

精养团头鲂池塘沉积物微生物群落的结构特征及组成多样性分析

李 晓¹, 李 冰^{1,2}, 董玉峰³, 朱 健^{1,2*}

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081;

3. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 为了研究精养团头鲂池塘冬季不投饵期间沉积物不同层次细菌群落结构的特征, 实验分层次采集池塘沉积物, 采用 PCR-DGGE(变性梯度凝胶电泳技术)及基因测序技术, 对池塘沉积物垂向空间分布的微生物群落特征及多样性的组成进行分析。结果显示: 精养团头鲂池塘的整个停饵期间沉积物微生物群落的丰富度(平均为 38)和多样性指数(平均为 3.18)均较高, 说明精养池塘沉积物中微生物数量多、种类丰富。上层(0~10 cm)和上层(10~20 cm)沉积物的微生物群落 Shannon 指数(3.29、3.27)略高于下层(20~30 cm)的 Shannon 指数(3.17), 底层沉积物样品的指数最小(2.96), 说明在底层沉积物中微生物群落结构趋于稳定, 菌群多样性变化较小。精养团头鲂池塘的整个停饵期间沉积物样品中上层(0~10 cm 和 10~20 cm)微生物的群落结构相似性较高(80%以上), 而底层(20~30 cm 和 30~40 cm)与中上层微生物的群落结构相似性较低(63%以上), 说明通过微生物群落结构的相似性程度可以大致看出样品的空间顺序。微生物群落组成多样性的结果显示: 精养团头鲂池塘沉积物在整个停饵期间包含的菌群分属于 8 个门: 变形菌门(β -、 γ -、 δ -亚群)(33.33%)、绿弯菌门(19.05%)、拟杆菌门(14.29%)、蓝细菌门(9.52%)、螺旋体门(9.52%)、硝化螺旋菌门(4.76%)、酸杆菌门(4.76%)、厚壁菌门(4.76%); 结果表明变形菌门为精养团头鲂池塘沉积物在停饵期间的优势菌群, δ -变形菌亚群(14.29%)是变形菌门中的优势菌群。本实验以期得到不同种类微生物的分子信息从而为以后筛选有益菌群奠定基础, 并为团头鲂精养池塘微生态环境的人工调控提供依据, 从而为适时监测养殖生态环境运营状况建立快速的分子生物学分析方法。

关键词: 团头鲂; 沉积物; DNA 提取; 变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE); 细菌多样性

中图分类号: Q 938; S 965

文献标志码: A

随着市场需求的增加, 团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)的养殖规模也在逐年扩大, 但是由于养殖环境的复杂性, 团头鲂在产量和品质上仍有不足之处, 目前养殖效益只是注重从饵料的投入、水质的改善等方面来提高, 却忽视了池塘中底泥的重要性。池塘的自净能力在很大程度上取决于池塘底泥生态, 即底泥的化学组成及微生物

相^[1]。因此探究底泥生境中微生物多样性的组成及数量变化, 寻找对养殖环境具有指示作用的微生物, 通过实时监测这些微生物的变化, 来比较准确的反映养殖环境的变化, 从而为以后筛选有益菌群奠定基础, 并为精养团头鲂池塘微生态环境的人工调控提供依据。

传统的微生物培养方法只能揭示很小一部分

收稿日期: 2013-10-09 修回日期: 2013-11-23

资助项目: “十二五”国家科技支撑计划(2012BAD25B07); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项基金(2013JBFC08)

通信作者: 朱 健, E-mail: zhuj@ffrc.cn

微生物的特征,99%的微生物是不可培养的^[2],而采用分子生物学的方法如 PCR-DGGE,则可以突破传统研究方法的局限性,充分了解大多数微生物菌群的种类及结构。目前该技术已被广泛应用于食品^[3]、土壤^[4]、水环境^[5]及动物粪便^[6]等不同环境微生物群落多样性的研究,而利用此技术分析团头鲂精养池塘某一养殖阶段沉积物细菌群落的多样性的报道较少。

本实验主要针对精养团头鲂的冬季不投饵期(2012年12月—2013年2月),以精养池塘不同层次的沉积物样品为研究对象,研究了该精养池塘底泥微生物群落结构的某些特征,通过间接研究微生物群落结构的变化,然后根据菌群结构变化特征来反映淡水养殖环境的变化,能为水产养殖提供一定的理论指导;探讨了该养殖系统内微生物组成的多样性及存在的某些微生物种属的特性,对于及时发现导致鱼类疾病产生的有害菌群有着指示作用,另外可以尝试发现池塘中的有益菌群,为以后开发微生物生态制剂提供重要的理论基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

底泥样品采集于宜兴大浦基地精养团头鲂池塘。本实验所用的沉积物样品为多管采样器采集,样品基本无扰动,较好地保持了沉积物的原状,在精养池塘的4个对角区域分别采集底泥,每个区域底泥采集40 cm,并分成4个层次:上层(0~10 cm)、中层(10~20 cm)、下层(20~30 cm)、底层(30~40 cm),采集完后在无菌条件下将4个对角区域同一层次的沉积物混匀,然后分装到无菌的50 mL的离心管中。为了便于样品的管理及识别,将样品进行编号,样品前面的数字表示不同月份(12、1、2),后面的字母表示不同层次(A代表0~10 cm、B代表10~20 cm、C代表20~30 cm、D代表30~40 cm),则样品依次标记为12-A、12-B、12-C、12-D,1-A、1-B、1-C、1-D,2-A、2-B、2-C、2-D,所有样品在DNA提取之前置于-80℃冰箱中保存。本实验中的精养池塘是以团头鲂为主体的养殖池塘,水深1.5 m,分别放养冬片鱼种2 900尾,配养鲢种310尾,草鱼10尾。具体的放养比例及规格如表1所示。

1.2 实验方法

DNA 提取方法 由于底泥中存在大量的

腐植酸,腐植酸的含量过高会影响PCR效果,因此在提取DNA之前对样品进行预处理对整个实验的成功至关重要,样品腐植酸的去除方法见文献[7]。按照闫建芳等^[8]改进的蛋白酶K-氯仿-异戊醇法提取DNA。首先,取污泥0.1 g,加入DNA提取液(0.1 mol/L PBS缓冲液(pH 8),0.1 mol/L EDTA(pH 8),0.1 mol/L Tris(pH 8),1.5 mol/L NaCl,1% CTAB)500 μL,混匀,再加4 μL蛋白酶K(10 mg/mL)置于1.5 mL离心管中,37℃静置10 min,加入60 μL 20% SDS,旋涡振荡10 min,室温10 000 r/min离心10 min,收集上清;沉淀中加入500 μL DNA提取液和60 μL 20% SDS,如前振荡并离心,收集上清,将两次的上清液与等体积的氯仿/异戊醇混合,离心后取上清液加入0.6倍体积的异丙醇,室温静置5 min,10 000 r/min离心10 min;倒掉上清液,沉淀用预冷的70%的乙醇洗涤,最后得到的沉淀物加入50 μL TE溶解,-20℃保存。本实验采取将DNA提取物稀释100倍的纯化方法。

表1 精养池塘鱼类放养比例及规格
Tab.1 The stocking proportion and size in intensive rearing pond

品种 variety	规格/g size	放养量/尾 stocking density
团头鲂 <i>Megalobrama amblycephala</i>	80~90	2 900
异育银鲫 <i>Carassius auratus gibelio</i>	60~70	400
鲢 <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	160~170	250
鳊 <i>Aristichthys nobilis</i>	120~130	60
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	60~70	10

16S rDNA-V3 高可变区的 PCR 扩增 本实验采用带GC夹细菌通用引物341F(5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3')和534R(5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3')^[9]进行细菌基因组DNA的扩增,GC-clamp序列为CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGGG CAC GGG GGG GGG,扩增片段为细菌的16S rDNA的V3可变区,PCR扩增采用50 μL体系,其中包括10×LAPCR Buffer(Mg²⁺ Plus)5 μL,10 mmol/L dNTP 4 μL,10 μmol/L上下游引物各1 μL,5 U/μL LA Taq DNA聚合酶0.5 μL,50 ng/μL模板DNA 2.0 μL,灭菌去离子水37.5 μL。整个过程采用降落PCR模式(touchdown-PCR),程序如下:94℃预变性5 min,94℃变性30 s,65℃退火30 s,72℃延伸

90 s,之后每个循环退火温度降低 0.5 °C,循环 20 次,在这个退火温度下再进行 15 个循环,72 °C 最终延伸 5 min。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。从琼脂糖凝胶中回收纯化 PCR 产物,采用大连宝生物工程公司的胶回收纯化试剂盒进行 (TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit),过程参照试剂盒中的使用说明进行实验操作。

PCR 扩增产物的变性梯度凝胶 (DGGE) 将 PCR 扩增产物通过 DGGE 进行分离,采用的凝胶变性梯度为 35% ~ 55%,浓度为 8% 的聚丙烯酰胺凝胶(化学变性剂为 100% 尿素 7 mol/L 和 40% 的丙烯酰胺),在 1 × TAE 缓冲液中 150 V 60 °C 下电泳 5 h,电泳完毕后采用银染的方法进行染色,最后用凝胶成像仪观察并记录结果。

DGGE 图谱中优势条带的克隆及测序 PCR 回收纯化产物与 pMD18-Tvector (TaKaRa) 在 16 °C 的连接过夜,转化大肠杆菌感受态细胞 DH5α,蓝白斑筛选挑选阳性克隆子,用 PCR 检验筛选出目的克隆。以阳性克隆为模板进行 PCR,再进行 DGGE 分析,与原来的条带在同一位置的克隆才是真正的阳性克隆。最后将所得的克隆片段送至上海生工进行测序。

数据分析 用 Quantity One 4.6 软件分析

样品电泳条带的数目和亮度,以此来评估微生物群落的生物多样性,微生物群落多样性采用 Shannon 指数 (H') 表示, H' 可以表示种群之间遗传多样性的分布和差异。其表达式为:

$$H' = - \sum_{i=1}^s \left(\frac{n_i}{N} \right) \ln \left(\frac{n_i}{N} \right) \quad (1)$$

式中, n_i 代表某泳道中单个条带的平均密度, N 代表该泳道下所有条带的密度和,用来评估各样品的多样性。

对于选定的 DNA 序列,对其进行克隆测序后,得到的序列首先在 RDP 数据库中检测嵌合体,去除嵌合体后的剩余序列通过 BLAST 程序在网上数据库中搜索高同源序列,所得序列和原序列利用 MEGA5.0 软件程序中 ClustaW 程序进行多序列匹配排列,然后通过 Neighbor Joining 方法构建系统进化树。

2 结果

2.1 细菌基因组 DNA 的提取及 PCR 扩增

以各样品提取的总 DNA 为模板进行 PCR 扩增,可以得到较为清晰的长度为 200 bp 左右的目的条带(图 1)。

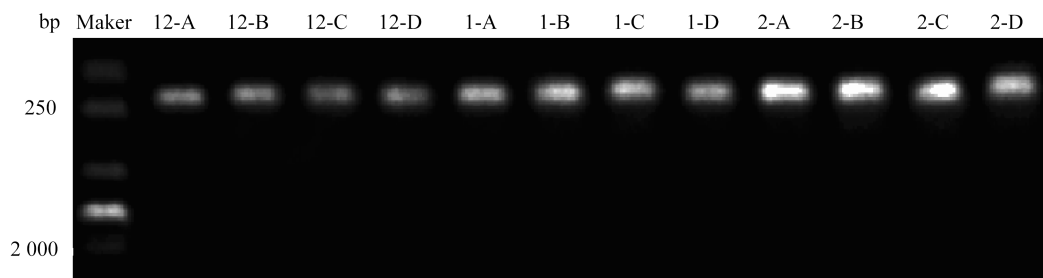


图 1 16S rDNA V3 片段扩增结果

Fig. 1 PCR amplification of bacterial 16S rDNA V3 fragments

2.2 微生物群落结构分析

微生物群落的 DGGE 图谱分析 DGGE 分离图谱显示,底泥中优势菌群达到 38 种以上(图 2)。比较 DGGE 各条带相对光密度发现,部分条带光密度变化具有明显随沉积物深度变化的特征。有的条带在各个深度的沉积物样品中均出现,如条带 5、6、7、11、12、18、22、28、29、32;有的条带只在特定深度的沉积物样品中出现,如条带 13、24 只存在于 20 ~ 30 cm 深度的范围内,条带 20 只存在于 30 ~ 40 cm 的深度层次中。DGGE

示意图显示,0 ~ 10 cm 层次的沉积物样品在不同月份共得到 97 个条带,10 ~ 20 cm 层次的沉积物样品在不同月份共得到 102 个条带,20 ~ 30 cm 层次的沉积物样品在不同月份共得到 94 个条带,30 ~ 40 cm 层次的沉积物样品在不同月份共得到 78 个条带。而在不投饵期间的不同月份中,12 月份不同深度的沉积物样品中共得到 134 个条带,1 月份不同深度的沉积物样品中共得到 120 个条带,2 月份共得到 113 个条带,平均为 120 条左右。

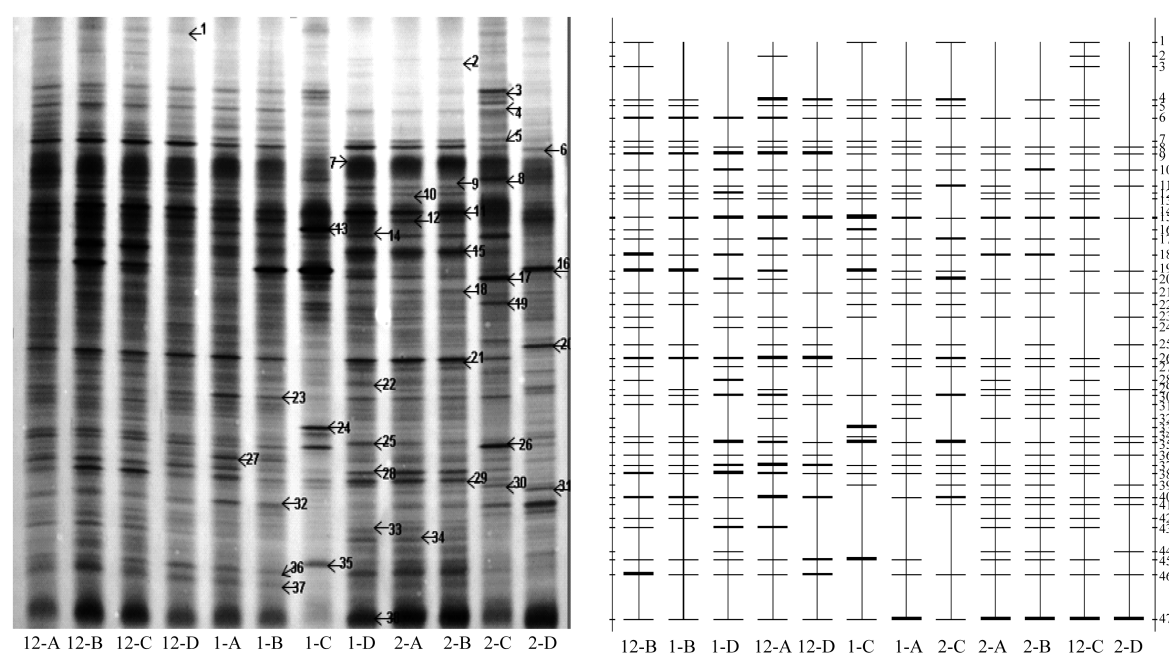


图 2 不同深度及不同月份沉积物样品细菌 DGGE 分离图谱及分析示意图

12-A ~ 12-B 表示团头鲂精养池塘 2012 年 12 月—2013 年 2 月沉积物样品,胶中部分数字代表测序条带

Fig. 2 Image of DGGE gels containing bacterial 16S rDNA fragments from sediment samples in different depths and months

12-A - 12-B corresponded to December 2012 to February 2013 sediment samples collected from *Megalobrama amblycephala* intensive rearing pond. Numbers in the gels marked excised and sequenced bands

微生物群落的 H' 分析 在团头鲂精养的整个停饵期间不同深度的沉积物样品其微生物群落的 H' 平均为 3.18。在各个月份不同深度的沉积物样品中,12、1、2 月份的 H' 数值平均分别为 3.29、3.17、3.06。总体趋势是 12 月份微生物群落的多样性最高,2 月份的最低。在各个深度不同月份的沉积物样品中,A、B、C、D 4 个深度的 H' 数值平均分别为 3.29、3.27、3.17、2.96(表 2)。中上层沉积物的微生物群落 H' 要高于下层沉积物的微生物群落 H' ,底层沉积物的微生物群落 H' 最小。

微生物群落的聚类分析 根据 DGGE 图谱进行 UPGMA 分析(图 3)。结果显示:在不同的月份中,12 月份不同深度的沉积物样品单独聚为一支,相似性在 85% 以上;1 月份不同深度的沉积物样品的相似性在 70% 以上;而 2 月份在 63% 以上,相似性较差。在不同的深度中,A、B 深度的菌群分枝在 3 个月份中都单独聚为一支,且相似性分别在 85%、80%、90% 以上。A、B 深度与 C、D 深度在 3 个相邻月份中的相似性分别在 85%、70%、63% 以上。且 C、D 深度的菌群在 1、2

月份均能分出独特的小枝,并与 A、B 深度的菌群距离相差较远。

表 2 不同深度及不同月份沉积物样品的 H'

Tab.2 The H' from sediments samples in different depths and months

样品编号 no.	H'	样品编号 no.	H'
12-A	3.39	12-A	3.39
12-B	3.41	1-A	3.21
12-C	3.30	2-A	3.27
12-D	3.06	mean	3.29
mean	3.29	12-B	3.41
1-A	3.21	1-B	3.19
1-B	3.19	2-B	3.21
1-C	3.11	mean	3.27
1-D	3.17	12-C	3.30
mean	3.17	1-C	3.11
2-A	3.27	2-C	3.10
2-B	3.21	mean	3.17
2-C	3.10	12-D	3.06
2-D	2.65	1-D	3.17
Mean	3.06	2-D	2.65
total mean	3.18	mean	2.96

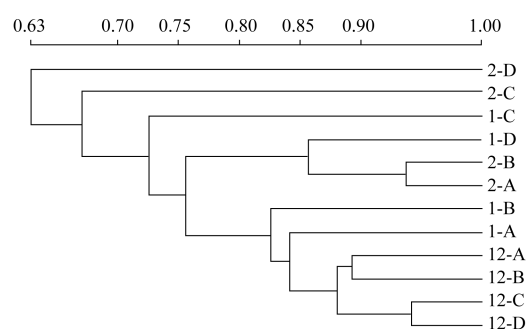


图3 不同深度及不同月份沉积物样品的UPMGA聚类分析图

Fig.3 UPMGA cluster analysis of sediment samples in different depths and months

2.3 DGGE条带的16S rDNA序列及系统发育分析

沉积物样品中细菌16S rDNA V3区特征片段经DGGE分离,切割特征性条带7、8、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、22、24、26、27、28、29、32、35、38进行序列测定,序列大小大致在169~195 bp范围之内。将所得序列输入GenBank,以Blast进行相似性分析。结果表明,21条所测序列的最相似序列基本来自GenBank数据库中未培养的微生物克隆(表3),所测序列与数据库中的16S rDNA序列相似性均在90%~100%之间。本研究选用数据库中与所测序列相似性最高的序列

表3 部分割胶回收条带的测序结果及相近的参考序列
Tab.3 Partial DNA sequences from DGGE bands and their close relatives in GenBank

条带号 band no.	序列长度 sequence length	GenBank 最相似序列 closest relatives in GenBank	相似性/% percentage similarity	GenBank 编号 GenBank accession no.	发育地位 phylogenetic affiliation
7	194	uncultured <i>beta proteobacterium</i> clone XSLD072	100	KC246323.1	β -变形菌门
		uncultured Alcaligenaceae bacterium clone LW1m-4-40	100	EU640273.1	(β -Proteobacteria)
8	189	uncultured <i>Bacteroidetes</i> bacterium clone J0-72	100	KC603065.1	厚壁菌门
		uncultured <i>Haliscomenobacter</i> sp. clone B3_0_036	100	JN866202.1	(<i>Bacteroidetes</i>)
10	195	uncultured <i>delta proteobacterium</i> clone P-R96	99	JN38878.1	δ -变形菌门
		uncultured <i>Geobacter</i> sp. clone U3A24	99	DQ201591.1	(δ -Proteobacteria)
11	169	uncultured <i>Nitrospira</i> sp. clone 1.70	100	GQ183206.1	硝化螺旋菌门(<i>Nitrospirae</i>)
12	170	uncultured <i>Chloroflexi</i> bacterium clone;C9001C_B12_4_C027	93	AB644931.1	绿弯菌门(<i>Chloroflexi</i>)
13	195	uncultured <i>Spirochaetes</i> bacterium clone Aug-CD221	95	JQ795213.1	螺旋体门(<i>Spirochaetes</i>)
14	194	uncultured <i>gamma proteobacterium</i> clone LakeCentre30	99	JQ726868.1	γ -变形菌门
		uncultured <i>Sinobacteraceae</i> bacterium clone 4G5	99	HQ003542.1	(γ -Proteobacteria)
15	169	uncultured <i>Roseiflexus</i> sp. clone XZZLH39	96	EU703480.1	绿弯菌门
		uncultured <i>Chloroflexi</i> bacterium clone DSH4C1-07	96	KF543224.1	(<i>Chloroflexi</i>)
16	169	uncultured bacterium clone S74_093	100	KC874493.1	γ -变形菌门
					(γ -Proteobacteria)
17	171	uncultured <i>cyanobacterium</i> clone ADK-WYh02-15	99	EF520521.1	蓝细菌门
		uncultured <i>Synechococcus</i> sp. clone LS149_SB_May_5m_6-C7	99	DQ519878.1	(<i>Cyanobacteria</i>)
18	181	uncultured <i>Firmicutes</i> bacterium clone Aug-KB411	99	JQ795271.1	厚壁菌门(<i>Bacteroidetes</i>)
		uncultured <i>Chroococcidiopsis</i> sp. clone QB78	95	FJ790633.1	蓝细菌门
19	171	uncultured <i>cyanobacterium</i> clone balE5_summer03	95	EF627918.1	(<i>Cyanobacteria</i>)
		uncultured <i>delta proteobacterium</i> clone LMC101	100	JN868261.1	δ -变形菌门
22	195	uncultured <i>Syntrophaceae</i> bacterium clone C4	97	HQ003562.1	(δ -Proteobacteria)
24	170	uncultured <i>Dehalococcoides</i> sp. clone OTU123	95	JQ217315.1	绿弯菌门(<i>Chloroflexi</i>)
26	189	uncultured <i>Bacteroidetes</i> bacterium clone OuchyA-48	99	FN679227.1	厚壁菌门(<i>Bacteroidetes</i>)
27	195	uncultured <i>Spirochaetes</i> bacterium clone RLT4_43	95	GU236043.1	螺旋体门(<i>Spirochaetes</i>)
28	189	uncultured <i>Bacteroidetes</i> bacterium clone KWK23F.44	97	JN656898.1	厚壁菌门(<i>Bacteroidetes</i>)
29	195	<i>Desulfobulbaceae</i> bacterium enrichment culture clone MS_ ACE_N7	95	HQ400773.1	δ -变形菌门
					(δ -Proteobacteria)
32	188	uncultured <i>Acidobacteria</i> bacterium clone 16G	93	JN178895.1	酸杆菌门(<i>Acidobacteria</i>)
35	170	uncultured <i>Chloroflexi</i> bacterium clone RAT24_23	96	GU236098.1	绿弯菌门(<i>Chloroflexi</i>)
38	194	uncultured <i>Dechloromonas</i> sp. clone BER_a12	99	JQ815631.1	β -变形菌门
		uncultured <i>Rhodocyclaceae</i> bacterium clone bf2-84	99	GU257838.1	(β -Proteobacteria)

构建 UPGMA 系统进化树(图 4)。系统进化树显示, 21 个克隆分属 8 个门: 变形菌门 (Proteobacteria) (β -、 γ -、 δ -亚群)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、绿弯菌门 (Chloroflexi)、厚壁菌门 (Firmicutes)、螺旋体门 (Spirochaetes)、硝化螺旋菌门 (Nitrospirae)、蓝细菌门 (Cyanobacteria)。各个门的细菌所占的比例如图 5 所示。研究结果显示, 变形菌门所占的比例最高, 为 33.33%。

精养团头鲂池塘沉积物优势菌的系统发育结果表明, 与栖息于沉积物中的细菌系统发育关系接近的物种主要有 *Haliscomenobacter* sp.、地杆菌属 (*Geobacter* sp.)、硝化螺旋菌属

(*Nitrospira* sp.)、玫瑰弯菌属 (*Roseiflexus* sp.)、拟色球藻属 (*Chroococidiopsis* sp.)、聚球藻属 (*Synechococcus* sp.)、*Dehalococcoides* sp.、*Dechloromonas* sp.。并且发现沉积物中存在伯克氏菌目 (Burkholderiales)、鞘脂杆菌目 (Sphingobacteriales)、除硫单胞菌目 (Desulfuromonadales)、黄色单胞菌目 (Xanthomonadales)、互营杆菌目 (Syntrophobacterales)、脱硫杆菌目 (Desulfobacterales) 的细菌种类。这些细菌菌属和相关序列均分离或者克隆来自沉积物、活性污泥等的有机化合物降解环境等生境中。

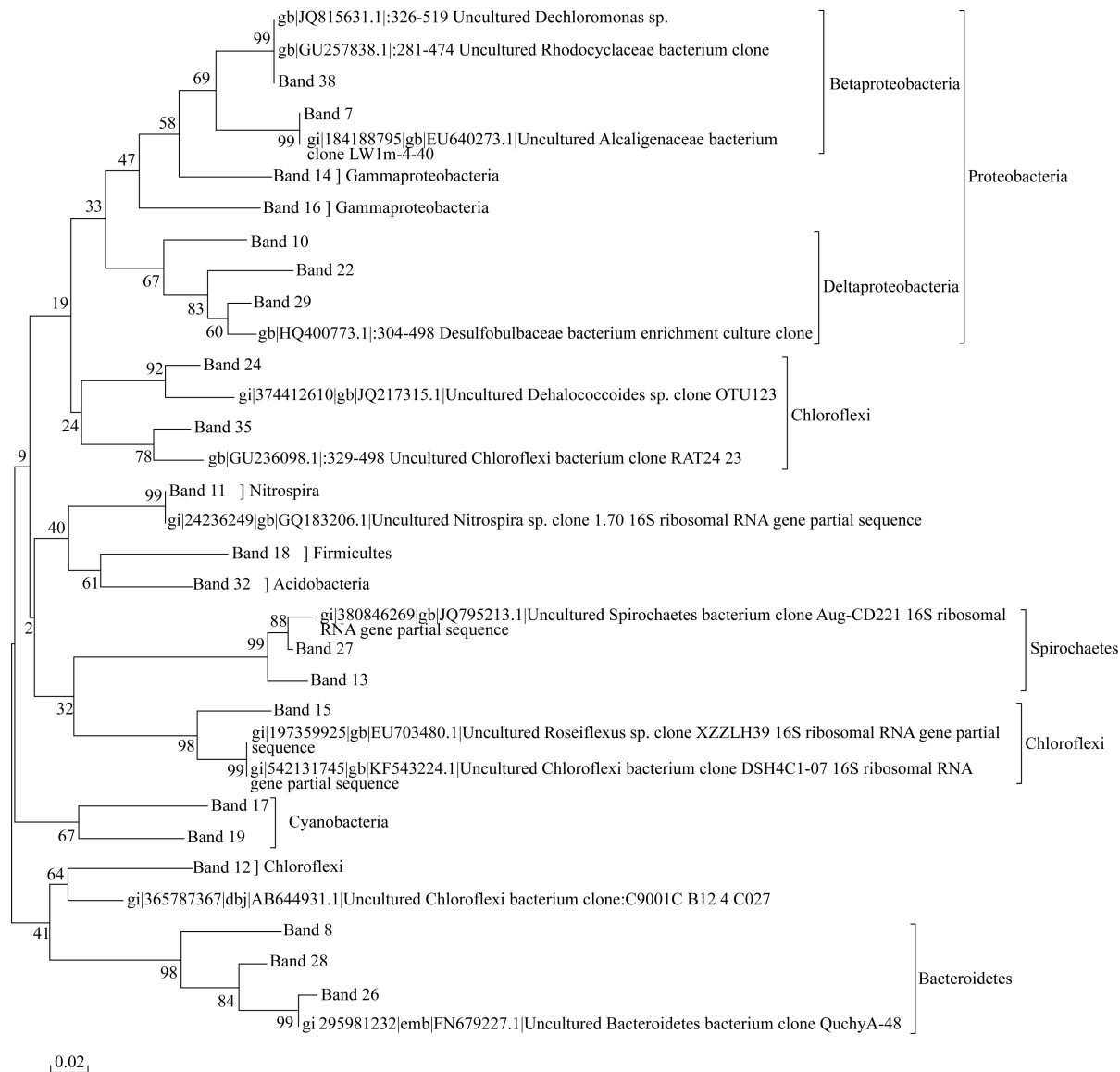


图 4 回收条带序列的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree constructed by the sequences of the excised DGGE bands

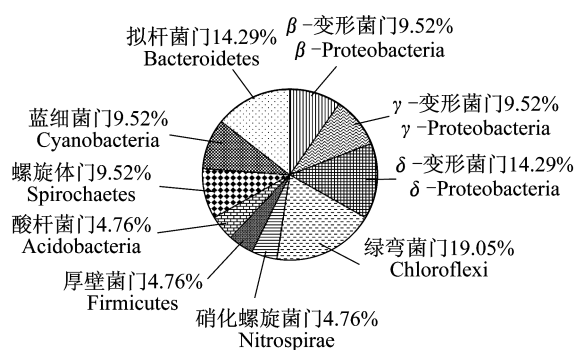


图5 各分支细菌在总细菌中所占比例
Fig. 5 The proportion of each phylotypes in total bacteria

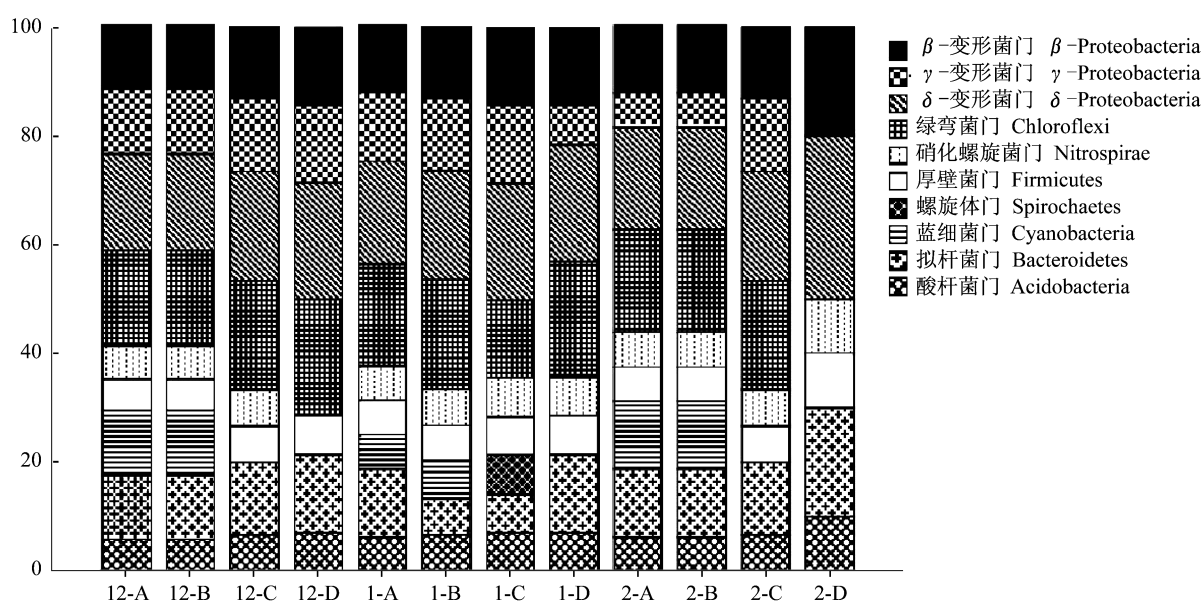


图6 16S rRNA 基因序列在不同分类阶元中分布特征变化
Fig. 6 Variation of proportions of 16S rRNA gene sequences within different phyla or subphyla

3 讨论

3.1 精养团头鲂池塘沉积物中微生物群落的基本结构特征分析

在 16S rDNA 测序的过程中,高质量的 DNA 模板的提取和 PCR 扩增等步骤都影响着最后的系统发育结果^[10]。本实验发现采用改进的蛋白酶 K-氯仿-异戊醇法提取,然后将粗提的 DNA 模板稀释 100 倍用于 PCR 扩增,可以得到高质量的产物,不仅节省了试剂盒的费用,而且不会导致较大的实验误差。另外本研究发现,在研究沉积物微生物多样性时,发现各个层次中微生物的种类存在一定的差异性,因此为了更加准确的描述精养池塘

21 种细菌菌属在所分析的 3 个相邻月份 4 个层次中不尽相同,结果如图 6 所示。螺旋体门细菌仅存在于 1 月份 C 层次的沉积物中;γ-变形菌门和绿弯菌门除了在不投饵期间 2 月份 D 层次的沉积物中没有分布,在其它月份的层次中均有分布;蓝细菌门在不投饵期间不同月份的 A 和 B 的层次中分布较多,而在 C 和 D 层次并未发现蓝细菌门细菌的存在;硝化螺旋菌门的细菌只在 12 月份的 D 层次没有分布,而在后 2 个月的 D 层次中存在;β-变形菌门、δ-变形菌门、拟杆菌门、酸杆菌门、厚壁菌门的细菌精养在团头鲂池塘不投饵期间 3 个相邻月份不同层次的沉积物样品中均存在。

沉积物中微生物的实际状况,有必要对样品进行分层研究,然后对各层数据进行综合分析,从而对沉积物各个层次的微生物区系进行更加全面的了解。

DGGE 带谱中的每一个条带代表一个可能的细菌类群或可操作分类单元(OUT)^[11]。本研究发现,在团头鲂精养池塘底泥中微生物丰富度非常高。通过 DGGE 图谱中的条带数目变化可知,团头鲂精养池塘沉积物不同层次的细菌丰度在整个不投饵期间表现出明显的空间差异性。而在整个停饵时期中的相邻月份中有一定程度的变化,但是变化不明显。由此可知,在养殖池塘不同层次沉积物环境中细菌丰度在空间上的变化比在时间上的变化明显。在相邻的月份中微生物数量变化

不明显,微生物群落结构差异不大,可能是由于底泥作为沉积物,包含的无机物和有机物含量丰富,群落结构复杂,影响因素众多,并非只受到某种单一因子或某些因子的影响,底泥中微生物的变化不如水样受到外界环境因素影响的变化大,相邻月份之间并没有严格的分界线,连续性好,因此优势种群演替的速度慢。

DGGE 图谱中条带的丰富度简要表达了沉积物微生物群落的多样性,但它不能反映群落相对多度的信息,而 Shannon 指数是研究群落物种数及其个体数和分布均匀程度的综合指标^[12],不仅跟条带数有关,而且与条带的强弱及分布也有一定关系。赵兴青等^[13]基于不同引物对湖泊沉积物中细菌群落结构的多样性进行比较研究,发现沉积物样品中细菌群落结构显示了明显的空间分布多样性差异,随着沉积深度的增加,细菌群落多样性指数呈现降低的趋势。据报道,沉积物中微生物总数和活性细菌数目通常在表层最高,并在垂向分布上随深度的增加而逐渐降低^[14-15]。在精养团头鲂池塘停饵时期不同层次沉积物样品中,随着沉积物深度的增加,微生物的多样性呈现逐渐降低的趋势。微生物类群主要分布在沉积物的中上层,可能是由于鱼类排泄物及残体的存在,使得中上层的有机和无机物比较丰富,满足微生物所需的营养,因此微生物的种类和数量比较丰富。而最底层沉积物的样品中微生物多样性最低,说明在此层次中微生物群落结构趋于稳定,受外界环境变化的影响较小。在精养团头鲂池塘停饵期间 3 个相邻月份的沉积物样品中,微生物的多样性呈现降低的趋势,说明在停饵的初期,鱼类的各种代谢活动比较频繁,导致微生物多样性较高;而随着停饵时间的延长,鱼类代谢活动开始减弱,导致多样性降低。由此可以说明鱼类的代谢活动可以影响沉积物中微生物的群落结构。

精养团头鲂池塘停饵期间沉积物样品的微生物群落结构随着停饵时间的延长,其相应的相似性程度逐渐降低。不同月份的中上层沉积物样品微生物群落结构的相似性较高,下层和底层沉积物样品其菌群结构的相似性较差。利用 UPGMA 聚类图,各样品的相似性程度可以大概看出样品的空间顺序。

因此,本研究认为可以将底泥微生物群落结构的变化特征作为一个指标,根据指标的变化来

反映包括团头鲂在内的淡水养殖环境的变化。通过分析微生物群落结构特征在空间上的分布差异,可以看作微生物群落是对环境污染或对压力的反应^[16]。

3.2 精养团头鲂池塘沉积物中微生物多样性组成的特征分析

本研究发现在精养团头鲂的不投饵期间并未发现有害菌群的存在,只是发现了少量蓝细菌的存在,可能由于精养池塘的水源内蓝藻开始生长,从而导致进入养殖池塘水体中蓝细菌增多,因此通过监测沉积物中蓝细菌种属的存在,可以实时的对养殖水体水质状况做出监测。另外在精养团头鲂的不投饵期间发现了一些有益菌群的存在,如对含氮污染物有去除作用的玫瑰弯菌属(*Roseiflexus* sp.),它能在低氧的情况下进行异氧硝酸还原作用。硝化螺旋菌属(*Nitrospira* sp.)的存在表明该池塘沉积物中存在较强的硝化作用的微环境,这对于以鱼类为主的养殖系统来说非常重要,因为硝化菌对水生植物非常重要,在水体中,如果缺少硝化菌,氨氮、硝酸盐、亚硝酸盐循环体系被中断,将导致水生环境破坏和鱼类的死亡。Yang 等^[17]用 DGGE 技术分析了大规模的印染废水二级生物处理系统中的细菌的动态性,发现尽管微生物群落和支流组成成分多变,一些细菌种类比如黄色单胞菌属在所有采集的样品中同时存在,并且发现在二级生物处理系统中这些菌属对一些难降解的污染物的降解起着重要的作用。因此认为在沉积物中黄色单胞菌属(*Xanthomonadaceae*)的细菌可以在分解沉积物环境中在对危害鱼类生存的有机物质中发挥作用。另外沉积物中的某些细菌菌属,例如,*Geobacter* sp.、*Dehalococcoides* sp.、*Dechloromonas* sp.等在沉积物环境中未见有相似的报告,表明该沉积物中含有特有的细菌区系。通过对精养池塘沉积物中微生物群落组成的多样性进行研究,这为下一阶段团头鲂养殖提供了一定的理论指导。

研究发现,精养团头鲂池塘沉积物样品在冬季不投饵期间的优势菌群为变形菌门,而且 δ -变形菌亚门是变形菌门中明显的优势菌群。 δ -*proteobacteria* 是一类具有多种功能的细菌,海洋沉积物中有机物质的降解有 50% 是通过 SRB 完成的^[18],并推测具有降解芳香化合物、氯化有机物或者聚磷等抗污染能力。目前在各种环境的微生物多样性调查中都发现变形杆菌是主要的类

群^[19-20],并且沉积物样品中该细菌类群十分丰富。Han等^[21]用16S rDNA克隆文库的方法分析了混养草鱼、异育银鲫和团头鲂3种鱼的池塘底泥微生物,发现养殖底泥中的微生物主要是变形菌门、厚壁菌门和分类地位未定(unclassified bacteria)的种类。程莹寅等^[1]研究草鱼池塘底泥微生物群落多样性时,发现池塘底泥的优势菌群为变形菌门,而变形菌门中的 γ -变形菌亚群是明显的优势类群。

研究还发现,精养团头鲂池塘沉积物中某些菌群随着月份及深度的不同呈现出一定的分布变化特征,而且某些菌群存在此消彼长的现象,即有些菌群在一定月份的深度的沉积物中出现,而在之后的月份一定深度的沉积物中消失,这种变化现象可以认为是细菌适应特殊环境的表现。

鉴于沉积物中具有十分丰富的微生物资源,其中优势菌群多为传统培养方法难以分离得到的非培养细菌菌属,如果改变培养条件,分离其中的有益功能菌群,为精养团头鲂池塘微生态环境的人工调控提供依据。本实验只是采用了最基本的分子生物学方法鉴定到了几种微生物的门属,了解到了精养团头鲂池塘底泥微生物菌群的大体组成,以后的工作需要构建底泥细菌16S rDNA克隆文库,然后对文库中的微生物群落进行了分析,以便得到更为详尽的精养团头鲂池塘底泥微生物菌谱,从而为团头鲂的健康养殖提供更为有效的理论指导。

参考文献:

- [1] 程莹寅,吴山功,郑英珍,等. 主养草鱼池塘底泥微生物群落多样性研究[J]. 淡水渔业,2011,41(6): 43-49.
- [2] Pace N R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere [J]. Science, 1997, 276 (5313): 734-740.
- [3] 付琳琳,曹郁生,李海星,等. 应用PCR-DGGE技术分析泡菜中乳酸菌的多样性[J]. 食品与发酵工业,2005,31(12):103-105.
- [4] 王洋清,杨红军,李勇. DGGE技术在森林土壤微生物多样性研究中的应用[J]. 生物技术通报,2011(5):75-79.
- [5] Wu Q,Zhao X H,Zhao S Y. Application of PCR-DGGE in research of bacterial diversity in drinking water [J]. Biomedical and Environmental Sciences, 2006,19(5):371-374.
- [6] 郭艳,张进良,邓昌彦,等. 利用PCR-DGGE技术分析猪粪堆肥细菌群落结构[J]. 河南师范大学学报:自然科学版,2010,38(5):159-162.
- [7] Xing D F, Ren N Q, Wang A J, et al. Continuous hydrogen production of autoaggregative *Ethanoligenens harbinense* YUAN-3 under non-sterile condition [J]. International Journal Hydrogen Energy, 2008, 33 (5): 1489-1495.
- [8] 闫建芳,刘秋,张璐,等. 一种活性污泥总DNA提取方法的优化[J]. 环境工程学报,2012,6(3):1000-1004.
- [9] Muyzer G, de Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S RNA [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3):695-700.
- [10] de Liphaya J R, Enzinger C, Johnsen K, et al. Impact of DNA extraction method on bacterial community composition measured by denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2004, 36(10):1607-1614.
- [11] 姚延丹,李谷,陶玲,等. 复合人工湿地-池塘养殖生态系统细菌多样性研究[J]. 环境科学与技术, 2011, 34(7):50-55.
- [12] Müller A K, Westergaard K, Christensen S, et al. The diversity and function of soil microbial communities exposed to different disturbances [J]. Microbial Ecology, 2002, 44(1):49-58.
- [13] 赵兴青,杨柳燕,陈灿,等. 基于不同引物的湖泊沉积物中细菌群落结构多样性的比较研究[J]. 南京农业大学学报:自然科学版,2008,44(3):289-296.
- [14] Mermillod B F, Nogaro G, Datry T, et al. Do tubificid worms influence the fate of organic matter and pollutants in stormwater sediments? [J]. Environment Pollution, 2005, 134(1):57-69.
- [15] Koizumi Y, Kojima H, Fukui M. Characterization of depth-related microbial community structure in lake sediment by denaturing gradient gel electrophoresis of amplified 16S rDNA and reversely transcribed 16SrRNA fragments [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2003, 46(2):147-157.
- [16] 白洁,李海艳,赵阳国. 黄海北部不同站位海洋细菌群落分布特征[J]. 微生物学报,2009,49(3):343-350.
- [17] Yang Q X, Wang J, Wang H, et al. Evolution of the microbial community in a full-scale printing and

- dying wastewater treatment system [J]. *Bioresource Technology*, 2012, 117: 155 – 163.
- [18] Jørgensen B B. Mineralization of organic matter in the sea-bed; the role of sulfate reduction [J]. *Nature*, 1982, 296: 643 – 645.
- [19] Hugenholtz P, Pituille C, Hershberger K L, *et al.* Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring [J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(2): 366 – 376.
- [20] Sullivan L A, Weightman A J, Fry J C. New degenerate *Cytophaga Flexibaeter Bacteroides* specific 16S ribosomal DNA-targeted oligonucleotide probes reveal high bacterial diversity in river Taff epilithon [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(1): 201 – 210.
- [21] Han S F, Liu Y C, Zhou Z G, *et al.* Analysis of bacterial diversity in the intestine of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) based on 16S rDNA gene sequences [J]. *Aquaculture Research*, 2010, 42(1): 47 – 56.

Analysis of sediment microbial communities in *Megalobrama amblycephala* intensive rearing pond

LI Xiao¹, LI Bing^{1,3}, DONG Yufeng², ZHU Jian^{1,3*}

(1. College of Fisheries, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;

2. Freshwater Fisheries Research Center, Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Wuxi 214081, China;

3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The composition and diversity of bacterial community in *Megalobrama amblycephala* intensive rearing pond sediments were investigated by PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) and DNA sequencing technology. Sediments were collected at different depths (0 – 10 cm, 10 – 20 cm, 20 – 30 cm, 30 – 40 cm) during non-feeding period. The structure feature displayed high levels in the richness of microbial communities (38) and Shannon-Wiener index (3.18). This represented that the *Megalobrama amblycephala* intensive rearing pond had a high microbial variety. The Shannon-Weiner index of the microbial community in the pelagic (0 – 10 cm, 10 – 20 cm) (3.29, 3.27) was slightly higher than that of the sub-bottom (20 – 30 cm) (3.17), and the index of the bottom (30 – 40 cm) was minimum (2.96), indicating the stability of the bacterial community structure. The microbial community structure showed a high degree of similarity (80%) at the pelagic (0 – 10 cm, 10 – 20 cm) in different months, while the similarity between pelagic and bottom (20 – 30 cm, 30 – 40 cm) was lower. Therefore, we could evaluate the sample space order through the similarity of the community structure. The diversity of microbial composition showed that the microflora in *M. amblycephala* intensive rearing period belonged to eight bacterial phyla: Proteobacteria 33.33% (β -, γ -, δ -Proteobacteria), Chloroflexi 19.05%, Bacteroidetes 14.29%, Cyanobacteria 9.52%, Acidobacteria 4.76%, Firmicutes 4.76%, Spirochaetes 9.52%, Nitrospirae 4.76%. The 16S rDNA clone library analysis indicated that there were lots of bacteria in the *M. amblycephala* intensive rearing pond sediments. The Proteobacteria which consisted mainly of δ -Proteobacteria was the dominant group in sediments. The results provided important information for selection of the beneficial bacteria and regulation of the micro-ecological environment in the *M. amblycephala* intensive rearing pond.

Key words: *Megalobrama amblycephala*; sediment; DNA extract; PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis); bacterial diversity

Corresponding author: ZHU Jian. E-mail: zhuj@ffrc.cn