

研究报告



象山港硅藻赤潮过程中真菌群落演替及互作特征

谢伟娟 陈晨 赵志颖 张继宁 侯繁荣 张德民 张化俊*

宁波大学海洋学院 浙江 宁波 315832

摘要:【背景】近岸海域赤潮的发生能显著改变包括真菌在内的微生物群落组成,进而影响海洋中碳氮元素循环。真菌是海洋中重要的分解者,但赤潮过程对真菌群落的影响少有报道。【目的】探明赤潮过程对真菌群落的影响,对进一步阐释赤潮对生态系统中物质循环的影响具有重要意义。【方法】针对2017年春季象山港硅藻赤潮,对真菌内源转录间隔区1 (Internally Transcribed Spacer 1, ITS1)序列进行高通量测序,研究赤潮过程中真菌群落响应及共现性特征。【结果】真菌群落的 α 多样性指数在赤潮暴发的各阶段差异显著,而且均与磷酸盐、硝酸盐和亚硝酸盐有显著相关性($P<0.05$)。子囊菌门(*Ascomycota*, 90.2%)和担子菌门(*Basidiomycota*, 8.27%)是本次硅藻赤潮的优势菌门,其中子囊菌门遍布赤潮暴发的4个阶段;锤舌菌纲(*Leotiomycetes*, 16.1%)和散囊菌纲(*Eurotiomycetes*, 9.3%)是纲水平上的主要优势类群。赤潮暴发过程中硝酸盐、亚硝酸盐、磷酸盐和温度等环境因素的改变,驱动真菌群落组成及结构发生显著变化。*Helotiales*、*Eurotiales*、*Xylariales*、*Saccharomycetales*和*Agaricostilbales*构成了真菌群落共现网络的主体。【结论】真菌群落在赤潮的各阶段具有显著的演替特征,赤潮藻生消是引起真菌群落演替的主要因素,但是环境因子也扮演着重要角色。赤潮过程中,真菌群落同类群内的互作要强于不同类群间的互作,这对维持群落的稳定性具有重要意义。

关键词: 硅藻赤潮, 真菌群落, 高通量测序, 象山港

Succession and interaction of fungal community during a diatom bloom in Xiangshan Bay

XIE Weijuan CHEN Chen ZHAO Zhiying ZHANG Jining HOU Fanrong
ZHANG Demin ZHANG Huajun*

School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo, Zhejiang 315832, China

Abstract: [Background] Harmful algal blooms (HABs) in coastal waters can significantly change the composition of microbial community, thereby affecting the cycling of carbon and nitrogen in the ocean. Fungi are important decomposers in the ocean, but the impact of HABs on fungal community has not been elucidated. [Objective] Clarifying the influence of HABs on the fungal community is of great importance for further explaining the effect of HABs on material cycle in the ecosystem. [Methods] Through ITS1

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (42076158); Fundamental Research Funds for Zhejiang Provincial Universities (SJLY2020005)

*Corresponding author: Tel: 86-574-87600164; E-mail: zhanghuajun@nbu.edu.cn

Received: 01-02-2021; Accepted: 07-03-2021; Published online: 18-05-2021

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(42076158); 宁波大学省属高校基本业务费项目(SJLY2020005)

*通信作者: Tel: 0574-87600164; E-mail: zhanghuajun@nbu.edu.cn

收稿日期: 2021-02-01; 接受日期: 2021-03-07; 网络首发日期: 2021-05-18

amplicon sequencing, we analyzed the response of fungal community to an early-spring diatom bloom in 2017, in order to investigate the dynamic and co-occurrence patterns of the community. **[Results]** The alpha diversity indices of the fungal community changed significantly among four bloom stages, and they were all correlated with phosphate, nitrate, and nitrite ($P < 0.05$). At the phylum level, the fungal community was dominated by *Ascomycota* (relative abundance: 90.2%) and *Basidiomycota* (8.27%), among which *Ascomycota* was dominant across the four stages. At the class level, fungi from *Leotiomycetes* (16.1%) and *Eurotiomycetes* (9.3%) were the most abundant. The succession of fungal community was mainly driven by the abundance of harmful algal species, but changes in environmental factors including nitrate, nitrite, and phosphate were also responsible. Co-occurrence network was mainly composed of *Helotiales*, *Eurotiales*, *Xylariales*, *Saccharomycetales*, and *Agaricostilbales*. **[Conclusion]** The fungal community demonstrated obvious succession during the diatom bloom, which was mainly induced by diatom abundance, as well as environmental factors. The interaction of the fungal community within group was stronger than that between groups during the bloom, which is important for maintaining community stability.

Keywords: diatom bloom, fungal community, high-throughput sequencing, Xiangshan Bay

随着社会经济的快速发展,大量工农业废水和生活污水排入近岸海域,海水中有有机污染物和氮、磷等营养盐的含量显著升高,水体富营养化程度日趋加剧,使得赤潮发生频率逐年增加^[1]。赤潮发生会影响海洋生态系统中的物质循环和能量流动,严重威胁海洋生态系统的平衡与稳定^[2]。赤潮过程对微生物群落的组成和结构也有显著影响,如 Delmont 等在研究棕囊藻赤潮对细菌群落结构的塑造作用时发现,在赤潮区域主导细菌群落的主要类群是拟杆菌门和变形菌门,而在非赤潮区域的主要类群则是变形菌门^[3]。真菌作为海洋微食物网的重要一环,在物质循环与能量流动中发挥着重要作用,如对难降解有机质的分解利用可促进海洋生态系统的元素循环;还可通过种间相互作用影响原生动植物和细菌的组成及分布,进而调整水体的生态平衡^[4-5]。同时,真菌还是去除水体污染物的主体,在促进硝化和反硝化作用^[6]以及去除水体中有毒化合物等方面具有重要作用^[7]。当前针对真菌群落的研究多集中在红树林^[8]、海底沉积物^[9-10]和河口湿地^[11]等生境,赤潮过程对真菌组成和群落结构影响的研究则较为缺乏。

象山港是半封闭狭长港湾,水体交换时间久且能力弱,加上象山港海域是重要的水产养殖基

地,大量养殖污染物的排放导致象山港水体长期呈富营养化状态,给赤潮生物的大量繁殖、暴发创造了有利条件。此前我们的研究已经报道了象山港春季赤潮暴发期间细菌和真核微生物群落组成和结构发生了显著变化^[12-13],证实赤潮过程对海洋细菌和浮游植物群落具有较强的塑造作用,赤潮生物及海域环境因子能显著影响微生物群落结构^[14];然而针对赤潮过程中真菌群落的研究仍有待进一步深入。基于此,本研究针对象山港2017年春季硅藻赤潮过程,采用内源转录间隔区1 (Internally Transcribed Spacer, ITS1)序列高通量测序技术,研究赤潮对真菌群落组成、多样性和互作特征的影响,揭示真菌群落对赤潮生消的响应特征。

1 材料与方法

1.1 样品采集

采样站点设计在文献[12]中已报道,简述如下:采样时间为2017年2月10日(Early Stage 1, ES1)、15日(Early Stage 2, ES2)、19日(Middle Stage 1, MS1)、23日(Middle Stage 2, MS2)、27日(Late Stage, LS)和3月8日(After Bloom, AB),在赤潮暴发区域5个站点进行表层海水(采集深度<0.5 m)样品采集。利用体积为5 L的水样

采集器采集表层海水,其中 1 L 水在经灭菌处理的筛绢(100 μm 孔径)上进行预过滤,再用 0.2 μm 聚碳酸酯膜二次过滤,收集水体样品中的微生物用于提取总 DNA,样品收集后放在超低温冰箱($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$)保存,共收集 29 个微生物样品。

1.2 主要试剂

Isopore 聚碳酸酯膜, Millipore 公司; Power Soil DNA Isolation 试剂盒, MO BIO 公司; *FastPfu* 聚合酶, 北京全式金生物技术有限公司。

1.3 水质测定及赤潮藻计数

现场测定温度、盐度、溶解氧(Dissolved Oxygen, DO)和 pH 等参数;于实验室测定铵盐、亚硝酸盐、硝酸盐、化学需氧量(Chemical Oxygen Demand, COD)、磷酸盐、硅酸盐、叶绿素 a (Chl a)含量,均按照《海洋监测规范》(GB 17378.4-2007)^[15]的标准和规范进行测定。本次硅藻赤潮由中肋骨条藻和柔弱几内亚藻引起,研究报道了 2 种藻类丰度及叶绿素 a 含量在赤潮各阶段的变化,而且根据叶绿素 a 含量将 ES1 和 ES2 合并为 ES 阶段,MS1 和 MS2 合并为 MS 阶段^[12]。

1.4 总 DNA 提取及测序

将微生物滤膜剪碎后,使用 Power Soil DNA Isolation 试剂盒提取总 DNA。利用引物对 ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') 和 ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3')对真菌 ITS1 序列进行 PCR 扩增,每个体系 20 μL ,单个样品设置 3 个重复,以降低扩增偏差。PCR 反应体系: 5 \times *FastPfu* Buffer 4 μL , dNTPs (2.5mmol/L) 2 μL , 正、反向引物(5 $\mu\text{mol/L}$)各 0.8 μL , *FastPfu* 聚合酶 0.4 μL , 牛血清白蛋白 0.2 μL , DNA 模板 10 ng, ddH₂O 补足 20 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 28 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。延伸之后混合所扩增产物,再将混合物用 PCR 产物纯化试剂盒纯化。经纯化检测后的样品送往上海美吉生物医药科技有限公司进行 Illumina MiSeq 双端测序,产物长度

为 300 bp。在送样时,1 个样品意外损失,因此总计测定 28 个样品。

1.5 测序数据处理及分析

原始数据存储在 NCBI 数据库中,编号为 PRJNA694776。测序数据采用 QIIME 1.9.1 和 USEARCH^[16]平台对原始数据进行降噪减噪处理和去除嵌合体。使用 Uclust 算法将相似度大于 97% 的序列划分为同一个分类操作单元(Operational Taxonomic Unit, OTU),利用 BLAST 方法^[15]与真菌的 UNITE 数据库(Version 7.2)比对注释。去除属于原生动物和后生动物的序列,每个样品的序列数介于 36 729–81 838 之间。将样品统一标准化为 36 700 条序列,共得到 2 433 个 OTU 进行下游分析。利用 R 语言的 Vegan^[17]包分别计算每个样品中的 α 多样性,如丰富度(Richness)、香农指数(Shannon index)和均匀度(Evenness),使用 ape 和 picante 包计算系统发育多样性指数(Phylogenetic Diversity, PD),并通过 ggplot2 包进行可视化,利用 Pearson 相关性分析研究各 α 多样性指数与环境因子的相关性。分别在门水平(相对丰度>0.1%)、纲水平(相对丰度>0.1%)分析真菌群落组成及演替特征。筛选丰度最高的 30 个 OTU,研究微生物在 OTU 水平的演替特征,同时利用 Spearman 相关性分析这 30 个 OTU 与 2 种赤潮藻的关系,并利用 heatmap^[18]包进行展示。为了筛选对真菌群落在赤潮各个阶段具有指示作用的类群,使用 indic-species^[19]软件包在丰度最高的 100 个 OTU 中筛选了 4 个阶段的指示物种,筛选条件为指示值>0.6 和 $P<0.01$ 。利用 vegan 包基于 Bray-Curtis 距离的相似性分析(Analysis of Similarity, ANOSIM)来量化赤潮暴发各阶段真菌群落的差异性;利用基于 Bray-Curtis 距离的冗余分析(下文简称 CAP 分析)探究真菌群落的演替特征及其与环境因子的关系,同时利用 Vegan 包^[17]中的 Adonis 函数进行多变量方差置换分析(Permutational Multivariate Analysis of Variance,

PERMANOVA)量化不同环境因子对真菌群落变异的影响。以上分析均在 R 语言中进行。

筛选至少出现在 20%样本中的所有 OTU 进行共现网络分析。使用 R 语言中的 Hmisc 包计算 OTU 之间的 Spearman 秩相关, 保留相关性系数 $|\rho|>0.8$ 且 $P<0.01$ (FDR 矫正)的节点和边, 利用 Gephi 0.9.2 进行网络可视化和模块化分析。同时计算包括节点(Nodes)、边(Edges)、模块化程度(Modularity)和平均聚类系数(Average Clustering Coefficient)等网络拓扑学参数。此外, 根据得到的真实网络的节点和边, 生成了与真实网络具有相同节点和边数的 Erdős-Rényi 随机性网络^[20], 然后比较真实共现网络和随机网络的拓扑学参数之间的差异。

2 结果与分析

2.1 真菌群落的 α 多样性

赤潮暴发不同阶段真菌群落的 α 多样性指数如均匀度、系统发育多样性、丰富度和香农指数差异显著(图 1), 均从 ES 期到 MS 期显著降低, MS 和 LS 期始终处在较低水平, 而到 AB 期恢复到初始水平。此外, 4 个 α 多样性指数与磷酸盐、硝酸盐和亚硝酸盐呈显著的正相关($P<0.05$), 与 pH、COD、Chl a 均呈显著的负相关($P<0.01$) (表 1)。以上结果表明, 真菌群落 α 多样性受硝酸盐、亚硝酸盐和磷酸盐的影响较大。

2.2 真菌群落的组成分析

在真菌群落组成方面, 子囊菌门(*Ascomycota*, 相对丰度 90.2%)和担子菌门(*Basidiomycota*, 相对

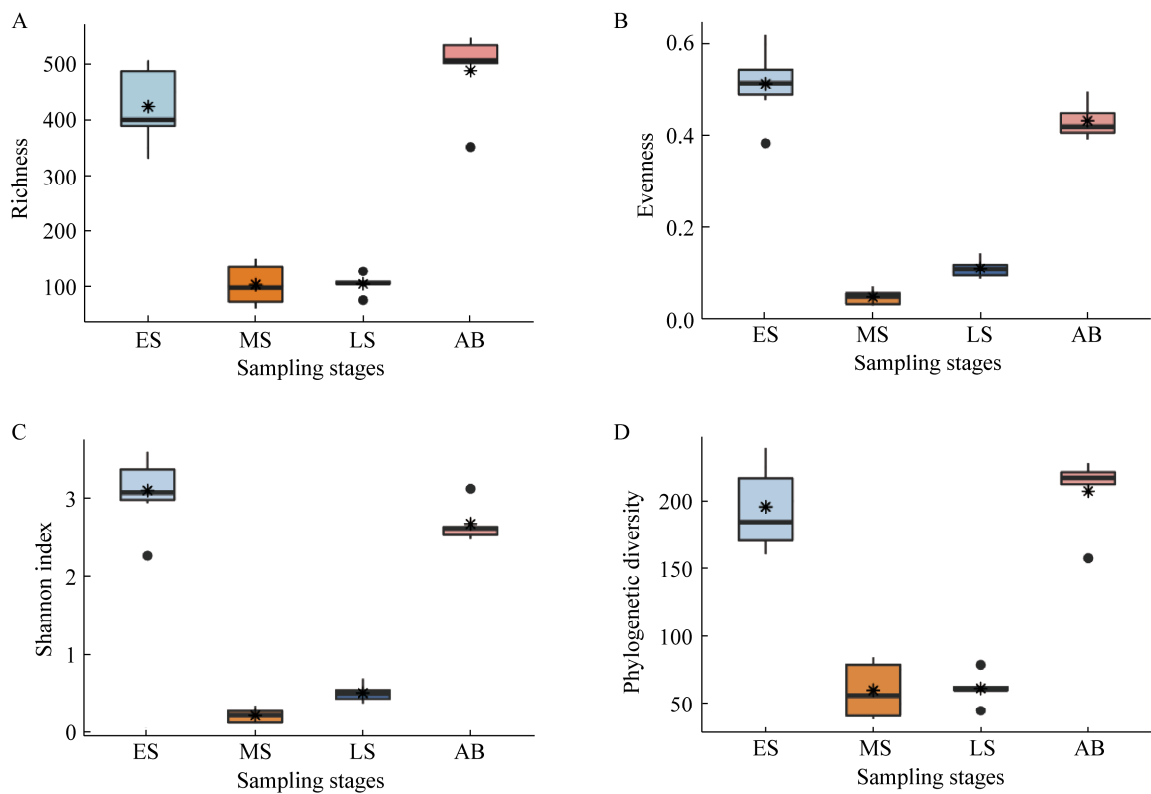


图 1 真菌群落 α 多样性变化

Figure 1 Changes of alpha diversity indices of fungal community

注: A: 丰富度; B: 均匀度; C: 香农指数; D: 系统发育多样性; 箱体中的星号表示平均值; 箱体中的水平线表示中位数

Note: A: Richness; B: Evenness; C: Shannon index; D: Phylogenetic diversity; The asterisks in box represent the average value; The horizontal lines in the box represent the median value

表 1 Pearson 相关性分析 α 多样性与环境因子的关系
Table 1 Relationship between alpha diversity and environmental factors based on Pearson correlation analysis

环境因子 Environmental factors	均匀度 Evenness	系统发育多样性 Phylogenetic diversity	丰富度 Richness	香农指数 Shannon index
硝酸盐 Nitrate	0.608**	0.764**	0.784**	0.605**
亚硝酸盐 Nitrite	0.466*	0.447*	0.492**	0.470*
磷酸盐 Phosphate	0.460*	0.583**	0.628**	0.462*
硅酸盐 Silicate	0.380*	0.574**	0.577**	0.372
溶解氧 DO	0.017	-0.231	-0.278	0.013
pH	-0.387*	-0.529**	-0.554**	-0.382
化学需氧量 COD	-0.359	-0.572**	-0.599**	-0.352
叶绿素 <i>a</i> Chl <i>a</i>	-0.226	-0.422*	-0.446	-0.228
铵盐 Ammonium	-0.180	-0.033	0.092	-0.174
盐度 Salinity	-0.137	0.071	0.0095	-0.134
温度 Temperature	-0.179	-0.099	-0.016	-0.177

Note: *: $P<0.05$; **: $P<0.01$

丰度 8.27%)是主要的优势门类群；其中子囊菌门在赤潮暴发的各个阶段都具有最高的丰度，特别是在 MS 和 LS 时期占总丰度的 99.8%；担子菌门在 ES 期的丰度较低而 AB 期的丰度较高(图 2A)。在纲水平上的主要优势菌群是锤舌菌纲 (*Leotiomyces*，相对丰度 16.1%)和散囊菌纲 (*Eurotiomyces*，相对丰度 9.3%)。锤舌菌纲在 ES 期(17.7%)和 AB 期(55.3%)均占优势地位，但 AB 期的丰度高于 ES 期；散囊菌纲在 ES 期(27.6%)丰度较高，是 ES 期的优势菌群(图 2B)。

在筛选的丰度最高的 30 个 OTU 中(图 3)，高丰度类群主要属于子囊菌门和担子菌门。同时也发现赤潮暴发各阶段的样品可按照赤潮暴发的 4 个阶段进行聚类，表明 4 个阶段真菌群落组成存在显著差异。从 2 种赤潮藻与丰度最高的 30 个 OTU 相关性分析结果中发现(图 3)，丰度前 30 的 OTU 与中肋骨条藻多呈显著正相关，与柔弱几内亚藻多呈负相关，说明本次赤潮的主要赤潮生物能显著影响真菌群落组成。

筛选出 42 个 OTU 作为各阶段真菌群落的指示微生物(图 4)，其中 ES 阶段 24 个，MS 和 LS 阶段各 1 个，AB 阶段 16 个。ES 中相对丰度较高

的指示类群为子囊菌门的 OTU1274 和散囊菌目的 OTU3619 (*Eurotiales*)；MS 和 LS 阶段的指示类群分别为柔膜菌目(OTU2920, *Helotiales*)和子囊菌门(OTU456)的成员。AB 阶段的高丰度指示类群是隶属于子囊菌门的柔膜菌目(OTU5003)和隶属于担子菌门的 OTU981。

2.3 真菌群落结构变异及其与环境因子的关系

CAP 分析显示，真菌群落可根据不同的赤潮暴发阶段进行聚类，表现出同一阶段样品显著聚类的特征(图 5)，而且不同赤潮暴发阶段样品沿着 CAP1 轴分布，表明赤潮过程中真菌群落结构有显著的变异。ANOSIM 分析也显示了赤潮暴发各阶段群落结构差异显著($P<0.05$ ，图 5)。CAP 分析和 PERMANOVA 结果(表 2)均发现，硝酸盐 ($R^2=0.367$ ， $P<0.001$)、亚硝酸盐 ($R^2=0.354$ ， $P<0.001$)、磷酸盐 ($R^2=0.343$ ， $P<0.001$)和温度 ($R^2=0.318$ ， $P<0.001$)与赤潮各阶段真菌群落结构变异显著相关。PERMANOVA 分析(表 2)同样表明，在众多因素中，赤潮藻生消是导致真菌群落演替最重要的因素($R^2=0.725$ ， $P<0.001$)。因此，赤潮过程中环境因子虽然对真菌群落有显著的塑造作用，但是赤潮藻类生消才是引起真菌群落演替的主要因素。

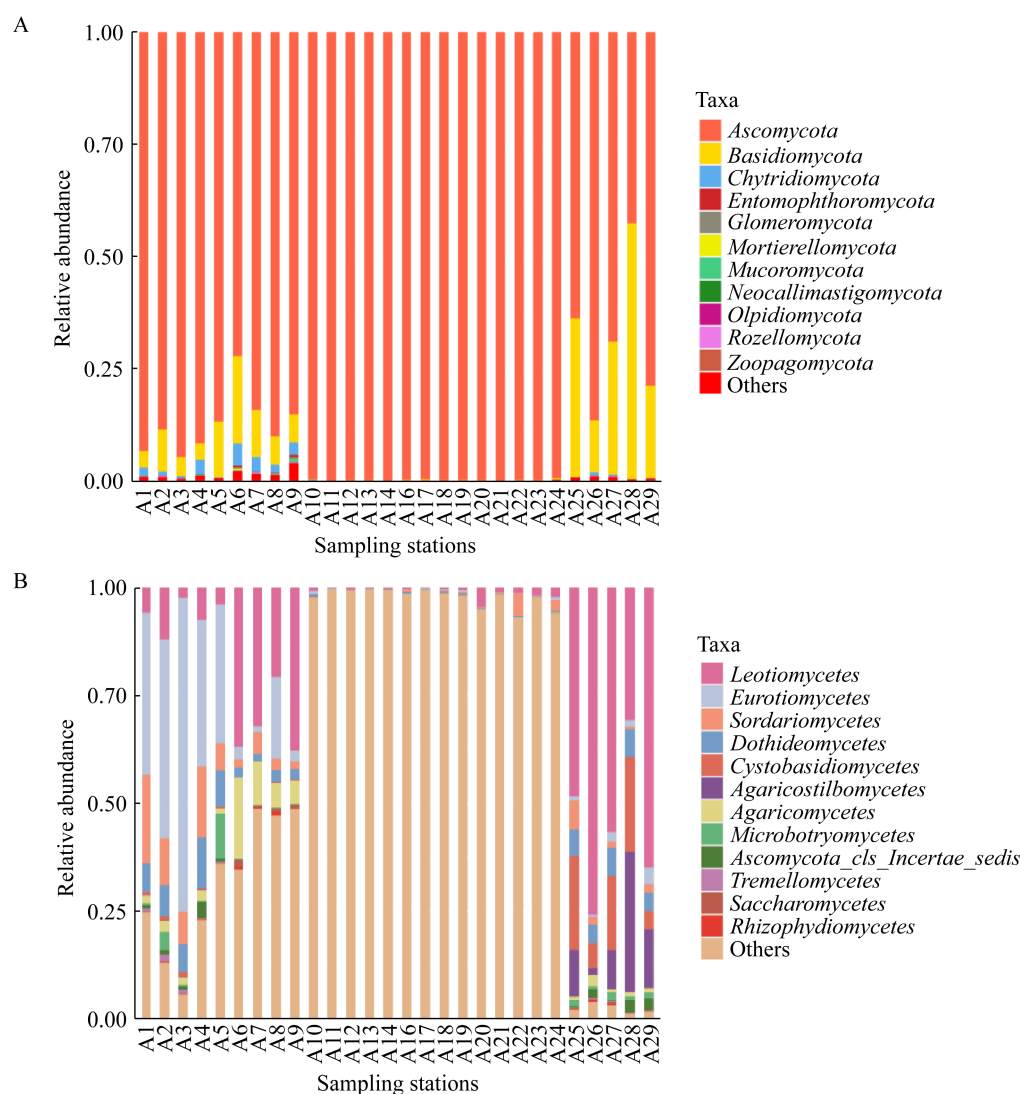


图 2 真菌群落的相对丰度
Figure 2 Relative abundance of fungal community
注: A: 门水平(0.1%); B: 纲水平(0.1%)
Note: A: Phylum level (0.1%); B: Class level (0.1%)

2.4 真菌群落共现网络分析

真菌群落共现网络具有无标度特征(幂律: $R^2=0.666$), 这与其相关随机网络(Erdős-Rényi 模型)不同, 表明真菌群落共现网络是非随机的。此外, 构建的真实共现网络的模块度(0.583)和聚类系数(0.520)分别大于随机网络的模块度(0.269)和聚类系数(0.036), 表明真实网络具有“小世界”特性和模块化结构。如图 6 所示, 真菌群落共现网络包含 215 个节点, 由 923 条边连接。整个赤潮暴

发期间真菌群落共现网络的节点主要由 *Helotiales* (43.0%)、*Eurotiales* (5.45%)、*Xylariales* (4.24%)、*Saccharomycetales* (3.64%)和 *Agaricostilbales* (3.64%) 组成, 而且同种类群内部的互作要高于各类群间的互作。此外, 真菌群落共现网络包含 5 个主要模块, 模块 I-V 分别占整个网络的 28.5%、24.2%、24.2%、10.9%和 3.64%; 同一模块多由同一类群组成, 如模块 I 主要为 *Helotiales*, 模块 II 包含大量 *Eurotiales*。

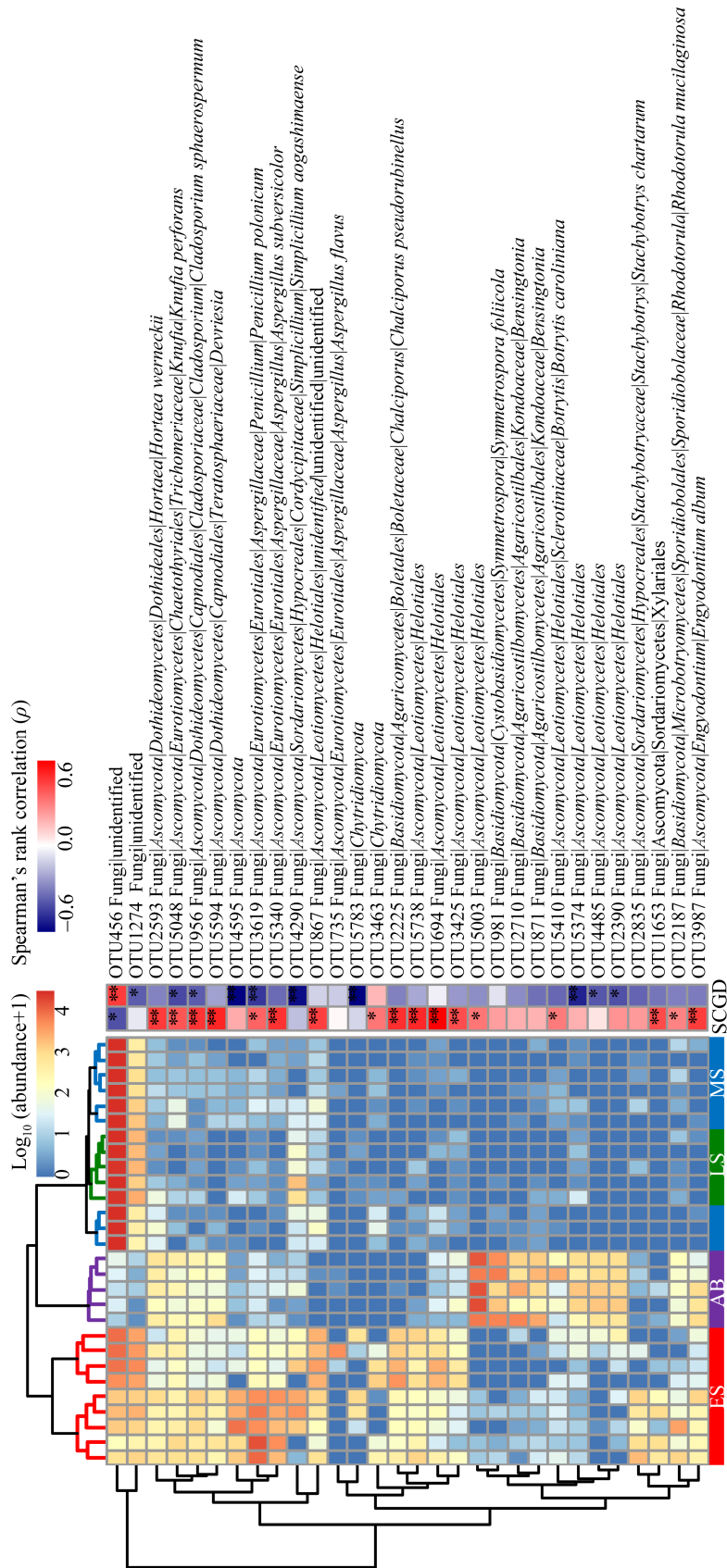


图 3 丰度最高的 30 个 OTU 丰度及其与 2 种赤潮生物之间的相关性

Figure 3 Abundance of the 30 most abundant OTUs and their correlations with two harmful algal species

注: GD: 柔弱几内亚藻; SC: 中肋骨条藻

Note: GD: *Guinardia delicatula*; SC: *Skeletonema costatum*

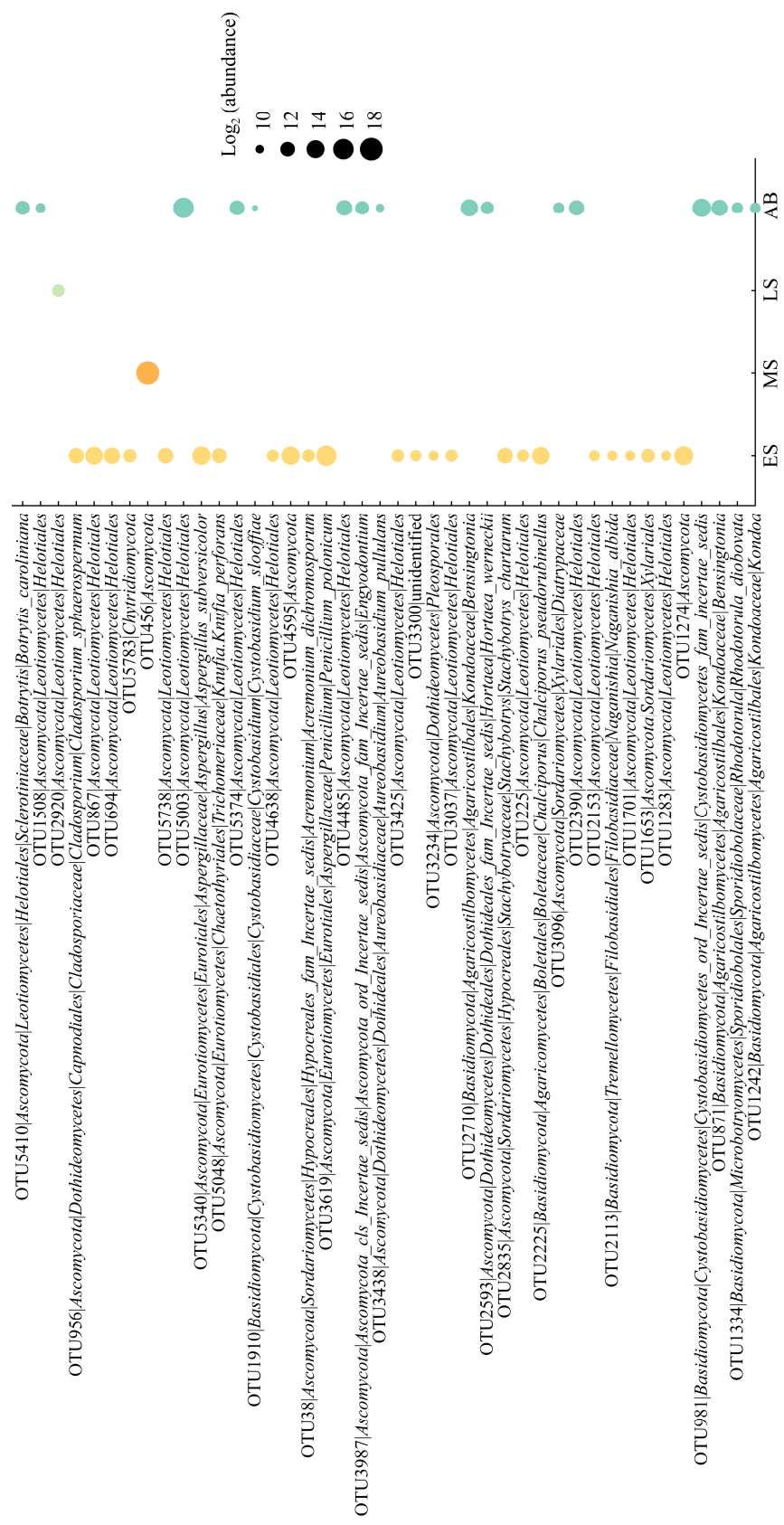


图 4 赤潮 4 个阶段的指示微生物及其相对丰度
Figure 4 Indicator species and their relative abundance in four bloom stages

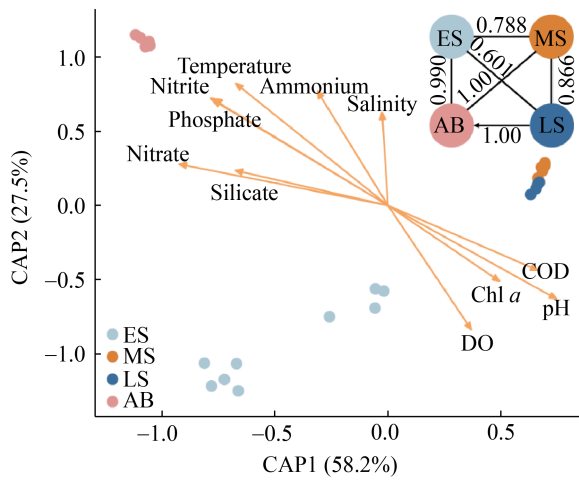


图 5 真菌群落结构差异及其驱动因素
Figure 5 Differences of fungal community and their correlation with environmental factors
注:基于 CAP 分析的真菌群落结构演替特征,并利用 ANOSIM 检验各个阶段的差异性(右上图, 所有 $P<0.05$)
Note: Succession patterns of fungal community were analyzed by CAP, and the differences of fungal community between two bloom stages were analyzed by ANOSIM (upper right, all $P<0.05$)

表 2 PERMANOVA 分析真菌群落演替与环境因子的关系(基于 Bray-Curtis 距离)

Table 2 PERMANOVA analysis based on Bray-Curtis dissimilarity for correlations between environmental variables and fungal community

Variables	R^2	P
暴发阶段 Bloom stages	0.725	<0.001
硝酸盐 Nitrate	0.367	<0.001
亚硝酸盐 Nitrite	0.354	<0.001
磷酸盐 Phosphate	0.343	<0.001
温度 Temperature	0.318	<0.001
pH	0.308	<0.001
化学需氧量 COD	0.223	<0.001
硅酸盐 Silicate	0.205	<0.01
溶解氧 DO	0.194	<0.01
叶绿素 a Chl a	0.161	<0.01
铵盐 Ammonium	0.159	<0.01
盐度 Salinity	0.083	0.072

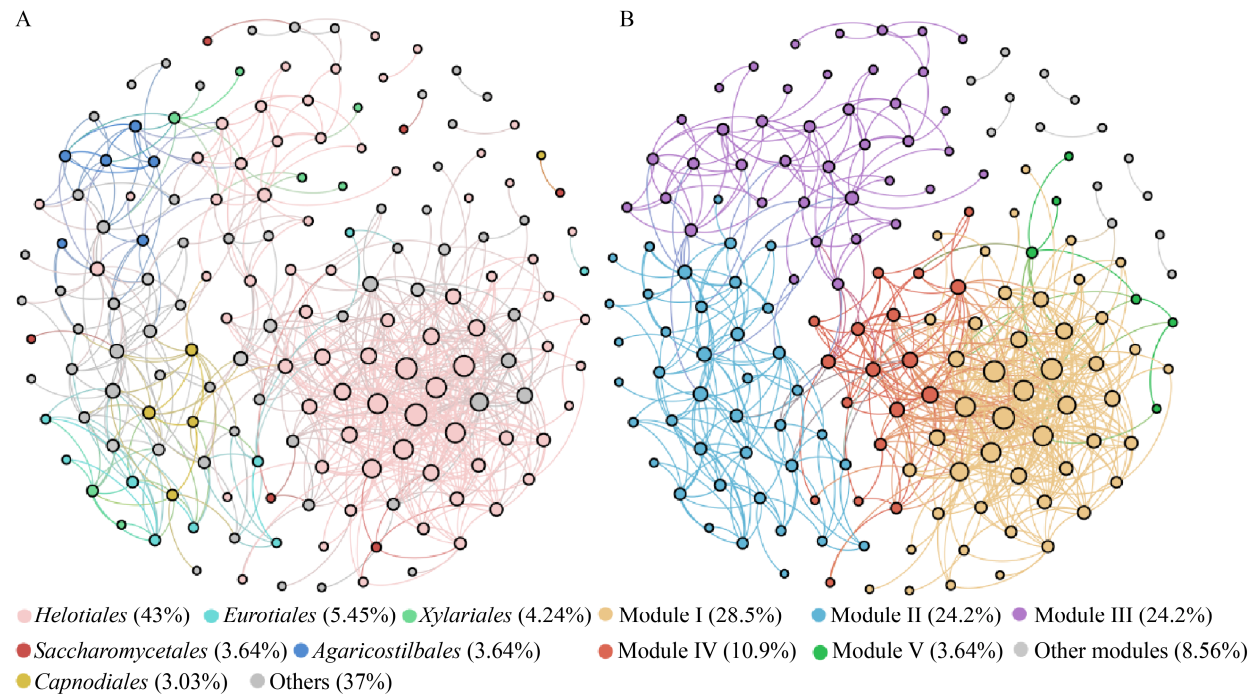


图 6 真菌群落共现网络
Figure 6 Co-occurrence network of fungal community
注: A: 网络节点根据目水平物种着色; B: 网络模块。节点大小指示其所连接边的数量
Note: A: Nodes colored by taxa at order level; B: Modules. The size of each node is proportional to the number of connections

3 讨论

硅藻赤潮发生对水体环境及微生物群落的组成和结构有显著影响,此前的研究发现象山港春季赤潮暴发推动了浮游植物和原核微生物群落结构及其共现模式的演替过程^[12-13]。真菌群落与浮游植物及原核微生物群落存在密切的互作关系,如 Frenken 等发现真菌能够寄生于硅藻中,而且大量富集的情况下可导致硅藻生物量的降低^[21]。研究表明,原核微生物能够降解抑制真菌生长的有毒化合物或者多糖,并且通过固氮作用为能够降解木质素的真菌提供氮源^[22-23]。此外,原核微生物能够利用浮游植物产生的有机质,而真菌作为有效分解剂,能够促进碳矿化过程的进行^[24-25],这对于维持海洋生态系统中的生物地球化学循环具有重要意义。目前针对赤潮暴发过程浮游植物与原核微生物群落的研究已较多,对微生物群落的重要成员——真菌群落的演替模式及共现关系的研究仍需深入阐述。

3.1 象山港硅藻赤潮中真菌群落 α 多样性

作为水体微食物环的重要组成部分,真菌不但可分解代谢水体中不易降解的有机质^[26],也可分解水生动物残体,同时也会通过种间关系的相互作用影响浮游植物群落、水生动物群落的组成结构^[27]。因此,真菌群落的多样性特征、组成、结构变化可以反映微生物群落应对环境变化的响应机制。本研究中真菌群落的 α 多样性指数在赤潮暴发的不同阶段均差异显著,从 ES 期到 AB 期呈现先降后升的变化趋势,与 Sun 等^[28]的研究结果类似,推测在赤潮暴发早期,真菌群落 α 多样性受赤潮暴发的影响较弱,此时真菌群落物种的多样性和丰富度达到最大;赤潮暴发中期,个别类群如子囊菌门的相对丰度显著升高,使得真菌群落的 α 多样性指数降低;而在赤潮暴发后,物种多样性恢复, α 多样性指数上升。除赤潮生消外,硝酸盐、亚硝酸盐及磷酸盐对真菌群落 α 多样性均有显著影响。研究发现,当水体中的

营养盐含量上升时,真菌群落的多样性也随之升高^[28];但在氮、磷等营养盐丰富的海区,真菌多样性随营养盐的升高反而降低^[29],这与我们的研究结果类似。因此,赤潮过程中藻类生消和营养盐含量的变化对真菌群落 α 多样性均有显著影响。

3.2 真菌群落的组成对赤潮生消的响应特征

随着硅藻赤潮暴发的进程,真菌群落组成发生了显著变化。子囊菌门在赤潮暴发的各个阶段均占据主导地位,这可能是因为子囊菌门作为腐生真菌,可以吸收利用藻类生长及裂解死亡时释放的大量有机物质,进而快速生长;在赤潮中后期子囊菌门占据绝对优势,推测赤潮暴发中后期大量藻类裂解,释放的大量有机质促进了子囊菌门的生长。Sun 等^[28]的研究同样发现子囊菌门在整个赤潮过程中均占优势,表明不同水域该类群均能迅速响应赤潮藻生消。基于 Spearman 相关性分析可以看出,门水平上的优势类群子囊菌门和担子菌门的相对丰度与中肋骨条藻的丰度显著相关(图 3)。此外,一些真菌,如 *Eurotiomycetes*、*Dothideomycetes* 和 *Leotiomyces* 等的相对丰度在暴发结束后升高且与赤潮藻的丰度呈显著负相关,可能是因为该物种通常具有机会性且快速生长的特性,在藻际环境中具有较强的竞争优势^[30]。

指示微生物是在环境中能指示环境变化特性的具有代表性的微生物。本研究发现,ES 和 AB 阶段比 MS 和 LS 含有更多的指示微生物(图 4),说明了 MS 和 LS 阶段环境的特殊性,可富集特定的真菌并利于其生长^[31]。筛选的指示微生物有大量属于柔膜菌目,其是一类全球范围内广泛分布的腐生生物,丰度变化通常与营养盐浓度和有机物质含量有关^[32],可参与有机物的分解作用^[33]。此外,在 ES 和 LS 中,隶属于子囊菌门的指示类群丰度较高,说明赤潮不同阶段由于环境的差异,富集的指示微生物也有较大差异。综上所述,赤潮发生过程对真菌群落有重要影响,藻类裂解释

放的有机质对真菌生长有显著的促进作用, 同时也会在赤潮生消的不同阶段富集特定的微生物。

3.3 真菌群落的结构变化及主要驱动因子

真菌群落结构的演替主要受赤潮藻类的生消影响。赤潮藻在生长、繁殖特别是裂解死亡时会向环境中释放大量有机质, 对以降解有机质维持自身生长的真菌群落结构具有强烈的塑造作用。此外, 环境因子如硝酸盐、亚硝酸盐、磷酸盐的变化对真菌群落组成和结构也有显著影响^[34]。由于象山港水产养殖和海上活动较多, 容易受陆源性输入营养物质的影响, 可能是微生物群落受环境因子波动影响的重要原因^[13]。有研究发现温度对真菌群落具有显著驱动性^[35]; 一项针对全球范围的海洋真菌群落结构分析发现环境因素、硝酸盐含量与真菌群落组成密切相关, 并解释了比地理距离更大的群落差异^[36]。Zhou 等^[37]发现氮/磷失衡是长江口赤潮暴发和优势种变化的主要原因, 而且影响真菌群落在物质循环中的功能。此外, 我们也观察到赤潮期间硝酸盐的浓度持续降低, 暴发后期和暴发后升高; Teeling 等的研究表明赤潮暴发期间氮底物的消耗会导致微生物群落组成变化^[31], 因而对真菌群落会产生显著影响。因此, 在硅藻赤潮暴发过程中, 赤潮生物的生消和环境因子的变化是影响真菌群落组成与结构变化的主要因素。

3.4 真菌的共现网络特征

网络分析是阐明微生物之间潜在相互作用的有效工具, 有助于了解微生物群落组成和丰富度之外的生态构建机制。在此次赤潮的研究中, 真菌群落共现网络具有非随机、无标度的特征, 与其他研究一致^[38]。整个赤潮暴发期间真菌群落共现网络中 *Helotiales*、*Eurotiales*、*Xylariales*、*Saccharomycetales* 和 *Agaricostilbales* 存在明显的互作关系。*Eurotiales* 类群具有在全球范围广泛分布的特征, 而且与大量海藻存在共生关系^[39], 因

此推测在硅藻赤潮暴发期间, 该类群可能与浮游植物存在复杂的种间共生关系。*Saccharomycetales* 可以通过改变其细胞膜组成以耐受深海高静水压, 而且在缺氧的环境下能够快速定殖^[40]。赤潮暴发后期水体溶解氧含量下降, 或对 *Saccharomycetales* 的定殖具有促进作用。在缺氧红树林沉积物中, 隶属于担子菌门的 *Agaricostilbales* 丰度较高, 该类群具有降解木质素和腐植酸等复杂有机物的能力^[8-9], 可为海洋环境中微生物的生长与繁殖提供一定的物质基础。共现网络分析进一步揭示了微生物之间的互作关系及协同效应, 其可能在维持微生物群落的稳定性和生态功能中起着重要作用。

4 结论

本研究发现 2017 年春季象山港硅藻赤潮过程中真菌群落的 α 多样性差异显著且主要受到亚硝酸盐和硝酸盐等环境因子的影响; 真菌群落的主要优势类群是子囊菌门和担子菌门, 其中子囊菌门在赤潮暴发的各阶段丰度都较高, 并且与赤潮藻中肋骨条藻的生长显著相关。在此次硅藻赤潮过程中, 除赤潮生物丰度外, 氮、磷也是驱动真菌群落组成和群落结构变异的主要环境因子。同时, 本研究发现在门水平以下, 如纲水平中有大量属于子囊菌门的序列未被注释, 这与刘晋仙等^[41]的研究结果类似, 2 项研究都使用 UNITE 真菌 ITS 序列数据库进行物种比对注释, 都有大量序列在较高分类水平无法注释, 推测可能与数据库序列不完善有关。在今后的研究中可考虑使用多个数据库进行比对分析, 以弥补各数据库之间的不足, 获得更完善的序列注释信息。此外, 本文主要研究的是赤潮暴发过程中真菌群落的演替模式及共现关系, 在未来的研究中可将微生物作为一个整体, 进而探讨各微生物群落之间的互作关系, 或对揭示赤潮发生机制及进展过程具有重要意义。

REFERENCES

- [1] Gu Y, Xiang YT. Relationship of red tide and eutrophication in Xiangshan Harbour area[J]. Marine Environmental Science, 2002(3): 67-69 (in Chinese)
谷颖, 项有堂. 象山港海域富营养化与赤潮的关系[J]. 海洋环境科学, 2002(3): 67-69
- [2] Yang Z, Ran LH, Xu XQ, Ji ZQ, Zhu Y, Chen QN, Chen JF. The behavior of phosphate in the Xiangshan Bay and its potential impact on harmful algal blooms[J]. Haiyang Xuebao, 2018, 40(10): 61-70 (in Chinese)
杨志, 冉莉华, 徐晓群, 季仲强, 朱勇, 陈倩娜, 陈建芳. 象山港水体的磷酸盐及其对赤潮的潜在影响[J]. 海洋学报, 2018, 40(10): 61-70
- [3] Delmont TO, Hammar KM, Ducklow HW, Yager PL, Post AF. *Phaeocystis antarctica* blooms strongly influence bacterial community structures in the Amundsen Sea polynya[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5
- [4] Duarte S, Baerlocher F, Pascoal C, Cassio F. Biogeography of aquatic hyphomycetes: current knowledge and future perspectives[J]. Fungal Ecology, 2016, 19: 169-181
- [5] Li W. Current status, problems and future prospects of the studies on molecular ecology of marine fungi[J]. Mycosystema, 2019, 38(7): 1021-1032 (in Chinese)
李伟. 海洋真菌分子生态学研究概况、问题与展望[J]. 菌物学报, 2019, 38(7): 1021-1032
- [6] Guest RK, Smith DW. A potential new role for fungi in a wastewater MBR biological nitrogen reduction system[J]. Journal of Environmental Engineering and Science, 2002, 1(6): 433-437
- [7] Weber SD, Ludwig W, Schleifer KH, Fried J. Microbial composition and structure of aerobic granular sewage biofilms[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(19): 6233-6240
- [8] Arfi Y, Marchand C, Wartel M, Record E. Fungal diversity in anoxic-sulfidic sediments in a mangrove soil[J]. Fungal Ecology, 2012, 5(2): 282-285
- [9] Mitra S, Bianchi TS, Guo L, Santschi PH. Terrestrially derived dissolved organic matter in the Chesapeake Bay and the middle Atlantic Bight[J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2000, 64(20): 3547-3557
- [10] Xu W, Li GW, Huang XL, Luo ZH. Fungal diversity study in the deep sea sediments of three oceans by culture-dependent approach[J]. Journal of Applied Oceanography, 2015, 34(1): 103-110 (in Chinese)
徐伟, 李广伟, 黄翔玲, 骆祝华. 三大洋深海沉积物样品可培养真菌多样性研究[J]. 应用海洋学学报, 2015, 34(1): 103-110
- [11] Yin XL, Chen GX, Wang C, Wang XT, Yang X, Wang WQ. Effects of *Spartina alterniflora* invasion on soil fungi community structure and diversity in estuarine wetland[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2020, 40(6): 2186-2194 (in Chinese)
尹晓雷, 陈桂香, 王纯, 王晓彤, 阳祥, 王维奇. 互花米草入侵对河口湿地土壤真菌群落结构及多样性影响[J]. 环境科学学报, 2020, 40(6): 2186-2194
- [12] Zhang HJ, Wang K, Shen LX, Chen HP, Hou FR, Zhou XY, Zhang DM, Zhu XY. Microbial community dynamics and assembly follow trajectories of an early-spring diatom bloom in a semi-enclosed bay[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(18): e01000-e01018
- [13] Hou FR, Zhang HJ, Xie WJ, Zhou XY, Zhu XY, Zhang DM. Co-occurrence patterns and assembly processes of microeukaryotic communities in an early-spring diatom bloom[J]. Science of the Total Environment, 2020, 711: 134624
- [14] Chen HP, Zhu JL, Zhang DM, Zhu XY, Zheng KH, Wang K. Temporal and spatial distribution of bacterioplankton community in the Xiangshan Bay in summer 2013[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2018(6): 1268-1278 (in Chinese)
陈和平, 朱建林, 张德民, 祝翔宇, 郑凯宏, 王凯. 象山港 2013 年夏季浮游细菌群落的时空分布特征[J]. 海洋与湖沼, 2018(6): 1268-1278
- [15] State Oceanic Administration. The specification for marine monitoring-Part 4: seawater analysis: GB 17378.4-2007[S]. Beijing: Standards Press of China, 2008 (in Chinese)
国家海洋局. 海洋监测规范: 第 4 部分海水分析: GB 17378.4-2007[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [16] Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST[J]. Bioinformatics, 2010, 26(19): 2460-2461
- [17] Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGinn D, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, et al. Vegan: community ecology package[Z]. R package version 2.5-3, 2018. <https://www.webofscience.com/wos/alldb/full-record/WOS:000189220100019>
- [18] Kolde R. Pheatmap: pretty heatmaps[Z]. R Package Version 1.0.12. 2018. <https://CRAN.R-project.org/web/packages/pheatmap/index.html>
- [19] De Caceres M, Legendre P. Associations between species and groups of sites: indices and statistical inference[J]. Ecology, 2009, 90(12): 3566-3574
- [20] Lieberman E, Hauert, C, Nowak, MA. Evolutionary dynamics on graphs[J]. Nature 2005, 433: 312-316
- [21] Frenken T, Velthuis M, De Senerpont Domis LN, Stephan S, Aben R, Kosten S, Van Donk E, Van De Waal DB. Warming accelerates termination of a phytoplankton spring bloom by fungal parasites[J]. Global Change Biology, 2016, 22(1): 299-309
- [22] Boer WD, Folman LB, Summerbell RC, Boddy L. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2005, 29(4): 795-811

- [23] Hoppe B, Kahl T, Karasch P, Wubet T, Bauhus J, Buscot F, Krueger D. Network analysis reveals ecological links between n-fixing bacteria and wood-decaying fungi[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e88141
- [24] Jiang ZB, Chen QZ, Zeng JN, Liao YB, Shou L, Liu JJ. Phytoplankton community distribution in relation to environmental parameters in three aquaculture systems in a Chinese subtropical eutrophic bay[J]. Marine Ecology Progress Series, 2012, 446: 73-89
- [25] Treseder KK, Lennon JT. Fungal traits that drive ecosystem dynamics on land[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2015, 79(2): 243-262
- [26] Li C, Ma ZZ, Qiao SS, Liu JX, Chai BF. Analysis of driving forces underlying the structure of fungal community in temperate forest soils based on microcosm experiments[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2018(5): 811-817 (in Chinese)
李鑫, 马转转, 乔沙沙, 刘晋仙, 柴宝峰. 原位微宇宙法研究温带森林土壤真菌群落构建的驱动机制[J]. 环境学报, 2018(5): 811-817
- [27] Ishida S, Nozaki D, Grossart HP, Kagami M. Novel basal, fungal lineages from freshwater phytoplankton and lake samples. Environmental Microbiology Reports, 2015, 7(3): 435-441
- [28] Sun JY, Song Y, Ma ZP, Zhang HJ, Yang ZD, Cai ZH, Zhou J. Fungal community dynamics during a marine dinoflagellate (*Noctiluca scintillans*) bloom[J]. Marine Environmental Research, 2017, 131: 183-194
- [29] Khomich M, Davey ML, Kausarud H, Rasconi S, Andersen T. Fungal communities in Scandinavian lakes along a longitudinal gradient[J]. Fungal Ecology, 2017, 27: 36-46
- [30] Bernhard JM, Kormas K, Pachiadaki MG, Rocke E, Beaudoin DJ, Morrison C, Visscher PT, Cobban A, Starczak VR, Edgcomb VP. Benthic protists and fungi of Mediterranean deep hypersaline anoxic basin redoxcline sediments[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 605
- [31] Teeling H, Fuchs BM, Becher D, Klockow C, Gardebrecht A, Bennis CM, Kassabgy M, Huang SX, Mann AJ, Waldmann J, et al. Substrate-controlled succession of marine bacterioplankton populations induced by a phytoplankton bloom[J]. Science, 2012, 336(6081): 608-611
- [32] Kagami M, Amano Y, Ishii N. Community structure of planktonic fungi and the impact of parasitic chytrids on phytoplankton in lake inba, Japan[J]. Microbial Ecology, 2012, 63(2): 358-368
- [33] Blanchette RA, Held BW, Jurgens JA, McNew DL, Harrington TC, Duncan SM, Farrell RL. Wood-destroying soft rot fungi in the historic expedition huts of Antarctica[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(3): 1328-1335
- [34] Zheng BH, Wang XY, Li YJ, Chen Y, Li BL, Li YY, Chen ZJ. Community structure, function, and influencing factors of planktonic fungi in the danjiangkou reservoir[J]. Environmental Science, 2021, 42(1): 234-241 (in Chinese)
郑保海, 王晓宇, 李英军, 陈彦, 李百炼, 李玉英, 陈兆进. 丹江口库区浮游真菌组成与功能及其影响因素[J]. 环境科学, 2021, 42(1): 234-241
- [35] Liu YL, Zhang YB, Lin QL, Hu HQ, Wang JH. Fungal community in Zhanjiang Bay of South China and its relationship with environmental factors[J]. Mycosystema, 2015, 34(1): 53-64 (in Chinese)
刘月廉, 张瑜斌, 林巧玲, 胡汉桥, 王季槐. 广东湛江湾优势真菌群落结构及其与理化因子的关系[J]. 菌物学报, 2015, 34(1): 53-64
- [36] Tisthammer KH, Cobian GM, Amend AS. Global biogeography of marine fungi is shaped by the environment[J]. Fungal Ecology, 2016, 19: 39-46
- [37] Zhou MJ, Shen ZL, Yu RC. Responses of a coastal phytoplankton community to increased nutrient input from the Changjiang (Yangtze) River[J]. Continental Shelf Research, 2008, 28(12): 1483-1489
- [38] Ma B, Wang YL, Ye SD, Liu S, Stirling E, Gilbert JA, Faust K, Knight R, Jansson JK, Cardona C, et al. Earth microbial co-occurrence network reveals interconnection pattern across microbiomes[J]. Microbiome, 2020, 8(1): 82
- [39] Blanchette RA, Held BW, Arenz BE, Jurgens JA, Baltes NJ, Duncan SM, Farrell RL. An Antarctic hot spot for fungi at shackleton's historic hut on cape royds[J]. Microbial Ecology, 2010, 60(1): 29-38
- [40] Simonato F, Campanaro S, Lauro FM, Vezzi A, D'Angelo M, Vitulo N, Valle G, Bartlett DH. Piezophilic adaptation: a genomic point of view[J]. Journal of Biotechnology, 2006, 126(1): 11-25
- [41] Liu JX, Li C, Luo ZM, Wang X, Bao JB, Chai BF. Distribution pattern and diversity maintenance mechanisms of fungal community in subalpine lakes[J]. Environmental Science, 2019, 40(5): 2382-2393 (in Chinese)
刘晋仙, 李鑫, 罗正明, 王雪, 暴家兵, 柴宝峰. 亚高山湖群中真菌群落的分布格局和多样性维持机制[J]. 环境科学, 2019, 40(5): 2382-2393