

东海陆架表层沉积物细菌群落结构及地理分布研究*

刘明华 王健鑫 俞凯成 蒋然 刘晓辉 王帅兵 刘雪珠

(浙江海洋学院海洋微生物生态与应用实验室 舟山 316022)

摘要 本研究通过构建 16S rDNA 克隆文库,对东海陆架五个站点的沉积物样品进行群落结构及地理分布研究。结果表明:东海陆架沉积物细菌分属于 13 个类群,包括变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、酸杆菌门(Acidobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、放线菌门(Actinobacteria)、硝化螺旋菌门(Nitrospira)、WS3、拟杆菌门(Bacteroidetes)、螺旋体门(Spirochaetes)、OP8、浮霉菌门(Planctomycetacia)、疣微菌门(Verrucomicrobiae)和芽单胞菌门(Gemmatimonadetes),其中变形菌门(γ -变形菌纲、 δ -变形菌纲)和绿弯菌门为优势菌群,Latescibacteria(WS3)、疣微菌门和芽单胞菌门分别是站点 DH6、DH21 和 DH9 的特有类群。五个站点细菌多样性从高到低排序依次为 DH9>DH21>DH17>DH6>DH16,其群落结构和丰度与各站点不同沉积环境类型有关。

关键词 细菌多样性;群落结构;16S rDNA;沉积物

中图分类号 Q933 **doi:** 10.11693/hyhz20150200045

海洋占据了地球总面积的 71%,拥有丰富的生物资源。微生物在海洋环境中扮演着重要角色,包含细菌、真菌、放线菌及病毒在内的海洋微生物不仅为地球提供了近一半的初级生产力,为现代工业生产提供了重要的天然药物和酶资源(Arrigo, 2005),同时参与物质和能量循环(Simmons *et al.*, 2008),影响全球气候变化(Azam *et al.*, 2004)。海洋沉积物是地球上面积最大的覆盖层,具有低温、高压、寡营养和无光照等极端环境特征,孕育了大量特殊生理特性的微生物类群,成为地球上最复杂的微生物栖息地,并在整个海洋生态系统的生物地球化学循环过程中发挥着重要的作用(Köster *et al.*, 2008)。因此开展海洋沉积环境中微生物资源及其多样性研究是海洋微生物从资源走向应用的关键(刘玉娟等, 2014)。

东海是西太平洋构造活动带中一个大型边缘海,处于 21°54'—33°17'N, 117°05'—131°03'E 之间,是西太平洋沟-弧-盆体系的典型发育地区(李家彪, 2008)。东海海域的水文状况及沉积动力环境较为复杂,碎

屑沉积物的搬运和沉积作用主要取决于沉积动力条件。东海海流系统主要由黑潮、台湾暖流、东海沿岸流,即外来的黑潮流及其分支和当地生成的沿岸流等组成(李万超, 2008)。典型的地质构造和多重的海流组成使得东海陆架不仅是研究生物地球化学循环的重要区域,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。关于东海微生物多样性的研究,早期多集中在表层海水环境和可培养微生物(郑国兴等, 1982; 宋志刚等, 2006; 卢婧雯等, 2012),近年来关于陆架沉积物微生物的研究成为新的热点领域(Park *et al.*, 2008; 张东声, 2011; 杜萍等, 2012; 王健鑫等, 2012; 有小娟等, 2013),当然采样区域、时间、方法以及研究对象、技术手段、结果都各有侧重。

海洋环境中绝大多数微生物都是处于未可培养的状态(Arakaki *et al.*, 2010),影响了对环境微生物的深入研究。随着近几年分子生物学技术的普及,从 DNA 水平研究微生物的多样性已成为当前研究最主要的技术手段,并推动了微生物海洋学的快速发展

* 国家自然科学基金面上项目, 31270160 号, J1310037 号; 浙江省自然科学基金项目, LY12C03003 号。刘明华, 硕士研究生, E-mail: 891903859@qq.com

通讯作者: 王健鑫, 副教授, E-mail: zswjx2575@163.com

收稿日期: 2015-02-04, 收修改稿日期: 2015-03-10

(Venter *et al.*, 2004)。本文采用 16S rRNA 基因克隆测序,对东海陆架五个站点(DH6, DH9, DH16, DH17, DH21)沉积物样品进行细菌种群多样性、群落结构和地理分布规律进行初步探讨,以期对东海陆架沉积环境微生物分子生态学研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品采集

海洋沉积物样品采集自 2007 年 4—5 月海洋调查项目,五个采样站点的位置信息如表 1 和图 1 所示。沉积物柱芯样品采集后立即分装于无菌样品袋中,−20°C 保存于科考船冰柜中,后置于实验室−80°C 超低温冰箱中长期保存,沉积物主要以中细砂为主。

表 1 各采样点信息
Tab. 1 The information of five sites

站点	水深(m)	纬度(N)	经度(E)
DH6	40	30°59.850'	123°59.730'
DH9	10	30°45.650'	122°06.617'
DH16	54	30°59.891'	125°00.004'
DH17	49	30°40.198'	123°00.148'
DH21	103	31°00.003'	126°59.567'

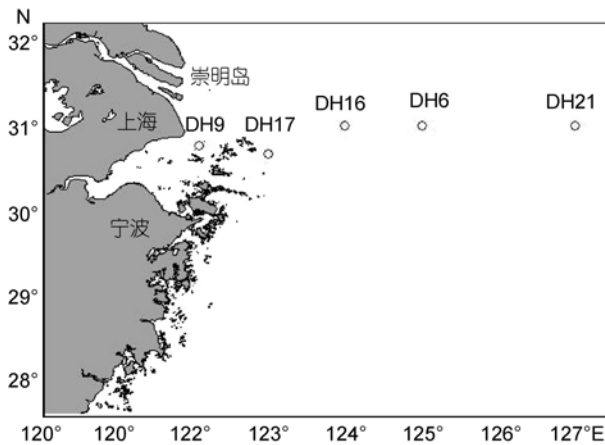


图 1 各采样站点分布示意图
Fig.1 Map of five sampling sites

1.2 样品总 DNA 的提取与纯化

利用 FastPrep®-24 快速核酸提取仪(MP Biomedicals 公司)和 Fast DNA spin kit for soil 试剂盒进行沉积物样品 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。

1.3 PCR 扩增和产物回收

将样品总 DNA 在梯度 PCR 仪(Biometra 公司)中进行扩增,所用引物为 341F (CCTACGGGAGGCAG

CAG)和 907R (CCGTCAATTCMTTTRAGTTT)。50μL PCR 扩增体系: DNA 模板 1μL, 反应引物 341F (10μmol/L)和 907R (10μmol/L)各 1μL, 10×PCR buffer (含 MgCl₂ 1.5mmol/L) 5μL, dNTP (2.5mmol/L) 5μL, rTaq 聚合酶(5U/μL) 0.5μL, ddH₂O 36.5μL。PCR 扩增循环条件为: 94°C 预变性 5min; 94°C 变性 30s, 55°C 退火 40s, 72°C 延伸 40s, 35 个循环; 最后 72°C 延伸 7min。1.2%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果,对条带(500—750bp)进行割胶,用 DNA 胶回收试剂盒(QIAGEN 公司)回收产物。

1.4 克隆子筛选和测序

PCR 割胶回收产物连接 pMD-18T(TaKaRa)载体,转化于 *Escherichia coli* DH5α 感受态细胞。经蓝白斑筛选,挑取白斑进行液体培养过夜,再通过菌液 PCR 进行扩增,扩增 10μL 体系为: Extaq 5μL, ddH₂O 4.1μL, 341F (10μmol/L)和 M13R (10μmol/L)各 0.2μL, 菌液 0.5μL。PCR 扩增循环条件为: 95°C 预变性 5min; 94°C 变性 1min, 58°C 退火 40s, 72°C 延伸 40s, 35 个循环; 最后 72°C 延伸 10min。电泳检测,选取 500—750bp 之间的克隆送苏州金唯智生物科技有限公司进行检测。

1.5 序列分析

将序列提交到 RDP II 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)进行序列比对分析,通过 MEGA 5 软件里 Neighbor-joining 法构建系统发育树(Kumar *et al.*, 2004)、利用 DOTUR 软件确定分类单位(OTU)(Schloss *et al.*, 2005)。细菌 16S rDNA 序列在 GenBank 核苷酸数据库中的接受号为 KR086422-KR086717。

2 结果与分析

2.1 细菌 16S rDNA 文库数据分析

对公司返回的序列进行去载体和嵌合体处理,共得到 508 有效克隆子,通过 DOTUR 软件分析,将相似度大于 97%的有效克隆子归为一个 OTU, DH6、DH9、DH16、DH17 和 DH21 五个站点的 OTU 分别为 47、82、36、69 和 86,并获得五个站点各自的 Bias-corrected Chao 1、ACE 丰富度指数、香农指数(*H'*)和辛普森指数(*D'*)(如表 2 所示)。利用生成的 Rarefaction 数据,制作稀释性曲线(图 2)。

表 2 东海陆架表层沉积物细菌多样性指数
Tab. 2 The bacterial diversity index from the surface layer sediments of the East China Sea

站点	有效克隆子数	OTU 数	Bias-corrected Chao 1	ACE 丰富度指数	香农指数(H')	辛普森指数(D)
DH6	105	47	232.25	329.176	2.93605	0.135165
DH9	96	82	401.5	433.6	4.33684	0.004167
DH16	97	36	225	152.516	2.61672	0.168814
DH17	100	69	281.143	284.774	4.03301	0.013535
DH21	110	86	471.857	492.577	4.31368	0.007673

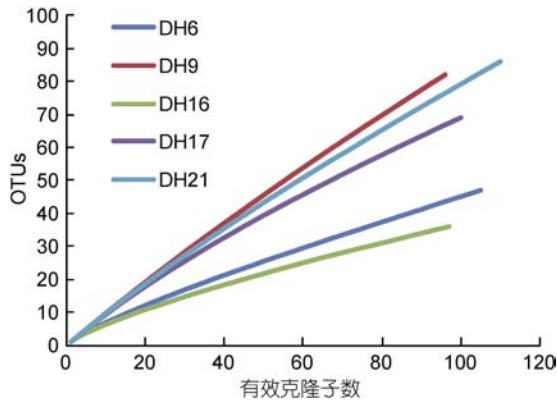


图 2 东海站点克隆文库稀释曲线

Fig.2 Rarefaction curve from five sampling sites of the East China Sea

文库分析结果表明: DH21 和 DH9 两个站点的 Bias-corrected Chao 1 和 ACE 丰富度指数显著高于其它三个站点; 而辛普森指数(D)显著低于其它三个站点, 可见 DH9 和 DH21 站点多样性较高, DH17 站点次之, DH6 和 DH16 两个站点的多样性最低。从稀释曲线上来看, 五个站点多样性由高到低排列依次为:

DH9>DH21>DH17>DH6>DH16, 与指数分析结果基本一致; 随着克隆子数量的增加, 稀释曲线的斜率有一定程度的减小, 但 DH9、DH21 和 DH17 三个站点的斜率仍然较大, 说明克隆子和 OTU 的数量还没有覆盖站点细菌多样性的真实范围。

2.2 细菌群落结构分析

对返回的 DNA 序列参考 NCBI Taxonomy 上的分类方法, 变形菌门以“纲”为分类单位, 其它细菌以“门”为分类单位, 共得到包括变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、酸杆菌门(Acidobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、放线菌门(Actinobacteria)、硝化螺旋菌门(Nitrospira)、WS3、拟杆菌门(Bacteroidetes)、螺旋体门(Spirochaetes)、OP8、浮霉菌门(Planctomycetacia)、疣微菌门(Verrucomicrobiae)和芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)等 13 个类群, 其中变形菌门包含 α -变形菌纲(Alpha-proteobacteria)、 β -变形菌纲(Beta-proteobacteria)、 γ -变形菌纲(Gamma-proteobacteria)和 δ -变形菌纲(Delta-proteobacteria), 五个站点的细菌多样性及群落组成结构如图 3 所示。

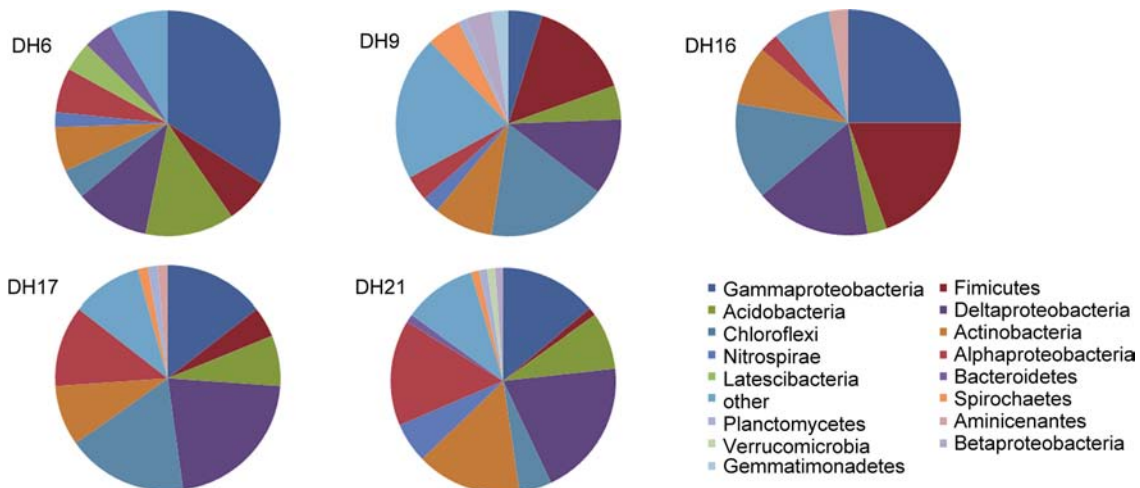


图 3 东海各站点表层沉积物菌群组成

Fig.3 Composition of clone libraries for surface layer sediments in five sites of the East China Sea

由图 3 可知, 变形菌门是东海陆架沉积物中的优势菌群, DH6、DH9、DH16、DH17 和 DH21 五个站点变形菌门的 OTU 数占总 OTU 的百分比分别为 51%、23%、44%、48% 和 50%。在变形菌门中, γ -变形菌和 δ -变形菌是两个主要的典型类群, 但在不同的站点, 其丰度也存在一定的差异: DH6 和 DH16 站点 γ -变形菌丰度高于 δ -变形菌, 而 DH9、DH17 和 DH21 站点的 δ -变形菌丰度又明显高于 γ -变形菌。 α -变形菌在各个站点也均有分布, DH21 站点的 α -变形菌丰度最高(含 13 个 OTU, 占比为 15.1%), DH17 站点的 α -变形菌丰度次之(8 个 OTU, 占比为 11.6%), DH6、DH9 和 DH16 站点丰度较低。 β -变形菌丰度最低, 只有在 DH9 和 DH21 两个站点有分布, 分别占总 OTU 的 3.7% 和 1.1%。

除了优势菌群外, 厚壁菌门、绿弯菌门、酸杆菌门和放线菌门在各个站点均有分布, 其丰度和多样性差异较大。厚壁菌门在 DH16 站点的丰度最高(占 16.4%), DH9 站点次之(12 个 OTU, 占比 14.6%), 其它三个站点均在 7% 以下。绿弯菌门在 DH17 站点的丰度最高(占比 17.4%), DH9 和 DH16 站点也有较高的丰度(分别为 17.1% 和 13.9%), 而 DH6 和 DH21 站点绿弯菌所含比例仅为 4.2% 和 4.7%。另外, 酸杆菌门在各个站点的丰度并不高, 除 DH6 站点的占比达到 12.8% 外, 其它站点丰度均在 10% 以下; 而放线菌门在 DH21 站点(14 个 OTU)丰度最高, 占总 OTU 的 15.1%。

还有一些门类并不是所有站点都有分布, 且丰度普遍较低。如硝化螺旋菌门只在 DH6、DH9 和 DH21 站点分布, 占比分别为 2.1%、2.4% 和 5.8%; WS3 只存在于 DH6 站点, 占比为 4.3%; 拟杆菌门只存在于 DH6 和 DH21 两个站点中, 占比分别为 4.2% 和 1.2%; 螺旋体门和浮霉菌门存在于 DH9、DH17 和 DH21 站点, 都只有唯一的 OTU 分布; OP8 在 DH16 和 DH17 站点各有一个 OTU 分布; 芽单胞菌门只在 DH9 站点有一个 OTU 分布; 疣微菌门也只在 DH21 站点有一个 OTU 分布。另外 5 个站点还有 8.3%—20.7% 的分类地位不确定的微生物。

2.3 16S rRNA 基因序列的系统进化分析

2.3.1 DH6 站点系统发育树分析

DH6 站点的 105 个有效克隆子可分为 11 个细菌类群(图 4), 其中 γ -变形菌纲占 47 个 OTU 的 36%, 是该站点的优势菌群, 以基因型 DH61B3(38 个克隆子)为代表的序列与爱琴海沉积物嗜冷杆菌(*Psychrobacter* sp. 3BM13Y12)

同源性较高(99%), 基因型 DH61B46 与东海陆架沉积物未培养 γ -变形菌 DH133B19 克隆有高同源性(99%), 基因型 DH62B33 与大洋地壳不可培养 γ -变形菌 P0X4b3H08 克隆有高同源性(99%), DH61B56 序列和澳大利亚大堡礁附近沉积物未培养 γ -变形菌 R76-92 克隆相似度达 99%。 δ -变形菌在 DH6 站点也有一定分布, 基因型 DH61B39 与比塞大瀉湖(突尼斯)沉积物未培养 δ -变形菌 2C48 克隆有高同源性(99%), DH62B39 序列与冲绳中部槽伊平屋村北场深海热液喷口附近沉积物未培养 δ -变形菌 IBP10m-6 克隆有高同源性(99%)。 α -变形菌则以基因型 DH62B34 为代表, 其序列与来自海洋死亡区(最小含氧区)的未培养细菌 SGSX1079 克隆同源性最高(100%)。

酸杆菌门有 6 个 OTU, 代表基因型 DH61B48 与南大西洋海岸线沙滩的未培养细菌 LC3-26 克隆高同源性(99%)。拟杆菌门在东海含量较低(2 个克隆子), 代表基因型 DH62B28 序列和南太平洋东芳扩张中心(ELSC)的深海热液区未培养 *Bacteroidetes bacterium* clone 44 有高同源性(99%)。放线菌代表基因型 DH62B38 序列与西南印度洋中脊沉积物中未培养细菌 T13J-B77 克隆同源性较高(99%)。绿弯菌门代表基因型 DH62B36 序列与东太平洋中国结核区的未培养细菌 ES0303-B80 克隆同源性高(99%)。厚壁菌代表基因型 DH61B16(2 个克隆子)与青藏高原湖泊细菌未培养细菌 Fi09-23 克隆具有高相似性(99%)。硝化螺旋菌在该区有少量分布, DH61B60 序列与香港维多利亚港沉积物未培养 *Nitrospirae bacterium* VHS-B4-29 克隆有较高的同源性(99%)。WS3 是 DH6 站点特有的类群, 其 DH62B29 序列与法属圭亚那海岸的未培养细菌克隆 5_64 具有很高的同源性(99%)。

2.3.2 DH9 站点系统发育树分析

从 DH9 站点的系统发育树中可以发现, 变形菌门虽丰度不高, 但覆盖了 4 个纲(图 5 所示)。 δ -变形菌其代表基因型 DH94B1 与西班牙西北海岸谢斯群岛漏油区域未培养细菌 ANOX-036 克隆序列有高同源性(99%), 基因型 DH94B15 序列与马洛卡岛(地中海附近海域)原油污染响应的未培养硫酸盐还原菌(SRB)MS-B135 克隆相似度较高(99%), 这与 δ -变形菌纲一些种类可以在厌氧条件下还原硫酸盐的性质相符。 β -变形菌代表基因型 DH92B6 与黄瓜根际未培养细菌 HG-J0184 克隆同源性高(99%), 另外基因型 DH91B8 与长江口崇西湿地芦苇根际未培养细菌 P-B269 克隆同源性较高(98%)。 γ -变形菌和 α -变形菌在该站点只有很少的类

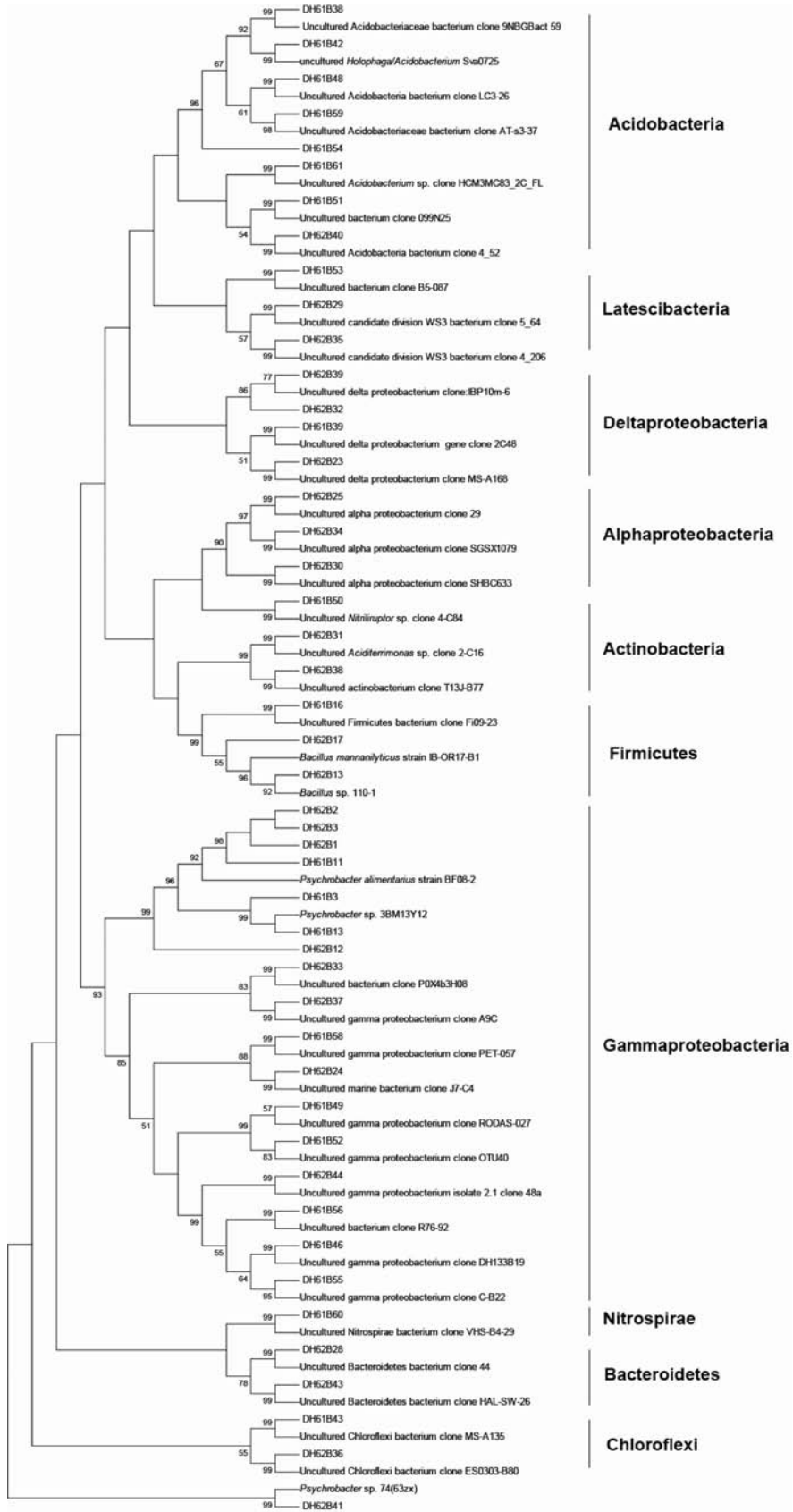


图 4 DH6 站点系统发育树
Fig.4 Phylogenetic tree for DH6 site

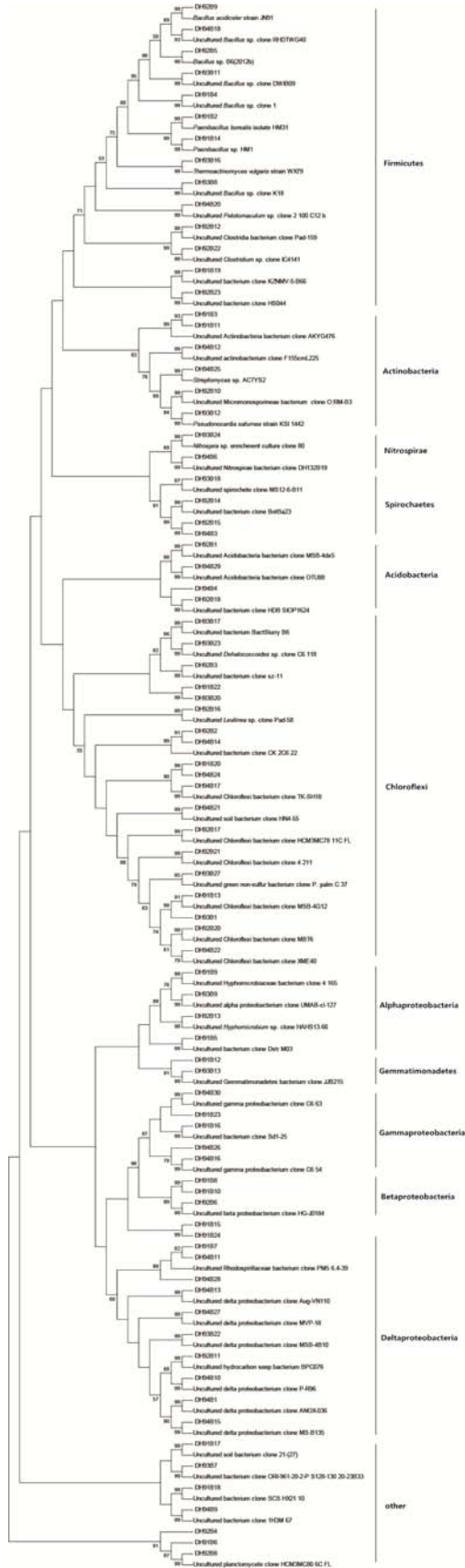


图5 DH9 站点系统发育树
Fig.5 Phylogenetic tree for DH9 site

群存在, 其中代表基因型 DH94B16 序列与椒江口沉积物未培养 γ -变形菌克隆 C6_54 同源性高(99%), DH91B9 序列与法属圭亚那海岸沉积物未培养 α -变形菌克隆 4_165 相似性较高(99%)。

绿弯菌门和厚壁菌门是 DH9 站点的两个主要类群, 分别占 17%和 14%。绿弯菌门类群中的基因型 DH94B17 与非洲中部坦噶尼喀湖沉积物的未培养细菌 TK-SH18 克隆同源性较高(99%), 基因型 DH92B21 与法属圭亚那海岸沉积物未培养绿弯菌 4_211 克隆具有较高亲缘性(99%), 基因型 DH92B17 与希腊克里特岛海域沉积物未培养细菌 HCM3MC78_11C_FL 克隆同源性较高(99%)。厚壁菌门类群中代表基因型 DH92B22 序列(2 个克隆子)与斯瓦尔巴特群岛 Austre Lovénbreen 冰川样品的未培养细菌 IC4141 克隆同源性较高(99%), DH94B20 序列与含烃蓄水层的 *Pelotomaculum* sp. clone 2_100_C12_b 有高同源性(相似度 99%)。

硝化螺旋菌门共有两个 OTU, 基因型 DH93B24 序列与地中海瀉湖石油污染沉积物中的可培养 *Nitrospira* sp. clone 80 同源性较高(99%), DH94B6 序列与同样来自东海沉积环境的未培养细菌 DH132B19 克隆同源性达 99%。螺旋体门中的 DH 92B14 序列与珠江口沉积物未培养细菌 BotBa23 克隆有很高的同源性(99%)。酸杆菌门在该站点有分布, 其中基因型 94B29 序列与南沙海湾养殖区沉积物的未培养细菌 OTU88 克隆同源性较高(99%)。芽单胞菌门是 DH9 站点特有的菌群, 其代表基因型 DH91B12 与黄海大陆架沉积物 Gemmatimonadetes bacterium clone JJB215 相似度达 99%。

2.3.3 DH16 站点系统发育树分析 由图 6 可知, DH16 站点中 γ -变形菌纲含量最高, 其中代表基因型 DH161B1(38 个克隆子)与椒江口沉积物未培养细菌 C5B01 克隆的同源性最高(100%), 基因型 DH162B12 与挪威斯瓦尔巴特群岛水样中的未培养军团菌目克隆 Legionellales bacterium SSIM-D10 具有很高的同源性(99%), 基因型 DH162B56 与南大西洋拉普拉塔河的沉积物未培养细菌克隆 γ -proteobacterium ARTE12_226 的亲缘性比较近(99%)。另外还有少量的 δ -变形菌克隆子, 其代表基因型 DH162B19 (3 个克隆子)与马洛卡沙性沉积物中的未培养细菌 MS-K53 克隆具有很高亲缘性(100%)。

厚壁菌门的含量仅次于 γ -变形菌纲(7 个 OTU), 该类群的基因型 DH162B34 序列与地中海马洛卡岛



图 6 DH16 站点系统发育树
Fig.6 Phylogenetic tree for DH16 site

沿岸附近的沉积物层未培养梭菌目克隆 Clostridiales bacterium MS-A191 的相似度最高(100%), DH162B26 序列则与地中海东部深海未培养克隆子 Fimicutes bacterium M71_D94 表现出高同源性(99%)。放线菌在该区域只有 3 个 OTU 分布, 其中 DH162B32 序列与北海区域的沉积物未培养放线菌 BAC-OG90 相似度最高(100%)。DH162B2 序列与南沙海湾的网箱养殖区域沉积物酸杆菌克隆子 *Acidobacterium* sp. OTU104 的同源性高达 100%。绿弯菌门在该站点有分布, 其中 DH162B53 序列与摩卡岛浅甲烷冷泉附近未培养克隆子 Anaerolineaceae bacterium isolate DGGE gel band 2 有高的同源性(100%)。DH16 站点还有独特的 OP8 类群分布, 其基因型 DH162B6 与香港维多利亚港未培养沉积物细菌 candidate division OP8 bacterium VHS-B3-2 克隆同源性为 100%。

2.3.4 DH17 站点系统发育树分析 γ -变形菌纲和 δ -变形菌纲是 DH17 站点两个主要的类群(图 7), 其中 γ -变形菌纲的代表基因型 DH172B7(5 个克隆子)意大利里窝那港海底沉积物未培养细菌 isolate 1.2, clone 140 有较高同源性(98%), DH173B23 序列和墨西哥 Alchichica 盐碱湖的未培养细菌 Alchichica_AQ1_1_1B_07 克隆同源性比较高(99%); δ -变形菌纲中的基因型 DH171B20(3 个克隆子)序列与意大利里窝那港海底沉积物的未培养细菌 isolate 2.1, clone 59b 克隆有较高同源性(99%), 基因型 DH173B46 与南沙海湾养殖区沉积物的未培养细菌 OTU146 克隆有很高亲缘性(99%)。 α -变形菌纲类群中 DH173B41 序列与甲基杆菌 *Methylobacterium komagatae* n23e-3 序列亲缘性比较高(99%), DH173B12(3 个克隆子)序列与 α -变形菌纲中的未培养醋杆菌 Acetobacteraceae bacterium AMIG7 克隆相似度为 99%。

绿弯菌门在该站点的含量比较丰富, 其中代表基因型 DH171B9(6 个克隆子)与坦噶尼喀湖得到的未培养细菌 TK-SH18 克隆具有较高的同源性(97%), DH172B23 序列与墨西哥大陆坡海湾的未培养细菌 IODP1320B2H.7.13 克隆具有高同源性(99%), 基因型 DH173B15 序列则和厦门红树林沉积物未培养细菌 XME13 克隆相似度为 99%。酸杆菌门类群中的基因型 DH172B10 序列与日本竹富岛海底热液环境中的未培养细菌 pItb-vmat-12 克隆具有高度同源性(99%)。厚壁菌门的代表基因型 DH171B13 序列与地中海马洛卡岛沿岸附近的沉积物未培养梭菌目 MS-C192 克隆的相似度最高(99%)。螺旋体门和浮霉菌

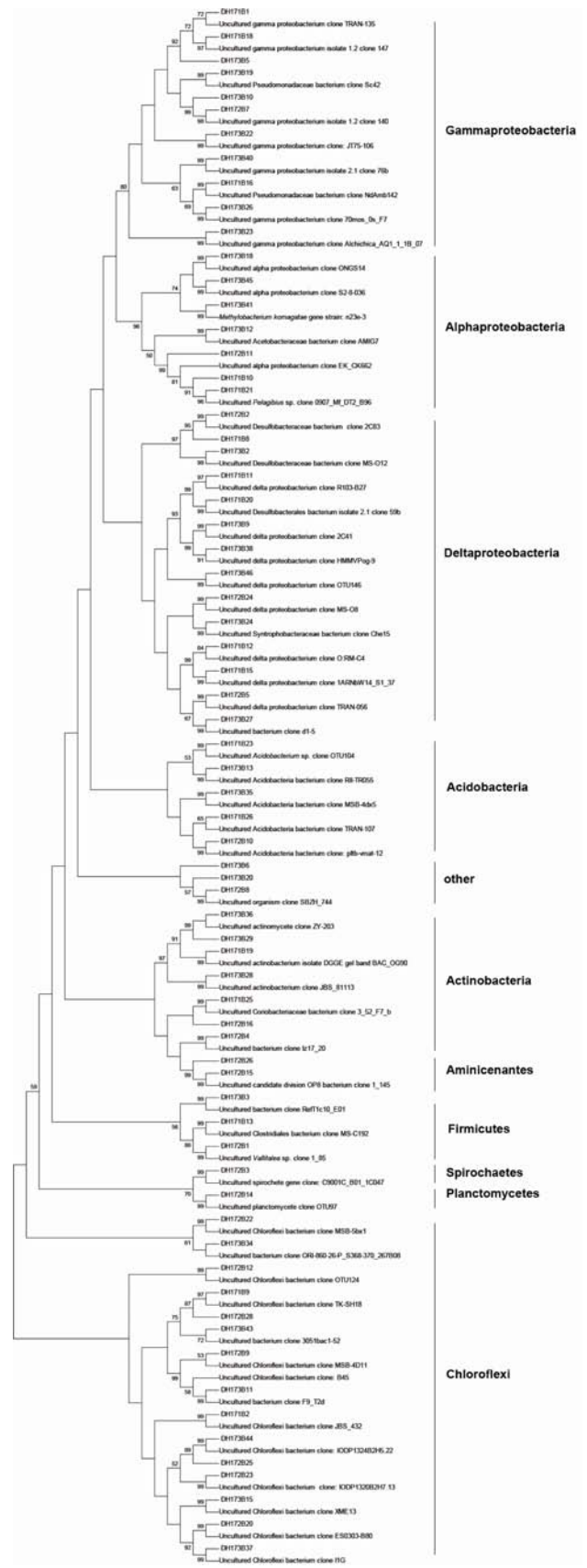


图 7 DH17 站点系统发育树
Fig.7 Phylogenetic tree for DH17 site

门在 DH17 站点分布较少,螺旋体门代表基因型 DH172B3 序列与日本下北半岛的海底沉积物中未培养细菌 C9001C_B01_1_C047 克隆具有高同源性(99%);浮霉菌门代表基因型 DH172B14 与南沙海湾养殖区沉积物的未培养细菌 OTU97 克隆相似性达 99%。OP8 在该站点也有分布,其基因型 DH172B15 与法属圭亚那海岸沉积物未培养细菌 1_145 克隆具有很高亲缘性(99%)。

2.3.5 DH21 站点系统发育树分析 由图 8 可知, DH21 站点的细菌多样性非常丰富。 δ -变形菌纲在该站点的丰度较高,代表基因型 DH211B18(3 个克隆子)与胶州湾未培养沉积物细菌 JBS_E404 克隆高度同源(100%),基因型 DH216B6(2 个克隆子)和 DH213B2(5 个克隆子)序列分别与西班牙西北海岸谢斯群岛漏油区域获得的未培养细菌 OXIC-088 和 RODAS-105 克隆高度同源(100%)。 α -变形菌纲中的代表基因型 DH212B2(6 个克隆子)与盐碱土壤未培养生丝微菌克隆 *Hyphomicrobium* sp. HAHS13.66 同源性很高(99%), DH211B16 序列与印度西部阿拉伯海岸坎贝湾沿岸土壤细菌 ONGS204 克隆有高同源性(98%), DH215B2 序列与南大西洋海岸线的海洋沙滩未培养细菌 LC1-34 克隆高度同源(100%)。 γ -变形菌纲的代表基因型 DH215B12(3 个克隆子)与意大利里窝那港海底沉积物未培养细菌 isolate 1.2, clone 147 同源性高达 100%, DH213B14 序列和同样来自西班牙西北海岸谢斯群岛漏油区域沉积物的未培养细菌 PET-057 克隆高度同源(100%)。 β -变形菌在该站点分布很少,且得到的序列 DH216B13 与地中海海绵区未培养细菌 *Nitrosospira* sp. Msd8 克隆高度同源(100%)。

放线菌门在该站点比较丰富,代表基因型 DH214B16 与希腊南部克里特岛的附近好氧沉积物未培养细菌 HCM3MC80_9D_FL 克隆具有很高的亲缘性(100%),另外基因型 DH216B10 相似度很高的序列来自北海(54°4'N/4°E)区域沉积物,与未培养细菌 isolate DGGE gel band BAC_OG90 克隆同源性高达 100%。酸杆菌门在 DH21 站点分布同样较多,基因型 DH215B6 序列与西班牙西北海岸谢斯群岛漏油区域沉积物的未培养细菌 PET-051 克隆同源性最高(100%),基因型 DH215B13 与来自东海陆架 DH-17 站点表层沉积物未培养细菌 DH132B07 克隆同源性较高(98%)。拟杆菌门的代表基因型 DH214B14 序列与南汤加弧火山 1 号口的浅层热液喷口的未培养细菌 V1B07b75 克隆具有很高的同源性(99%)。硝化螺

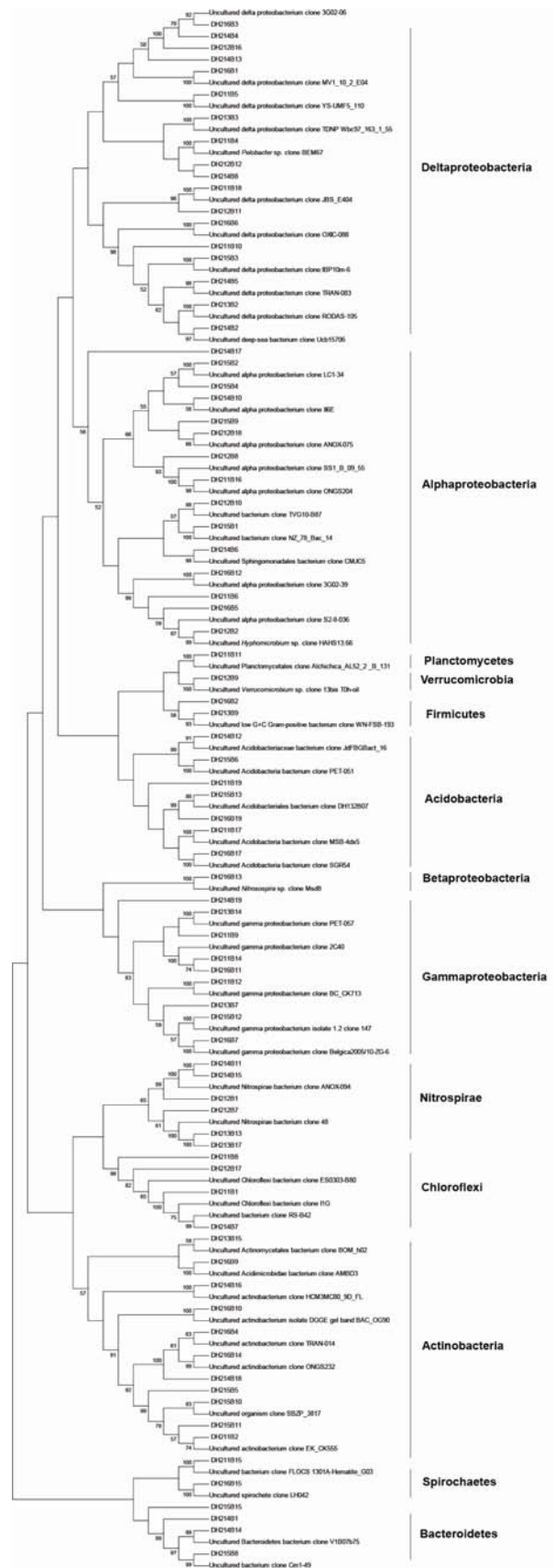


图 8 DH21 站点系统发育树
Fig.8 Phylogenetic tree for DH21 site

旋菌门以 DH214B11 为代表, 有 5 个克隆子, 其序列与西班牙西北海岸谢斯群岛漏油区域沉积物的未培养细菌 ANOX-094 克隆同源性高达 100%。浮霉菌门和螺旋体门在 DH21 站点都只有一个 OUT 分布, 其中浮霉菌代表序列 DH211B11 与墨西哥 Alchichica 盐碱湖的未培养细菌 Alchichica_AL52_2_1B_131 克隆同源性高达 100%; 螺旋体门代表基因型 DH216B15 序列与埃布罗、卡马格三角洲未培养细菌 LH042 克隆亲缘性很高(100%)。疣微菌是 DH21 站点的特有类群, 其基因型 DH212B9 序列与普罗旺斯 Etang-de-Berre 瀉湖沉积物未培养细菌 13bis T0h-oil 克隆高度同源(100%)。

3 讨论

3.1 典型优势菌群丰度和地理分布

变形菌门一直被认为是海洋表层沉积环境中的优势细菌类群, 一般都超过微生物生物量的 50% 以上(Ravenschlag *et al.*, 2001; Bowman *et al.*, 2003), 但在不同海域表层沉积物基因文库中所占的比例差异较大, 如卡斯卡底古陆边缘次表层沉积物中变形菌门含量占文库比例高达 95% (Marchesi *et al.*, 2001), 而在日本 Nankai 海槽 1176 站位次表层沉积物中, 变形菌门仅占基因文库的 22% (Kormas *et al.*, 2003)。关于变形菌在东海陆架表层沉积物中是否为典型优势菌群, 王健鑫等(2012)报道变形菌门占东海陆架表层沉积物细菌文库的 41.5%; 张东声(2011)研究长江口及邻近海域的沉积物微生物中变形菌门占该海域基因文库的 47.2%; 郑艳玲等(2012)研究崇明东滩表层沉积物变形菌门占文库的比例在 22.4%—34.6%; 本研究五个站点中有 4 个站点的变形菌门所占 OTU 数的比例接近或超过 50%, 说明变形菌门在东海区域是主要的细菌类群。

变形菌门不同纲的菌群在海洋沉积物中的丰度变化也是海洋微生物群落结构研究中的一个重要指标。王健鑫等(2012)研究表明 γ -变形菌纲是优势类群, 占东海 DH-13 站点区域基因文库的 52%; Feng 等(2009)对长江口和东海沿岸研究也认为沉积物中变形菌门以 γ -变形菌纲为主; 李友训等(2008)对东太平洋深海沉积物的研究也认为 γ -变形菌纲是该沉积物的优势菌群, 这些结果与本研究 DH6 和 DH16 相一致。但李涛等(2008)对南海西沙海槽地区的表层沉积物细菌多样性的研究发现 δ -变形菌纲为优势类群; 郭建丽等(2013)对双台子河口沉积物中细菌多样性研

究表明 δ -变形菌纲占基因文库的 60%, 为绝对优势菌群, 这些结果与本研究 DH9、DH17 和 DH21 站点相一致。另外有研究表明 δ -变形菌丰度的增加可能是与重金属、石油烃等环境污染影响相关(Orcutt *et al.*, 2010; 李新伟, 2012; 郭建丽等, 2013), 本研究的 DH9、DH17 站点研究结果也与这一观点相符。从地理位置看, DH9 和 DH17 站点位于舟山市嵊泗列岛附近, 周围渔船较多, 人为活动也相对频繁, 这些都可能引起重金属和油污污染。

绿弯菌门是 20 世纪 80 年代才被认可的一个新的系统发育分支(Woese *et al.*, 1987), 研究表明其在深海的冷泉、海底深部玄武岩、热液区等环境都有分布(Lysnes *et al.*, 2004; Reed *et al.*, 2006), 被认为在低氧和厌氧环境中发挥重要作用。绿弯菌门在 DH9 站点含量最高, 有着绝对优势, 在 DH17 站点含量次于最优优势 δ -变形菌纲。分析两个站点发现, DH9(绿弯菌门共 14 个 OTU, 表层占 3 个)和 DH17(绿弯菌门共 12 个 OUT, 表层占 2 个)表层含有绿弯菌门比例分别为 21.4%和 16.7%, 这似乎也表明绿弯菌适合生活在含氧量较低的沉积物环境中, 与陈明娜(2007)的研究结果相一致。

3.2 特殊类别细菌丰度和地理分布

疣微菌门是革兰氏阴性细菌, 在海洋动物、南极沿岸沉积物和海水等环境中存在(Bowman *et al.*, 2003, 2004; Sullivan *et al.*, 2004), 能在厌氧条件下进行亚硝化作用(Freitag *et al.*, 2003), 根据 16S rRNA 序列差异可将疣微菌门分为 7 个亚门(Schlesner *et al.*, 2006), 但关于疣微菌门的研究还是很少。Freitas 等(2012)对疣微菌门在全球海洋环境的分布和多样性的研究发现, 疣微菌在海洋沉积物细菌群落中占 1.4%, I 型和 IV 型亚门是沉积环境中丰度最高的类群, 对海洋中碳的生物地球化学循环有着重要作用, 同时对沿岸多个站点的研究表明, 陆地径流输出不是影响沿岸海域疣微菌门丰度的主要原因。本实验室前期研究发现疣微菌门在东海 DH-13 站点的含量为 3.9%(王健鑫等, 2012), 本研究表明疣微菌门是离岸最远的 DH21 站点的特有菌群(占比 1.1%), 其丰度和地理分布基本和 Freitas 等(2012)的结果相一致。

芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)是土壤环境微生物的 9 大类群之一, 丰度占到土壤中细菌 16S rRNA 基因文库的 0.2%—6.5%, 平均含量为 2.2% (Janssen, 2006; DeBruyn *et al.*, 2011), 但目前正式命名的仅为一属, 即芽单胞菌属(*Gemmatimonas*), 代表菌种为

Gemmatimonas aurantiaca strain T-27, 是一类革兰氏阴性细菌, 通过出芽方式繁殖(Zhang *et al*, 2003)。芽单胞菌门在海洋沉积环境的研究并不多, Heijs 等对地中海东部海底碳酸盐风化壳的研究发现有 Gemmatimonadetes 序列存在; Durbin 等(2011)对南太平洋深渊沉积环境的微生物群落进行研究, 发现 Gemmatimonadetes 在表层沉积环境丰度较高(7%—16%), 但随着深度增加, 丰度快速减少; 另外根据 16S rRNA 序列将芽单胞菌门划分为 4 个亚门, 其中 II 型和 IV 型亚门偏好存在于海洋和盐沼环境。芽单胞菌在本研究中存在于离岸最近的 DH9 站点, 可能是由于长江和钱塘江等径流冲刷陆地土壤后进入海洋沉积环境的结果。

Candidate division 使用最初的来源地或最先命名的克隆子来命名各分支, 如 OP_x (x 为数字)是根据黄石公园热泉黑曜岩池塘(Obsidian Pool)而命名的(Hugenholtz *et al*, 1998)。Farag 等(2014)通过 16S rRNA 基因全序列分析, 将 OP8 分为 4 纲 8 目, 并发现该类群在烃类污染的环境中丰度较高, 其次是海洋生境(特别是热液喷口和珊瑚礁), 水, 非海洋生境(尤其是地面泉水和地下水样品); 陈明娜(2007)和李涛等(2008)分别对东西太平洋和南海的沉积物研究, 均有发现该菌群, 本研究在 DH16 和 DH17 站点中也检测到同源序列, 说明 OP8 在不同海域沉积物中还是广泛存在的。另一类 Candidate division (WS3)只存在于 DH6 站点, 早期研究认为该菌群与产甲烷环境有关(Dojka *et al*, 1998), 王永霞(2014)在程海湖沉积物细菌多样性研究也有报道, Lin 等(2015)研究发现, WS3 一些类群能够形成硫复铁矿磁小体, 在铁和硫循环过程中扮演着未知的角色。

3.3 细菌群落结构与地质区域影响

东海陆架沉积环境错综复杂, 郑国兴等(1982)将东海陆架划分为现代长江水下三角洲沉积区、现代浅海沉积区、滨海残留沉积区、混合沉积区等不同地质区域。本研究的五个站点中, DH9 和 DH17 位于现代长江水下三角洲沉积区, 且两个站点都位于人类活动密集的区域, 受人为影响比较多; DH6 和 DH16 位于滨海残留沉积区, DH21 站点位于混合沉积区。

随着东部沿海地区经济的发展和人类活动影响的加大, 陆源输入使得东海的富营养化程度增加和环境污染加剧(王新等, 2010), 比如重金属污染、化学物质污染、油气田的开发、近海船坞的建设等都在持续影响着东海的近海生态环境平衡, DH9 和 DH17 受

其影响比较多, 细菌多样性和丰度均较高, 有较多同源序列都与重金属、化学物质和油气污染相关。DH6 和 DH16 位于滨海残留沉积区, 该区域是黑潮暖流与台湾暖流之间的过渡带, 为外洋海水所控制, 沉积速率低, 营养不够丰富, 故站点菌群的丰度不是很高, 这与郑国兴等(1982)得出的在滨海残留沉积区菌量最低的研究结果相一致。DH21 站点是本研究离海岸最远的站点, 其细菌多样性和丰度都比较高(尤其是放线菌门), 可能与郑国兴等(1982)研究中的 G8023 站点(离岸最远海区)一样, 受较高浓度的有机质、总氮含量影响, 同时该站点部分同源序列与油烃污染环境有关。

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
- 王永霞, 2014. 云南高原程海湖沉积物中的细菌多样性研究. 昆明: 云南大学博士学位论文, 1—146
- 王健鑫, 许贤恩, 周链链等, 2012. 东海陆架表层沉积物微生物多样性初步研究. 海洋与湖沼, 43(4): 805—813
- 卢婧雯, 张心齐, 杜丽丽等, 2012. 中国东海及南海近海 4 采样点海水可培养细菌的多样性研究. 浙江大学学报(理学版), 39(4): 443—449
- 有小娟, 李秋芬, 张 艳等, 2013. 象山港内西沪港海域沉积环境细菌群落结构的时空变化及其主要环境影响因子. 应用与环境生物学报, 19(5): 742—749
- 刘玉娟, 田新朋, 黄小芳等, 2014. 中国南海沉积环境可培养细菌多样性研究. 微生物学通报, 41(4): 661—673
- 杜 萍, 刘晶晶, 沈李东等, 2012. Biolog 和 PCR-DGGE 技术解析椒江口沉积物微生物多样性. 环境科学学报, 32(6): 1436—1444
- 李 涛, 王 鹏, 汪品先, 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
- 李万超, 2008. 东海泥质区沉积物部分化学成分的组成特征及其对环境因素的响应. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 1—77
- 李友训, 李富超, 秦 松等, 2008. 东太平洋深海沉积物中 DNA 的提取及细菌多样性初步分析. 海洋科学, 32(12): 69—74
- 李家彪, 2008. 东海区域地质. 北京: 海洋出版社, 1—105
- 李新伟, 2012. 胶州湾近岸沉积物中细菌群落对石油和铜污染的响应特征. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 1—70
- 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
- 张东声, 2011. 长江口及其邻近海域微生物的多样性和生态分布特征研究. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 1—131
- 陈明娜, 2007. 东、西太平洋深海沉积物细菌多样性研究. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所)硕士学位论文,

- 1—65
- 郑国兴, 史君贤, 陈忠元等, 1982. 长江口及邻近陆架海区细菌与沉积物相互关系的初步探讨. 海洋学报, 4(6): 743—752
- 郑艳玲, 侯立军, 陆敏等, 2012. 崇明东滩夏冬季表层沉积物细菌多样性研究. 中国环境科学, 32(2): 300—310
- 郭建丽, 樊景凤, 付慧等, 2013. 双台子河口沉积物中细菌多样性分析. 微生物学通报, 49(9): 1550—1559
- Arakaki A, Shibusawa M, Hosokawa M *et al*, 2010. Preparation of genomic DNA from a single species of uncultured magnetotactic bacterium by multiple-displacement amplification. Applied and Environmental Microbiology, 76(5): 1480—1485
- Arrigo K R, 2005. Marine microorganisms and global nutrient cycles. Nature, 437(7057): 349—355
- Azam F, Worden A Z, 2004. Microbes, molecules, and marine ecosystems. Science, 303(5664): 1622—1624
- Bowman J P, McCuaig R D, 2003. Biodiversity, community structural shifts, and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sediment. Appl Environ Microbiol, 69(5): 2463—2483
- Bowman J P, Nowak B, 2004. Salmonid gill bacteria and their relationship to amoebic gill disease. J Fish Dis, 27(8): 483—492
- DeBruyn J M, Nixon L T, Fawaz M N *et al*, 2011. Global biogeography and quantitative seasonal dynamics of Gemmatimonadetes in soil. Appl Environ Microbiol, 77(17): 6295—6300
- Dojka M A, Hugenholtz P, Haack S K *et al*, 1998. Microbial diversity in a hydrocarbon-and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. Appl Environ Microbiol, 64(10): 3869—3877
- Durbin A M, Teske A, 2011. Microbial diversity and stratification of South Pacific abyssal marine sediments. Environ Microbiol, 13(12): 3219—3234
- Farag I F, Davis J P, Youssef N H *et al*, 2014. Global Patterns of Abundance, Diversity and Community Structure of the *Aminicenantes* (Candidate Phylum OP8). PLoS One, 9(3): e92139, <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0092139>
- 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(2): 236—248
- Freitag T E, Prosser J I, 2003. Community structure of ammonia-oxidizing bacteria within anoxic marine sediments. Appl Environ Microbiol, 69(3): 1359—1371
- Freitas S, Hatosy S, Fuhrman J A *et al*, 2012. Global distribution and diversity of marine *Verrucomicrobia*. ISME J, 6(8): 1499—1505, doi:10.1038/ismej.2012.3
- Hugenholtz P, Pitulle C, Hershberger K L *et al*, 1998. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. J Bacteriol, 180(2): 366—376
- Janssen P H, 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. Appl Environ Microbiol, 72(3): 1719—1728
- Kormas K A, Smith D C, Edgcomb V *et al*, 2003. Molecular analysis of deep subsurface microbial communities in Nankai trough sediments (ODP Leg 190, Site 1176). FEMS Microbiol Ecol, 45(2): 115—125
- Köster M, Wardenga R, Blume M, 2008. Microscale investigations of microbial communities in coastal surficial sediments. Mar Ecol, 29(1): 89—105
- Kumar S, Tamura K, Nei M, 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Brief Bioinform, 5(2): 150—163
- Lin W, Pan Y, 2015. A putative greigite-type magnetosome gene cluster from the candidate phylum *Latescibacteria*. Environ Microbiol Rep, 7(2): 237—242, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1758-2229.12234/abstract?deniedAccessCustomisedMessage=&userIsAuthenticated=false>
- Lysnes K, Thorseth I H, Steinsbu B O *et al*, 2004. Microbial community diversity in seafloor basalt from the Arctic spreading ridges. FEMS Microbiol Ecol, 50(3): 213—230
- Marchesi J R, Weightman A J, Cragg B A *et al*, 2001. Methanogen and bacterial diversity and distribution in deep gas hydrate sediments from the Cascadia margin as revealed by 16S rRNA molecular analysis. FEMS Microbiol Ecol, 34(3): 221—228
- O'Sullivan L A, Fuller K E, Thomas E M *et al*, 2004. Distribution and culturability of the uncultivated 'AGG58 cluster' of the *Bacteroidetes* phylum in aquatic environments. FEMS Microbiol Ecol, 47(3): 359—370
- Orcutt B N, Joye S B, Kleindienst S *et al*, 2010. Impact of natural oil and higher hydrocarbons on microbial diversity, distribution, and activity in Gulf of Mexico cold-seep sediments. Deep Sea Res Part II, 57(21—23): 2008—2021, doi:10.1016/j.dsr2.2010.05.014
- 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. J microbiol, 46(3): 244—249
- Ravenschlag K, Sahn K, Amann R, 2001. Quantitative molecular analysis of the microbial community in marine Arctic sediments (Svalbard). Appl Environ Microbiol, 67(1): 387—395
- Reed A J, Lutz R A, Vetriani C, 2006. Vertical distribution and diversity of bacteria and archaea in sulfide and methane-rich cold seep sediments located at the base of the Florida Escarpment. Extremophiles, 10(3): 199—211
- Schlesner H, Jenkins C, Staley J T, 2006. The Phylum Verrucomicrobia: a phylogenetically heterogeneous bacterial group. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E eds. The Prokaryotes. New York: Springer, 881—896
- Schloss P D, Handelsman J, 2005. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. Appl Environ Microbiol, 71(3): 1501—1506
- Simmons T L, Coates R C, Clark B R *et al*, 2008. Biosynthetic origin of natural products isolated from marine microorganism-invertebrate assemblages. Proc Natl Acad Sci U S A, 105(12): 4587—4594
- Venter J C, Remington K, Heidelberg J F *et al*, 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso sea. Science, 304(5667): 66—74
- Woese C R, 1987. Bacterial evolution. Microbiol Rev, 51(2): 221—271
- Zhang H, Sekiguchi Y, Hanada S *et al*, 2003. *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum *Gemmatimonadetes* phyl. Nov. Int J Syst Evol Microbiol, 53(4): 1155—1163

COMMUNITY STRUCTURE AND GEOGRAPHICAL DISTRIBUTION OF BACTERIAL ON SURFACE LAYER SEDIMENTS IN THE EAST CHINA SEA

LIU Ming-Hua, WANG Jian-Xin, YU Kai-Cheng, JIANG Ran, LIU Xiao-Hui,
WANG Shuai-Bing, LIU Xue-Zhu

(Zhejiang Ocean University, Laboratory for Marine Microbial Ecology and Application, Zhoushan 316022, China)

Abstract We explored bacterial community structure and geographical distribution on the top layer sediments in five sites in the East China Sea by constructing 16S rDNA clone library. The results show that the bacteria were belonged to 13 groups including Proteobacteria, Firmicutes, Acidobacteria, Chloroflexi, Actinobacteria, Nitrospira, WS3, Bacteroidetes, Spirochaetes, OP8, Planctomycetacia, Verrucomicrobiae, and Gemmatimonadetes. The Proteobacteria and Chloroflexi were the dominant groups of all sites. WS3, Verrucomicrobiae, and Gemmatimonadetes were unique to Sites DH6, DH9, and DH21, respectively. The descendent order of bacterial diversity in site is DH9 > DH21 > DH17 > DH6 > DH16. In addition, community structure and abundance were closely related to different types of local sedimentary environments.

Key words bacterial diversity; community structure; 16S rDNA; sediment