

西双版纳地区热带雨林土壤酸杆菌 (*Acidobacteria*)群体结构和多样性分析

王春香 田宝玉 吕睿瑞 林伟铃 徐燕 黄钦耿 黄建忠*

(福建师范大学工业微生物教育部工程研究中心 生命科学学院
福建省现代发酵技术工程研究中心 福建 福州 350108)

摘要: 酸杆菌(*Acidobacteria*)广泛存在于自然界,在许多生态系统中发挥重要作用。本文以西双版纳热带森林的土壤为研究对象,提取土壤的总基因组 DNA 为模板,采用特异引物扩增酸杆菌 16S rRNA 基因,构建酸杆菌门细菌 16S rRNA 基因克隆文库,利用限制性片段长度多态性(RFLP)对随机克隆进行筛选、测序,对该生态环境下酸杆菌菌群种类和组成进行了系统发育分析。结果表明该地区热带森林土壤的酸杆菌有 5 个类群:分别为 Gp1、Gp2、Gp3、Gp5 和 1 个未知分类的酸杆菌种。其中 Gp1 是该土壤环境下酸杆菌门的绝对优势菌群,约占整个酸杆菌群的 50%–80%,其次是 Gp2,占 12%–25%,不同采样点酸杆菌类群的分布趋势是一致的。研究表明西双版纳热带森林土壤中的酸杆菌类群具有适应其土壤环境的广泛的多样性。

关键词: 热带森林, 红壤, 酸杆菌, RFLP 分析, 生态多样性

Distribution and Diversity of *Acidobacteria* in Tropical Rain Forest Soil of Xishuangbanna

WANG Chun-Xiang TIAN Bao-Yu LV Rui-Rui LIN Wei-Ling XU Yan
HUANG Qin-Geng HUANG Jian-Zhong*

(Engineering Research Center of Industrial Microbiology, Ministry of Education, College of Life Sciences, and Engineering Research Center of Fujian Modern Fermentation Technology, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350108, China)

Abstract: *Acidobacteria* is widely distributed in the nature and plays important roles in various ecosystems. In this study, soil samples were collected from Xishuangbanna Tropical Forest. Community DNA were directly extracted and amplified with the specific primers targeting the 16S rRNA genes of *Acidobacteria* to construct 16S rRNA gene libraries. The random clones from the libraries were screened and sequenced. Phylogenetic relationship of *Acidobacteria* in this specific ecosystem was built up. The results showed that members of the identified *Acidobacteria* belonged to five major groups: Gp1, Gp2, Gp3, Gp5 and an unclassified *Acidobacterium*. Among them, Gp1 was the most predominant group, about 50%–80%, Gp2 was followed by 12%–25%. Among the samples, the community structure of *Acidobacteria* was consistent. This

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 30800735); 福建省自然科学基金资助项目(No. 2008F3036, 2009J06014)

* 通讯作者: Tel: 86-591-22868212; ✉ tianby@fjnu.edu.cn

收稿日期: 2009-09-18; 接受日期: 2009-11-11

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

study discovered the high diversity of *Acidobacteria* populations distributed in the soil ecosystems to adapt their specific environments.

Keywords: Tropical forest, Red soil, *Acidobacteria*, RFLP analysis, Ecologically diverse

酸杆菌门(*Acidobacteria*)是新近基于分子生态学研究划分的新细菌类群, 可以分为 8 个不同的大类群 Gp1-8, 大多为嗜酸菌, 目前对它们的了解还很少。已有的研究表明酸杆菌广泛存在于自然界的各种环境中, 约占土壤细菌类群的 5%–46%^[1], 但也有研究表明酸杆菌门在一些土壤菌群结构中的比例超过了 50%, 如 Sang-Hoon Lee^[2]对栗子树根系周围的土壤样品的菌群结构分析表明酸杆菌门所占比例高达 65%。酸杆菌是土壤菌群结构的一大重要类群, 不但在根系和自然土壤中分布广泛, 而且其比例仅次于、甚至超过变形菌, 说明酸杆菌在自然环境中必然有其特定的生态功能^[3-4]。截止到目前, RDP-II 数据库中已有 3000 多条代表性的酸杆菌 16S rRNA 基因序列公布, 这些序列所代表的酸杆菌大多为未知不可培养细菌, 仅有少数得到纯培养^[5-6]。目前已分离培养并被《伯杰氏系统细菌学手册》确认的酸杆菌种仅有 7 种, 包括 *Acidobacterium*、*Geothrix*、*Holophaga* 以及新近报道的 *Edaphobacter aggregans*、*Edaphobacter modestus*、*Chloracidobacterium thermophilum* 和 *Terriglobus roseus*^[2]。国内基于酸杆菌门的研究很少, 虽然也有报道从不同的环境样品中鉴定出酸杆菌门细菌^[7], 但尚没有酸杆菌的专门研究报告。

西双版纳是我国热带雨林面积最大、生物多样性最丰富的地区, 季节雨林是西双版纳热带雨林的典型代表之一。在雨林森林生态系统中, 微生物对环境中植物多糖如木质纤维素、淀粉和蛋白质等 C、N 源的快速分解、能量的快速流动起着重要的作用^[8]。该地区土壤主要是由白垩系砂岩发育而成的偏酸性的砖红壤, 黄钦耿等人 2008 年的研究表明, 酸杆菌也是该类型土壤的一个重要的微生物类群^[9]。因此, 本研究以云南省西双版纳地区的雨林土壤出发, 采用基于 16S rRNA 基因的分子生态学手段分析该环境下酸杆菌门菌群结构和分布多样性, 为进一步阐释酸杆菌在土壤中的生态功能、深入理解微生物在雨林生态系统的物质循环与能量流动中发挥作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集与处理

土样采集于中国科学院西双版纳热带植物园, 该地区属西南热带季风气候, 年降水量为 1600 mm 左右, 年平均气温为 21.4°C–22.6°C。土壤是由白垩系砂岩发育而成的砖红壤。取样地内设 3 个取样点, BN-15 的采样地表有 2 cm–3 cm 厚的枯枝落叶层, BN-16 土样采于林间空地, BN-25 为树木根际区土壤。分别采取 5 cm–8 cm 土层的土样 0.5–1.0 kg, 置于塑料袋中, 带回实验室后于 4°C 保存, 在 1 个月内处理分析。土壤浸出液酶活(木聚糖酶和纤维素酶)的测定采用 3,5-二硝基水杨酸比色法(DNS 法)^[10]。酶活单位的定义: 在本测定条件下, 每分钟水解底物产生 1 μg 还原糖(以木糖或葡萄糖计), 所需酶量定义为 1 个酶活力单位(U)。

1.2 主要试剂和仪器

PCR 反应用的 rTaq 聚合酶、pMD18-T 载体以及限制性内切酶 *Hha* I、*Msp* I 和 *Hae* III 均购自于 TaKaRa 公司, 氨苄青霉素购自于 Sigma, 引物由上海生工公司合成。培养基配置参照分子克隆实验指南。

1.3 土壤 DNA 的提取

称取 1 g 土样, 提取土壤总基因组 DNA。方法参见 MO BIO Laboratories 公司试剂盒操作说明书。

1.4 酸杆菌 16S rRNA 基因文库的构建

采用酸杆菌特异的上游引物(ACD31F, 5'-GATC CTGGCTCAGAATC-3')和细菌通用的下游引物(1492R, 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), 以土壤基因组为模板扩增 16S rRNA 基因。PCR 扩增反应条件为: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 51°C 30 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 10 min。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳回收后, 连接 pMD18-T 载体, 转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞, 涂于添加 X-Gal 和 IPTG 的 LB 氨苄平板上。文库加入甘油至终浓度 20%, 混匀后于 -70°C 保存。

1.5 16S rRNA 基因克隆文库的筛选

从 16S rRNA 基因文库中随机挑取白色克隆子,

划线至新的 LB 氨苄平板。采用载体引物 M13RV-P (5'-GGAAACAGCTATGACCATGATTAC-3')和 M13-20(5'-CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT-3')进行菌落 PCR, 验证阳性克隆。取 8 μ L PCR 产物作为模板, 用限制性内切酶 *Hpa* I、*Msp* I 和 *Hae* III 37°C 酶切, 消化产物以 3%琼脂糖凝胶电泳分析限制性酶切带型。将不同的克隆根据这 3 组酶的酶切带型的结果进行归类。将具有不同谱型的克隆送交上海生工进行测序。同时根据文库酶切分析的结果计算克隆文库的覆盖率(Coverage)并进行多样性分析, 多样性指数包括带型、克隆数、Shannon 指数及 Evenness 指数^[11], 覆盖率计算公式为 $Coverage = [1 - (\text{带型仅出现 1 次的克隆子数}/\text{总克隆数})] \times 100\%$ ^[12]。

1.6 16S rRNA 基因序列的比较及系统发育树的构建

测序结果为自 1492R 一端起至少 750 bp 的 DNA 序列。所测序列经 CHECK-CHIMERA 程序进行嵌合序列鉴定以除去嵌合序列。将克隆对应的每一个谱型的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 和 RDP 数据库中的已知序列进行 BLAST 比较, 鉴定与克隆序列亲缘关系最近的种属。并从数据库获得相关种属的 16S rRNA 基因序列, 采用 Clustal X1.83 进行多序列比对^[13]。亲缘距离的计算和系统发育树的构建分别采用 MEGA(version 4.0)软件包^[14]中的 Kimura two-parameter 矩阵模型^[15]和 Neighbor-joining 法^[16], 设自展值为 1000 次, 构建系统发育树。本研究得到的非嵌合 16S rRNA 基因序列已提交到 GenBank 核酸数据库, 序列号为 FJ870595-FJ870660、GQ889417-GQ889421。

2 结果与分析

2.1 土壤样品的基本理化特性

热带雨林内 3 个取样点的土样进行分析, 土样的基本理化性质及酶活见表 1。

2.2 土壤总 DNA 的提取和酸杆菌 16S rRNA 基因的扩增

本研究采用 MO BIO Laboratories 生产的土壤 DNA 提取试剂盒提取土壤总基因组 DNA, 纯化后的 DNA 溶液为无色, 与 Marker 对比可知获得的 DNA 片段大约 23 kb, 纯度和浓度都较高, 满足下一步 PCR 对于模板的要求。

以纯化的土壤基因组总 DNA 为模板, 利用 ACD31F 和 1492R 引物扩增酸杆菌 16S rRNA 基因。PCR 摸索模板浓度, 结果显示以稀释 50 倍和 100 倍的 DNA 溶液为模板可以扩增出约 1.5 kb 的特异目的条带。

2.3 文库的 PCR-RFLP 筛选

PCR 扩增出的目的片段是样品中各种酸杆菌 16S rRNA 基因的混合物。为了避免同一克隆的重复测序, 在克隆测序之前, 常用 PCR-RFLP 对 rRNA 基因文库进行筛选。酶切产物经 3%琼脂糖凝胶电泳分离, 1.5 kb 的细菌 16S rRNA 基因片段产生了丰富的多态性。

酶切图谱显示, 3 份土样共检测到 71 条不同的酸杆菌 16S rRNA 基因酶切带型。所得到的 3 个克隆文库的覆盖率均达到 65%以上, 表明挑取的克隆子的数量已足够能反映出群落结构的面貌。表 2 列出了不同采样位点克隆文库的多样性指数, 样品

表 1 样品理化性质
Table 1 The physicochemical properties of the soils used in this study

样品 Sample	有机质 Organic matter (g/kg)	pH	碳氮比 C/N-ratio	含水量 MC	木聚糖酶活 Xylanase activity (U)	纤维素酶活 Cellulose activity (U)
BN-15	48.30	5.38	12.3	0.311	342	513
BN-16	43.20	5.51	11.3	0.240	452	546
BN-25	35.98	4.88	10.2	0.348	534	390

表 2 西双版纳地区酸杆菌 RFLP 多样性指数
Table 2 RFLP diversity indices for Acidobacteria of Xishuangbanna

样品 Sample	酶切带型数目 No. of RFLP types	克隆数 No. of clone	覆盖率(%) Coverage	Shannon 指数 Shannon index	Evenness 指数 Evenness index
BN-15	66	114	67.5	4.042	0.9648
BN-16	47	105	79.0	3.648	0.9474
BN-25	44	80	73.8	3.680	0.9724

BN-25 在种类个体分配的均匀性最高, 而样品 BN-15 的酸杆菌菌群的多样性最高, 酶切筛选到 66 条 RFLP 带型。此外, BN-16 筛选获得 47 条带型, BN-25 筛选到 44 条带型, 并且样品 BN-16 和 BN-25 绝大多数的 RFLP 带型与样品 BN-15 的带型相一致, 不同在于样品 BN-16 检测到 2 条新带型(BN16-28 和 BN16-36), 样品 BN-25 检测到 3 条新带型(BN25-3、BN25-51 和 BN25-11)。

2.4 酸杆菌 16S rRNA 基因数据的分析处理和系统发育分析

将测得的序列与 NCBI 和 RDP 数据库中已知序列进行相似性比较分析, 结果发现 56% 的克隆序列与数据库中已提交的序列相似性大于 97%, 42.4% 的克隆序列相似性介于 90%–97%, 1.6% 的克隆序列相似性介于 85%–90%。其中, 94% 的克隆序列与已发布的数据库中的环境未培养酸杆菌细菌的相似性最高, 仅有 6% 的克隆序列与数据库中的可培养的酸杆菌有较高的相似性, 表明文库中绝大部分酸杆菌克隆属于土壤环境中的酸杆菌菌群。在这些分析到的酸杆菌类群中, 只有极少数与已报道的可以纯培养的酸杆菌具有较高的相似性, 这与先前报道的酸杆菌大多为未知不可培养细菌的研究结果相一致。

通过对获得序列的系统发育和聚类分析(图 1)可以看出, 3 个土壤样品共 71 种不同 RFLP 带型最终聚为 5 个类群, 分别属于酸杆菌门中的 Gp1、Gp2、Gp3、Gp5 和 1 个 BN-15 样品独有的未知分类的酸杆菌 BN6-11。同一地区不同环境下的土样的菌群结构存在差异, 但差异相对较小。3 份土样中不同酸杆菌类群的组成和分布比例趋势是一致的, 其中 Gp1 是该土壤环境下酸杆菌门的绝对优势菌群, 约占整个酸杆菌群的 50%–80%, 其次是 Gp2 占 12%–25%(表 3)。相对来讲样品 BN-15 酸杆菌菌群多样性最高, 具有代表性, 其他土样(BN-16 和 BN-25)中的大部分酸杆菌类群在 BN-15 中同样被检测到。然而在样品 BN-16 中发现了 2 个与 Gp1 分支聚在一类的 2 个谱型(BN16-28 和 BN16-36), 并在样品 BN-25 中检测到 Gp3 类群的 2 个新谱型(BN25-3 和 BN25-51)和 Gp2 类群的 1 个新谱型(BN25-11)。

表 3 西双版纳地区热带雨林土壤酸杆菌类群分析与比较

Table 3 Analysis and comparison of different *Acidobacteria* groups in Xishuang Banna Tropical Forest

酸杆菌类群 Groups of <i>Acidobacteria</i>	各个酸杆菌类群所占的比例(%) Proportion of different <i>Acidobacteria</i> groups		
	BN-15	BN-16	BN-25
Gp1	65.8	79.0	52.5
Gp2	18.4	12.4	25.0
Gp3	8.8	6.7	17.5
Gp5	3.5	1.9	5.0
Unclassified <i>Acidobacteria</i>	3.5	0	0

3 讨论

在本研究中, 采用分子生物学方法对云南西双版纳热带雨林 3 个土壤样品中酸杆菌 16S rRNA 基因的多态性进行分析, 克隆文库的覆盖率均在 65% 以上, 说明各个文库分析的克隆数能够反映出样品菌落结构。西双版纳地区热带雨林的土壤酸杆菌的菌群结构差异相对较小, 组成和分布比例趋势是一致的, 其中样品 BN-15 的多样性指数最高, 在 3 个土样当中具有代表性。

从系统发育进化树看, 在该生境下酸杆菌门细菌主要分为 5 个类群: Gp1、Gp2、Gp3、Gp5 和 1 个未知分类的酸杆菌 BN6-11。西双版纳热带雨林土壤样品的分析结果基本上与先前的研究是一致的。Gp1 类群对土壤的 pH 值也极为敏感, 当土壤 pH < 6 时 Gp1 所占比例将明显变大, 而在 pH > 6.5 时在土壤样品中几乎检测不到 Gp1^[6,17]。由于西双版纳雨林地区土壤主要是由白垩系砂岩发育而成的偏酸性(pH < 5)的砖红壤, Gp1 是该土壤样品中优势类群, 约占整个酸杆菌类群的 50%–80%, 其次是 Gp2 占 12%–25%。Gp3 在先前有关土壤样品研究报道中很少被检测到, 特别在酸性土壤中几乎未被检出, 但是本研究中有一定比例的 Gp3 克隆被检测到。与 Gp1、Gp2 和 Gp5 的广泛分布不同, 其他的一些酸杆菌类群则只是一些特殊环境下检出^[6]。此外, 在 BN-15 样品中检测到的酸杆菌 BN6-11, 目前在已有的数据库中还没有找到相似性较高的序列, 并且在系统进化树是一个独立分支, 说明此序列所代表的种类属于一个未知分类的酸杆菌类群。

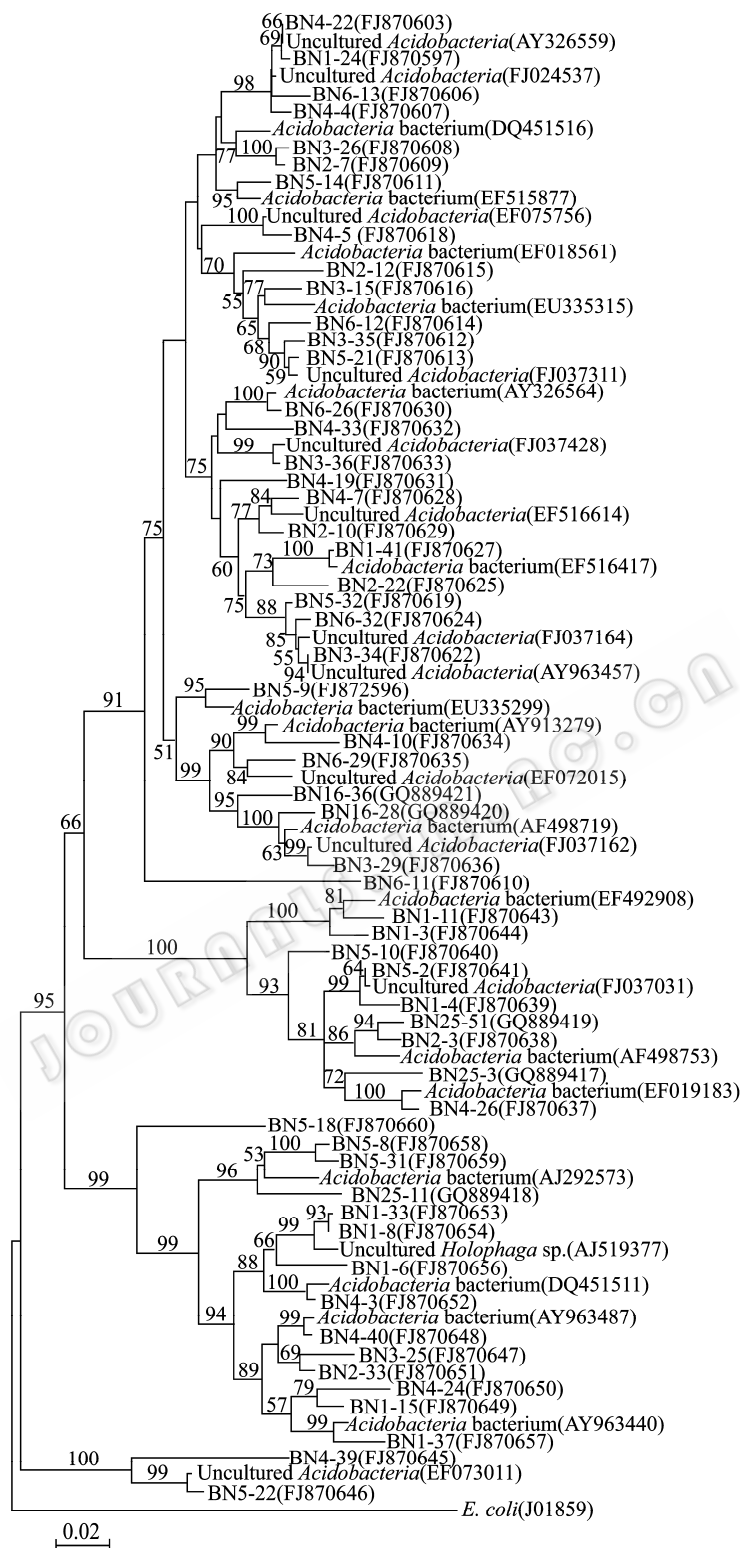


图 1 西双版纳地区热带雨林土壤酸杆菌类群系统发育分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of *Acidobacteria* 16S rRNA gene sequences in Xishuang Banna Tropical Forest

Note: Numbers on branch nodes are bootstrapping values (1000 resamplings). The sequence of *E. coli* (J01859) was used as outgroup nodes. The scale bar indicates 0.02 substitutions per nucleotide position.

土壤中存在各种细菌生理群, 它们在土壤元素循环中起着主要作用^[18], 其中大部分参与分解环境中植物残体系统提供 C 素来源。然而, 环境中绝大多数微生物的不可培养性在很大程度上限制了传统微生物学对生态系统中未培养微生物的生态功能的深入研究。本研究采用 16S rRNA 基因扩增技术和 RFLP 分析相结合的分子生物学方法克服了传统培养方法的缺陷, 可以有效避免在传统培养、分离等过程中造成微生物遗传信息多样性的丢失, 因此能够更全面和真实地反映菌群结构的特点。本文库中大多酸杆菌克隆为未知不可培养细菌, 这是传统培养方法无法实现的, 体现了 PCR-RFLP 技术的优越性。

本研究通过构建 16S rRNA 基因克隆文库研究西双版纳土壤样品酸杆菌门的菌群结构的特点, 为将来进一步研究酸杆菌门细菌在土壤生态系统中的特定功能提供基础信息。

参 考 文 献

- [1] Ellis RJ, Morgan P, Weightman AJ, *et al.* Cultivation-dependent and-independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal contaminated soil. *Appl Environ Microbiol*, 2003(69): 3223–3230.
- [2] Lee SH, Ka JO, Cho JC. Members of the phylum *Acidobacteria* are dominant and metabolically active in rhizosphere soil. *FEMS Microbiol Lett*, 2008(285): 263–269.
- [3] Janssen PH. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol*, 2006(72): 1719–1728.
- [4] Penn K, Wu D, Eisen JA, *et al.* Characterization of bacterial communities associated with deep-sea corals on Gulf of Alaska seamounts. *Appl Environ Microbiol*, 2006(72): 1680–1683.
- [5] Cole JR, Chai B, Farris RJ, *et al.* The ribosomal database project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res*, 2005(33): 294–296.
- [6] Barns SM, Takala SL, Kuske CR. Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom *Acidobacterium* in the environment. *Appl Environ Microbiol*, 1999(65): 1731–1737.
- [7] 张薇, 胡跃高, 黄国和, 等. 西北黄土高原柠条种植区土壤微生物多样性分析. *微生物学报*, 2007, 47(5): 751–756.
- [8] 杨效东, 邹晓明. 西双版纳热带季节雨林凋落叶分解与土壤动物群落: 两种网孔分解袋的分解实验比较. *植物生态学报*, 2006, 30(5): 791–801.
- [9] 黄耿钦, 田宝玉, 黄建忠, 等. 福州森林红壤细菌的菌群结构及其功能分析. *生物技术通报*, 2009(3): 132–136.
- [10] Nelson N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*, 1944, 153(2): 375–380.
- [11] 张文军, 齐艳红, Schoenly KG. 生物多样性和均匀度显著性的随机化检验及计算软件. *生物多样性*, 2002, 10(4): 431–437.
- [12] Kemp PF, Aller JY. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 47(2004): 161–177.
- [13] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, *et al.* The Clustal X windows interface, flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 1997(24): 4876–4882.
- [14] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3, Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis, and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 2004(5): 150–163.
- [15] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*, 1980(16): 111–120.
- [16] Saitou N, Nei M, Lerman LS. The neighbor-joining method, a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 1987(4): 406–425.
- [17] Michelle S, Kathryn ER, Peter H. Effect of pH on isolation and distribution of members of subdivision 1 of the phylum *Acidobacteria* occurring in soil. *Appl Environ Microbiol*, 2006(72): 1852–1857.
- [18] Vigdis T, Lise O. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol*, 2002(5): 240–245.