

# 南沙海区沉积物中细菌和古细菌 16S rDNA 多样性的研究\*

许飞 戴欣 陈月琴<sup>1)</sup> 周惠 蔡剑华<sup>†</sup> 屈良鹄

(中山大学基因工程教育部重点实验室 广州 510275)

<sup>†</sup>(中国科学院南海海洋研究所 广州 510301)

**摘要** 采用细菌 16S rDNA 通用引物和 PCR 扩增等方法,构建了南海南沙海区沉积物 16S rDNA 文库,并通过 RFLP 酶切分型对所获得的 70 个克隆进行测序。从国际分子生物学数据库中调取相关序列,以 PAUP4.0 分析软件构建序列同源性矩阵和系统发育树图。结果表明,与细菌文库中克隆相似的微生物属于 4 个细菌类群:变形细菌(*Proteobacteria*)(60%)、革兰氏阳性细菌(*Gram-positive bacteria*)(13%)、浮霉菌(*Planctomycetes*)(10%)和无硫绿细菌(*Green non-sulfur bacteria*)(6%),其中变形细菌(包括  $\delta$ -、 $\gamma$ -和  $\alpha$ -变形细菌)是明显的优势类群。采用 Blast 程序对所有序列基因数据库进行搜索,发现只有一个克隆与已知序列完全相似,说明文库具有极高的多样性。但是对古细菌文库中所获得的克隆子进行二级结构和序列特征分析的结果表明,这些克隆子均为海洋未获培养的细菌,因此在作者的文库中并未有古细菌的发现。

**关键词** 南海,海洋沉积物,细菌,古细菌,多样性

**中图分类号** Q93

目前的研究表明,海洋微生物不仅在海洋生态环境和物质循环中具有极其重要的作用,也是各种新型生物活性物质的潜在来源(Kolber *et al.*, 2001)。由于世界面临严重的资源、环境和人口问题,海洋生物资源包括海洋微生物资源的开发与多样性的研究已成为各沿海国家和地区关注的热点(张四明等, 2000; 李德尚等, 2002; Todorov *et al.*, 2000)。

有关海洋微生物的研究早在 19 世纪就已经进行,在随后的研究中,人们进一步认识到微生物资料在阐明海洋中进行的过程及其实质均有重要的意义(科利斯, 1958)。20 世纪 40 年代以来,人们一直采用分离培养的方法来研究海洋微生物。但是由于目前分离培养技术的限制,加上对许多海洋细菌的营养要求、培养条件等所知甚少,许多已知类群的海洋细菌,如浮游细菌-SAR clusters、与海洋动植物共生或共栖的细菌以及生活在高浓度  $H_2S$  环境中的氧化

硫细菌等许多属种都未能有效的对其进行分离培养,导致应用常规的分离培养方法无法全面地反映海洋微生物资源状况(Boivin-Jahns *et al.*, 1995),因此,非常有必要建立新的技术和方法来研究和开发海洋微生物资源。基于大分子 rRNA 及其基因结构分析基础的分子生物学技术,人们得以建立许多不依赖于微生物分离培养的分析方法,对许多无法通过常规手段分离培养的海洋细菌及古细菌进行深入研究,并为认识海洋微生物群落结构和多样性提供一个更客观的方法(Pace, 1997)。

南沙群岛是一接近赤道的热带海区,由于样品采集和分析方法的局限性,目前关于该海区微生物的报道非常少。作者采用以大分子核糖体 RNA 基因作为分类指标,对南沙海域的微生物多样性进行研究。

\* 教育部长江学者特聘教授配套优秀青年教师骨干基金(2000—2001)资助项目;广东省自然科学基金面上项目,001213 号。许飞,硕士,E-mail:bio-in@hotmail.com

1) 通讯作者,E-mail:lsbre16@zsu.edu.cn

收稿日期:2002-12-04;收修改稿日期:2003-04-15

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

沉积物样品由中国“试验 3 号”科学考察船采自南沙群岛西南部海区水深 400m 处(6°N, 110°E), 重量约为 1kg; 采样过程均按无菌要求进行, 样品采集后置于无菌袋中保存于 -20℃, 运至实验室保存于 -80℃。每次取样提取 DNA 前, 去除样品表层, 避免被陆地空气污染。

### 1.2 方法

**1.2.1 总 DNA 的提取和纯化** 采用两种方法提取总 DNA: (1)改进的 SDS-CTAB 法, 具体步骤见 Zhou 等(1997)。(2)溶菌酶-SDS-蛋白酶混合法, 具体步骤见 Kato 等(1997)。提取后于 -20℃ 保存备用。纯化的方法见 Zhou 等(1997)。

### 1.2.2 目的基因片段的 PCR 扩增和文库的构建

细菌文库 16S rDNA 的 PCR 扩增采用细菌 16S rDNA 扩增通用引物 16 + (5'-AGAGTTG ATCCTG-GCTCAG-3') 和 1492r (5'-GGTGA CCTGTTACGACTT-3'), 分别对应于 *E. coli* 16S rRNA 8-27 位和 1510-1492 位核苷酸。PCR 反应条件为: 94℃ 变性 4min, 然后 94℃ 1min、45℃ 1.5min、72℃ 2min, 循环 26 次; 72℃ 延伸 10min。古细菌文库 16S rDNA 的 PCR 扩增采用通用引物 w017 (6f, 5'-ATTCYGGTTGATC-CYGSCRG-3') 和古细菌通用引物 w002 (1509r, 5'-GNTACCTT GTTACGACTT-3') (Godon *et al.*, 1997), PCR 反应条件为: 94℃ 变性 4min, 然后 94℃ 1min、50℃ 1min、72℃ 2min, 循环 30 次; 72℃ 延伸 10min。扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。将上述的 PCR 产物经 QIAquick PCR 纯化试剂盒(QIA-GEN)纯化后, 进行补平和磷酸化。将补平和磷酸化的 PCR 扩增产物连接到 PTZ18 质粒载体的 SmaI 位点上, 转化大肠杆菌 TG1 细胞, 在含有 X-gal 和氨苄青霉素的 2YT 培养基上选择具有氨苄青霉素抗性的白色转化子构建 16S rDNA 文库。

**1.2.3 RFLP 酶切分型和序列测定** 对细菌文库克隆进行 PCR 检测, 并选用 *Afa*I、*Alu*I、*Hae*III、*Msp*I 四种限制性内切酶进行限制性内切酶片断长度多态性分析(RFLP), 筛选得到具有不同的多态性克隆, 测序以 P20 (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') 或 P48 (5'-AGCGG ATAACAATTTACACAGGA-3') 为引物, 在全自动测序仪(Perkin Elmer 377)完成。

**1.2.4 系统树构建及二级结构分析** 系统发育树图(图 1)中所有参考序列来源于国际分子生物学

数据库。将细菌文库序列都输入 Ribosomal Database Project 用 CHECK-CHIMERA (Maidak *et al.*, 2000) 软件分析检查, 去除嵌合及怪异序列。其余序列输入 Genbank 以 Blast 程序进行序列相似性比较分析。通过 Cluster W 程序(Tompson *et al.*, 1994)对序列进行多重比对, 采用 PAUP4.0(版本 4.0 b8)程序(Swofford, 1999), 使用 Kimura two-parameter(Kimura, 1980)模型构建序列距离矩阵, 使用 Neighbor-joining 法(Saito *et al.*, 1987)构建系统进化树, Bootstrap 法(Felsenstein, 1985)检测系统树, 自展系数为 1000。对古细菌文库所获克隆进行全部 16S rRNA 序列的测定, 二级结构图的绘制及序列特征分析参照文献(Gutel, 1996; Woese, 1987)。

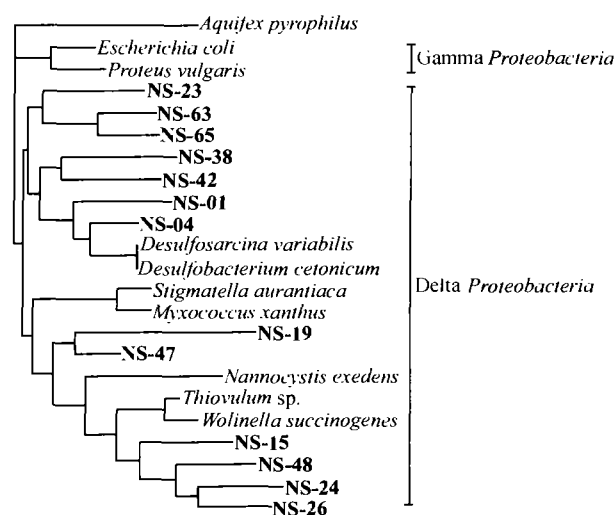


图 1 基因文库中与  $\delta$ -变形细菌相关的 16S rDNA 系统发育树图

Fig. 1 Phylogenetic tree of the NS 16S rDNA clones that are members of the  $\delta$ -Proteobacteria group

注:嗜火产液菌为外类群,采用邻接法(JC 矩阵)构建系统发育树图,树图主要节点的 bootstrap 值 > 50%

## 2 结果

### 2.1 细菌文库

在构建的南沙海洋沉积物细菌 16S rDNA 克隆文库中,对获得的上千个转化子进行 PCR 检测,发现其中约 200 个克隆含有正确长度的外源片断(约 1.5kb),使用 *Afa*I、*Alu*I、*Hae*III、*Msp*I 限制性内切酶进行 RFLP 酶切分型,得到了约 70 个具有不同酶切图谱的克隆。在构建的古细菌文库中只发现 2 个克隆,所得的两个克隆均与来自环境沉积物中未培养菌有着较高的同源性(80%)。

作者分别构建了 5 个主要类群的系统发育树图

和同源矩阵(图 1, 表 1), 但由于版面的限制, 只给出了含量最为丰富的  $\delta$ -变形细菌 (*Proteobacteria*) 的发育树图和同源矩阵。系统学分析的结果显示, 与细菌文库中克隆相似的微生物主要属于 4 个细菌类群, 其中与变形细菌相似的克隆为优势类群, 在 70 个克隆中有 42 个分别与该类群的  $\delta$ -、 $\gamma$ -和  $\alpha$ -亚簇相似, 9 个克隆则与革兰氏阳性细菌 (*Gram-positive bacteria*) 相似, 7 个克隆与浮霉菌 (*Planctomycetes*) 相似,

4 个克隆与无硫绿细菌 (*Green nonsulfur bacteria*) 相似, 2 个克隆与疣微菌 (*Verrucomicrobia*) 相似, 有 1 个克隆分别与噬纤维菌/黄杆菌/拟杆菌群 (*Cytophaga/Flavobacterium/Bacteroides*)、硝化螺菌群 (*Nitrospira* group) 和螺旋体 (*Spirochaetes*) 相似, 还有 3 个克隆, 与之相似的序列均来自环境沉积物中未培养细菌。

表 1  $\delta$ -变形细菌 16S rDNA 序列同源矩阵Tab.1 16S rDNA sequence similarity values of taxa in  $\delta$ -*Proteobacteria* group

克隆编号	相似性 (%)											
NS-01	100											
NS-04	87.5	100										
NS-15	79.1	78.0	100									
NS-19	72.9	75.2	76.4	100								
NS-23	78.6	78.1	76.4	73.5	100							
NS-24	80.4	82.4	81.6	78.6	78.1	100						
NS-38	74.6	78.7	78.2	68.9	72.6	76.3	100					
NS-26	80.1	82.7	82.7	78.5	77.4	92.1	78.4	100				
NS-63	77.5	79.0	76.4	73.6	80.5	80.9	74.0	79.5	100			
NS-65	75.8	77.0	75.9	70.6	77.1	79.7	73.8	78.8	90.4	100		
NS-42	76.9	81.2	76.0	70.0	76.1	77.6	77.2	77.0	75.5	76.2	100	
NS-47	84.4	83.2	77.6	78.9	78.0	83.2	75.5	81.6	79.8	77.4	78.0	100

## 2.2 古细菌文库

由于扩增古细菌引物的低保守性, 一般来说古细菌文库中都包含有较高比例的细菌克隆。所以作者对古细菌文库中所获得的 2 个克隆序列进行全部 16S rDNA 序列的测定, 进行二级结构图谱的绘制, 并由此根据大肠杆菌序列决定序列中碱基的具体位置 (Woese, 1987)。在作者的研究中, 共对 NS-71 序列的 43 个碱基位点与真细菌原界 (*Bacteria domain*)、古细菌原界 (*Archaea domain*) 和真核生物原界 (*Eucarya domain*) 特征序列进行比较分析 (表 2), 综合二级结构图谱和序列比较分析, 结果显示该序列为细菌类群, 明显区别于古细菌和真核生物, 同样对 NS-72 克隆的分析也显示该序列为海洋细菌, 因此在作者的文库中并未发现有古细菌的存在。

## 3 讨论与结语

### 3.1 沉积物总 DNA 的提取

由于来自海洋的沉积样品, 腐殖质类物质远比陆地淡水环境中的沉积样品和土壤样品多 (薛廷耀, 1962), 因此为了避免腐殖质等杂质的干扰 (腐殖质可以抑制各类生化反应), 作者选择了间接提取法-

溶菌酶-SDS-蛋白酶混合法 (Kato *et al.*, 1997) 提取总 DNA, 但同时也因提取率低, DNA 损失较大, 可能会对文库中微生物类群造成影响。另外, 作者也采用了直接提取法-SDS-CTAB 法 (Zhou *et al.*, 1997) 提取总 DNA, 该法虽然会增加腐殖质等杂质的含量, 但有效地避免了 DNA 的损失。因此, 作者采用了结合直接法和间接法的混合法提取沉积物中的总 DNA, 将两种方法所获 DNA 合并, 既可增加回收率, 又可部分地减少沉积中的杂质对 PCR 反应的影响。

### 3.2 总 DNA 纯化和 PCR 扩增

作者采用了稀释法排除残存的腐殖质对 PCR 反应的抑制作用, 逐级稀释的过程中, 腐殖质被不断的稀释, 从而消除了其对 Taq 酶的抑制作用。由于 PCR 扩增的偏向性, 即对不同的模板, 采用不同的引物和扩增条件, 扩增结果不同。PCR 的偏向性导致了 16S rDNA 克隆文库中所代表的各微生物类群的比例并不一定能反映原始样品中各微生物类群的比例 (Farrelly *et al.*, 1995), 因此对于 PCR 反应条件的摸索是相当必要的。实验中采用了降低退火温度 (45℃)、减少 PCR 反应的循环次数 (26 次) 等方法, 尽量减少 PCR 扩增的偏向性。

表 2 NS-71 克隆 16S rDNA 全序列特征分析

Tab.2 Comparison of domain-specific sequence signature in NS-71 16S rDNA sequence

核苷酸位点	细菌	古细菌	真核生物	NS-71	核苷酸位点	细菌	古细菌	真核生物	NS-71
9	C	G	G	G	756	C	G	A	C
10	A	Y	U	A	912	C	U	U	C
24	U	R	A	T	923	A	G	A	A
25	C	G	G	C	930	C	A	G	C
33	A	Y	A	A	931	C	G	G	C
53	R	C	C	A	952	U	C	C	T
113	G	C	C	T	962	C	G	U	C
338	A	G	A	A	966	G	U	U	G
339	C	G	C	C	973	G	C	G	G
350	G	Y	G	G	975	A	G	G	A
358	Y	G	G	T	1060	U	C	C	T
361	R	C	C	G	1086	U	C	Y	T
367	U	C	U	T	1087	G	C	U	G
377	G	C	Y	G	1109	C	A	A	C
386	C	G	R	C	1110	A	G	G	A
393	A	G	A	A	1197	A	G	G	A
403	C	A	A	C	1229	A	G	G	A
508	U	C	A	T	1381	U	C	C	T
523	A	C	A	A	1386	G	C	C	G
551	U	R	U	T	1387	G	U	C	G
585	G	C	U	G	1393	U	C	U	A
716	A	C	Y	A					

### 3.3 对细菌文库的探讨

与所测定的 70 个克隆最相似的细菌,往往是一些未获培养的细菌,其多数来自海洋环境。同时文库中约 86% 克隆与当前数据库中序列有着 5%—20% 的差异。这些结果表明文库的细菌多样性是相当高的,而且存在了大量的未获培养的细菌,代表着新的微生物属种。

作者的研究表明,从南沙沉积物中获得的绝大部分 16S rDNA 序列属于 *Proteobacteria* 类群,其中包括  $\delta$ -、 $\gamma$ -和  $\alpha$ -亚族,这一结果与近年来国外有关海洋沉积物中微生物多样性的报道一致 (Li *et al*, 1999)。作者在文库中发现了 16 个克隆属于海洋沉积物中的  $\delta$ -*Proteobacteria*, 3 个克隆与以硫还原细菌 (SRB) 相关, 11 个克隆与海洋中未获培养的  $\delta$ -*Proteobacteria* 相关 (图 1)。据报道 (Urakawa *et al*, 1999), 从海洋沉积物中获得的  $\delta$ -*Proteobacteria* 细菌主要以硫还原细菌 (SRB) 为主, 作者只获得 3 个  $\delta$ -*Proteobacteria* 克隆均与 SRB 相关 (NS-16—NS-18), 大多数与未获培养的  $\delta$ -*Proteobacteria* 相关, 表明沉积物中存在很多未知的  $\delta$ -*Proteobacteria*, 有待进一步研究。同时作者所构建的序列同源矩阵显示,  $\delta$ -*Proteobacteria* 细菌的所有克隆彼此之间有着较低的相

似性 (< 93%), 表明文库的多样性极高。15 个克隆属于  $\gamma$ -*Proteobacteria* 类群, 并且其中的 3 个克隆与海洋内共生氧化硫细菌相关, 大多数克隆仍与海洋中未获培养的  $\gamma$ -*Proteobacteria* 相关。

序列比较表明, 11 个克隆属于  $\alpha$ -*Proteobacteria* 类群, 这一丰度与在其他海洋沉积物的研究结果有所不同。人们发现在陆地土壤环境以及海水中占优势的  $\alpha$ -*Proteobacteria* 在海洋沉积物中却极少, 甚至没有发现 (Urakawa *et al*, 1999), 但这有可能是沿岸以及浅海沉积物的特征。Li 等 (1999) 对日本远海深海沉积物微生物多样性的研究结果与作者对南沙的分析结果基本一致, 在他们所测定的 75 个 16S rDNA 序列中, 除  $\gamma$ -*Proteobacteria* 占据优势 (24 个序列) 外, 第二大优势类群就是  $\alpha$ -*Proteobacteria* (8 个序列) 和  $\epsilon$ -*Proteobacteria* (7 个序列)。因此有理由相信高丰度  $\alpha$ -*Proteobacteria* 是深海沉积物中所特有的类群, 是深海沉积微生物中的标志类群。

在文库中发现 9 个克隆属于革兰氏阳性细菌, 其中 4 个克隆与未获培养的高 G + C 革兰氏阳性细菌聚为一类, 5 个克隆与海洋芽孢杆菌等一些低 G + C 革兰氏阳性细菌聚为一类。该类细菌一般在深海沉积物中丰度较低, 但是这类序列却在近海和浅海沉积物微生物多样性分析中经常发现。很多证

据已经表明海洋沉积物中确实存在着革兰氏阳性细菌(Ravenschlag *et al*, 1999),也是海洋沉积物细菌中的另一优势类群。另外有 7 个克隆与浮霉菌(*Planctomycetes*)相似,这也是海洋沉积物细菌中的一优势类群,还有 3 个克隆未能确定其所属类群,在进行系统学分析时,其位置是多变的。

### 3.4 对古细菌文库的探讨

尽管古细菌存在于海水中,是海洋浮游生物的细胞组成之一,但在作者的文库中并没有发现古细菌的存在。由于古细菌 PCR 扩增引物的低特异性,作者所得到的克隆在序列特征分析中被证明均属于未被培养的海洋细菌(克隆 NS-71 和 NS-72 16S rDNA 序列 Genbank 收录号分别为 AY172652 和 AY172653)。有研究表明古细菌在非极端环境-海洋沉积物中是非常稀少的,古细菌仅占沉积物原核生物的 2.5%—8% 或更少(Vetriani *et al*, 1999)。Todorov 等(2000)分析了其基因文库中的 91 个克隆,发现 94.5% 的克隆属于细菌,只有 2 个克隆与古细菌相关,因此在作者的文库中未发现古细菌的存在也并不奇怪。

在分析南沙这一典型的热带海区沉积物的微生物多样性时,作者获得的序列在大的类群上与国外对不同海域沉积物研究的相关文献报道大体一致(Gray *et al*, 1996; Li *et al*, 1999; Ravenschlag *et al*, 1999; Urakawa *et al*, 1999; Todorov *et al*, 2000),用作者获得的序列进行系统学分析的结果也表明海洋细菌类群的分布具有一定的规律性。同时,作者从南沙海区获得的大多数 16S rDNA 序列,都与发表在数据库中的 16S rDNA 序列表现出较大的差异(同源性仅为 80%—95%),显然,这些细菌在属种水平上完全不同,在这些未知种群中,蕴藏着目前还无法估量的资源。人类对海洋微生物多样性的认识有待深入,研究南海海域沉积物微生物的多样性,将进一步丰富人们对海洋微生物多样性的认识,为开发利用这一特殊生态环境的微生物资源奠定基础。随着研究理论的发展和研究技术的完善,人们必定从海洋的微生物世界中有新的收获。

### 参 考 文 献

- 李德尚、董双林, 2002. 对虾与鱼、贝类封闭式综合养殖的实验研究. *海洋与湖沼*, 33(1): 90—96
- 张四明, 邓 怀, 晏 勇等, 2000. 中华鲟随机扩增多态性 DNA 及遗传多样性研究. *海洋与湖沼*, 31(1): 1—7
- 薛廷耀编, 1962. *海洋细菌学*. 北京: 科学出版社, 1—157
- 科利斯 A E 著, 孙国玉译, 1958. 海洋微生物学的主要任务. *海洋与湖沼*, 1(3): 337—343
- Boivin-Jahns V, Bianchi A, Ruimy R *et al*, 1995. Comparison of phenotypic and molecular methods for the identification of bacterial strains isolated from a deep subsurface environment. *Appl Environ Microbiol*, 61(9): 3400—3406
- Farrelly V, Rainey F A, Stackebrandt E, 1995. Effect of genome size and rRNA gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl Environ Microbiol*, 61(7): 2798—2801
- Felsenstein J, 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4): 783—791
- Godon J J, Zumstein E, Dabert P *et al*, 1997. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol*, 63(7): 2802—2813
- Gray J P, Herwig R P, 1996. Phylogenetic analysis of the bacteria communities in marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 62(11): 4049—4059
- Gutel R R, 1996. Comparative sequence analysis and the structure of 16S and 23S rRNA. In: Zimmermann R A, Dahlberg A E ed. *Ribosomal RNA, Structure, Evolution, Processing, and Function in Protein Biosynthesis*. CRC Press, Boca Raton, FL. 111—128
- Kato C, Masui N, Horikoshi K, 1997. Properties of obligately barophilic bacteria isolated from a sample of deep-sea sediment from Izu-Bonin trench. *J Mar Biotechnol*, 4(1): 96—99
- Kimura M, 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*, 16(2): 111—120
- Kolber Z S, Plumley F G, Lang A S *et al*, 2001. Contribution of aerobic photoheterotrophic bacteria to the carbon cycle in the ocean. *Science*, 292(5526): 2492—2495
- Li L, Kato C, Horikoshi K, 1999. Microbial Diversity in Sediments Collected from the Deepest Cold-Seep Area, the Japan Trench. *Mar Biotechnol*, 1(4): 391—400
- Maidak B L, Cole J R, Lilburn T G *et al*, 2000. The RDP (Ribosomal Database Project) continues. *Nucleic Acids Res*, 28(1): 173—174
- Pace N R, 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 276(5313): 734—740
- Ravenschlag K, Sahn K, Perenthaler J *et al*, 1999. High bacterial diversity in permanently cold marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 65(9): 3982—3989
- Saito N, Nei M, 1987. The neighbor-joining method: a new method for constructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4(4): 406—425
- Swofford D L, 1999. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Version 4.0. Illinois Natural History Survey, Champaign, IL, 1—140
- Todorov J R, Chistoserdov A Y, Aller J Y, 2000. Molecular analysis of microbial communities in mobile deltaic muds of Southeastern Papua New Guinea. *FEMS Microbiol Ecol*, 33(2): 147—155
- Tompson J D, Higgins D G, Gibson T J, 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22(22): 4673—4680
- Urakawa H, Kita-Tsukamoto K, Ohwada K, 1999. Microbial diversity in

- marine sediments from Sagami Bay and Tokyo Bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiology*, 145(11): 3305—3315
- Vetriani C, Jannasch H W, MacGregor B *et al.*, 1999. Population structure and phylo-genetic characterization of marine benthic archaea in deep-sea sediments. *Appl Environ Microbiol*, 65(10): 4375—4384
- Woese C R, 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev*, 51(2): 221—271
- Zhou J Z, Davery M E, Figure J B, 1997. Phylogenetic diversity of a bacteria community determined from Siberian tundra soil DNA. *Microbiology*, 143(12): 3913—3919

## PHYLOGENETIC DIVERSITY OF BACTERIA AND ARCHAEA IN THE NANSHA MARINE SEDIMENTS, AS DETERMINED BY 16S rDNA ANALYSIS

XU Fei, DAI Xin, CHEN Yue-Qin, ZHOU Hui, CAI Jian-Hua<sup>†</sup>, QU Liang-Hu

(*School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou, 510275*)

<sup>‡</sup>(*South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, 510301*)

**Abstract** A 16S ribosomal DNA (rDNA) clone library from Nansha marine sediments was established by PCR using suitable primers. A total of 200 clones were selected by amplified rDNA restriction analysis(ARDRA) using four, fourbase-specific restriction enzymes(*Afa* I, *Alu* I, *Hae* III, *Msp* I). 70 restriction fragment length polymorphism(RFLP) types, constituting 35% of the total clone libraries, were detected and sequenced. Examination of 70 16S rDNA clones showed that the marine sediments of Nansha in the South China Sea contained a phylogenetically diverse population of organisms from the bacteria domain covering most of the microbial diversity in the libraries. For 70 clones, only one clone was identical to the known 16S rDNA sequences in the Ribosomal Database Project small subunit RNA database. In our clone library, all sequences had > 85% similarity to rDNA sequences retrieved from the DNA databases. The sequenced clones fell into four major lineages of the domain bacteria: the alpha, gamma and delta *Proteobacteria*, Gram-positive bacteria, Green nonsulfur bacteria, *Planctomycetes* and related organisms. 60% of clones belonged to the delta, alpha and gamma *Proteobacteria*, 13% belonged to Gram-positive bacteria, 10% to *Planctomycetes* and related organisms and the remaining 6% to Green nonsulfur bacteria(6%). The results suggest that these clones are very diverse in phylogeny. The subclass of the *Proteobacteria*, especially delta *Proteobacteria* predominates in this study. Molecular diversity of archaea was also analyzed by PCR amplification and sequencing of the rDNA clone library using an archaeaspecific primer set. The secondary structure and sequence signatures of the 16S rDNA from the representative clones were analyzed and the results showed that all clones obtained from the archaea clone library were closely related to uncultured bacteria. Therefore, no archaea was found in this library.

**Key words** South China Sea, Marine sediment, Bacteria, Archaea, Diversity