

# 链霉菌对小麦秸秆堆肥中微生物群落和酶活性的影响

吴艳萍<sup>a</sup>, 王国栋<sup>a</sup>, 赵明德<sup>b</sup>

(西北农林科技大学 a. 理学院, b. 林学院, 陕西 杨凌 712100)

**【摘要】**【目的】研究链霉菌(*Streptomyces thermovulgaris*)在农业废弃物资源化利用中的作用及其生物学机理。【方法】以含水量为 60%~65% 的小麦秸秆段为原料,按菌料质量比 1:120 接种链霉菌菌剂,以不接种链霉菌组为对照,采用稀释涂布平板法、BIOLOG 法和分光光度法研究链霉菌对小麦秸秆堆肥体系中微生物群落结构及酶活性的影响。【结果】在整个堆肥过程中,接种(+M)和不接种(-M)处理的细菌和放线菌数量均呈现高-低-高的变化趋势,真菌数量呈降低的趋势。接种链霉菌菌剂,改变了堆体中细菌群落结构组成,堆体细菌总代谢活性(AWCD)和细菌群落多样性均增加。主成分分析结果显示,在整个堆肥过程,不接菌处理堆体细菌群落结构典型变量值的变异很小,而接菌处理的变异较大。整个堆肥过程,接菌处理的蔗糖酶活性比不接菌处理高 50.07%,蛋白酶活性高 21.63%。【结论】接种链霉菌菌剂能够提高堆体细菌数量,提高堆体蔗糖酶和蛋白酶活性,但接种处理堆体中细菌群落稳定性低于不接菌处理。

**【关键词】** 链霉菌;小麦秸秆;堆肥;微生物群落;酶活性

**【中图分类号】** X71;S141.4

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1671-9387(2009)09-0134-05

## Effects of *Streptomyces thermovulgaris* on microbial community and enzyme activity during wheat straw composting process

WU Yan-ping<sup>a</sup>, WANG Guo-dong<sup>a</sup>, ZHAO Ming-de<sup>b</sup>

(a. College of Science, b. College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** 【Objective】 This study was to assess the role and biology mechanism of *Streptomyces thermovulgaris* agent in agricultural waste utilization. 【Method】 The experiment was conducted by wheat straw with 60%—65% water content, and quality materials by inoculum inoculated with 1:120. The non-inoculated treatment was set as control. Meanwhile, microbial cultural, BIOLOG and spectrophotometry method were employed to investigate the effects of *S. thermovulgaris* inoculation on microbial community and enzyme activities during wheat straw composting process. 【Result】 The trends of the number of bacteria and actinomycetes were high-low-high, and the number of fungi decreased during the composting process. Bacteria community structure was altered after *S. thermovulgaris* agent inoculation. AWCD and numbers of communities increased clearly. Principal component analyses indicated that the variation of bacteria community diversity of inoculation treatment was larger than that of non-inoculation treatment throughout the composting process. The average sucrose enzyme activity and protein enzyme activity of inoculation treatment were higher than those of non-inoculation treatment by 50.07% and 21.63% respectively. 【Conclusion】 The number of bacteria, sucrose enzyme activity and protein enzyme activity were promoted after

\* [收稿日期] 2008-12-22

[基金项目] 国家自然科学基金项目(50579066)

[作者简介] 吴艳萍(1974—),女,陕西礼泉人,讲师,硕士,主要从事环境生物物理学研究。E-mail:wuyanping1993@126.com

[通信作者] 王国栋(1957—),男,陕西礼泉人,教授,博士生导师,主要从事生物物理学研究。E-mail:gdwang211@yahoo.com.cn

*S. thermovulgaris* agent inoculation, however, the stability of bacteria community in inoculation treatment was lower than that of non-inoculation treatment.

**Key words:** *Streptomyces thermovulgaris*; wheat straw; composting; microbial community; enzyme activity

农业废弃物堆肥是由各种微生物类群共同作用而实现农业废弃物资源化利用的动态过程,是微生物与周围环境相互作用的结果,所以对该过程微生物群落结构动态进行监控,有利于有效地管理堆肥过程<sup>[1]</sup>。传统堆肥法通常都采用改善环境条件或增加营养的方法,利用堆制原料中的土著微生物来降解农业废弃物,这种方法由于堆肥初期有益微生物量少,需要一定时间才能繁殖起来,因此往往存在发酵时间长且肥效低等问题<sup>[2]</sup>。人工接种外来菌剂是加快堆肥腐熟过程的有效措施<sup>[3]</sup>。目前,国内外评价农作物秸秆堆肥进程的研究主要集中在微生物量<sup>[4]</sup>、有机碳<sup>[5]</sup>、离子交换量(CEC)<sup>[6]</sup>、荧光素二乙酸酯(FDA)<sup>[7]</sup>以及添加畜禽粪便调节C/N等方面<sup>[8]</sup>。冯宏等<sup>[9]</sup>使用 BIOLOG-GN 板研究了接种微生物菌剂对堆肥微生物碳源利用能力及堆肥不同阶段微生物的多样性和群落均匀度的影响,结果表明,接种菌剂可以提高堆体中微生物的多样性,加快堆腐进程。郁红艳等<sup>[10]</sup>以稻草和蔬菜叶为堆腐材料,使用 BIOLOG-GN2 板研究了不同堆腐时期堆体中细菌的群落变化,认为微生物在堆腐过程中起着重要的分解者角色。黄懿梅等<sup>[11]</sup>以新鲜牛粪和玉米秸秆为堆腐原料,并添加果园土壤(含有大量微生物),在强制通风静态堆肥反应器中进行堆腐实验,研究堆腐过程中氮素的转化规律。Ouwkerk 等<sup>[12]</sup>研究认为,链霉菌(*Streptomyces thermovulgaris*)是堆肥过程中的优势放线菌,大部分有嗜热性,为堆肥高温阶段的主要微生物类群。但是,关于接种链霉菌对小麦秸秆堆腐过程中堆体微生物群落结构和酶活性的研究鲜见报道。为此,本试验研究了接种链霉菌对小麦秸秆堆肥过程中微生物群落和水解酶活性的影响,以期链霉菌在小麦秸秆资源化利用中的应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验所用材料为小麦秸秆和链霉菌菌剂,小麦秸秆的粗有机物、有机碳、全磷、全氮和全钾含量分别为 937.50, 298.40, 1.32, 7.10 和 11.30 g/kg。链霉菌菌株分离自小麦堆肥前期堆体,经 16SrDNA

序列分析,与 GenBank 中菌株代号为 Z68094 的菌株相似程度达到 99.0%,生物学特性检测表现出很强的木聚糖酶和氧化酶活性。

### 1.2 试验设计

链霉菌用摇床振荡(140 r/min)培养 7 d 后,扩繁菌种培养基为:大豆粉 20.0 g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6.0 g、蛋白胨 3.0 g、葡萄糖 20.0 g、酵母粉 6.0 g、NaCl 2.0 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.60 g、CaCO<sub>3</sub> 2.0 g、蒸馏水 1 000 mL。将小麦秸秆切成 4~6 cm 小段后加水,使堆料含水量为 60%~65%。试验共设 2 个处理,即接种微生物菌剂(+M)和不添加菌剂(-M)处理。+M 处理按照菌料质量比 1:120 添加链霉菌菌剂,与小麦秸秆均匀混合进行堆腐。分别于堆腐后第 0,3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,35 和 40 天在堆肥装置中部采集样品,用于蔗糖酶和蛋白酶活性测定。同时在堆肥前期(3 d)、中期(21 d)和后期(40 d)取样,在 48 h 内测定微生物数量和细菌群落功能多样性,重复 3 次。

### 1.3 测定项目和方法

1.3.1 微生物数量 参考文献<sup>[13]</sup>,采用稀释涂布平板法测定细菌、真菌和放线菌数量。

1.3.2 细菌群落的功能多样性 采用 BIOLOG 方法,称取 2.0 g 堆体材料放入盛有 90 mL 8.5 g/L NaCl 无菌溶液的三角瓶中,180 r/min 摇床震荡 25 min。采用 10 倍稀释法,用 8.5 g/L NaCl 无菌溶液将其稀释为 10<sup>-3</sup> 倍。在超净工作台上,接种微生物悬浮液于 ECO 微平板中,每孔 150 μL。将接种的 ECO 板装入聚乙烯袋中,于(25±1) °C 下暗箱培养 240 h,期间每隔 12 h 用 ELISA 反应微平板读数器在 590 nm 读数 1 次<sup>[14]</sup>。ECO 板中有 31 种单一碳源,每种单一碳源重复 3 次,计算细菌总代谢活性(AWCD)和 Shannon 指数(H)。AWCD =  $\sum (C_x - R) / 31$ 。式中:C<sub>x</sub> 为各反应孔在 590 nm 下的光密度值;R 为对照孔的光密度值。H =  $-\sum P_x \times \ln P_x$ 。式中:P<sub>x</sub> =  $(C_x - R) / \sum (C_x - R)$ 。用碳源代谢孔的数目(AWCD > 0.2 则代表该孔碳源被利用)来表示群落丰富度指数(S)<sup>[14]</sup>。

1.3.3 酶活性 水解酶活性的测定参照关松荫<sup>[15]</sup>的方法进行。蔗糖酶活性的测定:利用 3,5-二硝基水杨酸比色法测定葡萄糖生成量以表征蔗糖酶活

性,酶活性单位用“mg/(g·h)”表示。蛋白酶活性的测定:利用茚三酮比色法测定氨基酸生成量以表征蛋白酶活性,活性单位用“mg/(g·h)”表示。每个试验处理均设置以蒸馏水代替基质的对照组,每处理 3 次重复。

#### 1.4 数据处理

试验数据采用 Excel(V2003)、SAS(V8.1) 和 SPSS(V12.0)软件进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 堆肥过程中堆体微生物数量的变化

链霉菌对不同堆肥时期堆体微生物数量与组成

表 1 链霉菌对不同堆肥时期堆体微生物数量与组成的影响

Table 1 Effects of *Streptomyces thermovulgaris* on the number of soil microorganisms in different composting processes

处理 Treatment	堆肥阶段 Composting stage	细菌/(10 <sup>5</sup> ·g <sup>-1</sup> ) Bacteria	真菌/(10 <sup>2</sup> ·g <sup>-1</sup> ) Fungi	放线菌/(10 <sup>4</sup> ·g <sup>-1</sup> ) Actinomycetes
-M	前期 Earlier	422±23 a	59±5 a	34±3 a
	中期 Middle	250±31 c	52±6 a	16±1 c
	后期 Latter	313±18 b	42±12 a	29±5 b
+M	前期 Earlier	545±42 a	56±11 A	38±2 a
	中期 Middle	416±27 b	43±13 B	18±1 c
	后期 Latter	501±13 a	28±9 C	31±4 b

注:同一处理同列数据后标不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ ),标不同大写字母表示差异极显著( $P<0.01$ )。下表同,

Note:The different small letters in each column represent statistical significance at 0.05 level. The different big letters in each column represent statistical significance at 0.01 level. The same as below.

### 2.2 堆肥过程中堆体细菌群落功能多样性的变化

由表 2 可见,接种链霉菌后,堆体细菌总代谢活性明显升高,中期的细菌总代谢活性极显著低于前期和后期。-M 处理的细菌丰富度指数差异不显著( $P>0.05$ ),这可能是由于堆肥过程中起作用的为特定细菌类群,如对温度不敏感的细菌类群;但接

菌后,堆体中细菌多样性增加,丰富度指数增大,且 +M 处理堆肥前期、中期和后期的细菌群落丰富度指数差异极显著( $P<0.01$ )。接种链霉菌后堆体细菌群落的 Shannon 指数增加,+M 处理中期的 Shannon 指数是 -M 处理的 2.45 倍。

表 2 链霉菌对不同堆肥期堆体细菌群落功能多样性的影响

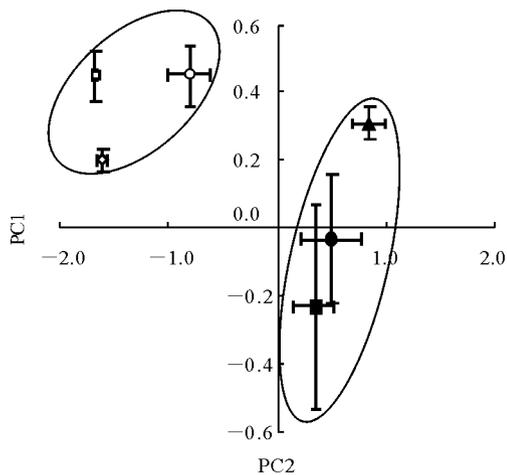
Table 2 Effects of *Streptomyces thermovulgaris* on the bacteria community functional diversity in different composting processes

处理 Treatment	堆肥阶段 Composting stage	细菌总代谢活性 AWCD	丰富度指数 S	Shannon 指数 H
-M	前期 Earlier	0.53±0.04 a	16±0.14 a	2.37±0.29 a
	中期 Middle	0.43±0.12 b	14±0.14 a	1.21±0.07 b
	后期 Latter	0.45±0.05 ab	15±0.14 a	2.07±0.21 ab
+M	前期 Earlier	0.79±0.09 A	27±0.08 A	3.45±0.16 a
	中期 Middle	0.45±0.29 C	15±0.14 C	2.97±0.29 b
	后期 Latter	0.66±0.02 B	20±0.22 B	3.51±0.49 a

采用 SPSS 12.0 软件对 BIOLOG 数据进行主成分分析(PCA),从中提取可以聚集单一碳源变量的数据变异(累积方差贡献率)为 81.79% 的前 2 个主成分 PC1(50.72%)、PC2(31.07%),分析 2 个处理堆体中细菌群落功能多样性的变化,结果见图 1。由图 1 可见,+M 和 -M 处理在主成分坐标体系中的分布差异十分明显。PC1 的方差贡献率最大,可以将 +M 和 -M 处理区分开,PC1 典型变量值差异

极显著( $F=18.72, P<0.01$ ),在堆肥前期、中期和后期,+M 处理分布在 PC1 的正端,而 -M 处理分布在 PC1 的负端。说明接菌后,堆体的细菌群落多样性发生了变化。同时,+M 处理不同堆肥时期的细菌群落结构也发生了变化,PC2 典型变量值差异也达到极显著水平( $F=21.54, P<0.01$ ),PC2 可将 +M 处理的前期、中期和后期很好地区分开来,前期 +M 处在 PC2 的最负端,中期处在 PC2 的最正

端,后期处在 PC2 的“0”点附近。在整个堆肥时期, -M 处理堆体细菌群落结构典型变量值的变异(离散)很小,而 +M 处理的变异较大。



◇ -M 处理前期 Earlier(-M) □ -M 处理中期 Middle(-M)  
○ -M 处理后期 Latter(-M) ■ +M 处理前期 Earlier(+M)  
▲ +M 处理中期 Middle(+M) ● +M 处理后期 Latter(+M)

图 1 不同处理堆体中细菌群落的主成分分析

Fig. 1 Principal component analysis of bacteria communities in composting process for different treatments

### 2.3 堆肥过程中堆体水解酶活性的变化

2.3.1 蔗糖酶活性 由图 2 可见,堆肥前期(0~3 d), 2 个处理的蔗糖酶活性急剧升高,在第 3 天达到峰值,酶活性分别为 699.74 和 548.74 mg/(g·h), +M 处理较 -M 处理高出 27.52%。随着堆肥时间的延

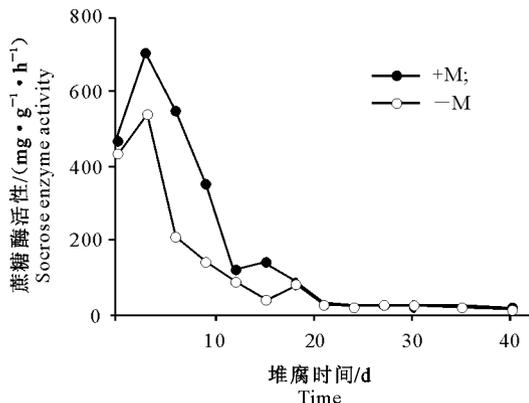


图 2 堆肥过程中蔗糖酶活性的变化

Fig. 2 Changes of sucrose enzyme activity during composting

长,蔗糖酶活性降低,21 d 后,2 个处理蔗糖酶活性均小于 30.00 mg/(g·h)。这可能是由于后期微生物可利用底物减少所致<sup>[16]</sup>。可见,添加链霉菌菌剂可以提高堆肥前期和中期堆体中蔗糖酶的活性,加速腐殖化进程。整个堆腐过程中,+M 和 -M 处理蔗糖酶活性的平均值分别为(198.88±48.82)和(132.53±11.12) mg/(g·h),+M 处理较 -M 处理高 50.07%。

对堆肥时间(x)与酶活性(y)进行拟合,得 +M 处理 x 与 y 的关系为: $y = 6.4447x^2 - 142.13x + 787.74, R^2 = 0.8557$ ; -M 处理 x 与 y 的关系为: $y = 6.2767x^2 - 122.68x + 595.82, R^2 = 0.8540$ 。

2.3.2 蛋白酶活性 由图 3 可见,堆肥前期(0~3 d), 2 个处理蛋白酶活性均急剧升高,在第 3 天达到最高峰值,分别为 629.74 和 648.75 mg/(g·h); 3 d 后,2 个处理蛋白酶活性均下降。整个堆腐过程中,+M 和 -M 处理蛋白酶活性的平均值分别为(188.42±48.82)和(154.91±11.12) mg/(g·h),前者较后者高 21.63%。

对整个堆腐过程中堆肥时间(x)与酶活性(y)进行拟合,可得 +M 处理 x 与 y 的关系为: $y = 6.3948x^2 - 139.36x + 761.07, R^2 = 0.8668$ ; -M 处理 x 与 y 的关系为: $y = 7.9481x^2 - 154.59x + 736.32, R^2 = 0.8736$ 。可见,添加链霉菌菌剂可以提高堆体过程前期和中期的蛋白酶活性。

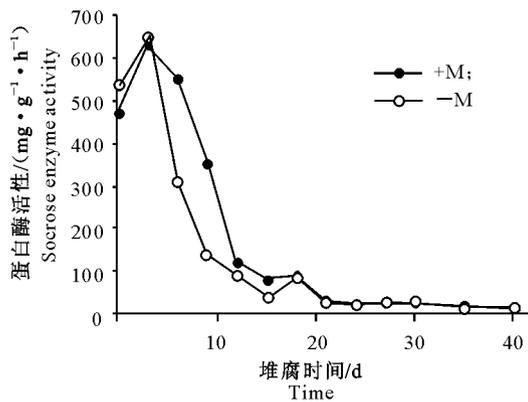


图 3 堆肥过程中蛋白酶活性的变化

Fig. 3 Changes of protein enzyme activity during composting

## 3 讨论

堆肥过程中细菌总数量呈高-低-高的变化趋势;真菌数在整个堆肥过程中一直呈下降趋势;而放线菌数变化规律与细菌非常相似,也呈高-低-高的变化趋势。说明腐熟后的堆肥腐殖质含量丰富,C/N 低,细菌、放线菌含量很高。

郁红艳等<sup>[10]</sup>研究认为,利用 BIOLOG-ECO 板研究农业废弃物堆腐过程中微生物群落结构的变化,能得到更为全面的微生物群落结构变化信息。本研究选用 ECO 板,这种类型的板包含 31 种与微生物代谢相关的碳源,部分是植物根系的分泌物,并且在每块 ECO 板上每种碳源有 3 次重复,可以减少接种液浓度不同造成的误差。本研究结果表明,

接种微生物菌剂可以提高堆腐初期微生物总的代谢活性,随着堆腐时间的延长,微生物代谢活性降低,这与郁红艳等<sup>[10]</sup>的研究结果相似,可能是由于堆体中的营养物质随着时间的延长被微生物所消耗,以及产生了某些生长抑制物质所致。郁红艳等<sup>[10]</sup>研究认为,堆肥初期细菌生长快、群落丰富。随着堆制的进行,其平均活性逐渐下降。在整个堆肥时期,不接菌处理堆体细菌群落结构典型变量值的变异(离散)很小,而接菌的变异较大。说明接种链霉菌,使堆体中细菌群落结构发生变异,而且群落结构稳定性降低<sup>[14]</sup>。

本研究采用 BIOLOG 法研究堆体微生物群落变化,并采用多元统计学方法——主成分分析法(PCA)解释 BIOLOG 数据,取得了理想的结果。虽然该方法有一定的局限性,如接种密度的影响,但是选用合适的板可以降低误差。因此,笔者认为,可以用 BIOLOG 法来评价堆腐过程中微生物群落的多样性变化。

#### [参考文献]

- [1] 牛俊玲,高军侠,李彦明,等.堆肥过程中的微生物研究进展[J].中国生态农业学报,2007,15(6):185-189.  
Niu J L, Gao J X, Li Y M, et al. Evaluation of the role of microorganisms in composting [J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2007, 15(6): 185-189. (in Chinese)
- [2] 黄丹莲,曾光明,黄国和,等.微生物接种技术应用于堆肥化中的研究进展[J].微生物学杂志,2005,25(2):60-64.  
Huang D L, Zeng G M, Huang G H, et al. Advance in the applications of microbial inoculation technology in composting [J]. Journal of Microbiology, 2005, 25(2): 60-64. (in Chinese)
- [3] 徐智,汤利,李少明,等.两种微生物菌剂对西番莲果渣高温堆肥腐熟进程的影响[J].应用生态学报,2007,18(6):1270-1274.  
Xu Z, Tang L, Li S M, et al. Effects of two microbial agents on high temperature composting of passion fruit marc [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2007, 18(6): 1270-1274. (in Chinese)
- [4] Gaind S, Pandey A K, Lata. Biodegradation study of crop residues as affected by exogenous inorganic nitrogen and fungal inoculants [J]. Journal of Basic Microbiology, 2005, 45(4): 301-311.
- [5] Tuomela M, Vikman M, Hatakka A, et al. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review [J]. Bioresource Technology, 2000, 72(2): 169-183.
- [6] Saharinen M H, Vuorinen A H, Kostikka M. Effective cation exchange capacity of manure compost of varying stages determined by the saturation-displacement method [J]. Communication in Soil Science and Plant Analysis, 1996, 27(15/17): 2917-2923.

- [7] Cayuela M L, Mondini C, Sánchez-Monedero M A, et al. Chemical properties and hydrolytic enzyme activities for the characterizations of two-phase olive mill wastes composting [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(10): 4255-4262.
- [8] 石其伟,刘强,荣湘民,等.不同微生物菌剂对水稻秸秆发酵效果的影响[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2006,32(3):264-268.  
Shi Q W, Liu Q, Rong X M, et al. Effects of different microbial agents on fermentation of rice straw in composting [J]. Journal of Hunan Agricultural University: Natural Sciences, 2006, 32(3): 264-268. (in Chinese)
- [9] 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[J].华南农业大学学报,2005,26(4):19-22.  
Feng H, Zhang X M, Li H X, et al. Effect of microbial inoculants on capability of utilizing carbon sources by microbes in compost [J]. Journal of South China Agricultural University, 2005, 26(4): 19-22. (in Chinese)
- [10] 郁红艳,曾光明,习兴梅,等.蔬菜-秸秆废物堆肥化中细菌群落变化研究[J].微生物学报,2007,47(2):98-102.  
Yu H Y, Zeng G M, Xi X M, et al. Analysis of bacterial communities in vegetable and straw wastes composting by Biolog method [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2007, 47(2): 98-102. (in Chinese)
- [11] 黄懿梅,苟春林,梁军峰.两种添加剂对牛粪秸秆堆肥化中氮素损失的控制效果探讨[J].农业环境科学学报,2008,27(3):1219-1225.  
Huang Y M, Gou C L, Liang J F. Effect of two amendments on nitrogen loss from composting of cattle manure and corn straw [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2008, 27(3): 1219-1225. (in Chinese)
- [12] Ouwerkerk D, Klieve A V. Bacterial diversity with in feed lot-manure [J]. Anaerobe, 2001, 7(2): 59-66.
- [13] 沈萍,范秀容,李广武.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,1999:49-57.  
Shen P, Fan X R, Li G W. Experiment of Microbiology [M]. Beijing: Higher Education Press, 1999: 49-57. (in Chinese)
- [14] 张海涵,唐明,陈辉,等.不同生态条件下油松(*Pinus tabulaeformis*)菌根根际土壤微生物群落[J].生态学报,2007,27(12):5463-5470.  
Zhang H H, Tang M, Chen H, et al. Microbial communities in *Pinus tabulaeformis* mycorrhizosphere under different ecological conditions [J]. Acta Ecologica Sinica, 2007, 27(12): 5463-5470. (in Chinese)
- [15] 关松荫.土壤酶及其研究法[M].北京:农业出版社,1983:260-339.  
Guan S Y. Soil enzyme and research method [M]. Beijing: Agricultural Press, 1983: 260-339. (in Chinese)
- [16] Benitez E, Nogales R, Elvira C, et al. Enzyme activities as indicators of the stabilization of sewage sludges composting with *Eisenia foetida* [J]. Bioresource Technology, 1999, 67(3): 297-303.