

文章编号: 1674-5566(2011)02-0191-07

## 基于 16S rRNA 技术的长江口微生物分子生物学鉴定与分析

曹波, 杨红, 许强华, 刘榕磊

(上海海洋大学 海洋科学学院, 上海 201306)

**摘要:** 基于2007年12月与2008年6月长江口上海附近海域采集的海水样品,使用27F和1492R两种通用引物对海洋微生物16S rRNA基因片段进行直接扩增,克隆并测序,构建细菌16S rRNA文库,通过NCBI数据库的基因比对,区分微生物种群,并使用Mega 4.0软件利用16S rRNA序列建立微生物的分子发育树。通过直接提取DNA进行扩增的方法,共检测出17个属的53种不同微生物,微生物种群结构随温度变化明显,优势种随温度变化有所不同,在不同季节水温下,微生物优势种优势明显;冬季以不动杆菌属为优势种群,分子发育树体现的遗传差异性较小;夏季微生物种群结构较复杂,其中以希瓦氏菌属及假单胞菌属为优势种群,分子发育树体现的遗传差异性较大;微生物分布存在明显的季节变化。

**研究亮点:** 环境微生物学在河口研究中目前处于起步阶段,而长江口微生态环境的研究目前还处于空白阶段,首次采用分子生物学方法,以16S rRNA作为研究对象,通过统计分析,对长江口的微生物结构及长江口微生态环境进行了分析和研究。

**关键词:** 长江口; 16S rRNA; 微生物; 种群鉴定

**中图分类号:** S 917

**文献标识码:** A

海洋微生物是海洋生态系统中的重要组成部分,海洋微生物的多样性研究,有助于我们更为深入地掌握海洋微生物的分布特征及其在整个海洋生态系统中的功能与作用,对深入开展海洋生态环境研究具有重要的意义。水生生态系统中,微型藻类与细菌的关系越来越引起人们的重视<sup>[1-2]</sup>。细菌对藻类的影响主要体现在:一方面细菌吸收藻类产生的有机物质,并为藻类的生长提供营养盐和必要的生长因子,从而调节藻类的生长;另一方面,细菌也可以通过直接或间接的作用抑制藻类的生长,甚至裂解藻细胞,从而表现为杀藻效应。而藻类对细菌也有相似的两方面作用。由于这些错综复杂的关系,使人们在研究浮游植物水华和赤潮的发生、发展、衰落与消亡机理时,不能不考虑细菌的重要性,其中细菌杀藻现象更为利用微生物防治赤潮提供了可能的途径<sup>[3]</sup>。

在微生物分类鉴定中,传统的方法是通过描述其形态差异和表型的方式进行界定,它包括能观察到的细胞形态学特征、生理生化特征(如可利用的营养物)、细胞组成结构(如脂质的种类),有时还包括细胞所栖息的小生态位<sup>[4]</sup>。随着分子生物学的发展,由于16S rRNA具有功能和进化上的同源性<sup>[5]</sup>,而且其序列进化变异频率缓慢,在整体结构上呈现极端保守性,分子大小适中,携带有充分的生物信息可以用来进行可靠的系统进化分析等特征,从而建立了通过比较16S rRNA全部核苷酸序列来确定生物分类地位的方法<sup>[6]</sup>,该方法具有方便、快捷等优点,同时可以从分子的角度来描述不同菌株种内之间的差异,对确定新种有重要的作用。本文主要采用了16S rRNA测序方法,对长江口上海附近海域的微生物群落进行了鉴定与分析。

收稿日期: 2010-04-19      修回日期: 2010-12-25

基金项目: 上海市908专项(ST1/ST2;PJ1-2;HD3);长江口中华鲟保护区周边水域中华鲟的分布及栖息地选择监测(D8005090331)

作者简介: 曹波(1982-),男,硕士研究生,专业方向为海洋环境监测与评价。E-mail: bcooper@live.cn

通讯作者: 杨红, E-mail: hyang@shou.edu.cn

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验样品

实验海水样品取自长江口附近海域,具体采样地点为 31°27'00"N, 122°00'00"E。2007 年 12 月与 2008 年 6 月共采集海水样品 4 次,每次用海水取样器随机获取海水样品 12 个。样品存放于 4 °C 冰箱中备用。长期保存,加入适量甘油,置于 -20 °C 冰箱保存,并尽快提取 DNA。

#### 1.1.2 主要试剂和引物

主要试剂和引物为 E. Z. N. A. soil DNA Kit (OMEGA), PCR 产物纯化试剂盒, pMD 18-T (TaKaRa), *Taq* 酶、dNTPs、引物(上海生工)。

### 1.2 总 DNA 提取及 16S rRNA 的 PCR 扩增、纯化

将提取的水样在无菌操作台上,使用灭菌的 0.45  $\mu\text{m}$  的玻璃纤维滤膜进行抽滤,由于长江口附近海域的水样含有大量的泥沙,因此将抽滤后的滤膜剪碎后,采用 DNA Kit 试剂盒对微生物 DNA 进行提取;将提取后的 DNA 在 1% 琼脂糖凝胶电泳下检测。采用微生物通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTGTTACGACTT-3') 对 16S rDNA 进行 PCR 扩增。

50  $\mu\text{L}$  反应体系为:10  $\times$  buffer 5  $\mu\text{L}$ , dNTPs 4  $\mu\text{L}$ , 引物各 1  $\mu\text{L}$ , *Taq* 酶 1U, DNA 模板 2  $\mu\text{L}$ 。反应条件为:95 °C 3 min;94 °C 1 min;58 °C 1 min;72 °C 1 min,30 个循环;72 °C 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增效果,PCR 产物纯化试剂盒进行纯化。

### 1.3 克隆及测序

纯化后的 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体,转化感受态细胞 *E. coli* TOP10,蓝白斑筛选出阳性克隆子,随机挑取 60 个菌落进行假阳性检测,筛选出阳性克隆进行测序,测序工作由南方基因公司完成。

### 1.4 序列分析

将测序所得序列经 NCBI 比对后,通过 Blast 程序与 GenBank 中核酸数据库进行对比分析 (<http://ncbi.nlm.nih.gov/blast>),选取同源性高的菌株,采用 Clusax 软件对比分析,运用 Mega 4.0 构建系统发育树。

## 2 结果与分析

### 2.1 海水样品与海洋沉积物总 DNA 提取及扩增

从海水样品与海洋沉积物样品中提取获得总 DNA,电泳显示 DNA 片段大小约 21 kb,片段较完整。使用引物 27F 和 1492R 对 16S rRNA 基因进行 PCR 特异性扩增后,获得特异扩增片段,扩增片段约 1 400 bp 左右。16S rRNA 的 PCR 产物的电泳图如图 1 所示,微生物总 DNA 电泳图如图 2 所示,对微生物 16S rRNA 进行 PCR 扩增的结果如图 3 所示。

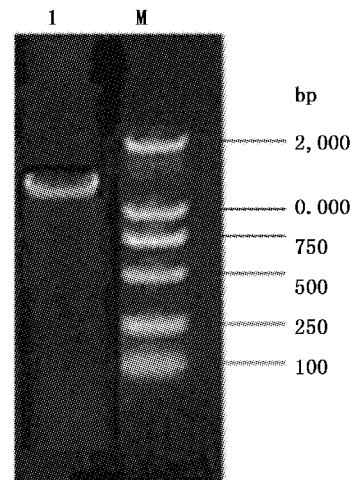


图 1 16S rRNA 电泳图

Fig. 1 16S rRNA electrophoresis

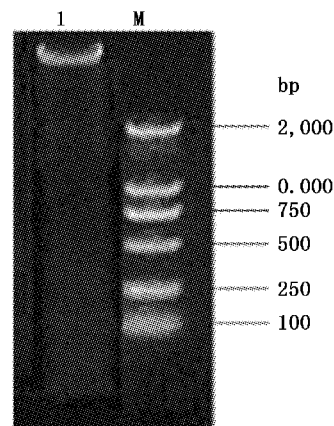


图 2 微生物总 DNA 电泳图

Fig. 2 Main DNA electrophoresis

如图 3 所示,将 PCR 扩增得到的微生物 16S rRNA 进行电泳分析,在 DL2000 的对照下,大致选取长度在 1500 ~ 2000 的扩增条带,将扩增条带进行纯化后,整理,测序。

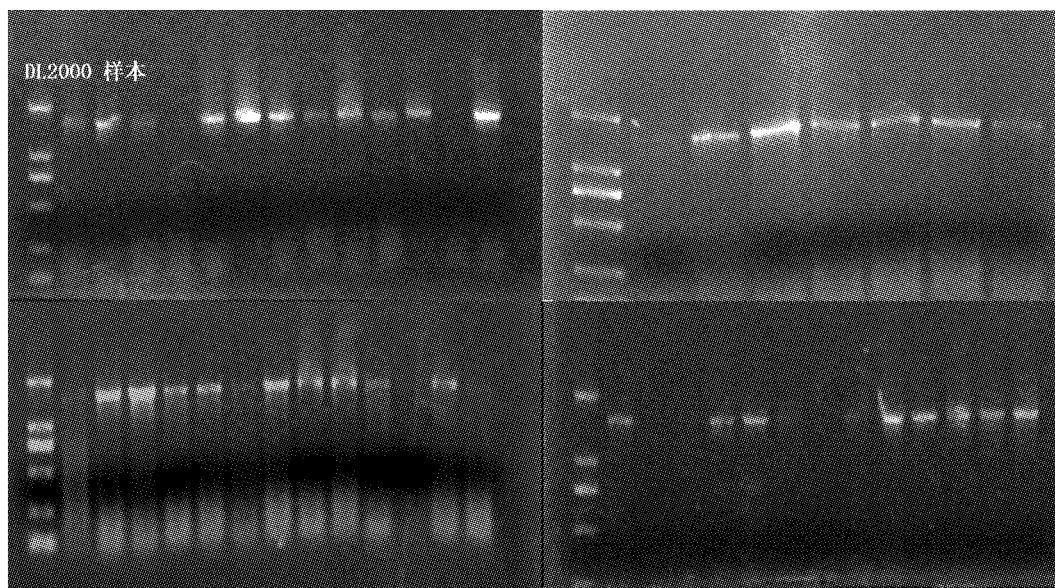


图3 16S rRNA PCR 电泳结果

Fig.3 The electrophoresis results of 16S rRNA PCR

## 2.2 微生物基因序列分析

通过对获得的 160 个转化子进行插入片段大小的 PCR 检测。结果发现,其中约 96 个克隆含有正确的外源片段,阳性克隆率为 60.0%。测序所得序列经 RDP 数据库分析,去除嵌合体后得到有效序列 53 个。对纯化后的 PCR 扩增产物直接进行测序。

将 16S rDNA 克隆子序列输入 NCBI 的 blast 数据库进行对比检索,与 GenBank 数据库收集的微生物序列进行序列配比分析,寻找同源性较高的序列进行比对,克隆子 16S rDNA 序列与最近的菌株同源性在 79%~99% 之间。其中 30 个克隆子来自 2007 年 12 月份海水样本,23 个克隆子来自 2008 年 6 月份海水样本。53 个克隆子序列在 GenBank 数据库的登录号为: AY267367. 1、EU934227. 1、EU798946. 1、EU071561. 1、EU770404. 1、EU880532. 1、EF471229. 1、EU831304. 1、FJ233861. 1、AY987723. 1、FJ002586. 1、CP000891. 1、AY030339. 1、EU770306. 1、CP000503. 1、EU916709. 1、AM114534. 1、AF269927. 1、EF540502. 1、EU794394. 1、EU250944. 1、EF061516. 1、AM690033. 1、AM421981. 1、AM421981. 1、EU781733. 1、AB205580. 1、EU888874. 1、CP000891. 1、DQ645481. 1、EU075118. 1、AB377504. 1、EF526505. 1、FJ037707. 1、

EU075115. 1、CP000891. 1、AM689939. 1、AJ000216. 1、AM421975. 1、EU916709. 1、DQ520810. 1、DQ990053. 1、EU082805. 1、AB027545. 1、DQ816944. 1、AY771739. 1、AF140017. 1、X91285. 1、FJ005054. 1、EU123935. 1、DQ416802. 1、FJ025770. 1、DQ659146. 1。

经过数据库检索、比对,统计结果见表 1。

## 2.3 长江口海域微生物多样性研究

根据所得到的 53 个不同的克隆子序列及由 Blast 搜索得到的 16S rDNA 部分序列构建 2007 年 12 月与 2008 年 6 月 16S rDNA 系统发育树(图 4、5)。

长江口微生物分布呈现明显的季节变化特征。夏季是微生物最为活跃的季节,微生物种群结构比较复杂,微生物种群密度也比较大。夏季,富营养化程度较高的水域比较容易爆发水华或者赤潮,微生物的数量和类别对赤潮或者水华的生消过程有一定的影响。同时,通过检测也发现存在大量的致病微生物,如本试验中检测到的肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*),霍氏肠杆菌(*Enterobacter hormacchei*),金黄葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)等可以对人和动物产生危害,可以引起消化道,呼吸道等疾病。而 2007 年 12 月左右,水温较低,在长江流域属于枯水期<sup>[7]</sup>,但是就同期观测的水质营养盐含量并没

表 1 微生物调查结果汇总表  
Tab.1 The result of the microbial research

季节	菌种所属菌属	菌种拉丁学名	碱基覆盖率 (%)	最大相似度 (%)	
冬季	芽孢杆菌属	<i>Bacillus megaterium</i>	89	96	
	霍氏肠杆菌	<i>Enterobacter hormacchei</i>	81	90	
	芽孢杆菌属	<i>Bacillus vallismortis</i>	92	93	
	芽孢杆菌属	<i>Bacillus sp</i>	90	96	
	肠杆菌属	<i>Enterobacter hormacchei</i>	82	94	
	肠杆菌属	<i>Enterobacter cloacae</i>	86	94	
	节杆菌属	<i>Arthrobacter mysorens</i>	88	95	
	假单胞菌属	<i>Pseudomonas sp</i>	91	94	
	嗜冷杆菌属	<i>Psychrobacter sp</i>	78	86	
	克雷伯氏菌属	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	79	87	
	肠杆菌属	<i>Enterobacter sp</i>	74	83	
	芽孢杆菌属	<i>Bacillus megaterium</i>	85	97	
	芽孢杆菌属	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	85	96	
	假单胞菌属	<i>Pseudomonas Putida</i>	87	96	
	节杆菌属	<i>Arthrobacter mysorens</i>	88	95	
	不动杆菌属	<i>Acinetobacter junii</i>	88	95	
	不动细菌属	<i>Acinetobacter grimontii</i>	86	96	
	不动杆菌属	<i>Acinetobacter sp</i>	84	96	
	不动杆菌属	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	83	96	
	芽孢杆菌属	<i>Bacillus sp</i>	80	96	
	不动杆菌	<i>Acinetobacter junii</i>	90	96	
	不动杆菌	<i>Acinetobacter grimontii</i>	85	92	
	不动杆菌	<i>Acinetobacter sp</i>	93	95	
	不动杆菌	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	92	92	
	肠杆菌	<i>Enterobacter hormacchei</i>	85	96	
	古菌属	<i>Bacillus vallismortis</i>	90	96	
	假单胞菌属	<i>Pseudomonas sp. BTs10022</i>	96	99	
	假单胞菌属	<i>Pseudomonas sp. GmFRB040</i>	98	99	
	芽孢杆菌属	<i>Bacillus sp. JY01</i>	98	98	
	芽孢杆菌属	<i>Bacillus pumilus</i>	90	95	
	夏季	假单胞菌属	<i>Pseudomonas grimontii</i>	98	99
		假单胞菌属	<i>Pseudomonas putida</i>	98	99
		纤维弧菌属	<i>Cellvibrio sp. 4 C16</i>	60	96
		黑何摩氏菌属	<i>Rheinheimera sp. W2</i>	61	92
		派克初菌属	<i>Petrobacter sp</i>	24	77
		芽孢杆菌属	<i>Bacillus pumilus</i>	43	99
		假单胞菌属	<i>Pseudomonas sp. SBC - 1</i>	45	85
		假单胞菌属	<i>Pseudomonas sp. NJ-49</i>	98	99
		假单胞菌属	<i>Pseudomonas sp. NJ-49</i>	98	94
		假单胞菌属	<i>Pseudomonas sp. VET-5</i>	98	96
		希瓦氏菌属	<i>Shewanella baltica</i>	98	96
		希瓦氏菌属	<i>Shewanella baltica OS195</i>	92	93
沙雷氏菌属		<i>Serratia sp. R1</i>	98	93	
希瓦氏菌属		<i>Shewanella baltica OS195</i>	95	91	
希瓦氏菌属		<i>Shewanella sp. CsQ2</i>	98	98	
气单胞菌属		<i>Aeromonas hydrophila</i>	81	90	
沙雷氏菌属		<i>Serratia sp. VET-2</i>	98	96	
拉乌尔菌属		<i>Raoultella sp. X1</i>	56	95	
希瓦氏菌属		<i>Shewanella baltica OS195</i>	97	90	
希瓦氏菌属		<i>Shewanella sp. CsQ2</i>	99	99	
气单胞菌属		<i>Aeromonas sp. SCB-1</i>	97	89	
希瓦氏菌属		<i>Shewanella baltica</i>	98	99	
假单胞菌属		<i>Pseudomonas sp. NJ-22</i>	91	98	

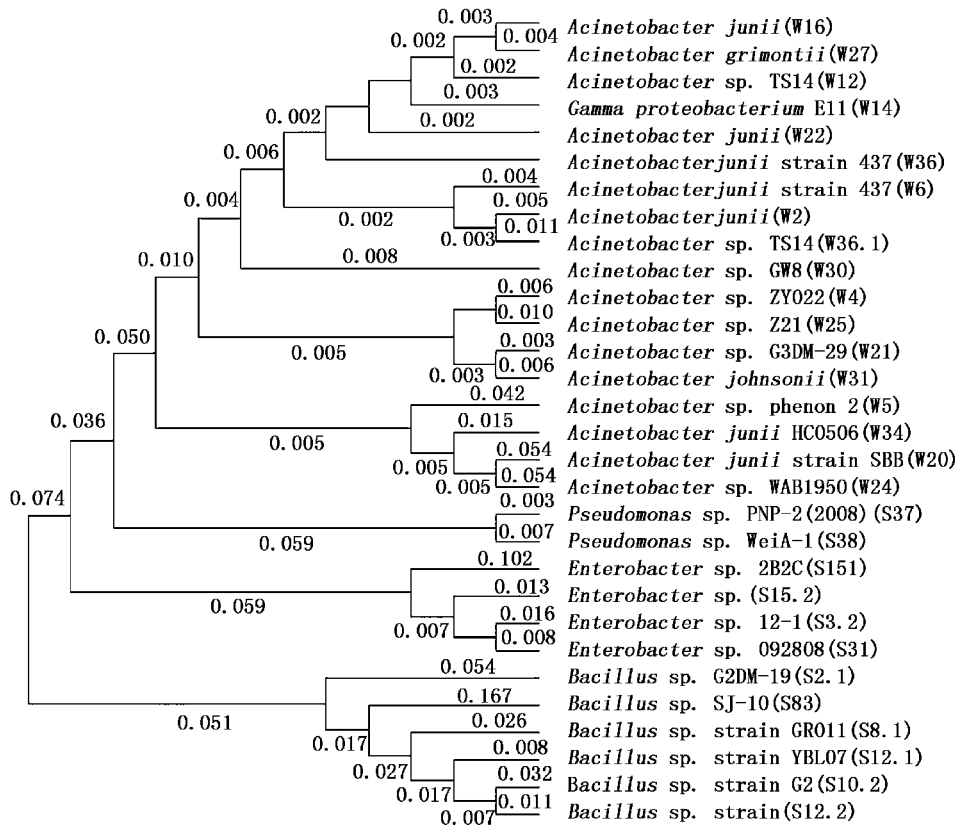


图 4 2007 年 12 月海水中微生物 16S rDNA 序列及数据库参比序列构建的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree showing the relationships of microorganism 16S rDNA sequences from the sea water and related clones or strains in Dec. 2007

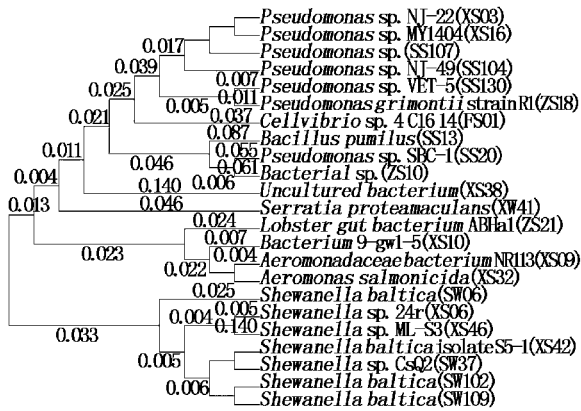


图 5 2008 年 6 月海水中微生物 16S rDNA 序列及数据库参比序列构建的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree showing the relationships of microorganism 16S rDNA sequences from the sea water and related clones or strains

有太大变化,长江口微生态变化最大的特点是优势菌种发生了重大变化,以不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 为主,微生物种群结构趋于单一,

但微生物生态呈现较稳定的状态。

### 2.4 微生物种群分布

对微生物种群分布特征进行分析,得出以下结果,如图 6 所示:

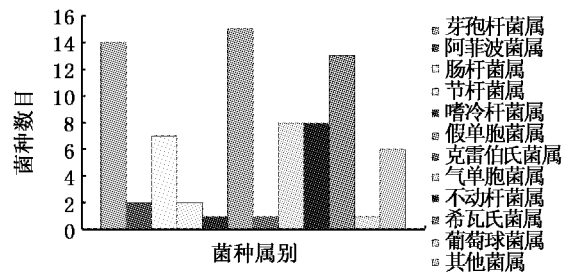


图 6 微生物种群结构分布图

Fig. 6 Microbe genera distribution

由图 6 可以看出微生物种群分布以芽孢杆菌属,假单胞菌属最多,其次是希瓦氏菌属,肠杆菌属,不动杆菌属,气单胞菌属;而其他菌属虽然也有分布,但是存在明显的季节缺省现象,有些属别的微生物只有在一个季节的海水样品中才

被检测到。这说明每种微生物适应环境的能力不一样,其中芽孢杆菌属,假单胞菌属,希瓦氏菌属的分布更加广泛,适应能力比较强。微生物是有机质的主要分解者,有机质经过微生物的分解后形成无机质,被其他生物主要是植物吸收利用重新进入物质循环,正是微生物的这种对有机质的降解作用使得生物活性的营养库得以不断补充和维持<sup>[8]</sup>。正是这个原因,微生物可以通过物质循环影响藻类生长。此外,微生物的某些属别和藻类存在共生关系,同时某些微生物对一些藻类具有特异的抑制作用。RIQUELME 和 ISHIDA 研究了海水细菌和微型藻类的相互作用,他们发现在发生硅藻(*Asterionella glacialis*)赤潮时,一种假单胞菌在此过程中成为了优势种,与藻类存在一定的共生作用;本实验分离到的巨大芽孢杆菌等芽孢杆菌属微生物对藻类细胞有一定的杀灭作用,郑天凌等对赤潮多发区、易发区厦门西海域的细菌进行研究发现巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)的细菌过滤液对塔玛亚历山大藻(*Alexandrium. Tamarettse*)有明显的抑制作用。

### 2.5 微生物鉴定方法的探讨

对海洋沉积物中微生物种类的鉴定采取先进行初步纯化培养再进行 16S rRNA 基因的 PCR 扩增的方法<sup>[9-11]</sup>,对海水和沉积物微生物样品进行了检测。但是微生物培养的过程中有一定数量的活的非可培养状态(viable but non-culture, VBNC)微生物没有能够培养出来,因此鉴定结果存在一定的误差,但是由于采取了对 16S rRNA 进行全序列测序的方法,对微生物的种属鉴别就具备了比较高的准确度。

## 3 讨论

本次研究在冬季、夏季两个季节的不同时间分别在同一地点采样 4 次,通过对 4 次采样进行分析,共分离、监测到 17 个属别的 53 个微生物菌种,其中以芽孢杆菌和假单胞菌为主,其他大部分微生物存在季节缺省现象,微生物分布存在明显的季节变化;使用分子生物学方法来鉴定微生物,具有很高的可信性,在属的水平上进行了分

析鉴定。微生物分布特性在一定程度上反映了长江口水域环境的变化特性,本研究对于长江口海域生态研究与长江口环境变化研究具有重要的参考与借鉴价值。

### 参考文献:

- [1] 魏皓,赵亮,武建. 浮游植物动力学模型及其在海域富营养化研究中的应用[J]. 地球科学进展,2001,16(2):26-32.
- [2] ZHENG T L, XUE X Z, LI F D. The function of microorganisms in marine ecologic environment [J]. Marine Sciences, 1994(3):35-38.
- [3] ZHENG T L. The role of micro-algae in the self-purification of marine environment [J]. Environmental Science, 1990, 10(2):1095-1120.
- [4] 常学秀,张汉波,袁嘉丽. 环境污染微生物学[M]. 北京:高等教育出版社,2006.
- [5] AKIRA I, HIROHARU I, MASASHIRO U, et al. Isao Hayashi Molecular phylogeny of the deep-sea Bacterium species (Gastropoda: Bacterium) around Japan: Inter- and intra specific relationships inferred from mitochondrial 16S rRNA sequences [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2007, 44(2):1342-1345.
- [6] 洪兴国,孙溢,张云波,等. 16S rRNA 在海洋微生物系统分子分类鉴定及分子检测中的应用[J]. 海洋水产研究, 2002,33(1):22-31.
- [7] 邱训平,穆宏强,支俊峰. 长江河口水环境现状及趋势分析[J]. 人民长江,2001,32(7):26-28.
- [8] 陈声明,林海萍,张立钦. 微生物生态学导论[M]. 北京:高等教育出版社,2007.
- [9] BABCOCK D A, WAWRIK B, PAUL J H, et al. Rapid screening of a large insert BAC library for specific 16S rRNA genes using TRFLP [J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 71(2):156-161.
- [10] KATHRIN R, EVELYNE B, ERKO S. The phylogenetic significance of peptidoglycan types: Molecular analysis of the genera Micro bacterium and Aureo bacterium based upon sequence comparison of gyrB, rpoB, recA and ppk and 16S rRNA genes [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2007, 30(6):102-108.
- [11] LIU Y, YANG G P, WANG H L, et al. Design of Vibrio 16S rRNA Gene Specific Primers and Their Application in the Analysis of Seawater Vibrio Community [J]. Journal of Ocean University of China (Oceanic and Coastal Sea Research), 2006,5(2):157-164.

## **A study of the microorganism using bio-molecular technology from the Yangtze Estuary based on the technology of 16S rRNA**

CAO Bo, YANG Hong, XU Qiang-hua, LIU Rong-lei

(*College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China*)

**Abstract:** This paper is mainly based on microorganism samples of seawater which were gathered around the Yangtze Estuary from Oct. 2007 to June 2008. The marine microorganism species were identified by using amplifications of 16S rRNA gene with primer 27F and 1492R, cloning and sequencing techniques. Through the database of NCBI, using the software of Mega 4.0, molecular phylogenetic tree was established with the sequences of 16S rRNA. In this paper, microorganism samples of seawater were respectively gathered in winter and summer at the same destination. Seventeen genera including fifty-three strains were achieved from the analysis of the four samples. Microbial community structure changes with temperature obviously, and dominant species vary with temperature. In winter, the *Acinetobacter* was the dominant species, and the molecular phylogenetic tree reflects a few genetic differences; In summer, microbial community structure was more complex, in which the *Shewanella* and *Pseudomonas* were the dominant species, and the molecular phylogenetic tree reflected greater genetic differences; In the waters of different temperature, microbial species shows different advantages obviously. Molecular phylogenetic tree reflects the genetic differences with obvious seasonal variation distribution.

**Key words:** estuary; 16S rRNA; microorganism; species identification