

三疣梭子蟹养殖塘表层底泥异养细菌群落比较研究

孙苏燕, 张德民*, 钱丽君, 潘志崇, 陈文桂

(宁波大学生命科学与生物工程学院, 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 采用菌落菌体形态观察和 16S rDNA 序列比对的方法, 对三疣梭子蟹养殖健康塘和病害塘表层底泥中的异养细菌进行了比较研究。分离得到的 255 株细菌可分为 13 个菌落类群, 33 个菌体亚群。对占异养细菌总数 34.5% 的两个优势亚群(A-NS-SpR 亚群, 不产芽孢的球杆状菌; B-SF-SR 亚群, 产芽孢的短杆状菌)的 16S rDNA 序列分析结果表明, A-NS-SpR 亚群属于变形菌门中的 2 个纲 3 个科 8 个属约 12 个种, 其中 *Halomonas ventosae* 和 *Donghicola eburneus* 两个种数量最多, 占该亚群菌株的 59.1%。B-SF-SR 亚群属于厚壁菌门芽孢菌纲的 3 个科 4 个属约 12 个种, 其中 *Bacillus decolorationis* 和 *Halobacillus trueperi* 两个种数量最多, 占该亚群菌株总数的 60.6%。从属的水平上讲, *Bacillus* 和 *Halomonas* 是优势属。A-NS-SpR 亚群在健康塘中的丰度(菌株数量)明显高于病害塘, 但多样性(种属数量)差别较小, 其中 Rhodobacteraceae 科在两个塘中的数量差别最大。与此相反, B-SF-SR 亚群在健康塘和病害塘中的丰度相当, 但健康塘的多样性明显多于病害塘, *B. decolorationis* 和 *H. trueperi* 在病害塘中的优势更明显。

关键词: 三疣梭子蟹; 底泥; 异养细菌; 群落; 16S rDNA

中图分类号: S 968.25⁺2

文献标识码: A

近年来, 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus* Miers) 成为浙江省的重要海水养殖品种之一。但随着养殖规模的不断扩大和集约化程度的不断提高, 各种疾病, 特别是细菌性疾病频发, 给三疣梭子蟹养殖业造成严重的经济损失, 严重制约了梭子蟹养殖业的持续健康发展^[1-2]。

病害的发生是梭子蟹、病源菌和环境相互作用的结果, 其中环境的恶化是主要因素, 环境中的理化因子变化可改变养殖水体及底泥中微生物的群落结构。正常情况下, 环境中的微生物群落, 有益或无害微生物的丰富度及多样性足以抑制环境中有害和条件致病菌的繁殖, 维持整个养殖环境的生态健康; 而当管理不当, 水质恶化, 再遇上天气的急剧变化(急剧降温、暴风雨侵袭、连续阴雨天等)时, 一方面, 可直接造成梭子蟹免疫力的下降, 容易受条件致病菌侵染, 另一方面造成一个有利于病原菌繁殖环境, 有益有害微生物

之间的平衡被打破, 条件致病菌大量繁殖, 导致疾病的发生。因此, 研究养殖水体及底泥中微生物的多样性特别是异养细菌的菌群结构及其演替规律对于探明梭子蟹发病原因及制定病害防治措施具有重要意义^[3]。

我们选取两个代表性的三疣梭子蟹养殖塘, 其中一个塘中梭子蟹发生类似“牛奶病”的疾病, 其典型症状为三疣梭子蟹沿岸爬上, 活动力差、呼吸困难、行动迟缓, 随病情加重, 外壳颜色有点发黄, 发病蟹死亡率为 100%, 造成梭子蟹连续不断死亡, 称为病害塘; 另一个塘, 没有明显的梭子蟹死亡迹象, 称为健康塘。我们基于菌落菌体特征和 16S rDNA 序列比对对这两个三疣梭子蟹养殖塘表层底泥中的细菌群落组成进行了比较研究, 初步揭示了健康塘和病害塘底泥异养细菌群落组成上的差异, 以期对探明梭子蟹发病原因、制定病害综合防治措施提供理论基础和具体指

收稿日期: 2010-01-03 修回日期: 2010-03-01

资助项目: 浙江省自然科学基金人才培养项目(R305333); 教育部创新团队(IRT0734); 教育部科学技术研究重点项目(208053); 宁波市农业攻关项目(2006C100042); 宁波大学学科项目(XK0715045)

通讯作者: 张德民, Tel: 0574-87600164, E-mail: zhangdemin@nbu.edu.cn

导。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2005年10月15日,宁波象山高塘岛,按照参考文献[4]的要求采集健康塘和病害塘的表层底泥。采样时间为10:00-12:00,每个养殖塘内按对角线方向设置了3个平行点(进出水口、池中央、相对于出水口的池边),应用抓斗式采泥器采集表层泥样,用无菌刀切取2 cm×5 cm×2 cm(长×宽×深度)的泥样块于无菌培养皿中,各平行样混合后,于4℃保存,在采样后4 h内处理样品。

1.2 理化因子的测定

酸碱度(pH)、温度(T)和盐度(S)分别用酸度计、温度计和盐度计进行测定,溶解氧(DO)用碘量滴定法、氨氮(NH₃-N)和硫化物(H₂S)用纳氏比色法测定。

1.3 细菌的分离、纯化及形态学研究

细菌计数、分离和纯化均采用 ZoBell 2216E^[5]培养基。准确称取泥样5 g,置于装有45 mL 无菌生理盐水的锥形瓶中,并加入灭菌的 Tween-80(终浓度为 5×10^{-6} mg/L),充分震荡成悬浮液,进行10倍梯度稀释,选择合适的3个稀释度取样分析,每个稀释度设3个平行,取100 μL 稀释液涂布平板,30℃连续培养2~5 d,逐日记录各平板菌落数及菌落形态。挑单菌落划线分离纯化3次。细胞形态观察,对细菌18 h培养物进行革兰氏染色,用光学显微镜油镜观察;芽孢形态观察用孔雀石绿染色法^[6]。

1.4 细菌基因组 DNA 的提取及 16S rDNA 基因的 PCR 扩增

细菌基因组 DNA 的提取参照张德民等^[7]的方法进行,并加以改进:菌株培养至对数生长期离心收集菌体,用 TE 洗涤细胞,重悬于 TE 中,加溶菌酶 0~2 mg/mL,37℃处理 5~30 min,加 SDS 至终浓度为 2%,60℃处理 5~60 min,酚/氯仿/异戊醇抽提,氯仿抽提两次,乙醇沉淀,溶于去离子水中。采用对大多数细菌的 16S rDNA 基因 V3 区具有特异性的引物对 341f-518r^[8] 扩增长约 230 bp 的片段用于 DGGE 分析。采用细菌通用性引物对 27f-1512r^[8] 扩增细菌 16S rDNA 约 1 400 bp 的片段用于测序。50 μL PCR 反应体

系为 0.2~1 μg 基因组 DNA,4 μmol/L 引物,200 μmol/L dNTPs,5 μL 10× Buffer,1 U DNA 聚合酶,补双蒸水到 50 μL。PCR 扩增采用降落 PCR:94℃预变性 5 min;前 10 个循环为 94℃ 1 min,65~60℃ 1 min,72℃ 30 s(其中每个循环后复性温度下降 0.5℃);后 18 个循环为 94℃ 1 min,60℃ 1 min,72℃ 30 s;最后 72℃ 延伸 5 min。

1.5 PCR 扩增产物的 DGGE 分析

变性梯度凝胶电泳(DGGE)^[8]在 DCode system(Bio-Rad)上进行,采用 8% 聚丙烯酰胺凝胶,变性梯度为 40%~70%,每个点样孔点 8 μL PCR 产物,在 60℃、180 V 的条件下电泳 6 h。电泳后,采用银染法^[9]进行染色,并用凝胶成像系统观察电泳条带并拍照。

1.6 细菌 16S rDNA 序列的测定及系统发育学分析

应用细菌通用性引物(27f-1541r) PCR 扩增细菌的 16S rDNA,用 UNIQ-10 柱式通用 DNA 纯化试剂盒纯化 PCR 产物,送上海生物工程技术服务有限公司进行序列测定,将所得序列通过 Blast 比对,与 NCBI^[10]上已有序列进行相似性比较,使用 Mega 4.0 软件构建系统发育树。

2 结果

2.1 养殖塘的理化因子和异养细菌总数

三疣梭子蟹养殖健康塘与病害塘理化因子的检测结果如表 1 所示,结果表明健康塘与病害塘基本没有差别,各项指标均在正常范围^[11]。健康塘与病害塘底泥中异养细菌总数差异不大,都在 10⁶ CFU/mL 数量级。健康塘异养细菌总数为 2.60×10⁶ CFU/mL,病害塘异养细菌总数为 1.87×10⁶ CFU/mL。这比文献报道的虾池环境^[12]和网箱养殖环境^[13]中异养细菌的数量高出 1 到 2 个数量级。但与石亚素等^[14]的结果一致。我们认为这可能是由于养殖业主投入过多饵料以及梭子蟹自身的排泄物使得塘内底泥中有机物含量大增,异养细菌迅速生长所致。

2.2 基于菌落形态上的分群研究

我们从三疣梭子蟹的两个养殖塘泥样中共分离了 255 株细菌,其中 135 株来自健康塘,120 株来自病害塘,首先对其进行划线纯化,经 3~5 d 培养后,记录其菌落形态并统计归类。

表 1 三疣梭子蟹健康塘和病害塘理化因子的检测结果

Tab.1 The physical and chemical factors for water in a *Portunus trituberculatus* rearing pond with disease occurring and one without

项目 item	温度(℃) temperature	酸碱度 pH	盐度 salinity	溶氧(mg/L) dissolved oxygen	氨氮(mg/L) ammonia nitrogen	硫化氢(mg/L) hydrogen sulfide
健康塘 the pond without disease occurring	24	8.2	25	4.3	<0.2	<0.01
病害塘 the pond with disease occurring	25	8.5	25	4.5	<0.2	<0.01
参照 DB33/395-2003 《无公害三疣梭子蟹》 refer to DB33/395-2003 《pollution-free of <i>Portunus trituberculatus</i> 》	中低层水温 low-level temperature 15~32	7.8~8.5	15~32	>4	<0.5	<0.1

根据菌落形态的差异将 255 株细菌分为 13 个类群(表 2),其中有 2 个优势类群,3 个较丰富类群和 8 个低频度类群。在健康塘中的第一大优势类群是 A 类群,有 58 株细菌,第二大优势类群是 B 类群,有 34 株细菌,而病害塘中的情况正好相反,即 B 类群是第一优势类群,有 39 株细菌,A

类群是第二大优势类群,有 32 株细菌。A 类群与 B 类群在菌落边缘和表面形态上有差别,即前者是整齐、凸起菌落,后者则是波状轮廓、平展菌落。另外,C 类群、D 类群及 E 类群在健康塘和病害塘中也有较多的菌株,而其余 8 个类群数量很少,有些仅出现在个别塘中。

表 2 三疣梭子蟹健康塘和病害塘表层底泥异养细菌的菌落形态学特征

Tab.2 The colony morphological characteristics of heterotrophic bacteria in surface sediment of a *Portunus trituberculatus* rearing pond with disease occurring and one without

菌落类群 colony-based groups	菌落形态特征 colony morphological characteristics					菌株数 number of strains		
	形状 shape	边缘 margin	表面形态 surface shape	质地 texture	光泽 optical	健康塘 health	病害塘 disease	总数 total
A	圆形 circular	整齐 entire	凸起 convex	奶油状 creaming	有光泽 glistening	58	32	90
B	圆形 circular	波状轮廓 contoured	平展 flat	奶油状 creaming	有光泽 glistening	34	39	73
C	圆形 circular	整齐 entire	凸起 convex	奶油状 creaming	透明 transparent	10	9	19
D	圆形 circular	波状轮廓 contoured	凸起 convex	奶油状 creaming	有光泽 glistening	9	8	17
E	圆形 circular	整齐 entire	平展 flat	奶油状 creaming	黯淡 dull	2	11	13
8 个低频度类群 8 groups of low frequency						22	21	43
总数 total						135	120	255

2.3 基于菌体形态上的亚群归类分析

根据 255 株细菌菌体形态大小,可将其进一步归并成 33 个菌体亚群(表 3),其中 43 株产芽孢细菌仅分布在 A 和 B 两大优势类群的 3 个菌体亚群中(B-SF-SR, A-SF-LR, A-SF-MR),两养殖塘的产芽孢细菌比例相近,健康塘产芽孢细菌有 22 株,占了该塘异养细菌总数的 16.3%,病害塘产芽孢细菌有 21 株,占了该塘异养细菌总数的 17.5%;其余 212 株不产芽孢细菌分布在 13

个菌落类群的 30 个菌体亚群中,不产芽孢细菌比例约为 83%。

从表中可知,最大的一个菌体亚群 A-NS-SpR 为不产芽孢细菌,菌体为球杆状,大小为 $(0.6 \sim 1.1) \times (1.4 \sim 1.6) \mu\text{m}$,共有 49 株,其中有 36 株来自健康塘,13 株来自病害塘。第二优势亚群 B-SF-SR 为产芽孢细菌,菌体短杆状, $(0.6 \sim 1.0) \times (1.2 \sim 3.0) \mu\text{m}$,芽孢椭圆形,共有 39 株;其中健康塘有 20 株,病害塘有 19 株。

表 3 三疣梭子蟹健康塘和病害塘表层底泥异养细菌的菌体形态学特征
 Tab.3 The morphological characteristics of heterotrophic bacteria in surface sediment of
 a *Portunus trituberculatus* rearing pond with disease occurring and one without

芽孢 spore	菌体形状 cell shape	菌体大小(μm) cell size	菌体亚群 cell-based subgroups	亚群菌株数 number of isolates in sub-group				
				健康塘 health	病害塘 disease	总数 total		
产芽孢 spore-forming	短杆状 short-rod	$(0.6 - 1.0) \times (1.2 - 3.0)$	B-SF-SR	20	19	39		
	长杆状 long-rod	$(0.5 \sim 0.7) \times (5.2 \sim 10)$	A-SF-LR	2	1	3		
	中杆状 middle-rod	$(0.6 - 0.8) \times (4.2 - 6.8)$	A-SF-MR	0	1	1		
不产芽孢 non-spore- forming	球杆状 sphere-rod	$(0.6 \sim 1.1) \times (1.4 \sim 1.6)$	A-NS-SpR	36	13	49		
			D-NS-SpR	4	2	6		
			M-NS-SpR	1	2	3		
			长杆状 long-rod	$(0.5 - 1.0) \times (3.4 - 5.7)$	B-NS-LR	10	10	20
					A-NS-LR	11	6	17
					F-NS-LR	3	4	7
					J-NS- LR	2	1	3
					C-NS-LR	0	2	2
					I-NS- LR	2	0	2
					N-NS- LR	0	1	1
	细中杆状 thin-middle-rod	$(0.3 \sim 0.5) \times (1.0 \sim 3.0)$	A-NS-TMR	9	11	20		
			B-NS-TMR	1	10	11		
			J-NS-TMR	1	0	1		
			中杆状 middle-rod	$(0.7 - 1.2) \times (1.5 - 3.0)$	C-NS-MR	7	5	12
					E-NS-MR	0	7	7
					G-NS-MR	1	3	4
	弧形 curved-rod	$(0.5 \sim 0.8) \times (1.0 \sim 5.2)$	D-NS-MR	0	1	1		
			D-NS-CR	3	5	8		
	橄榄形 olive	$(0.8 - 1.5) \times (1.5 - 3.5)$	B-NS-CR	2	0	2		
			N-NS-OI	3	4	7		
			E-NS- OI	2	4	6		
			H-NS-OI	1	1	2		
			K-NS-OI	2	0	2		
细长杆状 thin-long-rod	$(0.3 \sim 0.5) \times (3.0 \sim 6.0)$	B-NS-OI	1	0	1			
		F-NS-OI	0	1	1			
卵圆形 ovate	$(1.0 - 1.5) \times (1.0 - 2.0)$	C-NS-TLR	3	2	5			
		D-NS-TLR	2	0	2			
		G-NS-Ov	2	2	4			
		H-NS-Ov	3	0	3			
总数 total				F-NS-Ov	1	2	3	
				135	120	255		

注:1. 菌体亚群编号为菌落类群-芽孢产否-菌体形态,如 A-NS-SpR 为菌落类群 A 中不产芽孢的球杆状菌体亚群;B-SF-SR 为菌落类群 B 中产芽孢的短杆状菌体亚群。2. 菌体亚群符号,SpR,球杆状 sphere-rod;SR,短杆状 short-rod;TMR,细中杆状 thin-middle-rod;LR,长杆状 long-rod;MR,中杆状 middle-rod;CR,弧形 curved-rod;OI,橄榄形 Olive.

Notes:1. The composition of subgroup name, Colony group- forming spore -cell morphology. For example, A-NS-SpR represent Non Spore-forming Sphere-Rod bacteria in group A, ;B-SF-SR means Spore-Forming Short-Rod bacteria in group B. 2. The meaning of subgroup name, SpR, sphere-rod;SR, short-rod;TMR, thin-middle-rod;LR, long-rod;MR, middle-rod;CR, curved-rod;OI, Olive.

有些亚群在健康塘和病害塘中数量相当,除前述 B-SF-SR 亚群外,还有 A-NS-SMR、B-NS-LR、C-NS-MR 亚群;有些亚群的数量则在两个塘中差别很大,如前述 A-NS-SpR 和 A-NS-LR 这两个亚群在健康塘中分别有 36、11 株,明显高于病害塘中的数量(分别有 13 和 6 株);另一方面,B-NS-SMR 和 E-NS-MR 亚群在病害塘中的数量是 10 和 7 株,而在健康塘中则只发现 1 株 B-NS-SR,没有发现 E-NS-MR 亚群。其余亚群菌株数量很少,有些仅出现在个别塘中。这种分布上的差别是否与病害的发生相关值得进一步深入研究。

2.4 PCR-DGGE 指纹分析

我们对养殖塘中占分离细菌总数 34.5% 的两大优势亚群 A-NS-SpR 和 B-SF-SR 进行

PCR-DGGE 指纹分析,将同一菌落亚群的菌株放在同一板胶上进行 DGGE,带型完全一致的菌株看作同一个发育型(宫曼丽等^[15]),只测定其中 1 个代表菌株的序列。图 1 是筛除相同发育型的一个例子,选取 A-NS-SpR 亚群的细菌进行 PCR-DGGE 分析,在该亚群中,菌株 D-S1-24, H-S1-30, H-S2-49 (No. 2~4) 等 3 株细菌的 DGGE 带型完全一致,因此可以看成是同一发育型,菌株 D-S1-19 (No. 6) 和 D-S1-42 (No. 7) 的带型也完全一致,也可看作同一发育型,其它菌株的分析以此类推。这板胶上共有 20 株菌,经过 DGGE 筛选,只需对筛选出的 11 个代表菌株进行测序即可。两个养殖塘的 A-NS-SpR 和 B-SF-SR 的菌株共 88 株菌,在转接过程中死亡 11 株,实际分析 77 株。最后分成 30 个 DGGE 带型。

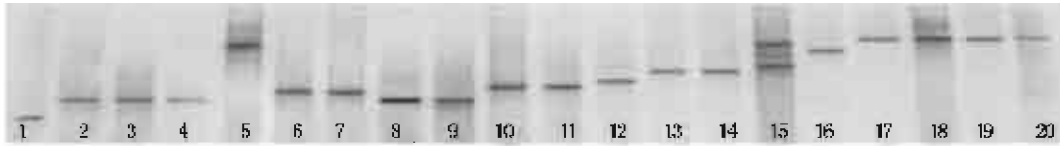


图 1 A-NS-SpR 亚群细菌 16S rDNA 的 DGGE 图谱

Fig. 1 DGGE profile of 16S rDNA of A-NS-SpR subgroup bacteria

No. 1: H-S2-11; No. 2: D-S1-24; No. 3: H-S1-30; No. 4: H-S2-49; No. 5: D-S2-10; No. 6: D-S1-19; No. 7: D-S1-42; No. 8: H-S1-27; No. 9: H-S1-41; No. 10: H-S2-12; No. 11: H-S2-25; No. 12: D-S1-45; No. 13: D-S2-28; No. 14: H-S1-22; No. 15: H-S2-46; No. 16: H-S1-7; No. 17: D-S2-22; No. 18: H-S2-39; No. 19: H-S2-23; No. 20: D-S1-10.

2.5 细菌的鉴定及系统发育分析

对上述 30 个 DGGE 带型的代表菌株的 16S rDNA 进行测序,将所得序列在 GenBank 数据库中进行 Blast 比对,找出与其最相近的序列所对应的种属(表 4),通常情况下,如果两个菌株的 16S rDNA 序列同源性 $\geq 97\%$,可以认为属于同种细菌,据此,30 条序列归属于 24 个种,取 24 个代表性菌株和对应种的典型菌株的序列构建系统发育树,如图 2 所示。

非产芽孢杆菌 A-NS-SpR 亚群的 44 株细菌全部属于变形菌门(Proteobacteria),分属于 α -变形菌纲的 Rhodobacteraceae 科和 γ -变形菌纲的 Halomonadaceae 科和 Alteromonadaceae 科,共有约 8 个属 12 个种(表 4,图 2-a)。其中 *Halomonas ventosae* 和 *Donghicola eburneus* 两个种菌株数量最多,分别有 17 和 9 株,占到该亚群菌株的 38.6% 和 20.5%。比较 A-NS-SpR 亚群在健康塘和病

害塘中的分布,相对于丰度的明显差别(菌株数量之比:31 株 vs 13 株),其多样性差别较小(种的数量之比:9 vs 7)。Rhodobacteraceae 科在两个塘中的菌株数量差别最大,健康塘中有 12 株,而病害塘中只有 2 株。在健康塘的 9 个种中,*H. ventosae* 和 *D. eburneus* 2 个种是优势种,而病害塘的 7 个种中只有 *Hm. ventosae* 为优势种。

对于产芽孢的 B-SF-SR 亚群来说,33 株菌分属于 3 个科 4 个属 12 个种(表 4,图 2-b)。其中 *Bacillus decolorationis* 和 *Halobacillus trueperi* 2 个种菌株数量最多,各有 10 株,合计占该亚群菌株总数的 60.6%。与 A-NS-SpR 亚群不同,B-SF-SR 在健康塘和病害塘中的分布丰度相当(18 株 vs 15 株),但健康塘的多样性(10 个种)明显高于病害塘(4 个种),*B. decolorationis* 和 *H. trueperi* 在病害塘的优势更明显。

表 4 三疣梭子蟹健康塘和病害塘表层底泥优势亚群细菌的物种多样性
 Tab.4 Diversity of dominant subgroup bacteria in surface sediment of
 a *Portunus trituberculatus* rearing pond with disease occurring and one without

目/科 order/family	属/种 genus/species	代表菌株 representative strains	相近种 16S rDNA 序列 16S rDNA sequences of similar species	16S rDNA 相似性 (%) 16S rDNA similarity	菌株数 number of strains		
					健康塘 health	病害塘 disease	总数 total
Rhodobacterales Rhodobacteraceae	<i>Donghicola eburneus</i>	H-S1-27					
		D-S1-24	DQ667965	99	8	1	9
	<i>Paracoccus zeaxanthinifaciens</i>	H-S2-24	AF461158 (T)	100	2	0	2
	<i>Phaeobacter gallaeciensis</i>	D-S2-31	Y13244 (T)	99	0	1	1
	<i>P. daeponensis</i>	H-S2-11	DQ981486	99	1	0	1
Oceanospirillales Halomonadaceae	<i>Citricella thiooxidans</i>	H-S1-1	AY639887 (T)	98	1	0	1
		D-S2-45	AY268080	97	12	5	17
	<i>H. salina</i>	H-S1-3 D-S2-51	X87217 (T)	97	2	2	4
Alteromonadales Alteromonadaceae	<i>H. taeanensis</i>	D-S2-22	AY671975 (T)	97	0	1	1
		H-S2-23 D-S1-10	DQ097526	98	2	2	4
	<i>Microbulbifer variabilis</i>	H-S1-8	AB167354	99	2	0	2
	<i>Marinobacterium litorale</i>	H-S1-60	DQ917760	97	1	0	1
	<i>M. stanieri</i>	D-S2-10	AB021367 (T)	99	0	1	1
Bacillales Bacillaceae	<i>Bacillus decolorationis</i>	H-S1-2 D-S1-2	AJ315075 (T)	97	3	7	10
		<i>B. aquimaris</i>	H-S2-32	AF483625 (T)	98	3	0
	<i>B. niacini</i>	D-S1-47	AB021194 (T)	97	0	1	1
	<i>B. pumilus</i>	H-S1-14	AY456263 (T)	100	2	0	2
	<i>B. megaterium</i>	H-W2-37	X60629 (T)	100	1	0	1
	<i>B. horti</i>	H-S2-15	D87035 (T)	97	1	0	1
	<i>B. horomiphilus</i>	H-S1-17	AB198718	99	1	0	1
	<i>B. hwajinpoensis</i>	H-S1-59	AF541966 (T)	99	1	0	1
	<i>Halobacillus trueperi</i>	H-S1-20 D-S1-52	AJ310149 (T)	98	4	6	10
		<i>H. dabanensis</i>	D-S1-30	AY351895 (T)	99	0	1
	<i>Planomicrobium okeanokaites</i>	H-S1-7	D55729 (T)	100	1	0	1
	<i>Exiguobacterium aestuarii</i>	H-S1-18	AY594264 (T)	100	1	0	1
	总数 total					49	28

注: T 代表典型菌株, H 代表健康塘, D 代表病害塘。

Notes: T is typical strains, H is strains which come from the pond without disease occurring, D is strains which come from the pond with disease occurring.

3 讨论

传统的细菌分类鉴定是一项复杂而细致的工作, 首先需对待鉴定的菌株进行分离纯化, 然后对其菌落特征、菌体形态、生理生化反应、次级代谢产物、生长条件、脂类组成、核酸性质等几十项指标进行描述和试验, 步骤十分繁琐。并且这些指标特征界限不清或不稳定, 受人为因素影响较大, 往往使实验陷入窘境, 使研究工作事倍功半。因此, 本实验室尝试了在细菌多样性的研究时, 只做传统鉴定中最直接、最简单的菌落

菌体形态特征的描述, 并以此作为初步分群的依据, 绕开繁杂的后续鉴定, 直接从分子层面进行多样性分析, 证明在基本不丢失细菌多样性的同时, 大大减轻了工作量^[9]。这里采用同样策略深入研究了健康塘和病害塘底泥中的细菌多样性。

我们根据菌落特征, 将分离自健康塘和病害塘中的 255 株细菌分成 13 大类群, 又基于菌体形态将其分成 33 个亚群。菌株数量最多的两个亚群占总菌株的 34.5%。第一优势亚群 A-NS-SpR 为不产芽孢杆菌, 占细菌总数的 19.2%, 占不产

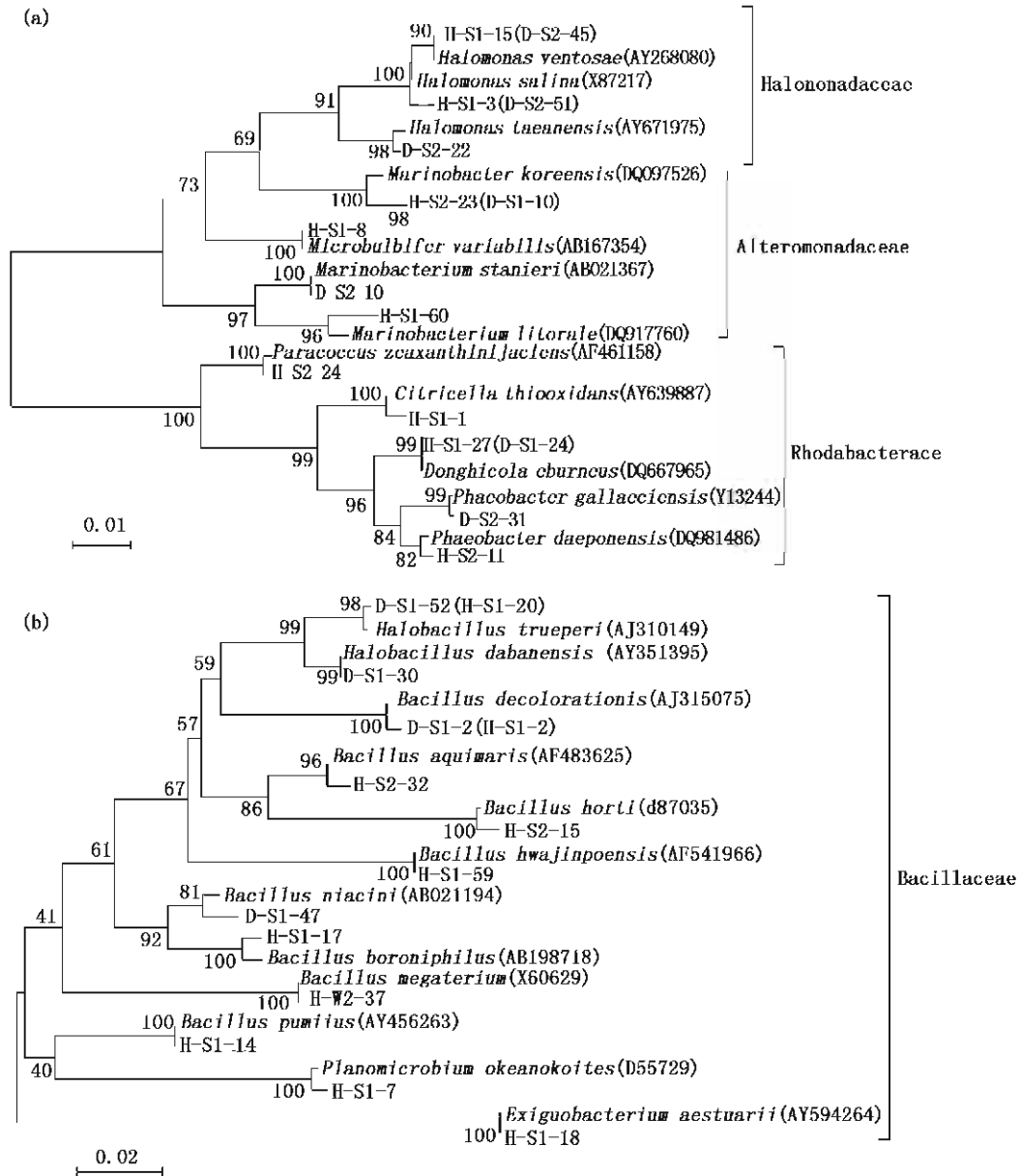


图2 三疣梭子蟹养殖塘表层底泥细菌 A-NS-SpR 亚群 (a) 和 B-SF-SR 亚群 (b) 的 16S rDNA 系统发育树
图中如果一个节点有两个代表菌株 (如, H-S1-15 (D-S2-45)) 则表示该种在健康塘和病害塘都有分布。

Fig. 2 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequences of representative strains of A-NS-SpR subgroup (a) and B-SF-SR subgroup (b) bacteria from the surface sediments of *Portunus trituberculatus* rearing ponds.

Two representative stains at one position (For example, H-S1-15 (D-S2-45)) indicate that this species distributed in both the ponds with and without disease occurring.

芽孢菌总数的 23.1%, 属于变形菌门中的 2 个纲 3 个科 8 个属, 其中 *Halomonas ventosae* 和 *Donghicola eburneus* 两个种数量最多, 合计占该亚群菌株的 59.1%。第二优势亚群 B-SF-SR 为产芽孢杆菌, 占细菌总数的 15.3%, 占产芽孢菌的 90.7%, 属于 4 个属约 12 个种, 其中 *Bacillus*

decolorationis 和 *Halobacillus trueperi* 两个种数量最多, 均占该亚群菌株的 30.3%。两个优势亚群的 4 个优势种合计 46 株, 占两个塘细菌总数的 18%。从属的水平上讲, *Bacillus* 和 *Halomonas* 是优势属, 分别有 20、22 株菌, 合计占两个塘细菌总数的 16%。*Bacillus* 属细菌有很多种都是益生菌

剂的组成细菌, *Halomonas* 属细菌至今还未见报道与疾病爆发有关,可认为是无害菌。他们是否在养殖池塘细菌群落结构和功能方面发挥重要的生态作用,是一个值得关注的问题。我们在对所有细菌的胞外酶检测和氮磷化合物代谢能力的研究也发现,这两个属的细菌在有机质降解和氮磷循环方面发挥着重要作用补充文献。

健康塘中,变形菌门有 9 个种,31 株菌,产芽孢细菌有 10 个种,18 株菌。病害塘中变形菌门的多样性稍有降低,仍有 7 个种,但其丰度明显降低,只有 13 株菌,其中 *Rhodobacteraceae* 科由 12 株降到 2 株;而产芽孢细菌在丰度上变化不大,仍有 15 株,但多样性丧失严重,仅剩 4 个种,其中 *B. decolorationis* 和 *H. trueperi* 两个种优势更加明显。异养细菌的丰度和多样性的变化与病害的发生相关性还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] 何伟贤. 三疣梭子蟹养殖常见病及防治办法[J]. 水产科学, 2004, 25(5): 29-31.
- [2] 王建平, 余晓巍, 周志强, 等. 宁波市三疣梭子蟹主要病害流行特征及应对措施[J]. 河北渔业, 2008, (9): 49-53.
- [3] 张志南, 田胜艳. 异养细菌在海洋生态系统中的作用[J]. 青岛海洋大学学报, 2003, 33(3): 375-383.
- [4] 国家海洋局. 海洋调查规范[M]. 北京: 海洋出版社, 1975.
- [5] 李筠, 吕艳, 李军, 等. 苗期中国对虾幼体异养细菌区系及其变化与病害发生的关系[J]. 中国海洋大学学报, 2004, 34(6): 1003-1007.
- [6] 东秀珠, 蔡妙英, 张德民, 等. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [7] 张德民, 黄志勇, 杨惠芳, 等. 几株红假单胞菌属细菌的表观特征及其遗传多样性研究[J]. 微生物学报, 2000, 40(3): 229-236.
- [8] 温丹, 张德民, 初航. 网箱养殖海区底泥产芽孢细菌多样性[J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(5): 615-621.
- [9] 钱丽君, 张德民, 徐小红. 应用 DGGE 分析三疣梭子蟹养殖塘底泥细菌的多样性[J]. 水产学报, 2007, 31(2): 204-210.
- [10] National Center for Biotechnology Information. Nucleotide sequence data bases (GenBank) [EB/OL]. [2008-10-26]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- [11] SMALLA K, WIELAND G, BUCHNER A, et al. Bulk and Rhizosphere soil bacterial community studies by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(10): 4742-4751.
- [12] 郭平, 许美美. 对虾养殖池水域环境细菌的动态变化[J]. 海洋与湖沼, 1994, 25(6): 626-629.
- [13] 金珊, 王国良, 薛良义, 等. 海水网箱养殖水域异养细菌和弧菌的数量动态[J]. 海洋渔业, 1999, 21(4): 154-156.
- [14] 石亚素, 童国忠, 薛超波, 等. 舟山市三疣梭子蟹养殖环境及生物体内细菌学研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(7): 801-803.
- [15] 宫曼丽, 任南琪, 邢德峰. DGGE/TGGE 技术及其在微生物分子生态学中的应用[J]. 微生物学报, 2004, 44(6): 845-848.

Comparative investigation of the heterotrophic bacterial community in the surface sediment of *Portunus trituberculatus* rearing pond

SUN Su-yan, ZHANG De-min*, QIAN Li-jun, PAN Zhi-chong, CHEN Wen-gui

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Faculty of Life Science and Biotechnology,

Ningbo University, Ministry of Education, Ningbo 315211, China)

Abstract: Heterotrophic bacterial community, in the surface sediment of *Portunus trituberculatus* rearing ponds with disease occurring and one without, was investigated by means of the morphology and 16S rDNA sequences. A total of 255 isolates were roughly clustered into 13 colony-based groups and 33 cell-based subgroups. The 16S rDNA sequences were analyzed of the two dominant subgroups A-NS-SpR (non spore-forming sphere-rod in A group) and B-SF-SR (spore-forming short-rod in B group), both of which accounted for 34.5% of all isolates. Subgroup A-NS-SpR belongs to phylum Proteobacteria, including two classes, three families, eight genera and about twelve species, and the dominant species are *Halomonas ventosae* and *Donghicola eburneus*, which totally accounted for 59.1% of this subgroup. Subgroup B-SF-SR belongs to phylum Firmicutes, including one class (Bacilli), three families, four genera and about twelve species. And two species (*Bacillus decolorationis* and *Halobacillus trueperi*) accounted for 60.6% in this subgroup, much more than other species. At genus level, *Bacillus* and *Halomonas* are majors within sbugroup. Subgroup A-NS-SpR show much higher abundance (number of isolates) in the healthy pond than in the diseased one, but similar diversity (number of species) with the latter. And family Rhodobacteraceae shows the biggest drop in the abundance in the diseased pond. In contrast, Subgroup B-SF-SR shows minor differences in abundance in healthy and diseased ones, but its diversity in the diseased pond lost obviously, compared with the healthy one.

Key words: *Portunus trituberculatus*; sediment; heterotrophic bacteria; community; 16S rDNA

Corresponding author: ZHANG De-min. E-mail: zhangdemin@nbu.edu.cn