

秦皇岛新开河河口邻近海域细菌多样性及其影响因子

周霜艳^{1Δ} 陈小娜^{1Δ} 崔磊² 宋智泉¹ 李正斌¹ 张赛¹
张建乐³ 张永丰³ 吕颂辉² 汪光义^{1*}

- (1. 天津大学环境学院天津大学海洋生态环境研究中心 天津 300072)
(2. 暨南大学赤潮与海洋生物学研究中心 广东 广州 510632)
(3. 国家海洋局秦皇岛海洋环境监测中心站 河北 秦皇岛 066002)

摘要:【目的】分析秦皇岛新开河河口及其邻近海域 3 个站位的细菌多样性, 了解入海口污染对微生物多样性的影响, 为该海域微生物的生态功能研究提供理论基础。【方法】于 2014 年 8 月选取秦皇岛新开河入海河口(XKH)及其邻近海域(W1, W2)共 3 个站位采集水样, 采用荧光显微镜计数以及构建 16S rRNA 基因克隆文库的方法, 分析细菌群落结构多样性与海水环境条件的关系。【结果】邻近海域 W1 站位的细菌总数(2.62×10^6 cells/mL)和多样性均高于新开河河口 XKH 站位(细菌总数: 6.62×10^5 cells/mL)和 W2 站位(细菌总数: 2.02×10^6 cells/mL); 从 XKH、W1、W2 3 个站位的 16S rRNA 基因克隆文库中分别获得 57、89、87 条有效序列, 按 97% 的序列相似性分别划分为 46、51、56 个 OTU, 分别属于 Proteobacteria、Cyanobacteria、Bacteroidetes、Firmicute、Actinobacteria、Planctomycetes 和 Verrucomicrobia 七个门。其中在 XKH 和 W2 站位中, Proteobacteria 门的克隆子分别占总克隆数的 50.9% 和 75.9%, 是最优势的类群, 分属于 Alphaproteobacteria、Betaproteobacteria、Gammaproteobacteria、Deltaproteobacteria 和 Epsilonproteobacteria 纲; 在 W1 站位中, Cyanobacteria 门的克隆子占总克隆数的 38.2%, 是该站位的最优势类群, 这些优势类群可通过利用水体中的氮等营养来调节水体生态环境。影响细菌群落分布的环境因子主要为溶解氧、pH 和氮营养盐。【结论】秦皇岛新开河河口及其邻近海域的细菌具有丰富的多样性, 处于河口海域过渡带的水样具有更高的多样性, 细菌群落多样性的分布受氮营养盐的影响更为显著。

关键词: 秦皇岛, 河口, 细菌多样性, 环境因子

Foundation item: Comprehensive Remediation Program of Near shore Marine Environment for Beidaihe and Adjacent Areas-2012 Security Engineering Projects (No. 2013E2-0003); Evaluation Program of Marine Environmental Conditions of Qinhuangdao with a Focus on the Current Situation in Pollution and the Distribution of Pathogenic Microbes (No. 2013E2-0010)

*Corresponding author: E-mail: gywang@tju.edu.cn

^ΔThese authors equally contributed to this work

Received: January 09, 2016; **Accepted:** March 11, 2016; **Published online** (www.cnki.net): March 14, 2016

基金项目: 北戴河及相邻地区近岸海域综合整治-2012 年海洋环境保障工程项目(No. 2013E2-0003); 秦皇岛海域病原菌现状和污染物调查项目(No. 2013E2-0010)

*通讯作者: E-mail: gywang@tju.edu.cn

^Δ共同第一作者

收稿日期: 2016-01-09; 接受日期: 2016-03-11; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-03-14

Impacts of environmental factors on bacterial diversity of Xinkai river estuary in the coastal area of Qinhuangdao

ZHOU Shuang-Yan^{1Δ} CHEN Xiao-Na^{1Δ} CUI Lei² SONG Zhi-Quan¹ LI Zheng-Bin¹
ZHANG Sai¹ ZHANG Jian-Le³ ZHANG Yong-Feng³ LÜ Song-Hui² WANG Guang-Yi^{1*}

(1. Center for Marine Environmental Ecology, School of Environmental Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

(2. Research Center for Harmful Algae and Marine Biology, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China)

(3. Qinhuangdao Marine Environmental Monitoring Central Station, SOA, Qinhuangdao, Hebei 066002, China)

Abstract: [Objective] The goal of this study is to reveal the dynamics of bacterial communities and their relationship with environmental variables through analysis of 16S rRNA gene clone libraries derived from the three stations of Xinkai River estuary for better understanding the ecological functions of this region. [Methods] In August 2014, water samples were collected from 3 stations of Xinkai River estuary (XKH) area and its adjacent water in the coast of Qinhuangdao. Bacterial abundance was estimated using a fluorescence microscope and 16S rRNA gene clone libraries derived from the total bacterial DNA of the water samples. [Results] Total number of bacteria (2.62×10^6 cells/mL) and diversity of station W1 were higher than that of Xinkai River estuary XKH station (6.62×10^5 cells/mL) and the station W2 (2.02×10^6 cells/mL); 16S rRNA gene clone libraries of the stations XKH, W1, and W2 yielded 46, 51 and 56 OTUs, respectively. Those OTUs belonged to the members of 7 different bacterial phyla: Proteobacteria, Cyanobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Planctomycetes and Verrucomicrobia. Proteobacteria was the predominant taxa in the clone libraries of the stations XKH (50.9%) and W2 (75.9%). On the other hand, members of Cyanobacteria were the predominant taxa (38.2%) in the station W1. These dominant groups were closely related to availability of nitrogen and other nutrients of water column. The environmental factors, which affected the distribution of bacterial communities, were dissolved oxygen, pH and nitrogen nutrients. [Conclusion] Xinkai River estuary and its adjacent seawater contained rich bacterial diversity. Particularly, the water samples from the transition zone between the estuary and the sea harbored much higher bacterial diversity. Distribution of bacterial communities was largely regulated by nitrogen nutrients.

Keywords: Qinhuangdao, Estuary, Bacterial diversity, Environmental factors

海洋微生物作为海洋的主要初级生产者, 种类繁多, 它们能够耐受海洋特有的高盐、高压、低营养、低光照等极端条件, 因而在物种、代谢和生态功能上具有更高的多样性^[1]。另一方面, 微生物代谢较快, 其数量和分布受诸多因素的影响, 例如海洋的理化性质、生物因素、陆源输入等^[2-3], 对海洋微生物群落结构及其组成的研究可以更好地了解海洋环境的变化以及海洋微生物的功能和作用。

细菌是海洋生态系统中的一个重要组成部分, 在海洋生态系统的能量流动、物质循环、元素转化、生态平衡及环境净化等方面起着举足轻重的作用。当水体条件发生改变时, 细菌的种类、数量及种群结构也呈现相应的改变, 这些变化可以用来表征海

洋环境质量的变化^[4-5]。例如日本生态学环境问题专门委员会^[6]认为可培养细菌总数代表海域受有机污染程度, 菌数与有机物浓度呈正相关, 并认为总菌数、活菌数或者两者之比值同海洋的污染、富营养化程度有很大关系。

河口区生态系统的特点之一就是有明显的盐度梯度, 同时承受着陆源排水所带来的高浓度的营养盐和有机质, 在该区域河流淡水与海水逐渐混合, 加上潮汐交替等的影响, 形成了独特的生存环境。随着河口的盐度变化, 淡水和海水中的微生物受到了环境条件变化的影响, 导致了物种组成、多样性、生物量和活性的差异^[7-9]。

近岸海域是人类赖以生存的主要环境区域之

一,受人类活动影响较大,生态系统非常脆弱。人类在开发利用近岸海域的过程中必然会影响到近岸海域的环境。秦皇岛是中国北方著名的港口城市,是我国重要的能源输出口岸和滨海旅游城市,新开河是秦皇岛境内的入海河流,入海口附近有一个小型港口码头。本研究着重研究分析了新开河河口区及其邻近海域细菌多样性分布,以及影响细菌多样性分布的环境因子。此前对秦皇岛河口及邻近海域细菌多样性的研究相对较少,王丽平等^[10]研究了秦皇岛褐潮暴发时期敏感海域细菌的种群特征,李佳霖等^[11]研究了秦皇岛近海养殖对潮间带微生物群落多样性的影响,杜利强等^[12]研究了秦皇岛海洋生物资源保护与可持续利用。然而,在河口及其邻近海域细菌多样性分布及其影响因子方面却没有较为深入的研究。本研究结果将丰富秦皇岛新开河河口及其邻近海域的微生物数据,得到影响新开河河口及其邻近海域细菌多样性分布的环境因子,对进一步改善该区域河流和海洋环境提供数据基础,并对这一区域微生物资源的开发与利用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 样品的采集与前处理

2014年8月用无菌玻璃瓶采集秦皇岛新开河河口(XKH)及邻近海域2个站位(W1,W2)的水样,站位分布如图1所示,经纬度见表1,其中XKH站位位于新开河入海口,邻近一小型码头,W1站位为距新开河河口约5海里的位置,W2站位处于距岸约15海里的位置,可作为相对于W1站位几乎未受河流影响的海洋样品对照。取样后,现场用便携式YSI测定水样的pH、温度、溶解氧、盐度,部分水样立即用无菌无颗粒甲醛现场固定,其余水样保存于无菌玻璃瓶中。每个采样点各采集水样2 L 4 °C保温箱运回实验室,运到实验室后,24 h内对这部分水样样品用孔径为0.22 μm的微孔滤膜进行过滤,每张滤膜过滤水样500 mL,将滤膜保存于-80 °C用于后续DNA提取;同时按照《海洋调查规范》(GB/T 12763.4-2007)测定各水样中的总氮、

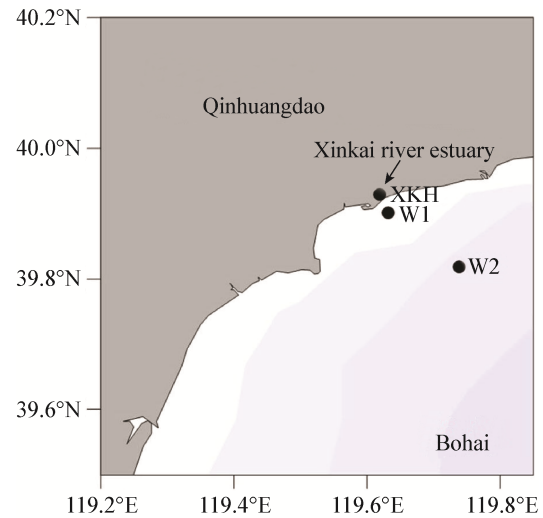


图1 采样站位图

Figure 1 Map of sampling site

表1 采样站位坐标		
Table 1 Coordinates of sampling stations		
站位	经度	纬度
Station	Longitude (°E)	Latitude (°N)
XKH	119.6192	39.9294
W1	119.6319	39.9019
W2	119.7382	39.8193

总磷、氨氮、硝氮、亚硝态氮和叶绿素 a 含量。

1.2 主要试剂、仪器及培养基

(1) 主要试剂:SYBR Gold 荧光染料、SYBR Select Master Mix for CFX 购于英潍捷基(上海)贸易有限公司;Taq DNA 聚合酶、DNA 胶回收试剂盒、pMD18-T 载体、氨苄青霉素购于天根生化科技(北京)有限公司;DNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒购于美国 Omega Bio-tek 公司。

(2) 主要仪器:Nikon ECLIPSE Ni 研究级正置荧光显微镜,尼康仪器(上海)有限公司;Bio-Rad S1000 Thermal Cycler PCR 仪、Bio-Rad CFX Connect Real-Time System 实时荧光定量 PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司。

(3) LB 培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0,酵母提取物 5.0,NaCl 10.0。固体培养基加入 1.5% (质量体积比)的琼脂粉。

1.3 细菌总数的统计

细菌总数采用改进的荧光显微镜直接计数法^[13-14]:用移液管取 1 mL 已摇匀的甲醛固定后的

海水样品, 真空抽滤到黑色微孔滤膜(Nuclepore filter ,0.22 μm ,25 mm diameter)上,加入 SYBR Gold 染色液避光染色 15 min, 取下滤膜置于干净载玻片上,有菌一面向上,滴加荧光保护剂。荧光显微镜蓝色激发光和油镜条件下对亮绿色的细菌进行观察,随机均匀选取 10 个视野对被染色的细菌个体进行计数统计。细菌丰度计算公式为:

$$\text{细菌丰度} = A \times S_1 / (S_2 \times V)^{[15]}$$

其中, A 表示所有视野中的细菌平均数, S_1 表示滤膜有效过滤面积, S_2 表示视野面积, V 表示过滤水样体积。

1.4 DNA 的提取、克隆文库的构建及分析

对 XKH、W1、W2 三个站点的水样滤膜采用 E.Z.N.A.TM Water DNA Kit 试剂盒(Omega, USA)按说明书提取样品 DNA, 选择细菌的 16S rRNA 基因的通用引物^[16]27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')对样品 DNA 进行 PCR 扩增。采用 25 μL 扩增反应体系: PCR mix 10 μL 稀释 100 倍的模板 DNA 1 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 引物各 1 μL , 1.0 U *Taq* DNA 聚合酶, ddH₂O 补足至 25 μL 。PCR 扩增程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后进行切胶回收纯化, 纯化后连接至 pMD18-T 载体转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 然后涂布于含有氨苄青霉素

(25 mg/L)的 LB 固体培养基培养进行假阳性检测, 获得阳性克隆子构建 16S rRNA 基因克隆文库。从 XKH 站位的 16S rRNA 基因克隆文库中随机挑选 60 个阳性克隆子, 从 W1、W2 站位的 16S rRNA 基因克隆文库中随机挑选 90 个克隆子进行 PCR 扩增, 扩增产物送去华大基因科技有限公司测序。

测序获得的序列结果用 Mothur 软件进行分析, 根据 97% 的相似性将 3 个站位的 16S rRNA 基因序列划分为不同的 OTU (Operational taxonomic unit), 并将随机挑选每个 OTU 的代表序列与 NCBI 数据库中的序列比对后进行门到属水平的分类; 计算每个文库的多样性指数、丰富度指数和文库覆盖率。

1.5 定量 PCR 实验

基于克隆文库分析鉴定结果, 选取优势菌门(纲)进行定量 PCR 实验。以提取的某采样点的 DNA 作为模板, 分别用表 2 中引物进行 PCR 扩增, 以 ddH₂O 为模板作为阴性对照。

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后切胶回收纯化, 将纯化后的 DNA 连接至 pMD18-T 载体, 导入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 涂布于含有氨苄青霉素(25 mg/L)的 LB 选择平板上培养后筛选阳性克隆, 将阳性克隆对应的菌液在含有氨苄青霉素(25 mg/L)的 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养。用 E.Z.N.A. Plasmid Midi Kit 试剂盒(Omega, USA)提取质粒作为标准模板, 提取完成后测出质粒浓度, 并计算其拷贝数。

表 2 Q-PCR 引物
Table 2 Primers of Q-PCR

菌门 (纲) Phylum (Class)	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	退火温度 Annealing temperature ($^{\circ}\text{C}$)	参考文献 References
α -Proteobacteria	Eub338F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	60.0	[17]
	Alf685R	TCTACGRATTCACCYCTAC	60.0	[18]
β -Proteobacteria	Eub338F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	60.0	[17]
	Bet680R	TCACTGCTACACGYG	60.0	[19]
Cyanobacteria	Cya106F	CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA	60.0	[20]
	Cya359R	CCCATTGCGGAARATTCCCC	60.0	[20]
Actinobacteria	Act235F	CGCGCCTATCAGCTTGTTG	60.0	[21]
	Eub518R	ATTACCGCGGCTGCTGG	60.0	[22]
Bacteroidetes	Bac798F	CRAACAGGATTAGATACCCT	61.5	[23]
	Bac967R	GGTAAGGTTCCCTCGCGTAT	61.5	[23]
Firmicutes	Fir928F	TGAAACTYAAAGGAATTGACG	61.5	[23]
	Fir1040R	ACCATGCACCACCTGTC	61.5	[23]

以各采样点的 DNA 样品为模板,同时将标准质粒模板梯度稀释(10^1-10^5)后分别作为模板,用表 2 引物分别进行 qPCR 实验,每个样品重复 3 次。反应体系为:DNA 模板(2.8–10.5 ng/ μ L) 1 μ L, SYBR Select Master Mix 10 μ L, 正向引物 (10 μ mol/L) 1 μ L, 反向引物(10 μ mol/L) 1 μ L, ddH₂O 补足至 20 μ L; 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 55 s; 95 $^{\circ}$ C 20 s, 60 $^{\circ}$ C 35 s (各引物退火温度见表 2), 72 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。根据标准质粒模板稀释的倍数及其拷贝数,对定量实验数据进行标准曲线的构建,根据标准曲线最终计算出各个待测样品中各菌门的拷贝数。

用 Canoco 5 软件对定量实验数据结果与测得的环境因子做基于 PCA (Principal Component Analysis)的物种-环境双序图,将环境变量排序后投影在 PCA 分析图上,分析各菌门与环境因子之间的关系。

2 结果与分析

2.1 细菌总数统计结果

秦皇岛新开河河口及其邻近海域细菌总数如图 2 所示,新开河河口 XKH 站位的细菌总数为 $(6.62\pm 2.55)\times 10^5$ cells/mL,其邻近海域 W1 站位的细菌总数为 $(2.62\pm 0.31)\times 10^6$ cells/mL, W2 站位细菌总数为 $(2.02\pm 0.35)\times 10^6$ cells/mL, W1 站位的细菌总数远远多于新开河河口 XKH 站位,也较离岸较远的 W2 站位多。文献[24]显示当水体有污染物(工业废水、生活污水、污水处理厂废水等)排入时,细菌处在一个营养状态不稳定及繁殖或死亡变化较大的状态下,其总数不能维持在一定水平,变化较大,所以推测处于新开河河口与其邻近海域的交替区域的 W1 站位因接受了新开河河口的排污,导致该区域营养盐变丰富,而且该区域温度适宜,同时促进了适应淡水与海水环境细菌的大量繁殖。

2.2 细菌多样性

从 XKH、W1、W2 三个站位的 16S rRNA 基因克隆文库中随机挑选阳性克隆子进行测序后,分别获得 57、89、87 条有效序列,用 Mothur 软件在

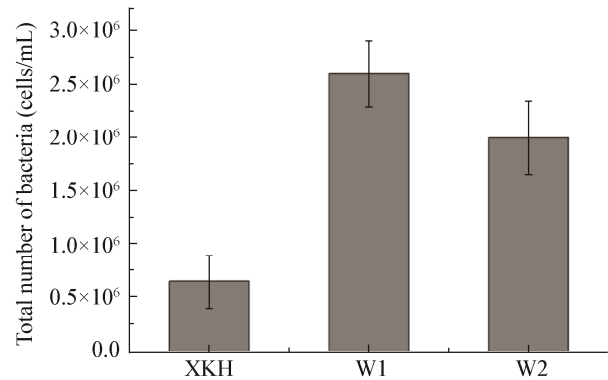


图 2 秦皇岛新开河河口及其邻近海域细菌总数统计结果
Figure 2 The results of total bacteria in Qinhuangdao Xinkai River estuary and its adjacent sea

97%的序列相似性水平上划分 OTU, 分别划分为 46、51、56 个 OTU, 基于 OTU 水平计算了 3 个站位的 Simpson 指数、Shannon-Weiner 指数、Chao1 指数、ACE 指数和文库覆盖率(表 3), 从每个 OTU 中随机挑选一条代表性序列, 在 GenBank 中分别寻找到最相似序列(表 4)。多样性指数、丰富度指数和覆盖率的计算结果表明 XKH、W1、W2 三个站位的 16S rRNA 基因克隆文库均具有丰富的多样性, W1 站位克隆文库的多样性和丰富度最高, XKH 站位次之, 而 W2 站位的克隆文库覆盖率最大。

位于新开河河口的 XKH 站位的 57 条有效序列分属于 4 个门 7 个纲 Proteobacteria 门(Alphaproteobacteria

表 3 XKH、W1、W2 三个站位 16S rRNA 基因克隆文库的多样性及丰富度指数

Table 3 Biodiversity and predicted richness of 16S rRNA gene clone libraries of stations XKH, W1, W2

项目 Item	站点 Station		
有效序列数 Number of valid sequences	57	89	87
OTU 数 Number of OTUs	46	51	56
Simpson index	0.016	0.032	0.018
Shannon-Weiner index	3.751	3.674	3.889
Chao1 index	120.228	141.367	91.061
ACE index	146.917	246.207	104.063
覆盖率 Coverage	0.351	0.595	0.598

纲、Betaproteobacteria 纲和 Gammaproteobacteria 纲), Bacteroidetes 门 (Bacteroidia 纲、Flavobacteriia 纲), Firmicutes 门 Clostridia 纲, Verrucomicrobia 门 Verrucomicrobiae 纲, 其中 Proteobacteria 门占 52.6%, 其次为 Bacteroidetes 门占 17.5%, Firmicutes 门和 Verrucomicrobia 门分别占 1.8%, 还有 26.3% 为 Unclassified 类群(图 3)。

位于新开河河口邻近海域的 W1 站位的 89 条有效序列分属于 6 个门 13 个纲: Cyanobacteria 门 (Synechococcophycidae 纲和 Chloroplas 纲), Proteobacteria 门 (Alphaproteobacteria 纲、Betaproteobacteria 纲、Gammaproteobacteria 纲和 Deltaproteobacteria 纲), Bacteroidetes 门 (Saprospirae 纲、Rhodothermi 纲和 Sphingobacteriia 纲), Firmicutes 门 Bacilli 纲, Actinobacteria 门 (Actinobacteria 纲和 Acidimicrobiia 纲), Planctomycetes 门 Planctomycetia 纲, 其中 Cyanobacteria 门占 38.2%, 其次为 Proteobacteria 门占 24.7%, Bacteroidetes 门占 9.0%, Actinobacteria 门占 5.6%, Firmicutes 门占 3.4%, Planctomycetes 门占 2.2%, 还有 16.9% 为 Unclassified 类群(图 3)。

位于离新开河河口较远海域的 W2 站位的 87 条有效序列分属于 5 个门 10 个纲: Cyanobacteria 门 (Synechococcophycidae 纲和 Chloroplas 纲), Proteobacteria 门 (Alphaproteobacteria 纲、Betaproteobacteria 纲、Gammaproteobacteria 纲和 Epsilonproteobacteria 纲), Bacteroidetes 门 Flavobacteriia 纲, Firmicutes 门 (Bacilli 纲和 Clostridia 纲), Actinobacteria 门 Acidimicrobiia 纲, 其中 Proteobacteria 门占 75.9%, 其次为 Bacteroidetes 门占 5.7%, Cyanobacteria 门占 4.6%, Firmicutes 门占 3.4%, Actinobacteria 门占 1.1%, 还有 9.2% 为 Unclassified 类群(图 3)。

对比 3 个站位的 16S rRNA 基因克隆文库在门水平的分布结果发现: (1) W1 站位与 W2 站位较 XKH 站位多了 Cyanobacteria 门和 Actinobacteria 门

类群, 推测这两个类群细菌主要活跃于营养盐更丰富的近岸海域; (2) XKH 站位较 W1 站位和 W2 站位多了 Verrucomicrobia 门类群, 文献曾报道在研究夏季湖光岩玛珥湖浮游细菌多样性时发现, Verrucomicrobia 门类群细菌是湖光岩玛珥湖浮游细菌的仅次于 Proteobacteria 门类群的次级优势类群^[25], 而海洋检测出来的则较少, 可推测这个类群细菌主要生存于淡水环境中; (3) W1 站位较 W2 站位多了 Planctomycetes 门类群, 可推测 W1 站位受了河流入海口污染物的影响, 水体环境发生了改变, 提供了适宜该类群细菌生存的条件; (4) 在 W1 站位 Cyanobacteria 门和 Proteobacteria 门类群含量均较高, 在 XKH 站位除了 Proteobacteria 门类群含量较高外, Bacteroidetes 门类群也占有一定优势, 而在 W2 站位, Proteobacteria 门类群属于绝对优势类群, 其他类群相对较少, 表明 Cyanobacteria 门类群细菌主要活跃于近岸海域, Proteobacteria 门类群细菌不管在河流入海口还是近远海都属于绝对优势类群。

在 XKH 站位的克隆文库中, 这些序列的最相似序列大多数来自于河口、海洋、湖泊等类似环境, 如中国台湾淡水河口、湘江河口、青藏高原湖泊、北京永定河和日本荒子河及印度洋等; 有些则来自于比较特殊的环境, 如污水处理厂的活性污泥、矿井沉积物和排污水、种植土壤、粪肥、烃污染沉积物、养殖水、微生物燃料电池等, 可见秦皇岛新开河在流入渤海的过程中, 接受了各种各样随着排污而带来的不同功能性的细菌, 从而影响到其邻近海域的海洋环境及微生物多样性。在这些 OTU 中, 丰度最高的 OTU01 与 GenBank 中一株三价砷氧化菌 *Acidovorax* sp. enrichment culture clone KWE55-19 (JQ670734.1) 具有 99% 的相似性; 丰度仅次于 OTU01 的 OTU06 与 GenBank 中一株可有效降解萘的菌株 *Hydrogenophaga atypica* strain BSB 41.8 (NR_029023.1) 也具有 99% 的相似性。

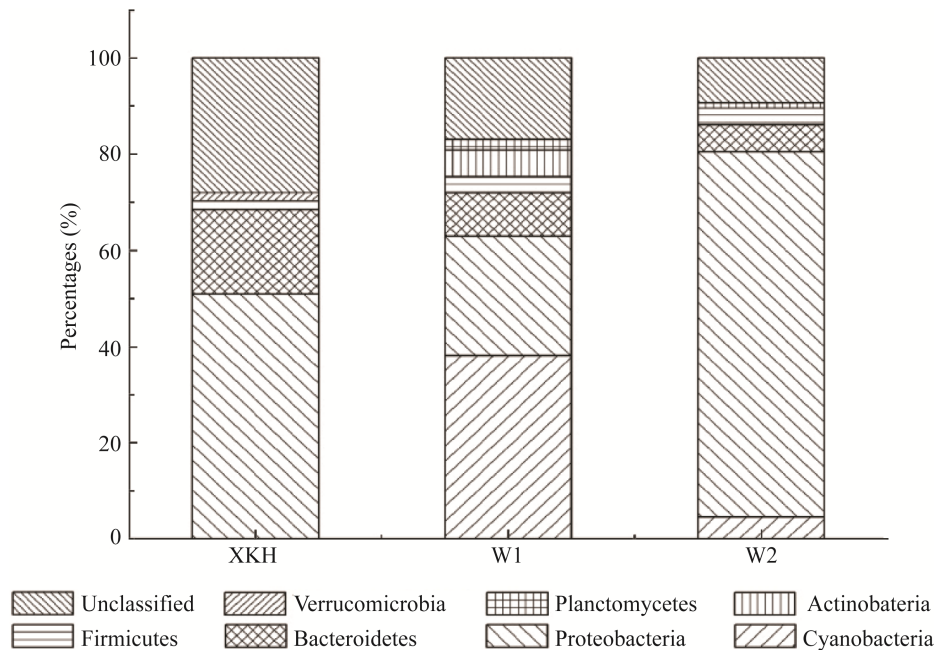


图3 XKH、W1、W2 三个站点 16S rRNA 基因克隆文库在门水平的分布情况

Figure 3 Taxonomic distribution of 16S rRNA gene clone libraries of the stations XKH, W1, W2 on the level of phylum

注：(1) XKH station: Proteobacteria (52.6%), Bacteroidetes (17.5%), Firmicutes (1.8%), Verrucomicrobia (1.8%), Unclassified (26.3%). (2) W1 station: Cyanobacteria (38.2%), Proteobacteria (24.7%), Bacteroidetes (9.0%), Firmicutes (3.4%), Actinobacteria (5.6%), Planctomycetes (2.2%), Unclassified (16.9%). (3) W2 station: Proteobacteria (75.9%), Bacteroidetes (5.7%), Cyanobacteria (4.6%), Firmicutes (3.4%), Actinobacteria (1.1%), Unclassified (9.3%).

在 W1 站位的克隆文库中，丰度排名前四的 OTU01、OTU02、OTU03、OTU04 均属于 Cyanobacteria 门，它们的最相似序列分别来自于红海、日本 Suigetsu 湖、印尼万鸦老湾、太平洋，并且 OTU01、03、04 的最相似序列(相似性均达 99%)都属于 *Synechococcus* 属，该属是海洋蓝细菌的代表性类群之一，是全球碳循环的主要参与者和初级生产力的主要贡献者之一；OTU12 和 OTU41 均属于 Bacilli 纲，其中 OTU12 的最相似序列来自于极端环境北极海冰，表明该 OTU 的细菌可能具有较强的耐寒性，而 OTU41 的最相似序列属于肠道细菌，推测该 OTU 的细菌可能是随着接受了沿岸排污的新开河流入海洋的，OTU25 属于 Actinobacteria 纲，最相似序列来自于船舶压舱水，而在新开河河口就有一个小型码头，出现在 W1 站位的该 OTU 的细菌可能来自于新开河河口；此外，OTU17 的细菌与 GenBank 中一株海洋嗜甲基菌 *Methylophilaceae* bacterium NB0095 (KP770106.1)

具有 100%相似性。

在 W2 站位的克隆文库中，有 25 个 OTU 来自 Alphaproteobacteria 纲的不同细菌类群，处于绝对优势地位，丰度较高的 OTU01、OTU02、OTU03、OTU04、OTU05、OTU06 分属于 *Rhodobacteraceae* 科、*Lutimaribacter* 属、*Anaerospora* 属、*Marivita* 属、*Donghicola* 属，其中 OTU02 的细菌最相似序列(相似性达 99%)来自一株海洋乙酸环己酯降解菌 *Lutimaribacter litoralis* strain KU5D5 (NR_113362.1)，OTU05 的最相似序列(99%相似性)来自一株印尼海水中的烃降解菌，OTU09 与一株来自黄海原油污染的海水中的石油降解菌 *Thioclava pacifica* strain DL5-4 (KF146513.1)具有 100%相似性。除此之外，还有几个 OTU 的最相似序列也来自于石油污染过的海水、沉积物或是土壤，这表明 W2 站位的海水曾受到石油污染。

此外，在 3 个站点中还发现了大量未被分类的细菌种类，这些种类细菌的特征及其作用也值得进行进一步的深入探索。

表 4 16S rRNA 基因序列相似性比对
Table 4 Comparison of the 16S rRNA gene sequences

站位 Station	OTU 编号 OTU No.	含序列数 Number of sequences	最相似的序列及其登录号 Closest relative and its accession No.	相似度 Sequence similarity (%)
XKH	OTU01	4	<i>Acidovorax</i> sp. enrichment culture clone KWE55-19 16S ribosomal RNA gene JQ670734.1	99
	OTU02	2	Uncultured Burkholderiales bacterium clone DS075 16S ribosomal RNA gene DQ234159.2	99
	OTU03	2	<i>Thermomonas fusca</i> 16S rRNA gene AJ519988.1	99
	OTU04	2	Uncultured bacterium clone E23 16S ribosomal RNA gene EU864445.1	99
	OTU05	2	Uncultured bacterium clone Z-56 16S ribosomal RNA gene FJ901114.1	92
	OTU06	2	<i>Hydrogenophaga atypica</i> strain BSB 41.8 16S ribosomal RNA gene NR_029023.1	99
	OTU07	2	Uncultured beta proteobacterium clone F-49 16S ribosomal RNA gene HQ132426.1	99
	OTU08	2	Uncultured bacterium clone C85 16S ribosomal RNA gene KJ808082.1	99
	OTU09	2	Uncultured <i>Aquabacterium</i> sp. clone 4e6 16S ribosomal RNA gene KM263172.1	99
	OTU10	1	Uncultured bacterium clone CSbiofilm_14_040210_B08 16S ribosomal RNA gene KC605367.1	99
	OTU11	1	Uncultured bacterium clone 212ds20 16S ribosomal RNA gene AY212659.1	97
	OTU12	1	Uncultured bacterium clone KPF1-111 16S ribosomal RNA gene KF269988.1	100
	OTU13	1	<i>Dokdonella fugitiva</i> strain A3 16S ribosomal RNA gene NR_042397.1	98
	OTU14	1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA AB622788.1	96
	OTU15	1	Uncultured Bacteroidetes bacterium gene for 16S rRNA AB723846.1	99
	OTU16	1	Uncultured Rikenellaceae bacterium clone BEMB11B-2C1 16S ribosomal RNA gene KJ955676.1	98
	OTU17	1	Uncultured <i>Cloacibacterium</i> sp. clone SFeB41 16S ribosomal RNA gene JQ723622.1	98
	OTU18	1	<i>Hydrogenophaga</i> sp. p3(2011) 16S ribosomal RNA gene HQ652595.1	96
	OTU19	1	Uncultured bacterium clone AGS-HB5-3 16S ribosomal RNA gene HQ403246.1	94
	OTU20	1	Uncultured <i>Flavobacterium</i> sp. clone XZTSH72 16S ribosomal RNA gene EU703375.1	96
	OTU21	1	Uncultured <i>Catellibacterium</i> sp. clone 6IISN 16S ribosomal RNA gene EU887785.1	94
	OTU22	1	Uncultured bacterium clone S-7 16S ribosomal RNA gene HQ132444.1	98
	OTU23	1	Uncultured <i>Porphyromonas</i> sp. gene for 16S ribosomal RNA LC003613.1	97
	OTU24	1	Uncultured Bacteroidetes bacterium gene for 16S rRNA AB478923.1	99
	OTU25	1	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone TS-42-9 16S ribosomal RNA gene GQ406181.1	96
	OTU26	1	<i>Novosphingobium</i> sp. A2-440 16S ribosomal RNA gene KF441613.1	84
	OTU27	1	Uncultured <i>Cloacibacterium</i> sp. clone NJFU_SLX-S131 16S ribosomal RNA gene KJ127995.1	99
	OTU28	1	Uncultured soil bacterium PBS-21 partial 16S rRNA gene AJ390461.1	88
	OTU29	1	Cloning vector p7S6 EU541493.1	80
	OTU30	1	<i>Flavobacterium suncheonense</i> strain F19S2 16S ribosomal RNA gene KJ635873.1	99
	OTU31	1	Uncultured Burkholderiales bacterium clone DS075 16S ribosomal RNA gene DQ234159.2	99
	OTU32	1	Uncultured Betaproteobacteria bacterium 16S rRNA gene from clone QEDN8CE01 CU925414.1	99
	OTU33	1	Uncultured bacterium clone DR938CH110701SACH52 16S ribosomal RNA gene DQ230968.1	93
	OTU34	1	Uncultured beta proteobacterium clone AKYH610 16S ribosomal RNA gene AY922140.1	99
	OTU35	1	Uncultured <i>Rhodocycylus</i> sp. clone R15-1 16S ribosomal RNA gene JF808917.1	97
	OTU36	1	Uncultured bacterium clone A15 16S ribosomal RNA gene KC682888.1	92

(待续)

(续表)

	OTU37	1	Uncultured <i>Thermomonas</i> sp. clone b2-134 16S ribosomal RNA gene	JX575839.1	95
	OTU38	1	<i>Xanthomonas</i> sp. P2-12-1 partial 16S rRNA gene	AM490086.1	96
	OTU39	1	Uncultured Alphaproteobacteria bacterium 16S rRNA gene from clone QEDV1DA11	CU919428.1	98
	OTU40	1	<i>Paracoccus</i> sp. DSG13 partial 16S rRNA gene	AM275338.2	98
	OTU41	1	Uncultured Alphaproteobacteria bacterium 16S rRNA gene from clone QEDT2AB09	CU920741.1	100
	OTU42	1	Uncultured bacterium clone HZNBL-B2 16S ribosomal RNA gene	EU591641.1	91
	OTU43	1	Uncultured <i>Flavobacterium</i> sp. clone BC031 16S ribosomal RNA gene	KC166702.1	99
	OTU44	1	Uncultured bacterium clone S75 16S ribosomal RNA gene	KR095247.1	99
	OTU45	1	Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone AKYH1486 16S ribosomal RNA gene	AY922120.1	95
	OTU46	1	Uncultured bacterium clone NBDTU25 16S ribosomal RNA gene	FJ529945.1	94
W1	OTU01	7	<i>Synechococcus</i> sp. RS9920 16S ribosomal RNA gene	AY172830.1	99
	OTU02	6	<i>Synechococcus</i> sp. NIBB 1071 genes for 16S rRNA	AB610896.1	99
	OTU03	6	Uncultured <i>Cyanobacterium</i> sp. clone XE2C09 16S ribosomal RNA gene	JN596608.1	99
	OTU04	5	<i>Synechococcus</i> WH8101 16S ribosomal RNA gene	AF001480.1	99
	OTU05	4	Uncultured alpha proteobacterium clone D13W_116 16S ribosomal RNA gene	HM057770.1	100
	OTU06	4	Uncultured alpha proteobacterium clone CB22G04 16S ribosomal RNA gene	EF471521.1	99
	OTU07	3	<i>Synechococcus</i> sp. RS9909 16S ribosomal RNA gene	AY172819.1	99
	OTU08	3	Uncultured Sphingobacteria bacterium clone IMS2R19 16S ribosomal RNA	JN233042.1	99
	OTU09	3	Uncultured cyanobacterium clone O-30-15 16S ribosomal RNA gene	KF827264.1	99
	OTU10	2	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone CB11B01 16S ribosomal RNA gene	EF471452.1	99
	OTU11	2	Uncultured Rhodobacteraceae bacterium clone S2-10-053 16S ribosomal RNA gene	KF787075.1	98
	OTU12	2	<i>Oceanobacillus</i> sp. BSi20641 16S ribosomal RNA gene	EU330342.1	99
	OTU13	2	Uncultured actinobacterium clone CB22F01 16S ribosomal RNA gene	EF471475.1	99
	OTU14	2	Uncultured Rhodobacteraceae bacterium clone DS163 16S ribosomal RNA gene	DQ234245.2	99
	OTU15	2	Uncultured alpha proteobacterium HF0010_30A23 genomic sequence	GU474853.1	99
	OTU16	1	Uncultured actinobacterium clone PLF63 16S ribosomal RNA gene	EU930648.1	96
	OTU17	1	Methylophilaceae bacterium NB0095 16S ribosomal RNA gene	KP770106.1	100
	OTU18	1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA	AB622789.1	97
	OTU19	1	Uncultured actinobacterium clone CB11D04 16S ribosomal RNA gene	EF471579.1	99
	OTU20	1	Uncultured cyanobacterium partial 16S rRNA gene	FR647972.1	77
	OTU21	1	Uncultured bacterium clone PVP-120 16S ribosomal RNA gene	EU283258.1	84
	OTU22	1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene	FM995183.1	99
	OTU23	1	Uncultured bacterium clone HglFeb0097m 16S ribosomal RNA gene	JX016502.1	99
	OTU24	1	Uncultured actinobacterium partial 16S rRNA gene	AJ575522.1	98
	OTU25	1	Uncultured actinobacterium clone Z-1-48 16S ribosomal RNA gene	FJ666190.1	98
	OTU26	1	Uncultured cyanobacterium clone MD3.17 16S ribosomal RNA gene	FJ425605.1	99
	OTU27	1	Uncultured gamma proteobacterium clone PEACE2006/192_P2 16S ribosomal RNA gene	EU394558.1	99
	OTU28	1	Uncultured gamma proteobacterium clone A13W_148 16S ribosomal RNA gene	HM057634.1	99
	OTU29	1	<i>Roseobacter</i> sp. SYOP1 16S ribosomal RNA gene	DQ659418.1	94

(待续)

					(续表)
	OTU30	1	Uncultured bacterium clone TA2FL_30 small subunit ribosomal RNA gene	KP410323.1	94
	OTU31	1	Uncultured bacterium clone S49 16S ribosomal RNA gene	JX282204.1	96
	OTU32	1	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone CB11C03 16S ribosomal RNA gene	EF471455.1	99
	OTU33	1	Uncultured bacterium clone g-92 16S ribosomal RNA gene	HQ738430.1	94
	OTU34	1	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone CB22H06 16S ribosomal RNA gene	EF471630.1	99
	OTU35	1	Uncultured cyanobacterium clone D8W_4 16S ribosomal RNA gene	HM057705.1	99
	OTU36	1	Uncultured bacterium clone S25_573 16S ribosomal RNA gene	EF574229.1	99
	OTU37	1	Uncultured planctomycete 8FN clone 8FN	EF591888.1	98
	OTU38	1	Uncultured bacterium clone g-51 16S ribosomal RNA gene	HQ738421.1	93
	OTU39	1	Uncultured marine bacterium clone BS_CoastalExp_T0_D3 16S ribosomal RNA gene	KR054194.1	100
	OTU40	1	Uncultured bacterium clone 6-S-39 16S ribosomal RNA gene	JN018647.1	74
	OTU41	1	<i>Enterococcus casseliflavus</i> strain Kd7 TUC-EEAOC 16S ribosomal RNA gene	KM096606.1	99
	OTU42	1	Uncultured <i>Bacteriovorax</i> sp. clone MD2.17 16S ribosomal RNA gene	FJ403066.1	94
	OTU43	1	Uncultured bacterium clone 20154U31 16S ribosomal RNA gene	EU237293.1	96
	OTU44	1	Uncultured bacterium clone D08 partial 16S rRNA gene	AM937273.1	97
	OTU45	1	Uncultured bacterium clone SSW54Ap 16S ribosomal RNA gene	EU592347.1	94
	OTU46	1	Uncultured bacterium clone Reef_K08 16S ribosomal RNA gene	GU119298.1	96
	OTU47	1	Uncultured deep-sea bacterium 16S rRNA gene	AM997613.1	92
	OTU48	1	Uncultured planctomycete partial 16S rRNA gene	AM422930.1	96
	OTU49	1	Uncultured alpha proteobacterium clone A13W_3 16S ribosomal RNA gene	HM057607.1	99
	OTU50	1	Uncultured alpha proteobacterium clone A13W_167 16S ribosomal RNA gene	HM057640.1	99
	OTU51	1	Uncultured alpha proteobacterium clone SHWN_night2_16S_755 16S ribosomal RNA gene	FJ745192.1	99
W2	OTU01	5	Rhodobacteraceae bacterium K7-1 16S ribosomal RNA gene	FJ449701.1	99
	OTU02	4	<i>Lutimaribacter litoralis</i> strain KU5D5 16S ribosomal RNA gene	NR_113362.1	99
	OTU03	4	Uncultured Rhodobacteraceae bacterium clone DS098 16S ribosomal RNA gene	DQ234181.2	99
	OTU04	4	<i>Marivita</i> sp. TS-T44 16S ribosomal RNA gene	KC762320.3	99
	OTU05	3	Alpha proteobacterium C53 gene for 16S rRNA	AB302382.1	99
	OTU06	2	<i>Donghicola</i> sp. CC-PW-76 16S ribosomal RNA gene	KF732817.1	97
	OTU07	2	Uncultured bacterium clone 3C002927 16S ribosomal RNA gene	EU801594.1	94
	OTU08	2	Uncultured <i>Arcobacter</i> sp. clone DS172 16S ribosomal RNA gene	DQ234254.2	99
	OTU09	2	<i>Thioclava pacifica</i> strain DL5-4 16S ribosomal RNA gene	KF146513.1	100
	OTU10	2	Rhodobacterales bacterium CB1049 16S ribosomal RNA gene	FJ869046.1	99
	OTU11	2	<i>Defluviimonas</i> sp. CC-PW-65 16S ribosomal RNA gene	KF732815.1	98
	OTU12	2	Uncultured marine microorganism clone NB031206_83 16S ribosomal RNA gene	KC425496.1	99
	OTU13	2	Uncultured alpha proteobacterium clone D13W_76 16S ribosomal RNA gene	HM057762.1	99
	OTU14	2	Uncultured bacterium clone SSW54Au 16S ribosomal RNA gene	EU592381.1	99
	OTU15	2	Uncultured epsilon proteobacterium clone C13W_56 16S ribosomal RNA gene	HM057679.1	99
	OTU16	2	Uncultured alpha proteobacterium clone D8W_183 16S ribosomal RNA gene	HM057737.1	99

(待续)

(续表)

OTU17	2	Uncultured marine microorganism clone NB031206_68 16S ribosomal RNA gene	KC425493.1	99
OTU18	2	Uncultured proteobacterium OCS5 16S ribosomal RNA gene	AF173975.1	99
OTU19	2	Uncultured bacterium clone 6C232574 16S ribosomal RNA gene	EU804623.1	99
OTU20	2	<i>Marivita roseacus</i> strain CB1052 16S ribosomal RNA	NR_132662.1	97
OTU21	2	Uncultured Rhodobacteraceae bacterium clone BPS_CK53 16S ribosomal RNA gene	HQ857621.1	98
OTU22	1	Uncultured epsilon proteobacterium clone ATB-LH-5962 16S ribosomal RNA gene	FJ535175.1	99
OTU23	1	<i>Flavobacterium</i> sp. CC-PW-34 16S ribosomal RNA gene	KF851343.1	99
OTU24	1	Uncultured <i>Arcobacter</i> sp. clone DS012 16S ribosomal RNA gene	DQ234096.2	96
OTU25	1	Gateway recycling conversion vector pCON-L1-cz DNA	LC094269.1	93
OTU26	1	Uncultured bacterium clone N13 16S ribosomal RNA gene	GQ377805.1	99
OTU27	1	<i>Escherichia coli</i> plasmid pAm08WL3069	GQ149348.1	95
OTU28	1	Gateway recycling conversion vector pCON-L4-cz DNA	LC094268.1	93
OTU29	1	Uncultured bacterium clone SeaWat_51146 16S ribosomal RNA gene	JQ199577.1	77
OTU30	1	Uncultured epsilon proteobacterium clone D004022A07 16S ribosomal RNA gene	EU721785.1	99
OTU31	1	Uncultured marine bacterium clone B17-4 16S ribosomal RNA gene	JX405609.1	85
OTU32	1	<i>Marivita roseacus</i> strain CB1052 16S ribosomal RNA gene	GU137308.1	99
OTU33	1	Uncultured alpha proteobacterium partial 16S ribosomal RNA	FM242220.1	99
OTU34	1	<i>Sulfitobacter</i> sp. CC-AMSY-48 16S ribosomal RNA gene	KC169809.1	98
OTU35	1	Uncultured alpha proteobacterium clone CB22G04 16S ribosomal RNA gene	EF471521.1	100
OTU36	1	<i>Rhodobacter</i> sp. ZH15 16S ribosomal RNA gene	FJ872532.2	99
OTU37	1	Uncultured alpha proteobacterium clone bac475 16S ribosomal RNA gene	JF727684.1	98
OTU38	1	<i>Neptunomonas</i> sp. MEBiC06243 16S ribosomal RNA gene	JQ672629.1	97
OTU39	1	<i>Neptuniibacter caesariensis</i> strain MED92 16S ribosomal RNA gene	NR_042749.1	96
OTU40	1	Uncultured actinobacterium clone A13W_33 16S ribosomal RNA gene	HM057614.1	100
OTU41	1	<i>Flavobacterium cucumis</i> gene for 16S rRNA, partial sequence	AB682419.1	99
OTU42	1	Uncultured cyanobacterium clone F8P4_10D04 16S ribosomal RNA gene	HQ242626.1	98
OTU43	1	Uncultured <i>Synechococcus</i> sp. clone CB11C04 16S ribosomal RNA gene	EF471456.1	99
OTU44	1	Uncultured marine bacterium clone S10-115 16S ribosomal RNA gene	JX405861.1	99
OTU45	1	<i>Donghicola</i> sp. FJ12 16S ribosomal RNA gene	KR185328.1	99
OTU46	1	<i>Thioclava pacifica</i> strain TL 2 16S ribosomal RNA gene	NR_043078.1	98
OTU47	1	Uncultured <i>Fluviicola</i> sp. clone ZXXXH2 16S ribosomal RNA gene	EU703456.1	94
OTU48	1	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone A13W_155 16S ribosomal RNA gene	HM057636.1	99
OTU49	1	Uncultured <i>Flavobacteria</i> bacterium 16S rRNA gene	FN433429.1	99
OTU50	1	Uncultured cyanobacterium clone D8W_4 16S ribosomal RNA gene	HM057705.1	99
OTU51	1	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain ZJ316 16S ribosomal RNA gene	JN126052.1	99
OTU52	1	<i>Enterococcus casseliflavus</i> strain OZK19 16S ribosomal RNA gene	KT630829.1	99
OTU53	1	Uncultured bacterium clone MY 91 16S ribosomal RNA gene	JN245708.1	99
OTU54	1	Uncultured Rhodobacteraceae bacterium clone S1-1-30 16S ribosomal RNA gene	KF786365.1	97
OTU55	1	Uncultured epsilon proteobacterium clone C8W_36 16S ribosomal RNA gene	HM057646.1	98
OTU56	1	Uncultured <i>Arcobacter</i> sp. clone lag_9 16S ribosomal RNA gene	KM494510.1	98

2.3 优势细菌群落丰度与环境因子的关系分析

3 个站位的环境参数数据如表 5 所示, 3 个站位的总磷含量都不高, 表明该区域是秦皇岛邻近海域的一个低磷区。离岸较远的 W2 站位的总氮含量明显多于 XKH 和 W1 站位, 可推测 XKH 站位和 W1 站位中的反硝化细菌较 W2 站位多, 反硝化作用更为活跃, 而且在这两个站位的克隆文库中也检测到了较多反硝化细菌, 而在 W2 站位则较少; W1 站位的叶绿素 a 含量显著高于 XKH 和 W2 站位, 溶解氧含量也较另两个站位高, 这可能与 W1 站位克隆文库中的优势菌群 Cyanobacteria 门有着密切关系, Cyanobacteria 门的细菌含有叶绿素 a (但不形成叶绿体), 能进行产氧性光合作用, 从而使 W1 站位的叶绿素 a 与溶解氧升高。

基于克隆文库的鉴定结果, 发现 Alphaproteobacteria、Betaproteobacteria 纲和 Cyanobacteria、Actinobacteria、Bacteroidetes、Firmicutes 门为采样区域的最优势类群, 经过定量 PCR 实验后, 分别得到它们在 3 个站位的丰度(表 6)。

环境参数 Environmental parameters	站位 Station		
	XKH	W1	W2
叶绿素 a Chl_a (mg/m ³)	2.46	19.09	3.89
总磷 TP (mg/L)	0.085	0.171	0.21
总氮 TN (mg/L)	0.651	0.662	1.783
氨氮 NH ₄ ⁺ -N (mg/L)	0.104	0.023	0.038
亚硝氮 NO ₂ ⁻ -N(mg/L)	0.002 17	0.001 27	0.000 25
硝氮 NO ₃ ⁻ -N (mg/L)	0.273 1	0.149 1	0.029 1
温度 Temperature (°C)	31.21	25.32	25.24
酸碱度 pH	7.45	11.97	11.86
溶解氧 DO (mg/L)	5.01	7.2	6.69

菌门 (纲) Phylum (Class)	站位 Station		
	XKH	W1	W2
Alpha-proteobacteria	2.42×10 ⁷	2.78×10 ⁷	2.59×10 ⁷
Beta-proteobacteria	1.18×10 ⁵	6.18×10 ⁴	7.47×10 ⁴
Cyanobacteria	1.29×10 ³	4.04×10 ⁶	2.75×10 ⁵
Actinobacteria	1.18×10 ³	2.25×10 ⁶	1.04×10 ⁵
Bacteroidetes	5.33×10 ⁶	2.13×10 ⁶	1.42×10 ⁵
Firmicutes	1.18×10 ⁵	1.24×10 ⁶	3.23×10 ⁵

为反映环境参数对 3 个站位细菌总数、优势菌群丰度及多样性分布的影响, 本研究采用来源于 PCA 的物种-环境双序图, 将环境变量排序图生成后再投影(图 4)。

由图 4 可以看出, 10 个环境因子中, 氨氮 (NH₄⁺-N)与第一排序轴呈最大正相关, 其次为温度, 溶解氧与第一排序轴呈最大负相关, 再其次为 pH 和叶绿素 a, 可见第一排序轴主要体现了氨氮、温度、溶解氧、pH 和叶绿素 a 的变化, 即从左往右氨氮、温度逐渐升高, 而溶解氧、pH 和叶绿素 a 逐渐

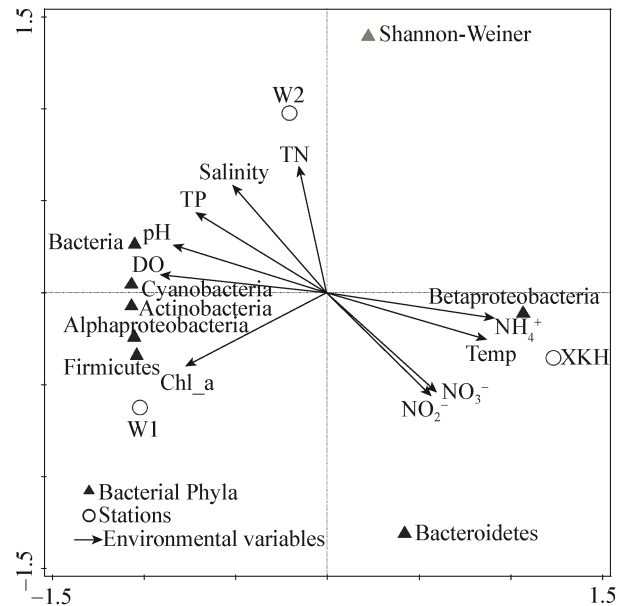


图 4 来源于 PCA 的物种-环境双序图
Figure 4 Species-Environmental Biordered Figure derived from PCA

降低；总氮(TN)与第二排序轴呈最大正相关，其次为盐度，而 NO_2^- 、 NO_3^- 与第二排序轴则呈负相关，表明第二排序轴主要反映的是总氮、盐度、硝氮和亚硝氮的变化，即从下往上总氮和盐度逐渐增加，而硝氮和亚硝氮逐渐降低。

从图4可以发现，细菌总数和Cyanobacteria门类细菌主要分布在第2象限，靠近溶解氧含量和pH，并与之呈正相关关系，说明细菌总数和Cyanobacteria门类细菌丰度的分布主要受溶解氧含量及pH的影响。Alphaproteobacteria纲、Actinobacteria门和Firmicutes门类细菌主要分布在第3象限，靠近溶解氧、pH、叶绿素a分布，与这3个环境因子呈正相关关系，表明Alphaproteobacteria纲、Actinobacteria门和Firmicutes门类细菌丰度的分布主要受溶解氧、pH和叶绿素a的影响。Betaproteobacteria纲和Bacteroidetes门类细菌则分布在第4象限，Betaproteobacteria纲类细菌丰度的分布主要受氨氮和温度的影响，而Bacteroidetes门类细菌丰度的分布主要受硝氮和亚硝氮的影响。表示香农多样性指数的点位于第1象限，主要受总氮的影响，并与之呈正相关，可见各站位的细菌多样性主要受总氮含量的影响。

3 结论与讨论

3.1 细菌总数分布比较

本研究发现秦皇岛新开河河口XKH站位的细菌总数为 6.62×10^5 cells/mL，其邻近海域W1站位的细菌总数为 2.62×10^6 cells/mL，W2站位细菌总数为 2.02×10^6 cells/mL，同处于海区位置的W1与W2站位的细菌总数均高于新开河河口XKH站位，而W1站位与W2站位相比，差异不是很大，表明细菌总数在近远海的分布上并没有特别显著的变化。李和阳等^[26]在深圳海域细菌总数及可培养细菌研究中发现深圳海域的细菌总数数量级为 10^6 ；赵顺^[27]在研究北黄海微表层与次表层海水细菌丰度时空变化特征时发现夏季细菌总数平均值为 1.75×10^6 cells/mL。海水细菌总数统计结果与本研究

基本吻合，说明在海洋中的细菌总数的空间差异性并不显著。

张东声^[28]在研究长江口及其邻近海域微生物多样性时，发现长江口的细菌丰度在夏季时为 $(2.66-1.19) \times 10^6$ cells/mL，比本研究中的新开河河口细菌总数高了近一个数量级，这说明环境条件和营养物质的不同对细菌总数也会产生一定的影响；李和阳等^[26]在研究深圳海域时发现细菌总数与 COD_{Mn} 和 BOD_5 呈现显著的正相关关系，这种与有机物的相关关系能有效反映出海域有机物的存在状况。本研究中，细菌总数的分布与水中溶解氧浓度和pH具有较显著的正相关关系，而细菌总数与氮磷营养盐的含量却没有比较显著的相关性，无法直观反映海水中营养盐的存在分布状况。但本研究未对细菌总数与 COD_{Mn} 、 BOD_5 等有机物参数的关系进行研究，以后有待做进一步的研究探讨。

3.2 多样性分布比较

通过对秦皇岛新开河河口及其邻近海域3个站位(XKH、W1、W2)的16S rRNA基因克隆文库的构建及多样性分析，我们对新开河河口及其邻近海域的细菌群落结构组成有了更完善的了解，其中W1站位的克隆文库展现出更为丰富的多样性。Sun等^[29]在研究16S rRNA基因组内多样性对原核生物多样性的影响时，发现原核生物体内的16S rRNA基因通常都存在多个基因序列不完全相同的拷贝，而且这个差异往往会在研究原核生物的多样性时对结果产生一定程度的高估，在3%水平时，基于V6区的细菌多样性研究可能会引起12.9%的高估，基于16S rRNA基因全长的细菌多样性研究会引起5.8%的高估，均高于基于V4-V5区的多样性高估值。在本研究中对16S rRNA基因全长进行了测序，根据Sun等的研究结果可见本研究的细菌多样性的结果有一定程度的高估，为了最大程度减小这种高估值，在以后进行细菌多样性研究时，应选择V4和V5区的基因序列设计引物进行实验。

(1) XKH河口站位：Proteobacteria门细菌占该

站位总克隆子数的 52.6%，处于绝对优势地位，此前也有文献报道^[30]在河流环境中 Proteobacteria 门占优势地位是其微生物群落结构组成的特征之一，这与本研究结论一致；该站位的 Betaproteobacteria 纲占总克隆子数的 35.1%，是第一优势菌纲，白洁等^[31]在研究黄海西北部沉积物细菌群落多样性的过程中，发现更易在受污染环境中发现的 Betaproteobacteria 纲细菌可作为环境质量监测与评价的生态指标；所以通过监测 XKH 河口站位的 Betaproteobacteria 纲的丰度可以用来评价 XKH 河口的污染程度，从而帮助更好地治理新开河河口的污染，减小入海河口排污对邻近海域生态环境的影响。

(2) W1 和 W2 站位：Proteobacteria、Cyanobacteria、Actinobacteria 和 Bacteroidetes 门类群微生物含量丰富，相似的是，李佳霖等^[11]研究发现秦皇岛海水养殖的水体中 Proteobacteria 门类群微生物为优势菌群，其余也包括 Cyanobacteria、Actinobacteria 和 Bacteroidetes 门类微生物；王丽平等^[10]在研究秦皇岛褐潮暴发敏感海域细菌种群特征时也发现在该海域 Proteobacteria 门类群微生物为第一优势门。这些对秦皇岛海域细菌多样性的研究结果也与本研究基本一致。

Cyanobacteria 门作为 W1 站位的第一优势类群，大部分克隆子属于 *Synechococcus* 属。*Synechococcus* 属细菌是全球碳循环的主要参与者和初级生产力的主要贡献者之一，是微型浮游动物最重要的食物源之一^[32]，为 W1 站位的微型浮游动物提供了丰富的食源；有文献显示通过分析 *Synechococcus* 属微生物基因组发现其似乎能够利用一些有机物作为合成氮和磷的原料^[33]，可见该属微生物在降解部分有机物、调节 W1 站位氮磷含量时起到了一定作用。此外，Cyanobacteria 门类群微生物在氮、磷丰富的水体中生长旺盛，可作为水体富营养化的指示生物，而且该类群有某些属种可在富营养化的海湾和湖泊中引起赤潮和水华，应引起相关环境部门的高度重视。

在 W1 站位丰度第四高的 Actinobacteria 门类群

细菌，它们的活性次生代谢产物约占目前已发现微生物活性次生代谢产物的 50%，其次生代谢产物结构新颖，很多为活性较强的新化合物，多被用来生产抗生素等药物^[34]，W1 站位丰富的 Actinobacteria 门类群资源可被进一步利用开发生产海洋药物。在 W2 站位中丰度最高的 Alphaproteobacteria 纲，作为水体生态系统中常见的类群，它们通过参与氮的固定作用调节水体环境中氮含量^[35]。

3.3 多样性影响因子的比较

由于细菌等微生物新陈代谢速度较快，其群落结构和组成会受到多种环境因素如温度、pH、COD、营养盐等因素的影响^[26]。微生物群落结构及其组成与其生存的生态系统及环境有密切的联系，微生物群落组成及其复杂程度一方面决定了生态系统的特征和强弱，另一方面，环境条件的改变会引起微生物群落结构及其组成的变化^[36-37]。因此，对不同环境条件下微生物群落结构的多样性进行研究，对于揭示微生物与环境之间的关系，以及综合评价分析环境等方面都具有重要的作用^[38]。

本研究通过来源于 PCA 的物种-环境双序图的分析，发现细菌总数和 Cyanobacteria 门类细菌丰度的分布主要受溶解氧含量及 pH 的影响，并呈正相关。肖慧^[5]在研究天津渤海湾各细菌指标与生态因子之间的相关关系时发现，细菌总数的分布主要受亚硝氮和 pH 的影响，而与溶解氧并没有显著相关性，这个结果与本研究结果的差异可能是由于采样位置与采样环境的不同所导致。Roeselers 等^[39]在对格陵兰热泉中 Cyanobacteria 多样性的研究中发现 Cyanobacteria 的群落多样性与温度有显著的相关性，这与本研究中影响 Cyanobacteria 群落分布的主要因素是溶解氧与 pH 的结果并不一致，造成这种差异的原因可能来自样品来源的差异，本研究的样品来自于河口区及其邻近海域，水体环境与热泉的水体环境差异较大。

本研究中 Alphaproteobacteria 纲、Actinobacteria 门和 Firmicutes 门类细菌丰度的分布主要与溶解氧、pH 和叶绿素 a 呈正相关关系，Betaproteobacteria

纲类细菌丰度的分布正相关于氨氮和温度两个环境因子,而 Bacteroidetes 门类细菌丰度的分布则是随着硝氮和亚硝氮的升高而增加。李佳霖等^[11]在秦皇岛潮间带的研究区域发现形成微生物群落结构差异的主要环境因子是温度、盐度、pH 和 NO₃⁻浓度,其余的影响作用可能主要来自于未测定的环境因子和部分难以预计的环境外力,这与本研究得出的结论基本一致。

本研究还发现,在总体上各站位的细菌多样性主要是受总氮含量的影响,并与之呈正相关关系。本研究与李佳霖等的研究中均发现秦皇岛邻近海域属于低磷营养盐区,但是氮营养盐的含量非常丰富,是影响秦皇岛邻近海域微生物群落分布及多样性的主要环境因子;胡晓娟^[40]在研究广东桂山岛海域微生物群落特征时发现影响该区域微生物群落分布的主要环境因子为总磷含量和盐度,其中受人类活动影响较大的区域还会受总氮含量的影响,这与本研究的结果有一定差异。因为桂山岛海域水体为磷中等限制潜在性富营养水平,磷营养是限制其初级生产力和细菌生产力的潜在因子^[41],而本研究的海域磷营养含量很低,对细菌多样性分布的影响较小。

本研究为初步掌握秦皇岛新开河河口及其邻近海域细菌多样性状况提供了一定的参考,得到了影响该区域内细菌多样性分布的环境因子(溶解氧、pH、氮营养盐),对进一步改善该区域河流和海洋环境提供了数据支持,也为该区域海洋环境监测及其微生物资源的开发与利用提供了数据基础。

参 考 文 献

- [1] de Long EF. Diversity of naturally occurring prokaryotes[A]//Colwell RR, Simidu U, Ohwada K. Microbial Diversity in Time and Space[M]. New York: Plenum Press, 1996
- [2] Chen LP, Hou FJ, Zhang DJ, et al. Distribution Characteristics of *Pseudomonas* in Ningbo coastal sewage outlets[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(4): 926-930 (in Chinese)
陈丽萍, 侯付景, 张迪骏, 等. 宁波沿海陆源排污口假单胞菌属(*Pseudomonas*)分布特点[J]. *海洋与湖沼*, 2013, 44(4): 926-930
- [3] Jiang N, Li CL, Zhou J, et al. Diversity and distribution of dominant bacteria nearby Ningbo land-based drainage discharge outlets[J]. *Journal of Ningbo University (Natural Science & Engineering Edition)*, 2013, 26(2): 22-27 (in Chinese)
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: 理工版*, 2013, 26(2): 22-27
- [4] Chen JX, Xu YT. The status and function of microbe in Suzhou creek ecosystem[J]. *Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control*, 2002, 3(7): 70-74 (in Chinese)
陈金霞, 徐亚同. 微生物在苏州河生态系统中的地位及作用[J]. *环境污染治理技术与设备*, 2002, 3(7): 70-74
- [5] Xiao H. Studies on bacteriology of costal waters in Bohai bay and the application of bacteria on assessment of quality of coastal environment[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2005 (in Chinese)
肖慧. 渤海湾近岸海域的细菌学研究及其在海岸带环境质量评价中的应用[D]. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文, 2005
- [6] Japanese ecological society panel on environmental issues. Environment and Indicator Organisms: Volume of Waters[M]. Translated by Lu QZ. Beijing: China Environmental Sciences Press, 1987: 234-244 (in Chinese)
日本生态学会环境问题专门委员会. 环境和指示生物: 水域分册[M]. 卢全章, 译. 北京: 中国环境科学出版社, 1987: 234-244
- [7] Shish FK, Ducklow HW. Temperature regulation of heterotrophic bacterioplankton abundance, production, and specific growth rate in Chesapeake Bay[J]. *Limnology and Oceanography*, 1994, 39(6): 1243-1258
- [8] Del Giorgio PA, Bouvier TC. Linking the physiologic and phylogenetic successions in free-living bacterial communities along an estuarine salinity gradient[J]. *Limnology and Oceanography*, 2002, 47(2): 471-486
- [9] Troussellier M, Schäfer H, Bataillier N, et al. Bacterial activity and genetic richness along an estuarine gradient (Rhône River plume, France)[J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 2002, 28: 13-24
- [10] Wang LP, Nan BX, Hu PL. Bacterial community characteristics in Qinhuangdao coastal area, Bohai Sea: a region with recurrent brown tide outbreaks[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2015, 28(6): 899-906 (in Chinese)
王丽平, 南炳旭, 扈培龙. 秦皇岛褐潮暴发敏感海域细菌种群特征[J]. *环境科学研究*, 2015, 28(6): 899-906
- [11] Li JL, Wang GY, Qin S. Microbial communities of sediments influenced by mariculture from the coast of Qinhuangdao[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2011, 20(5): 920-926 (in Chinese)
李佳霖, 汪光义, 秦松. 秦皇岛近海养殖对潮间带微生物群落多样性的影响[J]. *生态环境学报*, 2011, 20(5): 920-926
- [12] Du LQ, Li SC. Protection and sustainable utilization of marine bio-resources in Qinhuangdao[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2012, 40(22): 11377-11379 (in Chinese)
杜利强, 李顺才. 秦皇岛海洋生物资源保护与可持续利用[J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(22): 11377-11379
- [13] State Oceanic Administration. Technical Specification of Marine Biological and Ecological Investigations[M]. Beijing: Ocean Press, 2006 (in Chinese)
国家海洋局. 海洋生物生态调查技术规程[M]. 北京: 海洋出版社, 2006
- [14] Zhao HP, Li QX, Tao JH. Methods of fluorescence enumeration of marine bacteria and application[J]. *Journal of Hebei University of Engineering (Natural Science Edition)*, 2007, 24(1): 57-60 (in Chinese)
赵海萍, 李清雪, 陶建华. 海洋细菌荧光显微计数法及其应用[J]. *河北工业大学学报: 自然科学版*, 2007, 24(1): 57-60
- [15] Zheng TL, Wang F, Xu MZ, et al. Bacterial production, biomass and role in microbial loop in Taiwan Strait[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2002, 33(4): 415-423 (in Chinese)

- 郑天凌, 王斐, 徐美珠, 等. 台湾海峡海域细菌产量、生物量及其在微生物环中的作用[J]. 海洋与湖沼, 2002, 33(4): 415-423
- [16] Suzuki MT, Giovannoni SJ. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(2): 625-630
- [17] Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing[A]//Stackebrandt E, Goodfellow M. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics[M]. Chichester, England: John Wiley & Sons, 1991: 115-176
- [18] Overmann J, Coolen MJL, Tuschak C. Specific detection of different phylogenetic groups of chemocline bacteria based on PCR and denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rRNA gene fragments[J]. Archives of Microbiology, 1999, 172(2): 83-94
- [19] Stach JEM, Maldonado LA, Ward AC, et al. New primers for the class *Actinobacteria*: application to marine and terrestrial environments[J]. Environmental Microbiology, 2003, 5(10): 828-841
- [20] Nübel U, Garcia-Pichel F, Muyzer G. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(8): 3327-3332
- [21] Manz W, Amann R, Ludwig W, et al. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment[J]. Microbiology, 1996, 142(5): 1097-1106
- [22] Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3): 695-700
- [23] de Gregoris TB, Aldred N, Clare AS, et al. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa[J]. Journal of Microbiological Methods, 2011, 86(3): 351-356
- [24] Liu XW, Lü XJ. To evaluate the applications of total bacteria in the aquatic ecological environment[J]. Environmental Protection and Circular Economy, 2011, 31(10): 46-47 (in Chinese)
- 刘辛伟, 吕晓洁. 细菌总数测定在水生态环境中的应用探讨[J]. 环境保护与循环经济, 2011, 31(10): 46-47
- [25] Guo QR. Comparison of genetic diversity of total planktonic bacteria and active planktonic bacteria in Huguangyan Maar Lake in summer[D]. Zhanjiang: Master's Thesis of Guangdong Ocean University, 2011 (in Chinese)
- 郭倩茹. 夏季湖光岩玛珥湖浮游细菌和浮游活性菌遗传多样性的比较[D]. 湛江: 广东海洋大学硕士学位论文, 2011
- [26] Li HY, Chen MX, Li G, et al. Occurrence of total and culturable bacteria in Shenzhen coastal waters and their application in the environment assessment[J]. Marine Environmental Science, 2011, 30(4): 487-491 (in Chinese)
- 李和阳, 陈明霞, 李刚, 等. 深圳海域细菌总数及可培养细菌总数的分布及其在环境评价中的应用研究[J]. 海洋环境科学, 2011, 30(4): 487-491
- [27] Zhao S. The spatial and temporal feature of bacterial abundance and community structure in the surface microlayer and subsurface layer of the Northern Yellow Sea[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian Ocean University, 2014 (in Chinese)
- 赵顺. 北黄海微表层与次表层细菌丰度及群落结构的时空变化特征研究[D]. 大连: 大连海洋大学硕士学位论文, 2014
- [28] Zhang DS. Diversity and distribution of microorganism in Changjiang Estuary and adjacent areas[D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2011 (in Chinese)
- 张东声. 长江口及其邻近海域微生物的多样性和生态分布特征研究[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2011
- [29] Sun DL, Jiang X, Wu QL, et al. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(19): 5962-5969
- [30] Zwart G, Crump BC, Kamst-van Agterveld MP, et al. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers[J]. Aquatic Microbial Ecology, 2002, 28(2): 141-155
- [31] Bai J, Li HY, Zhang J, et al. Diversity of bacterial community in the sediments of the Northern Yellow Sea[J]. China Environmental Science, 2009, 29(12): 1277-1284 (in Chinese)
- 白洁, 李海艳, 张健, 等. 黄海西北部沉积物中细菌群落 16S rDNA 多样性解析[J]. 中国环境科学, 2009, 29(12): 1277-1284
- [32] Iturriaga R, Mitchell BG. Chroococcoid cyanobacteria: a significant component in the food web dynamics of the open ocean[J]. Marine Ecology: Progress Series, 1986, 28: 291-297
- [33] Palenik B, Brahamsha B, Larimer FW, et al. The genome of a motile marine *Synechococcus*[J]. Nature, 2003, 424(6952): 1037-1042
- [34] Tian XP, Zhang S, Li WJ. Advance in marine Actinobacterial research-a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(2): 161-169 (in Chinese)
- 田新朋, 张偲, 李文均. 海洋放线菌研究进展[J]. 微生物学报, 2011, 51(2): 161-169
- [35] Xie CH, Yokota A. *Sphingomonas azotifigens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of *Oryza sativa*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56(4): 889-893
- [36] Chen J, Xie P. Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins-LR and -RR in two freshwater shrimps, *Palaemon modestus* and *Macrobrachium nipponensis*, from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China[J]. Toxicon, 2005, 45(5): 615-625
- [37] Dong GF, Xie SQ, Zhu XM, et al. Nutri-toxicological effects of cyanobacteria on fish[J]. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(19): 6233-6241 (in Chinese)
- 董桂芳, 解绶启, 朱晓鸣, 等. 水华蓝藻对鱼类的营养毒理学效应[J]. 生态学报, 2012, 32(19): 6233-6241
- [38] Wang ZH, Yang JQ, Zhou J, et al. Composition and structure of bacterial communities in waste water of aquatic products processing factories[J]. Research Journal of Biotechnology, 2014, 9(2): 65-70
- [39] Roeselers G, Norris TB, Castenholz R W, et al. Diversity of phototrophic bacteria in microbial mats from Arctic hot springs (Greenland)[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(1): 26-38
- [40] Hu XJ. Analysis on microbial community characteristics in the typical sea areas in Guangdong province[D]. Guangzhou: Doctoral Dissertation of Ji'nan University, 2013 (in Chinese)
- 胡晓娟. 广东典型海域微生物群落特征分析[D]. 广州: 暨南大学博士学位论文, 2013
- [41] Sun DL, Jiang X, Wu QL, et al. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(19): 5962-5969