

分子生物学技术在堆肥微生物研究中的应用综述

张蔓¹, 魏明宝^{1,2}, 马闯^{1,2}, 张宏忠^{1,2}, 赵继红^{1,2}

(1. 郑州轻工业学院 材料与化学工程学院, 河南 郑州 450001;

2. 河南省表界面科学重点实验室, 河南 郑州 450001)

摘要:对常用的16S/18S rRNA/DNA序列分析、变性梯度凝胶电泳、DNA单链构象多态性分析、限制性片段长度多态性分析、随机扩增多态性DNA分析、扩增的限制性片段长度多态性分析等分子生物学技术的特点及其在堆肥微生物研究中的应用进行了述评,提出堆肥微生物研究应结合传统的分离培养方法,多种技术互补使用,以便取得更科学的结果。

关键词:堆肥;微生物;分子生物学技术

中图分类号:Q71;Q75;Q785 **文献标志码:**A **DOI:**10.3969/j.issn.2095-476X.2013.03.004

Review of application of molecular biotechnology in compost microorganism research

ZHANG Man¹, WEI Ming-bao^{1,2}, MA Chuang^{1,2}, ZHANG Hong-zhong^{1,2}, ZHAO Ji-hong^{1,2}

(1. College of Material and Chemical Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;

2. He'nan Provincial Key Lab of Surface and Interface Science, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: The molecular biotechnology characteristics and application in compost microorganism research were reviewed, including 16S/18S rRNA/DNA sequence analysis, DGGE, SSCP, RFLP, RAPD and AFLP technology. In the future research of compost microorganism, we will complementarily use the traditional separation method and combine molecular biotechnology to achieve a better science result.

Key words: compost; microorganism; molecular biotechnology

0 引言

人类在生产和生活中产生了大量有机固体废弃物,主要包括农作物秸秆、畜禽粪便、生活垃圾、城市污泥等。堆肥具有良好的环境效应、生物处理的可持续性和实现废弃物的循环利用等特点,被许多国家和地区广泛接受,成为处理有机固体废弃物的有效方法之一^[1]。堆肥是利用自然界广泛存在的

微生物(细菌、真菌、放线菌等)或商业菌株,有控制地促进可被生物降解的有机物转化为稳定的腐殖质HS的生物化学过程^[2],本质是群落结构迅速演替的多个微生物群体共同作用的动态过程^[3-4]。堆肥接种高效微生物菌剂,能够迅速提高堆温,有效增加微生物数量,加快有机物料分解速度,促进堆肥产品的腐熟、稳定,减少臭气的产生,促进氮素的积累,提高堆肥效率^[5-8],研究堆肥微生物对于揭示

收稿日期:2013-03-26

基金项目:河南省重大公益项目(101100910300);国家水体污染控制与治理科技重大专项子课题(2012ZX07204-001)

作者简介:张蔓(1989—),女,河南省周口市人,郑州轻工业学院硕士研究生,主要研究方向为固体废弃物处理。

堆肥过程中物质转化规律和工艺优化有非常重要的意义。

近年来,国内外学者对堆肥微生物进行了一系列理论和实践研究。由于堆肥原料性质和微生物群落结构复杂多样,随温度的改变,微生物处于动态变化。另外,传统方法主要采用一定配比的培养基和固定的培养温度,通过分离纯化和培养选育,对微生物的种群与群落多样性进行研究,忽略了气候变化和生物相互作用的影响,具有明显的人工选择性^[9]。许多研究已经证实,自然界中90%以上微生物要求的营养条件非常严格或是难以培养,通过传统的分离方法鉴定的微生物只占环境微生物总数的0.1%~10%,因此,利用传统纯培养方法难以快速、准确、定量地反映堆肥不同阶段微生物群落结构的演替规律和微生物多样性的原始状态及动态变化^[10],具有很大局限性^[11]。经历了百余年的发展和完善,利用传统纯培养法从环境中直接分离鉴定菌种的科研工作已接近极限^[12]。

分子生物学以研究分子水平生命本质为目的,以核酸和蛋白质等生物大分子的结构及其在遗传信息和细胞信息传递中的作用为研究对象,是当前生命科学中发展最快并与其他学科广泛交叉和渗透的重要前沿领域^[13]。分子生物学技术的发展,弥补了传统方法的不足,为堆肥微生物的研究开辟了新的途径,也为堆肥复合菌系的选育、堆肥过程的控制提供了行之有效的手段。当然分子生物学技术也具有一定的缺陷,利用其分析环境样品,得到的结果难免有所偏差。本文拟对分子生物学技术在堆肥微生物研究方面取得的进展进行综述,以期为进一步正确运用这些技术提供参考。

1 16S/18S rRNA/DNA 序列分析技术在堆肥微生物研究中的应用

16S/18S rRNA/DNA 序列分析技术是由环境微生物样品总 DNA 的提取、引物与探针的设计、聚合酶链式反应(PCR)扩增、遗传指纹技术、16S rRNA 基因(rDNA)克隆文库的构建、序列测定、序列分析与系统树构建、核酸杂交等一系列技术组成。在实际的研究与应用中,可以根据研究对象和目的的不同单独或组合使用以上技术^[13]。

1.1 16S/18S rRNA/DNA 序列分析技术及其应用

利用 16S/18S rRNA/DNA 序列分析技术不需要

对微生物进行分离培养,能够动态地研究微生物群落的多样性,真实反映微生物的生存状态。随着核酸序列数据库的不断补充和完善,可以实现对复杂环境微生物快速、微量、准确、简便的分类和检测。1983年,C. R. Woese 等^[14]利用该技术定义并建立了古菌界,将生物界重新划分为3主干6界系统。目前,该技术在堆肥微生物研究方面被广泛应用。使用该技术的关键在于:首先要有足以代表实际生存环境的微生物组成的基因组 DNA;其次是有数量足够多的克隆子,以反映环境样本实际的微生物组成情况,构建 16S/18S rRNA 基因文库,最后进行 16S/18S rDNA 序列分析。

采用 16S/18S rRNA/DNA 序列分析技术,不仅能对分子特性进行研究,而且能够用于数量检测、预测自然进化关系以及物种分类。P. Partanen 等^[3]对生产性和中试阶段的生活垃圾堆肥中的细菌多样性进行了研究,通过对得到的超过 1 500 条近全长 16S rRNA 序列进行分析,发现其中超过 500 条序列在所检测样品中只出现一次,另外,尽管大多数序列与堆肥中已发现的微生物序列相似,但是仍有部分细菌系统发育型是首次被检测到,经过统计学分析,预测在生活垃圾堆肥中可能存在超过 2 000 种不同的细菌系统发育型;且中试阶段和生产性阶段的生活垃圾堆肥微生物在属水平上比较相似,而在种和菌株水平上差异较大。

1.2 变性梯度凝胶电泳技术及其应用

DGGE 技术由 Fischer 等最早于 1979 年在检测 DNA 片段中的点突变时提出。1993 年 G. Muyzer 等^[15]将该技术应用于微生物生态学研究,证实了其在研究自然界微生物群落的遗传多样性和演替规律方面所具有的独特优越性。DGGE 技术无需培养,不受培养基的影响,可以快速、可靠、可重复地同时分析多个样品,非常适用于堆肥这种复杂环境中的微生物分析,已引起越来越多研究者的重视^[16]。目前,该技术被广泛应用于河流、活性污泥、生物膜、土壤、堆肥^[17-21]等环境样品的微生物多样性检测及群落结构演替分析,已成为研究堆肥化过程中微生物多样性重要的分子生态技术之一^[22]。该技术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,揭示堆肥化过程中好氧和厌氧的、可分离培养和目前不

可分离培养的微生物的动态及多样性。

目前,将 DGGE 技术与其他技术(传统微生物培养技术、构建 rDNA 克隆文库、PCR 等)相结合,能够发挥各种技术的优势,在堆肥微生物的研究中有着广泛的应用。王伟东等^[4]将 DGGE 和平板计数法相结合对堆肥化过程中微生物的区系动态变化进行了研究。结果表明:在堆肥化过程中,微生物数量总的趋势是细菌的数量最多,放线菌次之,真菌的数量最少,在堆肥前后中温微生物、高温放线菌、高温真菌的数量也有明显变化,通过 DGGE 分析表明,发酵过程中细菌的种类发生了明显的更迭现象。

将 PCR 与 DGGE 相结合的 PCR-DGGE 技术,可以通过图谱特征来分析系统中微生物的群落变化规律,克服了传统微生物研究方法的局限性,目前已被广泛应用于环境样品的研究中^[23-26]。党秋玲等^[27]以生活垃圾为原料进行好氧堆肥,多阶段强化接种功能微生物菌剂,利用 PCR-DGGE 方法并结合聚类分析和 Shannon-Weaver 指数变化来研究堆肥过程中多阶段强化接种对细菌群落多样性的影响,结果表明,多阶段接种堆肥能有效提高堆体降温期和二次发酵期的温度,并提高半纤维素、纤维素和木质素的降解率。

DGGE 与单链构象多态性(SSCP)技术相比,2种技术能够提供的信息相似,但在描述某些过程方面存在细微差异,DGGE 对细菌群落结构变化更敏感。叶凝芳等^[28]针对细菌群落的 16S rDNA V3 区,采用 DGGE 和 SSCP 技术,分别分析蔬菜类废物中温好氧降解过程中的细菌群落,比较 2 种技术对微生物群落结构和动态变化的解析水平,结果表明,细菌群落结构在中温好氧降解过程中有显著变化,随降解时间的延长总体呈现从简单到复杂的趋势;主成分分析结果表明,细菌群落结构的演替与好氧降解过程不同阶段生物物质组成具有相关性。

受 DNA 提取方法、PCR 条件和效率等因素的影响,DGGE 技术也存在其局限性:一般只有在总的微生物群落中占 1% 以上的种群才能被检测出来,弱勢菌群不能检测到,只能分离较小的 DNA 片段,较长的片段分离率下降,限制了用于系统发育分析和探针的序列信息数量。

2 分子标记技术在堆肥微生物研究中的应用

16S/18S rRNA/DNA 序列分析技术虽然能够对

环境中各种微生物进行量化,但是需要的测序工作量大,时间周期长且不经济,而且要求要有足够的克隆子数才能准确反映环境中的微生物群落的真实组成情况。分子标记技术可用于监测微生物群落结构及其动态变化过程,近年来被广大科研工作者引入到微生态研究中,发挥了巨大的作用。

广义的分子标记是指可遗传并可检测的 DNA 序列或蛋白质,狭义的分子标记概念只指 DNA 标记,目前被广泛采纳^[29]。DNA 分子水平上的遗传标记可以揭示生物的遗传多态性。将 DNA 限制性片段长度多态性作为遗传标记的思想由 D. Botstein 等^[30]首次提出,至今,联合 PCR 技术已经发展了十多种基于 DNA 多态性的分子标记技术。本文主要阐述以下几种分子标记技术在堆肥微生物研究中的应用。

2.1 DNA 单链构象多态性分析及其应用

SSCP 技术主要用于各种点突变,短核苷酸序列的缺失或插入等突变的检测。该技术由 M. Orita 等^[31]于 1989 年首次提出,并由 D. H. Lee 等^[32]首次应用于微生物群落组成的分析。之后,F. Schwieger 等^[33]对该技术进行了改进,提高了其图谱带型的分辨率和可读性,使之更适合较为复杂的微生物群落结构的分析。该技术简便、快速、灵敏、适于大样本筛查,且不需要特殊仪器,目前已在堆肥微生物检测^[34]中得到了广泛应用。

M. Orita 等^[31]在研究中将 SSCP 用于检查 PCR 扩增产物的基因突变,从而建立了 PCR-SSCP 技术,简便性和灵敏性进一步提高,该技术目前在堆肥微生物研究中已有广泛应用,且操作简便,价格低廉。章戴荣^[35]在研究中将 PCR-SSCP 技术应用于检测堆肥细菌和真菌随时间的变化,结果表明:在堆肥过程中,细菌和真菌构成的微生物群落发生了很大变化,前期细菌的优势地位在 15 d 后被真菌取代,因此,提高堆肥效率的措施应当重点放在堆肥后期。N. Abid 等^[36]通过使用 PCR-SSCP 技术研究实验室规模的反应器中活性污泥堆肥过程中微生物的群落演替,结果表明:细菌群落比真核生物群落具有更高的多样性,在堆肥 60 d 后,堆肥中微生物群落趋于稳定,且堆肥危害植物的毒性明显消失。

然而,PCR-SSCP 技术也有其局限性:随着分析片段长度增加,分析灵敏度降低;大于 500 bp 的片段则只能检出 10% ~ 30% 的变异,且该技术仅限于

对样品中优势菌群的分析,有些单链 DNA 可以形成不止一个稳定的构象,造成对微生物多样性的过高估计.选择合适的引物,扩增合适长度的 DNA 片段,可以弥补灵敏性方面的不足^[37-38].

2.2 限制性片段长度多态性分析及其应用

限制性片段长度多态性(RFLP)技术利用限制性内切酶对 DNA 进行切割,产生长短、数目不同的限制性切割片段,进而利用电泳技术或特定探针杂交对 DNA 样品的限制性内切酶切割产物进行分析,根据 DNA 序列的限制性片段长度多态性分析微生物种群的遗传多样性,或经过多个探针的比较确定生物的进化和分类关系.喻曼等^[39]用 RFLP 技术研究了农业固体废物堆肥过程中的微生物多样性及其动态变化,结果表明:在不同发酵期接种黄孢原毛平革菌(*P. chrysosporium*)对堆肥进程的影响不同.接种黄孢对堆肥细菌群落的影响显著且迅速,二次接种可以很好地巩固一次接种的效果.利用该技术简单快捷,自动化程度高,准确率高,但存在的问题是图谱的谱带比扩增 DNA 的谱带要多,因此会过高估计群落成员数.

RFLP 技术在牧草的个体识别、遗传图谱的绘制、目的基因定位、检测群体内或群体间序列差异程度^[40-43]、辅助育种等方面的研究中有着广泛的应用,利用该技术有利于培育优良品种,提高牧草的产量、品质和生态效益.陈金华等^[44]利用 DGGE 和 RFLP 方法初步研究了桑粒肩天牛幼虫肠道微生态系统,结果显示:桑粒肩天牛幼虫肠道微生物非常丰富,2种方法都能有效反应肠道微生物的多样性状况,且 RFLP 分辨率更好.

末端限制性片段长度多态性 T-RFLP 是由 RFLP 技术发展起来的一种高通量指纹技术,该技术将酶切产物电泳后进行荧光检测,得到末端限制性片段的多样性,进而研究微生物群落的结构、组成及其动态变化,还可以研究微生物的系统发育及种属鉴定.该技术目前在微生物生态学中广泛应用. U. M. E. Schütte 等^[45]对 T-RFLP 在微生物群落结构研究中的应用进展进行了综述:虚拟 PCR 和限制性内切酶工具以互联网为基础,极大地方便了 T-RFLP 技术对引物和限制性内切酶的选择,使用该方法的缺陷在于利用自动测序仪完成 T-RFLP 价格昂贵.

2.3 随机扩增多态性 DNA 分析及其应用

随机扩散多态性 DNA(RAPD)技术建立在 PCR 技术基础上,利用一系列碱基顺序随机排列的、不同的寡聚核苷酸单链为引物,对所研究的基因组 DNA 进行 PCR 扩增. RAPD 技术继承了 PCR 技术效率高、样品用量少、灵敏度高、检测容易等优点,同时又有其独到之处^[46]:操作程序技术简单,不需要特殊的仪器设备,不需 DNA 探针,只需少量 DNA 样品,用一个引物就可扩增出许多片段,成本较低,多态性丰富,因此,非常适合对微生物种群进行快速检测.已有研究表明, RAPD 技术具有很好的种群特异性,能够用于微生物遗传多样性的研究^[47]. 陈杰娥等^[48]利用 RAPD 方法分析了厌氧氨氧化污泥驯化过程中的微生物遗传性质,发现不同反应器内的微生物遗传变异较大,通过对比分析,找到了效果更好的驯化途径.

RAPD 技术在微生物的分类鉴定方面有其显著的优越性:在 *Frankia* 菌中,16S rRNA 扩增、扩增核糖体 DNA 限制性分析(ARDRA)、重复基因外回纹序列-聚合酶链式反应(REP-PCR)等均以属间甚至原核生物普遍存在的高度保守序列为基础设计引物,比较变异程度和同源相关性,进而评价系统发育和鉴别物种.由于产物同源保守性强,给种内或亚种的区分鉴别带来问题. RAPD 由于不需要设计特异的引物,一次可获得大量 DNA 多态性片段,为在同一属(或群)下分类鉴别提供了有效可行的办法^[46].

RAPD 分析中存在的最大问题是重复性较低,工作量大,容易受各种因素的影响.随着分子技术的发展,在实际使用中,它的缺点将被克服或通过其他方法加以弥补和完善.

2.4 扩增的限制性片段长度多态性分析及其应用

扩增的限制性片段长度多态性(AFLP)技术是基于 PCR 技术扩增基因组 DNA 的限制性片段的分子标记技术.使用该技术,可以在预先不知道 DNA 序列信息的情况下同时进行多数 DNA 酶切片的 PCR 扩增.反应程序主要包括 3 个基本步骤:制备模板 DNA、扩增酶切片段和凝胶电泳分析.

AFLP 分析技术结合了 RFLP 和 PCR 技术,因此,它除了具备重复性强、可信度高等优点外,还具有 RFLP 技术可靠性和 PCR 技术高效性的特点,方便、快速,目前被认为是 DNA 指纹图谱技术中多态

性最为丰富的一项技术^[49]。作为一种检测遗传多样性、构建高密度遗传图谱以及定位克隆目的基因的理想分子标记技术,AFLP技术在细菌的分类和鉴定、真菌的分类和基因标定、菌株之间亲缘关系、微生物的遗传多样性^[50-53]等方面有广泛的应用,并将在鉴定与评估堆肥微生物种质资源、评估堆肥微生物种群内与菌群间的多样性水平和描述种下水平的遗传关系方面发挥重要作用。

3 其他技术在堆肥微生物研究中的应用

在环境微生物的研究中,生物芯片技术主要应用于对环境中原微生物的检测和快速诊断^[54]。目前,生物芯片技术主要包括基因芯片、蛋白质芯片和芯片实验室三大领域,基因芯片是其中最重要的一种。由于芯片技术仅通过一次杂交实验就可得出多种目的核酸的基因信息,具有快速、高通量、平行化等其他技术无法比拟的优点,现已广泛应用于临床诊断和食品卫生监督等研究领域,为细菌、病毒、真菌等病原体的种类鉴定、功能基因及耐药性检测等提供了一个强有力的工具^[55]。可以将基因芯片技术应用于堆肥中的特定微生物种群的检测,如监测某些功能微生物在堆肥过程中的动态变化,也可用于检测堆肥产品中可能存在的病原微生物,从而对堆肥质量进行监控,为堆肥的安全使用提供保障。

流式细胞术 FCM 应用于对液体中的细胞或其他生物微粒逐个进行多参数快速(10^3 细胞/s)定量分析和分选,检测环境微生物的类群结构,具有自动、快速、客观、直接和同时检测多参数的优点,可以很好地避免显微术人工计数的主观性偏差,弥补传统培养方法的局限性^[56]。许多研究者成功地使用 FCM 技术对简单的人工培养的微生物细胞群或诸如活性污泥等复杂的微生物自然群落进行了分析^[57]。

另外,扩增性 rDNA 限制性酶切片段分析 ARDRA、基因工程 GE 等技术,也有着广阔的应用前景,但目前在堆肥微生物学中应用还不是很多。

4 结语

随着堆肥技术的广泛应用,对准确、快捷、简便的堆肥微生物研究技术的需要更加迫切。分子生物学技术能够突破菌株分离和培养的限制,直接对堆

肥微生物总 DNA、微生物群落多样性的动态变化进行研究,为寻找适当的微生物菌剂,优化堆肥工艺提供理论指导。另外,传统的分离培养方法和分子生物学技术,在目前应用于堆肥微生物多样性和群落结构变化规律研究中,都存在自身的缺陷,因此,如果能够根据需要,将新技术与传统培养方法相结合,多种技术相互配合,互为补充进行菌种的分离鉴定,将能够提供更加直观、全面、准确的信息,得到更加科学合理的结果。

参考文献:

- [1] Zhu N, Deng C, Xiong Y, et al. Performance characteristics of three aeration systems in the swine manure composting[J]. *Bioresource Technology*, 2004, 95(3):319.
- [2] 韦元雅,宋鹏,陈五岭,等.堆肥法处理城市有机垃圾研究综述[J]. *上海环境科学*, 2008, 27(5):214.
- [3] Partanen P, Hultman J, Paulin L, et al. Bacterial diversity at different stages of the composting process[J]. *BMC Microbiology*, 2010, 10(1):94.
- [4] 王伟东,王小芬,朴哲,等.堆肥化过程中微生物群落的动态[J]. *环境科学*, 2007, 28(11):2591.
- [5] 顾文杰,张发宝,徐培智,等.复合微生物菌剂对市政污泥堆肥中有机物质的影响[J]. *广东农业科学*, 2011(12):71.
- [6] 王玉军,窦森,崔俊涛,等.复合菌剂对农业废弃物堆肥过程中理化指标变化的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2006, 25(5):1354.
- [7] 徐智,张陇利,张发宝,等.堆肥反应器中2种微生物接种剂的堆肥效果研究[J]. *环境科学*, 2009, 30(11):3409.
- [8] Xi B D, Liu H L, Zeng G M, et al. Composting MSW and sewage sludge with effective complex microorganisms[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2002, 14(2):264.
- [9] Howeler M, Ghiorse W C, Walker L P. A quantitative analysis of DNA extraction and purification from compost[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 54(1):37.
- [10] 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.
- [11] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. *Microbiological Reviews*, 1995, 59(1):143.
- [12] Vaz-moreira I, Egas C, Nunes O C, et al. Culture-dependent and culture-independent diversity surveys target differ-

- ent bacteria: A case study in a freshwater sample[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2011, 100(2): 245.
- [13] 曾光明, 黄国和. 堆肥环境生物与控制[M]. 北京: 科学出版社, 2006.
- [14] Woese C R, Gutell R, Gupta R, et al. Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids[J]. *Microbiological Reviews*, 1983, 47(4): 621.
- [15] Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 695.
- [16] 牛俊玲, 高军侠, 李彦明, 等. 堆肥过程中的微生物研究进展[J]. *中国生态农业学报*, 2007, 15(6): 185.
- [17] 屠腾, 李蕾, 毛冠男, 等. 利用细胞计数手段和 DGGE 技术分析松花江干流部分地区的细菌种群多样性[J]. *生态学报*, 2012, 32(11): 3505.
- [18] 孙庆华, 柏耀辉, 赵翠, 等. DGGE, T-RFLP, LH-PCR 对两种活性污泥的微生物种群多样性分析的比较[J]. *环境工程学报*, 2009, 3(8): 1365.
- [19] 王华金, 朱能武, 李冲, 等. 微生物燃料电池阳极生物膜微生物群落的 PCR-DGGE 分析[J]. *农业环境科学学报*, 2012, 31(7): 1431.
- [20] 吕新, 陈丽华, 李玥仁. 4 种不同土壤微生物 DNA 提取方法对 DGGE 分析微生物群落的影响[J]. *福建农业学报*, 2012, 27(4): 367.
- [21] Cherif H, Ayari F, Ouzari H, et al. Effects of municipal solid waste compost, farmyard manure and chemical fertilizers on wheat growth, soil composition and soil bacterial characteristics under Tunisian arid climate[J]. *European Journal of Soil Biology*, 2009, 45(2): 138.
- [22] Muyzer G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 1999, 2(3): 317.
- [23] Bonito G, Isikhuemhen O S, Vilgalys R. Identification of fungi associated with municipal compost using DNA-based techniques [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(3): 1021.
- [24] 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*, 2006, 51(2): 209.
- [25] Calli B, Mertoglu B, Roest K, et al. Comparison of long-term performances and final microbial compositions of anaerobic reactors treating landfill leachate[J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97(4): 641.
- [26] Wang G H, Jin J, Liu J J, et al. Bacterial community structure in a Mollisol under long-term natural restoration, cropping and bare fallow history estimated by PCR-DGGE [J]. *Pedosphere*, 2009, 19(2): 156.
- [27] 党秋玲, 李鸣晓, 席北斗, 等. 堆肥过程多阶段强化接种对细菌群落多样性的影响[J]. *环境科学*, 2011, 32(9): 2689.
- [28] 叶凝芳, 吕凡, 何晶晶, 等. DGGE 和 SSCP 解析蔬菜类废物好氧降解过程细菌群落结构及演替的比较[J]. *农业环境科学学报*, 2007, 26(3): 1132.
- [29] 王爱杰, 任南琪. 环境中的分子生物学诊断技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [30] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314.
- [31] Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, et al. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1989, 86(8): 2766.
- [32] Lee D H, Zo Y G, Kim S J. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(9): 3112.
- [33] Schwieger F, Tebbe C C. A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(12): 4870.
- [34] 米文秀, 谢冰, 徐亚同. PCR-SSCP 技术用于脱臭微生物群落结构的研究[J]. *环境科学*, 2008, 29(7): 1992.
- [35] 章戴荣. 利用 PCR-SSCP 技术分析猪粪堆肥微生物群落动态[D]. 成都: 四川农业大学, 2007.
- [36] Abid N, Chamkha M, Godon J, et al. Involvement of microbial populations during the composting of olive mill wastewater sludge [J]. *Environmental Technology*, 2007, 28(7): 751.
- [37] Duthoit F, Godon J J, Montel M C. Bacterial community dynamics during production of registered designation of origin Salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene single-strand conformation polymorphism analysis [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(7): 3840.
- [38] Sliwinski M K, Goodman R M. Spatial heterogeneity of crenarchaeal assemblages within mesophilic soil ecosystems as revealed by PCR-single-stranded conformation

- polymorphism profiling [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(3):1811.
- [39] 喻曼, 许育新, 曾光明, 等. RFLP 法研究接种对农业废物堆肥微生物多样性的影响 [J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(2):396.
- [40] Bauchan G R, Campbell T A, Hossain M A. Comparative chromosome banding studies of nondormant alfalfa germplasm [J]. Crop Science, 2003, 43(6):2037.
- [41] Isobe S, Klimenko I, Ivashuta S, et al. First RFLP linkage map of red clover (*Trifolium pratense* L.) based on cDNA probes and its transferability to other red clover germplasm [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 108(1):105.
- [42] Ekuere U, Dosdall L, Hills M, et al. Identification, mapping and economic evaluation of QTLs encoding root maggot resistance in [J]. Crop Science, 2005, 45(1):371.
- [43] Pesaro M, Widmer F. Identification and specific detection of a novel Pseudomonadaceae cluster associated with soils from winter wheat plots of a long-term agricultural field experiment [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(1):37.
- [44] 陈金华, 王中康, 贺闽, 等. DGGE 和 RFLP 方法分析桑粒肩天牛幼虫肠道微生物多样性 [J]. 生物技术通报, 2008(6):115.
- [45] Schütte U M E, Abdo Z, Bent S J, et al. Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 80(3):365.
- [46] 徐晓飞, 林炜铁, 彭智辉, 等. RAPD 技术及其在微生物学方面的应用 [J]. 生命的化学, 2001(5):436.
- [47] Abbasi P A, Miller S A, Meulia T, et al. Precise detection and tracing of *Trichoderma hamatum* 382 in compost-amended potting mixes by using molecular markers [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(12):5421.
- [48] 陈杰娥, 贾晓珊, 徐昕荣. 应用 RAPD 方法分析厌氧氨氧化污泥驯化过程中的微生物遗传性质 [J]. 环境科学学报, 2007, 27(6):961.
- [49] 王世伟, 齐小辉, 刘军, 等. AFLP 技术在微生物分类鉴定、基因标定及遗传多样性方面的应用 [J]. 生物技术, 2003, 13(5):42.
- [50] Velappan N, Snodgrass J L, Hakovirta J R, et al. Rapid identification of pathogenic bacteria by single-enzyme amplified fragment length polymorphism analysis [J]. Diagnostic microbiology and infectious disease, 2001, 39(2):77.
- [51] Zhong S, Steffenson B. Identification and characterization of DNA markers associated with a locus conferring virulence on barley in the plant pathogenic fungus *Cochliobolus sativus* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2002, 104(6-7):1049.
- [52] 何月秋, Leung H, Zeigler R S, 等. 稻瘟病菌变异菌株的 AFLP 分析 [J]. 菌物系统, 2002, 21(3):363.
- [53] 冯瑞华. 用 AFLP 技术和 16S rDNA PCR-RFLP 分析毛茛菪根瘤菌的遗传多样性 [J]. 微生物学报, 2000, 40(4):339.
- [54] 刘国传, 陆琳, 汪琳, 等. 致病微生物检测生物芯片图像去噪方法的研究 [J]. 仪器仪表学报, 2009, 30(2):351.
- [55] 高兴, 王景林. 基因芯片技术在病原细菌检测中的应用 [J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(2):100.
- [56] 朱海霞. FCM 检测低能 N^+ 注入对活性污泥微生物菌群的影响 [D]. 郑州: 郑州大学, 2007.
- [57] Zilles J L, Peccia J, Noguera D R. Microbiology of enhanced biological phosphorus removal in aerated-anoxic orbital processes [J]. Water Environment Research, 2002, 74(5):428.