

不经培养的农田土壤微生物种群构成 及系统分类的初步研究

陈 灏 唐小树 林 洁 张伯生 任大明

(复旦大学生命科学学院 遗传工程国家重点实验室 上海 200433)

摘 要 采用一系列的现代分子生物学技术,避开传统的分离培养过程,探讨自然界中微生物种群的基因多样性。经过直接从土壤中抽提总 DNA,并对总 DNA 中 16S rDNA V3 可变区序列作 PCR 扩增、变性梯度凝胶电泳等,对农田土壤微生物种类分布进行初步的研究,发现不同的农田土壤间的菌种差异相当显著,同时对部分农田微生物的系统分类作了初步尝试,为农田土壤微生态和高效菌肥的研究提供了新的实验依据。

关键词 不经培养,微生态,系统进化

中图分类号:Q938 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2002)04-0478-06

越来越多的证据显示可在实验室培养的菌种仅占自然界中细菌种类的极小部分,还有相当多的菌种因为无法培养而未被人类所认识,而它们所包含的极大量的遗传基因是一笔无法估量的财富。不经过传统培养,直接从土壤中抽取总 DNA^[1],并进行分子生物学分析来研究土壤微生物种群情况,是近几年逐步发展起来的全新实验手段。通过这种实验技术,可以有效地避免在传统富集、培养、分离、研究过程中造成的微生物多样性丢失^[2]、种群构成发生变化等弊病,能够更直接更可靠的反映土壤微生物的原始组成情况。

实验中采集了几种植不同农作物的农田土壤,分别抽取其中的微生物总 DNA 后,通过 PCR 及变性梯度凝胶电泳获得了各种农田土壤中微生物 16s rDNA V3 序列的分布,对其中部分序列进行测序和生物信息学研究以后,对农田微生物分布做了初步研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品 土样 1:农田旁未耕种土壤;土样 2:小麦育种田土壤;土样 3:蔬菜育种田土壤;土样 4:玉米育种田土壤,这四份土样均采自上海农业科学院,采样距离不超过 50m。土样 5:棉花农田土壤,土样 6:毛豆农田土壤,这两份土壤采自安徽省当涂县江心乡,采样距离不超过 100m。土样 7:青菜农田土壤,土样 8:茄子农田土壤,这两份土样采自安徽省当涂县城关镇五一村,采样距离不超过 50m。

1.1.2 其他材料及试剂 纯化试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司,PCR 引物^{5'}(P2 5'-CGCCCGCCGCGCGGGCGGGCGGGGCACGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3',P1 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')由上海生工公司合成。

作者简介 陈 灏(1978-),男,上海市复旦大学遗传所(200433)硕士研究生,主要从事未经培养的微生物分子生物学研究。

收稿日期 2001-10-08,修回日期 2002-02-22

1.2 方法

1.2.1 土壤中抽提染色体 DNA^[3] 称取 10g 土壤于三角瓶, 加入 13.5mL DNA 抽提缓冲液 (100mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 100mmol/L EDTA, pH8.0, 100mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH8.0, 1.5mol/L NaCl, 1% CTAB), 100 μ L 蛋白酶 K (10mg/mL)。将三角瓶放置于 37 $^{\circ}$ C, 225 r/min 摇床 30 min。加 1.5mL 20% SDS, 65 $^{\circ}$ C 水浴 2h, 每隔 15~20 min 轻轻摇动一下。将三角瓶中的物质移入 50mL 离心管, 控制于室温、5 000r/min, 离心 10min, 取上清液待用。沉淀中再加入 4.5mL DNA 抽提缓冲液, 0.5mL 20% SDS, 振荡 10s 后, 65 $^{\circ}$ C 水浴 10min, 离心 10min。重复上一步骤一次, 合并上清, 混匀。再加入等体积氯仿/异戊醇 (24:1), 5 000r/min 离心 10min, 取水层, 再加入 0.6 体积的异丙醇, 室温放置 1h 时, 9 000r/min 离心 20min (室温), 取沉淀溶解于 pH7.6 TE 缓冲液 (10mmol/L Tris \cdot Cl, pH7.6, 1mmol/L EDTA, pH8.0) 500 μ L。

1.2.2 试剂盒纯化粗制 DNA 纯化方法见纯化试剂盒说明书。

1.2.3 16S rDNA 基因的 PCR 扩增: PCR 体系为无菌双蒸水 33 μ L, 10 \times PCR 反应缓冲液 5 μ L, 2.5mmol/L dNTP 溶液 2 μ L, 13 μ mol/L PCR 引物 P1 1 μ L, 6 μ mol/L PCR 引物 P2 2 μ L, Taq 酶 2 μ L, 经过纯化的土壤 DNA 溶液 5 μ L。PCR 扩增程序见参考文献^[4,5]。

1.2.4 PCR 产物的纯化浓缩: 合并数管纯化产物, 置于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱中冷冻保存, 取出后以 Parafilm 膜封口, 放入管中用冷冻抽干机处理 3~4h 后, 将干粉溶于 30 μ L pH7.6 TE 中, 保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱待用。

1.2.5 PCR 产物的进一步分离测序^[5-8]: 用 DGGE 电泳分离 DNA, 制备变性梯度凝胶, 使其变性梯度 15%~55%。使用的电泳缓冲液为 1 \times TBE (0.009mol/L Tris-硼酸, 0.002mol/L EDTA)。加样量为 30 μ L DNA + 6 μ L 6 \times 溴酚蓝二甲苯氰溶液。电压 200V, 60 $^{\circ}$ C, 电泳 2.5~3.0h, 溴乙锭染色 0.5h。从凝胶上切下含目标条带的凝胶块。转移至微量离心管中, 将凝胶挤碎, 加 1~2 倍凝胶块体积的洗脱缓冲液 (0.5mol/L 乙酸铵, 10mmol/L 乙酸镁, 1mmol/L EDTA, pH8.0, 0.1% SDS), 在旋转平台上于 37 $^{\circ}$ C 温育过夜, 15 000g 离心 5min, 取上清, 加 2~3 倍体积乙醇, 于冰上放置 30min。15 000g 离心 10min, 沉淀 DNA。将 DNA 重溶于 10 μ L TE (pH7.6) 中。参照 1.2.3 节所述, 进行 PCR 扩增, 由上海博亚生物公司测序。

2 结果

2.1 不经过培养对土壤微生物总 DNA 的抽提

将各土壤样品抽提所得 DNA TE 溶液经过 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳, 分别在 8~23kb 左右出现条带 (图 1-a, b) 表明已获得较长片段的土壤微生物的总 DNA。

2.2 从总 DNA 中扩增 16S rDNA 片段

从土壤样品中获得的总 DNA 经过 PCR 后, 均获得特异扩增片段, 大小在 250bp 左右, 为 16S rDNA V3 区段片段。(图 2-a, b)

2.3 变性梯度凝胶电泳分离扩增所得 16S rDNA 片段

将所得 16S rDNA 片段通过变性梯度凝胶电泳, 可以看到分离为若干条带。(图 3-a, b) 并且每种土壤样品的 PCR 产物所出现的条带都不同。

2.4 各分离 16S rDNA 片段测序

割胶分离并测序 I, C, VI, VII, VIII 5 条片段, 测序结果如表 1。

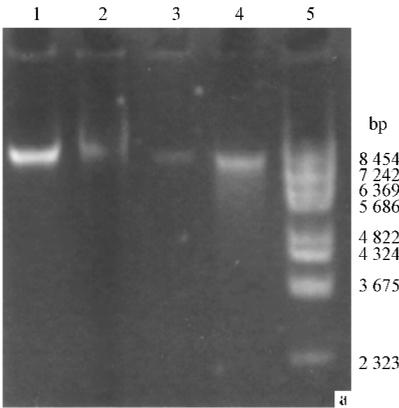


图 1-a 上海农业科学院四种土壤样品抽提的 DNA

Fig.1-a Extracted DNA from SAMPLE 1 2 3 4
 1. Unfarmed soil sample ; 2. Corn soil sample ;
 3. Vegetable soil sample ; 4. Wheat soil sample ;
 5. Lambda DNA-BstE II Digest Marker.

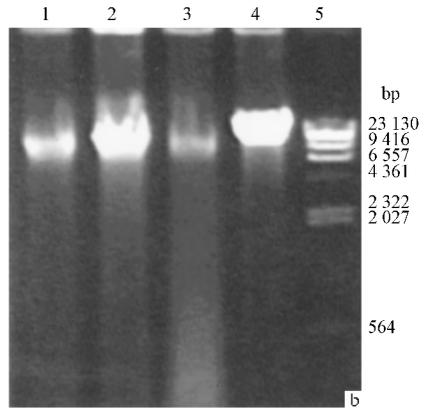


图 1-b 安徽省当涂县四种土壤样品抽提的 DNA

Fig.1-b Extracted DNA from SAMPLE 5 6 7 8
 1. Eggplant soil sample ; 2. Green soy bean soil sample ;
 3. Vegetable soil sample ; 4. Cotton soil sample ;
 5. Lambda DNA-Hind III Digest Marker.

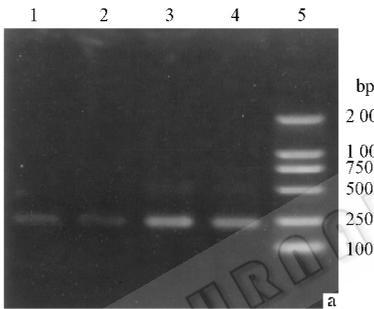


图 2-a 上海农业科学院土壤样品 DNA PCR 产物

Fig.2-a 16S rDNA amplified by PCR from
 Extracted DNA of SAMPLE 1 2 3 4
 1. Unfarmed soil sample ; 2. Corn soil sample ;
 3. Vegetable soil sample ; 4. Wheat soil sample ;
 5. DL2000 Marker.

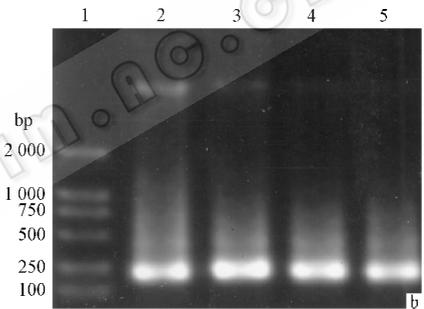


图 2-b 安徽省当涂县土壤样品 DNA PCR 产物

Fig.2-b 16S rDNA amplified by PCR from
 Extracted DNA of SAMPLE 5 6 7 8
 1. DL2000 Marker ; 2. Cotton soil sample ;
 3. Green soy bean soil sample ; 4. Eggplant soil sample ;
 5. Vegetable soil sample.

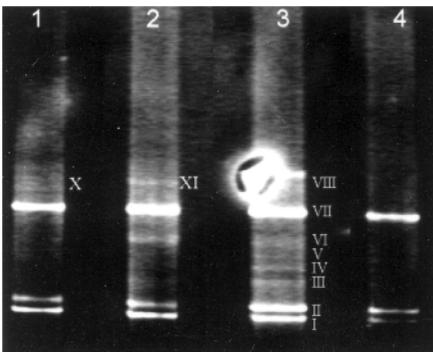


图 3-a PCR 所得 16S rDNA 的 DGGE 分离结果

Fig.3-a 16S rDNA separated by DGGE
 1. Unfarmed soil sample 1 ; 2. Wheat soil sample 2 ;
 3. Vegetable soil sample 3 ; 4. Corn soil sample 4

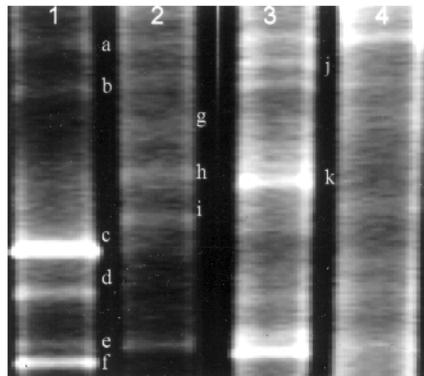


图 3-b PCR 所得 16S rDNA 的 DGGE 分离结果

Fig.3-b 16S rDNA separated by DGGE
 1. Eggplant soil sample 8 ; 2. Green soy bean soil sample 6 ;
 3. Vegetable soil sample 7 ; 4. Cotton soil sample 5.

表 1 部分 16S rDNA DGGE 片段测序分析结果

Table 1 The sequences of several 16S rDNA DGGE fragments

Sequenced bands	Sequences	The strains which have the highest identity from NCBI
I	5'-GGCTTTCTGGTAAGGTACCGTCAGGGCGCCGGCAGTTAACCGGCGCTTGTCTCCCTTACAACAGAGCTTACGACCCGAAGGCCTTCTTCACTACGCGGGCTTGTCTCCGTAGACTTTTCGTCATTGGCGAAGATTCCCTACTGCTGCCCTCCCGTAGGCCCCCGTGCCCCCGCCGCGCCGCCGCGCGCGCGGGCGG-3'	Uncultured bacterium SP11~17(96%) <i>Bacillus niacini</i> (93%) <i>Bacillus infermos</i> (92%) <i>Planococcus southpolaris</i> (91%) <i>Bacillus macroides</i> (91%)
VII	5'-GGTAACGTCAATGAGCAAAGGTATTAACCTTACTCCCTTCTCCCGCTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCATACAGCGGCATGCGTGCATCAGGCTTGGCGCCATTGTGCAATATCCCCACTGCTGCCCTCCCGTAGGCCCCCGTGCCCCGCCCGCCCGCGCGCGCGGGCGG-3'	<i>Escherichia coli</i> (100%) <i>Serratia marcescens</i> (100%) Ruminal bacterium PAD23(100%) <i>S. sonnei</i> (100%) <i>S. flexneri</i> (100%)
VIII	5'-TCTGGTAAGGTACCGTCAGGGCGCCGGCAGTTAACCGGCGCTTGTCTTCCCTTACAACAGAGCTTTACGACCCGAAGGCCTTCTTCACTCACGCGGNGTNGCTCCGNCAGACTTTTCGTCATTGCGGAAGATTCCTACTGCTGCCCTCCCGTAGGCCCCCGTGCCCCGCCCGCCCGCGCGCGGGCGG-3'	Uncultured bacterium SP11~17(94%) <i>Bacillus niacini</i> (90%) <i>Bacillus flavothermus</i> (94%) <i>B. methanolicus</i> (94%) <i>Bacillus clausii</i> (95%)
VI	5'-GGTACCGTCAATGAGCAAAGGTATTAACCTTACTCCCTTCTCCCGCTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCTTTTATACACGCGGNATGGNTGGATCAGGCTTGGCGCCATTGTGCAATATCCCCACTGCTGCCCTCCCGTAGGCCCCCGTGCCCCGCCCGCCCGCGCGCGCGCGGGCGG-3'	<i>Escherichia coli</i> (95%) <i>Serratia marcescens</i> (95%) <i>S. sonnei</i> (95%) <i>S. flexneri</i> (95%) <i>S. dysenteriae</i> (95%)
C	5'-GGTGTAGCCGATGCCTTATTCTCAGGTACATTACGTTCCCAACAGTGGAAAGGTTTATCCCTGACAAAAGCAGTTTACAACCCATAGGGCAGTCATCCTGCACGCGGCATGGCTGGTTACAGAGTCCCTCCATTGACCAATATCTTACTGCTGCCCTCCCGTAGGCCCCCGTGCCCCGCCCGCCCGCGCGCGGGCGG-3'	Unidentified cytophagales(95%) <i>Sphingobacterium multivorum</i> (93%) <i>Pedobacter</i> sp.(92%) <i>Flavobacterium</i> sp.(91%) <i>S. mizutae</i> (90%)

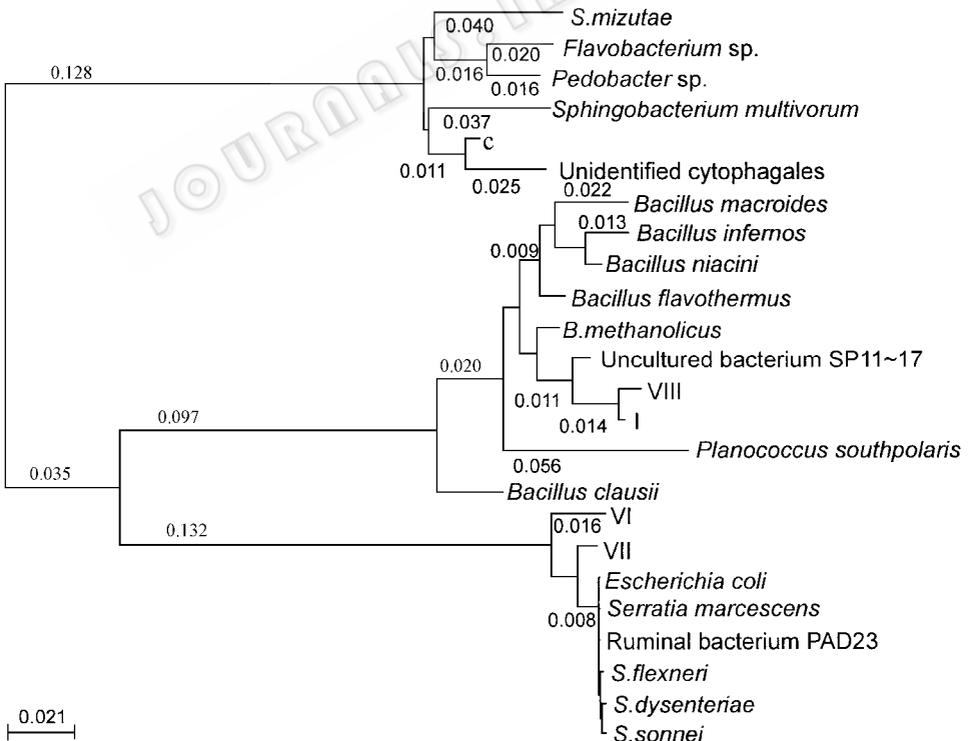


图 4 测定的 16S rDNA 序列所代表的微生物的系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of the sequenced microorganism

2.5 测序结果的生物信息学分析

通过 NCBI 的查找比对,选取与各所测序列最接近的 18 条序列,将所有这些序列通过 Phylip 和 Clustal W 处理,所得系统树如图 4。

3 讨论

从土壤中不经培养直接抽提微生物的总 DNA,由于避免了在培养过程中的筛选和富集作用,能够更直接的反映土壤中的微生物多样性及种群分布情况,较之传统培养、分离、鉴定的全过程而言,更快也更准确。通过这种方法研究,已经有多个报道指出,大约有 90% 以上的从直接抽提的土壤总 DNA 中发现的菌种是以前未被分离得到或未经充分研究的,这意味着自然界中还存在着极为丰富的微生物资源等待我们去开发。

在实验中发现不同的农田土壤存在明显的微生物种群分布差异,从所得 DGGE 图谱来看,地域对农田土壤微生物种群构成有一定的影响,在地域比较一致的 2 组土壤(1、2、3 和 4 为一组,5、6、7 和 8 为一组)中,组内都存在一定的共性。1、2、3 和 4 土样均含有 I、II 和 VIII 号条带,5、6、7 和 8 土样中均含有 a、e 号条带,而地域更接近的 7 和 8 两号土样中都存在着 b 号条带。这说明农田土壤微生物种群具有一定的地域性,揭示在农作物引种过程中除传统的气候土质等因素外,不同地域间的农田微生物种群差异可能也会有一定的影响。但在同组的不同土样之间也存在着明显的差异性,表现为某些条带的不同。条带 III、IV 和 V 仅存在于 3 号 4 号土样中,条带 XI 仅存在于 2 号土样中,条带 X 仅存在于 1 号土样中;c、d、f 号条带只存在于 8 号土样中,g、i 号条带则存在于 6 号土样中;j 号条带只有 7 号土样中有。这些差异性反映种植不同作物的农田中存在其特殊的微生物种群。由于 1、2、3 和 4,5 和 6,7 和 8 号土样采自相邻地段,并且土质基本相同,因此这些差异并非是由地域或土质差异所造成,而是种植不同农作物对农田土壤微生态环境影响的直接反映。由此提示种植不同的农作物可能会使农田土壤微生物种群构成发生改变,使之具有特殊性。农业生产中存在一种有趣的现象,即将某一作物改种于原来种植其他作物的农田中,往往在头一两年无法获得好收成,可能也与这种微生物种群差异相关。同时,未耕种土地(土壤样品 1)中所能分离到的微生物条带最少,除 I、II 和 VIII 外不存在其他农田中所具有的微生物,也提示这些特殊的微生物有可能对相应的农田微生态环境构建或作物生长起到特殊作用。另外实验结果说明建立农田微生物种群 16S rDNA 图谱是可行的,通过对这些图谱的对比分析将有助于对微生物生态、微生物菌肥等多方面研究的开展。

利用 DGGE 分离 16S rDNA 条带并加以测序,是一条可行的快速研究农田土壤微生物种群的技术路线。从对几个 DGGE 条带测序的结果来看,可以对条带所代表的菌株的分类地位有一些初步的了解。条带 I 和 VIII 与阳性菌 *Bacillus* 属有较近的亲缘关系,条带 VI 和 VII 与一些阴性菌 *E. coli* 和 *Serratia* 属有较近亲缘关系,c 与 *Sphingobacteria* 类群有较近亲缘关系。虽然由于所用引物获得的 16S rDNA 片段较短,无法确切判别条带所对应的微生物的分类地位,但对于了解农田微生物种群分布仍是有帮助的,改进 PCR 所用引物获得更长 16S rDNA 片断以后应可有效地确定菌株的分类地位,这对于我们快速大规模研究农田土壤微生物种群结构是非常有益的,同时可以获得传统培养方法无法得到的菌株的情况,能够更全面真实地反映农田土壤微生态环境的面貌。同时,除 VII 号条带外,其他条

带的顺序与已知菌株的顺序都有较大的差异,暗示这些条带所代表的菌株可能尚未被人们获得并研究过,如果这样的结果具有代表性,说明可能有 80% 以上的农田土壤微生物菌株尚未被加以研究,因此采用此方法对农田土壤微生物进行研究将是大有可为的。

参 考 文 献

- [1] Seow K T, Meurer G, Gerlitz M, et al. *J Bacteriol* 1997, **179**(21): 7360 ~ 7368.
- [2] Watanabe K, Baler P W. *J Biosci Bioeng*, 2000, **89**(1): 111.
- [3] Zhou J Z, Bruns M A, tiedje J M. *Appl Environ Microbiol*, 1996 **62**: 316 ~ 322.
- [4] Watanabe K, Teramoto M, Futamata H, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1998 **64**: 4396 ~ 4402.
- [5] Muyzer G, Waal E C, uitterlinden A g. *Appl Environ Microbiol*, 1993 **59**(3): 695 ~ 700.
- [6] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T (金冬雁等译). 分子克隆实验指南第二版. 北京: 科学出版社, 1996.
- [7] Fischer S G, Lerman L S. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983 **80**: 1579 ~ 1583.
- [8] Muyzer G. *Microbiology*, 1999 **2**: 317 ~ 322.

Community Constitute and phylogenetic Analysis on Soil Uncultured Microorganism

Chen Hao Tang Xiaoshu Lin Jie Zhang Bosheng Ren Daming

(The State Key Laboratory of Genetic Engineering, School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract : Many evidences show bacteria that can be cultured in lab are only the minority of germs existing in nature. Most of bacteria, containing rich valuable gene resource, are unknown for they are uncultured. To research these uncultured bacteria, Directly extract crude DNA from farm soil, separate 16S rDNA mixture amplified by PCR from the crude DNA, sequence it and compare the sequences with the records of NCBI to classify the germs. The significant microbe community difference from respective soil, which have possibility in developing a new tool for researching soil bacteria diversity were found.

Key words : Uncultured, Microbe ecology, Phylogenesis

欢迎投稿！欢迎订阅！欢迎提出宝贵意见！