

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49(2) 227-232; 4 February 2009
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

采用变性梯度凝胶电泳研究双孢蘑菇培养料后发酵过程中的细菌群落结构

何丽鸿^{1,2}, 陈明杰^{1*}, 潘迎捷³

(¹ 农业部应用真菌资源与利用重点开放实验室, 上海市食用菌工程技术研究中心, 上海市农业遗传育种重点实验室, 上海市农业科学院食用菌研究所, 上海 201106)

(² 南京农业大学生命科学院微生物系, 南京 210095)

(³ 上海水产大学, 上海 200090)

摘要 【目的】对双孢蘑菇培养料“后发酵”期间的细菌群落结构进行了初步的研究, 希望利用现代分子生态学的方法能快速、准确地对培养料发酵过程中的微生物群落结构进行动态的检测。【方法】采用变性梯度凝胶电泳(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)对取自双孢蘑菇培养料“后发酵”不同时期的七份样品的特异性扩增细菌 16S rDNA 的 V3 可变区进行分析。【结果】双孢蘑菇培养料中的细菌组成要远远丰富于人们用传统的分离方法所获得的类群; 空气调节时期的培养料中不仅检测到了前人用经典培养方法获得的 *Bacillus* 属嗜热细菌, 还发现了一些未曾报道的 Bacilli 门的成员, 如 *Trichococcus* 属、*Planococcus* 属和 *Caryophanon* 属, 以及 γ -Proteobacteria 亚纲。而在“后发酵”刚开始和即将结束的培养料中分别检测到了 *Thermus thermophilus* 和 α -Proteobacteria 亚纲的细菌, 这些是近年来利用分子生物学方法在各类高温堆肥中发现的新类群。【结论】发现双孢蘑菇培养料“后发酵”过程中细菌的群落结构发生了明显的变化, 在双孢蘑菇培养料“后发酵”过程中还发现了大量目前尚未获得培养的细菌类群。

关键词: 双孢蘑菇培养料后发酵; 细菌群落结构; PCR-DGGE

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)02-0227-06

“后发酵”是双孢蘑菇 *Agaricus bisporus* (Large) Sing 培养料制备工艺中的一项关键技术, 通过室内控温的堆肥过程, 控制各种嗜热微生物的生理代谢和群落衍替可以进一步促进培养料成为有利于蘑菇菌丝吸收、利用的“选择性”栽培基质。在这一过程中, 各种嗜热微生物的生理代谢和群落衍替发挥了至关重要的作用, 微生物的群落衍替是决定双孢蘑菇培养料发酵成功与否的关键因素之一。但是至今为止, 后发酵培养料的好坏还没有定性的指标加以判断, 只能依靠技术员的经验对培养料后发酵的好坏加以判断。本试验运用 PCR-Denaturing Gradient

Gel Electrophoresis 结合的现代分子生态学方法, 对“后发酵”期间双孢蘑菇培养料内的细菌群落结构进行了初步的研究, 希望利用现代分子生态学的方法能快速、准确地对培养料发酵过程中的微生物群落结构进行动态的检测, 为今后培养料后发酵的定性判断指标的建立提供基础。

1 材料和方法

1.1 供试的双孢蘑菇培养料

双孢蘑菇培养料, 取自山东省九发食用菌股份有限公司的培养料制备车间。

基金项目: 农业部公益性行业科研专项项目(nyhyzx07-008)

* 通信作者。Tel: +86-21-52630034; Fax: +86-21-62201337; E-mail: mjchen@saas.sh.cn

作者简介: 何丽鸿(1979-), 女, 福建福州人, 硕士研究生, 主要从事堆肥中的分子生态学研究。E-mail: hlhcala@sina.com

收稿日期: 2008-06-11; 修回日期: 2008-10-31

1.1.1 培养料配方 如表 1。

1.1.2 样品编号及取样的时间 :见表 2。

表 1 双孢蘑菇培养料的配方

Table 1 Components of the compost for *Agaricus bisporus*

Component	Wet weight/kg	Humidity/%	Nitrogen ratio	Total Nitrogen content/kg	Total carbon content/kg
Wheat straw	26000	11	0.6	139	9710
Chicken manure	21000	70	4.9	309	1340
gypsum	1800				
urea	1500		46	69	
Total	48950			517	11050
Total compost contain	C% = 35.2	N% = 1.65	C/N = 21.4	Water content	75%

Data collected from compost workshop production records. Total Nitrogen contain = Nitrogen ratio X total dry weight of compost, C% N% was calculated by dry weight.

表 2 双孢蘑菇培养料取样编号和取样时间

Table 2 Details of the Samples tested in this study

Sample number	time interval	Air temperature /substrate temperature/°C	Period in Phase II
C1	0	33.1/40.3	Begin of Phase II
C2	35.5 h	55.6/57.8	Before pasteurization
C3	12.5 h	56.3 /59.3	After pasteurization
C4	24 h	52.0/55.5	The first day of air adjustment
C5	48 h	50.6/53.6	The Thrid day of air adjustment
C6	48h	48.7/49.6	The fifth day of air adjustment
C7	31 h	22.5/23.7	End of Phase II

Compost temperature is determine in the center of compost which is a little different with sample temperature.

1.2 培养料的采集

从距培养料顶端约 50 cm 处采集样品约 500 g, 放入液氮中速冻后于 -20°C 保存。

1.3 双孢蘑菇后发酵培养料样品 DNA 的提取与分析

按照文献 [1] 中描述的方法对双孢蘑菇后发酵培养料样品 DNA 进行提取, 用于 DGGE 分析的细菌 16S rDNA V3 区的扩增参见文献 [2]。按照文献 [3] 中描述的方法, 对样品进行 DGGE 分析。按照文献 [4] 中描述的方法, 对 DGGE 胶上某些条带进行割胶、回收、克隆、测序。测序工作由上海博亚生物技术有限公司完成。

1.4 序列的系统发育分析

序列在 GenBank 数据库中进行 Blast 比对, 检索相近序列。对本试验获得的序列及数据库中的相近序列应用 Clustalx 软件计算其亲缘关系, 用 Mega2 软件构建系统发育树。

2 结果

2.1 V3-PCR 扩增的琼脂糖凝胶电泳

将 16S rDNA 的 V3-PCR 扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 电泳结果如图 1, 7 个样品 (C1-C7) 均扩增获得约 250 bp 的目的片段。电泳图谱中 1 为

PCR 扩增的负对照(在 PCR 扩增时采用等体积的无菌重蒸水替代加入样品的 DNA 模板)没有扩增出条带, 证明反应体系没有受到外源 DNA 的污染。

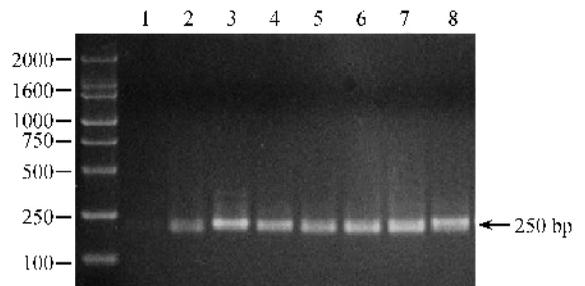


图 1 采用 V3-PCR 对样品进行扩增后产物的琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig.1 The electrophoresis of V3-PCR products. M. DGL2000 Marker, 1. PCR negative control 2~8. PCR amplification results for C1~C7 samples.

2.2 V3-PCR 产物的 DGGE 图谱

不同细菌类群的 V3 区域片段大小基本一致, 但其 DNA 的序列组成存在差异, 利用 DGGE 可以将片段大小相同但序列组成不同的不同细菌类群的 V3 区域进行分离。如图 2 所示, 在 35%~65% 的变性梯度范围内, 7 份取自不同发酵时期的培养料样品, 其 V3-PCR 扩增产物都实现了较好的分离。从 DGGE 电泳图谱可以看出整个“后发酵”过程中细菌的多样性极

为丰富,且群落组成存在明显的衍替过程。

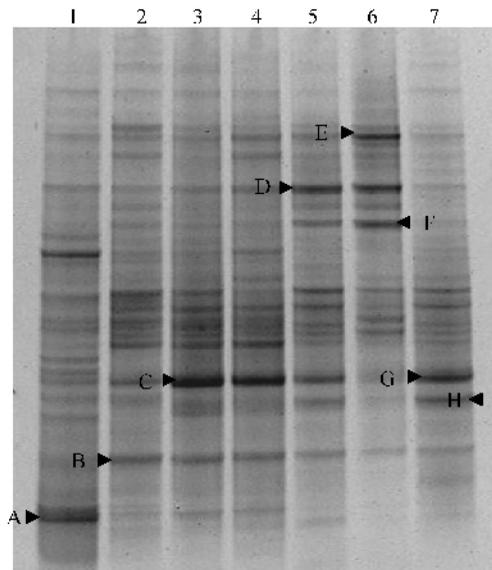


图2 采用 V3-PCR 对样品进行扩增后产物的 DGGE 图谱
 Fig.2 DGGE of amplified V3 fragments. 1-7 : C1-C7 samples. A, B, C, D, E, F, G and H are dominant bands for further purification and sequence.

2.3 DGGE 图谱中主要条带的序列测定

2.3.1 目的条带的验证: 分别从目的片段的克隆文库中挑选了 8 个阳性克隆, 进行 DGGE 的验证。由于 PCR 扩增中产生的单链等原因使得验证过程中

假阳性较严重。如图 3 所示目的条带 E 的 8 个阳性克隆经验证仅发现 50% 的克隆携带目的片段(图中箭头所指为携带的目的片段)。

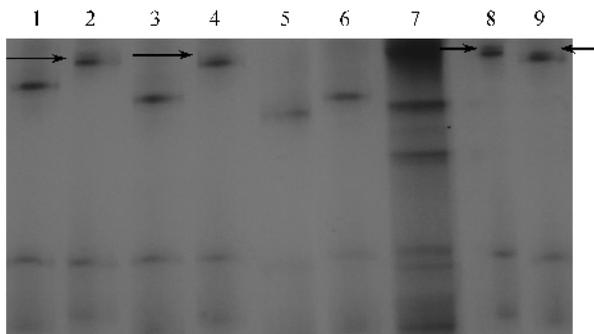


图3 阳性克隆的 V3-PCR-DGGE 验证(部分)
 Fig.3 Comparison of V3-PCR-DGGE community patterns with single products isolated from profile and reamplified from the positive clones. Sample 1-6, 8, 9 are positive clone of band E from DGGE analysis, Sample 7 is DGGE results for sample C5.

2.3.2 目的条带的测序结果: 不同序列组成的 DNA 片段可能具有相同的 T_m 值, 使得 DGGE 电泳中会出现一个条带代表多种不同微生物类群的情况^[10]; 因此, 每一目的条带挑取 3 个已验证的阳性克隆进行序列测定。对于序列一致(99% 以上同源)的克隆, 取其一进行统计分析, 测序结果及 BLAST 比对获得的系统发育信息如表 3。

表 3 目的条带的序列比对结果

Table 3 Sequence and phylogenetic affiliations of DNA recovered from DGGE gel

Band			Closest relative			
No.	Genbank Accession No.	Similarity	Organism	Genbank Accession No.	Phylogenetic affiliation	Source
A-1	DQ082870	100%	<i>Sphaerobacter thermophilus</i>	AJ 420142	Chloroflexi	
A-2	DQ082871	99.45%	<i>Thermus thermophilus</i>	AY788091	Deinococci	
B	DQ082872	87%	Uncultured bacterium clone X9Ba49	AY607181	Unclassified bacteria	Anoxic rice field
C-1	DQ082873	91%	Uncultured bacterium clone X9Ba49	AY607181	Unclassified bacteria	Anoxic rice field
C-1	DQ082874	90%	Uncultured Chloroflexic bacterium clone AKYG999	AY921904	Unclassified Chloroflexi	Farm soil adjacent to a silage storage
C-2	DQ082874	90%	Uncultured Chloroflexic bacterium clone AKYG999	AY921904	Unclassified Chloroflexi	Farm soil adjacent to a silage storage
D-1	DQ082875	98%	<i>Caryophanon . tenue</i>	X70315	Bacilli	
D-2	DQ082876	100%	<i>Bacillus silvestris</i>	AJ006086	Bacilli	
E-1	DQ082877	100%	<i>Bacillus</i> sp. STB9	AY603079	Bacilli	Biodegradation of petroleum hydrocarbons by indigenous thermophilic bacteria
F-1	DQ082878	100%	<i>Planococcus</i> sp. JG07	AF144750	Bacilli	Korean traditional fermented seafood
F-2	DQ082879	100%	Uncultured Gram-positive bacterium	AY444834	Uncultured Gram-positive bacterium	
G-1	DQ082880	91%	Uncultured Chloroflexic bacterium clone AKYG999	AY921904	Unclassified Chloroflexi	Farm soil adjacent to a silage storage
G-2	DQ082881	90%	Uncultured bacterium clone X9Ba49	AY607181	Unclassified bacteria	Anoxic rice field
H-1	DQ082882	92%	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	AJ308501	Chloroflexi	Hypersaline microbacterium mats
H-2	DQ082883	93%	Uncultured bacterium clone G32	AF407705	Unclassified bacteria	Environmental sample
H-2	DQ082883	92%	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	AJ308501	Chloroflexi	Hypersaline microbacterium mats

A - H are number of target band pick from DGGE, 1, 2 are the clone number for analysis.

2.3.3 目的条带的系统发育分析:对获得的序列以及数据库中的相近序列经 Clustalx 软件计算其亲缘关系,用 Mega2 软件创建系统发育树,如图 4 所示,在构建的系统发育树中 DGGE 条带代表的细菌类群可分为两大分支:一是以 *Bacillus* 属为代表的 Bacilli 纲,该分支的细菌主要活跃在“空气调节”阶段,传统的分离培养法和一些分子生物学检测手段都显示以 *Bacillus stearothermophilus* 为代表的专性嗜热细菌是高温堆肥中最为重要的一类细菌,然而近来不少报道显示 *Bacillus* 属的其他类群也广泛地分布于高温堆肥中,如 Peter^[5]等在食物废料的堆肥中检测到

了 *Aneurinibacillus* 以及 *Brevibacillus*, 而 Michel Blanc^[11]等则在败叶和木屑组成的堆肥中发现了 *Bacillus firmus*。检测到的 *Bacillus silvestris* 也是首次报道存在于高温堆肥中。还有较大一部分是非 *Bacillus* 属的 Bacilli 纲成员,如 *Caryophanon* 属,以及 *Planococcus* 属;另一分支其细菌类群较为复杂:条带 H 代表的 *Chloroflexus aurantiacus*, 同 A-1 克隆代表的 *Sphaerobacter thermophilus* 均是 Chloroflexi 门的成员;条带 B、C、G 所代表的一类目前尚未获得培养的 Chloroflexi 门细菌,同以上的和 Deinococci 门构成了 DGGE 系统发育树中的另一大分支。

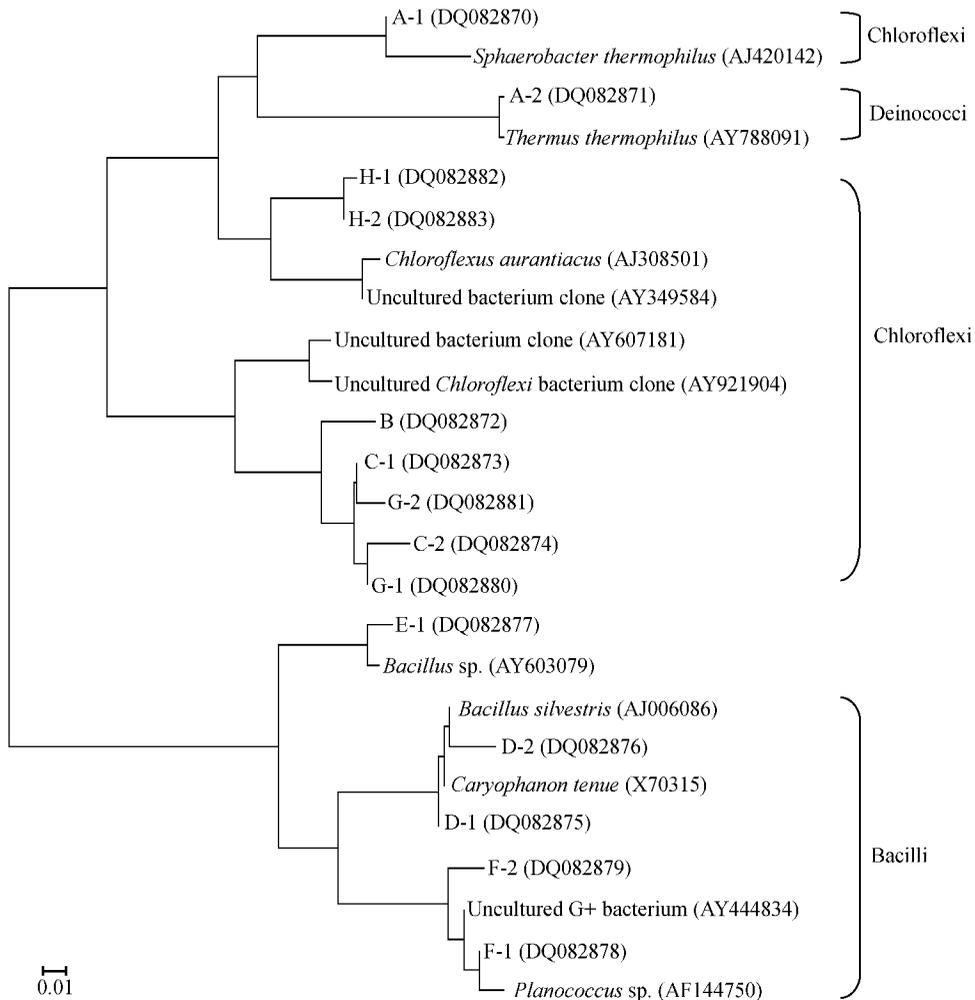


图 4 DGGE 主要条带的系统发育分析

Fig.4 Phylogenetic analysis of the predominant bands in the DGGE profile. The Number in the bracket is sequence accession number in Genbank, the label indicted there are 1% difference on the nuclear acid sequence.

3 讨论

从 DGGE 的电泳图谱中发现“后发酵”刚开始时,在变性梯度胶的底部即高变性梯度处有一条极为明显的条带,在“后发酵”过程中该条带逐渐减弱,

直至最后消失。由此推测,有一类(G+C)含量较高的细菌在“后发酵”前期处于生长优势,随着“后发酵”的进行,该类细菌逐渐消亡;对比“空气调节”的不同阶段,发现“空气调节”的前期以一些(G+C)含量中等的细菌类群占优势,随后一些(G+C)含量较

低的类群快速繁衍,逐渐占据了优势地位;“降温”(Cooling)后的培养料其细菌组成也与“空气调节”时期的差异较大,这与“降温”过程中培养料的温度迅速从“空气调节”时的约 50℃ 降低到低于 25℃ 的发酵工艺是相符的。“后发酵”过程中由于温度等环境条件的迅速变化,细菌的群落组成发生了明显的变化。

DGGE 图谱中,目的条带 A 为“后发酵”刚开始时独有的一个条带,序列测定的结果,克隆 A-1 与 *Sphaerobacter thermophilus* 的序列 100% 同源,克隆 A-2 与 *Thermus thermophilus* 99% 同源。1996 年 Trello Beffa^[6] 等在各类堆肥中分离出一类不产芽孢的杆状、革兰氏阴性菌,营养物质利用情况鉴定、总蛋白图谱分析以及 16S rDNA 的 RFLP 分析,都显示其与 *Thermus thermophilus* 具有极高的同源性,目的条带 B 所代表的是一类还未获得培养的细菌类群,且 GenBank 数据库中已知序列与它的同源性普遍较低,最高的也仅为 87%。从 DGGE 图谱中可知条带 B 代表的是一类(G+C)含量较高的细菌,是“后发酵”前期的优势菌,随着“后发酵”的进行,该类群逐渐减少至消亡;目的条带 C 是 DGGE 图谱中分布于“巴氏消毒”和“空气调节”时期的重要条带,在“空气调节”后期该条带逐渐减弱消失,出料时期 DGGE 图谱的该位置再次出现明显条带,推测可能为不同的细菌类群,为区别于条带 C,将此条带命名为 G。然而如表 3 序列分析的结果显示,目的条带 C 和 G 是分布于不同时期的同一类细菌,并且同条带 B 所代表的细菌极有可能是同一大类的细菌,因为在已知序列中与它们同源性最高的是同一序列群,即 Uncultured bacterium clone X9Ba49 和 Uncultured Chloroflexic bacterium clone AKYG999。不同的是条带 C 和 G 与这组已知序列的同源性为 92%,相比 B 条带高一些。以此推测在培养料的“后发酵”过程中极有可能存在一类还未报道的优势细菌类群;DGGE 图谱中;“空气调节”时期的优势细菌是一些(G+C)含量较低的类群。测序结果显示 3 条主要条带 D、E、F 代表的均是 Bacilli 纲的成员。D-1 克隆与 *Caryophanon tenue* 98% 同源,而 D-2 克隆与条带 E 代表的均是 *Bacillus* 属的细菌,D-2 克隆与 *Bacillus Silvestris* 100% 同源,E 条带的序列与 *Bacillus* sp. STB9 100% 同源;*Bacillus* 属一直被认为是高温堆肥中最为重要的一类嗜热细菌^[7-9],在有机物的降解过程中发挥着重要的作用;目的条带 F 与 Bacilli 纲的 *Planococcus* sp. JG07 的序列 100% 同源;F-2 与一未获得培养的革兰氏阴性菌 100% 同源。目的条带

H 代表的可能是 *Chloroflexus* 属的一个新成员,因为在已知的序列中与其同源性最高的一类还未获得培养的细菌,而在已培养的微生物中与其同源性最高的是 *Chloroflexus aurantiacus*,二者的同源性也仅为 92%。DGGE 条带的测序结果中,虽然受 DGGE 电泳有效分离片段大小的限制,该试验中扩增的细菌 V3 可变区片段大小仅 200 bp 左右,以此反映的系统发育信息来确定微生物的分类地位还有待进一步验证^[10]。此次测试分析的仅是取自离堆料顶约 50cm 处的堆料样品,由于堆肥的表层、中间和深层的微生物类群差异较大,因此,本文结果只能反应堆料中部分细菌的主要类群和变化过程,但这个初步的结果就发现在培养料的“后发酵”过程中极有可能存在一类还未报道的优势细菌类群,反映出双孢蘑菇“后发酵”中的细菌类群要远远丰富于以往人们用纯培养方法分离所确定的类群。

综上所述,V3-PCR-DGGE 的结果说明了在整个“后发酵”过程中细菌的群落结构发生了较大变化:在“前发酵”结束;“后发酵”刚开始时 *Sphaerobacter thermophilus* 和 *Thermus thermophilus* 两类专性嗜热细菌为培养料中的优势微生物。从系统发育的角度而言 Chloroflexi 门和 Deinococci 门的细菌是“后发酵”刚开始时的优势类群,随着“巴氏消毒”的进行其优势地位逐渐被一些尚未培养的 Chloroflexi 门细菌替代;而在“空气调节”阶段 Bacilli 纲的各类群大量繁殖,成为培养料中新的优势类群;“降温”阶段 Chloroflexi 纲的细菌又重新成为主要类群。

参考文献

- [1] 何丽鸿,赵勇,陈明杰,等.堆肥中微生物总 DNA 的高效提取.微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)2006,46(1):162-165.
- [2] Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59: 695-700.
- [3] 赵勇,李武,周志华,等.秸秆还田后土壤微生物群落结构变化的初步研究.农业环境科学学报(Journal of Agro-environmental Science),2005,24(6):1114-1118.
- [4] Sun HY, Deng SP and Raun WR, Bacterial community structure and diversity in a century-old manure-treated agroecosystem. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70: 5868-5874.

- [5] Peter MD and William CG , Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolates and extracted DNA. *FEMS Microbiology Ecology* , 2000 , 35 : 207 – 216.
- [6] Trello B , Michel B , Pierre-Francois L , et al . Isolation of *Thermus* strains from hot composts (60 to 80°C). *Applied and Environmental Microbiology* , 1996 , 62 : 1723 – 1727.
- [7] Flegg PB , Spencer DM and Wood DA , The cultivation of mushrooms. UK , Wiley-Intersciences Publication , 1985.
- [8] LJLD van Griensven. The biology and technology of the cultivated mushroom. the Netherlands , The Mushroom Experimental Station , 1988.
- [9] Overstijns A. The conventional Phase II in trays or selves. *Mushroom Journal* , 1981.
- [10] Gerard M , Kornelia S , Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* , 1998 , 73 : 127 – 141.
- [11] Michel B , Laurent M , Trello B , et al. Thermophilic bacterial communities in hot compost as revealed by most probable number counts and molecular(16S rDNA) methods. *FEMS Microbiology Ecology* .1999 , 28 : 141 – 149.

Bacterial communities in the phase II of *Agaricus bisporus* compost by denaturing gradient gel electrophoresis

Lihong He^{1,2} , Mingjie Chen^{1*} , Yingjie Pan³

(¹Key Laboratory of Applied Mycological Resources and Utilization , Ministry of Agriculture , the People 's Republic of China , Shanghai Biotechnology and Engineering Research Center for Edible Fungi , Shanghai key laboratory of agricultural genetics and breeding , Institute of Edible Fungi , Shanghai Academy of Agricultural Sciences , Shanghai 201106 , China)

(²Department of Microbiology , College of Life Science , Nanjing Agricultural University , Nanjing 210095 , China)

(³Shanghai Ocean University , Shanghai 200090 , China)

Abstract : [**Objective**] We studied the bacterial community during *Agaricus bisporus* composting phase II , to develop a quick and accurate method by modern molecular ecology technique for dynamic inspection on bacterial community during *A. bisporus* composting. [**Methods**] We selected seven *A. bisporus* compost samples from different stages of phase II. We used PCR to amplify the V3 regions of the 16S ribosomal DNA from those samples. We analyzed PCR products by denaturing gradient gel electrophoresis. [**Results**] The denaturing gradient gel electrophoresis profile showed a dramatic change of bacterial communities which related to the process of phase II of *A. bisporus* compost. DNA sequencing of the dominant bands of denaturing gradient gel electrophoresis profile indicated that the bacterial diversity in the phase II of *A. bisporus* compost was much higher than that studied by traditional method cultured-based approach. We found not only the genus of *Bacillus* , commonly believed to dominate high temperature compost , but also some new groups belonged to the class of Bacilli such as *Trichococcus* , *Planococcus* , *Caryophanon* and even the γ -subgroup of Proteobacteria. At the same time , some sequences were related to the genus of *Thermus thermophilus* and α -subdivision of Proteobacteria which were only recently reported in the hot compost. Several sequences display extremely low similarity with the cultivated species in the GenBank , indicating high diversity of uncultivated bacteria in the process of *A. bisporus* composting. [**Conclusion**] We found distinctly changes on bacterial communities during *A. bisporus* composting phase II by denaturing gradient gel electrophoresis profile. Also we found a lot of presently uncultured bacteria species during *A. bisporus* composting. The results indicted that molecular ecology methods broaden and deepen our knowledge about the environmental microbes , and also shown the potential application for *A. bisporus* compost evaluation.

Keywords : *Agaricus bisporus* compost phase II ; bacterial community ; PCR- denaturing gradient gel electrophoresis

(本文责编 张晓丽)

Supported by the Commonweal Industry Scientific Researcher Project from Ministry of Agriculture(nyhyz07-008)

(Corresponding author. Tel : + 86-21-52630034 ; Fax : + 86-21-62201337 ; E-mail : mjchen@saas.sh.cn

Received : 11 June 2008/Revised : 31 October 2008