#### DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.01234

# 象山港中部养殖区细菌群落结构的特征及其在生境修复过程中的 变化

李秋芬1,有小娟1,2,张艳1,毛玉泽1,焦海峰3

1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室,中国水产科学研究院 黄海水产研究所,山东 青岛 266071;

2. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003;

3. 浙江省宁波市海洋与渔业研究院, 浙江 宁波 315010

摘要:象山港地处浙江中部沿海(121°25′-122°03′E,29°05′-29°46′N),港内平均水深 20 m 左右,最深达 55 m。近年 来,象山港网箱养殖规模不断增大,陆源污染加重,导致象山港的环境问题日益严重。为了找到象山港网箱养殖环 境的有效修复方法及修复效果评价方法,采用海带和龙须菜等大型藻类对象山港中部网箱养殖区进行生境修复, 同时应用总 DNA 提取、PCR-变性梯度凝胶电泳分析及克隆、测序和生物信息学分析等方法,研究了网箱养殖区和 藻类养殖区沉积环境中细菌群落的特征及其在生境修复过程中的变化。结果表明,象山港网箱养殖区细菌种类丰 富,由 7 个门的细菌组成。生境修复使网箱养殖区细菌多样性有增加趋势,优势种群由放线菌门、海仙菌属和苍白 杆菌属的细菌代替了不动杆菌属、嗜氨基杆菌和假单胞菌属的细菌;藻类养殖区由 5 个门的细菌组成,细菌群落结 构相对比较稳定。冗余分析结果显示,氨氮和 COD 是沉积环境细菌群落结构的主要影响因子,细菌群落结构的好 转趋势与化学因子的好转是一致的,这说明采用大型藻类对网箱养殖区环境进行生境修复具有明显的效果,同时 可以确定细菌群落结构可作为生境修复效果评价的指标之一。本研究通过科学分析藻类养殖对养殖区环境的影响 及评价生境修复的效果,可为实现生态系统调控与管理、以及养殖业的可持续发展提供理论参考依据。

关键词:象山港;网箱养殖区;藻类养殖区;生境修复;细菌群落;PCR-DGGE 中图分类号:Q93;S949 文献标志码:A 文章编号:1005-8737-(2013)06-1234-13

目前能在实验室中培养的细菌种类仅占自然 界中的极少部分<sup>[1]</sup>,应用传统的分离培养方法研 究环境细菌的种群构成会导致严重的多样性丢失。 采用分子生物学方法研究细菌多样性可以克服上 述问题,已被国内外广泛采纳<sup>[2]</sup>,其中,变性梯度 凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)技术<sup>[3-4]</sup>,在研究自然界微生物群落的遗 传多样性和种群差异方面具有显著的优越性,目 前已经成为分析微生物群落遗传多样性和动态变 化的强有力工具,并被广泛应用于活性污泥<sup>[5-6]</sup>、 生物膜<sup>[7]</sup>、土壤<sup>[8]</sup>、底泥<sup>[9]</sup>等环境样品中的微生物 多样性检测和种群演替研究。

象山港地处浙江中部沿海,是一个狭长型半 封闭海湾,汇水区面积为1445 km<sup>2</sup>,地理坐标在 东经121°25′-122°03′,北纬29°05′-29°46′,港内 平均水深20m左右,最深达55m(图1)。近年来, 象山港网箱养殖规模较大,而藻类养殖规模相对 较小,再加上陆源污染,导致象山港的环境问题 日益严重。2009-2011年,本课题组尝试在象山港 中部网箱养殖区附近采用增加大型藻类养殖规模 来进行生境修复试验。为了评价修复效果,除定 期监测水体和沉积环境理化指标的变化,还采用

收稿日期: 2013-02-02; 修订日期: 2013-04-02.

基金项目:海洋公益性行业科研专项经费项目(200805069, 201305043).

作者简介: 李秋芬(1969-), 女, 博士, 研究员, 主要从事环境微生物和微生物生态学研究. E-mail: liqf@ysfri.ac.cn

1235

PCR-DGGE 技术,对修复过程中养殖区沉积环境 中的细菌群落结构进行分析。旨在了解养殖区底 泥中细菌多样性和菌群结构的变化,为科学地分 析藻类养殖对养殖区环境的影响及评价生境修复 的效果提供科学依据,并为实现生态系统调控与 管理、以及养殖业的可持续发展提供参考。

#### 1 材料和方法

1.1 试验设计

选取位于象山港中部的南沙岛周围海域作为 实验区,其中岛北部为网箱养殖区(4 号站),养殖 面积约 7.5 hm<sup>2</sup>,养殖器材多为木架浮动式网箱, 规格主要为 3 m×3 m×6 m,共有网箱约 4 000 个, 每个网箱放养 1 000 尾左右,年产量约 1 000 t,养 殖种类主要为鲈鱼(约占养殖总量的 75%)、大黄 鱼(约占养殖总量的 25%),养殖周期一般为 2~3 年;岛东部为藻类养殖区(5 号站),养殖藻类 (海 带、龙须菜)面积从 2008 年的 74.7 hm<sup>2</sup> 增加至约 150 hm<sup>2</sup>,养殖方式采用筏式养殖,每年 11 月份 放苗,次年 5 月份收获。调查站位分布及其经纬 度见图 1 和表 1。

#### 1.2 样品采集

分别于 2009 年 8 月、11 月,2010 年 3 月、5 月、8 月,2011 年 5 月、8 月(共计 6 次)在网箱养 殖区和藻类养殖区采集水样及底泥样品,各站位 在不同位置采集 5 个样,混合后作为一个样品。 部分水样送宁波市海洋与渔业研究院进行理化指





衣.	Ⅰ 家山港	<b>十部乔殖区%</b>	间宣站点地理坐标						
Tab. 1 Geographic coordinates of sampling stations in the									
aquaculture area of middle Xiangshan Bay									
站位	东经	北纬							

站业 sampling station	乐经 east lon- gitude	א⊊ north latitude	备注 explanation
L1	121.5543	29.50077	贝类养殖区 shell fish culture
L2	121.6103	29.51433	毛蚶底播区 blood clam culture
L3	121.6098	29.53095	牡蛎养殖区 oyster culture
L4	121.6144	29.54282	网箱养殖区 cage culture
L5	121.6263	29.54028	大型藻类养殖区 macro-algae culture
L6	121.6332	29.54307	排污口 waste water outlets
L7	121.6853	29.55852	大型藻类养殖区 macro-algae culture
L8	121.7565	29.54112	西沪港鱼类养殖区 fish culture in Xihugang
L9	121.7913	29.52065	西沪港港底 bottom of Xihugang
L10	121.7954	29.53473	西沪港中东部 middle east of Xihugang

标测定,泥样放置于冰盒暂存,并于 2~3 h 内送 往实验室-80℃冰箱保存。

1.3 主要试剂和仪器

溶菌酶、*Taq* DNA 聚合酶(含 Mg<sup>2+</sup>)(购自 fermentas)、SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒(购 自生工生物工程有限公司)、pMD18-T Vector(购自 TaKaRa)、BMTOP10 感受态细胞(购自 Biomed)、 高速冷冻离心机(Sigma 3-18k,德国)、凝胶成像 分析系统(DNR Chemi BIS,以色列)、变性梯度凝 胶电泳系统(Bio-RAD,美国)、梯度 PCR 扩增仪 (eppendorf,德国)等。

1.4 实验方法

**1.4.1** 底泥总 **DNA** 的提取 总 DNA 提取参照 文献[10]报道的方法并根据象山港底泥样品特性 稍作改动。采用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测总 DNA, -20°C 保存作为 PCR 模板。

1.4.2 16S rRNA 基因的 PCR 扩增 采用细菌通用引物 341F(5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3')和 534R(5'-ATTACCGCGG-CTGCTGG-3'), 其中,

341F 5'端加一 GC 链,以底泥总 DNA 为模板。反 应条件为 95℃变性 3 min; 94℃变性 1 min, 55℃退 火 1 min, 72℃延伸 1 min, 30 个循环; 72℃最终延 伸 10 min。PCR 产物用 1.2%的琼脂糖凝胶进行电 泳检测,之后收集足够的 PCR 产物进行浓缩和纯 化, -20℃保存,用作后续实验。

1.4.3 变性梯度凝胶电泳(DGGE) 参照仪器说 明书,配制变性梯度 45%~70%的 8%丙烯酰胺凝 胶,电泳缓冲液为 1×TAE,将 12 µL PCR 浓缩产 物和 6 µl 2×Loading buffer 混匀后,上样。电压 56V,60℃,电泳 14 h, Gel Green 染色。摄影后在 蓝光照射下切下 DGGE 胶上比较亮的特征条带, 放置于 60 µL 无菌水中,4℃培养过夜,并进行 PCR 扩增,扩增产物纯化后,-20℃下保存备用。

**1.4.4 DGGE** 图谱分析 对 DGGE 电泳图谱进 行软件分析,根据图谱上的条带数量位置以及吸 光强度计算每个样品的香农多样性指数(Shannon 指数,*H*)<sup>[11]</sup>和样品间的相似度指数<sup>[12]</sup>。多样性指 数的计算公式为:

 $H = -\Sigma(n_i/N) \lg(n_i/N)$ 

式中, *n<sub>i</sub>* 表示一个样品上每条带的吸收峰面积, *N* 表示所有吸收峰面积的综合。样品间的相似性指数计算公式为:

 $C_{\rm sAB} = 2L_{\rm AB}/(L_{\rm A}+L_{\rm B}) \times 100\%$ 

式中,  $C_{sAB}$ 为样品 A 和样品 B 之间的相似性指数,  $L_{AB}$ 为样品 A 与样品 B 上位置相同的条带数,  $L_A$ 为样品 A 上的条带总数,  $L_B$ 为样品 B 上的条带数。 **1.4.5** 基因克隆 将 DGGE 条带的 PCR 产物纯化 回收后, 按照 PMD18-T Vector 的说明进行连接转化, 选取单克隆送交上海生工生物工程有限公司测序。

**1.4.6** 系统发育分析 使用 NCBI BLAST (http: //www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)对所得序列进行同源 性分析,并使用 ClustalX1.83 软件进行多序列匹配 排列 (Mµltiple alignments), 通过 MEGA 3.1 采用邻 接法(neighbour-joining-analysis)构建系统发育树。

**1.4.7** 理化指标测定 参照《海洋监测规范》 (GB17378.4-2007), 氨氮的测定采用次溴酸盐氧 化法; 亚硝酸氮的测定采用盐酸萘乙二胺分光光 度法; 硝酸氮的测定采用锌-隔还原法; 氨氮、亚 硝酸氮和硝酸氮含量之和称之为总无机氮含量 (DIN)、COD 的测定采用碱性高锰酸钾法。

1.4.8 沉积物样品中细菌群落结构与水环境因子的相关性分析 运用生物统计学软件 CANOCO for windows (Version 4.5)对 DGGE 图谱数字化后, 与环境因子相结合,进行冗余分析(RDA),研究 各个样品中微生物群落结构与其水环境因子的相关性。RDA 图中,横轴为第一排序轴,纵轴为第二排序轴,箭头所处的象限表示环境因子与排序轴之间的正负相关性,箭头连线的长度代表着某种环境因子与研究对象分布相关程度的大小,箭头连线间的夹角代表环境因子间的相关程度<sup>[13]</sup>。

2 结果与分析

#### 2.1 底泥总 DNA 直接提取

从 4 号和 5 号站的底泥样品中成功提取了总 DNA, DNA 条带单一、完整(图 2)。总 DNA 片段 大小主要集中在 20 kb 左右, 与细菌基因组的大 小接近<sup>[14]</sup>。提取的 DNA 可以作为一下步特异性 扩增的模板。



图 2 象山港中部养殖区底泥提取的总 DNA 电泳图

M: DNA 分子量 marker; A: 样品 DNA Fig. 2 Total DNA extracted from the sediments of culture area in middle Xiangshan Bay M: DNA marker, A: total DNA of samples

#### 2.2 16S rRNA 基因的 PCR 扩增

采用细菌通用引物(341F/534R)对底泥样品的 DNA 进行特异性扩增的产物在 1.2%的琼脂糖凝 胶电泳图中呈单一条带(图3),大小在200 bp左右, 无明显的非特异性扩增现象,可以作为下一步 DGGE 分析的对象。



#### 图 3 象山港中部养殖区底泥 DNA 样品的 PCR 产物琼脂 糖凝胶电泳图谱

M: DNA marker; A: 4 号站 PCR 产物, B: 5 号站 PCR 产物, CK: 阴性对照

Fig. 3 Profile of agarose gel electrophoresis of PCR products of the DNA samples from the sediments of culture area in middle Xiangshan Bay M: DNA marker, A: PCR product of station 4,

B: PCR product of station 5, CK: negative control

#### 2.3 PCR 扩增产物的 DGGE 分析

2.3.1 网箱养殖区细菌种群 16S rRNA 基因 PCR 扩增产物的 DGGE 分析 网箱养殖区不同时期 底泥样品 16S rRNA 基因 PCR 产物的变性梯度凝 胶电泳结果如图 4 所示。从 DGGE 图谱来看,网 箱养殖区样品的条带数从 12~31 条不等,表明各 时期样品的细菌种群具有较高的多样性,亮度高 的条带在泳道中的位置各不相同,说明不同时期 样品的细菌优势种和种群结构各有所不同,每年 的夏季样品(8 月)条带数明显低于春季(3 月和 5 月)。这从细菌的多样性指数(图 5)也可反映出来, 2010年3月和5月的多样性指数分别 1.25 和 1.39, 而 2009 年和 2010 年 8 月的才分别为 1.07 和 0.98。 不过,2011 年 8 月的反而高于 5 月的 1.11,呈现增 加的趋势。





#### 图 4 象山港中部网箱养殖区样品 DGGE 分离图谱 图中数字为条带序号。

Fig.4 DGGE profiles of samples from cage culture area in Xiangshan Bay

Numbers in the figure refer to the excised bands.





middle Xiangshan Bay

网箱养殖区所有样品之间的相似性在 30%~ 92% (表 2), 说明不同时期细菌的种群结构均有较 大差异。除个别情况外, 呈现各年相邻季节的相似 性指数较高, 说明种群结构是个逐渐变化的过程。 2.3.2 藻类养殖区细菌种群 16S rRNA 基因 PCR 扩增产物的 DGGE 分析 藻类养殖区不同时期 底泥样品 16S rRNA 基因 PCR 产物的变性梯度凝 胶电泳结果如图 6 所示, 藻类养殖区样品的条带 数从 18~30 条不等, 亮度高的条带在泳道中的位 置基本相同, 说明每个时期细菌的优势种群基本 一样。2009 年 8 月、2010 年 3 月样品的条带数量

#### 表 2 象山港中部网箱养殖区底泥样品中细菌群落相似 性指数

Tab. 2 Similarity index of bacterial communities in sediment samples from cage culture area in middle Xiangshan Bay

	2009.8	2010.3	2010.5	2010.8	2011.5	2011.8
2009.8	100					
2010.3	68.4	100				
2010.5	62.5	73.1	100			
2010.8	41.4	30.3	32.6	100		
2011.5	91.4	92.3	65.3	26.7	100	
2011.8	52.4	69.6	75	54.1	65.1	100



### 图 6 象山港中部藻类养殖区样品 DGGE 分离图谱 图中数字表示条带序号.

Fig. 6 DGGE profiles of samples from algae culture area in middle Xiangshan Bay Numbers in the figure refer to the excised bands.

和亮度均低于 2010 年 5 月之后的样品的,这从细 菌的多样性指数(图 7)也可反映出来,前者的细菌 多样性指数分别为 1.11 和 1.14,后者均在 1.34 以 上。2010年夏季(8月)样品的多样性指数低于 2010 年春季(5 月),而 2011 年夏季又高于 2011 年春季 的,说明多样性呈逐渐升高趋势;与网箱养殖区 相比,藻类养殖区细菌的平均多样性指数较高。

由表 3 可知, 藻类养殖区所有样品之间的相 似性在 38%~100%。2009 年 8 月与 2010 年 3 月 样品的谱带特征很相似, 相似性指数为 97.3%,



图 7 象山港中部藻类养殖区样品 Shannon 多样性指数

Fig. 7 Shannon indexes of samples from algae culture area in middle Xiangshan Bay

表 3 象山港中部藻类养殖区底泥中细菌群落相似性指数 Tab. 3 Similarity index of bacterial communities of sediment samples from algae culture area in middle Xiangshan Bay

	2009.8	2010.3	2010.5	2010.8	2011.5	2011.8
2009.8	100					
2010.3	97.3	100				
2010.5	75	38.8	100			
2010.8	76.6	39.6	98.3	100		
2011.5	78.3	40.4	96.6	98.2	100	
2011.8	76.6	39.6	98.3	100	98.2	100

而 2010 年 3 月的样品与其之后样品的相似性较低, 大多在 40%以下。2010 年 5 月之后的样品的条带 谱基本一致, 彼此的相似性指数均在 96%以上。

#### 2.4 细菌种群组成分析

网箱养殖区细菌种群组成分析 2.4.1 将网箱养 殖区样品 DGGE 凝胶中主要条带进行测序后, 经 在GenBank中比对,共获得39个条带的同源性信 息。从构建的系统树(图 8)分析、象山港养殖区底 泥环境中存在着大量不同类型的微生物种群,分 布广泛,种类繁多。网箱养殖区的39个序列分别 属于变形菌门(Proteobacteria)的 α-、δ-、γ-变形菌 纲 (Proteobacteria) (20 个 OTUs)、厚壁菌门 (Firmicutes) (2个 OTUs)、拟杆菌门(Bacteroidetes) (1个OTUs)、绿弯菌门(Chloroflexi)(3个OTUs)、 放线菌门(Actinobacteria)(5 个 OTUs)、酸杆菌门 (Acidobacteria)(2 个 OTUs)和疣微菌门(Verrucomicrobia)(1 个 OTUs),其中变形菌门(Proteobacteria)不仅在整体菌群中占绝对优势,在各个时期 也是占比例最大的菌群。网箱养殖区还有17个序 列(占总条带数的 43.6%)与未培养细菌的 DNA 序

列具有高度相似性,说明象山港网箱养殖区微生物资源丰富,还存在大量未被认知的类群。

生物修复前网箱养殖区优势菌群有 9 种,分 别为 Acinetobacter sp. 2C56(2011)(不动杆菌属,  $\gamma$ -变形菌纲)、 Aminobacter aminovorans strain EE9(嗜氨基杆菌,  $\alpha$ -变形菌纲)、Chloroflexi(绿弯 菌门)、Pseudomonas sp. L-6(2012)(假单胞菌属,  $\gamma$ -变形菌纲)、 Desulfobacteraceae(脱硫杆菌属,  $\delta$ -变 形杆菌纲)、 Serratia nematodiphila(肠杆菌科,  $\gamma$ -变形菌纲)和 Desulfobulbaceae(布鲁氏菌科,  $\delta$ -变 形杆菌纲),与之相比,生物修复后的优势菌群也 有9种,但类群有所变化,表现为3种新的优势菌 群取代原来的优势菌群,分别为放线菌门 (Uncultured actinobacterium clone HAHS13.051)、

海仙菌属(Haliea sp. DSW4-37)和苍白杆菌属 (Ochrobactrum sp.)细菌代替了不动杆菌属 [Acinetobacter sp. 2C56(2011)]、嗜氨基杆菌 (Aminobacter aminovorans strain EE9)和假单胞菌 属[Pseudomonas sp. L-6(2012)]的细菌。

2.4.2 藻类养殖区细菌种群组成分析 将藻类养 殖区 DGGE 凝胶中的主要条带进行测序后, 经在 GenBank 中比对, 共获得 30 个条带的同源性信息, 它们分别属于变形菌门(Proteobacteria)的 α-、δ-、 γ-、ε-变形菌纲(Proteobacteria)(22 个 OTUs), 厚壁 菌门(Firmicutes) (2 个 OTUs), 拟杆菌门(Bacteroidetes) (1 个 OTUs), 绿弯菌门(Chloroflexi)(3 个 OTUs), 放线菌门(Actinobacteria)(1 个 OTUs,) (图 9), 与网箱养殖区类似, 变形菌门(Proteobacteria)也是占比例最多的菌群, 藻类养殖区也 有 13 条序列(占总条带数的 43.3%)与未培养细菌 的 DNA 序列具有高度相似性, 说明象山港藻类 养殖区的微生物资源也是丰富多样, 有大量未被 认知的类群。

藻类养殖区的优势菌群先呈增加趋势,而后趋 于稳定,主要优势菌群有 Chloroflexi(绿弯菌门)、 *Acinetobacter* sp.(不动杆菌, γ-变形菌纲)、 delta proteobacterium(δ-变形杆菌纲)、 *Psychrobacter adeliensis*(嗜冷隐球菌, γ-变形菌纲)、 *Marinobacter* sp.(海洋杆状菌, γ-变形菌纲)、 *Photobacterium*  sp.(发光杆菌,  $\gamma$ -变形菌纲)、*Cupriavidus* sp.(贪铜 菌,  $\gamma$ -变形菌纲)、*Sulfitobacter* sp.(亚硫酸杆菌, 放 线菌门)、*Phyllobacterium* sp.(叶杆菌,  $\alpha$ -变形菌纲), 其中变形菌门的  $\gamma$ -变形菌纲占优势地位。

2.5 养殖区主要理化指标的变化

如表 4 所示, 在修复过程中, 两个养殖区的 总无机氮含量一直呈下降趋势, 分别从 2009 年 8 月份的 1.48 mg·L<sup>-1</sup>和 1.18 mg·L<sup>-1</sup>, 经过一个平台 期, 降到了 2011 年 8 月份的 0.27 mg·L<sup>-1</sup> 和 0.39 mg·L<sup>-1</sup>, 达到或接近二类海水水质标准; 两 个养殖区的活性磷酸盐含量变化不大, 5 月份普 遍低于 8 月和 11 月份, 但一直高于三类海水水质 标准。由于总无机氮的明显下降, 两个养殖区水 体中氮磷比出现了明显的下降, 使氮和磷营养盐 的配比更趋合理, 更有利于浮游植物的繁殖。两 个养殖区的有机物含量(COD), 均达到海水一类 水质标准。在不同时间波动较大, 但总体也呈现 了下降趋势。

2.6 养殖区细菌群落结构与环境因子的相关性分析 2.6.1 网箱养殖区细菌群落结构与理化因子的相 关性分析 如图 10 所示,第一排序轴的主要影 响因子为氨氮(正相关)、COD(正相关)、活性硅酸 盐(负相关);第二排序轴的主要影响因子为 COD(负相关)、活性磷酸盐(正相关)、DIN(负相 关)。从箭头的连线长度可以看出,环境因子对网 箱养殖区沉积物细菌群落结构影响的相关性大小 为氨氮>COD>活性磷酸盐>活性硅酸盐>DIN>硝 氮>亚硝氮,说明氨氮、COD、活性磷酸是影响网 箱养殖区沉积物细菌群落结构的 3 个主要因素。

2.6.2 藻类养殖区细菌群落结构与理化因子的相 关性分析 如图 11 所示,第一排序轴的主要影响 因子为 COD(正相关)、活性磷酸盐(正相关)、活 性硅酸盐(负相关);第二排序轴的主要影响因子 为 DIN、硝氮、亚硝氮,均为正相关。从箭头的 连线长度可以看出,理化因子对藻类养殖区沉积 物细菌群落结构影响的相关性大小为 DIN>硝氮> 亚硝氮>COD>活性磷酸盐>活性硅酸盐>氨氮,说 明 DIN、硝氮、亚硝氮是影响藻类养殖区沉积物 细菌群落结构的 3 个主要因素。



图 8 基于 DGGE 条带 16S rRNA 基因序列的象山港中部网箱养殖区细菌系统发育树 Fig. 8 Phylogenetic tree of bacteria in cage culture area in middle Xiangshan Bay based on the sequences of 16S rRNA gene on





图 9 基于 DGGE 条带 16S rRNA 序列的象山港中部藻类养殖区细菌系统发育树

Fig. 9 Phylogenetic tree of bacteria in algae culture area in middle Xiangshan Bay based on the sequences of 16S rRNA gene on DGGE bands

象山港中部网箱和藻类养殖区海水理化指标的变化

Tab. 4 Physics-chemical character of the seawater in cage and algae culture areas in middle Xiangshan Bay															
时间 ac time	活性G /(mg active p	活性磷酸盐 /(mg·L <sup>-1</sup> ) active phosphate		活性硅酸盐 /(mg·L <sup>-1</sup> ) active silicate		化学需氧量 /(mg·L <sup>-1</sup> ) chemical oxygen demand		氨氮/(mg·L <sup>-1</sup> ) ammonium -nitrogen		亚硝酸氮 /(mg·L <sup>-1</sup> ) nitrite -nitrogen		硝酸氮/(mg·L <sup>-1</sup> ) nitrate- nitrogen		总无机氮 /(mg·L <sup>-1</sup> ) DIN	
(year-	网箱区	藻类区	网箱区	藻类区	网箱区	藻类区	网箱区	藻类区	网箱区	藻类区	网箱区	藻类区	网箱区	藻类区	
month)	cage cult. area	algae cult. area	cage cult. area	algae cult. area	cage cult. area	algae cult. area	cage cult. area	algae cult. area	cage cult. area	algae cult. area	cage cult. area	algae cult. area	cage cult. area	algae cult. area	
2009-8	0.063	0.062	1.89	1.31	0.90	0.71	0.02	0.019	0.030	0.027	1.43	1.13	1.48	1.18	
2010-3	0.051	0.050	1.31	1.33	1.30	0.82	0.11	0.09	0.012	0.011	0.66	0.58	0.78	0.68	
2010-5	0.03	0.03	1.05	1.12	1.38	1.26	0.05	0.06	0.016	0.021	0.73	0.73	0.80	0.82	
2010-8	0.058	0.053	1.15	1.15	0.72	0.38	0.06	0.11	0.014	0.010	0.55	0.57	0.62	0.69	
2011-5	0.038	0.056	0.68	0.72	1.58	1.56	0.04	0.06	0.019	0.015	0.57	0.68	0.65	0.80	
2011 - 8	0.077	0.075	1.40	1.46	0.40	0.54	0.01	0.002	0.012	0.008	0.26	0.38	0.27	0.39	



表 4

图 10 象山港中部网箱养殖区沉积物细菌多样性与环境 因子的冗余分析图

Fig. 10 Redundancy analysis about the bacterial community structure in the sediment and environmental factors in the cage culture area of middle Xiangshan Bay

#### 3 讨论

目前,对象山港养殖区环境方面已有的研究 报道,主要以海洋浮游动植物、底栖动物为研究 对象展开,而对该海域微生物多样性和菌群结构 组成方面的研究还较少<sup>[15-16]</sup>。本研究采用 PCR-DGGE分子生物学技术对网箱养殖区和藻类 养殖区沉积环境中的微生物群落进行了研究,并 首次比较分析了它们在生境修复过程中的变化。

3.1 网箱养殖区细菌群落的特征及变化 本研究结果表明象山港网箱养殖区细菌种类



#### 图 11 象山港中部藻类养殖区沉积物细菌多样性与环境 因子的冗余分析图

Fig. 11 Redundancy analysis about the bacterial community structure in the sediment and environmental factors in the algae culture area of middle Xiangshan Bay

丰富多样,由7个门(变形菌门、绿弯菌门、放线 菌门、酸杆菌门、厚壁菌门、拟杆菌门、疣微菌 门)的细菌组成,这些菌均属于海洋沉积环境中常 见的微生物,其中变形菌门是菌群中最大的一门, 这与对黄海海区和维多利亚港沉积物等的微生物 群落研究结果相一致<sup>[17-18]</sup>。

网箱养殖区细菌多样性表现出一定的季节变 化规律,即每年的夏季样品(8月)条带数及细菌多 样性明显低于春季(3月和5月),这可能与周边海 域藻类养殖的季节性有关,受温度影响,在象山 港养殖海带一般 11 月份开始, 次年 5 月份收获。 海带养殖期间、需要大量氮、磷等营养盐、可使得 周边水体中的营养盐浓度降低、富营养化程度降 低, 氮磷比趋于合理, 对象山港环境有较大的改 善作用、这可能有利于更多种类的细菌繁殖、而 8 月份海上没有养殖海带,由于缺少藻类的分解 吸收作用、导致网箱养殖区的营养盐含量持续增 高,对细菌的生长造成抑制甚至是毒害作用。同 时发现、网箱养殖区的细菌多样性指数在生境修 复后、尤其是 2011 年 8 月较前一年同一月份有增 加趋势、并且优势种群发生变化、这表明针对网 箱养殖区生境日益变坏、高富营养化的现象,在 周边海域连续养殖海带、龙须菜等大型藻类,对 网箱养殖区环境有持续改善作用,这一点,通过 对该海域水体无机氮和磷酸盐等营养盐的含量、 氮磷比及有机物含量的长期跟踪监测结果也可体 现出来。

对比生物修复过程中网箱养殖区菌群结构的 变化、发现修复后网箱养殖区底泥中出现了 3 种 新的细菌、其中 Uncultured actinobacterium clone HAHS13.051 属于放线菌、放线菌主要能促使土 壤中的动物和植物遗骸腐烂、在甾体的转化、石 油的脱蜡、污水的处理等方面也有广泛的用途, 在自然界的氮素循环中也起着一定的作用; 海仙 菌属细菌 Haliea sp. DSW4-37 是化能异养菌, 目 前的报道中交替单胞菌属的细菌有些属于海洋 中的有益菌,而且这些有益菌(probiotics)在水 产养殖中日益受到重视<sup>[19-20]</sup>。本研究发现生态修 复后优势菌群出现了交替单胞菌,我们推测这株 优势菌可能具有杀死水体中病原菌的作用、在今 后的工作中可以多加关注; Ochrobactrum sp.也属 于光合细菌、可能具有彻底降解甲基对硫磷的能 力<sup>[21-24]</sup>。甲基对硫磷(methyl parathion, MP)是目 前我国使用量和生产量最大的农药品种之一。 Uncultured actinobacterium clone HAHS13.051, Haliea sp. DSW4-37 和 Ochrobactrum sp.的出现 说明网箱养殖区底泥中出现了适应当前沉积环境 并可修复生态环境的菌株、有助于生境的进一步 修复。

3.2 藻类养殖区细菌群落变化

研究结果显示,象山港藻类养殖区细菌种类 虽然不如网箱养殖区细菌种类多,但也种类繁多, 由 5 个门(变形菌门、绿弯菌门、放线菌门、厚壁 菌门、拟杆菌门)的细菌组成。

藻类养殖区的菌群结构在经过一定时间的藻 类养殖后菌群种类由少变多,而后趋于稳定。每 年 3~5 月份是海带生长旺季,说明利用藻类的吸 收作用,水体中的一些有毒有害成分得到降解, 富集的营养盐成分得以降低;利用藻类的生长来 消耗和吸收网箱养殖区贝类的排泄物及残饵溶出 的营养成分<sup>[25]</sup>,净化后的水质利于细菌的生存, 随着藻类养殖时间的延长,修复作用越来越明显, 水域生态环境朝着良性方向发展,从而使沉积环 境中的细菌群落结构保持健康而稳定的状态。

藻类养殖区自 2010 年 5 月后出现了 3 种新的 优势菌群,包括 Rhodocista sp. CAJ2-2、 Uncultured delta proteobacterium clone AT-s3-66 和 Cupriavidus sp. SLV-2362。 Rhodocista sp. CAJ2-2 是一种光合细菌、该属细菌在生态系统能 量转化和物质循环中具有重要的意义,可被用于 水产养殖; $\delta$ -变形菌纲包括硫酸盐还原菌[脱硫弧 菌属(Desulfovibrio)、脱硫菌属(Desulfobacter)、脱 硫球菌属 (Desulfococcus)、脱硫线菌属 (Desulfonema)等]和硫还原菌[如除硫单胞菌属 (Desulfuromonas)]等,结合本研究站位传统平板 培养法的测定结果、我们推测、这株菌可能具有 降解硫的功能; Cupriavidus sp. 2 是一种假单胞菌, 该属的细菌具有保护环境、降解土壤的有毒物质 和人工合成雌激素的作用<sup>[26]</sup>,且它广泛存在于 江河湖海及土壤中、今后可着重研究该菌、以期 对改善环境做出贡献。

#### 3.3 象山港养殖区生境修复效果评价

网箱和藻类养殖区的各项理化指标中,除了 活性磷酸盐含量在生境修复前后变化不大外,其 余各项如 DIN、COD、N/P 等均呈下降趋势,这 一结果与朱根海<sup>[27]</sup>报道的 1982–2011 年间象山港 海域氮、磷营养盐浓度呈逐年增加趋势的结果存 在差异,这充分说明采用海带和龙须菜等大型藻 类对网箱养殖区环境进行生境修复,具有明显的 效果,细菌群落结构可作为生境修复效果评价的 指标之一。

生境修复前后, 沉积环境中优势菌株的作用 发生了略微改变, 原因可能是环境中各种理化因 子的改变对菌群的变化起了优胜劣汰作用。这些 菌群的变化可能对海洋环境前后变化具有指示和 检测功能, 已有对环境污染压力对微生物群落结 构影响的研究发现, 许多生态系统在中等污染程 度下, 微生物种类随污染的产生和加重有改变的 趋势, 这种趋势对于稳定生态系统内部功能具有 积极意义<sup>[28–29]</sup>。在今后的工作中, 可以着重研究 检测出的优势菌株, 以期对养殖区的生境修复做 出贡献。

冗余分析(RDA)表明网箱养殖区氨氮、COD、 活性磷酸盐是影响其细菌群落结构的主要环境因 子,藻类养殖区 DIN、硝酸氮、亚硝酸氮是影响 其细菌群落结构的主要环境因子。王海丽等<sup>[30]</sup>发 现各种形态的氮是影响象山港海域上覆水中硝化 细菌丰度的重要因素,吕明姬等<sup>[31]</sup>的研究也表明 氮类无机营养物是影响滇池浮游细菌分布的主要 因子。由此可以看出氮素是微生物生长所必需的 基础物质,并对总细菌群落结构有重要影响。

但是,研究结果也表明,到修复采样结束时 网箱养殖区底泥中的微生物多样性及种类仍没有 达到最佳状态,长期的网箱养殖导致沉积环境的 细菌多样性呈逐年降低趋势,自我调节能力下降, 这与顾晓英等<sup>[32]</sup>的研究结果一致。目前的藻类养 殖对水体起到了一定的修复作用,但由于时间 短、规模小,还难以完全消除网箱养殖带来的富 营养化污染<sup>[33]</sup>。所以,生境修复作为一项长期的 系统工程,应根据生态系统平衡发展原理,对密 集养殖海区的网箱数量进行削减和科学管理,引 导渔民增加贝类、藻类等的养殖规模和对养殖品 种科学搭配,并有计划地长期推行,才能取得明 显效果,保证未来海洋渔业的可持续发展。

参考文献:

[1] Amann R I, Lidwig W, Schleifer K H. Phylogenetic

identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiol Rev, 1995, 59(1): 143–169.

- [2] 俞慎,李勇,李振高,等. 土壤生物量作为红壤质量生物 指标的探讨[J]. 土壤学报, 1999, 36(3): 413–422.
- [3] Fischer S G, Lerman L S. DNA Fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1983, 80: 1579–1583.
- [4] Muyzer G, de Waal E C, Uitferlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction- amplified genes coding for 16S rRNA[J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(3): 695–700.
- [5] Liu W T, Chan O C, Fang H P. Microbial community dynamics during start-up of acidogenic anaerobic reactors[J]. Wat Res, 2002, 36: 3203–3210.
- [6] Fang H P, Zhang T, Liy Y. Characterization of an acetate-degrading sludge without intracellular accumulation of polyphosphate and glycogen[J]. Wat Res, 2002, 36: 3211–3218.
- [7] Zhang T, Fang H P. Phylogenetic diversity of a SRB-rich marine biofilm[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 57: 437–440.
- [8] Donnell G O, Gorres H E. 16S rDNA methods in soil microbiology[J]. Curr Opin Biotechnol, 1999, 10: 225–229.
- [9] Ferris M J, Muyzer G, Ward D M. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62: 340–346.
- [10] 傅莲英, 席峰, 袁建军, 等. 海水养殖沉积环境微生物总 DNA 的提取方法研究[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2006, 45(6): 841-846.
- [11] Shannon C E, Weaver W. The mathematical theory of communication[J]. Urbana: University of Illinois Press, 1964: 365–368.
- [12] Magurran A E. Ecological diversity and its measurement[J]. New Jersey: Princeton University Press, 1988: 265–266.
- [13] 秦华,李国栋,叶正钱,等.集约种植雷竹林土壤细菌群 落结构的演变及其影响因素[J].应用生态学报,2010, 21(10):2645-2651.
- [14] Zhou J Z, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62: 316–322.
- [15] 刘晶晶,曾江宁,陈全震,等.象山港网箱养殖区水体和 沉积物的细菌生态分布[J]. 生态学报,2010,30(2): 377–388.

- [16] Liu Z L, Cai Y M, Ning X R. The distribution of chlorophyll a and primary productivity in the middle and west of Xiangshan Bay[J]. Donghai Marine Science, 1998, 16 (3):
- [17] Gao A G, Chen Q Z, Hu X G. Ecological characteristics on macrobenthos of net cage culture areas in the Xiangshan Bay[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2005, 27 (4): 108–113.
- [18] 白洁, 李海艳, 赵阳国. 黄海北部不同站位海洋细菌群落 分布特征[J]. 微生物学报, 2009, 49(3): 343–350.
- [19] Zhang W, Ki J S, Qian P Y. Microbial diversity in polluted harbor sediments I: Bacterial community assessment based on four clone libraries of 16S rDNA[J]. Estuar Coast Shelf S, 2008, 76(3): 668–681.
- [20] Riquelme C, Araya R, Vergara N, et al. Potential probiotic strains in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) [J]. Aquaculture, 1997, 154: 17–26.
- [21] Gatesoupe F J. The use of probiotics in aquaculture[J]. Aquaculture, 1999, 180: 147–165.
- [22] 柏文琴. 甲基对硫磷降解菌的筛选、鉴定及降解酶基因的 定位与克隆[D]. 北京: 中国科学院动物研究所, 2004
- [23] 姜莉, 史艳芳, 刘鑫, 等. 不动杆菌 D10 对土壤中对硫磷 的降解[J]. 科技导报, 2011, 29(1): 33–39.
- [24] Yu C P, Roh H, Chu K H. 17β-Estradiol-degrading bacteria isolated from activated sludge[J]. Envir Sci Technol, 2007, 41(2): 486–492.

- [25] 姜岩,刘艳,王晓萍.氯嘧磺隆降解菌的分离鉴定及其降 解特性[J].中国农学通报,2012,28(12):88–92.
- [26] 张健, 邬翱宇, 施青松. 象山港海水养殖及其对环境的影响[J]. 东海海洋, 2003, 21(4): 54–59.
- [27] 朱根海,陈立红,刘晶晶,等.东海象山港海域主要营养物质年际变化及环境影响评价[C]//环境经济与环境管理 —2012 年中国环境科学学会学术年会论文集.北京:中国农业大学出版社,2012:849-852.
- [28] 黄卫,宋海燕.环境中类固醇雌激素的转化机制研究进展[J].广东化工,2009,36(7):71-73.
- [29] Girvn M S, Campbell C D, Killham K, et al. Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation[J]. Environ Microbiol, 2005, 7(3): 301–313.
- [30] 王海丽,杨季芳,陈吉刚,等.象山港海域硝化细菌与反 硝化细菌的时空分布特征及其与环境因子的关系[J].生 态学杂志,2011,30(4):752-762.
- [31] 吕明姬, 汪杰, 范铮, 等. 滇池浮游细菌群落组成的空间 分布特征及其与环境因子的关系[J]. 环境科学学报, 2011, 31(2): 299–306.
- [32] 顾晓英,陶磊,尤仲杰.象山港大型底栖动物的群落特征[J].海洋与湖沼,2010,41(2):208-213.
- [33] 蒋增杰,方建光,毛玉泽,等.宁波南沙港养殖水域沉积物-水界面氮磷营养盐的扩散通量[J].农业环境科学学报, 2010,29(12):2413-2419.

18-24.

## Changes in the characteristics of the bacterial community structure during habitat restoration of aquaculture sites in Xiangshan Bay

LI Qiufen<sup>1</sup>, YOU Xiaojuan<sup>1, 2</sup>, ZHANG Yan<sup>1</sup>, MAO Yuze<sup>1</sup>, JIAO Haifeng<sup>3</sup>

3. Ocean and Fisheries Academy of Ningbo, Ningbo 315010, China

Abstract: Xianshan Bay (121°25′–122° 03′E, 29°05′–29°46′N) is located in the middle of Zhejiang province along the coast, a long and narrow semi-closed bay with the water area of 1 445 km<sup>2</sup>, and average water depth of 20 m. In recent years, the scale of aquaculture became larger and larger, and with pollution from land-based source, which made the environment in this bay increasingly deteriorate. During 2009-2011, we expanded the scale of macro-algae culture near the cage area of middle Xiangshan Bay to try to restore the habitat around the areas of cage culture. To assess the response, we measured the characteristics of the bacterial communities in the sediment of cage and algae culture areas using PCR, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), cloning, and sequencing. The bacterial communities in the sediment environment of the cage culture area consisted primarily of 7 phyla lineages of the domain bacteria. There was an increase in bacterial diversity during restoration and the dominant bacterial group changed from Acinetobacter sp., Aminobacter aminovorans strain EE9, and Pseudomonas sp. to the uncultured actinobacterium clone HAHS13.051, Haliea sp. DSW4-37, and Ochrobactrum sp.. The bacterial community in the algal culture area consisted primarily of 5 phyla lineages of the domain bacteria and the structure remained relatively stable. RDA analysis revealed that ammonia and COD are the primary factors influencing the variation in bacterial community structure. The improving trend in bacterial communities was consistent with improvements in chemical indices. Our results demonstrate that the use of macroalgae to restore the habitat of cage culture areas was effective, and suggest that bacterial community structure can be used as an index to evaluate the effectiveness of habitat restoration.

Key words: Xiangshan Bay; cage culture area; algae culture area; habitat restoration; bacterial community; PCR-DGGE

<sup>1.</sup> Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

<sup>2.</sup> College of Marine Life, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;