Journal of Applied Oceanography

九龙江河口区微生物多样性及群落结构的时空分布

洪 璇^{1,2},张永雨³,陈仲巍²,李鹤宾²,赵春贵¹,杨素萍¹ (1. 华侨大学生物工程与技术系,福建厦门 361021;

2. 厦门医学院厦门市海洋医用天然产物与细胞工程重点实验室,福建 厦门 361008;

3. 中国科学院青岛生物能源与过程研究所,山东 青岛 266101)

摘要:河口区由于其独特的地理环境和理化条件,拥有丰富的微生物资源,在生物地球化学循环中 起着重要作用.然而,由于人类活动带来的河口区环境因素改变,引起的微生物群落结构的时空变 化目前还知之甚少.本研究选取九龙江河口区7个近年来遭受较为严重人类活动干扰的采样点,分 別在丰水期和枯水期采集表层水体,采用流动注射法测定了水体的三氮、电导率、pH值和溶解性磷 酸盐等环境参数,采用海水和淡水培养基,基于纯培养技术分析了可培养细菌的总数和分布特征, 并通过构建16S rRNA 基因克隆文库的方法研究细菌的多样性和群落结构变化.研究表明,变形菌 门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)是各克隆文库中最优势的 类群.在河口下游海水区,变形菌门微生物与放线菌门微生物的比例约为2:1~3:1,而在河口上游 淡水区,变形菌门和放线菌门的比例约为1:1.在河口下游海水区,α变形菌纲(Alphaproteobacteria)为变形菌门中的优势类群,而在河口上游淡水区,β变形菌纲(Betaproteobacteia)为变形菌门中的优势类群,而在河口上游淡水区,β变形菌纲(Betaproteobacteria)为优势类群. 厚壁菌门(Firmicutes)是克隆文库中丰度占第四的类群,说明水体可能遭受畜牧养殖粪便污染.本 研究表明,九龙江河口区微生物群落结构受水体盐度、温度、水文情况等时空因子及人类活动造成 的营养物浓度上升、动物粪便污染等共同影响,呈现出独特的时空分布特点.

关键词:海洋生物学;细菌群落;环境变化;九龙江河口区

DOI:10.3969/J.ISSN.2095-4972.2017.02.003

中图分类号:P735

文献标识码:A

河口区由于其淡水与海水混合的特性,以及其 潮汐规律带来的营养物质及有机物的循环,为生活 在其间的微生物提供了强烈的环境梯度,因而成为 最富生产力和最具动态变化的水生生态系统之 一^[1].微生物是地球生物圈的主要组成部分,在生 物地球化学循环中起着不可替代的作用^[2].在河口 生态系统中,微生物群落主要受到时间和空间因素 的混合影响,当受到环境的压力及干扰时,呈现出群 落结构的组成及多样性的变化^[3].与淡水生态系统 及海洋生态系统相比,关于河口区微生物群落结构 的时空动态变化及其与环境因子的关系目前尚知之 甚少. 文章编号:2095-4972(2017)02-0167-10

近年来,人类活动引起日益增多的营养物质和 化学污染物排放入河口区,造成了水质污染及河口 区生态系统的破坏,给人类健康带来了严重威 胁^[4-5].研究表明,生态系统环境因素的改变会引起 微生物群落结构组成的快速变化,所以微生物群落 可被用于生态系统健康及水质的监测^[6].

九龙江(24°12′~25°44′N,116°50′~118°02′E) 是福建省仅次于闽江的第二大河流,是福建南部主 要饮用水源,惠及约九百万人民.在过去三十年间, 九龙江河口区受到人类活动的严重破坏,包括营养 物质、化学药物和致病菌的污染^[79]等.过去已有一 些关于九龙江河口区微生物群落结构的报道,例如

收稿日期:2016-07-23

基金项目:国家海洋公益性行业科研专项资助项目(201505026);福建省自然科学基金资助项目(2015J01137);中国科学院城市环境与健康 重点实验室基金资助项目(KLUEH201005);厦门南方海洋研究中心科研资助项目(14GYY74NF38);厦门市科技计划资助项目 (3502Z20163020)

作者简介:洪璇(1983~),女,博士研究生,讲师;E-mail:hx@ xmmc. edu. cn

通讯作者:杨素萍(1966~),女,博士生导师,教授;E-mail:yangsuping@hqu.edu.cn

受多环芳烃污染的红树林沉积物中细菌群落结构的 研究^[10]、九龙江流域浮游及底栖古菌群落^[11]的研 究、九龙江河口区原核生物及真核生物群落结构的 研究^[12]等,对九龙江河口区的微生物群落组成提供 了总体性的描述.还有一些研究报道关注了整个九 龙江流域微生物群落结构的时空动态变化^[13].但总 的来说,关于九龙江河口区微生物群落结构组成及 多样性的时空分布特点,尤其是人类活动造成的环 境因素改变带来的群落结构变化,目前研究得较少.

本研究我们采用纯培养技术及构建 16S rRNA 基因克隆文库的方法,研究了九龙江河口区浮游细 菌群落结构的组成和多样性,探索了其时空分布规 律以及与人类活动带来的环境因子改变的相关性. 了解河口区微生物群落的时空分布特性及人类对其 的影响,有助于增加我们对微生物群落在河口生态 系统中分布及功能的认识,并且对进一步利用微生 物群落来监测水质起到指导作用.

1 材料和方法

1.1 样品采集及环境因子分析

本研究在位于福建省龙海市的九龙江河口区选 取了7个采样点(S1~7,见图1),分别在枯水期(12 月)和丰水期(3月)采集其表层水样(枯水期样品 用D表示,丰水期样品用R表示).S1和S2在河口 区的上游,主要是淡水;S3和S4在河口区的中游, 淡水与海水混合;S5、S6和S7在河口区的下游,主 要是海水.S1、S3和S5属于九龙江北溪的下游,位 于龙海市紫泥镇的北支流;而S2、S4和S7属于九龙 江西溪的下游,位于龙海市紫泥镇的南支流.



图 1 九龙江河口区采样点分布



将采集的表层水样通过粗过滤(40 µm 孔径尼 龙膜)去除沙粒等大颗粒杂质,放置在4℃保温箱内 运回实验室,并在24 h内完成样品分析.样品的 pH 值及电导率采用 Accument Excel XL60 进行测定,氨 氮、硝氮和亚硝氮含量采用流动注射分析仪(Lachat Instruments, USA)进行测定^[14],溶解性磷酸盐的测 定采用钼酸铵分光光度法^[15].将上述水样滤液再次 过滤以除去大多数原生动物和藻类(3 μm 孔径聚碳 酸酯膜),再经0.22 μm 滤膜过滤,将滤膜用锡箔纸 包好置于-80℃保存,用于微生物多样性分析.

1.2 平板培养

分别采用营养琼脂平板(蛋白胨 10 g/dm³,牛 肉膏 3 g/dm³, NaCl 5 g/dm³, 琼脂粉 18 g/dm³)和 ZoBell 2216E琼脂平板(蛋白胨 5 g/dm³,酵母粉 1 g/dm³, FePO₄ 0.01 g/dm³,琼脂粉 18 g/dm³,陈海水 1 dm³)来模拟淡水和海水环境.将每份水样各取 50 mm³,分别在两种培养基上涂布后(每份水样做 3 组 平行实验),在 25℃培养箱中培养 3 d. 记录每块平 板上的菌落数.

1.3 DNA 提取、PCR 扩增及克隆文库构建

用 DNA 提取试剂盒(OMEGA, USA)提取水样 中细菌的 DNA. 采用一对通用引物 27f(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 及 1391r (5'-GACGGGCGGTGTGTRCA-3')^[16]对 16S rRNA 基因 的全长进行扩增,获得约1.4 kb 的基因片段. PCR 反应体系如下: 25 mmol/dm³ 的 MgCl₂ 4 mm³, 2.5 mmol/dm³的 dNTPs 4 mm³,25 µmol/dm³的引物 1 mm³,10×PCR 反应缓冲液 5 mm³,2U Taq DNA 聚 合酶,20 ng 的模板,高纯水补足 50 mm³. PCR 扩增 程序如下:94℃预变性2 min;94℃变性30 s,55℃退 火1 min,72℃延伸1 min,重复 30 个循环;72℃延伸 10 min. 将 PCR 扩增产物进行琼脂糖电泳并割胶纯 化,将获得的基因片段连接到克隆载体 pMD18-T, 再转化到感受态细胞大肠杆菌 DH5α 中,进行蓝白 斑筛选后,随机挑选阳性克隆,构建16S rRNA 基因 克隆文库.

1.4 克隆文库分析

在每一个16S rRNA 基因克隆文库中随机选取 100 个阳性克隆,以通用引物 27f 为引物,测序一个 反应,可获得约 850 bp 的 DNA 序列,通过 Bellerophon 在线分析,去除嵌合体,获得有效序列.使用 MEGA 软件,将这些有效序列在 GenBank 数据库中 与最相似的序列进行比对^[17].通过 DOTUR 软件,采 用 97% 的序列相似性标准,将获得的 16S rRNA 基 因序列划分为不同的 OTU^[18](Operational taxonomic unit,OTU),在每个 OTU 中随机选取一个克隆,作为 本 OTU 的代表序列.计算各文库的文库覆盖率、多 样性指数^[19](Simpson,Shannon-Weiner)以及丰富度 指数^[20](Abundance-based coverage estimator; Biascorrected),并根据各 OTU 的丰度进行主成分分析.

1.5 16S rRNA 基因核酸序列登记号

本研究中 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中的 序列登记号为 KC006152—KC006244 (S1-D), KC006335—KC006407 (S1-R), KC006066— KC006151(S6-D)和 KC006245—KC006334(S6-R).

2 结果与分析

2.1 环境因子测定

对所有水样的 pH 值、电导率,以及氨氮、硝氮、

亚硝氮和溶解性磷酸盐的质量浓度(下简称浓度) 进行测定,结果见表 1. 在枯水期,溶解性磷酸盐的 浓度在 8. 786~11. 922 mg/dm³之间,而在丰水期, 在 1. 835~3. 703 mg/dm³之间.在7个采样点中有 5个采样点(S1~4,S7)的总氮浓度不论枯水期还是 丰水期都超过 1. 0mg/dm³,超过了国家饮用水安全 标准^[21].不论枯水期还是丰水期,河口上游淡水区 的氨氮浓度都高于河口下游海水区,这可能是由于 上游地区农业及城镇居民生活造成的污染^[79].

表 1	采样点在丰水期及枯水期的环境因子测定结果

Tab. 1 Environmental parameters at the sampling sites in rainy and dry seasons

采样点 一	pH 值		电导率/ms・cm ⁻¹		$C_{\rm NH_{4}-N}/\rm{mg}\cdot \rm{dm}^{-3}$		$C_{ m NOx-N}/ m mg\cdot dm^{-3}$		$C_{\rm PO_4-P}/{ m mg} \cdot { m dm}^{-3}$	
	雨季	旱季	雨季	旱季	雨季	旱季	雨季	旱季	雨季	旱季
S1	7.030	6.980	3.398	2. 681	1. 281	1. 126	0.093	1. 192	3.044	11.922
S2	7.190	7.000	1.508	1.798	2. 232	1.810	0. 384	1. 168	3.703	10. 681
S3	6.870	7.160	2. 477	1.354	1.212	0.732	0.000	1. 536	2.714	8.786
S4	7.200	7.200	15.612	4. 992	1.283	0.916	0. 687	1.462	2.824	10. 895
S5	7.400	7.630	30. 631	20. 574	0.815	0. 104	0.000	0. 645	2.165	9. 546
S6	7.430	7.650	33. 500	21. 153	0.754	0. 202	0.461	0. 429	1.835	10. 212
S7	7.440	7.540	30. 902	16. 823	0.846	0. 705	0. 513	0. 918	1.945	10. 454

紫泥镇南支流紧邻龙海市城镇居民生活区,其 中 S2 采样点靠近龙海市政生活污水排放口:S4 采 样点位于龙海市榜山镇严溪头区段,其上游有园仔 头村、港仔尾、新社、沙洲村,他们生活污水的排放会 对 S4 采样点的水质产生影响,并且 S4 采样点附近 有采沙场,其上常年有采沙船作业,故 S4 采样点水 质的变化会受采沙行为的影响.紫泥镇北支流主要 流经农业区,其中S1采样点位于紫泥镇安山村西部 水域,周围都是农田;S3站点位于九龙江北港大桥 下游约1.73 km 处,位于埔尾村和蔡店村所属区域, 附近有农田排水口,其水质与农作物种植有关.从表 1可以看出,紫泥镇南支流的采样点 S2、S4、S7 的氨 氮浓度高于紫泥镇北支流的采样点 S1、S3、S5,并且 所有采样点在丰水期的氨氮浓度都高于枯水期,说 明水体中氨氮浓度与人类活动造成的污染物排放、 季节及降雨密切相关.

2.2 可培养微生物计数

基于纯培养技术的分析表明,在淡水培养基 (营养琼脂培养基)上,可培养细菌总数在2.0×10⁴ ~8.8×10⁵ CFU/cm³间,在海水培养基(ZoBell 2216E琼脂培养基)上,可培养细菌总数在2.0×10⁴ ~8.6×10⁵ CFU/cm³之间,总体差异不大,但具体 样品呈现出时间及空间分布特点(图2).不论在淡水还是海水培养基上,除了 S6 采样点以外,其它所有位于淡水区的采样点的可培养细菌总数都高于位于海水区的采样点,在丰水期和枯水期都呈现出这一规律.在淡水培养基上,所有采样点枯水期样品的可培养细菌总数都比丰水期样品要高,而在海水培养基上,7 个样品中有 5 个呈现了这一规律.

2.3 微生物群落结构分析

为了进一步分析微生物多样性及群落结构的时 空分布特点,我们从7个采样点中选取了2个可培 养细菌数量较多的采样点分别代表河口上游淡水区 (S1)和下游海水区(S6),进行16SrRNA 基因克隆 文库的构建.分别以采样点S1和S6在丰水期(以R 表示)和枯水期(以D表示)的样品构建16SrRNA 基因克隆文库,即S1-R、S1-D、S6-R和S6-D.从时间 维度分析,根据Shannon-Weiner指数、Simpson指数 和克隆文库覆盖率,枯水期样品S1-D和S6-D的微 生物群落多样性高于S1-R和S6-R.从空间维度分 析,S6采样点的克隆文库S6-R和S6-D的微生物群 落多样性略高于S1采样点的克隆文库S1-R和S1-D.丰富度指数SACE和SChaol也展现了相似的结果(表 2),说明取自河口下游海水区,相对远离人类活动

流域中扩散,所以造成了微生物多样性的下降.



图 2 淡水、海水培养基中可培养微生物计数

Fig. 2 Quantity of the cultured bacteria in freshwater medium and seawater medium

a. 淡水培养基, b. 海水培养基

表 2	16S rRNA	▲基因克隆文库的生物多样性和丰富度指数
-----	----------	---------------------

Tab. 2 Biodiversity and predicted richness of the clone libraries of 16S rRNA gene

克隆文库	克隆子数目 /个	OTU 数目 /个	Simpson (D)	Shannon -Weiner(<i>H</i>)	${S}_{ m Chaol}$	$S_{ m ACE}$	文库覆盖率 /%
S1-R	73	37	0.036	3. 37	47.0	49.0	74
S1-D	93	51	0.031	3.60	117.0	140.0	62
S6-R	90	42	0.032	3. 41	55.0	61.0	77
S6-D	86	53	0.021	3.74	140. 9	163.1	56

以序列相似性 97% 为标准,将 342 条 16S rRNA 基因有效序列划分为8个门:变形菌门(Proteobacteria)、浮霉菌门(Planctomycetes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、蓝藻门(Cyanobacteria)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、绿弯菌门(Chloroflexi),见图 3. 在所有 4个克隆文库中,变形菌门和放线菌门都是最优势 的类群. 在河口下游海水区 S6 采样点的 2 个克隆文 库中,变形菌门克隆数所占的比例(S6-R 克隆文库 中占 56.67%, S6-D 克隆文库中占 62.79%) 约为放 线菌门克隆所占比例 (S6-R 克隆文库中占 28.89%, S6-D 克隆文库中占 20.93%) 的 2~3 倍. 而在河口上游淡水区 S1 采样点的 2 个克隆文库中, 变形菌门克隆数所占的比例(S1-R 克隆文库中 35.62%, S1-D 克隆文库中 38.66%) 与放线菌门克 隆所占比例(S1-R 克隆文库中 36.99%, S1-D 克隆 文库中 42.96%) 约为 1:1. 此外, 在 4 个克隆文库的 变形菌门中,其纲水平的分布也不同.在 S6-R 克隆 文库和 S6-D 克隆文库中 α 变形菌纲 (Alphaproteobacteria)为主要类群,分别占各自克隆文库中变 形菌门的 66.67% 和 55.56%,而 β 变形菌纲(Betaproteobacteria)、 γ 变形菌纲(Gammaproteobacteria) 和 Δ 变形菌纲(Deltaproteobacteria)则占少数.但在 S1-R 克隆文库和 S1-D 克隆文库中,β 变形菌纲为 最优势的类群,分别占各自克隆文库中变形菌门的 84.62% 和 86.11%(图4).

S1-R、S1-D、S6-R、S6-D 四个克隆文库分别有 73、93、90、86 个克隆,根据 97% 的序列相似性被划 分为 37、51、42、53 个 OTU. PCA 样本排序图显示,由 OTU 多样性所代表的各样本群落结构互相之间均 有明显差异(图 5).

克隆文库 S1-R 包括 37 个 OTU, 划分为6 个门: 变形菌门(包括 α 变形菌纲、β 变形菌纲、γ 变形菌 纲、Δ 变形菌纲)、浮霉菌门、拟杆菌门、放线菌门、疣 微菌门、绿弯菌门.其中放线菌门和变形菌门是最优 势的类群,分别占克隆文库的 36.99% 和 35.62%. 克隆文库中丰度最高的 OTU 为 OTU5, 占克隆子总 数的 8.22%, 它与 OTU6(占克隆子总数的 4.11%)









在 GenBank 中的最相近序列都是一株 β 变形菌纲 的 淡 水 浮 游 细 菌 *Limnohabitans* sp. Rim47 (HE600686). 其次为 OTU1 和 OTU26, 各占克隆子



Fig. 5 PCA scores plot showing the similarity of OTU diversity between the four samples of Jiulong River estuary

总数的 6.85%, 分别与 GenBank 中来源于活性污泥, 带有橙色色素的绿色非硫细菌 Kouleothrix aurantiaca(AB079638) 以及来源于水生植物根系的 bacterium KW-45(AB529716)具有 86% 和 99% 的序列相似性. 疣微菌门仅在 S1-R 克隆文库中出现,其 代表序列在 GenBank 中的最相似序列来源于一株 疣微菌门的结冷胶降解菌^[22],它们具有 94% 的序 列相似性. 过去有研究表明,虽然疣微菌门的微生物 只在群落中占很小的比例,但是该类群的一些种属 在多糖降解中发挥着重要作用^[23]. OTU8 与 Gen-Bank 中的来源于稻田的反硝化菌 *Curvibacter* sp. UKPF43(AB769213)具有 97% 的序列相似性,它的 存在可能与九龙江河口区的高含氮量有关.

克隆文库 S1-D 中含有 93 条有效序列,根据 97%的序列相似性分为 51 个 OTU,分属于 6 个门: 变形菌门(包括 α 变形菌纲、β 变形菌纲和 γ 变形 菌纲)、浮霉菌门、拟杆菌门、放线菌门、厚壁菌门和 蓝藻门.与克隆文库 S1-R 相同,放线菌门、变形菌门 是最优势的类群,分别占克隆文库的 42.96% 和 38.67%.克隆文库中丰度最高的 OTU 占克隆子总 数的 12.90%,它与一株淡水浮游放线菌 actinobacterium SCGC AAA043-F06(HQ663390)具有 92% 的 序列相似性.丰度第二高的 OTU 与 GenBank 中来源 于水生植物根系的 bacterium KW-45(AB529716)具 有 97% 的序列相似性.这个代表序列在 S1-R 克隆 文库中也占优势地位.

克隆文库 S6-R 中含有 90 条有效序列,根据 97%的序列相似度分为 42 个 OTU,分属于 4 个门: 变形菌门(包括 α 变形菌纲、β 变形菌纲和 γ 变形 菌纲)、拟杆菌门、放线菌门和蓝藻门.变形菌门是 最优势的类群,占 56.67%,但其中没有发现 Δ 变形 菌纲.放线菌门是第二优势的类群,占 28.89%.克 隆文库中丰度最高的 OTU 占克隆子总数的 11.11%,它与 GenBank 中的 alpha proteobacterium SCGC AAA076-L10(JF488452)具有 100% 的序列相 似性.其次为 OTU26,占克隆子总数的 7.78%,它与 OTU27(占克隆子总数的 2.2%)的最相似序列都是 来源于放线菌门的淡水浮游细菌 Candidatus Aquiluna rubra. OTU37 与 GenBank 中的一株反硝化菌 Denitratisoma sp. TSA61(AB542411)具有 94% 的序 列相似性.

克隆文库 S6-D 中含有 86 条有效序列,根据 97%的序列相似度分为 53 个 OTU,分属于 6 个门: 变形菌门(包括 α 变形菌纲、β 变形菌纲、γ 变形菌 纲和 Δ 变形菌纲)、放线菌门、浮霉菌门、厚壁菌门、 拟杆菌门、绿弯菌门.其中,变形菌门是最优势的类 群,占克隆子总数的 62.79%.克隆文库中丰度最高 的 OTU(占克隆文库的 10.46%)与海洋放线菌 Candidatus Actinomarina minuta (KC811143.1)的序列相似性为99%.OTU35 是丰度第二大的OTU,在克隆文库中占5.81%,它和Alpha proteobacterium SCGC AAA298-J15 (HQ675246)的序列相似性为99%,该菌株来源于深海.OTU28和OTU32同为克隆文库中丰度第三的OTU,各占克隆文库的4.65%.OTU28与另一株同样分离于深海中的Alpha proteobacterium SCGC AAA298-KO6(HQ675249)的序列相似性为99%.值得注意的是,OTU32与一株分离于河口区红树林沉积物中的苯酚降解菌(EU697081)具有97%的序列相似性,而过去曾有报道,在本研究采样区域附近的龙海红树林自然保护区曾受到多环芳香族化合物的污染^[10].

2.4 讨论

本研究表明,变形菌门、放线菌门、拟杆菌门是 所有克隆文库中最优势的类群,它们总计占克隆子 总数的91.52%.厚壁菌门、浮霉菌门、蓝藻门、疣微 菌门、绿弯菌门合计占剩余的8.48%.这项结果与 之前报道的九龙江河口区浮游细菌群落结构相符 合[10-12]. 在本研究中,变形菌门是丰度最大的类群, 过去也有文献报道,变形菌门在丰度上占优势地位 是河流环境中微生物菌群结构的特征之一[24]. 放线 菌门的微生物是本研究中属于丰度第二的类群,在 过去的研究中也经常发现该类群微生物存在于河流 或湖泊系统的浮游微生物中[25],这可能是由于放线 菌能够产生抗生素,用于抵抗某些原生生物的侵 入^[26-28]. 值得注意的是,在枯水期的样品中,不论是 S1 采样点还是 S6 采样点,厚壁菌门都是克隆文库 中丰度第4的类群,在S1-D和S6-D克隆文库中分 别占5.39%和5.81%.在我们过去对九龙江流域微 生物群落组成的研究中曾发现,将16S rRNA 基因 片段进行 DGGE 后割胶测序,结果表明 21% 的序列 属于厚壁菌门^[12]. Hu 等(2014) 也报道了在九龙江 流域中发现厚壁菌门的克隆子占克隆文库的 14.1% [8]. 厚壁菌门的微生物一般出现在哺乳动物 肠道或土壤沉积物之类的厌氧环境中,很少出现在 含氧量较高的淡水表层(丰度低于1%)^[29-33].如此 高丰度的厚壁菌门微生物出现在九龙江河口区水样 中,说明该水体可能受到严重的动物粪便污染.

从时间维度分析,本实验结果揭示了水文情况 及温度对微生物群落结构带来的影响.关于水文情况 况的影响,对比枯水期和丰水期,通过多样性指数、 丰富度指数以及微生物类群的分布可以看出,在枯 水期 S1 和 S6 采样点的样品都表现出了更高的生物 多样性.基于纯培养技术进行的可培养细菌数量的 分析也表明,在7个采样点中有6个样品在枯水期 的可培养细菌数量多于丰水期(图2).水文情况和 温度的改变也造成了微生物群落组成的变化. 以采 样点 S6 为例,从枯水期到丰水期,放线菌门和拟杆 菌门的微生物在克隆文库中所占比例明显上升,但 厚壁菌门、浮霉菌门、绿弯菌门的微生物在枯水期存 在,在丰水期却从克隆文库中消失.关于温度的影 响,在本研究中发现,在12月低温时期所采集的样 品中, 蓝藻门的微生物(占 S1-D 克隆文库的 5.39%)呈现较高丰度,而在3月份温度回暖后所采 集的样品中没有检测到蓝藻门微生物,这与过去分 别在冬季和夏季对九龙江流域微生物群落的研究相 符合^[12].在S1采样点中,绿弯菌门的微生物在12 月份的 S1-D 文库中消失, 而在 3 月份出现(占 S1-R 克隆文库的8.33%),也呈现了温度规律,因为绿弯 菌门的微生物已被报道其丰度与水温具有密切关 系^[34-35].因此,本研究表明九龙江河口区微生物群 落结构和组成在时间维度上的变化与温度及水文条 件的改变密切相关.这与过去的研究相吻合,因为不 同类群的微生物有其最适宜生长温度,并且枯水期 降雨及水流量的减少会造成营养物质浓度的上升, 所以温度^[36-39]、水文情况造成的营养物质浓度改变 会对微生物群落的多样性和组成造成影响^[4042].

从空间维度分析,空间因子的影响体现在微生物群落的类别.比较河口上游淡水区(S1)和河口下 游海水区(S6)的微生物群落类别,发现不论在枯水 期还是丰水期,在采样点S1的样品中,放线菌门都 是最优势的类群,而变形菌门都是第二大类群.但在 采样点S6的样品中却相反,变形菌门和放线菌门分 别是第一和第二大类群(图3).在S1样品中,从纲 水平的分布来看,β变形菌纲的细菌是变形菌门中 丰度最大的纲,而在S6样品中,α变形菌纲的细菌 是变形菌门中丰度最大的纲(图4).参见表1提供 的环境因子数据,包括营养物质(氨态氮、硝态氮、 溶解性磷酸盐)的浓度以及盐度(以电导率来反 映),可知这进一步证实了之前的其它研究结论,即 盐度和营养物质浓度对微生物群落结构和组成产生 重要影响^[4344].

同时,本研究进一步验证了我们之前关于本区 域反硝化细菌多样性的推断^[45].在本研究中,通过 16S rRNA 基因的测序及比对,发现了海细菌属 (Marinobacterium)、红小梨形菌属(Rhodopirellula)、 青枯菌属(Ralstonia)、从毛单胞菌属(Comamonas) 和丝硫菌属(Thiothrix)微生物的存在.而我们之前 通过 nirS 基因克隆文库分析本区域反硝化细菌多 样性时,也发现部分 nirS 基因可能来源于这几个属 的微生物.在这几个属当中,海细菌属是丰度最大的 类群,这个属中有一些菌种已被报道能够参与厌氧 氨氧化反应^[46].克隆文库中红小梨形菌属微生物在 Genbank 中的最相似序列来源于一株在波罗的海西 南面基尔湾水体中分离到的细菌 Rhodopirellula baltica SH1(NR_043384.1),并且红小梨形菌属的微 生物也曾被报道参与反硝化反应^[47].同样的,青枯 菌属、从毛单胞菌属和丝硫菌属都有许多微生物被 发现具备反硝化能力^[48-49].考虑到采样点附近由于 人类活动带来的高浓度的氮排放,在水体微生物群 落中发现这些属微生物的存在也不足为奇了,这进 一步说明了九龙江河口区微生物群落结构和组成受 到这些营养物质排放的严重影响^[37].

3 结论

九龙江河口区微生物群落结构与环境因子改 变,尤其是人类活动造成的环境因子改变息息相关, 展现出了一定的时空变化规律.变形菌门、放线菌 门、拟杆菌门是该区域最优势的类群.变形菌门与放 线菌门的比例,在河口下游海水区约为2:1~3:1, 但在河口上游淡水区约为1:1.变形菌门作为丰度 最大的类群,其纲水平的分布在不同区域也有所区 别.在河口下游海水区,α变形菌纲为最优势类群, 而在河口上游淡水区,β变形菌纲最占优势.厚壁菌 门是丰度占第4的类群,说明水体可能遭受畜牧养 殖粪便污染.本研究表明,九龙江河口区微生物群落 结构受水体盐度、温度、水文情况等时空因子及人类 活动造成的营养物浓度上升、动物粪便污染等共同 影响,呈现出独特的时空分布特点.

参考文献:

- Kan J, Suzuki M T, Wang K, et al. High temporal but low spatial heterogeneity of bacterioplankton in the Chesapeake Bay[J].
 Applied & Environmental Microbiology, 2007, 73(21):6 776-6 789.
- [2] Freimann R, Bürgmann H, Findlay S E, et al. Bacterial structures and ecosystem functions in glaciated floodplains: contemporary states and potential future shifts[J]. ISME Journal, 2013, 7(12):2 361-2 373.
- [3] Chen Z B, Zhou Z Y, Peng X, et al. Effects of wet and dry seasons on the aquatic bacterial community structure of the three

Gorges Reservoir [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2013, 29(5): 841-853.

- [4] Vishnivetskaya T A, Mosher J J, Palumbo A V, et al. Mercury and other heavy metals influence bacterial community structure in contaminated Tennessee streams[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2011, 77(1): 302-311.
- [5] Vörösmarty C J, McIntyre P B, Gessner M O, et al. Global threats to human water security and river biodiversity[J]. Nature, 2010, 467(7 315): 334.
- [6] Staley C, Gould T J, Wang P, et al. Bacterial community structure is indicative of chemical inputs in the Upper Mississippi River[J]. Frontiers in Microbiology,2014,5:524.
- [7] Chen N W, Hong H S. Integrated management of nutrients from the watershed to coast in the subtropical region [J]. Current Opinion in Environmental Sustainability, 2012, 4(2):233-242.
- [8] Hu A Y, Yang X Y, Chen N W, et al. Response of bacterial communities to environmental changes in a mesoscale subtropical watershed, Southeast China[J]. Science of the Total Environment, 2014, 472:746-756.
- [9] Liu L M, Yang J, Yu X Q, et al. Patterns in the composition of microbial communities from a subtropical river: effects of environmental, spatial and temporal factors [J]. PLoS ONE, 2013, 8(11):e8123.
- [10] Tian Y, Liu H J, Zheng T L, et al. PAHs contamination and bacterial communities in mangrove surface sediments of the Jiulong River Estuary, China[J]. Marine Pollution Bulletin, 2008, 57(6/12):707-715.
- [11] Li Q Q, Wang F P, Chen Z W, et al. Stratified active archaeal communities in the sediments of Jiulong River estuary, China
 [J]. Frontiers in Microbiology, 2012, 3:311.
- [12] Liu L M, Yang J, Zhang Y Y. Genetic diversity patterns of microbial communities in a subtropical riverine ecosystem (Jiulong River, southeast China) [J]. Hydrobiologia, 2011, 678(1):113-125.
- [13] Wang Y M, Liu L M, Chen H H, et al. Spatiotemporal dynamics and determinants of planktonic bacterial and microeukaryotic communities in a Chinese subtropical river[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2015, 99(21): 9 255-9 266.
- [14] Wang C F, Yu X Q, Lv H, et al. Nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater by the green alga *Chlorella* sp.
 [J]. Journal of Environmental Biology, 2013, 34(2):421-425.
- [15] 国家环境保护总局. GB 11893-1989 水质总磷的测定钼酸铵分光光度法[S]. 北京:中国标准出版社, 1989.
- [16] Lane D J, Pace B, Olsen G J, et al. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses [J]. Proceedings of the National Academy of Science, 1985, 82(20):6 955-6 959.
- [17] Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0[J]. Bioinformatics, 2007, 23(21): 2 947-2 948.
- [18] Schloss P D, Handelsman J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2005, 71(3): 1 501-1 506.
- [19] Dang H Y, Li T G, Chen M N, et al. Cross-ocean distribution of *Rhodobacterales* bacteria as primary surface colonizers in temperate coastal marine waters[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2008, 74(1):52-60.
- [20] Dang H Y, Zhang X X, Sun J, et al. Diversity and spatial distribution of sediment ammonia-oxidizing Crenarchaeota in response to estuarine and environmental gradients in the Changjiang Estuary and East China Sea[J]. Microbiology, 2008, 154 (7):2 084-2 095.
- [21] 国家环境保护总局. GB 3838-2002 中华人民共和国地表水环境质量标准[S]. 北京:中国环境科学出版社, 2002.
- [22] Otsuka S, Suenaga T, Vu H T, et al. Brevifollis gellanilyticus gen. nov., sp. nov., a gellan-gum-degrading bacterium of the phylum Verrucomicrobia [J]. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 2013, 63(8): 3 075-3 078.
- [23] Martinez-Garcia M, Brazel D M, Swan B K, et al. Capturing single cell genomes of active polysaccharide degraders: an unexpected contribution of Verrucomicrobia[J]. PLoS ONE,2011,7(4):e35314.
- [24] Zwart G, Crump B C, Agterveld M, 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.
- [25] Warnecke F, Amann R, PernthalerJ. Actinobacterial 16S rRNA genes from freshwater habitats cluster in four distinct lineages
 [J]. Environmental Microbiology, 2004, 6(3):242-253.
- [26] Hahn M W, Luensdorf H, Wu Q, et al. Isolation of novel ultramicrobacteria classified as *Actinobacteria* from five freshwater habitats in Europe and Asia[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2003, 69(3): 1 442-1 451.
- [27] Pernthaler J, Posch T, Simek K, et al. Predator-specific enrichment of actinobacteria from a cosmopolitan freshwater clade in mixed continuous culture[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2001, 67(5): 2 145-2 155.
- [28] Sahoo K, Dhal N K. Potential microbial diversity in mangrove ecosystems: A review [J]. Indian Journal of Geo-Marine Sci-

ences, 2009, 38(2): 249-256.

- [29] Newton R J, Bootsma M J, Morrison H G, et al. A microbial signature approach to identify fecal pollution in the waters off an urbanized coast of Lake Michigan [J]. Microbial Ecology, 2013, 65(4): 1 011-1 023.
- [30] Ley R E, Lozupone C A, Hamady M, et al. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota[J]. Nature Reviews Microbiology, 2008, 6(10):776-788.
- [31] Stearns J C, Lynch M D, Senadheera D B, et al. Bacterial biogeography of the human digestive tract[J]. Scientific Reports, 2011,1:170.
- [32] Wiegel J, Tanner R, Rainey F A. An introduction to the family Clostridiaceae[J]. Prokaryotes, 2006, 4: 654-678.
- [33] Newton R J, Jones S E, Eiler A, et al. A guide to the natural history of freshwater lake bacteria [J]. Microbiology & Molecular Biology Reviews: MMBR, 2011, 75(1):14-49.
- [34] Tuorto S J, Darias P, McGuinness L R, et al. Bacterial genome replication at subzero temperatures in permafrost[J]. ISME Journal, 2014, 8(1):139-149.
- [35] Wang S, Hou W G, Dong H L, et al. Control of temperature on microbial community structure in hot springs of the Tibetan Plateau[J]. PLoS ONE,2013,8(5):e62901.
- [36] Lindström E S, Kamst-Van Agterveld M P, Zwart G. Distribution of typically freshwater bacterial groups is associated with pH, temperature, and lake water retention time[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2005, 71(12):8 201-8 206.
- [37] Shade A, Kent A D, Jones S E, et al. Interannual dynamics and phenology of bacterial communities in a eutrophic lake [J]. Limnology & Oceanography, 2007, 52(2):487-494.
- [38] Pomeroy L R, Wiebe W J. Temperature and substrates as interactive limiting factors for marine heterotrophic bacteria[J]. Aquatic Microbial Ecology, 2001, 23(2):187-204.
- [39] Sun Z, Li G P, Wang C W, et al. Community dynamics of prokaryotic and eukaryotic microbes in an estuary reservoir [J]. Scientific Reports, 2014, 4:6 966.
- [40] Liu L M, Yang J, Lv H, et al. Synchronous dynamics and correlations between bacteria and phytoplankton in a subtropical drinking water reservoir[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2014, 90(1): 126-138.
- [41] Muscarella M E, Bird K C, Larsen M L, et al. Phosphorus resource heterogeneity in microbial food webs[J]. Aquatic Microbial Ecology, 2014, 73(3):259-272.
- [42] Yang J, Yu X Q, Liu L M, et al. Algae community and trophic state of subtropical reservoirs in southeast Fujian, China[J]. Environmental Science & Pollution Research, 2012, 19(5):1432-1442.
- [43] Henriques I S, Alves A, Tacão M, et al. Seasonal and spatial variability of free-living bacterial community composition along an estuarine gradient (Ria de Aveiro, Portugal) [J]. Estuarine Coastal & Shelf Science, 2006, 68(1):139-148.
- [44] Laque T, Farjalla V F, Rosado A S, et al. Spatiotemporal variation of bacterial community composition and possible controlling factors in tropical shallow lagoons[J]. Microbial Ecology, 2010, 59(4):819-829.
- [45] 洪璇,洪有为,陈仲巍,等.九龙江河口区 nirS 型反硝化细菌多样性及系统发育学分析[J]. 微生物学通报, 2015, 42 (9):1 639-1 650.
- [46] Oakley B B, Francis C A, Roberts K J, et al. Analysis of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) genes and cultivation reveal depauperate community of denitrifying bacteria in the Black Sea suboxiczone[J]. Environmental Microbiology, 2007,9(1):118-130.
- [47] Green S J, Prakash O, Gihring T M, et al. Denitrifying bacteria isolated from terrestrial subsurface sediments exposed to mixed-waste contamination[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2010, 76(10): 3 244-3 254.
- [48] Hong X, Zhang X J, Liu B B, et al. Structural differentiation of bacterial communities in indole-degrading bioreactors under denitrifying and sulfate-reducing conditions[J]. Research in Microbiology, 2010,161(8):687-693.
- [49] Trubitsyn I V, Belousova E V, Tutukina M N, et al. Expansion of ability of denitrification within the filamentous colorless sulfur bacteria of the genus *Thiothrix*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2014, 358(1):72-80.

Phylogenetic diversity and spatiotemporal patterns of the bacterial community in Jiulong River estuary

HONG Xuan^{1,2}, ZHANG Yong-yu³, CHEN Zhong-wei², LI He-bin², ZHAO Chun-gui¹, YANG Su-ping¹

(1. Department of Bioengineering and Biotechnology, Huaqiao University, Xiamen 361021, China; 2. Xiamen Key Laboratory of Marine Medicinal Natural Products and Cell Engineering, Xiamen Medical College, Xiamen 361008, China;

3. Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, China)

5. Quiguao institute of bioenergy and bioprocess reenhology, enniese readenry of selences, Quiguao 200101, ennia/

Abstract: Estuary ecosystems are important water sources with microorganisms as key components playing crucial roles in global biogeochemical cycles. However, the spatiotemporal variation in the distribution and abundance of microbes as well as the response to anthropogenic environmental changes are still poorly understood. In this study, seven sampling sites were selected in Jiulong River estuary, which has experienced intensive human perturbation in recent years. The changes in the diversity and structure of microbial community were analyzed while the environmental factors were determined both in rainy and dry seasons. The results of 16S rRNA gene clone libraries indicated that Proteobacteria, Actinobacteria and Bacteroidetes were the most predominant groups. Both in rainy and dry seasons, the ratio of Proteobacteria to Actinobacteria was about 2:1 ~ 3:1 in the upper reaches while about 1:1 in the lower reaches. At the level of class, Betaproteobacteria dominated the phylum of Proteobacteriain in the upper reaches but Alphaproteobacteria were the majority in the lower reaches. Firmicutes were the fourth abundant group in dry season, implying the contaminated water bodies by fecal pollution. Our study demonstrated that the microbial community in Jiulong River estuary was sensitive to human-caused environmental changes and displayed a distinct spatiotemporal pattern driven by salinity, nutrients, temperature, river flow and contamination such as animal feces.

Key words:marine biology; bacterial community; environmental change; Jiulong River estuary DOI:10. 3969/J. ISSN. 2095-4972. 2017. 02. 003

(责任编辑:肖 静)