

徐 兵,陆灏钰,韦雪铭,等. 海鲜菇栽培料中细菌菌落结构及多样性分析[J]. 江苏农业科学,2020,48(5):148-152.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.05.031

海鲜菇栽培料中细菌菌落结构及多样性分析

徐 兵¹,陆灏钰¹,韦雪铭²,张 良²,冀 宏¹

(1.常熟理工学院生物与食品工程学院,江苏常熟 215500;2.昆山市正兴食用菌有限公司,江苏昆山 215300)

摘要:采用高通量测序技术研究海鲜菇栽培料中的细菌群落多样性、微生物群落组成,结果表明,海鲜菇栽培料细菌 16S rDNA 的 V3 ~ V4 区测序共获得 52 192 条序列,10 588 个 OTU 数目,栽培料中具有较多的微生物群落;群落中,变形菌门占 92.71%, γ -变形菌纲占 75.77%,假单胞菌目占 69.76%,莫拉氏菌科占 68.73%,不动杆菌属占 66.30%。

关键词:海鲜菇栽培料;微生物群落;多样性;高通量测序;细菌

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)05-0148-05

海鲜菇别称真姬菇,在分类学上隶属白蘑科玉蕈属^[1],为药食两用菌,其营养丰富,味道鲜美,海鲜菇多糖具有提高免疫力、抗老化、降血脂等功效^[2-3]。在海鲜菇工厂化生产中,栽培料的应用具有悠久的历史^[4],其质量、数量直接关系到海鲜菇的产量、质量。栽培料主要营养提供者农业废弃物,发酵时间相对较长,需要 3 个月左右,对环境要求高,这就大大增加了海鲜菇工厂化生产的场地空间、人工成本,从而导致企业生产成本增加。有研究表明,栽培料在天然堆肥条件下,微生物菌落生长受温度变化的影响较大^[5-6],研制出既适合海鲜菇生长,又能缩短堆料时间的菌剂显得尤其重要,而开展海鲜菇栽培料中微生物群落研究具有更重要的意义^[7-9]。目前,国内外对海鲜菇栽培料主要研究其配比优化,对海鲜菇栽培料细菌群落的研究鲜见报道。

高通量测序技术是目前相对比较成熟的检测手段,被广泛应用于微生物群落多样性的研究。自 2007 年 Orsouw 等初次对玉米采用高通量测序技术进行测序^[10]开始,便开启了测序新世界的大门,2011 年完成对橡胶树、可可树等多种植物的测序^[11-12]。本研究利用高通量测序技术,分析海鲜菇栽培料中的微生物群落组成和多样性,剖析各类微

生物的数量比例,明确优势菌群,了解优势菌群在栽培料中的主要作用,为主动控制堆肥发酵过程、缩短堆料周期、减少企业生产成本、提高海鲜菇产量和质量提供可靠的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试材料 堆料 3 个月的海鲜菇栽培料,其配比为玉米芯 3%、甘蔗渣 3%、木屑 3%、麦麸 1%、豆粕 0.5%、玉米粉 0.5%、生石灰 0.025%,由昆山正兴食用菌有限公司提供。

1.1.2 试剂 DNA 提取试剂盒 E. Z. N. A. Soil DNA Kit,由 OMEGA 公司生产;Qubit 3.0 DNA 检测试剂盒,由 Life 公司生产;2 × Taq Master Mix,由 Vazyme 公司生产;MagicPure Size Selection DNA Beads,由 Transgen 公司生产。

1.1.3 仪器与设备 台式离心机,由 Thermo Fisher 公司生产;混匀型干式恒温器,由深圳拓能达科技有限公司生产;电泳仪、电泳槽,由北京六一仪器厂生产;凝胶成像系统,由 UVP 公司生产;Qubit[®] 3.0 荧光计,由 Invitrogen 公司生产;PCR 仪,由 BIO-RAD 生产;移液器,由 Eppendorf 公司生产。

1.2 测定内容与方 法

1.2.1 理化指标 分别参照《食品安全国家标准 食品中水分的测定》(GB 5009.3—2016)、《食品安全国家标准 食品中灰分的测定》(GB 5009.4—2016)、《食品安全国家标准 食品 pH 值的测定》(GB 5009.237—2016)、《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》(GB 5009.5—2016)、《食品安全

收稿日期:2019-02-26

基金项目:江苏省苏州市农业科技创新项目(编号:SNG2017066)。

作者简介:徐 兵(1982—),男,江苏常熟人,硕士,实验师,从事微生物学研究。E-mail:xubing@cslg.cn。

通信作者:冀 宏,博士,教授,从事食、药用菌研究。E-mail:595827676@qq.com。

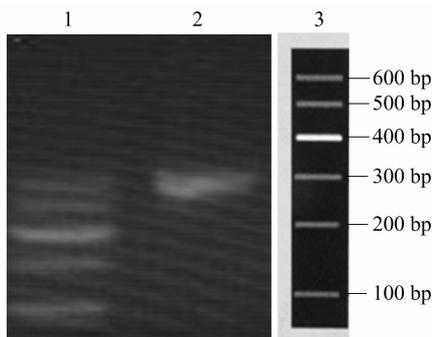
国家标准《食品中氨基酸态氮的测定》(GB 5009.235—2016)测定海鲜菇栽培料的水分、灰分、pH 值、蛋白质含量、氨基酸态氮含量。采用 DNS 法测定还原糖、总糖含量。

1.2.2 微生物指标 分别参照《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》(GB 4789.2—2016)、《食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数》(GB 4789.3—2016)、《饲料中细菌总数的测定》(GB/T 13093—2006)测定海鲜菇栽培料中的菌落总数、大肠菌群数、细菌总数。

1.2.3 微生物多样性

1.2.3.1 样品处理 取栽培料原始样品 200 mg, 放入无菌的 2 mL EP 管中, 加入浓度为 70% 的乙醇 1 mL, 混合, 振荡; 室温 10 000 r/min 离心 3 min, 丢弃上浆; 添加 $1 \times$ 磷酸缓冲盐溶液 (PBS 溶液), 混匀, 室温 10 000 r/min 离心 1 min, 丢弃上层液体; 倒置 EP 管在吸湿纸上 1 min, 直到没有液体流出, 将样品管置于烘箱中 55 °C 干燥 10 min, 使残留乙醇完全挥发。

1.2.3.2 DNA 提取和 PCR 扩增 采用试剂盒提取海鲜菇栽培料中的细菌基因组 DNA, 提取的基因组 DNA 在细菌 16S rDNA 的 V3 ~ V4 区进行 2 轮 PCR 扩增; 待反应完全结束, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 可得到清晰的条带 (图 1), DNA 浓度达到扩增所要求, 可用于后续的研究分析。



1—样品; 2—标记; 3—标记对比

图1 海鲜菇栽培料中细菌 DNA PCR 产物电泳检测

1.2.3.3 测序数据处理优化 运用 Qiime 1.8.0 软件过滤序列, 去除 3' 端的引物接头、引物错配比率 >0.1 的序列、样本中序列尾部质量值 <20 的碱基、含 N 的序列、长度 <200 bp 的序列、嵌合体序列, 使用 Mothur 1.30.1 软件中的 Uchime 去除嵌合体序列。

1.2.3.4 多样性分析 采用 Usearch 5.2.236 软件对 97% 相似水平下的操作分类单元 (OTU) 进行聚

类分析, 选择丰度最高的序列作为 OTU 代表性序列; 采用 Mothur 1.30.1 软件分析得出 Shannon 指数、Simpson 指数、Coverage 指数等群落分布多样性指数及 Chao1 指数、ACE 指数等群落分布丰度指数。

1.2.3.5 群落结构分析 采用序列比对分析软件 Blastn 工具将 OTU 序列与对应数据库进行比对, 筛选出 OTU 序列的最佳比对结果, 并对比对结果进行过滤, 获得样品在门、纲、目、科、属不同分类水平上的分类学比对情况。

2 结果与分析

2.1 海鲜菇栽培料的理化性状及微生物指标

试验结果表明, 海鲜菇栽培料中水分含量、灰分含量、pH 值、蛋白质含量、氨基酸态氮含量、还原糖含量、总糖含量分别为 60.27%、2.44%、7.20、3.98%、0.023%、0.18%、26.70%, 菌落总数、细菌总数分别为 1.3×10^7 、 1.2×10^8 CFU/g, 大肠菌群未检出。

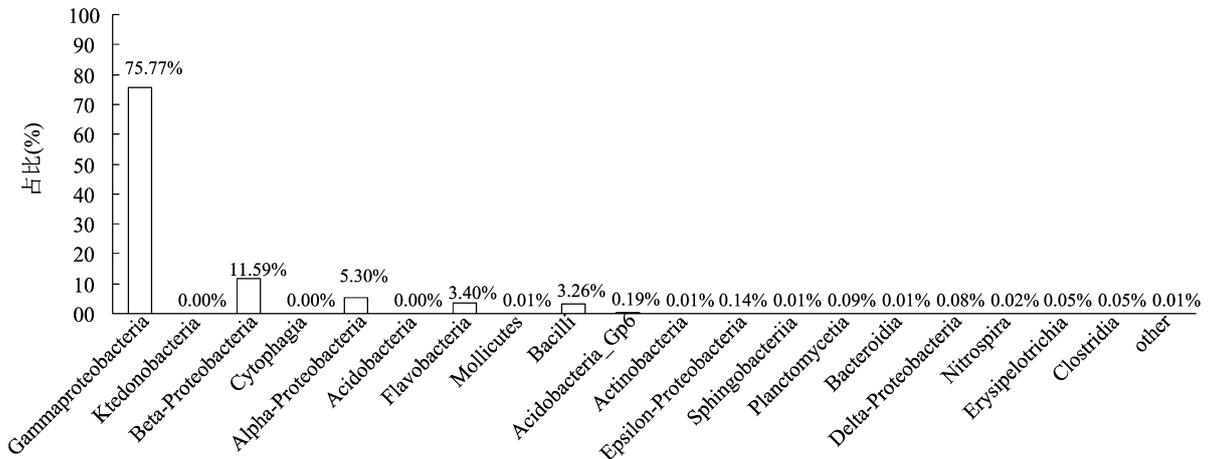
2.2 海鲜菇栽培料中的微生物多样性

试验结果表明, 从 16S rDNA 基因的 V3 ~ V4 测序中获得 56 422 个序列, 平均长度为 462.26 bp, 质控后, 共有 52 192 个序列, 平均长度为 424.26 bp; 对 97% 相似水平下的序列进行 OTU 统计分析, 共获得 10 588 个 OTU 数; 经软件分析, ACE、Chao1、Shannon、Simpson、Coverage 指数分别为 480 779.61、151 060.50、4.59、0.10、0.81, 说明栽培材料中微生物群落的多样性、总体丰富程度相对较高^[13]。

2.3 海鲜菇栽培料细菌群落在不同分类学上的分布

2.3.1 门、纲 试验结果表明, 海鲜菇栽培料中共鉴定出 11 个细菌门, 主要的有变形菌门 (Proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、厚壁菌门 (Firmicutes)、放线菌门 (Actinobacteria)、硝化螺旋菌门 (Nitrospirae)、绿弯菌门 (Chloroflexi)、浮霉菌门 (Planctomycetes)、软壁菌门 (Tenericutes)、酸杆菌门 (Acidobacteria) 9 个细菌门, 占比分别为 92.71%、3.63%、3.37%、0.19%、0.02%、0.01%、0.01%、0.01%、0.01%。由图 2 可见, 变形菌门中的 γ -变形菌纲占比相对最高, 为 75.77%, 是细菌的主要种类。

2.3.2 目、科 由图 3、图 4 可见, 海鲜菇栽培料中共鉴定出超过 20 种细菌目, 其中, 假单胞菌目

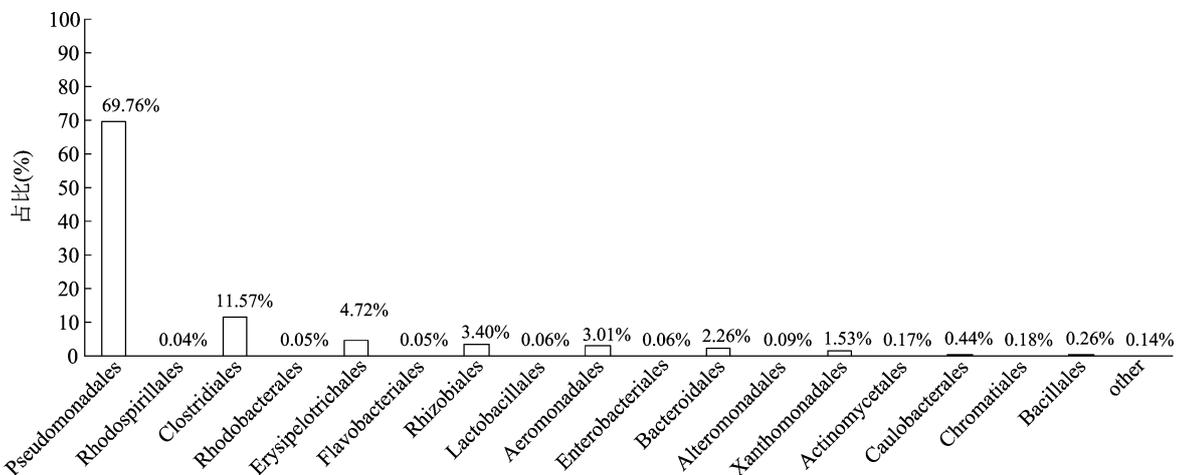


Gammaproteobacteria— γ -变形菌纲; Ktedonobacteria—纤线杆菌纲; Beta-Proteobacteria— β -变形菌纲; Cytophagia—蓝藻菌纲; Alpha-Proteobacteria— α -变形菌纲; Acidobacteria—酸杆菌纲; Flavobacteria—黄杆菌纲; Mollicutes—柔膜菌纲; Bacilli—杆菌纲; Acidobacteria_Gp6—Gp6酸杆菌纲; Actinobacteria—放线菌纲; Epsilon-Proteobacteria— ϵ -变形菌纲; Sphingobacteriia—鞘脂杆菌纲; Planctomycetia—浮霉菌纲; Bacteroidia—拟杆菌纲; Delta-Proteobacteria— δ -变形菌纲; Nitrospira—硝化螺旋菌纲; Erysipelotrichia—丹毒丝菌纲; Clostridia—梭菌纲; other—其他

图2 海鲜菇栽培料细菌群落 在纲水平上的菌群分布

(Pseudomonadales)的比例相对最高,达到69.76%,而伯克氏菌目(Burkholderiales)、红细菌目(Rhodobacterales)分别为11.57%、4.72%,说明在目水平上看,假单胞菌目最为占优;在科水平上,莫拉氏菌科(Moraxellaceae)、丛毛单胞菌科

(Comamonadaceae)分别属于假单胞目、伯克氏菌目,所占比例分别为68.73%、11.46%,而红细菌目中红杆菌科(Rhodobacteraceae)仅为4.72%,说明莫拉氏菌科最为占优。



Pseudomonadales—假单胞菌目; Rhodospirillales—红螺菌目; Burkholderiales—伯克氏菌目; Clostridiales—梭菌目; Rhodobacterales—红细菌目; Erysipelotrichales—丹毒丝菌目; Flavobacteriales—黄杆菌目; Rhizobiales—根瘤菌目; Lactobacillales—乳杆菌目; Aeromonadales—气单胞菌目; Enterobacteriales—肠杆菌目; Bacteroidales—拟杆菌目; Alteromonadales—交替单胞菌目; Sphingobacteriales—鞘脂杆菌目; Xanthomonadales—黄单胞菌目; Actinomycetales—放线菌目; Caulobacteriales—柄杆菌目; Chromatiales—着色菌目; unclassified—未分类; Bacillales—芽孢杆菌目; other—其他

图3 海鲜菇栽培料细菌群落 在目水平上的菌群分布

2.3.3 属 由图5可见,海鲜菇栽培料中共鉴定获得超过49个细菌属,主要有不动杆菌属(*Acinetobacter*)、丛毛单胞菌属(*Comamonas*)、芽孢杆菌属(*Gemmobacter*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、希瓦氏菌属(*Shewanella*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*),占比分别为66.30%、9.56%、

3.43%、2.99%、1.55%、1.49%,其中,不动杆菌属最为占优。

3 结论与讨论

食用菌栽培料中的含水量一般控制在60%~65%^[14-15];灰分含量的高低会直接影响海鲜菇中矿

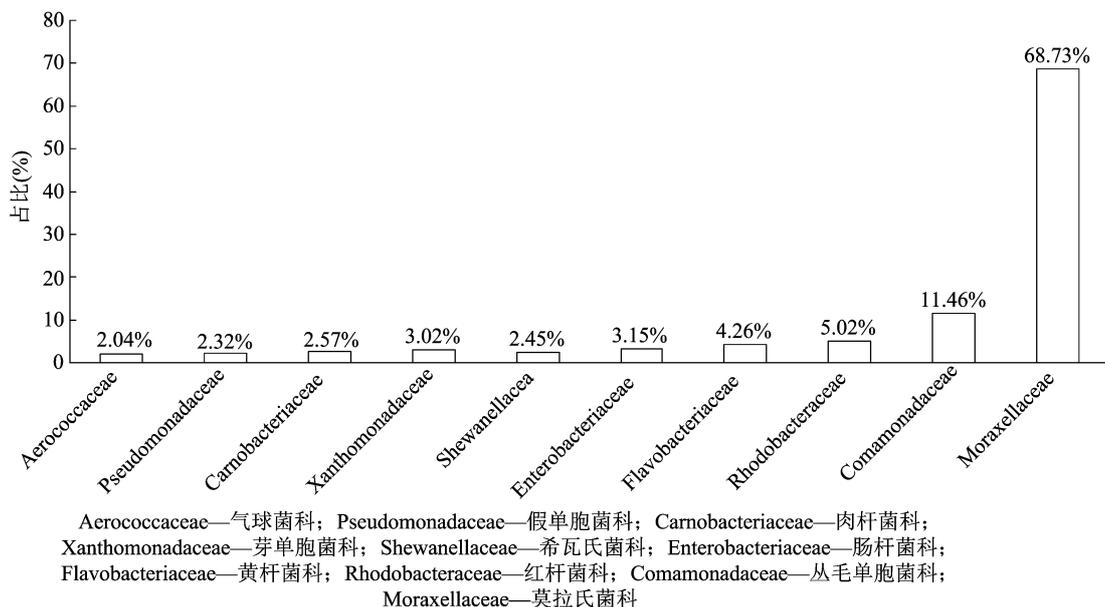
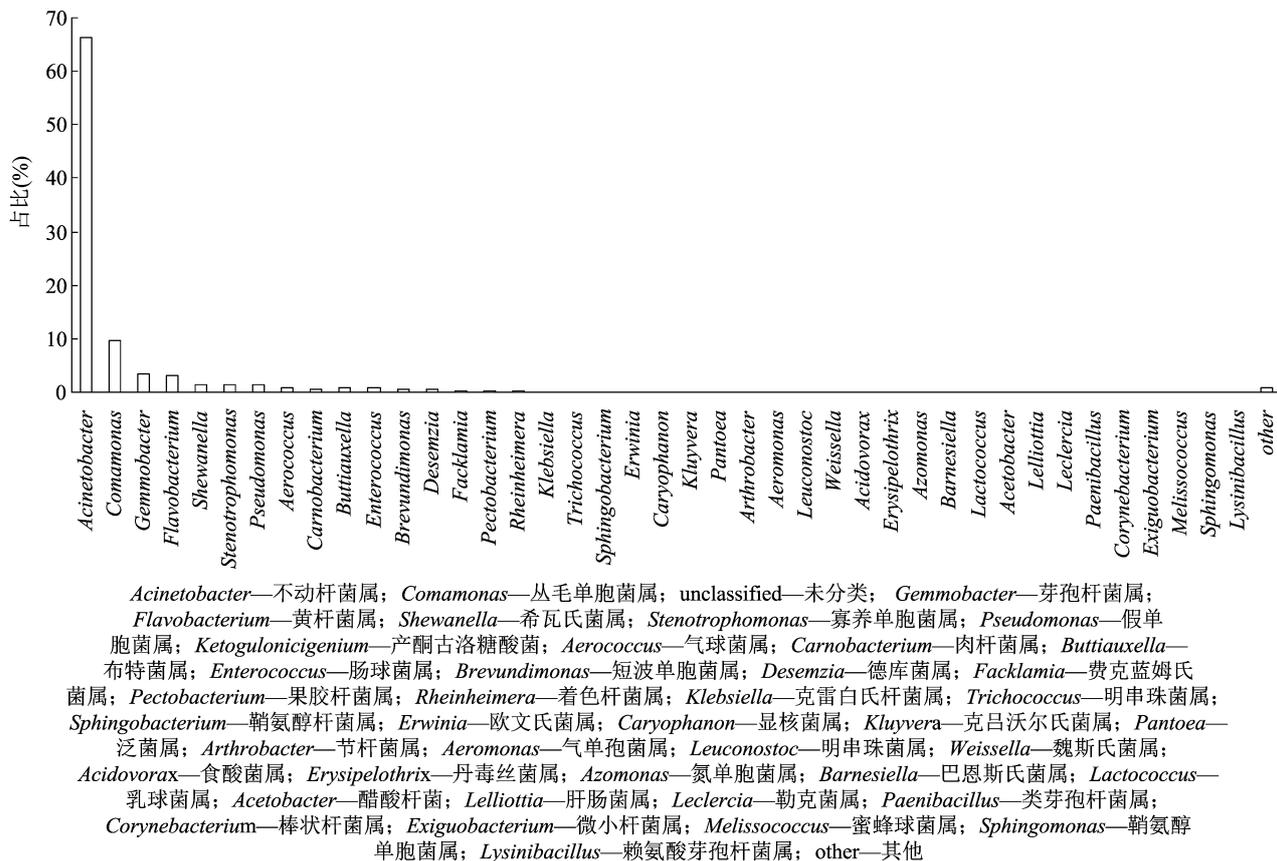


图4 海鲜菇栽培料细菌群落在科水平上的菌群分布



图中未进行中文标注的暂无中文属名

图5 海鲜菇栽培料细菌群落在属水平上的菌群分布

物质含量的多少;pH 值偏低,拌料操作中往往加入 1% 的石灰来调控^[16],pH 值偏高,可以在栽培料中添加含氮量较高的物质。本试验结果表明,海鲜菇栽培料中的水分含量、灰分含量、pH 值分别为

60.27%、2.44%、7.20,满足海鲜菇工厂化生产的需求。栽培料中微生物生长有一部分是依靠其分解栽培料中的糖,糖含量高低至关重要,而发酵时间越长,糖含量会越少,因此,在早期发酵阶段,应尽

可能满足微生物的生长需求,使其充分发酵^[17-18]。本试验结果表明,海鲜菇栽培料中蛋白质含量、氨基酸态氮含量、还原糖含量、总糖含量分别为 3.98%、0.023%、0.18%、26.70%,能较好满足海鲜菇生长对养分的需求。

海鲜菇生长所需养料是靠微生物分解栽培料中的营养物质获得,微生物扮演着重要的角色。 γ -变形菌亚群在变形菌门中是重要的菌群,而变形菌门是革兰氏阴性菌的主要组成部分^[19]。Peters 等分析由玉米秸秆、木屑组成的堆肥材料中的细菌群落发现,其中存在大量的 γ -变形菌亚群^[20]。假单胞菌目在栽培料发酵过程中对加快腐熟发挥着重要的作用,王胜认为,一个好的腐熟环境可以加快碳、氮、磷、钾、硫等分解而被植物吸收,并在秸秆腐熟中加入沼泽红假单胞菌以创造好的发酵环境^[21]。不动杆菌是兼性厌氧菌,能降解纤维素,在自然发酵过程中,栽培料中的氧含量会相对较低,对不动杆菌而言可提高堆肥中纤维素的分解效率^[22-23]。本试验采用高通量测序、微生物多样性检测技术分析海鲜菇栽培料中的细菌群落结构和多样性,结果表明,共获得 52 192 条序列,10 588 个 OTU 数;栽培料中共鉴定得到细菌菌落 11 个门、20 个目、49 个属,栽培料中的优势菌群分别是变形菌门、 γ -变形菌纲、假单胞菌目、莫拉氏菌科、不动杆菌属,其相应占比分别为 92.71%、75.77%、69.76%、68.73%、66.30%,说明栽培料中菌群有较好的多样性和丰度,对海鲜菇生长十分有利。

须补充的是,本次试验中未检出大肠杆菌,说明海鲜菇栽培料被粪便污染的可能性很小,存在肠道病原微生物的可能性微乎其微,这在一定程度上减少了不利菌群对栽培材料潜在的危害。

参考文献:

- [1] Bolormaa Z, Kang M G, Seo G S, et al. Analysis of nutritional characteristics and physiological functionality of *Hypsizygus marmoreus* (brown cultivar) [J]. The Korean Journal of Mycology, 2012, 40(2): 104-108.
- [2] Mori K, Kobayashi C, Tomita T, et al. Antiatherosclerotic effect of the edible mushrooms *Pleurotus eryngii* (Erngi), *Grifola frondosa* (Maitake) and *Hypsizygus marmoreus* (Bunashimeji) in apolipoprotein E-deficient mice [J]. Nutrition Research, 2008, 28(5): 335-342.
- [3] Ikekawa T. Beneficial effects of mushrooms, edible and medicinal, on health care [J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2001, 3(2/3): 79.
- [4] Sato S, Hirakawa H, Isobe S, et al. Sequence analysis of the genome of an oil-bearing tree, *Jatropha curcas* L. [J]. DNA Research, 2011, 18(1): 65-76.
- [5] 周月明, 雷阳明, 夏家帅, 等. 农业废弃物堆肥化进程与纤维素类物质降解研究 [J]. 三峡生态环境监测, 2018, 3(1): 32-40.
- [6] 万水霞, 郭熙盛, 朱宏斌, 等. 自然堆肥过程中微生物群落的动态变化 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(28): 13710-13711, 13749.
- [7] 季家举, 谢元. 工厂化海鲜菇瓶栽技术研究 [J]. 轻工科技, 2018, 34(2): 7-8, 24.
- [8] 谢春芹, 贾君, 凡军民, 等. 海鲜菇优良菌株筛选和栽培营养条件的优化研究 [J]. 中国食用菌, 2017, 36(1): 10-13.
- [9] 黄亮, 王玉, 班立桐, 等. 海鲜菇工厂化瓶栽优良菌株的筛选 [J]. 江苏农业科学, 2017, 45(20): 135-137.
- [10] Orsouw N J V, Hogers R C J, Janssen A, et al. Complexity reduction of polymorphic sequences (CRoPS™): a novel approach for large-scale polymorphism discovery in complex genomes [J]. PLoS One, 2007, 11: e1172.
- [11] Argout X, Salse J, Aury J M, et al. The genome of *Theobroma cacao* [J]. Nature Genetics, 2011, 43(2): 101-108.
- [12] Shulaev V, Sargent D J, Crowhurst R N, et al. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*) [J]. Nature Genetics, 2011, 43(2): 109-116.
- [13] 张敏, 张艳, 黄丽丽, 等. 基于 16S rDNA 高通量测序方法比较新疆西北部地区乳品中微生物的多样性 [J]. 食品科学, 2017, 38(20): 27-33.
- [14] 巫仁高. 海鲜菇工厂化袋栽制袋关键技术集成研究 [J]. 福建农业学报, 2016, 31(2): 140-144.
- [15] 李淑荣, 王丽, 倪淑君, 等. 海鲜菇营养成分分析 [J]. 食品工业, 2018, 39(2): 311-313.
- [16] 刘建军, 朱爱莲, 金力, 等. 栽培瓶培养料理化性质对真姬菇生长的影响 [J]. 浙江食用菌, 2009, 17(4): 49-51.
- [17] 王鸿磊, 王红艳, 宋俊芬, 等. 双孢菇培养料工厂化发酵过程中微生物及物质变化研究 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(1): 94-96.
- [18] 常路路, 申进文. 平菇培养料发酵过程理化因素及微生物变化研究 [J]. 中国食用菌, 2012, 31(4): 34-36.
- [19] 王琪. 芦笋老茎栽培食用菌和培养料堆制过程中微生物多样性的研究 [D]. 太原: 山西大学, 2012.
- [20] Peters S, Koschinsky S, Schwieger F, et al. Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single-strand-conformation polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(3): 930-936.
- [21] 王胜. 一种沼泽红假单胞菌腐解剂及其在盐碱地秸秆腐熟改土中的应用: CN105110823A [P]. 2015-12-02.
- [22] 朱燕华, 王倩, 宋晓霞, 等. 基于稻、麦秸秆工厂化栽培双孢蘑菇的理化性质变化研究 [J]. 中国农学通报, 2017, 33(7): 86-91.
- [23] 丁晓飞, 丁立功, 郭悠然, 等. 一种具有纤维素降解能力的兼性厌氧的不动杆菌及其应用: CN106497834A [P]. 2017-03-15.