

# 紫色土硅酸盐细菌的遗传多样性研究\*

胡桦<sup>1,2</sup> 陈强<sup>†</sup> 李登煜<sup>1</sup> 吴思思<sup>1</sup> 谢卓霖<sup>1</sup> 贺积强<sup>1</sup> 周俊初<sup>2</sup>

(1 四川农业大学资源环境学院微生物学系, 四川雅安 625014)

(2 华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070)

## GENETIC DIVERSITY OF SILICATE BACTERIA ISOLATED FROM PURPLE SOILS

Hu Hua<sup>1,2</sup> Chen Qiang<sup>†</sup> Li Dengyu<sup>1</sup> Wu Sisi<sup>1</sup> Xie Zhuolin<sup>1</sup> He Jiqiang<sup>1</sup> Zhou Junchu<sup>2</sup>

(1 College of Resources and Environmental Sciences, Sichuan Agricultural University, Yaan, Sichuan 625014, China)

(2 State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

关键词 硅酸盐细菌; 16S rRNA PCR RFLP; RAPD; 多样性

中图分类号 Q939.1 文献标识码 A

硅酸盐细菌是土壤中一类能分解硅酸盐类矿物, 破坏其晶格结构, 使矿物钾转化成有效钾释放出来供植物生长的细菌<sup>[1]</sup>。它不仅能溶磷解钾, 亦有固氮的作用<sup>[2]</sup>。目前的种类主要有, 环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)、胶质芽孢杆菌(*B. mucilaginosus*)和土壤芽孢杆菌(*B. edaphicus*)三个种的菌株<sup>[3,4]</sup>。由于硅酸盐细菌的独特作用, 已广泛应用于采矿、冶金、微生物肥料、饲料工业上<sup>[2]</sup>。我国在硅酸盐细菌的生物学功能方面已进行了大量的工作, 尤其是在硅酸盐细菌作为生物肥料方面<sup>[5-9]</sup>, 但是对硅酸盐细菌的分类地位和遗传多样性研究较少。贺积强等研究表明<sup>[10]</sup>, 紫色土硅酸盐细菌的理化性质和解磷解钾特性存在差异, 本研究应用 RAPD、TP-PCR 和 16S rRNA PCR-RFLP 进一步分析了这些硅酸盐细菌的遗传多样性及系统发育地位, 以期弄清其遗传背景。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试硅酸盐细菌的分离与纯化

菌株分离采用硅酸盐细菌专用培养基<sup>[11]</sup>, 制备

土壤悬液:  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , 每一稀释度设 3 次重复, 混菌平板法; 混菌平板于 28~30 °C 培养箱中培养 3~5 d, 挑选圆形突起、无色透明粘稠的单个菌落, 在固体平板上划线培养 5~7 d, 如此重复划线 2~3 次直至获得纯培养。挑取典型的菌落镜检, 观察到的为大荚膜杆菌, 菌体长杆状,  $G^-$ , 荚膜厚, 呈椭圆形, 与典型的硅酸盐细菌形态特征相似<sup>[5,10,12]</sup>。得到供试硅酸盐细菌 38 株, 其中 36 个菌株分离自四川紫色土, 其余分离自重庆紫色土, 分别编号 K1~K41; 2 个参照菌株(胶质芽孢杆菌 *Bacillus mucilaginosus* VKPM 7519T 和 ASI. 232) 分别由南京农业大学黄为一教授、中国农业科学院土壤肥料研究所惠赠, 供试硅酸盐细菌见表 1。

### 1.2 硅酸盐细菌总 DNA 提取

根据杨江科等介绍的方法<sup>[13]</sup>提取细菌总 DNA。

### 1.3 遗传特性分析

1.3.1 供试引物 实验中采用了 6 个 RAPD 引物和 1 对 16S rDNA PCR 引物, 供试引物见表 2。

\* 四川农业大学青年科技创新基金(14304)、四川省教育厅重点项目(2004A004)和华中农业大学农业微生物学国家重点实验室基金资助

† 通讯作者, E-mail: qiangchenq@yahoo.com.cn

作者简介: 胡桦(1981~), 女, 四川泸州人, 硕士研究生, 从事细菌遗传多样性研究。E-mail: huhua9920012@yahoo.com.cn

收稿日期: 2005-10-31; 收到修改稿日期: 2006-03-11

表1 供试的硅酸盐细菌

菌株及编号	分离地或来源	土壤类型
<i>Bacillus mucilaginosus</i> VKPM 7519T	南京农业大学	
<i>Bacillus mucilaginosus</i> AS1.232	中国农业科学院土壤肥料研究所	
K1, K2, K18, K19	四川乐山	石灰性紫色土
K3, K16, K17	四川乐山	酸性紫色土
K5	四川内江	中性紫色土
K22, K23, K24	四川内江	石灰性紫色土
K6, K7, K8, K9, K10, K11, K12	四川宜宾	石灰性紫色土
K13, K27, K28, K41	四川雅安	中性紫色土
K14, K15	四川名山	石灰性紫色土
K25, K26	四川遂宁	中性紫色土
K40	四川蓬溪	石灰性紫色土
K37, K38	四川南充	石灰性紫色土
K29, K30	重庆	石灰性紫色土
K31	四川绵阳	石灰性紫色土
K32	四川绵阳	中性紫色土
K4	四川仁寿	石灰性紫色土
K20	四川江安	酸性紫色土
K33	四川巴中	石灰性紫色土
K36	四川达县	石灰性紫色土
K35	四川泸县	中性紫色土

表2 供试引物

引物名称	序列
P5	5'-TCGGAGTGGC-3'
P22	5'-CTAGGCGTCG-3'
P24	5'-ACCCATGCGG-3'
P25	5'-CGGAGAGTAG-3'
P58	5'-CGGAGACCG-3'
P64	5'-CCACGCCCAA-3'
P9	5'-GAGAGTTGATCCTGGCTCAG-3'
P14	5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'

**1.3.2 RAPD 扩增** RAPD 扩增, 引物序列见表2。反应体系的总体系为 25  $\mu$ l, RAPD 扩增程序为: 94  $^{\circ}$ C 初始变性 3 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 1 min, 37  $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72  $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 35 个循环, 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min<sup>[13]</sup>。扩增产物以 200 bp DNA ladder 作分子量标准, 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 4 h, 用柯达自动凝胶成像系统拍照。

**1.3.3 16S rRNA PCR-RFLP** 为了获得供试菌株的 16S rDNA 扩增片段, 实验采用的 P9, P14 引物对(表2), 分别对应于 *E. coli* 16S rRNA 基因的第 7~ 第 27 个碱基位置和第 1541~ 第 1522 个碱基位置。反应体系为 50  $\mu$ l。扩增程序: 初始变性 94  $^{\circ}$ C 3 min;

94  $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55  $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72  $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 30 个循环, 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 扩增产物以 Marker V 作分子量标准, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 贮存于 -20  $^{\circ}$ C 冰箱备用。各取 8~ 10  $\mu$ l 的 PCR 产物, 分别加入 10U 的 *Msp*I、*Hae*III、*Hinf*I、*Alu*I 限制性内切酶, 37  $^{\circ}$ C 酶切 3 h, 在 1.5% 琼脂糖凝胶上水平电泳后, 紫外光检测并用柯达自动凝胶成像系统拍照。

#### 1.4 数据分析及处理

凝胶图像经电脑扫描处理后, 在同一位置有带的记为“1”, 没有的记为“0”。应用 NTSYS 软件进行相似性分析, 采用平均连锁法(UPGMA) 进行聚类分析构建树状图谱<sup>[13, 14]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 遗传特性分析

**2.1.1 RAPD** 本研究选用的 6 个随机单引物的 RAPD 结果, 各引物分别产生了 1~ 13 条带, 扩增谱带表现出了明显的多态性(图1), 表明选用的 RAPD 随机引物能够较好地反映出供试菌株间的遗传多样性。

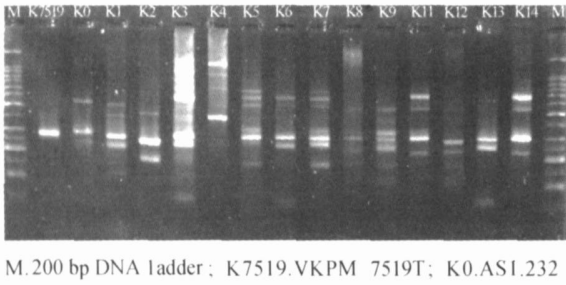


图 1 以 P22 为引物部分菌株的 RAPD 电泳图谱

对供试菌株的 RAPD 图谱进行聚类分析后, 获得了 RAPD 聚类树状图(图 2), 图 2 可见, 供试硅酸盐细菌在 26% 的相似性水平被分成了 5 个群。群 I 有 4 株菌, 3 株分离自宜宾; 群 II 由 8 个菌株组成, 群 II 包含 4 个菌株, 群 IV 最大, 由 18 株硅酸盐细菌和 2 株参比菌株 *B. mucilagenosus* VKPM 7519T 和 AS1. 232 组成, 占供试紫色土硅酸盐细菌的 47.3%; 分离自乐山的 K2、K3、K18 和 K37 聚在群 V 中。约 45% 供试菌株聚于群 IV, 与 *B. mucilagenosus* VKPM 7519T 聚在一群, 表明这些菌株与胶质芽孢杆菌的遗传特性相近; 另一方面, 供试菌株间也表现出了较大的遗传多样性, 群 I、II、III 和群 V 的菌株与 *B. mucilagenosus* VKPM 7519T 有差异。此外, 虽然部分菌株按地域聚群, 但全部供试菌株间地域差异性不明显。

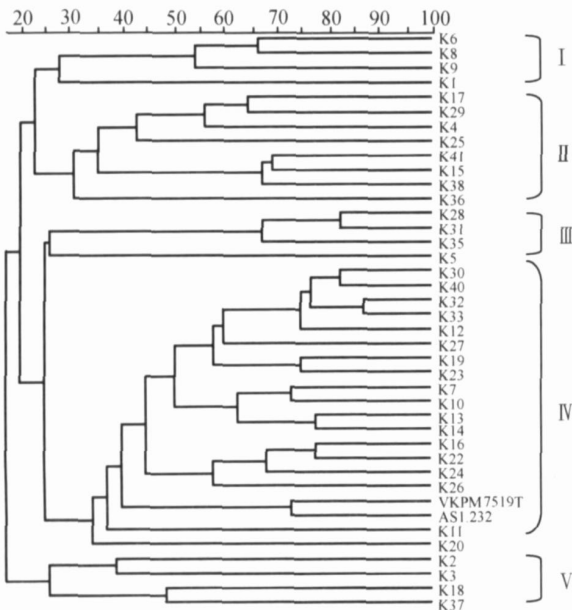


图 2 供试菌株 RAPD 分析树状图

2.1.2 TP-PCR 在 6 个随机引物的基础上, 实验选择了 P5+ P22、P24+ P25 二对随机引物进行了 TP-PCR, 以进一步研究供试菌株间的遗传特性。

与以 P22 为引物的 RAPD 扩增图谱相比, 双引物 P5+ P22 的谱带相对来说有所增加(图 3), 而且其特异性的谱带增多, 这更有利于揭示出菌株间更大的多样性。TP-PCR 聚类结果见图 4。

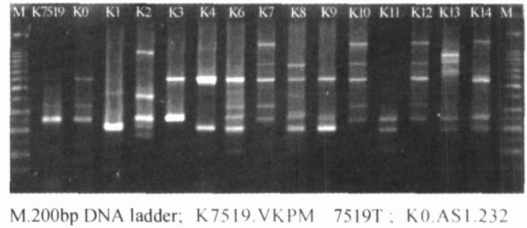


图 3 部分菌株 TP-PCR 产物电泳图(P5+ P22 为引物)

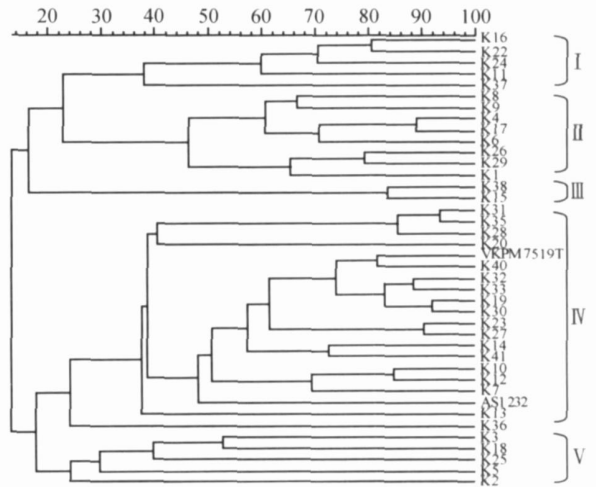


图 4 供试菌株 TP-PCR 分析树状图

由图 4 可见, 与 RAPD 分析结果相似, TP-PCR 将供试菌株也分成了 5 个群。群 I 由来自乐山、宜宾、内江、南充的 5 株菌组成; 群 II 的 8 株菌分别分离自宜宾、仁寿、乐山等地; 群 III 由 K38 和 K35 组成, 分离自南充市和名山县; 群 V 的 5 株菌分离自乐山、遂宁、内江; 供试菌株中, 由分离自绵阳、泸县、雅安等地的 18 株菌组成群 IV, 与参比菌株 *B. mucilagenosus* VKPM 7519T 和参比菌株 *B. mucilagenosus* AS1. 232 聚成一群, 占供试菌株的 47.3%。

**2.1.3 RAPD 和 TP-PCR 综合分析** 综合 RAPD 和 TP-PCR 扩增图谱进行聚类分析, 聚类结果见图 5。供试菌株和标准菌株在 28% 的相似性上可分为 5 个群, 其中 17 株菌和参比菌株 *B. mucilaginosus* VKPM 7519T 和 AS1. 232 同处在群 I。综合分析结果与 RAPD 和 TP-PCR 的聚类结果相似, 表明实验条件稳定和一致时, RAPD 分析具有较好的可靠性。

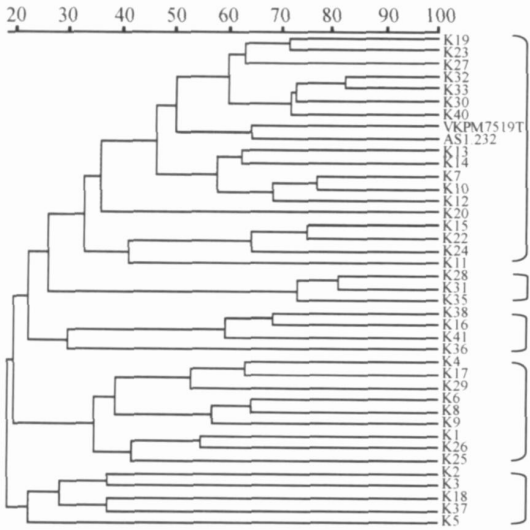
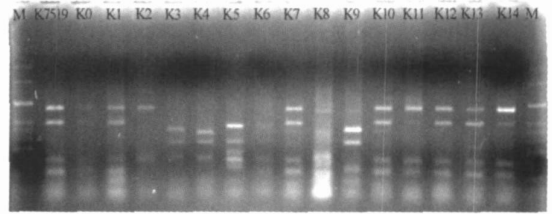


图 5 供试菌株 RAPD 和 TP PCR 综合分析树状图

**2.2 16S rRNA PCR-RFLP 聚类分析**

在 RAPD 分析的基础上, 本研究对供试 38 株硅酸盐细菌, 2 株 *B. mucilaginosus* 参比菌株进行了 16S rRNA PCR-RFLP 分析。

以 P9 和 P14 为引物, 对供试菌 16S rRNA 基因进行扩增, 均获得 1.5kb 的片段。用 *Hae*III、*Hinf*I、*Alu*I、*Msp*I 限制性内切酶分别对 40 个菌株的 16S rRNA PCR 产物酶切电泳后, 分别得到 11、9、7 和 7 种内切酶图谱类型, 图 6 为部分菌株的 *Hae*III 酶切图。对四种限制酶酶切谱带综合分析后, 全部供试菌株分成了 21 种 16S rRNA PCR-RFLP 遗传型(表 3), 大多数菌株集中在遗传型 11、12、13 中, K1, K2 等 17 个菌株则单独形成了 17 个基因型, 表明供试紫色土硅酸盐细菌在系统发育上也存在差异。虽然土壤都为紫色土, 但是由于土壤理化性质、微域地形、气候以及植被存在不同, 客观上为紫色土硅酸盐细菌遗传多样性的产生提供了条件。如 K6~ K12 等 7 个菌株分离自宜宾, 土壤类型为石灰性紫色土, 但在 16S rRNA PCR-RFLP 分析中, 这些菌株分属于 5 个不同的遗传型。



M.Marker V : K7519.VKPM 7519T; K0.AS1.232

图 6 16S rRNA PCR 扩增产物 *Hae*III 酶切产物电泳图

表 3 供试菌株 16S rRNA PCR RFLP 基因型

菌株及编号	<i>Hae</i> III	<i>Hinf</i> I	<i>Alu</i> I	<i>Msp</i> I	基因型
VKPM 7519T, AS1. 232	A	A	A	A	1
K1	A	B	A	A	2
K2	B	C	B	A	3
K3	C	D	A	B	4
K4	D	E	C	C	5
K5	E	F	D	D	6
K6	F	G	D	E	7
K7	G	E	D	F	8
K8	H	G	E	E	9
K9	I	G	F	C	10
K10, K11, K12, K13, K14	A	A	D	A	11
K15, K17, K29, K38, K41	D	E	G	D	12
K16, K19, K20, K22, K23, K27, K30, K32, K33, K40	D	E	G	D	13
K18	C	F	A	G	14
K24	A	A	G	A	15
K25	H	G	D	E	16
K26	H	G	D	A	17
K28	H	H	D	A	18
K31, K35	J	A	D	A	19
K36	D	I	A	F	20
K37	K	E	B	F	21

用平均连锁聚类法 (UPGMA) 对供试菌株 16S rRNA 扩增片段的 4 种酶切带谱进行了聚类分析, 获得的 16S rRNA PCR-RFLP 聚类分析结果表明(图 7), 在 59% 相似性水平处, 供试菌株聚在一起。在 62% 相似性水平处, 所有菌株被分为 3 个 16S rDNA 遗传群, 其中, 群 I 最大, 由 25 株供试菌株组成, 它们与 2 株参比菌株 *B. mucilaginosus* VKPM 7519T 和 AS1. 232 聚在一起; 群 II 由 10 株供试菌株组成, 包括分离自乐山的 K2、K3、K17、K18 和分离自仁寿、

内江、名山、重庆和宜宾的 K4、K5、K15、K29 和 K6、K9; 群 II 的 3 个菌株分别分离自南充和雅安。群 II 和群 III 菌株与 *B. mucilaginosus* 亲缘关系较远。16S rRNA PCR-RFLP 聚类分析中, 供试菌株间仍然没有表现出明显的地域性差异。

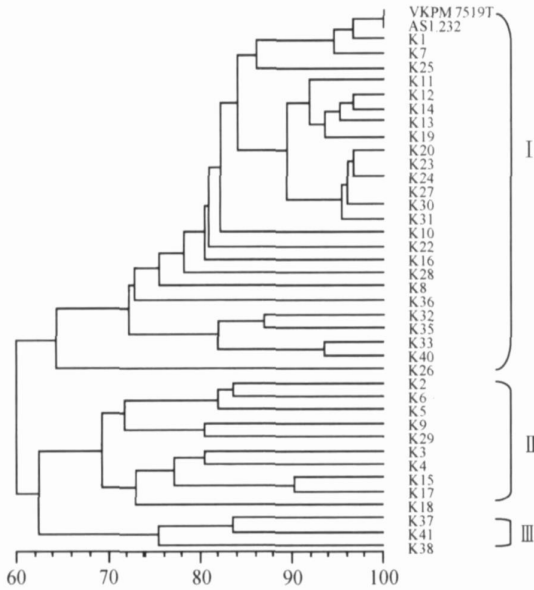


图 7 供试菌株 16S rRNA PCR RFLP 树状图

### 3 结 论

利用 RAPD、TP-PCR 和 16S rRNA PCR-RFLP 技术研究了分离自四川、重庆的紫色土的 38 株硅酸盐细菌的遗传多样性和系统发育。结果表明, 供试菌株间遗传多样性明显存在, 在 RAPD、TP-PCR 分析中, 供试菌株分别在 26%、23% 相似性水平划分为 5 个群, 约 50% 的供试菌株与胶质芽孢杆菌 *B. mucilaginosus* VKPM 7519T 聚在一群; 16S rRNA PCR-RFLP 分析结果表明, 在 62% 相似水平, 供试菌株被分为 3 群, 约 65.8% 的供试菌株与胶质芽孢杆菌 *B. mucilaginosus* VKPM 7519T 聚在一群。说明大多数

紫色土硅酸盐细菌的系统发育与 *B. mucilaginosus* VKPM 7519T 相近, 但菌株间存在明显的遗传差异。实验结果还表明, RAPD、TP-PCR 和 16S rRNA PCR-RFLP 均能较好地反映出供试菌株间的遗传差异。本研究中, 菌株聚类与地理来源没有明显的联系, 紫色土土壤类型对硅酸盐细菌遗传特性的影响, 尚需进一步探讨。

### 参 考 文 献

- [1] 李元芳. 硅酸盐细菌肥料的特性和作用. 土壤肥料, 1994, 2: 48~49
- [2] 盛下放, 黄为一. 硅酸盐细菌 NBT 菌株生理特性的研究. 土壤学报, 2001, 38(4): 569~574
- [3] 盛下放. 硅酸盐细菌在不同生境土壤中的分布. 土壤, 2004, 36(1): 81~84
- [4] Zahra M K, Monib M, Abdel et Al S I, et al. Significance of soil inoculation with silicate bacteria. Zentralblatt fur Microbiologie, 1984, 139(5): 349~357
- [5] 何琳燕, 盛下放, 陆光祥, 等. 不同土壤中硅酸盐细菌生理生化特征及其解钾活性的研究. 土壤, 2004, 36(4): 434~437
- [6] 谭卫华, 徐阳春, 蒋廷惠, 等. 硅酸盐细菌促进玉米生长的生理机制. 农业环境科学学报, 2003, 22(6): 736~739
- [7] 连宾, 傅平秋, 莫德明, 等. 硅酸盐细菌解钾作用机理的综合效应. 矿物学报, 2002, 22(2): 179~183
- [8] 殷永娟, 黄为一, 盛下放. 硅酸盐细菌的解钾作用及对棉花的增产效果. 土壤, 2001, 33(3): 163~166
- [9] 盛下放, 黄为一. 硅酸盐细菌 NBT 菌株解钾机理初探. 土壤学报, 2002, 39(6): 863~871
- [10] 贺积强, 李登煜, 张小平, 等. 紫色土硅酸盐细菌的表型特征及溶磷解钾能力. 应用与环境生物学报, 2003, 9(1): 71~77
- [11] 中国科学院南京土壤研究所微生物室编. 土壤微生物研究法. 北京: 科学出版社, 1985
- [12] 何琳燕, 殷永娟, 黄为一. 一株硅酸盐细菌的鉴定及其系统发育学分析. 微生物学报, 2003, 43(2): 162~168
- [13] 杨江科, 谢福莉, 周俊初. 江汉平原及其周边地区花生根瘤菌的遗传多样性. 生态学报, 2003, 23(3): 504~511
- [14] 杨江科, 周俊初. 潍坊花园口土样中土著大豆根瘤菌的遗传多样性研究. 应用与环境生物学报, 2000, 6(3): 168~173