

# 象山港南沙岛不同养殖模式沉积物 微生物群落结构分析\*

孙超<sup>1,2</sup> 朱玲<sup>1</sup> 毛玉泽<sup>1</sup> 范艳君<sup>1</sup> 周春娅<sup>1</sup>  
杨傲傲<sup>1</sup> 朱伟<sup>2</sup> 庄志猛<sup>1</sup>

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 山东省渔业资源与生态环境重点实验室 中国水产科学研究院  
黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 青岛农业大学生命科学学院 青岛 266109)

**摘要** 通过构建 16S rDNA 克隆文库对象山港南沙岛不同养殖模式(贝类养殖、藻类养殖及网箱养殖)表层沉积物微生物多样性和群落结构特征进行了比较和分析,共获取 136 个 OUT。其中,贝类养殖区、藻类养殖区和网箱养殖区 OTU 分别为 58、48 和 57 个。各站位 OTU 分布差异明显,表现出高度的多样性。基于 16S rDNA 序列的生物多样性和丰富度分析表明,网箱养殖区丰富度指数 ACE 为 739,香浓指数  $H'$  为 3.8,均为最高值,丰富度指数  $Chao$  为 245,略低于于贝类养殖区。贝类养殖区丰富度指数  $Chao$  为 303,在各养殖区中最高。藻类养殖区丰富度指数 ACE 为 174、 $Chao$  为 89,香浓指数  $H'$  为 3.6,均为最低值。系统发育分析表明,南沙岛各养殖区的优势种群均为变形菌门(Proteobacteria),但是藻类养殖区微生物群落结构与其他养殖区域相比,16S rDNA 克隆文库差异显著,其中根瘤菌属(*Rhizobium*)及其他光合细菌在藻类养殖区分布较多。网箱养殖区沉积物表层微生物群落中出现了与环境污染密切相关的菌群,如志贺氏菌属(*Shigella*)、埃希氏菌属(*Escherichia*)和  $\epsilon$ -变形菌纲的微生物种群,揭示网箱养殖对底质沉积物环境的影响较大。

**关键词** 网箱养殖; 贝类养殖; 藻类养殖; 微生物群落结构; 象山港

**中图分类号** S963 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2014)04-0013-09

微生物作为养殖生态系统的重要组成部分,在生源要素的分解与转化、有机污染物降解、能量流动及生态系统稳定性维护等方面发挥重要作用(Boynton *et al.*, 2008; 郑天凌等, 2002; 范艳君等, 2012)。沉积物是养殖系统中碳、氮、磷等营养元素的主要富集场所(过锋等, 2012; 张继红等, 2013),也是微生物的重要栖息地。碳、氮、磷和硫等生源要素在养殖系统中的富集和再循环影响或决定着沉积物中微生物群落的组成及其多样性,而沉积物微生物群落积极参与调控这些生源要素的再循环,驱动养殖系统环境演

替过程,是表征海水养殖沉积环境现状的理想生物标志物(宋金明, 2000)。近海养殖作为我国沿海地区的主要支柱产业,在创造巨大经济效益的同时,所引发的环境问题也日益突出,但关于微生物群落结构对养殖压力下沉积环境变化响应的研究还缺乏相关报道。象山港作为浙江省主要的海水养殖基地,誉称国家级“大鱼池”(胡文翔等, 1991)。通过研究象山港南沙岛网箱养殖区、贝类养殖区和藻类养殖区的表层沉积物微生物群落组成及分布特征,探讨不同养殖模式下,沉积物微生物群落对沉积环境变化的响应,为建立不

\*国家自然科学基金(40976073, 40776090)、国家海洋局海洋公益性行业科研专项(201305043)、中央分成海域使用金支出项目(2013551)和中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费项目(20603022013005)共同资助。孙超, E-mail: sun215766@126.com

通讯作者: 朱玲, 副研究员, E-mail: zhuling@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2012-06-29, 收修改稿日期: 2014-03-05

同养殖模式的微生物环境指示作用提供依据,为养殖污染区的生物修复技术提供了参考。

## 1 采样区域概述

象山港南沙岛位于浙江省宁波市裘村镇,平均水深约 13 m。网箱养殖是南沙港最重要的水产养殖方式,养殖面积约 61.8 hm<sup>2</sup>,年产量约 1000 t,养殖品种主要为鲈鱼、大黄鱼、美国红鱼等,养殖周期一般为 2–3 yr。近年来,为促进该海域网箱养殖的健康发展,同时开展贝类和藻类养殖,贝类养殖品种为褶牡蛎为主,养殖面积约 5.1 hm<sup>2</sup>;藻类主要养殖品种为海带和龙须菜,养殖面积约为 74.7 hm<sup>2</sup>。

## 2 材料与方法

### 2.1 沉积物的采集及理化性质分析

2007 年 1 月,选取象山港南沙岛网箱养殖区(10 号-S10)、贝类养殖区(1 号-S1)和藻类养殖区(2 号-S2)为研究目标,采用无干扰多管柱状采泥器采集沉积物样品。收集上覆水后,将 0–2 cm 表层样品均匀混合,分别用灭菌的 50 ml 聚丙烯管收集,一份保存于 4℃ 冰箱中,用于沉积物样品的理化因子测定;另 1 份保存于–20℃ 冰箱中,用于沉积物基因组 DNA 提取。每个研究区域设置 3 个重复。

用 GF/F 玻璃纤维滤膜过滤各站位上覆水和 7000 r/min、20 min 离心后获得的沉积物上清液,后用于营养盐分析。营养盐测定方法参照《海洋监测规范》(GB17387.4, 2007)进行,磷酸盐(PO<sub>4</sub>-P)采用磷钼蓝法测定;氨氮(NH<sub>4</sub>-N)采用次溴酸盐氧化法测定;亚硝酸盐(NO<sub>2</sub>-N)采用萘乙二胺法测定;硝酸盐(NO<sub>3</sub>-N)采用镉柱还原法测定;表层酸挥发性硫化物(AVS)采用亚甲基蓝光度法测定。

### 2.2 沉积物 DNA 的提取

取 0.4 g 沉积物加入 0.6 ml 清洗液(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 200 mmol/L NaCl, 5 mmol/L Na<sub>2</sub>-EDTA, 1% PVP, 1% CTAB),充分振荡混匀后,55℃ 水浴 5 min,离心去上清液。重复以上操作两次后,向离心管中加入 0.4 ml DNA 提取液(100 mmol/L Tris-HCl pH 8, 100 mmol/L Na<sub>2</sub>-EDTA, 100 mmol/L Sodium phosphate pH 8, 1.5 mol/L NaCl, 1% CTAB),5 μl 溶菌酶振荡混匀,于 37℃ 水浴 30 min 后,加入 80 μl 10% SDS 和 4 μl 蛋白酶 K, 55℃ 水浴 2 h。然后加入 1/2 体积 4.5 mol/L 的 NaCl,混合均匀,再加入等体积的氯仿–

异戊醇(24:1),轻微震荡 15 min 后,12000 r/min 离心 5 min,取上清液。最后,加入 0.6 体积的异丙醇,混匀,室温静置 15 min 后,12000 r/min 离心 15 min,超纯水溶解。溶解的 DNA 经 1.5% 琼脂糖电泳检测。

### 2.3 16S rDNA 克隆文库构建

以溶解的 DNA 为模板,以 GC341F(5'- CCT ACG GGA GGC AGC AG -3')和 907R(5'- CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT -3')为引物进行 PCR 扩增。25 μl 的 PCR 反应体系包括:2.5 μl 10× PCR Buffer, 1.5 μl MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L), 2 μl dNTP (25 mmol/L), 1 μl 引物 (10 μmol/L), 0.2 μl (1U) *Taq* 酶, 1 μl DNA 模板, 15.8 μl PCR 水。PCR 反应条件为:94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 34 s, 54℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 30 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。

将每个养殖区 3 个重复样品的 PCR 产物混合,切胶纯化,与 pMD18-T (TaKaRa)载体连接后,转化到大肠杆菌 TOP10 感受态细胞中,构建 16S rDNA 克隆文库。

### 2.4 测序与克隆文库分析

通过“蓝白斑”筛选,每个养殖区随机检出 130 个白色菌落,利用载体通用引物 M13F/M13R 进行菌落的 PCR 筛选,去除假阳性和非目标克隆后,选取 100 个阳性克隆进行测序。

利用 MOTHUR 软件将相似性 97% 的 16S rDNA 序列归为同一个操作分类单元(Operational Taxonomic Units, OTUs),估算每 16S rDNA 克隆文库的丰富度指数 *Chao* 和 *ACE* 和多样性指数 Shannon-Weiner (*H'*)。

覆盖百分率(Coverage, *C*)通过公式  $C = [1 - (n1/N)] \times 100\%$  计算

式中  $n1$  为克隆文库中仅出现一次的 OTU 数目,  $N$  为每个克隆文库的克隆总数。

### 2.5 系统发育分析

序列相似性搜索通过 GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的 Blastx 程序进行,选取相似性最高的序列作为构建系统进化树的参照序列。利用 EBI 的 ClustalW2 程序(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)和 MEGA 4.0 软件,采用 Neighbor-Joining 方法构建系统发育树,进行系统发育分析。

## 3 结果与分析

### 3.1 采样区域的理化性质分析

采样区域沉积环境的理化性质见表 1。上覆水中

表 1 采样站位的理化性质  
Tab.1 Physical and biogeochemical characteristics of the sampling sites

站点 Station	NO <sub>2</sub> -N(μmol/L)		NO <sub>3</sub> -N(μmol/L)		NH <sub>4</sub> -N(μmol/L)		PO <sub>4</sub> -P(μmol/L)		AVS(μmol/g)
	上覆水 Overlying water	间隙水 Pore water							
S10	1.11	0.23	50.00	142.05	3.96	96.31	9.05	103.66	12.625
S1	0.93	6.03	62.14	101.59	11.43	65.29	2.57	78.57	0.784
S2	0.93	0.45	61.07	452.38	7.64	51.28	2.36	4.55	0.088

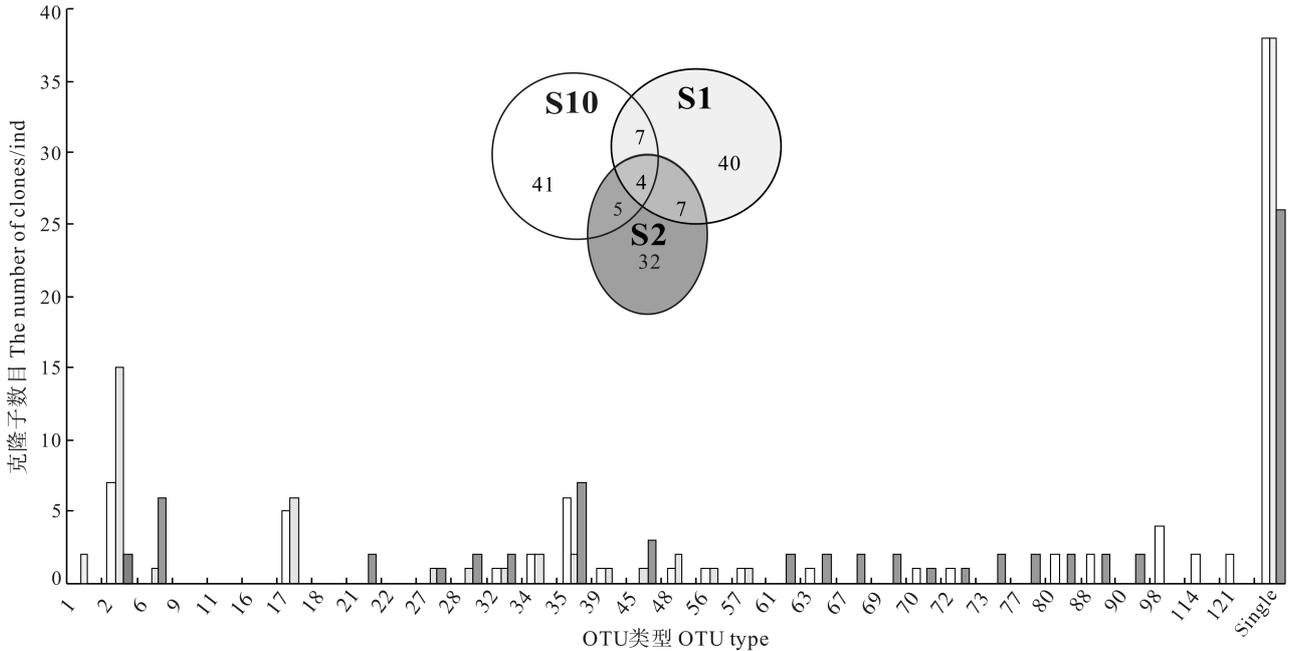


图 1 南沙岛不同养殖区域细菌 16S rDNA 基因克隆文库 OTUs 的分布

Fig.1 OTUs patterns of the 16S rDNA clone libraries from sediments of the Nansha Bay

NO<sub>2</sub>-N 和 NO<sub>3</sub>-N 在 3 个养殖区变化不明显。但在间隙水中，贝类养殖区的 NO<sub>2</sub>-N 明显高于网箱养殖区和藻类养殖区，分别是二者的 26.2 倍和 13.4 倍；藻类养殖区的 NO<sub>3</sub>-N 最高，是网箱养殖区的 3.18 倍，贝类养殖区的 4.45 倍。上覆水 NH<sub>4</sub>-N 含量贝类养殖区最高，网箱养殖区最低；但在间隙水中，网箱养殖区最高，藻类养殖区最低。PO<sub>4</sub>-P 在上覆水和间隙水中表现出相同的变化趋势，均是网箱养殖区最高，藻类养殖区最低，相差 3.83 倍和 22.78 倍。表层沉积物 AVS 含量网箱养殖区最高，分别是贝类养殖区和藻类养殖区的 16.10 倍和 143.47 倍。

### 3.2 16S rDNA 克隆文库分析

3 个养殖区测序 300 个阳性克隆子共获得 240 个有效的 16S rDNA 序列，每个站位 80 个。利用 Mothur 分析软件，将序列相似性 97% 定义为同一 OTU，可将 240 个 16S rDNA 序列归属于 136 个 OTU 类型。

不同养殖区克隆文库的 OTU 类型、分布及包含的克隆子数目如图 1 所示。S10 与 S1 所包含的 OTU 数目和单克隆 OTU 数目类似，分别为 57/38 和 58/38，均高于 S2(48/26)。尽管 3 个养殖区共有的 OTU 类型只有 4 个，但所含克隆子比例却很高，分别为 S10(23.74%)、S1(30%)和 S2(15%)，其中 OTU2 是 S1 的主要优势种群(18.75%)和 S10 的次优势种群(8.75%)，OTU35 是 S1 和 S2 的次优势种群，两者没有主要优势种群。

### 3.3 16S rDNA 克隆文库多样性分析

不同养殖区 OTUs 数目、文库覆盖百分率 *C*、丰富度指数 *Chao* 和 *ACE* 和多样性指数 *H'* 的分析结果见表 2。由表 2 可以看出，*C* 越高，表明文库表达真实环境中 16S rDNA 基因群落结构的置信度越高；相同库容下，*C* 越低，说明真实环境中 16S rDNA 基因群落多样性越高。3 个养殖区 16S rDNA 克隆文库的覆盖百分率均没有达到饱和，表明每个站位 80 个克

表 2 南沙岛沉积物 16S rDNA 克隆文库覆盖百分率、丰富度指数与多样性指数

Tab.2 The calculations of the coverage, richness index and diversity indices of 16S rDNA clone libraries from sediments of the Nansha Bay

Station	16S rDNA clones 数目	OTUs 数目	C(%)	Chao	ACE	H
S10	80	57	28.75	245 (134/415)	739 (542/1015)	3.8 (3.6/4.0)
S1	80	58	27.5	313 (160/495)	330 (166/744)	3.6 (3.5/4.0)
S2	80	48	40	89 (65/149)	174 (125/253)	3.6 (3.4/3.8)

隆子的库容还不能完全反映各养殖区微生物的群落结构组成。S10 与 S1 的  $C$  远远低于 S2, 说明贝类养殖区和网箱养殖区沉积物微生物群落多样性远远高于藻类养殖区。丰富度指数和  $ACE$  分析也表明, 网箱养殖区和贝类养殖区微生物丰富度远高于藻类养殖区,  $Chao$  指数是藻类养殖区的 2.75 和 3.52 倍;  $ACE$  指数是藻类养殖区的 4.25 和 1.90 倍。

### 3.4 16S rDNA 的系统发育分析

将测序所得 16S rDNA 序列在 GenBank 中进行对比, 得到不同站位细菌的分类, 可以看出 S1、S2 和 S10 站位的优势种群均为变形菌门(Proteobacteria), 其克隆数分别占其克隆数的 58%、69%和 65%。拟杆菌门(Bacteroidetes)仅次于变形菌门, 在不同站位沉积物中大量分布, 都占克隆总数的 13%。此外 S1 站点厚壁菌门(Firmicutes)含量也超过 10%, 占克隆总数的 19%, 大于 S2 和 S10 站位 13%(图 2)。

象山港沉积物中微生物还包括绿弯菌(*Chloroflexi*)、放线菌(*Actinobacteria*)、酸杆菌(*Acidobacteria*)、硝化螺旋菌(*Nitrospirae*)、浮霉菌(*Planctomycetes*)、疣微菌(*Verrucomicrobia*), 它们在不同站位中的分布均比较少, 各细菌占总克隆数的比例都小于 10%。

在 GenBank 中选取部分相似性最高的序列与所有 OTU 类型随机序列一起, 利用 ClustalW2 程序和 MEGA 4.0 软件构建系统进化树如图 3a-图 3b 所示。从图 3a-图 3b 可以看出, 象山港不同养殖区沉积物 16S rDNA 细菌系统发育树可以划分为 9 个门类。其中变形菌门为各个站位的优势种群, 包括  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  和  $\epsilon$  亚纲。

$\gamma$ -变形菌亚纲包括 24 个 OTUs, 进化分支为 3 大支, 主要包括 S1 的优势种群 OTU2 和 S2、S10 的次优势种群 OTU17。OTU2 包括 23 个克隆子, 其中 15 个克隆子属于 S1, 2 个克隆子属于 S2, 7 个克隆子属

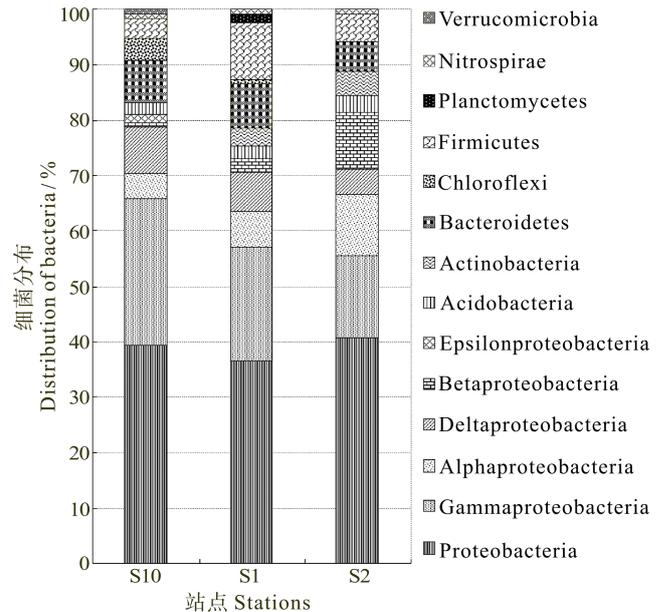


图 2 S1、S2 和 S10 站点细菌分布

Fig.2 Distribution of bacteria at S1, S2 and S10 stations

于 S10, 这些序列与已知的海岸养殖排放废水的假单胞菌 *Pseudomonas* AHJ1(JN834008)相似性较高; OTU17 包括 11 个克隆子, 其中有 6 个克隆子属于 S2, 10 个克隆子属于 S10, 这些序列与大肠杆菌 *Escherichia coli*(HE605049)相似性为 96%。

$\beta$ -变形菌包括 19 个 OTUs, 进化分支为两大支, 主要属于伯克氏菌目(*Burkholderiales*)和红环菌目(*Rhodocyclales*)。包括 S2 的次优势种群 OTU6。OTU6 共有 6 个克隆子, 全部属于 S2 克隆文库, 这些序列与珠江口富营养化水域中的细菌 *Methyloversatilis* sp.(JN177630)具有 97%的相似性。另外还发现 OTU59 与南极冰雪融水里的细菌 *Uncultured Curvibacter* sp.(FJ946584)具有 96%的相似性。不同站位之间细菌数量变化较为明显, 主要聚集在 S2 站点, S1 也稍有分布。

$\alpha$ -变形菌亚纲包括 18 个 OTUs, 进化分支分为 4 个大分支。实验得到 30 个克隆子属于这一类群, 占变形菌门的 19.6%。其中 7 个克隆子(S1: 2; S2: 1; S10: 4)属于红杆菌目(*Rhodobacterales*), 7 个克隆子(S1: 3; S2: 4)属于根瘤菌目(*Rhizobiales*), 8 个克隆子(S1: 1; S2: 4; S10: 7)属于鞘脂单胞菌目(*Sphingomonadales*), 8 个克隆子(S1: 1; S2: 7)属于柄杆菌目(*Caulobacterales*)。

放线菌在 S10 站点没有分布, 大量聚集在 S1 和 S2, 主要属于丙酸杆菌属(*Propionibacterium*)和棒杆菌属(*Corynebacterium*)。硝化螺旋菌只在 S2 有分布, 与 GenBank 登录序列 FJ484473(*Uncultured Nitrospirae* bacterium)有较高的相似率。酸杆菌大量聚集在

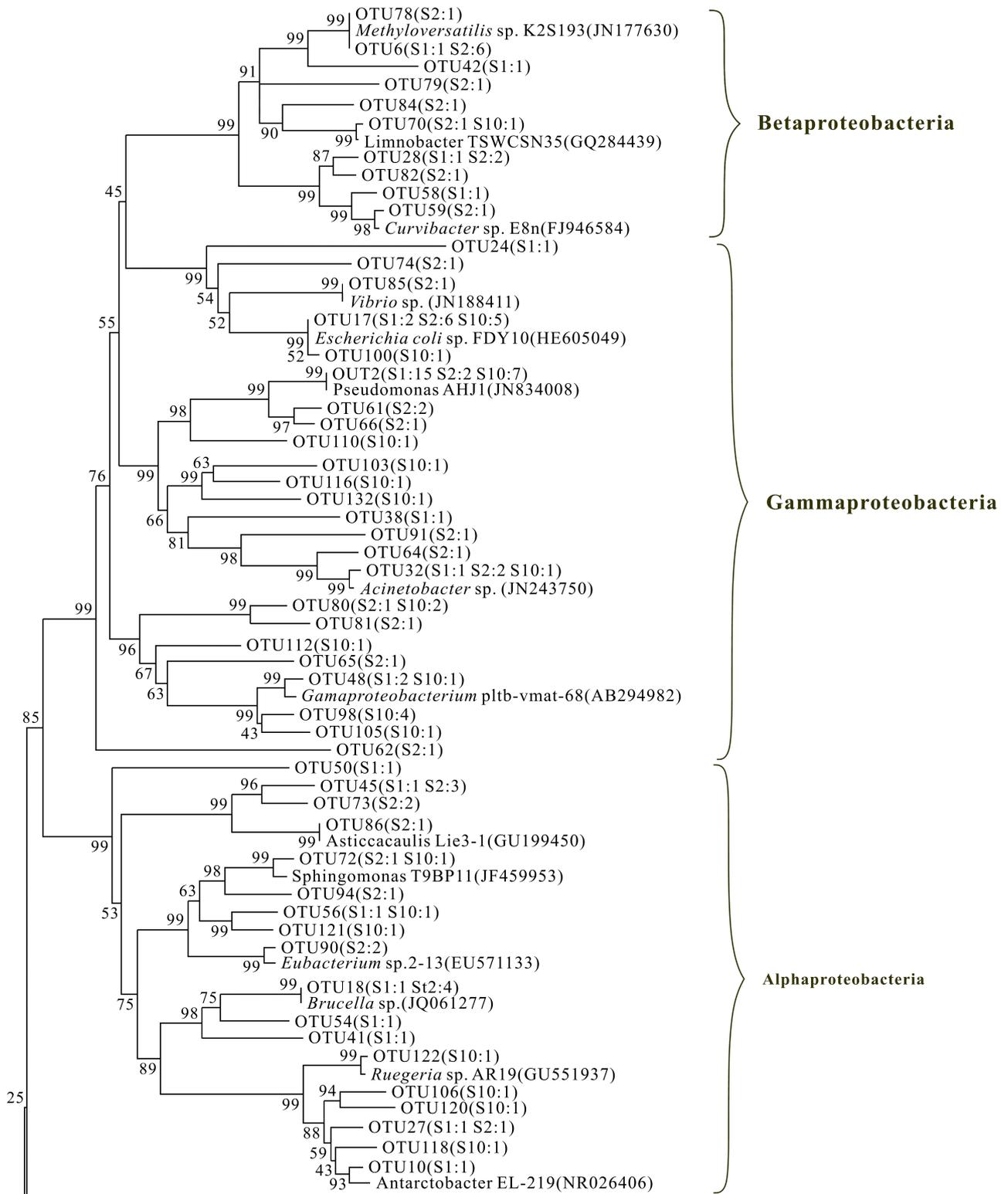


图 3a 南沙岛不同养殖区域细菌 16S rDNA 系统发育分析

Fig.3a Phylogenetic affiliation of 16S rRNA gene fragments at Nansha Bay

S1 和 S10 与 Genbank 登录序列 JF344475 (Uncultured *Acidobacteria* bacterium) 有较高的相似率。拟杆菌门 (Bacteroidetes) 组成, 主要包括 17 个 OTUs, 进化分

支为两个大分支。拟杆菌在不同养殖模式沉积物中的分布相对比较均匀, 主要与 *Cytophaga*(DQ070835)、*Robiginitalea* sp.(FJ872534)和 *Salibacter*(AM712887)聚

在一起。绿弯菌、疣微菌和浮霉菌在各站位的分布较少。

3.5 不同站点克隆文库之间比较

利用 LIBSHUFF 分析方法测定各处理克隆文

库之间的差异, 结果见表 3。从表 3 可以看出, 3 个站点两两比较, S1、S2 站点之间和 S2、S10 站点之间的 16S 克隆文库有显著变化( $P<0.05$ ), 说明 S2 站点 16S 克隆文库与其他站点文库存在显著性差异。S1 和

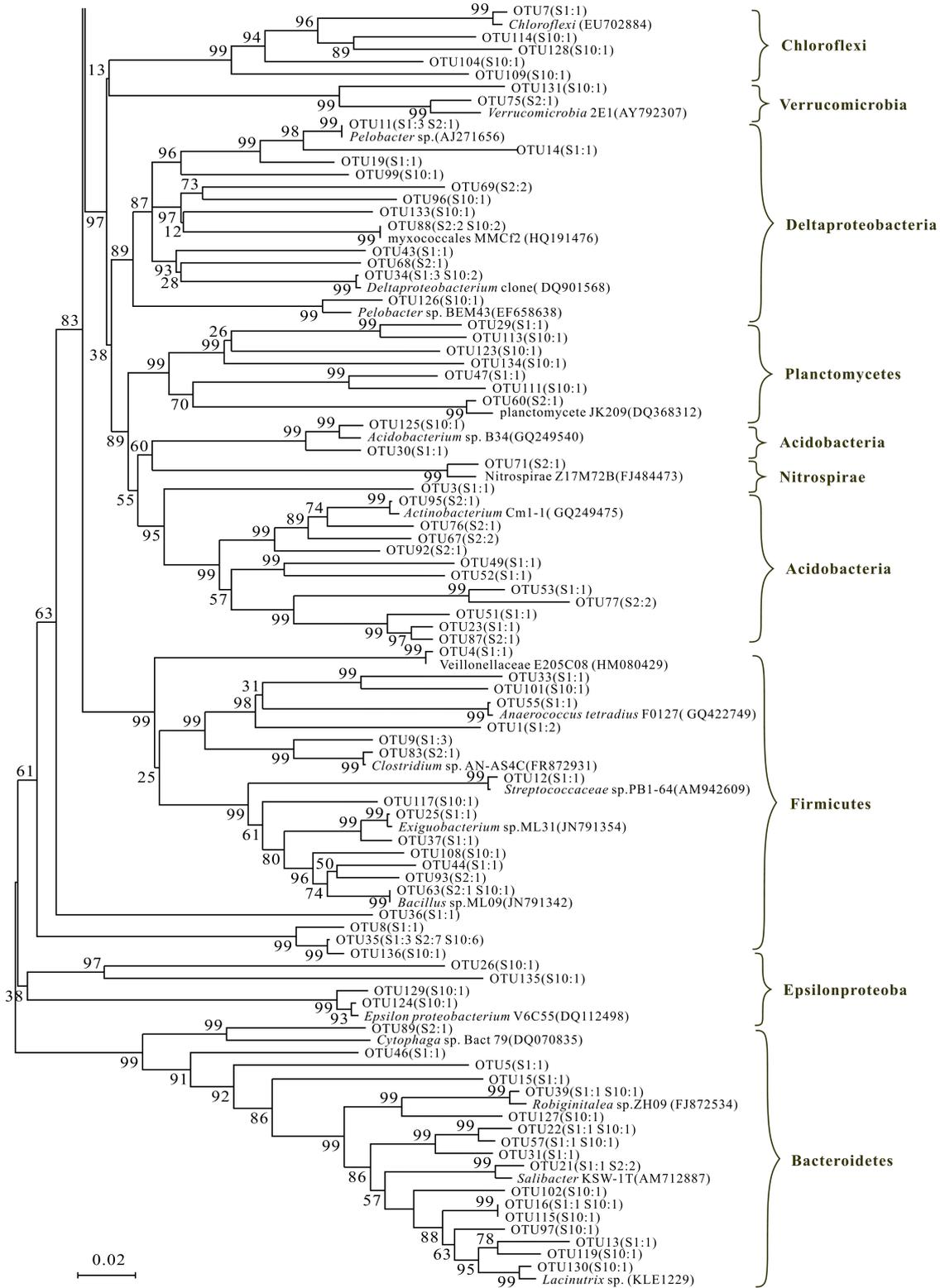


图 3b 南沙岛不同养殖区域细菌 16S rDNA 系统发育分析  
Fig.3b Phylogenetic affiliation of 16S rRNA gene fragments at Nansha Bay

表 3 不同站点 16S 克隆文库组成比较

Tab.3 Pairwise comparisons of phylotype compositions of 16S rDNA libraries

比对 Comparison	显著分析 Significance	比对 Comparison	显著分析 Significance
S1-S2	0.0195	S2-S1	0.0479
S1-S10	0.1953	S10-S1	0.1522
S2-S10	<0.0001	S10-S2	0.0104

S10 站点的 16S 克隆文库没有显著变化( $P>0.05$ ), 说明 S1 和 S10 站点 16S 克隆文库差异不显著。结合多样性分析来看, 养殖的不同类型对微生物的多样性和群落结构产生了显著影响, 网箱养殖微生物多样性较高, 群落结构与贝类养殖区相似, 藻类养殖区的多样性与群落结构与网箱和贝类养殖不同, 微生物多样性较低。

利用 Mouthur 软件进一步对 3 个站点细菌群落结构相似性聚类分析, 通过 16S 基因文库的序列相互比对分析发现 S2 站位不同于其他两个站位(图 4), S1 站位和 S10 站位群落结构相似, 进一步说明 S2(贝类养殖区)细菌群落结构不同于其他站位。

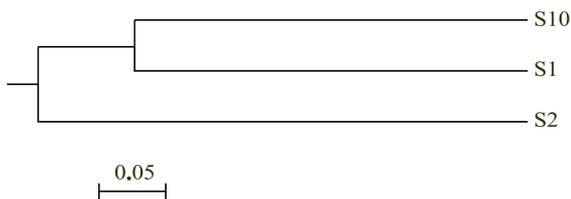


图 4 各个站位沉积物样品的细菌群落结构相似性聚类分析  
Fig.4 Similarity clustering analysis of bacterial community structure of different sites

#### 4 讨论

已有研究表明, 养殖业对环境影响往往会表现为沉积物微生物多样性的改变和群落结构的变化(薛恒平等, 1997; 刘晶晶等, 2006; 刘斌等, 2010)。Caruso 等(2003)研究表明, 鱼类养殖加剧了水体和底泥中微生物的活动, 养殖后水体中异氧细菌数量虽无较大改变, 但沉积物中变化显著, 并且这种影响还波及到远离养殖区的对照点。本研究通过克隆文库的方法对不同养殖区表层沉积物中微生物群落结构进行了对比分析, 研究发现, 系统进化树中 3 个文库的大部分克隆都集中在变形菌(*Proteobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)和厚壁菌门(*Firmicutes*)中, 存在分布差异的种群如绿弯菌门, 疣微菌, 放线菌门和浮霉菌, 它们在各站位的分布较少, 这表明象山港南沙岛不同

养殖区表层沉积物微生物群落结构相似。

16S rDNA 克隆文库分析表明, 优势种群变形菌门 3 个养殖区沉积物中均有分布, 包含 5 个亚纲( $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -和  $\epsilon$ -), 而且随着养殖模式的不同, 包含的克隆数量也不相同。 $\gamma$ -变形菌占网箱养殖区细菌总数的 41%, 大于其他养殖类型中这一比例。其中还在网箱养殖区检测到了大量病原菌贺氏菌属(*Shigella*)与埃希氏菌属(*Escherichia*)的存在, 推测  $\gamma$ -变形菌大量的分布同时伴有病原菌的增殖与网箱养殖区受有机污染较严重有关(La Rosa *et al.*, 2001; 郭芳等, 2006; Castine *et al.*, 2009)。 $\beta$ -变形菌和  $\alpha$ -变形菌亚纲在藻类养殖区大量分布, 而在贝类和网箱养殖区分布较少。 $\beta$ -变形菌纲( $\beta$ -proteobacteria)中 S2 的次优势种群 OTU6 是根瘤菌属(*Rhizobium*), 能够以硝酸盐作为氮源和电子受体进行固氮作用(Brümmer *et al.*, 2003; 侯建军等, 2005)。 $\alpha$ -变形菌门是海洋异养细菌中的一个优势种群, 一般在近海的富营养化海域  $\alpha$ -变形菌纲数量多意味着研究海域的初级生产力较高(Bowman *et al.*, 2003)。大型藻类的生物固氮及光合作用可能是造成这两种种群分布差异的主要因素(Brümmer *et al.*, 2003)。 $\delta$ -变形菌在群落组成中占有很大比重, 分别占贝类、藻类和网箱养殖区细菌总数的 11%、8%和 15%。该细菌属于有机化能营养菌, 多数为硫酸盐还原细菌(SRB), 能够参与硫代谢反应(Mounier *et al.*, 2004; Mantzavrakosa *et al.*, 2007), 厌氧降解很多海洋环境中的有机污染物(Inagaki *et al.*, 2003)。研究结果显示, 网箱养殖区  $\delta$ -变形菌分布较多, 而藻类养殖区分布较少, 这一结果可能与网箱养殖区受硫污染较严重有关。上述结果表现出微生物对不同沉积物环境的适应, 说明虽然 3 种养殖区沉积物中微生物群落结构相似, 但其群落分布存在差异。

网箱养殖区表层沉积物还检测到独特的种群,  $\epsilon$ -变形菌纲克隆在文库中所占比例仅为 5%, 而且只在网箱养殖区出现, 这与 Asami 等(2005)研究的结果一致。 $\epsilon$ -变形菌纲最近被研究认为是一种混合自养性类群, 普遍存在与海洋和陆地生态系统中(Spring *et al.*, 2000), 在生物化学和地质学进程中起到重要的作用, 尤其是在硫循环中, 可以用来指示深海热泉及富含硫的区域(Nakagawa *et al.*, 2003)。结果显示,  $\epsilon$ -变形菌只在网箱养殖区有分布, 可能由于网箱养殖对底质硫化物贡献较大(表1)。值得注意的是, 在南沙岛贝类和网箱养殖区的表层沉积物中还监测到硝化螺旋菌门、疣微菌门和浮霉菌门的细菌, 这些类群广泛分布于海底沉积物及冷泉(Nancy *et al.*, 2007), 是氮循环中重要

的类群(李涛等, 2008), 这一结果可能与网箱养殖区和贝类养殖区氮含量较高有关。

通过对不同养殖区微生物群落多样性分析结果表明, 网箱养殖区(S10)的香浓指数值为 3.8, 高于贝、藻类养殖区, 丰富度指数 *Chao* (245)和 *ACE* (739)远远高于藻类养殖区(S2), 这可能与网箱养殖方式密切相关。网箱养殖多是采取高密度的投饵养殖, 致使得残饵、粪便等在养殖区大量积累, 加速了养殖水域的污染(王肇鼎等, 2003), 污染环境中沉积物微生物群落结构表现为多样性和丰富度指数较高, 这种趋势在以往的研究中也得到过论证(Snaird *et al.*, 1997)。Cetecioglu 等(2009)研究了 Marmara 湾高污染区沉积物环境中的微生物群落结构, 结果显示, 其物种丰富度和多样性要高于其他海域沉积物中的微生物群落。生态系统在中等污染程度下, 微生物丰度会随污染的产生和加重而改变, 这种变化有助于减少物种之间的竞争压力, 对生态系统的稳定有重要的意义(Hunter *et al.*, 2005), 因此不同养殖环境中微生物多样性改变是微生物群落适应环境变化的表现。

## 参 考 文 献

- 王肇鼎, 彭云辉, 孙丽华, 等. 大鹏澳网箱养鱼水体自身污染及富营养化研究. 海洋科学, 2003, 27(2): 77-81
- 过锋, 赵俊, 陈聚法. 胶州湾湿地水体中总氮和总磷的分布及变化特征. 渔业科学进展, 2012, 33(3): 108-114
- 李涛, 王鹏, 汪品先. 南海南部陆坡表层沉积物细菌和古菌多样性. 微生物学报, 2008, 48(3): 323-329
- 刘晶晶, 陈全震, 曾江宁, 等. 海水养殖区微生物生态研究. 浙江海洋学院学报, 2006, 25(1): 72-76
- 刘斌, 陶莹, 党晓霞. 滩涂养殖对海洋生态系统的影响. 创新, 2010, 4(1): 58-60
- 宋金明. 海洋沉积物中的生物种群在生源物质循环中的功能. 海洋科学, 2000, 24(4): 22-26
- 范艳君, 朱玲, 朱伟, 等. 珠江口颗粒附着微生物群落沿环境梯度的演替. 渔业科学进展, 2012, 33(3): 8-14
- 张继红, 方建光, 唐启升, 等. 桑沟湾不同区域养殖栉孔扇贝的固碳速率. 渔业科学进展, 2013, 34(1): 12-16
- 郑天凌, 王斐, 徐美珠. 台湾海峡海域细菌产量、生物量及其在微食物环中的作用. 台湾海峡, 2002, 33(4): 415-423
- 胡文翔. 象山港赤潮调查报告. 海洋环境科学, 1991, 10(4): 77-81
- 郭芳, 黄小平. 海水网箱养殖对近岸环境影响的研究进展. 水产科学, 2006, 25(1): 27-40
- 侯建军, 黄邦钦. 海洋蓝细菌生物固氮的研究进展. 地球科学进展, 2005, 20(3): 312-319
- 薛恒平, 薛彦青. 水产养殖同微生态与微生物生态之间关系初探. 饲料与工业, 1997, 18(2): 23-25
- Asami H, Aida M, Watanabe K. Accelerated sulfur cycle in coastal marine sediment beneath areas of intensive shellfish aquaculture. Appl Environ Microbiol, 2005, 71: 2925-2933
- Bowman J, Mccuaig R. Biodiversity, community structural shifts, and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sediment. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(5): 2463-2483
- Boynton WR, Kemp WM. Nitrogen in the Marine Environment, 2nd Edition. Elsevier Inc., Burlington, Massachusetts. Estuaries, In: Capone DG, Bronk DA, Mulholland MR and Carpenter EJ (ed), 2008, 809-856
- Brümmer IHM, Felske A, Wagner-Döbler I. Diversity and seasonal variability of  $\beta$ -proteobacteria in biofilms of polluted rivers: analysis by temperature gradient gel electrophoresis and cloning. Appl Environ Microbiol, 2003, 69: 4463-4473
- Caruso G, Genovise L, Mancuso M. Effects of fish farming on microbial enzyme activities and densities: comparison between three Mediterranean sites. Lett Appl Microbiol, 2003, 37(4): 324-328
- Castine SA, Bourne DG, Trott LA, *et al.* Sediment microbial community analysis: establishing impacts of aquaculture on a tropical mangrove ecosystem. Aquaculture, 2009, 297(2): 91-98
- Cetecioglu Z, Ince BK, Kolukirik M, *et al.* Biogeographical distribution and diversity of bacterial and archaeal communities within highly polluted anoxic marine sediments from the Marmara Sea. Marine Pollution Bulletin, 2009, 58(3): 384-395
- Hunter-Cevera J, Karl D, Buckley M. Marine Microbial Diversity, the Key to Earth's Habitability. Washington DC: American Academy of Microbiology, 2005, 25: 1-22
- Inagaki F, Takai K, Kobayashi H, *et al.* *Sulfurimonas autotrophica* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing  $\epsilon$ -proteobacterium isolated from hydrothermal sediments in the Mid-Okinawa Trough. Inter J Syst Evol Microbiol, 2003, 53(6): 1801-1805
- La Rosa T, Mirto S, Marino A, *et al.* Heterotrophic bacteria community and pollution indicators of musselfarm impact in the Gulf of Gaeta (Tyrrhenian Sea). Mar Environ Res, 2001, 52(4): 301-321
- Mantzavarakosa E, Kornaros M, Lyberatos G, *et al.* Impacts of a marine fish farm in Argolikos Gulf (Greece) on the water column and the sediment. Desalination, 2007, 210(1-3): 110-124
- Mounier E, Hallet S, Cheneby D, *et al.* Influence of maize mucilage on the diversity and activity of the denitrifying community. Environ Microbiol, 2004, 6: 301-312
- Nakagawa S, Takai K, Inagaki F, *et al.* Distribution, phylogenetic diversity and physiological characteristics of epsilon-Proteobacteria in a deep-sea hydrothermal field. Environ

- Microbiol, 2005, 7: 1619–1632
- Nancy NP, Dale TA, Wayne HP, *et al.* Characterization of the prokaryotic diversity in cold saline perennial springs of the Canadian high Arctic. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(5): 15332–15343
- Snaidr J, Amann R, Huber I, *et al.* Schleifer Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Microbiol*, 1997, 63(7): 2884–2894
- Spring S, Schulze R, Overmann J, *et al.* Identification and characterization of ecologically significant prokaryotes in the sediment of freshwater lakes : molecular and cultivation studies. *FEMS Microbiol*, 2000, 24: 573–590

(编辑 陈严)

## The Structures of Sediment Microbial Communities in Different Mariculture Models at Xiangshan Bay of China

SUN Chao<sup>1,2</sup>, ZHU Ling<sup>1</sup>, MAO Yuze<sup>1</sup>, FAN Yanjun<sup>1</sup>, ZHOU Chunya<sup>1</sup>,  
YANG Aoao<sup>1</sup>, ZHU Wei<sup>2</sup>, ZHUANG Zhimeng<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory for Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Key Laboratory for Fishery Resources and Eco-environment, Shandong Province, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. College of Life Science, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109)

**Abstract** Xiangshan Bay, the biggest marine aquaculture base in Zhejiang Province, is a semi-enclosed bay with slow water exchange rate. In the center of Xiangshan Bay lies Nansha Bay where a variety of mariculture models are applied. To better understand the structures and diversity of sediment microbial communities in different mariculture models, we constructed the 16S rDNA clone library for the analysis of samples from the shellfish culture, the seaweed culture and the fish cage culture. We obtained 136 OTUs from three sampling models that included 58 OTUs from the shellfish culture, 48 from the seaweed culture, and 57 from the fish cage culture. The distribution patterns of OTUs were highly different between the three sampling models which indicated the distinct microbial community structures. The calculation of species richness (Chao), evenness (ACE), and diversity (Shannon) were 245/739/3.8 (fish cage culture), 313/330/3.6 (shellfish culture) and 89/174/3.6 (seaweed culture) respectively. This suggested that the diversity of 16S rDNA gene clone libraries of seaweed culture model was the lowest among all three models. The results of the phylogenetic analysis showed that proteobacteria were the dominant microbes in all sampling models. The microbial community structure of the seaweed culture model differed obviously from those of the shellfish culture and the fish cage culture models. Rhizobium and some photosynthetic bacterial sequences were abundant in the seaweed culture clone library. Moreover, microbes closely related to sediment pollution were found in the fish cage culture model, such as *Shigella*, *Escherichia*, and  $\epsilon$ -Proteobacteria. This implied that the fish cage culture could be the major source of pollution in the sediment of Nansha Bay.

**Key words** Shellfish culture model; Seaweed culture model; Fish cage culture model; Microbial community structure; Xiangshan Bay