

中国东海海洋微生物种群多样性初步研究

宋志刚² 许强芝¹ 鲁心安² 焦炳华^{1*} 艾峰¹

(第二军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室 上海 200433)¹

(华东师范大学生命科学学院 上海 200062)²

摘要: 以东海海洋微生物群落为研究对象, 用稀释平板分离法, 从海泥和海水得到 542 株分离物。随机选取 58 株发酵培养, 将所有发酵菌株的 16S rDNA 基因扩增, 并用限制性内切酶 *Hinf*I 对 PCR 产物进行 ARDRA (Amplified rDNA restriction analysis) 多态性分析, 共得到 16 种不同的操作分类单元 (Operational Taxonomic Unit, OTU)。其中 OTU5 和 OTU7 所包含的菌株分别占总分离物的 32.7% 和 19.0%, 为优势分离物。优势分离物的 ERIC-PCR 基因组指纹图分析表明, 前者的 19 株分离物共有 12 种不同的指纹图类型, 而后的 11 株分离物有 4 种。结果显示, 东海海域的海水和底泥具有明显的微生物种群多样性特征。

关键词: 海洋微生物, 种群多样性, ARDRA, ERIC-PCR

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 01-0063-06

A Primary Study on Population Biodiversity of Marine Microorganisms from East China Sea

SONG Zhi-Gang² XU Qiang-Zhi¹ LU Xin-An² JIAO Bing-Hua^{1*}

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433)¹

(School of Life Science East China Normal University, Shanghai 200062)²

Abstract: Marine bacteria from the samples of sea sediments and seawater were directly plated on isolation media and the biodiversity of isolates was examined with DNA fingerprinting. 542 single colonies were obtained from the media. ARDRA with enzyme *Hinf*I revealed 16 operational taxonomic units (OTU) which were dominated by OTU5 group which accounts for 19 isolates, and OTU7 group which accounts for 11 isolates. The biodiversity of isolates from these two dominant OTU groups was further investigated by a genomic fingerprinting technique, ERIC-PCR. The results indicated that there were 12 different ERIC-PCR types present among the OTU5 group while only 4 among the OTU7. The data indicated rich diversity profiles of marine microorganisms were presented in the East China Sea.

Key words: Marine microorganisms, Population diversity, ARDRA, ERIC-PCR

近年来随着分子生物学的发展, 分子生物学方法逐渐被应用在对微生物多样性研究中^[1], 并已经形成一个新兴的学科分支——微生物分子生态学。在研究微生物群落生态学时, 微生物的纯培养与微生物分子生态学能够相互促进, 相互补充, 从而加深对微生物的研究, 因此建立一类把分离培养技术和分子生态学手段相结合的方法, 对检测具有特定生态功能的细菌种群的多样性以及研究微生物与环境之间的关系有重要的意义。Tabacchioni 等^[2] 人曾用纯培养的方法从玉米根部分离了大量菌株, 然后用 ARDRA (Amplified ribosomal DNA restriction analysis) 的方法从中鉴定出 83 株菌株属于

* 通讯作者 Tel: 021-25070306, E-mail: Jiaobh@uninet.com.cn

作者还有: 杨好¹ 刘小宇¹ 施晓琼¹

收稿日期: 2005-04-12, 修回日期: 2005-05-30

Burkholderia cepacia, 进一步用 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 指纹图分析技术来分析这些菌株的遗传多样性, 发现 *B. cepacia* 属于种内变异相当大的一个种。赵立平等^[3] 人曾分离出焦化废水处理系统中的细菌, 利用 16S rDNA 的 PCR 产物进行 ARDRA 多态性分析和 ERIC-PCR 基因组指纹图谱分析来研究细菌种群的多样性。这种基于 PCR 的技术已成功应用于微生物群落的种群进行遗传多样性的研究。

地球上辽阔的海域孕育了丰富的海洋微生物资源。中国东海独特的海洋环境蕴藏着丰富的微生物资源, 这些资源有待去大规模开发利用, 而对海洋微生物资源的调查对今后开发微生物资源具有重要的指导意义。本实验以我国东海海水和海泥中的微生物群落为研究对象, 通过平板稀释分离和分子生物学相结合的手段, 评估海洋中的微生物种群多样性, 为东海微生物资源的利用和开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2004年4月10日至5月10日从我国东海海域(离海岸线约30公里)采集海洋泥样5份、水样2份。样品在-20℃冰箱中保存, 直到使用。

1.2 培养基与试剂

培养基: 葡萄糖 5 g, 蛋白胨 4 g, 酵母膏 5 g, 牛肉膏 4 g, 人工海水^[4] 定容至 1,000 mL, pH 6.0~6.5。固体平板培养基: 上述配方中加入琼脂 20 g。

限制性内切酶、PCR 试剂等均购自 TaKaRa 公司; 其他试剂购自中国医药(集团)上海化学试剂公司。

1.3 微生物的分离和纯化

海水样品: 取海水样品 1 mL 和无菌人工海水 9 mL, 震荡混匀, 制成 10^{-1} 稀释液, 进一步稀释为 10^{-2} ~ 10^{-5} 浓度梯度液, 每个梯度取 100 μ L 稀释液接种在固体培养基平板上, 在 25℃ 恒温生化培养箱里培养。根据肉眼观察, 将所有单菌落分别转接划线在相同培养基平板上, 分离纯化。挑出单菌落、接种在固体培养基上, 置于 25℃ 下继续培养 3~7 d。

海泥样品: 称取 5 g 海泥, 加入 45 mL 无菌海水, 激烈振荡 1 min 至混合均匀, 静置 30 min。取上清液逐级稀释为 10^{-2} ~ 10^{-5} 浓度, 每个梯度取 100 μ L 上清液接种在固体培养基平板上, 在 25℃ 恒温生化培养箱里培养。分离纯化菌株的方法与海水样品分离相同。

1.4 单菌落的发酵培养

将分离到的单菌落接种在液体培养基中, 25℃ 条件下, 130 r/min 摇床培养 48 h。4,000 r/min 离心 5 min 收集菌体, -20℃ 冰箱储存中备用。

1.5 DNA 提取

根据徐平^[5] 等的微波炉法提取基因组 DNA。

制得的 DNA 即可作为 PCR 模板, 将其储存于 4℃ 冰箱中备用。

1.6 16S rDNA 扩增

16S rDNA 扩增引物: 正向引物 Primer A (对应于 *E. coli* 的 16S rDNA 5'端 8~271 位置): 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 反向引物为 Primer B (对应于 *E. coli* 的 16S rDNA 5'端 1523~1504r 位置): 5'-TTAAGGATGGTGATGCCGCA-3'。PCR 扩增条件: 95℃ 预变性 5 min, 然后 95℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 3 min 共 30 个循环, 再 72℃ 后延伸 5 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测: 点样量为 5 μ L。

1.7 ARDRA 分析

取 5 μ L 的 16S rDNA 的 PCR 产物, 分别加入 1 μ L *Hinf* I、2 μ L 相应的 10 \times Buffer 和

12 μ L 去离子水, 使反应体系为 20 μ L。37 $^{\circ}$ C 恒温 2~3 h。酶切产物用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.8 ERIC-PCR 分析

ERIC 特异性引物序列^[6]: 引物 1 3'-CACTTAGGGGTCCTCGAATGTA-5'; 引物 2 5'-AAGTAAGT GACTGGGGTGAGCG-3'。PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 7 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 52 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 最后延伸 10 min。

PCR 产物用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 用天能凝胶图像分析仪照相。

2 结果与分析

2.1 DNA 的提取和 PCR 扩增

将从样品中提取的总 DNA 进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 在 20 kb 左右出现条带 (如图 1A), 表明已获得较为完整的微生物的全部基因组的 DNA。提取出的基因组 DNA 经过用 16S rRNA 引物 PCR 后, 均获得了特异扩增片段, 扩增片断约 1, 500 bp 左右, 此片断为 16S rDNA 基因的全序列扩增 (如图 1B)。图 1 显示了一个样品的总 DNA 和 16S rDNA 基因的扩增产物。

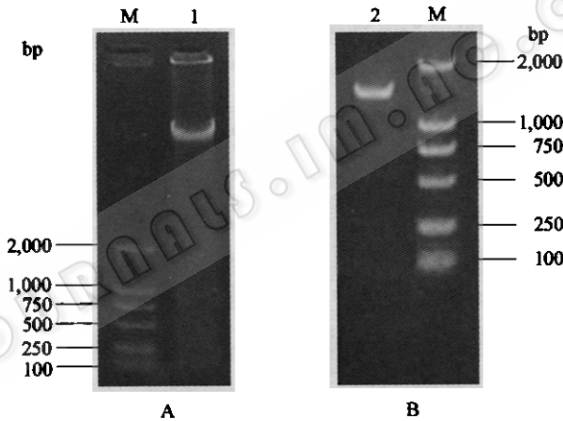


图 1 (A 和 B) 细菌基因组 DNA 和 16S rDNA 的 PCR 产物

M DL2000 marker, Lane 1 Genome DNA, Lane 2 PCR product of 16S rDNA

2.2 ARDRA 分析

选取 10^{-3} 稀释度平板, 挑取平板上形态差别较大的菌落分别划线分离纯化。从培养基平板上获得了 542 个单克隆菌落。从这些纯化的菌株中随机选取 58 个单克隆菌落分别接种在液体培养基摇床培养, 提取的基因组 DNA 扩增 16S rDNA。用限制性内切酶 *Hinf*I 对 PCR 产物进行 ARDRA 多态性分析, 其结果如图 2A、B, 共得到了 12 种不同的 ARDRA 图谱类型。

有研究表明^[7] 16S rRNA 基因序列的 ARDRA 分析可以区分出菌种 (species), 每一个菌种都有一个独特的酶切图谱, 每种代表一个操作分类单位 (Operational Taxonomic Unit, OTU)。用这种方法显示的 OTUs 多样性可用以评估微生物群落中的最低限度的细菌种的数目。本研究中, 随机挑选的这 58 株菌至少有 12 个不同的细菌菌群, 把他们称为 12 个 OTUs。不同的 OTU 菌株数目差别很大, OTU1、OTU9、OTU10 和 OTU12 每个种群只有一个菌株; 其次是 OTU2、OTU8 和 OTU11, 分别有 2、3、3 株菌; 数目较多

的是 OTU3、OTU4 和 OTU6 分别有 5、6、5 株；这 10 个 OTUs 是稀有种群，菌株总数为 28 株，仅仅占菌株总数的 48.3%。而在所有菌株中占优势性的种群是 OTU5 和 OTU7，分别有 19 和 11 个菌株。OTU5 达到了菌株总数的 32.7%，其次是 OTU7，占 19.0%。这说明 OTU5 和 OTU7 是分离的菌落中占优势的两个主要的细菌类群。

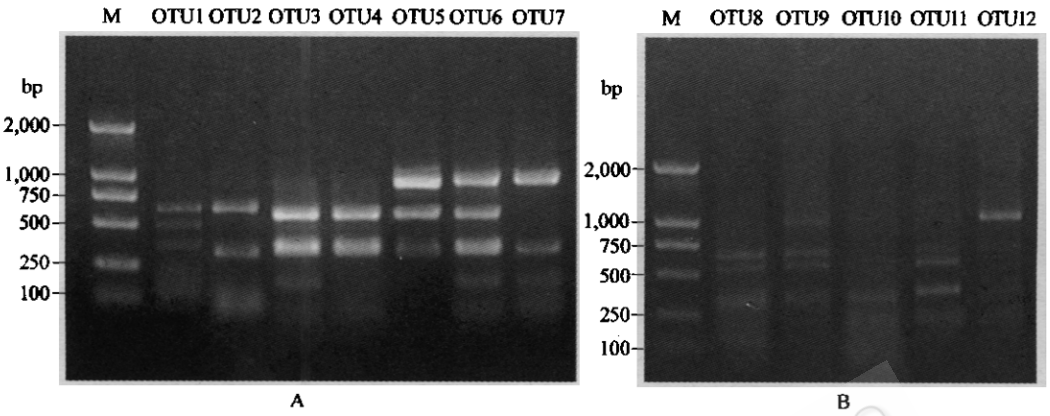


图 2 (A 和 B) *Hinf* I 酶切 58 株细菌的 16S rDNA PCR 产物后的 ARDRA 类型
M DL2000 marker, Lane 1 ~ 12 ARDRA patterns of strains isolated from medium

2.3 种群多样性分析

用 ARDRA 方法将纯化的菌株分成 12 个操作分类单元后，将优势种群 OTU7 和 OTU5 的菌株进一步通过 ERIC-PCR 指纹图的方法在菌株水平上分析其遗传多样性。结果前者的 19 株优势菌株显示出了 12 种不同的指纹图谱（如图 3A 和 B 泳道 1 ~ 12）；而后者的 11 株菌显示出 4 种不同的指纹图谱（如图 3B 泳道 13 ~ 16）。这一结果表明 OTU7 分类单元是多样性比较丰富的种群，19 菌株中有 11 个不同的菌种；而 OTU5 菌株也有 11 个，但是它的菌株数目相对较少只有 4 个不同的菌株。

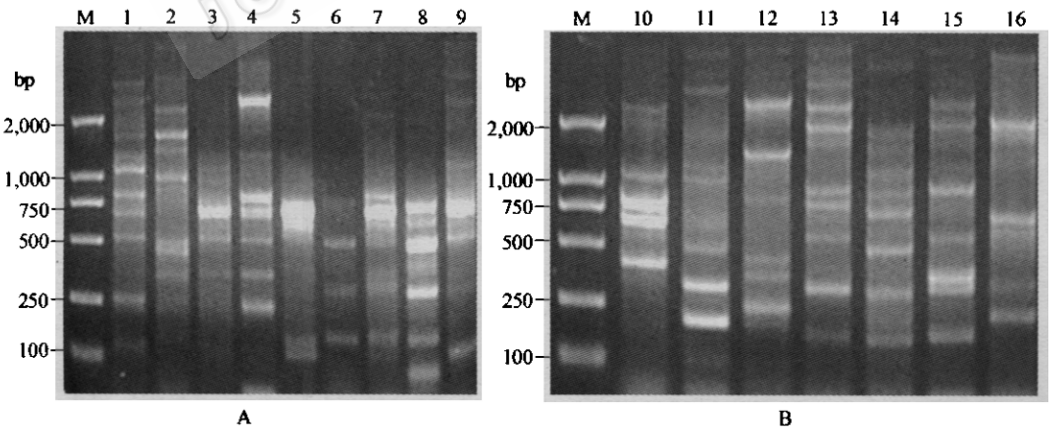


图 3 (A 和 B) OTU7 和 OTU5 不同菌株 ERIC - PCR 指纹分析凝胶图

M DL2000 marker, Lane 1 ~ 12 Unique ERIC-PCR patterns of strains obtained from OTU7, Lane 13 ~ 16 Unique ERIC-PCR patterns of strains obtained from OTU5

据报道^[6]，利用 ERIC 保守序列设计的引物对细菌 DNA 进行 PCR 扩增，可以得到反映细菌基因组结构特征的谱带，由此可在亚种和菌株水平鉴定细菌，每一种带型代表一种类型的菌株或者是菌株的一个亚型。在这些考察的 30 个菌株中，显示了 16 个不同的菌

种,多样性占到了53%,所以可以看出海洋微生物种群的具有很明显多样性特征。

3 讨论

本实验样品是从东经120°45'22"、122°40'48",北纬27°15'50"、31°24'7"组成的东海海域内采集的。采集地点位于潮间带以外,离海岸线约30海里。由于采集的地点远离陆地,从而确保分离到的微生物是真正的海洋微生物。哪些海洋微生物才能被认为是真正来自海洋,这个问题一直是海洋微生物研究的一个难题。海洋中的细菌有两个来源,一是真正的海洋微生物,二是陆地上的微生物适应了海洋环境,这类微生物来源于陆地,进入海洋环境后逐渐适应了海洋环境,因而可以在海水中生存,它们本质上不是海洋微生物^[8]。从接近海岸线的海域采集的样品容易被这类陆生微生物污染,所以本实验的样品减少了这类微生物污染的可能性,得到的菌株可靠性高。

目前有许多研究表明,ARDRA可用来估计分离物中存在的最低限度的细菌种的数量^[7]。进行ARDRA分析时,我们从542个分离菌落中随机挑选了58个克隆,然后用HinfI对其16S rDNA-PCR产物进行了多态性分析,结果分成了12个OTUs,OTUs数是所占全部克隆的20.7%。从这些数据可以看出:①本实验每分离得到5株分离物就是一个菌种,挑选的58个单克隆中至少有12种细菌;②OTUs相对较少,考虑到仅对好氧微生物进行培养,又是只用一种培养基上分离纯化菌株,可以培养的菌株数目可能较少;如果在多种条件下,利用多种培养基来培养细菌,应该能得到更多的OTUs。

ERIC-PCR得到的DNA条带特征可以反映出细菌整个基因组结构的差异,具有很强的鉴别亚种和菌株的能力^[6]。通过ERIC-PCR遗传指纹图对海洋细菌的多样性进行研究。发现菌落数目最多的OTU5操作单元19株分离物得到了12个遗传指纹图谱,而OTU7的11株分离物仅显示了4个不同的遗传指纹图谱。这两个优势分离物中的菌株数目分别是12株和4株,占到了分离物总数的63.2%和36.4%。OTU7的菌株数量较多,细菌的种类相对较少;而OTU5不但细菌数目多,细菌的种类也丰富,种群多样性明显。

ARDRA多态性结合ERIC-PCR遗传指纹图分析显示,58株分离物有12个不同的OTUs,这些细菌在种属水平上完全不同,所以东海海域的微生物群落具有种群多样性;另外OTU5这个优势分离物中的菌株种类又有12种,说明菌种中同样存在菌株的多样性,显然,我国东海海域的海洋微生物无论是菌种还是在同一个菌种的菌株层次上都具有生物多样性。这些细菌仅仅是可以在这一种分离培养基上培养出来的,大量的微生物可能不能培养,在这些未知种群中,蕴藏着目前还无法估量的资源。因此,进一步研究中国东海微生物,加强微生物多样性的研究,将进一步丰富我们对海洋微生物多样性的认识,为我们利用这些特殊的微生物资源奠定基础。

参考文献

- [1] Amann R, Ludwig W. FEMS Microbiol Rev, 2000, 24 (5): 555~565.
- [2] Tabacchioni S, Chiarini L, Bevivino A C, et al. Microbial Ecol, 2000, 40 (3): 169~176.
- [3] 陈敏, 赵立平. 微生物学报, 2003, 43 (3): 366~371.
- [4] 张士催, 马军荣, 范晓. 海洋生物技术原理和应用. 北京: 海洋出版社, 1997.
- [5] 徐平, 李文均, 徐丽华, 等. 微生物学通报, 2003, 30 (4): 82~84.
- [6] 赵立平, 肖虹, 李艳琴, 等. 应用与环境生物学报, 1999, 5 (suppl): 30~33.
- [7] Dunbar J, White S, Forney L. Appl Environ Microbiol, 1997, 63 (4): 1326~1331.
- [8] MacLeod R A. Bacteriol Rev, 1965, 29: 9~23.