

南海北部陆坡深水区沉积物细菌多样性调查

王 鹏,李 涛

(同济大学 海洋地质国家重点实验室,上海 200092)

摘要: 采用分子生物学手段,调查南海北部陆坡深水区沉积物细菌多样性。分析表明其细菌分成 5 个类群,变形细菌门(Proteobacteria),厚壁菌门(Firmicutes),浮霉菌门(Planctomycetes),拟杆菌门(Cytophaga/ Flexibacteria/ Bacteroides,简称 CFB)及脱铁杆菌门(Deferribacteres)。分别占总体的 34%,38%,18%,4%,6%。其中 60% 以上的克隆子与硫代谢相关,20% 克隆子最相近序列来自于油污污染环境,说明硫代谢是该区域物质代谢的重要组成,同时该区域有油气渗透的烃类物质存在并影响着该区域的微生物群落结构。

关键词: 南海北部陆坡;细菌多样性;微生物勘探
中图分类号: Q938.1 **文献标识码:** A

文章编号: 1000-3096(2008)04-0036-04

微生物作用与油气资源的生成、聚集、储存、勘探等各个环节都有密切联系。微生物作用使沉积物中有机质向利于生烃的物质转化,同时对有机物的保存与富集有积极作用^[1],研究微生物与油气资源的关系,并根据微生物的特点开发油气资源已成为必然趋势,但目前微生物石油研究多集中于陆地和浅水区域。自 20 世纪 70 年代末期以来,随着美国墨西哥湾、巴西坎皮斯盆地和西非等深水油气勘探不断获得成功,深水勘探在全球蓬勃发展起来,深水微生物勘探与开发也开始起步^[2]。

南海是西太平洋最大的一个边缘海,其北部陆坡深水区处于陆、洋过渡带上,具有较好的石油形成和储藏条件,广州海洋地质调查局 1999~2000 年在对西沙海槽区以及北部陆坡区的初步调查中发现了“拟海底反射层”(Bottom Simulating Reflector,简称 BSR),证明这些地区可能存在大面积天然气水合物,其油气勘探属于前瞻性研究区域^[3]。作者选择高质量的南海西沙海槽沉积物样品,分析该地区的细菌多样性并初步分析这些微生物可能的生物地球化学作用,为深水区油气资源微生物勘探研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

作者研究的样品于 2005 年中、法联合 IMAG-ES147 航次(MARCO 航段)中,在南海北部陆坡(17°57.70'N,114°57.33'E)由无扰动箱式取样器采集,水深 3 697 m。样品的采集过程保证无菌操作,采集后立即放置在 -20℃ 冰箱中,运回实验室后保存于 -80℃。样品位于海底表层以下 2 m 左右,位于浊流层上面,岩性为灰绿色沙质黏土。

1.2 总 DNA 的提取与纯化

沉积物样品中总 DNA 提取采用 SDS-CTAB 抽提法^[4]。粗提的 DNA 用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒(上海生工)纯化,按照说明书操作。

1.3 16S rDNA PCR 扩增

利用细菌 16S rDNA 的特异引物(27F: A GA GTT TGA TCM TGG CTC AG;1492R: GGT TAC CTT GTT ACG ACT T;M 为 A 或 C)^[5],以纯化后的总 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应在 Biomatro T3 扩增仪上进行,反应体系为 50 μL,PCR 原液组成为: 10 ×PCR 扩增缓冲液 5 μL, dNTPs 4 μL (dATP、dGTP、dCTP、dTTP 均为 25 mmol/L),两种引物各 1 μL (6 μmol/L),Taq 聚合酶 1U,以及适量 DNA 扩增模板。PCR 反应条件为 95℃ 变性 3 min,然后 94℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 1 min,循环 30 次;最后 72℃ 延伸 10 min。

1.4 16S rDNA 文库的构建及限制性内切酶片段长度多态性(RFLP)分析

利用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒(上海生工)纯化回收深海 DNA 样品中扩增出来的细菌 16S rDNA 产物,将回收得到的产物克隆到 Takara 公司 PMD-18T 载体上,并转化到 DH5 感受态细胞

收稿日期:2007-09-29;修回日期:2008-02-04

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目(2007CB815904);国家自然科学基金资助项目(40606032);国家“十一五”大洋专项基金资助项目(DYXM-115-02-2-17);同济大学青年优秀人才培养行动计划资助项目(2006 KJ056)

作者简介:王鹏(1978-),女,山东德州人,讲师,博士,主要从事海洋微生物研究工作,电话:021-65982012, E-mail: pengwang@mail.tongji.edu.cn

中,涂布接种于含有 X-gal 和氨苄青霉素的 LB 培养基上,37 °C 培养 20 h 左右,利用蓝白筛选初筛出所有的白色克隆子,采用通用引物 T7,Sp6 进行菌落 PCR 再次鉴定筛选出所有阳性克隆子。在各个阳性克隆子的细菌 16S rDNA PCR 扩增产物中加入 2 倍体积的 100%乙醇和终浓度为 2.5 mol/L 的乙酸铵溶液,将离心纯化回收得到的细菌 16S rDNA 溶于适量无菌水中,加入过量的识别位点为 4 bp 的限制性内切酶 Msp I(购自 TaKaRa),在 37 °C 进行 8 h 以上的酶切反应,使之完全酶解,然后在 3%的琼脂糖胶(购自 BIOWEST)上进行电泳,分析样品中所含细菌的类型和异同。

1.5 16S rDNA 序列测定与系统发生分析

根据 RFLP 分析结果,部分阳性克隆中细菌 16S rDNA 序列由南方基因公司测定,所得序列在核糖体数据库计划(Ribosomal Database Project,简称 RDP)中先利用嵌合序列去除程序(CHECK-CHIMERA, Maidak et al., 2000)进行序列有效性验证,剔除无用序列,将剩余序列进行序列配对分析(SEQUENCE-MATCH),找出 RDP 库中相关序列;同时在 NCBI 上利用 Blast 程序(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)搜索美国国立生物技术信息中心建立

表 1 南海北部陆坡细菌 16S rDNA 克隆子亲缘关系

Tab. 1 Phylogenetic affiliation of bacterial 16S rDNA clones from northern slope of the South China Sea

克隆子编号	进化关系最近的细菌	来源	相似性 (%)	克隆子数 (个)
- Proteobacteria				
E02-24	<i>Ralstonia</i> sp. C1, A Y479983	废弃核反应堆	99	2
- Proteobacteria				
5E02-2	Sulfate-reducing bacterium mXyS1, AJ006853	北海油轮油箱水相	82	5
E602-28	Delta proteobacterium EbS7, AJ430774	Guaymas 盆地沉积物	89	6
E02-36	<i>Desulfomonile limimaris</i> , AF230531	Breeze 海湾沉积物	82	4
Firmicutes				
E02-3	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i> , AF209708	腾冲热泉	79	2
E02-7	<i>Desulfosporosinus</i> sp. S7, AF076244	被汽油污染的蓄水层	78	5
E02-8	<i>Desulfitibacter alkalitolerans</i> , A Y538171	生物腐蚀的热电厂反应堆	81	3
E02-11	<i>Desulfotomaculum kuznetsovii</i> , A Y036903	海底沉积物	82	4
E02-47	<i>Desulfitibacter alkalitolerans</i> , A Y538171	生物腐蚀的热电厂反应堆	82	2
E02-20	<i>Desulfosporosinus</i> sp. A10, AJ582756	污水处理厂污泥	84	3
Planctomycetes				
E02-12, 23, 37	Planctomycetales bacterium Ellin7244, A Y673410	南澳洲红壤	83	3
E02-15	Planctomycetales bacterium Ellin7244, A Y673410	南澳洲红壤	84	2
E02-32, 42	Planctomycetales bacterium Ellin7244, A Y673410	南澳洲红壤	81	2
E02-43	Anaerobic ammonium-oxidizing planctomycete KOLL2a, AJ250882	污水处理转盘	81	2
Flavobacteriaceae				
E02-4	<i>Flavobacterium ferrugineum</i> , AM230484	冰冻食品	91	2
Deferribacteres				
E02-26	<i>Caldothrix abyssi</i> LF13T	大西洋洋中脊	84	3

的核酸蛋白序列数据库 GenBank、欧洲分子生物学实验室数据库(EMBL)和日本的 DNA 数据库(DD-BJ)上所有的相关序列,确定样品中所含细菌所属的种类范畴;结合这两部分搜索结果,挑选其中的部分序列,利用 DNAMAN (version 5.1, Lynnon Bio-Soft)软件进行分析,利用邻接法(Neighbor-joining method)构建了系统发育树。

2 结果与分析

2.1 细菌 16S rDNA 文库的构建和 16S rDNA 的 RFLP 分析

将所有阳性克隆子置于新鲜 LB(Amp⁺)平板上培养,再以液体 LB 培养至对数生长期后,将上述所有克隆子保种,存放于 -70 °C 备用,构建了南海西沙海槽沉积物样品中的细菌 16S rDNA 文库。挑取阳性克隆子 50 个进行 RFLP 分析,共得到 19 个谱型。19 个谱型的代表克隆子测序后,将这 19 个序列与 RDP 库中所有已收集的细菌 rDNA 序列进行序列配对分析,寻找同源性较高的序列进行对比,克隆子 16S rDNA 序列与最近的菌株的同源性在 78%~99%之间(表 1)。

2.2 细菌 16S rDNA 的序列测定和系统进化分析

19 个代表克隆子序列中去除同源性 99% 以上的克隆子序列,将剩余的 16 个克隆子序列结合在 Gene Bank、EMBL、DDBJ 和 RDP 中的搜索结果,利用 DNAMAN 中相关分析软件构建了系统进化树(图 1)。分析表明该海区次表层沉积物中细菌种群包括浮霉菌门,革兰氏阳性菌类群厚壁菌门、变形杆菌门的 γ -、 β -亚群等。综合 RFLP 分析结果与测序结果,变形杆菌门占 34%,厚壁菌门占 38%,浮霉菌门

占 18%,余下 10%克隆子属于拟杆菌门及脱铁杆菌门。在变形杆菌门中, β -亚群占有绝对优势,达到 88%。以往研究表明变形杆菌门是深海沉积物中的主要细菌类群,其中 β -亚群的细菌多数与物质代谢尤其是硫代谢相关,主要存在于冷泉、热液区域^[6-8],该区域存在相对丰富的 β -亚群,同时在厚壁菌门中,有约 90%的克隆子与硫代谢相关,说明硫代谢是该区域物质代谢的重要组成。20%(E02-2, E02-7)的克隆子的相似序列来自于油污染的水相或者天然气水合物区,说明该区域中可能有烃类物质代谢。

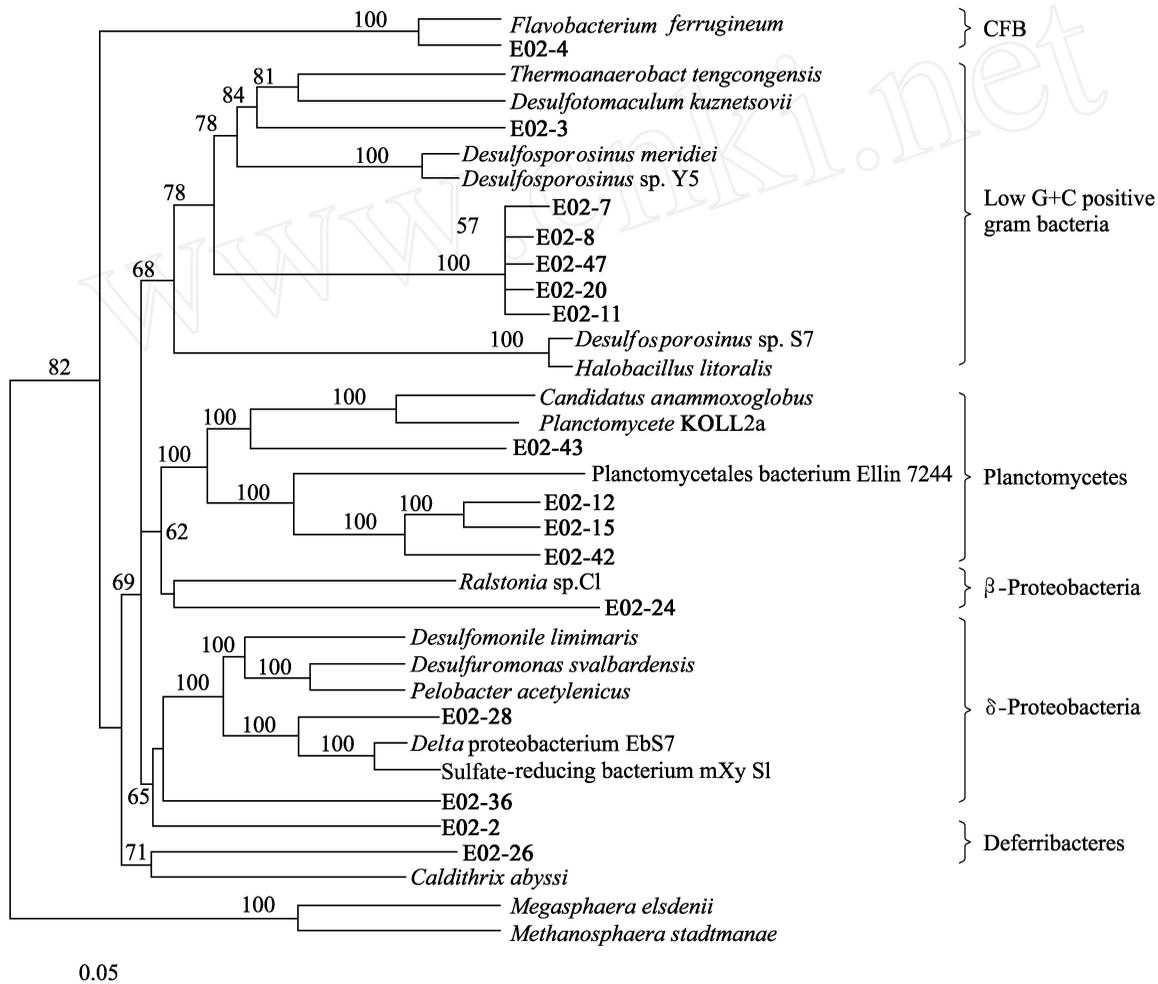


图 1 南海北部陆坡细菌 16S rDNA 系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of bacterial 16S rDNA clones from northern slope of South China Sea

本研究序列以“E02-XX”命名

“E02-XX” is sequence name in this paper

3 讨论

微生物勘探就是不同地区取土样,通过分析微生物种类及数量来推测该区是否有油气藏存在^[9]。该技术作为钻井勘探前期的辅助手段,特点

是成本低,操作方便。中国曾成功地在东海实行微生物勘探,但是对于深水区的微生物勘探研究刚刚开始。选择南海北部深水区陆坡浊流沉积丰富的海域作为研究区域,浊积砂体作为油气重要的储集层,是继三角洲之后又一找油的重要领域^[10]。本研究采

用浊流沉积上层沉积物作为研究样品调查其细菌多样性。结果显示超过 60 % 的克隆子与硫、氮的代谢相关,以往研究表明烃类物质的生成、储藏及降解都与微生物的各种物质代谢相关;同时与油气污染相关的序列也在本研究中检测到;结合以往的北部陆坡地球物理调查结果^[2,11],推测该区域可能有油气藏的组分渗透,并影响着该区域沉积物细菌的群落结构。本研究采用分子生物学手段分析南海深水区浊流沉积丰富区域细菌群落结构并做出初步推测,为今后中国深水区微生物勘探研究提供尝试性资料。

参考文献:

- [1] 王万春,陶明信. 地质微生物与油气资源[J]. 地质通报, 2005, 24(10): 1 022-1 026.
- [2] 陶维祥,赵志刚,何仕斌,等. 南海北部深水西区石油地质特征及勘探前景[J]. 地球学报, 2005, 26(4): 359-364.
- [3] 王宏斌,梁劲,龚跃华,等. 基于天然气水合物地震数据计算南海北部陆坡海底热流[J]. 现代地质, 2005, 19(1): 67-73.
- [4] Peng W, Fengping W, Meixiang X, *et al.* Molecular phylogeny of methyloproteobacteria in a deep-sea sediment from a tropical west pacific warm pool[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2004, 47:77-84.
- [5] DeLong E F. Archaea in coastal marine environments [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 5 685-5 689.
- [6] Ravenschlag K, Sahm K, Pernthaler J, *et al.* High bacterial diversity in permanently cold marine sediments [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(3): 3 982-3 989.
- [7] Inagaki F, Sakihama Y, Inoue A, *et al.* Molecular phylogenetic analyses of reverse transcribed bacterial rRNA obtained from deep-sea cold seep sediment [J]. *Environ Microbiol*, 2002, 4: 277-286.
- [8] Zeng R, Zhao J, Zhang R, *et al.* Bacterial community in sediment from the western pacific "warm pool" and its relationship to environment [J]. *Science in China Ser D Earth Sciences*, 2005, 48(2): 282-290.
- [9] 梅博文,袁志华. 地质微生物技术在油气勘探开发中的应用[J]. 天然气地球科学, 2004, 15(2): 156-161.
- [10] 饶孟余,钟建华,赵志根,等. 浊流沉积研究综述和展望[J]. 煤田地质与勘探, 2004, 32(6): 1-5.
- [11] 陈忠,颜文,陈木宏,等. 南海北部大陆坡冷泉碳酸盐结核的发现:海底天然气渗漏活动的新证据[J]. 科学通报, 2006, 51(9): 1 065-1 072.

Phylogenetic analysis of bacterial community in deep-sea sediment from northern slope of the South China Sea

WANG Peng, LI Tao

(State Key Laboratory of Marine Geology, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Received: Sep. , 29, 2007

Key words: northern slope of the South China Sea; bacterial diversity; microbial prospecting

Abstract: The bacterial community in one deep-sea sediment sample from northern slope of the South China Sea was investigated by molecular methods. A phylogenetic analysis revealed that the bacterial population was composed of 5 major lineages of the domain bacteria, Proteobacteria (34%), Firmicutes (38%), Planctomycetes (18%), Cytophaga-Flexibacteria-Bacteroides (CFB) (4%) and Deferribacteres (6%). Over 60% clones were related with metabolism of sulfur, indicating the important role of sulfur cycle in this area. 20% clones show high similarity with clones from an environment impacted by gasoline, indicating the existence of hydrocarbon from petroleum resources.

(本文编辑:谭雪静)