

## 凡纳滨对虾覆膜养殖池塘沉积物 微生物群落的磷脂脂肪酸谱图分析

翟海佳<sup>1</sup>, 郑忠明<sup>1\*</sup>, 金中文<sup>2</sup>, 陆开宏<sup>1</sup>, 孙芳<sup>1</sup>, 汪洋<sup>1</sup>, 李越蜀<sup>1</sup>

(1. 宁波大学教育部应用海洋生物技术重点实验室, 浙江 宁波 315211;

2. 宁波市海洋与渔业研究院, 浙江 宁波 315020)

**摘要:**于2010年7—10月,选择浙江省宁波市3个凡纳滨对虾覆膜养殖池塘进行水质、沉积物理化因子的研究,并采用磷脂脂肪酸谱图(PLFA)法研究了沉积微生物在不同养殖阶段的群落结构变化及其与环境因子的相关性。结果表明,在整个凡纳滨对虾养殖期间,沉积物PLFAs组成以饱和脂肪酸、支链脂肪酸和单不饱和脂肪酸为主,多不饱和脂肪酸与环丙烷脂肪酸含量较少。微生物总生物量、细菌生物量和真菌生物量伴随着养殖的进行都明显增加。虽然沉积物微生物是以细菌为主体,但真菌更适应沉积物的环境,因此细菌与真菌的比值在不断降低。 $G^+$ 细菌与 $G^-$ 细菌的比值表现在养殖后期比中期有所下降,但在末期变化不明显。冗余分析(RDA)表明,微生物总生物量、细菌生物量和真菌生物量与总氮(TN)正相关性最为显著, $G^+$ 细菌生物量和 $G^-$ 细菌生物量与 $NO_2^-$ -N、 $NO_3^-$ -N呈现显著的正相关,这些微生物群落结构因子全部和透明度(SD)呈现显著负相关关系。

**关键词:**凡纳滨对虾;覆膜池塘;沉积物;微生物群落结构;磷脂脂肪酸谱图

**中图分类号:**Q 938.8; S 967.4

**文献标志码:**A

池塘沉积物是指池塘水体范围内发生的物理、化学及生物学过程所产生的沉降物质,是养殖生态系统的重要组成部分。沉积物中的有机质一部分可以被底栖生物同化,还有很大一部分需要微生物的参与才能进行分解<sup>[1]</sup>。因此,池塘中的微生物生态系统状况,微生物数量种群组成上的变动以及代谢分解有机物的能力对养殖环境有很大的影响<sup>[2]</sup>。由于养殖生态系统的特殊性,池塘内微生物群落不仅受到环境中能源、营养、捕食等因素的影响还要受到各种有序的人类活动的干预,如人工投饵、增氧、调节pH等。因此,养殖环境中微生物群落结构的变化应该呈现一定的规律性,反应当时养殖系统的健康状况。

有关养殖池塘沉积物中微生物的相关研究已有较多报道,贾俊涛等<sup>[3]</sup>采用围隔实验生态学方法,对对虾养殖池塘沉积物中的细菌总量、氨化细

菌、产 $H_2S$ 细菌和硫酸盐还原菌的数量变化进行监测;申玉春等<sup>[4]</sup>用血球板计数法对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)高位池沉积中的细菌数量的动态变化进行了研究;钱丽君等<sup>[5]</sup>用传统平板稀释法对三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)养殖池塘泥样中的细菌进行分离纯化,并应用PCR-DGGE方法揭示各类群细菌的分类多样性;LEON等<sup>[6]</sup>对养殖池塘表层沉淀物中微生物的活动特点进行了研究。但目前这些研究大都是建立在分离培养计数的基础之上,然而大部分环境微生物处于存活不可培养状态,使得通过传统培养分离法了解环境微生物生物量与群落结构变化比较困难;另外由于不同地域气候、气象特点不同,养殖品种不同,各地的养殖水域和池塘的生态系统有其显著的特点,因此不同养殖池塘沉积物微生物生物量与群落结构之间的变化趋势往往不相同。

收稿日期:2011-06-02 修回日期:2011-09-21

资助项目:国家科技支撑计划(2011BAD13B08);宁波大学教研项目(JYXMxzh200913)

通讯作者:郑忠明, E-mail: zhengzhongming@nbu.edu.cn

近年来,磷脂脂肪酸(phospholipid fatty acid, PLFA)谱图分析技术已广泛应用于堆肥样品、湖泊沉积物和土壤微生物群落研究<sup>[7-9]</sup>,但应用于养殖池塘沉积物微生物群落结构分析还鲜有报道。本研究通过现场调查,选择了新型养殖模式下的凡纳滨对虾覆膜养殖池塘,对其进行现场和实验室的水质及沉积物理化因子检测,并引入PLFA法对沉积物中微生物群落结构不同时期的变化进行分析,通过主成分分析(principal component analysis, PCA)和冗余分析(redundancy analysis, RDA)研究环境因子与沉积物微生物群落结构间的关系,旨在通过对新型养殖模式池塘环境微生物生态的研究,比较准确地了解其生态状况,监测环境变化,并用来指导养殖生产。

## 1 材料与方法

### 1.1 采样池塘

选择浙江省宁波市横山码头的3个理化条件相同的高密度凡纳滨对虾养殖池塘,池底全部覆盖厚度为0.5 mm的黑色聚乙烯塑料薄膜,每个池塘面积约3 000 m<sup>2</sup>,养殖期间池塘水位为1.5~1.8 m。7月5日统一投放虾苗(0.8~1.0 cm),放养密度100 ind/m<sup>2</sup>。在养殖期间,前期(7月5日—8月5日)不换水,中期(8月5日—9月5日)每半个月少量换水,后期(9月5日—9月25日)累积换水三分之一,末期(9月25日以后)因已开始捕捞,不再换水。增氧方式为水表层铺设管道和水车增氧两种方式结合。

### 1.2 样品的采集和处理

于2010年7—10月,每10天采集3个覆膜凡纳滨对虾养殖池塘的中间和四周底层的水样,水样中氨氮、亚硝酸盐、硝酸盐、总氮、总磷等指标用HACH(DR/2800)水质检测仪检测,测定方法按照《海洋调查规范》进行<sup>[10]</sup>。现场利用美国产的HACH(Quanta)水质检测仪,检测池塘底部(沉积物与水界面接触处)溶解氧、温度、盐度、pH,并用透明度盘测定水体透明度。同时分别在养殖的中期、后期、末期3个时期分别采集覆膜池底稠状沉积物于灭菌的样品瓶中,然后放入4℃泡沫塑料冷藏箱中保存,并在采样后的4 h内进行冷冻干燥处理。

### 1.3 微生物群落分析方法

用PLFA法测定沉积物微生物群落结构,

PLFA是活体微生物细胞膜恒定组分,其对环境因素敏感且在生物体外迅速降解,因此特定菌群PLFA变化可反映出原位土壤细菌、真菌活体生物量与菌群结构<sup>[11-13]</sup>。具体操作在WHITE等<sup>[14]</sup>的方法上加以改进:(1)提取,称5 g冷冻干燥后的沉积物,加入4 mL柠檬酸缓冲液,5 mL氯仿,10 mL甲醇[V(柠檬酸缓冲液):V(氯仿):V(甲醇)=0.8:1.0:2.0],25℃避光震荡3 h,3 000 r/min离心10 min后取上清液。再加入5 mL柠檬酸缓冲液和5 mL氯仿(柠檬酸缓冲液:氯仿:甲醇=0.9:1.0:1.0),震荡1 min,避光条件下保存18 h。经18 h静置分离后,吸走上层水相部分,保留底层氯仿相,在氮气下吹干氯仿。(2)分离,使用固相萃取装置分离PLFA,固相萃取小柱为Supelco Discovery SPE DSC-Si Silica tube. 3 mL. 500 mg(52654-u. pack of 54),先用10 mL氯仿清洗小柱,3 mL氯仿分批溶解样品后注入硅胶柱内,然后依次分别加入10 mL氯仿、10 mL丙酮、10 mL甲醇,收集甲醇相并在氮气下吹干。(3)甲脂化,向吹干样品中加入1 mL V(甲醇):V(甲苯)(1:1)和1 mL 0.2 mol/L KOH甲醇溶液,手动摇晃1 min,放入水温34~36℃温浴15 min,后冷却到室温,依次加入2 mL去离子水,0.3 mL 1 mol/L HAc,2 mL正己烷,漩涡混合30 s,然后3 000 r/min离心10 min,重复提取一次,合并两次提取的正己烷相,氮气下吹干,-20℃冷冻保存。在进行GC测定前用加入C19:0做为内标的正己烷(色谱纯)定溶。

GC条件:GC型号为Agilent 6890;毛细管柱采用HP-5(30 m×0.25 mm×0.25 μm)不分流进样,进样口温度260℃,检测器温度260℃。PLFAs定量根据外标标样,选用Supelco公司的Bacterial Acid Methyl Esters Mix和478852-U内含37种脂肪酸甲酯(fatty acid methyl esters, FAMES)混合标样,可涵盖沉积物PLFAs范围。

脂肪酸分子式以“X:Y $\omega$ Z(c/t)”表示,其中“X”代表脂肪酸分子的碳原子总数,“Y”代表不饱和烯键的数目,“ $\omega$ ”代表烯键距离羧基的位置,“Z”为烯键或环丙烷链的位置。前缀“i”(iso)代表异构甲基支链(距甲基端的第二个碳原子),“a”(anteiso)代表前异构甲基支链(距甲基端的第三个碳原子),“cy”代表环丙基支链,后缀“c”和“t”分别代表顺式和反式同分异构体。

特征脂肪酸是不同微生物类群的生物标志物,根据现有的研究成果<sup>[15-17]</sup>,本研究以 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, i15:0, a15:0, i16:0, 16:1 $\omega$ 9, i17:0, cy17:0 作为细菌源脂肪酸;真菌源脂肪酸以 18:1 $\omega$ 9c + t, 18:2 $\omega$ 6c + t, 18:3 $\omega$ 3 表示;革兰氏阳性菌( $G^+$ )以 i15:0, a15:0, i16:0 和 i17:0 表示,革兰氏阴性菌( $G^-$ )以 cy17:0 表示。

#### 1.4 数据分析

数据采用主成分分析及冗余分析等数学统计方法,分析软件为 ORIGIN8、SPSS 18.0、CANOCO for windows 4.5。

## 2 结果

### 2.1 池塘水质环境和营养盐变化

在整个调查期间,3 个池塘的水质变化保持了良好的一致性。其中水温大致相近(28.47 ~ 32.43  $^{\circ}\text{C}$ ),没有发生较大的起伏;盐度在整个养殖过程中有下降趋势,尤其在后期更为明显,整个过程的平均盐度为 25.19;pH 随着养殖的进行有

增高的趋势,但大体波动范围为 8.24 ~ 9.92,平均为 9.20,为碱性水体;溶解氧因使用了两种不同的增氧方式,且进行了定时增氧,因此波动不是太大,基本维持在 5 ~ 9 mg/L;池塘透明度变化在 0.25 ~ 1.20 m,平均为 0.55 m,水体透明度前期较高,但随养殖时间的延长,中后期水中有机碎屑和无机悬浮物的数量,以及水中浮游植物、浮游动物的种类和数量的大幅增加而显著下降(表 1)。养殖试验期内 3 个池塘的水体营养盐呈现了明显的变化,主要表现在总氮随着养殖的进行一直呈现上升的趋势;亚硝酸盐和硝酸盐在养殖前期和中期保持了一个很低的水平,但到了后期都发生了急速的提升。氨氮在整个养殖期间则经历了一个低水平到一个高水平后又迅速回落的过程;总磷在养殖前期到中期这个阶段呈现上升趋势,并在中期达到了最高值,但伴随着养殖的继续进行而又迅速回落,最后在养殖的末期再次升高(表 1)。

表 1 实验池塘各项水质指标  
Tab.1 The main water quality indicators of the experimental ponds mean  $\pm$  SD

日期 date	水温/ $^{\circ}\text{C}$ WT	pH	盐度 S	溶氧/ (mg/L) DO	透明度/ m SD	氨氮/ (mg/L) $\text{NH}_4^+$ -N	硝氮/ (mg/L) $\text{NO}_3^-$ -N	亚硝氮/ (mg/L) $\text{NO}_2^-$ -N	总氮/ (mg/L) TN	总磷/ (mg/L) TP
07-06	28.47 $\pm$ 0.61	8.47 $\pm$ 0.17	27.86 $\pm$ 0.47	8.26 $\pm$ 0.13	1.17 $\pm$ 0.03	0.060 $\pm$ 0.010 <sup>a</sup>	0.233 $\pm$ 0.057 <sup>a</sup>	0.010 $\pm$ 0.004 <sup>a</sup>	1.700 $\pm$ 0.458 <sup>a</sup>	0.380 $\pm$ 0.095 <sup>a</sup>
07-15	30.05 $\pm$ 0.22	8.44 $\pm$ 0.29	26.23 $\pm$ 2.64	6.31 $\pm$ 0.79	0.97 $\pm$ 0.03	0.140 $\pm$ 0.122 <sup>a</sup>	0.367 $\pm$ 0.115 <sup>a</sup>	0.028 $\pm$ 0.022 <sup>a</sup>	2.667 $\pm$ 0.416 <sup>b</sup>	0.527 $\pm$ 0.065 <sup>a</sup>
07-25	29.40 $\pm$ 0.39	9.25 $\pm$ 0.08	26.69 $\pm$ 3.60	5.81 $\pm$ 0.74	0.78 $\pm$ 0.06	0.073 $\pm$ 0.023 <sup>a</sup>	0.267 $\pm$ 0.058 <sup>a</sup>	0.004 $\pm$ 0.002 <sup>a</sup>	1.467 $\pm$ 0.153 <sup>a</sup>	0.593 $\pm$ 0.049 <sup>ab</sup>
08-05	30.65 $\pm$ 0.46	9.49 $\pm$ 0.34	28.13 $\pm$ 3.21	6.22 $\pm$ 1.99	0.67 $\pm$ 0.03	0.080 $\pm$ 0.056 <sup>a</sup>	1.300 $\pm$ 0.385 <sup>b</sup>	0.003 $\pm$ 0.001 <sup>a</sup>	1.933 $\pm$ 0.551 <sup>ab</sup>	0.670 $\pm$ 0.070 <sup>ab</sup>
08-15	30.88 $\pm$ 1.32	9.37 $\pm$ 0.24	28.50 $\pm$ 2.49	7.18 $\pm$ 0.74	0.60 $\pm$ 0.05	0.243 $\pm$ 0.172 <sup>a</sup>	1.467 $\pm$ 0.153 <sup>b</sup>	0.004 $\pm$ 0.003 <sup>a</sup>	2.767 $\pm$ 1.305 <sup>b</sup>	1.150 $\pm$ 0.248 <sup>c</sup>
08-25	30.93 $\pm$ 0.84	9.36 $\pm$ 0.18	26.27 $\pm$ 1.00	6.14 $\pm$ 0.85	0.53 $\pm$ 0.03	0.313 $\pm$ 0.205 <sup>a</sup>	1.400 $\pm$ 0.60 <sup>b</sup>	0.008 $\pm$ 0.005 <sup>a</sup>	5.867 $\pm$ 0.666 <sup>c</sup>	1.000 $\pm$ 0.200 <sup>c</sup>
09-05	29.68 $\pm$ 0.12	9.52 $\pm$ 0.37	26.79 $\pm$ 3.03	6.47 $\pm$ 1.13	0.43 $\pm$ 0.03	1.643 $\pm$ 0.330 <sup>b</sup>	0.700 $\pm$ 0.200 <sup>ab</sup>	0.103 $\pm$ 0.031 <sup>ab</sup>	5.567 $\pm$ 1.365 <sup>c</sup>	0.400 $\pm$ 0.173 <sup>a</sup>
09-15	32.43 $\pm$ 0.17	9.24 $\pm$ 0.30	23.98 $\pm$ 2.03	7.92 $\pm$ 0.77	0.35 $\pm$ 0.00	1.700 $\pm$ 0.656 <sup>b</sup>	1.467 $\pm$ 0.833 <sup>b</sup>	0.428 $\pm$ 0.145 <sup>c</sup>	6.667 $\pm$ 0.929 <sup>c</sup>	0.287 $\pm$ 0.045 <sup>a</sup>
09-25	29.92 $\pm$ 0.19	9.38 $\pm$ 0.05	20.03 $\pm$ 0.86	8.46 $\pm$ 0.77	0.27 $\pm$ 0.03	0.520 $\pm$ 0.205 <sup>a</sup>	6.867 $\pm$ 1.401 <sup>c</sup>	0.579 $\pm$ 0.006 <sup>d</sup>	8.767 $\pm$ 0.961 <sup>d</sup>	0.866 $\pm$ 0.335 <sup>bc</sup>

注:表中同一列标有不同字母的平均数表示差异显著( $P < 0.05$ )。

Notes: Means with different superscripts in the same column of chart are significantly different( $P < 0.05$ ).

### 2.2 沉积物微生物群落结构分析

沉积物磷脂脂肪酸组成及相对含量 在养殖的不同时期,3 个不同的池塘总共检测到 PLFA

种类从 C14 到 C20 共计 21 种。其中,饱和脂肪酸包括 14:0、15:0、16:0、17:0 和 18:0 这 5 种,其相对含量为 42.61% ~ 65.24%,是沉积物中含量

最丰富的脂肪酸种类,其次是支链脂肪酸  $i15:0$ 、 $a15:0$ 、 $i16:0$ 、 $i17:0$  和单不饱和脂肪酸  $14:1$ 、 $15:1$ 、 $17:1$ 、 $18:1\omega9c$ 、 $18:1\omega9t$ 、 $16:1\omega9$ 、 $20:1$  相对含量分别为 6.24% ~ 10.31% 和 15.23% ~ 21.49%。多不饱和脂肪酸  $18:2\omega6c$ 、 $18:2\omega6t$ 、 $18:3\omega3$ 、 $20:3\omega3$  的相对含量较低,仅占总 PLFA 的 2.77% ~ 6.11%,而环丙基脂肪酸  $cy17:0$  的相对含量最低,不到总磷脂脂肪酸(PLFA)的 2%。

特征性脂肪酸的主成分分析(PCA) 将不同时期能指示不同微生物群落类型的特征性脂肪酸进行主成分分析(图 1),结果显示:PC1 和 PC2 两个主成分占沉积物微生物群落结构组成的 81.4%。除  $i16:0$  外,其他特征脂肪酸远离原点,说明在养殖过程中脂肪酸的含量发生了明显变化。其中  $14:0$ 、 $a15:0$ 、 $16:1\omega9$ 、 $cy17:0$ 、 $18:0$ 、 $18:1\omega9c+t$ 、 $18:2\omega6c+t$  和  $18:3\omega3$  在 PC1 上的载荷值较高,主成分一是它们的代表因子。其中的不饱和脂肪酸是指示真菌的特征脂肪酸脂肪酸, $cy17:0$  是革兰氏阴性菌( $G^-$ )的特征脂肪酸,说明了真菌和  $G^-$  在养殖过程中发生了明显的变化。 $i15:0$ 、 $i16:0$ 、 $i17:0$  在 PC1 上的载荷值相对较低,它们是革兰氏阳性菌( $G^+$ )的特征性脂肪酸,说明养殖过程沉积物中的  $G^+$  变化相对不明显。

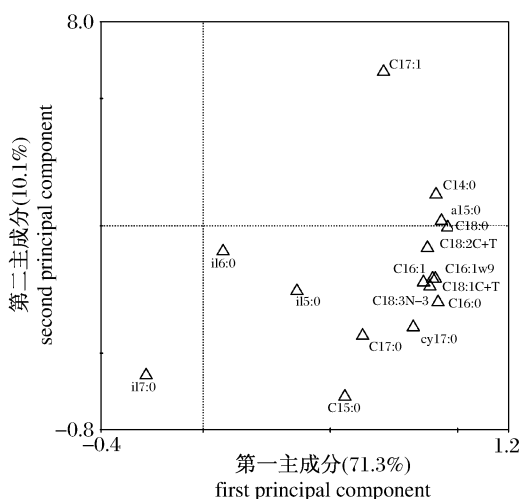


图 1 PCA 分析显示特征脂肪酸随养殖时间的变化分布

Fig. 1 PCA of characteristic fatty acid profiles of samples in different culture period

### 2.3 微生物总 PLFA (生物量) 及群落结构变化

有研究发现用总 PLFA 指示的生物量与用熏蒸技术提取计算的微生物生物量有很好的相关性<sup>[18-19]</sup>。因此本试验用总 PLFA 指示总微生物

生物量变化。如图 2 所示,在整个凡纳滨对虾养殖的不同时期,3 个实验塘沉积物中的微生物量有显著变化,主要表现在 PLFA 总量(TPLFA)随着凡纳滨对虾养殖的延长皆呈递增的趋势,后期的 TPLFA 为养殖中期的 1.5 ~ 1.7 倍,到了末期 TPLFA 已达到中期的 1.8 ~ 2.2 倍。同时通过对各类型微生物特征性 PLFA 的统计分析,细菌和真菌的生物量(BPLFA 和 FPLFA)以及  $G^+$  PLFA 和  $G^-$  PLFA 也是随着养殖时间的延长而逐渐增加的,这和上述计算的微生物总生物量的变化趋势相同。但通过对比不同养殖时期的 BPLFA 和 FPLFA 后发现,在养殖的整个周期内,虽然沉积物中微生物是以细菌为主体的群落结构,但 BPLFA 与 FPLFA 的比值(B:F)由养殖中期的( $6.60 \pm 0.78$ )降到后期的( $5.63 \pm 0.49$ )再到末期的( $4.73 \pm 0.23$ )。这说明了随着养殖的进行,细菌生物量在整个微生物群落中的比重在不断降低,养殖过程中池底沉积物底质理化特性的改变更适应于真菌的生长繁殖。 $G^+$  PLFA 与  $G^-$  PLFA 的比值在中期约为( $2.15 \pm 0.16$ ),到了后期已经降到( $1.47 \pm 0.19$ )。但在末期时并没有发生明显变化,大体为( $1.46 \pm 0.11$ )。说明  $G^+$  和  $G^-$  细菌在养殖池塘后期到末期这段时间里,结构比例已经趋于稳定,不再随环境变化而变化。

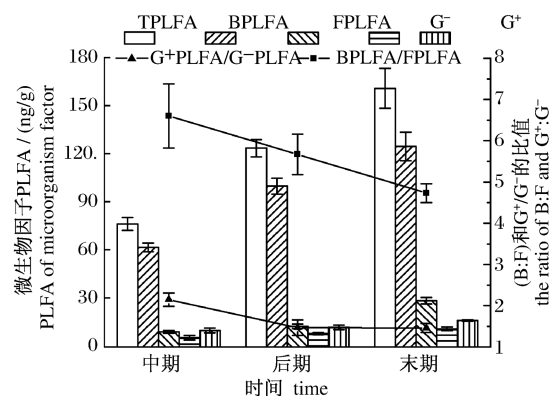


图 2 不同养殖时期沉积物微生物群落结构变化(平均值 ± 标准差)

Fig. 2 Variation of microbial community structure in the sediments of different aquaculture periods (mean ± SD)

### 2.4 沉积物微生物群落结构与环境因子关系的冗余分析(RDA)

通过选取总 PLFA (TPLFA)、细菌 PLFA (BPLFA)、真菌 PLFA (FPLFA)、 $G^+$  细菌 PLFA ( $G^+$  PLFA)、 $G^-$  细菌 PLFA ( $G^-$  PLFA)、细菌

PLFA: 真菌 PLFA (B:F) 和  $G^+$  细菌 PLFA:  $G^-$  细菌 PLFA ( $G^+ : G^-$ ) 7 个因子作为可能的群落分析指标和 DO、pH、温度、盐度、透明度以及 TP、TN、 $NH_4^+ -N$ 、 $NO_3^- -N$ 、 $NO_2^- -N$  等环境因子, 对它们进行冗余分析 (RDA), 考察各不同微生物群落因子与环境因子变量之间的关系, 以及各群落因子对微生物群落结构随外界条件变化的表征程度。冗余分析使用 CANOCO For windows 4.5 (图 3)。

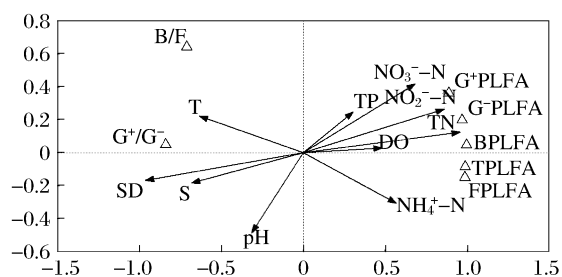


图 3 微生物群落结构因子与水质指标的冗余分析  
坐标轴上数值表示因子的重要程度, 箭头号延伸至该图边缘的因子表示其变化显著, 与其它因子具相关性。

Fig. 3 Redundancy analysis result of sediments microbial community structure variables and water quality indexes

The value of a coordinate axis indicates the factor is important, the arrow extends this chart edge, indicated that its change is remarkable, has the relevance with other factors.

TPLFA、BPLFA 和 FPLFA 3 个因子与总氮 (TN) 正相关性最为显著, 与透明度 (SD) 则呈显著负相关性。B:F 本身和 BPLFA 和 FPLFA 有着较好的负相关性 (图 3), 因此可以通过这两个因子进行表征。 $G^+$  PLFA 和  $G^-$  PLFA 与  $NO_2^- -N$ 、 $NO_3^- -N$  呈现显著正相关, 同时与 SD 的显著负相关性最高。 $G^+ : G^-$  本身和  $G^+$  PLFA 和  $G^-$  PLFA 有着很好的负相关性, 因此可以通过它们进行表征。BPLFA、TPLFA 和 FPLFA 3 个因子还与  $NO_2^- -N$  有显著正相关关系, 与  $NO_3^- -N$  和  $NH_4^+ -N$  的正相关关系稍弱, 与 S 呈现一定的负相关性。 $G^-$  PLFA、 $G^+$  PLFA 与 TN 存在着显著正相关, 与  $NH_4^+ -N$  则正相关性不显著。另外, 因为在养殖期间 T、pH、DO 变化不明显, 而 TP 发生了较大的波动, 因此 4 个可能的群落结构因子都没能很好地表征它们的变化 (图 3)。综上所述, 在本实验分析中, TPLFA、BPLFA、FPLFA、 $G^+$  PLFA 和  $G^-$  PLFA 5 个因子能够较好地反映微生物群落结构对环境因子的应答, B:F 和  $G^+ : G^-$  两个因子与环境营养要素相关性的主要特点虽然与其它 5 个因

子一样, 但是相关性明显较弱。

### 3 讨论

集约化养殖池塘是受人类活动直接影响的生态系统, 系统内群落生物量高、有机负荷大, 各种理化因子、生物因子关系十分复杂, 并且处于不断变化之中<sup>[20]</sup>。在本实验中, 3 个新养殖模式下的凡纳滨对虾覆膜养殖池塘, 因池底全部覆膜, 阻断了底泥与池水的物质交换, 因此随着养殖时间的增加, 由于大量残饵、排泄物和尸体等在池底沉积和腐败, 高温下, 水体中营养盐等浓度在养殖后期增加迅速。同时, 3 个池塘属于标准化养殖池塘, 因此在养殖过程中, 各种理化因子表现出相当的一致。

微生物、水生动物、外界环境、人工操作都影响养殖系统理化因子动态变化, 而微生物在环境中理化因子的动态变化中具有决定性的作用<sup>[21]</sup>。微生物是各种有机物质的分解者和转化者, 能直接利用动、植物生命活动过程中和死后分解形成的各类碎屑、生物大分子等。在分解过程中释放营养盐为浮游微藻大量繁殖提供所需的养分, 而浮游微藻对水体中的  $NH_4^+ -N$ 、 $NO_3^- -N$ 、 $NO_2^- -N$  以及 pH、溶解氧的变动有重要的影响, 所以养殖系统中的理化因子的动态变化与微生物具有显著的关系<sup>[22]</sup>。从本研究结果来看, 覆膜池塘的特殊环境状况, 使池底沉积物随着养殖的进行而产生。由于凡纳滨对虾迅速成长, 水体中的浮游植物和浮游动物也大量繁殖, 养殖废物 (如未被食用的饵料, 对虾的排泄物以及衰老死亡的浮游生物) 以固态营养物或溶解态营养物的形式沉积于水底, 同时池塘底质中 N、P 以及其他营养物的含量大量增加, 因而附着于其中的各类沉积物微生物也伴随着其所需养分的增加而迅速增加。细菌: 真菌的比值 (B:F) 可反映细菌和真菌含量的变化范围和两个种群的相对丰富程度<sup>[23]</sup>, 对比不同养殖时期的特征性脂肪酸后可发现, 覆膜池塘沉积物中的 B:F 比值逐渐降低, 表明在养殖的后期, 真菌的繁殖速度更快, 更适应覆膜池塘的沉积物环境。THIET 等<sup>[24]</sup> 和 VRIES 等<sup>[25]</sup> 分别报道了 B:F 比值低的微生物群落可驱动土壤内源碳底物进一步矿化, 因而可以表明土壤生态系统的稳定性。因此, 养殖池塘沉积物 B:F 比值的逐渐降低, 也暗示随着养殖的进行, 后期的沉积物生

态系统变得更为稳定。同时鉴于真菌在有机废物的生物处理方面有着积极的作用,故可认为真菌生物量的增加对覆膜池塘污染负荷的降低有较大贡献。另外在自然生态系统中, $G^+$ 在细菌结构中占优势,但在覆膜养殖池塘中这种优势却在养殖过程中逐渐降低。可见覆膜池塘的特殊生态环境对 $G^-$ 细菌有着更为积极的意义。

通过把微生物群落结构因子与水质指标进行RDA分析,发现TPLFA、BPLFA、FPLFA的变化与TN呈线性正相关关系, $G^+$  PLFA和 $G^-$  PLFA与 $NO_2^-$ -N、 $NO_3^-$ -N呈现显著正相关关系,说明了整个池塘的氮循环和微生物数量的动态变化有着重要的相互依托关系。微生物群落结构对环境变化尤其是可利用营养物质的变化很敏感<sup>[26]</sup>,当有机质大量存在时,微生物便能充分发挥其分解利用有机质的能力,其中的氮源更是以各种形式分散在水体中被各种类型的微生物所利用,因此也丰富了微生物的群落结构。KARNER等<sup>[27]</sup>的研究也表明氮含量高低以及氮源的循环有可能成为影响微生物数量变化的限制因子。另外COLORN等<sup>[28]</sup>提到趋于简单化的微生物群落生态系统是不稳定的,也增加了养殖生物患病的可能性,而丰富的微生物群落结构可以更好地维护养殖生态系统平衡。微生物的生命活动释放的营养盐能促使浮游植物的大量繁殖,导致SD降低。本实验中微生物总量与SD呈现负相关,进一步说明试验末期沉积物微生物的数量和多样性程度较高,促进了有机物的分解及浮游植物的生长。RIVKIN等<sup>[29]</sup>研究发现微生物的总量随水温升高而增大,但当水温已处于适宜范围时,温度对微生物的促进作用明显减弱,而其它影响因子变得更为重要。从本实验的水温变化趋势看,从7月到9月间采样,水温的变化幅度并不大,且处于微生物繁殖的适宜范围(27~33℃),因此对于微生物总量的相关性不高。

本实验利用PLFA技术分析了解膜凡纳滨对虾养殖池塘不同时期的沉积物中微生物群落结构变化情况和与环境因子的相关性。实验结果表明:整个养殖过程中,新型养殖模式的覆膜池塘环境因子表现出良好的一致性和稳定性,同时沉积物微生物群落的多样性以及结构变化与环境的协调性也表现得较为合理。PLFA技术利用PLFAs不同时期的组成差异来描述环境样品中的微生物

群体,在一定程度上克服了传统培养方法的缺陷,并且操作相对简便,是一种快捷、可靠的微生物群落分析方法。但在实际应用中,PLFA技术并不能准确地定量不同种群的绝对生物量,也不能反映种群功能特点<sup>[30]</sup>。因此,在今后的实验设计中应该结合其他分子生物学技术从微生物功能群落的层面研究微生物群落结构,并继续利用PLFA谱图分析方法对养殖池塘沉积微生物群落结构进行长期监测分析,通过与环境因子对比分析,以便更好地认识和利用微生物之间的结构变化及其物种的多样性来指导渔业生产。

#### 参考文献:

- [1] 崔玉珩. 人工养虾池生态系统结构特点及其控制对策[J]. 海洋科学, 1994, 23(2): 64-65.
- [2] BRIGGS M R P, FUNGE-SMITH S J. A nutrient budget of some intensive marine shrimp ponds in Thailand[J]. Aquaculture Research, 1994, 25(8): 789-811.
- [3] 贾俊涛, 吕艳, 李筠. 对虾围隔生态系底泥中细菌数量动态研究[J]. 动物医学进展, 2003, 24(4): 76-78.
- [4] 申玉春, 叶富良, 周玉竹, 等. 南美白对虾高位池沉积物理化性质和细菌状况的研究[J]. 华中农业大学学报, 2005, 24(4): 387-390.
- [5] 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.
- [6] LEON E, MEIJER YORAM A. On the use of micro-electrodes in fish pond sediments[J]. Aquacultural Engineering, 1999, 21(2): 71-83.
- [7] 喻曼, 曾光明, 陈耀宁, 等. PLFA法研究稻草固态发酵中的微生物群落结构变化[J]. 环境科学, 2007, 28(11): 2603-2608.
- [8] 赵大勇, 燕文明, 冯景伟, 等. 磷脂脂肪酸分析在湖泊沉积物微生物生态学研究中的应用[J]. 化学与生物工程, 2009, 26(12): 17-20.
- [9] 张秋芳, 刘波, 林营志, 等. 土壤微生物群落磷脂脂肪酸PLFA生物标记多样性[J]. 生态学报, 2009, 29(8): 4127-4137.
- [10] 国家海洋局, 国家技术监督局. GB 12763.6-91 海洋调查规范[S]. 北京: 中国标准出版社, 1993.
- [11] LIU B R, JIA G M, CHEN J, et al. A review of methods for studying microbial diversity in soil[J]. Pedosphere, 2006, 16: 18-24.
- [12] VESTAL J R, WHITE D C. Lipid analysis in microbial ecology[J]. Biological Science, 1989, 39:

- 535 - 541.
- [13] ZELLES L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil; A review [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1999, 29: 111 - 129.
- [14] WHITE D C, STAIR J O, RINGELBERG D B. Quantitative comparisons of in situ microbial biodiversity by signature biomarker analysis [J]. *Journal of Industry Microbiology*, 1996, 17: 185 - 196.
- [15] WHITE D C, FINDLAY R H. Biochemical markers form easurement of predation effects on the biomass, community structure, nutritional status, and etabolic activity of microbial biofilms [J]. *Hydrobiologia*, 1988, 159: 119 - 132.
- [16] FROSTEGARD A, BÅÅTH E. The use of phospholipids fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil [J]. *Biology and Fertility Soils*, 1996, 22(1 - 2): 59 - 65.
- [17] KLAMER M, BÅÅTH E. Microbial community dynamics during composting of straw material studied using phospholipid fatty acid analysis [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1998, 27: 9 - 20.
- [18] HELLEANN B, ZELLES L, PALOJARVI A, *et al.* Emission of climate-relevant trace gases and succession of microbial communities during open-window composting [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(3): 1011 - 1018.
- [19] ZELLES L, BAI Q Y, RACKWITZ R, *et al.* Determination of phospholipid and lipopolysaccharide-derived fatty acids as an estimate of microbial biomass and community structures in soils [J]. *Biology and Fertility Soils*, 1995, 19(2): 115 - 123.
- [20] 申玉春,熊邦喜,叶富良,等. 凡纳滨对虾高位池细菌数量变化与水环境因子的关系 [J]. *海洋科学*, 2006, 30(7): 33 - 37.
- [21] 郑天凌,陈瑛. 控制对虾弧菌病药物的实验研究 [J]. *水产学报*, 1994, 18(3): 215 - 220.
- [22] MORIARTYD J W. The role of microorganisms in aquaculture ponds [J]. *Aquaculture*, 1997, 151: 333 - 349.
- [23] FROSTEGARD A, BÅÅTH E, TUNLID A. Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1993, 25: 723 - 730.
- [24] THIET R K, FREY S D, SIX J. Do growth yield efficiencies differ between soil microbial communities differing in fungal; bacterial ratios? Reality check and methodological issues [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2006, 38(4): 837 - 844.
- [25] VRIES F T, HOFFLAND E, EEKEREN N V, *et al.* Fungal/bacterial ratios in grasslands with contrasting nitrogen management [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2006, 38(8): 2092 - 2103.
- [26] YOZA B A, HARADA R M, NIHOUS G C, *et al.* Impact of mariculture on microbial diversity in sediments near open ocean farming of *Polydactylus sexfilis* [J]. *Ecological Indicators*, 2007, 7(1): 108 - 122.
- [27] KARNER M, FUKS D, HERNDL G J. Bacterial activity along a trophic gradient [J]. *Microbial Ecology*, 1992, 24: 243 - 257.
- [28] COLORN A, DIAMANT A, ELDAR A, *et al.* *Streptococcus iniae* infections in Red Sea cage-cultured and wild fishes [J]. *Diseases Aquatic Organisms*, 2002, 49(3): 165 - 170.
- [29] RIVKIN R B, PUFLAND J N, ANDERSON M R, *et al.* Microzooplankton bacterivory and herbivory in the NE subarctic Pacific [J]. *Deep Sea Research II*, 1999, 46: 2579 - 2618.
- [30] ELSAS J D, DUARTE G F, ROSADO A S, *et al.* Microbiological and molecular biological methods monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1998, 32: 133 - 154.

## Study on sediment microbial community structure in *Litopenaeus vannamei* ponds covered with a bottom plastic sheet using phospholipid fatty acid ( PLFA ) analysis

ZHAI Hai-jia<sup>1</sup>, ZHENG Zhong-ming<sup>1\*</sup>, JIN Zhong-wen<sup>2</sup>, LU Kai-hong<sup>1</sup>,  
SUN Fang<sup>1</sup>, WANG Yang<sup>1</sup>, LI Yue-shu<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Institute of Ocean and Fisheries of Ningbo, Ningbo 315020, China)

**Abstract:** In order to better understand the important role of sediment microorganisms in material cycle and energy flow of aquaculture pond system, three shrimp (*Litopenaeus vannamei*) ponds covered with plastic sheet in the bottom in Hengshan, Ningbo were chosen and phospholipid fatty acid (PLFA) analysis methods were used to investigate the sediment microbial community structure and its relationship with physical-chemical factors during a three-month period (from June to September, 2010). The results showed that the sediment PLFAs were mainly contributed by the saturated fatty acid, branched fatty acid and monounsaturated fatty acid; the amount of polyunsaturated fatty acid and cyclopropane fatty acid was relatively smaller. The total microbial biomass, bacterial biomass and fungi biomass increased significantly with culture time. The principal component analysis (PCA) of the characteristic PLFAs in different periods showed the total of PC1 and PC2 explained the composition of sediment microbial community structure of 81.4%. Although the majority of microorganisms in the sediment were bacteria, bacteria/fungi ratio decreased significantly with culture time due to the better adaptation of fungi to the sediment habitat. The ratios of G<sup>+</sup>/G<sup>-</sup> bacteria in the later culture period were smaller compared to the mid-period, but did not change obviously from later period to final-period. Redundancy analysis (RDA) showed that the total microbial biomass, bacterial biomass and fungi biomass were significantly correlated with the total nitrogen and G<sup>+</sup> bacterium biomass, G<sup>-</sup> bacterium biomass were significantly correlated with the NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N. All of them were negatively correlated with the secchi depth (SD). The experimental results indicated that throughout the whole culture process, environmental factors of this new model ponds showed good consistency and stability. Simultaneously, the diversity of the sediment microbial community and the coordination between the structure variation and the environment are also relatively reasonable. The results also demonstrated that the PLFA technique well explained the microbial community according to the variation of PLFAs' composition in different periods, and overcame the shortcomings of traditional culturing analyzing methods to a certain extent.

**Key words:** *Litopenaeus vannamei*; pond covered with a bottom plastic sheet; sediment; microbial community structure; phospholipid fatty acid

**Corresponding author:** ZHENG Zhong-ming. E-mail: zhengzhongming@nbu.edu.cn