

黄渤海海草分布区日本鳗草根际微生物群落结构特征及其功能分析

刘鹏远^{1,2,3}, 张海坤^{1,2}, 陈琳¹, 孙延瑜^{1,2,3}, 王彩霞^{1,2}, 宋虹¹, 胡晓珂^{1,2,3*}

¹中国科学院烟台海岸带研究所, 海岸带生物学与生物资源利用重点实验室, 山东 烟台 264003

²青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 海洋生物学与生物技术功能实验室, 山东 青岛 266237

³中国科学院大学, 北京 100049

摘要: 日本鳗草(*Zostera japonica*)是亚洲特有的海草种类, 具有重要生态价值。近年来, 黄渤海海草分布区中的日本鳗草海草床持续退化, 引起了研究人员的广泛关注。【目的】基于根际微生物的分布与日本鳗草的健康生长密切相关的设想, 本文旨在探究黄渤海海草分布区日本鳗草根际细菌群落结构多样性并分析其与海草健康生长的内在联系。【方法】选取黄渤海海草分布区中东营、威海、大连3个地点的日本鳗草根际与非草区表层沉积物, 采用高通量测序技术(Illumina HiSeq PE300)解析根际微生物群落特征, 并结合相关环境参数分析其环境功能。【结果】日本鳗草根际表层沉积物中主要存在的细菌类群有: 变形菌门(*Proteobacteria*)所占比例为41.1%, 蓝细菌门(*Cyanobacteria*)占15.4%, 拟杆菌门(*Bacteroidetes*)占12.6%, 放线菌门(*Actinobacteria*)占9.3%。不同地点之间以及样品类型(海草床根际与非根际)之间的微生物群落存在显著差异, 主要表现为根际富含硫酸盐还原菌和固氮菌。环境因素: TN (total nitrogen)、TC (total carbon)、TOC (total organic carbon)、黏土(Clay)、砷(As)与根际群落组成与分布显著相关。【结论】从功能的角度来看, 不同地点、不同样品类型之间的差异物种多与硫、氮代谢相关, 硫酸盐还原菌对维持日本鳗草的生态健康起关键作用; 日本鳗草根际微生物群落分布与环境因子、空间分布有一定相关性。

关键词: 黄渤海, 海草床, 根际, 微生物群落, 多样性

海草(seagrass)是海岸带生态系统重要初级生产者, 它们为许多无脊椎动物和鱼类提供了栖息环境和育苗场所, 成为许多海鸟的主要食物来源, 同时河口及近海处的海草区域是微生物活动的热

点。中国海草区可以划分为两大区域: 南海海草分布区和黄渤海海草分布区^[1]。近年来, 南海对海草资源已经进行了系统研究并逐步建立了海草床的保护区、监测区及示范区域^[2-4]。而黄渤海海草

基金项目: 中科院前沿重点研发项(QYZDB-SSW-DQC041); 中科院国际合作项目(133337KYSB20180015); 国家重点基础研究发展计划(973计划, 2015CB453300); 中科院科技网络服务计划(ZSYS-006)

*通信作者。Tel: +86-535-2109127; E-mail: xkhu@yic.ac.cn

收稿日期: 2018-09-28; 修回日期: 2018-11-30

区研究却严重落后, 迄今尚未对该区海草床进行过系统研究。黄渤海海草床主要分布在山东威海荣成市和辽宁大连长海县沿海地区。其中山东以威海荣成天鹅湖海草床面积最大, 此外在东营垦利县、青岛市、烟台市、莱州湾也有零星海草分布, 大连长海县周边的几个岛屿也有海草床发现。总体而言, 黄渤海区海草床的调查与保护整体落后, 致使海草床退化的机理尚不清楚。因此, 为了防止黄渤海区域海草床的继续退化, 保护该区生境物种多样性及环境质量, 迫切需要加强对黄渤海海草床的系统研究。

日本鳗草(*Zostera japonica*)是亚洲特有的拟大叶藻亚属(*Subgenus Zosterella*)种类^[5], 植株矮小却具有重要生态价值。日本鳗草可以生活在大叶藻难以适应的水温和光照波动强烈的较浅潮间带, 表现出更强的适应能力和生命力^[6], 是中国分布最为广泛的海草种类, 在中国的黄渤海和南海等沿海地区均有分布。文献记载, 在黄渤海地区日本鳗草曾出现在山东省潍坊、青岛、烟台、威海、日照等地^[7-8]。近年来, 黄渤海区海草生境破坏严重, 很难再找到大面积连续分布的日本鳗草海草床^[8]。因此, 以日本鳗草为例, 研究黄渤海区海草床的退化机制、环境效应及其修复方案具有一定的代表性。

根际微生物的种类和数量与植物的生长、繁殖密切相关^[9]。例如, 植物根际的固氮菌、硫细菌、铁细菌、解磷菌等可促进植物转化和吸收各种元素。根际有益微生物还可以产生嗜铁素减少有害微生物对可利用铁的消耗, 最终导致致病性下降^[10]。青蒿根际微生物中细菌和放线菌数量与植株青蒿素产量呈正相关关系^[11]。Ryuc 等^[12]研究发现微生物产生的 2,3-丁二醇、三羟基二丁酮等挥发性物质可促进拟南芥的生长; 一些存在于植物根际的

细菌能产生植物生长激素直接促进植物的生长, 也能通过抑制植物病原菌等间接途径增强植物的抗病害能力。当然, 植株与根际微生物的交互作用依赖于适宜的环境因素(如温度、CO₂浓度、pH、溶氧、重金属含量、有机物含量等)。恶劣的自然环境可能会导致微生物群落结构、数量发生变化, 使有益菌减少有害菌增多, 从而导致海草致病腐烂、萌发率降低等。因此, 结合环境因素探究根际微生物多样性及功能有助于理解海岸带海草生境退化的原因。

植物的生存和性能依赖相关微生物群落的稳态。当前大多数植物微生物群落研究都集中在陆地物种, 并且空间尺度相对狭小, 海洋植物尤其日本鳗草相关的微生物群落结构与作用机制仍不清楚。目前尚无研究报道黄渤海区日本鳗草的生存状况和微生物在海草营养中的作用。基于此, 本实验选取黄渤海海草床分布区中三个典型日本鳗草生长地点: 山东东营、山东威海、辽宁大连(其中山东东营^[8]及辽宁大连海草床为刚发现的新草甸, 之前从未对此进行过海草根际菌群结构研究; 此 3 处海草分布区是黄渤海地区沿海面积最大、受保护较好的日本鳗草海草床代表区域); 以采集到的日本鳗草根际土壤作为研究对象, 利用高通量测序手段并结合海草沉积物中的理化因子, 探究黄渤海海草床草区和无草区的细菌多样性、菌群结构及分布, 解析了黄渤海海草床微生物的空间变化及对环境因子的响应, 丰富了我国海草床微生物多样性的基础数据。

1 材料和方法

1.1 样品采集

样品于 2018 年 4 月 16 号、18 号、26 号分别

在东营垦利区、大连长海县、威海荣成市 3 地(图 1)采集, 每个地点采 8 个表层沉积物(0–10 cm)样品, 且两两样品之间间距大于 10 m, 其中 5 个日本鳗草的根际(3 mm)沉积物, 3 个非草区沉积物(距草区 20–40 m)。其中山东威海荣成天鹅湖(37.21° N, 122.34° E), 位于胶东半岛东北角处。天鹅湖是一个仅通过一个狭窄的湾口与外界相连的潟湖, 环境宜人, 生物资源丰富, 近海水质达到国家 2 类以上标准。湾内有大面积海草床, 主要海草种类为大叶藻和日本鳗草(日本鳗草距岸约 30 m 处), 该地丰富的海草资源得益于天鹅湖保护区的封闭环境; 山东东营海草床(37.95° N, 119.10° E)位于东营市垦利区外环, 黄河入海口以北约 10 km, 恰好处在胶州湾与渤海湾交界处。该处为湿地生态系统, 海草品种只有日本鳗草(离岸约 200 m)。互花米草毗邻日本鳗草生长在潮上带部分, 周围发展了大量滩涂养殖业, 并且油田开垦严重。大连长海县海草床(39.23° N, 122.70° E), 位于辽宁大连的长海岛, 海草种类有大叶藻和日本鳗草, 日本鳗草生长在离岸约 300 m 的潮间带。由于和外界较为隔绝, 岛上无重工业, 环

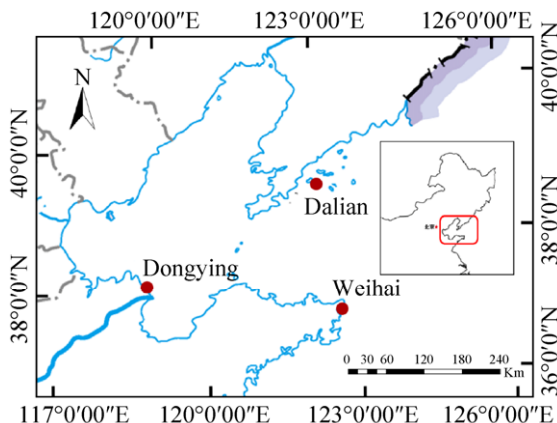


图 1. 黄渤海海草分布区采样站位图

Figure 1. Sampling sites of seagrass distribution area in Yellow Sea and Bohai Sea.

境优美, 海产资源丰富, 因此该处海草长势较好且面积是三地之最。野外采集到的样品放置于冰桶后加入足量冰袋、避光保存带回实验室, 用于提取 DNA 的样品于 -80°C 中储存; 而用于测定理化因子的沉积物在冷冻干燥机中处理 72 h。

1.2 理化参数的测定

1.2.1 粒径检测: 冷冻干燥后的样品过 2 mm 孔径的筛网去除大粒径杂质后, 取适量用激光粒度仪(Malvern Instruments, 英国)测量粒径大小。

1.2.2 测定 SO_4^{2-} : 冷冻干燥后的沉积物样品过 100 目筛网后, 称取 1 g 沉积物放入试管中, 加入 5 mL 超纯水, 超声(功率 300 W 下) 1 h 使其充分混匀, 用注射器吸取上清液, 用 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 用超纯水按 1:20 比例稀释至 40 mL, 离子色谱仪(Dionex ICS-3000, 美国)测定其浓度, 并且每个样品都设置了 3 个平行。

1.2.3 三态氮测定: 称取过 100 目筛网的样品 2.5 g 于 50 mL 的塑料瓶, 加入 2 mol/L 的 KCl 溶液 25 mL, 振荡 1 h 浸提; 注射器吸取上清液过 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜至 3 个 15 mL 离心管中, 并用连续流动分析仪(Seal, 德国)进行测定, 每个样品均有 3 个重复。

1.2.4 重金属含量的测定: 称取过 100 目筛网的样品 0.5 g 于 15 mL 干净的离心管中, 加入 1 mol/L 盐酸 10 mL, 超声 1 h 后用超纯水稀释 20 倍, 利用电感耦合等离子体质谱仪(PerkinElmer, 香港)检测。

1.2.5 沉积物中碳、氮含量的测定: 称取过 100 目筛网的样品 2 g 于玻璃离心管中, 向棕色瓶中加入 1 mol/L 的盐酸 3 mL, 超声作用 1 h 使其充分混匀, 室温下放置 1 h 后用滴管吸出上清, 再向棕色瓶中加 1 mol/L 的盐酸直至无气泡产生, 超声 1 h 后室温放置 24 h; 用滴管吸出上清后加 3 mL 超纯水并混匀, 置于 60°C 烘箱中烘干表层水, 再

重复加水烘干,直至上清液的 pH 呈中性为止,烘干样品测定总有机碳(TOC)和总有机氮(TON)。另称取过 100 目筛网的样品 2 g,用于总碳(TC)和总氮(TN)含量的测定。这些测定都在元素分析仪(Elementar, 德国)上完成,且均设置 3 个重复。

1.3 基因组 DNA 的提取、PCR 扩增及高通量测序

日本鳗草根际与非根际样品中的 DNA 采用的是 PowerSoil™ DNA Isolation Kit 试剂盒提取,实验流程参照试剂盒说明书。DNA 纯度和浓度在 NanoDrop 2000C 紫外分光光度计(Thermo Fisher Scientific, 美国)上检测。使用正向引物 341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3')和反向引物 806R (5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3')^[13-14]扩增细菌 16S rRNA 基因的 V3-V4 高变区。扩增体系为 20 μ L, 4 μ L 5 \times FastPfu 缓冲液, 2 μ L 2.5 mmol/L dNTPs, 5 μ mol/L 0.8 μ L 引物, 0.4 μ L FastPfu 聚合酶, 10 ng DNA 模板。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 27 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。使用 2%琼脂糖凝胶回收 PCR 产物,经过纯化、洗脱及 2%琼脂糖电泳检测。扩增片段利用 NEB Next Ultra DNA Library Prep Kit 试剂盒构建 PE300 文库,在 Illumina Miseq 平台进行测序(上海美吉生物医药科技有限公司)。

1.4 数据分析与多样性分析

原始序列使用 Trimmomatic 软件质控^[15], FLASH 软件进行拼接。数据的质控经历了严格的标准,包括测序质量>20;只允许引物 2 个碱基错配,去除模糊碱基;overlap 序列最小长度为 10 bp, overlap 区无法拼接的序列被去除等。使用 UCHIME 软件过滤嵌合体;使用 UPARSE 软件(version 7.1)根据 97%相似度进行 OTU 聚类,只有

单条序列的 OTU 被去除;利用 RDP classifier 对每条序列进行物种分类注释;比对数据库 Silva (SSU128), 比对阈值为 70%。利用 Mothur (v.1.36)^[16]计算样品的 α 多样性(包括 Shannon、Simpson、Chao1、Ace、Coverage 指数); β 多样性利用 Primer V6.0 (Primer-E Ltd.)计算出的加权 Bray-Curtis 距离,作 NMDS 图、样本层级聚类分析(Cluster)。利用 SPSS (V.16.0)统计软件进行 One-way ANOVA 及 Spearman 相关性检验,以 $P \leq 0.05$ 作为差异显著水平;用 R 软件(V.3.1.3)中 vegan 包进行 RDA 和 PCA 分析,并使用 FastTree 根据最大似然法构建进化树,用 FastUniFrac 分析得到样本间距离矩阵绘制 Heatmap 物种与环境因子相关性热图。

2 结果与分析

2.1 黄渤海海草床环境因子特征

威海、东营、大连海草床沉积物样品使用 One-way ANOVA 的 SLD 检验和独立样本 t 检验(independent-samples t -test, two-tailed),发现不同地点以及样品类型(海草床根际与非根际)之间的环境因子显著不同($P \leq 0.05$) (表 1)。三地对比可以看出 TOC、TON (total organic nitrogen)及中值粒径(grand size, $257.36 \pm 18.89 \mu\text{m}$)在威海较高,并且该地的 TOC 和 TON 的含量分为 0.74% 和 0.11%,是东营及大连海草床沉积物含量的 2.8-7.4 倍;TC ($1.28\% \pm 0.05\%$)、TOC/TON 比值($8.00\% \pm 0.98\%$)显示东营与其他两地差异极为显著($P \leq 0.01$),各重金属含量在东营明显偏高,东营 NH_4^+ 含量($450.28 \pm 68.57 \mu\text{mol/kg}$), SO_4^{2-} 含量($12.27 \pm 0.80 \mu\text{mol/kg}$), 中值粒径($57.54 \pm 1.57 \mu\text{m}$)显著小于威海($257.36 \pm 18.89 \mu\text{m}$)与大连($213.19 \pm 4.81 \mu\text{m}$) ($P \leq 0.001$)。 NO_3^- 和 NO_2^- 含量在威海($20.46 \pm 2.37 \mu\text{mol/kg}$; $7.83 \pm$

表 1. 根际环境因子在地域之间以及草区和非草区之间的差异(平均值±标准误)

Table 1. The regional difference of rhizosphere environmental factors and the difference between rhizosphere and unvegetated samples (mean±standard errors)

Physicochemical variables	Weihai (WH)	Dongying (DY)	Dalian (DL)	<i>P</i>			Vegetated/ (V)	Unvegetated/ (U)	<i>P</i> (V vs. U)
				WH vs. DY	WH vs. DL	DY vs. DL			
TOC/%	0.74±0.03	0.26±0.05	0.10±0.01	0.001**	≤0.001**	0.365	0.37±0.07	0.16±0.02	0.013*
TON/%	0.11±0.00	0.03±0.00	0.03±0.00	≤0.001**	≤0.001**	0.532	0.06±0.01	0.03±0.00	0.050*
TOC/TON	6.67±0.07	8.00±0.98	3.71±0.30	0.379	0.005**	0.001**	6.13±0.57	4.79±0.45	0.213
TC/%	0.85±0.02	1.28±0.05	0.16±0.01	≤0.001**	0.43	≤0.001**	0.76±0.12	0.60±0.11	0.184
TN/%	0.11±0.00	0.06±0.00	0.05±0.00	≤0.001**	≤0.001**	≤0.001**	0.08±0.01	0.06±0.00	0.322
NH ₄ ⁺ / (μmol/kg)	283.87±15.65	450.28±68.57	405.44±120.88	1.71	0.308	0.701	379.87±47.97	387.37±58.98	0.922
NO ₂ ⁻ / (μmol/kg)	20.46±2.37	33.99±4.69	41.83±3.26	0.0240*	0.001**	0.146	32.10±3.03	24.58±4.19	0.153
NO ₃ ⁻ / (μmol/kg)	7.84±1.78	37.32±4.44	41.32±2.98	≤0.001**	≤0.001**	0.402	28.82±4.35	25.00±4.23	0.564
SO ₄ ²⁻ / (mmol/kg)	8.25±0.55	12.27±0.80	6.86±0.24	0.012*	0.806	0.007**	9.13±0.69	6.71±1.52	0.112
Grand size/μm	257.36±18.89	57.54±1.57	213.19±4.81	≤0.001**	0.079	≤0.001**	176.03±23.69	248.96±39.6	0.105
Sizes Clay/%	0.76±0.17	3.06±0.17	0.00±0.00	0.003**	0.166	≤0.001**	1.28±0.36	0.25±0.10	0.013*
Silt/%	15.35±2.07	52.35±1.61	0.86±0.35	≤0.001**	0.088	≤0.001**	22.85±5.85	8.44±3.22	0.043*
Sand/%	83.89±2.24	44.58±1.65	99.14±0.35	≤0.001**	0.091	≤0.001**	75.87±6.20	91.31±3.27	0.039
Pb/(μg/g)	5.60±0.61	8.60±0.47	4.26±0.17	0.001**	0.708	≤0.001**	6.15±0.54	4.53±0.83	0.093
V/(μg/g)	11.03±1.01	15.35±1.19	10.11±0.39	0.005**	0.934	0.004**	12.16±0.79	9.16±0.49	0.011*
Cr/(μg/g)	2.76±0.39	5.43±0.81	2.00±0.14	0.004**	0.773	0.002**	3.4±0.48	1.57±0.27	0.010*
Mn/(μg/g)	34.19±2.27	255.33±17.6	26.89±2.08	≤0.001**	0.525	≤0.001**	105.47±28.86	126.65±33.49	0.730
Fe/(μg/g)	2436.56±295.07	7192.19±881.39	2174.76±173.35	≤0.001**	0.813	≤0.001**	3934.51±681.89	2050.71±451.34	0.024*
Co/(μg/g)	1.42±0.20	4.09±0.44	1.21±0.11	≤0.001**	0.625	≤0.001**	2.24±0.38	1.49±0.37	0.181
Ni/(μg/g)	3.80±0.53	10.99±1.23	2.07±0.18	≤0.001**	0.429	≤0.001**	5.62±1.11	2.9±0.92	0.085
Cu/(μg/g)	4.09±0.79	8.76±0.57	2.29±0.17	≤0.001**	0.310	≤0.001**	5.05±0.79	2.32±0.5	0.006**
Zn/(μg/g)	11.39±1.51	19.04±2.04	9.26±0.60	0.005**	0.738	0.002**	13.23±1.38	6.99±0.99	0.004**
As/(μg/g)	3.17±0.09	4.66±0.12	2.81±0.14	≤0.001**	0.001**	≤0.001**	3.54±0.22	3.85±0.25	0.481
Cd/(μg/g)	0.10±0.01	0.11±0.01	0.05±0.00	0.046*	0.055	≤0.001**	0.09±0.01	0.04±0.01	0.001**
Ai/(μg/g)	1872.86±265.47	3586±489.18	1248.5±119.83	0.003**	0.650	0.001**	2235.79±317.21	989.18±215.26	0.008*
Sc/(μg/g)	0.34±0.03	0.86±0.08	0.32±0.01	≤0.001**	0.971	≤0.001**	0.51±0.07	0.35±0.06	0.111
Ti/(μg/g)	24.84±2.66	29.46±3.67	40.86±3.48	0.484	0.007*	0.034*	31.72±2.52	16.44±2.31	≤0.001*

** $P \leq 0.01$; * $P \leq 0.05$.

1.78 μmol/kg)显著低于东营和大连($P \leq 0.001$)。重金属浓度在三地差异十分显著, 所测重金属都在东营浓度最高、大连最低, 东营与威海、大连差异显著(除 As、Ti 金属外)($P \leq 0.05$), 而威海金属

含量与大连差异不大(ANOVA, $P > 0.05$); 大连海草床根际土壤中 TOC、TON 及各重金属含量(除 Ti 含量三地最高外)都显著较低。

对比草区与非草区, 草区的相关理化因子浓

度普遍较高, 尤其 TOC、TON、黏土(Clay)、粉砂(Silt)及重金属 V、Cr、Fe、Cu、Zn、Cd、Ai、Ti 浓度草区显著高于非草区($P \leq 0.05$), 而 NH_4^+ 、中值粒径(grand size)、沙粒(sand)含量在非草区较高, 其他环境因子差异并不显著。

2.2 日本鳗草根际微生物群落组成差异及多样性指数

24 个样品经过测序共得到 1078214 条有效序列, 且原始数据已上传至 NCBI 数据库, 生成的序列号为 PRJNA490600。

海草床沉积物细菌群落结构在门水平上(图 2-A), 变形菌门(*Proteobacteria*) (41.1%)、蓝细菌门(*Cyanobacteria*) (15.4%)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*) (12.6%)、放线菌门(*Actinobacteria*) (9.3%)是海草床根际及周围沉积物中的主要优势菌群, 并且根际微生物群落结构在地域之间及不同样品类型(草区与非草区)之间组间差异显著($P \leq 0.05$, 表 2)。为了更直观展示不同地域样品之间的物种差异, 通过 Kruskal-Wallis 秩和检验得到了门水平上组间显著差异的物种, 丰度在前 10 的差异物种($P \leq 0.05$)通过物种差异柱状图显示(图 3-A)。日本鳗草根际沉积物中变形菌门相对丰度在东营最高, 蓝细菌所占比例东营最低; 螺旋体(*Spirochaeta*)相对丰度在威海最高, 芽单胞菌门(*Gemmatimonadetes*)、*Ignavibacteriae* 门相对丰度在威海最低; 梭杆菌门(*Fusobacteria*)、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)的相对丰度在大连略高于其他两地样品。利用 wilcoxon 秩和检验得到了根际与非根际丰度前 10 的差异物种($P \leq 0.05$) (图 3-B)。门水平上根际与非根际相比, 酸杆菌门(*Acidobacteria*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、芽单胞菌门(*Gemmatimonadetes*)、梭杆菌门(*Fusobacteria*)、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)、螺旋体(*Spirochaeta*)、

Ignavibacteriae、脱铁杆菌门(*Deferribacteres*)均在根际处含量较高; 拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、*Latescibacteria* 在非根际土壤中相对丰度较大。

在纲水平上(图 2-B), 根际样品中 δ -变形菌纲(*Deltaproteobacteria*)、 ϵ -变形菌纲(*Epsilonproteobacteria*)、梭菌纲(*Clostridia*)、拟杆菌纲(*Bacteroidia*)、芽单胞菌纲(*Gemmatimonadetes*)平均丰度高于非根际样品, γ -变形菌纲(*Gamma proteobacteria*)、黄杆菌纲(*Flavobacteriales*)、 α -变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)、鞘脂杆菌纲(*Sphingobacteriia*)、噬纤维菌纲(*Cytophagia*)在非根际样品中显示出明显优势。

在目水平上如图 2-C 所示, 根际中脱硫杆菌目(*Desulfobacterales*)、弯曲菌目(*Campylobacterales*)、梭菌目(*Clostridiales*)、除硫单胞菌目(*Desulfuromonadales*)等菌种丰度显著高于非根际, 而非根际比根际更富含黄杆菌目(*Flavobacteriales*)、红细菌目(*Rhodobacterales*)、黄单胞菌目(*Xanthomonadales*)、鞘脂杆菌目(*Sphingobacteriales*)。

在科水平上(图 2-D), 根际土壤中脱硫球茎菌科(*Desulfobulbaceae*)、脱硫杆菌科(*Desulfobacteraceae*)、螺旋杆菌科(*Helicobacteraceae*)平均丰度占显著优势。非根际中黄杆菌科(*Flavobacteriaceae*)、红杆菌科(*Rhodobacteraceae*)、酸微菌科(*Acidimicrobiaceae*)、腐螺旋菌科(*Saprosiraceae*)平均丰度均高于根际。

通过对 16S rRNA 基因高通量测序结果比对, 得出 α -多样性指数统计表(表 3)。Sobs 指数是实际观测到的 OTU 数目, Shannon 指数和 Simpson 指数用来反映物种的多样性情况, Ace 指数和 Chao1 指数用来指示物种的丰富度情况, Coverage 指数用来检测测序深度。由表 3 可知, Sobs 指数为威海、东营大于大连。根据 Shannon 指数和 Simpson

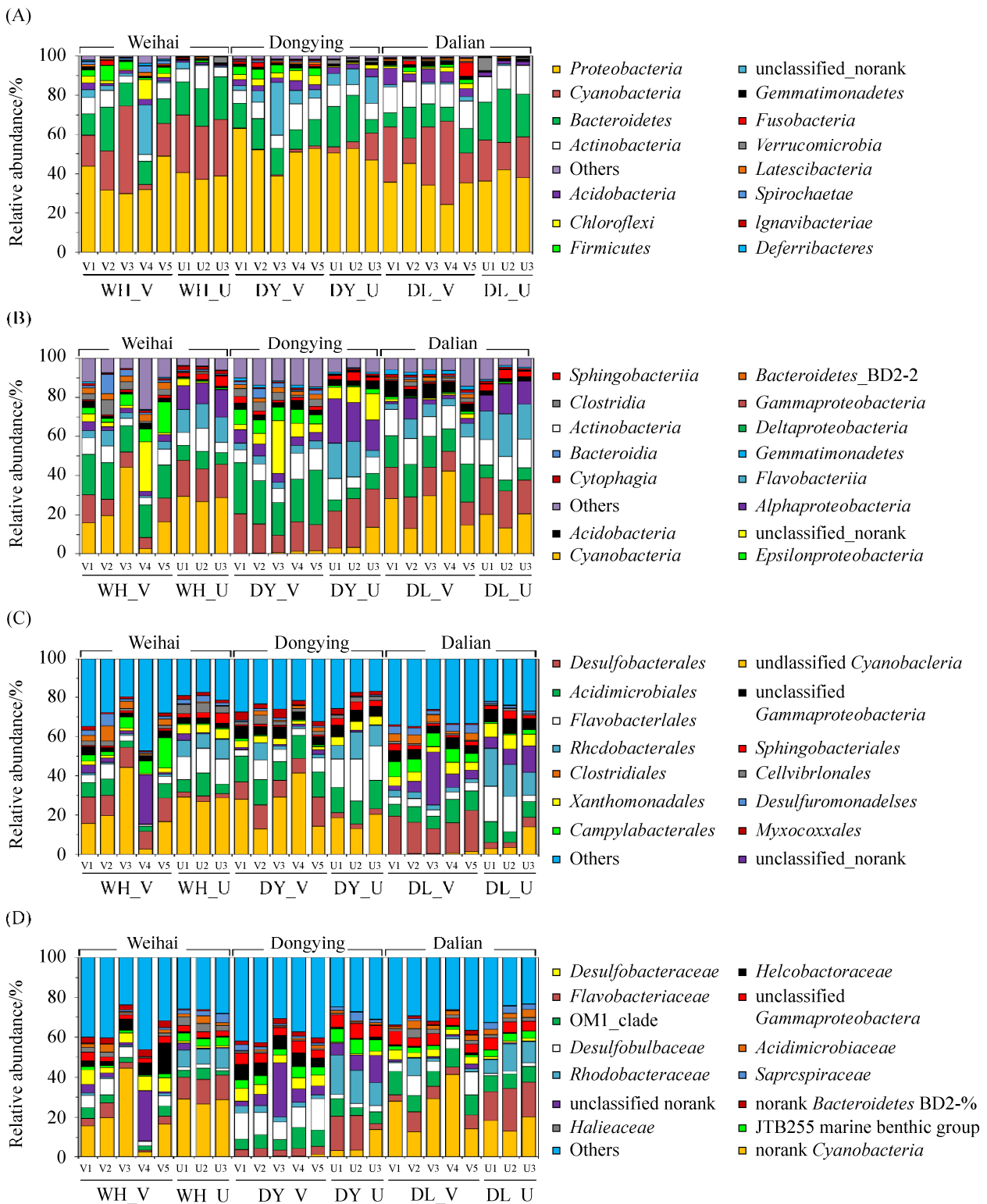


图 2. 海草床微生物类群在不同分类阶元上的相对丰度

Figure 2. Relative abundance of microbial taxa in seagrass bed at phylum (A), class (B), order (C), family (D) levels.

表 2. 基于 Bray-Curtis 距离对不同地域及有无海草定植的沉积物中细菌群落结构的 ANOSIM 分析

Table 2. ANOSIM testing the spatial differences in bacterial communities between Weihai (WH), Dongying (DY) and Dalian (DL) or between vegetated (V) and unvegetated (U) sediment samples based on Bray-Curtis metrics

Group	Vegetated (V)		Unvegetated (U)		V vs. U	R	P
	R	P	R	P			
Global R	0.916	0.001	1.000	0.004	All samples	0.512	0.002
WH vs. DY	0.892	0.008	1.000	0.100	Within WH	0.682	0.018
WH vs. DL	0.732	0.008	1.000	0.100	Within DY	1.000	0.018
DY vs. DL	1.000	0.008	1.000	0.100	Within DL	0.969	0.018

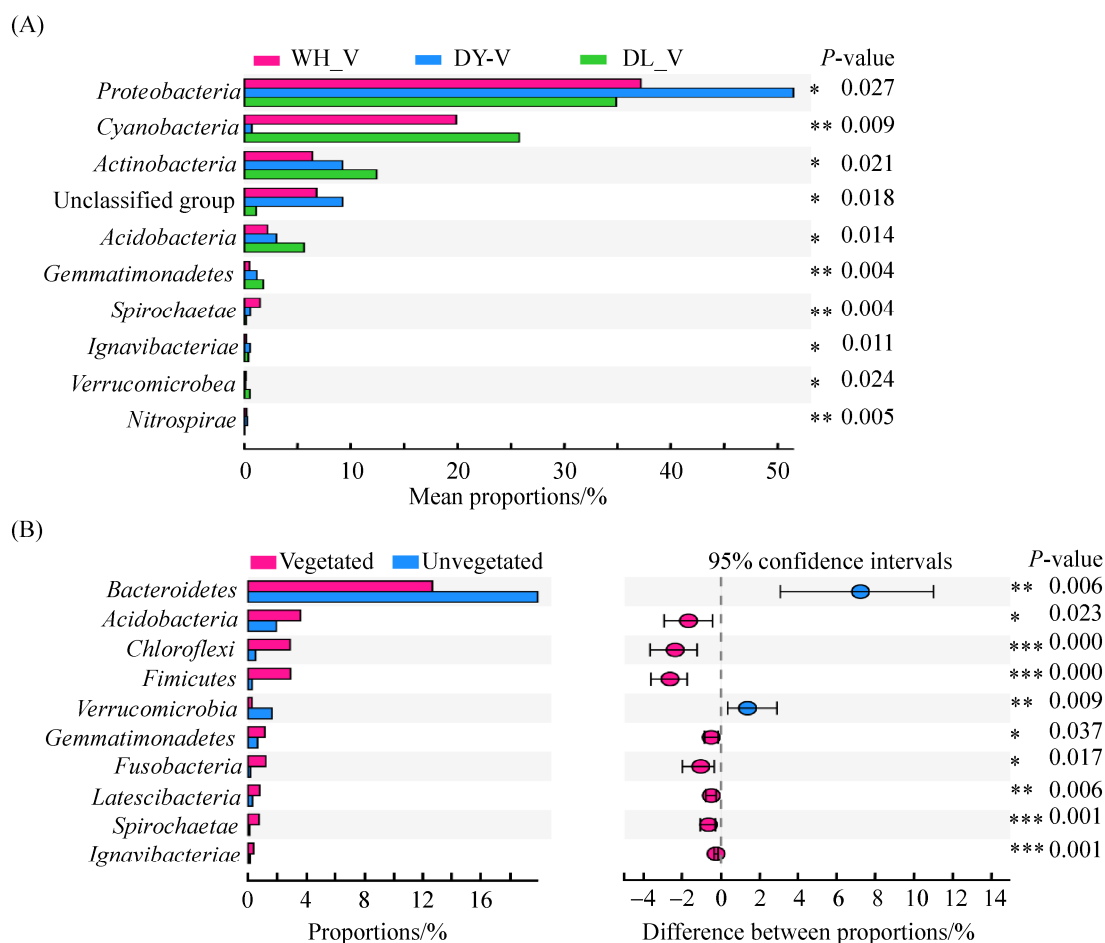
Significant differences ($P \leq 0.05$) are highlighted in bold.

图 3. 主要类群的相对丰度在地域之间(A)以及有无海草定植之间(B)的对比

Figure 3. Comparison of relative abundance of major taxa between regions (A) and with or without seagrass vegetated (B). *indicate $P \leq 0.05$; ** indicate $P \leq 0.01$.

指数结果发现, 东营样品 Shannon 指数显著高于其他两地(ANOVA, $P \leq 0.05$), Simpson 指数略低于其他两地(差异不显著), 由此可知东营海草根际微生物多样性更高。根据 Ace 指数和 Chao1 指数

可以看出, Chao1 指数和 Ace 指数大小顺序为东营>威海>大连, 并且东营与其他两地均差异显著(ANOVA, $P \leq 0.05$), 表明相比于其他两地东营海草根际微生物群落丰富度更高。另外所有实验样

表 3. 微生物 α 多样性指数分析(平均值 \pm 标准误)
Table 3. Microbial α -diversity index (mean \pm standard errors)

Sites	Sobs	Shannon	Simpson	Ace	Chao	Coverage
WH_V	1801.60 \pm 112.18	5.35 \pm 0.25	0.03 \pm 0.02	2359.58 \pm 153.33	2363.19 \pm 134.68	0.98 \pm 0.00
WH_U	1804.00 \pm 27.84	5.21 \pm 0.04	0.03 \pm 0.00	2426.50 \pm 23.43	2416.01 \pm 12.19	0.99 \pm 0.00
DY_V	2124.20 \pm 92.33	6.09 \pm 0.07	0.01 \pm 0.00	2733.26 \pm 91.81	2739.34 \pm 103.70	0.98 \pm 0.00
DY_U	1611.67 \pm 118.72	5.49 \pm 0.06	0.01 \pm 0.00	2238.98 \pm 167.36	2215.83 \pm 153.56	0.98 \pm 0.00
DL_V	1582.40 \pm 63.56	5.05 \pm 0.16	0.03 \pm 0.01	2176.77 \pm 69.60	2185.79 \pm 63.88	0.98 \pm 0.00
DL_U	1444.33 \pm 62.71	5.18 \pm 0.05	0.02 \pm 0.00	1991.65 \pm 61.78	2023.68 \pm 78.43	0.98 \pm 0.00

Letters in sample IDs mean the vegetated (V) and unvegetated (U) samples collected from the Weihai (WH), Dongying (DY) and Dalian (DL), respectively.

品覆盖度均在 98% 以上, 测序结果可靠。以上结果表明黄渤海日本鳗草根际微生物物种丰度和多样性存在明显区域差异, 然而在草区与非草区样品间 α -多样性指数没有明显规律。

我们分别检验了细菌群落结构在威海、东营和大连之间, 以及草区和非草区之间存在差异, 发现无论使用 Bray-Curtis 距离和 weighted UniFrac 距离算法在 OTU 水平上对样本中包含的物种信息进行非度量多维尺度排序 (non-metric multidimensional scaling, NMDS) 和主坐标分析 (principal Coordinate Analysis, PCoA) (图 4-A-B),

都显示出海草的定植与否对细菌群落组成和结构起着决定性作用 ($R=0.512$, $P=0.002$)。样品间的区域性差异 (威海、东营、大连) 及样品类型差异 (草区、非草区) 都在图中明显区分开来; 从整体上来看, 无论草区还是非草区样品, 都存在极显著的地域性差异 (ANOSIM vegetated global $R=0.916$, $P=0.001$; unvegetated global $R=1.000$, $P=0.004$) (表 2)。三个采样地之间两两比较, 发现草区样品之间均差异显著且 P 值都为 0.008, 而非草区样品间却没有明显的差异 ($P=0.100 > 0.05$, 表 2)。进一步比较同一地区的草区和非草区之间菌群结构

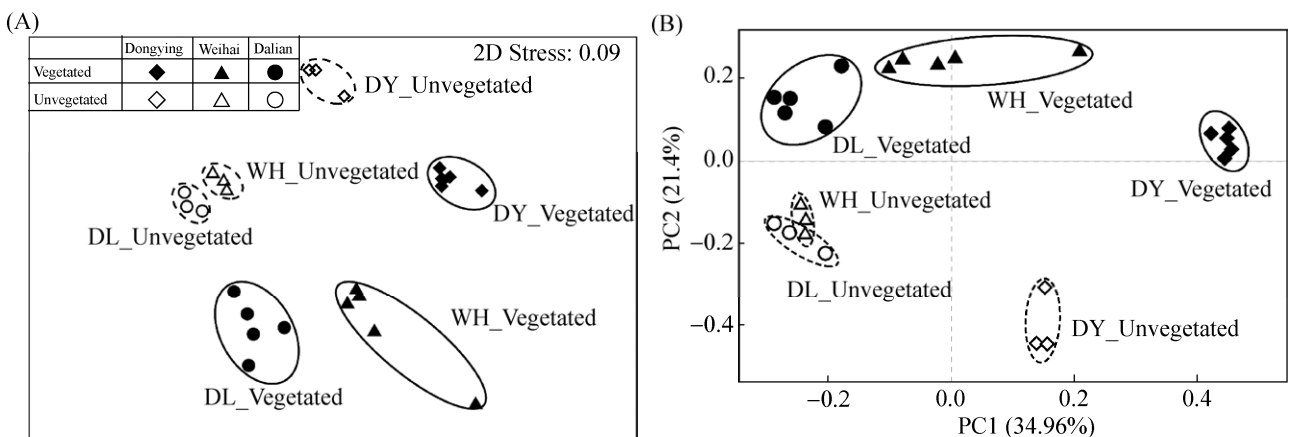


图 4. 基于 Bray-Curtis 和 weighted UniFrac 距离作细菌群落非度量多维尺度排序(A)和主坐标分析(B)

Figure 4. Plots of nonmetric multidimensional scaling based on Bray-Curtis distance (A) and principal coordinate analysis based on weighted UniFrac distance (B) showing the differences in bacterial community structure.

差异,发现都存在显著不同($P=0.018$,表2)。样本层级聚类分析(图5)更加直观地显示了样本间的相似程度,可以看出草区样本中所包含的微生物种类、数量等信息明显区别于非草区,在所有样品中威海与大连样本的微生物群落结构更为相似。

2.3 微生物类群对环境因子间的响应

根据门水平冗余分析(RDA)发现不同地域、不同样品类型(草区和非草区)与不同的环境因子存在着紧密联系(图6)。其中图6所展示的环境因子如TN($P=0.005$)、TOC/TON值($P=0.021$)及重金

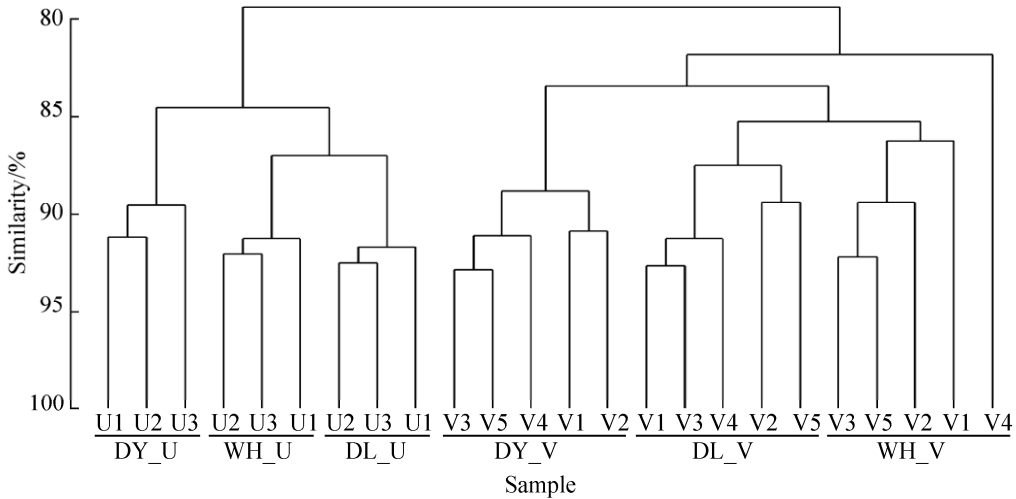


图5. 基于Bray-Curtis距离的样品聚类分析

Figure 5. Plots of sampling sites cluster scaling based on Bray-Curtis distance.

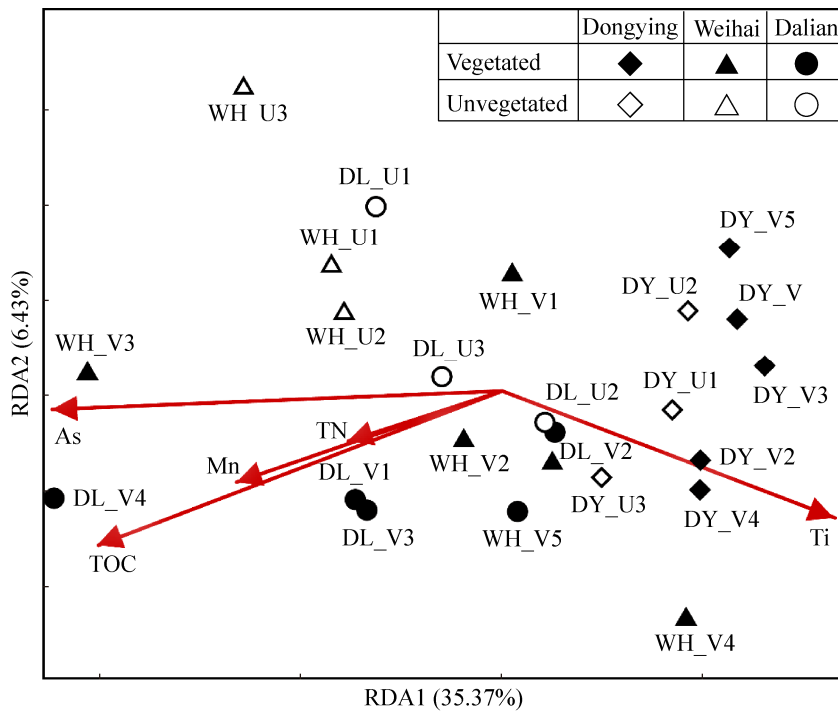


图6. 门水平上冗余分析

Figure 6. Redundancy analysis based on phylum level.

属 Mn ($P=0.009$)、As ($P=0.002$)、Ti ($P=0.018$)的浓度对门水平上微生物群落组成与分布有着显著的影响, 5 个因子在轴 RDA1、RDA2 上的解释度分别为 34.81%和 6.73%。

通过计算环境因子与门水平上丰度为前 30 的物种之间的 Spearman 相关系数并对物种层级求平均值的方式进行聚类, 将获得的数值矩阵通过 Heatmap 图展示(图 7), 颜色变化表示相关程度大小, 体现了物种类群对日本鳗草根际土壤环境的适应程度。结果发现 *Latescibacteria*、浮霉菌门(*Planctomycetes*)、脱铁杆菌门(*Deferribacteres*)、*Aminicenantes*、*Ignavibacteriae*、*Nitrospinae*、酸杆菌门 (*Acidobacteria*)、芽单胞菌门 (*Gemmatimonadetes*)等物种分布较为密集, 都与环境因子 Ti、Cu、Co、Fe、Sc、Pb、Ni、Zn、Cd、V、Cr、Ai、 SO_4^{2-} 有显著正相关性($P \leq 0.05$), 并

且酸杆菌门 (*Acidobacteria*)、芽单胞菌门 (*Gemmatimonadetes*)、*Nitrospinae*、*Ignavibacteriae* 还与 NO_2^- 、 NO_3^- 成显著正相关关系($P \leq 0.05$)。同时变形菌门(*Proteobacteria*)、*Parcubacteria*、硝化螺旋菌门(*Nitrospirae*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)与环境因子 TC、重金属(除 Ti 外)、 SO_4^{2-} 、Clay、Silt 呈显著负相关性($P \leq 0.05$)。

为了检验 OTU 水平上群落距离矩阵(weighted-UniFrac 距离)和环境变量矩阵(Bray-Curtis 距离)之间的相关性, 利用 Mantel test 统计检验(表 4), 通过 r 值和显著性水平 P 值反映相关性程度。由表 4 发现部分环境因子(包括 TN、TC、TOC、Clay、As)与 OTU 水平物种之间相关性显著, 而环境因子 NO_2^- 、 NH_4^+ 、Grandsize、Sand、Pb、Cr、Co、Ai、Zn、Sc、Ti、V、Fe 虽然与物种相关性不显著, 但都呈现了负相关性趋势。

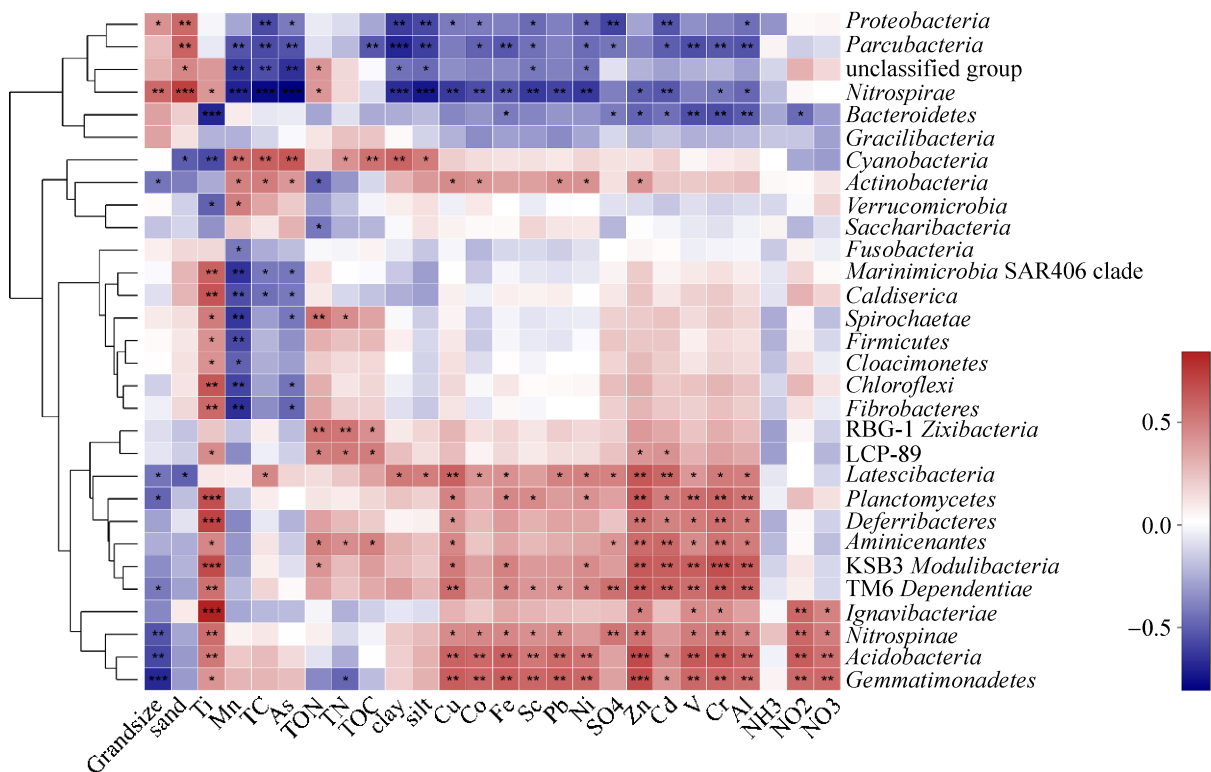


图 7. 门水平上的相关性分析热图

Figure 7. Heatmap correlation analysis on the phylum level. * indicate $P \leq 0.05$; ** indicate $P \leq 0.01$.

表 4. OTU 水平上 Mantel test 检验

Table 4. Mantel test of environmental factors at OTU level

Environmental factors	Mantel test (<i>r</i> statistics)	<i>P</i> -value
TN	0.210	0.043*
TC	0.294	0.004**
TON	0.089	0.354
TOC	0.207	0.025*
NO ₃ ⁻	0.122	0.234
NO ₂ ⁻	-0.019	0.851
NH ₄ ⁺	-0.144	0.250
SO ₄ ²⁻	-0.051	0.636
Grandsize	-0.006	0.953
Sand	-0.017	0.919
Silt	0.094	0.258
Clay	0.217	0.001**
Pb	-0.020	0.861
Cr	-0.055	0.695
Co	-0.041	0.759
Ni	0.035	0.713
Cu	0.020	0.815
As	0.268	0.002**
Cd	0.127	0.114
Ai	-0.022	0.862
Zn	-0.060	0.621
Sc	-0.056	0.621
Ti	-0.011	0.943
V	-0.055	0.650
Mn	0.120	0.055
Fe	-0.073	0.561

* indicate $P \leq 0.05$; ** indicate $P \leq 0.01$.

3 讨论

3.1 黄渤海日本鳗草分布区及非草区环境差异

本研究调查了黄渤海海草区东营、威海、大连三地日本鳗草根际以及相邻表层沉积物特性和理化指标。由于海草对营养物质的沉积、保留、矿化作用,导致海草区沉积物中营养元素往往比无草区沉积物更丰富。实验发现海草根际沉积物中黏土(Clay)和粉砂(Silt)所占比例更大、颗粒更细,同时 TOC、TON 含量显著高于非草区,这表明海草可以降低水流速度,加速泥沙沉积,抑制底泥再悬浮^[17],并且海草碎片能够高效保存有机

氮^[18-19],阻止营养盐的释放。海草根际可以释放溶解性有机碳,并能从上覆水中捕获碳颗粒,通过离体叶、腐质根及茎来增加有机碳负荷,因此海草床处有丰富的碳物质^[18]。同时小颗粒沉积物往往具有较高的保存能力,从而使有机物更容易被包裹。通过观察发现日本鳗草适宜生长在更靠岸的潮间带的沙质或粉砂质土壤中,猜想这样的地质可能更有利于为海草根际提供氧气,解除硫化物等物质的毒害。硝酸盐和铵盐是植物最重要的无机化合物氮源,硝酸盐一般需要还原成铵盐后才能进入有机体中。实验结果显示 NH₄⁺含量在植物根际中含量较低,表明日本鳗草根际吸收了 NH₄⁺作为有效氮源^[20-22]。由于黏土(Clay)颗粒较细携带了沉积物中大部分重金属^[23],因此有海草覆盖的沉积物中重金属浓度显著高于裸露区,体现了海草富集重金属的重要生态角色。海草床地域对比中同样可见,东营海草根际沉积物粒度最小,重金属含量最大;相反,大连海草根际沉积物主要为大粒径的沙粒(Sand),重金属含量三地也最低。

3.2 日本鳗草根际细菌群落的多样性

通过对 16S rRNA 基因测序结果在不同分类水平上进行分析,结果表明变形菌门(*Proteobacteria*)、蓝细菌门(*Cyanobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、放线菌门(*Actinobacteria*)在日本鳗草根际沉积物细菌群落中占主导地位。并且海草根际中厚壁菌门(*Firmicutes*)、脱铁杆菌门(*Deferribacteres*)显著多于非根际土壤。其中固氮微生物占据了重要的组成部分包括变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、放线菌门(*Actinobacteria*)。铁还原菌和硫酸盐还原菌也是重要的固氮细菌,脱铁杆菌属于革兰氏阴性菌是典型的铁还原菌,可以使用铁、锰或硝酸盐进行厌氧呼吸,也可通过发酵产生能量^[24]。固氮作用可以促进海草光合作用、平

衡沉积物中反硝化和厌氧氨氧化造成的氮损失，海草床根系固氮菌群的相对稳定对海草床的健康及发挥其生态功能至关重要。

纲水平上蓝细菌纲(*Cyanobacteria*)、 γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)在日本鳗草根际中丰度较高(15.5%; 12.7%)。蓝藻具有还原硝酸盐和固碳的生态功能，可以维持海草的氮需求^[25]。 δ -变形菌纲(*Deltaproteobacteria*)、 ϵ -变形菌纲(*Epsilonproteobacteria*)成员弯曲菌目(*Campylobacteriales*)在草区根部更为富集。 δ -变形菌纲(*Deltaproteobacteria*)含有大部分已知硫酸盐的菌属(如 *Desulfovibrio*, *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfonema*)、硫还原菌和其他生理功能的厌氧菌(如铁还原菌)。许多 γ -变形菌和 ϵ -变形菌利用氧气和硝酸盐作为电子受体进行硫化物的氧化^[26]。弯曲菌目是从米草中分离出来的固氮菌^[27]，此外它也是已知的硫酸盐还原菌。脱硫球茎菌科(*Desulfobulbaceae*)、脱硫杆菌科(*Desulfobacteraceae*)平均丰度在根际显著高于非根际。脱硫球茎菌科(*Desulfobulbaceae*)为化能异养菌，可进行发酵代谢，部分成员不能使用硫酸盐作为末端电子受体，而是通过歧化还原硫化物或以硫代硫酸盐、多硫化物作为电子受体^[28]。脱硫杆菌科(*Desulfobacteraceae*)大多数使用硫化物作为主要能源，有研究显示某些成员还能在硫酸盐还原条件下对萘等环境污染物进行降解^[29]。

通过分析发现硫酸盐还原菌、固氮菌和铁还原菌在海草根际生态系统占领着关键性地位。硫酸盐还原菌是近岸海洋厌氧降解有机质的主要类群，丰富的有机碳源有利于其繁殖，因此在海草区丰度较高。另外硫和氮的代谢过程并不是相互独立，硫酸盐还原菌也是海草沉积物中氮固定的主要成员^[30-32]；铁还原菌除了提供固定的氮来满

足海草快速生长的需要，其产生的铁还能通过漫长的沉淀作用形成黄铁矿来减轻硫化物的毒害作用^[33]。与其他沿海海洋生态系统一样，微生物在海草床根系沉积物中迅速消耗氧气时会在表层之下造成缺氧环境，由于沉积物中大量的硫酸盐极易获得电子成为终端电子受体，因此硫酸盐还原菌在有机物矿化中占主导地位^[32,34]。地球化学证据表明，硫酸盐还原作用与海草床沉积物中的碳和养分循环密切相关^[35-36]。海草为硫酸盐代谢提供根际分泌物^[32]，作为回报，海草使用来自硫酸盐还原菌固定的氮，并且可以满足海草大约 50% 的氮需求^[37]。海草床内固氮发生率高于附近非草区沉积物，Welsh 等^[38]和 Nielsen 等^[37]估计硫酸盐还原菌负责介导海草根际固氮量的 60%–95%。Holmer 等^[35]的一项研究表明，海草床沉积物中超过 80% 的磷酸盐需求是由硫酸盐还原过程中的有机质周转来调节的。

3.3 海草根际菌群驱动因素

微生物群落组织结构的研究是理解海草床微生物生态系统的基础，其影响因素非常复杂。一些物理化学因素(例如有机碳氮、粒度和许多金属的浓度)在草区和非草区沉积物之间差异显著。海草沉积物中有机物的主要来源包括海草根际分泌物、落叶碎屑及浮游植物残骸，表现出不同的碳氮比及分解速率^[18]。结合 RDA 和 Mantel test 分析显示，微生物群落结构的变化主要与沉积物中 TN、TC、TOC、Clay、As 环境因素显著相关，表明碳源、氮源及部分重金属浓度对海草根际微生物群落结构的影响。海草区与非草相比，草区富含有机物、碳储量较高，更有利于微生物繁殖。微生物群落与 TN 的相关性暗示了氮对根际微生物群落组成的重要性：氮通常是陆地植物的限制性养分，在一些海草研究中也观察到氮限制^[39]。

陆生植物与固氮细菌之间, 通过有益的相互作用克服了氮元素限制, 目前也已发现了固氮细菌与海草间的关联作用^[30,33]。通过之前研究可知, 低浓度重金属对微生物有刺激作用, 但高浓度则会抑制其生长。重金属砷(As)影响菌群组成, 可能正是由于其对固氮生物和硫酸盐还原菌的强烈毒性^[40]所致。

综上所述, 不同地域、不同样品类型之间的差异物种多与硫和氮代谢相关, 硫酸盐还原菌对维持日本鳗草的生态健康起关键作用, 它不仅可解除日本鳗草根际硫化物的毒害作用, 而且也是固氮菌的重要组成, 供应着日本鳗草生长必要的氮素需求。

参考文献

- [1] Zheng FY, Qiu GL, Fan HQ, Zhang W. Diversity, distribution and conservation of Chinese seagrass species. *Biodiversity Science*, 2013, 21(5): 517–526. (in Chinese)
郑凤英, 邱广龙, 范航清, 张伟. 中国海草的多样性、分布及保护. *生物多样性*, 2013, 21(5): 517–526.
- [2] 黄小平, 黄良民. 中国南海海草研究. 广州: 广东经济出版社, 2007.
- [3] Fan HQ, Qiu GL, Shi YJ, Li S. Studies on physiological ecology of seagrasses in subtropical China. Beijing: Beijing Science Press, 2011. (in Chinese)
范航清, 邱广龙, 石雅君, 李森. 中国亚热带海草生理生态学研究. 北京: 北京科学出版社, 2011.
- [4] Wang DR, Wu ZJ, Chen CH, Lan JX, Wu R, Chen XH, Zhang GX, Li YC. Distribution of sea-grass resources and existing threat in Hainan Island. *Marine Environmental Science*, 2012, 31(1): 34–38. (in Chinese)
王道儒, 吴钟解, 陈春华, 兰建新, 吴瑞, 陈晓慧, 张光星, 李元超. 海南岛海草资源分布现状及存在威胁. *海洋环境科学*, 2012, 31(1): 34–38.
- [5] Shin H, Choi HK. Taxonomy and distribution of *Zostera* (*Zosteraceae*) in eastern Asia, with special reference to Korea. *Aquatic Botany*, 1998, 60(1): 49–66.
- [6] Zhang XM, Zhou Y, Wang F, Liu P, Liu BJ, Liu XJ, Yang HS. Ecological characteristics of *Zostera japonica* population in Swan Lake of Rongcheng, Shandong Province of China. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2013, 24(7): 2033–2039. (in Chinese)
张晓梅, 周毅, 王峰, 刘鹏, 刘炳舰, 刘旭佳, 杨红生. 山东荣成天鹅湖日本鳗草种群的生态特征. *应用生态学报*, 2013, 24(7): 2033–2039.
- [7] den Hartog C, Yang ZD. A catalogue of the seagrasses of China. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 1990, 8(1): 74–91.
- [8] Zhou Y, Zhang XM, Xu SC, Song XY, Lin HY, Wang PM, Gu RT. New discovery of larger seagrass beds with areas > 50 ha in temperate waters of China: An unusual large seagrass (*Zostera japonica*) bed in the Yellow River estuary. *Marine Sciences*, 2016, 40(9): 95–97. (in Chinese)
周毅, 张晓梅, 徐少春, 宋肖跃, 林海英, 王朋梅, 顾瑞婷. 中国温带海域新发现较大面积(大于 50 ha)的海草床: I 黄河河口区罕见大面积日本鳗草海草床. *海洋科学*, 2016, 40(9): 95–97.
- [9] Hu XJ. Rhizosphere microorganisms and plant nutrition. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 1999, 21(3): 77–79. (in Chinese)
胡小加. 根际微生物与植物营养. *中国油料作物学报*, 1999, 21(3): 77–79.
- [10] Zhang HM, Kim MS, Krishnamachari V, Payton P, Sun Y, Grimson M, Farag MA, Ryu CM, Allen R, Melo IS, Paré PW. Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta*, 2007, 226(4): 839–851.
- [11] Liu F, Wu XL, Cui GL, Peng R, Li HL. Dynamics of microbial number in rhizosphere of *Artemisia annua* L. and its relationship with artemisinin content. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2010, 21(1): 37–38. (in Chinese)
刘飞, 伍晓丽, 崔广林, 彭锐, 李红丽. 青蒿根际微生物数量动态及其与青蒿素含量的关系研究. *时珍国医国药*, 2010, 21(1): 37–38.
- [12] Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Wei HX, Paré PW, Kloepper JW. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(8): 4927–4932.
- [13] Yu Y, Lee C, Kim J, Hwang S. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, 89(6): 670–679.
- [14] Neefs JM, van de Peer Y, Hendriks L, de Wachter R. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(S1): 2237–2317.
- [15] Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114–2120.
- [16] Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, van Horn DJ,

- Weber CF. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(23): 7537–7541.
- [17] Gacia E, Duarte CM. Sediment retention by a Mediterranean *Posidonia oceanica* meadow: the balance between deposition and resuspension. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2001, 52(4): 505–514.
- [18] Duarte CM, Holmer M, Marbà N. Plant-microbe interactions in seagrass meadows//Kristensen E, Haese RR, Kostka JE. Interactions Between Macro-and Microorganisms in Marine Sediments. Washington, DC: American Geophysical Union, 2005: 31–60.
- [19] Kristensen E, Haese RR, Kostka JE. Interactions between macro- and microorganisms in marine sediments. Washington, DC: American Geophysical Union, 2005.
- [20] Welsh DT, Bourgués S, de Wit R, Herbert RA. Seasonal variations in nitrogen-fixation (acetylene reduction) and sulphate-reduction rates in the rhizosphere of *Zostera noltii*: nitrogen fixation by sulphate-reducing bacteria. *Marine Biology*, 1996, 125(4): 619–628.
- [21] Welsh DT. Nitrogen fixation in seagrass meadows: regulation, plant-bacteria interactions and significance to primary productivity. *Ecology Letters*, 2000, 3(1): 58–71.
- [22] Caffrey JM, Kemp WM. Nitrogen cycling in sediments with estuarine populations of *Potamogeton perfoliatus* and *Zostera marina*. *Marine Ecology Progress Series*, 1990, 66: 147–160.
- [23] Maslennikova S, Larina N, Larin S. The effect of sediment grain size on heavy metal content. *Lakes Reservoirs and Ponds*, 2012, 6(1): 43–54.
- [24] Huber H, Stetter KO. Family I. *Deferribacteraceae* fam. nov//Boone DR, Castenholz RW. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. New York: Springer-Verlag, 2001: 465–466.
- [25] Palenik B, Brahamsha B, Larimer FW, Land M, Hauser L, Chain P, Lamerdin J, Regala W, Allen EE, McCarren J, Paulsen L, Dufresne A, Partensky F, Webb EA, Waterbury J. The genome of a motile marine *Synechococcus*. *Nature*, 2003, 424(6952): 1037–1042.
- [26] Campbell BJ, Engel AS, Porter ML, Takai K. The versatile ϵ -proteobacteria: key players in sulphidic habitats. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4(6): 458–458.
- [27] McClung CR, Patriquin DG. Isolation of a nitrogen-fixing *Campylobacter* species from the roots of *Spartina alterniflora* Loisel. *Canadian Journal of Microbiology*, 1980, 26(8): 881–886.
- [28] Kuever J. The family *Desulfobulbaceae*//Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F. The Prokaryotes. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014: 75–86.
- [29] Kümmel S, Herbst FA, Bahr A, Duarte M, Pieper DH, Jehmlich N, Seifert J, Von Bergen M, Bombach P, Richnow HH, Vogt C. Anaerobic naphthalene degradation by sulfate-reducing *Desulfobacteraceae* from various anoxic aquifers. *FEMS Microbiology Ecology*, 2015, 91(3), doi: 10.1093/femsec/fiv006.
- [30] Capone DG, Budin JM. Nitrogen fixation associated with rinsed roots and rhizomes of the eelgrass *Zostera marina*. *Plant Physiology*, 1982, 70(6): 1601–1604.
- [31] Waisel Y, Agami M. Ecophysiology of roots of submerged aquatic plants//Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U. Plant Roots: the Hidden Half. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 1996: 895–909.
- [32] Holmer M, Nielsen SL. Sediment sulfur dynamics related to biomass-density patterns in *Zostera marina* (eelgrass) beds. *Marine Ecology Progress Series*, 1997, 146: 163–171.
- [33] Sun FF, Zhang XL, Zhang QQ, Liu FH, Zhang JP, Gong J. Seagrass (*Zostera marina*) colonization promotes the accumulation of diazotrophic bacteria and alters the relative abundances of specific bacterial lineages involved in benthic carbon and sulfur cycling. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(19): 6901–6914.
- [34] Jørgensen BB. Bacteria and marine biogeochemistry//Schulz HD, Zabel M. Marine Geochemistry. Berlin, Heidelberg: Springer, 2006: 169–206.
- [35] Holmer M, Andersen FØ, Nielsen SL, Boschker HT. The importance of mineralization based on sulfate reduction for nutrient regeneration in tropical seagrass sediments. *Aquatic Botany*, 2001, 71(1): 1–17.
- [36] Hansen JW, Udy JW, Perry CJ, Dennison WC, Lomstein BA. Effect of the seagrass *Zostera capricorni* on sediment microbial processes. *Marine Ecology Progress Series*, 2000, 199: 83–96.
- [37] Nielsen LB, Finster K, Welsh DT, Donnelly A, Herbert RA, de Wit R, Lomstein BA. Sulphate reduction and nitrogen fixation rates associated with roots, rhizomes and sediments from *Zostera noltii* and *Spartina maritima* meadows. *Environmental Microbiology*, 2001, 3(1): 63–71.
- [38] Welsh DT, Wellsbury P, Bourgues S, De Wit R, Herbert RA. Relationship between porewater organic carbon content, sulphate reduction and nitrogen fixation (acetylene reduction) in the rhizosphere of *Zostera noltii*. *Hydrobiologia*, 1996, 329(1/3): 175–183.
- [39] De Boer WF. Seagrass-sediment interactions, positive feedbacks and critical thresholds for occurrence: a review. *Hydrobiologia*, 2007, 591(1): 5–24.
- [40] Singh S, Shrivastava AK, Singh VK. Arsenic and cadmium are inhibitors of cyanobacterial dinitrogenase reductase (nifH1) gene. *Functional & Integrative Genomics*, 2014, 14(3): 571–580.

Rhizosphere microbial community structure and function of *Zostera japonica* in the distribution area of seagrass beds in the Yellow Sea and Bohai Sea

Pengyuan Liu^{1,2,3}, Haikun Zhang^{1,2}, Lin Chen¹, Yanyu Sun^{1,2,3}, Caixia Wang^{1,2}, Hong Song¹, Xiaoke Hu^{1,2,3*}

¹ Key Laboratory of Coastal Biology and Bio-resource Utilization, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, Shandong Province, China

² Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, Shandong Province, China

³ University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: *Zostera japonica* is a unique Asian seaweed species and has important ecological value. In recent years, *Zostera japonica* has been continuing to degenerate, causing widespread concern among researchers. **[Objective]** We hypothesized that the rhizospheric microorganisms were closely related with the healthy growth of *Zostera japonica*. We explored the diversity and function of microbial community in root of *Zostera japonica* at coastal zone of Yellow sea and Bohai sea, and intrinsic relationship with seagrass. **[Methods]** We collected surface sediment samples of *Zostera japonica* roots and unvegetated areas from three locations including Dongying, Weihai, and Dalian city. We investigated the rhizosphere microbial community structure by sequencing on Illumina HiSeq300 platform and analyzed the correlation between microbial community structure and environmental parameters. **[Results]** The most dominated phyla widely distributed in the rhizospheric surface sediments of *Zostera japonica* included: *Proteobacteria* (41.1%), *Cyanobacteria* (15.4%), *Bacteroidetes* (12.6%), *Actinobacteria* (9.3%). Comparisons of different regions (Weihai, Dongying, and Dalian) or sample types (rhizosphere vs. non-rhizosphere) showed significant differences in microbial communities, mainly due to the presence of sulfate-reducing bacteria and nitrogen-fixing bacteria found in the rhizosphere. Total nitrogen, total carbon, total organic carbon, clay, were all significantly correlated to rhizospheric bacterial community composition and distribution. **[Conclusion]** From a functional point of view, the differences between groups was mostly related to sulfur and nitrogen cycling, and sulfate reducing bacteria play a key role in maintaining the ecological health of *Zostera japonica*.

Keywords: Yellow sea and Bohai sea, seagrass bed, rhizosphere, microbial community, diversity

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Key Research Project of Frontier Science of Chinese Academy of Sciences (QYZDB-SSW-DQC041), by the International Cooperation Project of Chinese Academy of Sciences (133337KYSB20180015), by the National Basic Research Program of China (2015CB453300), and by the Science and Technology Service Network Program of Chinese Academy of Sciences (ZSYS-006)

*Corresponding author. Tel: +86-535-2109127; E-mail: xkhu@yic.ac.cn

Received: 28 September 2018; Revised: 30 November 2018