

文章编号: 1004-4353(2016)01-0085-06

# 长白山湿地细菌群落结构分析及 优势菌株鉴定

孙海慧, 吴昊, 权跃, 尹振浩, 尹成日\*  
( 延边大学理学院 化学系, 吉林 延吉 133002 )

**摘要:** 对长白山北坡和西坡不同湿地的土壤细菌的群落结构及优势菌株进行了总体研究. 采用 PCR-DGGE 分子生物学技术, 对湿地土壤样品中总 DNA 的 16S rDNA 的 V3 区进行 PCR 扩增, 通过变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 对扩增产物进行分离. 回收了 26 个清晰的条带, 对其中 19 个特征性条带进行了测序, 除了条带 12、13、16 为可培养的微生物外, 其他 16 个条带都是不可培养微生物. 通过传统培养法, 利用 MIDI 微生物鉴定系统, 对 8 种可培养的最优势菌株进行了分析, 各菌种分别为 *Bacillus* sp., *Bacillus licheniformis*, *Virgibacillus pantothenicus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Paenibacillus alginolyticus*, 优势菌株间的相似性水平较低.

**关键词:** 长白山湿地; 细菌群落; PCR-DGGE; MIDI 鉴定系统

**中图分类号:** Q938.1      **文献标识码:** A

## Bacteria community structure analysis and dominant strains identification of wetland in Changbai Mountain

SUN Haihui, WU Hao, QUAN Yue, YIN Zhenhao, YIN Chengri\*  
( Department of Chemistry, College of Science, Yanbian University, Yanji 133002, China )

**Abstract:** In this study, the bacteria community structure and dominant strains of the soil samples from different wetlands of Changbai Mountain north slope and western slope were generally investigated. PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) molecular biology technique was used to analyze the bacteria community of different wetland in Changbai Mountain. The V3 variable region of the bacterial 16S rDNA gene fragment of total DNA in the wetland was amplified by PCR. The PCR products were checked by DGGE. 26 clear bands were excised from DGGE gel profiles, 19 specific bands were chosen for sequencing, the results show that band 12, 13 and 16 are cultivable bacteria and the other 16 bands belong to uncultivable kind. By the traditional culture method, 8 kinds of dominant strains that isolated and purified from different wetland were identified using MIDI microbial identification system, dominant strains containing *Bacillus* sp., *Bacillus licheniformis*, *Virgibacillus pantothenicus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Paenibacillus alginolyticus* is identified. Low similarity level appeared between different dominant strains.

**Keywords:** Changbai Mountain wetland; bacteria community; PCR-DGGE; MIDI identification system

### 0 引言

长白山具有生物多样性、生态系统完整的特

点,是一座天然的“自然博物馆”和巨大的“生物基因库”,由于海拔梯度的不同,植被带在分布上呈现出不同的多样性(即物种多样性、遗传多样性、

微生物多样性等)<sup>[1]</sup>. 长白山自然保护区是我国保持比较完整的自然生态系统之一,湿地微生物种类繁多且自然资源丰富<sup>[2]</sup>. 区内有很多天然湿地,由于湿地受到独特的地质、复杂的气候、特有的水文等因素的影响,形成了分布明显的植被垂直带<sup>[3]</sup>. 由于长白山独特的自然环境和地理条件,长白山湿地可能具有与其它湿地不同的微生物种群、群落以及基因资源. 微生物是湿地生态系统中不可缺少的重要部分,微生物群落结构对湿地生态系统的净化具有重要作用,也是影响湿地能量循环和降解污染物的核心因素,对阻止和延缓污染物进入水体也起到不容忽视的作用<sup>[4-7]</sup>;因此,研究湿地微生物群落结构和功能,具有重要理论意义和实践价值. 传统的微生物培养方法具有局限性,只能反映极少数微生物的信息(仅占微生物总数的 0.1%~1%),很难提供有关微生物群落结构的完整信息<sup>[8]</sup>. 为弥补传统微生物培养方法的局限

性,近年来 Biolog 微平板法<sup>[9]</sup>、脂肪酸甲酯谱图分析方法(Fatty Acid Methyl Ester, FAME)<sup>[10-13]</sup>、DGGE<sup>[14-18]</sup>、温度梯度凝胶电泳(Temperature Gradient Gel Electrophoresis, TGGE)<sup>[19]</sup>等被应用到环境微生物多样性的研究中,并取得了较好的效果. 本文采用 PCR-DGGE 技术,对长白山湿地土壤中微生物的群落结构及优势菌株进行了研究,旨在为长白山微生物资源的开发利用和长白山生态环境的保护提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 采样地概况及样品采集

土壤样品分别采集于长白山北坡和西坡湿地土壤,采集距离湿地地表深度约为 10 cm. 每份土壤样品采集约 300 g,放入无菌塑料袋后置于有冰袋的保鲜盒中,实验室于 4 ℃ 保存. 湿地土壤样品参数及相关特征如表 1 所示.

表 1 长白山 12 个不同海拔湿地土壤样品参数及相关特征

湿地名称	海拔/m	地理位置	水文特征	温度/℃	pH 值
天池瀑布草根湿地(北坡)	1 960	42°02′38.6″N, 128°03′24.8″E	季节性积水	8.5	6.5
天池瀑布草根湿地(北坡)	1 948	42°02′38.0″N, 128°03′28.8″E	常年积水	7.5	6.5
小天池草根湿地(北坡)	1 826	42°03′36.1″N, 128°03′32.1″E	常年积水	9	6.0
地下森林林下草本湿地(北坡)	1 561	42°05′51.6″N, 128°04′97.2″E	季节性积水	11	6.0
地下森林升麻草本湿地(北坡)	1 507	42°05′72.7″N, 128°04′35.1″E	常年积水	10	6.0
梯子河草本湿地(西坡)	1 594	41°51′85.1″N, 127°58′67.5″E	季节性积水	10	6.0
鸢尾花园草本湿地(西坡)	1 468	41°56′63.2″N, 127°57′99.7″E	季节性积水	14	7.0
高山花园草本湿地(西坡)	1 428	41°56′70.2″N, 127°55′93.5″E	常年积水	14	7.0
高山花园草本小湿地(西坡)	1 428	41°56′65.2″N, 127°55′87.3″E	常年积水	14	7.0
王池花园草本湿地(西坡)	1 428	41°56′74.0″N, 127°57′86.0″E	季节性积水	14	6.0
松江河草本湿地(西坡)	1 142	41°00′67.6″N, 127°51′20.7″E	常年积水	15	7.0
小沙河草本湿地(西坡)	978	42°02′45.0″N, 127°46′47.2″E	常年积水	15	7.0

1.2 土壤微生物的 PCR-DGGE 分析

1.2.1 基因组 DNA 的提取 采用强力土壤 DNA 提取试剂盒(MOBIO 公司)对长白山 12 个不同湿地土样按试剂盒的试验步骤进行基因组 DNA 的提取,提取后的 DNA 在 1% 琼脂糖凝胶电泳上检测.

1.2.2 基因 16S rDNA V3 区的 PCR 扩增 对细菌的 16S rDNA V3 区进行 PCR 扩增,采用细菌通用引物 GC-338F 和 518R(见表 2). 以在长白山湿地中提取的 DNA 稀释液作为模板,PCR 反应体

系为 25.0 μL,其中 10×PCR 缓冲液(Mg<sup>2+</sup> Plus)为 2.5 μL, dNTP 混合物(0.25 mmol/L)为 2.0 μL, TaKaRaTaq 酶(5 U/μL)为 0.3 μL,正、反引物(10 μmol/L)各为 1.0 μL,模板 DNA 为 5.0 μL,二次蒸馏水为 13.2 μL. 扩增条件:先在 94 ℃ 预变性 9 min 后,在 94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s,进行 30 个循环;然后在 72 ℃ 延伸 7 min,反应结束后在 4 ℃ 保存. 扩增产物用 2% 的琼脂糖凝胶进行检测.

表 2 PCR 扩增引物

引物(10 μM)	序 列
C-338F	5'-CGCCCGCCGCGCGGGCGGGC GGGGCGGGGCACGGGGG- GACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'
518R	5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'
338F	5'-TACGGGAGGCAGCAG-3'

**1.2.3 PCR 反应产物的 DGGE** 采用变性梯度凝胶电泳仪(DGGEK-2401,C. B. S 公司)对 PCR 扩增后得到的产物进行质量分数为 8%的聚丙烯酰胺凝胶电泳,其变性梯度范围为 55%~70%. 在 1×TAE 电泳缓冲液中,在温度 60 ℃、电压 80 V 的条件下运行 13.5 h. 用无菌刀片进行特异性条带的切割、扩增、克隆,然后委托上海生工测序公司进行测序. 测序结果与 NCBI 基因库比对,得到最相似的菌株名称,并进行同源性比对分析. 应用 MEGA 4 软件采用邻接法(Neighbor-Joining Method)构建系统发育树.

1.3 土壤中可培养微生物的分离与鉴定

**1.3.1 可培养菌株的分离纯化** 称取 1 g 采集的湿地土壤样品溶于 9.0 mL 无菌蒸馏水中,采用 10 倍稀释法,将土样从 10<sup>-1</sup> 稀释至 10<sup>-6</sup>,将浓度分别为 10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup> 的稀释液移取 200.0 μL,用无菌三角棒把溶液均匀涂布在 R2A、NA 2 种培养基上. 将其放置在 30 ℃ 的生化培养箱中恒温培养 2~5 d. 根据菌落的颜色、大小、形态以及表面结构等方面判断不同的菌种,用无菌、冷却的接种环挑取单菌落并进行划线分离. 如有 2 种或几种不同的菌种混合在一起生长,多次进行传代培养,直至得到纯化的菌种为止. 纯化后的菌株用光学显微镜进行微观形态观察并照相.

**1.3.2 采用微生物鉴定系统对菌株鉴定** 将培养好的纯菌株采用四区划线法,转移至 TSA 培养基上,然后放入 28 ℃ 的培养箱中培养,待菌株生长至一定的量后,对其进行菌株的鉴定. 取处于生长对数后期的第 3 区菌落约 40 mg 转入干净且干燥的有螺旋盖的培养试管底部,依次对其进行皂化、甲基化、萃取,然后利用干净的移液管将上层有机相移至新的玻璃管中. 加入 3.0 mL 稀碱液,温和旋转振荡 5 min. 静置,分层,移出有机相的 2/3 至干净的气相用小瓶中,使用 Agilent GC

6850 型气相色谱仪进行测试. 检测器为氢火焰离子检测器,色谱柱为 Agilent 19091B-102E(25 m×0.20 mm×0.33 μm). 气相色谱各项参数条件均由 MIDI Sherlock 程序设置调用. 通过软件程序与标准数据库进行比对得到菌株的鉴定结果,并进行分析.

2 结果与分析

2.1 土壤微生物的 PCR-DGGE 分析

**2.1.1 土壤基因组 DNA 的提取及 16S rDNA 的 PCR 扩增** 将提取的基因组 DNA 进行 16S rDNA 的 PCR 扩增,如图 1 示,12 个样品均已扩增成功,有一定的亮度和纯度,未出现引物二聚体,说明得到了良好的 PCR 扩增产物. 通过与 DNA 标记物对比,判定其片段大小为 230 bp 左右.

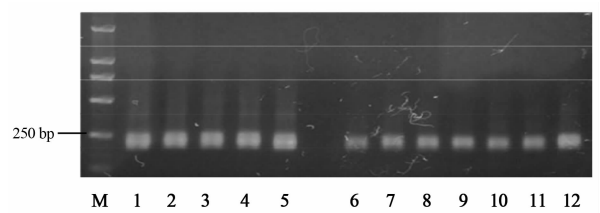


图 1 长白山不同海拔湿地土壤样品的 PCR 扩增结果

**2.1.2 PCR 扩增产物的 DGGE 分析** 12 个不同海拔湿地土壤样品的 16S rDNA 基因 V3 区片段扩增产物的 DGGE 结果如图 2 所示. 从 DGGE 条带上可以推断:其菌种丰富度均较高,而且条带之间差异比较明显,表明长白山不同海拔土壤微生物的差异性.

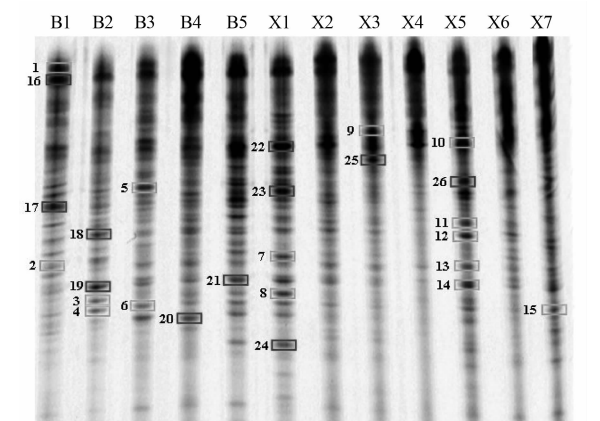


图 2 长白山不同海拔湿地土壤样品的 DGGE 图谱

**2.1.3 PCR 扩增产物的 DGGE 分析** 从 12 个

湿地土壤样品中,选出 26 个清晰的条带,并对其  
中 19 个特征性条带进行切胶回收、测序,将条带  
测序结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对,

结果见表 3. 将最终得到的鉴定结果进行同源性  
比对分析(图 3),由图 3 可知它们之间的同源性  
指数较低.

表 3 条带序列在 NCBI 数据库中的比对结果

条带	比对结果	相似度/%	序列号
1	uncultured eubacterium WR8159 partial 16S rRNA, clone WR8159	91	AJ292902.1
2	Uncultured Acidobacteria bacterium clone C. la-48 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98	JX504932.1
3	Uncultured bacterium clone GB7N87004JLNX1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequece	93	HM711185.1
4	Uncultured Thiohalorhabdus sp. isolate DGGE gel band b1 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100	HQ166140.1
5	Uncultured bacterium clone Bfb08-A8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	JF910477.1
6	Uncultured Xanthomonadaceae bacterium clone T92h04c 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95	HM447958.1
7	Uncultured Acidobacteriaceae bacterium partial 16S rRNA gene, clone A9_56	91	AM940655.1
8	Uncultured Acidobacteria bacterium clone AlertE11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95	JF508325.1
9	Uncultured Acidobacteria bacterium clone MWM1-36 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94	HQ674961.1
10	Uncultured Leptospira sp. clone D_A11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	91	EU514101.1
11	Uncultured bacterium clone Carex05C 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	91	HM535088.1
12	Prosthecomicrobiumhirschii ATCC:27832 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94	HM037994.1
13	Afipiabroomeae strain C-20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	AY568506.2
14	Uncultured organism clone SBZP_514 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	89	JN534938.1
15	Uncultured soil bacterium clone GO0VNXF07IGQ6Z 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	92	JF395848.1
16	Stenotrophomonas sp. oral taxon A62 clone SW044 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96	GU428848.1
17	Uncultured Phyllobacteriaceae bacterium clone UVplus3_42 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95	JQ700884.1
18	Uncultured Bradyrhizobium sp. partial 16S rRNA gene, clone CL3.D116	99	FM175838.1
19	Uncultured Acidobacteria bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: 9m264	92	AB736198.1

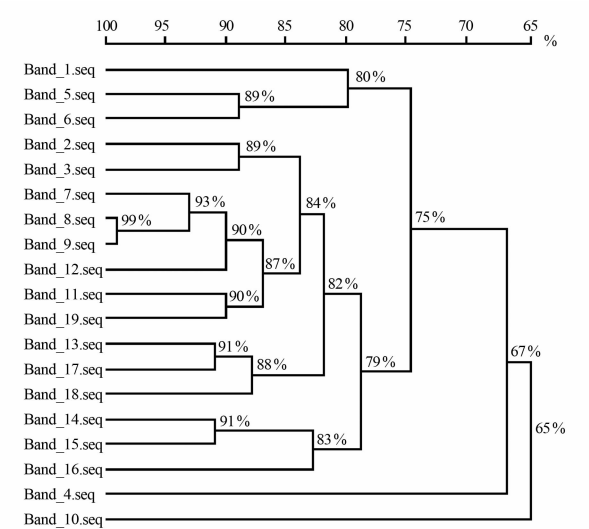


图 3 测序条带之间的同源性比对

2.2 湿地土壤中菌株的分离和鉴定

2.2.1 菌株的分离 如表 4 所示,从北坡湿地土  
壤中共分离得到 79 株菌株,从西坡湿地土壤中共  
分离得到 51 株菌株.

表 4 不同湿地土壤中分离菌株的数量

北坡湿地 海拔高度/m	分离菌株 数量	西坡湿地 海拔高度/m	分离菌株 数量
1 960	21	1 594	10
1 945	20	1 468	13
1 826	10	1 428	7
1 561	12	1 428	9
1 507	16	1 428	4
—	—	1 145	6
—	—	978	2

2.2.2 菌株的形态学观察 将菌株放在光学显

显微镜下观察其菌落形态(图 4),可以看出菌株的微观形态为细菌。

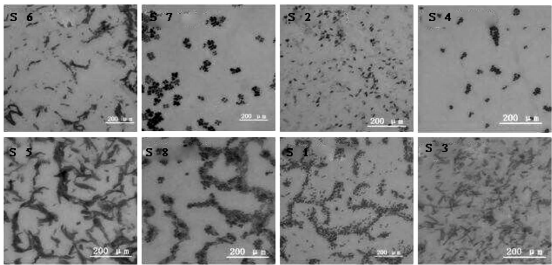


图 4 光学显微镜下菌体形态

**2.2.3 菌株的 MIDI 鉴定** 从长白山 12 个湿地土壤样品中分离得到 130 种菌株,其中有 54 种菌株能在 TSA 培养基上生长. 根据菌株的生长情况,最终选择了 8 种长势优良的优势菌株,采用 MIDI 微生物鉴定系统对优势菌株进行鉴定,其结果见表 5. 8 种优势菌株的鉴定结果与相似性水平分析见图 5 和图 6. 2D Plot 图中的坐标点比较分散,说明其相似性水平较低,湿地土壤中微生物种类丰富。

表 5 8 株优势菌株的 MIDI 鉴定结果

菌株名称	相似度/%	相似指数	菌株相似名称
S1	93.07	0.468	<i>Bacillus licheniformis</i> ( <i>Bacillus subtilis</i> group)
S4	93.52	0.647	<i>Virgibacillus pantothenicus</i> ( <i>Bacillus</i> )
S3	89.38	0.222	<i>Bacillus</i> GC group 22 ( <i>No 16S match to known species</i> )
S6	88.80	0.263	<i>Bacillus cereus</i> GC subgroup B
S7	97.47	0.407	<i>Micrococcus luteus</i> GC subgroup C
S2	92.00	0.739	<i>Bacillus licheniformis</i> ( <i>Bacillus subtilis</i> group)
S5	93.07	0.517	<i>Virgibacillus pantothenicus</i> ( <i>Bacillus</i> )
S8	96.78	0.670	<i>Paenibacillus alginolyticus</i>

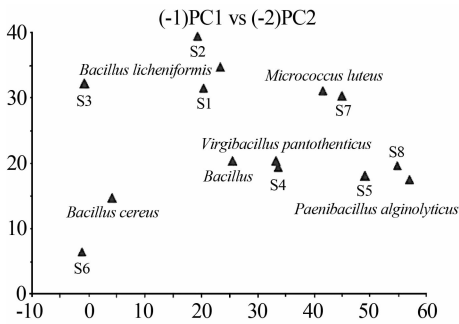


图 5 优势菌株间的 2D Plot 相似图

品,由于土壤中存在的腐殖酸会影响后续 PCR 扩增<sup>[20]</sup>,因此为了更好的提取 DNA,采用了土壤 DNA 试剂盒,这样可以有效地去除土壤中的腐殖酸和杂质,提高提取基因组 DNA 的浓度. 在对 PCR 扩增产物检测时,使用 2% 的琼脂糖凝胶电泳的目的是分离长度不同的 DNA 样品. 在 DGGE 实验室,使用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶的作用是在变性剂存在下使双链 DNA 部分解链,从而分离长度相同而序列不同的 DNA 样品. PCR-DGGE 法的测定结果中包括可培养细菌与不可培养细菌. 对 PCR 扩增产物进行 DGGE 的结果中出现了很多条带,但是本实验只切胶、回收、测序了 19 个最为清晰且具有特异性的条带进行了分析,其中条带 11 和条带 12 的亮度最佳. 测序结果显示,条带 11 为不可培养微生物,条带 12 为突柄微菌属(*Prosthecomicrobium*). 条带 2、7、8、9、19 均为酸杆菌属(*Acidobacteria*),其所对应的条带出现在不同的位置,而且占优势. 另外,在 19 个条带中除了条带 12、13、16 为可培养的微生物外,其余的均为不可培养的微生物. 条带 3、5、11、15 为不可培养的特殊菌株,这说明传统的分离方法不能鉴定出

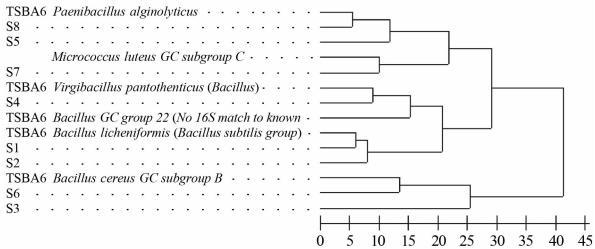


图 6 优势菌株间的相似树形图

3 讨论

3.1 PCR-DGGE 法对长白山湿地细菌群落结构分析鉴定

基因组 DNA 来源于长白山湿地的土壤样

这些菌株,也更加体现出 DGGE 的优越性。

### 3.2 MIDI 微生物鉴定系统对长白山湿地中可培养细菌的分析鉴定

MIDI 微生物鉴定系统对长白山湿地土壤微生物中 8 种优势可培养菌株进行了分析,发现可培养的优势菌种为 *Bacillus* sp., *Bacillus licheniformis*, *Virgibacillus pantothenicus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Paenibacillus alginolyticus*。

## 4 结论

采用 PCR-DGGE 技术与 MIDI 微生物鉴定系统结合方式,对长白山不同湿地土壤细菌群落进行了鉴定,该方法能够避免传统分离鉴定方法的物种丢失的问题,而且既可以分析整体微生物物种,又可以单独分析可培养的优势菌种,具有传统方法无法比拟的优越性。研究表明,长白山湿地土壤中含有丰富的细菌种类,值得进一步深入研究。

## 参考文献:

- [1] 吴钢,肖寒,赵景柱,等. 长白山森林生态系统服务功能[J]. 中国科学,2001,31(5):471-480.
- [2] 刘海良,董世杰. 举世闻名的长白山[J]. 野生动物,1999,20(6):36-38.
- [3] 吴钢,肖寒,赵景柱,等. 长白山森林生态系统服务功能[J]. 中国科学,2001,31(5):471-480.
- [4] 王中华,项学敏,周集体. 人工湿地污水处理技术及其在我国中小城镇的应用[J]. 工业水处理,2009,29(12):1-4.
- [5] 杜刚,黄磊,高旭,等. 人工湿地中微生物数量与污染物去除的关系[J]. 湿地科学,2013,11(1):13-20.
- [6] Anderson L K, Kristen, Wheeler A K, Robinson B J, et al. Atrazine mineralization potential in two wetlands[J]. Water Research, 2002,36(19):4785-4794.
- [7] Weaver M A, Zablotowicz R M, Locke M A. Laboratory assessment of atrazine and fluometuron degradation in soils from a constructed wetland[J]. Chemosphere, 2004,57(8):853-862.
- [8] Kuske C R, Barns S M, Busch J D. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid south western United States that are present in many geographic regions[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63(9):3614-3621.
- [9] Sellyei B, Wehmann E, Makrai L, et al. Evaluation of the biology system for the identification of certain closely related *Pasteurella* species[J]. Diagnostic Microbiology & Infectious Disease, 2011,71(1):6-11.
- [10] Weon H Y, Son J A, Yoo S H, et al. *Terra-bacteraeriphilus* sp. nov., isolated from an air sample[J]. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 2010, 60(5):1130-1134.
- [11] Larkin R P, Groves C L. Identification and characterization of isolates of *Phytophthora infestans* using fatty acid methyl ester (FAME) profiles[J]. Plant Disease, 2003,87(10):1233-1243.
- [12] Martin P A, Gundersen-Rindal D, Blackburn M, et al. *Chromobacterium subtsugae* sp. nov., a betaproteobacterium toxic to Colorado potato beetle and other insect pests[J]. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 2007, 57(5):993-999.
- [13] Mummey D L, Stahl P D, Buyer J S. Microbial biomarkers as an indicator of ecosystem recovery following surface mine reclamation[J]. Applied Soil Ecology, 2002,21(3):251-259.
- [14] Deng B, Shen C H, Shan X H, et al. PCR-DGGE analysis on microbial communities in pit mud of cellars used for different periods of time[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2012,118(1):120-126.
- [15] Yang C Y, Li Y, Zhou Y Y, et al. Bacterial community dynamics during a bloom caused by *Akashiwo sanguinea* in the Xiamen sea area, China[J]. Harmful Algae, 2012,20(14):132-141.
- [16] Dufossé L, Donadio C, Valla A, et al. Determination of speciality food salt origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacterial communities by PCR-DGGE: an application on marine salts produced in solar salterns from the French Atlantic Ocean[J]. Food Control, 2013,32(2):644-649.
- [17] Honma H, Asano R, Obara M. Bacterial populations in epilithic biofilms along two oligotrophic rivers in the Tohoku region in Japan[J]. Journal of General & Applied Microbiology, 2009, 55(5):359-371.
- [18] Li J M, Jin Z X, Gu Q P. Effect of plant species on the function and structure of the bacterial community in the rhizosphere of lead-zinc mine tailings in Zhejiang, China[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2011,57(7):569-577.
- [19] Danko P, Kozák A, Podhradsky D, et al. Analysis of DNA intercalating drugs by TGGE[J]. Journal of Biochemical & Biophysical Methods, 2006, 65(2/3):89-95.
- [20] 张秀敏,徐金娥,王海洋. 从土壤样品中提取和纯化微生物 DNA 方法研究进展[J]. 保定师专学报, 2005,18(2):34-39.