

# 连云港海底底泥及青海湖底泥细菌多样性研究

侯梅锋<sup>1,2,3</sup>, 何士龙<sup>1,2\*</sup>, 李栋<sup>3</sup>, 张洁<sup>1,2</sup>, 赵云<sup>1,2,3</sup>

(1. 中国矿业大学环境与测绘学院, 徐州 221008; 2. 江苏省资源环境信息工程重点实验室, 徐州 221008; 3. 中国科学院生态环境研究中心环境水质学国家重点实验室, 北京 100085)

**摘要:** 通过对不同盐环境连云港海底底泥和青海湖底泥样品构建细菌 16S rRNA 克隆文库, 对 2 个环境样品中细菌群落的多样性、丰富度和优势度等进行了比较, 并对其群落组成结构进行了分析. 结果表明, 连云港海底底泥文库的多样性指数 Shannon diversity ( $H$ ) 达到 3.53, 青海湖底泥文库的 Shannon diversity ( $H$ ) 达到 3.05, 这 2 个样品的细菌群落均具有很高的多样性. 连云港海底底泥中细菌序列主要类群为: 变形菌门 (Proteobacteria, 49.2%), 拟杆菌门 (Bacteroidetes, 29.2%); 而青海湖底泥中细菌序列主要类群为: 拟杆菌门 (Bacteroidetes, 60.0%), 厚壁菌门 (Firmicutes, 26.0%). 这些细菌中存在一些耐盐和嗜盐菌, 对工业生产和高盐废水处理具有重要参考意义.

**关键词:** 盐环境; 16S rRNA 克隆文库; 细菌多样性; 耐盐嗜盐菌

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2011)09-2681-08

## Bacterial Diversity in Lianyungang Marine Sediment and Qinghai Lake Sediment

HOU Mei-feng<sup>1,2,3</sup>, HE Shi-long<sup>1,2</sup>, LI Dong<sup>3</sup>, ZHANG Jie<sup>1,2</sup>, ZHAO Yun<sup>1,2,3</sup>

(1. School of Environment and Spatial Informatics, China Mining University, Xuzhou 221008, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Resources and Environment Information Engineering, Xuzhou 221008, China; 3. State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

**Abstract:** The 16S rRNA clone libraries of two different saline environments the Lianyungang marine sediment and the Qinghai Lake sediment were constructed. The Shannon diversity index, Chao and ACE richness index and Simpson dominance index of the bacterial communities in the two samples was compared, and the analysis for the bacterial community structures of this two samples was conducted. The results showed that the Shannon diversity index of Lianyungang marine sediment achieved 3.53, and that of Qinghai Lake sediment achieved 3.05, it was concluded that the bacterial communities in the two samples were diverse. The main bacterial communities in Lianyungang marine sediment included Proteobacteria (49.2%) and Bacteroidetes (29.2%), and Bacteroidetes (60.0%) and Firmicutes (26.0%) were the main bacterial communities in Qinghai Lake sediment. Some halotolerant and halophilic bacteria were found, which were important for industrial production and high saline wastewater treatment.

**Key words:** saline environment; 16S rRNA clone library; bacterial diversity; halotolerant and halophilic bacteria

目前, 微生物群落结构和多样性是微生物生态和环境科学研究的热点内容. 对目标环境微生物群落的种群结构和多样性进行分析并研究其动态变化, 可以为优化群落结构、调节群落功能和发现新的重要微生物功能类群提供有效的方法. 盐环境是一类特殊环境, 全球存在大量的盐环境, 如海洋、盐湖、盐滩、晒盐场、盐渍土壤以及地下岩盐和卤水. 近 30 年来, 各国学者对盐环境微生物进行了大量研究, 应用分子生物学方法分析揭示出盐环境中微生物的多样性及群落结构特征, 对其中的特殊微生物进行分离应用<sup>[1-4]</sup>. 其中的耐盐、嗜盐微生物, 它们在细胞构造、生命活动和种系进化上的突出特征, 不仅在生命科学的基础理论研究上有着重要的意义, 而且在现代生物技术产业、环境保护、农业和药物的开发应用上有巨大的潜力<sup>[5,6]</sup>, 是一类极具开发潜力的微生物资源.

本研究选择 2 类不同的盐环境连云港海底底泥及青海湖底泥为对象, 采用基于 16S rRNA 基因的分子生物技术调查了两组中细菌类微生物群落的多样性及组成结构, 并对两者进行了比较分析. 本研究将丰富人们对不同含盐环境微生物多样性的认识, 以期为进一步深入开发和利用盐环境微生物奠定基础.

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 样品来源及理化特征

2010 年 6 月, 分别从连云港近海 (34.75°N,

收稿日期: 2010-11-02; 修订日期: 2010-12-03

基金项目: 科技部国际科技合作项目 (2006DFA91870); 高等学校博士学科点专项科研基金项目 (20090095120018)

作者简介: 侯梅锋 (1985~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为高盐微生物, E-mail: hou.meifeng@163.com

\* 通讯联系人, E-mail: hslongrees@163.com

119.53°E) 海底和青海湖(36.75°N, 99.58°E) 湖底采集了底泥样品, 样品采集后于 4℃ 冰箱中保存. 样品理化特性见表 1.

表 1 样品理化特性

Table 1 Physical and chemical characters of the two samples

样品	pH	电导率 /mS·cm <sup>-1</sup>	Cl <sup>-</sup> 浓度 /g·L <sup>-1</sup>	DOC 浓度 /mg·L <sup>-1</sup>
连云港海底底泥	6.89	34.2	18.84	94.17
青海湖底泥	7.33	27.0	11.95	145.5

### 1.1.2 主要试剂与仪器

Fast DNA SPIN Kit for Soil 试剂盒, 鼎国 DNA 快速纯化/回收试剂盒, pMD-18-T Vector (TaKaRa)、Taq DNA 酶 (Tiangen)、dNTP (Tiangen)、DNA Marker (Biomed) 等. FastPrep 核酸快速提取仪, 凝胶成像仪 (Bio-rad)、电泳仪 (Bio-rad)、PCR 扩增仪 (Bio-rad) 等.

### 1.2 样品总 DNA 的提取和 PCR 扩增

样品总 DNA 的提取使用 Fast DNA SPIN Kit for Soil 试剂盒, 具体方法见试剂盒. 采用细菌 16S rDNA 通用引物 (27F: 5'-AGAGTTGATCCTGGC TCAG-3'; 1492R: 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增, 扩增片段大小约 1500 bp. 反应体系为 50 μL, 包括 10 × PCR buffer (1.5 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>) 5 μL, dNTP 4 μL (2.5 mmol·mL<sup>-1</sup>), 10 μmol 上下游引物各 1 μL, Taq DNA 酶 (2.5 μ·μL<sup>-1</sup>) 0.5 μL, 模板 DNA 1 μL, 无菌超纯水 37.5 μL. 反应条件为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1.5 min, 共 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 7 min. 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行分析, 然后用北京鼎国公司的 DNA 快速纯化/回收试剂盒对 PCR 扩增产物进行纯化, 具体方法见试剂盒.

### 1.3 克隆文库构建及系统发育分析

#### 1.3.1 克隆文库构建

将纯化后的 PCR 产物在 16℃ 条件下与载体 pMD-18-T Vector 过夜连接, 并转化至 JM109 感受态细胞 (TakaRa) 中, 接种到含有 X-gal、IPTG 和氨苄青霉素的 LB 平板培养基上, 37℃ 过夜培养, 挑取具有氨苄青霉素抗性的白色转化子, 构建克隆文库. 使用载体质粒引物 M13 确认质粒载体插入片段的长度, 利用 HaeIII 内切酶对插入序列进行酶切电泳分类, 每种类型选择 1~2 株为代表, 将菌悬液送至北京奥科生物公司进行测序.

#### 1.3.2 系统发育分析

DNA 序列首先由 BioEdit 软件进行手工校正,

然后同 RDP II 和 GenBank 数据库进行比对<sup>[7,8]</sup>, 保留最相似的序列, 用 Clustal-X 将参照序列和克隆序列一起进行排列<sup>[9,10]</sup>, 随后用 MEGA4.0 软件采用邻接法进行系统进化树的构建<sup>[11]</sup>, 可能的 chimera 序列用 RDP II 中的 CHIMERA\_CHECK 和 Bellerophon 软件进行检查<sup>[12]</sup>. 相似度超过 97% 的序列被认为是一个命名单位 (operational taxonomic unit, OTU). 并对 OTU 的丰富度指数  $S_{Chao1}$  和  $S_{ACE}$  以及多样性指数 Shannon diversity ( $H$ ) 进行了计算, 均匀度指数 Evenness ( $E$ ) 由公式  $E = H/\ln n$  计算, 式中  $n$  是 OTU 的总数. 覆盖率 Coverage ( $C$ ) 由公式  $C = 1 - (n_1/N)$  计算得到, 式中  $n_1$  是文库中只出现一次的 OTU 数目,  $N$  是克隆的总数.

## 2 结果

### 2.1 16S rRNA 克隆文库构建及多样性指数分析

分别将从连云港克隆文库和青海湖克隆文库挑取的克隆子与 GenBank 数据库中的序列进行比对, 获得最相似序列. 连云港克隆文库共获得 65 个有效克隆子, 青海湖克隆文库共获得 50 个有效克隆子, 将相似度超过 97% 的序列认为是 1 个 OTU, 结果见表 2 和表 3 (字母 F 和 N 是连云港海底底泥样品不同次克隆的编号, 字母 B 和 M 是青海湖底泥不同次克隆的编号).

分别计算 2 个文库的丰富度指数  $S_{Chao1}$  和  $S_{ACE}$ 、多样性指数 Shannon diversity ( $H$ )、均匀度指数 Evenness ( $E$ ) 和覆盖率 Coverage ( $C$ ), 结果见表 4. 这 2 个文库的覆盖率分别为 52.3% 和 64.0%, 说明 2 个文库的库容都比较小, 挑选的克隆理论上只反应了样品中 60% 左右的细菌多样性, 但这里的统计指数仅是实际值的保守估计. 最近 Kemp 等<sup>[13]</sup>运用了多种统计方法分析比较了文献中报道的 225 个来自多种环境的 16S rRNA 克隆文库的组成, 发现随着库容的增大, OTU 的数目总在增加, 表明至今的研究均未能穷尽样品中细菌多样性. 2 个文库的多样性指数 Shannon diversity ( $H$ ) 分别达到 3.53 和 3.05, 表明这 2 个样品的细菌群落具有较高的多样性.

### 2.2 16S rRNA 克隆文库分析

根据连云港海底底泥部分 16S rRNA 克隆序列构建的系统发育树见图 1, 根据青海湖底泥部分 16S rRNA 克隆序列构建的系统发育树见图 2, 通过系统发育树可以看出 2 个样品均具有丰富的细菌种属.

表 2 连云港海底底泥 16S rRNA 序列相似性比对结果

Table 2 BLAST result of 16S rRNA sequence from the Lianyungang marine sediment

OTU 编号(克隆编号)	GenBank 上的序列登记号	GenBank 上最相似序列(登记号)及相似度/%
Bacteroidetes 29.2%		
LYG-1( F-79 ,F-3 ,F-80)	HQ703804	<i>Croceimarina litoralis</i> ( EF108214) 96%
LYG-2( F-15)	HQ703795	<i>Ulvibacter antarcticus</i> ( EF554364) 96%
LYG-3( F-2 ,F-84 ,F-85 ,F-74 ,F-66)	HQ703796	uncultured Bacteroidetes bacterium( AJ969457) 94%
LYG-4( F-73)	HQ703822	uncultured bacterium( FJ716931) 95%
LYG-5( F-40)	HQ703815	uncultured marine bacterium( FR685113) 93%
LYG-6( F-24 ,F-61 ,F-91 ,F-93 ,F-39)	HQ703799	uncultured Bacteroidetes bacterium( GQ261811) 96%
LYG-7( F-63 ,F-45)	HQ703824	<i>Flexithrix dorotheae</i> ( AB078038) 90%
LYG-8( F-54)	HQ703801	uncultured Bacteroidetes bacterium( AJ441221) 97%
$\gamma$ -Proteobacteria 27.7%		
LYG-9( F-69 ,F-37)	HQ703825	uncultured $\gamma$ -Proteobacterium( DQ351758) 98%
LYG-10( N-74 ,N-64)	HQ703844	uncultured $\gamma$ -Proteobacterium( DQ351809) 98%
LYG-11( F-71 ,N-91 ,N-38 ,N-67 ,N-85 ,N-83)	HQ703821	uncultured $\gamma$ -Proteobacterium( DQ351787) 99%
LYG-12( F-10)	HQ703805	bacterial endosymbiont of <i>Idas</i> sp. ( AM402960) 95%
LYG-13( F-29)	HQ703814	uncultured $\gamma$ -Proteobacterium( GU230360) 97%
LYG-14( N-35)	HQ703831	uncultured $\gamma$ -Proteobacterium( FJ497636) 98%
LYG-15( F-35)	HQ703828	$\gamma$ -Proteobacterium RAp143( EU672868) 94%
LYG-16( F-62)	HQ703826	<i>Oleiphilus messinensis</i> ( NR025432) 91%
LYG-17( N-31)	HQ703843	marine bacterium <i>marisflavum</i> ( EF468717) 94%
LYG-18( F-13)	HQ703807	marine $\gamma$ -Proteobacterium HTCC2148( AY386334) 97%
LYG-19( F-56)	HQ703819	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. Ws17( AJ704790) 91%
$\delta$ -Proteobacteria 16.9%		
LYG-20( F-60)	HQ703802	uncultured candidate division OP8 bacterium( FN424394) 97%
LYG-21( F-68)	HQ703820	<i>Desulforhopalus singaporensis</i> ( NR028742) 94%
LYG-22( F-16)	HQ703808	benzene mineralizing consortium clone SB-29( AF029047) 96%
LYG-23( F-6)	HQ703812	<i>Desulfobaba gelida</i> ( NR028730) 97%
LYG-24( N-23 ,N-62)	HQ703836	uncultured <i>Desulfuromonas</i> sp. ( AY177801) 98%
LYG-25( N-69)	HQ703838	uncultured <i>Desulfuromonas</i> sp. ( DQ395053) 98%
LYG-26( N-53 ,N-63)	HQ703835	uncultured $\delta$ -Proteobacterium( GU230390) 95%
LYG-27( F-41 ,F-42)	HQ703829	<i>Pelobacter</i> sp. A3b3( AJ271656) 98%
$\varepsilon$ -Proteobacteria 3.1%		
LYG-28( N-87)	HQ703839	uncultured bacterium( FJ628292) 95%
LYG-29( F-89)	HQ703798	uncultured $\varepsilon$ -Proteobacterium( GQ249515) 99%
$\alpha$ -Proteobacteria 1.5%		
LYG-30( F-38)	HQ703800	<i>Rhodobacter</i> sp. 20V17( HM050420) 92%
Cyanobacteria 7.7%		
LYG-31( F-5 ,F-47)	HQ703816	chloroplast <i>Amphora coffeaeformis</i> ( FJ002183) 99%
LYG-32( F-11 ,F-51)	HQ703818	chloroplast <i>Thalassiosira punctigera</i> ( FJ002174) 99%
LYG-33( N-50)	HQ703837	chloroplast <i>Bacillaria paxillifer</i> ( AJ536452) 90%
Verrucomicrobia 6.2%		
LYG-34( F-1 ,F-75 ,F-83 ,F-77)	HQ703809	uncultured Verrucomicrobiales bacterium( DQ351738) 96%
Acidobacteria 1.5%		
LYG-35( F-86)	HQ703813	uncultured Acidobacteria bacterium( GU230436) 93%
Chloroflexi 1.5%		
LYG-36( F-57)	HQ703793	uncultured Chloroflexi bacterium( AY921965) 93%
Firmicutes 1.5%		
LYG-38( F-7)	HQ703810	uncultured <i>Bacillus</i> sp. ( AF454301) 91%
Actinobacteria 1.5%		
LYG-39( N-37)	HQ703834	uncultured actinobacterium( DQ431884) 93%
Nitrospira 1.5%		
LYG-37( F-49)	HQ703817	<i>Nitrospira</i> sp. enrichment culture clone LPTV-S11( HM131832) 97%

表 3 青海湖底泥 16S rRNA 序列相似性比对结果

Table 3 BLAST result of 16S rRNA sequence from the Qinghai Lake sediment

OTU 编号(克隆编号)	GenBank 上的序列登记号	GenBank 上最相似序列(登记号)及相似度/%
Bacteroidetes 60.0%		
QH-1( B-82 ,B-66 ,B-11 ,B-21 ,B-23 ,B-37 , B-47 ,M-47 ,M-87)	HQ703869	benzene mineralizing consortium clone SB-1( AF029039) 96%
QH-2( B-14 ,B-46)	HQ703854	uncultured bacterium( EF632650) 98%
QH-3( B-68)	HQ703850	uncultured bacterium( EF632713) 96%
QH-4( B-51)	HQ703849	uncultured Bacteroidetes bacterium( FJ516920) 95%
QH-5( B-47 ,B-78 ,B-90)	HQ703876	Bacteroidetes bacterium enrichment culture clone VNC3B008 ( GU339485) 96%
QH-6( M-77 ,M-5 ,M-28 ,M-64)	HQ703882	uncultured bacterium( EF632931) 99%
QH-7( B-16 ,B-87 ,B-20)	HQ703866	Rikenellaceae bacterium JAM-BA0501( AB362265) 98%
QH-8( B-17 ,M-35)	HQ703871	uncultured <i>Cytophagales</i> bacterium( FJ517039) 92%
QH-9( B-4)	HQ703874	uncultured <i>Cytophagales</i> bacterium( FJ516914) 96%
QH-10( B-73 ,B-8)	HQ703851	<i>Salegentibacter</i> sp. BSw21547( GQ452870) 98%
QH-11( B-96)	HQ703859	<i>Gillisia</i> sp. ZS4-6( FJ889670) 96%
QH-12( B-50)	HQ703863	<i>Cyclobacterium</i> <i>lianum</i> ( DQ534063) 94%
Firmicutes 26.0%		
QH-13( B-89 ,B-52)	HQ703855	<i>Clostridium</i> sp. P410( 2) ( GU370092) 98%
QH-14( B-9)	HQ703861	<i>Tindallia</i> <i>texcoconensis</i> ( DQ234901) 95%
QH-15( B-58)	HQ703865	<i>Clostridia</i> bacterium P221( 2) ( GU370091) 97%
QH-16( M-4)	HQ703883	uncultured bacterium( AB506399) 99%
QH-17( B-3 ,B-45 ,M-13 ,M-66)	HQ703875	<i>Alkalibacterium</i> <i>putridalgicola</i> ( AB294168) 98%
QH-18( B-70)	HQ703864	<i>Planococcus</i> sp. EP36( AM403727) 98%
QH-19( B-2)	HQ703872	uncultured <i>Bacillus</i> sp. ( AF454301) 93%
QH-20( M-10)	HQ703885	Arctic bacterium NP25( EU196331) 98%
QH-21( B-95)	HQ703867	uncultured bacterium( CU922503) 96%
Proteobacteria 8.0%		
QH-22( B-72)	HQ703870	Rhodocyclaceae bacterium FTL9( DQ451825) 98%
QH-23( B-56)	HQ703857	<i>Azoarcus</i> sp. CR23( AF011328) 96%
QH-24( B-63)	HQ703877	<i>Nitrosomonas</i> sp. Nm143( AY123794) 98%
QH-25( B-55)	HQ703856	$\gamma$ -Proteobacterium HRh1( FJ482231) 93%
Tenericutes 6.0%		
QH-26( B-94 ,B-6 ,B-41)	HQ703848	<i>Acholeplasma</i> <i>palmae</i> ( L33734) 93%

表 4 两地 16S rRNA 克隆文库的多样性指数及覆盖率

Table 4 Diversity index and Coverage of the two 16S rRNA clone libraries

样品	克隆数目	OTU 数目	$S_{Chao1}$	$S_{ACE}$	Shannon 指数	Evenness 指数	Coverage/%
连云港海底底泥	65	39	97.1	156.1	3.53	0.96	52.3
青海湖海底泥	50	26	51.5	67.3	3.05	0.94	64.0

### 2.2.1 连云港海底底泥 16S rRNA 克隆文库分析

在连云港海底底泥中变形菌门( Proteobacteria , 49.2%) 和拟杆菌门( Bacteroidetes , 29.2%) 为主要类群。变形菌门( Proteobacteria) 又包括  $\gamma$ -变形菌纲(  $\gamma$ -Proteobacteria , 27.7%) ,  $\delta$ -变形菌纲(  $\delta$ -Proteobacteria , 16.9%) ,  $\varepsilon$ -变形菌纲(  $\varepsilon$ -Proteobacteria , 3.1%) 和  $\alpha$ -变形菌纲(  $\alpha$ -Proteobacteria , 1.5%) 4 个纲。除此以外, 该文库还包括蓝细菌门( Cyanobacteria , 7.7%) , 疣微菌门( Verrucomicrobia , 6.2%) , 厚壁菌门( Firmicutes ,

1.5%) , 绿弯菌门( Chloroflexi , 1.5%) , 放线菌门( Actinobacteria , 1.5%) , 硝化螺旋菌门( Nitrospira , 1.5%) 和酸杆菌门( Acidobacteria , 1.5%) 7 个门。

对连云港海底底泥的 65 个测序克隆进行同源性分析发现, 有 4 个克隆属于拟杆菌门( Bacteroidetes) 中的 Flavobacteriaceae, 该科中大部分细菌属于中度嗜盐菌, 其中克隆 F15 与 *Ulvibacter antarcticus*( EF554364) 相似度为 96% , 该相似菌株可在 1.0% ~ 3.0% 的 NaCl 环境中生长, 最适生长盐度为 2.0%<sup>[14]</sup>。有 9 个克隆属于变形菌门

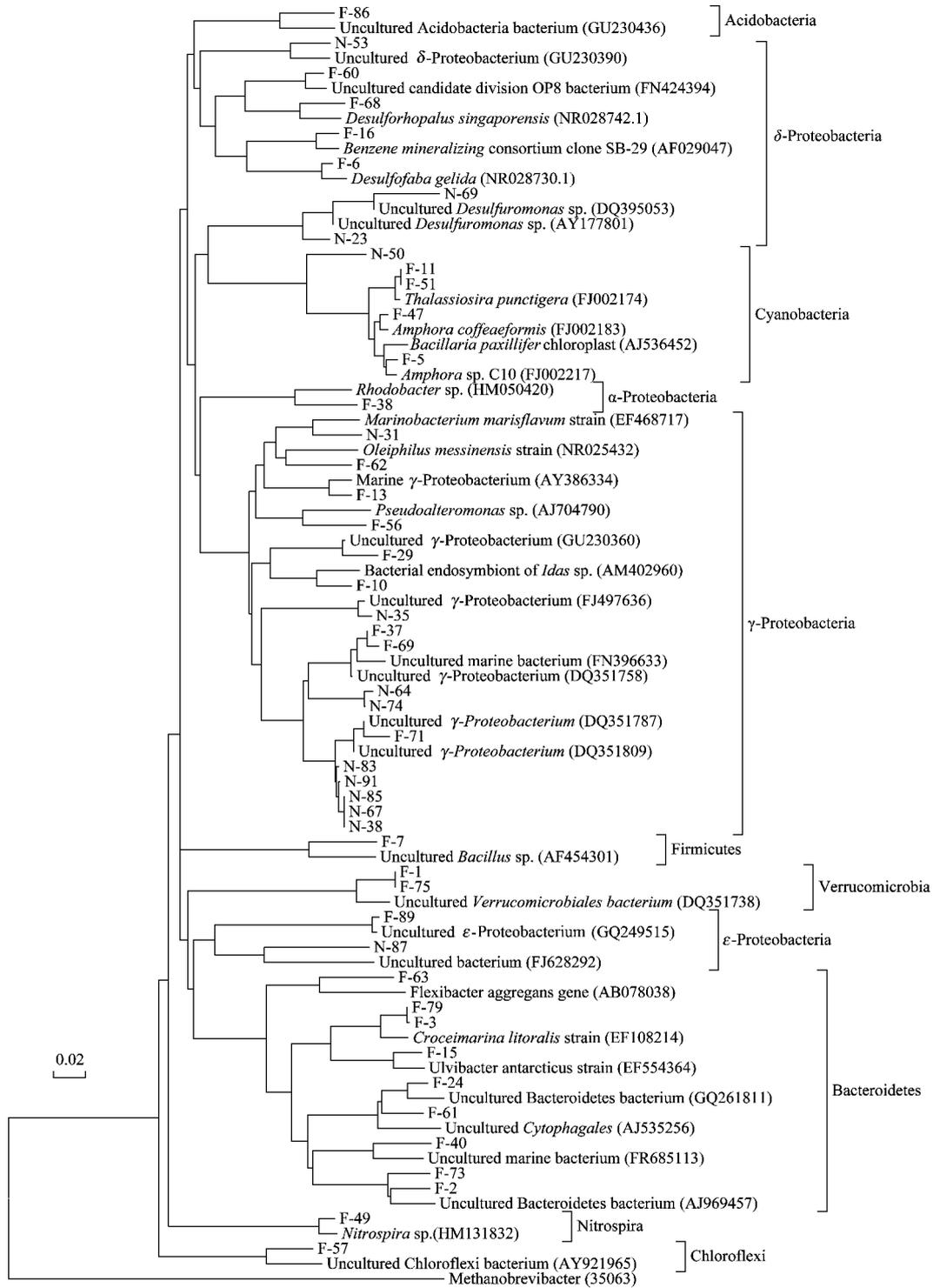


图 1 连云港海底底泥中部分 16S rRNA 克隆序列构建的系统发育树

Fig. 1 Neighbour-joining phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences ( partial clone sequences) obtained from the Lianyungang marine sediment

(Proteobacteria) 中的硫酸盐还原菌( sulfate-reducing bacteria, SRB), 该细菌类群属于中度嗜盐菌, 其中克隆 F6 与 *Desulfofaba gelida* ( NR028730) 相似度为 97% , 克隆 F41/F42 与 *Pelobacter* sp. A3b3

( AJ271656) 相似度为 98% . 克隆 F89 属于变形菌门 (Proteobacteria) 中的 *Sulfurovum* 属, 该属细菌可在 1.0% ~ 6.0% 的海盐环境中生长<sup>[15]</sup>, 克隆 F13 与海洋细菌 marine gamma proteobacterium HTCC2148

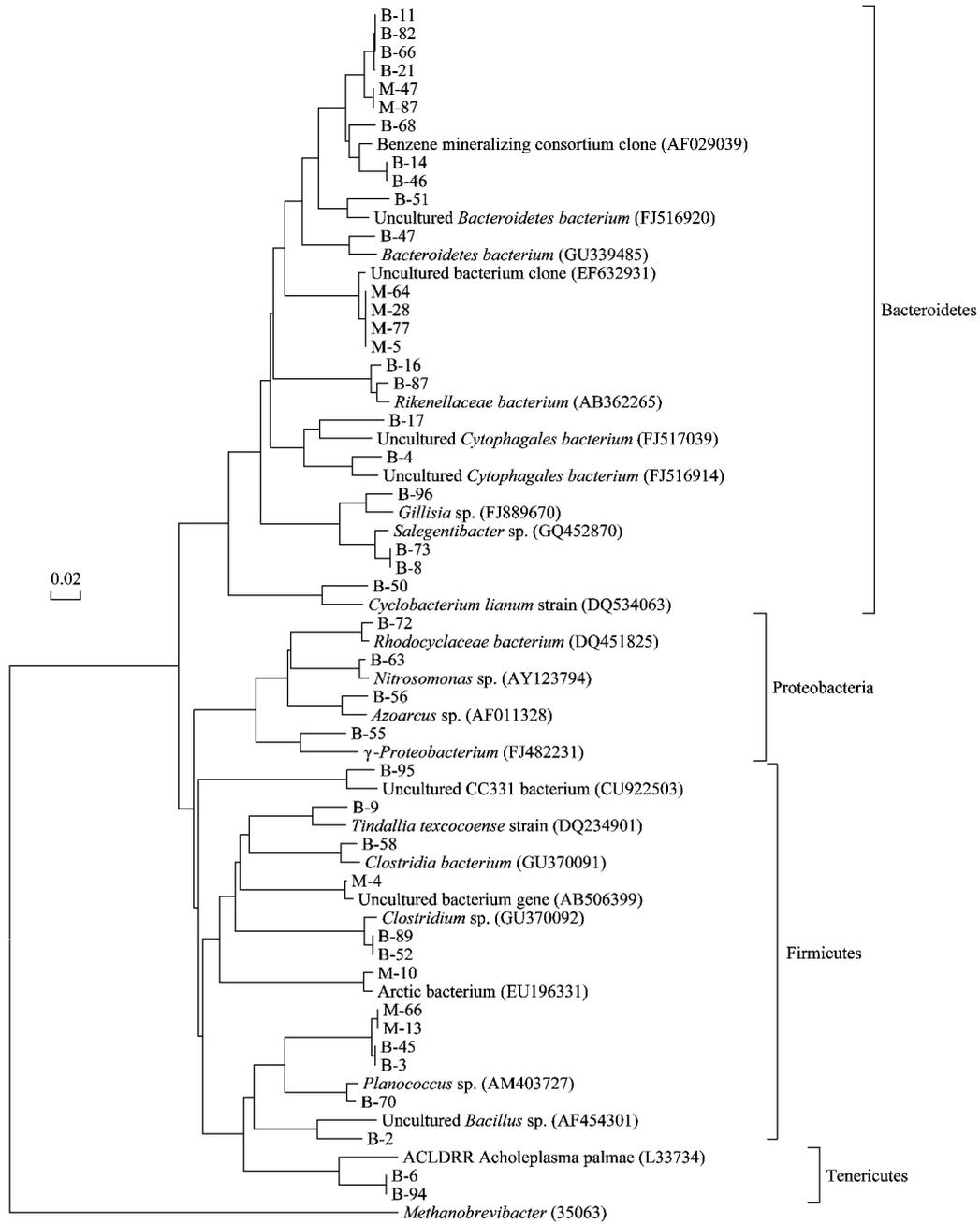


图 2 青海湖底泥中部分 16S rRNA 克隆序列构建的系统发育树

Fig. 2 Neighbour-joining phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences (partial clone sequences) obtained from the Qinghai Lake sediment

(AY386334) 相似度为 97% ,大多数海洋细菌都是轻度嗜盐菌 ,克隆 F10 与嗜甲基菌属 (*Methylophag*) 中的 bacterial endosymbiont of *Idas* sp. (AM402960) 相似度为 95% ,克隆 F16 与苯矿化菌 benzene mineralizing consortium clone SB-29( AF029047) 相似度为 96% . 有 5 个克隆属于蓝细菌门 (Cyanobacteria) 中的硅藻属 (*Bacillariophyta*) ,这是一类能耐受高盐水体的藻类 ,大多数嗜盐硅藻的最适盐浓度低于 7.5% ,只有少数在 12.5% ~ 15.0%

之间 ,其中克隆 F47 与硅藻咖啡双眉藻 chloroplast *Amphora coffeaeformis*( FJ002183) 相似度为 99% ,该藻可在 0.8% ~ 6.0% NaCl 范围内生长 ,随着盐度增大 ,藻生长速度减慢<sup>[16]</sup> . 克隆 F7 与厚壁菌门 (Firmicutes) 中的 uncultured *Bacillus* sp. (AF454301) 相似度为 91% ,该相似序列来自美国加利福尼亚州的马姆莫斯高盐碱湖 . 克隆 F49 与硝化螺旋菌 *Nitrospira* sp. (HM131832) 相似度为 97% . 相似序列中大多数来自海洋环境 ,个别来自盐碱湖 ,

且大部分属于未被培养的细菌,表明该文库蕴藏着丰富的微生物资源。

### 2.2.2 青海湖底泥 16S rRNA 克隆文库分析

在青海湖底泥中拟杆菌门 (Bacteroidetes, 60.0%) 和厚壁菌门 (Firmicutes, 26.0%) 为主要类群,还包括变形菌门 (Proteobacteria, 8.0%), 柔膜菌门 (Tenericutes, 6.0%)。

对青海湖底泥的 50 个克隆进行同源性分析发现,有 13 个克隆属于厚壁菌门 (Firmicutes),其中克隆 M10 与 Arctic bacterium NP25 (EU196331) 相似度为 98%,该相似序列来自加拿大的一个盐度为 7.5% 硫酸盐泉,克隆 B45 等与嗜碱菌 *Alkalibacterium putridalgalicola* (AB294168) 相似度为 98%,*Alkalibacterium* 是中度嗜盐菌属,克隆 M81 等与肉杆菌属中的 *Carnobacterium pleistocenium* (NR025211) 相似度为 95%,该相似序列可在 0 ~ 5.0% 的 NaCl 范围内生长<sup>[17]</sup>,克隆 B9 与 *Tindallia texcoconensis* (DQ234901) 相似度为 95%,该相似菌株是 1 株中度嗜盐碱菌,适宜生长的 NaCl 范围在 5.0% ~ 10.0%<sup>[18]</sup>,克隆 B2 与 uncultured *Bacillus* sp. (AF454301) 相似度为 93%。有 3 个克隆属于拟杆菌门 (Bacteroidetes) 中的黄杆菌科 Flavobacteriaceae,克隆 B96 与 *Gillisia* sp. ZS4-6 (FJ889670) 相似度为 96%,克隆 B8/B73 与 *Salegentibacter* sp. BSw21547 (GQ452870) 相似度为 98%,克隆 B50 与拟杆菌门 (Bacteroidetes) 中的 *Cyclobacterium lianum* (DQ534063) 相似度为 94%,该相似菌株可在 1.0% ~ 12.0% 的 NaCl 范围内生长<sup>[19]</sup>。有 4 个克隆属于变形菌门 (Proteobacteria),其中克隆 B55 与  $\gamma$ -Proteobacterium HRh1 (FJ482231) 相似度为 93%,该相似菌株来自高盐湖泊,克隆 B63 与亚硝化单胞菌 *Nitrosomonas* sp. Nm143 (AY123794) 相似度为 98%,克隆 B56 与固氮弧菌 *Azoarcus* sp. CR23 (AF011328) 相似度为 96%,克隆 B72 与硫杆菌属 (*Thiobacillus*) 中的 Rhodocyclaceae bacterium FTL9 (DQ451852) 相似度为 98%,克隆 M47 等与苯矿化菌 benzene mineralizing consortium clone SB-1 (AF029039) 等相似度为 95% ~ 96%。该文库中的相似序列来源比较广泛,有海洋环境、盐碱湖、腌制食品等,且多是已获得培养的菌种。

### 3 讨论

通过对连云港海底底泥和青海湖底泥这 2 种不

同盐环境的样品分别构建 16S rRNA 克隆文库,并进行系统发育分析,笔者发现 2 个文库中的大多数 16S rRNA 序列都与发表在 GenBank 数据库中的 16S rRNA 序列有较大的差异,在连云港海底底泥中有 40.0% 的克隆序列与相似序列的相似度低于 95%,在青海湖底泥中则有 16.0% 的克隆序列与相似序列相似度低于 95%,表明连云港海底底泥和青海湖底泥中存在大量未知菌种,有待进一步开发利用。

在连云港海底底泥文库中,获得的序列在大的类群上与国外对不同海域沉积物的研究结果大体一致,但不同海域沉积物中细菌群落优势类群也存在一定的差异<sup>[20-22]</sup>。本研究表明连云港海底底泥中最大的细菌类群是变形菌门 (Proteobacteria),而其中的  $\gamma$ -纲又占优势,含 18 个克隆子,这一结果与西太平洋海域的很多研究结果一致<sup>[23-24]</sup>,其次是  $\delta$ -纲,含 11 个克隆子, $\alpha$ -纲在陆地土壤环境和海水中占优势,而在海洋沉积物中很少甚至没有发现,本文库中含有 1 个克隆子,可能是受到了近海陆生环境的影响;另一大类群是拟杆菌门 (Bacteroidetes),其中有 4 个克隆子属于 Flavobacteria,该类群是海洋表层水中的主要类群<sup>[25-26]</sup>,本研究也证明了这一点。在青海湖文库中,拟杆菌门 (Bacteroidetes)、厚壁菌门 (Firmicutes) 和变形菌门 (Proteobacteria) 三者所占比例高达 94.0%,这 3 种类群普遍存在一般的盐碱湖中<sup>[6, 27, 28]</sup>,柔膜菌门 (Tenericutes) 的细菌则较少,在其他盐湖中也较少见。对比 2 个文库发现,变形菌门 (Proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和厚壁菌门 (Firmicutes) 是两者共有的细菌类群,且连云港文库比青海湖文库中的细菌类群丰富很多,大部分都是青海湖没有的,两者具有不同的生物多样性。这是由于样品都来自含盐环境,但一个属于海洋环境,另一个属于内陆湖泊,两者具有不同的生态环境及物质循环过程。

海洋及盐碱湖泊中广泛存在着嗜盐、耐盐菌,它们遍布于细菌域的各个主要系统发育分枝上,目前发现大约 50 个细菌属中含有嗜盐和耐盐细菌,它们分别属于变形菌门 (Proteobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、放线菌门 (Actinobacteria)。测序结果表明 2 个文库中的大部分克隆子都归属于上述几类细菌,且同源细菌大多数来源于海洋及盐碱湖泊环境,具有一定的嗜盐耐盐能力。

## 4 结 论

细菌多样性分析和 16S rRNA 克隆文库分析结果表明,连云港海底底泥和青海湖底泥中有着丰富的细菌多样性,且前者比后者更丰富。这些细菌中很多都是未知种属,其中存在大量的耐盐和嗜盐菌,它们的特征、功能及在工业生产和环境治理等方面的应用有待进一步深入研究。

## 参考文献:

- [ 1 ] Liu X B , Yao T D , Kang S C , et al. Bacterial community of the largest oligosaline Lake , Namco on the Tibetan Plateau [J]. *Geomicrobiology Journal* , 2010 , **27**( 8 ) : 669-682.
- [ 2 ] Niederberger T D , Perreault N N , Tille S , et al. Microbial characterization of a subzero , hypersaline methane seep in the Canadian High Arctic [J]. *International Society for Microbial Ecology* , 2010 , **4**( 10 ) : 1326-1339.
- [ 3 ] Surakasi V P , Antony C P , Sharma S , et al. Temporal bacterial diversity and detection of putative *methanotrophs* in surface mats of Lonar crater lake [J]. *Journal of Basic Microbiology* , 2010 , **50**( 5 ) : 465-474.
- [ 4 ] Jiang H C , Dong H L , Zhan G X , et al. Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka , an Athalassohaline Lake in northwestern China [J]. *Applied and Environmental Microbiology* , 2006 , **72**( 6 ) : 3832-3845.
- [ 5 ] 赵百锁,杨礼富,宋 蕾,等. 中度嗜盐菌在生物技术中的应用[J]. *微生物学通报*, 2007, **34**( 2 ) : 359-362.
- [ 6 ] 任培根,周培瑾. 中度嗜盐菌的研究进展[J]. *微生物学报*, 2003, **43**( 3 ) : 427-431.
- [ 7 ] Altschul S F , Madden T L , Schaffer A A , et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs [J]. *Nucleic Acids Research* , 1997 , **25**( 17 ) : 3389-3402.
- [ 8 ] Cole J R , Chai B , Farris R J , et al. The ribosomal database project ( RDP-II ) : Introducing my RDP space and quality controlled public data [J]. *Nucleic Acids Research* , 2006 , **35**( 1 ) : 169-172.
- [ 9 ] Thomas A H. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. *Nucleic Acids Symposium Series* , 1999 , **41**( 1 ) : 95-98.
- [ 10 ] Thompson J D , Gibson T J , Plewniak F , et al. The Clustal-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Research* , 1997 , **25**( 24 ) : 4876-4882.
- [ 11 ] Kumar S , Tamura K , Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Briefings in Bioinformatics* , 2004 , **5**( 2 ) : 150-163.
- [ 12 ] Huber T , Faulkner G , Hugenholtz P. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments [J]. *Bioinformatics* , 2004 , **20**( 14 ) : 2317-2319.
- [ 13 ] Kemp P F , Aller J Y. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us [J]. *FEMS Microbiology Ecology* , 2004 , **47**( 2 ) : 161-177.
- [ 14 ] Choi T H , Lee H K , Lee K , et al. *Ulvibacter antarcticus* sp. nov. , isolated from Antarctic coastal seawater [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 2007 , **57**( 12 ) : 2922-2925.
- [ 15 ] Inagaki F , Takai K , Neelson K H , et al. *Sulfurovum lithotrophicum* gen. nov. , sp. nov. , a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the  $\epsilon$ -Proteobacteria isolated from Okinawa Trough hydrothermal sediments [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 2004 , **54**( 5 ) : 1477-1482.
- [ 16 ] 马美荣,李朋富,陈丽,等. 盐度和营养限制对盐田底栖硅藻咖啡双眉藻生长及胞外多糖产率的影响[J]. *盐业与化工*, 2008, **37**( 5 ) : 30-34.
- [ 17 ] Elena V Pikuta , Damien M , Asim B , et al. *Carnobacterium pleistocenium* sp. nov. , a novel psychrotolerant , facultative anaerobe isolated from permafrost of the Fox Tunnel in Alaska [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 2005 , **55**( 1 ) : 473-478.
- [ 18 ] Alazard D , Badillo C , Fardeau M L , et al. *Tindallia texcoconensis* sp. nov. , a new haloalkaliphilic bacterium isolated from lake Texcoco , Mexico [J]. *Extremophiles* , 2007 , **11**( 1 ) : 33-39.
- [ 19 ] Ying J Y , Wang B J , Yang S S , et al. *Cyclobacterium lianum* sp. nov. , a marine bacterium isolated from sediment of an oilfield in the South China Sea , and emended description of the genus *Cyclobacterium* [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 2006 , **56**( 12 ) : 2927-2930.
- [ 20 ] Gray J P , Herwig R P. Phylogenetic analysis of the bacteria communities in marine sediments [J]. *Applied and Environmental Microbiology* , 1996 , **62**( 11 ) : 4049-4059.
- [ 21 ] Li L , Kato C , Horikoshi K. Microbial diversity in sediments collected from the deepest cold-seep area , the Japan Trench [J]. *Marine Biotechnology* , 1999 , **1**( 4 ) : 391-400.
- [ 22 ] Ravenschlag K , Sahm K , Pernthaler J , et al. High bacterial diversity in permanently cold marine sediments [J]. *Applied and Environmental Microbiology* , 1999 , **65**( 9 ) : 3982-3989.
- [ 23 ] 李会荣,俞勇,曾胤新,等. 北极太平洋扇区海洋沉积物细菌多样性的系统发育分析[J]. *微生物学报*, 2006, **46**( 2 ) : 177-183.
- [ 24 ] Newberry C J , Webster G , Cragg B A , et al. Diversity of prokaryotes and methanogenesis in deep subsurface sediments from the Nankai Trough , Ocean Drilling Program Leg 190 [J]. *Environmental Microbiology* , 2004 , **6**( 3 ) : 274-287.
- [ 25 ] Kirchman D L. The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments [J]. *FEMS Microbiology Ecology* , 2002 , **39**( 2 ) : 91-100.
- [ 26 ] Simon M , Glockner F O , Amann R. Different community structure and temperature optima of heterotrophic picoplankton in various regions of the Southern Ocean [J]. *Aquatic Microbial Ecology* , 1999 , **18**( 3 ) : 275-284.
- [ 27 ] Dong H L , Zhang G G , Jiang H C , et al. Microbial diversity in sediments of Saline Qinghai Lake , China: linking geochemical controls to microbial ecology [J]. *Microbial Ecology* , 2006 , **51**( 1 ) : 65-82.
- [ 28 ] Ma Y H , Zhang W Z , Xue Y F , et al. Bacterial diversity of the Inner Mongolian Baer Soda Lake as revealed by 16S rRNA gene sequence analyses [J]. *Extremophiles* , 2004 , **8**( 1 ) : 45-51.