

高压技术在深海沉积物兼性嗜压菌的筛选和鉴定中的应用

游志勇¹, 汤熙翔^{1,2}, 肖湘^{1,2}

(1. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005; 2. 国家海洋局第三海洋研究所, 福建 厦门 361005)

摘要:通过自行改进的高压培养罐及高压设备,对深海沉积物进行可培养微生物的筛选,获得6株具有较强耐受压力的细菌.16SrDNA的测序结果表明这些细菌分别属于6个不同的菌属.压力生长试验的结果表明这6株细菌在40MPa的条件下仍然具有较强的生长能力,属于兼性嗜压菌.对不同压力下生长的细菌做显微镜检,结果显示,除了一株芽孢杆菌在40MPa下的菌体形态发生了明显的变化外,其它5株细菌在压力条件下的菌体的分裂均没有受到明显的影响.

关键词:高压技术;深海沉积物;兼性嗜压菌;细菌筛选

中图分类号:Q93

文献标识码:A

文章编号:1000-8160(2007)04-0555-07

深海是典型的高压环境,静水压是深海生物很重要的一个刺激因子.对高压的适应,尤其是基因表达调控机制对高压环境的适应可能是早期生命过程中的一个重要因素.研究深海微生物不仅能增加我们对深海微生物对特殊条件的适应机制,而且可以为探索生命起源和进化提供参考资料^[1].

按照微生物在高压下的反应,可将它们分为4类:常规细菌、兼性嗜压菌、嗜压菌、极端嗜压菌.嗜压菌是指在任意的生长允许温度范围之内,最适生长压力大于1个大气压的细菌^[2];兼性嗜压菌是指最适生长压力为常压,且在小于40MPa下能正常生长的细菌.嗜压或耐压是深海微生物的显著特征.深海环境下的“土著”微生物主要是兼性嗜压菌和嗜压菌.其共同特点是,既能在高压也能在常压下生长.从2003年开始的深海嗜压菌全基因组计划,带动了国际范围内对压力生物学研究及特殊极端酶开发的热情^[3].尽管如此,微生物的压力适应性机理的研究才刚刚开始,远远落后于微生物其它抗逆性研究^[4].

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,由于海洋中微生物往往集结一起,一些微生物处于非活性的不可培养状态以及培养基的选择作用等原因,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^[5].另一方面,常规的筛菌方法往往忽略了深海中的压力因素,因而不能将“土著”的耐嗜压细菌从大量的在高压下处于休眠状态的普通细菌中分离出来.因此,我们通过引进高压技术用于深海沉积物的筛选,以获得兼性嗜压或者嗜压的菌株.在前期的工作中我们已经从西太平洋暖池地区1912m水深沉积物中成功分离出耐嗜压细菌新种^[6].本文将介绍利用我们自行建立的便携式高压培养装

收稿日期:2007-01-18

基金项目:国际海底区域研究开发“十五”项目(DY105-04-02-07)

作者简介:游志勇(1980~),男,硕士生.

通讯作者:肖湘(1968~),男,研究员,博士.

置,分离和培养兼性嗜压细菌的尝试.

1 材料和方法

1.1 样品采集及保存

本文研究的西太平洋深海沉积物样品,于2002年5月期间,中国大洋协会的“DY105-12, 14”航次采集获得,航次任务由中国“大洋一号”科学考察船执行.采样站位分布于热带太平洋西部(“暖池”区)洋区.南海沉积物样品于2006年5月期间,由中国科学院南海海洋研究所的“7 000m 深潜器选址航次”采集获得,航次任务由“中国海监 83”海洋监测船执行.

沉积物样品采集都是采用多管采样器进行采样.西太平洋沉积物样品以1cm为一个层次在超净工作台中切割,并分装于采样杯中,保存于 -20°C .南海沉积物样品从表层向底部取样,前10cm每2cm切割,之后每4cm切割取样,样品分装于采样袋中, -20°C 保存.样品带回实验室后,取内层沉积物样品进行下一步实验工作.

太平洋深海沉积物:WP02-1,东经 $125^{\circ}00.0'$,南纬 $16^{\circ}56.9'$,水深3 000m;WP02-4:东经 $141^{\circ}43.7'$,南纬 $9^{\circ}46.8'$,水深2 900m.

南海深海沉积物,BD6-1MC:东经 $114^{\circ}34.16'$,北纬 $17^{\circ}59.48'$,水深3 587m.

1.2 培养基

2216E:0.5%蛋白胨,0.1%酵母膏;3.4% NaCl 和 0.001% FePO_4 .

1.3 便携式高压装置

该装置主要由两部分组成:加压装置和压力罐,二者由导管相连形成通路.加压装置包括储水器、压力指示表和手动泵三部分(图1).

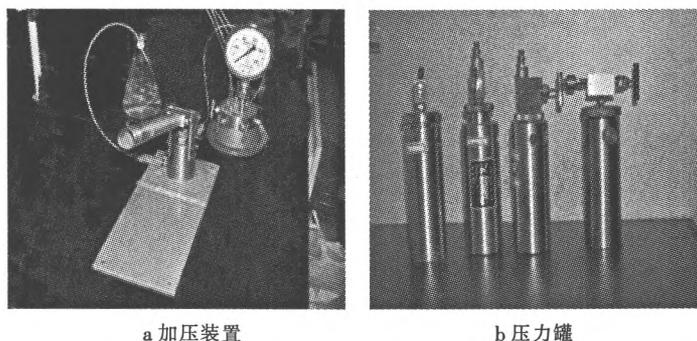


图1 便携式高压培养装置

Fig.1 Handy device for high pressure culture

1.4 筛选方法

- 1) 取1g沉积物样品于 10cm^3 的2216E培养液中,混匀.
- 2) 用巴氏德管吸取样品混合物并封口.而后将巴氏德管放入压力罐中,30MPa静水压,放置在 8°C 的培养箱中,7d后取出样品.
- 3) 将高压富集后的样品重新用新鲜的培养基按1:10的比例稀释.
- 4) 重复2、3步骤9次.
- 5) 取出巴氏德管,将高压富集后的样品均匀涂在2216E平板上,将培养皿放入 15°C 恒温

箱中培养.

6) 挑取单菌落并划线.

1.5 细菌的鉴定

将所筛得的细菌通过 16S rDNA 进行鉴定. 将不同平板上所获得的菌株, 采用引物 (Eubac27F (EF): 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3' ($T_m = 57.0$), Eubac1492R (ER): 5'GGTTACCTTGTTACGACTT3' ($T_m = 49.2$)) 进行扩增. 采用 Gel Extraction Kit (OMEGA) 对 PCR 产物进行纯化, 并与 pMD-18T 载体相连接, 转化到大肠杆菌感受态细胞 top10 中挑取阳性克隆并测序. 这 6 株细菌的 16S rDNA 在 GeneBank 上的检索号分别是: AM286803, AM396490-AM396494.

1.6 细菌在压力条件下的生长状况的测定

挑取单菌落于相应的培养液中, 摇培至饱和状态. 按 1:1 000 的比例加入到新鲜的培养基中. 分别装入巴氏德管中, 分别施以 0.1、10、30、40MPa 等几个不同的静水压, 于 15℃ 下培养 3d. 取出并测定各自的生长状况. 并对在 0.1、30、40MPa 条件下生长的细菌作显微检测.

2 结果

2.1 细菌 16S rDNA 的扩增

以细菌 16S rDNA 通用引物对所筛得的细菌进行 PCR 扩增, 获得长度约为 1.5kb 的 DNA 目的片段 (图 2).

2.2 细菌 16S rDNA 序列的 BLAST 结果

对所获得片段的测序结果进行 BLAST 序列比对分析, 结果如表 1 所示.

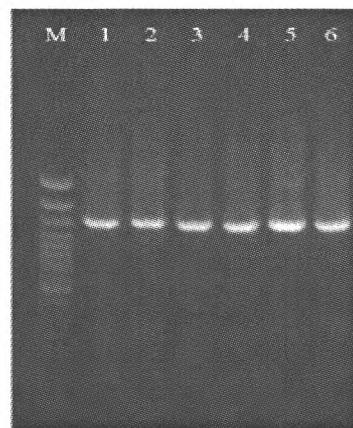


图 2 细菌 16S rDNA 的 PCR 扩增结果

Fig.2 16S rDNA sequences amplification of the bacteria isolated

(M: DNA 分子量标准; 1-6: 细菌 16SrDNA 的 PCR 扩增结果)

表 1 细菌 16S rDNA 序列的 BLAST 结果

Tab.1 BLAST result of the 16S rDNA

菌株编号	相似菌株	来源 (采样点)	相似性
动杆菌 ES-2 (<i>Planomicrobium</i> sp. ES-2)	动杆菌 <i>maritimus</i> (<i>Planomicrobium maritimus</i>)	WP02-1	97.9%
沙雷氏菌 ES-1 (<i>Serratia</i> sp. ES-1)	沙雷氏菌 <i>marcescens</i> (<i>Serratia marcescens</i>)	WP02-1	99.3%
假单胞菌 ES-3 (<i>Pseudomonas</i> sp. ES-3)	假单胞菌 <i>synxantha</i> (<i>Pseudomonas synxantha</i>)	WP02-1	99.3%
希瓦氏菌 ES03 (<i>Shewanella</i> sp. ES03)	希瓦氏菌 <i>kaireiae</i> (<i>Shewanella kaireiae</i>)	WP02-4	99.2%
芽孢杆菌 SS-1 (<i>Bacillus</i> sp. SS-1)	芽孢杆菌 <i>simplex</i> (<i>Bacillus simplex</i>)	BD6-1 MC	99.4%
不动杆菌 SS-2 (<i>Acinetobacter</i> sp. SS-2)	不动杆菌 <i>johnsoni</i> (<i>Acinetobacter johnsonii</i>)	BD6-1 MC	99.1%

除了动杆菌 ES-2 与动杆菌 *maritimus* 的相似性为 97.9% 外, 所获得菌株与已知菌株的 16S rDNA 序列的相似性都达到 99% 以上. 这 6 株细菌分别属于 6 种不同的菌属. 其中西太沉积物 4 株, 南海的 2 株. 其分别各属于动性杆菌菌属、不动杆菌属、沙雷氏菌属、希瓦氏菌属、假单胞菌属和芽孢杆菌属.

2.3 不同压力下细菌培养 3d 后生长状况的测定

这 6 株细菌在不同压力下的生长情况如表 2 所示. 表中所列的数值为各菌液 OD600 的吸收光值. 我们可以看出这 6 株细菌在常压(0.1MPa)下的生长状况最好. 除了不动杆菌 SS-2 在 10MPa 的条件下生长速度明显高于 30MPa 下的生长速度; 芽孢杆菌 SS-1 在 30MPa 下的生长速度比 10MPa 下的稍快. 其它 5 株菌在 10MPa 和 30MPa 的生长速度没有明显的差异. 而在 40MPa 下, 沙雷氏菌 ES-1 和假单胞菌 ES-3 的生长速度与在 30MPa 下的没有明显变化, 其余四株细菌的生长速度出现了比较明显的下降.

表 2 不同压力条件下细菌生长情况的测定
Tab.2 Bacterial growth under different hydrostatics

菌 株	细菌生长的静水压力大小			
	0.1MPa	10MPa	30MPa	40MPa
沙雷氏菌 ES-1	0.226	0.154	0.16	0.158
动杆菌 ES-2	0.314	0.138	0.123	0.118
假单胞菌 ES-3	0.306	0.143	0.154	0.152
希瓦氏菌 ES03	0.209	0.146	0.137	0.112
芽孢杆菌 SS-1	0.27	0.133	0.159	0.121
不动杆菌 SS-2	0.299	0.163	0.117	0.098
大肠杆菌 Top10(<i>Escherichia coli</i> Top10)	0.433	0.281	0.098	0.014

对不同压力条件下(0.1、30、40MPa)生长的细菌形态作显微观察, 其结果如图 3 所示.

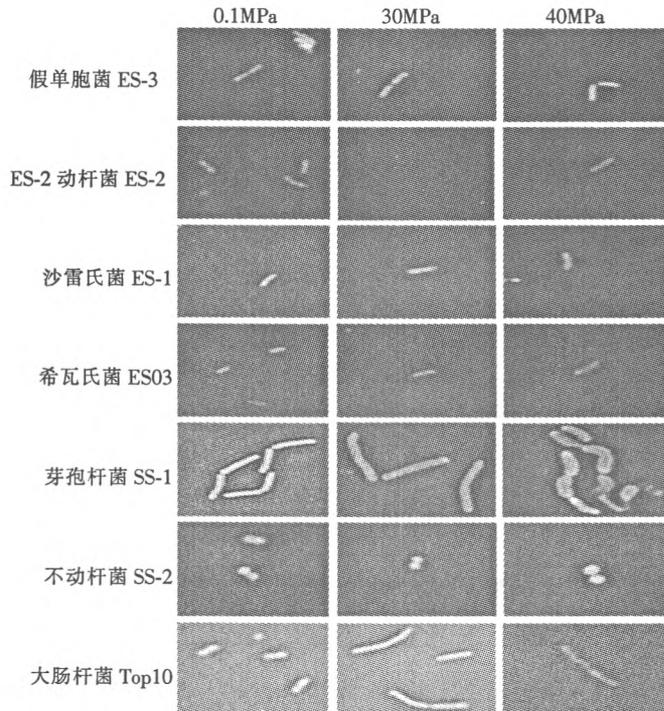


图 3 不同压力下生长, 细菌形态的显微检测(×2 000)

Fig.3 Microscopy of bacterial shapes

(0.1MPa、30MPa、40MPa 表示细菌生长的静水压力大小; 其中大肠杆菌为对照菌株)

以压力敏感菌大肠杆菌(*E. coli* Top10)作为对照.从图中我们可以看出,大肠杆菌在 30MPa 下菌体明显拉长,而在 40MPa 下则成菌丝状态.而对于本实验所筛得的 6 株菌则没有类似的状况.只有希瓦氏菌 ES03 和不动杆菌 SS-2 在 40MPa 下菌体有较为明显的变大.而芽孢杆菌 SS-1 在 30MPa 下菌体变粗,40MPa 下菌体缢缩呈短棒状.其它几株菌的菌体形态在常压和高压下没有明显的变化.

3 讨论

自从 1979 年 Yayanose 等(1979)首次成功分离了一个嗜压菌 CNPT-3^[7],迄今为止科学家们总共分离得到 33 株嗜压菌,其中包括两株极端嗜压菌^[8-11].这些细菌都属于 γ -亚群中的 5 个菌属:希瓦氏菌属(*Shewanella*),莫里特拉菌属(*Moritella*),科尔韦氏菌属(*Colwellia*),发光杆菌属(*Photobacterium*)和嗜冷单胞菌(*Psychromonas*)^[12],同时对细菌的嗜压机制也有了初步的探索.但由于对采样,转移和培养设备有较高的要求,深海耐嗜压微生物的研究远远落后于其它嗜极微生物的研究.

深海环境中存在大量休眠状态的常规细菌,如在细菌筛选前没有经过处理,由于大量细菌的干扰(图 4A),给耐嗜压细菌的筛选造成很大的不便.而在经过压力富集 7d 后,由于常规细菌在压力下无法生长或者生长缓慢,而耐嗜压细菌由于压力的激活使得其细菌菌落的数量相对增加(图 4B),从而更有利于将“土著”微生物的分离.

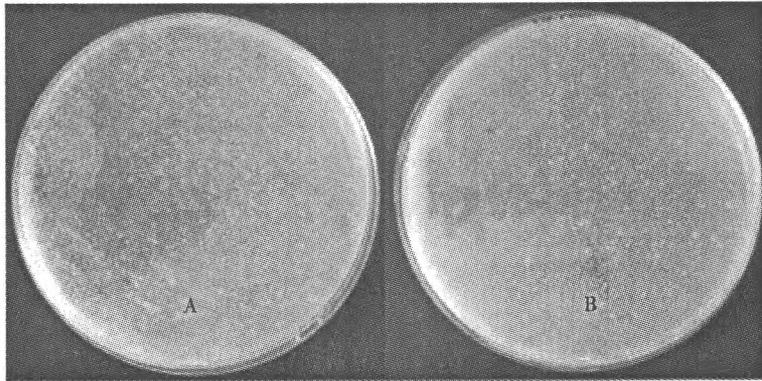


图 4 深海沉积物样品在经过压力富集后与不经压力富集直接涂板的比较

Fig.4 Microbial comparison between the sediments with and without pressure manipulation

(A:表示没有经过压力富集;B表示经过 30MPa 压力富集 7d)

本实验从西太平洋和南海深海沉积物中,通过压力的反复富集,最后共筛得 6 株细菌.其中从西太平洋沉积物中筛得 4 细菌,从南海沉积物中筛得 2 株.16S rDNA 的测序及其比对结果,这 6 株菌分别属于动性杆菌属,不动杆菌属,沙雷氏菌属,希瓦氏菌属,假单胞菌属和芽孢杆菌属.

对这 6 株细菌在不同的压力下的生长速度作测定,从结果中我们可以得知,这 6 株细菌都不属于嗜压菌.从它们的生长状况来看,它们在 40MPa 下仍具有较强的生长能力,因此可归为兼性嗜压菌.对不同压力条件下生长的菌株作形态的显微观察,除芽孢杆菌 SS-1 外,其它 5 株细菌在不同的压力下细菌的形态并没有发生明显的变化.ZoBell 等(1970)的报告认为,随着生

长环境压力的增加,由于压力敏感菌的细胞分裂受到影响,因此使得此类细菌的菌体变成细长^[13]。而芽孢杆菌 SS-1 的菌体随着压力的增加反而变得粗短;从生长的状态上看细菌的生长受到了较为明显的影响。这说明了细菌在 30MPa 左右的条件下生长正常,而在 40MPa 情况下,生长受到抑制,这与我们取样点的静水压的大小相符。

本实验虽然获得了 6 株兼性嗜压菌,但是我们并没有获得预期的嗜压菌,这可能与我们现有的样品采集和保藏转运技术有关。目前国内还没有专门的深海沉积物保真采样器应用于耐嗜压微生物的分离,因此从样品的采集到保存过程中难免会出现压力和温度的变化,这就影响了微生物的生长,甚至导致其中一类细菌,特别是嗜压菌和嗜冷菌的死亡。Horikoshi 等(2004, 1998)利用深潜器在海底采样的同时进行样品的保真转移^[14,15],成功筛选获得 2 株嗜压菌科尔韦尔氏菌(*Colwellia piezophila*)和莫里特拉菌(*Moritella japonica*)。目前,我们已经设计了航载高压培养体系,预期在未来的航次中,可以减少航渡过程中样品常压保藏的影响。

压力试验的结果显示,与压力敏感菌相比,这 6 株细菌明显的抗静水压能力。而与嗜压菌相比,它们在常压条件下的生长能力又强于嗜压菌对低压的耐受能力。因此,作为深海微生物高压适应性的研究材料,深度兼性嗜压菌具有特殊的研究价值。

参考文献:

- [1] Kato C, Sato T, Horikoshi K. Isolation and properties of barophilic and barotolerant bacteria from deep-sea mud samples [J]. *Biodivers Conserv*, 1995, 4: 1~9.
- [2] Yayanos A A. Barophiles and Piezophiles In *Nature Encyclopedia of Life Sciences*[M]. London: Nature Publishing. 2001.
- [3] Hough D W, Danson M J. Current opinion in chemical biology [J]. *Extremozymes*, 1999, 3: 39~46.
- [4] Lammi M J, Elo M A, Helminen H J, et al. Hydrostatic pressure-induced changes in cellular protein synthesis [J]. *Biorheology*, 2004, 41:309~313.
- [5] Ferguson R L, Buckley E N, Palumbo A V. Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1984, 47: 49~55.
- [6] Wang F P, Wang P, Xiao X, et al. Isolation of extremophiles with the detection and retrieval of *Shewanella* strains in deep-sea sediments from the west Pacific [J]. *Extremophiles*, 2004, 8: 165~168.
- [7] Yayanos A A, Dietz A S, Bostel R V. Isolation of a deep-sea barophilic bacterium and some of its growth characteristics [J]. *Science*, 1979, 205:808~810.
- [8] Kato C, Horikoshi K. Gene Expression Under Hydrostatic Pressure High Pressure Bioscience and Biotechnology (Hayashi R, Balny C eds)[M]. Elsevier Science, Amsterdam, 1995.59~66.
- [9] Kato C, Inoue A., Horikoshi K. Isolating and characterizing deep-sea microorganisms [J]. *Trends Biotechnol*, 1996, 14:6~12.
- [10] Kato C, Li L, Horikoshi K, et al. Extremely barophilic bacteria isolated from the Mariana Trench, Challenger Deep, at a depth of 11 000 meters [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64:1 510~1 513.
- [11] Kato C, Masui N, Horikoshi K. Properties of obligately barophilic and barotolerant bacteria from deep-sea sediment from the Izu-Bonin Trench [J]. *J Mar Biotechnol*, 1996, 4:96~99.
- [12] Nogi Y, Kato C, Horikoshi K. *Psychromonas kaikoae* sp. nov., a novel piezophilic bacterium from the deepest cold-seep sediments in the Japan Trench[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2002, 52: 1 527~1 532.
- [13] ZoBell C E. Pressure Effects on Morphology and Life Processes of Bacteria[A]. Zimmerman A High Pres-

- sure Effects on Cellular Processes[M]. London: Academic Press, 1970. 85 ~ 130.
- [14] Nogi Y, Hosoya S, Kato C, *et al.* *Colwellia piezophila* sp. Nov., a novel piezophilic species from deep-sea sediments of the Japan Trench [J]. *Int J Syst Evol Microbiol J Gen Appl Microbiol*, 2004, 54: 1 627 ~ 1 631.
- [15] Nogi Y, Kato C, Horikoshi K. *Moritella japonica* sp. Nov., a novel barophilic bacterium isolated from a Japan Trench sediment [J]. *J Gen App Microbiol*, 1998, 44: 289 ~ 295.

Application of hydrostatic technique in the isolation and characterization of piezophilic bacteria from deep-sea sediments

YOU Zhi-yong¹, TANG Xi-xiang^{1,2}, XIAO Xiang^{1,2}

(1. School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. Third Institute of Oceanography, SOA, Xiamen 361005, China)

Abstract: Through hydrostatic technique, 6 facultative piezophilic bacteria were isolated from the deep-sea sediments, which were from the east Pacific and south sea of China. BLAST results of 16S rDNA sequences indicated that the bacteria were defined to 6 different genus respectively. The tests of the optimal growth pressure showed that all of the bacteria were facultative piezophilic that could grow under 40MPa. It showed that under the high pressure the bacterial shapes showed no visual change compared with that in the atmosphere, except *Bacillus* sp. SS-1.

Key words: hydrostatic technique; deep-sea sediments; facultative piezophilic; bacteria isolation

(责任编辑:霍湘娟)