

DOI: 10.13376/j.cblls/2014149

文章编号: 1004-0374(2014)10-1038-08

## 胶质类芽孢杆菌功能及基因组学研究进展

马鸣超, 姜昕, 李力, 李俊\*

(中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 农业部微生物产品质量安全风险评估实验室(北京), 北京 100081)

**摘要:** 胶质类芽孢杆菌 (*Paenibacillus mucilaginosus*) 因其具有多功能、强抗逆等特点而成为微生物肥料的首选菌种, 它在农业生产中表现出提高土壤速效钾与速效磷含量、促进作物生长、提高作物产量和品质等多方面的效应, 一直是研究的重点和热点。首次从 *P. mucilaginosus* 的系统发育地位及快速检测技术、生物学功能、基因组学研究进展等方面进行综述, 以期进一步拓宽对该细菌生物学特征及其功能的认识, 推动其在生态农业中的应用。

**关键词:** 胶质类芽孢杆菌; 系统发生; 生物学功能; 基因组学

**中图分类号:** Q93; S182 **文献标志码:** A

## Function and genomics of *Paenibacillus mucilaginosus*

MA Ming-Chao, JIANG Xin, LI Li, LI Jun\*

(Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Microbial Products (Beijing), Ministry of Agriculture, Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** *Paenibacillus mucilaginosus*, a production strain of microbial fertilizers, had attracted considerable attention of researchers due to its growth-promoting properties of crops, such as releasing mobile nutritional ions, dissolving K, P and other beneficial elements. This review summarized its phylogenetic position, morphological characteristics, rapid detection technology, biological functions and genomics research. The results would broaden the understanding on biological functions of *P. mucilaginosus* and be meaningful to solve the problems in the applications.

**Key words:** *P. mucilaginosus*; phylogene; biological functions; genomics

胶质类芽孢杆菌 (*P. mucilaginosus*), 又名胶冻样类芽孢杆菌, 是类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*) 中的一个重要菌种。因它能够分解硅酸盐和铝硅酸盐组成的含钾矿物, 释放出钾离子而俗称为硅酸盐细菌。目前所说的硅酸盐细菌还包括土壤类芽孢杆菌 (*Paenibacillus edaphicus*) 和环状芽孢杆菌 (*Bacillus circulans*)。进一步研究发现, *P. mucilaginosus* 还能活化磷元素和其他营养元素, 并通过其菌体自身代谢产生有机酸、氨基酸、激素等物质促进植物的生长, 改善植物营养及生长条件, 同时产生胞外多糖, 具有增强植物非特异性免疫能力的作用, 有些菌株还具备固氮的功能<sup>[1-3]</sup>。同时, 该菌种通过产大量荚膜和胞外多糖, 能在不同的环境条件下生长繁殖, 其具备的多功能、强抗逆等特点使之成为近几年微

生物肥料的首选菌种。据统计, 全国约有 20 多个省 (区) 30 多种作物, 近 57 万  $\text{hm}^2$  耕地上使用该菌种制成的微生物肥料, 并在农业生产中表现出提高土壤速效钾与速效磷含量、促进作物生长、提高作物产量和品质等多方面的效应, 是微生物肥料研发的重点和热点之一<sup>[4-5]</sup>。此外, 在采矿、冶金、饲料工业领域也有着广阔的应用。

近年来, 随着 *P. mucilaginosus* 受到越来越广

收稿日期: 2014-04-24; 修回日期: 2014-06-04

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31200388); 国家高技术研究发展计划 (“863” 计划) (2013AA102802-04); 中央级公益性科研院所专项资金资助项目 (IARRP-2014-4)

\*通信作者: E-mail: jli@caas.ac.cn

泛的关注, 其研究也取得了许多重要进展。本文通过对其系统发育地位、生物学功能及作用机理方面的综述, 并在结合本课题组近几年研究成果的基础上, 阐述了其在基因组学方面的最新研究进展及针对该菌种建立的快速检测技术, 对进一步拓宽该菌种的认识和应用, 解决实践中的应用问题, 具有重要的理论价值。

## 1 胶质类芽孢杆菌的分类地位及快速检测

### 1.1 该菌系统发育地位的确定

长期以来, 国内外学者对 *P. mucilaginosus* 分类地位的归属争议较大。1939年, 原苏联学者 Aleksandrov 从土壤中分离出一种细菌, 能分解正长石和磷灰石而释放出磷钾, 称之为硅酸盐细菌; 并于1950年从岩石中分离出一株产黏液的硅酸盐细菌, 定名为胶质芽孢杆菌硅酸盐亚种 (*Bacillus mucilaginosus* sub sp. *siliceus*)。1967年, Aleksandrov 通过形态学鉴定第一次提出了胶质芽孢杆菌。1986年, 俄国学者 Avakyan 等<sup>[6]</sup>通过对硅酸盐细菌亚种进行形态学及生理生化特性的研究, 将之定名为胶质芽孢杆菌新种 (*Bacillus mucilaginosus* sp. nov.)。该菌的特征为: 在硅酸盐细菌固体培养基上形成无色透明隆起, 如半粒玻璃珠状的菌落, 用接种环挑起可拉成丝。显微镜下, 菌体呈粗长杆状, 包有椭圆形肥大荚膜, 可形成粗大椭圆形的芽孢。*P. mucilaginosus* 一般好氧或兼性厌氧生长, 最适生长温度在 28~30 °C, 最适 pH 为 7.0~8.0, pH 低于 5.0 或高于 8.5 均不能生长。V-P 反应、甲基红、氧化酶、柠檬酸盐利用和卵磷脂酶反应阴性, 能使明胶液化, 使石蕊退色, 使牛奶酪化, 产生吡啶。

1997年, Shelobolina 等<sup>[7]</sup>通过对胶质芽孢杆菌的 11 个菌株的生理生化实验、脂肪酸组成分析、DNA 同源性分析及 16S rDNA 序列分析等, 支持 Avakyan 将此类菌定名为胶质芽孢杆菌 (*B. mucilaginosus*)。1998年, 该菌名在国际细菌分类权威学报《国际系统细菌学杂志》(*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*) 发表生效<sup>[8]</sup>。随后, 很多学者提出, 该菌种因其芽孢成熟后膨大但不形成梭形, 又与类芽孢杆菌近源, 认为此类细菌是介于芽孢杆菌属和类芽孢杆菌属之间的过渡型菌种。直到 2010年, Hu 等<sup>[9]</sup>通过对胶质芽孢杆菌的 7 个菌株以及 *B. edaphicus* VKPM B-7517<sup>T</sup> 进行生理生化实验、DNA G+C 含量分析、DNA-DNA 同源性比较及基于 16S rDNA 和 *gyr B*

基因的系统发育分析, 将胶质芽孢杆菌归为类芽孢杆菌属, 并更名为胶质类芽孢杆菌 (*Paenibacillus mucilaginosus* comb. nov.)。至此, *P. mucilaginosus* 的分类地位最终被确定。

### 1.2 该菌快速检测技术的建立

*P. mucilaginosus* 作为微生物肥料产品中的重要功能菌, 如何准确快速鉴别对优良菌株筛选和产品检测至关重要。常用的检测方法是根据检测菌种的形态学或生理生化特征进行初步判断, 再结合某种合适的分子生物学手段进行鉴定分析。然而, *P. mucilaginosus* 与土壤类芽孢杆菌 (*P. edaphicus*) 是近源菌, 两者具有极其相似的菌体形态和菌落特征, 生理生化性质也很相近, 因此用传统的微生物检测方法很难将两者分开。基于 16S rDNA、*gyrB* 基因等保守序列的系统发育学分析方法能够准确地鉴定 *P. mucilaginosus*<sup>[9]</sup>, 但需要大量测序, 过程繁琐且花费较高, 在大批量菌株的鉴定中并不适用。特异 PCR 检测技术具有特异性强、敏感度高、快速灵敏的优点, 利用该技术进行 *P. mucilaginosus* 的分类鉴定比起其他的检测方法更加简便省时, 并且避免了大量测序, 节省检测成本。

Wu 等<sup>[2]</sup>首先建立了 *gyrB* 靶基因的 PCR 快速检测技术, 获得特异性引物 F2 (5'-ACG GAT ATC TCC CAG ACG TTC AT-3') 和 R5 (5'-ACG GGC ACG CTG CGC CTG TAC G-3')。该方法能特异性扩增 519 bp 的保守序列, 适用于环境样品中目标菌群的大尺度筛选和鉴定。本实验室王璇等<sup>[10]</sup>选择 *P. mucilaginosus* 特异性片段为靶基因, 设计特异性引物, 通过 PCR 条件的优化和特异性、灵敏度的验证, 筛选得到一对 *P. mucilaginosus* 的特异引物 (orf-06701-F: 5'-ATG GAG GAA ACA TGG GGT GA-3'; orf06701-R: 5'-TCA GGA ATG AAG GCC CCC TT-3'), 建立了 *P. mucilaginosus* 快速鉴别方法。研究表明, 该引物仅能在以 *P. mucilaginosus* 为模板时特异性扩增 333 bp 的保守序列, 为基因间非编码序列, 其检出灵敏度为每微升反应体系 400~1 000 个细胞; 同时, 用该方法成功地鉴定了从土壤中分离得到的 *P. mucilaginosus*, 并且得到的特异性片段序列同源性达到 100%。该方法既适用于大量纯培养分离物的鉴定, 又适用于土壤、水体等环境样品中痕量目的菌群以及微生物肥料中功能菌株的检测。

## 2 胶质类芽孢杆菌的多种生物学功能及初步机理

近年来, 国内外许多学者对 *P. mucilaginosus*

的功能进行了大量的研究,证实了该菌具有解钾、溶磷、固氮、促生、抗病、吸附等多种功能,并开展了相关的机理研究。

## 2.1 解钾功能

*P. mucilaginosus* 作为能改善作物钾素营养的微生物肥料生产菌种,其解钾效果及机理也一直是研究的重点和热点。自 20 世纪 60 年代,陈廷伟等就开始对硅酸盐细菌的生理形态及其对磷钾矿物的分解能力进行研究。盛下放和冯阳<sup>[11]</sup>以及赵艳等<sup>[12]</sup>的研究也分别证明了硅酸盐细菌显著的解钾能力,通常比对照增加 84%~139%,其解钾效果已得到充分肯定。近年来,本课题组从植物根际土壤中筛选了十余株高效解钾菌株,其中以 *P. mucilaginosus* 3016 解钾效果最为显著<sup>[10, 13-14]</sup>。

尽管肯定了其解钾功能,但对其解钾的机理争议较大。目前关于 *P. mucilaginosus* 分解硅酸盐矿物并释放出其中钾素的机理有多种假说,主要集中在酸解、酶解、荚膜胞外多糖形成、细菌-矿物中复合物形成等方面。Rožanova<sup>[15]</sup>认为硅酸盐细菌在生长过程中产生的胞外多糖或有机酸是导致硅酸盐细菌分解硅酸盐矿物解钾的原因。盛下放和冯阳<sup>[11]</sup>通过研究认为该菌的解钾作用是产生的有机酸、氨基酸的酸溶解以及有机酸、氨基酸与多糖的络合作用共同作用的结果。刘五星等<sup>[16]</sup>也通过实验认为胶质芽孢杆菌的解钾能力可能会与其独特的荚膜多糖结构和产生的小分子有机酸有关。Basak 和 Biswas<sup>[3]</sup>研究发现接种胶质芽孢杆菌后,由于其对云母的解钾作用,样品中速效钾含量比对照显著增加,然后他们通过 X-射线衍射研究分析了钾释放动力学。胡星等<sup>[17]</sup>认为多糖通过其黏结作用使矿物颗粒与细胞物质团聚在一起,进而形成细菌-矿物复合物,促使细菌细胞和矿物颗粒进一步接触,更有利于钾离子等矿物离子的释放和矿物颗粒的风化。也有学者认为其与矿物接触并产生特殊的酶,从而破坏矿物的结晶结构。

但无论哪种假说,其最终都是通过矿物颗粒崩解、晶格破坏,从而释放出  $\text{SiO}_2$ 、K 等离子,只是造成矿物颗粒崩解、晶格破坏的成因不同。实际上,虽然 *P. mucilaginosus* 能够产生有机酸等物质,且多糖分子中也含有 -COOH 官能团,但单一的酶解、酸解都不足以分解连硫酸和盐酸都分解不了的坚固的钾长石,因此,必须有强酸性的微环境,促进土壤矿物的分解,这种微环境的形成应该是通过多糖的包裹、产酸、产酶等综合作用的结果,从而形成

细菌-矿物复合物,破坏矿物的晶格,促使  $\text{SiO}_2$ 、K 等离子的释放。综合目前研究进展,对胶质芽孢杆菌分解矿物的机理可以初步归纳为:(1) *P. mucilaginosus* 通过自身生理代谢分泌大量的胞外多糖,黏稠的多糖将钾矿石等土壤矿物包裹;(2) 土壤矿物在细菌及其代谢产物的侵蚀下逐渐崩解成更小的颗粒,继而被细菌胞外多糖包裹形成细菌-矿物复合物;(3) 细菌在发酵增殖过程中产生小分子有机酸,被细菌-矿物复合物中的荚膜多糖强烈地络合,从而使得复合物微环境逐渐发生改变,局部形成一个高浓度的酸性区域,使土壤矿物发生分解;(4) 随着土壤矿物发生分解,  $\text{SiO}_2$  与荚膜多糖发生络合,从而降低游离的  $\text{SiO}_2$  浓度,打破矿物溶解与结晶过程中暂时的动态平衡,促进矿物降解,从而释放出被矿物晶格包围的  $\text{SiO}_2$ 、K 等离子。

## 2.2 溶磷功能

土壤里约 95% 的磷以难溶的矿物态存在,可溶性磷肥施入土壤后大部分很快发生专性吸附和化学沉淀固定,转变成植物难以吸收利用的无机态磷。由于 *P. mucilaginosus* 能分解无机磷矿物,故能释放出难溶的磷营养元素供给作物吸收<sup>[18]</sup>。王思远<sup>[19]</sup>研究了该菌种与化肥配施对烤烟和土壤的综合效应,结果表明施用该菌种,能明显地促进土壤养分的转化,其中磷的转化效果比对照高 10.3%~28.0%,并能明显地促进烟株的生长发育。李玉梅等<sup>[20]</sup>通过土壤培养和液体培养,研究了不同磷水平对硅酸盐细菌溶磷能力的影响。结果表明,液体培养中磷矿粉含量 0.1% 时,生物释磷率最大为 32.0%;随添加磷矿粉含量的增加,硅酸盐细菌溶磷有降低趋势。谌书等<sup>[21]</sup>研究了硅酸盐细菌对磷矿石的风化作用,结果表明,硅酸盐细菌对磷矿石的风化作用源自细菌生长导致的机械破坏作用、胞外分泌物的生化降解作用以及多种因素之间的协同作用。

溶磷过程主要通过两个途径,一是解磷细菌促进土壤中无机磷酸盐的溶解;二是促进土壤中有机磷的分解释放。目前对胶质类芽孢杆菌的溶磷机理相关研究很少。已知其他土壤微生物的溶磷机制有多种方式:(1) 代谢过程中分泌的各种有机酸,通过质子化、络合溶解等作用促进土壤难溶态磷的溶解释放,也可与 Ca、Mg、Fe、Al 等元素进行螯合作用,从而减少可固定磷酸根的阳离子,增加土壤磷酸根离子的活性;(2) 释放  $\text{H}_2\text{S}$ , 与磷酸铁作用产生磷酸亚铁和可溶性正磷酸盐离子;(3) 分解植物残体,产生胡敏酸和富里酸,这两种酸能与复合磷

酸盐中的钙、铁或铝螯合, 或与其形成可溶性的复合物, 使土壤无效态磷变为有效态磷; (4) 通过呼吸作用释放出  $\text{CO}_2$ , 溶于水后生成碳酸, 降低周围环境中的 pH 值, 引起磷酸盐的降解。

已知磷酸盐调节子 PhoA 和 PhoB 因子在溶磷过程中起到重要作用。通常在 *phoB* 的启动下, 细菌细胞可以吞噬有机酯中的无机磷, 并加快所吞噬 Pi 的透膜运输, 以此来充当磷饥饿拯救系统。该代谢过程中涉及的另一重要的基因为 *phoA*, 其编码碱性磷酸酶, 当菌株处于磷酸盐饥饿状态时, 其启动子及信号肽序列将指导合成大量的碱性磷酸酶并分泌到细胞的周质空间。Goldstein 和 Liu<sup>[22]</sup> 从草生欧文氏菌 (*Erwinia herbicola*) 中筛选分离并克隆了 PQQ (吡咯奎啉醌) 合成基因 (*pqqE*)。该基因属诱导型基因, 编码 GDH 途径中葡萄糖脱氢还原酶的辅酶, 在细菌利用葡萄糖并产酸的过程中起关键作用, 可以促进细菌对无机磷的溶解作用, 具有溶解无机磷的功能。谌书等<sup>[23]</sup> 利用蛋白质双向电泳技术, 初步研究了胶质芽孢杆菌在磷矿石风化过程中菌体蛋白质组的变化, 认为这些变化的蛋白质点与细胞的代谢调控、细胞激活、分化、增生以及信号转导通路等有关。目前已克隆的有关促进无机磷溶解的基因大多与细菌产酸有直接关系或起调节作用, 而其他种类的无机磷溶解基因报道较少。

### 2.3 固氮功能

通常来说, 固氮生物之所以能够固定空气中分子态氮素, 转化为可供有机体利用的化合态的氨, 是通过固氮酶来完成的。固氮酶由两个组分构成, 一个组分是钼铁蛋白即固氮酶 (二氮酶), 另一个是铁蛋白, 又称为固氮酶还原酶 (二氮酶还原酶)。固氮酶的这两种蛋白在单独存在时都不呈现固氮酶活性, 只有两者加合在一起形成复合体后, 才具有催化氮还原成氨的能力<sup>[24]</sup>。固氮酶系统本身是细菌体内氮代谢的重要组成部分, 所以固氮基因的表达除了受其本身的操纵子 *nif LA* 的调节以外, 还受到氮调节 *ntr* 以及 *gln* 系统的调节, 系统之间相互协调发生作用。NifA 作为正调控因子, 在转录水平上通过与 RNA 聚合酶  $\delta^{54}$  因子互作, 从而激活其他所有 *nif* 基因的表达; 而 NifL 蛋白作为负调控因子, 其表达产物可以通过与 *nifA* 基因的表达产物结合, 从而抑制 *nif* 基因的表达。由于固氮过程是一个高需能过程以及固氮酶对氧的高度敏感, 所以 NifA 蛋白的调节活性通过与阻遏蛋白 NifL 的结合受到外界氧和结合态氮的严格调节, 这种调节可能是

通过蛋白与蛋白直接接触的方式进行的<sup>[24]</sup>。*ntr* 系统由 *ntrA*、*ntrB* 和 *ntrC* 等 3 个基因组成, 其中 *ntrA* 是  $\delta^{54}$  蛋白因子的结构基因 (即 RpoN), *ntrB* 和 *ntrC* 是 *ntr* 系统表达的活化因子, 目前对 *ntr* 氮调控系统的报道相对较多<sup>[25-27]</sup>。*gln* 系统由 *glnA*、*glnB*、*glnD* 和 *glnE* 等 4 个基因组成, 其中 *glnA* 是谷氨酰胺合成酶的结构基因, *glnB* 编码 PII 调控蛋白, *glnD* 和 *glnE* 分别编码尿苷转移酶和腺苷转移酶<sup>[28]</sup>。目前, *nifJC*、*nifHDKTY*、*nifENX*、*nifUSVW*、*nifZM*、*nifF*、*nifLA* 和 *nifBQ* 等转录单位大部分基因所编码的蛋白质产物已被分离, 功能已被确定。

但是, 目前对于 *P. mucilaginosus* 固氮能力的研究认可不一, 并且在分子水平上缺乏理论支持。*P. mucilaginosus* 能够固氮的最直接证据为该细菌可在完全无氮的培养基上生长良好, 并且不适应高氮培养生长条件。本课题组对 *P. mucilaginosus* 3016 固氮特性进行了研究, 采用凯氏定氮法测定两种不同培养条件下发酵液中总氮素的含量。结果发现, 与空白对照相比, 接入菌株 3016 的总氮含量分别提高了 12.53% 和 10.85%, 表现出一定的固氮能力。同时采用  $^{15}\text{N}$  标准同位素标记法发现, 菌株 3016 的硅酸盐细菌培养基和改良 ACCC55 培养基的  $^{15}\text{N}$  丰度比对照组分别提高了 15.45% 和 36.95%, 证实菌株 3016 可以固定大气中的  $\text{N}_2$ , 并且在含氮的环境下有利于其生长。但在现有实验条件下, 未检测到菌株 3016 的固氮酶活性, 同时根据 3016 全基因组测序结果, 其基因组中不具备编码固氮酶的全套基因。菌株 *P. mucilaginosus* KNP414 也发现同样的问题<sup>[29]</sup>。上述结果的矛盾, 推测可能是由于在菌株大量的未知及假设功能的基因中, 具有某种未验证的固氮功能基因, 但需进一步验证。

### 2.4 促生及抗病功能

国内外学者在对 *P. mucilaginosus* 的研究中发现, 此种细菌有刺激作物生长和抑制作物病害作用, 有的菌株能产生抗生素, 甚至不止一种抗生素, 能限制多种病原菌如致病性镰刀菌、腐霉菌、立枯丝核菌所引起的许多病害。刘荣昌<sup>[30]</sup> 通过对 *P. mucilaginosus* HM8841 菌株进行盆栽实验研究发现, 该菌纯培养液对棉花黄、枯萎病和禾谷类茎腐病等有明显抑制作用; 蒋先军等<sup>[31]</sup> 发现该类细菌多个菌株对植物生长具有刺激作用, 其发酵代谢产物中含有较高浓度的植物激素; 刘光焯等<sup>[32]</sup> 从紫色土壤中分离筛选出具有释钾、拮抗双重活性的硅酸盐细菌菌株, 发现其发酵液具有抑菌作用, 经核磁共

振波谱、红外光谱和质谱分析表明抗生物质为多羟基黄酮类化合物；盛下放和冯阳<sup>[11]</sup>的研究表明，硅酸盐细菌能合成多种有机酸和植物激素，促进植物生长。因此，可以考虑将 *P. mucilagenosus* 看做一类促进植物生长的根际细菌，即 PGPR 菌株，应用 PGPR 理论研究硅酸盐细菌对植物生长的作用、对植物病害和病原菌的抑制作用及其对植物抗逆性的影响很有意义。

### 2.5 吸附功能

*P. mucilagenosus* 因多糖产量较高，具有较强的吸附能力，且具有无毒性、污染小、pH 适用范围宽以及絮凝效果好和成本低等特点，其作为絮凝剂在废水处理等领域显示了较大的潜力。这些多糖类絮凝物质与蛋白质类、糖蛋白类或核酸类的微生物絮凝剂相比具有更高的热稳定性。这种多糖类絮凝物质的絮凝机制可能涉及化学键以及电荷中和等<sup>[33-34]</sup>。夏彬彬等<sup>[35]</sup>研究了 *P. mucilagenosus* 对  $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  的生物吸附性能，结果显示该菌最大  $\text{Cd}^{2+}$  耐受浓度为 100 mg/L，最大  $\text{Zn}^{2+}$  耐受浓度为 100~110 mg/L。代淑娟等<sup>[36]</sup>研究了 *P. mucilagenosus* 吸附  $\text{Pb}^{2+}$  的可能性，并对其吸附机理和吸附剂与捕收剂的作用机理进行了分析。红外光谱测试结果显示，该菌可以有效地吸附  $\text{Pb}^{2+}$ ，其吸附过程主要与细胞多糖成分中  $-\text{COO}^-$  基团有关，吸附力为静电力、氢键和范德华力为主的物理吸附。2010 年，Mo 和 Lian<sup>[37]</sup> 又研究了 *P. mucilagenosus* 对  $\text{Hg}^{2+}$  的吸附作用，阐述了吸附的机制和平衡参数。结果显示，实验数据符合朗缪尔模型，其平衡常数为  $3.32 \times 10^4/\text{mol}$ ，最大吸附量高达 393 mg(Hg)/L。

## 3 胶质类芽孢杆菌基因组学研究进展

近几年对该菌开展的结构基因组学、比较基因组学和功能基因组学研究，将从基因水平上全面揭示其功能机理，为推广应用提供理论基础。

### 3.1 结构基因组学研究

随着第一株细菌的全基因组测序，大量代表性的模式生物基因组计划 (MOGP) 和微生物基因组计划 (MPG) 相继开展。近 20 年来的统计结果显示，GenBank 每年收集的基因组测序信息几乎呈指数递增。截至 2014 年 4 月，已经被测序 (Chromosomes) 或正在进行中 (Scaffolds or Contigs) 的微生物基因组有 11 317 株，其中 2 399 株为真核生物 (Eukaryote)、274 株为古细菌 (Archaea)、4 562 株为细菌 (Bacteria)、4 082 株为病毒 (Viruse)。类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*)

内菌株的基因组研究相对滞后，目前仅有 12 个菌株完成全基因组测序，分别是 *Paenibacillus* sp. JDR-2<sup>[38]</sup>、*Paenibacillus* sp. Y412MC10<sup>[39]</sup>、*Paenibacillus polymyxa* E681<sup>[40]</sup>、*P. polymyxa* M1<sup>[41]</sup>、*P. polymyxa* SC2<sup>[42]</sup>、*P. polymyxa* SQR-21<sup>[43]</sup>、*P. polymyxa* CR1<sup>[44]</sup>、*P. mucilagenosus* 3016<sup>[14]</sup>、*P. mucilagenosus* K02 (仅有基因组序列信息，未见相关文献)、*P. mucilagenosus* KNP414<sup>[29]</sup>、*Paenibacillus terrae* HPL-003<sup>[45]</sup> 和 *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* DSM 25430<sup>[46]</sup>。类芽孢杆菌属内的菌株在基因水平上存在较大差别，如菌株基因组大小存在较大变化 (4.06~8.82 Mb)，GC 含量范围比较广 (44.6%~58.4%)，不同种之间基因水平同源性较低。目前已报道的 12 株菌中仅发现 *P. polymyxa* M1 和 *P. polymyxa* SC2 存在质粒等，推测其原因，可能与这类菌基因组中存在较多的插入序列等重复序列有关系，通过重复序列的转移摄入大量的环境调控因子以适应不断变化的外界环境。

目前 3 株 *P. mucilagenosus* 已完成全基因组测序，均只有一个环状染色体，暂未发现质粒存在，与 PFGE 电泳结果相符。基因组较一般细菌较大，为 8.6~8.9 Mb，含有大量重复序列，可能是基因组在进化过程中发生了大规模的插入/缺失、倒位和基因水平转移造成的。GC 含量较芽孢杆菌属内其他菌种较高<sup>[29]</sup>，暗示其较高的 DNA 密度和相对复杂的二级结构，蕴含着基因组起源与进化的重要信息<sup>[47]</sup>。重复序列区域 (RP 区域) 的 G+C 含量明显低于其他区域，而且该区域也是 no hits ORFs 的密集分布区。基因数量较多，平均基因密度约 1 200 bp/个。根据比对区域大于基因长度 40% 并且相似度大于 40% 的基因，检索到菌株 3016 基因组中固氮基因 41 个，如主要表达调节基因 *nif A*、*nif L*，但未发现 *nif H* 基因。目前已完成全基因组测序的 3 株 *P. mucilagenosus* 基因组基本特征见表 1。

### 3.2 比较基因组学研究

鉴于 *P. mucilagenosus* 3016、KNP414 和 K02 全基因组序列有较高的同源性，在种内仅选择 *P. mucilagenosus* KNP414 和类芽孢杆菌属内其他两株菌 *P. polymyxa* SC2、*Paenibacillus* sp. JDR-2 进行比较基因组学分析，研究类芽孢杆菌属菌株之间在染色体结构以及基因分布上的线性关系。结果发现，*P. mucilagenosus* 3016 与 *P. polymyxa* SC2 以及 *Paenibacillus* sp. JDR-2 在核酸水平上线性关系不明显，具有同源关系的核酸片段都在 5 kb 以下，而且没有一定的分

表1 *P. mucilaginosus* 菌株基因组基本特征

Item	<i>P. mucilaginosus</i> 3016	<i>P. mucilaginosus</i> KNP414	<i>P. mucilaginosus</i> K02
Accession	CP003235	CP002869	CP003422
Chrs	1	1	1
Size (Mb)	8.74	8.66	8.82
G+C content(mol%)	58.3	58.4	58.3
Gene	7 528	7 983	7 578
Protein coding genes	7 057	7 811	7 354
RNA genes	212	147	189
—rRNA genes	42	39	39
—tRNA genes	170	108	150
Pseudogene	259	19	35

注: *P. mucilaginosus* KNP414基因组含有6个可能的sRNAs<sup>[29]</sup>。

布规律, 表明它们的直系同源基因较少, 其原因可能是基因组在进化过程中发生了大规模的插入/缺失、倒位等现象, 具体有待深入分析。但是, *P. mucilaginosus* 3016 与 *P. mucilaginosus* KNP414 菌具有很好的共线性, 在 *P. mucilaginosus* 3016 存在的 7 317 个 CDS 中, 有 6 712 个可以在 *P. mucilaginosus* KNP414 中找到对应的同源蛋白, 占总数的 92.13%; 有 3 496 个 CDS 可以在 *P. polymyxa* SC2 中找到对应的同源蛋白, 占总数的 47.99%; 有 4676 个 CDS 可以在 *Paenibacillus* sp. JDR-2 中找到对应的同源蛋白, 占总数的 64.19% (数据未发表)。

将 *P. mucilaginosus* 3016 基因组与本实验室报道的另一株类芽孢杆菌 *P. polymyxa* SC2 基因组进行比较发现, 两株菌存在 1 641 个共有基因, 而 3016 特有的基因有 5 416 个<sup>[14]</sup>。对 3016 特有基因进行 COG 功能分类发现, 主要是与碳水化合物运输及代谢 (占 10.73%)、转录 (占 9.31%)、信号转导 (占 6.96%)、氨基酸运输及代谢 (占 5.89%) 等功能相关的基因, 如 *ywlF*<sup>[48-49]</sup>、*ppdK*<sup>[50-52]</sup>、*ytiB*<sup>[53]</sup>、*yurN*<sup>[54]</sup> 等。

### 3.3 功能基因组学研究

*P. mucilaginosus* 在转录组和蛋白质组学方面的研究鲜有报道, 如通过蛋白质双向电泳技术, 研究了 *P. mucilaginosus* 在风化磷矿石过程中菌体蛋白质组的变化及差异, 以此了解该菌溶磷作用的分子生物学机制<sup>[18,23]</sup>。以加磷矿粉为处理组, 不加磷矿粉为对照组, 发现处理组菌体细胞的蛋白点表达量与对照组比较, 共有差异蛋白质点 496 个, 其中有 214 个蛋白质点表达上调, 75 个蛋白质点表达下调, 207 个蛋白质点为新合成。研究人员认为细菌对磷矿石风化作用时激活了某些蛋白的表达, 新合成、表达量增加和表达量下降的蛋白质点与细胞的代谢

调控、细胞激活、增殖、分化和信号转导通路等有关, 研究结果为揭示 *P. mucilaginosus* 溶磷机制提供了新的思路。但遗憾的是, 未能对不同磷诱导条件下的差异蛋白进行鉴定, 研究结果有一定的局限性。

基于此, 本课题组采用蛋白质组学方法, 对有无磷和无磷条件下培养的 *P. mucilaginosus* 3016 的蛋白表达进行了分析。结果显示, 与无磷对照相比, *P. mucilaginosus* 3016 经有磷条件培养后的表达蛋白有 29 个发生上调, 36 个发生下调。通过 MOLDI-TOF 质谱对差异表达蛋白进行鉴定, 确定了 35 种差异蛋白。这些蛋白主要为代谢相关蛋白、转运相关蛋白、翻译相关因子、分子伴侣以及一些应激蛋白。在磷矿石的刺激下, *P. mucilaginosus* 3016 的糖酵解途径、磷酸戊糖途径、三羧酸循环以及电子传递和氧化磷酸化中的一些蛋白出现了差异变化, 推测溶磷过程后有一定量的磷酸基团进入菌体内部参与了以上过程; 同时, 木糖相关蛋白和丝氨酸相关蛋白显著上调, 也暗示了上述蛋白在溶磷过程起到不可或缺的作用。后续可借助转录组技术和荧光定量 PCR 技术, 分析与溶磷过程相关功能基因的表达水平, 以期在基因水平揭示 *P. mucilaginosus* 溶磷的分子机理。

由于该菌种在生长过程中产生肥厚的荚膜和黏稠的多糖, 常规的原生质体转化等遗传操作较为困难<sup>[55]</sup>, 限制了功能基因的深入研究。在植物遗传转化研究中常用的基因枪轰击法, 为胶质类芽孢杆菌的基因改造提供了新的思路。通过将一个植酸酶分泌表达元件插入到转座子载体 pSZ21 的 mini-Tn5 内, 构建植酸酶分泌型表达载体 pSP43, 借助基因枪的方法成功将其转化到野生的胶质类芽孢杆菌中, 已构建了多功能工程菌<sup>[56-57]</sup>。

## 4 展望

近年来,随着 *P. mucilaginosus* 的深入研究和广泛应用,越来越多的学者开始关注其系统发育地位、生物学功能及作用机理、基因组学等方面的研究进展。尤其是 *P. mucilaginosus* 三株菌全基因组测序的完成,为全面认识该菌种的遗传背景,研究其基因(蛋白质)与其生理功能的关系,解析功能基因的调控和表达,提供了最全面的基础数据。

后续将进一步开展功能基因组学、蛋白质组学、转录组学等研究,研究基因转录、翻译和蛋白质间的相互作用,以期在基因、RNA 转录、蛋白质产物等水平上,全面分析基因的功能,揭示功能基因(蛋白)的表达和响应,进而阐明微生物响应适应环境的基因调控及反馈机制。这对于进一步拓宽对 *P. mucilaginosus* 的认识和推动其应用,具有重要的理论价值和现实意义。

### [参 考 文 献]

- [1] Sheng XF, He LY. Solubilization of potassium-bearing minerals by a wild-type strain of *Bacillus edaphicus* and its mutants and increased potassium uptake by wheat. *J Microbiol*, 2006, 52: 66-72
- [2] Wu JG, Wang JF, Zhang XH, et al. A *gyr B* targeted PCR for rapid identification of *Paenibacillus mucilaginosus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87: 739-47
- [3] Basak BB, Biswas DR. Influence of potassium solubilizing microorganism (*Bacillus mucilaginosus*) and waste mica on potassium uptake dynamics by grass (*Sorghum vulgare* Pers.) grown under two Alfisols. *Plant Soil*, 2009, 317: 235-55
- [4] Liu WX, Xu XS, Wu XH, et al. Decomposition of silicate minerals by *Bacillus mucilaginosus* in liquid culture. *Environ Geochem Health*, 2006, 28: 133-40
- [5] 李俊, 沈德龙, 林先贵. 农业微生物研究与产业化进展 [M]. 北京: 科学出版社, 2011: 49-50
- [6] Avakyan ZA, Pivovarova TA, Karavaiko GI. Characteristics of a new *Bacillus mucilaginosus* species. *Microbiology*, 1986, 55: 477-82
- [7] Shelobolina ES, Avakyan ZA, Bulygina ES, et al. Description of a new species of mucilaginosus bacteria, *Bacillus edaphicus* sp. nov. and confirmation the taxonomic status of *Bacillus mucilaginosus*. *Mikrobiologiya*, 1997, 66: 813-22
- [8] Wood TM. Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. *Int J Syst Bacteriol*, 1998, 48: 631-2
- [9] Hu XF, Li SX, Wu JG, et al. Transfer of *Bacillus mucilaginosus* and *Bacillus edaphicus* to the genus *Paenibacillus* as *Paenibacillus mucilaginosus* comb. nov. and *Paenibacillus edaphicus* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2010, 60: 8-14
- [10] 王璇, 马鸣超, 关大伟, 等. 胶质类芽胞杆菌 PCR快速检测方法. *微生物学报*, 2011, 11: 1485-93
- [11] 盛下放, 冯阳. 不同条件下硅酸盐细菌对含钾矿物分解作用的研究. *土壤*, 2005, 5: 572-4
- [12] 赵艳, 张晓波, 郭伟. 不同土壤胶质芽胞杆菌生理生化特征及其解钾活性. *生态环境学报*, 2009, 18(6): 2283-6
- [13] 常文智, 马鸣超, 陈慧君, 等. 胶质类芽胞杆菌对花生生长和土壤微生物学性状的影响. *应用与环境生物学报*, 2014, 20(2): 185-91
- [14] Ma MC, Wang ZY, Li L, et al. Complete genome sequence of *Paenibacillus mucilaginosus* 3016, a bacterium functional as microbial fertilizer. *J Bacteriol*, 2012, 194 (10): 2777-8
- [15] Rozanova EP. Leaching of glass sand during microbiological oxidation of oil. *Mikrobiologia*, 1986, 55(5): 787-91
- [16] 刘五星, 徐旭士, 杨启银, 等. 胶质芽胞杆菌对土壤矿物的分解作用及机理. *土壤*, 2004, 36(5): 547-50
- [17] 胡星, 连宾, 郁建平, 等. 含钾矿粉对胶质芽胞杆菌分泌胞外多糖的影响. *高校地质学报*, 2011, 17(1): 107-11
- [18] Chen S, Lian B, Liu CQ. Effect of *Bacillus mucilaginosus* on weathering of phosphorite and a preliminary analysis of bacterial proteins. *Chn J Geochem*, 2008, 27: 209-16
- [19] 王思远. 硅酸盐细菌与化肥配施对土壤养分的转化和烤烟生长发育的影响. *吉林农业大学学报*, 2000, 2: 10-5
- [20] 李玉梅, 王根林, 孙彬, 等. 不同磷钾水平对硅酸盐细菌解钾溶磷能力的影响. *中国农学通报*, 2007, 23(5): 258-60
- [21] 谌书, 连宾, 刘从强. 一株胶质芽胞杆菌对磷矿石风化作用的实验研究. *矿物学报*, 2008, 28(1): 77-83
- [22] Goldstein MA, Liu ST. Molecular cloning and regulation of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola*. *Biol Technol*, 1987, 5: 72-4
- [23] 谌书, 刘从强, 连宾. 胶质芽胞杆菌对磷矿石风化作用时细菌蛋白质的双向电泳分析. *微生物学通报*, 2009, 36(3): 334-8
- [24] Martinez AI, Little R, Dixon R. Role of the amino-terminal GAF domain of the *NifA* activator in controlling the response to the antiactivator protein *NifL*. *Mol Microbiol*, 2004, 52: 1731-44
- [25] Huergo LF, Assumpção MC, Souza EM, et al. Repressor mutant forms of the *Azospirillum brasilense* NtrC protein. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70: 6320-3
- [26] Reitzer L. Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol*, 2003, 57: 155-76
- [27] Steenhoudt O, Vanderleyden J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol Rev*, 2000, 24: 487-506
- [28] Zhang Y, Pohlmann EL, Roberts GP. *Gln D* is essential for *NifA* activation, NtrB/NtrC-regulated gene expression, and posttranslational regulation of nitrogenase activity in the photosynthetic, nitrogen-fixing bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *J Bacteriol*, 2005, 187: 1254-65
- [29] Lu JJ, Wang JF, Hu XF. Genome sequence of growth-improving *Paenibacillus mucilaginosus* strain KNP414.

- Genome Announc, 2013, 1(5): 1-2
- [30] 刘荣昌. 生物钾肥在农业生产中的作用[M]//葛诚. 微生物肥料的生产应用及其发展. 北京: 中国农业科技出版社, 1995: 66-74
- [31] 蒋先军, 黄昭贤, 谢德体, 等. 硅酸盐细菌代谢产物对植物生长的促进作用. 西南农业大学学报, 2000, 22(2): 116-9
- [32] 刘光焯, 林洋, 黄昭贤. 硅酸盐细菌解钾兼拮抗活性菌株的筛选. 应用与环境生物学报, 2001, 7(1): 66-8
- [33] Lian B, Chen Y, Yuan S, et al. Study on flocculability of metalions by *Bacillus mucilagiuosus* GY03 strain. *Chn J Geochem*, 2004, 23(4): 380-6
- [34] Lian B, Wang B, Pan M, et al. Microbial release of potassium from K-bearing minerals by thermophilic fungus: *Aspergillus fumigatus*. *Geochim Coschim Acta*, 2008, 72(1): 87-98
- [35] 夏彬彬, 仲崇斌, 魏德州, 等. 胶质芽孢杆菌对 $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ 的生物吸附. 生物技术, 2008, 18(3): 80-4
- [36] 代淑娟, 周东琴, 魏德洲, 等. 胶质芽孢杆菌对水中 $Pb^{2+}$ 生物吸附-浮选性能研究. 金属矿山, 2007, 5(5): 70-4
- [37] Mo B, Lian B. Hg(II)adsorption by *Bacillus mucilaginosus*: mechanism and equilibrium parameters. *World J Microb Biotechnol*, 2010, 8(10): 1-8
- [38] Chow V, Nong G, St John FJ, et al. Complete genome sequence of *Paenibacillus* sp. strain JDR-2. *Stand Genomic Sci*, 2012, 6(1): 1-10
- [39] Mead DA, Lucas S, Copeland A, et al. Complete genome sequence of *Paenibacillus* strain Y4.12MC10, a novel *Paenibacillus lautus* strain isolated from Obsidian hot spring in Yellowstone National Park. *Stand Genomic Sci*, 2012, 6(3): 381-400
- [40] Kim JF, Jeong H, Park SY, et al. Genome sequence of the polymyxin-producing plant-probiotic rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* E681. *J Bacteriol*, 2010, 192(22): 6103-4
- [41] Niu B, Rueckert C, Blom J, et al. The genome of the plant growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* M-1 contains nine sites dedicated to nonribosomal synthesis of lipopeptides and polyketides. *J Bacteriol*, 2011, 193(20): 5862-3
- [42] Ma MC, Wang CC, Ding YQ, et al. Complete genome sequence of *Paenibacillus polymyxa* SC2, a strain of plant growth-promoting rhizobacterium with broad-spectrum antimicrobial activity. *J Bacteriol*, 2011, 193(1): 311-2
- [43] Li S, Yang D, Qiu M, et al. Complete genome sequence of *Paenibacillus polymyxa* SQR-21, a plant growth-promoting rhizobacterium with antifungal activity and rhizosphere colonization ability. *Genome Announc*, 2014, 2(2): 1-2
- [44] Eastman AW, Weselowski B, Nathoo N, et al. Complete genome sequence of *Paenibacillus polymyxa* CR1, a plant growth-promoting bacterium isolated from the corn rhizosphere exhibiting potential for biocontrol, biomass degradation, and biofuel production. *Genome Announc*, 2014, 2(1): 1-2
- [45] Shin SH, Kim S, Kim JY, et al. Genome sequence of *Paenibacillus terrae* HPL-003, a xylanase-producing bacterium isolated from soil found in forest residue. *J Bacteriol*, 2012, 194(5): 1266
- [46] Djukic M, Brzuszkiewicz E, Fünfhau A, et al. How to kill the honey bee larva: genomic potential and virulence mechanisms of *Paenibacillus larvae*. *PLoS One*, 2014, 9(3): 1-14
- [47] Zhang SH, Huang YZ. Limited contribution of stem-loop potential to symmetry of single-stranded genomic DNA. *Bioinformatics*, 2010, 26: 478-85
- [48] Chen XH, Koumoutsi A, Scholz R, et al. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(9): 1007-14
- [49] Veith B, Herzberg C, Steckel S, et al. The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2004, 7: 204-11
- [50] Ueda K, Yamashita A, Ishikawa J, et al. Genome sequence of *Symbiobacterium thermophilum*, an uncultivable bacterium that depends on microbial commensalisms. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(16): 4937-44
- [51] Chivian D, Brodie EL, Alm EJ, et al. Environmental genomics reveals a single-species ecosystem deep within Earth. *Science*, 2008, 332: 275-8
- [52] Lu YK, Marden J, Han M, et al. Metabolic flexibility revealed in the genome of the cyst-forming  $\alpha$ -1 proteobacterium *Rhodospirillum cente*. *BMC Genomics*, 2010, 11: 325-37
- [53] Gibbons HS, Broomall SM, McNew LA, et al. Genomic signatures of strain selection and enhancement in *Bacillus atrophaeus* var. *globigii*, a historical biowarfare simulant. *PLoS One*, 2011, 6(3): 1-17
- [54] Zhang GQ, Deng A, Xu QY, et al. Complete genome sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* TA208, a strain for industrial production of guanosine and ribavirin. *J Bacteriol*, 2011, 193(12): 3142-3
- [55] Li X, Yang SH, Yu XC, et al. Construction of transgenic *Bacillus mucilaginosus* strain with improved phytase secretion. *J Appl Microbiol*, 2005, 99: 878-84
- [56] 李明刚, 李欣, 张克勤, 等. 一种植酸酶分泌型转基因芽孢杆菌菌株及其应用: 中国, 200510014305.9 [P]. 2006-02-15
- [57] Li X, Wu ZQ, Li WD, et al. Growth promoting effect of a transgenic *Bacillus mucilaginosus* on tobacco planting. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 74: 1120-5