

# 秦皇岛近海养殖对潮间带微生物群落多样性的影响

李佳霖<sup>1</sup>, 汪光义<sup>2</sup>, 秦松<sup>1\*</sup>

1. 中国科学院烟台海岸带研究所, 山东 烟台 264001; 2. 美国夏威夷大学海洋系, 美国 夏威夷 96822

**摘要:** 潮间带微生物群落在驱动海岸带生态系统物质循环和能量流动中具有重要作用, 近海养殖造成的环境问题日益凸显, 但其对潮间带微生物群落结构的影响还缺乏研究。采用变性梯度凝胶电泳(DGGE)和限制性片段长度多态性(RFLP)的分子生物学技术, 研究秦皇岛养殖区与旅游区潮间带沉积物中微生物多样性的差异, 分析养殖区微生物的 16S rRNA 基因文库的组成特征。结果表明: 养殖区的微生物群落结构与旅游区形成较大的差异, DGGE 图谱中养殖区的特有条带主要集中于  $\gamma$ -变形菌纲( $\gamma$ -proteobacteria), 还分布于  $\alpha$ -变形菌纲( $\alpha$ -proteobacteria), 拟杆菌门(Bacteroidetes), 放线菌门(Actinobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes)。影响潮间带微生物的群落结构的主要环境因子包括温度、盐度、pH 和  $\text{NO}_3$  浓度, 影响率达 55.2%。对差异最大的洋河大桥南养殖区(Q1 站)的微生物样品建立克隆文库分析群落结构, 变形菌门(Proteobacteria)为优势菌群, 占总群落的 60%, 其中  $\gamma$ -变形菌纲是主要存在的微生物纲, 其余菌群包括放线菌门、拟杆菌门、蓝藻菌门(Cyanobacteria)和疣微菌门(Verrucomicrobia)的微生物。养殖区海岸带微生物群落中出现了与环境污染和赤潮密切相关的菌群, 如拟杆菌门、肠杆菌属(Enterobacteriaceae)和  $\alpha$ -变形细菌红细菌目(Roseovarius)的微生物。

**关键词:** 近海养殖; 潮间带沉积物; 微生物群落结构; 变性梯度凝胶电泳; 16S rRNA 基因文库

**中图分类号:** X172

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1674-5906 (2011) 05-0920-07

潮间带微生物的群落多样性和空间异质性较高, 这是由其存在的特殊环境造成的, 潮间带随潮汐变化其环境因子的扰动作用明显增加; 人类活动产生的环境问题如养殖污染、富营养化、陆源排污、围海造田等对微生物产生了不同程度的压力<sup>[1-2]</sup>。潮间带微生物作为海岸带生态系统生物地化循环的参与者, 群落组成对近海海陆营养盐输送、有机物降解、污染物转化具有重要影响<sup>[3-4]</sup>。通过分子生物学技术, 对环境微生物群落的研究表明温度、湿度、盐度、营养盐浓度、重金属污染等环境因子都能够引起其结构分布的差异<sup>[5-7]</sup>。近海养殖是我国沿海地区的主要支柱产业, 而养殖造成的诸多环境问题也日益凸显, 但其对微生物群落结构产生的影响还缺乏相关的研究<sup>[8]</sup>。秦皇岛是我国北方重要的养殖基地和旅游城市, 通过对其养殖和旅游功能区潮间带微生物群落结构差异的分析, 阐明养殖压力下微生物的多样性特征, 探讨养殖造成的近海富营养化水体对潮间带微生物群落分布的影响程度和趋势, 为建立潮间带养殖污染压力的微生物指标体系提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究地点概况与样品采集

秦皇岛市地处渤海湾西部, 海岸线东起山海关, 西至昌黎县滦河口, 海岸带的旅游区主要位于

中部, 养殖区则位于东西两侧。沿海岸线自西向东设 5 个采样点, 分别位于洋河大桥南养殖区(Q1)、洋河大桥养殖区(Q2)、北戴河浴场(Q3)、金屋浴场(Q4)和山海关养殖区(Q5), 其中 Q1、Q2 和 Q5 处于养殖区, Q3 和 Q4 则处于旅游区(图 1)。

样品采集于 2009 年 9 月低潮期的潮间带。沉积物采取多点取样法, 用无菌采样管采集表层 3 cm 沉积物混合物约 10 g, 置于 4 °C 保温箱带回实验室存放于 -80 °C 冰柜中至 DNA 提取; 采集部分沉积物样品低温保存带回, 用于测定研究站点的总碳总氮含量和含水率, 另采集部分沉积物样品离心后取上层间隙水, 经 0.45  $\mu\text{m}$  醋酸纤维膜过滤后装入预处理过的聚乙烯瓶, 低温保存带回实验室用于营养盐的测定。

### 1.2 站位环境参数的测定

海水的温度、盐度和 pH 参数在现场用便携式电导率仪、pH 仪(Mettler Toledo, Switzerland)测定, 根据测定的温度和电导率数据计算采样点的盐度。沉积物间隙水中的营养盐浓度用 AAIII(Seal Analytical GmbH, Germany)测定<sup>[9]</sup>。沉积物中的总碳(TC)、总氮(TN)含量用仪器 Vario EL III(Elementar, Germany)进行测定<sup>[10]</sup>。沉积物的  $w$ (含水率)用质量法测定<sup>[11]</sup>。

### 1.3 沉积物基因组 DNA 提取

沉积物的基因组 DNA 用珠磨法进行提取<sup>[12]</sup>。

**基金项目:** 中国科学院创新团队国际合作伙伴计划

**作者简介:** 李佳霖 (1980 年生), 女, 助理研究员, 博士, 主要从事海岸带环境微生物研究。E-mail: jlli@yic.ac.cn

\*通信作者: 秦松 (1968 年生), 男, 研究员, 主要从事海岸带生物资源研究。E-mail: sqin@yic.ac.cn

**收稿日期:** 2011-03-23

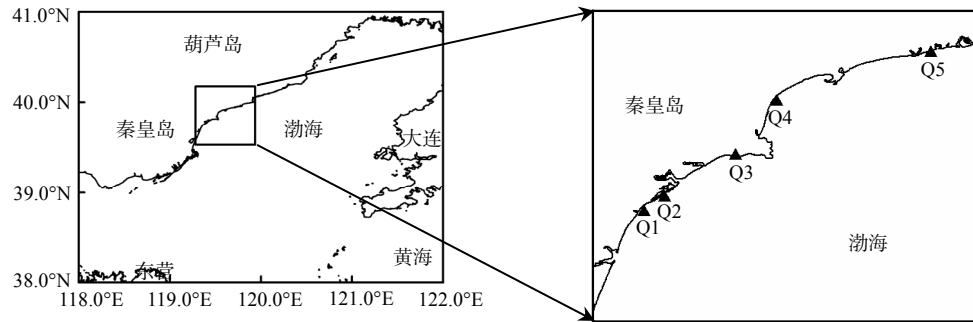


图1 秦皇岛潮间带采样站分布

Fig.1 Map of sampling stations at Qinhuangdao intertidal sediment

取 0.50 g 沉积物样品置于含有 0.50 g 硅锆玻璃球的珠磨管中, 加入 0.5 mL 的 CTAB 磷酸缓冲液和 0.5 mL 酚仿异戊醇 [ $V_{\text{磷酸缓冲液}} : V_{\text{酚仿异戊醇}} : m_{\text{沉积物}} = 25 : 24 : 1$ ], 在 Mini-BeadBeater (BioSpec, USA) 上以  $4000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  裂解细胞  $3 \times 20 \text{ s}$ ,  $13000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min 取上清液加入氯仿异戊醇 [ $V_{\text{氯仿异戊醇}} : V_{\text{上清液}} = 24 : 1$ ], 混合后离心取上清液加入 1.0 mL 含 30% PEG6000 的  $\text{NaCl} (1.6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1})$  混合后过夜。再次离心, 沉淀物用 70% 乙醇 ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) 洗涤两次, 干燥, 溶解于  $50 \mu\text{L}$  TE 缓冲液中,  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  保存, 用于后续 PCR 实验。

#### 1.4 PCR 扩增

以提取的沉积物基因组 DNA 为模板, 采用细菌 16S rRNA 基因 V3 区的通用引物进行 PCR 扩增反应, 扩增仪为 iCycler (Bio-Rad, USA)。

用于 DGGE 分析的 PCR 反应所选择的引物是 F341 (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 R534 (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'), 扩增的目标基因片段长度约 200 bp。进行 DGGE 电泳的 PCR 引物在 F341 的 5' 端接入 40 bp 的 GC 夹子<sup>[13]</sup>。反应条件为  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  变性 5 min;  $92 \text{ }^\circ\text{C}$  变性 30 s,  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  退火 30 s,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸 1 min, 30 个循环;  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  最终延伸 10 min。

用于 16S rRNA 基因文库分析的 PCR 反应以 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 为引物, 目标基因片段长度约 1450 bp<sup>[14]</sup>。PCR 反应条件为  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  变性 5 min;  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  变性 30 s,  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  退火 1 min,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸 2 min, 30 个循环;  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  最终延伸 10 min。

#### 1.5 DGGE 多态性分析

PCR 产物用 DeCode System (Bio-Rad, USA) 进行电泳, 电泳条件为聚丙烯酰胺胶浓度 6%, 变性梯度 40%~70%,  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ , 60 V 运行 16 h, 凝胶采用银染法进行染色。电泳得到的图谱照片用 Quantity One 软件 (Bio-Rad, USA) 进行条带识别, 并将识别

的条带信息用 Primer 6.0 软件进行统计分析, 计算各个站位的细菌的丰度, 获得聚类分析结果<sup>[15]</sup>, 通过软件的 BIO-ENV 程序对影响微生物分布的主要环境因子进行分析<sup>[16]</sup>。对 DGGE 图谱中各个站位的优势条带和特征条带割胶回收,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  培养过夜, 并进行 PCR 扩增, 扩增产物纯化后, 送测序公司 (诺赛, 北京) 测序。测序结果提交 GenBank 数据库进行序列同源性比对。

#### 1.6 16S rRNA 基因文库分析

将 Q1 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, 选择阳性克隆进行扩增, 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分别用 *Msp* I 及 *Hha* I 限制性内切酶消化。酶切后的 DNA 片段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 (诺赛, 北京)。计算库容,  $C = [1 - (n/N)] \times 100\%$ <sup>[17]</sup>, 将所得序列提交 RDP 数据库鉴定种属, 计算各类群所占的比例<sup>[18]</sup>, 并比对 GenBank 数据库, 应用 MEGA 4.0 软件 N-J 方法构建该站位的系统进化树。

## 2 结果与分析

### 2.1 站位环境参数的测定结果

采样期间秦皇岛市无明显的降雨过程, 除 Q2 站位于洋河附近外, 其余 4 个采样点附近无河流和城市排污口。5 个采样站点的主要物理和化学参数的测定值分别见表 1 和图 2。

Q2 站位于洋河大桥下的养殖区, 受洋河淡水入海的影响, 盐度低于其它 4 个站点。从测定的化学参数可以看出, 除  $\text{NO}_3^-$  含量外, 其余各参数的分布养殖区高于旅游区。根据《海水水质标准 (GB3007—1997)》, 旅游区的 Q3 和 Q4 达到国家一类水质标准, 而养殖区的 Q1 和 Q2 达二类水质标准, 位于山海关养殖场的 Q5 站位达三类水质标准。各个站点测定的 N/P 比值范围为 17~35, 根据 Redfield 比值, 研究海域表现为 P 营养盐限制型。

表 1 各站位沉积物的常规物理参数测定值  
Table 1 Physical characteristics of different stations sediments

站位	温度/℃	盐度	pH	w(含水率)%	类型及质地
Q1	23.5	31.8	7.89	22.0	养殖区 砂质
Q2	24.1	28.4	7.71	23.5	养殖区 砂质
Q3	24.4	31.3	7.77	22.6	旅游区 砂质
Q4	24.1	31.8	7.86	23.7	旅游区 砂质
Q5	23.6	30.3	7.83	19.9	养殖区 砂质

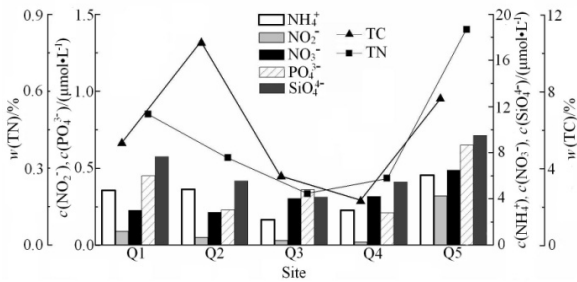


图 2 各站位的化学参数测定值  
Fig.2 Summary of porewater and sediment chemistry of the different stations

2.2 DGGE 图谱分析结果

通过 DGGE 技术可以分析不同站位的微生物分布特征,对秦皇岛潮间带 5 个站位扩增的微生物 DNA 进行 DGGE 分析,结果见图 3(A)。凝胶图谱

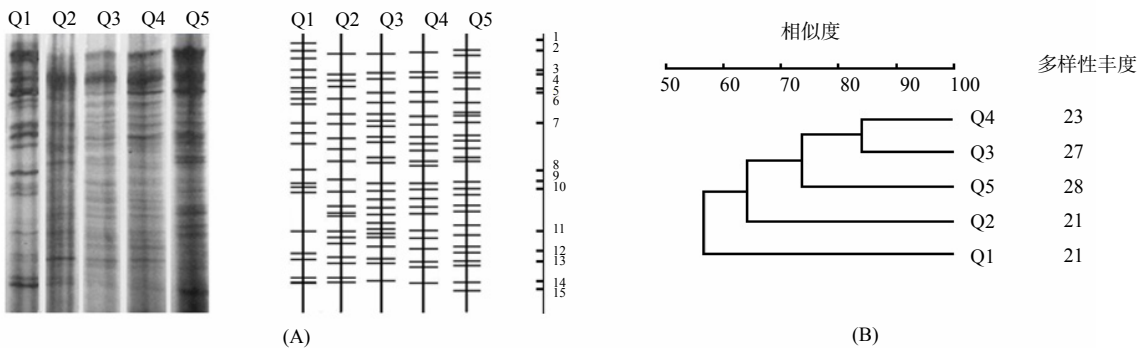


图 3 各站位微生物的 DGGE 凝胶图谱(A)及聚类分析结果(B)  
Fig.3 Bacterial DGGE profiles (A) and cluster analysis (B) of coastal sediments at different stations

bacteria), 还分布于  $\alpha$ -变形菌纲( $\alpha$ -proteobacteria), 放线菌门和厚壁菌门。

2.3 Q1 站位的系统发育分析

Q1 站位位于养殖污染区内,且与处于旅游区站位的微生物群落结构差异较大,为了考量秦皇岛近海养殖对潮间带沉积物中微生物群落组成造成的影响,对 Q1 站的 PCR 产物通过 RFLP 方法构建 16S rRNA 基因文库进行分析。对随机挑取的 120 个阳性克隆片段分别用限制性内切酶 *Msp* I 和 *Hha* I 进行酶切,共得到 24 个 OTU。根据酶切图谱的类型进行统计学检验,克隆文库的库容 83.3%,表明该克隆文库能较全面的反映 Q1 站位的微生物群落多

中的条带是不同微生物 16S RNA V3 区的基因片段,其数目的多少反映了该站位微生物群落遗传多样性的丰度。各个站位分离到 21 至 28 条不同的条带,其中 Q1 和 Q2 的条带数目最少, Q5 站位分离到的条带数目最多。以凝胶图谱中相应位置是否出现条带作为依据,对各个站位的微生物多样性进行聚类分析的结果见图 3(B)。聚类分析的结果显示同处于旅游功能区的 Q3 和 Q4 站相似度最高,为 84.0%, Q3 与 Q1 站的相似度最低,仅为 54.2%,聚类分析的结果体现了海岸带功能区对微生物群落多样性的影响。对环境因子的影响进行统计分析,结果表明在秦皇岛潮间带的研究区域形成微生物群落结构差异的主要环境因子是温度、盐度、pH 和  $\text{NO}_3$  浓度,影响率为 55.2%,

对凝胶图谱中的优势条带和特征条带进行序列测定,并通过 BLAST 与 GenBank 数据库进行比对,匹配同源性最高的序列,结果见表 2。15 条序列分布于变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)与厚壁菌门(Firmicutes),其中 9 条序列与未培养细菌的 DNA 序列具有高度相似性,说明海岸带微生物资源丰富,且存在大量未被认知的类群。DGGE 图谱中养殖区的特有条带主要集中于  $\gamma$ -变形菌纲( $\gamma$ -proteo

多样性。样品中各个 OTU 所含克隆子数目及所属细菌类群见表 3。其中多数 OTU 序列与 GenBank 数据库中已知细菌的 16S rRNA 序列相似度高于 90%。120 个克隆子中有 60.0%属于变形菌门,其中占优势的纲为  $\gamma$ -变形菌纲占总细菌库的 27.5%,其余细菌主要分布于放线菌门、拟杆菌门、蓝藻细菌(Cyanobacteria)和疣微菌门(Verrucomicrobia)。根据测序结果建立 Q1 站的系统进化树(图 4)。

3 讨论

本研究采用 PCR-DGGE 分子生物学技术对秦皇岛潮间带旅游区和养殖区沉积物中的微生物群落进行了比较分析。DGGE 是目前环境微生物研究中

表 2 DGGE 特征条带序列对比结果  
Table 2 Alignment of DGGE band to its most-similar GenBank sequence

条带	同源微生物 (NCBI 登录号)	相似度/%	条带存在的站点
1	<i>Roseobacter litoralis</i> Och 149 (X78312)	93	Q1
2	<i>Klebsiella</i> sp. SRC_DSD23 (HM195208)	97	Q1、Q2、Q3、Q4、Q5
3	Uncultured bacterium clone SIPt0-42 (GU584868)	99	Q1、Q3、Q4、Q5
4	<i>Escherichia coli</i> clone KC035 (GU415906)	99	Q1、Q2、Q3、Q4、Q5
5	Uncultured <i>Sulfitobacter</i> sp. F2C95 (AY697887)	94	Q1、Q5
6	Uncultured <i>Alcanivorax</i> sp. clone 13II24-46 (GU108567)	90	Q1、Q2
7	Uncultured Bacteroidetes bacterium CB22B12 (EF471584)	91	Q1、Q2、Q3、Q4、Q5
8	Uncultured Gammaproteobacterium clone SGST472 (GQ348004)	96	Q1
9	<i>Bacillus</i> sp. CNJ778 PL04 (DQ448758)	98	Q2
10	Uncultured Gammaproteobacterium clone A13W-148 (HM057634)	94	Q1、Q5
11	Uncultured bacterium clone (FJ904656)	100	Q1、Q2、Q3、Q4、Q5
12	Gammaproteobacterium SF293 (GU061024)	94	Q5
13	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band db32 (AF531537)	98	Q1、Q2、Q3、Q4、Q5
14	<i>Propionibacterium</i> sp. 215 (AM410900)	95	Q1、Q2
15	Uncultured <i>Bacillus</i> sp. clone ML615J-28 (AF454301)	91	Q5

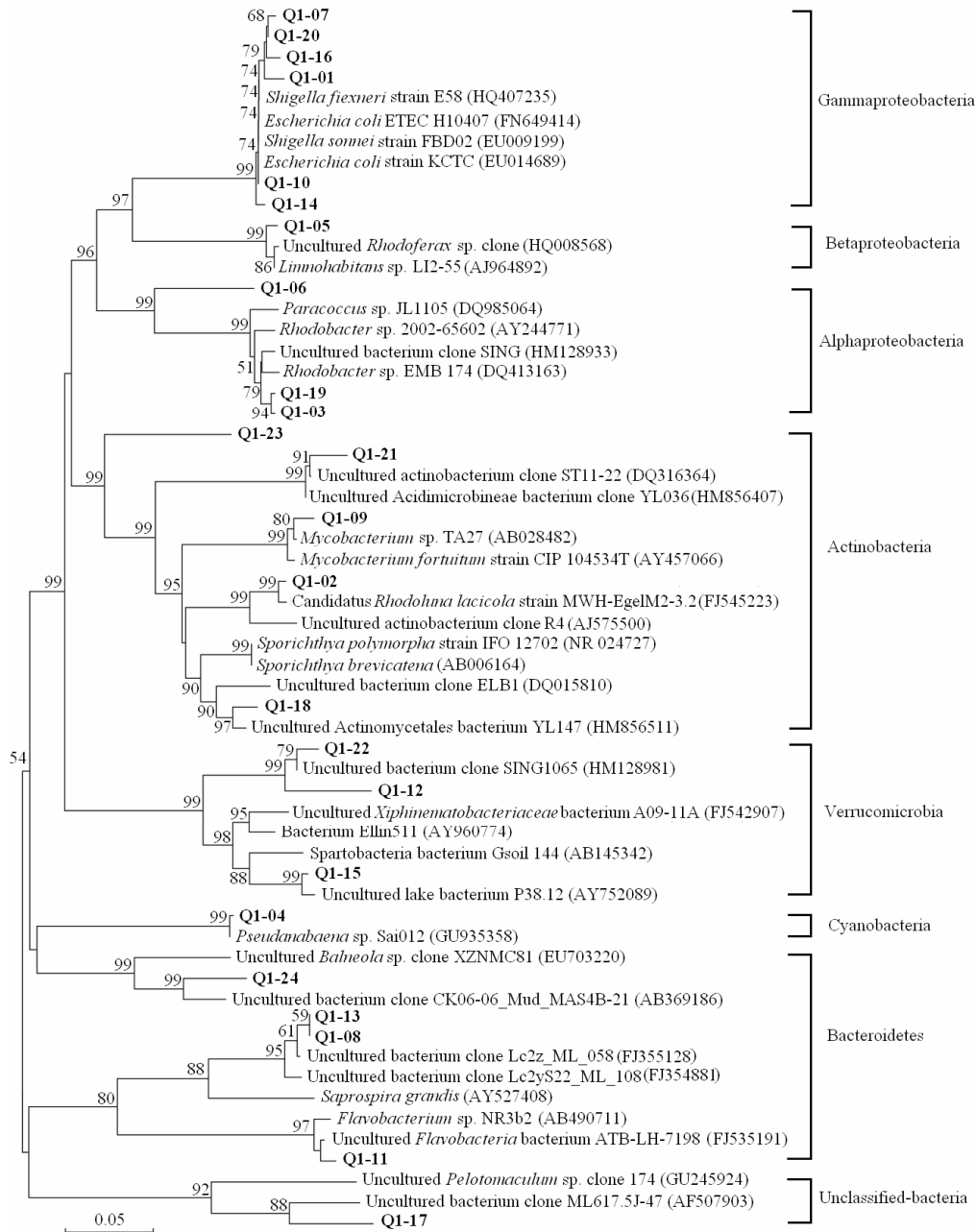
表 3 Q1 站细菌 16S rRNA 克隆文库分析结果  
Table 3 Data of bacterial 16S rRNA clone library at Q1 station

OTU 编号	相似细菌 (NCBI 登录号, 相似度)	细菌所属纲 (百分比)	细菌所属门 (百分比)
Q1-03/Q1-19	<i>Rhodobacter</i> sp. EMB 174 (DQ413163, 92%)	Alphaproteobacteria (14.2%)	
Q1-06	<i>Rhodobacter</i> sp. 2002-65602 (AY244771, 93%)		
Q1-05	Uncultured <i>Rhodospirillum rubrum</i> sp. clone FL_11 (HQ008568, 95%)	Betaproteobacteria (18.3%)	
Q-01	<i>Shigella dysenteriae</i> strain FBD013 (EU009184, 98%)		
Q1-14	<i>Shigella flexneri</i> strain E58 (HQ407235, 96%)	Gammaproteobacteria (27.5%)	Proteobacteria (60.0%)
Q1-07/Q1-16/Q1-20	<i>Escherichia coli</i> ETEC H10407 (FN649414, 97%)		
Q10	<i>Escherichia coli</i> KO11 (CP002516, 99%)		
Q1-02	Uncultured actinobacterium clone R4 (AJ575500, 93%)		
Q1-09	<i>Mycobacterium</i> sp. TA27 (AB028482, 97%)	Actinobacteridae (5.8%)	Actinobacteria (11.7%)
Q1-18	<i>Acidothermus cellulolyticus</i> 11B (CP000481, 92%)		
Q1-23	Uncultured bacterium clone ELB16-113 (DQ015810, 90%)	Acidimicrobidae (5.8%)	
Q1-21	Uncultured actinobacterium ST11-22 (DQ316364, 97%)		
Q1-08/Q1-13	<i>Saprospira</i> sp. SS98-5 (AB088635, 92%)	Sphingobacteria (14.2%)	Bacteroidetes (15.0%)
Q1-24	Uncultured <i>Balneola</i> sp. clone XZNM81 (EU703220, 88%)		
Q1-11	<i>Flavobacterium</i> sp. NR3b2 (AB490711, 95%)	Flavobacteria (0.8%)	
Q1-04	<i>Limnothrix</i> sp. MR1 (AJ580008, 99%)	Cyanobacteria (1.7%)	Cyanobacteria (1.7%)
Q1-12/Q1-22	Uncultured Verrucomicrobiae bacterium (GU257578, 96%)	Verrucomicrobiae (5.8%)	Verrucomicrobia (10.8%)
Q1-15	Spartobacteria bacterium Gsoil 144 (AB245342, 93%)	Spartobacteria (5.0%)	
Q1-17	Uncultured <i>Pelotomaculum</i> sp. clone 174 (GU245924, 84%)	Unclassified-bacteria (0.8%)	

普遍采用的研究方法之一，在揭示微生物遗传多样性和微生物种群异化方面具有独特的优越性，其电泳条带数、各个条带的强度和迁移率表征了所研究的生态系统中微生物群落的多样性和组成变化。5个站位的微生物多样性丰度结果表明，山海关养殖场的微生物丰度较高，其次是旅游区，而位于秦皇岛南部的2个养殖站位的微生物丰度最低。已有对环境污染压力对微生物群落结构影响的研究发现，许多生态系统在中等污染程度下，微生物种类随污染的产生和加重有改变的趋势，这种趋势对于稳定

生态系统内部功能具有积极意义<sup>[19-20]</sup>。位于秦皇岛南部的养殖场出现微生物丰度降低的现象可能与秦皇岛南部6月至8月间发生的由微小型光合浮游生物数量暴增导致的海水异常有关，海洋细菌和藻类生消过程有紧密联系，藻类的代谢产物对特异类型细菌的生长具有有利或有害的作用，可能造成细菌群落结构出现异常，种群多样性降低的现象<sup>[21]</sup>。

微生物群落结构是其外界环境因子的反映，通过Primer 6.0软件的BIO-ENV程序对环境因子的影响进行统计分析，分析结果表明在秦皇岛潮间带的



标尺长度为 5%的核苷酸置换率, 比对序列的 GenBank 数据库登录号列于括号中

图 4 Q1 站位的系统发育分析

Fig.4 Phylogenetic affiliation of 16S rRNA gene fragments at Q1 station

研究区域形成微生物群落结构差异的主要环境因子是温度、盐度、pH 和  $\text{NO}_3^-$  浓度, 影响率达 55.2%, 其余的影响作用可能主要来自于未测定的环境因子和部分难以预计的环境外力, 例如动植物的竞争和扰动、微量金属元素的存在和有机污染物的影响等<sup>[22]</sup>。温度和盐度都是海洋微生物分析和研究的重要环境因子, 其对微生物影响的典型环境是海底热泉和河口区, 以往的研究表明在上述特定的环境中, 微生物的群落结构都有其特殊性, 如 Roeselers 等<sup>[23]</sup>对格陵兰地区热泉中蓝细菌多样性的研究发现其群落多样性与环境温度呈显著性相关。环境中

pH 的变化, 能够直接或间接的改变沉积物中物理和化学的反应过程, 进而造成微生物群落结构的变化<sup>[24]</sup>。营养盐是沉积物环境中微生物生长的物质基础, 尽管在研究区域内表现为 P 营养盐限制型, 但是统计分析的结果显示  $\text{NO}_3^-$  浓度对微生物群落结构的影响作用更明显, 这可能与  $\text{NO}_3^-$  在沉积环境中的电子受体功能有关<sup>[22]</sup>。

Q1 站位于秦皇岛市海岸线的南端, 其微生物群落结构在聚类分析结果中与旅游区形成较大差异。构成 Q1 站点 16S rRNA 基因文库的 5 类细菌 (变形菌门、放线菌门、拟杆菌门、蓝藻细菌和疣

微菌门)均属于海洋沉积环境中的常见微生物,细菌种类相对较少<sup>[25]</sup>,但与在西班牙 Mallorca 岛近海受人类活动影响较大区域获得的细菌 16S rRNA 基因文库的种类结果类似<sup>[26]</sup>。文库中变性菌门为优势菌群,占整个文库的 60%。变形菌门是细菌中最大的一门,通常是海洋水体和沉积物环境的微生物群落结构的优势菌群,对黄海海区和维多利亚港部分站位沉积物的微生物研究中变形菌门也占到全文库的 60%<sup>[18, 27]</sup>,比土壤微生物中所占比重略高<sup>[28]</sup>。 $\gamma$ -变形菌纲是变形菌门中的优势亚群,测序比对结果表明主要包括埃希氏菌属(*Escherichia*)和志贺氏菌属(*Shigella*)两类细菌。埃希氏菌普遍分布于人和动物体内,是环境水质测定中的卫生学指标,其在环境水体中大量存在易引发大肠杆菌病等水污染事件。志贺氏菌是常见的病原菌,其来源可能是水产养殖过程中投放的生物饵料,经食物链传递能够引发人类的细菌性痢疾,本研究比对获得的高同源性细菌 EU009199 就是一株人类肠胃疾病的致病菌。埃希氏菌和志贺氏菌的存在说明 Q1 站位的养殖活动已经造成了水体一定程度的污染。 $\alpha$ -变形菌纲检测到的细菌主要为红细菌目(*Roseovarius*),是一类以硫化氢为受体的光自养微生物,在水体中 $\alpha$ -变形菌纲细菌的丰度与初级生产力呈 U 型相关,一般在近海的富营养化海域 $\alpha$ -变形菌纲数量多意味着研究海域的初级生产力较高<sup>[29]</sup>。 $\beta$ -变形菌纲( $\beta$ -proteobacteria)的 Q1-05 是红育菌属(*Rhodoferrax*),能够以硝酸盐作为氮源和电子受体进行光合作用。值得注意的是,红细菌属和红育菌属均为光合自养微生物,菌体呈红棕色,且在文库中所占比重很高(32.5%),秦皇岛南部 6 月至 8 月间爆发的微小型光合浮游生物增殖的水体异常事件,海水泛微红色,说明造成事件的种群可能是红细菌属和红育菌属的微生物。放线菌既是致病菌又是海洋生物资源利用的重要菌群,目前使用的大部分抗生素以及酶制剂等都来源于放线菌,在秦皇岛潮间带获得的放线菌序列与未培养的细菌相似度较高,说明潮间带的放线菌生物资源的研究还有很大的潜力<sup>[30]</sup>。拟杆菌门的细菌是赤潮藻类的共生细菌,与赤潮的发生有一定的联系,在文库中也占有一定的比重<sup>[26]</sup>,主要包括黄杆菌属(*Flavobacteria*)和鞘脂杆菌属(*Sphingobacteria*)两类。

本研究通过 PCR-DGGE 和 RFLP 技术,揭示了秦皇岛近海养殖对潮间带沉积物中微生物群落结构的影响程度和影响后果。DGGE 结果可以客观的反应微生物群落在站位间的差异,但不可否认尽管理论上 DGGE 胶可以分离 1 bp 差异的 DNA 序列,但是实际的分辨率受实验条件的限制,而且 DGGE

分析技术测定的条带长度偏小,可以考虑结合 t-RFLP 技术对不同站位的微生物群落进行更为细致的多样性聚类分析<sup>[30]</sup>。从微生物群落的功能出发,对功能微生物及其影响的生物地化过程,如硝化和反硝化过程等进行研究,是从更深层次上理解海岸带微生物功能的重要途径。同时,养殖污染对海岸带的影响是一个长期的复杂过程,通过累积样品,能够进一步解释影响的过程和机理,并在研究的过程中探索海岸带微生物资源的可利用价值是今后研究的方向。

### 参考文献:

- [1] COCI M, RIECHMANN D, BODELIER P L E, et al. Effect of salinity on temporal and spatial dynamics of ammonia-oxidising bacteria from intertidal freshwater sediment [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2005, 53(3): 359-368.
- [2] SHIARIS M P, REX A C, PETTIBONE GW, et al. Distribution of indicator bacteria and *Vibrio parahaemolyticus* in sewage-polluted intertidal sediments[J]. Appl Environ Microbiol, 1987, 53(8): 1756-1761.
- [3] ORTEGA-MORALES B O, CHAN-BACAB M J, ROSA-GARCIA S C D, et al. Valuable processes and products from marine intertidal microbial communities [J]. Curr Opin Biotech, 2010, 21(3): 346-352.
- [4] OEVELEN D, MOODLEY L, SOETAERT K, et al. The trophic significance of bacterial carbon in a marine intertidal sediment: results of an *in situ* stable isotope labeling study [J]. Limnol Oceanogr, 2006, 51(5): 2349-2359.
- [5] BÖER S I, HEDTKAMP S I C, BEUSEKOM J E E, et al. Time-and sediment depth-related variations in bacterial diversity and community structure in subtidal sands [J]. The ISME Journal, 2009, 3(7): 780-791.
- [6] 李晔, 孙丽娜, 杨继松, 等. 基于 PCR-DGGE 的重金属污染土壤微生物种群指纹分析[J]. 生态环境学报, 2010, 19(9): 2204-2208.
- [7] LIU Ye, SUN Lina, Yang Jisong, et al. Microbial communities in heavy metal polluted soils by PCR-DGGE fingerprint [J]. Ecology and Environmental Sciences, 2010, 19(9): 2204-2208.
- [8] OGIIVIE L A, GRANT A. Linking pollution induced community tolerance (PICT) and microbial community structure in chronically metal polluted estuarine sediments [J]. Mar Environ Res, 2008, 65(2): 187-198.
- [9] CASTINE S A, BOURNE D G, TROTT L A, et al. Sediment microbial community analysis: establishing impacts of aquaculture on a tropical mangrove ecosystem [J]. Aquaculture, 2009, 297: 91-98.
- [10] 白洁, 王晓东, 李佳霖, 等. 北黄海沉积物-水界面反硝化速率及影响因素研究[J]. 中国海洋大学学报, 2007, 37(4): 653-656.
- [11] BAI Jie, WANG Xiaodong, LI Jialin, et al. A Study of the Denitrification Rate and Its Influence Factors at the Sediment-Water Interface in Summer in the North Yellow Sea [J]. Periodical of Ocean University of China, 2007, 37(4): 653-656.
- [12] WEI Jianbing, XIAO Duning, ZENG Hui, et al. Spatial variability of soil properties in relation to land use and topography in a typical small watershed of the black soil region, northeastern China[J]. Environ Geol, 2008, 53(8): 1663-1672.
- [13] DONG L F, THORNTON D C O, NEDWELL D B, et al. Denitrification in sediments of the River Colne estuary, England[J]. Mar Ecol Prog Ser, 2000, 203: 109-122.
- [14] MILLER D R, BRYANT J E, MANSEN E L, et al. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(11): 4715-4724.
- [15] 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[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(3): 695-700.
- [14] DYMOCK D, WEIGHTMAN A J, SCULLY C, et al. Molecular analysis of microflora associated with dentoalveolar abscesses[J]. *J Clin Microbiol*, 1996, 34(3): 537-542.
- [15] SAHAN E, MUYZER G. Diversity and spatio-temporal distribution of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in sediments of the Westerschelde estuary [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2008, 64(2): 175-186.
- [16] CLARKE KR, GORLEY RN. PRIMER v6: user Manual/Tutorial [M]. Plymouth: PRIMER-E, 2006.
- [17] 徐成斌, 孟雪莲, 马溪平, 等. 16S rDNA 克隆文库方法对制药废水处理系统中微生物多样性的研究[J]. *生态环境学报*, 2009, 18(4): 1236-1240.
- XU Chengbin, MENG Xuelian, MA Xiping, et al. Microbial community diversity in the alternate-flow biological reactor of pharmaceutical wastewater by 16S rDNA clone library [J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2009, 18(4): 1236-1240.
- [18] 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[J]. *微生物学报*, 2009, 49(3): 343-350.
- BAI Jie, LI Haiyan, ZHAO Yangguo. Bacteria distribution at different stations in the Northern Yellow Sea [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(3): 343-350.
- [19] GIRVAN M S, CAMPBELL C D, KILLHAM K, et al. Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation [J]. *Environ Microbiol*, 2005, 7(3): 301-313.
- [20] JOHNSTON E L, ROBERTS D A. Contaminants reduce the richness and evenness of marine communities: a review and meta-analysis [J]. *Environ Pollut*, 2009, 157(6): 1745-1752.
- [21] 曹晓星, 苏建强, 郑天凌, 等. 海洋微生物的多样性在赤潮调控中的利用[J]. *海洋科学*, 2007, 31(5): 63-69.
- CAO Xiaoxing, SU Jianqiang, ZHENG Tianling, et al. Marine microbial diversified and its application in red-tide control [J]. *Marine Sciences*, 2007, 31(5): 63-69.
- [22] LIU Z F, FU B J, ZHENG X X, et al. Plant biomass, soil water content and soil N:P ratio regulating soil microbial functional diversity in a temperate steppe: a regional scale study [J]. *Soil Biol Biochem*, 2010, 42: 445-450.
- [23] ROESELERS G, NORRIS T B, CASTENHOLZ R W, et al. Diversity of phototrophic bacteria in microbial mats from Arctic hot springs (Greenland) [J]. *Environ Microbiol*, 2007, 9(1): 26-38.
- [24] NOLL M, WELLINGER M. Changes of the soil ecosystem along a receding glacier: testing the correlation between environmental factors and bacterial community structure[J]. *Soil Biol Biochem*, 2008, 40: 2611-2619.
- [25] IKENAGA M, GUEVARA R, DEAN A, et al. Changes in community structure of sediment bacteria along the Florida coastal everglades marsh-mangrove-seagrass salinity gradient[J]. *Microbiol Ecol*, 2010, 59(2): 284-295.
- [26] AGUILÓ-FERRETTJANS M M, BOSCH R, MARTÍN-CARDONA C, et al. Phylogenetic analysis of the composition of bacterial communities in human-exploited coastal environments from Mallorca Island (Spain) [J]. *Syst Appl Microbiol*, 2008, 31(3): 231-240.
- [27] ZHANG W, KI J S, QIAN P Y. Microbial diversity in polluted harbor sediments I: Bacterial community assessment based on four clone libraries of 16S rDNA [J]. *Estuar Coast Shelf S*, 2008, 76(3): 668-681.
- [28] SPAIN A M, KRUMHOLZ L R, ELSHAHED M S. Abundance, composition, diversity and novelty of soil Proteobacteria [J]. *The ISME Journal*, 2009, 3: 992-1000.
- [29] HORNER-DEVINE M C, LEIBOLD M A, SMITH V H, et al. Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity [J]. *Ecol Lett*, 2003, 6: 613-622.
- [30] ENWALL K, HALLIN S. Comparison of T-RFLP and DGGE techniques to assess denitrifier community composition in soil [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2009, 48(1): 145-148.

## Microbial communities of sediments influenced by mariculture from the coast of Qinhuangdao

LI Jialin<sup>1</sup>, WANG Guangyi<sup>2</sup>, QIN Song<sup>1</sup>

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

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

**Abstract:** Microbial community serve as the driving force behind nutrient cycling and energy transduction in intertidal coastal ecosystems. However, little is known of their distribution affected by the activities of offshore mariculture which causes many serious environmental problems in recent years. The variations of microbial population in sediments from tourist and mariculture zones at coastal area of Qinhuangdao were investigated using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) method. 16S rRNA clone library was also constructed to analyse the composition and structure of bacterial communities at the polluted mariculture station by restriction fragment length polymorphism (RFLP) approach. The results suggested that bacterial composition was distinct among the tourist and aquaculture zones. Phylogenetic affiliations of mariculture-specific DGGE bands were mainly  $\gamma$ -proteobacteria, but also  $\alpha$ -proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria and Firmicutes. Statistical analysis indicated that temperature, salinity, pH and nitrate concentration had main effects on the bacterial distribution with the correlation as 55.2%. The 16S rRNA clone library of Q1, located at the mariculture zone south to Yanghe Bridge, revealed that the dominant phylum was the Proteobacteria (60%), and the main class within Proteobacteria was  $\gamma$ -proteobacteria. Other sequences in the library were meanwhile affiliated with the Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria and Verrucomicrobia. Furthermore several sequences were related to the groups which had been frequently associated with nutrients enrichment and phytoplankton blooms, such as members of Bacteroidetes, Enterobacteriaceae and Roseovarius clade of the subclass  $\alpha$ -proteobacteria.

**Key words:** coastal mariculture; intertidal sediment; microbial diversity; denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE); 16S rRNA clone library