

脂肪酸生物标记法研究零排放猪舍 基质垫层微生物群落多样性

刘 波¹, 郑雪芳¹, 朱昌雄², 蓝江林¹, 林营志¹, 林 斌³, 叶耀辉⁴

(1. 福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福州 350003; 2. 中国农业科学院环境与可持续发展研究所, 北京 100081

3. 福建省农业科学院农业工程研究所, 福州 350003; 4. 福建省宁德地区农科所, 宁德 355003)

摘要:用微生物群落脂肪酸生物标记总量,分析零排放猪舍基质垫层微生物群落的数量变化,日本洛东微生物菌种处理组和零排放 I 号菌种处理组各层微生物脂肪酸生物标记含量变化趋势相近。基质垫层微生物群落脂肪酸生物标记检测出 37 个生物标记,构成微生物群落的指纹图谱,含量最高的前 4 个生物标记为:细菌 16:00 含量为 431260,细菌 18:1 ω 9c 含量为 413075,厌氧细菌 18:1 ω 7c 含量为 101368,耗氧细菌 i15:0 含量为 90328。不同的生物标记多样性指数在基质垫层不同层次分布不同,可作为衡量特定微生物生物标记功能的一个指标。通过基质垫层微生物脂肪酸生物标记特征指数 B 的分析,提出了微生物群落分布的特征指标,生物标记特征指数 B 越高,表明微生物群落中的细菌和真菌含量越高,有利于基质垫层分解粪便排泄物,可作为基质垫层微生物群落变化优劣的特征性指标;通过基质垫层耗氧细菌和厌氧细菌脂肪酸生物标记含量比值,构建发酵指数 F,作为基质垫层发酵特性的指标,发酵指数 F 越高,表明耗氧细菌起的作用越大,反之,耗氧细菌起的作用越小,生物标记的发酵指数可以作为研究粪便排泄物的微生物分解过程的指数。

关键词:零排放猪舍;基质垫层;磷脂脂肪酸(PLFAs)

文章编号:1000-0933(2008)11-5488-11 中图分类号:Q143 文献标识码:A

The diversity of PLFAs biomarkers for the microbial community in the stroma cushion of non-pollution pigsty

LIU Bo¹, ZHENG Xue-Fang¹, ZHU Chang-Xiong², LAN Jiang-Lin¹, LIN Ying-Zhi¹, LIN Bin³, YE Yao-Hui⁴

1 Agricultural Bio-Resources Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China

2 Institute of Environment and Sustainable Development in Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

3 Agricultural Engineering Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China

4 Fujian Ningde Agricultural Research Institute, Fujian Ningde 355003, China

Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(11): 5488 ~ 5498.

Abstract: The PLFAs biomarkers were introduced into analyzing the The diversity of PLFAs biomarkers for the microbial community in the stroma cushion of non-pollution pigsty. The microbial strains of LUODON and LPF #1 were used to treat the stroma cushion in the non-pollution pigsty. The results showed that the efficiency of fomentation on the pig effluent by the two strains were similar. 37 of PLFAs biomarkers were detected out by the MIDI microbial identify system, which

基金项目:国家水体污染控制与治理科技重大专项资助项目(2008ZX07425-002);福建省财政专项资助项目——福建省农业科学院科技创新团队建设基金(STIF-Y03);福建省发展和改革委员会饲用益生菌产业化技术研究资助项目

收稿日期:2008-05-16; **修订日期:**2008-09-24

作者简介:刘波(1957~),男,福建惠安人,博士,研究员,主要从事微生物生物技术和生物防治研究. E-mail: fzliubo@163.com

Foundation item: The project was financially supported by National Key Technology R&D Program (No. 2008ZX07425-002); Financial Department of Fujian Government-Science; Technology Innovation Foundation of FAAS(No. STIF-Y03), Probiotics R&D project of Fujian Provincial Development and Reform committee

Received date:2008-05-16; **Accepted date:**2008-09-24

Biography: LIU Bo, Ph. D., Professor, mainly engaged in microbial biotechnology and biocontrol. E-mail: fzliubo@163.com

constructed the finger printing of the microbial community in the stroma cushion in the non-pollution pigsty. The four most high of PLFAs were the bacterium biomarker of 16:00 with 431260, bacterium biomarker of 18:1 ω 9c with 413075, the anaerobic bacterium biomarker of 18:1 ω 7c with 101368, the aerobic bacterium of 15:0 with 90328. The different PLFAs biomarkers were distributed in the different layers of stroma cushion with different densities. The new characteristic index (B) of the PLFAs biomarkers was built up as $B = [\text{PLFAs bacterium PLFAs fungus}] / [\text{PLFAs actinomycetes PLFAs protest}]$ to analyze the structure of microbial community. The new fermentation index (F) of the PLFAs biomarkers was built up as $F = [\text{aerobic bacterium PLFAs} / \text{anaerobic bacterium PLFAs}]$ to distinguish the fermentation state in the stroma cushion of pigsty.

Key Words: non-pollution pigsty; stroma cushion; PLFAs

生物发酵舍零排放养猪法是根据微生态理论和生物发酵理论,筛选环境益生菌和饲用益生菌,在猪舍内铺设由谷壳、锯末、米糠等原料组成的基质垫层作为培养基,接种环境益生菌,喂饲用益生菌,猪饲养在上面,其所排出的粪尿在猪舍内经微生物完全发酵迅速降解、消化,从而达到免冲洗猪栏、无臭味、零排放,从源头实现环保、无公害养殖目的。微生物群落在零排放猪舍中起到决定性的作用,然而,基质垫层中的微生物群落动态研究,显得十分的薄弱,一方面是由于许多功能微生物无法人工培养^[1],另一方面,用分离微生物的方法研究微生物群落动态工作量繁重,使得了解微生物实际群落变化比较困难。

脂肪酸生物标记法可以完整检测到样品中微生物群落变化,如真菌、放线菌、耗氧细菌、厌氧细菌等。它的主要原理是不同微生物具有不同的特征脂肪酸^[2]。White 等^[3]最先利用脂肪酸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,脂肪酸生物标记法在堆肥样品、海河沉积物和土壤微生物研究中得到广泛应用^[4~8]。但目前还未见应用于零排放猪舍基质垫层微生物群落的研究。

引入 FAME 谱图分析方法,研究微生物脂肪酸生物标记 (PLFA biomarker) 变化动态,指示微生物群落的变化。FAME 谱图分析方法的原理是基于脂类几乎是所有生物细胞膜的重要组成部分^[9~11],不同微生物体内往往具有不同的磷脂脂肪酸组成和含量水平,其含量和结构具有种属特征或与其分类位置密切相关,能够标识某一类或某种特定微生物的存在^[12],是一类最常见的、有效的生物标记物^[17~19]。但是古生菌不能使用 FAME 谱图进行分析,因为它的极性脂质是以醚而不是酯键的形式出现^[13]。此外,磷脂不能作为细胞的贮存物质,一旦生物细胞死亡,其中的磷脂化合物就会马上消失,因此,磷脂脂肪酸可以代表微生物群落中“存活”的那部分群体^[14~16]。

本研究应用 PLFAs 法分析零排放猪舍基质垫层微生物群落磷脂脂肪酸生物标记特征,并结合 Shannon-Wiener (H_1) 和 Pielou 均匀度 (J) 等测定方法,进行微生物群落脂肪酸生物标记总量的比较、微生物群落脂肪酸生物标记的检测和聚类分析、微生物群落脂肪酸生物标记多样性指数、基质垫层微生物脂肪酸生物标记特征指数 B 的分析,基质垫层耗氧细菌和厌氧细菌脂肪酸生物标记比值发酵指数 F 的分析,揭示养猪粪便排放过程,基质垫层微生物变化的特点,从而了解微生物群落的变化,找出零排放猪舍基质垫层粪便分解功能的微生物指标,作为监控零排放猪舍基质垫层功能发挥的标准。

1 材料与方法

1.1 基质垫层微生物群落取样

零排放猪舍基质垫层微生物群落取样于宁德地区农科所养殖场,基质垫层用日本洛东微生物菌种(福州洛东公司生产)和零排放 I 号菌种(研究者自行研制,凝结芽孢杆菌 LPF#1 菌株 [*Bacillus coagulans* LPF#1], 菌种产品质量孢子 10 亿/ml), 两个栏紧靠着,基质垫层高度 80cm,配方由谷壳 49%、锯末 49%、鲜猪粪 1%、米糠 1% 组成。用处理菌种兑水稀释 1000 倍,加入基质垫层搅拌,使基质垫层水分保持在 45%,堆制发酵 10d,而后摊平养猪,一个垫层可以使用 3a。为了解短期内(1~2 个月内)基质垫层内微生物结构差异,取样分别在前者 60d 和后者 30d 后进行;取样层分为第 1 层(0~20cm)、第 2 层(20~40cm)、第 3 层(40~60cm)、第 4

层(60~80cm);取样方法为五点取样,每层的样本充分混合后取出小样进行微生物群落脂肪酸生物标记分析。

1.2 微生物群落脂肪酸生物标记的检测

PLFAs 的提取方法参考 Frostegard^[20] 和 Kourtev^[21] 略做修改。脂肪酸提取步骤:(1)脂肪酸的释放和甲酯化,取 10g 基质垫料于 50ml 离心管中,加入 20 ml 0.2mol/L 的 KOH 甲醇溶液,斡旋震荡 5min,并于 37℃ 水浴温浴 1h,每 10min 斡旋样品一次。(2)中和溶液 pH 值:加入 3 ml 1.0 mol/L 的醋酸溶液,充分摇匀。(3)脂肪酸的萃取:加入 10 ml 正己烷,充分摇匀,2000r 离心 15min,取上层正己烷相于干净玻璃试管中,吹干,溶剂挥发。(4)在玻璃试管中加入 0.6ml 体积比为 1:1 的正己烷:甲基丁基醚溶液,充分溶解 3~5min,转入 GC 小瓶,用于脂肪酸测定。

样品脂肪酸成份检测及成份分析参照 Margesin 等^[22]。脂肪酸成份检测:用微生物自动分析仪(Sherlock MIS 美国 MIDI 公司生产)分析微生物脂肪酸生物标记,在下述气相色谱条件下平行分析脂肪酸甲酯混合物标样和待检样本:二阶程序升高柱温,170℃ 起始,经 5℃/min 升至 260℃,而后经 40℃/min 升至 310℃,维持 90S;汽化室温度 250℃;检测器温度 300℃;载气为 H₂(2ml/min),进样模式为分流进样,分流比为 100:1;辅助气:Air(350ml/min),H₂(30ml/min);尾吹气为 N₂(30ml/min);柱前压 10.00 psi(1Psi = 6.895kPa);进样量 1μl。脂肪酸成份分析:系统根据各组分保留时间计算等链长(ECL)值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,再将二者与系统谱库中的标准菌株数值匹配计算相似度(similarity index, SI),从而给出一种或几种可能的菌种鉴定结果。一般以最高 SI 的菌种名称作为鉴定结果,但当其报告的几个菌种的 SI 比较接近时,则根据色谱图特征及菌落生长特性进行综合判断。以脂肪酸混合标样校正保留时间。

1.3 微生物群落脂肪酸生物标记总量的比较

将两个微生物菌种处理的基质垫层各层微生物脂肪酸生物标记分别计算总和,以微生物脂肪酸生物标记总和代表微生物群落总量,作图比较不同菌种处理的基质垫层各层微生物群落总量的变化,分析处理的效果。

1.4 微生物群落脂肪酸生物标记的检测

将样本微生物脂肪酸生物标记(PLFAs)分析的结果,以处理层次为指标,以脂肪酸生物标记为样本,构建表格,总体分析各脂肪酸生物标记(PLFAs)在各处理基质垫层中的分布。

1.5 微生物群落脂肪酸生物标记的聚类分析

将样本微生物脂肪酸生物标记(PLFAs)分析的结果,以处理层次为指标,以脂肪酸生物标记为样本,构建矩阵,将数据进行中心化处理,欧氏距离为聚类尺度,用类平均法对数据进行系统聚类,分析各类的特点。

1.6 微生物群落脂肪酸生物标记多样性指数

引入群落生态学 Pielou 均匀度指数(J),对微生物群落脂肪酸生物标记在不同处理各层次分布的均匀度进行分析,均匀度指数越高,表明微生物脂肪酸生物标记(PLFAs)在基质垫层各层次分布的频次较高、含量的分布较为均匀,其计算公式为:

$$J = - \sum P_i \ln P_i / \ln S$$

式中, $P_i = N_i/N$, N_i 为处理 i 种脂肪酸生物标记的含量, N 为试验中脂肪酸生物标记的总含量, S 为脂肪酸生物标记种类总数。

引入群落生态学多样性指数香农-威纳指数(H),对微生物群落脂肪酸生物标记在不同处理各层次分布的多样性指数进行分析,多样性指数高,表明微生物生物标记(PLFAs)在基质垫层各层次分布的总量较高,分布的格局较复杂,Shannon-Wiener 多样性指数(H)的计算公式为:

$$H = - \sum P_i \ln P_i$$

式中, $P_i = N_i/N$, N_i 为处理 i 种脂肪酸生物标记的含量, N 为试验中脂肪酸生物标记的总含量。

1.7 不同基质垫层特征微生物脂肪酸生物标记特征指数(B)的分析

选用微生物脂肪酸生物标记 16:00 代表细菌数量^[23],18:3 ω6c (6,9,12) 代表真菌数量^[23,24],20:4 ω6,

9,12,15c 代表原生生物数量^[23],TBSA 10Me18:0 代表放线菌数量^[25],构建生物标记特征指数,生物标记特征指数(B)公式定义为:

$$\text{生物标记特征指数}(B) = \frac{\text{细菌} \times \text{真菌}}{\text{原生生物} \times \text{放线菌}}$$

特征指数 B 越小,表明细菌和真菌的含量相对较少,比较分析基质垫层各层次微生物分布的情况。

1.8 不同基质垫层耗氧细菌和厌氧细菌脂肪酸生物标记发酵指数(F)的分析

选用微生物脂肪酸生物标记 i17:0 代表耗氧细菌^[24],18:1 ω 7c 代表厌氧细菌^[26,27],计算耗氧细菌/厌氧细菌的比例,构建发酵指数 F ,公式定义为:

$$\text{发酵指数}(F) = \frac{\text{耗氧细菌生物标记}}{\text{厌氧细菌生物标记}}$$

分析基质垫层各层次耗氧细菌和厌氧细菌分布的情况。当发酵指数高时,表明耗氧细菌含量较高,发酵处于耗氧状态,反之,发酵处于厌氧状态。

2 结果

2.1 微生物群落脂肪酸生物标记的比较

试验结果见图 1。各生物标记脂肪酸含量的总和代表着微生物的总量。日本洛东微生物菌种处理组和零排放 I 号菌种处理组各层微生物生物标记脂肪酸含量的总量变化趋势相近,两个处理的第 2 层微生物含量最低,其余较高;日本洛东微生物菌种处理组第 1 层为 268249、第 2 层为 133483、第 3 层为 270406、第 4 层为 271520;零排放 I 号菌种处理组 203721、第 2 层 184572、第 3 层 220481、第 4 层 236522。前者的各层微生物脂肪酸生物标记含量比后者略高,但差异不显著 ($P < 0.05$),表明在短时间内(时间间隔 30d),各层微生物结构具有一定的稳定性。

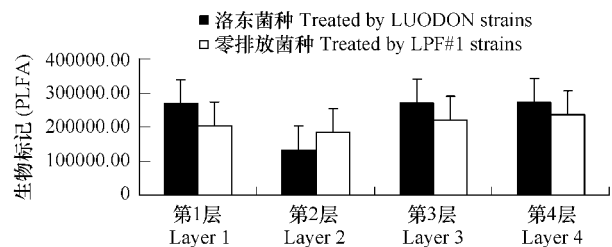


图 1 不同微生物菌种处理组各层脂肪酸生物标记总量变化

Fig. 1 Amounts of PLFAs biomarkers contents in the four layer stroma cushion of non-pollution pigsty treated by two strains

2.2 微生物群落脂肪酸生物标记在基质垫层中的分布

试验结果见表 1。从不同微生物菌种处理组基质垫层的不同层次中分析出 37 个脂肪酸生物标记,指示着不同类群的微生物,包括细菌、真菌、放线菌、原生生物等。不同脂肪酸生物标记在基质垫层的各层次的分部有几种类型:(1)生物标记数量小,在各层中的分布不完全,如 i11:0 3OH 指示着耗氧细菌,数量在 220 以下,在洛东微生物菌种处理组仅分布在第 2 层(20~40cm),其余层次没有分布,零排放 I 号微生物菌种处理组分布在第 1、2、3 层次,第 4 层次没有分布;(2)生物标记数量小,在各层次的分布为完全分布,如 12:00 指示着细菌,数量在 576~1329 之间,在两种微生物菌种处理的基质垫层的各层完全分布;(3)生物标记数量大,在各层次的分布不完全,如 i17:0 3OH 指示着耗氧细菌,数量在 1854~10315 之间,在洛东微生物菌种处理组各层次中仅在第 2、3 层中分布,零排放 I 号微生物菌种处理组各层次中在第 1、3、4 层中分布,第 2 层没有分布;(4)生物标记数量大,在各层次的分布为完全分布,如 18:1 ω 9c 指示着细菌,数量在 31320~107126 之间,在两种微生物菌种处理的基质垫层的各层完全分布。

2.3 微生物群落脂肪酸生物标记的聚类分析

分析结果见图 2。当 $\lambda = 6.791$ 时,可将基质垫层的微生物脂肪酸生物标记分为 3 类,类型 I 中含有脂肪酸生物标记 a15:0(耗氧细菌)、18:00(细菌)、i15:0(耗氧细菌)、i16:0(耗氧细菌)、18:1 ω 7c(厌氧细菌)、16:00(细菌)和 18:1 ω 9c(真菌),其特征为生物标记含量高,数量在 67475~431260 之间,同时在不同层次基质垫层中皆为完全分布、微生物都是细菌;类型 II 中含有脂肪酸生物标记 cy17:0、cy19:0 ω 8c、i17:0 3OH 和 11Me18:1 ω 7c,其特征是生物标记含量中等,cy17:0 和 cy19:0 ω 8c 两种脂肪酸标记在不同层次基质垫层中完全分布,i17:0 3OH 和 11Me18:1 ω 7c 两种脂肪酸标记在不同层次基质垫层中不完全分布;类型 III 为其余的脂

表 1 不同微生物菌种处理组脂肪酸生物标记在各层的分布

Table 1 Distribution of PLFAs biomarkers in the four layer stroma cushion of non-pollution pigsty treated by two strains

序号 No.	生物标记 Biomarker	微生物类型 Microbial group	洛东微生物菌种处理组 Treated by LUODON strains				零排放 I 号微生物菌种 处理组 Treated by LPF#1			
			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	细菌 Bacteria in general	0	220	0	0	149	193	139	0
2	i11:0 3OH	革兰氏阳性性细菌 Gram-positive bacteria	441	0	383	0	365	0	0	609
3	12:00	细菌 Bacteria in general	779	706	781	576	1329	1155	957	968
4	12:0 3OH	革兰氏阳性性细菌 Gram-positive	578	0	547	0	480	421	556	368
5	i13:0	黄杆菌属 <i>Flavobacterium</i>	427	0	366	0	365	263	433	303
6	14:00	细菌 Bacteria in general	3518	1765	3231	2105	3586	3519	3664	3444
7	i14:0	耗氧细菌 Aerobes G +	1826	603	1439	1021	1481	1314	1450	1211
8	a15:0	细菌 Bacteria in general	14518	4483	9568	4518	11092	10810	12235	9268
9	i15:0	细菌 Bacteria in general	15479	5226	12494	8437	12775	11449	13180	11288
10	i15:0 3OH	革兰氏阴性细菌 Gram-negative bacteria	3321	521	3301	1301	2564	3331	2378	2590
11	i15:1 G	细菌 Bacteria in general	1531	0	1343	518	449	531	582	548
12	16:00	假单胞杆菌 <i>Pseudomonas</i> sp.	59261	32378	60500	66735	51235	48358	56178	56615
13	10Me16:0	硫酸盐还原细菌 Sulfate-reducing bacteria	9400	2755	9231	9427	0	0	0	6803
14	a16:0	革兰氏阳性性细菌 Gram-positive bacteria	1041	436	909	743	577	510	1091	1143
15	i16:0	革兰氏阳性性细菌 Gram-positive bacteria	10313	5067	8556	5281	7081	6696	7885	7387
16	16:0 N alcohol	细菌(莫拉菌属 <i>Moraxella</i>)	544	0	646	610	485	738	560	868
17	16:1 ω5c	甲烷氧化菌 Methane-Oxidizing bacterial	1806	0	1665	1985	1232	0	1287	2170
18	16:1 ω9c	革兰氏阴性细菌 Gram-negative bacteria	0	0	1027	0	0	0	756	0
19	17:00	节杆菌属 <i>Arthrobacter</i>	3213	1793	3058	2820	2896	2778	3312	3290
20	10 Me 17:0	放线菌 <i>Actinobacteria</i>	1252	818	1177	565	506	378	543	593
21	a17:0	革兰氏阳性性细菌 Gram-positive bacteria	7216	2461	5027	2967	4855	4753	5438	4715
22	cy17:0	革兰氏阴性细菌 Gram-negative bacteria	5972	2185	4856	2938	5799	4241	5849	5801
23	i17:0	耗氧细菌 Aerobes	4989	1986	4409	2745	3666	3966	4032	3695
24	i17:0 3OH	革兰氏阴性细菌 Gram-negative bacteria	0	1854	10315	0	7664	0	6417	11020
25	17:1 ω8c	革兰氏阴性细菌 Gram-negative bacteria	2375	1104	2399	2779	1839	1471	1813	1908
26	i17:1 ω9c	细菌 Bacteria in general	0	0	0	0	4492	5370	5119	0
27	18:00	嗜热解氢杆菌 <i>Hydrogenobacter</i>	9240	6890	10353	8698	7820	7271	8510	8693
28	i18:0	革兰氏阳性性细菌 Gram-positive bacteria	6078	2794	4850	4271	5174	4367	4408	6332
29	10Me 18:0	放线菌 <i>Actinobacteria</i>	3572	1298	3231	1541	2435	2342	2518	4127
30	11Me 18:1 ω7c	纤维菌属 <i>Cellulomonas</i>	4779	1824	6336	0	0	2428	0	4044
31	18:1 ω7c	厌氧细菌 Anaerobes	16247	6722	16772	13758	11292	12713	12503	11361
32	18:1 ω9c	真菌 Fungi	53113	35554	59259	107126	34982	31320	40981	50740
33	18:3 ω6c (6,9,12)	真菌 Fungi	2252	1512	3047	2010	1817	1691	1916	2222
34	cy19:0ω8c	伯克霍尔德菌 <i>Burkholderia cepacia</i>	11453	6137	11000	11264	8274	6601	8947	7762
35	20:00	细菌 Bacteria in general	1462	1734	1257	1159	1177	1122	1384	1203
36	20:1 ω9c	嗜热解氢杆菌 <i>Hydrogenobacter</i>	710	1291	1147	1181	738	869	0	0
37	20:4 ω6,9, 12,15c	原生生物 Protozoa	9543	1366	5926	2441	3050	1603	3460	3433

i, a, cy 和 Me 分别表示异、反异、环丙基和甲基分支脂肪酸; ω, c 和 t 分别表示脂肪酸端、顺式空间构造和反式空间构造 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

肪酸生物标记, 数量差异较大, 但都在 60000 以下, 在基质垫层中分布的形式多样化, 有完全分布和不完全分布, 微生物中含有细菌、真菌、放线菌、原生生物等。

2.4 微生物群落脂肪酸生物标记多样性指数

试验结果见表 2。基质垫层微生物群落脂肪酸生物标记按照总数量的高低分成 4 个组,即高含量组(67475 ~ 431260)、中含量组(21064 ~ 58266)、低含量组(10145 ~ 19411)、小含量组(701 ~ 7251);生物标记的分布频次从 2 ~ 8,表明生物标记所指示的微生物在不同微生物处理组的各层次的分布差异;生物标记的香农-威纳指数和均匀度指数出现两种状态,一种是香农-威纳指数高,均匀度指数也高,如 a15:0 的香农-威纳指数为 2.9059,均匀度指数为 0.9686,表明生物标记所指示的微生物在基质垫层的各层次数量分布多,同时均匀度好;另一种是香农-威纳指数低,均匀度指数高,如 i17:1 ω9c 香农-威纳指数为 1.5810,均匀度指数为 0.9975,表明生物标记所指示的微生物在基质垫层的各层次数量分布较少,但均匀度较好。

在高含量组中,各脂肪酸生物标记在各层基质垫层中为完全分布,所指示的微生物种类主要是细菌,包括了耗氧菌和厌氧菌;香农-威纳指数(H)大于 2.9581,表明各生物标记分布的多样性指数较高,所指示的微生物在各层中有较好的分布特点,均匀度大于 0.9593,表明生物标记分布的均匀度指数较高,所指示的微生物在各层中分布较为均匀。

在中含量组中,各脂肪酸生物标记在各层基质垫层中有完全分布和不完全分布,所指示的微生物种类有细菌、放线菌和原生生物,香农-威纳指数(H)在 2.1543 ~ 2.9799 之间,表明各生物标记分布的多样性指数较高,但不同的生物标记间差异较大,所指示的微生物在各层中有较好的分布特点,均匀度大于 0.9278,表明生物标记分布的均匀度指数较高,所指示的微生物在各层中分布较为均匀;

在低含量组中,各脂肪酸生物标记在各层基质垫层中有完全分布和不完全分布,所指示的微生物种类有细菌和真菌,香农-威纳指数(H)在 1.5810 ~ 2.9851 之间,表明各生物标记分布的多样性指数较高,但不同的生物标记间差异较大,所指示的微生物在各层中分布数量多少差异较大,均匀度大于 0.9442,表明生物标记分布的均匀度指数较高,所指示的微生物在各层中分布较为均匀;

在小含量组中,各脂肪酸生物标记在各层基质垫层中有完全分布和不完全分布,所指示的微生物种类主要是细菌,香农-威纳指数(H)在 0.9833 ~ 2.9537 之间,表明各生物标记分布的多样性指数差异较大,所指示的微生物在各层中分布数量多少差异较大,均匀度大于 0.9931,表明生物标记分布的均匀度指数较高,所指示的微生物在各层中分布较为均匀。

2.5 不同基质垫层微生物脂肪酸生物标记特征指数 B 的分析

试验结果见表 3。细菌用 16:00 代表,真菌用 18:3 ω6c (6,9,12)代表,原生生物用 20:4 ω6,9,12,15c 代表,放线菌用 TBSA 10Me18:0 代表,分析结果表明,在不同微生物菌种处理的基质垫层的不同层次中,细菌含量 > 原生生物 > 放线菌 > 真菌。从细菌指示生物标记看,不同微生物菌种处理组中,第 3 层 ≈ 第 4 层 > 第 1 层 > 第 2 层。不同的微生物指示生物标记在各层的分布存在显著差异。生物标记特征指数 B 分析结果表明,在洛东微生物菌种处理组中,特征指数 B 的大小顺序为:第 2 层 > 第 3 层 > 第 4 层 > 第 1 层,在零排放 I 号微生物菌种处理组中,特征指数 B 的大小顺序为:第 1 层 > 第 3 层 > 第 2 层 > 第 4 层;特征指数 B 越大,表明指

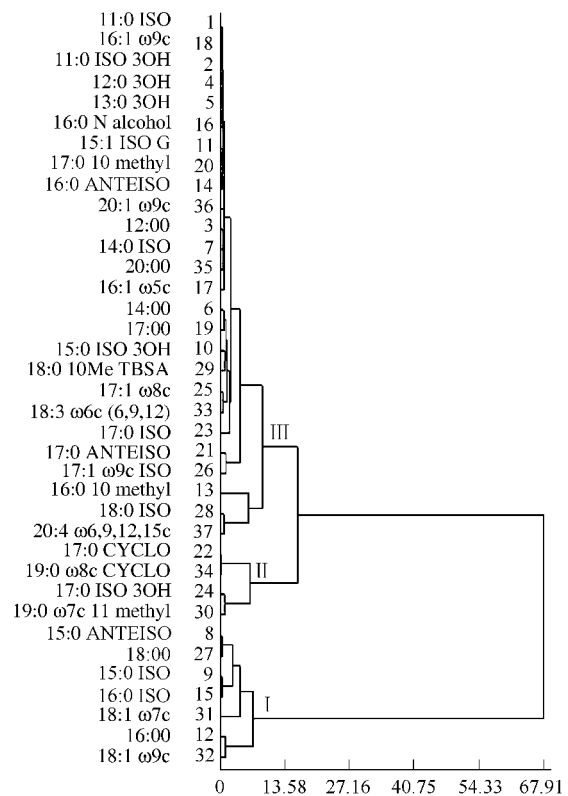


图 2 基质垫层微生物群落脂肪酸生物标记的聚类分析
Fig. 2 Cluster analysis of PLFAs biomarkers for the microbial community in the stroma cushion of non-pollution pigsty

示细菌和真菌的生物标记含量越高。

表 2 基质垫层微生物群落脂肪酸生物标记多样性指数

Table 2 The diversity index of the PLFAs biomarkers of the microbial community in the stroma cushion of non-pollution pigsty

序号 No.	类型 Type	脂肪酸生物标记 PLFAs biomarkers	频次 Freq	脂肪酸总量 PLFAs total value	SHANNON (<i>H</i>)	均匀度(<i>J</i>) Evenness(<i>J</i>)
12	生物标记高含量组	16:00	8	431260	2.9747	0.9916
32	High PLFAs	18:1 ω9c	8	413075	2.8780	0.9593
31	value group	18:1 ω7c	8	101368	2.9581	0.9860
9		i15:0	8	90328	2.9451	0.9817
8		a15:0	8	76492	2.9059	0.9686
34		cy19:0ω8c	8	71438	2.9644	0.9881
27		18:00	8	67475	2.9892	0.9964
15	生物标记中含量组	i16:0	8	58266	2.9654	0.9885
28	Middling PLFAs	i18:0	8	38274	2.9640	0.9880
22	value group	cy17:0	8	37641	2.9319	0.9773
13		10Me16:0	5	37616	2.2201	0.9561
21		a17:0	8	37432	2.9360	0.9787
24		i17:0 3OH	5	37270	2.1543	0.9278
37		20:4 ω6,9,12,15c	8	30822	2.7290	0.9097
23		i17:0	8	29488	2.9558	0.9853
6		14:00	8	24832	2.9604	0.9868
19		17:00	8	23160	2.9799	0.9933
29		10Me18:0 TBSA	8	21064	2.9120	0.9707
30	生物标记低含量组	11Me18:1 ω7c	5	19411	2.1923	0.9442
10	Low PLFAs	i15:0 3OH	8	19307	2.8604	0.9535
33	value group	18:3 ω6c (6,9,12)	8	16467	2.9687	0.9896
25		17:1 ω8c	8	15688	2.9506	0.9835
26		i17:1 ω9c	3	14981	1.5810	0.9975
35		20:00	8	10498	2.9851	0.9950
7		i14:0	8	10345	2.9455	0.9818
17		16:1 ω5c	6	10145	2.5548	0.9883
3	生物标记小含量组	12:00	8	7251	2.9537	0.9846
14	Min PLFAs value	a16:0	8	6450	2.9220	0.9740
36	group	20:1 ω9c	6	5936	2.5466	0.9852
20		10Me17:0	8	5832	2.8823	0.9608
11		i15:1 G	7	5502	2.6259	0.9354
16		16:0 N alcohol	7	4451	2.7822	0.9910
4		12:0 3OH	6	2950	2.5670	0.9931
5		i13:0	6	2157	2.5635	0.9917
2		i11:0 3OH	4	1798	1.9686	0.9843
18		16:1 ω9c	2	1783	0.9833	0.9833
1		i11:0	4	701	1.9748	0.9874

2.6 不同基质垫层耗氧细菌和厌氧细菌脂肪酸生物标记发酵指数 *F* 的分析

试验结果见表 4 和图 3。从表 4 可知,不同处理方法的基质垫层耗氧细菌和厌氧细菌脂肪酸生物标记在各层次的分布差异显著,总体上厌氧细菌指示生物标记数量大于耗氧细菌。洛东微生物菌种处理组处理的时间较久大约两个月,零排放 I 号微生物菌种处理组时间较短仅一个月,从总体上看,不同微生物处理方法相应层次,时间长的指示细菌生物标记含量比时间短的来的略高,如洛东微生物菌种处理组细菌生物标记总量第

1 层为 21236、第 2 层为 8708、第 3 层为 21181、第 4 层为 16503, 零排放 I 号微生物菌种处理组细菌生物标记总量第 1 层为 14958、第 2 层为 16679、第 3 层为 16535、第 4 层为 15056。

表 3 基质垫层特征微生物群落脂肪酸生物标记含量的比较

Table 3 PLFAs biomarks content of the representative microbial community in the stroma cushion of non-pollution pigsty

脂肪酸生物标记 PLFAs biomarks	微生物种类型 Microbial group	洛东微生物菌种处理组 Treated by LUODON strains				零排放 I 号微生物菌种处理组 Treated by LPF#1			
		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
16:00	细菌 Bacteria in general	59261	32378	60500	66735	51235	48358	56178	56615
18:3 ω 6c (6,9,12)	真菌 Fungi	2252	1512	3047	2010	1817	1691	1916	2222
20:4 ω 6,9,12,15c	原生动物 Protozoa	9543	1366	5926	2441	3050	1603	3460	3433
TBSA 10Me18:0	放线菌 Actinomycetes	3572	1298	3231	1541	2435	2342	2518	4127
生物标记特征指数 B PLFAs biomarks characteristic index B		3.9650	27.6106	9.6278	7.0056	12.5349	11.0106	12.3546	8.8790

表 4 不同基质垫层耗氧细菌和厌氧细菌脂肪酸生物标记的比例

Table 4 The proportion of aerobic bacterium PLFAs and anaerobic bacterium PLFAs in different stroma cushion

脂肪酸生物标记 PLFAs biomarks	洛东微生物菌种处理组 Treated by LUODON strain				零排放 I 号微生物菌种处理组 Treated by LPF#1 strain			
	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
i17:0 耗氧细菌 i17:0 Aerobes	4989	1986	4409	2745	3666	3966	4032	3695
18:1 ω 7c 厌氧细菌 18:1 ω 7c Anaerobes	16247	6722	16772	13758	11292	12713	12503	11361
细菌生物标记总量 PLFAs total value	21236	8708	21181	16503	14958	16679	16535	15056

发酵指数 F 表明了耗氧细菌和厌氧细菌的比例, 发酵指数越大, 耗氧菌含量越多, 厌氧发酵的水平较低。从发酵指数 F 的变化看, 不同的处理时间, 发酵指数 F 变化规律不同, 发酵时间长的, 发酵指数 F 随着层次的增加而减小, 发酵时间短的, 发酵指数 F 的变化不明显。各层洛东微生物菌种处理组处理的时间较长约两个月, 发酵指数 F 随着层次的增加而下降, 第 1 层为 0.3070、第 2 层为 0.2954、第 3 层为 0.2628、第 4 层为 0.1995, 零排放 I 号微生物菌种处理组处理的时间较短约 1 个月, 发酵指数 F 在第 1~2 层次中与前者相比较

变化不大 ($P > 0.05$), 第 1 层为 0.3246, 第 2 层为 0.3119; 在第 3~4 层与前者相比有较大差异 ($P < 0.05$), 第 3 层为 0.3224, 第 4 层为 0.3252, 表明相差 30d, 洛东微生物菌种处理组在基质垫层第 3~4 层厌氧细菌含量高于零排放 I 号微生物菌种处理组。

3 讨论

零排放猪舍基质垫层微生物群落脂肪酸生物标记多样性分析, 从微生物群落脂肪酸生物标记总量的比较、微生物群落脂肪酸生物标记的检测和聚类分析、微生物群落脂肪酸生物标记多样性指数、基质垫层微生物脂肪酸生物标记特征指数 B 的分析, 基质垫层耗氧细菌和厌氧细菌脂肪酸生物标记发酵指数 F 的分析, 揭示养猪粪便排放过程, 基质垫层微生物变化的特点, 从而了解微生物群落的变化, 找出零排放猪舍基质垫层粪便分解功能的微生物指标, 作为监控零排放猪舍基质垫层功能发挥的指标。尽管零排放猪舍基质垫层的研究很多, 但是, 采用脂肪酸生物标记研究微生物群落的未见报道。研究结果表明, 用微生物脂肪酸生物标记, 分析零排放猪舍基质垫层微生物群落变化规律, 方法可行, 指标灵敏。从试验采用的两种微生物菌种处理组看, 除

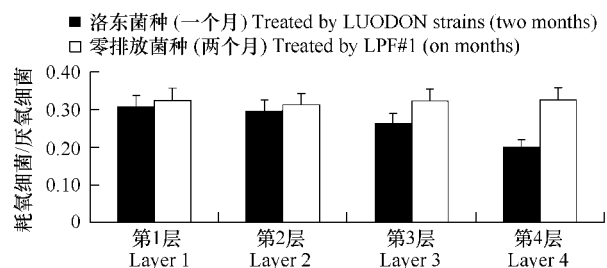


图 3 不同微生物菌种处理组发酵指数 F 的变化

Fig 3 Change of fermentation index (F) with two different strains treating

了时间差异造成的微生物群落的差异,其他差异不大,两个菌种都能很好地发挥零排放猪舍基质垫层分解粪便排泄物的功能。

通过微生物群落脂肪酸生物标记总量的比较,表征了基质垫层微生物脂肪酸生物标记数量变化;通过微生物群落脂肪酸生物标记的检测和聚类分析,检测到微生物脂肪酸生物标记 37 种,代表了不同类型的微生物,有细菌、真菌、放线菌和原生生物;聚类分析结果将具有完全分布特性的,同时含量高的生物标记聚成一类,他们成为分解粪便排泄物的主要微生物的指示生物标记。通过微生物群落脂肪酸生物标记多样性指数的分析,可以看到不同的微生物生物标记,在基质垫层不同层次分布的多样性不同,提示了不同的微生物在不同的时间和层次内发挥的作用不同,可作为衡量特定微生物生物标记功能的一个指标;通过基质垫层微生物脂肪酸生物标记特征指数 B 的分析,提出了微生物群落分布的特征指标,生物标记特征指数越高,表明微生物群落中的细菌和真菌含量越高,有利于基质垫层分解粪便排泄物,可作为基质垫层微生物群落变化优劣的特征性指标;粪便排泄物的微生物分解过程包含着耗氧和厌氧发酵过程,通过基质垫层耗氧细菌和厌氧细菌脂肪酸生物标记发酵指数 F 的分析,揭示了基质垫层发酵特性,发酵指数 F 越高,表明耗氧细菌起的作用越大,厌氧细菌越小,反之,发酵指数 F 越小,厌氧细菌起的作用越大,耗氧细菌起的作用越小,生物标记的发酵指数可以作为研究粪便排泄物的微生物分解过程的指数。

微生物脂肪酸生物标记,指示着微生物群落,不同的微生物种类可以有不同的生物标记,相同的微生物种类的不同种下分类阶元也有不同的生物标记,同一个生物标记,可以存在不同的微生物中,一组微生物脂肪酸生物标记,相当于微生物群落的指纹图谱而相互区别^[28,29]。本研究提供了零排放猪舍基质垫层微生物群落的分析手段,关于零排放猪舍基质垫层生物标记多样性、生物标记特征指数 B 、生物标记发酵指数 F 的变化规律,有待于进一步研究。

不同微生物的脂肪酸在组成和含量上有较大差异,它和微生物的遗传变异、耐药性等有极为密切的关系。大多数革兰氏阳性菌(G^+)中支链 C15:0 脂肪酸丰度很高^[30],而在大多数革兰氏阴性菌(G^-)菌中 C16:0 丰度较高。一些细菌如考克斯氏体属、土拉弗朗西丝菌属、假单孢菌属和结核分枝杆菌属细菌有其特殊的脂类,可经磷脂脂肪酸分析实现鉴定。短链脂肪酸已经用于厌氧细菌的鉴定^[31]。Dubey 等成功的测定了分枝杆菌属 4 株菌的脂肪酸,确定其主要由 16 种脂肪酸组成,并分析了它们之间的差异^[32]。

根据微生物细胞脂肪酸的组成,一般可通过单次实验比较准确的将微生物鉴定到种,但是脂肪酸是一种可随着培养条件变化而发生改变的细胞组分,并且气相色谱、质谱等是高精密度的分析仪器,因此,分析过程的条件选择和质量控制则显得非常重要,必须对培养基成分、微生物培养条件、微生物纯化、菌龄、色谱条件等实验条件进行标准化,否则会严重影响方法的准确度和重复性^[33]。目前已有一种商业化的微生物 FAME 气相色谱分析系统,即 Sherlock MIS 微生物鉴定系统(美国 MIDI 公司开发),Sherlock MIS 微生物鉴定系统从微生物的培养、菌落的收集、微生物细胞皂化释放脂肪酸、脂肪酸甲基化、脂肪酸甲酯的萃取和洗涤,到最后的鉴定、结果的判断都有一套完整的标准化程序,可以避免上述不利条件的影响。Sherlock MIS 微生物鉴定系统具有分析周期短、操作简单、准确度高等优点,目前国内外已有将 Sherlock MIS 应用于微生物鉴定和脂肪酸生物标记研究的文献报道^[31,32]。

4 结论

(1)用微生物群落脂肪酸生物标记总量,分析零排放猪舍基质垫层微生物群落数量变化,思路可行,方法简便,可靠性高。

(2)基质垫层微生物群落脂肪酸生物标记检测出 37 个生物标记,构成微生物群落的指纹图谱,不同的生物标记多样性指数在基质垫层不同层次分布的多样性指数不同,可作为衡量特定微生物生物标记功能的一个指标。

(3)通过基质垫层微生物脂肪酸生物标记特征指数 B 的分析,提出了微生物群落分布的特征指标,生物标记特征指数 B 越高,表明微生物群落中的细菌和真菌含量越高,有利于基质垫层分解粪便排泄物,可作为

基质垫层微生物群落变化优劣的特征性指标,

(4)通过基质垫层耗氧细菌和厌氧细菌脂肪酸生物标记发酵指数 F 的分析,揭示了基质垫层发酵特性,发酵指数 F 越高,表明耗氧细菌起的作用越大,厌氧细菌越小,反之,发酵指数 F 越小,厌氧细菌起的作用越大,耗氧细菌起的作用越小,生物标记的发酵指数可以作为研究粪便排泄物的微生物分解过程的指数。

References:

- [1] Zhang H X, Wang X Y, Qi H, *et al.* Development in research methods of microbial ecology. *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23(5):988—995.
- [2] Tunlid A, White D C. Biochemical analysis of biomass, community structure, nutritional status, and metabolic activity of microbial community in soil. In: Stotzky G, Bollag J M eds. *Soil biochemistry*. New York: Dekker, 1991. 229—262.
- [3] White D C, Davis W M, Nickels J S, *et al.* Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate. *Oecologia*, 1979, 40: 51—62
- [4] Medeiros P M, Fernandes M F, Dick R P, *et al.* Seasonal variations in sugar contents and microbial community in a ryegrass soil. *Chemosphere*, 2006, 65(5):832—839.
- [5] Hackl E, Pfeffer M, Donat C, *et al.* Composition of the microbial communities in the mineral soil under different types of natural forest. *Soil Biology & Biochemistry*, 2005, 37(4):661—671.
- [6] Puglisi E, Nicelli M, Capri E, *et al.* A soil alteration index based on phospholipids fatty acid. *Chemosphere*, 2005, 6(11):1548—1557.
- [7] Syakti A D, Mazzella N, Nerini D, *et al.* Phospholipid fatty acid of a marine sedimentary microbial community in a laboratory microcosm: response to petroleum hydrocarbon contamination. *Organic Geochemistry*, 2006, 37(11):1617—1628.
- [8] VanderGheynst J S, Lei F. Microbial community structure dynamics during aerated and mixed composting. *Transactions of the ASAE*, 2003, 46(2): 577—584.
- [9] Vestal J R, White D C. Lipid analysis in microbial ecology: Quantitative approaches to the study of microbial communities. *Bioscience*, 1989, 39: 535—541.
- [10] Liu B R, Jia G M, Chen J, *et al.* A review of methods for studying microbial diversity in soils. *Pedosphere*, 2006, 16(1):18—24.
- [11] Jennifer M, Fraterrigo, Teri C, *et al.* Microbial community variation and its relationship with nitrogen mineralization in historically altered forests. *Ecology*, 2006, 87(3): 570—579.
- [12] Steger K, Jarvis A, Smårs S, *et al.* Comparison of signature lipid methods to determine microbial community structure in compost. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 55(2): 371—82.
- [13] Masood A, Stark K D, Salem N Jr, *et al.* A simplified and efficient method for the analysis of fatty acid methyl esters suitable for large clinical studies. *J Lipid Res*, 2005, 46(10): 2299—305.
- [14] Webster G, Watt L C, Rinna J, *et al.* A comparison of stable-isotope probing of DNA and phospholipid fatty acids to study prokaryotic functional diversity in sulfate-reducing marine sediment enrichment slurries. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(9): 1575—89.
- [15] Neufeld J D, Dumont M, Vohra J, *et al.* Methodological considerations for the use of stable isotope probing in microbial ecology. *Microbial Ecology*, 2007, 53(3): 435—42.
- [16] Winding A, Hund-Rinke K, Rutgers M. The use of microorganisms in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2005, 62(2): 230—48.
- [17] Ponder F Jr, Tados M. Phospholipid fatty acids in forest soil four years after organic matter removal and soil compaction. *Applied soil Ecology*, 2002, 19:173—182.
- [18] Zelles L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterization of microbial communities in soil: A review. *Biology Fertility of Soils*, 1999, 29:111—129.
- [19] Torneman N, Yang X, Bengtsson G, *et al.* Spatial Covariation of Microbial Community Composition and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Concentration in a Creosote Polluted Soil. *Environ Toxicol Chem*, 2007.
- [20] Frostegård A, Tunlid A, Baat I E. Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59:3605—617.
- [21] Kourtev P S, Ehrenfeld J G, Hggelom M. Exotic plant species alter the microbial community structure and function in the soil. *Ecology*, 2002, 83(11):3152—3166.
- [22] Margesin R M. Hammerle, *et al.* Microbial activity and community composition during bioremediation of diesel-oil-contaminated soil: effects of hydrocarbon concentration, fertilizers, and incubation time. *Microb Ecol*, 2007, 53(2): 259—69.
- [23] White D C, Stair J O, Ringelberg D B. Quantitative comparisons of *in situ* microbial biodiversity by signature biomarker analysis. *J. Ind.*

- Microbiol, 1996, 17: 185 — 196.
- [24] Wilkinson S, Anderson J, Scardelis S, *et al.* PLFA profiles of microbial communities in decomposing conifer litters subject to moisture stress. *Soil Biol. Biochem*, 2002, 34: 189 — 200.
- [25] Baath E, Anderson T H. Comparison of soil fungal/bacteria ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques. *Soil Biol Biochem*, 2003, 35: 955 — 963.
- [26] Borga P, Nilsson M, Tunlid A. Bacterial communities in peat in relation to botanical composition as revealed by phospholipid fatty acid analysis. *Soil Biol Biochem*, 1994, 26: 841 — 848.
- [27] Zelles L. Phospholipid fatty acid profiles in selected members of soil microbial communities. *Chemosphere*, 1997, 35: 275 — 294.
- [28] Crossman Z M, Ineson P, Evershed R P. The use of C-13 labelling of bacterial lipids in the characterization of ambient methane-oxidising bacteria in soils. *Organic Geochem*, 2005, 36(5): 769 — 778.
- [29] Tunlid A, Hoitink H A J, Low C, *et al.* Characterization of bacteria that suppress *Rhizoctonia* damping-off in bark compos media by analysis of fatty acid biomarkers. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 55: 1368 — 1374.
- [30] Juneja V K, Foglia T A, Marmer B S. Heat resistance and fatty acid composition of *Listeria monocytogenes*; effect of pH, acidulant, and growth temperature. *Journal of Food Protection*, 1998, 61(6): 683 — 687.
- [31] Demoling A L, Bååth E. Use of pollution-induced community tolerance of the bacterial community to detect phenol toxicity in soil. *Environ Toxicol Chem*, 2007, 10: 1.
- [32] Dubey S K, Tripathi A K, Upadhyay S N. Exploration of soil bacterial communities for their potential as bioresource. *Bioresour Technol*, 2006, 97(17): 2217 — 2224.
- [33] Muller K D, Weischer T, Schettler D, *et al.* Characterization of the periodontal microflora by the fatty acid profile of the broth grown microbial population. *Zentralbl Bakteriell*, 1998, 288(4): 441 — 449.

参考文献:

- [1] 张洪勋, 王晓谊, 齐鸿雁, 等. 微生物生态学研究方法进展. *生态学报*, 2003, 23(5): 988 ~ 995.