

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00407

复合池塘循环水养殖系统微生物群落结构分析

姚延丹^{1,2}, 李谷¹, 陶玲¹, 李晓莉¹, 张世羊¹, 赵巧玲¹, 林玉良¹

1. 中国水产科学研究院 长江水产研究所, 湖北 荆州 434000;

2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 于 2008 年 6 至 10 月逐月调查研究了新型复合池塘循环水养殖系统各塘水体理化和微生物分子特征。通过提取水样中细菌总 DNA, 扩增其 16S rDNA 基因 V3 区, 再经 DGGE 分析获得图谱, 选择其中主要的 13 条特征条带进行克隆测序。研究结果表现为, 随水流方向(P1→P5), 各循环塘溶氧(DO)和透明度(SD)依次呈明显下降趋势, 而 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、TP 和 COD_{Mn} 水平呈明显上升趋势; 与对照塘相比, 循环塘 DO 和 SD 升高, COD_{Mn} 和营养盐水平降低。DGGE 图谱分析显示, 各养殖塘微生物种类丰富, 循环塘与对照塘的群落结构存在明显差异, 且差异主要表现在较弱的条带上; 13 条特征条带的测序结果表明, 池塘优势菌群分属 4 个门: 放线菌门(Actinobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)、蓝细菌门(Cyanobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes), 其中有 2 条属于蓝细菌门的条带特定分布于对照塘。典型对应分析(CCA)排序结果显示, DGGE 图谱条带分布与理化因子密切相关。与传统池塘养殖相比, 该养殖模式有助于改善养殖池塘微生态环境。本研究旨在为池塘微生物群落结构及其功能关系研究提供借鉴。[中国水产科学, 2011, 18(2): 407–415]

关键词: 复合池塘循环水养殖系统; 微生物群落结构; 人工湿地; DGGE

中图分类号: S94

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)02-0407-09

复合池塘循环水养殖系统(Integrated Pond Recirculating Aquaculture System, IPRAS)是运用生态学原理, 将人工湿地、生态沟渠、生物塘等生态工程技术和池塘养殖有机结合构建的一种具有节水和生态安全的新型池塘养殖系统^[1]。研究结果表明, 该系统作为一种新的池塘养殖生产方式, 在提高养殖产品品质, 改善养殖产品质量, 节约水资源及有效解决废水排放等方面均具有明显的理论和实践意义^[2]。

微生物作为营养物质的分解者和转化者、物质和能量的贮存者^[3-4]以及食物链中重要生产者^[5], 在池塘养殖过程中具有重要作用, 它的群落结构不仅构成水体物质循环基础, 而且明显指示水环

境质量变化^[6]。传统微生物种群结构研究一直建立在传统分离和培养方法上, 这种方法费时费力, 培养种群数量有限, 不能代表整个微生物群落结构。变性梯度凝胶电泳(Denatured Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)是基于 16S rDNA 保守性的 DNA 指纹技术, 能避开分离培养途径的不足, 可以原位研究微生物群落结构组成。该技术从 1993 年被 Muyzer 等^[7]首次用来分析土壤环境微生物区系以来, 已被广泛应用于各种环境微生物生态学研究^[8], 并已发展成为目前研究微生物群落结构的主要分子生物学方法。PCR-DGGE 技术可以使碱基序列稍有区别的 PCR 扩增产物在变性剂浓度逐步提高的聚丙烯酰胺凝胶中具有不同的

收稿日期: 2010-06-08; 修订日期: 2010-08-23.

基金项目: 农业部农业科技成果转化资金项目(2008GB23260394); 农业部现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(NYCYTX-49); 中央级公益性科研院所基本科研业务费; 中国水产科学研究院渔业水体净化技术和系统研究重点开放实验室开放基金项目(FWT-200701)。

作者简介: 姚延丹(1984-), 女, 硕士研究生. E-mail: fairy3558@yahoo.com.cn

通讯作者: 李谷, 研究员. Tel: 0716-8126716; E-mail: ligu667@yahoo.com

迁移位点,从而实现不同序列的分离。与传统的微生物分离培养技术相比,具有快速、准确的特点,为微生物群落结构和功能解析提供了强大的技术手段^[9]。

本研究利用 PCR-DGGE 技术,通过对比分析新型复合池塘养殖系统和传统池塘养殖系统微生物群落结构特点,以期为进一步优化系统构建与运行提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验系统

复合池塘循环水养殖系统位于中国水产科学研究院长江水产研究所窑湾试验场。该系统由水质净化单元、养殖单元和生态沟渠 3 部分构成(图 1)。其中,水质净化单元包括综合生物塘和人工湿地两部分。综合生物塘占地面积 450 m²,水深 1.0~1.5 m,塘内放养部分滤食性鱼类,沿岸植茭白、芦苇等水生植物,具有初级净化功能;人工湿

地由一组 L×W×H 为 30 m×8.5 m×0.6 m 的床体,填埋碎石作为基质,深度 0.6 m,沿水流方向分别栽种美人蕉(*Canna indica*)、鸢尾(*Iris tectorum*)和菖蒲(*Acorus calamus*) 3 种湿生植物,初始栽种密度均为 8~10 株/m²。养殖单元为一组由 5 口池塘(P1-P5)用涵管相互串联组成,每口池塘面积均为 1 000 m²,水深 1.8 m;生态沟渠起联通作用,为 L×W×H=200 m×0.54 m×0.62 m,沟内置易于藻类附着的载体,湿地出水水中溶氧不足现象得到明显改善。与此同时,设对照塘 1 口(P6),未参与循环,池塘面积 1 000 m²。试验过程中,系统水交换量维持在 10%~15%。池塘主养黄颡鱼,鱼种体质量 8~10 g,放养密度为 9.0×10⁴ 尾/hm²,混养规格 20~30 g/尾鲢鳙夏花鱼种 3.0×10³ 尾/hm²以调节水质,鱼种放养前用 3%食盐水浸洗 10 min 左右,全程投喂全价商品黄颡鱼浮性饵料,(商品标号 Q/ZZ013-2008,由浙江中大饲料有限公司生产),养殖过程中池塘管理方式一致。

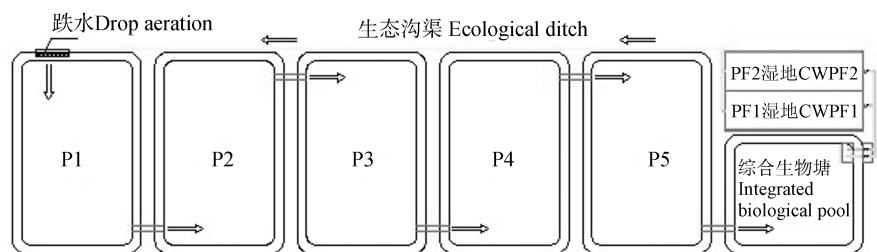


图 1 试验系统示意图(P1-P5 为循环塘; 箭头指水流方向)

Fig. 1 Chart of the experimental system(P1-P5 represents five recirculating ponds; arrows show water flow direction)

1.2 样品采集与处理

1.2.1 采样设计与测试指标 采样时间为 2008 年 6 至 10 月,频率 1 次/月,采样点包括 5 级循环塘和 1 个对照塘。各塘水质理化指标用采水器随机选取 3 个位点,取等量水样混合带回实验室分析,其中水温(T)、pH 值和溶氧(DO)等用美国奥立龙水质分析仪在线测定;铵氮(NH₄⁺-N)、总氮(TN)、总磷(TP)和高锰酸盐指数(COD_{Mn})测定按《水和废水监测分析方法》^[10],透明度(SD)用塞氏盘现场测定。为便于分析,P1 塘 6 月份样品编号为 S1-6,7 月份为 S1-7,前一数字代表塘号,后一数字代

表月份,依此类推将样品进行编号。

1.2.2 DNA 提取 用 0.22 μm 的滤膜过滤 200 mL 水样,在无菌条件下将滤渣用 TE 水(10 mmol/L Tris-HCl+1 mmol/L EDTA, pH 值为 8.0)在培养皿中洗下来,在 10 000 r/min 条件下离心 10 min,收集沉淀物保存于-20℃。所有样品在提取 DNA 之前需完全解冻。DNA 提取参照 Zhou 等^[11]的方法。粗提的 DNA 溶液,用上海申能博彩 3S 纯化柱纯化后,置于-20℃保存。

1.2.3 PCR 扩增 使用细菌通用引物: 341F-GC-clamp(5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC

GGG GCG GGGGCA CGG GGGG GGG CCT ACG GGA GGC AGC AG-3')和 534R(5'-CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT-3'), 扩增的DNA片段为细菌的16S rDNA的V3区, 同时设置阴性对照。PCR的反应体系为25 μ L, 其中包括10 $\times$ Buffer 2.5 μ L, 10 mmol/L dNTP 0.3 μ L, 10 mol/L上下游引物各0.5 μ L, 5 U/ μ L *Taq* DNA聚合酶0.3 μ L, 50 ng/ μ L模板DNA 1.0 μ L, 灭菌去离子水19.9 μ L。使用美国PTC-200型PCR仪完成反应, 整个过程采用降落PCR模式(touchdown-PCR, td-PCR)。程序如下: 94 $^{\circ}$ C预变性5 min, 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 65 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸90 s, 之后每个循环退火温度降低0.5 $^{\circ}$ C, 循环20次, 在这个退火温度下再进行11个循环, 72 $^{\circ}$ C最终延伸5 min。扩增产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 DGGE凝胶电泳 用扩增后的PCR产物进行变性梯度凝胶电泳分析。所用的胶浓度为10%(丙烯酰胺:双丙烯酰胺=37.5:1, 质量比), 变性梯度范围为20%~50%(100%的变性剂中含有7 mol/L的尿素和40%的去离子甲酰胺), 上样量为20 μ L。运行状况是: 在1 $\times$ TAE电泳缓冲液(20 mmol/L Tris+10 mmol/L 冰乙酸+0.5 mmol/L EDTA, pH 7.4)中, 于60 $^{\circ}$ C, 80 V条件下电泳12 h。电泳完成后, 用银染的方法观察结果并照相保存。

所得图像用Bio-Rad公司的凝胶定量软件Quantity one 4.1.0进行处理, 其中包括对泳道和条带的技术处理及DGGE图谱的聚类分析。聚类是依据戴斯系数(Dice Coefficient, C_s)按照UPGMA算法进行, 其中 $C_s=2j/(a+b)$, j 是样品A和B共有的条带, a 和 b 分别是样品A和B的条带数。戴斯系数的范围是从0(没有相同条带)到1(所有的条带相同)。

1.2.5 特征条带的回收与测序 从DGGE凝胶上切下待回收条带的中间部分, 放入1.5 mL的离心管中, 用枪头将凝胶压碎。再加入50 μ L的TE缓冲液, 于4 $^{\circ}$ C浸泡过夜。次日, 于3 000 r/min常温下离心1 min, 取1 μ L上清液为模板, 按照1.2.3中的PCR反应体系和程序再次扩增, 用DGGE检查回收条带的纯度和分离状况。如此重复, 直到

与原来的条带位置一致为止。PCR产物经纯化后(AxyPrep Gel DNA Purification Kit, 杭州)与pMD18-T载体连接, 转化感受态大肠杆菌细胞DH5 α 。待菌落长出后, 挑取单菌落, 用PCR检验筛选出目的克隆。以阳性克隆为模板进行PCR, 再进行DGGE分析, 与原来的条带在同一位置的克隆才是真正的阳性克隆。最后将所得的克隆片段送至北京天一辉远生物科技有限公司进行测序。

将测序获得的16S rDNA序列在网上进行BLAST比对分析, 获得与每条序列亲缘关系最近的序列信息(Closest Relatives)。使用CLUSTALX工具将选取的特征序列与本实验的测序结果一起按照最大同源性的原则进行多重序列比对, 将比对结果导入MEGA3.1^[12](Molecular Evolutionary Genetics Analysis, MEGA)软件包, 用UPGMA(The Unweighted Pair Group Method with Arithmetic averages)方法构建系统进化树。

1.3 数据分析

为进一步探讨养殖塘中微生物群落结构与环境因子关系, 本实验采用多元统计分析-典型对应分析(Canonical Correspondence Analysis, CCA), 该分析在Canoco 4.5 for Windows软件中进行。方差分析(One-Way ANOVA)在SPSS 13.0软件中进行。

2 结果与分析

2.1 理化指标

试验期间各养殖塘水温变化基本一致; 沿水流方向(P1 $\rightarrow$ P5), 循环塘pH、TN有一定波动, DO、SD呈明显下降趋势, 而 NH_4^+ -N、TP和 COD_{Mn} 呈明显上升趋势(图2)。方差分析结果表明, pH、DO、SD和TP在各塘间差异显著($P<0.05$, $n=30$), 具体表现为对照塘pH显著高于各循环塘, 循环塘间无显著差异; P1塘DO水平显著高于其他各塘, 而对照塘低于各循环塘; 透明度P1塘显著高于其他各塘, 而对照塘与其他循环塘(P1塘除外)无显著差异; P1塘TP含量显著低于P3至P6, 而对照塘显著高于P1、P2和P4。

2.2 微生物群落结构

2.2.1 DGGE图谱 由DGGE图谱可知, 水样中

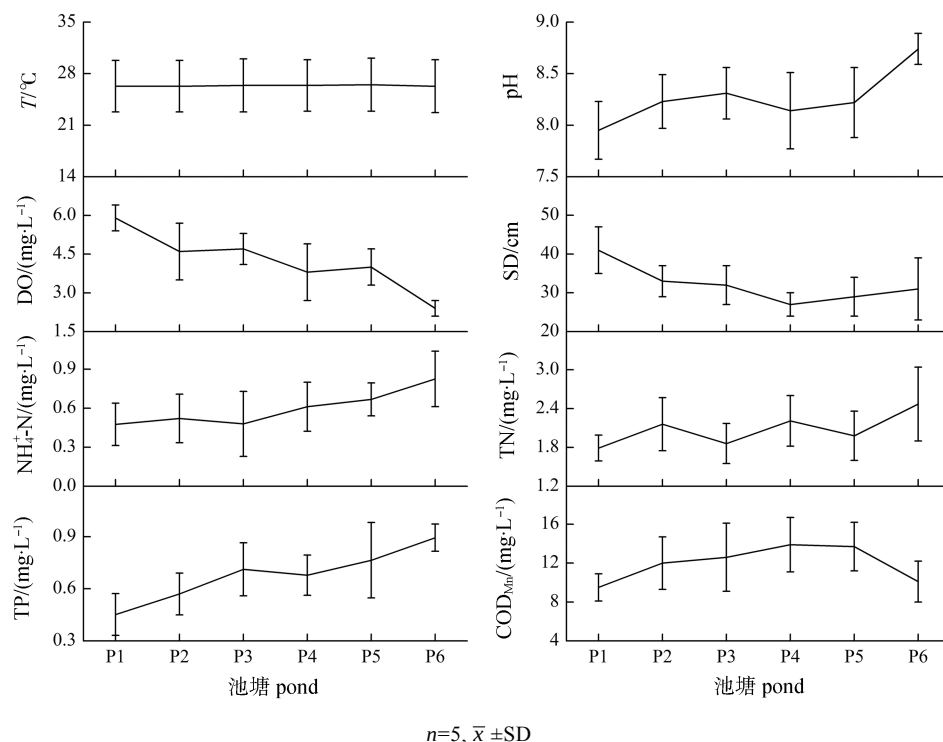


图 2 复合池塘养殖系统各塘水体理化特征
误差线为 1 倍标准差。

Fig. 2 The physicochemical characteristics of water body in each pond of the IPRAS
Error bar indicates one standard deviation.

微生物丰度较高,在时空上均有较大差异,具体体现在 DGGE 图谱条带的数量、位置及亮度上,但差异主要表现在较弱的条带上,表明池塘中的优势细菌相对稳定,但较弱条带代表的细菌类群存在较大差异。图谱中的条带 6、7、8、12、13 在不同月份的各池塘中均存在,且亮度很高,说明这些微生物是池塘中的优势菌群,对维持池塘微生态环境的稳定起主要的调控作用。这些菌属可充分利用浮游植物产生的有机物(分泌物或残体)大量繁殖,因而产生了明显的特征条带。各样品存在位置相同但数目不同的条带(如条带 1、2、3、4、10、11),说明在该系统不同池塘中存在种属相同但数量不同的微生物。这些种属的微生物对环境变化的适应性较强,在物质代谢和能量转化中发挥着重要作用,是一些生态幅比较广泛的种属,这些特征条带被回收并进行测序分析。同时,对照塘中 5 号和 9 号条带较亮,是不同于循环塘的条带,也被回收并进行测序分析(图 3)。

2.2.2 聚类分析 由 Quantity one 软件计算出的

戴斯系数,通过 UPGMA 算法进行聚类分析,生成系统树(图 4)。由图可知,对照塘 5 个样(S6-1, S6-2, S6-3, S6-4, S6-5)单独聚在一起,表明对照塘微生物群落结构与循环塘不同。

2.2.3 16S rDNA 序列及系统发育分析 细菌 16S rDNA V3 区特征片段经 DGGE 分离、条带切割,共得到 13 条条带。测序结果表明,序列大小在 162~195 bp 范围之内。将所得序列输入 GenBank,以 Blast 进行相似性分析。结果表明,13 条所测序列的最相似序列均来自 GenBank 数据库中未培养的微生物克隆(表 1)。除了条带 1 之外(相似性 88%),所测序列与数据库中的 16S rDNA 序列相似性在 90%~100%之间。用这些序列与本实验所得的序列构建进化树。进化树中包含大量已知序列,可作为目标序列进化地位的参考。本研究选用数据库中与所测序列相似性最高的序列构建 UPGMA 系统进化树(图 5)。

系统进化树显示,13 个克隆分属 4 个门:放线菌门(Actinobacteria), α 、 β 、 γ 变形菌门(Proteo-

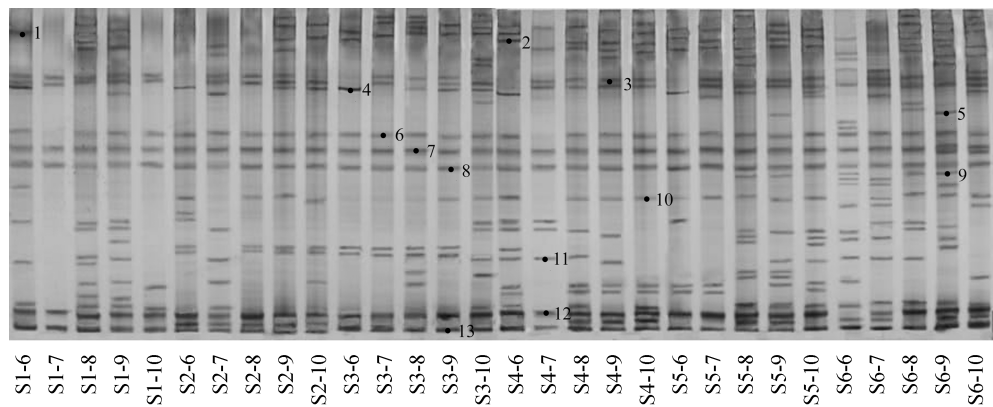


图 3 水样 16S rDNA PCR 产物的 DGGE 图谱
图中标记的数字 1-13 为回收条带.

Fig.3 DGGE fingerprints of PCR amplified 16S rDNA fragments from water samples
The marked numbers of 1-13 were excised bands.

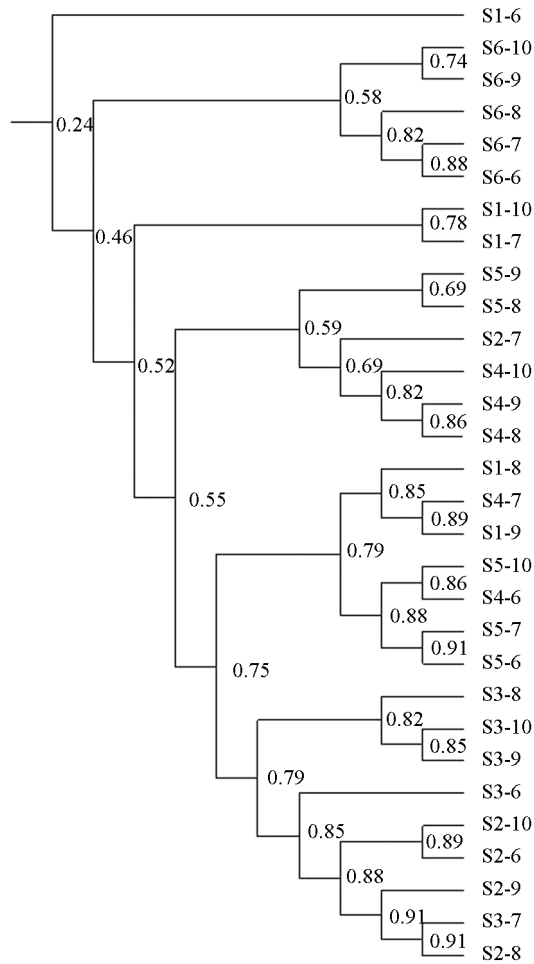


图 4 用 UPGMA 方法构建的 DGGE 图谱系统树
Fig. 4 Clustering dendrogram of DGGE patterns based on UPGMA method

bacteria), 蓝细菌门(Cyanobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes), 其中有 3 条序列(5、9、10)属于蓝

细菌门。10 号序列几乎在每个塘中都有发现, 5 号和 9 号在对照塘中分布较多且较亮。从分类角度来看, 它们大都属于被广泛定义的淡水细菌类群。

2.3 典型对应分析(CCA)

为了探讨测定的环境因子对微生物群落结构的影响, 将 DGGE 图谱的数字化结果和理化指标结合在一起进行 CCA 排序分析(表 2, 图 6)。由表 2 可知, 排序结果的第 1 轴和所有轴均达显著水平(蒙特卡罗检验, $P<0.05$), 说明排序结果是可靠的。CCA 分析的前两轴解释了 15.7%的方差变异信息, 而解释的总方差为 35.4%。从二维排序图来看, 对照塘中的 4 个样点(S6-7, S6-8, S6-9, S6-10)靠得较近, 对应较高的为 pH、TP、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 TN, 而 P1 塘中的 5 个样点(S1-6、S1-7、S1-8、S1-9、S1-10)靠得较近, 对应较高的为溶氧和透明度。相对于其他指标, 实验过程中温度对微生物群落结构变异的贡献最小。

3 讨论

水体理化指标的分析结果显示, 沿水流方向(P1→P5), 复合池塘循环水养殖系统各循环塘水样 pH 值、TN 有一定波动, DO、SD 呈明显下降趋势, 而 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、TP 和 COD_{Mn} 呈明显上升趋势。分析原因笔者认为在该循环系统中, P1 塘是循环水的伊始, 它接纳了经人工湿地和复氧沟渠处理后的新水源。由于生物塘水体被泵提升到人工湿

表 1 割胶回收条带的测序结果及其相近的参考序列

Tab.1 DNA sequences from DGGE bands and their close relatives in GenBank

条代号 band no.	GenBank 最相似序列 closest relatives in GenBank	相似性/% percentage similarity	GenBank 编号 GenBank accession no.	发育地位 phylogenetic affiliation
1	Uncultured bacterium clone HRP1_W73	88	FJ409267.1	<i>Acinetobacteria</i>
2	Uncultured <i>actinobacterium</i> clone Ume_OR_68	99	FJ646411.1	<i>Actinotobacter</i>
3	Uncultured <i>gamma proteobacterium</i> clone LTUG02014	90	AY144244.1	<i>Proteobacteria</i>
4	Uncultured <i>gamma proteobacterium</i> clone 228 WD3	100	EU447540.1	<i>Proteobacteria</i>
5	Uncultured bacterium clone WPUB192	100	FJ006840.1	<i>Cyanobacteria</i>
6	Uncultured bacterium clone DXH4-97	100	FJ558984.1	<i>Acinetobacteria</i>
7	Uncultured <i>Bacteroidetes</i> bacterium clone PRD18D12	99	EU801496.1	<i>Bacteroidetes</i>
8	Uncultured <i>Burkholderiales</i> bacterium clone Gap-2-53	99	EU642165.1	<i>Proteobacteria</i>
9	Uncultured marine bacterium clone ZA3743	99	EU092015.1	<i>Cyanobacteria</i>
10	Uncultured <i>cyanobacterium</i> clone balA7_spring03	100	EF627924.1	<i>Cyanobacteria</i>
11	Uncultured <i>alpha proteobacterium</i> clone C31.25SM	97	AF431144.1	<i>Proteobacteria</i>
12	Uncultured <i>Acinetobacter</i> sp. clone NSR3Q1b78	99	EU629702.1	<i>Acinetobacteria</i>
13	Uncultured bacterium clone Hel1ah01	98	FJ229166.1	<i>Actinotobacter</i>

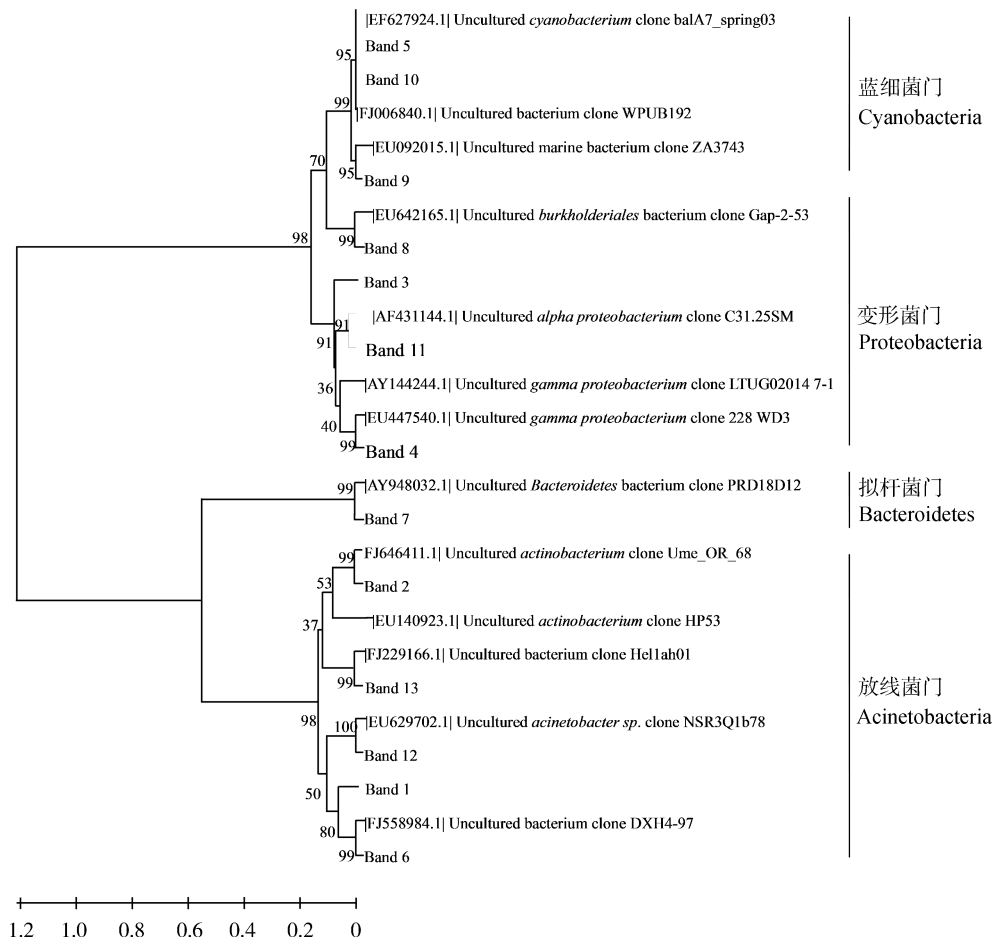


图 5 回收条带序列的系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree constructed by the sequences of the excised DGGE bands

表 2 CCA 分析前两轴的统计特征
Tab. 2 Summary of the CCA analysis for the first two axes

项目 item	轴 1 axis 1	轴 2 axis 2
特征值 eigenvalues	0.139	0.094
属种-环境相关关系 species-environment correlations	0.875	0.922
方差累积百分比 cumulative percentage variance		
属种数据 species data	9.4%	15.7%
属种-环境关系 species-environment relation	26.5	44.4
解释的总方差 total variance explained	35.4%	
蒙特卡罗检验 Monte Carlo permutation test	<i>F</i> -ratio	<i>P</i> -value
轴 1 axis 1	2.174	0.010
所有轴 all axes	1.440	0.002

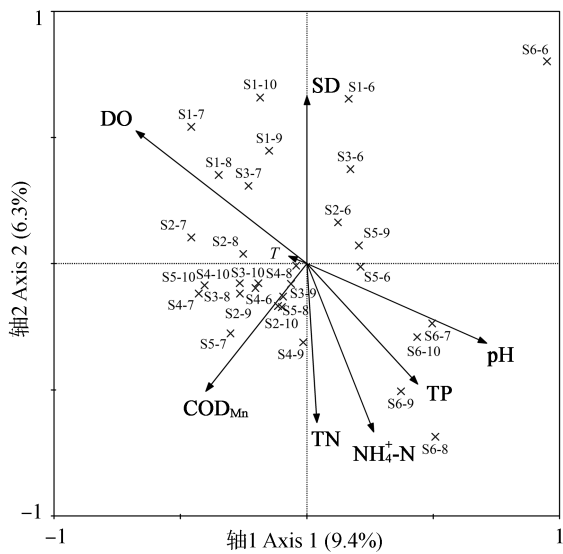


图 6 典型对应分析二维排序图
Fig. 6 CCA bi-plot based on DGGE patterns and environmental variables

地, 因此在 P1 塘至生物塘间形成了水位差, 进而促使了水循环。因为 P1 塘补充的是新水源(DO 和 SD 高, 营养盐水平低), 所以在 P1→P5 塘间形成了梯度。统计结果表明, 人工湿地的循环水处理提高了养殖水体的 DO 和 SD 水平, 降低了水体的营养状态。

DGGE 技术避免了分离纯化培养带来的分析误差, 并能准确、快速地分析复杂环境样品的微生物群落结构。Fandino 等^[12]用 PCR-DGGE 方法分析了加州海岸带水域腰鞭毛虫多发期(dinoflagellate bloom)的细菌群落, 结果显示微生物群落以 α -Proteobacteria、 γ -Proteobacteria 和 Cytophaga 为主; Casamayor 等^[13]用 PCR-DGGE 方法研究了西班牙

两个硫湖-Cisó 和 Vilar 的微生物群落组成, 结果显示 Cisó 湖的微生物组成以革兰氏阳性菌 Proteobacteria 为主, 而 Vilar 湖则以 Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides 和 Cyanobacteria 菌群为主。

本研究利用该方法获得了养殖塘水体中微生物群落组成的 DGGE 图谱。通过 DGGE 图谱分析可知, 各循环塘和对照塘均表现出较高的微生物丰度, 不同池塘样品的 DGGE 带谱有差异, 但差异主要表现在较弱的条带上, 表明池塘中的优势细菌相对稳定, 但较弱条带代表的细菌类群存在较大差异。通过带谱聚类分析, 发现细菌的优势类群相对稳定, 但对照塘的带谱与其他各循环塘的明显不同。有研究结果表明, 浮游生物群落 DNA 指纹与主要的环境限制因子密切相关^[15-16]。在寡营养水体中, 营养盐是限制微生物生长的主要因子, 其中尤以磷含量较为突出^[17]; 而在某些特定条件下, 氮含量高低有可能成为影响微生物数量变化的限制因子^[18]。在本研究中, CCA 分析结果显示, 养殖塘水体中氮磷含量的高低对微生物群落结构影响较大。与对照塘相比, 循环塘中微生物群落结构的改变与人工湿地的循环处理降低了水体的营养状态有关。

通过测序分析, 发现这些优势条带在 GenBank 中的最相似菌群为放线菌、变形菌、拟杆菌和蓝细菌。据报道这些细菌都是水体中普遍存在的菌群^[19-20]。回收条带的测序结果表明, 有 3 条特征条带(图 3 中条带 5、9、10)分属蓝细菌门, 其中有 2 条(图 3 中条带 5 和 9)特定地分布于

对照塘中。已有研究表明, TP 浓度与蓝藻门细胞密度和生物量呈显著正相关, 而与其他浮游植物无明显的相关性, 说明水体中磷含量与蓝藻生长密切关系^[21]。此外, 在用 PCR-DGGE 方法研究太湖水体中细菌群落组成时发现, 代表蓝细菌门的条带在蓝绿藻暴发时亮度很高, 也是那时水体中的优势藻类序列, 因此有可能作为蓝绿藻暴发的指示条带^[22]。在本研究中, 理化监测的结果是对照塘中 TN、TP 及 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度在养殖中后期均超过了循环塘, 对照塘中丰富的氮磷营养盐为蓝细菌的生长繁殖提供了便利。蓝细菌的激增会引起池塘水质的恶化。因此, 循环塘相比于对照塘缺少 2 条蓝细菌特征条带, 说明人工湿地的循环水处理改善了养殖塘的微生态环境, 减少了池塘发生蓝藻水华的可能, 有助于池塘健康养殖。

参考文献:

- [1] 李谷. 一种兼具节水和安全功能的池塘养殖复合系统: 中国, ZL 270051740.8 [Z]. 2008, 9.17
- [2] 曾梦兆. 人工湿地基质酶及其活性与净化养殖废水效果相关性研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- [3] Azam F, Fenchel T, Field J G, et al. The ecological role of water-column microbes in the sea [J]. Mar Ecol Prog Ser, 1983, 10: 257–263.
- [4] 冯胜, 高光, 朱广伟, 等. 基于 16S rDNA-DGGE 和 FDC 技术对富营养化湖泊不同生态修复工程区细菌群落结构的研究 [J]. 应用与环境生物学报, 2007, 13(4): 535–540.
- [5] Stockner J G, Antia N J. Algal picoplankton from marine and freshwater ecosystems: a multidisciplinary perspective [J]. Can J Fish Aquat Sci, 1986, 43: 2472–2503.
- [6] Paerl H W, Dyble J, Moisander P H, et al. Microbial indicators of aquatic ecosystem change: current applications to eutrophication studies [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2003, 46(3): 233–46.
- [7] Muyzer G, de Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA [J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(3): 695–700.
- [8] Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1998, 73(1): 127–141.
- [9] Muyzer G, de Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA [J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(3): 695–700.
- [10] 国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法[M]. 第 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [11] Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(2): 316–322.
- [12] Kumar S, Tamura K, Neil M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. Brief Bioinform, 2004, 5: 150–163.
- [13] Fandino L B, Riemann L, Steward G F, et al. Bacterial succession during a dinoflagellate bloom analyzed by DGGE and rDNA sequencing [J]. Suppl EOS Trans Am Geophys Union, 1998, 79(1), OS63.
- [14] Casamayor E O, Schäfer H, Bañeras L, et al. Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(2): 499–508.
- [15] 颜庆云, 余育和, 冯伟松, 等. 洞庭湖浮游生物群落 DNA 指纹与理化因子的关系 [J]. 水生生物学报, 2005, 29(6): 601–606.
- [16] 余育和, 张文静, 颜庆云. DNA 指纹分析技术在群落级生命系统应用的可能性 [J]. 水生生物学报, 2004, 28(5): 457–463.
- [17] Toolan T, Wehr J D, Findlay S. Inorganic phosphorus stimulation of bacterioplankton production in a meso-eutrophic lake [J]. Appl Environ Microbiol, 1991, 57(7): 2074–2078.
- [18] Karner M, Fuks D, Herndl G J. Bacterial activity along a trophic gradient [J]. Microb Ecol, 1992, 24: 243–257.
- [19] Warnecke F, Amann R, Pernthaler J. Actinobacterial 16S rRNA genes from freshwater habitats cluster in four distinct lineages [J]. Environ Microbiol, 2004, 6(3): 242–253.
- [20] Kirchman D L. The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2002, 39: 91–100.
- [21] 李华芝. 富营养化水体生物栅修复技术中微生物种群结构研究 [D]. 上海: 华东师范大学, 2006.
- [22] 吴鑫. DGGE 指纹图谱分析太湖富营养化水体中细菌群落结构的变化 [D]. 上海: 上海交通大学, 2007.

Analysis of microbial community structure in an integrated pond recirculating aquaculture system

YAO Yandan^{1, 2}, LI Gu¹, TAO Ling¹, LI Xiaoli¹, ZHANG Shiyang¹, ZHAO Qiaoling¹, LIN Yuliang¹

1. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Aquaculture has been one of the fastest growing segments of global food production sector in recent decades. With the rapid development, it also leads to many environmental problems. For example, both per unit area yield of aquatic products and their quality has declined continuously. It is important that well-balanced systems be developed that are sustainable. Constructed wetlands (CWs) are ecologically beneficial, low-cost treatment alternatives, proven capable of reducing suspended solids, 5-day biochemical oxygen demand (BOD₅), nitrogen, phosphorus and heavy metals from wastewater of many sources. In the present paper, the physicochemical and microbial characteristics of culture ponds in an Integrated Pond Recirculating Aquaculture System (IPRAS) based on constructed wetland were investigated during the period of June to October 2008. In the study, 16S rDNA gene V3 region was amplified from total DNA of bacteria in water samples and followed by DGGE. Sequences of 13 dominant bands excised from DGGE gels were analyzed and the closest relatives of obtained sequences were all uncultured bacterial clone in GenBank. The results indicated that levels of dissolved oxygen (DO) and transparency (SD) showed a decreasing trend along the flow direction (P1→P5), while an opposite trend for ammonium nitrogen (NH₄⁺-N), total phosphorus (TP) and chemical oxygen demand (COD_{Mn}). The recirculating treatment increased water DO and SD, while decreased pH, COD_{Mn} and nutrients compared to the control. The DGGE fingerprints suggested a high species richness of microorganism and the clustering dendrogram revealed distinct differences in microbial community structure between the recirculating and control ponds. By the phylogenetic tree, the 13 dominant bands were grouped into four phyla: Actinobacteria, Proteobacteria, Cyanobacteria and Bacteroidetes, among which two cyanobacterial bands particular distributed in the control. The results of canonical correspondence analysis (CCA) also revealed that the distribution characteristics of DGGE fingerprints was strongly associated with the measured environment. Hereby, conclusions could be reached that the recirculating aquaculture system, as a new cultivation pattern, effectively improved the microbial environment of the culture ponds and benefited pond aquaculture. The results also provided basic references for analyzing the microbial community structure and their functional relationships in further study. [Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(2): 407–415]

Key words: integrated pond recirculating aquaculture system; microbial community structure; constructed wetland; DGGE

Corresponding author: LI Gu. E-mail: ligu667@yahoo.com