

文章编号:1000-0615(2007)02-0204-07

应用 DGGE 分析三疣梭子蟹养殖塘底泥细菌的多样性

钱丽君, 张德民, 徐小红

(宁波大学生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211)

摘要:将传统的菌落菌体形态分类方法与分子生物学方法相结合研究了三疣梭子蟹养殖塘底泥中一个细菌类群的多样性。首先采用平板稀释法对三疣梭子蟹养殖塘底泥中的细菌进行分离与纯化,根据各菌株的菌落形态特征初步将 118 株分离物分为 8 个类群,其中最大的一个类群的菌落基本特征为圆形、边缘整齐、表面凸起、菌落有光泽,对该类群的细菌多样性分析表明,通过芽孢染色可将产芽孢菌和不产芽孢菌区分开,不产芽孢菌根据其菌体形态又分为 3 个亚群,其中卵圆形细菌是最大的一个亚群,共有 16 株。应用 PCR-DGGE 方法对该类群进行菌株的遗传多样性分析。结果表明,卵圆形类群 16 株细菌中就有 11 株不同系统发育型的细菌。最后,将这 11 株细菌进行了 16S rDNA 部分序列(约 750 bp)的测定,并做系统发育学分析,结果显示,这些细菌的系统发育学地位相距很远,分属于 γ -Proteobacteria、 α -Proteobacteria 和 Firmicutes 等类群。试验结果表明,以菌落特征的差异来挑选不同的菌株作为分析细菌多样性的第一个筛选步骤,会大大低估可培养异养细菌的多样性。

关键词:三疣梭子蟹; 异养细菌; 16S rDNA; 变性梯度胶电泳; 变形菌门

中图分类号:S 931.3; S 968.25⁺²

文献标识码:A

Bacteria diversity in *Portunus trituperkulatus* pond sediment estimated by denaturing gradient gel electrophoresis

QIAN Li-jun, ZHANG De-min, XU Xiao-hong

(Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Bacteria diversity was investigated in culture pond sediment of *Portunus trituperkulatus* by means of the characteristics of morphology of colony, cell and 16S rDNA. A total of 118 strains of bacteria were isolated and purified from culture pond sediment of *Portunus trituperkulatus* by serially plate dilution, and primarily clustered into 8 groups based on colony characteristics. Further research was focused on the biggest group of them, whose colonies characterized by circular shape, flat margin, convex surface, and glistening. Among this group, 31 strains were non-spore-forming bacteria, and divided into 3 sub-groups, i. e. sphere-rod, middle rod and long rod group. Sphere-rod sub-group was the biggest one, including 16 isolates. The genetic diversity of sphere-rod sub-group was analyzed using PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) molecular fingerprinting techniques. Eleven different phylogenetic types were found within 16 isolates. 16S rRNA gene partial sequences (about 750 bp from 5' end) of 11 representative isolates were

收稿日期:2006-08-28

资助项目:浙江省自然科学基金人才培养项目(R305333);浙江省教育厅专项任务(20051296);宁波市科技项目(2004A610026)(2005C100097)

作者简介:钱丽君(1982-),女,杭州富阳人,在读研究生,从事环境微生物学研究。E-mail:lijunqian1982@yahoo.com.cn

通讯作者:张德民, Tel: 0574-87600164; E-mail:zhangdemin@nbu.edu.cn

determined and phylogenetically analyzed. The results indicated that the sphere-rod cultivable bacteria were clustered into three clusters in two phyla: phylum Firmicutes and phylum Proteobacteria including class γ -Proteobacteria and α -Proteobacteria. The conclusion is that using the differences of colony characteristics as the first step of pick-up of isolates will greatly underestimate the diversity of cultivable heterotrophic bacteria.

Key words: *Portunus trituperkulatus*; heterotrophic bacteria; 16S rDNA; denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE); Proteobacteria

异养细菌在养殖池塘的物质循环、能量流动、元素转化、生态平衡及环境净化等方面起着十分重要的作用。对异养细菌群落组成结构、功能及其多样性的认识有助于了解养殖池塘生态系的特性,并借以评价水体的各项指标^[1]。

国内关于养殖池塘异养细菌的研究,绝大多数是根据细菌的菌落特征差异来挑菌^[2],随后对其进行形态观察和生理生化试验,从而分析可培养异养细菌的多样性,由于菌落特征分类信息的有限性,相同菌落的菌株可能会在分类上亦存在丰富的多样性,因此仅靠菌落特征筛选细菌多样性会严重低估养殖塘中可培养异养细菌的多样性。

近年来,分子生物学技术(PCR, DGGE, FISH等)应用到各种环境微生物生态学的研究中,如高温热泉^[3]、湖泊^[4]、海洋^[5]、土壤^[6]等,极大地丰富了人们对微生物多样性、微生物群落结构和功能的认识,但至今未见将这些先进的技术手段应用在养殖池塘异养细菌的多样性分析上。

将 PCR, DGGE 及序列分析等技术引入养殖池塘的异养细菌多样性分析中,有望揭示出同一菌落特征菌群内的遗传及分类多样性。本研究采用传统平板稀释法对梭子蟹养殖池塘泥样中的细菌进行分离纯化,依据这些细菌的菌体形态与菌落特征进行归类,应用 PCR-DGGE 方法对其中的一个大类群进行菌株的遗传多样性分析,随后通过分析各菌株的 16S rDNA 的部分序列,揭示各类群细菌的分类多样性,为进一步研究不同种群的细菌在梭子蟹养殖池塘中的生态功能提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

样品的采集和处理 2005 年 10 月 15 日在宁波象山高塘岛对两个三疣梭子蟹养殖塘进行了泥样的采集。采样时间为 10:00 - 12:00, 每个池塘分别设 3 个采样点(进出水口、池中央、池边),应用采泥器采集泥样,然后用无菌刀切取 2

cm × 2 cm × 5 cm 的泥样块于无菌培养皿中,各样品于黑暗、4 ℃ 的环境保存,在采样后 4 h 内进行实验。

Zobell 2216E 培养基^[7] 蛋白胨:5 g;磷酸高铁:0.01 g;酵母膏:1 g;琼脂:15 g;陈海水:1000 mL; pH 7.6 ~ 7.8。

仪器设备 Eppendorf 离心机、SORVALL Bifuge PrinoR 型 冷冻离心机、BIO - RAD PCR 仪和变性梯度凝胶电泳仪。

1.2 研究方 法

可培养异养细菌的分离、纯化及形态学研究采集的泥样用无菌生理盐水进行 10 倍系列稀释,选择合适的 3 个稀释度取样分析,每个稀释度设 3 个平行,取 100 μ L 稀释液涂 Zobell 2216E 培养基平板,30 ℃ 连续培养 2 ~ 5 d,逐日记录各平板菌落数及菌落形态。细胞形态观察用结晶紫简单染色,芽孢形态观察用孔雀绿染色^[8]。

细菌基因组 DNA 的提取和 16S rDNA V3 片段的 PCR 扩增 细菌基因组 DNA 提取按照张德民^[9] 等的方法进行,将提取的 DNA 直接作为 PCR 模板。采用对大多数细菌的 16S rRNA 基因 V3 区具有特异性的引物对:341f + GC(5' - CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC CCT ACG GGA GGC AGC AG - 3') 和 518r(5' - ATT ACC GCG GCT GCT GG - 3'),扩增产物长约 230 bp,用于 DGGE 分析。采用细菌通用性引物对:27f(5' - AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG - 3') 和 1541r(5' - ACG GCT ACC TTG TTA CGA CT - 3'),扩增细菌 16S rDNA 的全序列,用于测序。PCR 反应体系:25 ng 模板,4 μ mol · L⁻¹ 引物,200 μ mol · L⁻¹ dNTP, 2.5 μ L 10 × buffer, 1.5 mmol · L⁻¹ MgCl₂, 0.75 U DNA 聚合酶,补双蒸水到 25 μ L。PCR 反应条件:采用降落 PCR, 94 ℃ 预变性 5 min; 前 10 个循环为 94 ℃ 1 min, 65 ~ 60 ℃ 1 min, 72 ℃ 30 s(其中每个循环后复性温度下降 0.5 ℃); 后 18 个循环为

94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 30 s; 最后 72 °C 延伸 5 min。

PCR 扩增产物的 DGGE 分析 使用 BIO-RAD 梯度胶制备装置, 根据实验需要, 制备变性剂浓度 0% ~ 100% 的 8% 聚丙烯酰胺凝胶垂直胶, 其中变性剂的浓度从左向右依次递增, 150 V, 60 °C, 电泳 3 h。制备变性剂浓度 30% ~ 80% 的 8% 聚丙烯酰胺凝胶平行胶, 其中变性剂的浓度从上向下依次递增。150 V, 60 °C, 电泳 5.5 h。凝胶用银染法^[10]或 EB 显色, 用数码相机对结果拍照。

细菌 16S rDNA 序列的测定 应用细菌通用性引物 (27f ~ 1541r) PCR 扩增细菌的 16S

rDNA, 用 UNIQ-10 柱式通用 DNA 纯化试剂盒纯化 PCR 产物, 送上海生物工程技术公司进行序列测定, 将所得序列用 BLAST 程序在 GenBank 数据库中进行相似性搜索, 从中获取相近模式菌株 16S rDNA 序列, 用 Clustal X 程序进行序列对排, 将相似性低的序列登录 GenBank 数据库, 随后采用 Neighbor-Joining 法^[11]构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 可培养异养细菌的形态学研究

将从养殖塘底泥中分离得到的 118 株细菌, 依据菌落形态差异初步分为 8 个类群 (表 1), 其

表 1 不产芽孢异养细菌的菌落及菌体形态学特征
Tab. 1 The morphological characteristics of non-spore-forming heterotrophic bacteria

形态 morphology	边缘 margin	表面形态 surface shape	质地 texture	光泽 optical	非芽孢菌株数 number of non-spore-forming bacteria	非芽孢菌亚群 sub-groups of non-spore-forming bacteria	亚群菌株数 number of sub-group isolates	菌株代号 no. of isolates
A 圆形 circular	整齐 entire	凸起 convex	奶油状 creaming	有光泽 glistening	31	卵圆形 sphere-rod (0.5 ~ 0.6 μm) × (0.8 ~ 1.2 μm)	16	H-S ₁ : 1, 3, 8, 13, 15, 18, 31, 36, 50, 51, 58, 59; H-S ₂ : 28, 40, 52; D-S ₂ : 45
						杆状 rod (0.5 ~ 1.0 μm) × (0.7 ~ 2.0 μm)	8	H-S ₂ : 4, 29, 54; D-S ₁ : 7, 18; D-S ₂ : 7, 22, 33
						长杆状 rod (0.4 ~ 1.2 μm) × (2.0 ~ 4.0 μm)	7	H-S ₁ : 33, 52; H-S ₂ : 21, 44; D-S ₁ : 45, 52; D-S ₂ : 10
B 圆形 circular	整齐 entire	凸起 convex	脆性 brittle	有光泽 glistening	2	长杆状 rod (0.4 ~ 1.2 μm) × (2.0 ~ 4.0 μm)	2	D-S ₁ : 9; D-S ₂ : 26
C 圆形 circular	整齐 entire	凸起 convex	膜状 membranous	黯淡 dull	0	0	0	0
D 圆形 circular	波状轮廓 contoured	凸起 convex	奶油状 creaming	有光泽 glistening	4	弧形 curved-rod (0.4 ~ 1.0 μm) × (1.0 ~ 3.0 μm)	2	H-S ₂ : 8; D-S ₁ : 10
						杆状 rod (0.5 ~ 1.0 μm) × (0.7 ~ 2.0 μm)	2	D-S ₁ : 27, 47
E 圆形 circular	整齐 entire	平展 flat	奶油状 creaming	有光泽 glistening	8	弧形 curved-rod (0.4 ~ 1.0 μm) × (1.0 ~ 3.0 μm)	5	D-S ₁ : 39, 41, 47, 50; D-S ₂ : 60
						卵圆形 sphere-rod (0.5 ~ 0.6 μm) × (0.8 ~ 1.2 μm)	3	H-S ₂ : 16; D-S ₁ : 11; D-S ₂ : 42
F 圆形 circular	整齐 entire	平展 flat	奶油状 creaming	黯淡 dull	4	卵圆形 sphere-rod (0.5 ~ 0.6 μm) × (0.8 ~ 1.2 μm)	4	H-S ₁ : 19; D-S ₁ : 17, 61; D-S ₂ : 44
G 不规则 irregular	不规则 irregular	凸起 convex	奶油状 creaming	有光泽 glistening	1	杆状 rod (0.5 ~ 1.0 μm) × (0.7 ~ 2.0 μm)	1	D-S ₁ : 16
H 不规则 irregular	不规则 irregular	平展 flat	奶油状 creaming	有光泽 glistening	2	弧形 curved-rod (0.4 ~ 1.0 μm) × (1.0 ~ 3.0 μm)	2	D-S ₂ : 19; D-S ₁ : 55

注: 在菌株编号中: H 表示健康养殖池; D 表示病害养殖池; S 表示泥样; S₁ 表示 24 h 培养后记录的细菌; S₂ 表示 48 h 培养后记录的细菌

Notes: H denotes healthy culture pond; D denotes disease culture pond; S denotes sediment; S₁ denotes recorded after cultivated for 24 hours; S₂ denotes recorded after cultivated for 48 hours

中 A 类群最大,包括 77 株细菌,菌落特征为:圆形菌落,边缘整齐,表面凸起,呈奶油状质地,有光泽。E 和 D 类群也有较多的菌株,分别包括 14 和 10 株细菌,类群 C 和类群 G 分别只有 1 个菌株。我们对 A 类群的菌体形态做芽孢染色,发现有 46 株细菌属芽孢杆菌,31 株是非芽孢细菌,分别占 60% 和 40%;在 31 株非芽孢杆菌中,依据菌体形

态又可分为 3 个亚群:卵圆形细菌($0.5 \sim 0.6 \mu\text{m}$) \times ($0.8 \sim 1.2 \mu\text{m}$),中杆状细菌($0.5 \sim 1.0 \mu\text{m}$) \times ($0.7 \sim 2.0 \mu\text{m}$),长杆状细菌($0.4 \sim 1.2 \mu\text{m}$) \times ($2.0 \sim 4.0 \mu\text{m}$)。卵圆形细菌最多,共有 16 株(表 1)。随后,参考文献[12]方法对该亚群菌株的菌落特征和菌体形态进行了更为详细的描述(表 2)。

表 2 卵圆形异养细菌的菌落及菌体形态学特征

Tab. 2 The morphological characteristics of sphere-rod cultivable heterotrophic bacteria

菌落特征 cell characteristics	卵圆形细菌($0.5 \sim 0.6 \mu\text{m}$) \times ($0.8 \sim 1.2 \mu\text{m}$) sphere-rod bacteria($0.5 \sim 0.6 \mu\text{m}$) \times ($0.8 \sim 1.2 \mu\text{m}$)			
	H-S ₁ -3,59	H-S ₁ -15,31,36,50,58; H-S ₂ -40;D-S ₂ -45	H-S ₁ -1,13,18; H-S ₂ -28,51	H-S ₁ -8; H-S ₂ -52
直径(mm) diameter	3~4	1~2	1~2	3
形态 morphology	圆形 circular	圆形 circular	圆形 circular	圆形 circular
边缘 margin	整齐 entire	整齐 entire	整齐 entire	整齐 entire
表面形态 surface shape	平台状 platform	平台状 platform	凸起 convex	低凸起 slightly convex
质地 texture	奶油状 creaming	奶油状 creaming	奶油状 creaming	奶油状 creaming
光泽 optical	有光泽 glistening	有光泽 glistening	有光泽 glistening	有光泽 glistening

注:30 °C 培养 5 d

Notes:cultivated at 30 °C for 5 days

2.2 不产芽孢卵圆形细菌的 PCR-DGGE 指纹

分析 将卵圆形的 16 株细菌随机编号(No. 1 ~ No. 16),随后对这些细菌进行基因组 DNA 的提取和 16S rRNA 基因 V3 区片段的特异性扩增,扩增产物约 230 bp 左右。通过 DGGE 垂直胶(变性梯度 0~100%)显示这 16 株细菌的变性范围约为 40%~60%,随后确定 DGGE 平行胶的变性梯度为 30%~80%,平行胶的结果见图 1。最左边的 5 个菌株(H-S₁-58, H-S₁-15, D-S₂-45, H-S₂-40, H-S₁-50)和菌株 H-S₂-51(No. 9)、H-S₁-60(No. 12)的条带位置非常接近;菌株 H-S₁-31(No. 14)和 H-S₁-36(No. 15)的位置相近,菌株 H-S₁-18(No. 6)和 H-S₂-28(No. 11)、H-S₁-1(No. 16)位置相近。改变变性条件或电泳条件证实 H-S₁-58, H-S₁-15, D-S₂-45, H-S₂-40, H-S₁-50 位置相同,菌株 H-S₁-31 和 H-S₁-36 的位置相同,其他各菌株的条带位置则各不相同(结果未显示),根据 DGGE 的原理,相同片段长度而序列不同的 DNA 双链在变性梯度凝胶中有不同的解链行为,会在不同的凝胶位置停止迁移。即 DGGE 中不同位置上的条带所对应的菌株系统发育型也不同。因此,可以确定卵圆形亚群 16 株细菌中,细菌多样性非常丰富,至少有 11 个系统发育型。

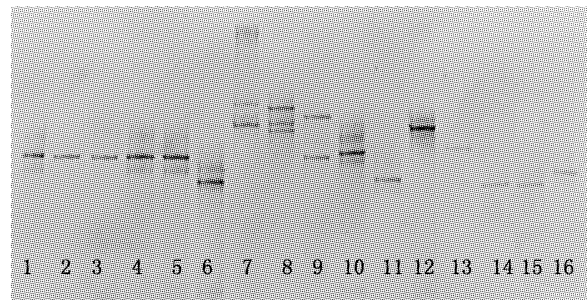


图 1 卵圆形异养细菌 PCR 产物的 DGGE 平行胶分离图谱

Fig. 1 Paralleled DGGE profile of PCR products of sphere-rod cultivable heterotrophic bacteria

1:H-S₁-58; 2:H-S₁-15; 3:D-S₂-45; 4:H-S₂-40; 5:H-S₁-50; 6:H-S₁-18; 7:H-S₁-3; 8:H-S₁-8; 9:H-S₂-51; 10:H-S₁-59; 11:H-S₂-28; 12:H-S₁-60; 13:H-S₁-13; 14:H-S₁-31; 15:H-S₁-36; 16:H-S₁-1

图 1 也显示,菌株 H-S₁-3、H-S₁-8 和 H-S₂-51 出现了 2~4 条不等的条带,多次的 PCR-DGGE 重复性实验证实,这些条带的数目和相对位置都非常稳定,说明这 3 株细菌的 16S rRNA 基因具有异质性。

2.3 细菌的鉴定及系统发育学分析

将不同系统发育型的 11 株细菌进行 16S rDNA 全序列的扩增,测定其 5'端约 750 bp 左右的序列,该序列包含 16S rDNA 中 C1 和 C2 保守

区以及 V1 和 V2 高变区。将获得的序列通过 Blast 对 GenBank 数据库中序列进行相似性搜索。系统发育学分析结果表明(图 2),这 11 株细菌的系统发育学地位相距很远,分属于厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)的 α -变形菌纲和 γ -变形菌纲等三大类群,其中属于 γ -变形菌占卵圆形分离菌株的 62.5%,10 株细菌中有 8

株在细菌系统学上与盐单胞菌属(*Halomonas*)关系密切,16S rDNA 序列相似性为 97% ~ 100%,成为卵圆形细菌中的最优势菌群。属于 α -变形菌纲中的 4 株细菌(占卵圆形分离菌株的 25%)与红细菌科(Rhodobacteraceae)系统关系密切,16S rDNA 序列介于 81% ~ 100% 之间,成为第二大优势菌群。

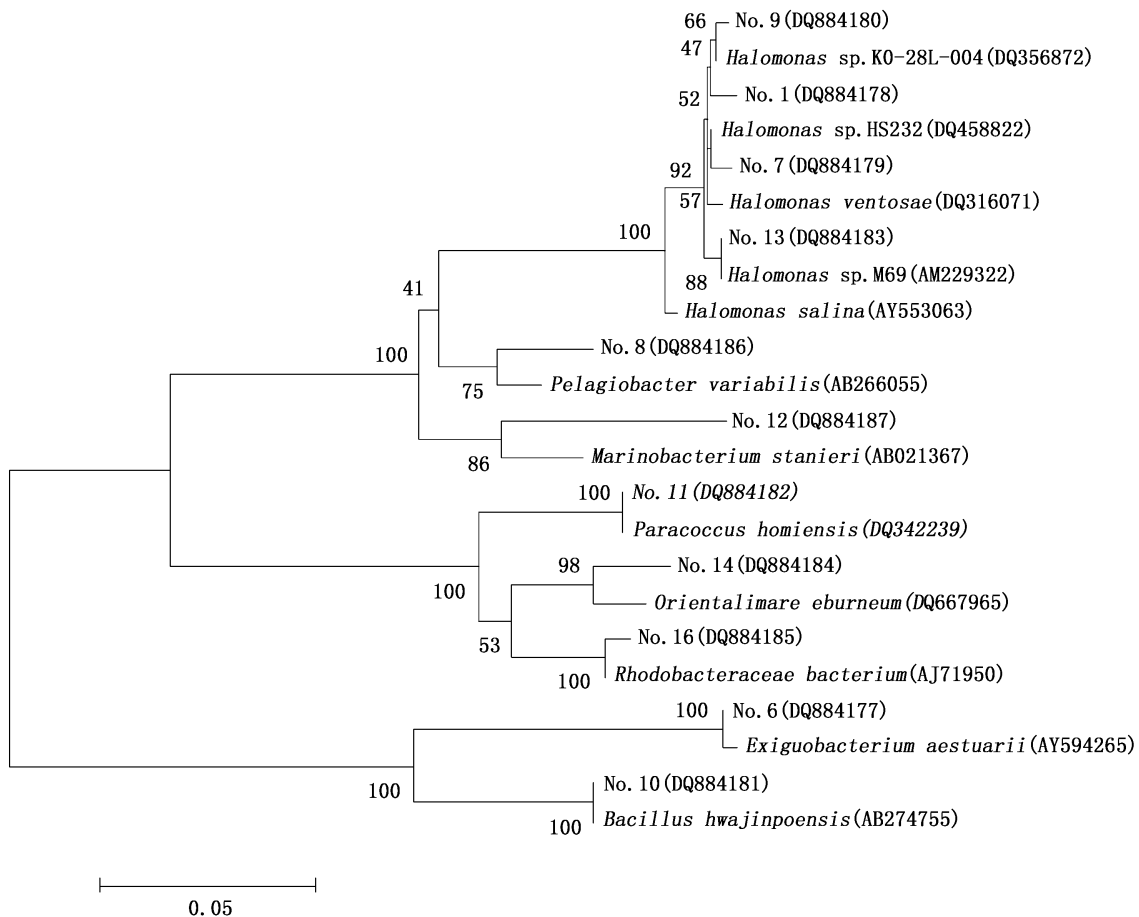


图 2 根据卵圆形异养细菌的 16S rDNA 序列(650 bp)构建的系统发育树

Fig. 2 Dendrogram for sphere-rod heterotrophic bacteria based on partial 16S rRNA gene sequences(650 bp)

Data in parentheses are the GenBank accession numbers and the number of isolates represented by this strain

The scale bar indicates 0.05 substitutions per nucleotide position

3 讨论

传统的细菌分类鉴定是一项复杂而又细致的工作,要鉴定一株细菌,首先需分离纯化,然后对其菌落特征、菌体形态结构、生理生化反应、次级代谢产物、生长条件、脂类组成、核酸性质等几十项指标进行描述和试验,步骤非常繁琐。因此,许

多学者根据不同的细菌在特定的培养基中可表现出其特定的菌落形态,用菌落特征作为初筛标准分析细菌的多样性,挑出菌落特征有差异的菌落再进一步做深入的鉴定实验。我们随机分离出 118 株细菌,依据菌落特征分成 8 个类群,其中最大的类群又依据其菌体形态大小分成 3 个亚群,采用 PCR-DGGE-序列分析等分子生物学方法对

其中最大的一个亚类群内的细菌多样性进行了分析。结果显示,16 株细菌中竟有 11 株不同的系统发育型,并且这种多样性并不局限于种属科内,而是分散到两个门 3 个纲的 8 个科中(图 2)。这说明简单地依靠菌落(或加上菌体形态)特征筛选细菌多样性可能会大大低估细菌多样性。事实上,在多数水体中,细菌多样性异常丰富,通常要超过水体中的真核生物^[13]。因此,虽然有关细菌多样性研究的报道很多,但都因为分析菌株的数量有限而缺乏统计学意义。

我们的工作表明,只做传统鉴定中最直接、最简单的菌落菌体形态特征描述,绕开繁琐费时的后续鉴定,直接采用 PCR-DGGE-序列分析等分子生物学方法对其多样性做进一步分析,可较好地解决细菌鉴定的繁杂性和细菌多样性的丰富性的矛盾。传统的细菌鉴定,还有一个令大多数研究者困扰的问题,就是有些指标特征界限不清或不稳定,往往是经历了大量费时费力工作后,只有极少数菌株鉴定到种,部分菌株到属,还有相当数量的菌株只能到科及以上类群。而分子生物学方法对各菌株的分类地位、分类层次可有一个较为清晰的认识。

根据菌落菌体特征对细菌菌株初步归群时,应先确定固定的培养基成分,固定培养时间、温度等,然后选择表现稳定、易于区别的特征做归类指标,不易过细,因为有些特征的变化是连续的,且其变化是培养条件的差异引起的还是菌株遗传差异引起的,不易分辨,如菌落凸起与否、菌落颜色等。如有必要,等细菌的 16S rDNA 系统学分析确定了其分类地位后,再补充一些可能对其鉴定有参考价值的菌落特征。如在对 16 株卵圆形细菌的菌落特征做了补充分析后,发现菌落的形态、质地、光泽等可能对菌株的分类具有参考价值,虽然表面形态有些变化,但仔细观察、比较仍可辨别,可与菌落大小一起作为次一级的辨别特征,进一步区分各系统发育型(表 2)。在分析的 16 个样品中,有 3 个菌株表现出 16S rRNA 基因的异质性。我们对这 3 株细菌进行了 16S rDNA 全序列的克隆,分别随机挑选了 30 个转化子进行 PCR-DGGE 分析,找出了每株细菌的各条带所对应的转化子。根据测序结果,这 3 株细菌都属于 γ -Proteobacteria,结合 rrndb(the ribosomal RNA operon copy number database, [msu.edu\)发现,这 3 株细菌的 16S rRNA 基因的异质性现象还未见报道。](http://rrndb.cme.</p>
</div>
<div data-bbox=)

卵圆形细菌的系统发育学分析结果与近年来国内外有关海洋沉积物微生物多样性的报道一致^[14-15], γ -Proteobacteria 细菌是底泥中主要的优势菌群。而 α -Proteobacteria 的丰度与已有的一些有关海洋沉积物中优势变形细菌报道不太一致^[16],但由于海水养殖塘与一般自然状态下的海洋沉积物不完全相同,并不是一个完全自然的微生物生态环境。同时,卵圆形细菌只是所分离细菌中的一个亚类群,并不能完全表征可培养异养细菌多样性。

参考文献:

- [1] 张志南,田胜艳. 异养细菌在海洋生态系统中的作用[J]. 青岛海洋大学学报, 2003, 33(3): 375 - 383.
- [2] 于占国,林凤翱,贺杰. 异养细菌与虾病关系的研究[J]. 海洋学报, 1995, 17(3): 85 - 91.
- [3] Ferris M J, Muyzer G, Ward D M. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62: 340 - 346.
- [4] Cytryn E, Minz D, Oremiad R S, et al. Distribution and diversity of archaea corresponding to the limnological cycle of a hyper saline stratified lake (Solar Lake, Sinai, Egypt) [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66: 3269 - 3276.
- [5] Moeseneder M, Arrieta J S M, Muyzer G, et al. Optimization of terminal restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(8): 3518 - 3525.
- [6] Smalla K, Wieland G, Buchner A, et al. Bulk and Rhizosphere soil bacterial community studies by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(10): 4742 - 4751.
- [7] 李筠,吕艳,李军,等. 苗期中国对虾幼体异养细菌区系及其变化与病害发生的关系[J]. 中国海洋大学学报, 2004, 34(6): 1003 - 1007.
- [8] 东秀珠,蔡妙英,张德民,等. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [9] 张德民,黄志勇,杨惠芳,等. 几株红假单胞菌属细

- 菌的表观特征及其遗传多样性研究[J]. 微生物学报, 2000, 40(3): 229 - 236.
- [10] 李西平, 钱新华, 姚英民, 等. 聚丙烯酰胺凝胶电泳银染方法的选择[J]. 第一军医大学学报, 2004, 24(9): 1072 - 1076.
- [11] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. *Mol Biol Evol*, 1987, 4: 406 - 425.
- [12] 吴根福, 虞左明, 吴洁, 等. 杭州西湖水域可培养异养细菌的群落多样性[J]. 生物多样性, 2003, 11(6): 467 - 474.
- [13] Patrick D, Schloss Jo. Status of the microbial census[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004, 68(4): 686 - 691.
- [14] Li L, Kato C, Horikoshi K. Microbial diversity in sediments collected from the deepest cold-seep area, the Japan Trench[J]. *Biodivers Conserv*, 1999, 8: 659 - 677.
- [15] 戴欣, 王保军, 黄燕, 等. 普通和稀释培养基研究太湖沉积物可培养细菌的多样性[J]. 微生物学报, 2005, 45(2): 161 - 165.
- [16] Ravensschlag K, Sahm K, Pernthaler J, *et al.* High bacterial diversity in permanently cold marine sediments [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 3982 - 3989.