

# 山东省渤海海洋保护区典型海域表层海水微生物群落多样性分析

付新华<sup>1</sup>, 刘国宁<sup>2</sup>, 何健龙<sup>3</sup>, 马元庆<sup>3</sup>, 宋秀凯<sup>3</sup>, 孟 丽<sup>1</sup>, 贾青妹<sup>1</sup>

(1. 潍坊医学院 生物化学与分子生物学教研室, 山东 潍坊 261053; 2. 潍坊市海洋环境监测中心站, 山东 潍坊 261041; 3. 山东省海洋环境与资源研究院, 山东 烟台 264006)

**摘要:** 海洋微生物在生态系统循环中发挥重要作用。为系统了解山东省渤海海洋保护区表层海水微生物群落多样性, 作者利用 Illumina 高通量测序及生物信息学分析技术研究了 12 个水体样品的菌群构成和多样性特征。实验结果表明, 山东渤海海洋保护区典型海域表层海水微生物群落丰富, 12 个水体样品 OTU 分属于 25 门、56 纲、103 目、163 科、227 属; 门、纲、目、科、属分类等级上的优势类群分别为变形菌门(Proteobacteria)(57.95%)、 $\alpha$ -变形菌纲(Alphaproteobacteria)(21.88%)、黄杆菌目(Flavobacteriales)(4.31%)、红细菌科(Rhodobacteraceae)(10.68%)、*Candidatus portiera*(7.94%); 保护区内表层海水微生物具有其独特的菌群特征和多样性。本研究结果为进一步认识海洋微生物多样性与海洋生态环境保护的关系奠定了基础。

**关键词:** 渤海海洋保护区; 微生物群落; 多样性分析

中图分类号: X55 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2017)01-0039-09  
DOI: 10.11759//hykx20160329002

海洋微生物的种类繁多, 包括细菌、真菌、古细菌等, 物种数高达 2 亿~10 亿<sup>[1]</sup>, 它们在生态系统循环和生物活性物质开发中都发挥重要作用。因此, 海洋微生物研究已成为当今的一大热点, 并涉及环境、生态、医药等多个领域。王家生等<sup>[2]</sup>分析了海洋极端环境微生物活动与油气资源的关系; 余玥<sup>[3]</sup>研究了深海极端微生物正青霉(*Enpenicillium* sp.)的化学成分。许多研究人员还从海洋微生物中分离得到多种糖类、肽类、甾醇类等具有抗肿瘤、抗氧化、抗菌等作用的活性物质<sup>[4-6]</sup>。海洋微生物多样性研究对了解群落结构间的动态变化及其生态功能、修复海洋生态系统以及微生物资源的合理开发均具有重要意义。

传统的海洋微生物多样性研究方法如平板培养法、核酸分子 RFLP、DGGE 等方法, 极大地促进了海洋微生物生态学等相关学科的发展。但是这些方法仅能测定海水中的部分微生物种类, 而且灵敏度不够高。高通量测序, 如 454 Life Sciences 公司及 Illumina 公司的第二代测序技术以及其他的单分子测序技术等, 以同时对上万的基因位点进行分析为特色, 具有大规模平行测序、进行定量等优点, 越来越多地用于基因组分析, 涉及基因测序和基因组学研究等多个方面<sup>[7-8]</sup>。而 Illumina 测序技术又具有低

错误率和低成本的优点, 使得简单、快速、较准确地获取海水微生物信息成为可能。16S rDNA 是原核生物基因组中的高保守性和高特异性的 DNA 序列, 对其进行序列分析已成为检测和鉴定微生物的重要手段<sup>[9]</sup>。16S rDNA 由保守区和高变区组成, 利用高变区可进行物种多样性分析<sup>[10]</sup>。对扩增后的 16S rDNA 高变区进行高通量测序避免了海洋微生物难纯培养等的困扰, 可使操作简单、分析全面而准确。

渤海为中国唯一内海, 资源丰富, 其中渔业、港口、石油、旅游和海盐是渤海的五大优势资源, 但是近封闭的内海特征使得其水体交换能力很差。作为黄河、辽河、海河三大水系的汇聚地, 环渤海区域在

收稿日期: 2016-03-29; 修回日期: 2016-04-27

基金项目: 山东省渤海海洋生态修复及能力建设(20140601); 山东省高等学校科技计划项目(7J12LE51); 山东省科技发展计划项目(2014GSF117030); 潍坊市科学技术发展计划(2016ZJ1047)

[Foundation: Ecological Restoration and Capacity Building Program for Bohai Sea of Shandong Province, No.20140601; The Project of Shandong Province Higher Educational Science and Technology Program, No.7J12LE51; Science and Technology Development Projects of Shandong Province, No.2014GSF117030; Weifang Science and Technology Development Plan, No.2016ZJ1047]

作者简介: 付新华(1976-), 女, 山东茌平人, 副教授, 博士, 主要从事生物化学与分子生物学研究, 电话: 0536-8462531, E-mail: wfyxyfxh@163.com

经济高速发展的同时,其海区亦饱受污染事故的影响。海洋污染对海洋生物生存造成严重危害,并影响了其生物多样性<sup>[11]</sup>。虽为中国重要海域,但是对渤海海洋微生物资源研究较少,且主要集中在海洋沉积物微生物上<sup>[12-14]</sup>;而海水微生物则鲜有报道,仅限于采用非高通量测序方法的研究<sup>[15-16]</sup>。海洋保护区是以保护海洋自然环境为目的,依法对具有特殊保护价值的海域、海岸、河口、岛屿等划出一定面积予以特殊保护和管理的海洋相关区域。本研究采用 Illumina Miseq 测序平台,研究了山东省渤海海洋保护区典型海域表层海水微生物群落多样性,本研究结果将对该海域生态系统的保护修复和微生物资源的开发利用提供基础数据和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究区域概况、海水样品采集与微生物收集

山东省渤海海洋保护区位于山东省渤海区境内,是为保护贝类、鱼类等重点保护对象、有关部门在山东省渤海区海域设立的海洋保护区。作者于 2014 年秋季在保护区内选取了 12 个采样点,采样点位置见图 1,取每个点的表层海水 1 L,封存后立即运往实验室供实验分析用。取样及封存方法根据中华人民共和国国家标准 GB17378.3-2007。

水样先进行过滤以除去水体中的大颗粒,再用 0.22 μm 微孔滤膜抽滤,将滤膜有菌面对折后用无

菌锡箔纸包住,装于灭菌袋中,标记好后置于 -20℃ 保存。

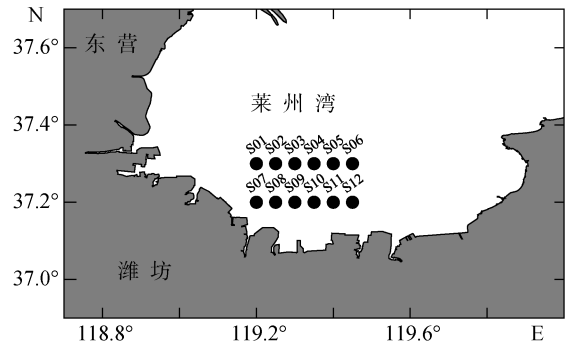


图 1 12 个水体微生物采样点示意图

Fig. 1 Location of the 12 water samples

### 1.2 微生物 DNA 提取、扩增和高通量测序

水体微生物 DNA 提取采用水样 DNA 提取试剂盒(OMEGA),提取步骤参照说明书。提取后的微生物 DNA 用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测,凝胶成像系统分析 DNA 提取的结果,符合实验需求的基因组 -20℃ 保存备用。

分别用 16sFF/16sFR、V3F/V3R 和 V4F/V4R 3 对引物,对水体微生物 DNA 的 16S rDNA 全长、V3 高可变区、V4 高可变区进行 PCR 扩增,引物序列见表 1。对纯化后质量合格的 PCR 产物进行 DNA 文库的构建,用合格的文库进行 Illumina Paired-end 测序。

表 1 用于 PCR 反应的 3 对引物序列

Tab. 1 Sequence of three primer pairs used in PCR

引物	序列(5' 3')	引物	序列(5' 3')
16sFF	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	16sFR	GGTACCTTGTACGACTT
V3F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	V3R	TTACCGCGCTGCTGGCAC
V4F	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	V4R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT

### 1.3 数据处理与信息分析

高通量测序得到的原始数据滤除低质量的序列。使用 FLASH 软件<sup>[17]</sup>进行序列拼接,利用重叠关系将成对读段(reads)拼装成高变区的序列标签(Tags)。利用 USEARCH 软件<sup>[18]</sup>将拼接好的 Tags 经过优化后,在 97%相似度下将其聚类为用于物种分类的操作单元(OTU)。通过 OTU 与数据库比对,进行物种注释和 OTU 的物种分类。计算常用的 α 生物多样性指数:Chao、ACE、Simpson 和 Shannon 指数,分析微生物群落的多样性,通过稀疏度分析样品的

测序深度;并采用 QIIME 进行主成分分析(PCoA),分析不同样品微生物多样性的差异<sup>[19]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 水体微生物 16S rDNA 全长、V3 高变区、V4 高变区扩增

12 个海水微生物样本的总基因组 DNA 分别用 3 对引物扩增 16S rDNA、V3 高变区、V4 高变区结果显示:对于 16S rDNA 的扩增,所得单一产物长度在 1 000~2 000 bp,条带清晰规则较亮,即浓度较高;

对于 V3 高变区的扩增产物电泳条带近似弥散,且条带较暗,即浓度较低;而对于 V4 高变区的扩增,所得单一产物长度在 250~500 bp,条带清晰规则较亮,即浓度较高。综上结果,选取 V4 高变区进行高通量测序。

## 2.2 高通量测序原始数据处理

对山东省渤海海洋保护区 12 个水体微生物样本进行高通量测序,共得到 312 451 条 reads,平均每个样品 26 037 条,SD 值为 209;共拼装获得 310 330 条 Tags,平均每个样品 25 860 条,SD 值为 214;共产生 676 个 OUT。每个样品 OTU 统计结果见表 2。

表 2 样品 OTU 统计  
Tab. 2 OTUs of samples

样品编号	Tags 数/条	OTU 数/个
WCY1	20101	370
WCY2	20952	336
WCY3	20331	371
WCY4	20017	360
WCY5	20527	340
WCY6	20455	358
WCY7	20232	342
WCY8	20752	394
WCY9	20563	445
WCY10	21904	363
WCY11	21253	423
WCY12	21083	405

## 2.3 水体微生物群落结构

通过与数据库进行比对,对 OTU 进行物种分类,并分别在门、纲、目、科、属 5 个分类等级水平上对各个样品作微生物物种构成柱状图。图 2~图 6 显示了各样品在不同分类等级上的物种构成状况,从图中可以直观看出不同物种在每个样品中所占的比例。门分类等级画所有物种的柱状图,从纲分类等级开始,将物种丰度在所有样品均低于 0.5%的物种全部合并成其他(Others)。12 个水体样品所有 OTU 分属于 25 门,56 纲,103 目,163 科,227 属。

### 2.3.1 门

总体上看,12 个水体样品内共有来自 25 个菌门的微生物种系型被鉴定出来,微生物群落多样性样品间存在差异。在门水平,水体内平均相对丰度处在前十位的微生物门类依次为变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、蓝细菌门(Cyanobacteria)、

放线菌门(Actinobacteria)、泉古菌(Crenarchaeota)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、浮霉菌门(Planctomycetes)、广古菌门(Euryarchaeota)、厚壁菌门(Firmicutes)和脱铁杆菌门(Deferribacteres, SAR406);平均相对丰度大于 1%的有 6 种,其中变形菌门(Proteobacteria)丰度高达 57.95%,拟杆菌门(Bacteroidetes)达 15.79%,蓝细菌门(Cyanobacteria)达 11.27%,放线菌门(Actinobacteria)达 6.62%,泉古菌门(Crenarchaeota)达 3.70%,疣微菌门(Verrucomicrobia)达 1.34%;其他菌门平均丰度在 1%以下。各样品在门分类等级上的微生物组成见图 2。

### 2.3.2 纲

各样品在纲分类等级上的微生物组成见图 3。12 个水体样品中共检测到微生物 56 纲,其中物种丰度在所有样品中平均高于 0.5%的共有 19 个。平均相对丰度大于 10%的纲分别是  $\alpha$ -变形菌纲(Alphaproteobacteria)(21.88%)、 $\gamma$ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)(19.75%)、黄杆菌纲(Flavobacteriia)(14.31%)和  $\beta$ -变形菌纲(Betaproteobacteria)(10.93%)。

### 2.3.3 目

各样品在目分类等级上的微生物组成见图 4。12 个水体样品中包含微生物 103 目,其中物种丰度在所有样品平均高于 0.5%的共有 30 个。相对丰度大于 5%的目分别是黄杆菌目(Flavobacteriales)(14.31%)、海洋螺菌目(Oceanospirillales)(10.07%)、嗜甲基菌目(Methylophilales)(9.50%)和交替单胞菌目(Alteromonadales)(7.39%)

### 2.3.4 科

12 个水体样品中有微生物 163 科,物种丰度在所有样品平均高于 0.5%的共有 32 个。相对丰度最大的 5 个科所占比例总和达 36.6%,分别是红细菌科(Rhodobacteraceae)(10.68%);嗜甲基菌科(Methylophilaceae)(9.50%);盐单胞菌科(Halomonadaceae)(7.96%);弯曲菌科(Campylobacteraceae)(4.31%)和 OM60(4.15%)。各样品在科分类等级上的微生物组成见图 5。

### 2.3.5 属

各样品在属分类等级上的微生物组成见图 6。12 个水体样品中含有微生物 227 属,物种丰度在所有样品平均高于 0.5%的共有 22 个。相对丰度最大的 5 个属所占比例总和达 23.23%,分别是 *Candidatus portiera*(7.94%)、*Sediminicola*(4.72%)、弓(形)杆菌属(*Arcobacter*)(4.31%)、亚硝化侏儒菌属(*Nitrosopumilus*)(3.69%)和海洋生菌属(*Octadecabacter*)(2.57%)。

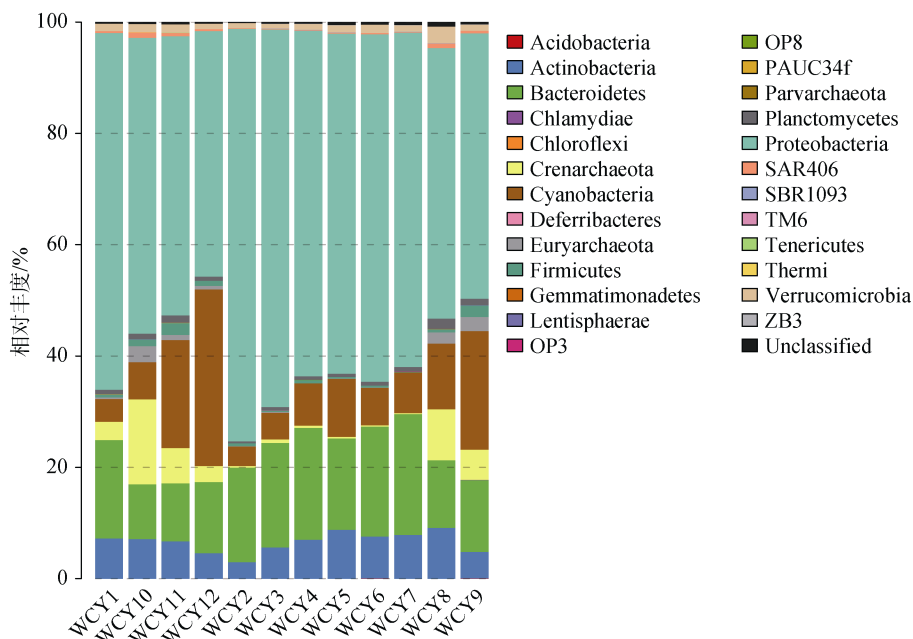


图 2 水体样品在门分类等级上的微生物组成

Fig. 2 Bacterial composition of the water column sample with respect to the phylum level

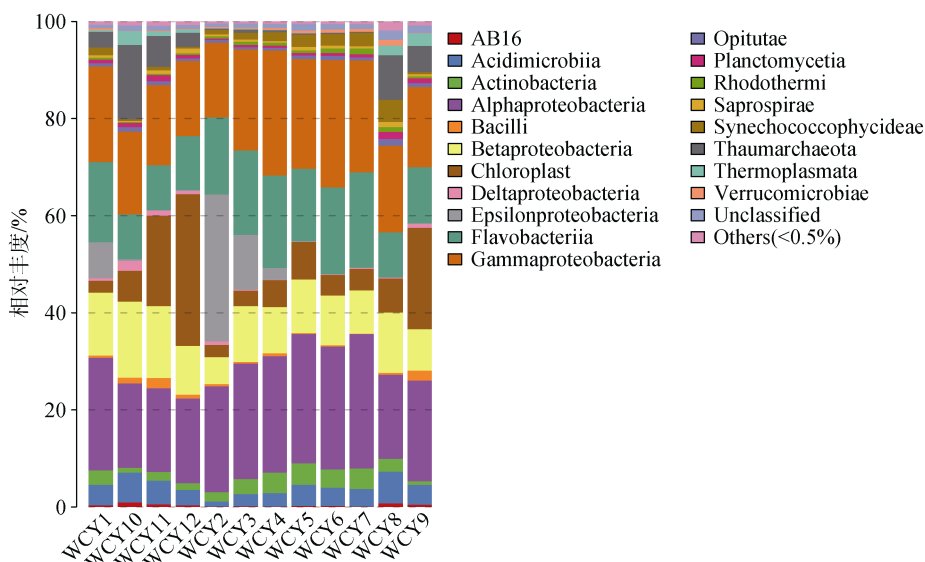


图 3 水体样品在纲分类等级上的微生物组成

Fig. 3 Bacterial composition of the water column sample with respect to the class level

## 2.4 水体微生物多样性指数

样品的 $\alpha$ 多样性分析见表 3, 12 个水体样品 chao 平均值为 410.68, ace 平均值为 417.67, shannon 平均值为 4.30, simpson 平均值为 0.0313, 样品微生物多样性较高。

稀疏曲线用来评估所测序列库容中环境微生物的种类和数量。样品稀疏曲线显示 12 条曲线已达到平台期, 表明通过高通量测序技术, 12 个水体样品中

的微生物基本完全测出(图 7)。

使用主坐标分析(PCoA)的方法展示 12 个水体样品间微生物多样性的差异大小。主成分 PC1 和次要成分 PC2 分析结果见图 8。由图可见多数样品点之间距离较远, 表明组间差异显著。主成分分析结果显示, PC1 贡献度为 49.45%, PC2 贡献度为 20.09%, 除 5 号和 6 号取样点外的其他取样点水体微生物样品不能聚集在一起, 说明样品间水体微生物组成有差异。

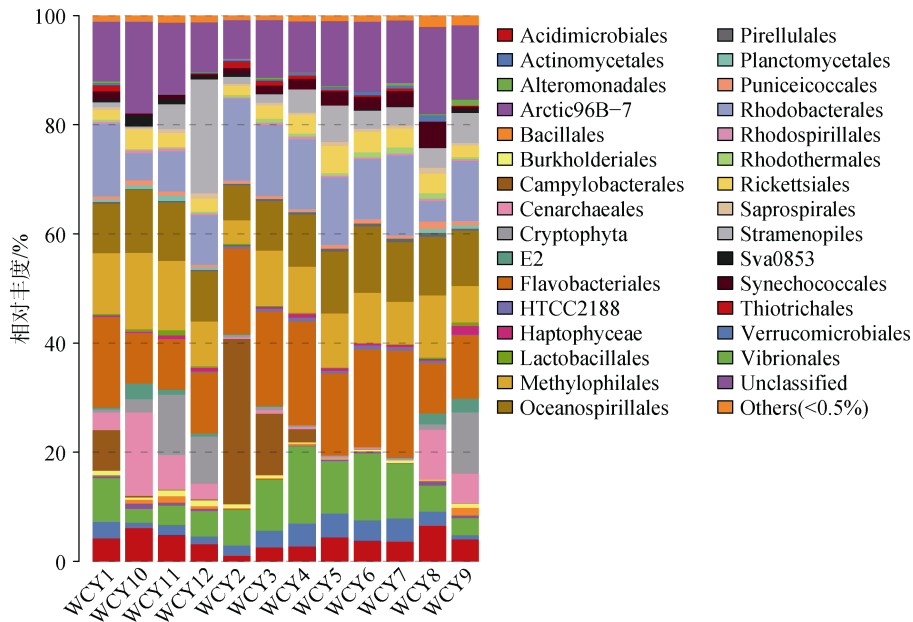


图 4 水体样品在目分类等级上的微生物组成

Fig. 4 Bacterial composition of the water column sample with respect to the order level

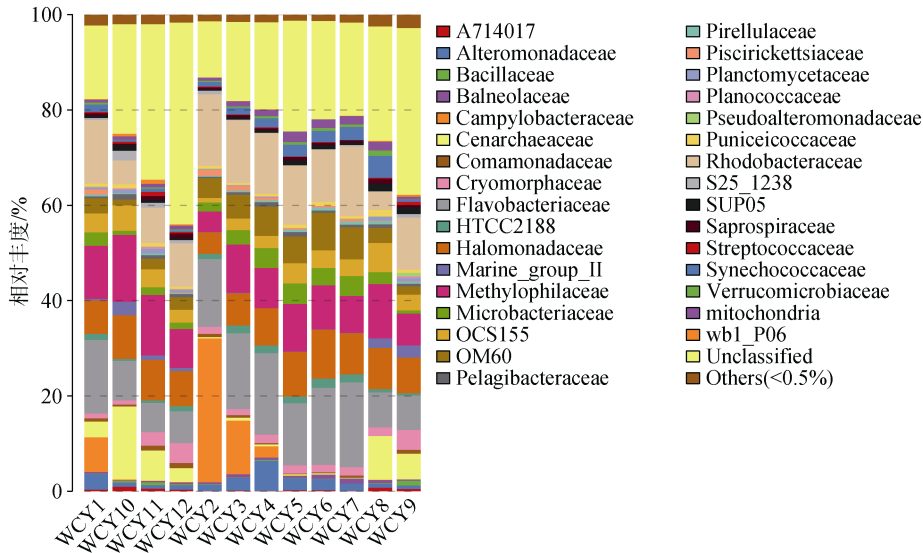


图 5 水体样品在科分类等级上的微生物组成

Fig. 5 Bacterial composition of the water column sample with respect to the family level

### 3 讨论

本研究利用 Illumina Miseq 测序平台对山东省渤海海洋保护区典型海域表层海水微生物群落特征和多样性进行了初步研究，列出了保护区海水微生物门、纲、目、科、属不同分类等级上的优势群落类型和相对丰度。虽然本次研究所采集海水样本的数量及其分布范围有限，但是 Illumina Miseq 高通量测序技术的应用为进一步对山东省渤海海洋保护区

内海水微生物资源的调查积累了一定的经验和新的技术支撑。本研究中，12 个样品在遗传距离 0.03 下的稀疏曲线已达到平台期，说明通过高通量测序技术测出的微生物包含了山东省渤海海洋保护区内水体样品中微生物的绝大部分。微生物群落特征显示，山东省渤海海洋保护区表层海水内存在大量微生物群落，并具有其独特的菌群特征和多样性。保护区内表层海水微生物在门、纲、目、科、属不同分类等级上的未分类 OUT 分别为 0.40%、1.08%、11.89%、

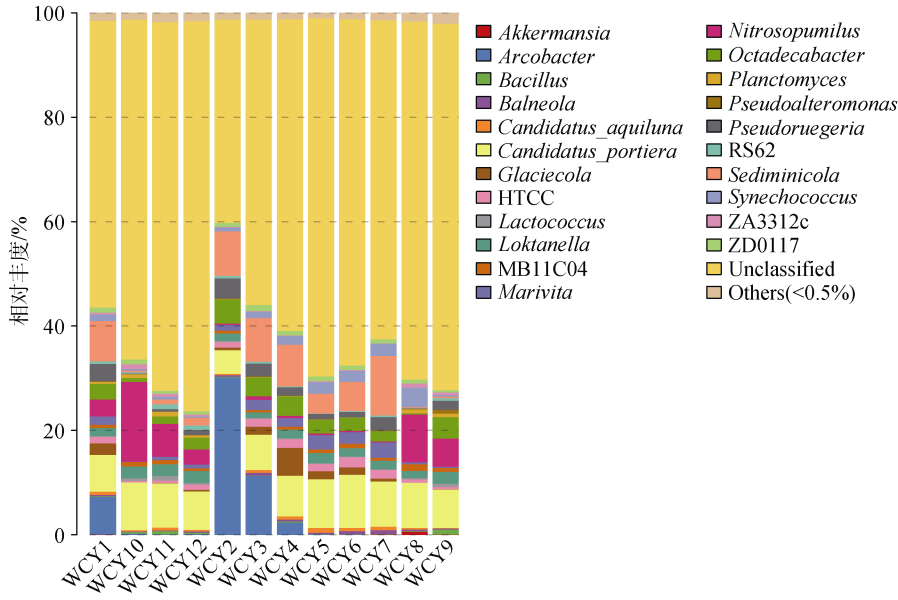


图 6 水体样品在属分类等级上的微生物组成

Fig. 6 Bacterial composition of the water column sample with respect to the genus level

表 3 样品 Alpha 多样性统计结果

Tab. 3 Statistical results of sample Alpha diversity

样品编号	Sobs 指数	Chao 指数	Ace 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	样品编号	Sobs 指数	Chao 指数	Ace 指数	Shannon 指数	Simpson 指数
WCY1	370	396.50	404.87	4.37	0.0247	WCY8	394	417.95	427.80	4.41	0.0254
WCY2	336	395.43	384.38	3.68	0.0902	WCY9	445	480.51	494.24	4.54	0.0204
WCY3	371	421.96	428.72	4.23	0.0310	WCY10	363	397.53	404.71	4.07	0.0424
WCY4	360	388.50	401.28	4.30	0.0249	WCY11	423	445.32	456.02	4.52	0.0213
WCY5	340	382.00	381.39	4.33	0.0220	WCY12	405	422.75	435.57	4.51	0.0197
WCY6	358	403.12	412.70	4.33	0.0236	平均	375.58	410.68	417.67	4.30	0.0313
WCY7	342	376.53	380.34	4.25	0.0299						

23.53%, 62.81%, 说明随着分类的细化无明确分类名称信息的群落类型所占比例增大, 这可能与测序区间、序列长度以及比对的数据库等有关。

本研究在山东省渤海海洋保护区典型海域表层海水中共检测出变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、蓝细菌门(Cyanobacteria)等 25 门, 其中变形菌门是相对丰度最高的微生物类群, 这一结果与国内外关于水体微生物多样性的很多研究相一致<sup>[20-22]</sup>。对黄海表层海水微生物多样性的研究报道显示, 其水体微生物群落主要有变形菌门、拟杆菌门、蓝细菌门、疣微菌门、放线菌门和浮霉菌门<sup>[23]</sup>。渤海与黄海表层海水微生物组成在门分类等级水平上有较高的相似性, 这可能与两者地理位置相近有关。微生物类群的相对丰度与其多样性有关, 研究中按 97%相似性定义 OTU 是因为微生物群落并不仅仅

是只含有少数高相对丰度的基因型, 而是含有大量相对独特的基因型。

Alpha 多样性是对单个样品中物种多样性的分析<sup>[24]</sup>, 包括 observed species 指数、chao 指数、ace 指数, shannon 指数以及 simpson 指数等。前面 4 个指数越大, 最后一个指数越小, 说明样品中的物种越丰富。本研究中 12 个样品 chao 平均值为 410.68, ace 平均值为 417.67, shannon 平均值为 4.30, simpson 平均值为 0.0313, 表明渤海海洋保护区内微生物多样性较高。主坐标分析(PCoA)可以展示样品间微生物多样性的差异大小, 如果两个样品距离较近, 则表示这两个样品的物种组成较相似。主坐标分析图中的一个点代表一个样品, 两个点之间的距离越近, 说明两个样品的微生物群落差异越小。本研究中 12 个取样点, 除两个取样点外的其他取样点水体微生物

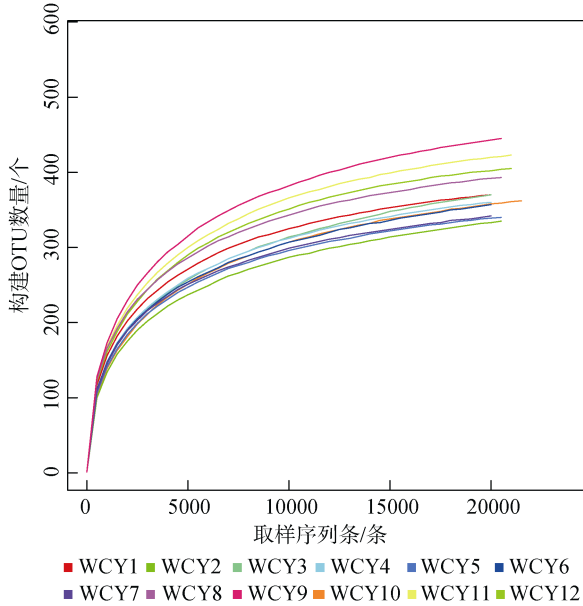


图 7 样品在遗传距离 0.03 下的稀疏曲线

Fig. 7 The rarefaction of different samples obtained at genetic distances of 0.03

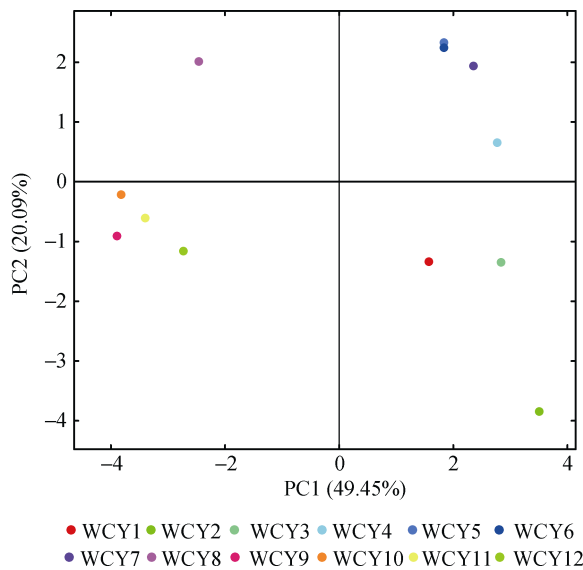


图 8 基于 OTU 数据的不同水体微生物群落的主成分分析  
Fig. 8 Principal component analysis (PCA) of all microbial communities based on OTU data

物样品不能聚集在一起, 说明渤海海洋保护区不同区域间微生物组成差异显著。

水体污染会影响其微生物群落组成与多样性<sup>[24-25]</sup>。渤海为中国内海, 山东省渤海海洋保护区距离陆地较近, 海洋微生物会由于海水的有机物污染而获得大量营养物质, 人类活动会影响微生物的群落组成及其多样性。对渤海海水微生物多样性的研究不仅有利于对其微生物群落结构的了解, 而且有助于特

殊功能微生物的发现和开发。另外, 海水温度、溶解氧和季节可能是影响渤海水体微生物群落结构特征的重要因素。有研究表明, 海洋中微生物的组成及其多样性与海水的温度、季节、深度等环境条件相关<sup>[26-28]</sup>。2008 年发生在黄海的浒苔灾害曾引起表层海水中 $\alpha$ -变形菌和蓝细菌的增加,  $\gamma$ -变形菌纲和拟杆菌的减少<sup>[23]</sup>。因此, 有关温度、溶解氧含量、浮游生物和季节等因素对渤海表层海水微生物分布和其群落结构变化的影响, 有待深入研究。

参考文献:

- [1] 张偲, 张长生, 田新朋, 等. 中国海洋微生物多样性研究[J]. 生物多样性保护, 2010, 25(6): 651-657.  
Zhang Si, Zhang Changsheng, Tian Xinpeng, et al. Study of diversities of marine microbes in China[J]. Biodiversity Conservation, 2010, 25(6): 651-657.
- [2] 王家生, 王永标, 李清. 海洋极端环境微生物活动与油气资源的关系[J]. 地球科学-中国地质大学学报, 2007, 32(6): 781-788.  
Wang Jiasheng, Wang Yongbiao, Li Qing. Potential relationship between extremophiles and hydrocarbon resources in marine extreme environment[J]. Earth Science-Journal of China University of Geosciences, 2007, 32(6): 781-788.
- [3] 余玥. 深海极端微生物正青霉(*Enpenicillium* sp.)化学成分[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2012: 1-60.  
Yu Yue. Chemical constituents of *Enpenicillium* sp. from deep-sea derived extremophile[D]. Harbin: Harbin University of Commerce, 2012: 1-60.
- [4] 詹萍, 梁静娟, 庞宗文. 产生物活性物质海洋微生物的研究进展[J]. 玉林师范学院学报(自然科学), 2007, 28(3): 71-74.  
Zhan Ping, Liang Jingjuan, Pang Zongwen. Development of study on marine microbe bioactive substance[J]. Journal of Yulin Teachers College(Natural Science), 2007, 28(3): 71-74.
- [5] 张清丽, 顾谦群, 崔承彬, 等. 海洋来源的放线菌次级生物代谢产物及其生物活性[J]. 中国海洋药物, 2004, 23(5): 49-54.  
Zhang Qingli, Gu Qianqun, Cui Chengbin, et al. Secondary metabolites of marine-derived actinomycete microbes and their bioactivities[J]. Chin J Mar Drugs, 2004, 23(5): 49-54.
- [6] 张亚鹏, 朱伟明, 顾谦群, 等. 源于海洋真菌抗肿瘤活性物质的研究进展[J]. 中国海洋药物, 2006, 25(1): 54-58.  
Zhang Yapeng, Zhu Weiming, Gu Qianqun, et al. Advances in studies of antitumor compounds from marine fungi[J]. Chin J Mar Drugs, 2006, 25(1): 54-58.

- [7] 王兴春, 杨致荣, 王敏, 等. 高通量测序技术及其应用[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(1): 109-114.  
Wang Xingchun, Yang Zhirong, Wang Min, et al. High-throughput sequencing technology and its application[J]. China Biotechnology, 2012, 32(1): 109-114.
- [8] Mardis E R. Next-generation DNA sequencing methods[J]. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2008, 9: 387-402.
- [9] Kolbert C P, Persing D H. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens [J]. Curr Opin Microbiol, 1999, 2(3): 299-305.
- [10] 刘朝军. 16SrDNA 序列测定在细菌鉴定中的应用[J]. 军医进修学院学报, 2011, 32(7): 774-776.  
Liu Zhaojun. Application of 16SrDNA sequencing for identification of bacteria[J]. J Chinese PLA Postgrad Med Sch, 2011, 32(7): 774-776.
- [11] 申丹, 焦琳琳, 常禹, 等. 黄海和渤海沿海地区生态系统健康评价[J]. 生态学杂志, 2015, 34(8): 2362-2372.  
Shen Dan, Jiao Linlin, Chang Yu, et al. Ecosystem health assessment of Yellow Sea and Bohai coastal areas[J]. Chinese Journal of Ecology, 2015, 34(8): 2362-2372.
- [12] Wang Liping, Zheng Binghui, Lei Kun. Diversity and distribution of bacterial community in the coastal sediments of Bohai Bay, China [J]. Acta Oceanologica Sinica, 2015, 34(10): 122-131.
- [13] Liu Jiwen, Liu Xiaoshou, Wang Min, et al. Bacterial and archaeal communities in sediments of the north chinese marginal seas [J]. Microbial Ecology, 2015, 70: 105-117.
- [14] Yang Fenglong, Yang Jingshui, Deng Chunping, et al. Bacterial communities and their hydrocarbon bioremediation potential in the Bohai Sea, China[J]. Marine Ecology Progress Series, 2015, 538: 117-130.
- [15] Zhang Jiaojiao, Ma Guannan, Deng Yuangao, et al. Bacterial diversity in Bohai Bay solar saltworks, China[J]. Current Microbiol, 2016, 72(1): 55-63.
- [16] Sun Jinsheng, Guo Fei, Geng Xuyun, et al. Seasonal changes and diversity of bacteria in Bohai Bay by RFLP analysis of PCR-amplified 16S rDNA gene fragments[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 27(2): 275-284.
- [17] Magoc T, Salzberg S. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [18] Edgar R C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. Nature Methods, 2013, 10(10): 996-998.
- [19] Patrick D S, Sarah L W. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(23): 7537-7541.
- [20] Sogin M L, Morrison H G, Huber J A. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere" [J]. PNAS, 2006, 103(32): 12115-12120.
- [21] Murray A E, Grzymiski J J. Diversity and genomics of antarctic marine micro-organisms[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2007, 362(1488): 2259-2271.
- [22] Zeng Y X, Zou Y, Grebmeier J M. Culture-independent and-dependent methods to investigate the diversity of planktonic bacteria in the northern Bering Sea[J]. Polar Biology, 2012, 35(1): 117-129.
- [23] Guo Cong, Li Fuchao, Jiang Peng, et al. Bacterial diversity in surface water of the Yellow Sea during and after a green alga tide in 2008 [J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2011, 29(6): 1147-1154.
- [24] Beazley M J, Martinez R J, Rajan S. Microbial community analysis of a coastal salt marsh affected by the deepwater horizon oil spill[J]. PLoS One, 2012, 7(7): 1-13.
- [25] 李磊, 蒋玫, 沈新强, 等. 长江口及邻近海域水体中石油烃分布特征及其污染评价[J]. 环境化学, 2014, 33(8): 1366-1372.  
Li Lei, Jiang Mei, Shen Xinqiang, et al. Spatial distribution and pollution analysis of the petroleum hydrocarbons in water from the Changjiang Estuary and its adjacent areas[J]. Environmental Chemistry, 2014, 33(8): 1366-1372.
- [26] 白佳玉, 马学广. 中国海洋入侵种的大海洋生态系统空间分布[J]. 海洋环境科学, 2015, 34(23): 347-353.  
Bai Jiayu, Ma Xueguang. Spatial distribution of marine invasive species in the large marine ecosystems of China[J]. Marine Environmental Science, 2015, 34(23): 347-353.
- [27] 刘晓辉, 王健鑫, 王帅兵, 等. 长江口及邻近海域表层海水细菌多样性及群落结构[J]. 海洋与湖沼, 2015, 46(6): 1531-1541.  
Liu Xiaohui, Wang Jianxin, Wang Shuaibing, et al. Bacterial diversity and community structure in surface seawater of Changjiang River estuary and adjacent areas[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2015, 46(6): 1531-1541.
- [28] Ning X, Lin C, Su J. Long-term changes of dissolved oxygen, hypoxia, and the responses of the ecosystems in the East China Sea from 1975 to 1995[J]. Journal of Oceanography, 2011, 67(1): 59-75.



# Analysis of microbial community diversity in the Bohai Sea marine protected areas of the Shandong Province

FU Xin-hua<sup>1</sup>, LIU Guo-ning<sup>2</sup>, HE Jian-long<sup>3</sup>, MA Yuan-qing<sup>3</sup>, SONG Xiu-kai<sup>3</sup>, MENG Li<sup>1</sup>, JIA Qing-mei<sup>1</sup>

(1. Weifang Medical University, Weifang 261053, China; 2. Weifang Marine Environment Monitoring Centre, Weifang 261041, China; 3. Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Weifang 264006, China)

**Received:** Mar. 29, 2016

**Key words:** Bohai Sea marine protected areas; microbial community; diversity analysis

**Abstract:** Marine microbes play an essential role in marine ecosystems. To systematically understand microbial community diversity in the Bohai Sea marine protected areas of the Shandong Province, we investigated the microbial community composition and diversity of 12 water samples using the Illumina high-throughput sequencing and bioinformatics analysis technology. Results for the 12 sampling points showed that the number of relative microbial groups included 25 phyla, 56 classes, 103 orders, 163 families, and 227 genera. Dominant groups at the phylum, class, order, family and genus classification levels were Proteobacteria (57.95%), Alphaproteobacteria (21.88%), Flavobacteriales (14.31%), Rhodobacteraceae (10.68%), and *Candidatus portiera* (7.94%), respectively. These findings suggest that Bohai Sea marine protected areas in the Shandong Province brine have high levels of microbial diversity. This diversity provides basic information and knowledge to further understand the relationship between marine microbial diversity and protection of oceanic environment ecology.

(本文编辑: 谭雪静)