

海洋沉积物中特有细菌类群的初步探讨^{*}

戴欣¹, 周惠¹, 蔡创华², 周世宁¹, 屈良鹄¹

(1. 中山大学生命科学学院 // 基因工程教育部重点实验室, 广东 广州 510275;

2. 中国科学院南海海洋研究所, 广东 广州 510275)

摘要: 通过构建 16S rRNA 基因文库对中国南海南沙海区沉积物中细菌多样性进行分析, 并将获得的 16S rRNA 基因序列与国际基因数据库 GenBank 进行相似性比较及聚类分析, 结果发现来自海洋沉积物的未能培养的微生物往往组成一簇, 并与现已获培养并鉴定的微生物自然分开, 这一现象表明, 海洋沉积物中存在特有的微生物属种。

关键词: 中国南沙; 海洋沉积物; 特有细菌类群; 16S rRNA 基因

中图分类号: Q939.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2001) 06-0051-04

20 世纪 40 年代以来, 人们一直采用分离培养的方法来研究海洋微生物。但是, 由于海洋中微生物往往结集一起, 一些微生物处于非活性的不可培养状态以及培养基的选择作用等原因, 导致应用常规的分离培养方法无法全面地反映海洋微生物资源状况^[1]。

基于大分子核糖体 RNA 基因 (16S 或 23S rDNA) 分析基础上的分子生物学技术, 使人们得以建立许多不依赖于微生物分离培养的分析方法, 对各种生境中的微生物多样性获得更系统和全面的了解^[2]。目前, 通过分析环境样品中的 16S rDNA 序列, 人们发现在陆地水体沉积物和土壤中, 存在着这些特有地理环境中许多未知的新种及其特有的微生物群落^[3]; 对海水中浮游微生物多样性的研究, 也显示出在大西洋、太平洋和北冰洋等地理隔离的海域中分别存在相同的新的分类单元^[4]。海洋沉积物占地球面积 70% 以上, 它既不同于淡水沉积物、土壤等陆地环境, 又与海水水体环境相对独立, 沉积物中的微生物往往具有适应其特殊环境的形态学、生理学上的特异性, 对其多样性的研究已成为世界各国研究的热点。

至 2001 年 7 月, 国际基因数据库中收录的有关海洋细菌的 16S rRNA 基因序列已达 6 000

多条, 而其中海洋沉积物中细菌的 16S rRNA 基因序列也超过 200 条, 使人们以 16S rRNA 基因为指标, 对微生物在海洋环境中分布规律性的研究成为可能。在对我国南沙海洋沉积物中细菌多样性研究中获得 16S rDNA 序列进行比较分析中, 我们发现来自海洋沉积物的未能培养的微生物往往组成一簇, 并与现已获培养并鉴定的微生物自然分开, 本文对此工作进行报道。

1 材料和方法

1.1 样品的采集和处理

样品由中国试验 3 号科学考察船采自南沙群岛西南部海区水深 200 ~ 500 m 处, 采集后保存于一 20 ℃, 运至实验室后保存于一 80 ℃。

1.2 DNA 提取和纯化

沉积物总 DNA 的提取和纯化参考文献[5]的方法。

1.3 16S rDNA 的 PCR 扩增

采用细菌 16S rDNA 扩增通用引物 16 (+) 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1492r 5'-GGTACCTTGTACGACTT-3', 分别对应于 *E. coli* 16S rRNA 8 ~ 27 位和 1 510 ~ 1 492 位; PCR 反应条件为 94 ℃ 变性 4 min, 然后在 94 ℃ 1 min, 45 ℃ 1.5 min, 72 ℃ 2 min 循环 26 次,

^{*} 基金项目: 国家杰出青年科学基金资助项目 (39525007); 教育部长江学者特聘教授配套优秀青年教师骨干基金资助项目

收稿日期: 2001-05-08; 作者简介: 戴欣 (1970—), 女, 讲师; 通讯联系人: 屈良鹄。

72 °C 延伸 10 min. 扩增产物经 $w = 1.0\%$ 琼脂糖凝胶电泳进行分析.

1.4 海洋沉积物细菌 16S rDNA 克隆文库的构建

沉积物总 DNA 的 PCR 产物经 QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) 纯化后, 进行补平和磷酸化. 将补平磷酸化的 PCR 扩增产物连接到 PTZ18 质粒载体的 *Sma* I 位点上, 转化大肠杆菌 TG1 细胞, 在含有 X gal 和氨苄青霉素的 2YT 培养基上选择具有氨苄青霉素抗性的白色转化子构建 16S rDNA 文库.

1.5 16S rDNA 序列的测定和分析

随机挑选 20 个转化子采用 PE 公司 377 测序仪进行序列测定. 获得的序列输入 GenBank, 以 Blast 程序对数据库中的所有序列进行比较分析, 用 ClusterW 进行 DNA 的排列并用 Phylip 软件包进行系统学分析.

2 结果与讨论

对南沙海区沉积物进行总 DNA 的提取、纯化, 并以细菌专一性引物进行 PCR 扩增 (结果见图 1), 将扩增产物进行克隆, 构建了细菌 16S rDNA 克隆文库. 在获得的上千个转化子中随机选取 20 个存在预期大小片段的克隆进行 16S rDNA 序列测定, 将获得的序列输入 GenBank, 以 Blast 程序对数据库中的所有序列进行比较分析, 并从中选取与所克隆的 16S rDNA 序列相似性较高的序列, 应用 Clustal W 进行 DNA 排序, Phylip 软件包进行聚类分析. 基于 16S rRNA 基因的聚类分析中, 分别采用了邻接法 (neighbour joining) 和简约法 (parsimony) 构建系统树, 所获得的结果是一致的. 对其中 4 个 δ Proteobacteria、2 个 γ Proteobacteria 和 1 个 α Proteobacteria 类群的 16S rDNA 克隆的聚类分析结果见图 2.

由图 2a 可见, 在 δ Proteobacteria 的 4 个克隆中, NS0205, NS0211, NS0345 序列基本相同, 它们与来自海洋沉积物中的硫还原细菌 (SRB) *Desulfomonile limimaris* (AF230531 和 AF282177) 聚为一类, 与其他 δ Proteobacteria 的细菌距离较远; 与克隆 NS0114 系统关系最密切的则是来自特殊水体环境中未被培养的 δ Proteobacterium 细菌 (AF293008) 和未被鉴定的细菌 (AF317744), 但位于该类群的最早分支.

由图 2b 可见, 属 γ Proteobacteria 类群的 2

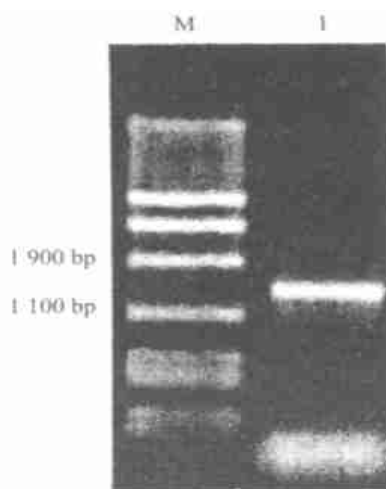


图 1 南沙海洋沉积物总 DNA 扩增产物

Fig. 1 16S rDNA amplification of total DNA extracted from marine sediment of Nansha islands
M 相对分子质量标准; 1 16S rDNA 扩增产物

个克隆中, 克隆 NS0106 与来自海洋沉积物的未被培养细菌 (AF259641) 聚为一类, 而来自特殊水体环境的未鉴定细菌 (AF317768) 位于该类群的最早分支; 该类群与已知的细菌距离较远; 更为典型的是克隆 NS0214, 它与来自日本深海沉积物的未获培养的细菌^[6] (GenBank 收录号为 AB0155XX) 聚为一大类群, 与分离自海洋动物体内共生的细菌形成姐妹群, 但距离甚远. 克隆 0214 处于深海沉积物细菌类群的最早分支. 在该类群中的未获培养的 γ Proteobacteria (AF223300) 同样为来自海洋沉积物的 16S rDNA 克隆.

图 2c 是对属 α Proteobacteria 类群的克隆 NS0265 的聚类分析图. 该克隆同样与分离自日本深海沉积物未鉴定的 α Proteobacteria 细菌 (AB015526) 聚为一类. 系统位置上与其它的微生物距离较远.

综上所述, 发现来自海洋沉积物的未能培养的微生物往往组成一簇, 并与现已获培养并鉴定的微生物自然分开, 这一现象表明, 海洋沉积物中存在其特有的微生物属种, 这些类群由于各种原因目前尚未获得纯培养物. 事实上, 由于海洋环境的特殊性, 人们已经从海洋中分离获得了至少 90 个新的属或新的种, 并从中获得了许多具有特殊生理功能的物质^[7,8]. 在对从南沙沉积物中分离获得的纯培养物进行 16S rDNA 序列分析

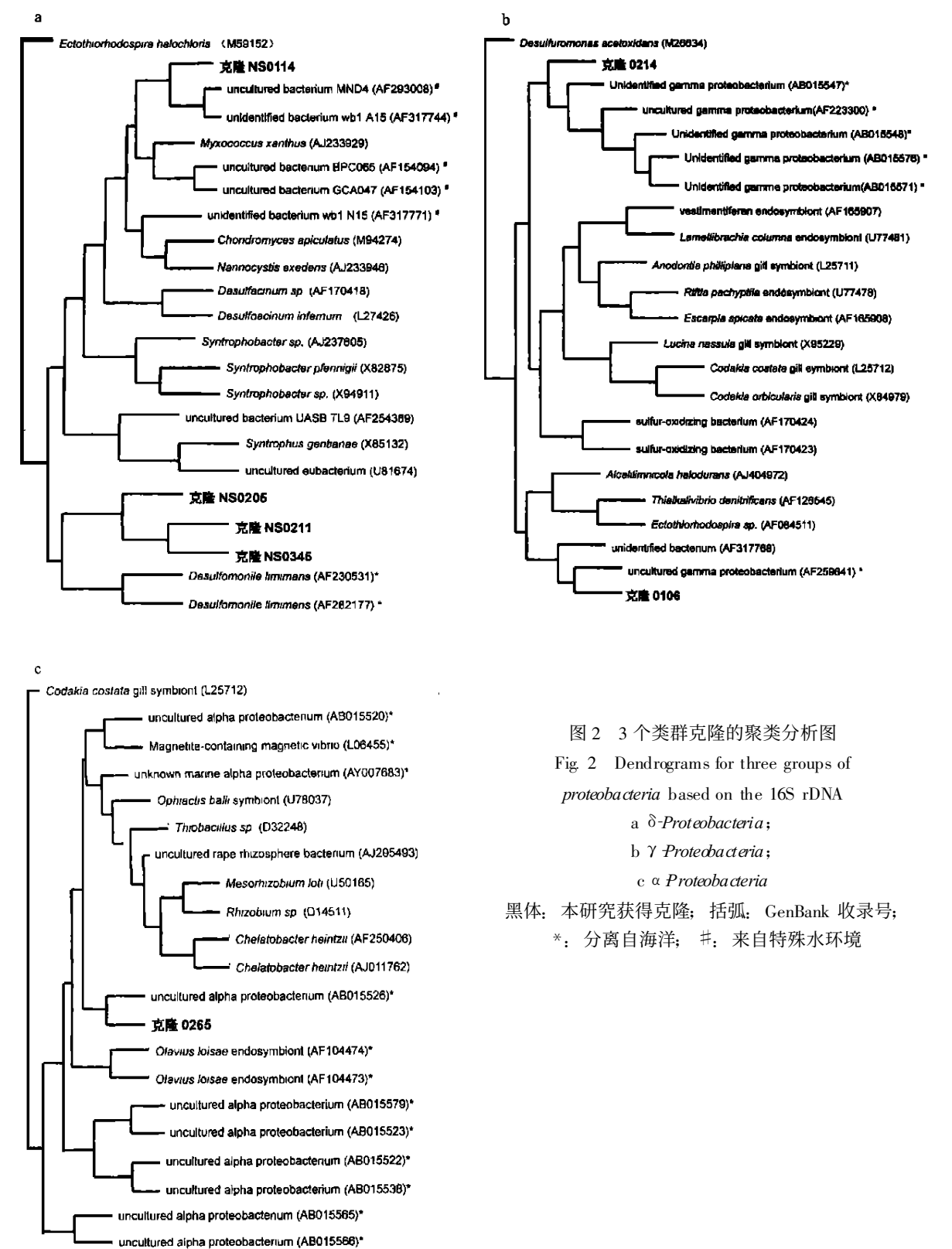


图 2 3 个类群克隆的聚类分析图

Fig 2 Dendrograms for three groups of proteobacteria based on the 16S rDNA

a δ-Proteobacteria;

b γ-Proteobacteria;

c α-Proteobacteria

黑体: 本研究获得克隆; 括弧: GenBank 收录号;
*: 分离自海洋; #: 来自特殊水环境

时, 也发现其中占比例最大的海洋芽孢杆菌则与来自大西洋、北极和南极深海沉积物的海洋芽孢杆菌的 16S rDNA 序列相似性高达 98% 以上 (结果待发表)。此外, 从海水中已经获得了一些特殊的在陆地尚未发现的新类群, 表明海洋环境的特殊性必然从遗传性质上影响了海洋中的微生物^[3, 4]。因此, 海洋环境 16S rDNA 序列的增加, 分离自海洋纯培养物的增加, 将使最终发现海洋微生物分布的规律性, 发现并获得海洋环境中新的微生物类群, 促进海洋微生物的发展。

参考文献:

- [1] FERGUSON R L, BUCKLEY E N, PALUMBO A V. Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement[J]. Appl Environ Microbiol, 1984, 47: 49—55.
- [2] PACE N R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere[J]. Science, 1997, 276(5313): 734—740.
- [3] WISE M G, McARTHUR J V, SHIMKETA L J. Bacterial diversity of a Carolina Bay as determined by 16S

rRNA gene analysis: confirmation of novel taxa[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63: 1505—1514.

- [4] GIOVANNONI S J, BRITSCHGI T B, MOYER C L, et al. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton[J]. Nature, 1990, 345: 60—63.
- [5] ZHOU J Z, DAVERY M E, FIGURE J B, et al. Phylogenetic diversity of a bacterial community determined from Siberian tundra soil DNA[J]. Microbiology, 1997, 143: 3913—3919.
- [6] LI L, KATO C, HORIKOSHI K. Bacterial diversity in deep sea sediments from different depths[J]. Biodivers Conserv, 1996, 8: 659—677.
- [7] LEE H K, CHUN J, MOON E Y, et al. *Hahella chejuensis* gen. nov., sp. nov. an extracellular polysaccharide-producing marine bacterium[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2001, 51(2): 661—666.
- [8] ENGEIHardt M A, DALY K, SWANNELL R P, et al. Isolation and characterization of a novel hydrocarbon degrading, Gram positive bacterium, isolated from intertidal beach sediment, and description of *Planococcus alkanoclasticus* sp. nov[J]. J Appl Microbiol, 2001, 90(2): 237—247.

A Preliminary Study on the Novel Taxa of Bacteria as Determined by 16S rRNA Gene Analysis

DAI Xin¹, ZHOU Hui¹, CAI Chuang hua², ZHOU Shi ning¹, QU Liang hu¹

(1. School of Life Sciences, Zhongshan University //The Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education, Guangzhou 510275, China

2. South China Sea Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China)

Abstract: The diversity of bacteria presents in marine sediment of Nansha islands has been analyzed by constructing a 16S rDNA clone library. The partial 16S rDNA sequences of 20 clones from the library were determined. Dendrograms were constructed by sequence analyse and comparison with the data of GenBank. The results showed that the 16S rDNAs from uncultured marine bacteria always cluster together, while far away from other known bacteria. Which suggested that there are more novel taxa of bacteria in marine sediments.

Keywords: Nansha Islands; marine sediment; 16S rDNA; novel taxa