

文章编号: 1674 - 5566(2011)01 - 0126 - 05

## 枸杞岛海藻场沉积物细菌群落组成的初步研究

尹冰玉, 章守宇

(上海海洋大学 海洋科学学院, 上海 201306)

**摘要:** 提取枸杞岛海藻场沉积物样品总 DNA, 以细菌 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增, 经分子克隆、测序与序列分析, 构建了沉积物细菌 16S rDNA 文库和系统发育树, 进行沉积物中细菌多样性及系统发育分析。结果表明, 沉积物中细菌分属 5 个类群, 分别为变形细菌门(Proteobacteria, 48.2%)、厚壁菌门(Firmicutes, 22.2%)、放线菌门(Actinobacteria, 14.8%)、绿屈挠菌门(Chloroflexi, 3.7%)和酸杆菌门(Acidobacteria, 3.7%), 还有一些尚未确定其分类(7.4%)。在枸杞岛海藻场沉积物变形细菌门类群中,  $\gamma$ -变形菌占主导地位, 约为 46.1%, 其次为  $\alpha$ -变形菌(23.1%)、 $\beta$ -变形菌(15.4%)、 $\varepsilon$ -变形菌(7.7%)和  $\delta$ -变形菌(7.7%)。作为海洋沉积物中的优势菌群, 不同生态系统中变形细菌门类群的组成略有不同, 功能类群的组成与生态系统机制密切相关。厚壁菌门和放线菌门作为革兰氏阳性菌的两个分支, 在枸杞岛海藻场中主要参与分解碎屑及异养营养素的循环过程。

**研究亮点:** 海藻场生态系统具有很高的初级生产力, 食物链以碎屑食物链为主, 在碎屑食物链中分解者的种类及功能十分重要, 而这方面研究尚未见报道。首次通过在海藻场中采集样本、16S rDNA 测序研究海藻场中分解者的种类并分析其功能, 为深化海藻场生态系统研究提供依据。  
**关键词:** 海藻场; 海洋沉积物; 16S rDNA; 细菌群落; 枸杞岛  
**中图分类号:** S 938.1  
**文献标识码:** A

海藻场是由在冷温带大陆架区的硬质底上生长的大型褐藻类与其他海洋生物群落所共同构成的一种近岸海洋生态系统<sup>[1]</sup>。在海洋生态系统中, 海藻场不仅能为某些重要经济渔业资源提供产卵和栖息场所, 还有较强的海域环境净化功能, 所以海藻场生态系统的基础调查和应用研究对于当前我国渔业资源严重衰退和环境恶化的现状, 具有重大研究价值和意义<sup>[2]</sup>。

枸杞岛海藻场位于浙江舟山群岛东北部海域, 岛岸线总长 22.5 km, 除东部 0.5 km 为沙滩外, 其余均为岩礁, 其潮间带和潮下带均有不同程度的大型底栖海藻生长。现有调查显示, 该海藻场内外栖息着数量较多的幼小鱼、虾、蟹, 生物多样性丰富, 初级生产力高<sup>[3]</sup>; 海藻场食物网组成中, 碎屑食物链的作用十分突出<sup>[4]</sup>。作为海藻

场生态系统中的一部分, 分解者的细菌种类组成、分解功能及其参与整个系统的“有机-无机”物质循环以及能量转换的贡献等, 都是海藻场生态系统研究的重要组成部分, 这方面的研究尚未见报道。本文通过现场采样和 16S rDNA 测序法, 查明枸杞岛海藻场沉积物中的细菌群落组成模式, 探讨其分解功能, 以期深化海藻场生态系统研究提供依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 样品采集

2009 年 9 月, 在浙江枸杞岛海藻场(122°45'53.5"E, 30°43'23.1"N, 深 12 m) 通过抓斗式采泥器采集沉积物样品一份。样品采集后装于无菌样品瓶, 于保温箱内加冰保存, 尽快运

收稿日期: 2010-02-10 修回日期: 2010-05-24

基金项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划项目(2006AA100303); NSFC(30871924); 国家科技支撑计划(2007BAD43B03); 上海市教委重点学科建设项目(J50702)

作者简介: 尹冰玉(1986-), 女, 硕士研究生, 专业方向为海洋生态系统工程。xiaoyu9895@163.com

通讯作者: 章守宇, E-mail: syzhang@shou.edu

至实验室后保存于  $-80^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱。

### 1.2 主要试剂和引物

主要试剂和引物有 E. Z. N. A. soil DNA Kit (OMEGA)、PCR 产物纯化试剂盒 (Novasygen)、pMD 18-T (TaKaRa)、Taq 酶、dNTPs、引物 27 bf、1 492 br、M13-47、M13-RV-M(由上海生工提供)。

### 1.3 沉积物样品 DNA 提取

样品总 DNA 提取采用 E. Z. N. A. soil DNA Kit 试剂盒提取,1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.4 16S rDNA PCR 扩增及纯化

采用细菌 16S rDNA 通用引物 27bf (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492br (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')<sup>[5]</sup> 进行 PCR 扩增。50 $\mu\text{L}$  反应体系为<sup>[6]</sup>:10 $\times$  buffer 5  $\mu\text{L}$ , dNTPs 4  $\mu\text{L}$ , 引物各 1  $\mu\text{L}$ , Taq 酶 1 U, DNA 模板 2  $\mu\text{L}$ 。反应条件为:95  $^{\circ}\text{C}$  3 min;94  $^{\circ}\text{C}$  1 min;58  $^{\circ}\text{C}$  1 min;72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 30 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  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。

### 1.5 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,在含有 AMP、X-gal、IPTG 的 LB 培养基上进行蓝白斑筛选,随机挑取 60 个菌落用通用引物 M13-47 和 M13-RV-M 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。

### 1.6 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 CLUSALX 软件对比分析,运用 MEGA 4.0 构建系统发育树。

## 2 结果

### 2.1 海洋沉积物总 DNA 提取及扩增

从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。通过细菌 16S rDNA 特异性 PCR 扩增,电泳获得单一条带,大小约 1.5 kb(图 1)。

### 2.2 细菌 16S rDNA 测序

通过对获得的 60 个转化子进行插入片段大小的 PCR 检测。结果发现,其中约 34 个克隆含有正确的外源片段(图 2),阳性克隆率为 56.7%。

测序所得序列经 RDP 数据库分析,去除嵌合体后得有效序列 27 个。

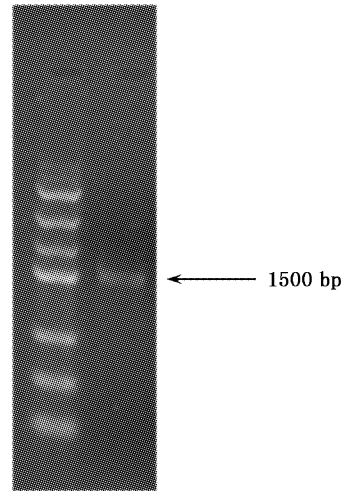


图 1 沉积物细菌 16S rDNA 基因扩增  
Fig. 1 PCR amplification of bacterial 16S rDNA from the sediment

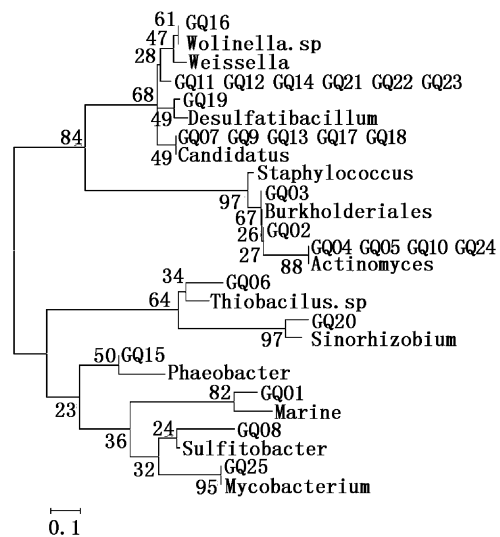


图 2 沉积物中细菌 16S rDNA 序列及数据库参比序列构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree showing the relationships of bacterial 16S rDNA sequences from the sediments and related clones or strains

### 2.3 系统进化分析

将 27 个有效序列的克隆子与 GenBank 数据库收集的细菌 16S rDNA 序列进行序列配比分析,寻找同源性较高的序列进行比对,其中 25 个克隆子 16S rDNA 序列与最近的菌株同源性在 80% ~ 99% 之间(表 1),2 个克隆子未确定其分

类地位。大多数克隆子与来自海洋、湖泊及环境的沉积物源性最高。将所测序列提交到

GenBank 数据库, 获得序列号 HM138677-HM138689。

表 1 枸杞岛海藻场沉积物部分细菌 16S rDNA 克隆子亲缘关系  
Tab. 1 Phylogenetic affiliation of part bacterial 16S rDNA from microbial bacterial in seaweed beds sediments of Gouqi Island

克隆子	序列登录号	种系型	相近物种	相近物种登录号	相似性	丰度
GQ01	HM138677	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Marine Gammaproteobacterium</i>	NZ_AAVT01000019	82%	3.7%
GQ02	HM138678	<i>Chloroflexi</i>	<i>Staphylococcus aureus subsp.</i>	ACHD01000228	94%	3.7%
GQ03	HM138679	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales sp.</i>	NZ_AAUJ02000001	97%	3.7%
GQ04	HM138680	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomyces sp.</i>	ACIJ02000002	85%	11.1%
GQ06	HM138681	<i>Acidobacteria</i>	<i>Thiobacillus sp.</i>	AE016825	90%	3.7%
GQ07	HM138682	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Candidatus Vesicomysocius</i>	AP009247	95%	18.5%
GQ08	HM138683	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sulfitobacter sp.</i>	CP000488	90%	3.7%
GQ11	HM138684	<i>Firmicutes</i>	<i>Weissella sp.</i>	FM179323	96%	22.2%
GQ15	HM138685	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Phaeobacter strain</i>	CP001083	99%	3.7%
GQ16	HM138686	<i>Epsilonproteobacteria</i>	<i>Wolinella sp.</i>	CP001581	81%	3.7%
GQ19	HM138687	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfatibacillum alkenirorans</i>	FN555004	85%	3.7%
GQ20	HM138688	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sinorhizobium strain</i>	CP000478	96%	7.4%
GQ25	HM138689	<i>Actinobacteria</i>	<i>Mycobacterium avium subsp</i>	FP565814	96%	3.7%

对所测得的序列进行 Blast 分析, 结果表明: 变形细菌门 (Proteobacteria) 为优势菌种 (48.2%), 其次为厚壁菌门 (Firmicutes, 22.2%), 除此之外还检测到放线菌门 (Actinobacteria, 14.8%)、绿屈挠菌门 (Chloroflexi, 3.7%)、酸杆菌门 (Acidobacteria, 3.7%), 其余一些未确定其分类地位 (7.4%)。

在所测得的 13 个变形菌门克隆子中,  $\gamma$ -变形菌 (*Gammaproteobacteria*) 占有绝对优势 (46.1%), 其次为  $\alpha$ -变形菌 (*Alphaproteobacteria*, 23.1%)、 $\beta$ -变形菌 (*Betaproteobacteria*, 15.4%)、 $\epsilon$ -变形菌 (*Epsilonproteobacteria*, 7.7%)、 $\delta$ -变形菌 (*Deltaproteobacteria*, 7.7%)。

根据所得的 25 个不同的克隆子序列及由 Blast 搜索到的 16S rDNA 部分序列构建枸杞岛海藻场沉积物细菌 16S rDNA 系统发育树 (图 2)。

### 3 讨论

#### 3.1 DNA 提取与扩增

16S rDNA 测序法整个过程中, DNA 提取、纯化及扩增都影响着最后的实验结果。与水体不同, 沉积物中含有腐植酸及酚类化合物, 这些都影响着 DNA 的提取及纯化效果<sup>[7-8]</sup>。本文采用试剂盒进行提取, 在提取过程中适当减少沉积物样品量, 以达到最好的提取效果。PCR 反应中,

退火温度及循环数都会影响最后的结果, 前人的研究中, 循环数从 25 ~ 33 不等<sup>[9]</sup>, 退火温度从 55 °C ~ 65 °C 不等<sup>[10]</sup>, 本文经过多次尝试, 将退火温度选择为 58 °C, 30 个循环, 这样既能提供后续反应足够的 DNA 模板, 又能减小因循环过多引起的实验误差。

#### 3.2 细菌群落分析

变形细菌门是海洋沉积物中的优势菌群<sup>[11]</sup>, 不同生态系统沉积物中变形细菌门结构也有较大差异。本文研究表明: 枸杞岛海藻场沉积物以  $\gamma$ -变形菌占多数, 其次为  $\alpha$ -变形菌和  $\beta$ -变形菌。这一结果与已报道的不同生态系统中沉积物细菌群落组成略有差异。霍颖异等<sup>[12]</sup>通过培养与非培养方法相结合, 研究了浙江苍南大渔湾沉积物细菌多样性, 结果表明沉积物以  $\delta$ -变形菌和  $\gamma$ -变形菌为多数。梁君斌等<sup>[13]</sup>通过 RFLP 分析了亚热带红树林表层沉积物中细菌多样性, 结果显示微生物群落以  $\gamma$ -变形菌为主要菌群, 其次为  $\delta$ -变形菌。魏曼曼等<sup>[14]</sup>通过 PCR-RFLP 调查了劳盆地深海热泉口生态系统沉积物中细菌多样性, 发现  $\gamma$ -变形菌和  $\epsilon$ -变形菌为优势菌群, 优势菌群的不同可能是形成不同生态系统生态机制的影响因素。

$\gamma$ -变形菌是培养方法中最常见的种类<sup>[15]</sup>, 具有很强的适应性, 包括许多参与氮代谢和甲基代

谢的种类。本文检测到  $\gamma$ -变形菌门中一些最常见的属,如埃希氏菌属 (*Escherichia*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、着色菌属 (*Chromatium*)、固氮菌属 (*Azotobacter*)等。假单胞菌属常见于近岸海水及沉积物中,青岛、浙江等近海海域均有检测到。固氮菌属通过与海藻共生,利用分子态氮进行固氮作用。埃希氏菌属是  $\gamma$ -变形菌中常见的一种,可以从被陆源污染的近岸海水中分离出来,常被用作海域环境水质及水体养殖环境监测的指标,故可作为海藻场生态系统环境状况的一种指示菌。

$\alpha$ -变形菌以氧化低价硫化物为主要代谢类型<sup>[16]</sup>,沉积物中丰富的  $H_2S$  可能是代谢过程中主要的电子供体。 $\beta$ -变形菌中硫杆菌属常见于热液喷口及冷泉中<sup>[17]</sup>,本文检测到的硫杆菌属数量很少,而  $\alpha$ -变形菌数量较多,推测藻场生态中参与硫循环的主要为  $\alpha$ -变形菌。

海洋沉积物中  $\delta$ -变形菌主要以硫还原细菌 (SRB) 为主,本文只检测到 GQ19 克隆子属于脱硫弧菌属 (*Desulfovibria*),与日本 Sagami 湾沉积物<sup>[18]</sup>中检测的细菌亲缘关系最近,而多数文献报道沉积物中  $\delta$ -变形菌数量很多,表明沉积物中存在很多未知的  $\delta$ -变形菌,需要进一步研究。

革兰氏阳性菌也是海洋沉积物中常见的一类细菌,本文所检测的革兰氏阳性菌包括 *Firmicutes* 和 *Actinobacteria*, *Firmicutes* 中的 *Clostridium* 有多种发酵途径,可以形成有机酸、乙醇和氢气<sup>[19]</sup>,在海洋碳-氮循环中起着重要作用。*Actinobacteria* 在不同生态系统中种类及数量皆有不同,本论文检测到 *Actinobacteria* 中的两个类群: *Actinomyces* 和 *Mycobacterium*。其中 GQ25 与分离自贝类养殖场底泥的 *Mycobacterium* 亲缘关系近。*Actinobacteria* 在土壤中丰度很高,近岸沉积物中丰富的 *Actinobacteria* 可能来自于陆源土壤的流失。在海藻场生态系统中,它们的主要生态学意义是分解作用及异养营养素的循环,因为它们可以产生胞外酶分解多糖、蛋白质和糖类等有机物,相比于同为碎屑食物链为主的红树林生态系统,海藻场生态系统中 *Actinobacteria* 较为丰富,生态机制也更为复杂。

*Acidobacteria* 常见于浅海沉积物,且大多发现在不可培养细菌中,需要通过分子生物学手段才能检测到。Colquhoun 等指出,酸杆菌在沉积物

的分布很广泛,主要出现在地热区、温泉区的沉积物和土壤中<sup>[20]</sup>。在用于微生物燃料电池的微生物中,也有该类微生物的发现,推测该菌可能与海藻场物质流动及能量代谢有关。

此外,本文还检测到了 *Chloroflexi*。这类菌主要出现在远洋及深海沉积物中,近海地区则较少<sup>[21]</sup>,可能由于海藻场生态系统离岸较近,容易受陆源和人为影响,容易形成不同的群落结构。

#### 参考文献:

- [1] Hugenholtz P, Goebel B M, Pace N R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity[J]. *Bacterial*, 1998, 180(18):4765 - 4774.
- [2] WILLIAMS S L. Introduced species in seagrass ecosystems: Status and concerns[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2007, 350(1): 89 - 110.
- [3] 章守宇,汪振华,林军,等. 枸杞岛海藻场夏、秋季的渔业资源变化[J]. *海洋水产研究*, 2007, 28(1):45 - 52.
- [4] 王凯. 枸杞岛海藻场褐菖鲈和大泷六线鱼摄食研究[D]. 上海:上海海洋大学, 2008.
- [5] 李涛,王鹏,汪品先. 南海西沙海槽沉积物细菌多样性初步研究[J]. *地球科学进展*, 2006, 21(10):1058 - 1062.
- [6] 肖慧,张艳,张喆,等. 青岛威海水域夏冬季表层沉积物细菌多样性的初步研究[J]. *中国海洋大学学报*, 2009, 39(4):641 - 646.
- [7] LI L, KATO C, HORIKOSHI K. Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depths[J]. *Biodiversity and Conservation*, 1999, 8(1):659 - 677.
- [8] RAVENSCHLAG K, SAHM K, PERNTHALER J, et al. High bacterial diversity in permanently cold marine ediments[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(3): 3982 - 3989.
- [9] URAKAWA H, KITA-TSUKAMOTO K, OHWADA K. Microbial diversity in marine sediments from Sagami Bay and Tokyo Bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene analysis[J]. *Microbiology*, 1999, 145(21):3305 - 3315.
- [10] ANDREW J R. 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(5):199 - 211.
- [11] NORRIS T B, WRAITH J M, CASTENHOLZ R W, et al. Soilmicrobial community structure across a thermal gradient following a geothermal heating event[J]. *Appl EnvironMicrobiol*, 2002, 68(12):6300 - 6309.
- [12] 霍颖异,许学伟,王春生,等. 浙江苍南近海沉积物细菌物种多样性[J]. *生态学报*, 2008, 28(10):5166 - 5172.
- [13] LIANG J B, CHEN Y Q, LAN C Y, et al. Recovery of novel bacterial diversity from mangrove sediment[J]. *Mar Biol*, 2007, 150(10):739 - 747.

- [14] 魏曼曼, 王玉光, 郑甲, 等. 劳盆地深海热液喷口沉积物中细菌多样性研究[J]. 微生物学通报, 2009, 36(4): 538 - 543.
- [15] 邹扬, 曾胤新, 田蕴, 等. 白令海北部表层沉积物中细菌多样性的研究[J]. 极地研究, 2009, 21(1): 15 - 23.
- [16] COLQUHOUN J A, HEALD S C, LI L, *et al.* Taxonomy and biotransformation activities of some deep sea actinomycetes [J]. *Extremophiles*, 1998, 2(3): 269 - 277.
- [17] NUISS Y, EVIES T P, LEE J, *et al.* Analysis of microbial diversity in oligotrophic microbial fuel cells using 16S rDNA sequence [J]. *Fems Microbiology Letters*, 2004, 233(1): 77 - 82.
- [18] 穆春华, 包振民, 陈刚, 等. 西北太平洋沉积物中细菌多样性的研究[J]. 海洋学报, 2006, 28(4): 121 - 127.
- [19] JUKIA R, LI T, CHRISTIANE E, *et al.* Impact of DNA extraction method on bacterial community composition measured by denaturing gradient gelelectrophoresis [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, 36(6): 1607 - 1614.
- [20] KATRIN R, KERSTIN S, JAKOB P, *et al.* High bacterial diversity in permanently cold marine sediments [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(9): 3982 - 3989.
- [21] LINA L, JEAN G, PETER N, *et al.* Microbial diversity in Nankai trough sediments at a depth of 3843m [J]. *Journal of Oceanography*, 1999, 55(9): 635 - 642.

## A preliminary study on the composition of bacterial community in the seaweed bed sediment of Gouqi Island

YIN Bing-yu, ZHANG Shou-yu

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

**Abstract:** The clone library of 16S rDNA and the phylogenetic tree were constructed with extraction of bacterial DNA from seaweed bed sediment sample of Gouqi Island, PCR amplification of bacterial 16S rDNA by universal primers, molecular clone, sequencing of 16S rDNA fragments and sequence analysis. The biodiversity of bacteria and phylogenetic analysis showed that the bacterial community fell into five main lineages: Proteobacteria (48.2%), Firmicutes (22.2%), Actinobacteria (14.8%), Chloroflexi (3.7%), Acidobacteria (3.7%). In addition, a part of unidentified bacteria (7.4%) was detected. Gammaproteobacteria played the dominant role in the *Proteobacteria* community of the seaweed bed sediment, it was about 46.1%, followed by the Alphaproteobacteria (23.1%), Betaproteobacteria (15.4%), Epsilonproteobacteria (7.7%), Deltaproteobacteria (7.7%). As the preponderant bacteria of marine sediment, the composition of *Proteobacteria* community was different in dissimilar ecosystems. It explained that the composition of the functional group is closely related to the mechanism of ecosystem. As the two branches of Gram-positive bacteria, *Firmicutes* and *Actinobacteria* mostly participated in decomposition of detritus and heterotrophic nutrient cycle in the seaweed beds of Gouqi Island.

**Key words:** seaweed bed; marine sediment; 16S rDNA; bacterial community; Gouqi Island