

## 广东金山温泉沉积物中原核与真核微生物多样性初步分析

肖凯, 曹理想, 陆勇军, 周世宁\*

(中山大学生命科学学院, 有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广州 510275)

**摘要:** 【目的】本研究旨在采用不同的 PCR 引物对广东省恩平市金山温泉的高温水底沉积物微生物多样性进行初步的分析。【方法】采用改进的玻璃珠法抽提温泉沉积物中环境基因组 DNA, 通过对用 4 对引物分别扩增得到的原核微生物 16S rRNA 基因和真核微生物 ITS 序列的分析, 将所得到的数据与国际基因数据库 GenBank 进行相似性比较并构建系统发育树。【结果】研究发现原核类群 G 的 14 个优势克隆中 7 个都属于蛭弧菌属 (*Bdellovibrio*)。与它们最相似的序列是从海洋中分离到的两个菌株 *Bacteriovorax* sp. NE1 (EF092445) 和 *Bdellovibrio* sp. JS5 (AF084859), 相似性分别为 96% 和 99%。原核类群 X 的 4 个序列主要属于蓝细菌类群, 其中 JS - X2 与在美国黄石公园温泉发现的 *Uncultured Cyanobacterium* (L35331) 有 95% 的相似性, 并且与已经全基因组测序的嗜热蓝细菌聚球藻 *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (47118315) 有 89% 的相似性。真核类群 Z 有三个类群, 分别是 *Penicillium* sp., *Lodderomyces* sp. 和 *Gloeotinia* sp.。其中大部分序列与青霉属相似性在 88%~90% 之间。【结论】所得到的结果显示金山温泉中的微生物多样性十分丰富。

**关键词:** 温泉; 沉积物; RFLP; 微生物多样性

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 06-0717-08

温泉中的微生物不仅具有特殊的生理机制和独特的基因, 而且其生态系统相对比较简单、稳定, 对此环境的研究有助于对微生物生态学的认识和相关研究方法的建立<sup>[1-3]</sup>, 而对微生物多样性的了解是研究温泉微生物的重要方面。

迄今, 对温泉高温环境下的生物多样性的了解并不完全<sup>[4]</sup>, 这主要由于人工很难完全模拟温泉的生境, 因而无法很好地建立微生物群落的结构及其功能(即代谢活动)之间的联系<sup>[5]</sup>。这在一定程度上是由于传统微生物技术的局限性所造成的。

基于 rRNA 系统发育框架发展起来的分子生物学技术使得对不同生境中的微生物群落进行全面而快速的分析成为可能。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>[7]</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>[8,9]</sup>。国内云南大学对云南腾冲温泉也进行过系统研究<sup>[2]</sup>。目前, 对细菌 16S rRNA 基因、真核微生物的 ITS 序列的选择性扩增、克隆和比较分析已被广泛应用于分类学、生态学以及进化生物学等领域的研究<sup>[21]</sup>。本研究利用 ARDRA (扩增 rDNA 限制性酶切片分析) 方法分析温泉环境下细菌和放线菌的 16S rRNA 基因以及和真菌的 18S rDNA ITS 区的遗传变异性, 从而提供有关温泉环境下耐热微生物类群的结构及其多样性的初步信息。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 样品采集: 采样地点广东省恩平市金山温泉, 泉涌区自然水温常年达 80 以上露天泉涌 300 多处,

基金项目: 国家“863 计划”(2007AA09Z448)

\*通讯作者。Tel/Fax: +86-20-84110238; E-mail: lsszsl@mail.sysu.edu.cn

作者简介: 肖凯(1985-), 男, 湖北黄冈人, 硕士研究生, 主要研究方向为微生物多样性以及宏基因组文库构建。E-mail: coolegg12@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-08-28; 修回日期: 2008-01-16

日流量 2000 多立方米。采样点水温为 68.5 , pH 为 8, 偏碱性。用 500 mL 的取样管取底泥后, 立即放入液氮罐中保存, 取水样 1 L 用保鲜袋扎紧后放入保温瓶中保存, 5 h 内运回实验室。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** pMD18-T 载体、*Msp*、*Hae* 内切酶、Taq DNA 聚合酶、dNTP (TaKaRa 公司); 100bp Marker (北京鼎国公司); 引物由广州赛百胜生物技术公司合成。DNA 凝胶回收试剂

盒(上海华瞬生物技术有限公司)。SynGene genius 凝胶成像系统(USA); PTC-100 PCR 仪(MJResearch); GS-15R 型台式冷冻离心机(Beckman); 常温台式离心机(Eppendorf)。

**1.1.3 菌株:** 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  为本实验室保存。

**1.1.4 引物:** 表 1 为用于原核 16S rDNA 片段以及真核 ITS 间隔区片段扩增的引物。

表 1 用于原核 16S rDNA 片段以及真核 ITS 间隔区片段扩增的引物

Table 1 The sequences of 5 sets of primers used to amplify 16S rDNA segment of prokaryote and ITS segment of Eukaryote

Primer	Target site	Sequence(5' 3')	Group name	Reference
Uni515f	515-534	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA		[11]
Uni1406R	1406-1423	GACGGGCGGTGTGTRCA	Prokaryote group G	[11]
16F	8-27	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Prokaryote group X	[20], [6]
1492R	1510 - 1492	GGTTACCTGTTCAGACTT		[20], [6]
Arch21F	21-41	TTCCGGTTGATCCYGCCGGA	Archea group A	[8]
1496R	1514-1496	TTACCTGTTCAGACTTGG		[8]
ITS1F	ITS 间隔区	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Eukaryote group Z	[10], [17]
ITS4R	ITS 间隔区	TCCTCCGCTTATTGATATGC		[10], [17]

\* Instruction: Primers of Group G are universal primers for Bacteria, Archaea; Primers of Group X are specify for bacteria; Primers of Group A are specify for Archaea and primers of Group Z are specify for Eukarya.<sup>[11]</sup>

## 1.2 样品总 DNA

由于温泉的底泥与一般陆地环境中的土壤样品有很大的不同, 其成胶状, 因而对常用的细胞破碎和总 DNA 提取的玻璃微珠法<sup>[18, 22]</sup>进行了改进:

称取 5 g 样品于碾磨上, 加入 5 g 玻璃微珠, 用碾磨棒将其混匀后, 加入液氮, 再用碾磨棒用力碾磨, 反复几次, 使样品完全成为泥状。称取 4 g 混合物于 10 mL 无菌离心管中, 加入 3.6 mL 磷酸盐裂解 buffer, 0.4 mL 20% 的 SDS 溶液。4 , 13000  $\times$  g 离心 20 min, 上清加入 300  $\mu$ L 5mol/L KAc, 1 mL 40% PEG8000, 混匀置于 -20 冰箱至少 30 min。4 , 13000  $\times$  g 离心 20min, 弃上清。加入 500  $\mu$ L 2  $\times$  CTAB, 68 温浴 1 h, 平分 2 个 1.5 mL EP 管。加入等体积的氯仿/异戊醇, 上下颠倒混匀至少 5 min, 10000  $\times$  g 离心 5 min, 取上层。加等体积异丙醇混匀, 室温下沉淀至少 10 min, 13000  $\times$  g 离心 10 min 弃上清。200  $\mu$ L 70% 酒精沉淀一次, 13000  $\times$  g 3 min 弃上清。加入 20  $\mu$ L TE(PH=8.0)溶解 DNA。

同时为了检测处理过程中对 DNA 裂解的影响, 将同一沉积物样品分为五份, 分别编为 1-5 号。其中, 1 和 2 号样品采用上述传统方法提取, 不同的是 1 号采用液氮冻融, 2 号采用冰水冻融。3 和 4 号采用的是加入液氮于碾钵中, 再用 68 裂解。以上 4 个样品

在裂解过程中都经过 4 次剧烈的涡旋振荡。5 号样品直接加液氮于碾钵中, 碾磨 10 min, 不经过 68 裂解。

## 1.3 16S rDNA 全序列的 PCR 扩增和纯化

采用 5 对引物(表 1)对总 DNA 进行扩增, 分别扩增 5 个类群 rDNA。PCR 反应条件: 94 4 min; 94 45 s, X 45 s, 72 1 min, 循环 26 次; 72 10 min。其中引物 Uni515F 和 Uni1406R 对应原核类群 G, 退火温度 50 ; 引物 16F 和 1492R 对应原核类群 X, 退火温度 54 ; 引物 Arch21F 和 1496R 对应古菌类群 A, 退火温度梯度在 50 ~60 , 每个梯度间隔 1 ; ITS1F 和 ITS4R 对应真核类群 Z, 退火温度 50 。将 3 种类群 PCR 扩增产物经浓缩及割胶纯化之后备用。

## 1.4 克隆文库构建以及 ARDRA 分析

根据 pMD18 T-vector 的操作说明书将所得到的 PCR 纯化产物连接于 T 载体(TaKaRa), 再采用 CaCl<sub>2</sub> 法转化到 *E.coli* Dh5 $\alpha$  感受态细胞。每个类群随机挑取 96 个克隆子, 采用载体上的 M13 引物进行菌落 PCR, 反应条件为: 94 30s, 55 30s, 72 90 s, 30 个循环; 72 10 min, 4 保存。将得到的菌落 PCR 产物用两种内切酶 *Hae* 和 *Msp* 对菌落 PCR 产物进行酶切。根据酶切图谱选择不同操作分类单元

(Operational Taxonomic Units, OTUs) 的代表克隆子送上海生工生物技术公司进行 DNA 序列测定, 同时根据公式  $C = 1 - n_1/N$  ( $N$  代表分析的有效 16S rDNA 克隆数,  $n_1$  则代表在 16S rDNA 克隆文库仅出现过一次的 OTU 的数量。) 计算克隆文库的 Coverage ( $C$ ) 值。

### 1.5 序列分析与进化树的建立

将测序结果输入 GenBank, 通过 BLAST 程序在 GenBank(www.ncbi.nlm.nih.gov) 中进行相似性搜索, 并从比对后所得的结果中找到相似度比较高的序列进行比对分析, 应用 Clustal X 1.81 进行 DNA 排序, 应用 MAGA4.0 软件对序列进行裁减, 再用此软件中包含的 ClustalX 1.8 进行 DNA 排序对齐排序后使用 N-J 法构建系统进化树, 经重复取样 1000 次, 进行 bootstrap 值分析, 最后得到可信度最高的一棵。GenBank 的收录号附于序列名称后。

## 2 结果和讨论

### 2.1 总 DNA 的提取

从图 1 中可以看到, 4 种不同的处理方法得到的 DNA 条带都在 23 kb 以上, 表明都能够提取到 DNA, 但是 DNA 的质量有细微差别。其中 3, 4 号 DNA 条带的拖带比较严重, 说明此种处理样品的方法过于剧烈, 不利于得到长片段的完整 DNA。1 号样品的点样孔中有比较明显的荧光, 说明此种方法可能得到的蛋白质和其他杂质比较多。2 号和 5 号样品的条带比较整齐并且亮度很高, 两个样品点样孔中看不到有荧光。

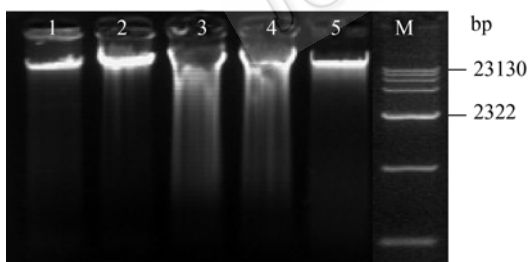


图 1 沉积物基因组 DNA 电泳图谱

Fig. 1 Genome DNA extracted from the sediment. M= $\lambda$ -Hind . 1. freeze with liquid nitrous; 2. freeze with ice; 3, 4. crush with pestle; 5. crush with liquid nitrous.

### 2.2 PCR 扩增

如图 2 所示, 用两对细菌的 16S rRNA 基因引物扩增同一个总 DNA 样品, 扩增产物的大小原核类群 G 约为 900 bp, 原核类群 X 约为 1500 bp, 真核类群 Z 约为 700 bp。符合预测结果。但古菌类群 A 未见特异性扩增条带。

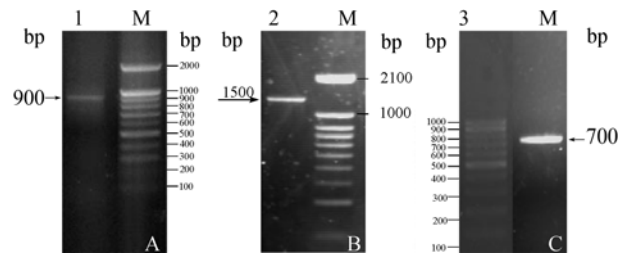


图 2 3 种类群微生物 rDNA 的 PCR 结果

Fig. 2 PCR amplification results of 3 groups of microbial DNA. A: Prokaryote Group G; B: Prokaryote Group X; C: Eukaryote Group Z. 1, 2. 16S rDNA; 3. ITS1, ITS4 and 5.8S rDNA; M. 100bp DNA Marker.

### 2.3 PCR 产物酶切分型

将得到的菌落 PCR 产物用两种限制性内切酶的消化, 每条 rDNA 被内切酶消化为 2~4 条 100~500 bp 的条带。

### 2.4 四种类群的克隆文库的覆盖率

利用覆盖率的公式计算出每种 OTU(Operational Taxonomic Unit)的克隆子个数, 绘制成 4 个克隆文库的克隆子分布图。结果显示(图 3), 原核类群 G 中有 6 个 OTU 属于优势类群, 分别占到了克隆子数的

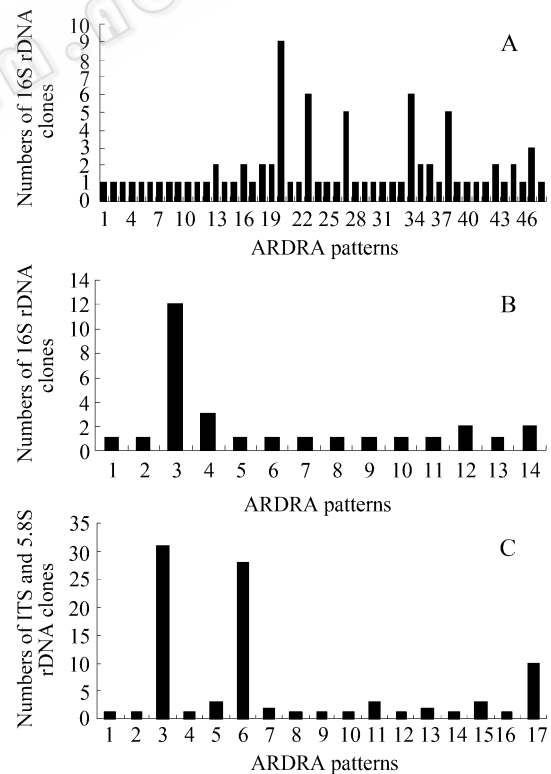


图 3 3 种类群文库克隆子 PCR-ARDRA 酶切谱型分布  
Fig. 3 Profiling of PCR-ARDRA patterns from 3 rRNA gene libraries. A: Distribution of ARDRA patterns from Prokaryotic Group G; B: Distribution of ARDRA patterns from Prokaryotic Group X; C: Distribution of ARDRA patterns from Eukaryotic Group Z.

9.3%、6.3%、5.2%、6.3%、5.3%、3.1%。原核类群 X 则主要存在两个优势类群,分别占克隆子数的 40% 和 10%。真核类群 Z 存在 3 个优势类群,分别占克隆子总数的 32.2%、29.1%和 10.4%。

2.5 系统发育树分析

2.5.1 原核类群 G 的 16S rDNA 序列系统发育分析:

从原核类群 G 中挑取 6 个 ARDRA 分型上占优势的 OTU 的克隆子和 13 个非优势 OTU 的克隆子进行序列分析。系统发育树(图 4)显示其中 7 个都属于蛭

弧菌属,分别是 JS-GU20, JS-GU17, JS-G37, JS - G29, JS-GM2, JS-G42, JS-G41。与它们相似的序列是从海洋中分离出来的两株菌株 *Bacteriovorax* sp. NE1 (EF092445)和 *Bdellovibrio* sp. JS5 (AF084859), 相似性分别为 96%和 99%。JS-GM15 在进化树上显示和假单胞菌目中的不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 有很高的相似性。而 JS-GM5 和 JS-GM17 则和 *Gulbenkiania mobilis* (AM295491)分在同一分支里, 此菌为分离自葡萄牙一处理后的废水中, 实验室培

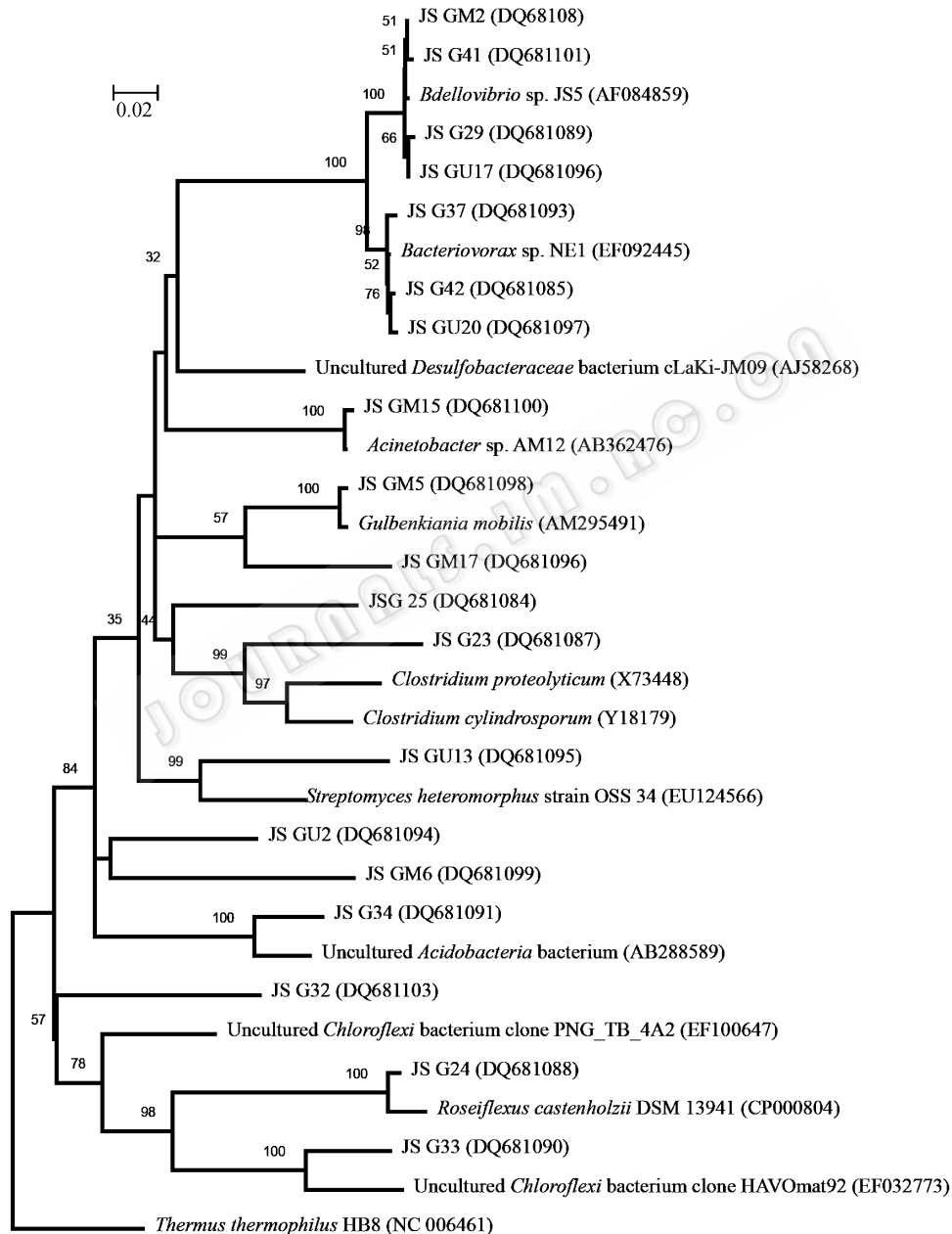


图 4 原核类群 G 16S rRNA 序列系统发育树分析(NJ)

Fig. 4 Neighbor-Joining tree constructed showing the phylogenetic relationships among 16S rRNA gene sequences of Prokaryotic Group G and their closely related sequences downloaded from GenBank etc. The numbers at the nodes indicate the bootstrap values (>50%) based on neighbor-joining analyses of 1000 resample data sets. Bar: 2 nucleotide substitutions per 100 nucleotides of 16S rRNA gene sequence.

养温度为 30 。 JS-G25 和 JS-G23 和梭菌属的 *Clostridium proteolyticum* (X73448) 分在同一支, 它们大多为化能异养菌, 最适温度为 10 ~65 。 JS- GU13 和放线菌属的 *Streptomyces heteromorphus* strain OSS 34 (EU124566) 有很 98% 的相似性, 此菌株曾用于生产抗生素 C-2801X, 这种抗体是一种新型的头孢霉素的抗生素。 JS-G34 和一株不可培养的 *Acidobacteria bacterium* (AB288589) 有 99% 的相似性, 此菌株是在日本某稻田中发现的。 JS-G32、 JS-G24 和 JS-G32 都处于绿弯菌门, 其中 JS-G24 和玫瑰菌属的 *Roseiflexus castenholzii* DSM 13941 (CP000804) 有 99% 的相似性。 绿弯菌门 (Chloroflexi) 是一类通过光合作用产生能量的细菌, 它们具有绿色的色素是兼性厌氧生物。

**2.5.2 原核类群 X 的 16S rDNA 序列系统发育分析:** 原核类群 X 的系统发育树 (图 5) 显示的 4 个序列中

3 个属于蓝细菌类群。其中 JS-X2 与在美国黄石公园的温泉发现的 *Uncultured cyanobacterium* (L35331) 有 95% 的相似性, 并且与已经全基因组测序的嗜热蓝细菌聚球藻 [ *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (47118315) ] 有 89% 的相似性。该藻的特征是缺少使饱和脂肪酸去饱和的基因, 比其他蓝藻具有更多的热休克蛋白基因<sup>[9]</sup>。 JSX8 与 *Roseiflexus castenholzii* (AB041226) 的相似性达 95%。 JS-X6 和 JS-X31 都与属于绿菌科 ( *Chlorobium* ) 的 *Pelodictyon luteolum* DSM 273 (CP000096) 有 96% 的相似性, 这株菌已经由美国能源部进行了全基因组测序。

**2.5.3 真核类群 Z 的 ITS-rDNA 序列系统发育分析:** 真核类群 Z 的系统发育树 (图 6) 显示, 所得的 OTU 可被归为 3 个类群, 分别是 *Penicillium* sp., *Lodderomyces* sp. 和 *Gloeotinia* sp. 其中大部分和青霉

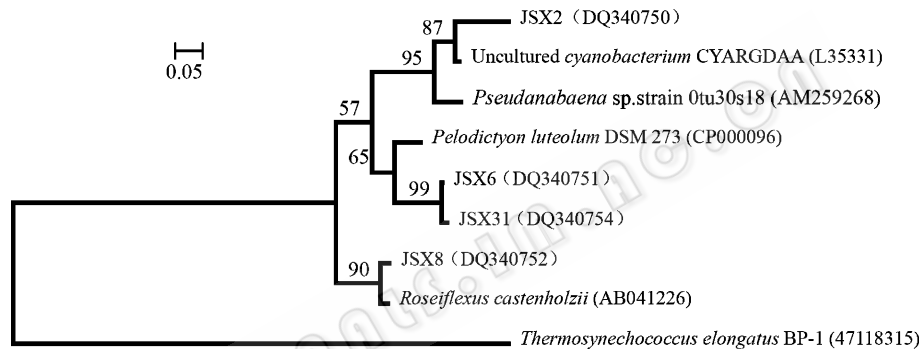


图 5 原核类群 X 16S rRNA 序列系统发育树分析(NJ)

Fig. 5 Neighbor-Joining tree constructed showing the phylogenetic relationships among 16S rRNA gene sequences of Prokaryotic Group X and their closely related sequences downloaded from GenBank etc. The numbers at the nodes indicate the bootstrap values (>50%) based on neighbor-joining analyses of 1000 resample data sets. Bar: 5 nucleotide substitutions per 100 nucleotides of 16S rRNA gene sequence.

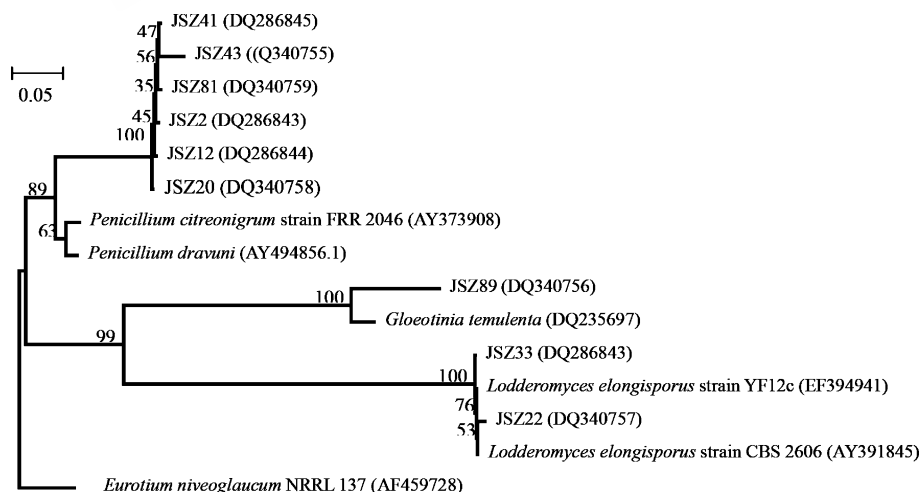


图 6 真核类群 Z ITS rRNA 序列系统发育树分析(NJ)

Fig. 6 Neighbor-Joining tree constructed showing the phylogenetic relationships among ITS and 5.8S rRNA gene sequences of Prokaryotic Group Z and their closely related sequences downloaded from GenBank etc. The numbers at the nodes indicate the bootstrap values (>50%) based on neighbor-joining analyses of 1000 resample data sets. Bar: 5 nucleotide substitutions per 100 nucleotides of rRNA gene sequence.

属相似,但是相似度较低,只有 88%~90%,而且独立成为一支,所以这些克隆子所代表的菌株可能来自新的种群。而 JS-Z22 与 JS-Z33 与路德酵母属的 *Lodderomyces elongisporus* strain CBS 2606 (AY391845.1)和 strain YF12c (EF394941)有 99%的相似性。与 JS-Z89 归在同一支的 *Gloeotinia temulenta* (DQ235697)属于植物病原菌,他们 BLAST 结果相似性只有 84%。

### 3 讨论

#### 3.1 关于 DNA 提取方法

从 4 种提取方法中可以看到 3 号和 4 号样品降解较为严重,5 号样品的带型最整齐,2 号样品的量最多。从温泉环境分析,猜测可能是由于生长在此种环境中的微生物的最适温度都在 60 以上并且抵御外界不利环境的能力很强,因而在细胞壁没有破坏之前 DNA 的降解都很少,但是一旦细胞壁破碎之后再采用剧烈的方法,那么 DNA 很容易降解。2 号样品与 5 号样品对比,可以发现 5 号样品 DNA 量较少,那么可以知道,由于没有使用 68 进行蛋白质变性,因而有可能一部分 DNA 仍然被一些蛋白质结合而无法提取到。综合以上结果,2 号样品采用冰水混合物冻融的提取方案是最佳方案。

#### 3.2 关于序列比对方法

由于采用 pMD18-T 载体克隆 16S rRNA 基因的 PCR 产物时,16S rRNA 基因的插入并没有方向性。进行序列分析时,我们只选用了载体多克隆位点上游 5 端的引物 M13(+)作为测序引物进行单向测序,因此得到 16S rRNA 基因 5 端和 3 端的序列是完全随机的。但是不管测序得到的序列长度是否能够包含整个 16S rRNA 基因的序列,总是能够在序列中找到其中一个正向或者反向的 16S rRNA 基因引物。而只有所有序列都处于同一方向所构建的进化树才是最有可靠的,因而建立的亲缘关系与实际还是有很大差别的。因而最优的做法是选择一对引物中的正向引物在所得序列中进行搜索,能够找到匹配碱基的序列则说明此序列已经是处于正向。再在那些不能找到匹配碱基的序列中搜索反向引物,如果得到匹配碱基,则说明这些序列是处于反向的,那么则将这些序列反向互补得到其正向序列。如果一条序列既无法找到正向引物也无法找到反向引物,那么有可能这条序列是非特异性扩增结果,同时也有可能是测序过程中

单个碱基误差,这个时候需要降低碱基的搜索精度,配合人工检查来完成。最后将重新排列好方向的测序所得序列和 GenBank 中所得的序列进行比对,裁去两头的多余序列,使得所有序列两头对齐。对于 GenBank 中的序列方向问题,虽然 NCBI 没有官方的说明,但是个人将 GenBank 中所得的序列直接与已经确定的正向序列比对所得到的系统发育树是最符合实际分类标准的。关于此问题的讨论和解释还未在正式出版物中见到。

#### 3.3 关于扩增古菌类群

本实验尝试采用古菌引物 Arch21F 和 1492R 引物对<sup>[8]</sup>采用梯度 PCR 对温泉环境 DNA 进行扩增,结果没有出现特异性扩增条带。可能的原因是此引物对于发酵环境中的甲烷类群的古菌有很强的偏爱性,但是对于温泉中普遍存在的泉古菌的扩增效果不好。在后续针对此环境的古菌 rDNA 扩增实验,可能需要改换新的引物。

#### 3.4 群落分布的特征

在原核类群 G 中,有一半的 OTU 克隆子属于蛭弧菌属(*Bdellovibrio*),而根据一般文献报道[23],寄生型蛭弧菌生长,要求 pH6.0~8.5;温度 23 ~37 ,低于 12 ,高于 42 时均不生长。并且未见有关嗜热的蛭弧菌的报道,但是由于在实验过程中能够污染到这种菌的可能性非常小,因此可以确定这些相似序列是来自于金山温泉的沉积物中。在 Susana 等对蛭弧菌 *B. bacteriovorus* 基因组中 LexA 调控系统的研究发现 Lex A 基因与蓝细菌的 Lex A 蛋白有选择的结合作用,而不能被其它细菌的 Lex A 蛋白所识别。因此推测蛭弧菌的生存与蓝细菌有很大的相关性,而从实验结果中发现原核类群 X 中大部分是属于蓝细菌的。对于蛭弧菌适应高温环境的机制,可能的假设是首先蛭弧菌寄生于其它细菌体内,因此寄主的内部温度可能会比外界无机环境温度要低,其次在进化过程中一些热激蛋白对蛭弧菌的基因组以及代谢过程起到保护作用。

从结果中可以看到 3 种引物的偏爱性是非常明显的,原核类群 X 的细菌通用引物在扩增温泉中的环境微生物中偏向于蓝细菌类群而对于原核类群 G 所采用的 Universal 原核扩增引物的效果却是非常令人满意的,它扩增的序列分布于蓝细菌(*Cyanobacterium*)和变形菌(*Proteobacterium*)中,而后者是目前已知细

菌中涵盖比例最大的一部分。因此原核类群 G 的引物是 3 种引物扩增结果中最能反应环境微生物多样性的。但是从所得到的测序后比对结果来看, G 引物对于蛭弧菌属(*Bdellovibrio*)有明显的偏爱性, 但是这种偏爱性只影响特定类群的丰度而对研究环境中的微生物多样性影响较小。

真核微生物所显示的多样性并不高, 可能的原因主要有以下几点: (1) 嗜热的真核微生物相比于嗜热原核微生物的保护机制可能更加完善, 在提取 DNA 的过程中, 可能一部分耐热真核微生物的 DNA 无法被提取出来; (2) 方法的偏爱性, PCR 扩增产物可能并不能代表初始模板中全部来源的序列; (3) 同时引物的偏爱性使得我们对环境微生物多样性的认识也会有影响, 由于高温环境下的真菌与海洋中以及常规的陆地真菌的保守序列可能有很大的差别, 目前所采用的引物序列可能不能反应此种生态环境下的优势类群。但是, 由于高等生物适应极端环境的能力不如低等生物, 因而所得到的多样性比原核类群低, 这点是符合预期的。

所得到的序列和已知序列表现出来的相似性都不是很高, 因而温泉中的这部分真核微生物资源还有待深入研究, 由于温泉的高温环境相对于垃圾填埋场等人工发酵堆来说更加原始, 因此保留下来的微生物资源有其独特性。这些微生物资源的进一步利用还有待于耐热微生物培养技术的改进和不依赖培养的分子生物技术的发展。

### 参 考 文 献

- [1] Pace NR. A molecular view of microbial diversity and the biosphere *Science*, 1997, 276: 734–740.
- [2] 王涛, 柴丽红. 免培养法对一热泉细菌多样性的初步研究. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2003, 43(5): 541–546.
- [3] 迟桂荣. 极端环境微生物的研究概况. *德州学院学报(Journal of Dezhou University)*, 2004, 17(2): 74–76.
- [4] 柳耀建, 林影. 极端微生物的研究概况, *工业微生物(Industrial Microbiology)*, 2000, 30(3): 53–55.
- [5] David M, Ward TS. A Natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62: 1353–1370.
- [6] David MW, Michael JF, Stephen CN, *et al.* A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62: 1353–1370.
- [7] Takai K, Sako Y. A molecular view of archaeal diversity in marine and terrestrial hot water environments. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, 28: 177–188.
- [8] Nakamura Y, Kaneko T, Sato S, *et al.* Complete genome structure of the thermophilic cyanobacteria *Thermostreptococcus longatus* BP-1(Supplement). *DNA Res*, 2002, 9(4): 135–148.
- [9] Anderson IC, Campbell CD, Prosser JI. Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. *Environ Microbiol*, 2003, 45: 36–47.
- [10] Baker GC, Godon JJ, Smith DA. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 55: 541–555.
- [11] Godon JJ, Zumstein E, Dabert P, *et al.* Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63: 2802–2813.
- [12] Hugenholtz P, Pace NR. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. *Trends Biotechnol*, 1996, 14: 190–197.
- [13] Ken T, Koki H. Molecular phylogenetic analysis of archaeal nitro-containing genes coding for rRNA obtained from a deep subsurface geothermal water pool. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 5586–5589.
- [14] Ferris MJ, Muyzer G, Ward DM. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Profiles of 16S rRNA-Defined Populations Inhabiting a Hot Spring Microbial Mat Community; *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 42: 340–346.
- [15] Redecker D. Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots, *Mycorrhiza*, 2000, 30: 73–80.
- [16] Reysenbach AL, Pace NR, Robb FT, *et al.* *Archaea: A Laboratory Manual—Thermopiles*. 1<sup>st</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995.
- [17] Zhou JZ, Brunsma TD, Jej M. DNA Recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiol*, 1996, 62: 316–322.
- [18] 温杰, 刘毅. 16S rRNA 基因 RFLP 用于不同科细菌区分, *大连医科大学学报(Journal of Dalian Medical University)*, 2005, 27(3): 81–83.
- [19] 戴欣, 蔡创华, 周世宁, 等. 海洋沉积物中特有细菌类群的初步探讨, *中山大学学报(自然科学版)(Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni)*, 2001 40(6): 55–58.
- [20] 焦晓丹, 吴凤芝. 土壤微生物多样性研究方法的进展. *土*

- 壤通报(*Chinese Journal of Soil Science*), 2004, 35(6): 789–792. 377–381.
- [21] 徐晓宇, 闵航. 土壤微生物总 DNA 提取方法的比较. 农业生物技术学报(*Journal of Agricultural Biotechnology*), 2005, 13(3):
- [22] 蔡俊鹏, 赵俊. 蛭弧菌的最新研究进展. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2006, 46(6): 1028–1032.

## A molecular view of microbial diversity in sediment of the Jinshan hot spring, Guangdong province

Kai Xiao, Lixiang Cao, Yongjun Lu, Shining Zhou\*

(State Key Laboratory for BioControl, College of Life Sciences, Sun Yat-sen (Zhongshan) University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** [Objective] The aim of this study is to analyze the microbial diversity in the sediment of Jingshan hot spring. [Method] We extracted environment DNA from the sediment and then amplified the 16S rRNA genes of prokaryote and internal transcribed spacers(ITS) DNA of eukaryote by PCR with specific conservative primers. The PCR products were ligated to the T vectors and transformed into *Escherichia coli* to construct libraries. The libraries were analyzed by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) approach. The clones of dominant ARDRA patterns were selected to sequence. The sequence similarities were analyzed by using the BLAST programs for searching the GenBank DNA databases. [Results] We identified 14 dominant operational taxonomic units (OTUs) from prokaryote G. group. The Phylogenetic tree shows that 7 of them (JS-GU20, JS-GU1, JS-G37, JS-G29, JS-GM2, JS-G42, JS-G41) belong to *Bdellovibrio*. They had the highest similarity to *Bacteriovorax* sp. NE1 (EF092445) and *Bdellovibrio* sp. JS5 (AF084859), 96% and 99% respectively. Four major OTUs of prokaryote X group belong to *Cyanobacterium*. One of them, named JS-X2, has a similarity of 95% with an uncultured *Cyanobacterium* (L35331) which was gained from a hot spring of the Yellowstone National Park and has a similarity of 89% with *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (47118315). Most OTUs of eukaryotic group have 90% sequences similarity to that of *Penicillium* sp.. [Conclusion] The results showed that the microbial diversity in the sediment of Jinshan hot spring is rich. And the result of several clones' similarity to *Bacteriovorax* sp. showed that there might be a new group of thermophilic *Bacteriovorax* sp. in the hot spring sediment.

**Keywords:** hot spring; sediment; ARDRA; microbe diversity; rRNA gene

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2007AA09Z448)

\*Corresponding author. Tel: +86-20-84110238; Fax: +86-20-84036215; E-mail: lsszsl@mail.sysu.edu.cn

Received: 28 August 2007/ Revised: 16 January 2008

### 欢迎订阅《微生物学报》

2008年《微生物学报》改为月刊(每月4日出版),每期页码为144面,单价为55.00元,全年定价660元。读者可以通过以下3种方式订阅本刊。刊号为:ISSN 0001-6209;CN11-1995/Q。

1. 邮购:欢迎广大读者直接与本刊编辑部联系购买,可通过邮局汇款,我们将按期免费邮寄。

汇款地址:(100101)北京朝阳区大屯路中国科学院微生物研究所内

收款人:《微生物学报》编辑部;电话:(010)64807321;E-mail:bjb@im.ac.cn

另外,本刊编辑部现存有少量过期期刊,如有需要者可与编辑部联系,款到即免费寄上。

2. 邮发:全国各大邮局均可订阅。

国内邮发代号:2-504;国外发行代号:BM67

3. 科学出版社期刊出版中心发行部:直接与科学出版社联系。

地址:(100717)北京东黄城根北街16号;电话:(010)64034563;E-mail:journal@mail.sciencep.com