

DOI: 10.5846/stxb201305070961

苗 祯, 杜宗军, 李会荣, 楼妍颖, 罗 玮. 5 株北极微藻藻际环境的细菌多样性. 生态学报, 2015, 35(5): 1587-1600.

Miao Z, Du Z J, Li H R, Lou Y Y, Luo W. Analysis of bacterial diversity in the phycosphere of five Arctic microalgae. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(5): 1587-1600.

5 株北极微藻藻际环境的细菌多样性

苗 祯^{1,2}, 杜宗军¹, 李会荣², 楼妍颖², 罗 玮^{2,*}

1 山东大学(威海)海洋学院, 威海 264209

2 中国极地研究中心, 国家海洋局极地科学重点实验室, 上海 200136

摘要: 对 5 株北极微藻, 如脆杆藻 (*Fragilariopsis* sp.)、微单胞藻 (*Micromonas* sp.)、四棘藻 (*Attheya septentrionalis*)、海链藻 (*Thalassiosira* sp.) 和小球藻 (*Chlorella* sp.) 的不同生长时期的粘附细菌和游离细菌的 16S rRNA 基因进行 PCR-DGGE 分析, 研究藻际环境的细菌多样性。结果表明, 5 株微藻具有不同的藻际微生物群落结构组成, 其中微单胞藻、脆杆藻、四棘藻和海链藻的藻际细菌主要由 Cyanobacteria (藻蓝细菌)、 α -Proteobacteria (α -变形菌纲) 和 γ -Proteobacteria (γ -变形菌纲) 组成, 仅微单胞藻和脆杆藻检测出 CFB (*Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*, 噬纤维菌-屈挠杆菌-拟杆菌)。小球藻由 Cyanobacteria、CFB、 α -Proteobacteria 和 β -Proteobacteria (β -变形菌纲) 组成。微单胞藻的藻际菌群结构稳定, 不同生长时期的游离细菌和粘附细菌组成差异不明显。3 株硅藻-脆杆藻、四棘藻和海链藻的游离细菌主要由 γ -Proteobacteria 组成, 小球藻的游离细菌主要为 β -Proteobacteria, 而 5 株微藻的粘附细菌主要由 Cyanobacteria 组成。从 DGGE 图谱来看, 在脆杆藻生长的延滞期、指数期和稳定期, 其藻际游离细菌和粘附细菌的 16S rRNA 基因扩增条带数量和位置均有明显差异, 但优势扩增条带较稳定; 其他 4 株藻粘附细菌和游离细菌的扩增条带比较稳定, 说明藻际关联菌群结构较稳定。藻菌种间特异性关系为不同微藻藻株提供了重要的线索, 同时也带来更多的隐藏在藻际环境中的信息。

关键词: 北极微藻; 藻际环境; 关联菌群; 16S rRNA; DGGE

Analysis of bacterial diversity in the phycosphere of five Arctic microalgae

MIAO Zhen^{1,2}, DU Zongjun¹, LI Huirong², LOU Yanying², LUO Wei^{2,*}

1 Marine College, Shandong University (Weihai), Weihai 264209, China

2 State Oceanic Administration Key Laboratory for Polar Science, Polar Research Institute of China, Shanghai 200136, China

Abstract: As an important primary producer in the marine ecosystem, phytoplankton cells excrete organic compounds. These include high proportions of carbohydrates, amino acids and organic acids, including glycolic acid which forms the base of the marine microbial food web, and affects bacterial growth. Bacteria can live free in the phycosphere and also attached to the surface of algal cells, consuming extracellular products and consequently participate in biogeochemical cycling. Phytoplankton-bacteria interactions range from symbiotic to parasitic interactions, which play an important part in the microbial loop. However, research into phytoplankton-bacterium interactions is limited and yet to be published. The object of this study was to determine the specific associations between dominant algae and associated bacteria in the North Polar Region. We analyzed bacterial diversity in the phycosphere of four Arctic marine microalgae isolates (*Micromonas* sp., *Fragilariopsis* sp., *Attheya septentrionalis* and *Thalassiosira* sp.) and one glacial isolate, *Chlorella* sp.. *Fragilariopsis* sp., *Attheya septentrionalis*, and *Thalassiosira* sp. belong to Bacillariophyta, while *Chlorella* sp. and *Micromonas* sp. belong to

基金项目: 国家 863 计划项目 (2012AA021706, 2013AA065805); 南北极环境综合考察与评估专项 (CHINARE2012-02-01)

收稿日期: 2013-05-07; **网络出版日期:** 2014-04-17

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: luowei@pric.org.cn

Chlorophyta. The 16S rRNA gene of the attached and free bacteria related to these five microalgae during different growth phases was analyzed by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis. The associated bacterial diversity based on DGGE profiles was rich. These bacteria were clustered into Cyanobacteria, CFB, α -Proteobacteria, β -Proteobacteria, and γ -Proteobacteria. Bacteria in the phycosphere of marine isolates *Micromonas* sp., *Fragilariopsis* sp., *Attheya septentrionalis* and *Thalassiosira* sp. mainly belonged to cyanobacteria, α -Proteobacteria and γ -Proteobacteria. CFB was detected only in the phycosphere of *Micromonas* sp. and *Fragilariopsis* sp. With regard to the only glacial isolate *Chlorella* sp., cyanobacteria, CFB, α -Proteobacteria, and β -Proteobacteria were detected in the majority. Differences in the dominant bacterial species of each microalgae, were distinguished. Cyanobacteria and α -Proteobacteria were detected in the phycosphere of these microalgae. Cyanobacteria bands from *Fragilariopsis* sp., *Attheya septentrionalis* and *Chlorella* sp. differed from those of *Micromonas* sp. and *Thalassiosira* sp. *Sulfitobacter* of α -Proteobacteria coexisted with both *Fragilariopsis* sp. and *Thalassiosira* sp. β -Proteobacteria was traced only from the glacial isolate *Chlorella* sp. γ -Proteobacteria was commonly detected in the four marine microalgal cultures except the glacial isolate *Chlorella* sp. *Shewanella* was found closely associated with *Micromonas* sp., *Attheya septentrionalis* and *Fragilariopsis* sp., while *Pseudoalteromonas* was associated with *Attheya septentrionalis* and *Fragilariopsis* sp. and *Thalassiosira* sp. DGGE profiles and clustering analysis showed that the attached and free bacteria associated with *Fragilariopsis* sp. during the lag phase, exponential phase and stationary phase varied, except that the dominant bacteria was constant. Free bacteria in the phycosphere of the three diatom strains were claded into γ -Proteobacteria, while free bacteria associated with *Chlorella* sp. was clustered into β -Proteobacteria. Meanwhile, attached bacteria associated with these four microalgae were comprised mainly of cyanobacteria. However, the attached and free bacteria from the other four microalgae strains were invariable, indicating stability of the bacterial community structure in the phycosphere, except for a slight variation in the abundance of the dominant bacteria. The associated bacterial community related to the Arctic microalgae isolations was analyzed and it would help us recognize the mechanism of phytoplankton-bacteria interaction and their coexisting contribution in the Arctic ecosystem.

Key Words: arctic microalgae; phycosphere; associated bacteria; 16S rRNA; DGGE

微藻分泌的胞外产物对细菌食物链具有重要作用,形成了自微藻细胞向外至一定距离的对细菌生长有刺激作用的区域,类似于陆上的根际环境,这个区域被命名为“藻际环境”(phycosphere)^[1]。有研究表明藻际环境的游离细菌和粘附细菌群落结构是不同的^[2-3], Fandino 等研究表明在腰鞭毛藻赤潮期间游离细菌主要属于 α -Proteobacteria 和 γ -Proteobacteria,粘附细菌主要以 CFB 菌群占优势^[3]。Schäfer 等研究了 6 种不同的藻株附着不同的“卫星”细菌群落,而且基因指纹显示这种“卫星”附着关系较为稳定。所有藻株附着类群的共同点就是均归属于 α -Proteobacteria 和 CFB 其中的某一个支系^[4]。也有研究表明海洋藻际环境中细菌群落和海洋中的游离细菌群落在系统发育上有着明显的区别,说明两种不同生存环境下的细菌种群结构组成由不同的选择性压力所影响^[5-6]。更多的生态调查研究表明在浮游植物赤潮过程中细菌群落组成与浮游植物的组成、生长和生理状态相关^[4-5,7-8]。特定藻类能吸引不同细菌附生群落,显示浮游植物-细菌相互作用具有种间特异性^[4,6,9],而菌群对某些微藻的表现出“溶藻”^[10]或者“共促”机理^[11]都证明了藻-菌关联之间的特异性。

北极地区是受全球变化影响最深的地区,极地海洋系统易于受到周围环境等因子的影响,已经引起科学家对这些极端区域海洋微生物的多样性和生态学作用的极大兴趣。目前极地海洋微生物多样性研究多以海冰、海水和近岸沉积物微生物群落为研究对象,对北极海域浮游细菌系统发育多样性的研究表明,浮游细菌主要分布在 α -、 γ -Proteobacteria、 δ -Proteobacteria、 ε -Proteobacteria、CFB 类群、绿色非硫细菌和 Verrucomicrobia 这 7 个大的类群。这些克隆序列跟多数非培养的环境序列存在高度同源性^[12]。人们利用传统培养技术和分子生物学技术开展了对北极楚科奇海、弗拉姆海峡、斯匹次卑尔根岛附近峡湾海冰样品的细菌系统发育多样

性分析。海冰细菌主要属于 α 、 γ -Proteobacteria、CFB、低 G+C 含量革兰氏阳性菌群和高 G+C 含量革兰氏阳性菌群^[13-15]。而极区微藻也是常见的浮游植物类群,是重要的初级生产力类群,北极海域的主要优势种类为青绿藻和硅藻。它们同样在北冰洋生态系统的碳固定过程中起着重要的作用。目前人们热衷于极地快速变化环境下的特定种群(浮游植物,浮游细菌,浮游动物等)的生态学调查,而在这种迅速变化的生境中的生态系统反馈和应对机理需要更多的摸索和一些全新的理解。在此背景下,展开针对北极获得的几株优势微藻藻际环境中藻菌关联的机理的研究。

基于对北极的优势浮游植物-细菌相互作用机制的探索为目的,从北极各生境中分离出的具重要生态地位的微藻,并对与这些微藻紧密关联的微生物群落多样性进行研究,将对认识北极海域微食物环以及其中的各个生态学角色有了更深入的认识。

1 材料与方法

1.1 藻种来源及培养

本研究中的 5 株北极微藻,信息见表 1。海洋微藻微单胞藻(*Micromonas* sp.)、脆杆藻(*Fragilariopsis* sp.)、四棘藻(*Attheya septentrionalis*)和海链藻(*Thalassiasira* sp.)购自美国国家海洋藻类和微生物中心(NCMA, Maine, USA),淡水藻小球藻(Lw 2006/68)采自 2006 年中国第 3 次北极黄河站考察,北极斯匹次卑尔根群岛黄河站(78°55'N, 11°56'E)附近的夏季冰川融水坑,样品低温(6 ± 0.5 °C)保存回国,在实验室分离纯化并保存于中国极地研究中心藻种库。

表 1 本研究中使用的微藻
Table 1 Microalgae strains used in this study

微藻 Microalgae	编号 No.	分类 Classification	来源 Source	培养基 Medium
脆杆藻 <i>Fragilariopsis</i> sp.	CCMP 2297	Bacillariophyta	巴芬湾	L1+Si
四棘藻 <i>Attheya septentrionalis</i>	CCMP 2084	Bacillariophyta	巴芬湾	f/2
海链藻 <i>Thalassiasira</i> sp.	CCMP 1056	Bacillariophyta	挪威海	f/2
微单胞藻 <i>Micromonas</i> sp.	CCMP 2099	Chlorophyta	巴芬湾	L1
小球藻 <i>Chlorella</i> sp.	Lw 2006/68	Chlorophyta	斯匹次卑尔根岛	B

微藻培养在光照培养箱中进行,温度为(6 ± 0.5) °C,光强为 2000 lx,光照周期为光:暗 = 12 h : 12 h。所有藻株的培养基参照表 1,海水均采自北极海域,将海水通过 0.45 μm 的膜过滤,121 °C,20 min 进行灭菌。维生素溶液通过 0.2 μm 滤器进行除菌。

1.2 微藻生长曲线的测定

微藻计数主要采用光学显微镜细胞计数^[16]。取 100 μL 混匀的藻液均匀加入细胞计数板中,光学显微镜(Olympus)(10×40)观察计数。计数从第 0 天开始,每 2 d 计数 1 次。

1.3 藻际环境的细菌采样

取不同生长期的藻液 10 mL 直接通过 0.2 μm 的聚碳酸膜(Whatman)过滤,获得游离和粘附的总细菌。取不同生长期的藻液 10 mL,先经膜过滤,获得微藻细胞的粘附细菌(Attached);其中 *Micromonas* sp. 由于细胞约为 2.0—3.0 μm ,选用孔径为 2.0 μm 的滤膜,其他藻株选用 3.0 μm 滤膜。将滤液再通过 0.2 μm 的滤膜,获得藻液中的游离细菌。滤膜及样于冰箱-80 °C 保存。

1.4 DNA 提取

DNA 提取参照 Zhou 等^[17]的方法进行。

1.5 16S rRNA 基因全长序列 PCR

参照 Bosshard 等^[18]的方法进行。16S rRNA 基因引物序列如下:27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC

AG -3') 和 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T -3')。PCR 反应条件为 94 ℃ 变性 4 min, 然后在 94 ℃ 45 s, 50 ℃ 45 s, 72 ℃ 1 min 循环 30 次, 72 ℃ 延伸 10 min。

1.6 16S rRNA 基因 V3 区的 PCR 扩增

采用 Shabir 等^[19]的方法进行。引物的序列如下: 341F (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAG GGG AGG CAG CAG-3') 和 534R (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'), 下划线处为 GC 钳序列。PCR 扩增在 Veriti Thermal Cycler (ABI) 上进行。以 1 μL 16S rRNA 全长序列 PCR 产物作为模板, PCR 反应条件: 94 ℃ 预变性 4 min, 然后是 30 循环 (94 ℃ 变性 30 s, 58 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min), 最后 72 ℃ 延伸 10 min。

1.7 变性梯度凝胶电泳 (DGGE)

800 ng—1 μg 16S rRNA 基因 V3 区扩增产物进行 DGGE 分离。用 D-code System 电泳仪 (Bio-Rad 公司) 进行 DGGE 电泳分离。制备变性梯度凝胶, 使 PAGE 胶浓度为 8%, 变性梯度 40%—60% (7 mol/L 尿素和 40% 甲酰胺为 100% 变性), 电泳缓冲液为 1×TAE, PCR 产物在 60 ℃, 200 V 条件下电泳 6 h。电泳完毕, 用 GelRed™ (Biotium) 染色 45—60 min。DGGE 图谱通过 Gel Doc 2000 凝胶成像系统 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 获得。

将聚丙烯酰胺凝胶中在同一个水平位置的条带割下, 放在 PCR 小管中, 并加入 20 μL MilliQ 水, 放在 4 ℃ 冰箱过夜, 以此为模板, 进行 16S rRNA V3 区 PCR 扩增, 实验条件同上。

1.8 DNA 序列测序和分析

按照 pMD18-T 载体试剂盒 (Takara, 大连) 说明进行操作。将 16S rRNA 基因 V3 区扩增产物分别同 pMD18-T 载体连接, 连接产物转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中。涂布至含有氨苄青霉素 SOC 平板上, 37 ℃ 培养 12 h。每个平板挑取克隆, 接入 500 μL SOC 液体培养基 37 ℃ 培养, 经 T 载体引物 PCR 扩增筛选阳性克隆, 扩增引物为 M13+(5'-GTA AAA CGA CGG CCA G -3') 和 M13-(5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC -3'), 送去 (南方基因测试中心) 测序。测序获得的 16S rRNA 序列进行 BLAST 比对 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 应用 CLUSTALX1.8 (多重序列比对程序) 进行匹配比对, 后用 PHYLIP 3.67 (进化树分析) 构建进化树^[20]。

1.9 聚类分析

根据电泳条带的有无, 运用图像分析软件 Quantity One (4.6.2) 分析 DGGE 图谱, 采用 UPGMA 法进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 生长曲线测定结果

5 株微藻的生长曲线见图 1。从图 1 中可以看出, 5 株微藻的生长周期约为 30 d。小球藻的 3 个生长阶段不明显, 将小球藻 3 个生长阶段大致划分, 延滞期约为 7 d, 随后进入指数生长期, 在 21 d 达到最大密度, 随后略微下降并稳定生长。其他 4 株微藻的生长阶段较明显, 脆杆藻、四棘藻、海链藻和微单胞藻的延滞期分别为前 9 d、5 d、12 d 和 9 d, 在 16 d、14 d、27 d 和 16 d 达到最大生长密度, 随后进入稳定生长期。藻液分别取自各个藻株的生长延滞期、指数期和稳定期 (图 1)。

2.2 藻际微生物多样性分析

从 DGGE 电泳图谱 (图 2A, 图 3A, 图 4A, 图 5A, 图 6A) 可以看出, 5 株微藻藻际细菌群落的条带的数目和位置有所区别, 说明不同藻株的藻际细菌群落组成不同。5 种藻际细菌群落的优势种均十分明显, 分别对应于 DGGE 图谱中的亮条带。较微弱 DGGE 条带所对应的细菌类群的数量可能相对较低。

基于 5 株微藻藻际细菌的 DGGE 图谱主要条带, 共获得 59 条克隆序列 (其中一条测序失败), 它们的测序结果经 BLAST 比对显示 (表 2), 5 株微藻藻际细菌种群与数据库中的已知序列的相似性为 87%—100%, 包括: Cyanobacteria、CFB 菌群、α-Proteobacteria、β-Proteobacteria、γ-Proteobacteria (图 7)。由表 2 和系统进化树

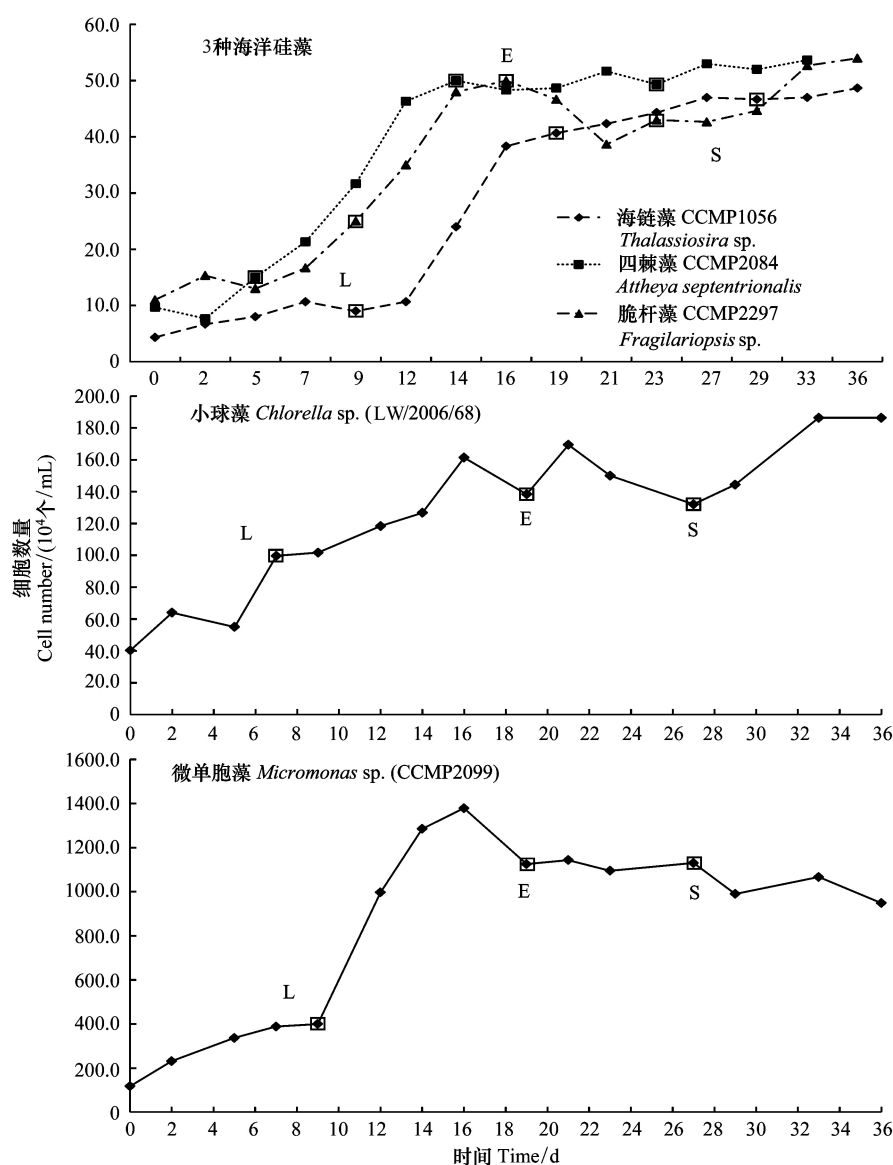


图1 5种不同微藻的生长曲线

Fig.1 The growth curve of five different microalgae involved into this study

L: 延滞生长期; E: 指数生长期; S: 稳定生长期

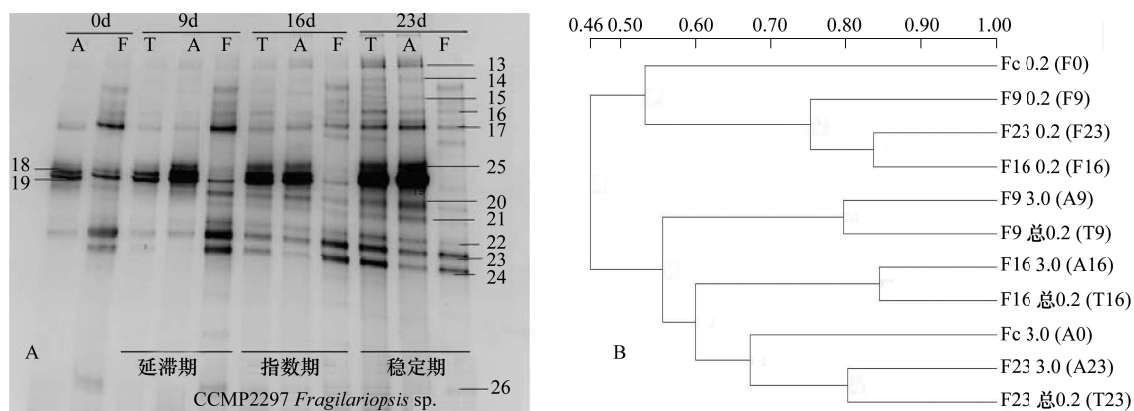


图2 脆杆藻藻际细菌群落的16S rRNA基因V3区的DGGE图谱和聚类分析图(T: 总细菌; A: 粘附细菌; F: 游离细菌)

Fig.2 DGGE patterns and cluster analysis of 16S rRNA gene V3 region amplification fragments of bacteria community in the phycosphere of *Fragilariopsis* sp.

(图 7)可以看出,从 5 株微藻培养液获得的细菌数量和类群有所不同。微单胞藻、脆杆藻、四棘藻和海链藻的藻际细菌中,主要由 *Cyanobacteria*、 α -*Proteobacteria* 和 γ -*Proteobacteria* 组成,仅微单胞藻和脆杆藻检测出 CFB 菌群。淡水藻株小球藻是由 *Cyanobacteria*、CFB 菌群、 α -*Proteobacteria*、 β -*Proteobacteria*,而无 γ -*Proteobacteria*。无论是哪种微藻,群落的优势种都十分明显,它们分别对应于 DGGE 泳道中的亮条带。从 DGGE 图和系统进化树中可以看出,微单胞藻藻际优势菌群为 *Cyanobacteria* 和 γ -*Proteobacteria*(图 7 中 M 表示);脆杆藻藻际优势菌群为 *Cyanobacteria*、CFB 和 γ -*Proteobacteria*(图 7 中 F 表示);小球藻藻际优势类群为 *Cyanobacteria* 和 β -*Proteobacteria*(图 7 中 C 表示);四棘藻藻际优势类群为 *Cyanobacteria*(图 7 中 A 表示);海链藻藻际优势类群为 *Cyanobacteria* 和 γ -*Proteobacteria*(图 7 中 T 表示)。可以发现 *Cyanobacteria* 和 γ -*Proteobacteria* 在这几株微藻的藻际环境中广泛存在。

脆杆藻藻际细菌测序的 DGGE 条带有 14 条(图 2A),属于 γ -*Proteobacteria* 和 *Cyanobacteria* 的序列各有 5 条,属于 α -*Proteobacteria* 和 CFB 的序列各有 2 条。其中 α -*Proteobacteria* 的序列属于红细胞科的亚硫酸盐杆菌属(*Sulfitobacter*), γ -*Proteobacteria* 的序列属于海洋杆菌属、希瓦菌属和假交替单胞菌科的交替假单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)等属,CFB 的序列属于奥文氏菌属(*Owenweeksia*),*Cyanobacter* 的序列属于盐螺旋菌属(*Halospirulina*)。亮度较高的条带为 Band_17、Band_18、Band_19、Band_23 和 Band_24。Band_17 属于奥文氏菌属,与香港牛尾海分离获得香港奥文氏菌(*Owenweeksia hongkongensis*)相似性为 95%,与普拉姆岛沿岸未培养拟杆菌细菌克隆 PI_4b12a 相似性为 99%。Band_18、Band_19 属于 *Chroococcales* 目,与 *Halospirulina tapeticola* 相似度为 91%,与墨西哥湾沿岸海水中未培养 *Cyanobacterium* 克隆 CM01187X1E11 相似性分别为 99%和 100%。Band_23 属于海洋杆菌属,与北极海冰中的嗜冷海杆菌相似性为 99%。Band_24 属于 *Chromatiaceae* 纲,与海洋沉积物中加拿大希瓦菌(*Shewanella canadensis*)的相似性为 93%,与来自密歇根湖近岸的未培养的 *Chromatiaceae* 纲的细菌克隆 Gap-2-29 相似性为 95%。

从四棘藻获得的 DGGE 条带有 12 条(图 3A),与 γ -*Proteobacteria* 相似的序列有 6 条,与 α -*Proteobacteria* 和 *Cyanobacteria* 相似的序列各有 3 条。其中 α -*Proteobacteria* 的序列属于陆丹式菌属(*Loktanella*), γ -*Proteobacteria* 中的序列属于交替单胞菌科海洋杆菌属和冰居杆菌属、假交替单胞菌科的交替假单胞菌属、甲基球形菌属(*Methylosphaera*)和寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)等,*Cyanobacteria* 的序列属于盐螺旋菌属。亮度较高的条带 Band_39、Band_40 均属于 *Chroococcales* 目,与已鉴定的 *Halospirulina tapeticola* 相似度为 91%,与来自墨西哥湾沿岸海水未培养 *Cyanobacterium* 克隆 PI_4g9g 相似性为 100%。

海链藻 DGGE 主要条带有 13 条(图 4A),与 γ -*Proteobacteria* 相似的序列有 7 条,与 α -*Proteobacteria* 相似的序列有 2 条,与 *Cyanobacter* 相似的序列有 4 条。其中 α -*Proteobacteria* 中的序列属于红细胞科的亚硫酸盐杆菌属和赫夫勒氏菌属(*Hoeflea*), γ -*Proteobacteria* 中的序列属于假单胞菌科的假单胞菌属(*Pseudomonas*)和铁还原单胞菌属(*Ferrimonas*),*Cyanobacteria* 中的序列属于 *Rubidibacter* 属和原绿球菌属。亮度较高的条带有 5 条,分别是 Band_49、Band_51 和 Band_55 属于 γ -*Proteobacteria*,Band_54、Band_56 属于 *Cyanobacteria*。Band_49、Band_51 和 Band_55 与铁还原单胞菌属相似性最高,与日本湾 *Ferrimonas kyonanensis* 相似性分别为 95%、94%和 95%,Band_49 与来自东部热带北太平洋的未培养 γ -*Proteobacteria* 克隆 JL-ETNP-R18 相似性为 96%。Band_51 和 Band_55 与来自墨西哥湾深海的未培养 γ -*Proteobacteria* 克隆 OV01102/03 和 H10-120 相似性分别为 95%和 96%。Band_54 与 *Rubidibacter* 属相似性最高,与来自西太平洋楚克环礁海水 *Rubidibacter lacunae* 相似性为 91%,与低盐度潮汐沉积物的未培养 *Cyanobacteria* 的克隆 D05RT35 相似性为 100%。Band_56 与海洋原绿球菌(*Prochlorococcus marinus*)相似性为 87%,与海洋环境中未培养的 *Cyanobacterium* 克隆 SGPW483 相似性为 97%。

微单胞藻藻际细菌测序的 DGGE 条带为 12 条(图 5A),分别属于 α -*Proteobacteria*(1 条)、 γ -*Proteobacteria*(6 条)、*Cyanobacter*(3 条)和 CFB(2 条),其中 α -*Proteobacteria* 的序列属于红细胞科的十八杆菌属(*Octadecabacter*), γ -*Proteobacteria* 的序列属于海洋杆菌(*Marinobacter*)、希瓦菌属(*Shewanella*)、嗜冷单胞菌属

(*Psychromonas*)、深海弯菌属(*Thalassolituus*)和伦黑墨氏菌属(*Rheinheimera*)等属,CFB的序列属于*Leadbetterella*属,Cyanobacter的序列属于原绿球菌(*Prochlorococcus*)属。亮度较高的Band_4、Band_5、Band_8和Band_9均属于 γ -Proteobacteria。其中Band_4和Band_8与希瓦菌属(*Shewanella*)相似性最高,与海洋沉积物获得的加拿大希瓦菌(*Shewanella canadensis*)相似性分别为92%和94%,Band_4与Norwegian深海海水环境的未培养细菌克隆Kwat47相似性为98%。Band_8与来自密歇根湖近岸的未培养细菌克隆Gap-2-29相似性为95%。Band_5与海洋原绿球菌(*Prochlorococcus marinus*)相似性为87%,与南极冰川附近海水未培养的细菌克隆IB0346E7相似性为100%。Band_9为海洋杆菌属(*Marinobacter*),与来北极海冰嗜冷海杆菌(*Marinobacter psychrophilus*)相似性为100%。

小球藻藻际细菌测序的DGGE条带有7条(图6A),属于 α -、 β -Proteobacteria和Cyanobacteria的序列各有2条,仅1条属于CFB。 α -Proteobacteria中的序列属于中间根瘤菌属(*Mesorhizobium*)和短波单胞菌属(*Brevundimonas*), β -Proteobacteria中的序列属于*Herminiimonas*属,CFB中的序列属于比自欧式属(*Bizionia*),Cyanobacteria中的序列属于盐螺旋菌属。亮度较高的条带Band_29、Band_30和Band_31,Band_29属于*Herminiimonas*属,与来自瓶装矿物水的*Herminiimonas fonticola*相似性为99%。Band_30、Band_31属于*Chroococcales*目,与*Halospirulina tapeticola*相似性为91%,与来自墨西哥湾沿岸海水的未培养Cyanobacterium克隆Gap-3-60相似性分别为100%和99%。

Cyanobacteria和 α -Proteobacteria在5株微藻藻际环境中均有发现。脆杆藻、小球藻和四棘藻藻际细菌Cyanobacteria的条带相同(均为*Halospirulina tapeticola*),而微单胞藻和海链藻藻际细菌Cyanobacteria是有相同的条带,相同条带为*Prochlorococcus marinus*,与其他3株的Cyanobacteria不同。脆杆藻和海链藻藻际环境均有 α -Proteobacteria的*Sulfitobacter*属的细菌。 β -Proteobacteria只在淡水的小球藻中存在。除小球藻,其他海洋微藻均有 γ -Proteobacteria存在。其中微单胞藻、脆杆藻和四棘藻藻际环境中,均有*Shewanella*属的细菌。而在脆杆藻、四棘藻和海链藻中有*Pseudoalteromonas*属的细菌。*Marinobacter*属的细菌在微单胞藻和脆杆藻的藻际环境中存在。

2.3 不同微藻藻际粘附细菌和游离细菌多样性

微单胞藻藻际细菌16S rRNA基因DGGE电泳图谱聚类分析(图5B)显示游离细菌和粘附细菌分别各自聚为一簇,但是两者之间的相似性指数达到80%以上,说明微单胞藻藻际游离细菌和粘附细菌无显著变化。

脆杆藻、四棘藻、海链藻和小球藻聚类分析(图2B、图3B、图4B、图6B)显示游离细菌和粘附细菌各自聚为一簇,相似性分别为45%、68%、56%和60%,说明游离细菌和粘附细菌多样性显著不同。根据图2—图4、图6和表2也可以看出,脆杆藻中游离细菌由CFB和 γ -Proteobacteria组成,粘附细菌由Cyanobacteria组成;小球藻游离细菌由 β -Proteobacteria组成,粘附细菌由Cyanobacteria组成;四棘藻的游离细菌由 γ -Proteobacteria组成,粘附细菌由Cyanobacteria组成;海链藻的游离细菌由 α -Proteobacteria和 γ -Proteobacteria,粘附细菌由Cyanobacteria和 α -Proteobacteria组成。

2.4 不同生长期的藻际细菌多样性

脆杆藻藻际细菌聚类分析(图2B)显示游离细菌在脆杆藻生长的延滞期(F9)、指数期(F16)与稳定期(F23)相似性在75%以上,与F0的相似性为53%,说明游离细菌的群落结构在脆杆藻不同生长期无明显变化,只是与脆杆藻刚培养时的细菌群落发生了明显变化。在延滞期时游离细菌的DGGE条带有5条,而在稳定期游离细菌的条带有8条(图2A)。粘附细菌中,相似度最高的是稳定期(A23)和A0,为67%,与延滞期(A9)相似度最低,为50%,说明粘附细菌在脆杆藻的不同生长时期的多样性不同,在延滞期时粘附细菌的条带仅有4条,而到了稳定期粘附细菌的条带达到11条(图2A), γ -Proteobacteria和CFB多样性增加,并且 α -Proteobacteria也被检测到。生长初期游离细菌和粘附细菌的多样性有明显差异,且游离细菌多样性较为丰富。到了生长末期,游离和粘附细菌群落组成更加丰富。

四棘藻藻际细菌聚类分析(图3B)显示游离细菌在四棘藻生长的延滞期(F5)与刚培养时(F0)相似度在

80%以上,而 F5 和 F0 与指数期(F14)聚在一起,相似度在 70%以上,而这 3 个时期的游离细菌与稳定期的相似度最低,仅为 25%。粘附细菌中指数期(A14)和稳定期(A23)相似度在 90%以上,与延滞期(A5)的相似度也在 85%以上,说明游离细菌或粘附细菌多样性在四棘藻各个生长期并没有太大的变化。Band_39、Band_40 微藻各个生长阶段的粘附状态的丰度比游离状态的多。

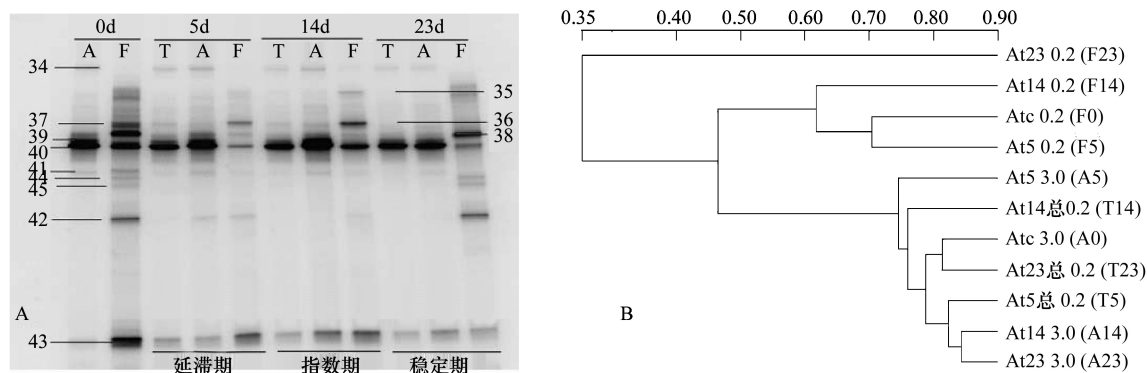


图3 四棘藻藻际细菌群落的 16S rRNA 基因 V3 区的 DGGE 图谱和聚类分析图(T: 总细菌;A: 粘附细菌;F:游离细菌)

Fig.3 DGGE patterns and cluster analysis of 16S rRNA gene V3 region amplification fragments of bacteria community in the phycosphere of *Attheya septentrionalis*

海链藻藻际细菌聚类分析(图 4B)显示,粘附细菌中,指数期(A19)和延滞期(A9)相似度为 95%,这两个时期与稳定期的相似度为 75%。游离细菌中,稳定期(F29)和指数期(F19)相似度为 85%,与延滞期的相似度也在 73%。说明粘附细菌和游离细菌的多样性在整个生长周期无明显变化。DGGE 图谱(图 4A)显示了丰富的海链藻藻际细菌的多样性,优势关联菌群在整个生长周期无明显变化。其中主要关联菌群如(Band_49, Band_56)粘附状态的丰度比游离状态的少,而 Band_51, Band_54, Band_55 作为粘附状态的丰度则比游离状态的多。

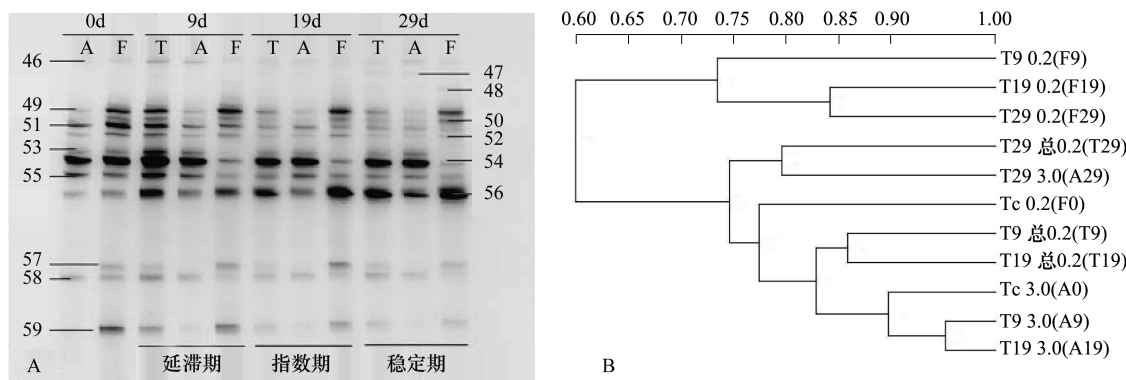


图4 海链藻藻际细菌群落的 16S rRNA 基因 V3 区的 DGGE 图谱和聚类分析图(T: 总细菌;A: 粘附细菌;F:游离细菌)

Fig.4 DGGE patterns and cluster analysis of 16S rRNA gene V3 region amplification fragments of bacteria community in the phycosphere of *Thalassiosira* sp.

微单胞藻藻际细菌聚类分析(图 5B)显示游离细菌在微单胞藻生长的延滞期(F9)、指数期(F19)和稳定期(F27)相似度在 85%以上,粘附细菌在微单胞藻生长延滞期(A9)和稳定期(A27)相似度为 93%,而微单胞藻延滞期和稳定期的粘附细菌与指数期(A19)相似度最低。说明微单胞藻整个生长周期中,游离细菌和粘附细菌结构稳定。

小球藻藻际细菌聚类分析(图 6B)显示游离细菌在小球藻生长的稳定期(F27)和指数期(F19)相似度最高,为 86%,然后小球藻生长的延滞期和稳定期的游离细菌与延滞期(F7)聚在一起,相似度也在 80%以上。粘附细菌在小球藻生长的延滞期(A7)和稳定期(A27)聚在一起,相似度为 93%,小球藻在这两个时期的粘附

细菌与指数期(A19)相似度最低,为 49%。说明小球藻整个生长周期的关联菌群多样性和优势关联菌群均较为稳定,无显著变化,但是粘附细菌和游离细菌的多样性和优势菌群则明显不一致(图 6A)。

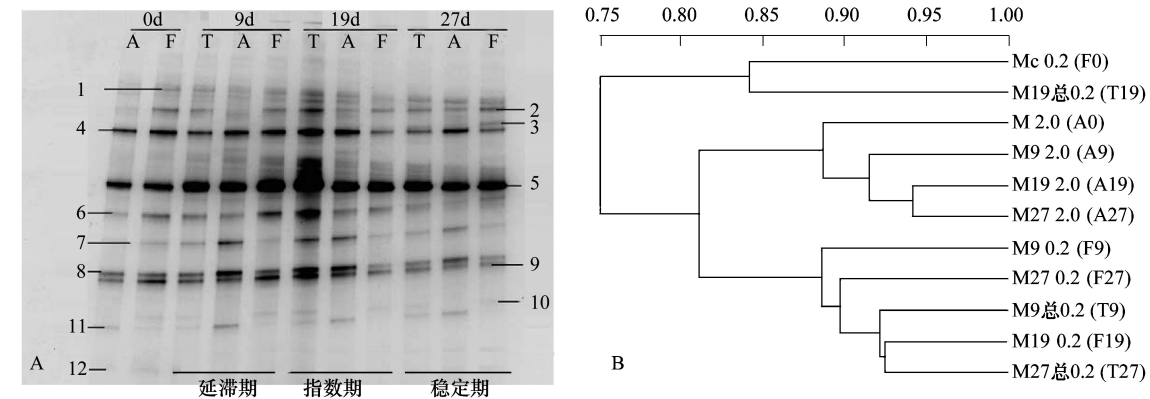


图 5 微单胞藻藻际细菌群落的 16S rRNA 基因 V3 区的 DGGE 图谱和聚类分析图(T: 总细菌;A: 粘附细菌;F:游离细菌)

Fig.5 DGGE patterns and cluster analysis of 16S rRNA gene V3 region amplification fragments of bacteria community in the phycosphere of *Micromonas* sp.

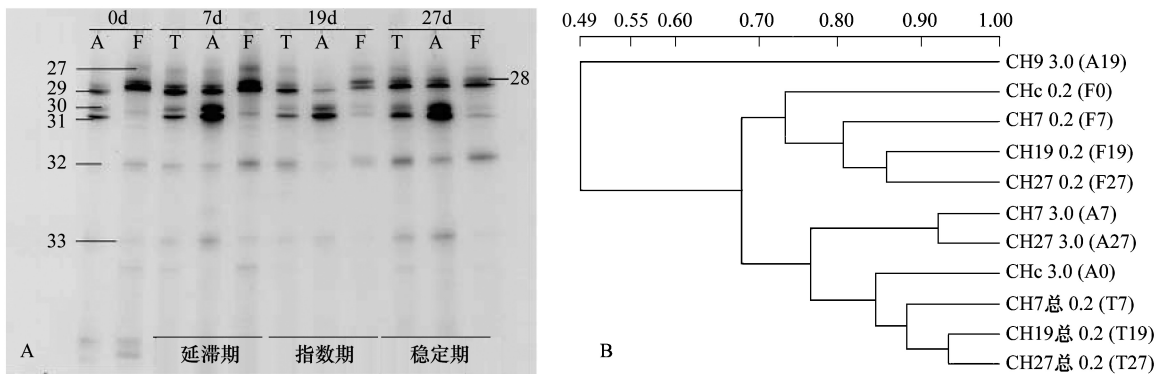


图 6 小球藻藻际细菌群落的 16S rRNA 基因 V3 区的 DGGE 图谱和聚类分析图(T: 总细菌;A: 粘附细菌;F:游离细菌)

Fig.6 DGGE patterns and cluster analysis of 16S rRNA gene V3 region amplification fragments of bacteria community in the phycosphere of *Chlorella* sp.

表 2 北极微藻藻际细菌 16S rRNA 基因 DGGE 条带鉴定结果

Table 2 DGGE bands of bacterial populations from Arctic microalgae identified by partial 16S rRNA gene analysis					
DGGE 条带	分类	有效描述的物种的最相似序列(登录号)	相似度/%	数据库中最相似的序列(登录号)	相似度/%
DGGE band	Taxonomic group	Most closely related sequence from a validly described bacterial species (GenBank accession No.)	Sequence similarity	Most closely related database sequence (GenBank accession No.)	Sequence similarity
微单胞藻 <i>Micromonas</i> sp.					
Band_1	Gammaproteobacteria	<i>Psychromonas arctica</i> (NR_028821)	94	clone Kwat47(EU035868)	98
Band_2	Gammaproteobacteria	<i>Thalassolituus oleivorans</i> (NR_028972)	94	clone B78-116 (EU287080)	100
Band_3	Gammaproteobacteria	<i>Rheinheimera texasensis</i> (NR_043133)	94	clone SHAB602(GQ348690)	95
Band_4 *	Gammaproteobacteria	<i>Shewanella canadensis</i> (NR_042994)	92	clone Kwat47(EU035868)	98
Band_5 **	Cyanobacteria	<i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. <i>Pastoris</i> (NR_028762)	87	clone IB0346E7(HQ730061)	100
Band_6 *	Cyanobacteria	<i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. <i>Pastoris</i> (NR_028762)	87	clone IB0346E7(HQ730061)	100
Band_7	CFB	<i>Leadbetterella byssophila</i> (NR_043233)	94	clone ME05b11G6 (FJ828154)	95

续表

DGGE 条带 DGGE band	分类 Taxonomic group	有效描述的物种的最相似序列(登录号) Most closely related sequence from a validly described bacterial species (GenBank accession No.)	相似度/% Sequence similarity	数据库中最相似的序列(登录号) Most closely related database sequence (GenBank accession No.)	相似度/% Sequence similarity
Band_8 *	Gammaproteobacteria	<i>Shewanella canadensis</i> (NR_042994)	94	clone Gap-2-29 (EU642169)	95
Band_9 *	Gammaproteobacteria	<i>Marinobacter psychrophilus</i> (NR_043513)	100		
Band_10	Alphaproteobacteria	<i>Octadecabacter antarcticus</i> (NR_027580)	98	<i>Octadecabacter</i> sp. ANT9202 (AY167337)	99
Band_11	CFB	<i>Leadbetterella byssophila</i> (NR_043233)	94	clone ME05b11G6 (FJ828154)	95
Band_12	Cyanobacteria	<i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. <i>Pastoris</i> (NR_028762)	87	clone IB0346G2 (HQ730072)	100
脆杆藻 <i>Fragilariopsis</i> sp.					
Band_13	Gammaproteobacteria	<i>Pseudoalteromonas arctica</i> (NR_043959)	100		
Band_14	Gammaproteobacteria	<i>Marinobacter psychrophilus</i> (NR_043513)	99	<i>Marinobacter psychrophilus</i> (FR691434)	99
Band_15	Gammaproteobacteria	<i>Shewanella canadensis</i> (NR_042994)	93	clone Kwat47	99
Band_16	CFB	<i>Owenweeksia hongkongensis</i> (NR_040990)	95	clone PI_4b12a (AY580701)	99
Band_17 *	CFB	<i>Owenweeksia hongkongensis</i> (NR_040990)	95	clone PI_4b12a (AY580701)	99
Band_18 **	Cyanobacteria	<i>Halospirulina tapeticola</i> (NR_026510)	91	clone CM01187X1E11 (GU170707)	99
Band_19 **	Cyanobacteria	<i>Halospirulina tapeticola</i> (NR_026510)	91	clone CM01187X1E11 (GU170707)	100
Band_20	Alphaproteobacteria	<i>Sulfitobacter marinus</i> (NR_043936)	99	<i>Sulfitobacter</i> sp. LM-16 (AJ534237)	100
Band_21	Alphaproteobacteria	<i>Sulfitobacter marinus</i> (NR_043936)	98	<i>Sulfitobacter</i> sp. LM-16 (AJ534237)	100
Band_22	Cyanobacteria	<i>Halospirulina tapeticola</i> (NR_026510)	91	clone AW03F12 (EF630247)	100
Band_23 *	Gammaproteobacteria	<i>Marinobacter psychrophilus</i> (NR_043513)	99	<i>Marinobacter psychrophilus</i> (FR691434)	100
Band_24 *	Gammaproteobacteria	<i>Shewanella canadensis</i> (NR_042994)	93	clone Gap-2-29 (EU642169)	95
Band_25	Cyanobacteria	<i>Halospirulina tapeticola</i> (NR_026510)	91	clone AW03F12 (EF630247)	100
Band_26	Cyanobacteria	<i>Halospirulina tapeticola</i> (NR_026510)	91	clone AW03F12 (EF630247)	100
小球藻 <i>Chlorella</i> sp.					
Band_27	Alphaproteobacteria	<i>Mesorhizobium thioglycolicum</i> (NR_042358)	100		
Band_28 *	Betaproteobacteria	<i>Herminiimonas fonticola</i> (NR_043090)	100		
Band_29 *	Betaproteobacteria	<i>Herminiimonas fonticola</i> (NR_043090)	99		
Band_30 **	Cyanobacteria	<i>Halospirulina tapeticola</i> (NR_026510)	91	clone Gap-3-60 (EU639772)	100
Band_31 **	Cyanobacteria	<i>Halospirulina tapeticola</i> (NR_026510)	91	clone Gap-3-60 (EU639772)	99
Band_32	CFB	<i>Bizionia myxarmorum</i> (NR_043121)	98	CLAb44 (HQ230110)	98
Band_33	Alphaproteobacteria	<i>Brevundimonas nasdae</i> (NR_028633)	100		100
四棘藻 <i>Attheya septentrionalis</i>					
Band_34	Cyanobacteria	<i>Halospirulina tapeticola</i> (NR_026510)	91	MBE6 (AF191757)	100
Band_35	Gammaproteobacteria	<i>Pseudoalteromonas espejani</i> (NR_029285)	98	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. BSi20627 (EU330358)	99
Band_36	Gammaproteobacteria	<i>Glaciecola punicea</i> (NR_036866)	99	<i>Glaciecola</i> sp. D94 (DQ652563)	100
Band_37	Gammaproteobacteria	<i>Methylosphaera hansonii</i> (NR_026033)	96	clone MOH_577_24 (EU399445)	99
Band_38	Gammaproteobacteria	<i>Glaciecola punicea</i> (NR_036866)	98	<i>Glaciecola</i> sp. D94 (DQ652563)	98
Band_39 *	Cyanobacteria	<i>Halospirulina tapeticola</i> (NR_026510)	91	clone PI_4g9g (AY580402)	100
Band_40 **	Cyanobacteria	<i>Halospirulina tapeticola</i> (NR_026510)	91	clone PI_4g9g (AY580402)	100
Band_41	Gammaproteobacteria	<i>Shewanella canadensis</i> (NR_042994)	93	clone Kwat47 (EU035868)	99
Band_42	Gammaproteobacteria	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i> (NR_025104)	100		
Band_43	Alphaproteobacteria	<i>Loktanella atrilutea</i> (NR_041390)	100		
Band_44	Alphaproteobacteria	<i>Loktanella salsilacus</i> (NR_025539)	100		
Band_45	Alphaproteobacteria	<i>Loktanella atrilutea</i> (NR_041390)	100		
海链藻 <i>Thalassiosira</i> sp.					
Band_46	Cyanobacteria	<i>Rubidobacter lacunae</i> (NR_044104)	91	clone 16B_215 (AM501739)	100

续表

DGGE 条带 DGGE band	分类 Taxonomic group	有效描述的物种的最相似序列(登录号) Most closely related sequence from a validly described bacterial species (GenBank accession No.)	相似度/% Sequence similarity	数据库中最相似的序列(登录号) Most closely related database sequence (GenBank accession No.)	相似度/% Sequence similarity
Band_47	Gammaproteobacteria	<i>Ferrimonas kyonanensis</i> (NR_041387)	95	clone JL-ETNP-R18(AY726789)	96
Band_48	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas cedrina</i> subsp. <i>Fulgida</i> strain (NR_042147)	98	M71_D72(FM992728)	98
Band_49 *	Gammaproteobacteria	<i>Ferrimonas kyonanensis</i> (NR_041387)	95	clone JL-ETNP-R18(AY726789)	96
Band_50	Gammaproteobacteria	<i>Ferrimonas kyonanensis</i> (NR_041387)	95	clone H10- 120(HQ222995)	96
Band_51 *	Gammaproteobacteria	<i>Ferrimonas kyonanensis</i> (NR_041387)	94	clone OV01102/03(HM587890)	95
Band_52	Cyanobacteria	<i>Rubidibacter lacunae</i> (NR_044104)	91	clone DT_068(DQ881210)	100
Band_53	Gammaproteobacteria	<i>Ferrimonas kyonanensis</i> (NR_041387)	95	clone H10- 120(HQ222995)	96
Band_54 **	Cyanobacteria	<i>Rubidibacter lacunae</i> (NR_044104)	91	clone D05RT35 (GQ242576)	100
Band_55 *	Gammaproteobacteria	<i>Ferrimonas kyonanensis</i> (NR_041387)	95	clone H10- 120(HQ222995)	96
Band_56 **	Cyanobacteria	<i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. <i>Pastoris</i> (NR_028762)	88	clone SGPW483(GQ346754)	97
Band_58	Alphaproteobacteria	<i>Hoeflea alexandrii</i> (NR_042321)	100		
Band_59	Alphaproteobacteria	<i>Sulfitobacter mediterraneus</i> (NR_026472)	100		

* * 条带最亮; * 条带比较亮

3 讨论

3.1 不同微藻藻际细菌多样性

采用 PCR-DGGE 方法对北极不同生境的 5 株微藻藻际环境微生物多样性进行了序列系统发育分析。研究表明,5 株北极微藻藻际细菌具有显著的种间特异性,每个藻株的主要附生微生物群落差异显著。Schäfer 等通过 PCR-DGGE 的方法对 6 株海洋硅藻的附生细菌群落进行分析,6 株硅藻具有不同的附生细菌群落,在 6 株硅藻中检测出的主要类型都是特有的,只有少数类型在多个硅藻中共同存在^[4]。不同微藻藻际细菌群落结构的不同预示着微藻提供为这些细菌提供了特异性的生存条件,从而对细菌进行选择。研究的 3 株硅藻藻际细菌 γ -Proteobacteria 占优势, α -Proteobacteria 占少数,在四棘藻中没有检测出 CFB,这与 Schäfer 等研究的硅藻(双尾藻、威氏海链藻、冰河拟星杆藻、聚生角毛藻和圆筛藻)的藻际细菌主要由 α -Proteobacteria 和 CFB 占优势不同,预示着尽管是相同纲的藻株,其藻际细菌群落结构差异明显。

根据表 2 和图 5 可以看出,微单胞藻藻际细菌为 α -Proteobacteria、 γ -Proteobacteria、Cyanobacteria 和 CFB 菌群四类。 β -Proteobacteria 通常在淡水环境中的非常丰富,多数情况下在海洋样品中的含量是很低或者是无法检测出来的,因此 β -Proteobacteria 不是典型的海洋浮游细菌^[21-22]。从淡水藻小球藻藻际细菌发现 β -Proteobacteria 存在,但是无 γ -Proteobacteria。Fisher 等对 3 株淡水绿藻 *Desmidium grevillii*、*Hyalotheca dissiliens* 和 *Spondylosium pulchrum* 研究显示克隆的序列中存在 β -Proteobacteria^[23]。这些结果说明 β -Proteobacteria 在淡水环境中广泛存在, γ -Proteobacteria 是典型的海洋细菌,尽管在海洋中大量存在,但是在本研究中的小球藻藻际环境中没有检测到,预示了 γ -Proteobacteria 可能在小球藻-细菌间的相互作用并不重要。

Grossart 等研究圆海链藻和骨条藻这两株硅藻藻际细菌多样性,发现细菌主要属于 α -Proteobacteria、 γ -Proteobacteria 和 CFB 菌群 3 类,并且 α -Proteobacteria 的 *Roseobacter* 在这两株硅藻都有存在^[5]。在本研究中 Cyanobacteria、 α -Proteobacteria、 γ -Proteobacteria 在 3 株硅藻:脆杆藻、四棘藻和海链藻藻际环境中均有分布,CFB 菌群仅在脆杆藻中存在。多种藻类藻际细菌的系统发育分析反映了 α -Proteobacteria、 γ -Proteobacteria 和 CFB 广泛存在。

在 5 株微藻藻际环境中都检测到 Cyanobacteria。在多数极地环境中 Cyanobacteria 不仅在光合自养微生物占优势地位,而且构成了微生物生态系统的生物量。有报道在北极海洋存在 Cyanobacteria,但是很少是浮游植物的主要成员^[24]。

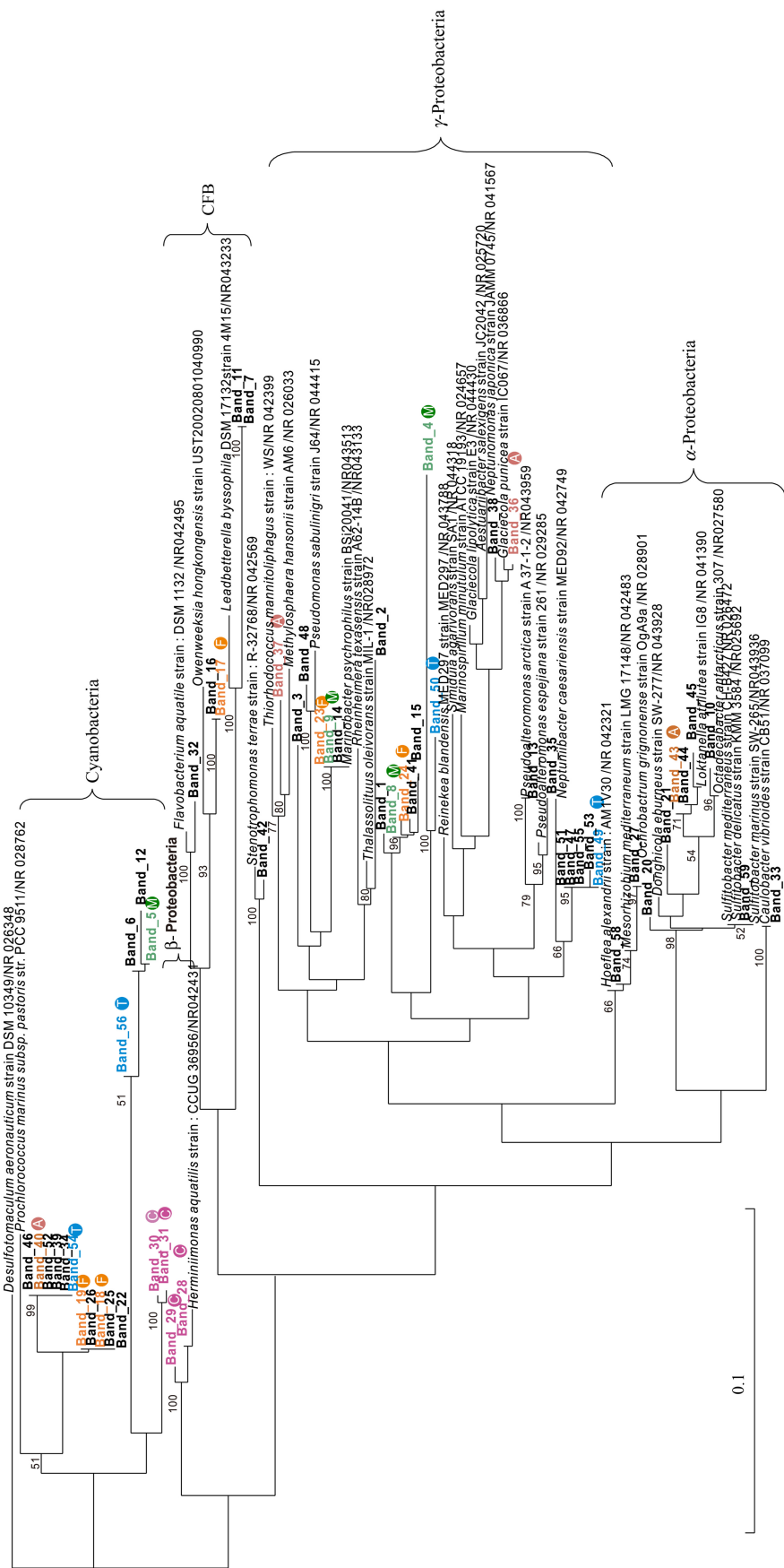


图 7 5 种微藻实际细菌的 16S rRNA 基因 V3 区序列系统发育树

Fig 7 Phylogenetic trees of bacterial 16S rRNA V3 gene sequences obtained from phycosphere of five microalgae

系统发育树采用邻位法构建，分枝上的数字为 1000 次自展值分析所得大于 55% 的值；线段代表进化距离；本研究中获得的主要带用字母表示，与微藻相关的 DGGE 的主要带用带字母的彩圈标记；A、C、F、M 和 T 分别代表四棘藻、小球藻、脆杆藻、微单胞藻和海绵藻

3.2 不同微藻藻际粘附细菌和游离细菌多样性

微单胞藻细菌结构稳定,游离细菌和粘附细菌的群落结构组成差异并不明显,几乎由相同的种类组成,仅在丰度上存在细微的差异(游离细菌和粘附细菌的一些条带在亮度上有差异,如条带 4 在微单胞藻指数期时的条带)。从图 5A 中可以看到,各个条带在游离细菌和粘附细菌中均存在,说明在微藻培养液中,细菌菌群在游离细菌和粘附细菌中都没有明显的差异。

脆杆藻、小球藻、四棘藻和海链藻游离细菌和粘附细菌的群落结构组成不同,游离细菌主要由 α -Proteobacteria 和 γ -Proteobacteria,而粘附细菌主要由 Cyanobacteria 组成。该结果与 Fandino 和 Grossart 研究结果一致^[3,5]。在腰鞭毛藻藻际环境中,游离细菌主要由 α -和 γ -Proteobacteria 组成,而粘附细菌则由 CFB 构成^[3],在硅藻藻际环境中,游离细菌由 α -Proteobacteria 组成,粘附细菌由 CFB 构成^[5],说明至少在这两类微藻中游离细菌、粘附细菌的组成是相似的。并且也有研究表明不同藻种来源的藻际细菌也是不同的。在海洋环境中,硅藻藻际粘附细菌主要由 γ -Proteobacteria 和 CFB 组成^[25],在湖泊与河流中,硅藻藻际粘附细菌则主要由 β -Proteobacteria 组成^[26-27]。因此,推测微藻藻际环境中的细菌类群可能与所处的环境相关。

3.3 不同生长期藻际细菌多样性

微单胞藻、小球藻、四棘藻和海链藻各生长期藻际微生物的 DGGE 图谱比较稳定,说明微生物多样性变化不大,主要差别仅为游离细菌和粘附细菌丰度上有所不同。该结果与 Schäfer 的研究结果较一致, Schäfer 发现藻际微生物的 DGGE 图谱在整个生长期非常稳定,仅发现 2 株硅藻海链藻(*Thalassiosira weissflogii*)和角毛藻(*Chaetoceros socialis*)存在的微小差异,在不同的时间条带亮度不同。

脆杆藻藻际细菌的研究结果则显示粘附细菌的多样性在延滞期、指数期和稳定期有显著不同;游离细菌只是在接种时不同,在延滞期、指数期和稳定期细菌群落结构无明显差异。在延滞期时,脆杆藻粘附细菌的条带仅有 4 条,游离细菌的条带有 5 条,而到了稳定期粘附细菌的条带达到 11 条,游离细菌的条带有 8 条,在稳定生长期新出现了 α -Proteobacteria 的 *Sulfitobacter* 属和 γ -Proteobacteria 的 *Shewanella* 属细菌。Riemann 等在研究由海链藻主导的硅藻赤潮时发现,在赤潮到达顶峰时细菌的 3 种主要种群消失,随后新的种群出现,主要是由特化的 α -Proteobacteria 和 CFB 相关细菌组成,其中 α -Proteobacteria 主要是玫瑰杆菌属(*Roseobacter*)的细菌,而 CFB 则分布在 *Flexibacter* 属、*Cytophaga* 属和勒温氏菌属(*Lewinella*)^[7]。Grossart 等对圆海链藻的藻际细菌多样性研究表明,藻际指数期和稳定期的细菌多样性显著不同,在稳定期检测到细菌数量明显最多, α -Proteobacteria 主要由 *Roseobacter* 组成,第二大类 CFB 则主要有 *Brumimicrobium* 属和极地杆菌属(*Polaribacter*)。 α -Proteobacteria 的数量在指数生长期由 22% 增长到 31%,而在稳定生长期进一步增长至 41%^[5]。说明海链藻的藻际细菌群落结构相似,主要的关联群落主要是 α -Proteobacteria 和 CFB 组成,而脆杆藻的藻际细菌群落结构则明显不同。杨晓茹对塔玛亚历山大藻的微生物多样性研究也表明指数期的细菌多样性远低于延滞期和稳定期^[8]。这些研究均与本研究一致,在微藻从刚开始培养至稳定期的转变过程中,微藻释放的有机物发现了变化,从而导致游离和粘附细菌的群落结构均发生了变化。 α -Proteobacteria 的多样性和数量在稳定生长期增长,预示了 α -Proteobacteria 更能适应稳定期的微藻藻际环境。

致谢:感谢中国极地研究中心张瑾实验员对研究的帮助。

参考文献 (References):

- [1] Bell W, Mitchell R. Chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products. *Biological Bulletin*, 1972, 143(2): 265-277.
- [2] De Long E F, Franks D G, Alldredge A L. Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs. free-living marine bacterial assemblages. *Limnology and Oceanography*, 1993, 38(5): 924-934.
- [3] Fandino L B, Riemann L, Steward G F, Long R A, 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.
- [4] Schäfer H, Abbas B, Witte H, Muyzer G. Genetic diversity of 'satellite' bacteria present in cultures of marine diatoms. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 42(1): 25-35.

- [5] Grossart H P, Levold F, Allgaier M, Simon M, Brinkhoff T. Marine diatom species harbour distinct bacterial communities. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(6): 860-873.
- [6] Rooney-Varga J N, Giewat M W, Savin M C, Sood S, LeGresley M, Martin J L. Links between phytoplankton and bacterial community dynamics in a coastal marine environment. *Microbial Ecology*, 2005, 49(1): 163-175.
- [7] Riemann L, Steward G F, Azam F. Dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(2): 578-587.
- [8] 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 株产毒藻际细菌多样性分析. *环境科学*, 2009, 30(1): 271-279.
- [9] Bates S S, Gaudet J, Kaczmarek I, Ehrman J M. Interaction between bacteria and the domoic-acid-producing diatom *Pseudo-nitzschia multiseries* (Hasle) Hasle; can bacteria produce domoic acid autonomously? *Harmful Algae*, 2004, 3(1): 11-20.
- [10] 王新, 周立红, 郑天凌, 宁修仁. 塔玛亚历山大藻藻际细菌溶藻过程. *生态学报*, 2007, 27(7): 2864-2871.
- [11] Ferrier M, Martin J L, Rooney-Varga J N. Stimulation of *Alexandrium fundyense* growth by bacterial assemblages from the Bay of Fundy. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 92(4): 706-716.
- [12] Bano N, Hollibaugh J T. Phylogenetic composition of bacterioplankton assemblages from the Arctic Ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(2): 505-518.
- [13] Brinkmeyer R, Knittel K, Jürgens J, Weyland H, Amann R, Helmke E. Diversity and Structure of Bacterial Communities in Arctic versus Antarctic Pack Ice. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(11): 6610-6619.
- [14] Junge K, Imhoff F, Staley T, Deming W. Phylogenetic diversity of numerically important arctic sea-ice bacteria cultured at subzero temperature. *Microbial Ecology*, 2002, 43(3): 315-328.
- [15] Groudieva T, Kambourova M, Yusef H, Royter M, Grote R, Trinks H, Antranikian G. Diversity and cold-active hydrolytic enzymes of culturable bacteria associated with Arctic sea ice, Spitzbergen. *Extremophiles*, 2004, 8(6): 475-488.
- [16] 侯建军, 黄邦钦, 戴相辉. 赤潮藻细胞计数方法比较研究. *中国公共卫生*, 2004, 20(8): 907-908.
- [17] Zhou J Z, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(2): 16-322.
- [18] Bosshard P P, Santini Y, Grütter D, Stettler R, Bachofen R. Bacterial diversity and community composition in the chemocline of the meromictic alpine Lake Cadagno as revealed by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, 31(2): 173-182.
- [19] Dar S A, Kuenen J G, Muyzer G. Nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis approach to determine the diversity of sulfate-reducing bacteria in complex microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(5): 2325-2330.
- [20] Luo W, Li H R, Cai M H, He J F. Diversity of microbial eukaryotes in Kongsfjorden, Svalbard. *Hydrobiologia*, 2009, 636(1): 233-248.
- [21] Nold S C, Zwart G. Patterns and governing forces in aquatic microbial communities. *Aquatic Ecology*, 1998, 32(1): 17-35.
- [22] Glöckner F O, Fuchs B M, Amann R. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: A first comparison based on fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(8): 3721-3726.
- [23] Fisher M M, Wilcox L W, Graham L E. Molecular characterization of epiphytic bacterial communities on charophycean green algae. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(11): 4384-4389.
- [24] Vincent W F. Cyanobacterial dominance in the polar regions // Whitton B A, Potts M, eds. *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*. Dordrecht: Kluwer, 2002: 321-340.
- [25] Bidle K D, Azam F. Bacterial control of silicon regeneration from diatom detritus: significance of bacterial ectohydrolases and species identity. *Limnology and Oceanography*, 2001, 46(7): 1606-1623.
- [26] Grossart H P, Simon M. Bacterial colonization and microbial decomposition of limnetic organic aggregates (lake snow). *Aquatic Microbial Ecology*, 1998, 15(2): 127-140.
- [27] Böckelmann U, Manz W, Neu T R, Szewzyk U. Characterization of the microbial community of lotic organic aggregates ('river snow') in the Elbe river of Germany by cultivation and molecular methods. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, 33(2): 157-170.