

青岛潮间带沉积物可培养厌氧细菌多样性的研究

王雅苹, 史晓翀, 于少兰, 张晓华

(中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 为了验证设计的简易厌氧培养方法, 作者以青岛潮间带沉积物为研究对象, 采用 5 种培养基, 从青岛潮间带沉积物共分离获得 138 株厌氧细菌。16S rDNA 序列分析表明, 这些细菌分属 3 个门 15 个属 32 个种, 其中 γ -变形菌纲 64 株 18 个种, 在种类上处于优势地位; 此外还包括 δ -变形菌纲 (δ -Proteobacteria) 16 株 2 个种, ϵ -变形菌纲 4 株 1 个种, 拟杆菌门 (Bacteroidetes) 29 株 8 个种, 梭杆菌门 (Fusobacteria) 25 株 3 个种。在属水平上, 弧菌属 (*Vibrio*)、*Marinifilum* 属、泥杆菌属 (*Ilyobacter*)、脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*)、希瓦氏菌属 (*Shewanella*) 在数量上占优势。此外, 有 26 株 8 种细菌 (占总菌株数的 18.84%) 与已知菌的同源性介于 89.38%~94.22%, 为潜在的海洋细菌新科或新属, 表明此简易厌氧菌培养方法在获得新菌方面具有较大优势。另外, 研究结果还表明, 不同培养基对特定的类群具有选择性: 2216E 培养基对 γ -变形菌纲分离培养效率较高; SPG 培养基在获得新菌方面具有优势 (占新菌数 62.5%), 且这些新菌大多属于拟杆菌门和梭杆菌门, 其中 SPG-1 培养基对于分离硫酸盐还原菌和难培养的 ϵ -变形菌纲细菌具有优势, SPG-4 培养基对分离硝酸盐还原菌具有优势。

关键词: 潮间带沉积物; 厌氧菌; 可培养细菌; 多样性; 16S rDNA

中图分类号: Q938.8 文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2015)03-0092-08

doi: 10.11759/hyhx20140320002

厌氧微生物作为海洋微生物中的一大类群, 对于生物地球化学循环、海洋环境污染修复、绿色能源开发乃至全球气候变化都发挥着重要作用^[1-4]。厌氧菌特殊的代谢酶系可为天然活性物质的筛选提供资源^[5]。同时, 厌氧菌对于丰富微生物种质资源库、探索生命起源以及构建生物界完整的系统发育图谱都有积极意义^[6]。

近年来, 分子生物学技术的飞速发展使海洋微生物分子生态学研究取得重大进展^[7], 微生物纯培养因此失去吸引力, 但是要对微生物生理特性、代谢途径及其在生物地球化学循环中的作用等进行深入研究, 就必须对微生物进行纯培养^[8]。目前, 对于海洋厌氧菌的研究主要集中在经济物种 (牡蛎、海参等) 和模式生物 (斑马鱼)^[9-11], 而对环境样品中厌氧微生物多样性的研究报道较少。

潮间带是与人类关系最为密切的海洋环境之一, 生产力高, 介质环境复杂, 各界面间的交换作用活跃, 微生物多样性丰富^[12,13]。通常潮间带沉积物表层数毫米或数厘米以下为厌氧区^[14], 因此厌氧菌微生物在潮间带沉积物占绝对优势。2009 年, Lasher 等^[15]用 16S rDNA 克隆文库的方法对美国乔治亚州萨佩洛岛潮间带厌氧沉积物中的细菌多样性进行了

研究, 发现潮间带沉积物中存在大量其他环境样品中未报道的类群。2011 年, Das 等^[16]分析了印度孙德尔本斯红树林潮间带沉积物的细菌分布, 发现在 30 cm 处的厌氧菌丰度是好氧菌的 12 倍。这些研究表明潮间带沉积物中厌氧细菌分离培养的潜力巨大。本研究在 Strobel^[17]厌氧培养方法的基础上进行优化改进, 采用相对简易的厌氧培养方法对青岛潮间带沉积物中的厌氧细菌进行了分离培养, 并对获得的菌株进行 16S rDNA 测序鉴定, 分析可培养厌氧细菌的多样性, 为厌氧菌资源的开发利用提供基础。

1 材料与amp;方法

1.1 样品采集和处理

2013 年 3 月采集了青岛太平角 (东经 120°35'665", 北纬 36°05'186") 潮间带距表层 15 cm 左右处的厌氧区黑色沉积物。去除表层沉积物后, 将充满氮气的无菌

收稿日期: 2014-03-20; 修回日期: 2014-05-19

基金项目: 中央高校基本科研业务费资助项目 (201262008; 201262009)

作者简介: 王雅苹 (1987-), 女, 山东烟台人, 硕士研究生, 主要从事海洋微生物研究, 电话: 0532-82032767, E-mail: yapingouc@hotmail.com; 史晓翀, 通信作者, E-mail: shixiaochong@ouc.edu.cn

血清瓶打开瓶塞后迅速插入采样区的黑色沉积物中, 采样后迅速盖严瓶塞, 返回实验室后反复充抽 N_2 2~3 次, 以确保样品处于厌氧环境, 并在取样 2 h 内进行厌氧菌富集培养。

1.2 培养基及无氧环境的设置

1.2.1 培养基

本研究采用简化的 2216E 培养基和 4 种 SPG 培养基对厌氧菌进行分离培养。在各培养基中加入 0.02% 半胱氨酸作为还原剂, 0.01% 刃天青作为指示剂。所有的固体培养基加入 2% 琼脂。

2216E 培养基包含酵母膏 1 g/L, 蛋白胨 5 g/L, $FePO_4$ 0.1 g/L, pH 7.6。

SPG 基础培养基包含 PIPES 6.5 g/L, NaCl 25 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.7 g/L, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 4.3 g/L, NH_4Cl 0.25 g/L, KCl 0.5 g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.14 g/L, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.14 g/L, $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ 0.002 g/L, 维生素溶液 1 mL/L^[18], 微量元素溶液 1 mL/L^[19], pH 7。

在 SPG 基础培养基中分别添加以下成分制成选择培养基: SPG-1: 乳酸钠(20 mmol/L), 酵母膏(0.01%), Na_2SO_4 (20 mmol/L); SPG-2: 酪蛋白氨基酸(0.1%), 酵母膏(0.01%); SPG-3: 乙酸钠(5 mmol/L), Na_2SO_4 (20 mmol/L); SPG-4: 酵母膏(0.01%), $NaNO_3$ (10 mmol/L)。其中 SPG-2 是寡营养的异养菌培养基, SPG-1 和 SPG-3 为硫酸盐还原菌的选择性培养基, 而 SPG-4 是硝酸盐还原菌的选择性培养基。

1.2.2 无氧环境的设置

无氧液体培养基配制过程的简化是本方法特点之一。作者采用的方法是在 Strobel^[17]无氧液体培养基配制方法的基础上, 经过改进和优化。两种方法比较如下:

常规方法: H_2 还原除氧柱 混合气除 O_2 配制培养基 121 °C 脱气 10 min 通混合气 15~30 min 彻底除 O_2 分装密封 121 °C 灭菌。

简易方法: 配置培养基(含刃天青和半胱氨酸) 分装 通混合气数秒排气密封 121 °C 灭菌。具体过程: 将 10 mL 配制的液体培养基(含半胱氨酸和刃天青)加至 50 mL 厌氧培养瓶中, 充 N_2 数秒至气泡完全充盈厌氧瓶以排除瓶内空气, 立即塞上橡胶塞, 拧紧外盖。121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

1.3 厌氧菌的富集、分离纯化及保藏

向盛有液体培养基的厌氧培养瓶中充 N_2 , 同时取 0.1 g 沉积物样品迅速加至液体培养基中, 继续充 N_2 数秒后迅速盖好瓶塞。每种培养基接种 3 瓶, 分

别置于 4、16 和 28 °C 培养 4 周。

本研究的平板操作在轻便型气密隔离罩(法国 Erlab)中进行。用注射器吸取 100 μ L 富集后的菌液涂布于固体培养基, 放入厌氧培养袋(C-43, 日本三菱)中, 加入厌氧产气袋(2.5 L, 日本三菱)后密封, 反复抽真空充 N_2 3 次, 然后分别置于 4、16 和 28 °C 培养 30 d 至菌落肉眼可辨。根据菌落形态特征差异挑取不同单菌落, 划线纯化 3 次后接入液体培养基, 保种(甘油保种液的配制同液体培养基的配制)。

1.4 细菌基因组 DNA 的提取及 16S rDNA 扩增

将菌株接种于相应的无氧液体培养基中, 于 28 °C 活化培养 2 周。离心收集菌体, 利用酚-氯仿法^[20]提取细菌基因组 DNA。采用细菌 16S rDNA 通用引物^[21](上游引物 B8F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 下游引物 B1510: 5'-GGTACCTTGT TACGACTT-3')进行 PCR, 退火温度为 55 °C。1.0% 琼脂糖凝胶进行电泳检测, 并用琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒(北京天根)进行回收、纯化。

1.5 细菌 16S rDNA 序列及细菌多样性分析

所得菌株的 16S rDNA 序列测定由北京六合华大生物公司进行。将 16S rDNA 序列在 NCBI 数据库和 EzTaxon-e 数据库中经 BLAST 程序比对, 用 MEGA 5.0 软件以邻接法构建系统进化树。将获得菌株的 16S rDNA 序列提交 GenBank。采用香依指数(H')进行多样性表征。

2 结果

2.1 分离纯化结果

从青岛潮间带沉积物中共分离得到细菌 138 株。根据 BLAST 比对结果, 分属 3 个门 15 个属 32 个种(表 1)。包括变形菌门、拟杆菌门和梭杆菌门; 其中变形菌门包括 γ -变形菌纲 64 株(46%)、 δ -变形菌纲 16 株(12%)和 ϵ -变形菌纲 4 株(3%), 其他包括拟杆菌门 29 株(21%), 梭杆菌门 25 株(18%)。弧菌属(*Vibrio*)、*Marinifilum* 属、泥杆菌属(*Ilyobacter*)、脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)、希瓦氏菌属(*Shewanella*) 在数量上占优势。所有菌株中, 16S rDNA 序列同源性低于 97% 的有 8 种 26 株(89.38%~94.22%), 为潜在的海细菌新科或新属。其中菌株 1-10、2-1 和 3-4 都与 *Marinifilum fragile*(Genbank ID: FJ394546)同源性

最高, 将其 16S rDNA 序列进行两两比对, 相似度分别为 88%、89%、94%, 故为 3 种不同新菌。将与已知菌种的同源性比对结果作为初步判断本研究分离

菌株厌氧类型的依据。分离的 138 株细菌中, 兼性厌氧菌 26 种 93 株(81.25%), 耐氧菌 3 种 22 株(9.37%), 严格厌氧菌 3 种 23 株(9.37%), 如表 1 所示。

表 1 青岛潮间带沉积物可培养厌氧细菌

Tab. 1 Anaerobic bacteria isolated from intertidal sediments of Qingdao

类群	代表菌株	菌株数	Genbank 登录号	相似菌株(Genbank 登录号)	相似性(%)	厌氧类型
γ-变形菌纲 (γ-Proteobacteria)	MA-17	2	KF650744	<i>Photobacterium jeanii</i> (GU065209)	98.59	兼性厌氧
	1-1	4	KF650740	<i>P. marinum</i> (HE573747)	100	兼性厌氧
	MA-5	4	KF650741	<i>Vibrio azureus</i> (AB428897)	98.24	兼性厌氧
	MA-35	2	KF650742	<i>V. ponticus</i> (AJ630103)	100	兼性厌氧
	MA-10	8	KF650745	<i>V. diabolicus</i> (X99762)	100	兼性厌氧
	MA-30	4	KF650746	<i>V. jasicida</i> (AB562589)	98.91	兼性厌氧
	MA-16	8	KF650747	<i>V. ordalii</i> (AEZC01000173)	98.92	兼性厌氧
	MA-11	2	KF650748	<i>V. owensii</i> (GU018180)	99.78	兼性厌氧
	MA-15	2	KF650749	<i>V. fortis</i> (AJ514916)	100	兼性厌氧
	MA-37	6	KF650750	<i>V. campbellii</i> (X74692)	99.18	兼性厌氧
	3-12	6	KF650764	<i>Shewanella xiamenensis</i> (FJ589031)	99.87	兼性厌氧
	1-3	2	KF650751	<i>S. gaetbuli</i> (AY190533)	99.79	兼性厌氧
	4-11	2	KF650769	<i>S. fidelis</i> (AF420312)	99.33	兼性厌氧
	MA-19	3	KF650743	<i>Pseudoalteromonas issachenkonii</i> (AF316144)	100	兼性厌氧
	3-5	3	KF650767	<i>P. atlantica</i> (X82134)	100	兼性厌氧
	3-7	2	KF650768	<i>P. espejiana</i> (X82143)	100	兼性厌氧
	MA-13	1	KF650766	<i>Aeromonas punctata</i> subsp. <i>Caviae</i> (X60408)	100	兼性厌氧
MA-8*	3	KF650752	<i>Gallaecimonas xiamenensis</i> (JQ666155)	93.13	兼性厌氧	
δ-变形菌纲 (δ-Proteobacteria)	MA-29	14	KF650738	<i>Desulfovibrio oceani</i> subsp. <i>oceani</i> (FJ655907)	99.58	耐氧
	MA-18	2	KF650739	<i>D. marinisediminis</i> (AB353727)	98.89	严格厌氧
ε-变形菌纲 (ε-Proteobacteria)	1-2*	4	KF650753	<i>Arcobacter suis</i> (FJ573216)	94.22	兼性厌氧
梭杆菌门 (Fusobacteria)	MA-9	4	KF650754	<i>Propionigenium maris</i> (X84049)	98.35	耐氧
	MA-31	2	KF650755	<i>Psychrilyobacter atlanticus</i> (AY579753)	99.12	严格厌氧
	4-1	19	KF650756	<i>Ilyobacter polytropus</i> (CP002282)	99.8	严格厌氧
拟杆菌门 (Bacteroidetes)	MA-3*	4	KF650757	<i>Bacteroides ovatus</i> (AAXF02000050)	90.03	耐氧
	MA-6*	1	KF650758	<i>Prolixibacter bellariivorans</i> (AY918928)	89.8	兼性厌氧
	4-10	2	KF650759	<i>Sunxiuqinia elliptica</i> (GQ200190)	99.8	兼性厌氧
	4-4*	2	KF650760	<i>S. faeciviva</i> (AB362263)	92.56	兼性厌氧
	3-4*	6	KF650762	<i>Marinifilum fragile</i> (FJ394546)	89.44	兼性厌氧
	2-1*	4	KF650763	<i>Marinifilum fragile</i> (FJ394546)	93.89	兼性厌氧
	1-10*	2	KF650761	<i>Marinifilum fragile</i> (FJ394546)	89.38	兼性厌氧
	3-2	8	KF650765	<i>M. flexuosum</i> (HE613737)	98.2	兼性厌氧

注: “*” . 新菌

表 2 为各培养基分离菌株在属水平上的组成。*H* 揭示了各培养基分离细菌的多样性。所有的 15 个属中, 7 个属(来自 γ -变形菌纲的弧菌目(Vibrionales)和气单胞菌目(Aeromonadales), 梭杆菌门的梭杆菌目(Fusobacteriales)和拟杆菌门的拟杆菌目(Bacteroidales)) 只由 2216E 培养基分离得到, 另有 4 个属只由 SPG 培养基分离得到。对照 4 种 SPG 培养基的分离倾向还可以看出: 与 *M. fragile*(FJ394546)表现出最高同源性的 3 种新菌在 4 种 SPG 培养基中都能得到, 而 *Arcobacter* 和 *Photobacterium* 两个属只由 SPG-1 分离到, *Sunxiuqinia* 属只由 SPG-4 分离到。

表 2 各培养基分离菌株所属类群及在属水平上的组成
Tab. 2 The phyla and genera of isolates from different media

类群	属	培养基					总计
		2216E	SPG-1	SPG-2	SPG-3	SPG-4	
γ -变形菌纲	弧菌属(<i>Vibrio</i>)	33/8	-	-	-	3/2	64/18
	加利西亚单胞菌属(<i>Gallaecimonas</i> *)	3/1	-	-	-	-	
	气单胞菌属(<i>Aeromonas</i>)	1/1	-	-	-	-	
	发光杆菌属(<i>Photobacterium</i>)	2/1	4/1	-	-	-	
	希瓦氏菌属(<i>Shewanella</i>)	5/2	1/1	-	2/1	2/1	
	假交替单胞菌属(<i>Pseudoalteromonas</i>)	1/1	-	-	5/2	-	
δ -变形菌纲	脱硫弧菌属(<i>Desulfovibrio</i>)	12/2	1/1	1/1	-	2/1	16/2
ϵ -变形菌纲	弓形杆菌属(<i>Arcobacter</i> *)	-	4/1	-	-	-	4/1
拟杆菌门	<i>Prolixibacter</i> *	1/1	-	-	-	-	29/8
	拟杆菌属(<i>Bacteroides</i> *)	4/1	-	-	-	-	
	<i>Marinifilum</i> *	-	2/1	4/1	6/2	8/2	
	<i>Sunxiuqinia</i> *	-	-	-	-	4/2	
梭杆菌门	产丙酸菌属(<i>Propionigenium</i>)	4/1	-	-	-	-	25/3
	<i>Psychrilyobacter</i>	2/1	-	-	-	-	
	泥杆菌属(<i>Ilyobacter</i>)	-	2/1	-	10/1	7/1	
	总计	70/20	14/6	5/2	23/6	26/9	
	<i>H</i>	4.05	2.38	0.72	2.19	2.94	

注: “*” . 与新菌同源性最高菌株所属的属; “-” . 无; “*H*” . 香农指数; “ ” . A/B, A 代表菌株数, B 代表菌种数

3 讨论与结论

厌氧微生物的分离培养需要严格的厌氧条件, 过程繁琐, 对技术要求高, 专业实验室多在厌氧手套箱中操作。然而厌氧手套箱价格昂贵, 运行和维护成本巨大, 而且占据空间大, 所以无法作为普通厌氧研究的首选。作者采用的方法是在 Strobel^[17]无氧液体培养基配制方法的基础上经过改进, 以轻便型气密隔离罩代替厌氧手套操作箱; 简化的无氧液体培养基配制方法和厌氧菌种保藏步骤经过试验, 均取得了良好的效果。

2.2 纯培养厌氧细菌的系统进化分析

通过 MEGA 5.0 构建可培养厌氧细菌的系统进化树。结果见图 1, 所有细菌分成 γ -变形菌纲、 ϵ -变形菌纲、 δ -变形菌纲、梭杆菌门和拟杆菌门 5 个分类单元, 其中变形杆菌门的 γ -变形杆菌纲为优势类群, 并以弧菌属为主。将所分离的新菌单独构建进化树, 如图 2 所示, 所有新菌均属于拟杆菌门和变形菌门, 其中拟杆菌门占多数, 主要由 SPG 培养基分离, 说明了 SPG 培养基对拟杆菌门细菌有一定选择性, 并对分离新菌有较强优势。

常规方法配制无氧液体培养基的过程繁琐, 整个过程需要相当长的时间, 除氧和分装过程需要消耗大量 H_2 和混合气, 使成本增高, 且 H_2 存在安全隐患(浓度 4%~74%可能引起爆炸)。本研究的简易方法只需通气数秒钟, 节约时间, 降低成本。另外, 在厌氧菌种保藏上, 甘油保种液与液体培养基处理方法一致, 简化了保种程序。而常规方法中脱气和灭菌过程涉及甘油的高温处理, 但高温会使甘油变性, 因而大大降低厌氧菌种保藏时间和保藏质量。

严格厌氧菌生长条件苛刻较难获得, 所以成为检验厌氧培养方法是否可行的标准。本研究将与已

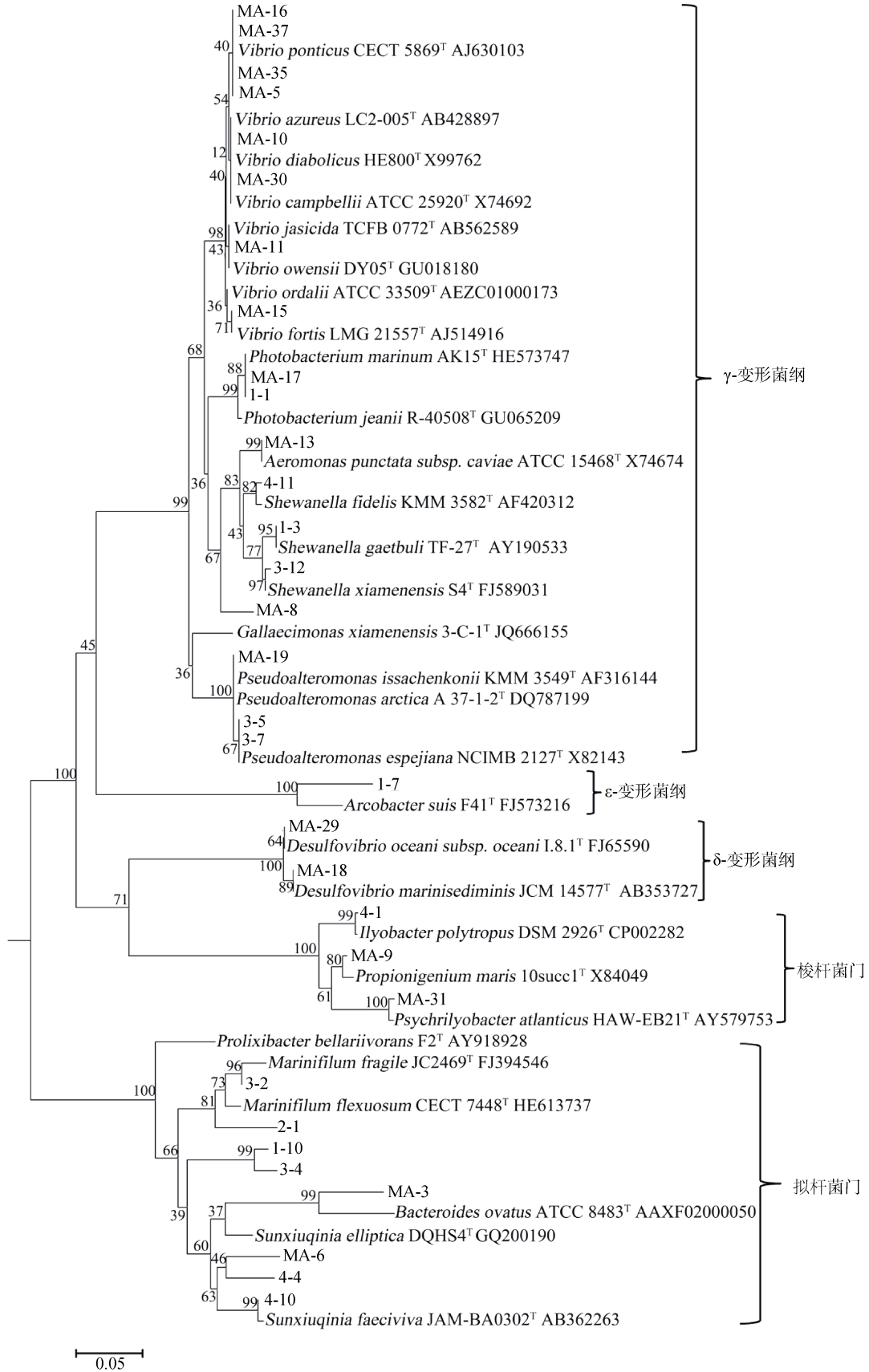


图 1 青岛潮间带沉积物可培养细菌进化树

Fig. 1 Neighbor-joining tree showing the relationship of bacterial strains isolated from intertidal sediments of Qingdao

基础。对于青岛潮间带沉积物这种研究较多的样品,通过改变培养方法,仍然可以获得较高的新菌率,这有力地证明微生物纯培养仍有巨大空间,不应只关注于难以获得的深远海或极端环境样品。培养方法的改进、培养基的合理设计或改良是探索海洋微生物多样性最根本有效的手段之一。

参考文献:

- [1] Waksman L D, Hotchkiss M, Carey C. Marine bacteria and their role in the cycle of life in the sea II. Bacteria concerned in the cycle of nitrogen in the sea[J]. The Biological Bulletin, 1933, 65(2): 137-167.
- [2] Rao P V, Baral S S, Dey R, et al. Biogas generation potential by anaerobic digestion for sustainable energy development in India[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2010, 14(7): 2086-2094.
- [3] Das S, Lyla P S, Khan S A. Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives[J]. Current Science, 2006, 90(10): 1325-1335.
- [4] Orcutt B, Meile C. Constraints on mechanisms and rates of anaerobic oxidation of methane by microbial consortia: process-based modeling of ANME-2 archaea and sulfate reducing bacteria interactions[J]. Biogeosciences Discussions, 2008, 5(3): 1933-1967.
- [5] Pettit R K. Culturability and secondary metabolite diversity of extreme microbes: expanding contribution of deep sea and deep-sea vent microbes to natural product discover[J]. Marine Biotechnology, 2011, 13: 1-11.
- [6] Ling D W. The development of the research on anaerobe [J]. Bulletin of Microbiology, 1995, 22(4): 245-252.
- [7] 李祎, 郑伟, 郑天凌. 海洋微生物多样性及其分子生态学研究进展 [J]. 微生物学通报, 2013, 40(4): 655-668.
- [8] Giovannoni S, Stingl U. The importance of culturing bacterioplankton in the “omics” age [J]. Nature Reviews Microbiology, 2007, 5: 820-826.
- [9] Colwell R R, Liston J. Microbiology of shellfish. Bacteriological study of the natural flora of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*)[J]. Applied Microbiology, 1960, 8: 104-109.
- [10] Zhang X C, Tomomi N, Masayuki M, et al. Diversity and function of aerobic culturable bacteria in the intestine of the sea cucumber *Holothuria leucospilota*[J]. Journal of General and Applied Microbiology, 2012, 58: 447-456.
- [11] Cantas L, Sørby J R T S, Aleström Peter, et al. Culturable gut microbiota diversity in zebrafish[J]. Zebrafish, 2012, 9 (1): 26-37.
- [12] 吕欣欣, 邹立, 刘素美, 等. 胶州湾潮间带沉积物有机碳和叶绿素的埋藏特征[J]. 海洋科学, 2008, 32(5): 40-45.
- [13] 李佳, 华尔, 张志南. 青岛砂质潮间带小型底栖动物分布及季节动态[J]. 应用生态学报, 2012, 23(12): 32-37.
- [14] Engelen B, Cypionka H. The subsurface of tidal-flat sediments as a model for the deep biosphere [J]. Ocean Dynamics, 2009, 59: 385-391.
- [15] Lasher C, Dyszynski G, Everett K, et al. The diverse bacterial community in intertidal[J]. Anaerobic Sediments at Sapelo Island, Georgia. Microbial Ecology, 2009, 58: 244-261.
- [16] Das S, De M, De T K, et al. Distribution of aerobic and anaerobic bacteria along the intertidal zone of sunderban mangrove ecosystems, NE coast of Bay of Bengal, India[J]. Indian Journal of Geo-Marine Sciences, 2011, 41(5): 405-411.
- [17] Strobel H J. Basic laboratory culture methods for anaerobic bacteria [C]//Biofuels: Methods and Protocols, US: Humana Press, 2009: 247-261.
- [18] Balch W E, Fox G E, Magrum L J, et al. Methanogens: reevaluation of a unique biological group[J]. Microbiology Review, 1979, 43: 260-296.
- [19] Steinsbu B O, Thorseth I H, Nakagawa S, et al. *Archaeoglobus sulfaticallidus* sp. nov., a thermophilic and facultatively lithoautotrophic sulfate-reducer isolated from black rust exposed to hot ridge flank crustal fluids[J]. IJSEM, 2010, 60: 2745-2752.
- [20] Moore E, Arnscheidt A, Krüger A, et al. Simplified protocols for the preparation of genomic DNA from bacterial cultures[C]//Molecular Microbial Ecology Manual, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2004, 3-18.
- [21] Ludwig J A, Reynolds J F. Statistical Ecology: A primer on methods and computing[M]. New York: John Wiley and Sons, 1988: 337.
- [22] Aller R C. Bioturbation and remineralization of sedimentary organic matter: effects of redox oscillation[J]. Chemical Geology, 1994, 114: 331-345.

- [23] Köpke B, Wilms R, Engelen B, et al. Microbial diversity in coastal subsurface sediments: a cultivation approach using various electron acceptors and substrate gradients[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(12): 7819-7830.
- [24] Finnegan L, Garcia-Melgares M, Gmerek T, et al. A survey of culturable aerobic and anaerobic marine bacteria in de novo biofilm formation on natural substrates in St. Andrews Bay, Scotland[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2011, 100: 399-404.
- [25] Brück W M, Brück T B, Self W T, et al. Comparison of the anaerobic microbiota of deep-water *Geodia* spp. and sandy sediments in the Straits of Florida[J]. *International Society for Microbial Ecology*, 2010, 4: 686-699.
- [26] Bryant M P, Campbell L L, Reddy C A, et al. Growth of *Desulfovibrio* in lactate or ethanol media low in sulfate in association with H₂-utilizing methanogenic bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1977, 33(5): 1162-1169.
- [27] Wirsen C O, Sievert S M, Cavanaugh C M, et al. Characterization of an autotrophic sulfide-oxidizing marine *Arcobacter* sp. that produces filamentous sulfur[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(1): 316-325.

Diversity of culturable anaerobic bacteria isolated from intertidal sediments of Qingdao

WANG Ya-ping, SHI Xiao-chong, YU Shao-lan, ZHANG Xiao-hua
(College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: Mar., 20, 2014

Key words: Intertidal sediment; anaerobic bacteria; culturable bacteria; diversity; 16S rDNA

Abstract: Oxygen is consumed within the first few millimeters or centimeters of the intertidal sediments, which makes the lower layer as an anaerobic ambient with abundant anaerobic bacteria. However, little information is available about culturable anaerobic bacteria inhabiting intertidal sediments. In order to prove the simple method for anaerobic bacteria isolation, intertidal sediments of Qingdao were chosen as the objects for study. Five different anaerobic media were used for the isolation, and then isolates were identified using 16S rRNA gene sequences. A total of 138 bacterial isolates clustered into 3 phyla, 15 genera and 32 species were recorded. Bacterial isolates belonged to γ -*Proteobacteria* were recorded as a highly dominant (64 isolates and 18 species), followed by δ -*Proteobacteria* (16 isolates and 2 species), ϵ -*Proteobacteria* (4 isolates and 1 species), Bacteroidetes (29 isolates and 8 species) and Fusobacteria (25 isolates and 3 species). Furthermore, at the genus level investigation, *Vibrio* was recorded as the most common genera among all the isolates, followed by *Marinifilum*, *Ilyobacter*, *Desulfovibrio* and *Shewanella*, etc. Notably, there were 26 isolates and 8 species (18.84%) which might belong to novel families or genus, whose homology was recorded between 89.38% and 94.22%, with one belonged to rarely isolated ϵ -*Proteobacteria*. All the results above indicated that the fast, simple and easily designed method had some advantages in isolating novel strains. Moreover, the study investigated that the different media and enrichment strategies were selective for specific bacterial groups. The medium 2216E showed a better effect in the diversity of bacterial isolates, and the medium SPG showed a better effect in the separation of novel bacteria, especially for Bacteroidetes and Fusobacteria. Meanwhile, the SPG-1 Medium showed a greater capability to isolate SRB and bacteria of ϵ -*Proteobacteria*, and SPG-4 medium prone to isolating NRB.

(本文编辑: 谭雪静)