

应用 16S rDNA 克隆文库法分析有机物料腐熟菌剂细菌组成*

李国媛 李俊** 姜昕 李力 沈德龙

(中国农业科学院农业资源与农业区划研究所 北京 100081)

摘要 应用 16S rDNA 克隆文库法对有机物料腐熟菌剂 A 和 B 样品中的细菌组成进行分析研究。结果表明,样品 A 有 14 个 OTU,主要是融合乳杆菌(*Weissella confusa*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)其比例分别占总克隆文库的 28.6%、30.4%和 23.2%。样品 B 有 43 个 OTU,主要是布氏乳杆菌(*Lactobacillus buchneri*)、香肠乳杆菌(*Lactobacillus farciminis*)和耐酸乳杆菌(*Lactobacillus acetotolerans*),占总克隆文库的比例分别为 18.03%、18.86%和 13.12%。所得出的结果均与产品标注存在差异。样品 A 未提及细菌的种类,而样品 B 只标注短小芽孢杆菌。研究表明这一方法在微生物菌剂细菌组成分析及其质量检测中具有良好的应用前景。

关键词 有机物料腐熟菌剂, 16S rDNA 克隆文库法, 细菌组成

中图分类号: Q938.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2007)05-0939-04

Bacteria Composition of Organic Matter-decomposing Inoculant Analyzed with 16S rDNA Clone Library*

LI Guo-Yuan LI Jun** JIANG Xin LI Li SHEN De-Long

(Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract Using 16S rDNA clone library method, the bacteria composition of the Organic Matter-decomposing Inoculants A and B were investigated. The results indicated that: Sample A was clustered into 14 taxonomic operational units (OTUs), the dominant communities are *Weissella confusa*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus*, which accounted for 28.6%, 30.4% and 23.2%; Sample B was clustered into 43 OTUs, the dominant communities are *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus farciminis* and *Lactobacillus acetotolerans*, which accounted for 18.03%, 18.86% and 13.12%, respectively. The results had much difference from the samples' labels there were not bacteria in the table of sample A and only *Bacillus pumilus* was the same with the table of sample B. This study showed that 16S rDNA clone library method has nicer application perspectives in analyzing the bacteria of microbial inoculant and its quality control.

Key words Organic matter-decomposing inoculant, 16S rDNA clone library analysis, Bacteria composition

有机物料腐熟菌剂,是微生物肥料的一个重要品种,是指能加速各种有机物料(包括农作物秸秆、畜禽粪便、生活垃圾及城市污泥等)分解、腐熟的微生物活体制剂。由于其腐熟对象的复杂性,决定了有机物料腐熟剂菌种组成的多样性。此类产品一般为复合菌剂,由细菌、酵母、真菌和放线菌组成,采用传统的平板培养测定这类产品质量,不仅费时费力,更主要是不能准确测定出其所含的菌群,尤其是其中的细菌组成,由于其种类多且形态鉴别特征少,给国家控制和监管此类产品带来难度。微生物

分子生态学的发展和应用,从技术层面为有机物料腐熟菌剂中菌群的准确、快速分析提供了手段。

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的交叉学科,主要是以微生物基因组 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^[1]。构建克隆文库是微生物分子生态学中用来研究微生物组成的常用方法之一^[2],目前细菌菌群分析中应用最多的是 16S rDNA 克隆文库方法。它是通过对

* 国家科技支撑项目(No. 2006BAD25B04)

** 通讯作者 Tel 010-68975891 E-mail jli@caas.ac.cn

收稿日期: 2007-03-19, 修回日期: 2007-04-25

16S rDNA全长序列进行扩增和分析,达到研究和监测样品与环境细菌多样性、种群结构和区系变化的目的^[3,4],并应用于水体、土壤、海洋沉积物、生物水处理系统中的微生物分析。

本文采用建立 16S rDNA 克隆文库的方法,通过测序并与已知序列比较确定细菌种类,以揭示有机物料腐熟菌剂样品中的细菌组成,同时也可以根据克隆文库中克隆子出现的频率了解样品的细菌组成比例。

1 材料与方法

1.1 样品

所用样品来自 2 个企业的有机物料腐熟菌剂,为固体剂型,编号分别为 A、B。A 产品标注的微生物种类是酵母菌、米曲霉。B 产品标注的微生物是枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、多粘芽孢杆菌和短小芽孢杆菌。它们均是生产中广泛应用的产品。

1.2 菌落平板计数、菌种的分离和纯化

按照中华人民共和国国家标准 GB20287-2006 和中华人民共和国农业行业标准 NY/T 1114 - 2006 的规定操作。

1.3 样品总 DNA 提取

采用文献 5 方法。

1.4 PCR 反应体系参数

样品细菌 16S rDNA 全长扩增见文献 6。PCR 扩增总体系为 25 μ L:10 \times buffer 2.5 μ L, dNTP (2.5mmol/L) 2 μ L,引物(浓度为 10mmol/L)各 0.5 μ L, Mg²⁺(25 mmol/L)1.5 μ L, Taq 酶(2.5U)0.2 μ L, 稀释 DNA 模板 1 μ L, ddH₂O 补足至 25 μ L。

1.5 克隆文库的构建

割胶纯化 PCR 产物,与 pMD19-T 载体连接,转化大肠杆菌 DH5 α 涂板,37 $^{\circ}$ C 培养 12h 后,挑取阳性克隆子,用限制性内切酶 *Csp6* 和 *Hinf* I 分型,每个酶切类型挑取一个代表菌株进行测序(上海生工公司),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 同源性检索后下载同源性序列。

2 结果与分析

2.1 样品的 16S rDNA 克隆文库分析

对随机挑取 A 样品的 111 个阳性克隆、B 样品

的 122 个阳性克隆采用限制性内切酶 *Csp6* 和 *Hinf* I 酶切,A 共得 24 个酶切类型,B 共得 57 个酶切类型。每个酶切类型挑取 1 个代表克隆子进行测序,测序结果在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对,将序列比对结果相同的克隆子定义为一个操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)。样品 A 得到 14 个 OTU,样品 B 得到 43 个 OTU。2 个样品的主要 OTU 所含克隆子数目及其相似性菌株如表 1 所示。

由表 1 结果可知,A 样品克隆子与 GenBank 数据库中已知细菌的 16S rDNA 序列相似性最高为 99%,最低为 96%;其中 OTU1、OTU3、OTU4 的克隆数最多,为克隆文库中优势菌株,其菌种分别是 *Weissella confusa*, *Bacillus subtilis* 和 *Bacillus pumilus*;研究分析共得到的芽孢杆菌属的克隆子有 62 个,占库容总量的 55.86%;属于乳酸菌的克隆子共有 39 个,占库容总量的 35.14%。另外有 9 个克隆子(占 8.10%)与已知类群相似性较低,在 GenBank 数据库中未找到与其相似的已知细菌序列,属于未知类群,它们分属于不同的 OTU,与目前不可培养细菌 uncultured *Staphylococcus* sp. (AF467426)、Uncultured bacterium (DQ818699)、Uncultured Bacterium (DQ129420)的相似性分别是 99%、96%、97%。

样品 B 克隆子与 GenBank 数据库中已知细菌的 16S rDNA 序列相似性范围在 91%~100%,其中有 101 个克隆子(占 82.79%)与已知序列同源性高于 97%。有 29 个 OTU 仅含有 1 个克隆子,24 个克隆子(占 19.37%)与已知类群相似性较低,在 GenBank 数据库中未找到与其相似的已知细菌序列,它们分属于不同的 OTU,与目前不可培养细菌 uncultured bacterium、uncultured compost bacterium、uncultured soil bacterium 等的同源性较高,表明样品 B 中的细菌具有丰富的多样性。如表 1 所示,克隆文库中优势菌株为 OTU1、OTU5 和 OTU7,分别占克隆文库比例为 18.03%、13.12%、18.86%。根据克隆文库所得结果,克隆子大致可分为 4 大类,即:乳酸菌类、醋酸菌类、芽孢菌类和目前不可培养类,分属于上述 4 类的克隆子数量分别是 70、4、12 和 24,它们分别占克隆文库库容总量的 57.38%、3.28%、9.84% 和 19.67% 共占库容总量的 90.16%。其余为只有 1 个克隆子的博特氏菌属 *Bordetella petrii* (AJ870969)

(100%)、脱氮硫杆菌 *Thiobacillus denitrificans*

(74055513)(99%) 斯氏小小梨形菌 *Pirellula staleyi* (AF399914) (90%) 气微菌属 *Aeromicrobium alkaliterrae* (AY822044) (98%) 泛养硫球菌 *Paracoccus pantotrophus* (AB098590) (98%) *Proteobacterium* (AY040677) (94%) 短杆菌属 *Brevibacterium* sp. (AY577816) (99%) 假单胞菌属 *Pseudoxanthomonas suwonensis* (AY927994) (98%) 另外 样品中还有 2 个克隆子为放线菌 *Thermobifida fusca* YX(71914138)(100%)

表 1 16S rDNA 克隆文库法分析的样品主要细菌组成结果

样品	操作分 类单元	每个 OTU 含克隆数	最相似菌株(NCBI 登录号)	每种 OTU 百分比(%)	相似性 (%)
A	OTU1	32	融合乳杆菌 <i>Weissella confusa</i> (DQ321751)	28.80	98 – 99
	OTU2	3	肠膜明串珠菌 <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (AY675249)	2.70	97
	OTU3	34	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i> (AB065370)	30.60	99
	OTU4	26	短小芽孢杆菌 <i>Bacillus pumilus</i> (AB195283)	23.40	97 – 99
	OTU5	7	不可培养葡萄球菌 <i>Uncultured Staphylococcus</i> sp. (AF467426)	6.30	99
	OTU6	2	<i>Weissella cibaria</i> (AJ422031)	1.80	98
B	OTU1	22	布氏乳杆菌 <i>Lactobacillus buchneri</i> (AB205055)	18.03	96 – 98
	OTU2	6	Uncultured soil bacterium(AF423263)	4.92	93
	OTU3	3	短乳杆菌 <i>Lactobacillus brevis</i> (D37785)	2.46	96
	OTU4	2	<i>Thermobifida fusca</i> YX(71914138)	1.64	100
	OTU5	16	耐酸乳杆菌 <i>Lactobacillus acetotolerans</i> (M58801)	13.12	97 – 98
	OTU6	4	<i>Bacillus</i> sp. (AY572480)	3.28	99
	OTU7	23	香肠乳杆菌 <i>Lactobacillus farciminis</i> (AJ417499)	18.86	97 – 99
	OTU8	3	短乳杆菌 <i>Lactobacillus brevis</i> (AF515220)	2.46	95 – 99
	OTU9	2	短小芽孢杆菌 <i>Bacillus pumilus</i> (AB195283)	1.64	99
	OTU10	3	假单胞菌属 <i>Pseudoxanthomonas suwonensis</i> (AY927994)	2.46	98
	OTU11	3	Uncultured compost bacterium(DQ346448)	2.46	98
	OTU12	2	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i> sp. (Y13066)	1.64	93
	OTU13	2	Uncultured <i>alpha proteobacterium</i> (AJ318163)	1.64	97

2.2 采用菌落平板计数法测定的样品结果

按传统的平板计数方法测定的样品菌含量见表 2 ,其菌含量均高于国家和行业的标准要求。样品 A 测定含有 5 株芽孢杆菌和 2 株乳酸菌 ,样品 B 测定含有 6 株芽孢杆菌和 1 株乳酸菌。

表 2 平板计数方法测定的样品菌含量

样品		A		B	
总菌含量(108 cfu/g)		9.59		9.81	
芽孢菌 (10 ⁸ cfu/g)	枯草芽孢杆菌	2 株		3 株	
	短小芽孢杆菌	3 株	3.37	1 株	0.22
	类芽孢杆菌	0		2 株	
乳酸菌 (10 ⁸ cfu/g)	乳杆菌	1 株		1 株	
	片球菌	1 株	5.47	0	1.2

2.3 16S rDNA 克隆文库法和菌落平板计数测定结果的比较

样品 A 的 16S rDNA 建库结果得出有 4 种芽孢杆菌和 5 种分属于不同 OTU 的乳酸菌。其中芽孢杆菌还包括表 1 未列出的只有 1 个克隆子的 OTU9 [*Bacillus subtilis*(32468687)]和 OTU10 [*Bacillus* sp. (AB199317)];乳酸菌则分别是 *Weissella confusa* (DQ321751) *Weissella cibaria*(AJ422031) *Weissella cibaria* (DQ294961) *Leuconostoc mesenteroides* (AY675249)、乳明串珠菌 *Leuconostoc lactis* (AJ970316) ,其中前 3 种同属于魏斯菌属。而样品 A 菌落平板计数测定结果只含有 2 株枯草芽孢杆菌、3 株短小芽孢杆菌和 2 株乳酸菌。

样品 B 的 16S rDNA 建库结果共得到 8 株芽孢杆菌,包括 2 株类芽孢杆菌属 *Paenibacillus* sp. (共 2 个克隆子,占 1.64%) 和 8 株乳酸菌。芽孢杆菌除去表中所列的 OTU6、OTU9、OTU12 以外,其余皆是只有 1 个克隆子 OTU,乳酸菌则分别是 *Lactobacillus buchneri*、*Lactobacillus brevis*、*Lactobacillus farciminis*、*Lactobacillus acetotolerans*、类布氏乳杆菌 *Lactobacillus parabuchneri*、坏发酵乳杆菌 *Lactobacillus malefermentans*。另外建库结果还检测到 1 株嗜热放线菌 *Thermobifida fusca* YX(71914138) 2 个克隆子,占 1.64%) 的存在。菌落平板计数测定结果却得到 6 株芽孢菌和 1 株乳酸菌。

建库结果与样品所标注的菌群存在差异,样品 A 申报的菌种中并未提及细菌的存在。而实验结果表明该样品的菌群组成包括细菌,主要为芽孢杆菌和乳杆菌。样品 B 的建库结果只有 OTU9 与样品标注的短小芽孢杆菌一致,其余均未检测到。原因可能是 (1) 厂家为了保护自主知识产权,不会将所有菌株标出。(2) 厂家在生产过程中主动地加入了标注菌种,但是加入的菌种实际并未成为产品中的优势菌种。部分菌种加入以后由于脱离原有合适的培养条件,被其他竞争能力强的菌种稀释并取代。

分析 16S rDNA 克隆文库法和菌落平板计数两种方法存在差异的可能原因有 3 方面:①提取样品 DNA 时细胞破碎难易程度有差别,造成 DNA 本身与实际样品之间产生偏差;②PCR 扩增过程中 DNA 扩增的偏好性;③平板测定所用培养基不适合某些寡营养微生物生长。

3 讨论

本文采用构建 16S rDNA 克隆文库的方法分析了目前广泛应用的两种有机物料腐熟菌剂产品的细菌组成。结果表明样品 A 的优势细菌是乳酸菌和芽孢杆菌,样品 B 的优势细菌是乳酸菌,除了样

品 A 建库结果检测到的芽孢杆菌比菌落平板计数测定结果少 1 株以外,16S rDNA 克隆文库法均比平板法得到的细菌种类多,可见 16S rDNA 克隆文库法能更好地反映出样品中存在的细菌,从而全面、准确的测定产品中细菌菌群组成及其比例。

作为一种全新的技术手段,16S rDNA 克隆文库法最大的优点是可以不经过细菌分离培养,直接对样品进行分析。将得到的微生物 16S rDNA 序列提交到 GenBank 中,采用 BLAST 程序与已知序列进行相似性分析,得到原始样品中微生物的菌群和数量信息,揭示微生物的多样性,进而进行微生物分类系统发育分析^[7]。

本研究表明 16S rDNA 克隆文库法可以用于微生物菌剂中的细菌组成分析,快速准确检测菌剂质量,这对于微生物菌剂质量的提高,推进微生物肥料行业的可持续发展具有重大意义。16S rDNA 克隆文库方法也有其不足之处,仅适用于细菌菌群的分析^[8]。对样品中真菌和酵母菌等真核微生物分析,需要建立 18S rDNA 克隆文库,还要结合其它分子生物学技术如 DGGE 等,进一步研究腐熟过程中各种微生物演替、菌系稳定性等问题,从而指导微生物菌剂产品的生产并提高产品质量。

参考文献

- [1] 李武,王凌华,等.微生物学通报,2006,33(1):53~58.
- [2] Amman R J, Ludwig W, Schleifer K H. Microbiol Rev, 1995, 59:143~169.
- [3] Brambilla E, Hippe H, Hagelstein A, et al. Extremophiles, 2001, 5(1):23~33.
- [4] Baker G C, Gaier S, Cowan D A, et al. FEMS Microbiology Letters, 2001, 200:103~109.
- [5] 高平,赵立平.生态学报,2002,22(11):2015~2019.
- [6] Di Cello F, Bevivino A, Chiarini L, et al. Appl Environ Microbiol, 1997, 63:4485~4493.
- [7] 张彤,方汉平.微生物学通报,2003,30(2):97~101.
- [8] 乐毅全,顾国维.四川环境,2003,22(6):1~5.