

# 青岛陆源排污口邻近海域异养细菌的组成与分布\*

刘 霜<sup>1,2①</sup> 李永霞<sup>3</sup> 刘旭东<sup>4</sup> 崔正国<sup>3</sup> 王亚楠<sup>5</sup>  
孙蓓蓓<sup>1,2</sup> 宋 帅<sup>1,2</sup>

(1. 国家海洋局北海环境监测中心 青岛 266033; 2. 国家海洋局海洋溢油鉴别与损害评估技术重点实验室 青岛 266033; 3. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 4. 青岛市环境监测中心站 青岛 266003; 5. 青岛市海洋与渔业局 青岛 266071)

**摘要** 对青岛近海度假区、港口区、养殖区、工业区 4 类排污口邻近海域异养细菌的组成与分布进行了调查研究, 采用海洋异养细菌平板涂布培养法分离细菌, 基于 16S rDNA 的扩增性 DNA 限制性酶切片分析(ARDRA)进行聚类筛选并测序鉴定。结果显示, 青岛排污口邻近海域可异养培养的菌株分布于变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes) 4 个细菌类群, 变形菌门细菌数量占总测序数量的 68%, 其中  $\gamma$ -变形菌纲的数量在变形菌门中占 88%; 不同海域中细菌组成与分布有所不同, 放线菌门和拟杆菌门的细菌种类较少且各海域分布有所不同, 但  $\gamma$ -变形菌纲的弧菌属细菌(*Vibrio* sp.)在 4 类海域中均被发现, 占总检测量的 18.54%, 其中溶藻胶弧菌(*Vibrio alginolyticus*)占弧菌总量的 25%。不同海域也检测到 *V. parahaemolyticus*、*V. harveyi*、*V. campbellii*、*V. parahaemolyticus* 等水产养殖业的潜在致病菌。根据 16S rDNA 系统进化关系和细菌门类聚类分析得到的结论推断, 工业区与养殖区海域的细菌组成和分布相似度较高, 推断各海域的细菌组成与排污口类型有一定相关性。

**关键词** 排污口; 海洋异养细菌; 16S rDNA; 弧菌

中图分类号 S948 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2014)06-0023-07

陆源入海排污口是指将生活、生产污水排入大海的出口。近年来, 随着社会生产力的不断发展及人民生活水平的不断提高, 排污口对邻近海域的环境压力也日益增大(姜南等, 2013)。海洋环境对污染物的降解处理能力有限, 污染物的经常性超标必然对排污口及邻近海域的生态环境及微生物群落构成严重威胁(刘慧慧等, 2013)。

自 19 世纪 30 年代科学家 Ehrenberg 首次分离了第一株海洋细菌以来, 随着对海洋科学领域的不断研究和探索, 海洋微生物尤其是海洋异养细菌在海洋生态系统物质循环、能量流动及维持海洋生态系统多样性和稳定性方面的重要性被人们广泛认可并深入研究(孙昌魁等, 2001; Fuhrman *et al*, 1980)。分离培养是

微生物学一项传统但不可或缺的研究, 虽然近年来非培养手段不断发展并在微生物多样性调查中得到广泛应用, 但纯培养仍然是对微生物生理特性和生态功能进行深入分析的基础, 因此菌株的分离纯化一直受到微生物学家的高度重视(田甜等, 2009; Erick *et al*, 2008; 王印庚等, 2012; 胡修贵等, 2012)。

不同时期、不同海域的水质环境不同, 其微生物群落的组成与结构也不相同。李筠等(2006)研究了 1999–2000 年间青岛近岸养殖密集区、工业区、洁净区的海洋异养细菌分布, 分离到的细菌分别属于弧菌属(*Vibrio*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、海单胞菌属(*Oceanimonas*)、噬纤维菌属(*Cellulophaga*)、

\* 海洋公益性行业科研专项(201105007)资助

① 通讯作者: 刘 霜, 高级工程师, E-mail: liushuang@bhfj.gov.cn

收稿日期: 2013-12-24, 收修改稿日期: 2014-02-19

赤细菌属(*Erythrobacter*)和 *Rhodovirga*。

为了研究近些年青岛近海排污口细菌的种类特征及分布规律,本研究在青岛近海的 4 类功能区(港口区、度假区、养殖区和工业区)的排污口附近海域进行采样,利用扩增性 rDNA 限制性酶切片段多态性分析(Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis, ARDRA),从中选择具有差异性的片段进行测序,探讨青岛近海不同排污口海域海水中细菌的种类组成、优势菌群的群落结构和分布特点,为排污口的科学治理与环境质量评价提供相关依据,也为近海微生物资源及生态环境的研究提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株来源

**1.1.1 样品采集** 于 2011 年 7-8 月,在青岛近海的 4 类排污口附近海域(图 1)采集了 2-3 次表层海水样品。其中 A 为度假区排污口邻近海域(市南区五四广场),B 为港口区排污口邻近海域(四方区海泊河),C 为养殖区排污口邻近海域(崂山区浦里),D 为工业区排污口邻近海域(李沧区制碱公司排污区)。2011 年青岛市海洋环境公报显示,度假区排污口污水主要为附近居民和酒店的生活污水,污染物主要为有机质、氨氮和磷酸盐等;港口区污水的污染物除了有机质、氨氮、磷酸盐外,还有油类物质;养殖区排污口污水主要来自附近的海水养殖基地,富含铵盐和有机质;工业区排污口污水成分与附近工业生产相关,除了有机质和氮磷元素外,还有重金属离子(砷、汞、铅、镉等)。

海水样品采用无菌采水瓶在表层收集 250 ml,冷藏带回实验室,2 h 内进行处理。方法参照海洋监测规范。



图 1 采样站点

Fig.1 Geographic locations of the sampling sites

**1.1.2 样品的处理及细菌的培养** 用无菌海水对样品进行 10 倍系列稀释,稀释后的样品涂布于 2216E、TCBS、海水 R2A 培养基平板。每个平板涂布稀释样品 0.1 ml,每个稀释度涂布 3 个平板。28℃ 培养 2 d 后进行计数,从菌落数介于 30-300 之间的平板上,采用随机挑取菌落法,在每个样品中随机挑取至少 20 个表现不同的菌落(细菌菌落的大小、颜色、透明度、干燥或湿润、边缘是否规则、菌落突起、平坦或凹陷等特征指标),再进一步纯化。每个菌落纯化至少两次。纯化后的细菌培养液中加入 20% 无菌甘油, -80℃ 冷冻保存备用。

### 1.2 16S rDNA 分析

**1.2.1 细菌基因组 DNA 的提取** 选取表现具有不同特征的菌株使用煮沸法和酚-氯仿法进行 DNA 提取。优先使用煮沸法提取 DNA,未能扩增出 16S rDNA 片段时,再使用酚-氯仿法。

**煮沸法:**将培养后用无菌生理盐水洗脱重悬的菌体 0.5 ml,沸水浴 10 min,冰浴 20 min。4℃ 下 12000 r/min 离心 10 min,取上清液 0.3 ml,其中所含 DNA 作为 PCR 模板。

**酚-氯仿法:**优化 Ausubel (1992)所提方法:将活化的菌株 28℃ 培养 24-48 h,用无菌生理盐水洗脱菌体,10000 r/min 离心 10 min,收集菌体。475 μl TE 缓冲液重悬菌体,加入 25 μl 10% SDS、5 μl 蛋白酶 K,混匀后 55℃ 水浴 1 h。加入等体积饱和酚混匀,静置 2 min,10000 r/min 冷冻离心 10 min。取上清液,加等体积氯仿混匀,12000 r/min 离心 10 min。取上清液,加 1/10 体积的 3 mol/L 乙酸钠(pH=5.2)、2.5 倍体积无水乙醇,混匀后置 -20℃ 冰箱过夜。次日取出,10000 r/min 离心 15 min,弃上清液,用 70% 乙醇洗两次,置室温干燥 1 h。取 50 μl 无菌蒸馏水溶解,取部分用紫外分光光度计测定 DNA 含量,剩余部分置 -20℃ 冰箱保存。

**1.2.2 16S rDNA 片段的扩增** 根据设计的引物从总 DNA 中扩增 16S rDNA。引物为细菌 16S rDNA 通用引物,扩增 16S rDNA 基因 8-1510 核苷酸序列。引物选择参照文献(DeLong, 1992),上游引物: 5'-AGAG-TTTGATCCTGGCTCAG-3'; 下游引物 5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3',引物由上海生物工程公司合成。

扩增体系的总体积为 50 μl,其中包括 5 μl 10× Buffer(含 Mg<sup>2+</sup>)、5 μl dNTP (2.5 mmol/L)、约 30 ng 总 DNA 溶液、上下游引物各 0.5 μl (20 pmol/L)、0.3 μl *Taq* 聚合酶,双蒸水补齐 50 μl 总体积。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min、55℃ 退火 1 min

30 s、72℃延伸 1 min, 30 个循环; 72℃延伸 10 min。

**1.2.3 扩增产物的检测及纯化** 扩增产物于 1%琼脂糖凝胶电泳检测。采用胶回收试剂盒(宝生物, 大连)纯化 PCR 产物。

**1.2.4 扩增性 rDNA 限制性酶切片分析(ARDRA)**

将 PCR 产物用 *Hha* I 进行酶切。酶切反应体系为 15  $\mu$ l。其中, *Hha* I 1.5  $\mu$ l, 10 $\times$ Buffer 1  $\mu$ l, 16S rDNA 扩增产物 5  $\mu$ l, 双蒸水 7.5  $\mu$ l。

### 1.3 测序与结果分析

根据酶切结果将菌株归类筛选, PCR 产物送华大基因生物公司进行测序, 将测得的序列与 GenBank 数据库中的基因序列进行相似性比较, 找出相似度最近的细菌, 对测序结果进行分类分析。

测序菌株的系统进化树, 基于 16S rDNA 序列, 以 Mega 5.0 建立的 Neighbor-joining 进化树, 节点自举值为 1000 次重复结果, 标尺长度表示核苷酸序列的替换为 5%。

采用 Primer 5 软件, 根据物种是否出现在各被测群体中进行群落聚类分析(Cluster)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 各排污口海域细菌的种类组成与分析

从各排污口海域采样, 经分离纯化保种 312 株细菌, 其中度假区、工业区、港口区和养殖区排污口邻近海域分别纯化 77 株、69 株、88 株和 78 株。酶切聚类筛选后的测序结果显示, 151 株菌与 GenBank 中的序列同源性较高, 达到 98%以上。一般认为, 16S rDNA 同源序列超过 99%的细菌为同一个种, 16S rDNA 序列同源性在 97%–99%之间的细菌为同一个属, 16S rDNA 序列同源性小于 97%的则为新种类。因此, 根据这个规则来确定菌株的种属。

经鉴定, 隶属于 62 个属的 151 株细菌分布于 4 大细菌类群: 变形菌门(Proteobacteria) 104 株, 隶属于 29 个属; 厚壁菌门(Firmicutes) 36 株, 隶属于 8 个属; 放线菌门(Actinobacteria) 7 株, 隶属于 5 个属; 拟杆菌门(Bacteroidetes) 4 株, 隶属于 3 个属(表 1)。各大类群的细菌占测序细菌总数的比例见图 2, 变形菌门细菌数量占总测序数量的 68%, 其中  $\gamma$ -变形菌纲的数量在变形菌门中占 88%; 厚壁菌门、放线菌门和拟杆菌门的数量分别占总测序数量的 24%、5%和 3%。

在度假区、工业区、港口区和养殖区的 4 类排污口海域中, 变形菌门和厚壁菌门的细菌均有分布且种类丰富(图 3、表 1)。度假区排污口海域分离到的 30

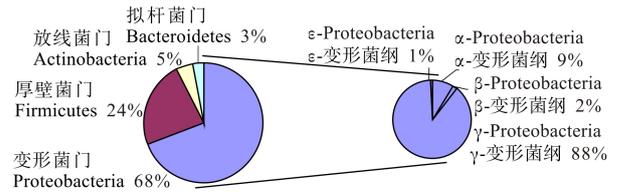


图 2 测序细菌种类的分布

Fig.2 The distributions of sequenced bacteria

株细菌, 其中变形菌门的种类最丰富, 包括  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\epsilon$ -变形菌纲的 9 个属, 未发现放线菌门的菌株;  $\gamma$ -变形菌纲的 *Vibrio* sp. 是优势菌群, 占度假区总量的 36.67%。工业区排污口海域分离到的菌株在变形菌门、厚壁菌门、放线菌门和拟杆菌门 4 个门类均有分布; 放线菌门分离到 *Brevibacterium* sp.、*Microbacterium* sp. 和 *Nesterenkonia* sp. 3 个属的细菌各 1 株; 与度假区排污口海域相同, *Vibrio* sp. 是优势菌群。港口区排污口海域分离到 56 株细菌, 细菌种类最丰富; 变形菌门包括  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ -变形菌纲的 14 个属; 放线菌门分离到 *Cellulomonas* sp. 的 1 株细菌; 其中  $\gamma$ -变形菌纲的 *Klebsiella* sp. 占 12.50%, 为优势菌群, 而 *Vibrio* sp. 只占 1.79%。养殖区海域分离到 *Nesterenkonia* sp. 和 *Agrococcus* sp. 两个属的 3 株放线菌, 未分离到拟杆菌; *Vibrio* sp. 为优势菌群, 另外分离到的同样来自  $\gamma$ -变形菌纲的 *Pseudidiomarina* 占该区域细菌总数的 15.79%, 为第二大优势菌群。

许多研究表明, 变形菌门的  $\gamma$ -变形菌纲和  $\alpha$ -变形菌纲是海洋环境中微生物的主要类群(Acinas *et al*, 1999; 李彬等, 2010; 高菲等, 2012)。本研究结果显示,  $\gamma$ -变形菌纲的菌株在分离到的菌株中占到了大多数, 说明各排污口海域的细菌优势菌群与一般海洋环境中的优势菌群相比, 未发生明显变化。4 类排污口海域中均大量存在  $\gamma$ -变形菌纲的 *Vibrio* sp., 与宁波陆源排污口优势菌群检测结果一致(姜南等, 2013)。

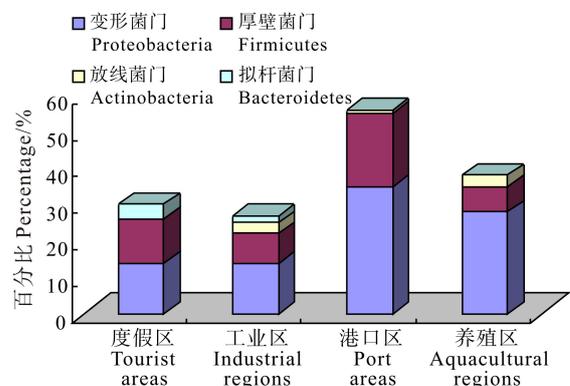


图 3 4类海域的细菌门类组成

Fig.3 The bacterial compositions of the four sea areas

表1 各排污口附近海域异养细菌 16S rDNA 序列鉴定结果  
Tab.1 The sequence results of the strains analyzed by 16S rDNA

类群 Group	度假区 Tourist areas		工业区 Industrial regions		港口区 Port areas		养殖区 Aquacultural regions	
	种属 Genus	百分比 Percentage (%)	种属 Genus	百分比 Percentage (%)	种属 Genus	百分比 Percentage (%)	种属 Genus	百分比 Percentage (%)
$\alpha$ -变形菌 $\alpha$ -Proteobacteria	<i>Donghicola</i>	3.33	<i>Phaeobacter</i>	3.70	<i>Rhodobacteraceae</i>	1.79	<i>Brevundimonas</i>	5.26
	<i>Rhodobacteraceae</i>	10.00	<i>Sphingomonas</i>	3.70				
$\beta$ -变形菌 $\beta$ -Proteobacteria	<i>Hydrogenophaga</i>	3.33			<i>Limnobacter</i>	1.79		
$\gamma$ -变形菌 $\gamma$ -Proteobacteria	<i>Alteromonas</i>	6.67	<i>Alcanivoracaceae</i>	3.70	<i>Alcanivorax</i>	1.79	<i>Alishewanella</i>	2.63
	<i>Citrobacter</i>	3.33	<i>Alcanivorax</i>	3.70	<i>Alteromonas</i>	1.79	<i>Enterobacter</i>	5.26
	<i>Pseudoalteromonas</i>	6.67	<i>Idiomarina</i>	3.70	<i>Chromohalobacter</i>	8.93	<i>Enterobacteriaceae</i>	2.63
	<i>Pseudomonas</i>	6.67	<i>Pseudidiomarina</i>	3.70	<i>Citrobacter</i>	5.36	<i>Escherichia</i>	5.26
	<i>Vibrio</i>	36.67	<i>Vibrio</i>	29.63	<i>Enterobacter</i>	3.57	<i>Klebsiella</i>	2.63
					<i>Halomonas</i>	3.57	<i>Idiomarina</i>	2.63
					<i>Klebsiella</i>	12.50	<i>Pseudomonas</i>	2.63
					<i>Marinobacter</i>	1.79	<i>Pseudidiomarina</i>	15.79
					<i>Pseudoalteromonas</i>	7.14	<i>Shewanella</i>	7.89
					<i>Pseudomonas</i>	7.14	<i>Shigella</i>	2.63
					<i>Salinisphaera</i>	5.36	<i>Vibrio</i>	18.42
					<i>Vibrio</i>	1.79		
$\epsilon$ -变形菌 $\epsilon$ -Proteobacteria	<i>Arcobacter</i>	3.33	<i>Acinetobacter</i>	7.41	<i>Acinetobacter</i>	5.36	<i>Acinetobacter</i>	5.26
厚壁菌门 Firmicutes	<i>Bacillus</i>	3.33	<i>Bacillus</i>	7.41	<i>Bacillus</i>	8.93	<i>Bacillus</i>	7.89
	<i>Virgibacillus</i>	3.33	<i>Exiguobacterium</i>	7.41	<i>Enterococcus</i>	1.79	<i>Chryseomicrobium</i>	2.63
			<i>Staphylococcus</i>	7.41	<i>Exiguobacterium</i>	1.79	<i>Staphylococcus</i>	2.63
					<i>Gracilibacillus</i>	1.79		
					<i>Staphylococcus</i>	8.93		
					<i>Virgibacillus</i>	5.36		
放线菌门 Actinobacteria			<i>Brevibacterium</i>	3.70	<i>Cellulomonas</i>	1.79		
			<i>Microbacterium</i>	3.70			<i>Nesterenkonia</i>	2.63
			<i>Nesterenkonia</i>	3.70			<i>Agrococcus</i>	5.26
拟杆菌门 Bacteroidetes	<i>Escherichia</i>	3.33	<i>Flexibacter</i>	3.70				
	<i>Maribacter</i>	6.67	<i>Orabacterium</i>	3.70				
	<i>Neptuniibacter</i>	3.33						

革兰氏阳性的厚壁菌门细菌在近海海水中较为常见 (Ravenschlag *et al*, 1999)。在本研究中, 厚壁菌门细菌也主要分布于青岛周边海域的水体中。

放线菌门和拟杆菌门的细菌种类较少且各海域分布有所不同, 可能与各海域的环境因子有相关性。本研究分离到的放线菌门细菌包括 5 个属, 分别来自氮磷元素和有机质丰富、多种污染物共存的工业区、港口区和养殖区, 而氮磷元素和有机质相对较少、污染也较少的度假区海域未发现放线菌门的细菌。放线菌门在有机质分解和矿化的过程中起着重要的作用 (Bull *et al*, 2005)。本研究在一定程度上验证了已

有的报道: 微生物在地理空间上的分布差异可以看作是微生物群落对环境污染或压力的反应 (白洁等, 2009)。

## 2.2 弧菌的组成与分布

调查研究发现,  $\gamma$ -变形菌纲的弧菌属细菌 (*Vibrio* sp.) 在 4 类海域中均被检测到, 占总检测量的 18.54%。Ren 等 (2006) 研究表明, 不同区域的海水中微生物种类多样性有所不同。本研究的青岛度假区、工业区、港口区和养殖区各排污口邻近海域的污染物种类及污染情况各有不同, 各排污口弧菌的分布必然存在差

异性。

4 类海域共检测到 11 个种的弧菌, 各海域检测到的弧菌种类及其数量见表 2。度假区弧菌种类最丰富, 共分离到 12 株, 隶属于 *V. alginolyticus*、*V. azureus*、*V. communis*、*V. harveyi*、*V. parahaemolyticus* 和 *V. splendidus* 6 个种, 其中 *V. harveyi* 最多。港口区只检测到 1 株弧菌(*V. azureus*)。工业区检测到 8 株弧菌, 来自 *V. alginolyticus*、*V. campbellii*、*V. parahaemolyticus*、*V. splendidus* 4 个种, *V. alginolyticus* 数量最多。养殖区检测到 *V. alginolyticus*、*V. chagasii*、*V. diabolicus*、*V. owensii* 和 *V. rotiferianus* 5 个种的弧菌, *V. rotiferianus* 数量最多。整体来看, 4 类海域中, *V. alginolyticus* 是数量最多的弧菌种类, 占弧菌测序总量的 25%。众多研究表明(韩善桥等, 2008; Ren *et al.*, 2006; 赖福才等, 2004), 从不同海域分离出的细菌虽然种类与数量上有差别, 但 *V. alginolyticus* 均为数量最多的菌株, 说明在我国广大海域中 *V. alginolyticus* 分布广泛。

*V. parahaemolyticus*、*V. harveyi*、*V. campbellii*、*V. parahaemolyticus* 等均为水产养殖业常见潜在致病菌(Manuela *et al.*, 2003; Alsina *et al.*, 1994), 本研究在不同排污口海域也检测到了上述菌种, 随区域的不同致病菌种也随之变化。

弧菌的 16S rDNA 系统进化关系显示(图 4), 工业区和养殖区两个排污口海域的弧菌大部分聚成了一簇, 说明这两个海域的弧菌的群落特征相似, 它们与度假区和港口区海域的弧菌群落分布有一定差异, 这说明弧菌细菌群落因海域环境的不同而呈现一定

的差异性。本研究的工业区采样点位于青岛李沧区制碱企业等工业排污口附近, 重金属离子含量较其他海域丰富; 而养殖区采样点位于崂山浦里海水养殖区附近, 养殖废水中氮磷含量较高。这两个海域的水质较其他两个海域的有机质和重金属离子含量高, 污染较严重, 因此推测二者海域的细菌分布具有一定的相关性, 可能与海域的水质特征有一定关系。有研究指出, 弧菌属的一些种类具有高效处理低浓度的氮磷或重金属污染的能力, 这类细菌在治理工业、养殖废水方面有广阔的应用前景(赵锐, 2010)<sup>1)</sup>。

### 2.3 物种聚类分析

根据各海域细菌的种类和数量作出的度假区、工业区、港口区和养殖区 4 类排污口邻近海域的细菌种类聚类图(图 5), 度假区和港口区的排污口邻近海域细菌种类聚成一支, 相似度在 70%左右; 而工业区和养殖区的排污口邻近海域的细菌种类聚成另外一支, 相似度为 50%, 说明工业区和养殖区的排污口邻近海域的细菌群落与度假区和港口区的细菌群落差异较明显。

表 2 各海域检测到的细菌种类中, 工业区和养殖区检测到数量最多的细菌均为弧菌。根据 16S rDNA 序列结果的系统进化关系得到的弧菌群落关系显示(图 4), 工业区和养殖区排污口海域的弧菌种类分布相似度较高。这些结果在一定程度上验证了细菌种类聚类分析中工业区和养殖区排污口细菌群落相似性高的特点。

表 2 各海域弧菌的种类

Tab.2 The distribution of *Vibrio* sp. in different sea areas

种类 Species	度假区 Tourist areas	工业区 Industrial regions	港口区 Port areas	养殖区 Aquacultural regions	合计 Total
<i>V. alginolyticus</i>	3	3	—	1	7
<i>V. azureus</i>	1	—	1	—	2
<i>V. campbellii</i>	—	1	—	—	1
<i>V. chagasii</i>	—	—	—	1	1
<i>V. communis</i>	1	—	—	—	1
<i>V. diabolicus</i>	—	—	—	1	1
<i>V. harveyi</i>	4	—	—	—	4
<i>V. owensii</i>	—	—	—	1	1
<i>V. parahaemolyticus</i>	1	3	—	—	4
<i>V. rotiferianus</i>	—	—	—	3	3
<i>V. splendidus</i>	2	1	—	—	3
总计 Total	12	8	1	7	28

1) 赵锐. 青岛近海两种生态环境可培养细菌多样性研究及 3 株海洋新菌的分类鉴定. 中国海洋大学博士学位论文, 2012, 15-16

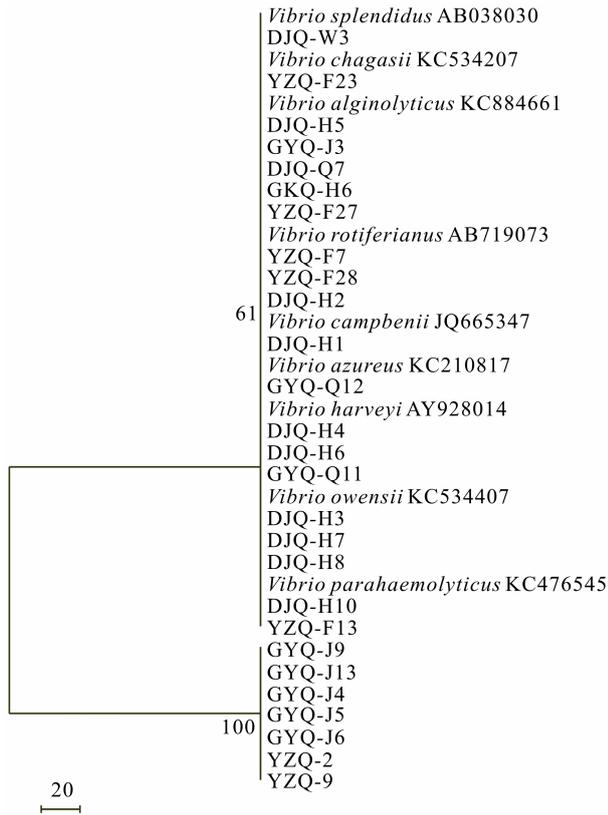


图4 各海域弧菌的16S rDNA系统进化分析

Fig.4 Phylogeny of *Vibrio* (dominant strain) in different sea areas based on the analysis of 16S rDNA

DJQ: 度假区; GKQ: 港口区; GYQ: 工业区; YZQ: 养殖区  
 DJQ: tourist areas; GKQ: port areas; GYQ: industrial regions;  
 YZQ: aquacultural regions

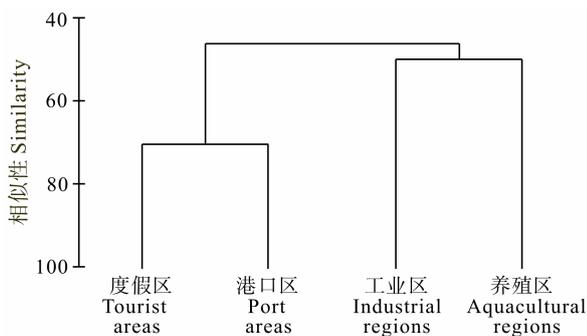


图5 4类海域的细菌种类相似度聚类

Fig.5 The cluster analysis of bacteria in different sea areas

### 3 结论

(1) 青岛近海排污口海域表层水的细菌组成具有多样性,分离到的菌株分布在变形菌门、厚壁菌门、放线菌门和拟杆菌门4个细菌类群。变形菌门是优势菌群,在度假区、工业区、港口区和养殖区4类排污口海域中均大量存在,变形菌门细菌数量占总测序数量的68%,其中 $\gamma$ -变形菌纲的数量在变形菌门中占

88%;不同排污口邻近海域中细菌组成和分布有所不同,放线菌门和拟杆菌门的细菌种类较少且各海域分布有所不同,但 $\gamma$ -变形菌纲的弧菌属细菌(*Vibrio* sp.)在4类海域中均被检测到,占总检测量的18.54%,其中溶藻胶弧菌占弧菌总量的25%。

(2) 弧菌为重要的条件致病菌,在排污口各海域均被检测到,并随排污口类型的不同种类也不同,应引起相关部门的重视,加强相关监测。

(3) 不同区域的海水中微生物多样性有所不同。根据16S rDNA系统进化关系和细菌门类聚类分析得到的结论推断,工业区和养殖区海域的细菌组成和分布相似度较高,推测各海域的细菌组成与海域环境有一定相关性。

本研究拓宽了对青岛近岸不同排污口水域可培养细菌多样性的认识,并初步总结、比较了各个区域的细菌类群特点,为进一步研究青岛近岸海洋异养细菌的多样性及其分布规律与环境的关系奠定了基础,为周边海域污水治理提供了理论储备,也为今后微生物资源的开发和利用做了前期准备。

### 参 考 文 献

- 田甜,李冬梅,戴世颀,等.海洋环境中难培养微生物的寡营养培养.微生物学通报,2009,36(7):1031-1039
- 白洁,李海艳,赵阳国.黄海北部不同站位海洋细菌群落分布特征.微生物学报,2009,49(3):343-350
- 孙昌魁,冯静,马桂荣.海洋微生物多样性的研究进展.生命科学,2001,13(3):97-99
- 刘慧慧,徐英江,邓旭修,等.莱州湾海域双酚A污染现状调查.渔业科学进展,2013,34(4):16-20
- 李彬,荣小军,姜卓,等.秋、冬季节刺身养殖池塘浮游细菌数量变化规律的研究.渔业科学进展,2010,31(3):44-48
- 李筠,周宏霞,刘佳琳,等.青岛近岸特征环境中海洋异养细菌的分布规律及其分子鉴定.中国海洋大学学报(自然科学版),2006,36(6):965-970
- 王印庚,郭伟丽,荣小军,等.养殖刺参“化板症”病原菌的分离与鉴定.渔业科学进展,2012,33(6):81-86
- 姜南,李春丽,周君,等.宁波陆源入海排污口优势菌群的数量、组成分析与研究.宁波大学学报(理工版),2013,26(2):22-27
- 胡修贵,赵培,李玉宏,等.生物絮团中异养亚硝化菌的分离鉴定及其特性.渔业科学进展,2012,33(5):97-103
- 高菲,孙慧玲,王肖君,等.刺身龙须菜混养系统中细菌数量与群落组成.渔业科学进展,2012,33(4):89-98
- 韩善桥,虞积耀,姜涛,等.东南沿海海域海水细菌的分布.解放军预防医学杂志,2008,26(1):18-21
- 赖福才,王前,周一平,等.南海西沙海域海水细菌学调查及药敏检测.第一军医大学学报,2004,24(3):347-348
- Acinas SG, Anton J, Rodriguez-Valera F. Diversity of free-living and attached bacteria in offshore Western Mediterranean

- waters as depicted by analysis of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(2): 514–522
- Alsina M, Blanch AR. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *J Appl Bacteriol*, 1994, 76(1): 79–85
- Ausubel FM. Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from current protocols in molecular biology, 3rd, 1995, 555–557
- Bull AT, Stach JEM. Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2005, 87(1): 65–79
- DeLong EF. Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(12): 5685–5689
- Erick C, James MT. New tools for discovering and characterizing microbial diversity. *Curr Opin Biotech*, 2008, 19(6): 544–549
- Fuhrman JA, Azam F. Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of Brith Columbia, Antarctica and Southern California. *Appl Envir Microbiol*, 1980, 39(6): 1085–1095
- Manuela DL, Michiel S, Marcelo E, *et al.* Complete sequence of virulence plasmid pJM1 from the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* strain 775. *J Bacteriol*, 2003, 185(19): 5822–5830
- Ravenschlag K, Sahm K, Peruthaler J, *et al.* High bacterial diversity in permanently cold marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(9): 3982–3989
- Ren J, Dang H, Song L. Bacterial and cyanobacterial diversities determined by T-RFLP analyses in Jiaozhou Bay. *Acta Oceanologica Sinica*, 2006, 25(4): 124–130

(编辑 冯小花)

## Diversity and Distribution of Marine Heterotrophic Bacteria Nearby Qingdao Land-Based Drainage Discharge Outlets

LIU Shuang<sup>1,2①</sup>, LI Yongxia<sup>3</sup>, LIU Xudong<sup>4</sup>, CUI Zhengguo<sup>3</sup>, WANG Yanan<sup>5</sup>,  
SUN Beibei<sup>1,2</sup>, SONG Shuai<sup>1,2</sup>

(1. North China Sea Environment Monitoring Center, SOA, Qingdao 266033; 2. Key Laboratory of Marine Spill Oil Identification and Damage Assessment Technology, SOA, Qingdao 266033; 3. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 4. Qingdao Environmental Monitoring Station, Qingdao 266003; 5. Ocean and Fisheries Bureau of Qingdao, Qingdao 266071)

**Abstract** Three hundred and twelve strains of heterotrophic bacteria were isolated from the seawater of Qingdao land-based drainage discharge outlets. The sampling locations included tourist area, port area, aquaculture area and industrially affected region. Based on the analysis of 16S rDNA and Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis(ARDRA), these strains were clustered and identified. Four phyla including Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria and Bacteroidetes were identified. Sixty-eight percent of strains belonged to Proteobacteria, and 88% of Proteobacteria were classified into Gammaproteobacteria. The diversity and distribution of the bacteria among each region were different, and a few of them were Actinobacteria and Bacteroidetes. *Vibrio* sp. was found in all four regions, and it accounted for more than 18% of strains. Twenty-five percent of *Vibrio* sp. was *V. alginolyticus*. Many pathogenic bacteria such as *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. campbellii*, and *V. parahaemolyticus* were found in all samples. Based on analysis of 16S rDNA and clustering, the diversity and distributions of bacteria between industrially affected region and aquaculture area were highly similar. These results suggest a close relationship between the environment and the diversity and distribution of bacteria among different regions.

**Key words** Discharge outlet; Marine heterotrophic bacteria; 16S rDNA; *Vibrio* sp.

① Corresponding author: LIU Shuang, E-mail: liushuang@bhj.gov.cn