

中国南海南沙海区沉积物中细菌 16S rDNA 多样性的初步研究*

戴欣¹ 周惠¹ 陈月琴¹ 蔡创华² 周毅频² 周世宁¹ 屈良鹤^{1**}

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

2. 中国科学院南海海洋研究所, 广州 510275

摘要 通过构建并分析中国南海南沙海区沉积物中细菌 16S rRNA 基因文库, 对其遗传多样性进行了研究. 发现沉积物中细菌 16S rRNA 基因主要来自变形细菌(*Proteobacteria*)的 δ -、 γ -、 α -亚族和浮霉状菌目(*Planctomycetales*)等类群, 所获的 16S rRNA 基因的序列与 GenBank 中已知的细菌 16S rDNA 序列差异较大, 这一结果表明在中国南沙海区沉积物中存在丰富的微生物多样性, 并潜藏着特有的微生物资源.

关键词 中国南沙 海洋沉积物 细菌多样性 16S rRNA 基因

关于海洋微生物研究方面最早的工作由 ZoBell 在 1946 年进行^[1], 由他设计的 ZoBell 2216E 培养基至今仍在富集和分离纯化海洋微生物的研究中广泛应用. 其后, 人们发现由于海洋中微生物往往集结在一起; 而且, 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的多样性^[2]. 迄今为止, 分离获得的能进行培养的海洋细菌主要有以下一些属种: 假单胞菌属(*Pseudomonas*), 弧菌属(*Vibrio*), 螺菌属(*Spirillum*), 交替单胞菌属(*Alteromonas*), 无色杆菌属(*Achromobacter*), 黄杆菌属(*Flavobacterium*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*); 深海的科尔韦尔氏菌属(*Colwellia*)、希瓦氏菌属(*Shewanella*)、发光杆菌属(*Photobacterium*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)以及噬压微生物等^[3].

基于大分子核糖体 RNA 基因(16S rDNA 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, 对各种生态环境中的微生物多样性获得更系统和全面的了解^[4,5]. 目前, 通过分析环境样品中的 16S rDNA 序列, 人们发现在各种自然生态环境下存在着许多未知的微生物新种, 它们与已知的类群

在系统分类上截然不同而成为一些“系统型”, 这表明适应某一特殊生态环境的微生物往往是系统学上相关的类群. 对海水中浮游微生物多样性的研究, 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^[6,7]; 在陆地水体沉积物和土壤中, 人们也发现存在于这些地理环境的特有微生物群落^[8]. 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, 目前国际上对海洋沉积物多样性的研究, 主要集中在近岸海区, 包括海湾、沿海以及河口等区域的海洋沉积物, 而对远海、深海沉积物微生物多样性的调查相对较少^[9,10].

南沙群岛为我国南海诸岛中位置最南、岛礁最多的一个群岛, 其广阔的水域又是我国惟一接近赤道的热带海区. 经过中国科学院南沙综合考察队 10 年的科学考察^[11], 已在南沙群岛的部分岛礁地质、地形地貌、现代沉积和成岩作用及环礁的环境等方面取得了大量成果; 并对南沙群岛及其邻近海区海洋生物多样性进行了大量的研究, 积累了丰富的数据. 但由于样品采集和分析方法的局限性, 对南沙海区沉积物中微生物多样性的研究则尚未见报道.

2001-07-12 收稿, 2001-10-12 收修改稿

* 国家杰出青年科学基金(批准号: 39525007)和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

** 联系人, E-mail: Lsbr04@zsu.edu.cn

本文通过对我国南沙海区沉积物中细菌 16S rRNA 基因文库的构建和分析, 初步探讨我国远海海域沉积物中细菌的多样性。

1 材料和方法

沉积物样品由中国试验 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 -20℃, 运至实验室后保存于 -80℃。

沉积物总 DNA 的提取和纯化参考文献[12]的方法。16S rDNA 的 PCR 扩增采用细菌 16S rDNA 扩增通用引物 16 (+) 5'-AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3' 和 1492r 5'-GGTTACCTTGTTAC-GACTT-3', 分别对应于 *E. coli* 16S rRNA 8~27 位和 1510~1492 位核苷酸。PCR 反应条件为 94℃ 变性 4 min, 然后 94℃ 1 min, 45℃ 1.5 min, 72℃ 2 min, 循环 26 次; 72℃ 延伸 10 min。扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。

海洋沉积物细菌 16S rDNA 克隆文库的构建过

程为将上述的 PCR 产物经 QIAquick PCR 纯化试剂盒(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。

随机挑选 12 个转化子进行序列测定。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

构建了南沙海洋沉积物细菌 16S rDNA 克隆文库。在获得的上千个转化子中随机选取 43 个转化子, 以限制性内切酶 *Eco*RI-*Bam*HI 进行酶切检测, 发现其中 33 个转化子中存在预期大小的 16S rDNA 片段。其中 12 个转化子克隆的 16S rDNA 序列和序列分析结果见表 1。

表 1 南沙海洋沉积物 16S rDNA 克隆的序列分析

克隆编号	序列长度/bp	GenBank 收录号	相近物种及同源性(%)	系统类群
NS0105	500	AJ306684	漫游海单胞菌 <i>Marinomonas vaga</i> (94)	γ -Proteobacteria
NS0106	500	AJ306685	纳勒博洞穴水体中未获培养的细菌 Unidentified bacterium (95.7)	γ -Proteobacteria
NS0114	500	AJ310384	沉积物中未获培养的 δ 变形细菌 Unidentified bacterium(91.8)	δ -Proteobacteria
NS0205	500	AJ310385	脱硫念珠菌(硫酸盐还原细菌) <i>Desulfomonile limimaris</i> (93.2)	δ -Proteobacteria
NS0211				
NS0345				
NS0214	500	AJ306686	深海沉积物中未获培养的细菌 Uncultured from deep sea (92.7)	γ -Proteobacteria
NS0215	500	AJ310386	海洋中含磁铁矿的磁弧菌 Magnetite-containing magnetic vibrio (92)	α -Proteobacteria
NS0265				
NS0343	500	AJ310387	深海沉积物中未获培养的细菌 Unidentified alpha- proteobacterium (88)	α -Proteobacteria
NS1019	500	AJ310389	深海沉积物中未获培养的细菌 Unidentified bacterium BD3-11 (94.4)	
NS1114	500	AJ310388	火山口热液处的细菌 Hydrothermal vent eubacterium(91.6)	

在测定的 12 个转化子克隆中, 10 个克隆分别属于 δ -, γ -和 α -Proteobacteria 类群, 2 个克隆暂时未确定即 NS1019 和 NS1114。其中 NS1019 与分离自深海沉积物的未培养及鉴定的细菌 BD3-11 (AB015552)^[10] 的同源性为 94.4%, 但在 GenBank 数据库中未找到与其同源性大于 85% 的已鉴定微生物序列, 最接近的是从厌气的生物膜(biofilm)中获得的 *Planctomycetales* 类群的克隆(AF202656), 同源性只有 80.8%。与此类似, 与克隆 NS1114 序列同源性较高的细菌均为来自海洋的未获培养的细菌, 包括从美国夏威夷海岛活动火山口热液中分离到 PVB-OUT-10B(U15117)(同源性为 91.6%)、来自深海沉积物的(AF354155)^[13](同源性为 89.4%)以及来自日本深海

沉积物的(AB015537)^[10](同源性为 88.0%); 与之最相近的可培养细菌为 δ -Proteobacterium 的 *Geobacter bremensis*, 但同源性只有 85.6%。

对 NS1019 和 NS1114 进行的聚类分析表明, 前者与来自深海的未培养的细菌(AB015552)自然地组成一类, 并归入 *Planctomycete* 类群中(图 1)。但是由于它们与 *Planctomycete* 细菌 16S rDNA 序列之间的差异较大, 我们推测在深海沉积物中, 可能存在一类与现已发现的 *Planctomycete* 类群有较大差别的微生物。对克隆 NS1114 的聚类分析(图 2)表明, 它属于 δ -Proteobacterium 类群, 并与来自海洋的另外 3 个克隆组成一簇, 系统位置上与其他的 δ -Proteobacteria 微生物距离较远。

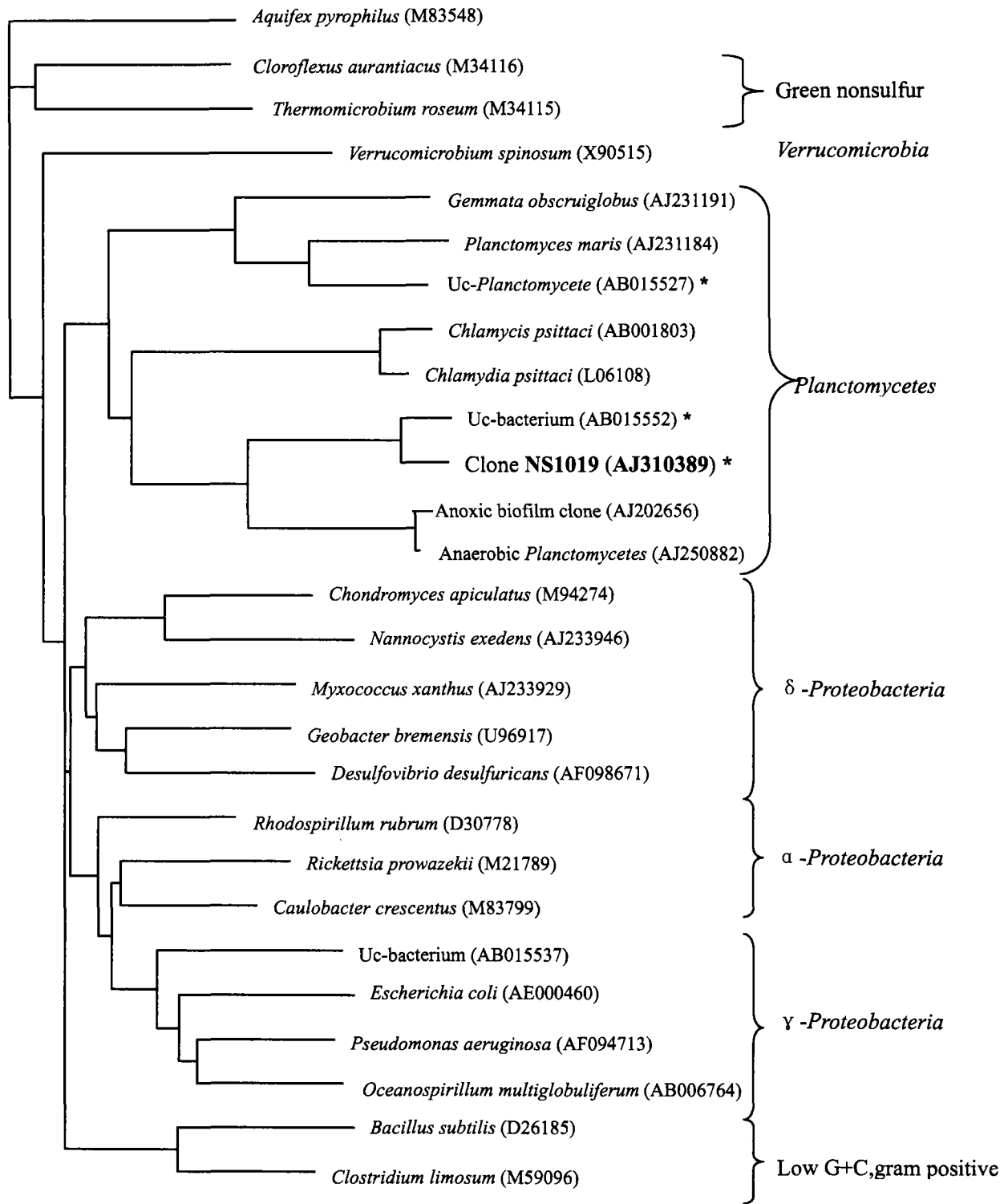


图1 对克隆 NS1019 (AJ310389) 的聚类分析

(neighbour-joining 法构树) 外类群为 *Aquifex pyrophilus* (M83548)
 Uc 为未获培养; * 为从海洋中分离; 黑体为本研究中获得序列

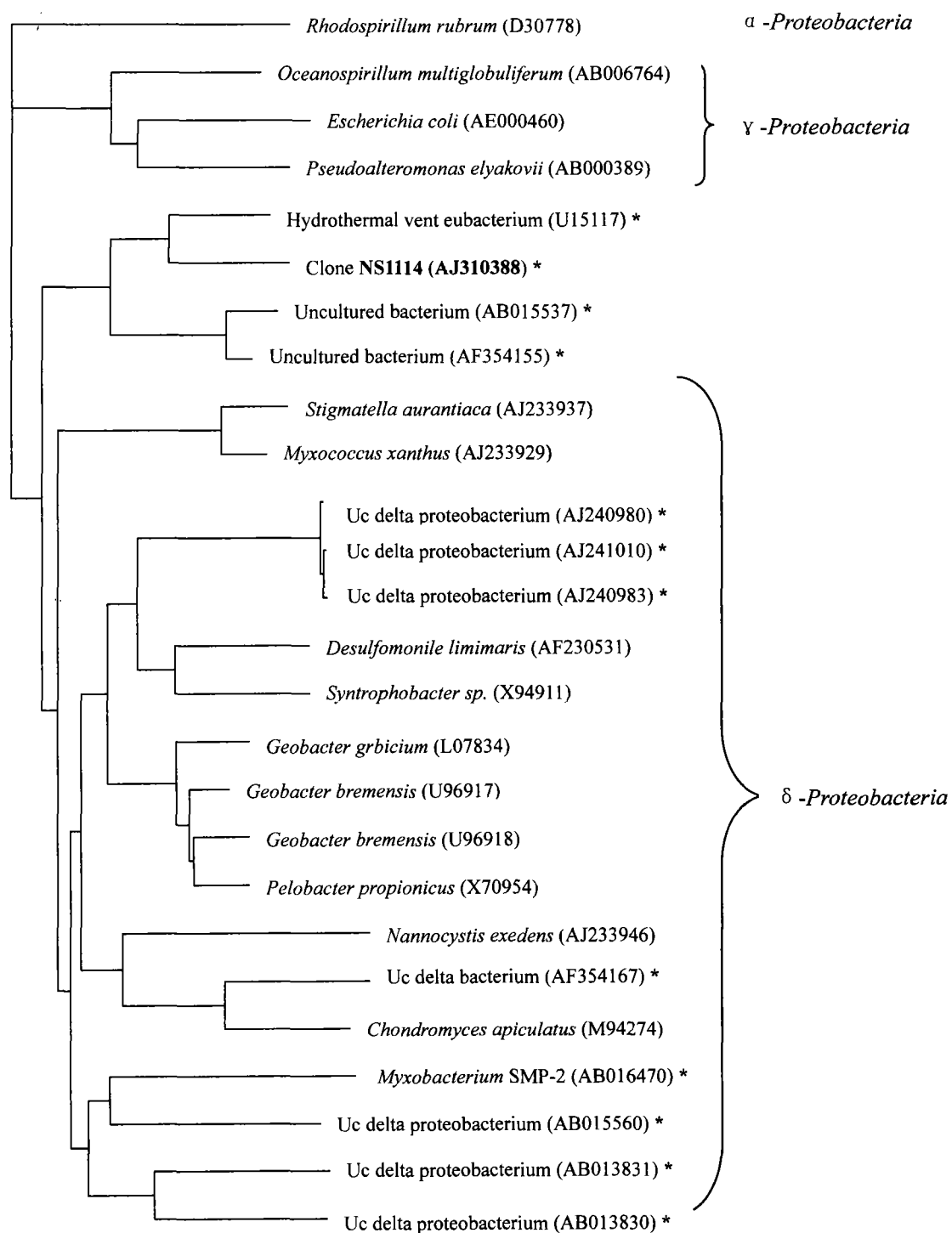


图2 对克隆 NS1114(AJ310388)的聚类分析

(neighbour-joining 法构树) 外类群为 *Rhodospirillum rubrum* (D30778)

Uc 为未获培养; * 为从海洋中分离; 黑体为本研究获得的序列

3 讨论

我们的研究表明从南沙沉积物中获得的绝大部分 16S rDNA 序列属于 *Proteobacteria* 类群, 其中包括 γ -和 δ -亚族, 这一结果与近年来国外有关海洋沉积物中微生物多样性的报道是一致的, 如在海洋沉积物中较为丰富的 γ -*Proteobacteria* [10,14,15], 我们在 12 个克隆中获得了 3 个不同的 γ -*Proteobacteria* 序列, 并且其中的 2 个克隆与海洋内共生氧化硫细菌相关. 据报道, 从海洋沉积物中获得的 δ -*Proteobacteria* 细菌 [16~18] 主要以硫酸盐还原细菌 (SRB) 为主, 我们获得的 4 个 δ -*Proteobacteria* 克隆均与 SRB 相关, 表明沉积物中这一类群微生物占优势.

令人奇怪的是, 在 12 个克隆中有 3 个属 α -*Proteobacteria* 类群, 这一丰度与在其他海洋沉积物的研究中的结果有所不同. 人们发现在陆地土壤环境 [12] 以及海水中 [19] 占优势的 α -*Proteobacteria* 在海洋沉积物中却极少 [14,17,18], 甚至没有发现 [15,16], 但这有可能是沿岸以及浅海沉积物的特征. 最近, Li 等 [10] 对日本远海深海沉积物微生物多样性的研究结果与我们对南沙的分析结果一致, 在他们所测定的 75 个 16S rDNA 序列中, 除 γ -*Proteobacteria* 占据优势 (24 个序列) 外, 第二大优势类群就是 α -*Proteobacteria* (8 个序列) 和 ϵ -*Proteobacteria* (7 个序列).

在所测定的 12 个克隆中没有发现明显与革兰氏阳性细菌系统相关的序列, 可能与该类细菌在远海深海沉积物中的丰度较低有关, 但是, 这类序列却在近海和浅海沉积物微生物多样性分析中经常发现 [14,15,17,18]. 长期以来人们都在争论海洋中获得的这些革兰氏阳性细菌, 究竟是海洋本土的细菌, 还是由河流带到海中的陆生微生物; 是否由于这类细菌的细胞壁的特殊构造, 或者由于它们所处的状态 (如芽孢等) 导致在应用分子生物学方法时无法充分地获得这类细菌的 DNA 而造成分析时的误差, 它们在深海中的实际分布状况和丰富程度如何, 尚待进一步研究.

在分析从海洋沉积物获得的 16S rDNA 序列 (包括对 γ , α -*Proteobacteria* 类群的聚类作图) 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, 这一现象表明, 海洋沉积物中存在其特有的微生物属种. 目前, 许多研究指出, 用 DNA 分析技术所

揭示的环境样品中的微生物多样性比分离得到的微生物多样性高得多 [5,20]. 我们对南沙沉积物中 36 株可培养细菌也进行了 16S rDNA 序列分析, 结果表明它们主要为海洋螺菌属 (*Oceanospirillum*), 弧菌属 (*Vibrio*), 芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 等属种, 而文库中 16S rDNA 序列所代表的细菌类群则更多 (结果待发表). 目前, 通过继续对该文库的大规模测序分析, 我们又获得了许多不同种类海洋细菌 16S rDNA 序列. 因此, 应用分子生物学技术对海洋, 特别是深海、远海沉积物中微生物多样性的进一步调查, 将使我们有可能发现该类环境中新的微生物类群.

总之, 在分析中国南海海域南沙这一典型的热带海区沉积物的细菌多样性时, 我们获得的序列在大的类群上与国外对不同海域沉积物研究的相关报道大体是一致的, 用我们获得的序列进行聚类分析的结果也表明海洋细菌类群的分布具有一定的规律性. 另外, 我们从南沙海区获得的每一个 16S rDNA 序列, 都与发表在基因库中的 16S rDNA 序列表现出较大的差异 (同源性仅为 88%~94%), 显然, 这些细菌在属种水平上完全不同, 在这些未知种群中, 蕴藏着目前还无法估量的资源. 因此, 研究中国南海海域沉积物微生物的多样性, 将进一步丰富我们对海洋微生物多样性的认识, 为我们开发利用这一特殊生态环境的微生物资源奠定基础.

参 考 文 献

- 1 ZoBell C E. Marine Microbiology. A Monograph on Hydrobacteriology. Massachusetts: Chronica Botanica Company, 1946
- 2 Ferguson R L, et al. Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement. Appl Environ Microbiol, 1984, 47: 49
- 3 Kato C, et al. Isolating and characterizing deep-sea marine microorganisms. TIBTCH J, 1996, 14: 6
- 4 Pace N R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. Science, 1997, 276(5313): 734
- 5 Brambilla E, et al. 16S rDNA diversity of cultured and uncultured prokaryotes of a mat sample from Lake Fryxell, McMurdo Dry Valleys, Antarctica. Extremophiles, 2001, 5(1): 23
- 6 DeLong E F, et al. High abundance of Archaea in Antarctic marine picoplankton. Nature, 1994, 371: 695
- 7 Giovannoni S J, et al. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. Nature, 1990, 345: 60
- 8 Wise M G, et al. Bacterial diversity of a Carolina Bay as determined by 16S rRNA gene analysis: Confirmation of novel taxa. Appl Environ Microbiol, 1997, 63: 1505

- 9 Li L, et al. Microbial diversity in sediments collected from the deepest cold-seep area, the Japan Trench. *Mar Biotechnol*, 1999, 1: 391
- 10 Li L, et al. Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depths. *Biodivers Conserv*, 1999, 8: 659
- 11 中国科学院南沙综合科学考察队. 南沙群岛及其邻近海区海洋生物多样性研究. 北京: 海洋出版社, 1996
- 12 Zhou J Z, et al. Phylogenetic diversity of a bacterial community determined from Siberian tundra soil DNA. *Microbiology*, 1997, 143: 3913
- 13 Orphan V J, et al. Comparative analysis of methane-oxidizing archaea and sulfate-reducing bacteria in anoxic marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(4): 1922
- 14 Gray J P, et al. Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62: 4049
- 15 Urakawa H, et al. Microbial diversity in marine sediments from Sagami Bay and Tokyo Bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiology*, 1999, 145: 3305
- 16 Cifuentes A, et al. Prokaryotic diversity in *Zostera noltii*-colonized marine sediment. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66: 1715
- 17 Llobet-Brossa E, et al. Microbial community composition of Wadden Sea sediments as revealed by fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64: 2691
- 18 Ravenschlag K, et al. High bacterial diversity in permanently cold marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 3982
- 19 Gonzalez J M, et al. Numerical dominance of a group of marine bacteria in the α -subclass of the class *Proteobacteria* in coastal seawater. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63: 4237
- 20 Torsvik V, et al. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *J Biotechnol*, 1998, 64(1): 53

早期生命研究取得重要突破 ——我国发现“寒武大爆发”的绝灭动物门

2001年11月22日出版的英国《Nature》杂志发表了西北大学早期生命研究所所长舒德干教授等与英国皇家学会会员、剑桥大学 Morris 教授合作完成的早期动物演化研究领域又一突破性成果——“中国澄江化石库中发现新的后口动物门”，并将这一绝灭类群命名为“古虫动物门”。这是舒德干等近年来第6次在《Nature》杂志上公布他们在“寒武纪生命大爆发”研究这一重大前沿领域的系列性科学发现。《Nature》杂志还在同一期上发表了“论古虫动物门”的专题评述。

自1859年达尔文创立生物进化论以来，人们便开始认识到发生在5.4~5.3亿年前古生代之初的早寒武世生命突然爆发的奇特现象，这一生命演化史上极不寻常的景观在动物界表现得尤为突出。科学界早已形成共识，整个动物界从低等类群向高等类群的演化“大树”在经历了包括各种水母和珊瑚虫等较为低等的双胚层腔肠动物门构成的“树干”阶段之后，便辐射产生出了门类众多的三胚层动物。所有这些三胚层动物，根据它们胚胎发育期中口的发育特点可归并为两大类，并分别构成了“树冠”上的两大“枝系”：即原口动物和后口动物。在1995年以前的近一个半世纪，虽经数代古生物学家的不懈努力，在早寒武世动物爆发主幕中发现了形形色色的动物类别，然而它们几乎全部局限于原口动物。

舒德干教授在国家自然科学基金持续资助下，开展了对我国澄江生物群的研究。1996年以来，在《Nature》杂志上连续发表的5篇论文，首次全面勾勒出这次超级生命大爆发同时创生出原口动物和后口动物两大枝系的完整动物演化“大树”的基本轮廓。人们普遍认同，5.3亿年前寒武大爆发之初的动物“大树”在属种多样性上远不及今日现存的动物“大树”；然而，两者在门类多样性上孰高孰低，却一直是学术界长期争论的一个重大悬案。现代生物学和分子生物学最新研究表明，现存的后口动物中只有半索动物门、棘皮动物门和脊索动物门3个门类，舒德干教授等近年来的多项发现首次论证了在早寒武世后口动物中不仅出现了所有这3个门类的先驱代表，而且还产生了现今已不复存在的第4个门——古虫动物门。这些成果为全面、准确揭示寒武纪生命大爆发的属性和力度提供了有力的证据，成为自20世纪初北美著名的布尔吉斯页岩化石库发现以来关于“寒武大爆发”全貌认识上的一次重大的突破。

(供稿: 姚玉鹏)