

3种养殖模式水体中细菌多样性研究

李革雷 陈昌福 高宇 刘振兴 谭晶晶

华中农业大学水产学院, 武汉 430070

摘要 采用16S rDNA克隆文库技术,对位于武汉市少潭河水库养殖基地3种养殖模式[根据放养鱼所占比例,草鱼75%、鲢15%、鳙6%、异育银鲫4%,为模式1(MSH1);草鱼75%、鲢15%、鳙3%、匙吻鲟3%、异育银鲫4%,为模式2(MSH2);草鱼75%、鲢15%、匙吻鲟6%、异育银鲫4%,为模式3(MSH3)]水体中细菌多样性进行研究。系统发育分析结果表明:3种养殖模式中细菌的16S rDNA克隆文库的序列总共分布于10个门,分别是变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、蓝藻细菌门(Cyanobacteria)、浮霉菌门(Planctomycetes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、放线菌门(Actinobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、梭杆菌门(Fusobacteria)和OP10。对3种养殖模式中细菌的16S rDNA克隆文库的序列多样性分析结果表明,MSH2中细菌克隆文库的多样性指数优于MSH1和MSH3,而MSH3优于MSH1。

关键词 养殖模式; 16S rDNA 克隆文库; 细菌多样性; 系统发育分析

中图分类号 S 917 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)03-0381-010

微生物群落是水体生态系统重要的组成部分,在水体中氮、磷、硫和碳等要素的循环和利用中起到至关重要的作用。有些菌群具有丰富的蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、氧化酶等,可以降解不被水生动物或植物利用的大分子有机物,使其生成二氧化碳、水及其他小分子的物质;细菌有很强去除各种氮素化合物的能力,维护有利于水生动物尤其是鱼虾的生长良好环境;细菌可以产生某种次生代谢产物,从而抑制有害细菌和藻类的生长繁殖;细菌还可以作为生产者,将可溶性有机物转化成菌体蛋白,从而直接或间接地给水生动物提供营养物质,在食物链中起重要作用。细菌多样性对其所在的生态系统所发生的生化反应具有重要的影响,因此,对环境中细菌多样性的研究可以用来监控环境变化^[1-5]。基于微生物群落在水体中的重要作用,人们对不同水体的微生物进行了研究,这些研究结果表明不同水体和水质条件下的细菌多样性不同^[6-9],本研究的对象为3种不同养殖模式水体的细菌群落,目的在于了解不同养殖模式中细菌多样性以及不同模式水体细菌多样性的异同,为分析不同养殖模式的优势菌群及其功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验地点与养殖模式的设定

试验池塘位于武汉市新洲区少潭河水库的水产养殖基地。选择10个条件大致相同的养殖池塘开展本研究,其中9个作为试验池塘,1个作为储备塘。池塘均为正方形,四周是水泥护墙,底部存在适量底泥,长宽各10.0 m,水体深1.2 m左右。池塘饲养用水来源于少潭河水库。根据放养各种鱼类的比例不同而设定为3种养殖模式,各种养殖模式均以草鱼为主,混养匙吻鲟、鳙、鲢和异育银鲫。根据放养鱼所占比例,草鱼75%、鲢15%、鳙6%、异育银鲫4%,为模式1(MSH1);草鱼75%、鲢15%、鳙3%、匙吻鲟3%、异育银鲫4%,为模式2(MSH2);草鱼75%、鲢15%、匙吻鲟6%、异育银鲫4%,为模式3(MSH3)。

1.2 水样的采集和处理

取样前将装水样的蓝盖玻璃瓶用1%的盐酸溶液浸泡1 d,然后用单蒸水冲洗干净,封口后进行高压灭菌,烘干后备用。采样点选在每个池塘的四角和中间,用采水器在每个点均采集水面下0.5 m左

收稿日期: 2011-02-22

基金项目: 农业公益性行业科研专项经费项目(200803013)和 973 项目(2009CB118700)

李革雷, 硕士研究生, 研究方向: 水产动物病害与防治。E-mail: ligelei77-55@163.com

通讯作者: 陈昌福, 教授, 研究方向: 水产动物病害与防治。E-mail: chenchangfu@mail.hzau.edu.cn

右 2.0 L 水样,再将 5 个点的水样混合均匀,最后取混匀后的 500.0 mL 水样分装到处理过的水样瓶中。封好盖的水样瓶放入装有冰袋的保温箱中运回实验室,立即进行下一步实验。

1.3 水体中菌体 DNA 的提取

水样以 0.22 μm 的滤膜过滤,使菌体附着在滤膜上,用 4 mL Lysis Buffer 将菌体洗下,将收集的菌液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 12 000 r/min 离心 10 min,集菌。往菌体沉淀中加入 1.5 mL 溶菌酶溶液(0.15 mol/L NaCl,0.1 mol/L Na_2EDTA ,15.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 溶菌酶),37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 1 h。在液氮和 65 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中循环冻融 3 次,每次 3 min,冷却至室温后,加入 15 μL 蛋白酶 K(0.02 g/100 mL)和 75 μL 的 10% SDS,沉淀再用 0.5 mL 裂解缓冲液和 0.5 mL SDS 洗涤 1 次。然后加入等体积 Tris-饱和酚抽提 1 次,12 000 r/min 离心 10 min;加入等体积 Tris-饱和酚:氯仿:异戊醇溶液(25:24:1)后,再抽提 1 次,12 000 r/min 离心 10 min;加入氯仿:异戊醇溶液(24:1)后,抽提 2 次,12 000 r/min 离心 10 min。加入 0.25 倍体积的 3.0 mol/L 乙酸钠,2 倍体积的无水乙醇于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 过夜沉淀 DNA。然后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 12 000 r/min 离心 20 min,沉淀用 1 mL 70% 的乙醇洗涤 2 次,4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12 000 r/min 离心 10 min;无水乙醇洗涤 1 次,4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12 000 r/min 离心 10 min,室温晾干。重悬于 50.0 μL TE(10.0 mmol/L Tris-HCl,1.0 mmol/L EDTA)中,将获得的样品置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

1.4 细菌 16S rDNA 的扩增和纯化

对基因组 DNA 进行 10 倍、100 倍和 1 000 倍稀释后,进行细菌 16S rDNA 的扩增。50.0 μL 的反应体系包括 10 \times PCR Buffer 5.0 μL , MgCl_2 (25.0 mmol/L) 3.0 μL , dNTP (10.0 mmol/L) 1 μL , 27F (10.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 1 mL, 1492R (10.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 1 μL , DNA 模板 5.0 μL , Taq DNA Polymerase (5.0 U/ μL) 1.0 μL , 加 ddH₂O 到 50.0 μL 。扩增用引物为通用引物 1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 和细菌特异引物 27F(5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3')。反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,45 $^{\circ}\text{C}$ 90 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,26 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

扩增得到的细菌混合 16S rDNA 基因(约 1.5 kb)用 AxyPrep PCR 清洁试剂盒,按照试剂盒说明书的方法进行 16S rDNA 基因的纯化。将纯化后的

16S rDNA 基因经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 16S rDNA 克隆文库的建立和筛选

将纯化后的细菌 16S rDNA 基因与 pMD 18 T-vector 连接,连接反应体系为:pMD 18-T Vector 1.0 μL , Solution I 5.0 μL , Template 4.0 μL 。在酶连仪中 14 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜,完成连接反应。转化感受态的 *E. coli* DH-5 α ,随机挑取白斑菌落 96 个,接种在新的含 AMP 的 LB 培养基上 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。以载体引物 RV-M (5'-GAGCGGATAACAATTCACACAGG-3') 和 M13-47 (5'-CGC-CAGGGTTTCCCAGTCACGAC-3') 进行菌落 PCR,经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测验证阳性克隆。每个样品选取 50 个阳性克隆送上海英潍公司测序,本文库以平板形式进行保存。

1.6 序列的分析处理与系统发育树的构建

将获得的 16S rDNA 部分序列通过 RDP(Ribosomal Database project II)用 CHIMERA CHECK version 2.7 在线分析同一文库中可能的嵌合体(Chimeria),并将明显的 Chimeria 序列去除。将拼接好的序列用 DNA Star 软件包中的 MegAlign 进行配对和多序列比较(multiple alignment),将相似性 $\geq 97\%$ 的序列作为同一操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)。然后在 NCBI 上进行在线比对,找出各 OTU 代表序列在 GenBank 中最相似的序列并下载。依靠软件 ClustalX 1.83 对相似序列和本试验测得的序列进行多序列比对,比对结果用 Bioedit 进行校正。系统发育树的构建采用 MEGA(version 4.1)软件包中的 Neighbor-joining 法,设自展值为 1 000 次^[10]。

1.7 水质测定

溶解氧(DO)用仪器 HQd Meters and IntelliCAL™ Probes 在采样现场测定,其他指标在实验室参照文献[11]进行测定。

2 结果与分析

2.1 克隆文库的建立

稀释 10 倍和 100 倍的 PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示稀释 10 倍的细菌总 DNA 的 16S rDNA 扩增产物在琼脂糖凝胶电泳中有明显条带,且在 1 000 bp 和 2 000 bp 之间,大约为 1 500 bp,这和 16S rDNA 的碱基数相符合,说明稀释 10 倍时扩增成功;而稀释 100 倍的扩增产物没有条带,即没有扩增成功。将扩增成功的

PCR 产物用 AxyPrep PCR 清洁试剂盒进行纯化，严格按照流程操作，最终得到 25.0~30.0 μL 的纯化产物。

将随机挑选的菌落进行菌落 PCR，然后通过

1% 的琼脂糖凝胶电泳检测，结果如图 1 所示。图 1 中亮带所示值位于 1 500 bp 左右，说明连接和转化很成功。样品 MSH1、MSH2 和 MSH3 各挑选 50 个符合条件的亮带所对应的菌落送出测序。

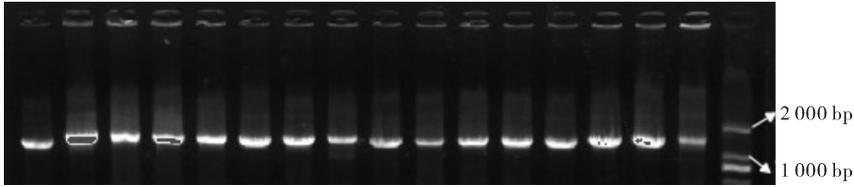


图 1 菌落 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 1 The results of agarose gel electrophoresis of colony PCR products

2.2 16S rDNA 文库分类操作单元 (operational taxonomic unit, OTU) 分析

每个模式送出 50 个阳性克隆菌株测序，将克隆的测序结果用 RDP II 中的 Chimera Check 程序进行检查，结果没有发现 Chimera。然后用 DNA Star 软件包中的 MegAlign 对每种模式的 50 个克隆序列进行本地比对，将相似性 $\geq 97\%$ 的序列作为 1 个 OTU，然后在 NCBI 网站上用 BLAST 程序对分化出的 OTU 的代表序列进行在线比对。结果显示 MSH1 的 50 个克隆被分为了 41 个 OTU，有 31 个 OTU 的代表序列与 GenBank 数据库中的未培养细菌的 16S rDNA 序列相似性较高 (90%~99%)，其余 10 个 OTU 代表序列与已培养的细菌的 16S rDNA 序列相似性较高 (92%~99%)；MSH2 的 50 个克隆则包含了 45 个 OTU，有 33 个 OTU 的代表序列与未培养细菌的 16S rDNA 序列相似性较高

(93%~100%)，其余 12 个 OTU 代表序列与已培养的细菌的 16S rDNA 序列相似性较高 (79%~99%)；MSH3 的 50 个克隆被分为了 43 个 OTU，有 28 个 OTU 的代表序列与 GenBank 数据库中的未培养细菌的 16S rDNA 序列相似性较高 (87%~99%)，其余 15 个 OTU 代表序列与已培养的细菌的 16S rDNA 序列相似性较高 (91%~100%)。

对 3 种模式的克隆文库进行多样性指数计算^[12]，得出 MSH1、MSH2 和 MSH3 的覆盖率 (C) 分别为 28%、20% 和 26%；香农指数 (H') 分别为 1.56、1.42 和 1.61；辛普森指数 (D) 分别为 0.98、0.99 和 0.99；均匀度 (J') 为 0.97、0.86 和 0.99 (表 1)。覆盖率 (C) 用来评价所构建的文库对环境微生物多样性的体现程度，3 种模式的覆盖率都较低，说明构建的基因文库可以很好地反应池塘水体微生物的多样性。

表 3 3 种模式的 16S rDNA 文库克隆数和多样性指数

Table 3 The number of 16S rDNA clones and diversity index in the 3 aquaculture models

文库 Library	总克隆数 Total clones	OTU 数 OTUS	覆盖率 (C) / % Coverage	香农指数 (H') Shannon-Wiener index	辛普森指数 (D) Simpson index	均匀度 (J') Evenness
MSH1	50	41	28	5.20	0.98	0.97
MSH2	50	45	20	5.44	0.99	0.99
MSH3	50	43	26	5.35	0.99	0.98

2.3 系统发育分析

采用 MEGA (version 4.1) 软件包中的 Neighbor-joining 法分别构建了 3 种模式的主要菌群的系统发育树^[13]。由系统发育树可以看到 MSH1 的 16S rDNA 克隆文库的序列主要分布于 6 大类细菌，分别是 Proteobacteria、Bacteroidetes、Cyanobacteria、Planctomycetes、Verrucomicrobia 和 Actinobacteria (图 2)；MSH2 的 16S rDNA 克隆文库的

序列主要分布于 9 大类细菌，分别是 Proteobacteria、Bacteroidetes、Cyanobacteria、Actinobacteria、Planctomycetes、Verrucomicrobia、Acidobacteria、Chloroflexi 和 Fusobacteria (图 3)；MSH3 的 16S rDNA 克隆文库的序列主要分布于 8 大类细菌，分别是 Proteobacteria、Bacteroidetes、Cyanobacteria、Planctomycetes、Verrucomicrobia、Actinobacteria、Acidobacteria 和 Fusobacteria (图 4)。3 种模式

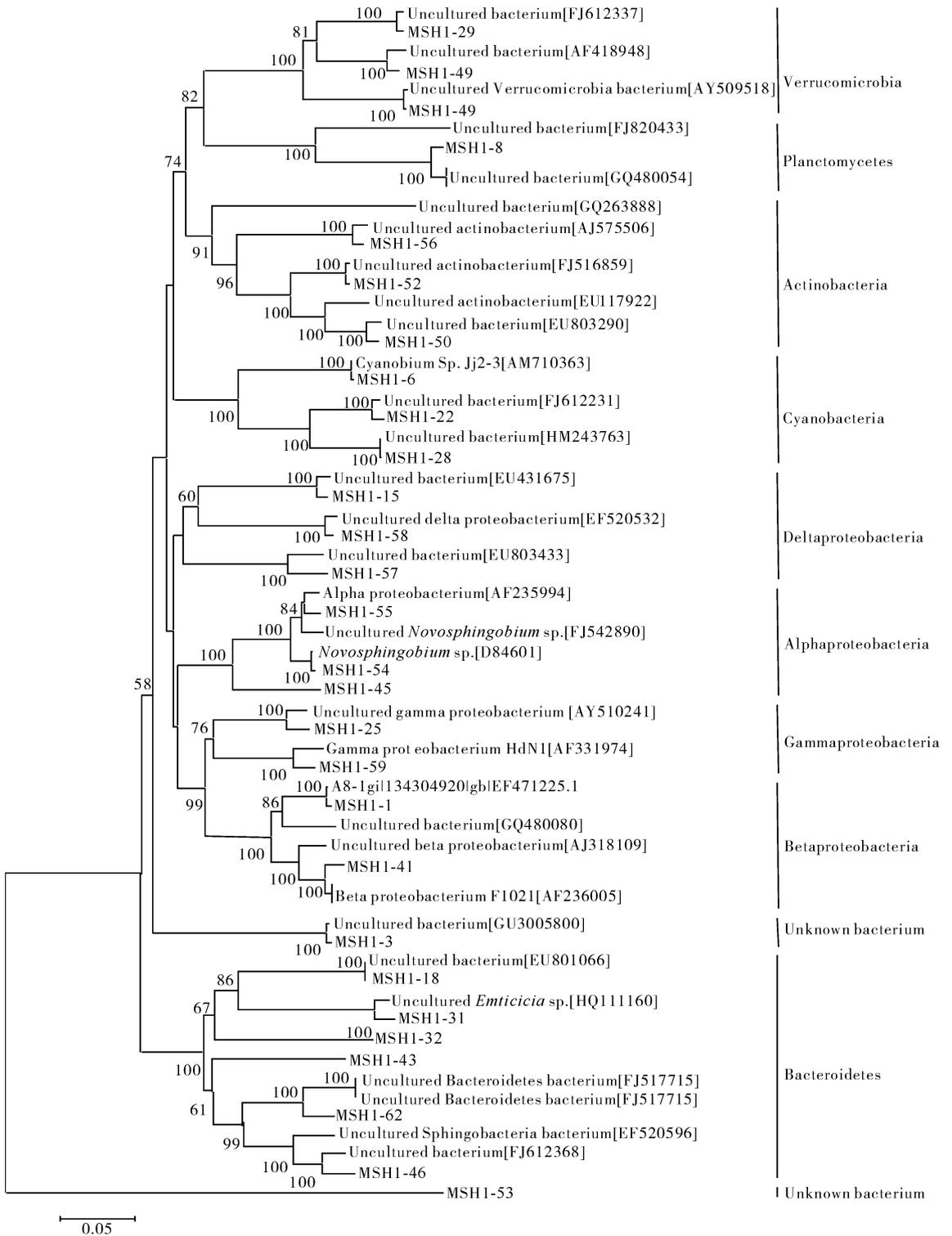


图 2 MSH1 的 16S rDNA 克隆文库构建的系统发育树

Fig. 2 The phylogenetic tree structured by 16S rDNA clone library from MSH1

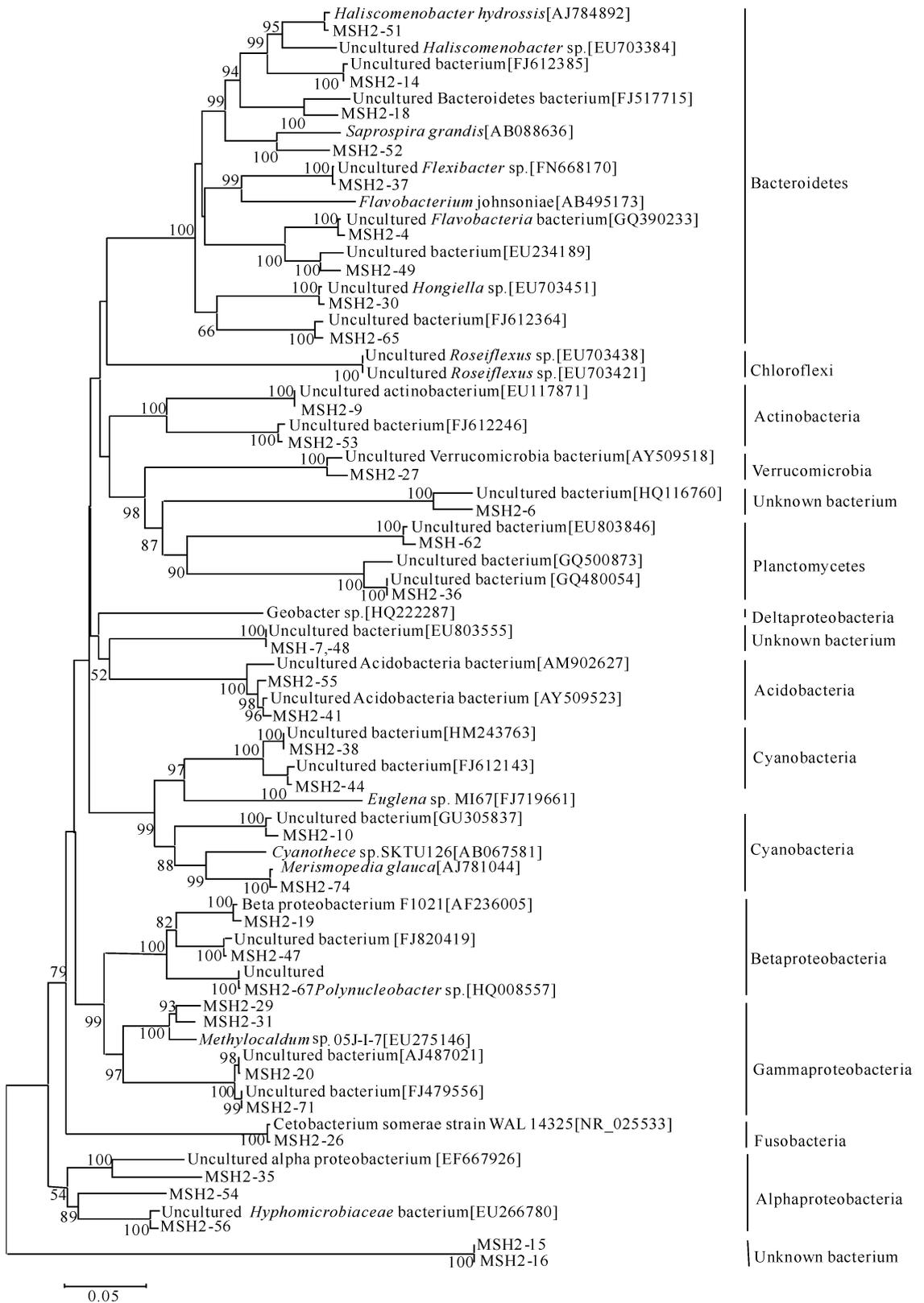


图 3 MSH2 的 16S rDNA 克隆文库构建的系统发育树

Fig. 3 The phylogenetic tree structured by 16S rDNA clone library from MSH2

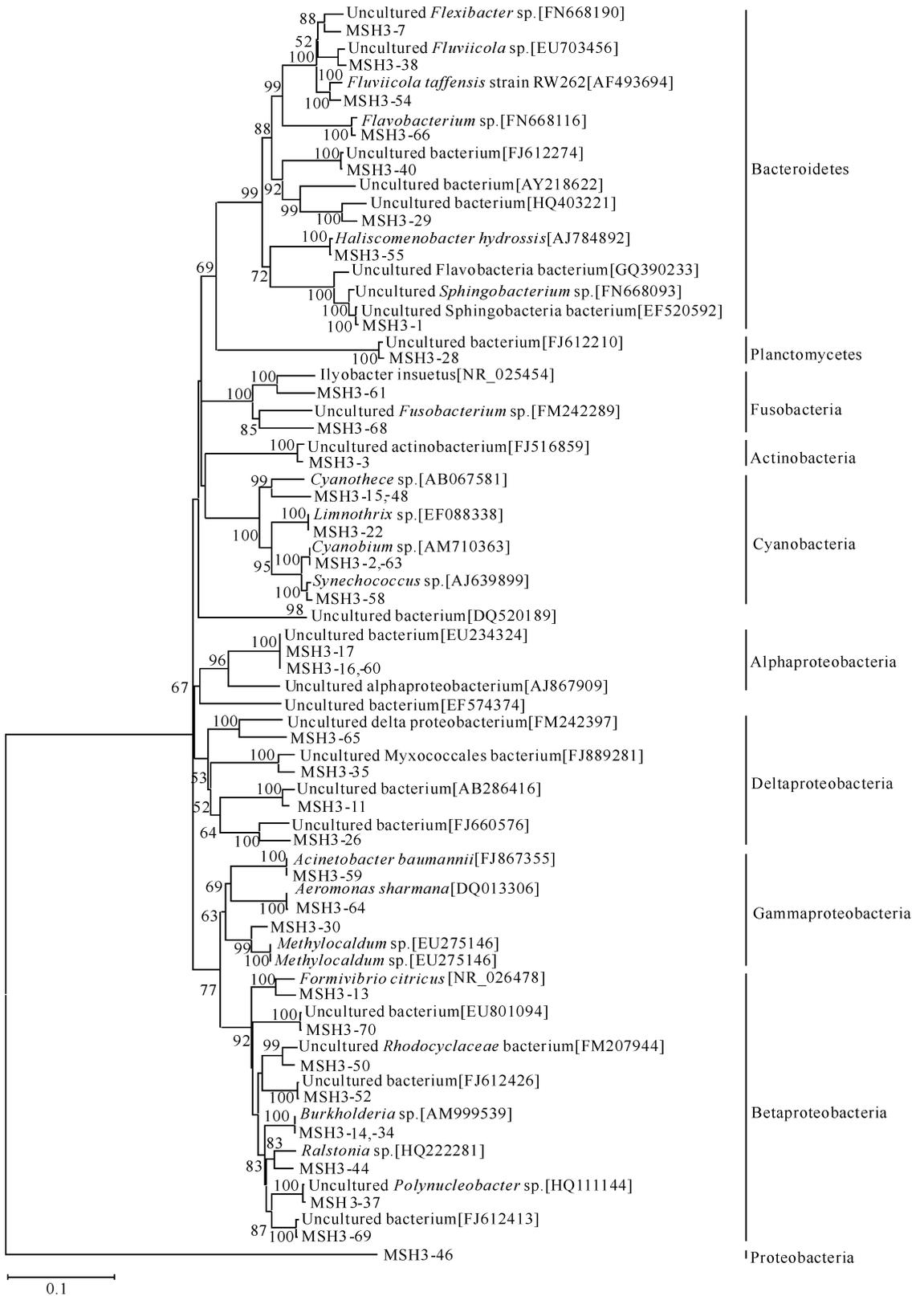


图 4 MSH3 的 16S rDNA 克隆文库构建的系统发育树

Fig. 4 The phylogenetic tree structured by 16S rDNA clone library from MSH3

中的 Proteobacteria 都包含 4 种亚群, 即 Alphaproteobacteria、Betaproteobacteria、Gammaproteobacteria 和 Deltaproteobacteria。

MSH1 中确定到属或种的序列有 MSH1-1、MSH-6、MSH1-31、MSH1-45、MSH1-54 和 MSH1-55。它们对应的 NCBI 数据库中的相似属或种分别是 *Burkholderia* sp. CHNCT10 (EF471225), 相似度为 99%; *Cyanobium* sp. JJ2-3 (AM710363), 相似度为 99%; Uncultured *Emticicia* sp. cuticle_12 (HQ111160), 相似度为 96%; Uncultured *Sphingobacteria* bacterium ADK-MOe02-10 (EF520596), 相似度为 90%; *Novosphingobium* sp. S23306 (D84601), 相似度为 92%; Uncultured *Novosphingobium* sp. A08-08E (FJ542890), 相似度为 99%。MSH2 中确定到属或种的序列有 MSH2-4、MSH2-38、MSH2-15、MSH2-26、MSH2-30、MSH2-31、MSH2-34、MSH2-37、MSH2-51、MSH2-52、MSH2-56、MSH2-63、MSH2-64、MSH2-67、MSH2-68 和 MSH2-74。它们对应的 NCBI 数据库中的相似菌属或种分别是 Uncultured *Flavobacteria* bacterium clone eub62C10, 相似度为 97%; Uncultured *Roseiflexus* sp. clone XZXXH50, 相似度为 95%; *Cyanothece* sp. SKTU126, 相似度为 95%; *Cetobacterium somerae* strain WAL 14325, 相似度为 99%; Uncultured *Hongiella* sp. clone XZXXH14, 相似度为 98%; *Methylocaldum* sp. 05J-I-7, 相似度为 93%; Uncultured *Roseiflexus* sp. clone XZXXH122, 相似度为 97%; Uncultured *Flexibacter* sp., 相似度为 99%; *Haliscomenobacter hydrossis*, 相似度为 98%; *Saprospira grandis*, 相似度为 90%; Uncultured *Hyphomicrobiaceae* bacterium clone D10_05, 相似度为 98%; Uncultured *Haliscomenobacter* sp. clone XZXXH141, 相似度为 99%; *Flavobacterium johnsoniae*, 相似度为 93%; Uncultured *Polynucleobacter* sp., 相似度为 99%; *Geobacter* sp., 相似度为 96%; *Merismopedia glauca*, 相似度为 99%。MSH3 中确定到菌属或种的序列有 MSH3-1、MSH3-2、MSH3-7、MSH3-13、MSH3-14、MSH3-15、MSH3-17、MSH3-18、MSH3-22、MSH3-30、MSH3-35、MSH3-37、MSH3-38、MSH3-43、MSH3-44、MSH3-50、MSH3-54、MSH3-55、MSH3-58、MSH3-59、MSH3-61、MSH3-64、MSH3-66 和 MSH3-68。它们对应的 NCBI 数据库中的相似菌

属或种分别是 Uncultured *Sphingobacteria* bacterium clone ADK-GRe02-21, 相似度为 94%; *Cyanobium* sp. JJ2-3, 相似度为 99%; Uncultured *Flexibacter* sp., 相似度为 95%; *Formivibrio citricus* strain CreCit1, 相似度为 94%; *Burkholderia* sp. GAH5, 相似度为 99%; *Cyanothece* sp. SKTU126, 相似度为 91%; Uncultured *Flavobacteria* bacterium clone eub62C10, 相似度为 99%; Uncultured *Sphingobacterium* sp., 相似度为 99%; *Limnothrix* sp. CENA110, 相似度为 100%; *Methylocaldum* sp. 05J-I-7, 相似度为 94%; Uncultured *Myxococcales* bacterium clone Plot18-F09, 相似度为 95%; Uncultured *Polynucleobacter* sp. clone blastula_1, 相似度为 99%; Uncultured *Fluviicola* sp. clone XZXXH2, 相似度为 97%; *Methylocaldum* sp. 05J-I-7, 相似度为 93%; *Ralstonia* sp. enrichment culture clone Van98, 相似度为 94%; Uncultured *Rhodocyclaceae* bacterium, 相似度为 96%; *Fluviicola taffensis* strain RW262, 相似度为 94%; *Haliscomenobacter hydrossis*, 相似度为 98%; *Synechococcus* sp. 0BB26S03, 相似度为 98%; *Acinetobacter baumannii* strain RUH 0875, 相似度为 99%; *Ilyobacter insuetus* strain VenChi2, 相似度为 91%; *Aeromonas sharmana* strain GPTSA-6, 相似度为 99%; Uncultured *Fusobacterium* sp., 相似度为 95%。

2.4 3种模式细菌群落结构比较分析

MSH1 的优势菌群是 Proteobacteria (26%)、Bacteroidetes (18%)、Cyanobacteria (14%) 和 Actinobacteria (12%); MSH2 的优势菌群是 Proteobacteria (22%)、Bacteroidetes (22%)、Cyanobacteria (12%); MSH3 的优势菌群是 Proteobacteria (42%)、Bacteroidetes (26%)、Cyanobacteria (14%)。3 种模式的其他菌门所占比例均在 10% 以下, 且分布均匀 (图 5)。

Proteobacteria 的 4 个亚群在 3 种模式中所占比例也不一样。其中 Alphaproteobacteria 分别占 MSH1、MSH2 和 MSH3 菌群的 8%、4% 和 6%; Betaproteobacteria 分别占各模式菌群的 10%、10% 和 22%; Gammaproteobacteria 分别占各模式菌群的 4%、4% 和 4%; Deltaproteobacteria 分别占各模式的 4%、2% 和 8%。图 6 所表示的是 Proteobacteria 的 4 种亚群在 3 种模式的 Proteobacteria 中分别

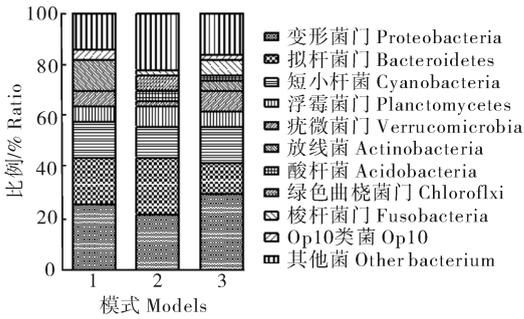


图 5 16S rDNA 克隆文库序列在 3 种养殖模式中的分布

Fig. 5 The distribution of sequences from 16S rDNA clone library in the 3 aquaculture models

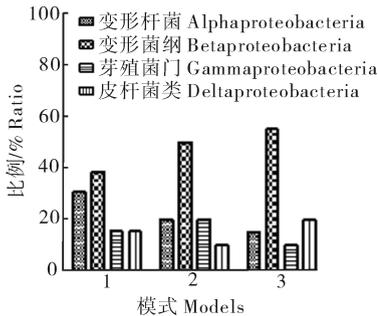


图 6 3 种养殖模式中变形菌门的不同亚群结构

Fig. 6 Structure of different subgroups of proteobacteria in the 3 aquaculture models

所占的比例,可以看出 Betaproteobacteria 亚群是 3 种模式 Proteobacteria 亚群的优势群体,分别占到 3 种模式变形菌门的 38.5%、50%和 55%。

3 种模式共有的细菌群落包括 Proteobacteria、Bacteroidetes、Cyanobacteria、Planctomycetes、Verrucomicrobia 和 Actinobacteria,说明这 6 大类细菌是 3 种模式水体的基础菌群。不同的是 MSH1 和 MSH3 都有 OP10 细菌,MSH2 没有;MSH2 和 MSH3 都有酸杆菌门和梭杆菌门,MSH1 没有;只有 MSH2 存在绿弯菌门,另外 2 种模式没有。

2.5 水质分析结果

试验池塘的水源来自少潭水库,试验过程中每天投喂饲料,水体透明度为 50 cm 左右。对 3 种模式的试验池塘水质进行分析,在各个池塘中均未检测到 NO_2^- 态氮和 NO_3^- 态氮,说明水体中这 2 种化学物质含量极低。3 种模式的 COD 值都较低,MSH2 的 COD 值高于其他 2 种;DO 含量都较低,MSH3 的 DO 高于其他 2 种;TP 均较低,MSH3 略低于其他 2 种;MSH2 和 MSH3 的 PO_4^{3-} 盐含量均较低,MSH1 没有检测到; NH_4^+ 含量都较低,MSH2 略高于其他 2 种;TN 含量也均较低,MSH1 高于其他 2 种;碱度和硬度含量顺序均为 $\text{MSH1} > \text{MSH2} > \text{MSH3}$ (表 2)。

表 2 3 种模式池塘水质

Table 2 The water quality of 3 models' ponds

模式 Models	水质指标/(mg/L) Water quality parameter									
	TP	PO_4^{3-}	NH_4^+	TN	NO_2^-	NO_3^-	COD	碱度 Alkalinity	盐度 Salinity	DO
MSH1	0.127	0.000	0.206	1.219	0	0	5.602	1.251	1.404	2.21
MSH2	0.127	0.029	0.223	0.885	0	0	7.405	1.149	1.298	2.32
MSH3	0.108	0.042	0.207	0.943	0	0	5.410	1.075	1.264	3.07

3 讨论

3.1 3 种养殖模式水体细菌多样性比较

由 16S rDNA 克隆文库分析可以得出,3 种模式细菌种类都很丰富。相比而言,3 种模式的 OTU 的数量关系为 $\text{MSH2} > \text{MSH3} > \text{MSH1}$,覆盖率大小关系为 $\text{MSH1} > \text{MSH3} > \text{MSH2}$,香农指数的大小关系为 $\text{MSH2} > \text{MSH3} > \text{MSH1}$,辛普森指数大小关系为 $\text{MSH2} = \text{MSH3} > \text{MSH1}$,均匀度的大小关系为 $\text{MSH2} > \text{MSH3} > \text{MSH1}$ 。由上面的数量关系可以得知,MSH2 的细菌多样性高于 MSH1 和 MSH3,而 MSH3 的细菌多样性高于 MSH1。因为辛普森指数代表了细菌的丰富度,故可以知道 MSH2 和 MSH3 的丰富度相当,且它们的丰富度都

大于 MSH1。这样的细菌多样性关系应该和 3 种模式的鱼类混养比例有关。在 3 种模式中,草鱼所占比例为 75%,鲢为 15%,异育银鲫为 4%。不同的是 MSH1 中鳙占 6%,没有匙吻鲟;MSH2 中鳙占 3%,匙吻鲟占 3%;MSH3 中没有鳙,匙吻鲟占 6%。这说明了养殖池塘中鱼类种类的多样性影响了水体中细菌的多样性。同时还可以得出当用匙吻鲟取代了鳙时,水体中细菌多样性增加,这从侧面说明了水体中和匙吻鲟存在有关的细菌多于和鳙有关的细菌,也就是说匙吻鲟的存在可以丰富水体中的细菌多样性。比较 3 种模式的优势菌群可得出,在有鳙而没有匙吻鲟的水体中,Actinobacteria 所占比例较高(12%),成为优势菌群,在既有鳙又有匙吻鲟的水体中,Actinobacteria 所占比例下降(6%),在只有匙

吻鲟的水体中, Actinobacteria 的比例最小(2%), 这说明鳙的存在可以增加 Actinobacteria 的数量; 同时也可以看出, 在只有匙吻鲟的 MSH3 中 Proteobacteria 的比例占到绝对优势, 明显多于 MSH1 和 MSH2, 这说明匙吻鲟的存在又可以增加 Proteobacteria 的数量。

分析不同模式的 Proteobacteria 的亚群发现, 随着鳙比例的降低和匙吻鲟比例的升高, Betaproteobacteria 的比例升高, Alphaproteobacteria 的比例下降, Gammaproteobacteria 和 Deltaproteobacteria 的变化没有规律性。这说明鳙和匙吻鲟混养比例会影响到 Betaproteobacteria 和 Alphaproteobacteria 数量变化, 而对另外 2 个亚群没有影响。

3.2 淡水养殖水体细菌多样性特点

本研究结果表明 3 种养殖模式总共有 10 个菌门, 这说明以草鱼为主的淡水养殖模式水体中都蕴含丰富的细菌多样性。其中 Proteobacteria 在 3 种模式中都是第一优势菌门, 分别占总细菌的 26%、22% 和 42%, 并且 Betaproteobacteria 亚门(10%、10% 和 22%) 是优势亚门, Bacteroidetes 是第二优势菌门, 分别占 18%、22% 和 26%。这和朱国锋^[14]对鄱阳湖南湖区细菌多样性的研究结果比较一致, 结果显示鄱阳湖南湖区的第一大菌门是 Proteobacteria(39.8%), 且 Betaproteobacteria(17.2%) 是第一亚门, 第二大菌门是 Bacteroidetes。不同的是本试验的结果显示 Cyanobacteria 是第三大菌门, 而鄱阳湖的第三大菌门是 Actinobacteria, 这可能与湖泊水体和养殖水体的水质特点不同以及采样的时间和深度等因素有关。这说明在无严重污染的淡水水体中 Proteobacteria 和 Bacteroidetes 是优势菌门, 其他菌群的优势地位会随水环境的不同而发生变化。

3.3 池塘水质条件和细菌多样性的关系

Proteobacteria 是脱氮除磷去 COD 的功能性菌门。王海燕等^[15]对 MDAT-IAT 净化池中的细菌群落结构研究表明, IAT 池中的优势菌主要是变形菌门, 占到了 67%, 对氮磷的去除率分别达到 92.5% 和 95.9%。徐成斌等^[16]对制药污水处理系统 ABR 池中的菌群进行了研究, 结果显示变形杆菌占到菌门总数的 78.6%, 对 COD 负荷有较好的抗冲击能力。这说明在污染严重的水体中 Proteobacteria 的数量较大, 它们可以作为水环境修复微生物以及严重污染水体的特征菌门。本试验中 Proteobacteria 也是第一大优势菌门, 这和水质的各种指标都较低

有密切联系。

通过系统发育分析可以看出, 在 3 种模式中都包含有一定数量的功能性菌群。例如 *Hyphomicrobiaceae* 和 *Burkholderia* sp. 具有固氮、降磷以及生防作用, *Ralstonia* sp. 和 *Novosphingobium* 可以降解多环芳烃(PAHs), 减少其对鱼类和人自身的危害^[17], 同时 *Ralstonia* sp. 还具有降解有机物的能力, 如苯酚以及多菌灵的成分苯并咪唑等; *Sphingobacteria* 对 COD 和氨氮具有较好去除能力^[18]。这些菌群的相互作用保证了养殖水体中物质和能量的微循环, 具有重要的作用。当然水体中还包含一些条件致病菌, 如 *Flexibacter* sp., *Flavobacteria* 等^[19], 当水环境适合其生长时就会转化成致病菌, 所以维持良好水质和微生物的多样性对水产动物的生存和生长至关重要。

参 考 文 献

- [1] GILBRIDE K A, FRIGON D, CESNIK A, et al. Effect of chemical and physical parameters on a pulp mill biotreatment bacterial community[J]. *Water Research*, 2006, 40: 775-787.
- [2] 王晓慧, 文湘华, 杨宁宁, 等. 污水处理工艺对氨氧化菌及细菌群落的影响[J]. *中国环境科学*, 2009, 29(6): 622-628.
- [3] 关统伟, 赵珂, 夏占峰, 等. 新疆于田盐池放线菌群落结构[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(4): 515-521.
- [4] 郑勇, 郑袁明, 张丽梅, 等. 极端环境下嗜热甲烷营养细菌研究进展[J]. *生态学报*, 2009, 29(7): 3865-3871.
- [5] 刘兵, 李太武, 苏秀榕, 等. 宁波北仑港冬季浮游细菌多样性研究[J]. *台湾海峡*, 2009, 28(2): 217-222.
- [6] 孙鑫鑫, 刘惠荣, 冯福应, 等. 乌梁素海富营养化湖区浮游细菌多样性及系统发育分析[J]. *生物多样性*, 2009, 17(5): 490-498.
- [7] 吴鑫, 奚万艳, 杨虹. 太湖梅梁湾冬季浮游细菌的多样性[J]. *生态学杂志*, 2006, 25(10): 1196-1200.
- [8] 王安利, 郑桂丽, 廖绍安, 等. 虾池中具有降解硝酸盐或亚硝酸盐能力的细菌多样性[J]. *生态学报*, 2007, 27(5): 1937-1944.
- [9] 孙超, 吴敏, 史锋. 新疆两湖细菌的非培多样性研究[J]. *浙江大学学报: 理学版*, 2008, 35(4): 448-455.
- [10] 雷衍之. 养殖水环境化学实验[M]. 北京: 中国农业出版社, 2006.
- [11] 马鸣超, 姜昕, 李俊, 等. 应用 16S rDNA 克隆文库解析人工快速渗滤系统细菌种群多样性[J]. *微生物学通报*, 2008, 35(5): 731-736.
- [12] 江红, 林如, 陈路劼, 等. 智利海洋沉积物中放线菌多样性[J]. *微生物学报*, 2010, 50(7): 862-869.
- [13] 林山杉, 付丽丽, 金玉花, 等. 序批式接触氧化反应器中细菌多样性及其功能[J]. *环境科学研究*, 2007, 20(4): 111-119.
- [14] 朱国锋. 鄱阳湖南湖区细菌的 16S rDNA 多样性研究[D]. 南昌: 南昌大学图书馆, 2008: 40-50.

- [15] 王海燕,周岳溪,戴欣,等. 16S rDNA 克隆文库方法分析 MDAT-IAT 同步脱氮除磷系统细菌多样性研究[J]. 环境科学学报,2006,26(6):903-910.
- [16] 徐成斌,孟雪莲,马溪平,等. 16S rDNA 克隆文库方法对制药废水处理系统中微生物多样性的研究[J]. 生态环境学报,2009,18(4):1236-1240.
- [17] 袁军,赖其良,郑天凌,等. 深海多环芳烃降解菌新鞘氨醇杆菌 H25 的降解特性及降解基因[J]. 微生物学报,2008,48(9):1208-1213.
- [18] 崔志松,邵宗泽. 一株海洋新鞘氨醇杆菌 *phe-8* (*Novosphingobium* sp.) 的 PAHs 降解基因和降解特性[J]. 厦门大学学报:自然科学版,2006,45(S1):257-261.
- [19] TIMOTHY M L, CINDY H N, LISA M P, et al. Stability of the bacterial communities supported by a seven-stage biological process treating pharmaceutical wastewater as revealed by PCR-DGGE[J]. Water Research,2002,36:638-646.

Biodiversity of aquatic microbial communities in three aquacultural systems

LI Ge-lei CHEN Chang-fu GAO Yu LIU Zhen-xing TAN Jing-jing

College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract The bacterial diversity in three aquacultural systems in Shaotan river reservoir of Wuhan city was studied by the method of 16S rDNA clone library. The grass carp, silver carp, and gible carp were basal groups of the 3 aquacultural systems, while the paddlefish and big head carp were added by different proportions. No paddlefish and 6% big head carp was named system 1, while 3% paddlefish and 3% big head carp was named system 2, and 6% paddlefish and no big head carp was named system 3. The result of phylogenetic analysis showed that the sequences of 16S rDNA clone library in three aquacultural systems included 10 bacterial communities: Proteobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Planctomycetes, Verrucomicrobia, Actinobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi, Fusobacteria and OP10. The multifarious analysis demonstrated that the diversity index of system 2 was better than the other aquacultural systems, while the diversity index of system 3 was better than system 1.

Key words aquacultural system; 16S rDNA clone library; bacteria diversity; phylogenetic analysis

(责任编辑:边书京)