广东农业科学 2018，45（8）：65–72
Guangdong Agricultural Sciences doi：10.16768/j.issn.1004–874X.2018.08.010

景凤霞，李云琪，唐灵杰，等 . 不同营养因子对土壤细菌可培养物种多样性的影响［J］. 广东农业科学，2018，45（8）：65–72.

不同营养因子对土壤细菌可培养物种多样性的影响

景凤霞，李云琪，唐灵杰，李小锦，王宇辉，张秀敏
（河北大学生命科学学院，河北 保定 071002）

摘 要：通过在改良的 VL55 培养基中添加 6 种不同的营养因子，利用大量稀释法对采自河北、青海和云南的 3 份土壤样品进行细菌分离，并对所分离菌株进行 16S rRNA 基因序列系统发育分析，比较利用不同营养因子分离的可培养细菌物种多样性。结果表明，添加营养因子分离得到的细菌物种多样性明显高于对照；土样 1 对照分离得到 5 个属，添加 6 种营养因子的处理共分离得到 22 个属；土样 2 对照分离得到 2 个属，添加 6 种营养因子的处理共分离得到 17 个属；土样 3 对照分离得到 6 个属，添加 6 种营养因子的处理分离得到 15 个属。添加不同营养因子的培养基组合分离得到各自独特的细菌类群。其中，从青海土样中分离得到的菌株 HBUM200206 与运动东菌（*Dongia mobilis*）LM22T 的亲缘关系最近，序列相似性为 94.58%，可能是红螺菌科（Rhodospirillaceae）的一个潜在新属。此外，有 12 株菌与亲缘关系最近的模式菌株的 16S rRNA 基因序列相似性均小于 98.65%，可能为潜在的新种。

关键词：营养因子；难培养微生物；系统发育分析；细菌分离；多样性；潜在新种
中图分类号：S154.38 **文献标识码**：A **文章编号**：1004–874X（2018）08–0065–08

Effects of different nutritional factors on culturable species diversity of soil bacteria

JING Feng–xia, LI Yun–qi, TANG Ling–jie, LI Xiao–jin, WANG Yu–hui, ZHANG Xiu–min
（*College of Life Sciences, Hebei University, Baoding* 071002, *China*）

Abstract：By adding six different nutrient factors to the modified VL55 medium, a large number of dilutions were used to isolate bacteria from three soil samples collected from three regions of Hebei, Qinghai, and Yunnan. The phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene sequences was performed on the strains isolated using six different nutrient factors to compare the species diversity of culturable bacteria. The results showed that the bacterial species diversity obtained from the addition of nutritional factors was significantly higher than that of the control; 5 genera were isolated from the soil sample 1 control, 22 genera were isolated from the experimental group with the addition of six nutritional factors; soil sample 2 control was isolated two genera, 17 genera were isolated from the experimental group; 6 genera were isolated from the soil sample 3 control, and 15 genera were isolated from the experimental group. The combination of culture media with different nutrient factors was added to isolate their unique bacterial populations. Among them, the strain HBUM200206 isolated from the soil sample of Qinghai Province had the closest genetic relationship with *Dongia mobilis* LM22T, and the 16S rRNA gene sequence similarity was 94.58%, which may be a potential new genera of Rhodospirillaceae. In addition, the 16S rRNA gene sequence similarity of the 12 strains and the closest relatives of the type strains were all less than 98.65%, which may be potential new species.

Key words：nutrition factors; refractory microorganism; phylogenetic analysis; bacterial separation; diversity; potential new species

收稿日期：2018–05–07
基金项目：国家自然科学基金（31270053）；河北省自然科学基金（C2014201141）
作者简介：景凤霞（1990–），女，在读硕士生，E–mail：1139539385@qq.com
通讯作者：张秀敏（1970–），女，博士，教授，E–mail：zhxiumin1106@126.com

自然生境中的微生物物种非常丰富，但可培养物种仅占环境微生物总数的0.1%~10%[1]。大多数对人类有益的微生物仍处于一种不可培养的状态，难以得到其纯培养物。传统的培养方法是向样品提供丰富的营养物质，然后选择快速生长的菌落，这些培养方法仅能获得自然生境中的一小部分细菌[2]，这就使得绝大多数细菌难以被研究和利用。许多研究者通过改变培养基成分和培养条件或创新培养方法来解决这一问题。岳秀娟等[3]在培养基中添加丙酮酸钠、过氧化氢酶和甜菜碱等物质用以培养微生物，这些物质可以减少微生物代谢过程中产生的活性氧，结果显示添加活性氧清除能力物质的平板上菌落数比对照组明显增加，并且分离得到多株具有抗菌活性的微生物，这种方法为抗生素的筛选和菌种的保藏提供了新的来源。高丝氨酸内酯作为一种信号分子也被普遍研究[4]。

Shayne 等[5]设计了以 VL55 培养基为基础培养基，向培养基中加入不同的生长因子，共分离得到包括 9 门 17 纲 60 科的 350 株细菌，序列比对结果显示，有 93 株（27%）细菌为新属。Tanaka 等[6]在灭菌前将磷酸盐和琼脂分开，菌落生长的数量增多，其中超过 30% 属于未培养微生物。目前，越来越多的科研工作者致力于利用宏基因组分析方法来寻找新的未培养微生物，研究其遗传多样性和微生物群落的结构，以及了解其在生态系统中的重要作用[7-8]，并通过使用 16S rRNA 基因序列对未培养的细菌进行多样性分类[9]。也有一些学者通过采用富集培养的方法，获得之前未培养的微生物[10]。

本试验以改良的 VL55 为基础培养基，向其中添加 6 种不同的营养因子，通过大量稀释对采自河北、青海和云南的 3 份土壤样品进行细菌分离培养，比较可培养细菌的物种多样性情况，以期发现更多新的微生物类群，为开发新材料、新药物提供丰富的微生物物种资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

土样采集：试验于 2016 年在河北省微生物多样性研究与应用实验室进行，供试土壤样品分别采自河北涞水县上港村、青海三江源、云南无量山 3 个地区，分别记为土样 1、土样 2 和土样 3，分别风干、研碎、除去石子和细根，过 2 mm 筛备用。

培养基：改良的 VL55 基础培养基：2-（N-吗啉）乙磺酸 3.9 g，七水合硫酸镁 0.048 g，氯化钙 0.067 g，磷酸氢二铵 0.053 g，丙酮酸钠 0.8 g，结冷胶 3%，蒸馏水 1 L。灭菌前加入 2 mL 亚硒酸 - 钨酸盐溶液[11]和 2 mL 微量元素溶液 SL-10[12]。 用 0.2 mol/L 的 NaOH 和 0.1 mol/L 的 KOH 混合液调节改良的 VL55 基础培养基 pH 与土壤 pH 一致，高温灭菌后，在使用前加入维生素溶液 1 和维生素溶液 2[13]。然后分别添加 6 种不同的营养因子（表 1）。

PCR扩增试剂：使用细菌通用16S rRNA基因引物27f（5’-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3’）[15]和1492r（5’-GGTTACCTTGTTACGACTT-3’）[16]，引物由通用生物系统（安徽）有限公司合成。PCR反应体系：*Taq* DNA聚合酶、10 × Taq PCR Buffer

表 1 6 种不同营养因子组合

营养因子	主要成分	参考文献
1	2 mmol/L N- 乙酰葡萄糖胺	[6]
2	D- 葡萄糖、D- 半乳糖、D- 木糖、L- 阿拉伯糖，每种各 0.5 mmol/L	[6]
3	D- 半乳糖醛酸、D- 葡萄糖醛酸、L- 抗坏血酸、D- 葡萄糖酸钠，每种各 0.5 mmol/L	[6]
4	乙酸钠、苯甲酸钠、L- 乳酸钠、甲醇，每种各 0.5 mmol/L	[6]
5	氨基酸混合物：天冬氨酸 4.7 g，苏氨酸 2.1 g，丝氨酸 3.2 g，谷氨酸 9.6 g，脯氨酸 6.9 g，甘氨酸 1.5 g，丙氨酸 2 g，缬氨酸 2.2 g，甲硫氨酸 0.9 g，异亮氨酸 1.1 g，亮氨酸 2.5 g，酪氨酸 0.7 g，苯丙氨酸 1.4 g，赖氨酸 3.5 g，组氨酸 1 g，精氨酸 1.5 g，dd H_2O 1 L。每 1 L 氨基酸混合物原液再加 0.8 g L- 色氨酸，完全溶解后混匀，取 10 mL 混合液加入 1 L 培养基	[4]
6	海藻酸钠、黄原胶、果胶、木聚糖、羟甲基纤维素，每种各 0.05%	[14]

（含Mg^{2+}）、10 mmol /L 高纯dNTPs（北京康为世纪生物科技有限公司）。细菌基因组DNA提取试剂盒，北京康为世纪生物科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 细菌分离与保存 土样 1、土样 2 和土样 3 各称取 1 g 样品，分别加入 99 mL VL55 液体培养基中，振荡混匀，取 0.5 mL 土壤悬浮液于 4.5 mL 试管中进行 10^{-1}~10^{-7} 梯度稀释，之后涂布分离进行细胞计数，根据计数结果确定 100 μL 菌液中尽可能低于 1 个细胞的稀释度。经统计得出土样 1 的 10^{-4} 梯度每 100 μL 菌液中含细胞总数为 5 个，土样 2 的 10^{-4} 梯度每 100 μL 菌液中含细胞总数为 5 个，土样 3 的 10^{-5} 梯度每 100 μL 菌液中含细胞总数为 3 个。因此，3 种土壤样品均选择 10^{-4}、10^{-5}、10^{-6}、10^{-7} 4 个梯度进行大量稀释，每个梯度取 100 μL 至装有 5 mL 添加不同营养因子组合的 VL55 液体培养基的试管中，直至将每个梯度试管内的液体分装完毕，每个梯度分装 45 支试管，每种土样稀释液共分装试管 1 080 支。然后置于 28℃、200 r/min 恒温摇床培养。

待试管内的培养液浑浊后，接种至 R2A 固体平板上，置于 28℃生化培养箱中倒置培养；待平板上长出菌落后，挑取单菌落于 R2A 液体培养基中，置于 28℃、200 r/min 摇床振荡培养；待菌体长出后，用显微镜验纯，吸取 0.5 mL 菌液于含有 50% 甘油的甘油管中，每株菌保藏两支甘油管，–20℃保藏菌体。剩余菌体经 12 000 r/min 离心、收集，用于提取基因组 DNA。

1.2.2 细菌 DNA 的提取和 16S rRNA 基因扩增 使用康为世纪生物科技有限公司的细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株的基因组 DNA。使用细菌通用引物 27f 和 1492r 对菌株的 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增。

PCR 扩增体系为 50 μL，其中包括 0.5 μL 上游和下游引物（20 μmol/L），2 μL DNA（70 ng/μL）模板，1 μL dNTP（10 mmol/L），5 μL 10×Buffer，0.3 μL *Taq* DNA 聚合酶（5 U/μL），加入无菌去离子水至要求的体积。PCR 扩增条件：94℃预变性 5 min；94℃变性 1 min、55℃退火 45 s、72℃延伸 1 min，30 个循环；72℃延伸 10min。

1.2.3 16S rRNA 基因测序及系统进化分析 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并回收，送通用生物系统（安徽）有限公司测序。利用 EzBiocloud 对菌株测序所得的 16S rRNA 基因序列进行同源性比对，找出亲缘关系最近的模式菌株的 16S rRNA 基因序列及相似值。再利用 BioEidt 和 MEGA 5.0 软件对分离得到的新物种进行系统发育分析，系统发育树的构建采用 Neighbour–Joining 模型，进而确定其系统发育地位。

2 结果与分析

2.1 土壤细菌菌株分离结果

2.1.1 土样 1 将土样 1 进行梯度稀释，再经大量稀释分装于添加不同营养因子的 VL55 液体培养基中，将分离所得菌株的 16S rRNA 基因序列在 EzBioCloud 中进行同源性比对，得出土样 1 的分离结果，对照分离得到 5 个属，添加 6 种营养因子的处理共分离得到 22 个属。从图 1（封三）可以看出，土样 1 添加 6 种不同营养因子处理均分离到对照未分离到的微球菌属（*Micrococcus*）的菌株，其中，添加营养因子组合 1 分离得到特有的农球菌属（*Agrococcus*）、考克氏菌属（*Kocuria*）和塚村氏菌属（*Tsukamurella*）的菌株，添加营养因子组合 2 分离得到特有的短杆菌属（*Brevibacterium*）、纤维单胞菌属（*Cellulomonas*）、肠杆菌属（*Enterobacter*）和原小单孢菌属（*Promicromonospora*）的菌株，添加营养因子组合 6 分离得到特有的博斯氏菌属（*Bosea*）、极单胞菌属（*Polaromonas*）和鞘氨醇杆菌属（*Sphingobacterium*）的菌株。

2.1.2 土样 2 将土样 2 按照土样 1 的处理方式进行处理，其分离结果（图 2，封三）显示，对照分离得到 2 个属，添加 6 种营养因子的处理共分离得到 17 个属，其中，处理 1 分离得到特有的鞘氨醇杆菌属（*Sphingobacterium*）的菌株，处理 2 分离得到特有的慢生根瘤菌属（*Bradyrhizobium*）、东属（*Dongia*）和贪噬菌属（*Variovorax*）的菌株，处理 3 分离得到特有的阿菲波菌属（*Afipia*）的菌株，处理 5 分离得到特有的放线多形菌属（*Actinopolymorpha*）、

卡西列罗属（*Caballeronia*）和莫拉氏菌属（*Moraxella*）的菌株，处理 6 分离得到特有的类芽孢杆菌属（*Paenibacillus*）的菌株。

2.1.3 土样 3 将土样 3 按照土样 1 处理方式进行处理，其分离结果（图 3，封三）显示，对照分离得到 6 个属，添加 6 种营养因子的处理共分离得到 15 个属，其中，处理 1 分离得到特有的无色小杆菌属（*Achromobacter*）和根瘤菌属（*Rhizobium*）的菌株，处理 2 分离得到特有的贪铜菌属（*Cupriavidus*）和贪噬菌属（*Variovorax*）的菌株，处理 5 分离得到特有的假芽孢杆菌属（*Fictibacillus*）的菌株，处理 6 分离得到特有的节杆菌属（*Arthrobacter*）和纤维单胞菌属（*Cellulomonas*）的菌株。

2.2 潜在新种 16S rRNA 基因相似性比对结果

目前认为划分细菌新种的 16S rRNA 基因序列相似性阈值是 98.65%[17]。通过在改良的 VL55 培养基中添加 6 种不同的营养因子，利用大量稀释法对采自河北、青海和云南的 3 份土壤样品进行微生物物种的分离。结果（表 2）显示，有 12 个菌株与其参比菌株的 16S rRNA 基因序列相似性均低于 98.6%。其中，土样 1 未分离得到序列相似性低于 98.65% 的菌株，不存在替在新种，土样 2、土样 3 分别分离得到 4 株和 8 株潜在新种。因此，这 12 个菌株很有可能为潜在的新种，按隶属 7 个不同的属分别构建系统发育树，结果见图 4~ 图 9。

表 2 不同土样添加营养因子处理分离得到潜在新种的比对结果

土样	营养因子	菌株编号	注册序列号	最相近菌株	序列相似性（%）
土样 2	2	HBUM200206	KY945658	*Dongia mobilis* LM22T	94.58
		HBUM200202	KY945886	*Variovorax boronicumulans* BAM–48T	98.14
	5	HBUM200239	KY945768	*Phyllobacterium sophorae* CCBAU 03422T	97.63
		HBUM200240	KY945769	*Phyllobacterium sophorae* CCBAU 03422T	97.69
土样 3	1	HBUM200352	KY945717	*Massilia haematophila* CCUG 38318T	97.97
	3	HBUM200424	KY945600	*Burkholderia jirisanensis* JRM2–1T	97.98
		HBUM200427	KY945582	*Paraburkholderia dipogonis* DL7T	98.50
	4	HBUM200448	KY945625	*Paraburkholderia sprentiae* WSM5005T	98.57
	5	HBUM200452	KY945566	*Paraburkholderia kirstenboschensis* Kb15T	98.27
	6	HBUM200488	KY945620	*Paraburkholderia rhynchosiae* WSM3937T	97.86
		HBUM200503	KY945645	*Paraburkholderia ginsengisoli* NBRC 100965T	98.43
		HBUM200497	KY985325	*Cellulomonas chitinilytica* X.bu–bT	97.81

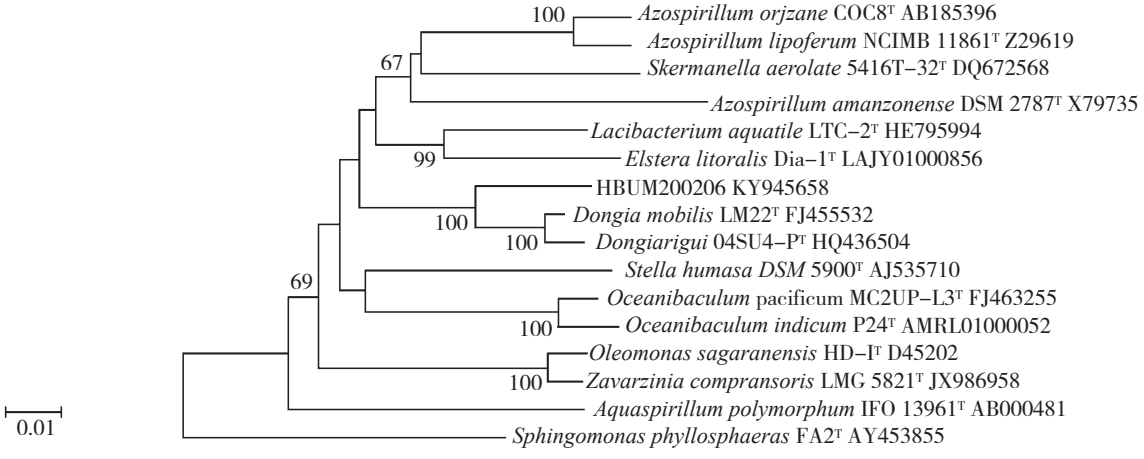


图 4 依据 16S rRNA 基因序列构建的 HBUM200206 相关菌株的 N–J 系统发育树

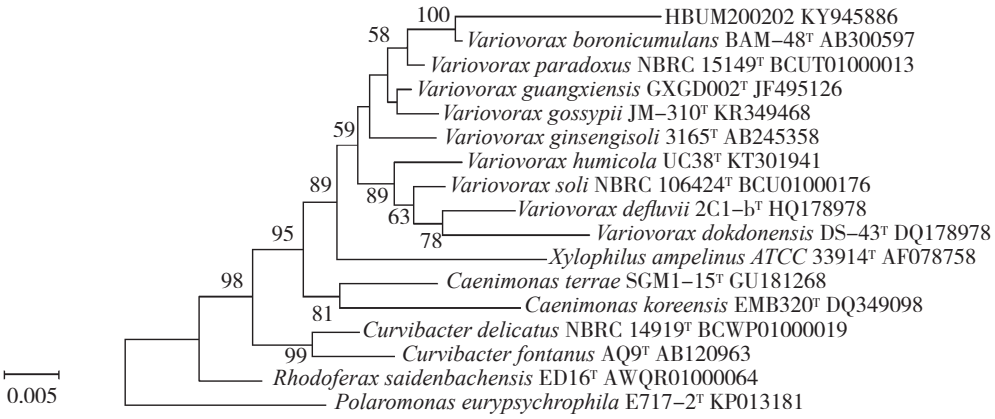


图 5　依据 16S rRNA 基因序列构建的 HBUM200202 相关菌株的 N–J 系统发育树

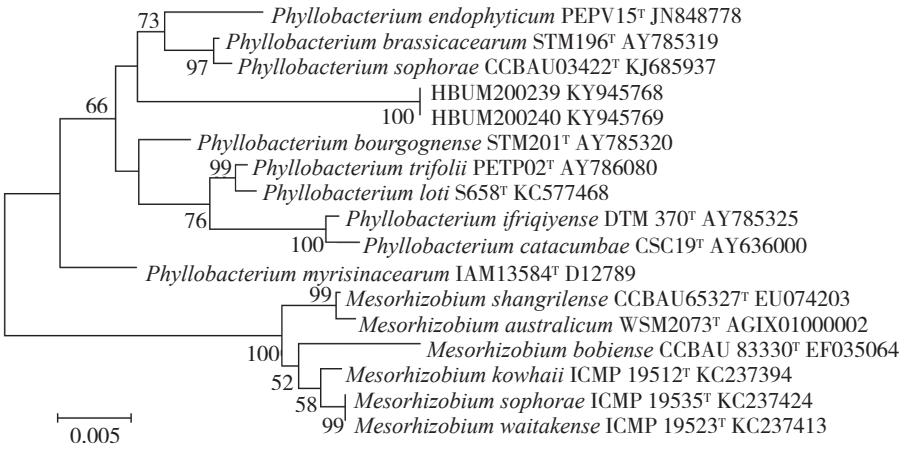


图 6　依据 16S rRNA 基因序列构建的叶杆菌属相关菌株的 N–J 系统发育树

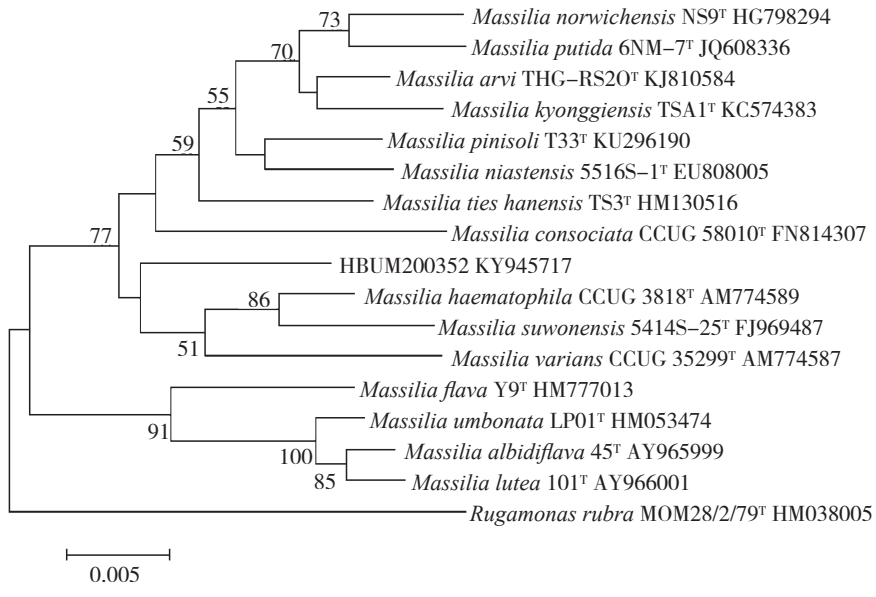


图 7　依据 16S rRNA 基因序列构建的 HBUM200352 相关菌株的 N–J 系统发育树

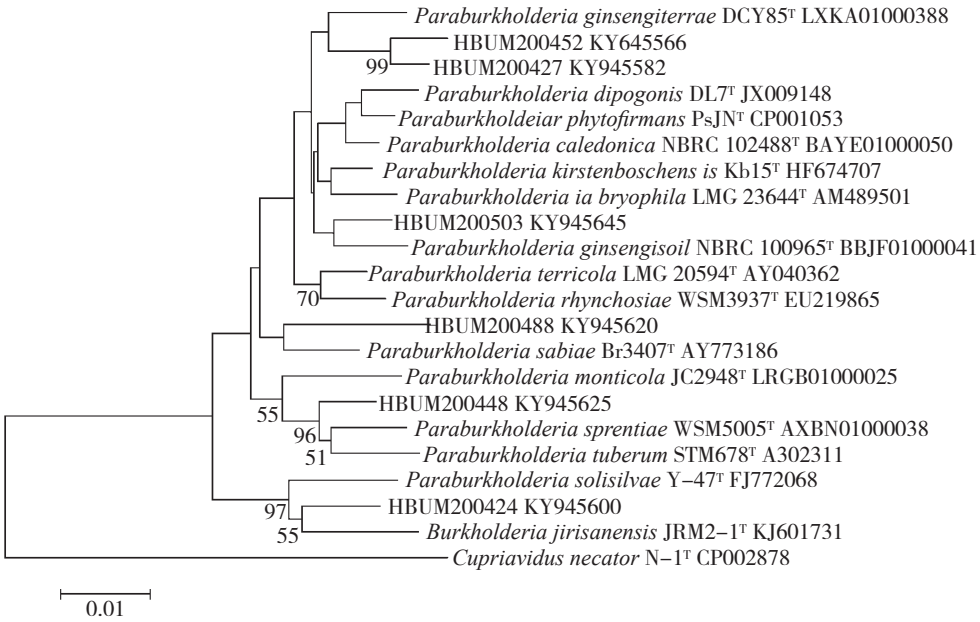


图 8　依据 16S rRNA 基因序列构建的副伯克霍尔德氏菌属相关菌株的 N–J 系统发育树

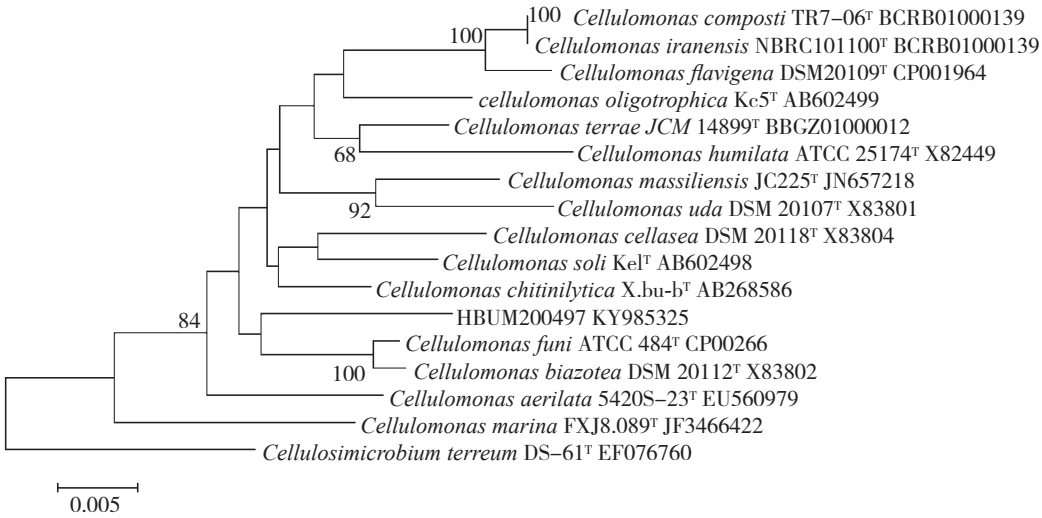


图 9 依据 16S rRNA 基因序列构建的 HBUM200497 相关菌株的 N–J 系统发育树

3　结论与讨论

本研究通过在培养基中添加不同营养因子，对采自河北、青海和云南的 3 份土壤样品的微生物进行大量稀释分离，结果表明分离得到的微生物物种多样性均较对照丰富；添加不同营养因子的培养基处理分离得到各自独特的微生物类群，表明不同的营养因子能够选择性分离得到不同微生物类群，对于丰富微生物物种多样性有重要意义。

综合来看，3 份土壤样品在添加营养因子 1 和 2 的培养基中分离得到的菌株种类均较对照丰富，添加营养因子 4 的培养基分离得到的菌株种类均较对照少。其中，营养因子 1 中的 N– 乙酰葡萄糖胺能够与 N– 乙酰胞壁酸经 β –1，4 糖苷键连接间隔排列形成细菌细胞壁的主要成分肽聚糖，添加 N– 乙酰葡萄糖胺有利于保持细胞外形并保护细菌抵抗低渗环境，起到一定的屏障作用，更有利于细菌存活。

营养因子 2 中葡萄糖、乳糖、麦芽糖、阿拉伯糖等作为菌株的碳源可以促进其生长繁殖。当培养基中同时含有葡萄糖、乳糖、麦芽糖、阿拉伯糖及其他碳源时，细菌会优先使用葡萄

糖作为碳源，而当其耗尽时，细菌需要经过一定时间的适应，才能利用乳糖及其他碳源继续生长。补充不同的碳源会引起菌体生理及生长特性变化，使其分离得到的菌株更为丰富。

营养因子4中乙酸钠、苯甲酸钠、L-乳酸钠均为常见的防腐剂，能够抑制微生物的生长繁殖。乙酸钠作为一种广谱型防腐剂，能够抑制细菌、霉菌及酵母菌的生长；苯甲酸钠具有较强的抑菌作用，可通过扩散的方式被细菌所摄取，改变细胞膜的通透性，抑制细胞膜对氨基酸的吸收；L-乳酸钠对致病菌有很好的抑制作用，因此添加营养因子4使菌株的丰富性下降。

此前，16S rRNA基因序列和DNA-DNA杂交比较的结果显示，70%的DNA-DNA匹配性对应于约97%的16S rRNA基因相似性，即界定种的阈值为97%。Kim等[17]研究报道，区分两个不同种的16S rRNA基因序列相似性的临界值为98.65%，即两株菌的16S rRNA基因序列相似性在98.65%以下，则认为它们属于不同种，不需要做DNA-DNA杂交实验。

本研究结果表明，分离得到的菌株HBUM200206与运动东菌（*Dongia mobilis*）LM22T的亲缘关系最近，序列相似性为94.58%，可能是红螺菌科（Rhodospirillaceae）的一个潜在新属。菌株HBUM200202、HBUM200206、HBUM200239、HBUM200240、HBUM200352、HBUM200424、HBUM200427、HBUM200448、HBUM200452、HBUM200488、HBUM200497和HBUM200503与亲缘关系最近的模式菌株的16S rRNA基因序列相似性均小于98.65%，可能为潜在的新种。

参考文献：

[1] 牛丽纯, 孙玉芳, 赵天琦, 等. 未培养微生物的限制因素及培养方法研究进展J]. 微生物前沿, 2014, 3(2): 17-28.

[2] Hugenholtz P, Goebel B M, Pace N R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity[J]. J Bacteriol, 1998, 180(18): 4765-4774.

[3] 岳秀娟, 余利岩, 李秋萍, 等. 自然界中难分离培养微生物的分离和应用[J]. 微生物学通报, 2006, 33(3): 77-81.

[4] Hirakawa H, Tomita H. A new class of Acyl-homoserine lactone quorum sensing signals[J]. Nihon Saikingaku Zasshi, 2013, 68(4): 325-335.

[5] Joseph S J, Hugenholtz P, Sangwan P, et al. Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(12): 7210-7215.

[6] Tanaka T, Kawasaki K, Daimon S, et al. A hidden pitfall in the preparation of agar media undermines microorganism cultivability[J]. Appl Environ Microbiol, 2014, 80(24): 7659-7666.

[7] Ravin N V, Mardanova A V, Skryabin K G. Metagenomics as a tool for the investigation of uncultured microorganisms[J]. Russian Journal of Genetics, 2015, 51(5): 431-439.

[8] Carolina M M, Francisco R V, Rohit G. Genomes of planktonic acidimicrobiales: widening horizons for marine actinobacteria by metagenomics[J]. Mbio, 2015, 6(1): e02083-14.

[9] Lee D E, Lee J, Kim Y M, et al. Uncultured bacterial diversity in a seawater recirculating aquaculture system revealed by 16S rRNA gene amplicon sequencing[J]. Journal of Microbiology, 2016, 54(4): 296-304.

[10] Takashi N, Aya S, Kazuaki Y, et al. The combination of functional metagenomics and an oil-fed enrichment strategy revealed the phylogenetic diversity of lipolytic bacteria overlooked by the cultivation-based method[J]. Microbes Environ, 2014, 29(2): 154-161.

[11] Tschech A, Pfennig N. Growth yield increase linked to caffeate reduction in Acetobacterium woodii[J]. Arch Microbiol, 1984, 137(2): 163-167.

[12] Widdel F, Kohring G W, Mayer F. Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids Ⅲ Characterization of the

Filamentous Gliding *Desulfonema limicola* gen. nov. sp. nov.,and *Desulfonema magnum* sp. nov. [J]. Arch Microbiol, 1983, 134(4): 286–294.

[13] Janssen P H, Schuhmann A, Mörschel E, et al. Novel anaerobic ultramicrobacteria belonging to the Verrucomicrobiales lineage of bacterial descent isolated by dilution culture from anoxic rice paddy soil[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63(4): 1382–1388.

[14] Hudson J A, Schofield K M, Morgan H W, et al. *Thermonema lapsum* gen. nov., sp. nov., a thermophilic gliding bacterium[J]. Int J Syst Bacteriol, 1989, 39(4): 485–487.

[15] Edwards U, Rogall T, Blöker H, et al. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes: characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA[J]. Nucleic Acids Research, 1989, 17: 7843–7853.

[16] Lane D J. 16S/23S rRNA sequencing[A]. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics [M]. United Kingdom: Stackebrandt E, Goodfellow M,1991: 125–175.

[17] Kim M, Oh H S, Park S C, et al. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64: 346–351.

（责任编辑　邹移光）