

云南腾冲热海三热泉细菌多样性的研究*

李沁元 崔晓龙** 张东华 彭谦 徐丽华

(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: 应用变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 对云南腾冲热海 3 个高温热泉中菌藻席和泉底沉积物的细菌多样性进行了初步研究。直接从环境样品中提取总 DNA, 用两套细菌通用引物进行 PCR 扩增, 分别得到包含 V_8 和 V_9 高变区的 16S rDNA 片段, 进行 DGGE 分析。结果表明: 菌藻席和泉底沉积物中不仅物种组成差异较大, 而且都存在丰富的细菌多样性; 一些关键的生态因子, 如氧气、温度等会对群落中微生物的物种组成有很大影响。

关键词: DGGE, 高温热泉, 细菌多样性

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 05-0049-06

Studies on the Bacterial Diversities of the Hot Springs at Tengchong Rehai in Yunnan Province China*

LI Qin-Yuan CUI Xiao-Long** ZHANG Dong-Hua PENG Qian XU Li-Hua

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

Abstract: Bacterial biodiversities of microbial mat and sediments, which were sampled from thermal springs of Tengchong Rehai in Yunnan, were preliminarily studied with PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE). Directly extracted total DNA from environmental samples amplified by PCR with two sets of bacteria-specific primers. The PCR products, which include the V_8 and V_9 high-variable regions respectively, were analyzed by using DGGE. The DGGE profiles not only indicated the existence of higher levels of bacterial diversity, but also showed that the microbial mat and sediments have different dominant bacteria. Furthermore, the bacterial PCR-DGGE displayed clear profiles of bacterial structure selected by the key abiotic factors of the extreme environments, such as temperature and concentration of oxygen.

Key words: DGGE, Hot spring, Bacterial biodiversity

云南腾冲县位于滇西南, 地近欧亚和印度两个大陆板块的镶接部位, 是地中海-喜马拉雅地热带的重要组成部分, 也是中国大陆著名的火山地热区^[1]。由于高温热泉与地球早期的环境比较接近, 其中的微生物生态系统比较简单、稳定, 并且相对封闭, 对其进行生态学研究有助于微生物生态系统模型的建立^[2]。因此, 对腾冲热海高温热泉中的微生物群落进行深入细致的研究, 对进一步认识高温环境中的微生物生态系统结构与功能具有重要的意义。

高温环境中的微生物有其独特的生活环境和生理需求, 而传统纯培养方法的局限严重妨碍了全面客观地认识其中的微生物群落。所以, 目前对其多样性及系统发育的

* 国家自然科学基金项目资助项目 (No.30260004)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No.30260004)

** 联系人 Tel: 86-871-5034621, Fax: 86-871-5173878, E-mail: xlclui@ynu.edu.cn

作者还有: 王涛, 柴丽红, 姜成林

收稿日期: 2003-11-26, 修回日期: 2004-01-14

研究多采用免培养法^[3]。其中,变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)自1993年 Muyzer^[4]首次将其应用于微生物生态学的研究以来,在高温和其它环境的微生物多样性的研究中均得到了广泛的应用^[2,3,5]。国内对腾冲热海地区高温菌的研究开展较早,从早期的纯培养法和直接形态观察法到近来的免培养法都证实了其中所蕴藏的丰富的微生物资源^[1,6-8]。

本文利用 DGGE 法对腾冲热海 3 个高温热泉 4 个泉眼中的细菌多样性进行了初步研究,结果显示,所研究样点中均具有比较丰富的细菌多样性,并且不同温度、具不同物理化学性质的泉眼中细菌组成有明显差异,值得对其中的微生物进行深入的研究。

1 材料与方 法

1.1 样品的采集

样品采集于 2002 年 10 月下旬,所采样品为菌藻席和泉底沉积物,分别采集于腾冲热海的蛤蟆嘴(HMZ)、大滚锅(DGG)和眼镜泉的上下两个泉眼(YJQ-1, YJQ-2)(见表 1)。样品采后 3h 之内于 0℃ 黑暗保存,回实验室后置于 -20℃ 黑暗保存。

表 1 采集样品的基本特征

样品编号	采样点	温度(℃)	pH	样品
HMZ	蛤蟆嘴	90	8.0	白色菌藻席
DGG	大滚锅	84	7.2	泉边白色沉积物
YJQ-1	眼镜泉上坑	92	8.4	泉底沉积物,红褐色细砂
YJQ-2	眼镜泉下坑	90	8.4	泉底沉积物,黑褐色细砂

1.2 总 DNA 的提取

用酶解法、化学裂解法和物理裂解法结合,选出适合于不同样点的提取方法,直接从环境样品中提取出总 DNA^[7,8]。

1.3 PCR 扩增

用细菌的 16S rDNA 通用引物,扩增出 16S rDNA 的高变区片段(表 2)。PCR 扩增体系为 50 μ L,包括 5 μ L 10 \times Buffer, 4 μ L dNTP Mix, 4 μ L 正向引物, 4 μ L 反向引物, 1 μ L DNA 模板, 1 U Taq DNA 聚合酶;PCR 扩增条件为:94℃ 预变性 5 min 后,先进行 20 个循环的降落 PCR(94℃ 1 min, 退火 1 min, 72℃ 3 min;退火温度由 63℃ 到 43℃,每一循环递减 1℃),再进行 15 个循环(94℃ 1 min, 48℃ 退火 1 min, 72℃ 3 min),最后 72℃ 10 min。

表 2 所用引物的序列

引物	靶位点	序列(5' to 3')	PCR 产物
P1 ^[7] : 1055F	1055 ~ 1070	ATG GCT GTC GTC AGC T	V ₉ 高变区
1406R-GC*	1392 ~ 1406	ACG GGC GGT GTG TAC	392 bp
P2 ^[7] : 341F-GC	341 ~ 357	CCT ACG GGA GGC AGC AG	V ₈ 高变区
907R*	907 ~ 926	CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT	626 bp

* GC 是一段约 40bp 的富含 GC 的序列,其序列为:5'-CGC CCG CCG CGC CCG CCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G-3'^[4]

PCR 产物用玻璃珠(Silver Beads)DNA 胶回收试剂盒(上海生工)进行纯化。

1.4 DGGE

选用 6% 的聚丙烯酰胺凝胶,并且两套引物分别选用不同的变性梯度进行电泳。P1

变性剂梯度为 35% ~ 75%，P2 变性剂梯度为 25% ~ 65% (7 mol/L 的尿素，40% 的甲酰胺为 100% 的变性剂浓度)。120 V 恒定电压，60℃ 下电泳 8 h。电泳结束后用 EB 进行染色。DGGE 带谱用 Phytools 和 Phylip 软件进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 总 DNA 的提取

由于环境样品成分复杂，并且极端环境中微生物的细胞数量较少，所以采取不同的提取方法进行组合，选取适合不同样点的提取方法提取样品的总 DNA。将从环境样品中直接提取的总 DNA 进行 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳，在 20 kb 左右出现条带 (图 1)，表明已获得较为完整的环境样品的总 DNA。



图 1 直接从环境样品中提取的总 DNA (Marker: λ DNA/*Eco*T14)

2.2 PCR 扩增

提取出的总 DNA 经过 PCR 扩增后，两套引物均获得了特异扩增片段，P1 的扩增产物约 390 bp，为 16S rDNA 的 V_9 高变区片段。P2 的扩增产物约 600 bp，为 16S rDNA 的 V_8 高变区片段 (图 2)。

2.3 DGGE 结果与分析

将纯化的 PCR 产物通过变性梯度凝胶电泳，可看出分离得到若干条带 (图 3)，并且各个样点的条带在数量和位置上均有差异，初步统计结果如下 (表 3)，而根据条带差异聚类结果则如图所示 (图 4)。

DGGE 是根据 DNA 片段序列的不同，既解链温度的不同，将片段大小相同的 DNA 片段分开的电泳检测方法。根据其原理，DGGE 带谱中的每一条带代表一个可能的细菌类群或可操作分类单位 (OTU)^[9]。从表 3 的统计结果可以看出，引物 P1 扩增产物的 DGGE 图谱中，HMZ 有 33 条带，DGG 有 28 条带，YJQ-1 有 25 条带，YJQ-2 有 26 条带，这说明每种环境样品至少由 20 种以上的可能物种组成，都具有比较丰富的细菌多样性。同时引物 P2 扩增产物的 DGGE 带谱也证明了这一点。此外，由于 DGGE 通常只能检测到细胞数量相对较多的微生物物种的存在^[3]，带谱的亮度在一定程度上可以反应出其所代表的物种的细胞数量，可以认为带谱中较亮的条带代表了环境中的优势菌群 (图 3)。

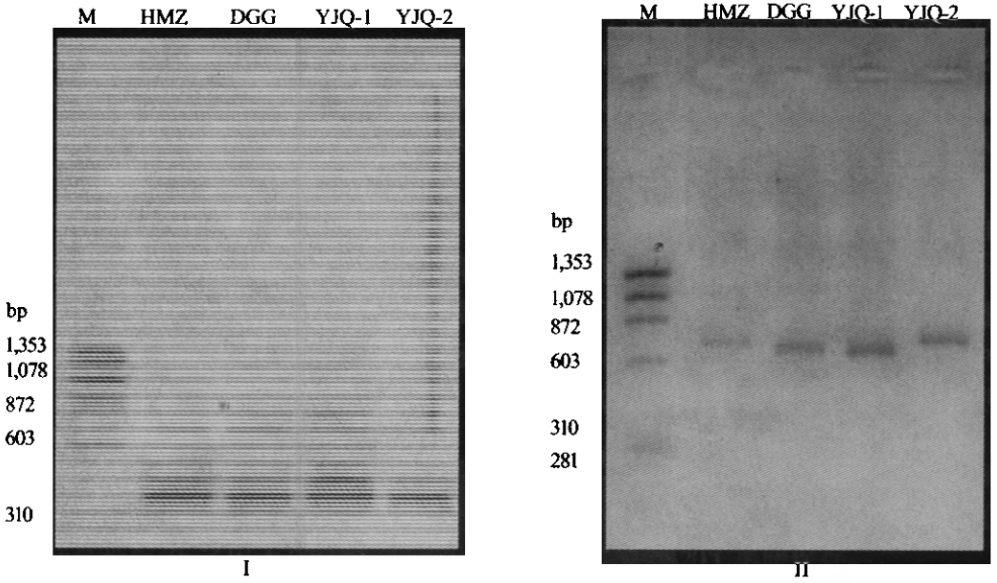


图2 环境样总 DNA 的 PCR 产物 (Marker: ϕ xDNA/Hae III)

I 引物 P1 的 PCR 产物, II 引物 P2 的 PCR 产物

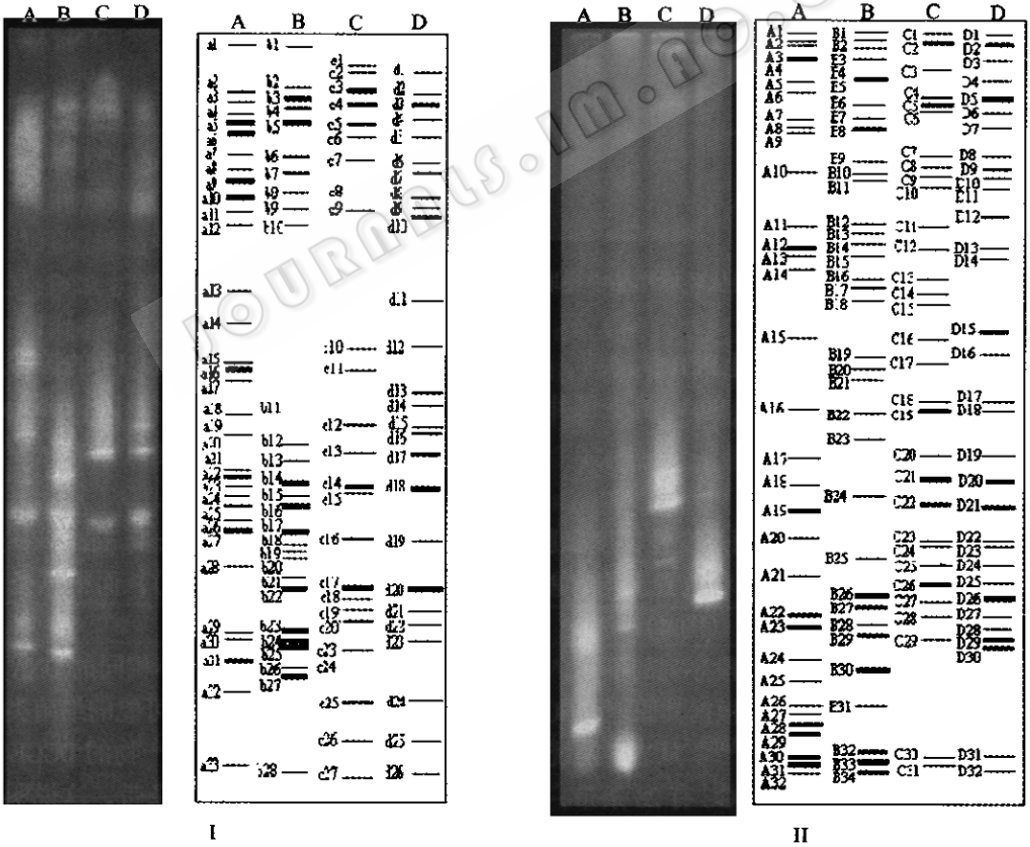


图3 PCR 产物的 DGGE 图谱

I P1 PCR 产物的 DGGE 图谱, II P2 PCR 产物的 DGGE 图谱

A HMZ, B DGG, C YJQ-1, D YJQ-2

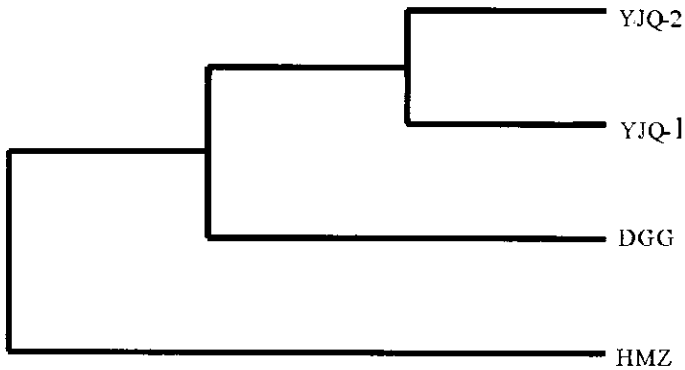


图4 DGGE带谱聚类结果

表3 DGGE带谱统计结果

	HMZ	DGG	YJQ-1	YJQ-2
P1DGGE	33	28	25	26
条带数	9	10	4	5
P1 较亮的条带数	(a5, a6, a9, a10, a15, a16, a22, a26, a31)	(b3, b5, b14, b16, b17, b22, b23, b24, b25, b27)	(c3, c4, c14, c17)	(d3, d10, d17, d18, d20)
P2DGGE	32	34	31	32
条带数	9	9	6	8
P2 较亮的条带数	(A4, A12, A19, A22, A23, A28, A29, A30, A31)	(B5, B8, B26, B27, B29, B30, B32, B33, B34)	(C2, C5, C19, C21, C22, C26)	(D2, D5, D15, D20, D21, D26, D29B, D30)

对 DGGE 带谱的统计结果表明, 不同性质的样品 (菌藻席和泉底沉积物) 在微生物物种组成上差异显著。引物 P1 和 P2 扩增产物的 DGGE 带谱均显示, HMZ 和其它 3 个样点共有的条带分别只有 2 条和 3 条, 而且代表优势物种的较亮的条带在数量和位置上有明显的不同。这可能是由样点不同的物化因素所导致的差异: 蛤蟆嘴的水化学类型为 $\text{HCO}_3\text{-Cl-Na}$ 型而其它 3 个泉眼的水化学类型是 $\text{Cl-HCO}_3\text{-Na}$ 型, 泉水中的阴离子和阳离子的含量有较大差别, 环境因子的差异会对物种组成产生影响。而且 HMZ 菌藻席采集于一脉动式沸喷泉的喷水口周围, 其它沉积物样品则均采自沸泉坑的泉边或泉底, 氧气作为重要的环境因素必然会影响微生物群落的物种组成。

此外, 温度也是影响环境样中细菌组成的重要因素。虽然泉眼的物化性质稍有不同, 但温度比较接近的 YJQ-1 和 YJQ-2 的基本细菌组成差异不大, 条带的位置、多少、亮度均比较接近, 只是在一些较弱的条带上存在差异, 但与温度差别较大 DGG 比较, 物种组成的差异较大, 较弱和较亮的条带均有不同。P1 扩增产物 DGGE 图谱统计结果显示, YJQ-1 和 YJQ-2 相同的条带数有 16 条, YJQ-1 和 DGG 相同的条带有 6 条, YJQ-2 和 DGG 相同的条带有 7 条, 而 3 种样品相同的条带仅有 3 条。对 P2 扩增产物的 DGGE 图谱进行统计, 结果与之类似。

根据 DGGE 带谱中条带的数量、位置等性状进行聚类分析的结果 (图 4) 也证明了上述结论。从聚类图可以直观地看出, 由于样品性质的不同, HMZ 与其它 3 个样差异显著, 单独形成一个分支。在另一分支中, 样品性质和样点环境差异不大的 YJQ-1 和 YJQ-2 聚为一簇, 与 YJQ 样品同为沉积物的 DGG 由于温度的差异, 形成该簇中一个单独的分支。

引物 P1 和 P2 扩增产物 DGGE 分析得出的结论基本一致,但由于两套引物的扩增产物是包含不同高变区的大小不同的片段,从而同一样品不同扩增产物的 DGGE 条带数目并不完全相同。

3 结论

DGGE 已被证明是检测微生物多样性的一种快速可靠的方法^[3,5,9],其带谱中条带的数量和亮度,可相应地反应出环境样品中微生物物种的数量和优势菌群。我们对不同性质、不同温度的环境样品进行 DGGE 和聚类分析的结果表明,高温热泉中的菌藻席和泉底沉积物都具有比较丰富的细菌多样性,都存在 20 个以上的可能的细菌类群。菌藻席和泉底沉积物在细菌物种组成上差异显著。并且一些关键的生态因子,如阴阳离子、氧气、温度等会对群落中微生物的物种组成有很大影响。

当然,要真正清楚环境中微生物群落的真实状况,仅凭 DGGE 分析是不够的,由于 DGGE 的一些缺陷,如嵌合体、多操纵子、共迁移、异源双链体等会导致结果产生偏差^[5,9]。需要与其它方法如纯培养、克隆、原位杂交等结合使用,才能客观地从不同方面反应环境样中微生物多样性的信息^[9,10]。

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.* Appl Environ Microbiol, 1998, **62**: 1353 ~ 1370.
- [3] Viggó T M, Kristjánsson J K, Kristmannsdóttir H, *et al.* Appl Environ Microbiol, 2001, **67**: 827 ~ 833.
- [4] Muyzer G, E C de Waal A G. Appl Environ Microbiol, 1993, **59**: 695 ~ 700.
- [5] Gelsomino A, Keijzer-Wolters A C, Elsas J D, *et al.* Journal of Microbiological Methods, 1999, **38**: 1 ~ 15.
- [6] Yanfen X, Yi X, Ying L, *et al.* IJSEM, 2001, **51**: 1335 ~ 1341.
- [7] 王涛, 柴丽红, 崔晓龙, 等. 微生物学报, 2003, **43** (5): 541 ~ 546.
- [8] 王涛, 柴丽红, 郭春雷, 等. 生物技术, 2003, **13** (1): 17 ~ 18.
- [9] Head I M, Saunders J R, Pickup R W. Microbial Ecology, 1998, **35**: 1 ~ 21.
- [10] Amann R, Ludwig I W, Schleifer K H. Microbiol Rev, 1995, **59**: 143 ~ 169.