

两种三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*) 养殖塘中浮游细菌的季节变化*

陈逸斐 韦 梦 裘琼芬^① 蒋霞敏 王春琳

(宁波大学海洋学院, 宁波 315211)

摘要 结合基于细菌 16S rRNA 基因的 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)以及传统塘 M2(土塘)水体不同季节细菌群落结构和多样性进行分析。结果显示, M1、M2 养殖塘水体细菌群落主要由变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)、蓝藻门(Cyanobacteria)组成。养殖过程中, 细菌群落结构随时间发生了显著变化, 不同养殖塘水体细菌群落结构变化的方向不同。M1 养殖塘水体由放线菌门主导的群落结构向蓝藻菌门以及变形菌门主导的群落结构发展, M2 养殖水体由蓝藻菌门主导的向变形菌门主导的群落结构发展, 说明养殖后期改良塘水体有利于蓝藻细菌的生长。无论是 M1 还是 M2, 拟杆菌门在 8-9 月含量最高, 且养殖过程中在 M2 水体的含量始终高于 M1。随着养殖时间的推移, M1 养殖塘水体细菌群落由多样性指数高的稳定性结构向多样性指数低的不稳定性结构转变, 而 M2 水体养殖后期仍保持较高的多样性指数。PCA 分析结果显示, M1 养殖塘水体细菌群落差异性大于 M2, 说明 M2 水体细菌群落对环境变化的抵御能力大于 M1。相关性分析结果显示, 不同养殖塘水体细菌群落分布受环境的影响效应不同。

关键词 三疣梭子蟹; 水体; 细菌群落; T-RFLP

中图分类号 Q938 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)05-0119-07

在养殖过程中, 为了提高产量, 饵料的投入往往高于实际需求, 这种做法往往导致养殖水体水质恶化, 尤其是在养殖中后期, 水质恶化更加严重(Sugiura *et al*, 2006; Ma *et al*, 2013)。水质的恶化给养殖对象的健康带来很大的压力, 常常会导致严重的疾病暴发和经济损失, 已成为威胁水产养殖发展的主要因素(Defoirdt *et al*, 2011)。近年来, 大量的证据表明, 浮游生物群落与养殖对象的健康密切相关, 在养殖生态系统中, 细菌与养殖生物的健康生长以及养殖环境关系密切。细菌群落和功能的变化受到环境因子的影响(Cotner *et al*, 2002), 同时又反过来影响各种环境因子, 如细菌种类和数量的动态变化导致环境中溶氧

(DO)、pH 等环境因子的变化, 同时环境的恶化可导致病害微生物更容易入侵养殖生物体, 对养殖生物的健康生长带来不良影响。研究表明, 在健康的虾群和病变的虾群中有明显不同的细菌群落(Lucas *et al*, 2010; Boutin *et al*, 2013; Zhang *et al*, 2014)。微生物的组成可以作为诊断养殖对象病变的指标(Chytrý *et al*, 2002)。Berry 等(2012)研究表明, 细菌组成结构的变化对葡萄糖硫酸钠诱导的疾病有指示作用。Fortunato 等(2013)研究表明, 细菌分类指示具有季节性动态变化的特征。微生物的群落组成还可以反映环境的质量(Dang *et al*, 2008; Yeo *et al*, 2013), 沉积物中细菌的组成可指示污染程度(Xiong *et al*, 2014)。因此了解养殖

*国家海洋经济创新发展区域示范项目(2014-31)和宁波市农村科技创新创业资金项目(2014C92011)共同资助。陈逸斐, E-mail: 930737601@qq.com

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

收稿日期: 2015-04-16, 收修改稿日期: 2015-05-31

水体细菌群落的变化对掌握养殖状况有重要作用。关于宁波象山港三疣梭子蟹与脊尾白虾混养养殖水体细菌群落的研究尚未见报道。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(塘底铺网四周铺砂养殖塘)以及传统塘(土塘)水体不同季节细菌群落结构和多样性进行分析,探讨养殖过程中水体环境细菌群落的变化,对宁波象山港三疣梭子蟹养殖业的健康发展有重要意义。

1 材料与方法

1.1 水样采集

三疣梭子蟹养殖塘位于宁波市象山港东胜养殖区,养殖塘分两种类型:一为改良塘(M1),底铺网、四周铺砂,设置两个平行塘;二为传统土塘(M2),设置3个平行塘。单个塘面积为1600 m²,水深1.2 m,采用底部充氧方式增氧。2013年6月8日投放三疣梭子蟹4期自然种苗,放苗密度为6只/m²,同时每个塘投放1.75 kg 脊尾白虾亲虾进行虾蟹混养。

样品采集于2013年6–12月中旬,将单个塘中不同站位养殖水混合后,取200 ml水样过滤(0.22 μm, 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℃冻存备用。

1.2 理化分析

按照《海洋监测规范》原位测定养殖水体的水温、溶解氧、盐度、pH和透明度,实验室内测定过滤所得水体中的总氮、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)。

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 *Msp* I(TaKaRa)进行酶切,反应体系及条件参考裘琼芬等(2013)。

1.5 克隆/测序和系统发育分析

选取M2养殖塘7月水体样品构建细菌16S rRNA基因克隆文库。采用无荧光标记的引物27f/907r进行PCR扩增,其余PCR条件同上。以凝胶纯化后PCR产物为模板,以pMD-19T Vector(TaKaRa)为载体,4℃过夜连接。连接产物转入到大肠杆菌JM109

感受态细胞中(TaKaRa),并在含X-gal、IPTG的LB培养基上进行蓝白斑筛选。分别筛选82个阳性克隆进行测序,所得测序结果利用ARB软件的NJ算法(Neighbor-Joining)进行系统发育分析。

1.6 数据处理

细菌16S rRNA基因T-RFLP图谱中每一个限制性片段(T-RF)为一个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)。计算细菌的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。

取平行T-RF相对丰度的平均值,在Excel中绘制T-RFLP百分比图,利用Past软件对T-RFLP结果进行主成分分析,结合环境因子,利用CANOCO 4.5软件对各点进行冗余分析,同时利用Past进行细菌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的细菌群落结构分析

用荧光标记细菌16S rRNA基因的通用引物27f/907r扩增目的片段,并进行末端限制性片段多态性分析(图1)。结果显示,养殖过程中,养殖塘水体细菌主要由T-RF 490 bp、439 bp、150 bp、130 bp、94 bp、167 bp、69 bp组成,各个片段相对丰度变化不同。养殖初期,M1和M2水体细菌群落组成明显不同。在放苗的30d(6月),M1水体以69 bp、167 bp和439 bp为主,相对丰度分别为43.5%、31.8%和18.2%;而M2水体6月主要以490 bp为主,相对丰度占60%左右,其次到439 bp,其相对丰度为17%左右。同时,94 bp、130 bp、150 bp、167 bp也占3%–6%左右,但未出现69 bp片段。M1养殖水体细菌群落变化比M2大,出现了490 bp,且相对丰度达46%左右,69 bp和167 bp均略有降低,同时出现少量130 bp片段;M2水体7月较6月而言变化不是很明显,出现了69 bp片段,但丰度仅占4%左右,94 bp片段相对丰度有所升高。两种养殖塘水体8–9月细菌群落结构差异不大,相对丰度较大的片段均为490 bp、94 bp和439 bp。养殖后期(10–12月)两种养殖塘水体均以490 bp、439 bp为主,但二者在M1和M2中的相对

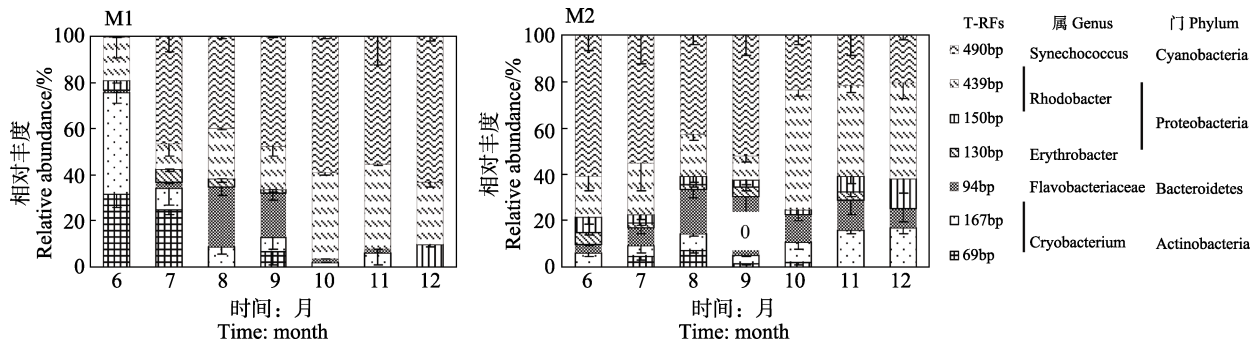


图 1 养殖塘水体细菌 T-RFLP 百分比

Fig.1 T-RFLP patterns of bacterial 16S rRNA genes of aquaculture water

丰度不同。490 bp 在 M1 和 M2 水体的相对丰度分别为 55%–65%和 20%–23%，439 bp 在 M1 和 M2 水体的相对丰度分别为 27%–37%和 40%–50%。养殖过程中各个 T-RF 百分比的变化说明，养殖水体细菌群落组成随时间发生变化，不同养殖塘水体在养殖初期就有不同的细菌群落组成，且不同养殖塘水体细菌群落结构随时间的变化不同。

从细菌 16S rRNA 基因的克隆和系统发育分析结果可知，养殖塘水体细菌群落主要有变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)、蓝藻门(Cyanobacteria)以及浮霉菌门(Planctomycetes)。克隆文库中有 39.0%左右属于蓝藻门，13.4%属于变形菌门，17.1%属于拟杆菌门，20.7%属于放线菌门，2.4%属于浮霉菌门，剩下的为 γ -变形菌纲。在两种养殖塘水体中大量存在的 T-RF 490 bp 所代表的细菌属于蓝藻门、Chroococcales、聚球藻属(*Synechococcus*)，T-RF 439 bp、150 bp、130 bp 所代表的细菌分别属于变形菌门红细菌属(*Rhodobacter*)、*Leisingera*，变形菌门、深海细菌属(*Thalassobacter*)，鞘脂单胞菌科(Sphingomonadaeae)、煮杆菌属(*Erythrobacter*)。T-RF 94 bp 属于拟杆菌门的黄杆菌科。T-RF 167 bp、69 bp 所代表的细菌均属于放线菌门、微杆菌科(Microbacteriaceae)的冷杆菌属(*Cryobacterium*)。

为了进一步比较两种养殖塘水体细菌群落结构的季节性变化，对各个时间点细菌 16S rRNA 基因的 T-RFLP 结果进行主成分分析，结果如图 2 所示。两种养殖塘水体细菌群落结构随季节演替存在一定的规律，从养殖初期到养殖末期，二者的细菌群落演替方向显著不同。M1 养殖塘水体细菌群落结构从放线菌门主导向蓝藻门主导的群落发展，而 M2 养殖塘水体细菌群落结构从蓝藻门主导的群落结构向变形纲门主导的群落发展。8、9 月时二者细菌群落组成重叠在一起，群落结构较为相似。从各个点在主轴上的分散程度可以看出，整个养殖过程中 M1 养殖塘水体

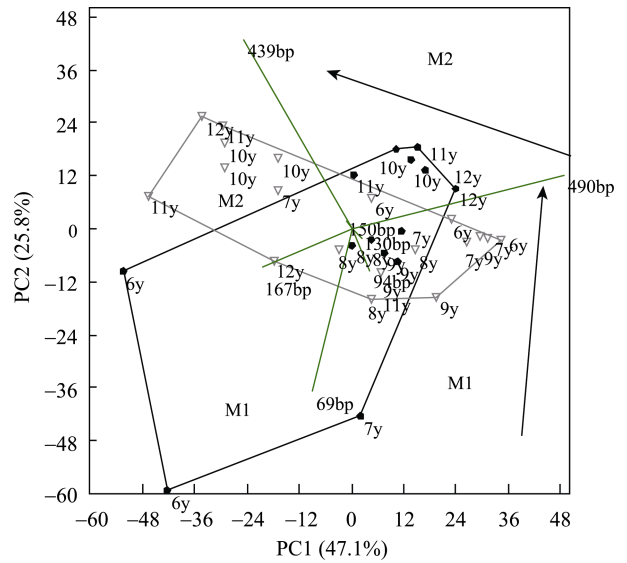


图 2 细菌 16S rRNA 基因 T-RFLP 的主成分分析

Fig.2 Principal component analysis for the bacterial 16S rRNA gene T-RFLP

细菌组成分布比 M2 广，说明从 6–12 月 M1 养殖塘水体细菌群落结构差异性大于 M2。

2.2 基于 T-RFLP 的细菌多样性分析

基于细菌 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 各个月份养殖水体中细菌的 Shannon 多样性指数 H' 以及均匀度指数 E' (表 1)。结果显示，M1 和 M2 水体细菌群落多样性 8 月最大。M1 养殖水体细菌群落多样性在养殖前期(6–9 月)大于养殖后期(10–12 月)，而 M2 水体细菌群落多样性在养殖初期(6–7 月)最小。M1 与 M2 二者相比较，养殖初期(6–7 月)和养殖中期(8–9 月)相差不是很明显，而到了养殖后期(10–12 月)，M2 养殖水体细菌多样性明显大于 M1。

2.3 细菌分布与环境因子的关系

为了研究环境因子对细菌群落结构变化的影响，

表1 基于 T-RFLP 图谱的细菌多样性分析

(Mean±SE, n=3)

Tab.1 Analysis of bacteria diversity based on T-RFLP profiles (Mean±SE, n=3)

时间(月) Time(Month)	Shannon 多样性指数 H'		均匀度指数 E'	
	Shannon Diversity index H'		Evenness index E'	
	M1	M2	M1	M2
6	0.96±0.01	1.18±0.09	0.64±0.04	0.66±0.06
7	1.15±0.05	1.05±0.13	0.68±0.07	0.65±0.15
8	1.37±0.06	1.49±0.11	0.85±0.05	0.83±0.06
9	1.29±0.02	1.26±0.11	0.86±0.04	0.71±0.05
10	0.83±0.01	1.23±0.03	0.60±0.01	0.81±0.04
11	0.87±0.05	1.26±0.07	0.87±0.08	0.75±0.02
12	0.86±0.01	1.33±0.21	0.79±0.01	0.88±0.11

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), 结果显示, 选取的 9 个环境因子对 M1、M2 养殖塘水体各时间点细菌分布的解释量分别为 58.4%和 39.1%, 其中主轴 RDA1 解释量分别为 33.2%和 25.2%, 说明所选取的环境因子对 M1 水体细菌分布的影响程度大于 M2 养殖水体。对于 M1 养殖水体, 总氮、pH、透明度、盐度、总磷、氨氮对 7-9 月细菌分布影响较大; 溶解氧、温度对 10-12 月细菌分布的影响较大, 同时亚硝酸氮对 10-11 月细菌分布的影响也较明显; 环境因子对 6 月细菌分布的影响较小, 不是很集中。对于养殖塘 M2, 6、8、9、10、11 月主要受亚硝酸氮、总磷影响; 12 月和 7 月主要受总氮、pH、透明度、DO、温度、氨氮以及盐度的影响, 但是影响效应不是很集中。从 RDA 分析可以看出, 各

个环境因子对不同养殖塘水体细菌群落动态变化的影响不同。

从各个 T-RF 与环境因子的相关性分析(表 2)可以得出, 相同的 T-RF 片段, 在不同养殖塘水体中, 受到环境因子的影响不同。放线菌门细菌在土塘(M2)中受环境的影响较大, 相对丰度随温度和透明度的降低而增加; 而在改良塘(M1)养殖塘中仅受透明度的影响较大, 但透明度高时相对丰度较大。拟杆菌门细菌在 M1 养殖环境中受环境影响较大, 温度、pH、透明度、总氮较高时, 抑制其生长, 而高氨氮促进其生长; 但在 M2 养殖塘中, 仅受 pH 的影响较为显著, 在 pH 较低时含量较高。放线菌门的各个科受环境的影响有差异, 在 M1 中, 深海细菌属(*Thalassobacter*)(150 bp)和赤杆菌属(*Erythrobacter*)(130 bp)受环境影响较大, 而在 M2 中, 红细菌属(*Leisingera*)(439 bp)受环境影响较大。在 M1 水体中, 随温度和透明度降低, 蓝藻门细菌含量增多, 总磷、溶解氧对其的影响与温度相反, 而在 M2 中, 蓝藻门细菌随温度升高含量增多, 溶解氧、透明度、总氮、总磷较低时, 含量较大。相关性分析表明, 同种菌种在不同的生态系统中受到环境的影响不同。

3 讨论

结合 T-RFLP 与克隆测序结果显示, 养殖过程中两种养殖塘水体细菌群落主要由变形菌门、拟杆菌门、放线菌门、蓝藻门组成, 这些都是水体中普遍存在的细菌(Warnecke *et al*, 2004; Kirchman, 2002)。多数研究表明, 水体微生物群落结构具有高度时空动态

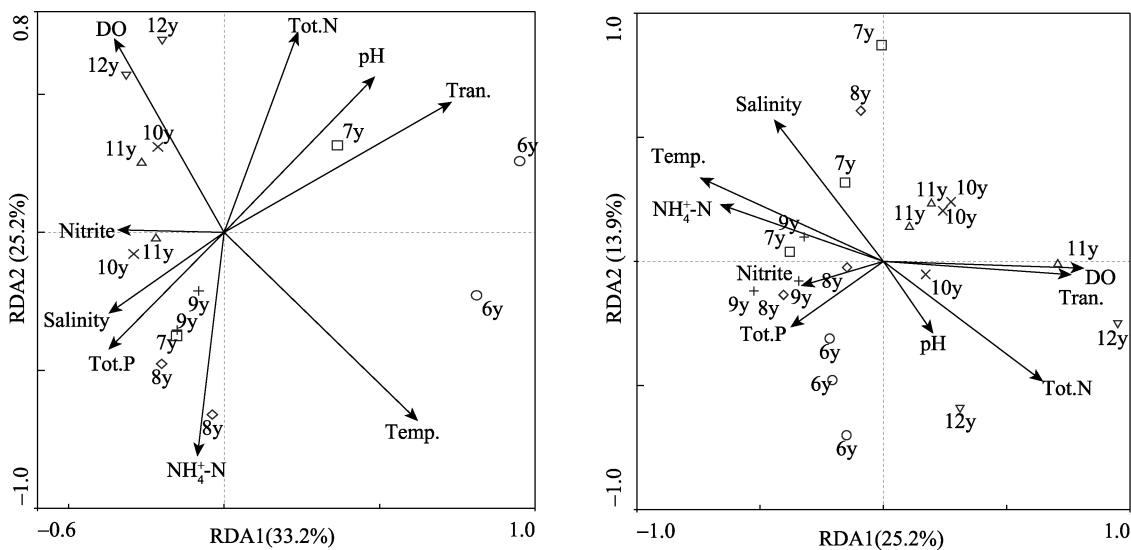


图3 不同时间养殖塘水体细菌群落结构与环境因子的冗余分析

Fig.3 Redundancy analysis for bacteria community compositions and environmental factors of aquaculture water during different period

表 2 细菌 16S rRNA 基因与环境相关性以及线性回归分析

Tab.2 Correlation and linear regression analysis of bacterial 16S rRNA gene and environmental factors

		69 bp		167 bp		94 bp		130 bp		150 bp		439 bp		490 bp	
		M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
Temperature	r	0.421	0.321	0.493	-0.495	0.419	0.027	0.549	0.261	-0.479	-0.399	-0.623	-0.550	-0.681	0.733
	P	0.133	0.167	0.073	0.0263	0.134	0.907	0.042	0.266	0.082	0.081	0.017	0.012	0.007	<0.001
DO	r	-0.183	-0.221	-0.269	0.255	-0.755	-0.392	-0.095	-0.396	0.494	0.320	0.267	0.622	0.561	-0.479
	P	0.531	0.348	0.351	0.277	0.001	0.087	0.745	0.083	0.072	0.168	0.355	0.003	0.037	0.032
Salinity	r	0.016	0.365	-0.409	-0.243	0.272	0.300	0.608	-0.065	-0.519	-0.323	-0.354	-0.256	0.390	0.194
	P	0.957	0.114	0.145	0.301	0.347	0.198	0.021	0.786	0.057	0.164	0.214	0.276	0.167	0.413
pH	r	0.331	-0.183	0.303	-0.018	-0.529	-0.486	-0.100	-0.069	0.765	0.284	-0.316	-0.002	-0.269	0.262
	P	0.248	0.439	0.293	0.941	0.052	0.029	0.732	0.771	0.001	0.224	0.271	0.991	0.351	0.265
Tran.	r	0.360	-0.128	0.613	-0.539	-0.537	-0.276	-0.374	-0.448	0.704	0.076	-0.128	0.606	-0.603	-0.610
	P	0.207	0.589	0.019	0.014	0.047	0.237	0.187	0.047	0.004	0.749	0.661	0.004	0.022	0.004
Tot.N	r	0.001	-0.405	0.272	0.683	-0.719	-0.119	-0.699	-0.235	0.733	0.418	0.377	0.357	-0.112	-0.562
	P	0.998	0.007	0.346	<0.001	0.003	0.615	0.005	0.319	0.002	0.066	0.183	0.122	0.702	0.009
Tot.P	r	-0.290	-0.186	-0.236	-0.189	0.307	0.051	0.025	0.148	0.557	-0.162	0.364	0.462	0.532	-0.576
	P	0.314	0.433	0.415	0.423	0.286	0.831	0.932	0.531	0.038	0.494	0.200	0.040	0.025	0.008
NH ₄ ⁺ -N	r	-0.137	0.382	0.001	-0.275	0.965	0.390	0.409	0.225	-0.414	-0.188	-0.326	-0.534	-0.145	0.355
	P	0.640	0.096	0.996	0.240	<0.001	0.089	0.146	0.341	0.141	0.428	0.255	0.015	0.621	0.123
NO ₂ ⁻ -N	r	-0.331	-0.231	-0.159	-0.089	-0.080	0.335	-0.403	0.171	-0.334	-0.193	0.641	-0.207	0.267	0.135
	P	0.247	0.327	0.586	0.706	0.784	0.147	0.153	0.469	0.242	0.416	0.013	0.382	0.355	0.571

注: 黑体表示显著相关($P<0.05$) Note: Bold means significant correlation ($P<0.05$)

性(Gilbert *et al*, 2009; Or *et al*, 2012; Teeling *et al*, 2012)。微生物群落结构的变化与生态功能的改变有关, 研究表明, 微生物群落结构发生重大变化可能大幅度改变其生态功能(Xiong *et al*, 2010; Comte *et al*, 2011)。细菌群落组成与养殖对象的病变密切相关, 细菌群落组成在健康环境中与非健康环境中明显不同(Lucas *et al*, 2010; Boutin *et al*, 2013; Zhang *et al*, 2014)。微生物调节系统对养殖生物体的健康十分重要, 浮游细菌群落骤然变化可能导致养殖对象病变暴发(Beardsley *et al*, 2011)。从两种养殖塘水体细菌群落结构的变化来看, 改良塘水体细菌群落结构变化幅度大于传统塘, 从微生物学角度预示着改良塘水体生态功能稳定性小于传统塘, 同时改良塘细菌群落骤然变化可能对养殖生物带来不利影响。

养殖过程中变化较为显著的有拟杆菌门、黄杆菌科(Flavobacteriaceae)和变形菌门、红细菌属、聚球藻属。两种养殖水体黄杆菌科相对丰度在高温天气时(8、9月)迅猛增多, 且在改良塘中变化幅度大于传统塘。黄杆菌科是异养生物, 专门降解复杂有机物, 为其他类群生物提供可利用底物(Teeling *et al*, 2012; Williams *et al*, 2013)。有研究表明, 黄杆菌科的大量减少导致有机物累积, 使微生物循环失衡(Abell *et al*, 2005)。

由此可见, 改良塘水体微生物循环平衡性小于传统塘。红细菌属是能够产生病毒样元件的微生物(Lang *et al*, 2007), 红细菌属与养殖对象的健康密切相关, 病原体如红细菌属能导致养殖生物体的大量死亡(Zhang *et al*, 2014)。养殖过程中, 两种养殖塘水体的红细菌属逐渐增多, 并与总磷呈正相关。Zhang 等(2014)研究表明, 病害塘与健康塘水体细菌群落的变化主要是由病害塘水体总磷以及化学需氧量(COD)显著升高引起。因此, 从红细菌属的变化来看, 到了养殖后期, 水体环境越来越不利于养殖对象的生长。蓝藻是与水质变化密切相关的一种细菌(王云波等, 2008), 蓝藻的大量繁殖会导致养殖水体水质恶化(姚延丹等, 2011)。从蓝藻细菌的变化来看, 改良塘水质逐渐变差, 而传统塘水质较养殖初期有改善。多样性指数是评价微生物群落多样性的有效方法(Stam *et al*, 2010)。两种养殖塘水体细菌群落多样性均在 8 月最大, RDA 分析发现, 8 月的细菌分布受氨氮显著影响。氨氮作为微生物可利用的有效氮素之一(Schimel, 2000), 8 月水体中较高浓度氨氮为细菌的生长提供有利条件。多样性指数的变化与水体环境的变化有关, 当群落结构从多样性指数较高的稳定结构向多样性指数较低的不稳定结构转变, 对应的环境变得相对脆弱, 增大养

殖病害暴发的几率(裘琼芬等, 2013)。从多样性指数的变化来看, 传统塘养殖环境的稳定性大于改良塘。

两种养殖塘水体细菌群落结构变化的不同可能与养殖塘底质有关。传统土塘土壤中本身含有氮等无机盐, 溶于水后增加了池塘水的肥力, 同时土壤中的有机物质经过微生物分解后溶于水变成了简单的无机盐等, 也能增加水体的肥力, 这为养殖初期蓝藻生长提供了良好的条件。而在改良塘中, 底铺网四周铺砂改良措施减少了土壤与水体接触的面积, 土壤中的有机物质等不能溶于水, 养殖初期时水体氮、磷等营养元素以及有机质含量相对较低, 不利于蓝藻门细菌的生长, 水体主要优势菌为放线菌。但随着时间的推移, 底泥的厚度不断增加, 养殖塘水体肥力不断增加(贾晓燕, 2006), 为蓝藻门细菌的生长提供了有利条件。而在传统土塘中, 随着养殖时间推移, 淤泥与土壤中的粘土矿粒结合在一起, 对水体中的一些离子状物质发生吸附作用, 并能与其他离子代谢达到动态平衡, 再加上养殖后期饵料投入的减少以及养殖生物体的减少, 使得水体中总磷含量下降, 这可能是土塘养殖后期水体蓝藻门细菌含量减少的原因。两种养殖塘泥土界面的差异也可能是群落变化差异的主要原因。泥水界面层是营养物质再生以及有机物矿化的重要场所(Hargreaves, 1997), 底铺网四周铺砂改良减少了泥水界面层的面积, 可能导致营养物质再生能力比传统土塘弱, 这可能是细菌群落结构的影响因素之一。养殖对象对底泥扰动的差异也可能导致两种养殖塘水体细菌群落结构的差异。底泥的扰动影响有效态磷的转化过程(李大鹏等, 2010), 氮、磷等营养盐是影响微生物群落结构的重要因素。底铺网四周铺砂改良措施减少了养殖对象对底泥的扰动, 同时也可能造成两种养殖塘氮、磷等营养盐物质循环的差异, 因而有可能导致这两种养殖塘水体细菌群落结构变化不同。综上所述, 三疣梭子蟹养殖塘水体浮游细菌群落结构随季节发生变化, 且在不同养殖塘水体变化明显不同。外界环境如温度、季节的变化等对传统土塘细菌群落的影响较小, 对改良塘细菌群落影响较大。

参 考 文 献

王云波, 谭万春. 水源蓝藻暴发的原因分析及水质安全保障措施. 中国农村水利水电, 2008(5): 37-40
 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
 姚延丹, 李谷, 陶玲, 等. 复合池塘循环水养殖系统微生物群落结构分析. 中国水产科学, 2011, 18(2): 407-415
 贾晓燕. 养殖池塘底质改良措施. 农家顾问, 2006 (7): 51-53
 裘琼芬, 张德民, 叶仙森, 等. 象山港网箱养殖对近海沉积物

细菌群落的影响. 生态学报, 2013, 33(2): 483-491
 Abell GJ, Bowman JP. Ecological and biogeographic relationships of class Flavobacteria in the Southern Ocean. FEMS Microbiol Ecol, 2005, 51, 265-277
 Beardsley C, Moss S, Malfatti F, *et al.* Quantitative role of shrimp fecal bacteria in organic matter fluxes in a recirculating shrimp aquaculture system. FEMS Microbiol Ecol, 2011, 77(1): 134-145
 Berry D, Schwab C, Milinovich G, *et al.* Phylotypelevel 16S rRNA analysis reveals new bacterial indicators of health state in acute murine colitis. ISME J, 2012, 6: 2091-2106
 Bore SI, Hedtkamp SIC, van Beusekom JEE, *et al.* Time and sediment depth-related variations in bacterial diversity and community structure in subtidal sands. ISME J, 2009, 3: 780-791
 Boutin S, Bernatchez L, Audet C, *et al.* Network analysis highlights complex interactions between pathogen, host and commensal microbiota. PLoS One, 2013, 8: e84772
 Chytrý M, Tichý L, Holt J, *et al.* Determination of diagnostic species with statistical fidelity measures. J Ve Sci, 2002, 13: 79-90
 Comte J, del Giorgio P A. Composition influences the pathway but not the outcome of the metabolic response of bacterioplankton to resource shifts. PLoS ONE, 2011, 6, e25266
 Cotner JB, Biddanda BA. Small players, large role: microbial influence on biogeochemical processes in pelagic aquatic ecosystems. Ecosystems, 2002, 5(2): 105-121
 Dang H, Zhang X, Sun J, *et al.* Diversity and spatial distribution of sediment ammonia-oxidizing crenarchaeota in response to estuarine and environmental gradients in the Changjiang Estuary and East China Sea. Microbiology, 2008, 154, 2084-2095
 Defoirdt T, Sorgeloos P, Bossier P. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. Curr Opin Microbiol, 2011, 14(3): 251-258
 Fortunato CS, Eiler A, Herfort L, *et al.* Determining indicator taxa across spatial and seasonal gradients in the Columbia River coastal margin. ISME J, 2013, 7: 1899-1911
 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: 3132-3139
 Kirchman DL. The ecology of Cytophaga-Flavobacteria in aquatic environments. FEMS Microbiol Ecol, 2002, 39(2): 91-100
 Lang AS, Beatty JT. Importance of widespread gene transfer agent genes in alpha-proteobacteria. Trends Microbiol, 2007, 15, 54-62
 Lucas R, Courties C, Herbland A, *et al.* Eutrophication in a tropical pond: Understanding the bacterioplankton and phytoplankton dynamics during a vibriosis outbreak using flow cytometric analyses. Aquaculture, 2010, 310(1-2): 112-121
 Ma Z, Song X, Wan R, *et al.* A modified water quality index for intensive shrimp ponds of *Litopenaeus vannamei*. Ecol Indic, 2013, 24: 287-293

- 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. *Sci Rep*, 2012, 2: 207
- Schimel J. Global change: rice, microbes and methane. *Nature*, 2000, 403(6768): 375–377
- Stam MC, Mason PRD, Pallud C, *et al.* Sulfate reducing activity and sulfur isotope fractionation by natural microbial communities in sediments of a hypersaline soda lake (Mono Lake, California). *Chem Geol*, 2010, 278(1/2): 23–30
- Sugiura SH, Marchant DD, Wiggins T, *et al.* Effluent profile of commercially used low-phosphorus fish feeds. *Environ Pollut*, 2006, 140(1): 95–101
- Teeling H, Fuchs BM, Becher D, *et al.* Substrate-controlled succession of marine bacterioplankton populations induced by a phytoplankton bloom. *Science*, 2012, 336: 608–611
- Warnecke F, Amann R, Pernthaler J. Actinobacterial 16S rRNA genes from freshwater habitats cluster in four distinct lineages. *Environ Microbiol*, 2004, 6(3): 242–253
- Williams TJ, Wilkins D, Long E, *et al.* The role of planktonic Flavobacteria in processing algal organic matter in coastal East Antarctica revealed using metagenomics and metaproteomics. *Environ Microbiol*, 2013, 15: 1302–1317
- 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: 7277–7284
- Xiong J, Ye X, Wang K, *et al.* The Biogeography of the sediment bacterial community responds to a nitrogen pollution gradient in the East China Sea. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80: 1919–1925
- Yeo SK, Huggett MJ, Eiler A, *et al.* Coastal bacterioplankton community dynamics in response to a natural disturbance. *PLoS ONE*, 2013, 8, e56207
- Zhang D, Wang X, Xiong J, *et al.* Bacterioplankton assemblages as biological indicators of shrimp health status. *Ecol Indic*, 2014, 38: 218–224

(编辑 江润林)

The Seasonal Variations of Bacterioplankton in Two Types of Ponds of *Portunus trituberculatus*

CHEN Yifei, WEI Meng, QIU Qiongfeng^①, JIANG Xiamin, WANG Chunlin

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

Abstract The dynamic changes and diversity of bacterial communities in two types of ponds (M1: pond with sand around and netted bottom, M2: traditional soil pond) of *Portunus trituberculatus-exopalaemon carinicauda* polyculture in different seasons were investigated by the technology of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis based on bacterial 16S ribosomal RNA gene and cloning. The results showed that the bacterial communities in both M1 and M2 consisted of Proteobacteria, Bacteroidete, Actinobacteria, and Cyanobacteria. The composition of bacteria community changed dramatically with breeding time with various compositions in different ponds. The bacterial community in M1 is composed of Actinomycetes, Cyanobacterium and Proteobacteria, while the bacterial community in M2 included Cyanobacterium and proteobacteria, indicating that M1 was conducive to the growth of Cyanobacteria. The highest relative abundances of Bacteroidetes were in August and September in both M1 and M2, and M2 always has higher relative abundances of Bacteroidetes than M1 during the whole farming time. The bacterial community of M1 pond changed from high diversity index and stability structure to low diversity index and instability structure over breeding time, while bacterial community of M2 pond remained high diversity index in the late breeding time. PCA analysis showed that the seasonal variations of bacterioplankton were much more obvious in M1 than M2, indicating the greater ability of M2 to resist environmental change than M1. Correlation analysis results indicated that environmental factors have different effects on bacteria community of each pond water.

Key words *Portunus trituberculatus*; Aquacultural water; Bacteria community; T-RFLP

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