

中华绒螯蟹生态育苗池塘细菌群落分析

徐 宇^{1,2,3}, 邓燕飞^{1,2,3}, 杨志强^{1,2,3}, 葛家春^{1,2,3,4}, 杨鸞劼^{1,2,3}

(1. 江苏省淡水水产研究所, 江苏 南京 210017;

2. 江苏省淡水水产种质资源保护与利用重点实验室, 江苏 南京 210017;

3. 江苏省农业种质资源保护与利用平台, 江苏 南京 210014;

4. 南京淳一水产科技发展有限公司, 江苏 高淳 211316)

摘要:为探究江苏省射阳地区沿海滩涂中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)生态育苗池塘细菌群落结构,分别对养殖池塘水体(S_7 , S_8 , S_9)和池塘底泥(N_7 , N_8 , N_9)细菌群落 16S rDNA 的 V3、V4、V5 可变区进行扩增,检测合格的文库进行高通量测序;利用 Qiime(v1.7)软件,对序列阈值 97%相似性水平进行聚类分析;分别以门、纲、目、科和属的分类水平对样本进行 α -多样性指数分析;以 Chaol 指数和 Shannon 指数评估菌种丰富度和多样性。结果表明,3 个生态育苗池塘得到 OTU 分别为 8 881、7 406、8 566 个。 S_7 微生物归属于 16 门、29 纲、58 目、97 科、191 属; S_8 为 9 门、18 纲、38 目、68 科、132 属; S_9 为 17 门、32 纲、60 目、111 科、227 属。 N_7 为 41 门、103 纲、198 目、325 科、572 属; N_8 为 42 门、103 纲、203 目、318 科、534 属; N_9 为 40 门、99 纲、196 目、323 科、578 属。养殖水体优势菌群以变形菌门(Proteobacteria)为主,其次是拟杆菌门(Bacteroidetes);池塘底泥优势菌群以变形菌门为主,其次为拟杆菌门、绿弯菌门(Chloroflexi)和浮霉菌门(Planctomycetes)。养殖池塘底泥中细菌群落的丰富度和物种多样性明显高于养殖水体,水体中细菌群落的丰富度 $S_9 > S_7 > S_8$,物种的多样性 $S_7 > S_9 > S_8$ 。池塘底泥中细菌群落的丰富度 $N_7 > N_9 > N_8$,物种的多样性 $N_7 > N_9 > N_8$ 。

关键词:中华绒螯蟹;生态育苗;养殖水体;底泥

中图分类号:Q145 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2019)01-0064-07

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)又称河蟹,隶属甲壳纲、十足目、方蟹科、绒螯蟹属,主要分布在我国东部海域沿岸和通海的江河湖泊中。自 20 世纪 70 年代中华绒螯蟹人工育苗技术突破后,苗种已基本满足养殖生产的需要。生态育苗是以育苗池为核心,采用天然海水,通过人工生态系统建立,实现分解者、生产者 and 消费者之间物质和能量的生态平衡。生态育苗优于传统育苗方法,使育苗池水质得到改善、成活率显著提高、蟹苗质量好(王武等,2010)。在养殖池塘中,有机物的分解、氮磷等营养元素的转化、养殖生物饵料的供给等过程,微生物发挥着重要的功能,病原微生物的种类和数量也直接影响着养殖生物的健康和收益。因此,对养殖生态环境的研

究,不仅可以了解生态环境给养殖生物带来的潜在风险,也是养殖与环境和谐发展的重要问题。自然条件下微生物处于共生体系,传统培养方法的局限性很难获得纯培养物,也不能准确反映自然状态下微生物群落的真实情况(Amann et al,1995;Auguet et al,2009;Hugenholtz et al,2009)。

随着分子生物学的发展,高通量测序技术(Next Generation Sequence,NGS)可以直接从样本中扩增 16S rDNA 序列的可变区,在进行测序的同时,对样本中微生物群落结构和含量进行大规模数字化分析,全面准确地测定微生物的相对丰度。本文运用高通量测序技术,对 16S rDNA 的 V3、V4 和 V5 可变区进行扩增,使用 Illumina MiSeq 平台测序,Paired-end Reads 进行拼接,UCLUST 方法进行 OTU 聚类分析,Qiime(v1.7)软件计算样本中物种丰富度,物种多样性和测序深度。以期全面了解江苏省射阳县沿海滩涂中华绒螯蟹生态育苗池塘中养殖水体和底泥微生物群落的真实情况,为河蟹健康繁育和生态环境保护提供参考依据。

收稿日期:2017-07-31

基金项目:江苏省水产三新项目(D2017-4-2);江苏省科技厅现代农业项目(BE2015369)。

作者简介:徐宇,1986 年生,女,助理研究员,主要从事种质资源保护与利用。E-mail:jsgyxuyu@126.com

通信作者:杨鸞劼,1963 年生,女,研究员,主要从事水生动物疾病预防与控制研究。E-mail:yangyj025@126.com

1 材料与方法

1.1 样品采集

样本采自江苏省射阳县大洋特种水产苗种场,随机选择 3 个中华绒螯蟹生态育苗池塘,采集养殖水体和池塘底泥。采用 2.5 L 有机玻璃采水器采集养殖水体。每个养殖池塘选择上风口和下风口各 2 个采样点,将同一池塘 4 个采样点的水样充分混匀后,取 1.0 L 养殖水体为一个检测样本。3 个养殖池塘水样编号为 S₇、S₈、S₉。检测样本用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,剪碎滤膜,浸泡灭菌蒸馏水中,涡旋混匀器充分振荡 1 min,制成菌悬液,弃滤膜,4℃ 以下保存。

每个养殖池塘选择对角的 2 个底泥采集点,采集池塘底泥 5.0 cm³,将同一池塘 2 个采样点的底泥充分混匀,称取 50.0 g。3 个养殖池塘底泥编号为 N₇、N₈、N₉,4℃ 保存备用。

1.2 DNA 的制备、PCR 扩增和测序

检测样本的 DNA 提取分别采用 TIANamp Genomic DNA Kit DNA 提取试剂盒和 TIANamp Soil DNA Kit 土壤基因组 DNA 提取试剂盒。

16S rDNA 上包括 V3、V4 和 V5 的 3 个高度可变区。V3-V4 区扩增上游引物:CCTACGGRB-GCASCAGKVRVGAAT;下游引物:GGACTAC-NVGGGTWTCTAATCC。V4-V5 区扩增上游引物:GTGYCAGCMGCCGCGGTAA;下游引物:CTTGTGCGGKCCCCCGYCAATTC。

25 μL 反应体系包括 2 × Taq Master Mix 12.5 μL,模板 DNA 100 ng,正反向引物各 1.0 μL,灭菌 ddH₂O 补足至 25 μL。反应条件为 94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 60 s,35 个循环,72℃ 延伸 7 min。

2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物扩增效果。由苏州金唯智生物科技有限公司进行 Illumina MiSeq 平台测序和 Paired-end Reads 拼接工作。

1.3 数据处理分析

测序结果原始数据利用软件 CASAVA (v1.8.2)进行图像碱基识别,初步质量分析得到原始测序数据(PF data)。使用 pandaseq(v2.7)将 2 条序列进行比对,根据比对末端重叠区进行拼接,拼接时至少 20 bp 的重叠区。使用 Trimmomatic (v0.30)去除引物和接头序列,去除两端质量值低于 20 的碱基,去除长度小于 400 bp 的序列。使用 Usearch(8.0)将拼接过滤后的序列与数据库进行比

对,去除嵌合体序列(Chimera sequence),得到有效序列(No chimera)。

利用 Qiime(v1.7)软件中的 UCLUST 方法进行 OTU 聚类分析,序列相似性设为 97%,得到 OTU 列表和代表性序列。使用 RDP classifier 贝叶斯算法对 97%相似水平的 OTU 代表序列进行分类分析。以 OTU 的物种分类结果为依据,分别在门、纲、目、科和属的分类水平对各样本进行 α-多样性指数分析。

α-多样性指数分析是通过物种丰富度、物种多样性和测序深度进行评价。菌群丰度采用 Chaol 指数,其值越高,表明物种的丰富度越高。菌群多样性采用 Shannon 指数,其值越大,表明物种的多样性越高。测序深度采用 Good's coverage 指数,其值越接近 1,表明测序深度已基本覆盖样本中的所有物种。

Chaol 丰富度指数:

$$S_{\text{Chaol}} = S_{\text{obs}} + n_1(n_1 - 1)/2(n_2 + 1)$$

式中:S_{Chaol}为最终评估的 OTU 数量;S_{obs}为实际测出的 OTU 数量;n₁只含 1 条序列的 OTU 数量;n₂含 2 条序列的 OTU 数量。

Shannon 多样性指数:

$$H = -\sum_{i=1}^S (n_i/N) \cdot \ln(n_i/N)$$

Good's Coverage:

$$C_{\text{depth}} = 1 - n_1/N$$

式中:N 为所有的序列数;n₁为含 1 条序列的 OUT 数量。

2 结果

2.1 高通量测序质量

养殖水体 3 个检测样本,初步质量分析得到原始测序序列(PE reads)条数为 75 081~216 139,对原始序列进行拼接、过滤和去除嵌合体后的有效序列(No chimera)条数为 67 016~192 987,得到有效序列平均长度(AvgLen)为 430.27~452.19 nt。有效序列百分比(Effective)在 88.36%~89.29%,样品序列分析结果见表 1。

养殖池塘底泥 3 个检测样本,初步质量分析得到原始测序序列条数为 179 337~190 721。对原始序列进行拼接、过滤和去除嵌合体后的有效序列条数为 165 100~174 543,得到有效序列平均长度为 430.83~434.10 nt,有效序列百分比在 91.52%~92.06%。

表 1 样品序列分析

Tab.1 Sample analysis sequence

样品号	原始序列	有效序列	有效序列 平均值/nt	有效序 列比/%
S ₇	149147	131788	452.19	88.36
S ₈	75081	67016	430.27	89.26
S ₉	216139	192987	432.50	89.29
N ₇	179337	165100	434.10	92.06
N ₈	190721	174543	432.59	91.52
N ₉	181414	166955	430.83	92.03

2.2 OTU 聚类分析

97%相似性水平的聚类分析,7号养殖池塘得到 OTU 为 8881,其中 S₇和 N₇特有的 OTU 数目分别是 1 573 和 6 818,共有的 OTU 为 490。8号养殖池塘得到 OTU 为 7 406,其中 S₈和 N₈特有的 OTU 数目分别是 559 和 6 654,共有的 OTU 为 193。9号养殖池塘得到 OTU 为 8 566,其中 S₉和 N₉特有的 OTU 分别是 2 061 和 5 994,共有的 OTU 为 511(图 1)。

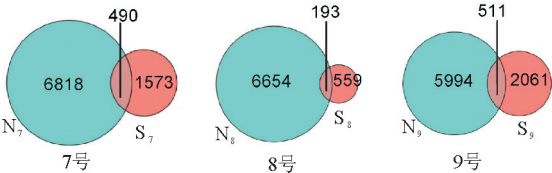


图 1 养殖池塘中微生物聚类分析

Fig.1 Cluster analysis of the microbial community in water and sediment samples in each sampling pond

2.3 菌群结构

2.3.1 养殖水体 不同池塘水体的微生物分类水平物种种类和数量见表 2。

S₇ 微生物共计 16 门、29 纲、58 目、97 科、191 属。优势菌群为拟杆菌门 (Bacteroidetes), 占 54.05%, 其次是变形菌门 (Proteobacteria) 44.10%。纲分类水平, 黄杆菌纲 (Flavobacteria) 占 43.80%, 纤维粘网菌纲 (Cytophagi) 8.68%; γ -变形菌纲 (Gammaproteobacteria) 29.65%, α -变形菌纲 (Alphaproteobacteria) 11.13%。属分类水平, 黄杆菌属 (*Flavobacterium*) 为 35.48%, 假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 25.56%, *Algoriphagus* 7.06%, 假红杆菌属 (*Pseudorhodobacter*) 3.23%, 嗜冷杆菌属 (*Psychrobacter*) 2.81%, 其他检测量不足 1% 的属占 16.40%(图 2)。

S₈ 微生物共计 9 门、18 纲、38 目、68 科、132 属。优势菌群为变形菌门, 占 71.47%, 其次为拟杆菌门 26.92%。纲分类水平, γ -变形菌纲为 29.50%, α -变形菌纲 25.92%, β -变形菌纲 (Betaproteobacteria) 16.05%, 纤维粘网菌纲 18.45%, 鞘脂杆菌纲

(Sphingobacteriia) 4.60%, 黄杆菌纲 3.86%。属分类水平, 检测量均不足 1% 的属占 22.01%, 嗜冷杆菌属 14.15%, 假单胞菌属 11.00%, 假红杆菌属 16.36%, 似杆菌属 (*Algoriphagus*) 14.98%, 杆菌属 (*Massilia*) 12.10%, 黄杆菌属 1.86%, 短波单胞菌属 (*Brevundimonas*) 1.85%(图 3)。

S₉ 微生物共计 17 门、32 纲、60 目、111 科、227 属。优势菌群为变形菌门 86.20%, 其次为拟杆菌门 12.66%。纲分类水平, γ -变形菌纲 65.22%, β -变形菌纲 14.22%, α -变形菌纲 6.71%, 黄杆菌纲 7.62%, 鞘脂杆菌纲 2.61%, 纤维粘网菌纲 2.41%。属分类水平, 假单胞菌属 48.20%, 不动杆菌属 (*Acinctobacter*) 13.85%, 杆菌属 9.83%, 黄杆菌属 5.96%, 似杆菌属 2.08%, 检测量均不足 1% 的占 14.46%(图 4)

2.3.2 池塘底泥 不同池塘底泥的分类水平物种种类和数量见表 2。

N₇ 微生物共计 41 门、103 纲、198 目、325 科、572 属。优势菌群为变形菌门, 占 61.33%, 拟杆菌门 25.89%, 其次为绿弯菌门 (*Chloroflexi*) 4.63%, 浮霉菌门 (*Planctomycetes*) 1.76%。纲分类水平, γ -变形菌纲占 22.46%, ϵ -变异菌纲 (*Epsilonproteobacteria*) 12.18%, α -变形菌纲 11.87%, δ -变异菌纲 (*Deltaproteobacteria*) 11.86%, β -变形菌纲 2.43%, 黄杆菌纲 17.81%, 鞘脂杆菌纲 5.29%, 纤维粘网菌 1.99%, 暖绳菌纲 (*Caldilineae*) 2.58%, 厌氧绳菌纲 (*Anaerolineae*) 1.88%, 浮霉菌纲 (*Planctomycetacia*) 1.36%, 检测量均不足 1% 的纲占 5.15%。属的分类水平, 检测量均不足 1% 的属占 55.75%, 其次是 *Sulfurovum* 11.03%, *Salinimicrobium* 7.07%, *Marinicella* 3.92%, *Porticoccus* 2.87%, *Gillisia* 2.38%, *Litoreibacter* 2.05%, 嗜甲基菌属 (*Methylophaga*) 1.85%, 氏菌属 (*Lewinella*) 1.84%, 硫碱螺旋菌属 (*Thioalkalispira*) 1.46%, *Pacificibacter* 1.33%, 海杆菌属 (*Marinobacter*) 1.32%, 脱硫叶菌属 (*Desulfobulbus*) 1.22%, *Sulfurimonas* 1.10%。

N₈ 微生物共计 42 门、103 纲、203 目、318 科、534 属。优势菌群为变形菌门, 占 74.40%, 其次为拟杆菌门 15.51%, 绿弯菌门 3.01%, 浮霉菌门 1.61%。纲分类水平, γ -变形菌纲为 26.49%, α -变形菌纲 20.20%, ϵ -变异菌纲 12.25%, δ -变异菌纲 11.83%, β -变形菌纲 3.28%, 黄杆菌纲 10.49%, 鞘脂杆菌纲 2.70%, 纤维粘网菌 1.44%; 暖绳菌纲 1.50%, 厌氧绳菌纲 1.36%, 浮霉菌纲 1.23%, 检测

量均不足 1% 的纲占 4.46%。属的分类水平,检测量均不足 1% 的属占 59.45%,*Sulfurovum* 9.88%,*Salinimicrobium* 4.71%,*Pacificibacter* 3.71%,假单胞菌属 3.01%,*Marinicella* 2.78%,硫碱螺旋菌属 2.58%,*Sulfurimonas* 2.24%,嗜甲基菌属 1.38%,海杆菌属 1.32%,*Litoreibacter* 1.28%,*Neptuniibacter* 1.08%(图 3)。

N₉ 微生物共计 40 门,99 纲,196 目,323 科,578 属。优势菌群为变形菌门,占 72.78%,其次是拟杆菌门 18.48%,浮霉菌门 2.32%,绿弯菌门 1.98%。纲分类水平, γ -变形菌纲 27.84%, α -变形菌纲 21.94%, ϵ -变异菌纲 10.40%, β -变形菌纲 1.78%,黄杆菌纲 13.34%,鞘脂杆菌纲 2.79%,纤维粘网菌 1.56%,浮霉菌纲 2.01%;异常球菌纲(*Deinococci*)10.50%;检测量均不足 1% 的纲占 4.04%。属的分类水平中,检测量均不足 1% 的属占 60.85%,*Sulfurovum* 9.27%,*Salinimicrobium*

4.38%,*Porticoccus* 4.22%,嗜甲基菌属 2.54%,*Marinicella* 2.28%,食盐菌属(*Alcanivorax*) 2.05%,*Pacificibacter* 1.89%,需盐杆菌属(*Salegentibacter*) 1.84%,*Marinobacter* 1.53%,*JTB255_marine_benthic_group* 1.24%,*Sulfurimonas* 1.11%,脱硫叶菌属 1.10%,*Ulvibacter* 1.01%(图 4)。

表 2 不同分类水平物种种类和数量
Tab.2 Species number at different classification levels for each sample

样品号	门	纲	目	科	属
S ₇	16	29	58	97	191
S ₈	9	18	38	68	132
S ₉	17	32	60	111	227
N ₇	41	103	198	325	572
N ₈	42	103	203	318	534
N ₉	40	99	196	323	578

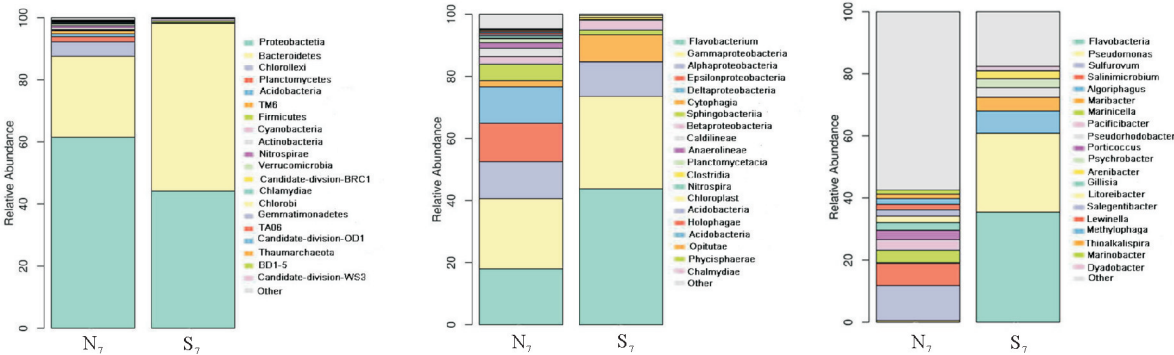


图 2 7 号池塘水体和底泥微生物菌群门、纲、属分类水平的相对丰度

Fig.2 Relative abundance composition of the microbial community at phylum, class and genus level for S₇

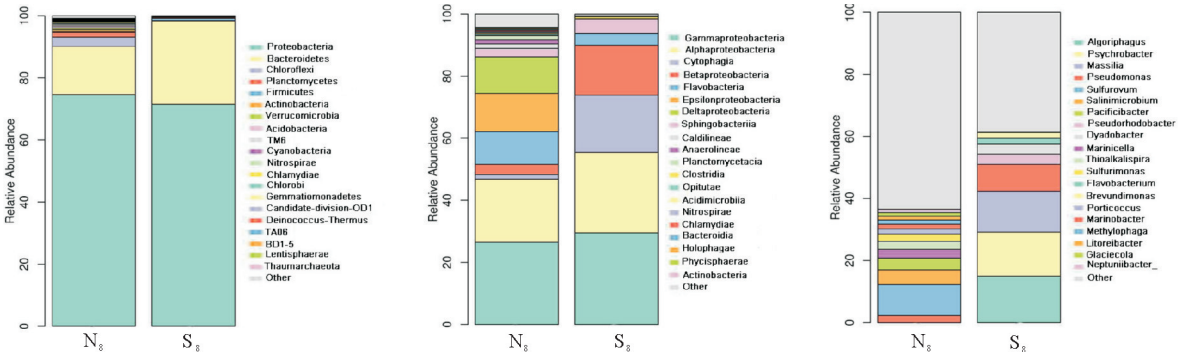


图 3 8 号池塘水体和底泥微生物菌群门、纲、属水平的相对丰度

Fig.3 Relative abundance composition of the microbial community at phylum, class and genus level for S₈

2.4 α -多样性指数分析

养殖池塘水体和底泥样本的多样性指数见表 3。养殖水体 Chaol 指数值 S₉ 最高,为 3 871.752;其次是 S₇,为 3 695.049。Shannon 指数值 S₇ 最高,

为 6.468;其次是 S₉,为 5.548。S₈ 池塘的 Chaol 指数值和 Shannon 指数值分别为 1 352.828 和 5.416,为 3 个池塘中最低。覆盖率指数分别达到 0.992, 0.994 和 0.995。

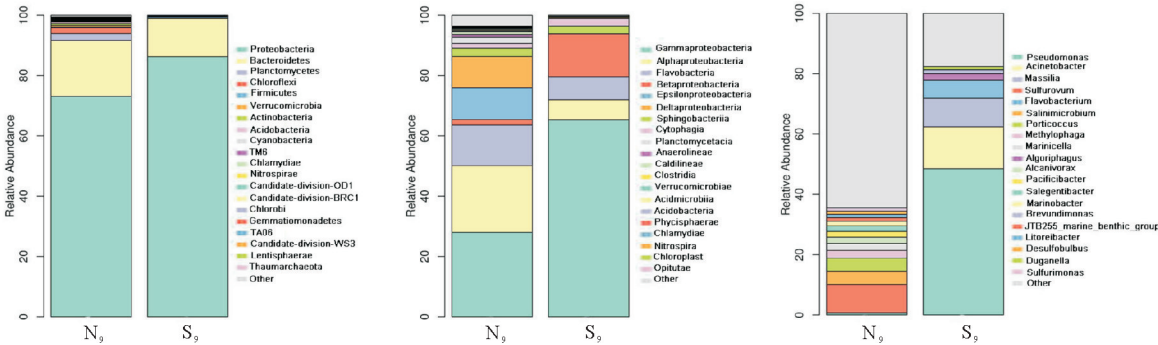


图 4 9 号池塘水体和底泥微生物菌群门、纲、属水平的相对丰度

Fig.4 Relative abundance composition of the microbial community at phylum, class and genus level for S₉

池塘底泥 Chaol 指数值 N₇ 最高, 为 14 887.530, 其次是 N₉, 为 12 894.510。Shannon 指数值 N₇ 最高, 为 10.050; 其次是 N₉, 为 9.654。N₈ 的 Chaol 指数值和 Shannon 指数值分别为 12 148.140 和 9.480, 为 3 个池塘中最低。覆盖率指数分别达到 0.972, 0.980 和 0.977 (表 3)。

3 个养殖池塘样本检测结果比较, 底泥中的菌落丰富度和物种多样性明显高于水体。养殖池塘水体中菌落丰富度 S₉ > S₇ > S₈, 物种多样性 S₇ > S₉ > S₈。养殖池塘底泥中菌落丰富度 N₇ > N₉ > N₈, 物种多样性 N₇ > N₉ > N₈。

表 3 养殖池塘水体和底泥样本多样性指数

Tab.3 Sample diversity index in aquaculture water and sediment samples

样品号	Chaol 指数	Shannon 指数	覆盖率指数
S ₇	3695.049	6.468	0.992
S ₈	1352.828	5.416	0.994
S ₉	3871.752	5.548	0.995
N ₇	14887.530	10.050	0.972
N ₈	12148.140	9.480	0.980
N ₉	12894.510	9.654	0.977

3 讨论

近年来,应用高通量测序技术对 16S rDNA 基因的分析,能够全面解析微生物群落的种类和数量,已成为研究环境样本微生物菌群多样性的重要手段 (Sogin et al, 2006; 孙欣等, 2013)。本研究采用 16S rDNA 的 V3、V4 和 V5 可变区进行高通量测序,分析了 3 个中华绒螯蟹生态育苗池塘中养殖水体和池塘底泥的细菌群落组成,揭示了难以通过传统生物学方法研究的细菌种群和数量。检测样本经过对原始序列拼接、过滤和去除嵌合体后,得到养殖水体的有效序列为 67 016 ~ 192 987,有效序列百分比为 88.36% ~ 89.29%。池塘底泥的有效序列条数为 165 100 ~ 174 543,有效序列百分比为 91.52% ~

92.06%。测序结果较好地反映了样品中细菌群落的组成。

3.1 生态育苗池塘的优势菌群组成

3 个养殖池塘水体的优势菌群为变形菌门和拟杆菌门,但菌群结构和相对丰度完全不同, S₈ 和 S₉ 以变形菌门为优势群,相对丰度分别为 71.47% 和 86.20%,以 γ-变形菌纲、α-变形菌纲和 β-变形菌纲为优势亚群,假单胞菌目、假单胞菌科、假单胞菌属为优势菌。S₇ 以拟杆菌门的相对丰度为 54.5%,以黄杆菌纲(43.80%)、黄杆菌目(43.80%)、黄杆菌科(43.79%)、黄杆菌属(35.48%)为优势菌。池塘底泥中的菌群比养殖水体更为丰富,3 个养殖池塘的优势菌群均为变形菌门和拟杆菌门,变形菌门的相对丰度均高于拟杆菌门。γ-变形菌纲,α-变形菌纲和 ε-变形菌纲为优势亚群,拟杆菌门中的黄杆菌纲、黄杆菌目、黄杆菌科为优势菌。检测量不足 1% 的属分别达到 55.75%、59.45% 和 60.85%。

在养殖水体和池塘底泥中,γ-变形菌纲和 α-变形菌纲均为优势菌群。γ-变形杆菌中假单胞菌目 (Pseudomonadales)、假单胞菌科 (Pseudomonadaceae)、假单胞菌属 (Pseudomonas) 均有较高的丰度。α-变形菌纲中红螺菌目 (Rhodospirillales) 的红螺菌科 (Rhodospirillaceae) 以及红细菌目 (Rhodobacterales) 的红细菌科 (Rhodobacteraceae) 还有少量的根瘤菌目细菌。γ-变形菌是海洋中普遍存在的细菌,多样性很高,数量也很大,尤其在营养物质含量高的水域,多为硫化细菌及固氮细菌,都是主要的优势细菌 (Ivanova et al, 2003; Payne et al, 2006)。在厌氧环境中,部分 γ-变形杆菌可与该环境中的动物形成共生关系,对环境中的碳、硫循环起着重要作用 (Bakunina et al, 1999; Huber et al, 2004; 白洁等, 2009)。α-变形菌纲中的这类细菌能够通过光合作用进行生长代谢,二氧化碳和氮的固

定在养殖环境系统碳、氮循环中发挥着重要作用 (Cottrell et al, 2000)。

3.2 优势菌群与育苗水体物质代谢的相互作用

拟杆菌门的细菌与 DNA、脂类和蛋白质等有机物质的转换密切相关,这些有机物质的吸收和利用是各种水体环境中碳循环的重要组成部分 (Cottrell et al, 2000)。养殖水体和底泥均有少量的 *Mari-bacter* 属和 *Lutibacter* 属,此属细菌为兼性厌氧细菌,可进行硝酸盐的反硝化过程 (黄志涛等, 2016),说明江苏省射阳县沿海滩涂中华绒螯蟹生态育苗池塘中存在着反硝化过程。黄杆菌纲是拟杆菌门中的三大纲之一,广泛存在于水体和土壤等环境中。在厌氧环境下,通过亚硝化单胞菌的氨氮化作用和硝化螺旋菌的硝酸盐氧化作用,转化对养殖动物有毒的氨氮和亚硝酸盐 (裘钱玲琳等, 2016)。Stenholm 等 (2008) 认为黄杆菌是水生动物的条件致病菌,大量存在会增加养殖动物染病的风险。养殖水体和底泥中均有相对丰度的黄杆菌纲 (Flavobacteriia)、黄杆菌目 (Flavobacteriales)、黄杆菌科 (Flavobacteriaceae) 细菌, S_7 中黄杆菌属 (*Flavobacterium*) 的相对丰度达 35.48%。因此,在中华绒螯蟹生态育苗的生产中,需要密切关注养殖环境中病原菌的变化情况,随时监测养殖水体中氨氮和亚硝酸盐的变化,降低养殖动物的染病风险。

综上所述,自然生态系统中,微生物的丰度和空间分布呈不均匀状态,而且种类繁多,遗传背景复杂,菌群结构和功能随环境因素的变化而改变。养殖环境中的细菌群落组成不仅对养殖生物的生态环境有重要影响,而且对养殖生物的营养和免疫也有重要作用 (王武等, 2010)。分析微生物菌群多样性和相对丰度的变化,对维持和调控养殖生态系统,揭示更多功能菌的作用,预防和控制养殖水生动物疾病有重要的作用和意义。随着高通量测序技术的应用和发展,将推动人们对自然环境中微生物群落结构及其功能特点的认识,对探索养殖环境中菌群多样性更具应用价值。

参考文献

- 白洁,李海艳,赵阳国,2009. 黄海北部不同站位海洋细菌群落分布特征[J]. 微生物学报, 49(3): 343-350.
- 黄志涛,宋协法,李勋,等,2016. 基于高通量测序的石斑鱼循环水养殖生物滤池微生物群落分析[J]. 农业工程学报, 32(S1): 242-247.
- 裘钱玲琳,徐如卫,朱建林,等,2015. 凡纳滨虾土塘养殖与循

- 环养殖系统细菌菌落结构比较研究[J]. 生物学杂志, 32(6): 45-49.
- 孙欣,高莹,杨云峰,2013. 环境微生物的宏基因组学研究新进展[J]. 生物多样性, 21(4): 393-400.
- 王武,李应森,2010. 河蟹生态养殖[M]. 北京: 中国农业出版社.
- Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H, 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiological Reviews, 59(1): 143-169.
- Auguet J C, Barberan A, Casamayor E O, 2009. Global ecological patterns in uncultured Archaea[J]. The International Society for Microbial Ecology Journal, 59(1): 143-169.
- Bakunina I, Shevchenko L S, Nedashkovskaia O I, 1999. Screening of marine bacteria for fucoidan hydrolases[J]. Mikrobiologiia, 69(3): 370-376.
- Cottrell M T, Kirchman D L, 2000. 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, 66(4): 1692-1697.
- Huber I, Spanggaard B, Appel K F, et al, 2004. Phylogenetic analysis and in situ identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum)[J]. Journal of Applied Microbiology, 96(1): 117-132.
- Hugenholtz P, Hooper S D, Kyrpides N C, 2009. Focus: Synergistetes[J]. Environmental Microbiology, 11(6): 1327-1329.
- Ivanova E P, Sawabe T, Zhukova N V, et al, 2003. Occurrence and Diversity of Mesophilic Shewanella Strains Isolated from the North-West Pacific Ocean[J]. Systematic and Applied Microbiology, 26(2): 293-301.
- Payne M S, Hall M R, Bannister R, et al, 2006. Microbial diversity within the water column of a larval rearing system for the ornate rock lobster (*Panulirus ornatus*)[J]. Aquaculture, 258(1): 80-90.
- Sogin M L, Morrison H G, Huber J A, et al, 2006. Microbial Diversity in the Deep Sea and the Underexplored "Rare Biosphere"[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103(32): 12115-12120.
- Stenholm A R, Dalsgaard I, Middelboe M, 2008. Isolation and characterization of bacteriophages infecting the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*[J]. Appl Environ Microbiol, 74(13): 4070-4078.

Microbial Community in Ecological Breeding Ponds for the Chinese Mitten Crab *Eriocheir sinensis*

XU Yu^{1,2,3}, DENG Yan-fei^{1,2,3}, YANG Zhi-qiang^{1,2,3}, GE Jia-chun^{1,2,3,4}, YANG Yuan-jie^{1,2,3}

(1.Freshwater Fisheries Research Institute of Jiangsu Province, Nanjing 210014, P.R.China;

2.Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources of Jiangsu Province, Nanjing 210014, P.R.China;

3.The Jiangsu Provincial Platform for Conservation and Utilization of Agricultural Germplasm, Nanjing 210014, P.R.China;

4.Nanjing Purity Aquaculture Development Co., Ltd., Gaochun 211316, P.R.China)

Abstract: Microbial community composition plays an important role in aquaculture systems, affecting the nutrition and immune response of aquaculture organisms. In this study, we investigated the microbial community structure and diversity in the water and sediment of Chinese mitten crab ecological breeding ponds in Sheyang, Jiangsu Province, aiming to provide a reference for environmental protection and healthy breeding of the crab. Water and sediment samples (labeled as S_7 , S_8 , S_9 and N_7 , N_8 , N_9) were collected from three breeding ponds in the aquatic seedling farm of Sheyang County. The V3 – V5 hypervariable region of the 16S rRNA gene from bacteria in water and sediment samples was sequenced using high-throughput sequencing technology and expressed in operational taxonomic units (OTUs) using MOTHUR software. The resulting sequences with no less than 97% sequence similarity were clustered using Qiime (v1.7) software and the richness and diversity of the microbial community were evaluated based on the Chaol index and Shannon index. Ponds 7, 8, and 9 displayed, respectively, 8 881, 7 406 and 8 566 OTUs. The microbial community of water sample S_7 included 191 genera, 97 families, 58 orders, 29 classes and 16 phyla; for S_8 , 132 genera, 68 families, 38 orders, 18 classes and 9 phyla; and for S_9 , 227 genera, 111 families, 60 orders, 32 classes and 17 phyla. The microbial community of sediment sample N_7 included 572 genera, 325 families, 198 orders, 103 classes and 41 phyla; for N_8 , 534 genera, 318 families, 203 orders, 103 classes and 42 phyla; and for N_9 , 578 genera, 323 families, 196 orders, 99 classes and 40 phyla. Proteobacteria was the dominant taxa detected in the water and sediment samples, followed by Bacteroidetes. The abundance and diversity of microbes in the sediment were much higher than in the water. The information provided by this study will be helpful in rearing Chinese mitten crab larvae.

Key words: *Eriocheir sinensis*; ecological breeding ponds; aquaculture water; sediment