

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.02.001

• 基础研究 •

浮游细菌群落变化对锥状斯氏藻藻华的影响*

姚蜜蜜^{1,2} 周 进² 李庆赞^{1,2} 吕 浩^{1,2} 蔡中华^{2△}

(1 清华大学生命科学学院 北京 100084; 2 清华大学深圳研究生院海洋科学与技术学部 广东 深圳 518055)

摘要 目的:本实验以大亚湾原发性锥状斯氏藻为例,采集野外样品,分析藻华不同时期主要菌群的结构和环境样品的硫化物与赋存形态。**方法:**应用末端限制性片段长度多态性技术和主成分分析方法,分析藻华发生过程中浮游细菌群落相似程度的情况,得到差异显著的浮游细菌类群。选出代表类群的样品进行 16S rDNA 高变区测序,获取浮游细菌的分类结果及相对丰度。采用 Pearson 相关性分析浮游细菌、藻、硫化物两两间的相互关系。**结果:**早期藻华以 *Enterobacteriaceae* 为主导,各优势菌群(*Enterobacteriaceae*; *Alteromonadaceae*; *Rhodobacteraceae*)的比例约为 8:1:21,硫元素主要以 DMS 形式存在;而后期 *Alteromonadaceae* 成为优势物种,各优势菌群的比例转变为 3:5:25,硫的赋存形态由 DMS 转变为 DMSO; *Rhodobacteraceae* 在藻华的前期与后期均以优势种存在。本实验还发现藻华不同时期 4 种与藻呈正向相关的细菌,以及 8 种对藻起负向调节作用的细菌,它们在藻华生消的过程中扮演着不同的角色。**结论:**菌群的组成性改变与藻华生消具有一定的相关性,并对藻类的硫代谢产生影响。结果的获得有助于认识藻华微生物过程中硫代谢的生态学功能,拓展锥状斯氏藻藻华的理论认识。

关键词:锥状斯氏藻;浮游细菌群落;硫化物形态;藻菌关系

中图分类号:Q938.8 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2015)02-201-07

Dynamics of Bacterial Community during the Bloom Caused by *Scrippsiella Trochoidea**YAO Mi-mi^{1,2}, ZHOU Jin², LI Qing-yun^{1,2}, LV hao^{1,2}, CAI Zhong-hua^{2△}

(1 School of life science, Tsinghua University, Beijing, 100084, China;

2 Division of Ocean Science and Technology, Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen, Guangdong, 518055, China)

ABSTRACT Objective: This experiment focuses on the *scrippsiella trochoidea* bloom in Daya Bay to explore the microbial community structure and the occurrence form of sulfide in different bloom stages. **Methods:** Bacterial community structures of the bloom were evaluated by T-RFLP and PCA. The genetic diversity of bacterial community was analyzed by illumina sequencing. Pearson correlation coefficient was used to describe the correlation among bacterial community, algae and sulfur. **Results:** In early stage of the bloom, the ratio of advantage bacterium groups (*Enterobacteriaceae*: *Alteromonadaceae*: *Rhodobacteraceae*) was about 8:1:21, and *Enterobacteriaceae* played the leading role. Sulfur existed mainly in the form of DMS. In decline period of the bloom, the proportion of each advantage bacterium group turned into 3:5:25, and *Alteromonadaceae* became the dominant species. The combined form of sulfur changed into DMSO. And *Rhodobacteraceae* was the permanent dominant species during the bloom. In addition, this study found that there were kinds of bacteria closely related to *scrippsiella trochoidea* in different periods of the bloom, including four positively regulated bacteria and eight negatively regulated bacteria, which played different roles during the bloom. **Conclusions:** It is confirmed that changes in composition of bacterial flora have relations with algal bloom. And dynamics of bacterial community also has effect on the sulfur metabolism. Therefore, this work is helpful to understand the microbiology ecology function of sulfur metabolism during the bloom, and to expand theoretical knowledge of *scrippsiella trochoidea* bloom.

Key words: *Scrippsiella trochoidea*; Bacterial community; Sulfide form; Relationship between algae and bacteria

Chinese Library Classification(CLC): Q938.8 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)02-201-07

前言

藻华是海洋中某些浮游生物(尤指藻类)、原生动物或细菌

* 基金项目:科技部 973 计划前期专项(2012CB426504);国家海洋公益性项目(2012050209,2013050211);

深圳市基础研究计划(JCYJ20130402145002375);南山区创新研发基金(KC2013JSCX003A)

作者简介:姚蜜蜜(1989-),女,硕士,主要研究方向:微生物生态学,E-mail:thuyaomimi@foxmail.com

△通讯作者:蔡中华,电话:0755-26036108,E-mail:caizh@sz.tsinghua.edu.cn

(收稿日期:2014-07-16 接受日期:2014-08-05)

等在特定环境条件下爆发性增殖或聚集到一定水平,引起水色异常或水域环境改变的一种生态现象^[1]。其中部分藻华伴有毒素或有害物质产生,称为有害藻华(Harmful algal blooms, HABs)^[2]。HABs打破了海洋生态系统的平衡,直接或间接地危害到海洋生物、环境安全和人类健康,成为世界三大近海环境问题之一,引起全球范围的广泛关注^[3-5]。近年来,城市化的进程和工业化脚步的提速,带来了海洋环境新一轮的承载压力,使得我国沿海藻华的发生频率、强度、影响范围以及藻种种类呈增加趋势^[6-8],严重危害海洋生态系统的健康。这类生态灾害的频繁出现,制约了海洋资源的可持续利用、海洋经济的可持续发展及滨海旅游的健康形成;同时也与沿海各省建立“海洋强省”,形成“蓝色经济”的地位极不相称。因此,藻华事件已成为政府、公众和科研人员关注的共性问题。

基于藻华灾害的重大影响,人们已对其进行了大量的研究,包括生物鉴定、生态过程、监测预警以及防控策略等。目前,在藻华发生、消长以及海洋学机制的认识上有了诸多进展^[1,9]。然而,困扰人们对藻华深入了解的瓶颈之一依然是它的过程机制,这已成为人们揭开其神秘本质的“黑匣子”。近年来,随着研究的深入人们越来越多的认识到,藻华的形成与共生微生物有着密不可分的关系^[1]。微生物作为初级生产力的主要贡献者,拥有极大的生物多样性和功能多样性,在藻华的形成中具有重要的生态学作用。以藻际环境(Phycosphere)的共生微生物为例,前人的工作已证实微生物的作用贯穿于藻类的整个生活史^[10],包括孢子的萌发,幼体的附着,物质的代谢(VB₁₂、Fe、S),毒素的产生,以及藻类的消亡等。例如,Rooney-Varga等用变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析藻类消长与其附着菌菌群结构关系时发现,菌群结构与藻类数量密切相关^[11]。Christopher等利用细菌与甲藻*Gymnodinium catenatum*共培养研究微生物与藻类关系时发现,甲藻从孢囊萌发到植物体的生长都需要海洋细菌分泌的菌源物质以保证其生存和生长^[12]。Teeling H等利用宏基因组方法研究藻华过程中浮游细菌碳水化合物代谢相关的酶的变化,表明藻细胞产生的多样底物能为浮游细菌提供生态位^[13]。因此,聚焦于微生态领域,有望在新的层面认识藻华形成的动态过程。

为此,本实验以南海近岸的优势甲藻——锥状斯氏藻为例,研究藻华发生过程中微生物的动态变化,结合硫代谢特征,探讨微生物组成与藻华生消过程的相关性,为藻华的形成原因收集微生态证据。本次工作的开展有望获得锥状斯氏藻藻华的微生物学特征,为认识南海沿岸(大亚湾、大鹏湾)的甲藻藻华提供理论借鉴。

1 材料与方法

1.1 样品采集

锥状斯氏藻藻华样品来源于大亚湾坝光海域自然发生的藻华(N22° 61'11", E114° 39'76")。在整个藻华发生期(2012年8月4日至13日)连续采样,收集藻华发生区的表层海水(4 L),其中,2 L样品加入戊二醛固定,用于细胞计数和环境微生物DNA提取;另外2 L样品用玻璃瓶顶空盛装,用于水体有机硫化物含量测定。样品采集后置于冰块环境带回实验室。样品采集日期为8月4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日和13

日,并依此编号为1-8。

1.2 细胞计数

1.2.1 锥状斯氏藻细胞计数 取表层海水经鲁格氏碘液固定后,在光学显微镜(Nikon Eclipse E200)下计数藻细胞。每个样品重复3次,计算平均值。

1.2.2 浮游细菌计数 取经戊二醛溶液(终浓度2%)固定后的样品1~2 mL,加入分散剂Tween80分散细胞(终浓度10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$),用DAPI染料染色10 min(终浓度1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$),将染色样品过滤至黑色聚碳酸酯滤膜(孔径0.22 μm , Millipore)上,经封片、固定后,在荧光显微镜(Leica DM2500)下观察计数。每个样品重复3次,按公式 $a_0=a_1\times S_0\div S_1$ 计算细胞数目(其中 a_0 :被测试样品的细菌总数, a_1 :视野下细菌总数, S_0 :滤膜的面积, S_1 :视野的面积)。

1.3 有机硫化物含量的测定

水体中有机硫化物(DMS、DMSP、DMSO)含量参照Lestremat F等的方法进行^[14]。DMSP和DMSO两种不同赋存形态的硫化物样品需经过前处理转化为DMS后,才能进行检测。DMSP的前处理方法为,向样本中加入NaOH(终浓度为5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),室温条件下反应过夜;DMSO的前处理方式,向样本中依次加入0.04 g NaBH₄,1:1(v/v)的HCl,磁力搅拌下溶解反应15 min。DMS含量的检测采用顶空固相微萃取的方法进行收集,利用气质联用仪(SHIMADZU)进行定性和定量分析。

1.4 细菌总DNA提取

将采集的海水过滤于0.22 μm 孔径的混合纤维滤膜(Jing Teng)上,于-80℃保存。采用DNA提取试剂盒(PowerWater DNA isolation kit, MOBIO)提取微生物的DNA于-20℃保存备用。

1.5 末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)

1.5.1 16S rRNA扩增、纯化及酶切 以提取的DNA为模板进行PCR反应。PCR体系为:引物16SR-1492(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')和16S-27(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')各0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, dNTPs 0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 2×GC buffer 25 μL , Taq酶1 U, ddH₂O补至50 μL 。反应条件:95℃ 5 min, 1个循环;95℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 90 s, 25个循环;72℃ 10 min, 1个循环。用PCR产物回收试剂盒(SanPrep; Sangon)对其进行纯化,纯化步骤参照试剂盒说明。将纯化的PCR产物用Hha I酶(Takara)于37℃酶切过夜,酶切产物在70℃下水浴10 min使酶失活。

1.5.2 T-RFLP分析 酶切产物进行STR分析测序(上海基康生物技术有限公司)。使用Peak Scanner软件导出数据,将导出的数据用T-REX^[15]在线软件(<http://trex.biohpc.org/>)进行分析。样品分析前,首先采用2.5倍标准差法去除噪音,随后舍弃片段长度小于50 bp和大于550 bp杂峰,最后对每个T-RF进行标准化。经过此步分析处理的T-RFLP数据用于细菌群落分析。

1.6 16S rDNA高变区测序

将样品总DNA进行16S rDNA高变区序列的测序(华大基因)。针对样品DNA的16S rDNA V6区进行PCR扩增,采用Qubit Fluorometer及琼脂糖凝胶电泳法(浓度为2%)对

PCR 扩增产物进行检测。检测合格的样品用于构建文库,合格的文库进行 cluster 制备,于 illumina 测序仪上对 16S rDNA 的 V6 区进行 101PE 测序。测序结果用于细菌群落分析。

1.7 数据分析

1.7.1 细菌群落组成与变化分析 根据浮游细菌群落的相似性结果,选出浮游细菌群落差异显著的样本进行相应的 16S rDNA 高变区测序。测序结果经整合得到不同分类等级的细菌相对丰度。选取最佳分类水平(科)上的物种对细菌群落组成进行介绍,并进行双向聚类分析(two-way cluster analysis)。细菌群落的变化分析,采用主成份分析法(PCA)。经统计软件(SPSS,v16.0)对 T-RF 进行正态分布验证后;选用 PC-ORDv4 软件进行 PCA 分析,具体方法及有效性验证参照文献进行^[16]。

1.7.2 藻菌相互关系分析 采用 Pearson 积矩相关系数对锥状斯氏藻数量和科分类水平细菌的相对丰度进行相关性分析,找出与藻华具有正向和负面相关的细菌。数据经 SPSS v16.0 计算,显著性水平为 0.05 和 0.01,错误发现率(FDR)为 0.05。

1.7.3 藻与硫化物相互关系分析 以锥状斯氏藻数量为指标,分别与 3 种不同类型的硫化物(DMSP、DMS 和 DMSO)进行散点图分析,用以判断相互之间的线性关系。

利用 Pearson 相关性分析来验证上述结果的属性(正相关或负相关)。数据经 SPSS v16.0 计算,显著性水平为 0.05 和 0.01,错误发现率(FDR)为 0.05。

2 结果与分析

2.1 藻细胞数目、细菌生物量和硫化物含量

采样过程中,藻、细菌及硫化物的量均发生明显变化(图 1)。藻细胞数量在第 2 次采样有最大值(潜在的爆发期),最大密度为 $27.0 \times 10^3 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$;在第 8 次采样时降至最低值(潜在消退期),此时的细胞密度为 $0.43 \times 10^3 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$;中间各期的藻细胞数量有一定波动,数量处于 $3.8\text{--}16.3 \times 10^3 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间(图 1A)。细菌的数量在藻华初期较低,仅为 $4.1 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$;随后的动态过程中,它的数量变化与藻华的发生有近似的相关性,但在藻华接近尾声时,细菌总量激增至最大值($16.0 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$)(图 1A)。硫化物的变化中,DMSP、DMS 的浓度与藻的数量呈正相关,在第 2 次采样时达到最高值,在第 8 次采样降至最低(图 1B、C)。DMSO 的浓度变化与上述两种硫化物有一定差异,藻华初期 DMSO 的浓度较低,随后在藻华消失前有一个递升过程,但在藻华结束期迅速减少(图 1D)。通过比较 DMSO 与其它两种赋存形态的硫化物,我们发现 DMSO 与藻细胞的变化呈现近似的“错峰对应”,这表明 DMSO 的浓度变化有一定的滞后性。

2.2 浮游细菌群落变化

不同样品的浮游细菌群落之间的变化过程如图 2 所示。PCA 结果反映出浮游细菌群落在藻华发展过程中一直处在变化之中,并按照藻华发生的前、中、后期区分开来。在藻华起始阶段,样品 1 形成一个单独的类群;样品 2 和样品 8 之间“相关性距离”较近,显示藻华爆发时期与衰亡时期的浮游细菌群落具有较大相似性。在藻华发展时期,浮游细菌群落可分为两个类群:类群 1(样品 3、4)和类群 2(样品 5、6、7)。聚类分析(图 3)显示了与 PCA 分析相似的结果,一方面印证了 PCA 的结

果,另一方面也反映了 T-RFLP 指纹图谱的可信度。

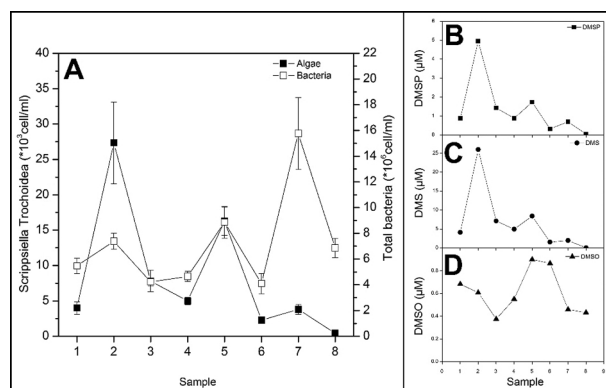


图 1 藻、细菌和硫化物的总体变化情况

Fig.1 Dynamics in Algae, Bacteria, and Organic sulfide concentration during the Scrippsiella Trochoidea bloom

A.藻和细菌的数量;B.DMSP 的浓度;C.DMS 的浓度;D.DMSO 的浓度
A. Biomass of algae (solid square), bacteria (hollow square); B. Concentrations of DMSP; C. Concentrations of DMS; D. Concentrations of DMSO.

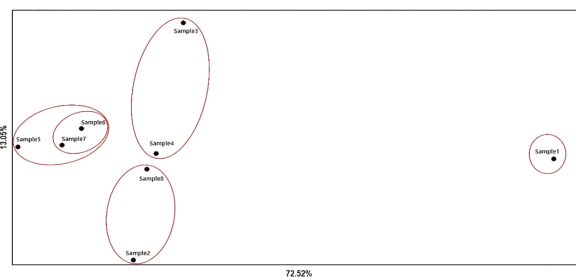


图 2 不同采样批次中(分别编号为 1-8)浮游细菌群落主成分分析(PCA)

Fig.2 Principal component analysis (PCA) of bacterioplankton assemblage in all samples

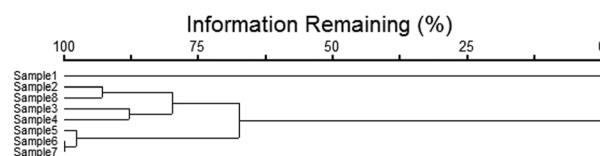


图 3 不同采样批次中(分别编号为 1-8)浮游细菌群落聚类分析(CA)

Fig.3 Cluster analysis of bacterioplankton assemblage in all samples

2.3 浮游细菌群落组成

根据浮游细菌群落的变化情况,选取编号为 2、4、5、7 的样品进行 16S rDNA 高变区测序,了解浮游细菌群落组成。以科分类水平的细菌相对丰度(图 4)和聚类分析(图 5)进行表征。从科分类水平来看 *Rhodobacteraceae*、*Enterobacteriaceae* 和 *Alteromonadaceae* 在 4 个样品中占主导地位(>60%)。在所有采集的样本中,*Rhodobacteraceae* 的相对丰度维持在 40%以上,表明这种细菌是藻华过程中的优势菌。在样本 2、4 中,*Enterobacteriaceae* 的相对丰度更高,显示其在藻华起始及爆发时期可能行使主导的生态学作用。在样本 5、7 中,*Alteromonadaceae* 的百分比比例更高,表明这类细菌可能在藻华的消亡过程中扮演重要的角色。此外,样品 2 中以 *Vibrionaceae* 为主导,推测 *Vibrionaceae* 可能在藻华爆发时期占据主导地位。聚类分

析的结果表明, 分属于 *Alphaproteobacteria* 及 *Gammaproteobacteria* 的科分类水平的细菌种类众多, 并显示出百分含量

上的巨大优势, 这与大量研究藻华过程中细菌群落组成中反映的优势菌群的结果一致^[17]。

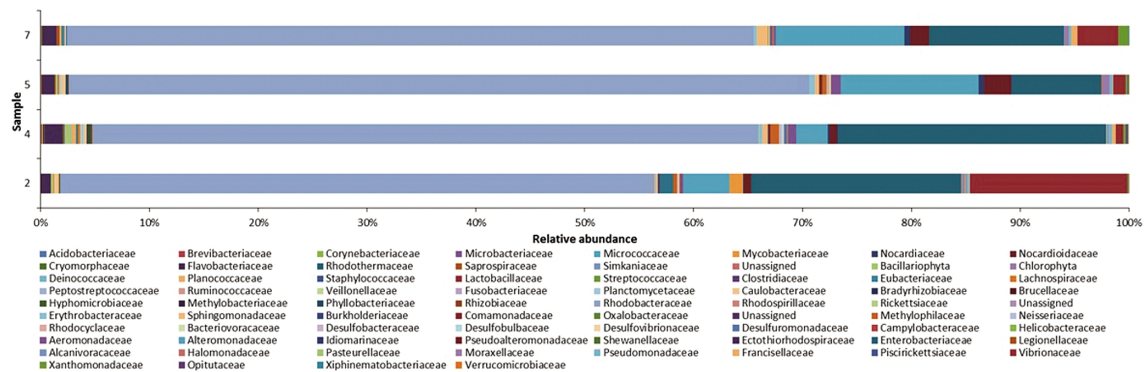


图 4 科分类水平细菌的相对丰度
Fig.4 Relative abundance of the bacterial family

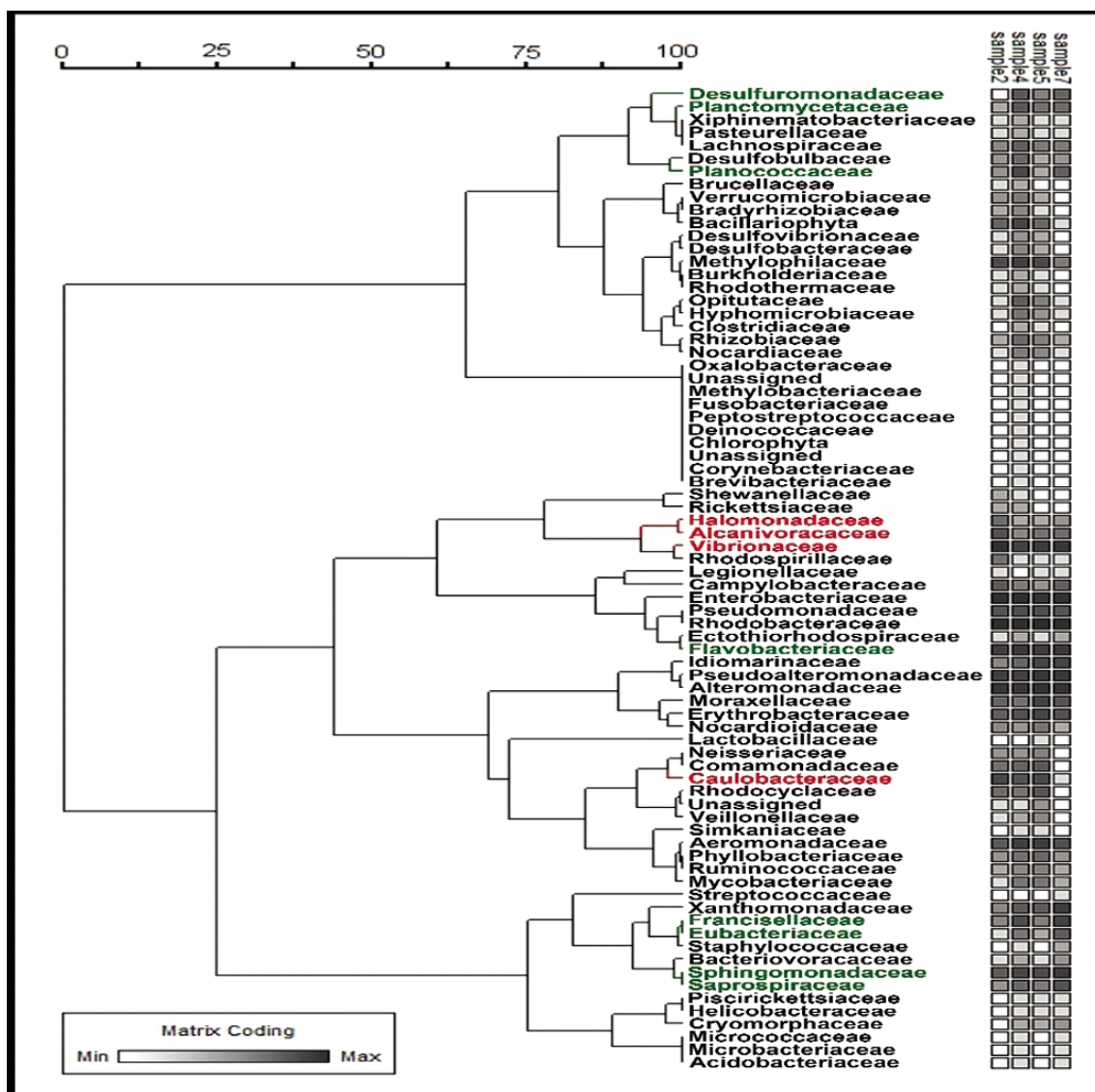


图 5 浮游细菌群落在科分类水平上的双向聚类分析

Fig.5 Two-way cluster analysis of bacterioplankton assemblage in the family level

* 注: 红色标注表示与锥状斯氏藻呈正相关的细菌; 绿色标注表示与锥状斯氏藻呈负相关的细菌。

*Note: Bacteria in red represents the bacteria positively correlated with algae; Bacteria in green represents the bacteria negatively correlated with algae.

2.4 藻菌相互关系

藻菌丰度的相互关系以 Pearson 积矩系数来表征, 结果如图 5 所示(红色标注的细菌为正相关, 绿色标注的细菌为负相关)。从图中可以看出: 在藻华生消的过程中, *Alcanivoracaceae*、*Caulobacteraceae*、*Halomonadaceae* 及 *Vibrionaceae* 这 4 类细菌与锥状斯氏藻呈正相关; 而 *Desulfuromonadaceae*、*Flavobacteriaceae*、*Eubacteriaceae*、*Francisellaceae*、*Saprospiraceae*、*Planctomycetaceae*、*Sphingomonadaceae*、*Planococcaceae* 等 8 类细菌则呈现负相关。结合细菌相对丰度(图 4)及藻细胞数量的变化情况(图 6)分析: *Caulobacteraceae* 与藻细胞数量之间的变化趋同, 说明其能够正向调节藻细胞的生长; *Alcanivoracaceae*、*Vibrionaceae* 及 *Halomonadaceae* 在藻华的起始与发展阶段与藻的变化趋势相同, 而在藻华衰亡时期与藻的变化趋势相反, 推测这 3 类细菌可能具有功能多样性, 在藻华前期体现协同共生作用, 而在后期则参与溶藻与降解过程; 而与藻华藻呈负相关的 8 类细菌均与藻细胞的变化趋势负相关, 表明它们在藻细胞的生长过程中起负向调节的作用。

2.5 藻与硫化物的相互关系

结合散点图与 Pearson 相关性分析了藻与不同赋存形态的硫化物之间的相互关系(图 6)。DMSP 与藻之间存在明显的线性关系(图 6A), 经 Pearson 相关性确定 DMSP 与藻之间存在极显著正相关性 ($r=0.96, P<0.01$)。DMS 与 DMSP 相似(图 6B), 与藻细胞存在显著的正相关关系($r=0.96, P<0.01$)。而且, 相比于 DMSP, DMS 的斜率更大, 相关程度更高。至于硫化物的另一种形态 DMSO, 在整个分析过程中未见与藻细胞之间的线性关系(图 6C)。

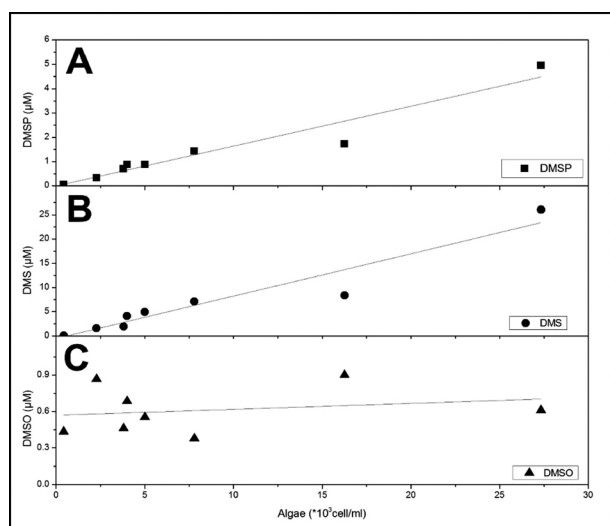


图 6 藻与硫化物相互关系的线性分析

Fig.6 Linear analysis of associations between algae and organic sulfide
A. 藻与 DMSP 之间关系的散点图; B. 藻与 DMS 之间关系的散点图; C. 藻与 DMSO 之间关系的散点图

A. Correlation between algae and DMSP by scatter plot; B. Correlation between algae and DMS by scatter plot; C. Correlation between algae and DMSO by scatter plot.

3 讨论

3.1 浮游细菌与藻细胞数量的相关性

微生物参与藻华的动态过程与藻细胞有密切的生态关系, 各类甲藻藻华中均发现共生微生物与藻细胞存在一定的关联, 比如塔玛亚历山大藻周从细菌的特点^[18], 短凯伦藻藻际浮游细菌的组成^[19]等。这些已有的研究证明: 在藻华早期, 细菌与藻细胞处于共生状态, 两者在数量上变化趋同; 而当发展到藻华后期, 细菌发生了从结构到功能的演替, 使得其生态角色相应改变, 致使菌类数量与藻类密度呈现负相关。本次实验中, 我们发现在锥状斯氏藻藻华发生早期, 细菌密度与藻细胞数量呈现正相关; 而在发生晚期, 菌类丰度与藻类生物量呈现负相关, 进一步证明了甲藻藻华中微生物与藻类存在密切关系的结论。比较这类关系时发现: 各类藻华事件中 "藻-菌" 相关性在程度、时间和范围上存在一定的差异, 这种波动的形成可能与个体差异及环境因素(营养条件、水文特点、时空特点)有关^[10]。

3.2 浮游细菌与藻细胞的互作关系

作为藻华事件的一对共生体, 微生物(尤其是细菌)与藻类的关系多样而复杂。藻华生消过程中, 菌群会依据生态事件的进程在组成与结构上发生演替, 以行使不同的功能, 响应藻华的各期状态。本次实验中发现: 锥状斯氏藻藻华的进程中菌群与藻类存在明显的互作关系, 并以多样化的身份出现, 按生态功能大体可分为三类: 常驻菌、正向调节菌和负向调节菌。

常驻菌群主要包括 *Enterobacteriaceae*、*Alteromonadaceae* 和 *Rhodobacteraceae*。这 3 类细菌在整个藻华过程中普遍存在。事实上, 在亚历山大藻和立马藻的研究中, 人们也发现 *Enterobacteriaceae* 是一种常驻菌群, 在整个过程中固生在藻体表面, 拥有较高的丰度, 其原因在于该菌具有生物被膜 Biofilm 的形成能力, 它的存在能够调节生态位(Niche), 促进其它微生物的定殖^[20]。*Alteromonadaceae* 是海洋中一类常见的变形杆菌, 它具有物种多样性和功能多样性, 在环境中具有较强的适应能力。本次实验发现该菌作为 "常驻人口" 之一, 可能与它调节水质及提供营养物质(DOC、VB₁₂)有关。对于 *Rhodobacteraceae*, 该菌在前期和后期都作为优势种而存在, 应归因于它的抗菌能力和消耗有机污染物的能力, 使得它在藻华的不同时期都是活跃的 "物质加工者"^[21]。在分析固生微生物的过程中不难发现: 常驻角色不管由谁来担当, 总的都是遵循 "生态组成服务于生态功能" 这一原则。

经 Pearson 相关性分析鉴定的行使正向调节作用的菌株中, 主要功能菌群有 *Vibrionaceae*、*Alcanivoracaceae* 和 *Caulobacteraceae*。藻华持续期间当锥状斯氏藻细胞数量达到最大值时, *Vibrionaceae* 的相对丰度也达到最大(11.52%)。有研究指出, *Vibrionaceae* 具有代谢多种核心酶的能力, 如淀粉酶、蛋白酶、酯酶和脂肪酶等^[22]。这些高活力酶的存在便于转化环境中的有机物, 为藻类提供所需的生长元素; 同时, 藻类的代谢产物也能被菌株利用, 以实现其自身的生长。这说明 *Vibrionaceae* 与锥状斯氏藻细胞间存在互利互惠的协同关系。当藻华进入消退期, 菌群结构发生相应转变, 起初占据主导地位的 *Vibrionaceae* 逐渐被 *Alcanivoracaceae* 取代。Yakimov 等研究证实 *Alcanivorax* spp. 能有效降解烃类物质来为自身提供碳源及能量^[23]。藻华后期, 由于自身溶解和碎片的增加, 使得水体中可

利用的能源增加,藻际环境中一些机会主义者,如 *Alcanivoracaceae*,能利用这一时机实现自身数量的快速增殖。锥状斯氏藻中观察的这一现象,表明 *Alcanivoracaceae* 碳源的利用上具有比其它菌株更为明显的优势,是藻华后期主要的物质分解者。对于另外一类正相关菌 *Caulobacteraceae*,观察到一个有趣的现象,即该菌的相对丰度与藻细胞数量的变化趋势完全一致。这种自身数量随藻细胞密度而严格匹配的现象,表明 *Caulobacteraceae* 是一类环境依赖菌,它的生物量受宿主细胞的调节。事实上, Park 等对从属于 *Caulobacteraceae* 的细菌 *Brevundimonas spp.* 进行研究,发现这株细菌是宿主 (*Chlorella ellipsoidea*) 的寄生菌,类似于植物的根瘤菌^[24]。本次实验与之有类似之处,表明 *Caulobacteraceae* 在锥状斯氏藻的生活史中可能是一类终生依附物种。

在与藻细胞呈现负相关的菌株中,最明显的是 *Flavobacteriaceae*, 它的相对丰度与藻细胞数量的变化趋势完全相反,并在藻华消退时期迅速增加,二者之间呈现显著负相关。Yang 等^[25]及史荣君^[26]在研究中发现 *Flavobacteriaceae* 对 *Scripsiella trochoidea* 具有杀藻作用,通过变形锥状斯氏藻细胞,使其细胞膜内物质分布不均匀而失去运动活性,最终聚集沉淀而死亡,表明 *Flavobacteriaceae* 与 *Scripsiella trochoidea* 存在拮抗关系。本次观察到的结果进一步验证了该菌的生态功能,并推测 *Flavobacteriaceae* 是一种潜在的溶藻菌,具有开发成抑藻菌株的潜力。值得一提的是,在所有发现的负调节能力菌株中,只有 *Desulfuromonadaceae* 具有转化硫的能力,它是一种硫代谢的还原菌。结合藻-菌数量变化以及 *Scripsiella trochoidea* 能够产生 DMSP 的事实, *Desulfuromonadaceae* 有可能是利用藻类硫化物的主要物种。当藻类后期代谢物外溶时, *Desulfuromonadaceae* 能优先利用藻类释放的 DMSO 进行增殖,使得藻细胞密度和菌群数量向两端衍生,最终表现出明显的负相关。其它负调节能力菌株,如 *Saprospiraceae*、*Sphingomonadaceae*、*Planococcaceae*、*Eubacteriaceae*、*Francisellaceae* 以及 *Planctomycetaceae* 都在本次实验中观察到具有不同程度的调节能力,这主要源自于这些菌株溶藻活力、调节 Ca^{2+} 浓度,以及降解多聚物能力的发挥^[27-31]。

3.3 硫化物在藻华过程中的作用

硫元素是海洋环境中一种重要的生源要素,参与多样化的生物地球化学循环,是初级生产力形成的主要营养源之一,在微生物及浮游植物中具有重要的作用。水体环境中,硫元素以不同的化合物形式存在,其不同的赋存状态拥有不同的溶解性和活性,直接影响海洋生物对它的吸收与利用。近年来,在可利用的硫化物状态中,DMS、DMSP 以及 DMSO 是关注较多的三类。缘由在于 DMS 及 DMSP 参与了负温室效应的过程^[32]。浮游植物在海洋环境中拥有巨大的生物量 ($n \times 10^3 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 海水), 现有的证据表明它们对 DMS 和 DMSP 具有极强的代谢能力与生物转化能力^[33,34],因而针对浮游藻类开展硫化物的研究成为了新的热点。现有的研究已发现,DMSP 的代谢与锥状斯氏藻浮游细菌存在一定关系^[35,36],然而,将硫化物引入藻华事件,分析“硫-藻-菌”三者相关性的研究还相对缺乏。

本次研究探讨了三者之间的关系,发现 DMSP、DMS 的浓

度随着锥状斯氏藻细胞数量的波动而同步变化,证实了藻与 DMSP、DMS 之间存在显著的相关性(正向)。在结合菌群变化时,我们发现藻细胞对两种硫化物的加工与利用,在时间上或许早于细菌,未能提供给的细菌利用该硫化物的机会,因而推断浮游细菌群落对 DMSP 及 DMS 的作用是间接的。而对于另外一种硫化物 DMSO,藻与其之间不存在线性关系,而且 DMSO 的浓度变化较藻细胞数量的变化有一段时间的延迟,说明浮游细菌具有直接加工 DMSO 的机率,推测菌群对 DMSO 的作用可能是直接的。这与 DMSO 的产生只能通过光氧化和细菌氧化的途径得到的研究结果相一致^[37]。本次工作首次尝试了分析硫化物在甲藻藻华中的变化状态,了解到硫化物的利用与代谢在藻与菌之间存在一定的差异,为后续甲藻藻华中硫化物生态学研究提供了借鉴。

4 总结

锥状斯氏藻是深圳近岸的优势甲藻,是近十年高发藻种之一,引起了环境、生态以及养殖部门的广泛关注^[38]。本次工作结果表明浮游细菌群落变化与藻华生消有着密切的关系,一方面验证了浮游细菌与藻细胞数量整体关联,发生期的优势菌群为 *Rhodobacteraceae*、*Enterobacteriaceae* 和 *Alteromonadaceae*; 发展期以 *Vibrionaceae* 和 *Caulobacteraceae* 占主导; 消亡期则演替为 *Alcanivoracaceae* 和 *Flavobacteriaceae* 占优势。各主要菌群对锥状斯氏藻起着正调节或负调节的作用。此外,硫化物的研究发现浮游细菌通过调节藻类的生长进而影响其代谢产物的产出,表明浮游细菌群落在影响藻类数量的同时,也影响其生理代谢。后续的研究中我们将进一步注重自然样品,延伸采样的时间跨度以获得更为完善的样本材料,细化藻华过程中硫化物的代谢分析与分子机理。

参考文献(References)

- [1] 郑天凌. 赤潮控制微生物学[M]. 厦门: 厦门大学出版社, 2011: 1-40
Zheng Tian-ling. Regulation of red tide: from the perspective of microbiology[M]. Xiamen: Xiamen university press, 2011: 1-40
- [2] Backer L, McGillicuddy D. Harmful algal blooms [J]. Oceanography, 2006, 19(2): 94-106
- [3] Anderson DM. Approaches to monitoring, control and management of harmful algal blooms (HABs) [J]. Ocean & coastal management, 2009, 52(7): 342-347
- [4] Anderson D, Townsend D, McGillicuddy D, et al. The ecology and oceanography of toxic Alexandrium fundyense blooms in the Gulf of Maine[J]. Deep-Sea Res II, 2005, 52(19-21): 2365-2876
- [5] Wang L, Li X. Management of shellfish safety in China [J]. Journal of Shellfish Research, 1998, 17(5): 1609-1611
- [6] Anderson DM, Glibert PM, Burkholder JM. Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition, and consequences[J]. Estuaries, 2002, 25(4): 704-726
- [7] Hallegraeff GM. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase[J]. Phycologia, 1993, 32(2): 79-99
- [8] Wang S, Tang D, He F, et al. Occurrences of harmful algal blooms (HABs) associated with ocean environments in the South China Sea [J]. Hydrobiologia, 2008, 596(1): 79-93
- [9] 周名江, 朱明远. 我国近海有害赤潮发生的生态学、海洋学机制及

- 预测防治研究进展[J]. 地球科学进展, 2006, 21(7): 673-679
- Zhou Ming-jiang, Zhu Ming-yuan. Progress of the project "ecology and oceanography of harmful algal bloom in China" [J]. Advances in earth science, 2006, 21(7): 673-679
- [10] Doucette GJ. Interactions between bacteria and harmful algae: a review[J]. Natural toxins, 1995, 3(2): 65-74
- [11] Rooney-Varga JN, Giewat MW, Savin MC, et al. Links between phytoplankton and bacterial community dynamics in a coastal marine environment[J]. Microbial Ecology, 2005, 49(1): 163-175
- [12] Bolch CJ, Subramanian TA, Green DH. The toxic dinoflagellate *Gymnodinium Catenatum* (dinophyceae) requires marine bacteria for growth[J]. Journal of Phycology, 2011, 47(5): 1009-1022
- [13] Teeling H, Fuchs BM, Becher D, et al. Substrate-controlled succession of marine bacterioplankton populations induced by a phytoplankton bloom[J]. Science, 2012, 336(6081): 608-611
- [14] Lestremat F, Desauziers V, Fanlo J-L. Headspace SPME followed by GC/PPFD for the analysis of malodorous sulfur compounds in liquid industrial effluents [J]. Analytical and bioanalytical chemistry, 2004, 378(1): 190-196
- [15] Culman SW, Bukowski R, Gauch HG, et al. T-REX: software for the processing and analysis of T-RFLP data [J]. BMC Bioinformatics, 2009, 10(1): 171-171
- [16] Culman S, Gauch H, Blackwood C, et al. Analysis of T-RFLP data using analysis of variance and ordination methods: a comparative study[J]. Journal of Microbiological Methods, 2008, 75(1): 55-63
- [17] Liu M, Xiao T, Sun J, et al. Bacterial community structures associated with a natural spring phytoplankton bloom in the Yellow Sea, China [J]. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography, 2013, 97: 85-92
- [18] Wichels A, Hummert C, Elbrächter M, et al. Bacterial diversity in toxic *Alexandrium tamarense* blooms off the Orkney Isles and the Firth of Forth[J]. Helgolander marine research, 2004, 58(2): 93-103
- [19] Jones KL, Mikulski CM, Barnhorst A, et al. Comparative analysis of bacterioplankton assemblages from *Karenia brevis* bloom and nonbloom water on the west Florida shelf (Gulf of Mexico, USA) using 16S rRNA gene clone libraries[J]. FEMS microbiology ecology, 2010, 73(3): 468-485
- [20] Ingle DJ, Clermont O, Skurnik D, et al. Biofilm formation by and thermal niche and virulence characteristics of *Escherichia* spp [J]. Applied and environmental microbiology, 2011, 77(8): 2695-2700
- [21] Gutierrez T, Singleton DR, Aitken MD, et al. Stable isotope probing of an algal bloom to identify uncultivated members of the Rhodobacteraceae associated with low-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon degradation [J]. Applied and environmental microbiology, 2011, 77(21): 7856-7860
- [22] Dias AC, Andreote FD, Dini-Andreote F, et al. Diversity and biotechnological potential of culturable bacteria from Brazilian mangrove sediment [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, 25(7): 1305-1311
- [23] Yakimov MM, Timmis KN, Golyshin PN. Obligate oil-degrading marine bacteria [J]. Current opinion in biotechnology, 2007, 18(3): 257-266
- [24] Park Y, Je K-W, Lee K, et al. Growth promotion of *Chlorella ellipsoidea* by co-inoculation with *Brevundimonas* sp. isolated from the microalga[J]. Hydrobiologia, 2008, 598(1): 219-228
- [25] Yang X, Li X, Zhou Y, et al. Novel insights into the algicidal bacterium DH77-1 killing the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*[J]. Science of The Total Environment, 2014, 482: 116-124
- [26] 史荣君. 海洋溶藻细菌的筛选及其溶藻特性研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2012: 43-45
- Shi Rong-jun. Algicidal activities of marine bacterium isolated from a HABs area, South China [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012: 43-45
- [27] Su J, Yang X, Zhou Y, et al. Marine bacteria antagonistic to the harmful algal bloom species *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) [J]. Biological Control, 2011, 56(2): 132-138
- [28] Tujula NA, Crocetti GR, Burke C, et al. Variability and abundance of the epiphytic bacterial community associated with a green marine Ulvacean alga[J]. The ISME journal, 2010, 4(2): 301-311
- [29] Tadolné ké RD. Strong coupling between natural Planctomycetes and changes in the quality of dissolved organic matter in freshwater samples[J]. FEMS microbiology ecology, 2007, 59(3): 543-555
- [30] Basu S, Deobagkar DD, Matondkar SP, et al. Culturable bacterial flora associated with the dinoflagellate green *Noctiluca miliaris* during active and declining bloom phases in the Northern Arabian Sea [J]. Microbial ecology, 2013, 65(4): 934-954
- [31] Birkbeck T, Feist S, Verner-Jeffreys D. *Francisella* infections in fish and shellfish[J]. Journal of fish diseases, 2011, 34(3): 173-187
- [32] Charlson RJ, Lovelock JE, Andreae MO, et al. Oceanic phytoplankton, atmospheric sulphur, cloud albedo and climate [J]. Nature, 1987, 326(6114): 655-661
- [33] Keller MD, Korjff-Bellows W. Physiological Aspects of the Production of Dimethylsulfoniopropionate (DMSP) by Marine Phytoplankton[M]. US: Springer, 1996: 131-142
- [34] Keller MD. Dimethyl sulfide production and marine phytoplankton: the importance of species composition and cell size [J]. Biological Oceanography, 1989, 6(5-6): 375-382
- [35] González JM, Simó R, Massana R, et al. Bacterial community structure associated with a dimethylsulfoniopropionate-producing North Atlantic algal bloom [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(10): 4237-4246
- [36] Pinhassi J, Simó R, González JM, et al. Dimethylsulfoniopropionate turnover is linked to the composition and dynamics of the bacterioplankton assemblage during a microcosm phytoplankton bloom [J]. Applied and environmental microbiology, 2005, 71(12): 7650-7660
- [37] Hatton A, Turner S, Malin G, et al. Dimethylsulphoxide and other biogenic sulphur compounds in the Galapagos Plume [J]. Deep-Sea Research Part II, 1998, 45(6): 1043-1053
- [38] 谭上进, 朱小山, 周进, 等. 深圳近岸海域环境状况近 10a 变化趋势 [J]. 海洋环境科学, 2014, 33(1): 154-156
- Tan Shang-jin, Zhu Xiao-shan, Zhou Jin, et al. Environmental conditions of Shenzhen offshore waters in recent 10 years [J]. Marine environmental science, 2014, 33(1): 154-156