

# 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*) 两种养殖塘水体古菌的季节变化\*

胡越航 韦 梦 姜柳伊 裘琼芬<sup>①</sup> 王春琳

(宁波大学海洋学院 宁波 315211)

**摘要** 结合基于古菌 16S rRNA 基因的末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)技术与克隆测序技术对象山港三疣梭子蟹-脊尾白虾混养模式下改良塘 M1(塘底铺网、四周铺砂的养殖塘)以及传统塘 M2(土塘)不同季节水体古菌群落结构和多样性进行分析。结果显示, M1、M2 养殖塘水体古菌群落均由泉古菌门(Crenarchaeota)和广古菌门(Euryarchaeota)组成。M1、M2 水体古菌群落组成在养殖初期较相似,但随着养殖时间的推移,古菌群落结构组成发生显著差异。M2 养殖水体古菌群落结构随时间变化的差异性大于 M1,说明 M2 养殖生态古菌群落稳定性低于 M1,底铺网、四周铺砂的改良措施可以减少古菌群落变化的幅度。相关性分析发现,多样性指数高时,古菌分布受环境的影响较小;2 种养殖塘水体古菌分布受温度、溶解氧、总氮和总磷的影响较大。

**关键词** 三疣梭子蟹; 水体; 古菌; T-RFLP

**中图分类号** Q938.8 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)05-0108-07

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)生长快、个体大、肉质鲜美,是重要的海水养殖产品之一。象山港是浙江省宁波市重要的水产养殖基地,目前对该养殖区的研究大多数以水质分析(张丽旭等, 2007)、浮游植物和底栖生物研究(刘莲等, 2008)为主,缺乏对微生物的研究,尤其是对古菌的研究(刘晶晶等, 2010; 王海丽等, 2011)。完整且精确地描述生物体的多样性和相对丰度对于了解任何生态系统都是至关重要的(Chaban *et al*, 2006)。自然界中 85%以上的微生物不可培养(Amann *et al*, 1995),因此,传统的分离、纯化、鉴定等方法无法研究微生物的生理生化、细胞组成结构以及形态学。近年来,随着分子生物学技术的发展,环境微生物 DNA 提取方法不断改进(Cho *et al*, 1996),基于 PCR 技术的分子生物学方法在水体微生物生态的研究中应用越来越广泛。末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)技术是一种较先进的生态学指纹分析方法,具有高灵敏度、高通量等特点,且因其易操作、

能获得半定量结果等优势,在微生物研究中被广泛应用(Marsh *et al*, 1999)。

古菌在生态系统的物质循环和能量转换中扮演重要的角色(Könneke *et al*, 2005),广泛存在于各类海域环境以及高盐、高热等环境中。古菌界主要由泉古菌门(Crenarchaeota)和广域古菌门(Euryarchaeota)组成(Madigan *et al*, 2008)。蔡小龙等(2012)结合 <sup>15</sup>N-稳定性同位素探针技术与克隆技术研究养殖水体中氮循环转化及相关功能微生物的群落结构,发现参与氮循环的古菌主要有奇古菌门、泉古菌门和广古菌门。属于泉古菌门的氨氧化古菌以及广古菌门的产甲烷古菌和硫酸盐还原菌等均在海洋的碳、氮、硫等元素循环中必不可少,也是目前研究的热点(Hurtgen, 2012; Lazar *et al*, 2011; Pitcher *et al*, 2011; Valentine, 2011)。研究养殖水体古菌群落的变化,对了解养殖水体物质循环等至关重要。但目前关于宁波市象山港三疣梭子蟹养殖塘水体古菌的研究尚未见报道。

\* 浙江省公益项目(2015C32004)和宁波市科技计划项目(2015C10062)共同资助。胡越航, E-mail: 546264457@qq.com

① 通讯作者: 裘琼芬, 讲师, E-mail: qiuqiongfen@nbu.edu.cn

收稿日期: 2015-06-14, 收修改稿日期: 2015-07-10

本研究通过 T-RFLP 技术结合克隆测序的方法, 对象山港三疣梭子蟹-脊尾白虾混养模式下改良塘(塘底铺网、四周铺砂的养殖塘)以及传统塘(土塘)不同季节水体古菌群落结构和多样性进行分析, 试图探讨养殖过程水体环境中古菌群落的变化, 为象山港三疣梭子蟹养殖的生态评价提供微生态基础信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 水样采集

三疣梭子蟹养殖塘位于浙江省宁波市象山港东胜养殖区, 采样点及样品处理同陈逸斐等(2015)所述。共 2 种类型养殖塘: 一为改良塘(M1), 底铺网、四周铺砂, 设置 2 个平行塘; 二为传统土塘(M2), 设置 3 个平行塘。养殖塘的基本情况见表 1。样品采集于 2013 年 6–12 月中旬, 2 h 内采集所有养殖塘的水样, 将单个塘中不同站位养殖水混合后, 取 200 ml 水样过滤(0.22  $\mu\text{m}$ , Millipore), 所得滤膜用于微生物 DNA 的提取, 水体用于氮磷含量的分析。所有样品低温运回实验室,  $-20^{\circ}\text{C}$  冻存备用。

### 1.2 理化分析

水体理化测定参考陈逸斐等(2015), 养殖水体的水温、溶解氧、盐度、pH 和透明度按照《海洋监测规范》在原位进行测定, 过滤所得水体带回实验室, 测定其中的总氮、总磷、氨氮以及亚硝酸氮。

### 1.3 总 DNA 的提取和 PCR 扩增

将滤膜放于 2 ml 裂解管中进行养殖水总 DNA 的提取, 提取方法参考 Noll 等(2005), 采用古菌 16S rRNA

基因的通用引物 109f (ACKGCTCAGTAACACGT)和 915r (GTGCTCCCCGCCAATTCCT)进行 PCR 扩增。反应体系(50  $\mu\text{l}$ ): 5  $\mu\text{l}$  10 $\times$ Buffer, 4  $\mu\text{l}$  2.5 mmol/L dNTPs, 1  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{mol/L}$  引物, 1  $\mu\text{l}$  2.5 U *Taq* DNA 聚合酶(TaKaRa), 1  $\mu\text{l}$  DNA 模板, 加水至 50  $\mu\text{l}$ , 混匀。反应程序为  $94^{\circ}\text{C}$  变性 5 min, 30 个循环包括  $94^{\circ}\text{C}$  30 s,  $53^{\circ}\text{C}$  45 s,  $72^{\circ}\text{C}$  90 s, 最后  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。此外, PCR 扩增产物若用于 T-RFLP 分析, 其后引物用 FAM 进行荧光标记。

### 1.4 T-RFLP 分析

将乙醇沉淀法纯化后的 PCR 产物用限制性内切酶 *Taq* I (TaKaRa)进行酶切, 反应体系及条件参考陈明明等(2014)。酶切产物用乙醇-醋酸钠沉淀法进行纯化。酶切纯化后进行限制性片段的基因扫描: 取 1–3  $\mu\text{l}$  酶切纯化样品, 与 10  $\mu\text{l}$  HiDi-甲酰胺和 0.2  $\mu\text{l}$  内标混合,  $95^{\circ}\text{C}$  变性 3 min, 马上置于冰浴。通过 ABI 3130XL Genetic Analyzer 进行限制性片段扫描, 结果由 ABI GeneMap 分析软件直接导出。

### 1.5 克隆/测序和系统发育分析

选取 M2 养殖塘 7 月水体样品构建古菌 16S rRNA 基因克隆文库。采用无荧光标记引物 109f/915r 进行 PCR 扩增, 其余 PCR 条件同上。以切胶纯化后 PCR 产物为插入片段, 以 pMD-19T Vector (TaKaRa) 为载体,  $4^{\circ}\text{C}$  过夜连接。连接产物转入大肠杆菌 JM109 感受态细胞(TaKaRa)中, 并在含 X-gal、IPTG 的 LB 培养基上进行蓝白斑筛选。筛选得到 24 个阳性克隆进行测序, 利用 ARB 软件的 NJ 算法(Neighbor-Joining)对测序结果进行系统发育分析。

表 1 两种养殖塘基本情况  
Tab.1 The basic condition of the two ponds

塘 Pond	面积 Area ( $\text{m}^2$ )	水深 Depth (m)	底质 Sediment	混养种类 Polyculture species	蟹品种 Crab variety	放苗时间 Seeding time (d)	放苗规格 Seeding size	充氧方式 Aerating way
M1	1600	1.2	底铺网, 四周铺砂 Pond with sand and netted bottom	三疣梭子蟹, 散养 <i>P. trituberculatus</i> Cage-free mode (6 ind/ $\text{m}^2$ ) 脊尾白虾 <i>P. carinicauda</i> (1500 g parents)	自然种 Open pollinating seeds	6.8	4 期苗 Seedlings at stage IV	底充氧 Filling oxygen at the bottom
M2	1600	1.2	土塘 Traditional soil pond	三疣梭子蟹, 散养 <i>P. trituberculatus</i> Cage-free mode (6 ind/ $\text{m}^2$ ) 脊尾白虾 <i>P. carinicauda</i> (1500 g parents)	自然种 Open pollinating seeds	6.8	4 期苗 Seedlings at stage IV	底充氧 Filling oxygen at the bottom

## 1.6 数据处理

古菌 16S rRNA 基因 T-RFLP 图谱中每一个限制性片段(T-RF)为 1 个 OTU (Operational Taxonomic Unit), 以各个 T-RF 的相对峰高值(每个 T-RF 的峰高占累积峰高的百分比)为各个 OTU 的相对丰度, 相对丰度低于 5%的 OTU 不予考虑(Noll *et al.*, 2005)。计算古菌的 Shannon 多样性指数( $H'$ )和均匀度指数( $E'$ ), 计算公式如下:

$$H' = -\sum P_i \ln P_i;$$

$$E' = H' / \ln S$$

式中,  $P_i$  为第  $i$  个 OTU 的相对丰度,  $S$  为 OTU 总数。根据各 T-RF 的相对丰度, 得到古菌 T-RFLP 百分比图, 利用 Past 软件对 T-RFLP 结果进行主成分分析(PCA), 结合环境因子, 利用 CANOCO 4.5 软件对各点进行冗余分析(RDA), 同时, 利用 Past 进行古菌 16S rRNA 基因与环境相关性以及线性回归分析。

## 2 结果

### 2.1 基于 T-RFLP 的古菌群落结构以及多样性分析

对养殖塘水体古菌 DNA 进行 16S rRNA T-RFLP 分析(图 1)。整个养殖过程中, M1 和 M2 养殖水体古菌群落主要由 78 bp、188 bp、111 bp、339 bp、793 bp 组成, 不同养殖塘古菌群落组成随时间的变化有差异。

养殖起始期(6月), M1 水体占优势的 T-RF 片段为 78 bp, 相对丰度为 46%, 其次为 111 bp, 相对丰度为 20%左右, 188 bp 和 793 bp 含量在 16%左右; M2 水体占主要优势的 T-RF 片段亦为 78 bp, 但相对丰度在 36%左右, 其次为 111 bp, 相对丰度为 28%左右, 188 bp 和 793 bp 含量为 16%–17%; 从数据上来看, 6月时 2 种水体古菌群落组成相似。7月时, M1 水体古菌群落组成中占绝对优势的 T-RF 为 78 bp, 相对丰度达 54%左右, 其次为 88 bp 和 793 bp, 相对丰

度分别为 21%和 16%, 各个片段的比例相差较大; 而 M2 的群落组成中, 78 bp、188 bp、111 bp、793 bp 比例分配较为均匀, 在 20%–30%之间; 说明 7 月时 2 种水体古菌群落结构组成差异较大。8 月时, M1 和 M2 水体古菌群落组成较为相似, 78 bp 占群落组成的 40%左右, 111 bp 和 188 bp 在 5%–10%之间波动。9 月时, M1 和 M2 水体古菌群落结构组成有较大差异, M1 水体以 78 bp、111 bp、793 bp 为优势菌, 相对丰度均在 30%以上, 188 bp 占比小于 10%; 而 M2 水体 188 bp 的相对丰度最大, 达 37%以上, 其他片段(78 bp、111 bp、793 bp)相对丰度较为均匀。10 月时, 2 种水体古菌群落组成也存在很大差异, M1 水体以 339 bp 相对丰度最大, 其次为 78 bp, 而 M2 水体则以 793 bp 相对丰度最大。11 月 2 种养殖塘水体古菌群落组成差异较大, M1 水体以 78 bp、111 bp、188 bp、793 bp 为主, 相对丰度大小为 793 bp > 111 bp > 78 bp > 188 bp; M2 水体以 78 bp、188 bp、793 bp 为主, 相对丰度大小为 78 bp > 793 bp > 188 bp。

从古菌群落组成来看, 从养殖初期到养殖结束, 水体古菌群落结构发生变化, 且不同养殖塘水体古菌群落结构的变化有所不同。基于古菌 16S rRNA 基因 T-RFLP 的末端限制性片段长度的数目以及相对丰度, 计算了 M1 和 M2 各月养殖水体中古菌的 Shannon 多样性指数  $H'$  以及均匀度指数  $E'$ , 结果如表 2 所示。M1 水体 10 月时古菌多样性最大, 7 月和 12 月最小; 而 M2 水体 8、11 月养殖水体古菌群落多样性大于其他月。由此可见, 2 种养殖塘水体古菌多样性的变化不同。

为了确定各个 T-RF 属于哪些菌属, 从构建好的 M2 七月养殖水体样品古菌 16S rRNA 基因文库中随机选出 24 个阳性克隆进行测序, 所得测序结果利用 ARB 软件及数据库构建古菌系统发育树, 分析样品中古菌的分类地位。系统发育分析结构表明, 养殖水体古菌群落主要由泉古菌门(Crenarchaeota)和广古菌门(Euryarchaeota)组成。T-RFLP 中占优势的 T-RF78bp

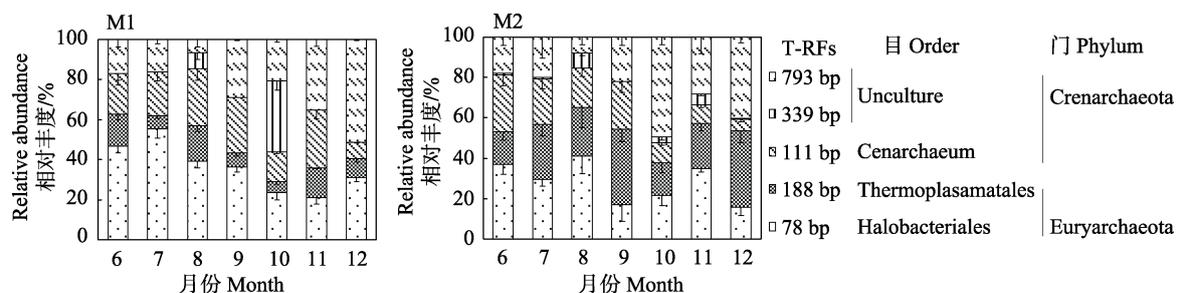


图 1 养殖塘水体古菌 16S rRNA 基因 T-RFLP 百分比

Fig.1 T-RFLP profiles of archaeal 16S rRNA in the aquaculture water

表 2 基于 T-RFLP 图谱的古菌多样性分析  
Tab.2 Analysis of diversity of archaea based on T-RFLP profiles (Mean±SE, n=3)

月份 Month	Shannon 多样性指数 $H'$		均匀度指数 $E'$	
	M1	M2	M1	M2
6	1.27±0.01	1.22±0.04	0.92±0.01	0.85±0.05
7	1.12±0.06	1.19±0.08	0.81±0.04	0.88±0.05
8	1.30±0.01	1.35±0.07	0.85±0.01	0.83±0.04
9	1.27±0.04	1.19±0.16	0.92±0.01	0.91±0.07
10	1.46±0.05	1.09±0.14	0.91±0.03	0.77±0.08
11	1.26±0.05	1.36±0.03	0.90±0.01	0.82±0.05
12	1.13±0.03	1.03±0.07	0.82±0.02	0.71±0.05

属于广古菌门 (Euryarchaeota)、嗜盐杆菌目 (Halobacteriales), T-RF188 bp 属于广古菌门(Euryarchaeota)热原体目(Thermoplasmatales), 793 bp、339 bp 属于泉古菌门(Crenarchaeota), 111 bp 属于泉古菌门(Crenarchaeota)餐古菌属(*Cenarchaeum*)。

为了进一步比较 2 种不同底质养殖塘水体古菌群落结构的季节性变化, 对各个点古菌 16S rRNA 基因的 T-RFLP 结果进行主成分分析(图 2)。从养殖初期到养殖结束, M1 从广古菌门(T-RF 78 bp)向泉古菌门(T-RF 793 bp)演替比较明显, M2 的这种演替趋势并不明显。各个时间点 M1 和 M2 水体古菌在主成分分析轴上的分散程度不同, 整个养殖过程中, M1 养殖水体古菌在主成分分析轴上的分散程度小于 M2, 说明 M1 水体古菌群落结构随时间的变化幅度小于 M2。

### 2.2 古菌分布与环境因子的关系

为了研究环境因子对古菌群落结构变化的影响,

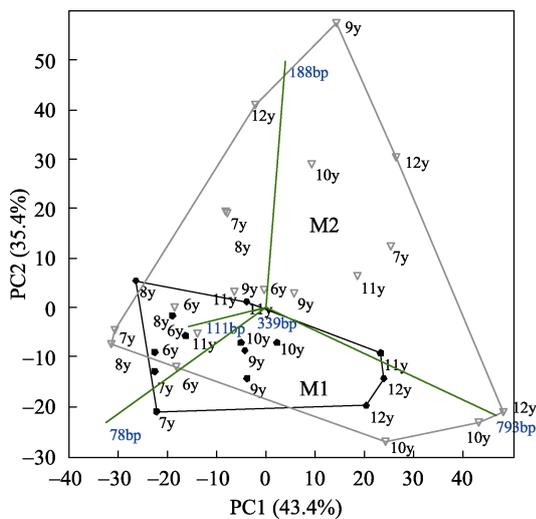


图 2 古菌 16S rRNA 基因 T-RFLP 的主成分分析  
Fig.2 Principal components analysis of the archeal 16S rRNA gene T-RFLP

将环境因子水温、溶氧、盐度、pH、透明度、总氮、总磷、氨氮以及亚硝酸氮与 T-RFLP 结果进行 RDA 分析(图 3)。选取的 9 个环境因子对 M1、M2 养殖塘水体各时间点古菌分布的解释量分别为 84.2%和 35.7%, 其中, 主轴 RDA1 解释量分别为 66.8%和 22.9%, 说明所选取的环境因子对 M1 水体古菌分布的影响程度大于 M2 养殖水体。M1 水体 11 月古菌分布受 pH 的影响较为显著, 12 月受总氮、氨氮、温度和溶解氧影响较为显著, 8 月与 12 月相似, 但受各个环境因子的影响效应与 12 月相反, 6、7、9 月受透明度、盐度的影响较为明显, 10 月古菌分布受到环境的影响最小。M2 水体 12 月古菌分布受环境影响与 M1 相似, 除了受总氮、氨氮、温度和溶解氧影响较为显著, 还受总磷的影响; 9 月受亚硝酸盐、盐度和透明度影响较为显著, 11 月和 8 月受到环境因子的影响最小。从图 3 可以看出, 从养殖初期开始, 2 种不同养殖塘水体各个月古菌分布受环境的影响不同, 但到养殖结束时, 2 种养殖水体较为相似。

为了了解环境因子对各个 T-RF 的影响, 将环境因子与各个 T-RF 片段进行相关性分析(表 3), 广古菌门(T-RF78bp、T-RF188bp)在 M1 水体中受环境的影响比在 M2 中大, 在 M1 中受温度、亚硝酸盐以及溶解氧的影响显著, 在 M2 中与各个环境因子的相关性均不显著。泉古菌门在 M1 和 M2 中受环境的影响不同。在 M1 水体中, 339 bp 受总磷的影响较为显著, 111 bp 受溶解氧影响较大, 793 bp 受温度影响较大, 而在 M2 养殖环境中, 339 bp 受 pH 影响显著, 111 bp 受温度、总磷、总氮影响较大, 793 bp 受温度、溶解氧影响较大。泉古菌门细菌在 M2 养殖水体中受环境的影响大于 M1。由此可见, 在 2 种养殖水体中, 温度、溶解氧、总氮、总磷对古菌群落的影响较大, 同种 T-RF 片段, 在不同养殖塘受环境的影响有差异。

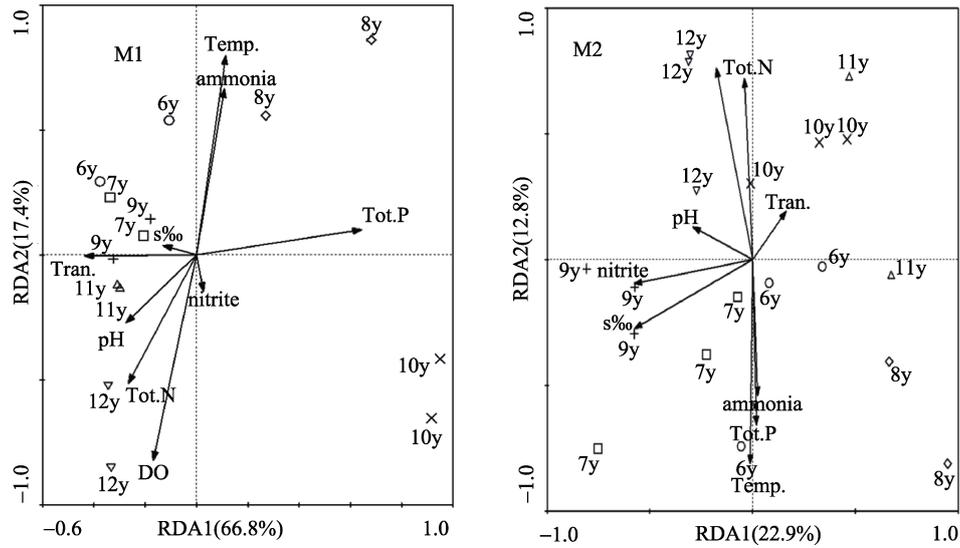


图 3 不同时间养殖塘水体古菌群落结构与环境因子的冗余分析

Fig.3 Redundancy analysis for archaeal community compositions and environmental factors in the aquaculture water at different time points

表 3 古菌 16S rRNA 基因与环境相关性以及线性回归分析

Tab.3 Correlation and linear regression analysis of archaeal 16S rRNA gene and environmental factors

AR		78 bp		188 bp		339 bp		111 bp		793 bp	
		M1	M2								
温度 Temperature	r	0.728	0.305	0.120	-0.159	-0.065	-0.028	0.346	0.757	-0.830	-0.469
	p	<0.010	0.202	0.681	0.514	0.823	0.908	0.225	<0.010	<0.010	0.042
DO	r	-0.106	-0.254	-0.606	0.073	0.101	-0.401	-0.601	-0.570	0.633	0.475
	P	0.716	0.292	0.021	0.764	0.730	0.088	0.022	0.010	0.015	0.039
盐度 Salinity	r	0.214	-0.233	-0.461	0.232	-0.112	-0.285	0.219	0.186	-0.100	-0.083
	P	0.460	0.335	0.096	0.338	0.701	0.235	0.451	0.444	0.731	0.734
pH	r	0.435	-0.042	-0.326	-0.061	-0.131	-0.552	-0.514	0.096	0.234	0.119
	P	0.119	0.864	0.254	0.803	0.654	0.014	0.060	0.694	0.418	0.625
透明度 Transparency	r	0.281	0.086	0.214	0.151	-0.349	0.057	-0.261	-0.406	0.189	-0.014
	P	0.329	0.724	0.461	0.535	0.220	0.813	0.367	0.083	0.515	0.951
总氮 Total N	r	-0.266	-0.284	0.028	0.192	-0.059	-0.095	-0.383	-0.644	0.542	0.383
	P	0.357	0.237	0.924	0.430	0.840	0.696	0.175	<0.010	0.044	0.105
总磷 Total P	r	-0.422	0.083	0.194	-0.140	0.568	0.207	0.056	0.686	-0.235	-0.308
	P	0.132	0.734	0.504	0.567	0.034	0.394	0.846	<0.010	0.416	0.199
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	r	0.170	0.098	0.392	0.028	-0.184	0.238	0.461	0.310	-0.440	-0.293
	P	0.560	0.689	0.164	0.906	0.526	0.326	0.097	0.195	0.114	0.222
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	r	-0.708	-0.362	0.275	0.173	0.094	-0.331	0.312	0.244	0.185	0.052
	P	<0.010	0.127	0.339	0.478	0.748	0.166	0.276	0.313	0.525	0.832

### 3 讨论

古菌群落结构的研究表明, 养殖水体古菌群落结构在养殖过程中发生变化, 不同养殖塘水体古菌群落结构的变化不同。微生物群落结构及功能受到环境因

子的制约(Cotner *et al*, 2002)。以往对不同水体生态过程微生物群落结构的研究结果显示, 环境因子显著影响微生物的分布, 且不同的生态环境受到的调控因子不同(刘敏, 2011)<sup>1)</sup>。对海洋生态系统中古菌群落的研究发现, 古菌在不同海域中的分布有所不同, 且其分

1) 刘敏. 我国黄、东海典型生态过程中的微生物群落结构. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2011

布受到盐度、含氧量、温度、各营养元素的含量与分布等因素的影响(Ren *et al.*, 2006)。王晓霞(2010)<sup>1)</sup>研究表明, 总磷和总盐是影响古菌群落变化的主要因素。RDA 分析结果显示, 改良塘中古菌分布受盐度的影响较小, 传统塘古菌分布受盐度影响较大。同时, 相关性分析结果显示, 改良塘中 339 bp 以及传统塘中 111 bp 与总磷显著相关, 且这 2 种片段也是古菌群落组成变化较显著的片段, 由此可见, 总磷是这 2 种养殖塘水体古菌群落变化的主要因素之一, 底铺网、四周铺砂改良后减少了盐度对养殖塘水体古菌分布的影响。2 种养殖塘水体古菌多样性指数的变化不同, 但 RDA 分析结果显示, 多样性指数高的月份受所选环境因子的影响最小。在以往的研究中也发现, 营养盐以及 pH 等环境因子是影响古菌多样性的重要因素(陈明明等, 2014), 由此可见, 养殖塘水体古菌多样性指数降低是受环境的影响。

研究表明, 水体微生物群落结构具有高度时空动态性(Gilbert *et al.*, 2009; Or *et al.*, 2012; Teeling *et al.*, 2012)。本研究结果中, 养殖起始期(6 月), 2 种养殖塘水体古菌群落结构差异不是很明显, 但随着养殖时间的推移, 不同养殖塘水体古菌群落差异越来越大, 传统土塘养殖水体古菌群落结构随时间的差异性大于改良养殖塘, 且这种差异性是由属于广古菌门、热原体目的 188 bp 引起。但相关性分析显示, 所选取的 9 个环境因子对热原体目的影响较小。从底质差异的角度出发, 改良塘底铺网四周铺砂可以有效减少沉积物的累积, 从而减少养殖生物对沉积物的影响, 传统土塘沉积物的累积会更快, 养殖生物对底泥沉积物的扰动也更加明显。李大鹏等(2010)研究表明, 底泥的扰动促进易释放态磷向难释放态磷转变, 从而减少了水体中有效态磷的含量, 同时土壤中有有机质也能影响氮磷在水体的分布(Huang *et al.*, 2008)。因此, 2 种养殖塘养殖生物对底泥沉积物扰动的差异可能是引起古菌群落结构变化差异的原因之一。微生物群落结构的变化与生态功能的改变有关, 研究表明, 微生物群落结构变化可能改变其生态功能(Xiong *et al.*, 2010; Comte *et al.*, 2011)。由此可见, 底铺网、四周铺砂改良措施使水体古菌群落结构变化幅度小于传统塘, 从而使其生态功能的稳定性大于传统塘。

综上所述, 本研究采用 T-RFLP 与克隆测序的方法, 通过 PCA、RDA 以及相关性分析古菌群落分布与环境因子之间的关系, 结果表明, 多样性指数高时, 古菌分布受环境的影响较小; 2 种养殖塘水体古菌分

布受温度、溶解氧、总氮和总磷的影响显著; 底铺网、四周铺砂改良措施可以减少养殖水体古菌群落的变化幅度。

## 参 考 文 献

- 王海丽, 杨季芳. 象山港海域硫酸盐还原菌的时空分布及其影响因素. 生态学杂志, 2011, 30(12): 2857-2862
- 刘莲, 任敏, 陈丹琴, 等. 象山港乌沙山电厂附近海域的底栖生物状况. 海洋环境科学, 2008, 27(s1): 19-22
- 刘晶晶, 曾江宁, 陈全震, 等. 象山港网箱养殖区水体和沉积物的细菌生态分布. 生态学报, 2010, 30(2): 377-388
- 李大鹏, 黄勇, 范成新. 底泥间歇扰动-沉降过程对静止水体中生物有效磷的影响. 环境科学, 2010, 31(8): 1795-1800
- 张丽旭, 蒋晓山, 蔡燕红, 等. 近 4 年来象山港赤潮监控区水质状况综合评价. 海洋湖沼通报, 2007(4): 98-103
- 陈明明, 王少璞, 韦梦, 等. 象山港网箱养殖区沉积物的古菌空间分布. 生态学报, 2014, 34(14): 4099-4106
- 陈逸斐, 韦梦, 裘琼芬, 等. 两种三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)养殖塘中浮游细菌的季节变化. 渔业科学进展, 2015, 36(5): 119-125
- 蔡小龙, 罗剑飞, 林炜铁, 等. 珠三角养殖水体中参与氮循环的微生物群落结构. 微生物学报, 2012, 52(5): 645-653
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol Rev, 1995, 59(1): 143-169
- Chaban B, Voisin S, Kelly J, *et al.* Identification of genes involved in the biosynthesis and attachment of *Methanococcus voltae* N-linked glycans: insight into N-linked glycosylation pathways in Archaea. Mol Microbiol, 2006, 61(1): 259-268
- Cho JC, Lee DH, Cho YC, *et al.* Direct extraction of DNA from soil for amplification of 16S rRNA gene sequences by polymerase chain reaction. J Microbiol, 1996, 34(3): 229-235
- Comte J, Giorgio PAD. Composition influences the pathway but not the outcome of the metabolic response of bacterioplankton to resource shifts. PLoS One, 2011, 6(9): 3679-3694
- Cotner JB, Biddanda BA. Small players, large role: microbial influence on biogeochemical processes in pelagic aquatic ecosystems. Ecosystems, 2002, 5(2): 105-121
- Gilbert JA, Field D, Swift P, *et al.* Seasonal succession of microbial communities in the Western English Channel using 16S rDNA-tag pyrosequencing. Environ Microbiol, 2009, 11(12): 3132-3139
- Huang CJ, Dong QX, Lin JD, *et al.* Sediment water, organic matter, nitrogen and phosphorus contents in a large-scale mariculture located in Zhelin Bay, eastern Guangdong Province, China. Acta Oceanol Sin, 2008, 30(2): 38-49
- Hurtgen MT. The Marine Sulfur Cycle, Revisited. Science, 2012,

1) 王晓霞. 乌鲁木齐河源 1 号冰川前缘微生物原生演替. 新疆大学硕士研究生学位论文, 2010

- 337(6092): 305–306
- Könneke M, Bernhard AE, De la Torre JR, *et al.* Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 2005, 437(7058): 543–546
- Lazar CS, Parkes RJ, Cragg BA, *et al.* Methanogenic diversity and activity in hypersaline sediments of the centre of the Napoli mud volcano, Eastern Mediterranean Sea. *Environ Microbiol*, 2011, 13(8): 2078–2091
- Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, *et al.* Brock Biology of Microorganisms 12th edn. *Int Microbiol*, 2008, 11: 65–73
- Marsh ME. Coccolith crystals of *Pleurochrysis carterae*: crystallographic faces, organization, and development. *Protoplasma*, 1999, 207(1–2): 54–66
- Noll M, Matthies D, Frenzel P, *et al.* Succession of bacterial community structure and diversity in a paddy soil oxygen gradient. *Environ Microbiol*, 2005, 7(3): 382–395
- Or A, Shtrasler L, Gophna U. Fine-scale temporal dynamics of a fragmented lotic microbial ecosystem. *Scientific Report*, 2012, 2(1): 207
- Pitcher A, Villanueva L, Hopmans EC, *et al.* Niche segregation of ammonia-oxidizing archaea and anammox bacteria in the Arabian Sea oxygen minimum zone. *ISME J*, 2011, 5(12): 1896–1904
- Ren LC, Li MY, Bao SX. The investigation of the marine archaea diversity. *Life Sci Res*, 2006, 10(2): 67–70
- Teeling H, Fuchs BM, Becher D, *et al.* Substrate-controlled succession of marine bacterioplankton populations induced by a phytoplankton bloom. *Science*, 2012, 336(6081): 608–611
- Valentine DL. Emerging topics in marine methane biogeochemistry. *Annu Rev Mar Sci*, 2011, 3: 147–171
- Xiong J, Wu L, Tu S, *et al.* Microbial communities and functional genes associated with soil arsenic contamination and rhizosphere of the arsenic hyper-accumulating plant *Pteris vittata* L. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(21): 7277–7284

(编辑 冯小花)

## The Seasonal Variations of Archaea in Two Kinds of Ponds for *Portunus trituberculatus*

HU Yuehang, WEI Meng, JIANG Liuyi, QIU Qiongfeng<sup>①</sup>, WANG Chunlin

(School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315211)

**Abstract** The dynamic changes and diversity of archaeal communities in two kinds of ponds (M1: the pond with sanded walls and netted bottom; M2: the traditional pond with soil) for the polyculture of *Portunus trituberculatus-Exopalaemon carinicauda* in different seasons were investigated. The study was conducted with a combination of cloning/sequencing and terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis based on archaeal 16S ribosomal RNA. Physicochemical characters of the sea water were monitored at the same time to examine the relationship between environmental factors and archaeal communities. The results showed that the archaeal communities in both M1 and M2 were composed of Crenarchaeota and Euryarchaeota. Halobacteriales and thermoplasmatales in Euryarchaeota were the majority accounting for nearly half of the entire sample. Halobacteriales was more abundant than thermoplasmatales, however, it was the marked alteration in the relative abundance of thermoplasmatales that primarily led to the archaeal community shift. The structure of archaeal community in aquaculture water changed dramatically during the culture. The archaeal communities of M1 and M2 were similar at the beginning of the culture, but changed significantly over time. Principal component analysis showed that the variation in M2 was larger than in M1, which indicated the lower stability of archaeal community in the former. Redundancy analysis indicated that 84.2% of the archaeal community in M1 could be explained by the 9 factors measured in this study, while that M2 was also determined by other factors and only 35.7% was explained. The improvement of pond sediment could reduce the extent of changes in the archaeal community. Correlation analysis showed that the higher the diversity index was, the smaller the influence of environment on the distribution of archaea. In general, the distribution of archaea in pond water changed over seasons, and was greatly affected by temperature, dissolved oxygen, total nitrogen, and total phosphorus.

**Key words** *Portunus trituberculatus*; Aquacultural water; Archaea; T-RFLP

① Corresponding author: QIU Qiongfeng, E-mail: qiuqiongfeng@nbu.edu.cn