

DOI: 10.5846/stxb201512102472

薛俊增, 肖南燕, 王琼, 吴惠仙. 洋山港海域细菌群落多样性的季节变化. 生态学报, 2016, 36(23): 7758-7767.

Xue J Z, Xiao N Y, Wang Q, Wu H X. Seasonal variation of bacterial community diversity in Yangshan Port. Acta Ecologica Sinica, 2016, 36(23): 7758-7767.

洋山港海域细菌群落多样性的季节变化

薛俊增, 肖南燕, 王 琼, 吴惠仙*

上海海洋大学船舶压载水检测实验室, 上海 201306

摘要: 洋山深水港是中国大陆首个在远离陆地达 30 多 km 的海岛上建立的大型国际港口, 水环境复杂; 港口环境受港口建设和航运等人类活动的影响巨大。曾有学者针对洋山深水港海域表层海水中古菌多样性进行过调查和分析, 但涉及包括细菌在内的微生物多样性尚未深入研究。利用高通量测序技术对洋山港海域细菌丰度、种类组成特征的季节变化进行了研究。结果表明该海域可培养细菌总数 $1.2\text{—}9.1\times 10^4$ CFU/mL, 相比其他近岸海域和港口处于较低水平; 该海域可培养细菌总数整体情况呈现夏季 > 秋季 > 冬季 > 春季, 夏季的可培养细菌总数与其他季节区别明显。该海域优势类群为变形菌门 (Proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和蓝藻门 (Cyanobacteria), 秋季、冬季和春季样品优势类群为 γ -变形菌 (γ -proteobacteria) 和 α -变形菌 (α -proteobacteria), 夏季样品优势类群为黄杆菌 (Flavobacteriales)。秋季和冬季的优势类群为盐单胞菌属 (*Halomonas*) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*), 夏季则被聚球蓝细菌 (*Synechococcus*) 和黄杆菌属 (*Flavobacteriaceae*) 等代替。盐单胞菌属在洋山港海域内的秋冬春 3 季所占比例均接近或超过 50%, 是最具生长优势的细菌类群, 是洋山港海域细菌群落中的优势类群, 其生长情况同样存在季节性差异。群落多样性指数显示, 该海域微生物多样性整体情况呈现夏季 > 春季 > 冬季 > 秋季, 夏季相较其他季节而言, 细菌种群较多, 物种较为丰富, 多样性程度高; 秋冬两季微生物物种组成相对单一, 多样性程度低。结合同时期环境因子, 对洋山港海域细菌群落与环境因子数据进行了典范对应分析, 结果显示影响洋山港细菌群落季节性差异的主要环境因子依次为总有机碳、盐度、叶绿素 a 和温度。海水温度和盐度等重要环境因子的季节变化, 导致细菌优势类群存在明显的季节差异。

关键词: 洋山港; 细菌; 多样性; 高通量测序技术

Seasonal variation of bacterial community diversity in Yangshan Port

XUE Junzeng, XIAO Nanyan, WANG Qiong, WU Huixian*

Ballast water detecting lab of Shanghai Ocean University, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Yangshan Port is an international port with a complex water environment, located on an island more than 30 kilometers from mainland China. Human activities, such as port construction and shipping, have a great impact on the environment around the port. Researchers have investigated and analyzed the archaeal diversity in the surface seawater of Yangshan Port; however, the diversity of bacteria in Yangshan Port has not been studied in depth. Seasonal variation of bacterial abundance and characteristics of community composition in Yangshan Port were investigated by using a high-throughput sequencing approach. We explored the seasonal variation in dominant groups, total cultivable bacteria, and relationships between microbes and environmental parameters. Results indicated that the density of total cultivable bacteria in Yangshan Port was $1.2\text{—}9.1\times 10^4$ CFU/mL, which was lower than in other offshore areas and ports. The density of total cultivable bacteria was highest in summer, with a significant difference compared to the other three seasons; the order of total cultivable bacteria across various seasons was summer > autumn > winter > spring. Results also indicated that the dominant groups differed across seasons. Diversity analyses revealed the presence of Proteobacteria, Bacteroidetes, and

基金项目: 上海市自然科学基金资助项目 (15ZR1420900); 海洋公益性行业科研专项资助项目 (201305027); 上海高校海洋科学一流学科建设资助项目; 上海高校知识服务平台资助项目 (ZF1206)

收稿日期: 2015-12-10; **修订日期:** 2016-05-09

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: hxwu@shou.edu.cn

Cyanobacteria. Dominant groups were γ -proteobacteria and α -proteobacteria from autumn to spring, while Flavobacteriales dominated in summer. Autumn and winter were dominated by the *Halomonas* and *Pseudomonas* genera that were replaced by *Synechococcus* and *Flavobacteriaceae* in summer. The proportion of *Halomonas* was approximately 50% in autumn, winter, and spring; *Halomonas* was the most competitive of the bacterial community groups, however, there were also seasonal differences in its growth. Compared to the other three seasons, microbes were more abundant and diverse in summer; the order of bacterial diversity across various seasons was summer > spring > winter > autumn. Bacterial community composition was relatively simple with low levels of diversity throughout autumn and winter. Canonical correspondence analysis was used to explore the relationship between microbes and environmental parameters of Yangshan Port. The most significant factors affecting bacterial dominance were total organic carbon, salinity, chlorophyll-a, and temperature. Seasonal changes in temperature, salinity, total organic carbon, and other important abiotic factors affected the bacterial biomass, community composition, and dominant groups of microorganisms in Yangshan Port.

Key Words: Yangshan Port; bacteria; diversity; high-throughput sequencing

港口作为水陆交通的集结点,是联系陆地运输和海洋运输的枢纽,随着国际贸易的发展,港口的建设以及经营活动对港口区域及当地环境产生了一系列影响^[1-3],如改变生物栖息地、石油和化学品泄漏产生的环境污染等,其中远洋船舶压载水、船舶废水的排放以及船体附着生物的释放等有可能导致生物入侵^[4-7]。微生物作为生态环境中的分解者是海洋生态系统的重要组成部分,参与海洋生态系统中的物质循环和能量流动^[8-9],其中存在着具有独特的生理代谢和功能特征的类群,在维持海洋生态环境的稳定中起重要作用^[8]。研究港口微生物多样性对保护港口及邻近海域的生态环境等有重要的理论和现实意义。

国内外学者在近岸和港口海域对微生物进行了研究,结果显示表层浮游细菌总体丰度呈现近岸高于远岸的趋势^[10],微生物主要类群为变形菌^[10-15],港口微生物组成和数量的变化主要受到水温、季节、潮汐和取样位置等多因素影响^[16-20],不同研究区域内微生物物种组成存在差异^[10,15,21-22],另外近岸和港口的海域中可能还存在未被认知的细菌类群^[10-11],港口水域中微生物群落组成特点和全面的群落多样性分析少见报道。

洋山深水港是中国大陆首个在远离陆地达 30 多 km 的海岛上建立的大型国际港口,是世界最大规模的集装箱港区之一^[23],受台湾暖流、长江冲淡水及江苏沿岸流等水流影响,泥沙含量大,水环境复杂^[24-25],同时港口环境也受港口建设和航运等人类活动的巨大影响。曾有学者针对洋山深水港海域表层海水中的古菌多样性进行过调查和分析^[26],但涉及包括细菌在内的微生物多样性尚未深入研究。本研究应用高通量测序技术对洋山港海域细菌的多样性进行了分析,研究了细菌丰度和类群组成的特征,并进一步探讨了优势类群的季节性差异、可培养细菌丰度、群落结构与环境因子间的关系,丰富了港口生态学基础理论研究,并为洋山港入侵生物学和环境保护提供基础和依据。

1 材料方法

1.1 样品采集

为分析洋山港微生物群落的季节变化,分别于 2014 年 10 月(秋季)、2015 年 1 月(冬季)、2015 年 4 月(春季)和 2015 年 7 月(夏季)在洋山港小洋山港口东岸(122.0°E,30.6°N)采集样品(图 1)。海水样品的水文信息(水温、盐度、溶解氧和 pH)当场使用仪器测定并记录,叶绿素 a 依据《海洋监测规范》GB17378.7—2007 测定,总有机碳依据《海洋监测规范》GB17378.4—2007 测定。现场使用灭菌蓝口玻璃瓶收集海水样品,于 2 小时内低温运送回上海海洋大学船舶压载水检测实验室。

1.2 可培养细菌总数

可培养异养细菌采用海水 2216E 平板涂布培养计数方法(Hetero-trophic Bacterial 2216E Plate Count, HPC)计数^[27]。选取平均菌落数在 30—300 之间的平板,计数菌落形成单位数(Colony-Forming Units, CFU)。

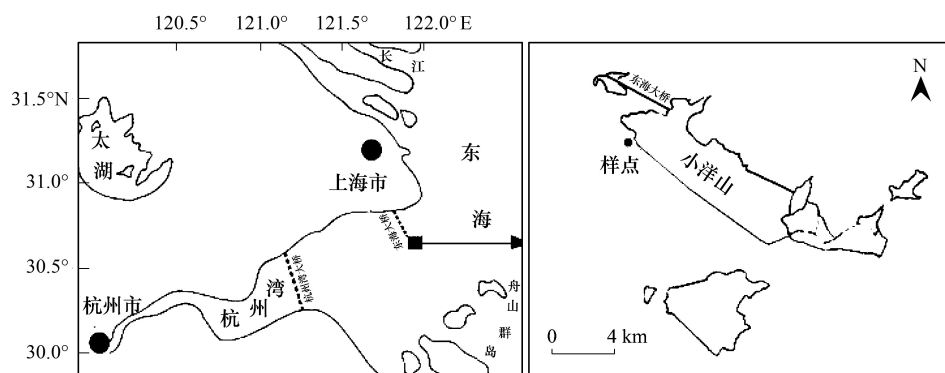


图1 样点设置

Fig.1 Sampling site

1.3 微生物 DNA 提取与测序

1.3.1 微生物基因组 DNA 提取

采样现场收集的海水样品,在 2 h 内低温运回实验室后,立即对各样品进行处理:取 1 L 海水,经 3 μm 和 0.22 μm 微孔滤膜(滤膜事先灭菌处理)两级过滤后,弃去 3 μm 微孔滤膜,0.22 μm 微孔滤膜上即压载水微生物;使用灭菌手术镊子,将 0.22 μm 滤膜转移到 1.5 mL 离心管中,对个各样品进行编号后,立即放入 -80°C 冰箱中冷冻 4 h;取出冷冻后放有微生物滤膜的离心管,使用灭菌手术剪刀和镊子,将 0.22 μm 滤膜剪碎转移到 1.5 mL 灭菌离心管中;使用 3S DNA 分离提取试剂盒(上海博彩生物技术有限公司)对微生物的 DNA 进行提取。

1.3.2 细菌 16S rDNA 的 PCR 扩增

将 DNA 样品稀释至 20 ng/ μL 后作为 PCR 模板,采用引物 515F(5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3')和 907R(5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3')对细菌 16S rRNA 的 V4 和 V5 可变区进行扩增^[28]。PCR 反应体系 20.0 μL : ddH₂O 9.6 μL , dNTP (2.5 mmol/L) 2.0 μL , 5 $\times$ FastPfu Buffer 4.0 μL , Fast Pfu Polymerase 0.4 μL , 模板 (20 ng/ μL) 2.00 μL , 引物 F (5 $\mu\text{mol/L}$) 1.00 μL , 引物 R (5 $\mu\text{mol/L}$) 1.00 μL 。PCR 反应程序: 98 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 27 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,扩增出目的条带后进行后续实验。

1.3.3 Illumina 的 MiSeq 平台测序

在 Illumina 公司 MiSeq 平台测序得到的原始数据后对有效序列进行处理,其中有效序列(对测序得到的原始数据,根据 barcode 区分筛选出含有完整 barcode 的序列^[29])共 174,569 条;优质序列(对有效序列进行质量控制和优化,筛选过滤出长度 > 300 bp,无模糊碱基,平均质量分值 > 25,并在核糖体数据库具有 $\geq 80\%$ 匹配度的序列^[29]) 162,116 条,其中序列长度在 301—400 bp 的占 99.98%,优质序列将用于后续生物信息分析。较高的总序列数和较高的优质序列比例表明样本 OTU 可以有效表征样本中微生物种群。

1.4 数据分析

利用各水环境指标和可培养细菌总数四季均值数据矩阵,采用 SPSS 16.0 软件进行 One-way ANOVA(单变量因素方差分析)进行显著性检验。

运用 Qiime (version 1.7.0) 进行序列过滤^[30],运用 Mothur 软件 (version 1.31.2) 中 uchime 的方法去除嵌合体序列^[31],得到最终用于后续分析的优质序列。用 Mothur 软件在 97% 的相似水平下对序列进行 OTU (Operational Taxonomic Units) 聚类^[31],注释用数据库为 Silva (Release 11.9)^[32]。在 Qiime 中调用 BLAST 的方法对序列数据库进行比对^[33],获得每个 OTU 代表序列的分类学信息。

采用 FastTree 的方法对 OTU 的代表序列构建系统发育树^[34]。根据 beta 多样性距离矩阵进行层次聚类 (Hierarchical clustering) 分析^[29],使用非加权组平均法 UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic

mean) 算法构建树状结构(图 3)。根据各样品物种丰度情况,应用运用 Mothur 软件中的 summary.single 命令,计算生物多样性指数,包括:群落丰富的指数——ACE 指数^[35]和 Chao 指数^[35];群落多样性 (Community diversity) 的指数——Simpson 指数^[36]和 Shannon 指数^[37]。

2 结果与分析

2.1 洋山港海域水环境特征

洋山港样点的水温四季变化范围为 11.0—27.1℃,盐度变化范围为 17.4—21.1,溶解氧变化范围 0.232—0.352 μmol/L,pH 变化范围 8.02—8.80,叶绿素 a 变化范围 0.42—1.80 μg/L,总有机碳变化范围 2.13—11.86 mg/L。洋山港海域秋冬两季总有机碳含量和盐度高,夏秋两季叶绿素 a 含量高;方差分析结果显示四季中水温、盐度、溶解氧、叶绿素 a 和总有机碳两两之间存在显著性差异 ($P<0.05$)。

表 1 洋山港近岸海水样品信息

Table 1 Yangshan Port seawater sample information

采样季节	采样日期	水温	盐度	溶解氧	pH	叶绿素 a	总有机碳
Seasons	Sampling Date	Temperature/℃	Salinity	DO/(μmol/L)		Chl-a/(μg/L)	TOC/(mg/L)
秋季 Autumn	2014 年 10 月	20.3±0.2	19.7±0.1	0.262±0.000	8.80±0.01	1.29±0.01	11.86±0.01
冬季 Winter	2015 年 1 月	11.0 ±0.1	21.1±0.1	0.352±0.001	8.12±0.01	0.75±0.01	8.22±0.01
春季 Spring	2015 年 4 月	14.9±0.2	19.3±0.2	0.253±0.001	8.02±0.01	0.42±0.01	5.21±0.04
夏季 Summer	2015 年 7 月	27.1±0.1	17.4 ±0.1	0.232±0.001	8.21±0.01	1.80±0.01	2.13±0.02

2.2 微生物丰度分析

洋山港微生物样品丰度结果见图 2,结果显示:洋山港海域夏季样品中可培养细菌总数要高于其他季节,秋季、冬季和春季海水样品细菌总数为 $1.2\text{—}3.9\times 10^4$ CFU/mL,而夏季海水样品细菌总数为 9.1×10^4 CFU/mL;样品 OTU 数量为 30759—43297,4 季的 OTU 数量变化不明显。另方差分析结果显示可培养细菌总数除春季和冬季外,其他季节两两之间均存在显著性差异 ($P<0.05$)。洋山港海域夏季样品中可培养细菌总数明显要高于其他季节,总体情况呈现夏季>秋季>冬季>春季。

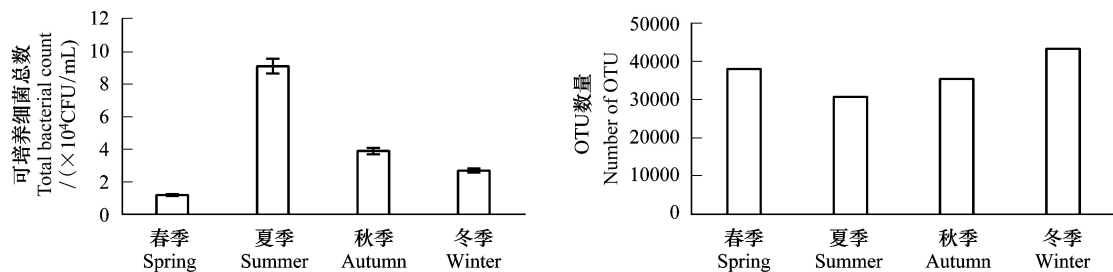


图 2 样品丰度

Fig.2 Abundance of samples

2.3 物种组成和优势类群

统计洋山港海域四季微生物样品序列信息,包括 18 门,33 纲,83 目,142 科,242 属,326 种;门类分别是变形菌门 (Proteobacteria 84.7%)、拟杆菌门 (Bacteroidetes 8.8%)、蓝藻门 (Cyanobacteria 3.6%)、放线菌门 (Actinobacteria 2.5%)、厚壁菌门 (Firmicutes 0.1%)、浮霉菌门 (Planctomycetes 0.1%)、脱铁杆菌门 (Deferribacteres 0.03%)、迷踪菌门 (Elusimicrobia 0.03%)、酸杆菌门 (Acidobacteria 0.03%)、疣微菌门 (Verrucomicrobia 0.02%)、芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes 0.01%)、装甲菌门 (Armatimonadetes 0.01%)、黏胶球形菌门 (Lentisphaerae 0.004%)、NPL-UPA2 0.004%、绿弯菌门 (Chloroflexi 0.004%)、螺旋体 (Spirochaetae 0.001%)。另有 0.1% 的 OTU 序列在进行 BLAST 比对后没有得到确切的分类学信息。

洋山港海域的优势类群为 γ -变形菌 (γ -proteobacteria 65.7%)、 α -变形菌 (α -proteobacteria 15.4%)、黄杆菌 (Flavobacteriales 8.5%)、蓝藻 (Cyanobacteria 3.6%) 和 β -变形菌 (β -proteobacteria 3.5%) 且存在季节性差异; 其中秋季、冬季和春季样品优势类群为 γ -变形菌和 α -变形菌, 夏季样品优势类群为黄杆菌和蓝藻; 秋冬春 3 个季节的优势类群均为盐单胞菌属 *Halomonas*, 夏季的优势类群为聚球蓝细菌 *Synechococcus* 和黄杆菌属 *Flavobacteriaceae*。盐单胞菌属 *Halomonas* 为 γ -变形菌纲, 盐单胞菌科微生物, 革兰氏阴性菌^[38-39], 在春季样品中所占比例高达 50.4%, 而在夏季样品中只有 2.0%; 同属于 γ -变形菌的假单胞菌属 *Pseudomonas* 在冬季、秋季和春季的含量均远远高于夏季样品中的含量; 聚球蓝细菌 *Synechococcus* 在夏季样品中含量为 12.6%, 而在在冬季、秋季和春季的含量均低于 0.1%; 黄杆菌属 *Flavobacteriaceae* 在冬季、秋季和春季的含量均远远低于夏季样品中的含量。洋山港秋季、冬季与春季样品物种组成相对一致, 在图中聚成一簇, 而夏季样品物种组成与其他季节不同, 差距明显。另外虽秋冬两季物种组成相对一致, 但在具体微生物类群上依旧存在差异, 其中 *Vibrio*, *Pseudoalteromonas* 在冬季含量高于秋季, *Halomonas* 在秋季含量高于冬季, *Tepidimonas* 仅在秋季出现。

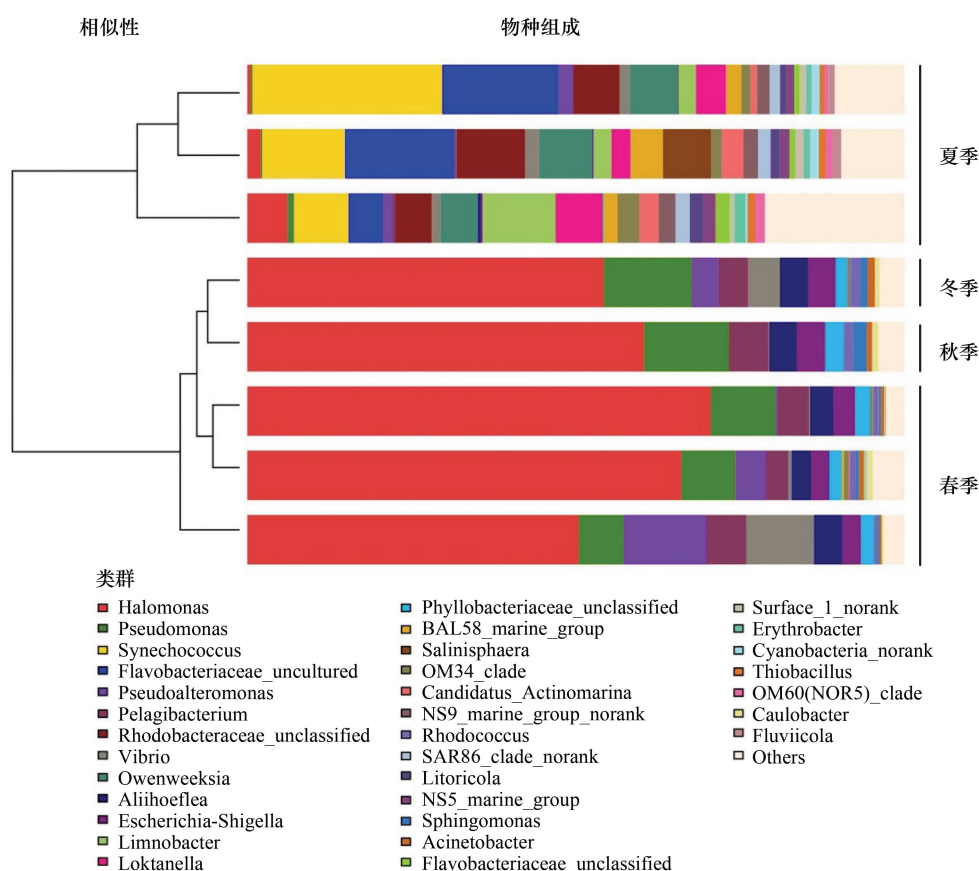


图3 各样品类群比较和聚类分析

Fig.3 Comparison of bacterial groups in each sample

2.4 群落多样性指数

群落多样性指数是反映群落丰富度和均匀度的综合指标, 洋山港海域海水样品群落多样性指数见表 2, 结果显示洋山港微生物多样性整体情况呈现夏季 > 春季 > 冬季 > 秋季。夏季微生物相较其他季节而言, 微生物种群较多, 物种较为丰富, 多样性程度高; 秋冬两季微生物物种组成相对单一, 物种丰富程度不及夏季, 多样性程度低。其中夏季样品的 ACE 指数、Chao 指数和 Shannon 指数均高于其他季节样品, 秋季、冬季和春季样品的 Shannon 指数为 1.65—1.86, 夏季样品为 3.49, 高于其他季节样品约 1 倍, 各多样性指数均显示夏季样品生物多样性程度高。

表 2 细菌群落多样性指数				
Table 2 Bacterial diversity index				
样品编号	ACE 指数	Chao 指数	Shannon 指数	Simpson 指数
Sample No.	ACE	Chao	Shannon	Simpson
春季 Spring	136	138	1.68	0.448
夏季 Summer	381	388	3.49	0.064
秋季 Autumn	68	74	1.65	0.388
冬季 Winter	75	74	1.86	0.322

2.5 群落多样性与环境因子相关性分析

结合同时期环境因子,对洋山港海域细菌的物种组成与环境因子数据进行了典范对应分析(图4),排序图中,前两个排序轴的特征值分别为0.821和0.105,环境因子轴与样点排序轴之间的相关系数分别为0.832和0.798。结果显示各环境因子对物种分布均有不同程度的影响,6个环境因子中叶绿素a含量与第一排序轴成最大正相关0.802,其次为温度成第二正相关0.762;总有机碳含量(-0.909)和盐度(-0.852)与第一排序轴成负相关,另外pH(-0.058)和溶解氧(-0.522)与第一排序轴相关性相对较弱。秋季、冬季和春季各环境因子间数值较为相近,各样品在排序图中距离相对较近,结果显示物种的分布与盐度和总有机碳含量呈正相关,与温度和叶绿素a含量呈负相关;而夏季样品在排序图中与其他季节样品相距较远,结果显示夏季样品中物种的分布与温度和叶绿素a含量呈正相关,与盐度和总有机碳含量呈负相关。

3 讨论

在海洋生态系统中,可培养细菌总数是评价海洋生态环境的重要参数,反应了该区域微生物生存状态和水生态环境^[40],一般港口或近岸海域可培养细菌总数为 10^4 — 10^7 CFU/mL^[10-15,41-42],洋山港海域可培养细菌总数为 1.2 — 9.1×10^4 CFU/mL,相比其他近岸或港口处于较低水平(表3)。研究表明该海域营养条件不如外

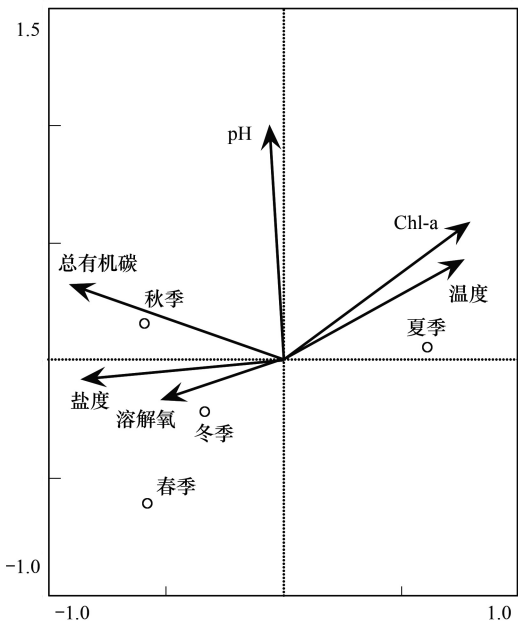


图4 细菌群落的典范对应分析

Fig.4 Canonical correspondence analysis of bacterial communities

表 3 各海域可培养细菌总数比较			
Table 3 The total number of cultivable bacteria			
海域	季节	可培养细菌总数/($\times 10^4$ CFU/mL)	参考文献
Areas	Seasons	Culturable total bacteria($\times 10^4$ CFU/mL)	References
北黄海近岸	夏季(2011年8月)	175	[47]
	冬季(2012年1月)	167	
长江口邻近海域	夏季(2006年8月)	120—260	[19]
	冬季(2007年1月)	40—80	
外高桥港口	夏季(2012年7月)	300	[18]
	冬季(2013年1月)	120	
芦潮港港口	夏季(2012年7月)	200	[18]
	冬季(2013年1月)	50	
洋山港港口	夏季(2015年7月)	9.1	本文
	冬季(2014年1月)	2.7	

高桥港、芦潮港等河口或近岸港口^[43];而悬浮物含量为 160—2900 mg/L(未发表数据),较其他近岸或港口水域表层高(约 10^{-1} — 10^3 mg/L)^[44-45]。水体中营养物质是限制浮游生物生长繁殖的重要因素^[24],另外高浓度悬浮颗粒会大大削弱水体中的真光层厚度^[46],降低海洋初级生产力,可培养细菌所需营养物质受限制,导致该类群数量相比其他近岸或港口处于较低水平。

由于近岸海洋生态环境的差异,不同海域生存着不同的海洋微生物^[22]。洋山港水域细菌主要由变形菌、拟杆菌这两大类组成,其中 γ -变形菌为优势类群;山东近海海水样品中 α -变形菌为优势类群^[20];北黄海近海海水样品中 γ -变形菌和黄杆菌为优势类群^[47];这些类群均为海水常见细菌类群,这一结果与国内外海洋细菌组成的相关研究结果一致^[10-15,41-42]。在本次研究中,秋季、冬季和春季优势菌群为 γ -变形菌和 α -变形菌,夏季优势类群为黄杆菌,细菌优势类群存在明显的季节差异。

从群落多样性与环境因子相关性分析结果可以看出,洋山港海域秋冬季物种的分布主要与盐度和总有机碳含量呈正相关,而夏季物种的分布主要与叶绿素 a 含量呈正相关。秋冬春 3 季的主要优势类群为盐单胞菌属和假单胞菌属,这两个类群的总和在当季样品中所占比例约 58.5%—73.4%,该海域秋冬季水温偏低,营养水平处于全年相对较低水平^[48];在海洋生态系统中,海水温度、盐度和营养盐等是影响细菌群落分布的最主要因素^[49-50]。在温度和营养条件均不利的秋冬季,具有很强的适应能力,对温度、盐度和溶解氧的适应范围广泛的盐单胞菌属^[38-39,51],成为该时段数量最大的类群;另外由于营养水平处于相对较低水平,许多异养细菌的生长受到限制,但假单胞菌属营养要求简单,分解有机质能力极强,且增殖速度快,该属很大一部分属于耐冷菌,能在低温下良好生长^[39,52],假单胞菌属在冬季生长优势明显,成为该时段的优势类群。而在夏季,该海域细菌的优势类群出现明显的变化,盐单胞菌属和假单胞菌属被聚球蓝细菌和黄杆菌属等代替,该时段细菌群落多样性程度高,物种较为丰富,且除聚球蓝细菌外多数为异养细菌。随夏季的到来,海水温度升高,浮游细菌的新陈代谢能力逐渐增强;叶绿素 a 含量处于四季较高水平,加上该海域各水流交锋随季风交替,营养物质在夏季交换频繁^[53],环境状况、物质和能量条件得以改善,能利用浮游植物细胞溶出物以及浮游动物摄食过程溶出的有机物碎屑的各种异养细菌得以繁殖生长。自养生长的聚球蓝细菌和异养细菌在能量和物质相对充足的夏季,成为该时段的优势类群。其中聚球蓝细菌 *Synechococcus* 是海洋浮游生物群落的重要组分,是海洋环境中初级生产力的主要贡献者^[54],在夏季太阳辐射增强、水温升高的有利条件下积极地进行光合作用,大量繁殖生长。肖天等人^[55]、Agawin 等人^[56]和 Du Rand 等人^[57]均对蓝细菌在海域中生物量的变化进行过研究,结果表示蓝细菌的生物量具有季节差异,由于研究的海域和方法的不同,生物量最高值出现的月份并不一致,但均表示海水温度是影响蓝细菌生物量变化的主要因素;在本次研究中,蓝细菌的丰度在夏季最高,我们认为这一情况是由太阳辐射和海水水温在夏季均处于最高,蓝细菌的光合作用强,导致蓝细菌成为该时段优势类群。另外,随夏季水温升高,浮游细菌的新陈代谢能力逐渐增强,黄杆菌等异养细菌通过降解来自于藻类的有机物为自身生长提供来源^[58],而且被黄杆菌分解的有机物还能为其其它异养细菌提供食物来源,导致异养细菌大量生长,夏季细菌多样性程度高;而在冬季具有较高优势的假单胞菌在竞争激烈的夏季表现较弱,有研究推测假单胞菌的分布与季节性温度变化有关^[59],夏季含量较低,与本文研究结果较一致。综上所述,海水温度等重要环境因子的季节变化通过影响微生物群落的生存条件而影响着微生物群落组成以及种群数量,导致微生物优势类群存在明显的季节差异;环境中物质和能量的丰富程度影响着不同类型微生物的生长,导致夏季优势类群与秋冬春差异较大。

盐单胞菌属为革兰氏阴性菌,是一类中度嗜盐菌^[38-39,51],在洋山港海域内秋冬春 3 季所占比例均接近或超过 50%,综合洋山港海域四季细菌群落的物种分布情况来看,盐单胞菌是最具生长优势的细菌类群,是洋山港海域细菌群落中的优势类群,但其生长情况同样存在季节性差异。群落多样性与环境因子相关性分析结果显示,秋冬春季物种的分布主要与盐度呈正相关,而夏季与盐度呈负相关;环境因子相关性结果也显示秋冬春季的盐度与夏季间存在显著性差异。盐单胞菌属的生长对盐度依赖大,对营养盐含量要求低^[38-39,51],在温度较低且盐度相对较高的秋冬季,其他异养细菌生长受到温度和营养盐限制生存状态不佳,但盐单胞菌适应

了该时段相对较高的盐度环境,生存优势明显;但在夏季,该海域海水盐度降低,使得盐单胞菌生长受到限制,盐单胞菌的生存优势降低显著;同时在夏季光照水平和营养盐水平上升,海水温度升高,浮游细菌的新陈代谢能力逐渐增强,依靠光合作用自养生长的聚球蓝细菌和通过降解来自于藻类的有机物为自身生长提供来源的异养细菌成为该时段的优势类群。

海洋微生物群落在维持海洋生态环境的稳定中起重要作用,海洋环境中不同微生物群落结构有所差异,一些特殊的微生物群落在生态环境中所起的调控作用也不相同,其中在本次研究中检测到的盐单胞菌属微生物具有很强的适应能力,对温度、盐度和溶解氧的适应范围广^[38-39,51],某些菌株还具有很强的耐受和去除某些重金属离子的能力,在污水处理与生物修复方面可能具有重要的应用价值^[51],此类微生物具有独特的生理代谢和功能特征。在今后的港口微生物多样性研究中,我们还应该关注对环境污染有调节控制作用的微生物类群,对其功能基因的测定、表达机制和作用机制等进行进一步研究,这类对海洋环境的监测和修复具有重要意义微生物类群应该得到重点关注和进一步的合理利用。

参考文献 (References):

- [1] Chen B, Zhang L P. Practice on strategic environmental assessment of harbor planning. *Shanghai Environmental Sciences*, 2003, 22(12): 1013-1016.
- [2] Waters R C. Port economic impact studies: practice and assessment. *Transportation Journal*, 1977, 16(3): 14-18.
- [3] Zhao F M, Wang D Z, Wei X. Strategic environment assessment of general layout planning of port. *Environmental Science & Technology*, 2007, 30(7): 64-66.
- [4] Altug G, Gurun S, Cardak M, Ciftci P S, Kalkan S. The occurrence of pathogenic bacteria in some ships' ballast water incoming from various marine regions to the Sea of Marmara, Turkey. *Marine Environmental Research*, 2012, 81: 35-42.
- [5] Emami K, Askari V, Ullrich M, Mohinudeen K, Anil A C, Khandeparker L, Burgess J G, Mesbahi E. Characterization of bacteria in ballast water using MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38515.
- [6] Ruiz G M, Rawlings T K, Dobbs F C, Drake L A, Mullady T, Huq A, Colwell R R. Global spread of microorganisms by ships. *Nature*, 2000, 408(6808): 49-50.
- [7] Takahashi C K, Lourenço N G G S, Lopes T F, Rall V L M, Lopes C A M. Ballast water: a review of the impact on the world public health. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 2008, 14(3): 393-408.
- [8] Caron D A. Marine microbial ecology in a molecular world: what does the future hold?. *Scientia Marina*, 2005, 69(S1): 97-110.
- [9] Coelho F J R C, Santos A L, Coimbra J, Almeida A, Cunha Â, Cleary D F R, Calado R, Gomes N C M. Interactive effects of global climate change and pollution on marine microbes: the way ahead. *Ecology and Evolution*, 2013, 3(6): 1808-1818.
- [10] 白洁, 刘小沙, 侯瑞, 赵阳国, 高会旺. 南海南部海域浮游细菌群落特征及影响因素研究. *中国环境科学*, 2014, 34(11): 2950-2957.
- [11] Du J K, Xiao K, Huang Y L, Li H X, Tan H M, Cao L X, Lu Y J, Zhou S N. Seasonal and spatial diversity of microbial communities in marine sediments of the South China Sea. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2011, 100(3): 317-331.
- [12] Siam R, Mustafa G A, Sharaf H, Moustafa A, Ramadan A R, Antunes A, Bajic V B, Stingl U, Marsis N G R, Coolen M J L, Sogin M, Ferreira A J S, Dorry H E. Unique prokaryotic consortia in geochemically distinct sediments from Red Sea Atlantis ii and discovery deep brine pools. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42872.
- [13] Sun F L, Wang Y S, Wu M L, Wang Y T, Li Q P. Spatial and vertical distribution of bacteria in the Pearl River estuary sediment. *African Journal of Biotechnology*, 2012, 11(9): 2256-2266.
- [14] Zeng Y X, Zhang F, He J F, Lee S H, Qiao Z Y, Yu Y, Li H R. Bacterioplankton community structure in the Arctic waters as revealed by pyrosequencing of 16S rRNA genes. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2013, 103(6): 1309-1319.
- [15] 白洁, 时瑶, 宋亮, 李正炎. 黄海西北部浮游细菌生物量分布特征及其与环境因子的关系. *中国海洋大学学报*, 2009, 39(4): 592-596.
- [16] Cury J C, Araujo F V, Coelho-Souza S A, Peixoto R S, Oliveira J A L, Santos H F, Dávila A M R, Rosado A S. Microbial diversity of a Brazilian coastal region influenced by an upwelling system and anthropogenic activity. *PLoS One*, 2011, 6(1): e16553.
- [17] Ghizelini A M, Mendonça-Hagler L C S, Macrae A. Microbial diversity in Brazilian mangrove sediments-a mini review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2012, 43(4): 1242-1254.
- [18] 李鲜鲜, 何文辉, 董占营, 崔丽香, 蔡清洁, 张奥. 上海沿岸海域微生物的分布特征及其与环境因子的关系. *江苏农业科学*, 2014, 42(1): 286-291.

- [19] 李云, 李道季. 长江口邻近海域浮游细菌分布与环境因子的关系. 海洋通报, 2007, 26(6): 9-18.
- [20] 张艳. 山东近岸海域水体细菌多样性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.
- [21] 李和阳, 陈明霞, 李刚, 郑天凌, 郑森林, 陈彬. 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. 海洋环境科学, 2011, 30(4): 487-491.
- [22] 马聪, 陈昌国, 蒋学兵, 李丹丹, 刘敏, 郝秀红, 马学斌, 钱扬会. 中国海域海洋细菌分布特征分析. 解放军医学杂志, 2012, 37(9): 909-913.
- [23] 陈沈良, 李向阳, 俞航, 谷国传. 潮流作用下洋山港水域悬沙和底沙的交换. 海洋学研究, 2008, 26(1): 11-17.
- [24] 孙玲霜, 薛俊增, 庄骅, 王宝强, 吴惠仙. 洋山港浮游植物群落特征研究. 海洋湖沼通报, 2012, (3): 50-57.
- [25] 王宝强, 田华, 薛俊增, 刘艳, 吴惠仙. 洋山深水港海域水环境的周年变化. 上海环境科学, 2011, 30(2): 60-64.
- [26] 孙国伟, 肖劲洲, 陈小兵, 王洪明, 龚超文, 潘迎捷, 王永杰. 洋山深水港海域表层海水中古菌多样性特点. 微生物学杂志, 2014, 34(5): 13-20.
- [27] 薛廷耀. 海洋细菌学. 北京: 科学出版社, 1962.
- [28] Xiong J B, Liu Y Q, Lin X G, Zhang H Y, Zeng J, Hou J Z, Yang Y P, Yao T D, Knight R, Chu H Y. Geographic distance and pH drive bacterial distribution in alkaline lake sediments across Tibetan Plateau. Environmental Microbiology, 2012, 14(9): 2457-2466.
- [29] Jiang X T, Peng X, Deng G H, Sheng H F, Wang Y, Zhou H W, Tam N F Y. Illumina sequencing of 16S rRNA tag revealed spatial variations of bacterial communities in a mangrove wetland. Microbial Ecology, 2013, 66(1): 96-104.
- [30] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman F D, Costello E K, Fierer N, Peña A G, Goodrich J K, Gordon J I, Huttley G A, Kelley S T, Knights D, Koenig J E, Ley R E, Lozupone C A, McDonald D, Muegge B D, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky J R, Turnbaugh P J, Walters W A, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nature Methods, 2010, 7(5): 335-336.
- [31] Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T, Hall J R, Hartmann M, Hollister E B, Lesniewski R A, Oakley B B, Parks D H, Robinson C J, Sahl J W, Stres B, Thallinger G G, Van Horn D J, Weber C F. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(23): 7537-7541.
- [32] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner F O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Research, 2013, 41(D1): D590-D596.
- [33] Altschul S F, Gish W, Miller W, Myers E W, Lipman D J. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology, 1990, 215(3): 403-410.
- [34] Price M N, Dehal P S, Arkin A P. FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. Molecular Biology and Evolution, 2009, 26(7): 1641-1650.
- [35] Pitta D W, Pinchak W E, Dowd S E, Osterstock J, Gontcharova V, Youn E, Dorton K, Yoon I, Min B R, Fulford J D, Wickersham T A, Malinowski D P. Rumen bacterial diversity dynamics associated with changing from bermudagrass hay to grazed winter wheat diets. Microbial Ecology, 2010, 59(3): 511-522.
- [36] Mahaffee W F, Kloepper J W. Temporal changes in the bacterial communities of soil, rhizosphere, and endorhiza associated with field-grown cucumber (*Cucumis sativus* L.). Microbial Ecology, 1997, 34(3): 210-223.
- [37] Shannon C E, Weaver W. The Mathematical Theory of Communication. Urbana: University of Illinois Press, 1971: 3-55.
- [38] Vreeland R H, Litchfield C D, Martin E L, Elliot E. Halomonas elongata, a new genus and species of extremely salt-tolerant bacteria. International Journal of Systematic Bacteriology, 1980, 30(2): 485-495.
- [39] Whitman W B, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H J, Trujillo M E, Ludwig W, Suzuki K I, Parte A. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Berlin: Springer, 2012.
- [40] 日本生态学会环境问题专门委员会. 环境和指示生物. 卢全章, 译. 北京: 中国环境科学出版社, 1987.
- [41] Li L N, Kato C. Microbial diversity in the sediments collected from cold-seep areas and from different depths of the deep-sea//Horikoshi K, Tsujii K, eds. Extremophiles in Deep-Sea Environments. Japan: Springer, 1999: 55-88.
- [42] Uthicke S, McGuire K. Bacterial communities in Great Barrier Reef calcareous sediments: contrasting 16S rDNA libraries from nearshore and outer shelf reefs. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 2007, 72(1/2): 188-200.
- [43] 郑丙辉, 周娟, 刘录三, 林岩璇, 朱延忠. 长江口及邻近海域富营养化指标原因变量参照状态的确定. 生态学报, 2013, 33(9): 2780-2789.
- [44] 鲍献文, 李真, 王勇智, 李娜. 冬、夏季北黄海悬浮物分布特征. 泥沙研究, 2010, (2): 48-56.
- [45] 张怀静, 翟世奎, 范德江, 郭志刚, 于增慧, 曹立华, 杨荣民, 张晓东. 三峡工程一期蓄水后长江口及其邻近海域悬浮物浓度分布特征. 环境科学, 2007, 28(8): 1655-1661.

- [46] 徐兆礼, 李鸣, 高倩, 陈华. 洋山工程影响海洋环境关键因子的分析. 海洋环境科学, 2011, 29(5): 617-622, 635-635.
- [47] 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, 2014.
- [48] 边佳胤, 袁林, 王琼, 姜佳枚, 李娟英, 庄骅, 薛俊增, 吴惠仙. 洋山深水港海域水质变化趋势分析及富营养化评价. 海洋通报, 2013, 32(1): 107-112.
- [49] 白洁, 张昊飞, 李岿然, 孙靖. 海洋异养浮游细菌生物量及生产力的制约因素. 中国海洋大学学报, 2004, 34(4): 594-602.
- [50] Lozupone C A, Knight R. Global patterns in bacterial diversity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(27): 11436-11440.
- [51] 张甲耀, 夏盛林, 邱克明, 熊凯. 潜流型人工湿地污水处理系统氮去除及氮转化细菌的研究. 环境科学学报, 1999, 19(3): 323-327.
- [52] 杨光富, 魏云林. 假单胞菌研究现状及应用前景. 生物技术通报, 2011, (1): 37-39, 49-49.
- [53] 齐继峰. 东海水团特征及黑潮与东海陆架水交换研究[D]. 北京: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2014.
- [54] Iturriaga R, Mitchell B G. Chroococcoid cyanobacteria: a significant component in the food web dynamics of the open ocean. Marine Ecology-Progress Series, 1986, 28: 291-297.
- [55] 肖天, 岳海东, 张武昌, 王荣. 东海聚球蓝细菌(*Synechococcus*)的分布特点及在微食物环中的作用. 海洋与湖沼, 2003, 34(1): 33-43.
- [56] Agawin N S R, Duarte C M, Agusti S. Growth and abundance of *Synechococcus* sp. In a Mediterranean Bay: seasonality and relationship with temperature. Marine Ecology Progress Series, 1998, 170: 45-53.
- [57] DuRand M D, Olson R J, Chisholm S W. Phytoplankton population dynamics at the Bermuda Atlantic time-series station in the Sargasso Sea. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography, 2001, 48(8/9): 1983-2003.
- [58] Williams T J, Wilkins D, Long E, Evans F, DeMaere M Z, Raftery M J, Cavicchioli R. The role of planktonic *Flavobacteria* in processing algal organic matter in coastal East Antarctica revealed using metagenomics and metaproteomics. Environmental Microbiology, 2013, 15(5): 1302-1317.
- [59] 陈丽萍, 侯付景, 张迪骏, 何伟娜, 周君, 张春丹, 童茜茜, 王中华, 李太武. 宁波沿海陆源排污口假单胞菌属(*Pseudomonas*)分布特点. 海洋与湖沼, 2013, 44(4): 926-930.