

有机堆肥 PCR-DGGE 的微生物分子多态性分析*

李自刚 黄为一

(农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京农业大学生命科学院微生物学系, 南京 210095)

MICROBIAL MOLECULAR PHYLOGENETIC DIVERSITY ANALYSIS OF ORGANIC COMPOST USING PCR-DGGE METHOD

Li Zigang Huang Weiyi

*(Key Lab of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture; Microbiology Department, College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)*关键词 PCR-DGGE; 16 S rDNA/RNA; 有机堆肥; 微生物分子多态性
中图分类号 Q93; S14 文献标识码 A

目前, 利用有机固体废弃物生产生物有机肥料已成为一门产业^[1]。生物有机肥料具有的优越性是任何一种化肥都不能代替的。因为生物有机肥中的有机质不但可以作为 N、P、K 等作物营养元素的主要来源, 而且还能促使土壤团粒结构形成, 提高土壤保水、保肥的能力, 进而提高作物的产量^[2]。同时有机堆肥过程中形成的腐殖酸以及一些低分子量有机物质具有重要的生理功能^[3]。目前阻碍有机固体废弃物堆肥进展的一个重要原因就是至今还没有一个权威的评论方法或统一的指标对堆肥腐熟进行评价^[4], 从分子微生物生态学角度对有机堆肥的微生物多样性和堆肥中腐熟微生物研究鲜见报道。

经典的平板培养分离方法研究自然环境中(如堆肥环境和土壤环境)的微生物多样性有很大的缺陷, 如自然环境中可分离培养的微生物种类只占该环境下微生物种类总数的 0.1%~10%^[5], 不能很好地反映自然环境中微生物多样性的原始状态^[6]。而微生物分子生物学方法, 如聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳法(Polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE)自 1993 年被应用于微生物生态学研究以来^[5], 许多微生物实验室都将它作为分析自然环境微生物种群的多样性和种群动态监测的工具。

1 材料与方法

1.1 材料

堆肥试验于 2003 年 8 月 21 日至 2004 年 7 月 10 日在江苏南京山田奶牛场生态堆肥厂进行。堆肥原料有: 锯木屑(A)、稻糠(B), A 和 B 购自山田奶牛场附近的家具加工厂和碾米厂; 新鲜奶牛粪便(C), 收集自山田奶牛场奶牛养殖棚; 成品有机肥(D), 由南京山田奶牛场生态堆肥厂生产。其中 A、B、D 用于调整 C 起始时的水分, 使开始的堆肥原料湿度保持在 65%±5%^[7]。堆肥腐熟后(堆肥腐熟由 Dou 推荐的方法判定^[8]), 从堆体的不同位置点(>10)各平行取样 3 次, 每次 250 g, 并分批次充分混匀, 然后再从中平行取样 3 次, 每次 250 g, 取样后将样品于 0~5℃冰箱冷藏贮存以供分析。土壤样品取自江苏南京山田奶牛场蔬菜地, 取样范围约为 660 m²。取样方法参见文献^[10], 取样时间为 2004 年 6 月 28 日。根据堆肥起始混合原料组成 AC、BC、ABC、ACD、BCD、ABCD、CD 对照(CK)的不同, 样品分别标记为 1、2、3、4、5、6、7、8。其中 CK 为不添加任何外来原料的纯鲜牛粪, 自然风干至湿度为 65%±5%, 然后再进行堆肥。

* 上海市科技兴农重点攻关项目(农科攻字 2000 第 5-6 号)资助

- 通讯作者

作者简介: 李自刚(1978-), 男, 博士研究生, 主要从事生物肥料、环境微生物学与分子微生物学研究

收稿日期: 2004-10-24; 收到修改稿日期: 2005-03-22

1.2 方法

堆肥样品 DNA 的提取与纯化方法按照 Michael 的方法进行^[9]。土壤样品总 DNA 提取方法按照本实验室常用方法进行,并参见文献^[11]。提取后微生物 16 S rDNA 的扩增及变性梯度凝胶电泳方法参见文献^[12]。变性梯度凝胶电泳图谱的泳道编号所代表的样品与上述编号所代表的样品相同,第 9 号泳道为商品有机肥样品的微生物 16 S rDNA 的 DGGE 图谱,土壤样品微生物 16 S rDNA 的 DGGE 图谱在 DGGE 图上以“S”直接标识。

2 结果与讨论

各个堆肥样品、商品有机肥和土壤样品的变性梯度凝胶电泳图谱如图 1 所示。由图 1 可知,每个堆肥样品经过 PCR-DGGE 均可以分离出数目不等的电泳条带,且各条带强度和迁移率互不相同。9 种堆肥样品以及土壤样品的 PCR 产物中含有的数目不等的 DNA 片段是一些不同种类微生物的 16 S rDNA/RNA 基因 V6-V8 区的 DNA 片段,这些片段代表着微生物的不同种类^[13]。通过这些片段的测序以及测序后的 DNA 序列和国际标准核酸库的已知序列相比对,就可以得出这些在 DGGE 中被分离的 DNA 片段所代表的微生物,从而确定不同堆肥中所含有的微生物类群并推断其在高温堆肥中物质转化时所起的作用。同时,也可以根据它们起作用时的环境条件来开发新的微生物资源用于生产实践,并能为有机肥施用后土壤微生物区系的改善提供分子生态学方面的证据。



图 1 不同堆肥样品的变性梯度凝胶电泳(DGGE)分离图谱

由图 1 可知, U、T、R、O、Q、P、E、X、W 等共有条带说明在 9 种堆肥样品中存在着这几种电泳条带所

代表的基本微生物类型,这就为用分子微生物学指标作为堆肥腐熟度判断标准提供了分子生物学依据;而 1、2、7 和 9 等堆肥样品与其他几种堆肥样品相比分别缺少了某些电泳条带,如 A、B、C、D、I、J 等,但它们缺失的电泳条带却又不完全相同,这从另一个方面说明了堆肥微生物的多样性,这正是我们从高温堆肥中利用分子生物学方法寻找新的微生物资源的关键性所在;4、5、6 条带比较丰富,说明在这几种堆肥中可能存在着数目较多的微生物;而 9 的电泳条带相对较少,可能暗示此种堆肥中微生物的种类相对较少,但在此种情况下有机堆肥腐熟程度如何,有必要深入研究。对 8 泳道所代表的 CK 来讲,虽然其成熟样品 DGGE 电泳条带也较为丰富,但从堆肥工艺方面来看,劳动强度大、堆肥时间长,因此不宜采取这种堆肥措施。就 DGGE 图谱中的电泳条带和土壤的电泳条带比较而言,从整体上来说,有机堆肥样品的微生物电泳条带要比土壤样品的微生物电泳条带丰富得多,这从分子微生物学角度说明在农田中施用有机堆肥可以改善土壤的微生物区系。

总之,PCR-DGGE 这些条带的存在说明,在不同堆肥样品中存在着特异的微生物,如果对这些特异性条带做进一步研究可得出其所代表的微生物种类,再结合这些堆肥产品施用后对作物的影响,就可以开发利用对作物有益的微生物,消除对作物或环境有害的微生物。这一点通过堆肥样品中诸条带和土壤各条带的对比就更加明显,这也同时说明堆肥中和土壤中存在着相同的微生物区系。所有这些现象均可以说明各种堆肥样品中有共同的微生物种群,但也有着自己特有的微生物种类,这可能与不同堆肥原料的化学组成不同有关。而在腐熟堆肥中出现的某些特殊种类的微生物,如 U、T、R、O、Q、P、E、X、W 等共有条带所代表的微生物种群,可以作为堆肥腐熟度评价的指示性微生物, Ishii^[14]也曾提出过以出现特征微生物作为堆肥腐熟标志的设想。

参考文献

- [1] 范海荣,华珞,傅棣,等. 城市垃圾堆肥的生态效应与对策研究. 土壤, 2004, 36(5): 498~505
- [2] Bhatti A U, Khan Q, Gumarti A H, *et al.* Effect of organic manure and chemical amendments on soil properties and crop yield on a salt affected Entisol. *Pedosphere*, 2005, 15(1): 46~51
- [3] Serenella N, Diego P, Adele M, *et al.* Physiological effect of humic substance on higher plants. *Soil Biology & Biochemistry*, 2002, 34: 1527~1536

- [4] Claudio M, Maria T D A, Liviana L, *et al.* An integrated chemical, thermal, and microbiological approach to compost stability evaluation. *J. Environ. Qual.*, 2003, 32: 2 379~ 2 386
- [5] Muyzer G, Wall E C D, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16 S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, 59: 695~ 700
- [6] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 1995, 59(1): 143~ 169
- [7] 张相锋, 王洪涛, 聂永丰, 等. 高水分蔬菜废物和花卉、鸡舍废物联合堆肥的中试研究. *环境科学*, 2003, 24(2): 147~ 150
- [8] Dou Z, Zhang G Y, Stout W L, *et al.* Efficacy of alum and coal combustion by-products in stabilizing manure phosphorus. *Journal of Environmental Quality*, 2003, 32: 1 409~ 1 479
- [9] Michael H, William C G, Larry P W. A quantitative of DNA extraction and purification from compost. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 54: 37~ 54
- [10] 鲍士旦主编. 土壤农化分析(第三版). 北京: 中国农业出版社, 2000. 14~ 20
- [11] 黄婷婷, 曹慧, 王兴祥, 等. 一种土壤微生物总 DNA 的高效提取方法. *土壤*, 2004, 36(6): 662~ 666
- [12] Zhu W Y, William B A, Konstantinov S R, *et al.* Analysis of 16 S rDNA reveals bacterial shift during in vitro fermentation of fermentable carbohydrate using piglet faces as inoculum. *Anaerobe*, 2003, 9: 175~ 180
- [13] Konstantinov S R, Zhu W Y, Williams B A, *et al.* Effect of fermentable carbohydrates on piglet facial bacterial communities as revealed by 16S ribosomal DNA. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 43: 225~ 235
- [14] Ishii K, Fukui M, Takii S. Microbial succession during a composting process as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 89: 768~ 777