

# 利用 DGGE 评价不同培养基回收番茄根际细菌类群的能力

孙晓棠<sup>1,2</sup>, 姚青<sup>3</sup>, 刘琼光<sup>2</sup>, 朱红惠<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>广东省微生物研究所 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070)

(<sup>2</sup>华南农业大学资源环境学院 广州 510642)

(<sup>3</sup>华南农业大学园艺学院 广州 510642)

**摘 要** 用营养肉汤、YG、根系分泌物、土壤浸渍液 4 种培养基从番茄根际分离培养细菌,并结合变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术对 4 种培养基回收番茄根际细菌种群的能力进行了比较研究。结果表明,不同培养基和培养温度,回收到的细菌种群有一定差异,低营养浓度的 YG 培养基在较低的培养温度 20℃ 下进行较长时间的培养,比高营养浓度营养肉汤培养基产生更多、更具代表性的细菌,以根系分泌物为基础的培养基从番茄根际回收到的优势菌群最多。该研究初步建立了用 DGGE 技术对不同培养基回收分离细菌种群能力进行评价的方法。

**关键词**: 培养基; 种群多样性; DGGE

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)03-0482-05

随着微生物分子生态学技术的发展,人们可以避开纯培养,通过分析环境样品中 DNA 分子的种类和数量来反应微生物区系组成和群落结构。对与群落结构的变化相伴随的种群变化进行分析,能够得到一些具特定生态功能的优势种群的信息<sup>[1,2]</sup>。但另一方面,对每个功能性优势种群的信息并不是仅仅通过分子方法就能得到,因此,纯培养对于详细地分析每个种群的功能是必不可少的,对于分离微生物群落中功能性的优势菌群是必要的<sup>[3]</sup>。建立一种把分离培养技术与分子生态手段相结合的方法,对检测具特定生态功能的细菌种群的多样性、研究微生物与环境之间的相互作用等具有重要的意义。

在评价不同分离技术的效果时,分离到的细菌种群是否是环境样品中的代表菌、优势菌和主要功能菌是一个核心问题<sup>[4]</sup>。人们发现,自然环境中的微生物多样性要比实验室中已经分离到的微生物多样性复杂的多,由于培养条件和培养方法的不足,许多在自然环境中占优势的细菌至今为止还未在实验室里被分离出来<sup>[1]</sup>,因此发展新型培养基和培养技术仍是一个尚待开拓的研究领域。

DGGE 技术是近几年发展起来的新技术。自 1993 年 Muzyer 等<sup>[5]</sup>首次应用于微生物生态的研究以来,由于该方法可以使只有一个碱基差别的核酸序列在梯度凝胶泳动中完全分离<sup>[6]</sup>,具有传统微生物分析方法无可比拟的优势,得到广泛的应用<sup>[7,8]</sup>。

本文以番茄根际土壤中的微生物群落为研究对象,通过常规稀释涂布平板分离,结合分子生态学研究技术,评价不同的培养基和培养方法回收番茄根际细菌种群的能力,为开发新的培养基和培养技术提供理论依据和分子水平的评价

方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品来源** 土壤采自广东省农科院大丰试验基地,在番茄结果期,按 5 点取样法选取番茄植株,将其根系连同土壤挖出,抖掉根系外围土,将土样连同根系装入密封袋中,立即带回实验室,自然风干,研磨过 1mm 筛。土壤 PH 为 6.25。其中部分土壤用于实验,其余保存于 4℃ 冰箱中。

**1.1.2 培养基**: 采用营养肉汤培养基作为高营养浓度培养基,含 1g 酵母汁的半合成培养基 YG<sup>[9]</sup>、根系分泌物、土壤浸渍液培养基为低营养浓度培养基。土壤浸渍液培养基配制方法:取土样 400g 用蒸馏水振荡 1h,静置后,过 0.2μm 微孔滤膜除菌,加 18g 琼脂,补足水至 1L,自然 PH。改良的根系分泌物培养基配制方法:取番茄根系,烘干后称 50g,研磨成粉状,用蒸馏水振荡提取 1h,5000r/min 离心 20min 后过 0.2μm 微孔滤膜除菌,加 18g 琼脂,补足水至 1L,自然 PH。

**1.1.3 主要试剂和仪器**: DNA 纯化试剂盒 Wizard DNA Cleanup system 购于美国 Promega 公司;引物由赛百盛公司合成;Taq DNA 聚合酶及其他试剂购于威佳公司;PCR 扩增仪 GeneAmp PCR system 2400,德国 PE 公司;变性梯度凝胶电泳仪 The Dcode™ Universal Mutation system,美国 Bio-Rad 公司;UVI 紫外成像系统,英国 UVI 公司。

### 1.2 细菌的分离和纯化

将土样充分振荡,制备 10<sup>-1</sup> ~ 10<sup>-5</sup> 不同稀释度的样品,分别在 4 种培养基上涂平板,置于两种不同温度下培养。28℃ 培养 2d,20℃ 培养 12d,每天进行平板菌落计数。

基金项目:广东省科技计划项目资助(2003C20511)

\* 通讯作者。Tel/Fax 86-20-37656629; E-mail: zhuohonghui66@yahoo.com.cn

作者简介:孙晓棠(1980-),女,山东莱州市人,硕士研究生,主要从事植物病害生物防治研究。E-mail: jaotangsun80@sohu.com

收稿日期:2005-06-24;接受日期:2005-09-06;修回日期:2005-09-26

### 1.3 平板回收菌总 DNA 的提取

分别用 10mL 无菌水洗涤平板, 收集菌体。菌体总 DNA 的提取按 Ellis 的方法<sup>[10]</sup>。

### 1.4 根际土壤细菌总 DNA 的提取与纯化

采用修改后的 Bead-Beating 法<sup>[11]</sup>。称取 10.0g 土样, 放入盛有 10 粒无菌玻璃珠 (直径 3mm ~ 5mm) 的三角瓶中, 加 15mL 提取缓冲液 (100mmol/L Tris-HCl, 100mmol/L EDTA-Na<sub>2</sub>, 200mmol/L NaCl, 1% PVP, 2% CTAB, pH 8.0)。在 180r/min, 37℃ 条件下振荡 30min, 然后加 2mL 20% SDS 继续振荡 10min。65℃ 水浴 1h 后 6000r/min 离心 15min, 收集上清液, 加 0.5 倍体积 PEG (30%) -NaCl (1.6mol/L), 混匀后室温下静置 2h, 10000r/min 离心 20min, 沉淀用 2mL TE 重新悬浮。加 4mol/L NaAc (pH 5.4) 至终浓度 0.3mol/L, 用酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1) 抽提一次, 加 0.6 倍体积异丙醇沉淀 2h, 12000r/min 离心 20min, 沉淀干燥后, 用 200μL TE 溶解, 再用 Wizard® DNA clean-up system (Promega) 纯化后, 置于 -20℃ 保存, 待用。

### 1.5 16S rDNA 的 PCR 扩增

所用引物为细菌 16S rDNA V3 高变区 F341-357 (GC) 和 R534-518。反应程序: 94℃ 5min 预变性, 94℃ 1min, 60℃ 30s, 72℃ 2min, 10 个循环; 94℃ 30s, 60 ~ 55℃ 30s (-0.5℃/循环), 72℃ 2min, 10 个循环; 94℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 2min, 15 个循环; 72℃ 7min。扩增产物采用 1.5% 琼脂糖分析检验。

### 1.6 变性梯度凝胶电泳 (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)

PCR 产物浓缩后, 采用 D-Code 突变检测系统 (Bio-Rad, Hercules, Calif.) 对样品进行 DGGE 分析。所用的聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8%, 变性梯度为 35% ~ 60% (100% 的变性剂为 7mol/L 尿素, 40% 甲酰胺), 180V, 60℃ 恒温, 0.5 × TAE 中电泳 4.0h, GoldView 染料染色 30min, UVI 成像系统拍照。用 UVIBand 分析软件帮助确定样品电泳条带的多少和条带的亮度峰值。

### 1.7 数据分析

用 Sorenson 配对比较相似性系数 (pairwise similarity coefficient,  $C_s$ ) 比较不同样品 DGGE 指纹图谱的相似性<sup>[12]</sup>。 $C_s = 2j/(a+b)$ , 其中  $a, b$  表示两个比较对象中的 DNA 条带数目,  $j$  表示  $a$  和  $b$  中相同的条带数量。多样性指数 ( $H$ )、物种丰度 ( $S$ ) 指标被用来比较各个样品的细菌多样性。计算公式如下<sup>[13]</sup>:

$$H = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i = - \sum_{i=1}^S (N_i/N) \ln (N_i/N)$$

其中,  $p_i$  是某个样品中单一条带的强度在该样品中的所有条带总强度中所占的比率,  $S$  是某个样品中所有条带数目总和。用 UVIBand 分析软件进行聚类分析。

## 2 结果和分析

### 2.1 细菌的分离计数

平板计数的结果表明, 不同培养条件和培养基上得到的菌落数有一定的差异 (表 1), 其中根系分泌物培养基在 20℃

培养 6d 后菌落数就达到  $2.7 \times 10^8$  cfu/g 土, 12d 后菌落数最多, 为  $5.12 \times 10^8$  cfu/g 土。在 28℃ 条件下培养 2d 后, 高营养浓度培养基平板上几种生长速率快的细菌类群迅速占据优势, 菌落形态较单一, 大部分菌落直径超过 2mm, 有的甚至达到 1cm, 尤其在低稀释度的平板上, 几种快速生长的细菌菌落迅速扩展成一片, 导致无法对其他菌落进行计数。在较低的培养温度 20℃ 下培养, 随着培养时间的延长, 各培养平板上出现的菌落数不断增加 (图 1)。前 3 天菌落数增长缓慢, 第 3 ~ 10 天增长迅速, 第 10 天之后又趋于缓慢。营养肉汤和 YG 培养基上菌落增长趋势相同, 菌落形态各异。而土壤浸渍液培养基上的菌落均较小, 菌落数量多形态无法辨认。

表 1 番茄根际土壤细菌平板菌落计数 ( $\times 10^8$  cfu/g 土)

Table 1 CFU of bacteria isolated from tomato rhizosphere soil

on different plates ( $\times 10^8$ cfu/g 土)				
Isolation medium	Nutrient broth	YG	Soil extract	Root exudate
20℃	1.07 ± 0.05A *	1.44 ± 0.02AB	1.43 ± 0.15AB	5.12 ± 0.53C
28℃	1.01 ± 0.07A	2.08 ± 0.04B	1.01 ± 0.12A	1.28 ± 0.06AB

\* Values indicate the average ± standard error, and different initial letters indicate the significant difference ( $P = 0.01$ )

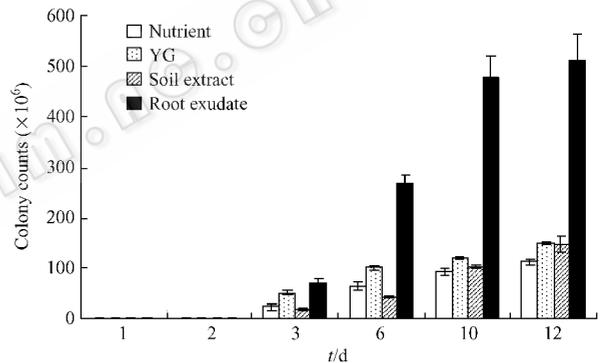


图 1 在 20℃ 条件下不同培养基上菌落数随培养时间增长趋势

Fig. 1 Increasing tendency of the colony counts along with incubation time on different plates incubated at 20℃.

### 2.2 16S rDNA V3 高变区的 PCR 扩增

从番茄根际抽提纯化所得的总 DNA 片段大小介于 18 ~ 23kb 之间, 纯度较高。以纯化后的基因组 DNA 为模板进行 16S rDNA V3 高变区的 PCR 扩增, 均得到大小为 230bp 左右的扩增片段 (图略) 适合于 DGGE 分析。

### 2.3 DGGE 分析

用通用引物对直接从番茄根际土壤提取的 DNA 样品和从同一番茄根际土壤中分离到的纯培养菌株的 DNA, 进行 16S rDNA V3 区扩增, 扩增产物进行 DGGE 分析。从电泳结果可以看出, 不同样品的电泳图谱有很大的区别 (图 2)。4 种培养基在 28℃ 培养 12d 的 DGGE 指纹图谱无论从条带的位置、多少、亮度上看均比较接近, 只是在一些较弱的条带上存在差异, 说明回收到的优势菌群较相似。表现为都含有 15 ~ 18 条条带, 相同的条带共 11 条, 其中 a, b, c, d, e, f 条带在 4 种培养基图谱中均较亮, 可能是几种生长速率快的细菌种群。而在 20℃ 培养的 DGGE 指纹图谱中各样品的条带数均

较多,但较弱和较亮的条带均有不同,差异明显。营养肉汤有 21 条带, YG 有 24 条, 土壤浸渍液有 19 条, 根系分泌物有 25 条, 但相同的条带仅有 5 条, 条带 g 仅存在于营养肉汤培养基中, 条带 h 仅存在于 YG 培养基中, 条带 i 仅存在于土壤浸渍液培养基中, 条带 j 仅存在于根系分泌物培养基中, 说明在 20℃ 条件下, 不同培养基所分离到的优势菌有较显著的差异。4 种培养基都能分离到在其他培养基上分离不到的独特类型的细菌种群。从图中我们还可以看出, 通过培养基回收得到的细菌种群与番茄根际土壤样品相比明显较少, 条带的位置和亮度也存在差异。条带 l、m、n 所对应的细菌在番茄根际土壤环境中处于优势地位, 但经培养基回收后却不能检测到。相反的, 番茄根际环境中数量较少以及难于用 DGGE 检测到的细菌, 经培养后却大量出现, 如条带 b、c、f、k 等, 这些细菌在环境中可能并不起主要作用或者不在数量上占优势。

表 2 数据显示, 番茄根际样品与在 28℃ 培养的营养肉汤、YG、土壤浸渍液、根系分泌物培养基相似指数较低,  $C_s$  值分别为 0.21、0.10、0.20、0.11, 与在 20℃ 培养的 4 种培养基相似指数分别为 0.34、0.43、0.36、0.44。可见在 20℃ 培养下低

表 2 不同样品的  $C_s$  值

Table 2  $C_s$  values of different samples

Lanes compared	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9
L1	1.00								
L2	0.79	1.00							
L3	0.76	0.91	1.00						
L4	0.77	0.88	0.79	1.00					
L5	0.21	0.10	0.20	0.11	1.00				
L6	0.33	0.27	0.32	0.23	0.37	1.00			
L7	0.26	0.20	0.29	0.16	0.43	0.56	1.00		
L8	0.19	0.12	0.18	0.06	0.36	0.33	0.51	1.00	
L9	0.21	0.15	0.25	0.11	0.44	0.38	0.58	0.53	1.00

L1-L4 : Nutrient Agar, YG, Soil extract, Root exudate incubated at 28℃; L6-L9 : Nutrient Agar, YG, Soil extract, Root exudate incubated at 20℃; L5 : rhizosphere soil of tomato plants.

从图 3 可以看出, L6、L7、L8、L9 的群落多样性指数 ( $H$ ) 和物种丰度 ( $S$ ) 值均较高, 而 L1、L2、L3 和 L4 的数值则相对较低。其中番茄根际样品的多样性指数 ( $H$ ) 和物种丰度 ( $S$ ) 值最高, 其次是在 20℃ 培养的营养肉汤和 YG 培养基。

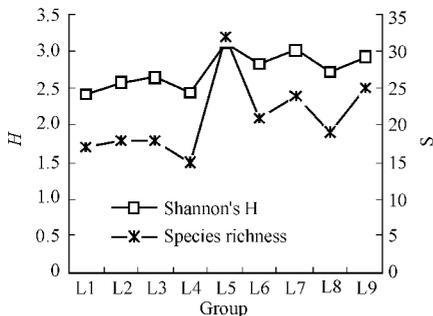


图 3 不同样品中细菌类群多样性指数 ( $H$ ) 和物种丰度 ( $S$ )

Fig. 3 Shannon-Wiener index ( $H$ ) and species richness ( $S$ ) of different samples estimated by the DGGE bands patterns. L1-L4 : Nutrient Agar, YG, Soil extract, Root exudate incubated at 28℃; L6-L9 : Nutrient Agar, YG, Soil extract, Root exudate incubated at 20℃; L5 : rhizosphere soil of tomato plants.

营养浓度的根系分泌物和 YG 培养基能更多的分离出番茄根际的优势菌群。

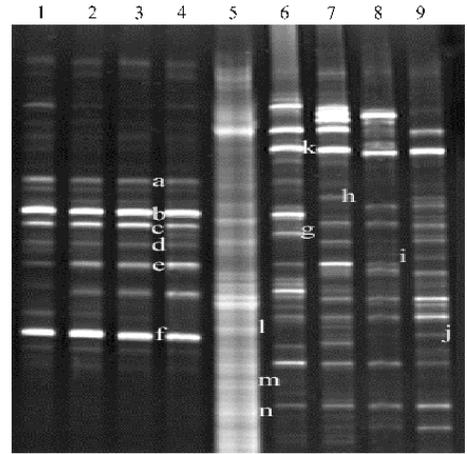


图 2 不同样品的 DGGE 图谱

Fig. 2 DGGE profile of different samples. L1-L4 : Nutrient Agar, YG, Soil extract, Root exudate incubated at 28℃; L6-L9 : Nutrient Agar, YG, Soil extract, Root exudate incubated at 20℃; L5 : Rhizosphere soil of tomato plants.

聚类分析结果表明 (图 4): 在 28℃ 培养的 4 种培养基聚为一类, 相似性达到 77% 以上, 其中 YG 和土壤浸渍液相似性高达 91%。番茄根际土壤样品与在 20℃ 培养的 4 种培养基聚为一类, 但相似性较低, 其中 YG 和根系分泌物的相似性最高也只有 58%。

### 3 讨论

土壤微生物资源极为丰富, 然而到目前为止, 可以人工培养的土壤微生物极为有限, 不到总量的 1%<sup>[14]</sup>, 而这些未培养细菌的生理及生态作用, 在大多数情况下只能在被分离后以纯培养的形式进行研究。但是传统的培养条件和培养方法容易造成选择性偏差, 富集回收得到在环境中可能并不起主要作用或者不在数量上占优势的菌群。如传统的平板筛选到的拮抗菌施入土壤后受到土壤中各种因素的影响, 未必能成为土壤中的优势种群而使防病效果不稳定。近年来, 国外有关培养基对细菌种群分离的研究报道日益增多<sup>[15, 16]</sup>, 而国内的研究报道不多见, 急待加以开展。

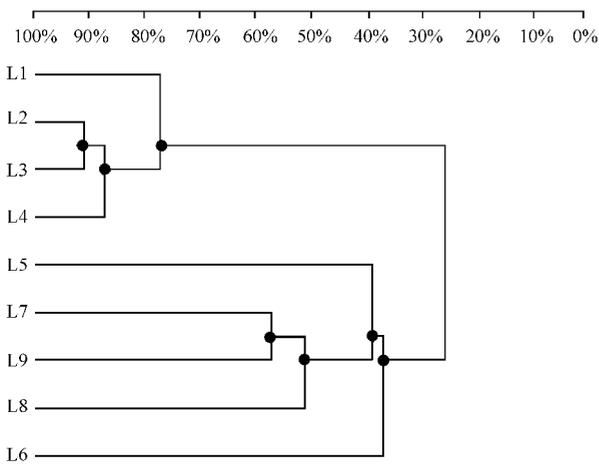


图 4 DGGE 条带的聚类分析

Fig. 4 Cluster dendrogram analysis of DGGE bands in gel. L1-L4 : Nutrient Agar, YG, Soil extract, Root exudate incubated at 28°C ; L6-L9 : Nutrient Agar, YG, Soil extract, Root exudate incubated at 20°C ; L5 : rhizosphere soil of tomato plants.

茄根际细菌种群的能力进行了评价。从 DGGE 图谱上可以看出,在不同培养条件和培养基上回收到的番茄根际细菌多样性及物种丰度存在较大差别。在 28°C 条件下培养 2 天后的培养基,无论群落多样性指数、物种丰度还是与番茄根际样品的相似指数,相比在 20°C 条件下培养 12d 后的培养基均较低。这是因为很多细菌只能以较低的生长速率生长<sup>[17]</sup>,在较低的培养温度下进行较长时间的培养,能抑制其中生长速率较快的细菌种群迅速占优势,增加了生长速率较慢的细菌种类被分离培养的可能性。因此,较低的温度下进行较长时间的培养会提高可培养细菌种群的多样性及物种丰度。

营养肉汤是一类高营养浓度培养基,其蛋白胨和牛肉膏的含量均较高,而 YG 是一类低营养浓度的培养基,各种成分含量均较低。前者可培养的细菌数、群落多样性指数、物种丰度和与番茄根际样品的相似指数均明显低于后者。据文献报道,大部分的细菌不能在平板上生长是因为它们只适应于低营养浓度。当土壤细菌涂布到不同稀释度营养肉汤培养基时,稀释 100 倍的营养肉汤上生长的细菌数要明显高于未稀释的培养基,而且许多细菌只能在经稀释后的培养基上被分离<sup>[17]</sup>。因此,低营养浓度的培养基有时比高营养浓度的培养基可能分离出更多的、更具代表性的细菌。本实验的结果也基本证实了这一观点。

细菌的根际定殖能力受到根系分泌物的影响。根系分泌物如氨基酸、糖和有机酸都是细菌在根际定殖的重要的营养来源<sup>[18]</sup>。从理论上讲,能在某种植物根际定殖并维持长时间的菌株,应该是对该植株根际分泌物非常适应或者能利用根际分泌物作营养的,只有这些菌才能在根际占有优势。利用根系分泌物做培养基可能为番茄根际土壤中的优势菌提供最接近其生态环境的生长条件。本研究结果表明,在 4 种培养基中,根系分泌物培养基能够更多地分离出番茄根系土壤中各种不同类型的细菌,显示出最好的优势菌群回收特

性。至于土壤浸渍液培养基,由于营养成分含量太低,其上的菌落均较小,有的甚至无法辨认,在提取 DNA 时,可能有的细菌没有提到,导致其 DGGE 图谱上条带较少。

DGGE 技术是近几年发展起来的新技术,适用于多个样品的同时分析。它最大的优点是可以不通过培养细菌而直接获取土壤样品中细菌的总 DNA,然后对其进行微生物多样性、微生物群落结构等方面的研究,避免了传统技术的局限性。但 DGGE 作为一种分子生物技术,也存在一些缺陷,如 DGGE 只对较小的片段具有较高的分析灵敏度,这些较小的 DNA 片段只能提供有限的系统发育信息,土壤微生物种类很多,但 DGGE 图谱中一般只有 10~20 条带,这些条带反映的是土壤群落中的优势菌群,而土壤中的弱势菌群不能被检测到。尽管 DGGE 技术具有某些局限性,但与传统的用形态和生理生化特征鉴定的方法相比,具有快速、准确、重复性高等优点,是传统技术不可比拟的。

本文初步建立了利用 DGGE 技术对不同培养基回收分离细菌类群能力进行评价的方法,将分子生物学技术与传统方法两者有机的结合起来,弥补了分子生物学方法在分析低丰度微生物时存在的某些缺陷,提示在研究过程中应当怎样使用不同的培养基,最大限度的在实验室中还原土壤中的微生物,更有目的的筛选优势菌种,为开发新的培养基和培养技术提供一定的理论依据和分子水平的评价方法,也为生态学研究技术的发展提供了新的思路。

致谢 广东省农科院何自福博士和广东省微生物研究所陈美标在样品采集方面给予了大力支持,谨表衷心感谢!

#### 参 考 文 献

- [1] Bond PL, Hugenholtz P, Keller J, et al. Bacterial community structures of phosphate-removing and non-phosphate-removing activated sludges from sequencing batch reactors. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**(5):1910-1916.
- [2] Watanabe K, Hino S. Identification of a functionally important population in phenol-digesting activated sludge with antisera raised against isolated bacterial strains. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**(10):3901-3904.
- [3] Watanabe K, Teramoto M, Futamata H, et al. Molecular detection, isolation, and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**(11):4396-4402.
- [4] McCaig AE, Grayston SJ, Prosser JI, et al. Impact of cultivation on characterisation of species composition of soil bacteria communities. *FEMS Microbiol Ecol*, 2001, **35**(1):37-48.
- [5] 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. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**(3):695-700.
- [6] Myers RM, Fischer SG, Lerman LS, et al. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res*, 1985, **13**(9):3131-3145.

- [ 7 ] Cindy H N , Vigdis T. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. *Soil Science Society of America Journal* , 2000 , **64** : 1382 – 1388.
- [ 8 ] Tresse O , Lorrain MJ , Rho D. Population dynamics of free-floating and attached bacteria in a styrene-degrading biotrickling filter analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Microbiol Biotechnol* , 2002 , **59** : 585 – 590.
- [ 9 ] Shiomi Y , Nishiyama M , Onizuka T , *et al.* . Comparison of Bacterial Community Structures in the Rhizosphere of Tomato Plants Grown in Soils Suppressive and Conducive towards Bacterial Wilt. *Appl Environ Microbiol* , 1999 , **65** ( 9 ) : 3996 – 4001.
- [ 10 ] Ellis RJ , Thomapson IP , Bailey MJ. Temporal fluctuations in the pseudomonas population associated with sugar beet leaves. *FEMS Microb Ecol* , 2000 , **28** : 345 – 356.
- [ 11 ] Yeates C , Gilling MR. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. *Biological Procedures Online* , 1998 , **1** : 40 – 47.
- [ 12 ] 高平平 赵立平. 微生物群落结构探针杂交评价不同培养基从活性污泥分离优势菌群的能力. *微生物学报* , 2003 **43** ( 2 ) : 264 – 270.
- [ 13 ] Andreoni V , Cavalca L , Rao MA , *et al.* . Bacteria communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. *Chemosphere* , 2004 , **57** : 401 – 412.
- [ 14 ] Amann RI , Ludwig W , Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* , 1995 , **59** ( 1 ) : 143 ~ 169.
- [ 15 ] Tabacchioni S , chiarini L , Bevivino A , *et al.* . Bias caused by using different isolation media for assessing the genetic diversity of a natural microbial population. *Microb Ecol* , 2000 , **40** ( 3 ) : 169 – 176.
- [ 16 ] Uyttendaele M , Bagamboula CF , De Smet E , *et al.* . Evaluation of culture media for enrichment and isolation of *Shigellasonnei* and *S. Flexneri*. *International Journal of Food Microbiology* , 2001 , **70** ( 3 ) : 255 – 265.
- [ 17 ] 陈 敏 赵立平. 焦化废水处理系统中不同培养基分离的细菌种群多样性. *微生物学报* , 2003 **43** ( 3 ) : 366 – 371.
- [ 18 ] Jaeger CH , Lindow SE , Miller W , *et al.* . Mapping of sugar and amino acid availability in soil around roots with bacterial sensors of sucrose and tryptophan. *Appl Environ Microbiol* , 1999 , **65** ( 6 ) : 2685 – 2690.

## Capacity evaluation of different media for isolating bacteria populations from the rhizosphere of tomato plants with DGGE

SUN Xiao-tang<sup>1, 2</sup> , YAO Qing<sup>3</sup> , LIU Qiong-guang<sup>2</sup> , ZHU Hong-hui<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> Guangdong Institute of Microbiology , Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application , Guangzhou 510070 , China )

(<sup>2</sup> College of Resources and environmental , South China Agriculture University , Guangzhou 510642 , China )

(<sup>3</sup> College of Horticulture , South China Agriculture University , Guangzhou 510642 , China )

**Abstract** : Bacteria from the rhizosphere of tomato plants were cultured on nutrient broth , YG , soil extract and root exudate media. The capabilities of these 4 media for recovering the bacterium communities were evaluated with denaturing gradient gel electrophoresis ( DGGE ) technique. Results showed that there were certain differences in the obtained bacterial communities when different media and culture temperatures were applied. Numbers of CFU on solid media indicated that the YG agar medium incubated at 20°C could recover more populations than the high-nutrient-concentration Nutrient agar medium ; while the root exudate based medium recovered the highest numbers of bacteria from the rhizosphere of tomato plants. 16S rDNA fragments amplified by PCR from different media and rhizosphere soil bacterium DNA were analyzed with DGGE . The DGGE fingerprints showed that there was a discrepancy between bacterial populations observed by cultivation techniques and molecular retrieval. The rhizosphere pattern consisted of more strong bands than the media. The DGGE patterns of the 4 different media incubated at 28°C showed a relatively high level of similarity. In contrast , those of the 4 media incubated at 20°C were significantly different from each other. Shannon-Wiener index ( H ) , species richness ( S ) , Cs values and Cluster dendrogram analysis of different samples revealed that the YG agar medium and the root exudate based medium recovered the highest proportion of predominant populations from the rhizosphere. In the study a new strategy has been proposed for evaluating the capacity of different media in terms of recovering the predominant populations.

**Keywords** : Medium ; Population diversity ; DGGE

Foundation item : Guangdong Province Science and Technology Project Fund ( 2003C20511 )

\* Corresponding author. Tel/ Fax : 86-20-37656629 ; E-mail : zhu honghui66@yahoo.com.cn

Received : 24 June 2005 / Accepted : 6 September 2005 / Revised : 26 September 2005