

网箱养殖海区底泥产芽孢细菌多样性*

温 丹 张德民 初 航

(宁波大学生命科学与生物工程学院 “应用海洋生物技术”教育部重点实验室 宁波 315211)

提要 采用培养与 16S rRNA 基因序列比对的方法,对海水网箱养殖区底泥中的可培养细菌进行研究。结果表明,网箱正下方的产芽孢细菌比例高达 50%,随着离网箱距离的增加,产芽孢细菌的比例明显降低,200m 远时,其比例降至 17%。从 3 个采样点分离纯化出 91 株产芽孢细菌,对其菌落形态、菌体形态的研究和部分菌株 16S rRNA 基因的 DGGE 带型和序列分析表明,91 株产芽孢细菌中,有 85 株属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)的 10 个种,25 个发育型;6 株属于盐芽孢杆菌属(*Halobacillus*)的 1 个种,3 个发育型。芽孢杆菌属的 *B. marisflavi*、*B. baekryungensis*、*B. aquamaris*、*B. pumilu* 等 4 个种为优势类群。此外,接近半数的产芽孢细菌能代谢含硫化合物,部分菌株能够还原硝酸盐或分解无机磷化合物,仅有 3 株菌具有亚硝酸盐还原作用。

关键词 产芽孢细菌,海水网箱养殖,底泥,16S rRNA 基因,多样性

中图分类号 X172

产芽孢细菌广泛分布于土壤(张华勇等,2001)、水体和海洋(Erin *et al.*,2007)等环境中,在工业、农业、医学和科学研究领域具有广泛的应用价值。目前对产芽孢细菌的研究主要集中在对其工业应用价值、功能菌株的筛选、有机物的代谢能力等方面(金世芳等,1997;刘真等,2007)。而对于该类群在环境中的分布及功能研究较少,越来越多的证据表明产芽孢细菌具有重要的生态功能,在有机物降解、碳氮磷循环中发挥着重要作用。本文在对海水网箱养殖区底泥中总异养细菌分析的基础上,利用菌落菌体特征和 16S rRNA 基因序列比对对底泥中产芽孢细菌的种群组成进行了深入分析,并研究了其转化含氮、含磷、含硫化合物的性质,以期揭示其种群组成与近海养殖活动之间的关系,为开发和利用产芽孢细菌资源奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 样品的采集

本次泥样来自浙江省奉化市莼湖镇铜照村大黄

鱼网箱养殖区,中心地理坐标为:29°32'N、121°33'E。采样时间为:2006年11月26日中午11:00—13:00。共设置了3个采样点,编号分别为A、B、C,其中A点位于网箱的正下方,B点位于距养殖区网箱50m处,C点位于距网箱200m处。按照《海洋调查规范》(国家海洋局,2007)中的要求,用深水采泥器采集三个点的泥样。将各样品置于黑暗、4℃的环境中保存,4h内进行后续实验。

1.2 总异养细菌计数

总异养细菌的计数采用CFU法,准确称取3g泥样,置于装有27ml无菌生理盐水的锥形瓶中(内含玻璃珠),充分摇匀,进行10倍系列稀释,共3个稀释度(分别为 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4}) (金珊等,1999),取100 μ l涂布于Zobell 2216E培养基平板上,每个稀释度做3个平板,30℃恒温培养24h后计数。

1.3 产芽孢细菌的分群研究

从上述平板上随机挑取菌株进行纯化,其中A点和B点各挑取80株,C点挑取128株。参照常见细菌系统鉴定手册(东秀珠等,2001)对已纯化的菌株进

* 浙江省自然科学基金人才培养项目,R305333号;长江学者和创新团队发展计划(PCSIRT)资助,“高效海水养殖与灾害响应机制”,IRT0734号;国家科技基础条件平台建设项目(2005DKA2120609)资助。温丹,硕士研究生,E-mail:wenning@163.com

通讯作者:张德民,博士,教授,E-mail:zhangdemin@nbu.edu.cn

收稿日期:2008-03-27,收修改稿日期:2008-05-19

行芽孢染色, 筛选出产芽孢细菌并观察芽孢形态, 同时进行革兰氏染色, 观察菌体形态并记录。根据菌落特征、菌体形态和芽孢形态对这些菌株进行分群研究。

1.4 基因组 DNA 的提取

细菌基因组 DNA 的提取方法参照文献(张德民等, 2000)进行。

1.5 PCR-DGGE 分析

以基因组 DNA 作为模板进行 PCR 扩增, 采用细菌通用引物 GC+341F 和 518R 对 16S rDNA 的 V3 区进行扩增, 引物序列分别为: GC+341F, 5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCC CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'; 518R, 5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'。扩增产物长约 230bp, 用于 DGGE 分析。采用细菌通用引物 27F 和 1541R 扩增 16S rDNA 的序列, 扩增产物约 1400 bp, 用于测序。引物序列为 27F, 5'-AGA PTT TGA TCC TGG CTC AG-3', 1541R, 5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CT-3'。

PCR 反应体系为 50 μ l, 包括: 模板 50ng、正向及反向引物 4 μ mol/L、dNTP 200 μ mol/L, 10 \times buffer(含 Mg²⁺) 5 μ l, Taq DNA 聚合酶 1U(TaKaRa), 补灭菌的超纯水到 50 μ l。反应条件为: 94 5min; 前 10 个循环为 94 1min; 65—60 1min; 72 30s, 降落梯度为 0.5。后 18 个循环为 94 1min; 60 1min; 72 30s; 最后 72 延伸 5min。

变性梯度凝胶电泳(DGGE)在 DCode system (Bio-Rad)上进行, 采用 8%聚丙烯酰胺凝胶, 变性梯度为 40%—70%, 每个点样孔点 8 μ l PCR 产物, 在 60、180V 的条件下电泳 6h。电泳后, 采用银染法进行染色, 并用凝胶成像系统观察电泳条带并拍照。

1.6 16S rDNA 序列的测定及系统发育学分析

采用通用引物 27F 和 1541R, PCR 扩增细菌的 16S rDNA 全序列, 用 UNIQ-10 柱式通用 DNA 纯化试剂盒(上海生工)纯化 PCR 产物, 送上海生工测序。

所得序列提交到 GenBank 数据库中, 并用 BLAST 程序进行同源性比较, 利用 FASTGROUP 程序(http://biome.sdsu.edu/fastgroup/fg_tools.htm)进行相似性分析, 利用 MEGA4 软件构建系统发育树。本

实验中所分离的产芽孢细菌的 16S rDNA 序列登录号为: EU621382 — EU621389, EU661786 — EU661815, EU746413 — EU746427, EU809474 — EU809481, FJ447539。

1.7 产芽孢细菌部分生理生化特性分析

参照常见细菌系统鉴定手册(东秀珠等, 2001)测定各采样点产芽孢细菌的生态功能, 包括硝酸盐还原、亚硝酸盐还原能力、利用无机硫产 H₂S 能力和降解无机磷化合物的能力。

2 结果与分析

2.1 总异养菌的数量及产芽孢细菌的分布情况

对各采样点泥样中的异养菌进行计数, 结果(表 1)显示, 距网箱 50m 处(B 点)异养菌的数量最多, 达 1.60 $\times 10^5$ CFU/ml, 而距网箱 200m 处(C 点)的数量最低, 为 8 $\times 10^4$ CFU/ml。网箱正下方(A 点)则介于二者之间, 为 1.14 $\times 10^5$ CFU/ml。但三个采样点之间差别不大。

作者从三个采样点随机挑取了 288 株菌, 通过芽孢染色鉴定出 91 株产芽孢细菌。这些产芽孢细菌在各采样点的分布状况及所占的比例见表 1, 其中 A 点的 80 株异养菌中, 有产芽孢细菌 41 株, 占该点总数的 51.3%; B 点的 80 株异养菌中, 有产芽孢细菌 28 株, 占该点总数的 35.0%; C 点的 128 株异养菌中, 有产芽孢细菌 22 株, 占该点总数的 17.2%。因此可以认为海水网箱养殖区泥样中产芽孢细菌的比例与距网箱的距离存在明显的相关性。

2.2 产芽孢细菌的分群研究

根据产芽孢细菌的菌落大小、表面形态、边缘、质地和光泽等特征将其初步划分为 3 个类群, 即 类群、 类群和 类群。在这三个类群中, 类群最大, 囊括了 60 株菌, 菌落特征为: 圆形菌落, 边缘整齐, 表面凸起, 呈奶油状质地, 有光泽; 类群为 29 株, 菌落特征为: 圆形菌落, 边缘整齐, 表面平展, 呈奶油状质地, 有光泽; 类群只有 2 株, 菌落特征为: 圆形菌落, 边缘呈波轮状, 表面平展, 呈奶油状质地,

表 1 海水养殖区底泥异养菌及产芽孢细菌的数量

Tab.1 Amount of heterotrophic bacteria and spore-forming bacteria in marine fish-cage sediment

采样点	异养菌数量(CFU/ml)	挑取异养菌的数量	产芽孢细菌的数量	产芽孢细菌所占的比例(%)
A	1.14 $\times 10^5$	80	41	51.3
B	1.60 $\times 10^5$	80	28	35.0
C	8.00 $\times 10^4$	128	22	17.2

有光泽。

芽孢染色结果显示, 全部 91 株产芽孢细菌的芽孢可分成椭圆型和卵圆形两类; 革兰氏染色结果又将之分为长杆、中杆、短杆和球杆。根据芽孢染色及革兰氏染色的结果将上述三个类群的产芽孢细菌分成 13 个亚群(表 2)。 类群包括 6 个亚群: 芽孢椭圆的长杆状细菌, 芽孢椭圆的中杆状细菌, 芽孢椭圆的短杆状细菌, 芽孢椭圆的球杆状细菌, 芽孢卵圆形的短杆细菌, 芽孢卵圆形的球杆状细菌; 类群包括 5 个亚群: 芽孢椭圆的中杆状细菌, 芽孢椭圆的短杆状细菌, 芽孢椭圆的球杆状细菌, 芽孢卵圆形的短杆状细菌, 芽孢卵圆形的球杆状细菌; 类群 2 株产芽孢细菌可分成 2 个亚群, 即芽孢椭圆的短杆状细菌和芽孢卵圆形的球杆状细菌。

从表 2 可以看出, 各采样点产芽孢细菌的菌落及

菌体形态都呈现出多样性。在 和 两个菌落类群中, 芽孢椭圆的短杆状细菌都是优势亚群, 其数量明显多于其余 11 个亚群, 芽孢椭圆的短杆状细菌在 类群中有 43 株, 占总菌数的 47.2%, 在 类群中共 22 株, 占总菌数的 24.2%, 两者合计占 71.4%, 其余 11 个类群合计占 28.4%。

2.3 产芽孢细菌 16S rDNA 的 DGGE 指纹及序列分析

2.3.1 PCR-DGGE 指纹分析 为了避免重复测序, 减少工作量, 降低成本, 在上述分群研究结果的基础上, 作者首先对这批产芽孢细菌的 16S rDNA 进行了 PCR-DGGE 指纹分析, 将同一菌落类群的菌株放在同一板胶上进行 DGGE, 带型完全一致的菌株看作同一个发育型(宫曼丽等, 2004), 只测定其中 1 个代表菌株的序列。图 1 是筛除相同发育型的一个例子, 作者选取 类群中芽孢椭圆的短杆状细菌进行 PCR-

表 2 产芽孢细菌的菌落菌体形态分群
Tab.2 Grouping of the spore-forming bacteria in morphology of colony and cell

菌落类群	芽孢形态	菌体形态及大小	产芽孢细菌的数量			合计
			A	B	C	
	椭圆	长杆状 $[(0.5-0.7) \times (5.2-10) \mu\text{m}]$	2	0	0	60
		中杆状 $[(0.5-0.8) \times (3.0-5.2) \mu\text{m}]$	1	0	0	
		短杆状 $[(0.5-1.0) \times (1.2-3.0) \mu\text{m}]$	19	12	12	
		球杆状 $[(1.5-2.0) \times (1.5-2.0) \mu\text{m}]$	2	1	3	
	卵圆形	短杆状 $[(0.5-1.0) \times (1.2-3.0) \mu\text{m}]$	1	2	1	
		球杆状 $[(1.5-2.0) \times (1.5-2.0) \mu\text{m}]$	1	2	1	
	椭圆	中杆状 $[(0.5-0.8) \times (3.0-5.2) \mu\text{m}]$	1	2	0	29
		短杆状 $[(0.5-1.0) \times (1.2-3.0) \mu\text{m}]$	11	8	3	
		球杆状 $[(1.5-2.0) \times (1.5-2.0) \mu\text{m}]$	1	0	0	
	卵圆形	短杆状 $[(0.5-1.0) \times (1.2-3.0) \mu\text{m}]$	0	1	1	
		球杆状 $[(1.5-2.0) \times (1.5-2.0) \mu\text{m}]$	0	0	1	
	椭圆	短杆状 $[(0.5-1.0) \times (1.2-3.0) \mu\text{m}]$	1	0	0	2
		卵圆形	球杆状 $[(1.5-2.0) \times (1.5-2.0) \mu\text{m}]$	1	0	
合计			41	28	22	91

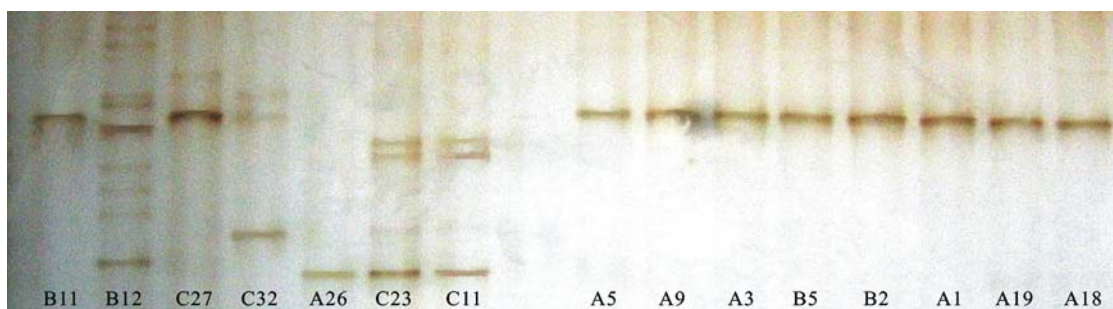


图 1 芽孢椭圆的短杆状细菌 16S rDNA 的 DGGE 图谱

Fig.1 PCR-DGGE profiles of 16S rDNA for some short rod and elliptical spore bacteria

DGGE 分析, 由图 1 可以看出, 在该亚群中, 菌株 B11、C27、A5、A9、A3、B5、B2、A1、A19、A18 等 10 株细菌的 DGGE 带型和数目完全一致, 因此可以看成是同一发育型, 选择其中之一进行测序。另外, C11 和 C23 的带型也完全一致, 同样选择其中之一测序, 其它菌株的分析以此类推。这板胶上共有 15 株菌, 经过 DGGE 筛选, 只需对筛选出的 5 个代表菌株进行测序即可, 从而节约了测序成本。最后将 91 株产芽孢细菌大约分成 64 个 DGGE 带型。

2.3.2 系统发育学分析 对上述不同 DGGE 带型的代表菌株的 16S rDNA 进行测序, 然后用这些菌株的序列做一个前导树, 由树上可看到, 64 个序列中只有 28 个序列有差异, 代表了 28 个不同的发育型, 将这 28 条序列提交到 GenBank 数据库中, 找出其最相近的序列所对应的种属(表 3)。并将这些序列与其对应种的典型菌株的序列进行同源性分析, 构建系统发育树(图 2)。通常情况下, 如果两个菌株的 16S rDNA 序列同源性 97%, 可以认为属于同种细菌。据此, 全部 91 株产芽孢细菌分成芽孢杆菌属(*Bacillus*)和盐芽孢杆菌属(*Halobacillus*)2 个属。其中芽孢杆菌属有 85 株, 又分属于 10 个种(图 2, Cluster1-Cluster9 和 Cluster11): 即 *B. marisflavi*、*B. baekryungensis*、*B. aquaemaris*、*B. pumilu*、*B. firmus*、*B. megaterium*、*B. catenulatus*、*B. vietnamensis*、*B. cereus*、*B. halodenitrificans*; 盐芽孢杆菌属(Cluster10)的 6 株归为 *H. blutaparonensis* 1 个种。从表 3 可以看出, 在养殖海

区底泥 11 种产芽孢细菌中, *B. marisflavi* (Cluster3)、*B. baekryungensis* (Cluster11)、*B. aquaemaris* (Cluster2) 和 *B. pumilu* (Cluster7)等 4 个种为优势种, 占菌株总数的比例均超过 10%, 在 13.2%—27.5%之间; *B. marisflavi* 数量最多, 共 25 株, 占总菌株数的四分之一以上。

从图 2 中还可看出, 有 5 个种包含 2 个或 2 个以上发育型。种内发育型分布情况见表 4。其中 *B. aquaemaris* 包括 6 个发育型; *B. marisflavi* 和 *B. baekryungensis* 各包括 5 个发育型; *B. vietnamensis* 和 *H. blutaparonensis* 各包括 3 个发育型。从发育型水平上看, 数量最具优势的发育型有 2 个: *B. marisflavi* 的发育型 *B.ma.-1*, 共 15 株, 占总菌株数的 16.5%; *B. pumilu* 的发育型 *B.pu.-1*, 共 12 株, 这一发育型囊括了该类群中的所有菌株, 占总菌株数的 13.2%; 数量较多的发育型有 5 个: *B. firmus* 中一个发育型有 8 个菌株, *B. aquaemaris* 中的发育型 *B.aq.-5*(5 个菌株), *B. marisflavi* 中的 *B.ma.-2*(5 个菌株), *B. baekryungensis* 中的 *B.ba.-1*(6 个菌株)和 *B.ba.-2*(5 个菌株), 各自占总菌株数量的比例在 5.5%—8.8%之间。

不同类群的产芽孢细菌在养殖区域底泥中的分布也具有一定的偏好性。如 *H. blutaparonensis* 在距网箱 50m 处有 5 株, 而在网箱正下方却没有出现。*B. marisflavi* 主要集中在网箱正下方及距网箱 50m 处的表层泥样里, *B. aquaemaris* 主要集中在网箱正下方和网箱 200m 处, 而 *B. baekryungensis* 和 *B. pumilu* 类群

表 3 养殖网箱底泥中产芽孢细菌的物种多样性
Tab.3 Diversity of spore-forming bacteria in sediments below fish-cage

最相近种属名称	代表菌株	最相近种属 参比序列	相似性(%)	菌株数量			
				A	B	C	合计
<i>B. marisflavi</i>	B15	AF483624 (T)	98	14	10	1	25
<i>B. baekryungensis</i>	A30	AF541965 (T)	98	7	6	3	16
<i>B. aquaemaris</i>	A21	AF483625 (T)	98	5	1	6	12
<i>B. pumilu</i>	B9	AF234854 (T)	98	4	3	5	12
<i>B. firmus</i>	A8	BAC16SRR03 (T)	98	6	2	0	8
<i>B. megaterium</i>	C17	AB334764	100	0	1	3	4
<i>B. catenulatus</i>	C23	AY523411 (T)	98	1	0	2	3
<i>B. vietnamensis</i>	A22	AB099708 (T)	99	2	0	1	3
<i>B. cereus</i>	A6	AB271745 (T)	98	1	0	0	1
<i>B. halodenitrificans</i>	A26	AB021186	99	1	0	0	1
<i>H. blutaparonensis</i>	C30	DQ058358 (T)	98	0	5	1	6
合计				41	28	22	91

注: “B.”为 *Bacillus*, “H.”为 *Halobacillus*, T 代表典型菌株

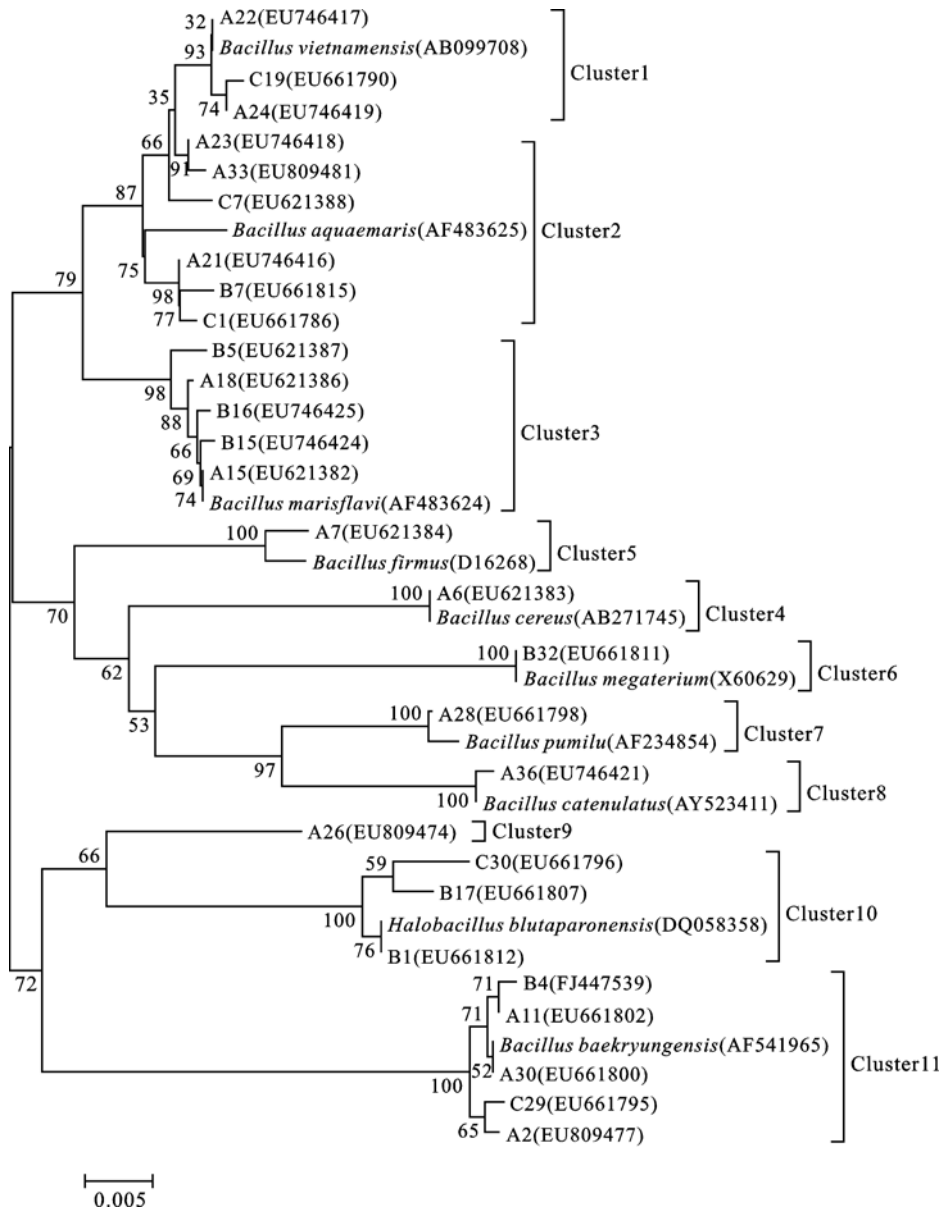


图 2 底泥中产芽孢细菌的 16S rDNA 系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA fragment of representative strains of spore-forming bacteria

的细菌在各点的分布状况差异不大。这是规律性的分布特性, 还是由于分析样本太小而出现的偶然性, 有待进一步工作证实。

2.4 产芽孢细菌部分生理生化特性分析

本实验还测定了产芽孢细菌代谢含氮、含硫、含磷化合物的能力。由表 5 可知, 在分离的 91 株产芽孢菌中, 有超过半数的细菌能够利用无机硫化物(硫代硫酸钠)产 H_2S , 且越接近网箱处, 这一作用越加明显; 有 15 株菌参与无机磷化合物的代谢; 有 12 株细菌具有硝酸盐还原功能, 仅有 3 株细菌具有亚硝酸盐还原能力, 并且这 3 株菌都来自网箱正下方。从

物种的水平上分析, 进行硝酸盐还原的类群主要为 *B. firmus*、*B. pumilus* 和 *B. marisflavi*, 进行亚硝酸盐还原的 3 株菌均属于 *B. firmus*; 降解无机磷化合物的类群主要为 *B. marisflavi* 和 *B. aquaemaris*; 分解无机硫产 H_2S 的主要为 *B. marisflavi*、*B. pumilus*、*B. aquaemaris*、*B. firmus* 等类群。

3 讨论

传统的细菌分类鉴定是一项复杂而细致的工作, 首先需对待鉴定的菌株进行分离纯化, 然后对其菌落特征、菌体形态、生理生化反应、次级代谢产物、生长条件、脂类组成、核酸性质等几十项指标进行描述和试验, 步骤十分繁琐。并且这些指标特征界限不清或不稳定, 受人为因素影响较大, 往往使实验陷入窘境, 使研究工作事倍功半。因此, 本实验室尝试在进行细菌多样性的研究时, 只做传统鉴定中最直接、最简单的菌落菌体形态特征的描述, 并以此作为初步分类的依据, 绕开繁杂的后续鉴定, 直接从分子层

面进行多样性分析。钱丽君等(2007)采用传统的菌落菌体形态分类与 PCR-DGGE 相结合的方法, 研究了三疣梭子蟹养殖塘底泥中细菌的多样性, 基本不丢失细菌多样性的同时, 大大减轻了工作量。这里作者继续用菌落菌体特征、DGGE 和测序相结合的方法研究了养殖海区产芽孢细菌的多样性。根据菌落菌体形态, 将这批产芽孢细菌分成 3 大类群 13 个亚群; 在分群基础上, PCR-DGGE 分析又将其进一步分成 64 种条带类型; 然后对不同条带类型菌株的测序及系统发育学分析, 确定这些产芽孢细菌分属于 2 个属的 11 个种(表 3 和图 2), 共有 28 个系统发育型。

表4 产芽孢细菌种内发育型的菌株数量分布
Tab.4 Distribution of intra-species phylotypes of spore-forming bacteria

最相近种	发育型	代表菌株	与最相近种的相似性(%)	菌株数量
<i>B. aquaemaris</i>	<i>B.aq.-1</i>	A21	98.6	3
	<i>B.aq.-2</i>	A23	98.4	1
	<i>B.aq.-3</i>	A33	98.3	1
	<i>B.aq.-4</i>	B7	98.3	1
	<i>B.aq.-5</i>	C1	98.6	5
	<i>B.aq.-6</i>	C7	98.0	1
<i>B. marisflavi</i>	<i>B.ma.-1</i>	A18	99.5	15
	<i>B.ma.-2</i>	B15	99.5	5
	<i>B.ma.-3</i>	B5	99.0	2
	<i>B.ma.-4</i>	B15	99.5	1
	<i>B.ma.-5</i>	B16	99.8	1
<i>B. baekryungensis</i>	<i>B.ba.-1</i>	A30	100.0	6
	<i>B.ba.-2</i>	A11	99.8	5
	<i>B.ba.-3</i>	B4	99.7	1
	<i>B.ba.-4</i>	C29	99.1	1
	<i>B.ba.-5</i>	A2	99.3	3
<i>B. vietnamensis</i>	<i>B.vi.-1</i>	A22	99.7	1
	<i>B.vi.-2</i>	A24	99.4	1
	<i>B.vi.-3</i>	C19	99.4	1
<i>H. blutaparonensis</i>	<i>H.bl.-1</i>	B1	100.0	3
	<i>H.bl.-2</i>	B17	99.5	2
	<i>H.bl.-3</i>	C30	98.4	1
<i>B. pumilu</i>	<i>B.pu.-1</i>	B9	99.4	12

注: 与最相近种的相似性(%)是指不同发育型代表菌株与所属种内最相近发育型菌株序列比对的结果

王亚南等(2004a, b, c)发现在海水养殖环境的底泥中芽孢杆菌属细菌占有优势地位, 作者的工作也证实了这点。并且表明网箱正下方底泥中产芽孢细菌的比例最高, 随着距网箱距离的增加, 底泥中产芽孢细菌的比例呈现出递减趋势。也就是说, 产芽孢细菌的比例与距网箱的距离存在明显的相关性。这可能与产芽孢细菌的生态功能有关。研究发现, 目前分离的产芽孢细菌绝大多数都能产生胞外酶, 分泌的酶类

已达到近 30 种(刘秀花, 2007), 研究较多的主要有中性和碱性蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶等。作者的研究结果(待发表)也显示, 在海水养殖环境中, 细菌分泌蛋白酶的活性较强, *Bacillus* 和 *Vibrio* 能分泌多种胞外酶, 且特定浓度的有机物对细菌分泌胞外酶具有一定的刺激作用。这表明产芽孢细菌在网箱底泥有机物降解活动中发挥极其重要的作用。随着养殖动物的残饵、粪便和排泄物的沉积, 网箱下方沉积物中聚集着大量的有机物。这些有机污染物由网箱正下方向外横向扩散(Aguado *et al*, 2004; Yokoyama, 2003), 形成有机污染浓度梯度, 并且离网箱越远, 其降解的时间可能越长, 降解程度可能也越高。作者推测产芽孢细菌在养殖区不同采样点底泥的分布差异与底泥中有机质的浓度梯度和组成差异相关。

产芽孢细菌中具有代谢含硫化合物能力的菌株比例很高, 可能表明其在小分子含硫化合物代谢中也发挥较大作用, 但代谢含氮含磷无机化合物的菌株比例较低, 可能表明, 产芽孢细菌对小分子氮磷物质的转化作用不大。但个别菌株可能例外, 如数量占优势的 *B. marisflavi* 类群, 在该类群中, 有一半以上的菌株具有代谢底泥中含氮、含磷、含硫的化合物的能力。由此推测, 产芽孢细菌所分泌的胞外酶是有机物降解的一大动力, 在有机质丰富的网箱底部聚集着大量的产芽孢细菌, 它们是维持养殖区物质循环的关键所在, 对维持养殖区的生态平衡具有重要作用。可以预测, 产芽孢细菌在海洋环境修复和开发海水养殖微生态制剂等方面具有重要的应用前景。这些芽孢杆菌有很大一部分可以代谢含硫化合物产生 H_2S , 或是具有硝酸盐还原功能。

值得注意的是, 作者发现, 产芽孢细菌的 16S rDNA 异质性(同一细胞内的不同拷贝的 16S rRNA 基因不同)出现频率很高, 尤其是 *B. aquaemaris*, 该类群菌株的 16S rDNA 的 DGGE 图谱和测序图谱无一例外的表现出异质性, 这些异质性的出现是否也具有特定的生态功能, 值得深入研究。

表5 产芽孢细菌代谢无机氮、磷、硫化合物的比例
Tab.5 Use of compounds containing N, P, or S by spore-forming bacteria

采样点	还原硝酸盐菌株的比例(%)	还原亚硝酸盐菌株的比例(%)	降解无机磷菌株的比例(%)	产 H_2S 菌株的比例(%)
A	17.1	7.3	9.8	56.1
B	10.7	0	25.0	53.6
C	9.1	0	18.2	36.4

致谢: 宁波大学 2004 级学生陶敏华和 2006 级学生崔萌参与部分实验工作, 谨致谢忱。

参 考 文 献

- 王亚南, 王保军, 戴 欣等, 2004a. 近海养虾场底泥中产芽孢细菌的生态特征. 应用与环境生物学报, 10(4): 484—488
- 王亚南, 彭志英, 2004b. 海水养虾场底泥中产 H₂S 的细菌的特征. 华南理工大学学报(自然科学版), 32(8): 89—92
- 王亚南, 彭志英, 刘双江, 2004c. 养殖场底泥中芽孢杆菌属细菌的生态学研究. 湛江海洋大学学报, 24(4): 23—27
- 东秀珠, 蔡妙英, 2001. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 353—378
- 刘 真, 邵宗泽, 2007. 南海深海沉积物烷烃降解菌的富集分离与多样性初步分析. 微生物学报, 47(5): 869—873
- 刘秀花, 2007. 芽孢杆菌生物学及其应用. 开封: 河南大学出版社, 12—13
- 张华勇, 李振商, 2001. 土壤芽孢杆菌及其资源的持续利用. 土壤, 2: 92—97
- 张德民, 黄志勇, 杨惠芳等, 2000. 几株红假单胞菌属细菌的表现特征及其遗传多样性研究. 微生物学报, 40(3): 229—236
- 国家海洋局, 2007. 《海洋调查规范第 6 部分: 海洋生物调查》(GB12763.6-2007). 北京: 中国标准出版社, 3—5
- 金 珊, 王国良, 薛良义等, 1999. 海水网箱养殖水域异养细菌和弧菌的数量动态. 海洋渔业, 4: 154—156
- 金世芳, 邱晓力, 王海玲, 1997. 芽孢杆菌碱性蛋白酶工业废水对河流的污染与防治. 浙江农业大学学报, 23(1): 1—6
- 宫曼丽, 任南琪, 邢德峰, 2004. DGGE/TGGE 技术及其在微生物分子生态学中的应用. 微生物学报, 44(6): 845—848
- 钱丽君, 张德民, 徐小红, 2007. 应用 DGGE 分析三疣梭子蟹养殖塘底泥细菌的多样性. 水产学报, 31(2): 204—210
- Aguado Gimenez Felipe, Gareia Gareia Benjamim, 2004. Assessment of some chemical parameters in marine sediments exposed to offshore cage fish farming influence: a pilot study. Aquaculture, 242: 283—295
- Erin A Gontang, William Fenical, Paul R Jensen, 2007. Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. Applied and Environmental Microbiology, 73(10): 3272—3282
- Yokoyama Hisashi, 2003. Environmental quality criteria for fish farms in Japan. Aquaculture, 226: 45—56

DIVERSITY OF SPORE-FORMING BACTERIA IN MARINE SEDIMENTS BELOW FISH-CAGE

WEN Dan, ZHANG De-Min, CHU Hang

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo, 315211)

Abstract Spore-forming bacteria have been widely studied for their capability to secrete various extracellular enzymes such as proteases, amylase etc., but less for their distribution and ecological roles in natural environment. The diversity of spore-forming bacteria in marine sediments of cage culture area were investigated in this paper. Results indicate that the proportion of spore-forming bacteria in sediment just below cage is as much as 50% of culturable heterotrophic bacteria. Distant from cage, the proportion of spore-forming bacteria reduces significantly. At a place 200m distant, the proportion dropped to 17%. Ninety one strains of spore-forming bacteria in three localities were isolated. Based on the sequences of 16S rRNA gene, these bacteria can be grouped into 2 genera. Of the 91 strains, 85 belong to *Bacillus*, including 10 species, 25 phylotypes; six strains are from 1 species of *Halobacillus*, containing 3 phylotypes. *B. marisflavi*, *B. baekryungensis*, *B. aquaemaris* and *B. pumilu* are dominant groups. As ecological function, about half of the spore-forming bacteria can metabolize sulfide, some can reduce nitrate or break down phosphate compound, and only 3 strains can reduce nitrite.

Key words Spore-forming bacteria, Marine cage culture, Sediment, 16s rRNA gene, Diversity