

文章编号: 1001-8166(2006)10-1058-05

南海西沙海槽沉积物细菌多样性初步研究*

李 涛, 王 鹏, 汪品先*

(同济大学海洋地质国家重点实验室, 上海 200092)

摘 要:对来自南海西沙海槽的深海沉积物进行总 DNA 提取,并构建细菌 16S rDNA 文库。细菌 16S rDNA 系统发育分析表明沉积物中细菌分属 4 个类群:变形杆菌 (*Proteobacteria*)、浮霉菌 (*Planctomycete*)、低 G+C 含量革兰氏阳性菌和放线菌 (*Actinobacteria*),它们分别占总体的 49%、22%、22%和 7%。*Proteobacteria*类群又以 α -*Proteobacteria*亚群占优势,其他分属 β 和 γ -*Proteobacteria*亚群。*Planctomycete*和低 G+C 含量革兰氏阳性菌两个常见于浅海的类群,在西沙海槽沉积物的丰度高于其他深海沉积物,可能是随沉积物被浊流搬运至海槽。

关键词:西沙海槽;海洋沉积物;16S rDNA 基因;细菌多样性

中图分类号: P736.21 **文献标识码:** A

地球表面有超过 50%的面积覆盖着深海沉积物,它们主要是由海洋真光层的颗粒连续沉降至海底而形成的。沉积物中的有机质被深海微生物群落再生循环^[1],构成了常见的碳循环、硫循环、氮循环等。深海沉积物中的多种固体矿物,如碳酸盐、硅酸盐、粘土、金属氧化物、金属硫化物,常是微生物作用的原料或产物^[2],研究表明这些矿物的溶解与形成与微生物作用有关,如铁还原菌在不同环境中能分别形成或溶解磁铁矿^[3,4]。越来越多的证据表明许多地质成矿过程与微生物活动有关,微生物在沉积物中的生物地球化学作用也是沉积地质过程的动力学,能够回答沉积物及沉积矿床的许多不知晓的问题^[5]。据估计,深海沉积物中的微生物生物量占全球生物总量的 10%以上^[6],然而在目前技术条件下仅有 0.001 到 1%的微生物是可培养的,直至近年来分子生物技术、生化技术以及基因组学的兴起,才使得深海沉积物中微生物的研究迅速发展起来。而基于 16S rDNA 的分子生物技术因为不依赖微生物的培养逐渐发展为研究深海沉积物中微生物群落的一种重要手段。

南海位于西太平洋边缘,靠近西太平洋暖池区,

有 3 条大的径流:珠江、湄公河、湄南河流入南海,给南海带来了丰富的陆源有机质。目前,我国对南海沉积物中微生物的研究主要集中在南沙海区,水深仅数百米,而对水深千米以上的沉积物还未涉及。本文选择南海深海盆地沉积物(水深 3 697 m)为研究对象,初步调查了细菌群落结构,结果表明研究区与南沙海区以及日本海沉积物中的细菌群落结构有较大的差别。

1 材料与方法

1.1 材料

本文研究的样品采自中、法联合的 MAGES147 航次(MARCO 航段)在南海北部西沙海槽北纬 17°57.70',东经 114°57.33'处,由无扰动箱式取样器从水深 3 697 m 的深海盆地采集的 MD05-2902 号沉积物柱(站位位置见图 1);样品层位位于海底以下 6 m 处,岩性为褐色粘土,采集的样品立即放置在 -20℃ 冰箱中,运回实验室后保存于 -80℃。

1.2 深海沉积物中微生物总 DNA 的提取与纯化

沉积物中的微生物总 DNA 提取采用 SDS-CTAB 抽提法^[11]:约 5 g 沉积物样品中加入 13.5 mL

收稿日期: 2006-02-27;修回日期: 2006-08-20.

* 基金项目:国家自然科学基金项目“南海及相邻海域古海洋学研究”(编号:40510487);海洋地质国家重点实验室开放基金项目资助。

作者简介:李涛(1980-),男,湖北监利人,博士研究生,主要从事地质微生物学方面研究。E-mail: lukelita0@163.com

* 通讯作者:汪品先(1936-),男,江苏苏州人,中国科学院院士,主要从事海洋地质、微体古生物学研究。E-mail: pxwang@online.sh.cn

抽提缓冲液 (100 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L EDTA (pH8.0), 100 mmol/L 磷酸钠 (pH8.0), 1.5 mol/L NaCl, 1% CTAB), 并加入 100 μ L 蛋白酶 K, 37 $^{\circ}$ C, 225 rpm, 振荡温育 30 min; 加入 1.5 mL 20% SDS, 混匀, 65 $^{\circ}$ C 水浴 2 h, 每 15 ~ 20 min 混匀一次; 室温 6 000 \times g 离心, 将上清液转移到一个新离心管; 用抽提缓冲液与 20% SDS 重复抽提沉积物一次, 合并两次上清液; 加入等体积氯仿混匀, 室温离心, 收集上层水相于一新离心管; 加入等体积异丙醇沉淀; 70% 冰乙醇洗涤后用去离子水溶解所得 DNA。

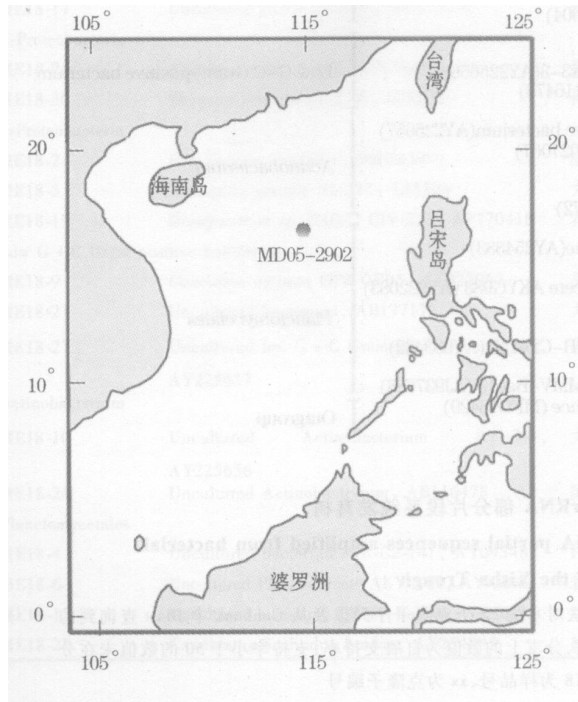


图 1 采样点位置示意图

Fig 1 Schematic diagram showing the sampling position

对粗提 DNA 使用 UNQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒 (上海生工) 纯化, 详细步骤参见说明书。

1.3 16S rDNA PCR 扩增

采用细菌 16S rDNA 扩增通用引物 (27F: 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'; 1492R: 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'; M 为 A 或 C) 进行 PCR 扩增, PCR 反应在 Biomatro T3 扩增仪上进行, 反应体系为 50 μ L, PCR 原液组成为: 10 \times PCR 扩增缓冲液 5 μ L, dNTPs 4 μ L (dATP, dGTP, dCTP, dTTP 均为 25 mmol/L), 两种引物各 1 μ L (6 μ mol/L), Taq 聚合酶 1U, 以及适量 DNA 扩增模板。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 变性 3 min, 然后 95 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 循环 35 次; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10

min。

1.4 PCR 扩增产物的纯化与 16S rDNA 文库的构建

用 UNQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒 (上海生工) 对 PCR 产物纯化, 将回收得到的产物克隆到 Promega 公司 PGEM-T 载体上, 并转化到 DH5 感受态细胞中, 涂布接种于含有 X-gal 和氨苄青霉素的 LB 培养基上, 37 $^{\circ}$ C 培养 20 h 左右, 随机挑取 27 个具有氨苄青霉素抗性的白色转化子, 做菌落 PCR 扩增, 并进一步筛选阳性克隆。

1.5 16S rDNA 序列测定与系统发生分析

阳性克隆中细菌 16S rDNA 部分序列由南方基因公司测定, 将所有序列提交到 RDP (ribosomal database project)^[12] 数据库, 利用在线工具 CHECK-CHMERA 检验, 未发现嵌合结构, 将所有序列分别提交到 Genbank 中利用 Blast 程序 (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) 进行相似序列搜索, 利用 ClustaX^[13] 进行序列比对分析, 然后用 MEGA 软件 (版本 3.1)^[14] 构建系统进化树, 进化距离为 Kimura2 距离。

2 结果

本文得到的 22 个不同的克隆子序列以及由 Blast 程序搜索得到的 18 条细菌 16S rDNA 部分序列构建出西沙海槽沉积物细菌 16S rDNA 系统发育树 (图 2)。

从系统发育树可以看出, 22 个克隆子分属 4 个类群: 变形杆菌 (*Proteobacteria*)、浮霉菌 (*Planctomycene*)、放线菌 (*Actinobacteria*) 和低 G+C 含量革兰氏阳性菌。其中, 以 *Proteobacteria* 类群占多数 (49%), 其他依次为 *Planctomycene* (22%)、低 G+C 含量革兰氏阳性菌 (22%) 和 *Actinobacteria* (7%)。 *Proteobacteria* 类群中有 α -、 β -、 γ -*Proteobacteria* 3 个亚族, 其中以 γ -*Proteobacteria* 亚族占优势 (46%), α -、 β -*Proteobacteria* 亚族分别为 23% 和 31%。由克隆子的亲缘关系 (表 1) 分析得知 *Proteobacteria* 类群中有 6 个克隆子序列与海洋沉积物克隆子亲缘关系相近, 其中克隆子 ME18-17、ME18-19 分别与研究区邻近的西太平洋暖池和日本海海沟的深海沉积物中的细菌亲缘关系相近。低 G+C 含量革兰氏阳性菌所有克隆子均与海底热液区来源的细菌亲缘关系相近, 而 *Actinobacteria* 与 *Planctomycene* 各有 1 个克隆子与海底热液区来源的细菌亲缘关系相近。其他克隆子则与一些陆地来源细菌或生物反应器中的细菌亲缘关系较近。

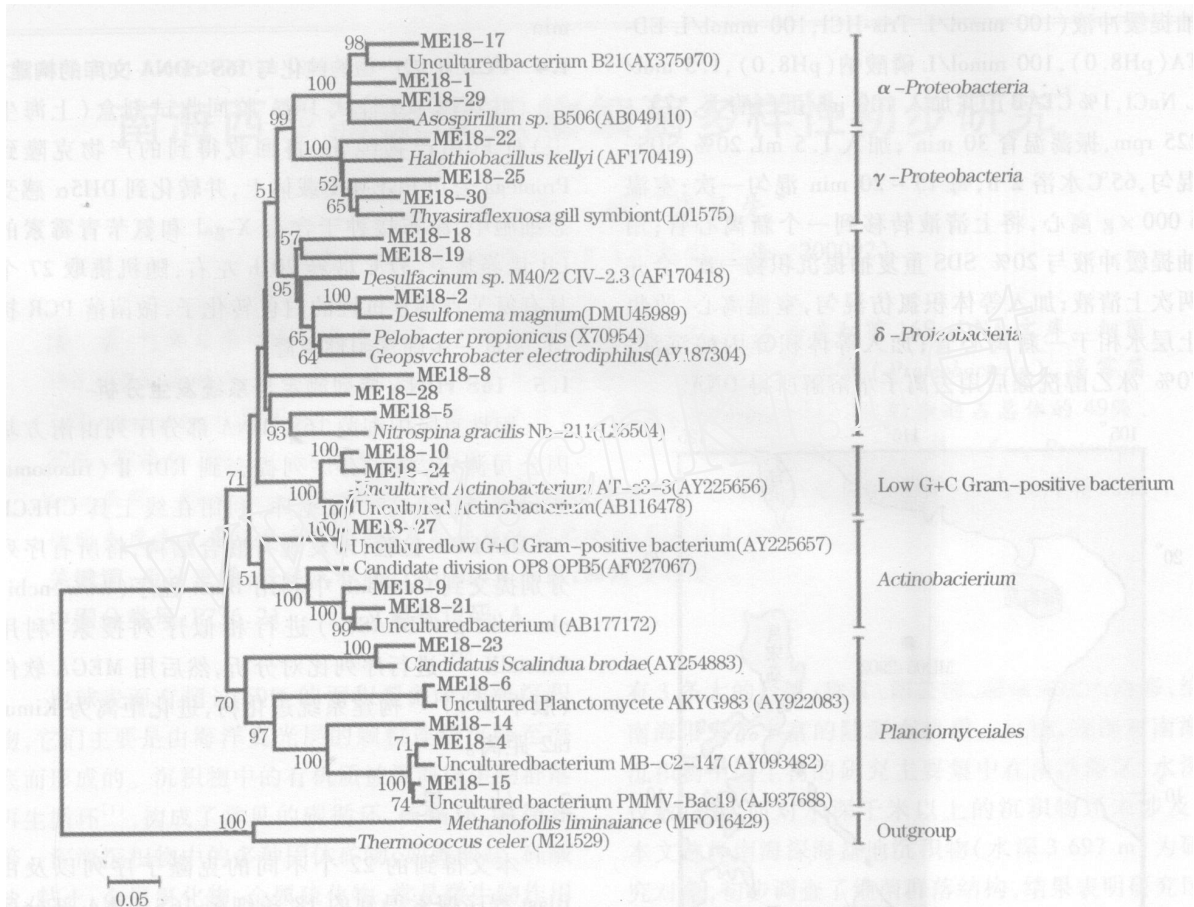


图 2 西沙海槽沉积物细菌 16S rRNA 部分片段系统发育树

Fig 2 Phylogenetic tree of the bacterial 16S rDNA partial sequences amplified from bacterial habitats in sediments of the Xisha Trough

以 *Methanofollis liminatans* 和 *Thermococcus celer* 为外类群,使用邻接法对本文 22 个克隆子序列以及从 Genbank 中 Blast 查询到的 20 条细菌 16S rRNA 部分片段构建得到该系统发育树。自展 100 次,分支上的数值为自展支持率,支持率小于 50 的数值未在分支上显示。本文获得的序列编号为 ME18-xx,M 代表 Marco 航次,E18 为样品号,xx 为克隆子编号

3 结论与讨论

3.1 DNA 提取与扩增的效率

利用基于 16S rDNA 的分子生物学的手段来研究环境微生物的多样性,要解决 2 个问题:

(1) 找到一种高效和无偏差的 DNA 提取方法^[15],即提取的 DNA 必须能反映出完整的细菌群落,并且能获得足量 DNA 进行 PCR 扩增,然而一些腐殖酸、色素以及重金属常常与提取的 DNA 共同存在,这些物质能抑制 PCR 扩增^[16]。大多土壤微生物 DNA 提取方法都适用于深海沉积物,如 SDS-CTAB 提取法、液氮冻溶法、细胞溶解法以及使用土壤微生物 DNA 提取试剂盒的方法。目前主要使用 SDS-CTAB 提取和一些商业试剂盒对海洋沉积物进行总 DNA 的提取。这两种提取方法各有利弊:SDS-

CTAB 直接提取方法能获得高产量的 DNA,同时杂质也多,如果能找到一种高效的纯化方法也不失为一种好的方法;商业试剂盒的使用,节省了 DNA 提取的时间,而且 DNA 的纯度也大大提高,从而广泛应用于大洋沉积物微生物 DNA 的提取,不过该方法同时使 DNA 量下降了,而且商业试剂盒一般采用玻璃珠破碎样品,极可能对长片断 DNA 进行剪切。即便是发现一种高效的 DNA 提取方法,但不同地理位置海底沉积物的物理、化学性质不同,可能该方法并不适合其他海域的沉积物,因此很难找到一种通用的 DNA 提取方法^[16]。本文研究表明对南海西沙海区表层沉积物而言,使用 SDS-CTAB 直接提取,并用微型吸附柱纯化是可行的。

(2) 尽量减少 PCR 偏差,首先需要较高浓度的 DNA 模板,当 DNA 模板浓度较低时,会发生随机

扩增而使 PCR 产生偏差。此外,所使用的 PCR 扩增的引物能适用于广泛的微生物种类,本文选择的引物 27F 与 1492R 扩增细菌 16S rDNA 序列的覆盖范围分别为 72.9% 和 16.3%^[16],基本能覆盖绝大

部分常见细菌种类。然而,由于深海沉积物中还存在着许多未知种的细菌,因此迫切需要找到最适合扩增深海沉积物细菌的引物。

表 1 西沙海槽沉积物细菌 16S rDNA 克隆子亲缘关系

Table 1 Phylogenetic affiliation of bacterial 16S rDNA clones from microbial bacterial in sediments of Xisha Trough

克隆子编号	进化关系最近的细菌	来源	相似性 (%)	克隆子数	克隆子之间的相似性 (%)
-Proteobacteria					
ME18-1	<i>Azospirillum</i> sp. B506, AB049110	野生水稻	88	1	
ME18-17	Uncultured bacterium B21, AY375070	西太平洋暖池洋底沉积物	89	1	
-Proteobacteria					
ME18-25	<i>Halothiobacillus kellyi</i> , AF170419	爱琴海浅水热液口	87	2	96
ME18-30	<i>Thyasira flexuosa</i> 共生菌, L01575	化能自养细菌 <i>Thyasira flexuosa</i>	89	1	
-Proteobacteria					
ME18-2	<i>Desulfonana magna</i> , DMU45989	法国蒙彼利埃附近海水泻湖厌氧底泥	92	1	
ME18-5	<i>Nitrospina gracilis</i> Nb-211, L35504	大西洋海水分离物	80	1	
ME18-19	<i>Desulfacinum</i> sp. M40/2 CM-2.3, AF170418	希腊 Mikos 岛附近海底沉积物	84	1	
Low G+C Gram-positive bacterium					
ME18-9	<i>Candidatus division</i> OP8 OPB5, AF027067	美国黄石国家公园热泉	87	1	
ME18-21	Uncultured bacterium, AB177172	太平洋边缘深海沉积物	94	3	97~98
ME18-27	Uncultured low G+C Gram-positive bacterium, AY225657	大西洋中脊中部热液区沉积物	98	2	98
Actinobacterium					
ME18-10	Uncultured Actinobacterium AT-s3-3, AY225656	大西洋中脊中部热液区沉积物	92	1	
ME18-24	Uncultured Actinobacterium, AB116478	滨海贝类养殖场海泥	92	1	
Planctomycetales					
ME18-4	Uncultured bacterium MB-C2-147, AY093482	Forearc 盆地含甲烷水合物深海沉积物	96	1	
ME18-6	Uncultured Planctomycete AKYG983, AY922083	农田土壤	97	1	
ME18-15	Uncultured bacterium PMMV-Bac19, AJ937688	喀尔巴阡山脉泥火山	97	1	
ME18-23	<i>Candidatus Scalindua brodae</i> , AY254883	旋转生物反应器	92	2	97

3.2 细菌的多样性

Proteobacteria 类群是深海沉积物中的主要类群^[17],因此 *Proteobacteria* 类群的代谢是深海沉积物中最主要的微生物活动。不同海区次表层深海沉积物中 *Proteobacteria* 类群的结构有较大差异。本文研究表明西沙海槽沉积物以 *-Proteobacteria* 占多数,其次是 *-Proteobacteria* 和 *-Proteobacteria*; 相邻的日本海沟深海沉积物以 *-Proteobacteria* 为主,其次是 *-Proteobacteria* 和 *-Proteobacteria*^[17,18]; 南海 (Nankai) 海槽沉积物主要是 *-Proteobacteria* 和 *-Proteobacteria*^[19]。

本文细菌群落中 *Planctomycetes* 和 *Actinobacteria* 两个类群的丰度明显高于南沙海区表层沉积物中两个类群所占的比例^[10],均为 22%。这两个类群常见于浅海沉积物,而在深海沉积物中丰度较低,如在日本海海沟沉积物中这两个类群极少,甚至没

有^[17,18]; 可能是因为南沙海底存在高频率的浊流作用,浊流将陆架上的沉积物搬运至海槽,大量生活在陆架沉积物中的微生物也一起被带至深海,部分适应深海环境而生存下来,从而提高了这些浅海类群的含量。革兰氏阳性菌一直存在着来自海洋本身还是来自河流之争^[9],本文多数革兰氏阳性菌与来自热液区的革兰氏阳性菌亲缘关系很近(序列相似性 87%~98%),而且西沙海槽远离河口,因此源自河流的可能性较小。

本文 22 个克隆子中有 11 个克隆子序列与文献报道的序列相似性低于 95% (表 1),表明西沙海槽沉积物中可能蕴含一些未知的新种。

致谢: 本文实验在中国海洋局第三海洋所完成,感谢肖湘和王风平研究员对实验的指导! 分析样品来自 AMGES 147 航次,特此感谢!

参考文献 (References):

- [1] Aller R C, Hall P O J, Rude P D, *et al* Biogeochemical heterogeneity and suboxic diagenesis in hemipelagic sediments of the Panama Basin[J]. *Deep-Sea Research*, 1998, 45: 133-165.
- [2] Nealson K H. Sediment bacteria: Who's there, what are they doing, and what's new? [J]. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 1997, 25: 403-434.
- [3] Bell P E, Mills A L, Heman J S. Biogeochemical conditions favoring magnetite formation during anaerobic iron reduction [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, 53: 2 610-2 616.
- [4] Kostka J E, Nealson K H. Dissolution and reduction of magnetite by bacteria[J]. *Environmental Science and Technology*, 1995, 29: 2 535-2 540.
- [5] Wang Pinxian. Earth system science in China *quo vadis?* [J]. *Advances in Earth Science*, 2003, 18: 837-851. [汪品先. 我国的地球系统科学研究向何处去 [J]. 地球科学进展, 2003, 18: 837-851.]
- [6] Parkes R J, Cragg B A, Bale S J, *et al* Deep bacterial biosphere in Pacific Ocean sediments[J]. *Nature*, 1994, 371: 410-413.
- [7] Ward D M, Weller R, Bateson M M. 16S rRNA sequences reveal uncultured inhabitants of a well studied thermal community [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 1990, 6: 105-115.
- [8] Dai Xin, Zhou Hui, Cai Chuanghua, *et al* A preliminary study on the novel taxa of bacteria as determined by 16S rDNA gene analysis [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2001, 40: 51-54. [戴欣, 周惠, 蔡创华, 等. 海洋沉积物中特有细菌类群的初步探讨 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2001, 40: 51-54.]
- [9] Dai Xin, Zhou Hui, Chen Yueqin, *et al* A preliminary study on 16S rDNA diversity of bacteria in the Xisha marine sediment, the South China Sea [J]. *Progress in Natural Science*, 2002, 12: 479-484. [戴欣, 周惠, 陈月琴, 等. 中国南海南沙海区沉积物中细菌 16S rDNA 多样性的初步研究 [J]. 自然科学进展, 2002, 12: 479-484.]
- [10] Xu Fei, Dai Xin, Chen Yueqin, *et al* Phylogenetic diversity of bacteria and archaea in the Nansha marine sediment, as determined by 16S rDNA analysis [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2004, 35: 89-94. [许飞, 戴欣, 陈月琴, 等. 南沙海区沉积物中细菌和古细菌 16S rDNA 多样性的研究 [J]. 海洋与湖沼, 2004, 35: 89-94.]
- [11] Zhou J Z, Davery E, Figure J B. Phylogenetic diversity of a bacterial community determined from Siberian tundra soil DNA [J]. *Microbiology*, 1997, 143: 3 913-3 919.
- [12] Maidak B L, Cole J R, Lilburn T G, *et al* The RDP-II (ribosome database project) [J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29: 173-174.
- [13] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL-W-Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22: 4 673-4 680.
- [14] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5: 150-163.
- [15] Roose-Amaleg C L, Gamier-Sillan E M H. Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples [J]. *Applied Soil Ecology*, 2001, 18: 47-60.
- [16] Webster G, Newberry C J, Fry J C, *et al* Assessment of bacterial community structure in the deep sub-seafloor biosphere by 16S rDNA-based techniques: A cautionary tale [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 55: 155-164.
- [17] Li L, Kato C, Horikoshi K. Microbial diversity in sediments collected from the deepest cold-seep area, the Japan Trench [J]. *Marine Biotechnology (NY)*, 1999, 1: 391-400.
- [18] Li L, Kato C, Horikoshi K. Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depths [J]. *Biodiversity and Conservation*, 1999, 8: 659-677.
- [19] Newberry C J, Webster G, Cragg B A, *et al* Diversity of prokaryotes and methanogenesis in deep subsurface sediments from the Nankai trough, Ocean Drilling Program Leg 190 [J]. *Environmental Microbiology*, 2004, 6: 274-287.

A Preliminary Study on the Diversity of Bacteria in the Xisha Trough Sediment, the South China Sea

LI Tao, WANG Peng, WANG Pin-xian

(State Key Laboratory of Marine Geology, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: The bulk DNA was isolated from bacterial habits in sediments of the Xisha trough, the south China sea. Using a pair of primers special for most common bacteria, the researchers amplified partial sequences of bacterial 16S rDNA gene and thus constructed a 16S rDNA clone library. A total of 22 clones were used to reconstruct the bacterial 16S rDNA phylogenetic tree. Guided by the phylogenetic tree, bacteria fell into four main lineages: *Proteobacteria*, *Planctomycene*, *Actinobacteria* and Low G + C Gram-positive bacterium. Among them, 49% belonged to *Proteobacteria*, 22% to *Planctomycene*, the same to Low G + C Gram-positive bacterium, and the remaining 7% to *Planctomycene*. The group of *Proteobacteria* clustered in three subgroups: α -, β - and γ -*Proteobacteria*, and the subgroup of γ -*Proteobacteria* predominated in them. Furthermore, the abundance of two groups of *Planctomycene* and Low G + C Gram-positive bacterium, living commonly in shallow marine deposits, was higher in sediments of the Xisha Trough than in other deep-sea sediments. Most members of these two groups were probably brought from the shelf into the trough sediment by the turbid

Key words: The Xisha trough; Marine sediment; 16S rDNA; Bacterial diversity