

16S rDNA 基因文库技术分析发酵床细菌群落的多样性

毕泗伟¹, 吴祖芳^{1*}, 虞耀土²

(1. 宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211;

2. 宁波市余姚河姆渡镇农业经济办公室, 浙江 宁波 315414)

摘要: 细菌群落在养殖发酵床中担负着重要的调节与废物发酵转化作用. 直接从不同发酵床层次样品中提取细菌总 DNA, 构建发酵床不同层次垫料的细菌基因克隆文库. 试验表明, 发酵床表层 45 株细菌中未培养微生物占 39.5%, 剩余细菌分属 13 个不同种, 优势菌不明显; 中层发酵床垫料 45 株细菌中未培养微生物占 15.5%, 剩余细菌分属 10 个不同种, 优势细菌为 *Rhodanobacter sp.* 和 *Frateriia sp.*; 深层发酵床垫料中检测到的 44 株细菌不含未培养微生物, 该层细菌主要有 14 个不同的种, 优势细菌为 *Rhodanobacter sp.* 占 47.7%, 其余种属相对较少且数量平均, 表明发酵床垫料细菌呈明显的多样性.

关键词: 发酵床; 细菌群落; 16S rDNA 基因文库; 微生物多样性

中图分类号: Q938.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2013) 01-0018-05

发酵床养殖技术是一种利用复合菌剂原地转化畜禽养殖废物的新型养殖技术, 广泛应用于生猪、牛以及禽类养殖中^[1]. 发酵床养殖技术能针对性解决养殖环节中的污染问题, 在山东、福建等省的养殖区已得到应用. 其主要特点是人工成本低、无二次污染^[2]. 但目前国内的发酵床菌剂无针对性、且良莠不齐, 阻碍了该技术大面积的推广^[3]. 自然界中 99% 的微生物都不能在实验室培养^[4], 传统微生物纯培养不能反映自然样品中微生物的丰度, 而近年来分子技术的发展给微生物学研究提供了新的途径^[5]. 基因文库技术能较全面地呈现自然状态下样品中微生物的活性, 包括大部分的未培养微生物^[6]. 基因文库技术已被广泛地应用于石油污染水域^[7]、制药污水^[8]、温泉土壤^[9]、果园土壤^[10-11]以及动物肠道^[12-13]等复杂的微生物环境中.

笔者通过建立正常运转发酵床内不同层次的细菌基因文库, 对该环境下的主要作用细菌进行多样性分析, 为研制高效专一的生猪养殖发酵床菌剂提供参考.

1 材料与方法

1.1 材料

生猪养殖发酵垫料, 取自余姚市河姆渡生态养殖场(使用市售发酵菌剂, 主要由枯草芽孢杆菌、光合细菌、乳酸菌等组成). 在同一猪圈内以“Z”字形 5 点取样, 深度分别为 10~15 cm、30~35 cm、50~55 cm, 混合均匀后作为 3 个试验样本, 分别为表层、中层和深层样本.

主要试剂: 土壤 DNA 提取试剂盒(Fast DNA^R SPIN kit for soil), 购于 MP Biomedicals 公司; 凝胶回收试剂盒, 购于上海生工生物工程有限公司; 限制性内切酶, 购于上海生工生物工程有限公司; PMD18-T 载体, 购于 Takara 公司; 平板计数培养基、乳糖胆盐发酵管、改良高氏培养基、麦芽汁培养基、MRS 培养基和 LB 培养基等.

主要仪器和设备: PCR 仪(Mastercycler pro), 购于 Eppendorf 公司; 恒温恒湿培养箱(HWS-430), 购于宁波江南仪器厂.

收稿日期: 2012-10-06.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://nbdxlg.paperopen.com/>

基金项目: 宁波市农业攻关项目 (2010C10058) .

第一作者: 毕泗伟 (1986—), 女, 山东莱芜人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 微生物与资源利用. E-mail: siweibi@yahoo.cn

*通信作者: 吴祖芳 (1963—), 男, 浙江奉化人, 博士/教授, 主要研究方向: 微生物应用技术. E-mail: wuzufang06@yahoo.com.cn

1.2 方法

1.2.1 传统培养技术分析发酵床垫料微生物

用梯度稀释法将3样本分别稀释,选择3个浓度梯度取0.1 mL稀释液涂布法接种于平板计数培养基上,每个浓度梯度2个平行,36 °C培养48 h,计细菌总数;同上,取适宜浓度分别接种于取乳酸胆盐发酵管、麦芽汁培养基、改良高氏培养基和MRS培养基中,分别培养适当时间后,分别计大肠菌群数、酵母菌数、放线菌数和乳酸菌数。

1.2.2 基因文库的建立

(1) 发酵垫料细菌DNA的提取。样品前处理:取-20 °C保存的发酵床垫料样品加液氮研磨至适宜大小。按照土壤DNA提取试剂盒的提取步骤操作^[14],得到3个样品细菌的粗DNA。

(2) DNA的扩增和纯化。以细菌通用引物27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R(5'-TACCTTGTACGACTT-3')扩增细菌16S rDNA。PCR扩增体系:总DNA 1 μL,上下游引物各1 μL, Buffer 5 μL, MgCl₂ 5 μL, dNTP 8 μL, Ex-Taq 0.4 μL, 无菌水加至总体积为50 μL。PCR扩增程序为95 °C预变性3 min (94 °C变性50 s, 52 °C退火50 s, 72 °C延伸90 s) 28个循环,72 °C延伸10 min。PCR扩增产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测并回收;将每种样品所有回收产物混合,以减少单向扩增的偏向性,增加所要构建的基因文库的丰度。

(3) PCR产物的连接转化。将PCR回收产物与PMD18-T 4 °C连接过夜;连接体系为Vector 0.5 μL, Solution I 2.5 μL, PCR回收产物2 μL。转化:采用热激法将3 μL连接产物转化到30 μL大肠杆菌感受态细胞中,稳定后加入800 mL LB静置20 min后37 °C摇床培养50 min。取培养物适量涂布于LB(Amp^r)平板上,放置20~30 min后于37 °C倒置培养12~16 h。

(4) 阳性克隆子检测和结合位点检测。随机挑选60株平板上的白色单菌落至液体LB培养基中,摇床180 r·min⁻¹培养过夜,得到菌液。以载体引物M13⁺(5'-CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC-3')和M13⁻(5'-AGCGGATAACAATTTACACAGG-3')扩增克隆子菌液来检测是否为阳性克隆。PCR反应体系:引物M13⁺、M13⁻各0.5 μL, MgCl₂ 2.5 μL, Buffer 2.5 μL, dNTP 1 μL, Ex-Taq 0.25 μL,

菌液1.0 μL,加无菌水补充至25 μL。PCR反应程序:95 °C预变性6 min (94 °C变性50 s, 54 °C退火50 s, 72 °C延伸90 s) 30个循环,72 °C最后延伸5 min。将PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳挑选阳性克隆子。阳性克隆子的结合位点检测:以M13⁺(5'-CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC-3')和27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')扩增阳性克隆子菌液来检测其结合位点。根据结合位点分类阳性克隆子,将菌液送宁波市镇海百川生物科技有限公司进行检测。

(5) 序列比对。利用Blast将测得基因序列与NCBI数据库中已有的基因序列进行相似性比对,利用DAMBE和MAGA 4.1进行分析。

2 结果与分析

2.1 传统微生物技术分析结果

利用传统纯培养技术,将3个发酵垫料样品利用不同培养基分离计数结果见表1。

表1 样本中不同微生物种类的数量 cfu·g⁻¹

细菌名称	表层样本	中层样本	深层样本
大肠杆菌	4.6×10 ⁶	9.0×10 ⁴	9.3×10 ⁵
酵母菌	—	—	—
放线菌	3.6×10 ⁴	2.3×10 ³	1.1×10 ²
乳酸菌	5.3×10 ³	—	—
芽孢杆菌	2.4×10 ³	2.0×10 ³	2.7×10 ³
总细菌	1.8×10 ⁷	2.5×10 ⁵	3.7×10 ⁶

注:“—”表示未测出。

从表1可知,发酵床表层、中层和深层3个垫料样本的细菌总数有明显的数量级上差异,其中表层数量最多,其次为深层,中层样本最少。3个样本的大肠杆菌和放线菌数目也表现为表层最多,中层最少。而3个样本芽孢杆菌的数目相当,无数量级上差异;3个样本基本都未检出含有酵母菌。同时可看出,试验测得的细菌总数远高于分离培养菌种的数量,说明发酵垫料样本的细菌种类繁多,除了以上几种试验室常规检测细菌外还存有大量的其他细菌。

2.2 发酵垫料的基因文库

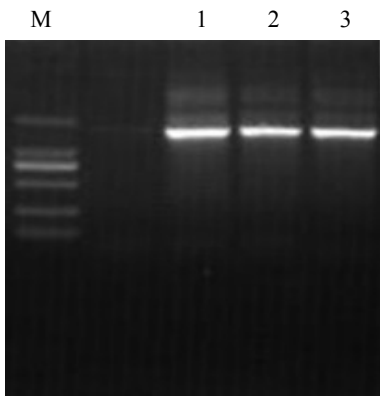
2.2.1 3个层次发酵垫料样本的总DNA提取

以液氮研磨均匀的发料垫料为样本,采用土

壤试剂盒方法提取样本的总 DNA, 经琼脂糖凝胶电泳检测样品条带大于 23 kb, 且明显无拖尾现象, 说明该方法提取的 DNA 纯度和完整性较好.

2.2.2 细菌 16S rDNA 扩增

分别以 3 个样本的总 DNA 为模板, 以 27F 和 1492R 为上下游引物, 经 PCR 扩增得到 1 500 bp 左右的扩增产物, 如图 1 所示. 将扩增产物回收纯化, 再经连接、转化得到大量白色斑点转化子.



M 为 Marker 2000; 1 为表层样本; 2 为中层样本; 3 为深层样本

图 1 3 个样本 DNA PCR 扩增后的 1%琼脂糖凝胶电泳结果

2.2.3 阳性克隆子的检测

每个样本随机挑 60 个白斑, 分别振荡培养后取菌液做模板, 以引物 M13⁺和 M13⁻进行 PCR 扩增, 挑选得到阳性克隆子.

2.2.4 样品 16Sr DNA 基因克隆文库系统分析

将生猪养殖发酵床垫料 3 个样本得到的阳性克隆子随机挑选进行测序, 序列结果与 GenBank 数据库进行比对, 结果表明大部分的阳性克隆序列与数据库存在的序列相似性介于 87%~99%之间, 3 个样本细菌群落构成见表 2~4.

从表 2 可以看出, 生猪养殖发酵床表层细菌呈现较高的多样性, 分布在 13 个属中, 但是优势菌相对不明显, 并且含有大量的未培养微生物. 其中 *Dyella* sp.、*Flavobacteria bacterium* (黄杆菌属)和 *Rhodanobacter* sp. 分别占 11%、9.3% 和 9.3%, *Luteibacter* sp. 占 6.9%, 相对于大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和产碱杆菌等所占比例较高, 为相对优势菌种. 未培养微生物大约占总数的 39.5%.

从表 3 可知, 中层细菌相对于表层细菌, 其细菌的多样性降低, 优势菌明显, 所有菌株分布在 10 个菌属中. 存在明显的优势菌 *Rhodanobacter* sp. 占

48.8%; *Frateuria* sp. 占 11%, *Flavobacteria bacterium*、黄杆菌、分枝杆菌、屈挠杆菌和产碱杆菌等所占比例较少. 此外, 还存在脱硫肠状菌和固氮根瘤菌. 未培养细菌减少至 15.5%.

表 2 表层发酵床垫料的细菌群落构成

菌株名称	克隆子数量	所占文库比例/%
<i>Dyella</i> sp.	5	11.6
<i>Flaobacteria bacterium</i>	4	9.3
<i>Rhodanobacter</i> sp.	4	9.3
<i>Luteibacter</i> sp.	3	6.9
<i>Escherichia coli</i> .	1	2.3
<i>Bevibacterium</i>	1	2.3
<i>Alcaligenes</i> sp.	1	2.3
<i>Eubacterium coprostanoligenes</i>	1	2.3
<i>Lactobacillus johsonii</i>	1	2.3
<i>Sanguibacter</i> sp.	1	2.3
<i>Truepera radiovictrix</i>	1	2.3
<i>Uncultured Pancomycete</i>	1	2.3
<i>Paracoccus</i> sp.	1	2.3
<i>Uncultured bacterium</i>	17	39.5

表 3 中层发酵床垫料的细菌群落构成

菌株名称	克隆子数量	所占文库比例/%
<i>Rhodanobacter</i> sp.	22	48.8
<i>Fateuria</i> sp.	5	11.0
<i>Uncultured Xanthomonadaceae</i>	4	8.8
<i>Flexibacter</i> sp.	1	2.2
<i>Flavobacteria</i> sp.	1	2.2
<i>Mycobacterium</i> sp.	1	2.2
<i>Mesorhizobium</i> sp.	1	2.2
<i>Alcaligenaceae</i>	1	2.2
<i>Dermacoccocae bacterium</i>	1	2.2
<i>Desulfotomaculum</i>	1	2.2
<i>Uncultured bacterium</i>	7	15.5

从表 4 可看出, 发酵床深层细菌多样性相对于发酵床中层更高, 优势菌群也更明显; 所有菌株分布在 14 个菌属中, 其中 *Rhodanobacter* sp. 同样为该层次的优势菌, 约占总量的 47%. 其次为 *Frateuria* sp. 约占 18.2%, *Flavobacteria bacterium*、黄杆菌属、

乳酸杆菌属和梭菌属等比例相对较少。该层次中不含有未培养微生物。

表4 深层发酵床垫料的细菌群落构成

菌株名称	克隆子 所占文库	
	数量	比例/%
<i>Rhodanobacter sp.</i>	21	47.7
<i>Frateuria sp.</i>	8	18.2
<i>Flavobacteria sp.</i>	2	4.5
<i>Gama Proteobacterium</i>	2	4.5
<i>Rhodanobacter tarrae strain</i>	2	4.5
<i>Weissella Paramesenteroides</i>	1	2.3
<i>Uncultured Planctomyceta</i>	1	2.3
<i>Uncultured Thiobacillus</i>	1	2.3
<i>Uncultured Clostridium</i>	2	2.3
<i>Lactobacillus</i>	1	2.3
<i>Gama Proteobacterium</i>	1	2.3
<i>Iron-reducing bacterium</i>	1	2.3
<i>Dokdonella fugitive sp.</i>	1	2.3
<i>Azotobacter</i>	1	2.3

3 讨论

生猪养殖发酵床含有丰富的有机质,是一个特殊的复杂的微生态环境,细菌的多样性除了受到发酵菌剂的影响还与生猪肠道细菌以及发酵床基质的营养因素等紧密相关。因此,微生物组成种类相对较多,呈现出很高的微生物多样性。

利用纯培养技术得到的不同层次细菌总数有明显的差别,其中表层细菌含量最丰富,其原因可能是直接接触生猪粪便。此外,表层含氧量高,导致大量的动物肠道细菌和好氧微生物的繁殖,因此其大肠杆菌的含量也比中层和深层数量高得多,各种好氧和兼性厌氧性细菌生长条件都能得到满足,细菌种类最多,未培养微生物的比例也相对较高。表层垫料基因文库中优势菌不明显,可能是因直接与粪便接触导致肠道细菌含量较高且丰富,而没有明显的优势菌株存在;大肠杆菌和枯草芽孢杆菌都有检出,但所占比例不大,而 *Flavobacteria bacterium*、*Dyella sp.*和 *Rhodanobacter sp.*各占10%左右, *Luteibacter sp.*占9%。文献[15]表明, *Dyella sp.*具有降解有机污染物的作用,已被应用于土壤修复中; *Rhodanobacter sp.*的一些菌株也被应用于

除去污水中的氨氮^[16]和有机污染物 $C_2HCH^{[17]}$ 。 *Luteibacter sp.*的某些种也能从土壤中分离应用于医学领域^[18],用来酶法合成10-去乙酰紫杉醇。在中层和深层垫料中, *Rhodanobacter sp.*所占比例更高,为优势菌,这可能与垫料中含有大量的氮素以及中层或深层中适宜的氧含量有关。此外,在发酵床中深层中还检出脱硫细菌和固氮菌,与发酵垫料粪便中高含量的氮磷有机物相关。

从本试验所构建的基因文库可看出,优势菌群与市购发酵菌剂构成说明中提到的芽孢杆菌和乳酸菌作为主要菌种成分等不相符,说明在发酵垫料自然环境中普通发酵菌剂的发酵的优势没有得到发挥,很难达到预期的调控目的。生猪养殖发酵垫料只能是依靠发酵菌剂启动发酵床运转,但更多的是依靠本身的土著菌种进行调节;该养殖技术还需结合发酵床应用环境条件等信息选择高效的发酵菌株(剂),以达到有效的人为操控目的。

在生猪养殖发酵垫料里存在大量的未培养微生物,在表层和中层样本中均占很大比例。受目前研究水平的限制,大量的未培养微生物的作用尚不清楚,其在发酵垫料中作用的大小无从考证,推测可能在维持发酵床正常运转上也会起到一定的作用。

4 结语

生猪养殖发酵床作为一种特殊的环境体系,内部微生物结构十分复杂。研究表明生猪养殖发酵床环境具有明显的细菌多样性特征,各层垫料细菌均分布在数十个已知细菌种属里,中层和深层垫料中具有明显的与分解氮等有机物相关的优势菌株,其优势细菌分别为 *Rhodanobacter sp.*和 *Frateuria sp.*;而表层没有明显的优势菌株存在。发酵床细菌多样性及分布规律的研究可以帮助了解发酵床的作用和微生物生态及作用机理,为针对性研制新型高效的发酵床菌剂提供重要依据。

参考文献:

- [1] 梁经峰,董德州,卜华.微生态发酵床养猪技术的应用[J].畜牧兽医,2010,8:69.
- [2] 王远孝,李雁,种翔,等.猪用发酵床的研究与应用[J].家畜生态学报,2007,28(6):139-142.

- [3] 陈绿素, 彭乃木, 郑秀兰, 等. 生物发酵舍零排放环保养猪技术的基本原理及技术关键[J]. 畜禽业, 2010, 7: 32-33.
- [4] 崔晓龙, 徐丽华, 文孟良, 等. 未培养微生物资源[J]. 微生物学通报, 2005, 3:144-146.
- [5] Falkowski P G, De Vargas C. Shotgun sequencing in the sea: A blast from the past[J]. Science, 2004, 304 (5667): 58-60.
- [6] 叶姜瑜, 罗固源. 未培养微生物的研究与微生物分子生态学的发展[J]. 微生物学通报, 2004, 31(5):111-115.
- [7] 吴作军, 卢滇楠, 张敏莲, 等. 微生物分子生态学技术及其在石油污染土壤修复中的应用现状与展望[J]. 化工进展, 2010, 29(5):789-795.
- [8] 徐成斌, 孟雪莲, 马溪平, 等. 16S rDNA 克隆文库方法对制药废水处理系统中微生物多样性的研究[J]. 生态环境学报, 2009, 18(4):1236-1240.
- [9] 蔡莹, 陈秀珍, 杨克迁, 等. 云南腾冲热泉土壤微生物基因组文库的构建与分析[J]. 微生物学报, 2006, 46(3): 427-431.
- [10] 刘玮琦, 茆振川, 杨宇红, 等. 应用 16S rDNA 基因文库技术分析土壤细菌群落的多样性[J]. 微生物学报, 2008, 48(10):36-38.
- [11] 黄珍, 谭志琼, 阮云泽. 香蕉园土壤 16S rDNA 文库分析[J]. 热带作物学报, 2010, 31(6):889-993.
- [12] 杨霞, 陈陆, 许瑞, 等. 致病性猪源肠球菌 16S rDNA-RFLP 研究及系统进化分析[J]. 中国兽医学报, 2010, 30(3):332-336.
- [13] 丁君, 李娇, 王姮, 等. 利用 16S rDNA 方法检测刺参消化道细菌种类[J]. 海洋环境科学, 2010, 29(2):250-254.
- [14] 翁佩芳, 陈希, 沈锡权, 等. 榨菜低盐腌制细菌群落多样性的分析[J]. 中国农业科学, 2012, 45(2):338-345.
- [15] 贾玉红. 菌株 *Dyella* sp. LA-4 降解底物光谱性及其在土壤修复中的应用[D]. 大连: 大连理工大学, 2009.
- [16] 胡春萍. 低温下去除污水中氨氮的菌 *Rhodanobacter* sp. 及分离培养方法: 中国, 201110416288.7[P]. 2012-05-09.
- [17] 张海燕, 李梅, 邱星辉. 持久性有机污染物 C2 六六六生物降解研究进展[J]. 微生物学通报, 2007, 34(5):965-969.
- [18] 李建华. 三尖杉宁碱的微生物转化与 10-去乙酰紫杉醇的酶法合成[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2007.

The Bacteria Diversity of Fermentation Bed in Pig-farming by 16S rDNA Gene Clone Library Analysis

BI Si-wei¹, WU Zu-fang^{1*}, YU Yao-to²

(1.Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2.Ningbo Hemudu Agriculture Economics Office, Ningbo 315414, China)

Abstract: Microorganism has an important regulatory and bioconversion function in fermentation bed of pig-breeding. The bacterial DNA samples are directly extracted from different depth in fermentation bed. The bacterial gene clone library is constructed correspondingly for these different types of samples. The results show that the uncultured microorganism appeared in the surface of the fermentation bed, which accounts for 39.5% of the total 45 strains detected. The others belong to 13 different species of bacteria and no predominant bacteria detected. In the middle layer of fermentation bed, uncultured microorganism accounts for 15.5% of the total 45 strains detected. The others consist of 10 different species of bacteria. The predominant bacteria are *Rhodanobacter* sp. and *Frateruria* sp. respectively. The uncultured microorganism is not detected in all 44 bacteria strains in the bottom of fermentation bed. There are 14 different bacteria genus in this layer. The predominant bacteria is *Rhodanobacter* sp., accounting for 47.7% in all the bacteria detected. The others are in a less proportion of total microbial population in this layer. The results demonstrate that the fermented bed in pig-farming manifested an obvious bacterial diversity.

Key words: fermentation bed; bacterial community; 16S rDNA gene library; microbial diversity

(责任编辑 史小丽)