

· 调查与评价 ·

渤海排污口邻近海域异养细菌的组成与分布

刘霜^{1,2} 李永霞³ 刘旭东^{1,2*} 王亚楠⁴ 孙蓓蓓^{1,2} 宋帅^{1,2}

(1. 国家海洋局海洋溢油鉴别与损害评估技术重点实验室, 山东 青岛 266033; 2. 国家海洋局北海环境监测中心, 山东 青岛 266033; 3. 黄海水产研究所鳌山卫基地, 山东 青岛 266237; 4. 青岛市海洋与渔业局, 山东 青岛 266071)

摘要: 对渤海4个重点监测排污口(北塘、大蒲河、弥河和虞河)邻近海域异养细菌的组成和分布进行了调查研究。结果表明,分离到的各排污口邻近海域的细菌隶属于变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)4个细菌类群,其中变形菌门的细菌最丰富。各排污口的优势菌有所不同,北塘、弥河2个采样点的优势菌分别为 *Bacillus* sp.、*Pseudoalteromonas* sp., 大蒲河采样点的优势菌为 *Vibrio* sp. 和 *Oceanospirillum* sp., 虞河采样点的优势菌为 *Shewanella* sp. 和 *Bacillus* sp.。多维尺度分析表明,北塘和虞河采样点的细菌种群特征较相近,细菌种群分布特征可能与排污口的海洋环境有一定的相关性。

关键词: 排污口; 海洋异养细菌; 16S rDNA; 优势菌; 多维尺度分析; 渤海

中图分类号: Q938.2 文献标识码: B 文章编号: 1006-2009(2014)01-0022-04

Diversity and Distribution of Marine Heterotrophic Bacteria Influenced by Discharge Outlets in Bohai Area

LIU Shuang^{1,2} LI Yong-xia³ LIU Xu-dong^{1,2*} WANG Ya-nan⁴ SUN Bei-bei^{1,2} SONG Shuai^{1,2}

(1. Key Laboratory of Marine Spill Oil Identification and Damage Assessment Technology, SOA, Qingdao, Shandong 266033, China; 2. North China Sea Environment Monitoring Center, SOA, Qingdao, Shandong 266033, China; 3. The Base in Aoshanwei of Yellow Sea Fisheries Research Institute, Qingdao, Shandong 266237, China; 4. Ocean and Fisheries Bureau of Qingdao, Qingdao, Shandong 266071, China)

Abstract: An investigation was done that the diversity and distribution of heterotrophic bacteria in the adjacent area of four main monitored discharge outlets in Bohai, which located in Beitang, Dapuhe, Mihe and Yuhe respectively. The results showed that all the isolated bacterial strains belonged to four phyla including Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria and Bacteroidetes, in which Proteobacteria was the dominant phyla. Furthermore, the dominant bacteria of four sampling locations are different. To be specific, *Bacillus* sp. and *Pseudoalteromonas* sp. were found to be dominant in Beitang and Mihe respectively. *Vibrio* sp. and *Oceanospirillum* sp. were prevailing in Dapuhe, while the dominant bacteria of Yuhe were *Shewanella* sp. and *Bacillus* sp. Results of MDS analysis indicated that the bacterial population characteristics from Beitang and Yuhe were similar to each other, suggesting that the diversity and distribution of bacteria probably be related with the marine environment.

Key words: Discharge outlet; Marine heterotrophic bacteria; 16S rDNA; Dominant strain; MDS; Bohai

我国沿海地区水产资源丰富、人口密集,是带动经济增长和发展的重要区域。近年来,随着生产力不断发展及人民生活水平的不断提高,越来越多的未经处理或稍加处理的生活污水、工业废水、农业污水排入近岸海域,污染日益加剧^[1]。虽

收稿日期:2013-09-22; 修订日期:2013-10-16

基金项目:海洋公益性行业科研专项基金资助项目(201105007)

作者简介:刘霜(1977—),女,河南周口人,高级工程师,硕士,主要从事海洋生态环境监测与评价工作。

* 通讯作者:刘旭东 E-mail: songxin19@163.com

然近几年各地的治理力度加大,但污染物超标排放现象依然十分突出。2010年全国陆源入海排污口监测结果显示,84%的入海排污口仍超标排放^[2]。

渤海为半封闭型内海,海域面积77 000 km²,自净能力有限。随着渤海各热点经济区进入大规模开发建设时期,渤海沿岸地区陆源入海排污压力越来越大,长期超标排放必然会对排污口及邻近海域的生态环境和生物群落如微生物群落构成严重的威胁。国家海洋局在环渤海沿海三省一市实施监测的排污口接近200个,其中23个为重点排污口。根据有关资料,近几年渤海陆源入海排污口的主要超标因子为磷酸盐、COD、悬浮物、氨氮^[3]。从重点排污口中选择COD、氨氮、磷酸盐、重金属等多项或某项超标严重的排污口,并考虑地理代表性,选取渤海沿岸4个重点排污口(北塘入海口、大蒲河入海口、弥河入海口和虞河入海口)邻近海域为研究对象,对排污口邻近海域的可培养细菌种类特征及分布规律研究分析,为排污口的科学评价与监管提供基础资料,也为近海微生物资源及生态环境研究提供基础数据。

1 材料与方 法

1.1 样品采集

2011年10月,对筛选确定的重点排污口附近海域的海水采样。4个采样点分别为:北塘(E117°44'01",N39°05'02",天津市,度假区);大蒲河(E119°18'18",N39°40'33",河北省秦皇岛市,港口区);弥河(E119°08'45",N37°11'09",山东省潍坊市,养殖区);虞河(E119°14'35",N36°59'33",山东省潍坊市,养殖区)。海水样品用无菌采样瓶在表层收集250 mL,冷藏带回实验室2 h内处理,方法参照《海洋监测规范 第7部分:近海污染生态调查和生物监测》(GB 17378.7-2007)。

1.2 细菌培养

样品用无菌海水进行10倍系列稀释后涂布于2216E、TCBS、海水R2A培养基平板^[4]。每个平板涂布稀释样品0.1 mL,每个稀释梯度涂布3个平板。28℃培养2 d后从菌落数介于30~300之间的平板上,采用随机挑取菌落法,在每个平板上随机挑取至少20个表观上(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)不同的菌落,再进一步纯化。在纯化后的细菌培养液中加入20%无菌甘

油,于-80℃冷冻保存备用。

1.3 分子鉴定

活化已纯化的细菌,用无菌生理盐水洗脱重悬0.5 mL,沸水浴10 min,然后置冰浴保存20 min。于4℃下12 000 r/min离心10 min,取上清液。细菌经煮沸后冰浴,细胞壁破裂,DNA释放到生理盐水中,故上清液可作为PCR模板^[2]。

根据细菌16S rDNA通用引物,扩增16S rDNA基因8-1510核苷酸序列^[5],上游引物:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';下游引物:5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3'。

扩增体系的总体积为50 μL^[3],其中包括5 μL 10倍缓冲液(10×buffer含Mg²⁺),5 μL脱氧核糖核苷三磷酸溶液(dNTP 2.5 mmol/L),5 μL DNA模板,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:94℃预变性5 min;94℃变性1 min;55℃退火1.5 min;72℃延伸1 min,30个循环;72℃延伸10 min。扩增产物于1%琼脂糖凝胶电泳检测,纯化PCR产物。

用限制性内切酶酶切PCR产物,电泳后根据酶切结果筛选不同的片段。将PCR产物用Hha I酶切,酶切反应体系为15 μL,其中Hha I 1.5 μL,10×buffer 1 μL,16S rDNA扩增产物5 μL,双蒸水7.5 μL。

1.4 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测序。将测得的序列与GenBank数据库中的基因序列作相似性比较,找出相似度最近的细菌,对测序结果分类分析。

2 结果

2.1 各排污口海域的细菌种类组成

从渤海4个排污口海域采集水样并分离纯化细菌,其中北塘、大蒲河、弥河和虞河分别纯化保种86株、68株、95株和75株,共324株。酶切聚类筛选后送测,得到117株菌的测序结果。序列结果经比对,与GenBank中的序列同源性较高,可达98%以上。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<97%的则为新种类,根据该规则确定菌株的种属情况。经鉴定,北塘、大蒲河、弥河和虞河4个排污口

邻近海域的细菌分布于 4 大细菌类群: 变形菌门 (Proteobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes)、放线菌门 (Actinobacteria) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes), 具体分布见图 1。

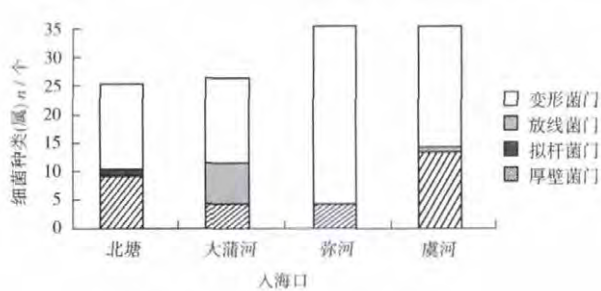


图 1 4 个海域的细菌门类组成

Fig. 1 The compositions of strains in the four sea areas

在北塘、大蒲河、弥河和虞河 4 个排污口海域中, 变形菌门和厚壁菌门的细菌都有分布, 变形菌门的细菌种类尤为丰富(见表 1), 放线菌门和拟杆菌门的细菌分布有较大差别。

北塘排污口海域分离到的细菌中, 厚壁菌门的 *Bacillus* sp. 是优势菌群, 占北塘测序总量的 1/4。其他占优势的菌群还有 γ -变形菌纲的 *Vibrio* sp.、*Shewanella* sp. 及 ϵ -变形菌纲的 *Campylobacteraceae* sp.。在 4 个海域中只有该海域分离到拟杆菌门的一株细菌 *Aquiflexum* sp.。大蒲河排污口海域分离到的菌株在变形菌门、厚壁菌门和放线菌门 3 个门类都有分布, γ -变形菌纲的 *Vibrio* sp. 和 *Oceanospirillum* sp. 都是优势菌群。放线菌门分离到 *Arthrobacter* sp.、*Corynebacterium* sp.、*Knoellia* sp.、*Microbacterium* sp. 4 个属的细菌。弥河排污口海域分离的细菌种类较集中, 来自变形菌门和厚壁菌门 2 个门类。 γ -变形菌纲的 *Pseudoalteromonas* sp. 是优势菌群, 占到该区域总测序量的 58.8%。厚壁菌门只分离到 *Bacillus* sp. 的菌株。虞河排污口海域的优势菌群是 γ -变形菌纲的 *Shewanella* sp. 和厚壁菌门的 *Bacillus* sp., 都占到测序总量的 26.5%。放线菌门分离到 *Nesterenkonia* sp. 的一株菌。

表 1 各排污口邻近海域异养细菌 16S rDNA 序列鉴定结果

Table 1 The identification results of the strains isolated analyzed by 16S rDNA sequencing

类群	北塘		大蒲河		弥河		虞河	
	细菌种类	占比/%	细菌种类	占比/%	细菌种类	占比/%	细菌种类	占比/%
α -变形菌纲	<i>Catellibacteriu</i>	4.17			<i>Aurantimonas</i>	2.94		
					<i>Roseobacter</i>	2.94		
					<i>Thioclava</i>	2.94		
γ -变形菌纲	<i>Klebsiella</i>	4.17	<i>Aeromonas</i>	4	<i>Idiomarina</i>	8.82	<i>Aeromonas</i>	2.94
	<i>Photobacterium</i>	4.17	<i>Citrobacter</i>	4	<i>Marinobacter</i>	2.94	<i>Agarivorans</i>	2.94
	<i>Shewanella</i>	12.5	<i>Colwelliaceae</i>	4	<i>Marinomonas</i>	2.94	<i>Listonella</i>	5.88
	<i>Vibrio</i>	16.67	<i>Enterobacter</i>	8	<i>Pseudoalteromonas</i>	58.82	<i>Oceanospirillum</i>	2.94
				<i>Vibrio</i>	8.82	<i>Shewanella</i>	26.47	
				<i>Neptunomonas</i>	4	<i>Thalassolituus</i>	2.94	
				<i>Oceanospirillum</i>	16	<i>Vibrio</i>	11.76	
				<i>Vibrio</i>	16			
ϵ -变形菌纲	<i>Campylobacteraceae</i>	12.5	<i>Arcobacter</i>	4			<i>Campylobacteraceae</i>	5.88
厚壁菌门	<i>Acinetobacter</i>	4.17	<i>Bacillus</i>	8	<i>Bacillus</i>	8.82	<i>Acinetobacter</i>	2.94
	<i>Bacillus</i>	25	<i>Salinicoccus</i>	4			<i>Bacillus</i>	26.47
	<i>Planococcus</i>	8.33					<i>Planomicrobium</i>	2.94
	<i>Staphylococcus</i>	4.17					<i>Staphylococcus</i>	2.94
拟杆菌门	<i>Aquiflexum</i>	4.17						
放线菌门			<i>Arthrobacter</i>	12			<i>Nesterenkonia</i>	2.94
			<i>Corynebacterium</i>	4				
			<i>Knoellia</i>	4				
			<i>Microbacterium</i>	8				

2.2 多维尺度(MDS)分析

采用多维尺度分析 4 个排污口邻近海域的细菌群落差异, 见图 2。水样可明显分为 3 个区域:

北塘和虞河采样区域的细菌群落特征相似度较高, 大蒲河和弥河采样区域分别属于 2 个不同的区域。北塘和虞河在地理位置上不相近, 前者位于天津

市,后者位于山东潍坊市;两者的海洋功能区类型也不相同,前者是度假区类型,后者是养殖区类型。北塘和虞河采样点的细菌种群特征较相近,可以推断与两个排污口的水质环境可能有一定的相关性,具体关系还需要进一步研究。

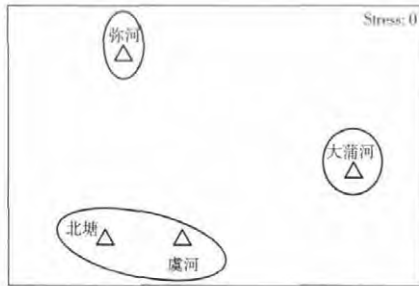


图 2 多维尺度分析

Fig. 2 MDS analyst in different areas

3 讨论

文献表明,变形菌门 γ -变形菌纲的细菌类群是海洋环境中微生物的主要类群^[6]。研究结果显示 γ -变形菌纲的菌株在分离到的菌株中占 30%~75%,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。

Ren 等^[7]研究表明,不同区域的海水中微生物种类多样性有所不同。4 个采样点来自陆源排污口,其邻近海域水体中的有机质、TP、氨氮、挥发酚和悬浮物等对海洋环境造成不同程度的影响,细菌群落及优势菌与远海区域相比可能会有差别。国内多项研究表明,弧菌(*Vibrio* sp., 尤其是 *Vibrio alginolyticus*) 是我国近海海域广泛存在的菌种,从不同海域分离出的细菌虽然种类与数量有差别,但 *Vibrio* sp. 均为优势菌^[8-9]。调查发现, γ -变形菌纲的 *Vibrio* sp. 在 4 个海域均被检测到,而只有大蒲河的优势菌是弧菌,其他 3 个海域的优势菌各有不同,北塘、弥河、虞河 3 个采样点的优势菌分别为厚壁菌门的芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)、 γ -变形菌纲的假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp.)、 γ -变形菌纲的希瓦氏菌(*Shewanella* sp.) 和厚壁菌门的芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)。不同海域优势菌的种类情况,在一定程度上验证了微生物在地理空间上的分布差异可以看作微生物群落对环境污染或对压力的反应^[10]。

测序结果显示,北塘和虞河 2 个采样点的种群特征较相似,其中 ϵ -变形菌纲和厚壁菌门的细菌种类相一致。多维尺度分析也显示,4 个采样点明显分为 3 个区域:北塘和虞河采样区域的细菌群落特征相似度较高,聚为一个区域,大蒲河和弥河采样区域分别属于 2 个不同的区域。4 个海域的水质情况和污染情况不尽相同,不同环境微生物的群落结构与相应的地质环境也有一定的相关性^[10],其各自细菌种群的差别和相似性,说明海洋微生物多样性既基于其自身基因的多样性,也依赖其生存环境的多样性。正是由于这些差异,才使得生态系统更加完整、更加稳定。

研究拓宽了对渤海重点监测排污口海域可培养细菌多样性的认识,并初步总结、比较了各个海域的细菌类群特点,为进一步研究渤海区域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,也为周边海域污水治理提供了理论储备。

[参考文献]

- [1] 吴洪杰,黄智民. 我国城市污水海洋处置的思索[J]. 海洋环境科学, 1996, 15(3): 71-75.
- [2] 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[J]. 宁波大学学报, 2013, 26(2): 22-27.
- [3] 国家海洋局北海分局. 2011 年北海区海洋环境公报[EB/OL]. [2013-07-14]. <http://www.ncsb.gov.cn/n1/n70003/n78312/n78350/c89805/attr/90013.pdf>.
- [4] 李筠,周宏霞,张晓华,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[J]. 中国海洋大学学报, 2006, 36(6): 965-970.
- [5] DELONG E F. Archaea in coastal marine environments[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 5685-5689.
- [6] ACINAS S G, 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[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65: 514-522.
- [7] REN J, DANG H Y, SONG L S et al. Bacterial and cyanobacterial diversities determined by T-RFLP analyses in Jiaozhou bay[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2006, 25(4): 124-130.
- [8] 韩善桥,虞积耀,姜涛,等. 东南沿海海域海水细菌的分布[J]. 解放军预防医学杂志, 2008, 26(1): 18-21.
- [9] 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[J]. 第一军医大学学报, 2004, 24(3): 347-348.
- [10] 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[J]. 微生物学报, 2009, 49(3): 343-350.