

大连长山群岛海岸带沉积物微生物群落结构特征

李佳霖¹, 王中华^{1,2}, 秦松^{1*}, 汪光义^{3*}

¹中国科学院烟台海岸带研究所, 烟台 264003

²宁波大学生命科学与工程学院, 宁波 315211

³ Department of Oceanography, University of Hawaii at Manoa, Honolulu HI 96822, USA

摘要:【目的】为揭示海岸带微生物群落结构在人类活动影响下的分布差异及对环境因子变化的响应趋势,【方法】本实验采用 t-RFLP 和 DGGE 技术,对大连长山群岛不同功能类型海岸潮间带沉积物中的微生物群落结构特征进行比对和分析,并通过 16S rRNA 基因文库解析养殖污染站位的微生物群落结构特征。【结果】T-RFLP 的 t-RF 分析显示,养殖污染严重站位的微生物丰度、香农指数和均匀度明显高于其它站位。通过对 t-RFLP 色谱峰和 DGGE 图谱聚类分析发现,处于旅游区的 2 个站位微生物群落结构相似度较高,养殖区随污染程度加重与旅游区的群落结构差异增大。对污染严重站位建立的克隆文库显示变形菌门 (Proteobacteria) 为优势菌群,其中 γ -变形菌门是主要存在的亚门微生物。【结论】T-RFLP 和 DGGE 技术从不同方面反映了环境中的微生物群落结构特征,研究结果表明养殖污染区的微生物群落结构发生明显变化,其影响大于地理隔离效应,污染严重区域的微生物群落中存在大量肠杆菌属,且多个物种与富营养化和赤潮相关联,如拟杆菌门和 α -变形细菌红细菌目的细菌。

关键词: 海岸带, 微生物群落结构, 分子生物学分析方法, 人类活动

中图分类号: Q938.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 05-0656-11

海岸带区域是人口聚集区和社会经济活动密集带,随着近海城市经济社会的加速发展,海岸带面临着诸如养殖污染、富营养化、陆源排污、围海造田及物种入侵等诸多生态问题,环境压力不断增大^[1]。海岸带环境恶化对生态系统的影响主要表现为生物多样性的变迁,由于微生物对环境现状的指示作用和物质循环的驱动作用,其群落结构特征的研究具有重要意义^[2]。海岸带微生物群落结构在不同环境因子压力下显现的特征分布及其对生态环境可能产生的反馈调节机制,是目前海洋环境科学领域的重要研究课题之一^[3]。

海洋沉积物中的微生物含量约为 $10^8 - 10^{10}$ 个/g^[4],种类达 0.1 - 2 亿种^[5],世代交替周期短;其群落组成随盐度、有机质含量、营养盐浓度等环境因素产生变化^[6],是表征生态环境现状理想的生物标志物^[7]。由于大多数海洋微生物不可培养,早期的微生物多样性研究受到限制。近 20 年来借助分子生物学和生物信息学技术,国内外学者就海洋微生物在时空和环境压力下呈现的多样性分布特征进行了大量研究,发现其群落结构在不同的生态环境下呈现一定规律的分布^[8-9],而且当环境改变时会表现出几乎同步的变化^[10-11]。在针对海

基金项目: 中国科学院创新团队国际合作伙伴计划“海岸带典型环境过程和资源效应”

* 通信作者: 秦松, E-mail: sqin@yic.ac.cn; 汪光义, E-mail: guangyi@hawaii.edu

作者简介: 李佳霖 (1980 -), 女, 山东烟台人, 助理研究员, 博士, 主要海洋环境微生物研究。E-mail: jlli@yic.ac.cn

收稿日期: 2010-12-01; **修回日期:** 2010-02-18

岸带微生物群落结构的研究中,德国 Sylt 岛沿岸砂质沉积物中的微生物群落在环境因子的扰动作用下多样性较高且时空分布差异明显^[12];海岸带重金属污染区微生物群落结构与环境中铜浓度变化具有一定的相关性^[13],但由于研究的时空局限性对于微生物群落结构变化的规律性认识还需要更多资料数据的支持。中国近海海岸带是世界上养殖污染压力最大的区域^[14],但是针对养殖污染进行的海岸带微生物群落结构变化的研究还较少,养殖污染对微生物群落结构产生的影响,以及由此造成的生物地化循环的变化都缺乏相关的研究报道。

大连长山群岛位于辽东半岛东南,海岸线长 359 km,是黄海北部重要的海珍品养殖基地和旅游景区。由于处于黄海深处,海域污染源主要来自船舶运输、居民生活和水产养殖,因此长山群岛海岸带区域的环境受大陆影响较小,环境条件相对稳定。岛上的海岸带区域按照功能区划可分为养殖区和旅游区,其中养殖区受养殖方式、规模及海流的影响呈现不同程度的富营养化。该区域典型站位微生物群落结构分布的差异能够反映人为活动造成的环境变化对生态系统产生的影响。

本研究采集了长山群岛不同区域的沉积物样本,通过末端限制性片段分析(Terminal restriction fragment length polymorphism, t-RFLP)技术比对不同站位微生物群落结构组成的差异,采用变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)技术对不同站位的特征微生物进行定位,并针对污染最严重的样本构建了微生物的 16S rRNA

基因文库,探讨海岸带微生物群落结构分布特征及在环境压力下呈现变化趋势,为海岸带的微生物资源利用提供基础研究资料。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

硅锆研磨珠(Biospec, USA),丙烯酰胺、尿素、过硫酸铵(Ameresco 产品),Tris、EDTA、APS(Sigma, USA),PEG6000、SDS(Merck 产品),Taq 酶、Msp I 和 Hha I 内切酶、dNTP、pMD18-T 载体(TaKaRa 公司),胶回收试剂盒、PCR 引物(Sangon, 上海),其它试剂为国产分析纯。BeadBeater(Biospec, USA),电泳系统 Power Pac1000、iCycler 扩增仪、DeCode System、GelDoc XR System(Bio-Rad Laboratories, USA),3730 测序仪(ABI, USA)。

1.2 采样站位和环境参数测定

2009 年 9 月,在长海县选取 4 个站位(图 1),于低潮期用无菌采样管采集表层 3 cm 沉积物约 10 g,每个站位采集 3 个平行样,置于 4℃ 保温箱带回实验室存放于 -80℃ 冰柜中至 DNA 提取。4 个站位分别位于獐子岛旅游区(D1),大长山岛浮阀养殖区(D2、D4),大长山岛旅游区(D3)。

海水的温度、盐度和 pH 参数在现场用便携电导率仪、pH 仪(Mettler Toledo, Switzerland)测定,沉积物中的 C、N 含量用大进样元素分析仪(Elementar, German)测定,沉积物间隙水中的营养盐含量用 AAIII(Seal Analytical GmbH, German)测定。

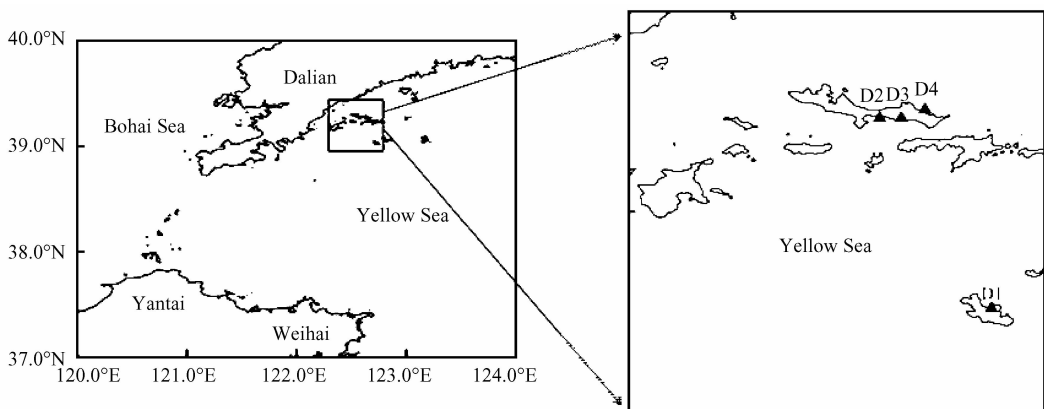


图 1 采样站位分布图

Fig. 1 Map of sampling sites.

1.3 DNA 提取

沉积物基因组 DNA 用珠磨法进行提取^[15], 提取后将 DNA 溶解于 50 μ L TE, 用于进行 PCR 反应。

1.4 PCR 扩增

以沉积物 DNA 为模板, 采用细菌 16S rRNA 基

因 V3 区的通用引物进行 PCR 扩增(表 1), 2 对引物扩增的 DNA 片段长度分别约为 200 bp 和 1500 bp, 扩增后电泳检测并进行纯化回收, 用于进一步实验的分析。

表 1 PCR 引物及反应条件

Table 1 Summary of primers and conditions used in PCR amplifications

Primer set	Experimental stage	Thermocycling program	Reference
341F ^a / 534R	DGGE & DGGE band sequencing	5min at 94°C; followed by 30 cycles of 30s at 92°C, 30s at 55°C and 1min at 72°C; and 10min final extensiopm at 72°C	[2,16]
27F/1492R	t-RFLP ^b & RFLP	5min at 95°C; followed by 30 cycles of 30s at 94°C, 60s at 50°C and 2min at 72°C; and 10min final extensiopm at 72°C	[17-18]

^a Primer 341F for PCR followed with DGGE analysis had the 5'-GC clamp (GCCCCGCCGCGCGCGCGGGCGGGGGCGGGGGCAGGGGGG).

^b For t-RFLP analysis, 6-carboxyfluorescein (6-FAM) was added to allow the detection of terminal fragments.

1.5 T-RFLP 多态性分析

将切胶回收的 PCR 纯化产物于 37°C 用 *Msp* I 内切酶进行酶切, 3h 后终止反应, 并送往上海基康生物技术有限公司进行 STR 检测 (ABI 3730 DNA Analyzer)。测定结果用 Peak scanner 1.0 软件进行分析。为了避免引物和杂峰的干扰, 对检测结果中碱基对 < 50 bp 和峰面积比重 < 1% 的片段用 T-REX 软件剔除^[19-20]后分析细菌的丰度 (*S*), 香农指数 (*H*) 和均匀度 (*E*), 并比较各站位沉积物细菌群落的相似性。对部分优势和特征片段长度的细菌群落通过 MiCA 3 数据库推测其同源性菌群^[21]。

1.6 DGGE 群落图谱分析

采用 DGGE 技术分析不同站位的特征性细菌分布。PCR 产物用 DeCode System 进行分析, 聚丙烯酰胺胶浓度为 6%, 变性梯度 40% - 70%, 60°C, 60 V 运行 16 h, 凝胶采用银染法进行染色。对 DGGE 图谱中各个站位的优势条带和特征条带割胶回收, 4°C 培养过夜, 并进行 PCR 扩增, 扩增产物纯化后, 送公司 (北京诺赛基因组研究中心) 测序。测序结果提交 NCBI 数据库进行序列同源性比对。

1.7 构建 16S rRNA 基因文库

将 D4 站位的 PCR 产物纯化回收后, 按照 pMD18-T Simple Vector 的说明进行连接转化, 并选择阳性克隆进行扩增后, 根据扩增条带大小鉴定重组子。对正确插入片段的阳性克隆进行 *Msp* I 或 *Hha* I 的 RFLP 酶切。酶切后进行电泳检测比较分析酶切带型, 酶切图谱完全一样的作为一个 OTU, 从每个 OTU 中选取单克隆送公司测序 (北京诺赛基因组研究中心)。计算库容^[22], 将所得序列提交

RDP 数据库, 计算各类群的比例^[23], 并比对 GenBank 数据库, 应用 MEGA 4.0 软件构建该站位的系统进化树。

2 结果

2.1 环境参数的测定结果

海水及沉积物的环境特征既能够影响该生存环境下的微生物群落结构, 也能够反映功能微生物进行生物地化循环形成的对环境的反馈作用。在采样期间, 研究区域内无明显的降雨过程, 各个采样点周围也未发现河流和污水管道入海, 但可以观察到各个采样站位存在较大差别。旅游区的两个站位 (D1、D3) 海水透明度较高, 沉积物以砂砾为主, 而养殖区的两个站位 (D2、D4) 海水较浑浊, 沉积物中含有淤泥, D4 站污染尤为严重, 沉积物呈黑色且有明显的腐臭味, 采样前的夏季, D2 和 D4 站位所在的养殖区出现养殖扇贝大量死亡的现象。

针对研究区域主要存在养殖污染的情况, 对各个采样站位选取了主要物理和化学参数进行测定, 结果分别见表 2 和图 2。站位间海水的温度差异主要是由采样时间不同造成的。各个站位的营养盐数据表明, 研究区域的水质较好, 旅游区达到国家一类水质标准, 养殖区的溶解无机氮 (DIN) 含量相对较高, 达到国家二类水质标准。但在 D4 站, 相对于较高的 NH_4^+ 和 NO_2^- 浓度, NO_3^- 含量较低, 这可能是由于该站沉积物次表层出现厌氧环境, 进而促进了反硝化过程 ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$)。各个站位海水中的 N/P

比值范围为 18 - 46, 根据 Redfield 比值, 研究区域表 现为 P 营养盐限制型。

表 2 各研究站位的常规物理参数测定值

Table 2 Values of the physical parameters of the different sites

Sites	Longitude(°E)	Latitude(°N)	T(°C)	Salinity(‰)	pH	Conductivity(μS/cm)	Water content(%)	Sediment type
D1	122.735	39.034	20.0	33.0	7.79	44.2	19.1	Sand
D2	122.608	39.271	26.4	31.5	7.92	41.2	21.6	Sand
D3	122.660	39.261	25.2	32.5	7.82	41.4	19.1	Sandy Mud
D4	122.625	39.281	26.9	31.5	8.03	41.6	28.9	Mud

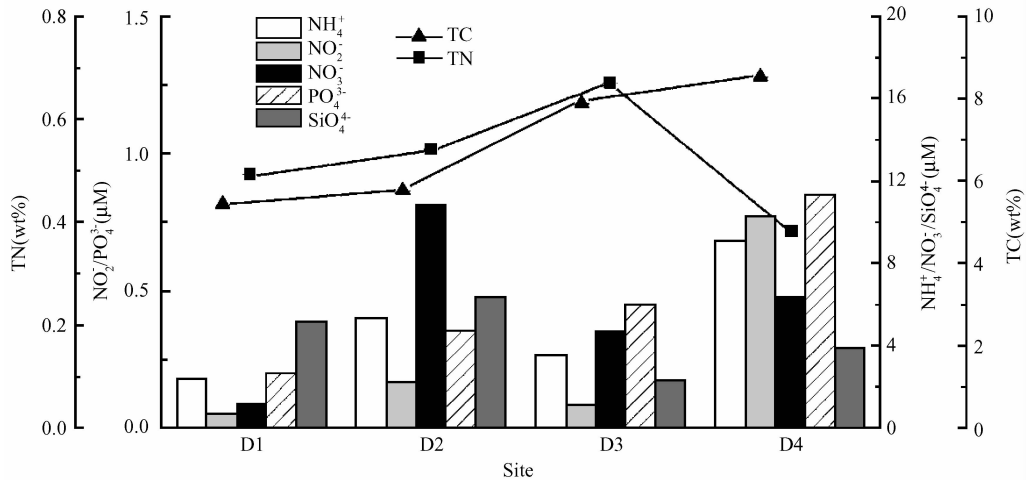


图 2 各研究站位的化学参数测定值

Fig. 2 Summary of water and sediment chemistry of the different sites.

2.2 各站位的 t-RFLP 分析结果

对 4 个站点沉积物样品进行 t-RFLP 分析, 结果如图 3 所示。每个荧光峰代表该样品中不同细菌的 16S rRNA 基因片段, 4 个样品得到的 T-RF 数分别为 20、23、35 和 70, D4 站点细菌的 16S rRNA 多样性明显高于其它站点。

根据各个站位的 t-RFLP 色谱图, 不同片段形成的荧光峰的峰面积可以反映细菌相对生物量的多少, 通过色谱峰对应的片段长度和峰面积, 对各个站点细菌的丰度(S), 香农指数(H)和均匀度(E)进行了计算, 结果见表 3。D4 站位的香农指数明显偏高, 说明该站点各种微生物的相对生物量较为均匀。旅游区站点微生物群落的香农指数和均匀度均低于养殖区。

对 4 个站位的色谱图根据荧光片段的长度进行匹配, 以各自形成的峰面积作为相对生物量值, 计算站点之间细菌群落的相似度。图 4 是各个站位的细菌相似性结果。从图中可以看到, 采集于海岸带旅

游区站位的样品, 其细菌群落的相似度较高, 聚类位置相近, 相似度达 45.61%, 它们与 D2 的相似度达到 34.32%, 而与 D4 的相似度则只有 20.52%。D2 和 D3 站点无论是地理位置还是海水潮流特点都更接近, 但是从上述分析结果可以看到, 功能区相近的 D1 和 D3 站点相似度更高, 这说明人类的养殖活动已经对微生物的群落结构产生了重要影响, 而 D4 站点由于养殖污染的破坏, 其与周围海区的微生物群落结构已经存在巨大差异。D4 站位的微生物群落结构通过构建 16S rRNA 基因文库进行进一步解析。

对在 4 个站点均出现的末端荧光片段长度 (108 bp、115 bp、116 bp、148 bp 和 488 bp), 及各个站位的优势末端荧光片段长度 148 bp (D1), 113 bp (D2), 296 bp (D3) 和 490 bp (D4) 比对其可能的同源性菌群, 结果如表 4 所示, 分布于变形菌门 (Proteobacteria)、浮霉菌门 (Planctomycetes)、绿弯菌门 (Chloroflexi) 和厚壁菌门 (Firmicutes)。

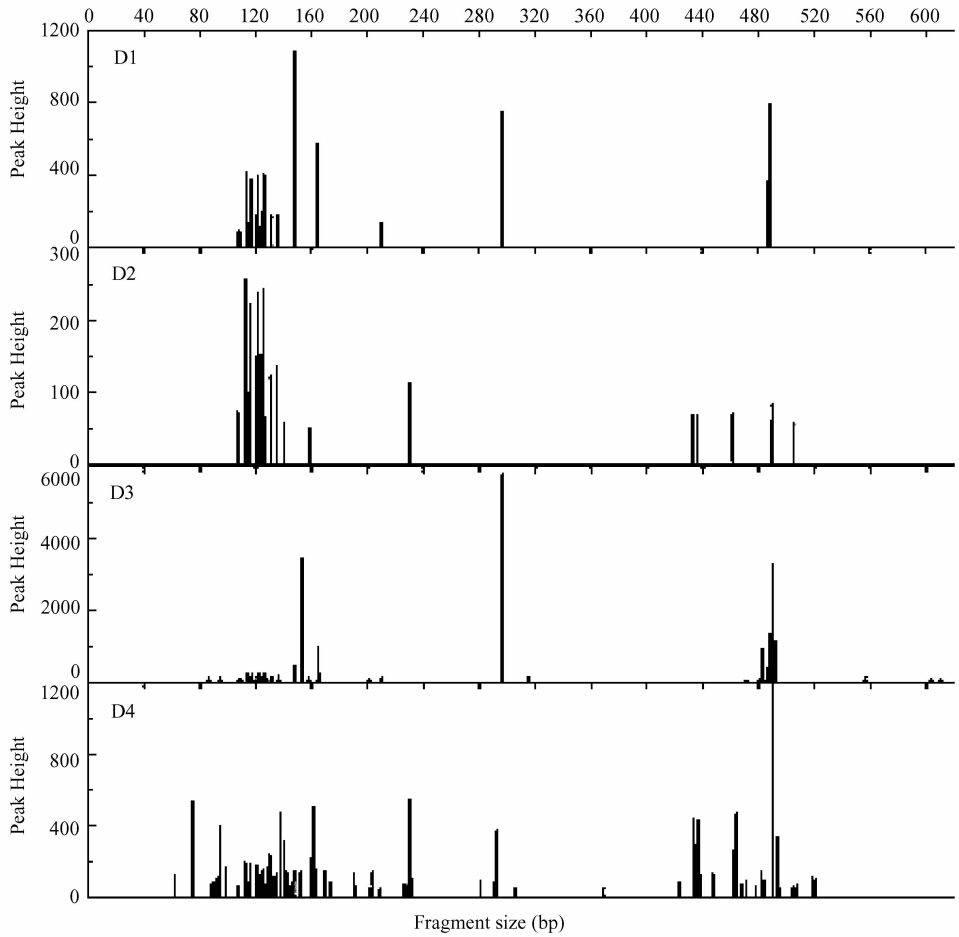


图3 不同站位沉积物细菌的 t-RFLP 分析图谱

Fig. 3 Summary of t-RFLP profiles from bacterial 16S rRNA genes of different sites.

表3 各站位沉积物的丰度、香农指数及均匀度

Table 3 Phylotype richness (S), Shannon-wienwe Index (H) and Evenness (E) values for the bacterial communities from t-RFLP profiles

Parameter	D1	D2	D3	D4
S^a	20	23	35	70
H^b	2.707	2.990	2.554	3.915
E^c	0.904	0.954	0.718	0.921

^a S , was calculated as the total number of distinct T-RF sizes (peaks between 50 bp and 620 bp) in the profile.

^b $H = -\sum (P_i \ln P_i)$, where P is the proportion of an individual peak area relative to the sum of all peak areas^[24].

^c $E = H/H_{\max}$, where $H_{\max} = \ln S$ ^[24].

2.3 各站位的 DGGE 图谱分析

对海岸带沉积物各个站位的样品的 PCR 产物进行 DGGE 分析及其聚类分析的结果如图 5 所示。各个样品分离到 17 到 27 条不同的条带,其中条带数目最多的站位是 D4,最少的出现在 D2 站。

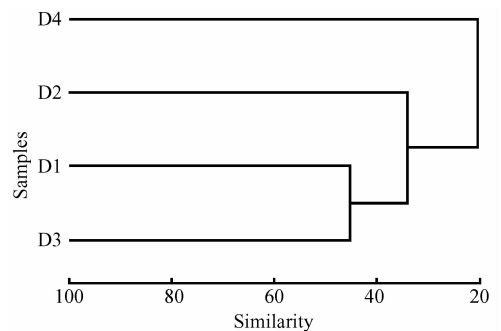


图4 各个站位沉积物样品的细菌群落结构相似性聚类分析

Fig. 4 Cluster analysis of bacterial community structure similarity from different sites.

以相应位置是否出现条带作为分析依据,得到的聚类结果显示旅游区的 D1 和 D3 站相似性达到 69.57%。

表 4 T-RFLP 特征荧光片段比对结果

Table 4 Alignment of characteristic t-RFLP fragment-size to its possible GenBank sequence

Fragment size	Possible match sequence by MiCA 3 (accession number)	Phylogenetic affiliation
108	Uncultured bacterium C85-25 (EU652587)	Alphaproteobacteria
113	Uncultured soil bacterium clone F6-89 (EF688380)	Planctomycetacia
115	Uncultured bacterium SJA-170 (AJ009500)	Chloroflexi
116	Unidentified bacterium (Z93972)	Betaproteobacteria
148	<i>Bacillus</i> sp. ARCTIC-P30 (AY573046)	Bacilli
296	<i>Eubacterium desmolans</i> (L34618)	Clostridia
488	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 8057 (AM111091)	Gammaproteobacteria
490	<i>Betaproteobacterium</i> JS666 (AF408397)	Betaproteobacteria

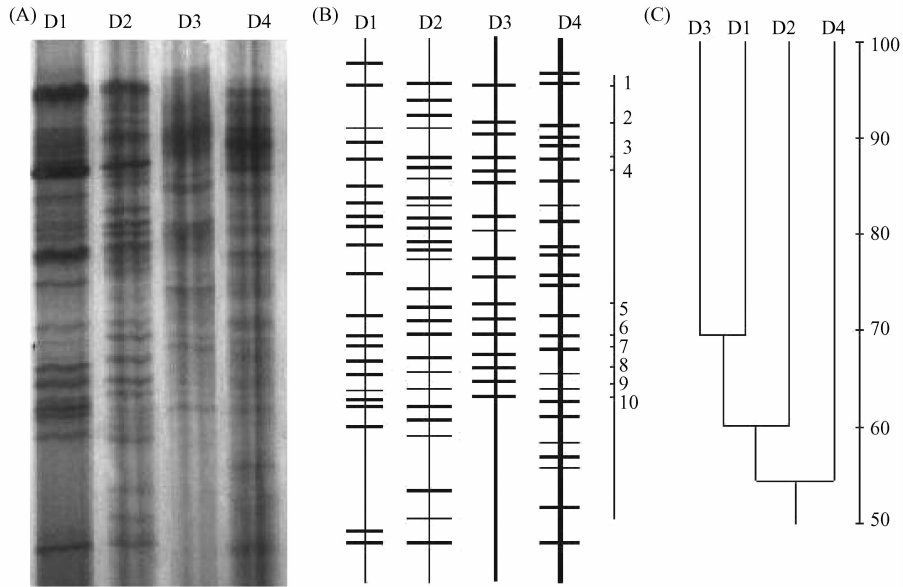


图 5 不同站位细菌的 DGGE 指纹图谱 (A)、(B) 及聚类分析结果 (C)

Fig. 5 Bacterial DGGE profiles (A), (B) and cluster analysis (C) of different sites.

根据 DGGE 指纹图谱,对 4 个站位均出现的条带(图 5 中的 1-3、6 和 8-10)、旅游区的特征条带(图 5 中的 7)和养殖区的特征条带(图 5 中的 4 和 5)进行序列测定,通过 BLAST 与 GenBank 数据库进

行比对,匹配同源性最高的序列,结果见表 5。其中 1、3 和 10 条带属于 *Gammaproteobacteria*,而其余条带都属于无法分类的细菌种。

表 5 DGGE 特征条带序列对比结果

Table 5 Alignment of DGGE band to its most-similar GenBank sequence

Band No.	Closest match by FASTA search (accession number)	Sequence identity/%
1	<i>Klebsiella</i> sp. SRC_DSD23 (HM195208)	97
2	Uncultured bacterium SIPt0-42 (GU584868)	99
3	<i>Escherichia coli</i> clone KC035 (GU415906)	99
4	Uncultured <i>Alcanivorax</i> sp. clone 13II24-46 (GU108567)	90
5	Uncultured bacterium clone SEW-C-G07 (EF659138)	94
6	Uncultured bacterium clone nby456g03c1 (HM827324)	93
7	<i>Escherichia coli</i> strain HPC125 (DQ129710)	94
8	Soil bacterium Cipr-S1T-M1LLSSL-3 (EU515384)	91
9	Uncultured bacterium clone Amsterdam-MN13BT4-326 (AY593434)	95
10	Uncultured bacterium clone (FJ904656)	100

2.4 D4 站位的系统发育分析

D4 站污染较严重,为了考量养殖污染下微生物群落的组成和结构,对 D4 站的 PCR 产物通过 RFLP 方法构建 16S rRNA 基因文库进行分析。样品随机挑取约 120 个阳性克隆片段,酶切得到的 OTU 数量为 24,文库的库容值为 82%,说明所建文库的覆盖率高,能够代表该站位的群落组成特征。根据测序结果建立该站位的系统进化树(结果见图 6),其中有一条序列无法确认其分类学位置,其余序列多与不可培养细菌具有高度相似性。根据测序的 Classifier 程序分类结果及双酶切结果相同的阳性克隆数,D4 站位的细菌中变形菌门(Proteobacteria)为优势菌群,占 65%,其中以 γ -变形细菌亚门丰度最高,占 41%,此外检测到的细菌还分布于拟杆菌门(Bacteroidetes)、浮霉菌门(Planctomycetacia)和放线菌门(Actinobacteria),分别占 6%、6%、12% 和 9%。

3 讨论

本研究采用 t-RFLP 和 DGGE 分子生物学方法,对大连长山群岛不同功能区海岸带的潮间带沉积物微生物群落结构进行了研究和分析。T-RFLP 和 DGGE 技术是目前普遍采用的两种分子生物学的研究方法,它们都以 PCR 实验为基础,前者以末端标记的 DNA 序列片段为目标分析序列,具有分辨率高、实验结果客观的特点,后者通过变性条件差异在梯度胶上分离不同碱基序列的 DNA 片段进行分析,样品间的比较更直观,检测到的条带可用于测序获取条带更详尽的信息。本研究中采用两种方法分别探讨了 4 个站位的微生物群落结构组成。T-RFLP 的分析结果通过对各个色谱峰面积的定量来精确反映各个分析条带在样品中的相对含量,根据该结果计算的微生物丰度、香农指数和均匀度能够客观真实地反映相应站位的微生物分布特征,但由于各个峰值的条带可能代表多个物种且无法直接进行进一步的测序,因此通过数据库查找其可能的相近种类作为研究参考^[21]。DGGE 只适用于 200 - 900 bp DNA 片段的分离,对分离条带进行扩增测序说明微生物优势物种的分布情况。T-RFLP 和 DGGE 方法在本研究中得到的聚类分析结果是相符的,在研究土壤微生物群落结构中两种方法获得的聚类分析结果也基本一致^[25-26]。

T-RFLP 和 DGGE 实验的聚类分析结果均证实旅游区站位(D1 和 D3)的相似度更高,其次是 D2 站,养殖污染较重的 D4 站位的相似度最低。根据采样站位图可知,D3 和 D2 站位的地理位置相近,但是 D3 与相同功能区划的 D1 站相似度更高,这说明人类养殖活动相对于地理隔离已经对微生物群落结构产生了更大的影响,且随着污染的加重微生物群落结构的差异性越明显。养殖污染较严重的站位(D4)的微生物群落结构产生明显变化,与其余站位差异较大,其群落结构特点是物种丰度较高,优势物种不明显,不同物种的均匀度高于其它站位。污染环境下微生物群落多样性表现出的上述趋势在以往的研究中也得到论证。Schäfer 等^[27]在营养盐的富集模拟实验中,监测了微生物群落结构组成的变化,DGGE 图谱结果说明控制组的微生物丰度要低于富集组。在香港维多利亚湾,通过 RFLP 克隆文库的方法,发现污染区域两个站位微生物群落的平均物种丰度为 47,香农指数 3.72,均匀度 0.89,均明显高于对比清洁站位的微生物群落结构的相应参数(分别为 33、3.24、0.78)^[28]。应用 DGGE 技术,Cetecioğlu 等^[2]研究了 Marmara 湾高污染区厌氧沉积物环境中的微生物群落结构,结果也显示其物种丰度要高于其它海域厌氧沉积物中的微生物群落丰度。在人为污染严重的环境中,较高的微生物多样性能够完成更多的生物地化循环过程,从而保持生态系统的稳定性,因此微生物丰度的增加是微生物群落适应环境变化的表现^[29]。

D4 站位的克隆文库解析养殖污染环境中微生物群落的结构组成。变形菌门中的 γ -变形细菌亚门是最为优势的类群。尽管国内外很多研究表明 γ -变形细菌亚门海洋表层沉积物的优势类群^[5,30],但是它们与本研究中 γ -变形细菌的物种构成存在明显差异。该亚门检测到的序列多属于肠杆菌目,是典型的异养厌氧型微生物,而在海洋沉积物中存在较多的则是着色菌目、假单胞菌目和军团菌目等。文库中与测序细菌处于同一进化枝的为埃希氏杆菌属和志贺氏菌属,均为致病菌^[31],文库中存在大量的肠杆菌目序列,说明环境的污染程度较严重,这也可能是夏季长山岛养殖区扇贝出现大量死亡的原因。 α -变形细菌亚门中主要是红细菌目,这类微生物在海岸带区域广泛分布,是赤潮发生后构成微生物群落的主要菌群,在富营养化的环境中具有竞

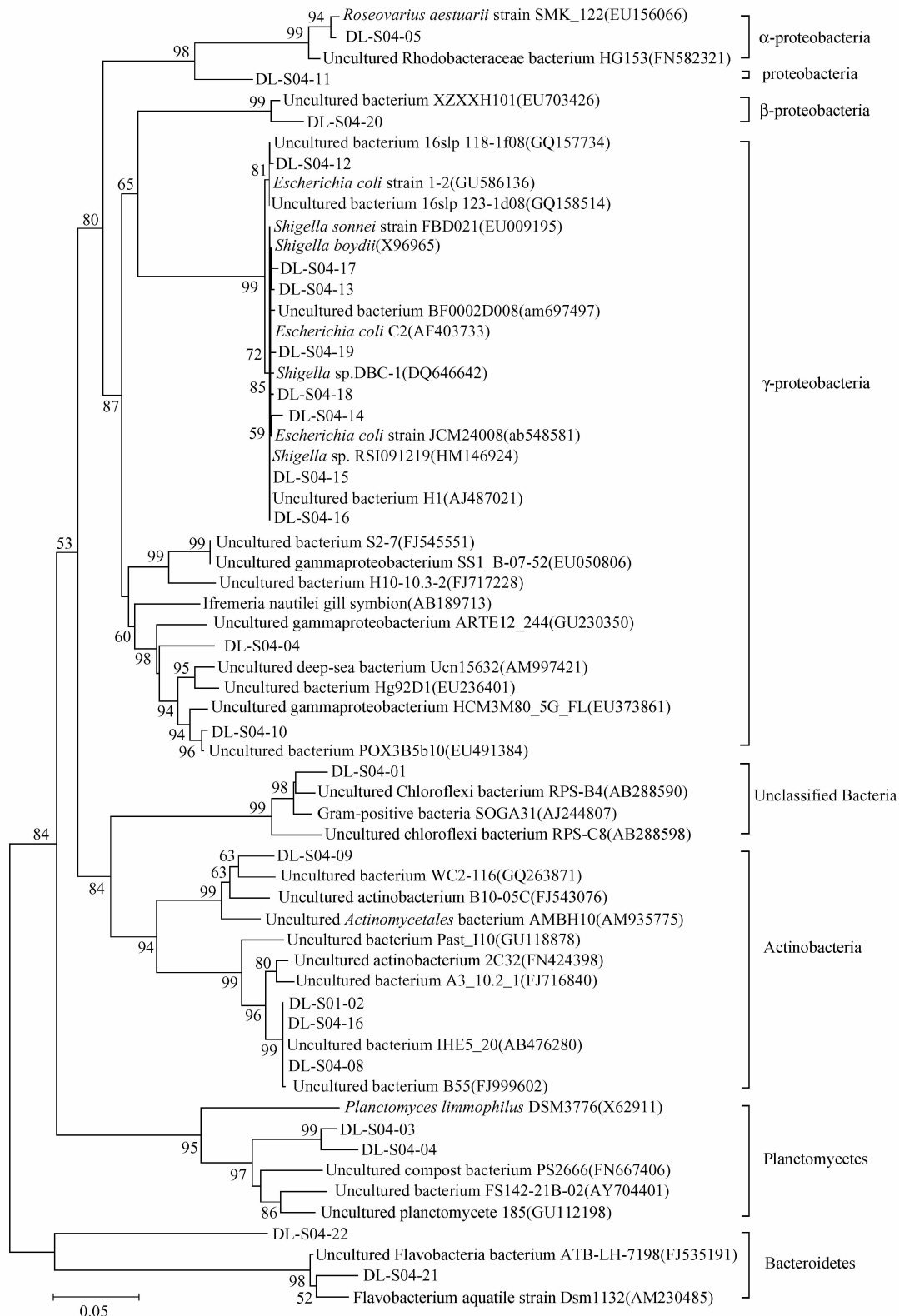


图 6 D4 站位的系统发育分析, 序列的 GenBank 登录号列于括号中, 标尺长度为 5% 的核苷酸置换率
 Fig. 6 Phylogenetic affiliation of 16S rRNA gene fragments at D4 site. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The scale bar: 5% sequence divergence.

争优势^[32]。拟杆菌门和浮霉菌门细菌能够降解环境中的有机质,此外,拟杆菌门细菌也是赤潮藻类的共生细菌,与赤潮的发生有一定的联系^[33]。文库中的多数序列与数据库中不可培养的细菌具有高度相似性,这表明海岸带微生物存在大量的未知资源,有待进一步的研究。

通过对4个站位微生物群落结构的分析,可以看到养殖压力对群落结构产生了重要影响,但是由于样本量较少,难以说明对微生物群落结构产生主要影响的环境因子。对于微生物的环境功能,还需要通过其它实验手段,如稳定同位素示踪技术的应用,来明确不同微生物物种在环境中的功能。这些都是进一步研究中需要探索的问题。

4 结论

本文采用 t-RFLP 和 DGGE 技术对大连分属于旅游区和养殖区的4个站位的微生物群落结构和多样性进行了研究,并对养殖污染严重的站位建立16S rRNA 基因文库解析其微生物群落组成,主要结论是:

养殖污染对微生物群落结构影响较大,地理位置相近的站位由于功能区划的不同其表现出的相似性差异大于地理隔离作用。养殖区的微生物群落结构丰度、香农指数和均匀度均较高。养殖严重污染区的微生物包括变性细菌,浮霉菌,拟杆菌,放线菌等多个功能类群,优势亚群是 γ -变形细菌,其主要构成是肠杆菌目。 α -变形细菌亚门中的红细菌目,以及浮霉菌和拟杆菌都是与赤潮发生有直接关联的微生物类群。

参考文献

[1] Böer S, Hedtkamp S, Van-Beusekom J, Fuhrman J, Boetius A, Ramette A. Time- and sediment depth-related variations in bacterial diversity and community structure in subtidal sands. *The ISME Journal*, 2009, 3(7):780-791.

[2] Cetecioglu Z, Ince BK, Kolukirik M, Ince O. Biogeographical distribution and diversity of bacterial and archaeal communities within highly polluted anoxic marine sediments from the marmara sea. *Marine Pollution Bulletin*, 2009, 58(3):384-395.

[3] Sahan E, Muyzer G. Diversity and spatio-temporal distribution of ammonia-oxidizing Archaea and Bacteria in sediments of the Westerschelde estuary. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 64(2):175-186.

[4] Poté J, Bravo AG, Mavingui P, Ariztegui D, Wildi W. Evaluation of quantitative recovery of bacterial cells and DNA from different lake sediments by Nycodenz density gradient centrifugation. *Ecological Indicators*, 2010, 10(2):234-240.

[5] 白洁,李海艳,赵阳国. 黄海北部不同站位海洋细菌群落分布特征. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2009, 49(3):343-350.

[6] Ikenaga M, Guevara R, Dean A, Pisani C, Boyer J. Changes in community structure of sediment bacteria along the Florida coastal everglades marsh-mangrove-seagrass salinity gradient. *Microbial Ecology*, 2010, 59(2):284-295.

[7] Zhang R, Liu B, Lau S, Ki J, Qian P. Particle-attached and free-living bacterial communities in a contrasting marine environment: Victoria Harbor, Hong Kong. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 61(3):496-508.

[8] Bernhard A, Tucker J, Giblin A, Stahl D. Functionally distinct communities of ammonia-oxidizing bacteria along an estuarine salinity gradient. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(6):1439-1447.

[9] 王鹏. 深海沉积物微生物多样性及其与环境相互关系的研究. 中国海洋大学博士论文, 2005.

[10] Baniulyte D, Favila E, Kelly J. Shifts in microbial community composition following surface application of dredged river sediments. *Microbial Ecology*, 2009, 57(1):160-169.

[11] Diaz-Ramirez I, Escalante-Espinosa E, Favela-Torres E, Gutierrez-Rojas M, Ramirez-Saad H. Design of bacterial defined mixed cultures for biodegradation of specific crude oil fractions, using population dynamics analysis by DGGE. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2008, 62(1):21-30.

[12] Ramette A, Tiedje JM, Boetius A. Impact of space, time and complex environments on microbial communities. *Clinical Microbiology and Infection*, 2009, 15(s1):60-62.

[13] Ogilvie LA, Grant A. Linking pollution induced community tolerance (PICT) and microbial community structure in chronically metal polluted estuarine sediments. *Marine Environmental Research*, 2008, 65(2):187-198.

- [14] Cao L, Wang WM, Yang Y, Yang CT, Yuan ZH, Xiong SB, Diana J. Environmental impact of aquaculture and countermeasures to aquaculture pollution in China. *Environmental Science and Pollution Research*, 2007, 14 (7):452-462.
- [15] Miller DN, Bryant JE, Madsen EL, Ghiorse WC. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65 (11): 4715-4724.
- [16] Muyzer G, de-Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3):695-700.
- [17] Dymock D, Weightman AJ, Scully C, Wade W. Molecular analysis of microflora associated with dentoalveolar abscesses. *Journal of Clinical Microbiology*, 1996, 34 (3):537-542.
- [18] Sakamoto M, Takeuchi Y, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. Application of terminal RFLP analysis to characterize oral bacterial flora in saliva of healthy subjects and patients with periodontitis. *Journal of Medical Microbiology*, 2003, 52(1):79-89.
- [19] Edmonds JW, Weston NB, Joye SB, Mou XZ, Moran MA. Microbial community response to seawater amendment in low-salinity tidal sediments. *Microbial Ecology*, 2009, 58 (3):558-568.
- [20] Culman SW, Bukowski R, Gauch HG, Cadillo-Quiroz H, Buckley D. T-REX: software for the processing and analysis of t-RFLP data. *BMC Bioinformatics*, 2009, 10 (1):171-180.
- [21] Shyu C, Soule T, Bent SJ, Foster J, Forney L. MiCA: a web-based tool for the analysis of microbial communities based on terminal-restriction fragment length polymorphisms of 16S and 18S rRNA genes. *Microbial Ecology*, 2007, 53(4):562-570.
- [22] Mao YJ, Zhang XJ, Yan X, Liu BB, Zhao LP. Development of group-specific PCR-DGGE fingerprinting for monitoring structural changes of *Thauera* spp. in an industrial wastewater treatment plant responding to operational perturbations. *Journal of Microbiological Methods*, 2008, 75(2):231-236.
- [23] Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole J. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16):5261-5267.
- [24] Dunbar J, Ticknor LO, Kuske CR. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(7):2943-2950.
- [25] Enwall K, Hallin S. Comparison of T-RFLP and DGGE techniques to assess denitrifier community composition in soil. *Letters in Applied Microbiology*, 2009, 48(1):145-148.
- [26] Smalla K, Oros-Sichler M, Milling A, Heuer H, Baumgarte S, Becker R, Neuber G, Kropf S, Ulrich A, Tebbe CC. Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, t-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: Do the different methods provide similar results? *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 69 (3):470-479.
- [27] Schäfer H, Bernard L, Courties C, Lebaron P, Servais P, Pukall R, Stackebrandt E, Troussellier M, Guindulain T, Vives-Rego J, Muyzer G. Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: changes in the genetic diversity of bacterial populations. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 34(3):243-253.
- [28] Zhang W, Ki JS, Qian PY. Microbial diversity in polluted harbor sediments I: bacterial community assessment based on four clone libraries of 16S rDNA. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2008, 76(3):668-681.
- [29] Hunter-Cevera J, Karl D, Buckley M. Marine Microbial Diversity, the Key to Earth's Habitability. Washington DC: *American Academy of Microbiology*, 2005:1-22.
- [30] Feng BW, Li XR, Wang JH, Hu Z, Meng H, Xiang LY, Quan ZX. Bacterial diversity of water and sediment in the Changjiang estuary and coastal area of the East China Sea. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, 70(2):236-248.
- [31] Nochi Z, Sahebkhietari N, Kharaziha P, Chiani M, Motavaze K, Dabiri H, Jafari F, Edalatkhah H, Reza Zali M, Noorinayer B. Comparison of 16S rRNA, 23S rRNA and *gyrB* genes sequences in phylogenetic relationships of *Shigella* isolates from Iran. *Annals of Microbiology*, 2009, 59(3):615-622.
- [32] Rooney-Varga JN, Giewat MW, Savin MC, Sood S, LeGresley M, Martin JL. Links between phytoplankton and bacterial community dynamics in a coastal marine environment. *Microbial Ecology*, 2005, 49(1):163-175.
- [33] Aguiló-Ferretjans MM, Bosch R, Martín-Cardona C, Lalucat J, Nogales B. Phylogenetic analysis of the

composition of bacterial communities in human-exploited coastal environments from Mallorca Island(Spain).

Systematic and Applied Microbiology, 2008, 31 (3) :231-240.

Microbial diversity of sediments from the coasts of Dalian Changshan Islands

Jialin Li¹, Zhonghua Wang^{1,2}, Song Qin^{1*}, Guangyi Wang^{3*}

¹ Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China

² Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China

³ Department of Oceanography, University of Hawaii at Manoa, Honolulu HI 96822, USA

Abstract: [**Objective**] To understand the impacts of anthropogenic activities on structure and composition of bacterial communities and to evaluate how bacterial communities respond to environmental gradients at coastal sediments. [**Methods**] The diversity of bacterial communities in sediments from tourist and mariculture zones at coastal area of Dalian Changshan Islands was assessed using terminal restriction fragment length polymorphism (t-RFLP) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches. Meanwhile, 16S rRNA clone library was constructed to reveal the composition and structure of bacterial communities in the most seriously polluted site (D4). [**Results**] There were much higher values of richness, Shannon-wiener and evenness index at D4 site by the analysis of terminal restriction fragments (t-RFs). The clustering result on the t-RFs areas and DGGE patterns showed that the bacterial diversity of tourist zone were more similar, while the distinction was increased with pollution levels among the tourist and mariculture zones. The 16S rRNA clone of D4 revealed that the Proteobacteria were the dominant phylum, and γ -proteobacteria was the main class within Proteobacteria. [**Conclusion**] The study documented changes in bacterial community structure by human impacts of mariculture than geographical location.

Keywords: coastal zone, bacterial community structure, molecular analysis, anthropogenic activities

(本文责编:王晋芳)