科学通报 2013 年 第 58 卷 第 17 期：1610 ~ 1619
专题：南海珊瑚生物学与珊瑚礁生态学 论 文 www.scichina.com csb.scichina.com
《中国科学》杂志社 SCIENCE CHINA PRESS

三亚湾珊瑚礁海域蓝藻群落组成的空间分布特征及其与环境因子的关系

凌娟[①②③④], 张燕英[①③], 董俊德[①③*], 王友绍[②], 黄晖[①③], 陈蕾[①③④], 黄小芳[①③④], 龙丽娟[①], 张偲[①]

① 中国科学院南海海洋研究所海洋生物资源可持续利用重点实验室, 广州 510301;
② 中国科学院南海海洋研究所, 热带海洋环境国家重点实验室, 广州 510301;
③ 中国科学院南海海洋研究所海南热带海洋生物实验站, 三亚 572000;
④ 中国科学院研究生院, 北京 100049
* 联系人, E-mail: dongjunde@vip.163.com

2012-04-25 收稿, 2012-06-07 接受, 2012-09-04 网络版发表
国家科技支撑计划(2009BAB44B03)、国家高技术研究发展计划(2012AA092104)、国家自然科学基金(40776069, 40676091, 41006069)、国家重点基础研究发展计划(2010CB833800)和中国科学院知识创新工程重要方向性项目(KSCX2-YW-EW-G-12)资助

摘要 对三亚湾春季表层和底层蓝藻群落的空间分布差异和蓝藻群落组成与环境因子的相关关系进行了研究. 利用流式细胞仪对蓝藻丰度进行了计数, 其结果显示, 表层蓝藻丰度范围为 0.70×10^4~2.37×10^4 cells/mL; 底层蓝藻的丰度范围为范围是 0.99×10^4~1.81×10^4 cells/mL. 采用的主要研究方法是变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)和多元统计学分析. DGGE 图谱结果显示三亚湾表层和底层的蓝藻群落结构的组成存在显著的差异性, 有些条带在同一站位的表层和底层都有出现而有些条带只存在于该站位的表层或者底层. 表层和底层群落中的普遍存在蓝藻种都是 *Synechococcus* 或 *Synechococcus*-like species (56.2%); 此外, 还有 *Chroococcidiopsis* (6.3%), *Cyanobium* (6.3%)和 Unclassified *cyanbacterium* (31.2%). 冗余分析结果显示与表层和底层蓝藻群落结构组成显著相关的环境因子是不同的, 其中与表层蓝藻群落结构组成显著相关的是叶绿素 Chl*a*, 生化需氧量, 硝酸盐和磷酸盐(P<0.05), 而与底层蓝藻群落结构组成显著相关的是硝酸盐, 亚硝酸盐和磷酸盐(P<0.05); 环境因子对三亚湾表层和底层蓝藻群落结构的空间分布差异的解释程度可分别达 99.3%和 58.3%.

关键词
蓝藻群落组成
变性梯度凝胶电泳
聚球藻
冗余分析

蓝藻在热带海洋区域具有广泛的分布并且具有较高的多样性[1], 它们在海洋生态系统尤其是远海中具有非常重要的生态学意义, 是该海域中主要的固氮微生物和微食物网的主要组成部分[2,3]. 据估算, 固氮蓝藻的在全球亚热带和热带的寡营养海域每年可提供的固氮量约为 100 Tg[4]. 生物固氮过程可为深海流失的碳提供一定的营养通量并且可以对温室气体二氧化碳的浓度起到一定的限制作用. 此外, 蓝藻(如鞘丝藻 *Lyngbya* sp.)是天然活性物质的重要来源[5], 并且它还具有降解有机污染物的能力, 如可以降解环境中的多环芳烃和杀虫剂等[6].

三亚湾是一个典型的热带海湾, 位于中国海南岛的最南端, 由珊瑚礁、红树林和海草床等多种热带海洋生态系统构成[7~9]. 三亚湾的一些早期研究结果表明三亚湾是一个温暖、寡营养的海湾, 其初级生产力主要受到氮素限制[10]; 蓝藻是该海域浮游植物的重要组成部分和初级生产力的重要贡献者[11], 然而关于三亚湾蓝藻群落结构的系统研究和分子生物学

引用格式: 凌娟, 张燕英, 董俊德, 等. 三亚湾珊瑚礁海域蓝藻群落组成的空间分布特征及其与环境因子的关系. 科学通报, 2013, 58: 1610–1619
英文版见: Ling J, Zhang Y Y, Dong J D, et al. Spatial variability of cyanobacterial community composition in Sanya Bay as determined by DGGE fingerprinting and multivariate analysis. Chin Sci Bull, 2013, 58, doi: 10.1007/s11434-012-5424-4

方面的研究还鲜有报道. 以前研究三亚湾蓝藻采用的主要方法是传统的显微镜分析和形态学鉴定, 该方法费时费力并且可能由于研究方法本身的缺陷导致忽视了一些微型种类(Pico级和Nano级). 因此, 本文采用变性梯度凝胶电泳(denatured gradient gel electrophoresis, DGGE)的方法对三亚湾蓝藻群落结构的空间分布特征进行研究[12]; 并利用多元直接梯度分析的冗余方法对蓝藻和环境因子的关系进行统计学分析, 这种高分辨率的 DNA 指纹和多元分析相结合的方法已经被广泛应用于水域生态系统中海洋微生物群落结构变化研究中[13].

本文主要通过研究三亚湾蓝藻的群落结构组成, 对比三亚湾表层和底层蓝藻群落结构组成的差异以及应用多元统计的方法分析与表层和底层蓝藻群落组成显著相关的环境因子, 以期对三亚湾表层和底层的蓝藻群落的空间分布特征有更加深入的认识, 并为蓝藻的进一步研究提供一定的理论基础.

1 材料和方法

(ⅰ) 研究区域和研究方法. 三亚湾位于中国海南岛的最南端(109°20′~109°30′E, 18°11′~18°18′N)[13], 是一个典型的热带海湾, 面积约为 120 km^2, 平均水深约为 16 m, 主要由鹿回头半岛、东瑁岛和西瑁岛组成. 在所有调查的站位中, 除了 W4 站位(26 m)和 W9 站位(28 m)外, 其余站位的水深都不超过 20 m(图 1). 采样时间为 2010 年 4 月 24 ~ 25 日, 在每个站位的表层和底层分别用 5 L 的 Niskin 采样瓶进行采水.

利用 YSI 水质分析仪(Hydrolab Corporation, USA)分别测定表层和底层的温度、盐度、溶解氧(dissolved oxygen, DO)等; SKALAR 营养盐自动分析仪器测定硝酸盐(NO_3-N, mg L^{-1})、亚硝酸盐(NO_2-N, mg L^{-1})和硅酸盐(SiO_3-Si, mg L^{-1}). 此外, 分别采用次溴酸盐氧化法和硅钼黄氧化法对铵盐浓度(NH_4-N, mg L^{-1})和磷酸盐浓度(PO_4-P, mg L^{-1})进行测定. 按照海洋监测规范进行测定(GB17378.4-1998, 中国)的方法对可溶解有机碳(dissolved organic carbon; DOC (mg/L)), 可溶解无机碳(dissolved inorganic carbon; DIC (mg/L)), 叶绿素(Chl*a* (μg L^{-1})), 化学需氧量(chemical oxygen demand, COD (mg L^{-1}))和生化需氧量(biochemical oxygen demand; BOD)进行测定[14]. 参照海洋调查规范(GB12763-91, 中国)中所描述的具体方法对用于蓝藻丰度分析的样品进行采集, 1 L 的水样用 0.22 μm 的醋酸纤维素膜进行过滤(Millipore, Durapore, 美国). 过滤后的滤膜经液氮速冻后置于−20℃保存直至实验室分析.

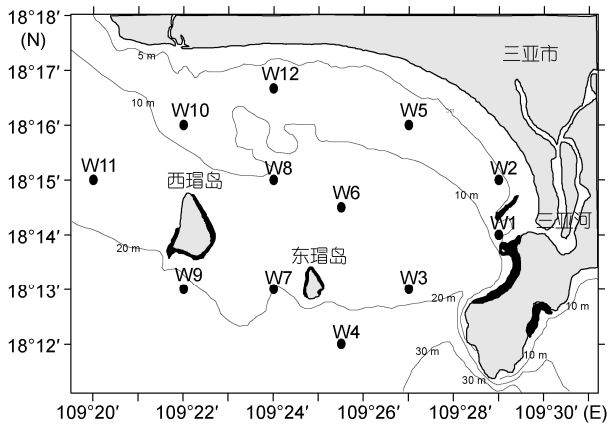

图 1 三亚湾珊瑚礁海区具体采样站位的示意图(W1~W12)

(ⅱ) 理化参数分析. 水体物理化学参数的测定主要是参照 Huang 等人[15], Zhou 等人[16]和海洋调查规范[14]的具体方法进行.

(ⅲ) DNA 提取, PCR 扩增和 DGGE. 首先提取样品中群落总体 DNA 具体参照 Bostrom 等人[17]的方法, 将获得 DNA 经过纯化后进行巢式 PCR. 首轮采用蓝藻特异性引物正向引物 CYA359F 和反向引物 23S30R[18]. PCR 扩增的仪器为 PTC-2000(Bio-Rad, USA), 扩增的具体程序参照 Nübel 等人[19], 第二轮采用的正向引物是 CYA359F, 反向引物是同等量的 CYA781R(a)和(b)[19], 其中引物 CYA781R(a)主要针对丝状蓝藻进行扩增而 CYA781R(b)主要扩增的对象是群落中的单细胞蓝藻. 在正向引物的 CYA359F 的 5′端添加有一个约 40 bp 的 GC 夹子(CGCCCGCCG-CGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG)用来提高目的 DNA 片段在 DGGE 胶上的分辨率[20]. 为了尽量减少样品之间的差异性和 PCR 的非特异性扩增, 每个样品的 PCR 做 3 个重复样, 将产物进行混合纯化后再进行 DGGE. 采用 INGENYphoruU-2 基因突变检测系统对 PCR 产物进行凝胶电泳分离, 实验采用 8%的聚丙烯酰胺(37.5∶1), 变性剂尿素与去离子甲酰胺的线性梯度为 45%~70%, 在 60℃, 200 V 下电泳 17 h, EB 染色后用 AlphaImager 成像系统(Alpha Innotech, USA)进行拍照分析, 并且对一些具有特殊性和共性的条带进行切胶回收, 按照 Nübel 等人[19]所描述的程序和引物 CYA359F-CYA781R(a)和(b)进

行扩增, 将所得的 PCR 产物进行重新上样, 以确定 DNA 片段在 DGGE 上的迁移率是否一致, 将迁移率一致的条带进行切胶回收、扩增、连接到 PMD18-T 并转化到大肠杆菌 DH5α 中(Takara Shuzo Co, 日本). 将所获得的阳性克隆送交英潍捷基用 M13 引物进行测序, 将所获得的序列在 Ribosomal Database Project (RDP)中使用分类工具进行初步的嵌合体分析, 然后使用 GenBank 数据库的 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)程序进行序列比对[21,22], 然后利用软件 ClustalX1.81 和 MEGA 采用邻接法进所获得序列构建系统进化树, 其中自举值为 1000 次, 表示 1000 次 bootstrap 重复样分析的支持百分比[23~25].

(ⅳ) 数据分析. 对 DGGE 图谱中三亚湾表层和底层的蓝藻群落结构分析参考 Zhang 等人[26]的方法, 使用软件 Canoco for windows 4.5(Wageningen, 荷兰)进行蓝藻群落结构组成和环境因子相关性分析时, 要考虑条带的位置和亮度. 首先, 将数据进行除趋势分析以决定采用多元分析的线性模型还是单峰模型[27~29], 初步结果显示表层和底层蓝藻群落结构组成与排序轴 1 的梯度长度分别为 2.269 和 4.388, 所以本文中采用冗余分析的排序方法来研究蓝藻群落组成的空间差异和环境因子的关系.

2 结果

2.1 水体的物理化学参数

三亚湾表层和底层的水体物理化学参数具体见表 1. 从中可以看出底层水体的盐度(34.30‰~34.41‰)比表层要稍高些 (34.16‰~34.37‰), 三亚河入海口处的 W1 站位的表层和底层的溶解氧浓度都呈现出最低值, 分别是 6.96 和 6.90 mg/L, 而叶绿素(Chl*a*)浓度和营养盐浓度(磷酸盐、硅酸盐、硝酸盐、亚硝酸和铵盐在该处都出现最大值. W1 站位表层的 Chl*a* 浓度为 2.93 μg/L, 约为 W10 站位表层叶绿素浓度的 15.4

表 1 三亚湾研究站位的表层和底层水体的物理化学参数(取值为平均值, *n*=3)

站位	温度 (℃)	盐度 (‰)	pH	DO (mg/L)	Chl*a* (μg/L)	COD (mg/L)	BOD (mg/L)	DIC (mg/L)	DOC (mg/L)	SiO_4-Si (mg/L)	PO_4-P (mg/L)	NO_2-N (mg/L)	NO_3-N (mg/L)	NH_4-N (mg/L)	CA (cells/mL)
WS1	26.32	34.16	8.12	6.96	2.93	0.98	0.52	27.77	1.291	0.105	0.009	0.004	0.024	0.017	2.37
WS2	26.39	34.34	8.13	7.25	1.47	1.13	0.50	27.68	2.196	0.098	0.006	0.003	0.010	0.014	2.061
WS3	26.45	34.32	8.06	7.06	0.41	0.33	0.22	28.20	1.187	0.099	0.003	0.002	0.006	0.014	0.88
WS4	26.47	34.37	8.11	7.11	0.42	0.65	0.20	27.85	1.076	0.086	0.003	0.002	0.009	0.016	0.88
WS5	26.84	34.24	8.15	7.32	0.30	0.73	0.07	27.57	1.005	0.091	0.004	0.002	0.005	0.016	0.70
WS6	26.30	34.36	8.08	7.15	0.56	0.36	0.28	28.10	1.060	0.114	0.004	0.001	0.006	0.014	1.66
WS7	26.37	34.35	8.06	7.11	0.67	0.91	0.08	28.21	0.822	0.098	0.003	0.002	0.007	0.013	1.62
WS8	26.59	34.32	8.12	7.11	0.84	0.22	0.10	27.77	1.027	0.090	0.003	0.002	0.007	0.013	1.49
WS9	26.40	34.33	8.06	7.13	1.28	0.62	0.01	28.20	0.701	0.099	0.005	0.001	0.006	0.016	2.23
WS10	26.78	34.28	8.13	7.16	0.19	0.29	0.16	27.74	1.159	0.094	0.004	0.003	0.009	0.014	0.80
WS11	26.69	34.23	8.12	7.10	0.50	0.29	0.10	27.71	0.773	0.088	0.003	0.001	0.006	0.015	1.32
WS12	27.38	34.19	8.11	7.21	0.65	0.87	0.07	27.84	0.740	0.105	0.004	0.002	0.009	0.014	1.45
WB1	26.20	34.30	8.11	6.90	1.17	0.84	0.08	27.84	0.602	0.103	0.006	0.003	0.014	0.018	1.81
WB2	26.04	34.38	8.08	7.21	0.60	0.76	0.35	28.10	1.562	0.103	0.004	0.002	0.007	0.016	1.50
WB3	26.11	34.46	8.09	7.03	1.05	0.44	0.21	28.01	1.071	0.103	0.002	0.001	0.006	0.015	0.95
WB4	26.10	34.32	8.13	7.10	0.42	0.76	0.08	27.68	1.032	0.094	0.002	0.002	0.008	0.014	1.04
WB5	26.50	34.35	8.10	7.36	1.25	0.87	0.03	27.93	0.999	0.086	0.002	0.002	0.007	0.015	1.00
WB6	26.21	34.41	8.13	7.11	0.70	0.33	0.06	27.68	0.817	0.097	0.002	0.001	0.006	0.017	1.30
WB7	26.07	34.34	8.07	7.26	0.77	0.80	0.19	28.18	1.098	0.086	0.002	0.001	0.007	0.014	1.09
WB8	26.42	34.35	8.13	7.11	0.22	0.33	0.16	27.68	0.971	0.101	0.002	0.002	0.008	0.015	1.61
WB9	26.26	34.36	8.08	7.20	1.09	0.65	1.06	28.10	1.032	0.101	0.003	0.001	0.007	0.018	1.23
WB10	26.46	34.33	8.13	7.13	0.55	7.64	0.32	27.68	1.021	0.084	0.003	0.001	0.006	0.013	1.32
WB11	26.40	34.34	8.11	7.31	0.59	0.55	0.02	27.84	0.701	0.097	0.002	0.001	0.005	0.013	1.40
WB12	26.55	34.33	8.12	7.43	0.85	0.47	0.16	27.77	0.833	0.103	0.003	0.001	0.006	0.016	1.31

倍, 叶绿素浓度总体上呈现出从滨海到离岸依次递减的趋势. 通过应用流式细胞仪对表层和底层蓝藻的丰度(cyanobacterial abundance, CA)进行计数, 结果显示表层蓝藻的丰度为 0.70×10^4~2.37×10^4 cells/mL, 底层蓝藻范围是 0.99×10^4~1.81×10^4 cells/mL.

2.2 蓝藻 DGGE 图谱分析

将蓝藻群落 DGGE 图谱上的条带命名为“CX”, X 为条带的编号(图 2). 表 2 为三亚湾蓝藻序列与 NCBI 中 GenBank 数据库中序列进行相似度比对所获得的结果, 本研究所获得的序列在 GenBank 数据库中的

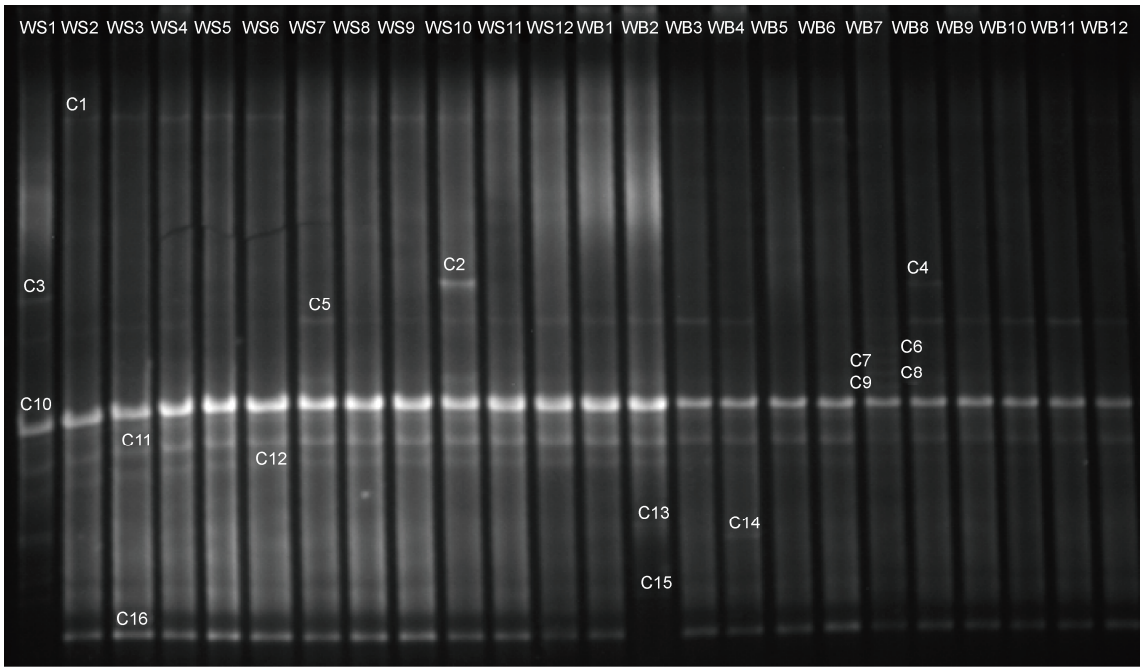

图 2　三亚湾 W1~W12 表层和底层蓝藻群落结构站位的表层和底层蓝藻群落群落组成 DGGE 图谱

S: 表层, 具体站位为 WS1~WS12; B: 底层, 具体站位为 WB1~WB12

表 2　三亚珊瑚礁海域所获得的蓝藻序列与 GenBank 数据库中已知序列的相似度比较结果

条带编号	登录号	NCBI 数据库中与获得菌株最高相似度的序列	最相近序列登录号	来源	相似百分比(%)
C1	JF914949	*Synechococcus* sp. KORDI-49	FJ497747	东中国海海水	97
C2	JF914950	Uncultured *cyanobacterium* Bac18	HM485317	西地中海北部的表层海水(5 m)	99
C3	JF914951	*Synechococcus* sp. MBIC10089	AB058226	日本海高盐区域海水	98
C4	JF914952	Uncultured *cyanobacterium* A8W-30	HM057799	黄海海水	99
C5	JF914953	*Synechococcus* sp. KORDI-56	FJ497734	东中国海海水	99
C6	JF914954	Uncultured *Synechococcus* sp. 031806#44	FJ903279	东中国海附近的寡营养黑潮水	99
C7	JF914955	*Synechococcus* sp. KORDI-15	FJ497743	东中国海海水	99
C8	JF914956	Uncultured *Synechococcus* sp. JL-SCS-L51	AY664001	南中国海海水	99
C9	JF914957	*Chroococcidiopsis* sp. BB96.1	AJ344555	南非土壤	93
C10	JF914958	*Synechococcus* sp. RS9920	AY172830	红海海水	99
C11	JF914959	Uncultured *cyanobacterium* Souza16sRcya18q	DQ363186	尤卡坦半岛海峡水体	99
C12	JF914960	Uncultured *cyanobacterium* ARTE9_416	GU230462	滨海水体	99
C13	JF914961	*Synechococcus* sp. KORDI-71	FJ497742	东中国海海水	99
C14	JF914962	Uncultured *Synechococcus* sp. clone 031606#40	FJ903235	黑潮流经的寡营养区海水	99
C15	JF914963	*Cyanobium* sp. JJ22K	AM710364	中度和重度富营养化的淡水	99
C16	JF914964	Uncultured *cyanobacterium* Bac18	HM485317	西地中海北部的海水	99

序列号为 JF914949-JF914964. 从图 2~4 可以看出, 所获得的蓝藻序列中的普遍存在蓝藻种为 *Synechococcus* 或 *Synechococcus*-like species (56.2%); 其他蓝藻种类为 *Chroococcidiopsis* (6.3%), *Cyanobium* (6.3%) 和 Unclassified *Cyanbacterium*(31.2%). 三亚湾蓝藻群落中所获得的蓝藻种类与 Genbank 数据库中的序列相似度为 93% ~ 99%, 而且与它们比较相似的序列大多都来源于海洋环境, 如中国东海外缘的黑潮、红海、东海和南大西洋的亚热带副热带环流等(表 2).

2.3 群落结构组成与环境因子的相关关系

图 3 显示的为 RDA 分析的结果, 从中可以看出表层蓝藻群落的前两个排序轴的特征值分别是 0.986 和 0.006, 底层蓝藻群落的前两个排序轴的特征值分别是 0.491 和 0.075. 参与冗余分析的环境因子在表层和底层的蓝藻群落组成之间所起的作用是不同的; 表层蓝藻群落之间的差异性受环境影响程度较大, 99.3%的差异都是由于环境因子的差异而造成的, 而底层蓝藻群落之间的差异性只有 58.3%与环境因子

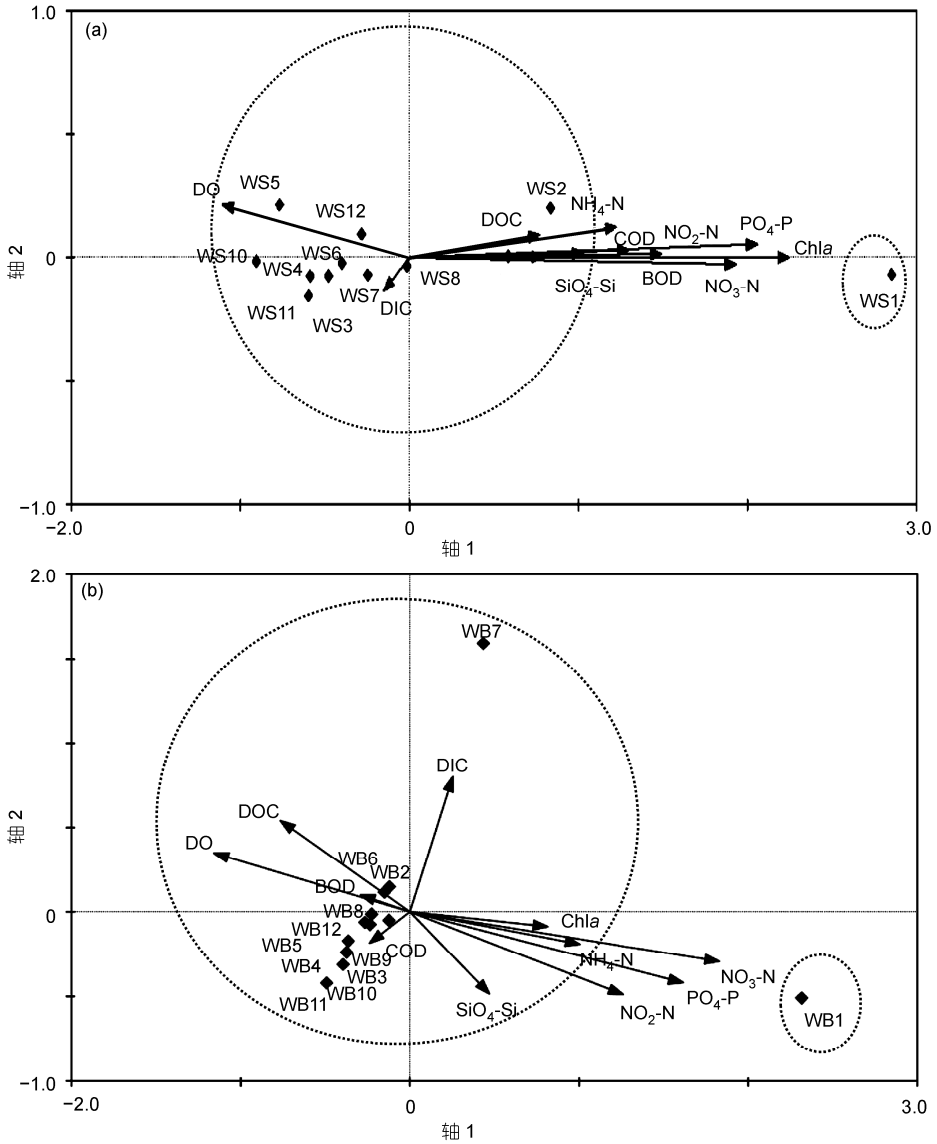

图 3 三亚湾蓝藻表底层蓝藻群落结构组成与环境因子的冗余分析结果

WS1~WS12 表示 12 个站位的表层蓝藻群落; WB1~WB12 表示 12 个站位的底层蓝藻群落, 箭头表示环境因子与各个站位蓝藻群落组成的关系. 与表层和底层蓝藻群落结构组成显著相关的环境因子(P<0.05)分别是 Chl*a*, BOD, PO_4-P, NO_3-N 和 NO_3-N, PO_4-P, NO_2-N

有关. 表 3 显示表层蓝藻群落结构中的冗余分析结果中前两个排序轴与种类组成和环境因子的相关系数分别是 99.3%和 99.9%. 底层蓝藻群落结构中前两个排序轴与种类组成和环境因子的相关系数分别是 84.3%和 97.1%, 这表明环境因子在三亚湾表层和底层的蓝藻群落组成的空间分布中都起着非常重要的作用. 蒙特卡罗检验结果显示与表层和底层的蓝藻群落组成显著(P<0.05, 显著相关; P<0.01, 极显著相关)相关的环境因子是不同, 其中与表层蓝藻群落组成显著相关的环境因子是 Chl*a*(P=0.002, P<0.01), BOD(P=0.014, P<0.05), PO_4-P(P=0.002, P<0.01) 和 NO_3-N(P=0.002, P<0.01), 而与底层蓝藻群落空间分布显著相关的环境因子是 NO_3-N (P=0.001, P<0.01), PO_4-P (P=0.002, P<0.01)和 NO_2-N(P=0.026, P<0.05). 从图 3 中还可以看出, 与其他站位的同层的蓝藻群落结构相比较, W1 站位表层和底层的蓝藻群落结构都与它们存在着较大的差异.

3 讨论

从图 2 可以看出三亚湾表层和底层的蓝藻群落结构组成具有一定的差异性, 如条带 C3 仅在 W1 站位的表层出现而在底层蓝藻群落中检测不到. 条带 C4, C6, C7, C8 和 C9 等只出现在某些站位的底层蓝藻群落中, 即使有些条带在表层和底层的蓝藻群落中都有存在, 如条带 C1, C5, C11, C12 和 C16 等, 但是它们在表层和底层的丰度也是不一致的, 这可能是由于同一站位的表层和底层水体的环境特征差异所导致的. 表层和底层蓝藻群落组成中共有的条带, 如条带 C10, C11 和 C12 的丰度明显不同, 表层水域中的丰度相对高于底层, 这可能是由于表层水体的营养盐浓度高于底层水体的原因(表 2). 表层蓝藻群落组成的分布特征是靠近三亚河入海口处(如 W1 和 W2 站位)蓝藻多样性比一些位于三亚湾外部的一些站位如 W4, W9 和 W11 蓝藻多样性略高, 而底层蓝藻群落组成相互间无明显差异.

将 DGGE 图谱中的比较亮的各个站位共有条带或者个别站位所具有的特异性条带进行切胶、回收、连接、转化和测序分析, 并将所得序列与 GenBank 数据库中的序列进行比对. 结果显示 C10 序列为三亚湾的普遍存在蓝藻种类, 经过 BLAST 对比分析发现其与来自红海水域中的 *Synechococcus* sp. RS9920 的相似度为 99%, 且该菌仅能够利用硝酸盐作为唯一的氮来源[30]. GenBank 数据库中与序列 C1, C5, C7 和 C13 相似度最高的序列(数据库中登录号分别为 FJ497747, FJ497734, FJ497743 和 FJ497742)都是源于东海, 其中与 C6 和 C14 最相近的序列(数据库中登录号分别为 FJ903279 和 FJ903235)都来自于黑潮. 由于发源于菲律宾的黑潮经过吕宋海峡时, 形成两条分支, 一条进入南海, 另外一条沿台湾岛东部继续北上进入东海. 通过对比发现, C1, C5, C7 和 C13 这 4 条序列其与来自于东海的序列相似度, 相似性范围是 97%~99%, 所以基于以上的推测, 三亚湾调查所获得序列和源于东海相关序列的菌群可能都起源于黑潮[31,32]. W7 站位于东瑁岛和西瑁岛之间, 旅游业

表 3 三亚湾珊瑚礁海域表层和底层的蓝藻群落结构 DGGE 图谱的冗余分析结果 a)

排序轴	特征值	种群-因子间的相关系数	种群数据变化累积百分比(%)	种群与因子关系变化累积百分比(%)	典型特征值总和
表层蓝藻群落					0.993
排序轴 1	0.986	1	98.6	99.3	
排序轴 2	0.006	0.72	99.2	99.9	
排序轴 3	0.001	0.624	99.2	100.0	
排序轴 4	0.000	0.55	99.3	100.0	
底层蓝藻群落					0.583
排序轴 1	0.491	0.96	49.1	84.3	
排序轴 2	0.075	0.618	56.6	97.1	
排序轴 3	0.017	0.867	58.3	100	
排序轴 4	0.023	0.000	81.3	0	

a) 表层数据的蒙特卡罗检验结果表明所有的特征值之和为 1.000; 排序轴 1 的 F=481.709, P=0.002; 所有排序轴: F=234.089, P=0.002. 底层数据的蒙特卡罗检验结果表明所有的特征值之和为 1.000; 排序轴 1 的 F = 8.483, P = 0.002; 所有排序轴: F= 4.233, P= 0.002

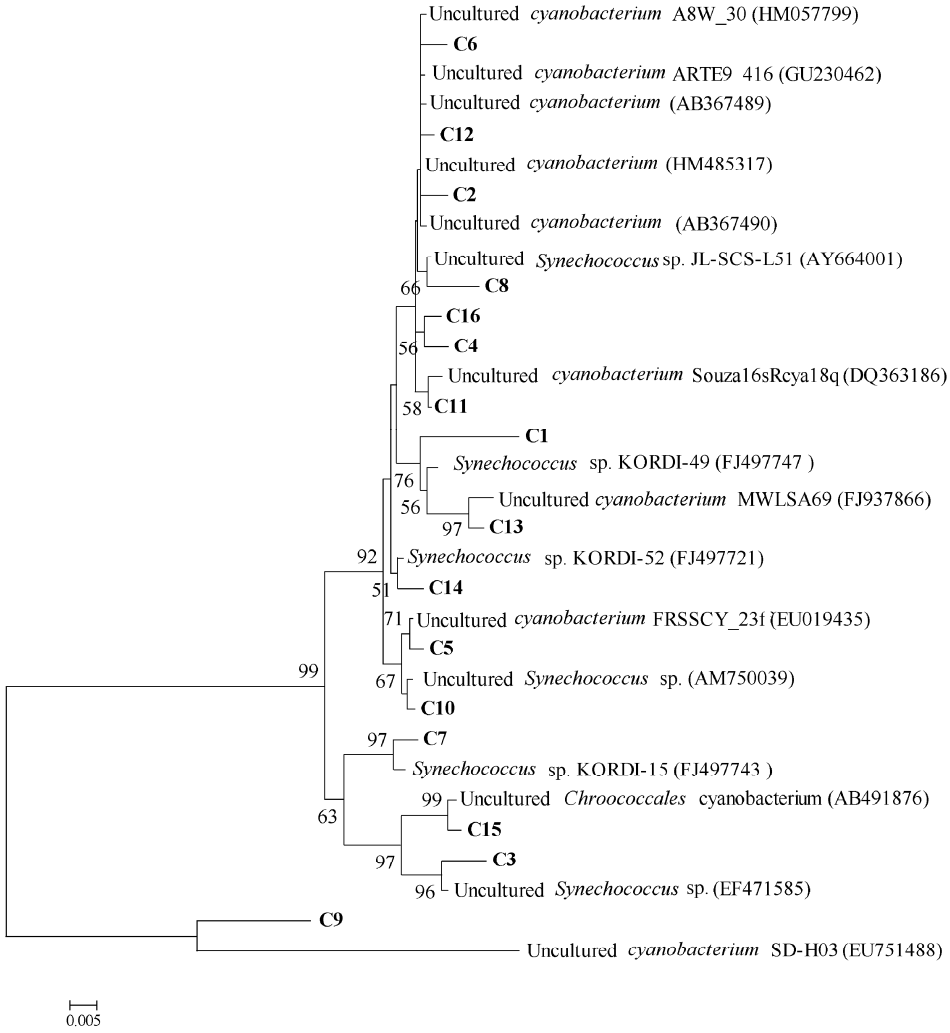

图 4 三亚湾蓝藻群落组成的 DGGE 图谱中所得蓝藻的分子系统进化树

Bootstrap 值重复 1000 次, 括号中为相似序列在 GenBank 中的登录号

十分发达, 因此与其他站位相比较, 该处的蓝藻群落组成更容易受到人类活动的干扰[15], 因此有些特异性的条带即上面提及的 C6, C7, C8 和 C9, 这可能与人类活动的影响有关系. 表 2 显示与 C9 序列相似度最高的蓝藻 *Chroococcidiopsis* sp. BB96.1 的相似度仅为 93%, 表明其可能是蓝藻新种[33]. C15 序列与 *Cyanobium* sp. JJ22K 具有最高的序列相似度, 已有研究表明 *Cyanobium* sp. JJ22K 在营养型和富营养型的淡水水库中都有获得分离, 其在淡水和海水生态系统的广泛分布, 表明该种能够对多种不同的环境都有较好的适应性[34].

从表 2 中可以看出, 三亚湾蓝藻群落中的普遍存在蓝藻种为 *Synechococcus* 或 *Synechococcus*-like 种类, 其在表层和底层的蓝藻群落中都占优势地位同时它们也是热带和亚热带海洋生态系统中的浮游植物的重要组成成分. Murphy 等人[35]研究发现 *Synechococcus* 在全球海洋尤其是沿海地区都具有广泛的分布且丰度较高(10^3~10^5 cell/mL). 它们能够进行光合作用和生物固氮作用, 是一些生源要素, 尤其是碳和氮的生物地球化学循环过程中不可缺少的组成部分. 据估测, 海洋中的聚球藻和原绿球藻 *Prochlorococcus* 每年可以从大气中吸收约为 1×10^{10} Tg 的碳, 该数量在全球海洋总固碳量占的比例超过了三分之二[36]. *Chroococcidiopsis* 是一种非异形胞的单细胞结构, 在全球海洋中具有广泛的分布, 甚至在一些极端环境中也有发现, 如多孔岩石, 南极的山谷和热带的沙漠[37].

在三亚湾还发现了其他种属的蓝藻如 *Cyanobium*, 其也是浮游植物的重要组成部分, 在海洋生态系统, 半咸水和淡水生态系统中都有广泛的分布.

从图 2 可以看出, 站位 W1 的蓝藻群落结构组成和其他站位相比较具有较大的差异, 这可能是由于该站位位于三亚河的入海口, 水体的物理化学性质受冲淡水和人类活动影响较大. 此外, RDA 结果表明与三亚湾表层和底层蓝藻群落组成的空间性差异显著相关的环境因子是不同的, 与表层蓝藻群落结构组成显著相关的环境因子是 Chl*a*, BOD, 硝酸盐和磷酸盐而与底层蓝藻群落结构组成显著相关的环境因子是硝酸盐、磷酸盐和亚硝酸盐, 其中硝酸盐和磷酸盐在表层和底层中都起着重要的作用. 这可能是由于春季浮游植物的的快速生长, 消耗了海水中的磷酸盐, 从而使其成为限制因素[38]. 表层蓝藻群落结构组成的冗余分析排序图表明 Chl*a*, BOD, 硝酸盐和磷酸盐与各个站位的蓝藻物种呈正相关, 而在底层蓝藻群落结构组成的冗余分析排序图中显示显著相关环境因子硝酸盐、磷酸盐和亚硝酸盐与物种分布也呈正相关, 推测这几种营养盐可能对蓝藻的生长具有一定的促进作用. 此外, 三亚湾的早期研究也显示出溶解无机营养盐尤其是磷酸盐和无机氮是影响三亚湾浮游植物分布的一个重要因素[38,39]. 在不同的生态系统中或同一生态系统的不同的物种而言, 影响它们群落组成的显著相关因子是不同, 如 Yan 等人[40]发现在三峡库区, 与细菌群落组成显著相关的环境因子是硝酸盐、溶解氧和硅酸盐, 而 Zeng 等人[41]认为在淡水水域环境中, 总氮、铵盐和 pH 是影响微生物群落结构组成的显著相关环境因子, 如在研究群岛海(Archipelago Sea)细菌的生物量对营养盐富集的响应时, 发现疣微菌在对照组中的密度最大而在营养加富实验的较高浓度组中的密度最低, 而聚球藻的类似菌在较低浓度组中的密度较低生物量较少而在较高浓度是生物量较高[40~42]. 因此, 深入研究三亚湾蓝藻群落结构组成的变化特征及与环境理化因子的相关性对三亚湾微生物资源的开发、利用和保护以及附近海洋环境的保护是十分必要的.

4 结论

本研究中通过应用流式细胞仪方法、变形梯度凝胶电泳和多元统计冗余分析的手段对三亚湾珊瑚礁海域的表层和底层蓝藻群落的结构以及其与环境因子的相关性进行了研究, 主要结论如下:

(1) 通过使用流式细胞仪对三亚湾表层和底层蓝藻的丰度进行了分析, 发现同一站位表层蓝藻的丰度略高于底层, 其丰度范围分别是 0.70×10^4~2.37×10^4 cells/mL 和 0.99×10^4~1.81×10^4 cells/mL.

(2) 通过对 DGGE 图谱中比较亮的条带进行测序分析可知, 得到的序列大多数是 *Synechococcus* 或 *Synechococcus*-like species(56.2%). 此外, 其他的种类还包括 *Chroococcidiopsis* (6.3%), *Cyanobium* (6.3%) 和 Unclassified *Cyanbacterium* (31.2%).

(3) 冗余分析结果显示与表层和底层蓝藻群落结构组成显著相关的环境因子是不同的, 其中与表层蓝藻群落结构组成显著相关的是叶绿素(P=0.002, P<0.01), 生化需氧量(P=0.014, P<0.05), 硝酸盐(P=0.002, P<0.01)和磷酸盐(P=0.002, P<0.01), 而与底层蓝藻群落结构组成显著相关的是硝酸盐(P=0.001, P<0.01), 亚硝酸盐(P=0.026, P<0.05)和磷酸盐(P=0.002, P<0.01). 环境因子对三亚湾表层和底层蓝藻群落结构的空间分布差异的解释程度可分别达 99.3%和 58.3%.

致谢 感谢中国科学院南海海洋研究所三亚热带海洋生物实验站的所有老师在样品采集和数据处理方面给予的支持和帮助; 感谢国家生态系统研究网络三亚站数据库与信息系统的老师提供了有关数据.

参考文献

1 Hoffman L. Marine cyanobacteria in tropical regions: Diversity and ecology. Eur J Phycol, 1999, 34: 371–379
2 Capone D G. The marine nitrogen cycle. In: Kirchman D L, ed. Microbial Ecology of the Oceans. New York: Wiley, 2000. 455–494
3 Zehr J P. Nitrogen fixation by marine cyanobacteria. Trends Microbiol, 2011, 19: 162–173
4 Capone D G. Marine nitrogen fixation: What's the fuss? Curr Opin Microbiol, 2001, 4: 341–348
5 杨斌, 董俊德, 杨志浩, 等. 中国南海蓝细菌的化学成分研究. 热带海洋学报, 2007, 26: 67–69

6 El-Bestawy E A, Abd El-Salam A Z, Mansy H A R. Potential use of environmental cyanobacterial species in bioremediation of lindane-contaminated effluents. Int Biodeterior Biodegrad, 2007, 59: 180–192
7 柯志新, 黄良民, 谭烨辉, 等. 三亚珊瑚礁分布海区浮游生物的群落结构. 生物多样性, 2011, 19: 696–701
8 施祺, 赵美霞, 张乔民, 等. 海南三亚鹿回头造礁石珊瑚碳酸盐生产力的估算. 科学通报, 2009, 54: 1471–1479
9 张乔民, 施祺, 陈刚, 等. 海南三亚鹿回头珊瑚岸礁监测与健康评估. 科学通报, 2006, 51(增刊Ⅱ): 71–77
10 Dong J D, Zhang Y Y, Wang Y S, et al. Spatial and seasonal variations of Cyanobacteria and their nitrogen fixation rates in Sanya Bay, South China Sea. Sci Mar, 2008, 72: 239–251
11 董俊德, 王汉奎, 张偲, 等. 三亚湾海水温度季节变化及溶解无机氮的垂直分布特征. 热带海洋学报, 2002, 21: 40–47
12 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 encoding for 16S rRNA. Appl Environ Microbiol, 1993, 59: 695–700
13 Kataoka T, Hodoki Y, Koji S, et al. Tempo-spatial patterns of bacterial community composition in the western North Pacific Ocean. J Mar Syst, 2009, 77: 197–207
14 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 海洋监测规范—海水分析(GB17378.4—1998). 北京: 中国标准出版社, 1998. 142–162
15 Huang L M, Tan Y H, Song X Y, et al. The status of the ecological environment and a proposed protection strategy in Sanya Bay, Hainan Island, China. Mar Pollut Bull, 2003, 47: 180–186
16 Zhou W, Li T, Cai C H, et al. Spatial and temporal dynamics of phytoplankton and bacterioplankton biomass in Sanya Bay, northern South China Sea. J Environ Sci-China, 2009, 21: 595–603
17 Bostrom K H, Simu K, Hagstrom A, et al. Optimization of DNA extraction for quantitative marine bacterioplankton community analysis. Limnol Oceanogr Meth, 2004, 2: 365–373
18 Lepère C, Wilmotte A, Meyer B. Molecular diversity of Microcystis strains (*Cyanophyceae*, *Chroococcales*) based on 16S rDNA sequences. Syst Geogr Plant, 2000, 70: 275–283
19 Nübel U, Garcia-Pichel F, Muyzer G. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. Appl Environ Microb, 1997, 63: 3327–3332
20 Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Anton Leeuw, 1998, 73: 127–141
21 Maidak B L, Cole J R, Parker C T, et al. A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). Nucl Acids Res, 1999, 27: 171–173
22 Altschul S F, Madden T L, Schaeffer A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. Nucl Acids Res, 1997, 25: 3389–3402
23 Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol, 2007, 24: 1596–1599
24 Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 11030–11035
25 Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol, 1987, 4: 406–425
26 Zhang Y Y, Dong J D, Yang Z H, et al. Phylogenetic diversity of nitrogen-fixing bacteria in mangrove sediments assessed by PCR-DGGE. Arch Microbiol, 2008, 190: 19–28
27 Zhang J C, Zeng G M, Chen Y N, et al. Effects of physico-chemical parameters on the bacterial and fungal communities during agricultural waste composting. Bioresource Technol, 2011, 102: 2950–2956
28 Lepš J, Šmilauer P. Multivariate Analysis of Ecological Data Using CANOCO. Cambridge: Cambridge University Press, 2003. 43–75
29 栾青杉, 孙军, 宋书群, 等. 长江口夏季浮游植物群落与环境因子的典范对应分析. 植物生态学报, 2007, 31: 445–450
30 Fuller N J, Marie D, Partensky F. Clade-Specific 16S Ribosomal DNA Oligonucleotides Reveal the Predominance of a Single Marine Synechococcus Clade throughout a Stratified Water Column in the Red Sea. Appl Environ Microbiol, 2003, 69: 2430–2443
31 Choi D H, Noh J H. Phylogenetic diversity of Synechococcus strains isolated from the East China Sea and the East Sea. FEMS Microbiol Ecol, 2009, 69: 439–448
32 Liang W D, Yang Y J, Tang T Y, et al. Kuroshio in the Luzon Strait. J Geophys Res, 2008, 113: C08048, doi: 10.1029/2007JC004609
33 Jezberova J. Phenotypic diversity and phylogeny of picocyanobacteria in mesotrophic and eutrophic freshwater reservoirs investigated by a cultivation-dependent polyphasic approach. Doctor Dissertation. Ceske Budejovice: University of South Bohemia, 2006
34 Rohwer F, Breitbart M, Jara J, et al. Diversity of bacteria associated with the Caribbean coral *Montastraea franksi*. Coral Reefs, 2001, 20: 85–91
35 Murphy L S, Haugen E M. The distribution and abundance of phototrophic ultraplankton in the North Atlantic. Limnol Oceanogr, 1985, 30: 47–58

36 Iturriaga R, Mitchell B G. Chroococcoid cyanobacteria: A significant component in the food web dynamics of the open ocean. Mar Ecol Prog Ser, 1986, 28: 291–297
37 Fewer D, Friedl T, Budel B. Chroococcidiopsis and heterocyst-differentiating cyanobacteria are each other's closest living relatives. Mol Phylogenet Evol, 2002, 23: 82–90
38 Zhang Y Y, Dong J D, Ling J, et al. Phytoplankton distribution and their relationship to environmental variables in Sanya Bay, South China Sea. Sci Mar, 2010, 74: 783–792
39 杨志浩, 董俊德, 吴梅林, 等. 三亚湾网采浮游植物群落结构特征分析. 热带海洋学报, 2007, 26: 62–66
40 Yan Q Y, Yu Y H, Feng W S, et al. Plankton community composition in the Three Gorges Reservoir Region revealed by PCR-DGGE and its relationships with environmental factors. J Environ Sci-China, 2008, 20: 732–738
41 Zeng J, Yang L Y, Du H W, et al. Bacterioplankton community structure in a eutrophic lake in relation to water chemistry. World J Microbiol Biotechnol, 2009, 25: 763–772
42 Sipura J, Haukka K, Helminen H, et al. Effect of nutrient enrichment on bacterioplankton biomass and community composition in mesocosms in the Archipelago Sea, northern Baltic. J Plankton Res, 2005, 27: 1261–1272