

基于 PCR-DGGE 技术的红树林区微生物群落结构

刘慧杰^{1,2}, 杨彩云¹, 田蕴^{1,2*}, 林光辉^{1,2}, 郑天凌^{1,2*}

(¹ 滨海湿地生态系统教育部重点实验室, 厦门大学生命科学学院, 厦门 361005)

(² 近海海洋环境科学国家重点实验室, 厦门 361005)

摘要:【目的】为了解红树林沉积物中细菌的群落结构特征。【方法】应用 PCR-DGGE 技术对福建浮宫红树林的 16 个采样站位样品细菌的群落结构进行了研究。根据 DGGE 指纹图谱, 对它们的遗传多样性进行了分析。【结果】各站位样品细菌多样性指数(H)、丰度(S)和均匀度(E_H)均有所不同, 这些差异与它们所处站位的不同有关, 红树林区细菌多样性高于非红树林区细菌多样性。对不同站位细菌群落相似性分析, 它们的相似性系数也存在一定的规律, 同一断面的细菌群落结构相近性较高。对 DGGE 的优势条带序列分析, 同源性最高的微生物分别属于变形菌门(Proteobacteria)、酸菌门(Acidobacteria)和绿菌门(Chlorobi), 它们均为未培养微生物, 分别来自于河口海岸沉积物。【结论】应用 PCR-DGGE 技术更能客观地反映红树林沉积物中真实的细菌群落结构信息。另外, 研究也表明红树林区微生物多样性丰富, 在红树林区研究开发未知微生物资源具有巨大的潜力。

关键词: PCR-DGGE; 红树林; 微生物群落结构; 细菌多样性

中图分类号: Q938.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 07-0923-08

红树林是自然分布于热带、亚热带海岸潮间带的木本植物群落, 通常生长在港湾河口地区的淤泥滩涂上, 是海滩上特有的森林类型^[1]。红树林群落与其所在的生境相互联系相互作用构成了红树林生态系统, 该生态系统在结构和功能上具有既不同于陆地生态系统又不同于海洋生态系统。它兼有海洋和陆地的性质却又与二者不同, 这种特殊的生境使其具有一些重要的独特性质^[2]。它是世界上最富有多样性, 生产力最高的海洋生态环境之一, 具有丰富的微生物资源并具有生态多样性^[3]。这种独特的生态系统和丰富的生物多样性必然蕴藏着独特的酶资源和基因资源^[4], 引起了国内、外学者的广泛关注。

微生物的多样性是生物多样性的重要组成部分

份, 红树林土壤微生物长期适应潮间带的盐生环境, 形成了特有的微生物类型。因此, 这里的微生物资源既丰富又不失特色, 其中以细菌和真菌为主, 占微生物资源总量的 91%^[5]。20 世纪 40 年代以来, 人们一直采用分离培养的方法来研究微生物多样性, 而事实上, 一些微生物经常处于“活的非可培养状态”(viable but nonculturable, VBNC)^[6], 通过实验室人工培养方法已经分离和描述的微生物物种数量仅占估计数量的 1%~5%, 而其余 95%~99% 的微生物类群仍然未被分离和认识^[7]。因而这种方法只能反映极少数微生物的信息, 并不能全面地分析微生物的多样性, 从而埋没了大量的具有应用价值的微生物资源^[8]。

自 1985 年 Pace 等利用核酸序列的测序来研究

基金项目: 国家“863 计划”(2008AA09Z408); 国家自然科学基金(40930847, 40976069, 30930017, 30940002); 福建省科技计划项目(2009Y0048); 深港创新圈项目(08Lh-04)

* 通信作者。田蕴, E-mail: tianyun@xmu.edu.cn; 郑天凌, E-mail: wshwzh@xmu.edu.cn

作者简介: 刘慧杰(1974-), 男, 内蒙古包头市人, 博士, 主要从事环境监测与环境微生物学研究。E-mail: liuhj20002001@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-12-20; **修回日期:** 2010-02-13

微生物的进化问题,加之近年来基因组学的兴起和现代分子生物技术的成熟,可以绕过纯培养的手段来研究微生物的多样性,使其进入了一个崭新的研究阶段^[9-10]。其中,变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)技术最早由 Fischer 和 Leman 提出并用于 DNA 突变检测,现在该技术在微生物群落多样性和种群动态监测中得到广泛应用。福建九龙江口浮宫红树林是我国主要典型红树林分布区之一,对该区域的研究已有多方面的报道,尽管在微生物学方面已有一些研究,但对于应用 PCR-DGGE 技术研究该区域细菌的群落结构仍鲜有报道。本文应用 PCR-DGGE 技术对红树林区微生物多样性进行了初步研究,以期更客观真实地反映红树林沉积物中细菌群落结构信息。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

蛋白胨、胰蛋白胨、酵母提取物为 OXOID 产品,

购自华美公司;Tris、EDTA、Agarose、SDS 购自泰京公司;CTAB、SDS、PVP、dNTP、IPTG、X-gal 为 Promega 产品,DNA marker 为 MBI 和 NEB 产品;Eubac341F (含 GC 夹子)、Eubac517R 由上海博亚生物有限公司合成,pMD18-T 载体为 TaKaRa 公司产品,其它试剂为国产分析纯。T-Gradient PCR 仪(Biometra, Germany),EPS-100 电泳仪(Tanon 天能科技有限公司),基因突变检测仪(用于变性梯度凝胶电泳)(BIO-RAD, Dcode, USA 公司),GIS-2008 凝胶成像分析仪(Tanon 天能科技有限公司)。

1.2 采样站位

福建九龙江口红树林位于九龙江口南岸的龙海市浮宫镇草埔头村,呈带状分布,宽度约为 40 米,主要植被为秋茄,林缘有少量桐花树和白骨壤伴生(图 1)^[11]。该红树林区北面临九龙江口,这是一条重要航道,东面为一淡水河,南边为水产养殖区、稻田区及居民生活区。该区域污染来源主要是水产养殖、居民生活和船舶运输。

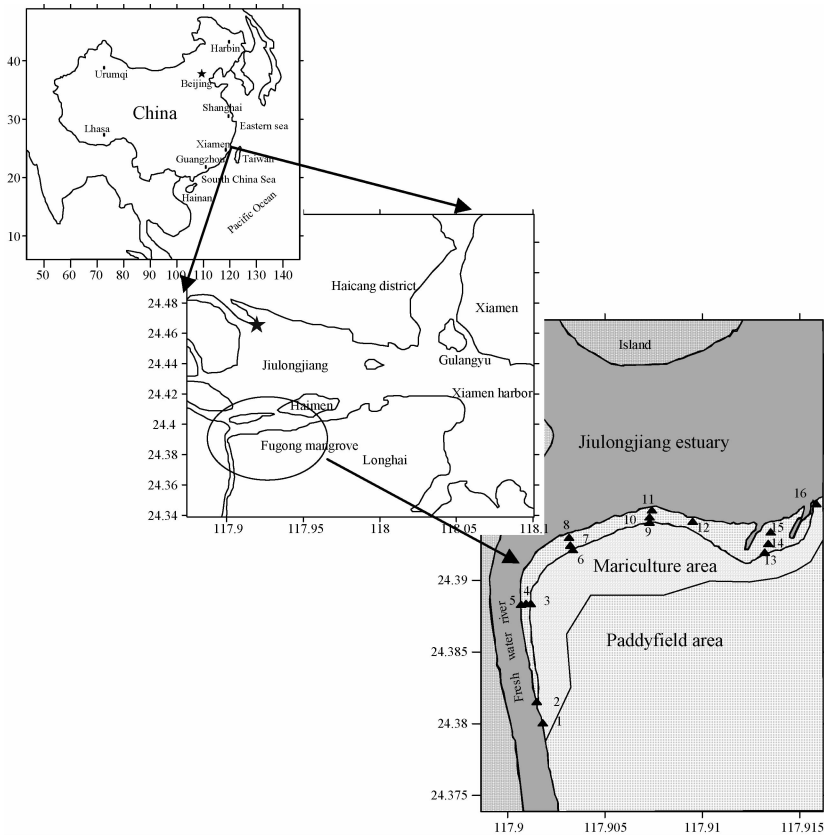


图 1 浮宫红树林采样站位图

Fig. 1 Map of Fugong mangrove area.

在高、中、低潮带共建立 16 个采样站位,在低潮期,分别在各站位进行多点采集红树林表层沉积物

样品,拣去根系并混合均匀后装入无菌袋。冰浴冷藏带回实验室迅速进行微生物学分析。

1.3 沉积物基因组 DNA 的提取与纯化

沉积物基因组 DNA 的提取按 Tian 等^[12]的方法进行,提取后将 DNA 溶解于 200 - 1000 μ L TE 中。DNA 的纯化采用 Qbiogene 公司 GeneClean Turbo Kit,纯化后保存于 -20 $^{\circ}$ C。

1.4 16S rDNA V3 片段的 PCR 扩增

选择细菌的 16S rDNA V3 区的引物^[13]341F-GC (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGCGGGG CACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 517R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'),以纯化后的红树林沉积物 DNA 为模板进行 PCR,其反应条件为 94 $^{\circ}$ C 5min;94 $^{\circ}$ C 1 min,65 $^{\circ}$ C 1 min(每个循环降 1 $^{\circ}$ C),72 $^{\circ}$ C 1min,10 个循环,94 $^{\circ}$ C 1 min,55 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1min,20 个循环,72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.5 各站位群落结构的 PCR-DGGE 分析

PCR 产物用基因突变检测仪分析,PAGE(聚丙烯酰胺)胶浓度为 8% (w/v),变性梯度为 40% - 60%。DGGE 程序按文献进行^[14]。电泳完毕后,将胶于含有 EB 的 1 \times TAE 缓冲液中染色,将染色后的凝胶用凝胶影像分析系统分析,观察每个样品的电泳条带并拍摄。

1.6 DGGE 条带的序列测定及系统发育树的构建

DGGE 凝胶在紫外分析仪照射下进行 DNA 条带的切割,切下的 DNA 条带分别放入 EP 管中,重复冲洗后,过夜保存;上清液作为 PCR 的模板进行扩增。纯化后的 PCR 产物与 pMD18-T 载体连接,并转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,送上海英骏生物技术有限公司进行测序。

所测得序列用 DNAMAN 去除载体序列和 GC 夹子后,将有效序列在 NCBI 上进行比对,以其中同源性最高的序列确定为参照菌株,相似性 $\geq 97\%$ 的序列视为同一序列型(sequence type)^[15],并用 DNAMAN 软件采用邻接法(Neighbor-joining method)构建系统发育树。

1.7 细菌遗传多样性的统计学分析

多样性指数(Shannon-wiener's 指数)又称香浓指数(H),丰度(S)和均匀度(E_H)等指标被用来比较各个样品的细菌多样性。计算公式如下:

$$H = - \sum_{i=1}^{i=s} P_i \ln P_i \quad (1)$$

$$E_H = H/H_{\max} = H/\ln S \quad (2)$$

其中,在研究细菌物种遗传多样性中, P_i 是某个样品中单一条带的强度在该样品的所有条带总强度

中所占的比率, S 是某个样品中所有条带数目总和。

2 结果

2.1 红树林沉积物总 DNA 的提取及纯化

采用原位裂解法提取红树林区 16 个站位沉积物样品的总 DNA,将总 DNA 溶于 TE 后,溶液有不同程度的深色,这可能与粗提 DNA 中含有较多的杂质有关。电泳观察各样品的总 DNA,均有不同程度的拖带,从电泳图谱来看,各站位样品总 DNA 大小约为 23 kb,并且形成较亮的主带。因粗提的红树林各站位样品总 DNA 含有较多的腐殖酸等杂质,不能直接进行后续 PCR 等操作,用 GeneClean Turbo Kit 试剂盒纯化后,DNA 拖带明显减少,杂质含量也明显较少,DNA 纯度较高。

2.2 16S rDNA V3 片段的 PCR 扩增

以细菌 16S rDNA V3 高变区序列的通用引物 Eubac341F 和 Eubac517R^[16]对所纯化后的红树林各站位样品总 DNA 进行 PCR 扩增,经纯化后的红树林样品总 DNA 均可进行 PCR 扩增反应,且均能够扩增出大小约为 200 bp 的 DNA 片段。

2.3 红树林各站位沉积物的 PCR-DGGE 图谱

对红树林各站位样品 16S rDNA V3 区 PCR 产物进行 DGGE 分析,结果如图 2 所示。不同条带代表该样品中不同细菌 16S rDNA V3 区基因片段,每个样品均可分离到 17 到 24 条数目不等、位置各异的细菌 16S rDNA V3 区片段条带,条带数目最少的为 1 号和 16 号站位,均为 17 条,条带数目最多的为 4 号、14 号和 15 号站位,它们的条带数均为 24 条。

2.4 红树林各站位沉积物微生物的遗传多样性

从各站位样品 DGGE 指纹图谱来看,不同的条带代表不同的细菌 16S rDNA V3 区基因片段,每个泳道中条带的亮度反映出细菌相对生物量的多少,电泳条带的多少可以直观地反映样品中细菌群落的遗传多样性,本研究根据电泳图谱中每条条带的信息,对各样品中的细菌多样性指数(H)、丰度(S)和均匀度(E_H)等指标进行了综合分析,结果如表 1 所示。

各站位样品细菌多样性指数(H)、丰度(S)和均匀度(E_H)均有所不同,细菌多样性指数最高的是 3 号站位,指数为 2.842,多样性指数最低的是 1 号站位,指数为 2.182;细菌丰度最高的是 4 号、14 号和 15 号站位,它们的丰度均为 24,细菌丰度最低的是 1 号和 16 号站位,它们的丰度均为 17;细菌的均

匀度最高的是 3 号站位, 均匀度为 0.933, 均匀度最

低的是 1 号站位, 均匀度为 0.770。

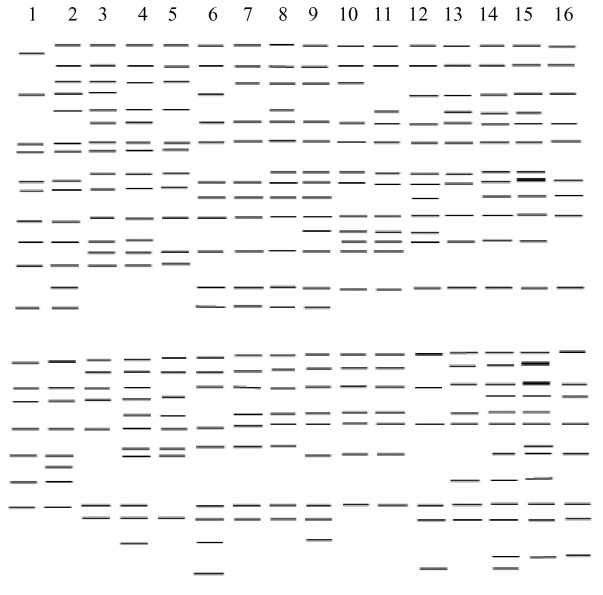
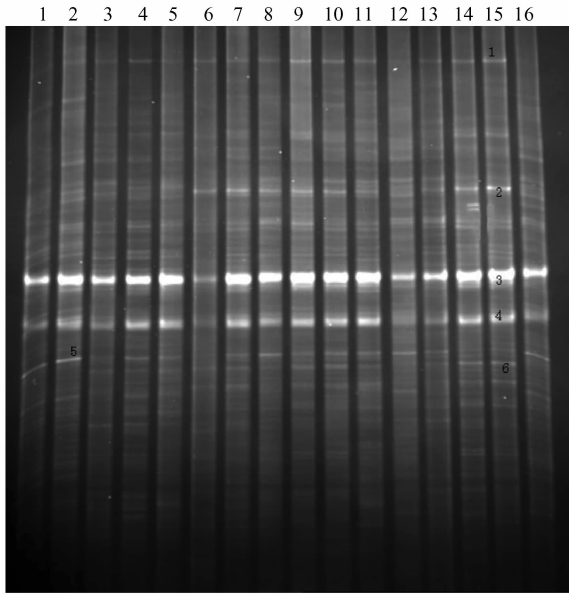


图 2 红树林沉积物不同站位细菌的 DGGE 指纹图谱

Fig. 2 Bacterial DGGE profile of mangrove sediments at different stations.

表 1 红树林各站位沉积物样品 DGGE 条带多样性指数、丰度及均匀度

Table 1 Shannon-wiener Index (H), Richness (S) and Evenness (E_H) of each sample estimated from mangrove sediments by DGGE bands patterns

Station	Shannon-wiener Index (H)	Richness (S)	Evenness (EH)	Station	Shannon-Wiener Index (H)	Richness (S)	Evenness (EH)
1	2.182	17	0.770	9	2.562	22	0.829
2	2.605	22	0.843	10	2.715	19	0.922
3	2.842	21	0.933	11	2.523	19	0.857
4	2.732	24	0.860	12	2.659	18	0.920
5	2.660	19	0.903	13	2.688	19	0.913
6	2.316	20	0.773	14	2.734	24	0.860
7	2.482	19	0.843	15	2.509	24	0.789
8	2.723	21	0.894	16	2.475	17	0.874

2.5 红树林各站位沉积物细菌群落相似性

在 DGGE 指纹图谱中, 不同的样品共有条带数目的多少, 可以反映不同样品之间细菌群落相似性。通过计算群落相似性系数可以得到群落之间细菌种类差异的信息, 表 2 列出了不同站位样品之间共有条带数和细菌相似性结果。从表中可以看出, 各样品间的细菌群落相似性系数不尽相同, 相似性系数最高的是 14 号和 15 号站位, 相似性系数为 95.83%, 相似性系数最低的是 1 号和 9 号站位, 相似性系数为 41.03%。对不同站位细菌群落结构相似性进行聚类分析, 结果如图 3 所示, 1 号和 2 号站位的分类位置较远于其它站位, 不同站位比较, 同一采样断面的站位细菌群落相似性较高, 聚类位置相近。

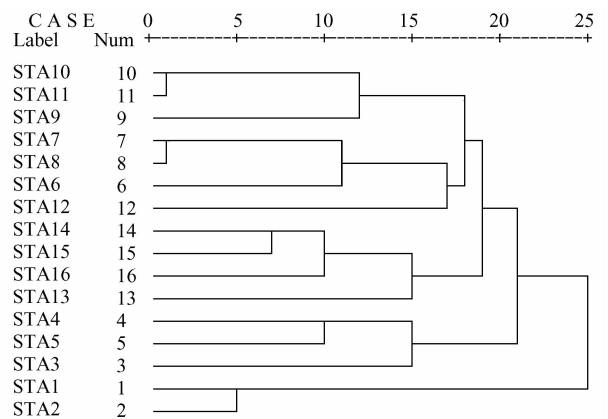


图 3 红树林各站位沉积物样品细菌群落结构相似性的聚类分析

Fig. 3 Cluster analysis of bacterial community structure similarity in different samples from mangrove sediments.

表 2 红树林不同站位沉积物不同站位细菌群落相似性分析

Table 2 Similarity coefficients of bacterial community in mangrove sediments at different stations

Station	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1		16	11	12	9	9	8	8	8	9	9	9	10	12	12	11
2	0.8205		16	16	13	12	12	13	13	13	12	12	14	16	16	13
3	0.5789	0.7442		20	16	13	13	15	14	14	14	13	15	16	16	12
4	0.5854	0.6957	0.8889		19	13	15	17	17	16	16	12	15	17	18	12
5	0.5000	0.6341	0.8000	0.8837		10	12	14	13	12	12	8	11	13	14	9
6	0.4865	0.5714	0.6341	0.5909	0.5128		17	17	17	13	13	15	14	16	16	14
7	0.4444	0.5854	0.6500	0.6977	0.6316	0.8718		19	18	15	14	13	14	15	16	13
8	0.4211	0.6047	0.7143	0.7556	0.7000	0.8293	0.9500		19	16	16	14	16	17	18	13
9	0.4103	0.5909	0.6512	0.7391	0.6341	0.8095	0.8780	0.8837		18	17	15	15	17	17	14
10	0.5000	0.6341	0.7000	0.7442	0.6316	0.6667	0.7895	0.8000	0.8780		18	14	15	16	16	12
11	0.5000	0.5854	0.7000	0.7442	0.6316	0.6667	0.7368	0.8000	0.8293	0.9474		14	16	17	17	12
12	0.5143	0.6000	0.6667	0.5714	0.4324	0.7895	0.7027	0.7179	0.7500	0.7568	0.7568		15	17	16	14
13	0.5556	0.6829	0.7500	0.6977	0.5789	0.7179	0.7368	0.8000	0.7317	0.7895	0.8421	0.8108		19	19	13
14	0.5854	0.6957	0.7111	0.7083	0.6047	0.7273	0.6977	0.7556	0.7391	0.7442	0.7907	0.8095	0.8837		23	17
15	0.5854	0.6957	0.7111	0.7500	0.6512	0.7273	0.7442	0.8000	0.7391	0.7442	0.7907	0.7619	0.8837	0.9583		17
16	0.6471	0.6667	0.6316	0.5854	0.5000	0.7568	0.7222	0.6842	0.7179	0.6667	0.6667	0.8000	0.7222	0.8293	0.8293	

The data above diagonal are the number of DGGE profile common bands and down are the coefficient of community similarity.

2.6 红树林沉积物优势条带序列的系统发育分析

根据红树林各站位沉积物样品的 PCR-DGGE 指纹图谱,对优势的条带进行切胶回收,共得到 5 条带,如图 1 所示,对这 5 条带进行序列测定,同源性最高的序列均为未培养微生物,如表 3 和图 4 所示。它们分别属于变形菌门 (Proteobacteria)、酸菌门 (Acidobacteria) 和绿菌门 (Chlorobi)。

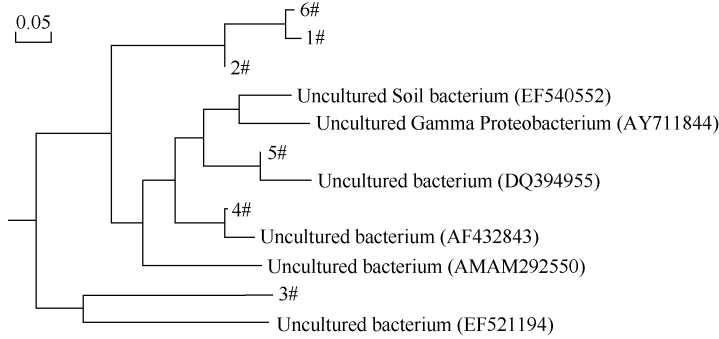


图 4 DGGE 切胶条带的系统发育树,序列的 GenBank 登录号列于括号中,标尺长度为 5% 的核苷酸置换率

Fig. 4 Phylogenetic tree of sequences from DGGE bands. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The scale bar: 5% sequence divergence.

3 讨论

红树林生长在热带、亚热带海岸潮间带,其生境具有还原性、酸性、高含盐量、营养丰富等特征^[17],其中的微生物资源既丰富又不失特色。该系统中分布着数量极其庞大,种类繁多的微生物。本研究前期实验结果也表明红树林沉积物细菌总数高达 10^9 cell/g 沉积物^[18],另外多环芳烃降解菌的数量也高达 $10^4 - 10^5$ cfu/g 沉积物^[12],并且也存在着丰富的降解高分子量多环芳烃的微生物^[19]。数量如此庞大的功能微生物,采用传统分离方法研究其群落结构具有时间长,过程复杂,有时还会造成严重的微生物多样性丢失。不经微生物分离培养,直接从土壤中抽提总 DNA,分析其中 16S rDNA 的序列多态性,以此反映微生物的种群构成,是近年来逐步发展起来的新方法。它有效克服了传统方法的缺点,所揭示的微生物多样性更加客观和真实。该方法对于研究红树林区沉积物微生物资源的开发利用具有重要的理论和现实意义。

本文通过 PCR-DGGE 技术分析了九龙江口红树林沉积物中的细菌群落结构分布特征,从不同站位样品的 DGGE 指纹图谱可以看出,每个样品均可分离到 17 到 24 条不等的条带,而不同的条带代表不同细菌的基因片段,表明每个站位样品都存在着

表 3 DGGE 切胶条带序列比对结果

Table 3 Alignment of DGGE sequenced clone to its most-similar GenBank sequence

Band	Closest genera	Similarity/%
1	Uncultured bacterium (EF521194)	45
2	Uncultured soil bacterium (EF540552)	97
3	Uncultured gamma proteobacterium (AY711844)	100
4	Uncultured bacterium (AF432843)	100
5	Uncultured bacterium (DQ394955)	99
6	Uncultured bacteria (AM292550)	62

在丰富的微生物种类。条带数目最少的为 1 号和 16 号站位,条带数最多的为 14 号和 15 号站位,1 号和 16 号站位均为非红树林覆盖区,而 14 号和 15 号站位为典型红树林覆盖区,表明红树林区细菌多样性高于非红树林区细菌多样性。研究证明,微生物-营养物质-植物间的紧密联系是红树林生态系统中营养物质保存和循环的主要机制之一。具有高生产力和丰富多样性的红树林土壤微生物,不断地将红树林凋落物转化成可被植物利用的氮、磷或其他营养物质。植物根系分泌物又为该系统中微生物和其他大型生物提供营养,使得根基微生物的多样性更加丰富^[20]。

电泳条带的多少,可以直观地反映样品中细菌群落的遗传多样性,而多样性指数是研究群落物种数及其个体数的分布均匀度的综合指标^[21]。本研究根据电泳图谱中每条带的信息,对各站位样品中的细菌多样性指数 (H)、丰度 (S) 和均匀度 (E_H) 等指标进行了综合分析,它们的细菌多样性指数、丰度和均匀度均存在差异,数值虽有所波动,但它们的变化范围不大。

在各站位样品的 DGGE 指纹图谱中,不同样品的共有条带数目的多少,可以反映不同样品之间细菌群落相似性^[22]。通过计算群落相似性系数可以得到群落之间细菌种类差异的信息,各站位样品间

的相似性系数变化范围为 41.03% - 95.83%, 不同站位间相似性系数变化较大。相似性系数较低的站位为 1 号站位, 而 1 号站位是淡水河浅滩, 无红树林生长, 表明红树林区与非红树林区微生物群落结构存在差异, 相似性系数较高的为 14 号和 15 号站位, 它们是典型的红树林覆盖区, 具有较高的相似性系数。

从各站位样品相似性进行聚类分析的图谱可以看出, 1 号和 2 号站位的聚类位置远于其它站位, 而 1 号站位是淡水河浅滩, 2 号站位刚好是红树林起点处, 地理位置最近, 这可能与它们的相似性系数较高, 聚类位置也较近有关。有红树林覆盖的各站位相似性聚类位置也较近, 这些站位均为相邻站位, 它们又大都处于同一采样断面, 这些站位聚类位置相近, 可以推测同一采样断面的细菌群落结构分布特征相似。

DGGE 指纹图谱能够直观地反映红树林区各站位细菌组成成份的变化, 它是一种能够提供一个细菌群落结构变化趋势的研究方法, 如果想要进一步了解细菌群落结构的组成, 一种简便可靠的方法就是对 DGGE 条带进行切胶回收测序^[23]。本研究通过对红树林区沉积物各站位样品 DGGE 的优势条带进行测序, 这些条带序列对应的同源性最高的微生物分别属于变形菌门 (Proteobacteria)、酸菌门 (Acidobacteria) 和绿菌门 (Chlorobi)。这些微生物均为未培养微生物, 且均来自于河口海岸沉积物。这些细菌还未被培养或不可培养, 就很难鉴定它们在原位生态环境中的生理生化特性及其所具备的生态功能意义, 要具体了解这些优势菌群在红树林沉积物中的结构与功能, 还需要做更全面、更细致、更深入的实验去研究。蒋云霞等构建了四个季节天然红树林土壤微生物的大片段宏基因组文库, 也为开发红树林湿地生态系统的特色微生物资源成为可能, 并为探索未培养微生物资源提供了借鉴^[24]。另外这些序列与 GenBank 数据库比对, 部分序列同源性较低, 可能是目前尚未获得纯培养的新种。这些菌株能够长期适应红树林沉积物环境, 并成为优势菌种。另一方面也说明红树林区存在着大量未培养微生物和尚未发现的微生物资源, 它们对于自然界和人类的贡献是无法估量的, 开发和利用这些红树林区微生物资源和功能基因资源具有巨大的潜能, 对于微生物学和生态学的发展和环境污染的生物修复等方面的应用具有重要的意义。

参考文献

- [1] Zhang CG, Leung KK, Wong YS, Tam NFY. Germination, growth and physiological responses of mangrove plant (*Bruguiera gymnorrhiza*) to lubricating oil pollution. *Environmental and Experimental Botany*, 2007, 60 (1):127-36.
- [2] Ge JP, Cai BY, Ping WX, Song G, Ling HZ, Lin P. Mating system and population genetic structure of *Bruguiera gymnorrhiza* (Rhizophoraceae), a viviparous mangrove species in China. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2005, 326 (1):48-55.
- [3] Al-Sayed HA, Ghanem EH, Saleh KM. Bacterial community and some physico-chemical characteristics in a subtropical mangrove environment in Bahrain. *Marine Pollution Bulletin*, 2005, 50 (2):147-55.
- [4] 蒋云霞, 郑天凌, 田蕴. 红树林土壤微生物的研究: 过去、现在、未来. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2006, 46 (5):848-51.
- [5] Alongi DM. Bacterial productivity and microbial biomass in tropical mangrove sediments. *Microbial Ecology*, 1988, 15 (1):59-79.
- [6] Bloomfield SF, Stewart GSAB, Dodd CER, Booth IR, Power EGM. The viable but non-culturable phenomenon explained? *Microbiology*, 1998, 144:1-3.
- [7] Rappe MS, Giovannoni SJ. The uncultured microbial majority. *Annual Review of Microbiology*, 2003, 57:369-94.
- [8] Dauga C, Dore J, Sghir A. Expanding the known diversity and environmental distribution of cultured and uncultured bacteria. *Medecine Scieeces (Paris)*, 2005, 21 (3):290-6.
- [9] Steele HL, Streit WR. Metagenomics: advances in ecology and biotechnology. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 247 (2):105-11.
- [10] Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, 68 (4):669-85.
- [11] 林鹏, 张瑜斌, 邓爱英, 庄铁诚. 九龙江口红树林土壤微生物的类群及抗菌活性. *海洋学报 (中文版) (Acta Oceanologica Sinica)*, 2005, 27 (3):133-41.
- [12] Tian Y, Liu HJ, Zheng TL, Kwon KK, Kim SJ, Yan CL. PAHs contamination and bacterial communities in mangrove surface sediments of the Jiulong River Estuary, China. *Marine Pollution Bulletin*, 2008, 57 (6-12):707-15.
- [13] Huang X, Tian Y, Luo YR, Liu HJ, Zheng W, Zheng TL. Modified sublimation to isolate phenanthrene-

- degrading bacteria of the genera *Spingomonas* and *Burkholderia* from Xiamen oil port. *Marine Pollution Bulletin*, 2008, 57 (6-12):538-43.
- [14] 高崇洋, 赵阳国, 王爱杰, 任南琪, 白洁, 田伟君, 张建, 李海艳. 耕作和施肥对不同深度黑土中细菌群落结构的影响. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2010, 50 (1):67-75.
- [15] 周峻沛, 邹长松, 顾英琦, 莫明和. 16S rDNA-RFLP 方法分析抑菌土中的细菌多样性. *云南大学学报 (自然科学版) [Journal of Yunnan University (Natural Sciences)]*, 2007, 29 (4):424-9.
- [16] Cui ZS, Lai QL, Dong CM, Shao ZZ. Biodiversity of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from deep sea sediments of the Middle Atlantic Ridge. *Environmental Microbiology*, 2008, 10 (8):2138-49.
- [17] Lovelock CE, Feller IC, Ellis J, Schwarz AM, Hancock N, Nichols P, Sorrell B. Mangrove growth in New Zealand estuaries; the role of nutrient enrichment at sites with contrasting rates of sedimentation. *Oecologia*, 2007, 153 (3):633-41.
- [18] Tian Y, Luo YR, Zheng TL, Cai LZ, Cao XX, Yan CL. Contamination and potential biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments of Xiamen, China. *Marine Pollution Bulletin*, 2008, 56 (6):1184-91.
- [19] 骆苑蓉, 胡忠, 郑天凌, 黄栩. 红树林沉积物中的微生物对苯并[a]芘的降解研究. *厦门大学学报 (自然科学版) [Journal of Xiamen University (Natural Science)]*, 2005, 44 (Sup):75-9.
- [20] Alongi D. The role of bacteria in nutrient recycling in tropical mangrove and other coastal benthic ecosystems. *Hydrobiologia*, 1994, 285 (1):19-32.
- [21] Gafan GP, Lucas VS, Roberts GJ, Petrie A, Wilson M, Spratt DA. Statistical analyses of complex denaturing gradient gel electrophoresis profiles. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43 (8):3971-8.
- [22] 张懿铨. 植物区系地理研究中的重要参数——相似性系数. *地理研究 (Geographical Research)*, 1998, 17 (4):429-34.
- [23] Sun HY, Deng SP, Raun WR. Bacterial community structure and diversity in a century-old manure-treated agroecosystem. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70 (10):5868-74.
- [24] 蒋云霞, 郑天凌. 天然红树林土壤微生物大片段宏基因组文库的构建. *环境科学 (Environmental Science)*, 2007, 28 (11):2609-14.

Analysis of microbial community structure in mangrove sediments by PCR-DGGE technique

Huijie Liu^{1,2}, Caiyun Yang¹, Yun Tian^{1,2,*}, Guanghui Lin^{1,2}, Tianling Zheng^{1,2,*}

(¹ Key Laboratory of Ministry of Education for Coast and Wetland Ecosystems, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

(² State Key Laboratory for Marine Environmental Sciences, Xiamen 361005, China)

Abstract: [**Objective**] To understand the microbial community in mangrove sediments. [**Methods**] Sixteen stations were established in the Fugong mangrove area of Jiulong River Estuary, Fujian, China. Microbial community structure in this area was evaluated by PCR-DGGE method. The genetic diversity of microorganisms was analyzed based on the DGGE fingerprint. [**Results**] There were significant differences among the Shannon-wiener index, Richness and evenness. The possible reason might due to distinct location of samples from different stations. Bacterial diversity was higher in the mangrove areas than that in non-mangrove areas. Similarity analysis of bacterial communities in different station showed certain trends in similarity coefficients, and bacterial community structure similarity of the same transect was much higher than others. According to the results of sequence analysis of DGGE dominant bands, all of them were phylogenetically close to Proteobacteria, Acidobacteria and Chlorobia which belonged to uncultured microbes from coastal sediments in the estuary. [**Conclusion**] There are abundant microbial diversity and a large number of unknown microbial resources in mangrove sediments which need further research.

Keywords: PCR-DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE); mangrove; microbial community structure; bacterial diversity

(本文责编:王晋芳)