中国水产科学 2020 年 4 月, 27(4): 393−405
Journal of Fishery Sciences of China

研究论文

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.19200

温度对拟穴青蟹循环水养殖系统微生物群落结构的影响

罗金飞[1], 廖永岩[2,3], 李书迪[1], 冯国禄[1,4]

1. 桂林理工大学环境科学与工程学院, 广西 桂林 541006;
2. 北部湾大学海洋学院, 广西 钦州 535011;
3. 广西北部湾海洋生物多样性养护重点实验室, 广西 钦州 535011;
4. 北部湾大学资源与环境学院, 广西 钦州 535011

摘要: 为探究温度对拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)循环养殖水体中微生物群落的影响, 深入理解环境因子与养殖水体微生物群落之间的相关性。在水温分别为 18 ℃、22 ℃、26 ℃、30 ℃和 32 ℃的循环养殖系统中进行拟穴青蟹养殖, 采用 16S rRNA 高通量测序技术对不同温度下的养殖水体微生物群落组成进行分析。结果表明: (1) Alpha 多样性指数显示 5 组水样中细菌群落多样性指数大小为 t26>t22>t30>t32>t18, 物种丰度大小为 t22>t26>t32>t30>t18。温度可以导致养殖水体中微生物群落多样性发生变化, 但并未发现二者之间直接的相关性。(2) 5 种温度下的养殖系统中细菌群落共有 31 门、43 纲、94 目、185 科和 351 属, 变形菌门(Proteobacteria)为循环养殖水体中绝对优势菌门。在养殖系统水温为 26 ℃时, 养殖水体中氮磷污染物含量相对较高, 其水中脱氮除磷菌属的相对丰度也显著高于其他 4 组。(3)由花瓣图和 UPGMA 聚类分析图进行相似性分析可知, 水体微生物群落对温度的变化有着良好的响应, 5 组水样的细菌群落结构总体相似性较低, 其中最高温度 32 ℃和最低温度 18 ℃的水体中细菌群落结构最为相似。(4)水体中微生物群落结构和与环境因子的相关性分析显示, 氮磷营养盐中的总磷(TP)和硝酸盐(NO_3^--N)对水中微生物群落特征具有显著性影响, 而温度是导致养殖水体中氮磷营养盐差异化的主要原因。上述研究结果初步解释了温度对拟穴青蟹循环养殖水微生物群落的作用机制, 为下一步深入研究拟穴青蟹循环水养殖系统中环境变化与微生物的相互关系提供参考。

关键词: 温度; 循环水养殖系统; 拟穴青蟹; 细菌群落; 高通量测序
中图分类号: S93 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005−8737−(2020)04−0393−13

青蟹中的拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)具有生长快、体型巨大、适应性强等优点, 因此被广泛作为人工养殖的对象[1]。在传统人工养殖过程中由于个体互相残杀而导致养殖存活率低, 给水产业造成巨大损失。作为工厂化养殖新模式之一的蟹公寓循环水养殖, 可以实现养殖空间高效集约化生产, 养殖过程方便可视, 有效避免青蟹间相互打斗残伤, 提高养殖成活率, 是未来青蟹养殖重要的新模式[2]。

青蟹的存活状态与其养殖环境息息相关, 其中温度是重要的养殖环境因子之一, 过高或者过低温度都会影响其生长代谢等生理活动, 甚至导致其死亡[3-5]。曾媛媛[6]发现过高盐度等环境因子会对拟穴青蟹产生胁迫作用, 导致其由于生理不适而死亡。李书迪等[7]发现 22~30 ℃的温度条件下最利于合浦绒螯蟹(*Eriocheir hepuensis*)的生存。陈琛等[8]研究发现养殖密度会显著影响凡纳滨对虾养殖水体中微生物群落特征。李存玉等[9]研究发现池塘和工厂化养殖条件下牙鲆肠道菌群结构差异与饵料、水环境等有关系。黄诗婷等[10]

收稿日期: 2019-07-07; **修订日期:** 2019-08-22.
基金项目: 国家自然科学基金项目(31360322).
作者简介: 罗金飞(1995–), 男, 硕士研究生, 从事生态环境保护研究. E-mail: mr.luojinfei@foxmail.com
通信作者: 冯国禄, 教授. E-mail: fengguolu8@163.com

通过比较发现 4 个拟穴青蟹养殖池的群落结构与养殖方式与水体营养程度密切相关。以上研究表明，养殖环境因子不仅会影响养殖对象的生理状态，也会改变养殖环境中的微生物群落结构。目前，对拟穴青蟹循环养殖水体的微生物群落结构研究较少，更缺少将环境因子与循环养殖水体微生物群落结构变化相结合的研究。

为探究温度对拟穴青蟹循环水养殖系统微生物群落结构的影响，以拟穴青蟹循环水养殖水体为研究对象，设置 5 组养殖温度梯度，采用高通量测序技术分析了不同温度梯度下循环水体中微生物群落结构特征，探讨了循环养殖水体温度与水中微生物群落结构之间的关系，以期为开展循环水养殖提供重要的微生物信息。

1 材料与方法

1.1 实验系统

在北部湾海洋生物多样性养护重点实验室的循环水养殖系统中进行为期 50 d 的拟穴青蟹养殖实验。养殖系统由蟹盒、生物滤池(混合式生化箱)、臭氧–蛋白质分离器、微滤机、制氧机、溶氧锥、恒温机及自动控制装置 8 大部分组成，循环水养殖系统工艺流程图如图 1 所示。循环水养殖系统水量为 3 m^3，循环水流量为 3 m^3/h。拟穴青蟹由恒生水产养殖专业合作社提供，每个实验组内养殖 320 只拟穴青蟹(一盒放一蟹，分成 4 个平行，每个平行 80 只)，养殖过程中投喂竞雄牌青蟹配合饲料(浙江台州市江南饲料有限公司)。通过添加 $NaHCO_3$ 调节水中 pH 至 7.8±0.3，通过制氧机维持系统溶解氧含量 7 mg/L 左右，通过温控装置，调节水体温度分别至 18 ℃、22 ℃、26 ℃、30 ℃和 32 ℃。

1.2 样品采集及分析

1.2.1 样采集及分析 分别在污水池、清水池、蟹盒各取 300 mL 的水，混合均匀后保存在无菌玻璃瓶中带回实验室分析。5 组温度实验样品编号分别为 t18、t22、t26、t30 和 t32。水质指标包括水温、pH、溶解氧(DO)、氨氮(NH_4^+-N)、亚硝酸盐(NO_2^--N)、硝酸盐(NO_3^--N)、总氮(TN)、磷酸盐(PO_4^{3-}-P)、总磷(TP)等。水温、DO 通过 YSI 溶氧仪现场测定；pH 通过哈纳 pH 计现场测定。氨氮(NH_4^+-N)、亚硝酸盐(NO_2^--N)、硝酸盐(NO_3^--N)、总氮(TN)、磷酸盐(PO_4^{3-}-P)、总磷(TP)均采用德国 SEAL 流动注射分析仪进行检测[11-14]。每个指标均测定 3 个平行样，结果取其平均值。

1.2.2 DNA 提取和测序 取 500 mL 水样经

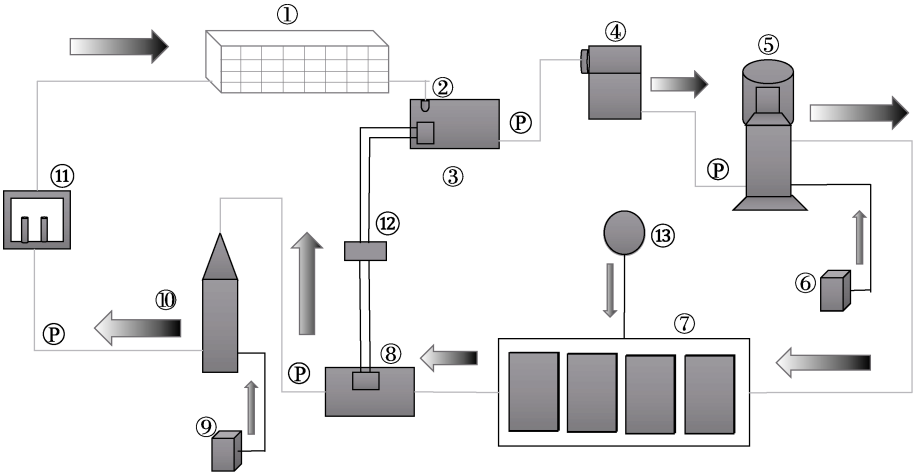

图 1 循环水养殖系统工艺图

1. 蟹盒; 2. 袋式过滤器; 3. 污水池; 4. 转鼓式微滤机; 5. 蛋白质分离器; 6. 臭氧发生器; 7. 生物滤池; 8.清水池; 9. 制氧机; 10. 高效溶氧锥; 11. 恒温机; 12. 控制器; 13. 曝气泵.

Fig. 1 Process flow chart of recirculating aquaculture system

1. aquaculture box; 2. bag filter; 3. sewage tank; 4. micro-screen filter; 5. protein skimmer; 6. ozone generator; 7. biological filter; 8. clean water tank; 9. oxygen making machine; 10. oxygen increasing machine; 11. thermostat unit; 12. controller; 13. aeration pump.

0.22 μm 微孔滤膜过滤, 用水体微生物总 DNA 抽提试剂盒提供的产品使用说明书提取水中微生物基因组 DNA。首先, 采用 CTAB 方法对样本进行 DNA 提取, 然后通过凝胶电泳检测所提区的样本 DNA 纯度和浓度, 之后取适量的样本 DNA 稀释至 1 ng/μL。以稀释后的基因组 DNA 为模板, 根据选择的测序区域, 使用带 Barcode 的特异引物, New England Biolabs 公司的 Phusion®High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer 和高效高保真酶进行 PCR 扩增, 确保扩增效率和准确性, 同时采用回收试剂盒回收产物。用单端测序(single-end)的方法, 构建小片段文库进行单端测序。16S rRNA 高通量测序工作由北京诺禾致源科技股份有限公司完成。

1.2.3　测序数据处理　使用 Cutadapt 先对 reads 进行低质量部分剪切, 再根据 Barcode 从得到的 reads 中拆分出各样品数据, 截去 Barcode 和引物序列初步质控得到原始数据(raw reads)经过以上处理后得到的 Reads 序列通过用 RDP Classifier 软件与 GreenGene 数据库进行物种注释, 去除其中的嵌合体序列, 得到最终的有效数据(clean reads)。

1.2.4　OTU 聚类分析及注释　利用 Uparse 软件对所有样品的全部 Clean Reads 进行聚类, 以 97% 的一致性将序列聚类成为 OTUs (operational taxonomic units), 同时选择 OTUs 中出现频数最高的序列作为代表序列。采用 Mothur 方法与 SSU rRNA 数据库进行物种 OTUs 序列注释分析, 获得分类学信息并统计各样本的群落组成。使用 MUSCLE 软件进行快速多序列比对, 得到所有 OTUs 序列的系统发生关系, 最后以样品中数据量最少的为标准进行均一化处理。

1.2.5　多样性及群落结构分析　根据 OTU 列表中的各样品物种丰度情况, 使用 Qiime 软件计算 Alpha 多样性指数, 并绘制稀释曲线。通过物种相对丰度和丰度聚类热图分析各样品的细菌群落结构, 采用花瓣图和 UPGMA 聚类树研究不同温度样品之间的相似性, 采用 Spearman 相关性热图和冗余分析(RDA)研究循环水体中微生物群落和水体环境因子之间的关系。

2　结果与分析

2.1　循环养殖水体环境性质

养殖用水取自同一批天然弱碱性海水, 过滤后投入循环水养殖系统中。拟穴青蟹养殖实验后, 不同温度下的循环养殖系统水体水质参数如表 1。水体 TN 最高为 t22, 其次为 t26, t18 组最低。在水温为 26 ℃系统中 TP 含量最高, 其次为温度在 22 ℃的条件下, 温度为 18 ℃时, 水样中 TP 含量为 10.173 mg/L, 为所有样品中最低。

表 1　不同温度水体水质参数

Tab. 1　Water quality parameters of different temperatures

mg/L

样品 sample	NH_4^+-N	NO_2^--N	NO_3^--N	PO_4^{3-}-P	TP	TN
t18	0.100	0.022	9.81	1.009	10.173	55.641
t22	0.022	0.069	27.556	2.773	30.671	78.537
t26	0.067	0.124	12.838	9.532	54.965	71.179
t30	0.041	0.157	44.534	4.38	24.345	67.667
t32	0.095	0.037	23.936	1.808	18.777	56.965

2.2　不同温度循环水养殖系统细菌群落多样性分析

各样品有效序列数均在 46000 以上, 平均长度为 430 bp, 其中 t18、t22、t26、t30 和 t32 样品中包含的 OTU 数目分别为 370、556、443、381 和 412。将所有样本的序列数据量随机统一抽取至 46378 条, 绘制相应的 OTU 数绘制稀释曲线, 结果显示各样品的稀释曲线均随序列数量的增加而逐渐趋于平缓(图 2), 说明测序数据量渐进合理,

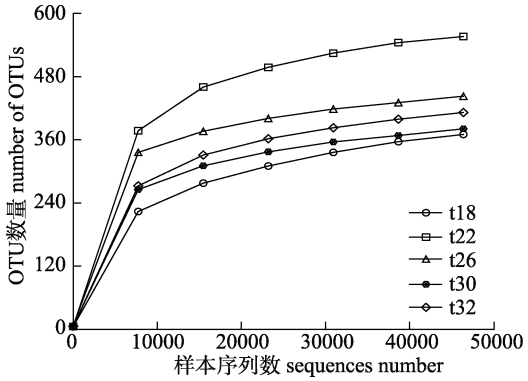

图 2　高通量测序稀释曲线

Fig. 2　The rarefaction curves of high-throughput sequencing results

测序结果能较好地反映不同温度下养殖水体中细菌的物种多样性。

Goods_coverage 指数表明此次高通量测序深度都在 99%以上，表明水样中微生物基因被检测出的概率很高。t22 组水样中 OTU 数目最多，为 556 个，t18 组最少，为 370 个(表 2)。ACE 说明 22 ℃和 26 ℃下的系统中微生物的物种数目明显高于 18 ℃、30 ℃、32 ℃条件下，observed-species 也印证了该结果的准确性。Shannon 指数可以反映样品丰度和均匀度，值越大表示该样品中微生物物种越丰富，各物种分配越均匀，t26 组的 Shannon 指数最高，结合 observed-species、Chao1 和 ACE 指数可知 22 ℃下系统中的微生物物种丰富度虽然高，但均匀程度低于 26 ℃条件下。Simpson 显示在 26 ℃的循环养殖系统中，微生物群落多样性最高，其次是 22 ℃下的水样，18 ℃的水样中微生物群落多样性最低。

表 2 养殖水体细菌 16S rRNA 序列及多样性指数
Tab. 2 Bacterial 16S rRNA sequence and diversity index in aquaculture water

样品 sample	检测种类 observed-species	Shannon	Simpson	Chao1	ACE	Goods_coverage
t18	370	3.244	0.734	461.737	442.042	0.998
t22	556	4.706	0.864	586.09	590.124	0.999
t26	443	6.063	0.937	504.091	512.574	0.999
t30	381	3.831	0.782	446.029	448.145	0.999
t32	412	3.910	0.775	454.059	459.875	0.999

2.3 不同温度循环水养殖系统细菌群落组成分析

不同温度条件下的养殖水体微生物群落结构组成相似，但各种微生物所占比例有一定的差异。样本中微生物群落在门分类水平上的分布如表 3 所示，样品中微生物主要隶属于 10 个门，变形菌门(Proteobacteria)在循环养殖水体中占有最大的丰度，平均比例为 86.84%。其他菌门分别为拟杆菌门(Bacteroidetes，2.40%~15.96%)、放线菌门(Actinobacteria，0.35%~3.92%)、浮霉菌门(Planctomycetes, 0.12%~2.2%)、梭杆菌门(Fusobacteria, 0.01%~0.68%)、厚壁菌门(Firmicutes，0.33%~3.26%)、蓝藻门(Cyanobacteria, 0.10%~0.66%)、硝化螺旋菌门(Nitrospira，0.01%~0.51%)、疣微菌门(Verrucomicrobia，0.03%~0.64%)以及少量分类不明确的细菌类群，其组成分布情况与前人研究结果[15-19]相类似。各组水样中变形菌门的相对丰度高低为 t30>t32>t18>t22>t26，拟杆菌门的相对丰度高低为 t26>t22>t32>t18>t30，放线菌门的相对丰度高低为 t22>t18>t32 >t30>t26，厚壁菌门的相对丰度高低为 t22>t26>t18>t30>t32，硝化螺旋菌门的相对丰度高低为 t26>t32>t18>t22>t30。微生物种类不同，其生长繁殖时对温度的需求也不同，在循环养殖水体中，不同的菌属对不同温度的响应程度不同。

表 3 不同温度下优势细菌类群 OTU 所占比例
Tab. 3 The proportion of OTU of dominant bacterial groups at different temperatures

%

菌种 strain	t18	t22	t26	t30	t32
变形菌门 Proteobacteria	92.80	82.17	72.48	93.46	93.29
拟杆菌门 Bacteroidetes	2.64	7.57	15.96	2.40	3.05
放线菌门 Actinobacteria	0.94	3.92	0.35	0.38	0.53
厚壁菌门 Firmicutes	0.67	3.26	3.09	0.59	0.33
浮霉菌门 Planctomycetes	0.45	0.59	2.2	0.12	0.41
梭杆菌门 Fusobacteria	0.01	0.12	0.68	0.03	0.01
蓝藻门 Cyanobacteria	0.61	0.14	0.1	0.66	0.42
疣微菌门 Verrucomicrobia	0.03	0.64	0.31	0.04	0.04
硝化螺旋菌门 Nitrospirae	0.06	0.02	0.51	0.01	0.09
unidentified bacteria	0.50	0.41	2.24	0.25	0.06

水产养殖过程中，养殖动物会排泄和分泌大量的氮磷物质，导致养殖水体恶化，威胁养殖动物的健康生长，严重时甚至造成其死亡，所以养殖废水中的氮磷营养性成分的去除转化是循环养殖水处理的重点。循环养殖系统中主要依靠脱氮除磷微生物降解和转化水中的氮磷污染物，因此分析微生物群落中脱氮除磷微生物的变化，对了解温度对拟穴青蟹循环水养殖系统微生物群落结构的影响十分重要。

对循环养殖水体中优势菌属进行统计分析，发现在水样的 40 种优势菌属中具有脱氮除磷功能的微生物有 7 种(表 4)。所有样本中均有鞘脂单胞菌属(*Sphingomonas*)和浮游球衣菌属(*Sphaerotilus*)

表 4　样品中优势功能菌分布特征

Tab. 4　Characteristics of dominant and functional bacteria in the samples

%

菌种 strain	主要作用 main function	所占比例 relative percentage					
		t18	t22	t26	t30	t32	合计 total
鞘脂单胞菌属 *Sphingomonas*	维护养殖生态系统稳定[20]	6.11	39.58	0.02	9.15	11.85	66.70
浮游球衣菌属 *Sphaerotilus*	吸收有机氮[21]	0.11	0.65	0.00	0.10	0.03	0.88
假单胞菌属 *Pseudomonas*	异养硝化–好氧反硝化菌[22], 反硝化聚磷菌[23-24]	0.12	0.25	0.65	0.35	0.15	1.52
希瓦氏菌属 *Shewanella*	参与除磷[25]	0.03	0.03	0.63	0.12	0.01	0.82
不动杆菌属 *Acinetobacter*	异养硝化–好氧反硝化菌[22], 反硝化聚磷菌[23-24]	0.17	0.02	1.90	0.05	0.12	2.26
黄杆菌属 *Flavobacterium*	好氧反硝化菌[23, 26]	0.60	0.29	3.33	0.27	0.38	4.86
假交替单胞菌属 *Pseudoalteromonas*	反硝化菌[21]	0.00	0.02	0.75	0.00	0.01	0.78
副球菌属 *Paracoccus*	异养硝化–好氧反硝化菌[27]	0.03	0.01	0.93	0.01	0.01	0.98
寡养单胞菌 *Stenotrophomonas*	还原硝酸盐[27]	56.12	0.49	1.50	65.10	54.06	177.27

的存在, 鞘脂单胞菌属具有维护养殖生态系统稳定的作用, 浮游球衣菌属可以吸收有机氮, 降低水体中有机物质。所有水体样本中都存在的异养硝化–好氧反硝化菌有假单胞菌属(*Pseudomonas*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)和副球菌属(*Paracoccus*), 说明循环养殖系统中存在着好氧反硝化的过程, 在好氧条件下的主要产物是 N_2O, 也可将氨氮在好氧条件下转化成气态产物。在该循环养殖水体中常见的反硝化菌属有黄杆菌属(*Flavobacterium*)、假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*), 这类菌有着脱氮作用, 可以将硝酸盐(NO_3^--N)中的氮(N)通过一系列中间产物(NO_2^--N、NO、N_2O)还原为 N_2, 还有着可以还原硝酸盐的寡养单胞菌(*Stenotrophomonas*)。养殖系统中参与磷转化和循环的菌属主要有假单孢菌属和希瓦氏菌属(*Shewanella*)。当水温为 26 ℃时, 脱氮除磷微生物所占比重明显高于其余 4 组, 这可能与此时拟穴青蟹生理代谢旺盛导致养殖系统中氮磷的含量高有关。

选取每组样品中前 35 个属, 从物种和样本两个层面进行聚类, 构建了物种丰度聚类图(图 3), 便于展示不同物种在不同温度样品中的聚集程度。对 5 个温度条件下的功能菌属丰度热图进行分析发现, 相对丰度排名前 35 的属都属于放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、蓝藻门(Cyanobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、梭杆菌门(Fusobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)以及 unidentified_Bacteria 这 7 门。在温度为 22 ℃的条件下, 乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)、鞘脂单胞菌属(*Sphingomonas*)、浮游球衣菌属(*Sphaerotilus*)、雷氏菌属(*Ralstonia*)、摩根菌属(*Morganella*)、副杆状菌属(*Parabacteroides*)和红球菌属(*Rhodococcus*)等 8 个属相对丰度较高。当养殖循环水温度为 26 ℃时, 属水平相对丰度较高的有假单胞菌属(*Pseudomonas*)、假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)、希瓦氏菌属(*Shewanella*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、交替赤杆菌属(*Altererythrobacter*)、副球菌属(*Paracoccus*)等 22 个属。当温度为 30 ℃时, 短波单胞菌属(*Brevundimonas*)、寡养单胞菌(*Stenotrophomonas*)和 unidentified *cyanobacteria* 属 3 个属相对丰度较高, 说明不同的菌属对不同温度的响应程度不同。

2.4　不同温度循环水养殖系统细菌群落相似性分析

为了更加直观地表现不同温度条件下, 循环养殖水体样品中 OTU 数目组成的相似性及重叠情况, 采用花瓣图的形式对 OTUs 聚类分析结果进行展示(图 4)。在循环水养殖系统中, 18 ℃与 22 ℃的条件下共有的 OTU 为 146, 22 ℃与 26 ℃的温度下共有的 OTU 为 151, 26 ℃与 30 ℃的温度下共有的 OUT 数为 79, 30 ℃与 32 ℃下共有的 OUT 数为 162, 在 18 ℃、22 ℃、26 ℃、30 ℃和

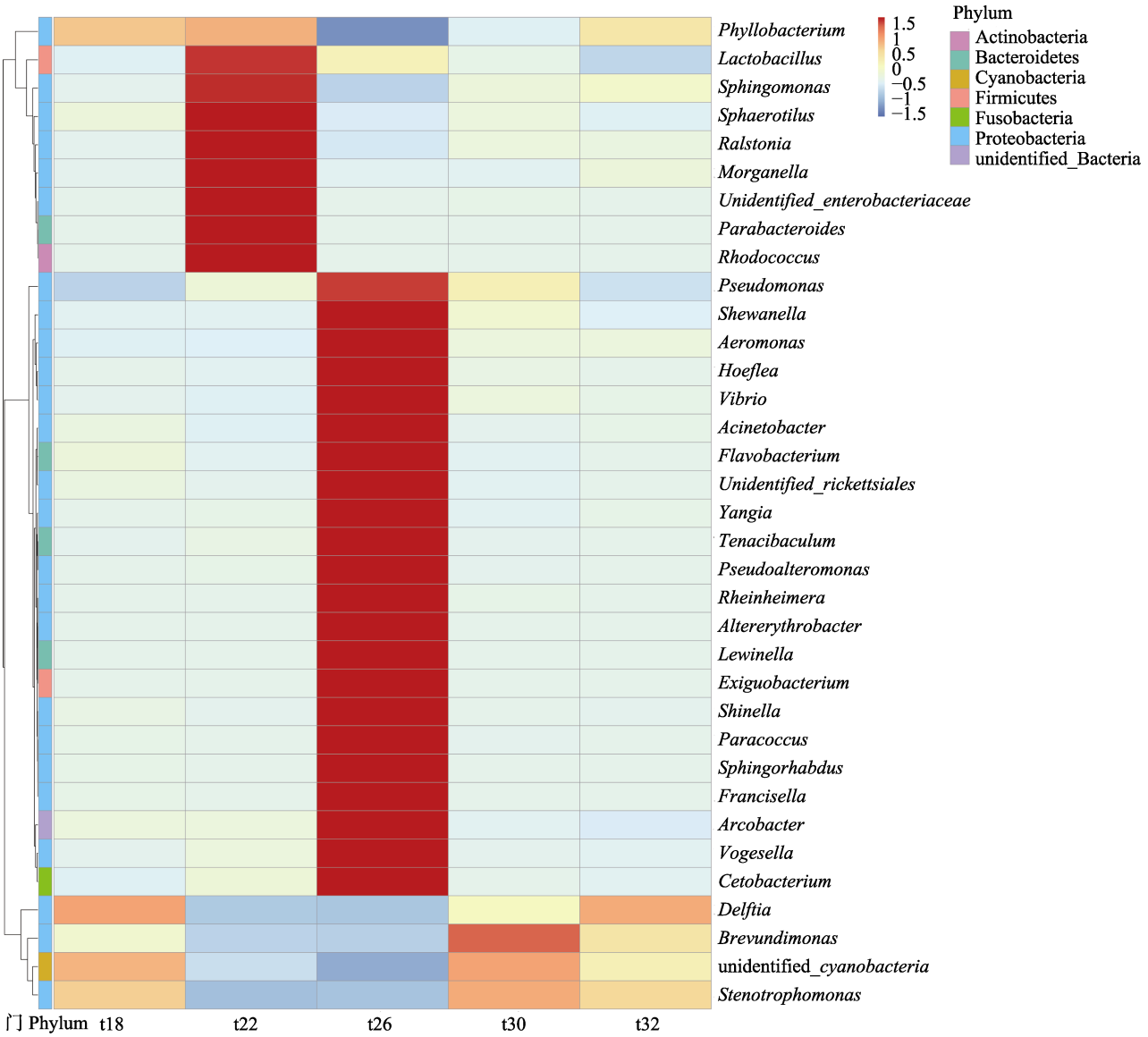

图 3 各水样优势细菌物种丰度热图

Fig. 3 Heatmap of the dominant bacteria in water samples

32 ℃。5 个温度下其共有 OTU 为 38，占总 OTU 数的 2.62%，说明不同温度条件下循环养殖水体中的微生物群落结构相似性比较低，温度对循环养殖水体中微生物群落多样性有显著影响，但是通过直接作用还是间接作用的方式导致微生物群落多样性发生变化还有待进一步探究。

为了进一步对 5 个温度梯度下的循环养殖水体微生物群落相似性进行分析，以 weighted unifrac 距离矩阵做 UPGMA 聚类分析，并将聚类结果与各样本在门水平上的物种相对丰度整合，结果如图 5 所示，在拟穴青蟹循环水养殖系统中，18 ℃和 32 ℃的水体中微生物群落结构相似度最高，18 ℃、30 ℃和 32 ℃的微生物群落结构相似度较高，22 ℃、26 ℃与其他 3 组的微生物群落结构相似度较低，说明在拟穴青蟹的生存温度范围内，水温对水环境中微生物群落结构的直接影响较小，可能温度主要是通过间接影响拟穴青蟹生理状态，造成拟穴青蟹生理代谢不正常，从而导致水中营养盐等水质参数差异化，因此水中微生物群落结构与温度梯度的直接相关性较弱。

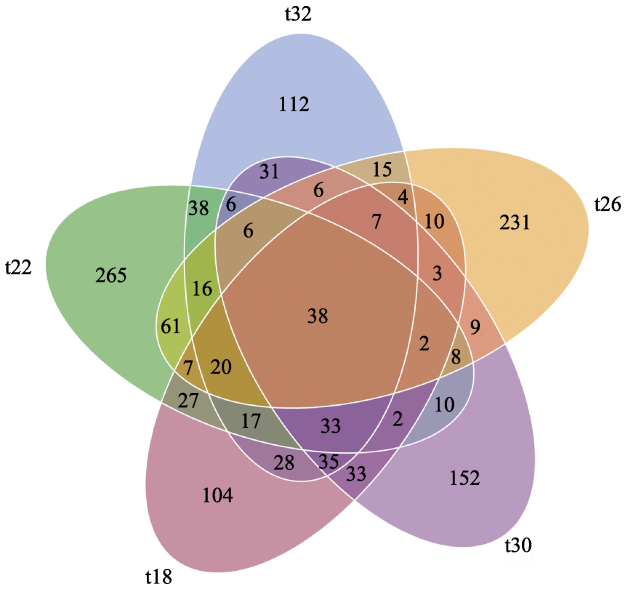

图 4　OTUs 聚类分析花瓣图

Fig. 4　Petal diagram of OTUs cluster analysis

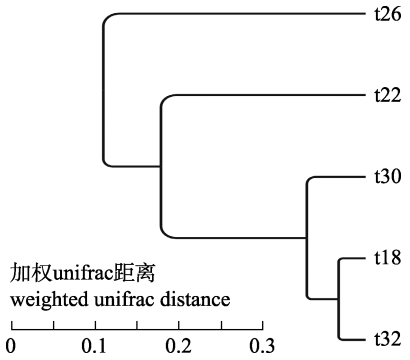

图 5　微生物群落聚类分析

Fig. 5　Cluster analysis of microbial communities

2.5　养殖水体细菌群落与环境因子的相关性分析

水温能够影响水中氮磷的浓度及其存在的形态，可以反映样本与水体氮磷等环境因子之间关系的 RDA 分析如图 6 所示，t18 组、t30 组和 t32 组与 NH_4^+-N 呈显著正相关，t22 组与 NO_2^--N、NO_3^--N、TN 呈显著正相关，t26 组与 TP、PO_4^{3-}-P 呈显著正相关。对养殖水体中的营养盐环境因子与样品进行相关性分析，发现样品分布受营养盐环境因子的影响从大到小依次为 TN、PO_4^{3-}-P、NO_3^--N、NH_4^+-N、TP 以及 NO_2^--N，说明养殖水体中氮磷等环境因子与水温的相关性显著，温度可能主要是通过营养盐改变水中微生物群落结构。

在一个生态系统中的微生物群落结构既与生物因素的息息相关，也和环境因子等非生物因素

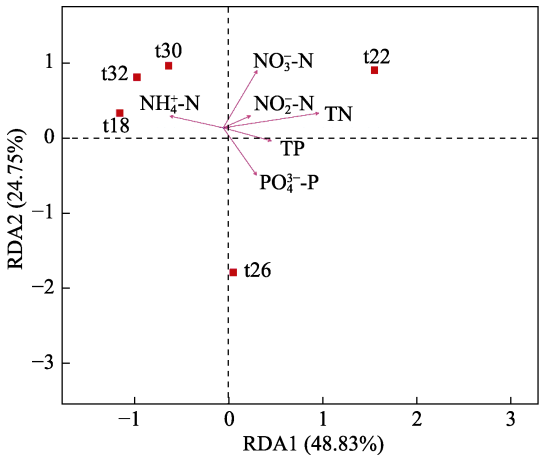

图 6　水体环境因子的 RDA 分析

Fig. 6　RDA analysis of physical and chemical factors of water

密不可分，两者共同作用，维护整个系统的生态平衡。为了解氮磷等营养盐环境因子与循环水体中微生物丰度之间的相关关系，选取水样中丰度前 35 个菌属制作 Spearman 相关性热图，结果如图 7 所示。雷氏菌属、鞘脂单胞菌属与 TP 显著正相关，弗朗西斯菌属(*Francisella*)、不动杆菌属、申氏杆菌属(*Shinella*)、黄杆菌属与 TP 显著负相关。黄杆菌属与 NO_3^--N 呈显著负相关，这与黄杆菌属具有好氧反硝化功能相互验证。希瓦氏菌属由于参与养殖系统中磷的去除，因此表现为随 TP 的降低而升高。具有好氧反硝化作用的副球菌属、黄杆菌属和不动杆菌属，与水中 NH_4^+-N 的浓度呈正相关，但与 TN、NO_3^--N、NO_2^--N 表现为负相关，这可能与水中溶解氧含量较高，好氧反硝化菌属发挥自身的功能作用，直接将铵态氮转化为气态产物，避免了 NO_3^--N、NO_2^--N 的产生有关。

3　讨论

3.1　温度对循环养殖水体微生物群落多样性的影响

采用高通量测序技术对 5 个温度条件下的循环养殖水体样品进行测序，共产生 1450 条 OTU，获得循环养殖水细菌群落 31 门、43 纲、94 目、185 科、351 属，稀释曲线最终趋于平缓，说明此次测序得到了样本中微生物的基因数据充足，其结果可以有效地反映研究水中微生物群落的组成，菌群丰度指数 ACE 的变化特征与 OTUs 变化特征

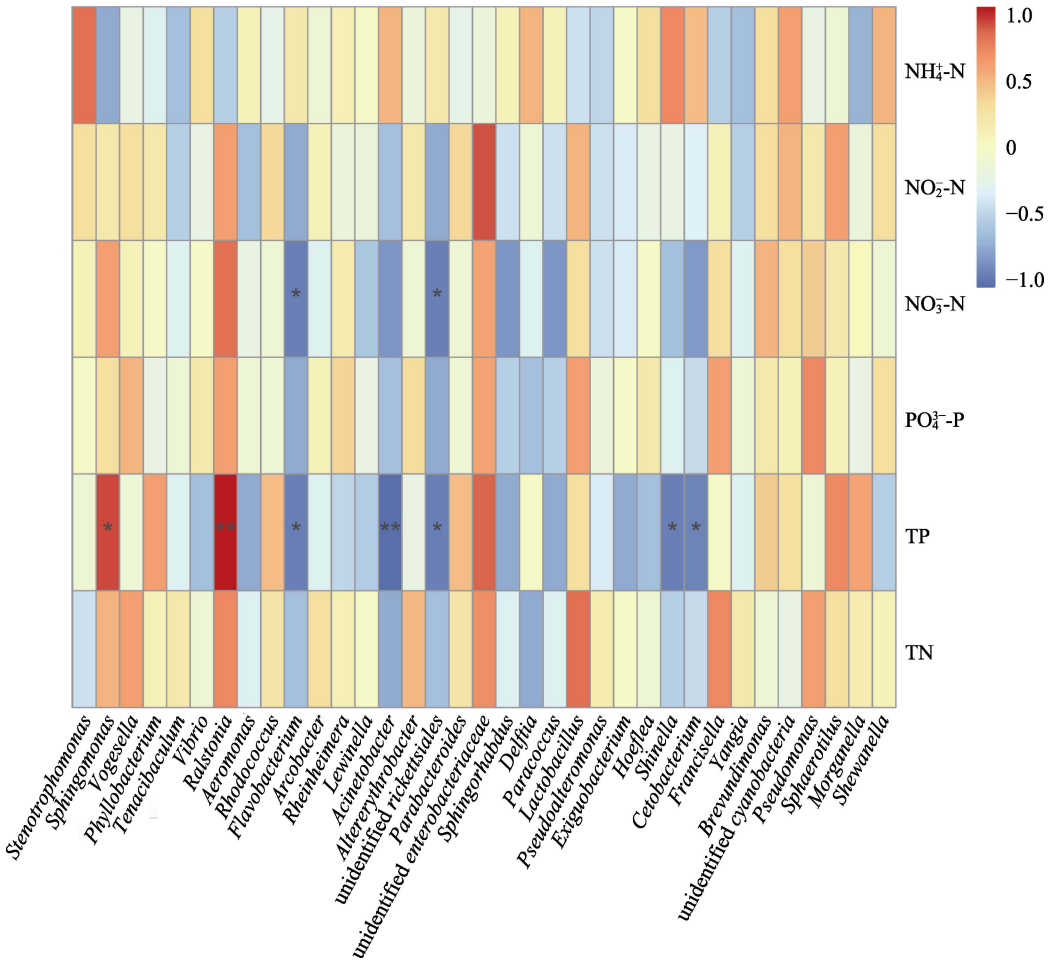

图 7 Spearman 相关性热图

*: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

Fig. 7 Spearman correlation heatmap

*: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

相同，菌群多样性指数中的 Shannon 和 Simpson 也具有相同的变化特征，其结果相互印证。曾涛涛等[28]对不同温度的除铀厌氧微生物群落结构特征进行解析，发现 35 ℃条件下细菌的种类较多。孙雪姣[29]研究发现在 0 ℃下的巴氏杀菌乳中细菌菌落多样性保持较好，其余温度下的样品中细菌菌落多样性向单一方向进行转变。陈梦齐等[30]发现象山港电厂温排水中部分 γ-变形菌群丰度与水温呈正相关。温度会影响微生物的活性，过高或过低的温度会使微生物群落丰度和多样性会显著减小，此次研究发现在循环养殖水体中 22 ℃下物种丰度最高，26 ℃下微生物种群落多样性和均匀度最高。

3.2 温度对循环养殖水体微生物群落组成的影响

根据所有样品在门和属水平的优势菌群组成分布特征显示，变形菌门是拟穴青蟹循环水养殖系统中最丰富的微生物群落，这可能与养殖用水为海水有关，有研究表明变形菌门是海洋环境和海洋沉积物中的主要菌群[31-32]。Martins 等[33]研究发现变形菌门是多宝鱼和塞纳加尔鳎循环水养殖水体中的优势菌群。吴越等[34]发现变形菌门是石斑鱼循环养殖水体中的最优势菌群。在拟穴青蟹循环水养殖系统中，变形菌门和拟杆菌门共占据循环养殖系统中细菌群落的 95%以上，其余所有菌门共占 5%左右，这一现象印证了生态学中关于群落结构最经典的物种多度分布模式[35]。

环境微生物的群落结构特征与微生物所处的各种环境因素之间有着良好的响应机制，两者紧密相关。由于养殖系统中的氮磷含量超标会对养殖对象造成毒害作用，所以分析养殖水体中脱氮

除磷菌属对研究拟穴青蟹循环水养殖系统微生物群落结变化具有代表性的作用。在 t26 组属水平相对丰度较高是具有脱氮除磷作用的菌属, 而且其物种丰富度也明显高于其余 4 组, 原因其一可能是 26 ℃下是拟穴青蟹的比较适合的生长发育温度, 其生长代谢比较比较旺盛, 导致养殖系统中氮磷排泄废物等对微生物生长比较有利的营养物质含量较高, 促进其相关菌属大量生长繁殖, 进而快速降解水中污染物, 构成良好的物质循环和能量流动; 其二可能是温度为 26 ℃比较有利于假单孢菌属、不动杆菌属和副球菌属等脱氮除磷微生物繁殖。温度通过自身和调节系统中细菌的营养物质含量从而影响微生物群落组成, 温度的不同会导致养殖对象的生理状态的不同, 使养殖系统中细菌营养物质出现差异性, 进而造成水样中细菌群落组成的不同。因此在进行拟穴青蟹循环水养殖时, 从微生物的角度出发, 养殖水温的设置应该综合考虑循环水养殖系统的稳定性和青蟹的生理代谢。

3.3　温度对循环养殖水体微生物群落结构相似性的影响

在不同温度下的循环养殖水体中, 微生物有着显著的差别。为了进一步了解是温度直接造成的群落结构差异, 还是由温度造成的营养盐等环境因子差异而导致的微生物群落结构组成不同, 对循环养殖水样进行相似性分析。从花瓣图可以看出, 尽管 5 组温度梯度差值相差不大, 但其 OTU 数目的相似性及重叠情况并不高, 共有 OTU 仅仅占总 OTU 数的 2.62%, 这表明温度一定程度上会显著影响水体中微生物群落多样性, 这与大量研究水体细菌群落多样性的结果相似。沈烽等[36]研究发现温度对南京玄武湖的细菌群落影响最显著。张雅洁等[37]研究发现北海湖水体中夏季和秋季细菌的物种多样性高, 造成这一现象的原因可能是冬季和春季水温低, 而温度则会显著影响水体中微生物的生长繁殖。由 UPGMA 聚类分析图可知, 温度对微生物群落多样性的影响并不是呈梯度性的, t18 和 t32 样品组的群落多样性相似度较高, 这说明营养盐等环境因子对养殖系统中微生物群落的影响比温度本身直接作用的影响系数大。当温度过高或者过低时, 都不利于保持养殖水体微生物群落多样性, 温度主要是通过影响养殖水体中氮磷营养盐等环境因子, 导致养殖循环水样中微生物群落多样性出现差异化。

3.4　环境因子对循环养殖水体微生物群落结构的影响

有研究表明, 循环水养殖池塘中营养盐是影响水体微生物群落的主要因素[38]。根据养殖水体微生物群落结构相似性分析发现, 循环养殖系统中营养盐等环境因子代替温度成为直接影响养殖系统微生物群落组成的主要因子。通过 RDA 分析发现, NH_4^+-N 在温度分别为 18 ℃、30 ℃、32 ℃的养殖系统中降解较慢, NO_2^--N、NO_3^--N 则在 22 ℃下不易被降解转化, 不同温度会导致水样中不同种类的污染物降解转化速率不同。温度过高或过低都会显著影响水体中 NH_4^+-N 和 NO_2^--N 的转化降解, 导致水体中 NH_4^+-N 和 NO_2^--N 含量过高, NH_4^+-N 过高可能会引起养殖动物氨中毒, NO_2^--N 含量过高则会导致水产养殖动物机体缺氧而死亡[39-40]。RDA 图反映了养殖循环水的氮磷相关营养盐水平与温度样本分布有密切关联, 说明温度会显著影响水体中氮磷的降解转化。

由于微生物自身的生物特性, 当微生物种类的不同, 其对环境因子的响应程度也不同。雷氏菌属和鞘脂单胞菌属的数目会随着水体中 TP 的含量升高而显著增加, 弗朗西斯菌属和申氏杆菌属等菌属则会随着 TP 浓度的增加而显著减少。黄杆菌属在好氧条件下具有反硝化作用, 能够降低水中的 NO_3^--N 含量, 因此表现为与水中 NO_3^--N 浓度成显著负相关。由于在循环水养殖系统中溶解氧含量很高, 因此不动杆菌属进行反硝化反应和好氧聚磷反应, 表现为与 TP 呈非常显著的负相关关系。希瓦氏菌属由于其除磷特性而与 TP 呈负相关关系。异养硝化–好氧反硝化菌属中的副球菌属和不动杆菌属由于其反硝化作用, 因此与 NH_4^+-N 的浓度呈正相关, 但与 TN、NO_3^--N、NO_2^--N 的关系表现为负相关。在生态系统对污染物的承载范围内, 系统中污染物的种类和含量与水中微生物丰度和多样性密切相关, 既相互促进, 同时也相互制约, 直至达到动态平衡。王欢等[41]发现

水温、酸碱度和总磷等环境因子是改变碧流河水库中微生物群落结构的主要因素。施瑶等[42]研究发现添加磷会显著改变对内蒙古草原土壤的微生物群落结构特征。陈兆进等[43]研究发现温度、pH 等不同环境因子对丹江口水库中不同的微生物群落影响程度不同。Chrzanowski 等[44]发现氮、磷等营养物质可以显著增加细菌的多样性。

在不同温度条件的拟穴青蟹循环水养殖系统中，导致微生物群落结构不同的主要原因是养殖水体中氮磷营养盐含量的不同，进而造成水中微生物群落结构差异化。该研究初步解释了温度对拟穴青蟹循环养殖水体中微生物群落结构的作用机理，为循环水养殖拟穴青蟹提供了重要的微生物学数据。

4 结论

在不同温度下开展循环水养殖拟穴青蟹实验，对养殖水体细菌群落采用高通量测序技术，进行测序深度在 99%以上的检测，分析温度与水体细菌群落的相关性。

(1) 5 种温度下的拟穴青蟹循环养殖系统中细菌群落共有 31 门、43 纲、94 目、185 科、351 属，其中 Alpha 多样性指数(ACE 指数、Chao1、Shannon、Simpson)的 ACE 指数及 OTU 数显示不同样品中物种丰度大小为 t22>t26>t32>t30>t18，Shannon、Simpson 指数表明水样中细菌的多样性多少为 t26>t22>t30>t32>t18。

(2) 养殖系统中门水平微生物主要由变形菌门、拟杆菌门、放线菌门、厚壁菌门、浮霉菌门、硝化螺旋菌门、梭杆菌门、疣微菌门和蓝藻门组成，变形菌门为 5 组水样共同的绝对优势菌属门。另外，在温度为 26 ℃的循环养殖水体中微生物物种丰富度最高，具有脱氮除磷效果的菌属也最多。

(3) 温度对养殖水体微生物群落结构产生显著性影响，导致 5 组水样之间相似度较低，其中 18 ℃和 32 ℃的养殖水体中微生物群落结构最为相似。

(4) 温度会造成养殖水体中氮磷等环境因子差异化，氮磷环境因子中的 TP 与养殖水体中雷氏菌属和鞘脂单胞菌属呈显著正相关，弗朗西斯菌属、不动杆菌属、希瓦氏菌属和申氏杆菌属与 TP 呈显著负相关，黄杆菌属与 NO_3^--N 呈显著负相关，副球菌属和不动杆菌属与 NH_4^+-N 的浓度呈正相关，不同种类的氮磷营养盐等环境因子与不同种类的微生物群落之间相互制约，动态平衡。

参考文献:

[1] Wang G Z, Li S J, Chen Z G. Status of mud crabs (*Scylla* spp.) farming and studies on the population biology of *S. paramamosain*[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2016, 55(5): 617-623. [王桂忠, 李少菁, 陈志刚. 青蟹(*Scylla* spp.)养殖现状及拟穴青蟹(*S. paramamosain*)种群生物学研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2016, 55(5): 617-623.]

[2] Nie X F, Li C X. Technology of aquaculture mud crabs in “crab apartment”[J]. Ocean & Fisheries, 2018(2): 56-57. [聂晓锋, 李春晓. “蟹公寓”养殖青蟹技术[J]. 海洋与渔业, 2018(2): 56-57.]

[3] Cheng Y X, Li L W, Luo H M, et al. Epidemiological investigation of the disease of aquaculture green crab (*Scylla serrata*)[J]. Scientific Fish Farming, 2007(8): 50-51. [程岩雄, 李利卫, 罗华明, 等. 养殖锯缘青蟹病害的流行病学调查研究[J]. 科学养鱼, 2007(8): 50-51.]

[4] Pan L Q. Effects of environment factors on osmoregulation and immune parameters of crustaceans[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2004. [潘鲁青. 环境因子对甲壳动物渗透调节与免疫力的影响[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2004.]

[5] Kawaguchi Y, Miyasaka H, Genkai-Kato M, et al. Seasonal change in the gastric evacuation rate of rainbow trout feeding on natural prey[J]. Journal of Fish Biology, 2007, 71(6): 1873-1878.

[6] Zeng Y Y. Effects of the environmental factors on physiology-biochemistry of *Scylla paramamosain*[D]. Xiamen: Xiamen University, 2009. [曾媛媛. 环境因子对拟穴青蟹生理生化影响[D]. 厦门: 厦门大学, 2009.]

[7] Li S D, Liao Y Y, Feng G L. Influences of temperature on biofilter purification efficiency, *Eriocheir hepuensis*’ survival rate and feeding behavior in recirculating aquaculture systems[J]. Journal of Qinzhou University, 2018, 33(1): 1-5. [李书迪, 廖永岩, 冯国禄. 温度对生物滤池净化及合浦绒螯蟹存活率和摄饵的影响[J]. 钦州学院学报, 2018, 33(1): 1-5.]

[8] Chen C, Yan M C, Zhang X, et al. Dynamics of the bacterial community in rearing water from an intensive pond containing different stocking densities of *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(4): 985-993. [陈琛, 闫茂仓, 张翔, 等. 凡纳滨对虾不同养殖密度高位

池水体细菌群落动态[J]. 中国水产科学, 2016, 23(4): 985-993.]

[9] Li C Y, Xu Y J, Liu X Z, et al. Comparative analysis of composition, diversity and origin of intestinal bacterial community in pond-and indoor tank-culture Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(2): 245-255. [李存玉, 徐永江, 柳学周, 等. 池塘和工厂化养殖牙鲆肠道菌群结构的比较分析[J]. 水产学报, 2015, 39(2): 245-255.]

[10] Huang S T, Chen R Y, Liu K S, et al. Comparative study of aquatic bacterial community from 4 ponds farming mud crabs, *Scylla paramamosain*[J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2012, 31(3): 387-395. [黄诗婷, 陈荣元, 刘克韶, 等. 四个拟穴青蟹养殖池水环境中细菌群落结构的比较研究[J]. 台湾海峡, 2012, 31(3): 387-395.]

[11] China National Standardization Administration Committee, General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Marine monitoring regulations: GB 17378.4-2007[S]. Beijing: Standards Press of China, 2007. [中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 海洋监测规范: GB 17378.4-2007[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.]

[12] Wang R H, Qian W, Zhu X F, et al. Flow injection analysis for simultaneous determination of nitrogen and phosphorus in water samples[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2013, 32(12): 32-36. [王如海, 钱薇, 朱小芳, 等. 流动注射法同时测定水中的氮磷指标[J]. 分析试验室, 2013, 32(12): 32-36.]

[13] Liu J Y, Li Q, Liu Z R, et al. Determination of five nutrient salts in pore water of sediments by flow-injection spectrophotometry[J]. Analytical Instrumentation, 2017(6): 28-33. [刘纪勇, 李强, 刘梓锐, 等. 流动注射分光光度法测定海洋沉积物间隙水中五项营养盐[J]. 分析仪器, 2017(6): 28-33.]

[14] Chen D H, Jiang B Y. Simultaneous determination of phosphate, nitrate nitrogen and nitrite nitrogen in seawater by flow injection[J]. Environmental Protection and Technology, 2018, 24(3): 52-54. [陈德华, 蒋冰艳. 流动注射法同时测定海水中磷酸盐、硝酸盐氮和亚硝酸盐氮的研究[J]. 环保科技, 2018, 24(3): 52-54.]

[15] Huang Z T, Song X F, Li X, et al. Analysis of microbial diversity of submerged biofilters in recirculating aquaculture system (RAS) for grouper (*Epinehelus moara*) based on high-throughput DNA sequencing[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2016, 32(S1): 242-247. [黄志涛, 宋协法, 李勋, 等. 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, 2016, 32(S1): 242-247.]

[16] Michaud L, Lo Giudice A, Troussellier M, et al. Phylogenetic characterization of the heterotrophic bacterial communities inhabiting a marine recirculating aquaculture system[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 107(6): 1935-1946.

[17] Cytryn E, Gelfand I, Barak Y, et al. Diversity of microbial communities correlated to physiochemical parameters in a digestion basin of a zero-discharge mariculture system[J]. Environmental Microbiology, 2003, 5(1): 55-63.

[18] Cytryn E, van Rijn J, Schramm A, et al. Identification of bacteria potentially responsible for oxic and anoxic sulfide oxidation in biofilters of a recirculating mariculture system[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(10): 6134-6141.

[19] Schreier H J, Mirzoyan N, Saito K. Microbial diversity of biological filters in recirculating aquaculture systems[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2010, 21(3): 318-325.

[20] Qin W. Characteristics of strain in *Procambarus clarkii* ponds with different stocking density and plants coverage[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2015. [秦伟. 不同放养密度和水草覆盖度下底埋培养基的克氏原螯虾池塘底泥微生物群落特征[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.]

[21] Dong X Z, Cai M Y. Handbook of Identification of Common Bacterial Systems[M]. Beijing: Science Press, 2001: 9-294. [东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 9-294.]

[22] Sun Q H, Yu D S, Zhang P Y, et al. Identification and nitrogen removal characteristics of a heterotrophic nitrification-aerobic denitrification strain isolated from marine environment[J]. Environmental Science, 2016, 37(2): 647-654. [孙庆花, 于德爽, 张培玉, 等. 1 株海洋异养硝化-好氧反硝化菌的分离鉴定及其脱氮特性[J]. 环境科学, 2016, 37(2): 647-654.]

[23] Xiao J J, Guo P, Huo W J, et al. Application of denitrifying microbes to wastewater denitrification[J]. Environmental Science & Technology, 2009, 32(12): 97-102. [肖晶晶, 郭萍, 霍炜洁, 等. 反硝化微生物在污水脱氮中的研究及应用进展[J]. 环境科学与技术, 2009, 32(12): 97-102.]

[24] Li X Y, Wang L P, Du Y P, et al. Diversity of aerobic denitrifying microbes from various environment and analysis of their denitrification ability[J]. Amino Acids & Biotic Resources, 2016, 38(2): 37-45. [李小义, 王丽萍, 杜雅萍, 等. 好氧反硝化微生物多样性及其反硝化功能初步研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2016, 38(2): 37-45.]

[25] Zhou S J, Lu B, Jia T T, et al. Composition and characteristics of phosphorus removal bacteria in the same recirculating water system for different marine fishes[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2017, 45(12): 120-123. [周胜杰, 路斌, 贾婷婷, 等. 养殖不同海水鱼的同种循环水系统中除磷细菌组

成及特性[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(12): 120-123.]

[26] Calvó L, Vila X, Abella C A, et al. Use of the ammonia-oxidizing bacterial-specific phylogenetic probe Nso1225 as a primer for fingerprint analysis of ammonia-oxidizer communities[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 63(6): 715-721.

[27] Li W Y. Study on effects of stocking densities on abalone water quality and optimization of treatment in the recirculating aquaculture system[D]. Qingdao: Qingdao Tehcnology University, 2016. [李文亚. 循环水系统放养密度对鲍养殖水质的影响及水处理效果优化研究[D]. 青岛: 青岛理工大学, 2016.]

[28] Zeng T T, Gao X, Mo G H, et al. Characterization of microbial community succession for uranium removal under different temperature[J]. China Environmental Science, 2018, 38(11): 4261-4268. [曾涛涛, 高翔, 莫官海, 等. 不同温度影响下除铀厌氧微生物群落结构特征解析[J]. 中国环境科学, 2018, 38(11): 4261-4268.]

[29] Sun X J. Effects of different storage temperatures on the quality and microorganisms of pasteurized milk[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2018. [孙雪姣. 不同贮藏温度对巴氏杀菌乳品质和微生物的影响[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2018.]

[30] Chen M Q, Liu Z D, Dai W F, et al. Effects of thermal discharge on the spatial distribution of bacterioplankton community near a power plant in Xiangshan Bay[J]. Acta Ecologica Sinica, 2016, 36(20): 6574-6582. [陈梦齐, 刘紫丹, 戴文芳, 等. 象山港电厂温排水增温对浮游细菌群落空间分布的影响[J]. 生态学报, 2016, 36(20): 6574-6582.]

[31] Li L N, Kato C, Horikoshi K. Microbial diversity in sediments collected from the deepest cold-seep area, the Japan trench[J]. Marine Biotechnology, 1999, 1(4): 391-400.

[32] Stevens H, Stübner M, Simon M, et al. Phylogeny of *Proteobacteria* and *Bacteroidetes* from oxic habitats of a tidal flat ecosystem[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2005, 54(3): 351-365.

[33] Martins P, Cleary D F R, Pires A C C, et al. Molecular analysis of bacterial communities and detection of potential pathogens in a recirculating aquaculture system for *Scophthalmus maximus* and *Solea senegalensis*[J]. PLoS ONE, 2013, 8(11): e80847.

[34] Wu Y, Ma J Z, Zheng Y N, et al. Analysis of microbial community structure in recirculating aquaculture system for groupers (*Epinephelus*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(5): 1045-1054. [吴越, 马建忠, 郑伊诺, 等. 石斑鱼循环水养殖系统微生物群落结构[J]. 中国水产科学, 2017, 24(5): 1045-1054.]

[35] Hou Q W, Bai H Y, Tie J, et al. Moth diversity in different forest successional stages in Lishan National Nature Reserve, Shanxi[J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 2014, 51(5): 1310-1319. [侯沁文, 白海艳, 铁军, 等. 山西历山国家级自然保护区不同演化阶段林型蛾类多样性[J]. 应用昆虫学报, 2014, 51(5): 1310-1319.]

[36] Shen F, Zhao D Y, Huang R, et al. Seasonal variation of bacterioplankton community structure in Xuanwu Lake (Nanjing) and its relationship with environmental factors[J]. Journal of Lake Sciences, 2017, 29(3): 662-669. [沈烽, 赵大勇, 黄睿, 等. 南京玄武湖浮游细菌群落结构的季节变化及其与环境因子的关系[J]. 湖泊科学, 2017, 29(3): 662-669.]

[37] Zhang Y J, Li K, Zhu H R, et al. Community structure of microorganisms and its seasonal variation in Beihai lake[J]. Environmental Science, 2017, 38(8): 3319-3329. [张雅洁, 李珂, 朱浩然, 等. 北海湖微生物群落结构随季节变化特征[J]. 环境科学, 2017, 38(8): 3319-3329.

[38] Song J H, Li G, Zhang S Y, et al. Carbon source metabolism characteristics and functional diversity of microbial communities in recirculating aquaculture ponds[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2013, 41(9): 305-309. [宋景华, 李谷, 张世羊, 等. 循环水养殖池塘微生物群落的碳源代谢特性和功能多样性[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(9): 305-309.]

[39] Schuler D J, Boardman G D, Kuhn D D, et al. Acute toxicity of ammonia and nitrite to Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at low salinities[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2010, 41(3): 438-446.

[40] Yu R L, Nie X P, Wei T L, et al. Toxicity of molecular ammonia & nitrite to fishes and the control measures[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 1999, 6(3): 74-78. [余瑞兰, 聂湘平, 魏泰莉, 等. 分子氨和亚硝酸盐对鱼类的危害及其对策[J]. 中国水产科学, 1999, 6(3): 74-78.]

[41] Wang H, Zhao W, Xie Z G, et al. Bacterial community structure characteristics in the Biliuhe reservoir and its key driving factors[J]. Environmental Science, 2018, 39(8): 3660-3669. [王欢, 赵文, 谢在刚, 等. 碧流河水库细菌群落结构特征及其关键驱动因子[J]. 环境科学, 2018, 39(8): 3660-3669.]

[42] Shi Y, Wang Z Q, Zhang X Y, et al. Effects of nitrogen and phosphorus addition on soil microbial community composition in temperate typical grassland in Inner Mongolia[J]. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(17): 4943-4949. [施瑶, 王忠强, 张心昱, 等. 氮磷添加对内蒙古温带典型草原土壤微生物群落结构的影响[J]. 生态学报, 2014, 34(17): 4943-4949.]

[43] Chen Z J, Ding C Y, Zhu J Y, et al. Community structure and influencing factors of bacterioplankton during low water periods in Danjiangkou Reservoir[J]. China Environmental

Science, 2017, 37(1): 336-344. [陈兆进, 丁传雨, 朱静亚, 等. 丹江口水库枯水期浮游细菌群落组成及影响因素研究[J]. 中国环境科学, 2017, 37(1): 336-344.]

[44] Chrzanowski T H, Sterner R W, Elser J J. Nutrient enrichment and nutrient regeneration stimulate bacterioplankton growth[J]. Microbial Ecology, 1995, 29(3): 221-230.

Influence of temperature on microbial community structure in a *Scylla paramamosain* recirculating aquaculture system

LUO Jinfei[1], LIAO Yongyan[2, 3], LI Shudi[1], FENG Guolu[1, 4]

1. College of Environmental Science and Engineering, Guilin University of Technology, Guilin 541006, China;
2. Ocean College, Beibu Gulf University, Qinzhou 535011, China;
3. Guangxi Key Laboratory of Beibu Gulf Marine Biodiversity Conservation, Qinzhou 535011, China;
4. College of Resources and Environment, Beibu Gulf University, Qinzhou 535011, China

Abstract: This study aimed to explore the effect of temperature on the microbial community in recirculating aquaculture water used to raise *Scylla paramamosain*, as well as to understand the relationship between environmental factors and the microbial community in the aquaculture water. The breeding experiment of *Scylla paramamosain* was carried out in a recirculating aquaculture system at water temperatures of 18 ℃, 22 ℃, 26 ℃, 30 ℃, and 32 ℃. The microbial community composition in the water was analyzed with 16SrRNA gene high-throughput sequencing technology. The results showed that, (1) the diversity index of the bacterial community in the five groups of water samples was t26>t22>t30>t32>t18, and the species abundance was t22>t26>t32>t30>t18. Temperature can significantly influence the diversity of microbial communities in aquaculture water, but no direct correlation was found between the two. (2) 31 phyla, 43 classes, 94 orders, 185 families and 351 genera of bacterial communities were obtained from the aquaculture system at five different temperatures. Proteobacteria was by far the dominant phyla in the aquaculture water. When the water temperature of the aquaculture system was 26 ℃, the content of nitrogen and phosphorus pollutants in the water was relatively high, and the relative abundance of nitrogen and phosphorus removal by bacteria in the water was significantly higher than at the other four temperatures tested. (3) Similarity analysis using petaline graphs and UPGMA cluster analysis showed that the aquaculture water's microbial community responded well to the temperature change. The overall similarity of the bacterial community structure was low among the five groups of water samples, and the bacterial community structures at the highest temperature of 32 ℃ and the lowest temperature of 18 ℃ were the most similar. (4) The correlation analysis of microbial community structure and environmental factors in the water showed that total phosphorous (TP) and NO_3^--N have significant effects on the characteristics of the microbial communities, with temperature being the main reason for the differentiation of nitrogen and phosphorus in the water. The above research results preliminarily explain the effect of temperature on the microbial community in *Scylla paramamosain* recirculating aquaculture systems, and provide a reference for further study on the relationship between environmental changes and microbial diversity in *Scylla paramamosain* recirculating aquaculture systems.

Key words: temperature; recirculating aquaculture system; *Scylla paramamosain*; bacterial community; high-throughput sequencing

Corresponding author: FENG Guolu. E-mail: fengguolu8@163.com