

## 蔬菜-秸秆废物堆肥化中细菌群落变化研究

郁红艳, 曾光明\*, 习兴梅, 黄红丽, 黄国和

(湖南大学环境科学与工程学院 长沙 410082)

**摘 要:** 以蔬菜-秸秆废物为堆肥原料, 在堆肥化过程中应用 Biolog 方法研究不同阶段细菌群落的动态变化。聚类分析与主成分分析表明, 细菌群落结构在一次发酵期间发生着剧烈变化, 二次发酵期间趋于稳定。能转化 Biolog 板上第一、二类碳源的细菌是蔬菜-秸秆废物堆肥化进程中的主要细菌种群, 且与木质纤维素的转化有关; 第四、六类碳源可表征堆肥中耐受高温的细菌, 其中第四类碳源转化细菌与木质纤维素的降解有关, 而第六类碳源转化细菌属于易降解有机物转化细菌。

**关键词:** 堆肥; Biolog 法; 群落; 细菌; 秸秆

中图分类号: Q939.9 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)01-0098-05

高温好氧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, 堆肥化的实质是微生物在适宜条件下不完全分解有机废弃物的代谢过程。因此微生物学研究是堆肥化研究的关键所在, 对开发堆肥微生物资源、加速堆肥过程、缩短堆肥周期、提高堆肥质量、减少堆肥过程中的氮损失、臭气挥发和产生具有重要意义<sup>[1]</sup>。为了有效控制堆肥过程, 必须了解这个过程中微生物对有机物的降解转化作用、微生物菌系的结构及其变化规律<sup>[2]</sup>。国内外学者就堆肥微生物学进行了广泛的研究, 所用的方法也有多种, 包括微生物纯培养法<sup>[3-5]</sup>、磷脂脂肪酸法<sup>[6,7]</sup>、酰指纹法<sup>[8]</sup>、分子生物学方法<sup>[9-11]</sup>、碳源利用(Biolog)法<sup>[12-15]</sup>等。

Biolog 法通过测试微生物对单一能源碳利用程度, 来反映微生物群体水平的生理轮廓, 用于测定微生物群落的功能多样性, 这种方法简便、快速, 灵敏度高, 分辨力强, 被广泛应用于土壤、水体、活性污泥等微生态系统的研究中。在堆肥化过程微生物学研究中, Biolog 法的应用较少, Claudio 等认为可能是缘于缺少标准方法, 并研究了利用该方法评价堆肥腐熟程度<sup>[12]</sup>。Laine 等<sup>[13]</sup>用 Biolog GN 板研究堆肥化修复氯酚污染的锯木厂土壤中微生物的动态变更, 并与传统方法比较, 获得相关微生态机理信息。Buyer 等<sup>[14]</sup>开发了应用 Biolog SF-N 板研究环境样品(包括土壤、堆肥)中真菌群落结构的新方法。冯宏

等<sup>[15]</sup>应用 Biolog GN 板研究接种菌剂对堆肥微生物利用碳源能力的影响, 采用多种群落多样性指数来处理试验结果, 综合描述堆肥不同阶段微生物的多样性和群落均匀度。

虽然 Biolog 法有其独到优势, 但目前在堆肥化过程中的应用研究相对匮乏, 再者不同的堆肥原料也决定了微生物群落结构的差异, 因此有必要对不同堆肥系统应用该方法获取更多的微生物学信息。本实验旨在应用 Biolog GN 板研究蔬菜-秸秆废物堆肥化过程中细菌群落的变化, 并应用多种多元统计方法处理试验结果, 以期获得更多堆肥化过程中细菌功能结构信息, 为该种方法在堆肥化中的应用提供指导。

## 1 材料和方法

### 1.1 堆肥原料

选择长沙郊区有代表性的农业有机废物进行实验。(1)难降解有机物: 稻草, 粉碎至 10~20mm (2)易降解有机物: 小白菜叶、芽白叶、卷心菜叶、莴苣叶、马铃薯茎叶、甘薯茎叶、西瓜茎叶和扁豆茎叶等, 粉碎至 10~20mm (3)腐殖土: 取自岳麓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。

### 1.2 堆制方法

上述堆肥原料按一定的配比充分混合, 使 C/N

基金项目: 国家 863 计划(2004AA649370); 国家 973 项目(2005CB724203)

\* 通讯作者。Tel: 86-731-8822754; E-mail: zgming@hnu.cn

作者简介: 郁红艳(1979-), 女, 江苏人, 博士研究生, 研究方向为固体废物处理。E-mail: hong-yan-yu@163.com

其他作者: 黄丹莲, 陈芙蓉

收稿日期: 2006-07-05 接受日期: 2006-08-24 修回日期: 2006-11-04

为 30, 含水率控制在 60% 左右, 前 2 周每周翻堆 2 次, 以后每周翻堆 1 次。按照堆肥进程(第 0, 2, 6, 11, 15, 28 天)分别在堆体周围、中心等不同高度取样混合, 一部分用以测定化学指标, 另一部分即刻用以 Biolog 检测。

### 1.3 Biolog 检测

5g 堆肥鲜样加 495mL 无菌生理盐水, 在 160rpm 回旋式摇床上振荡 1h, 静止片刻后取上清液 2mL 加入 18mL 无菌生理盐水, 使接种液稀释度为  $10^{-3}$ , 以每孔 150 $\mu$ L 将上述接种液接种至 Biolog GN2 板, 28 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 5d, 观察到有孔变色后每 12h 在 Biolog 自动鉴定仪上读数。

### 1.4 统计分析

Biolog 板各孔读数首先均减去 A1 孔(对照孔)读数, 将负值读数设为零, 然后参考文献<sup>[6]</sup>计算平均色度 AWCD, 根据平均色度值选取 108h 读数用于后述多元统计分析。

108h 的读数结果用平均色度值校正后, 首先进行 95 种碳源的聚类分析, 即将 95 种碳源顺序编号为 1~95, 作为聚类分析的变量, 将 5 个时间点作为样品进行聚类分析。校正后的读数还用于主成分分析, 所有多元统计分析由 Spss13.0 统计软件完成。

## 2 结果和讨论

### 2.1 堆肥化过程中细菌代谢活性

AWCD 值及其时间变化可以用来表示细菌的平均活性。由图 1 可以看出, 细菌群落代谢的 AWCD 值随时间变化曲线的形状符合一般微生物利用基质的规律, 即存在较明显的增长期、稳定期和衰减期等阶段。第 6 天、第 11 天堆肥中的细菌平均活性相近, 第 15 天、第 28 天细菌平均活性差别更小, 而堆肥初期(第 2 天)平均活性显著高于堆肥化中其它时期, 表明堆肥初期细菌生长快速、群落丰富。随着堆制的进行, 细菌平均活性逐渐下降。本研究中堆制原料主要为易降解的菜叶和难降解的稻草, 随着堆制进行, 一次发酵后菜叶已基本降解完, 二次发酵期间堆肥化中微生物主要碳源为富含木质纤维素的稻草, 所以生物活性下降。

Connell 等<sup>[17]</sup>综述用于多元统计分析的 Biolog 数据一般取某一时间点测定数据。选取原则为平均吸光度值在 0.5~1.0 间, 一般为培养后期、平均色度较为稳定的时间点, 因为此时一些生长较慢的微生物也已参与碳源代谢, 能反映较为全面的微生物群落信息。参考图 1, 本研究选取 108h 测定数据用

于多元统计分析。

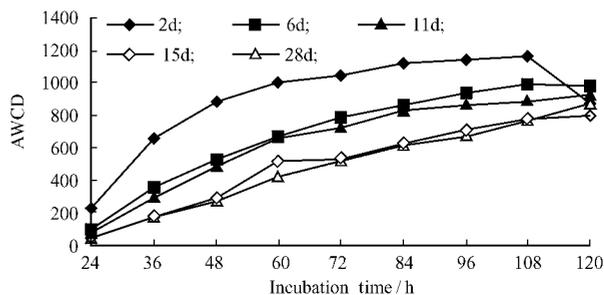


图 1 AWCD 随培养时间变化曲线

Fig. 1 Development of the average well color development (AWCD) with time.

### 2.2 堆肥化中细菌对各种碳源的利用能力

研究堆肥化中各阶段细菌对不同碳源利用能力的差异, 有助于更全面地了解细菌群落代谢功能特征。将堆肥不同阶段的细菌群落对 95 种碳源的利用进行聚类分析(图 2)。当距离为 15 时, 可将 95 类碳源分为六类。Biolog 微平板中 95 种碳源按照结构通常分为聚合物、糖类、羧酸、氨基酸、胺及其他六类, 显然聚类分析产生的随着堆制进行有相似消耗特性的六类碳源在结构上有很大的差异, 这也表明了堆肥化过程中群落结构变化的复杂性, 常见的将 Biolog 数据按照结构分为若干类后进行多元统计分析, 其实与实际生物信息有很大的误差。

聚类分析的六类碳源中典型碳源的标准化色度变化曲线见图 3。该曲线纵坐标不用吸光度, 因为试验没有校正接种密度, 用标准化的色度值代替直接读取的色度值(或吸光度值), 可避免曲线变化是由于接种生物量的显著影响引起的, 此时曲线的变化主要缘于堆制过程中细菌群落组成的变化。

从该图 3 可见第一类碳源(典型碳源 F6 L-丙氨酸)与第二类碳源(典型碳源 A5 吐温 40)消耗特性相近, 均在堆肥升温期消耗快速, 第 2 天达到高温以后迅速下降, 随着高温期结束, 即 10d 后, 开始逐渐升高, 在二次发酵时期, 细菌群落对这两类碳源的利用趋于稳定。第三类碳源为 B1, 即 i-赤藻糖醇, 这类碳源在堆制两天后, 即高温期才开始快速消耗, 一次发酵后趋于稳定。第四类碳源(典型碳源 G1 L-组氨酸)的消耗在整个堆制过程中均较低, 在一次发酵升温阶段上升到一定水平后基本维持不变。第五类碳源(典型碳源 H2 肌苷)消耗随着堆制进行变化最为剧烈, 温度升高, 降解这类物质的细菌活性增强, 但达到一定高温后, 此类细菌活性急剧下降, 随着高温期温度的适当降低, 此类物质又开始被细菌群落

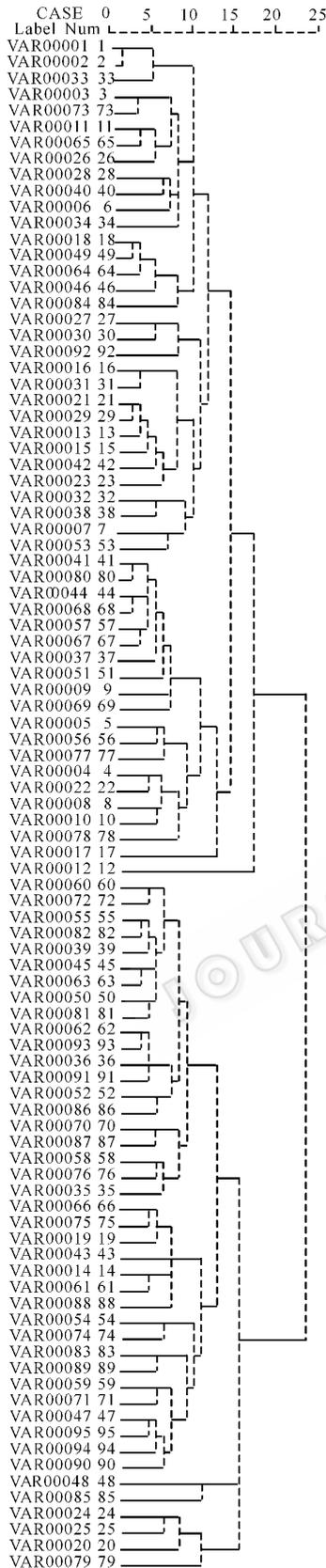


图2 堆肥过程中95种碳源的聚类分析图

Fig.2 Dendrogram from average linkage cluster between the 95 carbon substrates.

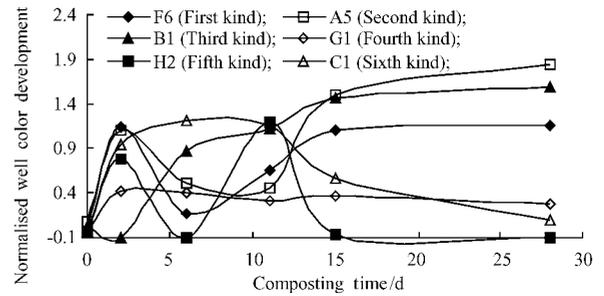


图3 堆肥化过程中典型碳源的消耗

Fig.3 Profiles of the time-course of colour development on six typical substrates from the clusters.

降解。但在二次发酵期间不存在该类物质的降解。第六类碳源(典型碳源 C1 D-蜜二糖)的消耗与其他类碳源显著不同,在温度较高的时期,这类碳源大量消耗,随着温度下降,以及易降解有机物的减少,这类碳源消耗持续下降。这一类碳源可能表征的是一部分高温细菌的生物活性。

从上述结果可见,堆制过程中细菌群落结构在一次发酵期间发生着剧烈变化,二次发酵期间趋于稳定,表明细菌群落在堆肥化过程中是从不稳态向稳态发展,这与传统的研究结果一致<sup>[3]</sup>。第一类与第二类碳源降解细菌均在高温期活性降低,开始降温后活性迅速升高,表明利用这两类碳源主要是一些嗜温细菌。这两类碳源在二次发酵期间消耗亦逐渐上升,并在整个细菌菌落中占优势地位,由于二次发酵期间堆体中能为细菌利用的碳源能源物质主要是稻草,可见此期间的细菌群有较高的木质纤维降解能力或者协同真菌、放线菌共同降解的能力。降解肌苷和 *p*-羟基苯乙酸的细菌对温度最为敏感,二次发酵期间未检测到这类细菌。第四类碳源在整个堆肥化进程中均有较为稳定的消耗,不随堆肥温度的变化而发生显著改变,可见利用这类碳源的细菌不仅能够耐受高温,并且具有一定木质纤维素降解能力,但这类细菌在细菌群落中始终较为弱势。

### 2.3 堆肥化中细菌群落代谢功能因子分析

对堆肥化过程中细菌群落利用 Biolog 微平板中 95 种碳源的情况进行因子分析,得到的主元向量中 4 个主成分特征值的贡献率与累积贡献率如表 1 所示。可见 4 个主成分即可表征原变量的全部信息,其中第 1 主成分(PC1)和第 2 主成分(PC2)累积贡献率达到 67.272%,以该 2 个主成分作图可较为全面地表征生物群落的代谢特征,结果如图 4 所示。

从图 4 可看出堆制高温期间第 6 天与第 11 天细菌群落组成相似,而二次发酵期间第 15 天与第

表 1 前 4 个主成分的贡献率与累积贡献率(%)

Table 1 The proportion and cumulative proportion of four principal components (%)

Principal component	PC1	PC2	PC3	PC4
Proportion	41.171	26.101	17.223	15.505
Cumulative	41.171	67.272	84.495	100.000

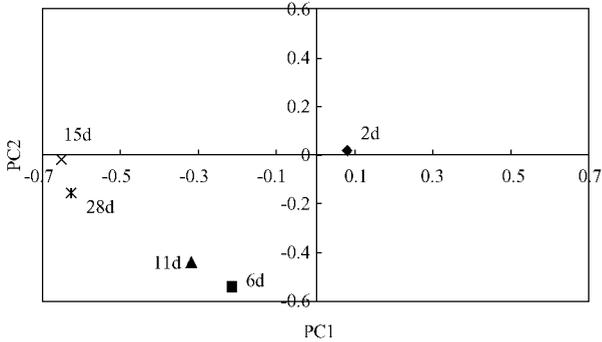


图 4 堆肥化过程中细菌群落的 PCA 分析结果

Fig.4 Plot of the first two principal component (PCA) scores for each plate.

28 天细菌群落组成亦可认为变化不大。显然随着堆制进程,堆肥中各时期细菌群落发生了显著变化。堆肥初期(第 2 天)PC1 与 PC2 均为正值,显见初期细菌活性很高。随着堆肥化进程,贡献率较高的 PC1 逐渐降低,表明细菌群落活性的下降,这与平均色度值 AWCD 变化曲线结果相统一。对 PC1 与 PC2

起主要贡献的各变量(PC1 系数绝对值不小于 0.03、PC2 系数绝对值大于 0.032 的碳源)如表 2 所示。可见影响 PC1 的碳源主要是几种糖、羧酸与氨基酸。其中大部分系数均为负值,可见随着堆制进行,PC1 逐渐降低,这与 PCA 结果图统一。结合图 4 与表 2,堆肥化过程中一次发酵期间 PC1 显著降低,可见此期间蔬菜-秸秆废物堆肥化过程中影响细菌群落的主要是转化 N-乙酰-D-葡萄糖胺、L-阿拉伯糖、赤藻糖醇、顺-乌头酸、柠檬酸、D-半乳糖醛酸、D,L-乳酸、D-葡萄糖二酸、L-谷氨酸、L-丝氨酸的细菌。而二次发酵期间,PC1 略有升高,显然此期间上述转化细菌逐渐衰弱,包括该类物质转化细菌的组成降低或者高能力降解细菌转变成低能力降解细菌,取代而起的是一大类能够利用  $\alpha$ -D-乳糖、琥珀酰胺酸、D,L- $\alpha$ -磷酸甘油的细菌群。

PC2 虽然贡献率较 PC1 低,但在堆肥化过程中亦发挥着重要作用。从图 4 可见随着堆制的进行,PC2 在高温期急速下降,这可能缘于此期间细菌数量的急剧减少。此后 PC2 在一次发酵期间逐渐升高,而二次发酵期间又逐渐下降,但都小于零,表明堆肥化中起次主要作用的主要是能利用 D-纤维二糖、D-果糖、D-半乳糖、麦芽糖、D-山梨醇、D-乳糖酸丙酯、D-葡萄糖酸、L-丙氨酸的细菌。

表 2 影响 PC1 与 PC2 的主要变量系数

Table 2 Coefficient of the major variables affecting PC1 or PC2

	Substrate	A8	A10	B1	B8	D2	D3	D6
PC1	Coefficient	-0.033	-0.031	-0.030	0.030	-0.034	-0.031	-0.035
	Substrate	E6	E10	F2	F10	G9	H10	—
	Coefficient	-0.037	-0.030	0.032	-0.033	-0.033	0.031	—
PC2	Substrate	A12	B2	B4	B10	C6	D5	—
	Coefficient	-0.042	-0.037	-0.035	-0.042	-0.039	-0.034	—
	Substrate	D7	D10	F6	G10	H5	H12	—
	Coefficient	-0.039	0.035	-0.042	0.034	0.038	0.037	—

2.4 两种多元统计分析比较

结合表 2 与图 2,观察到影响 PC1 的主要变量中,系数为负值的变量均属于聚类分析中的第一、二类碳源,而系数为正值的变量均属于第四类碳源。而影响 PC2 的主要变量中,系数为负值的变量与第一类碳源接近,系数为正值的变量均属于第四类碳源。根据因子分析结果堆肥化中起主要作用的是能转化系数负值的变量碳源的细菌,即第一、二类碳源,而系数正值的变量碳源(即第四类碳源)利用较弱,这些与聚类分析结果较为符合。

重要的有机物转化作用。堆肥初期细菌生长快速、群落丰富,随着堆制的进行,其平均活性逐渐下降。细菌群落结构在一次发酵期间发生着剧烈变化,二次发酵期间趋于稳定。能转化 Biolog GN2 板上第一、二类碳源的细菌是蔬菜-秸秆废物堆肥化进程中的主要细菌种群,且与木质纤维素的转化有关系。第四、六类碳源可表征堆肥化中耐受高温的细菌,其中第四类碳源转化细菌与木质纤维素的降解有关,而第六类碳源转化细菌属于易降解有机物转化细菌。

3 结论

尽管 Biolog 方法有很多优势,但是也存在一些不足之处,如常用的微平板具有一定的微生物选择性,GN 板针对革兰氏阴性细菌,GP 板针对革兰氏阳

细菌群落在蔬菜-秸秆废物堆肥化进程中起着

性细菌, SF-N 板针对真菌)不能反映整个微生物群落的功能多样性, 缺少有效的标准方法, 能排除接种液浓度、培养条件的影响等。Insam 等根据环境样品微生物群落研究的需要, 开发了 Biolog ECO 板, 这种板仅包含 31 种与功能群落相关的碳源, 大大降低了传统微平板的选择性, 而且在一块微平板上每种碳源均有 3 个重复, 可以有效地减少接种液浓度不同造成的结果误差<sup>[18]</sup>, 所以本研究后续将考虑应用 Biolog ECO 板考察堆肥化中微生物群落的动态变化, 以期获得更为全面的微生物群落信息。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] 朱能武. 堆肥微生物学研究现状与发展前景. 氨基酸和生物资源 2005, 27(4): 36-40.
- [ 2 ] 崔宗均, 宫小燕, 李国学. 变性梯度凝胶电泳在堆肥微生物研究中的应用. 微生物学通报 2004, 31(5): 116-119.
- [ 3 ] Hassen A, Belguith K, Jedidi N, *et al.* Microbial characterization during composting of municipal solid waste. *Bioresource Technology*, 2001, 80: 217-225.
- [ 4 ] Tiquia SM, Wan JHC, Tam NFY. Microbial population dynamics and enzyme activities during composting. *Compost Science & Utilization*, 2002, 10: 150-161.
- [ 5 ] Insam H, Amor K, Renner M. Changes in functional abilities of the microbial community during composting of manure. *Microbial Ecol*, 1996, 31: 77-87.
- [ 6 ] Carpenter-Boggs L, Kennedy AC, Reganold JP. Use of phospholipid fatty acids and carbon source utilization patterns to track microbial community succession in developing compost. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(10): 4062-4064.
- [ 7 ] Herrmann RF, Shann JF. Microbial community changes during the composting of municipal solid waste. *Microbial Ecology*, 1997, 33: 78-85.
- [ 8 ] Tang JC, Kanamori T, Inoue Y, *et al.* Changes in the microbial community structure during thermophilic composting of manure as detected by the quinone profile method. *Process Biochemistry*, 2004, 39: 1999-2006.
- [ 9 ] Halet D, Boon N, Verstraete W. Community dynamics of methanotrophic bacteria during composting of organic matter. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006, 101(4): 297-302.
- [ 10 ] Franke-Whittle IH, Klammer SH, Insam H. Design and application of an oligonucleotide microarray for the investigation of compost microbial communities. *Journal of Microbiological Methods*, 2005, 62: 37-56.
- [ 11 ] 傅以钢, 王峰, 何培松, 夏四清, 等. DGGE 污泥堆肥工艺微生物种群结构分析. 中国环境科学 2005, 25(Suppl): 98-101.
- [ 12 ] Mondini C, Insam H. Community level physiological profiling as a tool to evaluate compost maturity: a kinetic approach. *European Journal of Soil Biology*, 2003, 39: 141-148.
- [ 13 ] Laine MM, Haario H, Jørgensen KS. Microbial functional activity during composting of chlorophenol-contaminated sawmill soil. *Journal of Microbiological Methods*, 1997, 30: 21-32.
- [ 14 ] Buyer JS, Roberts DP, Millner P, *et al.* Analysis of fungal communities by sole carbon source utilization profiles. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, 45: 53-60.
- [ 15 ] 冯宏, 张新明, 李华兴, 等. 接种菌剂对堆肥微生物利用碳源能力的影响. 华南农业大学学报 2005, 26(4): 19-22.
- [ 16 ] 唐劲瑛, 胡洪营, 钱易. Biolog 方法在环境微生物群落研究中的应用. 微生物学报 2003, 43(1): 138-141.
- [ 17 ] O'Connell S, Lawson RD, Watwood ME, *et al.* Basic program for reduction of data from community-level physiological profiling using Biolog microplates: rationale and critical interpretation of data. *Journal of Microbiological Methods*, 2000, 40: 213-220.
- [ 18 ] Classen AT, Boyle SI, Haskins KE, *et al.* Community-level physiological profiles of bacteria and fungi: plate type and incubation temperature influences on contrasting soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 44: 319-328.

## Analysis of bacterial communities in vegetable and straw wastes composting by Biolog method

YU Hong-yan, ZENG Guang-ming\*, XI Xing-mei, HUANG Hong-li, HUANG Guo-he  
(College of Environmental Science and Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China)

**Abstract** : Bacterial communities were analyzed using Biolog method in agricultural waste composting. The results of cluster analysis and principle component analysis indicated that bacterial communities varied greatly during the first stage of composting, while began to stabilize during the second stage. Bacteria that could utilize the first and second kinds of carbon sources on Biolog plate were found to be the dominant ones during composting, which were also believed to be related with lignocellulose degradation. Thermophilic bacteria were believed to be able to metabolize the fourth and sixth kinds of carbon sources on Biolog plate. Thereinto, the fourth kinds of carbon sources were also connected with lignocellulose transformation. The bacteria utilizing the sixth kinds of carbon sources were just able to metabolize some simpler organic matters.

**Keywords** : Compost ; Biolog method ; Community ; Bacteria ; Straw

Foundation item : National Programs for High Technology Research and Development of China (2004AA649370) ; Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2005CB724203)

\* Corresponding author. Tel : 86-731-8822754 ; Email : zgming@hnu.cn

Other authors : HUANG Dan-lian, CHEN Fu-rong

Received : 5 July 2006 / Accepted : 24 August 2006 / Revised : 4 November 2006