

劳盆地深海热液喷口沉积物中细菌多样性研究

魏曼曼¹ 王玉光¹ 郑 甲¹ 周洪波^{1,2*}

(1. 中南大学资源加工与生物工程学院 湖南 长沙 410083)

(2. 中南大学生物冶金教育部重点实验室 湖南 长沙 410083)

摘 要: 采用 PCR-RFLP 技术调查了劳盆地深海热液喷口两位点沉积物中的细菌多样性。结果表明, 在劳盆地深海热液喷口沉积物环境中细菌多样性十分丰富, 样品 DY1 中发现 6 个细菌类群, DY2 中则存在 4 个细菌类群, 其中 *Gammaproteobacteria* 细菌亚群和 *Epsilonproteobacteria* 细菌亚群在两文库中均占据最大比例, 为沉积物样品中的优势菌群。另外, 在克隆文库中还发现了一些与数据库中的已知序列同源性较低的类群, 从而说明劳盆地深海热液喷口沉积物中存在特有的微生物种属。

关键词: 细菌多样性, 劳盆地深海热液喷口, PCR-RFLP, 系统发育分析

The Diversity of Bacteria in Sediments from Lau Basin Deep-sea Hydrothermal Vents

WEI Man-Man¹ WANG Yu-Guang¹ ZHENG Jia¹ ZHOU Hong-Bo^{1,2*}

(1. School of Minerals Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha, Hunan 410083, China)

(2. Key Laboratory of Biometallurgy, Ministry of Education, Central South University, Changsha, Hunan 410083, China)

Abstract: The bacterial diversity of two deep-sea sediments collected at Lau Basin hydrothermal vents were analysed by performing a restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of 16S rRNA gene sequences. Analysis of sequences showed that there were a diversity of bacterial populations in sediments from Lau Basin deep-sea hydrothermal vents, and six bacterial divisions and four bacterial divisions represented in the sample DY1 and DY2 respectively. The phyla *Gammaproteobacteria* and *Epsilonproteobacteria* were the most dominant groups in both clone library DY1 and DY2. Additionally, some bacterial sequences had lower similarity to most known sequences in the database, which suggested that there were some novel taxa of bacteria in sediment from Lau Basin deep-sea hydrothermal vents.

Keywords: Bacterial diversity, Lau Basin deep-sea hydrothermal vent, PCR-RFLP, Phylogenetic analysis

自 1979 年首次在太平洋深海热液区发现独立生命体系以来^[1,2], 热液喷口的周围生物群落因其独

特的极端生活环境及其独特生理生化特性成为海洋生物科学界最前沿、最焦点的研究领域。30 余年来,

基金项目: 国家自然科学基金(No. 40646029); 教育部新世纪优秀人才支持计划(No. NECT-06-0691); 国际海底区域研究开发“十一五”项目(No. DYXM-115-02-2-07); 海洋公益性行业科研专项经费项目资助(No. 200805032)

* 通讯作者: Tel: 86-731-8877216; E: zhoubh@mail.csu.edu.cn

收稿日期: 2009-01-23; 接受日期: 2009-02-16

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

随着海洋生物学和生命科学研究技术方法的进步,大量的深海热液喷口生物群落被相继发现,越来越多的喷口生物物种被分离鉴定出来,其中异常丰富的微生物资源更是研究的热点。尽管,已有大量深海热液喷口微生物(包括细菌和古菌)被成功的分离或鉴定出来,然而这仅仅占整个热液喷口微生物总量的很小一部分。由于环境的极端性及特殊性,深海热液喷口微生物的培养分离工作较为困难。近年来,随着分子生物学、系统发育学和基因组学等学科的发展,对这一极端环境中微生物的研究虽取得较大进步,然而对一些新近发现的深海热液喷口微生物群落的组成及其结构功能仍然知之甚少。

劳盆地是位于西南太平洋上的一个活性热液区,它的化学元素组成和生物多样性与东太平洋及其他热液喷口区明显不同。目前研究最多的是东太平洋和大西洋的热液喷口区,而对劳盆地深海热液喷口微生物群落的研究却较为贫乏。本研究采用PCR-RFLP技术,研究了劳盆地深海热液喷口两个沉积物样品中的细菌多样性,旨在了解该区域的细菌种类及其组成情况,从而为深海热液喷口微生物资源及生态环境的研究提供理论依据,为开发和利用这些极端微生物资源奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

本文分析所用沉积物样品是由“大洋一号”船于2007年5月用电视抓斗采样器在劳盆地深海热液喷口的19-4TVG8站(176°36'43"W, 22°13'35"S, 水深1722 m, 温度84°C)和19-4TVG11站(176°14'6"W, 20°55'48"S, 水深2255 m, 温度114°C)所采集。两样品分别被标记为DY1和DY2, 其中DY1是黑褐色沉积物, DY2为土黄色沉积物, 样品采集后立刻分装于灭菌的样品管中, 储存于-20°C。

1.2 实验方法

1.2.1 总DNA的提取和纯化: DNA的提取采用改进后的Zhou抽提环境DNA的方法(Zhou protocol)^[3]: 将5 g样品与3 g灭菌的沙子倒入研钵, 加入液氮研磨直至粉末状, 加入13.5 mL抽提缓冲液[100 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L EDTA (pH 8.0), 100 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 8.0), 1.5 mol/L NaCl, 1% CTAB], 并加入100 μ L蛋白酶K(50 mg/mL), 37°C水浴30 min; 加入1.5 mL 20% SDS, 65°C水浴2 h; 6000 \times g离心5

min; 加入4.5 mL抽提缓冲液和0.5 mL 20% SDS, 重复抽提1次。上清液中加入等体积氯仿: 异戊醇(24:1, V/V), 6000 \times g离心20 min, 收集上层水相, 重复抽提1次; 加入0.6倍体积异丙醇过夜沉淀, 12000 \times g离心1 h; 沉淀用70%预冷的冰乙醇洗涤1次, 室温下晾干后用100 μ L TE溶解沉淀。粗DNA用Tiangen纯化试剂盒(Tiangen)进行纯化。

1.2.2 16S rRNA PCR扩增和切胶纯化: 用细菌通用引物27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')和1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')进行16S rRNA的PCR扩增。50 μ L反应体系中包含2.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTPs, 0.2 pmol/L 引物, 1 \times PCR buffer (Fermentas), and 1 U *Taq* DNA 聚合酶 (Fermentas)。PCR反应条件为: 94°C 5 min; 94°C 45 s, 55°C 40 s, 72°C 90 s, 32个循环; 72°C 10 min。PCR产物经1%的琼脂糖凝胶电泳检测, 并用EZNA凝胶回收试剂盒进行纯化。

1.2.3 克隆和RFLP分析: PCR回收产物克隆到pGEM T-载体(Promega)上, 转化到*E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 蓝白斑筛选法挑取阳性克隆子, 建立16S rRNA克隆文库, 克隆文库通过AMP^r平板保藏。为了进行RFLP分析, 随机挑取文库中的菌落, 用M13正反引物5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'和5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'重新扩增插入的16S rRNA片段, 扩增的DNA片段用限制性内切酶*Msp* (Fermentas)和*Hin6* (Fermentas)消化6 h, 经2.5%凝胶电泳获得RFLP酶切图谱。

1.2.4 测序与系统发育分析: 分析RFLP条带, 挑选不同带型的克隆子送去测序(上海生工)。所得序列由ContigExpress软件拼接后, 通过Blast搜索引擎(www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast)搜索相似性序列, 采用Clustal X (version 1.8)对比分析序列, 再应用MEGA 3.1程序用邻近法(Neighbor-joining)方法构建系统发育树, bootstrap值设定为1000。

1.2.5 数据库序列号(Accession number): 将16S rRNA序列上传到NCBI数据库中, 序列号为FJ624426-FJ624454。

2 实验结果

2.1 DNA提取和PCR扩增

从5 g沉积物样品中提得了大小集中在23 kb左右的环境基因组DNA, 细菌通用引物扩增后获得约

1.5 kb 的 PCR 产物。扩增产物条带单一, 表明扩增效果较好。

2.2 克隆文库的构建和 RFLP 分析

两沉积物样品的 PCR 扩增产物经纯化后直接克隆到 pGEM T-载体上, 分别构建 16S rRNA 克隆文库 DY1 和 DY2。分别从两文库中随机挑取约 150 个阳性克隆, 限制性内切酶双酶切后共获得 73 种不同的酶切带型, 其中 DY1 中 34 种特征带型, DY2 中 39 种。每个酶切类型挑取 1 个代表克隆子进行测序。为了评估 RFLP 分析的克隆数目是否足够检测群落中的大多数微生物, 两文库 RFLP 分析的饱和曲线被分别构建(图 1)。从图中可以看出, 两文库的饱和曲线均趋向于饱和, 这说明构建的克隆文库能够比较完整的反映劳盆地深海热液喷口沉积物的细菌群落组成。

2.3 系统发育分析

不同带型的克隆子测序后经比对发现, 部分序

列(约 2%)与数据库中的已知序列同源性较低, 且根据系统发育分析结果仍无法确定其所属类群, 极可能是新的细菌类群, 标记为“Unidentified”。如图 2

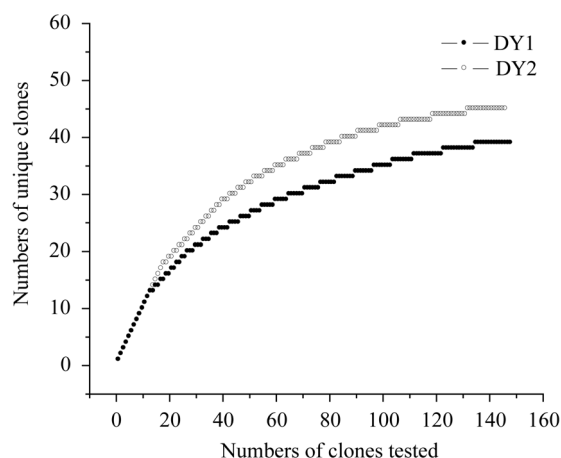


图 1 RFLP 分析的饱和曲线

Fig. 1 Accumulation curves for RFLP analysis

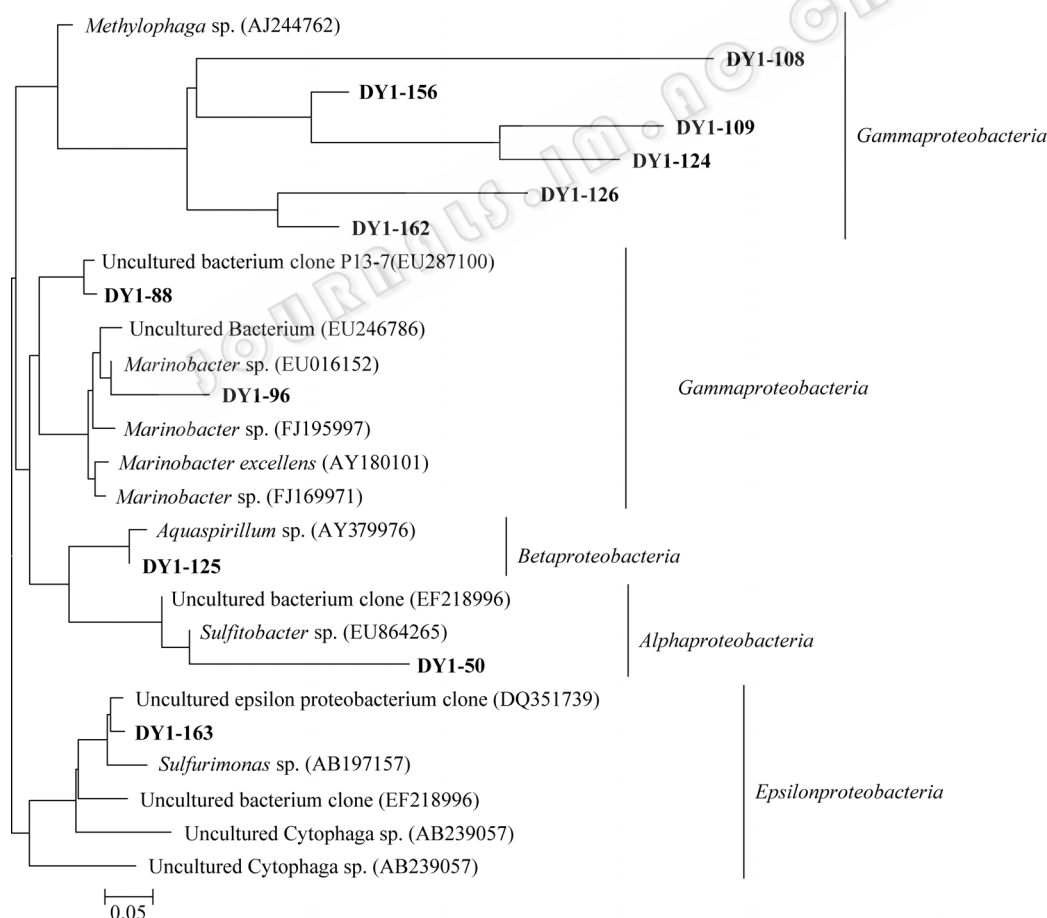


图 2 根据 16S rRNA 序列构建的劳盆地深海热液喷口沉积物 DY1 中部分细菌系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of the partial bacteria in sediment DY1 from Lau Basin deep-sea hydrothermal vent according to 16S rRNA gene sequences

注: 本文中的克隆子以粗体表示标识, 参照细菌序列引自 GenBank 数据库, 括号中的数字代表提交序号, 线段表示 5% 序列差异的分支长度。

Notes: Clones in this study were identified in bold. The reference bacteria were from GenBank database. Data in parentheses are the GenBank accession numbers. The scale bar represents 5 nucleotide substitutions per 100 nucleotides.

和 3, 将所测可确定分类地位的序列与数据库中同源序列共同构建系统发育树。系统发育分析表明, 文库 DY1 中的已知序列归属于 6 个类群: *Gammaproteobacteria*、*Epsilonproteobacteria*、*Alphaproteobacteria*、*Betaproteobacteria*、*Bacteroidetes* 和 *Actinobacteria*; 文库 DY2 中的序列分属于 *Gammaproteobacteria*、*Epsilonproteobacteria*、*Alphaproteobacteria* 和 *Actinobacteria* 4 个类群。从图 4 可以看出各类群所占的比例是不均衡的。除了 Unidentified 的类群, 变形细菌(*Proteobacteria*)中的 Gamma 亚群和 Epsilon 亚群是克隆文库中最大的 2 个细菌类群, 其中 *Gammaproteobacteria* 在文库 DY1 中占 51%, 在 DY2 中占 47%; *Epsilonproteobacteria* 在文库 DY1 和 DY2 中分别占 16% 和 15%。而 *Betaproteobacteria* 和 *Actinobacteria* 2 个类群只在克隆文库 DY1 中出现, 在文库 DY2 中未被发现。这表明两沉积物样品中的细菌群落存在一定的差别, 这可能与两样品的性质及其微环境不同有关。

此外, 还发现两文库中的克隆很多与未培养微生物同源关系很近, 比如克隆 DY1-101 和 DY1-77 与放线菌属(*Actinobacteria*)的未培养序列相近, 而 *Actinobacteria* 类群中的可培养细菌非常少。这些微生物是一类目前认识不足的微生物类群, 可能与特殊的环境条件有关, 但是这类微生物在海洋生态系统的生物地化循环中发挥着一定作用, 有待于更进一步的调查研究。

3 讨论

目前普遍认为在深海热液喷口这种极端环境中古菌占据较大比例, 但是细菌的海洋生态系统的生物地化循环中所发挥的重要作用也不容忽视。本研究采用 PCR-RFLP 技术对劳盆地深海热液喷口 2 个不同位点的沉积物样品中的细菌进行了 16S rRNA 序列的系统发育分析。分析结果表明, 在劳盆地深海热液喷口沉积物中具有较高的细菌多样性, *Gammaproteobacteria* 在克隆文库中占了很大比例 (DY1 中 51%, DY2 中 47%), 其次是一类与数据库已知序列同源性较低, 无法确定其所属类群的微生物, 再其次就是 *Epsilonproteobacteria* 细菌亚群。很明显, 在劳盆地深海热液喷口沉积物的细菌群落中, *Proteobacteria* 是主要类群, 其中 *Proteobacteria* 类群中的 Gamma 亚群和 Epsilon 亚群为优势菌群。这一结果

与国外其他深海热液喷口环境中的细菌多样性研究结果基本一致^[4]。

许多研究表明, *Gammaproteobacteria* 不仅是海洋沉积物和海水细菌中的主要类群, 而且在深海热液喷口这种特殊环境中的分布也较为广泛。Jiasong Fang 等研究了日本相模湾深海沉积物中的微生物多样性, 发现 *Gammaproteobacteria* 是优势菌群, 占总细菌数的 57%~64%^[5]; Lopez-Garcia 等对中印度洋脊热液喷口沉积物中的微生物群落研究发现, *Gammaproteobacteria* 是数量和种类最为丰富的细菌类群^[6]。这些结果充分说明了这类微生物在海洋生态系统的生物地化循环中起着重要作用。 ϵ -变形杆菌在深海热液喷口环境中更是占支配地位, 有研究表明其 rRNA 占了不同热液栖息地中总 rRNA 的 90% 以上^[7]。Nakagawa 等对多个深海热液喷口区域的调查发现, ϵ -变形杆菌是深海热液喷口环境中的一个重要细菌类群^[8]。而且深海热液喷口 ϵ -变形杆菌普遍缺少许多 DNA 修复基因, 导致了经常性的基因重组、突变、缺失和基因的水平转移, 这种基因可塑性对于提高生物的多样性, 增强生物对极端环境的适应性及维持物种在群落中的支配地位都很有帮助^[9]。

在 2 个沉积物样品中, *Gammaproteobacteria* 中的嗜甲基菌属 (*Methylophaga*) 和海杆菌属 (*Marinobacter*) 都是较为丰富的菌属, 本研究中这 2 个菌属的序列与来自其他海域 (包括海水和海洋表层沉淀) 的序列相似性 >97%, 说明这些菌属在海洋生态系统中分布的广泛性。

尽管劳盆地深海热液喷口 2 个沉积物样品中细菌的优势菌群是一致的, 但不同位点的细菌类群及组成却不尽相同, 表现出一定的空间差异性。导致这一差异的原因很可能与沉积物性质 (样品 DY1 为黑褐色沉积物, DY2 为土黄色沉积物) 及其所处微环境 (DY1 采样点温度 84°C, DY2 114°C) 有关。另外, 相对于东太平洋脊 (EPR) 和中印度洋脊 (MAR) 等研究较充分的热液喷口区域, 劳盆地热液喷口沉积物中具有一些独特的细菌种属, 例如文库 DY1 中的克隆 DY1-131、DY1-146 和文库 DY2 中的 DY2-25 在数据库中并未找到明显的相似性序列, 有些序列与数据库中同源性序列的相似性小于 90%, 据推测这些微生物很可能是劳盆地深海热液喷口沉积物中特有的新的细菌种属。由于深海热液喷口的极端生

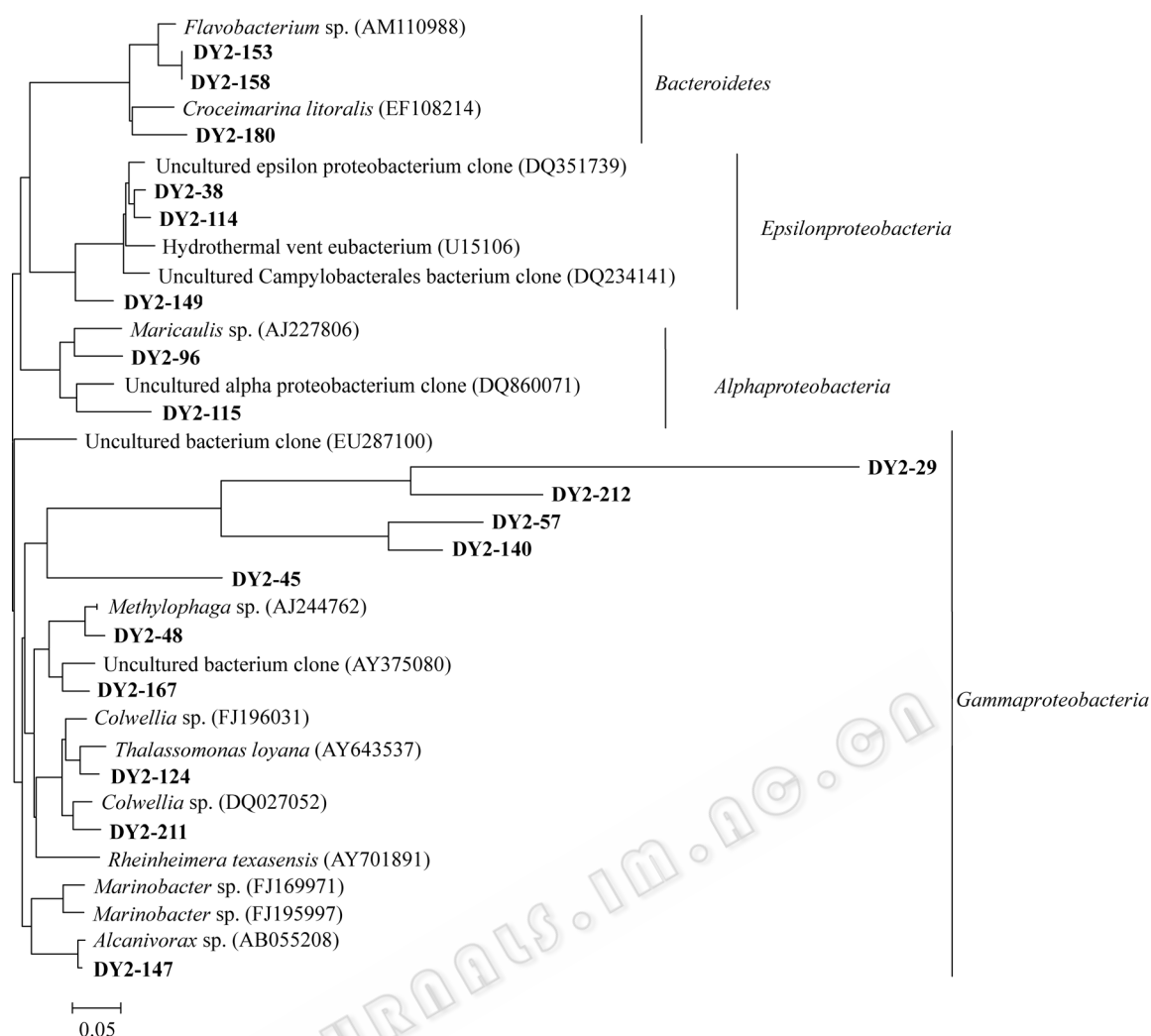


图3 根据 16S rRNA 序列构建的劳盆地深海热液喷口沉积物 DY2 中部分细菌系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of the partial bacteria in sediment DY2 from Lau Basin deep-sea hydrothermal vent according to 16S rRNA gene sequences

注：本文中的克隆子以粗体表示标识，参照细菌序列引自 GenBank 数据库，括号中的数字代表提交序号，线段表示 5% 序列差异的分支长度。

Notes: Clones in this study were identified in bold. The reference bacteria were from GenBank database. Data in parentheses are the GenBank accession numbers. The scale bar represents 5 nucleotide substitutions per 100 nucleotides.

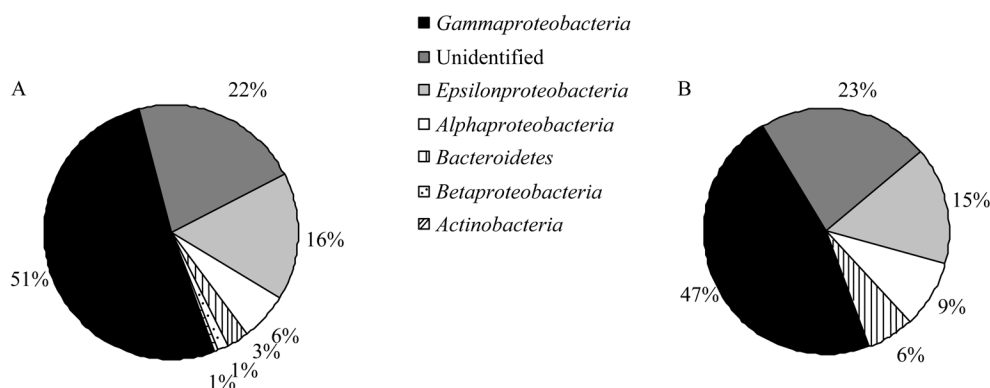


图4 各分支细菌在总细菌中所占的比例

Fig. 4 The proportion of each phylotypes in total bacteria

注：A：沉积物 DY1；B：沉积物 DY2。

Note: A: Sediment DY1; B: Sediment DY2.

存环境使得这些微生物具有十分独特的生理生化特征和能量代谢特征, 对这些微生物的调查研究具有重要的理论和实践意义^[10]。

本研究结果表明, 劳盆地深海热液喷口沉积物环境中具有较高的细菌多样性, 且多数细菌均是未被培养的, 更重要的是劳盆地深海热液喷口沉积物中存在其特有的微生物属种。对这些微生物类群的研究认识尚且不足, 大量的研究工作有待于进一步的开展。事实上, 由于深海热液喷口环境的特殊性, 人们已从这一环境中分离获得了一些新的微生物资源^[11-13], 且获得了许多具有特殊生理功能的活性物质。遗憾的是, 由于技术条件的限制及本身难于培养等各种原因深海热液喷口环境中仍有大量的微生物资源未被发现^[14], 因此研究深海热液喷口的微生物的多样性, 只是一个初步工作, 开展热液喷口微生物的适应性培养技术, 探索有效的培养及分离方法, 对于开发利用这些具有独特特性的微生物新资源具有重要意义^[15]。

参 考 文 献

- [1] Corliss JB, Dymond J, Gordon L, *et al.* Submarine thermal springs on the Galapagos Rift. *Science*, 1979, **203**: 1073-1083.
- [2] Francheteau J, Needham H, Choukroune P, *et al.* Massive deep-sea sulfide ore deposits discovered on the East Pacific Rise. *Nature*, 1979, **277**: 523-528.
- [3] Zhou JZ, Bruns MA, Tiedje JM. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **63**: 3789-3796.
- [4] Jeanthon C. Molecular ecology of hydrothermal vent microbial communities. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2000, **77**: 117-133.
- [5] Jiasong Fang, Arakawa Shizuka, Chiaki Kato, *et al.* Microbial diversity of cold-seep sediments in Sagami Bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene and lipid analyses. *FEMS Microbiol Ecol*, 2006, **57**(3): 429-441.
- [6] Lopez-Garcia P, Duperron S, Philippot P, *et al.* Bacterial diversity in hydrothermal sediment and epsilonproteobacterial dominance in experimental microcolonizers at the Mid-Atlantic Ridge. *Environ Microbiol*, 2003, **5**(10): 961-976.
- [7] Corre E, Reysenbach AL, Prieur D, *et al.* ϵ -Proteobacterial diversity from a deep-sea hydrothermal vent on the Mid-Atlantic Ridge. *FEMS Microbiol Lett*, 2001, **205**: 329-335.
- [8] Nakagawa S, Takai K, Inagaki F. Distribution, phylogenetic diversity and physiological characteristics of epsilon-Proteobacteria in a deep-sea hydrothermal field. *Environ Microbiol*, 2005, **10**: 1619-1632.
- [9] Satoshi N, Yoshihiro T, Shigeru S, *et al.* Deep-sea vent ϵ -proteobacterial genomes provide insights into emergence of pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104** (29): 12146-12150.
- [10] 王丽玲, 林景星, 胡建芳. 深海热液喷口生物群落研究进展. *地球科学进展*, 2008, **23**(6): 604-612.
- [11] Miroshnichenko ML, Bonch-Osmolovskaya EA. Recent developments in the thermophilic microbiology of deep-sea hydrothermal vents. *Extremophiles*, 2006, **10**: 85-96.
- [12] Smith JL, Campbell BJ, Hanson TE, *et al.* *Nautilia profundicola* sp. nov., a thermophilic, sulfur-reducing epsilonproteobacterium from deep-sea hydrothermal vents. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2008, **58**: 1598-1602.
- [13] Reysenbach AL, Liu Y, Banta AB, *et al.* A ubiquitous thermoacidophilic archaeon from deep-sea hydrothermal vents. *Nature*, 2006, **442** (7101): 444-447.
- [14] Miroshnichenko ML. Thermophilic microbial communities of deep-sea hydrothermal vents. *Microbiology*, 2004, **73**: 1-13.
- [15] Van Dover CL, Lutz RA. Experimental ecology at deep-sea hydrothermal vents: a perspective. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2004, **300**: 273-307.