

# 海洋浮游细菌在东海赤潮高发区的分布与活性

王新<sup>1,3</sup>, 李志江<sup>1</sup>, 郑天凌<sup>1,2,4\*</sup>

(1. 厦门大学滨海湿地生态系统教育部重点实验室, 厦门大学生命科学院, 厦门 361005; 2. 国家海洋局海洋生态系统与生物地球化学重点实验室, 杭州 310012; 3. 浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所, 杭州 310021; 4. 厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室, 厦门 361005)

**摘要:** 于 2006 年 4~5 月对东海近海 28°~30.7° N 之间的赤潮高发区浮游细菌的分布、活性和群落结构特征进行了调查。采用荧光显微计数法测定细菌丰度, 荧光模拟底物法测定细菌胞外酶活性, PCR-DGGE 分析该区域的细菌群落结构特征。结果表明, 东海赤潮高发区的浮游细菌丰度在  $5.85 \times 10^4 \sim 9.26 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$  之间, 其中舟山外海区域较高, 在整个调查区域北部海域高于南部海域。 $\beta$ -葡萄糖苷酶的平均活性为  $0.023 \mu\text{mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ , 氨肽酶的平均活性约为其 3.6 倍, 在 5  $\mu\text{m}$  以上颗粒中的胞外酶活性平均占总活性分别为 47.4% 和 44.24%。细菌胞外酶活性的分布与细菌丰度的分布无相关性, 在整个调查区域南部海域高于北部海域。细菌群落结构和多样性差异较大, 南部海域的细菌多样性低于北部海域。人类活动和陆源输入是影响浮游细菌分布的决定性因素, 台湾暖流对细菌胞外酶活性及其分布有着决定性的影响, 复杂的环境条件是细菌群落结构和多样性差异的主要原因之一。海洋细菌在东海赤潮高发区的生态作用有待进一步研究。

**关键词:** 赤潮; 东海; 浮游细菌; 胞外酶活性; 细菌群落结构

中图分类号: X55 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2010)02-0287-09

## Distribution and Activity of Marine Bacterioplankton at Frequent HAB Area of East China Sea

WANG Xin<sup>1,3</sup>, LI Zhi-jiang<sup>1</sup>, ZHENG Tian-ling<sup>1,2,4</sup>

(1. Key Laboratory of Ministry of Education for Coast and Wetland Ecosystems, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Laboratory of Marine Ecosystem and Biogeochemistry, Second Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Hangzhou 310012, China; 3. Institute of Plant Protection and Microbiology, Zhejiang Academy of Agriculture Science, Hangzhou 310021, China; 4. State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** The distribution, activity and community structure of bacterioplankton in surface water were investigated at frequent harmful algae blooms (HABs) area in East China Sea (28°-30.7° N) from April to May, 2006. The abundance of bacterioplankton was determined by using the DAPI (4, 6-diamidino-2-phenylindole) direct count (DDC) method. The  $\beta$ -glucosidase and aminopeptidase activity were measured with fluorogenic model substrates. And the bacterial community structure was analyzed by PCR-DGGE. Results showed that bacterial abundance in northern of the sampling area was much more than that in southern of the sampling area. It ranged from  $5.85 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$  to  $9.26 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ . And there was the highest value area outer the costal of Zhou Shan Island. The average aminopeptidase activity was 3.6 times of  $\beta$ -glucosidase activity which was  $0.023 \mu\text{mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$  in this area. The  $\beta$ -glucosidase activity in > 5  $\mu\text{m}$  fraction contributed 47.4% of the total, and that of the aminopeptidase activity was 44.24% of the total. Bacterial extracellular enzyme activity had a higher average value in southern of the sampling area. This indicated that the bacterial activity had no direct relationship with bacterial abundance. Bacterial diversity and community structure differed from each sampling station. There were more divers in northern sampling area. The results suggested that the human being activity and continental inputting organic matters played a key role on the distribution of bacterial abundance. The distribution of bacterial extracellular enzyme activity was mainly affected by the Taiwan warm current. And it was the complicated unknown factors that caused the difference of the bacterial community structure and diversity from each sampling station. Obviously, it needed further work to enhance the knowledge of the ecological function of the bacterioplankton at frequent HABs area of the coastal water in East China Sea.

**Key words:** harmful algae blooms (HABs); East China Sea; bacterioplankton; extracellular enzyme activity (EEA); bacterial community structure

收稿日期: 2009-03-19; 修订日期: 2009-05-26

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2008AA09Z408); 国家自然科学基金项目(40876061, 40930847, 30940002, 30800033); 国家海洋局海洋生态系统与生物地球化学重点实验室开放基金项目(LMEB200601); 长江学者和创新团队发展计划项目(40821063)

作者简介: 王新(1979~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为资源与环境微生物学, E-mail: wxmxu@163.com

\* 通讯联系人, E-mail: microzh@xmu.edu.cn

我国长江口及其临近区域有着特殊的水文特征<sup>[1]</sup>,因而形成特殊的温度、盐度、营养盐分布,使得该区域环境有利于海洋生物的生长.而随着我国工农业的发展,人为影响的加大,富营养化程度的增加,近十几年以来,我国长江口及其邻近区域每年在春夏之交暴发大面积、大规模的赤潮,其中有74.7%主要分布在 $30^{\circ}30' \sim 32^{\circ}00' \text{N}$ ,  $122^{\circ}15' \sim 123^{\circ}10' \text{E}$ 之间的区域,形成我国东海的赤潮高发区<sup>[2,3]</sup>,对我国近海环境、生态、渔业等均产生了严重影响,造成了巨大的损失.因而对于我国东海赤潮生消过程的研究是当前研究中的热点问题,在我国政府支持下已经开展了东海赤潮高发区形成机制及其防治的研究,也取得了一系列的成果<sup>[4]</sup>.浮游细菌在近海海洋环境物质转化和生态系统演变过程中具有重要作用,已有的研究也表明在赤潮的生消过程中海洋细菌可能起到极其重要的作用<sup>[5-13]</sup>.而在我国东海赤潮高发区的相关研究中,尚鲜见关于细菌在该区域行为的相关报道.本实验通过2006年春季对东海赤潮高发区的现场调查,研究了浮游细菌在该区域的分布、活性和群落结构特征,在分析浮游细菌和环境因素之间关系的基础上,探讨了浮游细菌在赤潮高发区物质转化和赤潮生消过程中的重要作用,以期为我国近海有害赤潮发生的生态学、海洋学机制及预测防治的研究提供科学依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 航次和采样站位

于2006-04-17~2006-05-07乘“中国海监47”考察船参加赤潮973项目“我国近海有害赤潮发生的生态学、海洋学机制及其预测防治”MC2006航次,对我国东海赤潮高发区 $28^{\circ} \sim 30.7^{\circ} \text{N}$ 的核心区域进行调查,在断面综合站位采集表层海水样品.采样站位如图1所示.采样站位的温度和盐度由YSI1600型水质测定仪现场测定.

### 1.2 样品的采集和处理

用30 L Niskin采水器获取表层海水(0~2 m).总菌计数样品经 $8 \mu\text{m}$ 孔径滤膜过滤后取20 mL,用经 $0.22 \mu\text{m}$ 孔径滤膜过滤的福尔马林固定(终浓度5%),装入无菌的30 mL塑料样品瓶中并贮存于 $4^{\circ}\text{C}$ 冰箱中.随后取1 L水样用 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤收集菌体,滤膜用铝箔包裹,液氮速冻后贮存于 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱,带回实验室提取基因组DNA.取2 L水样用于现场细菌胞外酶活性的测定,待测样品分为两部分,一部分直接用于胞外酶活性测定;另一部分经 $5 \mu\text{m}$

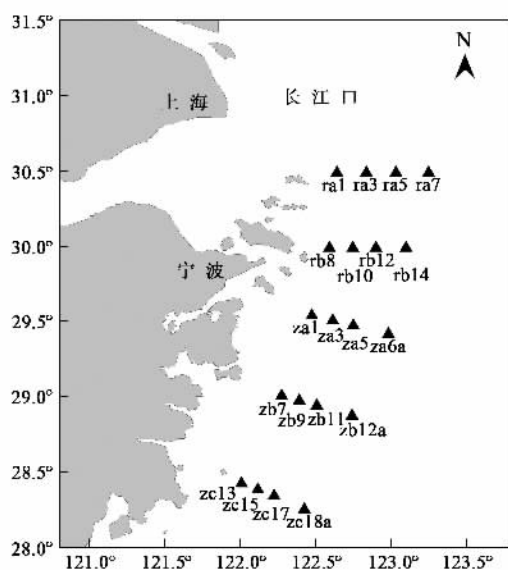


图1 东海赤潮高发区 MC2006 航次样品采集站位

Fig. 1 Sampling stations at frequent HABS area of East China Sea during MC 2006 cruise

滤膜过滤后进行胞外酶活性测定.

### 1.3 总菌计数

细菌计数采用 DAPI (4, 6-diamidino-2-phenylindole, Sigma Corp.) 染色法<sup>[14]</sup>.取1 mL 浓度 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的DAPI工作液,加入100  $\mu\text{L}$ 固定后的海水样品,避光在 $4^{\circ}\text{C}$ 冰箱中染色30 min,之后在 $<100 \text{ mm Hg}$ 的低压下真空抽滤到 $0.22 \mu\text{m}$ 的黑色聚碳酸酯膜(Waterman, 25 mm diameter)上,将滤膜置于滴有镜油的载玻片上,用数码荧光显微镜(OLYMPUS BX41)在油镜下进行荧光显微计数.计数时,随机选取10个视野计数被染色的细菌个数,按下式计算水样中的细菌丰度:

$$\text{细菌丰度}(\text{cells} \cdot \text{mL}^{-1}) = A \times S_1 / (S_2 \times V)$$

式中 $A$ 为10个视野中细菌平均个数, $S_2$ 为显微镜视野观察到的膜面积, $S_1$ 为滤膜有效过滤面积, $V$ 为用于计数的藻培养液样品的体积.

### 1.4 胞外酶活性的测定

胞外酶活性的测定采用荧光模拟底物法(fluorogenic model substrates, FMS)<sup>[15]</sup>,以胞外酶水解底物的速率来表示胞外酶活性.荧光模拟底物4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (MUF- $\beta$ -D-glucopyranoside)、L-leucine-4-methyl-7-coumarinylamide (L-Leucine-MCA)、MUF和MCA标准品均购自SIGMA公司. $\beta$ -葡萄糖苷酶和氨肽酶活性的测定各设2个平行和2个对照,以加入过量荧光模拟底物的方法在现场温度下测定.待反应终止

后在 -20℃ 条件下避光保存带回实验室进行测定 , 荧光值的测定使用 SPECTRA MAX M2 型多功能酶标仪. 测定荧光值时激发波长和发射波长  $\beta$ -葡萄糖苷酶为 360 nm、450 nm , 氨肽酶为 380 nm、450 nm. 胞外酶活性由下式计算 :

$$V = (F - F_0) / (t \times S)$$

式中 ,  $V$  为胞外酶水解底物的速率 [  $\mu\text{mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$  ] ,  $F$  为平行样品的荧光强度( 平均值 ) ,  $F_0$  为空白样品的荧光强度( 平均值 ) ,  $t$  为培养时间( h ) ,  $S$  为单位浓度(  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ) 标准荧光物质的荧光强度.

MUF 和 MCA 母液用采样站位原位海水配制成浓度为 1、0.5、0.25、0.125、0.063、0.032  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液 , 与样品同期测定荧光强度作标准工作曲线 , 斜率即为  $S$ .

1.5 细菌群落结构的 PCR-DGGE 分析

1.5.1 DNA 提取

将收集了大量菌体的滤膜剪成碎片 , 加入 2 mL DNA 提取缓冲液( 2% CTAB , 50 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$  EDTA , 50 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl , 1 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$  NaCl , pH 8.0 ) , 振荡器剧烈振荡 3 min , 加入溶菌酶( 终浓度 2 mg  $\cdot \text{mL}^{-1}$  ) , 37℃ 水浴 1 h ; 加入蛋白酶 K( 终浓度 0.2 mg  $\cdot \text{mL}^{-1}$  ) , 55℃ 水浴 1 h. 其他步骤参照文献 [ 16 ] .

1.5.2 PCR-DGGE 分析

以提取的样品的基因组 DNA 为模板 , PCR 扩增 16S rDNA V3 区片段 , 引物为连有 GC-夹子( 5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GCG GCG GCG GCA

CGG GGG G-3' ) 的 Eubac341f ( 5'-TAC GGG AGG CAG CAG-3' ) 和 Eubac517r ( 5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3' ) [ 17 ] , 参考文献 [ 18 ] 描述的方法采用 Touchdown PCR [ 19 ] 程序进行扩增. 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后用 Bio-Rad 公司 D-code System 进行 DGGE 分析. 聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8% , 变性梯度 40% ~ 60% . 60℃ 50 V 条件下电泳 1.5 h 后升电压至 150 V , 电泳 6 h. 聚丙烯酰胺凝胶从电泳仪上取下之后采用银染法染色 , 用扫描仪获取图像. 获得的 DGGE 图谱用 Quantity One-1-D 软件对 DGGE 条带进行数字化分析 , 用条带灰度大小来代替每个条带的扩增量 , 将不同泳道的条带组成一个数字化矩阵 , 用 Matlab 软件进行主成分分析.

2 结果与分析

2.1 东海赤潮高发区春季浮游细菌的分布和活性特征

2.1.1 采样海区现场温盐分布特征

2006 年春季 MC2006 航次调查期间 , 温度和盐度在采样区域的分布特征明显 , 从近陆到远海基本上成梯度分布. 调查海区水温总体不高 , 平均值为 15℃ . 受长江口及杭州湾冲淡水和台湾海峡北上暖流的影响 , 调查海域东南部海域温度较高 , 西北部温度较低. 盐度的平均值为 30‰ , 其分布和温度的分布有相似的趋势 , 呈典型的河口分布特征. 温度和盐度在采样站位的 zc17、zb11、za5、rb14 一线附近有明显的交汇锋面 , 这是 2 种性质的水流交汇的特征( 图 2 ).

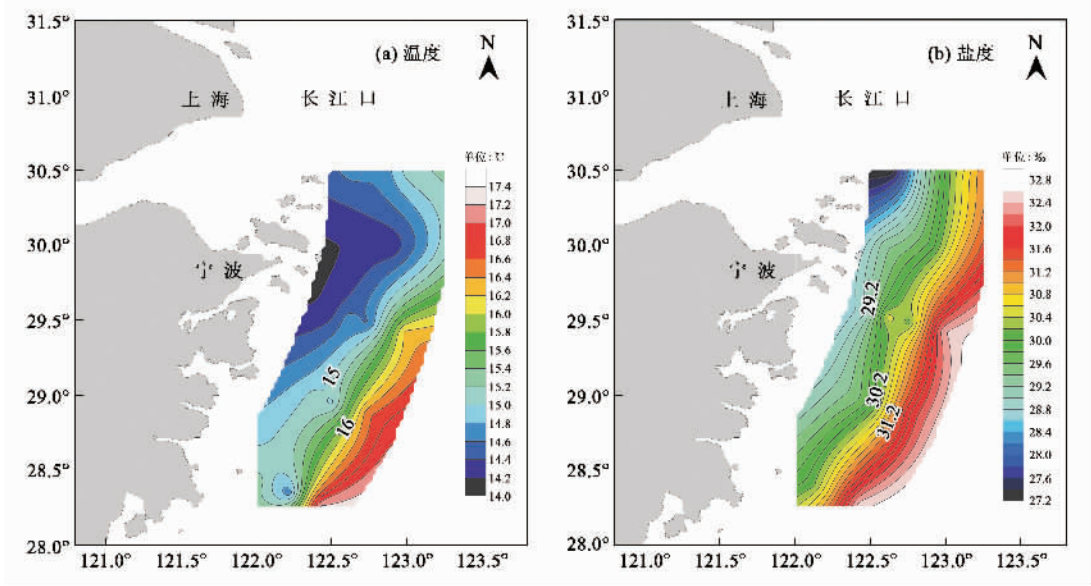


图 2 东海赤潮高发区春季温度和盐度的分布特征

Fig. 2 Horizontal distribution of temperature and salinity at frequent HABs area of East China Sea in Spring 2006

2.1.2 东海赤潮高发区春季浮游细菌的分布特征

东海赤潮高发区春季浮游细菌的丰度在调查海域平均为  $3.27 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 变动范围在  $5.85 \times 10^4 \sim 9.26 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$  之间. 其平面分布的总体特征是北部海域高于南部海域, 其中以 rb14 号站位所在海域最高(图 3), 从南部海域到北部海域, 浮游细菌的丰度基本呈梯度增加.

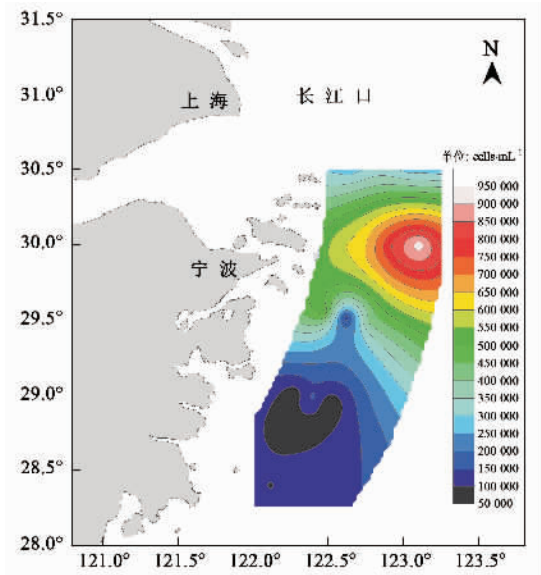


图 3 东海赤潮高发区春季浮游细菌丰度的分布特征  
Fig. 3 Distribution of bacterial abundance at frequent HABs area of East China Sea in Spring 2006

2.1.3 东海赤潮高发区春季细菌胞外酶活性的分布特征

在调查区域,南部和北部海区的  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性差异明显,以 za 断面为界,南部整体活性较高,  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性平均值为  $0.023 \mu\text{mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ ,最高达  $0.062 \mu\text{mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ . 而北部海区的  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性平均值仅为  $0.006 \mu\text{mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ . 在总体活性较高的南部海区,和温度的平面分布近似,采样站位的 zc17、zb11、za5 一线是  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性分布的分界线,同时这一线附近的  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性接近于南部海域的平均值. 总体上来看  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性的分布亦呈现出从近陆海域到外海不断增加的趋势. 在  $5 \mu\text{m}$  以上颗粒中的  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性平均占总活性的 47.4%,其范围在 6.6% ~ 90.9% 之间. 根据采样现场记录的信息,在 zb12、rb14 和 ra7 站位发生夜光藻赤潮, za3 站位发生硅藻赤潮,这些站位的  $5 \mu\text{m}$  以上颗粒中的  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性占总活性的比例 zb12 为 6.6%、rb14 为 22.8%、ra7 为 28.8%、za3 为 46.4%,均低于平均值.  $5 \mu\text{m}$  以上颗粒中的  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性在采样海域的分布总体上依然是南部海域较高,且在温盐的交汇区域附近活性总体较高,但其分布规律性不明显,显著异于总活性的分布特征. (图 4).

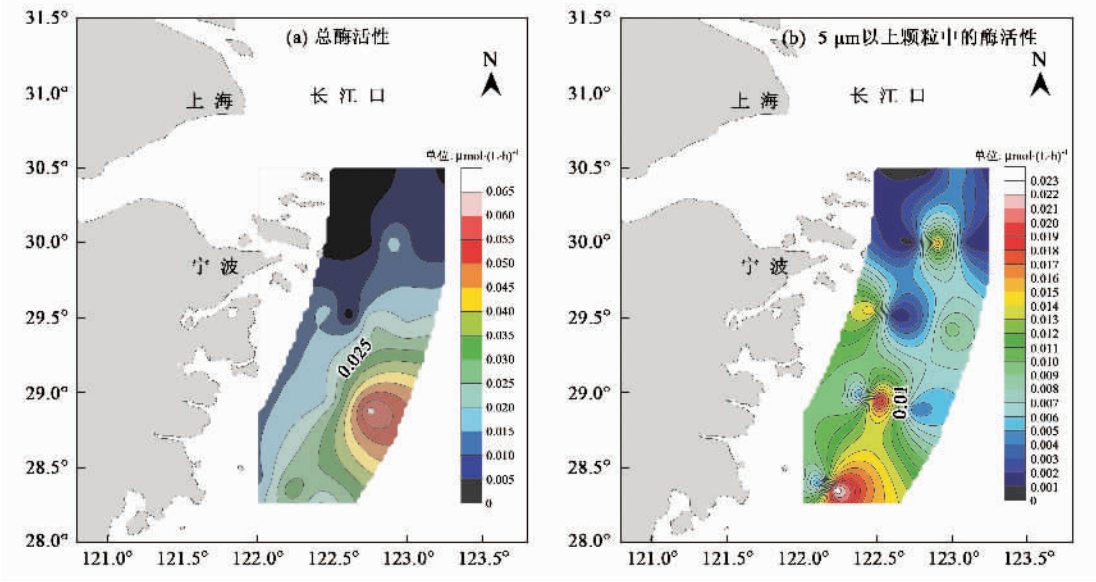


图 4 东海赤潮高发区春季  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性分布  
Fig. 4 Horizontal distribution of  $\beta$ -glucosidase activity at frequent HABs area of East China Sea in Spring 2006

相较  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性而言,赤潮高发区的氨肽酶活性较高,最高达  $0.49 \mu\text{mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ ,在调查

海域的平均值约为  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性 3.6 倍. 除在 za5 和 zc13 站位附近明显较高之外,在整个海域分布

比较均匀,南部海域的活性总体上稍高.5 μm 以上颗粒中的氨肽酶活性和总活性的分布特征基本相同,平

均占总活性的 44.24%,基本与 5 μm 以上颗粒中 β-葡萄糖苷酶活性平均占总活性的比例相同(图 5).

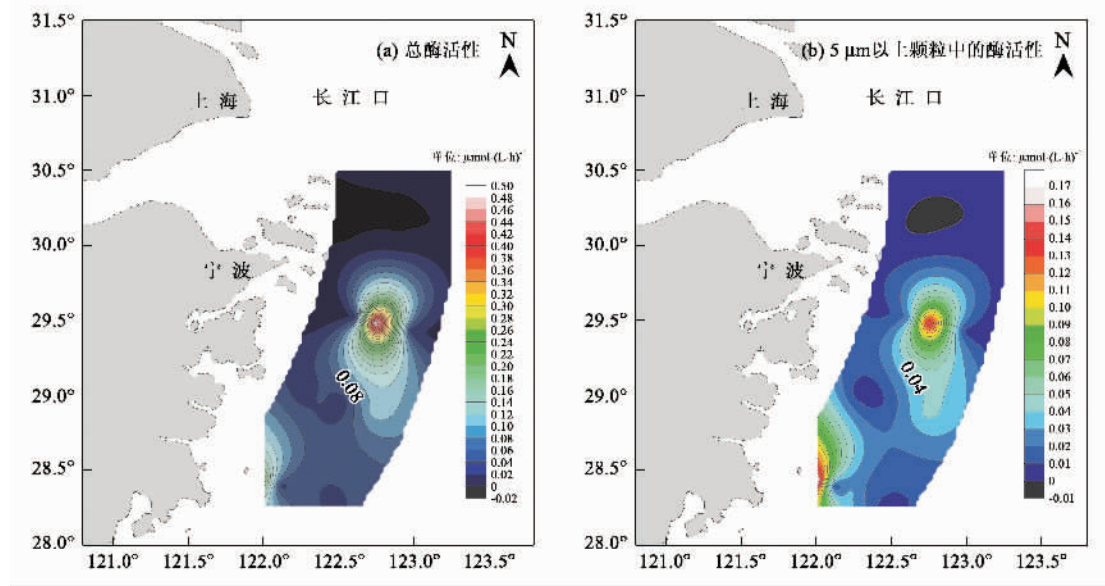


图 5 东海赤潮高发区春季氨肽酶活性分布  
Fig. 5 Horizontal distribution of aminopeptidase activity at frequent HABs area of East China Sea in Spring 2006

2.2 东海赤潮高发区春季细菌群落结构特征

对调查海域的 ra、rb、za、zb 这 4 个断面的站位的细菌群落结构进行了 PCR-DGGE 分析,获得了其 16S rDNA V<sub>3</sub> 区特征片段 DGGE 指纹图谱(图 6). DGGE 图谱中各站位的条带数显示了各站位浮游细菌的多样性,从获得的指纹图谱可以看出,在各断面以及各断面的站位之间,浮游细菌的多样性差别较大.数字化分析的结果表明,在 ra1、rb10、za1、za6a、zb7 所示站位的条带数均小于 20,并且这些站位的优势条带仅有 1~2 条.从整体上来看,南部海域的 za、zb 断面的细菌多样性远低于北部海域的 ra、rb 断面,其细菌种类数平均相差 2 种,且其优势菌种类也相差 2 条,表明调查的南部海域其细菌组成及主要细菌类群均较为单一.从电泳图谱种优势条带的位置来看,北部海域较为分散,但在南部海域主要优势条带处于同一位置,表明南部海域各站位优势菌大多为同一种细菌.细菌群落结构主成分分析结果显示了该海域不同站位浮游细菌群落结构的差异(图 7),za3、za5、ra5、ra7、ra3、rb12、rb14 等站位的细菌群落结构比较接近,与其他多样性较小的站位明显区别开来,而在这些站位中 rb14、ra7 和 za3 是现场记录中发生赤潮的站位.对于各断面而言,ra 和 rb 断面各站位细菌群落结构在 PC1 和 PC2 上均有显著差异,而 za 和 zb 断面各站位的细菌群落结构

的差异分别主要决定于 PC1 和 PC2,表明 ra 和 rb 断面的细菌群落结构远较 za 和 zb 断面复杂.

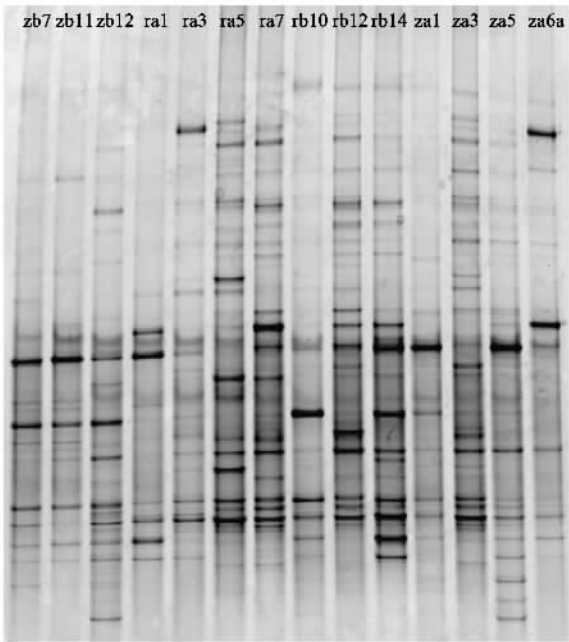


图 6 东海赤潮高发区春季表层细菌 16S rDNA V<sub>3</sub> 区特征片段 DGGE 指纹图谱  
Fig. 6 DGGE profiles of 16S rDNA V<sub>3</sub> fragments of bacteria in surface water at frequent HABs area of East China Sea in Spring 2006

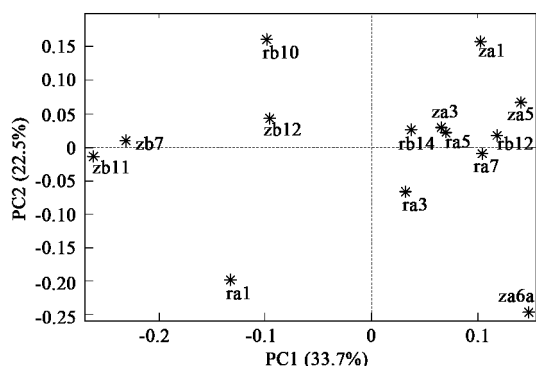


图7 东海赤潮高发区春季表层细菌群落结构的主成分分析结果

Fig. 7 PCA of bacterial community structure in surface water at frequent HABs area of East China Sea in Spring 2006

### 3 讨论

#### 3.1 东海赤潮高发区春季浮游细菌的分布、活性及其生态作用

我国东海从长江口到舟山外海的区域是受人类活动影响最大的区域,每年有着大量的陆源有机物质输入,而该区域又是台湾海峡北上暖流和长江口冲淡水交汇的区域<sup>[1]</sup>,复杂的水文地理条件使得该区域的浮游细菌分布同时受众多环境因素的影响。本航次调查的春季东海赤潮高发区的浮游细菌丰度在  $5.85 \times 10^4 \sim 9.26 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$  之间,其中以舟山外海区域较高。宁修仁等<sup>[20]</sup>认为在长江口及临近区域,在淡水和冲淡水的交界处异养细菌生物量及其活性均较高,在冲淡水区中部以及冲淡水和海水交汇处则是低细菌丰度和活性区域。本研究与其研究核心区域有所不同,且缺乏细致的水文参数的支持,但大体看来,东海赤潮高发区冲淡水和海水的交汇对浮游细菌分布的影响不明显。赵三军等<sup>[21]</sup>2000年秋季在东海海域的调查结果  $3.05 \times 10^5 \sim 1.36 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$  之间,其分布在舟山外海偏北区域较高。该研究细菌丰度较本研究的结果稍高,而细菌丰度分布较高区域也稍不同于本次调查的舟山外海,研究季节的不同以及不同季节陆源径流量和陆源输入的不同是区别产生的可能原因。从总体的分布上来看,春季浮游细菌在该海区丰度稍低,在北部海区分布较南部高,充分表明我国东海赤潮高发区尽管水文地理环境复杂,浮游细菌的分布受影响因素较多,但人类活动和陆源输入是决定性的因素。

海洋环境中浮游细菌重要生态作用的基础是其吸收转化海水中的溶解有机物(dissolved organic

carbon, DOM)进行的二次生产<sup>[22]</sup>。由于海洋环境中可利用溶解有机物(usable dissolved organic carbon, UDOM)的缺乏,许多转化过程必须在细菌胞外酶的参与下才可能完成<sup>[23]</sup>,因此在一定程度上,海洋细菌胞外酶的活性标志着细菌的活性。 $\beta$ -葡萄糖苷酶和亮氨酸氨肽酶是海洋环境中最为普遍的细菌胞外酶<sup>[24, 25]</sup>,在海洋环境中它们主要由异养微生物(异养细菌和真菌)产生<sup>[24, 26, 27]</sup>。 $\beta$ -葡萄糖苷酶对糖类具有较高的专一性而对糖苷键的专一性较小,主要裂解 $\beta(1 \rightarrow 2)$ 、 $(1 \rightarrow 3)$ 、 $(1 \rightarrow 4)$ 、 $(1 \rightarrow 6)$ 糖苷键<sup>[28]</sup>;氨肽酶能水解L型氨基酸组成的肽和酰肽;它们对海洋细菌碳源和氮源物质的摄取具有重要作用。从 $\beta$ -葡萄糖苷酶的活性分布来看,采样的南部海域明显高于北部海域,呈现从近陆海域向外海不断增加的趋势,与此同时,接近于调查海域平均活性的  $0.025 \mu\text{mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$  等值线基本和温盐交汇界面重合,说明温度对于东海赤潮高发区 $\beta$ -葡萄糖苷酶的活性的分布有着关键性的作用,同时,台湾暖流带来的还有大量的营养物质<sup>[1, 29]</sup>,也对该海域微生物的活性有着重要的影响。氨肽酶活性在整个调查海区均比较高,平均值是 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性3.6倍,表明在该海域浮游细菌可利用氮源远低于可利用碳源。氨肽酶在调查海区的分布相对比较均匀,但整体上也是南部区域较高,毫无疑问,南部海区温度较高会是一个重要的因素。在za5和zc13站位及附近出现的氨肽酶高活性区域,暗示该区域有着特殊的微生物生态过程,但现有数据尚无法解释其原因。上述结果充分说明台湾暖流在春季对东海赤潮高发区浮游细菌胞外酶活性及分布有着决定性的影响。无论是 $\beta$ -葡萄糖苷酶的活性还是氨肽酶活性,以它们所标志的浮游细菌的活性和细菌丰度在调查海域中的分布之间没有相关性,这也表明浮游细菌的丰度与其活性之间没有必然的联系,海洋细菌生态作用的研究中,细菌的活性是比细菌丰度更重要的一个参数。从整体上看,细菌丰度较高的北部海域反而细菌胞外酶活性较低,考虑到细菌胞外酶是诱导酶,是否陆源输入物质中有大量的UDOM使得北部海域胞外酶活性虽低,但细菌二次生产活性较高尚有待进一步研究。

细菌胞外酶的粒级特性反映了浮游细菌和不同颗粒之间的作用关系,在赤潮发生海域,可以提供藻菌之间生态作用关系的信息。在  $5 \mu\text{m}$  以上颗粒中的 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性平均占总活性的47.4%,氨肽酶为44.24%,基本相当,表明赤潮高发区颗粒有机

物( particulate organic carbon ,POC )的含量较高,且浮游细菌与之关系紧密。它们的平面分布和浮游细菌丰度的分布同样差异较大,从另一个侧面反映了在此调查海域细菌胞外酶活性和细菌丰度之间没有相关性,同时也表明胞外酶活性可以作为浮游细菌活性的一个较好指标。 $5\text{ }\mu\text{m}$ 以上颗粒中 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性的平面分布和总活性的平面分布同样差异显著,反映出浮游细菌和调查海域大 POC 之间作用的复杂性。在现场发生夜光藻赤潮的 zb12、rb14 和 ra7 站位, $5\text{ }\mu\text{m}$ 以上颗粒中的 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性占总活性的比例分别为 6.6%、22.8% 和 28.8%,而在发生硅藻赤潮的 za3 站位为 46.4%,这表明浮游细菌和夜光藻之间的作用远没有其与硅藻之间关系那么紧密,这很可能与夜光藻是异养藻类有关。

### 3.2 东海赤潮高发区春季浮游细菌多样性、群落结构特征及其控制因素

海洋环境中浮游细菌多样性和群落结构特征存在着时空的差异<sup>[30-32]</sup>,其控制因素尚不清楚,但可以肯定的是在一定的海区,受某一种或者几种关键因素的调控<sup>[33-35]</sup>。在春季的赤潮高发区,浮游细菌的多样性及其群落结构特征在在采样海区的各断面以及各断面的站位之间差别较大,因缺乏足够的环境及其它参数的支持,尚不能得出产生这种现象的具体原因。从现有的结果来看,东海赤潮高发区南部海域细菌多样性低于北部海域,且主要类群较为单一,大多为同一种细菌,这可能与北部海域更为复杂的环境条件有关。而在南部海域 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性总体较高,预示着这种细菌在南部海域具有较高的活性。浮游细菌的群落结构同样有明显差异,从 PCA 分析的结果来看,PC1 与 PC2 的和为 56.2%,但已然可将各站位有效分开,表明决定细菌群落结构的浮游细菌组成的多样性,暗示采样海域浮游细菌群落结构的影响因素是多样的。ra 和 rb 断面各站位细菌群落结构在 PC1 和 PC2 上均有显著差异,而 za 和 zb 断面各站位的细菌群落结构的差异分别主要决定于 PC1 和 PC2,这与东海赤潮高发区北部海域环境因素更为复杂,影响浮游细菌群落结构的因素较南部海域多是一致的。特定的细菌群落有其特定的功能,同样,浮游细菌群体表现出的活性特征也是其群落结构的表现,在一些 $\beta$ -葡萄糖苷酶的活性较高的区域如 ra1、za1、za6a 等站位,其细菌群落结构大致相似且异于其他区域,其特点是细菌多样性低,优势菌单一。在 za3、za5、ra5、ra7、ra3、rb12、rb14 等站位的细菌群落结构比较接近,与其他多样性较

小的站位明显区别开来,而在这些站位中 rb14、ra7 和 za3 是现场记录中发生赤潮的站位。对这些现象成因的深入探索必然有助于对浮游细菌在赤潮高发区中的生态作用的了解。

### 3.3 浮游细菌活性及群落结构研究对揭示赤潮生消机制的意义

海洋环境中的浮游细菌和浮游植物之间有着紧密的联系<sup>[36]</sup>,在世界范围内的赤潮高发引起研究人员对海洋中浮游细菌和浮游植物之间相互关系的研究,许多研究结果均表明海洋细菌可以促进或是抑制浮游植物的生长<sup>[5,9,37]</sup>、改变其生理状态<sup>[7,38,39]</sup>、甚至杀死浮游植物<sup>[10,40,41]</sup>。我国亦开展了大量研究工作<sup>[7,39,41-43]</sup>,并提出海洋有害赤潮的生物防治对策<sup>[12,44]</sup>。而对于具有种特异性的细菌和浮游植物之间关系的研究,让人们认识到细菌在调控浮游植物的变化中具有重要的作用<sup>[11,45,46]</sup>。尽管本研究在东海赤潮高发区的调查研究中,只发现浮游细菌的分布主要受人类活动及该区域特殊的水文地理条件的影响,胞外酶活性的分布受温度和台湾暖流的影响,但这正表明浮游细菌这一生物类群对海洋环境变化的灵敏响应。而 $5\text{ }\mu\text{m}$ 以上粒径的细菌胞外酶活性平均占了总活性的将近一半,足见浮游细菌活性和包括微藻在内的大颗粒有机物关系紧密。Bell 等<sup>[47]</sup>在 1972 年曾提出藻际环境(Phycosphere)的概念,研究了藻类和浮游细菌之间的紧密联系,笔者在前期研究中也探索了藻际环境微生物和微藻的生态关系<sup>[43]</sup>,藻际细菌对微藻的生理变化极为迅速。当海洋环境中暴发赤潮时,在这些区域藻际细菌的生态作用将更为明显。Riemann 等<sup>[18]</sup>通过对一次硅藻赤潮发生过程中细菌的丰度、活性及群落结构的研究发现在赤潮发生过程中细菌的数量、活性及群落结构发生较大的变化,其中细菌的胞外酶活性主要集中在较大的粒径范围内,而细菌的变化是在一个较短的时间内完成的,受环境中营养因素影响而变化的赤潮藻群落导致了细菌群落结构的和功能的变化。Crump 等<sup>[48]</sup>和 Weidner 等<sup>[49]</sup>的研究结果也支持类似的观点。Kmiyama 等<sup>[50]</sup>的研究表明在赤潮发生过程中,细菌的丰度和生物量在赤潮的形成初期和结束过程中出现峰值,表明细菌在赤潮形成和消亡过程中具有重要作用。本次调查研究处于东海赤潮高发区的大规模赤潮暴发前夕,似乎浮游细菌的分布和活性和赤潮之间并没有必然的关系,但在赤潮发生的站位浮游细菌的活性和群落结构特征则是明显异于其它站位。因此,在赤潮发生海域对浮游细菌

活性及其群落结构研究对揭示浮游细菌物质转化和赤潮生消过程中的生态作用具有重要的意义,将为我国近海有害赤潮发生的生态学、海洋学机制及预测防治的研究提供科学依据.

4 结 论

( 1 )本航次调查的东海赤潮高发区的浮游细菌丰度在舟山外海区域较高,在整个调查区域北部海域高于南部海域. 浮游细菌的分布受多种因素影响,但人类活动和陆源输入是决定性的因素.

( 2 )调查的海区氨肽酶的平均活性约是  $\beta$ -葡萄糖苷酶平均活性的 3.6 倍,在 5  $\mu\text{m}$  以上颗粒中的细菌胞外酶活性平均占总活性的将近一半. 细菌胞外酶活性在调查海域的分布与细菌丰度的分布没有相关性,在整个调查区域南部海域高于北部海域,胞外酶活性的粒级特性表明该海域颗粒有机物含量较高且大量浮游细菌吸附在颗粒物上. 台湾暖流对东海赤潮高发区细菌胞外酶活性及分布有着决定性的影响.

( 3 )调查的海区细菌群落结构和多样性差异较大,南部海域的细菌多样性低于北部海域. 在调查海区北部海域的环境条件较南部海域更为复杂是一个可能的原因. 海洋细菌在东海赤潮高发区的生态作用有待进一步研究.

致谢 :本研究工作承中国科学院海洋研究所俞志明、宋秀贤老师支持与帮助,国家海洋局第二海洋研究所朱德弟老师提供 MC2006 航次现场温盐数据,特此致以诚挚的感谢!

参考文献:

[ 1 ] 唐晓晖,王凡. 长江口临近海域夏、东季水文特征分析[ J ]. 海洋科学集刊, 2004 ,**46** :42-66.

[ 2 ] 周名江,颜天,邹景忠. 长江口邻近海域赤潮发生区基本特征初探[ J ]. 应用生态学报, 2003 ,**14**( 7 ):1031-1038.

[ 3 ] 徐韧,洪君超,王桂兰,等. 长江口及其邻近海域的赤潮现象[ J ]. 海洋通报, 1994 ,**13**( 5 ):25-29.

[ 4 ] 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.

[ 5 ] Liu J , Lewitus A J , Kempton J W , *et al.* The association of algicidal bacteria and raphidophyte blooms in South Carolina brackish detention ponds[ J ]. Harmful Algae , 2008 , **7**( 2 ):184-193.

[ 6 ] Bratbak G , Egge J K , Heldal M. Viral mortality of the marine alga *Emiliania huxleyi* ( Haptophyceae ) and termination of algal blooms[ J ]. Mar Ecol Prog Ser , 1993 ,**93** :39-48.

[ 7 ] Zheng T L , Su J Q , Maskaoui K , *et al.* Microbial modulation in

the biomass and toxin production of a red-tide causing alga[ J ]. Mar Pollut Bull , 2005 ,**51**( 8-12 ):1018-1025.

[ 8 ] Nakashima T , Miyazaki Y , Matsuyama Y , *et al.* Producing mechanism of an algicidal compound against red tide phytoplankton in a marine bacterium gamma-proteobacterium[ J ]. Appl Microbiol Biotechnol , 2006 ,**73**( 3 ):684-690.

[ 9 ] Mayali X , Azam F. Algicidal bacteria in the sea and their impact on algal blooms[ J ]. J Eukaryot Microbiol , 2004 , **51**( 2 ):139-144.

[ 10 ] Kim D , Kim J F , Yim J H , *et al.* Red to red - the marine bacterium *Hahella chejuensis* and its product prodigiosin for mitigation of harmful algal blooms[ J ]. J Microbiol Biotechnol , 2008 ,**18**( 10 ):1621-1629.

[ 11 ] Jung S W , Kim B H , Katano T , *et al.* *Pseudomonas fluorescens* HYK0210-SK09 offers species-specific biological control of winter algal blooms caused by freshwater diatom *Stephanodiscus hantzschii*[ J ]. J Appl Microbiol , 2008 ,**105**( 1 ):186-195.

[ 12 ] 郑天凌,苏建强. 海洋微生物在赤潮生消过程中的作用[ J ]. 水生生物学报, 2003 ,**27**( 3 ):291-295.

[ 13 ] 曹晓星,苏建强,郑天凌,等. 海洋微生物的多样性在赤潮调控中的利用[ J ]. 海洋科学, 2007 ,**31**( 5 ):63 - 69.

[ 14 ] Sherr B , Sherr E , Giorgio P D. Enumeration of total and highly active bacteria [ A ]. In : Paul J H ( ed ). Methods In microbiology , Marine Microbiology[ M ]. San Diego : Academic Press , 2001. 129-159.

[ 15 ] Hoppe H G. Use of fluorogenic model substrates for extracellular enzyme activity ( EEA ) measurement of bacteria [ A ]. In : Kempetal P F , Cole J J , Sherr B F , *et al.* ( eds ). Hand book of methods in aquatic microbial ecology[ M ]. Boca Raton : Lewos Publishers , 1993. 423-430.

[ 16 ] Fuhrman J A , Comeau D E , Hagstrom A , *et al.* Extraction from natural planktonic microorganisms of DNA suitable for molecular biological studies[ J ]. Appl Environ Microbiol , 1988 ,**54**( 6 ):1426-1429.

[ 17 ] Muyzer G , de Waal E C , Uitterlinden 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.

[ 18 ] Riemann L , Steward G F , Azam F. Dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom[ J ]. Appl Environ Microbiol , 2000 ,**66**( 2 ):578-587.

[ 19 ] Don R H , Cox P T , Wainwright B J , *et al.* “ Touchdown ” PCR to circumvent spurious priming during gene amplification[ J ]. Nucleic Acids Res , 1991 ,**19** :4008.

[ 20 ] 宁修仁,史君贤,蔡显明,等. 长江口和杭州湾海域生物生产力锋面及其生态学效应[ J ]. 海洋学报, 2004 ,**26**( 6 ):96-106.

[ 21 ] 赵三军,肖天,岳海东. 秋季东、黄海异养细菌( Heterotrophic Bacteria )的分布特点[ J ]. 海洋与湖沼, 2003 ,**34**( 3 ):295-305.

[ 22 ] Azam F , Fenchel T , Field J G , *et al.* The ecological role of

- water-column microbes in the sea[ J ]. *Mar Ecol Prog Ser* ,1983 ,**10** :257-263.
- [ 23 ] Münster U , Chröst R J . Origin , composition and microbial utilization of dissolved organic matter[ A ]. In : Münster U , Chröst R J ( eds ). *Aquatic Microbial Ecology :Biochemical and Molecular Approaches* [ M ]. New York : Spring-Verlag Inc . , 1990 . 8-46.
- [ 24 ] Chröst R J . Characterization and significance of  $\beta$ -glucosidase activity in lake water[ J ]. *Limnol Oceanogr* ,1989 ,**34**( 4 ) :660-672.
- [ 25 ] Hoppe H G , Giesenhausen H C , Hocke K . Changing patterns of bacterial substrate decomposition in an euteophication gradient [ J ]. *Aquat Microb Ecol* ,1998 ,**15**( 1 ) :1-13.
- [ 26 ] Meyer-Reil L A . Seasonal and spatial distribution of extracellular enzymatic activities and microbial incorporation of dissolved organic substrates in marine sediments [ J ]. *Appl Environ Microbiol* ,1987 ,**53**( 8 ) :1748-1755.
- [ 27 ] Fabiano M , Danovaro R . Enzymatic activity , bacterial distribution , and organic matter composition in sediments of the ross sea ( Antarctica ) [ J ]. *Appl Environ Microbiol* ,1998 ,**64**( 10 ) :3838-3845.
- [ 28 ] Barman T E . *Enzyme Handbook* [ M ]. Berlin : Springer-Verlag Inc . ,1969 . 928.
- [ 29 ] 赵保仁 ,任广法 ,曹德明 ,等. 长江口上升流海区的生态环境特征 [ J ]. *海洋与湖沼* ,2001 ,**32**( 3 ) :327-333.
- [ 30 ] Kataoka T , Hodoki Y , Suzuki K , *et al.* Tempo-spatial patterns of bacterial community composition in the western North Pacific Ocean[ J ]. *J Marine Syst* ,2009 ,**77**( 1-2 ) :197-207.
- [ 31 ] Acinas S G , Rodríguez-Valera F , Pedrós-Alió C . Spatial and temporal variation in marine bacterioplankton diversity as shown by RFLP fingerprinting of PCR-amplified 16S rDNA[ J ]. *FEMS Microbiol Ecol* ,1997 ,**24**( 1 ) :27-40.
- [ 32 ] Dojka M A , Harris J K , Pace N R . Expanding the known diversity and environmental distribution of an uncultured phylogenetic division of bacteria[ J ]. *Appl Environ Microbiol* ,2000 ,**66**( 4 ) :1617-1621.
- [ 33 ] Stoderegger K E , Herndl G J . Dynamics in bacterial surface properties of a natural bacterial community in the coastal North Sea during a spring phytoplankton bloom[ J ]. *FEMS Microbiol Ecol* ,2005 ,**53**( 2 ) :285-294.
- [ 34 ] Marcelino T S , Christina M P , Francisco P C , *et al.* Quantitative mapping of bacterioplankton populations in seawater : field tests across an upwelling plume in Monterey Bay[ J ]. *Aqua Microbiol Ecol* ,2001 ,**24**( 2 ) :117-127.
- [ 35 ] Benjamin A S , Mooy V , Allan H . Relationship between bacterial community structure , light , and carbon cycling in the eastern subarctic North Pacific[ J ]. *Limnol Oceanogr* ,2004 ,**49**( 4 ) :1056-1062.
- [ 36 ] Rooney-Varga J N , Giewat M W , Savin M C , *et al.* Links between phytoplankton and bacterial community dynamics in a coastal marine environmen[ J ]. *Microbial Ecol* ,2005 ,**49**( 1 ) :163-175.
- [ 37 ] Ferrier M , Martin J L , Rooney-Varga J N . Stimulation of *Alexandrium fundyense* growth by bacterial assemblages from the Bay of Fundy[ J ]. *J Appl Microbiol* ,2002 ,**92**( 4 ) :706-716.
- [ 38 ] Gallacher S , Flynn K J , Franco J M , *et al.* Evidence for production of paralytic shellfish toxins by bacteria associated with *Alexandrium* spp. ( Dinophyta ) in culture[ J ]. *Appl Environ Microbiol* ,1997 ,**63**( 1 ) :239-245.
- [ 39 ] Su J Q , Yu Z M , Tian Y , *et al.* Biological activity of a red-tide alga—*A. tamarens* under co-cultured condition with bacteria [ J ]. *J Environ Sci ( China )* ,2005 ,**17**( 6 ) :1047-1050.
- [ 40 ] Lovejoy C , Bowman J P , Hallegraeff G M . Algicidal effects of a novel marine *Pseudoalteromonas* isolate ( class *Proteobacteria* , gamma subdivision ) on harmful algal bloom species of the genera *Chattonella* , *Gymnodinium* , and *Heterosigma* [ J ]. *Appl Environ Microbiol* ,1998 ,**64**( 8 ) :2806-2813.
- [ 41 ] Su J Q , Yang X R , Zheng T L , *et al.* Isolation and characterization of a marine algicidal bacterium against the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarens*[ J ]. *Harmful Algae* ,2007 ,**6**( 6 ) :799-810.
- [ 42 ] 杨小茹 ,苏建强 ,郑小伟 ,等. 基于分子技术的 1 株产毒藻际细菌多样性分析 [ J ]. *环境科学* ,2009 ,**30**( 1 ) :271-279.
- [ 43 ] 王新 ,周立红 ,郑天凌 ,等. 塔玛亚历山大藻藻际细菌溶藻过程 [ J ]. *生态学报* ,2007 ,**27**( 7 ) :2864-2871.
- [ 44 ] Wang Y , Yu Z M . Biological strategies in controlling or mitigating marine harmful algal blooms ( HSBs ) [ J ]. *Acta Phytoecologica Sinica* ,2005 ,**29**( 4 ) :665-671.
- [ 45 ] Imai I , Ishida Y , Hata Y . Killing of marine phytoplankton by a gliding bacterium *Cytophaga* sp. isolated from the coastal sea of Japan[ J ]. *Mar Biol* ,1993 ,**116**( 4 ) :527-532.
- [ 46 ] Furuki M , Kobayashi M . Interaction between *Chattonella* and bacteria and prevention of this red tide[ J ]. *Mar Pollut Bull* ,1991 ,**23** :189-193.
- [ 47 ] Bell W , Mitchell R . Chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products[ J ]. *Biol Bull* ,1972 ,**143**( 2 ) :265-77.
- [ 48 ] Crump B C , Armbrust E V , Baross J A . Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia river , its estuary , and the adjacent coastal ocean[ J ]. *Appl Environ Microbiol* ,1999 ,**65**( 7 ) :3192-3204.
- [ 49 ] Weidner S , Arnold W , Stackebrandt E , *et al.* Phylogenetic analysis of bacterial communities associated with leaves of the seagrass *Halophila stipulacea* by a culture-independent small-subunit rRNA gene approach[ J ]. *Microbial Ecol* ,2000 ,**39**( 1 ) :22-31.
- [ 50 ] Kamiyama T , Itakura S , Nagasaki K . Change in microbial loop components : effects of a harmful algal bloom formation and its decay [ J ]. *Aqua Microb Ecol* ,2000 ,**21**( 1 ) :21-30.