

西南印度洋深海热液羽流海水细菌的多样性

任菲, 郝丽君, 宋磊, 朱雅新, 董志扬, 黄英, 黄力*, 戴欣*

中国科学院微生物研究所, 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

摘要: 【目的】分析西南印度洋深海热液羽流细菌的多样性特点, 为认识该特殊环境微生物对大洋生态系统的影响, 以及获得特殊的微生物资源奠定基础。【方法】将西南印度洋深海热液羽流海水进行原位浓缩, 对获得的 1000 倍浓缩海水样品进行富集培养和微生物纯培养; 通过构建原始海水浓缩样品和富集培养物的 16S rRNA 基因克隆文库, 结合纯培养获得的微生物菌株的 16S rRNA 基因, 分析该样品的细菌多样性结构和特点。【结果】共获得 104 个 16S rRNA 基因, 其中 50 个来自原始热液羽流浓缩海水样品, 40 个来自富集培养物, 14 个来自分离获得的纯培养, 它们分属于 γ -变形菌群 (γ -Proteobacteria) (74 个), α -变形菌群 (α -Proteobacteria) (14 个), β -变形菌群 (β -Proteobacteria) (5 个), 拟杆菌群 (Bacteroidetes) (4 个), 厚壁菌群 (Firmicutes) (2 个), 浮霉状菌 (Planctomycetes) (2 个), 疣微菌 (Verrucomicrobia) (2 个) 以及放线菌 (Actinobacteria) (1 个), 共 29 个不同的操作分类单元 (Operational Taxonomic Units, OTUs)。26 个序列与已知微生物 16S rRNA 基因相似性低于 97%, 最低的只有 86%。【结论】西南印度洋热液羽流存在较丰富的微生物多样性, 以 γ -Proteobacteria 为优势类群, 其次为 α -Proteobacteria; 该环境中存在较多尚未获得分离培养的微生物新属种。

关键词: 西南印度洋, 热液羽流, 16S rRNA 基因, 细菌多样性

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 11-1318-08

深海热液及由其所形成的羽流区是全球洋中脊热泉场的重要组成部分, 在深海热量和物质循环中有重要地位, 对全球海洋循环及大洋化学有重要影响^[1]。这些区域蕴含多种“金属硫化物烟囱”或“黑烟囱”释放的化合物, 形成极其独特的海洋生境, 成为海洋微生物生态学和资源学研究的新热点。热液羽流的形成是大洋中脊热泉喷出的热液进入海洋水体后, 上升并与周围低温海水混合, 热液组分浓度迅速稀释至 1 万倍 ($10^4:1$) 以上, 在达到中性浮力 (neutral buoyancy) 前混合流体可上升数百米, 同时

发生侧向扩散的结果^[2]。在羽流区中, 铁、锰离子以及甲烷、氨、氢和硫化氢等的浓度显著高于周围海水, 并可在大洋中扩散几公里。1986 年, Winn 等^[3]首次报道东太平洋 Juan de Fuca Ridges 洋脊 Endeavour 段热液形成的羽状流中存在大量微生物, 随后发现在深海热液羽流区中微生物细胞的数量^[4]、锰的氧化沉积速率^[5-6]都明显高于其周边海水, 而且, 在普通深海水体中少见或极弱的氨氧化反应^[7-8]和甲烷氧化反应^[9], 在热液羽流中普遍存在。可见, 热液羽流中微生物独特而活跃的代谢活动, 是

基金项目: 中国大洋协会项目 (DY125-15-R-02, DYXM-115-02-1-02); 中国科学院知识创新工程项目 (KSCX2-EW-J-6)

* 通信作者。戴欣, Tel: +86-40-64807418, E-mail: daixin@im.ac.cn; 黄力, Tel: +86-40-64807430, E-mail: huangl@sun.im.ac.cn

作者简介: 任菲 (1987-), 女, 陕西人, 硕士研究生, 主要从事海洋微生物生态学研究。E-mail: renfei3080@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-05-09; **修回日期:** 2012-05-22

大洋物质和能量循环的重要组成部分。

与海洋其他生境(包括热液口及其沉积物)相比,热液羽流微生物的研究工作相对较少,并且主要集中在太平洋热液所形成的羽状流中,而西南印度洋中脊(SWIR)由于其偏僻的海洋地理位置,传统上一直对其研究较少。基于微生物 16S rRNA 基因的多样性分析表明,源自不同热液口的羽状流中的微生物多样性群落组成各不相同^[4,10-11],从不同的羽流中分离获得的微生物菌株往往都具有某些特定的生态功能,诸如氧化锰、合成光合色素、自养生长或抗热抗辐射等^[11-14]。我国对深海热液区及其羽状流的规模性探测始于 2005 年,至 2010 年,我国已经在世界三大洋(印度洋、太平洋和大西洋)发现了 17 个海底热液区,其中西南印度洋新的热液活动区的发现,也是人类首次在超慢速扩张洋中脊发现海底热液活动区^[15]。目前,我国多个实验室在对来自大洋深海(包括西南印度洋)热液沉积物及其矿物中的微生物进行分离培养、多样性和功能基因分析等工作并取得了一系列成果^[15-24],但至今国内外未见有关西南印度洋这一超慢速扩张洋中脊热液羽流微生物多样性研究的报道。因此,本研究拟通过对西南印度洋深海热液羽流海水进行浓缩,将浓缩后的海水样品进行富集培养,并进一步纯培养微生物,综合浓缩样品和富集培养物的 16S rRNA 基因克隆文库以及分离获得的微生物菌株的 16S rRNA 基因进行多样性分析,揭示这一区域深海热液羽流微生物的多样性特点,为进一步了解微生物在该环境中的生态作用,获得更多新的微生物资源奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器和试剂: PCR 仪为 AB 公司 Veriti™96-well Thermal Cycler; DNA 提取试剂盒为 E. Z. N. A Water DNA Kit 购自 Omega 公司; DNA 纯化试剂盒购自 Omega 公司; DNA 提取试剂盒 bacterial genomic kit 购自 Axygen; 大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5a 感受态细胞购自北京全式金公司; 酵母提取物、胰蛋白胨购自 Oxoid 公司; 其他生化试剂均为国产分析纯。

1.1.2 培养基: (1) 富集培养基为 Zobell 2216E 培养基 (DSMZ medium514, BACTO MARINE BROTH)

稀释添加 N-乙酰葡萄糖胺 0.1 g/L, 硫代硫酸钠 0.1 g/L 改进而成; (2) 分离培养基: 分别采用海水基本培养基 (MHB) ^[25], Zobell 2216E 培养基, 海水 GYM 培养基 (DSMZ medium65, 陈海水配制), 海水 R2A 培养基 (DSMZ medium830, 陈海水配制)。

1.2 样品采集

样品于 2010 年 1 月 11 日采用我国自主研发的生物组合采样器, 将西南印度洋深海 2800 米热液羽流区海水原位浓缩 1000 倍, 样品采集地位点为 49°39'E/37°47'S。获得的浓缩样品部分直接接种于培养基中 4℃ 富集培养, 剩余部分抽滤于 0.22 μm 滤膜保存。

1.3 微生物富集培养

取原始浓缩热液羽流样品直接接种于富集培养基中, 接种量 5%, 4℃ - 10℃ 富集培养。

1.4 微生物纯培养

取富集培养物 100 mL 涂布于分离培养基上, 10℃ 培养约 26 d。

1.5 样品总 DNA 提取和 16S rRNA 基因片段 PCR 扩增

1.5.1 样品 DNA 的提取: 总 DNA 提取先采用液氮冻融破碎细胞壁, 再使用 Omega E. Z. N. A Water DNA Kit, 提取样品总 DNA。富集培养物总 DNA 及分离菌株 DNA 采用 Axygen bacterial genomic kit 提取。

1.5.2 微生物 16S rRNA 基因片段的特异性扩增: 所用引物为细菌通用引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCC (A) TGGCTCAG-3' 和 1492R: 5'-ACGGCTACCT TGTTACGACT-3'。PCR 扩增程序: 95℃ 5 min; 95℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 2 min, 30 个循环; 72℃ 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并经 DNA 纯化试剂盒纯化。

1.5.3 16S rRNA 基因克隆文库的构建: 纯化后的 PCR 产物连接 pGEM-T 载体, 转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5a 感受态细胞, 涂布于含氨苄青霉素 (50 mg/L) 的 IPTG /X-gal 平板上 37℃ 培养过夜。挑取白斑菌落提取质粒, 对阳性克隆的插入片段进行测序。

1.5.4 基于 16S rRNA 基因片段的微生物多样性分析: 对来自原始浓缩海水和富集培养物 16S rRNA 基因克隆文库的 16S rRNA 基因使用 RDP (Ribosomal Database Project) 的 CHECK-CHIMERA

程序 (<http://rdp8.cme.msu.edu/cgis/chimera.cgi>) 分析并去除嵌合序列将得到的有效序列用 DNAMAN 软件进行排序并获得相似性矩阵, 相似性 $\geq 97\%$ 的序列被认为是相同的分类单元 (OTU, operational taxonomic unit) 并用其中一个序列作为代表^[22], 每个 OTU 代表序列提交 GenBank 数据库 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) 并获得该数据库的收录号 (JQ975820-JQ975874); 对每一个代表序列进行 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 相似性比对, 根据比对结果选取参照序列, 用 Clustal X1.83 进行排序, MEGA5.0 (Neighbor-Joining 法) 构建系统进化树, Kimura 2-parameter 模式, Bootstrap 1000 次检测。

2 结果和讨论

2.1 印度洋深海热液羽流原始海水浓缩样品 16S rRNA 基因克隆文库的构建及多样性分析

采用 WATER DNA KIT 提取原始海水浓缩样品中的总 DNA, 用细菌通用引物 27F 和 1492R 进行 PCR 扩增, 获得 1500 bp 左右的单一条带用于文库构建 (图略)。共获得转化子约 200 个, 阳性率约为 80%。

随机挑取 50 个阳性克隆进行序列测定。按照 16S rRNA 基因相似性 $\geq 97\%$ 为一个 OTU 统计, 共获得 15 个不同的 OTUs。图 1 (空心标记线) 显示, 对该文库的测序趋于饱和。克隆序列的相似性比对结果 (表 1) 表明, 50 个克隆中, 14 个与交替单胞菌 (*Alteromonas*) 具有较高的相似性, 是其中的优势菌, 并且与它们相似性最高的菌株均分离自海水或盐水环境中; 另外, 12 个克隆与假单胞菌 (*Pseudomonas*) 相似性较高, 是原始海水浓缩样品中又一类优势菌; 与不动杆菌 (*Acinetobacter*) 相似的克隆共 7 个。基于 16S rRNA 基因的系统进化分析 (图 2) 发现, 来自原始海水浓缩样品克隆属于 5 个类群, 其中 γ -Proteobacteria 为优势类群 (36 个), 占总克隆数的 72%, 交替单胞菌、假单胞菌和不动杆菌均属此类群; α -Proteobacteria 占总克隆数的 18%, 它们主要与鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas*, 5 个)、柄细菌 (*Caulobacter*, 2 个) 和细小棒菌 (*Parvibaculum*, 2 个) 等属的微生物相似, 但相似性较低 (86% - 94%); 各有 2 个克隆分别与浮霉状菌类群

(Planctomycetes) 和疣微菌类群 (Verrucomicrobia) 的微生物相似, 分别占总克隆数的 4%, 这是海水中常见的两类微生物; 还有 1 个克隆与 Bacteroidetes 类群中能滑行运动的海洋细菌 *Mesonium mobilis* KMM6059 16S rRNA 基因序列相似性为 99%。50 个克隆中的 20 个克隆与已知属种微生物的 16S rRNA 基因序列相似性小于 97%, 其中所有 α -Proteobacteria 和 Verrucomicrobia 类群克隆的序列与已知微生物的 16S rRNA 基因相似性均小于 94%。其中鞘氨醇单胞菌和柄细菌在富集培养物的 16S rRNA 基因克隆文库中得到了一致的克隆序列 (表 1, 图 2), 但仍未能分离获得纯培养菌株。

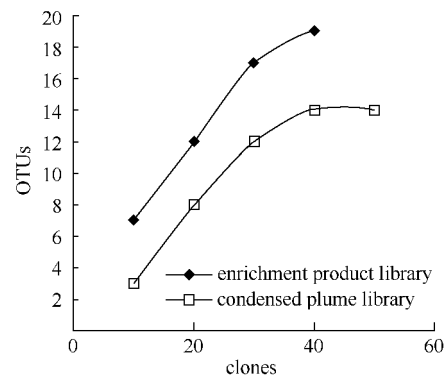


图 1 原始热液羽流样品及富集培养物 16S rDNA 文库稀释度曲线

Fig. 1 Rarefaction curves for the numbers of OTUs of bacteria in the concentrated hydrothermal plume water (with empty marker line) and the enrichment culture (with solid marker line) based on 16S rRNA gene sequence analysis.

采用非培养方法对热液羽流微生物多样性进行研究的报道尚不多。西太平洋 Suiyo Seamount 热液喷口形成的羽流中, γ -和 ϵ -Proteobacteria 为优势微生物类群, 其中 γ -Proteobacteria 微生物与共生于 Bathymodiolus 等贻贝类热液口底栖生物体内的微生物聚为一簇^[4]; 对东太平洋 Guaymas Basin 热液羽流中 16S rRNA 基因多样性的研究结果则表明, γ -和 α -Proteobacteria 为该生境的优势微生物类群, 其中 γ -Proteobacteria 微生物主要是一些嗜甲烷菌 (methanotrophs) 以及在其他热液区域获得的类似菌株或克隆, 还获得了与交替单胞菌和假单胞菌相似性较高的克隆和分离菌株^[11]; 最近, Sylvan 等采用 ARISA (Automated rRNA intergenic spacer analysis) 方法分别对东太平洋两个热液羽流的不同时空样点的微生物多样性进行分析, 结果表明, 除个别样品

外,两个羽流的微生物群落结构各不相同但各自又相对稳定,总体看来,该区域羽流中 ϵ -Proteobacteria 为优势类群,随着时间推移,则 γ -和 α -Proteobacteria 增多,推测它们主要是一些参与铁硫代谢的微生物^[10]。可见,源自不同热液喷口羽流中的微生物群

落结构和多样性特点是不同的。La Duc 等也曾尝试通过构建 16S rRNA 文库分析印度洋热液羽流的微生物群落及多样性,但因无法扩增 16S rRNA 基因而未能获得结果^[14]。

表 1 原始热液羽流样品、富集培养物和分离菌株的 16S rRNA 基因序列分析

Table 1 The BLAST results of 16S rRNA gene sequences retrieved from the concentrated hydrothermal plume water (Y), the enrichment culture (AE) and the isolated stains (I)

Represent clone No.	The closest relatives (the GenBank accession Number)	Identity / %	Number of clones		
			Y ²	AE ³	I ⁴
Y002	<i>Pseudomonas putida</i> BIRD-1 (CP002290)	99	11	10	1
Y035	<i>Pseudomonas fluorescens</i> LMG 14562 (HE586392)	99	1	2	2
Y007	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> SPd (FJ405363)	95	3	1	1
Y075	<i>Acinetobacter haemolyticus</i> Ld6 (HQ132734)	99	6	4	3
Y021	<i>Mesonium mobilis</i> KMM 6059 (DQ367409) ¹	99	1	2	1
Y003	<i>Caulobacter fusiformis</i> ATCC 15257 (NR_025320)	94	2	1	0
Y087	<i>Alteromonas macleodii</i> LS9 (FJ937879) ¹	96	10	2	0
Y095	<i>Sphingomonas aquatilis</i> JSS-7 (NR_024997)	86	5	1	0
Y036	<i>Parvibaculum lavamentivorans</i> DS-1 (AY387398) ¹	92	2	0	0
Y217	<i>Acinetobacter beijerinckii</i> NIPH2025 (EU477146)	99	1	0	2
Y077	<i>Haloferula rosea</i> 06SJR1-1 (NR_041671) ¹	91	2	0	0
Y072	<i>Alteromonas stellipolaris</i> LMG21856 (AJ564723) ¹	99	3	0	0
Y086	<i>Alteromonas hispanica</i> F-32 (NR_043274)	99	2	0	0
Y104	<i>Planctomyces limnophilus</i> Mu290 (NR_029225)	99	2	0	0
A002	<i>Pseudoalteromonas ruthenica</i> KMM290 (AF316890) ¹	97	0	1	0
A009	<i>Alcanivorax venustensis</i> ISO4 (NR_025145) ¹	99	0	1	0
A026	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i> F (AJ491845)	99	0	4	0
A027	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ABR11NW EA1433 (GU434689) ¹	99	0	1	0
A207	<i>Achromobacter</i> sp. BR3 clone1 (JN196540)	96	0	1	0
A048	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. E422-5 (FJ169977) ¹	89	0	1	0
E001	<i>Marinobacter gudaonensis</i> SL014B11A (DQ629025)	95	0	2	0
E007	<i>Shigella dysenteriae</i> FBD014 (EU009185)	99	0	2	0
E027	<i>Dietzia natronolimnaea</i> LLA (DQ333285)	89	0	1	0
E031	<i>Shigella flexneri</i> E58 (HQ407235)	100	0	1	0
E207	<i>Brevundimonas mediterranea</i> V4 (AJ244706)	99	0	2	0
I001	<i>Thalassospira xiamenensis</i> PTG4-18 (EU603449)	96	0	0	1
I003	<i>Acinetobacter lwoffii</i> BLAc9 (FJ860882)	97	0	0	1
I006	<i>Planococcus citreus</i> TF-16 (AF500008) ¹	99	0	0	1
I007	<i>Paenibacillus borealis</i> HM31 (AJ011327)	96	0	0	1

1, reference bacteria isolated from sea environments; 2, Number of the clones derived from the 16S rRNA clone library of the concentrated hydrothermal plume water; 3, Number of the clones derived from the 16S rRNA clone library of the enrichment culture; 4, Number of the strains isolated from the hydrothermal plume water.

2.2 富集培养物 16S rRNA 基因克隆文库的构建及多样性分析

采用细菌基因组试剂盒 (Bacterial genomic kit), 从接种浓缩海水、经富集培养获得的微生物中提取总 DNA, 同样用细菌通用引物 27F 和 1492R 进行 PCR 扩增, 扩增产物纯化后构建文库, 共获得约 200 个克隆, 阳性克隆率约为 80%。

随机挑选阳性克隆进行测序, 共获得 40 个 16S rRNA 基因序列, 分为 20 个 OTUs。相对原始海水浓缩样品而言, 尽管文库的稀释度曲线尚未饱和 (图 1 实心标记线), 但半数以上 (23 个) 克隆 (8 个 OTUs) 包括优势克隆与原始海水浓缩样品获得的结果一致, 说明富集结果具有一定代表性。系统聚类分析表明富集培养获得了两个新的类群 (图 2), 即 β -

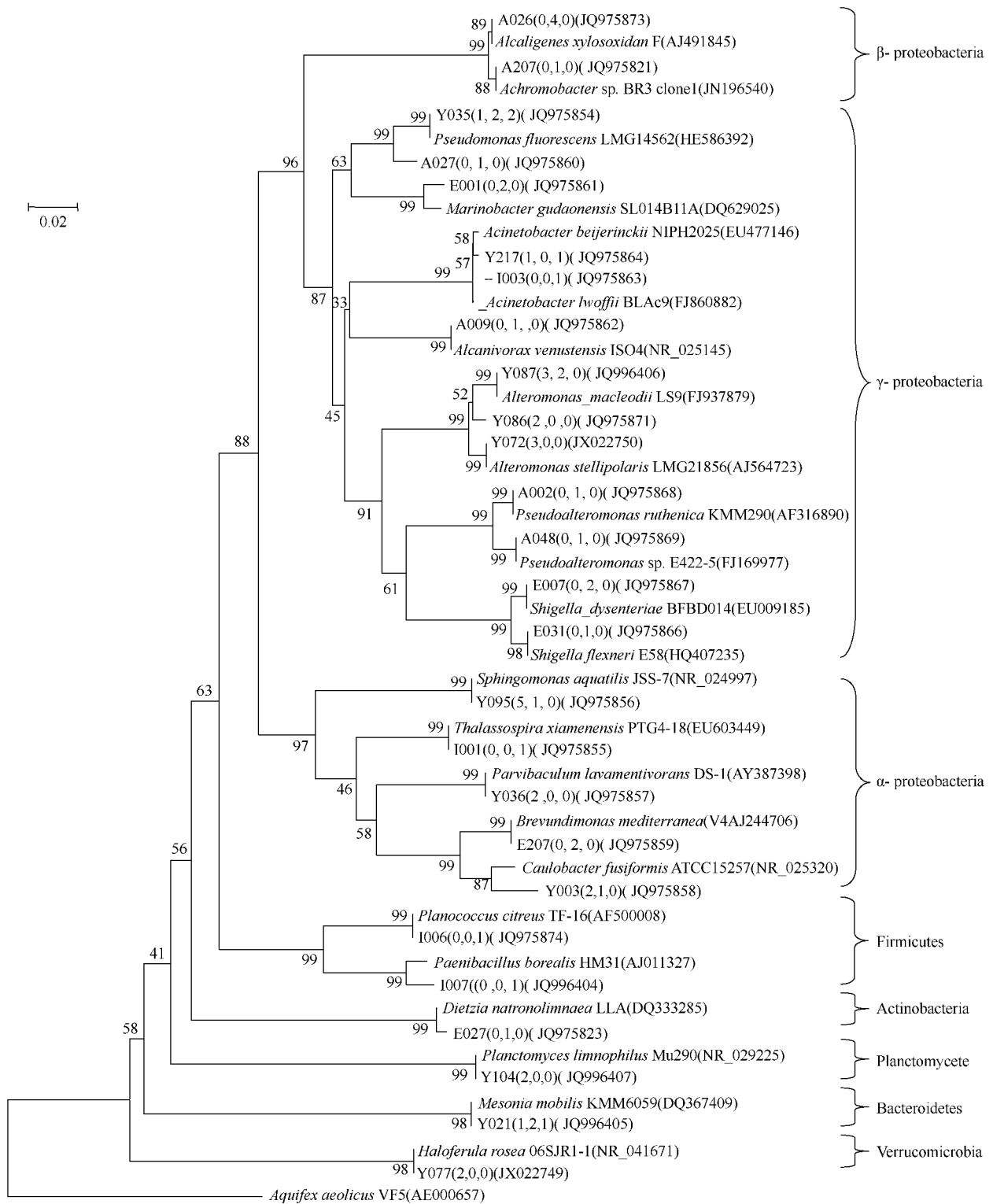


图 2 基于 16S rRNA 基因序列的热液羽流细菌系统发育树

Fig.2 Phylogenetic analysis of bacteria in the hydrothermal plume based on 16S rRNA gene sequences. The numbers at the nodes indicate bootstrap values (1000 resamplings). The numbers in the round brackets indicate the numbers of sequences in the concentrated hydrothermal plume water, the enrichment culture and the isolated strains. *Aquifex aeolicus* VF5 (AE000657) is used as outgroup.

Proteobacteria 和 Actinobacteria, 它们分别与无色杆菌 (*Achromobacter*) 和迪茨氏菌 (*Dietsia*) 相似 (表 1), 与后者的相似性只有 89%。尽管很多与硫氧化、氮氧化相关的 β -Proteobacteria 微生物常能从深海热液区域分离获得, 但它们似乎并非羽流中的优势类群, 在 Guaymas Basin 和 Suiyo Seamount 等热液羽流中, 这些类群的比例不高^[4,11], 放线菌类群的 16S rRNA 更是极少在羽流微生物 16S rRNA 基因克隆文库中发现, 由此推测, 这些克隆代表的菌株在西南印度洋原始海水样品中含量低, 但富集培养条件使它们得到了富集。有望通过进一步的富集培养和纯培养获得这些代表菌株, 从而分析它们在羽流中的生态功能。

2.3 分离获得的纯培养菌株 16S rRNA 基因分析

采用 4 种分离培养基共分离获得 14 株细菌, 10 个不同的 OTUs。对这些菌株 16S rRNA 基因的相似性分析结果 (表 1) 表明, 获得的菌株与已知菌株相似性均大于 95%, 其中 8 株细菌的 16S rRNA 基因 (6 个 OTU) 与来自原始海水浓缩样品和富集培养物 16S rRNA 基因克隆文库的序列一致, 表明这些微生物存在该环境中, 并较易于满足其富集和分离培养条件。它们主要是假单胞菌和不动杆菌以及低 GC% 革兰氏阳性菌 (Firmicutes), 已有的来自热液沉积物和热液羽流的分离菌株的报道表明, 这类在环境样品中分布广泛的微生物, 同样存在于深海热液羽流中, 并且可能具有新的生物生态学功能。如 Wang 等^[26] 从深海热液羽流分离到 *Pseudomonas aeruginosa* CW961, 能沉淀并去除溶液中的镉; Dick 等^[27] 发现大量分离自热液沉积物及其羽流区中的芽胞杆菌 *Bacillus* 具有氧化锰的能力; Yurkov 等^[13] 则从太平洋热液羽流分离出需氧细菌 *Citromicrobium bathyomarinum*, 该菌株能合成光合色素蛋白^[12]; La Duc 等^[14] 从印度洋热液羽流中筛选获得 46 株具有抗压抗辐射能力的细菌。因此, 对本研究分离获得的来自西南印度洋的菌株的生理生化特性分析, 将为我们进一步研究它们的生态适应性以及在大洋生态系统中的贡献提供线索, 也为新的微生物资源收集和利用奠定基础。

2.4 西南印度洋热液羽流样品中细菌多样性及其起源

在我们分析的西南印度洋热液羽流中存在至少 8 种不同类群的微生物, 即 γ -, α -, β -, Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes,

Planctomycetes, Verrucomicrobia 和 Actinobacteria。而无论是不依赖分离培养的直接文库构建, 还是富集分离培养, 均显示在该热液羽流中 γ -Proteobacteria 为优势微生物类群, 其中主要是交替单胞菌, 假单胞菌和不动杆菌等在自然界中分布特别广泛、代谢类型多样的微生物菌株; 其次是 α -和 β - Proteobacteria 类群的微生物。但获得的 α -Proteobacteria 克隆序列与已知微生物相似性偏低, 分离得到的该类群菌株也非常少, 需要进一步设法获得这些微生物资源以期进一步分析 α -Proteobacteria 类群微生物在该羽流的物质能量循环中的作用。

有关热液羽流微生物的起源, 早期倾向于认为是产生羽流的热液喷口^[3], 如前所述的 ϵ -Proteobacteria, 序列分析也证实它们与生活在热液口附近的底栖生物体内共生的微生物有关^[4]。随着越来越多的数据积累, 在羽流中也发现了诸多与其周边海水的序列相似的微生物 16S rRNA 基因序列。Dick 等^[11] 比较了 Guaymas Basin 羽流与其周边海水的微生物群落结构, 发现它们在类群组成上极其相似, 只是不同类群的含量不同, 即羽流中特殊的化合物含量会促进某些物种的大量繁殖。我们的结果表明, 西南印度洋深海热液羽流中获得的 γ -Proteobacteria, 可能更多地来自周边海水, 与已知微生物相似性较高; 而大部分 α -Proteobacteria、Verrucomicrobia 以及 Actionbacteria 类群的微生物, 与目前发表的微生物 16S rRNA 基因相似性较低, 推测它们来自深海热液口。如果能够从该海域深海羽流分离获得更多的微生物纯培养菌株, 将有可能研究它们的生理生化特性和生态功能, 进一步阐释它们的起源与生态意义。

致谢 感谢中国大洋协会 DY115-21 航次第五航段首席科学家、同济大学周怀阳教授在深海样品采集上提供的指导和帮助; 感谢同济大学王虎博士提供样品采集水域的地理化学参数信息。

参考文献

- [1] 杨作升, 范德江, 李云海, 王厚杰. 热液羽状流研究进展. 地球科学进展 (*Advances In Earth Science*), 2006, 2 (10): 999-1008.
- [2] Lupton JE, Delaney JR, Johnson HP, Tivey MK. Entrainment and vertical transport of deep-ocean water by buoyant hydrothermal plumes. *Nature*, 1985, 316 (6029): 621-623.

- [3] Winn CD, Karl DM, Massoth GJ. Microorganisms in deep-sea hydrothermal plumes. *Nature*, 1986, 320 (6064):744-746.
- [4] Sunamura M, Higashi Y, Miyako C, Ishibashi J, Maruyama A. Two bacteria phylotypes are predominant in the Suiyo Seamount hydrothermal plume. *Applied Environmental Microbiology*, 2004, 70 (2): 1190-1198.
- [5] Cowen JP, Massoth GJ, Baker ET. Bacterial scavenging of Mn and Fe in a mid- to far-field hydrothermal particle plume. *Nature*, 1986, 322 (6075):169-171.
- [6] Dick GJ, Clement BG, Webb SM, Fodric FJ, Bargar JR, Tebo BM. Enzymatic microbial Mn (II) oxidation and Mn biooxide production in the Guaymas Basin deep-sea hydrothermal plume. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2009, 73 (21):6517-6530.
- [7] Lam P, Cowen JP, Jones RD. Autotrophic ammonia oxidation in a deep-sea hydrothermal plume. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 47 (2):191-206.
- [8] Lam P, Cowen JP, Popp BN, Jones RD. Microbial ammonia oxidation and enhanced nitrogen cycling in the Endeavour hydrothermal plume. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2008, 72 (9):2268-2286.
- [9] De Angelis MA, Lilley MD, Baross JA. Methane oxidation in deep-sea hydrothermal plumes of the Endeavour Segment of the Juan de Fuca Ridge. *Deep-Sea Research part I-Oceanographic Research Papers*, 1993, 40 (6):1169-1186.
- [10] Sylvan JB, Pyenson BC, Rouxel O, German CR, Edwards KJ. Time-series analysis of two hydrothermal plumes at 9° 50' N East Pacific Rise reveals distinct, heterogeneous bacterial populations. *Geobiology*, 2012, 10 (2):178-192.
- [11] Dick GJ, Tebo BM. Microbial diversity and biogeochemistry of the Guaymas Basin deep-sea hydrothermal plume. *Environmental Microbiology*, 2010, 12 (5):1334-1347.
- [12] Yurkov VV, Krieger S, Stackebrandt E, Beatty JT. *Citromicrobium bathyomarinum*, a novel aerobic bacterium isolated from deep-sea hydrothermal vent plume waters that contains photosynthetic pigment-protein complexes. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181 (15): 4517-4525.
- [13] Beatty JT, Overmann J, Lince MT, Manske AK, Lang AS, Blankenship RE, Van Dover CL, Martinson TA, Plumley FG. An obligately photosynthetic bacterial anaerobe from a deep-sea hydrothermal vent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102 (26):9306-9310.
- [14] La Duc MT, Bernardini JN, Kempf MJ, Newcombe DA, Lubarsky M, Venkateswaran K. Microbial diversity of Indian Ocean hydrothermal vent plumes: microbes tolerant of desiccation, peroxide exposure, and ultraviolet and gamma-irradiation. *Astrobiology*, 2007, 7 (2):416-432.
- [15] 刘艳. 深海热液区微生物的筛选鉴定及对深海环境的响应机制. 山东师范大学, 硕士学位论文, 2009.
- [16] Li J, Zhou H, Peng X, Wu Z, Chen S, Fang J. Microbial diversity and biomineralization in low-temperature hydrothermal iron-silica-rich precipitates of the Lau Basin hydrothermal field. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, doi: 10.1111/j. 1574-6941.2012.01367.x.
- [17] Wang H, Li H, Shao Z, Liao S, Johnstone L, Rensing C, Wang G. Genome sequence of deep-sea manganese-oxidizing bacterium *Marinobacter manganoxydans* Mn17-9. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194 (4):899-900.
- [18] Xie W, Wang F, Guo L, Chen Z, Sievert SM, Meng J, Huang G, Li Y, Yan Q, Wu S, Wang X, Chen S, He G, Xiao X, Xu A. Comparative metagenomics of microbial communities inhabiting deep-sea hydrothermal vent chimneys with contrasting chemistries. *The ISME Journal*, 2011, 5 (3):414-426.
- [19] 董纯明, 陈亮, 廖悦婷, 邵宗泽. 一株深海热液环境来源的 PAHs 降解菌 TVG9-VII 的系统发育与降解基因. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2011, 51 (11):1548-1554.
- [20] Dong C, Lai Q, Chen L, Sun F, Shao Z, Yu Z. *Oceanibaculum pacificum* sp. Nov., isolated from hydrothermal field sediment of the south-west Pacific Ocean. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60 (Pt1):219-222.
- [21] Qi H, Chen H, Ao J, Zhou H, Chen X. Identification of differentially expressed genes in *Sulfobacillus* sp. TPY grown on either elemental sulphur or Fe(2+). *Journal of General and Applied Microbiology*, 2010, 56 (5):389-397.
- [22] Zhou H, Li J, Peng X, Meng J, Wang F, Ai Y. Microbial diversity of a sulfide black smoker in main endeavour hydrothermal vent field, Juan de Fuca Ridge. *Journal of Microbiology*, 2009, 47 (3):235-247.
- [23] Wang S, Xiao X, Jiang L, Peng X, Zhou H, Meng J, Wang F. Diversity and abundance of ammonia-oxidizing archaea in hydrothermal vent chimneys of the Juan de Fuca Ridge. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75 (12):4216-4220.
- [24] Wang F, Zhou H, Meng J, Peng X, Jiang L, Sun P, Zhang C, Van Nostrand JD, Deng Y, He Z, Wu L, Zhou J, Xiao X. GeoChip-based analysis of metabolic diversity of microbial communities at the Juan de Fuca Ridge hydrothermal vent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106 (12):4840-4845.

- [25] Thirkell D, Summerfield M. The membrane lipids of *Planococcus citreus* Migula from cells grown in the presence of three different concentrations of sea salt added to a basic medium. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1977 (1), 43:43-54.
- [26] Wang CL, Michels PC, Dawson SC, Kitisakkul S, Baross JA, Keasling JD, Clark DS. Cadmium removal by a new strain of *Pseudomonas aeruginosa* in aerobic culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63 (10):4075-4078.
- [27] Dick GJ, Lee YE, Tebo BM. Manganese (II)-oxidizing *Bacillus* spores in Guaymas Basin Hydrothermal sediments and plumes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72 (5):3184-3190.

Bacterial diversity in a deep-sea hydrothermal plume in the southwest Indian Ocean

Fei Ren, Lijun Xi, Lei Song, Yaxin Zhu, Zhiyang Dong, Ying Huang, Li Huang*, Xin Dai*

State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: [Objective] We characterized bacterial diversity in a deep-sea hydrothermal plume seawater in the southwest Indian Ocean to increase our understanding of the impact of the microorganisms on the ocean ecosystem and to survey microbial resources in this special environment. [Methods] The deep-sea hydrothermal plume seawater in the southwest Indian Ocean was concentrated in situ by 1000 folds, enrichment cultures were established with the concentrated sample, and isolates were purified. Bacterial 16S rRNA gene libraries were constructed from both the concentrated seawater sample and from the enrichment culture and analyzed. The 16S rRNA genes from the isolated strains were also analyzed. [Results] A total of 104 16S rRNA genes were obtained, in which 50 were from the concentrated plume seawater, 40 from the enrichment culture, and 14 from the isolated strains. These sequences are affiliated with γ -proteobacteria (74), α -proteobacteria (14), β -Proteobacteria (5), Bacteroidetes (4), Firmicutes (2), Planctomycetes (2), Verrucomicrobia (2) and Actinobacteria (1), and fall into 29 different operational taxonomic units (OTUs). Twenty-six sequences share less than 97% identity with the best-matched sequences in the public database, with the lowest being 86%. [Conclusions] There is rich bacterial diversity in the deep-sea hydrothermal plume seawater in the southwest Indian Ocean, where γ -proteobacterial groups were dominant, followed by α -proteobacterial groups. A number of species remain uncultured.

Keywords: southwest Indian Ocean, hydrothermal plume, 16S rRNA gene, bacterial diversity

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Program of China Ocean Mineral Resources R & D Association (DY125-15-R-02, DYXM-115-02-1-02) and by the Knowledge Innovation Program of Chinese Academy of Sciences (KSCX2-EW-J-6)

* Corresponding authors. Xin Dai, Tel: + 86-40-64807418, E-mail: daixin@im.ac.cn; Li Huang, Tel: + 86-40-64807430, E-mail: huangli@sun.im.ac.cn

Received: 9 May 2012 / Accepted: 22 May 2012