需与序列测定相结合。随着 DNA 测序费用的降低, 使直接建立克隆文库进行序列测定和分析成为更有效的表征微生物多样性的手段。

4 结论

1) 在堆肥过程中, 细菌的数量一直处于优势, 而真菌的数量远远少于细菌, 因此应该重视细菌在堆肥过程中的作用。

2) 用 Protocol PL DNA 提取方法能够顺利地从小堆肥样品中提取出较完整的基因组 DNA, 不会造成 DNA 的严重断裂, 纯化后可用于后续的 PCR 实验。

3) 构建了高温期堆肥样品 16S rDNA 和 18S rDNA 克隆文库。农业有机废物和城市生活垃圾 16S rDNA 克隆文库中分别共有 18 个、21 个 OTUs, 分属于细菌域的 14 个、15 个不同属, 其 18S rDNA 克隆文库中分别共有 8 个、9 个 OTUs, 分别属于细菌域的 8 个、9 个不同属, 推断农业有机废物堆体的优势菌为 *Bacillus megaterium*、*Rhizobium* sp.、*Phanerochaete chrysosporium*、*Penicillium* sp. 同属或同种的菌株; 城市生活垃圾堆体的优势菌为 *Bacillus megaterium*、*Azospirillum* sp.、*Phanerochaete chrysosporium* 同种或同属的菌株。

参考文献

- [1] 黄丹莲, 曾光明. 白腐菌应用于堆肥处理含木质素废物的研究. 环境污染治理技术与设备, 2005, 6(2): 29-32.
- [2] 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. 环境污染治理技术与设备, 2003, 3(3): 19-23.
- [3] 王敦球, 张学洪, 龙腾锐, 等. 利用城市固体废弃物生产有机复合肥施用效果研究. 给水排水, 2003, 29(5): 34-37.
- [4] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbial Rev*, 1995, 59: 143-169.
- [5] Patrick DS, Anthony GH, David BW, et al. Quantifying bacterial population dynamics in compost using 16S rRNA gene probes. *Appl Microbiol Biotech*, 2005, 66: 457-463.
- [6] Peters S, Koschinsky S, Schwieger F, et al. Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single-strand-conformation polymorphism- based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. *Appl En-*

- viron Microbiol*, 2000, **66**: 930–936.
- [7] 李阜棣, 喻子牛, 何少江. 农业微生物学实验技术. 北京: 中国农业出版社, 1996, pp.305–306.
- [8] 王玉万, 徐文玉. 木质纤维素基质发酵物中半纤维素、纤维素和木质素的定量分析程序. 微生物学通报, 1987, **13**(2): 82–84.
- [9] Yang ZH, Xiao Y, Zeng GM, *et al.* Comparison of methods for total community DNA extraction and purification from compost. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **74**: 918–925.
- [10] Adachi M, Matsubara T, Okamoto R, *et al.* Inhibition of cyst formation in the toxic dinoflagellate *Alexandrium* (Dinophyceae) by bacteria from Hiroshima Bay, Japan. *Aquat Microb Ecol*, 2001, **26**: 223–233.
- [11] Marshall MN, Cocolin L, Mills DA. Evaluation of PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities in compost. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, **95**: 934–948.
- [12] Hoti SL, Sridhar A, Das PK. Presence of wolbachia endosymbionts in microfilariae of wuchereria bancrofti (Spirurida: Onchocercidae) from different geographical regions in India. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2003, **98**: 1017–1019.
- [13] Sjostrom E. Wood Chemistry. Fundamentals and Applications, 2nd ed. New York/ London: Academic Press, 1993.
- [14] Good IL. The population frequencies of species and the estimation of population 3 parameters. *Biometrika*, 1953, **40**: 237–264.
- [15] Darby AC, Birkle LM, Turner SL, *et al.* An aphid-borne bacterium allied to the secondary symbionts of whitefly. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, **36**(1): 43–50.
- [16] Devereux R, He SH, Doyle CL, *et al.* Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: phylogenetic definition of a family. *Journal of Bacteriology*, 1990, **172**: 3609–3619.
- [17] 韩华君, 张 磊, 张 琴. 土壤中根瘤菌定殖研究进展. 土壤, 2008, **40**(2): 174–180.
- [18] Joe MM, Jaleel CA, Sivakumar PK, *et al.* Co-aggregation in *Azospirillum brasilense* MTCC-125 with other PGPR strains: Effect of physical and chemical factors and stress endurance ability. *J Taiwan Inst Chem Eng* (2009), doi: 10.1016/j.jtice.2009.02.006.
- [19] Peter F Strom. Identification of thermophilic bacteria in solid waste composting. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, **31**(10): 906–913.
- [20] 傅海燕, 曾光明, 黄国和, 等. 发酵培养法筛选堆肥中产表面活性物质的菌种. 环境科学与技术, 2004, **27**(6): 58–62.
- [21] 杨盛行. 生物性肥料的开发与应用潜力. 农业生技产业季刊, 2005, **4**: 9–14.
- [22] Patrick J Collins, Jin A Field, Pauline Teunissen, *et al.* Stabilization of lignin peroxidases in white rot fungi by tryptophan. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63**(7): 2543–2548.
- [23] Andre Ferraz, Jaime Rodriguez, Juanita Freer. Biodegradation of *Pinus radiata* softwood by white-and brown-rot fungi. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2001, **17**: 31–34.
- [24] 郭 鹏, 陈 敏, 陈中豪. 高效降解木质素优势混合菌的诱变选育研究. 广东工业大学学报, 1997, **14**(4): 30–35.
- [25] Hugenholtz BP, Blackall LL, Gwilliam H, *et al.* The use of 16S rDNA clone libraries to describe the microbial diversity of activated sludge communities. *Water Science and Technology*, 1998, **37**: 451–454.
- [26] Brambilla E, Hippe H, Hagelstein A, *et al.* 16S rDNA diversity of cultured and uncultured prokaryotes of a mat sample from Lake Fryxell, McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Extremophiles*, 2001, **5**: 22–33.

稿件书写规范

论文中阿拉伯数字的使用

凡是可以使用阿拉伯数字且很得体的地方均应使用阿拉伯数字。世纪、年代、年、月、日、时刻必须使用阿拉伯数字, 年份必须用全称。对科技期刊来说, 凡处在计量单位和计数单位前面的数字, 包括 9 以下的各位数字, 除个别特例外, 均应使用阿拉伯数字。不是表示科学计量和有统计意义数字的一位数可以用汉字, 例如: 一本教材、两种商品等。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>