

# 云南腾冲热海两热泉菌藻席细菌多样性的研究

李沁元 崔晓龙\* 张东华 彭 谦 徐丽华

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

**摘 要** :应用显微形态观察和变性梯度凝胶电泳(DGGE)对云南腾冲热海两热泉菌藻席的细菌多样性进行了比较分析。直接从环境样品中提取总 DNA ,用两套细菌通用引物进行 PCR 扩增 ,得到包含  $V_8$  和  $V_9$  高变区的 16S rDNA 片段 ,进行 DGGE 分析 ,结合形态观察 ,结果显示 ,热泉菌藻席中存在丰富的细菌多样性 ,且不同温度范围的菌藻席细菌组成差异显著。

**关键词** :变性梯度凝胶电泳(DGGE) ,菌藻席 ,细菌多样性

中图分类号 :Q938 文献标识码 :A 文章编号 :1001-6209(2004)04-0431-05

越来越多的证据表明 ,可培养微生物仅占自然环境微生物的极少部分 ,Amann 等<sup>[1]</sup>认为 ,自然环境中尚不可纯培养的微生物高达 85% ~ 99.9% ,并且即便是得到了纯培养 ,在不同的培养条件下其形态和生理特征均可能发生很多变化。这成为全面客观认识自然环境中微生物群落的严重障碍。直接从环境样品中提取总 DNA ,进行分子生物学、分子系统发育分析的免培养法 ,为揭示自然环境微生物多样性提供了一条新的途径<sup>[2]</sup>。变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis ,DGGE)是由 Fischer 和 Lerman 最先提出的用于 DNA 突变检测的一种电泳技术 ,自 1993 年 Muyzer<sup>[3]</sup>首次将该方法应用于微生物生态学的研究以来 ,已经被广泛应用于土壤<sup>[4]</sup>、高温<sup>[5,6]</sup>、海洋<sup>[7]</sup>及根际<sup>[8]</sup>等环境的微生物多样性研究中。

高温热泉与地球早期的环境比较接近 ,生存于其中的微生物具有独特的基因、特殊的生理机制和调节机制 ,对其进行生态学的研究有助于微生物生态学基础理论的发展和相关研究方法的建立。高温热泉中的菌藻席结构相对比较简单、稳定 ,形成了相对封闭的微生物生态系统 ,对其开展的研究多集中于微生物及其相互关系上 ,这有利于微生物生态系统模型的建立<sup>[6]</sup>。由于高温菌独特的生活环境和生理需求 ,目前对其多样性的研究多采用免培养法。云南腾冲县是中国大陆著名的火山地热区 ,腾冲热海高温热泉蕴藏有较为丰富的微生物资源<sup>[9~14]</sup>。国

内对该地区高温菌的研究工作开展得比较早 ,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工作者曾利用纯培养和直接形态观察法对腾冲热海中的微生物进行过一系列的研究<sup>[9~12]</sup>。此外本实验室还利用免培养法对该地区高温热泉的细菌多样性进行了研究<sup>[13~15]</sup> ,揭示了其中所蕴藏着的丰富的微生物资源。

本文介绍了用显微形态观察和 DGGE 法对腾冲热海两个不同温度热泉菌藻席的细菌多样性的比较分析结果 ,结果显示出两个样点菌藻席都具有比较丰富的细菌多样性 ,值得对其中的微生物进行深入系统的研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 样品的采集

样品采集于 2002 年 10 月下旬 ,所采样品为菌藻席 ,分别采集于路边的一泉眼(两种菌藻席 :Mat-1 和 Mat-2)和蛤蟆嘴(HMZ)(表 1)。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。

表 1 样品的基本情况

Table 1 Samples used in this study and their characteristics

Serial number	Site	Temperature/℃	pH	Microbial mats
MAT-1	A roadside hot spring	80	6.9	White
MAT-2	A roadside hot spring	80	6.9	Black
HMZ	Hot spring Hamazui	90	8.0	White

基金项目 国家自然科学基金项目(30260004)

\* 通讯作者。Tel :86-871-5034621 ; Fax :86-871-5173878 ; E-mail :xlcul@ynu.edu.cn

作者简介 李沁元(1978 - ) ,女 ,云南腾冲人 ,硕士研究生 ,研究方向为微生物生态。E-mail :qyli015@yahoo.com.cn

其他作者 王 涛 ,柴丽红 ,姜成林

收稿日期 2003-11-13 ,修回日期 2004-03-04

## 1.2 主要试剂和仪器

**1.2.1 主要试剂** :Ex Taq DNApolymerase ( 5U/ $\mu$ L ) , dNTP Mix( 各 2.5mmol/L ) , 10  $\times$  Ex Taq buffer ,引物 ( 10pmol/ $\mu$ L )均购自 TaKaRa。 尿素、玻璃珠( Silver Beads )DNA 胶回收试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司。 去离子甲酰胺 ,过硫酸铵购自上海华舜生物工程有限公司。

**1.2.2 主要仪器** :Mupid-2 Mini Gel Migration Trough ( Cosmo Bio Co. , Ltd , Advance Co. , Ltd. ) ,PCR Express thermal cycler ( ThermoHybaid ) ,The Decode<sup>TM</sup> Universal Mutation Detection System ( Bio-Rad ) , SYNGENE

成像系统。

## 1.3 显微形态观察

用埋片法进行显微形态观察。将载玻片放入待观察的泉眼 ,选取浸片约 6h 的载玻片进行显微观察。

## 1.4 总 DNA 的提取

用酶解法和化学裂解法结合直接从环境样品中提取出总 DNA<sup>[ 13 ~ 15 ]</sup>。

## 1.5 PCR 扩增

用细菌的 16S rDNA 通用引物 ,扩增出 16S rDNA 的高变区片段( 表 2 )。

表 2 所用引物的序列  
Table 2 The sequence of two primers

Primer	Target site/bp	Sequence	PCR products
P1 <sup>[ 16 ]</sup> : 1055F	1055 ~ 1070	5'-ATGGCTGTCGTCAGCT-3'	V <sub>9</sub> high-variable region
1406R-GC *	1392 ~ 1406	5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3'	
P2 <sup>[ 16 ]</sup> 341F-GC	341 ~ 357	5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'	V <sub>8</sub> high-variable region
907R *	907 ~ 926	5'-CCGTCAATTCMTTGTAGTTT-3'	

\* The GC clamp sequence is 5'-CGCCGCGCGCGCCGCGCCGTCGCGCGCGCCGCGCCG-3'<sup>[ 13 ]</sup>。

PCR 扩增体系为 50 $\mu$ L ,包括 10  $\times$  Ex Taq Buffer 5 $\mu$ L , dNTP Mix 4 $\mu$ L( 各 2.5mmol/L ) ,正向引物 1 $\mu$ L ( 10pmol/ $\mu$ L ) ,反向引物 1 $\mu$ L ( 10pmol/ $\mu$ L ) , DNA 模板 1 $\mu$ L( 约 10ng ) ,Ex Taq<sup>TM</sup> 0.25 $\mu$ L ( 5U/ $\mu$ L ) 。 PCR 扩增条件为 :94 $^{\circ}$ C 预变性 5min 后 ,先进行 20 个循环的降落 PCR( 94 $^{\circ}$ C 1min ,退火 1min ,72 $^{\circ}$ C 3min ;退火温度由 63 $^{\circ}$ C 到 43 $^{\circ}$ C ,每一循环递减 1 $^{\circ}$ C ) ,再进行 15 个循环 ( 94 $^{\circ}$ C 1min 48 $^{\circ}$ C 退火 1min ,72 $^{\circ}$ C 3min ) ,最后 72 $^{\circ}$ C 10min。 PCR 产物用玻璃珠( Silver Beads )DNA 胶回收试剂盒进行纯化。

## 1.6 DGGE

6% 的聚丙烯酰胺凝胶 ,两套引物分别选用不同的变性梯度进行电泳。 P1 变性剂梯度为 35% ~ 75% ,P2 变性剂梯度为 25% ~ 65%( 7mol/L 的尿素 ,40% 的甲酰胺为 100% 的变性剂浓度 ) 。 120V 恒定电压 ,60 $^{\circ}$ C 恒温下电泳 8h。 电泳结束后用 EB 进行染色。用 SYNGENE 成像系统进行观察。

## 2 结果和讨论

实验选取了两个不同温度样点中不同颜色的 3 种菌藻席样品进行研究 ,拟通过显微形态观察和 DGGE 分析温度差异对微生物群落组成的影响 ,以及同一泉眼不同颜色的菌藻席在物种组成上是否有

较大差异。

## 2.1 显微形态观察

样品的光学显微照片如图所示( 图 1 )。

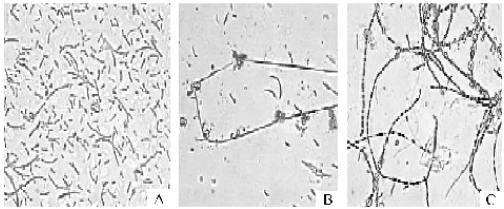


图 1 3 种菌藻席的光学显微照片( 400  $\times$  )

Fig.1 Light micrograph of microbial mats( 400  $\times$  )

A. MAT-1 ; B. MAT-2 ; C. HMZ.

直接形态观察是研究微生物生态的传统方法之一 ,可以获得较为直观的微生物形态特征。在采集样品时我们注意到 MAT-1 和 MAT-2 属同一个泉眼 ,温度为 80 $^{\circ}$ C ,pH6.9。 MAT-1 靠近出水口 ,而 MAT-2 则位于 MAT-1 的两侧及下流处 ,两种菌藻席除颜色差异外 ,外观无明显不同 ,均为长絮状菌藻席 ,并且粘性较大 ,附着力强。而 HMZ 样点温度较高 ,温泉自泉眼喷射而出 ,菌藻席紧附于出水口周围。经观察不同埋片时间的载玻片发现 ,由于样点温泉流速的影响以及高温环境中微生物新陈代谢较快的原因 ,若埋片时间短则菌体难以附着生长 ,而埋片时间太长则会在载玻片上长满菌体无法观察 ,所以选取

效果最佳的埋片 6h 后取出的载玻片进行显微形态观察。从光学显微照片可以看出,同一温泉菌藻席中菌体的形态多样性不是很高,但不同温泉的菌藻席形态差别很大。MAT-1 和 MAT-2 形态差异不大,呈不均匀的杆状,MAT-2 有附着于矿物粒上的长丝状菌体。HMZ 菌体呈长丝状,无分枝,少断裂。由于原核生物都比较微小,形态差异不大,通过直接形态观察很难获得全面的微生物多样性的信息,需要其他方法的补充。

2.2 总 DNA 的提取和 PCR 扩增

将从环境样品中直接提取的总 DNA 进行 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳,在 20kb 左右出现条带(图略),表明已获得较为完整的菌藻席的总 DNA。

提取出的总 DNA 经过 PCR 后,两套引物均获得了特异扩增片段,P1 的扩增产物约 390bp,为 16S rDNA 的  $V_9$  高变区片段。P2 的扩增产物约 600bp,为 16S rDNA 的  $V_8$  高变区片段(图略)。

2.3 DGGE 结果和分析

将纯化的 PCR 产物(3 个样品浓度一致)通过变性梯度凝胶电泳,可看出分离得到若干条带(图 2),各个样点的条带在数量和位置上均有差异,并且在相同条件下进行了 4 次 DGGE,结果一致,重复性较好。选取效果最佳的电泳图谱进行初步统计,结果见表 3。

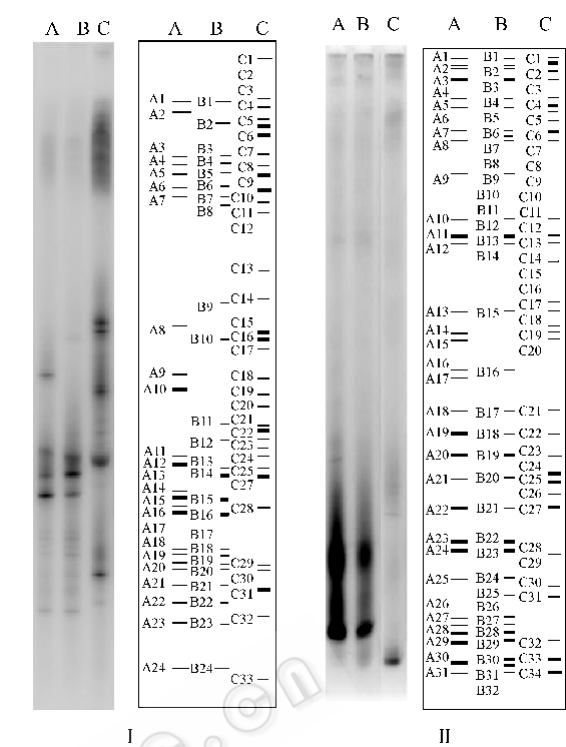


图 2 PCR 产物的 DGGE 图谱

Fig.2 DGGE patterns of the PCR products  
I . The DGGE profile was obtained with primer P1 and the model of the profile ;II . The DGGE profile was obtained with primer P2 and the model of the profile. A :MAT-1 ; B :MAT-2 ; C :MAT-3.

表 3 DGGE 带谱分析结果

Table 3 The results analyzed DGGE patterns

	MAT-1	MAT-2	HMZ
Band numbers of P1 DGGE pattern	24	24	33
Strong band numbers of P1DGGE pattern	4 ( A10 A12 A14 A15 )	3 ( B14 B15 B16 )	9 ( C5 C6 C9 C10 C15 C16 C22 C27 C31 )
Band numbers of P2 DGGE pattern	31	32	34
Strong band numbers of P2 DGGE pattern	10 ( A4 A11 A19 A20 A22 A23 A21 A28 A29 A30 )	9 ( B4 B12 B19 B22 B23 B28 B29 B30 B31 )	8 ( C2 C6 C9 C24 C25 C27 C33 C34 )

DGGE 是根据 DNA 片段序列的不同,既解链温度的不同,将片段大小相同的 DNA 片段分开的电泳检测方法。故根据其原理,DGGE 带谱中的每一条带代表一个可能的细菌类群或可操作分类单位(OTU)<sup>[18]</sup>。从表 3 的统计结果可以看出,引物 P1 扩增产物的 DGGE 图谱中,MAT-1 有 24 条带,MAT-2 有 24 条带,HMZ 有 33 条带,这说明每种菌藻席至少由 20 种以上的可能物种组成,具有比较丰富的细菌

多样性。同时引物 P2 扩增产物的 DGGE 带谱也证明了这一点。此外,由于 DGGE 通常只能检测到细胞数量相对较多的微生物物种的存在<sup>[3]</sup>,带谱的亮度在一定程度上可以反映出其所代表的物种的细胞数量,从而可以认为带谱中较亮的条带代表了菌藻席中的优势菌群(图 2)。

由显微形态观察结果和 DGGE 带谱均可看出,温度是影响菌藻席细菌组成的重要因素。采自同一

温度的 MAT-1、MAT-2 显微形态无太大的差别,但它们和 HMZ 的菌体形态差别就比较大。P1 和 P2 扩增产物的 DGGE 也都显示, MAT-1 和 MAT-2 基本的微生物组成差异不大,条带的位置、多少、亮度均比较接近,只是在一些较弱的条带上存在差异,但 HMZ 菌藻席比较,物种组成的差异较大,较弱和较亮的条带均有不同。P1 扩增产物 DGGE 图谱统计结果显示, MAT-1 和 MAT-2 相同的条带数有 17 条, MAT-1 和 HMZ 相同的条带有 11 条, MAT-2 和 HMZ 相同的条带有 11 条,而 3 种菌藻席相同的条带仅有 7 条。对 P2 扩增产物的 DGGE 图谱进行统计,结果与之类似。

从实验结果还可以看出,虽然 HMZ 的温度较高,但细菌多样性要更丰富一些, DGGE 条带数比 MAT-1 和 MAT-2 多,这可能是因为 MAT-1 和 MAT-2 采自路边的一处温泉,受人为因素影响较大,原始生境受人为干扰,多样性遭到破坏。而人为活动对蛤蟆嘴影响不大,使之保持了相对原始的状况。另外, MAT-1 和 MAT-2 除颜色差异外,无论从形态上还是 DGGE 结果上来看差异都不大,这可能是由于边缘水流的昼夜温差比中央水流温差变化大,温度的波动使之产生部分物种组成差异,而导致颜色差异。

引物 P1 和 P2 扩增产物 DGGE 分析得出的结论基本一致,但由于两套引物的扩增产物是包含不同高变区的大小不同的片段,从而同一样品不同扩增产物的 DGGE 条带数目并不完全相同,所检测到的优势菌群也有一定的差异。

综上所述,虽然由于原核生物形态差别小,显微形态所能观察到的微生物比较单一,但可以看出温度不同的菌藻席其物种组成也不相同。进行 DGGE 分析得出的结果显示,3 种菌藻席具有较丰富的细菌多样性,都存在 20 个以上的可能的细菌类群。并且进一步证明温度是影响菌藻席物种组成的关键生态因子,不同温度的菌藻席在物种组成上有明显差异。

国外学者对得到的 DGGE 单个条带测序从而进行系统发育分析,其结果与直接形态观察或纯培养结果均呈现一致性,证明 DGGE 是一种检测微生物多样性快速可靠的方法<sup>[17,19]</sup>,其条带的数量和亮度可相应地反映出环境样品中微生物物种的数量和优势菌群。当然,要真正清楚环境中微生物群落的真实状况,仅凭 DGGE 分析是不够的,由于 DGGE 的一些缺陷,如嵌和体、多操纵子、共迁移、异源双链体等会导致结果产生偏差<sup>[4,18]</sup>。需要与其它方法如

纯培养、克隆、原位杂交等结合使用,才能客观地从不同方面放映环境样中微生物多样性的信息<sup>[1,18]</sup>。无论怎样,使用免培养法,不仅可以提供相对比较准确的有关自然环境微生物多样性的信息,还可以指导人们设计更为合适的培养基和培养条件,获取更多的微生物纯培养,从而使人类能够更客观、真实地了解自然环境微生物多样性,以及为更好地开发利用未培养微生物资源奠定基础。

## 参 考 文 献

- [1] Amann R, Ludwig I W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 1995, **59**: 143 - 169.
- [2] Pace N R, Stahl D A, Lane D J, et al. The analyses of natural microbial population by ribosomal RNA sequence. *Advances in Microbial Ecology*, 1986, **9**: 1 - 55.
- [3] Muyzer G, Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 695 - 700.
- [4] Gelsomino A, Keijzer-Wolters A C, Elsas J D, et al. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, **38**: 1 - 15.
- [5] Ferris M J, Ward D M. Seasonal distributions of dominant 16S rRNA-defined populations in a hot spring microbial mat examined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 1375 - 1381.
- [6] Ward D M, Ferris M J, Nold S C, et al. A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial communities. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **62**: 1353 - 1370.
- [7] Díez B, Pedrós-Alíó C, Marsh T L, et al. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 2942 - 2951.
- [8] Smalla K, Wieland G, Buchner A, et al. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plang dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 4742 - 4751.
- [9] 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.
- [10] Xue Y F, 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.
- [11] Lin L B, Chen C Y, Peng Q, et al. *Thermus rehai* sp. nov., isolated from Rehai of Tengchong, Yunnan Province, China. *Basic Microbiol*, 2002, **42**: 337 - 344.

- [ 12 ] 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.
- [ 13 ] 王 涛,柴丽红,崔晓龙,等.免培养法对一热泉细菌多样性的初步研究.微生物学报,2003,43(5):541-546.
- [ 14 ] 王 涛,柴丽红,郭春雷,等.滇西热泉中9个16S rDNA克隆的分析.微生物学通报,2003,30(5):38-42.
- [ 15 ] 王 涛,柴丽红,郭春雷,等.几种直接从高温热泉沉积物中提取DNA方法之比较.生物技术,2003,13(1):17-18.
- [ 16 ] Ferris M J, Muyzer G, Ward D M. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62: 340-346.
- [ 17 ] Casamayor E O, Schüfer H, Baneras L, et al. Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66: 499-508.
- [ 18 ] Head I M, Saunders J R, Pickup R W. Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbia Ecology*, 1998, 35: 1-21.
- [ 19 ] Smit E, Leeflang P, Gommans S, et al. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 284-2291.

Bacterial Diversities of Microbial Mats in Two Hot Springs in Tengchong Rehai of Yunnan

LI Qin-Yuan CUI Xiao-Long\* ZHANG Dong-Hua PENG Qian XU Li-Hua

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

**Abstract** : The microbial mats of two hot springs in Tengchong Rehai of Yunnan, China, were analyzed by microscopy and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. Total DNAs directly extracted from environmental samples were amplified by PCR with two sets of bacteria-specific primers. The PCR products, which include the V8 and V9 high-variable regions respectively, were analyzed using DGGE. By comparing the morphology and DGGE patterns, the results not only indicated rich bacterial diversity profiles but also showed the microbial community differences between the two extreme environments.

**Key words** : DGGE, Microbial mat, Bacterial diversity

Foundation item : National Natural Science Foundation of China ( NSFC )( 30260004 )

\* Corresponding author. Tel : 86-871-5034621 ; Fax : 86-871-5173878 ; E-mail : xlcui@ynu.edu.cn

Received data : 11-13-2003

本 刊 重 要 声 明

为适应我国信息化建设需要,扩大作者学术交流渠道,本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网”。如作者不同意将文章编入该数据库,请在投稿时声明,否则本刊将视为同意收录。

另外,从2002年开始,凡被本刊录用的文章均统一纳入“万方数据——数字化期刊群”,进入因特网提供信息服务。有不同意见者,请事先声明。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬,不再另付。

读者可上网查询浏览本刊内容,并征订本刊。刊物网址: <http://wsxb.periodicals.com.cn>

《微生物学报》编辑部