



## 莆田近海孔烂病海带微生物群落结构及其与环境因子的关系

冯磊<sup>1,2</sup>, 钟晨辉<sup>1</sup>, 林琪<sup>1\*</sup>, 唐隆晨<sup>1</sup>, 宦忠艳<sup>1</sup>

(1. 福建省水产研究所, 福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室, 福建 厦门 361000;

2. 上海海洋大学, 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

**摘要:** 为探究莆田近海孔烂病海带微生物群落结构及其与环境因子的关系, 采用 16S rRNA 扩增子测序技术对健康海带 (HT)、孔烂病海带 (DT)、健康海带养殖区海水 (HS) 和孔烂病海带养殖区海水 (DS) 样本进行测序分析, 利用冗余分析研究了海水微生物群落与环境因子的关系。结果显示, HT 和 DT 样本的 Ace、Shannon 和 Heip 指数均具有显著差异, HS 和 DS 样本的 Ace 和 Shannon 指数具有显著差异, Heip 指数则无显著差异, 各样本的微生物群落分区明显。微生物群落组成分析显示, 盐单胞菌科在 HT 和 DT 样本中的相对丰度分别为 1.63% 和 49.01%, 蓝细菌门在 HS 和 DS 样本中的相对丰度分别为 74.45% 和 3.89%, 假交替单胞菌科在 DS 样本中的相对丰度为 30.87%, 在 HS 样本中却不足 1%。环境因子关联分析显示, HS 和 DS 样本中盐度和温度指标差异显著, 对海水微生物群落变异的解释度分别为 46.75% 和 42.42%。海水优势细菌群落中的蓝细菌与盐度呈正相关, 与温度呈负相关。优势细菌群落中的黄杆菌科、红杆菌科、假交替单胞菌科和弧菌科与盐度呈负相关, 与温度呈正相关。研究表明, 孔烂病的发生可能与海带微生物中的盐单胞菌和海水微生物中的蓝细菌、假交替单胞菌有密切的联系, 盐度和温度可能是导致海水微生物群落发生变化的关键环境因子。

**关键词:** 海带; 孔烂病; 高通量测序; 群落结构; 环境因子; 莆田

**中图分类号:** S 946.1

**文献标志码:** A

海藻表面含有丰富的有机物质, 能够向周围环境释放大量的有机碳, 引起微生物的趋向性<sup>[1]</sup>, 并且海藻含有的碳水化合物、氨基酸、多肽、蛋白质等大多数初级代谢产物都是微生物定殖的诱导剂<sup>[2]</sup>, 因此海藻容易受到微生物的感染<sup>[3-6]</sup>。海藻与其表面微生物具有复杂的相互作用关系, 微生物能够为海藻的生长及形态建成提供二氧化碳、矿物质和生长因子<sup>[7-8]</sup>, 能够保护藻体免受重金属<sup>[9]</sup>、原油<sup>[10]</sup>等有毒化合物的侵害。然而, 大型海藻表面常见的微生物如果进入藻体, 可能会损害藻体组织<sup>[11]</sup>。研究发现, 弧菌能够降解大型海藻的细

胞壁, 使条件致病菌能够顺利进入藻体, 导致病害发生<sup>[12]</sup>。当环境恶化时, 一些对海藻有利的细菌也有可能成为致病菌<sup>[13]</sup>。有研究表明, 海水盐度降低会引起条斑紫菜 (*Pyropia yezoensis*) 表面的腐霉菌大量繁殖<sup>[14]</sup>, 导致赤腐病发生。温度胁迫会降低海洋红藻的化学防御水平, 减少呋喃酮的分泌, 造成条件致病菌定殖或增殖到藻体表面, 最终导致白化病发生<sup>[15]</sup>。

患病海藻和健康海藻具有不同的微生物群落<sup>[16-21]</sup>, 因而可从微生物群落结构的角度, 了解微生物与海藻之间的相互作用, 这也是研究海藻

收稿日期: 2021-01-30 修回日期: 2021-03-02

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-50); 福建省科技重大专项 (2019NZ08003); 福建省水产种业创新与产业化工程项目 (2017FJSCZY01)

第一作者: 冯磊 (照片), 从事藻类生理生态研究, E-mail: 1257470992@qq.com

通信作者: 林琪, 从事水产遗传育种研究, E-mail: xmqlin@sina.com



病变机制的前提。孔烂病是海带初春养殖时期较为常见的一种病害,近年来,这种病害在我国福建省近岸海域频发,给海带养殖业造成较大的经济损失<sup>[22]</sup>。迄今为止,国内外有关亚热带近岸海域养殖海带的孔烂病发生机制的研究鲜有报道。基于此,本研究采用第二代测序技术,研究了福建莆田地区孔烂病海带和健康海带及其养殖区海水的群落结构和多样性,并运用冗余分析揭示影响海水微生物群落结构变化的主要环境因子,旨在为防控海带病害发生提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本采集、处理和环境因子测定

2019年3月22日,在福建省莆田市秀屿区平海镇海带养殖海区的3个养殖小区筏架上分别随机采集3份孔烂病海带样本(DT),同一天,于平海镇南面的南日岛海域中的3个养殖小区筏架上分别随机采集3份健康海带样本(HT),养殖小区间距为50 m(图1)。在采集海带样本时,一同采集海带样本所处海区表层的海水样本,分别为3份健康海带养殖区水样(HS)和3份孔烂病海带养殖区水样(DS)。在采集现场用快速水质测定仪(哈希)测定水温、盐度和溶解氧,并采用分光光度法测定水样中的硝酸氮、亚硝酸氮、氨氮、活性磷酸盐和pH,所用仪器设备均经过计量鉴定。使用Leica DMI8光学显微镜(德国莱卡)对海带样本进行显微观察和拍照。之后,使用无钙镁离子灭菌海水(calcium-and-magnesium-free seawater, CMFSW)去除海带样本表面的杂质及微藻,再将藻体切成3~4 cm长的小段,液氮速冻后于-80 °C超低温冰箱内保存备用。使用尼龙网(200 μm孔径)过滤去除海水中的杂质,然后使用真空抽滤

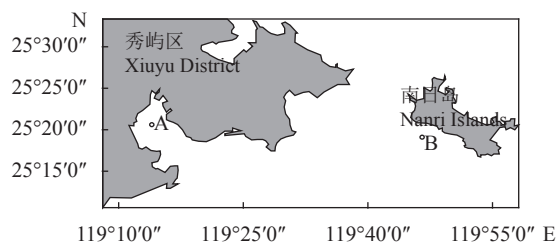


图1 海带和海水样本采样点

A. 孔烂病海带养殖海区, B. 健康海带养殖海区

Fig. 1 Sampling sites for the samples of *S. japonica* and seawater

A. area of cultivated kelp with Hole-Rotten disease, B. area of cultivated healthy kelp

机(予华牌 SHZ-DⅢ)进行负压抽滤。

### 1.2 DNA提取、序列扩增和测序

使用DNA提取试剂盒(QIAamp DNA Mini Kit)提取保存的海带和海水样本中的基因组DNA,制备基因组DNA模板,并使用16S rRNA基因V3~V4通用引物338F(5'-ACTCCTACGGGAG-GCAGCAG-3')和806R(5'-GGACTACHVGGGT-WTCTAAT-3')扩增目标DNA片段。PCR反应体系(20 μL)为2×Taq Mix 10 μL,引物各1 μL,模板DNA 1 μL, ddH<sub>2</sub>O补足至20 μL。采用降落式PCR,反应条件:95 °C预变性3 min;95 °C变性30 s;55 °C退火30 s;72 °C延伸45 s,共27个循环;72 °C后延伸10 min。使用AxyPrepDNA凝胶回收试剂盒(AXYGEN公司)切胶回收PCR产物,经Tris-HCl洗脱,2%琼脂糖凝胶电泳检测后,收集和纯化产物,在上海美吉生物医药科技有限公司的Illumina测序平台进行测序分析。

### 1.3 数据分析

使用Flash和Fastp软件对原始测序数据进行质控,得到优化序列,然后确定叶绿体和线粒体序列,将其从优化序列中剔除。采用RDPclassifier贝叶斯算法按照97%相似性对优化序列进行OTU聚类,比对silva132数据库,在不同分类学水平上统计各样本的微生物群落组成,然后使用R语言“vegan”软件包绘制群落结构组分图。使用mothur(v.1.30.2)软件计算不同随机抽样下的多样性指数,包括物种丰富度指数(Ace)、香农指数(Shannon)和均匀度指数(Heip)。基于Bray-Curtis非相似性进行主坐标分析(Principal Co-ordinates Analysis, PCoA)。使用R语言“plotrix”软件包绘制制作Venn图和共有OTU丰度饼图。使用R语言“stats”软件包和python的“scipy”软件包绘制菌群相似性分析图。使用R语言“vegan”软件包对环境因子与海带养殖区海水微生物群落组成变化相关性进行冗余分析(redundancy analysis, RDA)。使用SPSS v.24.0软件对健康海带和孔烂病海带养殖区海水水质进行单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 海带样本及其显微观察

孔烂病海带叶片出现许多大小不规则的孔洞(图2-a),叶片的“中带部”孔洞较“边缘部”多,叶片梢部病情最为严重,甚至已经出现孔洞相连而

造成叶片腐烂脱落的现象。健康海带叶片的表皮和内外皮层组织完整(图2-c), 而孔烂病海带叶片的表皮和内外皮层组织出现破损(图2-b), 边缘部细胞受损, 部分细胞已经出现解离现象。

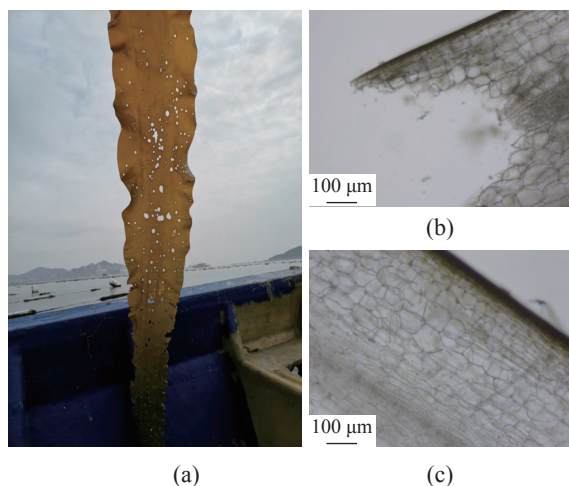


图2 孔烂病海带及其显微观察

(a) 孔烂病海带, (b) 患病海带破损的表皮和内外皮层组织, (c) 健康海带完整的表皮和内外皮层组织

**Fig. 2 Samples of *S. japonica* with Hole-Rotten disease and their microscope observations**

(a) kelp with Hole-Rotten disease, (b) damaged tissue of epidermis, endodermis and exodermis in diseased kelp, (c) intact tissue of epidermis, endodermis and exodermis in healthy kelp

## 2.2 测序结果

利用 16S rRNA 高通量测序技术, 过滤并去除叶绿体和线粒体序列后, 4 个实验组的 12 个样本共获得 643 701 条优化序列, 每条序列的平均长度为 418.29 bp。其中, 长度为 401~420 bp 的优化序列有 275 761 条, 占总序列数的 42.84%, 长度为 421~440 bp 的优化序列有 367 567 条, 占总序列数的 57.10%, 二者占全部序列的 99.94%。12 个样本的覆盖度均大于 99.39%, 表明此次测序结果基本能够反映样本微生物的真实情况。

## 2.3 海带和海水的微生物多样性及群落组成

为探究海带和海水微生物群落丰富度和多样性差异, 基于测序数据, 利用微生物群落 Ace、Shannon 和 Heip 指数表征微生物群落的  $\alpha$ -多样性(图 3-a~c)。结果显示, HT 和 DT 样本的各项指数均有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 表明健康海带和孔烂病海带微生物群落结构的丰度和多样性差异显著, 菌群分布不均匀。HS 和 DS 样本的 Ace 和 Shannon 指数具有显著差异 ( $P < 0.05$ ), Heip 指数则无显著

差异 ( $P > 0.05$ ), 表明健康海带养殖区海水和孔烂病海带养殖区海水微生物群落结构的丰富度和多样性差异显著, 菌群分布均匀。基于 Bray-Curtis 非相似性的主坐标分析显示, 4 组样本的微生物群落分区明显(图 3-d), 表明健康海带和孔烂病海带以及健康海带养殖区海水和孔烂病海带养殖区海水之间的微生物群落存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。

4 个实验组的整体微生物群落中的细菌分布于 46 门, 103 纲, 219 目, 415 科, 895 属, 1475 种, 共 2206 个 OTU。其中有 5 个门的相对丰度大于 1%, 10 个纲的相对丰度大于 1%, 25 个科的相对丰度大于 1%, 36 个属的相对丰度大于 1%。

从门水平组成看, HT 和 DT 样本的微生物群落组成相似(图 4-a), 主要包括变形菌门(Proteobacteria)、蓝细菌门(Cyanobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)和放线菌门(Actinobacteria)。从纲水平来看, HT 和 DT 样本的优势菌则不同(图 4-b), HT 样本的优势菌纲为  $\alpha$ -变形菌纲(Alphaproteobacteria, 38.96%)、 $\gamma$ -变形菌纲(Gammaproteobacteria, 32.83%)和黄杆菌纲(Flavobacteria, 14.52%), DT 样本的优势菌纲为  $\gamma$ -变形菌纲(60.83%)和  $\alpha$ -变形菌纲(9.37%), 其中  $\alpha$ -变形菌纲在 HT 和 DT 样本中的相对丰度具有显著差异 ( $P < 0.05$ )。拟杆菌纲(Bacteroidia)和梭菌纲(Clostridia)在 DT 样本中的相对丰度分别为 4.51% 和 2.69%, 在 HT 样本中的相对丰度均小于 1%。

从门水平分析养殖区海水微生物群落组成, 结果显示 HS 和 DS 样本的优势类群明显不同, HS 样本的优势菌门为变形菌门(9.31%)、蓝细菌门(74.45%)和厚壁菌门(10.15%), DS 样本的优势菌门为变形菌门(69.36%)和拟杆菌门(19.87%), 蓝细菌门在 DS 样本中相对丰度仅为 3.89%。从纲水平分析, HS 样本主要包括蓝细菌纲(74.45%)和芽孢杆菌纲(Bacilli, 9.58%), DS 样本主要包括  $\gamma$ -变形菌纲(50.71%)、 $\alpha$ -变形菌纲(17.68%)和黄杆菌纲(18.64%)。

从科水平组成来看(图 4-c), HT 样本的优势菌科主要有红杆菌科(34.64%)、假交替单胞菌科(Rhodobacteraceae, 12.7%)、黄杆菌科(Flavobacteriaceae, 7.31%)和莫拉菌科(Moraxellaceae, 8.13%), 盐单胞菌科(Halomonadaceae)在 HT 样本中的相对丰度仅为 1.63%。DT 样本的优势菌科主要有盐单胞菌科(49.01%)、黄杆菌科(10.42%)、红杆菌科(7.89%)和 Colwelliaceae(5.48%)。HS 样



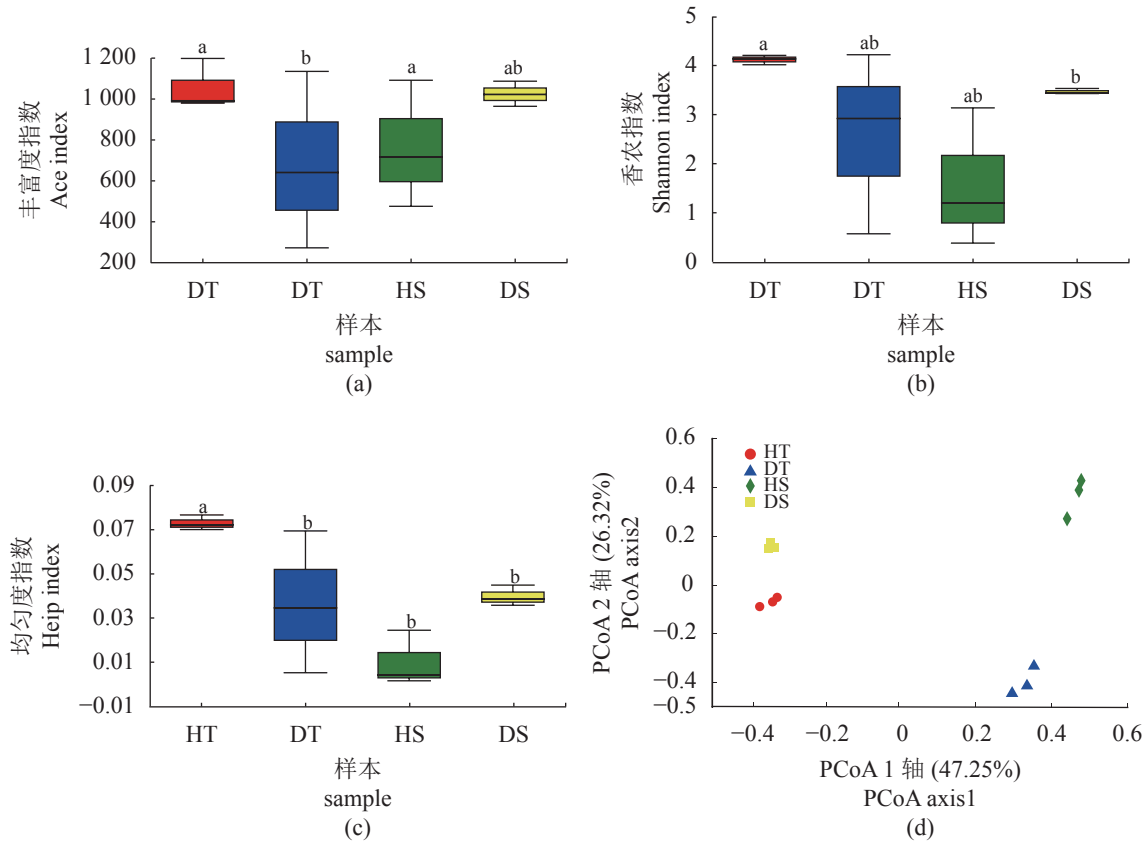


图3 海带和海水微生物群落多样性(a-c)及细菌群落结构PCoA聚类分析(d)

柱上不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ); HT: 健康海带, DT: 孔烂病海带, HS: 健康海带养殖区海水, DS: 孔烂病海带养殖区海水, 下同

Fig. 3 Diversity indices (a-c) of bacterial communities in *S. japonica* and seawater, and PCoA cluster analysis of bacterial community structure (d)

Different letters on the top of the column indicate significant difference ( $P < 0.05$ ); HT: healthy kelp, DT: kelp with Hole-Rotten disease, HS: seawater from cultivated areas of healthy kelp, DS: seawater from cultivated areas of kelp with Hole-Rotten disease, the same below

本的优势菌科主要有乳杆菌科 (Lactobacillaceae, 5.41%) 和蓝细菌中的未分类科 (74.42%), 假交替单胞菌科的相对丰度不足 1%。DS 样本的优势菌科主要有红杆菌科 (12.59%)、假交替单胞菌科 (30.87%)、黄杆菌科 (10.21%) 和弧菌科 (Vibrionaceae, 1.31%)。

#### 2.4 海带和海水核心微生物群落组成

4 组样本的核心微生物 OTU (相对丰度大于 1%) 数为 255 个, 占 OTU 总数的 11.56% (图 5-a)。HT 和 DT 样本共有的核心微生物 OTU 数为 79 个, 占海带 OTU 总数的 4.39%。HS 和 DS 样本共有核心微生物 OTU 数为 23 个, 占海水 OTU 总数的 1.3%。255 个核心 OTUs 中, OTU616 和 OTU1832 占据优势地位 (图 5-b), 分别属于变形菌门的盐单胞菌科和假交替单胞菌科, 相对丰度分别占核心微生物的 19.89% 和 17.44%。

根据 SIMPER 分析, 分别在海带和海水样本中筛选出 5 个和 3 个关键 OTUs (贡献度大于 5%), 用于解释健康海带和孔烂病海带以及健康海带养殖区海水和孔烂病海带养殖区海水的微生物群落结构差异。海带样本中, 5 个关键 OTUs 的总贡献度为 79.72%。贡献度最高的是 OTU616 (盐单胞菌科), 为 46.72%; 其他关键 OTUs 为 OTU1832 (假交替单胞菌科)、OTU73 (红杆菌科)、OTU644 (黄杆菌科) 和 OTU371 (红杆菌科), 贡献度分别为 11.22%、8.54%、7.11% 和 6.13% (图 6-a)。海水样本中, 贡献度最高的为 OTU1747 (蓝细菌), 为 72.9%; 其他关键 OTUs 为 OTU1832 (假交替单胞菌科) 和 OTU1931 (弧菌科), 贡献度分别为 29.8% 和 11.03% (图 6-b)。

#### 2.5 环境因子对微生物群落分布的影响

对健康海带和孔烂病海带养殖区海水水质进

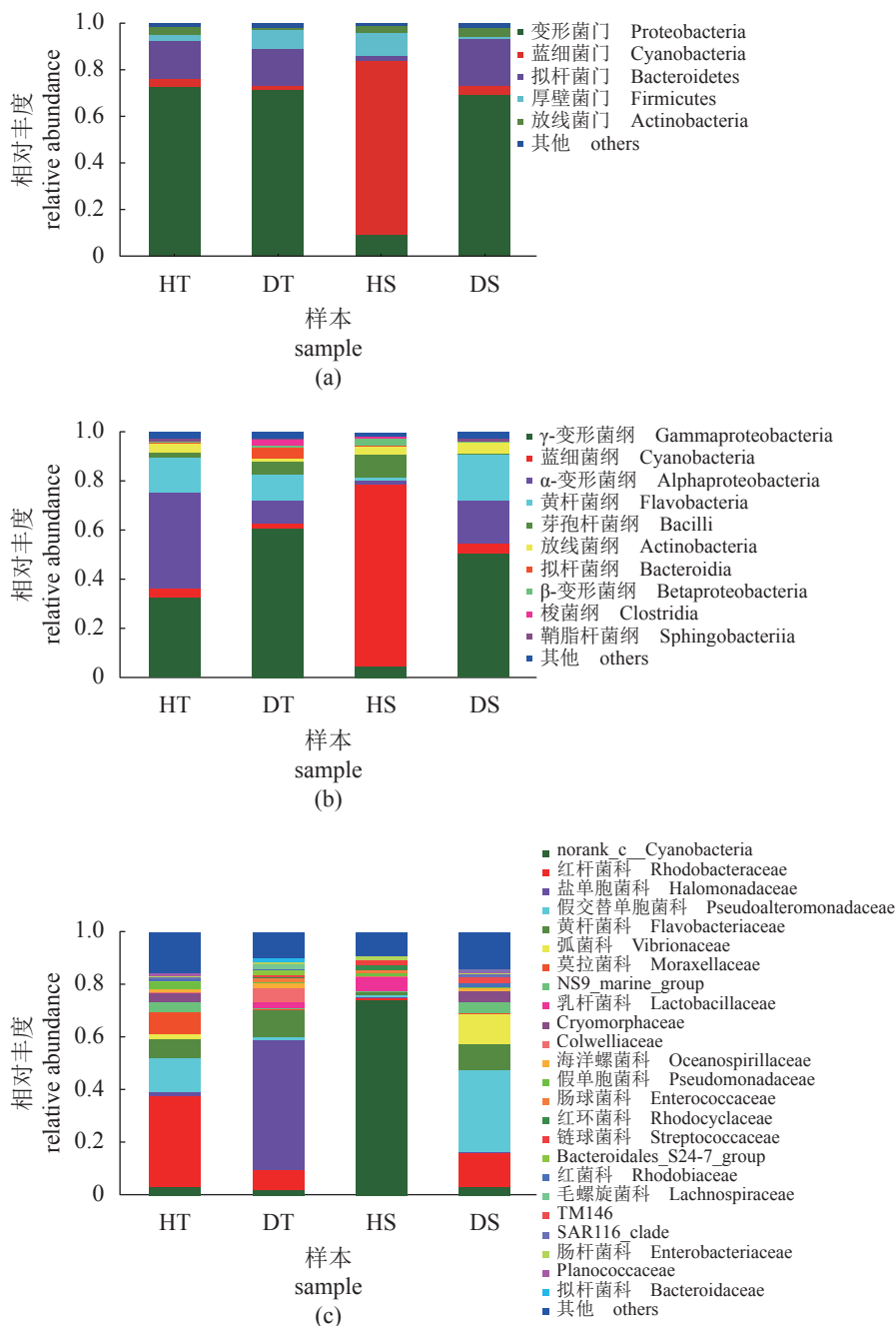


图 4 海带和海水的微生物群落组成

(a)、(b)、(c) 分别表示门水平、纲水平和科水平

Fig. 4 Bacterial communities in *S. japonica* and seawater

(a), (b) and (c) indicate classification at phylum level, class level and family level, respectively

行分析。结果显示, HS 和 DS 样本中盐度和温度指标差异显著 ( $P < 0.05$ ), pH、溶解氧 (DO)、硝酸氮 ( $\text{NO}_3^-$ -N)、亚硝酸氮 ( $\text{NO}_2^-$ -N)、无机磷 (DIP)、无机氮 (DIN)、氮磷比 (N/P) 等水环境因子指标差异不显著 ( $P > 0.05$ ) (表 1)。

在科水平上, 进行海带养殖水体微生物群落与环境因子之间的冗余分析 (图 7)。结果显示, 横

轴能解释的物种变量为 60.60%, 纵轴能解释的物种变量为 23.97%。养殖水体的盐度和温度对海水样本的微生物群落分布影响较大, 盐度、温度、pH、DIP 和 DIN 对群落变异的解释度分别为 46.75%、42.42%、10.56%、6.06% 和 6.24%。水体优势细菌群落中的蓝细菌与盐度呈正相关, 与温度、pH、DIP 和 DIN 呈负相关。优势细菌群落中的黄杆

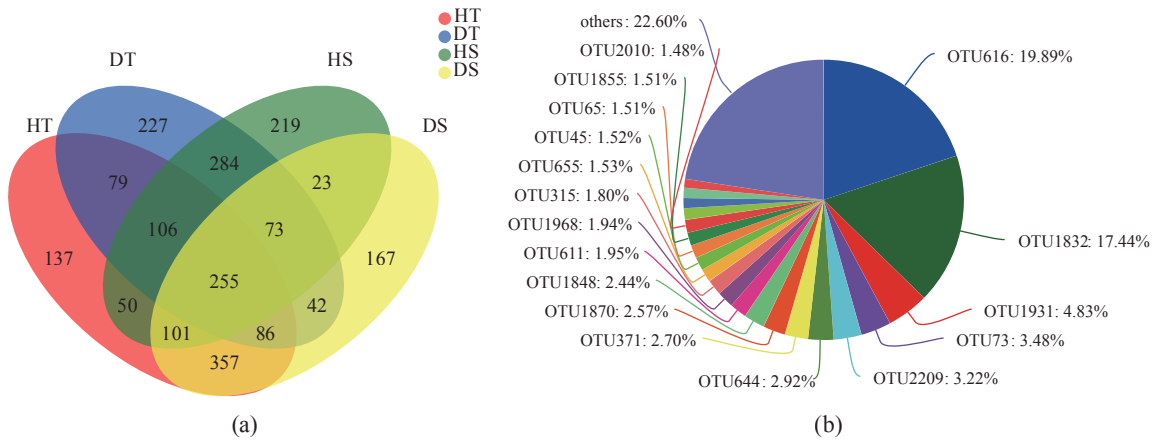


图 5 海带和海水核心微生物群落组成分析

(a) 微生物 OTU 的维恩图; (b) 共有 OTU 丰度图

Fig. 5 Core microbial analysis of *S. japonica* and seawater

(a) Venn diagram of OTU numbers in bacteria; (b) abundance of shared OTUs in kelp and seawater

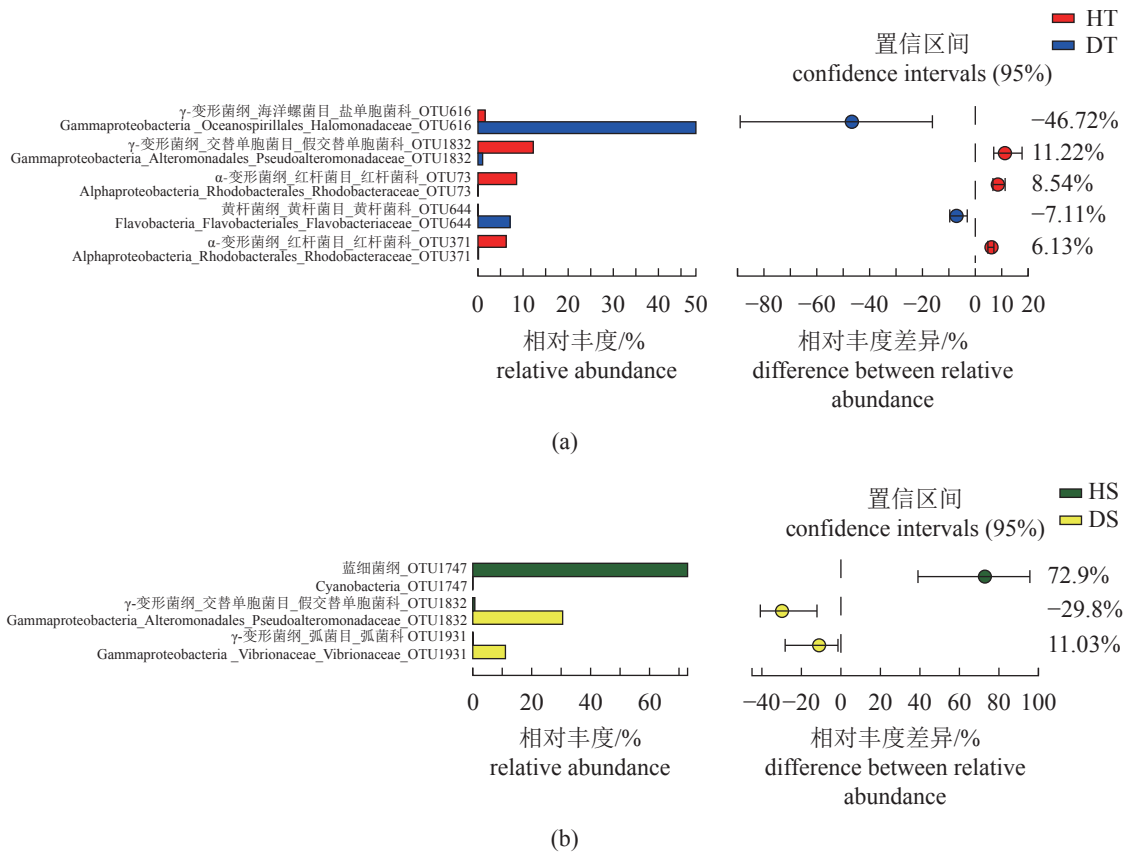


图 6 海带和海水菌群相似性分析

(a) 健康海带和孔烂病海带菌群相似性分析, (b) 健康海带和孔烂病海带养殖区海水菌群相似性分析

Fig. 6 Similarity analysis of *S. japonica* and seawater

(a) similarity analysis of healthy and Hole-Rotten diseased kelp, (b) similarity analysis of seawater from cultivated areas of healthy and Hole-Rotten diseased kelp

菌科、红杆菌科、假交替单胞菌科和弧菌科与盐度呈负相关, 与温度、pH、DIP 和 DIN 呈正相关。

### 3 讨论

本研究采用高通量测序技术分析了孔烂病海

表1 健康海带和孔烂病海带养殖区海水水质分析

Tab. 1 Water quality analysis of seawater from cultivated areas of healthy and Hole-Rotten diseased kelp

分组 group	pH	盐度 salinity	温度/°C temperature	含量/(mg/L) content					氮磷比 N/P
				溶解氧 DO	硝酸氮 NO <sub>3</sub> -N	亚硝酸氮 NO <sub>2</sub> -N	无机磷 DIP	无机氮 DIN	
HS	8.043±0.051 <sup>a</sup>	31.07±0.60 <sup>a</sup>	15.43±0.51 <sup>a</sup>	8.33±0.23 <sup>a</sup>	0.206±0.005 <sup>a</sup>	0.014±0.001 <sup>a</sup>	0.023±0.003 <sup>a</sup>	0.241±0.005 <sup>a</sup>	10.11±1.53 <sup>a</sup>
DS	8.053±0.012 <sup>a</sup>	27.63±1.29 <sup>b</sup>	16.93±0.81 <sup>b</sup>	8.33±0.29 <sup>a</sup>	0.199±0.004 <sup>a</sup>	0.014±0.001 <sup>a</sup>	0.024±0.004 <sup>a</sup>	0.237±0.007 <sup>a</sup>	10.07±1.78 <sup>a</sup>

注: 表格中同列肩标不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )

Notes: in the same column, different lowercase letters superscript indicate significant differences ( $P<0.05$ )

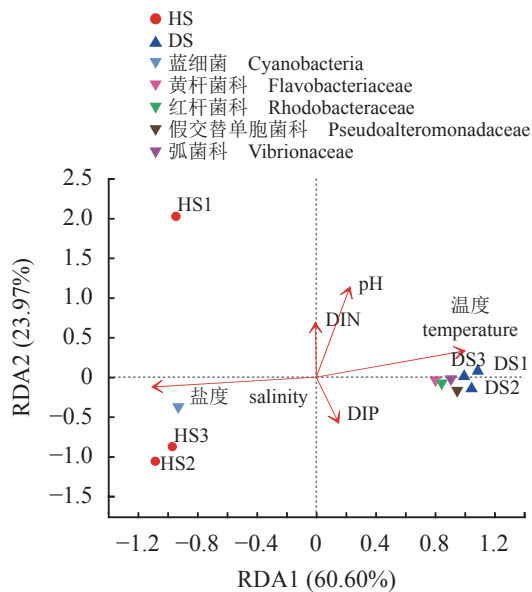


图7 海水与环境因子之间的冗余分析

Fig. 7 Redundancy analysis (RDA) between seawater and environmental factors

带及其养殖区海水的微生物群落结构, 发现健康海带和孔烂病海带的微生物多样性具有显著差异( $P<0.05$ ), 表明孔烂病发生可能与海带表面微生物群落结构的改变存在一定的联系。微生物多样性的改变可能与海带表面的某些条件致病菌有关<sup>[20]</sup>, 患病海带腐烂而释放的有机碳源促使表面的条件致病菌大量繁殖<sup>[23]</sup>, 微生物多样性也随之改变。这一观点在条斑紫菜<sup>[24]</sup>和龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)<sup>[25]</sup>中也有相似的报道。

群落结构分析发现, 海带样本的主要优势菌门为变形菌门、蓝细菌门、拟杆菌门和厚壁菌门, 这与珊瑚(*Pocillopora damicornis*)<sup>[26]</sup>、海绵(*Cymbastela*)<sup>[27-28]</sup>、大型海藻<sup>[29]</sup>等海洋生物表面微生物群落组成的报道相一致。在本研究中, 盐单胞菌科是最丰富的细菌科, 这暗示其与海带孔烂病发生有密切的联系。盐单胞菌属于中度嗜盐菌<sup>[30]</sup>, 研究表明海藻表面附生的盐单胞菌能够释放形态

发生化合物<sup>[31-32]</sup>, 并且能够为宿主提供维生素<sup>[7]</sup>, 有利于海藻生长。然而, 也有研究表明盐单胞菌是藻多糖有效降解菌的组成成员之一<sup>[33-36]</sup>, 不利于海藻生长。在本研究中, 与健康海带养殖区海水相比, 孔烂病海带养殖区海水中的蓝细菌含量甚少, 而蓝细菌属于光合自养菌, 许多蓝细菌类群具有固氮能力<sup>[37]</sup>。相关研究表明, 具有固氮能力的蓝细菌参与海带的氮同化过程, 可能产生许多抵抗有害微生物感染的活性化合物<sup>[38]</sup>。因此, 养殖水体中有益蓝细菌类的急剧减少可能会导致其他潜在的条件致病菌增殖。

微生物单胞菌属和假交替单胞菌科产生的琼脂酶能够直接引起江蓠(*Gracilaria gracilis*)出现病症<sup>[39]</sup>, 且琼胶降解产物会诱导氧化应激反应, 加快病程<sup>[40]</sup>。褐藻酸降解菌是海藻养殖环境中常见的条件致病菌, 主要包括假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)、单胞菌属(*Halomonas*)、弧菌属(*Vibrio*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)等<sup>[41-42]</sup>, 在正常情况下它们不会引起海带发病, 但若环境恶化, 褐藻酸降解菌大量繁殖, 会导致海带病害的发生<sup>[43]</sup>。在本研究中, 孔烂病海带养殖区海水微生物中检测到大量的假交替单胞菌科, 这表明当海水微生物群落中出现大量此类细菌时, 极可能会导致海带孔烂病的发生。SIMPER分析也显示, 在健康和孔烂海带样本中, 属于盐单胞菌科和假交替单胞菌科的 OTU616 和 OTU1832 提供了较高的贡献度, 表明这些微生物与海带孔烂病的发生有密切的联系。研究表明, 当温度大于 20 °C 时, 褐藻酸降解菌能够在较短的时间内大量繁殖, 极易造成海带病害的发生<sup>[44]</sup>。海带养殖环境的变化是导致其微生物群落结构差异化的关键因素<sup>[18]</sup>, 在本研究中, 孔烂病海带与健康海带养殖区海水的盐度和温度均存在显著差异( $P<0.05$ ), 这表明盐度和温度可能是导致条件致病菌大量繁殖和海带孔烂病发生的关键环境因子。

本研究揭示了海带孔烂病发生与海带和海水微生物群落之间的关系,微生物盐单胞菌、假交替单胞菌、蓝细菌和海带孔烂病的发生可能有着密切的联系,而盐度和温度可能是导致病害发生的关键环境因子。然而,为了清晰地阐明这些菌株对海带疾病发生和健康生长的重要作用,在今后的研究中需要进行体内感染实验,以便于建立精准防控海带病害发生的检测技术体系。

#### 4 结论

本实验基于高通量测序技术对海带和海水进行了微生物多样性和群落组成分析、核心微生物群落组成分析和 RDA 分析。结果显示,健康海带和孔烂病海带群落组成的差异主要是盐单胞菌科,健康海带养殖区海水和孔烂病海带养殖区海水群落组成差异主要是蓝细菌门和假交替单胞菌科,这些微生物可能与孔烂病的发生有密切的联系。多样性分析显示,健康海带和孔烂病海带微生物群落结构的丰度和多样性差异明显,菌群分布不均匀,这可能与海带表面的某些条件致病菌有关。环境因子分析显示,健康海带养殖区海水和孔烂病海带养殖区海水中的盐度和温度指标差异显著,推测盐度和温度是导致条件致病菌大量繁殖和海带孔烂病发生的关键环境因子。本研究结果为进一步探究海带孔烂病病变机制提供了理论依据。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

#### 参考文献 (References):

- [1] Paul V J, Puglisi M P. Chemical mediation of interactions among marine organisms[J]. *Natural Product Reports*, 2004, 21(1): 189-209.
- [2] Steinberg P D, De Nys R. Chemical mediation of colonization of seaweed surfaces[J]. *Journal of Phycology*, 2002, 38(4): 621-629.
- [3] Hellio C, De La Broise D, Dufossé L, et al. Inhibition of marine bacteria by extracts of macroalgae: potential use for environmentally friendly antifouling paints[J]. *Marine Environmental Research*, 2001, 52(3): 231-247.
- [4] Harder T, Dobretsov S, Qian P Y. Waterborne polar macromolecules act as algal antifoulants in the seaweed *Ulva reticulata*[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2004, 274: 133-141.
- [5] Potin P, Bouarab K, Salaün J P, et al. Biotic interactions of marine algae[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2002, 5(4): 308-317.
- [6] Lam C, Grage A, Schulz D, et al. Extracts of North Sea macroalgae reveal specific activity patterns against attachment and proliferation of benthic diatoms: a laboratory study[J]. *Biofouling*, 2008, 24(1): 59-66.
- [7] Croft M T, Lawrence A D, Raux-Deery E, et al. Algae acquire vitamin B<sub>12</sub> through a symbiotic relationship with bacteria[J]. *Nature*, 2005, 438(7064): 90-93.
- [8] Croft M T, Warren M J, Smith A G. Algae need their vitamins[J]. *Eukaryotic Cell*, 2006, 5(8): 1175-1183.
- [9] Dimitrieva G Y, Crawford R L, Yüksel G Ü. The nature of plant growth-promoting effects of a pseudoalteromonad associated with the marine algae *Laminaria japonica* and linked to catalase excretion[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 100(5): 1159-1169.
- [10] Semenova E V, Shlykova D S, Semenov A M, et al. Bacteria-epiphytes of brown macro alga in oil utilization in north sea ecosystems[J]. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*, 2009, 64(3): 107-110.
- [11] Goecke F, Labes A, Wiese J, et al. Chemical interactions between marine macroalgae and bacteria[J]. *Marine Ecology Progress*, 2010, 409: 267-299.
- [12] Wang G G, Shuai L, Li Y, et al. Phylogenetic analysis of epiphytic marine bacteria on Hole-Rotten diseased sporophytes of *Laminaria japonica*[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2008, 20(4): 403-409.
- [13] Egan S, Gardiner M. Microbial dysbiosis: rethinking disease in marine ecosystems[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 991.
- [14] Ding H Y, Ma J H. Simultaneous infection by red rot and chytrid diseases in *Porphyra yezoensis* Ueda[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2005, 17(1): 51-56.
- [15] Fernandes N, Steinberg P, Rusch D, et al. Community structure and functional gene profile of bacteria on healthy and diseased thalli of the red seaweed *Delisea pulchra*[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e50854.
- [16] Barott K L, Rodriguez-Brito B, Janouškovec J, et al. Microbial diversity associated with four functional groups of benthic reef algae and the reef-building coral *Montastraea annularis*[J]. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(5): 1192-1204.
- [17] Singh R P, Reddy C R K. Seaweed-microbial interactions



- tions: Key functions of seaweed-associated bacteria[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 88(2): 213-230.
- [18] Marzinelli E M, Campbell A H, Valdes E Z, *et al.* Continental-scale variation in seaweed host-associated bacterial communities is a function of host condition, not geography[J]. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(10): 4078-4088.
- [19] Zozaya-Valdes E, Egan S, Thomas T. A comprehensive analysis of the microbial communities of healthy and diseased marine macroalgae and the detection of known and potential bacterial pathogens[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 146.
- [20] Kumar V, Zozaya-Valdes E, Kjelleberg S, *et al.* Multiple opportunistic pathogens can cause a bleaching disease in the red seaweed *Delisea pulchra*[J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(11): 3962-3975.
- [21] Mancuso F P, D'hondt S, Willems A, *et al.* Diversity and temporal dynamics of the epiphytic bacterial communities associated with the canopy-forming seaweed *Cystoseira compressa* (Esper) gerloff and nizamuddin[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 476.
- [22] 张丽. 莆田近岸海域海带烂孔病起因的初步研究[J]. *应用海洋学学报*, 2019, 38(3): 433-439.  
Zhang L. Preliminary study on the causes of kelp spoilage sickness in coastal Putian[J]. *Journal of Applied Oceanography*, 2019, 38(3): 433-439 (in Chinese).
- [23] 安鑫龙, 齐遵利, 李雪梅, 等. 大型海藻龙须菜的生态特征[J]. *水产科学*, 2009, 28(2): 109-112.  
An X L, Qi Z L, Li X M, *et al.* A review on ecological characteristics of sea weed *Gracilaria lemaneiformis*[J]. *Fisheries Science*, 2009, 28(2): 109-112 (in Chinese).
- [24] Yan Y W, Yang H C, Tang L, *et al.* Compositional shifts of bacterial communities associated with *Pyropia yezoensis* and surrounding seawater co-occurring with red rot disease[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1666.
- [25] 裴鹏兵, 陈洋, 邓绍鸿, 等. PCR-DGGE 指纹图谱技术分析发病龙须菜附生菌菌群组成[J]. *中国水产科学*, 2018, 25(5): 1040-1050.  
Pei P B, Chen Y, Deng S H, *et al.* Analysis of the bacterial community composition of the epiphytes on diseased *Gracilaria lemaneiformis* using PCR-DGGE fingerprinting technology[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(5): 1040-1050 (in Chinese).
- [26] Bourne D G, Munn C B. Diversity of bacteria associated with the coral *Pocillopora damicornis* from the Great Barrier Reef[J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(8): 1162-1174.
- [27] Taylor M W, Schupp P J, De Nys R, *et al.* Biogeography of bacteria associated with the marine sponge *Cymbastela concentrica*[J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(3): 419-433.
- [28] Lee O O, Wong Y H, Qian P Y. Inter- and Intraspecific variations of bacterial communities associated with marine sponges from San Juan Island, Washington[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(11): 3513-3521.
- [29] Beleneva I A, Zhukova N V. Bacterial communities of some brown and red algae from Peter the Great Bay, the Sea of Japan[J]. *Microbiology*, 2006, 75(3): 348-357.
- [30] Kim K K, Lee J S, Stevens D A. Microbiology and epidemiology of *Halomonas* species[J]. *Future Microbiology*, 2013, 8(12): 1559-1573.
- [31] Spoerner M, Wichard T, Bachhuber T, *et al.* Growth and thallus morphogenesis of *Ulva mutabilis* (Chlorophyta) depends on a combination of two bacterial species excreting regulatory factors[J]. *Journal of Phycology*, 2012, 48(6): 1433-1447.
- [32] Tapia J E, González B, Goulitquer S, *et al.* Microbiota influences morphology and reproduction of the brown alga *Ectocarpus* sp.[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 197.
- [33] Wong T Y, Preston L A, Schiller N L. Alginate lyase: review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2000, 54(1): 289-340.
- [34] Tang J C, Xiao Y T, Oshima A, *et al.* Disposal of seaweed wakame (*Undaria pinnatifida*) in composting process by marine bacterium *Halomonas* sp. AW4[J]. *International Journal of Biotechnology*, 2008, 10(1): 73-85.
- [35] Goecke F, Labes A, Wiese J, *et al.* Dual effect of macroalgal extracts on growth of bacteria in Western Baltic Sea[J]. *Revista De Biologia Marina Y Oceanografia*, 2012, 47(1): 75-86.
- [36] Tang J C, Wang M, Zhou Q X, *et al.* Improved composting of *Undaria pinnatifida* seaweed by inoculation with *Halomonas* and *Gracilibacillus* sp. isolated from marine

- environments[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(3): 2925-2930.
- [37] Charpy L, Casareto B E, Langlade M J, *et al.* Cyanobacteria in coral reef ecosystems: a review[J]. *Journal of Marine Biology*, 2012, 2012: 259571.
- [38] Li J, Pang S J, Shan T F, *et al.* Changes of microbial community structures associated with seedlings of *Saccharina japonica* at early stage of outbreak of green rotten disease[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2020, 32(2): 1323-1327.
- [39] Desikan R, Mackerness S A H, Hancock J T, *et al.* Regulation of the arabidopsis transcriptome by oxidative stress[J]. *Plant Physiology*, 2001, 127(1): 159-172.
- [40] Weinberger F, Friedlander M. Response of *Gracilaria conferta* (Rhodophyta) to oligoagars results in defense against agar-degrading epiphytes[J]. *Journal of Phycology*, 2000, 36(6): 1079-1086.
- [41] 侯士昌, 温少红, 唐志红, 等. 一株高效褐藻酸降解菌的筛选、鉴定及其发酵条件的优化[J]. *海洋科学*, 2014, 38(7): 20-26.
- Hou S C, Wen S H, Tang Z H, *et al.* The screening, identification of alginate degrading bacteria and optimization of fermentation conditions[J]. *Marine Sciences*, 2014, 38(7): 20-26 (in Chinese).
- [42] 傅晓妍, 李京宝, 韩峰, 等. 褐藻胶裂解酶产生菌 *Vibrio* sp. QY102的发酵条件优化[J]. *中国海洋大学学报*, 2007, 37(3): 432-436.
- Fu X Y, Li J B, Han F, *et al.* Studies on *Vibrio* sp. QY102 fermentation processes for alginate lyase production[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2007, 37(3): 432-436 (in Chinese).
- [43] 陈騫, 林光恒, 沈世泽. 褐藻酸降解菌的研究 II. 海带夏苗培育中褐藻酸降解菌与烂苗的关系[J]. *海洋与湖沼*, 1981, 12(2): 133-137.
- Chen D, Lin G H, Shen S Z. Studies on alginic acid decomposing bacteria II. Rot disease of *Laminaria* summer sporelings caused by alginic acid decomposing bacteria[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1981, 12(2): 133-137 (in Chinese).
- [44] 肖慧, 唐学玺, 王艳玲, 等. 褐藻酸降解菌的生长条件及其对海带的生理效应[J]. *中国海洋大学学报*, 2006, 36(2): 261-264.
- Xiao H, Tang X X, Wang Y L, *et al.* Culture conditions of alginic acid decomposing bacteria and their physiological effects on *Laminaria japonica*[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2006, 36(2): 261-264 (in Chinese).

## Microbial community structure and its relationship with environmental factors on Hole-Rotten disease of *Saccharina japonica* in coastal Putian

FENG Lei<sup>1,2</sup>, ZHONG Chenhui<sup>1</sup>, LIN Qi<sup>1\*</sup>, TANG Longchen<sup>1</sup>, HUAN Zhongyan<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Cultivation and High-value Utilization of Marine Organisms in Fujian Province, Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361000, China;

2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** In order to explore microbial community structure and the correlation between environmental factors and community structure on Hole-Rotten disease of kelp *Saccharina japonica* in coastal regions of Putian, in this study, 16S rRNA gene amplicon sequencing technology was used to analyze the samples of healthy (HT) *S. japonica*, *S. japonica* with Hole-Rotten disease (DT), seawater from area of cultivated healthy *S. japonica* (HS) and seawater from area of cultivated *S. japonica* with Hole-Rotten disease (DS). The interactions between seawater microbial and environmental factors were analyzed by redundancy analysis (RDA) as well. The results showed that the Ace index, Shannon index and Heip index were significantly different between HT and DT samples ( $P < 0.05$ ), the Ace index and Shannon index were significantly different between HS and DS samples ( $P < 0.05$ ), while the Heip index was not significantly different ( $P > 0.05$ ). The results of principal co-ordinate analysis showed that the microbial community of each sample was obviously partitioned. Microbial community composition analysis showed the relative abundance of Halomonadaceae in the HT and DT samples were 1.63% and 49.01%, the relative abundance of Cyanobacteria in the HS and DS samples were 74.45% and 3.89%, respectively. The relative abundance of Pseudoalteromonadaceae in DS samples is 30.87%, nevertheless, less than 1% in HS samples. The results of correlation analysis of environmental factors showed the salinity and temperature were significantly different in the association between HS and DS samples ( $P < 0.05$ ), and the explanations for the variation of seawater microbial communities were 46.75% and 42.42%, respectively. The dominant Cyanobacteria in seawater was positively correlated with salinity and negatively correlated with temperature; the dominant Flavobacteriaceae, Rhodobacteraceae, Pseudoalteromonadaceae and Vibrionaceae, were negatively correlated with salinity and positively correlated with temperature. In summary, the occurrence of Hole-Rotten disease may be intimately related to the Halomonas in *S. japonica* epiphytes and the Cyanobacteria and Pseudoalteromonadaceae in seawater microorganisms. Salinity and temperature might be the key environmental factors leading to the change of seawater microflora.

**Key words:** *Saccharina japonica*; Hole-Rotten disease; high-throughput sequencing; community structure; environmental factors; Putian

**Corresponding author:** LIN Qi. E-mail: xmqlin@sina.com

**Funding projects:** China Agriculture Research System (CARS-50); Major Science and Technology Projects of Fujian Province (2019NZ08003); Seed Industry Innovation and Industrialization Project of Fujian Province (2017FJSCZY01)