

3 株深海细菌的生理及分子生物学鉴定

侯兆君¹, 张 明², 蒋富清³, 张宝玉³

(1. 天津科技大学, 天津 300457; 2. 安徽省肥西县城建环保局, 安徽 肥西 231200; 3. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071)

摘要: 从西菲律宾海底 4 954 m 深的沉积物中分离到一批深海细菌, 对其中编号为 B2、B5、B6 的 3 株细菌进行了生理、光学显微镜和扫描电镜观察, 并且进行了分子水平鉴定。菌落呈圆球形, 光滑, 3 株菌均带有颜色, B6 菌呈乳白色, B2 和 B5 菌分别呈现鲜艳的橙色和红色。扫描电镜观察表明 B2 和 B6 呈杆状, 但 B6 菌外面覆有鞘膜, B5 菌呈球状。生理实验表明, 3 株菌温度生长范围在 37℃ 以下, 最适生长温度分别为 20、28、28℃, 属于耐冷菌范畴。pH 耐受范围为 6~14, 最适 pH 分别为 8、8、12。3 株细菌 16S rRNA 基因序列同源性分析表明, 它们分属于芽孢杆菌(*Bacillus*)、节杆菌(*Arthrobacter*)、蛋白菌(*Acinetobacter*) 3 个不同的菌属。

关键词: 深海细菌; 电镜; 16S rDNA

中图分类号: Q93.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2013)03-0011-06

海底沉积物和上部洋壳构成了海底深部生物圈, 蕴藏着丰富的物种资源。海底深部生物圈微生物的研究已成为 21 世纪海洋领域地学和生物学综合研究的一个生长点, 显示出旺盛的生命力和发展应用前景。

海底深部生物圈为极端环境, 是嗜冷、嗜热、嗜压、嗜酸、嗜碱、嗜盐或嗜低营养等极端环境微生物的理想来源。由于不同的生长特性, 传统的菌种鉴定方法很难进行。即使参照传统方法对一些深海细菌进行鉴定, 其结果也并非与手册中描述相符合, 往往存在一定差异^[1-3]。或者有些细菌在不同培养条件下形态多变, 甚至在同一培养条件下菌落形态也不稳定。因此迫切需要建立一些简单、方便、易于操作的鉴定方法对深海微生物进行分析, 为深海微生物资源的开发利用奠定基础。

目前 16S rRNA 基因无论在高等生物, 还是在原核生物鉴定中的应用证实其已成为属间、种间分类研究中最常用也是最有效的分子指标, 被广泛地应用于各种微生物的遗传特性和分子差异的研究^[4], 同时国际上也建立了多个微生物 16S rRNA 序列数据库, 成为对微生物鉴定分类非常有用的参照系统。通过对未知微生物 16S rRNA 基因序列的测定和比较分析, 可以快速有效地对其进行鉴定。

作者从西菲律宾海底 4 954 m 深的沉积物中分

离到一批细菌, 其最适生长温度均低于 37℃。本文结合生理、电镜及分子生物学方法即应用 16S rRNA 基因作为分子指标对这些细菌进行分类鉴定, 并对其系统进化情况进行了分析。

1 材料与方法

1.1 菌株与培养基

菌株 B2, B5, B6(暂定名)分离自水深 4 954 m 处的深海底泥中。2216E 培养基: 酵母膏 0.1%, 蛋白胨 0.5%, Fe₄(PO₄)₃ 0.005%, 琼脂 1.5%, 加入过滤后的自然海水配制, pH 7.2~8.0。

1.2 菌株的分离与形态观察

首先用无菌刀片将冰冻的泥样上层削去, 用酒精灯灼烧该刀片, 冷却后用刀尖取少许泥样于无菌液体培养基, 上述培养液在 4℃ 培养 7~10 d, 转接相应的固体培养基, 培养观察是否有菌落生成, 菌落形态用光学显微镜和 KYKY2008B 扫描电镜观察。

收稿日期: 2012-08-10; 修回日期: 2012-11-12

基金项目: 科技部国家科技基础性工作专项(2012FY112900-01); 天津市科技兴海项目(KX2010-005); 中科院院先导项目(XDA0530401)

作者简介: 侯兆君(1988-), 男, 内蒙古乌兰浩特人, 硕士研究生, 研究方向: 藻类分子生物学; 电话: 15391081010, E-mail: houzhaojun824@126.com;

张明与侯兆君对本文贡献相同; 张宝玉, 通信作者, E-mail: byzhang@adio.ac.cn

1.3 菌株的最适生长条件测定

1.3.1 耐盐性与需盐性

测定方法参照常见细菌系统鉴定手册^[5]。

1.3.2 最适生长温度的测定

单菌于 17 ± 1 左右培养至指数生长期, 然后接种于 10 mL 2216E 培养基中, 在 6、10、15、20、28、37 等温度下培养 48 h, 取菌液测吸光度 A_{600} 。并绘制温度-生长曲线。

1.3.3 最适初始 pH 测定

于 2216E 液体培养基中 15 培养至指数生长期, 然后接种于不同起始 pH(pH6~14)的 10 mL 液体培养基中。150 r/min, 15 恒温培养 12 h, 取菌液测其吸光度 A_{600} 。并绘制 pH-生长曲线。

1.4 细菌 DNA 的制备

采用细菌单菌落直接 PCR 扩增法, 参照文献[4]制备细菌 DNA。即取一单菌落溶于 10 μ L SDS(1%) 溶液中, 充分振荡摇匀, 用 300 μ L TE 溶解获得 DNA 原液。将原液按一定的梯度稀释作为 PCR 扩增模板。

1.5 16S rDNA 的 PCR 扩增及克隆

采用细菌通用引物 8F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'^[14] 9R: 5'-GTTACCTTGTACGACTT-3'。50 μ L 扩增反应体系含有: 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl (pH8.3), 1.5 mmol/L MgCl₂, 细菌 DNA 模板约 10 ng, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTPs, 0.2 μ mol/L 引物, 0.3 U/ μ L Taq DNAase。每次均设阴性对照, PCR 反应条件如下: 96 变性 4 min, 94 变性 30 s, 59 退火 45 s, 72 延伸 1 min, 10 个循环后, 94 变性 30 s, 54 退火 45 s, 72 延伸 1 min, 最后是 72 延伸 10 min。在 Ependdorf Mastercycler Gradient 基因扩增仪上完成。扩增产物

以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 用凝胶成像系统 Pharmacia Biotech ImageMaster VDS 记录实验结果。

切胶回收纯化约 1.5 kb 目的 DNA 片段。用 T₄DNA 连接酶将纯化的片断与 pMD18-T vector 载体 (购自 Takara) 连接, 然后热激转化 *Escherichia coli* DH 5 感受态细胞。以氨苄青霉素(100 mg/L)抗性和蓝白斑筛选阳性转化子。菌液经 PCR 检测为含目的片断的阳性转化菌后, 交由上海博亚生物技术有限公司进行测序。

1.6 系统发育学关系分析

序列的多重排列用 BioEdit 中的 Clustal W 程序完成, 转换至 phylip 3.6, Bootstrap value 设为 1 000, 得到的树文件用 Treeview 3.2 输出。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离与形态观察

根据上述方法获得 3 株菌, 根据采集位置的不同暂命名为 B2、B5 与 B6。B2 菌为橙黄色圆形不透明菌落; B5 为鲜红色的圆形菌落; B6 为乳白色圆形不透明菌落。菌落见图 1。各菌株的扫描电镜照片见图 2。从 SEM 照片上可以看出, B2 和 B6 菌均为杆状细菌, 但 B6 菌的外面覆有鞘膜。B5 菌为球形。

2.2 菌株最适生长温度、盐度及 pH

2.2.1 最适温度

温度测试表明, 3 株菌在 4 均能生长, 但 3 株菌株最适温度分别约为 20、28、28, B2 菌 20 开始出现浑浊, 温度超过 28 生长开始缓慢(图 3)。

2.2.2 最适盐度

观察结果表明 B2 在盐度 3%~10% 生长良好; B5 和 B6 菌在盐度 3%~7% 能够生长, 盐度 10% 不生长。

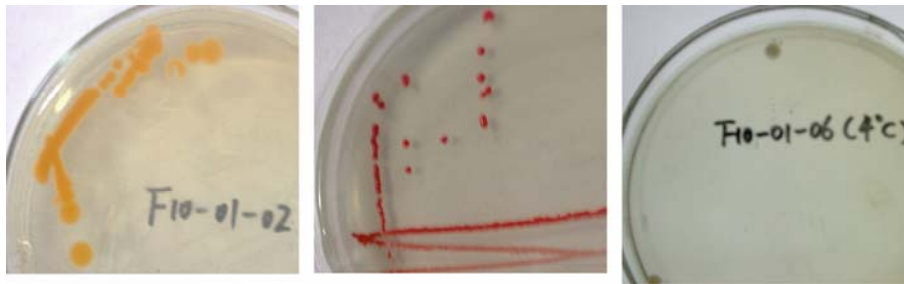


图 1 3 株菌菌落形态图片

Fig. 1 Optical images of 3 strains of deep-sea bacteria
自左向右依次为 B2, B5, B6 菌
it is B2, B5 and B6, from left to right respectively

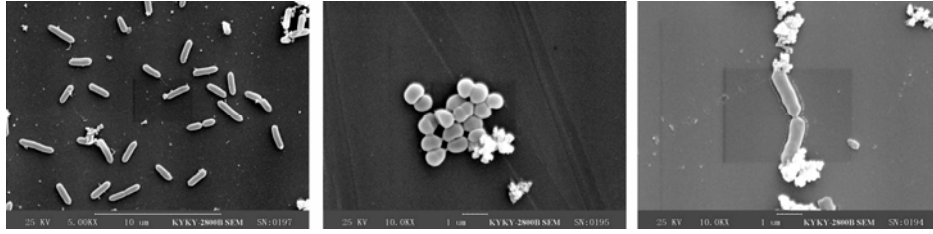


图 2 3 株深海菌的电子扫描照片

Fig. 2 SEM images of 3 strains of deep-sea bacteria
自左向右依次为 B2, B5, B6 菌
it is B2, B5 and B6, from left to right, respectively

2.2.3 最适 pH

pH 测试表明, B2 菌在 pH 8 时生长良好, pH 超过 8, 生长明显缓慢; B5 菌也在 pH 8 生长良好, pH 超过 10, 生长明显缓慢; B6 菌在 pH 12 下生长的最好, pH 超过 13, 生长明显缓慢(图 4)。

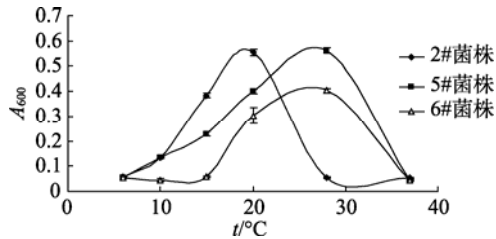


图 3 温度对 3 株菌生长的影响

Fig. 3 Changes of bacteria density at different temperature

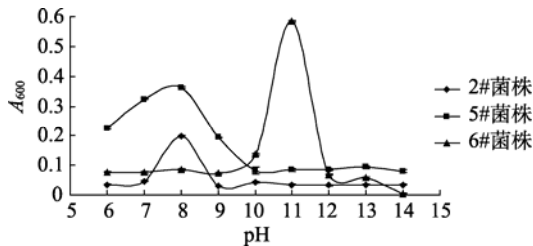


图 4 pH 对 3 株菌生长的影响

Fig. 4 Changes of bacteria density at different pH

2.3 菌株 16S rDNA 序列分析及系统发育分析^[6]

采用上述引物, B2 菌 16S rDNA 的 PCR 产物共获得 1 406 个碱基, B5 为 1 414 个; B6 为 1 399 个。上述序列已提交到 GenBank, 获得的序列号分别是: AY822610; DQ513408; DQ407272。

B2 菌 16S rDNA 的序列同源性分析表明, 它与 GenBank 中 *Bacillus* 菌(Accession number : AF221855、AY690690、BSP315068、BSP244686、BSP391199 等)有高达 99% 的同源性(表 1), 而这些细菌分别是海

洋杆状细菌或海洋土壤杆状细菌, 另外, 在系统进化树(图 5)上的聚类分析也表明, B2 菌与海洋杆状细菌或海洋土壤杆状细菌的亲缘关系也最近, 因此该菌应该属于海洋杆状细菌。

B5 菌 16S rDNA 的序列同源性分析表明, 它与 GenBank 中 *Arthrobacter* 菌(Accession number: AF479354、AF511518、AY131225、AY576708、DQ177488 等)有高达 99% 的同源性(表 1), 而这些细菌属于 *Arthrobacter* 菌, 均为从冰冻土壤或深海中分离出来的细菌, 为海洋土壤中常见菌。另外, 系统进化树(图 5)上的聚类分析也表明, B5 菌与 *Arthrobacter* 菌属细菌的亲缘关系也最近, 因此该菌应该属于 *Arthrobacter* 菌属。

B6 菌的 16S rDNA 的序列同源性分析表明, 它与 GenBank 中 *Acinetobacter* 菌(Accession number : AF188300、AF324537、AF468386、AY055373、AY994049、DQ088799 等)有高达 99% 的同源性(表 1), 而这些细菌是从深海中分离出来的 *Acinetobacter johnsonii*, 另外, 在系统进化树(图 5)上的聚类分析也表明, B6 菌与这些细菌的亲缘关系也最近, 因此该菌应该属于 *Acinetobacter johnsonii*。

一般认为 16S rRNA 序列同源性小于 98%, 可以认为属于不同的种, 同源性小于 93%~95%, 可以认为属于不同的属^[7-8]。综上所述, 本文研究的 3 株细菌应该分别属于芽孢杆菌(*Bacillus*)、节杆菌(*Arthrobacter*)、蛋白菌(*Acinetobacter*)3 个不同的菌属, 这 3 个菌属为从深海中分离出来的能够培养的常见菌属^[9-11]。

3 讨论

由于传统微生物培养法的局限以及海底深部生物圈生境的特殊性, 能够培养的微生物数量非常有限, 常常低于总细胞计数的 1%^[12]。为克服传统培养

表 1 深海微生物 16S rDNA 基因序列比对结果

Tab. 1 The BLAST results of 3 strains of deep-sea bacteria

菌株	数据库中对应的序列号	相同/比对的碱基数	相似性(%)
B2	BSP244686	1403/1406	99
	BSP315068	1403/1406	99
	BSP391199	1402/1406	99
	AF221855	1399/1406	99
	AY690690	1400/1406	99
B5	AF479354	1398/1404	99
	AF511518	1391/1403	99
	AY576708	1396/1403	99
	AY131225	1394/1403	99
	DQ177488	1396/1405	99
	X80748	1393/1402	99
B6	AF188300	1374/1377	99
	AF324537	1375/1377	99
	AF468386	1374/1377	99
	AY055373	1376/1377	99
	AY994049	1374/1377	99
	DQ088799	1375/1377	99

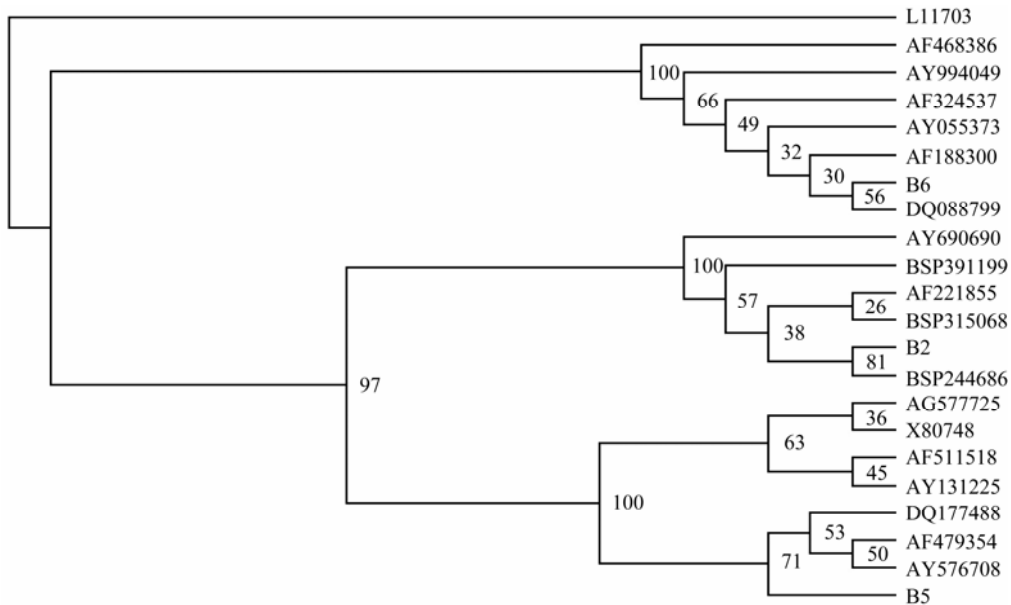


图 5 根据 16S rDNA 序列构建的深海细菌系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of deep-sea bacteria with 16S rDNA sequences by NJ method L11703 (*Thermonema lapsum*) is out-group

法的局限, 16S rRNA 基因序列和系统进化分析近年来得以广泛应用。分子技术研究表明, 海底深部生物圈不但蕴藏了丰富的微生物种类, 并且许多种类与目前已描述的所有细菌和古菌都相距甚远, 代表着新颖的微生物物种或类群。

海底 4 954 m 基本上是一个无光、高盐等极性

环境。我们获得的菌株从生长温度及对光的需求方面来看, 加上我们严格的无菌操作, 应该确定所获得的菌株是深海细菌。

按照最适生长温度和生长上限温度的不同, 深海细菌一般被分为 2 大类: 嗜冷型(psychrophilic)和耐冷型 (psychrotrophic 或 psychrotolerant)。其中,

嗜冷菌通常是指最适生长温度 ≤ 15 ，生长上限温度 < 20 的菌株；耐冷菌则是指能够在 4 左右良好生长、但最适生长温度 > 20 的微生物^[13]。根据该规定，我们所获得的3株菌应该属于耐冷菌范畴。

传统的菌种鉴定是选用不同的代谢底物作为碳源和氮源，将菌株利用碳、氮源的能力作为鉴定指标，该方法建立在37℃菌株能够正常生长的前提之上。而深海微生物的最适生长温度或者低于37℃，或者高于37℃，也就是说在37℃无法正常生长或根本无法生长。因此作者在参照常见细菌系统鉴定手册对其进行鉴定时，往往无法获得理想结果。因此，无法参照常规方法对其进行鉴定分类。通过16S rRNA基因序列同源性比较并结合系统发育分析，往往能够对极端微生物进行快速、准确的初步分类，并且这一方法已广泛应用于极端环境下细菌的鉴定，都取得了较好的结果^[14-16]。

参考文献:

- [1] Kämpfer P, Steiof M, Becker P M, et al. Characterization of chemoheterotrophic bacteria associated with the in situ bioremediation of a waste-oil contaminated site [J]. *Microbial Ecology*, 26 (2): 161-188.
- [2] 俞勇, 李会荣, 陈波. 一株产海藻糖合成酶南极海洋低温细菌的鉴定[J]. *极地研究*, 2005, 17(2): 127-133.
- [3] 王远亮, 李光玉, 东秀珠, 等. 中国大陆科学钻探(CCSZ)微生物研究——地下3900 m一株细菌的分离鉴定[J]. *岩石学报*, 2005, 21(2): 540-544
- [4] 戴欣, 陈月琴, 周惠, 等. 海洋细菌的分子鉴定分类[J]. *中山大学学报(自然科学版)*2000, 39(1): 68-71.
- [5] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [6] 吕明生, 王淑军, 房耀维, 等. 一株产低温右旋糖苷酶海洋细菌的筛选和鉴定[J]. *海洋科学*, 2011, 35(5): 32-37.
- [7] Devereux R, He S H, Doyle C L, et al. Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: phylogenetic definition of a family[J]. *Bacteriol.*1990, 172: 3609-3619.
- [8] Fry N K., Warwick S, Saunders N A, et al. The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family Legionellaceae.[J]. *Gen. Microbiol.*1991,137: 1215-1222.
- [9] Bowman J P, Mccammon S A, Brown M V, et al. Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic Sea ice [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(8): 3068-3078.
- [10] Thorseth I H, Torsvik T, Torsvik V, et al. Diversity of life in ocean floor basalt [J]. *Earth and Planetary Science Letters*, 2001, 194: 31-37.
- [11] Toffin L, Webster G, Weightman A J, et al. Molecular monitoring of culturable bacteria from deep-sea sediment of the Nankai Trough, Leg190 Ocean Drilling Program [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 48: 357-367.
- [12] Parkes R J, Gragg B A, Wellsburg P. Recent studies on bacterial populations and processes in subseafloor sediments: A review [J]. *Hydrogeological Journal*, 2000, 8(1): 11-28.
- [13] Morita R Y. Psychrophilic bacteria[J]. *Bacteriological Reviews*, 1975, 39(2): 144-167.
- [14] Yanagibayashi M, Nogi Y, Li L, et al. Changes in the microbial community in Japan Trench sediment from a depth of 6292 m during cultivation without decompression [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 170: 271-279.
- [15] Takai K, Inagaki F, Nakagawa S, et al. Isolation and phylogenetic diversity of members of previously uncultivated γ -proteobacteria in deep-sea hydrothermal fields [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 218: 167-174.
- [16] 徐庆强, 张志明, 王延明, 等. 产碱性纤维素酶海洋细菌的筛选、鉴定及酶学性质研究[J]. *海洋科学*, 2009, 33 (7): 1-5.

Identification of 3 strains of deep-sea bacteria by physiological and molecular biological methods

HOU Zhao-jun¹, ZHANG MING², JIANG Fu-qing³, ZHANG Bao-yu³

(1. College of Marine Science and Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China; 2. Environmental Protection Agency of Feixi Country, Feixi 231200, China; 3. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Received: Aug., 10, 2012

Key words: deep-sea bacteria; scanning electron microscope; 16S rDNA

Abstract: The investigated samples were collected from old, sediment-covered lava flows in the rift valley at a water depth around 4 954 m. Three strains of bacteria were purified and denoted as B2, B5 and B6. They were characterized with physiological, microscope, scanning electron microscope (SEM) and molecular methods. The bacteria were round, smooth and with different color. B6 showed ivory yellow, while B2 and B5 showed vivid orange and red, respectively. SEM results showed that B2 and B6 is rod shape, but B6 is covered with tunica vaginalis. B5 is globular. The growth temperature of these three strains is below 37 °C, the optimum growth temperature for B2, B5 and B6 was 20, 28 and 28 °C, respectively, The pH tolerance range was 6~14, and the optimum pH was 8, 8 and 12, respectively. 16S rRNA sequence analysis showed that they belong to 3 different genus, and they are Bacillus (Bacillus), Arthrobacter (Arthrobacter) and protein in bacteria (Acinetobacter), respectively.

(本文编辑: 张培新)