

长江口典型站位浮游细菌类群的组成特征研究

李和阳¹, 陈明霞^{1,2}, 焦念志³

(1. 国家海洋局 第三海洋研究所, 福建 厦门 361005; 2. 华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361005; 3. 厦门大学 近海海洋环境科学国家重点实验室, 福建 厦门 361005)

关键词: 长江口; 浮游细菌类群; 组成特征; 16S rDNA

中图分类号: Q178.53 文献标志码: A 文章编号: 0253-4193(2012)01-0183-06

1 引言

近年来人们对自然环境中的细菌遗传多样性产生了极大的兴趣。由于传统培养方法的限制, 无法检测占多数的不可培养细菌, 因此不能反映这些环境的细菌群落结构的多样性。近年来由于分子生物技术的不断进步并应用到细菌群落结构的分析^[1-5], 特别是基于 16S rDNA 序列的分子技术已被广泛地应用于许多不同环境样品, 自然环境中的细菌类群研究已得到广泛的关注, 包括土壤、淡水、海洋海水以及沉积物自然微生物群落的遗传多样性^[6-10]。特定环境下的微生物群落结构通常反映了这些微生物所处的生境特点以及它们在生态系统中的功能及其在生物地球化学循环中所起的作用^[6, 11-12], 因此通过自然环境中的细菌群落结构来研究生态学、环境学及全球变化等有重要意义。

国际上对海洋细菌的遗传多样性研究已经成为近年来的热点。相比之下, 我国这方面的研究比较薄弱。对许多重要海区如东海、南海等的海洋微生物群落结构很少研究, 这些海域的浮游细菌的群落结构多样性的数据尤为缺乏^[3-4, 13]。本文采用不依赖于培养的分子技术对长江口特定站位海洋细菌的

遗传多样性进行研究, 并对这些海洋优势细菌类群在所处的海洋环境中的作用进行探讨。

2 材料和方法

2.1 调查的站点和样品采集

本研究所用的样品是由“海监”47 号调查船于 2002 年 8 月 26 日至 9 月 3 日(赤潮 973 MC-2002-2 航次)采集的, 研究海域位于 29°0′~32°0′N, 122°0′~123°5′E 之间的长江口海域。根据该海域海水物理化学特性, 选取位于长江口水舌边沿的 ECS4 站位(31.0°N, 123.5°E)作为细菌遗传多样性研究站点(见图 1)。海水样品用 20 L Goflo 采水器采集, 采水后立即进行过滤以富集海洋微生物样品。

取约 5 L 的海水, 先以 3 μm 孔径的微孔滤膜过滤海水除去大颗粒物, 再以 0.2 μm 孔径、47 mm 直径的微孔滤膜(美国 Pall-Gelman), 在小于 0.03 MPa 的压力下真空抽滤海水, 富集超微型浮游生物。取下微孔滤膜, 浸泡到 50 mm 直径并加 1.8 mL 浸膜缓冲液(GTE, 40 mmol/dm³ EDTA, 50 mmol/dm³ Tris-HCl, 0.75 mol/dm³ 蔗糖, pH 8.0)的培养皿中, 于 -20 °C 保存直至抽提 DNA。

细菌总数的测定采用荧光显微镜直接计数法,

收稿日期: 2009-12-25; 修订日期: 2011-06-07。

基金项目: 国家自然科学基金项目(41006117); 国家海洋公益性行业专项经费项目(200805064); 福建省青年科技人才创新基金资助项目(2004J055); 福建省自然科学基金资助项目(Z0515011); 国家海洋局三所海洋研究所长基金资助项目(海三科 05003; 05007)。

作者简介: 李和阳(1978—), 男, 福建省惠安县人, 副研究员, 主要从事海洋微生物生态学及其环境资源效应相关领域的研究。E-mail: heyangli@126.com

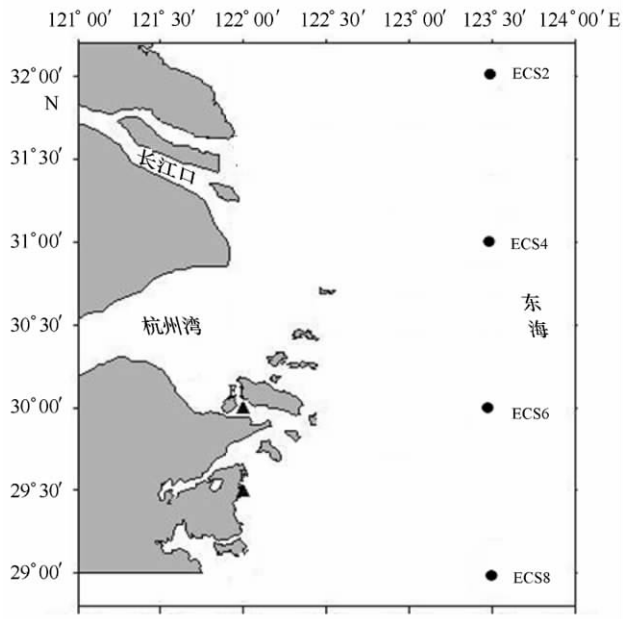


图1 长江口采样站位

收集海水样品于无菌取样瓶中,加入 4% 甲醛(W/V),混匀并于 4 °C 储存^[14],之后取 5 mL 的海水进行 DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) 染色 15 min (DAPI 终浓度为 5 ng/cm³)^[15],用 0.25 μm 孔径、25 mm 直径的黑色滤膜,在小于 0.03 MPa 的压力下真空抽滤,在荧光显微镜 (Axioskop40, Zeiss) 下计数^[16],计数时至少随机选取 15 个视野并且计数的总细菌数超过 350 个;其他物理化学参数(温度、盐度、叶绿素、溶解有机碳、总磷、总氮及主要营养盐)按 JOGFS protocol 推荐的方法进行测定^[17]。

2.2 DNA 的提取和 16S rDNA 扩增

DNA 的抽提按 Gordan 和 Giovannoni^[18] 描述的方法进行。取出装有样品的培养皿,用剪刀将膜剪碎,用研钵磨成浆状,分装入 1.5 mL 离心管中,加入 50 μL 溶菌酶(50 mg/cm³),37 °C 保温 1 h。加入 1/10 体积的 10% SDS(W/V),轻轻晃动混匀,加入 1/100 体积的蛋白酶 K(20 mg/cm³),58 °C 保温 1 h。10 000 r/min 4 °C 离心 10 min,取上清液。分别用酚-氯仿(25:24),氯仿-异戊醇(24:1)各抽提一次,吸上清液,用乙醇沉淀,用 70% 乙醇洗涤一次,烘干,用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳粗略估计含量,−20 °C 保存备用。

用于细菌的 16S rDNA 的 PCR 扩增引物分别是 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')^[19] 和 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG

ACT T-3')^[20]。PCR 反应体系:1U 的 Taq DNA 聚合酶,2 μL 的 DNA 模板,5 μL 的 10×PCR buffer (含 1.5 mg/cm³ Mg²⁺),正反引物各 0.5,200 μmg/cm³ 的 dNTP,加水补足至 50 μL 体积。PCR 反应程序:94 °C 变性 2 min,56 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1.5 min,共 25 个循环。取 2 μL PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2.3 限制片段长度多态现象分析

为了检测 16S rDNA-RFLP (restriction fragment length polymorphism) 谱型,使用上述 2 μL PCR 扩增产物稀释液(1:10)作为模板,以 27F,1492R 为引物,用与上述相同的反应体系及程序进行 PCR 扩增 2~3 次并进行 PCR 产物回收。取回收后的 PCR 产物 6~8 μL,用 HhaI, RsaI 和 HaeIII (TAKARA) 3 种不同的 4 碱基限制性内切酶分别于 37 °C 酶切 2 h 以上。酶切片段在 3% 琼脂糖凝胶中进行电泳分析,使用 DNA Ladder 100 bp 作为 DNA 标准物。

2.4 克隆测序

PCR 产物经 PCR 产物纯化试剂盒 (UNQI-5, 上海生工) 纯化,用 TA 克隆试剂盒连接克隆。用含有 50 μg/cm³ 氨苄青霉素、20 μg/cm³ X-Gal 和 24 μg/cm³ IPTG 的 LB (Luria-Bertani) 培养基作为选择性培养基,筛选出含有大约 1.5 kb 的插入片段的阳性克隆,用细菌特异引物进一步鉴定筛选。随机挑选 40 个白色的阳性克隆子进行后续研究。

以 M13 引物对、以 PCR 产物稀释液作为模板进行 PCR 扩增,用上述的 RFLP 方法进行分析。依照 RFLP 分析的结果选择相对应的 16 个代表性克隆子,用甘油保种,递交上海生工测序。测序结果用 Ribosomal 数据库 (RDP) 的 Checkj-chimera 的 Chimeric Artefacts 程序检查^[21],并与 DNA 数据库 (DDBJ, NCBI) 中相似的 16S rDNA 序列进行比较,检验序列的有效性。

2.5 系统进化分析

通过 Clustal W 程序 (ver. 1.81)^[22] 进行手动比对分析,去除其中模糊不清的核苷酸序列。使用 Kimura^[23] 的两个参数模型构建序列距离矩阵,使用 Clustal 的邻接法构建系统发育树^[24]。

3 结果

3.1 长江口环境特点及细菌数量分布特征

本文首先对海水性质及细菌密度分布进行检

测。海水的盐度反映了长江冲淡水对该海域水质的影响,细菌的密度与海水的盐度等物理化学性质的关系密切(图 2)。

在长江口出海口附近以及冲淡水水舌的边沿,细菌数量较低。细菌的高密度区出现在长江口以北海域,这可能与该季节的季风及洋流有关。该区域夏季盛行的东南风以及朝北的海流使长江河流向东海输出的营养盐在出海口附近向北转,导致浮游植

物生长繁殖旺盛并形成细菌的高密度区,相反,在长江口流域沿线,由于营养盐的往北输送,并在该海域与外海海水激烈混合,由此产生的高浊度和低透光率影响了浮游植物生长,从而形成海洋细菌低密度区。在长江口水舌边沿的 ECS4 站位附近的海水盐度形成致密的锋面,表明 ECS4 处于长江冲淡水与外海海水发生强烈混合的区域,具有典型的河口特征。

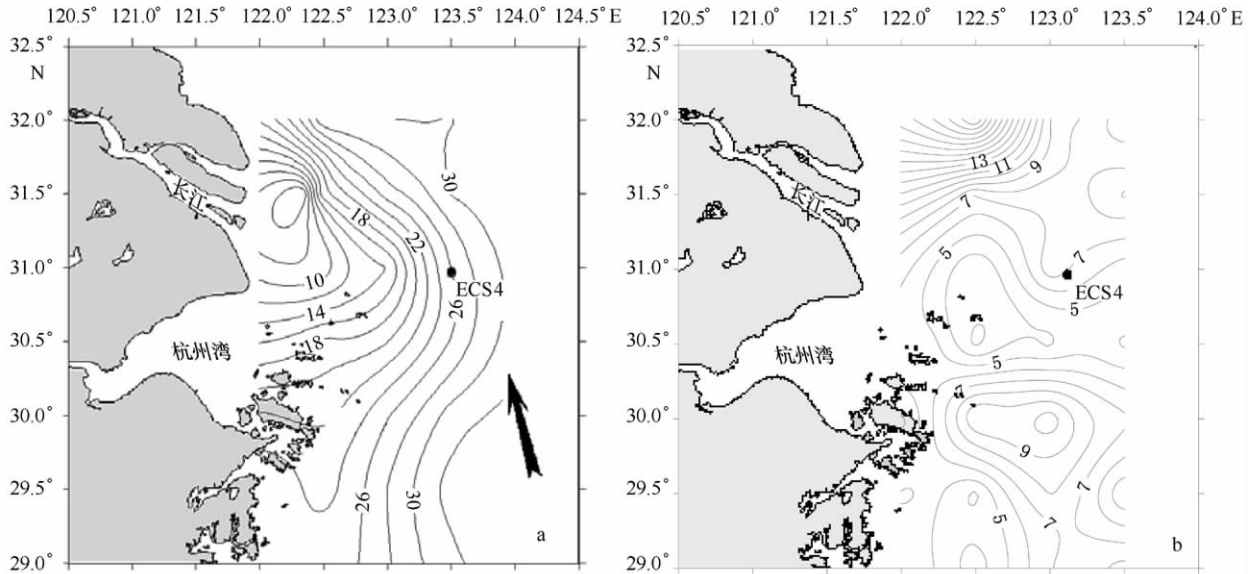


图 2 长江口表层水盐度(a)及浮游细菌密度(10^5 个/ cm^3)(b)等值线分布

3.2 ECS4 站位浮游细菌的优势类群

在构建的 ECS4 站位浮游细菌 16S rDNA 克隆文库中,挑取 40 个阳性克隆进行 16S rDNA-RFLP 分析,最终选取了 16 个优势代表类群的克隆子进行测序分析。通过测序得到长约 500 bp 的序列,与已有的核酸数据库比对结果表明,该站位的克隆文库中半数以上克隆子与不可培养细菌类群相近,多数克隆子(87.5%)与相对应的序列之间的相似性在 98% 以上。

该站位细菌系统进化树(见图 3)分析结果表明该站位细菌 16S rDNA 克隆文库中的相近微生物主要属于 4 个类群,其中与变形细菌(proteobacteria)相似的克隆子为优势菌群,多属于不可培养细菌类群,11 个克隆子中有 9 个分别与该群的 α -、 β -和 γ -变形菌亚纲相似,2 个克隆子与高 G+C 含量革兰氏阳性菌相似。 α -、 β -和 γ -三个变形菌亚族中以 β -变形菌亚族占优势,约占 28%,高于 α -变形菌亚族、 γ -变形菌亚族的比例。此外,高 G+C 含量革兰氏

阳性菌(占 13%)也是该站位细菌的主要类群之一。

通常把相似性在 97% 以上的克隆子归为一个分类操作单元(operation taxonomic units, OTUs)^[25]。在本研究中所有的克隆子被分为 8 个 OTUs,它们分别与淡水中常见的 α -和 β -变形菌亚族、海洋主要类群 γ -变形菌亚族以及其他类群相近,其中归属于 β -变形菌亚族的有 4 个 OTUs,它们分别是 ESC4B-01(3),ESC4B-03(2),ESC4B-05(4)和 ESC4B-08(2)(括号中的数字表示该 OTUs 所含的克隆子数);归属于 α -和 γ -变形菌亚族各有 1 个 OTUs,它们分别是 ESC4B-04(4),ESC4B-10(2);其余克隆子属于高 G+C 含量革兰氏阳性菌 ESC4B-11(5)或者其他类群。大部分序列与来自于世界其他海洋和河流的环境样品的未培养细菌有较高的相似性,其中 ESC4B-03 与来自于大西洋的大陆架哈特拉斯角的细菌类群相近(98%)^[26],另一个类群 ESC4B-01 与纽约的 South Glens 瀑布的淡水种相近(94%)^[27],还有一个类群(ESC4B-10)与可

培养 β -变形菌相近。ESC4B-09, ESC4B-11 分别与其他环境样品的不可培养细菌有较高的相似性,属

于高 G + C 含量革兰氏阳性菌(相似度分别为 98%, 99%)。

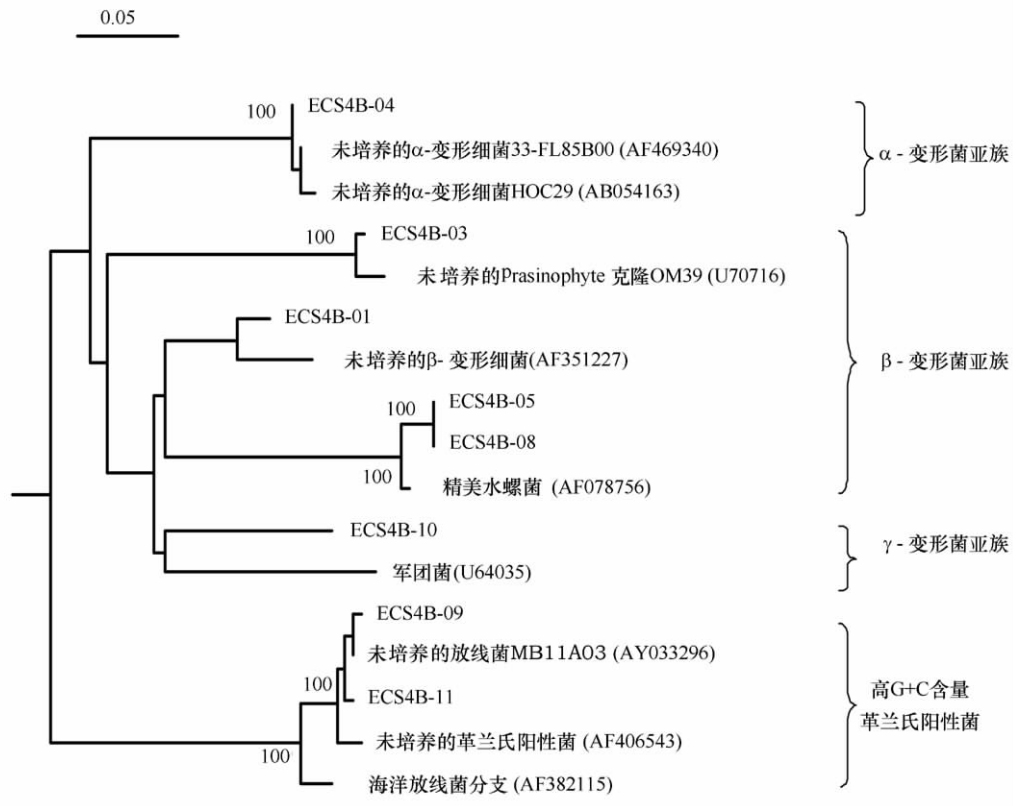


图3 东海 ECS4 站位浮游细菌类群的 16S rDNA 系统进化树
括号内为参照菌株的登录号,分支上数值表示经过 1 000 次计算后的置信度。比例尺表示遗传距离

4 讨论

4.1 长江口浮游细菌优势类群变化及其影响因素

本研究结果相比于以往的研究结果,细菌群落结构上具有较大差异: Sekiguchi 等^[13]分析了长江口 C1 站位细菌的遗传多样性,发现优势菌为 α -和 γ -变形菌,而 β -变形菌类群较少,仅有 1 个克隆子与 β -变形菌类群相近。本研究中 α -、 β -和 γ -变形菌类群均有分布,在数量上 α -和 γ -变形菌类群相对较少,而 β -变形菌则为优势类群(约占 28%),其中本研究中的一个 β -变形菌类群(ESC4B-03)的最相近克隆子与 Sekiguchi 等^[13]报道的 β -变形菌 ECS39 的相近克隆子是来源于同一个海域的细菌类群。此外,本研究也发现了高 G + C 含量革兰氏阳性菌(Actinobacteria)等其他细菌类群的分布,有的克隆子(ESC4B-10)与某些疾病相关。

以往的研究表明 β -变形菌多分布于淡水,海水中很少分布^[28-33]。其分布受到了海水温度和盐度

的限制,在盐度 10 以上一般不能生存^[34],而本研究却发现在盐度高达 26 的海水中也有 β -变形菌分布,并且形成了优势类群,这种分布特征是否表明有适应于高盐度环境的 β -变形菌的新种还是仅仅由长江口冲淡水携带来死细菌,由于 ECS4 站位正好是位于长江出海口的外延,对此我们还不能下结论。此外, ECS4 站位处于淡水、海水激烈混合的区域,因而也可能是由于该环境的特殊性导致 β -变形菌能够在该环境下生存。Sekiguchi 等^[13]研究该海域 C1 站位的细菌群落中包括源自于河水的 β -变形菌和疣微菌(verrucomicrobia),这些 OTUs 表明淡水细菌直接影响长江口环境的细菌群落结构。

4.2 长江口浮游细菌类群多样性及其生态作用

早期人们从海水中分离得到的海洋细菌中革兰氏阴性细菌占 90% 以上,研究也较多地集中在这些细菌。后来研究发现海洋中同样存在许多革兰氏阳性细菌,它们更多地分布于海洋沉积物^[3-4, 32, 35]和海洋生物共生系统中^[36-37],并在系统学上形成独

特的分支。本研究发现的未培养的高 G+C 含量革兰氏阳性菌属于放线菌纲的海洋放线菌进化分支 (marine actinobacteria clade), 这些类群通常能够降解有毒、有害的有机物质, 推测它们在该海域的有机污染物降解中起很大的作用。

本研究所发现的一些细菌类群与海洋中的致病菌相关。最近研究表明病原菌和藻类水华经常共同发生^[38], 其中包括大肠菌、弧菌等。本研究发现的军团菌 (legionella) 可能与某些呼吸疾病相

关^[39]。因此, 对海洋中的这些细菌类群应该引起重视。

海洋 β -变形菌与海水及沉积物的 NH_4^+ 氧化相关^[29-30,40]。本研究所观察到的这些细菌类群属于未培养细菌, 对它们的生态功能一无所知, 但结合该站位的无机氮 (NO_2^- , NO_3^- , NH_4^+) 水平都偏低, 这表明这些 β -变形菌可能与该海域海水的氨氧化有关。

参考文献:

- [1] HEAD I M, SAUNDERS J R, PICKUP R W. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms[J]. *Microb Ecol*, 1998, 35(1): 1-21.
- [2] FIERER N, JACKSON R B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(3): 626-631.
- [3] 李涛, 王鹏, 汪品先. 南海南部陆坡表层沉积物细菌和古菌多样性[J]. *微生物学报*, 2008, 48(3): 323-329.
- [4] WANG G H, DONG J D, LI X, et al. The bacterial diversity in surface sediment from the South China Sea[J]. *Acta Oceanol Sinica*, 2010, 29(4): 98-105.
- [5] CHANG Y L, WANG E T, SUI X H, et al. Molecular diversity and phylogeny of rhizobia associated with *Lablab purpureus* (Linn.) grown in southern China[J]. *Syst Appl Microbiol*, 2011, 34(4): 276-284.
- [6] LI L, KATO C, HORIKOSHI K. Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depths[J]. *Biodivers Conserv*, 1999, 8(5): 659-677.
- [7] BAIK K S, PARK S C, KIM E M, et al. Diversity of bacterial community in freshwater of Woopo wetland[J]. *J Microbiol*, 2008, 66(6): 647-655.
- [8] 张建萍, 董乃源, 余浩滨, 等. 应用 16S rDNA-RFLP 方法分析宁夏地区稻田土壤细菌的多样性[J]. *生物多样性*, 2008, 16(6): 586-592.
- [9] LI H, YU Y, LUO W, et al. Bacterial diversity in surface sediments from the Pacific Arctic Ocean[J]. *Extremophiles*, 2009, 13(2): 233-46.
- [10] TOBLER D J, BENNING L G. Bacterial diversity in five Icelandic geothermal waters: temperature and sinter growth rate effects[J]. *Extremophiles*, 2011, 15(4): 473-485.
- [11] PACE N R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere[J]. *Science*, 1997, 276(5313): 734-740.
- [12] LU J, DOMINGO J W S, LAMENDELLA R, et al. Phylogenetic diversity and molecular detection of bacteria in gull feces[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(13): 3969-3976.
- [13] SEKIGUCHI H, KOSHIKAWA H, HIROKI M, et al. Bacterial distribution and phylogenetic diversity in the Changjiang estuary before the construction[J]. *Microb Ecol*, 2002, 43(1): 82-91.
- [14] VELJI M I, ALBRIGHT L J. Microscopic enumeration of attached marine bacteria of seawater, marine sediment, fecal matter, and kelp blade samples following pyrophosphate and ultrasound treatments[J]. *Can J Microbiol*, 1986, 32(2): 121-126.
- [15] SCHALLENBERG M, KALFF J. Solutions to problems in enumerating sediment bacteria by direct counts[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1989, 55(5): 1214-1219.
- [16] PORTER K G, FEIG Y C. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora[J]. *Limnol Oceanogr*, 1980, 25(5): 943-948.
- [17] Protocols for the Joint Global Ocean Flux studies (JGOFS) core measurements[R]//JGOFS REPORT No. 19. JGOFS International Project Office Center for Studies of Environment and Resources. Bergen, Norway. Scor, Protocol for the JGOFS core measurements. June 1996.
- [18] GORDON D A, GIOVANNONI S J. Detection of stratified microbial populations related to *Chlorobium* and *Fibrobacter* species in the Atlantic and Pacific Oceans[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(4): 1171-1177.
- [19] GIOVANNONI S J. The polymerase chain reaction[M]//STACKEBRANDT E, GOODFELLOW M. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1991: 177-203.
- [20] ACHENBACH L, WOESE C. 16S and 23S rRNA-like primers[K]//SOWER K R, SCHREIER H J. *A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995: 521-523.

- [21] MAIDAK B L, OLSEN G J. The RDP (ribosomal database project)[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(1):109–111.
- [22] THOMPSON J D, HIGGINS D G, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice[J]. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22(22):4673–4680.
- [23] KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. *J Mol Evol*, 1980, 16(2):111–120.
- [24] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. *Mol Biol Evol*, 1987, 4(4): 406–425.
- [25] STACKEBRANDT E, GOEBEL B M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology[J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1994, 44(4): 846–849.
- [26] RAPPE M S, KEMP P F, GIOVANNONI S J. Phylogenetic diversity of marine coastal picoplankton 16S rRNA genes cloned from the continental shelf off Cape Hatteras, North Carolina[J]. *Limnol Oceanogr*, 1997, 42(5):811–826.
- [27] BAKERMANS C, MADSEN E L. Diversity of 16S rDNA and naphthalene dioxygenase genes from coal-tar-waste-contaminated[J]. *Microb Ecol*, 2002, 44(2):95–106.
- [28] GLOCKNER F O, FUCHS B M, AMANN R. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(8):3721–3726.
- [29] HOVANEC T A, DELONG E F. Comparative analysis of nitrifying bacteria associated with freshwater and marine aquaria[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(8):2888–2896.
- [30] VOYTEK M A, WARD B B. Detection of ammonium-oxidizing bacteria of the beta-subclass of the class proteobacteria in aquatic samples with the PCR[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(4):1444–1450.
- [31] 孙鑫鑫, 刘惠荣, 冯福应, 等. 乌梁素海富营养化湖区浮游细菌多样性及系统发育分析[J]. *生物多样性*, 2009, 17(5):490–498.
- [32] 王鹏, 李涛. 南海北部陆坡深水区沉积物细菌多样性调查[J]. *海洋科学*, 2008, 32(4):36–39.
- [33] 曲良. 北大西洋典型海湾浮游异养细菌群落特征研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.
- [34] BOUVIER T C, GIORGIO P A. Compositional changes in free-living bacterial communities along a salinity gradient in two temperate estuaries[J]. *Limnol Oceanogr*, 2002, 47(2):453–470.
- [35] RAVENSCHLIG K, SAHM K, AMANN R. Quantitative molecular analysis of the microbial community in marine arctic sediments (Svalbard)[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(1):387–395.
- [36] WEBSTER N S, WILSON K J, BLACKALL L L, et al. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(1):434–444.
- [37] KAPLEY A, SIDDIQUI S, MISRA K, et al. Preliminary analysis of bacterial diversity associated with the Porites coral from the Arabian sea[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2007, 23(7):923–930.
- [38] DOUCETTE G J, TRICK C G. Characterization of bacteria associated with different isolates of *Alexandrium tamarense*[M]//LASSUS P, ARZUL G, ERARD E, et al. Harmful Marine Algal Blooms. Paris:Lavoisier Sci Publ, 1995.
- [39] ADELEKE A, PRUCKLER J, BENSON R, et al. Legionella-like amebal pathogens-phylogenetic status and possible role in respiratory disease[J]. *Emerging Infect Dis*, 1996, 2(3):225–230.
- [40] MA Y, WANG L, QIAN L M. Community structure of β -proteobacterial ammonia-oxidizing bacteria in prawn farm sediment[J]. *Prog Nat Sci*, 2008, 18(6):679–684.

The community composition of bacterioplankton at typical station in the Changjiang Estuary

LI He-yang¹, CHEN Ming-xia^{1,2}, JIAO Nian-zhi³

(1. Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China; 2. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen, 361021 China; 3. State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Key words: Changjiang Estuary; bacterioplankton; community composition; 16S rDNA