

## 研究报告



## 南海环境微生物对聚球藻有机物质的响应

谢睿<sup>1,2</sup> 王煜<sup>1,2,3</sup> 焦念志<sup>\*1,2</sup> 郑强<sup>\*1</sup>

1 厦门大学海洋与地球学院 近海洋环境科学国家重点实验室 福建 厦门 361102

2 福建省海洋碳汇重点实验室 福建 厦门 361102

3 厦门大学环境与生态学院 福建 厦门 361102

**摘要:**【背景】海洋浮游植物产生的有机物质与异养细菌之间的相互作用是上层海洋物质和能量循环过程中的重要组成部分。【目的】探究寡营养海域微生物群落对聚球藻有机物(*Synechococcus*-derived organic matter, SOM)的响应和代谢利用过程,加深对海洋微生物介导的生物地球化学循环过程的认识。【方法】利用南海海域微生物群落,添加聚球藻有机物质后黑暗培养,对培养过程中有机碳、营养盐和活性微生物群落结构的变化进行追踪。【结果】在短期的培养过程中,有 60%–73% 的 SOM 被微生物所利用。 $\gamma$ -变形菌(*Gammaproteobacteria*)在培养过程中响应最快,也是最优势微生物类群。SOM 的加入改变了原位微生物群落结构,并且随着活性有机物质逐步被消耗,微生物群落结构也发生了演替。【结论】SOM 中的大部分物质都属于活性有机物质,可以快速地被微生物所降解利用。不同微生物类群响应不同生物可利用性有机物质,推动了海洋物质和能量的循环。

**关键词:** 南海, 聚球藻有机物质, 异养细菌

## The responses of environmental microbes from the South China Sea to *Synechococcus*-derived organic matter addition

XIE Rui<sup>1,2</sup> WANG Yu<sup>1,2,3</sup> JIAO Nian-Zhi<sup>\*1,2</sup> ZHENG Qiang<sup>\*1</sup>

1 State Key Laboratory for Marine Environmental Science, College of Ocean and Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361102, China

2 Fujian Key Laboratory of Marine Carbon Sequestration, Xiamen, Fujian 361102, China

3 College of Environment and Ecology, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361102, China

**Abstract:** [Background] The interaction between marine phytoplankton-derived organic matter and

**Foundation items:** National Key Research and Development Program of China (2018YFA0605800); National Natural Science Foundation of China (41776145); National Natural Science Foundation of China-United Nations Environment Programme (41861144018); China Ocean Mineral Resources Research and Development Association (DY135-E2-1-04); Fundamental Research Funds for the Central Universities (20720170107)

**\*Corresponding authors:** E-mail: JIAO Nian-Zhi: jiao@xmu.edu.cn; ZHENG Qiang: zhengqiang@xmu.edu.cn

**Received:** 28-03-2020; **Accepted:** 10-07-2020; **Published online:** 04-08-2020

**基金项目:** 国家重点研发计划(2018YFA0605800); 国家自然科学基金(41776145); 国家自然科学基金委员会与联合国环境规划署项目(41861144018); 中国大洋矿产资源研究开发协会项目(DY135-E2-1-04); 中央高校基本科研业务费专项资金(20720170107)

**\*通信作者:** E-mail: 焦念志: jiao@xmu.edu.cn; 郑强: zhengqiang@xmu.edu.cn

**收稿日期:** 2020-03-28; **接受日期:** 2020-07-10; **网络首发日期:** 2020-08-04

heterotrophic bacteria is an important part of biogeochemistry cycle in the upper ocean. **[Objective]** Studying the responses of microbial communities in oligotrophic environment to *Synechococcus*-derived organic matter (SOM) could increase our understanding of marine biogeochemistry cycle. **[Methods]** A SOM-addition incubation experiment was conducted in the South China Sea, and the variations of organic carbon, nutrients, and active microbial communities were monitored during the incubation. **[Results]** During the short-term incubations, 60%–73% of SOM was utilized by microbes. *Gammaproteobacteria* was the fastest responder, and the most dominant microbial population over the entire incubations. The addition of SOM changed the *in situ* microbial community structure, and the succession of microbial community structure was also observed corresponding the consumption of labile organic matter. **[Conclusion]** Most of the SOM belong to labile organic matter which could be quickly degraded and utilized by heterotrophic bacteria. Microbes could respond positively to phytoplankton-derived fresh organic matter, and their activities drive the biogeochemistry cycle in the ocean.

**Keywords:** The South China Sea, *Synechococcus*-derived organic matter, Heterotrophic bacteria

海洋占地球表面积的 71%，是地球上最大的碳库<sup>[1]</sup>。海洋碳循环也是全球碳循环中的重要组成部分，发挥着调节和缓冲全球气候变化的重要作用<sup>[2-3]</sup>。海洋浮游植物通过光合作用产生的初级生产力，可占地球年净初级生产力的一半<sup>[4]</sup>。在海洋中，浮游植物以溶解有机碳(dissolved organic carbon, DOC)或颗粒有机物碳(particulate organic carbon, POC)的形式将有机物质释放到水体环境中或者传递到其他营养级，其释放途径包括以下几类：生长过程中有机物的主动或被动释放、病毒的裂解作用、浮游动物的捕食以及衰亡浮游植物细胞的碎屑等<sup>[5]</sup>。这些有机物质中的很大一部分通过异养细菌的吸收利用进入了“微食物环(microbial loop)”<sup>[6]</sup>。“微食物环”理论的提出<sup>[6]</sup>，加深了人们对异养细菌在海洋物质和能量循环过程中的重要作用的认识。海洋中的异养细菌最终决定了有机碳的归宿：一部分变成异养细菌自身的生物量，一部分以二氧化碳的形式释放出去，还有一小部分转化为惰性有机物质(recalcitrant DOM, RDOM)在海洋中长期存储<sup>[7-10]</sup>。在有机碳的代谢利用过程中，异养细菌也推动了海洋中其他元素的生物地球循环，如氮、磷等<sup>[11-13]</sup>。

近年来海洋蓝细菌，主要包括原绿球藻(*Prochlorococcus*)和聚球藻(*Synechococcus*)，在海洋初级生产和碳循环过程中的重要作用被大家广

泛认识<sup>[14-15]</sup>。在寡营养环境下，蓝细菌对初级生产力的贡献可以与超微型真核浮游植物相媲美<sup>[16]</sup>。研究寡营养环境下蓝细菌光合作用产物与异养细菌之间的相互作用关系，对探究海洋物质和能量循环过程具有重要的意义。

南海(the South China Sea)作为全球最大的热带-亚热带陆架边缘海，其所属面积达  $3.5 \times 10^6 \text{ m}^2$ ，平均深度为 1 350 m，最深深度超过 5 500 m<sup>[17]</sup>。南海碳源汇的研究一直是中国科学家所关注的热点<sup>[18-20]</sup>。蓝细菌作为初级生产者在碳循环中有着不可忽视的作用<sup>[14]</sup>，并且与异养细菌有着密切的碳转化关系<sup>[21]</sup>，然而，目前对该海域微生物响应和转化代谢蓝细菌光合作用产物的研究仍相对缺乏。本研究选取了南海的两个站位：J4 (陆架)和 SEATS (海盆)，以聚球藻有机物质(*Synechococcus*-derived organic matter, SOM)作为添加有机碳源，在黑暗条件下进行培养。通过对培养过程中有机碳和营养盐变化的追踪，以及活性微生物群落结构变化的分析，探究南海微生物群落对 SOM 的响应和演替过程，以期加深对该海域生物地球化学循环过程的认识。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验站位与设计

#### 1.1.1 实验站位

实验站位为中国南海珠江口外陆坡区 J4 站位

(20.66°N; 114.67°E)和寡营养海盆区 SEATS 站位(18°N, 116°E)。搭载航次为 2016 年 11 月 2 号至 12 月 2 号的 973 南海航次。因两个站位都属于寡营养环境, 并且采水点为表层, 所以原位的氮磷无机营养盐(包括亚硝酸盐  $\text{NO}_2^-$ 、硝酸盐  $\text{NO}_3^-$  和磷酸盐  $\text{PO}_4^{3-}$ )都是在检测线以下(非痕量检测方法)。J4 站位的细菌丰度(培养起始点, 下同)为  $2.56 \times 10^5$  cells/mL, SEATS 站位的细菌丰度为  $1.58 \times 10^5$  cells/mL。J4 和 SEATS 站位总有机碳(total organic carbon, TOC)浓度分别为  $74.8 \mu\text{mol-C/L}$  和  $73.1 \mu\text{mol-C/L}$ 。

### 1.1.2 主要试剂和仪器

TRLzol<sup>®</sup> Reagent, Invitrogen 公司; RNeasy<sup>™</sup> Lysis Solution, Thermo 公司; Q5 DNA 高保真聚合酶, New England Biolabs 公司; TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit, Illumina 公司。总有机碳分析仪, 岛津公司; 营养盐自动分析仪器, Bran+Luebbe 公司; 荧光计, Thermo Scientific 公司。

### 1.1.3 实验设计

选用一株分离于厦门海域的聚球藻(*Synechococcus* sp.) XM-24<sup>[21]</sup>作为添加有机物质的来源。采用 SN 培养基进行培养<sup>[22]</sup>。将培养至对数生长期(约 15 d 左右)的藻体细胞  $8\ 000$  r/min 离心 15 min 进行收集, 去除上清培养液, 留下藻体细胞。之后用适当体积(15–30 mL)的超纯(Milli-Q)水对藻体细胞进行重悬, 并采用反复冻融的方法对藻体细胞进行破碎<sup>[23]</sup>。将处理后的藻体细胞破碎液置于  $-20\ ^\circ\text{C}$  保存备用。

采集 J4 和 SEATS 站位的表层海水(5 m), 海水先经过装有  $3\ \mu\text{m}$  滤膜的圆盘进行过滤(去除原生生物和大型浮游植物), 收集过滤后的海水, 分装到各个培养瓶(5 L)中。培养瓶为玻璃材质, 使用前经过  $2\ \text{mol/L}$  盐酸浸泡、Milli-Q 水清洗和  $450\ ^\circ\text{C}$  高温灼烧 4 h。实验组添加 SOM, 对照组不添加。实验组和对照组均设置 2 个平行重复。

## 1.2 总有机碳的采集与检测

### 1.2.1 TOC 的采集

利用移液管, 将约 20 mL 样品收集到 40 mL 的玻璃瓶中, 置于  $-20\ ^\circ\text{C}$  保存。实验中使用的玻璃耗材都经过  $2\ \text{mol/L}$  盐酸浸泡、Milli-Q 水清洗,  $450\ ^\circ\text{C}$  高温灼烧 4 h, 去除有机碳污染。

### 1.2.2 TOC 的检测

采用高温燃烧法, 使用总有机碳分析仪, 以纯度 99.995% 氧气作为载气, 催化剂在  $680\ ^\circ\text{C}$  下将样品中有机物质氧化为二氧化碳, 经过干燥除卤素后, 通过非色散红外进行检测。使用邻苯二磷酸氢钾制作标准曲线, 利用标准曲线斜率计算样品浓度, 并且在检测过程中利用 Hansell 实验室的标准深海海水(deep sea water, DSW)监测仪器状态。

## 1.3 营养盐的采集与检测

### 1.3.1 营养盐的采集

用移液管吸取样品 40 mL, 经  $0.45\ \mu\text{m}$  聚碳酸酯膜过滤, 滤液置于 50 mL 离心管中,  $-20\ ^\circ\text{C}$  保存。

### 1.3.2 营养盐的检测

检测的营养盐包括: 硝态氮( $\text{NO}_2^-$ 和  $\text{NO}_3^-$ )和磷酸盐( $\text{PO}_4^{3-}$ ), 采用营养盐自动分析仪器进行测定。

## 1.4 活性微生物群落结构样品的采集与检测分析

### 1.4.1 RNA 样品的采集与提取

使用过滤器对 RNA 样品进行采集。用移液管吸取 150 mL 样品, 海水通过  $0.2\ \mu\text{m}$  聚碳酸酯膜进行过滤, 将收集到的滤膜保存在加入了 1 mL RNA 保护液(RNeasy)的 1.5 mL 离心管中,  $-80\ ^\circ\text{C}$  保存。采用 Trizol 法对总 RNA 进行提取<sup>[24]</sup>。

### 1.4.2 高通量测序

样品送至上海派森诺生物科技有限公司进行活性微生物群落结构的检测分析。用引物 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3')和 907R (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3')进行细菌 16S rRNA 基因 V4–V5 区域的 PCR 扩增。PCR 采用 Q5 DNA 高保真聚合酶。PCR 反应体系(25  $\mu\text{L}$ ): Q5

Reaction Buffer 5  $\mu\text{L}$ , Q5 High-Fidelity GC Buffer 5  $\mu\text{L}$ , Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.25  $\mu\text{L}$ , dNTPs (200  $\mu\text{mol/L}$ ) 2  $\mu\text{L}$ , 正、反向引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 1  $\mu\text{L}$ , DNA 样品 2  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 8.75  $\mu\text{L}$ . PCR 反应条件: 98  $^{\circ}\text{C}$  30 s; 98  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 50  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 30 次循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  5 min。使用 TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit 进行文库构建。之后,在荧光计和 Agilent Bioanalyzer 2100 系统上进行文库质量的评估。最后,在 Illumina HiSeq 2500 平台上对文库进行测序,产生 450 bp 的配对末端读数,然后使用 FLASH 软件(V1.2.7, <http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>)进行组合。首先,使用 QIIME 对原始数据进行质量过滤,以去除质量不符合的。接着使用 Mothur37 中的 Chimera SLayer 算法去除嵌合体。之后,使用 UPARSE 软件(UPARSE V7.0.1001, <http://drive5.com/uparse/>)对操作分类单元(OTU)进行聚类,以 97% 的相似性为基准。最后,在 SILVA 数据库中进行比对,对 OTU 进行分类。高通量数据上传于 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 数据库,项目编号为 PRJNA613952。

## 2 结果与分析

### 2.1 培养过程中 TOC 浓度的变化

为了追踪培养过程中 SOM 的利用情况,检测了培养过程中 TOC 浓度的变化,结果如图 1A 和 1B 所示。J4 和 SEATS 站位培养体系中分别加入了约 149.4  $\mu\text{mol-C/L}$  和 135.6  $\mu\text{mol-C/L}$  的 SOM。在整个培养过程中,两个站位对照组中 TOC 浓度保持在一个较为平稳的状态;而实验组中 TOC 浓度都有明显的下降。

在 J4 站位实验组中,培养前 48 h 内 TOC 浓度有较大幅度下降,从 0 h 的 224.2  $\mu\text{mol-C/L}$  下降到 48 h 的 103.9  $\mu\text{mol-C/L}$ ; 48 h 后,TOC 浓度的下降出现了平台期,并且一直维持到培养结束。在 SEATS 站位实验组中,TOC 浓度从 0 h 的 208.2  $\mu\text{mol-C/L}$  下降为 24 h 的 150.7  $\mu\text{mol-C/L}$ ;之

后 TOC 浓度的下降出现平台期,浓度下降幅度变小;在培养结束时,TOC 浓度为 126.8  $\mu\text{mol-C/L}$ 。总而言之,TOC 浓度的显著下降体现了 J4 和 SEATS 站位原位微生物群落对 SOM 快速响应以及 SOM 较好的生物可利用性。但是,在培养周期内 SOM 并没有被完全降解利用,说明对于 J4 和 SEATS 站位的微生物群落来说,SOM 并不完全属于活性有机物质(labile DOM, LDOM)。此外,培养环境中较低浓度的无机氮可能限制了 SOM 被进一步利用。

### 2.2 培养过程中营养盐的变化

研究检测的营养盐包括  $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$  和  $\text{PO}_4^{3-}$ 。原位环境(表层海水)的营养盐均低于仪器检测线,所以没能获得对照组中营养盐数据。实验组中,由于 SOM 的添加,两个站位实验组中营养盐的浓度变化明显。

对于  $\text{NO}_2^-$  和  $\text{NO}_3^-$  来说,在 J4 站位实验组中(图 1C 和 1E),起始  $\text{NO}_2^-$  和  $\text{NO}_3^-$  浓度分别为 2.4  $\mu\text{mol/L}$  和 3.2  $\mu\text{mol/L}$ ,在整个培养过程中, $\text{NO}_2^-$  和  $\text{NO}_3^-$  浓度在小范围内波动;在培养结束时,浓度分别为 2.5  $\mu\text{mol/L}$  和 3.5  $\mu\text{mol/L}$ ,与起始的浓度相差不大。在 SEATS 站位中(图 1D 和 1F), $\text{NO}_2^-$  和  $\text{NO}_3^-$  浓度变化有着相似的规律,起始  $\text{NO}_2^-$  和  $\text{NO}_3^-$  浓度分别为 1.7  $\mu\text{mol/L}$  和 2.2  $\mu\text{mol/L}$ ,在培养结束时浓度分别为 1.9  $\mu\text{mol/L}$  和 3.5  $\mu\text{mol/L}$ 。整个过程伴随着  $\text{NO}_2^-$  和  $\text{NO}_3^-$  的生成和再利用。

对于  $\text{PO}_4^{3-}$  来说,J4 (图 1G)和 SEATS (图 1H) 站位实验组的起始浓度分别为 1.1  $\mu\text{mol/L}$  和 0.8  $\mu\text{mol/L}$ ,并且在培养过程中有类似的变化规律:从 0 h 到 12 h 过程中有一个小幅度的下降,之后保持上升的趋势;到培养结束时,浓度分别为 1.9  $\mu\text{mol/L}$  和 1.5  $\mu\text{mol/L}$ 。这个结果说明微生物在降解利用 SOM 的过程中将含磷有机物质以无机磷酸盐的形式释放出来,体现了微生物在海洋磷循环过程中的重要作用。

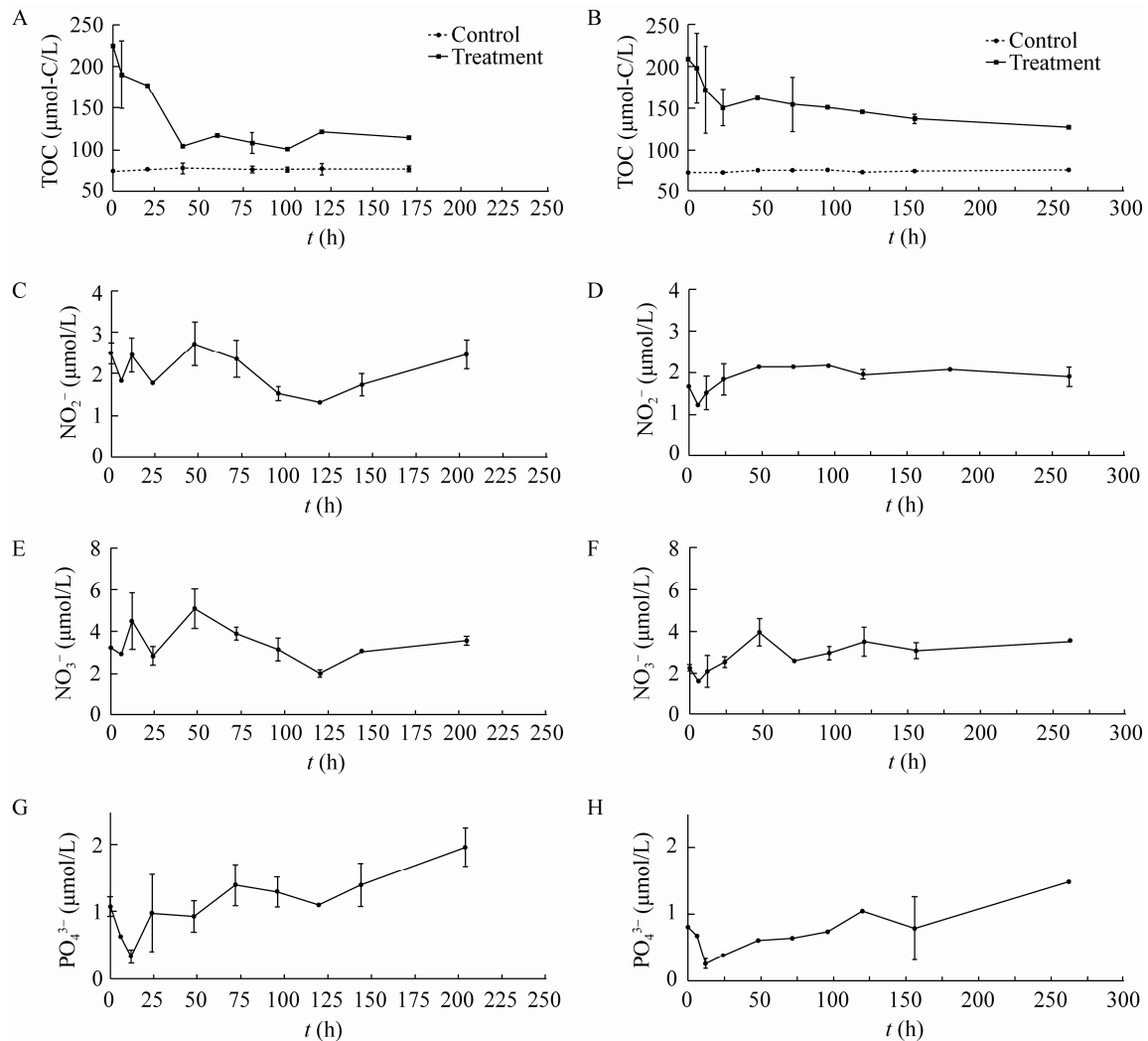


图1 J4 (A、C、E、G)和 SEATS (B、D、F、H) 站位培养过程中 TOC 和营养盐( $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$ 和  $\text{PO}_4^{3-}$ ) 的浓度变化  
Figure 1 The variation of TOC and nutrients ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{PO}_4^{3-}$ ) concentration during the incubation of station J4 and SEATS

## 2.3 培养过程中活性微生物群落结构的变化

### 2.3.1 对照组中活性微生物群落组成的变化

为了探究培养过程中活性微生物群落结构的变化, 分别从 J4 和 SEATS 站位培养体系中获得 301 059 条和 404 707 条 16S rRNA 基因序列。

对照组中没有额外添加有机物质, 但置于黑暗的条件下, 活性微生物群落结构也发生了一些变化, 结果如图 2 所示。J4 和 SEATS 站位的优势微生物类群较为相似, 在原位环境中优势的微生物类

群主要为  $\alpha$ -变形菌 (*Alphaproteobacteria*) (34.97%–36.66%)、 $\gamma$ -变形菌 (*Gammaproteobacteria*) (23.29%–33.91%)、蓝细菌 (*Cyanobacteria*) (22.33%–34.57%) 和拟杆菌 (*Bacteroidetes*) (1.37%–4.28%)。

随着培养的进行, *Alphaproteobacteria* 的相对丰度在两个站位中的变化都不大, 培养结束时, 在 J4 和 SEATS 站位的相对丰度分别为 32.70% 和 37.05%。虽然 *Alphaproteobacteria* 相对丰度没有发

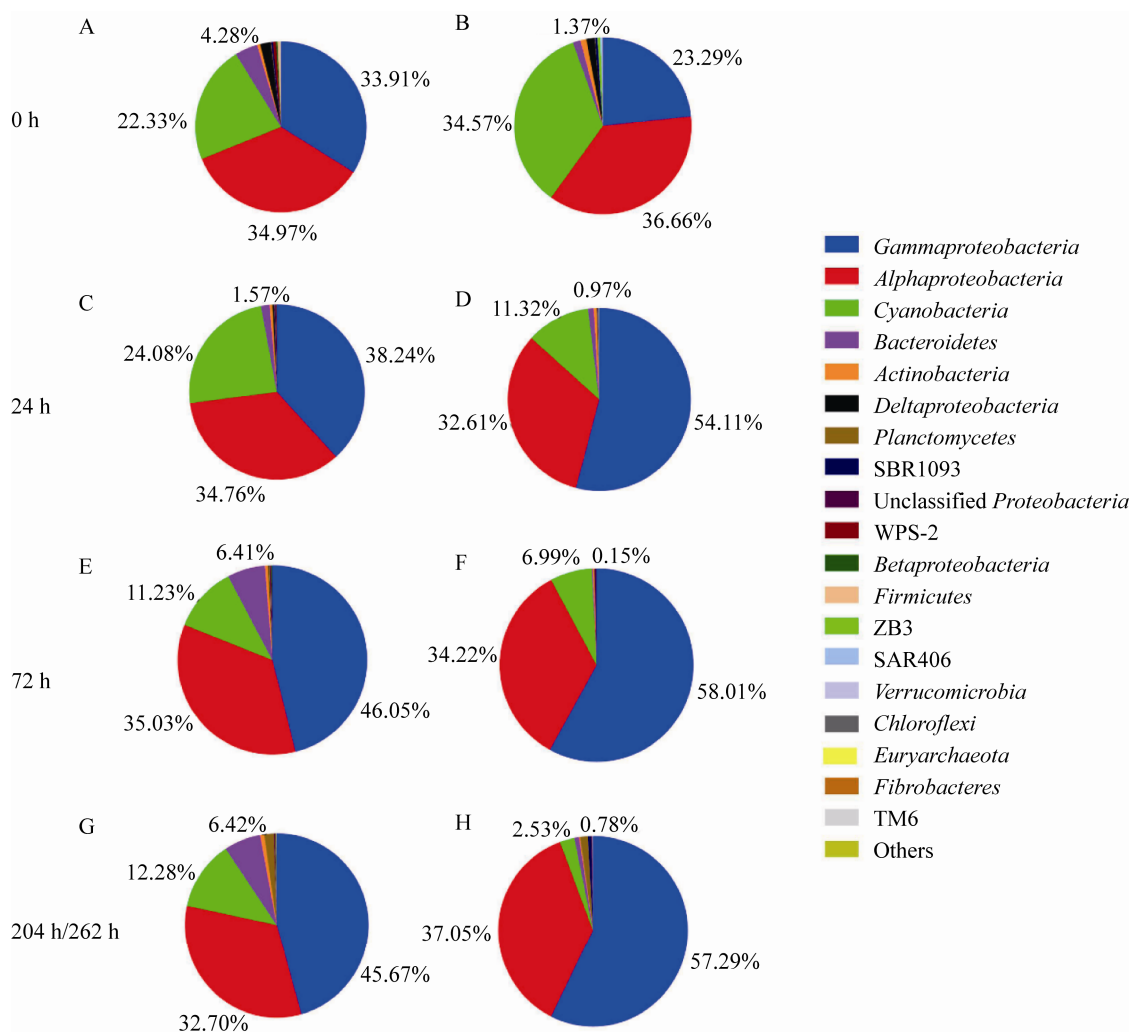


图 2 J4 (A、C、E、G)和 SEATS (B、D、F、H) 站位对照组中活性微生物群落结构变化

Figure 2 The relative abundance of bacterial taxonomic community composition of J4 (A, C, E, G) and SEATS (B, D, F, H) in phylum level

注：门水平，变形菌门除外，其为纲水平。

Note: Except for *Proteobacteria*, which are divided into classes.

生较明显变化，但是其中优势类群从早期的 *Pelagibacteraceae* 变为后期的 *Rhodobacteraceae*。然而 *Gammaproteobacteria* 在两个站位中的相对丰度都呈现上升趋势，在 J4 站位，*Gammaproteobacteria* 的相对丰度从 0 h 的 33.91% 上升到了 204 h 的 45.67%；在 SEATS 站位，从 0 h 的 36.66% 上升到 262 h 的 57.29%，占到了培养体系活性微生物群落的一半以上。在培养的起始点，*Cyanobacteria* 在 SEATS 站有着更高的相对丰度(34.57%)，而 J4 站

为 22.33%。随着黑暗培养的进行，在两个站位中 *Cyanobacteria* 相对丰度都有所下降。在 J4 站位，培养 72 h 时 *Cyanobacteria* 相对丰度下降为 11.23%，204 h 时相对丰度仍保持在一定水平(12.28%)。相比之下，在 SEATS 站 *Cyanobacteria* 有较大的下降幅度：72 h 时 *Cyanobacteria* 相对丰度为 6.99%，培养结束时相对丰度降为 2.53%。此外，J4 站位有更高的 *Bacteroidetes* 相对丰度(4.28%)，而在 SEATS 站仅为 1.37%。在培养结束时，J4 站位中

的 *Bacteroidetes* 相对丰度有所上升(6.42%), SEATS 站位降为 0.78%。

对照组结果体现了 *Gammaproteobacteria* 类群对环境变化较强的适应能力。此外, 虽然 *Cyanobacteria* 是光合自养生物, 但是黑暗条件下仍可以维持一定的生物活性。相比之下, 陆坡环境的 J4 站 *Cyanobacteria* 类群在黑暗环境能存活更长时间。

### 2.3.2 实验组中活性微生物群落组成的变化

J4 和 SEATS 站位实验组基于 16S rRNA 基因的微生物群落结构(目水平)变化如图 3 所示。在 J4 站位实验组中(图 3A), 0 h 的活性微生物类群主要为: 聚球藻(*Synechococcales*) (21.90%)、立克次氏体目(*Rickettsiales*) (17.89%, 主要为 *Pelagibacteraceae*)、海洋螺旋菌(*Oceanospirillales*) (13.23%, 主要为 *Candidatus\_Portiera*)、红杆菌(*Rhodobacterales*) (8.75%)、交替单胞菌(*Alteromonadales*) (8.51%) 和假单胞菌目(*Pseudomonadales*) (6.41%)。SOM 的加入对活性微生物群落结构产生了很大的影响。到 6 h 时, 培养体系中的优势活性微生物类群变为: *Alteromonadales* (62.49%, 主要为 *Alteromonas*)、弧菌目(*Vibrionales*) (29.33%, 主要为 *Pseudoalteromonas*) 和黄杆菌(*Flavobacteriales*) (3.33%)。直到 48 h 时, *Gammaproteobacteria* 中的 *Alteromonadales* 和 *Vibrionales* 仍然是培养体系中的优势微生物类群。同时, *Rhodobacterales* 的相对丰度在 6–48 h 呈现增加的趋势, 从 6 h 的 0.66% 增加为 48 h 的 15.40%, 其中主要为 *Nautella*。在 72 h 时, 培养体系内的活性微生物群落结构发生了很大的变化, 优势微生物类群变为: 军团菌目(*Legionellales*) (46.34%)、噬纤维菌目(*Cytophagales*) (10.24%, 主要为 *Roseivirga*)、*Rhodobacterales* (9.80%) 和 *Unclassified Gammaproteobacteria* (8.73%) 和 *Flavobacteriales* (5.33%)。相比 6 h 的高相对丰度, 在 72 h 时 *Alteromonadales* 的相对丰度仅为 5.35%。*Gammaproteobacteria* 中的 *Legionellales* 取代了

*Alteromonadales* 的优势地位, 并在培养后期保持优势地位, 在 204 h 其相对丰度仍有 45.03%。此外, *Cytophagales* 的相对丰度在 72 h 时也有所上升(10.24%), 并在培养后期保持上升趋势, 在 204 h 相对丰度可达 17.13%。在培养结束时, 优势的活性微生物类群变为: *Legionellales* (45.03%)、*Cytophagales* (17.13%)、*Flavobacteriales* (5.40%)、*Rhodobacterales* (3.93%) 和 *Sphingomonadales* (3.23%)。

在 SEATS 站实验组中(图 3B), 0 h 的活性微生物类群主要为: *Synechococcales* (34.47%)、*Rickettsiales* (28.35%, 主要为 *Pelagibacteraceae*)、*Oceanospirillales* (8.68%, 主要为 *Candidatus\_Portiera*)、*Alteromonadales* (6.93%, 主要为 *Alteromonas*) 和 *Rhodobacterales* (3.14%)。在培养 6 h 时, 优势活性微生物类群变为: *Unclassified Gammaproteobacteria* (47.82%)、*Alteromonadales* (39.91%, 主要为 *Alteromonas*)、*Vibrionales* (4.98%, 主要为 *Pseudoalteromonas*) 和 *Synechococcales* (3.96%)。之后, *Unclassified Gammaproteobacteria* 的相对丰度呈现逐渐下降的趋势, 到培养结束时, 其相对丰度仅为 1.47%。*Alteromonadales* 的相对丰度在 96 h 之前都保持在一个相对较高的水平(29.94%–42.43%), 96 h 后其相对丰度下降, 培养结束时其相对丰度仅为 1.65%。*Rhodobacterales* 在 96 h 时有最高相对丰度, 为 15.81%。在 120 h 时活性微生物群落结构有较大的变化: *Legionellales* (40.79%)、*Alteromonadales* (19.44%)、*Rhodobacterales* (10.15%)、*Unclassified Gammaproteobacteria* (8.30%)、*Flavobacteriales* (6.18%) 和 *Vibrionales* (5.70%)。*Gammaproteobacteria* 中的 *Legionellales* 成为优势活性微生物类群, 其相对丰度为 40.79%, 直到培养结束 *Legionellales* 都保持着优势地位, 在 262 h 时其相对丰度仍有 51.26%, 占到了活性微生物群落的一半。*Flavobacteriales* 在 120 h 有最高的相对丰度, 为 12.74%。在培养后期, *Cytophagales* 成为了优势微生物类群, 在 156 h 之前, 其相对丰度

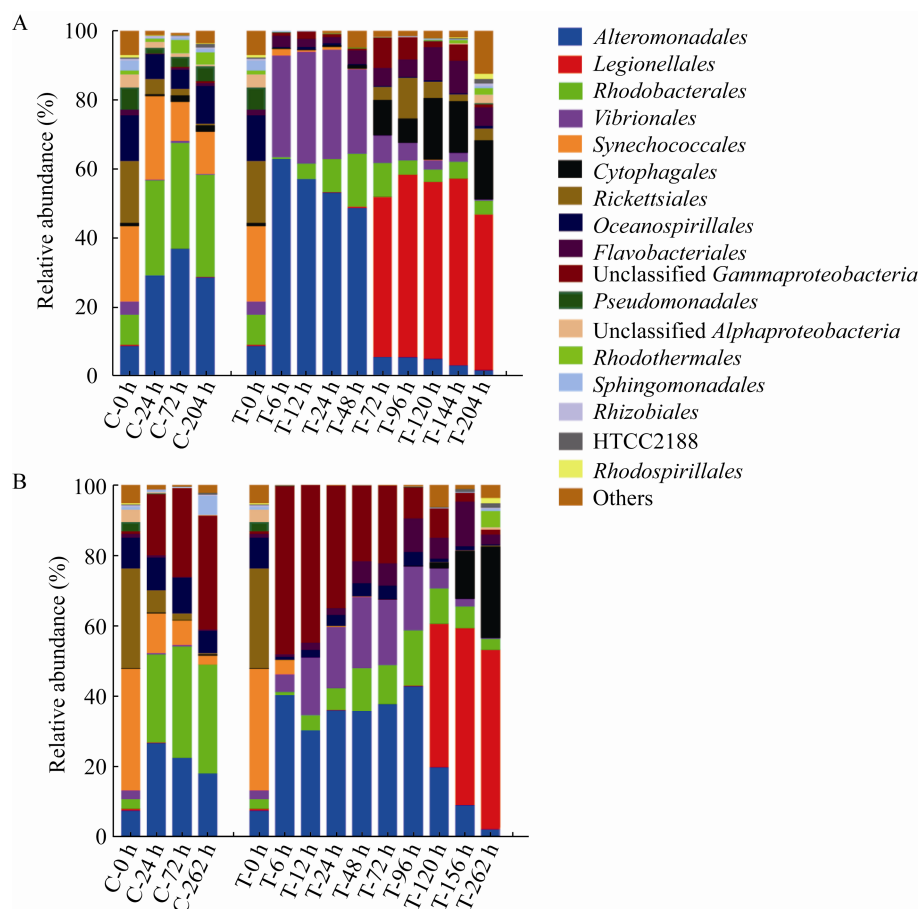


图3 J4 (A)和 SEATS (B) 站活性微生物群落结构变化(目水平)

Figure 3 The relative abundance of bacterial taxonomic community composition of station J4 (A) and SEATS (B) in order level

注: C: 对照组; T: 实验组.

Note: C: Control group; T: Treatment group.

低于 2%, 而 156 h 和 262 h 的相对丰度分别为 13.66% 和 26.17%。在培养结束时, 体系中的微生物群落结构为: *Legionellales* (51.26%)、*Cytophagales* (26.17%, 主要为 *Roseivirga*)、*Rhodothermales* (4.60%)、*Rhodobacterales* (3.08%)。

### 2.3.3 培养过程中活性微生物群落结构及多样性变化

为了探究微生物群落结构以及多样性的变化。基于 OTU 信息计算了  $\alpha$  多样性指数并进行了主成分分析(principal component analysis, PCA)。

培养过程中丰富度, 即 Chao1 指数(Chao1 index)和香农指数(Shannon-Wiener index)的变化如

表 1 所示。

在 J4 站位中, 对照组中的 Chao1 指数在 24 h 时呈现上升趋势, 之后就保持相对稳定直到培养结束; 香农指数在培养过程中没有太大的变化。实验组中的 Chao1 指数在 24 h 时呈现上升趋势, 并在 24 h 有最高值, 之后缓慢下降, 培养结束时稍低于对照组; 香农指数在 6 h 时有最低值, 之后呈现上升趋势, 在培养结束时与对照组中的 Chao1 指数保持一致。

在 SEATS 站位中, 对照组中 Chao1 指数在 72 h 前呈现上升趋势, 之后保持相对稳定; 香农指数呈现小幅度上升趋势。在实验组中, Chao1 指数



在 72 h 前呈现升高趋势,并在 72 h 时达到最高值,之后逐渐下降,培养结束时 Chao1 指数大大低于对照组;香农指数在 6 h 时降至较低水平,之后呈现上升趋势,24 h 后保持相对稳定直到 156 h,156 h 后又呈现下降趋势直到培养结束,培养结束时香农指数显著低于对照组。

PCA 分析结果显示(图 4),J4 站位(图 4A)对照组中不同时间点活性微生物群落结构彼此之间会更加接近,并与实验组有明显的差别;在实验组中,前期样品(48 h 之前)聚在一起,后期样品(72 h 之后)聚在一起,体现了培养过程中活性微生物群落结构的演替。在 SEATS 站中(图 4B),对照组 0 h 样品

表 1 培养过程中  $\alpha$  多样性指数变化  
Table 1 Variations of alpha diversity index during the incubations

Time (h)	Chao1 index				Shannon-Wiener index			
	J4 control group	J4 treatment group	SEATS control group	SEATS treatment group	J4 control group	J4 treatment group	SEATS control group	SEATS treatment group
0	374.65	—	511.00	—	5.25	—	4.64	—
6	—	433.56	—	619.23	—	2.69	—	3.20
12	—	507.11	—	754.06	—	3.38	—	4.39
24	632.83	678.28	624.04	728.00	4.8	3.99	4.45	5.18
48	—	645.17	—	932.07	—	3.90	—	5.17
72	618.98	617.93	876.01	1 007.28	4.77	4.75	5.02	5.28
96	—	486.02	—	834.83	—	4.62	—	5.12
120	—	—	—	817.47	—	—	—	5.07
144	—	532.23	—	—	—	4.58	—	—
156	—	—	—	480.92	—	—	—	3.66
204	602.25	464.00	—	—	5.09	5.05	—	—
262	—	—	822.85	298.70	—	—	5.31	3.01

注: —: 未检测。  
Note: —: Undetected.

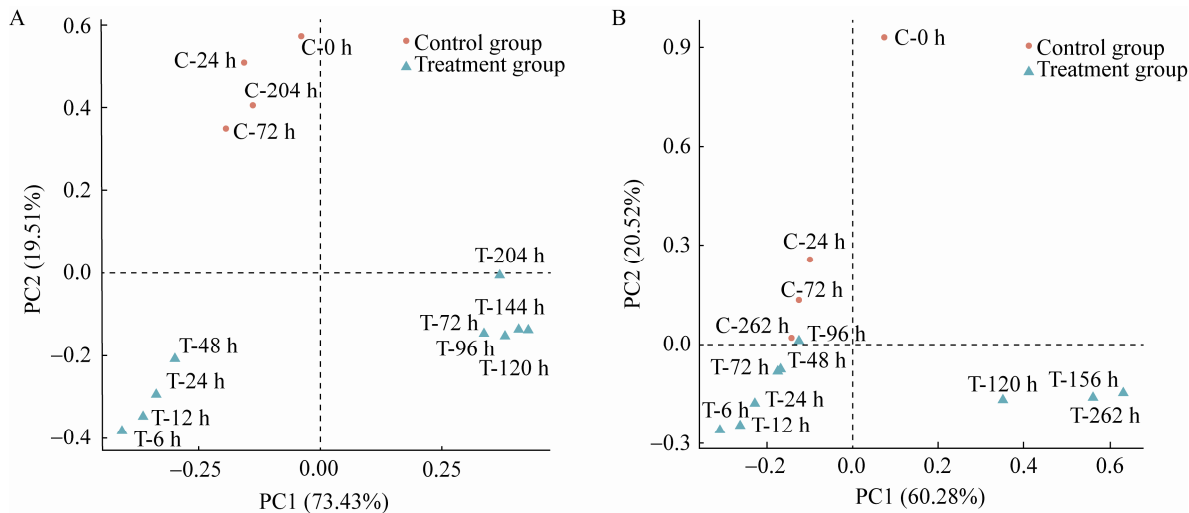


图 4 J4 (A)和 SEATS (B)站位基于 OTU 的主成分分析  
Figure 4 Principal component analysis of OTU in station J4 (A) and SEATS (B)

和其他样品有较大的差别;对照组中剩余样品和实验组中前期样品(96 h 之前)更接近;而实验组中的后期样品(120 h 之后)之间会更相似。

总的来说, SOM 的加入提高了微生物群落的丰富度(Chao1 指数), 说明不同微生物类群对新鲜有机物质进行了积极的响应。PCA 结果体现了活性微生物群落结构在培养过程中的演替, 可能与体系中有机的生物可利用性的变化有关。

### 3 讨论

#### 3.1 微生物群落对 SOM 的降解利用

海洋浮游植物通过被动或者主动的方式将大量光合作用产物释放到周围的水体中, 这些有机物质为周围微生物的生长提供了物质和能量基础<sup>[5]</sup>。浮游植物也是海洋 POC 的重要来源, 是海洋生物泵的重要组成部分<sup>[25]</sup>。本研究中, 大约 150  $\mu\text{mol-C/L}$  SOM 被添加到实验组中。实验结果显示 TOC 浓度在培养早期都有较为明显的下降, 表明 J4 和 SEATS 站位的微生物群落都对 SOM 的添加进行了快速的代谢利用。但是, 在 9 d 左右的培养周期中, 只有 60%–73% 的 SOM 被降解利用, 表明添加的 SOM 并没有在培养周期内被完全降解利用。这个结果说明, 对于 J4 和 SEATS 站位的微生物群落来说, SOM 并不完全属于 LDOM, 在早期就被降解利用的那部分有机物质应该属于 LDOM 或半活性有机物质(semi-LDOM, SLDOM)。在两个站位的培养过程中都出现了 TOC 下降平台期, 说明 SOM 中生物利用性较差的那部分需要微生物花费更多的能量和时间去利用代谢, 其中小部分有机物质或被转化成了 RDOM 在体系中积累。此外, 培养体系中营养盐水平(特别是硝酸盐浓度)也可能限制了微生物对 SOM 的利用。

#### 3.2 微生物群落结构的演替

活性微生物群落结构结果显示, SOM 的加入极大地改变了培养体系中的活性微生物群落结构。*Gammaproteobacteria* 是最快的响应者, 6 h 时其相对丰度分别占 J4 和 SEATS 站位的 92.90% 和

93.41%。*Gammaproteobacteria* 通常被称为“机会主义者”, 它们具有比较宽的底物利用能力, 能对周围环境变化进行快速的响应<sup>[26-27]</sup>。*Gammaproteobacteria* 中的 *Alteromonadales*、*Vibrionales* 和 *Unclassified Gammaproteobacteria* 是最早的响应者。早期研究也表明 *Alteromonadales* 可以对水体中的 LDOM 进行快速的响应<sup>[28]</sup>。此外, *Alteromonadales* 成员也被报道是海洋颗粒有机物的最早定殖者<sup>[29-30]</sup>。研究结果也体现了这点, 它们可以对 SOM 进行快速响应, 并且占据优势地位。此外, 在短期的培养过程中, *Gammaproteobacteria* 内也出现了类群的演替, 从培养早期的 *Alteromonadales*、*Vibrionales* 和 *Unclassified Gammaproteobacteria*, 变成后期的 *Legionellales*。*Alphaproteobacteria* 中的 *Rhodobacterales* 在培养的中期达到其相对丰度的最高值。*Rhodobacterales* 类群生长迅速, 通常对新鲜有机物质也能积极响应<sup>[32-33]</sup>。在我们的培养体系中, *Alphaproteobacteria* 和 *Bacteroidetes* 等微生物类群没能竞争过 *Gammaproteobacteria*, 未在第一时间占领优势地位。*Bacteroidetes* 中的 *Cytophagales* 和 *Flavobacteriales* 在培养后期有较高的相对丰度。*Bacteroidetes* 被广泛报道具有降解高分子溶解有机物质的能力, 也是浮游植物藻华期间中的主要响应类群<sup>[21, 33-35]</sup>。在培养的后期, *Gammaproteobacteria* 的相对丰度有所下降(J4 站为 50.51% 和 SEATS 站为 57.48%), 仍然是培养体系中的优势细菌类群。总的来说, 在短期的培养过程中, *Gammaproteobacteria* 是整个培养过程中最为优势的微生物类群。PCA 结果体现了活性微生物群落结构在培养过程中的演替, 这可能与体系中有机的生物可利用性的变化有关。随着培养的进行, SOM 中的 LDOM 逐步被利用, 活性微生物群落结构也随之变化。这个结果很好地体现了不同可利用性有机物质和微生物群落之间的相互作用。

实验组中 SOM 脉冲式的加入提高了微生物群落的丰富度(Chao1 指数), 体现了微生物群落对新

鲜有机物质的积极响应。Chao1 指数对稀有类群较为敏感, 计算时不考虑 OTU 的丰度和均匀度。然而香农指数对优势类群较为敏感, 计算时需要考虑 OTU 丰度和均匀度, 所以在两个站位的第 6 h 都出现了低值, 对应于该时间点高丰度的 *Gammaproteobacteria*。在培养后期, J4 站位丰富度的逐渐下降, 以及 SEATS 站位丰富度和多样性的显著降低, 可能与体系中有有机碳生物可利用性的降低有关。

#### 4 结论

海洋初级生产者产生的有机物质与异养细菌之间的相互作用是上层海洋物质和能量循环过程中的重要组成部分。本研究在南海寡营养环境考察了原位活性微生物群落对 SOM 的代谢利用以及演替过程。在 9 d 左右的培养过程中, 有 60%–73% 的 SOM 被微生物代谢利用, 说明 SOM 中的有机物质大部分都是属于 LDOM 或 SLDOM。但是, 在培养周期内, 添加的 SOM 并未被全部降解, 说明 SOM 中生物利用性较差的那部分需要微生物花费更多时间去降解。*Gammaproteobacteria* 是响应 SOM 添加最快的微生物类群, 并在培养体系中保持优势地位, 体现了它们灵活和多样的生活方式。*Alphaproteobacteria* 和 *Bacteroidetes* 也是培养体系内的主要活性微生物类群, *Alphaproteobacteria* 在培养中期有较明显的响应, *Bacteroidetes* 在培养后期有较明显的响应。丰富度(Chao1 指数)在培养前期的升高, 体现了微生物群落对 SOM 进行了积极的响应。PCA 结果显示出两个站位对照组和实验组之间活性微生物群落结构的差异, 并且实验组前期与后期活性微生物群落结构的差异, 表明 SOM 的添加影响了原位活性微生物群落结构, 并且随着体系中 LDOM 逐渐被利用, 活性微生物群落结构也随之发生演替。本研究很好地体现了浮游植物来源有机物质和异养细菌之间的相互作用, 可为深入理解原位环境异养细菌介导的生物地球化学循环过程提供线索。

#### REFERENCES

- [1] Sabine CL, Feely RA, Gruber N, et al. The oceanic sink for anthropogenic CO<sub>2</sub>[J]. Science, 2004, 305(5682): 367-371
- [2] Levin LA, Le Bris N. The deep ocean under climate change[J]. Science, 2015, 350(6262): 766-768
- [3] Ogawa H, Tanoue E. Dissolved organic matter in oceanic waters[J]. Journal of Oceanography, 2003, 59(2): 129-147
- [4] Field CB, Behrenfeld MJ, Randerson JT, et al. Primary production of the biosphere: Integrating terrestrial and oceanic components[J]. Science, 1998, 281(5374): 237-240
- [5] Mühlenbruch M, Grossart HP, Eigemann F, et al. Mini-review: phytoplankton-derived polysaccharides in the marine environment and their interactions with heterotrophic bacteria[J]. Environmental Microbiology, 2018, 20(8): 2671-2685
- [6] Azam F. Microbial control of oceanic carbon flux: the plot thickens[J]. Science, 1998, 280(5364): 694-696
- [7] Jiao NZ, Herndl GJ, Hansell DA, et al. Microbial production of recalcitrant dissolved organic matter: long-term carbon storage in the global ocean[J]. Nature Reviews Microbiology, 2010, 8(8): 593-599
- [8] Azam F, Fenchel T, Field JG, et al. The ecological role of water-column microbes in the sea[J]. Marine Ecology Progress Series, 1983, 10: 257-263
- [9] Sarmiento H, Morana C, Gasol JM. Bacterioplankton niche partitioning in the use of phytoplankton-derived dissolved organic carbon: quantity is more important than quality[J]. The ISME Journal, 2016, 10(11): 2582-2592
- [10] Kirchman DL, Suzuki Y, Garside C, et al. High turnover rates of dissolved organic carbon during a spring phytoplankton bloom[J]. Nature, 1991, 352(6336): 612-614
- [11] Falkowski PG, Fenchel T, DeLong EF. The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles[J]. Science, 2008, 320(5879): 1034-1039
- [12] Dyhrman ST, Ammerman JW, van Mooy BAS. Microbes and the marine phosphorus cycle[J]. Oceanography, 2007, 20(2): 110-116
- [13] Hutchins DA, Fu FX. Microorganisms and ocean global change[J]. Nature Microbiology, 2017, 2(6): 17058
- [14] Flombaum P, Gallegos JL, Gordillo RA, et al. Present and future global distributions of the marine cyanobacteria *Prochlorococcus* and *Synechococcus*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(24): 9824-9829
- [15] de Martini F, Neuer S, Hamill D, et al. Clade and strain specific contributions of *Synechococcus* and *Prochlorococcus* to carbon export in the Sargasso Sea[J]. Limnology and Oceanography, 2018, 63(S1): S448-S457
- [16] Fernández-Gómez B, Richter M, Schuler M, et al. Ecology of marine Bacteroidetes: a comparative genomics approach[J]. The ISME Journal, 2013, 7(5): 1026-1037
- [17] Su JN. Overview of the South China Sea circulation and its influence on the coastal physical oceanography outside the

- Pearl River Estuary[J]. *Continental Shelf Research*, 2004, 24(16): 1745-1760
- [18] Deng WC, Peng LL, Jiao NZ, et al. Differential incorporation of one-carbon substrates among microbial populations identified by stable isotope probing from the estuary to South China Sea[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 15378
- [19] Liu SL, Jiang ZJ, Wu YC, et al. Macroalgae bloom decay decreases the sediment organic carbon sequestration potential in tropical seagrass meadows of the South China Sea[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2019, 138: 598-603
- [20] Jiang ZJ, Zhao CY, Yu S, et al. Contrasting root length, nutrient content and carbon sequestration of seagrass growing in offshore carbonate and onshore terrigenous sediments in the South China Sea[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 662: 151-159
- [21] Zheng Q, Wang Y, Xie R, et al. Dynamics of heterotrophic bacterial assemblages within *Synechococcus* cultures[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(3): e01517-17
- [22] Zhao Z, Gonsior M, Luek J, et al. Picocyanobacteria and deep-ocean fluorescent dissolved organic matter share similar optical properties[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 15284
- [23] Zheng Q, Chen Q, Cai RH, et al. Molecular characteristics of microbially mediated transformations of *Synechococcus*-derived dissolved organic matter as revealed by incubation experiments[J]. *Environmental Microbiology*, 2019, 21(7): 2533-2543
- [24] Zhang Y, Zhao ZH, Dai MH, et al. Drivers shaping the diversity and biogeography of total and active bacterial communities in the South China Sea[J]. *Molecular Ecology*, 2014, 23(9): 2260-2274
- [25] Herndl GJ, Reinthaler T. Microbial control of the dark end of the biological pump[J]. *Nature Geoscience*, 2013, 6(9): 718-724
- [26] Tada Y, Taniguchi A, Nagao I, et al. Differing growth responses of major phylogenetic groups of marine bacteria to natural phytoplankton blooms in the western North Pacific Ocean[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(12): 4055-4065
- [27] Sarmiento H, Gasol JM. Use of phytoplankton-derived dissolved organic carbon by different types of bacterioplankton[J]. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(9): 2348-2360
- [28] Pedler BE, Aluwihare LI, Azam F. Single bacterial strain capable of significant contribution to carbon cycling in the surface ocean[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(20): 7202-7207
- [29] Lauro FM, McDougald D, Thomas T, et al. The genomic basis of trophic strategy in marine bacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(37): 15527-15533
- [30] McCarren J, Becker JW, Repeta DJ, et al. Microbial community transcriptomes reveal microbes and metabolic pathways associated with dissolved organic matter turnover in the sea[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(38): 16420-16427
- [31] Nelson CE, Wear EK. Microbial diversity and the lability of dissolved organic carbon[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(20): 7166-7167
- [32] Sheik AR, Brussaard CPD, Lavik G, et al. Responses of the coastal bacterial community to viral infection of the algae *Phaeocystis globosa*[J]. *The ISME Journal*, 2014, 8(1): 212-225
- [33] Cottrell MT, Kirchman DL. Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the *Cytophaga-Flavobacter* cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(4): 1692-1697
- [34] Teira E, Gasol JM, Aranguren-Gassis M, et al. Linkages between bacterioplankton community composition, heterotrophic carbon cycling and environmental conditions in a highly dynamic coastal ecosystem[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(4): 906-917
- [35] Teeling H, Fuchs BM, Becher D, et al. Substrate-controlled succession of marine bacterioplankton populations induced by a phytoplankton bloom[J]. *Science*, 2012, 336(6081): 608-611