

doi:10.11937/bfyy.20180049

果园枝条堆肥细菌群落多样性分析

李 磊¹, 闫 敏², 赵 佳³, 聂园军⁴

(1. 山西省农业科学研究院 园艺研究所, 山西 太原 030031; 2. 山西省农业科学研究院 农业环境与资源研究所, 山西 太原 030031; 3. 山西省农业科学研究院 生物研究中心, 山西 太原 030031; 4. 山西省农业科学研究院 农业资源与经济研究所, 山西 太原 030031)

摘 要:以果园枝条、新鲜羊粪为试材,采用添加外源发酵剂的方法进行堆肥处理,利用第二代高通量测序技术研究了堆肥过程中细菌群落的变化情况,以期为果园枝条废弃物的资源化循环利用提供参考依据。结果表明:12个样本共得到722 931条高质量序列,测序深度可以真实体现所取样本中的细菌群落多样性。堆肥不同时间段的细菌群落结构差异显著,发酵剂细菌群落多样性最小,所含种属最少;添加发酵剂后可显著改变堆肥的细菌群落多样性,发酵过程中芽孢杆菌和放线菌成为优势菌群,为果枝有机肥在后续施用过程中发挥促生作用奠定了基础。

关键词:堆肥;发酵;细菌群落;高通量测序

中图分类号:S 141.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2018)21-0043-06

我国现有果园面积约1 033万hm²,以修剪枝条4 500 kg·hm⁻²计算,年修剪枝条量高达约4 650万t^[1]。修剪枝条的开发利用亟待解决,其

资源化利用具有明显的经济效益和社会效益^[2]。由于果树枝条中含有大量的木质素和纤维素等难降解物质,抑制堆肥的腐熟,造成堆肥周期长、生物学效应低、堆肥腐熟不完全以及堆肥质量较差等问题^[3-5]。添加适合的发酵剂可有效提高果枝堆肥发酵效率,促进堆肥快速腐熟^[6]。近年来,关于果园枝条废弃物堆肥方面的研究逐渐成为热点,刘佳等^[7]研究不同堆肥条件对园林有机碳物质的影响,结果表明调节碳氮比、翻堆次数可以加速木质素、纤维素等有机碳物质的降解,有利于在堆肥后期形成腐殖质类物质,提高腐熟程度。这些研究多集中在有机质、氮、磷、钾等营养成分的

第一作者简介:李磊(1973-),男,本科,副研究员,现主要从事植物营养学与土壤改良等研究工作。E-mail: tfsllilei@163.com.

责任作者:闫敏(1975-),女,硕士,副研究员,现主要从事分子生物学及微生物与植物营养等研究工作。E-mail: ymrice@163.com.

基金项目:国家重点研发计划资助项目(2016YFD0201133);山西“农谷”研发专项资助项目(YCX2017D2209)。

收稿日期:2018-02-24

ketones. Among them, the content of esters was the highest, the content of acetic acid, octyl ester, Butanoic acid, 3-methyl-, ethyl ester, Pentanoic acid, ethyl ester were higher. and the aroma quality of the blueberry varieties with esters as the main volatile component was more significant. The volatile components of different blueberry groups had significant difference. The low-bush blueberry detected a total of 27 kinds of volatile components, their contents and types were higher than those of halfhigh-bush blueberry. There were also significant differences among different blueberry cultivars. ‘Emil’ was the highest, with 27 volatile components detected, with a total content of 4 519.44 ng·g⁻¹, and ‘Fundy’ detected was the least, which total content was 628.03 ng·g⁻¹.

Keywords: blueberry; volatile component; CG-MS; HS-SPME

变化上,而对堆肥过程中细菌群落的动态变化的报道却很少。

经过多年试验,山西省农业科学院生物技术研究中心开发出一种适合果枝堆肥的发酵剂(专利公开号 CN103740611A),可快速腐熟果枝堆肥。该研究基于 Illumina Miseq 平台的高通量测序技术,分析果枝堆肥过程中细菌群落多样性的变化情况^[8],以为果园枝条废弃物的资源化循环利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

果枝:修剪后废弃的苹果树枝,经粉碎过 10 目筛备用。

羊粪:未腐熟的新鲜羊粪。

堆肥发酵剂:由山西省农业科学院生物技术研究中心提供(专利公开号 CN103740611A)。

试剂和仪器:E. Z. N. A. Soil DNA Isolation kit 试剂盒、琼脂糖试剂盒、DNA 检测试剂盒(Qubit 2.0),上海派森诺生物科技有限公司。电泳仪(DYY-6C),北京六一仪器厂;凝胶成像仪(BG-gdsAUTO),北京百晶生物科技有限公司;Illumina Miseq 平台测序,上海派森诺生物科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 试验设计

2017 年 5 月在山西省农业科学院晋中市东阳基地进行堆肥试验,堆肥比例为果枝:羊粪=1:2(v:v),发酵剂添加量为 0.3%。试验有 3 次重复,每次重复为 30 m³ 果枝和羊粪翻匀后调整含水量至 60%,堆成下宽 2 m、上宽 0.5 m、高 1 m 的梯形垛进行发酵,发酵时间 20 d。

1.2.2 样本采集

取发酵剂(SC)100 g,重复 3 次共 3 个样本,4℃保存备用。果枝、羊粪堆肥的每个重复按未加发酵剂的起始堆肥(M)、发酵 1 d(FS)和发酵 20 d 完成腐熟(CF)这 3 个时间点取样,每个时间点取样按堆顶、堆芯和堆底进行“S”取样,每个样本 100 g,共取 5 个样本,4℃条件下带回实验室,将 5 个样本混匀后称取 100 g 为 1 个混合样本。

3 组重复试验,每组 3 个时间点共制备 9 个混合样本 4℃保存。

1.2.3 DNA 提取、PCR 扩增和高通量测序

利用 E. Z. N. A. Soil DNA Isolation kit (OMEGA, BIO-TEK, USA) 试剂盒提取 12 个样本 DNA^[9]。对细菌 16S rDNA 基因 V3-V4 高变区进行 PCR 扩增,引物序列:341F (CCTACGGGNGGCWGCAG) 和 805R (GACTACHVGGGTATCTAATCC)^[10]。扩增反应程序:94℃预变性 5 min;30 个循环(94℃ 45 s;55℃ 30 s(16S)/58.5℃ 45 s(18S);72℃ 1 min);72℃ 5 min^[11]。对 PCR 产物进行琼脂糖电泳,并采用琼脂糖试剂盒回收,然后用 Qubit 2.0 DNA 检测试剂盒对回收的 DNA 精确定量,每个处理 DNA 量取 10 ng,最后按 1:1 等量混合后采用 Illumina Miseq 平台进行测序^[12]。

1.2.4 生物信息学分析

利用 Fast QC 软件对测序原始数据进行质量控制,然后拼接、过滤掉低质量的序列,而后基于这些高质量序列进行可操作分类单元(Operational taxonomic units, OTUs)聚类(核苷酸序列相似度大于 97% 的序列作为一个 OTU)和物种分类分析,并将 OTU 和物种注释结合,从而得到每个样本的 OTUs 和每个分类谱系的基本分析结果^[13]。

利用 MOTHUR 软件进行细菌群落的多样性分析,包括覆盖率(Coverage)、辛普森指数(Simpson)、香浓(Shannon)指数、丰富度估计指数(ACE)和潮(Chao1)指数^[14-16]。覆盖率常用来评估克隆文库信息对环境微生物多样性的代表性,覆盖率越高代表性越高;Chao1 指数和 ACE 指数侧重于体现群落丰富度,Chao1 和 ACE 指数越大,表明群落的丰富度越高;Shannon 指数和 Simpson 指数兼顾群落均匀度,越高表明群落的多样性越高。利用 R 软件包绘制各样本属水平聚类热图(Heatmap)。利用 MOTHUR 软件进行细菌微生物群落的 PCA(Principal Component Analysis)分析对各样本进行聚类分析。

1.3 数据分析

试验数据采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析,应用邓肯氏多范围检测法(Duncan's multiple

range tests)进行差异显著性检验^[17]。

2 结果与分析

2.1 测序数据质量控制与 OTU 聚类

原始测序数据通过一系列质量控制及去除嵌合体 and 靶区域外序列,12 个供试样本细菌高质量序列的总数为 722 931。

使用 QIIME 软件,调用 UCLUST 这一序列比对工具,对前述获得的序列按 97% 的序列相似度进行归并和操作分类单元(Operational Taxonomic Units, OTU)划分,并选取每个 OTU 中丰度最高的序列作为该 OTU 的代表序列。随后计算各样本共有 OTU 的数量,并通过 Venn 图直观地呈现不同样本组间共有和独有 OTU 所占的比例。

图 1 中每个椭圆代表一组样本,椭圆间的重叠区域表明样本组间的共有 OTU,每个区块的数字表明该区块所包含的样本组的共有或独有 OTU 数量。果枝羊粪堆肥完成后其样本组(CF)细菌群落 OTUs 与发酵剂(SC)和发酵起始阶段(M,FS)的样本组细菌群落 OTUs 存在显著差异,有 1 156 个 OTUs 为 CF 所特有,而 SC、M 和 FS 的特有 OTUs 分别为 279、382 和 507。

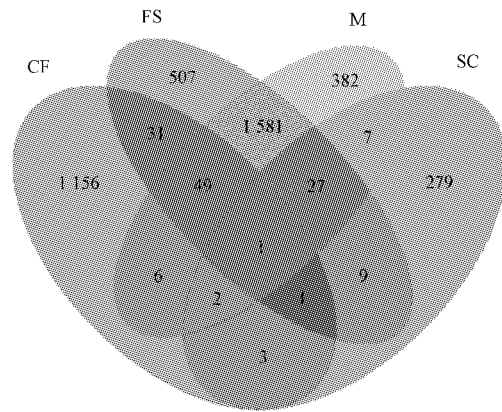


图 1 OTUs 的韦恩图

Fig. 1 The Venn map of OTUs

2.2 不同样本多样性分析

多样性指数分析表明,各样本覆盖率为 89%~95%,说明所测序深度可以真实体现所取样本中的细菌群落多样性。由表 1 可知,发酵剂样本组(SC)细菌群落的 4 种多样性指数均为最低;果枝有机肥堆肥发酵 1 d 后(FS)样本组细菌群落多样性略高于发酵开始前(M),但二者差异不显著;发酵完成后(CF)果枝有机肥细菌群落 4 种多样性指数显著下降。

表 1 不同样本中细菌多样性指数

Table 1 Bacterial diversity index of different samples

样本 Sample	覆盖率 Coverage rate/%	潮指数 Chao1	丰富度估计指数 ACE	辛普森指数 Simpson	香浓指数 Shannon
SC	91	273.61±0.34c	284.94±0.38c	0.37±0.05c	2.09±0.62c
M	89	1 408.00±0.89a	1 399.84±0.51a	0.98±0.11a	7.24±0.38a
FS	92	1 432.92±1.12a	1 560.42±0.99a	0.99±0.09a	8.42±0.75a
CF	95	917.78±0.66b	967.15±0.14b	0.87±0.06b	5.43±0.21b

注:数据为平均数±标准差。同列不同小写字母表示邓肯氏多范围检测法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。

Note: Data are mean±SD. Different lowercase letters in the same column indicate significant difference at 0.05 level by Duncan's multiple range test.

2.3 样本属水平聚类热图

将 12 个样本先按照彼此之间组成的相似度进行聚类,根据聚类结果横向依次排列。同理,细菌群落属水平物种也按照彼此在不同样本中分布的相似度进行聚类,根据聚类结果纵向依次排列,红色代表在对应样本中丰度较高的属,绿色代表丰度较低的属。由图 2 可知,4 个样本组在聚类过

程中各自分开。其中,SC 样本组在属水平上 *Wautersiella*、*Paenibacillus*、*Comamonas*、*Escherichia*、*Pseudomonas*、*Sphingobacterium* 和 *Acinetobacter* 的相对丰度较高;M 与 FS 样本组之间差异不显著;CF 与其它 3 个样本组差异均显著,在属水平上 *Bacillus*、*Marinimicrobium*、*Glycomyces*、*Virgibacillus*、*Yaniella* 与 *Georgenia* 相对丰度较高。

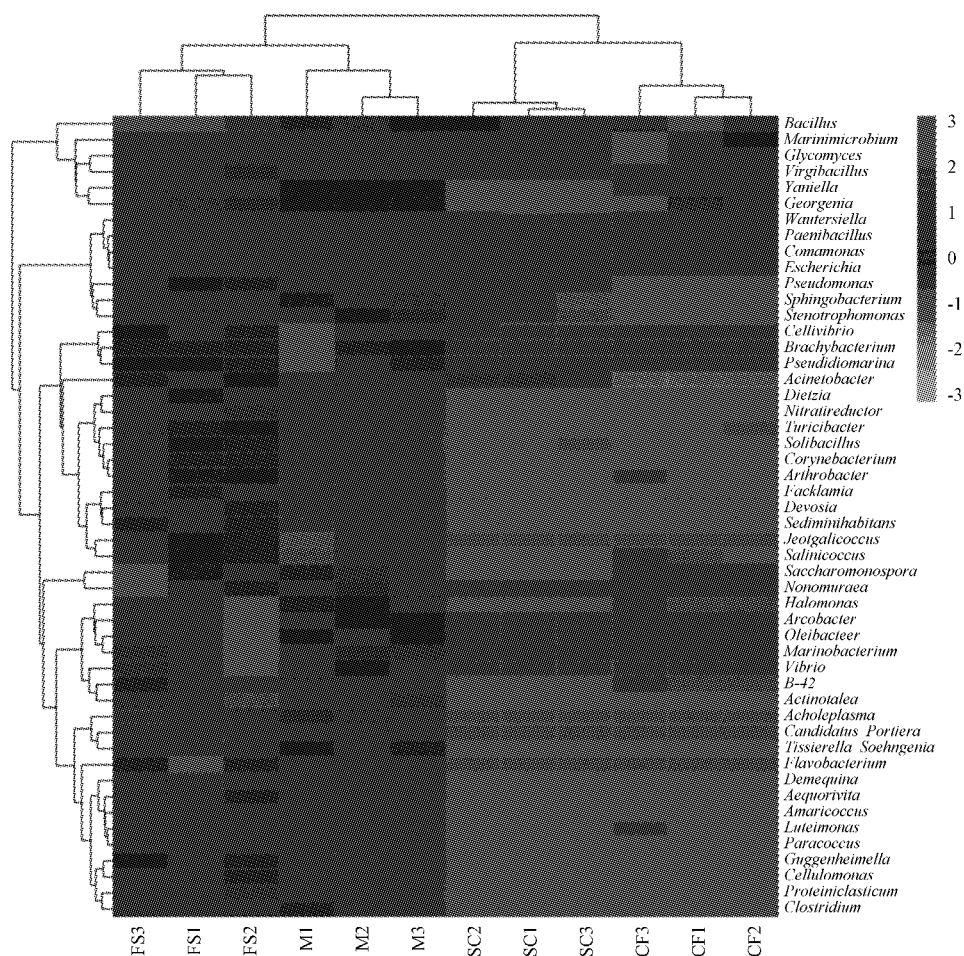


图2 样本间聚类热图

Fig. 2 Clustering heatmap of different samples

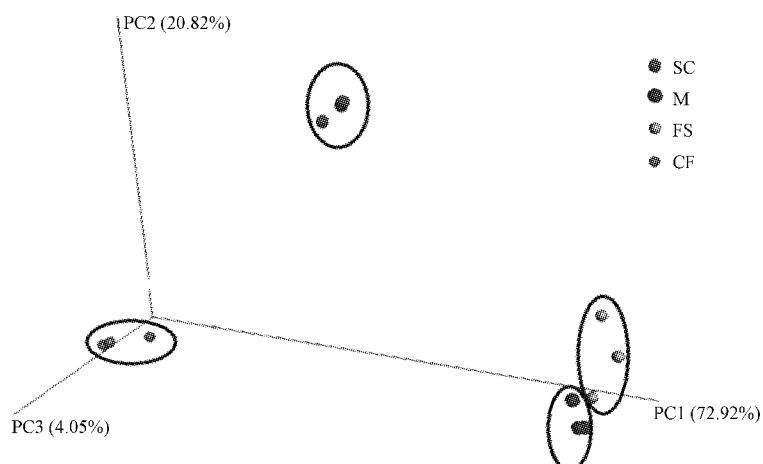


图3 样本间 PCA 分析

Fig. 3 PCA of different samples

2.4 样本间主成分分析

PCA 分析能够从原始数据中提取样品间最主要的差异特征,并根据这些差异特征将样本在新的低维坐标系中依次排序,使得样品在新坐标系中的距离远近能最大程度上还原样本间的实际差异。PCA 分析图中主成分 1(PC1)可以解释所有变量方差 72.92%;主成分 2(PC2)可以解释所有变量方差 20.82%;主成分 3(PC3)可以解释所有变量方差 4.05%。由图 3 可知,每个样本组的 3 个重复均各自聚类在一起,而 4 个样本组各自分开,说明各样本组在发酵过程中细菌群落结构发生改变,差异显著。

3 讨论

果枝配合农家肥进行堆肥发酵制成果枝有机肥,具有清洁、环保、低成本的优点,可实现果园枝条废弃物的资源化循环利用^[18]。果枝与农家肥混合堆肥实质是细菌发酵的过程,相对于自然发酵,添加发酵剂可提高堆肥效率,达到快速腐熟的目的^[19]。

该研究利用第二代高通量技术分析了堆肥过程中细菌群落的变化情况。12 个供试样本共得到 722 931 条高质量序列,样本覆盖率均达 89% 以上,说明测序深度足以反应样本的细菌群落多样性。OTU 划分后的样本间聚类(Venn 图)可以看出 4 个样本组间存在差异,其中发酵剂(SC)与不同堆肥时间点的 3 个样本组共有 OTU 最少,仅 37 个,差异最明显;未加发酵剂的混合料(M)与发酵 1 d(FS)的样本组间共有 OTU 最多,达 1 658 个,而发酵完成(CF)样本组与二者的共有 OTU 仅有 50 个。这说明添加发酵剂后,果枝堆肥发酵使得底物中的细菌群落发生巨大改变,显示其与自然发酵的差异。

细菌群落多样性指数结合样本属水平聚类分析表明,堆肥发酵剂由于只有人工添加的几种菌属(*Paenibacillus*、*Comamonas*、*Pseudomonas* 和 *Acinetobacter* 等),其多样性指数最低;而未加发酵剂的果枝堆肥在自然状态下多样性显著高于发酵剂;添加发酵剂的初始阶段,由于新的菌群加入,整个果枝堆肥的多样性略有升高,但差异不显著;待发酵完成后,果枝堆肥中细菌群落多样性发

生显著改变,原先在群落中占优势地位的 *Nitratireductor*、*Solibacillus*、*Arthrobacter*、*Amaricoccus* 和 *Paracoccus* 等属在发酵过程中迅速消亡,而 *Bacillus*、*Marinimicrobium*、*Glycomyces*、*Virgibacillus*、*Yaniella* 与 *Georgenia* 等属的细菌占据优势地位,这些属当中除了 *Bacillus* 外其余均属于放线菌,说明果枝堆肥经过高温阶段后芽孢杆菌与放线菌耐高温菌优势明显,而这二者又是著名的植物促生功能菌。冯红梅等^[20]也报道了类似结果。结合样本间的 PCA 分析可知,添加了具有自主知识产权的发酵剂后,果枝堆肥中的细菌群落发生巨大改变,4 个样本组各自聚在一起彼此间差异显著,发酵过程中生存能力更强的植物促生功能菌芽孢杆菌和放线菌成为优势菌群,为果枝有机肥在后续施用过程中发挥促生作用奠定了基础。

该研究为果园枝条废弃物的资源化循环利用提供了思路。在今后的研究中,应进一步缩短采样时间间隔,从而更加精确的分析果枝堆肥过程中细菌群落的动态变化,从而为果枝的肥料化应用提供参考依据。

参考文献

- [1] 刘进,杨成发,于方雷.果树枝条粉碎物快速发酵堆肥技术[J].果树实用技术与信息,2015(8):21-23.
- [2] 吴卫红,米锋,张大红,等.园林绿化废弃物资源化利用产业发展模式:以北京市为例[J].世界林业研究,2010,23(5):77-80.
- [3] 倪文清.园林绿化废弃物处理的现状及政策分析[J].现代园艺,2014(12):161.
- [4] 梁金凤,于跃跃,文方芳,等.添加腐熟菌剂对园林绿色废弃物堆肥化效果的影响[J].中国土壤与肥料,2013(6):97-104.
- [5] 李文玉,栾亚宁,孙向阳,等.接种外源微生物菌剂对园林废弃物堆肥腐熟的影响[J].生态学杂志,2014,33(10):2670-2677.
- [6] 王朴,丁昭全,张瑛,等.园林废弃物覆盖对园林土壤理化性质的影响[J].北方园艺,2013(1):70-72.
- [7] 刘佳,李婧男,文科军,等.不同堆肥条件下园林废弃物中有机碳物质的动态变化[J].北方园艺,2012(24):174-178.
- [8] CAPORASO J G, LAUBER C L, WALTERS W A, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011, 108: 4516-4522.
- [9] EDWARDS J, JOHNSON C, SANTOS-MEDELLIN C, et al. Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(8): 911-920.

- [10] 何莉莉,杨慧敏,钟哲科,等. 生物炭对农田土壤细菌群落多样性影响的 PCR-DGGE 分析[J]. 生态学报, 2014, 34(15): 4288-4294.
- [11] 秦杰,姜昕,周晶,等. 长期不同施肥黑土细菌和古菌群落结构及主效影响因子分析[J]. 植物营养与肥料学报, 2015, 21(6): 1590-1598.
- [12] GUO H, MAO Z, JIANG H, et al. Community analysis of plant growth promoting rhizobacteria for apple trees[J]. Crop Prot, 2014, 62: 1-9.
- [13] LI C, LI X, KONG W, et al. Effect of monoculture soybean on soil microbial community in the Northeast China[J]. Plant Soil, 2010, 330: 423-433.
- [14] LI J G, REN G D, JIA Z J, et al. Composition and activity of rhizosphere microbial communities associated with healthy and diseased greenhouse tomatoes[J]. Plant and Soil, 2014, 380(1-2): 337-347.
- [15] LING N. Variation of rhizosphere bacterial community in watermelon continuous mono-cropping soil by long-term application of a novel bioorganic fertilizer[J]. Microbiological Research, 2014, 169: 570-578.
- [16] LIU X, ZHANG S, JIANG Q, et al. Using community analysis to explore bacterial indicators for disease suppression of tobacco bacterial wilt[J]. Scientific Reports, 2016(6): 36773.
- [17] LOZUPONE C, KNIGHT R. UniFrac: A new phylogenetic method for comparing microbial communities[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71: 8228-8235.
- [18] 陈祥,易吉林,包兵,等. 园林植物废弃物堆肥的理化性状及参数研究[J]. 北方园艺, 2010(12): 225-228.
- [19] 李承强,魏源送,范耀波,等. 不同填充料污泥好氧堆肥的性质变化及腐熟度[J]. 环境科学, 2001, 22(3): 60-65.
- [20] 冯红梅,秦永胜,李筱帆,等. 添加菌剂和鸡粪对园林废弃物堆肥效果的影响[J]. 北方园艺, 2015(15): 156-160.

Analysis of Orchard Branches Composting on Soil Bacterial Diversity

LI Lei¹, YAN Min², ZHAO Jia³, NIE Yuanjun⁴

(1. Gardening Research Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan, Shanxi 030031; 2. Institute of Agriculture Environment and Resource Research, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan, Shanxi 030031; 3. Biotechnology Research Center, Shanxi Academy of Agriculture Sciences, Taiyuan, Shanxi 030031; 4. Institute of Agricultural Resources and Economics, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan, Shanxi 030031)

Abstract: To provide the basis for orchard branches waste resource recycling, the branches and fresh manure were used as test materials. The second generation of high-throughput sequencing technologies was used to analysis the bacterial community variation of the compost that adding exogenous starter. The results showed that total 722 931 high quality sequences were got from 12 samples. Sequencing depth could really reflect the sampling of the bacterial community diversity. Significant difference was found in bacterial community structure at different times of the composting and putrefaction. Base on the diversity index and heat map of genera analysis, fermenting agents had minimum bacteria community diversity and genera. The compost's bacterial community was changed because of the fermenting agents, the *Bacillus* and *Actinomycetes* had become advantage groups during the composting and putrefaction, this would promote the growth of plant in future.

Keywords: compost; fermentation; bacterial community; high throughput sequencing