

## 黄岛近海岸贝类养殖区细菌群落结构多样性及与环境因子响应

马景雪<sup>1,2</sup>, 张培玉<sup>1</sup>, 王宗兴<sup>2</sup>, 郑明刚<sup>2</sup>,  
高萍<sup>2</sup>, 曲凌云<sup>2</sup>, 郑风荣<sup>2\*</sup>

(1. 青岛大学环境科学与工程学院, 山东 青岛 266071;

2. 自然资源部第一海洋研究所, 山东 青岛 266061)

**摘要:** 为了研究近海贝类开放养殖水域中细菌种群分布规律以及微生物群落多样性对环境因子的响应及与水产动物发病的关系, 本实验于2019年7—11月采集黄岛某开放养殖水域不同样点海水样本, 分析不同水质因子(水温、盐度、pH、DO、叶绿素、氨氮、磷酸盐、硝酸盐和亚硝酸盐)的动态变化, 并利用高通量测序的方法分析了不同月份水样和栉孔扇贝组织样本中微生物群落结构和多样性的差异, 探讨了环境因子与微生物群落结构的相关性。结果显示, 水样本中细菌群落结构共检测到42个门, 94个纲。由变形菌门、拟杆菌门、蓝细菌门、放线菌门及厚壁菌门等组成, 其中变形菌门为优势菌门, 主要包括 $\gamma$ -变形菌纲和 $\alpha$ -变形菌纲。不同月份, 细菌 OTU 水平多样性分析结果为11月>9月>7月>10月>8月; 弧菌 OTU 水平多样性分析结果显示, 弧菌的多样性呈现先升高后降低的变化, 与水温的变化趋势一致, 8月养殖区多样性高于对照区。RDA分析表明, 叶绿素含量( $\mu\text{g/L}$ )和亚硝酸盐的浓度( $\text{mg/L}$ )对门水平的物种组成和群落结构具有显著的影响。磷酸盐含量( $\text{mg/L}$ )和DO( $\text{mg/L}$ )对弧菌属水平的群落结构具有显著影响。扇贝组织样本细菌群落结构共检测出45个门, 软壁菌门为优势菌门, 主要包括支原体菌属, 与磷酸盐含量( $\text{mg/L}$ )具有显著正相关。弧菌优势菌分离鉴定结果显示, 7—11月养殖环境中的优势菌为溶藻弧菌和哈维氏弧菌。研究表明, 养殖活动通过改变水体中的叶绿素和亚硝酸盐的含量, 对水体中的微生物群落结构产生了一定的影响, 同时磷酸盐和DO的变化对弧菌属水平的群落结构也产生了一定的影响。本结果可为贝类疾病的发生研究提供一定的理论支撑。

**关键词:** 贝类养殖; 环境因子; 高通量测序; 群落结构; 黄岛

**中图分类号:** Q 938.8; S 917.1

**文献标志码:** A

贝类养殖已经发展成为我国海水养殖的重要组成部分, 养殖规模也在不断增大, 但贝类暴发性病害的频发给贝类养殖产业造成了巨大的经济损失, 据不完全统计, 我国每年由病害造成的贝类养殖直接经济损失可高达20~30亿元<sup>[1]</sup>, 其中贝类弧菌病所造成的经济损失占据重要部分<sup>[2]</sup>, 严

重影响了贝类产业的可持续发展。

微生物是自然界中分布最广的一类生物类群。在海洋生态系统中, 微生物在物质循环、能量流动及维持生态系统稳定性等方面发挥了重要的作用, 但是当微生物中的部分条件致病菌大量存在时, 不仅会影响水质、打破生态平衡, 甚至会使

收稿日期: 2020-10-20 修回日期: 2021-03-15

资助项目: 国家重点研发计划(2017YFC1404504)

第一作者: 马景雪(照片), 从事海洋微生物研究, E-mail: 496148352@qq.com

通信作者: 郑风荣, 从事海洋生物学方面研究, E-mail: zhengfr@fio.org.cn



海水养殖动物患病。弧菌 (*Vibrio*) 是水产养殖中最常见的病原菌, 广泛分布在各类河口、近岸、海湾和深海海域中<sup>[3]</sup>。据统计, 国内外导致养殖贝类大规模发病死亡的病原弧菌约有 20 种<sup>[1]</sup>, 对多次大面积暴发的贝类流行病的弧菌病原菌进行研究后发现, 它们均来自于水体。在水产养殖区域, 当环境恶化、养殖动物免疫力下降以及致病菌的致病力增强时, 会引起养殖动物疾病的发生<sup>[4]</sup>。夏季是贝类疾病频发的季节<sup>[5]</sup>, 疾病季节性暴发与养殖环境中微生物种群的季节性变化存在十分密切的关系。Pereira 等<sup>[6]</sup>研究表明, 鱼类养殖水域中细菌群落结构会随着季节变化, 在春季会增加鱼类患病的几率。其次, 环境因子的变化也会影响微生物的群落结构与丰度。Parveen 等<sup>[7]</sup>在调查切萨皮克湾的长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 和水中致病性副溶血性弧菌 (*V. parahaemolyticus*) 的季节分布时发现, 弧菌密度与水温、浊度和溶解氧呈正相关, 因此, 检测海水中弧菌的群落结构对研究贝类流行病的暴发具有重要的意义。

位于黄岛区的开放式水产养殖区规模庞大, 种类居多, 其中栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 的底播养殖占据重要的比例。2018 年该养殖海域部分扇贝养殖区发生病害, 2019 年, 本团队选取易发病时间段 7—8 月及不易发病时间段 9—11 月, 对该海域环境理化因子进行监测, 利用基于 Illumina Miseq 高通量测序方法, 通过对 16S *rRNA* 序列分析对其细菌群落多样性, 及其在空间和时间尺度上的变化进行研究, 并探讨环境因子变化与菌群结构的关系, 以期为该水域水产养殖的健康发展提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集地点与时间

样品采集于青岛市黄岛区开放式养殖基地, 该基地属于多营养层次综合养殖模式, 种类多, 扇贝、海螺等海产品排列养殖。在该海域分 2 个区进行采样, 分别为养殖区和对照区 (相距约 1 km) (图 1)。在每个区每隔约 300 m 选取 3 个站位采样。采集时间为 2019 年 7—11 月, 每月采集 1 次。

### 1.2 材料与方法

环境因子的测量 使用 WZB-170 型便携式浊度计测量浊度, JENCO 9030M 便携式溶解氧测定仪测量 DO 含量和温度, 556MPS 便携式多参

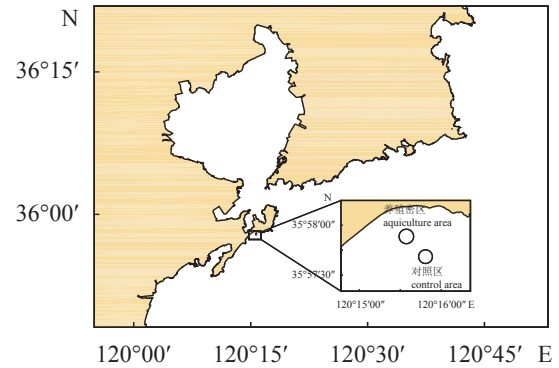


图 1 样品采集地理位置

Fig. 1 Geographic location of sample collection

数水质测量仪测量盐度, TURNER Designs Triligy 实验室荧光仪测量叶绿素含量, 其他参数在实验室中均用标准方法测量。数据利用 SPSS.22 软件进行处理。

流式细胞仪检测细菌丰度 各站位取 4 mL 海水至冻存管中, 随后加入 444  $\mu$ L 戊二醛固定, 在低温避光的环境下带回实验室, 用 0.45  $\mu$ m 滤器过滤后液氮处理,  $-80^{\circ}\text{C}$  保存。进样前, 取 180  $\mu$ L 样品和 20  $\mu$ L SYBR<sup>TM</sup> Green I nucleic acid gelstain (invitrogen, 美国) 染料混匀, 染色完成后, 上流式细胞仪 (BD, 型号 FACSCalibur) 测定。使用 Low 流速, 激发电压分别为 SSC 450、FL1 500、FL2 510 和 FL3 661。数据采用 CellQuest Pro Software 软件分析。

群落结构的水样处理 采用手持式柱状采水器在指定点采取 1 L 表层水, 运回实验室后, 采用负压过滤的方法用 0.22  $\mu$ m 的滤膜过滤 300 mL 水样, 将处理好的滤膜用液氮速冻, 放  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。每个站位设置 3 个重复。

Illumina Miseq 高通量测序 用 DNeasy<sup>®</sup> Powerwater<sup>®</sup> Pro Kit 试剂盒 (QIAGEN, 美国) 提取 DNA, 用 1% 的琼脂糖凝胶检测 DNA 的提取质量。利用引物 338F/806R (ACTCCTACGGGAGGCAGCAG/GACTACHVGGGTWTCTAAT)<sup>[8]</sup> 和 V-169F/V-680R (GGATAACYATTGGAAACGATG/GAAATTCTACCCCCTCTACAG)<sup>[9-10]</sup> 对样品 DNA 进行 PCR 扩增。将同一样本的 PCR 产物混合后使用 2% 琼脂糖凝胶回收 PCR 产物, 利用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axygen Biosciences, 美国) 进行回收产物纯化, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并用 Quantu<sup>TM</sup> Fluorometer (Promega, 美国) 对回收产物进行检测定量。使用 NEXTFLEX<sup>®</sup> Rapid DNA-Seq Kit 进行建库。

数据处理 使用 fastp<sup>[11]</sup> 软件对原始测序序列进行质控，使用 FLASH<sup>[12]</sup> 软件进行拼接；使用 UPARSE 软件，根据 97% 的相似度<sup>[13-14]</sup> 对序列进行 OTU 聚类并剔除嵌合体。利用 RDP classifier<sup>[15]</sup> 软件对每条序列进行物种分类注释。Shannon 多样性指数利用该公式计算：

Shannon 多样性指数计算公式：

$$H_{Shannon} = - \sum_{i=1}^{S_{obs}} \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N}$$

式中， $S_{obs}$  为实际观测到的 OTU 数目； $n_i$  为第  $i$  个 OTU 所含的序列数； $N$  为所有的序列数。

利用 R 语言和 SPSS.22 软件的 Spearman 等级相关系数进行群落结构及环境因子关联分析。利用 R 语言 (version 3.3.1) 进行物种组成分析、环境因子与群落结构的相关性分析及冗余分析。利用 SPSS 22 软件的单因素方差分析进行组间差异显著性检验。

扇贝组织的处理 在养殖区每个站位随机取十余只栉孔扇贝，低温保存，带回实验室。3 只为一组，每个站位设置 3 组重复。取扇贝鳃丝、内脏器官、外套膜和扇贝柱各 0.5 g，放入同一个无菌 EP 管中。液氮速冻后，-20 °C 保存。用 DNeasy® Powerwater® Pro Kit 试剂盒 (QIAGEN, 美国) 抽提样品 DNA，其余步骤同水样处理。

优势弧菌分离鉴定 将采集的水样稀释后，涂布于硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂培养基

(thiosulfate citrate bile salts sucrose agar, TCBS) 平板上，28 °C 过夜培养。取 0.5 g 上述处理的扇贝组织悬于灭菌蒸馏水中匀浆，3 000 r/min 离心，取上清液稀释，涂布于 TCBS 平板上，28 °C 过夜培养。将获得的优势菌落经 3 次分离纯化后，利用 16S *rRNA* 测序，测序结果与 GenBank 中的标准数据库比对。

## 2 结果

### 2.1 环境因子理化指标

黄岛近海养殖区在 2019 年 7—11 月的环境理化指标变化如表 1 所示，养殖环境是水产养殖过程中的重要部分，养殖用水的理化性质是养殖活动的重要保证，该区养殖水质符合海水水质检测标准 GB 3097—1997 第二类水质标准要求。

### 2.2 流式细胞仪检测结果

细胞流式图展示了海水中细菌单细胞的集聚分布情况 (图 2)，根据细胞聚集情况框选 R1、R2 门，得到细胞数。细菌细胞数量图结果显示，细菌数量在 9 月达到最低值，同时贝类在温度较高时，生命活动减慢，排泄物减少，使得水体细菌数会出现下降的趋势，而 10 月温度降低，细菌数量上升幅度较大，说明该时段的细菌生命活动较为活跃。Spearman 相关性分析显示，每毫升细胞数的数量与水样中叶绿素的含量显著相关 ( $P < 0.05$ ) (图 3)。

表 1 黄岛区某开放式养殖区理化性质指标

Tab. 1 Physical and chemical properties of an open aquaculture area in Huangdao District

区域 area	7月 July		8月 August		9月 September		10月 October		11月 November	
	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D
叶绿素/(µg/L) Chl	2.170	1.697	2.440	2.573	4.570	3.440	1.770	1.670	1.460	1.570
浊度(NTU) TUB	2.70	1.76	1.58	1.08	2.26	2.40	2.96	2.89	4.75	3.16
溶解氧/(mg/L) DO	7.27	7.26	6.60	6.73	6.53	6.50	6.96	7.08	7.80	7.79
温度/°C T	22.4	22.6	24.1	24.2	25.5	25.4	24.4	24.3	18.3	18.4
盐度 Sal	31.65	31.71	31.70	31.71	31.71	31.70	31.82	31.81	32.03	32.03
pH	8.30	8.25	8.31	8.21	8.27	8.19	8.16	8.22	8.42	8.35
可溶性无机氮/(mg/L) DIN	0.076	0.059	0.064	0.040	0.047	0.043	0.044	0.064	0.064	0.067
亚硝酸盐/(mg/L) nitrite	0.003 7	0.004 3	0.004 0	0.004 0	0.006 0	0.004 3	0.003 0	0.004 0	0.004 0	0.004 3
硝酸盐/(mg/L) nitrate	0.056	0.041	0.047	0.024	0.027	0.026	0.028	0.047	0.048	0.049
氨氮/(mg/L) ammonia	0.016	0.013	0.013	0.012	0.014	0.014	0.014	0.013	0.012	0.014
磷酸盐/(mg/L) phosphate	0.012	0.011	0.009	0.008	0.009	0.007	0.011	0.009	0.013	0.011

注：M. 养殖区；D. 对照区；表中数据均为各区3个站位的平均值

Notes: M. aquiculture area; D. control area; the data in the table are the average values of the three stations in each district

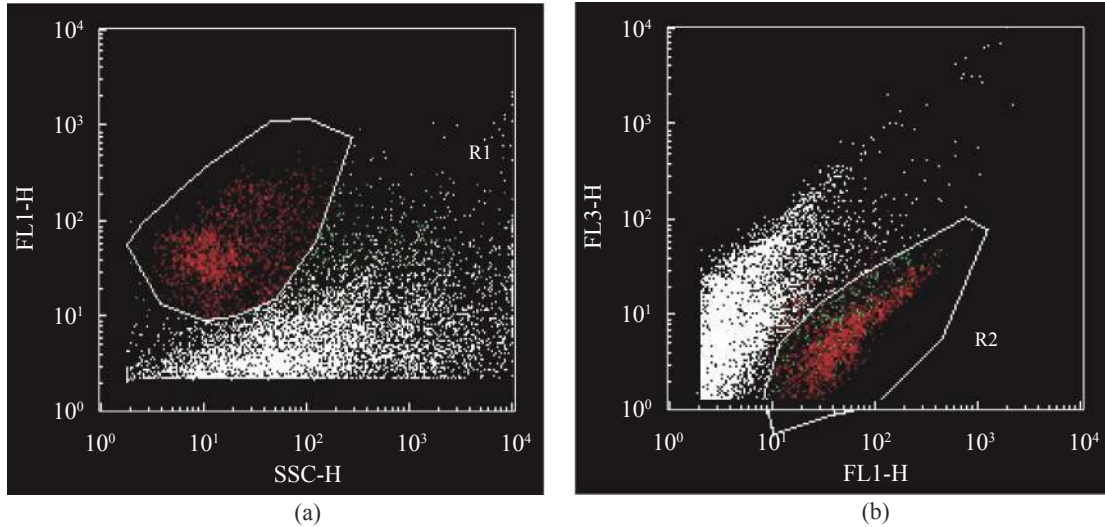


图2 细胞流式图

Fig. 2 Cell flow diagram

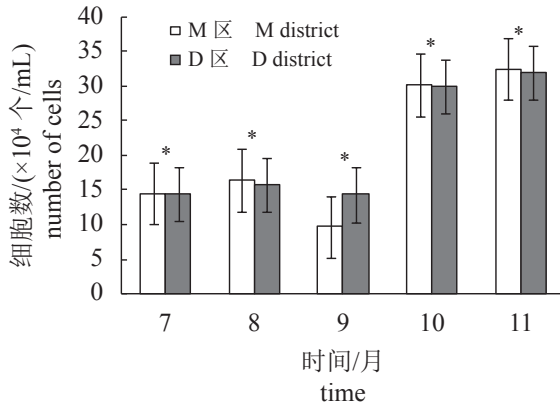


图3 养殖区海域细菌细胞数量图

\*表示与叶绿素含量显著相关 ( $P < 0.05$ ), M. 养殖区; D. 对照区, 下同

Fig. 3 Number of bacterial cells in the aquaculture area

\* means significantly correlated with chlorophyll content ( $P < 0.05$ ), M. aquiculture area; D. control area, the same below

### 2.3 水体菌群多样性及其对环境因子的响应

**水环境高通量测序结果初步分析** 黄岛区开放贝类养殖区水环境微生物 Illumina Miseq 高通量测序结果给出了测序的基础信息。水样中细菌的有效序列数为 1 692 054, 检测到 4 158 个 OTUs, Shannon 多样性指数为 3.94~5.38, Sobs 指数为 765~1 535, 覆盖度可达到 99.1%。在 OUT 水平上, 海水中细菌的 Shannon 多样性指数整体上呈现波动起伏的趋势, 最低点出现在 8 月, Shannon 多样性指数为 4.32, 且 8、9 月养殖区水样细菌多样性低于对照区 (图 4-a)。

在 OTU 水平上, 养殖区海水中弧菌的多样

性呈现先升高后降低的变化, 趋势与水温的变化一致 (图 4-b), 8 月出现最高点, Shannon 指数为 2.62, 养殖区水样中细菌多样性降低, 弧菌多样性升高。

**水环境群落结构分布** 对所获得的 OUT 序列进行门 (Phylum)、纲 (Class) 水平上的物种分类, 共检测出 43 个细菌门, 其中包括 10 个优势门 (丰度占比大于 1%), 包括变形菌门 (Proteobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、Marinimicrobia、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、厚壁菌门 (Firmicutes)、绿弯菌门 (Chloroflexi)、蓝细菌门 (Cyanobacteria)、Epsilonbacteraeota、Patascibacteria 和疣微菌门 (Verrucomicrobia)。其中变形菌门在不同月份均为最优菌门。9 月拟杆菌门丰度增加, 而变形菌门的丰度降低 (图 5)。

在纲水平上, 发现 94 个纲的细菌, 相对丰度较高的为  $\gamma$ -变形菌纲 (Gammaproteobacteria)、 $\alpha$ -变形菌纲 (Alphaproteobacteria)、拟杆菌纲 (Bacteroidia)。 $\gamma$ -变形菌纲在 7 月养殖区丰度占比最高, 为 49.86%, 同时该月份的对照区的  $\gamma$ -变形菌纲丰度占比也是最高的, 为 45.41%; 在养殖区中,  $\alpha$ -变形菌纲在 11 月丰度占比最高, 在对照区中, 8 月的丰度占比最高, 分别为 26.29% 和 25.21%; 拟杆菌纲在 9 月的养殖区和对照区的丰度含量占比最多, 分别为 26.07% 和 26.18% (图 6)。

属水平上细菌群落物种组成 heatmap 图显示, 10—11 月的细菌优势属组成较为相似, 而与 7—9 月的优势属组成存在差异性。实验所重点关注的弧菌, 在 7 月丰度最高, 而弧菌是引起贝类

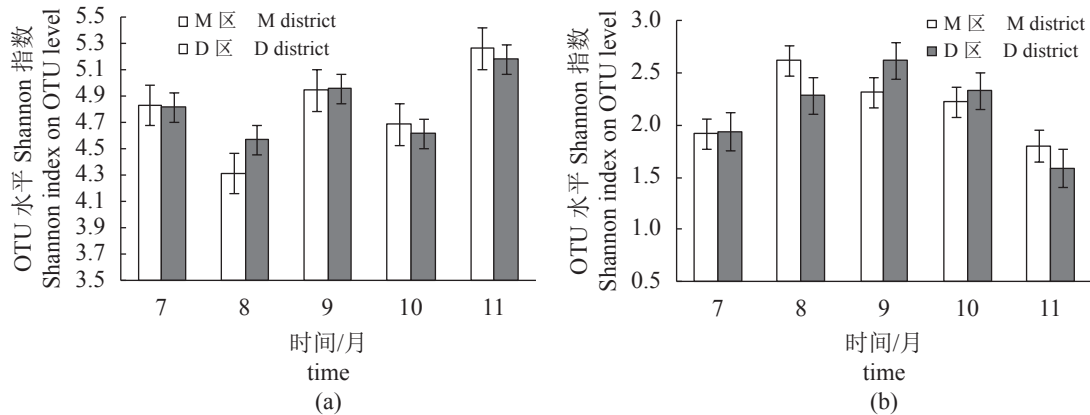


图 4 水环境 OTU 水平 Shannon 多样性指数图

(a) 水环境细菌多样性, (b) 水环境弧菌多样性

Fig. 4 Shannon index chart of water environment OUT level

(a) bacterial diversity in water environment, (b) *Vibrio* diversity in water environment

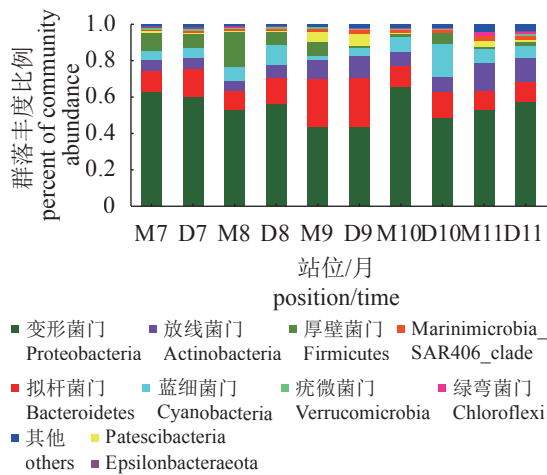


图 5 细菌门水平群落结构 Bar 图

“M7”表示 M 区 7 月的数据, 以此类推

Fig. 5 Bar diagram of bacterial phylum level community structure

"M7" indicates the data from M district in July, and so on

流行病的重要病原菌 (图 7), 因此这一结果与弧菌流行病易在夏季暴发的说法相符。

微生物群落组成与环境因子的关系 利用 VIF 筛选环境因子, 保留多重共线性小的环境因子供后续分析。根据门水平 RDA 分析, 发现不同月份的养殖区各样品中存在明显的差异, 环境因子对各样品的影响也呈时间尺度分布, 采用 bioenv 函数检验每个环境因子的显著性, 发现叶绿素 ( $P=0.005$ ) 和亚硝酸盐 ( $P=0.008$ ) 对门水平的物种组成和群落结构具有显著的影响 (图 8)。

相关性 Heatmap 图和环境因子聚类树分析结果表明, DO 和磷酸盐含量具有相关性, 而叶绿

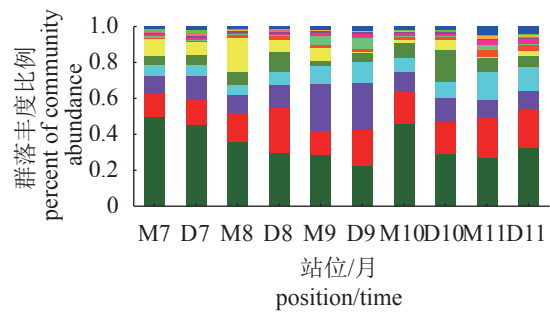


图 6 细菌纲水平群落结构 Bar 图

Fig. 6 Bar diagram of bacterial class level community structure

素含量和温度具有相关性。细菌群落物种组成门水平上, 厚壁菌门和环境的相关性比较显著, 被多组环境因子所影响。与叶绿素呈现显著正相关 (Spearman 相关系数  $r=0.75067$ ,  $P=0.00126$ ), 与浊度呈现显著负相关 (Spearman 相关性系数  $r=-0.81429$ ,  $P=0.00022$ ), 同时也与盐度呈现显著负相关 (Spearman 相关性系数  $r=-0.76992$ ,  $P=0.00079$ )。Marinimicrobia 与盐度和浊度呈现显著正相关, 而丰度占比最高的变形菌门, 与环境关联性较弱, 与亚硝酸盐呈现显著负相关 (Spearman 相关性系数  $r=-0.6468$ ,  $P=0.00916$ ) (图 9)。

水产养殖过程中, 会引起流行病的弧菌需要被重点关注。相关性 Heatmap 图和环境因子聚类

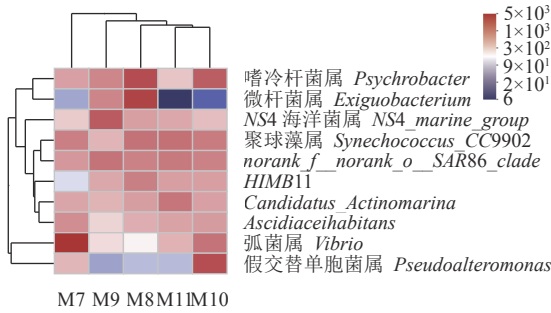


图 7 细菌属水平群落结构 Heatmap 图

Fig. 7 Heatmap diagram of bacterial family level community structure

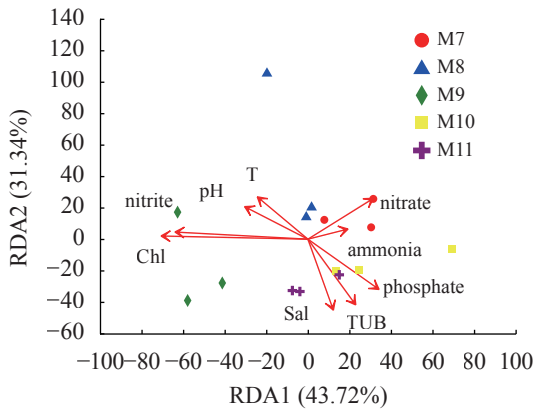


图 8 细菌门水平环境因子 RDA 分析

T. 温度; ammonia. 氨氮; DIN. 可溶性无机氮; TUB. 浊度; Sal. 盐度

Fig. 8 RDA diagram of bacterial phylum level environmental factor

T. temperature; ammonia. ammonium; DIN. soluble inorganic nitrogen; TUB. turbidity; Sal. salinity

树分析结果显示, 细菌群落物种组成属水平上, 弧菌属与磷酸盐呈现显著正相关 (Spearman 相关系数  $r=0.54585$ ,  $P=0.00181$ ), 与 DO 也呈现显著正相关 (Spearman 相关性系数  $r=0.50512$ ,  $P=0.00441$ ) (图 10)。

在弧菌物种组成种水平上, *V. caribbeanicus* 和副溶血性弧菌与环境因子的相关性较强, *V. caribbeanicus* 与 DO (Spearman 相关性系数  $r=-0.89445$ ,  $P=0.000006$ )、磷酸盐 (Spearman 相关性系数  $r=-0.81029$ ,  $P=0.00024$ )、浊度 (Spearman 相关性系数  $r=-0.80000$ ,  $P=0.00034$ ) 具有显著负相关, 与温度 (Spearman 相关性系数  $r=0.78922$ ,  $P=0.00046$ )、叶绿素 (Spearman 相关性系数  $r=0.81680$ ,  $P=0.0002$ ) 具有显著正相关; 副溶血性弧菌与温度具有显著正相关 (Spearman 相关性系数  $r=0.82165$ ,  $P=0.00017$ ), 与 DO 含量具有显

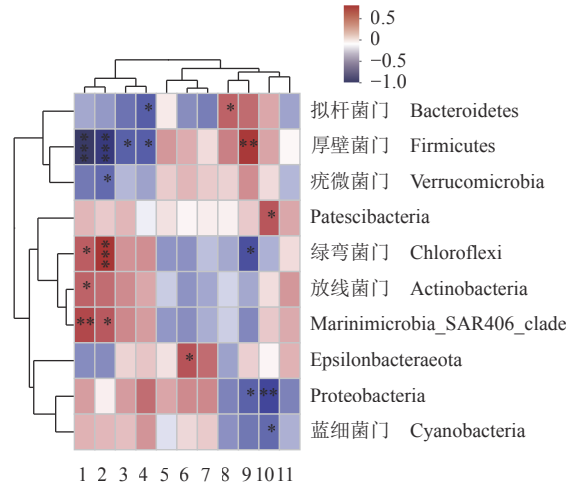


图 9 细菌门水平环境相关性 Heatmap 图

1. 浊度, 2. 盐度, 3. 磷酸盐, 4. 溶解氧, 5. 氨氮, 6. 可溶性无机氮, 7. 硝酸盐, 8. 温度, 9. 叶绿素, 10. 亚硝酸盐, 11. pH; \*.  $P<0.05$ , \*\*.  $P<0.01$ , \*\*\*.  $P<0.001$

Fig. 9 Heatmap diagram of bacterial phylum level environmental factor

1. turbidity, 2. salinity, 3. phosphate, 4. dissolved oxygen, 5. ammonium, 6. soluble inorganic nitrogen, 7. nitrate, 8. temperature, 9. chlorophyll, 10. nitrite, 11. pH, \*.  $P<0.05$ , \*\*.  $P<0.01$ , \*\*\*.  $P<0.001$

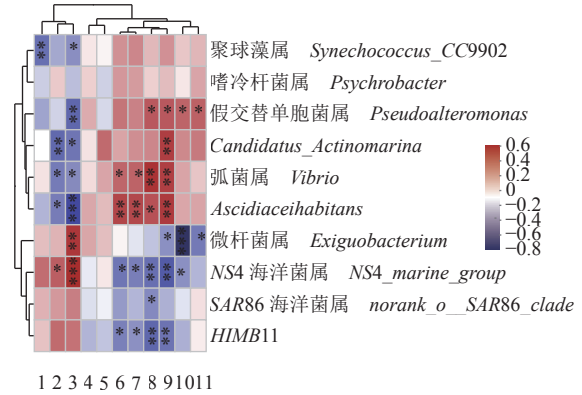


图 10 细菌属水平环境相关性 Heatmap 图

1. 亚硝酸盐, 2. 温度, 3. 叶绿素, 4. 氨氮, 5. pH, 6. 可溶性无机氮, 7. 硝酸盐, 8. 磷酸盐, 9. 溶解氧, 10. 浊度, 11. 盐度

Fig. 10 Heatmap diagram of bacterial genus level environmental factor

1. nitrite, 2. temperature, 3. chlorophyll, 4. ammonium, 5. pH, 6. soluble inorganic nitrogen, 7. nitrate, 8. phosphate, 9. dissolved oxygen, 10. turbidity, 11. salinity

著负相关 (Spearman 相关性系数  $r=-0.83363$ ,  $P=0.00011$ ), 同时, 副溶血性弧菌与叶绿素、磷酸盐和浊度等环境因子也具有相关性 (图 11)。副溶血性弧菌作为条件致病菌, 与环境因子的变化联系紧密, 其群落结构及空间分布受各种环境因子的综合影响, 而溶藻弧菌受环境因子的影响较小。

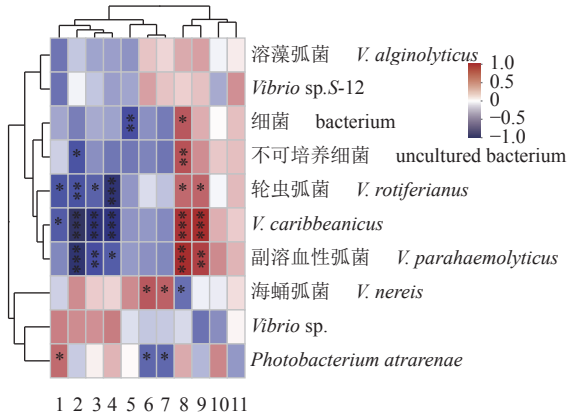


图 11 弧菌种水平环境相关性 Heatmap 图

1. 盐度, 2. 溶解氧, 3. 磷酸盐, 4. 浊度, 5. pH, 6. 可溶性无机氮, 7. 硝酸氮, 8. 温度, 9. 叶绿素, 10. 亚硝酸盐, 11. 氨氮, 图 14 同

Fig. 11 Heatmap diagram of *Vibrio* species level environmental factor

1. salinity, 2. dissolved oxygen, 3. phosphate, 4. turbidity, 5. pH; 6. soluble inorganic nitrogen, 7. nitrate, 8. temperature, 9. chlorophyll, 10. nitrite, 11. ammonium; the same as Fig. 14

2.4 扇贝组织细菌群落分析

Illumina Miseq 高通量测序结果显示, 扇贝组织中细菌的有效序列数为 240 032, 检测到 2 354 个 OTUs, Shannon 多样性指数为 1.91~4.89, Sobs 指数为 454~1 317, 覆盖度可达 99.44%。对所获得的 OUT 序列进行门 (Phylum) 水平的物种分类, 共检测出 45 个门, 其中优势菌门包括软壁菌门 (Tenericutes)、变形菌门、厚壁菌门、蓝细菌门、放线菌门、拟杆菌门、螺旋体门 (Spirochaetes)、酸杆菌门 (Acidobacteria) 及绿弯菌门。扇贝体内细菌群落结构呈时间分布, 8 月变形菌门占 37.20%, 成为优势菌门。而其他月份柔壁菌门均为优势菌门 (图 12)。

由于扇贝体内弧菌分布较少, 为了更直观地比较不同月份扇贝体内弧菌属的分布情况, 从群落分析中将弧菌属中的优势弧菌哈维氏弧菌的数据单独导出做图, 结果显示, 9 月的弧菌属丰度占比最高, 而 11 月未检测出哈维氏弧菌 (图 13)。

在属水平进行环境因子关联分析, 丰度最高的支原体与易引起流行病的弧菌及环境具有显著相关性, 支原体与磷酸盐具有显著正相关 (Sperman 相关系数  $r=1, P<0.001$ ), 弧菌与 DO 有显著负相关 ( $r=-1, P<0.001$ ) (图 14)。

2.5 弧菌优势菌的分离鉴定

对养殖区、对照区水样及扇贝组织进行可培

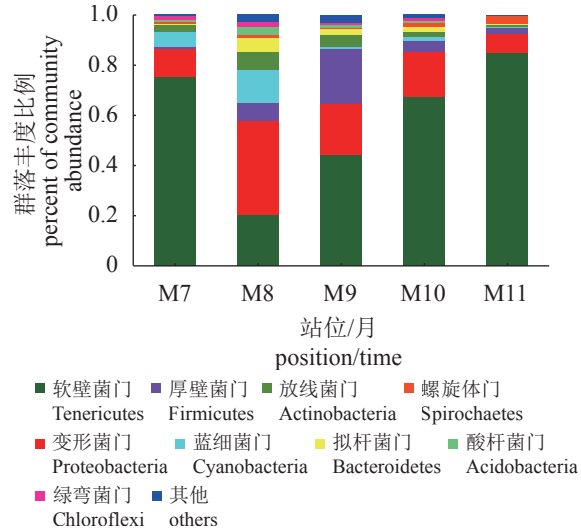


图 12 栉孔扇贝组织门水平群落结构 Bar 图

Fig. 12 Bar diagram of the level community structure of *C. farreri*

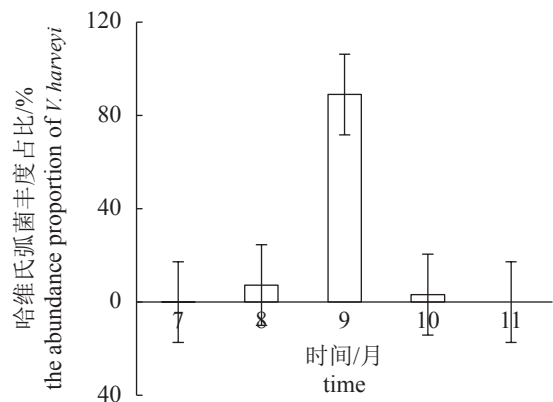


图 13 栉孔扇贝组织哈维氏弧菌丰度比例图

Fig. 13 Abundance ratio of *V. harveyi* in *C. farreri*

养弧菌的分离鉴定结果显示, 养殖区水样中可培养弧菌优势菌主要包括溶藻弧菌和哈维氏弧菌, 2 种弧菌均为引起扇贝病的重要病原菌, 相较于养殖区优势菌种类的单一, 对照区培养的优势菌种类较多, 且 8 月检出数量最多的为肠杆菌 (*Enterobacter*), 属于肠道外重要的条件致病菌 (表 2)。栉孔扇贝中 8—10 月可培养弧菌的优势菌分别为溶藻弧菌、哈维氏弧菌及溶藻弧菌, 与养殖环境中优势弧菌的种类一致。

3 讨论

3.1 黄岛开放式贝类养殖区细菌群落分析

通过 Illumina Miseq 高通量测序方法对养殖区海水水样进行门、纲水平的群落结构分析, 结

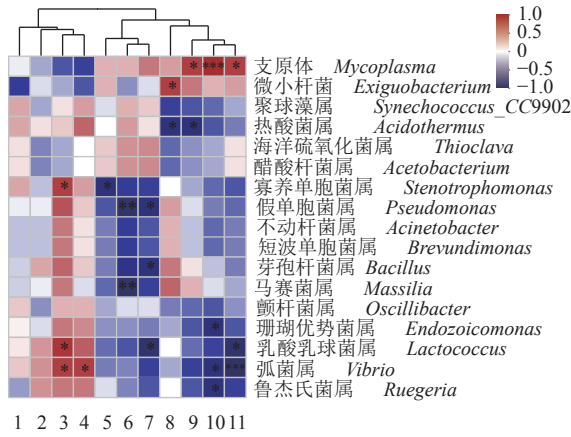


图 14 栉孔扇贝组织中细菌属水平环境相关性 Heatmap 图

Fig. 14 Heatmap diagram of bacterial genus in *C. farreri* tissue level environmental factor

表 2 水样及扇贝组织的弧菌分离鉴定

Tab. 2 Isolation and identification of *Vibrio* from water samples and scallop tissues

时间/月 time	M区 M district	D区 D district	栉孔扇贝组织 tissue of <i>C. farreri</i>
7	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. fortis</i>	<i>V. hyugaensis</i>
8	<i>V. alginolyticus</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>V. alginolyticus</i>
9	<i>V. harveyi</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. harveyi</i>
10	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>
11	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. fortis</i>	<i>V. chagssii</i>

果显示, 在水样中共检测到 43 个门, 94 个纲, Shannon 多样性指数为 3.94~5.38。在 8 月, 养殖区水样中细菌多样性下降, 弧菌多样性升高, 与对照区现象相反, 说明养殖活动确实对养殖区海域的菌群结构造成了影响。在优势菌门中, Marinimicrobia 在 9—11 月丰度占比较高, 该菌门在难降解型有机物和蛋白质有机物代谢方面发挥重要作用, 可作为蛋白水解氨基酸降解菌, 且具有降解芳香族苯乙酸的功能<sup>[16-17]</sup>。疣微菌门在 7—9 月丰度较高, 该门菌可降解 6 种不同的岩藻糖胶<sup>[18]</sup>。群落结构在时间尺度上呈现有规律的动态变化, 丰度最高的变形菌门随着时间的变化, 出现先降低再升高的趋势, 拟杆菌门则与它相反。吕宁<sup>[19]</sup>分析各虾蟹混养养殖水体在连续 5 个月 (2013 年 6 月—10 月) 中的微生物群落结构组成及变化, 结果显示, 养殖池水中微生物群落的多样性和丰度在 8—9 月达到最高, 在 6 月和 10 月多样性较低, 并且虾、蟹、贝混养, 池水体中微生物群落分布存在季节性变化, 与同类研究结果一致。

在纲水平中,  $\gamma$ -变形菌纲在群落中占据了主导地位, 且养殖区丰度占比高于对照区, 其中包含许多重要的病原菌, 如沙门氏菌属 (*Salmonella*)、耶尔辛氏菌属 (*Yersinia*)、弧菌属, 这些菌群会引起生物不同程度的感染, 严重者会导致大面积流行病的暴发。 $\alpha$ -变形菌纲也占据了一定的比例, 7—9 月养殖区中  $\alpha$ -变形菌纲的占比均小于对照区; 10—11 月则相反,  $\alpha$ -变形菌纲中包含大量光合细菌, 研究表明, 光合细菌会使水体中的氨氮含量、亚硝酸氮含量、硝酸氮含量和 COD 下降, DO 和 pH 升高<sup>[20]</sup>。综合理化因子的数据, 可以看出, 水体菌群在一定程度上会影响环境的理化指标。

通过 Illumina Miseq 高通量测序方法对养殖区栉孔扇贝组织进行门水平的群落结构分析, 共检测出 45 个门, 其中软壁菌门为优势菌门。分析显示, 扇贝体内携带大量的致病菌, 包括支原体菌属、不动杆菌属、芽孢杆菌属和弧菌属等, 不仅会使水产动物致病, 还会使人类患病<sup>[21-22]</sup>。弧菌的培养结果显示, 扇贝体内的弧菌主要来自于环境中, 弧菌优势菌的种类与环境中的大部分一致, 弧菌属中的优势菌哈维氏弧菌含量在 9 月升高, 故 9 月具有暴发哈维氏弧菌病的可能性。

开放式养殖属于环境依赖性产业, 水产养殖活动与水环境状况相互影响, 扇贝的生物沉降作用会引起营养物质滞留, 造成水体底质缺氧、水质恶化, 使病原菌弧菌的数量增多<sup>[23]</sup>, 改变生态系统中微生物群落结构, 降低生物多样性, 打破养殖区原有的生态平衡。因此, 关注养殖区水域生态环境的微生物群落结构有助于分析扇贝发病原因和过程, 为扇贝流行病的研究提供理论基础。

### 3.2 细菌群落分布与环境因子的关系

环境如何与细菌群落结构和多样性的动态变化相互影响, 是现在学者们研究的热点, Zhang 等<sup>[24]</sup>研究了凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 养殖水域的微生物群落的动态变化与环境参数的关系, 结果发现在水体中超过 10% 的微生物为变形菌门、蓝细菌门、放线菌门和拟杆菌门, 而且这些细菌的丰度变化具有季节性, 并且水温、溶解氧以及氨氮盐是影响微生物群落变化的主要环境因子。邹沈娟等<sup>[25]</sup>研究发现硝酸氮、温度和总氮是影响大冶湖水体细菌群落分布的主要环境因子。研究显示, 叶绿素 ( $P=0.005$ ) 和亚硝酸盐 ( $P=0.008$ ) 对养殖区海域门水平的物种组成和群落结构具有



显著影响,其中与光合作用有关的绿弯菌门受盐度影响显著,与浊度、叶绿素含量分别呈现不同程度的正相关和负相关。厚壁菌门与浊度和盐度呈显著负相关,与叶绿素呈显著正相关。在属水平中,有研究表明,*Exiguobacterium*中部分菌种具有嗜盐性<sup>[26]</sup>,可耐受17%和19%的NaCl浓度,该开放养殖区中*Exiguobacterium*与盐度呈现负相关。这类菌属可分解复杂有机污染物,转化重金属,在环境领域应用广泛<sup>[27]</sup>。弧菌属与环境影响密切,超出贝类免疫系统适应范围的环境因子在影响其免疫系统的同时,会增加病原菌的致病性,从而导致弧菌病害的发生<sup>[1]</sup>。在养殖区,多种弧菌表现出与环境变化响应的特征。*V. caribbeanicus*与环境关联性极大<sup>[28]</sup>,与温度和叶绿素呈现显著正相关,与浊度、盐度、磷酸盐、DO、pH、DIN、亚硝酸盐呈现显著负相关。副溶血性弧菌作为典型的条件致病菌,温度升高时,弧菌丰度显著增加,扇贝处在适温范围的边缘区,易在幼虫期感染病原菌。林克冰等<sup>[29]</sup>提出,弧菌导致对虾发病的极限浓度为 $10^3\sim 10^4$ 个/mL,并认为水体细菌数量与对虾发病有着直接的关系。流式结果显示,养殖区的细菌细胞数为96 934~325 000个/mL,细菌中弧菌属丰度比例为5.71%,弧菌细胞数为5 535~18 557个/mL,由于养殖区处于近海岸,扇贝处在流动的水体中,潮汐、海洋动力学等因子可能是未出现发病的原因之一。在该养殖区内的栉孔扇贝体内,支原体菌属与磷酸盐显著正相关( $P<0.001$ ),弧菌属与DO显著负相关( $P<0.001$ )。证实了栉孔扇贝发病与环境存在密切关系,为人工健康养殖提供了重要理论依据。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

#### 参考文献 (References):

- [1] 张颖雪,苏洁,樊景凤,等.海水养殖贝类弧菌病流行暴发及其环境影响因素研究进展[J].*海洋环境科学*, 2020, 39(3): 480-487.  
Zhang Y X, Su J, Fan J F, et al. Outbreaks of vibriosis in mariculture shellfish and its research progress[J]. *Marine environmental Science*, 2020, 39(3): 480-487 (in Chinese).
- [2] 陈爱平,朱泽闻,王立新,等.2006年中国水产养殖病害监测报告(一)[J].*科学养鱼*, 2007(7): 48-49.  
Chen A P, Zhu Z W, Wang L X, et al. Report on aquaculture disease monitor in China 2006[J]. *Scientific Fish Farming*, 2007(7): 48-49 (in Chinese).
- [3] 邬长祥.我国南方养殖海域溶藻弧菌的遗传多样性及部分毒力基因的分布特征研究[D].湛江:广东海洋大学, 2012.  
Wu C X. The genetic diversity and ditribution of virulent genes in *Vibrio alginolyticus* isolated from south China[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2012 (in Chinese).
- [4] Wan Y, Bai Y, He J, et al. Temporal and spatial variations of aquatic environmental characteristics and sediment bacterial community in five regions of Lake Taihu[J]. *Aquatic Ecology*, 2017, 51(3): 343-358.
- [5] 王秀华,王崇明,李筠,等.胶州湾栉孔扇贝大规模死亡的流行病学调查[J].*水产学报*, 2002, 26(2): 149-156.  
Wang X H, Wang C M, Li Y, et al. Epidemiological study on massive death of the cultured scallop *Chlamys farreri* in the Jiaozhou Bay[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2002, 26(2): 149-156 (in Chinese).
- [6] Pereira C, Salvador S, Arrojado C, et al. Evaluating seasonal dynamics of bacterial communities in marine fish aquaculture: a preliminary study before applying phage therapy[J]. *Journal of Environmental Monitoring*, 2011, 13(4): 1053-1058.
- [7] Parveen S, Hettiarachchi K A, Bowers J C, et al. Seasonal distribution of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay oysters and waters[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 128(2): 354-361.
- [8] Xu N, Tan G C, Wang H Y, et al. Effect of biochar additions to soil on nitrogen leaching, microbial biomass and bacterial community structure[J]. *European Journal of Soil Biology*, 2016, 74: 1-8.
- [9] Tout J, Siboni N, Messer L F, et al. Increased seawater temperature increases the abundance and alters the structure of natural *Vibrio* populations associated with the coral *Pocillopora damicornis*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 432.
- [10] Thompson J R, Randa M A, Marcelino L A, et al. Diversity and dynamics of a North Atlantic coastal *Vibrio* community[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(7): 4103-4110.
- [11] Chen S F, Zhou Y Q, Chen Y R, et al. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor[J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(17): i884-i890.
- [12] Magoč T, Salzberg S L. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [13] Edgar R C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences

- from microbial amplicon reads[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 996-998.
- [14] Stackebrandt E, Goebel B M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S *rRNA* sequence analysis in the present species definition in bacteriology[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1994, 44(4): 846-849.
- [15] Wang Q, Garrity G M, Tiedje J M, *et al.* Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16): 5261-5267.
- [16] Gao Z M, Huang J M, Cui G J, *et al.* *In situ* meta-omic insights into the community compositions and ecological roles of hadal microbes in the Mariana Trench[J]. *Environmental Microbiology*, 2019, 21(11): 4092-4108.
- [17] Huang J M, Wang Y. Genomic differences within the phylum Marinimicrobia: from waters to sediments in the Mariana Trench[J]. *Marine Genomics*, 2020, 50: 100699.
- [18] Sichert A, Corzett C H, Schechter M S, *et al.* Verrucomicrobia use hundreds of enzymes to digest the algal polysaccharide fucoidan[J]. *Nature Microbiology*, 2020, 5(8): 1026-1039.
- [19] 吕宁. 虾蟹养殖水体中微生物群落多样性分析 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.  
Lü N. Bacterial community diversity analysis in different aquaculture modes[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014 (in Chinese).
- [20] 邱宏端, 徐姗楠, 朱航, 等. 耐盐红螺菌科细菌对淡水鱼池水质及细菌类群的影响[J]. *水产学报*, 2002, 26(3): 231-236.  
Qiu H D, Xu S N, Zu H, *et al.* The influence of salt-resistant Rhodospirillaceae bacteria on the water quality and bacterial population in the freshwater fish-ponds[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2002, 26(3): 231-236 (in Chinese).
- [21] 张樱, 陈亚岗, 杨青. 不动杆菌感染及耐药机制的研究进展[J]. *国外医学·流行病学传染病学分册*, 2005, 32(2): 109-112.  
Zhang Y, Chen Y G, Yang Q. Acinetobacter infection and research advancement of resistant mechanism[J]. *Foreign Medical Sciences Epidemiology Lemology*, 2005, 32(2): 109-112 (in Chinese).
- [22] 李丽倩, 姚琳, 林才云, 等. 2018年贝类来源副溶血性弧菌毒力基因及耐药性分析[J]. *中国食品卫生杂志*, 2020, 32(4): 364-370.  
Li L Q, Yao L, Lin C Y, *et al.* Analysis of virulence genes and antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from shellfish in 2018[J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2020, 32(4): 364-370 (in Chinese).
- [23] 计新丽, 林小涛, 许忠能, 等. 海水养殖自身污染机制及其对环境的影响[J]. *海洋环境科学*, 2000, 19(4): 66-71.  
Ji X L, Lin X T, Yu Z N, *et al.* Mechanism of mariculture self-pollution and its effects on environment[J]. *Marine Environmental Science*, 2000, 19(4): 66-71 (in Chinese).
- [24] Zhang H, Sun Z L, Liu B, *et al.* Dynamic changes of microbial communities in *Litopenaeus vannamei* cultures and the effects of environmental factors[J]. *Aquaculture*, 2016, 455: 97-108.
- [25] 邹沈娟, 尹立强, 赵博礼, 等. 大冶湖浮游细菌群落结构及其环境影响因子研究[J]. *长江流域资源与环境*, 2020, 29(2): 360-368.  
Zou S J, Yin L Q, Zhao B L, *et al.* Study on bacterioplankton communities composition and the related environmental factors in the Daye Lake[J]. *Resources and Environment in the Yangtze Basin*, 2020, 29(2): 360-368 (in Chinese).
- [26] 张莹, 石萍, 马炯. 微小杆菌 *Exiguobacterium* spp. 及其环境应用研究进展[J]. *应用与环境生物学报*, 2013, 19(5): 898-904.  
Zhang Y, Shi P, Ma J. *Exiguobacterium* spp. and their applications in environmental remediation[J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2013, 19(5): 898-904 (in Chinese).
- [27] Kim I G, Lee M H, Jung S Y, *et al.* *Exiguobacterium aestuarii* sp. nov. and *Exiguobacterium marinum* sp. nov., isolated from a tidal flat of the Yellow Sea in Korea[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(2): 885-889.
- [28] Hoffmann M, Monday S R, Allard M W, *et al.* *Vibrio caribbeanicus* sp. nov., isolated from the marine sponge *Scleritoderma cyanea*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62(Pt 8): 1736-1743.
- [29] 林克冰, 周宸, 蔡清海, 等. 斑节对虾双季养成期间虾池水质和底泥细菌含量的变化[J]. *福建水产*, 1998(4): 7-12.  
Lin K B, Zhou C, Cai Q H, *et al.* Variation of total bacterial number in pond water and bottom mud during the double-cropping adult culture of *Penaeus monodon*[J]. *Journal of Fujian Fisheries*, 1998(4): 7-12 (in Chinese).

## Bacterial community structure diversity and environmental factors in the coastal shellfish culture area of Huangdao

MA Jingxue<sup>1,2</sup>, ZHANG Peiyu<sup>1</sup>, WANG Zongxing<sup>2</sup>, ZHENG Minggang<sup>2</sup>,  
GAO Ping<sup>2</sup>, QU Lingyun<sup>2</sup>, ZHENG Fengrong<sup>2\*</sup>

(1. Institute of Environmental Science and Engineering, Qingdao University, Qingdao 266071, China;

2. The First Institute of Oceanography of the Ministry of Natural Resources, Qingdao 266061, China)

**Abstract:** Shellfish farming is an important part of China's aquaculture industry. With the continuous expansion of the scale of aquaculture, the unreasonable operation of the aquaculture industry has caused a greater burden on the environment, caused the change of microbial community structure in aquaculture water, and caused certain harm to the health of shellfish aquaculture. Meanwhile, it has also caused huge economic losses to the shellfish aquaculture industry, which seriously affected the sustainable development of the shellfish industry. In order to study the open aquaculture waters of offshore shellfish, the distribution of bacterial populations, the response of microbial community diversity to environmental factors and its relationship with the incidence of diseases in aquatic animals, we collected sea water samples from different locations in an open aquaculture water area in Huangdao from July to November 2019 to analyze different water quality factors (water temperature, salinity, pH, dissolved oxygen, chlorophyll a, ammonia nitrogen, phosphates, nitrates and nitrites), used high-throughput sequencing methods to analyze the differences in the microbial community structure and diversity of water samples and *Chlamys farreri* tissue samples in different months, and discussed the correlation between environmental factors and microbial community structure. The results showed that 42 phyla and 94 classes were detected in the bacterial community structure of water samples. It is composed of Proteobacteria, Bacteroides, Cyanobacteria, Actinomycetes, Firmicutes, etc. Among them, Proteobacteria is the dominant phyla, mainly including  $\gamma$ -Proteobacteria and  $\alpha$ -Proteobacteria. The results of the diversity analysis of bacterial OTU levels in different months were November>September>July>October>August; the diversity analysis of *Vibrio* OTU level showed that the diversity of *Vibrio* increased first and then decreased, and the trend was consistent with the change of water temperature. The diversity of the culture area in August was higher than that of the control area. RDA analysis showed that the chlorophyll content ( $\mu\text{g/L}$ ) and nitrite ( $\text{mg/L}$ ) concentration had a significant impact on the species composition and community structure at the phylum level. Phosphate content ( $\text{mg/L}$ ) and DO ( $\text{mg/L}$ ) have a significant impact on the community structure of *Vibrio*. A total of 45 phyla were detected in the bacterial community structure of tissue samples, and the Tenericutes is the dominant phyla, mainly including *Mycoplasma*, which has a significant positive correlation with the phosphate content ( $\text{mg/L}$ ). The results of the isolation and identification of the dominant bacteria of *Vibrio* showed that the dominant *Vibrio* in the culture environment from July to November were *V. alginolyticus* and *V. harveyi*. Studies have shown that aquaculture activities have a certain impact on the microbial community structure in the water by changing the content of chlorophyll and nitrite in the water. At the same time, changes in phosphate and DO have a certain impact on the community structure of the *Vibrio* genus. The results of this study can provide certain theoretical support for the occurrence of shellfish diseases.

**Key words:** shellfish culture; environmental factors; high-throughput sequencing; community structure; Huangdao

**Corresponding author:** ZHENG Fengrong. E-mail: zhengfr@fio.org.cn

**Funding projects:** National Key R & D Program of China (2017YFC1404504)