

变性梯度凝胶电泳在堆肥微生物研究中的应用*

崔宗均¹ 官小燕^{2**} 李国学¹

(中国农业大学农业与生物技术学院 北京 100094)¹

(中国农业大学资源与环境学院 北京 100094)¹

摘要: 对当前堆肥中微生物种群分布及其对有机物分解作用的研究进行分析, 论述了分子生物技术中的变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 的特点。将 DGGE 与 PCR 扩增技术相结合, 可用于研究自然菌种堆肥和人工培养驯化菌种堆肥过程中微生物的演替规律, 为研究和筛选堆肥中的微生物提供更加有效、快速的信息, 促进堆肥技术的发展。

关键词: 变性梯度凝胶电泳, 堆肥, 微生物演替

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 05-0116-04

Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis on Study of Microbe in Composting Process

CUI Zong-Jun¹ GONG Xiao-Yan^{2**} LI Guo-Xue¹

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094)¹

(College of Resources and Environmental Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094)²

Abstract: Studies on the distribution of microbe and their degradation of organic material in compost are presented, and the character of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) method is also discussed. Combined with PCR technology, DGGE could be effectively applied to investigate microbial succession in composting with natural microorganism and with bred microbial community, which could provide prompt and efficient information to facilitate development of composting technology.

Key words: DGGE, Compost, Microbial succession

在生产及生活中, 人们产生大量的固体废弃物, 随着产生量不断增长, 成为严重的环境问题。在这些弃废物中, 农作物秸秆、畜禽粪便、城市生活垃圾和污水处理厂活性污泥含有大量有机物, 焚烧或填埋不仅造成严重的环境污染, 而且浪费了大量资源。将这些废物进行堆肥处理, 使之能够成为肥料, 从而实现物质的有效循环, 对于改善环境、有效利用生物资源具有重要意义^[1]。堆肥是利用自然界中广泛存在的微生物, 在人工控制的条件下, 将可生物降解的有机物转化为肥料的过程。为了有效控制堆肥过程, 必需了解这个过程中微生物对有机物的降解转化作用、微生物菌系的结构及其变化规律。

1 堆肥过程中微生物对有机物的分解及微生物种群的分布

在堆肥原料中存在多种具有分解有机物能力的微生物, 在它们的作用下, 堆肥中

* 国家“十五”科技攻关计划重大项目 (No. 2002BA516A03)

** 联系人 Tel: 010-62892857, E-mail: xiaoyan-gong@sina.com.cn

收稿日期: 2003-11-17, 修回日期: 2004-01-09

的有机物氧化分解, 释放能量, 用于微生物细胞的生长繁殖, 同时堆肥的温度发生变化^[2]。目前常用堆肥方式是高温好氧堆肥, 根据温度的变化, 堆肥过程分为四个阶段: 中温阶段, 在堆肥的初期, 堆肥中的主要微生物是嗜温菌, 包括细菌、放线菌和真菌, 分解易降解有机物和部分纤维素, 生成可溶性糖和有机酸, 并释放出热量, 堆肥的温度迅速上升至 55℃ ~ 65℃, 进入堆肥的高温阶段; 在高温段, 微生物以耐高温细菌为主, 并有少量放线菌, 霉菌对高温耐受能力差而死亡, 蛋白质和半纤维素被降解, 纤维素、木质素部分被降解; 随着易利用组分的消耗, 微生物代谢活动减弱, 物料温度下降, 进入降温阶段, 此时微生物种类增多, 趋于多样化, 真菌重新大量繁殖, 纤维素降解速度回升, 易分解物质消耗尽; 随后进入腐熟期, 纤维素降解停止, 木质素降解产物与死亡微生物中的蛋白质结合成腐殖质, 堆肥逐渐达到稳定。

2 传统分离培养方法与 DGGE 技术

传统的堆肥过程利用堆肥原料中原有的土著微生物, 对有机物进行降解和稳定化。这种方法时间长, 营养物质损失大。为了加快堆肥进程, 提高产品质量, 研究者致力于堆肥中微生物特性和演替规律的研究^[3,4], 在此基础上通过驯化、筛选等方法, 得到高效降解有机物、耐高温的微生物菌剂, 施于堆肥原料中, 可缩短堆肥时间^[5,6]。

目前, 大多数研究仍然采用传统的培养方法, 分离和纯化堆肥过程中各种微生物, 研究其特性和演替规律^[7], 同时一些新的分析方法和技术也被逐渐采用, Fang 等人采用 Biolog system 方法, 在堆肥中分离、筛选到属于专性或兼性嗜热芽孢杆菌^[8]。磷脂脂肪酸分析方法用来间接推测微生物的种类和特性, 研究表明, 随着堆肥的进行, 微生物种群迅速发生变化^[9]。然而这些结果仅限于可以培养的微生物, 而堆肥中存在着大量难以用传统方法培养的微生物, 它们可能是厌氧菌或营养条件苛刻, 或者菌种本身是未知的, 但是这些菌种有可能在堆肥过程中发挥着重要作用, 尤其对于难降解有机物的分解是必不可少的, 许多研究也证明了这一点^[5]。因此, 目前迫切需要新的菌种分离和鉴定技术, 在种或属的水平上跟踪堆肥过程中所有重要菌群的变化、演替规律, 为堆肥技术和工艺的研究提供理论基础。

变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 是在普通凝胶电泳上发展起来的 DNA 分离技术: DNA 分子在解链温度下发生变性, 双螺旋结构部分融解, 双链变为单链, 4 种碱基暴露出来, 它们与变性剂 (尿素) 产生不同的相互作用。凝胶中变性剂呈梯度分布, 则变性 DNA 分子在凝胶中由于变性剂的存在, 移动速度发生变化, 最终停止在特定的位置, 形成分离的条带, 这些条带可用 DNA 印迹杂交检测或被切下来提纯, 进行 PCR 扩增, 然后确定它们的 DNA 碱基顺序, 每一条带都代表一个不同的微生物种群, 仅仅分析条带就能得到有用的信息。与普通凝胶电泳相比, DGGE 技术具有更高的准确性和精确度, 能够将分子大小相同, 但碱基顺序不同的 DNA 分子进行分离, 快速、灵敏, 可以直接用来分析细菌染色体基因^[10,11]。

16S rDNA 普遍存在于原核微生物中, 它记载了微生物遗传和进化的信息, 既具有保守性又具有可变性, 且分子量适中, 因此被广泛用于微生物的鉴定。从混合菌群中提取 DNA, 通过 PCR 扩增反应得到 16S rDNA, 进行变性梯度凝胶电泳, 在凝胶上形成不同的条带, 对条带 DNA 进行分析, 获得微生物信息。这种分析方法不仅适用于通过普通培养方法得到的微生物, 还能够分离到难以或无法用常规方法培养的细菌或厌氧

菌, 以及混合微生物群落中含量很低的 DNA 序列, 无需培养, 不受培养基的影响。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地应用于环境微生物研究^[12]。

3 DGGE 用于堆肥过程中微生物菌群演替规律的研究

K. Ishii 等人采用 PCR 扩增和 DGGE 技术, 对微生物 16S rDNA 进行扩增、分离, 得到分离的 DNA 条带, 并对不同条带的碱基序列进行分析, 利用数据库进行检索, 选择同源性最近的菌株构建系统发育树, 研究高温好氧堆肥过程中微生物的种类和数量变化规律^[13]。

实验发现随着堆肥过程的进行, 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也发生相应的变化。在堆肥初期的中温阶段, DGGE 图谱中 DNA 条带分别与四种革兰氏阴性发酵菌的碱基序列相似。高温期的微生物分别与 *Bacillus* sp., *Viridibacillus* 和 *Gracilibacillus* 具有很高的相似性, 中温段的发酵菌消失, 温度达到最高值时, *B. coagulans* 占优势, 该菌能够水解蛋白质, 产生氨使 pH 上升。在降温阶段, 高温段中的菌消失, 出现新的条带, 与 *S. multivorum*, *A. otitis*, *Cl. fervidus*, *Cl. filamentosum* 和 *Alcaligenes* sp. NKNTAU 相似, 当易降解物质被分解后, 这些菌可以降解残存的复杂组分, 专性厌氧菌的出现表明堆肥中出现了适于厌氧微生物生存的厌氧环境。在腐熟期, DGGE 条带图谱更加复杂, 出现了新的条带, 与 *Arthrobacter* 有关的该属的绝大多数是土壤微生物, 这些结果表明, 堆肥末期的环境与土壤的寡营养环境相似。堆肥初期样品中 DNA 顺序与 DNA 数据库中的相关顺序具有很高的相似性, 而末期相似性较低, 表明早期出现的微生物易于分离, 且研究得比较透彻, 降温期后、腐熟期出现的微生物难于培养和分离, 对其研究较少, 缺乏相关 DNA 顺序的数据。

4 DGGE 用于纤维素降解菌系的研究

崔宗均等人以纤维素(滤纸和秸秆)作为碳源, 通过驯化从作物秸秆和畜禽粪便的堆肥中筛选到高效、稳定纤维素降解菌系 MCl。将菌系 MCl 用于作物秸秆和畜禽粪便堆肥, 可以加速堆肥进程, 将堆肥时间从 3 个月缩短为 2 个月^[5,6]。

研究表明在纤维素的降解过程中, DGGE 图谱条带的变化表明微生物菌群的种类和数量在发生变化。在最初 4 天, 条带 B、C、D 和 E 占主导, 随后条带 A 和 F 出现并占主导, 而条带 B、C、D 和 E 消失。

对条带 PCR 扩增产物碱基顺序进行分析, 发现 A 属于 *C. thermosuccinogenes*, 为严格厌氧菌, 这种菌存在于各种生活环境中, 能够利用寡糖通过发酵产生乙酸盐、乳酸盐和氢气, 然而不能利用纤维素和木聚糖进行生长。条带 C、D 和 E 之间顺序相似, 来自于同一菌株的不同操纵子, 属于 *Brevibacillus* sp., *Brevibacillus* 属细菌是严格好氧菌, 可利用各种糖产生酸, 与条带 C-E 相对应的细菌可能与糖的消耗和初期有机酸的产生有关, 它们所利用的糖来自于稻草的降解。B 和 F 分别属于 *Bordetella* sp. 和 *Pseudoxanthomonas*。 *Bordetella* 属细菌严格好氧或兼性厌氧, 不能水解蔗糖的非发酵性细菌, 不能利用葡萄糖、木糖或纤维二糖; *Pseudoxanthomonas* 属细菌是好氧菌。DGGE 分析结果表明, 好氧及兼性好氧菌可以与严格厌氧菌共存于同一微生物菌系中, 这表明通过代谢

活动和代谢产物, 这些微生物之间保持非常密切的关系。而条带 D 和 F 之间也具有某种关联。

利用人工方法筛选单个纤维素降解菌, 或将数个菌进行简单组合, 很难完成对堆肥原料中纤维素的降解、转化, 同时由于驯化和应用条件不同, 人工筛选和驯化的菌在自然环境中的生长受到了抑制, 说明单个菌或简单组合的菌群对环境的适应能力较差。高降解能力和降解稳定性可通过复杂的微生物菌系得到, 在稳定的微生物菌系中, 不同的微生物之间存在密切而复杂物质和能量代谢的关系, 可以使不同的微生物获得相对稳定的生存环境, 对环境的变化具有比较强的适应能力, 因此, 可以利用微生物菌系中的各种微生物分解堆肥中复杂的有机物, 同时保持菌系的稳定性和对环境的适应性。通过 DGGE 分离和 16S rDNA 顺序分析表明, 在微生物菌系中好氧菌和厌氧菌间存在协同作用, 它们的关系可以通过代谢产物的分析来推测。把堆肥中的微生物菌群作为一个微生态系统, 研究微生物之间的关系以及它们与环境的物质和能量代谢, 能够更加全面和深刻地理解堆肥过程所发生变化的机理, 从而为堆肥过程的优化控制提供理论基础, 进一步提高堆肥进程, 缩短堆肥时间, 而 DGGE 为这个研究过程提供有力的技术支持。

参 考 文 献

- [1] 李国学, 张福锁. 固体废物堆肥化与有机复混肥生产. 北京: 化学工业出版社, 2000.1-97.
- [2] 官家发. 四川环境, 2000, 19 (3): 21~22.
- [3] Strom P F. Appl Environ Microbiol, 1985, 50 (4): 906~913.
- [4] Strom P F. Appl Environ Microbiol, 1985, 50 (4): 899~905.
- [5] 崔宗均, 李美丹, 朴 哲, 等. 环境科学, 2002, 23 (3): 36~39.
- [6] Haruta S, Cui Z Z, Huang M L. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 59: 529~534.
- [7] Mckinley V L., Vestal J R. Appl Environ Microbiol, 1984, 47 (5): 933~941.
- [8] Fang M, Wong J W C. Water Air and Soil Pollution. 2000, 124: 333~334.
- [9] Boggs L C, Kennedy C., Reganold J P. Appl Environ Microbiol, 1998, 64 (10): 4062~4064.
- [10] Muyzer G, Waal E C D E., Uitterlinden A G. Appl Environ Microbiol, 1993, 59 (3): 695~700.
- [11] 张 彤, 方汉平. 微生物学通报, 2003, 30 (2): 97~101.
- [12] Ferris M J, Nold S C, Revsbech N P, et al. Appl Environ Microbiol, 1997, 63 (4): 1367~1374.
- [13] Ishii K, Fukui M, Takii S J. Appl Microbiol, 2000, 89: 768~777.