

文章编号: 1674-5566(2018)03-0321-08

DOI:10.12024/jsou.20180110004

## 洋山港海域海水压载后细菌群落结构演变及多样性变化

吴惠仙<sup>1,2</sup>, 邵于豪<sup>1,2</sup>, 刘亮<sup>1,2</sup>, 沈辰<sup>1,2</sup>, 薛俊增<sup>1,2</sup>

(1. 上海海洋大学 海洋生态与环境学院, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 港航生态安全研究中心, 上海 201306)

**摘要:** 研究压载环境下细菌群落结构以及多样性的变化特征, 为科学评估压载水排放的生态风险评估提供科学依据。通过对压载水中细菌群落进行连续 30 d 压载, 采用 Illumina Miseq 高通量测序技术分析鉴定细菌类群, 探讨压载环境下细菌群落结构演变规律。测序共获得有效序列 413 806 条, 总计 1 334 个 OTUs。不同压载时间的多样性指数及丰度指数存在较大差异, OTU 数量和多样性指数随压载时间而波动性上升, 30 d 时多样性最为丰富。细菌优势门分别为变形菌门和拟杆菌门, 变形菌门中  $\gamma$ -变形菌优势尤为显著, 且在压载中期(10 d)丰度迅速增加。黄杆菌是实验初始的优势分类单元, 相对丰度比例表现出先增加后减少的变化趋势, 第 5 天时上升至最高比例后逐渐下降。假单胞菌比例在第 10 天急剧增加至 50.16%, 随后菌群优势减弱。UPGMA 聚类分析表明, 压载条件下各水龄阶段之间的细菌群落变化情况的差异性较对照舱具有更大的波动性。NMDS 和 PCoA 分析进一步证明压载环境以及压载时间会对细菌群落结构造成一定程度的影响。

**关键词:** 细菌; 压载水; 压载时间; 岸基实验; 高通量测序; 生物入侵

**中图分类号:** X 834; S 917 **文献标志码:** A

相较于多细胞动物, 微生物对于生存环境更具适应性, 能够普遍存在于生物圈, 甚至于某些极端环境<sup>[1]</sup>。海水中微生物的数量远远超过桡足类、鱼类等大型水生生物, 细菌和病毒的数量级达到  $10^6 \sim 10^{11}$  个/L<sup>[2-5]</sup>。据统计, 通过船舶压载水途径进行传播的细菌高达 1 019 cells/d, 数量远远超过其他任何物种<sup>[6]</sup>。船舶达到目的港口后, 微生物一旦被释放到新的环境, 将很容易成为入侵物种。

1992 年首次在船舶压载水中发现致病型霍乱弧菌, 从而揭示了船舶压载水途径传播致病菌的危害性<sup>[7]</sup>。为防止病原微生物在我国沿海港口传播和扩散, 对到港船舶压载水中细菌总数、大肠菌群指标、沙门氏菌指标等卫生管理指示菌以及弧菌等致病菌进行了目的性检测<sup>[8-10]</sup>。然而, 由于缺乏对压载水中微生物种类组成的研究, 很难进一步了解压载水中微生物群落结构。高通量测序技术的发展突破了技术手段上的局

限性, 国内外研究人员得以从更为精准的分类水平进行分析, 深入开展到港船舶压载水中微生物多样性和群落结构特征的研究调查<sup>[11-14]</sup>。但目前相关资料依然较少, 对于压载过程中压载舱内微生物种类组成和群落结构变化特征的研究仍是空白。本文应用岸基模拟压载舱, 连续跟踪压载后细菌的动态变化情况, 以期阐明压载水中细菌的多样性和群落结构的变化规律及其生态适应机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 样品采集

上海海洋大学船舶压载水检测实验室岸基试验基地配备 600m<sup>3</sup> 全封闭钢筋混凝土结构模拟压载舱。舱体内壁涂有船舱专用防腐漆, 全舱不透光且具有较好隔热性, 仅在舱体上部设有直径为 100 cm 的封闭式人孔, 供人员进出和采样所用。设置自然条件下的开放式舱体为对照舱, 舱

收稿日期: 2018-01-23 修回日期: 2018-04-24

基金项目: 上海市科委科研项目(17DZ1202905); 上海市科委研发平台专项(16DZ2293800); 上海市自然科学基金(15ZR1420900); 海洋工程装备检测试验技术国家工程实验室建设项目[沪发改高技(2016)99号]

作者简介: 吴惠仙(1973—), 女, 博士, 教授, 研究方向为港航生态安全。E-mail: hxwu@shou.edu.cn

通信作者: 薛俊增, E-mail: jzxue@shou.edu.cn

体为 600 m<sup>3</sup> 全开放式钢筋混凝土结构。实验前对两舱进行彻底清洗。通过潜水泵引洋山港海域海水,经加载操作注满舱体。完成加载操作后,分别于第 0,1,5,10,15 和 30 天进行样品 T0, T1, T5, T10, T15, T30 的采集,第 0 天为压载当天,记为样品 T0,作为实验起始。同时进行对照舱样本 C0, C1, C5, C10, C15 和 C30 的采集。

### 1.2 样品预处理

所有样本均保存于冷藏箱中,2 h 内送到实验室,立即进行预处理。水样通过 3 μm 和 0.22 μm 微孔滤膜两级过滤后,将 0.22 μm 滤膜转移到 1.5 mL 离心管中,并保存于 -80 °C 条件下,用于后续 DNA 提取。

### 1.3 基因组 DNA 提取

DNA 的提取采用 3S DNA Isolation Kit V2.2 (上海博彩生物技术有限公司)DNA 提取试剂盒,按照操作说明书进行,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳 (TAE 缓冲液) 检测 DNA 完整性,超微量分光光度计 (Nanodrop 2000c, Thermo) 分析 DNA 相对浓度。

### 1.4 PCR 扩增及高通量测序

利用 16S rRNA 基因中 V4-V5 区域通用引物 515F (5' - GTGCCAGCMGCCGCGG-3') 和 907R (5' -CCGTCGAATTCMTTTRAGTTT-3') 进行 PCR 扩增。扩增条件设置为:95 °C 3 min,95 °C 30 s,5 °C 30 s,72 °C 5 s,30 个循环;72 °C 延伸 10 min。2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。PCR 产物于上海美吉生物医药科技有限公司 Illumina MiSeq 平台上进行高通量测序。

### 1.5 数据分析

运用 QIIME 1.7.0 对 Illumina 平台测序得到的序列数据进行过滤<sup>[15]</sup>,质控校准后得到优质序列用于后续分析。序列经过滤后,共获得 413 806 条高质量序列,各样品抽平处理至 26 538 条序列。在 97% 的相似水平下对所有序列进行 OTU (Operational Taxonomic Units) 划分,然后采用 RDP classifier 贝叶斯算法对 97% 相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析,数据库为 Silva 11.9<sup>[16]</sup>。应用 Mothur 软件计算生物多样性指数,包括:群落丰富指数 (Chao 指数) 和群落多样性指数 (Shannon 指数)<sup>[17]</sup>。运用 R 语言工具统计和作图软件进行主坐标分析 (Principal coordinates analysis, PCoA) 和非度量多维尺度分析

(Non-metric Multidimensional scaling, NMDS)<sup>[18]</sup>。采用非加权组平均法 (Unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA) 构建树状结构。

## 2 结果与分析

### 2.1 测序结果和多样性指数

通过对实验舱和对照舱各样本点细菌 Miseq 测序,过滤掉低质量序列后,共获得有效序列 413 806 条。其中实验舱各样本点平均有效序列数为 32 963 ± 4 745,对照舱各样本点平均有效序列数为 36 005 ± 3 587。从稀释曲线 (图 1) 中可知,当各样本序列数量达到 30 000 后曲线趋于平缓,说明测序量合理,能够真实反映水体中细菌群落情况。Chao 和 Shannon 指数在实验舱样本中的平均值为 591.67 和 3.64,而在对照舱样本中分别为 408.00 和 3.04,说明压载环境下细菌多样性和丰度均有所提高 (表 1)。

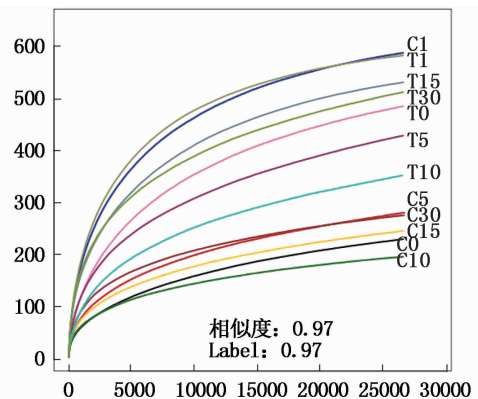


图 1 相似度为 0.97 条件下各样品的稀释曲线

Fig. 1 Rarefaction curves of each sample at cutoff level of 3%

### 2.2 细菌群落 OTU 特异性

在 0.97 相似度下得到样本 OTU 数目,通过维恩图表现实验舱和对照舱细菌群落 OTU 数目组成相似性、差异性和重叠情况 (图 2)。压载环境与自然环境下水体之间存在共有细菌 OTU 数目为 623,实验舱水样中特异性细菌 OTU 数目为 475,是对照舱水样中特异性细菌 OTU 数目的 2.39 倍。表明压载条件下有更多的特异性细菌类群存在。

表 1 样品测序数据统计表  
Tab. 1 Sequencing data statistics of samples

样本编号 Sample code	采样时间 Time	OTU 数量 Number of OTU	Chao 指数 Chao index	Shannon 指数 Shannon index
T0	0d	486	585	3.06
T1	1d	584	630	4.29
T5	5d	429	603	3.18
T10	10d	351	464	2.55
T15	15d	532	582	4.34
T30	30d	513	644	4.39
C0	0 d	229	304	2.39
C1	1 d	589	655	4.20
C5	5 d	280	415	2.32
C10	10 d	195	254	3.03
C15	15 d	245	364	3.06
C30	30 d	275	361	3.20

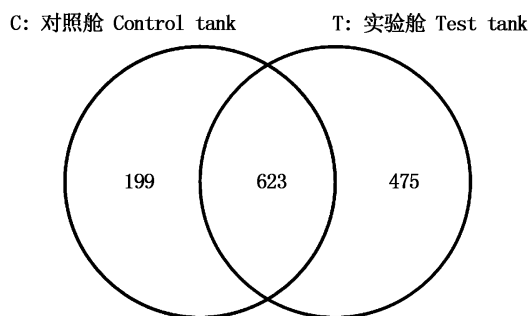


图 2 细菌 OTU Venn 图

Fig. 2 Venn diagram of bacterial OTUs

### 2.3 群落结构组成分析

变形菌门(Proteobacteria)为两舱体内主要细菌类群,实验舱中所占比例为  $66.23\% \pm 13.31\%$ ,对照舱为  $53.17\% \pm 10.99\%$ (图 3)。在发现的变形菌门中包括  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -变形菌,其中  $\gamma$ -变形菌纲占据菌群主要优势。实验舱中  $\gamma$ -变形菌的丰度比例范围为  $27.29\% \sim 73.43\%$ ,由第 0 天时  $40.60\%$  缓慢下降至第 5 天时  $32.33\%$ ,在第 10 天迅速增加至  $73.43\%$ ;此时,对照舱内  $\gamma$ -变形菌比例仅为  $8.18\%$ ,而  $\alpha$ -变形菌纲丰度比例达到  $24.11\%$ (第 5 天时仅  $6.36\%$ )。拟杆菌门(Bacteroidetes)丰度比例在实验舱中的变化范围为  $9.45\% \sim 45.76\%$ ,在对照舱为  $19.38\% \sim 66.48\%$ ,是出现的第二大类群细菌。其次是放线菌门(Actinobacteria),丰度比例在实验舱的变化范围为  $1.68\% \sim 10.76\%$ ,对照舱是  $0.37\% \sim 27.18\%$ 。变形菌门和拟杆菌门细菌在两舱中均表现出绝对的类群优势。酸杆菌门(Acidobacteria)和绿弯菌门(Chloroflexi)是实验

舱压载阶段出现的特有门类,压载前期(10 d 前)丰度比例低于  $1\%$ ,压载第 30 天时两者丰度增加至  $2.19\%$  和  $3.69\%$ (图 3)。蓝细菌门(Cyanobacteria)则仅在对照舱中出现。

在科 的 分 类 水 平 上,黄 杆 菌 科(Flavobacteriaceae)是实验初始的优势分类单元,第 0 天时实验舱和对照舱中的相对比例分别是  $43.52\%$  和  $46.33\%$ (图 4)。黄杆菌科(Flavobacteriaceae)在两舱内的相对丰度比例均表现出先增加后减少的变化趋势,第 5 天时上升至最高比例后逐渐下降。假替单胞菌科(Pseudoalteromonadaceae)在实验舱内的比例在第 10 天急剧增加至  $50.16\%$ ,随后菌群优势减弱。对照舱中微杆菌科(Microbacteriaceae)、Methylophilaceae 和 Surface\_1 的丰度比例增长尤为显著。

### 2.4 群落结构聚类分析

PCoA 分析用于研究样本群落组成的相似性或差异性,直观显示实验舱和对照舱细菌群落变化上的相似性和差异性(图 5)。PC1 和 PC2 两轴分别解释了  $18.92\%$  和  $42.87\%$  的细菌群落变化,第 0 天、1 天两舱体细菌群落接近,此后相对距离增大,表明不同环境下细菌群落变化情况的差异性。NMDS 分析同样揭示了两舱体内细菌群落结构的不同(图 6)。基于层次聚类中的非加权组平均法 UPGMA 对各采样点样品细菌群落构成的相似性进行了聚类分析,对照舱各采样点相似度较高,实验舱内细菌在压载过程中的群落结构表现出较大的波动,因此受到压载环境的显著影响(图 7)。

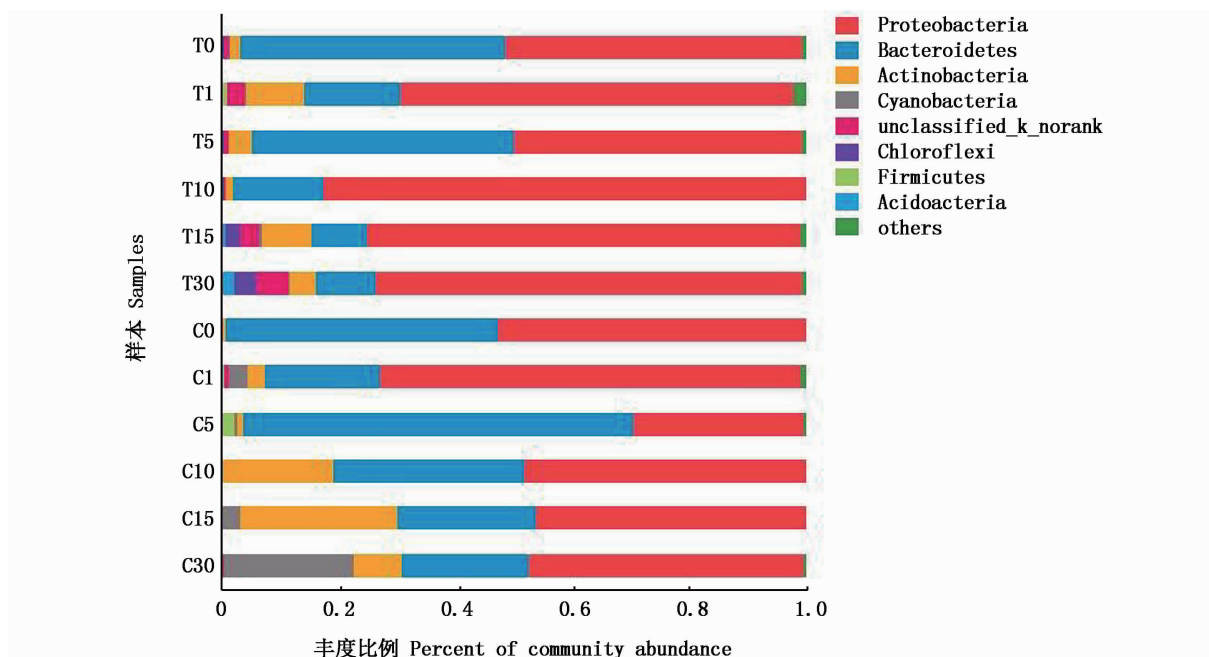


图3 细菌群落在门水平上的组成和相对丰度

Fig. 3 Composition at the phylum level and relative abundance of bacterial communities

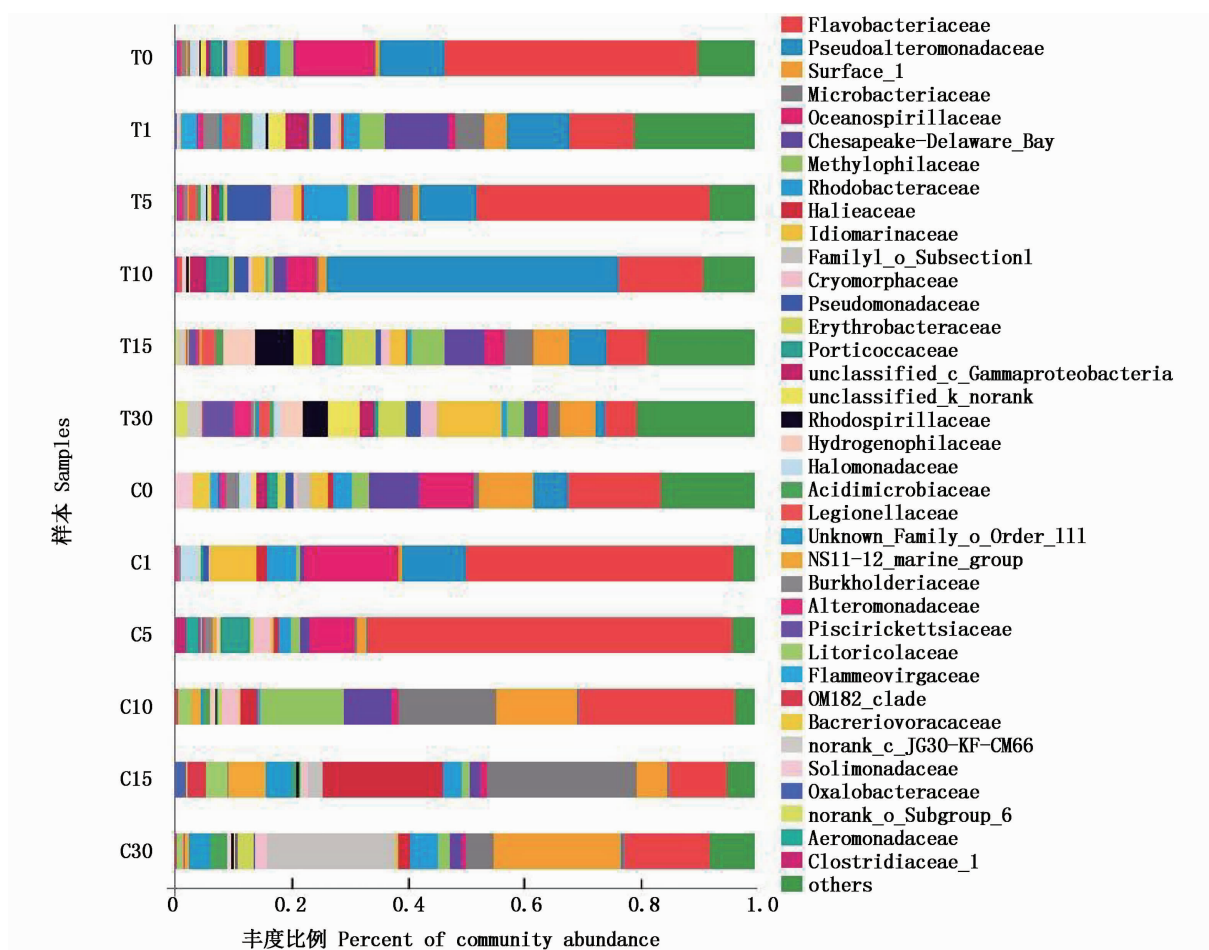


图4 细菌群落在科水平上的组成和相对丰度

Fig. 4 Composition at the family level and relative abundance of bacterial communities

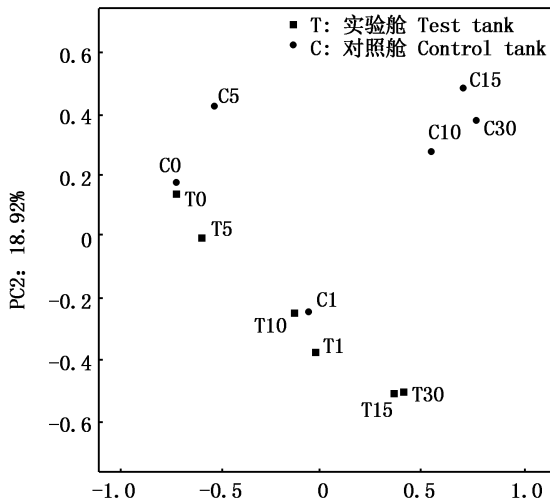


图5 细菌群落 PCoA 分析  
Fig. 5 Principal co-ordinates analysis between samples

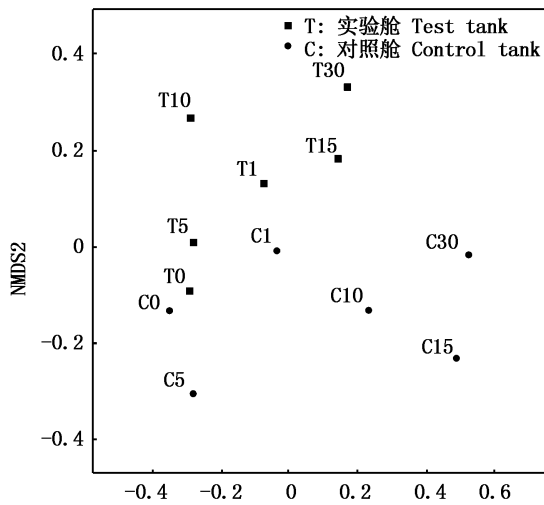


图6 细菌群落 NMDS 分析  
Fig. 6 Non-metric multidimensional scaling analysis between samples

种类数量以及丰度将会明显下降<sup>[20-21]</sup>。然而,压载水中细菌的丰度及其生物量能够保持稳定,与加载地水源保持一致,甚至发生随压载时间不断增长的变化情况<sup>[22-23]</sup>。HUA 等连续跟踪 4 条航线商船压载水中可培细菌总数的变化情况,在他所调查的 6 艘船舶航行过程中,细菌总数均有增加的情况,尤其发生在较长水龄时期<sup>[24]</sup>。TOMARU 等发现,压载水交换操作后可培细菌总数减少,但在短时下降之后,数量又随压载时间的延长而不断上升<sup>[25]</sup>。尽管以上研究中实验方法与本次研究不同,在具体数量上无法作出比较,但都在一定程度上证实了压载水中的微生物具有较高的存活能力,相较于其他浮游生物更易对目的港口造成生物入侵。

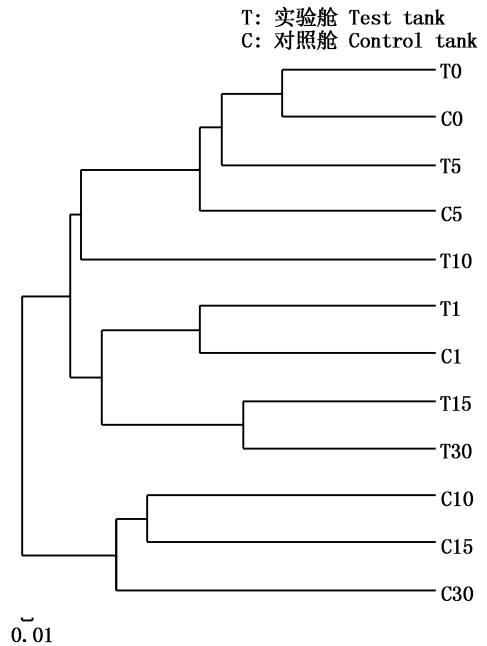


图7 多样本相似度树状图  
Fig. 7 Hierarchical clustering by unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) according to their weighted unifracs matrix.

### 3 讨论

通过对压载水中细菌群落进行连续压载 30 d 的 Miseq 高通量测序,结果表明细菌群落的丰度和多样性在一定程度上随压载时间的延长而增加(表 1)。一般在稳定良好的生态环境中,微生物数量增加,种群丰富度上升,意味着群落结构表现更为稳定<sup>[19]</sup>。在压载舱内,温度突变、黑暗密闭、无外来能源供给、舱壁防污涂料的毒性侵害等恶劣的压载舱条件使得大多数浮游植物和浮游动物无法长时间存活,经过长时间压载后

本次岸基实验压载水源来自洋山港近岸海域,该水域细菌主要由变形菌、拟杆菌这两大组组成,其中  $\gamma$ -变形菌为优势类群<sup>[26]</sup>。相较于对照舱, $\gamma$ -变形菌在实验舱内的丰度优势更为明显,压载过程中比例变化以升高为主。蓝细菌依靠光合作用产生能量维持生长,光照是影响其生长的重要因素<sup>[27]</sup>,压载舱黑暗无光的环境抑制了蓝细菌的生长,导致在压载水样品中蓝藻的丰度极低。变形菌门细菌呈革兰氏阴性,外膜结构主要

由脂多糖组成。该类细菌包含多种代谢途径,以营兼性或者专性厌氧及异养为主要生活方式。黄杆菌科(Flavobacteriia)和假替单胞菌科(Pseudoalteromonadaceae)是实验舱中 $\gamma$ -变形菌优势类群,其中黄杆菌科为好氧或兼性好氧的化能异养型微生物<sup>[28]</sup>,对环境适应能力较强;假替单胞菌科对于蛋白质和脂肪的分解能力极强,且增殖速度快,浮游生物大量死亡后,该类群细菌丰度迅速增加(图4)。

此外,在实验舱样本中存在一定比例的无法按目前分类学研究划分的菌属,说明在压载环境中有一定数量潜在的新种和细菌分类(图3)。并且此类群菌属的丰度比例随压载时间不断增大,由0.51%(5 d)上升至5.43%(30 d)。压载舱是区别于其他任何自然条件的特殊环境,该环境对于微生物的生理生化特征以及代谢机理都可能造成影响。XU等曾在浙江舟山到港船舶压载舱沉积物中成功分离鉴定新菌 *Kordiimnas lacus*<sup>[29]</sup>。压载水较沉积物而言,有更高的细菌丰度和多样性<sup>[30]</sup>,因此具有更为丰富开发潜力和更高的入侵风险。若船舶压载水未经处理直接排放,极易造成港口水域生态环境的污染,同时引发病原微生物污染,对人类健康造成威胁。

压载水因其携带致病微生物排放至港口国而获得重视。在以往的研究中,弧菌、绿脓杆菌和分支杆菌等致病菌或条件致病菌均有报道<sup>[31-33]</sup>,其中分支杆菌在实验舱各采样点均有发现。ROBIN在2016年通过高通量测序技术在压载水中发现了60种新的致病菌和条件致病菌,其中包括47种针对人体产生危害的病原菌<sup>[34]</sup>。泡囊短波单胞菌(*Brevundimonas vesicularis*)是一种较罕见的条件致病菌,可引发肺炎、败血症、皮肤炎症等病症<sup>[35]</sup>。本次岸基模拟压载实验中,泡囊短波单胞菌在实验舱内的丰度比例随压载时间持续增加,30 d时达到1.14%。假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)是常见的病菌属,在实验舱中共检出6种(包括1种无法确定种类)。某些功能细菌可能产生某些活性物质,例如 *Pseudomonas xanthomarina* 是仅有的能够对有机化合物进行降解的细菌<sup>[35]</sup>,在实验舱内的丰度最高达7.02%,这意味着压载环境下蕴藏很大的开发潜力。但与此同时,压载环境下也可能存在新型病原微生物,这对于人类健康以及其他生物的生存都存在

巨大的风险。

#### 参考文献:

- [1] DEMING J W. Unusual or extreme high-pressure marine environments [M]// HURST C J, KNUDSEN G R, MCINERNEY M J, et al. Manual of Environmental Microbiology. Washington, DC: ASM Press, 1997: 478-490.
- [2] DUCKLOW H W, SHIAH F K. Estuarine bacterial production [M]// FORD T E. Aquatic Microbiology: An Ecological Approach. America: Blackwell, 1993: 261-284.
- [3] PROCTOR L M. Advances in the study of marine viruses [J]. Microscopy Research & Technique, 1997, 37(2): 136-161.
- [4] FUHRMAN J A. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects [J]. Nature, 1999(6736): 541-548.
- [5] WOMMACK K E, COLWELL R R. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2000, 64(1): 69-114.
- [6] RUIZ G M, RAWLINGS T K, DOBBS F C, et al. Global spread of microorganisms by ships [J]. Nature, 2000, 408(6808): 49-50.
- [7] MCCARTHY S A, MCPHEARSON R M, GUARINO A M, et al. Toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and cargo ships entering Gulf of Mexico [J]. The Lancet, 1992, 339(8793): 624-625.
- [8] 赵丽青, 贾俊涛, 姜英辉, 等. 山东主要港口海域及入境船舶压载水中病原菌调查结果的多维尺度分析 [J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2013, 36(5): 334-337.
- [9] ZHAO L Q, JIA J T, JIANG Y H, et al. MDS analysis on the pathogenic bacterias in Shandong main Harbor water and entry ship ballast water [J]. Chinese Journal of Frontier Health and Quarantine, 2013, 36(5): 334-337.
- [10] 李春丽, 刘兵, 周君, 等. 宁波港压载水的细菌多样性研究 [J]. 生态科学, 2012, 31(6): 636-644, 670.
- [11] LI C L, LIU B, ZHOU J, et al. Study on genetic diversity of bacteria in ballast water from Ningbo port [J]. Ecological Science, 2012, 31(6): 636-644, 670.
- [12] 冯云霄, 张乐, 方振东, 等. 秦皇岛口岸入境船舶压载水中微生物携带情况调查 [J]. 环境科学导刊, 2011, 30(2): 58-61.
- [13] FENG Y X, ZHANG L, FANG Z D, et al. Investigation of microbe taken by ballast water of entry ships in Qinhuangdao port [J]. Environmental Science Survey, 2011, 30(2): 58-61.
- [14] FUJIMOTO M, MOYERBRAILEAN G A, NOMAN S, et al. Application of ion torrent sequencing to the assessment of the effect of alkali ballast water treatment on microbial community diversity [J]. PLoS ONE, 2014, 9(9): e107534.
- [15] NG C, LE T H, GOH S G, et al. A comparison of microbial water quality and diversity for ballast and tropical harbour waters [J]. PLoS ONE, 2015, 10(11): e0143123.

- [13] BRINKMEYER R. Diversity of bacteria in ships ballast water as revealed by next generation DNA sequencing[J]. Marine Pollution Bulletin, 2016, 107(1): 277-285.
- [14] WU H, CHEN C, WANG Q, et al. The biological content of ballast water in China: A review [J]. Aquaculture & Fisheries, 2017, 2(6):241-246.
- [15] CAPORASO J G, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data [J]. Nature Methods, 2010, 7(5): 335-336.
- [16] QUAST C, PRUESSE E, YILMAZ P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools [J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(Database issue): D590-D596.
- [17] SCHLOSS P D, GEVERS D, WESTCOTT S L. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies [J]. PLoS ONE, 2001, 6(12): e27310.
- [18] RIVAS M N, BURTON O T, WISE P, et al. A microbiota signature associated with experimental food allergy promotes allergic sensitization and anaphylaxis[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2013, 131(1): 201-212.
- [19] 贺纪正, 李晶, 郑袁明. 土壤生态系统微生物多样性-稳定性关系的思考[J]. 生物多样性, 2013, 21(4): 411-420.
- HE J Z, LI J, ZHENG Y M. Thoughts on the microbial diversity-stability relationship in soil ecosystems [J]. Biodiversity Science, 2013, 21(4): 411-420.
- [20] GOLLASCH S, LENZ J, DAMMER M, et al. Survival of tropical ballast water organisms during a cruise from the Indian Ocean to the North Sea [J]. Journal of Plankton Research, 2000, 22(5): 923-937.
- [21] CHAN F T, BRISKI E, BAILEY S A, et al. Richness-abundance relationships for zooplankton in ballast water: temperate versus Arctic Comparisons[J]. ICES Journal of Marine Science, 2014, 71(7): 1876-1884.
- [22] SEIDEN J M, WAY C, RIVKIN R B. Microbial hitchhikers: Dynamics of bacterial populations in ballast water during a trans-Pacific voyage of a bulk carrier[J]. Aquatic Invasions, 2010, 5(1):13-22.
- [23] HUA J, HWANG W H. Effects of voyage routing on the survival of microbes in ballast water[J]. Ocean Engineering, 2012, 42: 165-175.
- [24] TOMARU A, KAWACHI M, DEMURA M, et al. Changes in microbial communities, including both uncultured and culturable bacteria, with mid-ocean ballast-water exchange during a voyage from Japan to Australia [J]. PLoS ONE, 2014, 9(5): e96274.
- [25] 薛俊增, 肖南燕, 王琼, 等. 洋山港海域细菌群落多样性的季节变化[J]. 生态学报, 2016, 36(23): 7758-7767.
- XUE J Z, XIAO N Y, WANG Q, et al. Seasonal variation of bacterial community diversity in Yangshan Port [J]. Acta Ecologica Sinica, 2016, 36(23): 7758-7767.
- [26] HERLEMANN D P, LABRENZ M, JÜRGENS K, et al. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea[J]. Isme Journal, 2011, 5(10): 1571-1579.
- [27] BOONE D R, CASTENHOLZ R W, GARRITY G M, et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume One: the Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria [M]. 2nd ed. New York: Springer Verlag, 2001.
- [28] XU X W, HUO Y Y, BAI X D, et al. *Kordiimonas lacus* sp. nov., isolated from a ballast water tank, and emended description of the genus *Kordiimonas* [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61(2): 422-426.
- [29] DRAKE L A, DOBLIN M A, DOBBS F C. Potential microbial bioinvasions via ships' ballast water, sediment, and biofilm [J]. Marine Pollution Bulletin, 2007, 55(7-9): 333-341.
- [30] ALTUG G, GURUN S, CARDAK M, et al. The occurrence of pathogenic bacteria in some ships' ballast water incoming from various marine regions to the Sea of Marmara, Turkey [J]. Marine Environmental Research, 2012, 81:35-42.
- [31] BURKHOLDER J M, HALLEGRAEFF G M, MELIA G, et al. Phytoplankton and bacterial assemblages in ballast water of U.S. military ships as a function of port of origin, voyage time, and ocean exchange practices [J]. Harmful Algae, 2007, 6(4): 486-518.
- [32] EMAMI K, ASKARI V, ULLRICH M, et al. Characterization of bacteria in ballast water using MALDI-TOF mass spectrometry [J]. Plos One, 2012, 7(6): e38515.
- [33] BRINKMEYER R. Diversity of bacteria in ships ballast water as revealed by next generation DNA sequencing[J]. Marine Pollution Bulletin, 2016,107(1): 277-285.
- [34] CHANDRA A B, CHANDRA P A, CHAPNICK E K. Bacteremia caused by *Brevundimonas vesicularis* in a patient with biliary pancreatitis [J]. Infectious Diseases in Clinical Practice, 2010, 18(1): 54-55.
- [35] SOPEÑA F, LAIZ L, MORILLO E, et al. Phenanthrene biodegradation by *Pseudomonas xanthomarina* isolated from an aged contaminated soil[J]. Clean-soil Air Water, 2014, 42(6): 785-790.

## Variation of bacterial structure and diversity in the water after loading from sea to the simulation ballast cabin at Shanghai Yangshan Port

WU Huixian<sup>1,2</sup>, SHAO Yuhao<sup>1,2</sup>, LIU Liang<sup>1,2</sup>, SHEN Chen<sup>1,2</sup>, XUE Junzeng<sup>1,2</sup>

(1. College of Marine Ecology and Environment, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Centre for Research on the Ecological Security of Ports and Shipping, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** The microorganisms surviving in ballast tank have to face very harsh conditions. After doing simulation experiment at land-based test facility for one month, high-throughput sequencing of 16S rRNA genes showed distinct differences between ballast water (test group) and natural water (control group), which indicated the mechanism that the bacterial communities might demonstrate temporal variations. A total of 413,806 high-quality sequences and 1,334 singleton operational taxonomic units were obtained. Proteobacteria and Bacteroidetes were the major phyla, but the richness of Proteobacteria in test group (mostly Gammaproteobacteria) was higher than that in control group. The concentrations of Acidobacteria and Chloroflexi gradually increased from day 15 in test group. At the family level, Flavobacteriaceae became the most abundant taxon on day 5, but gradually decreased thereafter in test group. And the abundance of Pseudoalteromonadaceae gradually increased and it became the dominant taxon from day 10 onwards. The UPGMA analysis showed a tighter clustering of the microbial composition of control group, indicating higher similarities in structure as compared to the test group samples which were more dispersed. PCoA and NMDS were also applied and the results showed that ballast tank environment impacted bacterial community structure. In this study, the richness and diversity peaked on the day 30 after ballasting, which was dissimilar to previous studies. An appreciable number of unclassified reads were noted at the genus level in test group samples during the later ballasting stage. More bacterial taxa were found in ballast water after long age post-ballasting than were present in natural seawater. This increase demonstrated that conditions inside ballast tanks could support the development of some taxa. It suggested that ballast tanks may act as incubators under special environments and further emphasized the risk of species invasion.

**Key words:** microorganisms; ballast water; water age; land-based experiment; high-throughput sequencing; species invasion