

## 免培养法对一热泉细菌多样性的初步研究

王 涛 柴丽红 崔晓龙 彭 谦 姜成林\*

(云南大学云南省微生物研究所 教育部微生物资源开放重点实验室 昆明 650091)

**摘 要** 应用免培养法(Culture-independent)对云南腾冲热海大滚锅高温热泉中细菌的多样性进行初步的分析。经过克隆筛选,测定了 5 个克隆的 16S rDNA 插入片段的近全序列,系统发育分析的结果表明,它们分属于 *Bacillus*、*Hydrogenobacter* 和 *Pseudomonas*,有一个克隆尚难确定其分类地位,它属于 *Thermodesulfobacteriaceae* 科,介于 *Geothermobacterium* 属和 *Thermodesulfobacteria* 属之间。经 PCR 扩增出上述 5 个克隆 16S rDNA 插入序列中及环境样品总 DNA 中的 16S rDNA  $V_8$  高变区约 600bp 片段,进行变性梯度电泳(DGGE)。所得电泳图谱和 5 个序列的系统发育树不仅表明该高温热泉存在着丰富的细菌多样性,还显示了它们是该高温热泉中细菌的优势物种。

**关键词** 热泉,免培养法,DGGE,细菌多样性

中图分类号:Q938 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2003)05-0541-06

云南腾冲县位于滇西南,地质构造属于印度板块与欧洲板块碰撞交汇地带,是地中海-喜马拉雅地热带的重要组成部分,也是中国大陆著名的火山地热区。大滚锅(DGG)高温热泉是其中最著名的一口热泉。该泉位于东经  $98^{\circ}26'$ ,北纬  $24^{\circ}57'$ ,海拔高度 1453m,最高水热温度超过  $97^{\circ}\text{C}$ ,水质呈弱碱性( $\text{pH}8.5$ ),主要阳离子为  $\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$ ,富含硫化氢<sup>[1]</sup>,属超高温热泉。由于超高温热泉中的微生物不仅具有特殊的生理机制和独特的基因,而且超高温热泉的自然环境与早期的地球环境比较接近,其中的微生物生态系统相对比较简单、稳定,对其生态学的研究有助于认识微生物生态学的基本理论和相关研究方法的建立<sup>[2]</sup>,因此对温泉高温菌多样性的研究一直是高温菌研究的热点之一。

自然界中至今尚不可纯培养的微生物高达  $85\% \sim 99.999\%$ ,即便是得到了纯培养,其形态和生理也可能发生很多变化<sup>[3]</sup>,而且高温菌有其独特的生活环境及生理需求,所以目前对高温菌多样性及系统发育的研究多采用免培养法。用免培养法对高温菌研究开展最为系统和深入的是美国黄石国家公园热泉微生物<sup>[4,5]</sup>,欧洲和日本的学者也用分子生物学方法对冰岛和日本的一些高温热泉进行过比较深入的研究<sup>[6,7]</sup>。国内对腾冲热海高温菌的研究开展得比较早,中国科学院微生物研究所、北京大学和云南省微生物研究所的科学家曾经用纯培养和直接形态观察法对腾冲热海中微生物进行过一系列的研究<sup>[1,8~10]</sup>。

我们尝试用免培养法对大滚锅细菌多样性的初步研究得到了至少 26 条 DGGE 条带

基金项目 国家自然科学基金资助项目(39960003) 科技部基础研究重大项目前期研究专项(2001CCC00600);云南省教育厅 2001 年度教育基金(0111142)

\* 通讯作者。Tel 86-871-5034139; E-mail lihxu@ynu.edu.cn

作者简介 王 涛(1973-),男,四川宜宾人,2000 级硕士研究生,主要从事极端环境微生物生态方面的研究。

E-mail: asdfgwt@yahoo.com.cn

收稿日期 2002-11-13,修回日期 2003-04-21

及 4 个属(或属一级)的序列:*Bacillus*、*Hydrogenobacter*、未定属(介于 *Geothermobacterium* 和 *Thermodesulfobacteria* 之间)、*Pseudomonas*。显示大滚锅高温热泉中具有比较丰富的细菌多样性,值得进一步对该高温热泉的微生物进行深入研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 样品

所采样品为大滚锅热泉边白色、坚硬的沉积物,样点温度为 84℃,上有约 5cm 的水覆盖。样品采后 3h 之内于 0℃、黑暗保存,回实验室后置于 -20℃、黑暗保存。

### 1.2 总 DNA 的提取和 PCR 扩增 16S rDNA

酶解法和化学裂解法结合从环境样品中直接提取总 DNA。用细菌 16S rDNA 通用引物(正向引物 8-27F,反向引物 1429-1445R)进行扩增。反应过程为 94℃ 预变性 5min 后 35 个循环(94℃ 1min,退火 1min,72℃ 3min),最后 72℃ 延伸 10min。其中退火温度包括 52、53、54、56 和 58℃(分别用退火温度 52、53、54、56 和 58℃ 各做一个 PCR 反应,然后将产物进行混合)。

### 1.3 克隆、测序和系统发育分析

用 TaKaRa 公司的 T4 连接酶和缓冲液、Promega 公司的 pGEM-T 载体以及上海华舜公司的感受态大肠杆菌 JM109,得到 PCR 产物克隆。经蓝白斑筛选后,随机挑选阳性克隆子 40 个提取质粒,PCR 扩增出插入的 16S rDNA 片段后用 *Hha*I 酶切,选出酶切带谱不同的 5 个重组子进行测序。序列用 CLUSTALX 进行系统发育分析,用邻接法<sup>[11]</sup>构建出系统进化树。

### 1.4 变性梯度电泳(DGGE)

用细菌的 16S rDNA 通用引物(正向引物 341F—GC,反向引物 907R(每条引物实际为 20 个碱基,正向引物末端附加 40 个 GC 碱基))扩增出 16S rDNA  $V_8$  高变区片段。反应过程为 94℃ 预变性 5min 后,先进行 20 个循环的降落 PCR(94℃ 1min,退火 1min,72℃ 3min,退火温度由 58℃ 到 48.5℃ 依次递降)后,再进行 15 个循环(94℃ 1min,48℃ 退火 1min,72℃ 3min),最后 72℃ 延伸 10min。将扩增的 PCR 产物进行 DGGE 分离,条件为 8% 的聚丙烯凝胶,30%~62.5% 的变性剂梯度(7 mol/L 的尿素,40% 的甲酰胺为 100% 的变性剂浓度),120V 恒定电压,60℃ 下电泳 8h。

## 2 结果和讨论

### 2.1 系统发育分析

用邻接法构建的系统发育树(图 1),所测的大滚锅 5 个克隆序列分别位于 4 个不同的分类群。Clone DGG19 聚于 *Thermodesulfobacteriaceae* 科,与它聚在一起的 3 个序列是通过 BLAST 软件在 GenBank 中得到的与 Clone DGG19 序列相似性最大的前 3 个序列。其中,未鉴定的 *Thermodesulfobacterium* clone BspN50 是从美国黄石热泉,用免培养法得到的序列,Clone DGG19 序列与它的差异为 2.98%,*Geothermobacterium ferrireducens* FW-1a 也是从黄石公园热泉中分离出来的,初步定义为 *Thermodesulfobacteriaceae* 科下的一个新属 *Geothermobacterium* 与 Clone DGG19 序列的差异为 3.3%。另一株菌 *Thermodesulfobacterium commune*

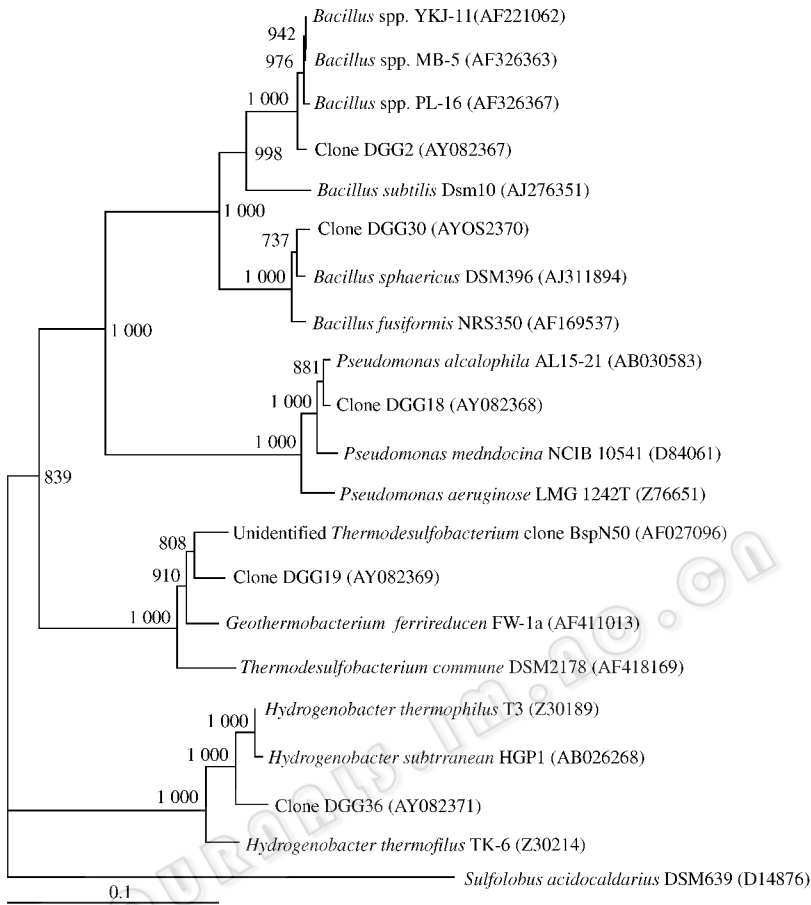


图 1 以 16S rDNA 序列为基础的大滚锅( DGG )克隆系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree of the clone DGG based on 16S rDNA sequences homology

DSM2178 ,已经得到纯培养 ,Zeikus 等<sup>[12]</sup>把它放在 *Thermodesulfobacterium* 属 ,它与大滚锅克隆 19 序列的差异达到 4.99%。所以 Clone DGG19 序列所代表的微生物很可能是 *Thermodesulfobacteriaceae* 科下 ,介于一个尚未有效发表的 *Geothermobacterium* 属和已有效发表的 *Thermodesulfobacterium* 属之间的一个属一级的分类群 ,很有必要深入研究。

Clone DGG36 聚在产氢杆菌属( *Hydrogenobacter* )一簇中 ,T3、HGP1 和 TK-6 的 3 个序列是用 BLAST 软件在 GenBank 中比较出来与 Clone DGG36 序列相似性最大的 3 个序列。Clone DGG36 与它们的差异分别为 2.3%、2.48% 和 4.16% ,且聚为一个单独的簇。因此很可能代表着产氢杆菌属下的一个新物种。

Clone DGG2 序列和 Clone DGG30 序列均聚在芽孢杆菌属( *Bacillus* )一簇。但 Clone DGG2 序列和 Clone DGG30 序列之间的差异很大( 9.8% ) ,分别聚在两个不同的亚簇。亚簇 I 中 ,与 Clone DGG2 序列最接近的是 *Bacillus jietogali* YKJ-11 ,*Bacillus* sp. MB-5 及 *Bacillus* sp. PL-16 ,它们的差异分别仅为 0.8%、0.82% 和 0.92%。它们很可能是属于同一个种。与 Clone DGG30 序列最相近的序列是 *Bacillus sphaericus* DSM396 ,实际差异为 0.99% ,所以

Clone DGG30 所代表的微生物可能是与 *Bacillus sphaericus* 相同的种。

Clone DGG18 归入假单胞菌( *Pseudomonas* )属的一个大簇。Clone DGG36 与 *Pseudomonas alcaliphila* AL15-21 之间的差异仅为 0.64% ,很可能属于同一个种。目前有关 *Pseudomonas* 属在高温环境中生存的报告不多,但还是有一些有关于 *Pseudomonas* 属的微生物在高温下能够生存的报道,如 Orphan 等<sup>[14]</sup>在用分子生物学方法对美国 60℃ ~ 90℃ 的地下含油层中的微生物进行分析的时候,发现了与 *Pseudomonas* 高度相似的序列。

2.2 DGGE 图

环境样品 DNA 与上述 5 个序列的 DGGE 结果见图 2。

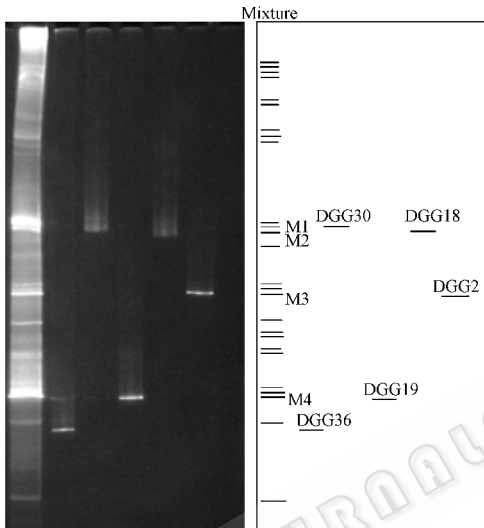


图 2 大滚锅热泉中细菌 16S rDNA 的 DGGE 图

Fig.2 DGGE pattern of the bacteria 16S rDNA in Dagunguo

从图中可以看出,DGG 环境样品( Mixture )中一共有 26 条条带,虽然不能说每一条带都能够代表该环境中的一种细菌,但这 26 条条带至少能代表超过 20 个细菌分类单位<sup>[13]</sup>,表明该环境中存在较丰富的细菌多样性。通过克隆、测序得到的几个序列除 Clone DGG36 外都在环境样品中找到了对应的条带:Clone DGG30 和 M1,Clone DGG18 和 M2,Clone DGG2 和 M3,Clone DGG19 和 M4。而且从 M1、M2、M3 和 M4 条带的亮度来看,它们所代表的细菌在该环境中均属于优势分类单位<sup>[15]</sup>。这表明虽然在克隆、测序法中所挑选出用于测序的克隆较少,但由于在测序之前通过了限制性片段长度多态性( RFLP )筛选,所测的序列还是能在一定程度上代表环境中的优势物种。而 Clone DGG36 代表的微生物属于产氢杆菌属( *Hydrogenobacter* ),目前已知的

的该属的微生物都是高温菌<sup>[16]</sup>,所以研究结果表明该属的微生物肯定存在于 DGG 高温热泉中。环境样品 DGGE 图中没有出现与 Clone DGG36 相对应的条带很可能是 PCR、克隆法与 DGGE 所用的 PCR 引物及条件不一样,Clone DGG36 所代表的模板在后者的 PCR 条件下受到抑制没有扩增出来<sup>[17]</sup>。虽然环境样品 DNA 与通过克隆得到的 5 个序列的 DGGE 图没有呈现一一对应,但也体现了较好的一致性。这表明两种方法探测环境中微生物多样性都是可行的。只不过要使克隆、测序法更加真实反映环境中微生物多样性,还需要挑选更多的克隆进行测序。

综上所述,免培养法分析结果显示大滚锅高温热泉中具有丰富的细菌多样性,至少存在 4 个属的细菌,还有 22 条 DGGE 条带所代表的细菌有待于进一步分析。目前用纯培养的方法从大滚锅热泉中仅分离到两个属的微生物: *Thermus rehai* RH99-02<sup>[9]</sup>和 *Thermoanaerobacter tengcongensis* sp. nov.<sup>[8]</sup>。本试验用免培养法检测到 3 个属( *Bacillus*、*Hydrogenobacterium*、*Pseudomonas* )和一个未确定其属一级分类单位( Clone DGG19 )的微生物的存在。从 DGGE 图可以看出,如果增加用于测序的克隆子的数量,应该还可以得到更多的微

生物分类单位。在研究所克隆的测序结果中没有发现 *Thermus* 属和 *Thermoanaerobacter* 属的序列,但从 DGG 样品中已经分离得到该两个属菌的纯培养,说明在对样品的 16S rDNA 克隆文库进行筛选的时候,由于选择不充分,会漏掉一部分序列。

当然,要弄清楚环境中微生物的真实状况,仅凭 16S rDNA( rRNA )序列进行分析是不够的。需要在得到纯培养后,根据形态、生理生化 and 分子生物学分析等多项指标进行。免培养法在 DNA 提取、PCR 以及克隆筛选过程中都可能产生一些偏差,而且有的微生物的 16S rRNA 基因存在多操纵子的问题,还有 GenBank 数据库中的数据也并不完全和完善。所以目前国外一些科学工作者在进行免培养法分析的时候,还使用直接形态观察法、原位杂交法等其他的辅助方法来加以判断<sup>[3,14]</sup>。免培养法得到的结果如果能通过纯培养来进一步证实,就能客观、真实地反映环境中微生物的存在。但单独使用免培养法,不仅可以提供相对比较准确的有关环境中微生物多样性的信息,还可以指导人们提高纯培养技术,使人类真正能够客观、真实地了解微生物多样性。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] 中国科学院青藏高原综合科学考察队. 腾冲地热. 北京: 科学出版社, 1989. 181 ~ 187.
- [ 2 ] David M W, Michael J F, Stephen C N, *et al.* A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, **62**: 1353 ~ 1370.
- [ 3 ] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 1995, **59**: 143 ~ 169.
- [ 4 ] Hugenholtz P, Pitulle C, Hershberger K L, *et al.* Novel division level bacterial diversity in a yellowstone hot spring. *J Bacteriol*, 1998, **180**: 366 ~ 376.
- [ 5 ] Pace N R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 1997, **276**: 734 ~ 740.
- [ 6 ] Ken T, Koki H. Molecular phylogenetic analysis of archaeal intron-containing genes coding for rRNA obtained from a deep-subsurface geothermal water pool. *Appl Envir Microbiol*, 1999, **65**: 5586 ~ 5589.
- [ 7 ] Viggó T M, Kristjánsson J K, Kristmannsdóttir H, *et al.* Discovery and description of giant submarine smectite cones on the seafloor in Eyjafjörður, Northern Iceland, and a Novel Thermal Microbial Habitat. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 827 ~ 833.
- [ 8 ] Xue Y, Xu Y, Liu Y, *et al.* *Thermoanaerobacter tengcongensis* sp. nov., a novel anaerobic, saccharolytic, thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Tengcong, China. *IJSEM*, 2001, **51**: 1335 ~ 1341.
- [ 9 ] Lin L, Chen Ch, Peng Q, *et al.* *Thermus rehai* sp. nov., isolated from Rehai of Tengchong, Yunnan Province, China. *Basic Microbiol*, 2002, **42**: 337 ~ 344.
- [ 10 ] 和致中, 彭 谦, 马 俊, 等. 云南温泉高温菌的研究 VII. 腾冲酸性高温温泉中的极端嗜热性芽孢杆菌. 微生物学报, 1989, **29**(30): 161 ~ 165.
- [ 11 ] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree. *Mol Biol Evol*, 1987, **4**: 406 ~ 425.
- [ 12 ] Zeijus J G, Dawson M A, Thompson T E, *et al.* Microbial ecology of volcanic sulphidogenesis: Isolation and characterization of *Thermodesulfobacterium commune* gen. nov. and sp. nov.. *J Gen Microbiol*, 1983, **129**: 1159 ~ 1169.
- [ 13 ] Orphan V J, Taylor L T, Hafenbradl D, *et al.* Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high-temperature petroleum reservoirs. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**: 700 ~ 711.
- [ 14 ] Head I M, Saunders J R, Pickup R W. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbiol Ecology*, 1998, **35**: 1 ~ 21.
- [ 15 ] Kurata S, Kanagawa T, Kamagata Y, *et al.* In Ninth International Symposium on Microbial Ecology( ISME-9 ). 2001, August 26 ~ 31. Amsterdam.
- [ 16 ] 和致中, 彭 谦, 陈俊英. 高温菌生物学. 北京: 科学出版社, 2000. 178 ~ 179.

- [ 17 ] Suzuki M T , Giovannoni S J . Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl Environ Microbiol* , 1996 , **62** : 625 ~ 630 .

## Preliminary Study on Bacterial Diversity in a Hot Spring by Using Culture-independent Approach

Wang Tao Chai Lihong Cui Xiaolong Peng Qian Jiang Chenglin \*

( Key Laboratory for Microbial Resources of Ministry of Education , Yunnan Institute of Microbiology ,  
Yunnan University , Kunming 650091 , China )

**Abstract** : Bacterial biodiversity of the hot spring Dagunguo in Tengchong Rehai in Yunnan Province , China was preliminarily studied with culture-independent method . Five complete 16S rDNA sequences were obtained and phylogenetically analysed . Four of these sequences were closely related to the genera : *Bacillus* , *Hydrogenobacter* and *Pseudomonas* , and the other one was clustered with the Family Thermodesulfobacteriaceae between an unpublished genus *Geothermobacterium* and *Thermodesulfobacteria* . The  $V_8$  high variable region ( about 600bp ) of 16S rDNA from the five 16S rDNA sequences and the genomic DNA were obtained by PCR . All of the PCR products were run DGGE . The pattern of DGGE and the phylogenetic tree of the five sequences not only indicated the hot spring Dagunguo of Yunnan province has plenty of bacterial species but also showed they were dominant bacterial species in the hot spring .

**Key words** : Hot spring , Culture-independent approach , DGGE , Microbial diversity

Foundation item : Chinese National Natural Science Foundation ( 39960003 ) ; Major Project for Fundamental Research and Development of Chinese National Ministry of Science and Technology ( 2001CCC00600 ) ; The Education Foundation of Yunnan Province ( 0111142 )

\* Corresponding author . Tel 86-871-5034139 , E-mail : lihxu@ynu.edu.cn

Received date : 11-13-2002

## 《微生物学报》投稿要求

1. 投稿范围 : 凡有关微生物学基础研究、应用基础研究及其高技术创新等领域的研究成果 , 包括普通微生物学、工业、农业、医学和兽医微生物学、免疫学以及与微生物学有关的生物工程等方面的研究报告、简报等 本刊均欢迎投稿。

2. 应首次发表 : 所有来稿均应未在公开出版的刊物上发表过。要求论点明确、数据可靠、行文简练、用词规范、图表清晰、结论合理。

3. 介绍信 : 所有来稿要求一式两份。论文是否涉及保密、署名是否无误 , 请出示第一署名单位的介绍信。若是与国外作者合写的论文 , 应出示国外作者同意以中文形式发表及署名顺序的信函说明。

4. 作者联系方式 : 请在投稿时提供通讯作者或第一作者的 Tel、Fax 和 E-mail 地址。

5. 审稿费 : 投稿时请随寄 100 元审稿费 , 可通过邮局汇来 ( 务请在汇款单上注明汇款单位和稿件第一作者 , 我们将开具正式发票 )。

6. 投稿及汇款地址 ( 100080 ) 北京中关村 中国科学院微生物研究所内 《微生物学报》编辑部

欲知更详细的投稿要求请登陆我刊的网址 : [Http://www.im.ac.cn/journals](http://www.im.ac.cn/journals)