

文章编号: 1000-0615(2016)02-0207-11

DOI: 10.11964/jfc.20150209707

## 高密度杂交鳢养殖围隔沉积物微生物群落结构 垂直变化规律及其与理化因子的关系

魏南<sup>1</sup>, 路斌<sup>1,2</sup>, 余德光<sup>1</sup>, 王广军<sup>1\*</sup>, 谢骏<sup>1</sup>, 夏耘<sup>1</sup>, 陈成勋<sup>2</sup>

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东广州 510380;

2. 天津农学院, 天津 300384)

**摘要:** 为研究高密度养殖系统沉积物微生物群落结构垂直变化规律以及与其对应深度的环境因子的关系, 实验选取了华南地区高密度养殖的典型模式——杂交鳢养殖模式, 使用PCR-DGGE技术分析了养殖围隔不同深度(0~50 cm)沉积物中的微生物群落结构, 同时使用透析装置采集对应沉积物的原位间隙水, 并使用微量分光光度法测定间隙水中理化指标, 从而探讨高密度养殖系统微生物群落结构垂直变化规律及其与沉积物间隙水理化因子的关系。结果显示, ①不同深度的养殖围隔沉积物微生物群落结构通过聚类分析可分3个差异显著的类群: 上层(0~6 cm)、中层(7~38 cm)和深层(39~50 cm), 其中中层微生物多样性最为丰富。②DGGE电泳共获得46个条带, 其中中层条带最多, 深层沉积物条带最少。主要微生物类群归属于拟杆菌门、变形菌门、厚壁菌门、疣微菌门和浮霉菌门。③测定的沉积物间隙水中离子,  $\text{NO}_3^-$ -N、 $\text{SO}_4^{2-}$ -S和 $\text{Fe}^{2+}$ 在沉积物中垂直分布均匀, 无明显梯度变化; 而 $\text{NH}_4^+$ -N、 $\text{NO}_2^-$ -N和 $\text{PO}_4^{3-}$ -P浓度变化较大。 $\text{NH}_4^+$ -N浓度随深度增加而逐渐增加, 在15~18 cm后趋于稳定, 为10.98~77.87 mg/L,  $\text{PO}_4^{3-}$ -P浓度随深度增加而减少, 在9~10 cm后趋于稳定, 为0.01~0.14 mg/L。④微生物群落结构与理化因子的相关性分析结果表明,  $\text{NH}_4^+$ -N和 $\text{PO}_4^{3-}$ -P为影响微生物群落结构垂直分布最大的理化因子组合, 其中 $\text{NH}_4^+$ -N对微生物群落结构垂直分布的影响稍大于 $\text{PO}_4^{3-}$ -P。 $\text{NH}_4^+$ -N、 $\text{PO}_4^{3-}$ -P为影响微生物群落结构的主要理化因子, 是杂交鳢养殖系统环境调控的主要控制指标。

**关键词:** 杂交鳢; 微生物群落结构; 沉积物; 垂直分布; 变性梯度凝胶电泳; 理化因子  
**中图分类号:** Q 949.24; S 917.4  
**文献标志码:** A

高密度池塘养殖是我国水产养殖主要方式之一, 近年来随着养殖规模的不断扩大, 集约化程度越来越高, 养殖者为了提高产量和效益, 多依靠投入过量的商品饲料和增加养殖密度来实现<sup>[1]</sup>。由于养殖密度高、投饵量大, 鱼类摄食后留下的残饵以及排泄物的量也较大, 沉降于池塘底部, 沉积物污染严重, 致使溶氧降低, 氨氮、亚硝酸盐等指标增高, 生态环境恶化, 从而影响沉积物中微生物群落的演替<sup>[2]</sup>; 另一方面, 微生物代谢也通过同化、异化作用降解沉

积物中的有机质, 影响沉积物中物质的分布、循环、转化等<sup>[3-4]</sup>。因此, 了解养殖池塘沉积物的微生物群落结构特征及其与相应的理化因子作用关系, 对养殖池塘污染评估、利用微生物进行养殖环境调控、沉积物污染修复等具有重要的意义。

杂交鳢(*Channa maculate*♀×*Channa argus*♂)为我国南方重要的肉食性养殖鱼类之一。为研究高外源物质投入的养殖系统中沉积物垂直分层的微生物群落结构特征, 本实验以杂交鳢高

收稿日期: 2015-02-09 修回日期: 2015-11-13

资助项目: 国家科技支撑计划(2012BAD25B04); 广州市珠江科技新星专项(2014J2200088)

通信作者: 王广军, E-mail: wgj5810@163.com

密度养殖模式为研究对象,使用PCR-DGGE技术分析养殖系统中不同深度沉积物的微生物群落结构,使用透析装置(Dialysis Peepers)<sup>[5-6]</sup>采集原位的沉积物间隙水,并用微量分光光度法<sup>[7-8]</sup>测定间隙水中 $\text{NH}_4^+$ -N、 $\text{NO}_3^-$ -N、 $\text{NO}_2^-$ -N、 $\text{SO}_4^{2-}$ -S、 $\text{PO}_4^{3-}$ -P和 $\text{Fe}^{2+}$ ,探讨养殖系统中不同深度沉积物的微生物群落结构垂直变化特征及其与沉积物间隙水中离子的相关性,为高密度养殖环境调控和沉积物修复提供理论数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 养殖实验条件

养殖实验在广州市南沙区中心沟水产养殖有限公司进行。首先在一养殖塘(20 m×200 m)中心构建3个8 m×8 m养殖围隔,每个围隔放养平均体质量(25.29±5.46) g的杂交鳢鱼苗500尾,投喂蛋白含量为40%的杂交鳢配合饲料,投饵量按体质量的3%~8%投喂。

### 1.2 沉积物样品的采集与处理

沉积物采集于杂交鳢养殖后期,于2013-09-15在3个养殖围隔的中心使用透明柱状采泥器(普利特,北京)分别采集柱状沉积物样品。沉积物分层按照上密下疏的原则:0~10 cm沉积物按2 cm间隔取样5层;10~50 cm按4 cm间隔取样10层,共15层。取样后,3组平行样品分别装入无菌封口袋中,冰盒保存带回实验室,-80 °C保存样品待微生物总DNA的提取。

### 1.3 总DNA提取和PCR扩增

冷冻保存的沉积物先使用冷冻干燥机(FD-1,北京德天佑)干燥处理24 h,以去除沉积物水分,称取0.25 g干燥后沉积物,三组平行样品分别使用FastDNA Spin Kit for Soil试剂盒(MP,美国)提取沉积物微生物总DNA,提取的DNA混合到一起。本实验使用巢式PCR方法扩增微生物16S rDNA目标序列,第一次扩增使用引物对fd1(5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3')和rp1(5'-ACGGTTACCTTGTACGACTT-3')<sup>[9]</sup>,反应程序为:94 °C,3 min;(94 °C,1 min,54 °C,1 min,72 °C,90 s)×30循环。第一次的PCR产物稀释100倍,作为第二次PCR的DNA模板。第二次扩增使用带有GC夹的上游引物GC-341f(5'-CGCCCGCCGCGCGGGCGGGCGGGG

CACGGGGG-CCTACGGGAGGCAGCAG-3')和下游引物534r(5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')扩增<sup>[9,10]</sup>,反应程序为:94 °C,3 min:(94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C,30 s)×30循环;72 °C,5 min。引物由Invitrogen(上海)公司合成。PCR产物使用1%的琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.4 变性梯度凝胶电泳

PCR扩增产物在1 mm厚的梯度为42%~48%的聚丙烯酰胺变性胶上分离DGGE条带,胶浓度为6%,梯度胶是由0%和100%(7 M尿素,40%去离子甲酰胺)的储备液混合灌注而成。PCR产物使用量为20 μL加5 μL上样缓冲液。使用INGENYphorU电泳系统(Ingeny,荷兰),在温度60 °C,120 V电压下预电泳20 min,后在110 V电压条件下电泳12 h。电泳完毕后,在室温条件下将凝胶浸泡在稀释10 000倍的GeneFinder核酸染色溶液(至善生物,厦门)中染色30 min。用凝胶成像分析系统(Carestream, USA)分析染色后凝胶并拍照。使用Quantity One 4.6.2软件(Bio-Rad, USA)根据照片分析不同深度沉积物样品中电泳条带的数目和分布以推测其群落结构及多样性。具体操作过程参考夏耘等<sup>[11]</sup>的方法。

### 1.5 目的条带割胶回收与克隆测序

用清洗后的刀片将目的条带切割下,并用灭菌去离子水清洗3遍,放进1.5 mL EP管内并捣碎,然后加入灭菌去离子水浸泡24 h。取上清液做DNA模版使用引物对341f和534r进行扩增。将割胶纯化的PCR产物在冰上与载体pMD19-T(TaKaRa,大连)连接,16 °C水浴3 h后加入*E.coli* DH5α感受态细胞热激转化后,使用氨苄青霉素(100 mg/mL)抗性选取阳性转化子,碱性提取质粒并确认阳性克隆体后,送Invitrogen(上海)公司测序。测序结果去除载体序列后,在NCBI上进行分析比对,根据相关序列找出所属微生物种类范畴。使用软件MEGA 5.0以1000 Bootstrap Neighbor-Joining法构建种系统发生树。

### 1.6 沉积物间隙水离子浓度测定

本实验使用Peeper透析装置(Dialysis Peepers)<sup>[5-6]</sup>采集沉积物原位的间隙水,具体实验装置和操作方法参考Metzger等<sup>[12]</sup>和魏南等<sup>[13]</sup>,3个Peeper板于2013-07-10分别垂直插入3个养殖围隔沉积物预定位置中,待平衡2个月后,于柱状沉

积物采集时,同步从沉积物中取出,将Peeper板表面清洗后,迅速带回实验室,用移液枪刺破渗透膜抽取水样,用于测定相关离子浓度。

沉积物间隙水离子浓度测定采用酶标仪微量分光光度法<sup>[7-8]</sup>。相应沉积物间隙水离子浓度测定方法分别为NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N:靛酚法;NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N:Cu-Cd还原法;NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N:格里斯显色试剂法;PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P:钼蓝法;SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-S:BaSO<sub>4</sub>-明胶法;Fe<sup>2+</sup>:邻二氮杂菲法,每个理化数据测定3个平行样,计算平均值作为离子浓度结果。

## 1.7 数据分析

利用Quantity One软件获得的所有DGGE条带的峰度值(Peak)的矩阵分析垂直分层的微生物群落结构。数据首先经log(x+1)对数转化处理,然后使用PRIMER 6.0软件<sup>[14]</sup>的等级聚类分析CLUSTER(hierarchical clustering)和非参数多维尺度分析MDS(non-metric multi-dimensional scaling)进行聚类,并根据聚类分析结果划分类群,DGGE条带峰度值的相似性矩阵利用Bray-Curtis相似性方法构建,并使用相似性分析ANOSIM(analysis of similarity)功能检验划分的类

群间的差异性。理化因子数据首先经log(x+1)正态化转化并标准化处理,并利用Euclidean距离方法构建相似性矩阵。使用REALTE功能检验群落结构数据矩阵与理化因子矩阵是否相关性,然后BEST/BIOENV进一步分析影响微生物群落结构最佳的理化因子组合。生物多样性指数使用条带数(*S*)、Margalef's物种丰富度指数(*d*)、Pielou's物种均匀度指数(*J'*)和物种多样性指数(*H'*)表示<sup>[15]</sup>。使用CANOCO 4.5的典范对应分析CCA(canonical correspondence analysis)分析不同深度的微生物群落结构与理化因子之间的关系。

## 2 结果

### 2.1 沉积物微生物16S rDNA DGGE结果分析

杂交鳢养殖围隔沉积物微生物16S rDNA的DGGE电泳共获得46个条带,其中1~2号分别为1~2 cm、3~4 cm深度沉积物样品,含24条条带。3~12号为4~38 cm深度沉积物样品,含有33~36条条带。13~15号为深层38~42 cm、43~46 cm、47~50 cm样品,含有28条条带。根据聚类分析结果分为表层、中间和深层微生物群落,中层沉

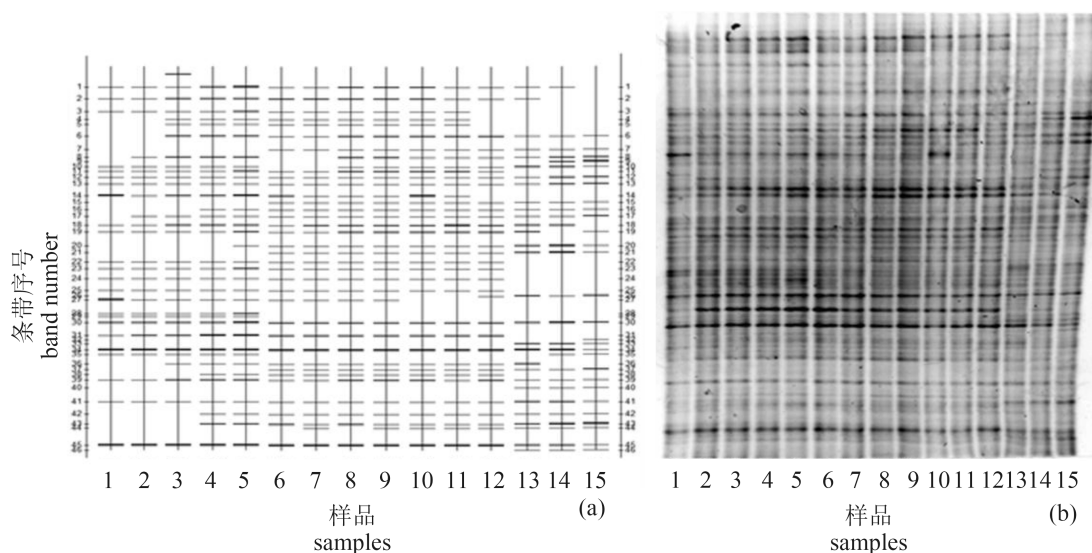


图1 养殖围隔沉积物垂直分层微生物DGGE图谱

(a) DGGE示意图; (b) DGGE电泳图谱

1. 1~2 cm; 2. 3~4 cm; 3. 5~6 cm; 4. 7~8 cm; 5. 9~10 cm; 6. 11~14 cm; 7. 15~18 cm;

8. 19~22 cm; 9. 23~26 cm; 10. 27~30 cm; 11. 31~34 cm; 12. 35~38 cm; 13. 39~42 cm; 14. 43~46 cm; 15. 47~50 cm

Fig. 1 DGGE maps of different depth of sediment samples in the hybrid snakehead aquaculture enclosures

(a) DGGE sketch map; (b) DGGE electrophoresis pattern

沉积物条带最多, 深层沉积物条带最少。所有深度沉积物共有条带为Band 10, 12, 13, 30, 34, 39, 41和45; 仅有中层沉积物有特有条带为Band 4, 5, 36, 38, 而表层和深层无特有条带。

## 2.2 DGGE目的条带克隆测序结果与分析

选取本实验丰度较高且有代表性的共有条带

和特有条带进行测序, 测序条带列表见表1。测序得到结果利用GenBank的Blast数据库进行核酸序列相似性比, 并鉴定菌种, 选用与数据库相似性最高(95%~100%)序列构建系统进化树(图2)。结果表明, 大部分测序序列的最相似序列为GenBank数据库中未培养的微生物克隆体(表1)。测序了28个DGGE条带, 共获得28个OTU(operational taxonomic unit)

表1 沉积物微生物DGGE目的条带克隆测序结果

Tab.1 The sequencing results of the prokaryote DGGE bands from the sediment samples

条带号 band name	序列长度 sequence size	GenBank数据库中最相近菌种名称(登录号) closest relative found in the GenBank database (access number)	相似性/% similarity
Band 4	194	Methylovorus glucosotrophus strain 6B1 (NR_104761.1)	98
Band 6	194	Methylovorus sp. MP688 strain MP688 (NR074780.1)	99
Band 8	189	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone PA-B16(DQ295374.1)	100
Band 9	189	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone Z32M54B(FJ484389.1)	98
Band 12	189	Uncultured bacterium clone NSDW2_01F(GU339485.1)	96
Band 13	189	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone GWS-Kdna25 (AY515486.1)	99
Band 14	189	Uncultured Bacteroidetes bacterium partial, clone VidyA-79 (FN679228.1)	100
Band 16	194	Alteromonas sp. 84BK9Y10 (KC815824.1)	98
Band 17	189	Uncultured bacterium clone Carbon Seq013_022210_B11 (EU283476.1)	99
Band 18	194	Uncultured beta proteobacterium clone Z17M85B (FJ484486.1)	99
Band 19	190	Bacteroidetes bacterium 6E gene (AB623231.1)	99
Band 22	189	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone CW2_P1_6D (KC110483.1)	99
Band 23	194	Uncultured gamma proteobacterium clone LMC67 (JN868230.1)	99
Band 24	193	Uncultured bacterium, clone: BSN183 (AB364887.1)	97
Band 25	194	Uncultured Geobacter sp. clone II-A-G4 (FR774780.1)	97
Band 30	169	Uncultured planctomycete clone Zac7187 (FJ485161.1)	95
Band 31	188	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone FII-AN009 (JQ579950.1)	96
Band 32	195	Uncultured Geobacter sp. clone ZJ-30d-108 (JN091622.1)	97
Band 33	193	Uncultured beta proteobacterium clone AlertF02 (JF508328.1)	99
Band 35	195	Uncultured Syntrophus sp. clone 128 (GU556344.1)	97
Band 38	194	Geobacter sp. Cd1 partial (HG005283.1)	99
Band 39	195	Uncultured Syntrophaceae bacterium clone DSS-10 (JN806341.1)	100
Band 40	181	Uncultured Firmicutes bacterium clone Aug-KB454 (JQ795311.1)	98
Band 41	187	Uncultured proteobacterium clone D10I2_INITIAL (GQ242394.1)	96
Band 42	195	Uncultured Desulfuromonadales bacterium clone d11CONTROL D35 (GQ242930.1)	100
Band 43	169	Roseomonas sp. JC162 partial (HE984358.1)	95
Band 45	169	Uncultured Firmicutes bacterium clone GASP-KC2W3_E01 (EU300078.1)	99
Band 46	172	Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone ZL56 (JF733689.1)	97

tional taxonomic unit), 分属于5个门: 拟杆菌门(Bacteroidetes)、变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)和浮霉菌门(Planctomycetes), 其中变形菌类为优势类群。变形菌门包括:  $\alpha$ -变形菌纲(Alphaproteobacteria)、 $\beta$ -变形菌纲(Betaproteobacteria)、 $\gamma$ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)和 $\delta$ -变形菌纲(Deltaproteobacteria)。

本实验获得的DGGE条带可以鉴定到属的条带分别是: Band 4和6属于嗜甲基菌属(*Methylophilus*)、Band 16属于交替单胞菌属(*Alteromonas*)、Band 25、32和38属于地杆菌属(*Geobacter*)、Band 35属于互营杆菌属(*Syntrophobacter*)、Band 43属于玫瑰单胞菌属(*Roseomonas*)。

### 2.3 微生物群落结构聚类分析及类群间的差异

杂交鳢养殖围隔垂直分层的沉积物微生物群落结构的CLUSTER和MDS聚类结果发现, 群落

结构按沉积物采样深度可分为表层沉积物、中间沉积物和深层沉积物3个类群, 其中MDS分析的2D压力系数仅为0.02(图3-b), 说明本聚类结果可以较好地解释各样品之间的关系(图3)。表层沉积物包括1~6 cm深的3个分层; 中间沉积物包括7~38 cm的9个分层; 深层沉积物包括47~50 cm的3个分层。

ANOSIM(one-way)检验3类群之间的差异, 深度不同的3个微生物类群之间的差异性极显著(Global  $R=0.962$ ,  $P<1\%$ ), 且中间沉积物微生物群落结构与表层和深层沉积物微生物群落结构之间都存在显著差异(中间vs. 表层:  $R=0.915$ ,  $P<1\%$ ; 中间vs. 深层:  $R=1$ ,  $P<1\%$ 差异性)。

### 2.4 微生物群落生物多样性分析

杂交鳢养殖围隔沉积物不同深度类群的微生物群落生物多样性指数的比较可知, 除物种均

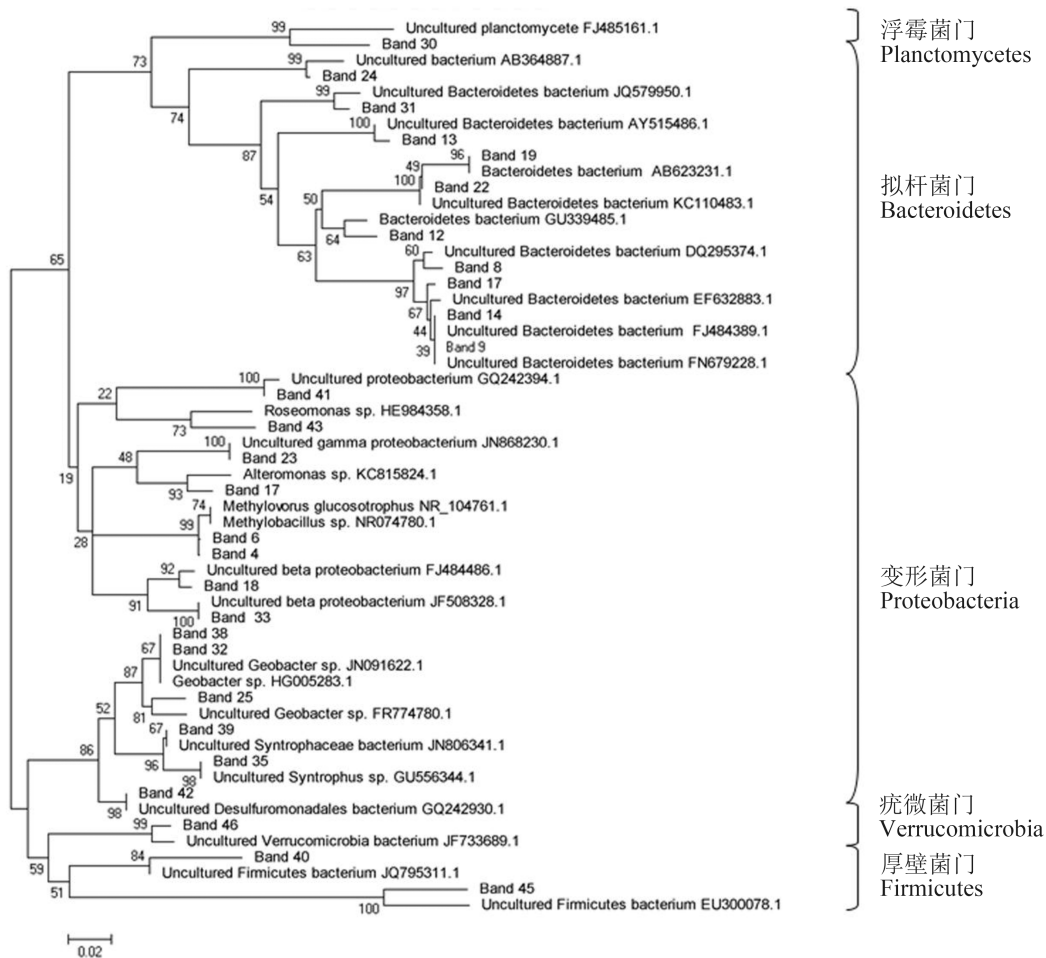


图 2 杂交鳢养殖围隔微生物系统谱系

Fig. 2 Phylogeny tree of microbial communities from the hybrid snakehead aquaculture enclosures

匀度指数( $J'$ )各类群相差不大外, 条带数( $S$ )、物种丰富度指数( $d$ )和物种多样性指数( $H'$ )都为中间类群最高, 深层次之, 表层最低(图4)。

### 2.5 沉积物间隙水理化因子垂直变化规律

由杂交鳢养殖围隔沉积物间隙水中各离子浓度垂直分布规律发现, 其中 $\text{NH}_4^+$ -N和 $\text{PO}_4^{3-}$ -P浓度垂直分布上下变化较大, 而 $\text{NO}_3^-$ -N、 $\text{NO}_2^-$ -

N、 $\text{SO}_4^{2-}$ -S和 $\text{Fe}^{2+}$ 在沉积物不同深度浓度差异不大(图5)。 $\text{NH}_4^+$ -N的浓度在表层沉积物随深度增加而升高, 15~18 cm后趋于稳定, 超过23 cm深后有稍降低的趋势, 变化范围为10.98~77.87 mg/L。 $\text{NO}_3^-$ -N、 $\text{NO}_2^-$ -N、 $\text{SO}_4^{2-}$ -S和 $\text{Fe}^{2+}$ 的浓度变化范围分别为0.30~0.44、0.05~0.07、8.25~14.39和0.000 30~0.000 53 mg/L (图5)。

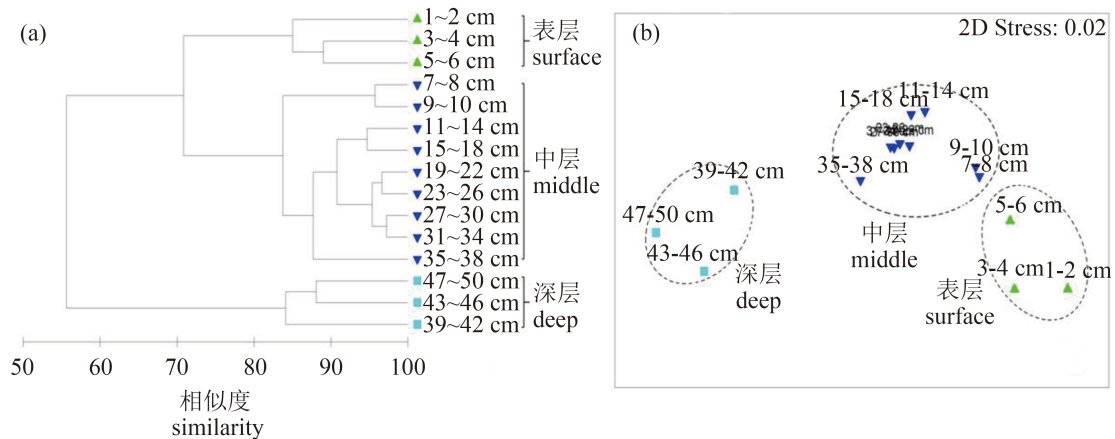


图3 CLUSTER和MDS聚类分析养殖围隔垂直分层的沉积物微生物群落结构

(a) CLUSTER聚类分析图; (b) MDS聚类分析图

Fig. 3 CLUSTER and MDS analysis of the depth-related microbial community structure in the hybrid snakehead aquaculture enclosures

(a) CLUSTER analysis; (b) MDS analysis

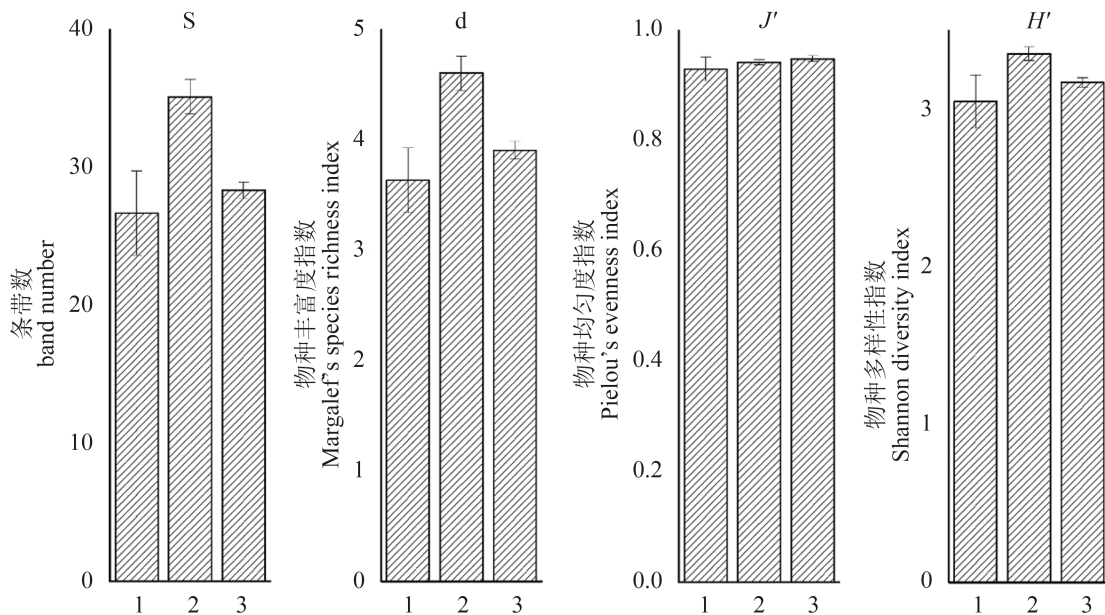


图4 养殖围隔三沉积物深度微生物类群的各生物多样性指数

1. 表层; 2. 中层; 3. 深层

Fig. 4 Diversity indexes of the three depth-related microbial communities in the hybrid snakehead enclosures

1. surface; 2. middle; 3. deep

### 2.6 微生物群落结构与理化因子之间的关系

PRIMER RELATE检验得出, 垂直分层的微生物群落结构数据矩阵与相应的理化数据矩阵具有较高的相关性( $\rho=0.32, 1\% < P < 5\%$ )。BEST/BIOENV进一步分析影响微生物群落结构最佳的理化因子组合为  $\text{NH}_4^+ \text{-N}$  和  $\text{PO}_4^{3-} \text{-P}$  ( $\rho=0.483, 1\% < P < 5\%$ ), 其中  $\text{NH}_4^+ \text{-N}$  ( $R=0.480$ ) 单

独对微生物群落结构的影响稍大于  $\text{PO}_4^{3-} \text{-P}$  ( $R=0.409$ )。CCA分析同样得出  $\text{NH}_4^+ \text{-N}$  和  $\text{PO}_4^{3-} \text{-P}$  为影响微生物群落结构的主要理化因子(图6)。

### 3 讨论

本研究得出杂交鳢养殖围隔垂直分层的沉积物微生物群落结构的变化具有明显的规律性,

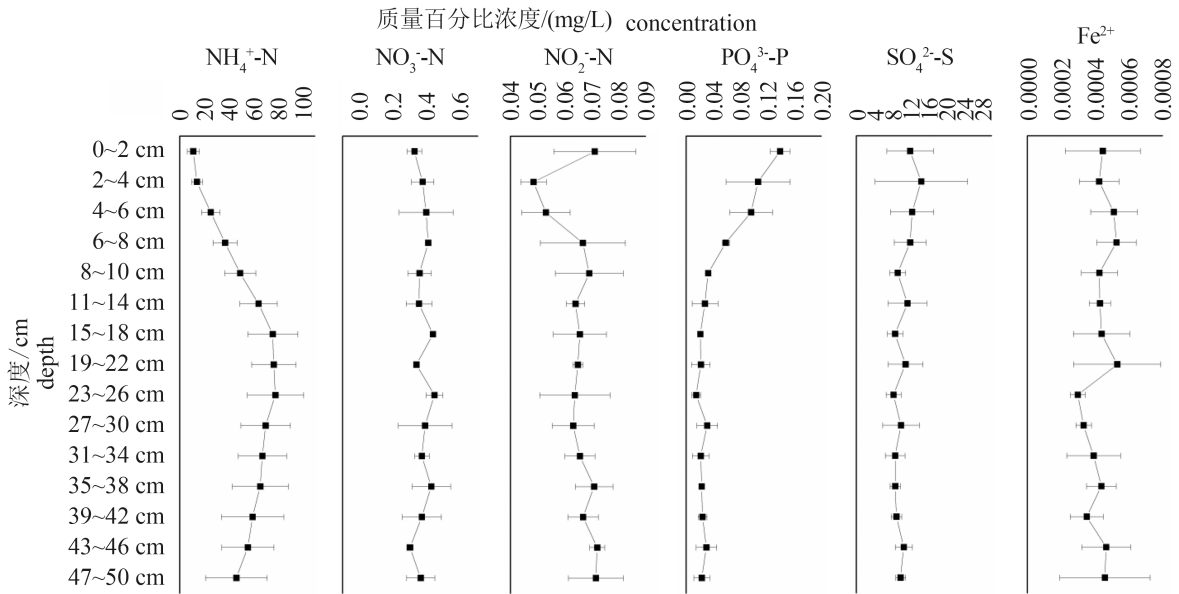


图5 杂交鳢养殖围隔沉积物间隙水离子垂直分布

Fig. 5 Variations in concentration of the ions as function of depth in hybrid snakehead enclosures

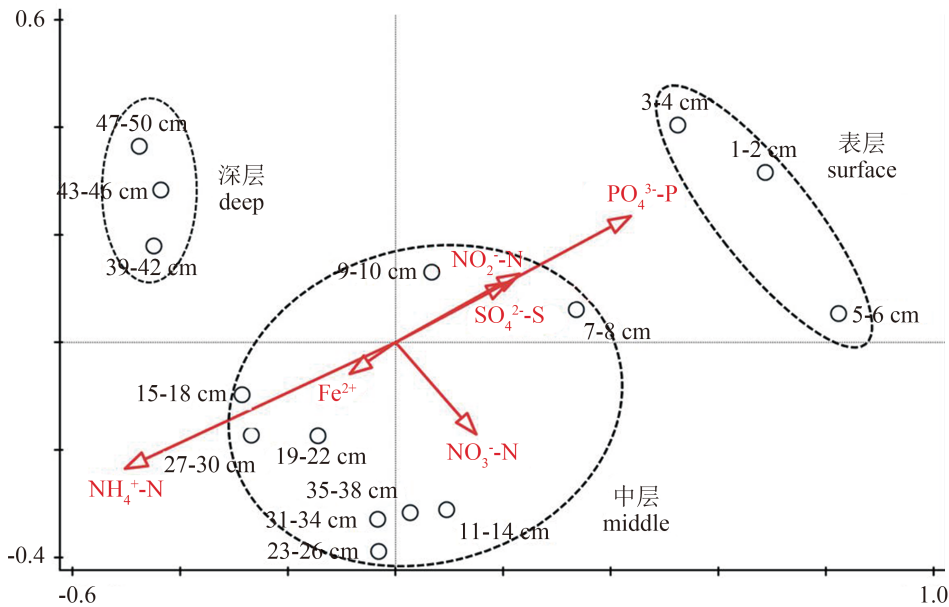


图6 CCA分析不同深度的微生物群落结构与理化因子的关系

Fig. 6 CCA analysis of the correlation between the depth-related microbial communities and environment factors in the hybrid snakehead enclosures

微生物群落结构根据不同深度分为表层、中层和深层沉积物微生物群落,分界点分别为6 cm和38 cm,类群间差异显著,说明随着沉积物深度的增加,溶氧含量、氧化还原电位、可利用的碳源、离子等因素有相应的垂直分布的变化,因不同的微生物适应不同深度的环境,从而群落结构随沉积物深度也有相应的差异<sup>[16-17]</sup>。中层沉积物微生物群落的条带数(*S*)、物种丰富度指数(*d*)和物种多样性指数(*H'*)相对较高,这可能与中层沉积物受外界影响较小且长期处于缺氧或低氧状态,给厌氧微生物提供了稳定的生长环境,生物多样性最高<sup>[2]</sup>。而表层沉积物经常受到高密度的养殖对象杂交鳢的生物扰动,以及养殖生产活动的人为干预(杀菌、杀藻类、抗生素使用等),影响微生物群落的稳定,生物多样性较低。深层沉积物由于随着深度不断增加,可供微生物利用的碳源、氮源等资源逐渐减少,因此使微生物的多样性受到了限制<sup>[18]</sup>。另外,养殖围隔沉积物微生物群落结构垂直分布虽差异显著,但各类群中特有微生物较少,仅中层沉积物有4条特有条带,共有条带相对较多,说明养殖池塘沉积物微生物物种上下层趋于均一,这可能与养殖周期结束后,池塘为了准备下一轮的养殖,清淤或翻塘泥等处理使沉积物理化性质上下层趋于均一化,从而各层沉积物中的微生物物种变化不大。

杂交鳢养殖围隔沉积物中微生物类群主要有变形菌门、拟杆菌门、疣微菌门、厚壁菌门、浮霉菌门,与其他养殖模式中沉积物的微生物结构组成类似,如草鱼池塘<sup>[19]</sup>,团头鲂池塘<sup>[2]</sup>,混养草鱼、异育银鲫和团头鲂3种鱼的池塘<sup>[20]</sup>,多以变形菌门为优势菌群,并且生物多样性指数多为2.8~3.2,相差不大,但相对于在洪湖<sup>[21]</sup>、太湖<sup>[22-23]</sup>、Biwa湖北湖<sup>[17]</sup>(生物多样性指数多为0.8~1.3)等自然水体沉积物中微生物群落,精养池塘物种多样性高很多。可能是因为精养池塘相对于自然系统,外源添加物较多,营养丰富,物质分解代谢旺盛,会产生大量的不同的小分子物质,适合不同的微生物类群利用,从而微生物物种多样性趋于多样化。另外,本研究发现在高密度杂交鳢养殖围隔有条件致病菌的存在,如Band 43与玫瑰单胞菌*Roseomonas* sp. (HE984358.1)的相似性为95%,该菌对人可表现

出低的致病潜力<sup>[24]</sup>,存在于饮用水、淡水湖、土壤等各种自然环境<sup>[25]</sup>,参与有机磷降解,本研究在养殖池塘沉积物中发现,可能与池塘的磷代谢有关<sup>[26]</sup>。其他鉴定到的微生物也多与池塘物质代谢,碳、氮、磷循环等有关,如Band 16与交替单胞菌(*Alteromonas* sp.) (KC8158241)为异养微生物,可利用淀粉和小分子碳源等,同时也可以水解尿素、还原硝酸、产生硫化氢等<sup>[27]</sup>; Band 35与互营杆菌*Syntrophobacter* sp. (G11556344.1)相似性为97%,在有机质降解过程中,可将各种挥发性脂肪酸降解为乙酸、CO<sub>2</sub>和H<sub>2</sub><sup>[28]</sup>; Band 4和Band 6分别与嗜甲基菌*Methylovorus glucosotrophus* (NR 104761.1)和*Methylophilus* sp. (NR074780.1)相似性为98%和99%,嗜甲基菌属可以有效地利用单碳(甲醇、甲胺等)简单有机化合物,同时同化铵<sup>[29-30]</sup>。

本研究得出NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N和PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P为影响垂直变化的群落结构变化的最佳环境因子组合,其中NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N和PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P都与微生物群落结构具有较高的相关性。自然环境中大量研究表明,N、P营养盐是影响微生物群落结构的重要因素<sup>[22,31]</sup>。在封闭的养殖系统,大量有机饲料投入是池塘沉积物N、P的主要输入形式<sup>[32-33]</sup>,有机物经微生物分解释放大量营养盐,其中N的主要形式为NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N<sup>[13]</sup>,部分P以无机离子形式存在。大量外源元素投入会改变沉积物理化因子的垂直变化规律, Metzger等<sup>[12]</sup>对比了地中海地区的Thau泻湖中高密度养殖区域和无水产养殖的中心区域沉积物各理化因子的垂直分布特征,发现养殖活动可缩短沉积物离子浓度梯度变化的距离,由大于92 cm降低至40 cm左右,使氧化还原较敏感的离子的垂直变化在上层沉积物变得更陡,显著改变了沉积物理化因子的垂直分布规律。环境因素的大幅变化必然影响沉积物垂向的微生物群落结构<sup>[34-35]</sup>,因而精养池塘的人为投放饵料等因素可能是影响沉积物系统中微生物群落变化的重要因素之一。

#### 参考文献:

- [1] 梁福权,朱文聪.池塘养殖水体净化修复技术研究进展[J].安徽农业科学,2012,40(35):17150-17153.  
Liang F Q, Zhu W C. Review of pond water purification and repair technology in aquaculture [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2012, 40(35): 17150-17153 (in Chinese).



- [2] 李晓, 李冰, 董玉峰, 等. 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[J]. 水产学报, 2014, 38(2): 218-227.  
Li X, Li B, Dong Y F, *et al.* Analysis of sediment microbial communities in *Megalobrama amblycephala* intensive rearing pond [J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(2): 218-227 (in Chinese).
- [3] 汪福顺, 刘丛强, 梁小兵. 湖泊沉积物-水界面铁的微生物地球化学循环及其与微量金属元素的关系[J]. 地质地球化学, 2003, 31(3): 63-69.  
Wang F S, Liu C Q, Liang X B. Biogeochemical cycling of iron at lake water-sediment interface and its influence on trace metals [J]. Geology-Geochemistry, 2013, 31(3): 63-69 (in Chinese).
- [4] Aller R C, Hall P O J, Rude P D, *et al.* Biogeochemical heterogeneity and suboxic diagenesis in hemipelagic sediments of the Panama Basin [J]. Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers, 1998, 45(1): 133-165.
- [5] Teasdale P R, Batley G E, Apte S C. *et al.* Pore water sampling with sediment peepers [J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 1995, 14(6): 250-256.
- [6] Hesslein R H. An in situ sampler for close interval pore water studies [J]. Limnology and Oceanography, 1976, 21(6): 912-914.
- [7] Laskov C, Herzog C, Lewandowski J, *et al.* Miniaturized photometrical methods for the rapid analysis of phosphate, ammonium, ferrous iron, and sulfate in pore water of freshwater sediments [J]. Limnology and Oceanography: Methods, 2007, 5(4): 63-71.
- [8] Tu X H, Xiao B D, Xiong J, *et al.* A simple miniaturised photometrical method for rapid determination of nitrate and nitrite in freshwater [J]. Talanta, 2010, 82(3): 976-983.
- [9] Torsvik V, Daae F L, Sandaa R A, *et al.* Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments [J]. Journal of Biotechnology, 1998, 64(1): 53-62.
- [10] Kennedy A C. Bacterial diversity in agroecosystems [J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 1999, 74(3): 65-76.
- [11] 夏耘, 邱立疆, 郁二蒙, 等. 生物絮团培养过程中养殖水体水质因子及原核与真核微生物的动态变化[J]. 中国水产科学, 2014, 21(1): 75-83.  
Xia Y, Qiu L J, Yu E M, *et al.* Dynamic changes of water quality factors and composition of pro-karyotic and eukaryotic microorganisms during culturing of bio-floc [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(1): 75-83 (in Chinese).
- [12] Metzger E, Simonucci C, Viollier E, *et al.* Benthic response to shellfish farming in Thau lagoon: Pore water signature [J]. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 2007, 72(3): 406-419.
- [13] 魏南, 余德光, 谢骏, 等. 吉富罗非鱼温棚池塘上覆水-沉积物间隙水营养盐垂直分布特征及其界面交换通量[J]. 中国水产科学, 2015, 22(4): 716-728.  
Wei N, Yu D G, Xie J, *et al.* Vertical distribution of the nutrients in overlying and interstitial waters and their interface diffusion rates in tilapia greenhouse aquaculture ponds [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(4): 716-728 (in Chinese).
- [14] Clarke K R, Gorley R N. PRIMER v6: User Manual/Tutorial [M]. Plymouth: Primer-E Ltd, 2006: 190.
- [15] 陈亚瞿, 徐兆礼, 王云龙, 等. 长江河口锋区浮游动物生态研究 I 生物量及优势种的平面分布[J]. 中国水产科学, 1995, 2(1): 49-58.  
Chen Y Q, Xu Z L, Wang Y L, *et al.* An ecological study on zooplankton in plume front zone of Changjiang (Yangtze) river estuarine area I biomass distribution of dominant species [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 1995, 2(1): 49-58 (in Chinese).
- [16] Wilms R, Köpke B, Sass H, *et al.* Deep biosphere-related bacteria within the subsurface of tidal flat sediments [J]. Environment Microbiology, 2006, 8(4): 709-719.
- [17] 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 16S rRNA fragments [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2003, 46(2): 147-157.
- [18] Rocap G, Larimer F W, Iamerdin J, *et al.* Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation [J]. Nature, 2003, 424(6952): 1042-1047.
- [19] 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.  
Cheng Y Y, Wu S G, Zheng Y Z, *et al.* Microbial

- diversity in the sediment of a pond mainly stocked with *Ctenopharyngodon idellus* [J]. *Freshwater Fisheries*, 2011, 41(6): 43-49 (in Chinese).
- [20] 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.
- [21] 赵彦玲. 洪湖沉积物中微生物群落结构的垂直分布[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011: 1-55.  
Zhao Y L. Vertical Distribution Of Microbiol Community Structure In Lake Honghu Sediment [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2011: 1-55 (in Chinese).
- [22] 赵兴青, 杨柳燕, 尹大强, 等. 太湖沉积物中微生物多样性垂向分布特征[J]. *地学前缘*, 2008, 15(6): 177-184.  
Zhao X Q, Yang L Y, Yin D Q, *et al.* Vertical distribution of the microbial community in modern lacustrine sediments of Taihu Lake [J]. *Earth Science Frontiers*, 2008, 15(6): 177-184 (in Chinese).
- [23] 赵兴青, 杨柳燕, 尹大强, 等. 不同空间位点沉积物理化性质与微生物多样性垂向分布规律[J]. *环境科学*, 2008, 29(12): 3537-3545.  
Zhao X Q, Yang L Y, Yin D Q, *et al.* Vertical distribution of physicochemical characteristics and the microbial diversity in different spatial sediments samples in lake Taihu [J]. *Environmental Science*, 2008, 29(12): 3537-3545 (in Chinese).
- [24] Struthers M, Wong J, Janda J M. An initial appraisal of the clinical significance of *Roseomonas* species associated with human infections [J]. *Clinical Infectious Diseases*, 1996, 23(4): 729-733.
- [25] 邱尔臣, 武烜, 贾继民, 等. 玫瑰单胞菌研究现状[J]. *疾病预防控制中心通报*, 2012, 27(2): 87-89, 94.  
Qiu E C, Wu X, Jia J M, *et al.* A review on *Roseomonas* [J]. *Bulletin of Disease Control & Prevention (China)*, 2012, 27(2): 87-89, 94 (in Chinese).
- [26] 江玉姬, 邓优锦, 刘新锐, 等. 一株能高效降解几种有机磷农药的菌株JS018的鉴定[J]. *微生物学报*, 2006, 46(3): 463-466.  
Jiang Y J, Deng Y J, Liu X R, *et al.* Isolation and identification of a bacterial strain JS018 capable of degrading several kinds of organophosphate pesticides [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46(3): 463-466 (in Chinese).
- [27] Van Trappen S, Tan T L, Yang J F, *et al.* *Alteromonas stellipolaris* sp. nov., a novel, budding, prosthecate bacterium from Antarctic seas, and emended description of the genus *Alteromonas* [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(4): 1157-1163.
- [28] Boone D R, Bryant M P. Propionate-degrading bacterium, *Syntrophobacter wolinii* sp. nov., gen. nov., from methanogenic ecosystems [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1980, 40(3): 626-632.
- [29] Govorukhina N I, Trotsenko Y A. *Methylovorus*, a new genus of restricted facultatively methylotrophic bacteria [J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1991, 41(1): 158-162.
- [30] 王文溪, 葛欣, 韩月梅, 等. 甲基营养菌MP688葡萄糖脱氢酶基因分离鉴定及性质研究[J]. *生物技术通讯*, 2013, 24(6): 805-809.  
Wang W X, Ge X, Han Y M, *et al.* Isolation and characterization of glucose dehydrogenase gene in *Methylovorus* sp. MP688 [J] *Letters in Biotechnology*, 2013, 24(6): 805-809 (in Chinese).
- [31] Dong H L, Zhang G X, Jiang H C, *et al.* Microbial diversity in sediments of saline Qinghai Lake, China: Linking geochemical controls to microbial ecology [J]. *Microbial Ecology*, 2006, 51(1): 65-82.
- [32] 高攀, 蒋明, 赵宇江, 等. 主养草鱼池塘水质指标的变化规律和氮磷收支[J]. *云南农业大学学报*, 2009, 24(1): 71-77.  
Gao P, Jiang M, Zhao Y J, *et al.* Variation rules of water quality and budget of nitrogen and phosphorus in ponds with grass carp as the dominant cultured species [J]. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 2009, 24(1): 71-77 (in Chinese).
- [33] 舒廷飞, 温琰茂, 汤叶涛. 养殖水环境中氮的循环与平衡[J]. *水产科学*, 2002, 21(2): 30-34.  
Shu T F, Wen Y M, Tang Y T. Cycle and budget balance of nitrogen in the cultivated water [J]. *Fisheries Science*, 2002, 21(2): 30-34 (in Chinese).
- [34] 周劲风, 温琰茂. 珠江三角洲基塘水产养殖对水环境的影响[J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2004, 43(5): 103-106.  
Zhou J F, Wen Y M. Effects of fish aquaculture on water environment in the Zhujiang river delta [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2004,

- 43(5): 103-106 (in Chinese). organically-enriched fish farm sediments [J]. FEMS  
[35] Bissett A, Bowman J, Burke C. Bacterial diversity in Microbiology Ecology, 2006, 55(1): 48-56.

## Vertical characteristics of microbial community structures and the relationship with environmental factors in sediments of hybrid snakehead aquaculture enclosures

WEI Nan<sup>1</sup>, LU Bin<sup>1,2</sup>, YU Deguang<sup>1</sup>, WANG Guangjun<sup>1</sup>, XIE Jun<sup>1</sup>, XIA Yun<sup>1</sup>, CHEN Chengxun<sup>1</sup>

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

2. Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

**Abstract:** Substrates and electron acceptors essential for microorganisms in aquaculture systems were gradually scavenged in undisturbed sediments according to the efficiency of energy metabolism along the depth, and the depth-related gradient of biogeochemical properties provided niches for metabolically diverse microorganisms. Vertical characteristics of microbial community structures may reflect the redox condition of the sediment which influences the quality of overlying water. In this study, the vertical microbial community composition of bacteria in high density culture of hybrid snakehead ponds sediment (0~50 cm) was investigated by PCR-DGGE, and the correlations between microbial communities with physicochemical characters of interstitial water were also discussed. Five phyla of bacteria including Bacteroidetes, Proteobacteria, Firmicutes, Verrucomicrobia, Planctomycetes were found. Hierarchical clustering (CLUSTER) and non-metric multidimensional scaling (MDS) analysis showed that microbial community of sediment core could be divided into three groups with significant differences, including the upper layer sediment (0~6 cm), middle layer sediment (7~38 cm) and the deep layer sediment (39~50 cm). Marglef's species richness index and Shannon-Wiener diversity index analysis of the vertical microbial communities indicated that middle layer of sediments had higher microbial diversities, which was similar to the studies of nature systems. The survey of vertical physicochemical characters of interstitial water revealed that  $\text{NH}_4^+$ -N concentrations ranged from 10.98 mg/L to 77.87 mg/L, increased with the sediment depth and stabilized after the depth of 15~18 cm, and  $\text{PO}_4^{3-}$ -P concentrations ranged from 0.01 mg/L to 0.14 mg/L, declined with the sediment depth and stabilized after the depth of 9~10 cm, and the concentrations of  $\text{NO}_3^-$ -N,  $\text{NO}_2^-$ -N,  $\text{SO}_4^{2-}$ -S,  $\text{Fe}^{2+}$  were relatively stable with little vertical variation. BIOENV/BEST analysis found that  $\text{NH}_4^+$ -N was the best environment factor which had great impact on the microbial communities, then  $\text{PO}_4^{3-}$ -P. The two factors are the main environment parameters of quality control in aquaculture water.

**Key words:** hybrid snakehead; microbial community structure; sediment; vertical distribution; DGGE; environmental factors

**Corresponding author:** WANG Guangjun. E-mail: wgj5810@163.com

**Funding projects:** National key Technology R & D Program of China (2012BAD25B04); Pearl River Nova Program of Guangzhou (2014J2200088)