

南京小龙山钾矿区植物根际可培养细菌的遗传多样性分析

王静, 盛下放, 曹建芳, 张树奎, 张垠, 何琳燕*

南京农业大学生命科学学院, 农业部农业环境微生物工程重点实验室, 南京 210095)

摘要: 【目的】矿区优势植物可培养细菌生物多样性研究将有助于了解植物根际细菌与矿物, 植物根系相互作用及对矿物风化和土壤形成的重要影响。【方法】采用纯培养法分离南京小龙山废钾矿区野生植物野塘蒿, 千金子和栽培植物甘薯根内与根周围土壤的可培养细菌, 通过 16S rDNA 限制性酶切多态性分析 (amplified rDNA restriction analysis, ARDRA) 和 16S rDNA 序列分析研究了可培养细菌的多样性。【结果】分离纯化到 60 株具不同菌落形态的可培养细菌, 在 60% 相似水平上可分为 18 个 OTU. 19 株代表菌株分别属于 3 个门, 10 个科, 11 个属。多数菌株属于变形菌门 (α -proteobacteria, 4 株, 21.1%; β -proteobacteria, 2 株, 10.5%; γ -proteobacteria, 6 株, 31.6%)。假单胞菌属 (*Pseudomonas*), 泛菌属 (*Pantoea*) 和根瘤菌属 (*Rhizobium*) 为优势种群。【结论】小龙山废钾矿区优势植物根围具有丰富的微生物种群多样性。

关键词: 矿区; 可培养细菌; 遗传多样性

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2009) 07-0867-07

生物风化是指矿物, 岩石受生物生长及活动影响而发生的风化作用, 包括动物, 植物和微生物与矿物相互作用等, 是在地表发生的最重要的地球化学现象之一 [1-3]。在地球表层土壤中, 微生物的活动可以导致硅酸盐, 磷酸盐, 碳酸盐, 氧化物和硫化物等矿物被破坏, 并从矿物中释放出大量植物生长必需的营养物质, 金属及非金属元素等提供给植物的生长 [4-6], 而植物生长发育过程中的代谢产物由根部分泌至土壤中, 改变了周围土壤的物理和化学性质, 使得微生物更易生存, 繁殖; 并且, 这些代谢产物还成为了根系范围内微生物的有效营养物质 [7-8]。因此, 土壤中微生物, 矿物, 植物之间形成相互依靠, 相互影响的密切关系, 共同影响矿物的风化及土壤的形成。矿物-微生物-植物相互作用研究, 不仅有助于揭示生命起源, 生命极限和生命本质等, 深入了解土壤微生物过程, 而且对评估和预测土

壤体系中养分元素的有效性, 有机污染物质的降解以及重金属毒性的影响, 进而提高污染物的修复效率等也有着重要的实际意义, 已经成为当前地质微生物学和土壤学领域的研究热点与前沿 [9-10]。但总体来讲目前这一领域的研究还不系统, 许多理论问题还不清楚, 关于矿区内植物根际微生物多样性的研究少见报道。

人们应用分离培养方法已有 100 多年的历史, 至今仍然是研究土壤微生物区系组成, 数量及主要生理类群结构状况的一种重要而不可替代的经典方法, 研究者普遍认为能够在平皿上形成菌落的微生物虽然只是土壤微生物群落中的部分可培养微生物, 但是在数量上占一定优势的种群。因此, 许多学者建议目前更应该加强纯培养的研究, 以期更全面地了解微生物的多样性和更好地利用这些自然资源 [11-12]。近年来, 16S rRNA 基因序列分析及核酸指

基金项目: 国家自然科学基金 (30400006)

* 通信作者。Tel: +86-25-84395125; E-mail: helyan0794@njau.edu.cn

作者简介: 王静 (1981-), 女, 河北张家口人, 硕士研究生, 主要从事矿物微生物多样性研究。E-mail: 2006116066@njau.edu.cn

收稿日期: 2008-12-31; 修回日期: 2009-03-20

纹图谱分析等分子技术也为微生物多样性结构和功能基因组的研究提供了崭新的思路。16S rDNA 限制性酶切多态性分析 (amplified rDNA restriction analysis, ARDRA) 可以快速地大量细菌分群, 是一种可在 16S rDNA 序列上区分细菌种 (species) 差异的简便, 可靠的方法, 在细菌资源遗传多样性及分类的研究中广泛应用^[5]。

小龙山钾矿位于江苏省南京市江宁区, 东经 118°44', 北纬 31°47', 在 20 世纪 60 年代作为钾矿露天开采过, 但由于高温煅烧工艺造成生产成本过高, 污染环境等原因而被废弃, 至今残留开采深坑处的矿体表面风化明显, 植被稀疏, 主要有草本和灌丛, 附近农田土壤为黄棕壤, 构成植物-矿体-微生物相互作用, 岩石到土壤的典型风貌。本文采用无机盐培养基, 稀释平板涂布法对该废矿区野生植物和栽培植物进行分离根内及根际可培养细菌, 分析其 16S rDNA 限制性酶切多态性, 为调查和合理利用矿物分解细菌资源提供基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源: 样品采集于中国江苏省南京小龙山钾矿区的优势野生植物野塘蒿 (*Conyza bonariensis* Linn.) Cronq), 千金子 (*Leptochloa chinensis* Linn.) Nees) 和农田栽培植物甘薯 (*Dioscorea esculenta* Lour.) Burkill), 采集时间为 2006 年 9 月。将植物连根带土装入灭菌袋中, 每种植物采三株, 带回实验室, 4℃ 保存, 三天内分离。

1.1.2 培养基: 蔗糖 10 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 g, K_2HPO_4 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, NaCl 0.1 g, 酵母膏 0.5 g, CaCO_3 1.0 g, 琼脂 20 g, 水 1000 mL, pH 7.2 ~ 7.4。以上培养基于 1.034×10^5 Pa 高压下, 115℃ 灭菌 15 min。

1.1.3 主要试剂和仪器: 限制性核酸内切酶 *Rsa* I, Taq DNA 聚合酶和 pMD19-T 载体购自 TaKaRa 公司; PCR 产物琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 TianGen 公司; PCR 仪购自美国 Bio-Red 公司。

1.2 菌株分离

采用抖根法^[4]将根际土壤与非根际土壤分开, 抖落土为非根际土壤, 附着在根系表面 2 mm 左右土壤为根际土壤。所采集植株的根用水冲洗干净, 用 75% 酒精和 0.1% 氯化汞先后表面消毒, 并用无菌水浸洗数次。采用稀释平板法分离植物根部内生细菌, 根际土壤细菌, 非根际土壤细菌。30℃ 培养 2 ~ 3 d, 挑取单菌落进行划线纯化。所得纯培养物

转至斜面, 保存于 4℃ 备用。

1.3 细菌 DNA 提取和 16S rDNA 扩增

细菌总 DNA 的提取方法参考袁天英等^[5]方法。以细菌通用引物 F27 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 R1492 (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') 扩增细菌 16S rDNA, 扩增片断长度为 1.5 kb。PCR 反应体系体积为 25 μL , 包括 5 U Taq DNA 聚合酶, 2.5 μL 10 × PCR 反应缓冲液, 2 μL 浓度为 2.5 mmol/L 的 dNTPs, 0.5 μL 浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 的引物, 1 μL DNA 模板。PCR 反应条件为: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 54℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用经 EB 染色的 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 扩增 rDNA 限制性酶切分析

以限制性核酸内切酶 *Rsa* I 消化 16S rDNA PCR 扩增产物, 酶切反应体系为: 0.25 μL 内切酶 *Rsa* I, 1 μL 酶切反应缓冲液, 0.5 μL PCR 产物, 最后加灭菌超纯水至 10 μL , 37℃ 下反应 3 h, 后取 5 μL 酶切产物在 2.5% 琼脂糖凝胶电泳, 染色。凝胶图像经电脑扫描处理, 在同一位置有带的记为 "1", 没有的记为 "0"。所获得酶切条带图像相同时, 认为他们是相同的基因型, 将每一个基因型称为一个操作分类单元 Operational Taxonomic Unit, OTU)。采用非加权平均连锁法 (Unweighted Pair Group Mathematical Average, UPGMA) 进行聚类分析并构建树状图谱。参考张庆等^[6]方法计算 Shannon-Weiner 指数 (H), 均匀度 (E), 丰富度 (Q), Simpson's diversity 指数 (D)。

1.5 16S rDNA 序列分析

根据 16S rDNA 限制性酶切片片段聚类分析结果, 选取代表菌株, 将成功扩增的 16S rDNA 采用琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化后连接 pMD19-T 载体, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 在含有 X-gal (40 $\mu\text{g/mL}$), IPTG (40 $\mu\text{g/mL}$), Amp (100 $\mu\text{g/mL}$) 的 LA 平板上筛选并快速检测含有重组子的白色菌落。挑取阳性克隆由上海英骏生物技术有限公司完成 16S rDNA 序列的测定。将所测序列用 BLAST 软件与 GenBank 中已知的 16S rDNA 序列进行比对分析, 选取若干同源性较高的参比菌株 16S rDNA 序列, 经 ClustalX1.83 软件对其格式编辑后用 MEGA 4.0 软件包^[7]构建系统发育树并计算序列相似性。

2 结果和分析

2.1 菌株的分离

根据菌落大小, 形态, 颜色等特征, 最终从本次

采集的样品中分离到 60 株菌落形态各异的可培养细菌。从各样品分离效果看, 植物根际土壤可培养细菌最丰富 (24 株, 40%), 非根际土壤细菌数量次

之 (22 株, 36.7%), 根内生细菌数量最少 (14 株, 23.3%)。

表 1 分离自矿区植物根内和根际, 非根际土壤的菌株及其 16S rDNA PCR-RFLP 类型

Table 1 Strains isolated from plant root, rhizosphere and bulk soils in mine as determined by amplified rDNA restriction analysis

Strain*	Plant	Sample	16S rDNA PCR-RFLP pattern
9G3	<i>Leptochloa chinensis</i> (Linn.) Nees	Rhizosphere soil	1
11G5	<i>Dioscorea esculenta</i> (Lour.) Burkill	Rhizosphere soil	1
8F3	<i>L. chinensis</i> (Linn.) Nees	Bulk soil	2
12F1	<i>D. esculenta</i> (Lour.) Burkill	Bulk soil	2
10I1	<i>D. esculenta</i> (Lour.) Burkill	Plant Root	2
9I4	<i>L. chinensis</i> (Linn.) Nees	Plant Root	3
7F1	<i>L. chinensis</i> (Linn.) Nees	Bulk soil	4
3I2	<i>Conyza bonariensis</i> (Linn.) Cronq	Plant Root	5
10G5, 12G2, 12G3, 12G4	<i>D. esculenta</i> (Lour.) Burkill	Rhizosphere soil	5
12I1	<i>D. esculenta</i> (Lour.) Burkill	Plant Root	5
11F1	<i>D. esculenta</i> (Lour.) Burkill	Bulk soil	5
7F3	<i>L. chinensis</i> (Linn.) Nees	Bulk soil	6
2F3	<i>C. bonariensis</i> (Linn.) Cronq	Bulk soil	6
2G5	<i>C. bonariensis</i> (Linn.) Cronq	Rhizosphere soil	6
2G2	<i>C. bonariensis</i> (Linn.) Cronq	Rhizosphere soil	7
10F3, 12F4	<i>D. esculenta</i> (Lour.) Burkill	Bulk soil	8
8F1	<i>L. chinensis</i> (Linn.) Nees	Bulk soil	8
8G1, 8G2	<i>L. chinensis</i> (Linn.) Nees	Rhizosphere soil	8
7I2	<i>L. chinensis</i> (Linn.) Nees	Plant Root	8
3G3	<i>C. bonariensis</i> (Linn.) Cronq	Rhizosphere soil	8
11G4	<i>D. esculenta</i> (Lour.) Burkill	Rhizosphere soil	9
10I2	<i>D. esculenta</i> (Lour.) Burkill	Plant Root	9
7G1, 7G2, 8G4	<i>L. chinensis</i> (Linn.) Nees	Rhizosphere soil	9
7I3	<i>L. chinensis</i> (Linn.) Nees	Plant Root	9
1F3, 3F4	<i>C. bonariensis</i> (Linn.) Cronq	Bulk soil	9
10F2, 11F2	<i>D. esculenta</i> (Lour.) Burkill	Bulk soil	10
3I1	<i>C. bonariensis</i> (Linn.) Cronq	Plant Root	10
7I1	<i>L. chinensis</i> (Linn.) Nees	Plant Root	11
9F2	<i>L. chinensis</i> (Linn.) Nees	Bulk soil	12
1F2	<i>C. bonariensis</i> (Linn.) Cronq	Bulk soil	12
11F4	<i>D. esculenta</i> (Lour.) Burkill	Bulk soil	13
10I4	<i>D. esculenta</i> (Lour.) Burkill	Plant Root	13
12F3	<i>D. esculenta</i> (Lour.) Burkill	Bulk soil	14
11G2	<i>D. esculenta</i> (Lour.) Burkill	Rhizosphere soil	14
9F1	<i>L. chinensis</i> (Linn.) Nees	Bulk soil	14
9G2	<i>L. chinensis</i> (Linn.) Nees	Rhizosphere soil	14
2G4	<i>C. bonariensis</i> (Linn.) Cronq	Rhizosphere soil	14
3F3	<i>C. bonariensis</i> (Linn.) Cronq	Bulk soil	15
3G2	<i>C. bonariensis</i> (Linn.) Cronq	Rhizosphere soil	15
1I2	<i>C. bonariensis</i> (Linn.) Cronq	Plant Root	15
12F2	<i>D. esculenta</i> (Lour.) Burkill	Bulk soil	16
10G2, 10G4	<i>D. esculenta</i> (Lour.) Burkill	Rhizosphere soil	17
3F1, 3F2	<i>C. bonariensis</i> (Linn.) Cronq	Bulk soil	17
1I1, 3I3, 3I4	<i>C. bonariensis</i> (Linn.) Cronq	Plant Root	18
1G1, 1G2, 2G1	<i>C. bonariensis</i> (Linn.) Cronq	Rhizosphere soil	18

* Strains marked in bold were used for phylogenetic analysis as showed in Fig. 1.

2.2 ARDRA 多态性分析

研究表明, 通过选择合适的限制性内切酶并减

少酶的数量能够更有效地提高 ARDRA 分析的可靠性^[8], 而酶切位点为 4 bp 的限制性内切酶 *Rsa* I 具

有较好的酶切效果^[9-21],因此,本研究选取一种限制性内切酶 *Rsa* I 进行 ARDRA 分析。分别提取了 60 株细菌的总 DNA,PCR 扩增获得的 16S rDNA 片段大小约为 1.5 kb,限制性内切酶 *Rsa* I 酶切谱带较丰富。供试 60 株菌株在 60% 相似水平上可聚为 18 个 OTU,第 5,8,9 和 18 个 OTU 中分别包含的菌株数量为 7,7,8,6,占总菌数的 46.7%。OTU8 在 80% 水平上又可分为 2 个群。菌株 9I4,7F1,2G2,7I1,12F2 分别具有独立的 ARDRA 型,而菌株 11F4 和 10I4 在 60% 水平上聚为一群,但在 80% 水平上又可分为 2 个亚群。不同植物样品的可培养细菌类型存在差异,如 OTU18 主要分布在野塘蒿的根内和根际土壤中,OTU5 主要分布于山芋根际土中,OTU8 和 9 在千金子样品中分离较多。

多样性指数计算结果见表 2,3。三种植物样品从植物来源看,三种植物样品的可培养细菌 OTUs

香农-威纳指数和均匀度的差距较明显,甘薯样品的可培养细菌多样性更高一些。从可培养细菌的分布位置看,根内可培养细菌多样性最低。但是,各样品的丰富度和辛普森指数之间的差异不明显。

表 2 不同植物来源可培养细菌多样性指数

Table 2 Diversity index of cultural isolates from different plants

Plant	d	H	Evenness	D
<i>C. bonariensis</i> (Linn.) Cronq	3.613	0.663	0.614	0.868
<i>L. chinensis</i> (Linn.) Nees	3.530	0.902	0.866	0.855
<i>D. esculenta</i> (Lour.) Burkill	3.827	1.027	0.922	0.881

d was calculates as follows: $d = (S - 1) / \ln N$ where *S* is the total number of OTUs and *N* is the number of all cultural isolates. *H* was calculated as follows: $H = - \sum (p_i) (\log_2 p_i)$ where *p_i* is the frequency of the *i*th OTU. $P_i = N_i / N$ where *N_i* is the number of isolates in the *i*th OTU. Evenness (*E*) was calculated from *H* as follows: $E = H / H_{max}$, where $H_{max} = \log_2 (S)$. *D* was calculated as follows: $D = 1 - \sum (p_i)^2$. The scale for *D* ranges from 1 to *D_{max}*, where $D_{max} = 1 - 1/S$.

表 3 不同分布部位可培养细菌多样性指数

Table 3 Diversity index of cultural isolates from different sources

Diversity index	<i>C. bonariensis</i> (Linn.) Cronq			<i>L. chinensis</i> (Linn.) Nees			<i>D. esculenta</i> (Lour.) Burkill		
	Plant Root	Rhizosphere soil	Bulk soil	Plant Root	Rhizosphere soil	Bulk soil	Plant Root	Rhizosphere soil	Bulk soil
H	0.539	0.724	0.672	0.602	0.640	0.778	0.602	0.619	0.887
Evenness	0.517	0.695	0.645	0.578	0.614	0.747	0.557	0.573	0.821

2.3 系统发育关系分析

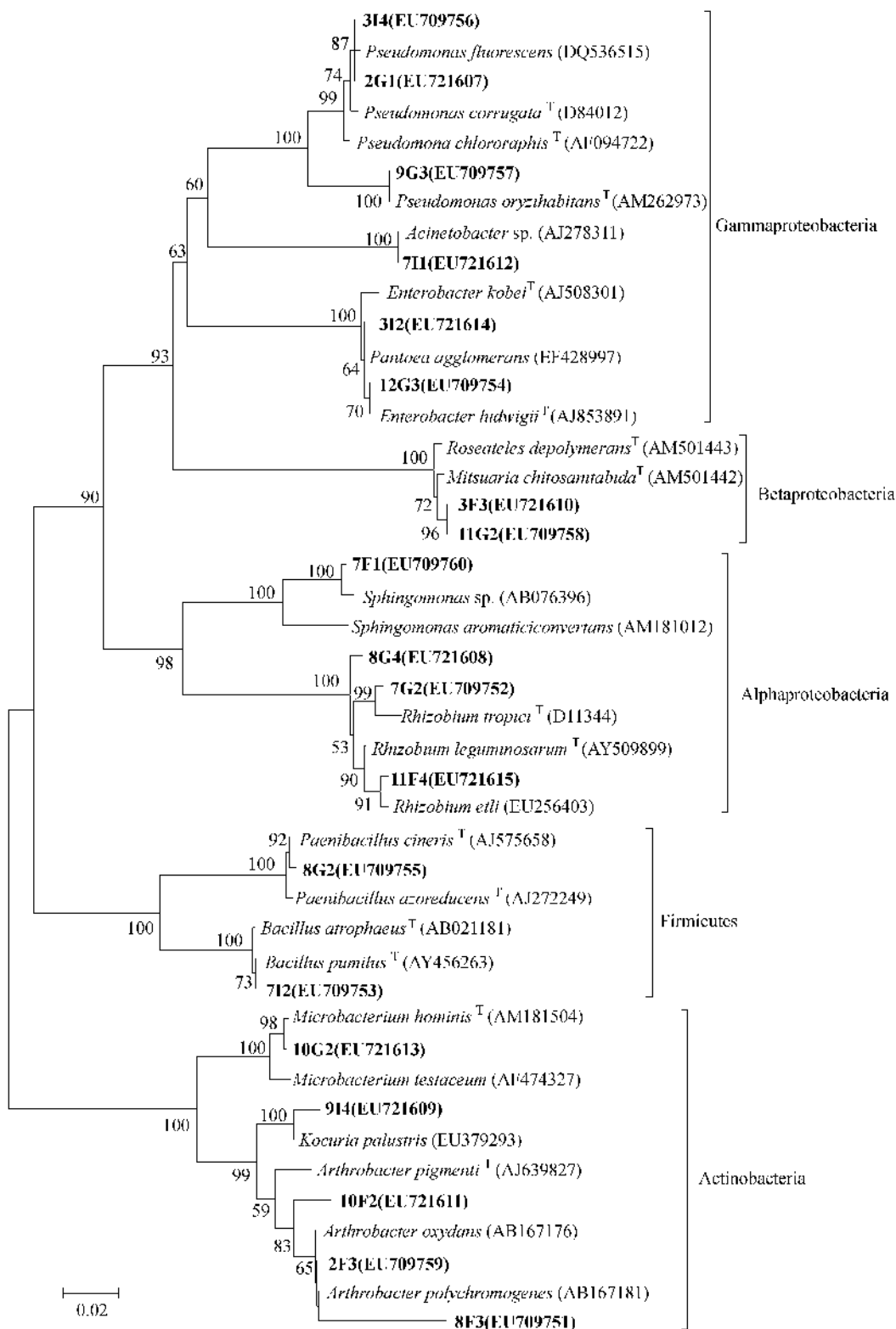
根据 ARDRA 多态性聚类结果,本研究挑选了各 OTU 的代表菌株进行 16S rDNA 部分序列的测定,并与 Genbank 数据库中的序列进行相似性比对,选取亲缘关系较近的菌种经 MEGA4.0 软件对 16S rDNA 序列进行 Neighbor-joining 法构建系统发育树,结果见图 1。本研究中 19 株细菌分属于细菌域的三大系统发育类群:变形菌门 (α -, β -, γ -Proteobacteria),厚壁菌门 (Firmicutes),放线菌门 (Actinobacteria),包括 11 个属:根瘤菌属 (*Rhizobium*),假单胞菌属 (*Pseudomonas*),泛菌属 (*Pantoea*),节杆菌属 (*Arthrobacter*),微杆菌属 (*Microbacterium*),芽孢杆菌属 (*Bacillus*),类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*),不动杆菌属 (*Acinetobacter*),鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*) 以及 *Kocuria* 和 *Mitsuaria*。

供试 19 株可培养细菌中有 12 株细菌属于变形菌门 (proteobacteria),其中 4 株属于 α -变形菌门 (α -proteobacteria) (21.1%); 2 株属于 β -变形菌门 (β -proteobacteria) (10.5%); 6 株属于 γ -变形菌门 (γ -proteobacteria) (31.6%)。5 株菌株属于放线菌门

(Actinobacteria) (26.3%), 2 株属于厚壁菌门 (Firmicutes) (10.5%)。由此可见,变形菌门 (proteobacteria) 细菌在该矿区可培养细菌中占优势。其中,假单胞菌属 (*Pseudomonas*),泛菌属 (*Pantoea*) 和根瘤菌属 (*Rhizobium*) 细菌的数量明显多于其他属菌株,成为优势种群。其他细菌,如节杆菌属 (*Arthrobacter*),微杆菌属 (*Microbacterium*),芽孢杆菌属 (*Bacillus*),类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*) 和 *Mitsuaria* 也有一定数量的分布。而鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*),不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 以及 *Kocuria* 则属于稀少种群。

3 讨论

许多研究者认为多金属矿山矿物的分解,有害重金属元素的释放,迁移及其沉淀和富集,都与植物,微生物活动密切相关^[22],而植物根际是土壤—植物生态系统物质交换的活跃界面,根际中细菌种类丰富,细菌群落与矿物,植物根系关系密切,共同影响矿物的风化及土壤的形成^[23]。本研究采用稀释培养法从南京小龙山废矿区生长的植物根际,非根际土壤和根内共分离到 60 株具不同菌落形态的



19 株细菌及其从 GenBank 数据库中相关种属细菌的 16s rDNA 序列为基础的系统发育树

Fig.1 Neighbor-Joining tree constructed showing the phylogenetic relationships among 16S rDNA sequences obtained from the isolates randomly selected and their closely related sequences downloaded from GenBank etc. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. Numbers at nodes indicate the bootstrap values (> 50%) based on neighbour-joining analyses of 1000 resampled datasets. The scale bar indicates the 0.02 evolutionary distance unit.

细菌, 扩增性 rDNA 限制性多态性分析 (ARDRA) 表明分离到的菌株在 60% 水平上可分为 18 个 OTU

(operational taxonomic unit), 16S rDNA 序列分析的 19 株可培养细菌归属于 3 个系统发育群, 10 个科, 11

个属,存在较丰富的微生物多样性,为进一步筛选高效矿物分解细菌,研究微生物—矿物—植物相互作用等提供了菌种资源。

从分离到的菌株来源看,各植物样品中可培养细菌的多样性是不均一的,矿区野生植物野塘蒿,千金子的根际细菌数量少于栽培植物甘薯的根际细菌数量,多样性指数分析表明甘薯根际的细菌区系最丰富。野塘蒿根内和根际土壤分离细菌多属于 OTU18,以假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 为主,千金子分离细菌归于 OTU8 和 OTU9,为芽孢杆菌属 (*Bacillus*),类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*)和根瘤菌属 (*Rhizobium*)。变形菌门 (proteobacteria)细菌成为优势种群,占 63.2%,而且假单胞菌属 (*Pseudomonas*)和根瘤菌属 (*Rhizobium*)细菌的数量明显多于其它种属,芽孢杆菌属 (*Bacillus*)和类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*)细菌也是分布广泛的种群。湛方栋等^[24]认为假单胞菌和芽孢杆菌为土壤典型的发酵型微生物,它们对环境条件变化反应迅速,生长很快,广泛存在于土壤中。我们认为矿区内由于人为开采使得植被受到破坏,土壤贫瘠状况随之提高,根瘤菌属 (*Rhizobium*)因能够固定大气中的氮气,提供自身及植物生长所需氮素,因此大量存在于根际土壤,成为了优势菌群。Puente 等^[25]研究也发现假单胞菌属 (*Pseudomonas*)和根瘤菌属 (*Rhizobium*)细菌能够有效的风化硅酸盐矿物。在采样过程中我们发现矿区附近农田广泛种植甘薯,杂草少见,农业耕作频繁,这可能是甘薯根际微生物的数量和多样性较高的原因。但是,三种植物根际细菌的丰富度并没有差异。分离的可培养细菌的数量及多样性与矿区土壤肥力,结构,植物种类的关系,是否受到矿区土壤有害重金属元素的影响以及与矿物分解的关系等还需要进一步深入研究。

由于运用可培养法获得的微生物种类在土壤微生物中只占有极小的一部分,只有将可培养与未培养方法结合起来才能真正反映微生物的多样性^[26-27]。因此,有必要应用现代分子生态学技术和多相分类系统,深入探究矿区微生物多样性,并结合植物学,土壤学,矿物学研究手段,阐明微生物多样性与植物种类,代谢产物以及与矿物风化之间的相互关系,对矿物生物风化,土壤形成理论和污染物高效修复技术等具有深远意义。

参考文献

- [1] Banfield JF, Barker WW, Welch SA, et al. Biological impact on mineral dissolution: Application of the lichen model to understanding mineral weathering in the rhizosphere. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96: 3404 – 3411.
- [2] Barker WW, Welch SA, Chu S, et al. Experimental observations of the effects of bacteria on aluminosilicate weathering. *American Mineralogist*, 1998, 83: 1551 – 1563.
- [3] 李莎,李福春,程良娟. 生物风化作用研究进展. *矿产与地质 (Mineral Resources and Geology)*, 2006, 20 (6): 577 – 582.
- [4] 占新华,蒋延惠,徐阳春,等. 微生物制剂促进植物生长机理的研究进展. *植物营养与肥科学报 (Plant Nutrition and Fertilizer Science)*, 1999, 5 (2): 97 – 105.
- [5] Sheng XF. Growth promotion and increased potassium uptake of cotton and rape by a potassium releasing strain of *Bacillus edaphicus*. *Soil Biology and Biochemistry*, 2005, 37, 1918 – 1922.
- [6] Calvaruso C, Turpault MP, Frey-Klett P. Root-associated bacteria contribute to mineral weathering and to mineral nutrition in trees: a budgeting analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72 (2), 1258 – 1266.
- [7] Harley AD, Gilkes RJ. Factors influencing the release of plant nutrient elements from silicate rock powders: a geochemical overview. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 2000, 56: 11 – 36.
- [8] 陆雅海,张福锁. 根际微生物研究进展. *土壤 (Soils)*, 2006, 38 (2): 113 – 121.
- [9] 陈骏,姚素平. 地质微生物学及其发展方向. *高校地质学报 (Geological Journal of China Universities)*, 2005, 11 (2): 154 – 166.
- [10] 荣兴民,黄巧云,陈雯莉,等. 土壤矿物与微生物相互作用的机理及其环境效应. *生态学报 (Acta Ecologica Sinica)*, 2008, 28 (4): 376 – 387.
- [11] 叶姜瑜,罗固源. 微生物可培养性低的生态学释因与对策. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2005, 45 (3): 181 – 185.
- [12] 陈义光,李汇明,李沁元,等. 一平浪盐矿古老岩盐沉积中可培养细菌的系统发育多样性研究. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2007, 47 (4): 571 – 577.
- [13] Laguerre G, Allard M, Revoy F. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60 (1): 56 – 63.
- [14] Courchesne F, Gobran GR. Mineralogical variations of bulk and rhizosphere soils from a Norway spruce stand. *Soil Science Society of America Journal*, 1997, 61: 1245 – 1249.

- [15] 袁天英, 杨江科, 张伟涛, 等. 我国主要生态区域绿豆慢生根瘤菌的遗传多样性和系统发育研究. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2006, 46 (6): 869 – 874.
- [16] 张庆, 陈立伟, 胡江, 等. 两种苯甲酸处理系统细菌群落结构的 ARDRA 分析. 环境科学与技术 (*Environmental Science and Technology*), 2005, 28 (3): 43 – 45, 56.
- [17] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24: 1596 – 1599.
- [18] 宋志刚, 许强芝, 鲁心安, 等. 中国东海海洋微生物种群多样性初步研究. 微生物学通报 (*Microbiology*), 2006, 33 (1): 36 – 40.
- [19] 吴展才, 余旭胜, 徐源泰. 采用分子生物学技术分析不同施肥土壤中细菌多样性. 中国农业科学 (*Scientia Agricultura Sinica*), 2005, 38 (12): 2474 – 2480.
- [20] Moyer CL, Tiedje JM, Dobbs FC. A computer-simulated restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial small-subunit rRNA genes: efficacy of selected tetrameric restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62: 2501 – 2507.
- [21] 刘婷, 陈朱蕾, 曹丽, 等. 16S rDNA – RFLP 分析六氯苯好氧降解菌群的结构及其多样性. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2006, 46 (5): 758 – 762.
- [22] 陆建军, 陆现彩, 王睿勇, 等. 多金属矿山环境中矿物的微生物分解及环境效应研究进展. 高校地质学报 (*Geological Journal of China Universities*), 2007, 13 (4): 621 – 629.
- [23] Kent AD, Triplett EW. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annual Review of Microbiology*, 2002, 56: 211 – 236.
- [24] 湛方栋, 陆引罡, 美国经, 等. 烤烟根际微生物群落结构及其动态变化的研究. 土壤学报 (*Acta Pedologica Sinica*), 2005, 42 (3): 488 – 494.
- [25] Puente ME, Bashan Y, Li CY, et al. Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. I. Root colonization and weathering of igneous rocks. *Plant Biology*. 2004, 6: 629 – 642.
- [26] 徐艳霞, 王光华, 金剑, 等. 大豆根际未培养与培养细菌群落结构差异比较研究. 大豆科学 (*Soybean Science*), 2007, 26 (6): 907 – 913.
- [27] 钟文辉, 蔡祖聪. 土壤微生物多样性研究方法. 应用生态学报 (*Chinese Journal of Applied Ecology*), 2004, 15 (5): 899 – 904.

Genetic diversity of cultivable bacteria of dominant plants in a potassium mine tailing of Nanjing

Jing Wang, Xiafang Sheng, Jianfang Cao, Shukui Zhang, Yin Zhang, Linyan He*

College of Life Science, Nanjing Agriculture University, Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Nanjing 210095, China)

Abstract [Objective] Plant rhizosphere bacteria play an important role in biogeochemical cycles. Microbial diversity of cultivable bacteria from soil-plant-mineral system in a mine tailing was assessed. [Methods] Cultivable bacteria were isolated by plating and screening from plant root, rhizosphere and bulk soils of predominant plants in a mine tailing of Nanjing, Jiangsu Province. Phylogenetic analyse based on 16S rDNA sequence comparisons and amplified rDNA restriction analysis of isolates were investigated. [Results] In total, 60 pure cultures were isolated; they could be grouped into 18 different operational taxonomic units (OTU) at the similarity level of 60%. Nineteen bacterial strains belonged to eleven genera (*Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Acinetobacter*, *Sphingomonas*, *Kocuria*, *Mitsuaria*) of three major phylogenetic groups (Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes). *Rhizobium*, *Pseudomonas* and *Pantoea* were the dominant groups. [Conclusion] Different cultivable bacteria inhabited in roots and soils of dominant plants in the mine tailing. They might play a certain role in the soil-plant-mineral environment.

Keywords: mine; cultivable bacteria; genetic diversity

(本文责编: 王晋芳)

Supported by the Natural Science Foundation of China (90400006)

* Corresponding author. Tel: +86-25-84395125; E-mail: helyan0794@njau.edu.cn

Received: 31 December 2008/ Revised: 20 March 2009