

青岛崂山湾近海扇贝养殖区细菌多样性 及环境因子分析

马景雪^{1,2,3}, 张培玉¹, 王宗兴^{2,3}, 郑明刚^{2,3}, 高 萍^{2,3},
曲凌云^{2,3}, 王 波^{2,3}, 郑风荣^{2,3*}

(1. 青岛大学 环境科学与工程学院, 山东 青岛 266071; 2. 自然资源部 第一海洋研究所, 山东 青岛 266061;
3. 自然资源部 海洋生态环境科学与工程实验室, 山东 青岛 266061)

摘 要: 为研究近海扇贝养殖水域水质、细菌种群分布规律以及微生物群落多样性对环境因子的响应, 2019 年 5 月至 10 月采集了青岛市崂山湾青山村近海栉孔扇贝养殖水域不同站位的海水样本, 通过高通量测序方法分析了不同月份海水样本微生物群落结构和多样性的差异, 探讨了环境因子与微生物群落结构的相关性。结果表明: ①检测到变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、蓝细菌门(Cyanobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes)等 52 个细菌门, 115 个纲, 其中变形菌门为优势菌门, 主要包括 γ -Proteobacteria 和 α -Proteobacteria 纲; ②2019 年 9 月, 养殖区水样中细菌多样性升高, 弧菌多样性下降, 且细菌细胞数量达到最高点, 说明该养殖区存在爆发弧菌病的可能性; ③ RDA 冗余分析表明, 浊度 ($P=0.027$) 对养殖密区细菌 OUT (Operational Taxonomic Units) 水平的物种组成和群落结构具有显著的影响, 硝酸盐 ($P=0.017$)、浊度 ($P=0.033$) 对养殖疏区 OTU 水平的物种组成和群落结构具有显著的影响; ④不同区域细菌门水平环境因子相关性 Heatmap 图分析表明, 养殖活动会影响近海细菌群落结构与环境因子的作用程度, 从而增加病害发生的可能性。本研究可为贝类疾病的防治及近海海域生态系统的健康发展提供一定的理论基础。

关键词: 近海养殖; 群落结构; 高通量测序; 环境因子

中图分类号: Q938.1

文献标志码: A

文章编号: 1671-6647(2022)02-0307-13

doi: 10.12362/j.issn.1671-6647.2022.02.012

引用格式: 马景雪, 张培玉, 王宗兴, 等. 青岛崂山湾近海扇贝养殖区细菌多样性及环境因子分析[J]. 海洋科学进展, 2022, 40(2): 307-319. MA J X, ZHANG P Y, WANG Z X, et al. Analysis of bacterial diversity and environmental factors in offshore scallop culture area of Laoshan Bay, Qingdao[J]. Advances in Marine Science, 2022, 40(2): 307-319.

中国拥有丰富的海洋渔业资源^[1], 海水养殖在海洋渔业中占有重要的地位。近年来, 我国水产养殖业发展迅猛, 其中贝类养殖已经发展成为我国海水养殖的支柱产业^[2], 据渔业年鉴统计, 2019 年全国贝类的海水养殖面积为 120.42×10^4 万 m^2 , 占全国海水养殖总面积 60.45%; 2019 年全国贝类海水养殖产量为 1 438.97 万 t, 占全国海水养殖总产量的 69.67%, 其中山东省位居全国沿海省份贝类养殖产量首位^[3]。

养殖规模的增加, 加速了向沿海生态系统的养分排放^[4-7], 使近海养殖水域的环境恶化, 导致病害频发, 给贝类养殖产业造成了巨大的经济损失。养殖自身污染问题成为养殖海域环境恶化的主要原因之一^[8], 加剧了海水富营养化程度, 破坏了生物多样性, 在不同浓度有机质的影响下, 微生物群落的生理机能也随之发生改变^[9-10], 而每天过滤大量海水的滤食性动物——双壳贝类则更容易受到水中细菌群落变化的影响^[11], 从而诱发贝类病变。

收稿日期: 2021-02-22

资助项目: 近海病原微生物灾害形成机制与监测预警技术研究——近海开放式养殖区病原微生物流行暴发机制及其风险预测 (2017YFC1404504)

作者简介: 马景雪(1995—), 女, 硕士研究生, 主要从事海洋微生物方面研究. E-mail: 496148352@qq.com

*** 通信作者:** 郑风荣(1975—), 女, 副研究员, 博士, 主要从事海洋生物学方面研究. E-mail: zhengfr@fio.org.cn

(王佳实 编辑)

位于青岛崂山湾海域的青山村扇贝养殖区规模庞大,其中栉孔扇贝的筏式养殖占据主要比例。该养殖区位于河口附近,河流的输入会导致近海岸呈现显著的盐度梯度,pH、温度和营养盐也发生明显变化,从而形成动态复杂的水环境系统^[12]。前人对养殖区浮游植物群落结构多样性颇有研究^[13-20],而对近海扇贝养殖区浮游细菌群落结构研究鲜少。2019 年本研究选取养殖活动频繁的 5 月至 10 月,对该海域环境理化因子进行监测,利用基于 16S rRNA 基因的 Illumina Miseq 高通量测序方法对其细菌群落多样性及其在空间和时间尺度上的变化进行分析,并探讨了环境因子与菌群结构的相互作用,以为该水域的水产养殖及近海海域生态系统的健康发展提供支持。

1 材料与方法

1.1 样品采集时间与地点

本研究于 2019 年 5 至 10 月在青岛市崂山湾青山村近海扇贝养殖海域采样,每月采集 1 次。采样区(图 1)分为养殖密区(120°41'40"E,36°09'21"N)、养殖疏区(120°42'04"E,36°09'28"N)、对照区(120°42'24"E,36°09'35"N)三个区,分别命名为 M 区、S 区和 D 区,在每个区域均等地选 3 个站位采样(间距>500 m)。

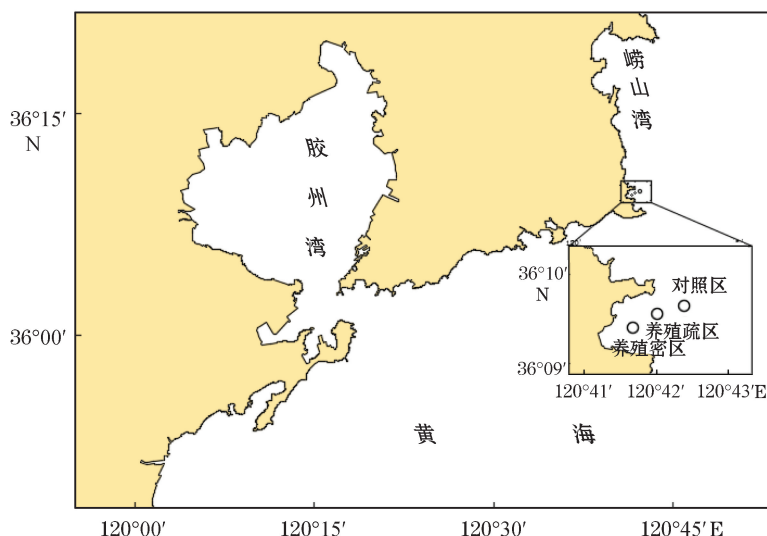


图 1 样品采集地理位置示意图

Fig.1 Geographic location of sample collection

1.2 样品采集与处理

用手持式柱状采水器在指定点采取 1 L 表层水,在低温(4 °C)条件下运回实验室;采用 0.22 μm 的滤膜负压过滤 300 mL 水样,将处理好的滤膜用液氮速冻,放-80 °C 冰箱保存。每份水样过滤重复 3 次。

1.2.1 环境因子的测量

本研究采用 WZB-170 型便携式浊度计测量水样浊度,JENCO 9030M 便携式溶氧(S)测定仪测量溶氧(Dissolved Oxygen, DO)质量浓度和温度(θ),556MPS 便携式多参数水质测量仪测量盐度,TURNER Designs Triligy 实验室荧光仪测量叶绿素 *a* (Chl-*a*) 质量浓度,其他参数在实验室中均用标准方法测量。

1.2.2 流式细胞术测定细菌丰度

各站位取 4 mL 海水至冻存管中,随后加入 444 μL 戊二醛固定,在低温避光的条件下带回实验室,液氮处理后,-80 °C 保存。采用细胞流式仪进样前,取 180 μL 样品和 20 μL SYBRTM Green I nucleic acid gelstain (invitrogen, USA) 染料混匀,染色完成后,上机测样。使用低流速(14 μL/min),激发电压为 SSC 450、FL1 500、FL2 510 和 FL3 661。

1.2.3 Illumina Miseq 高通量测序

用 DNeasy Powerwater Pro Kit 试剂盒(QIA-GEN,USA)提取 DNA,用 1%的琼脂糖凝胶检测提取的 DNA 质量。分别用细菌通用引物 338F-806R^[21]和弧菌特异性引物 V_169F-V_680R^[22-23]两对引物对 DNA 进行 PCR 扩增(表 1)。将同一样本的 PCR 产物混合后使用 2%琼脂糖凝胶回收 PCR 产物,利用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axy-gen Biosciences, Union City, CA, USA)回收产物纯化,2%琼脂糖凝胶电泳检测,并用 Quantus™ Fluorometer (Promega, USA)对回收产物进行检测定量。使用 NEXTFLEX Rapid DNA-Seq Kit 建库。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences in this study

名 称	序列 5'-3'
338F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG
806R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V_169F	GGATAACYATTGGAAACGATG
V_680R	GAAATTCTACCCCCTCTACAG

1.2.4 数据处理

利用均值法处理环境因子的数据及细菌细胞的丰度;使用 Fastp 软件^[24]和 FLASH 软件^[25]分别对原始测序序列进行质控和拼接,利用 UPARSE 软件根据 97%的相似度对序列进行 OTU 聚类并剔除嵌合体^[26-27]。利用 RDP classifier^[28]对每条序列进行物种分类注释。利用 R 语言(version 3.3.1)进行物种组成分析、环境因子与群落结构的相关性分析及冗余分析。利用 SPSS 22.0 的单因素方差分析(one-way Analysis of Variance, one-way ANOVA)进行组间差异显著性检验。

2 结 果

2.1 环境因子理化指标

养殖环境是水产养殖中一个不可忽视的部分,养殖用水的理化性质是养殖活动的重要保证,表 2 展示了崂山湾青山村近海养殖区在 2019 年 5 月至 10 月的环境理化指标变化,养殖水质符合《海水水质标准》(GB 3097—1997)^[29]第二类水质标准要求。

表 2 2019 年崂山湾青山村扇贝养殖区理化性质指标

Table 2 Physical and chemical properties of scallop culture area in Qingshan Village, Laoshan District from May to October in 2019

环境因子	5 月			6 月			7 月			8 月			9 月			10 月		
	M 区	S 区	D 区	M 区	S 区	D 区	M 区	S 区	D 区	M 区	S 区	D 区	M 区	S 区	D 区	M 区	S 区	D 区
$\rho_{\text{Chl-a}} / (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	1.51	1.09	1.47	1.82	2.02	2.68	1.51	1.99	1.47	1.54	1.75	1.57	1.92	1.52	1.41	1.62	1.41	1.79
浊度/NTU	3.45	4.52	2.38	3.24	2.82	2.11	4.78	2.97	2.62	4.81	6.50	2.75	7.89	7.04	5.69	7.92	9.68	7.99
$\rho_{\text{DO}} / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	8.66	8.63	8.80	7.91	7.91	8.03	6.07	6.43	6.47	6.24	6.27	6.57	6.70	6.64	6.63	7.30	7.28	7.33
$\theta / ^\circ\text{C}$	18.53	19.13	18.77	18.07	17.83	18.50	21.83	22.77	23.10	24.07	24.03	24.60	24.00	23.90	24.20	20.90	20.83	21.00
S	29.00	30.00	31.00	31.91	31.92	31.90	31.74	31.73	31.73	31.72	31.71	31.66	31.83	31.82	31.80	31.93	31.93	31.92
pH	7.39	7.38	7.39	8.41	8.47	8.45	8.23	8.26	8.28	8.26	8.31	8.34	8.14	8.18	8.26	8.29	8.30	8.36
$\rho_{\text{DIN}} / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	0.068	0.068	0.064	0.077	0.082	0.072	0.064	0.064	0.057	0.048	0.042	0.039	0.057	0.050	0.043	0.081	0.075	0.063
$\rho_{\text{亚硝酸盐}} / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	0.003 7	0.004 3	0.004	0.004	0.004	0.003	0.004	0.004	0.004	0.003	0.004	0.004	0.003	0.004	0.004	0.003	0.004	0.004
$\rho_{\text{硝酸盐}} / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	0.049	0.051	0.047	0.060	0.064	0.058	0.047	0.048	0.058	0.032	0.026	0.026	0.041	0.033	0.030	0.061	0.060	0.048

环境因子	续表																	
	5 月			6 月			7 月			8 月			9 月			10 月		
	M 区	S 区	D 区	M 区	S 区	D 区	M 区	S 区	D 区	M 区	S 区	D 区	M 区	S 区	D 区	M 区	S 区	D 区
$\rho_{\text{氨氮}} / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	0.015	0.013	0.013	0.012	0.014	0.010	0.013	0.012	0.014	0.013	0.012	0.009	0.013	0.014	0.008	0.016	0.011	0.009
$\rho_{\text{磷酸盐}} / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	0.009	0.009	0.009	0.007	0.009	0.006	0.009	0.007	0.009	0.009	0.007	0.009	0.009	0.007	0.009	0.009	0.007	0.009

注:表中数据均为每个区 3 个站位的平均值。

2.2 流式细胞仪检测细菌丰度结果

从海水中细菌单细胞的集聚分布情况(图 2)所示,侧向散射光(Side Scattering,SSC)与细胞的内容物含量有关,FL 表示颗粒被染上的荧光的数量。通过 SSC 对 FL1 和 FL3 对 FL1 双参数图对细菌细胞进行区分和计数。R1 和 R2 分别为在不同的荧光强度下根据聚集情况划分的细菌细胞门。由流式细胞仪计数结果(图 2)可知,每毫升海水的细胞数的变化呈现先上升后下降的趋势。养殖密区及疏区均在 9 月达到最高点,对照区的最高点出现在 8 月,其最低点均出现在 5 月(图 3)。

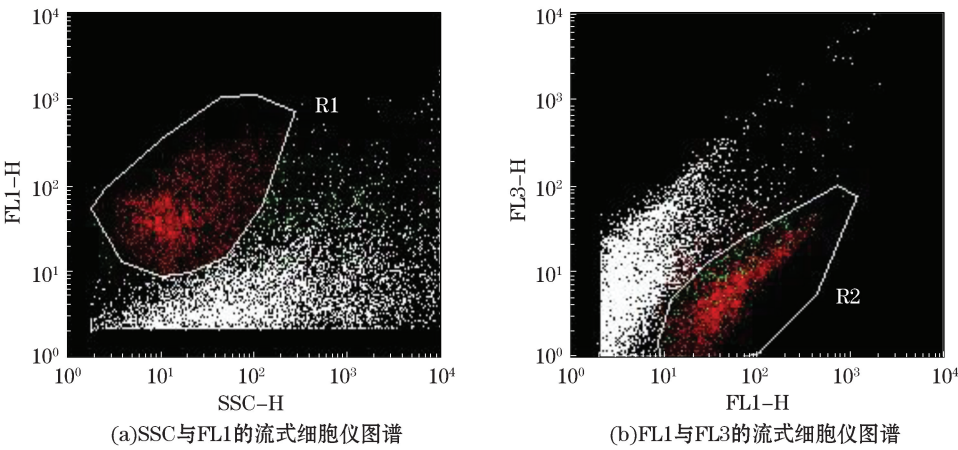


图 2 细胞流式图
Fig.2 Cell flow diagram

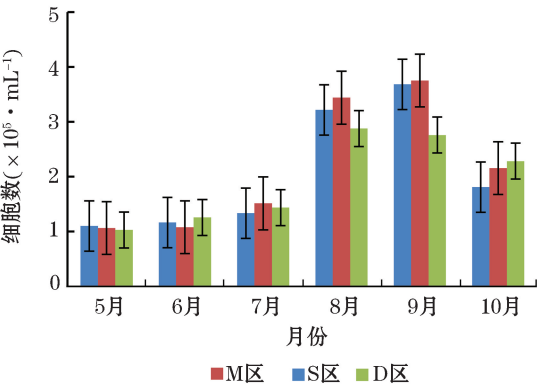


图 3 2019 年 5 月至 10 月养殖区海域细菌细胞数量
Fig.3 The number of bacterial cells in the aquaculture area from May to October in 2019

2.3 水体菌群多样性及其对环境因子响应

2.3.1 微生物 Alpha 多样性分析

通过聚类操作,根据 97%的相似度水平,对所有序列进行 OTU 划分,青山村扇贝养殖区及对照区细菌的香农-威纳指数(Shannon-Weiner Index)呈现波动的变化趋势,养殖疏区呈现先升高后下降的趋势。弧菌的香农-威纳指数均呈现 M 型变化。2019 年 9 月,细菌多样性升高而弧菌多样性降低,且细菌细胞数也达到峰值(图 4a 和 4b)。

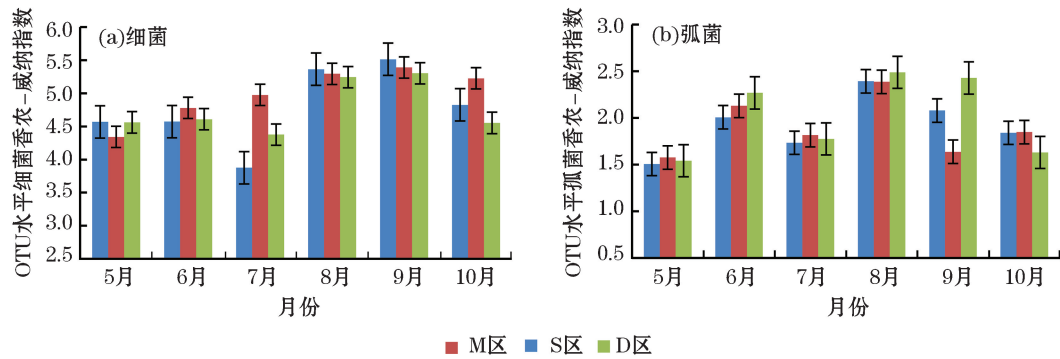


图 4 2019 年 5 月至 10 月水环境细菌和弧菌多样
Fig.4 The diversities of bacteria and *Vibrio* in water environment from May to October in 2019

2.3.2 水环境群落组成

本研究共检测出 52 个细菌门,其中存在 11 个优势门(丰度占比大于 1%),分别为变形菌门(Proteobacteria)、蓝细菌门(Cyanobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、Patescibacteria、疣微菌门(Verrucomicrobia)、Marinimicrobia_SAR406-clade、绿弯菌门(Chloroflexi)、Epsilonbacteraeota、酸杆菌门(Acidobacteria),其中变形菌门(Proteobacteria)为优势菌门(图 5)。

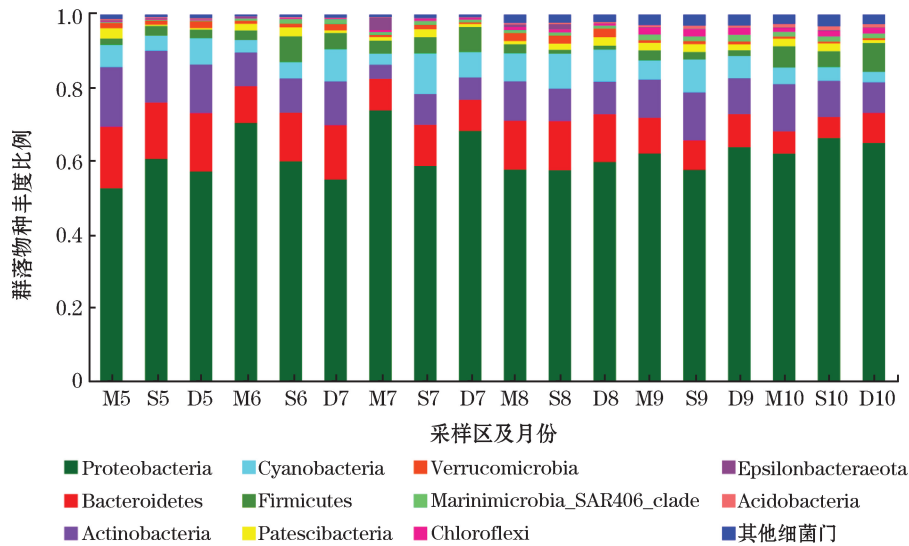


图 5 细菌门水平群落结构组成
Fig.5 Compostion of community structure at bacterial phylum level

在纲水平,共检测出 115 个纲,其中存在 13 个优势纲(丰度占比大于 1%),相对丰度较高的是 γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)、 α -变形菌纲(Alphaproteobacteria)、拟杆菌纲(Bacteroidia)和放线菌纲(Actinobacteria)(图 6)。

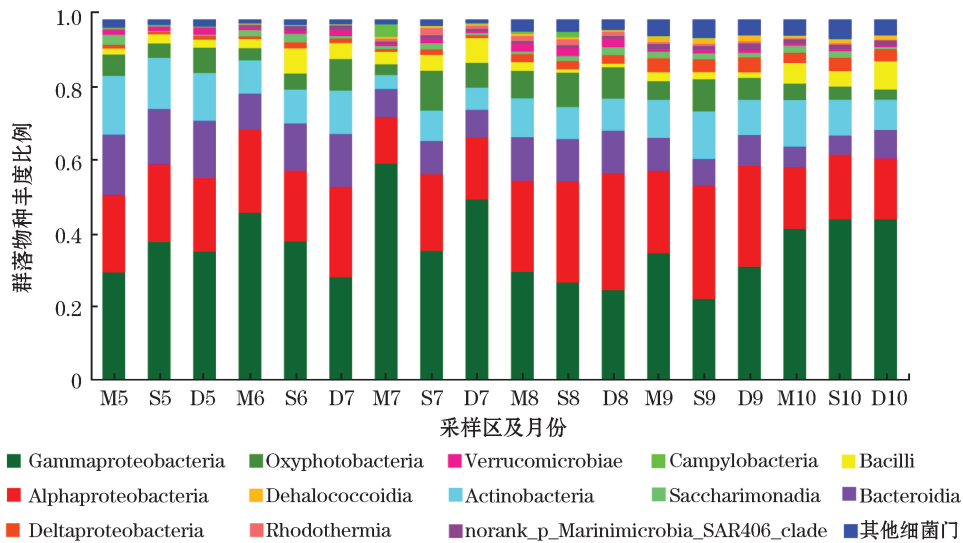


图 6 细菌纲水平群落结构组成

Fig.6 Composition of community structure at bacterial class level

弧菌属在细菌属水平丰度中占据重要的比例(图 7),养殖密区在 2019 年 6 月和 7 月出现较高的丰度比例,对照区在 2019 年 7 月的丰度比例最高。

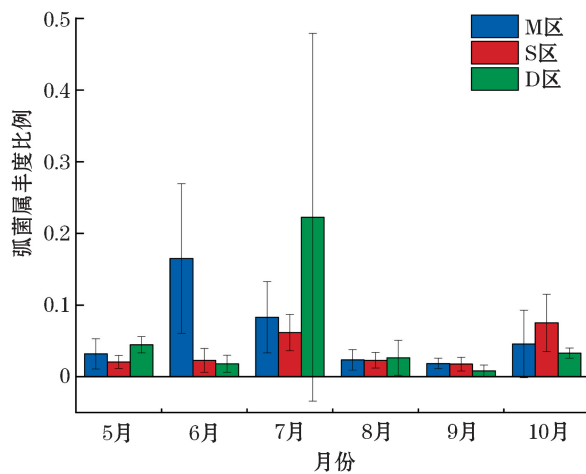
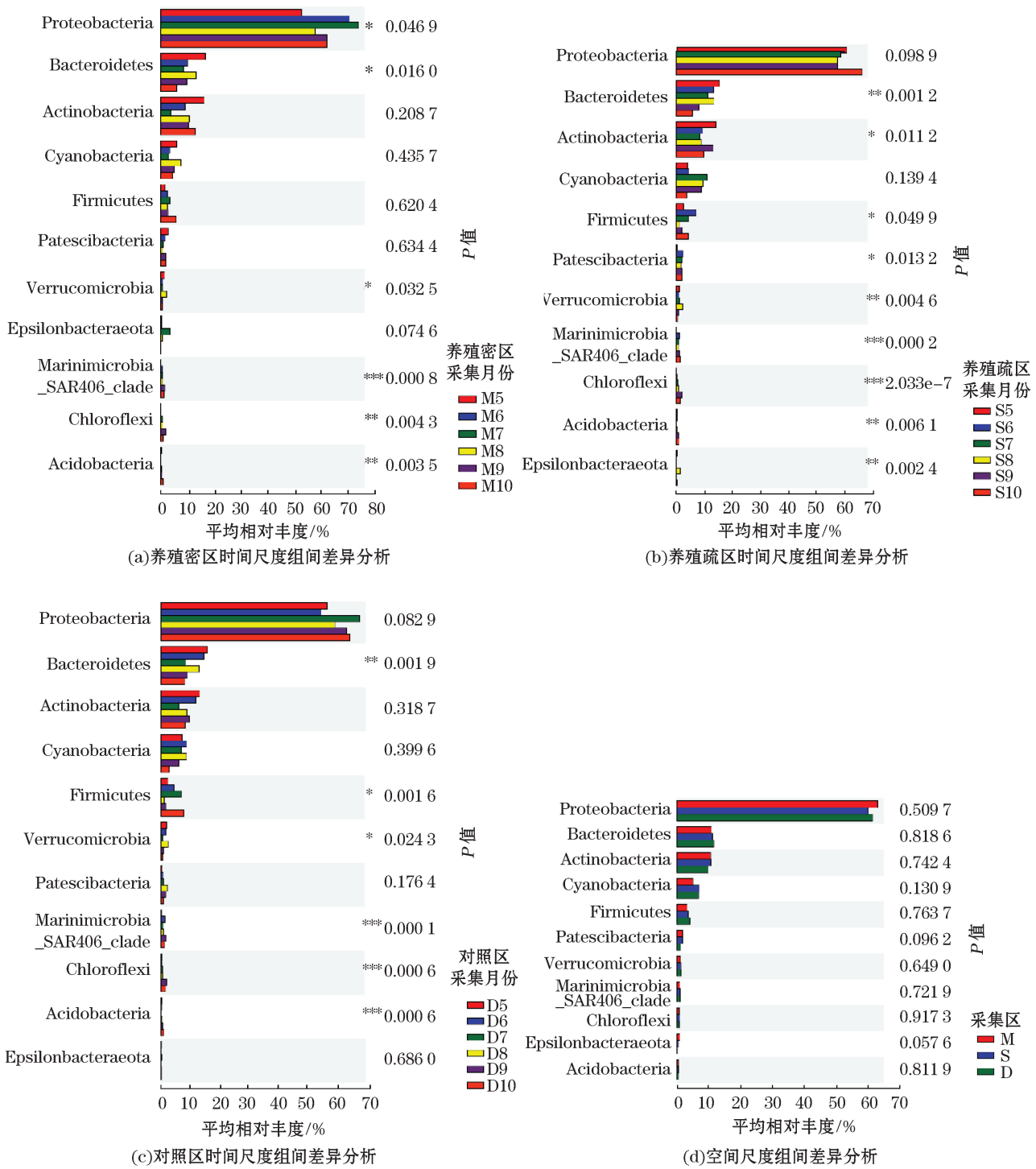


图 7 养殖区弧菌丰度比例分布

Fig.7 Diagram of abundance proportion of *Vibrio* in culture area from May to October in 2019

对各区不同月份的样品及密区、疏区和对照区的样品进行优势门的组间差异显著性检验分析,结果表明,各区样品在不同月份 Bacteroidetes、Verrucomicrobia、Marinimicrobia_SAR406_clade、Chloroflexi、Acidobacteria具有差异($P < 0.05$)或显著差异($P < 0.01$),而密区、疏区和对照区的样品在门水平上微生物组成没有显著差异(图 8)。



注: * 代表 $P < 0.05$ 时,组间具有差异性; ** 代表 $P < 0.01$ 时,组间具有显著差异性; *** 代表 $P < 0.001$ 时,组间具有极显著差异性。

图 8 组间差异显著分析

Fig.8 Analysis of significant differences between groups from May to October in 2019

2.3.3 水环境群落组成与环境因子的相关性

RDA 分析揭示了不同区域样品中微生物组成与环境因子的相关性,采用 bioenv 函数检验了每个环境因子的显著性,在养殖密区、养殖疏区和对照区的 RDA 分析中,第一坐标轴和第二坐标轴共贡献解释量分

别为 59.25%、47.1% 和 45.27%。结果表明,浊度($P=0.027$)对养殖密区 OTU 水平的物种组成和群落结构具有显著的影响;硝酸盐($P=0.017$)、浊度($P=0.033$)对养殖疏区 OTU 水平的物种组成和群落结构具有显著的影响,磷酸盐($P=0.004$)、DO($P=0.001$)、pH($P=0.004$)对其具有显著的影响;DO($P=0.018$)对对照区 OTU 水平的物种组成和群落结构具有显著的影响(图 9)。

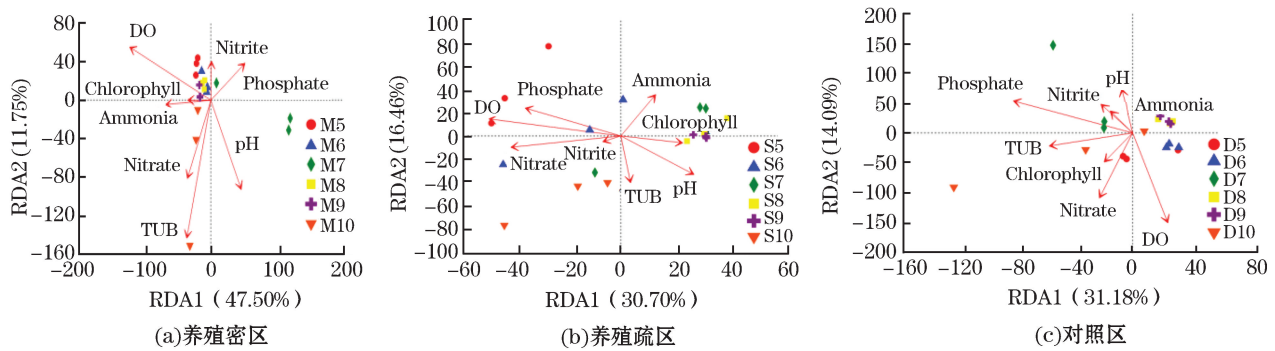
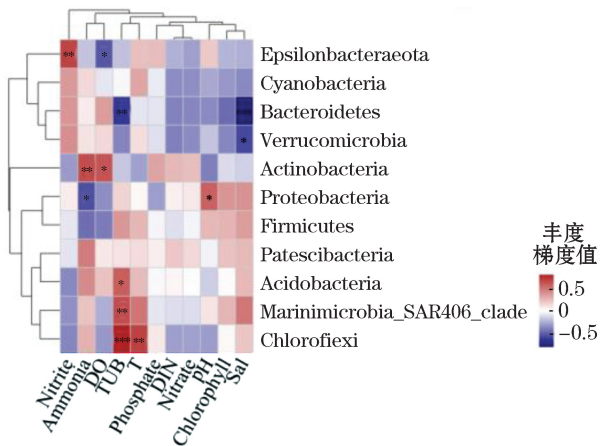


图 9 细菌 OTU 水平环境因子 RDA 分析

Fig.9 RDA analysis on the correlation between environmental factors and bacterial OTU level

通过 Spearman 相关性计算,利用求平均的方式对环境因子和物种层级进行聚类,选取门水平上丰度为前 11 位的物种进行分析,相关性 Heatmap 图和环境因子聚类树分析结果表明:

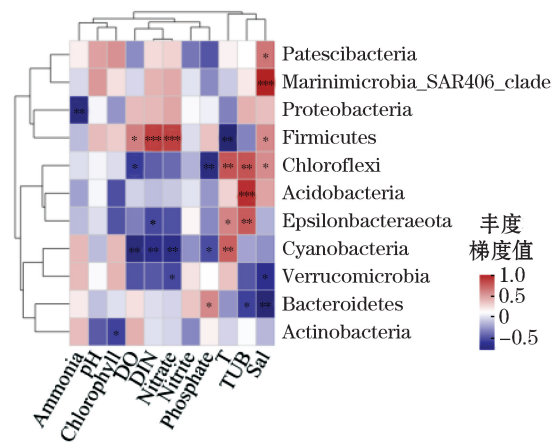
1) 在门水平上,养殖密区的细菌群落物种与环境因子均具有不同程度的相关性,其中,拟杆菌门与盐度(Spearman 相关系数 $r=-0.776$, $P<0.001$)呈现极显著负相关关系;绿弯菌门与浊度(Spearman 相关系数 $r=0.744$, $P<0.001$)呈现极显著正相关关系。养殖疏区的放线菌门与浊度呈现极显著正相关关系(Spearman 相关系数 $r=0.808$, $P<0.001$);Marinimicrobia_SAR406_clade 与盐度呈现极显著正相关关系(Spearman 相关系数 $r=0.856$, $P<0.001$),厚壁菌门分别与 DIN(Spearman 相关系数 $r=0.760$, $P<0.001$)和硝酸盐(Spearman 相关系数 $r=0.751$, $P<0.001$)呈现极显著正相关关系(图 10 和图 11)。



注: * 代表 $P<0.05$ 时,细菌群落物种与环境因子具有相关性; ** 代表 $P<0.01$ 时,细菌群落物种与环境因子具有显著相关性; *** 代表 $P<0.001$ 时,细菌群落物种与环境因子具有极显著相关性。

图 10 养殖密区细菌门水平环境因子相关性 Heatmap 图

Fig.10 Heatmap diagram of correlation between bacterial phylum level and environmental factors in intensive culture area

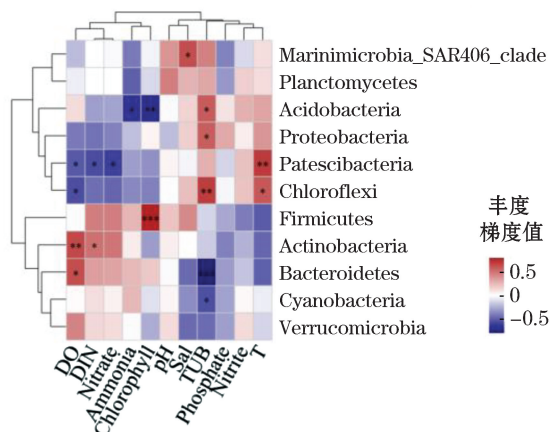


注: * 代表 $P<0.05$ 时,细菌群落物种与环境因子具有相关性; ** 代表 $P<0.01$ 时,细菌群落物种与环境因子具有显著相关性; *** 代表 $P<0.001$ 时,细菌群落物种与环境因子具有极显著相关性。

图 11 养殖疏区细菌门水平环境因子相关性 Heatmap 图

Fig.11 Heatmap diagram of correlation between bacterial phylum level and environmental factors in sparse culture area

2)在门水平上,对照区的物种与环境因子具有不同程度的相关性,与养殖区不同,其中,酸杆菌门和厚壁菌门与叶绿素分别呈现显著负相关关系(Spearman 相关系数 $r = -0.612, P < 0.01$)和极显著正相关关系(Spearman 相关系数 $r = 0.736, P = 0.001$),Patescibacteria 与温度呈现显著正相关关系(Spearman 相关系数 $r = 0.650, P < 0.01$),绿弯菌门和拟杆菌门分别与浊度具有显著正相关(Spearman 相关系数 $r = 0.642, P < 0.01$)和极显著负相关关系(Spearman 相关系数 $r = -0.722, P < 0.001$),放线菌门与溶解氧呈现显著正相关关系(Spearman 相关系数 $r = 0.607, P < 0.01$)(图 12)。



注: * 代表 $P < 0.05$ 时,细菌群落物种与环境因子具有相关性; ** 代表 $P < 0.01$ 时,细菌群落物种与环境因子具有显著相关性;
*** 代表 $P < 0.001$ 时,细菌群落物种与环境因子具有极显著相关性。

图 12 对照区细菌门水平环境因子相关性 Heatmap 图

Fig.12 Heatmap diagram of correlation between bacterial phylum level and environmental factors in control area

3 讨 论

3.1 海水水样细菌群落多样性

通过 Illumina Miseq 高通量测序的方法对养殖区海水水样进行门、纲水平的群落结构分析,结果表明,在水样样品中共检测到 52 个门、115 个纲,香农-威纳指数为 4.762~5.539, Sobs 指数为 676~2 140。2019 年 8 月和 9 月的细菌多样性指数较高,香农指数总体上随温度的变化而变化,但 2019 年 7 月的养殖密区和对照区的多样性指数相对低于趋势线,这可能是由在该月份取样时出现连续的雷雨天气所致。根据图 5 可知,不同区域不同月份的样品中的优势群落均为变形菌门(Proteobacteria),占总群落 50% 以上,主要包括 α -Proteobacteria 和 γ -Proteobacteria。其他的优势菌门排列依次是蓝细菌门(Cyanobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、Patescibacteria、疣微菌门(Verrucomicrobia)、Marinimicrobia、绿弯菌门(Chloroflexi)、Epsilonbacteraeota、酸杆菌门(Acidobacteria)。检测结果与近年来的研究结果相似,杨铭玉等^[30]对东海舟山渔场近岸细菌群落结构分析得出,该养殖区主要的细菌群落类群为变形菌(62.99%)、拟杆菌群(10.23%)、蓝藻细菌(9.69%)、放线菌门(8.94%)。辽东湾沿海的仿刺参、对虾混养养殖水体中主要是变形菌门(51.5%),其次是放线菌门(23.6%)、拟杆菌门(11.3%)、厚壁菌门(9.1%)^[31]。王飞飞^[32]利用高通量测序、分子生物学方法等手段对黄海北部海域贝类养殖区进行细菌群落分析,也证明养殖区的海水中变形菌门占绝对优势。

在纲水平中, γ -变形菌纲在群落中占据了主导地位,且养殖区丰度占比高于对照区,其中包含许多重要的病原菌,如沙门氏菌属(*Salmonella*)、耶尔辛氏菌属(*Yersinia*)、弧菌属(*Vibrio*),这些菌群会引起不同程

度的生物感染,严重者会导致大面积流行病的爆发。变形菌门中 σ -变形菌纲的比例相对较小,具有硫氧化、固碳、 C_1 利用和异养能力^[33],在 2019 年 8、9 和 10 月份活动较为频繁。SAR406 在 2019 年 9 和 10 月份占比较高,该菌门参与厌氧氨氧化与磷循环的过程^[34-35],且能够影响无机碳的固定^[36]。

在属水平,弧菌属是我们重点关注的对象,研究发现 2019 年 6 月的弧菌属比例在养殖区处在最高点,弧菌多样性也处于较高值,说明单一弧菌种的数量较低,且细菌细胞数量也较低,因此患病的几率大幅降低。2019 年 7 月弧菌的相对比例较高,细菌总数下降,弧菌多样性降低,因此单一弧菌种数量增加。2019 年 7 月、8 月和 9 月处于高温时期,适宜弧菌的快速繁殖,同时会降低扇贝的活性。因此该时期易爆发弧菌病。2019 年 9 月份虽然弧菌属占比不高,但是细胞总数处于峰值,且细菌多样性增大而弧菌多样性减少。因此 2019 年 9 月相较于其他高温月份(2019 年 7 月和 8 月)更具有爆发弧菌病的条件。邓欢等^[37]也曾报道过在 2019 年 9 月份大连爆发了扇贝弧菌病,造成了扇贝群体突发性死亡。

对各区不同月份的样品及密、疏、对照区的样品进行优势门的组间差异显著性检验分析,发现养殖活动对海水中菌群优势门的影响不大,组间没有明显差异,表明从养殖区到海区,浮游细菌群落优势门季节变化大于空间尺度差异。Lü 等^[38]研究表明黄河三角洲演替潮滩的细菌群落结构存在季节性差异。而 MA 等^[39]认为黄海沿岸由于河口的存在,从河流到深海,浮游细菌群落的空间变化大于季节尺度。

3.2 环境因子相关性分析

环境因子对微生物群落结构的影响一直是学者们关注的热点。不同的地理位置、环境因子与海域浮游细菌的群落结构组成之间会进行相互作用。在黄海沿岸,盐度是导致微生物群落结构向河流、河口两部分空间分化的主要因素^[39]。而在黄河三角洲附近,温度和亚硝酸盐构成菌群结构季节变化的主要驱动力^[38]。王彩霞等^[9]对渤海三湾环境因子与菌群结构进行 Heatmap 相关性分析得出,温度、磷酸盐、硝酸盐和铵盐与门水平上物种分布有显著正相关关系($P < 0.01$),而溶解氧、纬度和盐度与门水平上物种组成有明显的负相关关系($P < 0.05$)。养殖活动是否会影响环境因子与近海细菌群落结构的相互作用,大家鲜少关注。通过对环境因子与菌群结构的 Heatmap 相关性分析,我们发现对照区与养殖区所呈现的相关性结果之间还是有明显的差异。在门水平上,养殖区与对照区的相同的菌群所受到的不同环境因子影响,不但表现在相关性的程度上,甚至还改变了其作用方向,例如疣微菌门,在养密区与硝酸盐呈现负相关关系,而在对照区与其呈现微弱的正相关关系。绿弯菌门在养殖密区与温度(Spearman 相关系数 $r = 0.636$, $P < 0.01$)呈现显著正相关关系,养殖疏区与温度(Spearman 相关系数 $r = 0.678$, $P < 0.01$)呈现显著正相关关系,而在对照区绿弯菌门与温度(Spearman 相关系数 $r = 0.555$, $P < 0.05$)的相关性区域性降低。绿弯菌门在海洋生态系统中参与光合作用的过程,利用 3-羟基丙酸途径来固定二氧化碳,养殖区中的绿弯菌门更易受温度升高而增加,加强光合作用,释放更多的溶解氧,而扇贝是高耗氧生物,集聚性养殖会消耗大量溶解氧,绿弯菌门在养殖区与对照区中的相关性差异结果也证实养殖活动会影响环境因子与菌落结构的相关程度,这与先前的研究结果一致^[10]。研究近海养殖区海域微生物群落结构多样性和环境因子相关性为保护近海养殖生态环境可持续发展以及扇贝健康养殖提供了更好的理论基础。

4 结 论

本文利用细胞流式仪和高通量测序技术,对青岛崂山湾近海扇贝养殖水样进行多层次的分析,集中分析扇贝高发病月份的细菌群落变化情况,并综合考虑环境因子的变化,对样品菌群结构与环境因子相关性进行了分析,得到的结论如下:

1) 青岛崂山湾近海扇贝养殖水样中的优势菌门为变形菌门,其中, γ -变形菌纲在群落菌门中占据主导地位,养殖区 γ -变形菌纲丰度占比高于对照区,由于 γ -变形菌纲中含有多种致病菌,丰度占比增长的同时也增加了养殖区扇贝感染流行病的潜在风险。9 月处于高温时期,细菌总数增大,养殖区的细胞多样性上升且弧

菌多样性指数降低,使得扇贝在9月爆发弧菌病的可能性骤增。

2)在该近海区,养殖活动对海水细菌群落结构的影响主要以季节变化为主,在门水平上,浊度对养殖密区的菌群结构具有显著影响,DO对对照区的菌群结构具有显著影响。

3)养殖活动不仅影响了环境因子与菌群结构相关性的程度,甚至还会改变其相互作用的方向。

研究结果表明,青岛崂山湾近海扇贝养殖活动影响了正常的近海菌落的结构分布,集聚式养殖不同程度上增加了某些病原菌的丰度,增加了该区近海生物疾病爆发的风险,因此在近海养殖活动中要做到合理布局、科学喂养、适当降低养殖密度,这些措施对降低养殖活动对菌落结构多样性的影响具有重要意义。本文的研究结果可为实现近海科学养殖提供理论依据。

参考文献(References):

- [1] 廖凯, 杨正勇. 中国海水养殖业比较优势分析[J]. 中国渔业经济, 2019, 37(5): 22-29. LIAO K, YANG Z Y. Analysis on the comparative advantage of mariculture in China[J]. Chinese Fisheries Economics, 2019, 37(5): 22-29.
- [2] 梁艺. 獐子岛海域贝类养殖与营养盐限制的关系研究[D]. 青岛: 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所), 2019. LIANG Y. Impacts of scallop farming on nutrient limitation in the Zhangzi Island area[D]. Qingdao: University of Chinese Academy of Sciences (The Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences), 2019.
- [3] 成慧中, 王俊鹏, 马汝芳, 等. 山东省贝类养殖现状分析及发展建议[J]. 中国水产, 2020, 539(10): 75-77. CHENG H Z, WANG J P, MA R F, et al. Current situation analysis and development suggestion of shellfish culture in Shandong Province[J]. China Fisheries, 2020, 539(10): 75-77.
- [4] HOWARTH R, CHAN F, CONLEY D, et al. Coupled biogeochemical cycles: eutrophication and hypoxia in temperate estuaries and coastal marine ecosystems[J]. Frontiers in Ecology and the Environment, 2011, 9(1): 18-26.
- [5] XIONG J, YE X, WANG K, et al. Biogeography of the sediment bacterial community responds to a nitrogen pollution gradient in the East China Sea[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2014, 80(6): 1919-25.
- [6] NOGALES B, MA M, CELIA M, et al. Bacterial diversity, composition and dynamics in and around recreational coastal areas[J]. Environmental Microbiology, 2010, 9(8): 1913-1929.
- [7] NOGALES B, LANFRANCONI M, JUANA M, et al. Anthropogenic perturbations in marine microbial communities[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2011, 35(2): 275-298.
- [8] 沈雨欣, 李书杰, 李希磊, 等. 海湾扇贝养殖自身污染对养殖海区生态环境的影响[J]. 渔业研究, 2018, 40(4): 324-328. SHEN Y Y, LI S J, LI X L, et al. Self-pollution of *Argopecten irradians* culture effects on the ecological environment of aquaculture area[J]. Journal of Fisheries Research, 2018, 40(4): 324-328.
- [9] 王彩霞, 王毅波, 刘鹏远, 等. 渤海三湾表层水域细菌群落结构多样性及其环境因子分析[J]. 微生物学通报, 2018, 45(9): 122-137. WANG C X, WANG Y B, LIU P Y, et al. Diversity of bacterial community structure and its driving factors in three bays of Bohai Sea[J]. Microbiology China, 2018, 45(9): 122-137.
- [10] THOMAS F, SINHA R, KRISHNAN K. Bacterial community structure of a glacio-marine system in the Arctic (Ny-lesund, Svalbard)[J]. Science of the Total Environment, 2020, 718: 135264.
- [11] BURGE C, CLOSEK C, FRIEDMAN C, et al. The use of filter-feeders to manage disease in a changing world[J]. Integrative and Comparative Biology, 2016, 56(4): 1-15.
- [12] MORRIS A, ALLEN J, HOWLAND R, et al. The estuary plume zone: source or sink for land-derived nutrient discharges? [J]. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 1995, 40(4): 387-402.
- [13] 赵斌, 胡炜, 李成林, 等. 刺参养殖池塘浮游和底栖藻类群落及水质特征[J]. 广西科学院学报, 2020, 36(4): 399-405. ZHAO B, HU W, LI C L, et al. Community structure of phytoplankton and benthophyte in *Apostichopus japonicus* aquaculture ponds and water quality characteristics[J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 2020, 36(4): 399-405.
- [14] 陈丹丹, 庞巧珠, 涂志刚, 等. 后水湾深水网箱养殖区浮游植物群落季节变化及其与环境因子的关系[J]. 海洋环境科学, 2021, 40(1): 73-80. CHEN D D, PANG Q Z, TU Z G, et al. Seasonal variation of phytoplankton community and its relationship with environmental factors in deep-water cage aquaculture area of Houshui Bay[J]. Marine Environmental Science, 2021, 40(1): 73-80.
- [15] 盖建军, 王苗苗, 邹宏海, 等. 青虾养殖池塘浮游植物的群落结构研究[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(24): 107-110, 114. GAI J J, WANG M M, ZHOU H H, et al. Community structure of phytoplankton in the culture ponds of *Macrobrachium nipponense*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2020, 48(24): 107-110, 114.

- [16] 盖建军, 王苗苗, 邹宏海, 等. 江苏溧阳青虾养殖池塘浮游动物群落结构初探[J]. 水产养殖, 2020, 41(11): 11-17. GAI J J, WANG M M, ZHOU H H, et al. Study on community structure of zooplankton in *Macrobrachium niopponens* culture ponds in Liyang, Jiangsu Province[J]. Journal of Aquaculture, 2020, 41(11): 11-17.
- [17] 陈思, 李艺彤, 蔡文贵, 等. 虾蟹混养池塘浮游植物群落结构的变化特征[J]. 南方水产科学, 2020, 16(3): 79-85. CHEN S, LI Y T, CAI W G, et al. Variation characteristics of phytoplankton community in polyculture ponds of *Scylla serrata* and *Penaeus monodon*[J]. South China Fisheries Science, 2020, 16(3): 79-85.
- [18] 侯兴, 高亚平, 杜美荣, 等. 桑沟湾浮游植物群落结构时空变化特征及影响因素[J]. 渔业科学进展, 2021, 42(2): 18-27. HOU X, GAO Y P, DU M R, et al. Temporal and spatial variation in phytoplankton community structure and their relationship with environmental factors in Sanggou Bay[J]. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(2): 18-27.
- [19] 于潇, 卢钰博, 李希磊, 等. 莱州湾浮游植物时空变化及其与环境因子的关系[J]. 烟台大学学报(自然科学与工程版), 2020, 33(1): 63-71. YU X, LU Y B, LI X L, et al. Temporal and spatial variation of phytoplankton and its relationship with environmental factors in Laizhou Bay[J]. Journal of Yantai University (Natural Science and Engineering Edition), 2020, 33(1): 63-71.
- [20] 李希磊, 于潇, 卢钰博, 等. 2015—2017 年莱州湾招远海域扇贝养殖区浮游藻类群落变化[J]. 南方水产科学, 2019, 15(4): 11-18. LI X L, YU X, LU Y B, et al. Change in planktonic algae community in scallop culture area of Laizhou Bay during 2015 to 2017[J]. South China Fisheries Science, 2019, 15(4): 11-18.
- [21] XU N, TAN G, WANG H, et al. Effect of biochar additions to soil on nitrogen leaching, microbial biomass and bacterial community structure[J]. European Journal of Soil Biology, 2016, 74: 1-8.
- [22] JESSICA T, NACHSHON S, MESSER L, et al. Increased seawater temperature increases the abundance and alters the structure of natural *Vibrio* populations associated with the coral *Pocillopora damicornis*[J]. Frontiers in Microbiology, 2015(6): 432.
- [23] THOMPSON J, RANDA M, MARCELINO L, et al. Diversity and dynamics of a north Atlantic coastal *Vibrio* community[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(7): 4103-4110.
- [24] CHEN S, ZHOU Y, CHEN Y, et al. Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor[J]. Bioinformatics, 2018, 34(17): i884-i890.
- [25] MAGO T, SALZBERG S. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [26] EDGAR R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. Nature Methods, 2013, 10(10): 996-998.
- [27] STACKEBRANDT E, GOEBEL B. TAXONOMIC Note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1994, 44(4): 846-849.
- [28] WANG Q, GARRITY G, TIEDJE J, et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(16): 5261-5267.
- [29] 国家环境保护局. 海水水质标准: GB 3097—1997[S]. 北京: 中国标准出版社, 1998. State Environmental Protection Administration. Sea water quality standard: GB 3097—1997[S]. Beijing: Standards Press of China, 1998.
- [30] 杨铭玉, 刘强, 孟庆超, 等. 东海舟山渔场近岸海域细菌群落结构分析[J]. 中国水运, 2020, 20(1): 132-134. YANG M, LIU Q, MENG Q, et al. Analysis of bacterial community structure in coastal waters of Zhoushan fishery in East China Sea[J]. China Water Transport, 2020, 20(1): 132-134.
- [31] 关晓燕, 王摆, 蒋经伟, 等. 仿刺参—中国明对虾—斑节对虾混养下水体微生物组成和多样性[J]. 水产科学, 2020, 39(6): 796-803. GUAN X, WANG B, JIANG J, et al. Bacterial community and diversity analysis in a polyculture system of sea cucumber *Apostichopus japonicus* with Chinese Shrimp *Fenneropenaeus chinensis*, and Tiger Shrimp *Penaeus monodon*[J]. Fisheries Science, 2020, 39(6): 796-803.
- [32] 王飞飞. 贝类养殖水域细菌群落动态变化特征及长牡蛎含 CARD 基因免疫功能的初步研究[D]. 大连: 大连海洋大学, 2018. WANG F F. Dynamic changes of bacterial community in shellfish culture and the immune function of CARD-containing protein in oyster *Crassostrea gigas*[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2018.
- [33] SHEIK C, JAIN S, DICK G. Metabolic flexibility of enigmatic SAR324 revealed through metagenomics and metatranscriptomics[J]. Environmental Microbiology, 2014, 16(1): 304-317.
- [34] FRANCIS C, BEMAN J, KUYPERS M. New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation[J]. The ISME Journal, 2007, 1(1): 19-27.
- [35] WRIGHT J J, MEWIS K, HANSON N W, et al. Genomic properties of Marine Group A bacteria indicate a role in the marine sulfur cycle[J]. The ISME journal, 2014, 8(2): 455-468.
- [36] 姚鹏, 于志刚. 海洋环境中的厌氧氨氧化细菌与厌氧氨氧化作用[J]. 海洋学报, 2011, 33(4): 1-8. YAO P, YU Z. Anaerobic ammonium-oxidizing bacteria and anaerobic ammonium oxidation (anammox) in the marine environment[J]. Haiyang Xuebao, 2011, 33(4): 1-8.

- [37] 邓欢,陈隼,刘权恕,等. 养殖海湾扇贝弧菌病的研究[J].应用与环境生物学报, 2003(5): 517-521. DENG H, CHEN Q, LIU Q, et al. Vibriosis of bay scallop *argopecten irradians* cultured[J]. China Journal of Applied Environmental Biology, 2003(5): 517-521.
- [38] LÜ X, MA B, YU J, et al. Bacterial community structure and function shift along a successional series of tidal flats in the Yellow River Delta[J]. Scientific Reports, 2016(6): 36550.
- [39] MA L, MAO G, LIU J, et al. Spatial-temporal changes of bacterioplankton community along an exorheic river[J]. Frontiers in Microbiology, 2016(7): 250.

Analysis of Bacterial Diversity and Environmental Factors in Offshore Scallop Culture Area of Laoshan Bay, Qingdao

MA Jing-xue^{1,2,3}, ZHANG Pei-yu¹, WANG Zong-xing^{2,3}, ZHENG Ming-gang^{2,3}, GAO Ping^{2,3},
QU Ling-yun^{2,3}, WANG Bo^{2,3}, ZHENG Feng-rong^{2,3}

(1. Institute of Environmental Science and Engineering, Qingdao University, Qingdao 266071, China;

2. First Institute of Oceanography, MNR, Qingdao 266061, China

3. Laboratory of Marine Ecological Environment Science and Engineering, MNR, Qingdao 266061, China)

Abstract: In order to study the water quality of offshore scallop culture waters, the distribution of bacterial populations and the response of microbial community diversity to environmental factors, we collected the seawater samples from different stations in the offshore Chlamys scallop culture area of Qingshan Village in Laoshan Bay, Qingdao from May to October 2019. Through the high-throughput sequencing method, the differences in the microbial community structure and diversity in different months were analyzed, and the correlation between environmental factors and the microbial community structure was discussed. The results showed that: ①52 phyla and 115 classes were detected in bacterial community structure. It composed of Proteobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, etc, among which Proteobacteria was the dominant phylum, mainly including γ -Proteobacteria and α -Proteobacteria. ②In September, the bacterial diversity in the water samples of the aquaculture area increased and the cells number reached the highest level, while the diversity of *Vibrio* decreased, indicating the possible existence of vibrio disease outbreak. ③The RDA redundancy analysis showed that turbidity ($P=0.027$) had a significant impact on the species composition and community structure of the bacteria OUT level in the intensive culture areas. Nitrate ($P=0.017$) and turbidity ($P=0.033$) had a significant impact on the species composition and community structure of the OTU level in a sparse culture area. ④The heatmap analysis on the correlation between environmental factors in different regional bacterial phylum levels showed that the aquaculture activities affect the degree of interaction between the bacterial community structure and environmental factors in the coastal waters, thereby increasing the possibility of disease occurrence. The results of this study can provide a theoretical basis for the occurrence of shellfish diseases and the healthy development of coastal ecosystem.

Key words: offshore aquaculture; community structure; high-throughput sequencing; environmental factors

Received: February 22, 2021