基于高通量测序方法分析荣成月湖潮间带趋磁细菌多样性

张文燕[1, 2, 3, 4], 潘红苗[1, 2, 4], 董　逸[1, 2, 4], 杜海舰[1], 陈一然[1],
吴龙飞[5, 6], 肖　天[1, 2, 4, 5]

(1. 中国科学院海洋研究所海洋生态与环境科学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋生态与环境科学功能实验室, 山东 青岛 266273; 3. 中国科学院大学, 北京 100049; 4. 中国科学院海洋大科学研究中心, 山东 青岛 266071; 5. 中法趋磁多细胞生物进化与发育联合实验室, 北京 100029; 6. 法国科研中心地中海微生物研究所, 马赛 13009, 法国)

摘要: 荣成月湖是一个典型天然潟湖, 潮间带沉积物中存在多种形态趋磁细菌。通过 Roche 454 高通量测序平台, 对沉积物样品(B_S)和磁收样品(B_M)进行 16S rRNA 基因高通量测序, 认识荣成潮间带沉积物的细菌群落结构, 并了解趋磁细菌多样性及系统进化地位。研究结果表明沉积物样品中主要的细菌类群为 δ-变形菌纲, 占总细菌数的 26.4%, 其次是 γ-变形菌纲和 α-变形菌纲; 而磁收样品中细菌多样性和种类明显降低, 以 α-变形菌纲占绝对优势, 相对比例达 72.6%。在磁收样品和沉积物样品分别发现了 1 612 条和 186 条 reads 与趋磁细菌相关, 分别占细菌总数的 5.76%和 0.85%, 磁收样品中趋磁细菌数是沉积物样品的 6.8 倍。对两个样品中获得的趋磁细菌序列进行系统进化分析, 发现这些序列多数属于变形菌门的 α-变形菌纲, 以趋磁球菌占绝对优势, 少数属于 δ-变形菌纲, 与多细胞趋磁原核生物亲缘关系最近。海洋趋磁螺菌属仅在 B_M 样品中检出, 趋磁弧菌属在 B_M 样品优势度高于 B_S 样品, 而多细胞趋磁原核生物和趋磁螺菌属在 B_S 样品中优势度更高。通过分析样品间的差异 OTUs, 认为荣成潮间带沉积物中可能存在大量未知的趋磁细菌新类群。研究结果为下一步培养和开发趋磁细菌这一功能菌群, 发现趋磁细菌新类群及趋磁细菌生态功能提供了基础资料。

关键词: 潮间带; 多样性; 趋磁细菌; 高通量测序
中图分类号: Q939.99　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 1000-3096(2019)03-0001-10
DOI: 10.11759/hykx20180925001

趋磁细菌(Magnetotactic bacteria, MTB)是一类能够沿着磁力线运动的特殊细菌, 最早由 Bellini 和 Blakemore 独立发现[1-4]。趋磁细菌并不具有分类学意义, 在形态、生理代谢以及系统发育等方面具有多样性[5-9]。趋磁细菌形态多样, 常见有球形、杆状、弧形、螺旋形及多细胞聚集体形式(即多细胞趋磁原核生物)等。趋磁细菌生理代谢类型多样, 包括化能自养、化能异养等营养型及专性微好氧、专性或者兼性厌氧; 趋磁细菌系统发育地位也具有多样性, 目前, 已知的趋磁细菌隶属于变形菌门的 α-变形菌纲(Alphaproteobacteria)、γ-变形菌纲(Gammaproteobacteria)、δ-变形菌纲(Deltaproteobacteria)以及硝化螺菌门(Nitrospirae)和暂定分类单元 Omnitrophica[6, 9-10]。最近林巍等通过宏基因组分析的方法在暂定分类单元 Latescibacteria 和浮霉菌门(Planctomycetes)细菌的基因组中发现了趋磁细菌的磁小体岛基因, 证明这两个门中也可能存在趋磁细菌[11-12]。

趋磁细菌最重要的特征是体内可以生物成矿合成生物膜包裹的磁性纳米颗粒-磁小体(magnetosome)。趋磁细菌通过磁小体的导向作用, 借助鞭毛进行趋磁运动, 使其更有效地找到最适生存环境, 即有氧-无氧过渡区(oxic-anoxic transition zone, OATZ)[13-15]。趋磁细菌趋磁细菌在自然界分布极为广泛, 主要存在于淡水湖泊、海洋潮间带、潟湖、盐湖等环境, 在河流、土壤、大洋等环境中也有趋磁细菌的发现。趋磁细菌在自然环境中可能扮演着重要的生态角色, 参与铁、氮、硫、

收稿日期: 2018-09-25; 修回日期: 2019-05-08
基金项目: 国家自然科学基金项目(No.41776131, 41776130); 国家自然科学基金-山东联合基金(U1606404, U1706208)
[Foundation: National Natural Science Foundation of China, No.41776131, No.41776130; National Natural Science Foundation of China-Shandong Joint Fund Centers, No.U1606404, No.U1706208]
作者简介: 张文燕(1984-), 女, 山东潍坊人, 主要从事海洋微生物研究, E-mail: zhangwy@qdio.ac.cn; 肖天, 通信作者, E-mail: txiao@qdio.ac.cn

碳等元素的生物地球化学循环[6, 9, 12, 16]。由于趋磁细菌对营养的苛刻要求及微好氧等特性, 趋磁细菌的实验室分离纯化比较困难, 趋磁细菌纯培养菌株较少, 环境中的趋磁细菌多通过分析 16S rRNA 基因来确定它们的系统进化位置[12, 17-18]。

荣成月湖紧邻黄海, 是一个典型的天然潟湖, 是亚洲最大的天鹅冬季栖息地。该环境环境因子稳定变化, 沉积物界面稳定[19]。前期调查发现, 该区域潮间带沉积物中趋磁细菌丰度高, 种类丰富, 但克隆文库方法仅得到很少的遗传信息, 远远低于预期[20]。故本研究采用罗氏 454 高通量测序的方法, 对月湖沉积物和磁收样品中趋磁细菌的多样性进行研究, 以细菌群落结构作为背景, 预测和发现新的趋磁细菌种类。

1 材料与方法

1.1 样品采集及趋磁细菌形态观察

1.1.1 采样点及样品采集

荣成月湖(36°43′~37°27′N, 122°09′~122°42′E)是一个半封闭天然潟湖, 面积约 4.94 km^2, 其北、西、南三侧均被陆地包围, 东部由沙坝与外海隔开, 有一条与外海相通的潮汐汊道。月湖是亚洲最大的天鹅冬季栖息地, 受潮汐、天鹅迁徙、人工养殖、淡水输入等活动影响[19]。

于 2009 年 5 月—2010 年 8 月在荣成月湖北部潮间带(37°21′33.857″N, 122°34′41.571″E)进行样品采集, 采样底质均为砂质。利用自制工具采集黄黑交界面处的沉积物, 部分沉积物采集后放入–20℃保存备用(B_S); 部分沉积物装入采样瓶, 添加原位海水后带回实验室进行下一步研究。

1.1.2 趋磁细菌收集

将沉积物样品分装 500 mL 塑料瓶中, 每瓶装入约 150 mL 泥样, 加入约 150 mL 水样, 共分装 10 瓶。用胶带将磁铁粘在瓶壁上(S 极面向瓶壁), 30 min 后, 用吸管吸取磁铁附近的样品 1 mL 左右, 混合加入 20 mL 的小玻璃瓶中, 用磁铁再次富集约 30 min, 再用吸管吸取磁铁附近的液体 1 mL 左右[21]。显微镜观察后, 部分液体经 8 000 r/min 离心 5min, 制备成为磁收样品(B_M), –20℃保存; 部分液体进行 T-T 收集用于电镜观察。

1.1.3 趋磁细菌形态观察

使用 Olympus BX51 显微镜的微分干涉(Differential Interference Contrast, DIC)模式, 悬滴法观察磁收样品中趋磁细菌的有无。将磁收集的菌液后采用“T-T”法进一步富集趋磁细菌[22], 取富集的菌液滴铜网(北京中镜科仪技术有限公司)后, 用透射电子显微镜(HITACHI H8100, 中国海洋大学电镜室)对趋磁细菌形态进行观察。

1.2 细菌和趋磁细菌遗传多样性分析

1.2.1 沉积物总 DNA 提取

利用土壤 DNA 提取试剂盒(MP, FastDNA Spin Kit for Soil)和核酸裂解仪(Thermo, Fast Prep TM FP120), 按说明书对沉积物样品(B_S)0.5 g 和磁收样品(B_M)进行总 DNA 的提取。DNA 抽提后, 利用分光光度计(GE, Nano Vue Plus)检测 DNA 浓度, 同时利用 1%琼脂糖凝胶电泳进行 DNA 质量检测。

1.2.2 细菌 16S rRNA 基因的 PCR 扩增及测序

采用细菌通用引物 8F(5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′)[23]和 533R(5′-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3′)[24]扩增 16S rRNA 基因的 V1-V3 高变区。PCR 反应条件: 95℃预变性 3 min, 30 个循环(95℃变性 30 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 45 s), 最后 72℃延伸 10 min。PCR 反应体系: 5×PCR buffer 4 μL; 2.5 mmol/L dNTP 2 μL; 5 μmol/L P1 (8F) 0.8 μL; 5 μmol/L P2 (533R) 0.8 μL; 5 U/μL Taq 酶 0.4 μL; DNA 模板 2 μL; ddH_2O 10 μL。每个样品进行 3 个重复, 将同一样品 PCR 产物混合后经电泳检测。PCR 产物利用 2%琼脂糖凝胶回收和纯化, 经检测定量后构建文库, 利用 Roche 454 平台进行测序(上海美吉生物医药科技有限公司)。

1.3 数据分析

1.3.1 原始测序序列质量控制

对原始数据进行处理得到优化序列[25], 包括以下 4 个步骤: (1)去除测序接头、标记、前引物等序列; (2)利用特异性引物信息去除扩增过程中产生的非特异性扩增片段序列(引物碱基含 2 个以上错配); (3)去除长度过短和过长(<150 bp 或>600 bp)的序列; (4)去除含有模糊碱基、单碱基高重复(单碱基重复超过 6 个)的序列。对优化序列进行数据及长度分布统计后进行下一步分析。

1.3.2 OTU 聚类分析

利用 Mothur 软件对优化序列以 97%相似性水平做为阈值进行 OTU(Operational taxonomic units)聚类[26], 生成 OTU 表格, 并得到每个 OTU 代表序列, 并进行信息统计分析, 使用 UCHIME 软件剔除嵌合体[27]。

1.3.3 稀释曲线和多样性指数

利用 Mothur 做稀释曲线分析, 利用 R 语言工具制

作曲线图, 用以检验样本的测序数据量是否合理[28]。使用 Mothur 软件进行丰富度和多样性指数计算分析, 分析微生物群落的丰富度和多样性[26]。丰富度指数包含 ACE(http://www.mothur.org/wiki/Ace)[29]和 Chao(http://www.mothur.org/wiki/Chao)[30]; 多样性指数包括 Simpson 指数(http://www.mothur.org/wiki/Simpson)[31]和 Shannon 指数(http://www.mothur.org/wiki/Shannon)[32], 此外还有测序深度指数 Coverage(http://www.mothur.org/wiki/Coverage)。所有分析在 OTU 相似水平 97%(0.03)进行。

1.3.4 OTU 分类学分析及趋磁细菌鉴定

OTU 代表序列与 SILVA 数据库(121 版本)进行比对, 找出其最相近且可信度达 80%以上的种属信息, 根据 SILVA 库中的参考序列对 OTU 进行种属鉴定, 将得到的结果记录在 OTU 表格文件中[33]。对得到的物种分类信息进行人工校正, 对各 OTU 的代表序列进行 Local BLAST 比对[34], 数据库选择 GenBank 核酸数据库(nt/nr), 从输出结果中筛选趋磁细菌相关序列。

1.3.5 系统进化树构建

利用 NCBI Blast search 在线比对, 找出趋磁细菌相关序列在 GenBank 数据库中最相似的序列[34]。选择参照序列, 与本研究得到的序列一起用 Clustal W 软件进行比对, 并进行手工校正[35]。利用 MEGA 6 软件中的邻接法(Neighbor-Joining)构建系统发育树, 用 Bootstrap 法检验系统发育树, 自展系数为 1 000[36-37]。

2 研究结果

2.1 趋磁细菌的形态多样性

光学显微镜下用悬滴法观察, 可见对磁场敏感的趋磁细菌, 经换算, 沉积物中丰度可达 10^3~10^4 cells/cm^3。通过光学和透射电子显微镜观察菌体形态, 绝大多数趋磁细菌为球形与卵圆形, 也存在杆菌、弧菌、螺菌及多细胞趋磁原核生物(图 1)。趋磁细菌体内均发现磁小体, 其中, 球菌所含磁小体形状多为棱柱状, 可呈单链、双链或者不规则排列, 同时菌体内含多个致密颗粒。

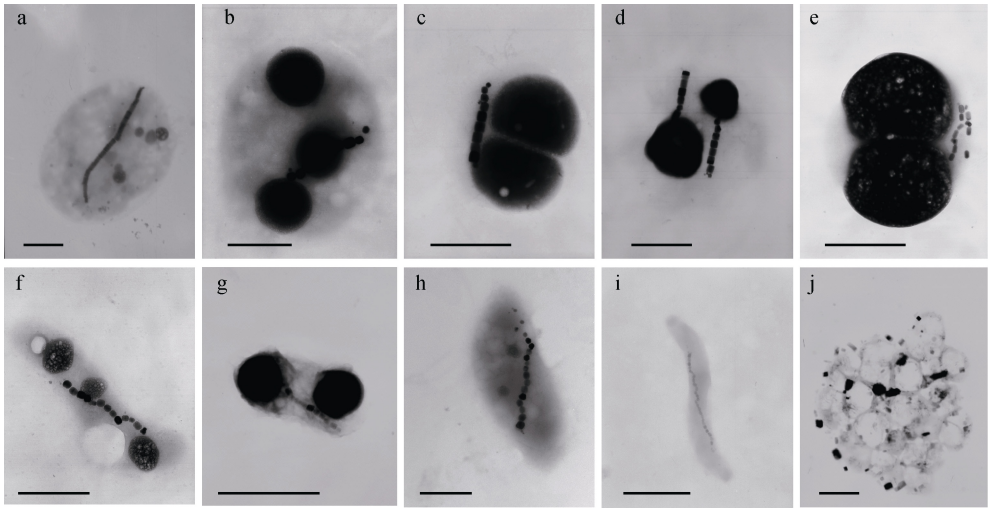


图 1 月湖潮间带沉积物中趋磁细菌形态

Fig. 1 TEM micrographs of individual MTB cells in intertidal sediments from Lake Yuehu

注: 标尺: C 和 G, 500 nm; J, 2 μm, 其余 1 μm

2.2 16S rRNA 基因高通量测序数据及评估

表 1 为 2 个沉积物样品的测序的统计数据, B_M 和 B_S 样品测序的优化序列分别为 27 991 和 21 794 条, 序列平均长度接近, 均为 454 bp 左右。从样品的 Coverage 来看, 2 个样品的覆盖率分别达到 92.6%和 87.7%, 能较好地反映样品菌群的整体情况。稀释曲线(Rarefaction curve)反映了样品的取样深度, 可以用来评价测序量是否足够。从图 2 可知, 两样品在 97%相似性水平下的稀释曲线逐渐趋于平缓, 随机测序数据可以覆盖绝大多数细菌的多样性, 能够较真实地反映该环境的细菌群落结构。此外, B_S 样品相较 B_M 样品而言有一定的上升趋势, 表明在 B_S 比 B_M 样品可能存在更多的未知序列。

对 2 个样品进行序列的 OTU 聚类, 其中 B_S 样品共得到 5 074 个细菌的 OTUs, 而 B_M 样品含 OTUs 数量更少, 仅有 3 199 个 OTUs; B_M 的 Shannon 指数明显低于 B_S, 分别为 4.62 和 10.49, 而 B_M 样品的 Simpson 指数明显高于 B_S(表 1), 说明 B_S 样品细菌

多样性明显高于 B_M 样品; 同时, 丰富度指数 ACE 和 Chao, 均为 B_S 样品高于 B_M 样品, 同样说明 B_S 样品有着更高的物种丰富度。磁收样品(B_M)的多样性和丰富度较沉积物样品(B_S)明显降低。

表 1　月湖潮间带沉积物样品高通量测序数据统计

Tab. 1　Sequencing data statistics of samples from intertidal sediments of Lake Yuehu

样品名称	优化序列数	序列平均长度	OTUs 数	ACE	Chao	Shannon	Simpson	Coverage
B_M	27 991	454.1	3 199	8 290	7 904	4.62	0.389 3	0.926 2
B_S	21 794	453.6	5 074	9 946	9 477	10.49	0.003 6	0.877 3

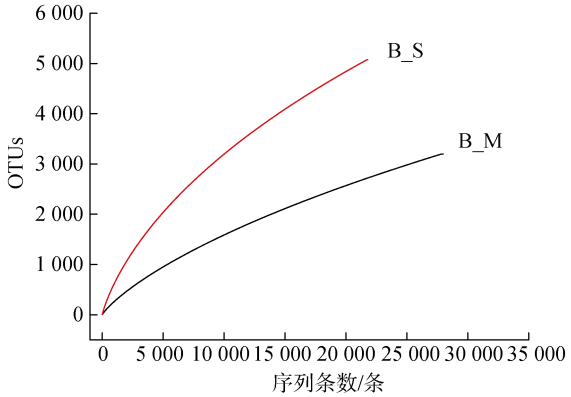


图 2　月湖潮间带沉积物样品稀释曲线(97%相似性水平)

Fig. 2　Rarefaction curve of samples from intertidal sediments of Lake Yuehu (97% similarity level)

2.3　OTU 分类地位及细菌群落多样性分析

对 2 个样品的 OTU 与 Silva 数据库(128 版本)对比进行分类学分析, B_S 样品的 5 074 个 OTUs 属于 30 门、76 纲、135 目、152 科、和 241 属; 而 B_M 样品的 3 199 个 OTUs 属于 32 门、66 纲、116 目、127 科和 197 属。除门水平外, B_M 样品含有的各分类阶元的总数均低于 B_S 样品。

在门和纲水平上对 2 个样品进行细菌群落结构分析, 2 个样品的细菌主要类群比较一致, 但相对比例差别很大。如图 3 所示, 在门水平细菌分类的统计分析发现, B_M 样品中变形菌门(Proteobacteria)占绝对优势, 相对比例达 88.0%, 其余门类比例均小于 4%。B_S 的

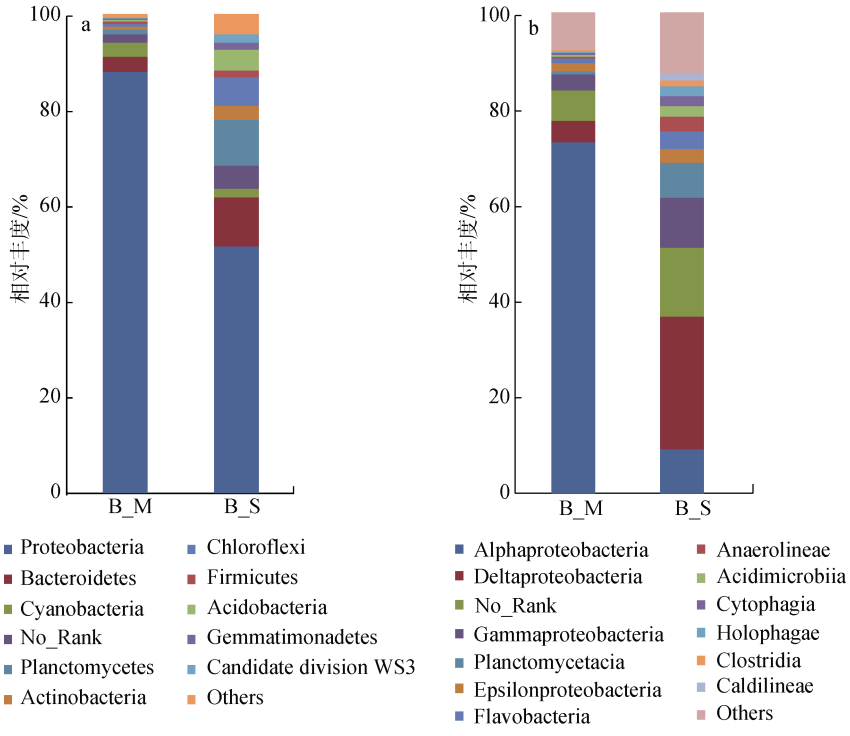


图 3　月湖潮间带沉积物细菌群落结构

Fig. 3　Community structures of bacteria in intertidal sediments from Lake Yuehu

注: a: 门水平; b: 纲水平

优势度最高的也是变形菌门, 相对比例为 51.5%。其次是拟杆菌门(Bacteroidetes)和浮霉菌门(Planctomycetes)(所占比例分别是 10.2%和 9.6%)。在纲水平, B_M 样品中 α-变形菌纲(Alphaproteobacteria)占绝对优势, 相对比例达 72.6%, 其次是 δ-变形菌纲(Deltaproteobacteria), 比例为 4.4%。而 B_S 样品 δ-变形菌纲、γ-变形菌纲(Gammaproteobacteria)和 α-变形菌纲较多, 比例分别是 26.4%、9.9%和 8.8%。而在属水平上, B_M 和 B_S 两个样品均为未分类的细菌比例最高, 且 B_M 样品远高于 B_S 样品(58.0%), 达到了 90.7%。

2.4 趋磁细菌多样性及系统进化分析

对所有 OTU 代表序列的分类信息进行手工校正, 筛选趋磁细菌相关序列。以相似性水平 90%为阈值, 在样品 B_M 中发现 242 个与趋磁细菌相关的 OTUs, 包含 1 612 条 reads, 分别占细菌总 OTUs 和 reads 总数的 7.56%和 5.76%。而 B_S 中有 40 个 OTUs 和 186 条 reads 序列与趋磁细菌相关, 占细菌总 OTUs 数和 reads 数的 0.79%和 0.85%。B_M 样品中的趋磁细菌 reads 数占总细菌 reads 数的比例, 即趋磁细菌相对丰度, 远高于 B_S 样品, 约为 B_S 样品的 6.8 倍, 大大提高了趋磁细菌的检出率。

对这些趋磁细菌相关序列进行分类地位统计(图 4)和系统发育分析(图 5), 这些序列多数属于变形菌门的 α-变形菌纲, 分别占趋磁细菌总 reads 数的 99.2%(B_M)和 87.5%(B_S), 此外, 还有少数属于 δ-变形菌纲的多细胞趋磁原核生物。趋磁细菌序列在属水平上的分类地位显示, B_M 和 B_S 样品中趋磁球菌属(*Magnetococcus*)均占绝对优势, 比例分别达到了 88.8%和 77.5%。趋磁弧菌(*Magnetovibrio*)是 B_M 样品中第二优势类群(7.4%), 而多细胞趋磁原核生物(Magnetoglobus)和趋磁螺菌属(*Magnetospirillum*)在 B_S 样品中优势度较高, 比例分别为 12.5%和 7.5%, 海洋趋磁螺菌属(*Magnetospira*)仅在 B_M 样品中出现。可见, 两样品趋磁细菌的优势类群相同, 非优势类群的群落结构略有差别。

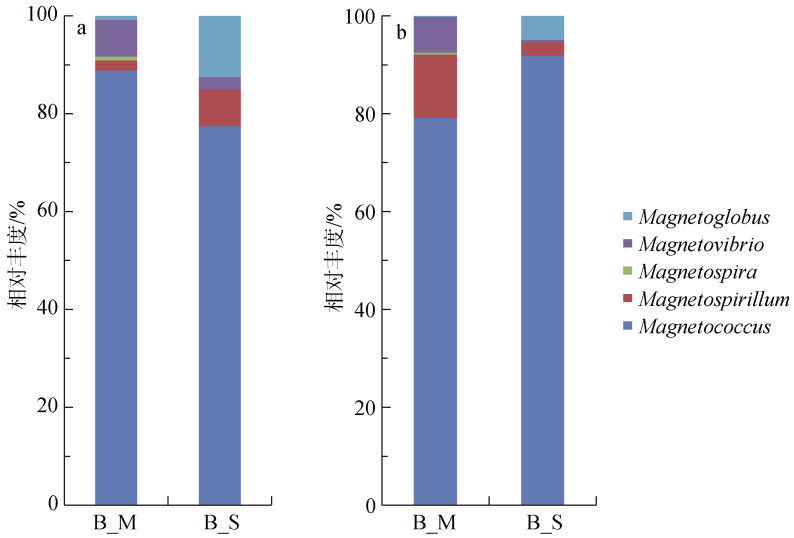


图 4 月湖潮间带沉积物趋磁细菌群落结构

Fig. 4 Community structures of magnetotactic bacteria in intertidal sediments from Lake Yuehu

3 讨论

本文通过 Roche 454 高通量测序平台对荣成月湖潮间带沉积物进行了细菌与趋磁细菌多样性分析。沉积物样品(B_S)和磁收样品(B_M)两个样品分别获得了 21 794 和 27 991 条细菌优化序列, 分别归属于 5 074 个和 3 199 个 OTUs。多样性指数分析显示, 磁收样品(B_M)的多样性和丰富度较沉积物样品(B_S)明显降低。通过对 Silva 数据库的对比, B_S 中主要的细菌类群为 δ-变形菌纲, 占总细菌数的 26.4%, 其次是 γ-变形菌纲和 α-变形菌纲; 而 B_M 以 α-变形菌纲占绝对优势, 相对比例达 72.6%, 其次是 δ-变形菌纲。与沉积物样品 B_S 相比较, 磁收样品 B_M 中细菌种类明显降低, 与多样性和丰富度指数结果也一致, 磁收通过磁场的作用对沉积物中的细菌进行选择性富集, 趋磁细菌和磁性颗粒附着细菌在此过程中比例会明显增加。通过与 NCBI nt/nr 数据库的比对, 在磁收样品(B_M)和沉积物样品(B_S)分别发现了 1 612 条和 186 条趋

磁细菌相关序列, 分别占细菌总数的 5.76%和 0.85%, B_M 样品中趋磁细菌数远高于 B_S 样品(6.8 倍), 相较于原始的沉积物样品, 磁收样品中趋磁细菌的相对丰度明显增加。

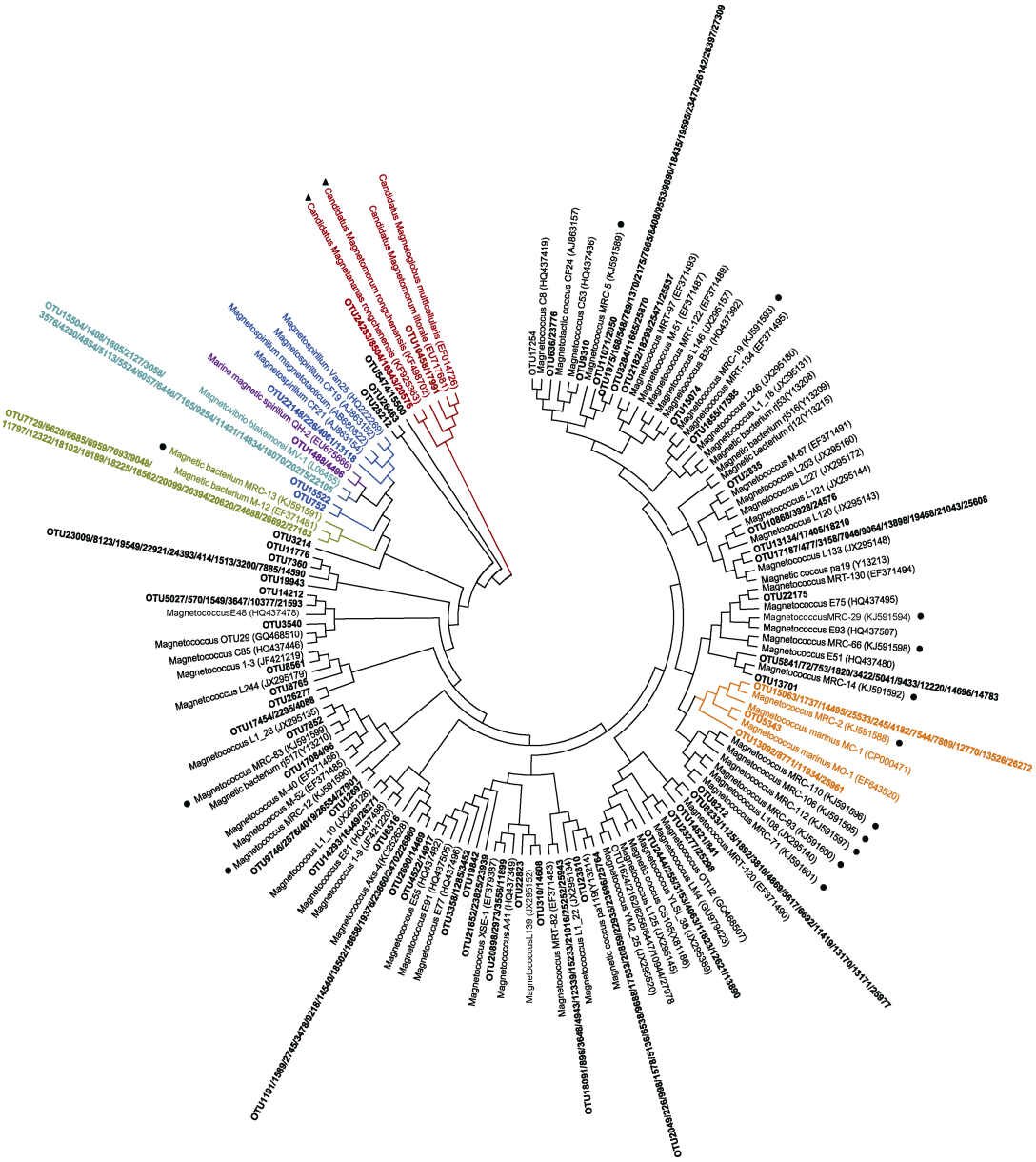


图 5　月湖潮间带沉积物中趋磁细菌的系统发育树

Fig. 5　Phylogenetic tree of magnetotactic bacteria in intertidal sediments from Lake Yuehu

注: ●月湖潮间带传统克隆文库测序得到的趋磁细菌序列; ▲显微操作调取获得的趋磁多细胞原核生物的序列

对得到的趋磁细菌 OTU 进行系统分类和进化分析, 结果显示这些趋磁细菌序列多数属于变形菌门的 α-变形菌纲, 两个样品中趋磁球菌属均占绝对优势, 还存在海洋趋磁螺菌属、趋磁弧菌属和趋磁螺菌属。此外, 还有少数属于 δ-变形菌纲的多细胞趋磁原核生物。而在相同采样地点, 通过对沉积物中趋磁细菌的富集, 利用传统克隆文库和 Sanger 测序的方法研究趋磁细菌多样性, 共获得了 29 条趋磁细菌 16S rDNA 序列, 经聚类得到了 14 个 OTUs, 其中 13 个 OTUs 属于 α-变形菌纲的趋磁球菌, 1 个 OTU 属于 γ-变形菌纲(图 5, 黑色圆圈代表序列)[20]。而在此处较常见的多细胞趋磁原核生物由于丰度较低没有检出, 其16S rDNA序列和系统进化地位分析是通过显微操作挑取单细胞, 经基因组扩增后进行 16S rDNA 的二次扩增和文库测序得

到的(图 5, 黑色三角代表序列)[38-39]。将本研究得到的趋磁细菌序列与克隆文库到的序列进行相似性分析, 属于 α-变形菌纲的趋磁球菌的 10 个 OTUs 在本研究中检出。综上分析, 与克隆文库方法相比, 高通量测序方法得到的优势趋磁细菌类群一致, 可以较好地覆盖克隆文库的结果, 证明高通量测序方法可靠; 同时, 高通量测序方法得到了更多的趋磁细菌序列, 包含受关注的多细胞趋磁原核生物和其他趋磁细菌类群, 在趋磁细菌检出和多样性分析方面具有明显的优势。但两个样品中非优势趋磁细菌的群落结构略有不同, 可能是磁收对不同种类趋磁细菌的收集效率不一致所导致, 例如对轴向运动的趋磁螺菌和乒乓运动的多细胞趋磁原核生物, 磁收效率有待于进一步提高, 探索效率更高的方法收集趋磁细菌有待于提高。本研究中, 高通量测序(Roche 454)得到的序列片段较短, 只有 500 bp 左右, 只能覆盖 16S rDNA 的 V1-V3 高变区, 目前其他二代测序方法也难以获得 16S rDNA 序列的全长[40-41]。后期可以考虑利用 PacBio 等三代测序方法替代二代测序方法[42], 可以实现 16S rDNA 全长序列测序, 将会得到更多的趋磁细菌序列信息。

由于本实验所用的比对方法以已知的趋磁细菌为参照, 对新的趋磁细菌类型确定有限, 因此可能会大大低估趋磁细菌的多样性。我们尝试找到了磁收样品 B_M 和沉积物样品 B_S 的差异 OTUs, 同时也对 B_M 样品中相对丰度显著增加的 OTUs 进行了分析, 以此预测新的趋磁细菌类群。共有和差异分析显示, 磁收样品 B_M 和沉积物样品 B_S 共有的 OTUs 仅为 1 177 个, 分别占 B_M 和 B_S 样品的 36.8%和 23.2%, 磁收样品中特有的 OTUs 有 2 022 个, 比例达到了 63.2%, 磁收处理是收集趋磁细菌的有效方法, 该处理明显改变了样品中细菌的群落结构。OTU 系统进化地位分析显示, 磁收样品中特有 OTUs 主要属于变形菌门的 α-变形菌纲、δ-变形菌纲和 γ-变形菌纲。为排除扩增子测序偏差的影响, 我们对这些 OTUs 中丰度相对较高(reads 数大于 10)的 35 个 OTUs 进行深入分析, 这些 OTUs 除一个分类地位未定外, 其余均属于变形菌门。其中, 19 个 OTUs 与趋磁细菌相关, 16 个未发现与趋磁细菌相关, 这些差异 OTUs 有可能是潜在的趋磁细菌新类群。同时, 我们找到了 B_M 样品中比例显著增加(>3 倍)的 OTUs 共 58 个, 系统分类和进化地位分析显示, 这些序列多数属于变形菌门的 α-变形菌纲、γ-变形菌纲和 δ-变形菌纲, 还有部分 OTUs 属于拟杆菌门、浮霉菌门和蓝细菌门; 与数据库中的已知趋磁细菌进行对比分析, 发现其中仅有 4 个 OTUs 与已知的趋磁细菌序列相关, 多数 OTUs 与未培养的细菌相似性最高。例如, OTU4, 其 reads 数在在 B_S 样品中仅为 3.3%, 而 B_M 样品中为显著优势菌, 占总 reads 数的 61.7%, 是 B_S 样品中相对丰度的 19 倍, 如此之高的差异极有可能是磁收造成的, 所以我们推测, OTU4 及其他相对比例显著增加的 OTUs 也可能是新的趋磁细菌种类。目前在变形菌门的 α-变形菌纲、γ-变形菌纲和 δ-变形菌纲已发现了趋磁细菌, 也发现了浮霉菌门中存在趋磁细菌的新证据[12, 43], 而在拟杆菌门和蓝细菌门中是否存在新的趋磁细菌种类, 值得期待, 需要进行下一步的研究。

趋磁细菌体内磁小体的合成是受基因即磁小体岛基因控制的, 磁小体岛基因是趋磁细菌的特异功能基因, 研究表明, 趋磁细菌的磁小体岛可能是通过基因的横向转移得到的 [8-9, 12, 43]。本论文方法主要基于趋磁细菌 16S rRNA 基因的分析, 由于 16S rRNA 基因和基因组尤其是磁小体岛的进化并不是完全平行的, 与趋磁细菌 16S rRNA 基因相似性很高的细菌有的可能不具有趋磁性, 并非趋磁细菌。相对于磁小体岛上的功能基因, 单纯以 16S rRNA 基因作为判断是否为趋磁细菌可能会不准确。另外, 磁收富集样品中也含有许多非趋磁细菌, 例如磁性颗粒附着细菌, 磁收样品 B_M 中特有的 OTUs 和比例显著增加的 OTUs 可能是新的趋磁细菌种类, 但我们目前无法排除磁性颗粒附着细菌的可能性。下一步, 我们将综合 16S rRNA 基因的扩增子测序和宏基因组测序中磁小体岛基因进行分析, 尝试发现或验证这些新的细菌种类。

综上所述, 本研究通过高通量测序平台对潮间带沉积物和磁收集样品进行测序, 了解沉积物细菌类群, 对趋磁细菌进行多样性和系统进化研究, 并预测新的趋磁细菌种类, 这些结果将为下一步发现和开发新的趋磁细菌类群提供参考结果。通过与传统方法比较, 在趋磁细菌多样性分析方面, 高通量测序方法效果优于传统方法, 具有明显的优势。

致谢: 本研究的样品由中国科学院海洋研究所徐剑虹老师协助采集, 电子显微镜的使用得到中国海洋大学姜明老师的帮助和支持, 在此向两位老师表示感谢。

参考文献:

[1] Bellini S. On a unique behavior of freshwater bacteria[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2009, 27(1): 3-5.

[2] Bellini S. Further studies on “magnetosensitive bacteria”[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2009,

27(1): 6-12.

[3] Blakemore R.P. Magnetotactic bacteria[J]. Science, 1975, 190(4212): 377-379.

[4] Frankel R B. The discovery of magnetotactic/magnetosensitive bacteria[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2009, 27(1): 1-2.

[5] Spring S, and Bazylinski D A. Magnetotactic Bacteria, in Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (Ed), The Prokaryotes (Vol. 2: Ecophysiology and Biochemistry)[M]. New York, NY, USA: Springer, 2006: 842-862.

[6] Amann R, Peplies J, and Schüler D. Diversity and Taxonomy of Magnetotactic Bacteria, in Schüler D (Ed), Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria[M]. Berlin: Springer, 2006. 25-36.

[7] Faivre D, and Schüler D. Magnetotactic Bacteria and Magnetosomes[J]. Chemical Reviews, 2008, 108(11): 4875-4898.

[8] Jogler C, and Schüler D. Genomics, genetics, and cell biology of magnetosome formation[J]. Annual Review of Microbiology, 2009, 63: 501-521.

[9] Lefevre C T, and Bazylinski D A. Ecology, diversity, and evolution of magnetotactic bacteria[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2013, 77(3): 497-526.

[10] Kolinko S, Jogler C, Katzmann E, et al. Single-cell analysis reveals a novel uncultivated magnetotactic bacterium within the candidate division OP3[J]. Environmental Microbiology, 2012, 14(7): 1709-1721.

[11] Lin W, and Pan Y. A putative greigite-type magnetosome gene cluster from the candidate phylum Latescibacteria[J]. Environmental Microbiology Reports, 2015, 7(2): 237-242.

[12] Lin W, Pan Y, and Bazylinski D A. Diversity and ecology of and biomineralization by magnetotactic bacteria[J]. Environmental Microbiology Reports, 2017, 9(4): 345-356.

[13] Uebe R, and Schüler D. Magnetosome biogenesis in magnetotactic bacteria[J]. Nature Reviews Microbiology, 2016, 14(10): 621-637.

[14] Schüler D. Genetics and cell biology of magnetosome formation in magnetotactic bacteria[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2008, 32(4): 654-672.

[15] Bazylinski, D A, and Frankel R B. Magnetosome formation in prokaryotes[J]. Nature Reviews Microbiology, 2004, 2(3): 217-230.

[16] Zhou K, Zhang W Y, Yu-Zhang K, et al. A novel genus of multicellular magnetotactic prokaryotes from the Yellow Sea[J]. Environmental Microbiology 2012, 14(2): 405-413.

[17] Pradel N, Fuduche M, and Ollivier B. Magnetotactic bacteria population in a pristine French Atlantic lagoon[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2016, 23(1): 691-697.

[18] Dong Y, Li J, Zhang W, et al. The detection of magnetotactic bacteria in deep sea sediments from the east Pacific Manganese Nodule Province[J]. Environmental Microbiology Reports, 2016, 8(2): 239-249.

[19] 牟晓燕, 杨永亮, 李春雁, 等. 山东半岛荣成湾月湖环境特征研究[J]. 青岛大学学报, 1999, 14: 56-59.
Mu Xiaoyan, Yang Yongliang, Li Chunyan, et al. Environmental characteristics of seawater in the Yuehu inlet, Rongcheng Bay, China[J]. Journal of Qingdao University, 1999, 14: 56-59.

[20] Du H J, Chen Y R, Zhang R, et al. Temporal distributions and environmental adaptations of two types of multicellular magnetotactic prokaryote in the sediments of Lake Yuehu, China[J]. Environmental Microbiology Reports, 2015, 7(3): 538-546.

[21] Wolfe R S, Thauer R K, and Pfennig N. A 'capillary racetrack' method for isolation of magnetotactic bacteria[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1987, 45: 31-35.

[22] 周克. 黄海沉积物多细胞趋磁原核生物的特性研究[D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2010.
Zhou Ke. Characterization of multicellular magnetotactic prokaryotes from coastal sediments of Yellow Sea[D]. Beijing: Graduate University of Chinese Academy of Sciences, 2010.

[23] Turner S, Pryer K M, Miao V P, et al. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis[J]. The Journal of Eukaryotic Microbiology, 1999, 46(4): 327-338.

[24] Huse S M, Dethlefsen L, Huber J A, et al. Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing[J]. PLoS Genetics, 2008, 4(11): e1000255.

[25] Bolger A.M., Lohse M., and Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. Bioinformatics, 2014, 30(15): 2114-2120.

[26] Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(23): 7537-7541.

[27] Edgar R C, Haas B J, Clemente J C, et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection[J]. Bioinformatics, 2011, 27(16): 2194-2200.

[28] Amato K R, Yeoman C J, Kent A, et al. Habitat degradation impacts black howler monkey (Alouatta pigra) gastrointestinal microbiomes[J]. The ISME Journal, 2013, 7(7): 1344-1353.

[29] Chao A, and Lee S M. Estimating the number of classes via sample coverage[J]. Publications of the American Statistical Association, 1992, 87: 210-217.

[30] Chao A. Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population[J]. Scandinavian Journal of Statis-

tics, 1984, 11(4): 265-270.

[31] Simpson J M, Kocherginskaya S A, Aminov R I, et al. Comparative microbial diversity in the gastrointestinal tracts of food animal species[J]. Integrative and Comparative Biology, 2002, 42(2): 327-331.

[32] Magurran A E. Ecological diversity and its measurement[M]. Princeton, N.J., USA: Princeton University Press, 1988: 81-89.

[33] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41: 590-596.

[34] Altschul S F, Gish W, Miller W, et al. Basic local alignment search tool[J]. Journal of Molecular Biology, 1990, 215(3): 403-410.

[35] Thompson J D, Higgins D G, and Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice[J]. Nucleic Acids Research, 1994, 22(22): 4673-4680.

[36] Kumar S, Nei M, Dudley J, et al. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences[J]. Briefings in Bioinformatics, 2008, 9(4): 299-306.

[37] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729.

[38] Zhang R, Chen Y R, Du H J, et al. Characterization and phylogenetic identification of a species of spherical multicellular magnetotactic prokaryotes that produces both magnetite and greigite crystals[J]. Research in Microbiology, 2014, 165(7): 481-489.

[39] Chen Y R, Zhang R, Du H J, et al. A novel species of ellipsoidal multicellular magnetotactic prokaryotes from Lake Yuehu in China[J]. Environmental Microbiology, 2015, 17(3): 637-647.

[40] Shokralla S, Spall J L, Gibson J F, et al. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research[J]. Molecular Ecology, 2012, 21(8): 1794-1805.

[41] Metzker M L. Sequencing technologies - the next generation[J]. Nature Reviews Genetics, 2010, 11(1): 31-46.

[42] Wagner J, Coupland P, Browne H P, et al. Evaluation of PacBio sequencing for full-length bacterial 16S rRNA gene classification[J]. BMC Microbiology, 2016, 16(1): 274.

[43] Lin W, Zhang W, Zhao X, et al. Genomic expansion of magnetotactic bacteria reveals an early common origin of magnetotaxis with lineage-specific evolution[J]. The ISME Journal, 2018, 12(6): 1508-1519.

Diversity of magnetotactic bacteria in intertidal sediments of Lake Yuehu, Rongcheng

ZHANG Wen-yan[1, 2, 3, 4], PAN Hong-miao[1, 2, 4], DONG Yi[1, 2, 4], DU Hai-jian[1], CHEN Yi-ran[1], WU Long-fei[5, 6], XIAO Tian[1, 2, 4, 5]

(1. CAS Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266273, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 4. Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071; 5. International Associated Laboratory of Evolution and Development of Magnetotactic Multicellular Organisms (LIA-MagMC), Beijing 100029; 6. Aix Marseille University, CNRS, LCB, Marseille 13009, France)

Received: Sep. 25, 2018
Key words: intertidal zone; diversity; magnetotactic bacteria; high-throughput sequencing

Abstract: Lake Yuehu is a typical natural lagoon, and several types of magnetotactic bacteria have been found in the intertidal sediments. To extend the knowledge about the bacterial community structure and the diversity of magnetotactic bacteria in the intertidal sediments, we conducted a systematic analysis of the population composition of 16 S rDNA amplicons of sediment samples (B_S) and magnetic samples (B_M) using the Roche 454 high-throughput sequencing platform. The major bacterial group in the sediment was found to be δ-Proteobacteria, accounting for 26.4% of the total bacteria, followed by Chlorophyceae, γ-Proteobacteria, and α-Proteobacteria, whereas there was an obvious reduction in the diversity and species richness in the magnetic samples, in which α-Proteobacteria predominated with a relative proportion of 72.6%. In the magnetic samples and the sediment samples, 1 612 and 186 reads were found to be related to magnetotactic bacteria, accounting for 5.76% and 0.85% of the total bacterial reads, respectively. The number of magnetotactic bacteria in the magnetic samples was 6.8 times that of magnetotactic bacteria in the sediment samples. Phylogenetic analysis of the magnetotactic bacterial sequences revealed that the majority of them belonged to α-Proteobacteria, with *Magnetococcus* being dominant, and a few sequences belonged to the multicellular magnetotactic prokaryotes of δ-Proteobacteria. *Magnetospirillum* sp. was detected only in B_M samples, and *Magnetovibrio* sp. in B_M samples was found in a higher proportion than that in B_S samples. Meanwhile, multicellular magnetotactic prokaryotes and *Magnetospira* sp. were more predominant in B_S samples. By analyzing the different Operational taxonomic units (OTUs) between the two samples, it is believed that there may be a large number of unknown new groups of magnetotactic bacteria in the intertidal sediments. These analysis results will provide the basic information necessary for the next step of cultivating and developing the functional species among the magnetotactic bacteria and discovering the novel groups and the ecological functions of magnetotactic bacteria.

(本文编辑: 赵卫红　梁德海)