

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180326001

http://www.ykxjz.cn/

孙藤芹, 汪文俊, 梁洲瑞, 刘福利, 孙修涛, 曹原, 王飞久. 紫菜养殖对养殖水体中细菌多样性分布及环境因子的影响. 渔业科学进展, 2019, 40(2): 115-121

Sun TQ, Wang WJ, Liang ZR, Liu FL, Sun XT, Cao Y, Wang FJ. Effect of *Pyropia* farming on bacterial communities and marine environmental factors. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(2): 115-121

紫菜养殖对养殖水体中细菌多样性 分布及环境因子的影响*

孙藤芹^{1,2} 汪文俊^{2①} 梁洲瑞² 刘福利²
孙修涛² 曹原^{1,2} 王飞久²

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 农业农村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 青岛 266071)

摘要 采用基于16S rDNA的高通量测序技术对山东长岛紫菜养殖区的细菌多样性分布进行了研究, 并与环境因子进行关联分析, 以探究紫菜养殖对环境的影响。结果显示, 长岛海区水环境细菌多样性较丰富, 呈现由近岸区(CDCNS)、养殖区(CDPF)、外海区(CDCOS)递减的趋势。分别基于所有细菌组成以及相对丰度最高的前20个属/种的聚类结果均显示, CDCNS和CDCOS区聚在一起, 明显区别于CDPF区。CDPF区的特异优势菌包括鼠尾菌属(*Muricauda*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、盐单胞菌属(*Halomonas*)、赤杆菌属(*Erythrobacter*)、海杆菌属(*Marinobacter*)。3个区域均未检测到河豚毒素假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas tetraodonis*)、柠檬假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas citrea*)等疑似紫菜致病菌。溶解氧(DO)和pH呈现由近岸向外海逐渐降低的趋势, 总颗粒悬浮物(TSS)反之。CDPF区氨氮(NH₄⁺-N)含量最低, 盐度最高。关联分析发现, 环境因子与环境微生物之间具有一定的相关性, 如嗜氨菌属(*Ammoniphilus*)的丰度与NH₄⁺-N浓度具显著正相关性, CDPF区最低, CDCOS区最高; 盐单胞菌属的分布与盐度具显著正相关性, CDPF区盐单胞菌属含量显著高于其他2个海区。研究表明, 紫菜养殖海区细菌群落结构特征与环境因子具有关联性, 其间的互作机制尚需进一步深入研究。

关键词 条斑紫菜; 环境因子; 细菌; 16S rDNA

中图分类号 S968 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)02-0115-07

紫菜味道鲜美, 营养丰富, 具有较高的经济价值, 是我国养殖面积最大的大型经济海藻(李晓蕾等, 2017)。近年来, 随着养殖需求增加, 主产区养殖海区饱和, 长期密集养殖, 加之全球气候变化、种质退

* 国家重点研发计划(2018YFD0901504)、山东省农业良种工程(南种北繁)项目(2017LZN013)、中国水产科学研究院基本科研业务费专项资金项目(2015A02)和山东省重点研发计划项目(2016GSF115038)共同资助[This work was supported by National Key Research and Development Program of China (2018YFD0901504), Shandong Agricultural Good Seed (South to North) Project (2017LZN013), the Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Chinese Academy of Fishery Sciences (2015A02), and Key Research and Development Plan of Shandong Province (2016GSF115038)]. 孙藤芹, E-mail: 1379882983@qq.com

① 通讯作者: 汪文俊, 副研究员, E-mail: wjwang@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-03-26, 收修改稿日期: 2018-03-29

化等原因,紫菜在主产区养殖过程中频繁出现病烂、生长迟缓、产量大幅下降等问题,我国紫菜养殖产业受到冲击。

一些学者针对紫菜养殖和育苗过程的病害问题展开了研究。杨锐等(2008)发现假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas nigrifaciens*)为健康紫菜表面的优势菌,且在周围海水和病烂紫菜上未分离到该菌。王洪斌等(2011)研究表明,河豚毒素假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas tetraodonis*)可能是条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)丝状体黄斑病病原菌。陈国耀等(1999)研究表明,琼脂降解菌主要附着在紫菜网绳上,可能引起紫菜脱落。闫咏等(2002)研究表明,导致条斑紫菜叶状体绿斑病的致病菌是柠檬假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas citrea*)。引起紫菜病变的致病菌大多数为条件致病菌。海洋环境瞬息万变,海水环境中的微生物组成复杂多变,健康稳定的水环境中微生物群落组成处于动态平衡,当某种或某些因素突然改变打破这种平衡,某一或某些条件致病菌就会在这种失衡的状态下迅速繁殖扩增,导致病害暴发。上述研究主要采用从病烂与健康紫菜藻体上分离、鉴定致病菌或藻际微生物方法展开研究,而针对紫菜养殖海区水环境微生物物种组成及群落结构的研究几乎没有。

通过培养、分离、鉴定等传统的方法研究微生物,受培养条件等限制,检测到的微生物物种较少,尤其对一些低丰度和培养条件特殊的细菌往往难以检测到。测序技术的发展带动宏基因组学的诞生,第2代测序技术的产生彻底弥补了第1代测序技术通量低、成本高的缺点,且可实现平行测序、可定量(张丁予等,2016)。基于第2代测序技术的微生物宏基因组研究方法,可高通量检测到样品中几乎全部微生物,包含一些新物种(盖珊珊,2016),能更精确的检测出海洋水环境中菌群的组成和数量。

本研究采用高通量测序技术对山东长岛紫菜养殖海区表层水环境中细菌多样性进行调查,以期掌握长岛紫菜养殖区水环境中的细菌多样性分布,通过与邻近非养殖海区水环境中微生物组成的比较,探索紫菜养殖活动对水环境细菌多样性分布的影响,为紫菜养殖病害的预测及防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集与处理

于2016年12月从山东长岛紫菜养殖区分别采集了近岸区(CDCNS)、紫菜养殖区(CDPF)、外海区

(CDCOS)的海水样品 3 L, 每组 6 个重复。现场用 0.22 μm 混合纤维滤膜抽滤海水样品,滤膜对折后置冻存管于干冰中保存,带回实验室,放入 -80°C 保存。

用塑料水桶或颠倒式采水器采集表层水样,测量指标包括温度、pH、溶解氧(DO)、盐度、氨氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$)、磷酸盐($\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$)、硅酸盐($\text{SiO}_3^{2-}\text{-Si}$)、总悬浮物(TSS)等。

1.2 实验方法

1.2.1 基于 16S rDNA 序列的第 2 代测序与分析

该项工作委托广州基迪奥生物科技有限公司完成。样品微生物的提取采用 DNA 提取试剂盒(HiPureSoil DNA Kits)(Megan, 广州)。DNA 的质量检测采用琼脂糖凝胶电泳法,用带有 Barcode 的特异引物对扩增 16S rDNA V3+V4 区(引物序列为 F: CCTAYGGGR-BGCASCAG; R: GGACTACNNGGGTATCTAAT)。PCR 扩增产物切胶回收,用 Qubit 3.0 荧光计进行定量。将纯化的扩增产物进行等量混合,连接测序接头,构建测序文库,进行 Hiseq 2500 PE250 (Illumina, 美国)测序。

对测序得到的原始数据进行处理,首先过滤掉低质量的序列,得到 Clean data。然后,根据 PE reads 之间的重叠关系,将成对双端 Reads 拼接为一条序列(Tag)。利用 Mothur(v.1.34.0)软件包对 Tag 序列进行去冗余处理(Patrick *et al*, 2009),挑选出 Unique tag 序列。使用基于 Naive Bayesian 方法的分类器 Rdp classifier 工具,对 Tag 进行物种注释。为了更好地获得样品中物种的多样性信息,进一步对 Tags 进行 OUT (Operating Taxonomic Unit)聚类,通过 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)数据库进行比对和 OTU Pathway 注释。计算 Alpha 多样性指数(Chao、ACE、Shannon 和 Simpson)与样品间 Bray-Curtis 系数,并根据 Bray-Curtis 系数的计算结果对样品进行聚类分析。

1.2.2 环境因子分析 使用 YSI 多参数水质分析仪 Proplus(美国)现场测定水温、pH、盐度、DO,使用 AA3 连续流动分析仪(Seal, 德国)测定各项营养盐的浓度。 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的测定采用靛酚蓝法, $\text{SiO}_3^{2-}\text{-Si}$ 的测定采用硅钼蓝法, $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 的测定采用抗坏血酸还原磷钼蓝法(GB/T 12763.4-2007),检测限分别为 0.04、0.030、0.024 $\mu\text{mol/L}$ 。TSS 通过称量过滤前后滤膜的差值计算(GB17378.4-2007)。根据 R 语言的皮尔森相关系数计算环境因子与微生物的丰度之间的相关性。

2 结果

2.1 长岛海区海水中细菌组成

对长岛海区海水样品测序结果通过 KEGG 数据库进行比对和 OTU Pathway 注释分析, 共检测出细菌 42 门。变形细菌门(Proteobacteria)为整个海区优势菌, 其次为厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、浮霉菌门(Planctomycetes)、放线菌门(Actinobacteria)、SBR1093、疣微菌门(Verrucomicrobia)、广古菌门(Euryarchaeota)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、绿弯菌门(Chloroflexi)。

长岛海区海水样品中共检测出 217 属。其中, 丰度最高的 10 个属分别为噬甲基菌属(*Methylophaga*)、盐单胞菌属(*Halomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、嗜氨菌属(*Ammoniphilus*)、交替单胞菌属(*Alteromonas*)、海洋粘细菌属(*Plesiocystis*)、南极杆菌属(*Antarctobacter*)、共生菌属(*Candidatus*)、柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)、十八杆菌属(*Octadecabacter*)。

2.2 长岛海区水环境微生物多样性分析

绘制不同海区样品在 0.03 距离下的 Alpha 丰富程度表, Chao、ACE 和 Shannon 3 种指数越大, Simpson 指数越接近于 0, 表示样品中的物种越丰富。

结果显示, 长岛整个海区海水微生物多样性都比较高, 其中, 以 CDCNS 的微生物物种组成最丰富, 且与其他 2 个海区差异明显(表 1)。

表 1 样品 Alpha 多样性统计结果

样品名称 Sample	Chao1 指数 Chao1	ACE 指数 ACE	香浓指数 Shannon	辛普森指数 Simpson
近岸区 CDCNS	16813	31122	4.94	0.0536
外海区 CDCOS	12154	22062	3.88	0.1215
养殖区 CDPF	13711	24566	4.08	0.1276

2.3 长岛海区海水菌群在各海区的聚类关系

根据在各个分类水平上各海区样品 OUT 数据, 计算样品间 Bray-Curtis 系数, 并根据 Bray-Curtis 系数的计算结果对样品进行聚类分析, 以判断在属分类水平上各样品的相似性与特异性。CDPF 明显区分于 CDCNS 和 CDCOS 区, 后二者优先聚为一组(图 1)。表明 CDCNS 和 CDCOS 区微生物群落结构更为相似, CDPF 区的细菌群落结构明显区别于 CDCNS 和 CDCOS 区。

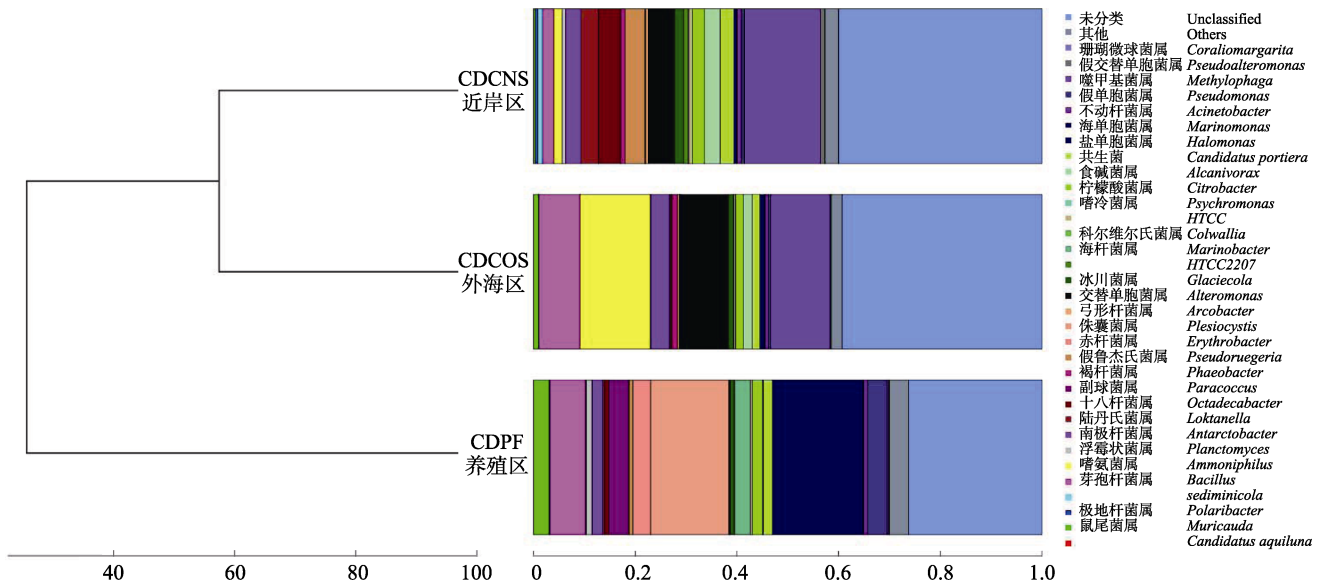


图 1 不同海区微生物群落结构的聚类关系
Fig.1 Cluster of microflora structure

2.4 养殖区较其他海区的细菌物种组成差异

根据长岛海水样品细菌物种分类的 OTU 数据绘制 heatmap, 以展示丰度最高的前 20 个属/种在不同区域间的表达情况(图 2)。聚类结果与图 1 类似, CDCNS

与 CDCOS 区优先聚在一起。其中, 鼠尾菌属(*Muricauda*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、盐单胞菌属、赤杆菌属(*Erythrobacter*)、海杆菌属(*Marinobacter*)、海洋粘细菌、副球菌属(*Paracoccus*)为 CDPF 区特异

性的优势菌。冰川菌属(*Glaciecola*)、共生菌、十八杆菌属、假鲁杰氏菌(*Pseudoruegeria*)、陆丹氏菌属(*Loktanella*)为 CDCNS 区特异性的优势菌。嗜氨菌属在 CDCOS 区相对丰度明显高于其他 2 个区域(图 2)。

2.5 典型菌属与环境因子的关联性分析

3 个区域海水盐度、pH、DO、营养盐等环境因子结果见表 2。从表 2 可以看出, CDPF 区的 $\text{NH}_4\text{-N}$

含量最低, CDCOS 区最高。同时, 整个海区盐度较高, 尤以 CDPF 区盐度最高。DO 和 pH 呈现由近岸向外海逐渐降低的趋势, TSS 则由近岸向外海逐渐增高。环境因子与环境微生物关联分析发现, 嗜氨菌属的分布与 $\text{NH}_4\text{-N}$ 和 TSS 的空间分布呈正相关, CDPF 区的嗜氨菌属丰度最小, CDCOS 区嗜氨菌属丰度最大。盐单胞菌属和海杆菌属的分布与盐度具显著相关性, CDPF 区盐单胞菌属和海杆菌属含量最多, 其他 2 个海区盐单胞菌含量较少(表 3)。

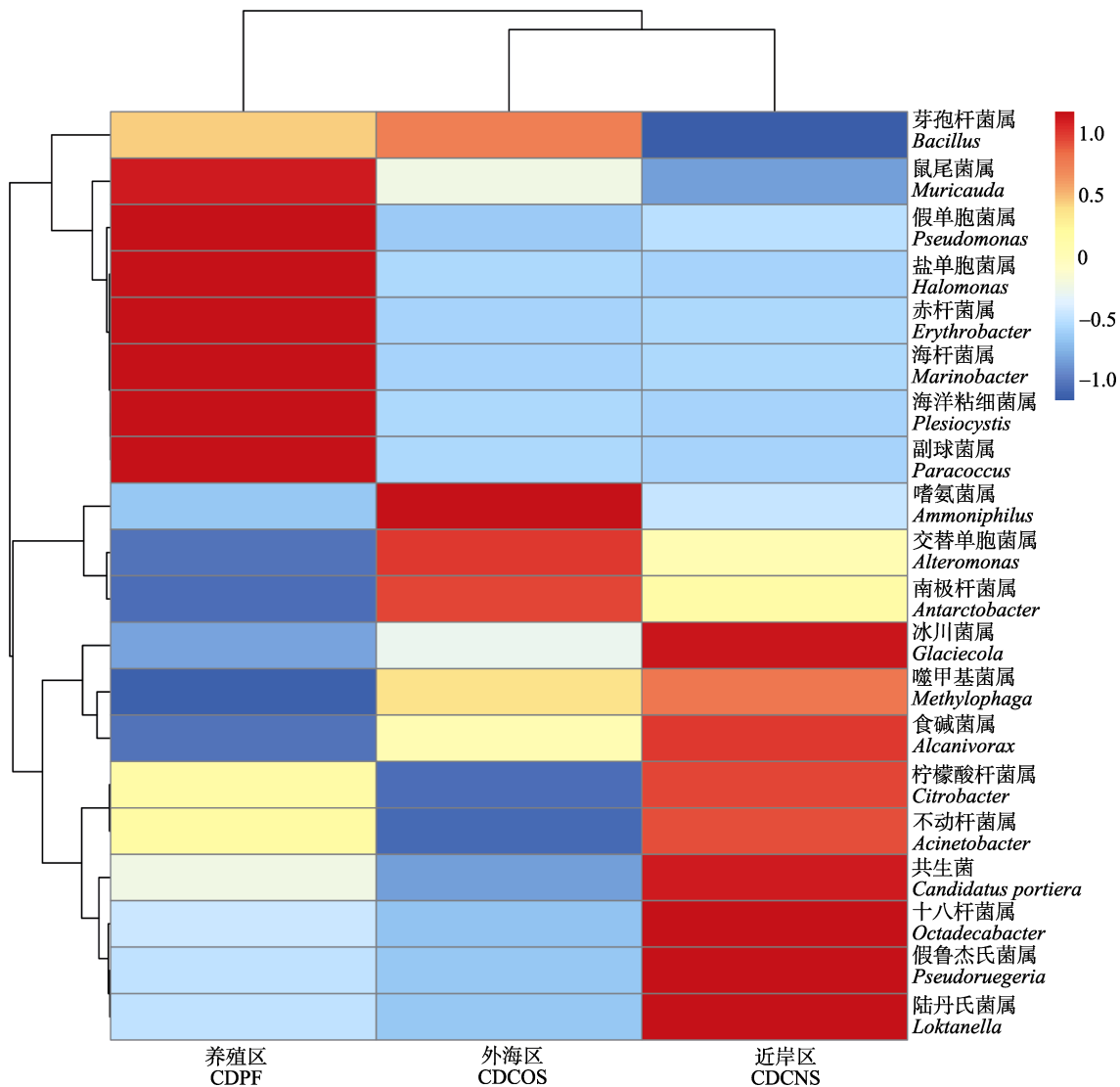


图 2 不同海区属分类水平的差异
Fig.2 Genus diversity among the three areas

3 讨论

紫菜富含蛋白质、维生素、矿物质和不饱和脂肪酸, 具有很高的营养价值, 是我国重要的大型经济海藻之一。紫菜养殖面积大, 养殖区域广, 其创造的经

济价值占全球大型海藻年总产值的 20% (陆勤勤等, 2016)。养殖紫菜还兼具修复近岸海洋环境的生态效益。条斑紫菜是我国北方地区主要养殖海藻品种, 近年来, 其养殖过程病烂、生长迟缓等问题日趋严重。微生物是环境重要组成, 其组成和结构变化将对养殖

表 2 各海区环境因子分析
Tab.2 Environmental parameters of the three areas

样品名称 Samples	氨氮 NH ₄ ⁺ -N (μmol/L)	硅酸盐 SiO ₃ ²⁻ -Si (μmol/L)	磷酸盐 PO ₄ ³⁻ -P (μmol/L)	溶解氧 DO (mg/L)	盐度 Salinity	pH	总悬浮物 TSS (mg/L)
近岸区 CDCNS	0.49	5.73	0.71	10.2	32.1	8.06	23.80
养殖区 CDPF	0.18	8.08	1.02	10.0	32.3	7.89	28.53
外海区 CDCOS	0.89	9.92	1.05	9.7	32.1	7.76	45.47

表 3 环境因子与部分菌属之间的相关系数
Tab.3 Correlation between environmental parameters and the abundance of some microorganisms

样品名称 Samples	氨氮 NH ₄ ⁺ -N (μmol/L)	硅酸盐 SiO ₃ ²⁻ -Si (μmol/L)	磷酸盐 PO ₄ ³⁻ -P (μmol/L)	溶解氧 DO (mg/L)	盐度 Salinity	pH	总悬浮物 TSS (mg/L)
盐单胞菌属 <i>Halomonas</i>	-0.82	0.09	0.45	0.11	1.00	-0.08	-0.29
嗜氨菌属 <i>Ammoniphilus</i>	0.94	0.77	0.49	-0.88	-0.58	-0.78	0.95
海杆菌属 <i>Marinobacter</i>	-0.83	0.07	0.43	0.13	1.00	-0.06	-0.31

生物的生长产生重要影响。已有研究多从温度、气候、种质与特定致病菌分离鉴定着手,而缺乏对养殖环境微生物群落结构特征的解析。

本研究发现,山东长岛海域丰度最高的细菌菌群为变形细菌门、厚壁菌门、拟杆菌门、浮霉菌门、放线菌门、SBR1093、疣微菌门等。付新华等(2017)和白洁等(2009)研究表明,环境微生物群落因海区和季节不同呈动态变化。对比不同采样时间,变形菌、拟杆菌、放线菌、浮霉菌等在渤海海洋保护区典型海域与黄海北部海域也被发现为主要优势菌,这些菌应该是海洋环境中普遍存在的细菌门类。疣微菌在秋季的渤海海域也是优势菌门(付新华等, 2017),但白洁等(2009)研究表明,在黄海北部海域水环境的优势菌组成中未包含该菌,推测疣微菌门可能为渤海海域特有的优势菌。在属分类水平上,本次调查海区发现 217 属,付新华等(2017)调查的渤海海区为 227 属,具有较好的区域一致性。然而,本次调查的长岛海域与付新华等(2017)调查的渤海保护区在蓝细菌门丰度上差异很大,这可能跟采样季节有关,本次采样时间在冬季,而付新华等(2017)采样时间在秋季,肖天等(2002)研究表明,低温不利于蓝细菌生存繁殖。

藻类和微生物群落之间相互利用、相互选择,在藻类周围形成特有的微生物群落结构(Fisher *et al.*, 1998)。通过聚类分析发现,长岛海域紫菜 CDPF 的微生物群落结构明显区别于相邻的 2 个区域,而相距较远的 CDCNS 和 CDCOS 区的微生物群落结构反而更为接近,这说明紫菜养殖确实对环境中微生物群落结构产生了影响。条斑紫菜养殖区水环境中特有的优势菌属包括鼠尾菌属、假单胞菌属、盐单胞菌属、赤杆菌

属、海杆菌属、海洋粘细菌属、副球菌属,其中,部分种属已在不同海区、不同紫菜样品的藻际微生物中被证实为优势菌。杨锐等(2008)从山东青岛的条斑紫菜叶状体表面分离得到海杆菌;武洪庆(2012)分别在射阳、连云港和大平三地的条斑紫菜表面分离得到了假单胞菌属;沈梅丽等(2013)在坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)特有的共附生细菌中分离到赤杆菌属和副球菌属。在不同海区不同紫菜样品或紫菜养殖区中,海杆菌属、假单胞菌属、赤杆菌属和副球菌属作为优势菌被检测或分离到,因此,作者推测,它们是典型的紫菜外生细菌组成,应与紫菜生长息息相关,但是,彼此间的互作关系尚需进一步深入探明。

通过藻际微生物研究发现,假交替单胞菌为条斑紫菜优势附生菌,且对条斑紫菜叶状体和丝状体生长均无不良影响(杨锐等, 2008)。杨锐等(2008)没有在其紫菜样品的相应生活水体中分离到该菌,可能由于所采用的第 1 代测序技术通量低,难以检测到水体中的低丰度菌,而假交替单胞菌在水体中丰度较低。通过对条斑紫菜丝状体黄斑病进行培养、分离等研究发现,河豚毒素假交替单胞菌可能为重要的致病菌组成(王洪斌等, 2011)。对条斑紫菜叶状体绿斑病的研究发现,柠檬假交替单胞菌是致病的直接因素(闫咏等, 2002)。本研究对长岛紫菜养殖区与非养殖区调查发现少量假交替单胞菌,其相对丰度小于 0.1%,且不同区域间假交替单胞菌的分布没有差异。调查结果未发现河豚毒素假交替单胞菌和柠檬假交替单胞菌,可能由于其丰度极低而未被检测到。

水环境中细菌多样性既与附近生物体的代谢活动、生理特征有关,又与环境因子(温度、盐度、DO、

pH、营养盐等)相关(胡晓娟, 2013)。本次调查结果发现, 环境因子在区域间具有较为明显的规律性, 如 DO、pH 呈现由近岸到外海逐渐递减, TSS、Si 和 P 呈由近岸到外海逐渐递增, $\text{NH}_4\text{-N}$ 的含量也在 CDCOS 区最高。由于调查海域有贝类养殖, 且与 CDCOS 区较近, 而离 CDCNS 区最远。贝类养殖消耗 O_2 造成 DO 下降, 排泄造成 TSS 和 N、P 等无机营养盐升高。而 CDPF 区 $\text{NH}_4\text{-N}$ 大大低于 CDCNS 区, 则是由紫菜生长消耗而致。而 CDPF 区的盐度也略高于其他 2 个区域, 其原因尚未知。通过关联以上环境参数与环境微生物分析发现, 二者在空间分布上具有一定的关联性, 如嗜氨菌属需生长在高浓度氨离子的环境中, 对氨有很强的依赖性(Zaitsev *et al*, 1998), 因此, 其分布与 NH_4^+ 的空间分布呈显著正相关, 成为 CDCOS 区典型的优势菌。盐单胞菌属为嗜盐菌, 喜繁盛于盐度较高的盐场附近或海洋中(刘军华等, 2009)。本研究发现, 盐单胞菌属的分布受盐度影响较大。CDPF 区盐度较 CDCNS 和 CDCOS 区略高, 盐单胞菌属则成为 CDPF 区特异性的优势菌。由于盐单胞菌属具有反硝化作用(赵贵成等, 2011), 可将海水中的 NO_3^- 还原为 NH_4^+ , 而紫菜在摄取氮盐的过程中, 优先消耗 $\text{NH}_4\text{-N}$ (Bronk *et al*, 1994), 因此, 盐单胞菌属的富集对紫菜生长应是有利的。

参 考 文 献

- Bai J, Li HY, Zhao YG. Bacterial distribution at different stations in the Northern Yellow Sea. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(3): 343–350 [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. *微生物学报*, 2009, 49(3): 343–350]
- Bronk DA, Glibert PM, Ward BB. Nitrogen uptake dissolved organic nitrogen release and new production. *Science*, 1994, 265(5180): 1843–1846
- Chen GY, Shen HS, Zhu MX, *et al*. Preliminary investigation on attaching bacteria and disease bacteria in thalli of *Porphyra yezoensis*. *Journal of Aquaculture*, 1999(1): 17–19 [陈国耀, 沈怀舜, 朱庙先, 等. 条斑紫菜叶状体附生菌及病原菌的初步调查. *水产养殖*, 1999(1): 17–19]
- Fisher MM, Wilcox LW, Graham LE. Molecular characterization of epiphytic bacterial communities on Charophycean green algae. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(11): 4384–4389
- Fu XH, Liu GN, He JL, *et al*. Analysis of microbial community diversity in the Bohai Sea marine protected areas of the Shandong Province. *Marine Sciences*, 2017, 41(1): 39–47 [付新华, 刘国宁, 何健龙, 等. 山东省渤海海洋保护区典型海域表层海水微生物群落多样性分析. *海洋科学*, 2017, 41(1): 39–47]
- Gai SS, Zhang WD. Microbiota of shell-boring conchocelis of *Pyropia yezoensis* determined by the next-generation sequencing. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2016, 47(5): 990–996 [盖珊珊, 张伟东. 基于第二代测序技术的条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)贝壳丝状体附生菌群研究. *海洋与湖沼*, 2016, 47(5): 990–996]
- Hu XJ. Analysis on microbial community characteristics in the typical sea areas in Guangdong Province. Master's Thesis of Jinan University, 2013, 46–49 [胡晓娟. 广东典型海域微生物群落特征分析. 暨南大学硕士研究生学位论文, 2013, 46–49]
- Li XL, Wang WJ, Liang ZR, *et al*. Antioxidant physiological characteristics of wild *Pyropia yezoensis* under desiccation stress. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(5): 156–163 [李晓蕾, 汪文俊, 梁洲瑞, 等. 野生条斑紫菜叶状体对干旱胁迫的抗氧化生理响应特征. *渔业科学进展*, 2017, 38(5): 156–163]
- Li W, Mamat O, Xu JL, *et al*. Comparative study of volatile components from tow strains of *Pyropia haitanensis* in different culture areas. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 147–156 [李微, 阿曼尼萨·买买提, 徐继林, 等. 不同海域不同品种坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)挥发性成分的比较分析. *渔业科学进展*, 2016, 37(5): 147–156]
- Liu JH, Long C, Lu XL, *et al*. Identification and bioassays of a strain of *Halomonas* sp. from the East China Sea. *Chinese Journal Marine Drugs*, 2009, 28(6): 5–10 [刘军华, 龙聪, 卢小玲, 等. 一株来源于东海的盐单胞菌的鉴定及活性筛选. *中国海洋药物杂志*, 2009, 28(6): 5–10]
- Patrick DS, Sarah LW, Thomas R, *et al*. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(23): 7537–7541
- Shen ML, Yang R, Luo QJ, *et al*. Microbial diversity of *Pyropia haitanensis* phycosphere during cultivation. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(10): 1087–1102 [沈梅丽, 杨锐, 骆其君, 等. 坛紫菜养殖周期中的藻际微生物多样性. *微生物学报*, 2013, 53(10): 1087–1102]
- Wang HB, Li XS, Xia YM, *et al*. Isolation, identification and biological pathogen of yellow spot disease in conchocelis of *Porphyra yezoensis*. *Marine Environmental Science*, 2011, 30(3): 361–364, 408 [王洪斌, 李信书, 夏亚明, 等. 条斑紫菜丝状体黄斑病病原体分离鉴定及生物学特性研究. *海洋环境科学*, 2011, 30(3): 361–364, 408]
- Wu HQ. Epibacterial community structure of several macroalgae. Doctoral Dissertation of University of Chinese Academy of Sciences, 2012, 50–51 [武洪庆. 不同养殖海藻表面附着细菌多样性分析. 中国科学院大学博士研究生学位论文, 2012, 50–51]
- Xiao T, Wang R. Distribution of *Synechococcus* in the Bohai Sea in Autumn and Spring. *Acta Ecologica Sinica*, 2002, 22(12): 2071–2078 [肖天, 王荣. 春季与秋季渤海蓝细菌(聚球蓝细菌属)的分布特点. *生态学报*, 2002, 22(12): 2071–2078]
- Yan Y, Ma JH, Xu P, *et al*. *Pseudoalteromonas citrea*, the causative agent of green-spot disease of *Porphyra yezoensis*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2002, 9(4): 353–358 [闫咏, 马家海, 许璞, 等. 1 株引起条斑紫菜绿斑病的柠檬假交替单胞菌. *中国水产科学*, 2002, 9(4): 353–358]
- Yang R, Fang WY, Shan YY, *et al*. Genetic diversity of epiphytic bacteria in *Porphyra yezoensis*. *Acta Oceanologica Sinica*, 2008, 30(4): 161–168 [杨锐, 方文雅, 单媛媛, 等. 条斑紫菜外生细菌的遗传多样性. *海洋学报*, 2008, 30(4): 161–168]
- Zaitsev GM, Tsitko IV, Rainey FA, *et al*. New aerobic ammonium-dependent obligately oxalotrophic bacteria: Description of *Ammoniphilus oxalaticus* gen. nov., sp. nov. and *Ammoniphilus oxalivorans* gen. nov., sp. nov. *International*

Journal of Systematic Bacteriology, 1998, 48(1): 151–163
 Zhang DY, Zhang TX, Wang GX. Development and application of second-generation sequencing technology. Environmental Science and Technology, 2016, 39(9): 96–102 [张丁予, 章婷曦, 王国祥. 第二代测序技术的发展及应用. 环境科学与技术, 2016, 39(9): 96–102]

Zhao GC, Zhang T, Gao Y, *et al.* Identification and bioactivities analysis of *Halomonas* sp. from seawater. Academic Journal of Second Military Medical University, 2011, 32(8): 813–817 [赵贵成, 张韬, 高云, 等. 海洋盐单胞菌属微生物的鉴定及生物学活性分析. 第二军医大学学报, 2011, 32(8): 813–817]

(编辑 陈严)

Effect of *Pyropia* Farming on Bacterial Communities and Marine Environmental Factors

SUN Tengqin^{1,2}, WANG Wenjun^{2①}, LIANG Zhouhui², LIU Fuli²,
 SUN Xiutao², CAO Yuan^{1,2}, WANG Feijiu²

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fishery, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

Abstract *Pyropia* is one of the most economically important seaweeds, which is mainly cultured in China. In recent years, water quality deterioration caused by long-term and intensive culture have led to problems for *Pyropia* aquaculture, such as disease outbreaks, decreased yields, and lower product quality. Microorganisms are important components of the environment and have important effects on the growth of other organisms. In this study, the microbial community structure in a *Pyropia yezoensis* aquafarm in Changdao, China, was studied using 16S rDNA-based high-throughput sequencing technology. Whether there were correlations between different environmental factors and the abundance of some predominant bacterial taxa was also tested to explore the environmental impacts of *Pyropia* farming. The results showed that microbial diversity was rich in the surveyed marine area. The abundance of Proteobacteria was the highest among all of the identified bacterial phyla. When the *Pyropia* farming area was compared with nearby non-farming areas, it was found that the highest abundances of microbial species occurred in the near-shore area (CDCNS), followed by the *Pyropia* farming area (CDPF), and the microbial diversity was the lowest in the offshore area (CDCOS). Cluster analysis of the samples was carried out based on Bray-Curtis similarity coefficient values calculated among them. The microbial community structure of CDCNS and CDCOS formed a clade that was separated from CDPF. Furthermore, the twenty genera with the highest abundances were used for a further cluster analysis, and the results showed that CDCNS and CDCOS clustered together, with more genera being especially abundant in CDPF. The predominant bacteria from CDPF included *Muricauda*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Erythrobacter*, and *Marinobacter*. Suspected pathogenic bacteria of *Pyropia*, such as *Pseudoalteromonas tetraodonis* and *Pseudoalteromonas citrea*, were not identified in the surveyed areas. Indeed, the abundance of the genus *Pseudoalteromonas* was lower than 0.1%, suggesting that the environment was safe for *Pyropia* farming. Dissolved oxygen (DO) and pH decreased gradually from CDCNS to CDCOS, and TSS increased gradually from CDCNS to CDCOS. The content of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ was the lowest in CDPF and the highest in CDCOS, while the salinity was the highest in CDPF. Correlation analyses showed that there were relationships between environmental factors and environmental microorganisms. The abundance of *Ammoniphilus* was positively correlated with the content of $\text{NH}_4^+\text{-N}$, which was the lowest in CDPF and the highest in CDCOS. The distribution of *Halomonas* was related to salinity, and the abundance of *Halomonas* was significantly higher in CDPF than in the other two areas. *Halomonas* functions in denitrification, and thus can promote the conversion of N from an oxidized state to reduced forms that are more easily absorbed by algae. In conclusion, this study represented the first report of the structure of the microbial community in a *Pyropia* aquafarm and its correlation with environmental factors. The results showed that farming *Pyropia* had significant influences on the environmental microbial community, which were closely related to variations in environmental factors caused by *Pyropia* farming. Such changes in environmental factors and microbial structure had corresponding effects on *Pyropia* growth. The mechanisms of these interactions between environmental microorganisms and *Pyropia* growth should be further investigated in the future.

Key words *Pyropia yezoensis*; Environment factors; Bacteria; 16S rDNA

① Corresponding author: WANG Wenjun, E-mail: wjwang@ysfri.ac.cn