

# 应用 PCR-DGGE 技术分析黄海冷水团海域的细菌群落组成

刘敏<sup>1,2</sup>, 朱开玲<sup>1</sup>, 李洪波<sup>1,3</sup>, 张涛<sup>4</sup>, 肖天<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院海洋研究所海洋生态与环境科学重点实验室, 青岛 266071; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049; 3. 国家海洋环境监测中心, 大连 116023; 4. 国家海洋局第二海洋研究所卫星海洋环境动力学国家重点实验室, 杭州 310012)

**摘要:**利用 PCR-DGGE 技术对 2 个季节(2006-04 和 2006-10)的黄海冷水团海域的细菌群落组成和优势菌群进行了分析。通过软件 Glyko Bandscan 分析 DGGE 图谱, 4 月份所有站位的条带数相近(约 17 条), 多样性丰富; 10 月份, 在冷水团范围以内站位的条带约 16 条, 其多样性也较丰富; 而在冷水团范围以外站位的条带少(约 12 条), 其多样性较低。细菌 16S rDNA V3 区特征片段经 DGGE 分离、条带切割, 共得到 24 条条带, 克隆、测序后, 进行系统进化分析, 结果显示这 24 条带分别归属于 2 个细菌类群: 变形细菌门(*Proteobacteria*)和拟杆菌门(*Bacteroides*)。在 24 条序列中有 16 条分别与变形细菌亚群的  $\gamma$ -和  $\delta$ -*Proteobacteria* 相似, 有 5 条与拟杆菌门相似。时空分析发现, 4 月份所有站位水体(海水温度为 7 ~ 12℃)的细菌群落组成和 10 月份(冷水团存在期)冷水团内部水体(海水温度低于 10℃)的细菌群落组成相同(都包括  $\gamma$ -*Proteobacteria*、 $\delta$ -*Proteobacteria* 和 *Bacteroides*), 与 10 月份冷水团外部水体(海水温度大于 19℃)的(包括  $\gamma$ -*Proteobacteria* 和 *Bacteroides*)不同。优势菌群也存在同样的分布特点, 4 月份所有站位水体的优势菌群与 10 月份冷水团内部水体的优势菌群也相同(都是  $\gamma$ -*Proteobacteria*), 而 10 月份冷水团外部水体不同的站位优势菌群不同。该海域细菌群落组成和优势菌群的分布特点, 可能与冷水团的形成有一定的相关性。

**关键词:**细菌群落组成; 16S rDNA 序列分析; PCR-DGGE; 黄海冷水团

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)04-1082-10

## Bacterial Community Composition of the Yellow Sea Cold Water Mass Studied by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

LIU Min<sup>1,2</sup>, ZHU Kai-ling<sup>1</sup>, LI Hong-bo<sup>1,3</sup>, ZHANG Tao<sup>4</sup>, XIAO Tian<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Marine Ecology & Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. National Marine Environmental Monitoring Center, Dalian 116023, China; 4. State Key Laboratory of Satellite Ocean Environment Dynamics, Second Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Hangzhou 310012, China)

**Abstract:** Bacterial community composition and predominant bacteria were analyzed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in the Yellow Sea Cold Water Mass (YSCWM). The results analysed by Glyko Bandscan software showed that samples from all stations in April and stations in the YSCWM area in October had almost the same number of different DNA bands (17 and 16 respectively) with high diversity. However, samples from the stations out of YSCWM area had fewer DNA bands (about 12) with lower diversity. 24 DGGE bands reflecting varying phylotypes were excised, cloned and sequenced. Phylogenetic analysis of 24 cloned bands showed that bacterial phylotypes were made up of two phyla bacteria, *Proteobacteria* and *Bacteroides*. Among these sequences, 16 were related to  $\gamma$ -*Proteobacteria* and  $\delta$ -*Proteobacteria* and 5 were related to *Bacteroides*. It indicated that bacterial community composition, as well as the predominant bacterial groups, from all sampling stations in April (the temperature of seawater was around 7 ~ 12℃) and the inter of YSCWM in October ( $\leq 10^\circ\text{C}$ ) was the same, different from the exterior of YSCWM ( $\geq 19^\circ\text{C}$ ). By comparing, from samples of exterior of YSCWM, the predominant bacteria groups were different with the different sampling stations. So it suggested that bacterial community composition and the characteristic of predominant bacteria of the YSCWM may have something to do with the development of the YSCWM.

**Key words:** bacterial community composition; 16S rDNA phylogenetic analysis; PCR-DGGE; Yellow Sea Cold Water Mass (YSCWM)

海洋微生物是海洋生态系统中的重要组成部分, 在海洋生物地球化学循环中起着重要的作用; 同时, 还是海洋微食物环的重要组分, 作为分解者和二次生产者, 影响着颗粒有机物的溶解与沉降、溶解有机物的形成和消耗、无机营养盐的形成等生态过程<sup>[1]</sup>。因此, 了解微生物的群落组成及其时空变化, 有助于更为深入地掌握海洋微生物的分布特征及其

在整个海洋生态系统中的功能与作用。

收稿日期: 2007-05-11; 修订日期: 2007-06-29

**基金项目:**国家重点基础研究发展规划(973)项目(2006CB400604); 国家自然科学基金项目(40376048); 中国科学院知识创新工程项目(KZCX2-YW-213); 中国科学院研究生科学与社会实践资助专项(创新研究类)

**作者简介:**刘敏(1982~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为海洋微生物生态学, E-mail: liuminxm@126.com

\* 通讯联系人, E-mail: txiao@ms.qdio.ac.cn

DGGE 技术已成为最近国内外研究微生物分子生态的重要技术<sup>[2]</sup>, 可用来监测某些生境中微生物群落结构及其在时间或空间上的动态变化<sup>[3-5]</sup>, 也可以对环境中的微生物多样性进行定性和半定量分析<sup>[6,7]</sup>. 1993 年 Muyzer 等<sup>[2]</sup> 首次将该技术应用于微生物生态学的研究<sup>[8]</sup>, 随后广泛应用于其他各种环境微生物生态学的研究, 如湖泊<sup>[9]</sup>、海洋<sup>[3,5,10,11]</sup>、活性污泥<sup>[12,13]</sup>、土壤<sup>[14]</sup>等.

黄海冷水团是我国陆架浅海中一个突出而重要的海洋现象, 具有季节性, 每年冬季更新, 有着相近的边界位置和温盐结构<sup>[15,16]</sup>. 冷水团的存在使海洋环境参数发生变化, 很早以前就引起了国内外海洋学者的重视. 以前的研究主要集中于物理海洋方面, 包括冷水团的温盐结构<sup>[16]</sup>、形成原因<sup>[17]</sup>、环流结构及特征<sup>[15]</sup>, 其演变过程及其演变机理<sup>[18]</sup>等; 近年来也对黄海冷水团水域生物化学特性进行了研究, 包括黄海冷水团夏季叶绿素垂直分布结构的影响机制<sup>[19]</sup>、黄海冷水团新生产力及微食物环作用<sup>[20]</sup>、黄海冷水团水域的浮游细菌分布及其摄食压力来源<sup>[21]</sup>等, 但是关于冷水团的细菌群落组成及优势菌群还鲜见报道. 本实验利用 PCR-DGGE 分子生物法对黄海冷水团的细菌群落结构及优势菌群进行了分析研究, 获得了冷水团的细菌群落指纹图谱及类群组成, 这将有助于了解冷水团的形成对微生物环, 乃至整个生态系统产生的影响.

1 材料与方法

1.1 样品采集

2006-04-08 ~ 2006-04-29、2006-10-16 ~ 2006-11-03 乘“北斗号”考察船执行专项调查. 采样站位如图 1 所示, 各站位的深度见表 1.

仲春季节, 黄海冷水团开始形成; 至春末成型; 7 ~ 8 月份为鼎盛时期; 进入仲秋季节, 处于衰退期; 至 12 月份冷水团消失<sup>[16,18]</sup>. 此次调查选择了 4 月份和 10 月份.

海水温度和盐度的观测由国家海洋局第二海洋研究所卫星海洋环境动力学国家重点实验室利用“海鸟”CTD 现场逐站观测.

每个站位表、中、底 3 层分别采集海水 10 L, 先用 3  $\mu$ m 微孔滤膜过滤除杂质, 再用 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜过滤收集菌体, -20  $^{\circ}$ C 冰箱储存带回实验室提取基因组 DNA<sup>[22]</sup>.

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取

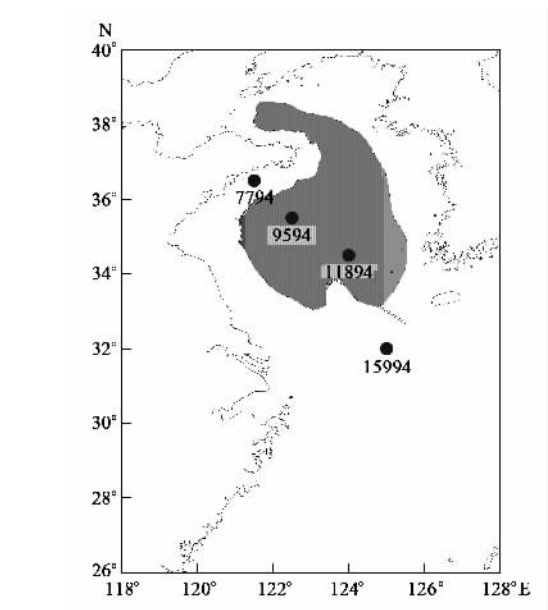


图 1 采样站位(阴影代表黄海冷水团边界的大体位置<sup>[16]</sup>)  
Fig.1 Map of sampling stations (Shadow area represents the approximate bottom boundary of YSCWM)

表 1 各站位表、中、底 3 层的深度/m  
Table 1 Depth of surface layer, mid-layer and bottom layer in all stations/m

| 位置 | 7794 | 9594 | 11894 | 15994 |
|----|------|------|-------|-------|
| 表层 | 0    | 0    | 0     | 0     |
| 中层 | 10   | 35   | 35    | 20    |
| 底层 | 25   | 50   | 81    | 45    |

将收集了大量菌体的滤膜剪成碎片, 加入 3 mL STET 缓冲液(8% 蔗糖, 0.5% Tritonx-100, 50 nmol/L EDTA, 50 nmol/L Tris-Cl pH8.0), 振荡器剧烈振荡 5 ~ 10 min, 加入溶菌酶 1.5 mL(10 mg/mL), 37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h; 加入蛋白酶 K(终浓度 200  $\mu$ g/mL)50 $^{\circ}$ C 水浴 1 h, 其他步骤同文献[22, 23]. 取 3  $\mu$ L 琼脂糖电泳检测.

1.2.2 16S rDNA V3 区 PCR

以提取的海水样品的环境基因组 DNA 为模板 PCR, 每个样品分别做 3 个浓度梯度(原浓度、稀释 10 倍、稀释 20 倍). 引物序列如下: \* GC341f(5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3')和 534r(5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3')<sup>[8,23,24]</sup>. PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 6 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 65 $^{\circ}$ C 退火 45 s(每个循环降 0.5 $^{\circ}$ C 至退火温度为 55 $^{\circ}$ C)<sup>[25]</sup> (Touchdown PCR), 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 然后再进行 20 个循环 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. 扩增产物经 1.0%(质量浓度)琼脂糖凝胶电泳进行分析.

1.2.3 DGGE 电泳

取 16S rDNA V3 区 PCR 产物 40  $\mu$ L, 用 Bio-Rad 公司 D-code System 电泳仪进行 DGGE 电泳分离<sup>[8,23]</sup>. PAGE 胶浓度为 8%, 变性梯度 40% ~ 65% (7 mol/L 尿素和 40% 去离子甲酰胺为 100% 变性), 电泳缓冲液为 1  $\times$  TAE, 58 $^{\circ}$ C, 65 V 条件下电泳 10 h. SYBR Green I 核酸染料(按 1:10 000, 体积比)染色 30 min, 0.5  $\times$  TAE 中脱色 15 min. 蓝盾可见光透射仪下进行拍照. 通过软件 Glyko Bandscan(Glyko Co. Ltd. USA)分析 DGGE 指纹图谱.

1.2.4 细菌 16S rDNA 序列的测定

从 DGGE 凝胶上小心切下 DGGE 条带, 500  $\mu$ L 无菌水冲洗 3 次, 60  $\mu$ L 无菌水 4 $^{\circ}$ C 过夜, 12 000 r/min 离心 5 min, 收集上清, 以此作为模板, 引物 341f(不含 GC-clamp)/534r 进行 16S rDNA V3 区 PCR 扩增, PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 6 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 循环 20 次.

上述 V3 区 PCR 产物经过纯化连接到载体 PGM-T, 转化 *E. coli* Top10 感受态细胞, 在含有 X-gal、IPTG 和氨苄青霉素的 LB 培养基上选择具有氨苄青霉素抗性的白色转化子. 采用 T 载体通用引物 T7 和 SP6 进行菌落 PCR, PCR 产物经 1% (质量浓度) 琼脂糖凝胶电泳检测是否为阳性克隆. 再以阳性克隆的 PCR 产物为模板, 进行 PCR, 引物为 \* GC341f 和 534r, 条件同上, 再进行 DGGE, 与原来的条带在同一位置的克隆才是真正的阳性克隆. 交由上海生工生物公司进行测序.

1.2.5 16S rDNA 序列分析

测序获得的 16S rRNA 序列与 BLAST 比对 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 获得与每条序列相

似性最高的序列. 使用 BioEdit 附带的 CLUSTALX 工具进行序列比对(gap open20, gap extend 7), 获得了长度 199 bp 的同源序列. 应用 MEGA3.1 软件的邻位相接法进行系统进化分析.

2 结果与分析

2.1 冷水团的位置

4 月份和 10 月份航次各站的海水温度随深度的变化如图 2、图 3. 4 月份 7794 站、9594 站和 11894 站表层到底层的海水温度都低于 10 $^{\circ}$ C, 15994 站的海水温度低于 12 $^{\circ}$ C, 所有站位从表层到底层的温度变化很小(平均温差为 0.85 $^{\circ}$ C), 都没有温跃层, 4 月份所调查的海域黄海冷水团还没有形成.

10 月份 7794 站(海水温度约 20 $^{\circ}$ C, 温差为 0.01 $^{\circ}$ C)和 15994 站(海水温度约 25 $^{\circ}$ C, 温差为 0.28 $^{\circ}$ C)没有温跃层, 9594 站(海水温度变化范围为 9 ~ 20 $^{\circ}$ C, 温差为 11 $^{\circ}$ C)和 11894 站(海水温度变化范围为 10 ~ 21 $^{\circ}$ C, 温差为 11 $^{\circ}$ C)温跃层明显, 大约 50 m 以下都被水温低于 10 $^{\circ}$ C 的冷水所盘踞, 可见 10 月份冷水团现象明显, 所调查的 4 个站位中 11894 站和 9594 站在冷水团范围以内, 7794 站和 15994 站在冷水团范围以外. 这与文献[16]报道的结果是一致的(图 1).

2.2 海水样品环境基因组 DNA 及 16S rDNA V3 区 PCR

提取的海水样品的环境基因组 DNA 可直接进行 PCR, DNA 片段大小主要集中在 21 kb 左右. 通过细菌特异性引物进行 PCR 扩增得到 16S rDNA V3 区序列, 扩增所产生的 DNA 片段均为单一条带, 片段大小约为 200 bp, 表明扩增产物无非特异性扩增现象.

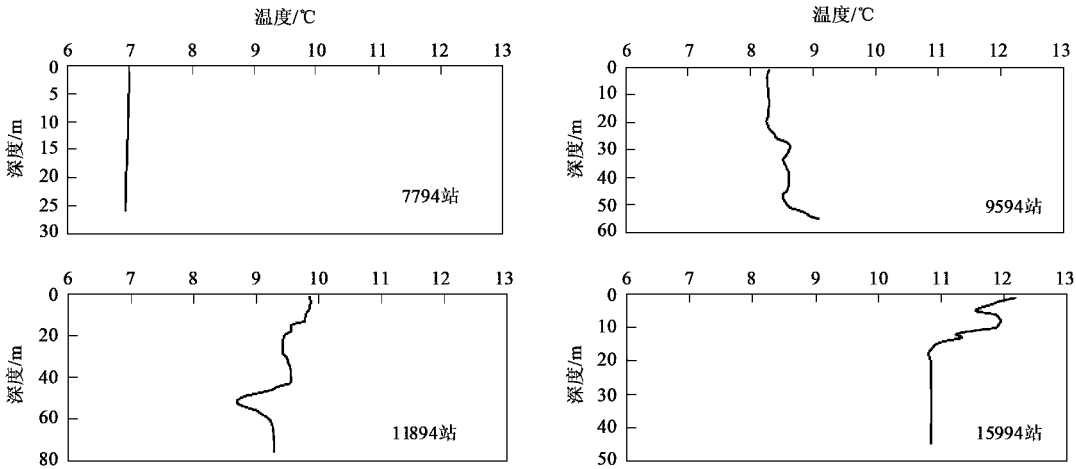


图 2 2006-04 航次各站位温度随深度的分布

Fig.2 Change of temperature with depth in the 2006-04 cruise

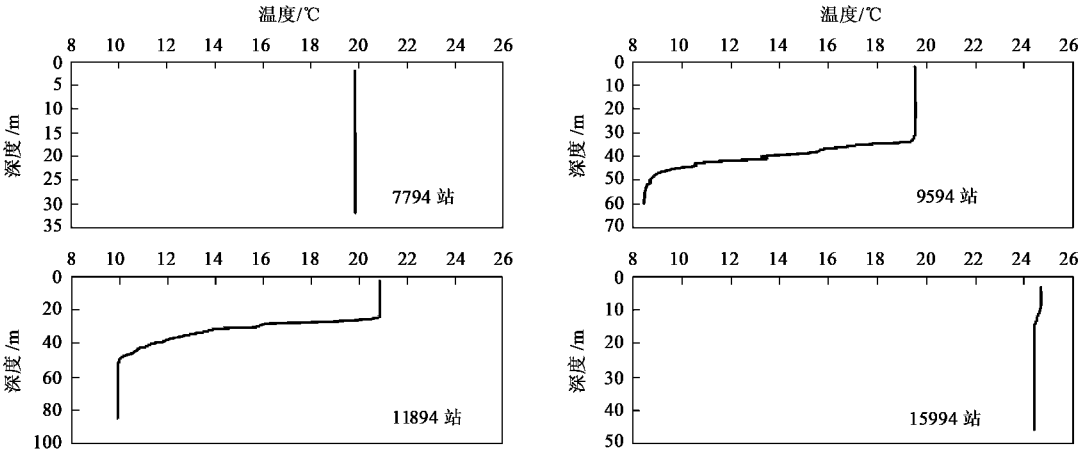


图 3 2006-10 航次各站位温度随深度的分布  
Fig.3 Change of temperature with depth in the 2006-10 cruise

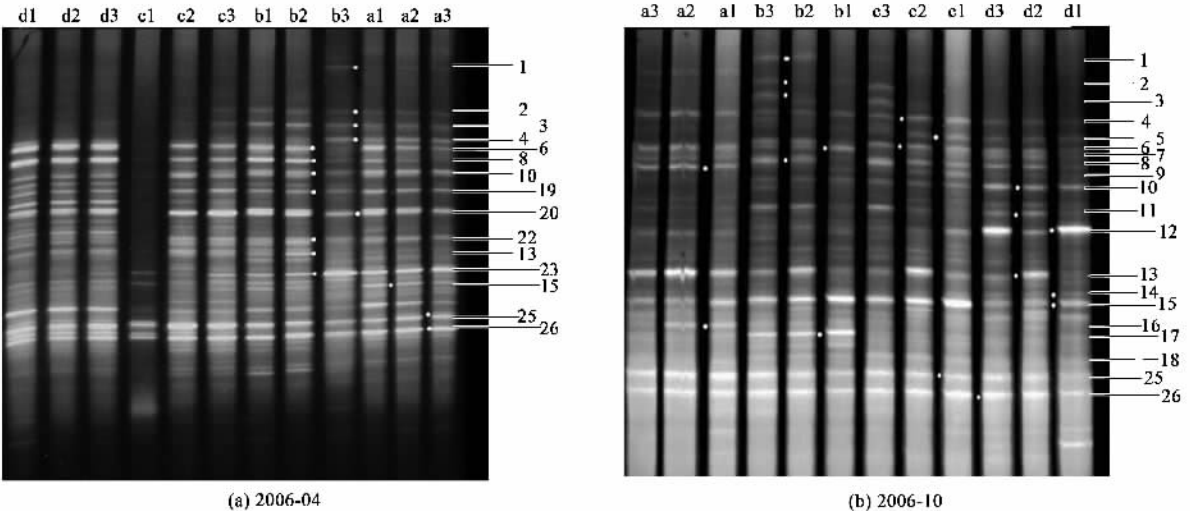
**2.3 细菌 16S rDNA V3 区特征片段 DGGE 指纹图谱**  
一般条带的多少可以反映出群落的多样性,条带信号强弱,可以反映相对的数量,从而确定不同样品中微生物的种类和数量关系,得出其中微生物多样性的信息<sup>[13,23,26]</sup>.

4 月份和 10 月份各站样品的 DGGE 图谱如图 4 所示.通过软件 Glyko Bandscan(Glyko Co. Ltd. USA)分析各站位的条带数目和相对亮度.4 月份得到 38 条不同位置的条带,其中亮度较高的条带约有 12 条.各样品的条带数如图 5,4 月份所有站位的条带数相近(约 17 条),多样性丰富.10 月份各站位得到 27 条不同位置的条带,其中亮度较高的条带约有 7 条.各样品的条带数如图 5,在冷水团范围以内的站位(11894 站和 9594 站)条带约 16 条,多样性也比较丰富;而冷水团范围以外的站位(15994 站和 7794

站)的条带数少(约 12 条),多样性较低.

**2.4 16S rRNA 序列及系统发育分析**  
细菌 16S rDNA V3 区特征片段经 DGGE 分离、条带切割,共得到 24 条 DGGE 条带,其中图 4(b)中的条带有一部分与图 4(a)中是一样的,如条带 1、2、3、4、6、8、10 等.将条带进行克隆测序,所得到的序列大小在 188~196 bp 范围内.序列已提交至 GenBank 核酸数据库,序列号为 EF433356~EF433372 和 EF493033~EF493038(表 2).

将所得序列通过输入 GenBank,用 Blast 程序进行相似性比较分析.结果表明,所有序列与数据库中 16S rDNA 序列的相似性在 94%~100%之间,其中 23 条相似性序列均来自于海洋环境.其中有 15 条序列与之最相似的 16S rDNA 序列来自于海洋环境中未培养的细菌克隆.获得的 24 条序列分别归属于



a1、a2、a3: 15994 站的表、中、底层,其他的类推; b: 11894 站, c: 9594 站, d: 7794 站; 点标记的条带为切割条带

图 4 2006-04 和 2006-10 黄海海域所有站位的 DGGE 图谱  
Fig.4 DGGE profiles of all the stations in April and October 2006

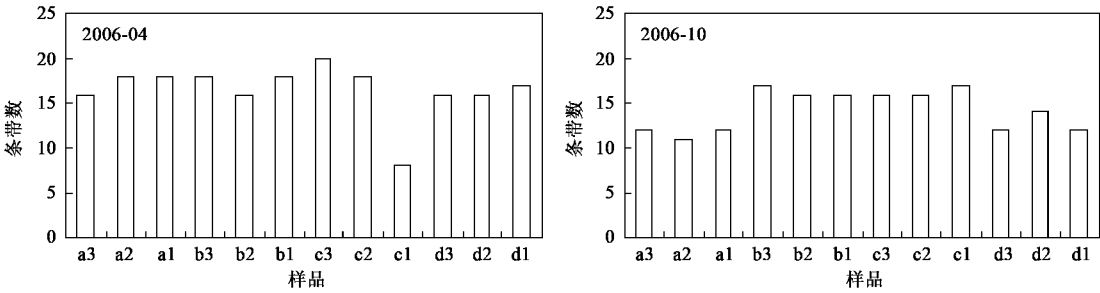


图 5 2006-04 和 2006-10 各站位的条带数

Fig.5 Number of bands of all the stations in April and October 2006

表 2 经 DGGE 分离获得的细菌 16S rDNA V3 序列

| Table 2 16S rDNA V3 sequence similarities to closest relatives of DNA recovered from the respective bands in DGGE gels |          |                                                                                        |       |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|----------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 条带                                                                                                                     | 序列号      | 亲缘关系最近的序列                                                                              | 相似性/% |
| YSCWM1                                                                                                                 | EF493036 | Uncultured <i>γ-Proteobacterium</i> clone b1pl1aH12(EF092653)                          | 99    |
| YSCWM2                                                                                                                 | EF433369 | Uncultured <i>Bacteroidetes</i> bacterium clone M0-Ar2-P2G08(EF016472)                 | 94    |
| YSCWM3                                                                                                                 | EF493034 | Uncultured delta <i>Proteobacterium</i> Arctic96A-24(AF355048)                         | 97    |
| YSCWM4                                                                                                                 | EF433362 | <i>Alteromonas</i> sp. KOPRI 11568(AY138988)                                           | 100   |
| YSCWM5                                                                                                                 | EF433361 | Uncultured <i>Bacteroidetes</i> bacterium clone T42_183(DQ436774)                      | 100   |
| YSCWM6                                                                                                                 | EF493037 | Uncultured <i>γ-Proteobacterium</i> clone JL-ESNP-I14(AY664201)                        | 100   |
| YSCWM7                                                                                                                 | EF433358 | Uncultured <i>γ-Proteobacterium</i> DGGE band: SIS02-21(AB265980)                      | 99    |
| YSCWM8                                                                                                                 | EF433356 | Uncultured <i>γ-Proteobacterium</i> DGGE band: SIS02-21(AB265980)                      | 100   |
| YSCWM9                                                                                                                 | EF433364 | <i>Pseudomonas veronii</i> (AM410088)                                                  | 100   |
| YSCWM10                                                                                                                | EF433360 | Uncultured <i>γ-Proteobacterium</i> clone PI_RT72(AY580804)                            | 99    |
| YSCWM11                                                                                                                | EF493033 | <i>Alteromonas</i> sp. KOPRI 11568(AY138988)                                           | 100   |
| YSCWM12                                                                                                                | EF433364 | <i>Pseudomonas veronii</i> (AM410088)                                                  | 100   |
| YSCWM13                                                                                                                | EF433363 | <i>Cellulophaga</i> sp. D3054(DQ480142)                                                | 99    |
| YSCWM14                                                                                                                | EF433372 | Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. clone HKTW8(EF427926)                                | 100   |
| YSCWM15                                                                                                                | EF433368 | Uncultured organism(DQ396109)                                                          | 95    |
| YSCWM16                                                                                                                | EF493038 | <i>Pseudoalteromonas</i> sp. BSi20634(EF382715)                                        | 100   |
| YSCWM17                                                                                                                | EF433370 | <i>Pseudoalteromonas</i> sp. Bsi20671(EF198395)                                        | 100   |
| YSCWM18                                                                                                                | EF433359 | Uncultured <i>γ-Proteobacterium</i> clone 5kpl1H10(EF092475)                           | 100   |
| YSCWM19                                                                                                                | EF433366 | Uncultured <i>Flavobacteriaceae</i> bacterium clone ESP10-K27II-42 bacterium(DQ810324) | 98    |
| YSCWM20                                                                                                                | EF493035 | Uncultured marine bacterium ZD0405(AJ400348)                                           | 98    |
| YSCWM21                                                                                                                | EF433367 | <i>Marinobacter</i> sp. R10(EF177663)                                                  | 96    |
| YSCWM22                                                                                                                | EF433365 | Uncultured bacterium clone ELB19-204(DQ015831)                                         | 95    |
| YSCWM23                                                                                                                | EF433357 | Uncultured <i>γ-Proteobacterium</i> clone T32_61(DQ436669)                             | 97    |
| YSCWM24                                                                                                                | EF433371 | <i>Flavobacteriaceae</i> bacterium DOKDO 020(DQ191181)                                 | 97    |

2 个细菌类群: 变形细菌门( *Proteobacteria* )和拟杆菌门( *Bacteroides* ).在 24 条序列中有 16 条分别与变形细菌亚群的  $\gamma$ -和  $\delta$ -*Proteobacteria* 相似,有 5 条与拟杆菌门相似,还有 3 条序列根据序列相似性无法确定其所属类群,由系统发育分析可以看出 YSCWM15 和 YSCWM20 处于  $\gamma$ -*Proteobacteria* 分支内,可以确定 YSCWM15 和 YSCWM20 属于  $\gamma$ -*Proteobacteria*, YSCWM22 处于拟杆菌门( *Bacteroides* )中 *Flavobacteria* 分支内,可以确定 YSCWM22 属于 *Flavobacteria* (图 6).

2.4.1 4 月份各站位的细菌群落组成和优势菌群分析

每个样品 DGGE 图谱中的每条条带都得到了相应的序列,并进行了序列比对分析,所以可根据条带数统计该样品的细菌群落组成.

4 月份所调查的海域黄海冷水团还没有形成.4 月份所有站位底层的细菌群落组成和总的细菌群落组成(不分层,表、中、底 3 层混在一起)都相同,都包括  $\gamma$ -*Proteobacteria*、 $\delta$ -*Proteobacteria* 和 *Bacteroides* (图 7、图 8). 优势菌群也都相同,为  $\gamma$ -*Proteobacteria* (YSCWM8 或 YSCWM20 或 YSCWM23)[图 4(a)].

2.4.2 10 月份各站位的细菌群落组成和优势菌群分析

(1)垂直分布 11894 站和 9594 站在冷水团范

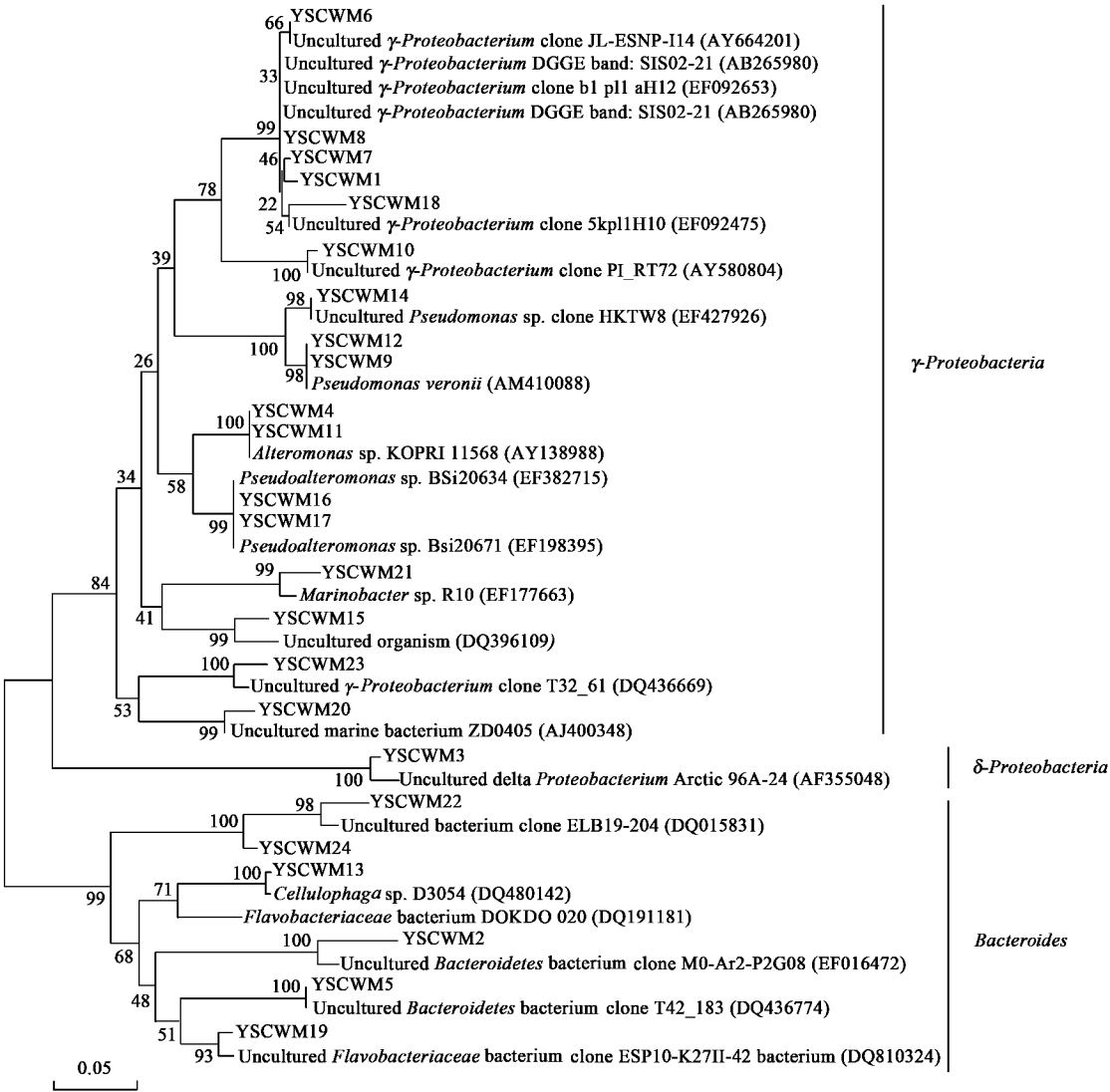
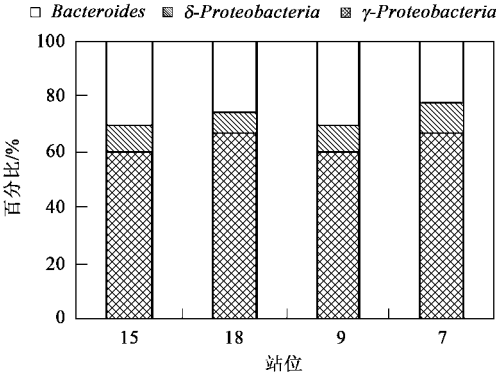


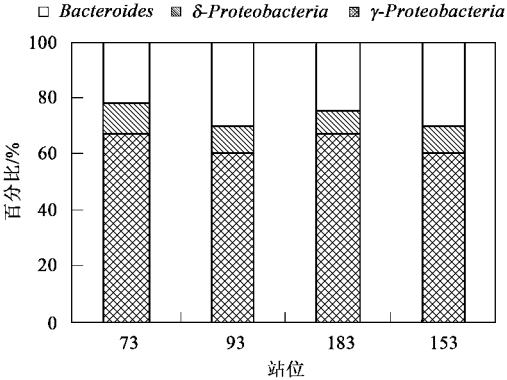
图 6 16S rDNA-V3 序列的系统发生树

Fig.6 Unrooted phylogenetic tree based on 16S rDNA-V3 sequences representing the respective DGGE bands in Table 2



15: 15994 站; 18: 11894 站; 9: 9594 站; 7: 7794 站

图 7 4 月份所有站位总的细菌群落组成



73: 7794 站底层; 93: 9594 站底层; 183: 11894 站底层; 153: 15994 站底层

图 8 4 月份所有站位底层的细菌群落组成

围以内,其底层位于冷水团水体内部,中层和表层位

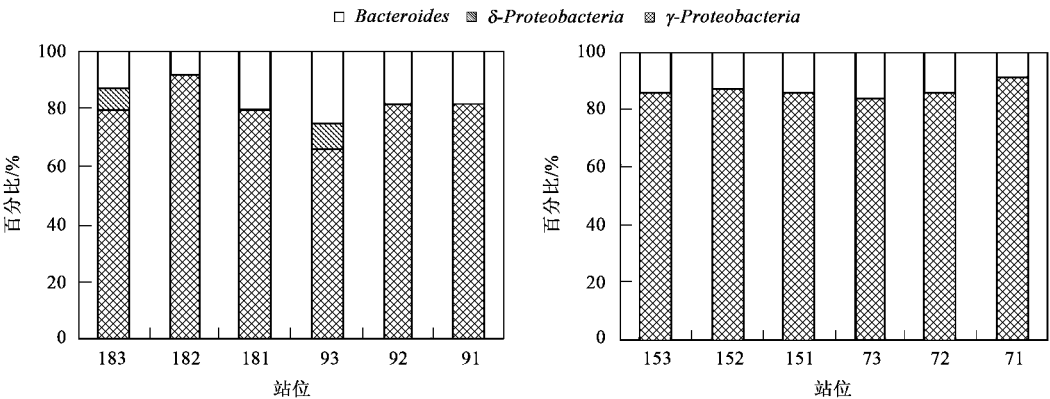
Fig. 8 Bacterial community composition of the bottom layer in all the station in April

于冷水团水体外部(图 3).

冷水团 站 位 底 层 ( 包 括 *γ-Proteobacteria*、*δ-Proteobacteria*和 *Bacteroides*)与中、表层的细菌群落组成(*γ-Proteobacteria* 和 *Bacteroides*)不同(图 9).表、中、底 3 层的优势菌群相同(YSCWM15),都是 *γ-Proteobacteria*(YSCWM15)[图 4(b)].也就是说在冷水团范围以内的站点,冷水团内部水体与冷水团外部水体的细菌群落组成不同,优势菌群相同,都是

*γ-Proteobacteria*.

在冷水团范围以外的站点(15994 站和 7794 站),表、中、底 3 层的细菌群落组成相同,都包括 *γ-Proteobacteria*和 *Bacteroides*(图 9).11594 站表、中、底 3 层优势菌群是相同的,都是 *Bacteroides*(YSCWM13),7794 站底层和表层相同,都是 *γ-Proteobacteria* (YSCWM12),中层是 *Bacteroides*(YSCWM13)[图 4(b)].



181、182、183:11894 站的表、中、底层; 91、92、93:9594 站的表、中、底层; 151、152、153:15994 站的表、中、底层; 71、72、73:7794 站的表、中、底层

图 9 10 月份冷水团站(11894 站和 9594 站)和非冷水团站(15994 站和 7794 站)表中底各层的细菌群落组成

Fig.9 Bacterial community composition of surface layer, mid-layer and bottom layer in all stations in October

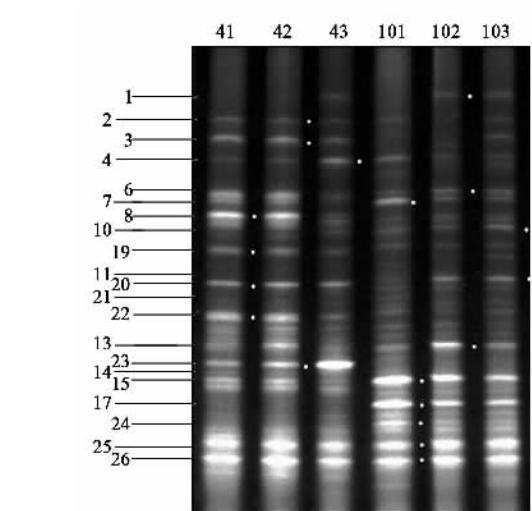
(2)水平(空间)分布 在冷水团范围以内站位的底层细菌群落组成(都包括 *γ-Proteobacteria*、*δ-Proteobacteria*和 *Bacteroides*)与在冷水团范围以外站位的(都包括 *γ-Proteobacteria* 和 *Bacteroides*)不同(图 9).

2.4.3 11894 站 4 月份和 10 月份的细菌群落组成和优势菌群分析

4 月份和 10 月份正好分别处于冷水团未形成前和形成后的 2 个不同时期.4 月份和 10 月份 11894 站底层的细菌菌群组成相同,都包括 *γ-Proteobacteria*、*δ-Proteobacteria* 和 *Bacteroides*(图 8 和图 9).优势菌群也相同,都是 *γ-Proteobacteria*(YSCWM23 或 YSCWM15 或 YSCWM17)(图 10).也就是说冷水团未形成前和形成后,该站点底层的细菌群落组成和优势菌群都是相同的.

3 讨论

DGGE 等分子生物学方法不但可以摆脱对传统培养条件的依赖,可以能对生态群落的结构变化进行快速有效地分析,同时也是研究不可培养微生物的强有力工具.但是局限于目前的技术和实验条件,



41、42、43:4 月份 11894 站表、中、底层; 101、102、103: 10 月份 11894 站表、中、底层;点标记的条带为切割条带

图 10 11894 站 4 月份、10 月份的 DGGE 图谱

Fig.10 DGGE profiles of station 11894 in April and October 2006

样品的采集,DNA 模板的质量,PCR 扩增的偏向性以及 DGGE 的制胶、电泳过程都会造成一些结果的偏差<sup>[1,27]</sup>.尽管如此,DGGE 仍是一种快速且相对有

效的研究群落结构的方法<sup>[1]</sup>。

在本实验中,经 DGGE 分离、条带切割和序列测定,获得 24 条序列,Blast 分析表明 23 条与之亲缘关系最近的序列来自于海洋环境,其中 15 条序列来自于海洋环境中未培养的细菌克隆。传统的微生物生态研究主要采用纯培养的方法,这样得到的细菌群落组成与实际有一定的偏差。而分子生物学方法能更可靠、更直接地反映微生物在生态系统中的原始构成情况。

虽然 16S rDNA 拷贝间有异质性,并且 PCR 过程中可能产生异源双链分子,但是同一样品做不同批次的 PCR-DGGE,如 11894 站 4 月份或 10 月份的样品 2 次 PCR,产物分别在 2 块聚丙烯酰胺凝胶中电泳,2 次的带型和优势条带基本上是一致的,说明该方法用来监测微生物群落随时间或空间上的动态变化是具有一定可靠性的。

DGGE 图谱中条带 25 和 26(图 4 和图 10)虽然亮度较高,但是没有成功克隆,这在其它研究报道也有类似的情况,有些优势条带也没有成功克隆测序<sup>[1]</sup>。图 4(a)中 c1 泳道,条带少,这可能与样品中细菌数量较少有关,也可能与分子技术固有的缺陷有关<sup>[28]</sup>。

黄海冷水团是冬季在黄海本地形成的,入春以后海面受热增温以及在本地特定的地形条件下,自身不断演变,在黄海的底部就留下了一个稳定的孤立水体,长时间几乎恒定不变,每年冬季更新,有着相近的边界位置和温盐结构<sup>[17,29]</sup>。本实验调查的海域,4 月份水体和 10 月份冷水团水体的温盐特征是一致的,并且水体比较稳定。同时,分析结果表明 4 月份所有站位的细菌群落组成都与 10 月份冷水团内部水体相同,而与 10 月份冷水团外部不同。优势菌群也存在同样的分布特点。因此,笔者推测这种分布特点与冷水团的形成有一定的相关性。李洪波等<sup>[21]</sup>曾报道过黄海冷水团水域的浮游细菌分布,指出浮游细菌的分布与水体温度和盐度变化有一定关系,冷水团水域内的浮游细菌生物量最低。温度可能不仅影响了浮游细菌的生物量,对细菌群落组成和优势菌群也是有影响的。

与 YSCWM3( $\delta$ -*Proteobacteria*)相似性最大的是 Uncultured delta proteobacterium Arctic96A-24(AF355048),来自于 Arctic Ocean,而 YSCWM3 在 10 月份冷水团站位(11894 站和 9594 站)的底层和 4 月份某些站位出现,所有这些水体的温度都低于 10℃。因此,笔者推测这类细菌的存在可能与低温有

关,且细菌的群落组成与其所处的生态环境相适应。

本实验室曾利用 PCR-DGGE 技术对长江口外海域的细菌群落组成进行了分析,与其结果相比,黄海海域的细菌多样性低,归属于 2 个类群:变形菌门(*Proteobacteria*)( $\gamma$ -*Proteobacteria*、 $\delta$ -*Proteobacteria*)和拟杆菌门(*Bacteroides*),而长江口海域的细菌归属于 4 个类群:变形菌门(*Proteobacteria*)( $\gamma$ -*Proteobacteria*、 $\delta$ -*Proteobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroides*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)和蓝细菌门(*Cyanobacteria*)。国外也曾报道过其他海域的细菌群落组成,1997 年 Pinhassi 等<sup>[30]</sup>用培养的方法分析波罗的海北部沿岸海域的浮游细菌优势菌群是  $\alpha$ -*Proteobacteria*、 $\gamma$ -*Proteobacteria*、 $\beta$ -*Proteobacteria* 和 *Cytophaga-Flexibacter*;1999 年 Christoph 等<sup>[7]</sup>用 PCR-DGGE 研究地中海西部海水,其细菌群落组成包括 3 大类群: $\alpha$ -*Proteobacteria*、 $\beta$ -*Proteobacteria* 和 *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*;1999 年 Lasse 等<sup>[1]</sup>用 PCR-DGGE 分析阿拉伯海海域的细菌群落主要是  $\alpha$ -*Proteobacteria*、 $\delta$ -*Proteobacteria* 和 *Actinobacteria*,但是没有  $\gamma$ -*Proteobacteria* 和 *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* 类群<sup>[1]</sup>。各海域的细菌群落组成不同,这可能与该海域特定的物理化学环境有关,与特定的地球化学作用有关。以上各海域都有  $\alpha$ -*Proteobacteria*,但是在长江口外海域和黄海冷水团海域的结果中都没有发现。而序列大部分归属于变形菌门(*Proteobacteria*)的  $\gamma$ -*Proteobacteria*、 $\gamma$ -*Proteobacteria* 类群具有很强的适应性,它们在不同环境的生态系统中都有广泛的分布<sup>[31]</sup>。

李杰等<sup>[20]</sup>对黄海冷水团新生产力及微食物环作用进行了分析。在黄海冷水团存在的季节,冷水团水域水层营养盐匮乏,浮游植物生产受限制。然而,在此时段内,浮游动物的生物量基本和浮游植物为同一量级且量值比较接近,由此可认定微食物环在黄海冷水团能流、物流循环过程中担当了重要的角色。因此,详细了解冷水团的微生物群落组成及其在该生态系统中的地位,有助于进一步揭示黄海冷水团水域浮游生态系统能流、物流循环的动力学特征。

## 4 结论

(1)通过软件 Glyko Bandscan 分析 DGGE 图谱,4 月份所有站位的条带数相近(约 17 条),多样性丰富;10 月份,在冷水团范围以内站位的条带约 16 条,其多样性也较丰富;而在冷水团范围以外站位的条带少(约 12 条),其多样性较低。

(2)4 月份所有站位的细菌群落组成与 10 月份冷水团内部水体(海水温度低于 10℃)相同(都包括 *γ-Proteobacteria*、*δ-Proteobacteria* 和 *Bacteroides*),而与 10 月份冷水团外部(海水温度大于 19℃)不同(包括 *γ-Proteobacteria* 和 *Bacteroides*).

(3)优势菌群也存在同样的分布特点.4 月份所有站位水体的优势菌群与 10 月份冷水团内部水体的优势菌群相同(都是 *γ-Proteobacteria*),而 10 月份冷水团外部水体,不同站位其优势菌群不同(11594 站表、中、底 3 层优势菌群相同,都是 *Bacteroides*, 7794 站底层和表层相同,都是 *γ-Proteobacteria*, 中层是 *Bacteroides*).

致谢:感谢“北斗号”考察船船长和船员在航次调查中给予的各方面帮助,感谢张武昌和徐剑虹老师对稿件提出宝贵意见.

#### 参考文献:

- [1] Lasse R, Grieg F S, Laura B F, *et al.* Bacterial community composition during two consecutive NE Monsoon periods in the Arabian Sea studied by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of rRNA genes[J]. *Deep-Sea Research II*, 1999, **46** (6):1791-1811.
- [2] 马悦欣, Jeremy Webb, Staffan Kjelleberg, 等. 变性梯度凝胶电泳(DGGE)在微生物生态学中的应用[J]. *生态学报*, 2003, **23**(8): 1561-1569.
- [3] Schauer M, Massana R. Spatial differences bacterioplankton composition along Catalan coast (NW Mediterranean) assessed by molecular fingerprinting[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, **33** (1):51-59.
- [4] Schafer H, Bernard L, Courtles C, *et al.* Microbial dynamics in Mediterranean nutrient enriched seawater mesocosms: changes in the genetic diversity of bacterial populations[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, **34**(3): 243-253.
- [5] Bano N, Hollibaugh J T. Diversity and distribution of DNA sequences with affinity to ammonia-oxidizing bacteria of the  $\beta$ -subdivision of the class *Proteobacteria* in the Arctic Ocean[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**(5): 1960-1969.
- [6] 臧红梅, 樊景凤, 王斌, 等. 海洋微生物多样性的研究进展[J]. *海洋环境科学*, 2006, **35**(3):96-100.
- [7] Christoph M H, Sabine R, Dietmar V, *et al.* Investigation of 0.2  $\mu$ m filterable bacteria from the Western Mediterranean Sea using a molecular approach: dominance of potential starvation forms[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, **31**: 153-161.
- [8] Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, **59**(3): 695-700.
- [9] Casamayor E O, Schäfer H, Baneras L, *et al.* Identification of and spatiotemporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**(2):499-508.
- [10] Bano N, Hollibaugh J T. Phylogenetic composition of bacterioplankton assemblages from Arctic ocean[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**(2):505-518.
- [11] Diez B, Pedros-Alioc, Marsh T L, *et al.* Application of denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE)to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**(7):2942-2951.
- [12] 孙寓姣, 左剑恶, 邢薇, 等. 高效厌氧产甲烷颗粒污泥微生物多样性及量化研究[J]. *环境科学*, 2006, **27**(11): 2354-2357.
- [13] 邢薇, 左剑恶, 孙寓姣, 等. 利用 FISH 和 DGGE 对产甲烷颗粒污泥中微生物种群的研究[J]. *环境科学*, 2006, **27**(11): 2268-2272.
- [14] 段学军, 闵航. 镉胁迫下稻田土壤微生物基因多样性的 DGGE 分子指纹分析[J]. *环境科学*, 2004, **25**(5):122-126.
- [15] 苏纪兰, 黄大吉. 黄海冷水团的环流结构[J]. *海洋与湖沼*, 1995, **26**(5):1-7.
- [16] 翁学传, 张以愚, 王从敏, 等. 黄海冷水团的变化特征[J]. *海洋与湖沼*, 1988, **19**(4):368-379.
- [17] 赫崇本, 徐斯, 汪园祥, 等. 黄海冷水团的形成及其性质的初步探讨[J]. *海洋与湖沼*, 1959, **2**(1):11-15.
- [18] 于非, 张志欣, 刁新源, 等. 黄海冷水团演变过程及其与邻近水团关系的分析[J]. *海洋学报*, 2006, **28**(5):26-34.
- [19] 张书文. 黄海冷水团夏季叶绿素垂直分布结构的影响机制[J]. *海洋与湖沼*, 2003, **34**(2):179-186.
- [20] 李杰, 吴增茂, 万小芳. 黄海冷水团新生产力及微食物网作用分析[J]. *中国海洋大学学报*, 2006, **36**(2):193-199.
- [21] 李洪波, 肖天, 丁涛, 等. 浮游细菌在黄海冷水团中的分布[J]. *生态学报*, 2006, **26**(4):1012-1020.
- [22] Fuhrman J A, Comeau D E, Hagström Å, *et al.* Extraction from natural planktonic microorganisms of DNA suitable for molecular biological studies[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, **54**(6):1426-1429.
- [23] 邢德峰, 任南琪, 宋佳秀, 等. 不同 16S rDNA 靶序列对 DGGE 分析活性污泥群落的影响[J]. *环境科学*, 2006, **27** (7):1424-1428.
- [24] Yu Z T, Morrison M. Comparisons of Different Hypervariable Regions of *rrs* Genes for Use in Fingerprinting of Microbial Communities by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70**(8):4800-4806.
- [25] Don R H, Cox P T, Wainwright B J, *et al.* "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification[J]. *Nucleic Acids Research*, 1991, **19**:4008.
- [26] 邢德峰, 任南琪, 宫曼丽. PCR-DGGE 技术解析生物制氢反应器微生物多样性[J]. *环境科学*, 2005, **26**(2):172-176.
- [27] Suzuki M T, Giovannoni S J. Bias caused by template annealing in the amplification mixtures of 16S rRNA genes by PCR[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**(2):625-630.

- 
- [28] Von Wintzingerode F, Goebel U B, Stackebrandt E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis [J]. FEMS Microbiol Rev, 1997, **21**(3): 213-229.
- [29] 缪经榜, 刘兴泉. 北黄海冷水团形成机制的初步探讨[J]. 中国科学(B 辑), 1990, **20**(12): 1311-1321.
- [30] Pinhassi J, Zweifel U L, Hagström Å. Dominant marine bacterioplankton species found among colony-forming bacteria [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, **63**(9): 3359-3366.
- [31] Ravensschlag K, Sahm K, Pemthaler J, *et al.* High bacterial diversity in permanently cold marine sediments [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, **65**(9): 3982-3989.