

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16349

## 石斑鱼循环水养殖系统微生物群落结构

吴越, 马建忠, 郑伊诺, 许凯伦, 李敏, 陈星星, 胡园, 曾国权, 黄振华

浙江省海洋水产养殖研究所, 浙江 温州 325005

**摘要:** 通过 16S rRNA 基因片段高通量测序研究了褐点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*)和东星斑(*Plectropomus leopardus*)循环水养殖系统水体细菌种群结构。结果显示石斑鱼循环水养殖系统中优势细菌类群为变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、蓝藻门(Cyanobacteria)、梭杆菌门(Fusobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)和硝化螺旋菌门(Nitrospira)。其中养殖塘、固液分离池、沉淀池和蛋白分离池中主要优势细菌为  $\gamma$ -变形菌纲(Gammaproteobacteria), 紫外消毒池和补氧池中则以 $\alpha$ -变形菌纲(Alphaproteobacteria)为主, 而生物滤池中两者比例接近, 均为优势种群。从养殖塘到补氧池细菌多样性指数先降低后升高, 生物滤池中达到最高值, 之后再次下降至紫外消毒池中达到最低值, 补氧池中有所回升。PCoA 分析和聚类分析结果表明, 养殖水在紫外消毒前后其细菌群落组成有着明显的差异。水质理化指标检测表明, 经过净化处理后, 循环系统的养殖水溶解氧含量上升, 氨氮和亚硝酸盐含量下降并维持在较低的浓度。环境因子与细菌群落结构相关性分析结果表明, 磷酸盐、pH、溶解氧和温度等指标可能对细菌群落结构影响相对较大, 但未发现两者间有很显著的相关性, 这可能与实验样本较少有关。

**关键词:** 石斑鱼; 循环水养殖系统; 养殖水体; 细菌群落; 高通量测序

中图分类号: S965

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)05-1045-10

石斑鱼(*Epinephelus*)是名贵的海洋经济鱼类。20 世纪 70 年代中国开始进行石斑鱼人工养殖实验, 至今已经有 30 多年历史<sup>[1]</sup>。现有石斑鱼养殖以网箱和池塘为主, 循环水养殖提供了一种高效利用水资源的养殖方式, 可大大降低养殖业对环境的污染程度, 且又具有养殖系统自身水质稳定、防病能力强等优势<sup>[2]</sup>。

水产养殖中水质变化与环境微生物紧密相关, 当养殖环境水体理化性质改变时, 微生物群落结构会相应产生变化<sup>[3]</sup>。传统的微生物种群结构研究主要基于微生物分离和培养技术, 可研究种类十分有限<sup>[4-5]</sup>。随着分子生物学技术的发展, DNA 指纹图谱和 16S rRNA 基因克隆文库等方法开始运用于环境微生物研究, 但是在全面解析微生物

生态多样性上仍然存在一定局限性<sup>[6-7]</sup>。宏基因组学(metagenomics)以环境中微生物基因组总和为研究对象, 通过测序分析和功能基因筛选等手段, 可快速有效地分析水体微生物群落的构成和功能<sup>[8-10]</sup>。在水产养殖中, 细菌 16S rRNA 高通量测序开始成为研究养殖环境微生物种群结构的新手段。

本研究将细菌 16S rRNA 高通量测序技术运用于石斑鱼循环水养殖系统水体中微生物种群结构的研究, 旨在为构建健康养殖系统提供理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验系统

石斑鱼循环水养殖系统建于浙江省温州市洞头县浙江省海洋水产养殖研究所基地内。系统自

收稿日期: 2016-11-24; 修订日期: 2017-02-27.

基金项目: 浙江省公益技术研究农业项目(2014C32079); 浙江省科技计划项目(2015F30021); 浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室 2013 年开放基金项目(J2013010); 浙江省科技计划项目(2015F50009); 浙江省公益技术研究农业项目(2015C32037).

作者简介: 吴越(1984-), 女, 助理研究员, 从事水产养殖环境微生物及环境监测研究. E-mail: wuy198412@aliyun.com

通信作者: 黄振华, 助理研究员, 研究方向水生生物学. E-mail: huangzhenhua0112@163.com

2014 年 9 月 23 日开始运行, 由养殖塘、固液分离池、沉淀池、生物滤池、蛋白分离池、紫外消毒池和补氧池等单元组成。通过空调、热水锅炉或电热棒控温, 每日循环 13 次, 系统水交换量约 5%。2014 年 11 月开始养殖石斑鱼, 养殖品种为褐点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*)和东星斑(*Plectropomus leopardus*), 放养密度为 100 尾/m<sup>3</sup>, 体重约为 100 g/尾, 养殖过程中投喂石斑鱼配合饲料(青岛七好生物科技有限公司), 每天上午下午各投喂配合饲料 1 次, 投喂量为鱼体重的 1%, 鱼体生长情况良好。

### 1.2 样品采集

采样时间为 2015 年 2 月 16 日(系统稳定后 3 个多月), 于系统养殖塘、固液分离池、沉淀池、生物滤池、蛋白分离池、紫外消毒池和补氧池等各池采取水样, 分别标记为 P1~P7。采样方法: 每个池中取 5 点水样, 每点取 1 L 水样, 混匀后为一个样品, 共采集 7 个样品, 采样时室内温度 15℃ 左右。所有样品采集后立即低温带回实验室分析。

### 1.3 水质指标检测

水质指标包括水温、盐度、pH、溶解氧(DO)、化学需氧量(COD)、氨氮(NH<sub>3</sub>)、亚硝酸盐(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)、硝酸盐(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)、磷酸盐(PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>)等, 实验方法根据《海洋监测规范第 4 部分: 海水分析》(GB 17378.4-2007)<sup>[11]</sup>操作。水温、盐度、pH 现场检测, 其他指标在水样运回实验室后立即检测, 所有指标当天全部测完。每个指标测定 3 个重复, 结果取平均值。

### 1.4 DNA 提取和 16S rRNA 高通量测序

水样取 100 mL 经 0.22 μm 无菌混合纤维素酯膜(Millipore)抽滤, 用水样微生物总 DNA 抽提试剂盒(MOBIO)提取微生物基因组 DNA。获得的 DNA 用 16S rRNA 保守区通用引物进行 PCR 扩增, PCR 产物用生工琼脂糖回收试剂盒回收。基于 Illumina MiSeq 测序平台, 构建小片段文库(加标记序列, 见表 1), 对 V3-V4 区进行双末端(paired-end)测序。高通量测序工作由浙江省微生物研究所完成。

### 1.5 数据处理

根据标记序列和扩增引物序列从原始数据中

拆分出各样品数据, 截去标记序列和引物序列后用 FLASH(V1.2.7)进行拼接。Qiime(V1.7.0)对拼接后的数据进行过滤处理, 通过 UCHIME Algorithm 与数据库(gold database)比对去除嵌合体序列。

### 1.6 序列分析

利用 Uparse 软件(v7.0.1001)对处理后的有效序列以 97%的一致性聚类成操作分类单元(operational taxonomic units, OTUs)。对 OTUs 代表序列用 RDP Classifier(Version 2.2)软件与 GreenGene 数据库进行物种注释(阈值 0.8~1)。使用 PyNAST 软件(Version 1.2)与 GreenGene 数据库中的“Core Set”数据信息进行多序列比对, 得到所有 OTUs 代表序列的系统发生关系。Alpha 多样性用香农指数(Shannon index)表示, 使用 Qiime 软件(Version 1.7.0)计算香农指数和 Unifrac 距离、构建 UPGMA 样品聚类树。使用 R 软件(Version 2.15.3)绘制 PCoA 图并进行 Beta 多样性指数进组间差异分析。环境因子与细菌种群之间相关性分析用 Canoco for windows 4.5 软件分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 高通量测序质量分析

测序数据经过质控及处理后, 有效序列长度主要分布在 450~500 bp 之间, 平均长度 450 bp 以上, 各样品序列数多数在 10000 以上, OTU 数量见表 1。以样品中随机抽取序列数及相应的 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趋于平缓(图 1), 说明测序数据量合理, 可覆盖样品中大部分 OTU。

表 1 各样品高通量测序结果分析  
Tab. 1 Analysis of the high-throughputs sequencing results

样品 sample	标记序列 barcode	有效序列 read	有效 OUT OTUs
P1	ATGCGTA	12412	1898
P2	TCATAGC	12165	1683
P3	TCTATAG	55134	4232
P4	TATGAGT	63468	5645
P5	TCGACTG	8892	1545
P6	AGTACGA	62024	1110
P7	ATCACTG	66141	968

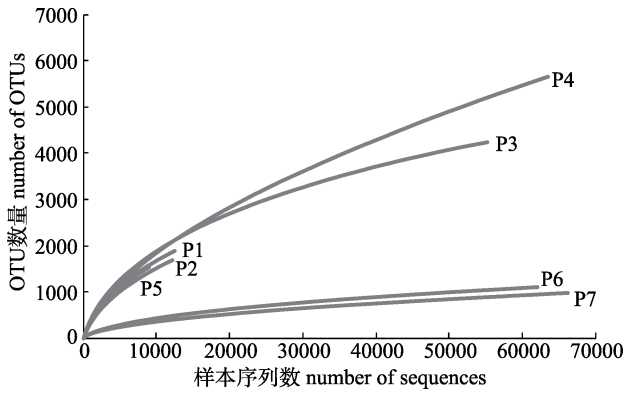


图 1 各样品高通量测序结果的稀释曲线  
Fig. 1 The rarefaction curves of high-throughput sequencing results

### 2.2 循环水养殖系统微生物群落组成分析

OTU 物种注释结果显示, 在整个系统中优势细菌种群主要分布于变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、蓝藻门(Cyanobacteria)、梭杆菌门(Fusobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)和硝化螺旋菌门(Nitrospira), 在各样品中占细菌 OTU 总数的 84.67%~99.76%。变形菌门在各塘水样中均为最优势细菌类群, 拟杆菌门主要分布于养殖塘 P1、固液分离池 P2、沉淀池 P3、生物滤池 P4、蛋白分离池 P5 和补氧池 P7, 梭杆菌门、厚壁菌门和硝化螺旋菌门主要分布于养殖塘 P1、固液分离池 P2、沉淀池 P3、生物滤池 P4、蛋白分离池 P5, 而蓝藻主要分布于补氧池中 P7。结果显示, 养殖水体细菌群落结构在紫外消毒前后有着明显的差异(图 2)。

在养殖塘 P1 和固液分离池 P2 中, 优势细菌为  $\gamma$ -变形菌纲(分别为 43.06%和 48.85%)、 $\alpha$ -变形

菌纲(分别为 10.56%和 8.95%)和梭杆菌纲(分别为 6.45%和 8.03%), 沉淀池 P3 中优势细菌为  $\gamma$ -变形菌纲(46.22%)、 $\alpha$ -变形菌纲(12.25%)和  $\delta$ -变形菌纲(5.81%), 生物滤池 P4 中优势细菌为  $\alpha$ -变形菌纲(29.35%)、 $\gamma$ -变形菌纲(28.09%)、梭杆菌纲(5.03%)以及未分类纲(7.9%), 蛋白分离池 P5 中优势细菌为  $\gamma$ -变形菌纲(41.77%)、 $\alpha$ -变形菌纲(12.06%)和  $\beta$  变形菌纲(9.47%), 紫外消毒池 P6 中优势细菌为  $\alpha$ -变形菌纲(74.95%)、和  $\gamma$ -变形菌纲(23.68%), 补氧池 P7 中优势细菌为  $\alpha$ -变形菌纲(49.96%)、Chloroplast(32.15%)、 $\gamma$ -变形菌纲(8.4%)和鞘脂杆菌纲(5.76%)。

选取所有样品丰度排序前 35 菌群构建丰度热图(图 3)。结果显示, 优势细菌占细菌总数 68.9%, 其中最优势菌群为弧菌科(Vibrionaceae)。结果表明少数几种细菌占细菌总数的大部分比例, 说明循环水养殖系统水体中微生物生态功能可能主要由少数几种微生物执行。

### 2.3 循环水养殖系统微生物多样性分析

细菌群落 Alpha 多样性用香农指数表示。结果显示, 7 个样品香农指数为 2.61~5.89, 从养殖塘到补氧池各水样香农指数先降后升, 至生物滤池中达到最高值, 之后再次下降至紫外消毒池中到最低值, 补氧池中有所回升(图 4a)。各样品之间多样性差异用 Beta 多样性指数表示, 结果如图 4b 显示, 每一个方格内上下两个数值分别为 weighted unifra 和 unweighted unifra 距离, 其数值大小介于 0~1 之间, 0 表示两样品为同一样品, 没有区别, 越接近于 1, 则区别越大。结果表明 P6 与 P7 塘

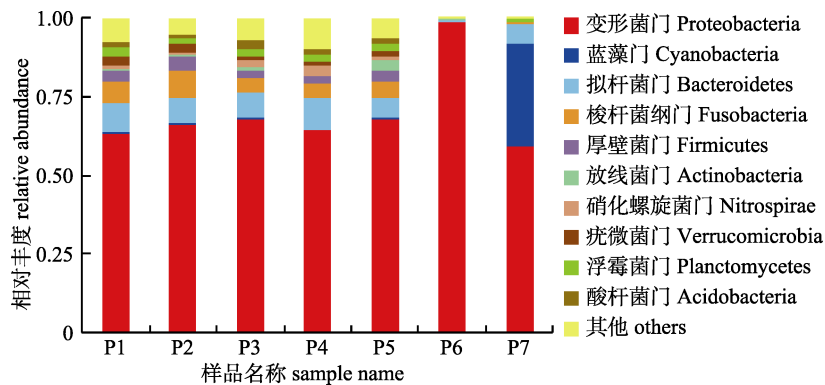


图 2 各样品细菌群落结构组成  
Fig. 2 Bacterial community composition of water samples

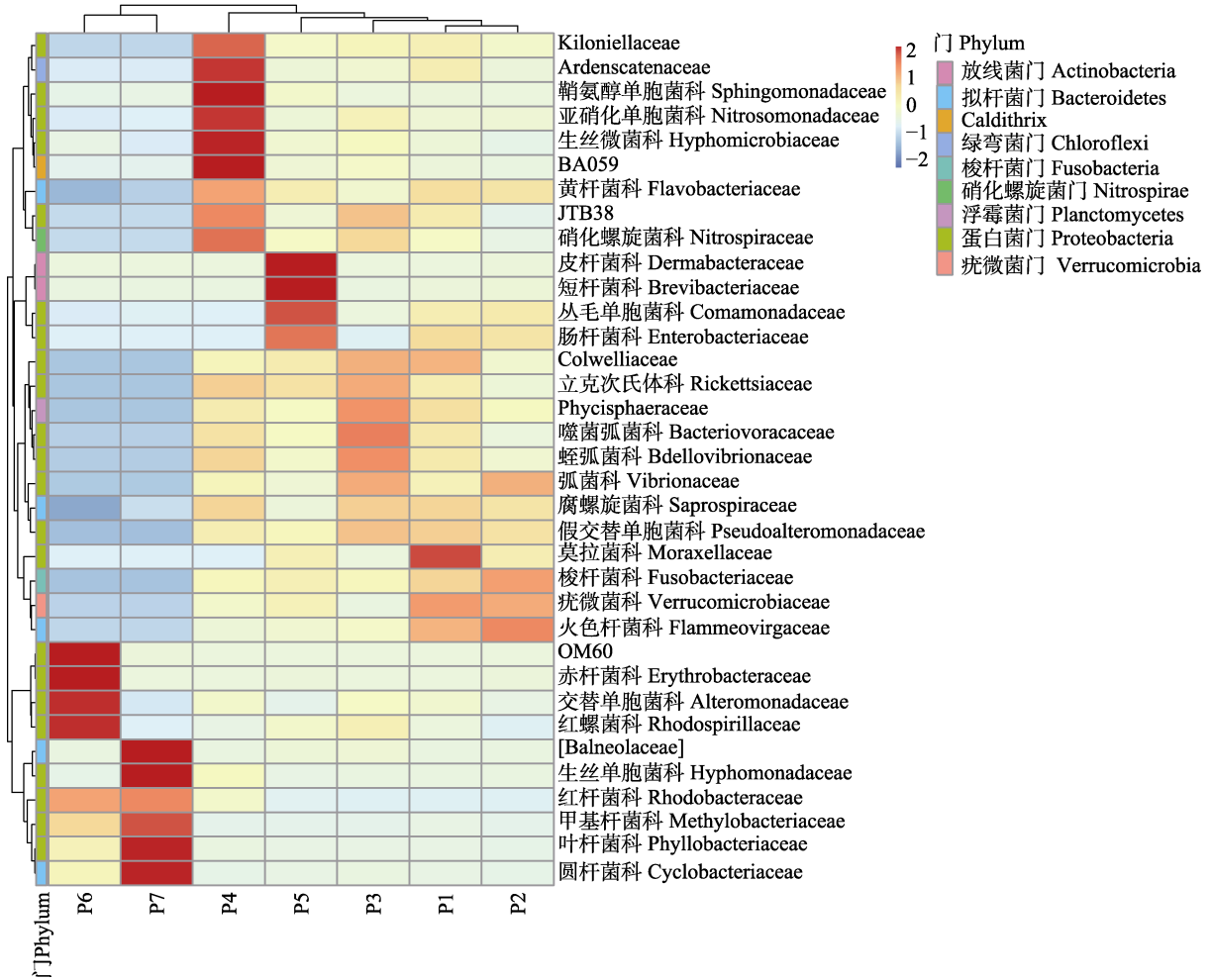


图 3 各池水样优势细菌物种丰度热图

Fig. 3 Heatmap of the dominant bacteria in water samples of different ponds

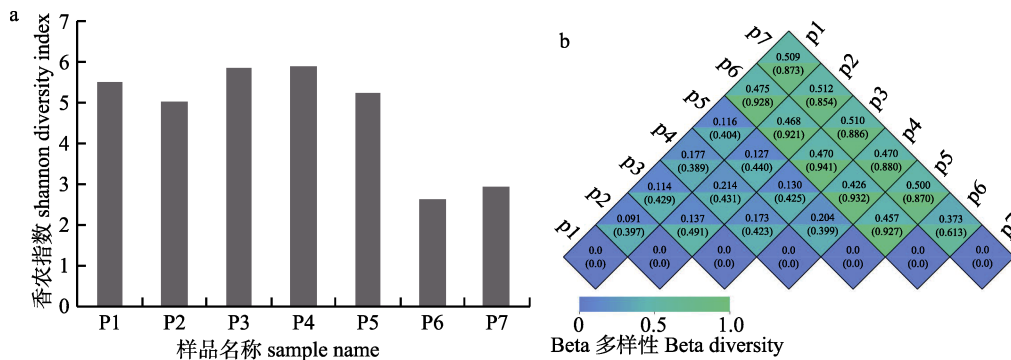


图 4 各塘细菌群落香农指数(a)和  $\beta$  多样性指数(b)

Fig. 4 Shannon diversity indices and  $\beta$ -diversity indices of bacterial community in water samples of different ponds

和其他塘之间的差异比较大。

由 PCoA(图 5a)和聚类分析(图 5b)结果可知, 养殖塘、固液分离池、沉淀池、生物滤池和蛋白分离池(P1~P5)样品可分为一类, 与紫外消毒池和补氧池(P6~P7)中之间细菌群落有较大差异。在

P1-P5 各塘水样中, P4 塘水样的细菌群落与另 4 个塘也有所不同。

#### 2.4 养殖水体细菌群落与理化因子的相关性分析

整个系统水温、盐度、pH 较为稳定, 水温为 22.6℃左右, 盐度为 26 左右, pH 为 7.2 左右; DO

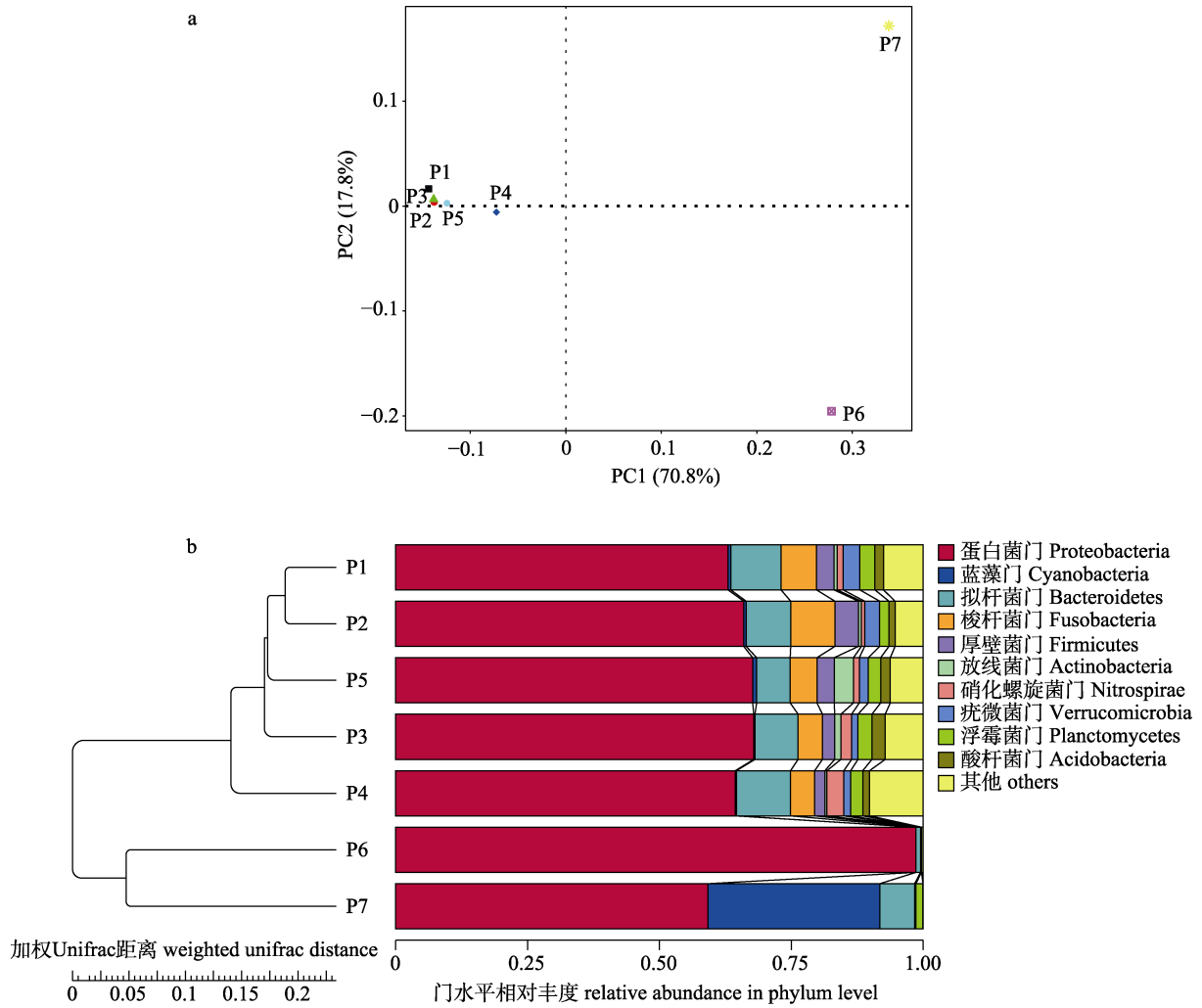


图 5 细菌群落主坐标分析图(a)和聚类分析图(b)  
Fig. 5 PCoA and cluster analysis plots of bacterioplankton

值沿着 P1→P7 水流方向呈现上升趋势, 其变化范围为 5.7~7.4 mg/L; COD 值范围为 2.32~2.60 mg/L, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 值范围为 1.69~1.87 mg/L, 两者波动较小; NH<sub>3</sub> 值范围为 0.020~0.045 mg/L, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 值范围为 0.013~0.016 mg/L, 两者变化趋势较为相似, 均从生物滤池 P4 池开始含量低于前面 P1-P3 池; NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 值范围为 11.57~11.67 mg/L, 波动较小(图 6)。经过净化处理后, 循环系统的养殖水溶解氧含量上升, 氨氮和亚硝酸盐含量下降并维持在较低的浓度。

为研究环境因子对细菌群落结构的影响, 采用 CANOCO 软件进行环境因子与细菌种群之间的相关性分析。首先进行除趋对应分析(detrended correspondence analysis, DCA), 结果表明最大梯度值为 4.507(>4), 择典范对应分析(canonical cor-

respondence analysis, CCA)(单峰模型排序)。结果显示第一排序轴代表了 48.32%的细菌与环境之间的关系累积变化, 第二排序轴代表了 22.96%细菌与环境之间的关系累积变化。PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>、NH<sub>3</sub> 和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 与第一排序轴成负相关, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>、盐度和 DO 与第二排序轴成负相关。各理化因子中 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>、pH、DO 和温度可能对细菌群落结构影响相对较大, 尤其是 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>是最主要的影响因素。但是总体而言, 这 9 个指标与细菌群落构成之间没有很显著的相关性(P > 0.05)(表 2)。

### 3 讨论

本研究通过基于 16S rRNA 基因片段的高通量测序分析了石斑鱼循环水养殖系统水体微生物

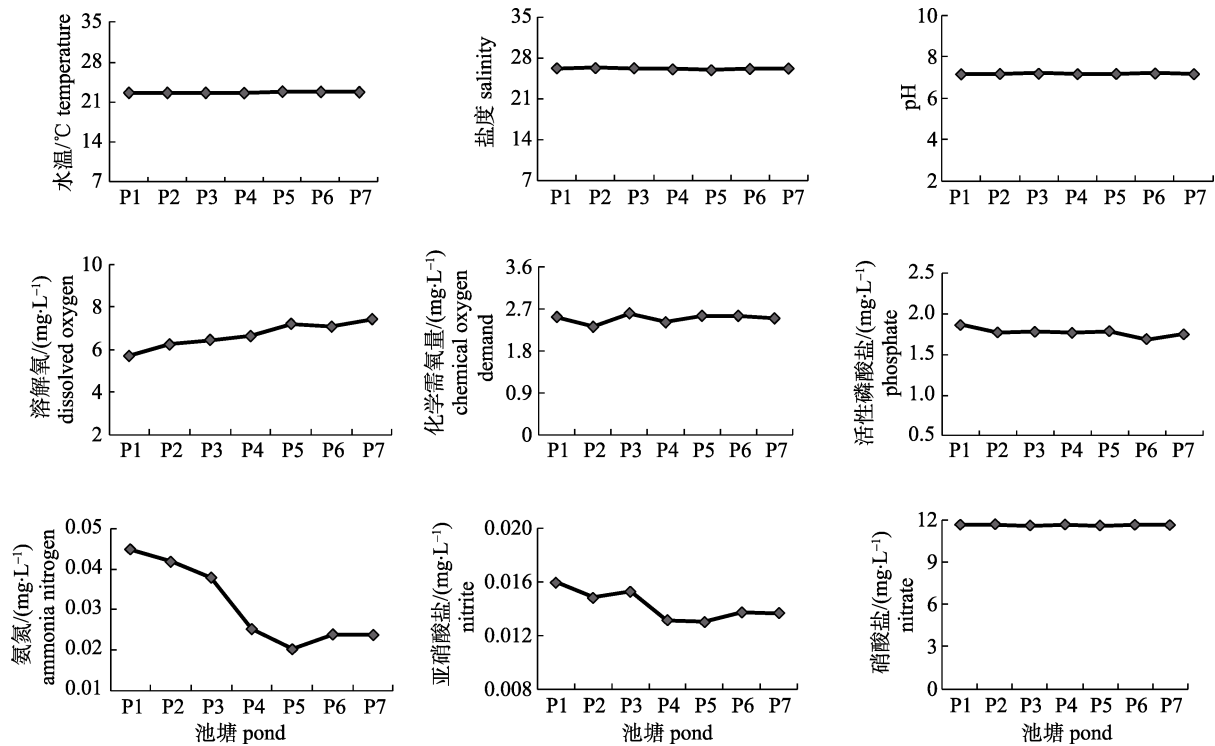


图 6 各池水样理化性质

Fig. 6 The physicochemical characteristics of water samples in different ponds

表 2 水样理化因子与细菌群落相关性分析

Tab. 2 The correlation between the physicochemical characteristics of water samples and bacteria taxa

理化因子 physicochemical characteristic	CCA1	CCA2	$r^2$	Pr (> r)
磷酸盐 phosphates	-0.98384	-0.17904	0.6614	0.114
氨氮 ammonia nitrogen	-0.97533	0.22076	0.2680	0.648
硝酸盐 nitrate	0.16562	0.98619	0.0158	0.986
亚硝酸盐 nitrite	-0.96026	0.27912	0.1194	0.884
化学需氧量 chemical oxygen demand	0.92113	0.38926	0.0816	0.848
温度 temperature	0.99008	0.14050	0.3379	0.419
盐度 salinity	0.06865	-0.99764	0.0274	0.993
溶解氧 dissolved oxygen	0.90543	-0.42451	0.4253	0.362
pH	0.73375	0.67942	0.5694	0.136

群落结构特征。结果显示,变形菌门是石斑鱼循环水养殖系统中最丰富的微生物群落。变形菌门分为 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 和 $\epsilon$ 五个纲,是海洋环境和海洋沉积物中的主要类群,其中 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 纲被认为是河流湖泊及海水等水体中的主要菌群<sup>[12-13]</sup>。Martins等<sup>[14]</sup>研究多宝鱼(*Scophthalmus maximus*)和塞纳加尔鲷(*Solea senegalensis*)循环水养殖系统,发现变形菌门是其中优势菌群。有研究认为 $\gamma$ -变形菌在营养物质含量高的水域是优势细菌,而 $\alpha$ -变形菌被认为在寡营养水体里占优势<sup>[15-16]</sup>。

本研究中养殖塘、固液分离池、沉淀池和蛋白分离池水样中以 $\gamma$ -变形菌纲为优势菌,紫外消毒池和补氧池水样中以 $\alpha$ -变形菌纲为主,这可能与循环水养殖系统中营养盐含量较高的养殖水在经过净化处理后水质得到了改良有关。

水质理化因子检测结果显示, $\text{NH}_3$ 、 $\text{NO}_2^-$ 和DO在系统中有较大变化。 $\text{NH}_3$ 和 $\text{NO}_2^-$ 是水产环境中两个十分重要的营养盐指标。有研究表明 $\text{NH}_3$ 和 $\text{NO}_2^-$ 含量高对石斑鱼的摄食率、生长速率和免疫水平等方面均造成不利影响<sup>[17-18]</sup>。在本系统中,

$\text{NH}_3$  在养殖塘中的含量最高, 之后开始降低, 并在从 P3 池经过 P4 池到 P5 池的过程中浓度下降尤为明显, P5 池后略有回升但基本维持在低水平。 $\text{NO}_2^-$  含量整体变化趋势与  $\text{NH}_3$  相似, 但变化幅度没有  $\text{NH}_3$  大。Alpha 多样性分析结果显示, P4 生物滤池细菌群落与其他池相比有较高的多样性, 其中鞘脂单胞菌目(Sphingomonadales)丰度(7.68%)、红细菌目(Rhodobacterales)丰度(6.30%)和硝化螺旋菌目(Nitrospirales)(3.19%)丰度较高。有研究表明鞘脂单胞菌中一些种属在维护池塘生态系统稳定方面有重要作用, 而红细菌能利用多种基质进行异养光合代谢反应, 两者均在水质净化中起到非常重要的作用<sup>[19-20]</sup>。硝化螺旋菌对环境中的亚硝酸盐类具有良好的去除作用, 且对中养殖废水的处理效果尤为显著<sup>[21]</sup>。理化检测还显示水体从 P3 池流经 P4 池到 P5 池的过程中  $\text{NH}_3$  下降幅度较大, 而细菌群落结构分析发现, 在 P4 生物滤池中新鞘氨醇杆菌属(*Novosphingobium*)丰度(7.18%)要明显高于其他单元(0.12%~0.96%)。新鞘氨醇杆菌普遍具有降解多环芳烃等烃类污染物的作用, 是良好的环境修复菌株<sup>[22]</sup>。有研究发现新鞘氨醇杆菌属某些细菌也具有降解水质中  $\text{NH}_3$  的功能<sup>[23]</sup>。本系统中从 P3 池流经 P4 生物滤池到 P5 池的过程中  $\text{NH}_3$  含量明显降低, 有可能与生物滤池中新鞘氨醇杆菌属细菌具有去除  $\text{NH}_3$  能力有关, 这也为筛选新型水质改良菌种提供了思路。在 P5 池至 P7 池中低水平  $\text{NH}_3$  和  $\text{NO}_2^-$  条件下, 弧菌科(Vibrionaceae)丰度为 0~12.52%, 明显低于 P1 池至 P4 池的丰度(17.94%~31.42%)。弧菌是一种典型的条件致病菌, 养殖水体中  $\text{NH}_3$  和  $\text{NO}_2^-$  含量较高时易使弧菌数量增加。弧菌可引起大规模水产疾病发生并造成严重死亡, 是石斑鱼养殖中主要的致病菌<sup>[24-25]</sup>。侯婷婷等<sup>[26]</sup>比较了青石斑鱼患病养殖池与健康养殖池细菌群落结构差异, 发现患病青石斑鱼养殖水体中核心微生物以弧菌等病原菌或对养殖动物不利的属为主。本系统中养殖水经过水质处理单元后, 在补氧池中水中弧菌仅占 0.02%, 数量已显著降低, 有助于控制病害发生的风险。另外, 水质溶解氧含量也有变化, 但变化趋势则与  $\text{NH}_3$  和  $\text{NO}_2^-$  不同, 在 P1 池中含量最低,

然后逐渐升高至 P7 池中达到最高。细菌群落结构分析发现, 在溶解氧含量低的 P1 池中, 肠杆菌目(Enterobacteriales)和梭杆菌目(Fusobacteriales)丰度较高, 这两类菌中多数种属为厌氧或兼性厌氧菌。在含氧量高的 P7 池中根瘤菌目(Rhizobiales)为优势菌, 其多数种属为好氧菌。总体来讲, 养殖尾水经过净化处理后  $\text{NH}_3$  和  $\text{NO}_2^-$  浓度降低, 溶解氧含量上升, 说明此循环水养殖系统有较好的水质净化和循环利用工艺。应用 CANOCO 软件分析环境因子和微生物种群之间相关性时, 虽未发现微生物群落组成结构和水质理化因子之间的显著相关性, 但这有可能是由于实验未采集时间序列样本以及实验样本较少等原因造成, 需在进一步研究中增大样品数量和采样时间点(比如系统运行前、中、后期)。

循环水养殖系统中生物滤池对控制整个系统中的有机物、氨氮、亚硝酸和硝酸盐浓度起着关键作用<sup>[27]</sup>。Leonard 等<sup>[28]</sup>发现循环水养殖系统中生物滤膜表层细菌会脱落并进入水体从而使水中微生物含量增加。在本研究中, 与循环水系统其他各单元相比, 生物滤池内水样中 OTU 数量明显增加(表 1), 香农指数值也较大(图 4a), 说明生物滤池中微生物数量较多, 多样性较为丰富。PCoA(图 5a)和聚类分析(图 5b)结果表明, 在紫外消毒池前 5 个塘水样大致分为一类, 与紫外消毒后微生物种群结果有较大差异, 其中生物滤池的细菌群落与其他 4 个塘又有所不同, 这说明作为最重要的水质净化单元, 生物滤池可能具有较特殊的细菌群落结构, 以发挥其在循环水系统中净化水质的作用。

综上所述, 石斑鱼循环水养殖系统中优势细菌类群为变形菌门。其中养殖塘、固液分离池、沉淀池和蛋白分离池中主要优势细菌为  $\gamma$ -变形菌纲, 紫外消毒池和补氧池中则以  $\alpha$ -变形菌纲为主, 而生物滤池中两者比例接近, 均为优势种群。从养殖塘到补氧池细菌多样性指数先降低后升高, 生物滤池中达到最高值, 之后再次下降至紫外消毒池中达到最低值, 补氧池中有所回升。整个循环水养殖系统中养殖塘、固液分离池、沉淀池、生物滤池和蛋白分离池各塘(P1~P5)的样品大致

可分为一类,与紫外消毒池和补氧池(P6~P7)之间细菌群落有较大差异,而在 P1~P5 各塘水样中,生物滤池水样的细菌群落与另四个塘也有所不同。经过净化处理后,循环系统的养殖水溶解氧含量上升,氨氮和亚硝酸盐含量下降并维持在较低的浓度。水质理化指标中  $\text{PO}_4^{3-}$ 、pH、DO 和温度可能对细菌群落结构影响相对较大,尤其是  $\text{PO}_4^{3-}$  是最主要的影响因素。但是总体而言,理化因子与细菌群落构成之间未发现显著的相关性( $P > 0.05$ )(表 2)。

### 参考文献:

- [1] Wang Y T. Techniques for fish culture in ocean cage in China[J]. *Marine Fisheries*, 2001, 23(4): 182-184. [王玉堂. 我国的海水网箱养鱼技术[J]. *海洋渔业*, 2001, 23(4): 182-184.]
- [2] Lin H R. The establishment of Grouper cultural technology and the ideas for sustained development of Grouper aquaculture industry[J]. *Journal of Fujian Fisheries*, 2012, 34(1): 1-10. [林浩然. 石斑鱼类养殖技术体系的创建和石斑鱼养殖产业持续发展的思考[J]. *福建水产*, 2012, 34(1): 1-10.]
- [3] Sugita H, Nakamura H, Shimada T. Microbial communities associated with filter materials in recirculating aquaculture systems of freshwater fish[J]. *Aquaculture*, 2005, 243: 403-409.
- [4] Kellenberger E. Exploring the unknown-the silent revolution of microbiology[J]. *Eur Mol Biol Organ Rep*, 2001, 2(1): 5-7.
- [5] Torsvik V, Ovreas L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2002, 5(3): 240-245.
- [6] Deng F, Yan Q P, Huang W Q, et al. Bacterial composition in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) culture water[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(6): 1277-1288. [邓菲, 鄢庆彬, 黄伟卿, 等. 大黄鱼网箱养殖水体的细菌群落结构[J]. *中国水产科学*, 2014, 21(6): 1277-1288.]
- [7] Nie Z J, Xu G C, Cheng Q Q, et al. Fingerprinting and diversity analysis of the predominant bacterial community in *Coilia nasus* from ponds and its environment[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(7): 1009-1017. [聂志娟, 徐钢春, 程起群, 等. 养殖刀鲚与生长环境菌群 PCR-DGGE 指纹图谱及多样性分析[J]. *水产学报*, 2014, 38(7): 1009-1017.]
- [8] Handelsman J, Rondon M R, Brady S F, et al. Molecular biology access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products[J]. *Chem Biol*, 1998, 10(5): 245-249.
- [9] Tang X M, Zheng J, Hao J M, et al. Applications of modern microbial identification technology in research of aquaculture environment[J]. *Microbiolog*, 2012, 39(6): 835-842. [汤学敏, 郑江, 郝聚敏, 等. 现代微生物识别技术在水产养殖环境研究中的应用[J]. *微生物学通报*, 2012, 39(6): 835-842.]
- [10] Sun X, Gao Y, Yang Y H. Recent advancement in microbial environmental research using metagenomics tools[J]. *Biodiversity Science*, 2013, 21(4): 393-400. [孙欣, 高莹, 杨云环. 环境微生物的宏基因组学研究新进展[J]. *生物多样性*, 2013, 21(4): 393-400.]
- [11] State Oceanic Administration People's Republic of China. GB 17378.4-2007, the specification for marine monitoring-Part 4: Seawater analysis[S]. Beijing: Standards Press of China, 2007. 国家海洋局. GB 17378.4-2007, 海洋监测规范第 4 部分: 海水分析[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [12] Stevens H, Stobner M, Simon M, et al. Phylogeny of Proteobacteria and Bacteroidetes from oxic habitats of a tidal flat ecosystem[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2005, 54(3): 351-365.
- [13] Microbial diversity in sediments collected from the deepest cold-seep area[J]. *Jpn Trench Mar Biotechnol*, 1999, 1(4): 391-400.
- [14] Martins P, Cleary D F, Pires A 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): 995-998.
- [15] Payne M S, Hall M R, Bannister R, et al. Microbial diversity within the water column of a larval rearing system for the ornate rock lobster *Panulirus ornatus*[J]. *Aquaculture*, 2006, 258(1-4): 80-90.
- [16] Tamaki H, Sekiguchi Y, Hanada S, et al. Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow eutrophic lake by molecular and improved cultivation-based techniques[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(4): 2162-2169.
- [17] Zheng L Y, Yang Q H, Huang Z C, et al. Effect of the breeding density and ammonia-nitrogen on growth and immunity of *Epinephelus coioides* in recirculating system[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2013, 22(5): 706-712. [郑乐云, 杨求华, 黄种持, 等. 循环水养殖密度和氨氮对斜带石斑鱼生长和免疫力的影响[J]. *上海海洋大学学报*,



- 2013, 22(5): 706–712.]
- [18] Zheng L Y. Acute toxic effects of ammonia and nitrite on *Epinephelus coioides* fry[J]. 郑乐云. 氨氮和亚硝酸盐对斜带石斑鱼苗的急性毒性效应[J]. 海洋科学, 2012, 36(5): 81–86.
- [19] 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.]
- [20] Qin Y Y, Li D T, Yang H. Population diversity and community structure of bacteria on biofilms in a potable water pre-treating bioreactor[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2007, 13(1): 104–107. [钦颖英, 李道棠, 杨虹. 给水生物预处理反应器的细菌种群多样性和群落结构[J]. 应用与环境生物学报, 2007, 13(1): 104–107.]
- [21] Deng D B. Community structure and dynamics of bacteria in a water recirculating system for culturing[D]. Fujian: Jimei University, 2010. [邓德波. 鳗鲡养殖循环水处理系统中细菌群落结构及动态变化[D]. 福建: 集美大学, 2010]
- [22] Yuan J, Lai Q L, Zheng T L, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium *Novosphingobium* sp. H25 isolated from deep sea and its degrading genes[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(9): 1208–1213. [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.]
- [23] Gong X J. Removal of iron, manganese and ammonia from groundwater of northeast small towns[D]. Jilin: Jilin University, 2015. [宫喜君. 东北小村镇地区地下水中铁锰氨氮去除实验研究[D]. 吉林: 吉林大学, 2015.]
- [24] Yan M C, Chen S B, Shan L Z, et al. A critical review: pathogenic vibrio in maricultural animals[J]. Fisheries Science, 2009, 28(8): 475–481. [闫茂仓, 陈少波, 单乐州, 等. 海水养殖动物致病弧菌的研究进展[J]. 水产科学, 2009, 28(8): 475–481.]
- [25] Luo M, Chen F X, Liu L L, et al. Progress in disease research of grouper aquaculture in China[J]. Fisheries Science, 2013, 32(9): 549–554. [罗鸣, 陈傅晓, 刘龙龙, 等. 我国石斑鱼养殖疾病的研究进展[J]. 水产科学, 2013, 32(9): 549–554.]
- [26] Hou T T, Zhong Z P, Liu Y, et al. Bacterial community characterization of rearing water of marine recirculating aquaculture systems for yellow grouper (*Epinephelus awoara*)[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(2): 253–263. [侯婷婷, 钟志平, 刘纘, 等. 青石斑鱼海水循环水养殖水体的细菌群落特征[J]. 微生物学报, 2016, 56(2): 253–263.]
- [27] Nijhof M, Bovendeur J. Fixed film nitrification characteristics in sea-water recirculation fish culture systems[J]. Aquaculture, 1990, 87(2): 133–143.
- [28] Leonard N, Blancheton J P, Guiraud J P. Populations of heterotrophic bacteria in an experimental recirculating aquaculture system[J]. Aquac Eng, 2000, 22(1–2): 109–120.

## Analysis of microbial community structure in recirculating aquaculture system for groupers (*Epinephelus*)

WU Yue, MA Jianzhong, ZHENG Yinuo, XU Kailun, LI Min, CHEN Xingxing, HU Yuan, ZENG Guoquan, HUANG Zhenhua

Zhejiang Mariculture Research Institute, Wenzhou 325005, China

**Abstract:** Groupers (*Epinephelus*) are part of the large fish family Serranidae and are an important marine-cultured genus. In China, groupers have been farmed for over 30 years. Innovative technologies such as recirculating aquaculture systems (RAS) have been developed to improve the efficiency and sustainability of intensive aquaculture. In RAS, bacterial communities that are critical to ecological processes are also closely correlated with diseases in aquaculture. This study aimed to clarify bacterial community characteristics in marine RAS for groupers. Water samples were collected from the following pond types: fish-production, solid-liquid separation, sedimentation, biofilter, protein-separation, ultraviolet-sterilization, and oxygen-increasing. Samples were filtered through 0.22  $\mu\text{m}$  mixed cellulose ester membranes to collect microbial biomass. Bacterial community DNA was isolated from the membrane filters. High-throughput sequencing (Illumina MiSeq) of the V3–V4 hypervariable region in the 16S rRNA gene was used to investigate microbiome structural characters. The results showed that Proteobacteria was the most abundant phylum in the water supply. Other important phyla included Bacteroidetes, Cyanobacteria, Fusobacteria, Firmicutes, and Nitrospira. Principal coordinate analysis and cluster analysis indicated that bacterial composition differed significantly before and after UV irradiation. The most dominant class in the rearing, solid-liquid separation, sedimentation, and protein-separation ponds was  $\gamma$ -Proteobacteria, whereas  $\alpha$ -Proteobacteria was the most dominant in the ultraviolet-sterilization and oxygen-increasing ponds. Both classes were dominant in the biological-filter pond. The Shannon diversity index decreased first and then increased, peaking in the biological filter pond before decreasing again to the lowest value in the ultraviolet-sterilization pond, followed by a slight increase in the oxygen-increasing pond. In addition, our analysis of the water environmental parameters showed that dissolved oxygen concentrations increased, whereas  $\text{NH}_3$  and  $\text{NO}_2^-$  concentrations decreased, remaining low after the water was purified. This outcome suggested that the RAS system has an effective water purification process. The correlations between microbial communities and environmental parameters were also investigated with canonical correspondence analysis, which showed that phosphates, pH, dissolved oxygen, and temperature had relatively stronger effects on bacterial communities than did other measured environmental variables. Overall, however, no significant association existed between environmental factors and microbial community structure, possibly due to small sample sizes.

**Key words:** *Epinephelus*; recirculating aquaculture system; rearing water; bacterial community; high-throughput sequencing

**Corresponding author:** HUANG Zhenhua. E-mail: huangzhenhua0112@163.com