

研究报告

南海深海沉积物放线菌多样性分析

王晶晶 陈志荣 官颖颖 李静*

(中国海洋大学海洋生命学院 山东 青岛 266003)

摘要:【目的】免培养和纯培养相结合分析南海深海沉积物放线菌多样性。【方法】免培养方法通过提取沉积物宏基因组 DNA, 利用放线菌门特异性引物扩增放线菌 16S rRNA 基因序列, 构建放线菌 16S rRNA 基因克隆文库, 文库经 RFLP (Restriction fragment length polymorphism) 分析后挑选代表序列测序并进行多样性指数分析和系统发育分析。可培养方法利用 8 种培养基进行菌株分离, 对排重后的菌株进行 16S rRNA 基因序列多样性分析。【结果】构建的两个深海位点的 16S rRNA 基因克隆文库在放线菌门的放线菌纲(Actinobacteria)、酸微菌纲(Acidimicrobiia)、腈基降解菌纲(Nitriliruptoria)和嗜热油菌纲(Thermoleophilia) 4 个纲中均有分布; 两个位点中的种群结构有差异, N40-4 位点的优势种群是放线菌纲的链霉菌目(Streptomycetales); N63-4 位点的优势种群是腈基降解菌纲的腈基降解菌目(Nitriliruptorales)。8 种培养基共分离出 41 株放线菌, 根据形态特征排重后得到的 19 株菌分布于 10 个不同的属, 12 个不同的种, 其中稀有放线菌属比例较高, 菌株 OAct400 为潜在的微杆菌属(*Microbacterium*)新种。【结论】南海深海沉积物蕴含着丰富的放线菌物种资源及大量未知种群, 具有进一步研究的价值。

关键词: 南海, 放线菌, 免培养, 可培养, 多样性

Actinobacterial diversity in the deep-sea sediments of the South China Sea

WANG Jing-Jing CHEN Zhi-Rong GUAN Ying-Ying LI Jing*

(College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003, China)

Abstract: [Objective] The purpose of the study was to analyze the actinobacterial diversity in the deep-sea sediments of the South China Sea by using culture-independent and culture-dependent approach. [Methods] Actinobacteria-specific 16S rRNA gene clone library was constructed. Representative clones selected based on the restriction fragment length polymorphism analysis were sequenced and placed into operational taxonomic unit (OTU) groups according to the 16S rRNA gene sequence similarity. Diversity statistics were analyzed using SPADE analysis software. Eight media were used to isolate actinobacteria strains from 11 sediment samples. 16S rRNA gene sequences of the representatives were sequenced to analyze phylogenetic diversity of the actinobacteria. [Results] Forty and ninety-nine

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31200009, 41176120)

*Corresponding author: E-mail: lijing313@ouc.edu.cn

Received: July 23, 2015; **Accepted:** December 11, 2015; **Published online** (www.cnki.net): December 31, 2015

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31200009, 41176120)

*通讯作者: E-mail: lijing313@ouc.edu.cn

收稿日期: 2015-07-23; 接受日期: 2015-12-11; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-12-31

positive clones were obtained from the two libraries and placed into 16 and 34 OTUs respectively. Both two libraries contained class Actinobacteria, Acidimicrobia, Nitrospirae and Thermoterrae. The dominant population of site N40-4 and N63-4 were order Streptomycetales and Nitrospirales respectively. Forty-one strains were obtained by the culture-dependent approach. Analysis of the 16S rRNA gene sequences of 19 representative strains showed that these strains belong to 10 different genera and 12 different species. **[Conclusion]** The deep-sea sediments of the South China Sea harbor abundant and diverse actinobacteria. The result also implied that there may be large numbers of unknown actinobacterial groups.

Keywords: The South China Sea, Actinobacteria, Culture-independent, Culture-dependent, Diversity

深海作为极端环境之一,蕴藏着数量庞大、种类繁多的生物资源,微生物是其中最重要的一类。深海微生物在深海的极端环境下生存,形成了独特的生理机制及代谢产物,具有重要的科研价值和经济价值,所以深海环境下极端微生物的研究不仅是目前生命科学最前沿的领域之一,也是海底深部生物圈研究和海底流体活动研究重要的组成部分^[1]。放线菌是一类有重要应用价值的微生物资源,因其产生丰富的活性次级代谢产物而备受关注,现已发现的2万多种微生物次级代谢产物中,约70%是由放线菌产生的^[2]。海洋放线菌是海洋微生物资源的重要组成部分^[3],尤其是深海放线菌是开发新的生物活性物质的重要来源。深海具有高压、低温或高温、黑暗、寡营养的极端环境^[4],长期适应于这种极端环境的深海放线菌必然有其特殊的代谢调控机制和物种多样性,所蕴含的应用潜力不可估量,可以说深海这一特殊环境是发现和筛选新的放线菌物种多样性和特殊代谢产物的宝贵资源。

南海是西太平洋最大的边缘海,兼具区域海洋和深海的共同特点,对东亚季风气候有着重要的影响,同时,其南部位于西太平洋暖池区,对全球气候变化具有敏感响应^[5],有着复杂多样的海底沉积环境及其可能蕴含的丰富的放线菌类群和潜在的大量结构新颖的代谢产物。系统地开展南海海洋放线菌多样性研究,评估其潜在的应用价值,对于开拓我国药用微生物资源具有重要意义。近年来,以南海海洋研究所和云南大学研究人员为主,针对南海海洋放线菌物种资源及其次级代谢产物进行了大量研究并取得了丰富的研究成果,发现了7个

亚目、13个科和28个属的放线菌^[6];发现和鉴定了14个放线菌新种,其中有7个来源于1000 m以下的深海沉积物^[7],显示出我国南海热带海域丰富的放线菌资源。但到目前为止,对于南海海洋放线菌,特别是深海沉积物环境中放线菌资源及其多样性的研究还停留在纯培养水平上,缺少系统全面的分析,由于传统纯培养方法的局限性,所获得的微生物不足自然界中微生物的1%,仅采用纯培养法开展多样性分析不足以客观地反映环境中微生物群落情况。因此,本研究利用16S rRNA基因文库技术与纯培养技术相结合的手段对南海深海沉积物放线菌物种多样性和系统发育多样性进行分析,推动对南海深海放线菌深入的认知,以便更好地发掘潜在资源,为南海放线菌资源的开发和有效利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源:样品选用东方红2号2011年8月南海航次的11个位点的沉积物样品,采集信息见表1。构建文库所用的深海沉积物样品是N40-4(3235 m, 14.5°N, 118°E); N63-4(4242 m, 15°N, 114°E),样品采集后于-20℃保藏。

1.1.2 主要培养基:Raffinose-Histidine agar^[8]、Starch-casein agar^[8]、A1^[9]、M2^[10]、M3^[10]、M4^[11]、改良高氏一号培养基^[11]和2216E^[11]共8种分离培养基;LB^[11]、1/2ISP2^[11]。分离培养基用陈海水配制,1×10⁵ Pa灭菌30 min后,添加终浓度为100 mg/L的制霉菌素、50 mg/L的萘啶酮酸和25 mg/L的重

表 1 南海沉积物样品信息
Table 1 Information of sediments of the South China Sea

编号 Serial number	水深 Depth (m)	位置 Location (cm)	温度 Temperature (°C)	盐度 Salinity (%)	样品类型 Sample types
N20-3	3 004	表层	2.343	3.462 5	沉积物
N39-3	1 996	表层	2.464	3.453 8	沉积物
N40-4	3 235	表层	2.354	3.462 8	沉积物
N42-5	2 093	下层 40	2.531	3.461 8	沉积物
N44-3	2 441	表层	2.349	3.462 6	沉积物
N46-3	1 471	表层	3.023	3.459 4	沉积物
N60-5	2 595	表层	2.365	3.359 5	沉积物
N63-4	4 242	表层	2.483	3.462 1	沉积物
N78-4	3 695	表层	2.385	3.462 9	沉积物
N78-5	3 695	下层 40	2.385	3.462 9	沉积物
N88-4	4 145	表层	2.460	3.463 1	沉积物

铬酸钾。

1.1.3 主要试剂和仪器：QIAEX II Gel Extraction Kit, 德国 QIAGEN 公司；Gel Extraction Kit, 美国 OMEGA 公司；pMD19-T Vector, 日本 TaKaRa 公司；引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。电泳仪(AC100-240V), 青岛英睿仪器设备销售有限公司；凝胶成像仪(GBOX/CHEMI-X16), 青岛爱普科生物工程有限公司。

1.2 16S rRNA 基因克隆文库构建及系统发育分析

1.2.1 样品总 DNA 的提取和纯化：采用 SDS-CTAB 溶菌酶法^[12-13]提取两个深海沉积物样品总 DNA, 溶于 200 μ L TE 缓冲液。粗提 DNA 采用 QIAEX II Gel Extraction Kit 纯化试剂盒纯化回收, 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 克隆文库的构建：用放线菌门特异性引物^[14]对样品总 DNA 进行 PCR 扩增, PCR 反应条件参照 Stach 等^[14]方法, 扩增片段大小约 640 bp。目的条带用 OMEGA 胶回收试剂盒纯化后通过 T4 连接酶与 pMD19-T 载体连接, 转化 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞。将转化产物涂布在含有氨苄青霉素、

X-gal 和 IPTG 的 LB 固体培养基上。随机挑取白色克隆子培养, 用 M13 载体引物进行阳性验证, 并构建克隆文库。用 *Hha* I 和 *Hae* III 对克隆子双酶切 2 h^[15], 每种不同酶切带型选取 1-2 个代表菌液送南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

1.2.3 系统发育分析：将两个位点所有 16S rRNA 基因序列测序结果在 EzBioCloud 和 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对, 用 MEGA 5.0^[16] (Molecular evolutionary genetics analysis) 软件采用邻接法 (Neighbor-Joining) 聚类分析, 并构建系统进化树。利用 Mothur DOS^[17] 工具进行操作分类单元 (OTU) 划分, 定义与其他样品之间序列相似度低于 98% 为一个单独的 OTU。通过 EstimateS 8.0 软件将序列之间的比对数据进行处理, 建立稀有度曲线, 预测其多样性。

1.3 纯培养放线菌多样性研究

1.3.1 菌株分离、纯化和保藏：取沉积物样品 0.5 g 于 4.5 mL 的 1/4 格里斯溶液中, 充分振荡混匀后, 将各个样品稀释成 10^{-2} 、 10^{-3} 两个梯度。将逐级稀释后的液体均匀涂布于固体分离培养基上, 28 $^{\circ}$ C 恒温培养 2-3 周, 挑取不同的单菌落转接到相同培

培养基平板上进行二次纯化。纯化的菌株接种于 1/2ISP2 斜面培养基培养, 随后转接于 20% 的甘油保种液中, 于 -80°C 长期保存。

根据菌落形态、颜色、气生菌丝、基内菌丝和孢子丝形状等^[18], 对分离菌株进行分类和表观排重。

1.3.2 放线菌菌株基因组 DNA 提取、16S rRNA 基因序列扩增: 提取放线菌基因组 DNA, 以提取的 DNA 为模板, 用 16S rRNA 基因全长引物^[19]扩增, 纯化后的扩增产物连接到 pMD19-T 载体, 转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。将经检验无误的克隆子送南京金斯瑞生物科技有限公司测序。测序结果在 EzBioCloud 和 GenBank 数据库进行 BLAST 比对分析。

2 结果与分析

2.1 16S rRNA 基因文库分析

2.1.1 克隆文库的构建和检验: 提取样品总 DNA (图 1A), 总 DNA 约为 15 kb, 条带单一。用放线菌门特异性引物扩增, 获得 640 bp 大小的目的片段(图 1B)。纯化 DNA 产物与 pMD19-T 载体连接, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 挑取白色克隆。用 M13 引物进行菌落 PCR, 排除假阳性克隆。N40-4 和 N63-4 位点样品分别得到 40 个阳性克隆和 99 个阳性克隆, 通过比较 *Hae* III、*Hha* I 双酶切图谱(图 2), 挑选代表克隆子进行测序。测序结果进行分析对比, 去除非放线菌序列, 两个位点样品分别归于 16 和 34 个不同的 OTUs。

2.1.2 文库多样性指数分析: 利用 EstimateS 8.0 软件构建各文库的稀有度曲线, 如图 3 所示。Kemp 等^[20]的研究结果表明, 随着库容(Library size)的增大, OTUs 的数目总是在增加, 几乎没有哪一个文库能够穷尽样品中微生物的多样性。因此, 用稀有度曲线分析 16S rRNA 基因克隆文库, Coverage *C* 不可能达到 100%, 当曲线趋于平缓或者趋于平台期时就可以认为库容已经足够。从图 3 曲线中可以看出, 在一定的范围内随着克隆子数的增加 OTUs

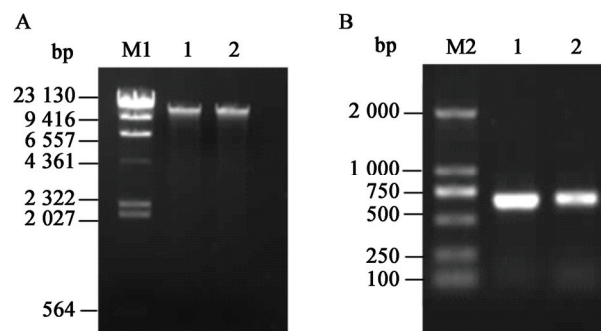


图 1 沉积物总 DNA 及放线菌门特异引物 PCR 扩增产物
Figure 1 Total DNA of sediments and PCR amplification products of Actinobacteria-specific primer

注: A: 提取的总 DNA; B: 放线菌门特异引物 PCR 扩增产物。
M1: λ DNA/*Hind* III 单切 DNA 分子量标准; M2: DNA 分子量标准 DL2000; 1-2: 位点 N40-4、N63-4。

Note: A: Total DNA; B: Actinobacteria-specific PCR product. M1: λ DNA/*Hind* III DNA marker; M2: DL2000 DNA marker; 1-2: Sites N40-4, N63-4.

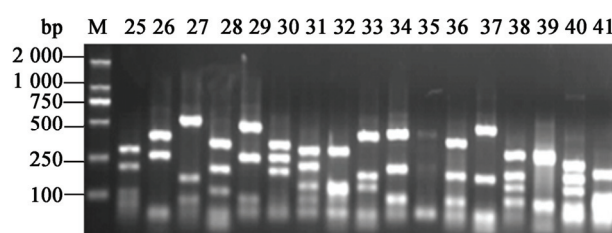


图 2 部分克隆子酶切电泳图

Figure 2 Electrophoretogram of enzyme digestion of partial clones

注: M: DNA 分子量标准 DL2000; 25-41: 克隆子编号。
Note: M: DL2000 DNA marker; 25-41: Number of clones.

数也随之增加, 当库容达到一定的数量, 曲线趋于平缓, 表明此时的库容已可以涵盖该位点的绝大部分放线菌类群。

利用 SPADE (<http://Hchao.stat.nthu.edu.tw>) 分析软件对文库多样性指数进行分析(表 2)。在可信区间为 95% 的情况下, N40-4 和 N63-4 两个位点的覆盖度(*C*)分别为 85.4% 和 81.8%; 位点 N63-4 的香农指数(Shannon index)、最大多样性指数(*H*_{max})及丰富度指数(*S*_{ace})均高于位点 N40-4, 反映其多样性高于位点 N40-4; 位点 N40-4 的均匀性指数(*E*_{venness} index)、辛普森指数(*S*_{impson} index)均高于位点

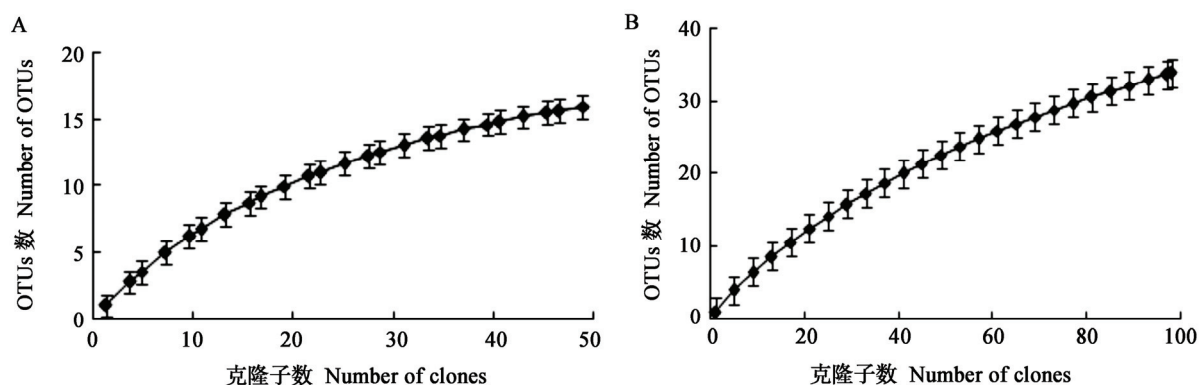


图3 N40-4位点和N63-4位点16S rRNA基因克隆文库稀有度曲线

Figure 3 Rarefaction curve of 16S rRNA gene clone library of N63-4 and N40-4

Note: A: The site N40-4; B: The site N63-4.

表2 克隆文库放线菌多样性指数
Table 2 Diversity indexes of the 16S rRNA gene clone library

位点 Sites	香浓指数 Shannon index	最大多样性指数 Hmax	均匀性指数 Evenness index	丰富度指数 Sace	辛普森指数 Simpson index	覆盖度 Coverage (%)
N40-4	2.526	4.00	0.632	76	0.901	85.4
N63-4	2.818	5.09	0.554	87	0.868	81.8

N63-4, 分别为0.632、0.554和0.901、0.868。以上多样性指数表明, 位点N63-4蕴含的放线菌类群比位点N40-4更丰富。

2.1.3 16S rRNA 基因文库多样性分析: 将N40-4位点和N63-4位点文库的克隆序列进行同源比对分析, 对比对结果进行统计(表3)。N40-4位点沉积物样品中40个克隆的分布情况见图4, 结果表明N40-4的16S rRNA基因文库代表的序列在放线菌纲(Actinobacteria)、酸微菌纲(Acidimicrobiia)、腭基降解菌纲(Nitriliruptoria)和嗜热油菌纲(Thermoleophila)4个纲均有分布, 其中放线菌纲(Actinobacteria)有10个OTUs和27个克隆, 占总OTUs的62.5%, 总克隆的67.5%, 其中链霉菌目(Streptomycetales)OTUs数和克隆子数最多, 是该位点的优势菌群。其次为酸微菌纲(Acidimicrobiia), 4个克隆子分布于4个OTUs。嗜热油菌纲(Thermoleophila)和腭基降解菌纲(Nitriliruptoria)都只有1个OTUs, 说明这些类群在该地区中虽然都有分布但多样性较低。

在N63-4位点沉积物样品中99个克隆的分布情况见图4。腭基降解菌纲(Nitriliruptoria)的腭基降解菌目(Nitriliruptorales)有48个克隆, 占总克隆的48.5%, 是该位点的优势菌群; 25个克隆分布于放线菌纲(Actinobacteria)的7个目中, 其中包括弗兰克氏菌目(Frankiales)、放线菌目(Actinomycetales)、棒杆菌目(Corynebacteriales)、微球菌目(Micrococcales)、链孢囊菌目(Streptosporangiales)、假诺卡式菌目(Pseudonocardiales)、链霉菌目(Streptomycetales), 7个目占总克隆的25.3%, 是该环境的中等数量类群, 其中放线菌目(Actinomycetales)最少, 仅1个克隆, 链孢囊菌目(Streptosporangiales)最多, 有10个克隆。酸微菌纲中的酸微菌目(Acidimicrobiales)有18个克隆, 10个OTUs, 分别占总克隆的18.2%和29.4%, 可以推测该位点酸微菌纲(Acidimicrobiia)多样性较高。

综合以上分析表明, 两个位点的16S rRNA基因文库代表序列在放线菌纲(Actinobacteria)、酸微菌纲(Acidimicrobiia)、腭基降解菌纲(Nitriliruptoria)

表 3 N40-4 和 N63-4 位点沉积物样品放线菌 16S rRNA 基因文库分析 Table 3 Analysis of the 16S rRNA gene clone libraries of N63-4 and N40-4 site			
纲 Class	目 Order	N63-4 (N40-4)	
		OTUs 数 Numbers of OTUs	克隆子数 Numbers of clones
放线菌纲 Actinobacteria	弗兰克氏菌目 Frankiales	2 (1)	2 (1)
	放线菌目 Actinomycetales	1 (0)	1 (0)
	棒杆菌目 Corynebacteriales	2 (0)	4 (0)
	微球菌目 Micrococcales	2 (0)	2 (0)
	链孢囊菌目 Streptosporangiales	2 (2)	10 (8)
	假诺卡氏菌目 Pseudonocardiales	2 (0)	4 (0)
	链霉菌目 Streptomycetales	2 (6)	2 (14)
	丙酸杆菌目 Propionibacteriales	0 (1)	0 (4)
酸微菌纲 Acidimicrobiia	酸微菌目 Acidimicrobiales	10 (4)	18 (4)
腈基降解菌纲 Nitriliruptoria	腈基降解菌目 Nitriliruptorales	8 (1)	48 (8)
嗜热油菌纲 Thermoleophilia	嗜热油菌目 Thermoleophilales	3 (1)	8 (1)

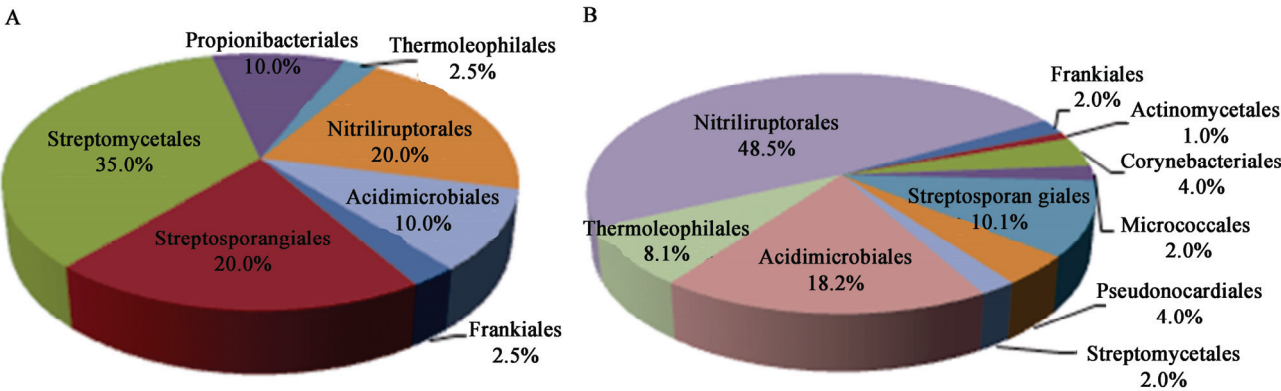


图 4 两个位点的放线菌克隆序列分布比例

Figure 4 Sequence distribution of Actinobacterial clones of two sites

Note: A: The site N40-4; B: The site N63-4.

和嗜热油菌纲(Thermoleophilia) 4 个纲均有分布, N63-4 位点共得到 99 个克隆, 归为 34 个 OTUs, N40-4 位点共得到 40 个克隆, 归为 16 个 OTUs。从总体上分析, N63-4 位点放线菌的多样性要高于 N40-4 位点放线菌。从各位点放线菌的具体分类上分析, 两个位点虽然都来自深海, 但都有各自的优势菌群, 其中 N40-4 位点链霉菌目(Streptomycetales)

占优势, N63-4 位点腈基降解菌目(Nitriliruptorales) 占优势。

2.2 可培养放线菌多样性研究

2.2.1 菌株分离和表观排重: 经过分离纯化和表观排重, 获得了 41 株形态各异的放线菌, 多数菌株的菌落形态与陆地放线菌差异较大, 没有典型的孢子丝结构, 菌落形态呈细菌形态。

2.2.2 菌株多样性分析: 经表观排重, 对得到 19 株菌进行 16S rRNA 基因全序列测定, 测序结果在 EzBioCloud 数据库进行同源比对。19 株菌分布于链霉菌属 (*Streptomyces*)、微杆菌属 (*Microbacterium*)、假诺卡氏菌属 (*Pseudonocardia*)、考克氏菌属 (*Kocuria*)、节杆菌属 (*Arthrobacter*)、拟诺卡氏菌属 (*Nocardiopsis*)、微球菌属 (*Micrococcus*)、迪茨氏菌属 (*Dietzia*)、异壁放线菌属 (*Actinoalloteichus*) 和糖多孢菌属 (*Saccharopolyspora*) 10 个不同的属, 包括 12 个不同的种, 其中大多数为稀有放线菌属。

由表 4 可知, 有 17 株菌与已知模式菌株的最大序列一致性在 99% 以上。OAct400 与已知菌株 *Microbacterium amylohydricum* N5^T 的最大一致性为

97.73%。一般而言, 与已知菌种一致性在 99% 以上, 可以归为同一个种^[21-22]。所以基本可以确定 OAct400 为微杆菌属的一个新种, 目前我们已经完成该菌株的新种鉴定工作。OAct415 与已知菌株 *Pseudonocardia kongjuensis* LM157^T 的最大一致性为 98.96%, 推测其为一株潜在的新亚种, 但是它的具体分类学位置, 还需要进一步做 DNA (杂交) 同源性分析, 并结合其他生理生化指标和化学鉴定指标才能确定。

3 讨论

特殊环境中的放线菌在长期的适应过程中, 会产生特殊的代谢机制和环境适应模式, 有可能产生丰富的物种多样性和独特的活性次级代谢产物, 因

表 4 可培养菌株多样性分析
Table 4 Diversity analysis of culturable strains

菌株编号 Strain number of representatives	16S rRNA 基因序列收录号 16S rRNA gene accession number	一致性最大菌株 The closest strain	最大一致性 Identity (%)
OAct400	KC505174	<i>Microbacterium amylohydricum</i>	97.73
OAct401	KC514114	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	99.86
OAct402*		<i>Micrococcus yunnanensis</i>	99.79
OAct403	KC514115	<i>Kocuria sediminis</i>	99.15
OAct404	KC514116	<i>Arthrobacter gandavensis</i>	99.72
OAct405	KC514117	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i> subsp. <i>albirubida</i>	99.86
OAct406*		<i>Nocardiopsis dassonvillei</i> subsp. <i>albirubida</i>	99.79
OAct407*		<i>Nocardiopsis dassonvillei</i> subsp. <i>albirubida</i>	99.79
OAct408	KC514118	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i> subsp. <i>dassonvillei</i>	100
OAct409*		<i>Nocardiopsis dassonvillei</i> subsp. <i>dassonvillei</i>	99.93
OAct410	KC514119	<i>Streptomyces badius</i>	99.93
OAct411*		<i>Streptomyces badius</i>	99.93
OAct412	KC514120	<i>Dietzia maris</i>	99.52
OAct413	KC514121	<i>Pseudonocardia carboxydivorans</i>	100
OAct414	KC514122	<i>Actinoalloteichus hymeniacidonis</i>	99.93
OAct415	KC514123	<i>Pseudonocardia kongjuensis</i>	98.96
OAct416*		<i>Actinoalloteichus hymeniacidonis</i>	99.93
OAct417	KC514124	<i>Saccharopolyspora gregorii</i>	99.50
OAct418*		<i>Saccharopolyspora gregorii</i>	99.57

注: 同源性最近种属相同的菌株其 16S rDNA 收录号未列出, 以*标出。

Note: The strains with no accession number were marked with "*" because of the same closest strain.

此成为重要的微生物资源。目前针对海洋(深海)环境放线菌资源及其次级代谢产物的研究方兴未艾^[6]。在整个海洋环境中, 海洋沉积物所占面积较大, 可覆盖地球表面积的 63.5%左右, 其营养丰富、腐殖质含量较高, 是海洋放线菌的重要栖息地的微栖息地, 因此放线菌类群多样性显著^[23-24], 早在 2003 年 Stach 等通过 DNA 检测, 就证明了海洋沉积环境中存在丰富的放线菌类群^[25]。近年来随着深海勘探技术的提高, 人们又把探索的目光从近海浅海转向深海大洋, 从深海海底沉积物中发现了许多不同于陆地或浅海的新的海洋放线菌类群^[26]。

本研究利用 16S rRNA 基因文库技术对 N40-4 和 N63-4 两个位点的放线菌多样性进行初步分析, 两个位点 N40-4 (水深 3 235 m) 和 N63-4 (水深 4 242 m) 均为深海沉积物, 16S rRNA 基因克隆文库表明, 两个位点的克隆序列在放线菌纲 (Actinobacteria)、酸微菌纲 (Acidimicrobia)、腈基降解菌纲 (Nitriliruptoria) 和嗜热油菌纲 (Thermoleophilia) 4 个纲中均有分布。这是目前首次利用免培养技术针对南海海洋沉积物放线菌多样性进行专门的分析。Stach 等利用 16S rRNA 基因文库技术对大西洋 3 814 m 处深海沉积物的放线菌多样性进行分析, 发现随着深度的增加放线菌群落结构相应发生变化, 在每一深度均有其独特的遗传多样性, 但多样性指数和物种数量随着深度增加而减少^[25]。我们的研究数据显示, 随着深度的增加, 放线菌群落结构组成确实发生变化, 水深 3 235 m 的 N40-4 位点中放线菌纲的链霉菌目 (Streptomycetales) 占优势, 水深 4 242 m 的 N63-4 位点中腈基降解菌纲的腈基降解菌目 (Nitriliruptorales) 占优势, 这一结果与 Stach 等^[25]的发现是一致的; 但在我们的研究结果中, 随着深度的增加, 南海深海沉积物中放线菌多样性指数和丰富度指数也相应增加, 在这一方面则与 Stach 等的研究结果相反。尽管已有研究表明, 随着海洋深度的增加, 海洋环境中放线菌的数量呈下降趋势^[6], 但也有新数据证实在某些特殊

海洋沉积环境中放线菌占据优势地位, 如在 Gulf of Mexico^[27] 和日本的南开海槽 (Nankai Trough) 的水合物沉积环境中 30%–40% 的原核生物为放线菌类群^[28-29]。根据这些结果, 我们推测深海放线菌多样性及群落结构也同样存在地理分布上的差异, 可能既受空间隔离的影响, 也受环境异质性因素的影响^[30]。

我们的纯培养研究结果也显示出我国南海深海沉积物环境蕴含着丰富且新颖的放线菌资源和多样性, 共获得 41 株放线菌, 经 16S rRNA 基因序列同源性比对, 选取的 19 株南海放线菌属于 10 个不同的属, 12 个不同的种, 其中稀有放线菌属比例较高; 此外除了链霉菌属、诺卡氏菌属和假诺卡氏菌属这 3 个常见丝状放线菌外, 其余的种属皆表现为类似细菌形态, 不产生丰富的气生菌丝。这一结果与目前已有的深海放线菌研究报道是一致的, 贾文文^[31]在南大西洋深海样品 (1 500–3 200 m) 中获得了 36 株放线菌, 分属于迪茨氏菌属 (*Dietzia*)、微球菌属 (*Micrococcus*)、戈登氏菌属 (*Gordonia*)、考克氏菌属 (*Kocuria*)、微杆菌属 (*Microbacterium*) 等 8 个属, 其中迪茨氏菌属和微球菌属为优势属。张玉便等^[32]从 3 个沉积物 (水深均在 2 600 m 以下) 中得到的 132 株放线菌, 分属于放线菌亚纲下的 6 个目、13 个科和 19 个属, 种属多样性及稀有放线菌所占的比例也比较大, 其中考克氏菌属 (*Kocuria*) 和短状杆菌属 (*Brachybacterium*) 为优势菌。Goodfellow 课题组^[33]从马里亚纳海沟 10 890 m 处沉积物中分离到 38 株放线菌, 分属于皮生球菌属 (*Dermacoccus*)、考克氏菌属 (*Kocuria*)、小单孢菌属 (*Micromonospora*)、链霉菌属 (*Streptomyces*)、*Tsukamurella* 和 *Williamsia*, 其中以 *Dermacoccus* 为优势属。尽管上述研究中深海沉积物样品数量有限, 所得到的研究结果不能完全代表深海中放线菌的完整多样性, 但综合各研究结果来看, 不同海域的深海沉积物中, 虽然放线菌优势菌属不同, 但分离到的纯培养菌株多数以不产气生菌丝的细菌形态放线菌为主, 与浅海海洋环境

中放线菌典型丝状菌落显著不同^[34-36]。

到目前为止,我国研究人员对南海海域放线菌物种资源进行了大量研究,田新朋等^[37]在南海沉积物中分离出的 700 多株放线菌分布于 9 个属级类群,其中在南海北部沉积环境分离到 *Pseudonocardia*、*Streptomyces* 和 *Salinispora* 等 8 个属;在南沙海域分离到 *Salinispora* 和 *Microbacterium* 等属。张道锋^[34]分析南海北部沉积环境可培养细菌多样性过程中分离到 169 株放线菌,分布在放线菌目(Actinomycetales)下的 8 个亚目 18 个科 37 个属中,其中链霉菌属为优势菌属,其次是迪茨氏属。陈名洪等^[38]在南海浅海沉积物样品中分离获得了大量的稀有放线菌,其分布于小单孢菌属(*Micromonospora*)、疣孢菌属(*Verrucosipora*)、盐生孢菌属(*Salinispora*)、继生菌属(*Jishengella*)、野村氏菌属(*Nonomuraea*)和马杜拉菌属(*Actinomadura*)等 9 个科、13 个属中。综合上述研究结果可以看出,南海沉积物中蕴藏丰富的放线菌资源,多样性丰富;特别是深海沉积物更蕴含着丰富的物种资源及巨大的研究潜力,亟待研究者去开发和利用。此外也可以发现,利用纯培养技术各个研究结果并不一致,这是因为对于放线菌这一特殊类群的微生物而言,采用不同的样品预处理方法及分离培养基得到的种属多样性差异很大^[39],需要根据不同类群的特性设计针对这些特定种属的选择性分离方法。

本研究利用免培养和纯培养技术结合的策略,深入研究了南海深海沉积物放线菌多样性,为南海深海放线菌的选择性分离提供了信息依据。我们将有针对性地设计多样化选择性分离培养基,改进现有分离手段,以获得南海特有或特色放线菌物种资源,丰富我国海洋放线菌资源宝库。

参 考 文 献

- [1] Xiao X, Wang FP. Research and development of deep-sea microbes[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2006, 31(2): 87-89,118 (in Chinese)
肖湘,王凤平. 深海微生物的研究开发[J]. 中国抗生素杂志, 2006, 31(2): 87-89,118
- [2] Subramani R, Aalbersberg W. Marine actinomycetes: an ongoing source of novel bioactive metabolites[J]. Microbiological Research, 2012, 167(10): 571-580
- [3] Bull AT, Stach JEM. Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery[J]. Trends in Microbiology, 2007, 15(11): 491-499
- [4] Zhao CH, Ye DZ, Wei WL. Research on deep-sea microbiology[J]. Microbiology China, 2006, 33(3): 142-146 (in Chinese)
赵昌会,叶德赞,魏文铃. 深海微生物的研究进展[J]. 微生物学通报, 2006, 33(3): 142-146
- [5] Cai GQ, Peng XC, Zhang YL. The significances of and advances in the study of sediment sources in the South China Sea[J]. Advances in Marine Science, 2011, 29(1): 113-121 (in Chinese)
蔡观强,彭学超,张玉兰. 南海沉积物物质来源研究的意义及其进展[J]. 海洋科学进展, 2011, 29(1): 113-121
- [6] Tian XP, Zhang S, Li WJ. Advance in marine actinobacterial research-a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(2): 161-169 (in Chinese)
田新朋,张偲,李文均. 海洋放线菌研究进展[J]. 微生物学报, 2011, 51(2): 161-169
- [7] Tian XP, Long LJ, Li SM, et al. *Pseudonocardia antitumoralis* sp. nov., a deoxynyboquinone-producing actinomycete isolated from a deep-sea sediment[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63(3): 893-899
- [8] Kuester E, Williams ST. Selection of media for isolation of streptomycetes[J]. Nature, 1964(202): 928-929
- [9] Kim TK, Garson MJ, Fuerst JA. Marine actinomycetes related to the 'Salinispora' group from the Great Barrier Reef sponge *Pseudoceratina clavata*[J]. Environmental Microbiology, 2005, 7(4): 509-518
- [10] Mincer TJ, Jensen PR, Kauffman CA, et al. Widespread and persistent populations of a major new marine Actinomycete taxon in ocean sediments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(10): 5005-5011
- [11] Feng G. Estimating the actinobacterial diversity and activity potentiality in a coastal wetland of the Yellow River Delta[D]. Qingdao: Master's Thesis of Ocean University of China, 2013 (in Chinese)
冯鸽. 黄河三角洲滨海湿地放线菌多样性及活性潜力评估[D]. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2013
- [12] Zhou JZ, Bruns MA, Tiedje JM. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(2): 316-322
- [13] Jackson CR, Harper JP, Willoughby D, et al. A simple efficient method for the separation of humic substances and DNA from environmental samples[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(12): 4993-4995
- [14] Stach JE, Maldonado LA, Ward AC, et al. New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments[J]. Environmental Microbiology, 2003, 5(10): 828-841
- [15] Feng G, Xu SS, Wang C, et al. Actinobacterial diversity in a coastal wetland of the Yellow River Delta revealed by culture-independent approach[J]. Microbiology China, 2013, 40(9): 1570-1579 (in Chinese)
冯鸽,许姗姗,王超,等. 黄河三角洲滨海湿地非培养放线菌多样性[J]. 微生物学通报, 2013, 40(9): 1570-1579
- [16] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739
- [17] Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(23): 7537-7541

- [18] Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Actinomycetes classification group. Manual of Determinative Streptomyces[M]. Beijing: Science Press, 1975: 19 (in Chinese)
中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1975: 19
- [19] Shun YH, Feng G, Wang C, et al. Phylogenetic diversity analysis and novel glycosides biosynthetic potential evaluation of Mangrove actinomycetes[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2013, 32(1): 46-54 (in Chinese)
孙艺华, 冯鸽, 王超, 等. 红树林放线菌多样性及新型糖苷类化合物合成潜力发掘[J]. 中国海洋药物, 2013, 32(1): 46-54
- [20] Kemp PF, Aller JY. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 47(2): 161-177
- [21] Devereux R, He SH, Doyle CL, et al. Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: phylogenetic definition of a family[J]. Journal of Bacteriology, 1990, 172(7): 3609-3619
- [22] Fry NK, Warwick S, Saunders NA, et al. The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family Legionellaceae[J]. Journal General Microbiol, 1991, 137(5): 1215-1222
- [23] You JL, Cao LX, Liu GF, et al. Isolation and characterization of actinomycetes antagonistic to pathogenic *Vibrio* spp. from nearshore marine sediments[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2005, 21(5): 679-682
- [24] Das S, Lyla PS, Khan SA. Distribution and generic composition of culturable marine actinomycetes from the sediments of Indian continental slope of Bay of Bengal[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2008, 26(2): 166-177
- [25] Stach J, Maldonado LA, Masson DG, et al. Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(10): 6189-6200
- [26] Fenical W, Jensen PR. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria[J]. Nature Chemical Biology, 2006, 2(12): 666-673
- [27] Lanoil BD, Sassen R, la Duc MT, et al. Bacteria and Archaea physically associated with Gulf of Mexico gas hydrates[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(11): 5143-5153
- [28] Colwell F, Matsumoto R, Reed D. A review of gas hydrates, geology and biology of the Nankai Trough[J]. Chemical Geology, 2004, 205(3/4): 391-404
- [29] Reed DW, Fujita Y, Delwiche ME, et al. Microbial communities from methane hydrate-bearing deep marine sediments in a forearc basin[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(8): 3759-3770
- [30] Galand PE, Casamayor EO, Kirchman DL, et al. Ecology of the rare microbial biosphere of the Arctic Ocean[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(52): 22427-22432
- [31] Jia WW. Isolated and diversity analysis of deep sea actinobacteria in the South Atlantic[D]. Harbin: Master's Thesis of Harbin Institute of Technology, 2013 (in Chinese)
贾文文. 南大西洋深海放线菌的分离与多样性分析[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学硕士学位论文, 2013
- [32] Zhang YB, Zhang GY. Diversity of cultivable actinomycetes in deep sea sediments of the South Atlantic Ocean[J]. Journal of Applied Oceanography, 2014, 33(4): 508-515 (in Chinese)
张玉便, 张改云. 南大西洋深海沉积物中可培养放线菌的多样性[J]. 应用海洋学学报, 2014, 33(4): 508-515
- [33] Pathom-aree W, Stach JE, Ward AC, et al. Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10 898 m) from the Mariana Trench[J]. Extremophiles, 2006, 10(3): 181-189
- [34] Zhang DF. A study on the diversity of culturable bacteria and their producing amylase and cellulase activities in sedimental environments from the north of South China Sea[D]. Kunming: Master's Thesis of Yunnan University, 2013 (in Chinese)
张道锋. 南海北部沉积环境可培养细菌多样性及其产淀粉酶和纤维素酶活性研究[D]. 昆明: 云南大学硕士学位论文, 2013
- [35] Jiang Y, Cao YR, Wang Q, et al. Diversity of cultured actinomycete in the Baltic Sea[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(11): 1461-1467 (in Chinese)
姜怡, 曹艳茹, 王茜, 等. 波罗的海放线菌的多样性[J]. 微生物学报, 2011, 51(11): 1461-1467
- [36] Moran MA, Rutherford LT, Hodson RE. Evidence for indigenous *Streptomyces* populations in a marine environment determined with a 16S rRNA probe[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(10): 3695-3700
- [37] Tian XP, Zhang S, Li WJ. Actinomycetes diversity and phylogenetic classification study in the sediment of the South China Sea[A]//Hainan Province Society for Microbiology. Abstract book of the Chinese society for microbiology in 2008 academic annual conference[C]. Haikou: Hainan Province Society for Microbiology, 2008 (in Chinese)
田新朋, 张偲, 李文均. 南海沉积环境海洋放线菌多样性及系统学分类研究[A]//海南省微生物学会. 2008年中国微生物学会学术年会论文摘要集[C]. 海口: 海南省微生物学会, 2008
- [38] Chen MH, Wang HL, Lin R, et al. The separation of rare actinomycetes from South China Sea and analysis of its halogenase gene[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2013, 38(9): 658-663 (in Chinese)
陈名洪, 王海龙, 林如, 等. 南海稀有放线菌的分离及其卤化酶基因分析[J]. 中国抗生素杂志, 2013, 38(9): 658-663
- [39] Xiao W, Li MG, Cui XL, et al. Some approaches for the selective isolation of rare actinomycetes[J]. Microbiology China, 2006, 33(1): 133-137 (in Chinese)
肖炜, 李铭刚, 崔晓龙, 等. 几种选择性分离稀有放线菌的方法[J]. 微生物学通报, 2006, 33(1): 133-137