

不同类型改性粘土去除米氏凯伦藻(*Karenia mikimotoi*)后絮体中细菌变化特点

丁 玉^{1,2,3,4}, 宋秀贤^{1,2,3,4}, 曹西华^{1,2,4}, 俞志明^{1,2,3,4}

(1. 中国科学院海洋研究所 海洋生态与环境科学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 海洋生态与环境科学功能实验室, 山东 青岛 266237; 3. 中国科学院大学, 北京 100049; 4. 中国科学院海洋大科学研究中心, 山东 青岛 266071)

摘要: 改性粘土能通过絮凝作用去除水体中的赤潮生物, 大量的微藻在短时间沉降到底层, 对底层环境中细菌群落组成及其功能产生的影响尚未见报道。本研究采用 16S rDNA 高通量测序技术, 分析了两种类型改性粘土——聚合氯化铝改性粘土(MC I)和硫酸铝改性粘土(MC II)处理后的米氏凯伦藻(*Karenia mikimotoi*)絮体中细菌群落随时间的变化情况。实验结果显示, 两种改性粘土对米氏凯伦藻的絮凝去除过程基本在 3 h 内完成, 并且絮体中细菌密度均随时间的推移不断增长。但不同类型改性粘土对细菌群落结构与功能产生不同的影响, MC I 组主要以 *Stenotrophomonas* 为主, MC II 组中 *Celeribacter* 占比较高。进一步分析发现两个实验组的细菌功能均以化能异养为主, 但 MC I 组中, 与硝酸盐还原、硝酸盐呼吸以及固氮等功能相关的细菌有较高丰度; 在 MC II 组中, 具有硫和硫化合物氧化、以及亚硫酸盐氧化等与硫转化功能有关的细菌占比较高。另外, 还初步分析了改性粘土治理后底层絮体中细菌群落的变化特征与有机质含量及营养盐变化的关系, 研究结果既能完善改性粘土技术的生态环境效应研究, 也将为粘土的生物改性提供理论支持。

关键词: 改性粘土; 赤潮; 细菌密度; 细菌群落结构

中图分类号: X55 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2021)07-0046-11
DOI: 10.11759/hyxx20200312001

赤潮是由生活在海水中的藻类大量增殖或聚集造成的一种生态异常现象^[1], 近年来, 赤潮在我国近海海域频繁出现, 对生态环境和养殖业等造成严重危害。2000 年以前, 我国赤潮发生次数和累计面积相对较少。自 2001 年起, 赤潮年发生次数维持在 50 次以上, 其中, 2012 年在我国东南沿海一带暴发的米氏凯伦藻(*Karenia mikimotoi*)赤潮对水产养殖业带来了毁灭性的打击, 直接经济损失超过 20 亿元^[2]。

作为全球性的典型海洋生态灾害之一, 赤潮从多个方面威胁着人类的生命安全, 有关赤潮治理方法的研究众多, 但大多数方法因成本、生态效应等问题仍停留在实验室阶段^[3]。而改性粘土絮凝法作为一种应急处置技术, 是目前可现场大规模应用的赤潮治理方法, 具有操作简便、成本节约、环境友好等优点。改性粘土除藻原理是通过改性粘土颗粒与赤潮藻细胞碰撞结合、发生絮凝, 使赤潮藻细胞沉降到底层死亡, 并对未絮凝的藻细胞造成损伤, 从而达到有效消除和控制赤潮的目的^[4]。

与赤潮藻自然消亡相比, 改性粘土法作为一种重要的赤潮防控手段, 可在短时间内迅速沉降大量藻细胞至底层, 絮凝后藻细胞的消亡分解问题一直备受关注。藻类的消亡分解过程除了受温度、pH、营养盐浓度等因素影响外^[5], 通常由细菌介导^[6]。目前, 关于细菌在藻类分解过程中的影响和作用等已有很多报道, 例如, 在分解的微囊藻(*Microcystis* spp.)细胞周围发现有大量杆菌聚集^[7]; 研究还发现在小球藻(*Chlorella* sp.)和中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)分解过程中异养菌优势群落从假单胞菌属-

收稿日期: 2020-03-12; 修回日期: 2020-05-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(41976148); 山东省重大科技创新工程项目(2019JZZY010808); 2019 年度“泰山学者攀登计划”项目 [Foundation: National Natural Science Foundation of China, No. 41976148; Key R&D project of Shandong Province, No. 2019JZZY010808; Taishan Scholars Climbing Program of Shandong Province of 2019]

作者简介: 丁玉(1994—), 女, 山东威海人, 博士研究生, 主要从事赤潮治理研究, 电话: 0532-82898985, E-mail: dingyuchn@foxmail.com; 宋秀贤(1966—), 通信作者, 研究员, 博士生导师, 电话: 0532-82898587, E-mail: songxx@qdio.ac.cn

产碱菌属(*Pseudomonas-Alcaligenes*)转变为不动杆菌属-莫拉菌属(*Acinetobacter-Moraxella*)^[8]。

改性粘土法的高效絮凝作用使大量藻细胞在短时间内脱离上层水体进入沉积物表面,这些沉积絮体中的藻源有机质可能部分被粘土吸附封存于底层沉积物中,部分被细菌分解后进入水体。因此,改性粘土絮凝赤潮生物过程中细菌群落的变化值得关注与研究。本文通过室内模拟实验,探究典型赤潮生物——米氏凯伦藻在不同改性粘土絮凝后,底层絮体中细菌变化差异,揭示改性粘土治理赤潮后对底层环境中细菌群落的组成及功能的影响,同时结合相关水质参数,初步探讨细菌群落变化与底层絮体中有机质(TOC)含量的关系,以期进一步完善对改性粘土生态环境效应的认识,为改性粘土治理赤潮的现场工作提供一定科学依据。

1 材料与方法

1.1 微藻培养及改性粘土制备

本研究选取我国近海典型的有毒赤潮藻——米氏凯伦藻为研究对象。藻种取自中国科学院海洋研究所海洋生态与环境科学重点实验室藻种库,在温度(20±1)℃、光照强度 50~60 μmol/(m²·s)、光暗比 12 h : 12 h 条件下进行培养,后期实验培养条件相同。所有实验用具经过 5%HCl 浸泡 24 h 后,在 121℃下高温灭菌 30 min。培养实验所用的海水取自青岛胶州湾海域,经 0.45 μm 混合纤维膜过滤、121℃高温灭菌 30 min,冷却至室温后,加入无硅 L1 营养液^[9]。

实验所使用的粘土为广西北海高岭土,所采用的改性剂分别为聚合氯化铝(PAC)和硫酸铝(AS)。聚合氯化铝改性粘土(MC I)和硫酸铝改性粘土(MC II)的制备方法参照文献[10-11]。本实验利用 16S rDNA 的方法测定改性粘土的带菌情况,多次浓缩提取 DNA 后,PCR 扩增均未获得目的条带,说明改性粘土自带细菌量较低;这可能是改性粘土的制备过程(包括水洗筛选、磁选净化、高温老化等十几道工艺^[4])使得材料本身的细菌含量较低,故在本文讨论中暂不考虑粘土自带细菌的影响。

1.2 实验设计

将米氏凯伦藻培养至指数生长期,混合均匀后分别置于 32 个 1 L 的容器中,藻密度约为(3.08±0.30)×10⁷ 个/L。分别加入 MC I 和 MC II,使其最终质量

浓度均为 0.5 g/L,于 3 h(在图中表示为 1 d)、3 d、5 d、7 d、11 d、16 d、21 d、26 d 采集样品,每组两个平行样。分层取样,首先,于液面下 3 cm 处移取藻液 10 mL,用于当日测定藻密度,随后,通过虹吸法吸出上层液体(940 mL),取其中 40 mL 用于溶解态营养盐(硝酸盐、亚硝酸盐、铵盐)的测定,样品经三氯甲烷固定后冻于-20℃待分析。剩余 50 mL 液体与底层絮体充分混匀,15 mL 絮体混合液经饱和氯化汞固定后储存于-20℃冰箱,用于测定总有机碳(TOC)。30 mL 用于测定 16S rDNA,样品于-80℃冰箱中储存。5 mL 样品经多聚甲醛(终浓度为 1%)固定后储存于-80℃冰箱中,用于细菌计数。

1.3 分析方法

1.3.1 细菌及藻细胞计数

将冻存的细菌样品融化处理后,利用无菌 TE (10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA)缓冲液稀释 100 倍(逐级稀释)。通过 SYBR Green I 染色剂(按照体积比 1 : 10 000)避光染色 15 min 后^[12],上流式细胞仪(BD FACS Calibur, USA)进行检测^[13],利用内含数量已知 Beads 的绝对计数管(BD Trucount tubes, USA)确定细菌浓度,将细菌在坐标轴上圈出来完成计数^[14]。藻细胞计数的样品用 Lugol 试剂固定,在倒置显微镜(Olympus IX71, Japan)下进行镜检细胞计数。

1.3.2 16S rDNA

真空抽滤絮体悬浊液于 0.22 μm 的滤膜上,用 OMEGA 水样提取试剂盒(D5525),按照使用说明书提取总 DNA,使用 1%琼脂糖凝胶电泳检测提取 DNA 的质量。将检测合格的 DNA 样品送至诺禾致源生物信息科技有限公司,使用 16S rDNA 通用引物 341F(5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3')和 806R(5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3')进行目的基因扩增,基于 Ion S5™XL 技术测序平台(Thermofisher),利用单端测序(single-end)的方法,完成 16S V3-V4 区域测序分析。

1.3.3 其他水质参数

TOC 通过总有机碳分析仪(Aanalytik jena Multi N/C 2100S, Germany)进行测定^[15]。营养盐浓度测定的方法参照《海洋调查规范》(GB/T 12763.4—2007),铵盐采用次氯酸钠-苯酚法,硝酸盐通过 Cd 还原为亚硝酸盐采用盐酸萘乙二胺法(重氮-偶氮法)^[16],所有营养盐样品均用营养盐自动分析仪(Skalar San++, Netherland)测定。

1.4 数据处理

改性粘土对藻细胞的去除率计算公式如下:

$$RE = \left(1 - \frac{N_t}{N_0}\right) \times 100\%, \quad (1)$$

其中, RE 为去除率, N_0 和 N_t 分别为添加改性粘土前和取样时间 t 时刻的藻细胞数量。

利用 FlowJo 软件(TreeStar, USA)进行细菌数量的读取和分析。使用 Qiime 软件(Version 1.7.0)计算 Shannon 指数。采用 FAPROTAX(Functional Annotation of Prokaryotic Taxa)数据库, 基于 16S rDNA 测序所得的 OTU 分类表对细菌群落的功能进行注释预测^[17]。使用 mothur 软件 amova 函数进行组间群落结构差异性分析。通过 LEfSe 软件使用线性判别分析方法(linear discriminant analysis, LDA)进行组间差异物种筛选。运用 Excel 2013 和 Origin 8.5 对数据进行处理及绘图。

2 实验结果

2.1 改性粘土对米氏凯伦藻的去除效果

实验结果显示, 质量浓度(以下简称浓度)为 0.5 g/L 的 MC I 能够迅速沉降水体中约 70% 的藻细胞, 在之后的 10 d 内藻细胞密度虽有一定程度的反弹, 但最高密度远低于自然生长的对照组的藻密度(约 8×10^7 个/L) (图 1)。加入 0.5 g/L 的 MC II 后, 对米氏凯伦藻去除率将近 100%, 且随时间推移并未出现再次增殖的现象。由此可见, 同样用量、不同类型改性粘土对同一种赤潮生物的去 除率有较大差异, 该结果与以往研究结果类似^[18]。

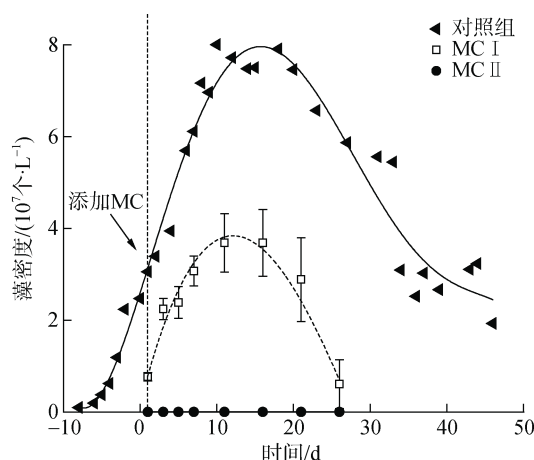


图 1 不同处理组中米氏凯伦藻密度随时间的变化情况
Fig. 1 Variation of *K. mikimotoi* density under contrasting systems

2.2 细菌密度、群落组成与功能预测

2.2.1 细菌密度

流式细胞仪测定结果表明, 添加 0.5 g/L 的 MC I 3 h 后, 絮体中细菌密度为 $(3.02 \pm 0.26) \times 10^{10}$ 个/L, 此后持续增长至第 26 d $(7.52 \pm 0.30) \times 10^{11}$ 个/L; 经 0.5 g/L 的 MC II 处理 3 h 后, 絮体中细菌密度为 $(7.51 \pm 1.28) \times 10^{10}$ 个/L, 而后增长至第 26 d $(5.18 \pm 0.30) \times 10^{11}$ 个/L (图 2)。

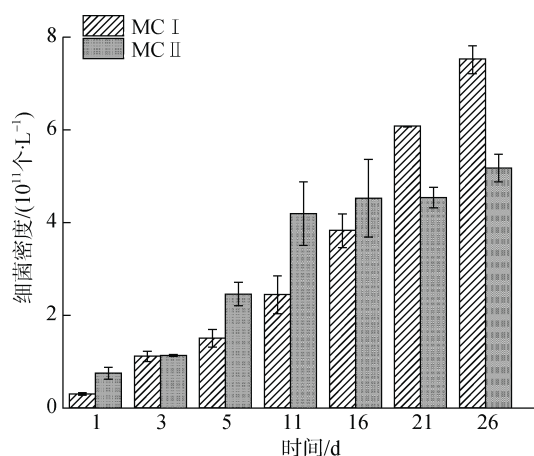


图 2 两种类型絮体中细菌密度随时间变化情况
Fig. 2 Variation of the bacterial density of flocs treated with two types of modified clay

2.2.2 细菌群落组成与多样性

细菌 16S rDNA 高通量测序后, 平均每个样品测得 37 008 条有效序列。所有样品的序列经过聚类后共得到 1 422 个 OTU(operational taxonomic unit, 操作分类单元), 经物种注释后共获得 21 个门、36 个纲、82 个目、159 个科和 322 个属的细菌。在属水平上, 两实验组最大丰度排名前 10 的物种相对丰度如图 3 所示。MC I 处理 3 h 后, 絮体中细菌主要以 *Stenotrophomonas* 为主, 且随时间变化, *Stenotrophomonas* 丰度逐渐降低, 第 26 d 主要以 *Celeribacter* 和 *Altererythrobacter* 为主。添加 MC II 后, 絮体中优势菌属同样随时间发生演替, 由 *Altererythrobacter*、*Marivita*、*Fluviicola* 逐渐向 *Celeribacter*、*Muricauda*、*Sulfitobacter*、*Altererythrobacter* 转变。选用 Shannon 指数评估不同改性粘土处理后絮体菌群的物种多样性(图 4), MC I 组 3 h 的 Shannon 指数为 0.44, 而后逐渐升高至第 26 d 的 4.93, MC II 组菌群多样性指数由 3 h 的 4.68 降低至第 11 d 的 2.43, 此后第 26 d 回升至 3.62。

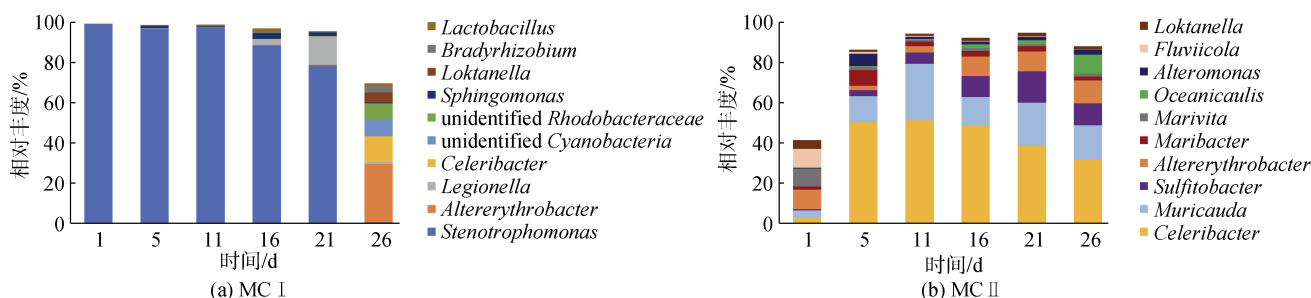


图3 属水平最大丰度排名前10的细菌物种相对丰度图
Fig. 3 Relative abundances of the top ten bacteria at the genus level

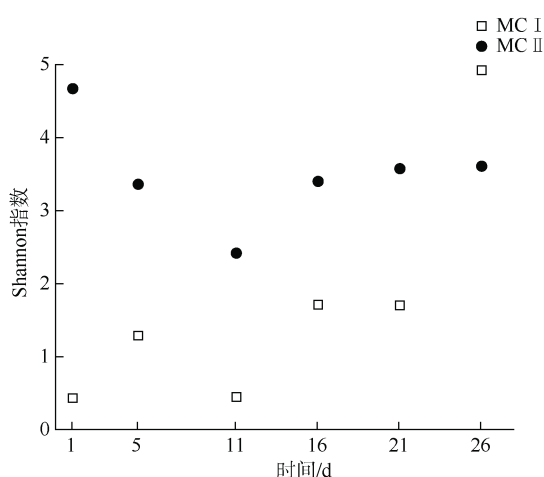


图4 MC I 和 MC II 组絮体中细菌的 Shannon 指数
Fig. 4 Bacterial Shannon index of MC I and MC II flocs

2.2.3 细菌功能预测

根据 16S rDNA 序列的分类注释结果, 采用 FAPROTAX 工具对 MC I 和 MC II 组的细菌群落功能注释后, 分别获得 57 和 53 种功能分组, 最大丰度排名前 20 的功能分组信息如图 5 所示。从图中可以看出, 化能异养(包括 chemoheterotrophy 和 aerobic chemoheterotrophy)功能相对丰度较高, 在所有样本中均有出现。另外, 在 MC I 组中, 具有硝酸盐还原(nitrate reduction)、硝酸盐呼吸(nitrate respiration)、固氮(nitrogen respiration)功能的细菌相对丰度较高; MC II 组中, 除了化能异养功能外, 细菌发酵功能(fermentation)的相对丰度较高, 后期还出现了较高比例的硫氧化(dark sulfur oxidation)、硫化物氧化(dark oxidation of sulfur compounds)和亚硫酸盐氧化(dark sulfite oxidation)方面的细菌功能。

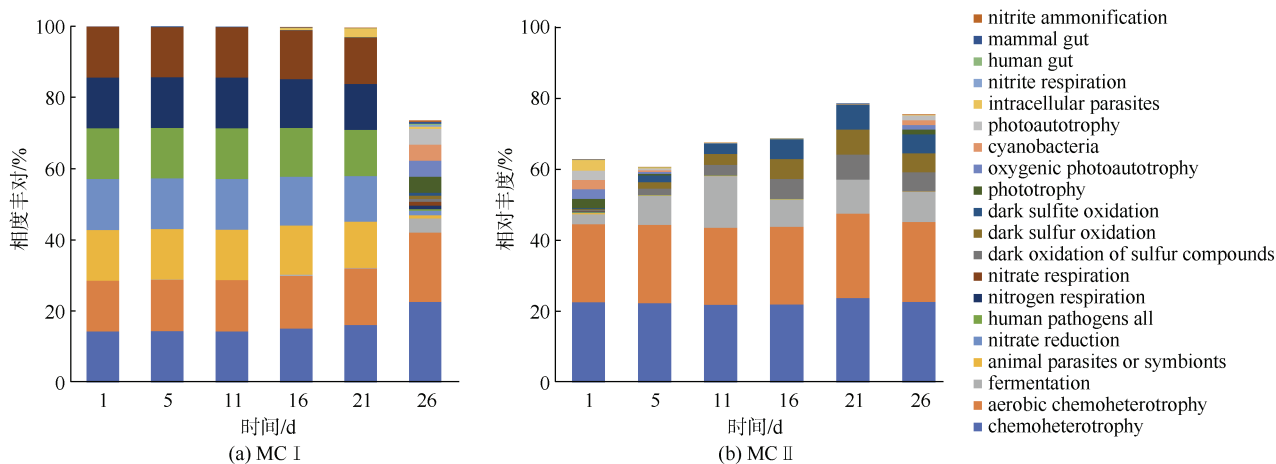


图5 不同改性粘土处理后, 絮体中细菌功能相对丰度
Fig. 5 Relative abundances of bacterial function in flocs treated with different modified clays

2.3 主要水质参数

本研究在分析不同处理组细菌密度和群落变化的同时, 也监测了主要水质参数的变化情况。经改性粘土处理后, MC I 组 3 h 絮体中 TOC 浓度为 $(151.35 \pm$

$16.23)$ mg/L, 实验前期略有下降, 而后随时间变化逐渐升高; MC II 组絮体 TOC 持续缓慢减少, 由 3 h 的 (203.18 ± 2.69) mg/L 降至第 26 d (166.24 ± 14.49) mg/L (图 6)。

水体中硝酸盐含量变化情况如图 7a 所示, 添加

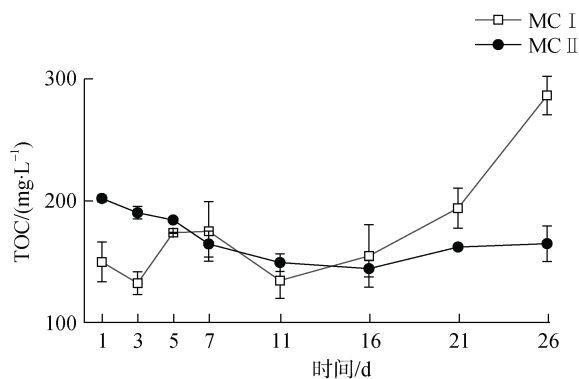


图 6 不同改性粘土处理后,絮体 TOC 随时间变化
Fig. 6 Changes of TOC in flocs after treatment with different modified clays over time

0.5 g/L 的 MC I 后, 3 h 水体中硝酸盐含量为 $(467.00 \pm 11.35) \mu\text{mol/L}$, 而后随时间变化持续降低至 $(262.15 \pm 5.86) \mu\text{mol/L}$ 。加入 MC II 后, 水体中硝酸盐浓度为 $(460.30 \pm 6.59) \mu\text{mol/L}$, 一直降低至第 21 d 的 $(392.22 \pm 0.47) \mu\text{mol/L}$, 第 26 d 回升至 $(459.95 \pm 2.59) \mu\text{mol/L}$ 。添加 MC I 后, 亚硝酸盐浓度从 $(2.85 \pm 0.01) \mu\text{mol/L}$ 增加到 $(35.09 \pm 4.12) \mu\text{mol/L}$; 而 MC II 组亚硝酸盐浓度变化幅度较小, 在 $(1.41 \pm 1.94) \mu\text{mol/L}$ 到 $(2.88 \pm 0.01) \mu\text{mol/L}$ 范围内波动(图 7b)。添加 0.5 g/L 的 MC I 后, 水体中铵盐浓度为 $(3.92 \pm 0.00) \mu\text{mol/L}$, 此后逐渐增加至 $(14.70 \pm 0.83) \mu\text{mol/L}$ 。添加 MC II 后, 铵盐浓度一直上升, 至第 26 d 为 $(22.28 \pm 3.02) \mu\text{mol/L}$ (图 7c)。

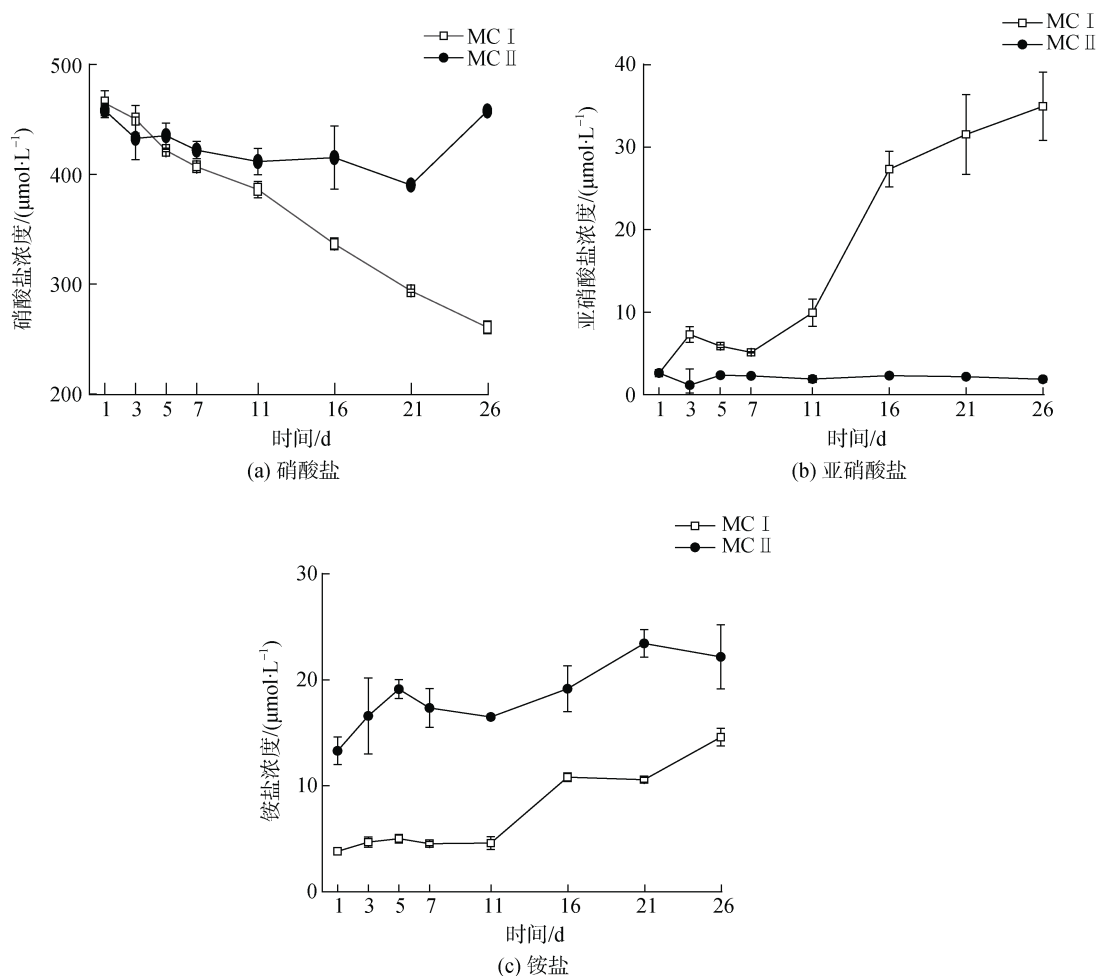


图 7 不同改性粘土处理后, 水体中溶解无机氮各组分变化
Fig. 7 Changes in dissolved inorganic nitrogen in water treated with two types of modified clay

3 讨论

3.1 改性粘土对细菌密度的影响

海洋细菌作为重要的分解者, 以多样化的代谢

活动参与海洋中的物质转化和分解过程, 其密度是海洋微生物研究的关键参数。有不少研究表明, 海洋细菌的密度^[19-20]和群落结构^[21-22]与赤潮暴发关系密切, 细菌与赤潮藻之间相互利用、相互选择, 形成特

有的微生物群落结构^[23]。

改性粘土通过表面改性使原土表面由负电性转变为正电性^[4]，而细菌表面含有羧基和磷酸基团等，带有大量负电荷^[24]，与表面带正电的改性粘土颗粒易发生絮凝沉降。有研究发现，在鱼虾养殖中可以使用粘土絮凝沉降细菌，以防止养殖生物幼体受到病原菌感染^[25]。本研究，由于不同类型改性粘土絮凝效果不同，MC II 对米氏凯伦藻的去除率高于 MC I (图 1)，可以推断 MC II 对细菌的絮凝效果也高于 MC I，致使 3 h 的 MC II 组絮体中的细菌密度高于 MC I 组(图 2)。

细菌生长繁殖需要适宜的条件，如营养物质、温度、水分、环境含氧量等^[26]，本研究中 MC I 和 MC II 组温度等环境条件稳定，造成细菌密度变化的主要差异来源于营养物质。在后续的 26 天实验中，底层絮体中细菌密度持续增加，这是由于沉积絮体含有大量的藻源有机质，为异养细菌提供了丰富的碳源等营养物质^[27]。Avnimelech^[28]研究发现，有机质含量会影响细菌密度，随着水体中 C/N 的提高，异养细菌含量会显著升高；Burford 等^[29]向养殖水体中添加有机碳，可以促进细菌的生长，消耗大量的营养物质，从而可控制养殖水体的无机氮。本实验中，同样用量、不同类型改性粘土对米氏凯伦藻的去除率不同(图 1)，致使底层絮体中有机质含量不同(图 6)，TOC 含量的差异可能会影响后续细菌密度的变化。实验前期(1~11 d)，MC I 组絮体中细菌平均增长速率为 2.14×10^{10} 个/(L·d)，而 MC II 组细菌平均增长速率为 3.44×10^{10} 个/(L·d)。由此可见，MC II 组底层絮体中较高的有机质含量为 MC II 组中细菌的增殖提供了更好的环境条件，可能是导致 MC II 组细菌的生长率高于 MC I 组的原因之一。在实验后期(11~26 d)，MC I 组絮体中细菌平均增长速率为 3.38×10^{10} 个/(L·d)，而 MC II 组为 6.60×10^9 个/(L·d)，推测其原因可能是 MC I 组中再次生长的藻细胞进入衰亡期(图 1)，水体中藻细胞死亡后沉降到底层，补充了絮体中藻源有机质的含量，从而促进了 MC I 组底层絮体中细菌的生长；而在 MC II 组后续的实验过程里，絮体中无藻源有机质补充，有机质成为细菌生长的限制条件，使得细菌的增长速率减缓。

细菌的生长与繁殖需要消耗有机物，而 MC I 处理后米氏凯伦藻经历再次生长与死亡的过程，在实验后期大量有机物沉降到底层，使得絮体中 TOC

增长，所以，本研究对 MC I 组前期和 MC II 组的细菌增长速率与 TOC 消耗速率进行相关性分析(图 8)。结果发现，细菌增长速率与 TOC 消耗速率呈正相关($P < 0.001$)，即 TOC 消耗得越快，细菌增长越快。由此可见，MC I 与 MC II 组中细菌密度变化与 TOC 含量密切相关，絮体中 TOC 含量会影响细菌密度。

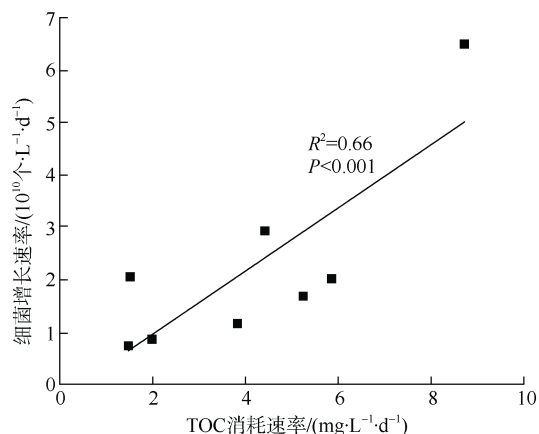


图 8 细菌增长速率与 TOC 消耗速率之间的相关性
Fig. 8 Correlation analysis between bacterial growth rate and TOC consumption rate

3.2 改性粘土对细菌群落组成及功能的影响

实验结果显示，不同类型改性粘土不仅能影响细菌密度，同时也会对细菌群落组成产生一定影响(图 3)。MC I 和 MC II 组组间细菌群落结构差异显著($P < 0.001$)，通过 LEfSe 分析(LDA score > 4)寻找 MC I、MC II 组间差异显著的物种，结果显示，MC I 组的差异显著的菌属为 *Stenotrophomonas*，MC II 组的差异物种有 *Celeribacter*、*Muricauda*、*Sulfitobacter*、*Altererythrobacter*、*Maribacter*、*Marivita*、*Alteromonas*、*Fluviicola*(图 9)。

MC I 组的细菌群落以 *Stenotrophomonas* 为主。该细菌为一种革兰氏阴性菌，约 0.5~1.5 μm ，有若干极生鞭毛，形态为微弯曲或直的杆状^[30-31]，在水和土壤等自然环境中广泛分布^[31]，有的还存在于植物根系中，能够参与固氮^[32]，有的能够降解一些复杂有机物^[31]，该属下的细菌大多耐药且抗菌，可用来作为生物防治剂^[33]。近年来，也曾多次在海洋环境中分离到该属的细菌^[34-35]，阴盼晴^[36]发现 *S. maitoiphilia* 可通过分泌胞外耐高温活性物质及胞外酶类抑制藻细胞存活，抑制赤潮藻锥状斯式藻(*Scrippsiella trochoidea*)的生长。*Stenotrophomonas* 还是一种耐卤菌群，能够在高浓度的 NaCl 条件下存活^[37]。另外，

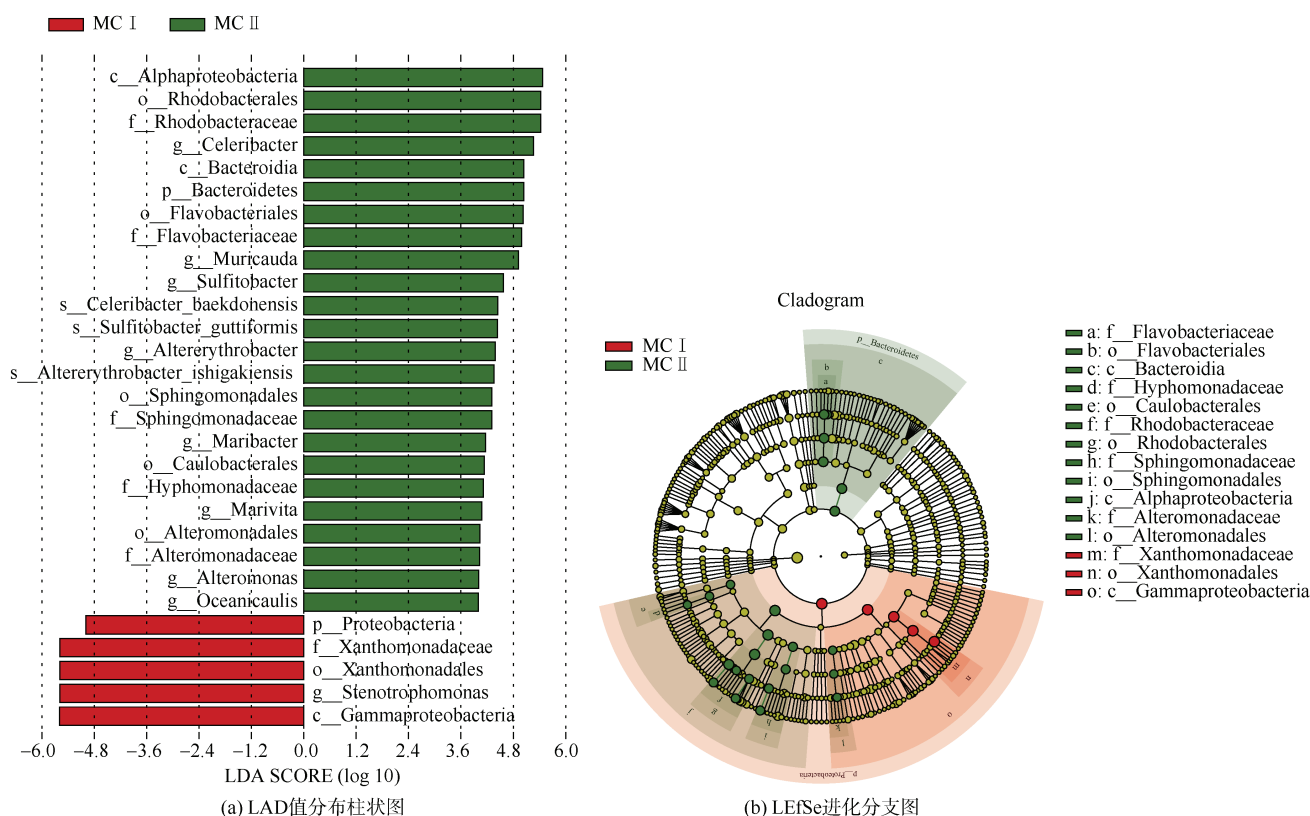


图9 MCI 和 MC II 组絮体中细菌的 LefSe 进化分支图
Fig. 9 LefSe analyses of MC I and MC II

Stenotrophomonas 能够产生螯合铝的有机酸和增加溶液 pH 值的多糖来降低铝的毒性, 因此该菌能够耐受高浓度铝^[38-39]。在 MC I 组中, 絮体中细菌物种多样性指数前期较低(图 4), 一种 *Stenotrophomonas* 占主要优势, 可能正是因为该类细菌对 MC I 中的聚合氯化铝具有一定耐受性, 或者 MC I 中的某些微量元素等综合因素的影响刺激了 *Stenotrophomonas* 的生长, 亦或未死亡米氏凯伦藻的影响。在 MC I 组后期, 絮体中菌群多样性指数升高, *Stenotrophomonas* 优势地位减弱, 可能是由于米氏凯伦藻完全衰亡、或者 MC I 中的某些微量元素耗尽等原因, 该结果将在后续的实验中进行进一步验证。

在 MC II 组中, 细菌群落结构随实验时间增加逐渐变化, 优势菌属发生演替, 由 *Altererythrobacter*、*Marivita*、*Fluviicola* 逐渐变为 *Celeribacter*、*Muricauda*、*Sulfitobacter*、*Altererythrobacter*, 推测该变化或与 MC II 的改性剂——硫酸铝有关。*Fluviicola*、*Altererythrobacter*、*Marivita* 三种菌属均为革兰氏阴性菌, 且为海水中常见的菌属^[40-42]。而随实验时间的进行, 为适应 MC II 处理后的环境, 细菌群落逐渐向 *Celeri-*

bacter、*Muricauda*、*Sulfitobacter*、*Altererythrobacter* 等菌属转变。*Celeribacter* 最早从海洋分离^[43], 是一种化能异养菌, 能够氧化硫代硫酸盐^[44], *Sulfitobacter* 能够产生亚硫酸盐氧化酶, 该属细菌可参与亚硫酸盐的氧化^[45-46], 而 *Altererythrobacter* 属下细菌可通过歧化反应降解硫代硫酸盐^[47]。硫是构成生命物质所必须的元素, 它是一些必需氨基酸、蛋白质、多糖、维生素和辅酶的组成成分, 它的转化过程较为复杂, 由多种硫细菌完成^[48]。在 MC II 组中, 实验后期的菌属大多能参与和硫相关的反应, 推测 MC II 组沉积絮体中存在硫转化的可能。

不同类型的改性粘土对细菌群落组成产生了不同的影响, 同时也会在一定程度上影响细菌群落的功能。而细菌在有机物矿化分解中起着重要作用, 其功能在一定程度上影响了海洋生态系统的物质循环与能量流动。经 FAPROTAX 对细菌群落功能进行预测发现(图 5), 在 MC I 组中, 具有硝酸盐还原、硝酸盐呼吸、固氮功能的细菌相对丰度较高, 且上述功能在 MC I 和 MC II 组中存在显著性差异($P < 0.05$)。通过水质参数变化发现, MC I 组水体中硝酸盐浓度降

低、亚硝酸盐浓度升高(图 7a, 图 7b), 推测其发生硝酸盐还原过程。

相比 MC I 组, MC II 组中发酵作用的细菌功能相对丰度较高, 后期还出现较高比例的硫、硫化物和亚硫酸盐氧化作用方面的细菌功能, 上述功能在 MC I 和 MC II 两组间差异显著($P < 0.05$)。这可能与 MC II 型改性粘土中改性剂有关, 而本实验中并未进行与硫有关的水质参数的测定, 拟在今后的研究中进一步完善和深入。

另外, MC I 和 MC II 组中化能异养功能均占有较高比例, 结合水质参数发现, MC I、MC II 组中 TOC 在实验前期均有所下降(图 6), 由此可见, MC I 和 MC II 组絮体中不同的细菌群落对藻源有机质进行了分解。此外, 本研究中, MC I 组、MC II 组水体中铵盐浓度均上升(图 7c), 推测有机氮在异养菌的作用下发生了降解。海水中还原态氨氮主要是海洋生物代谢和死亡分解的终产物^[49], 有机氮可以直接脱氨基, 氨基再与氢离子结合形成铵离子。

4 结论

1) 改性粘土处理后的 26 d 内, MC I 组和 MC II 组絮体中细菌密度持续增长, 且两组间细菌的增长速率不同, 这是由于不同类型改性粘土对米氏凯伦藻的去除率不同, 使底层絮体中的有机质含量不同, 从而影响细菌的密度变化。

2) 不同类型改性粘土对细菌群落结构产生了不同的影响, MC I 组絮体中细菌主要以 *Stenotrophomonas* 为主, MC II 组的优势种为 *Celeribacter*、*Muricauda*、*Altererythrobacter*、*Sulfitobacter* 等。通过 FAPROTAX 功能预测发现, MC I 组中的细菌具有较高丰度的硝酸盐还原、硝酸盐呼吸以及固氮等功能, MC II 组中硫氧化、硫化物氧化、亚硫酸盐氧化等与硫转化有关的细菌功能占比较高。

致谢: 感谢吴婷对实验部分的帮助, 感谢张悦对文章修改的建议, 同时十分感谢各位审稿专家对本文提出的建设性的修改意见与建议。

参考文献:

- [1] NOAA. What is a harmful algal bloom[EB/OL]. (2016-4-27) [2020-2-11]. <https://www.noaa.gov/what-is-harmful-algal-bloom>.
- [2] 郭皓, 丁德文, 林凤翱, 等. 近 20a 我国近海赤潮特点与发生规律[J]. 海洋科学进展, 2015, 33(4): 547-558. GUO Hao, DING Dewen, LIN Fengao, et al. Characteristics and patterns of red tide in China coastal waters during the last 20a[J]. Advances in Marine Science, 2015, 33(4): 547-558.
- [3] ANDERSON D M. Approaches to monitoring, control and management of harmful algal blooms (HABs)[J]. Ocean & Coastal Management, 2009, 52(7): 342-347.
- [4] YU Z, SONG X, CAO X, et al. Mitigation of harmful algal blooms using modified clays: Theory, mechanisms, and applications[J]. Harmful Algae, 2017, 69: 48-64.
- [5] SCHOENBERG S A, BENNER R, ARMSTRONG A, et al. Effects of acid stress on aerobic decomposition of algal and aquatic macrophyte detritus: Direct comparison in a radiocarbon assay[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1990, 56(1): 237-244.
- [6] CRANWELL P A. Decomposition of aquatic biota and sediment formation: bound lipids in algal detritus and lake sediments[J]. Freshwater Biology, 2010, 9(4): 305-313.
- [7] 吴生才, 陈伟民. 太湖浮游植物生物量的周期性变化[J]. 中国环境科学, 2004, 24(2): 151-154. WU Shengcai, CHEN Weimin. The periodic change of phytoplankton biomass in Taihu Lake[J]. China Environmental Science, 2004, 24(2): 151-154.
- [8] FUKAMI K, SIMIDU U, TAGA N. Fluctuation of the communities of heterotrophic bacteria during the decomposition process of phytoplankton[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1981, 55(2): 171-184.
- [9] GUILLARD R R L, HARGRAVES P E. *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a crysophyte[J]. Phycologia, 1993, 32(3): 234-236.
- [10] 俞志明, 邹景忠, 马锡年. 一种提高粘土矿物去除赤潮生物能力的新方法[J]. 海洋与湖沼, 1994, 25(2): 226-232. YU Zhiming, ZOU Jingzhong, MA Xinian. A new method to improve the capability of clays for removing red tide organisms[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1994, 25(2), 226-232.
- [11] 刘扬, 俞志明, 曹西华, 等. 悬浮液中硫酸根对改性粘土去除藻华生物效率的影响[J]. 海洋与湖沼, 2014, 45(4): 734-740. LIU Yang, YU Zhiming, CAO Xihua, et al. Effects of sulfate ion in suspension on modified clay particles in removing harmful algal organisms[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2014, 45(4): 734-740.
- [12] PATERSON J, NAYAR S, MITCHELL J, et al. Population-specific shifts in viral and microbial abundance within a cryptic upwelling[J]. Journal of Marine Systems, 2013, 113-114: 52-61.
- [13] 梁彦韬. 青岛近海浮游病毒、微微型浮游植物、异养细菌的丰度变化及其与环境相关性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008. LIANG Yantao. Dynamics of virioplankton, picophyto-

- plankton, heterotrophic bacteria and correlation with environmental factors in the coastal waters of Qingdao[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2008.
- [14] NICHOLSON J K A, STEIN D, MUI T, et al. Evaluation of a method for counting absolute numbers of cells with a flow cytometer[J]. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 1997, 4: 309-313.
- [15] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 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, 2007.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. The specifications for marine monitoring: Part 4 Sea-water analysis: GB 17378.4—2007[S]. Beijing: Standards Press of China, 2007.
- [16] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 海洋调查规范: 第4部分 海水化学要素调查: GB/T 12763.4—2007[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Specifications for oceanographic survey: Part 4 Survey of chemical parameters in sea water: GB/T 12763.4—2007[S]. Beijing: Standards Press of China, 2007.
- [17] LOUCA S, PARFREY L, DOEBELI M. Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome[J]. *Science*, 2016, 353: 1272-1277.
- [18] 邱丽霞, 俞志明, 曹西华, 等. 改性粘土对球形棕囊藻(*Phaeocystis globosa*)和东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*)的去除作用[J]. *海洋与湖沼*, 2017, 48(5): 982-989.
- QIU Lixia, YU Zhiming, CAO Xihua, et al. Removal efficiencies for *Phaeocystis globosa* and *Prorocentrum donghaiense* with modified clay[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2017, 48(5): 982-989.
- [19] FURUKI M, KOBAYASHI M. Interaction between *Chattonella* and bacteria and prevention of this red tide[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 1991, 23: 189-193.
- [20] 曾活水, 林燕顺, 姚瑞梅. 厦门西海域赤潮成因与细菌量相关性的研究[J]. *海洋学报*, 1993, 15(6): 105-110.
- ZENG Huoshui, LIN Yanshun, YAO Ruimei. Study on the correlation between the cause of red tide and the amount of bacteria in the western Xiamen sea area[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 1993, 15(6): 105-110.
- [21] RIEMANN L, STEWARD G, AZAM F. Dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(2): 578-587.
- [22] 李伟, 杨彩云, 李东, 等. 厦门海域2011年中肋骨条藻和血红哈卡藻赤潮期间细菌群落结构变化[J]. *微生物学报*, 2012, 52(10): 1268-1281.
- LI Yi, YANG Caiyun, LI Dong, et al. Dynamics of bacterial community during the bloom caused by *Skeletonema costatum* and *Akashiwo sanguinea* in Xiamen sea area[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(10): 1268-1281.
- [23] FISHER M M, WILCOX L W, GRAM L E. Molecular characterization of epiphytic bacterial communities on charophycean green algae[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(11): 4384-4389.
- [24] WILSON W W, WADE M, HOLMAN S, et al. Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, 43(3): 153-164.
- [25] ATTRAMADAL K J K, TØNDEL B, SALVESEN I, et al. Ceramic clay reduces the load of organic matter and bacteria in marine fish larval culture tanks[J]. *Aquacultural Engineering*, 2012, 49: 23-34.
- [26] 沈萍, 陈向东. 微生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2016.
- SHEN Ping, CHEN Xiangdong. *Microbiology*[M]. Beijing: Higher Education Press, 2016.
- [27] COLE J, LIKENS G, STRAYER D. Photosynthetically produced dissolved organic carbon: An important carbon source for planktonic bacteria[J]. *Limnology and Oceanography*, 1982, 27(6): 1080-1090.
- [28] AVNIMELECH Y. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems[J]. *Aquaculture*, 1999, 176(3): 227-235.
- [29] BURFORD M A, THOMPSON P J, MCINTOSH R P, et al. Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize[J]. *Aquaculture*, 2003, 219(1): 393-411.
- [30] WOLF A, FRITZE A, HAGEMANN M, et al. *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with antifungal properties[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52(6): 1937-1944.
- [31] RYAN R, MONCHY S, CARDINALE M, et al. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7(7): 514-525.
- [32] EGAMBERDIEVA D, JABBOROVA D, BERG G. Synergistic interactions between *Bradyrhizobium japonicum* and the endophyte *Stenotrophomonas rhizophila* and their effects on growth, and nodulation of soybean under salt stress[J]. *Plant and Soil*, 2016: 405, 35-45.
- [33] REYES-PEREZ J, HERNANDEZ-MONTIEL L G, VERO S, et al. Postharvest biocontrol of *Colletotrichum gloeosporioides* on mango using the marine bacterium *Stenotrophomonas rhizophila* and its possible mechanisms of action[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2019, 56(11): 4992-4999.

- [34] FURUSHITA M. Isolation of multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* from cultured yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) from a marine fish farm[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(9): 5598-5600.
- [35] ROMANENKO L, UCHINO M, TANAKA N, et al. Occurrence and antagonistic potential of *Stenotrophomonas* strains isolated from deep-sea invertebrates[J]. Archives of Microbiology, 2008, 189(4): 337-344.
- [36] 阴盼晴. 海洋嗜麦芽寡养单胞菌 JX14 对锥状斯氏藻抑藻机理的研究[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2019.
YIN Panqing. Study on the inhibiting mechanism of algae *Stenotrophomonas maltophilia* JX14 by bacterial *Scrippsiella trochoidea*[D]. Lanzhou: Lanzhou University of Technology, 2019.
- [37] ARULAZHAGAN, VASUDEVAN, YEOM I T. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon by a halotolerant bacterial consortium isolated from marine environment[J]. International Journal of Environmental Science & Technology, 2010, 7(4): 639-652.
- [38] PANHWAR Q, NAHER U, OTHMAN R, et al. Eliminating aluminum toxicity in an acid sulfate soil for rice cultivation using plant growth promoting bacteria[J]. Molecules, 2015, 20(3): 3628-3646.
- [39] MORA M L, ROLANDO D, SOBARZO J, et al. Aluminum-tolerant bacteria improve the plant growth and phosphorus content in ryegrass grown in a volcanic soil amended with cattle dung manure[J]. Applied Soil Ecology, 2017, 115: 19-26.
- [40] HWANG C Y. *Marivita cryptomonadis* gen. nov., sp nov and *Marivita litorea* sp nov., of the family Rhodobacteraceae, isolated from marine habitats[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(7): 1568-1575.
- [41] YANG H X, WANG X, LIU X W, et al. *Fluviicola hefeinensis* sp. nov., isolated from the wastewater of a chemical factory[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64: 700-704.
- [42] WU Y H, XU L, MENG F X, et al. *Altererythrobacter atlanticus* sp. nov., isolated from deep-sea sediment[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 64: 116-121.
- [43] IVANOVA E, WEBB H, CHRISTEN R, et al. *Celeribacter neptunius* gen. nov. sp. nov., a new member of the class *Alphaproteobacteria*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 60(7): 1620-1625.
- [44] FLOOD B, LEPRICH D, BAILEY J. Complete genome sequence of *Celeribacter baekdonensis* strain LH4, a thiosulfate-oxidizing alphaproteobacterial isolate from gulf of Mexico continental slope sediments[J]. Genome Announcements, 2018, 6(20): e00434-18.
- [45] MADRID V, ALLER J, ALLER R, et al. High prokaryote diversity and analysis of community structure in mobile mud deposits off French Guiana: Identification of two new bacterial candidate divisions[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2001, 37(3): 197-209.
- [46] KWAK M-J, LEE J-S, LEE K, et al. *Sulfitobacter geojensis* sp. nov., *Sulfitobacter noctilucae* sp. nov., and *Sulfitobacter noctilucicola* sp. nov., isolated from coastal seawater[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(11): 3760-3767.
- [47] GU X, DOU P. Isolation and characterization of *Altererythrobacter* sp. DT for biotreatment of and sulfur production from thiosulfate-bearing industrial wastewater[J]. Water, Air, & Soil Pollution, 2017, 228(1): 28.
- [48] 谭丽菊, 肖慧, CARLSON Craig A, 等. 海水中天然细菌对不同生源要素有机物的矿化作用[J]. 生态学报, 2016, 36(1): 77-85.
TAN Liju, XIAO Hui, CARLSON C A, et al. Mineralization of different dissolved organic matter containing various biogenic elements by natural bacteria in seawater[J]. Acta Ecologica Sinica, 2016, 36(1): 77-85.
- [49] BRANDES J, DEVOL A, DEUTSCH C. New developments in the marine nitrogen cycle[J]. Chemical Reviews, 2007, 107(2): 577-589.

Variation of bacteria in flocs after removal of *Karenia mikimotoi* by different types of modified clay

DING Yu^{1, 2, 3, 4}, SONG Xiu-xian^{1, 2, 3, 4}, CAO Xi-hua^{1, 2, 4}, YU Zhi-ming^{1, 2, 3, 4}

(1. CAS Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Laboratory of Marine Ecology and Environmental Science, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266237, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 4. Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Received: Mar. 12, 2020

Key words: modified clay; red tide; bacterial density; bacterial community

Abstract: The red tide in water can be removed by flocculation of modified clay. However, no study has reported on the effects of bacterial community composition and function in flocs after a large number of algae settle at the bottom within a short time. We used high-throughput sequencing methods to identify changes in the bacterial community in the settled *Karenia mikimotoi* flocs treated with two types of modified clay, i.e., polyaluminum chloride and aluminum sulfate modified clays (termed MC I and MC II, respectively). The flocculation removal process of *K. mikimotoi* by modified clay was completed within 3 h, and the bacterial density in the settled flocs increased continuously over time. Moreover, the structure of the bacterial community of the settled flocs was different, with *Stenotrophomonas* and *Celeribacter* as the main genera in the MC I group and MC II group, respectively. Chemoheterotrophy and aerobic chemoheterotrophy were the dominant functions in the bacterial community of both MC I and MC II groups. However, nitrate reduction, nitrogen respiration, and nitrate respiration were most commonly observed in the MC I group, while dark sulfur oxidation, dark oxidation of sulfur compounds, and dark sulfite oxidation were mostly observed bacterial functions in the MC II group. The relationship between the changes in the bacterial community in flocs and the changes in organic matter and nutrients after removal by modified clay was also analyzed. Results of this study cannot only improve the understanding of the ecological and environmental effects of modified clay but also provide theoretical support for future studies of micro-modified clay.

(本文编辑: 丛培秀)