腾冲热海眼镜泉粉红色菌藻席的细菌组成分析

张东华 李沁元 刘 杨 彭 谦*

(云南大学 云南省微生物研究所 教育部微生物资源开放研究重点实验室 昆明 650091)

摘 要:应用免培养法系统研究眼镜泉粉红色菌藻席的细菌组成。经过克隆筛选,测定了 23 个克隆的 16S rDNA 插入片段的近全序列。与 GenBank 的序列进行比对和相似性分析,结果表明,组成该菌藻席的细菌分属于 Proteobacteria、Firmicutes、Bacteroidetes、Actinobacter、Deinococcus-thermus、Aquificals 6 个类群(phylum),表现出了高度的细菌多样性。结合分析温度相近的 5 个热泉:Octopus spring、Haegindi and Fluidir spring、Olkelduhals、Grendalur spring 中的菌藻席细菌组成,表明生态位相近的不同环境中,其物种组成相近。Aquificales 是中性或弱碱性高温热泉菌藻席群落的优势物种。

关键词:热泉,菌藻席,细菌多样性,生态位,群落结构

中图分类号:Q938 **文献标识码**:A **文章编号**:0001-6209(2004)06-0820-04

热泉环境中的微生物常常生长发育为肉眼可见的菌藻席(Mat)[1],它们代谢旺盛,生长快速,局部遭到破坏后可迅速自我修复,并且与动植物相对隔离,从而在系统发育分析、微生物进化、温泉微生物生态系统研究以及发现新的微生物资源等方面都具有较高的研究价值。以前,对于菌藻席的研究主要采用纯培养(Culture-dependent method)和显微形态观察的方法。但由于传统方法自身的局限性,对于认识菌藻席在自然环境中的物种组成以及群落结构的全面性和客观性受到了怀疑[2]。1966 年 Brock[3] 就开始关注黄石国家公园 Octopus spring 中的红色菌藻席,并进行了一系列的纯培养分离实验,但都未成功。直到 1994 年 Pace 等[4] 采用分子生物技术,从该菌藻席的 16S rDNA 克隆文库中获得序列 EM3、EM17 和 EM19。原位杂交显示 EM17 代表的微生物是该菌藻席的主体,系统发育分析确定 EM17 为 Aquificales。随后,人们对美国黄石国家公园、冰岛和日本等地热环境中的菌藻席进行了更为广泛和深入的研究。大量研究表明温度是影响菌藻席的微生物组成和群落结构的重要因素之一,温度越高组成菌藻席的微生物多样性就越低,反之则越高。其次,温泉的水化学成分与菌藻席的群落结构也密切相关[5]。此外,影响菌藻席组成的还有温泉的规模、光照、pH 等因素。

腾冲热海眼镜泉中菌藻席的颜色、生存环境、生长温度、显微形态结构均与美国黄石国家公园 Octopus spring 中的红色菌藻席非常相似,以往对其的研究主要是采用纯培养法和直接形态观察法(Direct microscopy),利用分子生物技术对其物种组成及群落结构系统的研究国内还未见报道。本文应用免培养法(Culture-independent method)对眼镜泉粉红色菌藻席的细菌组成进行了分析,并与 Octopus spring、冰岛几热泉中菌藻席的细菌组成进行比较,阐明了高温热泉菌藻席细菌组成的特点以及眼镜泉菌藻席具有高度细菌多样性的原因。

1 材料和方法

1.1 样品采集

样品于 2002 年 10 月下旬从腾冲热海眼镜泉泉坑边缘采集。眼镜泉温度为 86℃,pH8.6,采集后的样品避光处理,回实验室后 4℃黑暗保存。

1.2 试剂和仪器

1.2.1 主要试剂:*Ex Taq* DNApolymerase (5U/μL),dNTP Mix (各 2.5 mmol/L),10× *Ex Taq* buffer,引物(10 pmol/μL)(TaKaRa)。Promega pGEM-T easy vector system Ⅱ,大肠杆菌(*Escherichia coli*)JM109 敏感菌(TaKaRa)。DNA 胶回收试剂盒(上海华舜生物工程有限公司)。限制性内切酶 *Hha* Ⅰ、*Hap* Ⅱ、*Rsa* Ⅰ(TaKaRa)。

1.2.2 主要仪器:Mupid-2 Mini Gel Migration Trough(Cosmo Bio Co., Ltd, Advance Co., Ltd.),PCR Express thermal cycler (ThermoHybaid)。

1.3 16S rDNA 扩增和酶切分析

1.3.1 总 DNA 的提取:采用酶解法[6] 直接从环境样品中提取 DNA。

1.3.2 16S rDNA 扩增:引物为细菌 16S rDNA 基因通用引物[4]。PCR 扩增体系为 50μL,包括 10× *Ex Taq* Buffer5μL,dNTP Mix 4μL(各 2.5mmol/L),正向引物 1μL(10pmol/μL),反向引物 1μL(10pmol/μL),DNA 模板 1μL(约 10ng),*Ex Taq*™ 0.25μL(5U/μL)。PCR 扩增条件为:94℃ 5min;94℃ 1min,1min,72℃ 3min,进行 30 个循环;最后在 72℃ 10min。其中退

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39960003;30360004)

* 通讯作者。Tel:86-871-5033543;Fax:86-871-5171975;E-mail:pengq2002@yahoo.com.cn

作者简介:张东华(1978-),女,青海人,硕士研究生,主要从事极端环境微生物生态学研究。E-mail:fooifoot@yahoo.com.cn

收稿日期:2004-03-19,修回日期:2004-06-20

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

火温度分别为 48℃、50℃、52℃、54℃、58℃、60℃,即以不同的退火温度进行一次 PCR 扩增,最后将 PCR 产物混合后纯化备用。

1.3.3　克隆和酶切分析:应用 Promega pGEM-T easy vector system 和大肠杆菌 JM109 敏感菌进行连接和转化。随机挑取阳性克隆 120 个,提取质粒。用引物(M13 M4:5′-GTTTTC-CCAGTCACGAC-3′;M13　RV:5′-CAGGAAACAGCTATGAC-3′,TaKaRa 公司)经 PCR 扩增释放出插入片段,并纯化 PCR 产物。用限制性内切酶 *Hha* Ⅰ、*Hap* Ⅱ、*Rsa* Ⅰ对 PCR 纯化产物进行酶切,然后用 8.0%聚丙烯酰胺凝胶电泳(100V,6h)及银染法检测酶切后的 16S rDNA 片段。

1.4　测序、序列比对和相似性分析

选择酶切带谱不同的克隆子送到上海博亚生物技术有限公司进行测序。将测序所得的序列与从 GenBank 中获得的 16S rDNA 序列用 Clustal X1.81 软件包进行序列比对和相似性分析。

2　结果

2.1　酶切分析

经电泳比较酶切带谱的差异,检测出 31 个克隆子的 16S rDNA的带型差异明显,部分样品的聚丙烯酰胺凝胶电泳图(图 1-A)和酶切带型差异较大的样品的模式图(图 1-B)如下所示。

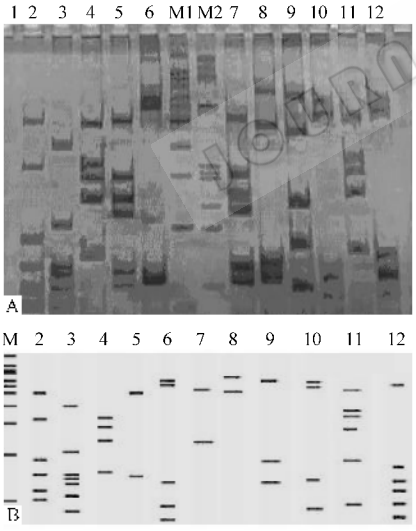

图 1　部分样品的聚丙烯酰胺凝胶电泳图和酶切模式图

Fig.1　Polyacrylamide gel electrophoresis of part samples and the restriction pattern of the 16S rDNA

A:The patterns of the restriction endonuclease *Hap* Ⅰ;B:The The restriction pattern of the 16S rDNA digested by *Hap* Ⅱ;Marker is 100bp ladder marker.

将带谱差异明显的 31 个克隆子送到上海博亚生物技术有限公司进行一个正向反应的测序,结果通过 Clustal X 1.81 软件包进行比对,选出 23 个相似性低于 98%的序列,测定其 16S rDNA近全序列。23 个克隆样品的 16S rDNA 及其它相关菌株在 GenBank 中的序列收录号(Accession number)为:YJQ-2 ~ YJQ-106 AY569280 ~ AY569302,小型水栖杆菌(*Aquabacterium parvum*) AF035052,未培养的细菌克隆(Unidentified bacterium clone 4953) AF097824,鞘氨醇单胞菌属某种(*Sphingomonas* sp. BF14) Z23157,甲基杆菌属某种(*Methylobacterium* sp. BF10) Z23156;未培养的 β-变形杆菌克隆(Uncultured beta Proteobacteriaium clone PRD01a011B) AF289159,德兰士瓦嗜碱菌(*Alkaliphilus transvaalensis*) AB037677,未培养的油菜根际细菌克隆(Uncultured rape rhizosphere bacterium wr0012) AJ295473,噬纤维菌目菌株(Cytophagales str. MBIC4147) AB022889,假单胞菌属某种(*Pseudomonas* sp. WR7 # 2) AY263480,韦龙氏假单胞菌(*Pseudomonas veronii*) AF064460,外链甲基杆菌(*Methylobacterium extorquens*) AF293375,日本慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*) AY169423,弓形菌属某种(*Arcobacter* sp. Solar Lake) L42994,节生甲基杆菌(*Methylobacterium nodulans*) AF220762,氢杆菌属某种(*Hydrogenobacter* sp. UZ27L2A) AJ320217,嗜热氢杆菌(*Hydrogenobacter thermophilus*) Z30189,产液菌目菌株(*Aquificales* str. SS5H1) AF301908, pIce1 AF301907,微杆菌属某种(*Microbacterium* sp.) AB004727,大异常球菌(*Deinococcus grandis*) Y11329,嗜糖假单胞菌(*Pseudomonas saccharophila*) AF368755,芽孢杆菌属某种(*Bacillus* sp. MB-5) AF326363,似玫瑰杆菌属某种(*Roseobacter-like* sp. V4.ME.23) AJ244714,吲哚金黄杆菌(*Chryseobacterium indoltheticum*) AY468448。

序列比对及相似性分析结果显示腾冲热海眼镜泉粉红色菌藻席是由 Proteobacteria、Firmicutes、Bacteroidetes、Actinobacter、Deinococcus-thermus 、Aquificae 6 个类群(phylum)的细菌组成,其中 Proteobacteria 类群在经分析的 23 个序列中出现频率最高,为 65%;其次是 Bacteroidetes,13%;Firmicutes 类群是 9%;Aquificae、Actinobacte、Deinococcus-thermu 所占比例最少均为 4%,表明该菌藻席的细菌组成复杂多样。YJQ-2 为 *Aquabacterium* 属,与柏林饮用水系统中的 *Aquabacterium parvum* 相似性最高,为 98%;YJQ-3 为 *Hyphomicrobiaceae* 科,与美国一工业污水处理系统的活性淤泥中获得的克隆 Clone 4963 的相似性最高,为 96%;YJQ-4 为 *Sphingomonas* 属;YJQ-5、YJQ-13 和 YJQ-19 均位于 *Methylobacterium* 属;与 YJQ-6 相似性最高的是从淡水中获得的克隆 PRD01a011B,为 95%;YJQ-8 是 *Alkaliphilus* 属,与从南非一金矿深处分离的嗜碱菌 *Alkaliphilus transvaalensis* 相似性高达 99%;YJQ-9 和 YJQ-15 位于 *Bacteroidetes* 类群;YJQ-10、YJQ-12、YJQ-16、YJQ-20、YJQ-50 都位于 *Pseudomonas* 属;YJQ-13 与 *Methylobacterium extorquens* 相似性为 96%;YJQ-17 为 *Bradyrhizobium* 属,与 *Bradyrhizobium japonicum* 相似性大于 99%;YJQ-28 为 *Hydrogenobacter* 属;YJQ-29 为 *Microbacterium* 属,与 *Microbacterium trichotecenolyticum* 相似性大于 98%;与 YJQ-47 相似性最高的是 *Deinococcus grandis* 为 94%;YJQ-55 是 *Bacillus* 属;与 YJQ-75 相似性最高的 *Roseobacter-like* sp. V4.ME.23,仅为 79%,可能代表了门一级的新物种;YJQ-106 为 *Chryseobacterium* 属(表 1)。

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

表 1 眼镜泉粉红色菌藻席的细菌组成

Table 1 Bacerial composition of the pink mat in spectacles hot spring

OUT *	Bacterial division	Identity to nearest hit by BLAST(%)
YJQ-2	*β-Proteobacteria*	*Aquabacterium parvum*(98)
YJQ-3	*α-Proteobacteria*	Clone 4963(96)
YJQ-4	*α-Proteobacteria*	*Sphingomonas* sp. BF14(98)
YJQ-5	*α-Proteobacteria*	*Methylobacterium* sp. BF10(99)
YJQ-6	*β-Proteobacteria*	PRD01a011B(95)
YJQ-8	*Firmicutes*	*Alkaliphilus transvaalensis*(99)
YJQ-9	*Bacteroidetes*	Uncultured *rape rhizosphere bacterium* wr0012(99.9)
YJQ-10	*Proteobacteria*	*Cytophagales* str. MBIC4147(96)
YJQ-12	*Proteobacteria*	*Pseudomonas* sp. WR7 # 2(99.7)
YJQ-13	*α-Proteobacteria*	*Pseudomonas veronii*(99.7)
YJQ-15	*Bacteroidetes*	*Methylobacterium extorquens*(96)
YJQ-16	*Proteobacteria*	Uncultured rape rhizosphere bacterium wr0012(99.8)
YJQ-17	*α-Proteobacteria*	*Cytophagales* str. MBIC4147(96)
YJQ-18	*ε- Proteobacteria*	*Pseudomonas veronii*(99.6)
YJQ-19	*α-Proteobacteria*	*Bradyrhizobium japonicum*(99.9)
YJQ-20	*Proteobacteria*	*Arcobacter* sp. Solar Lake(99.8)
YJQ-28	*Aquificae*	*Methylobacterium nodulans*(96),
		Pseudomonas veronii(99.6)
		Hydrogenobacter sp. UZ27L2A(99.7)
		Hydrogenobacter thermophilus(99.2)
YJQ-29	*Actinobacteria*	*Aquificales* str. SS5H1(99.1)
YJQ-47	*Deinococcus-Thermus*	pIce1(98)
YJQ-50	*β-proteobacte*	*Microbacterium* sp.(98.3)
YJQ-55	*Firmicutes*	*Deinococcus grandis*(94)
		Pseudomonas saccharophila(99.1)
YJQ-75	*α-proteobacte*	*Bacillus* sp. MB-5(99.4)
YJQ-106	Bacteroidetes	Uncultured *Bacillus* sp.(99.3)
		Roseobacter-like sp. V4.ME.23(79)
		Chryseobacterium indoltheticum(97)

* The 16S rDNA inserts of the clones.

3 讨论

温度是影响热泉生态系统的重要因子之一,温度越高,热泉微生物多样性越低;反之,温度越低,多样性则越高。腾冲热海眼镜泉与美国黄石公园 Octopus spring、冰岛 4 个热泉的温度相近,均为高温热泉,但眼镜泉菌藻席的细菌多样性要远远高于 Octopus spring 以及冰岛四热泉菌藻席。从 Octopus spring 粉红色菌藻席的克隆文库中只获得了 EM3、EM17 和 EM19 三个不同的 16S rDNA 序列,原位杂交表明 EM17 为该微生物群落的主体,系统发育分析确定 EM17 为 Aquificales[4];冰岛 Haegindi and Fluidir spring 中蓝色菌藻席仅由 pIce1、pIce2、pIce3、pIce4 组成,其中 pIce1 占所分析克隆的 90%,为该群落的主体,并且与 EM17 的相似性为 97.2%,表明该菌藻席与 Octopus spring 的菌藻席细菌组成相似[7];Olkelduhals 热泉的菌藻席由 *Aquificales* 和 *Thermus* 两个类群组成,其中 *Aquificales* 占 90%[8];而温度较低的热泉 Grensdalur 中菌藻席的组成较为丰富,由 *Aquificales*, *Thermodesulfobacterium*, *Thermotogales*, *Thermus-Deinococcus*, OP5, *Nitrospira*, New division△7 个类群组成,但 *Aquificales* 仍是该群落的主体[5]。表明 Aquificales 是高温热泉菌藻席中普遍存在的细菌类群,并且是组成该微生物群落的主体[4,7,9]。尽管 Octopus spring、Haegindi and Fluidir spring、Olkelduhals、Grensdalur spring 地理位置不同,但它们处于生态位相近的微环境中,因而其中的生物类型随之相近,Aquificales 由于其特殊的生理代谢途径成为中性或弱碱性高温热泉生态位中的优势生物类群。腾冲热海眼镜泉粉红色菌藻席中也检测到了 Aquificales 的序列 YJQ-28,并且与 pIce1 的相似性高达 98%,但该序列只占经系统发育分析的 23 个序列的 4%,而 Proteobacteria 类群的细菌成为该微生物群落的主体。眼镜泉粉红色菌藻席的细菌多样性远远高于黄石公园和冰岛几热泉的菌藻席,表现出很大的差异。这可能由于所采集的样品为附着在泉坑边缘的菌藻席,其温度较热泉内部的实际温度低,使得周围环境中的一些适应较低温度的微生物可以在其中生存,即该菌藻席中

△作者未确定

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

包含了多个微环境中的微生物类群,从而表现出了高度的细菌多样性;其次热海被开发成为旅游景点,大多数泉坑经过人工修建,其中的生物类群在一定程度上受到了人为的干扰。

参 考 文 献

[1] 中国科学院青藏高原综合科学考察队. 腾冲地热. 北京:科学出版社,1989.

[2] Ward D M, Ferris M J, Nold S C, *et al*. A natural view of microbial biodiversity within Hot Spring Cyanobacterial Mat communities. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, **62**: 1353 – 1370.

[3] Brock T D. The road to yellowstone-and beyond. *Annu Rev Microbiol*, 1995, **49**: 1 – 28.

[4] Reysenbach A L, Wickham G S, Pace N R. Phylogenetic analysis of the hperthermophilidc pink filament community in Octopus Spring, yellowstone national park. *Appl Environ Microbial*, 1994, **60**: 2113 – 2119.

[5] Skirnisdottir S, Hreggvidsson G O, Hj rleifsdottir S, *et al*. Influence of sulfide and temperature on species composition and community structure of hot spring microbial mat. *Appl Environ Microbial*, 2000, 66: 2835 – 2841.

[6] Osbert F, Brent R, Kingsten R E. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖,王海林,译. 北京:科学出版社, 1998.

[7] Takacs C D, Ehringer M, Favre R, *et al*. Phylogenetic characterization of the blue filamentous bacterial community from an Icelandid geothermal spring. *FEMS Microl Ecol*, 2001, **35**: 123 – 128.

[8] Hjorleifsdottir S, Skirnisdottir S, Hreggvidsson G O, *et al*. Species composition of cultivated and noncultivated bacteria from short filaments in an icelandic hot spring at 88℃. *Microl Ecol*, 2001, **42**: 117 – 125.

[9] Hugenholtz P, Pitulle C, Hershberger K L, *et al*. Novel division level bacterial diversity in Yellowstone Hot Spring. *Journal of Bacteriology*, 1998, **180**: 366 – 376.

Analysis of Bacterial Composition of The Pink Mat from Spectacles Hot Spring in Tengchong by Culture-independent Approach

ZHANG Dong-Hua　LI Qin-Yuan　LIU Yang　PENG Qian*

(*Key Laboratory for Microbial Resources of Ministry of Education*, *Yunnan Institute of Microbiology*, *Yunnan University*, *Kunming* 650091, *China*)

Abstract: The bacterial composition of the pink mat was studied by culture-independent approach. 23 complete 16S rDNA sequences were obtained. According to the sequences alignment and analysis of comparability, the bacteria of the pink mat was consisted of Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacter, Deinococcus-thermus, Aquificals. And compared with bacterial composition of the mats from Octopus spring in Yellowstone Park and Haegindi and Fluidir spring, Olkelduhals, Grensdalur spring in Iceland, the pink mat in spectacles spring had highest bacterial diversity among them because it perhaps included lots of bacteria at lower temperature. And the result indicated the same community lived in the same niche and Aquficales was dominant group among bacterial composition of the mat in higher temperature and near-neutral hot spring.

Key words: Mat, Hot spring, Bacterial diversity, Niche, Community

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (NSFC) (39960003; 30360004)

* Corresponding author. Tel: 86-871-5033543; Fax: 86-871-5171975; E-mail: pengq@yahoo.com.cn

Received date: 03-10-2004

写 作 要 点

凡投送本刊的稿件,如涉及到以下内容,请作者按照本刊要求撰写。

1. 摘要:中英文摘要均采用第三人称叙述,不允许出现第一人称,如:本文、本研究、我们……等。研究论文摘要包括目的、方法、结果和讨论,综述摘要包括论述内容的发展水平、自己的评论和展望。英文摘要中也可以加入自己的一些观点,用过去时态叙述作者工作,用现在时态叙述作者结论。要求语法正确,句子通顺,最好请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再投来。

2. 系统发育树:系统树中菌名应列出全称及菌株号;名字后加括号,其内含序列号;还应标出分枝点上的数字(即 Boostrap 值)。图注应说明"树"上所有的内容,包括:括号中的序列号、分支点上的数字涵义、比例尺代表的意义(如:0.01)。[参见:微生物学报,2004,44(2):143.]

3. 测序结果:因本刊版面紧张,所有测序结果(核酸、蛋白质),请作者先通过计算机网络进入国际基因库 EMBL(欧洲)或 GenBank(美国)或 DDBJ(日本),申请得到国际基因库接受号(Accession No.)后再投稿。

4. 参考文献:参考文献按文内引用的先后排序,必须是作者在论文中直接引用的、发表在正式出版物上的文献。未正式发表的文献(包括私人通讯、毕业论文等)一般不作为文献引用,必要时可作为脚注处理。

《微生物学报》编辑部

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