

去吸附法测定珠江口颗粒附着细菌的丰度特征 及其环境因子耦合研究

葛在名^{1,2}, 吴正超¹, 刘子嘉^{1,2}, 周卫文^{1,2},
董园¹, 李芊^{1,2}

(1.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, 广东 广州 510301; 2.中国科学院大学, 北京 100049)

摘要:海洋颗粒有机碳 (POC) 的输出通量决定了生物泵的运作效率, 海洋颗粒上附着细菌的丰度和活性影响 POC 向海洋内部的传输, 对全球碳封存起关键作用。为了更准确地评估珠江口近岸浊度较大水域中颗粒附着细菌的丰度特征, 本文在国内首次报道运用去吸附法对颗粒附着细菌进行了直接测定, 避免了间接测定中因总细菌计数不准确而可能产生的偏差, 同时将该丰度特征与相关环境因子进行了耦合研究。结果显示, 珠江口 3 个站位均是 2~20 μm 粒级颗粒上面的附着细菌丰度占优势, 其中珠海香洲港码头水域的丰度最大 (4.21×10^9 cells/L), 接下来是中大码头 (1.13×10^9 cells/L) 和万山岛水域 (0.27×10^9 cells/L)。颗粒附着细菌丰度最大的香洲港码头对应的 Chl *a* 含量相对较低, 可能是由于河口再悬浮颗粒有机质支撑了细菌的生长。此外, 珠江口水体营养盐的浓度和比例也影响着颗粒附着细菌的生长。

关键词:颗粒附着细菌; 去吸附法; 丰度; 珠江口; 环境因子

中图分类号: 文献标识码:A 文章编号: 1007-6336(2019)06-0001-06

Using detaching method to determine the abundance of particle-attached bacteria from the Pearl River Estuary and its coupling relationship with environmental factors

GE Zai-ming^{1,2}, WU Zheng-chao¹, LIU Zi-jia^{1,2}, ZHOU Wei-wen^{1,2},
DONG Yuan¹, LI Qian^{1,2}

(1.State Key Laboratory of Tropical Oceanography, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China; 2.University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Export fluxes of sinking particulate organic carbon (POC) are important for the function of biological carbon pump. Vertical transportation of POC into the ocean interior can be affected by particle-attached bacteria (PAB) via the change of their abundance and activities, which may eventually affect the carbon sequestration into the ocean. In order to better understand the characteristics of PAB in the turbid nearshore waters along the Pearl River Estuary (PRE), we applied and modified an existing analytical procedure to effectively detach PAB from sinking particles for more direct and accurate estimation of PAB. The coupling relationship between environmental factors and the abundance of PAB were further analyzed and discussed. Our results suggested that PAB from the fraction 2~20 μm particles was the dominant component of PAB in all stations. Moreover,

收稿日期: 2019-03-25, 修订日期: 2019-06-05

基金项目: 国家自然科学基金 (41706181, 41676108); 热带海洋环境国家重点实验室自主研究项目 (LTOZZ1705, LTOZZ1803)

作者简介: 葛在名 (1991-), 男, 河南息县人, 博士研究生, 主要从事海洋生态学研究, E-mail: gezaiming@scsio.ac.cn

通讯作者: 吴正超, 男, 助理研究员, 主要从事海洋微生物生态、海洋碳循环研究, E-mail: zcwu@scsio.ac.cn

李芊, 男, 研究员, 主要从事海洋生物地球化学循环研究, E-mail: qianli@scsio.ac.cn

there was a spatial change of PAB along the PRE with the highest abundance at Xiangzhou port (4.21×10^9 cells/L), following by Zhongda port (1.13×10^9 cells/L) and Wanshan island (0.27×10^9 cells/L). We also found that suspended organic particles might have supported PAB growth at Xiangzhou port where there was high PAB but low chlorophyll *a*. In addition, the growth of PAB might also subject to influences by varying concentrations and species compositions of inorganic nutrients in coastal waters. These results may be important for further understanding of PAB associated biogeochemical processes in coastal ecosystem.

Key words: particle-attached bacteria; detaching method; abundance; Pearl River Estuary; environmental factors

海洋浮游植物的光合作用将大气 CO_2 固定, 部分转化为自身组成的颗粒有机碳 (particulate organic carbon, POC), 通过食物链, 这些 POC 被传递给更大的颗粒 (如浮游动物等), 但大部分 POC 需要通过颗粒沉降的方式输出到海洋深层。颗粒在聚集沉降过程中, 异养细菌矿化利用其中的很大一部分 POC, 一小部分最终到达海底被永久封存^[1]。海洋异养细菌的矿化作用在很大程度上影响了 POC 向海洋内部的传输通量, 对全球碳封存具有关键性作用^[2]。

海洋沉降 (悬浮) 颗粒或颗粒聚合物 (例如透明多聚颗粒、海雪) 富含有机质和营养盐, 其含量相比周围水体要高出几个数量级, 因此, 它们又被认为是海洋荒漠中的“绿洲”^[3]。海洋颗粒附着细菌是直接附生在这些“绿洲”上的异养细菌, 相对游离于海水环境中的异养细菌, 其具有更高效的胞外水解酶系统等生化活性, 能快速促进 POC 的矿化降解^[4-5]。同样, 这些附着细菌的丰度要远远高于周围游离细菌^[6], 海洋颗粒上附着细菌的丰度和活性将会影响 POC 的输出通量和真光层中营养盐的供应效率。海洋环境下异养细菌与其生存的环境之间相互影响, 其分布特征受到非生物因素 (温盐、溶解有机质、营养盐、痕量元素等) 和生物因素 (浮游动物摄食、噬菌体感染等) 的综合影响^[7]。因此, 研究各海区海洋异养细菌丰度特征等参数与环境因子之间的制约因素也显得必不可少^[8]。

国内对于水体中颗粒附着细菌丰度的测定, 以往的研究多采用间接测定法, 即通过计算水体总的异养细菌与游离细菌间丰度之差获取。然而, 在总的异养细菌计数时, 并未对其中的附着细菌做任何颗粒去吸附处理^[9-10]。鉴于颗粒附着细菌自身特有的吸附特性, 未经专门的解吸附操

作, 其不能充分从颗粒物表面脱落释放到水中用于镜检或流式细胞检测, 从而其丰度被低估可能出现偏差。水样从外海到近岸河口浑浊带或从表层到底层 (沉积物), 偏差随着水体中颗粒浓度的增加而增大。为了提高颗粒附着细菌计数的准确度, 国际上对浊度较高的水样进行直接测定, 即在计数前增加去吸附处理^[11]。该方法已被广泛应用到高浊度水体环境样品分析 (包含生物膜^[12]、沉积物等^[13])。

珠江口受陆源输入的影响, 具有很高的生物生产力和 POC 输出通量, 上游水体中悬浮颗粒物含量很高, 下游浊度逐渐降低, 异养细菌群落结构梯度明显^[9, 14]。本文沿珠江口环境梯度选取了 3 个近岸浊度较大水域站位采样 (如图 1), 通过对颗粒附着细菌运用改进的去吸附法直接计数, 更加科学地测定了其在咸淡水中丰度特征, 初步探讨了其与环境因子间的耦合关系, 为珠江口近海的 POC 输出通量和储碳研究提供科学依据。

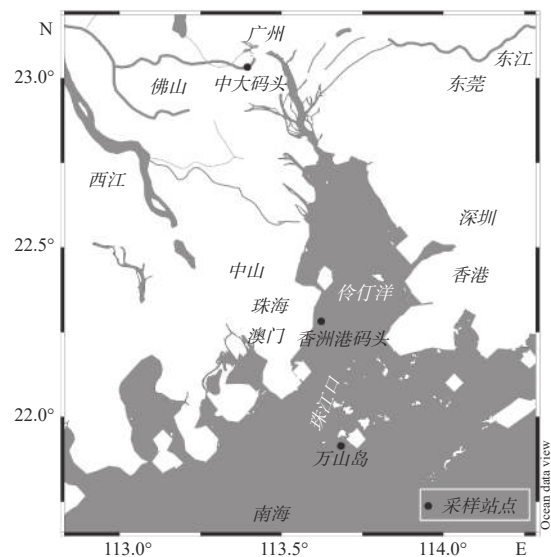


图 1 采样站点

Fig. 1 Map of sampling stations

1 材料与方法

1.1 采样站位

本文沿着盐度梯度对珠江口的3个近岸水域采样: 分别位于珠江口上游广州河段的中大码头、伶仃洋的珠海香洲港码头以及外海的万山岛水域(图1)。中大码头和香洲港码头水域的样品采集自2017年4月, 万山岛水域的样品采集自2017年8月。

1.2 样品采集及预处理

现场采集表层水样。盛装水样的聚乙烯水袋(10 L)预先酸泡并洗净, 采水前水样润洗3遍, 再装满通过150 μm筛绢的水样, 快速带回实验室处理。

环境因子采集: 取水样200 mL, 依次通过20 μm、2 μm和0.7 μm(GF/F)滤膜抽滤, 分别得到20~150 μm(小型), 2~20 μm(微型), 0.7~2 μm(微型)3个粒级的Chl *a*样品, -20℃冻存; 再取水样200 mL, 通过煅烧过的GF/F滤膜抽滤, 用于测定总悬浮颗粒物浓度; 滤液用于营养盐分析, -20℃冻存。

颗粒附着细菌采集: 取采集的水样1 L, 先依次通过20 μm、2 μm滤膜抽滤以除去较大粒级的颗粒, 再通过0.2 μm滤膜抽滤制备无菌水样备用(抽滤, 真空度<50 kPa)。再取水样200 mL, 依次通过20 μm、2 μm滤膜抽滤, 得到20~150 μm(小型), 2~20 μm(微型)两个粒级的颗粒; 通过2 μm滤膜时堵塞的浑浊水样, 更换滤膜后再过滤, 合并同级滤膜; 分别收集滤膜, 投入上述无菌水润洗过的15 mL离心管中, 加入无菌水浸没。将离心管水浴超声15 min(35℃, 功率为80 W), 再涡旋振荡3 min, 促使滤膜上的颗粒物脱离到无菌水中; 镊子夹取并用适量无菌水冲洗残留颗粒后, 弃膜。最后将洗脱下来的颗粒物悬液混匀, 甲醛固定(终浓度2%, V/V), 用2 mL离心管分装, 液氮闪冻后-20℃冻存, 用于悬浮颗粒附着细菌的测定(图2)。

1.3 环境因子的测定

本文环境因子包括温盐、Chl *a*、营养盐(磷酸盐、硝酸盐、氨氮)和总悬浮颗粒物。其中温盐采用温盐计现场测定; Chl *a*采用荧光法测定^[15], 硝酸盐按照文献^[16]提供的方法测定, 磷酸盐、氨氮、总悬浮颗粒物分别按照海洋监测规范

中的磷钼蓝分光光度法、次氯酸盐氧化法、重量法测定^[17]。

1.4 颗粒附着细菌丰度的测定

本研究采用Lunau等文献报道的去吸附法^[11], 用甲醇把附着细菌从颗粒上洗脱下来, 直接测定水样中颗粒附着细菌的丰度(图2)。操作如下: 取出冻存的颗粒悬液融化, 根据采样环境的梯度差异, 对悬液水样进行不同程度的稀释。取0.675 mL样品至1.5 mL的离心管中, 加入无菌水等倍稀释, 再加入去吸附剂甲醇0.15 mL(终浓度10%, V/V), 涡旋混匀。将离心管水浴超声15 min(35℃, 功率为80 W), 然后离心1 min(2000 r.m.p)。取上清液1 mL抽滤通过黑色核孔滤膜(0.2 μm, Whatman), 滴加10 μL SybrGreen 染液(667X)进行染色、制片、镜检计数。

水体颗粒附着细菌丰度的计算公式为:

$$N_{B/F} = \frac{W_A \cdot N \cdot F \cdot V_A}{F_A \cdot V} \times 10^3 \quad (1)$$

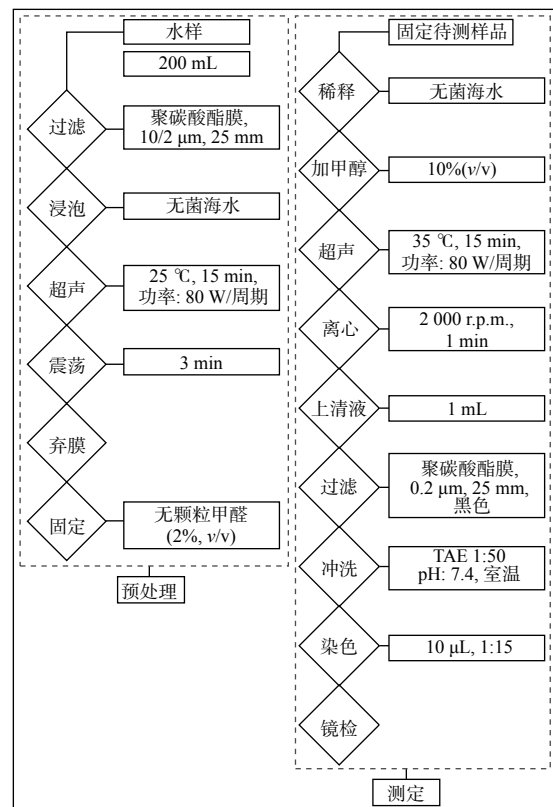


图2 直接测定颗粒附着细菌丰度的方法---去吸附法(流程图)(修改自文献[11])

Fig. 2 A direct method to determine the abundance of particle-attached bacteria --- Detaching Method (protocols) (Modified from reference [11])

式中: $N_{B/F}$ 为细菌丰度, $\text{cells}\cdot\text{L}^{-1}$; W_A 为滤膜的有效过滤面积, μm^2 ; N 为单个计数视野中细胞的平均个数; F 为稀释倍数(包括测定步骤中固定待测样品的稀释和超声中 0.675 mL 样品的稀释); V_A 为固定待测样品的体积, mL ; F_A 为镜检下计数的视野面积, μm^2 ; V 为过滤样品量, mL 。

1.5 数据处理

运用 Ocean Data View 4、微软 Excel 2010 以及 SPSS 22.0 软件进行采样站位制图、数据处理、以及附着细菌丰度与环境因子的相关性统计分析(Pearson 相关性系数分析)。

2 结果与讨论

2.1 环境因子的空间分布特征

3 个站位的环境差异显著。从中大码头到万山岛水域, 盐度梯度递增(图 3A)。虽然采样时间上万山岛水域(8月)晚于中大码头和香洲港码头(4月), 但是随着温度的增高, 盐度是降低的^[18], 所以即使在与前期两个站位同期采样, 万山岛海域的盐度依然最高。

氨氮和磷酸盐浓度均是中大码头水域最高, 分别为 $394.90\ \mu\text{mol/L}$ 、 $6.93\ \mu\text{mol/L}$, 然后到万山岛海域逐渐降低, 这是径流输运营养盐过程中生物体的利用所致。硝酸盐含量反常, 伶仃洋的香洲港码头水域含量最高, 为 $275.61\ \mu\text{mol/L}$ 。赵新锋等^[19]对香洲区城市地下水的研究表明, 该区地下水受到生活废水污染, 硝酸盐含量很高(平均值 $>550\ \mu\text{mol/L}$)。香洲港站靠近珠海城区的海岸带, 生活污水影响可能是诱因; 最低的站位仍然是万山岛海域(图 3B)。本文将硝酸盐与氨氮之和作为无机氮, 计算和磷酸盐比例, 结果显示 3 个站位的氮磷 Redfield 比值远远高于 16。香洲港码头水域的悬浮颗粒物浓度最高($50\ \text{mg/L}$), 这与伶仃洋河口地区独特的沉积环境有关, 其次是中大码头和外海万山岛水域(图 3C)。

本文分 3 个粒径对 Chl *a* 的浓度进行了测定。从总含量来看, 最高的是中大码头水域; 香洲港码头水域最低, 这与张霞等^[18]的研究结果一致, 推测是由于河口区悬浮颗粒物浓度较高($50\ \text{mg/L}$, 图 3C), 光限制了浮游植物的生长。

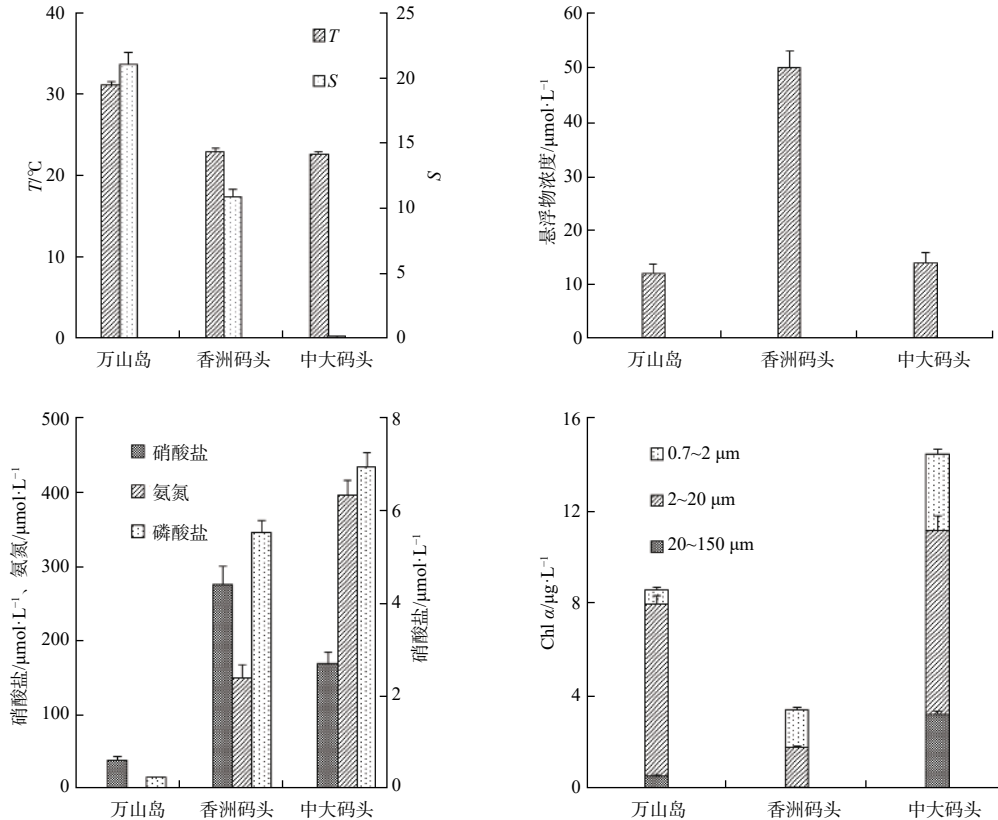


图 3 珠江口水域环境因子变化

Fig. 3 Variation of environmental factors in the Pearl River Estuary

此外, 3个站位分级 Chl *a* 浓度均显示微型浮游植物占优势, 尤为明显的是万山岛海域。中大码头和万山岛水域小型和微微型浮游植物的现存量相近, 而香洲港码头水域微型和微微型的现存量相近。3个站位的 Chl *a* 的含量均是 2~20 μm 粒级最高, 中大码头的含量高达 7.96 $\mu\text{g/L}$ 。中大码头和万山岛水域中 Chl *a* 含量在粒级 0.7~2 μm 和 20~150 μm 相当; 而香洲港码头水域在粒级 0.7~2 μm 和 2~20 μm 含量相近, 20~150 μm 含量较低(图 3D)。

2.2 颗粒附着细菌的丰度和空间分布特征

国内以往多通过计算水体总的异养细菌与游离细菌间丰度之差获取颗粒附着细菌的丰度^[9-10]。在总的异养细菌计数时, 由于颗粒附着细菌自身特有的吸附特性, 未经专门的解吸附操作, 其不能充分从颗粒物表面脱落释放到水中用于镜检或流式细胞检测, 从而其丰度被低估导致总的异养细菌丰度出现偏差。本文采用去吸附法直接测定了颗粒物附着细菌丰度(图 4)。香洲港码头水域中 2~20 μm 悬浮颗粒物上附着细菌的丰度最大(4.21×10^9 cells/L), 接下来是中大码头(1.13×10^9 cells/L)和万山岛水域(0.27×10^9 cells/L), 而 3个站位 20~150 μm 粒级上附着细菌的丰度差别不大。水温在 12~33 $^{\circ}\text{C}$ 区间内, 细菌的丰度及生长速率表现为随着水温的升高而增加^[20]。如果万山岛水域的采样时间(8月)与中大码头和香洲港码头水域同在 4月, 万山岛水域的附着细菌数量只会更低, 因此本研究获得的 3个站位的数据是完全可以进行对比分析的。3个站位均是 2~20 μm 粒级上的颗粒附着细菌丰度较大, 可能是由于该粒级的比表面积较大, 在水体中与细菌发生碰撞的机会较大, 所以细菌更容易富集在其周围形成高密度。

2.3 颗粒附着细菌丰度与环境因子的关系

本文颗粒附着细菌丰度最高的站位位于中等盐度、高悬浮颗粒物浓度的咸淡水交汇伶仃洋河口区(图 3, 图 4)。Crump 等^[21]的研究发现美国哥伦比亚河口最大的颗粒附着细菌碳含量出现在中等盐度水域, 但是它和浊度的变化量相关, 而与盐度的变化量并无相关。河口盐水楔头部的中等盐度水域往往存在河口最大浊度带(estuarine turbidity maxima, ETM), 该水域存在大

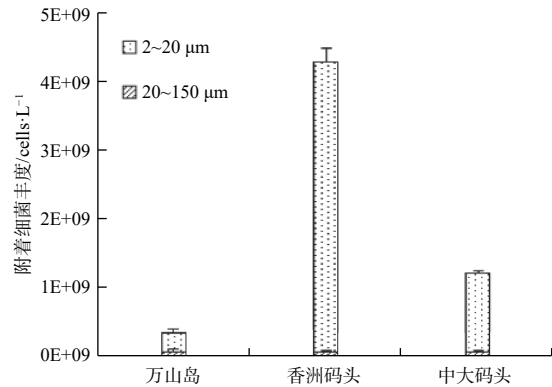


图 4 珠江口水域颗粒附着细菌丰度空间变化

Fig. 4 Spatial changes of particle-attached bacteria in the Pearl River Estuary

量的有机质悬浮颗粒, 能为异养细菌的附着生长提供载体。香洲港码头处于珠江口 ETM 范围内, 较高的悬浮颗粒物(图 3C)为其生长提供了附着基质和充足的营养, 使该站位颗粒附着细菌浓度比较大。

水体中营养盐的浓度和比例会对细菌的生长产生影响。细菌能利用溶解性的无机氮、磷作为营养盐进行生长, 本文营养盐充足的中大码头和珠海香洲港码头水域颗粒附着细菌的浓度较大, 而中等营养的万山岛海域的浓度较低。一般认为细菌对无机氮、磷的吸收比例为 5:1。珠江口及其邻近海域浮游植物和细菌的生长已被报道具有明显的磷缺乏效应^[22], 这在本文 3个站位有所体现: 磷缺乏越严重, 颗粒附着细菌的丰度越低。中大码头水域虽然浮游植物生物量较高, 但是氮盐相对于磷盐来说也很高, 使得其附着细菌的生长受到磷缺乏影响而没有较高的丰度(图 3B、图 3D)。

水生环境中浮游植物可以为附着细菌提供附着基质和营养来源, 哈德逊河口羽流区附着细菌的丰度与净 Chl *a* 浓度呈显著的正相关^[23]。本文参考 Chl *a* 粒级分离法, 以此来表征相应水域不同粒级浮游植物现存量的多少。结合图 3D 和图 4 可以分析变化趋势, Chl *a* 含量在中大码头高于万山岛水域, 相应的是中大码头的颗粒附着细菌也高于万山岛水域。然而, 香洲港码头水域最低的 Chl *a* 含量, 伴随的却是最高颗粒附着细菌丰度。分析发现, 香洲港码头水域悬浮颗粒物的浓度也是最高的(50 mg/L, 图 3C), 这些悬

浮颗粒物可以成为附着细菌的附着基质,其中的颗粒有机质可以为附着细菌生长提供营养,这可能是香洲港码头水域浮游植物生物量较低,但是附着细菌的浓度却较高的主要原因。相关性分析结果未显示出颗粒附着细菌与悬浮颗粒物的显著相关性,推测是由于采样站位较少,但是这两者之间表现出正相关的趋势(图3C、图4)。

3 结论

(1) 珠江口3个站位颗粒附着细菌的丰度梯度变化显著,珠海香洲港码头海域附着细菌的丰度最大,达到 4.30×10^9 cells/L,其次是中大码头和万山岛水域。3个站位均是2~20 μm 粒级的悬浮颗粒附着细菌丰度较大,可能是由于其比表面积较大,在水体中与细菌发生碰撞和接触的几率较高,所以细菌更易附着形成高丰度。

(2) 珠江口附着细菌丰度与悬浮颗粒物浓度呈正相关性的趋势,再悬浮颗粒有机质可能支撑了香洲港码头水域颗粒附着细菌的生长。

(3) 营养盐浓度影响珠江口水域颗粒附着细菌的生长,磷缺乏可能是中大码头高生产力、低颗粒附着细菌丰度的原因。

(4) 本文致力介绍一种较为准确的方法测定浑浊环境颗粒附着细菌的丰度,这对于与颗粒附着细菌相关的研究来说至关重要。受时间限制,本文的采样站位较少,数据量有限。未来的研究应该在本方法的基础上,更加全面且准确布设站位,获取具有统计学意义的数据,探索珠江口颗粒附着细菌丰度及其与环境因子相关性的一般性规律。

参考文献:

- [1] CHISHOLM S W. Oceanography: stirring times in the southern ocean[J]. *Nature*, 2000, 407(6805): 685-687.
- [2] HERNDL G J, REINTHALER T. Microbial control of the dark end of the biological pump[J]. *Nature Geoscience*, 2013, 6(9): 718-724.
- [3] 李洪波, 邵魁双. 海洋聚合体的研究现状[J]. *海洋环境科学*, 2011, 30(6): 886-890.
- [4] DANG H Y, LOVELL C R. Microbial surface colonization and biofilm development in marine environments[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2016, 80(1): 91-138.
- [5] AMIN S A, PARKER M S, ARMBRUST E V. Interactions between diatoms and bacteria[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2012, 76(3): 667-684.
- [6] TURLEY C M, MACKIE P J. Biogeochemical significance of attached and free-living bacteria and the flux of particles in the NE Atlantic Ocean[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 1994, 115: 191-203.
- [7] CULLEN J J. Hypotheses to explain high-nutrient conditions in the open sea[J]. *Limnology and Oceanography*, 1991, 36(8): 1578-1599.
- [8] NAGANUMA T. Abundance and production of bacterioplankton along a transect of Ise Bay, Japan[J]. *Journal of Oceanography*, 1997, 53: 579-583.
- [9] 李祥付, 徐杰, 施震, 等. 珠江口异养细菌时空分布特征及其调控机制[J]. *热带海洋学报*, 2018, 37(1): 27-36.
- [10] 宋玉芝, 赵淑颖, 黄瑾, 等. 太湖水体附着细菌和浮游细菌的丰度与分布特征[J]. *环境工程学报*, 2013, 7(8): 2825-2831.
- [11] LUNAU M, LEMKE A, WALTHER K, et al. An improved method for counting bacteria from sediments and turbid environments by epifluorescence microscopy[J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(7): 961-968.
- [12] KATO S, KOBAYASHI C, KAKEGAWA T, et al. Microbial communities in iron-silica-rich microbial mats at deep-sea hydrothermal fields of the Southern Mariana Trough[J]. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(8): 2094-2111.
- [13] BORRERO-SANTIAGO A R, DELVALLS T Á, INMACULADA RIBA M. Bacterial community responses during a possible CO₂ leaking from sub-seabed storage in marine polluted sediments[J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 593/594: 116-123.
- [14] LIU J W, FU B B, YANG H M, et al. Phylogenetic shifts of bacterioplankton community composition along the Pearl Estuary: the potential impact of hypoxia and nutrients[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 64.
- [15] PARSONS T R, MAITA Y, LALLI C M. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis[M]. Oxford: Pergamon Press, 1984: 107-109.
- [16] ZHANG J Z, FISCHER C J. A simplified resorcinol method for direct spectrophotometric determination of nitrate in seawater[J]. *Marine Chemistry*, 2006, 99(1/2/3/4): 220-226.
- [17] GB 17378.4-2007, 海洋监测规范 第4部分: 海水分析[S].
- [18] 张霞, 黄小平, 施震, 等. 珠江口异养细菌丰度与环境因子的耦合关系[J]. *海洋学报*, 2012, 34(6): 228-237.
- [19] 赵新锋, 陈法锦, 陈建耀, 等. 城市地下水硝酸盐污染及其成因分析——以珠海香洲区为例[J]. *水文地质工程地质*, 2008, 35(3): 87-92.
- [20] 谭洪新, 胡煜昂, 梅志平. 鱼池生态系统中影响浮游细菌生长制约因素的研究[J]. *应用生态学报*, 2002, 13(1): 95-100.
- [21] CRUMP B C, BAROSS J A, SIMENSTAD C A. Dominance of particle-attached bacteria in the Columbia River estuary, USA[J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 1998, 14(1): 7-18.
- [22] XU J, YIN K D, HE L, et al. Phosphorus limitation in the northern South China Sea during late summer: influence of the Pearl River[J]. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 2008, 55(10): 1330-1342.
- [23] DUCKLOW H W, KIRCHMAN D L. Bacterial dynamics and distribution during a spring diatom bloom in the Hudson River plume, USA[J]. *Journal of Plankton Research*, 1983, 5(3): 333-355.