

分子生态学方法在微生物肥料质量监测中的应用*

李武¹ 王凌华¹ 赵勇² 张晓君¹ 潘迎捷³ 赵立平^{1**}

(上海交通大学生命科学技术学院 微生物分子生态学与生态基因组学实验室 上海 200240)¹

(南京农业大学微生物学系 南京 210095)² (上海水产大学 上海 200090)³

摘要: 应用 PCR-DGGE 技术对某微生物肥料的质量进行了跟踪监测, 并结合分离培养和克隆文库分析对其菌种组成进行了检测。结果表明, 同一生产批次 3 个不同包装样品的细菌和真菌 DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) 图谱相似性为 80% ~ 100%, 3 个不同生产批次之间 DGGE 图谱相似性为 80% ~ 88%, 表明该微生物肥料的菌种组成的稳定性较好。但分离培养和克隆文库分析结果显示样品的菌种组成与产品标签说明之间存在较大差异。对于产品标注的 6 种微生物组成, 只有 *Lactobacillus* 属的微生物可与之对应, 其他检测到的 *Bacillus*、*Monascus*、*Brevibacillus*、*Pseudomonas* 和 *Penicillium* 属的微生物并未包括在产品说明中。研究表明用分子生态学方法可以比较客观准确的对微生物肥料质量进行评估和监测。

关键词: 微生物肥料, 分离培养, DGGE (变性梯度凝胶电泳), 克隆文库分析

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2006) 01-0053-06

The Use of Molecular Ecological Methods in the Quality Control of Biofertilizers*

Li Wu¹ WANG Ling-Hua¹ ZHAO Yong² ZHANG Xiao-Jun¹
PAN Ying-Jie³ ZHAO Li-Ping^{1**}

(Laboratory of Molecular Microbial Ecology and Ecogenomics, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240)¹

(Department of Microbiology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)²

(Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090)³

Abstract: PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) and clone library analysis combined with culture dependent isolation methods were used to analyze the population composition and its stability over different production batches of one commercial biofertilizer. DGGE fingerprinting showed that samples from the same production batch had 80% ~ 100% similarity coefficient and those from different batches had 80% ~ 88%, an indication that population composition of the biofertilizer was relative stable within the same batch and from batch to batch. Isolation followed with 16S rRNA clone library analysis showed that the microorganisms contained in the products were not in agreement with the product's label. Only *Lactobacillus*, one of the 6 microorganisms labeled in the products, was detected in the samples. Other bacteria detected with the two methods were *Bacillus*, *Monascus*, *Brevibacillus*, *Pseudomonas* and *Penicillium*, which were not listed in the product's label. These results showed that molecular ecological methods may provide a new technology for quality control of biofertilizers.

Key words: Biofertilizer, Culture-dependent method, DGGE, Clone library analysis

微生物肥料是指一类含有活微生物的特定制品, 应用于农业生产中, 能获得特定的肥料效应, 在这种效应的产生中, 制品中的活微生物起关键作用^[1]。因此, 微生物肥料的菌种组成决定产品的质量好坏, 菌种组成的稳定性决定产品质量的稳定性。目前国内对微生物肥料质量监测检验主要依赖于传统的分离培养技术, 由于分离培养方

* 上海市科技兴农重点攻关项目 (No. 2002-4-4-2)

** 通讯作者 Tel: 86-21-54744263, Fax: 86-21-54743348, E-mail: lpzhao@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2005-04-05, 修回日期: 2005-06-14

法费时费力、高选择性等方面的不足,给微生物肥料的质量监测带来诸多不便,同时也给厂家的质量控制增加了困难。另外,由于微生物肥料质量问题给农民带来损失的报道也时有发生。因此做好微生物肥料的产品质量监督工作很有意义,而发展新的、快速而准确的质量检测方法也显得尤为重要。

微生物分子生态学是近年来兴起的一门涉及生物学、基因组学和生物信息学等学科交叉学科。它主要以微生物基因组 DNA 的序列信息为依据,通过分析样品中 DNA 分子的种类和数量来反映微生物区系的组成和群落结构及其变化。因此,克服了分离培养的限制,可以在基因水平上准确的反映微生物群落结构的组成,可以客观灵敏的反映微生物种群的动态变化^[2]。目前,国外已经有大量的研究将微生物分子生态学方法运用于堆肥及其它微生物制品的质量检测中^[3,4]。相关技术在本研究室也得到比较成功的运用^[5,6]。本研究将分子生态学方法引入微生物肥料的质量监测中,并结合分离培养技术对微生物肥料进行跟踪监测以及对其菌种组成进行检验,旨在建立一种快速准确的微生物肥料质量监测和控制的新方法。

1 材料与方 法

1.1 样品

试验所用样品为固体微生物肥料,购买自某微生物肥料生产厂,本实验取 3 个生产批次,生产日期分别为: C1, 2004 年 4 月 28 日, C2, 2004 年 5 月 15 日, C3, 2004 年 5 月 26 日,每个批次取 3 个包装的样品,样品编号依次为 C1-1, C1-2, C1-3, C2-1, C2-2, C2-3, C3-1, C3-2, C3-3,并随机挑选 C1-2 用分离培养实验和克隆文库方法分析样品详细的菌种组成。

1.2 菌落计数、菌种的分离和纯化

菌落计数、菌种分离和纯化等具体操作及培养基配制按照中华人民共和国农业行业标准(微生物肥料) NY227-94 中规定操作。

1.3 微生物肥料样品总 DNA 的提取

微生物肥料 9 个样品总基因组 DNA 均采用 Bio 101 FastDNA Spin Kit (For Soil) 进行提取,提取方法参照试剂盒说明书。

1.4 分离菌株 PCR 反应模板的制备

细菌用煮菌法^[7]制备 PCR 反应模板,真菌 DNA 提取采用 Bio 101 FastDNA Spin Kit (For Soil)。

1.5 PCR 引物、反应体系及参数

细菌 16S rDNA 全长扩增见文献 [8],真菌 18S rDNA 全长扩增见文献 [9],细菌 16S rDNA V3 区扩增见文献 [10],真菌 ITS 序列扩增见文献 [11]。PCR 扩增总体体系均为 25 μ L: 10 \times Buffer 2.5 μ L, dNTP (2.5mmol/L), 引物(浓度均为 25pmol/ μ L)各 0.5 μ L, Mg²⁺ (25mmol/L) 2.0 μ L, 模板 2.0 μ L, Taq DNA 聚合酶 1U, ddH₂O 补足至 25 μ L。

1.6 DGGE 分析

DGGE 条件为: 8% 聚丙烯酰胺凝胶,其中细菌 V3 区 DGGE 采用 30% ~ 55% 变性梯度(100% 变性剂浓度为 7mol/L 尿素, 40% 甲酰胺),真菌 ITS 序列采用 30% ~ 50% 变性梯度,上样量均为 200ng。电压均 200V,电泳 4h, SYBR Green I 染色, UVP2GDS8000 凝胶成像系统(Ultraviolet Product Ltd)成像。DGGE 指纹图谱用 UVI-BandMap 软件(UVIttec Limited, England)做聚类分析。

1.7 分离菌株的鉴定

细菌 16S rDNA 全长和真菌 18S rDNA 全长的 PCR 扩增产物用 V-gene DNA Gel Extraction kit (杭州维特洁生化技术有限公司) 纯化后与 pGEM-T easy vector (Promega) 连接, 4 °C 水浴 16h 后转化大肠杆菌 DH5 α , 经蓝白斑筛选后, 随机挑取阳性克隆子验证后进行测序 (上海博亚公司)。测序结果在 GenBank 数据库中进行 BLAST 同源性检索。

1.8 克隆文库的构建

取 C1-2 号样品 (该样品也被用于做分离培养实验) 的总 DNA, 分别扩增其 16S rDNA 全长和 18S rDNA 全长, PCR 产物经割胶纯化后, 与 pGEM-T easy vector (Promega) 连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 涂板, 37°C 培养 12h 后, 挑取阳性克隆子, 用限制性内切酶 *Csp6 I* 和 *Hinf I* 分型, 并归类 OTU。对每个 OTU 选一个代表测序 (上海博亚公司), 用 DNA Man、Gene Tool 等软件对测序结果进行编辑、分析, 并把编辑好的序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST 同源性检索并下载同源性序列, 应用 Clustal X 和 Mega 软件构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 样品菌种组成分析

对微生物肥料菌种组成产品标签说明和试验所得结果进行了比较 (表 1)。实验过程中共从分离培养基中挑取了 71 株细菌, 20 株真菌, 分别扩增 16S rDNA 和 18S rDNA 全长, 用 *Csp6 I* 和 *Hinf I* 双酶切分型后, 选代表克隆测序 (上海博亚公司), 得到 4 株细菌和 2 株真菌。克隆文库分析中, 从 16S rDNA 文库中共随机挑取了 82 个阳性克隆子, 双酶切后共得到 13 个 OTU, 从 18S rDNA 文库中共随机挑取了 54 个阳性克隆子, 双酶切后共得到 5 个 OTU。

表 1 分离培养和克隆文库所得微生物肥料菌种组成与产品标签说明之间的比较

Microorganisms declared on the label	Microorganisms determined by pure culture	Microorganisms determined by clone library	CFU/g declared on the label	CFU/g determined by plate count
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus cypricasei</i>	<i>Lactobacillus cypricasei</i> <i>Lactobacillus genomo</i> sp. C1		
Beer yeast		<i>Lactobacillus</i> sp. 121B <i>Lactobacillus zeae</i>		
<i>Streptococcus lactis</i>	<i>Bacillus cereus</i> ATCC14579 <i>Bacillus oleronius</i>	<i>Bacillus halodenitrificans</i> <i>Bacillus litoralis</i>	3.0 × 10 ⁹	1.3 × 10 ⁶
<i>Streptomycete</i>	<i>Brevibacillus</i> sp. PLC3	<i>Bacillus galactosidilyticus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Monascus pilosus</i> <i>Monascus ruber</i>	<i>Monascus pilosus</i> <i>Monascus ruber</i>		
<i>Mucorales</i>		<i>Monascus purpureus</i> <i>Penicillium herquei</i>		

从分离培养与克隆文库二者的结果比较来看, 两者所得结果比较一致, 但与产品标签标注菌种之间有较大的差异, 只有 *Lactobacillus* 可以与产品标注的微生物对应。其余标注的 5 种微生物均没有得到培养物, 在克隆文库中也没有检测到。菌落计数结果显示, 产品的有效活菌数为 1.3 × 10⁶ CFU/g, 与厂家标注的 3.0 × 10⁹ CFU/g 也存在较大差异。

2.2 DGGE 结果分析

DGGE 图谱显示, 样品中的细菌组成比较复杂 (如图 1), 而真菌组成相对简单一些 (如图 2)。无论是细菌区系还是真菌区系, 聚类分析显示, 同一批次 3 个重复之间样品的 DGGE 图谱相似性达到 80% ~ 100%, 不同批次之间图谱相似性为 80% ~ 88%, 说明供试样品微生物组成比较稳定。

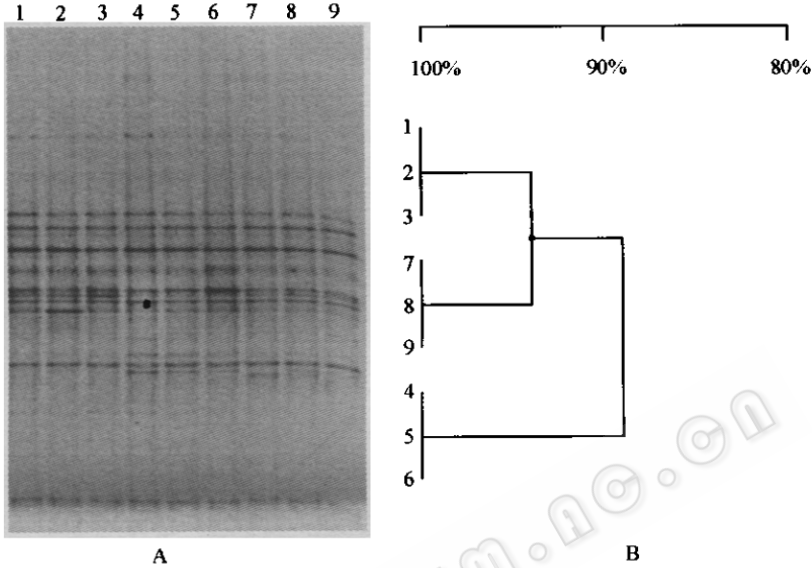


图 1 样品细菌 DGGE 图谱 (A) 及聚类分析 (B)

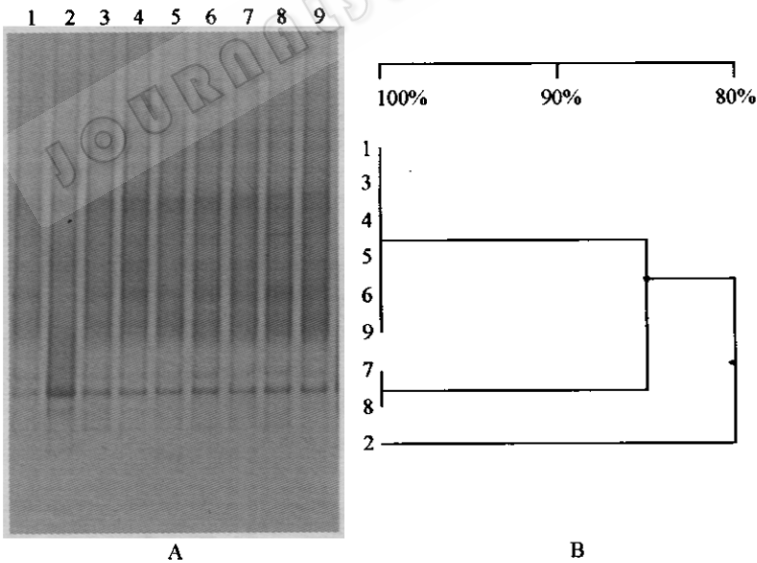


图 2 样品真菌 DGGE 图谱 (A) 及聚类分析 (B)

试验中将分离到的 4 株细菌和 2 株真菌与样品总基因组 DNA 分别同时扩增 V3 区和 ITS 序列做 DGGE 分析 (图 3), 对样品中的细菌区系而言, 其图谱较复杂, 显示样品微生物较多, 分离菌株在 DGGE 图谱中的条带与混合样品 DGGE 图谱中优势条带没有明显的对应关系, 说明分离菌株并非样品中的优势菌。对于真菌而言, 分离物与产品本身微生物组成有比较好的对应关系。

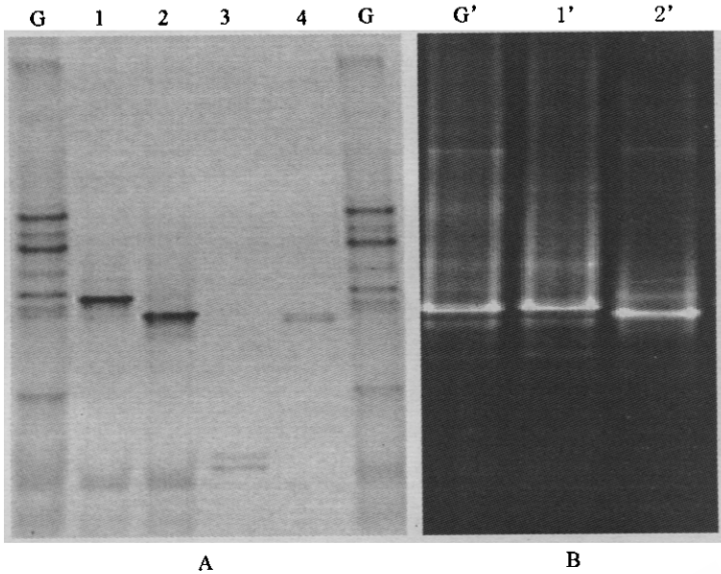


图 3 细菌 (A) 和真菌 (B) 分离培养结果与分子分析结果间比较的 DGGE 图谱
 G 样品基因组 V3 区 PCR 扩增产物, 1~4 四株细菌分离物 V3 区 PCR 扩增产物,
 G' 样品基因组 ITS 片段扩增产物, 1', 2' 两株真菌分离物 ITS 片段扩增产物

2.3 克隆文库的系统发育分析

文库构建过程中, 从 16S rDNA 克隆文库得到 13 个 OTU, 18S rDNA 克隆文库得到了 5 个 OTU, 每个 OTU 选一个代表测序, 测序结果在 GenBank 数据库中进行同源性检索, 同时在 GenBank 中登陆序列, 序列号附于系统发育树相应克隆编号后。并用 Clustal X 和 Mega 软件构建样品细菌组成系统发育树 (图 4), 真菌从略。

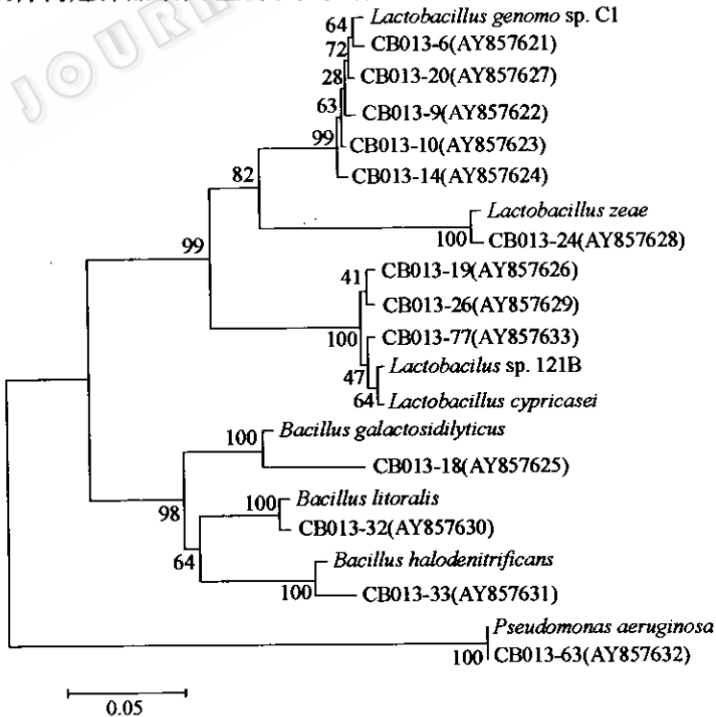


图 4 以 16S rDNA 序列为基础的微生物肥料克隆系统发育树

3 讨论

3.1 分离培养和克隆文库结合对产品菌种组成的检测

从产品菌种组成标签说明和本研究结果来看,产品说明和试验结果之间存在一定的差距,但分离培养和克隆文库所得结果比较一致。构建克隆文库是微生物分子生态学中用来调查环境中微生物组成的常用方法之一^[12]。1990年,Giovannoni等^[13]用这一方法分析了马尾藻海海面浮游微生物的多样性。我们将该方法引入微生物肥料这一相对简单的生态系统,便于对试验样品微生物组成做出客观的评价。本研究结果显示样品菌种组成与产品标签说明之间存在较大差距,仅有 *Lactobacillus* 属可以与文库和分离培养结果对应,而且该属的微生物在文库中的丰度很高,达到 77.8%,说明该属的微生物在研究样品中占很大比例。实验中从文库中得到的 *Pseudomonas*、*Bacillus*、*Monascus* 以及 *Penicillium* 这 4 个属的微生物都是产品标签没有标注的属,说明其产品生产过程中可能存在较大的污染问题,而这些问题厂家在生产过程中仅用分离培养技术可能难以及时发现或者没法检测到,而克隆文库可以作为一种很好的解决方法。

3.2 DGGE 技术对样品的动态监测

DGGE 是由 Fischer 和 Lerman^[14]最先提出的用于检测点突变的技术。1993年Muyzer^[10]首次将其引入生态学研究,目前该技术已经成为一项常规的分子生态学研究方法。DGGE 图谱的复杂性,能在一定程度上反应样品的复杂性,条带的多少,能反应样品中微生物的多少,条带的亮度,能反应样品中微生物组成的差异。本研究将分离培养技术和 DGGE 技术引入微生物肥料这一简单生态系统的分析中,为微生物肥料质量监测提供了一种新的快速的分子方法。从试验结果来看,供试 9 个样品 DGGE 图谱比较稳定,显示其细菌和真菌组成比较稳定,进而说明其产品质量相对比较稳定。但从图谱还不足以显示其样品具体的微生物组成,因此,本研究又随机选取其中 C1-2 号样品进行分离培养,得到 6 株菌,结果跟样品总基因组 DNA DGGE 图谱进行对比发现,分离菌株在 DGGE 图谱中的条带与 DGGE 图谱优势条带没有对应关系,说明培养得到的细菌菌群并非样品中的优势种群。因此, DGGE 技术用来评价微生物肥料这样相对简单的生态系统,能够比较客观快速的反应出产品的质量。

参 考 文 献

- [1] 陈华癸. 关于微生物肥料的几个问题. 北京: 中国科技出版社, 2000.
- [2] Giraffa G, Neviani E. *Int J Food Microbiol*, 2001, **67**: 19 ~ 34.
- [3] Temmerman R, Scheirlinck I, Huys G, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**: 220 ~ 226.
- [4] Fasoli S, Marzotto M, Riaaotti L, *et al.* *Int J Food Microbiol*, 2003, **82**: 59 ~ 70.
- [5] Wei G, Pan L, Du H, *et al.* *J Microbiol Methods*, 2004, **59**: 91 ~ 108.
- [6] Zhang X, Gao P, Chao Q, *et al.* *FEMS Microbiol lett*, 2004, **237**: 369 ~ 375.
- [7] 陈 敏, 赵立平. 微生物学报, 2003, **43** (3): 366 ~ 371.
- [8] Di Cello F, Bevivino A, Chiarini L, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 4485 ~ 4493.
- [9] Vainio E J, Hantula J. *Mycol Res*, 2000, **104**: 927 ~ 936.
- [10] Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinden A G. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 695 ~ 700.
- [11] White T J, Bruns T D, Lee S B, *et al.* USA Academic Press, 1990. 315 ~ 322.
- [12] Anman R I, Ludwig W, Schleifer K H. *Microbiol Rev*, 1995, **59**: 143 ~ 169.
- [13] Giovannoni S J, Britschgi T B, Moyer C L, *et al.* *Nature*, 1990, **345**: 60 ~ 63.
- [14] Fischer S G, Lerman L S. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, **80**: 1579 ~ 1583.