

东海陆架表层沉积物微生物多样性初步研究*

王健鑫 许贤恩 周链链 陶诗 刘雪珠 石戈

(浙江海洋学院海洋生物资源与分子工程实验室 舟山 316000)

提要 从东海陆架 DH-13 站点的表层沉积物中提取环境基因组 DNA, 通过 PCR 和 TA 克隆构建了细菌和古菌的 16S rDNA 基因文库, 并对克隆子文库进行系统发育分析。结果表明: 细菌序列以变形菌门(Proteobacteria, 41.5%)居多, 其次是浮霉菌门(Planctomycetes, 10.9%)、放线菌门(Actinobacteria, 8.9%)和 CFB group (7.9%), 另外还有少量酸杆菌门(Acidobacteria)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、硝化螺旋菌门(Nitrospira)和厚壁菌门(Firmicutes)等; 古菌序列全部来自泉古生菌门(Crenarchaeota), 其中 Marine Crenarchaeotic Group I (MG I, 93.6%)是绝对优势菌, 还有少量序列属于 Miscellaneous Crenarchaeotic Group (MCG)、Marine Benthic Group C (MBGC)和 Marine Benthic Group A (MBGA)。文库多样性分析结果显示东海陆架表层沉积物中有着丰富多样的微生物群落, 细菌的多样性更为显著。

关键词 表层沉积物, 微生物多样性, 16S rDNA

中图分类号 Q93

海洋沉积物是地球上面积最大的覆盖层, 约为 $3.5 \times 10^8 \text{ km}^2$, 占覆盖地球面积的 48.6%, 是海洋生态系统的重要组成部分, 也是地球上最复杂的微生物栖息地。据估计, 海底沉积物中的原核生物生物量占全球原核生物生物量的 1/2—5/6, 占全球生物总生物量的 1/10—1/3 (李涛等, 2008)。由于海底沉积物既不同于淡水沉积物、土壤等陆地环境, 又与海水水体环境相对独立, 其中的微生物往往具有一些适应其特殊环境的形态学、生理学、遗传学上的特异性(戴欣等, 2001), 其研究对于理解沉积物微生物群落结构和演化规律有着重要的意义。同时海洋沉积物还是营养元素进行生物地球化学循环的主要场所(Marion *et al.*, 2008), 是多种元素的储存库, 越来越多的研究表明微生物在整个海洋沉积物生态系统的生物地球化学循环过程中发挥着重要的作用(宋金明, 2000; Abreu *et al.*, 2001; Delong, 1992)。

东海作为西太平洋构造活动带中的一个大型边缘海, 处于 $21^\circ 54'—33^\circ 17' \text{N}$, $117^\circ 05'—131^\circ 03' \text{E}$ 之间

的特殊地理位置, 是西太平洋沟-弧-盆体系的典型发育地区(李家彪, 2008)。东海海域不仅有大量的淡水 ($>885 \text{ km}^3/\text{a}$)和营养盐汇入, 同时受来自赤道太平洋的黑潮和台湾海峡暖流以及黄海寒流的影响, 因此东海不仅有着多样的水文条件、显著的物理化学梯度、显著的季节差异, 同时有很高的初级生产力, 是碳和其它物质在全球生物地球化学循环的重要场所, 也是研究海底各种沉积作用和微生物群落多样性的有利场所。随着东部沿海地区经济的发展和人类活动影响的加大, 陆源输入使得东海富营养化程度增加和环境污染加剧(王新等, 2010), 由于沉积物是多种污染物质的储存地, 因此对该海区沉积物微生物的认知, 也是了解其在生物地球化学循环中的生态效应、调控机制和污染物降解功能的基础。关于东海微生物多样性的研究多集中在表层海水环境(宋志刚等, 2006; Zeng *et al.*, 2007), 对于陆架表层沉积物微生物多样性的研究较少(张林宝等, 2010; Park *et al.*, 2008)。本文采用 16S rRNA 基因克隆测序并构建系统发育树,

* 浙江省自然科学基金项目, LY12C03003 号; 浙江省科技厅公益性技术应用研究项目, 2011C31017 号; 舟山市科技局海洋类项目, 10248 号; 浙江省大学生科技创新项目, 2010R411002 号。王健鑫, 硕士, 高级实验师, E-mail: zswjx2575@163.com

通讯作者: 石戈, 教授, E-mail: shige2610105@163.com

收稿日期: 2011-12-26, 收修改稿日期: 2012-04-30

研究东海陆架 DH-13 站点的细菌和古菌多样性, 为了解东海陆架微生物的多样性和生态作用提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2007 年 4 月在东海陆架长江古河口区 DH-13 号采样点(31°30.103'N, 123°29.844'E; 水深 40m)采集柱状表层沉积物, 样品采集后立即将 0—10cm 的沉积物柱芯以 3cm 为单位分为 4 层, 分装于无菌样品袋中, -20℃保存, 后置于实验室-80℃超低温冰箱中长期保存, 沉积物以中细砂为主。

1.2 沉积物环境化学指标测量

常规水化学指标的测定参照海底沉积物化学分析方法(国标 GB/T20260-200; Heijs *et al.*, 2008)进行, 将 2ml 的沉积物放置于 60℃烘箱中连续烘 72h 后, 通过计算沉积物的重量损失来测定沉积物样品的含水量和密度; 沉积物中总有机碳含量(TOC)用总有机碳分析仪(TOC-V CSH, 日本岛津)进行测定; 沉积物中总氮含量(TN)用蛋白质自动分析仪(SKALAR Primacs SN, 荷兰)进行测定。

1.3 样品总 DNA 的提取与纯化

利用 FastPrep®-24 快速核酸提取仪(MP Bio-medicals 公司)和 FastDNA spin kit for soil 试剂盒进行 DNA 提取, 核酸蛋白检测仪(Bio-Rad 公司)测定 DNA 浓度和纯度, 纯化后用于 PCR 扩增。

1.4 PCR 扩增和产物回收

细菌 PCR 扩增采用通用引物 27F (5'-AGAGTTT GATCMTGGCTCAG-3'; M 为 A 或 C)和 1492R (5'-TA CGGYTACCTTGTACGACTT-3'; Y 为 C 或 T), 古菌 PCR 扩增引物采用 Arch 21F (5'-TTCCGGTTGATCC YGCCGGA-3')和 Arch 958R (5'-YCCGGCGTTGAMT CCAATT-3')。PCR 扩增条件: 95℃预变性 4min; 94℃变性 30s, 50℃退火 30s, 72℃延伸 60s, 循环 35 次; 最后 72℃延伸 10min。1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩

增结果, 并用 DNA 胶回收试剂盒(QIAGEN)回收产物。

1.5 克隆和测序

PCR 回收产物与 pMD-18T vector (TaKaRa)在 16℃连接过夜, 将连接产物转化到大肠杆菌(*E. coli*) DH5 α 感受态细胞, 蓝白斑筛选转化子, 挑选阳性克隆, 重新扩增插入片段, 将含有合适大小插入片段的克隆送上海美季生物技术有限公司进行测序。

1.6 序列分析

将序列提交到 RDP 数据库, 利用在线工具 CHECK-CHIMERA 检测嵌合体; 应用 BLASTN 程序搜索相似性序列, 进行系统发育分析。采用 ClustalX (Version 1.8)对序列进行比对分析, 通过 MEGA4 软件构建系统发育树(Kumar *et al.*, 2004); 利用 PHYLIP 软件包中 DNASIS 程序计算距离矩阵, 利用 DOTUR 软件确定分类单位(OTU)(Schloss *et al.*, 2005)。古菌和细菌部分 16S rDNA 序列在 GenBank 核苷酸数据库中的接受号分别为 JN590083—JN590174、JN672668 和 JN672607—JN672667、JN830951—JN830958。

2 结果与分析

2.1 样品环境化学指标

东海陆架 DH-13 号柱状样品的环境化学相关指标如表 1 所示, 总有机碳含量(TOC)在 1.84—7.58g/kg 之间, 总氮(TN)含量在 0.28—0.75g/kg 之间, NO₃⁻浓度在 3.84—6.94mg/kg 之间, 含水量在 11.3%—41.6% 之间, 碳氮比(TOC/TN)在 4.22—10.11 之间。

2.2 细菌和古菌 16S rDNA 文库分析

每层选取 30 个含有正确插入片段(约 1470bp)的细菌克隆进行测序, 返回的序列经过 RDP II 数据库分析并去除嵌合体后, 得到 103 个有效细菌序列, 片段长度均超过 1400bp, 其中 0—3cm 层、3—5cm 层、5—8cm 层、8—10cm 层的有效序列分别是 24、25、29 和 25 条, 通过 DOTUR 软件将相似性大于 97% 的克隆序列归为同一个 OTU, 细菌序列属于 92 个 OTU。每层选取 30 个含有正确插入片段(约 900bp)

表 1 DH-13 站点表层沉积物环境化学指标

Tab.1 Chemical measurements of surface layer sediment in DH-13 station

样品	总有机碳(g/kg)	总氮(g/kg)	TOC/TN	NO ₃ ⁻ (mg/kg)	含水量(%)
DH-13 (0—3cm)	1.84	0.28	6.57	—	11.3
DH-13 (3—5cm)	1.35	0.32	4.22	4.81	23.5
DH-13 (5—8cm)	6.66	0.78	8.54	6.94	41.6
DH-13 (8—10cm)	7.58	0.75	10.11	3.84	37.1

注: “—”表示未测出

的古菌克隆进行测序, 所测序列经筛选后得到 93 个有效古菌序列, 片段长度均超过 800bp, 其中 0—3cm 层、3—5cm 层、5—8cm 层、8—10cm 层的有效序列分别是 24、20、26 和 23 条, 通过 DOTUR 软件将相似性大于 98% 的克隆序列归为同一个 OTU, 古菌序列属于 10 个 OUT, 各文库的多样性指数见表 2 所示。

文库分析结果表明: 东海陆架表层沉积物 DH-13 站点细菌的 Chao 1 和 ACE 丰富度指数及 Shannon-Weaver 多样性指数远大于古菌, Simpson 优势度指数值远小于古菌, 说明 DH-13 站点的细菌多样性要高于古菌; 另外克隆子数量基本能够覆盖该站点细菌和古菌的多样性。

2.3 细菌 16S rDNA 测序和系统发育分析

东海 DH-13 站点的 103 个细菌克隆在系统发育树中形成 8 个类群(图 1 和图 2), 多数克隆子属于变形菌门(Proteobacteria, 41.5%)、浮霉菌门(Planctomycetes, 10.9%)、放线菌门(Actinobacteria, 8.9%)、CFB group (7.9%); 另外还有少量酸杆菌门(Acidobacteria, 5.9%)、疣微菌门(Verrucomicrobia, 3.9%)、硝化螺旋菌门(Nitrospira, 1.9%)、厚壁菌门(Firmicutes, 1%)。还有 20.1% 克隆子不能确定分类位置。

变形菌门(Proteobacteria)类群是海洋沉积物中的优势细菌类群, 但不同海区沉积物中变形菌的组成结构有较大差异, 东海陆架表层沉积物中变形菌占细菌文库的 41.5%, 这与西沙海槽表层沉积物中变形菌所占细菌文库的比例基本相似(30.5%)(Li *et al.*, 2008a), 但亚群组成却不尽相同。东海陆架表层沉积物中变形菌由 Alpha、Beta、Gamma 和 Delta 四个亚群组成, 其中 Gamma-Proteobacteria 亚群是优势类群(占变形菌克隆的 52%)。Gamma-Proteobacteria 的基因型 DH132B23(5 个克隆子)和 DH133B05(3 个克隆子)与东劳盆地扩张中心(ELSC)深海热液口区域检测到的未培养 Gamma-Proteobacteria 克隆子有高同源性

(99%), 基因型 DH133B08(2 个克隆子)、基因型 DH132B24(2 个克隆子)和基因型 DH132B31(2 个克隆子)与南大西洋拉普拉塔河口的未培养 Gamma-Proteobacteria 克隆子 ARTE12 有高同源性(99%), 基因型 DH132B01(2 个克隆子)与日本 Taketomi 岛的浅海热液口未培养 Gamma-Proteobacteria 克隆子有较高同源性(95%), 基因型 DH132B27(4 个克隆子)与比利时陆架海洋沉积物以及海南红树林土壤中的未培养 Gamma-Proteobacteria 克隆子有较高的同源性(97%), 基因型 DH134B08 和 DH131B13 分别与黄海沉积物和白令海北部表层沉积物检测到的未培养 Gamma-Proteobacteria 克隆子有较高的同源性。

Delta-Proteobacteria 包括粘细菌和严格厌氧的部分种类, 如硫酸盐还原菌(*Desulfovibrio*、*Desulfobacter*、*Desulfococcus*、*Desulfonema* 等)和硫还原菌(*Desulfuromonas*)等。东海陆架表层沉积物中 Delta-Proteobacteria 克隆也占到变形菌文库的 35%, 其基因型 DH133B26 (3 个克隆子)与墨西哥湾冷泉油气渗漏区沉积物未培养 Delta-Proteobacteria 克隆有高同源性, 基因型 DH132B04 (3 个克隆子)与我国北部油田污泥(刘五星等, 2010)未培养 Delta-Proteobacteria 克隆有高同源性, 预示着海洋沉积物中的 Delta-Proteobacteria 可能与石油资源利用和降解有关, 对环境中的碳和硫循环可能有着重要作用。另外基因型 DH132B36 (3 个克隆子)与深海(热液口)的未培养粘细菌目(Myxococcales)克隆子 916-W4-24 有高同源性(98%), 基因型 DH134B07 (4 个克隆子)与太平洋-北冰洋的表层沉积物中检测到的未培养 Delta-Proteobacteria 克隆有高同源性(98%), 还有两个基因型的同源序列来自南大西洋湾(SAB)陆架表层沉积物(96%)和 Monterey 海底峡谷沉积物(98%)。Alpha 和 Beta-Proteobacteria 在东海陆架表层沉积物中含量较少, 其中 Alpha-Proteobacteria 的同源序列来自于巴拿马加勒比海珊瑚表

表 2 东海陆架表层沉积物细菌和古菌多样性指数一览表
Tab.2 Measures of bacterial and archaeal diversity from the surface layer sediment of the East China Sea

多样性指标	计算公式	细菌 DH13b	古菌 DH13a
Bias-corrected Chao 1	Schloss <i>et al.</i> , 2005	515	20
Abundance-base Coverage Estimator (ACE)	Schloss <i>et al.</i> , 2005	454.4	17.46
Shannon index (H')	$H' = - \sum_{i=1}^S P_i \ln P_i$	4.47	1.36
Simpson index (D)	$D = 1 - \sum_{i=1}^S \frac{n_i(n_i-1)}{N(N-1)}$	0.0026	0.348

注: S 为样品中 OTUs 的数量, N 为样品中克隆子的总数, n_i 为一个 OTU 中包含克隆子的数量, P_i 为第 i 个物种中克隆子数占总克隆数的比例

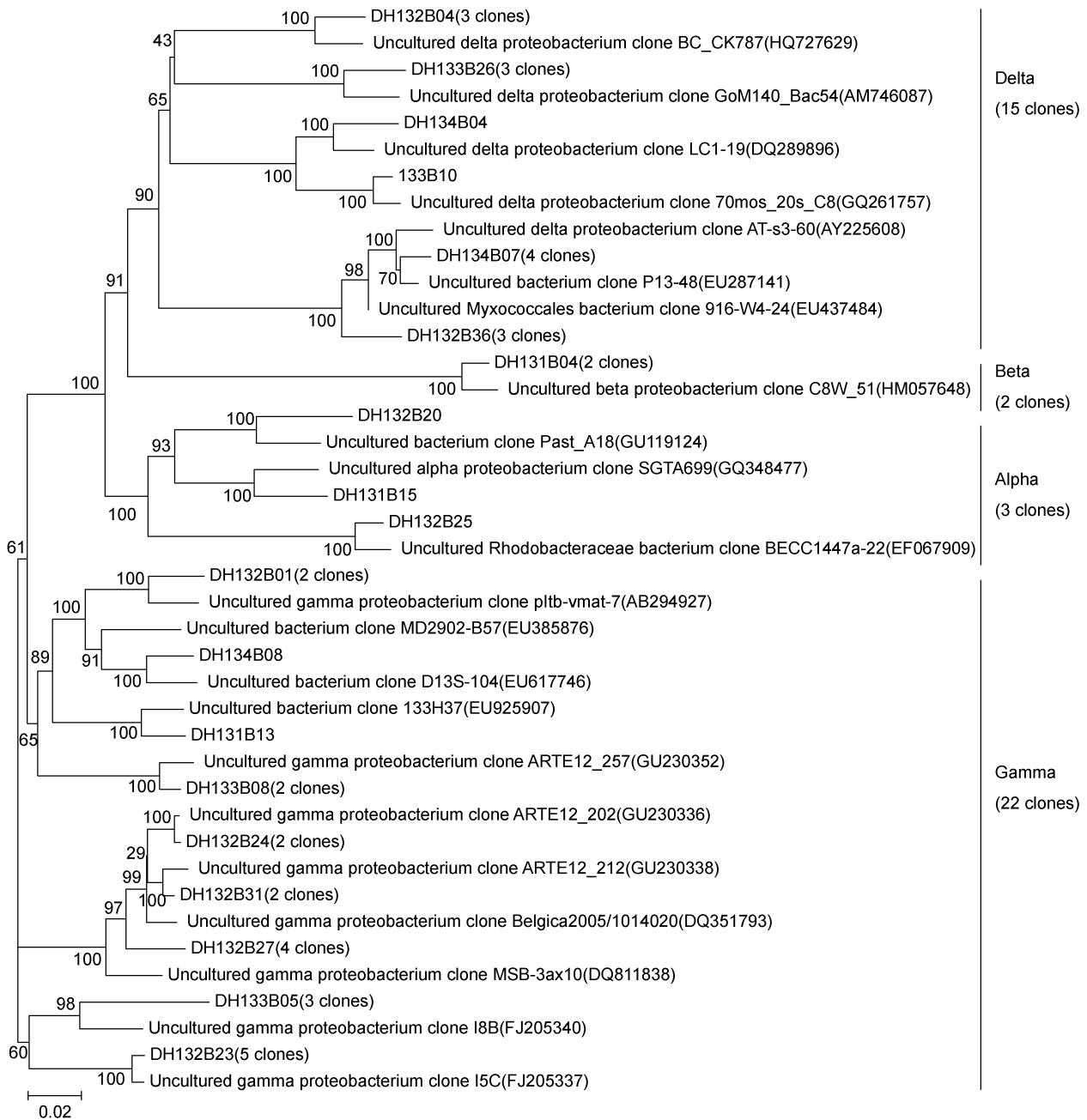


图 1 根据细菌 16S rDNA 基因序列构建的变形菌系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree of Proteobacteria according to 16S rDNA gene sequences

面)、最小含氧带、胡安·德富卡海隆的玄武岩内生红杆菌等, Beta-Proteobacteria 的同源序列主要来自于黄海海水。

浮霉菌门(Planctomycetes)在细菌分类中属于一个比较特殊的分支, 在许多海洋环境(Vergin *et al.*, 1998)中存在, 东海表层沉积物中浮霉菌的含量也较多, 其中基因型 DH134B06 (3 个克隆子)与南大西洋湾(SAB)陆架表层沉积物中的未培养浮霉菌有较高同源性(98%), 基因型 DH132B30 (2 个克隆子)与美国

Salton 海沉积物中的未培养浮霉菌有较高同源性(98%), 基因型 DH132B11 (4 个克隆子)与东劳盆地扩张中心(ELSC)深海热液口区域检测到的未培养浮霉菌克隆子有较高同源性(95%), DH133B16 (2 个克隆子)与汤加岛南部海底火山热液口表层沉积物中的未培养浮霉菌有较高同源性(96%)。

CFB 类群(Cytophaga-Flavobacterium-Bacterioides)是细菌进化树的重要类群, 主要分布在河口等颗粒有机物丰富的水域, 东海陆架表层沉积物中的

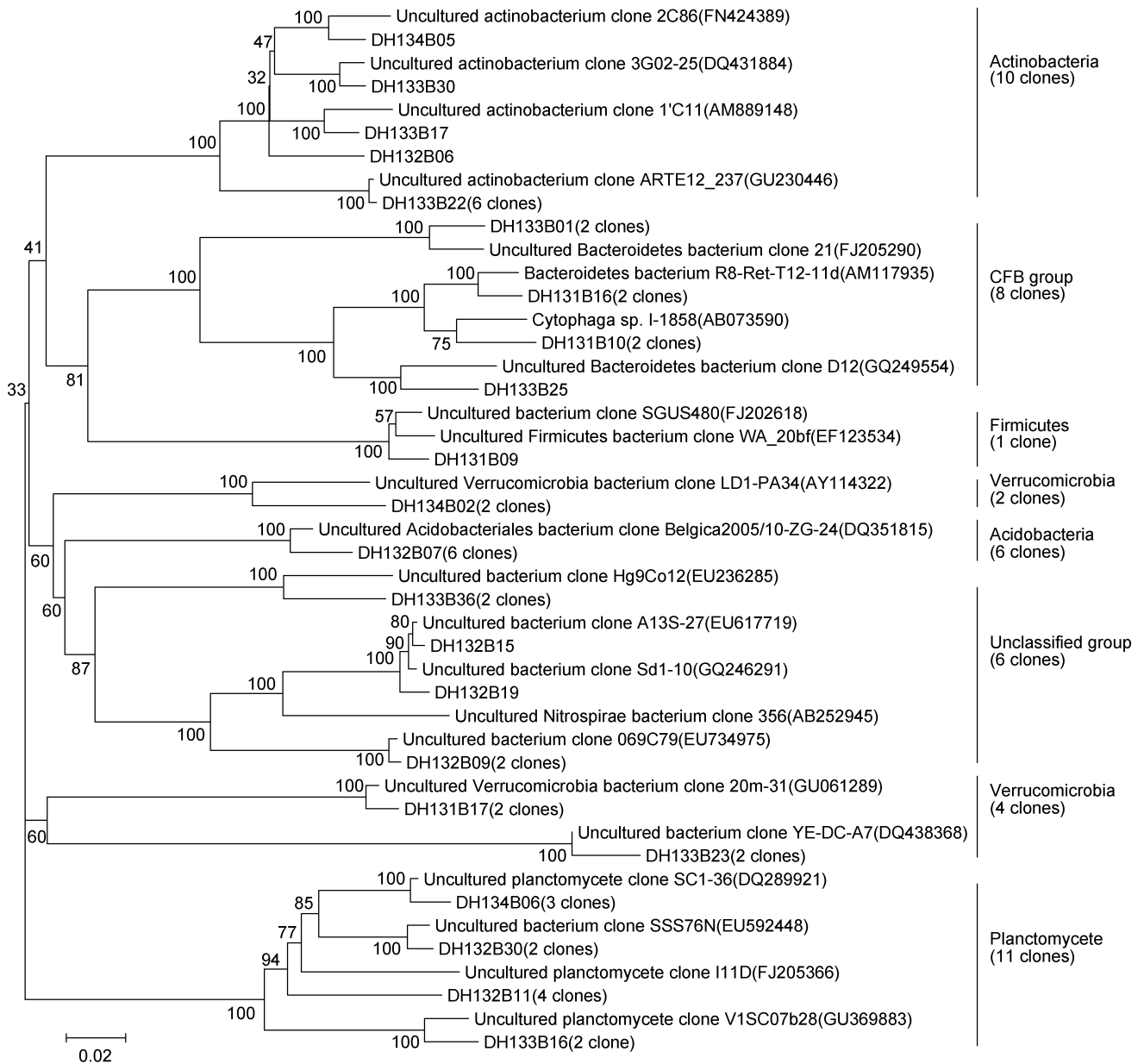


图2 根据细菌 16S rDNA 基因序列构建的其它分支细菌的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of other bacteria according to 16S rDNA gene sequences

CFB 类群有 2 个克隆子与分离自北海绵(*Phakellia ventilabrum*) 的拟杆菌 (*Bacteroidetes bacterium* R8-Ret-T12-11d) 菌株同源率为 96%, 有两个克隆子与海藻(*Monostroma oxyspermum*) 表面分离得到的噬纤维菌菌株(*Cytophaga* sp.I-1858) 同源率为 95%, 这些 CFB 菌株可能是随海洋动植物残骸沉降海底所至, 还有 4 个克隆子的同源序列分别来自于东苏盆地扩张中心(ELSC) 深海热液口区域、西班牙 Cadiz 海湾的厌氧沉积物和加勒比海珊瑚(*Montastraea faveolata*)。

海洋中的革兰氏阳性菌可以分为两个典型的类群: 高 G+C 含量的放线菌门(Actinobacteria) 和低 G+C

含量的厚壁菌门(Firmicutes)。东海陆架表层沉积物中放线菌的丰度也较高, 克隆子同源序列主要来自南大西洋拉普拉塔河口、墨西哥湾东北部海底沉积物、突尼斯 Bizerte 泻湖沉积物; 而唯一的一个厚壁菌门克隆子同源序列来自于感染黑带病的加勒比海铁星珊瑚(*Siderastrea siderea*) 的未培养克隆。

2.4 古菌 16S rDNA 测序和系统发育分析

东海 DH-13 站点 93 个古菌克隆组成的 16S rDNA 文库全部来自于泉古生菌门(Crenarchaeota) (图 3), 其中 Marine Crenarchaeotic Group I 占绝对优势 (MG I, 93.55%), 其余还有少量 Marine Benthic Group

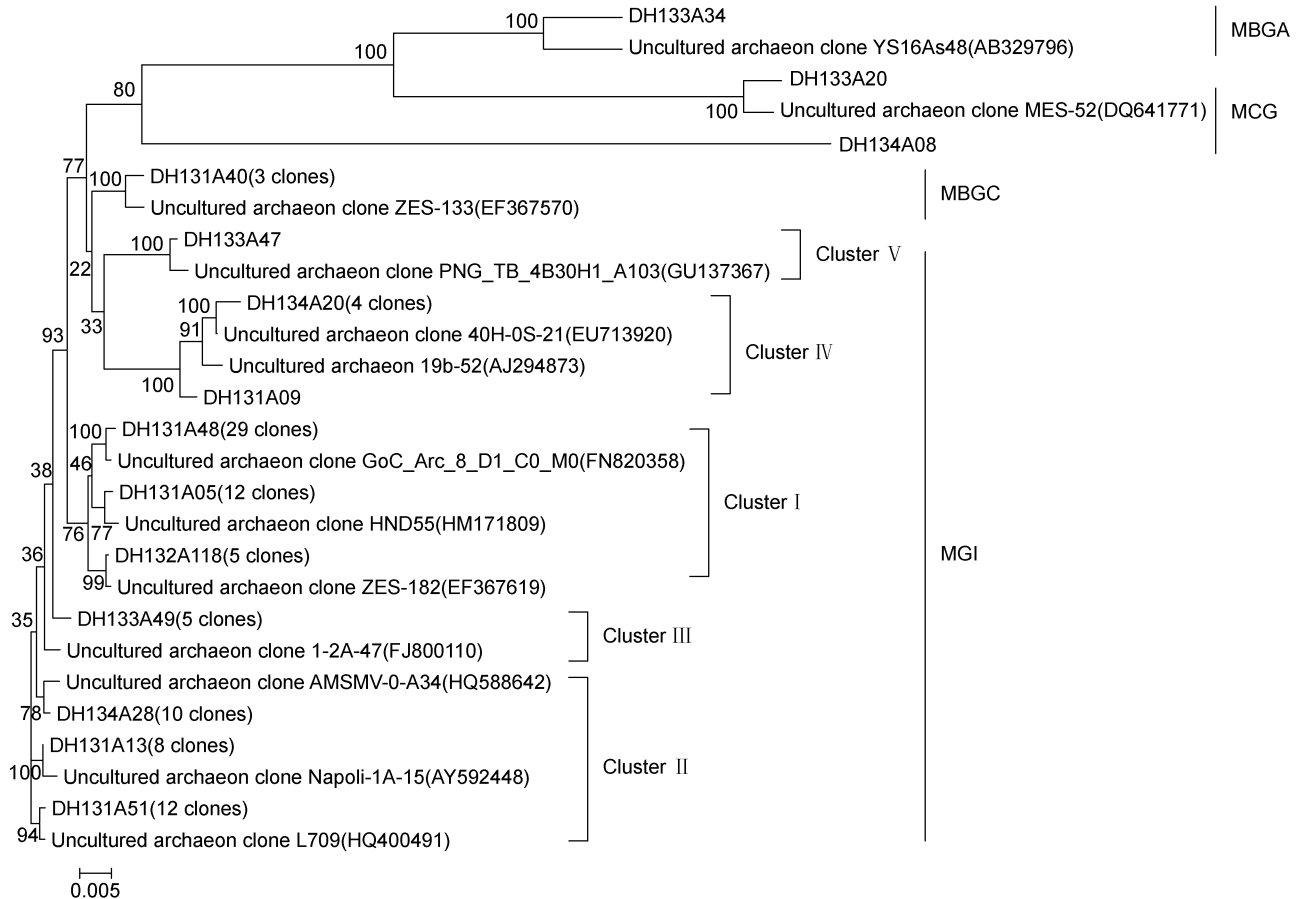


图 3 根据 16S rDNA 基因序列构建的古菌系统发育树

Fig.3 Archaeal phylogenetic tree according to 16S rDNA gene sequences

C (MBGC, 3.22%)、Miscellaneous Crenarchaeotic Group (MCG, 2.15%)、Marine Benthic Group A (MBGA, 1.08%)。

型海洋泉古生菌是由 Delong(1992)于海洋环境中首先发现, 分布于海底沉积物中, 该类群可能兼性自养或者代谢类型多样。MG I 是东海陆架表层沉积物 13 号站点的优势古菌, 根据序列差别可分为 5 类, 其中 Cluster I 是 MG I 中克隆子含量最多的一类 (占 52%), 其同源序列分别来自于西班牙 Cadiz 海湾的泥火山沉积物, 中国海南岛东部近岸沉积物, 印度西海岸河口沉积物等。Cluster II 是 MG I 中克隆子含量第二的一类 (占 34%), 其同源序列分别来自于阿姆斯特丹泥火山沉积物, 地中海东部深海 Napoli 泥火山沉积物, 中国大港油田盐碱土壤等。其它三类 MG I 的含量较低, 其同源序列分别来自于爱琴海沉积物、鄂霍次克海甲烷渗漏区沉积物、富含砷的浅海热液口沉积物、巴伦支海海底深部沉积物等。

MCG 广泛存在于多种陆地和海洋环境, 是秘鲁边缘 1227 和 1229 站位、地中海腐殖质、鄂霍次克

海近岸火山灰沉积物以及 Nankai 海槽等环境中古菌的优势菌群(Sorensen *et al*, 2006)。本次东海陆架表层沉积物中的 MCG 同源序列主要来自印度西海岸河口沉积物(Singha *et al*, 2010)。MBG 是海洋古菌类群重要的组成部分之一, 其中 MBGA 最先在大西洋深海沉积物分离得到(Li *et al*, 2008b), 在黄石国家公园温泉中分离到的 MBGA 同源序列为厌氧嗜热菌(Costantino *et al*, 1999)。因此 MBGA 类群中可能有不少种类可以适应高温、高渗透压等极端的生存环境。MBGC 也广泛分布于海洋环境中, 东海陆架表层沉积物中检测到 3 个克隆与鄂霍次克海深海甲烷渗漏区沉积物(99%)、黄河三角洲沉积物(99%)以及南极深海沉积物的 MBGC 序列高度同源。

3 讨论

3.1 沉积物地化指标与微生物多样性

碳和氮在海洋地球化学循环中扮演着重要的角色, 海洋沉积物是大气中二氧化碳的最终归宿之一,

也是微生物进行各种代谢反应的重要场所, 而沉积物中氮的再生、释放和储藏过程, 不仅可调控海洋中微型真核生物、浮游植物和细菌的生长, 同时也影响着海洋的固碳能力。

在海洋沉积物研究中, TOC/TN(碳氮比)的大小常被作为判断有机碳来源是海生还是陆源的标准, 海洋自身有机物的碳氮比其极限值(Redfield 比)为 6.6, 而陆源有机物的碳氮比要高, 可达 20 以上(Meyers, 1994), 因此沉积物中陆源有机物所占比例越高, 其碳氮比越大。从 DH13 站点沉积物样品的碳氮比测定结果(4.22—10.11)来看, 其有机物还是以海源为主。从沉积物碳氮比的变化趋势来看, 深层沉积物(5—10cm)的碳氮比要比表层(0—5cm)的碳氮比明显升高, 这可能是由于研究站点是东海陆架古河口区, 在晚更新世期间由于东海海平面波动导致东海陆架成为陆地(李家彪, 2008), 因此陆源有机质含量较高, 而等到海水重新覆盖后, 才有了海生有机物的沉积作用。

另外氮的矿化作用和固定作用其相对强弱与有机物质的碳氮比密切相关。当有机物质的碳氮比小时, 微生物的氮素固定作用就小于矿化作用, 多余的部分氮素即可释放积累于环境中, 供植物利用。反之, 如果有机物的碳氮比大, 则微生物的氮素固定作用不仅用尽矿化作用所释放的无机态氮, 而且还要从周围环境中吸收无机态氮以弥补不足。一般有机物 TOC/TN 与矿质氮释放的关系为: TOC/TN < 20 时, 净释放矿质氮; TOC/TN 为 20—30 时, 则不吸收也不释放; TOC/TN > 30 时, 则微生物从环境中吸收无机氮。因此推测 DH13 站点沉积物的微生物可能还是以矿化作用为主。

3.2 细菌多样性

东海陆架沉积物细菌多样性的相关研究不多, 潘洛安(2005)¹⁾在对长江口及附近海域沉积环境的研究表明: 该区域沉积物间隙水中细菌的高含量(平均值 8.18×10^6 cells/ml)及其不规则的垂向分布表明这些微生物是底栖微型生物食物网中的重要组成部分, 也因此可以影响到多种生物地球化学过程。Li 等(2011)利用 FISH 和 DGGE 方法发现长江口及东海区域海底表层沉积物的氨氧化 Beta-变形菌(β -AOB)的丰度为 $(1.87—3.53) \times 10^5$ cells/g, 其群落结构组成与沉积物的盐度、温度、呼吸作用和 TOC 等因子密切

相关, 也可以作为该海域硝化作用的间接指示因子。最近 Feng 等(2009)对长江口和东海沿岸海域海水和沉积物样品进行较全面的研究, 结果显示变形菌门是该海洋环境中含量最丰富的种群(占克隆数的 72.9%), 其它还有厚壁菌门(6.4%)、拟杆菌门(4.6%)和放线菌门(4.1%); 同时沉积物的细菌多样性要远高于海水, 沉积物中变形菌门以 Gamma-Proteobacteria 亚群为主, 其它还包括 Delta-Proteobacteria, 厚壁菌门、浮霉菌门、酸杆菌门、疣微菌门、绿弯菌门和硝化螺旋菌门。许多研究表明变形菌门是多数海洋表层沉积物环境中丰度最大的细菌, 一般都超过微生物生物量的 50%以上, 同时 Gamma-Proteobacteria 亚群是海洋沉积物中变形菌门中含量最多的一类(Ravenschlag *et al*, 2001; Bowman *et al*, 2003; Inagaki *et al*, 2003), 本文对 DH13 站点细菌群落结构的研究结果与 Feng 等(2009)类似, 也基本验证了上述观点。

3.3 古菌多样性

古菌在海洋环境中分布广泛且含量丰富, Karner 等(2001)通过对太平洋海水中古菌含量的测定和估算, 预计古菌占到海洋中原核生物的 1/3, 拥有如此巨大的含量, 古菌在海洋生态系统乃至全球生物地球化学过程中都扮演着举足轻重的角色(潘晓驹等, 2001)。其中泉古生菌是海水和沉积物环境中的主要古菌种属, 在印度西海岸 Mandovi 和 Zuari 河口(Singha *et al*, 2010)中泉古生菌占古菌克隆文库的 78%, 葡萄牙 Douro 河口沉积物(Abreu *et al*, 2001)中泉古菌占克隆文库的 85.7%。基因组和环境微生物学研究表明泉古生菌的营养方式是化能自养型、异养型或兼养型。关于东海表层沉积物海洋古菌的研究, Dang 等(2008)对长江口和东海区域沉积物中的氨氧化泉古菌的多样性和空间分布特征进行了相关研究, 序列分析结果表明 “*Candidatus Nitrosopumilus maritimus*” SCM1 是该区域广泛分布的氨氧化泉古菌, 长江口沉积物的氨氧化泉古生菌群落与东部太平洋海域沉积物基本相似, 同时陆源性的氨氧化古菌通过河流冲入海洋的途径对河口沉积物氨氧化泉古菌群落结构的组成和多样性有一定的影响; 张林宝等(2010)对东海内陆架闽浙沿岸泥质区沉积物的古菌多样性和群落垂向分布特征进行了研究, 16S rDNA 克隆文库的分析结果表明该区域古菌分别归属于泉古生菌和广古生

1) 潘洛安, 2005. 东海陆架及南海北部锋区微生物群落结构初探. 上海: 华东师范大学硕士学位论文, 85—97

菌,其中以 Miscellaneous Crenarchaeotic Group (MCG) 为主,仅含少量的 Marine Benthic Group B (MBG-B)、South African Gold Mine Euryarchaeotic Group (SAGMEG)、Anaerobic Methanotrophs 3 (ANME-3)、Marine Crenarchaeotic Group I (MG I)和 Marine Benthic Group D (MBG-D),同时古菌群落垂向分布与沉积物有机质含量和粒度变化密切相关。本文所研究的 DH13 站点其古菌克隆文库全部是泉古菌, MG I 古菌占泉古菌文库的 93.6%,这与印度西海岸 Mandovi 和 Zuari 河口的研究基本相似,但与东海内陆架闽浙沿岸区沉积物中泉古菌的组成和结构有较大差异,可能 DH13 站点在地质学上属于长江古河口区,其沉积物沙质特征与闽浙沿岸区泥质区差别明显,故表层沉积物古菌也有各自的独特性。

4 结论

本实验通过构建 16S rRNA 基因文库的方法对东海陆架 DH-13 站点表层沉积物中细菌和古菌的群落多样性进行研究,应用 DOTUR 软件对文库多样性进行分析,研究发现东海陆架表层沉积物拥有丰富多样的微生物类群,细菌含有 8 大类群,以变形杆菌为优势种群,古菌则包括泉古菌门的 4 个类群,其中 MG I 是绝对优势种群,与古菌相比,细菌的多样性更为显著。通过系统进化树的构建和相关多样性指数的分析,对该海域沉积物环境中的细菌和古菌多样性有了较为系统的了解,为进一步研究东海陆架表层沉积物的微生物生态系统提供了一些数据信息。

参 考 文 献

- 王 新,李志江,郑天凌,2010. 海洋浮游细菌在东海赤潮高发区的分布与活性. 环境科学, 31(2): 287—295
- 李 涛,王 鹏,江品先,2008. 南海南部陆坡表层沉积物细菌和古菌多样性. 微生物学报, 48(3): 323—329
- 李家彪,2008. 东海区域地质. 北京: 海洋出版社, 1—105
- 宋志刚,许强芝,鲁心安等,2006. 中国东海海洋微生物种群多样性初步研究. 微生物学通报, 33 (1): 63—67
- 宋金明,2000. 海洋沉积物中的生物种群在生源物质循环中的功能. 海洋科学, 24(4): 22—26
- 张林宝,李铁刚,党宏月等,2010. 东海内陆架泥质区沉积物古菌群落垂向分布特征. 地球科学(中国地质大学学报), 35(2): 254—260
- 潘晓驹,焦念志,2001. 海洋古菌的研究进展. 海洋科学, 25(2): 20—23
- 戴 欣,周 惠,蔡创华等,2001. 海洋沉积物中特有细菌类群的初步探讨. 中山大学学报: 自然科学版, 40(6): 51—54
- Abreu C, Jurgens G, Marco P D *et al*, 2001. Crenarchaeota and Euryarchaeota in temperate estuarine sediments. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 713—718
- Bowman J P, McCuaig R D, 2003. Biodiversity community structural shifts and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sediment. *Appl Environ Microb*, 69: 2463—2483
- Costantino V, Jannasch H W, MacGregor B J *et al*, 1999. Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic archaea in deep-sea sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10): 4375—4384
- Dang H Y, Zhang X X, Sun J *et al*, 2008. Diversity and spatial distribution of sediment ammonia-oxidizing crenarchaeota in response to estuarine and environmental gradients in the Changjiang Estuary and East China Sea. *Microbiology*, 154: 2084—2095
- Delong E F, 1992. Archaea in coastal marine environment. *Proc Natl Acad Sci*, 89: 5685—5689
- Feng B W, Li X R, Wang J H *et al*, 2009. Bacterial diversity of water and sediment in the Changjiang estuary and coastal area of the East China Sea. *FEMS Microbiol Ecol*, 70: 236—248
- Inagaki F, Suzuki M, Takai K *et al*, 2003. Microbial communities associated with geological horizons in coastal subseafloor sediments from the Sea of Okhotsk. *Appl Environ Microb*, 69: 7224—7235
- Karner M B, DeLong E F, Karl D M, 2001. Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature*, 409: 507—510
- Kumar S, Tamura K, Nei M, 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5: 150—163
- Li J L, Bai J, Gao H W *et al*, 2011. Distribution of ammonia-oxidizing Betaproteobacteria community in surface sediment off the Changjiang River Estuary in summer. *Acta Oceanol Sin*, 30(3): 92—99
- Li T, Wang P, Wang P X, 2008a. Microbia diversity in surface sediments of the Xisha Trough, the South China Sea. *Acta Ecologica Sinica*, 28(3): 1166—1173
- Li Y, Li F, Zhang X *et al*, 2008b. Vertical distribution of bacterial and archaeal communities along discrete layers of a deep-sea cold sediment sample at the East Pacific Rise (approximately 13 degrees N). *Extremophiles*, 12(4): 573—585
- Marion K, Rainer W, Maja B, 2008. Microscale Investigations of microbial communities in coastal surficial sediments. *Marine ecology*, 29: 89—105
- Meyers P A, 1994. Preservation of elemental and isotopic source identification of sedimentary organic matter. *Chemical Geology*, 144: 289—302
- Park S J, Park B J, Pham V H *et al*, 2008. Microeukaryotic diversity in marine environments, an analysis of surface layer sediments from the East Sea. *The Journal of Microbiology*,

- 46(3): 244—249
- Ravenschlag K, Sahm K, Amann R, 2001. Quantitative molecular analysis of the microbial community in marine *Arctic sediments* (Svalbard). *Appl Environ Microb*, 67: 387—395
- Schloss P D, Handelsman J, 2005. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3): 1501—1506
- Sorensen K B, Teske A, 2006. Stratified communities of active archaea in deep marine subsurface sediments. *Appl Environ Microbiol*, 72 (7): 4596—4603
- Vergin K L, Urbach E, Stein J L *et al*, 1998. Screening of a fosmid library of marine environmental genomic DNA fragments reveals four clones related to members of the order Planctomycetales. *Appl Environ Microbiol*, 64: 3075—3078
- Zeng Y H, Li H Y, Jiao N Z, 2007. Phylogenetic diversity of planktonic archaea in the estuarine region of East China Sea. *Microbiological Research*, 162: 26—36

A PRELIMINARY STUDY OF MICROBIAL DIVERSITY OF THE SURFACE LAYER SEDIMENTS FROM THE EAST CHINA SEA

WANG Jian-Xin, XU Xian-En, ZHOU Lian-Lian, TAO Shi, LIU Xue-Zhu, SHI Ge
(Zhejiang Ocean University, Laboratory for Marine Living Resources and Molecular Engineering, Zhoushan, 316000)

Abstract The environmental total DNAs were directly extracted from the surface layer sediment of the East China sea. The bacterial and archaeal 16S rDNA gene libraries were generated by using PCR and TA cloning. Phylogenetic results show that there are eight phyla in the bacteria domain: Proteobacteria (41.5%), Planctomycete (10.9%), Actinobacteria (8.9%), CFB group (7.9%), Acidobacteria, Verrucomicrobia, Nitrospira and Firmicutes, the phylum Proteobacteria is predominant. In the archaea domain, all clones were belonged to Crenarchaeota and no one Euryarchaeota clone was detected. There are four divisions in the Crenarchaeota kingdom: Marine Crenarchaeotic Group I (MG I, 93.6%), Miscellaneous Crenarchaeotic Group (MCG), Marine Benthic Group C (MBGC), Marine Benthic Group A (MBGA), and MG I is the dominating group. DOTUR statistics of 16S rDNA gene sequences from the libraries indicating a high richness in the sediment microbial communities.

Key words Surface layer sediment, Microbial diversity, 16S rDNA