

太平洋帕里西维拉海盆细菌多样性的非培养的初步分析

谢 华^{1,3} 薛燕芬¹ 赵爱民⁴ 李铁钢² 马延和^{1*}

(¹中国科学院微生物研究所 北京 100080) (²中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

(³中国科学院研究生院 北京 100039) (⁴中国生物技术发展中心 北京 100081)

摘 要 从环境中直接提取总 DNA, 构建了含 32 个有效转化子的太平洋帕里西维拉(Parece Vela)海盆 5010 米深处底泥的细菌 16S rRNA 基因文库。测序结果表明, 可以将 32 条有效序列分为 17 个不同的分类单元。大部分序列与已知细菌类群的 16S rDNA 序列相似性较高, 归属于 *Proteobacteria* 的 gamma 亚群、alpha 亚群和海洋非培养细菌类群, 主要分布在 *Pseudoalteromonas* 属、*Halomonas* 属、*Alcanivorax* 属、*Photobacterium* 属、*Acinetobacter* 属, 部分序列与已知细菌类群的 16S rDNA 序列同源性较低, 可能代表新的分类单位。研究结果表明, 帕里西维拉海盆不仅含有丰富的微生物物种, 并且存在尚未被认识的新物种。

关键词 深海, 生物多样性, 非培养方法

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2005)01-0001-05

深海是一个低温、高压、寡营养的环境。生活在深海环境中的细菌在海洋生态系统的生物地化循环中发挥着重要的作用。同时由于深海细菌所具有的对温度和压力的特殊适应性, 使它们在工业生产中的潜在利用价值普遍得到人们的关注^[1]。因此研究深海细菌多样性对理解海洋生态系统的功能、开发利用深海细菌资源具有重要的意义。

目前对于深海细菌多样性进行的研究主要通过培养的方法^[2-5], 已经从深海环境中分离得到了部分嗜冷、嗜压微生物。然而培养的方法仅能获得环境生物总量的很少一部分, 不足以反映环境中生物的多样性^[6]。非培养方法可以补充培养方法的不足, 较为完整的获得环境中的微生物种类。但是目前利用非培养方法对深海细菌开展的相关研究较少, 仅有日本科学家对马里亚纳大海沟(Mariana Trench)^[7]和日本附近深海底泥^[8-10]以及海底热液口^[11,12]的微生物多样性的相关报道。本文利用非培养方法对来自太平洋帕里西维拉海盆样品的细菌多样性进行了初步分析。

1 材料和方法

1.1 样品采集

样品是于 2002 年 2 月在太平洋帕里西维拉(Parece Vela)海盆内(20° 51.73' N, 136° 45.7' E)

5010m 处的表层(0 ~ 5cm)采集的泥样。由中国科学院海洋研究所提供, 使用的是箱式采样器, 样品运到实验室后于 0℃ 冰箱中保存至 2004 年 9 月。

1.2 主要试剂

DNA 纯化试剂盒购于北京天为时代科技有限公司, PCR 试剂盒购于北京天为时代科技有限公司, pGEM- T vector Easy System 试剂盒购于 Promega。

1.3 总 DNA 提取和 PCR 扩增

1.3.1 环境 DNA 提取 环境 DNA 的提取方法参见文献 [13], DNA 样品经纯化后进行 PCR 扩增。

1.3.2 16S rRNA 基因扩增 纯化后的 DNA 作为 PCR 扩增的模板, 使用细菌通用引物 27F [7 - 27, 大肠杆菌(*Escherichia coli*)顺序]: 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1541R [1522-1541, *E. coli* 顺序]: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'。PCR 反应体系(50 μ L) 5 μ L 10 \times Buffer, 2mmol/L MgCl₂, 1U Taq DNA 聚合酶, 0.2mmol/L 4 \times dNTPs, 20pmol/L 引物。PCR 反应条件: 94℃ 10 min, 94℃ 45s, 55℃ 45s, 72℃ 90s, 30 个循环, 72℃ 5min。

1.4 连接和转化

PCR 扩增得到的片段与 T-Vector 连接, 转化 *E. coli* TOP10 感受态细胞, 蓝白斑方法用于筛选转化子。挑取阳性克隆子, 快速提取质粒, 琼脂糖电泳检测插入片段的大小, 将含有合适片段大小的质粒

基金项目: 国家 863 计划(2001AA626040)

* 通讯作者。Tel : 86-10-62627951 ; Fax : 86-10-62651577 ; E-mail : mayanhe@sun.im.ac.cn

作者简介: 谢 华(1978 -), 女, 江苏人, 硕士研究生, 主要从事深海细菌多样性的研究。E-mail : huaxie399@hotmail.com

其他作者: 曾 艳¹

收稿日期: 2004-04-29, 修回日期: 2004-07-09

进行测序。测序工作由上海申能博彩生物科技有限公司完成,测序引物是 T7,530F 和 SP6。530F 的序列为:5'-GTGCCAGCAGCCGCGG-3'(515-530, *E. coli* 顺序)。

1.5 构建系统发育树

得到的序列首先在 RDP 数据库中检测嵌合体,去除嵌合体后的剩余序列通过 GenBank 的 BLAST 检索高同源性序列,进行系统发育分析。采用 Clustal X version 1.8 进行多序列匹配排列,通过 Treecon W (1.3b)程序中 Neighbor - Joining 方法,采用 Kimura 双参数计算模型,构建系统发育树。

1.6 数据库存取号(Accession number)

16S rRNA 基因序列在 GenBank 核苷酸数据库中的存取号为 AY588949-AY588965。

2 结果

2.1 深海环境 DNA 及细菌特异性 PCR 扩增

从 10 克深海环境样品中提取获得了约 500ng 环境总 DNA, DNA 片段较为完整,大小主要集中在 21kb 左右。通过细菌特异性 PCR 反应扩增得到的 16S rDNA 序列,扩增所产生的 DNA 片段为单一条带,片段大小长度约为 1.5kb,表明扩增产物无明显

非特异性扩增现象。

2.2 深海细菌 16S rDNA 测序

对 39 个含有正确插入片段的克隆进行了测序。经过 RDP 数据库分析,去除 7 个嵌合体。剩余 32 个序列,大小均大于 1400bp。根据这些细菌的 16S rDNA 序列之间的相似性比较,将具有大于等于 98% 相似性的克隆序列归于同一个分类单元,共 17 个。在总体上可以将太平洋帕里西维拉海盆细菌分为变形菌纲(*Proteobacteria*)的 alpha 亚群, gamma 亚群和海洋非培养细菌 3 个类群(表 1)。5 个序列归属于 *Proteobacteria* 的 alpha 亚群的玫瑰杆菌属(*Roseobacter*)、红菌属(*Rhodobium*)和一类磁细菌,占克隆总数的 15.6%。20 个序列归属于 *Proteobacteria* 的 gamma 亚群的发光杆菌属(*Photobacterium*)、盐单胞菌属(*Halomonas*)、海杆菌属(*Marinobacter*)、嗜脂肪烃菌属(*Alcanivorax*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)和假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*),占克隆总数的 62.5%。7 个序列与来自海洋的非培养序列同源性最高,而与已知的可培养细菌 16S rDNA 序列同源性很低,占克隆总数的 21.9%。

表 1 来自太平洋帕里西维拉底泥的 16S rDNA 序列分析结果

Table 1 Phylogenetic affiliations of 16S rDNA clone sequences obtained from sediment of Parece Vela, Pacific Ocean

Representative clone of clone group	GenBank No.	Number of total clones	Nearest phylogenetic neighbor	16S rDNA Similarity/ %
<i>α-Proteobacteria</i>				
DE4.1	AY588949	2	<i>Roseobacter</i> sp. GAI-109	94
DE6.8	AY588950	1	<i>Rhodobium orientis</i>	93
DE4.7	AY588951	2	Magnetite containing magnetic vibrioid strain MV-2	94
<i>γ-Proteobacteria</i>				
DE2.8	AY588952	3	<i>Photobacterium leiognathi</i>	96
DE1.1	AY588953	1	<i>Halomonas variabilis</i> strain ANT9112	98
DE2.10	AY588954	1	<i>Halomonas meridiana</i>	99
DE5.2	AY588955	1	<i>Marinobacter bryozoaenae</i>	97
DE2.9	AY588956	3	<i>Alcanivorax jadensis</i>	98
DE2.6	AY588957	1	<i>Pseudomonas chloritidismutans</i>	99
DE3.4	AY588958	2	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	99
DE3.1	AY588959	1	<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i>	97
DE3.9	AY588960	6	<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i>	99
DE6.7	AY588961	1	<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	99
Marine uncultured bacteria				
DE2.1	AY588962	2	Uncultured delta <i>proteobacterium</i>	99
DE2.5	AY588963	2	uncultured Low G + C Gram-positive bacterium Sva1064	99
DE6.13	AY588964	2	Unidentified bacterium clone K2-30-19	92
DE1.3	AY588965	1	Unidentified <i>proteobacterium</i>	98

2.3 系统发育分析

根据所获得的 16S rDNA 序列构建细菌系统发

育树(图 1)。归属于 *gamma-Proteobacteria* 类群的克隆序列与相应的已知细菌具有相近的亲缘关系,如

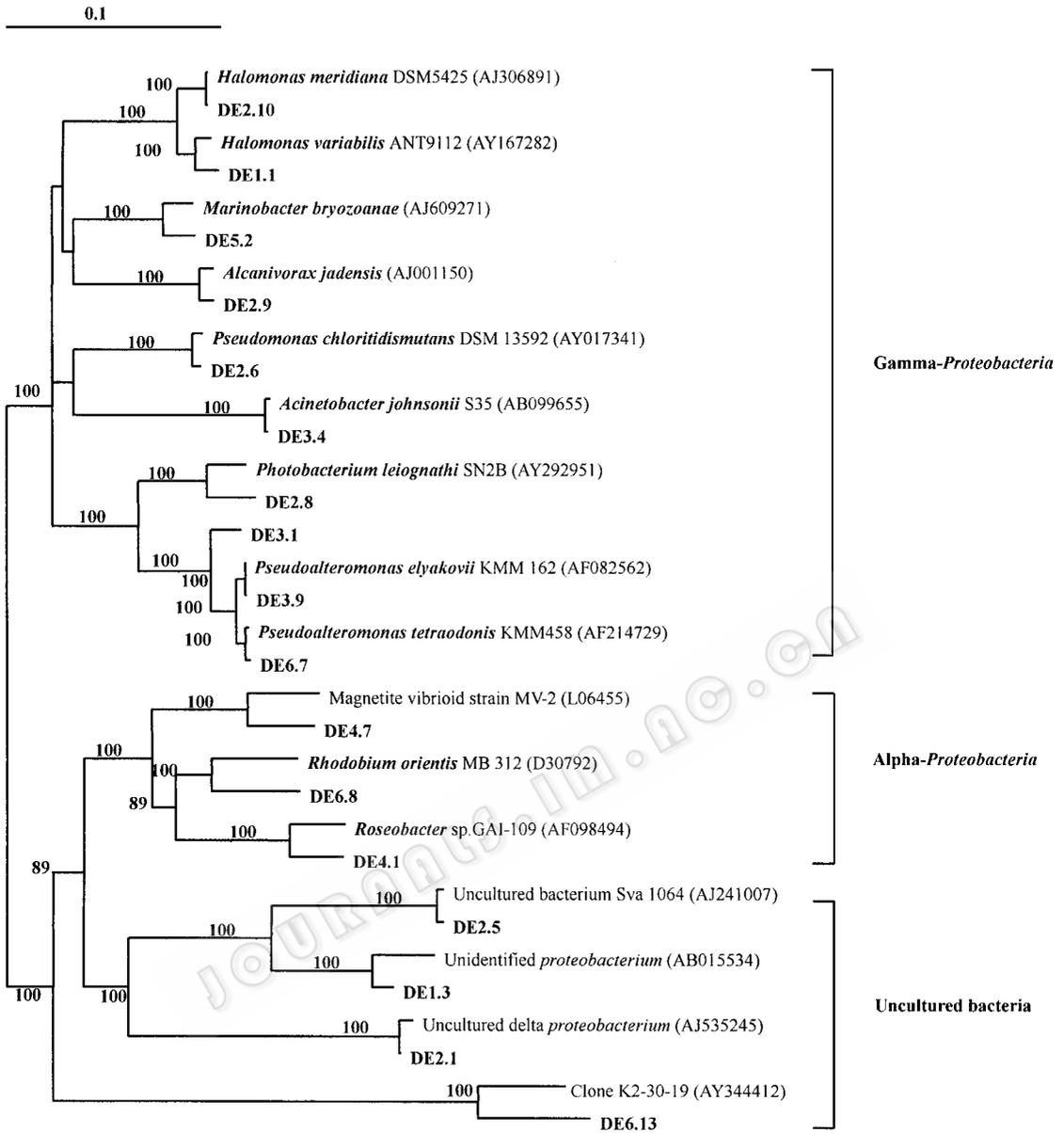


图 1 以 16S rDNA 序列为基础的太平洋 Parece Vela 海盆细菌系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree of the bacteria in Parece Vela Basin based on 16S rDNA sequences

“DE” refers to the representative bacterial clones. Numbers in parentheses represent the sequences’ accession number in GenBank.

The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 10% sequence divergence.

DE2.10 和 DE1.1 与分离自南极的 *Halomonas variabilis* 和 *Halomonas meridiana* (16S rDNA 序列相似性分别为 98% 和 99%); DE5.2 与分离自海洋 *Marinobacter bryozoanae* (97%); DE2.9 代表的 3 个 16S rDNA 序列与分离自潮间带底泥的轻度嗜碱菌 *Alcanivorax jadensis* (98%); DE2.6 与分离自生物反应器的兼性好氧氯酸盐还原细菌 *Pseudomonas chloritidismutans* (99%); 由 DE3.4 代表的 2 个序列与分离自活性污泥的 *Acinetobacter johnsonii* (99%); DE2.8 代表的 3 个 16S rDNA 序列与分离自 *Leiognathidae* 发光器官的

Photobacterium leiognathi (96%); DE3.1 与 DE3.9 代表的 6 个序列与分离自海洋软体动物的 *Pseudoalteromonas elyakovii* (> 97%); DE6.7 与分离自海洋的 *Pseudoalteromonas tetraodonis* (99%)。而归属于 alpha-Proteobacteria 类群的克隆序列与相应的已知细菌的亲缘关系较远, 如 DE4.7 代表的 2 个序列与一类弧菌形状的磁细菌 16S rDNA 序列相似性为 94%; DE6.8 与分离自海洋 *Rhodobium orientis* 的 16S rDNA 序列相似性为 93%; DE4.1 代表的 2 个序列与分离自海洋的 *Roseobacter* sp. GAI-109 的 16S rDNA 序列

相似性为 94%。归属于另一分支的克隆序列,与已分离到的细菌亲缘关系较远($< 90%$),而与海洋非培养细菌类群具有较近的亲缘关系,如 DE2.5 代表的 2 个 16S rDNA 序列 99% 相似于来自北冰洋底泥的非培养革兰氏阳性细菌;DE1.3 与来自深海底泥的序列具有 98% 的同源性;DE2.1 代表的 2 个 16S rDNA 序列 99% 相似于南极大陆架的底泥一个非培养序列;DE6.13 代表的两个 16S rDNA 序列 92% 相似于来自西太平洋的一个非培养细菌。

3 讨论

通过对细菌 16S rDNA 序列所进行的系统发育分析可知太平洋帕里西维拉海盆中的细菌具有丰富的多样性,他们主要分布在 *Proteobacteria* 的 alpha 亚群、gamma 亚群和海洋非培养细菌类群。有 25% 的序列与 *Pseudoalteromonas* 属的菌株具有较高的 16S rDNA 序列相似性,可能代表太平洋帕里西维拉海盆细菌的优势种群。与其它海域深海底泥细菌多样性的非培养研究相比较,*Pseudoalteromonas* 属在 Marina Trench 中尚无报道,在日本附近海域深海底泥中细菌优势种类属于 *Pseudomonas*,而不属于 *Pseudoalteromonas*。另外部分克隆序列在系统发育树上所处的位置明显区别于已报道的细菌种类。位于 *Proteobacteria* 的 alpha 亚群的 5 个序列和位于 *Proteobacteria* 的 gamma 亚群中的 DE2.8, DE5.2, DE3.1 以及它们所代表的序列与相似菌株的 16S rDNA 序列同源性均低于或等于 97%^[14],DE6.13 所代表的两个序列与来自西太平洋的非培养序列的 16S rDNA 序列的相似性为 92%。可能代表了太平洋帕里西维拉海盆中潜在的新的分类单位。这些均反映了太平洋帕里西维拉海盆中具有独特的细菌组成。

与克隆序列具有高 16S rDNA 序列相似性($> 97%$)的 *Halomonas variabilis*, *Halomonas meridiana*, *Acinetobacter johnsonii* 和 *Pseudomonas* 属的细菌均报道曾被发现于深海,这反映了深海底泥中细菌在种类上的相似性。另外,本实验获得了一些克隆序列与非深海环境中的细菌具有较高的相似性($\geq 98%$),如与 DE2.6 的 16S rDNA 序列 99% 相似的 *Pseudomonas chloritidismutans* 来自于生物反应器,*Alcanivorax jadensis*, *Pseudoalteromonas elyakovii* 和 *Marinobacter bryozonae* 虽然来自海洋,但不是来自深海,表明这些细菌种类分布在更广泛的生态环境中。本工作根据 16S rDNA 序列分析,获得了有关该地点细

菌多样性的初步认识,同时具有较低的($< 97%$) 16S rDNA 序列同源性的序列可能代表着的新的细菌分类单位。而认识这些细菌的生态学作用,还要发展合适的培养方法获得它们。

参考文献

- [1] Yayanos A A. Microbiology to 10 500 meters in the deep sea. *Annu Rev Microbiol*, 1995, **49**: 777 - 805.
- [2] Takami H, Kobata K, Nagahama T, et al. Biodiversity in deep-sea sites located near the south part of Japan. *Extremophiles*, 1999, **3**: 97 - 102.
- [3] Maruyama A, Honda D, Yamamoto H, et al. Phylogenetic analysis of psychrophilic bacteria isolated from the Japan Trench, including a description of the deep-sea species *Psychrobacter pacificensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, **50**: 835 - 846.
- [4] Takami H, Inoue A, Fuji F, et al. Microbial flora in the deepest sea mud of the Mariana Trench. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, **152**: 279 - 285.
- [5] Radjasa O K, Urakawa H, Kita-Tsukamoto K, et al. Characterization of psychrotrophic bacteria in the surface and deep-sea waters from the northwestern pacific ocean based on 16S ribosomal DNA analysis. *Marine Biotechnology*, 2001, **3**: 454 - 462.
- [6] Torsvik V, Goksoyr J, Daae F L. High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, **56**: 782 - 787.
- [7] Kato C, Li L, Tamaoka J, et al. Molecular analyses of the sediment of the 11000-m deep Mariana Trench. *Extremophiles*, 1997, **1**: 117 - 123.
- [8] Yanagibayashi M, Nogi Y, Li L, et al. Change in the microbial community in Japan Trench sediment from a depth of 6292m during cultivation without decompression. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, **170**: 271 - 279.
- [9] Li L, Guenzennec J, Nichols P, et al. Microbial diversity in Nankai Trough sediment at a depth of 3 843m. *Journal of Oceanography*, 1999, **55**: 635 - 642.
- [10] Urakawa H, Kita-Tsukamoto K, Ohwada Kouichi. Microbial diversity in marine sediments from Sagami Bay and Tokyo Bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiology*, 1999, **145**: 3305 - 3315.
- [11] Moyer C L, Dobbs F C, Kark D M. Phylogenetic diversity of the bacterial community from a microbial mat at an active hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**: 1555 - 1562.
- [12] Reysenbach A L, Longnecker K, Kirshtein J. Novel bacterial and archaeal lineages from an *in situ* growth chamber deployed at a mid-atlantic ridge hydrothermal vent. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, Sept: 3798 - 3806.
- [13] Tsai Y L, Olson B H. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Applied Environmental Microbiology*, 1991, **57**: 1070 - 1074.
- [14] Wayne L G, Brenner D J, Colwell R R, et al. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol*, 1987, **37**: 463 - 464.

Preliminary research on bacterial diversity of Parece vela Basin , Pacific Ocean by culture-independent method

XIE Hua^{1,3} XUE Yan-fen¹ Zhao Ai-min⁴ LI Tie-gang² MA Yan-he^{1*}

(¹ Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)

(² Institute of Oceanography , Chinese Academy of Sciences , Qingdao 266071 , China)

(³ Graduate School of the Chinese Academy of Sciences , Beijing 100039 , China)

(⁴ China National Center for Biotechnology Development , Beijing 100081 , China)

Abstract : The environmental DNA was directly extracted from the sediment in Parece Vela Basin , Pacific Ocean , at a depth of 5010m. Bacterial 16S rRNA gene library of 32 clones was generated using bacterial universal primers and 16S rDNA sequences were analyzed phylogenetically. 17 phylotypes were obtained. The library was dominated by gamma-*Proteobacteria* , alpha-*Proteobacteria* and marine uncultured bacteria. Sixty-two percent of the cloned sequences was highly related to the known bacteria in the genus *Halomonas* , *Alcanivorax* , *Pseudomonas* , *Acinetobacter* , *Pseudoalteromonas* (> 96% sequence similarity) , while some of the cloned sequences showed less affiliation with known taxa (< 94% sequence similarity) and may represent novel taxa.

Key words : Deep-sea , Culture-independent , Bacterial biodiversity

Foundation item : Chinese National High-Tech Research Program (2001AA626040)

* Corresponding authors . Tel : 86-10-62627951 ; Fax : 86-10-62651577 ; E-mail : mayanhe@sun.im.ac.cn

Other author ZENG Yan¹

Received date : 04-29-2004

2003 ~ 2004 年《微生物学报》审稿专家名单 按姓名汉语拼音排序

以下专家在 2003 年(全年)和 2004 年(部分)为本刊审阅过稿件 ,在此谨向您表示衷心地感谢 ! 为编辑部审阅稿件给专家们增加了额外的工作量 ,但是本着对作者、读者和期刊负责的原则 ,审稿又是一件非常重要的事情。为了扩大学术影响、促进微生物学科的发展 ,同时也为了提高《微生物学报》的质量 ,本刊编辑部希望您今后能够继续给予支持。

白逢彦	鲍时翔	蔡文启	蔡永峰	曹竹安	陈冠军	陈洪章	陈剑平	陈民钧	陈润生	陈三凤	陈文新	程光胜
程元荣	储 炬	丁 鉴	丁久元	丁明孝	丁清泉	东秀珠	董志扬	方 勤	方维焕	冯德荣	高培基	高 松
葛 诚	耿运琪	弓明钦	龚建华	龚祖坝	郭三堆	郭志儒	何朝族	何秀良	何忠效	赫荣乔	洪 健	胡丰林
胡福泉	胡学智	胡远扬	还连栋	黄 力	黄大昉	黄年来	黄秀梨	黄耀煌	黄耀玉	吉鑫松	焦瑞身	焦新安
江 宁	姜道宏	姜文侠	蒋立科	荆玉祥	阚 飙	柯家骏	孔宪刚	雷肇祖	黎高翔	李 元	李电东	李阜棣
李季伦	李琦涵	李若瑜	李士东	李永泉	李育阳	李越中	李祖义	梁 龙	梁宗琦	廖延雄	林 敏	刘华珍
刘会洲	刘如林	刘双江	刘湘涛	刘杏忠	刘秀梵	刘志敏	刘志培	娄无忌	陆 健	陆承平	陆德如	吕国忠
罗信昌	马德钦	马清钧	马贤凯	马延和	闵 航	倪汉文	潘兹书	钱世钧	钱新民	邱并生	曲音波	茹炳根
阮继生	邵宗泽	沈 萍	盛 军	施巧琴	苏国富	孙 明	孙君社	孙万儒	孙忠富	谭华荣	唐 宏	唐国敏
唐亚林	陶天申	田杰生	王 东	王敖全	王惠莲	王慧敏	王金生	王守一	王锡锋	王修垣	王以光	王用楫
王有智	王在时	王正祥	文华安	吴 润	吴加全	吴克刚	吴庆余	夏春谷	夏桂先	向 华	肖 天	谢 红
刑建民	徐 冲	徐冠珠	徐建国	许建和	严 杰	杨海花	杨汉春	杨怀文	杨建民	杨廉婉	杨苏声	杨希才
杨秀山	杨蕴刘	姚 斌	于嘉林	喻子牛	袁 生	袁勤生	袁正宏	袁志明	袁中一	张 杰	张 正	张博润
张楚瑜	张惠展	张建中	张曼夫	张小青	张渝英	张兆山	章克昌	赵立平	赵乃昕	赵小凡	郑天凌	周俊初
周培瑾	周雪平	周宇光	朱 军	朱 祯	朱宝泉	朱关福	朱厚础	朱庆裴	朱圣庭	朱伟云	朱玉贤	诸葛健
庄文颖	庄玉辉											