

山东半岛南北两侧海域真核浮游生物群落特征 及与环境因子的相关性分析*

刘朋超^{1,3} 王卫军^{1,2,3①} 骆启豪^{1,3} 李彬^{2,3} 孙国华^{2,3}
赵强⁴ 张金浩⁴ 杨建敏^{1,2,3①}

(1. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306; 2. 鲁东大学农学院 烟台 264025; 3. 山东省海洋资源与环境研究院 烟台 264006; 4. 烟台市水产研究所 烟台 264000)

摘要 为了解山东半岛南北两侧的烟台崆峒岛(KTD)海域和日照东港(DG)海域真核浮游生物群落特征,采用高通量测序技术,以 18S rDNA V4 区为目标基因,对 2017 年 10 月至 2018 年 7 月两海域的真核浮游生物多样性进行了检测;同期测定两海域的环境因子(溶解氧、氨氮含量等 10 个理化指标),并与真核浮游生物丰富度做相关性分析。实验结果表明:通过高通量测序技术共鉴定出浮游生物 455 种,其中, KTD 海域共检测出真核浮游生物 36 个门类 424 种; DG 海域共检测出真核浮游生物 34 个门类 365 种。绿藻门(Chlorophyta)、硅藻门(Diatomea)是两海域浮游植物中整体丰度最高的门类。KTD 海域,绿藻门各月丰度在 3.0%—21.3%之间,其中 2018 年 7 月(K1807)最高,达到了 21.3%;硅藻门各月丰度在 2.0%—16.59%之间,其中 2018 年 2 月(K1802)最高,达到了 16.59%。DG 海域,绿藻门各月丰度在 2.0%—12.3%之间,其中 2017 年 11 月份(D1711)最高,达到了 12.3%;硅藻门各月丰度在 2.0%—47.0%之间,其中 1 月(D1801)最高,达到了 47.0%。占优势地位的浮游动物主要是节肢动物门类的物种,其每月丰度分别在 6.0%—38.9%和 7.6%—48.6%之间。环境因子相关性分析表明水温、DO、pH、硅酸盐、硝酸盐氮等环境因子为影响该海域浮游生物群落结构的主要因子。研究结果对了解双壳经济贝类养殖区饵料组成及其在时空的变化,对海岸带食物网、生态基础管理和海洋经济贝类养殖生产等方面提供数据支撑。

关键词 真核浮游生物;环境因子;18S rDNA V4 区;多样性;相关性分析

中图分类号 Q178.1 doi: 10.11693/hyhz20190100009

崆峒岛海域(Kongtong Dao, KTD),位于山东省烟台市芝罘区北部,属于北黄海;东港海域(Donggang, DG)位于山东省日照市东港区南部,属于南黄海。黄海是一个半封闭的陆架浅海,以山东半岛的成山头至朝鲜的长山串之间的连线为界划分成南、北两部分(Liu *et al.*, 1998)。其中,北黄海位于山东半岛、辽东半岛和朝鲜半岛之间,西有经渤海海峡流入的黄河物质,南北有南沿岸流、鲁北沿岸流、西朝鲜沿岸流等沿岸流系汇入(杨青等, 2012);南黄海位于

山东半岛成山头与朝鲜半岛长山串连线以南、长江口北岸启东嘴与济州岛连线以北,除了最南部的长江汇入以外,西与山东半岛南部、江苏北部相邻,有灌河、射阳河、淮河等河流入海(王俊杰等, 2018)。由于两处海域特殊的地理位置和环境影响,使得其生态环境较为复杂,是研究浮游生物种类及群落结构的热点海区。

真核浮游生物主要包括浮游植物和浮游动物。其中,浮游植物是海洋生态系统中的初级生产者,是水

* 国家贝类产业技术体系, CARS-49 号; 山东省农业良种工程, 2017LZGC009 号; 山东省重点研发计划项目, 2017GHY215006 号; 烟台市科技发展计划项目, 2016ZH069 号。刘朋超, 硕士研究生, E-mail: 1023925419@qq.com

通信作者: 王卫军, 博士, 副教授, E-mail: wwj2530616@163.com; 杨建敏, 博士, 教授, E-mail: ladderup@126.com

收稿日期: 2019-01-12, 收修改稿日期: 2019-03-09

域生产力的基础(左涛等, 2008; 张婷等, 2014)。浮游动物作为海洋生态系统的次级生产者, 是经济水产动物, 特别是上、中层鱼类和一些幼鱼的饵料基础(吴瑞等, 2016)。二者都是海洋生态系统能量流动和物质循环的重要环节, 也是滤食性贝类饵料的重要组成部分(刘瑞玉, 1992)。一般浮游生物可分为六类: 巨型浮游生物, 大于 1cm, 如海蜇; 大型浮游生物, 5—10mm, 如大型桡足类、磷虾类; 中型浮游生物, 1—5mm, 如小型水母、桡足类; 小型浮游生物, 50 μ m—1mm, 如硅藻、蓝藻; 微型浮游生物, 5—50 μ m, 如甲藻、金藻; 超微型浮游生物, 小于 5 μ m, 如细菌(王先锋等, 2017)。其中, 微型也是较大浮游生物种类生长周期中某一阶段(高亚辉等, 1989)。

KTD、DG 两海域分别位于黄海南、北两端, 都是山东省重要贝类养殖区, 养殖有大量的滤食性海洋双壳贝类。双壳经济贝类食物营养级较广, 对符合其口径大小的真核浮游生物皆有摄食, 其中包括了大部分微型和微微型的浮游植物及部分微型的浮游动物(Davenport *et al.*, 2000; Lehane *et al.*, 2006)。由于微微型、微型浮游生物体型微小, 传统的显微镜检测所需的样本量又较大, 准确判断滤食性贝类的养殖区饵料成分较为困难。本研究为了更好的对养殖区浮游生物种类和多样性进行分析, 以 18S rDNA V4 区为目标基因, 采用高通量测序技术, 对山东半岛南北两侧 KTD、DG 海域的真核浮游生物群落结构逐月

进行了调查, 同时, 测定每个月份的环境因子, 并对环境因子和浮游动植物丰度进行关联分析。研究结果对了解双壳经济贝类养殖区饵料组成及其在时空的变化, 以及引起饵料组成变化的原因, 对海岸带食物网、生态基础管理和海洋经济贝类养殖生产等方面提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 样品采集及环境因子调查

在 KTD 和 DG 海域近岸养殖区设置站位, 采样区域见图 1。自 2017 年 11 月开始至 2018 年 7 月, 逐月采集水样, 水样经 0.2 μ m 滤膜过滤, 将滤膜转移至 1.5mL 无菌离心管中, 置于-20 $^{\circ}$ C 条件下冷冻保存运输。

环境因子调查与生物样品取样同期进行, 包括氨氮(NH_4^+ -N)、亚硝酸盐氮(NO_2^- -N)、硝酸盐氮(NO_3^- -N)、硅酸盐(SiO_3^{2-} -Si)、活性磷酸盐(PO_4^{3-} -P)、叶绿素 *a*(chl *a*)、溶氧(DO)、水温(SST)、盐度(S)、透明度(TRA)等, 各类营养盐通过各站点采集 1L 海水水样, 装入至聚乙烯瓶中, 并加入分析纯级氯仿进行固定; 叶绿素 *a* 采用分光光度法测定, 通过各站点采集 500mL 海水, 并加入 5mL 碳酸镁, 经过 0.22 μ m 孔径的微孔滤膜抽滤获得; 水温用表层温度计测定, 透明度使用透明度盘测定, 样品的采集、保存及分析均按中华人民共和国国家标准《海洋调查规范》(GB12763-2007)进行。

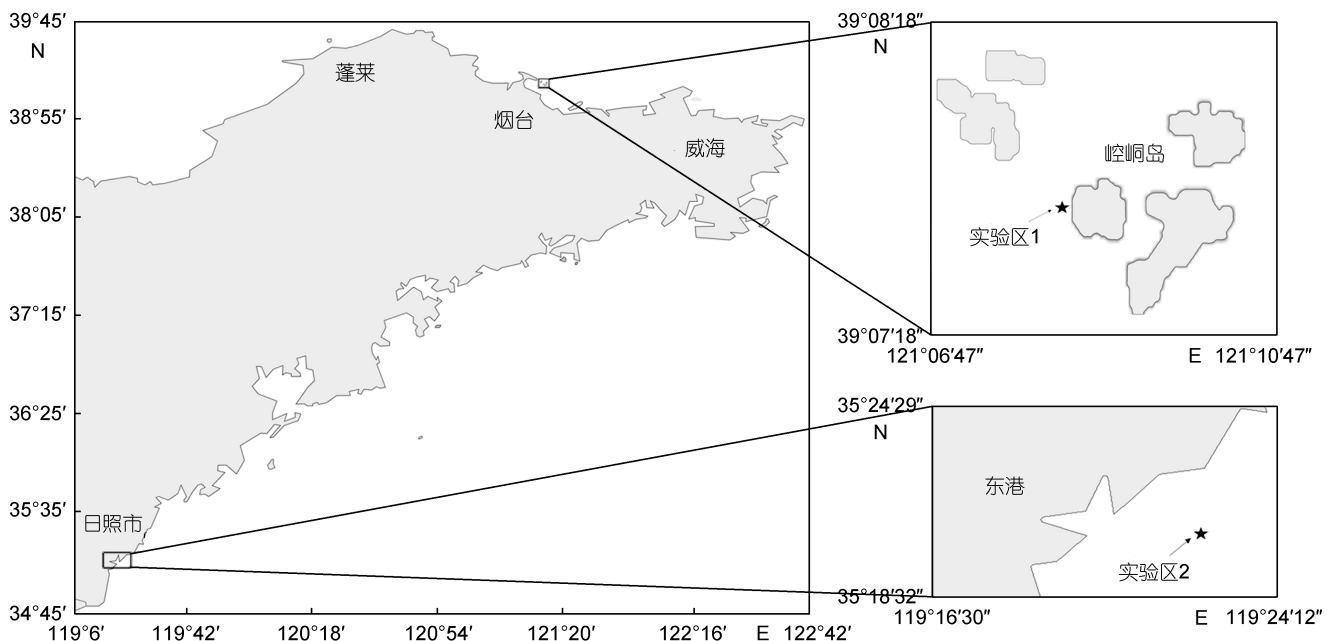


图 1 采样站位分布区域图

Fig.1 Sampling stations in the study area

1.2 基因组 DNA 的提取

将 0.22 μ m 滤膜剪碎置于 1.5mL 离心管中, 采用 CTAB 法提取滤膜上所有物种的宏基因组, 利用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测 DNA 的纯度和浓度, 检测合格后置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.3 18S V4 区 PCR 扩增

将检测合格的基因组 DNA 交由诺禾致源生物信息科技有限公司, 以稀释后的基因组 DNA 为模板, 使用带 Barcode 的特异引物、New England Biolabs 公司的 Phusion[®] High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer 和高效高保真酶进行 18S V4 区 DNA 的 PCR 扩增。V4 引物序列为 528F (5'-GCGGTAATTCAGCTCCA-3') 和 706R (5'-AATCCRAGAATTTCCACTCT-3')。PCR 产物使用 2% 浓度的琼脂糖凝胶进行电泳检测合格后, 根据 PCR 产物浓度进行等量混样, 使用 1 \times TAE 浓度 2% 的琼脂糖胶电泳纯化 PCR 产物, 剪切回收目标条带。

1.4 文库构建和上机测序

基于 IonS5TMXL 测序平台, 利用单端测序 (Single-End) 的方法, 使用 Thermofisher 公司的 Ion Plus Fragment Library Kit 48 RXNS 文库试剂盒进行文库的构建, 构建好的文库经过 Qubit 定量和文库检测合格后, 使用 Thermofisher 的 Ion S5TMXL 进行上机测序。

1.5 数据分析

1.5.1 测序数据分析 测序得到的原始数据 (Raw data) 使用 Cutadapt 软件过滤和按 barcode 拆分样本后得到有效数据 (Clean data)。为了研究样品的物种组成多样性, 对所有样品的有效数据 (Clean reads) 进行聚类, 以 97% 的一致性 (Identity) 将序列聚类成为 OTUs (Operational Taxonomic Units)。然后对 OTUs 的代表序列进行物种注释, 并在各分类水平上进行群落结构的统计, 得到对应的物种信息和基于物种的丰度分布情况。同时, 对 OTUs 进行丰度、Alpha 多样性计算等分析, 以得到样品内物种丰富度和均匀度信息、不同样品间的共有和特有 OTUs 信息等。另一方面, 通过主坐标分析 (PCoA, Principal Co-ordinates Analysis) 展示各样品之间的相似与差异。

1.5.2 理化指标及环境因子相关性分析 环境因子相关数据采用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析 (One-way ANOVA), 差异显著则进行 Duncan's 多重比较检验, 显著水平设定为 0.05。统计数据均以平

均值 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 的形式表示。对环境因子与物种及物种丰富度之间进行 (Canonical Correspondence Analysis, CCA) 典范对应分析 (Sheik *et al*, 2012)。用 CCA 典范对应分析可以检测环境因子、样品、种群三者之间的关系或者两两之间的关系, 可得到影响样品分布的重要环境驱动因子。

2 结果与分析

2.1 各样品有效序列数及物种 OTUs 数目统计

对测序得到的有效序列数进行 OTUs 聚类, 每个 OTUs 代表一类物种。本研究对聚类得到的 OTUs 数目进行统计, 并根据 OTUs 的数目做样品稀释曲线发现, 曲线显示所有样品 OTUs 数目都趋于饱和, 表明样品测序数据量较为合理, 再多的测序数据量只会产生少量的物种 (图 2)。对聚类得到的 OTUs 数目进行统计发现: 所有月份样品中种水平总共 455 个 OTUs。其中 KTD 海域的 OTUs 数目总体高于 DG 海域, KTD 海域浮游植物 OTUs 数目在 2018 年的 1 月、2 月、3 月、4 月较高, 最低是 2018 年的 6 月; 浮游动物 OTUs 数目最高是在 2018 年的 4 月、5 月, 最低是在 2018 年的 6 月。DG 海域浮游植物 OTUs 数目最高在 2017 年的 11 月、12 月份, 最低是在 2018 年的 4 月; 浮游动物 OTUs 数目最高是在 2017 年的 12 月, 最低是在 2018 年的 4 月 (表 1)。

2.2 KTD、DG 海域各月份样品群落多样性指数 (Alpha 多样性) 统计分析

多样性指数 (Alpha Diversity) 可用于分析样品内的生物群落多样性, 通过此分析我们可以对各样品内生物群落的丰富度和多样性进行检验 (Li *et al*, 2013)。本研究应用 QIMME 软件 (Caporaso *et al*, 2010) 计算得到各海水样品中的生物群落多样性指数见表 2。由表 2 可见, 各样品文库的覆盖率 (Coverage) 指数较高, 表明样本中序列没有被测出的概率较低, 测序结果能够反映样品中生物的真实情况。ACE 指数与 Chao1 指数是用来估计种群丰度的指数, 它们的值越大, 表明样本的生物种类越多, 丰富度越高。Shannon 多样性指数是用来估算样品中生物多样性的指数, 其值越高, 说明群落多样性越高。本研究对各样品 Alpha 多样性指数统计显示: KTD 海域 2017 年 11 月、2018 年 1 月、2 月、3 月物种多样性较高; 2018 年 6 月、7 月物种多样性最低。DG 海域 2017 年 12 月物种多样性较高, 2018 年 2 月、4 月、5 月物种多样性偏低。

表 1 有效序列数及 OTUs 数统计

Tab.1 The statistics of effective tags and the number of OTUs

样品编号	有效序列数	注释的序列数	样品 OTUs 总数(个)	注释到种水平上 OTUs 总数(个)	注释到种水平上浮游植物的 OTUs 数(个)	注释到种水平上浮游动物的 OTUs 数(个)
K1711	80058	67524	762	203	75	77
K1712	80036	64511	702	208	83	75
K1801	80090	64259	847	212	99	78
K1802	80119	66114	706	206	91	70
K1803	80220	67161	672	205	90	67
K1804	80111	65667	756	231	96	86
K1805	80046	60896	707	220	87	97
K1806	55678	33632	339	128	49	58
K1807	80122	69498	500	201	74	78
D1711	80167	68223	684	207	88	62
D1712	80282	66464	754	205	82	81
D1801	80241	66058	548	159	72	54
D1802	80138	68064	555	181	62	64
D1803	80111	69442	585	183	72	68
D1804	80081	70246	446	149	56	51
D1805	80150	66450	504	163	72	60
D1807	88319	73423	466	169	63	67

注: 样品编号中 K 表示烟台崆峒岛, D 表示日照东港, 17、18 表示 2017 年和 2018 年, 01—12 表示月份

表 2 Alpha 多样性指数统计

Tab.2 Statistics of the alpha diversity indices of sea water sample

样品编号	Shannon 指数	Chao1 指数	ACE 指数	Coverage 指数
K1711	6.419	828.895	844.340	0.996
K1712	5.658	850.140	887.094	0.994
K1801	6.619	1014.777	1020.235	0.994
K1802	6.645	843.794	856.302	0.995
K1803	6.248	845.000	839.698	0.995
K1804	5.655	948.974	968.815	0.994
K1805	5.555	836.055	839.052	0.995
K1806	4.769	370.189	379.855	0.998
K1807	4.782	586.884	588.982	0.997
D1711	5.374	788.019	800.199	0.996
D1712	6.260	911.593	920.444	0.994
D1801	5.339	734.667	710.768	0.995
D1802	4.556	695.226	710.364	0.995
D1803	5.134	690.619	725.982	0.995
D1804	4.470	540.250	547.082	0.997
D1805	4.366	604.897	633.344	0.996
D1807	5.320	541.833	557.401	0.997

注: 样品编号中 K 表示烟台崆峒岛, D 表示日照东港, 17、18 表示 2017 年和 2018 年, 01—12 表示月份

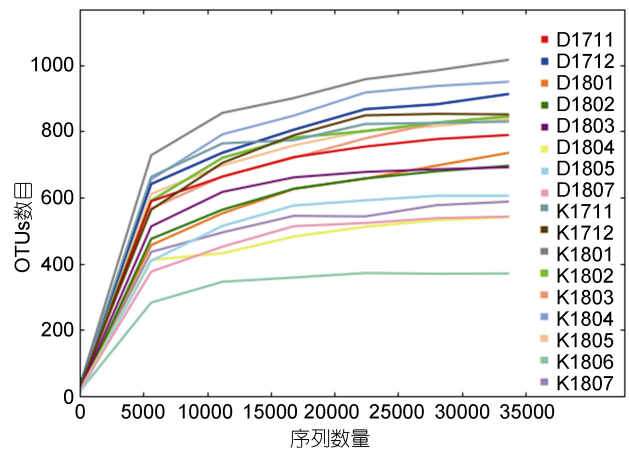


图 2 OTUs 数目稀释曲线

Fig.2 The rarefaction curves of the numbers of OTUs

2.3 真核浮游生物组成分析

用 RDP Classifier 方法(Wang *et al.*, 2007)与 Sliva 数据库(Quast *et al.*, 2013)对各样品 OTUs 代表序列进行物种注释, 并分别在各个分类水平: 界(kingdom)、门(phylum)、纲(class)、目(order)、科(family)、属(genus)、种(species)统计各样本的群落组成。其中, 在门分类水平上, KTD 海域 9 个月共检测出 36 个门类。DG 海域共检测出 34 个门类; 在种分类水平上, KTD

海域四个季度共检出物种 424 种, DG 海域四个季度共检出物种 365 种。选取每个样品相对丰度在门水平排名前 10 位的类群, 生成各门相对丰度柱形累加图, 选取相对丰度在属水平上排名前 30 位的类群, 生成各属相对丰度柱形累加图(图 3, 图 4)。

由图 3 可见, 各个月份样品之间门水平上差异明显。其中, 有待进一步明确其分类地位的门类占 16%—61%。绿藻门(Chlorophyta)、硅藻门(Diatomea)是两养殖海域浮游植物中整体丰度最高的门类, 在 KTD 海域, 绿藻门各月丰度在 3.0%—21.3%之间, 其中 7 月(K1807)最高, 达到了 21.3%; 硅藻门各月丰度在

2.0%—16.6%之间, 其中 2 月(K1802)最高, 达到了 16.6%。DG 海域, 绿藻门各月丰度在 2.0%—12.3%之间, 其中 11 月(D1711)最高, 达到了 12.3%; 硅藻门各月丰度在 2.0%—47.0%之间, 其中 1 月(D1801)最高, 达到了 47.0%。浮游动物在两地海水群落中占了很大比重, 其中占地位的主要是节肢动物门类的物种, 其每月丰度分别在 6.0%—38.9%和 7.6%—48.6%之间。在 KTD 海域的 2017 年 11 月、12 月和 2018 年的 1 月、2 月、3 月、4 月、7 月以及 DG 海域的 2017 年 11 月、12 月和 2018 年的 1 月、3 月、4 月、5 月、7 月的样品中占比较高。

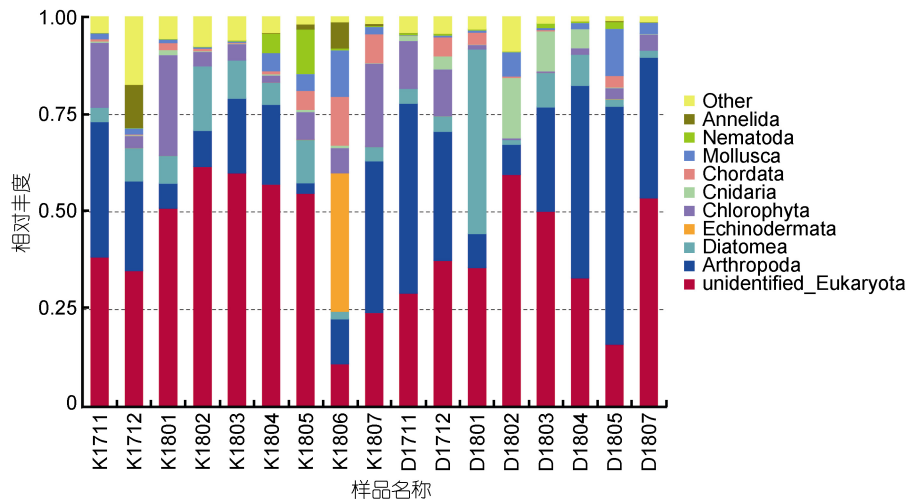


图 3 浮游真核生物门水平上相对丰度

Fig.3 Relative abundance of planktonic eukaryotes at phylum level

由图 4 可见, 除却有待明确分类地位的一些真核生物外, 丰度在属水平上排名前 30 位的类群中, 浮游动物主要有桡足类的哲水蚤亚目(Calanoida)、纤毛虫类的海游虫 (*Pelagostrobilidium*) 及 *Parastrombidinopsis*、环节动物门的叶须虫 (*Phyllodocida*)、双壳类的贻贝目(*Mytiloida*)和牡蛎目(*Ostreoida*)、海鞘类的复鳃目(*Stolidobranchia*)等。浮游植物中丰度排名前 30 的属较多, 主要有甲藻门的夜光藻属(*Noctiluca* sp.)、异甲藻属(*Heterocapsa* sp.)、双鞭甲藻类(*Haplozoon*)、沟鞭甲藻类(*Gyrodiniellum*)、营寄生的鞭毛虫类(*Haplozoon* sp.); 绿藻门的葡萄藻属(*Bathycoccus* sp.)、微球藻属(*Ostreococcus* sp.)、微胞藻(*Micromonas* sp.)、塔胞藻属(*Pyramimonas* sp.); 硅藻门的海链藻属(*Thalassiosira* sp.)、角刺藻属(*Corethron* sp.)、楔形藻属(*Licmophora* sp.)、细柱藻属(*Leptocylindrus* sp.)、舟形藻属(*Navicula* sp.)以及隐藻

门的全沟藻属(*Teleaulax* sp.)等。

2.4 KTD、DG 海域各月份样品浮游动物、植物群落比较分析

利用 PCoA 方法探明了各样品之间的关系(图 5), PCoA 点聚集程度表明两地样品中, 不同月份之间存在相似和差异, 其中 KTD 海域样品 2017 年 11 月(K1711)与 12 月(K1712)相似程度较高; KTD 海域 2018 年 3 月(K1803)样品与 DG 海域 2018 年 2、3、4 月(D1802、D1803、D1804)样品相似程度较高; KTD 海域 2018 年 1 月(K1801)样品与 DG 海域 2017 年 12 月(D1712)样品相似程度较高, 其余月份之间差异较大。

2.5 环境因子数据及相关性分析

2.5.1 环境因子数据分析 调查海域中, 监测到 KTD 海域 9 个月的水温最高是 2018 年 7 月的 21.2℃, 最低是同年 2 月的 4.5℃; DG 海域 8 个月最高水温是

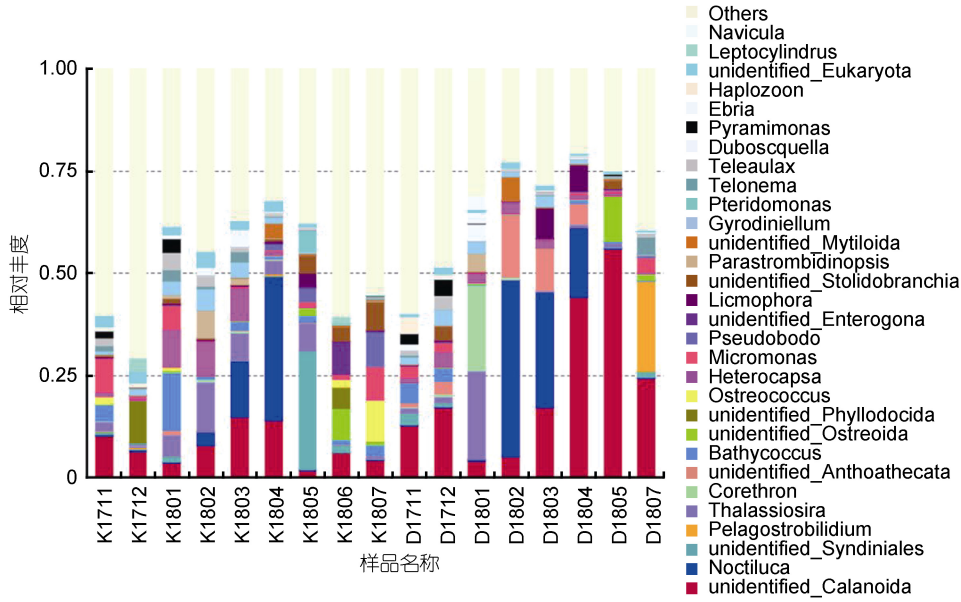


图 4 浮游真核生物属水平上相对丰度

Fig.4 Relative abundance of planktonic eukaryotes at genus level

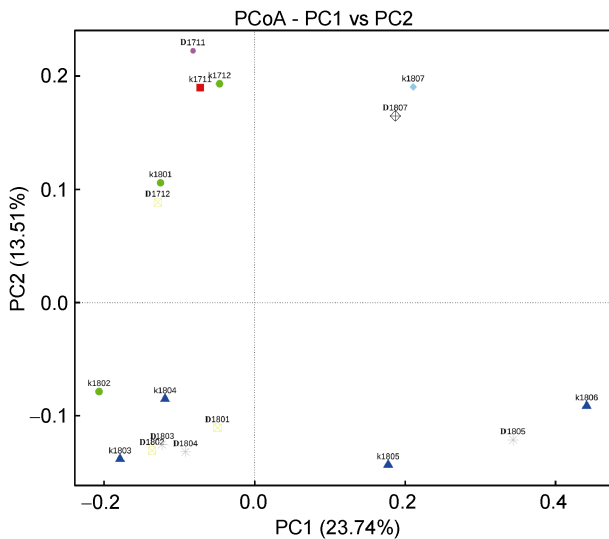


图 5 各样品间主坐标分析

Fig.5 Primary coordinate analysis among samples

注：横坐标表示第一主成分，百分比则表示第一主成分对样品差异的贡献值；纵坐标表示第二主成分，百分比表示第二主成分对样品差异的贡献值；图中的每个点表示一个样品

2018 年 7 月的 28.4℃，最低水温是同年 1 月的 5℃。其间监测 KTD 海域叶绿素 a 浓度冬春季节(2018 年 1—5 月)显著增加，最高是 2018 年 2 月份的 3.4μg/L；DG 海域叶绿素 a 浓度高水平出现在 2017 年的 12 月和 2018 年的 1 月及 4 月，最高值是 2017 年 12 月份的 5.4μg/L，也较符合冬春季节含量较高的特征。五项营养盐中氨氮(NH₄⁺-N)、活性磷酸盐(PO₄³⁻-P)含量

较为稳定，两海域各月份之间差异不显著；亚硝酸盐氮(NO₂⁻-N)、硝酸盐氮(NO₃⁻-N)、硅酸盐(SiO₃²⁻-Si)、变化波动较大，其中，KTD 海域硝酸盐氮(NO₃⁻-N)、亚硝酸盐氮(NO₂⁻-N)、硅酸盐(SiO₃²⁻-Si)含量整体呈现出一个秋冬季到春季降低，夏季升高的态势。DG 海域除 2018 年 4 月份硝酸盐氮(NO₃⁻-N)、亚硝酸盐氮(NO₂⁻-N)略有增高外，整体情况与 KTD 海域相似，详见表 3。

2.5.2 环境因子与浮游真核生物群落数据的相关性分析 通过 envfit 函数筛选出具有显著影响的环境因子与浮游生物群落数据做 CCA 典范对应分析(图 6)。CCA 分析图中，箭头表示环境因子，箭头连线的长度代表环境因子与群落分布和种类分布间相关程度的大小，箭头越长，说明相关性越大，反之越小。箭头连线和排序轴的夹角代表某个环境因子与排序轴的相关性大小，夹角越小，相关性越高，反之越低。环境因子之间的夹角为锐角时表示两个环境因子之间呈正相关关系，钝角表示呈负相关关系。由此图可以发现各月份的水温、溶氧(DO)、pH、硅酸盐、硝酸盐氮，对各浮游生物门类群落结构的改变有较大影响。水温与 pH、硝酸盐氮和硅酸盐之间呈正相关，与其他环境因子呈负相关。CCA 排序图上各物种的位置反映了各物种对于不同环境资源的依赖程度。由此图可以看出，海水样品中丰度较高的硅藻门和绿藻门浮游植物与溶氧、硝酸盐、硅酸盐之间呈现了较大的相关性。浮游动物中的纤毛虫类、鞭毛虫及后生动物门类的种则与水温、溶氧、pH 等相关性较大。

表 3 两海域各环境参数统计结果
Tab.3 Statistics of environmental parameters in the two areas

样品编号	SST (°C)	pH	DO (mg/L)	S	ST (cm)	chl <i>a</i> (μg/L)	NO ₃ ⁻ -N (mg/L)	NO ₂ ⁻ -N (mg/L)	NH ₄ ⁺ -N (mg/L)	PO ₄ ³⁻ -P (mg/L)	SiO ₃ ²⁻ -Si (mg/L)
K1711	16.1	8.14	6.13	30.0	134	0.5±0.1 ^{abc}	0.17±0.01 ^c	0.066±0.0115 ^c	0.05±0.02 ^{ab}	0.052±0.021 ^c	0.36±0.019 ^{def}
K1712	10.1	7.89	6.11	31.0	59	0.4±0.1 ^{ab}	0.17±0.00 ^c	0.021±0.0019 ^d	0.04±0.00 ^{ab}	0.027±0.011 ^{abc}	0.4±0.004 ^f
K1801	7.0	7.90	7.06	28.5	124	2.9±2.8 ^{defg}	0.16±0.03 ^c	0.004±0.0024 ^a	0.06±0.03 ^{ab}	0.012±0.005 ^a	0.4±0.057 ^f
K1802	4.5	8.01	8.19	30.0	109	3.4±0.6 ^{efgh}	0.16±0.01 ^c	0.006±0.002 ^{ab}	0.07±0.05 ^b	0.013±0.01 ^a	0.24±0.012 ^{bc}
K1803	7.1	7.94	8.56	30.5	248	1.9±0.4 ^{abcde}	0.07±0.00 ^{ab}	0.004±0.0014 ^a	0.04±0.01 ^{ab}	0.047±0.036 ^{bc}	0.28±0.004 ^{cd}
K1804	10.8	8.04	6.86	31.0	250	2.5±0.1 ^{bcdef}	0.62±0.00 ⁱ	0.015±0.0028 ^{cd}	0.05±0.03 ^{ab}	0.011±0.006 ^a	0.28±0.012 ^{cd}
K1805	14.0	8.18	6.38	31.0	230	2.6±0.4 ^{cdefg}	0.82±0.01 ^j	0.021±0.0014 ^d	0.05±0.00 ^{ab}	0.022±0.024 ^{ab}	0.09±0.001 ^a
K1806	20.2	8.13	6.51	31.0	410	1.0±0.1 ^{abcd}	0.07±0.00 ^{ab}	0.005±0.0008 ^a	0.05±0.00 ^{ab}	0.018±0.01 ^a	0.02±0.003 ^a
K1807	21.2	8.33	6.22	33.0	400	1.9±0.0 ^{abcde}	0.24±0.01 ^f	0.009±0.0003 ^{ab}	0.07±0.00 ^b	0.015±0.002 ^a	0.25±0.001 ^{bc}
D1711	16.9	7.86	6.07	30.0	210	0.2±0.2 ^a	0.29±0.01 ^g	0.06±0.0053 ^c	0.02±0.02 ^a	0.019±0.003 ^a	0.67±0.027 ^g
D1712	7.3	7.90	6.15	29.5	160	5.4±0.0 ^h	0.28±0.01 ^g	0.019±0.0059 ^d	0.05±0.02 ^{ab}	0.007±0.001 ^a	0.72±0.034 ^g
D1801	5.1	8.04	7.97	30.1	79	4.8±3.5 ^{gh}	0.14±0.00 ^d	0.008±0.0037 ^{ab}	0.04±0.01 ^{ab}	0.002±0.001 ^a	0.18±0.122 ^b
D1802	7.0	8.12	7.22	30.0	410	1.5±0.7 ^{abcde}	0.05±0.00 ^a	0.004±0.0011 ^a	0.05±0.03 ^{ab}	0.02±0.017 ^{ab}	0.3±0.034 ^{cd}
D1803	5.9	8.05	6.89	30.0	550	1.1±0.2 ^{abcd}	0.07±0.01 ^{ab}	0.004±0.0017 ^a	0.04±0.01 ^{ab}	0.017±0.002 ^a	0.31±0.01 ^{cde}
D1804	10.0	7.86	6.92	30.0	410	4.4±1.4 ^{fgh}	0.44±0.00 ^h	0.012±0.001 ^{bc}	0.04±0.00 ^{ab}	0.006±0.004 ^a	0.06±0.005 ^a
D1805	17.1	8.24	6.97	31.0	270	2.5±0.0 ^{bcdef}	0.09±0.01 ^b	0.005±0.0000 ^{ab}	0.05±0.00 ^{ab}	0.005±0.002 ^a	0.07±0.001 ^a
D1807	28.4	8.27	6.63	30.0	390	2.8±0.5 ^{defg}	0.11±0.01 ^c	0.007±0.0017 ^{ab}	0.06±0.01 ^{ab}	0.008±0.003 ^a	0.38±0.006 ^{ef}

注: 数据均为平均值±标准差; 同一列中不同字母标记的值表示差异显著($P<0.05$)

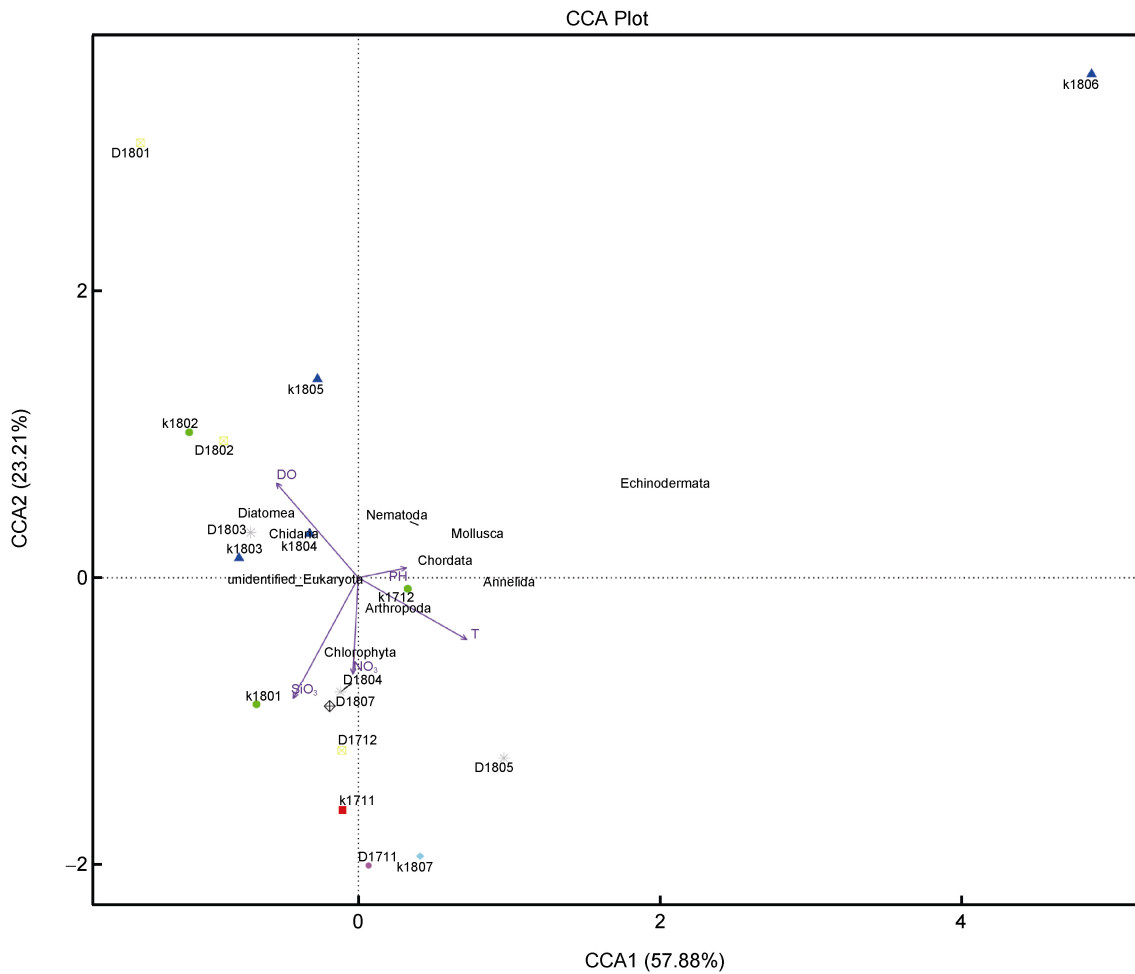


图 6 有显著影响的环境因子 CCA 分析
Fig.6 CCA analysis of major environmental factors

3 讨论

3.1 真核浮游生物种类鉴别方法的选择

高通量测序技术的广泛应用,极大地推动了浮游生物多样性的研究,尤其是对显微镜难以分辨的微型及微微型浮游生物(Howard *et al*, 2006; Amaral-Zettler *et al*, 2010; 王丽平等, 2015)。于杰(2014)采用高通量测序技术,以 18S rDNA V9 区为目标基因检测了渤海山海关海域微型浮游生物多样性;宋伦等(2016)以 18S rDNA V4 区为目标基因,结合高通量测序技术,对渤海长兴岛海域微型和微微型浮游植物多样性进行了检测,研究结果表明 V4 引物在微型、微微型浮游植物群落鉴定方面更为高效。王先锋等(2017)通过高通量测序技术,扩增了 18S rDNA V4 区 DNA,研究了平岛海域长牡蛎的真核食物组成。本研究以 18S rDNA 的 V4 区为目标基因,通过高通量测序技术,检测了海水样品中的真核浮游生物的组成,相对于传统镜检的方法,该技术具有简单快速、测序通量高、错误率低和成本低等特点,节省了大量的人力物力,能够很好地对两海域近岸养殖区浮游生物群落多样性进行检测。

3.2 KTD 和 DG 两海域环境因子分析

本研究发现, KTD 海域叶绿素 *a* 浓度冬春季节(2018 年 1—5 月)显著增加,最高是 2018 年 2 月份; DG 海域叶绿素 *a* 浓度高水平出现在 2017 年的 12 月和 2018 年的 1 月及 4 月,最高值是 2017 年 12 月份,也呈现出冬春季节含量较高的特征。认为叶绿素 *a* 和溶氧的增高是受到浮游植物丰度升高和水产经济作物养殖量减少的影响。冬季前后,正是滤食性经济贝类陆续大量上市的季节,对水体中浮游植物的摄食量大大减少,且冬春季节温度降低,贝类呼吸代谢及摄食率也大大降低(董波等, 2000)。

五项营养盐中氨氮($\text{NH}_4^+ - \text{N}$)、活性磷酸盐($\text{PO}_4^{3-} - \text{P}$)含量较为稳定,两海域各月份之间差异不显著;亚硝酸盐氮($\text{NO}_2^- - \text{N}$)、硝酸盐氮($\text{NO}_3^- - \text{N}$)、硅酸盐($\text{SiO}_3^{2-} - \text{Si}$)、变化波动较大,其中, KTD 海域硝酸盐氮($\text{NO}_3^- - \text{N}$)、亚硝酸盐氮($\text{NO}_2^- - \text{N}$)、硅酸盐($\text{SiO}_3^{2-} - \text{Si}$)含量整体呈现出一个秋冬季到春季降低,夏季升高的态势。DG 海域除 2018 年 4 月份硝酸盐氮($\text{NO}_3^- - \text{N}$)、亚硝酸盐氮($\text{NO}_2^- - \text{N}$)略有增高外,整体情况与 KTD 海域相似。认为是受到气候因素和地理位置影响: 两处海域都是近岸海域,有沿岸多条径流汇入;秋冬季

节降水减少,河流径流量也随之减少;夏季则降雨增多,雨水及河流径流的补充,使得两处海域营养盐含量得以补充。总体来说,近岸海域尤其是距海岸带不远的海域,受地理位置因素和气候因素干扰较大。

3.3 浮游真核生物的群落数据与环境因子相关性分析

综合分析浮游真核生物的群落数据与环境因子的相关数据发现,真核浮游生物各门类受溶氧(DO)、pH、水温、硅酸盐和硝酸盐氮的影响较大,且不同样品之间的差异较为显著。水温与 pH 及硝酸盐氮之间呈正相关,与海水中溶氧含量呈负相关;硅酸盐和硝酸盐之间呈正相关,与水温、pH 及溶氧呈负相关。认为在春季至夏季水温升高的过程中,降雪降雨的增加及河流流入带来水体中硝酸盐氮和硅酸盐含量的增高,促进了浮游植物丰富度的增加。同理,硝酸盐氮与硅酸盐含量的增高使浮游植物丰富度增加的同时,也促进了水体中溶氧的增高(图 6)。而叶绿素 *a* 的浓度可以作为浮游植物生物量的指标,可以反映海水中浮游植物现存量的变化(张学雷等, 2004),通过观测叶绿素 *a* 浓度观测值的变化规律也可以得出相同结论。

3.4 影响浮游动植物优势种的因素分析

本研究结果显示,两地养殖海域中的浮游植物类群主要优势种以硅藻、绿藻和甲藻为主,浮游动物主要是纤毛类、鞭毛类和一些后生动物门类种。从两地海域浮游动植物的优势种分析来看,两处海域饵料资源较为丰富,生产力水平较高,适合发展水产养殖业。

从浮游生物群落多样性指数的分析结果来看(表 2),秋冬季节物种多样性较春夏两季要高,且检测出来的总 OTUs 个数也保持一个较高的数目,这与谢斌等(2017)研究的结论—海州湾浮游植物种类和丰度季节变化的表现为秋季>夏季>春季的趋势相似。谢斌等(2017)及高春梅等(2015)认为,无机氮在春、夏、秋 3 季均由沉积物向水体进行迁移,在很大程度上增加了水体中各类营养盐的含量,直接或间接促进了各类浮游生物丰度的变化。对 KTD 和 DG 两海域而言,两地水产养殖业较为发达,主要养殖种类有海湾扇贝(*Argopecten irradians*)、长牡蛎(*Crassostrea gigas*)和贻贝(*Mytilus edulis*),其摄食饵料范围包括大部分微型、微微型浮游植物以及一部分大小与贝类摄食口径合适的纤毛虫、鞭毛虫类。冬季前后,正是滤食性贝类大量上市的季节,贝类的大量产出,减少了对作为饵料的浮游植物和一些浮游动物的摄食,而每年

的4—6月, 又是贝类性成熟繁殖阶段, 春到夏季, 大量稚贝又回到海区, 对海水中浮游植物的摄食量又大大增加, 这也符合本调查中叶绿素 *a* 浓度的变化规律, 根据此次针对浮游生物种类及丰度的调查, 结合我国北方沿海浮游动物摄食率的研究以及贝类摄食机制的特征(Wang *et al.*, 1998; 董婧等, 2003; 张学雷等, 2004), 综合认为, 除环境因子对浮游生物种群的影响, 贝类摄食是对养殖区浮游生物种类及丰度造成改变的主要原因。

4 结论

(1) KTD 和 DG 海域浮游生物种类较丰富, 两养殖海域浮游植物中的优势种群主要是硅藻门、绿藻门、甲藻门的物种; 浮游动物在两地海域生物群落中占优势地位的主要是节肢动物门、纤毛虫门类的物种。

(2) 两海域的真核生物群落组成受水温、溶氧、硝酸盐氮和硅酸盐的影响较大, 贝类摄食是影响两海域浮游生物群落多样性的重要因素。

参 考 文 献

- 于 杰, 2014. 浮游生物多样性高效检测技术的建立及其在渤海褐潮研究中的应用. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 5—20
- 王先锋, 林承刚, 许 强等, 2017. 利用 18S rDNA 分子方法分析浒苔绿潮过境期间长牡蛎摄食情况的变化. 海洋与湖沼, 48(6): 1362—1370
- 王丽平, 南炳旭, 扈培龙, 2015. 秦皇岛褐潮暴发敏感海域细菌种群特征. 环境科学研究, 28(6): 899—906
- 王俊杰, 于志刚, 韦钦胜等, 2018. 2017 年春、夏季南黄海西部营养盐的分布特征及其与浒苔暴发的关系. 海洋与湖沼, 49(5): 1045—1053
- 左 涛, 王 俊, 金显仕等, 2008. 春季长江口邻近外海网采浮游生物的生物量谱. 生态学报, 28(3): 1174—1182
- 刘瑞玉, 1992. 胶州湾生态学和生物资源. 北京: 科学出版社
- 杨 青, 王真良, 樊景凤等, 2012. 北黄海秋、冬季浮游动物多样性及年间变化. 生态学报, 32(21): 6747—6754
- 吴 瑞, 兰建新, 陈丹丹等, 2016. 海南省红树林区浮游动物多样性的初步研究. 热带农业科学, 36(11): 43—47
- 宋 伦, 吴 景, 刘卫东等, 2016. 渤海长兴岛海域微型和微微型浮游植物多样性. 环境科学研究, 29(11): 1635—1642
- 张 婷, 马行厚, 王桂苹等, 2014. 鄱阳湖国家级自然保护区浮游生物群落结构及空间分布. 水生生物学报, 38(1): 158—165
- 张学雷, 朱明远, 李瑞香等, 2004. 贝类养殖环境的多参数同步连续监测. 海洋科学进展, 22(3): 340—345
- 高亚辉, 金德祥, 1989. 海洋微型浮游生物的研究进展. 福建水产, (3): 33—37
- 高春梅, 朱 珠, 王功芹等, 2015. 海州湾海洋牧场海域表层沉积物磷的形态与环境意义. 中国环境科学, 35(11): 3437—3444
- 董 波, 薛钦昭, 李 军, 2000. 滤食性贝类摄食生理的研究进展. 海洋科学, 24(7): 31—34
- 董 婧, 毕远溥, 王文波等, 2003. 小窑湾高密度贝类筏式养殖对浮游植物群落的影响. 海洋水产研究, 24(3): 50—54
- 谢 斌, 张 硕, 李 莉等, 2017. 海州湾海洋牧场浮游植物群落结构特征及其与水质参数的关系. 环境科学学报, 37(1): 121—129
- Amaral-Zettler L, Artigas L F, Baross J *et al.*, 2010. A global census of marine microbes. In: McIntyre A D ed. Life in the World's Oceans: Diversity, Distribution, and Abundance. Oxford: Wiley-Blackwell, 223—245
- Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J *et al.*, 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nature Methods, 7(5): 335—336
- Davenport J, Smith R J J W, Packer M, 2000. Mussels *Mytilus edulis*: significant consumers and destroyers of mesozooplankton. Marine Ecology Progress Series, 198: 131—137
- Howard E C, Henriksen J R, Buchan A *et al.*, 2006. Bacterial taxa that limit sulfur flux from the ocean. Science, 314(5799): 649—652
- Lehane C, Davenport J, 2006. A 15-month study of zooplankton ingestion by farmed mussels (*Mytilus edulis*) in Bantry Bay, Southwest Ireland. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 67(4): 645—652
- Li B, Zhang X X, Guo F *et al.*, 2013. Characterization of tetracycline resistant bacterial community in saline activated sludge using batch stress incubation with high-throughput sequencing analysis. Water Research, 47(13): 4207—4216
- Liu Z X, Xia D X, Berne S *et al.*, 1998. Tidal deposition systems of China's continental shelf, with special reference to the eastern Bohai Sea. Marine Geology, 145(3—4): 225—253
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P *et al.*, 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Research, 41(D1): D590—D596
- Sheik C S, Mitchell T W, Rizvi F Z *et al.*, 2012. Exposure of soil microbial communities to chromium and arsenic alters their diversity and structure. PLoS One, 7(6): e40059
- Wang Q, Garrity G M, Tiedje J M *et al.*, 2007. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. Applied and Environmental Microbiology, 73(16): 5261—5267
- Wang R, Li C L, Wang K *et al.*, 1998. Feeding activities of zooplankton in the Bohai Sea. Fisheries Oceanography, 7(3—4): 265—271

CHARACTERISTICS OF EUKARYOTIC PLANKTON COMMUNITY AND ITS CORRELATION WITH ENVIRONMENTAL FACTORS IN THE NORTHERN AND SOUTHERN SEAS OF SHANDONG PENINSULA

LIU Peng-Chao^{1,3}, WANG Wei-Jun^{1,2,3}, LUO Qi-Hao^{1,3}, LI Bin^{2,3}, SUN Guo-Hua^{2,3},
ZHAO Qiang⁴, ZHANG Jin-Hao⁴, YANG Jian-Min^{1,2,3}

(1. *National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;* 2. *School of Agriculture, Ludong University, Yantai 264025, China;* 3. *Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006, China;* 4. *Yantai Fisheries Research Institute, Yantai 264000, China*)

Abstract To understand the characteristics of eukaryotic plankton community in mariculture of two sides of Shandong Peninsula, two representative locations were selected in the Kongtong Dao (KTD) area in Yantai of the northern side, and the Donggang (DG) area in Rizhao of the southern side. High-throughput sequencing technologies with 18S rDNA V4 area as the target gene were used to study the diversity of eukaryotic phytoplankton collected from October 2017 to July 2018 in the two areas. Meanwhile, environmental factors (dissolved oxygen, ammonia nitrogen content, and other 10 physical and chemical indicators) were measured and correlated with the eukaryotic plankton data. A total of 455 species of plankton were identified, of which 424 species in 36 categories were from KTD area, and 365 species in 34 categories from DG area. Chlorophyta and Diatomea were the most abundant phyla of phytoplankton in the two areas. In the KTD area, the monthly abundance of Chlorophyta was between 3.0% and 21.3%, peaked in July, and that of Diatomea between 2.0% and 16.59%, peaked in February. In the DG area, the monthly abundance of Chlorophyta was between 2.0% and 12.3%, peaked in November, and that of Diatomea ranged from 2.0% to 47.0%, peaked in January. In addition, the dominant zooplankton species were arthropod in monthly abundance ranging from 6.0% to 38.9% and 7.6% to 48.6% in the two areas, respectively. Correlation analysis of environmental factors showed that water temperature, DO, pH value, silicate, nitrate, and other environmental factors were the main factors shaping the structure of the plankton community in the sea. This study may help understand the composition of bait for bivalve in KTD and DG aquaculture areas and its spatial and temporal variation, and could provide data support to coastal food network, ecological basic management, and shellfish aquaculture production.

Key words eukaryotic plankton; 18S rDNA V4; regional environmental factors; diversity; correlation analysis