

# 黄海西北近岸沉积物中细菌群落空间分布特征

张健<sup>1</sup>, 赵阳国<sup>1\*</sup>, 李海艳<sup>1</sup>, 白洁<sup>1</sup>, 田伟君<sup>1</sup>

(1. 中国海洋大学 海洋环境与生态教育部重点实验室, 山东 青岛 266100)

**摘要:** 采用 16S rDNA 文库和变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 技术, 对黄海西北部 3 个近岸站位沉积物中细菌群落多样性及空间分布特征进行了调查和解析。对表层沉积物 16S rDNA 序列统计表明, 各站位细菌群落多样性很高,  $\gamma$ -和  $\delta$ -变形菌纲分别占克隆序列总数的 20%~32%, 是沉积物中的绝对优势类群。DGGE 图谱分析表明, 同一站位中不同深度的细菌群落结构相似性较高, 而不同站位间群落结构相差较远。研究表明在黄海西北近岸沉积物中细菌群落多样性较高, 优势类群明显, 在较小尺度范围内群落结构的垂直变化不明显。

**关键词:** 16S rDNA 文库; 变性梯度凝胶电泳; 细菌群落

中图分类号: Q938.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2010)02-0118-10

## 1 引言

海洋沉积物覆盖了地球表面 71% 的面积, 它是集高压、高盐等极端条件于一体的特殊生态环境<sup>[1]</sup>。根据溶解氧的分布与浓度, 沉积物通常分为 3 层<sup>[2]</sup>: 较浅的含氧表层; 缺氧但能进行特殊氧化作用的氧化层, 在这一层中硝酸盐、氧化锰、氧化铁是主要的电子受体; 硫化物层。在不同含氧层中对应分布着大量的功能细菌类群。海洋沉积物细菌群落是海洋生态系统的重要组成部分, 在海洋碳、氮、磷和硫等生源要素的矿化和循环中具有关键作用。研究表明海洋沉积物中有机物质的降解有 50% 是通过硫酸盐还原菌 (SRB) 完成的<sup>[3]</sup>, 氮的固定、硝化、反硝化等循环过程, 磷的吸收与释放均由相应的功能细菌参与完成<sup>[4]</sup>。基于此, 沉积物中细菌群落的生态学价值已经引起人们的广泛关注。

海洋沉积物中蕴藏着丰富的微生物种质和基因资源<sup>[5]</sup>。作为高压、高盐的特殊生境, 沉积物中更可能富集功能特异的微生物类群, 对这些微生物的种类和分布等研究, 将有助于丰富我国海洋药物资源

库<sup>[6]</sup>, 加强对未分离和未培养微生物的认识<sup>[5]</sup>, 揭示生命的多样性和复杂性<sup>[5]</sup>。早期对海洋细菌的相关研究都是建立在传统的纯培养方法基础上的, 这一方法很难完全体现自然生境中原始的细菌群落特征, 使其在海洋细菌多样性研究中受到了限制, 而分子生物学研究方法的不断发展和完善为其提供了有力手段, 如基于 16S rDNA 的遗传指纹和克隆文库技术、荧光原位杂交技术等, 已经被广泛应用于原位揭示微生物的种类、数量、丰度、分布以及群落演替等研究中<sup>[7-8]</sup>。

北黄海位于我国东北部, 东临朝鲜和韩国, 北靠辽南, 南接山东半岛, 形似四边形洼地。这一独特的地形分布特征使北黄海具有独特的冷水团等海洋现象和与之相伴的海洋生态系统<sup>[9]</sup>。相对于自然沉积环境, 近海容易受到人类活动的影响, 这类水体的沉积物生境更加特殊。细菌群落作为该特殊生境中的重要组成部分, 其群落种类组成和空间分布等特征亟需系统研究阐明, 为此, 本研究通过对表层沉积物构建细菌 16S rDNA 文库来揭示细菌群落的种类和多样性, 采用变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 技术, 解析

收稿日期: 2009-07-05; 修订日期: 2010-02-02。

资助项目: 水体污染控制与治理科技重大专项 (2008ZX07208-009); 国家自然科学基金 (40801193)。

作者简介: 张健 (1986—), 男, 江西省 市人, 硕士研究生, 主要从事环境微生物学研究。E-mail: zhangjian2727@sina.com.cn

\* 通信作者: 赵阳国 (1975—), 男, 山东省 市人, 讲师, 硕士生导师, 主要从事分子微生物生态学生态研究。E-mail: yg.zhao@yahoo.com.cn

沉积物细菌群落在垂向 4 个层次中的结构和分布特征, 探讨邻界水域、黄海冷水团以及人类活动等自然和人为因素对细菌群落的影响, 这将有助于深层次理解该海域沉积物的生态系统结构和功能, 也可为我国近海细菌资源及生态环境的研究提供理论依据。

## 2 材料与方法

### 2.1 样品采集

在 2007 年 4 月通过搭载“东方红 2 号”科考船, 在黄海、渤海交汇的近海(Sd)、北黄海冷水团附近(Cm)<sup>[9]</sup>和北黄海近岸陆架峰区附近(Ld)(图 1)采集沉积物。应用箱式沉积物采样器采集沉积物柱后, 将表层 0 cm(1)、10 cm(2)、20 cm(3)、30 cm(4)

沉积物置于灭菌管中, 于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。海水深度、温度、盐度数据由船载自容式 CTD 仪(美国 Sea-Bird Electronics 制造)获取, 相关数据信息见表 1。

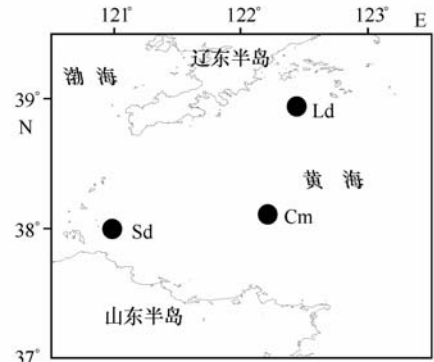


图 1 采样站位地理坐标

表 1 采样站位及表层沉积物细菌 16S rDNA 文库信息

站位	样品	深度/m	温度/ $^{\circ}\text{C}$	盐度	克隆数	OUT 数	覆盖度(%)	多样性指数	均匀度指数
Sd	Sd1	22	8.973	31.905	56	49	12.50	5.51	0.98
Cm	Cm1	54	5.601	32.345	58	54	6.90	5.71	0.99
Ld	Ld1	45	6.515	31.950	58	55	5.17	4.85	0.84

### 2.2 DNA 提取及 PCR 扩增

采用试剂盒 PowerSoil DNA Isolations kit (美国 Mobio 制造)提取沉积物总 DNA, 最终溶解于  $2\text{ mmol}/\text{dm}^3$  Tris-HCl (pH=8) 中, 取  $5\text{ }\mu\text{L}$  DNA 进行电泳检测。以总 DNA 为模板, 采用细菌 16S rDNA 保守引物进行 PCR 扩增。文库构建引物分别是 BSF8/20:  $5'$ -AGAGTTTGATCCTGGCT-CAG- $3'$ 和 BSR15 41/20:  $5'$ -AAGGAGGTGATC-CAGCCGCA- $3'$ <sup>[10]</sup>。DGGE 引物分别是 BSF8/20 和 BA534R-GC:  $5'$ -ATTACCGCGGCTGCTGG- $3'$ <sup>[11]</sup>, 其中 BA534R-GC 的  $5'$  端带有 GC 夹 (CGC-CCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCAC-GGG GGG), 所有引物均购自上海 Invitrogen。PCR 扩增在 Mycycle 扩增仪(美国 Bio-Rad Laboratories 制造)上进行,  $50\text{ }\mu\text{L}$  体系包括  $5\text{ }\mu\text{L}$   $10\times$  PCR 缓冲器 (含  $\text{Mg}^{2+}$ ),  $4\text{ }\mu\text{L}$  dNTP, 引物各  $1.5\text{ }\mu\text{L}$  ( $20\text{ }\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ ),  $0.25\text{ U}$  Taq DNA 聚合酶(大连宝生物公司生产), DNA 模板约  $10\text{ ng}$ 。PCR 反应条件为: 预变性  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $5\text{ min}$ ; 接以 30 个循环, 包括  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性  $40\text{ s}$ ,  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  (DGGE 为  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  每循环降  $0.3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) 退火  $30\text{ s}$ ,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸  $90\text{ s}$ ;  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $10\text{ min}$ 。

PCR 完成后取  $5\text{ }\mu\text{L}$  产物作电泳检测, 并与定量 Marker DL2000 进行比对。

### 2.3 16S rDNA 文库的构建

采用用胶回收方法纯化的 PCR 产物, 根据参考文献[12]构建表层沉积物中细菌的 16S rDNA 文库。当文库的阳性克隆效率高于 90% 时, 随机挑取 60 个左右白斑克隆进行测序(美国 ABI 3730), 测序时采用载体两侧的 M13 通用引物, 对获得的双向序列以 ChromasPro 软件(澳大利亚 Technelysium Pty 开发)进行序列拼接及载体去除。

### 2.4 DGGE 条件及群落图谱分析

应用 DGGE 技术解析细菌群落的结构。变性梯度胶中聚丙烯酰胺浓度为 8%, 变性梯度为 40%~65%, 温度为  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $75\text{ V}$ ,  $15\text{ h}$ , 凝胶采用银染法染色。根据 DGGE 图谱中同一迁移距离上条带的有无, 将图谱数字化处理, 应用 SPSS 软件(美国 SPSS Inc 开发)中, 以 PCA 方法对各泳道群落进行主成分分析。

选取数量较大或变化较大的条带按文献[13]的方法回收条带 DNA。取回收的 DNA 为模板, 以产生该 DGGE 图谱相同的不带 GC 夹的引物, 采用同

前体系和 PCR 程序进行扩增,PCR 产物切胶纯化(德国,NucleoSpin® Extract II, Macherey-Nagel 生产)后,按产品说明书克隆 T-载体(pMD19-T, 宝生物)。对转化子的筛选采用了蓝白斑及 PCR 的方法,PCR 直接以白斑菌落为模板,采用能与 T-载体插入点两侧特异结合的 M13 通用引物进行检测。每条带选取 5 个阳性克隆,同样以 M13 通用引物进行测序(ABI 3730)。

## 2.5 序列处理

采用 Sequencher 5.0 软件(美国 Gene Codes 公司开发)将相似性大于 97% 的序列归为同一个操作分类单元(operational taxonomy unit, OTU)。以覆盖率(C)来评价构建的 16S rDNA 文库对环境细菌多样性的体现,公式为

$$C = [1 - n/N] \times 100\%,$$

式中,  $N$  代表测序的克隆总数;  $n$  代表 OTU 数量<sup>[14]</sup>。

将所有序列提交到 RDP II(Ribosomal Database Project II) 数据库<sup>[15]</sup>进行在线分类,同时计算各类群的比例。下载相似序列,采用 Clustal W 对齐序列,去除冗余序列后,应用 MEGA 4.0 软件<sup>[16]</sup>以相邻法(引导指令为 1 000)绘制系统进化树。

对获得的文库 16S rDNA 序列,采用香农-威纳(Shannon-Weiner)指数<sup>[17]</sup>和 Pielou 均匀度指数<sup>[18]</sup>来描述群落的多样性和均匀性。香农-威纳指数的公式为

$$H' = - \sum (n_i/N) \log_2 (n_i/N),$$

式中,  $H'$  多样性指数;  $N$  为该文库序列总数;  $n_i$  为第  $i$  个 OTU 包含的序列条数;  $n_i/N$  第  $i$  个 OTU 中序列条数占文库序列的百分数。

Pielou 均匀度指数( $J'$ )公式为

$$J' = H'/H_{\max}, \quad H_{\max} = \log_2 S,$$

式中,  $J'$  一般为 0~1;  $S$  为该文库 OTU 总数;  $H_{\max}$  是群落理论上的最大多样性指数。

## 2.6 序列在基因库中的登录号

16S rDNA 文库序列和 DGGE 条带克隆序列均已递交至 GenBank 中,16S rDNA 文库 Sd1, Cm1 和 Ld1 序列分别对应的序列号为: GQ246282—GQ246337, GQ246338—GQ246395 和 GQ246396—GQ246453, DGGE 条带克隆序列对应的序列号为 GQ246230—GQ246281。

## 3 结果与分析

### 3.1 沉积物中细菌群落多样性

通过序列拼接及载体去除,从 Sd, Cm, Ld 三个站位表层沉积物样品 Sd1, Cm1, Ld1 分别得到 56, 58 和 58 个有效序列(表 1)。将相似性大于 97% 的序列归为 1 个 OTU 后,分别得到 49, 54, 和 55 个 OTU,进而计算各样品的覆盖率分别为 12.50%, 6.90% 和 5.17%; 香农-威纳指数和均匀度指数如表 1 所示,均呈现出 Cm1 大于 Sd1 大于 Ld1 的规律,这表明 Cm1 的微生物群落最复杂、最稳定,而 Ld1 最不稳定。

通过 RDP 中的 Classifier 程序,对所有序列进行分类,发现存在大量无法确定其分类位置的序列,样品 Sd1, Cm1, Ld1 分别有 3 条、10 条和 8 条序列无法确定其分类学位置(见图 2),其他序列多与未培养细菌具有更高相似性,这表明在海域沉积物中仍存在大量未被认知的细菌类群。

根据 Classifier 程序分类结果(表 1, 图 2), Sd1 沉积物细菌分布于 7 个已知的门, Cm1 和 Ld1 沉积物细菌序列都分布于 8 个已知门。变形菌门(Proteobacteria)在所有样品中均为优势菌群,在 Sd1 中占全序列的 60.71%, Cm1 中占全序列的 51.72%, Ld1 中占全序列的 55.17%, 其中  $\gamma$ -变形菌纲( $\gamma$ -proteobacteria)和  $\delta$ -变形菌纲( $\delta$ -proteobacteria)为克隆文库中的优势菌纲。

### 3.2 细菌群落 DGGE 分析

对各站位 4 层沉积物中优势细菌群落进行 DGGE 解析,图谱见图 3。对各群落条带数字化后进行主成分分析结果如图 4。从 DGGE 电泳图谱中可以看出各站位不同深度样品的可分辨电泳条带的数目和位置不完全相同,优势条带也不相同,从所有样品共检测到 30 条,其中 Sd 站位可分辨的电泳条带是 16~19 条, Cm 站位可分辨的电泳条带是 10~14 条, Ld 站位可分辨的电泳条带是 14~16 条,其中有 4 个条带(图 3 中条带 10, 12, 以及其他 2 个未测序条带)是各站位和各层次沉积物中都存在的,这说明不同样品的细菌组成差异较大。通过对 DGGE 图谱进行的主成分分析(见图 4)表明,同一站位而不同深度的微生物群落结构相似性较高,可聚为一类,而不同站位间的细菌群落相似性较远,可见同沉积物的垂向变化相比,地理上的距离差异对细菌群落的分布起着更重要的作用。

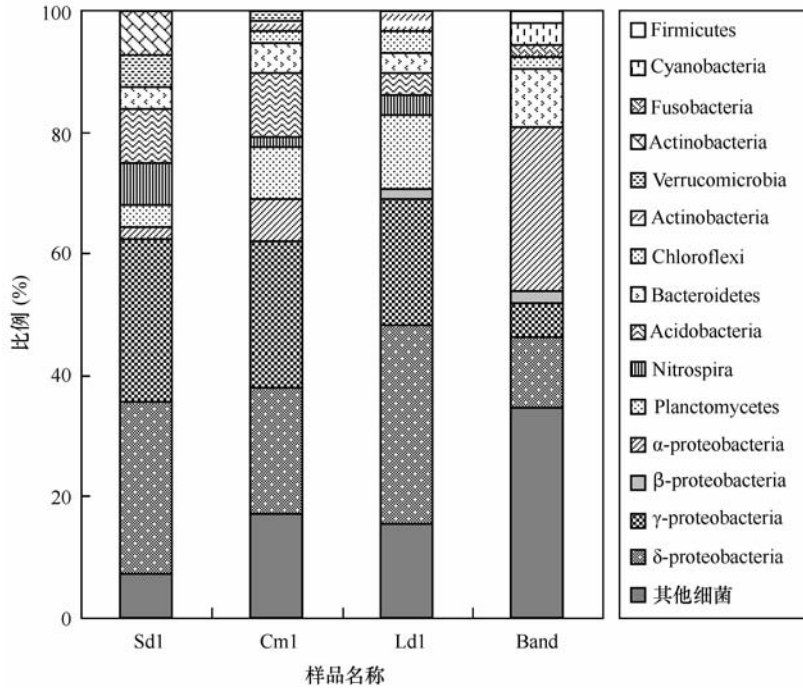


图2 各站点表层沉积物(Sd1, Cm1, Ld1)细菌 16S rDNA 序列和 DGGE 条带(Band) 克隆序列在不同分类阶元中的分布

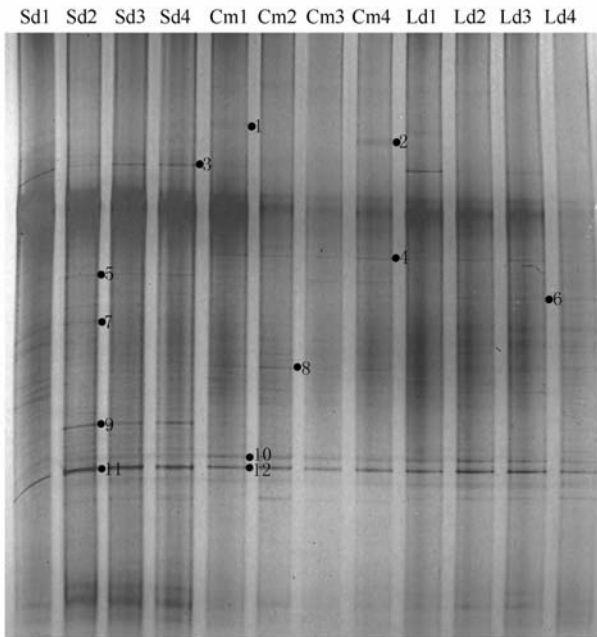


图3 各站点(Ld, Cm, Sd)不同层次沉积物细菌群落的 DGGE 图谱

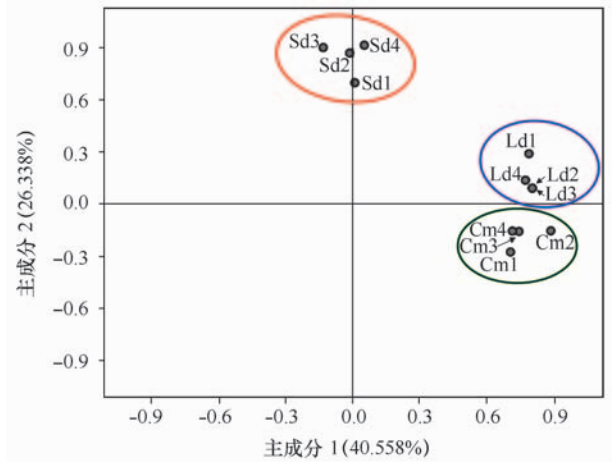


图4 DGGE 图谱中不同细菌群落的主成分分析

对 DGGE 图谱中部分条带进行克隆测序,共得到完整序列 52 条,同样采用 RDP 中的 Classifier 程序分类,结果表明 Band 序列分布于 6 个已知的门

(图 2),另外还有 18 条序列无法确定其分类学位置。变形菌门同样是 Band 序列中的最优势类群,占序列总数的 46.2%,但与克隆文库不同,Band 序列中的优势细菌纲是  $\alpha$ -和  $\gamma$ -变形菌纲( $\alpha$ -,  $\beta$ -proteobacteria)。从图中可以看出,除了优势菌群外,克隆文库和条带中的细菌所属的门类并不相同,Planctomyces, Nitrospira, Actinobacteria, Acidobacteria 只出现在克隆文库中,但 Firmicutes, Cyanobacteria, Fusobacteria 只出现在 DGGE 条带中,这种差异可能

是克隆文库覆盖率较低而 DGGE 条带选择主观性强导致的。

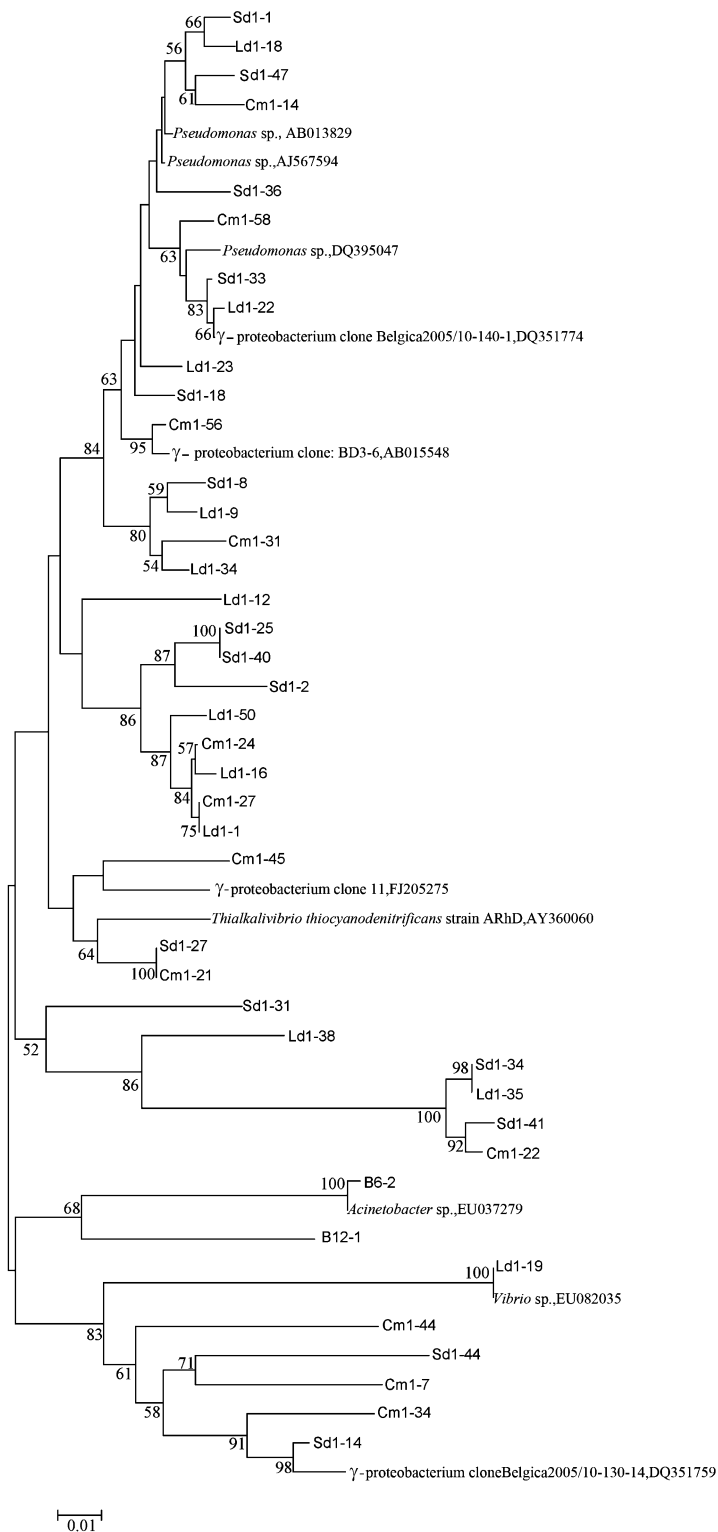


图 5  $\gamma$ -变形菌纲序列系统发育图谱

分支处数字为支持率(小于 50% 未显示), 比例尺表示 1% 的碱基差异。Sd, Cm, Ld 为各站点, 后面数字为各站点中对应的克隆序列号。B 为 DGGE 条带序列, 后面数字为其条带编号

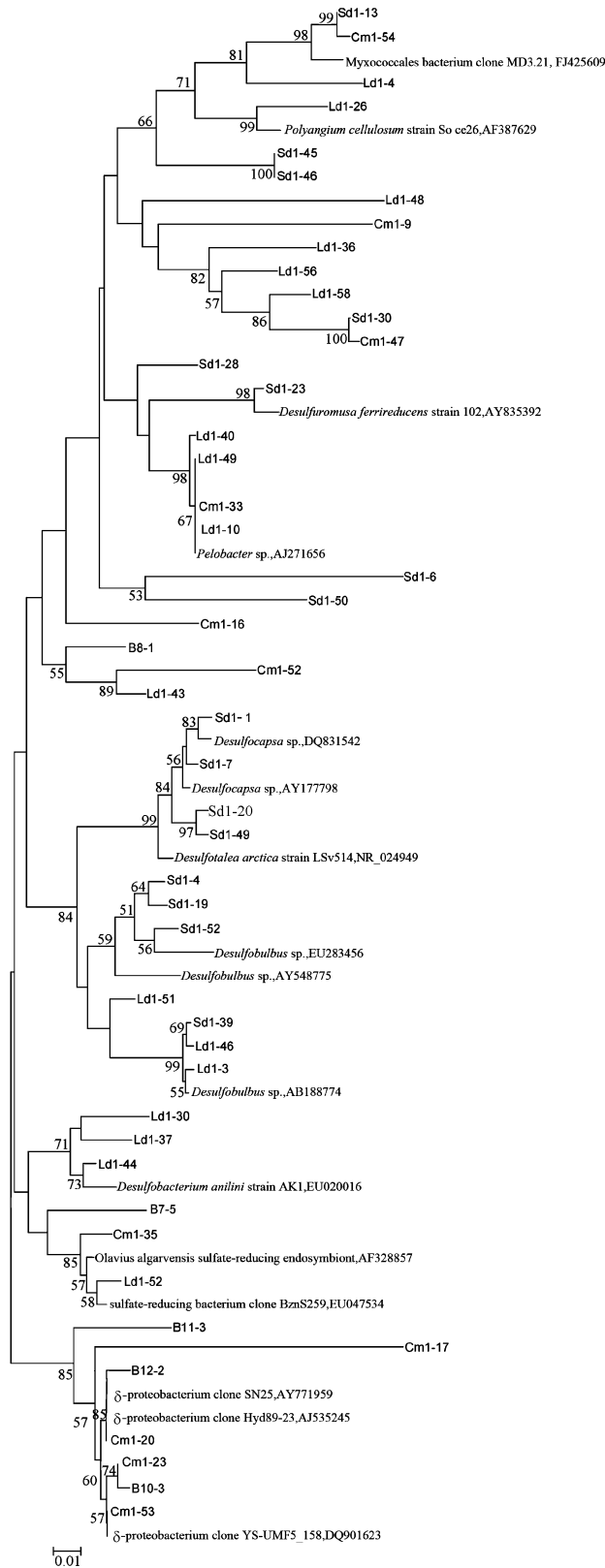


图6  $\delta$ -变形菌纲序列系统发育图谱

分支处数字为支持率(小于50%未显示),比例尺表示1%的碱基差异。Sd,Cm,Ld为各站位,后面数字为各站位中对应的克隆序列号。B为 DGGE 条带序列,后面数字为其条带编号

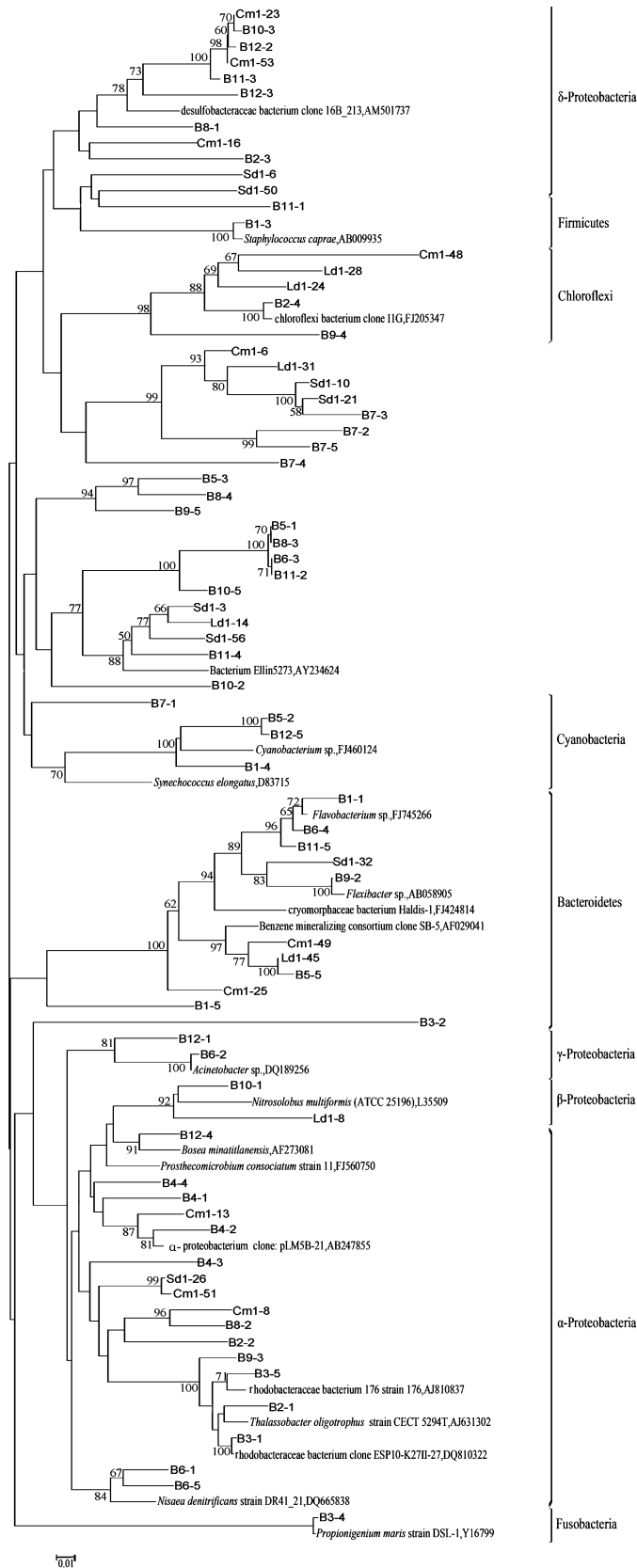


图 7 DGGE 优势条带系统发育图谱

分支处数字为支持率(小于 50% 未显示),比例尺表示 1% 的碱基差异。Sd,Cm,Ld 为各站位,后面数字为各站位中对应的克隆序列号。B 为 DGGE 条带序列,后面数字为其条带编号

### 3.3 优势细菌群落系统发育分析

选取表层细菌 16S rDNA 文库和 DGGE 条带中的  $\gamma$ -和  $\delta$ -变形菌纲以及 DGGE 优势群落序列来构建系统发育树,结果如图 5~7。

图 5 为各文库及 DGGE 条带序列中  $\gamma$ -变形菌纲的系统发育图。根据该图发现多数克隆序列与 GenBank 中的序列分离较远,即使有相似序列也多为未培养细菌,可见沉积物中细菌的多样性和不可培养性都非常高。虽然序列来自不同站位,但我们仍可见站间部分序列存在重叠的现象,如 Cm1-27 与 Ld1-1, Sd1-27 与 Cm1-21 等。在  $\gamma$ -变形菌纲中序列 Sd1-36 同太平洋中不可培养的 *Pseudomonas* sp. (AJ567594) 具有 97% 的相似性, Ld1-19 同 *Vibrio* sp. (EU082035) 具有 95% 的相似性, Cm1-56 同日本深海沉积物中不可培养的  $\gamma$ -变形细菌 (AB015548) 具有 99% 的相似性, B6-2 同从镉污染的土壤中分离的细菌 *Acinetobacter* sp. (EU037279) 具有 99% 的相似性, Sd1-14 同重金属污染的海洋沉积物中不可培养的  $\gamma$ -变形细菌 (DQ351759) 具有 97% 的相似性,这些序列的多样性可能决定着功能的多样性。

$\delta$ -变形菌纲主要是硫酸盐还原菌,其系统发育图谱如图 6 所示,这些序列在  $\delta$ -变形菌纲的不同目中均有分布,其中序列 Cm1-54 属于粘球菌目 (Myxococcales),同从加勒比海中与珊瑚健康状况相关的不可培养的细菌 (FJ425609) 具有 96% 的相似性, Ld1-49 属于脱硫单胞菌目 (Desulfuromonales) 序列,同南极海域沉积物中不可培养的 *Desulfuromonas* sp. (AY177801) 具有 98% 的相似性。Sd1-11 属于脱硫杆菌目 (Desulfobacterales) 序列,同英国科恩河口沉积物中不可培养的 *Desulfocapsa* sp. (DQ831542) 相似性可达 99%。DGGE 条带 B12-2 序列为该纲中互营杆菌目 (Syntrophobacterales) 序列,同瓦登海潮间带淤泥中的未培养细菌序列 (AY771959) 具有 99% 的相似性。

图 7 系统发育树中包含的是 DGGE 条带及 16S rDNA 克隆文库中部分相似序列,可以看到, DGGE 条带中的序列分别属于变形细菌门 (Proteobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes)、绿弯菌门 (Chloroflexi)、蓝细菌门 (Cyanobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、梭杆菌门 (Fusobacteria) 6 个已知的门,变形细菌门包括  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、和  $\delta$ -变形菌纲等,其中  $\alpha$ -变形菌纲中的序列 B3-5 同从海水中分离出

的红杆菌属细菌 *Rhodobacteraceae bacterium* (AJ810837) 具有 97% 的相似性,该菌能够氧化甲基卤化物; B2-1 同从地中海海水中分离出的微嗜盐、严格好氧的 *Thalassobacter oligotrophus* (AJ631302) 具有 96% 的相似性,此细菌能够产生细菌叶绿素 a;  $\beta$ -变形菌纲中的序列 B10-1 同亚硝化叶菌 *Nitrosolobus multiformis* (L35509) 的相似性为 92%,该菌能够将铵盐氧化成亚硝酸盐,参与硝化反应;  $\gamma$ -变形菌纲中的序列 B6-2 同不动杆菌 *Acinetobacter* sp. (DQ189256) 具有 97% 的相似性。厚壁菌门中的序列 B1-3 同山羊葡萄球菌 *Staphylococcus caprae* (AB009935) 具有高达 99% 的相似性,具有分解葡萄糖、麦芽糖和蔗糖的功能。拟杆菌门中序列 B9-2 同屈挠杆菌 *Flexibacter* sp. (AB058905) 具有 95% 的相似性,此种菌分离于一种海洋腰鞭毛虫细胞, B1-1 同不可培养的黄杆菌 *Flavobacterium* sp. (FG745266) 具有 96% 的相似性,可以分解海洋中的溶解有机物质。梭杆菌门序列 3-4 同 *Propionigenium maris* (Y16799) 具有 98% 的相似性,能在厌氧条件下将脱溴 2,4,6 三溴苯酚 (TBP) 还原成一溴苯酚 (monobromophenols)。由于 DGGE 条带序列的选择带有主观性,测序的带不一定是最优势的类群,而且 PCR 过程往往存在较大误差,所以 DGGE 条带序列同 16S rDNA 文库序列的分布存在许多分歧。

## 4 讨论与结论

对 Sd1, Cm1, Ld1 三个样品的克隆文库结果进行对比如图 2 所示,  $\gamma$ -和  $\delta$ -变形细菌是 3 个样品克隆文库中的优势类群,放线菌门、酸杆菌门、拟杆菌门、浮霉菌门、硝化螺旋菌门是 3 个克隆文库中都存在的细菌门类,但浮霉菌和硝化螺菌在 3 个克隆文库中所占的比例却存在明显的差别。浮霉菌在 Ld1 中的比例最大,在 Sd1 中的比例最小,而硝化螺菌在 Sd1 中的比例最大, Cm1 中的比例最小。出现这种差别的原因可能与站位所处的地理位置相关,其中 Sd1 站位位于渤海水域出水道口,柱深较浅,水交换显著,容易受到机械或气象扰动的影响,加之此站沉积物粒度较粗,氧的渗透率高,这些因素的综合作用可能使得此站沉积物具有很高的氧含量,进而促进了硝化螺旋菌的生长,而抑制了浮霉菌的生长。Ld1 位于辽东半岛近岸,陆源污染物排放量大,有机质来源复杂<sup>[19]</sup>,由于微生物分解而使溶解氧含量下

降,而溶解氧含量低、污染的水质适合浮霉菌的生长,但这种条件却不适合硝化螺旋菌的生长。Cm1 位于冷水团附近,水温较低,柱样较深,而且该站沉积物属于细粒泥质沉积物,影响了氧的渗透和传质,进而使氧含量下降,不利于硝化螺旋菌的生长。 $\beta$ -变形细菌仅在 Ld1 中检测到,这可能受到了人类活动污染的影响,有研究表明  $\beta$ -变形菌纲在污染环境的细菌群落组成中所占的比例更大<sup>[20]</sup>。绿弯菌门(Chloroflexi)在 Ld1 中比例最大,但在 Sd1 中并未检测到,这可能与含氧量有关,在本研究中所检测到的绿弯菌门细菌都是厌氧绿弯菌纲。

从 DGGE 图谱上可以看出,在同一站位不同深度范围内,相邻层次间细菌群落结构具有较高的相似性,但表层和底层细菌群落结构相似性相对较低,这可能是由于随着沉积层的加深,溶氧含量、氧化还原电位、硫酸盐含量、硫化物含量等逐渐过渡,从而 4 个沉积物层的细菌群落结构也相应形成一个变化过程。细菌群落这种变化同地理距离导致的差异相比并不明显,其中部分功能类群仍可能存在不同,只是 DGGE 技术分离能力所限而无法全部解析<sup>[21]</sup>。Andrew 等<sup>[22]</sup>的研究表明在 0~22 cm 内表、中、底三层沉积物内细菌群落结构发生明显的变化,这主要是由于沉积物中硫化物、甲烷的含量在垂向分布

上发生了明显的变化;Edlund 等<sup>[23]</sup>的研究表明在沉积物不同氧化还原层中细菌群落结构存在明显的变化。对沉积物生物化学层次划分的主要依据是电子受体和电子供体的变化,而在我们的研究中不同层次沉积物中的硫酸盐、磷酸盐和硝酸盐等典型电子受体的含量差异不显著(数据未给出),沉积物的理化性质没有发生根本的变化,属于同一个沉积物层,这可能是细菌群落结构垂向差异较小的原因。

从克隆文库和 DGGE 的结果可以看出,群落中存在一些细菌同其功能相应,如  $\delta$ -变形细菌纲中的 SRB 类群,SRB 能够在厌氧条件下将硫酸盐进行还原,而从 DGGE 图谱及系统发育结果可以看出,SRB 在 3 个站位的 4 个层次中都有分布,同深度无明显相关性,这表明 SRB 并非绝对厌氧,在好氧条件下也可以生存。有研究表明,SRB 能够耐氧数小时<sup>[24]</sup>,甚至在有氧气存在的条件下进行有氧呼吸<sup>[25-26]</sup>。

通过对黄海西北近岸 3 个站位沉积物细菌群落多样性及空间分布特征进行了解析,表明各站位沉积物微生物多样性都很高,变形细菌是优势群落,其中的  $\gamma$ -和  $\delta$ -变形细菌纲是最优势的类群,在同一站位中不同深度的细菌群落结构相似性较高,地理位置的差异是细菌群落分布的主导因素。

## 参考文献:

- [1] WOBUS A, BLEUL C, MAASSEN S, et al. Microbial diversity and functional characterization of sediments from reservoirs of different trophic state [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2003, 46: 331—347.
- [2] FENCHEL T, FINLAY B J. Ecology and evolution in the anoxic world [M]//MAY R M, HARVEY P H. Oxford Series in Ecology and Evolution. Oxford: Oxford University Press, 1995:276.
- [3] JØRGENSEN B B. Mineralization of organic matter in the sea-bed: the role of sulfate reduction [J]. Nature, 1982, 296: 643—645.
- [4] ARRIGO K R. Marine microorganisms and global nutrient cycles [J]. Nature, 2005, 437:349—55.
- [5] 秦松,丁玲. 专家论海洋生物基因资源的研究与利用[J]. 生物学杂志 2006, 23(1):1—4.
- [6] KINGHORN A D, CHIN Y W, SWANSON S M. Discovery of natural product anticancer agents from biodiverse organisms [J]. Current Opinion in Drug Discovery & Development, 2009, 12: 189—196.
- [7] NEWBERRY C J, FRY J C, WEIGHTMAN A J. Assessment of bacterial community structure in the deep sub-seafloor biosphere by 16S rDNA-based techniques: a cautionary tale [J]. Journal of Microbiological Methods, 2003, 55:155—164.
- [8] HARDOIM C C, COSTA R, ARA JO F V, et al. Diversity of bacteria in the marine sponge *Aplysina fulva* in Brazilian coastal waters [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75:3331—3343.
- [9] 杜兵,张义钧,单毅春,等. 北黄海底层冷水团的变化特征及其对外长山岛海区养殖扇贝死亡的影响[J]. 海洋通报,1996,15(1):17—28.
- [10] WILMOTTE A, VAN DER AUWERA G, DE WACHTER R. Structure of the 16S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis* HTF ('*Mastigocladus laminosus* HTF') strain PCC7518, and phylogenetic analysis [J]. FEBS Letters, 1993, 317: 96—100.
- [11] MUYZER G, TESKE A, WIRSEN C O, et al. Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments [J]. Archives of Microbiology, 1995, 164: 165—172.

- [12] ZU Y, GAO C, WANG W, et al. Characteristics of the microbial community in rhizosphere of *Camptotheca acuminata* cultured with exotic invasive plant *Eupatorium adenophorum* [J]. Science in China Series C: Life Sciences, 2007, 50: 22—30.
- [13] SCHWIEGER F, TEBBE C C. A new approach to utilize PCR-single strand-conformation polymorphism for 16S rRNA based microbial community analysis [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64: 4870—4876.
- [14] GOOD I J. The population frequencies of species and the estimation of population parameters [J]. Biometrika, 1953, 40(3—4): 237—264.
- [15] COLE J R, CHAI B, FARRIS R J, et al. The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis [J]. Nucleic Acids Research, 2005;33: 294—296.
- [16] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24:1596—1599.
- [17] MAGURRAN A E. Ecological Diversity and its Measurement [M]. New Jersey: Princeton University Press, 1988.
- [18] PIELOU E C. An Introduction to Mathematical Ecology [M]. New York: Wiley-Interscience, 1969.
- [19] 王极刚, 赵杰. 2001~2005年鸭绿江河口及邻近海域水质评价[J]. 海洋环境科学, 2008, 27:499—501.
- [20] BRÜMMER I H M, FELSKE A, WAGNER-DÖBLER I. Diversity and seasonal variability of  $\beta$ -proteobacteria in biofilms of polluted rivers: analysis by temperature gradient gel electrophoresis and cloning [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69: 4463—4473.
- [21] SEKIGUCHI H, TOMIOKA N, NAKAHARA T, et al. A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis [J]. Biotechnology Letters, 2001, 23:1205—1208.
- [22] ANDREW J, REED RICHARD A, LUTZ COSTANTINO V. Vertical distribution and diversity of bacteria and archaea in sulfide and methane-rich cold seep sediments located at the base of the Florida Escarpment [J]. Extremophiles, 2006, 10:199—211.
- [23] EDLUND A, H RDEMAN F, JANSSON J K, et al. Active bacterial community structure along vertical redox gradients in Baltic Sea sediment [J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(8): 2051—2063.
- [24] FUKUI M, TAKII S. Survival of sulfate-reducing bacteria in oxic surface sediment of a seawater lake [J]. FEMS Microbiology Ecology, 1990, 73: 317—322.
- [25] DILLING W, CYPIONKA H. Aerobic respiration in sulfate-reducing bacteria [J]. FEMS Microbiology Letters, 1990, 71: 123—128.
- [26] SANTOS H, FARELEIRA P, XAVIER A V, et al. Aerobic metabolism of carbon reserves by the “obligate anaerobe” *Desulfovibrio gigas* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1993, 195: 551—557.

## Temporal and spatial distribution characterization of bacterial community in sediments from the inshore of the northwest Huanghai Sea

ZHANG Jian<sup>1</sup>, ZHAO Yang-guo<sup>1</sup>, LI Hai-yan<sup>1</sup>, BAI Jie<sup>1</sup>, TIAN Wei-jun<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Ministry of Education for Marine Environment and Ecology, Ocean University of China, Qingdao 266100, China)

**Abstract:** 16S rDNA clone library combining with denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) technique was used to reveal the bacterial community diversity and the spatial distribution characteristics from the three stations of the sediment of the northwest Huanghai Sea. The bacterial 16S rDNA libraries of the surface sediments showed that at all three stations composed high diversity of bacterial communities,  $\gamma$ - and  $\delta$ -proteobacteria were the dominant groups, respectively, accounting for 20% and 32% of the total sequences. DGGE profiles showed that the bacterial community structure presented a high degree of similarity at the same stations at different depths, but demonstrated far distance from different stations. The present study shows that the bacteria from the coastal sediments have a high community diversity and possess dominant groups in bacterial community, but on a smaller scale, the vertical changes of community structure are not obvious.

**Key words:** 16S rDNA clone library; denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE); bacterial community