

八门湾红树林土壤芽胞杆菌分离与多样性分析

崔莹^{1,2} 黄惠琴² 刘敏² 孙前光² 朱军² 鲍时翔^{2*}

(1. 海南大学 农学院 海南 海口 570228)

(2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所 海南 海口 571101)

摘要: 【目的】了解八门湾红树林海漆林区土壤中可培养芽胞杆菌资源的多样性。【方法】采用水浴处理与直接涂布相结合的方法选择性分离土壤中的芽胞杆菌；利用 16S rDNA PCR-RFLP 与 16S rDNA 序列分析技术研究可培养芽胞杆菌资源的遗传多样性和系统发育关系。

【结果】16S rDNA PCR-RFLP 酶切图谱 UPGMA 聚类分析表明，在 100% 的相似性水平上，分离的 155 株芽胞杆菌分属 21 个遗传类群，显示了较为丰富的遗传多样性；由 21 种遗传类型代表菌株的 16S rDNA 序列分析结果得知，这些芽胞杆菌主要分布在 Bacillaceae 和 Paenibacillaceae 科下的 *Bacillus*、*Halobacillus*、*Virgibacillus* 和 *Paenibacillus* 4 个属，其中 *Bacillus* 为优势属；有 8 株芽胞杆菌的 16S rDNA 序列与数据库中相应模式菌株的最大相似性在 95.1%–99.0% 之间。【结论】八门湾红树林土壤可培养芽胞杆菌有着较为丰富的遗传多样性，并存在新的芽胞杆菌物种资源。

关键词: 红树林，芽胞杆菌，多样性，16S rDNA PCR-RFLP，系统发育

Isolation and diversity analysis of *Bacillus*-like species from Bamen Bay mangrove soil

CUI Ying^{1,2} HUANG Hui-Qin² LIU Min² SUN Qian-Guang² ZHU Jun²
BAO Shi-Xiang^{2*}

(1. College of Agriculture, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

(2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, CATAS, Haikou, Hainan 571101, China)

Abstract: [Objective] Analyze microbial diversity of *Bacillus*-like group isolated from soil samples in *Excoecaria agallocha* forest, Bamen Bay mangrove. [Methods] The low dilution soil suspensions with heat shock treatment and the high dilution soil suspensions without heat treatment were spread onto Petri dishes for isolating *Bacillus*-like group species selectively. Their genetic diversity and phylogeny were characterized by 16S rDNA PCR-RFLP and 16S rDNA sequence analysis. [Results] In the level of 100% similarity, UPGMA of 16S rDNA PCR-RFLP map showed that 155 isolates

基金项目：国家科技支撑计划项目(No. 2012BAC18B04)；中央级公益性科研院所基金项目(No. 1630052012002)

*通讯作者：Tel: 86-898-66988564；✉: bsxitbb@163.com

收稿日期：2013-03-21；接受日期：2013-05-13；优先数字出版日期(www.cnki.net)：2013-10-11

were grouped into 21 clusters, which presented abundant genetic diversity. Moreover, 16S rDNA sequence analysis of representative strains of 21 clusters proved that they were distributed in four genera, *Bacillus*, *Halobacillus*, *Virgibacillus* and *Paenibacillus*, in which *Bacillus* was the dominant one. Based on the comparison of 16S rRNA gene sequences, the high levels of 16S rRNA gene similarities of eight strains with the corresponding type strains ranged from 95.1% to 99.0%. **[Conclusion]** Cultivable *Bacillus*-like group species isolated from Bamen Bay mangrove soil revealed high genetic diversity and there existed some new species.

Keywords: Mangrove, *Bacillus*-like species, Diversity, 16S rDNA PCR-RFLP, Phylogeny

八门湾红树林位于海南省清澜港红树林自然保护区(110°30′–110°02′ E, 19°15′–20°09′ N), 其中含有 8 种红树植物群落类型, 包括 12 科、23 种真红树植物和 5 科、5 种半红树植物, 占全世界红树品种的 40%, 是我国红树品种最多的地方。红树林处于潮间带环境, 是陆地向海洋过渡的特殊生态系统, 与珊瑚礁、盐沼、上升流区生态系统并称为生产力水平最高的四大海洋生态系统, 在净化海水、促淤护岸、调节大气和维护生物多样性等方面起着重要的作用^[1]。

红树林土壤兼有海洋和陆地的性质, 是红树林生态系统的重要组成部分。因周期性遭受海水浸淹, 红树林土壤具有沼泽化、盐渍化、强酸性、有机质含量高等主要特征, 这些独特的性质决定了其中微生物资源的多样性和珍稀性^[2]。

研究表明, 芽胞杆菌(*Bacillus*)是红树林土壤区系中常见的细菌类群^[3]。芽胞杆菌是一类好氧或兼性厌氧、革兰氏染色多为阳性、能产生芽胞的化能异养型细菌。目前, 芽胞杆菌在工农业、医药卫生、环保等领域有着广泛的用途, 可用于处理工业废水和降解原油、降解土壤中的难溶化合物、防治植物病虫害、固定空气中的氮等^[4]。芽胞杆菌的多样性研究是开发利用芽胞杆菌资源的先决条件, 本文通过 16S rDNA PCR-RFLP 和 16S rDNA 序列分析对八门湾红树林土壤中的可培养芽胞杆菌资源的遗传多样性及系统发育关系进行研究, 为其在红树林生态系统中的功能研究以及在工农业、医药与环境等领域的应用研究提供微生物资源和技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品的采集: 在文昌八门湾红树林海漆林区用 5 点采样法采集 5–10 cm 深的土壤样品, 混合均匀后, 置于采样冰盒中并标记, 及时带回实验室进行菌株分离, 其余样品置于 4 °C 冰箱中保存备用。

1.1.2 培养基: 分离培养基: 海水麦芽汁营养琼脂培养基(MN): 将海水麦芽汁琼脂培养基(波美度为 7°)与海水营养琼脂培养基分别灭菌, 冷却至 55 °C 时将两种培养基以 1:1 的比例混合倒板。海水 MH 培养基(g/L): 蛋白胨 5, 酵母粉 1, 葡萄糖 10, 琼脂粉 18–20, pH 7.5。M1 培养基(g/L): 可溶性淀粉 2.5, 蛋白胨 1, 酵母粉 0.5, 甘油磷酸二钠 0.1, 琼脂粉 18–20, pH 7.5。以上培养基混合均匀后, 经 1.0×10^5 Pa 灭菌 20 min, 倒平板备用。

纯化培养基: 海水营养琼脂培养基(g/L): 牛肉膏 3, 蛋白胨 10, 氯化钠 5, 琼脂粉 18–20, pH 7.5。

1.2 芽胞杆菌的分离纯化及保藏

将混合土样进行梯度稀释, 稀释梯度为 10^{-1} – 10^{-3} 的土壤悬液, 经 80 °C 水浴处理 15 min 后取 0.1 mL 涂布; 对于稀释梯度为 10^{-4} – 10^{-6} 的土壤稀释液, 则不作热处理直接涂布。每种分离培养基在每个稀释梯度做一个平行实验组, 将平板置于 28 °C 培养 2–5 d。

根据菌落形状、颜色、边缘状态、透明度、表面干湿状态等表型特征, 挑取不同的单菌落重复划线 2–3 次, 直至获得纯培养。选取菌落表型不同

的菌株采用文献[5]的方法进行芽胞染色验证，去除芽胞细菌后，对产芽胞细菌进行编号保存。

1.3 八门湾红树林可培养芽胞杆菌 16S rDNA PCR-RFLP 分析

基因组 DNA 提取参照文献[6]进行。选用 16S rRNA 基因序列保守区域的两段引物扩增 16S rRNA 基因，P1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG AACGAACGCT-3')和 P6 (5'-TACGGCTACCTTGT TACGACTTCACCCC-3') 引物由上海生工生物技术有限公司合成。反应采用 50 μL 体系。PCR 反应程序为：95 °C 15 min；94 °C 1 min，58 °C 1 min，72 °C 2 min，共 30 个循环；72 °C 10 min。选取限制性内切酶 *Msp* I (TaKaRa)酶切后，经 3%的琼脂糖凝胶电泳得出酶切图谱^[7]。用 NTSYS-pc2.01 软件进行相似性分析，采用平均连锁法(UPGMA)聚类，得出菌株间的聚类关系^[8]。

1.4 16S rDNA 序列测定及其系统发育分析

从 16S rDNA PCR-RFLP 分型的不同遗传类型中，各选取 1–2 株菌进行 16S rDNA 测序，测序由上海生工生物工程有限公司完成。将测序结果在 EzTaxon server 2.1 和 GenBank 中进行 BLAST 比较分析。采用 MEGA 5.0 以邻位相连法 (Neighbor-Joining) 构建系统发育树，自展数 (Bootstrap)设置为 1 000。

2 结果与分析

2.1 八门湾红树林土壤可培养芽胞杆菌的分离结果

从 3 种培养基上分离的菌株通过菌落形态特征去除部分冗余菌株与芽胞染色验证后，共得到

155 株芽胞杆菌，具体结果如表 1 所示。其中从 80 °C 水浴加热处理的土壤悬液中共分离出 126 株芽胞杆菌，占芽胞杆菌分离总量的 81.29%；而从不经加热处理的土壤悬液中仅分离出 29 株芽胞杆菌，占芽胞杆菌分离总量的 18.71%。此外，本实验获得的 99 株芽胞杆菌分离自麦芽汁营养琼脂培养基 (MN)，占芽胞杆菌分离总量的 63.87%；48 株芽胞杆菌分离自 M1 培养基，占芽胞杆菌分离总量的 30.97%；仅有 8 株芽胞杆菌分离自 MH 培养基，占芽胞杆菌分离总量的 5.16%。

2.2 八门湾红树林土壤可培养芽胞杆菌的遗传多样性

分离出 155 株芽胞杆菌的 16S rDNA 扩增产物(1 500 bp 左右)使用限制性内切酶 *Msp* I 酶切分型，酶切图谱见图 1，图中每一个 16S rDNA 限制性片断长度多态性类型代表一种遗传类型，共得到 13 种带型。酶切图谱经聚类分析后得知，若以相似系数 0.48 为结合点，八门湾红树林土壤可培养芽胞杆菌可分为两大类群；以相似系数 0.74 为结合点，其可分为 10 个类群；随着相似系数的增大，可培养芽胞杆菌的群落结构越复杂，在相似系数为 1.00 时，八门湾红树林土壤可培养芽胞杆菌可分为 21 个类群(图 2)。

2.3 可培养芽胞杆菌基于 16S rDNA 序列的系统发育分析

由 21 个遗传类群选出的 24 株代表芽胞杆菌的 16S rDNA 序列(GenBank 登录号见图 3)的比对结果得出，有 20 株属于 Bacillaceae 科下的芽胞杆菌属(*Bacillus*, 17 株，占 70.8%)、喜盐芽胞杆菌属

表 1 八门湾红树林土壤芽胞杆菌的分离结果			
Table 1 Results of <i>Bacillus</i> -like isolates from Bamen Bay mangrove soil			
分离培养基 Isolation medium	80 °C 水浴处理(稀释梯度 10 ⁻¹ –10 ⁻³) Heat shock treatment (80 °C, Dilution gradient 10 ⁻¹ –10 ⁻³)	直接涂布(稀释梯度 10 ⁻⁴ –10 ⁻⁶) Without heat treatment (Dilution gradient 10 ⁻⁴ –10 ⁻⁶)	合计 Total
MN	85	14	99
MH	6	2	8
M1	35	13	48

注：上述分离结果均为去除重复菌株与芽胞染色验证后的统计结果。
Note: The data were collected after preliminary validation through spore staining and removal of the redundant isolates.

(*Halobacillus*, 2 株, 占 8.3%)和枝芽胞杆菌属(*Virgibacillus*, 1 株, 占 4.2%), 其中 *Bacillus* 为优势属; 有 4 株属于 *Paenibacillaceae* 科下的类芽胞

杆菌属(*Paenibacillus*), 占 16.7%。

由 EzTaxon server 2.1 中的序列比对结果得知, 有 2 株菌的 16S rDNA 序列相似性在 97%以下, 是

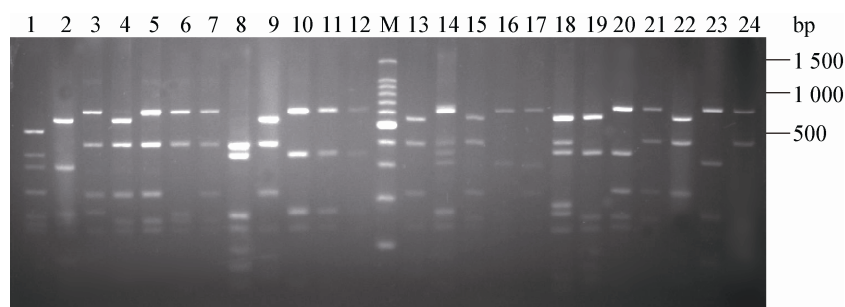


图 1 遗传类群代表菌株的 16S rDNA PCR-RFLP 酶切图谱

Figure 1 16S rDNA PCR-RFLP profile of the representative strains from different genetic group

Note: 1-24 are as follows: HB12003, HB12004, HB12007, HB12008, HB12012, HB12016, HB12018, HB12020, HB12022, HB12023, HB12024, HB12026, HB12027, HB12028, HB12033, HB12034, HB12035, HB12036, HB12037, HB12039, HB12040, HB12041, HB12042, HB12043. 3% agarose gel electrophoresis of *Msp* I digested 16S rDNA PCR products of 24 representative strains. M: 100 bp DNA ladder.

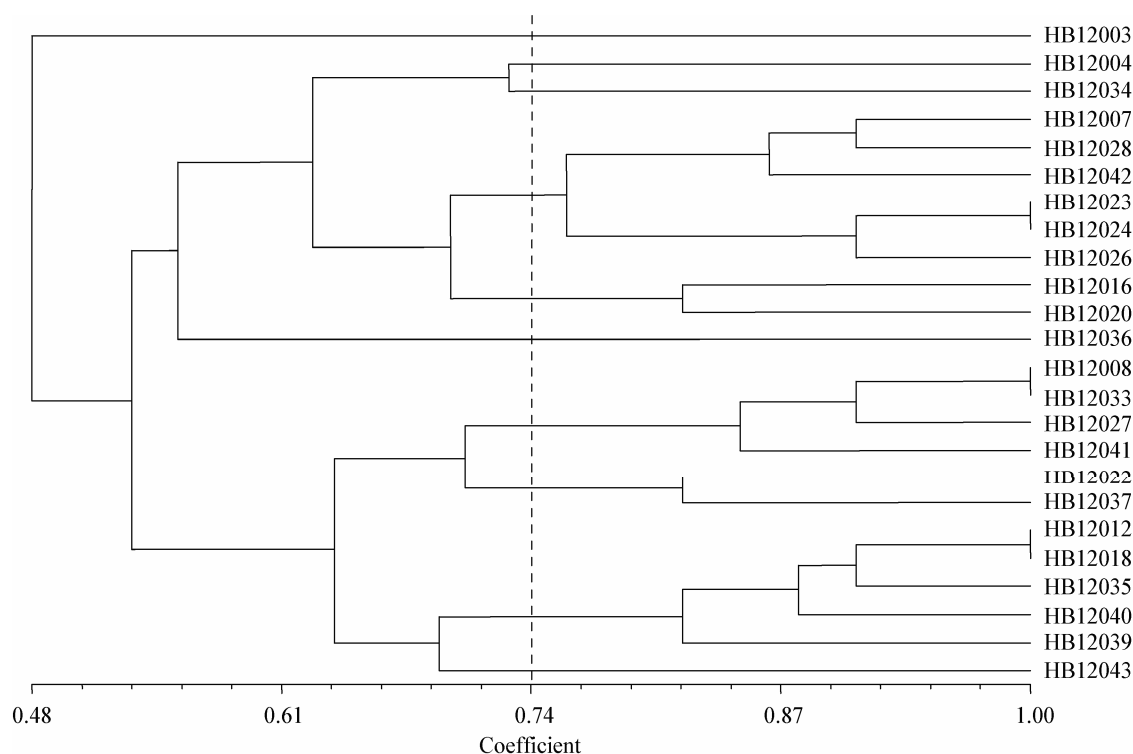


图 2 八门湾红树林土壤可培养芽胞杆菌的 16S rDNA PCR-RFLP 聚类分析树状图

Figure 2 UPGMA similarity dendrogram generated from 16S rDNA PCR-RFLP patterns of cultivable *Bacillus*-like species from Bamen Bay mangrove soil

Note: The number on the branch means the strains from different genetic group. The scale bar represents similarity indices for genetic similarity matrix based on UPGMA algorithm. Dotted line represents the clusters at similarity coefficients of 0.74.

八门湾红树林土壤中的芽胞杆菌新资源: 菌株 HB12036 与 *Bacillus okuhidensis* Kh10-101^T 的序列相似性最高 (95.1%), 菌株 HB12037 与 *Paenibacillus xylanilyticus* XIL14^T 的序列相似性最高 (95.9%)。菌株 HB12020、HB12028、HB12042、HB12043、HB12016 和 HB12018 与各自最近缘模式种的序列相似性分别为 98.5%、97.7%、98.3%、98.2%、98.6% 和 98.9%, 均在 97%–99% 之间, 可能为潜在的新分类单元^[9]。在系统发育树(图 3)中, 除 HB12043 独立成一支外, 其它菌株均与各自相似性最高的模式种聚在同一分支。

3 讨论

为从土壤中选择性分离芽胞杆菌, 在分离培养过程中对低稀释度的土壤悬液(10^{-1} – 10^{-3})采用 80 °C 水浴处理的方法。80 °C 水浴加热处理对芽胞杆菌的定向分离效果较好, 实验中 81.29% 的芽胞杆菌是通过该预处理方式获得的, 但此加热过程也可能杀死未形成芽胞的营养型芽胞杆菌。为了最大限度地分离其中的芽胞杆菌, 对较高稀释度的土壤稀释液(10^{-4} – 10^{-6})采用直接涂布的方法, 以补充分离长期以营养体形式存在、形成芽胞较少或未形成芽胞的芽胞杆菌, 如本实验分离的菌株 HB12026、HB12037、HB12042 与 HB12043 等, 其中菌株 HB12037 与最近缘模式种的相似性为 95.9%, 是八门湾红树林土壤中的芽胞杆菌新种资源; 菌株 HB12042 和 HB12043 与模式菌株的最大相似性分别为 98.3% 和 98.2%, 是八门湾红树林土壤中潜在的芽胞杆菌新资源。由此可知, 采用高稀释度土壤悬液直接涂布的方法, 有利于样品中一些特殊芽胞杆菌资源的分离, 但同时未经加热处理的稀释液也会引入一些非芽胞细菌, 所以在分离过程中辅以芽胞染色的方法初步排除这类杂菌的干扰。在分离过程中选择了 3 种培养基, 培养条件主要针对好氧、常温菌群, 共分离出 155 株芽胞杆菌, 其中海水麦芽汁营养琼脂培养基对本实验土样中的芽胞杆菌分离效果较好, 有 63.87% 的芽胞杆菌是

由该培养基分离获得, 由于人工培养基质的成分限制, 并不能完全模拟自然环境中的营养基质, 导致红树林土壤中一些种类的芽胞杆菌无法被分离, 使部分资源遗漏。因此需要优化分离培养技术, 以获取更多的可培养芽胞杆菌资源。

红树林是生物多样性高度浓缩的生态关键区, 有较高的微生物丰度和多样性^[10]。微生物生物多样性研究的本质内容是 DNA 的多样性。16S rDNA PCR-RFLP 可快速将芽胞杆菌划分成不同的遗传型, 基本反映了菌株间的遗传差异, 但由于 *Msp* I 酶切作用位点的限制与 16S rDNA 序列的相对保守性, 该方法并不足以揭示部分亲缘关系较近的芽胞杆菌间的遗传差异。如菌株 HB12023 与 HB12024 在 16S rDNA PCR-RFLP 聚类分析中属于相同的遗传型, 但 16S rDNA 序列分析结果表明, 这 2 株芽胞杆菌为不同的菌种。因此, 基于 16S rDNA 的系统发育关系更能准确反映芽胞杆菌近缘种属间的进化差异和多样性分化程度。16S rDNA PCR-RFLP 分析技术与 16S rDNA 序列分析技术的有效结合, 能快速、准确的检测土壤中的可培养芽胞杆菌资源。

本文首次对八门湾红树林土壤可培养芽胞杆菌资源进行了报道。研究表明, 八门湾红树林土壤中存在着丰富的芽胞杆菌资源, *Bacillus* 为其中的优势属, 占分离菌株的 70.8%。Shome 等^[11]研究表明, 印度南部的 Andaman 红树林沉积物中芽胞杆菌属(*Bacillus*)占细菌区系的 50%; Ranjan 等^[12]的研究结果得出, *Bacillus* 也为印度 Bhitarkanika 热带红树林境土壤细菌中的优势类群。林鹏等^[13]在研究九龙江口红树林土壤微生物的类群时发现 *Bacillus* 为其中的优势属。李元跃等^[14]也发现 *Bacillus* 是福建漳江口红树林湿地自然保护区土壤细菌的优势属。根据王海琪等^[15]的研究结果, *Bacillus* 也是厦门凤林湾红树林区土壤可培养细菌的主要类群之一。综上, 芽胞杆菌属为多处红树林土壤细菌中的优势类群。

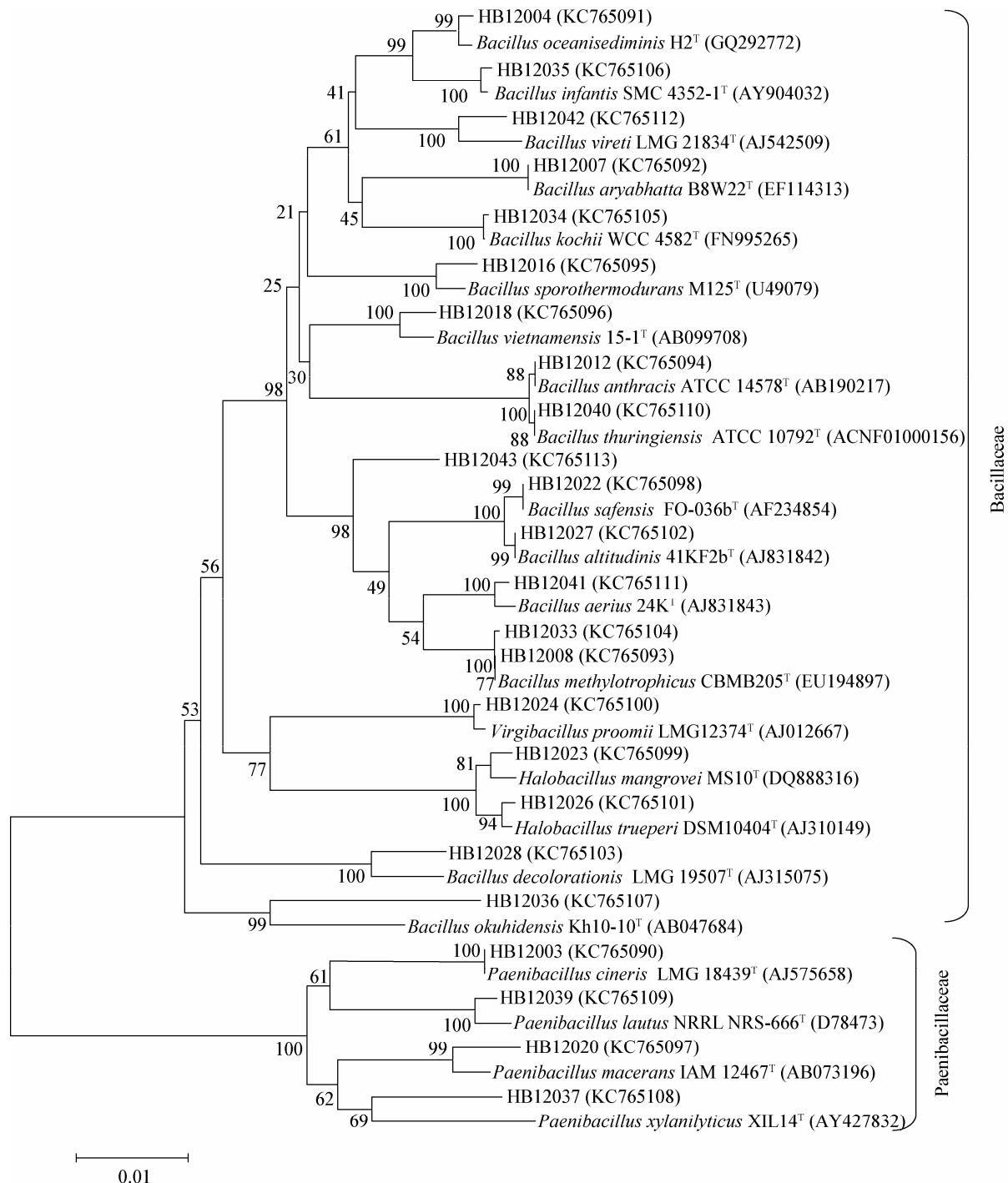


图 3 八门湾红树林可培养芽胞杆菌基于 16S rDNA 的系统发育分析

Figure 3 Phylogenetic tree of cultivable *Bacillus*-like group species from Bamen Bay mangrove soil based on 16S rDNA sequences

Note: Data in parentheses are the GenBank accession numbers of the isolates represented by the number out of the parentheses. The number on the node represents the similarity level of the following strain. Bootstrap values (in percent) mean the support for a specific branch. The Families to which the strains belong are presented on the right. Scale bar=0.01 substitutions/nucleotide position.

参 考 文 献

- [1] 段舜山, 徐景亮. 红树林湿地在海岸生态系统维护中的功能[J]. 生态科学, 2004, 23(4): 351-355.
- [2] 林鹏. 中国红树林生态系[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 23-30.
- [3] 蒋云霞, 郑天凌, 田蕴, 等. 红树林土壤微生物的研究: 过去、现在、未来[J]. 微生物学报, 2006, 46(5): 848-851.
- [4] 张华勇, 李振高. 土壤芽孢杆菌及其资源的持续利用[J]. 土壤, 2001(2): 92-96.
- [5] 郑平. 环境微生物学实验指导[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2005: 21.
- [6] Sass AM, McKew BA, Sass H, et al. Diversity of Bacillus-like organisms isolated from deep-sea hyper saline anoxic sediments[J]. Saline Systems, 2008(4): 8-18.
- [7] 陈兰, 张小平, Lindstrom K. 药用植物内生芽孢杆菌的多样性和系统发育研究[J]. 微生物学报, 2008, 48(4): 432-438.
- [8] Beneduzi A, Moreira F, Costa PB, et al. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil[J]. Applied Soil Ecology, 2013, 63: 94-104.
- [9] Stackebrandt E, Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standard[J]. Microbiol Today, 2006, 33: 152-155.
- [10] Holguin G, Vazquez E, Bashan Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: all overview[J]. Biology and Fertility of Soils, 2001, 33: 265-278.
- [11] Shome R, Shome BR, Mandal AB, et al. Bacterial flora in mangroves of Andaman: Part I. Isolation, identification and antibiogram studies[J]. Indian Journal of Marine Sciences, 1995, 24: 97-98.
- [12] Ranjan MR, Ranjan SM, Kanti DT, et al. Diversity and seasonal fluctuation of predominant microbial communities in Bhitarkanika, a tropical mangrove ecosystem in India[J]. Revista de Biología Tropical, 2012, 60(2): 909-924.
- [13] 林鹏, 张瑜斌, 邓爱英, 等. 九龙江口红树林土壤微生物的类群及抗菌活性[J]. 海洋学报, 2005, 27(3): 133-141.
- [14] 李元跃, 吴文林. 福建漳江口红树林湿地自然保护区的生物多样性及其保护[J]. 生态科学, 2004, 23(2): 134-136.
- [15] 王海琪, 潘文, 项炯华, 等. 厦门凤林红树林区土壤可培养微生物数量及细菌类群初探[J]. 集美大学学报: 自然科学版, 2011, 16(5): 352-358.