

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
52(10):1268–1281; 4 October 2012
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

厦门海域 2011 年中肋骨条藻和血红哈卡藻赤潮期间细菌群落结构变化

李祎^{1,2}, 杨彩云^{1,2}, 李东³, 田蕴¹, 郑天凌^{1,2*}

¹ 厦门大学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 厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室, 厦门 361005

³ 华侨大学化工学院, 厦门 361021

摘要: 【目的】研究 2011 年 8 月厦门海域爆发的由中肋骨条藻和血红哈卡藻共同引发的赤潮生消过程中细菌群落结构变化。【方法】应用变性梯度凝胶电泳技术 (Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 对两个赤潮站位和一个非赤潮站位的细菌群落结构进行研究。通过 DGGE 图谱分析确定赤潮生消过程中细菌群落中的关键菌群, 借助 Canoco 软件分析细菌菌群与环境因子的相关性。【结果】在赤潮起始阶段细菌的群落结构与 pH、N/P 的相关性较大, 在赤潮消亡阶段细菌的群落结构与盐度、温度呈明显的正相关。 γ 变形杆菌 (Gammaproteobacteria) (47.7%) 在赤潮期间处于主导位置, 假交替单胞菌属 (*Pseudoalteromonas*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、交替单胞菌属 (*Alteromonas*)、噬氢菌属 (*Hydrogenophaga*)、*Actibacter*、*Oleibacter* 等属均为优势菌群。香农-威列多样性指数表明, 赤潮站位细菌多样性随着赤潮生消呈先升高后降低趋势, 而非赤潮站位细菌多样性基本保持不变。通过 Canoco 对细菌菌群的主成分分析发现, 在赤潮开始阶段 *Hydrogenophaga* 属为优势菌群, 而在赤潮消退阶段则以 *Pseudomonas* 和 *Pseudoalteromonas* 属为主。赤潮站位藻际细菌和游离细菌群落多样性在藻密度较大时均达到最大值, 然而两者与环境因子的相关性有较大差别。【结论】研究结果表明赤潮站位细菌群落多样性远高于非赤潮站位, 细菌丰度随着赤潮藻密度的升高而增加, 细菌与赤潮藻有着密切的关系。本文首次研究了多种优势藻引发的赤潮环境下细菌群落结构的变化, 这对于多种藻引发的赤潮生消过程中细菌菌群结构有了深入的了解, 为赤潮调控的研究提供了理论依据。

关键词: 中肋骨条藻, 血红哈卡藻, PCR-DGGE, 细菌菌群结构, 细菌多样性

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 10-1268-14

近年来随着沿海城市的快速发展, 排入海洋环境中的有机氮、磷等污染物明显增多, 导致了沿海赤潮的频繁爆发, 给社会、经济和人类健康带来了巨大的威胁^[1-2]。厦门海域常有赤潮爆发, 在厦门海域引发赤潮的藻类之中, 以往是以中肋骨条藻

(*Skeletonema costatum*) 和角毛藻 (*Chaetoceros*) 等藻类为主^[3]; 近两年来, 血红哈卡藻 (*Akashiwo sanguine*) 赤潮爆发频率急剧升高, 几乎每年都有血红哈卡藻赤潮爆发。中肋骨条藻和血红哈卡藻在世界各地广泛分布。其中, 中肋骨条藻为广温广盐的

基金项目: 国家自然科学基金重点项目、面上项目 (40930847, 31070442); 福建省自然科学基金 (2012J01223)

* 通信作者。Tel: +86-592-2183217; E-mail: microzh@xmu.edu.cn

作者简介: 李祎 (1988-), 男, 河南安阳人, 硕博连读研究生, 主要从事海洋微生物生态研究。E-mail: liyixiamen@gmail.com

收稿日期: 2012-04-08; 修回日期: 2012-05-21

行^[19]。预电泳:40 V,40 min;电泳条件:110 V,9 h。电泳完毕后,将胶置于含有 EB (0.01%) 的 1 × TAE 缓冲液中染色,室温下染色约 30 min。将染色后的胶用 Gel Doc 凝胶影像分析系统 (Bio-Rad) 进行拍照分析,将主要条带切下后分别放入 EP 管中,加入 0.5 mL 去离子水冲洗,离心去上清。冲洗 2-3 遍后,加入 50 μL ddH₂O,4℃ 过夜保存。10000 × g 离心 10 min,取上清作为 PCR 的模板。

1.3.4 测序及进化树分析: 取 1.3.3 的模板,按照 1.3.2 的体系和 PCR 反应条件进行 PCR 扩增。将 PCR 产物进行纯化回收,然后将回收完的产物与载体 pMD19-T 相连,转入 DH5α 感受态细胞中,送上海英骏生物技术有限公司进行测序。将测序结果用 DNAMAN 去除载体序列后,提交到模式菌种库比对,选取与克隆子序列最相似的 1 个 GenBank 收录的模式菌种序列,并用 Mega 4.0 采用邻接法 (Neighbor-joining method) 构建系统发育树。

1.4 数据分析

电泳图谱采用 Quantity One 处理,能将实际的图形转化成模拟的条带,并且能输出每条泳道与其他泳道的相似性图谱。Quantity One 能把每个条带转换成数值,条带越亮数值就越大。用 Canoco 对赤潮现场起细菌菌群与环境因子之间的关系进行典型对应分析 (Canonical correspondence analysis, CCA), CCA 可以找到在赤潮生消过程中环境因子与主要菌群的关系。用 Canoco 来对赤潮现场细菌菌群进行主成分分析 (Principal component analysis, PCA), 来找寻关键菌群。利用 Quantity One 将条带转换成数字信息,再利用 Biodap 进行香农多样性指数分析,以获得细菌多样性信息。一般来说,如果泳道的条带越多、条带的亮度越大,最后计算得到的该泳道的香农多样性指数就越大,则该样品中细菌多样性就越大。香农多样性指数可以反映不同站位随着赤潮生消的细菌多样性变化,对细菌多样性有了更为直观的了解。

2 结果和分析

2.1 中肋骨条藻和血红哈卡藻赤潮现场环境参数及分析

根据表 1 的环境参数可知,在赤潮发生的前 3 d,赤潮站位 A1、H2 海水中的藻密度比较高,从第

4 d 开始呈下降趋势,直至到赤潮结束,表明从第 4 d 起赤潮开始消减。非赤潮站位 A2,在赤潮生消过程中,其藻密度均较低。

在这次赤潮期间,2 个赤潮站位 A1 和 H2 海水水温均保持在 30℃ 以上,霍文毅等^[4]的研究表明,中肋骨条藻的最适生长温度为 24℃ - 28℃,颜天等^[20]也指出中肋骨条藻的最适生长温度为 25℃,但他同时指出高温有利于中肋骨条藻的生长,易导致赤潮的爆发。因此该次赤潮爆发时候的高温天气促进了赤潮藻生长,成为赤潮爆发的主要诱因之一。而非赤潮站位 A2 海水水温较低,均维持在 30℃ 以下。赤潮站位 A1、H2 盐度均低于 29‰,非赤潮站位 A2 盐度均高于 30‰,赤潮站位的盐度均低于非赤潮站位。有研究指出,盐分不能令赤潮生物的生物量有明显增加,却会在低盐度情况下刺激赤潮生物加快细胞分裂速度^[21]。因此厦门海域赤潮爆发期间的低盐度对藻类生长有一定的刺激作用,对赤潮的爆发有一定影响。同时观察到赤潮站位的 pH 要高于非赤潮站位,这与陈雄文等^[22]的研究一致。他认为赤潮发生时,中肋骨条藻通过启动无机碳浓缩机制 (CCM),提高细胞对无机碳利用效率,使其在低 CO₂ (高 pH) 环境下维持光合作用的正常运行。厦门海域赤潮爆发时期赤潮站位的高 pH 导致海水中低 CO₂ 环境,从而有利于藻细胞对无机碳的利用,有利于藻类的生长。高 pH 同样也是赤潮爆发的推动因素^[23]。

在表 1 中,赤潮站位 (A1, H2) 与非赤潮站位 (A2) 的营养盐 (硝酸盐、亚硝酸盐、铵盐、活性磷酸盐、活性硅酸盐) 相比,呈现不同的变化规律。2 个赤潮站位的营养盐随着赤潮生消,呈现出相同的变化规律:在赤潮开始阶段赤潮站位的营养盐含量较高;而随着赤潮程度的加重,藻类对营养盐的利用加大,这些环境参数值下降;最后在赤潮消亡阶段,随着藻细胞的死亡,营养盐消耗减少、藻细胞破裂释放出胞内物质,使得营养盐含量又有增大趋势。在非赤潮区域,营养盐含量均无较大的变化,可能跟藻细胞数量没有明显改变有关。硝酸盐、亚硝酸盐、铵盐、活性磷酸盐、活性硅酸盐这些环境参数随着赤潮生消发生规律性的变化,能很好地反映赤潮的严重程度。赤潮站位的化学需氧量要比非赤潮站位高,说明赤潮站位的有机物含量比非赤潮站位丰富,因此赤潮的发生跟海水的污染程度有较大关系。赤潮

站位的溶氧变化与梁爱萍等^[24]的研究一致, 她认为当海域中浮游植物数量增加, 大量浮游植物进行光合作用时, 吸收 CO₂, 释放出 O₂, 复氧速率大于耗氧速率, 可导致表层水域中 DO 升高; 而当赤潮藻类过度增殖, 藻类呼吸作用及死藻腐解消耗了 O₂, 耗氧速率大于复氧速率, 可出现 DO 不足。本次赤潮期间赤潮站位 A1、H2 的溶氧随着赤潮生消呈现先增加后减小的趋势, 而非赤潮区域的溶氧基本没有变化, 说明本次赤潮对该海域溶氧的影响完全符合该

规律。根据刘东艳等^[25]的研究, 认为氮磷比为 16:1 的情况下, 最适合中肋骨条藻的生长, 在氮磷比大于 16 状态下的生长速度要优于氮磷比小于 16 的营养状态, 说明其生长主要受到氮的限制。赤潮站位在赤潮爆发最为严重时, 其氮磷比要比赤潮开始及消亡阶段的要高。说明本次中肋骨条藻和血红哈卡藻生长主要受氮含量的限制, 海水氮含量是影响赤潮生消的关键因素。

表 1 中肋骨条藻和血红哈卡藻赤潮现场理化参数

Table 1 Physicochemical parameters during *Skeletonema costatum* and *Akashiwo sanguine* bloom

Samples	T	Sal	pH	SC/AS	TALG	BACT	Chl a	NO ₃ -	NH ₄ +	NO ₂ -	DO	SRP	N/P	SP	SRSi	COD
A1-1	31.0	26	7.97	207.0	236.4	4.60 × 10 ¹¹	51.90	0.194	0.009	0.029	4.66	0.032	7.25	19.0	0.841	2.04
A1-2	30.8	28	7.89	154.9	184.1	4.11 × 10 ¹¹	23.32	0.355	ND	0.030	4.57	0.026	14.8	15.5	0.948	2.95
A1-3	30.5	25	7.84	170.3	189.5	9.96 × 10 ¹¹	52.97	0.117	0.018	0.013	7.68	0.010	14.8	13.8	0.57	1.89
A1-4	31.0	28	7.86	50.70	58.05	3.11 × 10 ¹¹	31.18	0.163	0.013	0.010	8.18	0.019	9.79	10.2	0.508	2.28
A1-5	31.0	30	7.82	9.900	37.35	2.86 × 10 ¹¹	21.30	0.255	0.078	0.026	6.17	0.027	13.3	10.1	1.023	1.38
A1-6	30.5	28	7.84	3.500	8.960	8.70 × 10 ¹⁰	21.97	0.212	0.046	0.020	6.35	0.015	18.5	9.80	0.636	1.35
H2-1	30.8	28	8.00	95.70	118.4	2.20 × 10 ¹¹	44.54	0.266	0.013	0.030	6.08	0.040	7.73	20.0	0.875	3.21
H2-2	30.5	29	7.93	27.00	43.25	1.12 × 10 ¹²	55.80	0.218	0.016	0.018	4.24	0.017	14.8	14.5	0.660	2.44
H2-3	30.8	22	7.91	106.2	123.3	4.11 × 10 ¹¹	26.36	0.146	0.020	0.015	7.66	0.006	30.2	14.0	0.551	1.50
H2-4	30.5	30	7.90	56.88	71.40	3.73 × 10 ¹¹	24.03	0.181	0.017	0.016	7.87	0.007	30.6	10.8	0.646	1.60
H2-5	31.5	29	7.87	45.00	61.80	2.36 × 10 ¹¹	21.93	0.111	0.047	0.014	6.93	0.013	13.2	8.40	0.490	1.37
H2-6	30.0	27	7.82	0.990	28.38	1.36 × 10 ¹¹	18.13	0.204	0.052	0.016	6.58	0.022	12.4	5.70	0.645	1.18
A2-1	29.0	30	7.85	ND	ND	9.96 × 10 ¹⁰	20.34	0.099	0.028	0.008	ND	0.006	22.5	27.8	0.150	0.68
A2-2	29.0	30	7.86	4.800	12.80	8.70 × 10 ¹¹	21.36	0.077	0.023	0.007	ND	0.005	21.4	19.4	0.380	0.60
A2-3	28.8	32	7.77	5.880	12.04	1.02 × 10 ¹²	21.85	0.056	0.019	0.006	6.43	0.006	13.5	14.4	0.325	0.76
A2-4	29.0	30	7.81	7.350	11.85	3.48 × 10 ¹¹	22.36	0.144	0.028	0.009	6.33	0.009	20.1	11.0	0.472	0.83
A2-5	29.0	30	7.88	1.500	8.400	2.86 × 10 ¹¹	19.32	0.201	0.022	0.008	6.12	0.007	33.0	16.0	0.256	0.66
A2-6	30.0	30	7.85	2.600	9.800	6.22 × 10 ¹⁰	22.97	0.200	0.019	0.012	6.99	0.005	46.2	12.4	0.417	0.98

T: temperature, °C; Sal: salinity, ‰; SC/AS: concentration of *Skeletonema costatum* and *Akashiwo sanguine*; TALG: total algal concentration; BACT: bacterial concentration, cells/mL; CHL a: chlorophyll a, µg/L; SP: suspended particle, mg/L; NO₂⁻: nitrite nitrogen, mg/L; NH₄⁺: ammonia nitrogen, mg/L; NO₃⁻: nitrate nitrogen, mg/L; SRP: soluble reactive phosphorus, mg/L; SRSi: soluble reactive silicate; N:P: ratio of total inorganic nitrogen and SRP; DO: dissolved oxygen, mg/L; COD: chemical oxygen demand, (mg/L); ND: not detected

2.2 细菌群落的 DGGE 图谱分析

变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 常被用来对环境样品中微生物群落结构进行分析^[26-27], 在聚丙烯酰胺凝胶的基础上, 加入了变性剂 (尿素和甲酰胺), 能把不同碱基组成的 DNA 片段区分开来。本次赤潮海水中的细菌通过不同孔径的滤膜能够将藻际细菌和游离细菌区分开, 由于藻细胞一般都大于直径为 5 µm 的醋酸纤维滤膜, 基本上所有藻体都被截留在 5 µm 膜上, 与之共存的藻际细菌也留在 5 µm 膜上。将 5 µm 膜过滤后的海水通过 0.22 µm 的滤膜, 能够将游离细菌截留在滤膜上, 从而将两种细菌区分开。图 1 所示为 3 个不同的站位 (A1、A2、H2) 的

DGGE 图谱。

在 DGGE 图谱中, 每个条带代表 1 种优势细菌, 不同的细菌由于 16S rRNA 片段序列不同, 在电泳过程中迁移的速率不同, 不同种的细菌得以分开, 同一条水平直线上的条带代表同一种细菌。在赤潮站位 A1 和 H2 的 DGGE 图谱中, 有较多的条带, 条带越多代表着该区域的优势细菌种群越多。而在非赤潮站位 A2 中, 条带相对较少, 说明非赤潮站位的优势细菌种群较赤潮站位少。在每张图中都有亮度较高的条带, 它们代表在该区域占优势的细菌。在赤潮站位 A1 中, 条带 3、4、8、12、21、22 均为优势条带, 它们所对应的细菌就是在赤潮区域 A1 中丰度较高

的细菌菌群。在赤潮站点 H2 的 DGGE 图谱中, 条带 2、17、18、19、29 所代表的菌群在藻际细菌和游离细菌中都占优势。在非赤潮站点 A2 中, 1、2、5、14、15、16 是主要条带。

通过对赤潮站点 A1、H2 和非赤潮站点 A2 的比较, 赤潮站点样品的 DGGE 图谱中条带的数量及亮度均比非赤潮站位的要高。可能是由于赤潮的爆

发, 藻细胞数量的增多造成了细菌丰度和种类的增加^[28], 细菌是伴随着赤潮藻的出现而出现的, 是与赤潮藻密切相关的。非赤潮站点 A2 样品的 DGGE 图谱中条带稀少并且条带的亮度普遍不高, 在藻际细菌和游离细菌中占优势的细菌没有明显的差别。通过以上的比较可知在赤潮爆发的时候, 细菌与赤潮藻密切相关, 对赤潮生消有很大的影响。

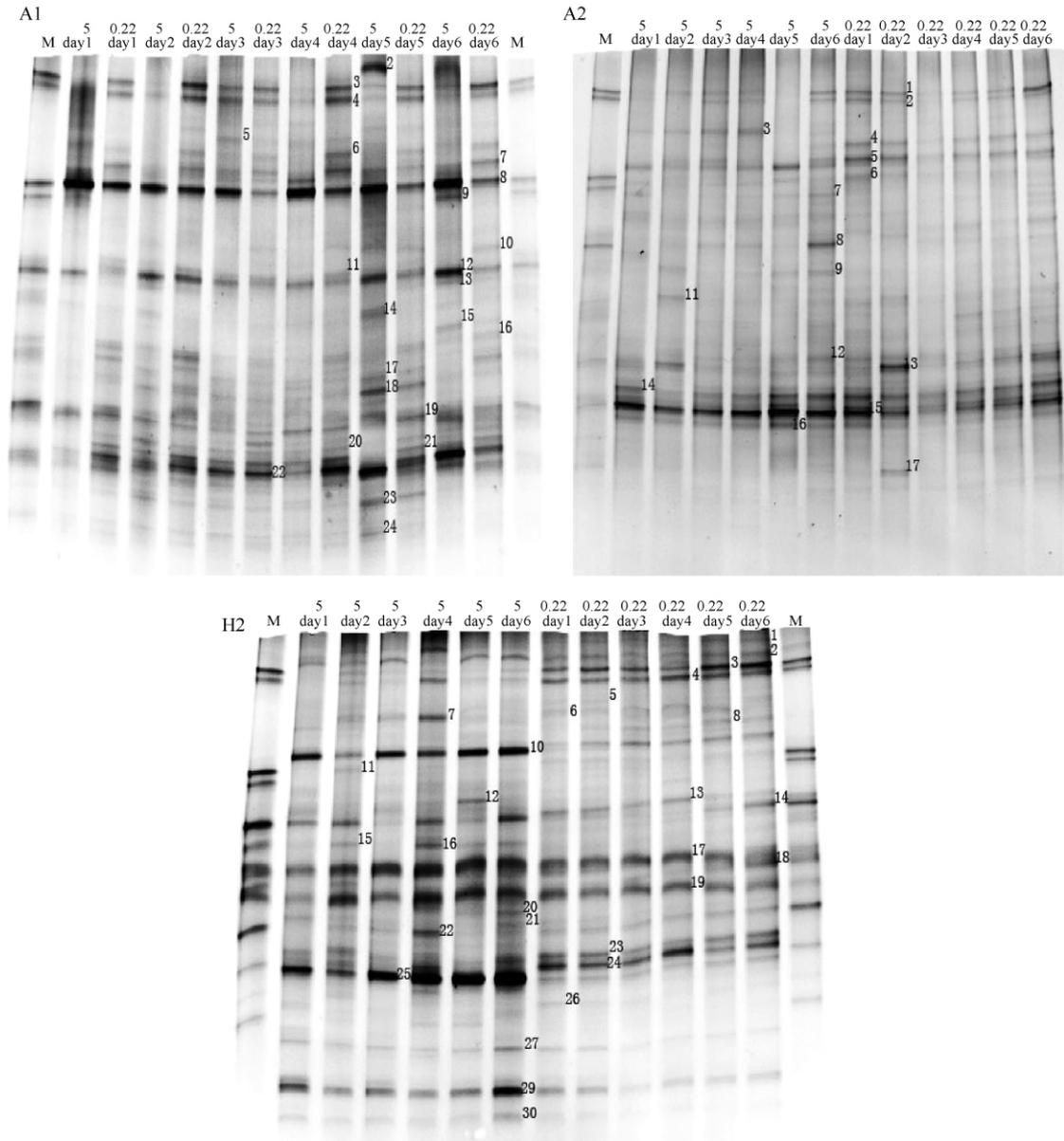


图 1 赤潮站点 A1、H2 及非赤潮站点 A2 样品 16S rRNA-V3 区的 DGGE 图谱

Fig. 1 Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-V3 fragments obtained from bloom sites A1, H2 and non-bloom site A2. Number 5 represents attached bacteria. Number 0.22 represents free-living bacteria. Day1 - 3: beginning and maintenance of the bloom (8. 1, 8. 2 and 8. 4); Day4 - 5: decline of the bloom (8. 5 and 8. 7); Day6: post-bloom (8. 11). M: self-made marker.

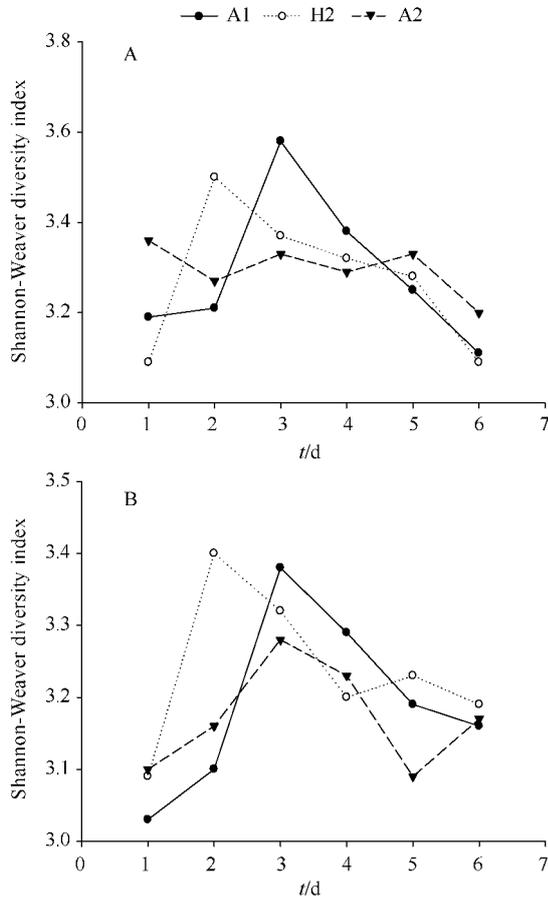


图 2 藻际细菌 (A) 和游离细菌 (B) 香农-威列多样性指数随时间的变化

Fig. 2 The Shannon-Weaver diversity index of attached bacteria (A) and free-living bacteria (B) changed during these days.

我们利用软件 Quantity One 将 3 张 DGGE 图谱的各个条带转换成数字信息,并借助于 Biodap 得到了每个泳道的香农-威列多样性指数 (Shannon-Weaver diversity index) (图 2),条带亮度大且条带数多的泳道所对应的香农-威列多样性指数就会较大。因此可以根据每条泳道的香农指数来分析细菌菌群随着赤潮生消的变化情况。

从图 2-A 中可以看出,非赤潮站点 A2 在这 6 d 的香农指数没有太大的变化,说明非赤潮站点 A2 的细菌多样性变化不大。而赤潮站点 A1, H2 在赤潮生消的过程中,香农指数发生规律性的变化。随着赤潮生消,香农指数呈现先升高后降低的趋势。赤潮站点 A1 的香农指数在第 3 天达到最大值,当天的藻密度也较高,可以看出在藻密度达到较大时其细菌的丰度和多样性也达到最大,再次证明了赤

潮发生时期细菌与赤潮藻之间的重要关系。在赤潮消滅阶段,可能是因为赤潮藻密度下降,与之相关的藻际细菌丰度也会下降,从而导致香农指数的降低。赤潮站点 H2 的香农指数在第 2 天就达到最大,之后随着赤潮的发展逐渐降低。

图 2-B 是赤潮发生时期各站点游离细菌的香农指数。其游离细菌的香农指数也有一定的规律。从赤潮站点 A1, H2 的细菌香农指数变化中可以看出,它们分别第 2 天和第 3 天有明显升高,与这两个站点藻际细菌的香农指数达到最大值的日期是一样的,这样看来藻际细菌和游离细菌有密切联系。随着赤潮的发展,它们的香农指数又有所下降,最后趋于稳定。非赤潮站点 A2 的香农指数呈上升趋势,但是在第 5 天有明显下降,这可能与前一天发生的台风有关。

2.3 细菌群落的进化树分析

切胶条带测序后建树分析,在赤潮站点细菌菌群主要属于 γ 变形杆菌 (Gammaproteobacteria), α 变形杆菌 (Alphaproteobacteria), β 变形杆菌 (Betaproteobacteria), 黄杆菌 (Flavobacteria); 其中占优势的是 Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria; 非赤潮站点的细菌菌群主要属于 Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Flavobacteria; 占优势的是 Gammaproteobacteria, Flavobacteria (图 3)。

在赤潮站点 A1 中, Gammaproteobacteria (40.9%) 占最大优势; 其次是 Alphaproteobacteria (36.4%), Flavobacteria (18.2%), Betaproteobacteria (4.5%)。在赤潮站点 H2 的海水中, Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Flavobacteria 分别占 55.6%、37%、7.4%。结果表明 Gammaproteobacteria 在赤潮站点占比较重要的地位, Gammaproteobacteria 与赤潮藻有密切关系, 这与 Imai I 等^[29]的研究一致。在以往研究中, 有大量的杀藻、溶藻细菌在 Gammaproteobacteria 中发现^[30]。2 个赤潮站点属于 Alphaproteobacteria 共有 19 个条带, 其中远洋杆菌属 (*Candidatus Pelagibacter*) (33.3%) 占最大一部分, 这与 Morris RM 等^[31]的研究一致。在 Gammaproteobacteria 中占最大优势的是假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas*) (21.1%), 在以往研究中^[32]也在该属中发现具有溶藻作用的细菌, 说明它可能对赤潮的消亡有一定作用。

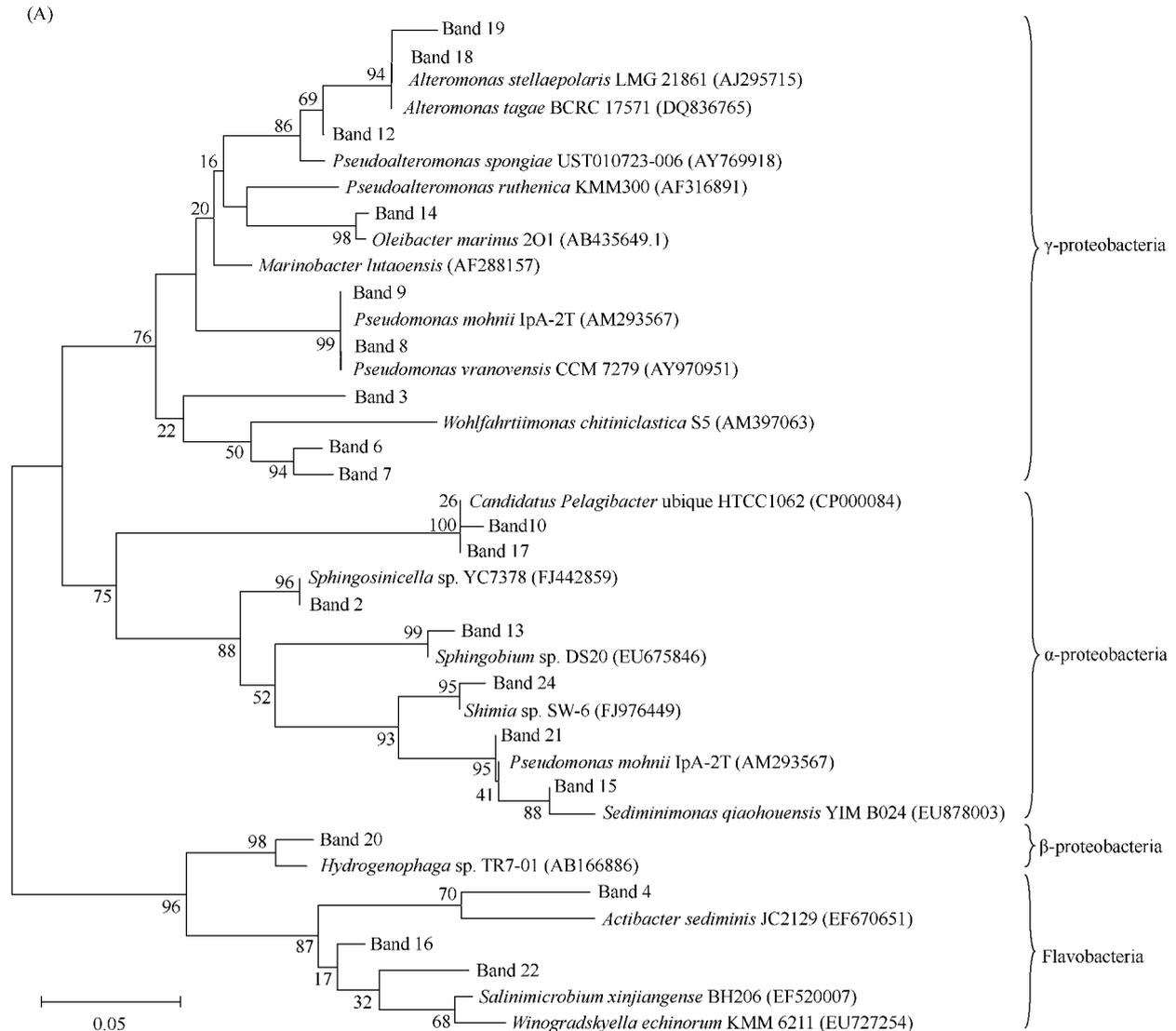


图3 站点 A1 (A) ,H2 (B) ,A2 (C) 样品 DGGE 切胶条带 16S rRNA 基因进化树分析

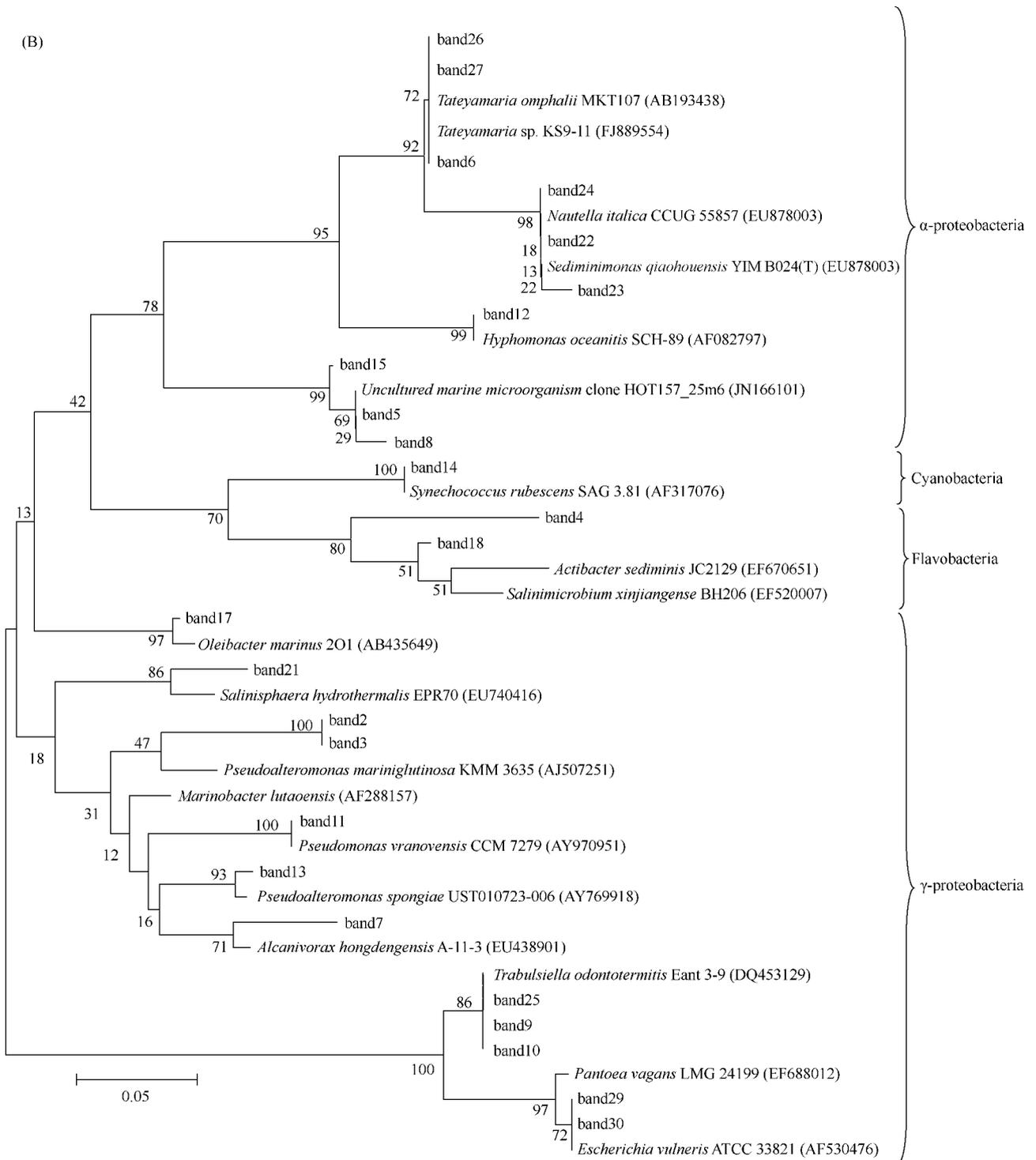
Fig. 3 Neighbor-joining tree showing the phylogenetic relationship of 16S rRNA gene sequences of excised DNA fragments from DGGE profile A1 (A) , H2 (B) and A2 (C) ; Numbers in bracket represent the sequences accession number in Gene Bank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 0.05 sequence divergence.

由图 1、3 可知: 在赤潮站点 A1 中, *Wohlfahrtiimonas* (band 6) 主要在 0.22 μm 滤膜处理后样品的泳道出现, 说明这些条带在游离细菌里占主要优势, *Shimia* (band 24) 主要出现在 5 μm 滤膜处理后样品的泳道, 是藻际细菌菌群中的优势菌。这一现象也出现在另一个赤潮站点 H2, 在赤潮站点 H2 的 DGGE 图中, *Pseudoalteromonas*、*Actibacter*、*Sediminimonas*、*Nautella* (band 3、4、23、24) 主要在 0.22 μm 滤膜处理后的泳道出现; 食碱菌 (*Alcanivorax*)、*Trabulsiaella*、*Tateyamaria* (band 7、10、

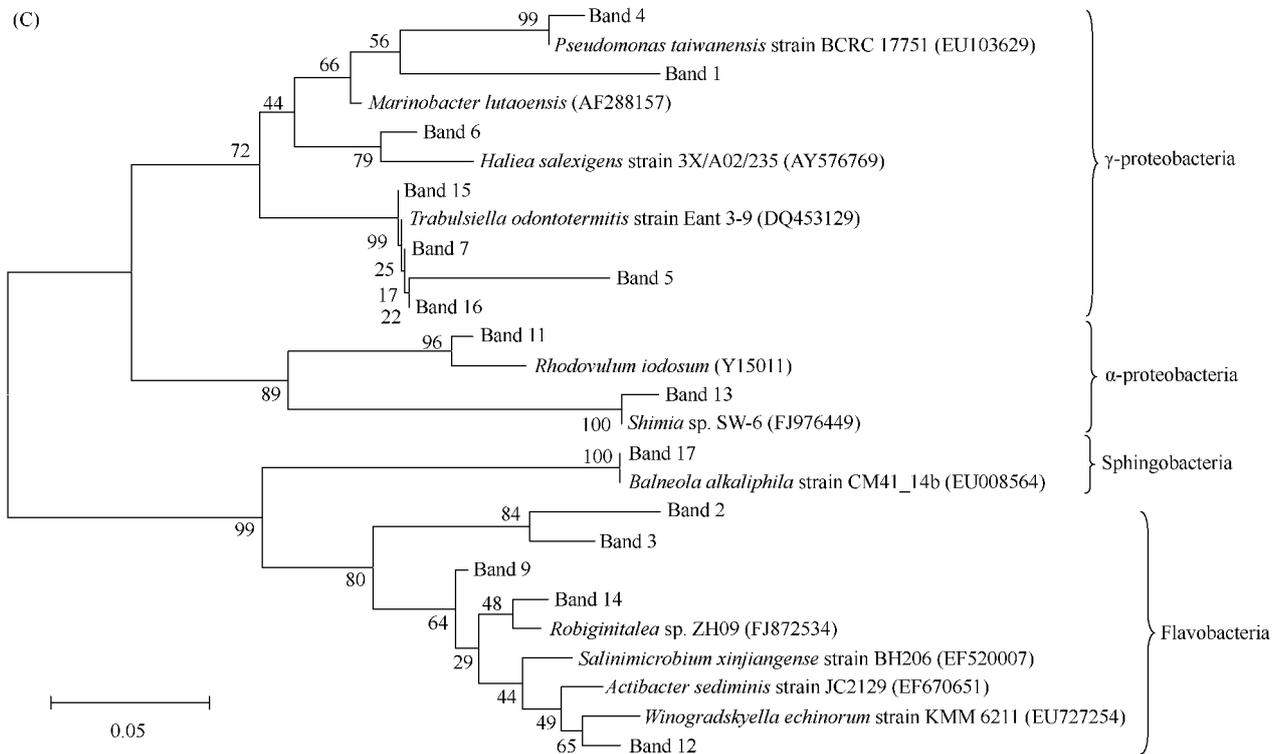
27) 主要出现在 5 μm 滤膜处理后样品的泳道中, 说明这些条带分别在游离细菌和藻际细菌中占有优势。

2.4 赤潮现场细菌菌群结构特征与环境因子的典型对应分析 (CCA)

通过典型对应分析 (CCA) 来找寻在赤潮生消过程中环境因子与细菌菌群之间的相关性。在赤潮生消的过程中, 不同的环境因子在不同阶段起着各自重要的作用, 对细菌的菌群变化有很大的影响 (图 4)。



续图 3



续图 3

由表 1 可知,从赤潮发生的第 4 天开始,藻密度开始下降,赤潮开始消退,第 4 天作为赤潮消退始期。根据现场的环境参数,选取几个重要的环境因子(T、盐度、硝酸盐、亚硝酸盐、活性磷酸盐、铵盐、细菌密度、藻密度、氮磷比和 pH; T、Salinity、NO₃、NO₂、SRP、NH₄、BACT、TALG、N/P、pH)进行典型对应分析。第 1-3 天代表赤潮发生及维持阶段,第 4-5 天代表赤潮消退阶段,第 6d 代表赤潮消亡。从图 4-A 中可以看出,在赤潮开始阶段,pH、BACT、N/P 对细菌菌群结构影响很大,赤潮现场的高 pH 及富营养化条件对于赤潮藻的生长有积极作用,藻密度增大的同时藻际细菌的数量及结构也会发生变化。在第 4-5 天,NO₂、NO₃、Salinity、SRP、T 对赤潮消亡阶段的藻际细菌菌群结构有很大影响,可能是营养盐的消耗造成了藻数量的锐减,从而对藻际细菌菌群结构造成影响。在图 4-B 中,游离细菌在赤潮开始阶段受 NO₂、NO₃、SRP、pH、TALG 等环境因子影响较大。在赤潮消亡阶段,NH₄、Salinity、N/P 对游离细菌影响较大。总的来说,在赤潮生消过程中,在不同的阶段与细菌菌群结构相关性较大的环境因子不同,并且藻际细菌与游离细菌受不同的环

境因子的影响不同,差别较大。

在图 4-C 中,赤潮站点 H2 的藻际细菌菌群在赤潮开始和消亡阶段都受到 TALG、T、NH₄、SRP 的影响,在开始阶段还受到 N/P、pH、NO₂、NO₃ 的影响,这可能跟赤潮开始阶段的营养盐充足对赤潮藻生长的促进作用有很大关系。在第 4 天,只受到 Salinity 和 BACT 的影响,站点 H2 的藻际细菌菌群结构在赤潮消亡的开始阶段受盐度影响很大,而与其他因素相关性不大。在图 4-D 中,赤潮的开始阶段对游离细菌菌群结构影响较大的环境因子与藻际细菌的基本相同,第 4 天几乎不受环境因子的影响,在消亡阶段受到 T、NH₄、Salinity 的很大的影响。

将赤潮站点 A1 和 H2 的细菌菌群结构与环境因子的关系对比,可发现在赤潮开始阶段细菌的菌群结构受到 pH、N/P 的影响很大。在本次赤潮过程中,赤潮站点都呈现出高 pH 的现象,这样看来高 pH 和充足的营养盐是引发赤潮的必要条件。在赤潮消亡阶段,细菌菌群结构受 Salinity、T 的影响较大,Crump BC 等^[33]的研究结果也表明盐度跟细菌的菌群结构变化有密切关系。然而与藻际细菌和游离细菌菌群结构相关的环境因子不尽相同,两类细

菌既有联系也有区别。

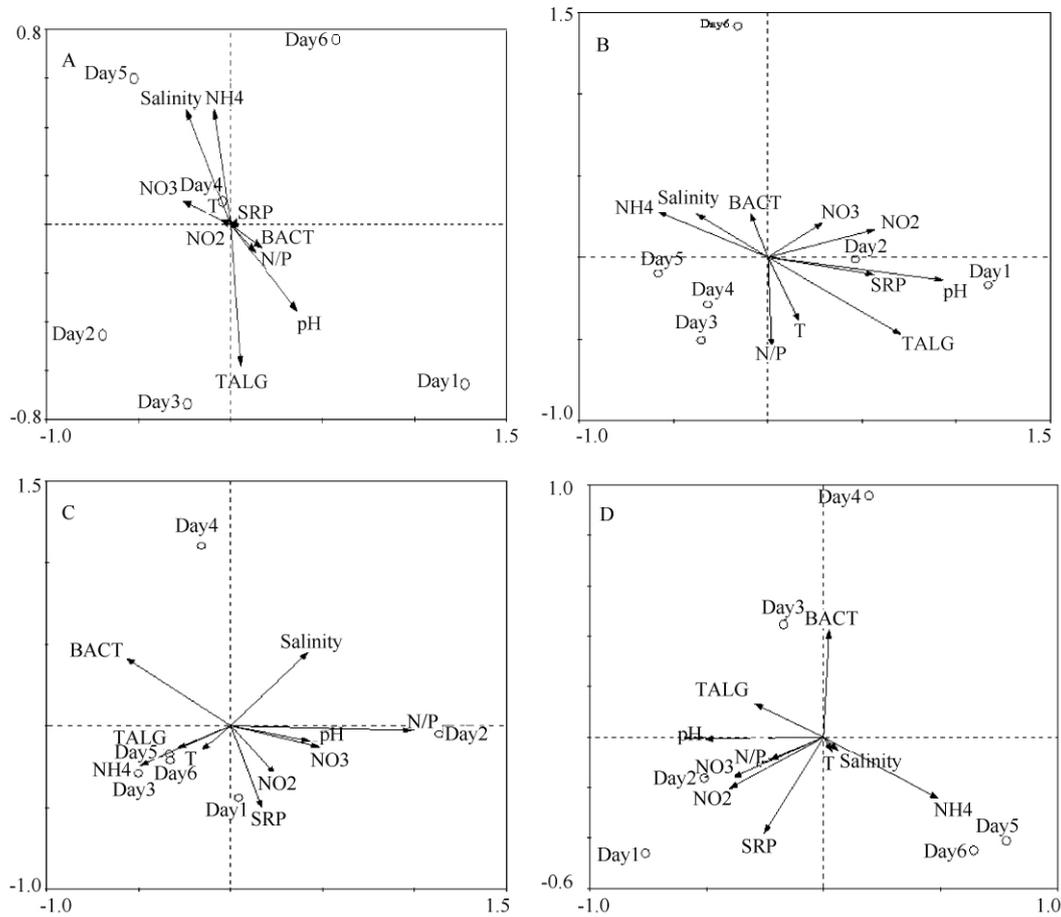


图 4 细菌菌群与环境因子的典型对应分析

Fig. 4 Canonical correspondence analysis (CCA) of bacterial community and environmental factors. environmental factors and attached bacteria in bloom sites A1 (A); environmental factors and free-living bacteria in bloom sites A1 (B); environmental factors and attached bacteria in bloom sites H2 (C); environmental factors and free-living bacteria in bloom sites H2 (D). Day (1-6) represents the process of red tide.

2.5 赤潮生消过程中细菌菌群结构的主成分分析 (PCA)

在赤潮生消过程中,细菌菌群中起主要作用的细菌不同,我们为了找寻细菌菌群结构变化过程中的关键菌群,对赤潮现场样品进行主成分分析 (PCA) 从而确定对赤潮起重要作用的关键菌群 (图 5, 6)。

在赤潮生消过程中,细菌群落结构不断发生变化。在赤潮的不同阶段,细菌群落中关键细菌不同。在图 5 中赤潮刚开始时 (Day 1), *Actibacter* (band 4)、*Salinimicrobium* (band 16)、噬氢菌属 (*Hydrogenophaga*, band 20) 对细菌群落有很大的影响,是关键菌群。Alfreider A 等^[34]的研究发现地下

水中与蓝藻共生的细菌属于 *Hydrogenophaga* 属; Höfle MG 等^[35]也发现在富营养化的湖水中有 *Hydrogenophaga* 属细菌的大量存在。这也说明 *Hydrogenophaga* 属跟藻类是同时存在的,与赤潮的发生有紧密联系。在赤潮达到最严重时 (Day 2, 3), 鞘脂菌属 (*Sphingobium*, band 13), 假单胞菌属 (*Pseudomonas*, band 21) 是关键菌群。很多研究^[36]都对 *Sphingobium* 属的细菌有过报道,认为该属细菌对芳香烃类污染物有降解作用,在赤潮最为严重时 COD 等有机污染物的增多可能是诱导 *Sphingobium* 属细菌成为优势菌群的因素。同样有很多研究^[37]认为 *Pseudomonas* 属的细菌普遍能直接或者间接杀藻,此阶段藻密度的大量升高对 *Pseudomonas* 属细

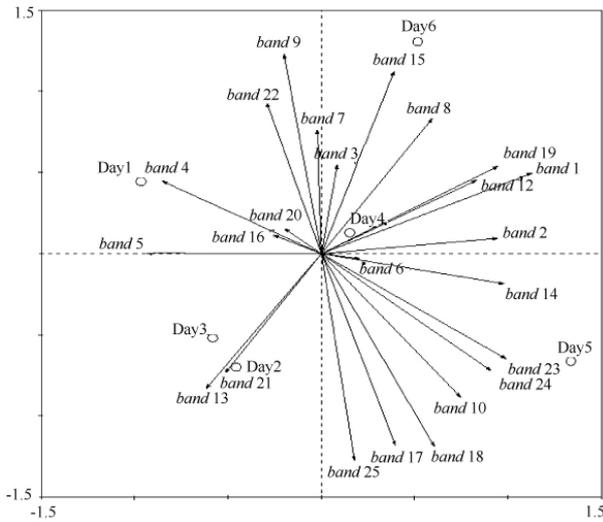


图5 赤潮站点 A1 在 1-6d 内细菌群落结构变化的主成分分析

Fig. 5 Principal component analysis (PCA) of dynamics of bacterial community during the six days in bloom site A1.

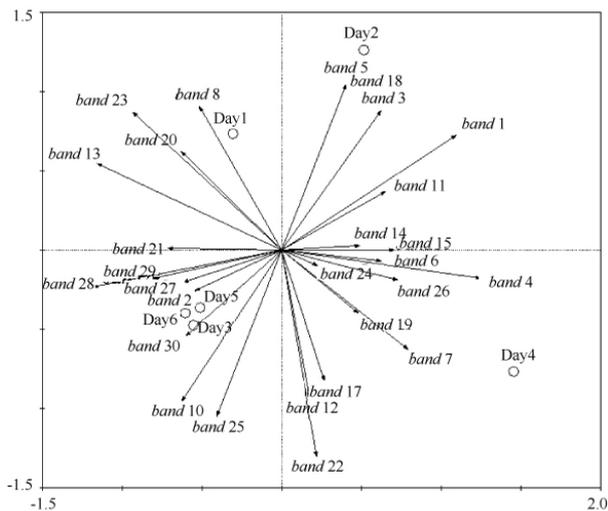


图6 赤潮站点 H2 在 1-6d 内细菌群落结构变化的主成分分析

Fig. 6 Principal component analysis (PCA) of dynamics of bacterial community during six days in bloom site H2.

菌有很大影响。在赤潮开始消退阶段 (Day 4), *Pseudomonas* (band 8)、*Pseudoalteromonas* (band 12) 等是关键菌群。由于 *Pseudoalteromonas* 属细菌的杀藻作用^[32], *Pseudoalteromonas* 属细菌数量增多而造成赤潮藻死亡, 这是赤潮开始消亡的一个十分重要原因。在赤潮消退阶段 (Day 5, 6), *Oleibacter* (band 14)、*Sediminimonas* (band 15)、*Shimia* (band 24) 是关键菌群。Teramoto M^[38] 研究发现 *Oleibacter* 属对海

洋环境中多环芳烃有很好的降解作用。赤潮藻细胞破裂后释放的胞内物质对于 *Oleibacter* 成为优势菌群有一定作用。

将赤潮站点 H2 的样品进行主成分分析, 来分析在赤潮生消过程中站点 H2 细菌菌群结构的变化 (图 6)。在图 6 中, 赤潮刚开始时 (Day 1), *Sediminimonas* (band 23) 对细菌菌群结构有重要影响。在赤潮最严重时 (Day 2, 3), *Actibacter* (band 18) 为优势菌群。在赤潮开始消退时 (Day 4), *Alcanivorax* (band 7)、*Nautella* (band 24)、*Tateyamaria* (band 26) 对细菌菌群结构影响很大。Wu YH 等研究^[39] 认为 *Alcanivorax* 属能够降解有机污染物, 在赤潮消退过程中可能对营养物质的消耗有很大作用。在赤潮消退后 (Day 5, 6), *Pseudoalteromonas* (band 2) 是最为关键的菌群, 主要是 *Pseudoalteromonas* 属细菌的杀藻作用, 与赤潮的消退有很大关系。

根据赤潮站点 A1 和 H2 的细菌菌群主成分分析可知: 在赤潮生消过程中, *Pseudoalteromonas*、*Pseudomonas*、*Alteromonas*、*Hydrogenophaga*、*Actibacter*、*Oleibacter* 等属细菌在菌群变化中起重要的作用。在赤潮开始阶段 *Hydrogenophaga* 属细菌是关键菌群, *Pseudomonas* 和 *Pseudoalteromonas* 属细菌在赤潮生消过程中占有十分重要的地位, 这与它们具有很好的杀藻能力有关, 经常在赤潮消亡阶段成为优势菌群。

3 结论

2011 年 8 月爆发的中肋骨条藻和血红哈卡藻赤潮是由多种优势藻引发的赤潮, 持续时间长, 危害严重。研究表明细菌菌群结构随着赤潮生消有着规律性的变化, 细菌多样性随着赤潮藻数量的增加而增加, 并随着其消亡而降低。在赤潮开始的阶段细菌的菌群结构受到 pH、N/P 的影响很大, 在赤潮的消亡阶段细菌的群落结构受盐度、温度的影响较大。在赤潮生消过程中, *Pseudoalteromonas*、*Pseudomonas*、*Wohlfahrtiimonas*、*Actibacter*、*Oleibacter*、*Hydrogenophaga* 等属在细菌菌群结构中占优势。在赤潮开始阶段, *Hydrogenophaga* 属细菌是关键菌群, *Pseudomonas* 和 *Pseudoalteromonas* 属细菌在赤潮消退阶段处于十分重要的地位。*Shimia*、*Alcanivorax*、*Trabulsiella*、*Tateyamaria* 属在赤潮发生区域的藻际

细菌中处于优势地位, *Wohlfahrtiimonas*、*Actibacter*、*Pseudoalteromonas*、*Sediminimonas*、*Nautella* 属是游离细菌的关键菌群, 藻际细菌与游离细菌既有联系又有区别, 在赤潮生消过程中不断变化。

细菌与藻类的关系密切, 细菌可以抑制藻类的生长, 藻类可以为细菌生长提供营养物质。菌-藻关系的深入研究对有效地预防及治理赤潮有着重要的作用。然而赤潮的发生仍然十分频繁, 其发生机理相当复杂^[40], 因而仍有许多问题值得人们去进一步探讨和解决。

参考文献

- [1] 蓝虹, 许昆灿, 张世民, 刘志勇, 苏荣. 厦门西海域一次中肋骨条藻赤潮与水文气象的关系. 海洋预报 (*Marine Forecasts*), 2004, 21 (4): 93-99.
- [2] 郑天凌, 田蕴, 苏建强, 王艳丽, 连玉武, 洪华生. 海洋赤潮生物与厦门海域几种细菌的生态关系研究. 生态学报 (*Acta Ecologica Sinica*), 2002, 22 (12): 2063-2670.
- [3] 许珠华, 侯建军. 福建沿岸海域赤潮发生特点及防治措施. 台湾海峡 (*Journal of Oceanography In Taiwan Strait*), 2005, 7 (27): 143-150.
- [4] 霍文毅, 俞志明, 邹景忠, 宋秀贤, 郝建华. 胶州湾中肋骨条藻赤潮与环境因子的关系. 海洋与湖沼 (*Oceanologia Et Limnologia Sinica*), 2001, (3): 311-318.
- [5] 洪君超, 黄秀清, 蒋晓山, 王桂兰. 长江口中肋骨条藻赤潮发生过程环境要素分析—营养盐状况. 海洋与湖沼 (*Oceanologia Et Limnologia Sinica*), 1994, 25 (2): 179-184.
- [6] 黄云峰, 冯佳和, 姜胜, 魏鹏, 冯洁婷, 白洁. 广州珠江口海域中肋骨条藻的周年变化及其与环境因子的关系. 生态科学 (*Ecological Science*), 2007, 26 (1): 50-54.
- [7] 周名江, 于仁成. 有害赤潮的形成机制、危害效应与防治对策. 自然杂志 (*Chinese Journal of Nature*), 2007, 29 (2): 72-77.
- [8] Matsubara T, Nagasoe S, Yamasaki Y, Shikata T, Shimasaki Y, Oshima Y, Honjo T. Effects of temperature, salinity, and irradiance on the growth of the dinoflagellate *Akashiwo sanguinea*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2007, 342 (2): 226-230.
- [9] 喻龙, 郝彦菊. 烟台四十里湾一次血红哈卡藻赤潮过程的分析. 海洋科学进展 (*Advances in Marine Science*), 2009, 27 (4): 516-522.
- [10] 苏灵江. 厦门海域血红哈卡藻赤潮的环流形势和水文气象条件分析. 福建水产 (*Journal of Fujian Fisheries*), 2009, 9 (3): 62-66.
- [11] 陈全震, 何德华. 甲藻赤潮对养鲍业的危害及其防治探讨. 水产学报 (*Journal of Fisheries of China*), 2000, 24 (2): 151-155.
- [12] 杜琦, 张友权, 高磊, 钱小明, 许翠娅. 近年福建海域赤潮的特点及防治对策. 福建水产 (*Journal of Fujian Fisheries*), 2002, 12 (4): 32-37.
- [13] 郑天凌, 苏建强. 海洋微生物在赤潮生消过程中的作用. 水生生物学报 (*Acta Hydrobiologica Sinica*), 2003, 27 (3): 291-295.
- [14] 杨小茹, 苏建强, 郑小伟, 周月霞, 田蕴, 宁修仁, 郑天凌. 基于分子技术的 1 株产毒藻藻际细菌多样性分析. 环境科学 (*Chinese Journal of Environmental Science*), 2009, 30 (1): 259-267.
- [15] Jarviea HP, Whittonb BA, Neal C. Nitrogen and phosphorus in east coast British rivers: speciation, sources and biological significance. *Science of The Total Environment*, 1998, 210-211: 79-109.
- [16] 唐尧基, 游文玮, 陈莹, 李耀群. 同步荧光法测定海水中叶绿素 a 的含量. 分析仪器 (*Analytical Instrumentation*), 2004 (3): 24-26.
- [17] Bell RT, Ahlgren GM, Ahlgren I. Estimating production of heterotrophic bacterioplankton via incorporation of tritiated thymidine. *Applied and Environmental Microbiology*, 1983, 45 (6): 1709-1721.
- [18] 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): 707-715.
- [19] 高崇洋, 赵阳国, 王爱杰, 任南琪, 白洁, 田伟君, 张健, 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.
- [20] 颜天, 周名江, 邹景忠, 钱培元. 香港及珠江口海域有害赤潮发生机制初步探讨. 生态学报 (*Acta Ecologica Sinica*), 2001, 21 (10): 1634-1641.
- [21] 黄小平, 黄良民, 谭焯辉, 朱良生. 近海赤潮发生与环境条件之间的关系. 海洋环境科学 (*Marine Environmental Science*), 2002, 21 (4): 63-69.
- [22] 陈雄文, 高坤山. 赤潮藻中肋骨条藻的光合作用对海水 pH 和 N 变化的响应. 水生生物学报 (*Acta Hydrobiologica Sinica*), 2004, 28 (6): 635-639.

- [23] Hansen PJ. Effect of high pH on the growth and survival of marine phytoplankton: implications for species succession. *Aquatic microbial ecology*, 2002, 28 (3) : 279-288.
- [24] 梁爱萍, 姜雪梅. 烟台市赤潮多发海域主要环境因子的变化趋势. 环境污染与防治 (*Environmental Pollution & Control*), 2008, 30(8) : 92-94.
- [25] 刘东艳, 孙军, 陈宗涛, 魏天迪. 不同氮磷比对中肋骨条藻生长特性的影响. 海洋湖沼通报 (*Transactions of Oceanology and Limnology*), 2002 (2) : 39-44.
- [26] Riemann L, Winding A. Community dynamics of free-living and particle-associated bacterial assemblages during a freshwater phytoplankton bloom. *Microbial Ecology*, 2001, 42 (3) : 274-285.
- [27] Fandino LB, Riemann L, Steward GF, Long RA, Azam F. Variations in bacterial community structure during a dinoflagellate bloom analyzed by DGGE and 16S rDNA sequencing. *Aquatic microbial ecology*, 2001, 23 (2) : 119-130.
- [28] González J M, Simó R, Massana R, Covert JS, Casamayor EO, Pedrós-Alió C, Moran MA. Bacterial Community structure associated with a dimethylsulfoniopropionate-producing North Atlantic algal bloom. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66 (10) : 4237-4246.
- [29] Imai I, Fujimaru D, Nishigaki T, Kurosaki M, Sugita H. Algicidal bacteria isolated from the surface of seaweeds from the coast of Osaka Bay in the Seto Inland Sea, Japan. *African Journal of Marine Science*, 2006, 28 (2) : 319-323.
- [30] Du ZJ, Wang J, Yang LJ, Chen GJ. Identification of a marine agarolytic bacterium *Agarivorans albus* QM38 and cloning and sequencing its beta-agarase genes. *Acta Oceanologica Sinica*, 2011, 30(1) : 118-124.
- [31] Morris RM, Rappé MS, Connon SA, Vergin KL, Siebold WA, Carlson CA, Giovannoni SJ. SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature*, 2002, 420 : 806-810.
- [32] Lovejoy C, Bowman JP, Hallegraeff GM. Algicidal effects of a novel marine *Pseudoalteromonas* isolate (Class Proteobacteria, Gamma Subdivision) on harmful algal bloom species of the Genera *Chattonella*, *Gymnodinium*, and *Heterosigma*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 64 (8) : 2806-2813.
- [33] Crump BC, Hopkinson CS, Sogin ML, Hobbie JE. Microbial biogeography along an estuarine salinity gradient: combined influences of bacterial growth and residence time. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 20 (3) : 1494-1505.
- [34] Alfreider A, Vogt C, Hoffmann D, Babel W. Diversity of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large-subunit genes from groundwater and aquifer microorganisms. *Microbial Ecology*, 2003, 45 : 317-328.
- [35] Höfle MG, Haas H, Dominik K. Seasonal dynamics of bacterioplankton community structure in a eutrophic lake as determined by 5S rRNA analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65 (7) : 3164-3174.
- [36] Cunliffe M, Kertesz MA. Effect of *Sphingobium yanoikuyae* B1 inoculation on bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in aged and freshly PAH-contaminated soils. *Environmental Pollution*, 2006, 144 (1) : 228-237.
- [37] Wang XL, Gong LY, Liang SK, Han XR, Zhu CJ, Li YB. Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Harmful Algae*, 2005, 4 (2) : 433-443.
- [38] Teramoto M, Ohuchi M, Hatmanti A, Darmayati Y, Widyastuti Y, Harayama S, Fukunaga Y. *Oleibacter marinus* gen. nov., sp. nov., a bacterium that degrades petroleum aliphatic hydrocarbons in a tropical marine environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61 (2) : 375-380.
- [39] Wu YH, Lai QL, Zhou ZW, Qiao N, Liu CL, Shao ZZ. *Alcanivorax hongdengensis* sp. nov., an alkane-degrading bacterium isolated from surface seawater of the straits of Malacca and Singapore, producing a lipopeptide as its biosurfactant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59 (6) : 1474-1479.
- [40] 郑天凌, 吕静琳, 周艳艳, 苏建强, 杨小茹, 张金龙, 田蕴, 熊小京, 章军, 蔡明刚, 郭东晖, 谢忠. 海洋有害赤潮调控功能菌的发现与研究. 厦门大学自然科学学报 (*Natural Science Journal of Xiamen University*), 2011, 50 (2) : 445-454.

Dynamics of bacterial community during the bloom caused by *Skeletonema costatum* and *Akashiwo sanguinea* in Xiamen sea area

Yi Li^{1,2}, Caiyun Yang^{1,2}, Dong Li³, Yun Tian¹, Tianling Zheng^{1,2*}

¹Key Lab of the Ministry of Education for Coastal and Wetland Ecosystems, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China

²State Key Lab for Marine Environmental Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China

³College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China

Abstract: [Objective] To investigate the dynamics of bacterial community in Xiamen sea during the bloom mainly caused by *Skeletonema costatum* and *Akashiwo sanguinea* in August 2011. [Methods] Bacterial community structures of samples from two bloom sites and one non-bloom site were evaluated by PCR-DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE). The genetic diversity of bacterial community was analyzed based on the DGGE fingerprint. The correlation between bacterial community and environmental parameters was studied by Canoco. [Results] The bacterial community was largely related to pH and N/P during the start-up stage of the bloom; while in the demise stage, it was mostly correlated to salinity and temperature. According to the results of sequence analysis of DGGE dominant bands, Gammaproteobacteria accounted for 47.7% during the bloom and *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Hydrogenophaga*, *Actibacter* and *Oleibacter* were dominant genus in bacterial community. The Shannon-Weaver diversity index showed that the diversity of bacterial community in bloom site increased firstly and then decreased during this bloom. *Hydrogenophaga* was dominant in the start-up stage of bloom, while *Pseudomonas* and *Pseudoalteromonas* were dominant in the demise stage of bloom. The diversity of attached bacteria and free-living bacteria in bloom sites reached maximum in the same day (the concentration of algae was high), both of them changed greatly during the bloom while the environment factors which correlated with the two communities were different. [Conclusion] It is the first report about dynamics of bacterial community during the bloom caused by several algae together. This work is helpful to understand the dynamics of bacterial community during the bloom, and provides a theoretical basis for bloom's control in the future.

Keywords: *Skeletonema costatum*, *Akashiwo sanguinea*, PCR-DGGE, dynamics of bacterial community, bacterial diversity

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Nature Science Foundation (40930847, 31070442)

* Corresponding author. Tel: +86-592-2183217; E-mail: microzh@xmu.edu.cn

Received: 8 April 2012/Revised: 21 May 2012