

## 应用 DGGE 技术分析流清河湾扇贝养殖海区 细菌群落结构的季节变化

杨彩霞<sup>1</sup>, 王崇明<sup>2</sup>, 李 贇<sup>1\*</sup>, 梁颜韬<sup>2</sup>, 王 娜<sup>1</sup>, 蔡玉勇<sup>1,2</sup>

(1. 中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 细菌是海区生态环境的重要组成部分, 为了解扇贝养殖海区细菌群落结构的季节性变化, 连续 11 个月(2009 年 5 月—2010 年 4 月, 2 月除外)定期采集青岛流清河湾扇贝养殖海区水深 0.5 m 处水样, 过滤收集粒径 0.22 ~ 3.00  $\mu\text{m}$  的微生物, 采用 CTAB 法提取样品总 DNA, PCR 扩增细菌 16S rDNA V3-V5 可变区序列, 并通过 DGGE 技术对所得序列进行分离, 结果共得到 36 条不同位置的条带, 1 月份水样细菌群落条带数最为丰富, 3 月份水样的细菌群落条带数最少。基于各月份 DGGE 条带数目和相对光密度, 对 11 个月份样品的细菌群落多样性进行 UPGMA 聚类分析, 结果表明, 3、4 和 5 月份细菌群落多样性具有较高的相似性, 优先聚为一支, 其余月份中, 7 月和 8 月, 9 月和 12 月, 10 月和 11 月分别优先聚为一支, 而 1 月份和 6 月份均单独分为一支。剪切 DGGE 图谱中的 20 条主要谱带重扩增、测序, 并进行 BLAST 比对。结果表明, 20 条序列与已知序列的相似性均在 94% 以上, 这 20 条序列所代表的细菌分属于  $\alpha$ -变形菌亚门 ( $\alpha$ -Proteobacteria)、 $\beta$ -变形菌亚门 ( $\beta$ -Proteobacteria)、 $\gamma$ -变形菌亚门 ( $\gamma$ -Proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、放线菌门 (Actinobacteria) 和疣微菌门 (Verrucomicrobia)。

**关键词:** 细菌群落结构; 16S rDNA; PCR-DGGE; 流清河湾

**中图分类号:** S 917.1; Q 938.1<sup>+</sup>5

**文献标志码:** A

栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 是中国北方主要的海水养殖贝类之一, 具有较高的营养价值和经济价值。但随着养殖规模的扩大, 病害日趋严重, 甚至直接威胁到该产业的生存, 病害问题已成为制约这一养殖业健康发展的重要因素<sup>[1-2]</sup>。细菌是养殖生态环境的重要组成部分, 分析养殖海区细菌群落结构及季节性变化, 比较不同养殖模式下细菌群落的结构差异, 对于了解养殖海区环境状况, 优化扇贝的养殖模式, 有效控制病害发展等均具有重要意义。

变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 技术是基于核酸片段大小相同、碱基组成不同而泳动速率不同的分离及分

析技术。该技术的优点在于可以同时多个环境样品中的微生物群落结构进行直接、快速分析, 可以比较全面客观地反映微生物群落多样性的变化情况<sup>[3-7]</sup>。自 1993 年 Muyzer 等<sup>[3]</sup>首次将该技术应用微生物生态学研究以来, 该技术已被广泛应用于食品<sup>[4]</sup>、土壤<sup>[5]</sup>、水环境<sup>[6]</sup>及动物肠道<sup>[7]</sup>等不同环境微生物群落多样性的分析, 显示该技术在微生物群落多样性分析方面具有突出的优势。

青岛流清河湾位于山东半岛东部, 面积约为 4.5 km<sup>2</sup>, 平均水深 12.6 m。该海域一直是扇贝养殖海区, 养殖模式采用单一的贝类筏式养殖方式。近年来, 这一海区也是扇贝流行病发生严重

收稿日期: 2011-10-12 修回日期: 2011-11-02

资助项目: 现代农业产业技术体系专项资金项目 (CARS-48)

通讯作者: 李 贇, E-mail: sxsdlwl@ouc.edu.cn

的区域。本研究采用 PCR-DGGE 技术,通过采集该扇贝养殖海区(2009 年 5 月—2010 年 4 月)水深 0.5 m 处水样,分析其细菌群落及优势菌群季节变化,作为该海区浮游生物多样性分析的一部分,以期了解扇贝病害发生前后细菌群落结构的变化情况,为全面分析养殖海区生态环境与扇贝流行病发生的关系以及为优化养殖模式提供重要理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集与总 DNA 提取

2009 年 5 月—2010 年 4 月(2010 年 2 月除外)使用卡盖式采水器(购自中国海洋大学海洋仪器厂)采集流清河湾扇贝养殖海区水深 0.5 m 处水样 5 L,低温运至实验室。在实验室内立即采用孔径为 25  $\mu\text{m}$  的筛绢和孔径 3  $\mu\text{m}$  的醋酸纤维素滤膜滤除大颗粒物质和大型浮游生物,用孔径为 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜收集粒径为 0.22 ~ 3.00  $\mu\text{m}$  的浮游生物。每个样品过滤 1 L 海水,过滤样品连同滤膜保存于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱以备 DNA 提取。

总 DNA 提取参考王娜等<sup>[8]</sup>的方法。提取的 DNA 溶于 TE 溶液中,紫外分光光度计测定 DNA 浓度和纯度, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存用于 PCR 扩增。

### 1.2 16S rDNA V3-V5 区 PCR 扩增及 DGGE 分析

细菌 16S rDNA V3-V5 可变区序列的扩增参照倪学勤等<sup>[7]</sup>的方法进行,本研究所用引物为,含有 GC 夹的正向引物 358f(5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3')和反向引物 907r(5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3')<sup>[9]</sup>,预期扩增片段长度约 560 bp。PCR 产物的初步检测采用 1% 琼脂糖凝胶电泳。

DGGE 电泳采用 D-code System 电泳仪(Bio-Rad 公司)。PAGE 胶浓度为 10%,变性剂梯度 35%~60%(7 mol/L 尿素和 40% 去离子甲酰胺为 100% 变性)。电泳缓冲液为  $1\times\text{TAE}$ ,每个点样孔加样品 50  $\mu\text{L}$ , $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、100 V 电泳 16 h,溴化乙锭染液(EB)染色 30 min,去离子水脱色 3 min,JS-380A 自动凝胶图像分析仪拍照。Quantity One 软件分析 DGGE 指纹图谱,基于 DGGE 条带数目和亮度进行 UPGMA 聚类分析。

### 1.3 细菌 16S rDNA 序列的测定及系统发育树构建

在波长为 354 nm 紫外线下,切取 DGGE

凝胶上的主要条带,溶于 50  $\mu\text{L}$  无菌去离子水中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  过夜溶解。重扩增,扩增产物连接到载体 pEASY-T1 (TRANS),转入 *E. coli* 感受态细胞,在 LB 固体培养基上  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  筛选培养 16 h,挑取白色转化子用含有氨苄青霉素抗性的 LB 液体培养基  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  震荡培养 8 h。T-载体通用引物进行菌液 PCR,经琼脂糖凝胶电泳检测后,阳性克隆交由生工生物工程(上海)有限公司完成测序。

测序所得的 16S rDNA 序列 D 在线进行 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 比对后,选择高相似序列与测得序列一起用于构建系统树,系统树构建采用 MEGA 4.0 生物软件中的邻接法 (Neighbor-Joining),其中,Bootstrap 为 1 000 次重复。

## 2 结果

### 2.1 海区细菌群落的 DGGE 图谱分析

各月样品经 PCR 扩增所得序列大小为 493 ~ 549 bp。从 11 个月份样品中共得到 198 条 DGGE 条带(图 1),处于不同位置的条带数为 36 条,每个月份条带数为 15 ~ 23 条,平均为 18 条。条带数最多的月份为 1 月,3 月份条带数最少。不同季节条带数的变化为,冬季(12 和 1 月)条带数最多(平均为 21 条),秋季(9、10 和 11 月)次之(平均为 18.3 条),春季(3、4 和 5 月)再次之(平均为 17 条),夏季(6、7 和 8 月)最少(平均为 16.7 条)。

图谱显示,不仅各月份 DGGE 电泳谱带数目不同,即使同一条带在不同月份其光密度也存在明显差异,这种光密度的变化一定程度上反映了该菌群相对丰度的变化。比较 DGGE 各条带相对光密度发现(图 2),部分条带光密度变化具有明显的季节性特征,如条带 10 主要存在于夏季到冬季(7 月—次年 1 月),条带 17 主要存在于 2009 年 5—7 月和 2010 年 1—4 月,条带 23 主要存在于 2009 年 8 月—2010 年 1 月。

基于各月份 DGGE 分离获得的条带数目和条带的光密度相对值进行 UPGMA 分析(图 3),11 个月份的细菌群落结构相似性可以分为两个大的类群,2010 年的 3—5 月样品归为一大类,2010 年 6 月—2011 年 1 月的样品归为另一大类群,这一大类群中,又进一步分为 4 个小类群,7—8 月、9—12 月,6 和 1 月各为单独一支。

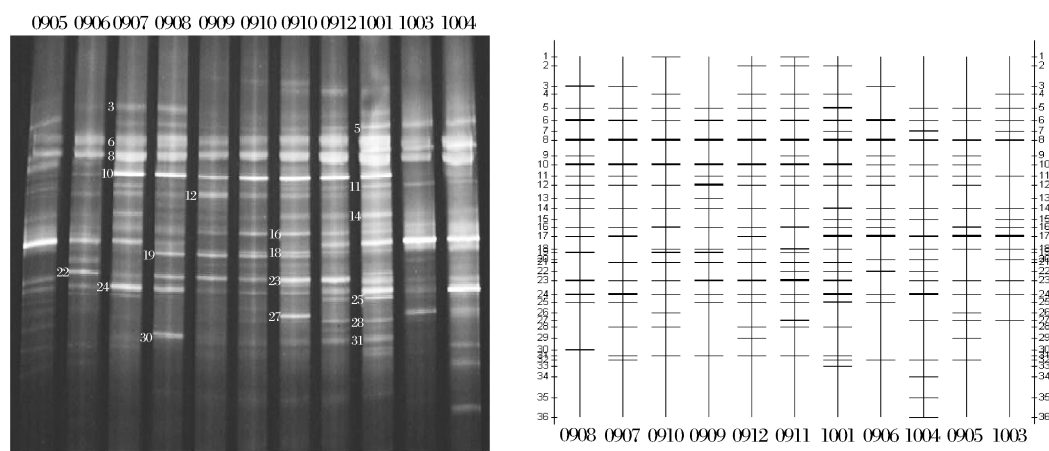


图1 流清河湾海区不同月份细菌 DGGE 分离图谱及分析示意图

0905 ~ 1004 表示流清河湾 2009 年 5 月 2010 年 4 月表层水样, 胶中数字代表测序条带。

Fig. 1 Image of DGGE gels containing bacterial 16S rDNA fragments from Liuqinghe Bay samples

0905 - 1004 corresponded to May 2009 to April 2010 samples (except February) collected from surface waters of Liuqinghe Bay. Numbers in the gels marked excised and sequenced bands.

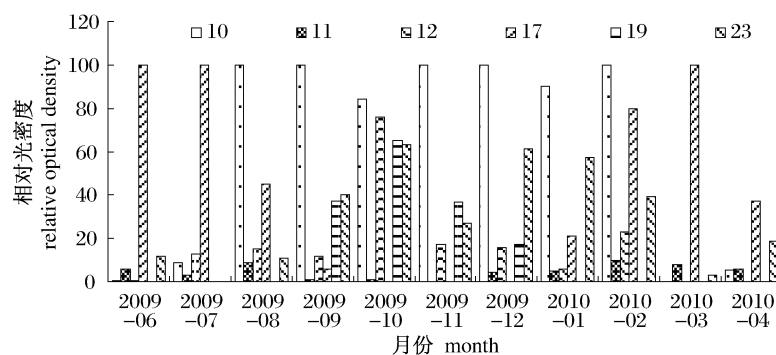


图2 流清河湾部分条带在不同月份的光密度变化

Fig. 2 Intensity changes of band in different months of Liuqinghe Bay

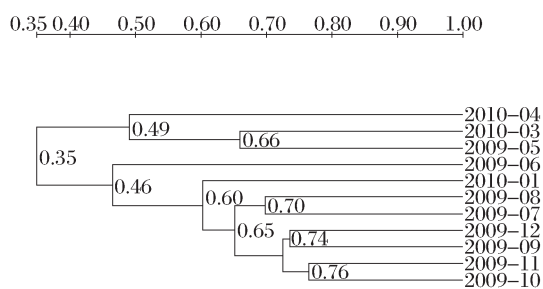


图3 基于 DGGE 图谱构建的流清河湾海区各月份细菌群落 UPGMA 聚类图

Fig. 3 UPGMA clustering analysis of bacterial population at the scallop culture area of Liuqinghe Bay

## 2.2 DGGE 条带的 16S rDNA 序列及系统发育分析

剪取 20 条主要 DGGE 条带进行重 PCR, 20

条条带覆盖总特征条带数的 55.56%。其中 9 条序列(条带 10, 16, 17, 18, 23, 24, 25, 27, 30)通过直接扩增即可成功测序, 其余 11 条序列经克隆后完成测序。测序结果经 GenBank 的 Blast 程序进行同源性搜索, 结果显示所有序列与数据库中相应原核生物 16S rDNA 序列的最大相似性为 94% ~ 100% (表 1)。20 条序列中 16 条属于海洋未培养的细菌克隆。

将 20 条序列与基因库中高相似性的已知细菌相应序列共同进行分析, 构建系统树, 结果显示, 20 条序列属于 4 个门(图 4), 分别为变形菌门 (Proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、放线菌门 (Actinobacteria) 和疣微菌门 (Verrucomicrobia)。其中, 条带 6、11、14、17、18、23 和 24 属于  $\alpha$ -变形菌亚门 ( $\alpha$ -Proteobacteria);

条带 25 和 27 属于  $\beta$ -变形菌亚门 ( $\beta$ -Proteobacteria); 条带 28 和 31 属于  $\gamma$ -变形菌亚门 ( $\gamma$ -Proteobacteria); 条带 3、5、12、19 和 30 属于拟杆菌门; 条带 8、10 和 16 属于放线菌门; 条带 22 属于疣微菌门。

20 种细菌种在所分析的 11 个月份中分布不尽相同, 属于  $\alpha$ -变形菌亚门和放线菌门的细菌在全年丰度均较高。 $\beta$ -变形菌门的细菌仅在 11、3

和 4 月份存在量较多。 $\gamma$ -变形菌亚门细菌在全年分布均较低, 仅在 1 月份数量较多。拟杆菌门细菌在 8、9、10 和 3 月份所占比例较高。疣微菌门细菌仅在 6 月份所占比例较高。其它未测序条带所代表的细菌均非高丰度种类, 在全年 11 个月份的分析中, 最高丰度出现在 4 月, 但也在 30% 以下(图 5)。

表 1 DGGE 分离的部分获序列在 GenBank 中的 Blast 搜索  
Tab. 1 Blast of excised DGGE band in GenBank

条带 band	序列号 GenBank accession no.	碱基数/bp bases number	亲缘关系最近的序列 most related sequence	相似度/% sequence similarity	归属类群 taxonomic group
条带 3	HQ161881	547	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone A13W_189 (HM057642)	99	Bacteroidetes
条带 5	HQ161882	547	Uncultured <i>Flavobacterium</i> sp. clone ARTE1_247 (GU230408)	99	Bacteroidetes
条带 6	HQ161883	522	Uncultured alpha proteobacterium clone C13W_53 (HM057678)	99	$\alpha$ -Proteobacteria
条带 8	HQ161884	528	Uncultured actinobacterium clone A13W_132 (HM057631)	99	Actinobacteria
条带 10	HQ161885	518	Uncultured actinomycete OCS155(AF001652)	99	Actinobacteria
条带 11	HQ161886	523	<i>Roseobacter</i> sp. WED1.1 (AY536562)	99	$\alpha$ -Proteobacteria
条带 12	HQ161887	541	Uncultured Bacteroidetes bacterium gene(AB266020)	99	Bacteroidetes
条带 14	HQ161888	523	Rhodobacteraceae bacterium IMCC1933(GQ468664)	99	$\alpha$ -Proteobacteria
条带 16	HQ161889	505	Uncultured actinobacterium clone CB01B02(EF471560)	99	actinobacteria
条带 17	HQ161890	511	Rhodobacteraceae bacterium RCA23(GQ468661)	99	$\alpha$ -Proteobacteria
条带 18	HQ161891	500	Uncultured alpha proteobacterium clone CB01D03(EF471712)	99	$\alpha$ -Proteobacteria
条带 19	HQ161892	541	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone SHBC1107(GQ350184)	100	Bacteroidetes
条带 22	HQ161893	545	Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone SGSO653(GQ347889)	99	Verrucomicrobia
条带 23	HQ161894	499	Uncultured <i>Roseobacter</i> sp. clone 2_C6(EU600651)	98	$\alpha$ -Proteobacteria
条带 24	HQ161895	493	Uncultured <i>Roseobacter</i> sp. clone BL03-SUM34(DQ778199)	99	$\alpha$ -Proteobacteria
条带 25	HQ161896	530	Uncultured beta proteobacterium clone PI_4r8c(AY580385)	99	$\beta$ -Proteobacteria
条带 27	HQ161897	527	<i>Limnobacter</i> sp. Aph2(FJ377401)	99	$\beta$ -Proteobacteria
条带 28	HQ161898	549	Uncultured gamma proteobacterium clone SGPW537(GQ346769)	100	$\gamma$ -Proteobacteria
条带 30	HQ161899	527	Uncultured Sphingobacteriales cum 'Crenotrichaceae' bacterium clone(FJ745018)	99	Bacteroidetes
条带 31	HQ161900	518	Uncultured gamma proteobacterium clone ES0303-B72(FJ437730)	94	$\gamma$ -Proteobacteria

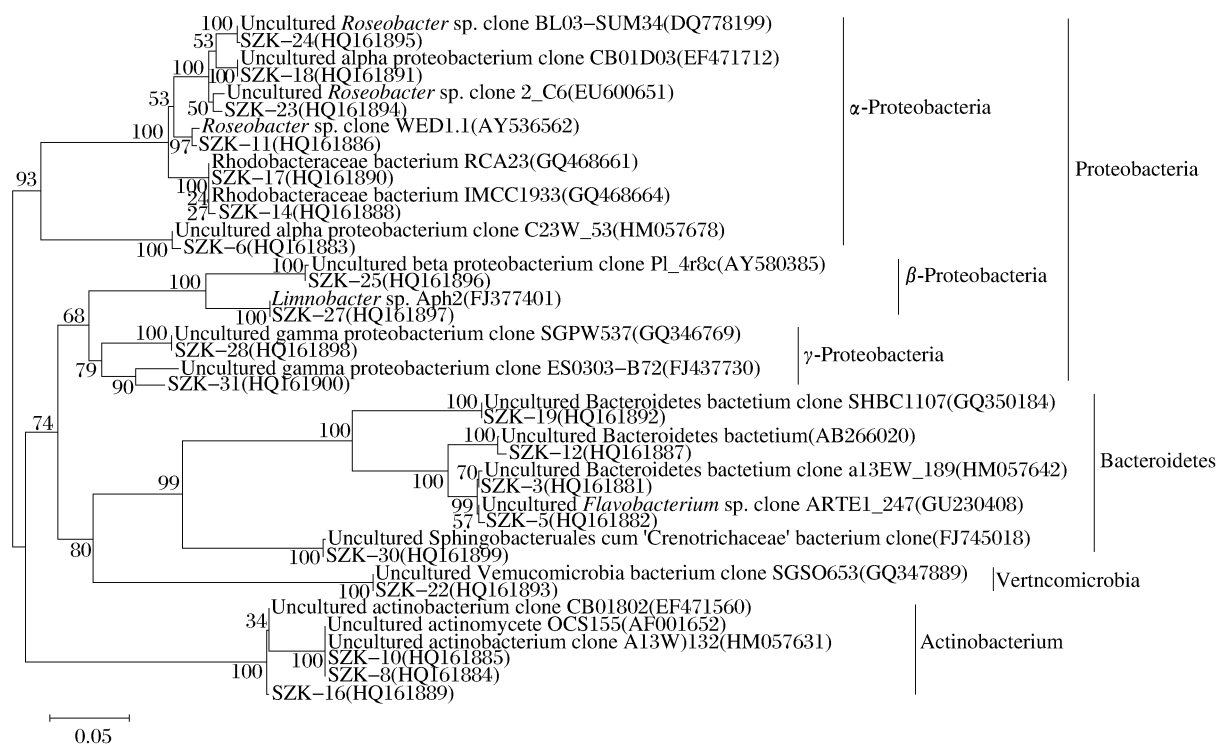


图 4 测序条带与其近源序列的亲缘关系分析

Fig. 4 Phylogenetic tree based on 20 sequenced bands and similar sequences from GenBank

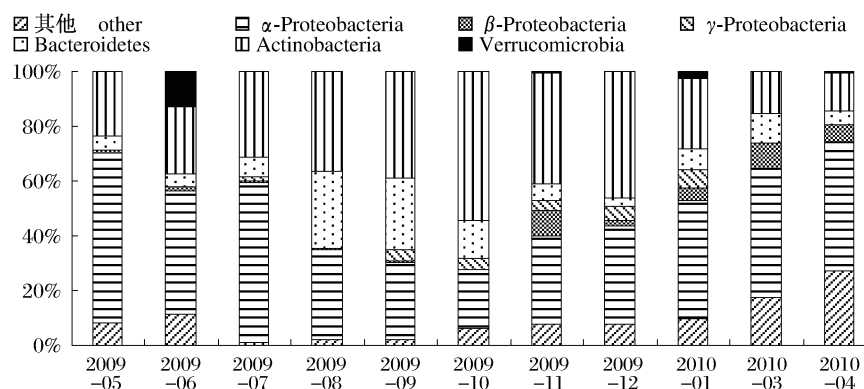


图 5 16S rRNA 基因序列在不同分类阶元中分布的季节变化

Fig. 5 Seasonal variation of proportions of 16S rRNA gene sequences within different phyla or subphyla

### 3 讨论

Kelly 等<sup>[9]</sup>通过构建 16S rDNA 克隆文库的方法分析了美国大南湾夏季细菌群落的结构变化,结果显示,此海区细菌群落主要由变形菌门(包括  $\alpha$ -变形菌、 $\beta$ -变形菌、 $\gamma$ -变形菌 3 个亚门)、噬纤维菌-屈挠杆菌群(Cytophaga-Flexibacter)和蓝细菌组成;Schauer 等<sup>[10]</sup>研究表明,布拉内斯湾海域细菌群落组成主要为  $\alpha$ -变形菌亚门、噬纤维菌-黄杆菌-拟杆菌群(Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides, CFB)和蓝细菌;刘敏等<sup>[11]</sup>通过 PCR-

DGGE 技术发现黄海海域细菌群落分属于变形菌门(包括  $\alpha$ -变形菌、 $\delta$ -变形菌门 2 个亚门)和拟杆菌门 2 大类群。白洁等<sup>[12]</sup>采用 16S rRNA 基因文库和变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术,对黄海两个站位的沉积物和水体中细菌群落特征进行了解析和评价,发现沉积物中拟杆菌门、疣微菌门、 $\gamma$ -变形菌亚门和  $\delta$ -变形菌亚门为优势菌群,水中则以厚壁菌门、 $\alpha$ -变形杆菌亚门和  $\beta$ -变形杆菌亚门为优势菌群,而放线菌门在水体和沉积物中均有分布。本研究对 20 条测定序列分析发现,流清河湾扇贝养殖海区的主要细菌群落分属变形菌门

( $\alpha$ -变形菌、 $\beta$ -变形菌、 $\gamma$ -变形菌)、拟杆菌门、放线菌门和疣微菌门,其中 $\alpha$ -变形菌亚门和放线菌门占主要优势。这些研究表明, $\alpha$ -变形菌是各个海区中的常见菌。Hugenhdtz等<sup>[13]</sup>认为在自然环境中, $\alpha$ -变形菌、 $\beta$ -变形菌和放线菌是常见类群。放线菌被认为主要分布在底泥、淡水或与无脊椎动物如海绵动物共栖,在有机质分解和矿化的过程当中起着非常重要的作用,同时该类菌也是生物活性物质和海洋药物开发的重要微生物来源<sup>[14]</sup>。

本研究发现,流清河湾海区某些菌群呈现明显的季节性变化,如条带10(放线菌),条带11( $\alpha$ -变形菌),条带12(拟杆菌),条带17( $\alpha$ -变形菌),条带19(拟杆菌),条带23( $\alpha$ -变形菌)。有趣的是某些相互替代的菌群具有相似的系统发育特征,如同属于 $\alpha$ -变形菌的条带17和条带23,条带17主要在春季和初夏为优势菌群,而在晚夏到初冬又被条带23替代,之后条带17又代替其成为优势菌。Casamayor等<sup>[15]</sup>研究淡水湖的菌群变化时,发现紫色硫细菌(purple sulfur bacteria)、蓝细菌和CFB也存在类似此消彼长的现象,Schauer等<sup>[10]</sup>在布拉内斯湾的结果和本实验室对桑沟湾贝藻混养海区的部分细菌群落进行的研究中也发现类似现象。李秋芬等<sup>[16]</sup>研究发现,随着氨氮浓度的增高,循环水养殖系统生物滤池中自然形成的生物膜上氧化细菌和亚硝化细菌的数量越多,而异养细菌数量则明显减少。进一步进行PCR-DGGE分析发现,生物滤池中自然形成的滤膜上的细菌优势菌分属拟杆菌门和变形菌门。可见,水体中部分环境因子的变化对细菌群落的多样性及季节性分布均具有重要影响,有研究认为水温的变化可能是主要原因<sup>[17]</sup>。单纯对流清河湾这一养殖海区PCR-DGGE分析结果进行UPGMA

聚类分析,11个月份的样品中,3—5月归为一大类,6月—次年1月归为另一大类群。在6月—次年1月这一大类群中,又进一步分为4个小类群:7—8月、9—12月,6和1月各为单独一支。从这种聚类分析中,可以看到5月底和6月初是采样海区环境因子变化比较剧烈的时期,另外,8月底和9月初是另一个环境变化的重要节点,在这期间,细菌群落发生了较大变化,而6月和1月单独为一支,可能这两个月份是细菌群落变化的一个过渡期。这一结果似乎与温度是决定海区细菌群落结构这一结论基本相符。

但是对2个地理位置相差不大的海区进行对比分析却发现温度可能并不是决定海区细菌多样性的唯一因子。对比本实验室对山东荣成桑沟湾贝藻混养海区细菌群落多样性季节变化的结果(表2)发现<sup>[17]</sup>,桑沟湾与流清河湾海区细菌群落结构及其季节性变化均存在一定的差异。桑沟湾和流清河湾海区同属于黄海,南北距离相距较近,温度的季节性变化相差不大(相差2~3℃),两个海区细菌群落结构季节性变化的不同显然不单单与海水温度变化有关。分析认为,两海区微生物季节性变化的不同可能来自于以下几个原因,首先流清河湾为开放式海湾,桑沟湾为内湾,水交换量存在明显差别,这势必影响到海区细菌群落的组成改变;其次,流清河湾海区贝类养殖采取单一养殖模式,春季没有海带等海藻养殖带来的竞争压力,而桑沟湾海区是传统的贝藻混养海区,海带的季节性养殖造成的海区营养状况的改变可能会造成海区细菌群落出现与流清河湾海区所不同的季节性变化。尽管这一推论还需要更多的背景知识及实验数据来支持,但两个海区微生物群落季节性变化的不同实际反映出两个养殖海区生态环境确实不同。

表2 流清河湾和桑沟湾养殖海区细菌群落结构的比较  
Tab.2 Comparisons of bacterial composition in the shellfish culture regions of Liqinghe Bay and Sanggou Bay

海区 site	采样次数/次 samples	细菌多样性		测序条带数 bands	主要细菌种类的相对比例 ratio of main species of bacteria				
		最高月份 month of the highest bacterial diversity	最低月份 month of the lowest bacterial diversity		$\alpha$ - Proteobacteria	$\beta$ -变形菌门和 $\gamma$ -变形菌门 $\beta$ -Proteobacteria and $\gamma$ -Proteobacteria	拟杆 菌门 Bacteroidetes	放线 菌门 Actinobacteria	疣微 菌门 Verrucomicrobia
流清河湾 Liuqinghe Bay	11	1月(23条)	3月(15条)	20	35.0%	10.0%	25.0%	15.0%	5.0%
桑沟湾 Sanggou Bay	7	8月(23条)	5月(14条)	11	27.3%	9.1%	27.5%	27.3%	-

已有研究表明,在贝藻混养模式海区,养殖扇贝死亡率显著低于贝类单一养殖模式海区<sup>[18-19]</sup>,这说明,桑沟湾海区的生态环境更有利扇贝养殖。从水交换状况来考虑,沙子口海区生态环境应该更有利于扇贝养殖,但实际情况却相反。对此的解释可能是桑沟湾海区大量藻类的养殖,藻类养殖改善了养殖海区的生态环境,对扇贝养殖起到了积极效果。我们曾对扇贝养殖海区大型藻类及浮游生物携带 AVNV 的情况进行分析,结果显示大型藻类具有集聚 AVNV 的能力<sup>[8]</sup>,使得海区浮游生物携带 AVNV 的数量有所降低,减少了滤食扇贝通过摄食活动感染 AVNV 的可能性。

#### 参考文献:

- [1] 宋庆云,罗挽涛,王文兴,等. 扇贝的养殖环境及其体内的细菌学分析[J]. 黄渤海海洋,1997,15(3):26-30.
- [2] Mydlarz L D, Jones L E, Harvell C D. Innate immunity, environmental drivers, and disease ecology of marine and freshwater invertebrates [J]. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 2006,37:251-288.
- [3] Muyzer G, Ellen C W, Andre G U. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993,59(3):695-700.
- [4] 付琳琳,曹郁生,李海星,等. 应用 PCR-DGGE 技术分析泡菜中乳酸菌的多样性[J]. 食品与发酵工业,2005,31(12):103-105.
- [5] Campbell J H, Clark J S, Zak J C, et al. PCR-DGGE comparison of bacterial community structure in fresh and archived soils sampled along a chihuahuan desert elevational gradient [J]. *Microbiology Ecology*, 2009,57:261-266.
- [6] Liu X C, Zhang Y, Yang M, et al. Analysis of bacterial community structures in two sewage treatment plants with different sludge properties and treatment performance by nested PCR-DGGE method [J]. *Journal of Environmental Science*, 2007, 19:60-66.
- [7] 倪学勤,Joshua Gong,Hai Yu,等. 采用 PCR-DGGE 技术分析蛋鸡肠道细菌种群结构及多样性[J]. 畜牧兽医学报,2008,39(7):955-961.
- [8] 王娜,李赞,任伟成,等. 扇贝养殖海区浮游生物携带 AVNV 的荧光定量分析[J]. 水产学报,2010,34(10):1566-1571.
- [9] Kelly K M, Chistoserdov A Y. Phylogenetic analysis of the succession of bacterial communities in the Great South Bay (Long Island) [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001,35:85-95.
- [10] Schauer M, Balagué V, Pedrós-Alió C, et al. Seasonal changes in the taxonomic composition of bacterioplankton in a coastal oligotrophic system [J]. *Aquatic Microbiology Ecology*, 2003,31:163-174.
- [11] 刘敏,朱开玲,李洪波,等. 应用 PCR-DGGE 技术分析黄海冷水团海域的细菌群落组成[J]. 环境科学,2008,29(4):1082-1091.
- [12] 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.
- [13] Hugenhdtz P, Goebel B M, Pace N R. Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity [J]. *Journal of Bacteriology*, 1998,180(18):4765-4774.
- [14] Bull A T, Stach J E M. Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2005,87:259-276.
- [15] Casamayor E O, Pedrós-Alió C, Muyzer G, et al. Microheterogeneity in 16S ribosomal DNA-defined bacterial populations from a stratified planktonic environment is related to temporal changes and to ecological adaptations [J]. *Applied and Environment Microbiology*, 2002,68:1706-1714.
- [16] 李秋芬,傅雪军,张艳等. 循环水养殖系统生物滤池细菌群落的 PCR-DGGE 分析[J]. 水产学报,2011,35(4):579-586.
- [17] 杨彩霞. 两个养殖海区及栉孔扇贝消化盲囊细菌群落多样性分析[D]. 青岛:中国海洋大学,2011.
- [18] 韦玮,方建光,董双林. 贝藻混养生态系互利机制中的作用因子[J]. 中国水产科学,2005,12(2):220-224.
- [19] 王德利. 贝藻混养技术在我国海水养殖中的应用与研究[J]. 黄渤海海洋,2001,19(1):78-81.

## Seasonal changes of bacterial community composition in the scallop culture area of Liuqinghe Bay studied by PCR-DGGE

YANG Cai-xia<sup>1</sup>, WANG Chong-ming<sup>2</sup>, LI Yun<sup>1\*</sup>, LIANG Yan-tao<sup>2</sup>, WANG Na<sup>1</sup>, CAI Yu-yong<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

**Abstract:** The seasonal changes of bacterial community composition in the scallop culture area of Liuqinghe Bay in Qingdao were analyzed in this study. Five liters of water samples from the 0.5 m depth were collected each time every month from May 2009 to April 2010, except February, and the one liter water samples were filtered by sterilized micro-filtration membranes to collect the micro-organisms within the size of 0.22  $\mu\text{m}$  to 3.00  $\mu\text{m}$ . Total DNA of the samples were extracted by CTAB method, the bacterial 16S rDNA V3-V5 variable sequence was amplified by PCR, the amplified sequences were separated by DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) techniques, and the DGGE fingerprint was analyzed by software Quantity One. Totally, 36 bands with different positions were showed. The most abundant bacterial composition was found in January, and the least was found in March. Based on the the UPGMA cluster analysis, the monthly samples were grouped into 2 seasonal types: March to May, June to January. A total of 20 dominant DGGE bands were successfully cloned and sequenced. Blast results showed that the similarities between these cloned sequences and the sequences in the GenBank were all over 94%. The 20 bands belonged to  $\alpha$ -Proteobacteria,  $\beta$ -Proteobacteria,  $\gamma$ -Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, and Verrucomicrobia, respectively.

**Key words:** bacterial community; seasonal variation; 16S rDNA; PCR-DGGE; Liuqinghe Bay

**Corresponding author:** LI Yun. E-mail: sxsdwl@ouc.edu.cn