



不同地区稻虾综合种养系统的微生物群落结构分析

贾丽娟^{1,2}, 王广军^{2*}, 夏耘², 张凯², 谢骏²,
郁二蒙², 李志斐², 龚望宝², 田晶晶²

(1. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业农村部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室, 广东省水产动物免疫与绿色养殖重点实验室, 广东广州 510380)

摘要: 为研究不同地区稻虾综合种养系统的环境及克氏原螯虾肠道的细菌群落结构差异, 为改进不同地区稻虾综合养殖策略提供依据, 采用 Illumina Miseq 高通量测序技术, 研究了武汉、永州和韶关地区稻田养殖克氏原螯虾的水体、底泥及虾肠道细菌群落结构, 并对水体、肠道菌群与环境因子之间的关系进行了分析。结果显示, 武汉地区稻虾综合种养系统的水体、底泥及克氏原螯虾肠道细菌群落的多样性均大于永州地区和韶关地区。武汉地区的稻虾综合种养系统的水体及底泥的细菌群落结构与永州地区和韶关地区均相似, 其中水体的优势菌门均为放线菌门、蓝细菌门、变形菌门和拟杆菌门; 底泥的优势菌门均为变形菌门。武汉地区的克氏原螯虾肠道的优势菌门为变形菌门、厚壁菌门和拟杆菌门; 优势菌属为柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter*, 10.85%)、气单胞菌属 (*Aeromonas*, 9.88%) 和 [*Anaerorhabdus*]_{furcosa_group} (8.43%) 等。永州地区的克氏原螯虾肠道的优势菌门为厚壁菌门和放线菌门; 优势菌属为 ZOR0006 (9.78%)、拟杆菌属 (*Bacteroides*, 5.41%) 和 [*Anaerorhabdus*]_{furcosa_group} (3.98%)。韶关地区的克氏原螯虾肠道的优势菌门为厚壁菌门和变形菌门; 优势菌属为柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter*, 9.31%)、拟杆菌属 (4.29%) 和 [*Anaerorhabdus*]_{furcosa_group} (4.58%) 等。环境因子关联分析结果显示, 总悬浮颗粒 (TSS) 和总磷 (TP) 对水体细菌群落结构具有显著影响, 磷酸盐 ($PO_4^{3-}-P$) 和化学需氧量 (COD_{Cr}) 对肠道微生物结构具有显著影响。研究表明, 不同地区水体、底泥及克氏原螯虾肠道微生物存在一定差异, 其中水体与底泥的微生物结构更相似。武汉地区稻虾综合种养系统中水体的微生物多样性最高, 对于稳定养殖系统有利。不同地区养殖系统微生物的优势菌门种类没有变化, 但是会改变优势菌门和优势菌属的相对丰度。养殖环境中的营养盐含量会对微生物群落结构产生一定程度的影响。

关键词: 克氏原螯虾; 稻虾综合种养; 水体; 底泥; 肠道; 菌群结构; 高通量测序

中图分类号: Q 938.2; S 917.1

文献标志码: A

克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*), 俗名淡水小龙虾、小龙虾等, 是一种适应能力和繁殖力较强的淡水经济虾类, 目前已成为我国重要的养殖

种类之一。克氏原螯虾的养殖方式主要有稻田养殖、池塘主养、池塘混养、藕塘套养等, 其中, 稻田养殖占比最大, 是克氏原螯虾养殖的主要生

收稿日期: 2021-05-06 修回日期: 2021-06-23

资助项目: 国家重点研发计划 (2019YFD0900304); 广东省促进经济发展专项资金 (2019B2); 中国水产科学研究院院级基本科研业务费 (2021SJ-XC2); 中国-东盟海上基金 (CAMC-2018F)

第一作者: 贾丽娟 (照片), 从事水产动物健康养殖研究, E-mail: 1661280002@qq.com

通信作者: 王广军, 从事稻渔综合种养及水环境调控研究, E-mail: wgj5810@163.com



产方式。2019年,我国克氏原螯虾总产量达208.96万t,养殖总面积达128.6万hm²。其中稻田养虾的产量177.25万t,养殖面积110.5万hm²,分别占总产量和总面积的84.82%和85.96%^[1]。稻田养虾(克氏原螯虾)也是我国稻渔综合种养的主要模式,占全国稻渔综合种养总面积的47.71%。

稻虾综合种养模式(稻田养虾)是一种集农业和养殖业于一体的高效人工生态系统^[2-3],在这一生态系统中,微生物驱动着整个生态系统的物质循环和能量流动,在生态系统中氮、磷、硫和碳等要素的循环和利用中起到至关重要的作用^[4],同时微生物群落组成与水质状况紧密相关^[5]。此外,由于水产动物生活于水中且消化道短,其消化道中的菌群结构易受环境的影响,水质的变化也会对水产动物的肠道微生物产生一定的影响^[6-7]。肠道微生物在水产动物的生长发育过程中起着非常重要的作用,既能参与机体自身营养物质的消化吸收,同时也可以调节肠道环境。肠道菌群平衡有利于宿主健康^[8],从而促进其生长发育。越来越多的证据表明,肠道菌群平衡可能受到外界环境的影响。目前我国的稻虾综合种养存在地区差异,养殖主产区的湖北产量高、效益好,而位于南方的广东,克氏原螯虾养殖面临繁殖率和成活率低等问题,制约着该地区克氏原螯虾产业的发展。研究不同地区稻虾养殖系统内微生物区系的多样性和功能,探究微生物在克氏原螯虾养殖中的作用,有可能为改进养殖策略提供新的思路。因此,本研究利用Illumina MiSeq高通量测序技术研究不同地区稻田养殖克氏原螯虾肠道、养殖水体和底泥微生物组成和多样性,分析其与环境因子的相互作用,以期不同地区克氏原螯虾健康养殖及养殖环境调控、不同环境下克氏原螯虾肠道微生物生理学研究提供基础数据和参考。

1 材料与方法

1.1 实验地点

实验采样地点选址如图1所示,分别位于广东省韶关市南雄市(韶关组,SG)(114.30966°E,25.11706°N)、湖南省永州市冷水滩区(永州组,YZ)(111.363551°E,26.332794°N)和湖北省武汉市蔡甸区(武汉组,WH)(114.03211°E,30.586919°N),于成虾养成期的6月进行采样。每个地区选取3块面积和养殖管理模式相近的稻田进行采样,

<https://www.china-fishery.cn>

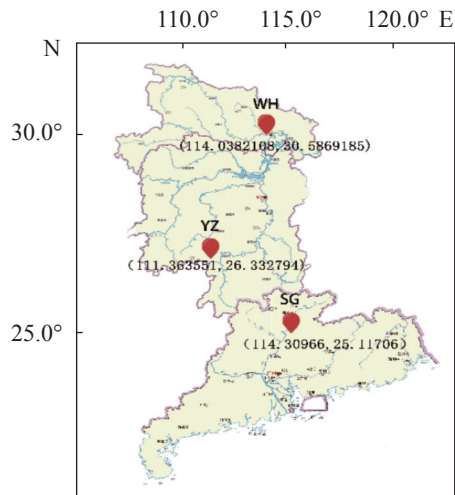


图1 采样点分布图

Fig. 1 Distribution of sampling points

即为3个生物学重复。

1.2 水样采集与水质指标测定

使用YSI水质监测仪现场测定水体温度(T)、溶解氧(DO)、pH、总溶解固体(TDS)和电导率(SPC)。使用五点采样法采集虾沟中距水体表面约10cm的水样,混合后作为1个样本,每个地区共3个样本。样品分为两份,一份用国标法测定化学需氧量(COD_{Cr})、硝态氮(NO₃⁻-N)、亚硝态氮(NO₂⁻-N)、氨氮(NH₄⁺-N)、总氮(TN)、总磷(TP)、总悬浮颗粒物(TSS)、磷酸盐(PO₄³⁻-P)和叶绿素a(Chl-a)浓度等水质指标。一份用无菌采水袋低温保存带回实验室,用0.2μm滤膜过滤后提取DNA,进行微生物检测。用于测定微生物的水体样品用S表示,三个地区分别为WHS、YZS和SGS。

1.3 底泥样品采集

使用活塞式柱状沉积物采样器采集底泥,用于基因组DNA提取。使用五点采样法采集后混合作为1个样本,每个地区共3个样本。保存于-80℃,提取DNA后用于微生物分析。用于测定微生物的底泥样品用N表示,三个地区分别为WHN、YZN和SGN。

1.4 肠道样品采集与基因组DNA提取

随机选择大小规格相近、体色鲜亮、附肢齐全、活动力较强、无病无伤的个体进行样品采集。实验所采集的克氏原螯虾为5月龄,体重为20.0~25.0g。每块稻田选择3尾虾进行肠道样品采集,

中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

混合后作为 1 个样本, 每个地区共 3 个样本。样品采集后于 -80°C 保存。使用细菌 DNA 提取试剂盒 (MN NucleoSpin 96 Soi) 提取肠道内容物细菌 DNA, 然后用 PowerSoilDN Isolation Kit(MoBio) 检测 DNA 浓度, 琼脂糖凝胶电泳检测纯度后进行高通量测序分析。用于测定微生物的肠道样品用 C 表示, 三个地区分别为 WHC、YZC 和 SGC。

1.5 PCR 扩增和高通量测序分析

使用 DNA 提取试剂盒从样本中提取 DNA, 使用 PowerSoilDNA Isolation Kit (MoBio) 检测 DNA 浓度。以 20 ~ 30 ng DNA 为模板, 使用设计的包含 "CCTACGRRBGCASCAGKVRVGAAT" 序列的上游引物和包含 "GGACTACNVGGGTWTCTAATCC" 序列的下游引物扩增原核生物 16S *rDNA* 的 V3 及 V4 的 2 个高度可变区。PCR 扩增采用 25 μL 反应体系, 包括上下游引物各 1 μL 、dNTPs 2 μL 、TransStart Buffer 2.5 μL 、TransStart *Taq* DNA 0.5 μL 和模板 DNA 20 ng, dd H_2O 补至体系 25 μL 。通过 Qubit3.0 Fluorometer (Invitrogen, 美国) 检测文库浓度。将文库定量到 10 nmol/L, 使用 Illumina MiSeq (Illumina, 美国) 进行 PE250/FE300 双端测序, 由 MiSeq 自带的 MiSeq Control Software (MCS) 读取序列信息。高通量测序文库的构建和基于 Illumina MiSeq 平台的测序由苏州帕诺米克生物科技有限公司完成。

本研究获得了中国水产科学研究院珠江水产研究所管理和使用伦理委员会批准 (审批号: LAEC-PRFRI-20200518), 实验过程中操作人员严格遵守伦理规范, 并按照中国水产科学研究院珠江水产研究所伦理委员会制定的规章制度执行。

1.6 数据分析

对测序得到的原始序列进行拼接、过滤, 得到有效序列。然后基于有效数据进行分类单元 (operational taxonomic unit, OTUs) 聚类和物种分类分析。采用 Canoco 5.0 软件对环境因子与水体、肠道微生物群落组成变化相关性分别进行冗余分析 (redundancy analysis, RDA), 使用蒙特卡罗检验法验证计算结果显著性。

2 结果

2.1 16S *rRNA* 基因测序的特点

高通量测序结果显示, 9 组 27 个样本用于后

续分析的平均有效序列数为 60 514 条。97% 相似度水平下 OTUs 数为 19 407 个。不同样本的 OTUs 数为 510~4 121 个; 群落丰富度的 Ace 指数为 774.91~5 356.00, Chao 1 指数为 750.83~5 162.90; 群落多样性的 Shannon 指数为 4.21~10.23, Simpson 指数为 0.821~0.997。样本中物种覆盖度大于 96% (96.5%~99.3%)(表 1), 表明本次测序基本代表了样本中微生物的真实情况。

同一地区, 样本中细菌群落的多样性排序为底泥>水体>肠道。Shannon、Chao 1 和 Ace 指数均为底泥最高, 肠道最低, 且不同样本之间差异显著 ($P < 0.05$); Simpson 指数均为底泥显著高于水体和肠道 ($P < 0.05$), 而肠道与水体之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。不同地区底泥的细菌群落丰富度和多样性相似度较高, 其中 Shannon、Simpson 和 Chao 1 指数均无显著性差异 ($P > 0.05$), Ace 指数武汉组显著高于永州组和韶关组 ($P < 0.05$)。不同地区间水体微生物多样性指数中, Simpson 和 Chao 1 指数无显著性差异 ($P > 0.05$); Shannon 指数武汉组显著高于韶关组 ($P < 0.05$); Ace 指数武汉组显著高于永州组和韶关组 ($P < 0.05$)。肠道微生物多样性指数中, 不同地区间 Simpson 指数无显著性差异 ($P > 0.05$); Shannon 和 Chao 1 指数武汉组显著高于韶关组 ($P < 0.05$); Ace 指数武汉组显著高于韶关组和永州组 ($P < 0.05$)。整体而言, 武汉组各样本细菌物种丰富度最高, 细菌多样性指数最大。

2.2 基于门水平的细菌群落结构

不同地区整体微生物群落中的细菌分布于 114 个门, 其中 16 个门的丰度大于 1%。按丰度高于 10% 统计分析显示, 变形菌门 (Proteobacteria) 和厚壁菌门 (Firmicutes) 在三个地区都为绝对优势菌门, 其在武汉组含量分别为 30.53% 和 17.84%; 永州组为 19.88% 和 24.44%; 韶关组为 19.27% 和 24.26%。

在武汉地区的稻虾综合种养系统中, WHS 组的优势菌门为变形菌门 (38.36%) 和放线菌门 (Actinobacteria, 17.35%); WHN 组的优势菌门为变形菌门 (22.76%); WHC 组的优势菌门为变形菌门 (30.49%)、厚壁菌门 (43.63%) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes, 14.25%)。在永州地区的稻虾综合种养系统中, YZS 组的优势菌门为变形菌门 (28.18%)、蓝细菌门 (Cyanobacteria, 17.03%) 和放线菌门

表 1 在 97% 相似度水平上样品中细菌的丰富度和多样性指数

Tab. 1 Richness and diversity index of bacteria in samples at the 97% similarity level

多样性指数 diversity index	样本类别 sample classification	武汉 WH	永州 YZ	韶关 SG
Observed_Species(OTU)	C	1 458 ± 37.39 ^{Ca}	978 ± 62.26 ^{Cb}	510 ± 42.80 ^{Cc}
	S	2 858 ± 34.66 ^{Ba}	2 180 ± 44.43 ^{Bb}	1 512 ± 48.26 ^{Bc}
	N	4 121 ± 41.62 ^{Aa}	3 953 ± 73.60 ^{Aa}	3 915 ± 84.65 ^{Aa}
Shannon	C	5.45 ± 0.13 ^{Ca}	4.79 ± 0.42 ^{Cab}	4.21 ± 0.24 ^{Cb}
	S	8.16 ± 0.15 ^{Ba}	7.88 ± 0.15 ^{Bab}	7.26 ± 0.16 ^{Bb}
	N	10.23 ± 0.06 ^{Aa}	9.85 ± 0.11 ^{Aa}	10.14 ± 0.14 ^{Aa}
Simpson	C	0.896 ± 0.013 ^{Ba}	0.858 ± 0.05 ^{Ba}	0.821 ± 0.03 ^{Ba}
	S	0.983 ± 0.002 ^{Aa}	0.982 ± 0.001 ^{Aa}	0.980 ± 0.002 ^{Aa}
	N	0.997 ± 0.001 ^{Aa}	0.996 ± 0.001 ^{Aa}	0.995 ± 0.001 ^{Aa}
Chao 1	C	2 212.74 ± 86.72 ^{Ca}	1 964.42 ± 110.46 ^{Ca}	750.83 ± 44.04 ^{Cb}
	S	4 118.14 ± 161.93 ^{Ba}	3 143.08 ± 156.96 ^{Bb}	2 076.61 ± 139.65 ^{Bc}
	N	5 162.90 ± 78.63 ^{Aa}	4 706.32 ± 56.83 ^{Aa}	4 451.32 ± 68.34 ^{Aa}
Ace	C	2 266.79 ± 76.14 ^{Ca}	1 723.07 ± 75.78 ^{Cb}	774.91 ± 44.29 ^{Cc}
	S	4 339.67 ± 96.52 ^{Ba}	3 303.29 ± 172.48 ^{Bb}	1 804.64 ± 117.75 ^{Bc}
	N	5 356.00 ± 64.33 ^{Aa}	4 870.00 ± 118.11 ^{Ab}	4 641.73 ± 105.03 ^{Ab}
测序深度指数 Goods_coverage	C	0.982 ± 0.003 ^{Aa}	0.985 ± 0.006 ^{Aa}	0.993 ± 0.001 ^{Aa}
	S	0.965 ± 0.002 ^{Bc}	0.974 ± 0.003 ^{Abb}	0.987 ± 0.002 ^{Ba}
	N	0.967 ± 0.002 ^{Ba}	0.968 ± 0.003 ^{Ba}	0.970 ± 0.004 ^{Ca}

注: 同一行不同小写字母表示不同地区差异显著, 同一列不同大写字母表示同一地区水体、底泥和肠道差异显著, 显著性水平为0.05。
Notes: Different lowercase letters in the same row indicate significant regional difference, while different capital letters in the same column indicate significant differences in water body, sediment and intestines in the same area, and the significance level is 0.05.

(23.10%); YZN 组的优势菌门为变形菌门 (18.36%); YZC 组的优势菌门为厚壁菌门 (65.11%) 和放线菌门 (12.93%)。在韶关地区稻虾综合种养系统中, SGS 组的优势菌门为变形菌门 (20.17%)、蓝细菌门 (23.36%)、拟杆菌门 (11.97%) 和放线菌门 (10.95%); SGN 组的优势菌门为变形菌门 (22.19%); SGC 组的优势菌门为厚壁菌门 (63.94%) 和变形菌门 (23.19%)(图 2-d)。

通过微生物 16S *rRNA* V3~V4 区测序结果构建 Venn 图, 分析了不同地区水体、底泥以及肠道中存在的优势菌群 (图 3)。武汉组水体、底泥以及肠道的不同样本共有 12 791 个细菌 OTUs, 包含 3 702 个共有 OTUs, 其中 WHC 组存在 613 个特有 OTUs, WHN 组存在 3 786 个特有 OTUs, WHS 组存在 1 418 个特有 OTUs (图 3-a)。永州组水体、底泥及肠道中共发现 13 509 个 OTUs, 包含 3 147 个共有 OTUs, 有 1 139 个 OTUs 只存在于 YZC 组, 4 377 个 OTUs 只存在于 YZN 组, 1 373 个 OTUs 只存在于 YZS 组。韶关组水体、底泥及肠道中共发现 12 135 个 OTUs, 包含 964

个共有 OTUs, 有 673 个 OTUs 只存在于 SGC 组, 5 973 个 OTUs 只存在于 SGN 组, 1 577 个 OTUs 只存在于 SGS 组。3 个地区均表现出底泥单独富集的细菌菌群数量最多。不同地区同一类型样本中, 水体包含 2 606 个共有 OTUs, 2 264 个 OTUs 只存在于 WHS 组, 1 599 个 OTUs 只存在于 YZS 组, 999 个 OTUs 只存在于 SGS 组。底泥包含 4 582 个共有 OTUs, 2 588 个 OTUs 只存在于 WHN 组, 2 519 个 OTUs 只存在于 YZN 组, 2 877 个 OTUs 只存在于 SGN 组。肠道包含 1 220 个共有 OTUs, 1 737 个 OTUs 只存在于 WHC 组, 2 118 个 OTUs 只存在于 YZC 组, 617 个 OTUs 只存在于 SGC 组。上述 3 种类型样品中, 韶关地区的样品单独富集的细菌菌群数量相对较少。

2.3 基于属水平的细菌群落结构

不同地区 9 组样品的细菌分布于 1 301 个属, 其中 14 个属的丰度大于 1%。在属水平上, 不同样品组的优势细菌 (丰度 > 3%) 组成及丰度存在明显差异。在武汉地区稻虾综合种养系统中, WHS

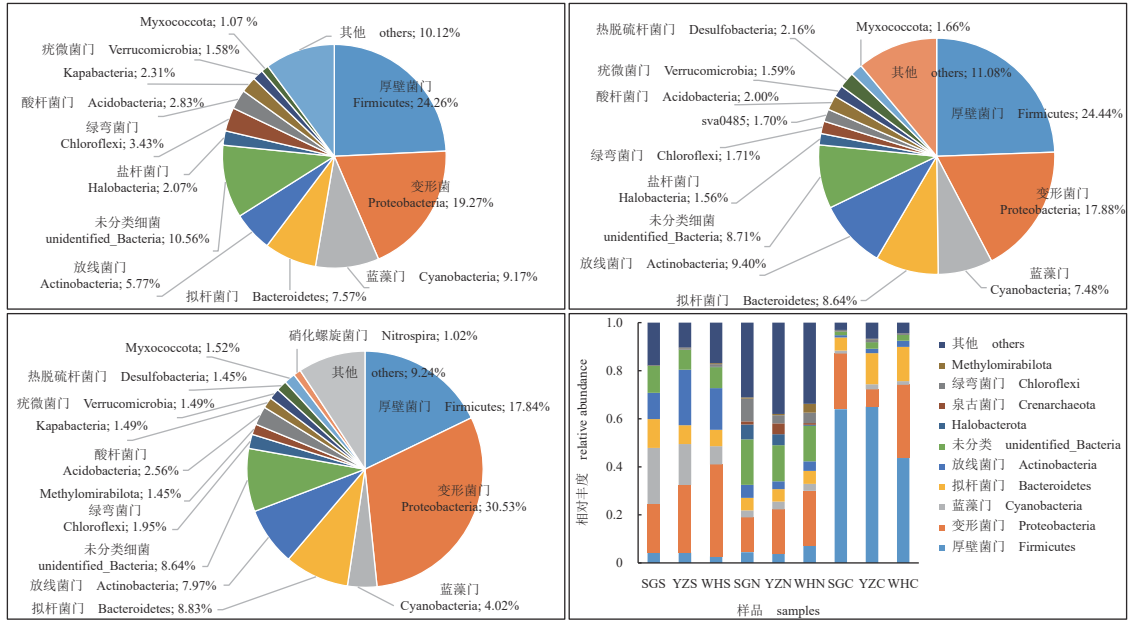


图 2 门水平下样品的细菌群落相对丰度图

(a) 韶关组整体细菌群落饼图; (b) 永州组整体细菌群落饼图; (c) 武汉组整体细菌群落饼图; (d) 门水平相对丰度前十的细菌群落组成。

Fig. 2 Relative abundance of bacterial community in the samples at phylum level

(a) Pie chart of the overall bacterial community in Shaoguan group; (b) pie chart of the overall bacterial community in Yongzhou group; (c) pie chart of the overall bacterial community in Wuhan group; (d) bacterial community composition of the top 10 relative abundances at phylum level.

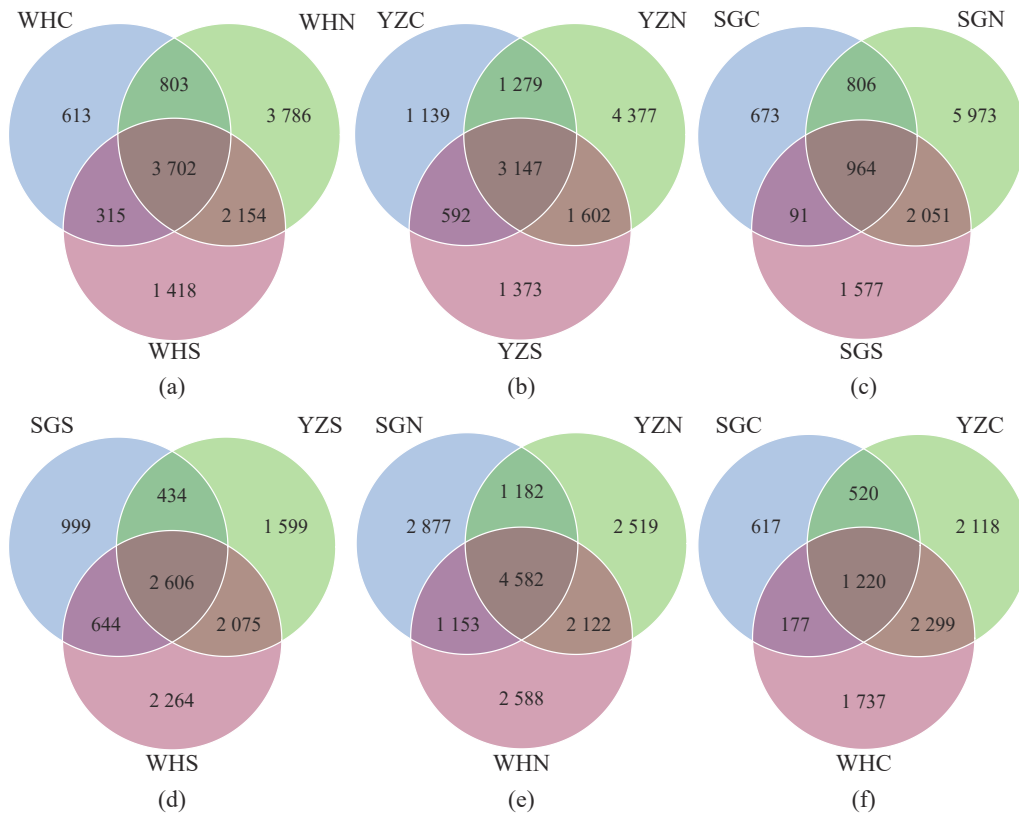


图 3 水体、底泥及肠道微生物 OTU 的 Venn 图

(a) 武汉组; (b) 永州组; (c) 韶关组; (d) 水体; (e) 底泥; (f) 肠道。

Fig. 3 Venn diagrams of the OTU of microflora in water, sediment and intestine

(a) Wuhan group; (b) Yongzhou group; (c) Shaoguan group; (d) water; (e) sediment; (f) intestine.

组主要优势菌属为 *Hgcl_clade* (8.13%)、多核杆菌属 (*Polynucleobacter*, 5.94%)、*Cyanobium_PCC-6307* (3.52%) 和 *Candidatus_Aquiluna* (3.98%); WHN 组没有鉴定出丰度大于 3% 的菌属; WHC 组的优势菌属为柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter*, 10.85%)、气单胞菌属 (*Aeromonas*, 9.88%) 和 *[Anaerorhabdus]_furcosa_group* (8.43%) 等。在永州的稻虾综合种养系统中, YZS 组的优势菌属为 *Cyanobium_PCC-6307* (8.23%)、*Hgcl_clade* (13.66%) 和多核杆菌属 (*Polynucleobacter*, 3.51%); YZN 组的优势菌属是 *Dechloromonas* (3.54%); YZC 组的优势菌属是 ZOR0006 (9.78%)、拟杆菌属 (*Bacteroides*, 5.41%) 和 *[Anaerorhabdus]_furcosa_group* (3.98%)。在韶关的稻虾综合种养系统中, SGS 组的优势菌属是 *Sphaerospermopsis_BCCUSP55* (8.83%)、*Hgcl_clade* (5.36%) 和玫瑰单胞菌属 (*Roseomonas*) (4.75%) 等; SGN 组没有丰度大于 3% 的菌属; SGC 组的优势菌属是柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter*, 9.31%)、拟杆菌属 (4.29%) 和 *[Anaerorhabdus]_furcosa_group* (4.58%) 等 (图 4)。通过对不同地区相同种类样品对比分析, 发现 WHS 组 *Candidatus_Aquiluna* 和多核杆菌属细菌相对丰度显著高于 SGS 组 ($P < 0.05$); YZS 组 *Hgcl_clade* 和 *Cyanobium_PCC-6307* 属细菌相对丰度显著高于 WHS 组和 SGS 组 ($P < 0.05$); SGS 组 *Sphaerospermopsis_BCCUSP55*、玫瑰单胞菌属和 *Pseudanabaena_PCC-7429* 属细菌相对丰度显著高于 WHS 组和 YZS 组 ($P < 0.05$)。YZN 组 *Dechloromonas* 属细菌相对丰度显著高于

SGN 组和 WHN 组 ($P < 0.05$)。WHC 组气单胞菌属、弧菌属、*[Anaerorhabdus]_furcosa_group* 和 *Dysgonomonas* 属细菌相对丰度显著高于 YZC 组和 SGC 组, 柠檬酸杆菌属细菌相对丰度显著高于 YZC 组 ($P < 0.05$); YZC 组 ZOR0006 属细菌相对丰度显著高于 WHC 组和 SGC, 拟杆菌属细菌相对丰度显著高于 WHC 组 ($P < 0.05$); SGC 组柠檬酸杆菌属细菌相对丰度显著高于 YZC 组 ($P < 0.05$)。

2.4 群落结构主坐标分析

在 OTU 水平上, 利用加权 UniFrac 距离计算进行微生物群落结构的主坐标分析 (PCoA 分析), 检验样品中微生物区系的群落结构 (图 5)。在 PCoA 图上, 横坐标为第一主坐标, 表示一个主成分, 纵坐标为第二主坐标, 表示另一个主成分, 百分比表示主成分对样本差异的贡献值; 图中的每个符号代表一个样本的微生物区系, 排序图上符号之间的距离反映了群落结构的相对不同。样本距离越接近, 表示物种组成结构越相似, 因此群落结构相似度高的样本倾向于聚集在一起。同一个组的样本使用同一种颜色表示。由图 5 可知, 第一主坐标对样本差异的贡献值为 32.96%, 第二主坐标对样本差异的贡献值为 24.07%。同一地区不同样本之间, 底泥和水体微生物区系距离更近, 说明其微生物组成结构相似度较肠道微生物高, 群落差异较小, 克氏原螯虾肠道和水体、底泥微生物组成差异较大。同类样本不同地区之间比较发现, 克氏原螯虾肠道微生物区系不同地区之间倾向于聚集在一起, 群落相似度较高, 永州与武

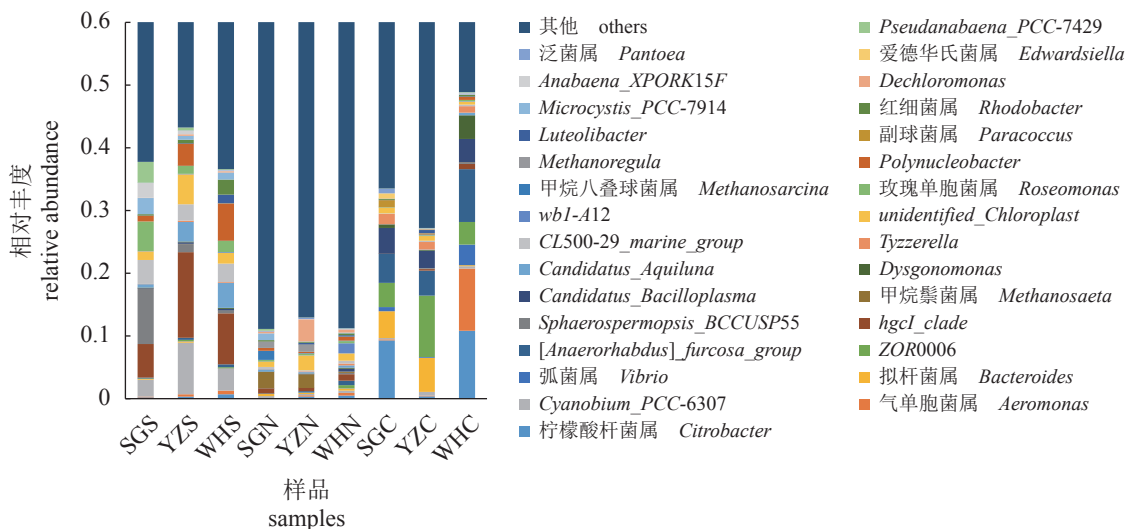


图 4 基于属水平的细菌群落组成

Fig. 4 Bacterial community composition at genus level

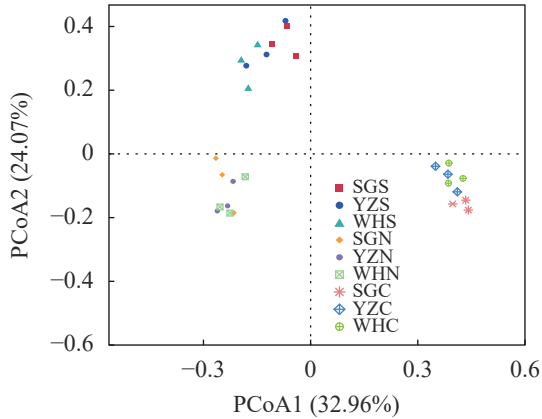


图 5 细菌群落的 PCoA 分析

Fig. 5 PCoA analysis of bacterial community structure

汉样本距离更接近, 物种组成更相似; 水体和土壤微生物区系武汉和永州相似度较韶关高。

2.5 环境因子对菌群分布的影响

不同地区养殖水体 pH 为 7.02~9.64, 溶解氧为 3.26~4.84 (表 2), 均在克氏原螯虾可以生存的范围, 但韶关组 pH 高于克氏原螯虾最适生存范围, 这可能是导致韶关地区养殖克氏原螯虾生长速率慢、存活率低的原因之一。不同地区稻田养克氏原螯虾水质差异较大, 武汉组水体 DO、TSS 和 SPC 均显著高于永州组和韶关组 ($P < 0.05$)。韶关组水体 pH、TSS、COD_{cr}、Chl-a 浓度、NH₄⁺-N 和 TN 含量显著高于武汉组和永州组 ($P < 0.05$)。

武汉组水体 PO₄³⁻-P 和 TP 含量较高, 显著高于永州组和韶关组 ($P < 0.05$)。永州组水体 NO₃⁻-N 和 NO₂⁻-N 含量较高, 显著高于武汉组和韶关组 ($P < 0.05$)。

选择属水平相对丰度前十的菌属进行水体和肠道菌群与环境因子之间的关系分析。不同养殖环境下属水平上的水体细菌群落与环境因子之间的 RDA 结果如图 6-a 所示, 横轴能解释的物种变量为 59.35%; 纵轴能解释的物种变量为 30.11%。水体的 TSS、NO₃⁻-N 和 TP 对不同地区水体细菌群落分布的影响较大。蒙特卡罗置换检验结果表明, 环境因子 TSS 和 TP 对水体细菌群落影响显著 ($P < 0.05$)。TSS 和 TP 对群落变异的解释度分别为 55.7% 和 22.1%, 可以认为是驱动水体群落变异的主要环境因子。TSS 对韶关稻虾综合种养模式下水体细菌多样性的影响大于武汉和永州。不同地区的优势菌属 *hgcI_clade* 与 NO₃⁻-N 和 NO₂⁻-N 呈正相关, *CL500-29_marine_group* 与 TSS、TN 和 T 呈正相关, *Polynucleobacter* 与 NO₃⁻-N、NO₂⁻-N 和 TP 呈正相关。

不同地区属水平下的克氏原螯虾肠道细菌群落与环境因子之间的 RDA 结果表明, 横轴能解释的物种变量为 52.57%, 纵轴能解释的物种变量为 25.16%。环境因子 PO₄³⁻-P、COD_{cr}、NO₂⁻-N 对不同地区稻虾综合种养模式下克氏原螯虾肠道细菌

表 2 不同地区水质指标比较

Tab. 2 Comparison of water quality index in different regions

水质指标 water quality index	武汉 WH	永州 YZ	韶关 SG
溶解氧/(mg/L) DO	4.84 ± 0.14 ^a	3.85 ± 0.19 ^b	3.26 ± 0.14 ^c
电导率/(μs/cm) SPC	191.65 ± 4.74 ^a	174.5 ± 6.31 ^b	94.93 ± 1.80 ^c
总溶解固体/(mg/L) TDS	122.07 ± 2.25 ^a	110.36 ± 1.95 ^b	60.48 ± 1.68 ^c
pH	8.61 ± 0.09 ^b	7.02 ± 0.07 ^c	9.64 ± 0.06 ^a
化学需氧量/(mg/L) COD _{cr}	24.70 ± 3.24 ^b	31.70 ± 2.63 ^b	73.20 ± 3.97 ^a
总悬浮颗粒/(mg/L) TSS	21.00 ± 1.36 ^b	13.80 ± 1.19 ^c	45.70 ± 1.65 ^a
叶绿素a/(μg/L) Chl-a	0.027 ± 0.002 ^b	0.024 ± 0.002 ^b	0.037 ± 0.001 ^a
总磷/(mg/L) TP	1.72 ± 0.05 ^a	0.71 ± 0.04 ^c	1.29 ± 0.04 ^b
磷酸盐/(mg/L) PO ₄ ³⁻ -P	0.41 ± 0.02 ^a	0.21 ± 0.02 ^b	0.24 ± 0.02 ^b
铵态氮/(mg/L) NH ₄ ⁺ -N	0.13 ± 0.004 ^c	0.20 ± 0.007 ^b	0.26 ± 0.009 ^a
硝态氮/(mg/L) NO ₃ ⁻ -N	0.21 ± 0.02 ^b	0.40 ± 0.02 ^a	0.18 ± 0.02 ^b
亚硝态氮/(mg/L) NO ₂ ⁻ -N	0.022 ± 0.001 ^b	0.037 ± 0.002 ^a	0.017 ± 0.001 ^c
总氮/(mg/L) TN	2.88 ± 0.11 ^b	2.85 ± 0.10 ^b	4.65 ± 0.12 ^a

注: 同一行不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Notes: Different lowercase letters in the same line indicate significant differences ($P < 0.05$).

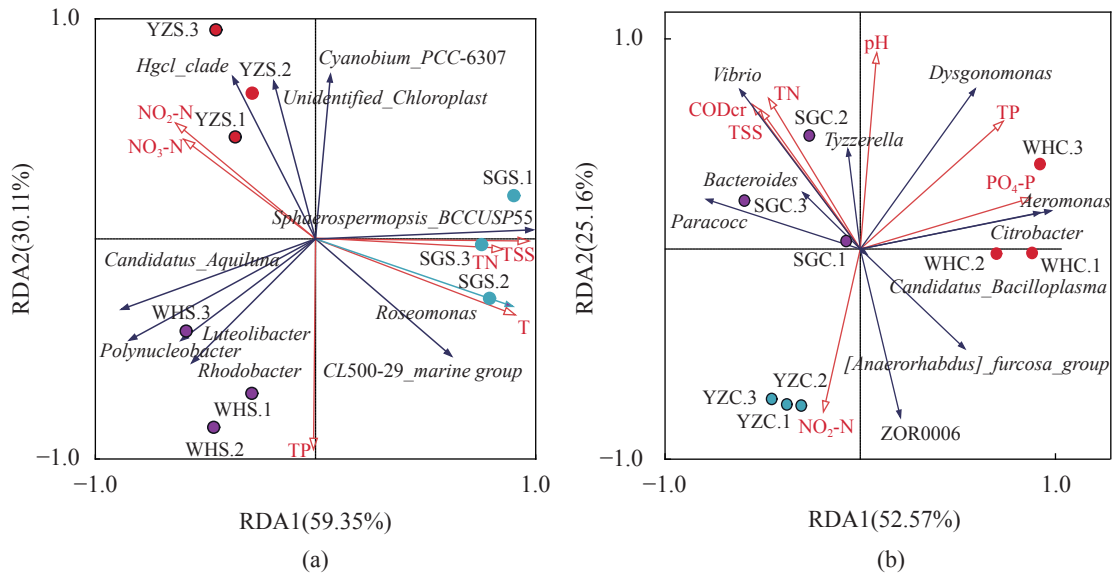


图 6 不同地区水体 (a) 和肠道 (b) 细菌群落与环境因子的冗余分析

Fig. 6 Redundancy analysis(RDA) of bacterial communities and environmental factors in water (a) and intestine (b) of different regions

群落分布的影响较大。蒙特卡罗置换检验表明, 环境因子 $PO_4^{3-}-P$ 对克氏原螯虾肠道细菌群落的影响最大, 对群落变异的解释度为 41.8%。 $PO_4^{3-}-P$ 对武汉组克氏原螯虾肠道细菌多样性的影响大于永州的和韶关的。不同地区克氏原螯虾肠道的优势菌属 *ZOR0006* 与 $NO_2^- -N$ 呈正相关, 与其他环境因子均呈负相关, *[Anaerorhabdus]_furcosa_group* 与 $NO_2^- -N$ 、 $PO_4^{3-}-P$ 呈正相关, 与其他环境因子负相关; 弧菌属与 TN、pH、CODcr 和 TSS 呈正相关 (图 6-b)。

3 讨论

3.1 稻虾综合种养系统中微生物的多样性

在稻虾综合种养模式中, 稻田中的杂草、昆虫和浮游生物等被克氏原螯虾摄食, 同时克氏原螯虾挖穴行为增加了土壤的渗透, 其粪便可用作优质肥料, 促进水稻生长, 增加物质循环和能量利用。因此, 稻虾综合种养模式作为一种良好的生态循环模式被广泛推广。多样性指数是用来描述微生物群落多样性的统计量, 它包括微生物种类丰富度和均匀度^[9]。微生物多样性, 特别是肠道微生物多样性, 可以被认为是宿主健康的特征之一^[10]。许多研究表明, 水产动物肠道微生物区系与养殖环境微生物区系密切相关, 环境微生物区系也与养殖动物疾病的发生有关^[11-12]。养殖环

境的微生物多样性降低, 致病菌或条件致病菌丰度增加, 会增加水产动物疾病发生率^[13]。在本研究中, 水体、底泥和克氏原螯虾肠道 Shannon、Chao 1 和 Ace 指数均为武汉地区最高, 表明武汉地区的稻虾综合种养系统中微生物多样性最高, 内外生态环境更为稳定, 这也可能是湖北是我国克氏原螯虾的主产区的原因之一。

本研究结果表明, 水体、底泥和克氏原螯虾肠道的微生物区系组成存在一定的重叠, 说明肠道微生物与养殖环境微生物相关。此外, 同一地区肠道微生物区系与养殖环境微生物区系的共有 OTUs 数目较低, 而水体和底泥的共有 OTUs 数目较高, 说明水体与底泥的细菌群落组成更为相似, 而克氏原螯虾肠道中的微生物群落与养殖系统中水体和底泥中的微生物群落存在一定差异。同时, 对比武汉、永州和韶关地区三类样品发现, 韶关地区的样品中 OTUs 单独富集的细菌菌群数量相对较少, 也从侧面说明了韶关地区微生物种类偏少, 可能缺乏某种(或几种)和克氏原螯虾生长有关的微生物, 下一步可以尝试在韶关地区养殖克氏原螯虾时定向培养特定微生物, 通过增加微生物的多样性来提高养殖产量。

3.2 不同地区稻虾综合种养系统中环境和肠道微生物的差异

变形菌门和放线菌门是淡水水体和底泥中分

布最为广泛的两大细菌门类^[14], 可以很好地促进土壤中的动物和植物遗骸腐烂。拟杆菌门为化能异养细菌, 能够有效降解污水中难降解的有机物。拟杆菌门也是养殖水体的优势菌门, 可以有效利用水体中的溶解性有机物^[15]。在本研究中, 变形菌门、放线菌门、蓝细菌门和拟杆菌门构成了水体的优势菌门; 变形菌门、厚壁菌门、拟杆菌门和放线菌门构成了肠道微生物区系的优势菌门; 而底泥微生物的优势菌门为变形菌门。具体而言, 变形菌门是所有样品中最占优势的菌门。该结果与 Shui 等^[16] 对克氏原螯虾、Fan 等^[17] 对凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)、Ma 等^[18] 对罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 等甲壳类动物的研究结果一致。变形菌门是甲壳类水生无脊椎动物肠道微生物的优势种, 在生理、形态和遗传学上具有很高的多样性^[19], 是肠道菌群失调的标志微生物。武汉组水体和底泥的变形菌门均高于永州组和韶关组, 也从侧面说明武汉地区更适宜克氏原螯虾养殖。此外, 拟杆菌门和厚壁菌门也是肠道微生物区系的主要成员。在本研究中, 所有克氏原螯虾样品肠道微生物区系均检测出了厚壁菌门, 且是优势菌门。蓝细菌 (Cyanobacteria) 曾被称为蓝藻或蓝绿藻, 是一类分布广、含有叶绿素 a、无鞭毛, 能够在光合作用时释放氧气的原核微生物。在氮、磷丰富且氮磷比例失调的水体中生长旺盛, 可作为水体富营养化的指示生物。本研究中永州组 (17.03%) 和韶关组 (23.36%) 水体中蓝细菌门丰度高于武汉组 (低于 10%), 这可能是武汉地区的养殖环境中氮含量较低, 碳、氮和磷营养物质的比例较好, 从而抑制了蓝细菌过度生长。

从属水平来看, 本研究中克氏原螯虾肠道中的优势菌属为 *Hgcl_clade*、多核杆菌属、*Cyanobium_PCC-6307*、气单胞菌属、柠檬酸杆菌属等, 这些结果与前人的研究结果一致^[20]。在本研究中, 武汉组水体中 *Candidatus_Aquiluna* 和多核杆菌属细菌相对丰度显著高于韶关组 ($P < 0.05$), 而韶关组水体中 *Sphaerospermopsis_BCCUSP55*、玫瑰单胞菌属和 *Pseudanabaena_PCC-7429* 属细菌相对丰度显著高于武汉组和永州组。研究表明, 多核杆菌属广泛分布在土壤及腐败的有机物中, 易在枯草浸汁中繁殖, 可利用蛋白质、多种糖类及淀粉, 这对稻田养殖中的克氏原螯虾生长非常有利; 而玫瑰

单胞菌属、*Sphaerospermopsis_BCCUSP55* 和 *Pseudanabaena_PCC-7429* 多为水体蓝藻暴发的主要微生物。因此, 在华南地区开展稻田养殖克氏原螯虾时, 可以定向培养水体中多核杆菌属的细菌, 而要控制玫瑰单胞菌属等蓝细菌门的微生物。*Dechloromonas* 属细菌具有反硝化功能, 是反硝化聚磷菌, 永州地区底泥中 *Dechloromonas* 属细菌相对丰度显著高于韶关地区和武汉地区 ($P < 0.05$), 这可能是导致永州水体中磷酸盐和总磷含量较低而底泥中磷酸盐和总磷含量较高的原因。

3.3 微生物群落与环境因子的关系

水质变化会影响水体微生物的群落组成^[21]。有研究表明, TN 和 TP 是水体微生物群落结构的主要影响因子^[22-23]。金笑等^[24] 对鄱阳湖不同区域沉积物细菌群落结构、功能变化及其与环境因子的关系研究表明, TN 浓度对细菌分布影响最大, pH 显著影响微生物代谢多样性。陆洋等^[25] 研究表明, TP、TN、 NO_3^- -N 和 NH_4^+ -N 会影响养殖池塘水体细菌群落的分布; 邱楚雯等^[26] 研究发现, TSS、TP、TAN 等水质因子会影响细菌群落组成。本研究中 TSS 和 TP 对养殖水体细菌群落影响最显著。由此可见, 环境因子均有可能影响养殖水体微生物群落结构。反之, 水体中微生物也会影响水质, 参与水体的物质循环^[26]。在水产养殖中通过向水体中添加有益微生物来改善水质就是应用这一原理。

水生动物消化道短且长期生活在水中, 其肠道微生物区系除了受宿主自身影响外, 还与外界环境因子紧密相关^[27-28]。水生生物肠道细菌群落和水质有很大的关系, 水体中不同因子对不同水产动物肠道菌群的影响不同。邱楚雯等^[26] 在对不同养殖模式下暗纹东方鲀 (*Takifugu obscurus*) 的肠道微生物群落结构研究中发现, 环境因子 TAN、TN、 NO_2^- -N 和 TP 等对肠道细菌群落分布的影响较大; 董兴学等^[6] 研究发现, TP 显著影响罗氏沼虾肠道菌群多样性, 可见水体理化指标对不同品种肠道菌群的影响是有差异性的, 表明磷酸盐对杆菌有相应的促进作用^[29], 而武汉的克氏原螯虾肠道中柠檬酸杆菌属 (10.85%) 丰度较高, 武汉水体中较高浓度的磷酸盐可能会促进此类菌的生长, 也提高了克氏原螯虾肠道内微生物多样性。本研究中水体 PO_4^{3-} -P、CODcr 和 NO_2^- -N 对不同地区

克氏原螯虾肠道微生物区系影响较大, 与前人研究结果一致。本研究中, 不同地区水体营养盐均存在差异, 推测不同地区克氏原螯虾肠道微生物结构的差异可能与其适应各自的生活环境有关。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2021.
Fishery and Fishery Administration of the Ministry of Agriculture and Rural Areas, National Aquatic Technology Promotion Terminal, China Society of Fisheries. China fishery statistics yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2021 (in Chinese).
- [2] Wongkiew S, Hu Z, Chandran K, *et al.* Nitrogen transformations in Aquaponic systems: a review[J]. *Aquacultural Engineering*, 2017, 76: 9-19.
- [3] Kyaw T Y, Ng A K. Smart Aquaponics system for urban farming[J]. *Energy Procedia*, 2017, 143: 342-347.
- [4] 李革雷, 陈昌福, 高宇, 等. 3种养殖模式水体中细菌多样性研究[J]. *华中农业大学学报*, 2012, 31(3): 381-390.
Li G L, Chen C F, Gao Y, *et al.* Biodiversity of aquatic microbial communities in three aquacultural systems[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2012, 31(3): 381-390 (in Chinese).
- [5] 朱婷婷, 田从魁. 水库底泥中微生物多样性及其与环境因子相关性分析[J]. *北京大学学报(自然科学版)*, 2018, 54(3): 625-632.
Zhu T T, Tian C K. Analysis on microbial diversity in the sediments and its relationship with environmental factors in a reservoir[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis*, 2018, 54(3): 625-632 (in Chinese).
- [6] 董学兴, 吕林兰, 赵卫红, 等. 不同养殖模式下罗氏沼虾肠道菌群结构特征及其与环境因子的关系[J]. *上海海洋大学学报*, 2019, 28(4): 501-510.
Dong X X, Lü L L, Zhao W H, *et al.* Effects of different cultural patterns on microbial communities in the intestine of *Macrobrachium rosenbergii* and interactions with environment factors[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2019, 28(4): 501-510 (in Chinese).
- [7] 尹军霞, 沈文英, 酆萍. 水温对南美白对虾肠道菌群影响的研究[J]. *海洋科学*, 2004, 28(5): 33-36.
Yin J X, Shen W Y, Li P. Study on the influence of water temperature on the intestinal microflora of *Penaeus vannamei*[J]. *Marine Sciences*, 2004, 28(5): 33-36 (in Chinese).
- [8] 赵月季, 郭海朋, 张德民. 不同养殖模式对凡纳滨对虾肠道微生物群落的影响[J]. *水产学报*, 2021, 45(2): 221-234.
Zhao Y J, Guo H P, Zhang D M. Effects of different culture patterns on the intestinal microbiota of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(2): 221-234 (in Chinese).
- [9] Stam M C, Mason P R D, Pallud C, *et al.* Sulfate Reducing activity and sulfur isotope fractionation by natural microbial communities in sediments of a Hypersaline Soda Lake (Mono Lake, California)[J]. *Chemical Geology*, 2010, 278(1-2): 23-30.
- [10] Ren Z G, Li A, Jiang J W, *et al.* Gut microbiome analysis as a tool towards targeted non-invasive biomarkers for early hepatocellular carcinoma[J]. *Gut*, 2019, 68(6): 1014-1023.
- [11] Hou D, Huang Z, Zeng S, *et al.* Comparative analysis of the bacterial community compositions of the shrimp intestine, surrounding water and sediment[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2018, 125(3): 792-799.
- [12] Xiong J B, Dai W F, Qiu Q F, *et al.* Response of host-bacterial colonization in shrimp to developmental stage, environment and disease[J]. *Molecular Ecology*, 2018, 27(18): 3686-3699.
- [13] 裘琼芬, 张德民, 叶仙森, 等. 象山港网箱养殖对近海沉积物细菌群落的影响[J]. *生态学报*, 2013, 33(2): 483-491.
Qiu Q F, Zhang D M, Ye X S, *et al.* The bacterial community of coastal sediments influenced by cage culture in Xiangshan Bay, Zhejiang, China[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(2): 483-491 (in Chinese).
- [14] Eiler A, Bertilsson S. Composition of freshwater bacterial communities associated with Cyanobacterial blooms in four Swedish Lakes[J]. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(12): 1228-1243.
- [15] Cottrell M T, Kirchman D L. Natural assemblages of marine Proteobacteria and members of the *Cytophaga-Flavobacter* cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(12): 4275-4282.

- onmental Microbiology, 2000, 66(4): 1692-1697.
- [16] Shui Y, Guan Z B, Liu G F, *et al.* Gut Microbiota of red swamp crayfish *Procambarus clarkii* in integrated crayfish-rice cultivation model[J]. *AMB Express*, 2020, 10(1): 5.
- [17] Fan J Q, Chen L M, Mai G Q, *et al.* Dynamics of the gut Microbiota in developmental stages of *Litopenaeus vannamei* reveal its association with body weight[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 734.
- [18] Ma R R, Wang Y, Zhao S, *et al.* The composition of the microbial community associated with *Macrobrachium rosenbergii* Zoeae varies throughout larval development[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2020, 43(4): 413-421.
- [19] Holt C C, Bass D, Stentiford G D, *et al.* Understanding the role of the shrimp gut Microbiome in health and disease[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2020: 107387.
- [20] 冯光志, 邹颜霓, 王月琳, 等. 小龙虾肠道产木聚糖酶细菌的分离与鉴定[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(6): 1364-1370.
- Feng G Z, Zou Y N, Wang Y L, *et al.* Screening and identification of xylanase-producing strains isolated from crayfish intestine[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(6): 1364-1370 (in Chinese).
- [21] 龚雪, 王继华, 关健飞, 等. 再生水灌溉对土壤化学性质及可培养微生物的影响[J]. *环境科学*, 2014, 35(9): 3572-3579.
- Gong X, Wang J H, Guan J F, *et al.* Impact of reclaimed water irrigation on soil chemical properties and culturable microorganisms[J]. *Environmental Science*, 2014, 35(9): 3572-3579 (in Chinese).
- [22] 倪蒙, 高强, 原居林, 等. 不同盐度罗氏沼虾育苗水体水质及微生物群落结构研究[J]. *江西农业大学学报*, 2019, 41(5): 976-985.
- Ni M, Gao Q, Yuan J L, *et al.* Effect of salinity on the water quality and microbial community structure of the water for young *Macrobrachium rosenbergii* rearing[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2019, 41(5): 976-985 (in Chinese).
- [23] 杜岩岩, 娄忠玉, 张艳萍, 等. 网箱养殖对刘家峡水库浮游细菌群落组成及影响因素分析[J]. *淡水渔业*, 2018, 48(5): 11-16.
- Du Y Y, Lou Z Y, Zhang Y P, *et al.* Effect of cage culture on community structure and influencing factors of bacterioplankton in Liujiaxia reservoir[J]. *Freshwater Fisheries*, 2018, 48(5): 11-16 (in Chinese).
- [24] 金笑, 寇文伯, 于昊天, 等. 鄱阳湖不同区域沉积物细菌群落结构、功能变化及其与环境因子的关系[J]. *环境科学研究*, 2017, 30(4): 529-536.
- Jin X, Kou W B, Yu H T, *et al.* Environmental factors influencing the spatial distribution of sediment bacterial community structure and function in Poyang Lake[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2017, 30(4): 529-536 (in Chinese).
- [25] 陆洋, 郁二蒙, 谢骏, 等. 添加芽孢杆菌对池塘中理化因子和细菌群落结构的影响分析[J]. *水产学报*, 2020, 44(1): 130-141.
- Lu Y, Yu E M, Xie J, *et al.* Analysis of the effect of adding *Bacillus* on the physicochemical factors and bacterial community structure in ponds[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(1): 130-141 (in Chinese).
- [26] 邱楚雯, 施永海, 王韩信. 暗纹东方鲀不同养殖模式下的微生物群落结构[J]. *水产学报*, 2021, 45(2): 209-220.
- Qiu C W, Shi Y H, Wang H X. Microbial community structure in different cultural patterns of *Takifugu obscurus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(2): 209-220 (in Chinese).
- [27] Meng H, Zhang Y, Zhao L L, *et al.* Body weight selection affects quantitative genetic correlated responses in gut Microbiota[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e89862.
- [28] Benson A K, Kelly S A, Legge R, *et al.* Individuality in gut Microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(44): 18933-18938.
- [29] 谢天卉, 任南琪, 邢德峰, 等. 磷酸盐浓度对产氢细菌 *Ethanoligenens harbinense* YUAN-3 生长和产气的影响[J]. *太阳能学报*, 2009, 30(6): 846-849.
- Xie T H, Ren N Q, Xing D F, *et al.* Effect of phosphate concentration on *Ethanoligenens harbinense* YUAN-3[J]. *Acta Energetica Solaris Sinica*, 2009, 30(6): 846-849 (in Chinese).

Analysis of microbial community structure in rice-shrimp integrated culture system of three different areas

JIA Lijuan^{1,2}, WANG Guangjun^{2*}, XIA Yun², ZHANG Kai², XIE Jun²,
YU Ermeng², LI Zhifei², GONG Wangbao², TIAN Jingjing²

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application and Cultivation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs,
Guangdong Key Laboratory of Aquatic Animal Immunity and Sustainable Aquaculture, Pearl River Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: Environmental microbiota plays important roles in the intestinal microbiota of aquatic animals. *Procambarus clarkii* has become the most important commercial species of shrimp in China with high commercial value, and the main culture mode of *P. clarkii* is rice-crayfish co-existing. *P. clarkii* culture is an important economic mainstay in Hubei province, China. However, information on the gut microbiota of *P. clarkii* is limited. To study the difference of bacterial community structure in the intestinal tract of *P. clarkii* and the environment of rice-crayfish comprehensive culture system in different areas, and to provide some basis for improving the comprehensive culture strategy of rice in different areas, Illumina MiSeq high-throughput sequencing method was used to sequence and analyze the two high-variation regions (V3-V4) of 16S *rRNA* gene of microbia of the water, sediment and intestine of *P. clarkii* in different regions (Wuhan, Yongzhou and Shaoguan). Redundancy analysis (RDA) was used to analyze the relationship among water, intestinal microorganisms and environmental factors. The results showed that the diversity of the bacterial community in the water, sediment and crawfish gut of rice shrimp integrated culture system in Wuhan area was higher than those in Yongzhou area and Shaoguan area. The bacterial community structure in the water and sediment of the rice shrimp integrated breeding system in Wuhan area was similar to those in Yongzhou area and Shaoguan area. Actinobacteria, Cyanobacteria, Proteobacteria and Bacteroidetes were the dominant phylum in water, Proteobacteria was the dominant phylum in sediments. The dominant bacteria in the intestine of *P. clarkii* in Wuhan area were Proteobacteria, Firmicutes and Bacteroidetes at the phylum level, and *Citrobacter* (10.85%), *Aeromonas* (9.88%) and *[Anaerorhabdus]_furcosa_group* (8.43%) at the genus level. The dominant bacteria in the intestine of *P. clarkii* in Yongzhou area were Firmicutes and Actinomycetes at the phylum level, and *ZOR0006* (9.78%), *Bacteroides* (5.41%) and *[Anaerorhabdus]_furcosa_group* (3.98%) at the genus level. The dominant bacteria in the intestine of *P. clarkii* in Shaoguan area were Firmicutes and Proteobacteria at the phylum level, and *Citrobacter* (9.31%), *bacteroidetes* (4.29%) and *[Anaerorhabdus]_furcosa_group* (4.58%) at the genus level. The results of correlation analysis between environmental factors and bacterial communities showed that TSS and TP had significant effect on the bacterial community structure of water, and PO_4^{3-} -P and COD_{Cr} had significant effect on the intestinal microbial community structure. The results show that there are some differences among the gut of *P. clarkii*, water and sediment of different regions, and the microbial structure of water bodies and sediment is more similar. The microbial diversity in the water body of rice shrimp integrated culture system in Wuhan area is the highest, which is beneficial to the stability of the breeding system. The culture environment in different regions did not affect the core phyla of microorganisms in the culture system, but changed the relative abundance of dominant phyla and genera. The nutrient content of culture environment will affect the microbial community structure to a certain extent.

Key words: *Procambarus clarkii*; integrated shrimp in rice field; water; sediment; intestine; microbial community structure; high-throughput sequencing

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

Funding projects: The National Key Research and Development Projects of China(2019YFD0900304); Special Fund for Promoting Economic Development in Guangdong Province(2019B2); Basic Scientific Research Business Expenses of Chinese Academy of Fishery Sciences(2021SJ-XC2); China-ASEAN Maritime Cooperation Fund (CAMC-2018F)