

## 变性梯度凝胶电泳分析草菇培养料二次发酵过程中细菌群落演替

陈长卿<sup>1,2</sup>, 姜云<sup>4</sup>, 孟丽<sup>2</sup>, 李玉<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>吉林农业大学农学院, <sup>2</sup>吉林农业大学教育部食药菌工程研究中心, <sup>3</sup>农业部北方食用菌资源利用重点实验室, <sup>4</sup>吉林农业大学生命科学学院, 长春 130118

**摘要:**【目的】了解草菇以废棉为主要成分的培养料在二次发酵过程中细菌群落结构变化情况, 确定发酵不同阶段的优势菌群, 为能够在分子水平上快速准确地监测发酵过程中菌群动态变化奠定基础。【方法】采用变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 及克隆菌株 16S rDNA 序列分析技术对草菇废棉培养料二次发酵不同阶段的样品中细菌群落结构进行分析。【结果】DGGE 图谱显示, 细菌群落多样性较为丰富, 条带多样性随着发酵进程逐渐降低, 而且在不同阶段中的优势条带及相对丰度在发生着动态的变化。回收克隆的 23 个不同发酵阶段的优势菌株来自于变形菌门、拟杆菌门和厚壁菌门,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -变形菌纲、鞘脂杆菌纲、拟杆菌纲和梭菌纲 6 个菌纲的 11 个属, 其中 19 株克隆菌株为耐热细菌, 在发酵的高温及降温阶段, 丛毛单胞菌属、鞘脂杆菌属、中华根瘤菌属和寡养单胞菌属细菌为优势类群。【结论】草菇废棉培养料二次发酵过程中细菌的群落结构及优势菌群在发生着动态的变化, 尤其是在进入高温期阶段, 优势菌群变化显著。

**关键词:** 草菇, 二次发酵, 细菌群落结构, 16S rDNA-DGGE

**中图分类号:** Q938      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2012) 08-0977-08

草菇 [*Volvariella volvacea* (Bull. ex Fr.) Sing.], 担子菌门 (Basidiomycota), 草菇属 (*Volvariella*) 真菌, 起源于我国广东省韶关南华寺, 距今已有近 300 年的栽培历史。目前中国是草菇最大的生产国和出口国, 产量占到世界总产量的 80% 以上。1971 年, 张树庭首次采用经过二次发酵的废棉栽培草菇并获得成功, 大大提高了产量和生产稳定性, 从而迅速推动了整个草菇产业的发展, 已成为现代草菇工厂化生产的核心技术<sup>[1]</sup>。在发酵过程中, 各种微生物群

落的广泛参与及动态变化起着至关重要的决定性作用, 例如可以促进物质的降解、营养元素的循环转化, 光能热能的转化利用, 提高发酵温度抑制病虫害的发生等。然而关于此发酵过程中微生物的群落结构及其不同阶段优势菌株类群及含量并不明确, 何丽鸿等<sup>[2]</sup>和 AJ Székely 等<sup>[3]</sup>在 2009 年曾分别报道了运用 DGGE 技术对双孢蘑菇主要以麦草和鸡粪为培养料进行二次发酵的过程中细菌群落结构研究, 初步明确了优势细菌类群及变化情况。而关于

**基金项目:** 国家现代农业 (食用菌) 产业技术体系; 吉林农业大学博士科研启动基金项目 (201005); 吉林农业大学博士后基金项目

\* 通信作者。Tel: +86-431-84532989; E-mail: yuli966@126.com

**作者简介:** 陈长卿 (1978-), 黑龙江伊春人, 博士, 讲师, 主要从事微生物群落结构研究。E-mail: ccqjy@163.com

**收稿日期:** 2012-03-27; **修回日期:** 2012-04-22

草菇类似方面的研究在国内外还未见报道。相比双孢菇而言,目前草菇主要以废棉作为培养料,二次发酵处理的时间也相对较短,发酵进程也存在较大差异,这些不同都会对发酵料中的微生物群落结构组成及演替变化规律产生重要影响。此外,目前草菇培养料发酵过程中口传心授式的经验性生产模式也急需准确快速的定性定量检测技术的支持。因此,本研究运用 DGGE 及克隆菌株 16S rDNA 序列分析技术对草菇培养料二次发酵过程中细菌群落开展分子生态学研究,期望明确发酵不同阶段微生物群落的组成及其演替变化情况,为能够准确高效监测发酵过程,解析发酵机制奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品采集:**实验材料取自江苏省丹阳市江南生物科技有限公司草菇生产基地,草菇培养料的配方为100 kg破籽棉加8 kg生石灰。将废棉浸泡在石灰水中充分吸水后起堆,自然堆沤24 h后,将培养料移至菇房中的床架上,关闭门窗开启升温设施,使室温在 50~60℃ 条件下维持6 h左右,然后自然降温,降至35℃时打开门窗,自然通风处理,二次发酵过程结束。在此处理过程中,本研究以温度为标准划分不同的发酵阶段,基本按照处理前、升温期、高温期、持续期和发酵后的过程来确定样品采集的时间及方法。在每个阶段采用多次混合采集样品,样品分为5个处理,分别为A(料温 25.5℃,0 h),B(料温 32.4℃ - 50.3℃,7 h),C(料温 56.7℃,9 h),D(料温 52.0℃ - 40℃,16 h),E(料温 32.6℃,18 h)。采集样品是从距培养料顶端约10 cm处5点采样混合后约300 g,液氮中速冻后于-80℃保存。

**1.1.2 主要仪器和试剂:**引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,Omega 土壤微生物 DNA 提取试剂盒 (Omega Bio-tek, Doraville, GA, USA), dNTP, *Taq* 聚合酶,琼脂糖,5% Goldview 染液,丙稀酰胺,双丙稀酰胺,尿素,甲酰胺等试剂购自长春市金海泰生物有限公司。仪器包括 5810 台式冷冻离心机 (Eppendorf, 德国), PTC-240 PCR 扩增仪 (Bio-Rad, USA), Dcode™ 基因突变检测系统 (Bio-Rad, 美国), SW-CJ-1D 洁净工作台 (江苏苏洁净化设备厂), 凝胶成像系统 (UVI, 英国)。

### 1.2 基因组 DNA 的提取和 PCR 扩增

利用磷酸缓冲液将样品进行预处理<sup>[4]</sup>, 12000 × g 离心10 min后, 弃上清, 保留沉淀物。DNA 提取及纯化采用 Omega 土壤微生物 DNA 提取试剂盒。利用细菌 16S rDNA V3 高变区通用引物 338f (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 518r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') 进行 PCR 扩增, 上游引物 5'端连接 GC 夹板 (CGCCCGCCGCGCGCGCGGCGCGGGCGGGGGCACGGGGGG), 反应体系为, 10 × Buffer (含 2.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub>) 5 μL, dNTP (10 mmol/L) 1 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, *Taq* 酶 1.25 U, 模板 DNA (50 ng/μL) 1.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 补充至 50 μL, 设置阴性对照。反应程序为 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 30 s; 56℃ 退火 60 s; 72℃ 延伸 30 s; 30 个循环, 72℃ 延伸 7 min, 停止于 4℃。取各处理的 PCR 产物 3 μL, 在 1.5% 琼脂糖凝胶上, 5% Goldview 染液, 1 × TAE 缓冲液, 120 V 稳压电泳 30 min, 凝胶成像系统进行检测。

### 1.3 DGGE 电泳及图谱分析

Dcode™ 基因突变检测系统 (Bio-Rad, USA) 对 PCR 产物进行 DGGE 电泳分离。聚丙烯酰胺凝胶 (丙稀酰胺: 双丙稀酰胺 = 37.5:1) 浓度为 8%, 变性剂浓度范围为 30% - 55% (100% 的变性剂为 7 mol/L 尿素, 40% 甲酰胺), 180 V 电压下, 60℃ 恒温, 1 × TAE 缓冲液电泳 4.0 h, 上样量为 PCR 产物 400 ng。电泳结束后, SYBR Green I 染色 30 min, 在凝胶成像系统中拍照。采用 Quantity One 2.0 软件 (Bio-Rad, USA) 对 DGGE 图谱进行自动分析, 确定样品电泳条带的多少和相对丰度值。

### 1.4 DGGE 条带回收和序列系统发育分析

选取各处理中优势条带 (编号如图 1) 进行产物回收, 以此为模板 2 次 PCR 扩增, 扩增引物及条件同 1.2 所述, 将 PCR 产物连接到 pUCm-T 载体并转化大肠杆菌感受态细胞、蓝白斑阳性筛选挑取白色菌落, 通过菌落 PCR 和酶切验证克隆后, 提取质粒, 交由上海生工生物工程技术服务有限公司测序。将测序结果提交到 GenBank 中进行 Blast 分析比对 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 并采用 MEGA4.0<sup>[5]</sup> 软件中的 Neighbor-Joining (NJ) 方法进行 1000 次 Bootstrap 检验后构建系统发育树, 确定菌株的种类, 提交序列后获得 GenBank 登录号。

2 结果和分析

2.1 DGGE 图谱分析

不同处理样品中的细菌类群 16S rDNA V3 区域的 PCR 片段大小一致, 利用 30% - 55% 的变性梯度电泳将不同细菌类群进行了较好的分离 (图 1), DGGE 图谱经过 Quantity one 2.0 软件处理后得出条带数量、位置和相对丰度值 (图 1, 表 1), 结果显示, 在 34 个位点上共获得 122 个条带, 各处理中的条带数量和相对丰度值存在差异, 处理 A ~ E 中分别获得 31、27、27、22 和 15 个条带, 除条带 1 (A1)、12、13 (A5)、19、23 (C2)、26 (A10)、28 (A11)、32 (A12) 和 34 (C6) 贯穿 5 个处理, 其余条带在各处理中的分布不同, 条带 A4、9、A6、A7、A8、A9、C1 和 29 只是在处理 E 中没有出现; 条带 8、10 和 14 只出现在处理 A 中, 即二次发酵前阶段, 条带 A2、A3、5、B2、A9、22、A11 和 30 则随着二次发酵的进行丰度逐渐减弱或消失, 而条带 B3、C3 和 C5 则随着发酵进行逐渐出现等。各条带的相对丰度值结果显示, 除条带 A1、A5、A10、A11 和 A12 在各处理中相对丰度均较高外, 其它条带在各处理间的丰度值都发生了不同程度的变化。图谱显示, 不同处理中的优势条带 (相对丰度大于 30%) 组成和相对丰度不尽相同, 处理 A 的优势条带包括 A1、A2、A3、A4、A5、A7、A9、A11 和 A12 等, 处理 B 的优势条带包括 A1、A4、A5、A9、A11 和 A12 等, 处理 C 的优势条带包括 A1、A4、A5、A9、C2、C4、A12 和 C5 等, 处理 D 的优势条带包括 A1、A4、D1、A9、B3、C1、C2 和 A10 等, 处理 E 的优势条带包括 A1、A5、C2、A10、C3 和 A12 等。

2.2 目的条带序列测定及聚类分析

将图中各处理中带有标记的优势条带进行回收、克隆并测序后, 共获得序列 23 条, 序列提交到 Genbank 中进行了 Blast 比对分析, 由表 2 可知, 所有序列比对同源性均高于 98%, 其中有 10 条序列为非培养细菌的 16S rDNA V3 区片段, A12、B2 和 D1 3 个克隆菌株为未知细菌。根据构建的系统进化树 (图 2) 分析结果可以看出, A12 与中华根瘤菌属 (*Sinorhizobium*) 的 C5 (JQ070405) 克隆菌株, B2、D1 与鞘脂杆菌属 (*Sphingobacterium*) 的 C3 (EU438982)、C4 (DQ530164) 克隆菌株分别聚为一类, 遗传关系和分类地位接近。因此本研究将 23 个

表 1 不同处理样品中 DGGE 条带的相对含量 (%)

Table 1 The relative intensity of DGGE bands within the different composting samples

Band No.	A	B	C	D	E
1 (A1)	82.55	82.45	81.35	86.13	82.29
2 (A2)	40.56	28.37	16.50	0.00	0.00
3 (A3)	50.58	28.52	0.00	0.00	0.00
4 (A4)	66.28	82.44	80.53	60.69	0.00
5	22.54	26.33	25.58	0.00	0.00
6 (B1)	0.00	26.58	0.00	0.00	0.00
7 (D1)	12.85	11.59	17.29	46.75	0.00
8	23.64	0.00	0.00	0.00	0.00
9	28.56	17.57	24.57	23.52	0.00
10	14.54	0.00	0.00	0.00	0.00
11 (B2)	23.48	21.22	15.82	0.00	0.00
12	15.64	27.56	25.61	28.98	13.48
13 (A5)	57.52	53.58	62.53	36.67	52.75
14	26.66	0.00	0.00	0.00	0.00
15 (A6)	25.78	27.59	29.35	21.86	0.00
16 (A7)	32.4	24.53	27.54	22.52	0.00
17 (A8)	26.50	25.37	23.50	21.54	0.00
18 (A9)	66.56	32.85	31.50	30.54	0.00
19	17.54	27.55	22.65	22.85	17.56
20 (B3)	0.00	26.74	29.63	52.61	29.35
21 (C1)	17.54	21.20	30.58	53.24	0.00
22	31.28	31.52	26.57	0.00	0.00
23 (C2)	18.31	29.65	34.88	53.57	32.59
24	18.75	0.00	0.00	0.00	46.56
25 (B4)	27.55	29.47	0.00	0.00	0.00
26 (A10)	26.52	27.35	31.56	50.47	48.46
27 (C3)	0.00	0.00	34.86	31.25	47.93
28 (A11)	46.28	55.98	32.41	22.56	20.68
29	19.18	21.66	17.56	15.22	0.00
30	17.58	16.74	16.46	0.00	0.00
31 (C4)	16.28	0.00	32.56	23.85	31.46
32 (A12)	43.56	45.28	44.36	31.59	37.64
33 (C5)	0.00	0.00	34.89	27.28	32.58
34 (C6)	15.42	14.65	24.54	17.56	17.53

菌株被划分到变形菌门 (Proteobacteria) (16 株, 69.57%)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) (6 株, 26.09%) 和厚壁菌门 (Firmicutes) (1 株, 4.34%), 其中 1 株厚壁菌门菌为梭菌属 (*Clostridium*) 细菌; 拟杆菌门类群中包含 *Dysgonomonas*、拟杆菌属 (*Bacteroides*) 和鞘脂杆菌属 (*Sphingobacterium*) 细菌; 而在 16 个克隆菌株构成的变形菌门类群中, 最大的一类亚群为  $\gamma$ -变形菌纲菌株 (56.25%), 例如不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*) 细菌等, 其次是  $\beta$ -变形菌纲亚类群的 3 个菌株 (B1、C1、C2) 均为丛毛单胞菌属 (*Comamonas*) 细菌, 而  $\alpha$ -变形菌纲亚类群的 2 个菌

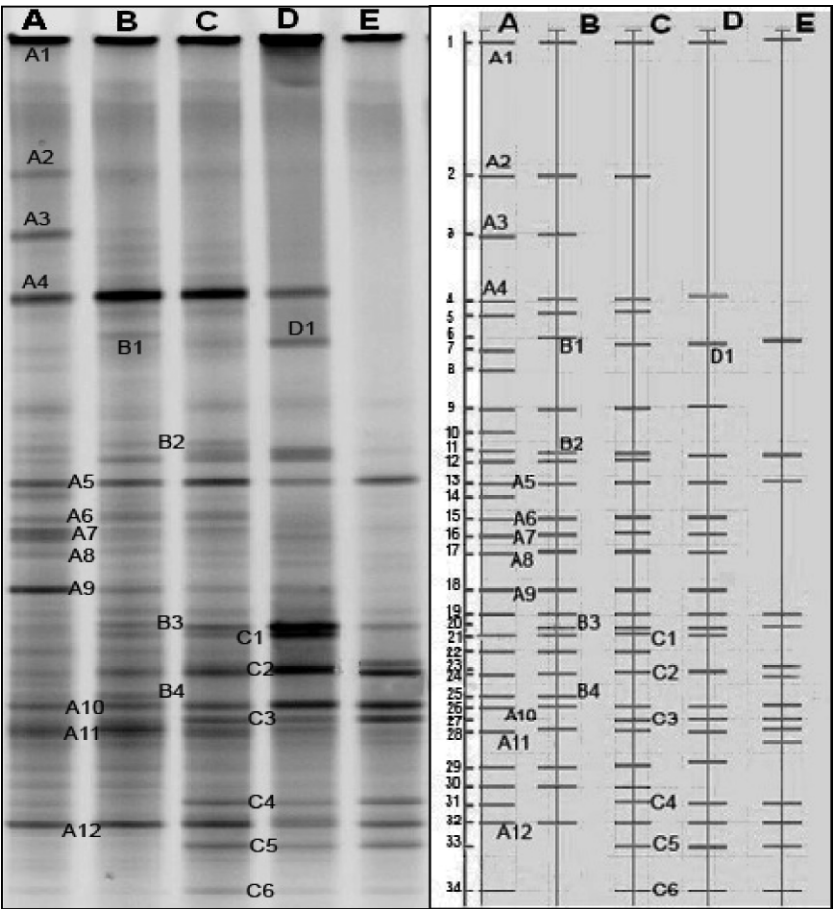


图 1 草菇培养料二次发酵中细菌 16S rDNA DGGE 分析图谱

Fig.1 DGGE fingerprints of 16S rDNA from Phase II compost of *Volvariella volvacea*.

表 2 DGGE 条带序列系统发育种类分析

Table 2 Phylogenetic affiliation of sequences retrieved from DGGE bands

Band	Most closely related organism (GenBank Accession No.)	Similarity /%	Affiliation (class, genus)
A1	Uncultured <i>Dysgonomonas</i> sp. (JF911640)	100	Bacteroidetes, <i>Dysgonomonas</i>
A2	Uncultured <i>Acinetobacter</i> sp. (GU356385)	100	Proteobacteria, $\gamma$ -Pro, <i>Acinetobacter</i>
A3	<i>Pseudomonas</i> sp. (JQ237663)	99	Proteobacteria $\gamma$ -Pro, <i>Pseudomonas</i>
A4	Uncultured <i>Bacteroides</i> sp. (FR693796)	99	Bacteroidetes, <i>Bacteroides</i>
A5	<i>Pseudomonas</i> sp. (JQ692082)	100	Proteobacteria $\gamma$ -Pro, <i>Pseudomonas</i>
A6	<i>Enterobacter</i> sp. (HQ234381)	100	Proteobacteria $\gamma$ -Pro, <i>Enterobacter</i>
A7	<i>Pseudomonas gingeri</i> (EU196787)	99	Proteobacteria $\gamma$ -Pro, <i>Pseudomonas</i>
A8	<i>Acinetobacter</i> sp. (JF322986)	99	Proteobacteria $\gamma$ -Pro, <i>Acinetobacter</i>
A9	<i>Acinetobacter lwoffii</i> (EU240445)	98	Proteobacteria $\gamma$ -Pro, <i>Acinetobacter</i>
A10	<i>Enterobacter asburiae</i> (JQ682630)	99	Proteobacteria $\gamma$ -Pro, <i>Enterobacter</i>
A11	<i>Enterobacter</i> sp. (GQ487560)	100	Proteobacteria, $\gamma$ -Pro, <i>Enterobacter</i>
A12	Uncultured bacterium (HQ891330)	100	Unknown
B1	Uncultured <i>Comamonas</i> sp. (JF923616)	100	Proteobacteria $\beta$ -Pro, <i>Comamonas</i>
B2	Uncultured bacterium (EF659299)	99	Unknown
B3	<i>Stenotrophomonas</i> sp. (JF829613)	99	Proteobacteria $\gamma$ -Pro, <i>Stenotrophomonas</i>
B4	<i>Clostridium</i> sp. (AB610567)	99	Firmicutes, <i>Clostridium</i>
C1	<i>Comamonas</i> sp. (HM113649)	100	Proteobacteria $\beta$ -Pro, <i>Comamonas</i>
C2	<i>Comamonas</i> sp. (GU458274)	100	Proteobacteria $\beta$ -Pro, <i>Comamonas</i>
C3	<i>Sphingobacterium</i> sp. (EU438982)	99	Bacteroidetes, <i>Sphingobacterium</i>
C4	<i>Sphingobacterium</i> sp. (DQ530164)	98	Bacteroidetes, <i>Sphingobacterium</i>
C5	<i>Sinorhizobium</i> sp. (JQ070405)	100	Proteobacteria $\alpha$ -Pro, <i>Sinorhizobium</i>
C6	<i>Klebsiella variicola</i> (JN941309)	100	Proteobacteria $\gamma$ -Pro, <i>Klebsiella</i>
D1	Uncultured bacterium (AM500800)	99	Unknown

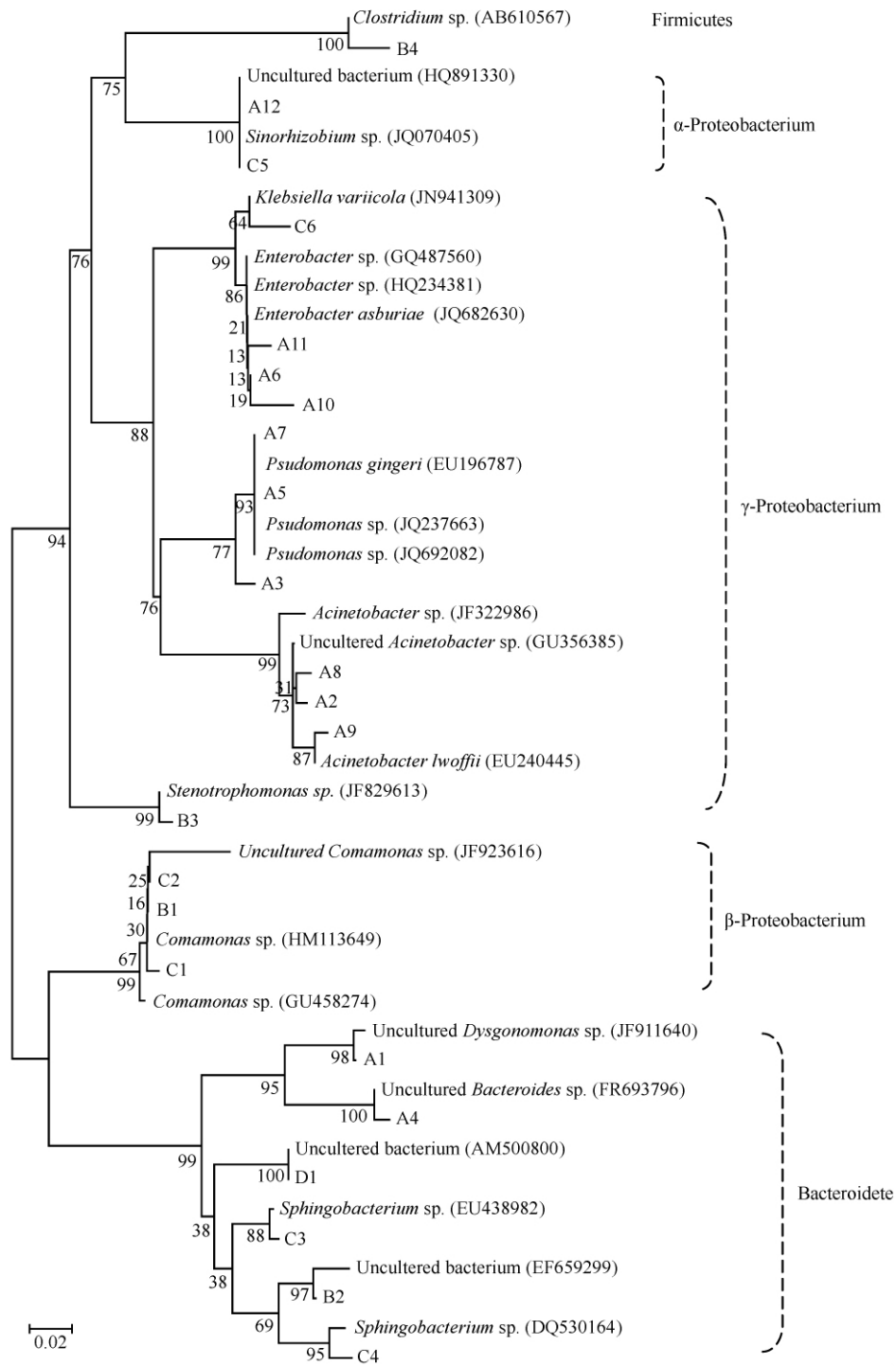


图 2 DGGE 优势条带的 16S rRNA 序列系统进化分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of the predominant bands in the DGGE profile based on partial 16S rRNA sequence.

株(C5、A12)为中华根瘤菌属(*Sinorhizobium*)细菌;研究结果还显示,除了A2、A3、B1和B4克隆菌株外,获得的其余19(82.61%)株克隆菌株均为耐热细菌(在C代表的发酵料高温期和持温期出现的菌株)。

### 3 讨论

本研究采用DGGE方法分析草菇培养料二次发酵过程中细菌群落的变化,研究结果表明不同处理样品间细菌群落结构在种类和丰度上存在着一定的差异,随着二次发酵进程的进行,细菌群落在发生着动态的演替,同时在高温期和持温期发现了多种耐热细菌,并根据16S rDNA序列初步确定了其分类地位。

从本研究获得的DGGE结果可以看出,图谱中电泳条带实现了清晰的分离,细菌群落多样性较为丰富。而且随着培养料温度的升高,发酵进程的推进,电泳条带在逐渐减少,意味着细菌群落多样性也在随之降低,这与已经报道的有关堆肥及发酵过程中细菌群落变化规律相一致<sup>[2, 6-8]</sup>。研究发现,除A1(*Dysgonomonas*)、A5(假单胞菌属)和A12(中华根瘤菌属)3条带外,不同的处理(发酵阶段)中优势条带及相对丰度在发生改变,意味着在二次发酵过程中菌群结构存在着动态的变化。在发酵前的样品中(处理A),优势细菌种类包括*Dysgonomonas*(A1)、假单胞菌属(A3、A5)、不动杆菌属(A2、A9)、拟杆菌属(A4)、肠杆菌属(A11)和中华根瘤菌属(A12)细菌。随着发酵过程的开始,在发酵初期的升温期(处理B),优势菌株的种类没有变化,只是不动杆菌属(A2、A9)和假单胞菌属(A3)属细菌的相对丰度在下降。而在发酵高温持温期阶段(处理C),优势菌株的组成较前两个阶段发生了明显的改变,其中寡养单胞菌属(B3)、丛毛单胞菌属(C1、C2)、鞘脂杆菌属(C3、C4)和中华根瘤菌属(C5)菌株开始出现或相对丰度显著增加,而且这类菌株在温度下降的过程中(处理D)依然持续保持着优势地位,但在最后的空气调节阶段,丛毛单胞菌属、寡养单胞菌属和拟杆菌属(A4)属细菌很难检测到或相对丰度显著下降,其优势细菌种类包括*Dysgonomonas*(A1)、假单胞菌属(A5)、肠杆菌属(A10)、鞘脂杆菌属(C3、C4)和中华根瘤菌属(A12、

C5)。此结果与何丽鸿等<sup>[2]</sup>(2009)和AJ Székely等<sup>[3]</sup>(2009)利用DGGE技术在双孢蘑菇培养料后发酵过程中细菌群落结构方面的研究结果并不相符,前者发现了芽孢杆菌属嗜热细菌,同时还发现了芽孢杆菌纲的成员,如束毛球菌属、动球菌属和显核菌属细菌,后者发现嗜热栖热菌是高温期阶段的优势细菌,而且在整个过程中发现了假黄色单胞菌属、假单胞菌属和*Thermacetogenium*属细菌等。

根据本研究测序菌株的分类地位可以看出,草菇培养料处理方式采用废棉为基质并经过二次发酵的过程中,细菌的种类较为丰富,23个克隆菌株隶属于变形菌门、拟杆菌门和厚壁菌门3个菌门, $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ -变形菌纲、鞘脂杆菌纲、拟杆菌纲和梭菌纲6个菌纲的11个属。其中19个获得序列的克隆菌株在发酵的高温期和持温期被检测到,即高温耐热菌,包括*Dysgonomonas*、拟杆菌属、肠杆菌属、假单胞菌属、不动杆菌属、寡养单胞菌属、丛毛单胞菌属、鞘脂杆菌属、中华根瘤菌属和克雷伯氏菌属10个属的细菌。YF Zhang等<sup>[9]</sup>(2009)采用DGGE及16S rDNA测序技术对麦秸为基质的微生物燃料电池生物能量转化过程中微生物群落的研究中曾发现2株克隆细菌与*Dysgonomonas*菌序列同源性为98%以上。Insam Heribert等<sup>[10]</sup>(2002)报道拟杆菌属、假单胞菌属、鞘脂杆菌属和不动杆菌属细菌在堆肥化过程中的发酵高温阶段被检测到。Hee-Chan Yang等<sup>[11]</sup>(2006)和Myungjin Lee等<sup>[12]</sup>(2011)分别在韩国不同地区的堆肥和污物中分离出寡养单胞菌属细菌,并鉴定为*Stenotrophomonas korensis* sp. nov. 和*S. daejeonensis* sp. Nov,而关于在发酵过程中检测到该属细菌的研究未见报道。关于丛毛单胞菌属细菌,已有较多关于其具有木质素和木质纤维素降解功能的研究报道,Yu H等<sup>[13]</sup>(2007)和Chen Y等<sup>[14]</sup>(2012)分别在在农业污水处理和竹浆造纸过程中发现丛毛单胞菌能够降解木质素和木质纤维素,本研究虽然没有对菌株进行分离培养及功能的分析,但根据已有报道,可以推测该类细菌在草菇培养料二次发酵及营养转化过程也在发挥着重要的类似作用。Boulter J等<sup>[15]</sup>(2002),DV Adegunloye and FC Adetuyi<sup>[16]</sup>(2009)在堆肥化过程中细菌鉴定及其抑制植物病原菌和利用猪牛粪进行堆肥的研究中,均发现了在堆肥发酵初级阶段存在着克雷伯氏菌,而本研究中的C6(克雷伯氏菌)克隆菌株在发酵各个

阶段均被检测到,说明该菌株可以在较高的温度环境存活并且可能在发酵过程中营养转化方面发挥着重要作用。芽孢杆菌纲尤其是芽孢杆菌属细菌被大量研究所报道,认为是高温堆肥中最为重要的一类耐热细菌,而根据本研究获得菌株序列的分析结果发现,在整个二次发酵过程中均未检测到芽孢杆菌纲细菌,这可能与选择 DGGE 条带种类和测序数量有关,也与发酵培养料成分、生态环境和发酵处理方式不同等因素相关。

## 参考文献

- [1] 侯立娟,李玉,孟丽, John A. Buswell, 陈明杰, 宋金第. 草菇培养料中微生物总 DNA 的高效提取. 东北林业大学学报 (*Journal of northeast forestry university*), 2011, 39(11): 56-60.
- [2] 何丽鸿, 陈明杰, 潘迎捷. 采用变性梯度凝胶电泳研究双孢蘑菇培养料后发酵过程中的细菌群落结构. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2009, 49(2): 227-232.
- [3] Székely AJ, Sipos R, Berta B, Vajna B, Hajdú C, Márialigeti K. DGGE and T-RFLP analysis of bacterial succession during mushroom compost production and sequence-aided T-RFLP profile of mature compost [J]. *Microbial Ecology*, 2009, 57: 522-533.
- [4] 陈长卿, 康振生, 王晓杰, 黄丽丽, 左豫虎. 大豆疫霉的分子检测. 西北农林科技大学学报 (*Journal of northwest A&F university*), 2005, 33(8): 73-77.
- [5] Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4. 0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [6] 喻曼, 肖华, 张棋, 曲云欢, 许育新. PLFA 法和 DGGE 法分析堆肥细菌群落变化. 农业环境科学学报 (*Journal of agri-environment science*), 2011, 30(6): 1242-1247.
- [7] 潘勤春, 孟镇, 钟其顶, 熊正河, 张玉彬, 雷振河. 汾酒大曲细菌群落结构的 PCR-DGGE 分析. 酿酒科技 (*Liquor-making Science & Technology*), 2011, 204(6): 95-99.
- [8] Wang HY, Zhang XJ, Zhao LP, Xu Y. Analysis and comparison of the bacterial community in fermented grains during the fermentation for two different styles of Chinese liquor. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2008, 35(6): 603-609.
- [9] Yifeng Zhang, Booki Min, Liping Huang and Irini Angelidaki. Generation of Electricity and Analysis of Microbial Communities in Wheat Straw Biomass-Powered Microbial Fuel Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(11): 3389-3395.
- [10] Insam Heribert, Riddech Nuntavun, Klammer Susanne. (Eds.) *Microbiology of Composting*. pp, 105-107. Springer, New York, 2002.
- [11] Hee-Chan Yang, Wan-Taek Im, Myung Suk Kang, Do-Yun Shin, and Sung-Taik Lee. *Stenotrophomonas koreensis* sp. nov., isolated from compost in South Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56(1): 81-84.
- [12] Myungjin Lee, Sung-Geun Woo, Myoungsoo Chae, Min-Cheol Shin, Hae-Min Jung, and Leonid N. Ten. *Stenotrophomonas daejeonensis* sp. nov., isolated from sewage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011(61): 598-604.
- [13] Yu H, Zeng G, Huang H, Xi X, Wang R, Huang D, Huang G, Li J. Microbial community succession and lignocellulose degradation during agricultural waste composting. *Biodegradation*, 2007, 18(6): 793-802.
- [14] Chen Y, Chai L, Zhu Y, Yang Z, Zheng Y, Zhang H. Biodegradation of kraft lignin by a bacterial strain *Comamonas* sp. B-9 isolated from eroded bamboo slips. *Journal of Applied Microbiology*, 2012 Mar 1. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05275.x.
- [15] Boulter J, J Trevors and G Boland. Microbial studies of compost: bacterial identification and their potential for turfgrass pathogen suppression. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2002, 18(7): 661-671.
- [16] DV Adegunloye and FC Adetuyi. Composting of Food Wastes Using Cow and Pig Dung as Booster. *European Journal of Applied Sciences*, 2009, 1(3): 34-39.

# Denaturing gradient gel electrophoresis analysis on bacterial community change in the phase II composting of *Volvariella volvacea* substrate

Changqing Chen<sup>1, 2</sup>, Yun Jiang<sup>4</sup>, Li Meng<sup>2</sup>, Yu Li<sup>2, 3\*</sup>

<sup>1</sup> College of Agronomy, Jilin Agricultural University, <sup>2</sup> Engineering Research Center of Chinese Ministry of Education for Edible and Medicinal Fungi, <sup>3</sup> Key Laboratory of North Edible Fungus Resources and Application, Ministry of Agriculture, <sup>4</sup> College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

**Abstract:** [Objective] To study the bacterial community change during the phase II composting of *Volvariella volvacea* substrate of cotton waste and to clarify the predominant bacteria at different composting stages. [Methods] The 16S rDNA-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) and clone strains sequencing methods were used to track the change of bacterial community during composting. [Results] The DGGE profile shows that the diversity of bacterial community was rich and bands diversity decreased with the composting progress. The dynamic changes of predominant community and relative intensity were observed. The 23 predominant strains belong to 3 classes of Proteobacteria, Bacteroidetes and Firmicutes, 6 families of  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -Proteobacterium, Bacteroidetes, Sphingobacteria and Clostridia, 11 genera, in which 19 strains were thermophilic bacteria. The genera of *Stenotrophomonas*, *Comamonas*, *Sphingobacterium* and *Sinorhizobium* were predominant bacteria in the stages of high temperature and drop of temperature during composting. [Conclusion] The bacterial community structure and predominant community change dynamically during the phase II of *Volvariella volvacea* composting, especially in the course of entering the stage of high temperature.

**Keywords:** *Volvariella volvacea*, phase II of composting, bacterial community, 16S rDNA-DGGE

(本文责编: 张晓丽)

---

Supported by the Earmarked Fund for National Modern Agro-industry Technology Research System, by the Doctor initial fund (201005) and by the Postdoctoral Fund of Jilin Agricultural University

\* Corresponding author. Tel: +86-431-84532989; E-mail: yuli966@126.com

Received: 27 March 2012/Revised: 22 April 2012