



## 暗纹东方鲀不同养殖模式下的微生物群落结构

邱楚雯, 施永海\*, 王韩信

(上海市水产研究所, 上海市水产技术推广站, 上海 200433)

**摘要:** 为探究暗纹东方鲀不同养殖模式下环境及肠道的细菌群落结构特征, 实验采用 Illumina Miseq 高通量测序方法对传统养殖与立体种养 2 种模式下水体、底泥及暗纹东方鲀肠道细菌的 16S *rRNA* 的 2 个高变区 (V3~V4) 进行测序分析, 利用冗余分析 (redundancy analysis, RDA) 方法来分析水体菌群与环境因子的关系, 使用典型关联分析 (canonical correlation analysis, CCA) 方法分析肠道菌群与环境因子的关系。结果显示, 立体种养模式下水体、底泥及暗纹东方鲀肠道细菌群落的多样性大于传统养殖模式。立体种养模式下水体及底泥的细菌群落结构与传统养殖模式的较为类似, 其中水体的优势菌门为放线菌门、蓝细菌门、变形菌门和拟杆菌门; 底泥的优势菌门为变形菌门和拟杆菌门。传统养殖模式下, 肠道的主要优势菌属为红球菌属, 立体种养模式下肠道主要优势菌属为葡萄球菌属、弓形杆菌属、*norank\_f\_norank\_o\_Chloroplast*、*Elizabethkingia* 和支原体属。环境因子关联分析结果显示, pH 对水体细菌群落结构具有显著影响。不同养殖模式下水体的优势菌属红球菌属与总悬浮固体 (TSS)、总磷 (TP)、总氮 (TN)、pH 和硝酸盐呈正相关。总氨氮 (TAN) 对暗纹东方鲀肠道细菌群落结构影响最大, 暗纹东方鲀肠道的优势菌属红球菌属、弓形杆菌属与 TSS、TP 呈正相关; 不动杆菌属和支原体属与 TAN、亚硝酸盐及硝酸盐呈正相关; 魏斯氏菌属和葡萄球菌属与 TSS、COD、TP、TN、硝酸盐、亚硝酸盐及 TAN 呈负相关。研究表明, 采用立体种养模式可提高养殖系统的细菌多样性, 降低病害暴发风险, 有助于抑制蓝细菌生长, 减小养殖对象的氧化应激损伤。此外, 养殖模式能够通过改变水体中氮、磷的含量对水体和暗纹东方鲀肠道的微生物群结构产生一定的影响。

**关键词:** 暗纹东方鲀; 传统养殖; 立体种养; 水体; 底泥; 肠道; 菌群结构; 高通量测序

**中图分类号:** Q 938.8; S 917.1

**文献标志码:** A

暗纹东方鲀 (*Takifugu obscurus*) 是一种富含蛋白质和必需氨基酸的海淡水鱼类, 其味道鲜美且具有较高营养价值, 深受消费者喜爱, 具有很高的经济价值。随着暗纹东方鲀市场的开放, 暗纹东方鲀养殖业不断发展。然而, 传统水产养殖模式存在养殖密度过高、水体污染速

率超过水体的自净能力以及病害频发等问题。发展绿色水产养殖是渔业产业可持续发展的必然方向。

立体种养模式是将植物水培与水产养殖结合的一种绿色养殖模式。立体种养模式中的水培植物可以有效地降解水中氮磷等有机物, 减

收稿日期: 2020-02-27 修回日期: 2020-06-20

资助项目: 上海市科技兴农重点攻关项目 (G20180208); 上海长江口主要经济水生动物人工繁育工程技术研究中心 (13DZ2251800); 上海市农业领军人才项目 (G201860)

第一作者: 邱楚雯 (照片), 从事水产动物养殖、繁育以及微生物方面研究, E-mail: nanqichuwen.05@163.com

通信作者: 施永海, E-mail: yonghais@163.com



少废水对水域环境的影响,促进生态系统平衡<sup>[1-2]</sup>。微生物在水产养殖生态系统中同样发挥重要作用,如污染物降解、氮磷循环和水体净化等<sup>[3-4]</sup>。水体和底泥中微生物是水域生态系统的重要组成部分,其微生物群落组成与水质状况关系紧密<sup>[5]</sup>。此外,由于水产动物生活于水中且消化道短,其消化道中的菌群分布易受环境的影响,水质的变化也会影响到水产动物的肠道<sup>[6-7]</sup>。因此,认识水体、底泥和水产动物肠道中微生物的群落组成,对了解养殖水体的生态环境、有针对性地选择养殖模式具有重要意义。

本实验设置传统养殖和立体种养2种养殖模式。采用Illumina MiSeq平台对暗纹东方鲀不同养殖模式下的水体、底泥和肠道微生物的16S *rRNA* V3~V4区进行高通量测序,比较分析微生物群落组成及其与环境因子的相互作用,以期今后优化养殖模式提供有参考价值的数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 养殖管理及样品采集

于2019年4月,在上海市水产研究所奉贤科研基地池塘进行不同养殖模式实验。实验分为传统单养模式组(S组)和立体种养模式组(M组)2个组,每组3个池塘,每个池塘养殖面积为1667 m<sup>2</sup>。传统养殖模式仅投放暗纹东方鲀,立体种养模式为鲀—虾—菜的立体模式。传统单养模式:暗纹东方鲀放养规格约为150 g,放养密度1.5尾/m<sup>2</sup>;立体种养模式:暗纹东方鲀放养规格约为150 g,放养密度1.2尾/m<sup>2</sup>;凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)放养规格为0.6~1.0 cm,放养密度为17.1尾/m<sup>2</sup>;每塘莼菜(*Lpomoea aquatica*)栽种量为12 kg,养殖周期为5个月。暗纹东方鲀养殖期间所用饲料为鳗粉状配合饲料,购自江苏常熟市泉兴营养添加剂有限公司,加工成团块状,现做现投。每天9:30投喂1次,日投饵量为鱼体质量的1%~3%(以每个池塘暗纹东方鲀当天下午15:00摄食完为准)。虾料购自浙江明辉饲料有限公司,一天投喂2次,分别为上午9:00和下午3:00。养殖用水为经过60目筛绢过滤的内河水,养殖实验过程中每2周换水1次,每次换水1/3。每个池塘具有独立进排水设施,并均装配1台1.5 kW的叶轮增氧机。实验期间水温28.1~32.6 °C, pH7.86~8.09,溶解氧(DO)≥7.26 mg/L。

<https://www.china-fishery.cn>

该实验所用样本于养殖实验末期采集(表1)。采集的样本包括6个养殖池塘的水体(SW1~SW3, MW1~MW3)、底泥(养殖初期ISS1~ISS3, IMS1~IMS3;养殖末期SS1~SS3, MS1~MS3)、暗纹东方鲀肠道内容物(SI1~SI3, MI1~MI3),共24个样品。采样时池塘水温为(27±1) °C, pH为8.14±0.17,每个池塘均采用5点采样法采集水体和底泥样品。利用采水器采集离水面50 cm处的水样,用装有0.22 μm微孔滤膜的真空抽滤装置进行抽滤,取出滤膜于灭菌离心管中,-80 °C保存待测。利用柱状采泥器采集1~5 cm的池塘表层底泥(100 mL),混合后置于灭菌离心管中,-80 °C保存待用。肠道内容物样品的采集即从每个鱼塘中随机采集5尾暗纹东方鲀,传统养殖模式下鱼体长(18.53±0.97) cm,体质量为(260.32±39.43) g;立体种养模式下鱼体长(17.59±1.28) cm,体质量为(246.94±40.08) g。在无菌状态下取出整个肠道,将肠道内容物挤出,并使用少量磷酸盐缓冲溶液(PBS)冲洗肠道内壁,收集肠道内容物样品于无菌离心管中,5尾鱼的肠道内容物混匀成一个样品。

表1 暗纹东方鲀不同养殖模式下水体、底泥及肠道的采样信息

Tab. 1 Sample information of water, sediment and intestine in different cultural patterns of *T. obscurus*

样品 samples	缩写 ID	采样日期 date of collection
水体 water	SW, MW	2019-09-10
初期底泥 initial sediment	ISS, IMS	2019-05-24
末期底泥 end sediment	SS, MS	2019-09-16
鲀肠道 <i>T. obscurus</i> intestine	SI, MI	2019-09-10

### 1.2 水质指标测定

2019年9月13日采集水样,测定氨氮(TAN)、亚硝酸盐(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N)、硝酸盐(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N)、化学需氧量(COD)、总氮(TN)及总磷(TP)等水质指标。其中TAN浓度测定采用苯酚—次氯酸盐法;NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N浓度测定采用重氮—偶氮比色法;NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N浓度测定采用锌镉还原—重氮偶氮法;TN浓度测定采用碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法(GB 11894—89);TP浓度测定采用钼酸铵比色法(GB 11893—89);COD采用碱性高锰酸钾法(GB 11914—89)。

### 1.3 免疫酶测定

随机选取5尾暗纹东方鲀的肝脏,保存于

液氮中, 然后 $-80^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中保存, 用于免疫酶活性的测定。肝脏抗氧化酶测定指标包括总超氧化物歧化酶 (total superoxide dismutase T-SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase GSH-PX)、过氧化氢酶 (catalase CAT)。上述指标均采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒, 并严格按试剂盒的具体要求操作。

#### 1.4 DNA 抽提和 PCR 扩增

根据 DNA 提取试剂盒 (FastDNA<sup>®</sup>SPIN Kit) (MP Biomedicals, 美国) 说明书进行总 DNA 抽提, DNA 浓度和纯度利用 NanoDrop 2000 进行检测, 利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量; 采用 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 引物对细菌 16S *rRNA* V3~V4 可变区进行 PCR 扩增, 扩增程序:  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 180 s;  $95^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,  $55^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 27 个循环; 最后  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。扩增体系 (20  $\mu\text{L}$ ): 5 $\times$ FastPfu 缓冲液 4  $\mu\text{L}$ , 2.5 mmol/L dNTPs 2  $\mu\text{L}$ , 引物 338F/806R 各 0.8  $\mu\text{L}$ , FastPfu 聚合酶 0.4  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 10 ng, 补足 dd H<sub>2</sub>O 至 20  $\mu\text{L}$ 。

#### 1.5 Illumina MiSeq 测序

使用 2% 琼脂糖凝胶回收 PCR 产物, 利用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒 (Axygen, 美国) 进行纯化。利用 QuantiFluor<sup>™</sup>-ST (Promega, 美国) 进行检测定量。根据 Illumina MiSeq 平台标准操作规程将扩增片段构建测序文库后, 利用 Illumina 公司的 MiSeq PE300 平台进行高通量测序 (上海美吉生物医药科技有限公司)。

#### 1.6 数据分析

原始测序序列使用 Trimmomatic 软件质控, 使用 FLASH 软件进行拼接; 具体方法: (1) 使用 UPARSE(version 7.1 <http://drive5.com/uparse/>) 软件对数据进行处理, 根据 97% 相似度水平对序列进行操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU) 聚类, 对物种进行注释与评估; 利用 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, 比对 Silva 数据库在不同分类学水平上统计各样本的群落组成; 利用 Mothur 软件计算 Alpha 多样性指数; 运用统计学 *t* 检验的方法, 进行样本指数的显著性差异分析; (2) 物

种组成分析, 利用 R 语言工具制作物种组成分析的群落饼图、Venn 图以及群落柱形图; (3) 采用 CANOCO 5.0 软件对环境因子与水体、肠道微生物群落组成变化相关性分别进行冗余分析 (redundancy analysis, RDA)、典型关联分析 (canonical correlation analysis, CCA) 及 499 次非限制性蒙特卡罗检验法验证计算结果显著性。

## 2 结果

### 2.1 16S *rRNA* 测序的特点

高通量测序结果显示, 8 组 24 个样本平均序列数为 66 377 条。97% 相似度水平下 OTUs 数为 9 106 个。不同样本的 OTUs 数为 191~4 013 个; 有关群落丰富度的 Ace 指数为 367.40~5 687.54, Chao 指数为 347.42~5 474.29; 有关群落多样性的 Shannon 指数为 0.66~6.56, Simpson 指数为 0.01~0.79, 样本中物种覆盖度大于 95.94%(从 95.94%~99.86%)(表 2), 表明本次测序基本代表了样本中微生物的真实情况。

从整体上看, 样本中细菌群落的多样性排序为底泥>水体>肠道。不同阶段底泥的细菌群落丰富度和多样性十分接近。后期底泥细菌的多样性略高于初期底泥。立体种养模式下水体、底泥及暗纹东方鲀肠道细菌群落的多样性大于传统养殖模式。

### 2.2 基于门水平的细菌群落结构

不同养殖模式下整体微生物群落中的细菌分布于 61 个门, 其中 11 个门的丰度>1%。按占 10% 以上为优势菌门统计, 传统养殖模式的优势菌门为放线菌门 (Actinobacteria, 36.64%) 和变形菌门 (Proteobacteria, 26.89%); 立体种养模式的优势菌门为变形菌门 (27.81%)、放线菌门 (12.20%)、拟杆菌门 (Bacteroidetes, 11.65%) 和厚壁菌门 (Firmicutes, 11.57%)(图 1)。

传统养殖模式下, SW 的优势菌门为放线菌门 (36.45%)、蓝细菌门 (Cyanobacteria, 28.00%)、变形菌门 (17.91%) 和拟杆菌门 (11.10%); ISS 组优势菌门为变形菌门 (51.00%) 和拟杆菌门 (14.73%); SS 组优势菌门为变形菌门 (48.1%) 和拟杆菌门 (11.07%); SI 组优势菌门为放线菌门 (88.78%)。立体种养模式下, MW 组的优势菌门为放线菌门 (36.19%)、变形菌门 (26.38%)、蓝细菌门 (12.23%)



表 2 在 97% 相似度水平上样品中细菌的丰富度和多样性指数

Tab. 2 Richness and diversity indexes relative to bacteria in samples at 97% similarity level

样品 samples	序列 reads	分类单元 OTUs	Ace指数 Ace index	Chao指数 Chao index	Shannon指数 Shannon index	Simpson指数 Simpson index	覆盖度/% coverage
SW	72 975±154 7 <sup>a</sup>	1 073±238 <sup>c</sup>	2 157.48±439.82 <sup>c</sup>	1 737.26±403.96 <sup>c</sup>	3.86±0.81 <sup>c</sup>	0.08±0.04 <sup>c</sup>	99.19±0.24 <sup>b</sup>
MW	72 956±896 <sup>a</sup>	1 266±320 <sup>c</sup>	2 165.04±446.20 <sup>c</sup>	1 843.69±371.82 <sup>c</sup>	4.73±0.29 <sup>b</sup>	0.03±0.01 <sup>c</sup>	99.20±0.08 <sup>b</sup>
ISS	64 588±845 8 <sup>b</sup>	3 270±481 <sup>b</sup>	5 057.31±224.57 <sup>b</sup>	4 730.89±563.57 <sup>b</sup>	6.38±0.18 <sup>a</sup>	0.01±0.00 <sup>c</sup>	96.00±0.29 <sup>d</sup>
SS	66 706±270 1 <sup>ab</sup>	3 907±236 <sup>a</sup>	5 546.13±212.50 <sup>ab</sup>	5 404.81±212.69 <sup>a</sup>	6.52±0.19 <sup>a</sup>	0.01±0.01 <sup>c</sup>	96.45±0.51 <sup>c</sup>
IMS	69 920±310 <sup>ab</sup>	3 613±192 <sup>ab</sup>	5 573.54±275.53 <sup>ab</sup>	5 205.06±143.72 <sup>ab</sup>	6.44±0.10 <sup>a</sup>	0.01±0.00 <sup>c</sup>	95.94±0.15 <sup>d</sup>
MS	72 218±107 3 <sup>ab</sup>	4 013±237 <sup>a</sup>	5 687.54±242.02 <sup>a</sup>	5 474.29±218.50 <sup>a</sup>	6.56±0.26 <sup>a</sup>	0.01±0.00 <sup>c</sup>	96.05±0.25 <sup>cd</sup>
SI	47 310±354 2 <sup>c</sup>	191±123 <sup>d</sup>	367.40±130.54 <sup>c</sup>	347.42±143.46 <sup>d</sup>	0.66±0.47 <sup>c</sup>	0.79±0.20 <sup>a</sup>	99.86±0.07 <sup>a</sup>
MI	64 343±886 4 <sup>b</sup>	512±201 <sup>d</sup>	986.94±271.99 <sup>d</sup>	761.71±200.70 <sup>d</sup>	1.69±0.30 <sup>d</sup>	0.35±0.06 <sup>b</sup>	99.65±0.19 <sup>a</sup>

注: SW、MW. 水体; ISS、SS、IMS和MS. 底泥; SI、MI. 暗纹东方鲀肠道; 同列不同字母表示差异显著 ( $P<0.05$ ); 下同  
Notes: SW, MW stand for water; ISS, SS, IMS and MS stand for sediment; SI, MI stand for *T. obscurus* intestines; values in the same column with different superscripts are significantly different ( $P<0.05$ ); the same below

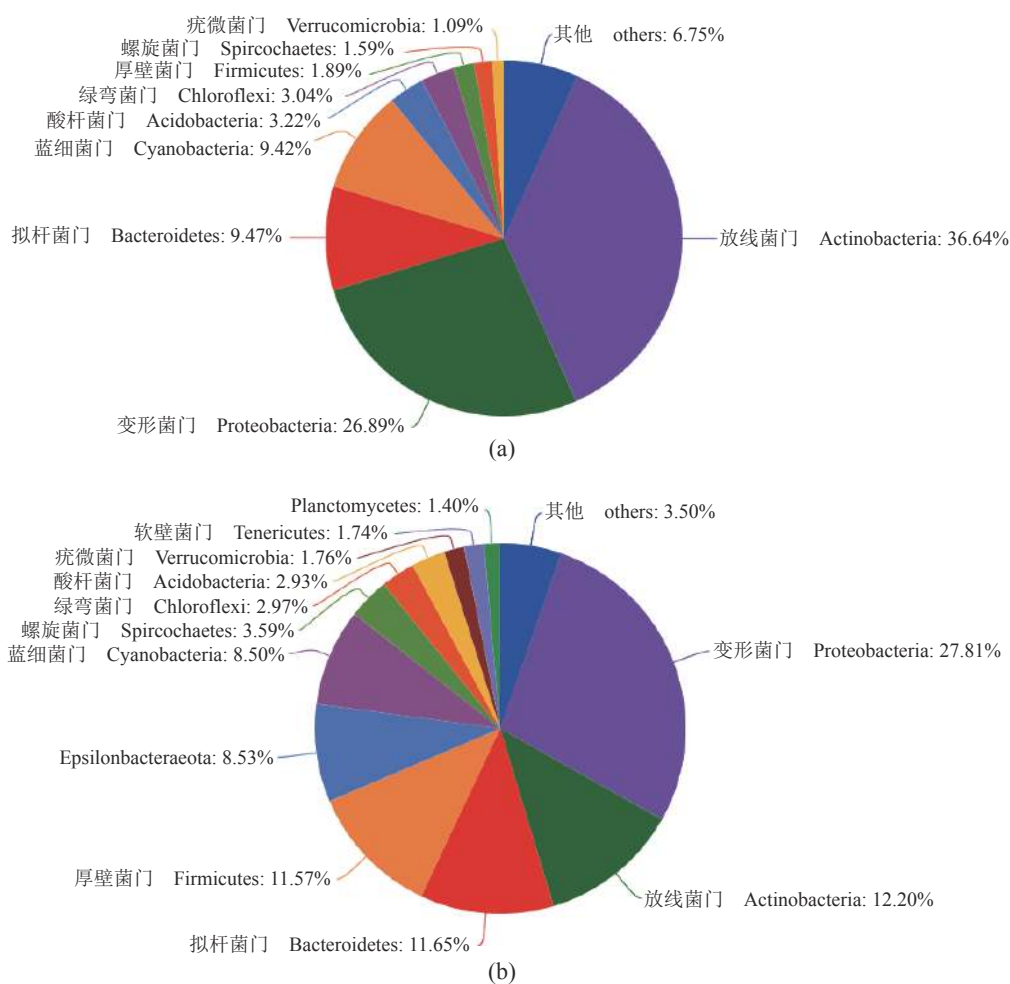


图 1 基于门水平整体细菌群落饼图

(a) 传统养殖模式, (b) 立体种养模式; 下同

Fig. 1 Pie chart of overall bacterial community at phylum level

(a) traditional cultural pattern, (b) three-dimensional cultivation pattern; the same below

和拟杆菌门 (12.06%); IMS 组优势菌门为变形菌门 (51.27%) 和拟杆菌门 (12.98%); MS 组优势菌门为变形菌门 (50.73%) 和拟杆菌门 (12.48%); MI 组优势菌门为厚壁菌门 (32.41%)、Epsilonbacteraota(25.36%)、蓝细菌门 (13.54%) 和拟杆菌门 (10.01%)(图 2)。

通过微生物 16S *rRNA* V3~V4 区测序结果构建 Venn 图, 从而分析不同养殖模式下水体、底泥以及肠道中存在的优势菌群 (图 3)。传统养殖模式下水体、底泥以及肠道的不同样本共有 7908 个细菌 OTUs, 其中有 135 个相同, 有 744 个 OTUs 只存在于 SW 组, 786 个只存在于 ISS 组, 1422 个只存在于 SS 组, 154 个只存在于 SI 组 (图 3-a)。底泥单独富集的细菌菌群数量最多。细菌菌群数量排序依次为 SS>ISS>SW>SI。立体种养模式

下水体、底泥及肠道中共发现 8 508 个细菌 OTUs, 其中有 306 个相同, 有 714 个只存在于 MW 组, 954 个只存在于 IMS 组, 1 296 个只存在于 MS 组, 386 个只存在于 MI 组 (图 3-b)。底泥单独富集的细菌菌群数量最多。细菌菌群数量排序依次为 MS>IMS>MW> MI。

### 2.3 基于属水平的细菌群落结构

不同养殖模式下 8 组样品的细菌分布于 1 464 个属, 其中 12 个属的丰度>1%。在属水平上, 不同样品组的优势细菌 (丰度大于 5% 的细菌) 组成及丰度存在明显不同。传统养殖模式下, SW 组主要优势菌属为 *Planktothricoides\_SR001*(17.00%)、*Candidatus\_Limnoluna*(10.26%)、红球菌属 (*Rhodococcus*, 9.27%)、*Hgcl\_clade*(6.25%) 和 *Microcystis*

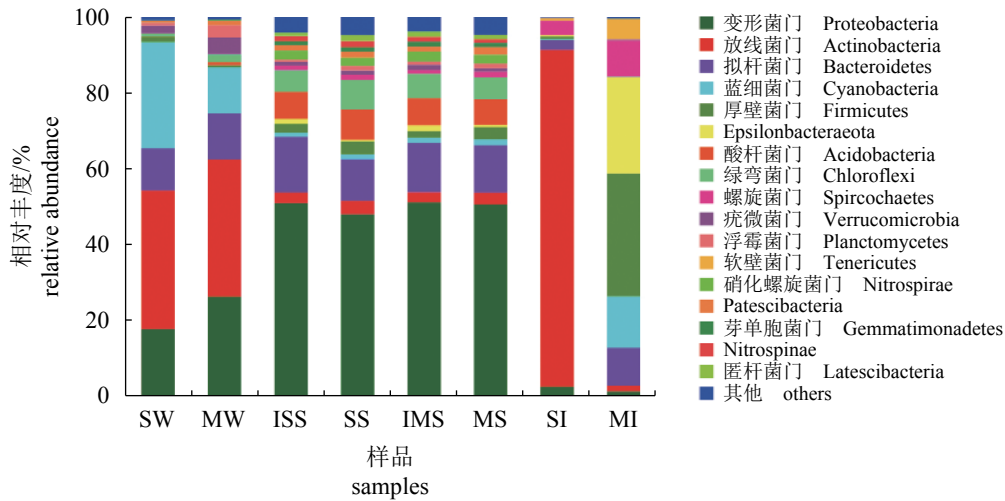


图 2 基于门水平的细菌群落组成

Fig. 2 Microbiota composition at phylum level

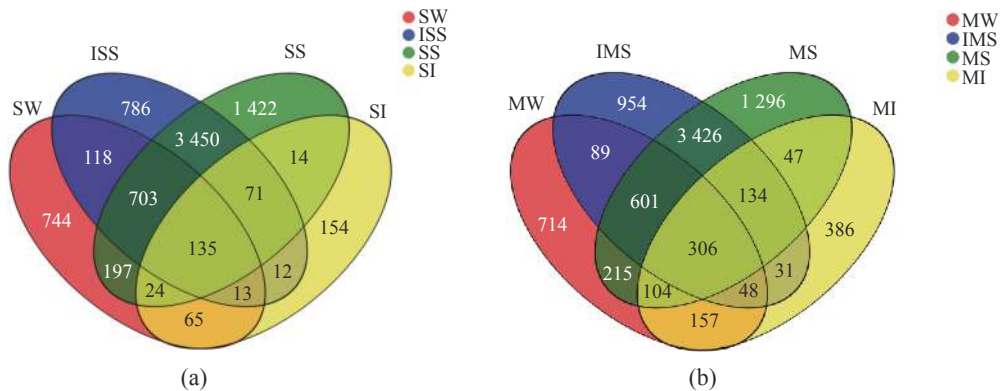


图 3 水体、底泥及肠道微生物 OTU 的维恩图

Fig. 3 Venn diagrams of the OTU of microflora in water, sediment and intestine

PCC-7914(5.05%); ISS 组主要优势菌为硫杆菌属 (*Thiobacillus*, 9.37%) 和 *norank\_f\_Steroidobacteraceae*(5.62%); SS 组主要优势菌为 *norank\_f\_Steroidobacteraceae*(7.25%) 和硫杆菌属 (*Thiobacillus*) (6.30%); SI 组主要优势菌为红球菌属 (88.23%)。立体种养模式下, MW 组主要优势菌为 *Hgcl\_clade* (12.11%)、*CL500-29\_marine\_group*(8.76%)、红球菌属(5.80%)和 *Planktothricoides\_SR001*(6.51%)。IMS 组主要优势菌为硫杆菌属 (9.73%) 和 *norank\_f\_Steroidobacteraceae*(5.88%); MS 组主要优势菌为硫杆菌属 (7.48%) 和 *norank\_f\_Steroidobacteraceae* (7.39%); MI 组主要优势菌为葡萄球菌属 (*Staphylococcus*, 28.93%)、弓形杆菌属 (*Arcobacter*, 25.36%)、*norank\_f\_norank\_o\_Chloroplas*(13.31%) *Elizabethkingia* (8.56%) 和支原体属 (*Mycoplasma*, 5.32%)(图 4)。

### 2.4 环境因子对菌群分布的影响

不同养殖模式下 TAN、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N、COD 和 TP 等水环境因子指标差异不显著 ( $P>0.05$ ) (表 3); 不同养殖模式下暗纹东方鲀肠道的 GSH-PX 有显著差异 ( $P<0.05$ ), T-SOD 和 CAT 差异不显著 ( $P>0.05$ )(表 4)。

不同养殖模式下属水平上的水体细菌群落与环境因子之间的 RDA 结果显示, 横轴能解释的物种变量为 52.1%; 纵轴能解释的物种变量为 34.7%。水体的 pH、TSS 和 COD 对不同养殖模式下水体细菌群落分布的影响较大。蒙特卡罗置换检验结果表明, 环境因子 pH 对水体细菌群落具有显著影响 ( $P<0.05$ )。pH 对群落变异的解释度为 47.3%, 可认为是驱动水体群落变异的主

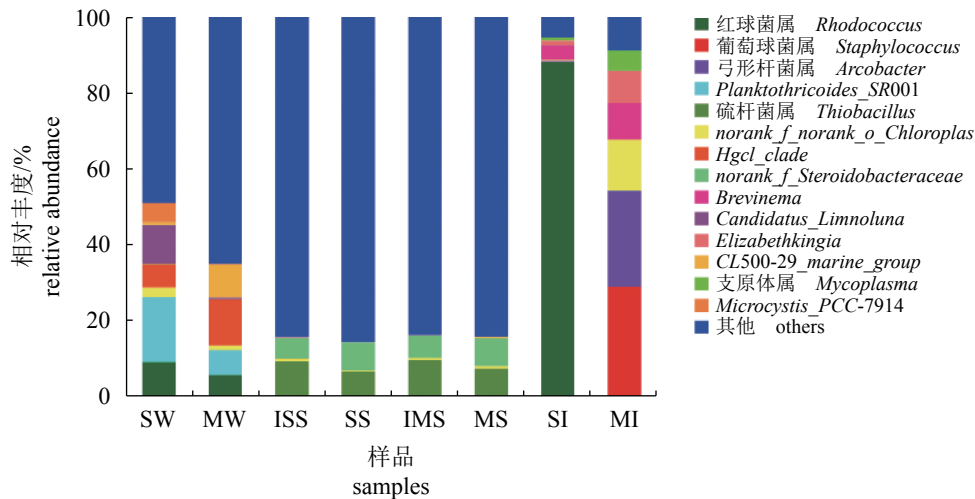


图 4 基于属水平的细菌群落组成

Fig. 4 Microbiota composition at genus level

表 3 暗纹东方鲀不同养殖模式对水质指标的影响

Tab. 3 Effect of different cultural patterns of *T. obscurus* on water quality indexes

组别 group	pH	TAN/ (mg/L)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/ (mg/L)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N/ (mg/L)	COD/ (mg/L)	TSS/ (mg/L)	TN/ (mg/L)	TP/ (mg/L)
传统养殖 traditional aquaculture	8.21±0.08 <sup>a</sup>	0.104±0.07 <sup>a</sup>	0.026±0.04 <sup>a</sup>	0.13±0.17 <sup>a</sup>	7.34±0.63 <sup>a</sup>	87.93±13.34 <sup>a</sup>	2.37±0.27 <sup>a</sup>	0.28±0.06 <sup>a</sup>
立体种养 three-dimensional cultivation	8.06±0.22 <sup>a</sup>	0.017±0.02 <sup>a</sup>	0.006±0.00 <sup>a</sup>	0.03±0.01 <sup>a</sup>	8.18±2.43 <sup>a</sup>	189.87±162.25 <sup>a</sup>	3.78±0.93 <sup>a</sup>	0.37±0.07 <sup>a</sup>

表 4 暗纹东方鲀不同养殖模式对抗氧化酶活力的影响

Tab. 4 Effect of different cultural patterns of *T. obscurus* on antioxidant enzyme activity

组别 group	总超氧化物歧化酶/(U/mg prot) T-SOD	谷胱甘肽过氧化物酶/(U/g prot) GSH-PX	过氧化氢酶/(U/g prot) CAT
传统养殖 traditional aquaculture	14.07±1.09 <sup>a</sup>	58.21±0.01 <sup>a</sup>	179.09±0.01 <sup>a</sup>
立体种养 three-dimensional cultivation	16.00±0.77 <sup>a</sup>	41.80±0.01 <sup>b</sup>	149.83±0.05 <sup>a</sup>





要微生物类群, 可以利用溶解性有机物<sup>[11]</sup>。本研究中立体种养模式下水体和底泥的变形菌门和拟杆菌门均高于传统养殖模式。在养殖水体中残饵及粪便在养殖水体中沉积, 可能导致水体中拟杆菌门细菌含量增加<sup>[12]</sup>。由于立体种养模式除了养殖暗纹东方鲀外, 还养殖了凡纳滨对虾, 推测虾的投放可能使水体中残饵及粪便有所增加, 从而引起细菌丰度改变。研究表明, 养殖模式的改变可引起环境微生物群落的变化, 从而促进生态平衡。蓝细菌作为一种古老的、分布广泛的原核生物类型, 在全球的碳氮循环中扮演着重要角色, 但当蓝细菌过度生长时会导致水体溶解氧量下降, 水质恶化, 鱼类及其他生物出现大量死亡, 打破生态平衡<sup>[13-14]</sup>。本研究发现, 立体种养模式下水体的蓝细菌门(12.23%)相对丰度明显低于传统养殖模式下水体的蓝细菌门(28.00%), 这可能是由于立体种养模式改变了水体中氮磷等元素的比例, 从而抑制了水体中的蓝细菌的生长。

在传统养殖模式下肠道的主要优势菌为红球菌属。多项研究从红球菌属中分离出高效的苯酚降解菌株, 表明红球菌可用于治理水体、土壤的酚类污染物<sup>[15-17]</sup>。可见传统养殖模式下环境因子有利于红球菌属生长, 从而使红球菌属在暗纹东方鲀肠道形成优势菌。立体种养模式下主要优势菌包括葡萄球菌属、弓形杆菌属、*Elizabethkingia* 及支原菌属。葡萄球菌属多数为非致病菌, 少数可导致疾病, 该菌属属于反硝化细菌。张云鹏等<sup>[18]</sup>研究发现, 葡萄球菌属是凡纳滨对虾体表的优势菌, 尤其在腹部占据了绝对优势。本研究中, 葡萄球菌属为立体种养模式下暗纹东方鲀肠道的优势菌, 这与混养凡纳滨对虾是否有关, 有待进一步研究。*Elizabethkingia* 属多为致病菌, 可威胁人类生命, 尤其是免疫缺陷的患者<sup>[19]</sup>。弓形杆菌属与人类的胃肠炎、畜类的胃肠炎和流产有关<sup>[20]</sup>。立体种养模式下暗纹东方鲀肠道存在致病菌属, 但并未发病, 生长情况与传统养殖模式未见显著差异。可见今后立体种养模式应加强病害防控工作, 确保水产动物健康生长。此外, 本研究还发现立体种养模式下的 GSH-PX 活性显著低于传统种养模式。GSH-PX、SOD 和 CAT 共同组成了生物体内重要的抗氧化还原系统, 防止细胞膜和其他生物组

织功能受氧化应激的损伤<sup>[21]</sup>。GSH-PX 被认为是检测不同环境因子对鱼类影响的重要生理指标。关于鱼类疾病与 GSH-PX 之间关系的研究较少, 但有研究发现其在无脊椎动物的免疫系统中发挥重要作用。当凡纳滨对虾、罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*)、斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 被细菌感染时体内 GSH-PX 基因表达量和酶活性显著提高, 从而保护细胞免受氧化损伤<sup>[22-24]</sup>。可见, 虽然立体种养模式下暗纹东方鲀的肠道存在致病菌, 但相比传统养殖模式, 立体种养模式下暗纹东方鲀组织受氧化应激的损伤更小, 水产动物肠道微生物结构与抗氧化酶的关系有待进一步研究。

水质变化会影响水体微生物的群落组成<sup>[25]</sup>。杜岩岩等<sup>[26]</sup>、倪蒙等<sup>[27]</sup>研究认为, 总氮和总磷是影响水体微生物群落结构的主要环境因子。刘晨宇等<sup>[28]</sup>研究发现 TN 浓度对河道细菌菌属分布影响最大。金笑等<sup>[29]</sup>研究认为, TN 浓度对细菌分布影响最大, 而 pH 是影响微生物代谢多样性的显著因子。本研究发现, pH 对水体细菌群落组成影响最为显著, 这与之前的研究结果略有不同。可见, 不同环境因子都有可能影响水体微生物的群落组成。反之, 水体中微生物也会影响水质, 参与水体的物质循环。在立体种养模式中, 参与氮循环的硝化细菌是最重要的有机体之一。硝化细菌能够将 TAN 转化为容易被植物吸收的硝酸盐<sup>[30-31]</sup>。TAN 在水中可作为氨氧化细菌 (ammonia-oxidizing bacteria, AOB) 的能量来源。AOB 利用氨产生  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  作为亚硝酸盐氧化细菌 (nitrite-oxidizing bacteria, NOB) 的能量来源, 被转化为硝酸盐。充分氧化的含氮废物成分硝酸盐以及其他存在于水中的氨, 可以被植物用来满足氮的生长需求。在农业系统的土壤中 3 种主要的硝化细菌为硝化杆菌 (*Nitrobacter*)、亚硝基单胞菌 (*Nitrosomonas*) 和硝化螺菌 (*Nitrospira*)<sup>[32]</sup>。本研究发现在底泥样本中存在硝基螺菌门。硝化细菌主要分布于蔬菜的根际及表面、底泥; 反硝化细菌主要分别于蔬菜的根际; 固氮菌主要分布于水体和蔬菜的根际及表面。由此可见, 养殖系统中的水生植物在氮循环中发挥重要作用。水体中还含有硫杆菌属, 能将硫化物氧化成单质硫或硫酸盐, 或将硫代硫酸盐氧化为硫酸盐, 调节水体中硫化物。



肠道微生物群落结构主要由宿主自身及外界生长环境因素所决定<sup>[33-34]</sup>。研究表明, 水体的环境因子 TAN、TN、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 和 TP 对不同养殖模式下暗纹东方鲀肠道细菌群落分布的影响较大。董学兴等<sup>[6]</sup>研究发现, TP 显著影响罗氏沼虾肠道微生物结构, 同时养殖模式可通过影响水体营养盐尤其是氮磷的含量影响罗氏沼虾肠道微生物群落结构, 与本研究结果类似。综上表明, 与传统养殖模式相比, 立体种养模式可提高养殖系统的细菌多样性, 降低病害暴发风险, 对稳定水产养殖生态系统有利。立体种养模式可有效抑制水体中蓝细菌的生长, 减小养殖对象的氧化应激损伤。可见养殖模式的改变, 能够引起微生物群落的变化, 从而促进生态平衡。此外, 养殖模式能够通过改变水体中氮、磷的含量对水体和暗纹东方鲀肠道的微生物群结构产生一定的影响。

#### 参考文献 (References):

- [ 1 ] Kyaw T Y, Ng A K. Smart aquaponics system for urban farming[J]. *Energy Procedia*, 2017, 143: 342-347.
- [ 2 ] Wongkiew S, Hu Z, Chandran K, *et al.* Nitrogen transformations in aquaponic systems: a review[J]. *Aquacultural Engineering*, 2017, 76: 9-19.
- [ 3 ] Newton R J, Jones S E, Eiler A, *et al.* A guide to the natural history of freshwater lake bacteria[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2011, 75(1): 14-49.
- [ 4 ] 任丽娟, 何聃, 邢鹏, 等. 湖泊水体细菌多样性及其生态功能研究进展[J]. *生物多样性*, 2013, 21(4): 421-432.
- Ren L J, He D, Xing P, *et al.* Bacterial diversity and ecological function in lake water bodies[J]. *Biodiversity Science*, 2013, 21(4): 421-432(in Chinese).
- [ 5 ] 朱婷婷, 田从魁. 水库底泥中微生物多样性及其与环境因子相关性分析[J]. *北京大学学报(自然科学版)*, 2018, 54(3): 625-632.
- Zhu T T, Tian C K. Analysis on Microbial diversity in the sediments and its relationship with environmental factors in a reservoir[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis*, 2018, 54(3): 625-632(in Chinese).
- [ 6 ] 董学兴, 吕林兰, 赵卫红, 等. 不同养殖模式下罗氏沼虾肠道菌群结构特征及其与环境因子的关系[J]. *上海海洋大学学报*, 2019, 28(4): 501-510.
- Dong X X, Lü L L, Zhao W H, *et al.* Effects of different cultural patterns on microbial communities in the intestine of *Macrobrachium rosenbergii* and interactions with environment factors[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2019, 28(4): 501-510(in Chinese).
- [ 7 ] 尹军霞, 沈文英, 郇萍. 水温对南美白对虾肠道菌群影响的研究[J]. *海洋科学*, 2004, 28(5): 33-36.
- Yin J X, Shen W Y, Li P. Study on the influence of water temperature on the intestinal microflora of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Marine Sciences*, 2004, 28(5): 33-36(in Chinese).
- [ 8 ] Stam M C, Mason P R D, 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)[J]. *Chemical Geology*, 2010, 278(1-2): 23-30.
- [ 9 ] 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[J]. *生态学报*, 2013, 33(2): 483-491.
- Qiu Q F, Zhang D M, Ye X S, *et al.* The bacterial community of coastal sediments influenced by cage culture in Xiangshan Bay, Zhejiang, China[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(2): 483-491(in Chinese).
- [10] Eiler A, Bertilsson S. Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes[J]. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(12): 1228-1243.
- [11] Cottrell M T, Kirchman D L. Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the *Cytophaga-flavobacter* cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(4): 1692-1697.
- [12] Rosselló-Mora R, Thamdrup B, Schäfer H, *et al.* The response of the microbial community of marine sediments to organic carbon input under anaerobic conditions[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 1999, 22(2): 237-248.
- [13] 曹焕生, 孔繁翔, 谭啸, 等. 太湖水华蓝藻底泥中复苏和水柱中生长的比较[J]. *湖泊科学*, 2006, 18(6): 585-589.
- Cao H S, Kong F X, Tan X, *et al.* Comparison of recruitment from sediments with pelagic growth of cyanobacteria in Lake Taihu, China[J]. *Journal of Lake Sciences*,

- 2006, 18(6): 585-589(in Chinese).
- [14] 范立民, 吴伟, 裘丽萍, 等. 罗非鱼养殖池塘水和表层沉积物中蓝藻的群落结构及影响因素研究[J]. 上海海洋大学学报, 2017, 26(6): 844-852.
- Fan L M, Wu W, Qiu L P, *et al.* Community structure of cyanobacteria in water and surface sediment of tilapia ponds and the influencing factors[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2017, 26(6): 844-852(in Chinese).
- [15] 苏琼, 江子骏. 高效苯酚降解菌的筛选及其降解特性分析[J]. 湖北大学学报(自然科学版), 2019, 41(6): 567-571.
- Su Q, Jiang Z J. Screening and degrading property of highly effective phenol degrading bacterium strain[J]. Journal of Hubei University (Natural Science), 2019, 41(6): 567-571(in Chinese).
- [16] 沈锡辉, 刘志培, 王保军, 等. 苯酚降解菌红球菌PNAN5菌株(*Rhodococcus* sp. strain PNAN5)的分离鉴定、降解特性及其开环双加氧酶性质研究[J]. 环境科学学报, 2004, 24(3): 482-486.
- Shen X H, Liu Z P, Wang B J, *et al.* Isolation, identification of phenol-degrading *Rhodococcus* sp. strain PNAN5 and characterization of its ring-cleavage dioxygenases[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2004, 24(3): 482-486(in Chinese).
- [17] 谢晓航, 叶萌, 潘宏, 等. 嗜联苯红球菌B403对酚类污染物的降解特性及动力学分析[J]. 环境工程学报, 2020, 14(4): 1103-1112.
- Xie X H, Ye M, Pan H, *et al.* Degradation characteristics and kinetic analysis of phenolic pollutants by *Rhodococcus biphenylivorans* B403[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2020, 14(4): 1103-1112(in Chinese).
- [18] 张云鹏, 朱立颖, 肖朝耿, 等. 南美白对虾体表与肠道细菌菌群结构的DGGE分析[J]. 中国食品学报, 2016, 16(8): 218-224.
- Zhang Y P, Zhu L Y, Xiao C G, *et al.* DGGE analysis of surface bacterial community and gut flora of *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(8): 218-224(in Chinese).
- [19] Lin J N, Lai C H, Yang C H, *et al.* *Elizabethkingia* infections in humans: from genomics to clinics[J]. *Microorganisms*, 2019, 7(9): 295.
- [20] 骆海朋. 应用纤维膜过滤方法从鱼肠内容物中分离到一株布氏弓形杆菌[J]. 中国食品卫生杂志, 2010, 22(2): 109-112.
- Luo H P. Isolation of a strain of *Arcobacter butzleri* from the content of fish intestine[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2010, 22(2): 109-112(in Chinese).
- [21] 谢晓泽. 大黄鱼谷胱甘肽过氧化物酶 GPx1 和 GPx4 的鉴定及其体外表达研究 [D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2018.
- Xie X Z. Identificaiton and expression of glutathione peroxidase 1 and glutathione peroxidase 4 from *Larimichthys crocea*[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2018 (in Chinese).
- [22] Yeh S P, Liu K F, Chiu S T, *et al.* Identification and cloning of a selenium dependent glutathione peroxidase from giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 27(2): 181-191.
- [23] Liu K F, Yeh M S, Kou G H, *et al.* Identification and cloning of a selenium-dependent glutathione peroxidase from tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and its transcription following pathogen infection and related to the molt stages[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2010, 34(9): 935-944.
- [24] Liu C H, Tseng M C, Cheng W. Identification and cloning of the antioxidant enzyme, glutathione peroxidase, of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and its expression following *Vibrio alginolyticus* infection[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 23(1): 34-45.
- [25] 龚雪, 王继华, 关健飞, 等. 再生水灌溉对土壤化学性质及可培养微生物的影响[J]. 环境科学, 2014, 35(9): 3572-3579.
- Gong X, Wang J H, Guan J F, *et al.* Impact of reclaimed water irrigation on soil chemical properties and culturable microorganisms[J]. Environmental Science, 2014, 35(9): 3572-3579(in Chinese).
- [26] 杜岩岩, 娄忠玉, 张艳萍, 等. 网箱养殖对刘家峡水库浮游细菌群落组成及影响因素分析[J]. 淡水渔业, 2018, 48(5): 11-16.
- Du Y Y, Lou Z Y, Zhang Y P, *et al.* Effect of cage culture on community structure and influencing factors of bacterioplankton in Liujiaxia reservoir[J]. *Freshwater Fisheries*, 2018, 48(5): 11-16(in Chinese).

- [27] 倪蒙, 高强, 原居林, 等. 不同盐度罗氏沼虾育苗水体水质及微生物群落结构研究[J]. 江西农业大学学报, 2019, 41(5): 976-985.
- Ni M, Gao Q, Yuan J L, *et al.* Effect of salinity on the water quality and microbial community structure of the water for young *Macrobrachium rosenbergii* rearing[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2019, 41(5): 976-985(in Chinese).
- [28] 刘晨宇, 祝亚楠, 王继华, 等. 不同季节尾水排放对河道细菌群落结构的影响[J]. 环境科学研究, 2018, 31(5): 893-900.
- Liu C Y, Zhu Y N, Wang J H, *et al.* Impact of tail water discharged on bacterial community structure in river in different seasons[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2018, 31(5): 893-900(in Chinese).
- [29] 金笑, 寇文伯, 于昊天, 等. 鄱阳湖不同区域沉积物细菌群落结构、功能变化及其与环境因子的关系[J]. 环境科学研究, 2017, 30(4): 529-536.
- Jin X, Kou W B, Yu H T, *et al.* Environmental factors influencing the spatial distribution of sediment bacterial community structure and function in Poyang Lake[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2017, 30(4): 529-536(in Chinese).
- [30] Canfield D E, Glazer A N, Falkowski P G. The evolution and future of earth's nitrogen cycle[J]. *Science*, 2010, 330(6001): 192-196.
- [31] Daims H, Lebedeva E V, Pjevac P, *et al.* Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria[J]. *Nature*, 2015, 528(7583): 504-509.
- [32] Acosta-Martínez V, Dowd S, Sun Y, *et al.* Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40(11): 2762-2770.
- [33] Meng H, Zhang Y, Zhao L L, *et al.* Body weight selection affects quantitative genetic correlated responses in gut microbiota[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e89862.
- [34] Benson A K, Kelly S A, Legge R, *et al.* Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(44): 18933-18938.

## Microbial community structure in different cultural patterns of *Takifugu obscurus*

QIU Chuwen, SHI Yonghai\*, WANG Hanxin

(Shanghai Fisheries Technical Extension Station, Shanghai Fisheries Research Institute, Shanghai 200433, China)

**Abstract:** Compared with the traditional aquaculture system, three-dimensional cultivation is a potential sustainable cultural pattern that integrates aquaculture with hydroponics in which nitrogen-rich effluent from the fish production is utilized for plant growth. Environmental microbiota plays an important role in the intestinal microbiota of aquatic animals. The association among water, sediment and obscure pufferfish (*Takifugu obscurus*) intestine under two cultivation patterns should be investigated to reveal the microbiota differences. The aim of the study was to understand the bacterial community structure in different cultural patterns of *Takifugu obscurus*. Here we compared the microbial community structure with composition variation of water, sediment and the intestine of *T. obscurus* in different cultural patterns to explore the relationship among them. The aim of this study is to provide a reference for the further study of microbiota in the three-dimensional cultivation pattern. Illumina MiSeq high-throughput sequencing method was used to sequence and analyze the two high-variation regions (V3-V4) of 16S *rRNA* gene of microbia of the water, sediment and intestine of *T. obscurus* in two cultural patterns (the traditional aquaculture and three-dimensional cultivation). The interactions between water microbia and water environment were analyzed by redundancy analysis (RDA). The interactions between intestine microbial and water environment were analyzed by canonical correlation analysis (CCA). The richness and diversity of the bacterial community of water, sediment and intestine of *T. obscurus* under three-dimensional cultivation patterns were higher than that in the traditional cultural pattern. The bacterial community structure of water and sediment under three-dimensional cultivation patterns was similar to that in the traditional cultural pattern. Actinomyces (36.19%), Proteobacteria (26.38%), Cyanobacteria (12.23%), and Bacteroidetes (12.06%) were the dominant phyla in water. Proteobacteria (50.73%) and Bacteroidetes (12.48%) were the dominant phyla in sediment. The dominant genus was *Rhodococcus* (88.23%) in the intestine in the traditional cultural pattern. However, *Staphylococcus* (28.93%), *Arcobacter* (25.36%), *norank\_f\_norank\_o\_Chloroplast* (13.31%), *Elizabethkingia* (8.56%) and *Mycoplasma* (5.32%) were the dominant genera in the intestine in three-dimensional cultivation pattern. The results of correlation analysis of environmental factors showed that pH had a significant effect on the water bacterial community. The dominant genus *Rhodococcus* in water were positively correlated with total suspended solid (TSS), total phosphorus (TP), total nitrogen (TN), pH and nitrate. Total ammonia nitrogen (TAN) had a great influence on the intestine bacterial community of *T. obscurus*. *Rhodococcus* and *Arcobacter* as the dominant bacteria in the intestine were in positive correlation with TSS and TP. *Acinetobacter* and *Mycoplasma* were in positive correlation with TAN, nitrite and nitrate. *Weissella* and *Staphylococcus* were in negative correlation with TSS, COD, TP, TN, nitrate, nitrite and TAN. The research showed that the use of three-dimensional cultivation pattern could improve the diversity of bacteria in the aquacultural ecosystem, reduce the risk of disease outbreak, inhibit the growth of Cyanobacteria, and reduce the oxidative stress damage to aquaculture objects. Furthermore, the cultural patterns could have a certain effect on water and *T. obscurus* intestine bacterial community by changing nitrogen and phosphorus concentration in the water.

**Key words:** *Takifugu obscurus*; traditional aquaculture; three-dimensional cultivation; water; sediment; intestine; microbial community structure; high-throughput sequencing

**Corresponding author:** SHI Yonghai. E-mail: yonghais@163.com

**Funding projects:** Shanghai Agriculture Applied Technology Development Program (G20180208); Shanghai Yangtze Estuary Main Economic Aquatic Animal Artificial Breeding Engineering Technology Research Center (13DZ2251800); Shanghai Leading Agricultural Talent Program(G201860)