

## 研究论文

## 白令海北部表层沉积物中细菌多样性的研究

邹扬<sup>1,3</sup> 曾胤新<sup>1,2</sup> 田蕴<sup>1,3</sup> 郑天凌<sup>1,3</sup><sup>1</sup> 厦门大学生命科学学院, 滨海湿地生态系统教育部重点实验室, 厦门 361005;<sup>2</sup> 中国极地研究中心, 国家海洋局极地科学重点实验室, 上海 200136;<sup>3</sup> 厦门大学, 近海海洋环境科学国家重点实验室, 厦门 361005)

**摘要** 提取白令海表层沉积物样品总 DNA, 构建沉积物中的细菌 16S rDNA 文库, 通过 RFLP 酶切分型与序列测定, 进行沉积物中的细菌多样性及系统发育分析。结果表明, 该沉积物中细菌多样性丰富, 获得的 125 条序列归属于 10 个细菌类群, 包括占据优势地位的变形细菌 (*Proteobacteria*, 49.6%)、酸杆菌门 (*Acidobacteria*, 20.8%), 以及拟杆菌门 (*Bacteroidetes*, 6.4%)、放线菌门 (*Actinobacteria*, 5.6%)、浮霉菌门 (*Planctomycetes*, 5.6%)、硝化螺旋菌门 (*Nitrospirae*, 4%)、疣微菌门 (*Verrucomicrobia*, 2.4%)、绿弯菌门 (*Chloroflexi*, 1.6%)、纤维杆菌门 (*Fibrobacteres*, 0.8%)、螺旋体 (*Spirochaetes*, 0.8%)。此外, 还有一部分分类地位尚不明确的细菌 (2.4%)。而在变形细菌中,  $\alpha$  亚群为其中的优势类群。

**关键词** 白令海 沉积物 细菌 多样性

## 1 前言

海洋中分布着数量庞大、种类繁多的微生物。其中, 海洋沉积物表层 (0—10 cm) 就栖息了大约  $1.7 \times 10^{28}$  个微生物<sup>[1]</sup>。它们具有种类和群落结构、代谢类型、适应机制的多样性, 在海洋生态系统物质循环、能量流动、信息传递中发挥着重要的作用。

白令海是太平洋最北部的海域, 它介于亚洲与北美洲之间<sup>[2]</sup>。其底质类型主要为粗砾、砂、粉砂、粉砂-粘土-硅藻软泥、粘土-硅藻软泥、粉砂-软泥等。作为世界第三大海, 白令海是世界上最具有生产力的海洋生态系统之一, 不但是全球的重要渔区, 也是我国的主要远洋渔业作业场所。我国先后于 1999 年、2003 年及 2008 年进行了三次大规模的北极科学考察活动, 在白令海的研究对象多为浮游植物与大型动物, 关于海洋微生物的报道多集中在生物量及特定种属的分布上。国外对该区域的研究, 将大部分注意力放在细菌丰度

[收稿日期] 2008 年 10 月收到来稿, 2008 年 12 月收到修改稿。

[基金项目] 国家自然科学基金 (项目编号 40676002)、国际极地年中国行动计划以及长江学者和创新团队发展计划项目 (40521003) 资助。

[作者简介] 邹扬, 女, 1982 年生。厦门大学生命科学学院硕士研究生。

[联系作者] 郑天凌, E-mail: micozh@xmu.edu.cn

和碳循环方面<sup>[3,4]</sup>。有关白令海细菌群落结构和系统发育多样性的研究报道非常少,在较系统地对白令海沉积物中细菌多样性进行研究方面几乎还是空白。

本文通过提取沉积物中的总 DNA, 构建其细菌 16S rDNA 文库, 再通过对 16S rDNA 序列进行比较, 构建系统发育树, 研究了白令海沉积物细菌群落结构及生物多样性。本文结果将有助于增进我们对该海域生态系统过程及功能的认识。

## 2 材料与方法

### 2.1 样品

本研究样品为 2007 年 5 月—6 月美国 HLY0702 航次白令海科学考察期间采自白令海北部海域 438 m 深处 DBSE 站位 (179°6'57"W, 60°30'24"N)。采样过程按无菌要求进行, 样品采集后于 -20 °C 保存。

### 2.2 主要试剂

DNA 提取试剂盒 UltraClean Soil DNA Isolation Kit 为 MO BIO 公司产品; Ex Taq DNA 聚合酶等用于 PCR 扩增的试剂均购自泰京公司; *Alu* I 等核酸工具酶为 Takara 公司产品; PCR 产物回收试剂盒 GENE CLEAN Turbo Kit 购自 Qbiogene 公司; 引物合成及 DNA 测序由上海英骏生物技术有限公司完成。

### 2.3 方法

#### 2.3.1 沉积物样品总 DNA 的提取

采用 MO BIO 公司 DNA 提取试剂盒提取沉积物样品总 DNA, 具体步骤参照产品说明书。

#### 2.3.2 目的基因片段的 PCR 扩增及产物割胶回收

细菌 16S rDNA 的 PCR 扩增采用细菌通用引物 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') 和 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')。PCR 反应条件为 94 °C, 5 min; 94 °C, 1 min; 55 °C, 1 min; 72 °C, 2 min; 循环 30 次; 72 °C 延伸 8 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果, 并用 PCR 纯化试剂盒回收产物。

#### 2.3.3 16S rDNA 克隆文库的构建

纯化后的 PCR 产物连接到 pUC57-T 质粒载体上, 转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 通过蓝白斑初筛阳性克隆子。目标克隆子点种于已编号的 LB-Amp 平板上 4 °C 保存。对初筛的阳性克隆进行插入片段大小的验证, 所用引物为 RV-M (5'-GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG-3') 和 M13-47 (5'-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3')。扩增产物经琼脂糖电泳分析, 具有约 1500bp 插入片段的克隆为目标克隆。

#### 2.3.4 RFLP 分析与序列测定

用限制性内切酶 *Alu* I 对阳性验证的 PCR 产物于 37 °C 酶切 4 h 经 4% 琼脂糖凝胶电泳检测, 分析克隆子 RFLP 谱型。对具有不同酶切图谱的克隆进行测序。

#### 2.3.5 序列分析

所测得序列用 DNAMAN 软件去除载体序列后, 利用 BLAST 工具在 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行序列比对, 获得相关序列的分类信息。利用 DNAMAN

软件并采用邻接法 (Neighbor-joining method) 构建系统发育树。自举值为 100。所有序列已登录 GenBank 数据库 (序列号: EU734910—EU735031; EU934237; EU934238)。

### 3 结果

#### 3.1 DNA 提取和 PCR 扩增

白令海 DBSE 站位沉积物中所提取的总 DNA 大小约为 23 kb 片段完整。用细菌通用引物 27F 和 1492R 进行扩增, 经电泳检测 (图 1), 发现扩增出几乎全长的 16S rDNA PCR 产物, 大小约 1.5 kb 且条带单一, 扩增效果较好。

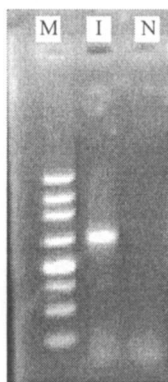


图 1 PCR 扩增 16S rDNA 的琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig 1. PCR amplification of 16S rDNA. M: DNA Ladder Maker (Takara, China); I: 16S rDNA 扩增产物; N: Negative control

#### 3.2 细菌 16S rDNA 文库的 RFLP 分析

在构建的白令海沉积物细菌 16S rDNA 克隆文库中, 对获得的 333 个转化子进行插入片段大小的 PCR 检测。结果发现, 其中约 216 个克隆含有正确长度的外源片段, 阳性率为 64.9%。使用 *Alu*iv 限制性内切酶进行 RFLP 酶切分型, 得到了 131 个具有不同酶切图谱的克隆。图 2 为部分克隆的 RFLP 酶切分型。

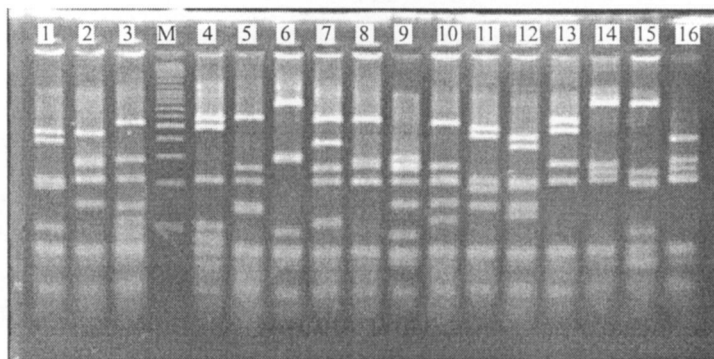


图 2 部分克隆子的 RFLP 酶切分型图谱

Fig 2 Example of RFLP of an amplified 16S rDNA digested with endonuclease *Alu*iv. M: GeneRuler™ DNA Ladder Mix, SM0331 (Fementas, America)

### 3.3 系统发育分析

对上述 131 个基因型不同的克隆进行测序, 获得长度约为 1.5 kb 的有效 16S rDNA 序列 124 条。经 BLAST 比对, 从 GenBank 数据库中找到与这些序列具有较高相似性 (86%—99%) 的已有序列。

结果显示 (图 3), 在沉积物样品中, 变形细菌 (*Proteobacteria*) 占据优势 (49.6%), 其次为酸杆菌门 (*Acidobacteria*), 占 20.8%。除此之外, 还检测到拟杆菌门 (*Bacteroidetes*, 6.4%)、放线菌门 (*Actinobacteria*, 5.6%)、浮霉菌门 (*Planctomycetes*, 5.6%)、硝化螺旋菌门 (*Nitrospirae*, 4%)、疣微菌门 (*Verrucomicrobia*, 2.4%)、绿弯菌门 (*Chloroflexi*, 1.6%)、纤维杆菌门 (*Fibrobacteres*, 0.8%)、螺旋体 (*Spirochaetes*, 0.8%)。另有一部分属于分类地位尚不明确的细菌 (2.4%)。

表 1 各分支细菌在总细菌中所占比例

Table 1 The proportion of each phylotypes in total bacteria

系统类群	所占比例	系统类群	所占比例
<i>Proteobacteria</i>	49.60%	<i>Verrucomicrobia</i>	2.40%
<i>Acidobacteria</i>	20.80%	<i>Chloroflexi</i>	1.60%
<i>Bacteroidetes</i>	6.40%	<i>Fibrobacteres</i>	0.80%
<i>Actinobacteria</i>	5.60%	<i>Spirochaetes</i>	0.80%
<i>Planctomycetes</i>	5.60%	Other bacteria	2.40%
<i>Nitrospirae</i>	4%		

而在变形细菌中,  $\delta$  亚群与  $\gamma$  亚群占据优势, 分别为 53.2% 与 40% (表 2)。

表 2 各亚群在变形细菌中所占比例

Table 2 The proportion of each subclass in total *Proteobacteria*

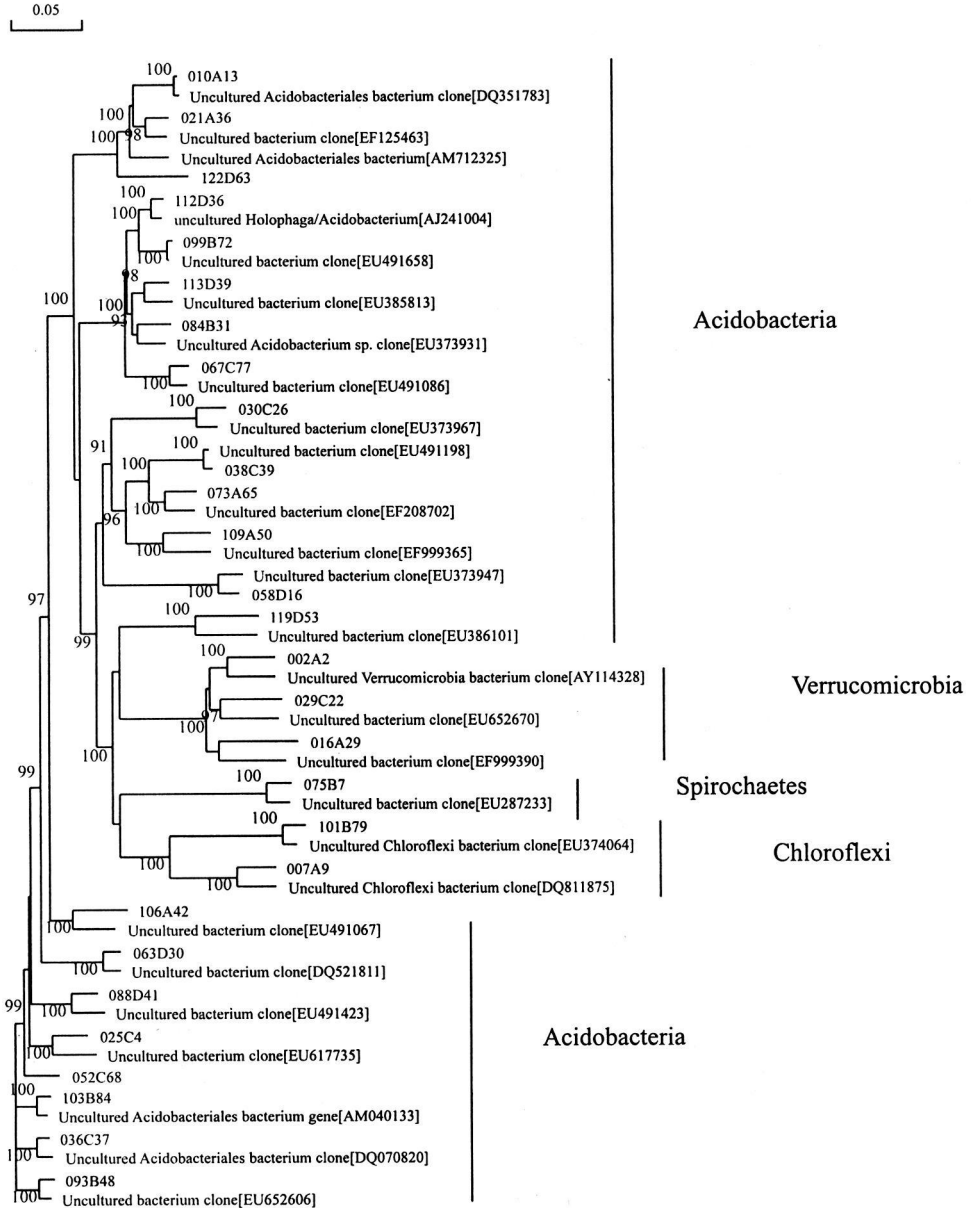
亚群名称	$\gamma$ - <i>Proteobacteria</i>	$\delta$ - <i>Proteobacteria</i>	$\alpha$ - <i>Proteobacteria</i>	$\beta$ - <i>Proteobacteria</i>
所占比例	40%	53.20%	4.80%	1.60%

图 3 显示了沉积物克隆序列及其已知高相似性序列的进化关系。与白令海沉积物细菌具有较近亲缘关系的序列, 绝大多数 (99.2%) 都来自不可培养的细菌, 而在这些不可培养的细菌中, 大多数均来源于海洋环境尤其是海洋沉积物。

## 4 讨论

本文通过构建 16S rDNA 文库对白令海北部 DBSE 站位的海洋沉积物样品进行了细菌多样性与系统发育分析。结果显示, 这一区域的沉积物细菌涵盖了包括 *Proteobacteria* 和 *Acidobacteria* 等在内的 10 个门, 呈现出丰富的多样性。通过与 GenBank 数据库比对, 发现 124 条所测序列与已知的细菌序列的相似性最低为 86%、最高为 99%。其中 55 条序列 (44%) 与 GeneBank 基因序列的同源性  $\leq 95\%$ 。这表明在白令海沉积物中可能蕴含了丰富的未知微生物资源, 有待于改进检测手段和培养方法对其进行进一步的探索与开发。





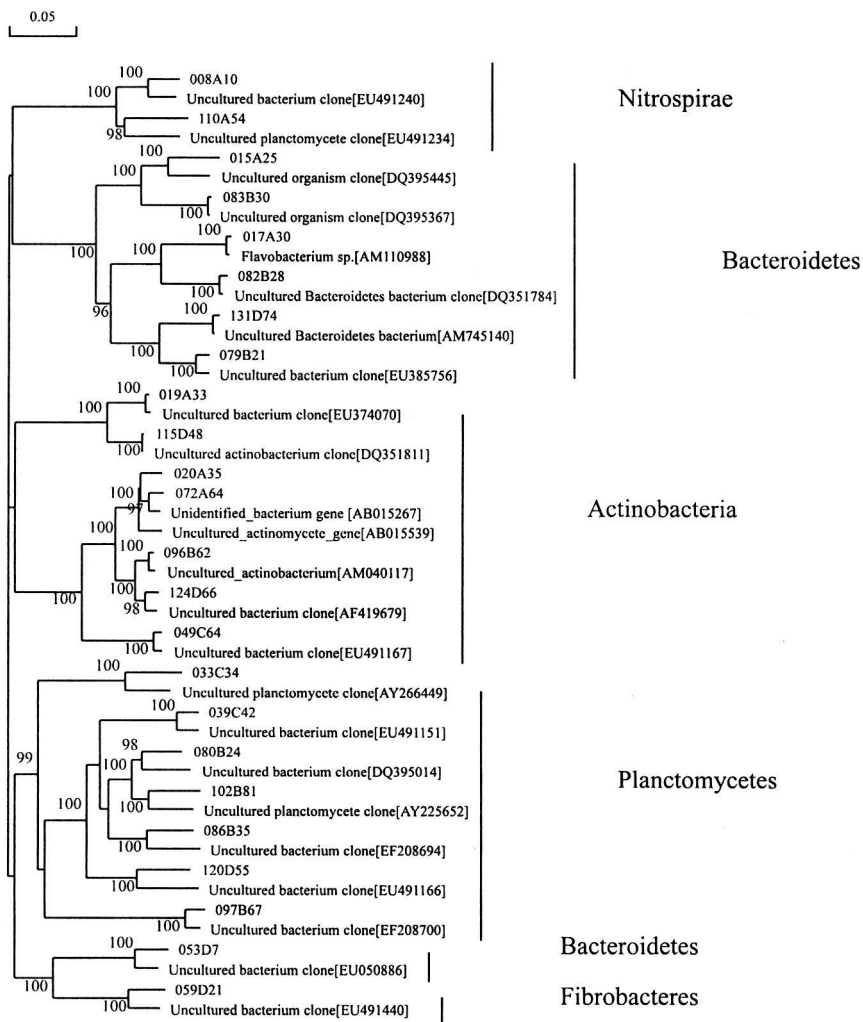


图 3 基于白令海沉积物细菌 16S rDNA 序列构建的系统发育树

Fig 3 Phylogenetic trees of bacterial 16S rDNA sequences from the sediments in Bering Sea

研究还表明,在白令海表层沉积物中最丰富的微生物类群为 *Proteobacteria*, 约占所测克隆子的一半。分离于海洋的许多菌株,包括嗜压菌、嗜冷菌、嗜热菌及适压菌,均属于 *Proteobacteria*<sup>[5,6]</sup>。*Proteobacteria* 在海洋环境中普遍存在<sup>[7,8]</sup>。从该沉积物样品中获得的 *Proteobacteria* 类群,涵盖了  $\alpha$ 、 $\beta$  及  $\delta$  4 个亚群,其中  $\delta$ -*Proteobacteria* 比例最高 (26.4%), 其次为  $\gamma$ -*Proteobacteria* (20%)。这一结果与 Ravenschlag 等<sup>[9,10]</sup> 采用荧光原位杂交方法对北极 Svalbard 群岛海洋沉积物微生物群落结构分析的结果基本一致: 在其研究的沉积物表层 5 cm 样品中包括了  $\beta$ 、 $\gamma$  和  $\delta$ -*Proteobacteria*、*Planctomycetales*、革兰氏阳性细菌及 CFB 类群,其中  $\delta$ -*Proteobacteria* 最为丰富。Li 等<sup>[11]</sup> 采用构建 16S rDNA 文库的方法对南海西

沙海槽地区的表层沉积物细菌多样性的研究也显示,  $\delta$ -*Proteobacteria* 为优势类群。与此不同的是, 有研究者用 PCR-DGGE 技术对北极太平洋扇区 4 个站位表层沉积物以及 3 个不同深度的海洋沉积物样品的细菌多样性研究表明,  $\gamma$ -*Proteobacteria* 为沉积物中的优势细菌类群<sup>[12-13]</sup>。在南海南沙海槽及东北太平洋沉积物中, 也以  $\gamma$ -*Proteobacteria* 占据优势<sup>[14-15]</sup>。这种微生物群落中优势类群的差异, 有可能是沉积物的理化性质、地理位置以及气候条件等环境因素造成的。例如在鄂霍次克海的沉积物中,  $\alpha$ -和  $\delta$ -*Proteobacteria* 在泥浆区为优势类群, 而在火山区则是  $\alpha$ -和  $\gamma$ -*Proteobacteria* 占据优势<sup>[11]</sup>。

本研究中属于  $\delta$ -*Proteobacteria* 亚群的克隆, 其亲缘序列全部来自未可培养细菌, 其中很大一部分来自北极地区或“冷泉”区域的沉积物, 这说明这个类群的微生物在温度较低的沉积物环境中存在较为普遍的分布。 $\delta$ -*Proteobacteria* 亚群属于有机化能营养菌, 与硫代谢有关<sup>[16]</sup>, 其中绝大多数都属于硫酸盐还原细菌 (SRB)。本次研究随机挑选的克隆中,  $\delta$ -*Proteobacteria* 占到 26.4%, 说明硫化物的代谢在该海区沉积物的物质循环过程中可能占有重要地位。

$\gamma$ -*Proteobacteria* 在本沉积物中的变形细菌类群中处于次优势地位。甲烷营养菌的两个类型之一 (I/X 型) 就属于  $\gamma$ -*Proteobacteria*<sup>[17]</sup>。此外, Freitag 等<sup>[18]</sup> 在研究海洋沉积物厌氧条件下氨代谢情况时发现,  $\gamma$ -*Proteobacteria* 在厌氧氨氧化过程中起着重要作用。因此, 沉积物中存在的大量  $\gamma$ -*Proteobacteria*, 可能与沉积物的碳、氮循环密切相关。

*Acidobacteria* 的大多数细菌均为未可培养的, 需通过分子生物学手段才能检测到。Colquhoun 等<sup>[19]</sup> 指出, *Actinobacteria* 类群的细菌在沉积物中的分布很广泛。该类群细菌多出现于地热产生区<sup>[20]</sup>, 在热泉区的沉积物和土壤中较为丰富<sup>[21]</sup>。与他人的研究结果不同<sup>[12]</sup>, 本次调查中 *Actinobacteria* 在沉积物中占有较大比例 (20.8%)。在处于次北极地区的白令海沉积物中发现较高比例、与 *Actinobacteria* 同源性高的序列, 暗示在 *Actinobacteria* 类群中仍有适冷菌的存在。

致谢 感谢美国田纳西大学 Jackie M. Grebmeier 教授为样品采集提供机会; 感谢参加 HLY 0702 航次的其他科学家以及美国海岸警卫队 Healy 破冰船船长及全体船员为样品采集提供帮助。

## 参考文献

- Whitman W B, Coleman D C, Wiebe W J. Prokaryotes: The unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(12): 6578-6583.
- 陈立奇, 等. 北极海洋环境与海气相互作用研究. 北京: 海洋出版社, 2003.
- Nagata Fukuda H, Fukuda R, et al. Bacterioplankton distribution and production in deep Pacific waters: Large-scale geographic variations and possible coupling with sinking particle fluxes. *Limnol Oceanogr* 2000, 45(2): 426-435.
- Hu Y, Du H, Jiao N, et al. Abundant presence of the gamma-like proteobacterial *pmf* gene in oxic seawater. *FEMS Microbiol Lett* 2006, 263(2): 200-206.
- Takanishi H, Inoue A, Fujii F, et al. Microbial flora in the deepest seamount of the Mariana Trench. *FEMS Microbiol Lett*



- 1997, 152(2): 279–285.
- 6 Delong E F, Franks D G, Yayanos A A. Evolutionary relationships of cultivated psychrophilic and barophilic deep-sea bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1997, 63(5): 2105–2108.
  - 7 Kato C, Li L, Tamaoka J, et al. Molecular analyses of the sediment of the 11,000m deep Mariana Trench. *Extremophiles* 1997, 1(3): 117–123.
  - 8 Cifuentes A, Anton J, Benlloch S, et al. Prokaryotic diversity in *Zostera noltii*-colonized marine sediments. *Appl Environ Microbiol* 2000, 66(4): 1715–1719.
  - 9 Ravenschlag K, Salm K, Pemthaler J, et al. High bacterial diversity in permanently cold marine sediments. *Appl Environ Microbiol* 1999, 65(9): 3982–3991.
  - 10 Ravenschlag K, Salm K, Amann R. Quantitative molecular analysis of the microbial community in marine Arctic sediments (Svalbard). *Appl Environ Microbiol* 2001, 67(1): 387–395.
  - 11 Li T, Wang P, Wang P, et al. Microbial diversity in surface sediments of the Xisha Trough, the South China Sea. *Acta Ecol Sin*, 2008, 28(3): 1166–1173.
  - 12 苏玉环, 李会荣, 李筠, 等. 北极太平洋扇区深海沉积物的细菌多样性研究. *高技术通讯*, 2006, 16(7): 752–756.
  - 13 李会荣, 俞勇, 曾胤新, 等. 北极太平洋扇区海洋沉积物细菌多样性的系统发育分析. *微生物学报*, 2006, 46(2): 177–183.
  - 14 Newbery 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. *Environ Microbiol* 2004, 6(3): 274–287.
  - 15 Xu H, Wu M, Wang X, et al. Bacterial diversity in deep-sea sediment from northeastern Pacific Ocean. *Acta Ecol Sin*, 2008, 28(2): 479–485.
  - 16 Inagaki F, Sakihama Y, Inoue A, et al. Molecular phylogenetic analyses of reverse-transcribed bacterial rRNA obtained from deep-sea cold seep sediments. *Environ Microbiol* 2002, 4(5): 277–286.
  - 17 Gulkedge J, Ahmad A, Steudler P A, et al. Family- and genus-level 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for ecological studies of methanotrophic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 2001, 67(10): 4726–4733.
  - 18 Fregitag T E, Prosser J I. Community structure of ammonia-oxidizing bacteria within anoxic marine sediments. *Appl Environ Microbiol* 2003, 69(3): 1359–1371.
  - 19 Cokuhoun J A, Heath S C, Li L, et al. Taxonomy and biotransformation activities of some deep-sea actinomycetes. *Extremophiles* 1998, 2(3): 269–277.
  - 20 Norris T B, Walsh J M, Castenholz R W, et al. Soil microbial community structure across a thermal gradient following a geothermal heating event. *Appl Environ Microbiol* 2002, 68(12): 6300–6309.
  - 21 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.

# INVESTIGATION OF BACTERIAL DIVERSITY IN SURFACE SEDIMENT FROM THE NORTHERN BERING SEA

Zou Yang<sup>1,3</sup>, Zeng Yinlin<sup>1,2</sup>, Tian Yun<sup>1,3</sup> and Zheng Tianling<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory of Ministry of Education for Coastal and Wetland Ecosystem, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China

<sup>2</sup> Key Laboratory for Polar Science of State Oceanic Administration, Polar Research Institute of China, Shanghai 200136, China

<sup>3</sup> State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China

## Abstract

Biodiversity of bacteria in the top layer of the sediment from Northern Bering Sea was studied by a combination of RFLP and 16S rDNA analysis. Phylogenetic analysis showed that bacterial community composition of the sediment had a high diversity. 124 clones from the 16S rDNA library fell into ten bacterial groups including *Proteobacteria* (49.6%), *Acidobacteria* (20.8%), *Bacteroidetes* (6.4%), *Actinobacteria* (5.6%), *Planctomycetes* (5.6%), *Nitrospirae* (4%), *Verrucomicrobia* (2.4%), *Chloroflexi* (1.6%), *Fibrobacteres* (0.8%) and *Spirochaetes* (0.8%). In addition, a part of unidentified bacteria (2.4%) was detected, suggesting a potential source of novel bacterial species or genera.  $\delta$  and  $\gamma$ -*Proteobacteria* were two dominant fractions in the *Proteobacteria*.

**Key words** Northern Bering Sea sediments, bacteria diversity