

好氧堆肥微生物研究方法进展

叶劲松^{1,2,3}, 吴克^{2,3}, 蔡敬民^{2,3}, 俞志敏^{2,3}, 陈天虎

(1. 合肥学院生物与环境工程系, 安徽合肥230022; 2. 城市固废处理与资源利用安徽省工程技术研究中心, 安徽合肥230022; 3. 中德环境技术转化中心, 安徽合肥230022; 4. 合肥工业大学资源与环境学院, 安徽合肥230009)

摘要 在好氧堆肥微生物研究中, 传统分离培养和显微技术以其简便易行的特点仍然在被继续使用, 但是由于特定生境中大多数微生物处于“存活但不能培养”状态, 所以对于好氧堆肥中的微生物进行研究时, 就必须采用现代生物化学方法和分子生物学方法。回顾了醌类分析、磷脂脂肪酸分析和 ATP 分析这3类现代生物化学方法和16S rRNA 和18S rRNA 基因序列分析、16S~23S rDNA 转录间隔区序列分析、DGGE 变性梯度凝胶电泳和 DNA 微阵列这4类现代分子生物学方法, 应用于堆肥过程中微生物研究的现状。最后指出不同的分子生物技术相结合, 再辅以必要的传统方法, 是将来堆肥微生物研究方法的发展方向 and 趋势。

关键词 好氧堆肥; 分离培养; 现代生物化学与分子生物学; 现状与展望

中图分类号 S154.3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)30-13287-05

Progress on Research Methods for Microorganisms during Aerobic Composting

YE Jinsong et al (Department of Biological and Environmental Engineering, Hefei University, Hefei, Anhui 230022)

Abstract In the research on microorganism during aerobic composting, the traditional isolation and culture and the microscope technology had characteristics of easy and simple to conduct, which were still used today. Due to the “viable but nonculturable” of many microorganism in certain habitat, the modern biochemistry and molecular biology must be used when carrying out test on microorganism during aerobic composting. The application of three modern biochemistry technologies, which were quinones profiling, PLFAs (phospholipid fatty acids) and ATP, in the microorganism research during aerobic composting was reviewed, as well as the 16S rRNA/18S rRNA gene sequence analysis, 16S-23S rDNA internal transcribed spacer sequence analysis, denaturing gradient gel electrophoresis and DNA microarrays. Finally, it was pointed out that the development trend of compost microorganisms was combining with different molecular biological technologies and with the auxiliary of the indispensable traditional methods in future.

Key words Aerobic composting; Isolation and culture; Modern biochemistry and molecular biology; Current status and forecast

概述好氧堆肥的过程, 是在有氧条件下, 微生物降解有机质, 产生腐殖质的过程。在此过程中, 微生物起了关键作用。揭示出微生物的变化规律, 有利于深化对堆肥过程的理解。而对微生物进行研究的方法的科学与否, 又将直接影响到对于客观规律的准确把握。笔者就目前国内外对堆肥过程中的微生物进行研究时所采用的研究方法, 从传统的分离培养方法、现代生物化学方法和现代分子生物学方法3个方面分别作了评述, 并且指出了今后堆肥微生物研究方法的发展方向。

1 好氧堆肥过程微生物研究的传统方法

对微生物进行定性定量的研究, 必然涉及到如何计数其生长繁殖量, 以及做相应的分类鉴定。

对微生物数量进行测定的传统方法主要有平板菌落计数法、显微镜直接计数法和生物量法(如生物量C, 生物量N)等。传统分类鉴定菌种方法是: 先通过分离纯化, 得到纯培养物后再进行一系列的形态、生理生化反应、生态特性等表型指标的测定。最后查阅权威性的菌种鉴定手册(主要是《伯杰氏系统细菌学手册》和《安·贝氏菌物词典》)加以鉴定。

1.1 平板菌落计数法 平板菌落计数法是将待测样品经适当稀释之后, 其中的微生物充分分散成单个细胞, 取一定量的稀释液接种到平板上, 经过培养, 由每个单细胞生长繁殖而形成肉眼可见的菌落, 即一个单菌落应代表原样品中的一个单细胞。统计菌落数, 根据其稀释倍数和取样量, 即可换算出样品中的含菌数。

目前国内学者对堆肥微生物进行研究时, 多数采用的是

分离培养方法。如卫亚红等采用稀释平板培养方法分离测定细菌、真菌和放线菌数量, 来分析家畜粪便好氧堆肥中主要微生物类群^[1]。王春铭等采用平板计数法和最大概率法测定城市污泥堆肥干污泥中主要微生物类群的变化^[2]。

平板计数可以获得活菌信息。但是它费时费力, 且要求操作者技术娴熟。

1.2 显微直接计数法 显微计数是用记数板(例如血球记数板)观察记数的方法。此法得到的结果是包括死细胞在内的总菌数。目前已有用特殊染料作活菌染色后再用镜检计数的方法, 可以克服这一缺点。例如荧光染色快速计数死菌活菌技术, 用2种核酸染料对细胞进行染色。一种是SYTO9, 它把活细胞染成绿色; 另一种是Propidium Iodide, 它只染色死细胞, 为红色。此方法可简便、快速记数活死菌数。

总之, 目前国内对好氧堆肥中的微生物进行研究时所采用的方法, 还是以经典的培养计数为主。而对于这样的传统方法, 国外也还在继续使用^[3-4]。不过他们使用的多是微型、简便、快速或自动化的鉴定系统。如市售有美国安普科技中心生产的Balog仪器, 有95种不同的碳源, 通过计算机统计可以把细菌鉴定到种。

1.3 特定功能微生物研究方法 设计特定培养基, 筛选堆肥中具有特定功能的微生物, 这是传统培养方法的最具有特色之处。

比如, 木质纤维素的降解是有机质堆肥降解的关键所在, 故有学者用刚果红透明圈筛选法^[5]和滤纸筛选法^[6]来筛选研究纤维素高效降解菌。

传统培养方法, 因其简便易行, 一直被广泛应用。然而此法有个很大的缺陷。因为在特定的环境中, 大多数微生物表现出一种“存活但不能培养”(Viable but nonculturable, VB-NC)的状态^[7]。鉴于人类目前的认识水平和技术手段, 用实

基金项目 安徽省科技厅资助项目(50450304); 安徽省教育厅重点项目(KJ2008A126); 合肥学院科研发展基金项目。

作者简介 叶劲松(1973-), 男, 安徽合肥人, 硕士, 助教, 从事环境微生物工程研究。

收稿日期 2008-10-19

实验室的培养条件不可能同时满足不同类型的微生物对于营养、温度、通气以及pH等条件的要求。因此通过传统的培养方法,分离到的微生物只占环境微生物总数的0.1%~10.0%^[8-9],它不能及时追踪堆肥过程中整个微生物群落结构和多样性的变化。

堆肥中的微生物,实质上是一个微生态群体。要想准确全面地追踪其种类和数量随着时间(或温度)的演变情况,必然要用现代生态学的一些方法来研究。

2 好氧堆肥微生物研究的现代生物化学和分子生物学方法

不依赖于培养的生物化学和现代分子生物学的方法,可以揭示微生物种类和遗传的多样性,并给出关于群落结构的直观信息,目前正广泛应用于特定生境中的微生物研究。

研究微生物的现代方法有多种。按照学科门类划分的有现代生物化学方法,如细胞壁、脂类、醌类和ATP分析等;分子生物学方法,如核酸分子杂交、16S或18S rRNA寡核苷酸序列分析、重要基因序列分析和全基因组测序等。

2.1 现代生物化学方法

2.1.1 醌类分析 (Quinones profiling)。呼吸醌广泛存在于微生物的细胞膜中,是细胞膜的组成成分,在电子传递链中起重要作用。醌含量可用作微生物量的标记^[10]。有两类主要的呼吸醌:泛醌(Ubiquinone, UQ)即辅酶Q和甲基萘醌(Menaquinone, MK)即维生素K。醌可以按分子结构在类(UQ和MK)的基础上,依据侧链含异戊二烯单元的数目和侧链上使双键饱和的氢原子数进一步区分。研究表明,每一种微生物都含有一种占优势的醌^[11],而且不同的微生物含有不同种类和分子结构的醌^[12]。能对原核和真核微生物同时有效测定。因此,醌的多样性可定量表征微生物的多样性。醌谱图的变化,可表征群落结构的变化。

醌图谱分析法与各种分子生物学方法相比,具有能准确反映微生物量的特点;与其他化学分类指标如PLFA(Phospholipid fatty acids)法相比,能更好地区别和鉴定不同的微生物种类,因此在环境包括堆肥在内的微生态测定中也得到了越来越广泛的应用^[13]。

醌的分析步骤分3步:醌萃取、提纯分离、定性与定量分析。根据微生物醌的摩尔组成可以计算出微生物的多样性(DQ)和微生物种的分布均匀性(EQ)^[14]。用醌图谱法描述微生物群落的参数有5个^[12]。对两个不同的群落,由分析5个参数可以计算出另一个参数——非相似性指数(D),用于定量比较两个群落组成结构的差异大小。

唐景春等采用醌类图谱分析法研究了3种典型废弃物牛粪、食物残渣及污泥堆肥过程中微生物变化的特点,结果表明:牛粪堆肥只在初始阶段活性较高,之后很快降低,其醌含量较低^[15]。在堆肥中期达到最大值为36.3~117.0 μmol/kg,醌多样性指数DQ初始期为10.3~12.8,堆肥过程中逐渐升高至后期达18.1~22.7,污泥堆肥的各项特性介于食物残渣和牛粪之间。

醌类分析法,操作简单、快速、精度高和数据处理容易,能够同时对应微生物生态评价的3个重要指标(微生物群体结构、生物量及微生物多样性)。但是它不能反映具体哪个属或哪个种的变化^[16]。

2.1.2 磷脂脂肪酸分析。Wite等于20世纪70年代末,80年代初发展了磷脂脂肪酸图谱分析技术PLFA^[17-18]。

磷脂是构成细胞膜的主要组分,约占细胞干重的5%。在细胞死亡时,细胞膜很快被降解,磷脂脂肪酸被迅速地代谢掉,因此它只在活细胞中存在,十分适合于指示微生物生物量和群落结构的动态变化。另一个重要因素是脂肪酸具有属的特异性,它可以指示主要菌群的变化,象真菌、放线菌、G⁺细菌和G⁻细菌^[19]。

磷脂脂肪酸谱图分析法大致步骤:首先将磷脂脂肪酸部分用Bigh和Dyer法提取出来^[20],然后用气相色谱分析,得出PLFA谱图。群落的微生物结构发生变化,即可以通过谱图的变化得到快速有效的监测。美国商品化的MDI系统(Microbial identification system)拥有许多常见微生物的特征PLFAs谱图,增强了磷脂脂肪酸谱图法的定性能力。

Kaner等用稻草作堆肥原料,用PLFA分析法对堆肥过程中的微生物生物量和群落结构的变化进行了研究,结果表明:用来指示总生物量的总PLFA,在第1天后即达到峰值^[21]。用PLFA指示G⁺细菌的量,随着温度的上升而上升,随温度的下降而下降;G⁻细菌和真菌在温度上升到50℃期间,数量是上升的,而在高温持续期是下降的。脂肪酸不饱和度(Degree of fatty acid unsaturation)在整个升温阶段由0.48直线下降至0.08,而在随后的降温阶段随温度的下降,呈V型反转上升。

喻曼等在稻草固态发酵体系中同时接种土壤微生物和黄孢原毛平革菌,用磷脂脂肪酸(PLFA)谱图分析法研究微生物群落和生物量变化,结果发现:根据标记性脂肪酸的变化,在发酵第6天,革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、真菌的含量都达到了最高值,其中,革兰氏阳性菌的含量较低。主成分分析结果显示,发酵后期以18碳不饱和脂肪酸为主,与标记性脂肪酸分析结果一致,同时跟木质纤维素降解率的变化趋势对应^[22]。

PLFA法无须纯培养,同时简便,可靠,适于快速跟踪研究微生物群落的动态变化。它也有不足:第一,它不能从种的水平上鉴定微生物,只能鉴定到属。第二,从PLFA组成的变化判断微生物的种群变化表征的并不是种群绝对生物量的变化,目前还没有不同种群实际生物量及其脂肪酸含量之间计算的转换因子。第三,细菌和真菌在不同的生长时期以及环境压力下的脂肪酸含量有所变化,给监测带来困难。

2.1.3 ATP分析。广泛存在于活细胞体内的ATP(Adenosine triphosphate),由于它的含量和细胞生物量呈线性关系,同时胞内ATP含量随着不同的种以及生长率的变化而变化,所以它适合于微生物活性的定量测定^[23]。它的基本原理是利用虫荧光素酶荧光反应来进行分析。现已有市售的ATP照度计工具包。国外最早于20世纪90年代应用于食品微生物污染检测,随后应用到环境微生物领域。

ATP分析因其结果只包括活菌,且无须培养、快速、简便,在堆肥中得到了一定应用。

Garcia等用污泥和城市垃圾分别堆肥,试验结果一致:起始时ATP较高,随后呈现快速下降趋势,至腐熟阶段处于低水平^[24]。

Hbiuchi 等用木削刨花和麦麸为堆肥原料,使用简化的 AIP 分析方法检测堆肥过程中微生物随时间的变化,结果显示,微生物量随堆肥温度升高而上升,随温度下降而下降^[23]。

2.2 现代分子生物学技术 现代分子生物学技术是建立于 PCR 技术(Polymerase chain reaction)之上的。PCR 技术是一种体外扩增核酸序列,从而获得多个核酸拷贝的技术。它克服了“VBNC”的局限,可用于环境微生物 DNA 的扩增,并且对扩增产物可以进行定性定量分析,常和其他的分子生物学技术相结合一起使用。

PCR 技术也存在一些问题,如假阳性、假阴性的出现。假阳性结果主要是污染造成的。因此要求 PCR 技术必须规范化,要有标准的实验室设备,操作中有防污染措施,要严格按照 Kwork 等的防污措施^[25] 进行操作。每份标本重复 2 次,可有效地避免假阳性的出现。假阴性的结果与标本处理、试剂配制及操作中优化条件的选择有关。

在对好氧堆肥微生物进行研究时,目前所用到的分子生物学方法主要有以下 3 种。

2.2.1 16SrRNA 和 18SrRNA 基因序列分析。16SrRNA 基因为所有细菌共有,素有“细菌化石”之称,是细菌系统分类学研究中最有用的手段。利用 16SrRNA 序列分析可以区分细菌和古细菌两大范畴,以及分属于其领域内的不同微生物。18SrRNA 基因和 16SrRNA 基因相类似。理论上,对真菌等真核生物的 rRNA 序列分析应该像细菌等原核生物的一样进行,但由于真菌等真核生物核糖体的编码基因以及调节机制比较复杂,对其研究还不够透彻,如今真正应用在真菌等真核微生物生态学的分析上还是比较少的^[26]。

对于一些营养要求苛刻、难以培养或培养时间很长的细菌,可以用 PCR 或者改良后的套式 PCR、原位 PCR、免疫 PCR 等多种 PCR 与其他分子生物学分析方法(如变性梯度凝胶电泳和扩增核糖体 DNA 限制性分析等)相结合,进行测序。有了微生物 16SrDNA 序列,不论是全序列还是部分序列,都可以提交到 GenBank 采用 Blast 程序与已知序列进行相似性分析。GenBank 将按照与测得序列的相似性高低列出已知序列名单、相似性程度以及这些序列相对应的微生物种类,并进一步据微生物 16SrRNA 的序列同源性,计算不同物种之间的遗传距离,然后采用聚类分析等方法,将微生物进行分类,在属或种的层次上构建它们的系统发育树^[27]。

Dees 等用 PCR 扩增细菌的 16SrDNA(包括 1 500 bp 的特异性片段)、放线菌的 300 bp 特异性片段,以及真菌 18SrDNA,分析了在人工高温堆肥中的微生物多样性^[28]。在克隆文库中,70 个克隆中,有 52 个 ARDRA 型(组)独特,这表明:在高温堆肥中,非培养细菌群落具有高度多样性。

刘有胜等用基于 16SrDNA 的 PCR-DGGE(变性梯度凝胶电泳)技术对城市餐厨垃圾堆肥过程中细菌种群结构随时间的变化进行了研究^[29]。DNA 的提取与纯化采用改进的蛋白酶 K-CTAB 法纯化,然后总 DNA 进行 PCR 扩增;细菌通用引物 GC-341F,序列分别为:GC-341F,(5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG CAC GGG GGG CCT ACG GGA GGC AGCAG 3');907R,(5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT)。扩增片段长约 600 bp。PCR-DGGE 图谱显示:不同时间

堆肥样中细菌 DGGE 图谱有着明显的差异性;堆肥升温期细菌种群丰富,优势种群不明显;高温期细菌种群减少,优势种群明显;降温期细菌种群结构基本保持稳定。温度对堆肥过程中细菌种群具有明显的筛选作用。

将 16SrRNA 和 18SrRNA 基因序列分析,与其他 PCR 以及 DGGE 等的结合,既能够克服传统培养技术的限制,又可以得到样品中微生物不同种群的数量和种类分布的信息,精确指示微生物种类和多样性。

由于 16S DNA 序列的高度保守性,所以此方法对于相近种或同一种内不同菌株之间的鉴别分辨力较差^[30]。

2.2.2 16S ~23S rDNA 转录间隔区(Internal transcribed spacer, ITS) 序列分析。

在原核生物的 rDNA 操纵子中,由于 ITS 在自然进化中不受选择的压力,所以变异更快,足以满足种及种以下水平的分类,因此对于 16S ~23SrDNA 转录间隔区的研究也较多。

Schloss 等通过细菌自动化的 rRNA 转录间隔区序列分析方法(B-ARISA),得出在堆肥开始阶段,细菌群落结构变化和 pH 变化一致;是产乳酸的真菌导致了 pH 值的下降^[31]。

Ranjard 等又把 ARISA 应用到真菌群落的研究^[32]。他们根据测定包括 5.8S 基因和两个转录间隔区(ITS)在内的,在 18S 和 28S 基因之间区域的不同长度,而设计了多个引物,用来识别不同的真菌群落。

Hansgate 等用真菌自动化的 rRNA 转录间隔区序列分析方法(F-ARISA)和 18SrRNA 基因测序方法,研究了堆肥开始升温时期真菌菌群结构的变化^[33]。鉴定跟踪真菌菌群结构结果表明:有 *Backusella* sp., *Micoraceae*, *Gectrichum* sp. 和 *Pclia* sp. 这 4 个不同的真菌属类存在。

由于 ITS 序列分析具有快速、简单、准确、重复性好等优点,近来成为细菌分类与鉴定的热点。然而也要看到:必须利用有效的技术手段,来解决 16S ~23SrDNA 转录间隔区的不同拷贝之间大小比较相近和不易区分的问题,以确保能够扩增出所有的拷贝。它不是万能的,不能对所有的菌株进行鉴别,如大肠杆菌的不同血清型等。

2.2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 法。具有化学变性剂梯度的聚丙烯酰胺凝胶,能够有区别地解链 PCR 扩增产物。不同的双链 DNA 片段,由于沿着化学梯度的不同解链行为,将在凝胶的不同位置上停止迁移。DNA 解链行为的不同导致一个凝胶带图案,此图案即代表微生物群落中的主要种类的一个轮廓。该方法能够快速将分子大小相同,但碱基顺序不同的 DNA 分子进行分离^[34],可以提供群落中优势种类的信息和同时分析多个样品。它已经广泛应用于分析原核和真核群落结构的时空变化。

其主要步骤:核酸提取;16SrRNA 或 18SrRNA 基因的 PCR 扩增;扩增产物进行电泳;割带回收 DNA,测定不同 DNA 谱带的碱基序列,同基因文库中的对应序列相比较,从而确定种属。

Ishii 等应用 PCR-DGGE 技术,对微生物 16SrDNA 进行扩增,分离得到 DNA 条带,对不同条带测序分析,再和 Gene Bank 对照,选择同源性较近的菌株构建系统发育树,研究高温堆

肥过程中微生物的种类和数量变化规律^[35]。试验发现,在45 d的堆肥过程中,DGGE条带发生很大的变化:随着温度的升高,条带数减少,当温度降低时,条带数又逐渐增多,表明条带所代表的微生物种类也发生相应的变化。尤其在腐熟期,DGGE条带图谱变得更加复杂,出现了新的条带,且缺乏相关DNA顺序的数据。

Wakase等用培养和DNA分析(此指DGGE)方法,同时研究接入商业菌剂的堆肥过程中的微生物的演变情况^[36]。他们发现:用PCR-DGGE分析方法得出的菌剂本身中的优势菌,和加入了菌剂的堆肥过程中的优势菌,并不保持一一对应关系。虽然没有证据表明,菌剂本身中的优势菌在堆肥中仍然是优势菌,但是菌剂本身中的优势菌的多样性,在不同的室温下培养后变化明显。

对好氧堆肥过程中微生物的研究,近年来国内也有学者开始使用分子生物学手段。徐大勇等采用传统培养方法和PCR-DGGE技术研究了人工接种堆肥和自然堆肥微生物群落的演变过程^[37]。DGGE图谱显示,2种堆肥不同时期存在不同的细菌种群,其条带数量亦呈“升高-降低-升高-降低”变化趋势(趋势和用培养方法得出的结果一致),堆肥升温期条带丰富,优势条带不明显;堆肥高温期条带数量减少但出现优势条带,表明高温阶段以嗜热菌或耐高温菌为主;堆肥降温期条带数量再次增多;堆肥腐熟期条带数量少且无优势条带,表明腐熟阶段微生物种群数量少且代谢强度趋于平缓;DGGE图谱还表明,人工接种菌株成为堆肥高温期优势菌株。

DGGE法具有可靠,可重复,快速和容易操作等特点。但它也有不足:只能分离较小的片段(500 bp)^[38];是依据16SrDNA的DGGE研究群落多样性,由于某些种类的16SrDNA的拷贝之间的异质性问题,以及异源核酸双链分子的检出^[39],可能会导致自然群落中细菌数量的过多估计。

2.2.4 DNA微集阵列(DNA microarrays)。又称寡核苷酸微芯片,代表了最新的分子工具之一。它是一套DNA探针,通常是从cDNA或基因组克隆纯化PCR产物,存放在固体支持物上,其密度可达1 cm²几百个点。它对于来自环境样品中的16SrRNA基因的检测,具有高通量的优点^[40]。一次试验就可以完成几千个的菌株或种属等以上分类单位的鉴别^[41]。因此适合于环境中微生物群落多样性的研究,包括有益菌群和病原菌的过程监测。

Franke-Wittle等为了探明堆肥中不同微生物存在与否,设计了一个寡核苷酸微芯片^[42]。这个芯片是由瞄准于16SrRNA基因可变区,由很多寡核苷酸探针组成。探针是按照堆肥中已经存在的微生物和致病菌而设计的,探针长17~25 bp,包括大部分种特异性的序列。试验表明:在各种堆肥样品中,*Streptococcus*(链球菌),*Acinetobacter Iwoffii*(不动杆菌属)和*Clostridium mt tani*(梭菌属)总是存在的。

但是DNA芯片也有很多问题亟待解决,体现在硬件和软件两个方面。硬件方面主要是需要昂贵的尖端仪器;软件(技术)方面,主要是探针制备复杂,空间因素不利于杂交,多种探针杂交条件的优化选择等。

3 好氧堆肥微生物研究方法的展望

(1) 微生物研究的现代分子生物学方法,尤其是那些能够

全面地、高分辨地研究微生物生态学的分子技术,必然会被应用到堆肥中的微生物研究上来。比如:

荧光原位杂交技术(*Fluorescent in situ hybridization, FISH*):是微生物生态学研究常用的用于原位观察微生物细胞的技术,它根据核糖体小亚基rRNA基因的保守区,设计合成有荧光标记的特异性寡核苷酸探针,不经过环境基因组的提取以及核糖体小亚基rRNA基因的PCR扩增,而直接与固定在玻片或纤维膜上的组织或细胞中的特定的核苷酸序列进行杂交,探测其中所具有的同源核酸序列,结果可以直接在荧光显微镜下观察。FISH技术结合分子生物学的精确性和显微镜的可视性,可进行微生物的空间分布情况分析和特征性微生物的鉴定与定量分析。

它可将单个细菌从复杂的菌群背景中检测出来,并加以定量化,且可以检测出个体微生物的原位生理特性和功能,并实现在种属水平上跟踪堆肥过程中所有重要菌群的变化、演替规律,而且所需的时间很短,有望成为一种常规的简便分析方法。

PCR-限制性内切核酸酶方法(*Restriction endonuclease, PCR-RFLP*):是利用PCR扩增产物用限制性内切酶进行切割并电泳,以酶切后DNA片段长度变化来表现出来,通过DNA转印及分子杂交方法检验。可用于种以下分类。

PCR-单链构象多态性研究(*Single strand conformational polymorphism, PCR-SSCP*):可清晰地分辨出样品中至少8种微生物,而且分析仪器比DGGE简单,避免了在PCR过程中相似异源双链的形成。尤其是荧光标记的引物、SSCP和毛细管电泳相结合,即以荧光毛细管电泳(*Fluorescence capillary electrophoresis, FCE*)为基础的单链构象多态性分析,不但可对细菌群落进行多态性分析,而且可直接鉴定样品中的细菌。

分子生物技术作为环境生物技术的前沿,必将给堆肥微生物的研究带来革命性的变化。其最终发展趋势是原位、快速、灵敏、准确定量和高通量。

(2) 理论而言,使用分子生物学技术,可完全实现对堆肥中的微生物进行分类鉴定。但是这项技术在国内刚刚起步,加上对试验条件要求高,而堆肥生态系统本身的复杂性,DNA提取的困难性和完全性,过程的干扰,常常导致数据的可靠性下降。因此,国内需要完善和改进对于堆肥微生态的研究,比如目标DNA提取纯化的研究,以及堆肥微生物基因文库(比如降解木质纤维素菌的相关降解基因文库等)的建立和完善等。从目前的发展趋势可以看出,分子生物学技术正逐步取代某些传统的研究方法而被广泛应用于堆肥环境微生物研究。

(3) 单一研究方法必然有其固有的缺陷,而几种方法的联合使用可以扬长避短,进一步提高检测结果的准确性。所以必须将不同的分子技术相结合,再辅以必要的培养、生理生化测定等传统方法,来最终达到监测和鉴定的目的。

参考文献

- [1] 卫亚红,梁军锋,黄懿梅,等.家畜粪便好氧堆肥中主要微生物类群分析[J].土壤肥料科学,2007,23(11):242-248.
- [2] 王春铭,卢建文,雷恒毅,等.城市污泥堆肥过程中微生物研究[J].生态环境,2007,16(2):462-466.
- [3] ADEGUNLODY D V, ADETUYI F C, AKINYOYOYE F A, et al. Microbial analysis of compost using cowdung as booster[J]. Pakistan Journal of Nutrition, 2007,

- 6 (5) :506- 510.
- [4] XI B D, HUANG G H, ZHANG G J, et al. A Temperature-guided three stage inoculation method for municipal solid wastes composting[J]. *Environmental Engineering Science*, 2007, 24(6) :745- 754.
- [5] 叶劲松, 吴克, 蔡敬民, 等. 生物垃圾好氧处理中的纤维素降解菌生长规律研究[J]. *生物技术*, 2007, 17(2) :69- 72.
- [6] 牛俊玲, 李国学, 崔宗均, 等. 堆肥中高效降解纤维素林丹复合菌系的构建及功能[J]. *环境科学*, 2005, 26(4) :186- 190.
- [7] 张洪勋, 王晓谊, 齐鸿雁. 微生物生态学研究方法进展[J]. *生态学报*, 2003, 23(5) :988- 995.
- [8] ALBRECHT A, WITZENBERGER R, BERNZEN U, et al. Detection of airborne microbes in a composting facility by cultivation based and cultivation independent methods[J]. *Ann Agric Environ Med*, 2007, 14(1) :81- 85.
- [9] YU H Y, ZENG G M, HUANG H L, et al. Microbial community succession and lignocellulose degradation during agricultural waste composting[J]. *Biodegradation*, 2007, 18(6) :793- 802.
- [10] SAITOU K, NAGASAKI K, YAMAKAWA H, et al. Linear relation between the amount of respiratory quinones and the microbial biomass in soil[J]. *Soil Science Plant Nutrition*, 1999, 45(3) :775- 778.
- [11] HU H Y, IIMB R, GOTO N, et al. Analytical precision and repeatability of respiratory quinones for quantitative study of microbial community structure in environmental samples[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, 47(1) :17- 24.
- [12] 胡洪营, 童中华. 微生物醌指纹法在环境微生物群体组成研究中的应用[J]. *微生物学通报*, 2002, 29(4) :95- 98.
- [13] TANG J C, MAIEN, TADA Y, et al. Characterization of the maturing process of cattle manure compost[J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41(2) :380- 389.
- [14] HU H Y, FUJIE K, NAKAGOME H, et al. Quantitative analyses of the change in microbial diversity in a bioreactor for wastewater treatment based on respiratory quinones[J]. *Water Research*, 1999, 33(15) :3263- 3270.
- [15] 唐景春, 周启星, 张冠辉. 不同来源生物质废弃物高温堆肥过程的物理化学及微生物性质研究[J]. *环境科学*, 2007, 28(5) :1158- 1164.
- [16] 车玉伶, 王慧, 胡洪营, 等. 微生物群落结构和多样性解析技术研究进展[J]. *生态环境*, 2005, 14(1) :127- 133.
- [17] WHITE D C, DAVIS W M, NCKELS J S, et al. Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate[J]. *Oecologia*, 1979, 40(1) :51- 62.
- [18] TUNIDA A, BAIRD B H, TREXLER MB, et al. Determination of phospholipid ester-linked fatty acid and poly- γ -hydroxybutyrate for the stimulation of bacterial biomass and activity in the rhizosphere of the rape plant *Brassica napus* (L.) [J]. *Can J Microbiol*, 1985, 31(2) :1113- 1119.
- [19] FROSIEGA R D A, BA A A T H E. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1996, 22(1) :59- 65.
- [20] BIGHIE G, DYER W J. A rapid method of total lipid extraction and purification[J]. *Can J Biochem Physiol*, 1959, 37(8) :911- 917.
- [21] KLAMMER M, BAATH E. Microbial community dynamics during composting of straw material studied using phospholipid fatty acid analysis[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1998, 27(1) :9- 20.
- [22] 喻曼, 曾光明, 陈耀宁, 等. PLFA 法研究稻草固态发酵中的微生物群落结构变化[J]. *环境科学*, 2007, 28(11) :2603- 2608.
- [23] HORUCH J I, EBEL K, TADA K, et al. Simplified method for estimation of microbial activity in compost by AIP analysis[J]. *Bioresour Technol*, 2003, 86(1) :95- 98.
- [24] GARCIA C, HERNANDEZ T, COSTA F, et al. Changes in AIP content, enzyme activity and inorganic nitrogen species during composting of organic wastes[J]. *Can J Soil Sci*, 1992, 72(3) :243- 252.
- [25] KWOKS, HIGUCHI R. Avoiding false positive with PCR[J]. *Nature*, 1989, 339(6221) :237- 238.
- [26] HILL G T, MITKOWSKI N A, ALDRICH WOLFE L, et al. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities[J]. *Applied Soil Ecology*, 2000, 15(1) :25- 36.
- [27] MACALAD Y J, BANHELD J F. Molecular geomicrobiology: Genes and geochemical cycling[J]. *Earth and Planetary Sciences Letters*, 2003, 209(1/2) :1- 17.
- [28] DEES P M, GHORSE W C. Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolates and extracted DNA[J]. *FEMS Microbiological Ecology*, 2001, 35(2) :207- 216.
- [29] 刘有胜, 杨朝晖, 曾光明, 等. PCR-DGGE 技术对城市餐厨垃圾堆肥中细菌种群结构分析[J]. *环境科学学报*, 2007, 27(7) :1151- 1156.
- [30] 乐毅全, 顾国维. 16S rRNA 基因技术在环境科学领域中的应用[J]. *四川环境*, 2003, 22(6) :1- 4.
- [31] SCHLOSS P D, HAY A G, WILSON D B, et al. Tracking temporal changes of bacterial community fingerprints during the initial stages of composting[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2003, 46(1) :1- 9.
- [32] RANJARD L, PLY F, LATA J C, et al. Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(10) :4479- 4487.
- [33] HANSGATE A M, SCHLOSS P D, HAY A G, et al. Molecular characterization of fungal community dynamics in the initial stages of composting[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 51(2) :209- 214.
- [34] 彭科峰, 曹立群, 吴韶平, 等. DGGE 和 T-RFLP 在堆肥微生物群落结构研究中的应用[J]. *生物信息学*, 2006, 33(1) :31- 33.
- [35] ISHI K, FUKU M, TAKI S. Microbial succession during a composting process as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 89(5) :768- 777.
- [36] WAKASE S, SASAKI H, ITOH K, et al. Investigation of the microbial community in a microbiological additive used in a manure composting process[J]. *Bioresour Technol*, 2008, 99(7) :2687- 2693.
- [37] 徐大勇, 黄为一, XU A Y, 等. 人工接种堆肥和自然堆肥微生物区系与分子多态性的变化[J]. *生态与农村环境学报*, 2006, 22(1) :29- 33.
- [38] MERS R M, HSHERS G, LERMAN L S, et al. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis[J]. *Nucleic Acids Res*, 1985, 13(9) :3131- 3145.
- [39] FERRIS MJ, WARD D M. Seasonal distributions of dominant 16S rDNA defined populations in a hot spring microbial mat examined by denaturing gradient gel electrophoresis[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(4) :1375- 1381.
- [40] BODROSSY L, SESSITSCH A. Oligonucleotide microarrays in microbial diagnostics[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2004, 7(3) :246- 255.
- [41] BODROSSY L, STRAUS PAVESE N, MURRELL J C, et al. Development and validation of a diagnostic microbial microarray for methanotrophs[J]. *Environ Microbiol*, 2003, 5(7) :566- 582.
- [42] FRANKE WHITTLE I H, KLAMMER S H, INSAM H. Design and application of an oligonucleotide microarray for the investigation of compost microbial communities[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2005, 62(1) :37- 56.

(上接第13159页)

系统;建成了“人才素质强、技术先进、设备先进、管理科学、服务一流”的森林资源健康和生态环境状况综合监测管理体系,全面建成了运行高效、支撑力强的完善的、先进的、现代的林业科技创新体系。

(4) 全面建成了繁荣先进的生态文化体系。社会公众普遍具备良好的生态文化素质和可持续发展的伦理道德观念。人与自然实现了和谐发展,林业的生态、经济、社会三大效益协调统一,林业生产组织及社会组织健全、完善而先进,全面实现了全社会参与林业生态建设、林业产业建设和生态文化体系建设的良好局面。林业及森林资源的监督、管理及保护

形成了以社会群众组织为主,国家政府为辅的良好模式。全面建成了有力推动现代林业更好发展的、主题突出、内容丰富、形式多样、贴近生活、富有感染力的生态文化体系。

参考文献

- [1] 贾治邦. 履行建设生态文明重大使命推进现代林业又好又快发展[J]. *林业经济*, 2008(1) :3- 11.
- [2] 吕月良, 陈钦. 林业现代化评价研究[M]. 北京: 中国林业出版社, 2006: 28- 36.
- [3] 中国现代化战略研究课题组、中国科学院中国现代化研究中心. 中国现代化报告2003——现代化理论、进程与展望[M]. 北京: 北京大学出版社, 2003: 56- 62.
- [4] 霍佳. 林业发展阶段论的经济学分析[D]. 北京: 北京林业大学, 2006: 2- 6.
- [5] 江泽慧. 中国现代林业[M]. 北京: 中国林业出版社, 2001: 126- 130.