

# 滇西热泉中9个16S rDNA克隆的分析\*

王涛 柴丽红 郭春雷 崔晓龙 徐丽华

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

**摘要:** 用免培养法 (Culture-independent approach) 从腾冲大滚锅和龙陵大沸泉两个高温热泉中获得的 16S rDNA, 经克隆筛选, 测定了其中 9 个克隆的 16S rDNA 插入片段的近全序列, 构建系统发育树进行分析。结果表明, 9 个克隆中有 4 个是 *Thermus* 属、2 个是 *Bacillus* 属、1 个是 *Hydrogenobacter* 属、1 个是 *Pseudomonas* 属, 还有 1 个在 *Thermodesulfobacteriaceae* 科, 介于 *Geothermobacterium* 属和 *Thermodesulfobacteria* 属之间。

**关键词:** 热泉, 免培养法, 16S rDNA, 克隆

**中图分类号:** Q93      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0253-2654 (2003) 05-0038-04

## STUDY ON NINE 16S rDNA CLONES CAME FROM TWO HOT SPRINGS IN THE WEST OF YUNNAN

WANG Tao, CHAI Li-Hong, GUO Chun-Lei, CUI Xiao-Long, XU Li-Hua

(The Key Laboratory for Microbial Resources of Ministry of Education, P. R.

Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091)

**Abstract:** Nine almost completely 16S rDNA sequences were obtained from Dagunguo of Tengchong Rehai and a hot spring Dafeiquan of Longling by culture-independent method. Based on phylogenetic analyzing, four of these sequences belong to the genus *Thermus*, two are *Bacillus* and the other three sequences belong to the genera *Hydrogenobacter*, *Pseudomonas* and a potential new genus that belongs to the family *Thermodesulfobacteriaceae* between the genera *Geothermobacterium* and *Thermodesulfobacteria*, respectively.

**Key words:** Hot spring, Culture-independent approach, 16S rDNA, Clone

腾冲、龙陵两县位于中国西南边陲, 与缅甸接壤, 距省会昆明 700km, 海拔约 1450m 左右, 是国内著名的地热区之一。腾冲的大滚锅 (DGG) 和龙陵的大沸泉 (DFQ) 相距约 70km, 是以流量大、温度高而出名的, 两泉泉水出口温度均在 96℃ 左右。大滚锅 (pH8.5) 和大沸泉 (pH7.5) 的水质都呈弱碱性, 主要阳离子为 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>, 富含硫化氢<sup>[1]</sup>。

高温热泉, 尤其是超高温热泉的自然环境与早期的地球环境比较接近, 研究其中的微生物对认识地球上生命的起源和进化具有十分深远的科学意义, 同时因为这些微生物具有较高的经济价值, 作为可再生的生物资源, 备受各国科学家关注。由于超高温热泉中微生物生态系统相对比较单纯, 与动、植物及其它环境中的微生物有生存环境上的隔离, 提供了用免培养法等分子手段对其进行种群生态学研究理想场所, 免

\* 科技部基础研究重大项目前期研究专项 (No. 2001CCC00600)

国家自然科学基金 (No. 39960003)

云南省教育厅科研基金资助项目 (No. 0111142)

\*\* 联系人

作者还有: 彭 谦, 姜成林\*\*

收稿日期: 2002-09-26, 修回日期: 2002-11-22

培养手段和方法的建立对种群生态学的理论和方法具有很大的促进作用<sup>[2]</sup>。按照这种方法的研究结果认为,目前自然界中不可纯培养的微生物可能高达85%~99.999%<sup>[3]</sup>。国外最早是利用5S rDNA进行研究,随后Pace和他的同伴及学生利用16S rDNA对美国黄石公园热泉进行了系统的微生物资源调查<sup>[4]</sup>。欧洲和日本的一些学者也用类似的方法对冰岛和日本的一些高温热泉进行了种群数量研究。

中国科学院微生物研究所、北京大学和云南省微生物研究所的一些科学工作者曾经用纯培养和直接形态观察法对腾冲热海中的微生物进行过一系列的研究<sup>[1,5]</sup>。我们利用免培养法,对腾冲大滚锅和龙陵大沸泉微生物种群进行初步调查。本文介绍用细菌通用引物扩增并测定的9个克隆的16S rDNA结果。结果分析表明,获得了*Thermus*、*Bacillus*、*Hydrogenobacter*、*Pseudomonas* 4个属一级的序列和1个未定属(介于*Geothermobacterium*和*Thermodesulfobacteria*之间)序列。所得到的序列都提示与上述各属中有关种的典型菌株的16S rDNA序列差异度达到构成新种的可能。现将初步结果报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

大滚锅热泉采样点温度84℃,所采样品为用不锈钢打孔器所取下的泉壁白色沉积物和泉水的混合物。大沸泉采样点温度96℃,所采样品为泉底沉积物,为灰深黑色的细沙(混有白色约1立方厘米左右、坚硬的小石)和泉水的混合物。样品采集后3h之内于0℃,黑暗保存。带回实验室后于-20℃,黑暗保存。

### 1.2 总DNA的提取、扩增

DNA提取用酶解法,按改进的Antoon等的方法进行<sup>[6]</sup>。DNA纯化后用细菌16S rDNA通用引物(8-27F, 1529-1546R)<sup>[7]</sup>进行扩增。反应过程为95℃预变性4min后,35个循环(95℃1min,退火1min,72℃3min)后,72℃延伸10min。其中退火温度包括52/53/54/56/58℃,也就是以每个温度做一个PCR反应,然后将产物进行混合,纯化。

### 1.3 克隆、测序

连接反应用大连宝生的T4连接酶和缓冲液,转化反应用Promega的pGEM-T载体和上海华舜的JM109敏感菌。随机挑选2个样点的阳性克隆子各40个提取质粒。用正向引物:pGEM-T载体M<sub>13</sub> primers M<sub>4</sub>,反向引物:pGEM-T载体M<sub>13</sub> primers RV扩增出插入的16S rDNA序列。16S rDNA序列经纯化后用HhaI 37℃酶切,在2.8%的高分辨率琼脂糖凝胶电泳。选出酶切带谱不同的9个重组子送大连宝生有限公司进行测序。

### 1.4 克隆样品的序列注册号

9个克隆样品的16S rRNA序列在Genbank的注册号分别是:DFQ6: AY082363; DFQ28: AY082364; DFQ34 AY082365; DFQ37: AY082366; DCG2: AY082367; DCG18: AY082368; DCG19: AY082369; DCG30: AY082370; DCG36: AY082371。

### 1.5 系统发育树的构建

系统发育树的构建采用Saitou and Nei的neighbor-joining法,经过Felsenstein的方法经1,000次bootstrap分析,用邻接法构建的系统发育树如图1和图2。标尺代表每100个核苷酸有10个核苷酸替换。用于分析的16S rDNA序列为1494bp。图1中自上而下的序列号(大沸泉的4个除外)依次为:AF331969、Y18411、Y18410、Y18406、Y18409、AF027019、AF445644、X07998、L09667、Y18416、Y13594;图2中从上至下的序列号

(大滚锅的5个除外)依次为: AF027096 AF411013 AF418169 Z30189 AB026268 Z30214 AF221062 AF326363 AF326367 AJ276351 AJ311894 AF169537 AB030583 D84016 Z76651 J01695。

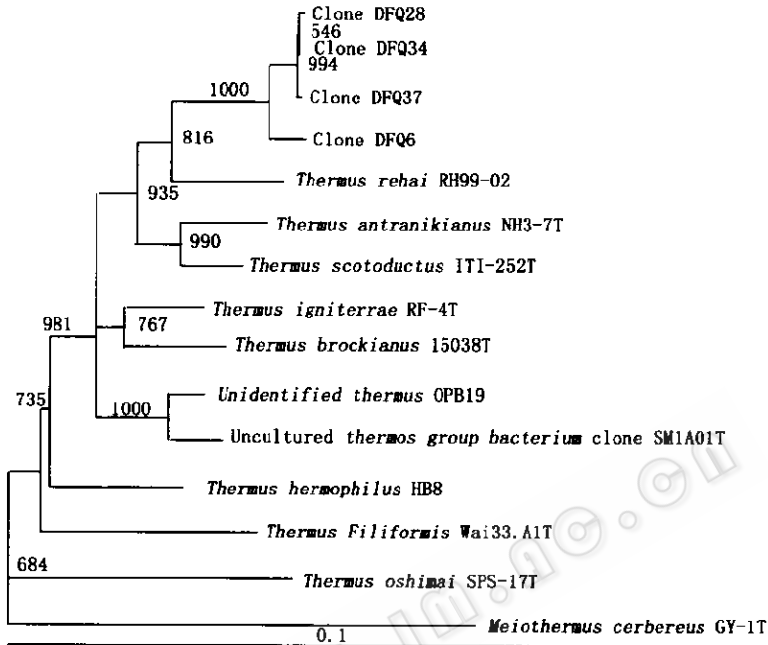


图1 以16S rDNA序列为基础的大沸泉(DFQ)克隆系统发育树

## 2 结果与讨论

### 2.1 大沸泉4个克隆的系统发育分析

从图1可知,来自大沸泉的4个克隆序列与栖热菌属各种的相似程度较高。虽然DFQ28、DFQ34和DFQ37聚在一起,DFQ6单独形成一支,但4个克隆之间的差异都在2%以内,属同一个种。与Thermus属各已知种的相似性均在97%以下,与最相近的本研究室从腾冲大滚锅热泉中分离到的*T. rehai* RH99-02<sup>[8]</sup>的最小差异度也在3.49%。所以,它们很可能代表着潜在的新种(potential species)。本次试验从大沸泉的样品只获得Thermus属菌的信息,似乎不能真正代表大沸泉细菌类群的真实情况,是何原因,尚待研究。

### 2.2 大滚锅5个克隆的系统发育分析

从图2可以看出,来自大滚锅的5个克隆序列被分别聚在4个不同的分类群中。DGG19聚于Thermodesulfobacteriaceae科,与它聚在一起的3个序列是Unidentified Thermodesulfobacterium clone BspN50(从美国黄石热泉用免培养法获得的序列),与DGG19序列的差异度为2.98%;Geothermobacterium ferrireducens FW-1a(从黄石公园热泉中分离),与DGG19序列的差异度为3.3%;Thermodesulfobacterium commune DSM2178(系Michaelde等人获得的纯培养),与DGG19序列的差异达到4.99%。所以,DGG19序列所代表的很

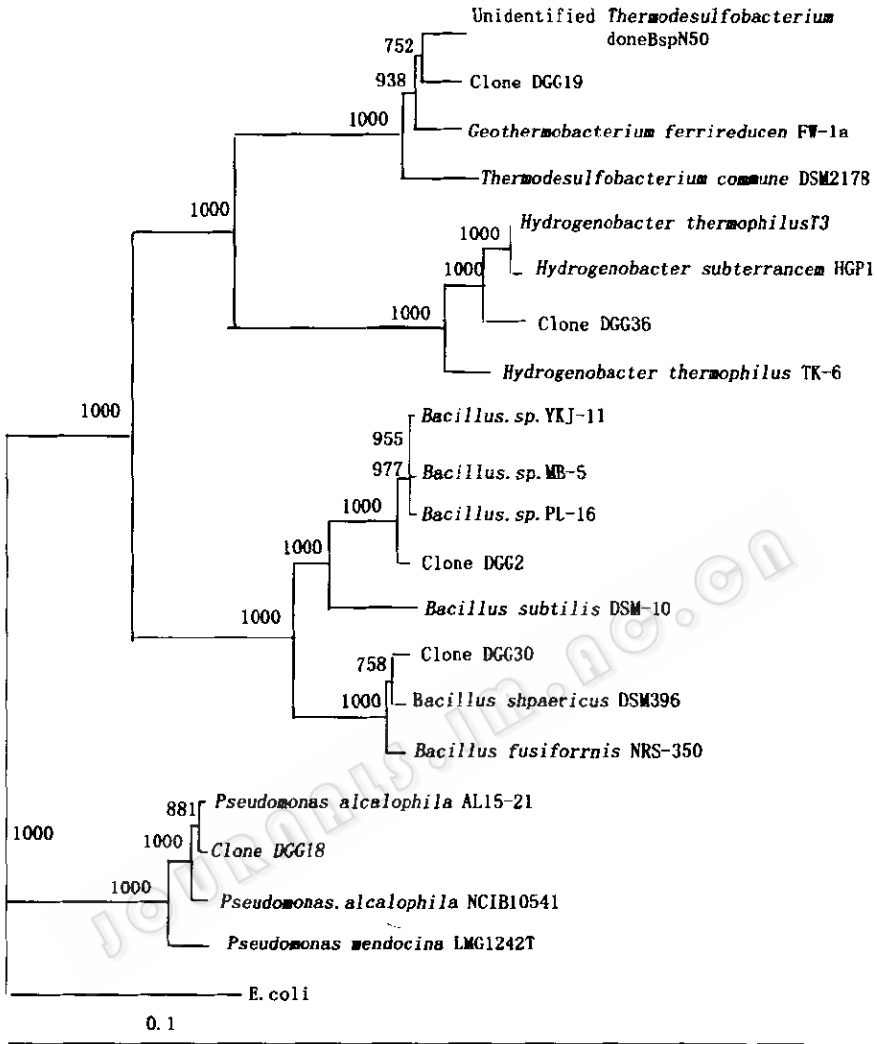


图2 以16S rDNA序列为基础的大滚锅(DGG)克隆系统发育树

可能是 *Thermodesulfobacteriaceae* 科下, 介于 *Geothermobacterium* 属和 *Thermodesulfobacterium* 属之间的一个属一级的分类单元。

DGG36 聚在产氢杆菌属 (*Hydrogenobacter*) 簇中, 与 T3、HGP1 和 TK-6 是相似性最大的3个序列。其中 HGP1 是 (从日本地下高温热水中分离到的纯培养, T3 和 TK-6 是从日本温泉的热水中分离到的)。DGG36 与 *Hydrogenobacter thermophilus* T3 序列之间的差异度为 2.3%, 与 *Hydrogenobacter subterranean* HGP1 序列之间的差异度为 2.48%, 与 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 序列之间的差异为 4.16%。因此, 很可能是产氢杆菌属下的一个新种。

DGG2 和 DGG30 均聚在芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 一簇。但 DGG2 和 DGG30 之间的差异度很大 (9.8%), 并且分别聚在两个不同的亚簇中。亚簇 I 中, 与 DGG2 序列最近的

是 *Bacillus jiejotgali* YKJ-11, *Bacillus* sp. MB-5 及 *Bacillus* sp. PL-16, 它们的差异度分别为 0.8%, 0.82% 和 0.92%。尽管它们的 16S rRNA 同源性比较高, 但 YKJ-11 分离于韩国的海洋发酵食品中, MB-5 和 PL-16 均分离于海岸污泥, 它们的栖息地和生态环境完全不同, 它们是否属于同一个种, 还必须有待杂交结果的证实。与 DGG30 序列最相近的序列是 *Bacillus sphaericus* DSM396 和 NRS-350, 差异度分别为 0.99%, 与 1.58%。DSM396 并不是高温菌, DGG30 所代表的微生物与 *Bacillus sphaericus* 是何关系, 是一个非常令人感兴趣的问题。

DGG18 归入假单胞菌 (*Pseudomonas*) 属一簇。与 *Pseudomonas alcaliphila* AL15-21 和 *Pseudomonas mendocina* NCIB10541 序列最相近。DGG36 与 *Pseudomonas alcaliphila* AL15-21 之间的差异度为 0.64%。*Pseudomonas aeruginosa* LMG1242<sup>T</sup> 为 *Pseudomonas* 属的模式菌株, AL15-21 分离于海水中, NCIB10541 的适宜培养温度为 30℃。但 Orphan V. J 等在用分子生物学方法对美国 60℃ ~ 90 的地下含油层中的微生物进行分析时, 发现了与 *Pseudomonas* 高度相似的序列<sup>[9]</sup>。

### 2.3 用免培养法获得的基因种的初步评价

据目前的文献报道, 用纯培养方法从大滚锅热泉中已分离到 3 个属的细菌: *Bacillus thermocoagulans* sp. Nov.<sup>[10]</sup>、*Thermus rehai* RH99-02<sup>[7]</sup> 和 *Thermoanaerobacter*<sup>[5]</sup>。本试验用免培养法探测到 3 个属 (*Bacillus*、*Hydrogenobacterium*、*Pseudomonas*) 和 1 个还不能确定其属一级分类单位的微生物的存在, 序列分析表明它们多数是潜在的新种。但没有发现 *Thermus* 和 *Thermoanaerobacter*。这可能和样品的分析量较少有关。

免培养法试图根据 16S rDNA (rRNA) 来研究环境微生物的组成、分布及结构。但要弄清楚环境中微生物的真实情况, 仅靠 16S rDNA (rRNA) 序列分析是不够的, 因为在 DNA 提取、PCR 以及克隆筛选中会产生种种偏差, 而且由于 Genbank 数据库中的数据不完全和完善, 因此, 目前国外一些科学工作者在进行免培养法分析的时候, 还使用直接形态观察、原位杂交等来加以补充<sup>[3]</sup>。但无论如何只有得到纯培养, 结合形态、生理等进行的多相分类, 才能真正表明一个物种的存在。

利用古菌、真菌引物对大滚锅和大沸泉中古菌和真菌的研究正在进行中, 待报道。

### 参 考 文 献

- [1] 中国科学院青藏高原综合科学考察队. 1989 腾冲地热. 北京: 科学出版社, 1989. 181 ~ 187.
- [2] David M W, Michael J F, Stephen C N, et al. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, **62**: 1353 ~ 1370.
- [3] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K. *Microbiol Rev*, 1995, **59**: 143 ~ 169.
- [4] Olsen G J, Lane D J, Giovannoni S J, et al. *Annu Rev Microbiol*, 1986, **40**: 337 ~ 365.
- [5] Yanfen X, Yi X, Ying L, et al. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, **51**: 1335 ~ 1341.
- [6] Antoon D L A, Jan D V E, Frans J D B, et al. *MOLECULAR MICROBIAL ECOLOGY MANUAL*, Dordrecht, Kluwer Academic publisher 1995, 1.14/1 ~ 1.14/7.
- [7] Brosius J, Dull T J, Sleeter D D, et al. *J Mol Biol*, 1981, **148**: 107 ~ 127.
- [8] Lianbing L, Chaoyin C, Qian P, et al. *Journal of Basic Microbiology*, 2002, **42** (5): 339 ~ 346.
- [9] Orphan V J, Taylor L T, Hafenbradl D, et al. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**: 700 ~ 711.
- [10] 和致中, 彭 谦, 马 俊, 等. *微生物学报*, 1989, **29** (30): 161 ~ 165.