

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20231121002

<http://www.yykxjz.cn/>

张旭, 周丽, 蔡敏, 崔娜欣, 庞思, 邹国燕, 赵志勇, 袁泉, 黄伟伟, 张亚雷. 基于宏基因组学的中华绒螯蟹养殖池塘水体微生物群落结构和功能组成分析. 渔业科学进展, 2024, 45(4): 112-124

ZHANG X, ZHOU L, CAI M, CUI N X, PANG S, ZOU G Y, ZHAO Z Y, YUAN Q, HUANG W W, ZHANG Y L. Metagenomics-based analysis of microbial community structure and function composition in aquaculture pond for Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(4): 112-124

基于宏基因组学的中华绒螯蟹养殖池塘 水体微生物群落结构和功能组成分析^{*}

张 旭^{1,2} 周 丽^{1①} 蔡 敏¹ 崔娜欣¹ 庞 思¹
邹国燕¹ 赵志勇³ 袁 泉¹ 黄伟伟¹ 张亚雷²

(1. 上海市农业科学院生态环境保护研究所 上海低碳农业工程技术研究中心 上海 201403;

2. 同济大学 污染控制与资源化研究国家重点实验室 上海 200092;

3. 上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所 上海 201403)

摘要 养殖水体中的微生物群落结构及功能组成对养殖生态系统具有重要作用。为了全面系统评估中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)养殖中后期水体微生物群落结构和功能组成,于2022年6—10月逐月监测上海市崇明区中华绒螯蟹养殖池塘内水质指标,同时基于宏基因组学技术分析了养殖期内水体中微生物物种组成及功能结构特征,并探讨了二者与环境因子的关系。结果显示,该养殖池塘在养殖中后期主要超标水质指标为pH、高锰酸盐指数、总磷和总氮。在养殖期水体中,6—8月的微生物群落多样性以及7—8月的微生物群落丰富度处于较高水平,优势门为细菌中的变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、蓝细菌门(Cyanobacteria)和病毒中的尾噬菌体门(Uroviricota),而在属水平上,丰度占比前10的优势属在多组之间均存在显著差异,如7月蓝藻门微囊藻属(*Microcystis*)细菌和8—10月的有尾噬菌体目(unclassified_o_Caudovirales)病毒丰度明显高于其他月份。微生物的主要功能为代谢功能包括能量代谢、全局和概览图、氨基酸代谢等,不同月份的功能组成存在显著差异,尤其是6—7月代谢途径丰度明显高于8—10月,而优势细菌变形菌门、放线菌门和拟杆菌门是上述功能的主要贡献者。环境因子对微生物群落结构和功能组成的影响趋势一致,叶绿素a和pH是影响最显著的环境因子,溶解氧、总磷的影响作用稍弱。在养殖水体中,丰度占比较大的致病菌为肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica*)、爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)。研究结果可为中华绒螯蟹养殖池塘水体微生物群落结构和功能组成研究提供基础数据,并可为养殖水质调控及生态系统构建提供理论依据。

关键词 养殖塘; 中华绒螯蟹; 宏基因组学; 微生物群落; 功能; 环境因子

中图分类号 S965 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2024)04-0112-13

* 国家重点研发计划(2021YFC3201503)、长江生态环境保护修复联合研究二期项目(2022-LHYJ-020304)、上海市科委“科技创新行动计划”项目(21DZ1202204)和上海市农业科学院卓越团队建设计划/助跑计划项目(沪农科卓〔2022〕023)共同资助。张 旭, E-mail: zhangxu@saas.sh.cn

① 通信作者: 周 丽, 副研究员, E-mail: zhouli@saas.sh.cn

收稿日期: 2023-11-21, 收修改稿日期: 2023-12-18

在水产养殖生态系统中,微生物是非常重要的组成要素,其群落和功能结构对生态系统具有指示作用。水产养殖环境中微生物的主要作用包括反映养殖环境水体系统的生态特征、水产养殖活动引发的生态失衡,指示所在水域水生动物的健康水平等(刘培敏等,2022)。微生物作为生态系统中的重要参与者和分解者,群落和功能结构的动态平衡必然会随着水体的营养特点和水质参数朝着适应环境变化的方向移动,并能影响水生动物的生长状况。因此,深入剖析水产养殖环境中微生物群落和功能结构对于养殖环境的水质调控和生态构建具有重要意义。

养殖水体中微生物群系变化与养殖品种及养殖环境密切相关。首先,拥有不同遗传基因的水产动物会由于采食习性和肠道菌群的不同,对周边水体环境产生不同的交互影响,从而调控菌群结构、影响养殖环境生态系统的微生物群系。如在中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)工厂化养殖水体中以变形菌门(*Proteobacteria*)和髌骨细菌门(*Patescibacteria*)细菌为主(苏俊宇等,2022),而凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)工厂化养殖水体中以变形菌门和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)细菌为主(宫晗等,2023);其次,同一养殖产品的不同养殖环境也会影响水体中微生物群落结构的变化方向,比如在三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)养殖过程中,微生物群落结构在改良塘(塘底铺网四周铺砂)水体中由放线菌门(*Actinobacteria*)主导向蓝藻菌门(*Cyanobacteria*)及变形菌门主导变化,而在传统土塘中则由蓝藻菌门主导向变形菌门主导变化,并且不同养殖塘水体微生物群落分布受环境的影响效应不同(陈逸斐等,2015)。因此,在研究养殖生态系统中微生物群落结构变化并为实际生产提供指导时,要针对特定的养殖品种和养殖环境开展具体分析。

传统的微生物群落研究方法仅能对部分细菌或可培养细菌分布特点进行分析,而可独立培养微生物占比仅为1% (Quaiser *et al*, 2011),分析结果具有一定的局限性。宏基因组学直接获得生境中微生物群落总的基因组信息,可以对环境中微生物群落结构进行全面、系统的分析。目前,已利用宏基因组学对不同水域内微生物群落和功能结构进行了研究,比如三峡库区(罗芳等,2019)、沿海养殖水域(高权新等,2019)、生态浮床池塘水体(曲疆奇等,2023)等。但利用宏基因组学技术对养殖过程中水体内微生物群落和功能结构变化的研究较为缺乏。

本研究以上海市崇明区中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)养殖池塘为研究对象,分析6—10月关键养殖期内水体理化指标的动态变化,利用宏基因组学技

术研究养殖期内微生物群落结构和功能组成的变化,探讨微生物群落和功能结构与环境因子的关系,着重分析养殖环境中常见致病菌的富集特征,旨在为调控环境因子及构建健康养殖生态系统提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 采样地点与养殖情况

采样地点位于上海市崇明区某中华绒螯蟹养殖基地(31°44'N, 121°14'E),采样蟹塘长140 m、宽85 m,总面积11 900 m²,水深0.7~1.0 m。池塘内种植伊乐藻(*Elodea canadensis*)和苦草(*Vallisneria natans*),覆盖面积为70%左右。池塘内配备1台5 kW曝气机,每天曝气6 h;配备8台3 kW推流机,在夏季高温期(8月)同时开启3台,每天运行3~4 h。2022年3月10日放苗,放养密度为1 000只/亩。4—6月期间,每天投喂饵料0.5~1 kg/亩;6—10月期间,每天投喂饵料2~3 kg/亩。

1.2 样品采集与测定

2022年6—10月,逐月采集养殖池塘水样。池塘沿对角线设置3个采样点,使用5 L有机玻璃采水器采集各点水样。pH、水温(water temperature, WT)、溶解氧(dissolved oxygen, DO)等指标通过多参数水质分析仪(Hach, HQ 4300)现场测定;叶绿素a(chlorophyll a, Chl-a)、总磷(total phosphorus, TP)、磷酸盐(phosphate, PO₄)、总氮(total nitrogen, TN)、氨氮(ammonia nitrogen, NH₃-N)、亚硝态氮(nitrite nitrogen, NO₂-N)、硝态氮(nitrate nitrogen, NO₃-N)、高锰酸盐指数(permanganate index, IMn)、五日生化需要量(biochemical oxygen demand for 5 days, BOD₅)测定方法均参考《水和废水监测分析方法》(第四版)(国家环境保护总局水和废水监测分析方法编委会,2013)。3个取样点各取200 mL水样后0.22 μm滤膜抽滤,液氮冷冻后放置于-80 °C冰箱保存,样品最终送往上海美吉生物医药科技有限公司进行宏基因组测序。具体方法如下:抽提滤膜上的截留物DNA,并对其进行质量检测评估。DNA样本检测合格后,将其随机片段化并筛选合适大小的插入片段进行文库构建。构建好的文库质检合格并精确定量后,使用 Illumina NovaSeq 6000测序系统进行宏基因组测序。

1.3 数据分析

使用SPSS 20.0软件中的单因素方差(one-way ANOVA)分析养殖水体水质理化指标,不同因素间的

多重比较采用 Duncan 检验, 结果以平均值±标准差 (Mean±SD) 表示。宏基因组数据进行多组比较采用 Kruskal-Wallis 秩和检验, Post-hoc 检验方法为 Tukey-Kramer。显著性水平均为 $P=0.05$ 。

对测序得到的原始数据(raw data)进行过滤处理, 去除污染及低质量数据等, 得到有效数据(clean data), 将数据拼接组装并统计组装结果。对重叠群(contigs)进行基因预测并去冗余, 构建基因目录(gene catalogue), 使用 BLASTP (Altschul, 1997) (V2.2.28+, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)与 NR (nr_202109) 数据库进行比对, 物种注释方法为 Best-hit, 获得物种注释信息; 使用 BLASTP 将非冗余基因集序列与 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.jp/kegg/>) 的基因数据库(GENES) 比对进行功能注释; 使用 Diamond 软件, 通过 BLASTP 把目标氨基酸序列与 PHI 数据库(Pathogen Host Interactions Database, <http://www.phi-base.org/index.jsp>) 进行比对得到致病菌注释结果。基于相应的分类学数据表, 利用 R 语言工具(V4.3.0)作图绘制群落柱形图; 为反映样品的聚类模式, 使用 R 语言(V4.3.0) WGCNA 功能在属水平进行主坐标分析(PcoA); 通过 Mothur 1.30 (Liu *et al*, 2020) 进行 α 多样性指数分析; 利用 R 语言(V4.3.0) Vegan 包进行群落 Heatmap 图和冗

余分析(Redundancy Analysis, RDA); 利用 LEfSe 软件 (http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/root?tool_id=lefse_upload) 对不同月份微生物物种和致病菌进行线性判别分析(LDA) (采用 all-against-all 多组比较策略), 以识别不同月份养殖水体中的“生物标记”微生物物种和致病菌。基于样本的物种和 KEGG 功能分析不同功能的门水平上物种贡献度 Heatmap 图。不同月份养殖水体中的所有微生物基因组原始数列已上传至 NCBI 网站(登录号: PRJNA983952)。

2 结果与分析

2.1 水质指标

中华绒螯蟹养殖池塘在养殖中后期(6—10 月)的水质指标见表 1。在此期间, 不同月份间的水质指标均存在显著性差异($P<0.05$)。其中, 6 月, pH、DO 和 BOD_5 最高; 7 月, WT 和 Chl-a 最高; 6—8 月高温期, PO_4 、TN、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 和 IMn 均在 8 月出现高值; 8 月的 DO 显著高于 7 月($P<0.05$); 而 9—10 月低温期, TP、 PO_4 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、IMn 和 BOD_5 出现高值。根据《渔业水质标准》(GB 11607)和《地表水环境质量标准》(GB 3838-2002)的Ⅲ类水标准, 该养殖塘在养殖中后期主要超标指标为 pH、IMn、TP 和 TN。

表 1 中华绒螯蟹养殖池塘水体理化指标($n=3$; Mean±SD)
Tab.1 Physicochemical parameters in the water bodies of the *Eriocheir sinensis* culture ponds

项目 Items	6月 June	7月 July	8月 August	9月 September	10月 October
pH	9.97±0.06 ^a	9.15±0.25 ^b	8.65±0.44 ^b	7.92±0.39 ^c	8.62±0.13 ^b
水温 WT/°C	33.75±0.43 ^a	33.78±1.27 ^a	29.63±0.04 ^b	22.00±0.02 ^c	20.04±0.54 ^d
溶解氧 DO/(mg/L)	11.88±1.61 ^a	6.61±1.00 ^{bc}	11.07±1.45 ^a	5.23±0.95 ^c	9.37±2.62 ^{ab}
叶绿素 a Chl-a/(μg/L)	1.33±0.58 ^d	50.67±2.08 ^a	20.67±8.08 ^c	33.33±6.11 ^b	7.00±1.00 ^d
总磷 TP/(mg/L)	0.11±0.01 ^d	0.23±0.02 ^c	0.34±0.01 ^b	0.43±0.04 ^a	0.09±0.01 ^d
磷酸盐 PO_4 /(mg/L)	0.08±0.01 ^c	0.16±0.03 ^b	0.30±0.02 ^a	0.28±0.02 ^a	0.03±0.00 ^d
总氮 TN/(mg/L)	0.89±0.03 ^c	1.14±0.09 ^b	2.41±0.24 ^a	1.25±0.10 ^b	0.78±0.02 ^c
氨氮 $\text{NH}_3\text{-N}$ /(mg/L)	0.65±0.01 ^c	0.55±0.04 ^d	0.88±0.07 ^a	0.75±0.04 ^b	0.21±0.01 ^e
亚硝态氮 $\text{NO}_2\text{-N}$ /(mg/L)	0.01±0.00 ^b	0.01±0.00 ^b	0.05±0.00 ^a	0.01±0.00 ^b	0.01±0.00 ^b
硝态氮 $\text{NO}_3\text{-N}$ /(mg/L)	0.02±0.01 ^d	0.01±0.01 ^d	0.23±0.02 ^c	0.46±0.04 ^a	0.37±0.04 ^b
高锰酸钾指数 IMn/(mg/L)	5.59±0.07 ^b	7.43±0.20 ^a	8.04±0.39 ^a	8.06±1.20 ^a	5.53±0.15 ^b
五日生化需氧量 BOD_5 /(mg/L)	5.20±0.00 ^a	3.50±0.10 ^c	3.57±0.06 ^c	4.07±0.25 ^b	5.00±0.53 ^a

注: 同行数据的不同上标表示组间存在显著差异($P<0.05$)。

Note: Values in each row with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

2.2 微生物群落组成及差异分析

6—10 月, 中华绒螯蟹养殖池塘样本中共检测到细菌 155 门、258 纲、468 目、990 科、4 272 属; 真核生物 50 门、190 纲、564 目、1 236 科、2011 属;

古菌 22 门、43 纲、72 目、106 科、233 属; 病毒有 17 门、23 纲、31 目、67 科、881 属。在所有样本中, 细菌均是主要类别, 占比均达到 75% 以上, 尤其是在 7 月样本中平均占比达到 93.06%; 其次是病毒, 占比均超过 5% 以上, 尤其是 9 月样本中的平均占比达到

17.83%。图 1a 中 PCoA 分析(ANOSIM, $P=0.001$)表明, 微生物群落结构在不同月份之间存在显著性差异, 同时, 6、7 月相较于 8—10 月的微生物群落结构的差异更为明显。由图 1b 可得, 6—8 月微生物群落多样性以及 7—8 月的微生物群落丰富度处于较高水平。

图 1c 显示, 门水平上, 不同月份样本中微生物优势门的组成比例变化很大, 从 0.11% 到 49.11%。优势门主要为细菌中的变形菌门、拟杆菌门、放线菌门、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)、蓝细菌门和病毒中的尾噬菌体门(*Uroviricota*) (至少在 1 组样本中群落平均占比>10%)。在所有样品中, 变形菌门细菌所占比例均为最高, 尤其是 6 月水体中, 变形菌门细菌占比达到 49.11%。利用 Kruskal-Wallis 秩和检验分析可知, 排名前 10 的优势门微生物在多组之间均存在显著差异。在属水平上, 丰度占比前 10 的优势属在多组之间也均存在显著差异(图 1d)。6 月放线菌门未分类暂定种 *Nanopelagicaceae* 科细菌丰度明显高于其他月份, 丰度占比为 4.89%, 同时另外一种变形菌门 *Limnohabitans* 属细菌丰度在 6 月占比也较高, 丰度占比达 7.05%。7 月蓝细菌门微囊藻属(*Microcystis*)的细菌丰度明显高于其他月份, 丰度占比达到 15.94%; 而一种未分类的属于尾噬菌体门有尾噬菌体目(*unclassified_o_Caudovirales*)病毒在 7 月的丰度明显低于其他月份, 丰度占比为 4.23%, 这种病毒在 8—10 月的丰度明显升高, 尤其在 9 月的丰度占比达 13.96%。8 月除了有尾噬菌体目病毒丰度较高以外, 一种变形菌门中未分类柄杆菌科(*unclassified_f_Caulobacteraceae*)细菌占比相较其他月份丰度占比较高, 为 3.66%。9 月除了有尾噬菌体目病毒丰度较高外, 一种疣微菌门中未分类丰祐菌纲(*unclassified_c_Opitutae*)丰度占比较高, 为 6.14%。10 月除了有尾噬菌体目病毒和未分类丰祐菌纲细菌外, 一种放线菌门中暂定种 *Planktophila* 占比较高, 为 4.38%。

鉴于在所有样本中细菌丰度均占到 75% 以上, 细菌在各样本中发挥作用比较大。因此, 通过 LEfSe 分析不同月份之间具有显著差异的细菌物种。LEfSe 物种层级图($LDA>4$)统计了从门到属各分类水平下具有显著差异的物种。由图 1e 可知, 6 月显著富集的是变形菌门和放线菌门细菌, 对不同月份之间差异影响最大的不同分类细菌涉及变形菌门、伯克氏菌目(*o_Burkholderiales*)、 β -变形菌纲(*c_Betaproteobacteria*)、丛毛单胞菌科(*f_Comamonadaceae*)以及 α -变形菌纲(*c_Alphaproteobacteria*)等; 7 月显著富集的是蓝细菌门和浮霉菌门(*p_Planctomycetes*)细菌, 对不同月份之间差异影响最大的不同分类细菌涉及到蓝细菌门、微

囊藻属、微囊藻科(*f_Microcystaceae*)、色球藻目(*o_Chroococcales*)等; 8 月显著富集的是疣微菌门中的疣微菌纲(*c_Verrucomicrobiae*)、疣微菌目(*o_Verrucomicrobiales*)、疣微菌科(*f_Verrucomicrobiaceae*)和变形菌门中的柄杆菌目(*o_Caulobacterales*)、柄杆菌科(*f_Caulobacteraceae*)等; 9 月显著富集的是疣微菌门、丰祐菌纲、伯克氏菌科(*f_Burkholderiaceae*)、念珠藻目(*o_Nostocales*)、黄杆菌纲(*c_Flavobacteriia*)等; 10 月显著富集的是拟杆菌门、暂定种 *Planktophila* 属、 γ -变形菌纲(*c_Gammaproteobacteria*)。

2.3 微生物功能组成及差异分析

通过与 KEGG 代谢通路数据库进行对比分析(图 2a), 不同月份养殖蟹塘内的微生物基因功能包括代谢(*metabolism*)、环境信息处理(*environmental information processing*)、生物体系统(*organismal systems*)和细胞进程(*cellular processes*)四大通路, 主要集中在代谢功能中的能量代谢(*energy metabolism*)、全局和概览图(*global and overview maps*)和氨基酸代谢(*amino acid metabolism*)等。图 2b 显示, 不同月份中养殖蟹塘中的微生物的 KEGG 通路在二级分类水平存在显著差异($P<0.05$), 氨基酸代谢(*amino acid metabolism*)功能明显富集于 6 月样本中; 能量代谢、碳水化合物代谢(*carbohydrate metabolism*)、膜转运(*membrane transport*)功能明显富集于 7 月样本中; 细胞生长和死亡(*cell growth and death*)、信号转导(*signal transduction*)、神经系统(*nervous system*)功能主要富集于 8—10 月。通过 KEGG 代谢通路在三级分类水平上总丰度前 20 的功能分析(图 2c), 除了代谢功能中的代谢路径(*metabolic pathways*)在多组之间无差异外, 其他三级分类水平的功能均存在差异, 比如代谢功能下的次生代谢产物的生物合成(*biosynthesis of secondary metabolites*)、细胞进程功能下的丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢(*alanine, aspartate and glutamate metabolism*)和环境信息处理功能下的氨基酸的生物合成(*biosynthesis of amino acids*)在多组比较中存在显著差异, 并且均是 6 月的功能丰度最高。同时发现, 存在差异的三级分类水平上的功能大部分属于代谢通路, 且 6、7 月的功能丰度大于 8—10 月。LEfSe 采用线性判别分析($LDA>2$)来估算每个功能丰度(三级分类水平上)对差异效果影响的大小。如图 2d 所示, 5 个月份中共有 11 个功能存在显著差异。6 月富集功能为氨基酸代谢、次生代谢产物的生物合成及丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢等; 7 月富集功能为

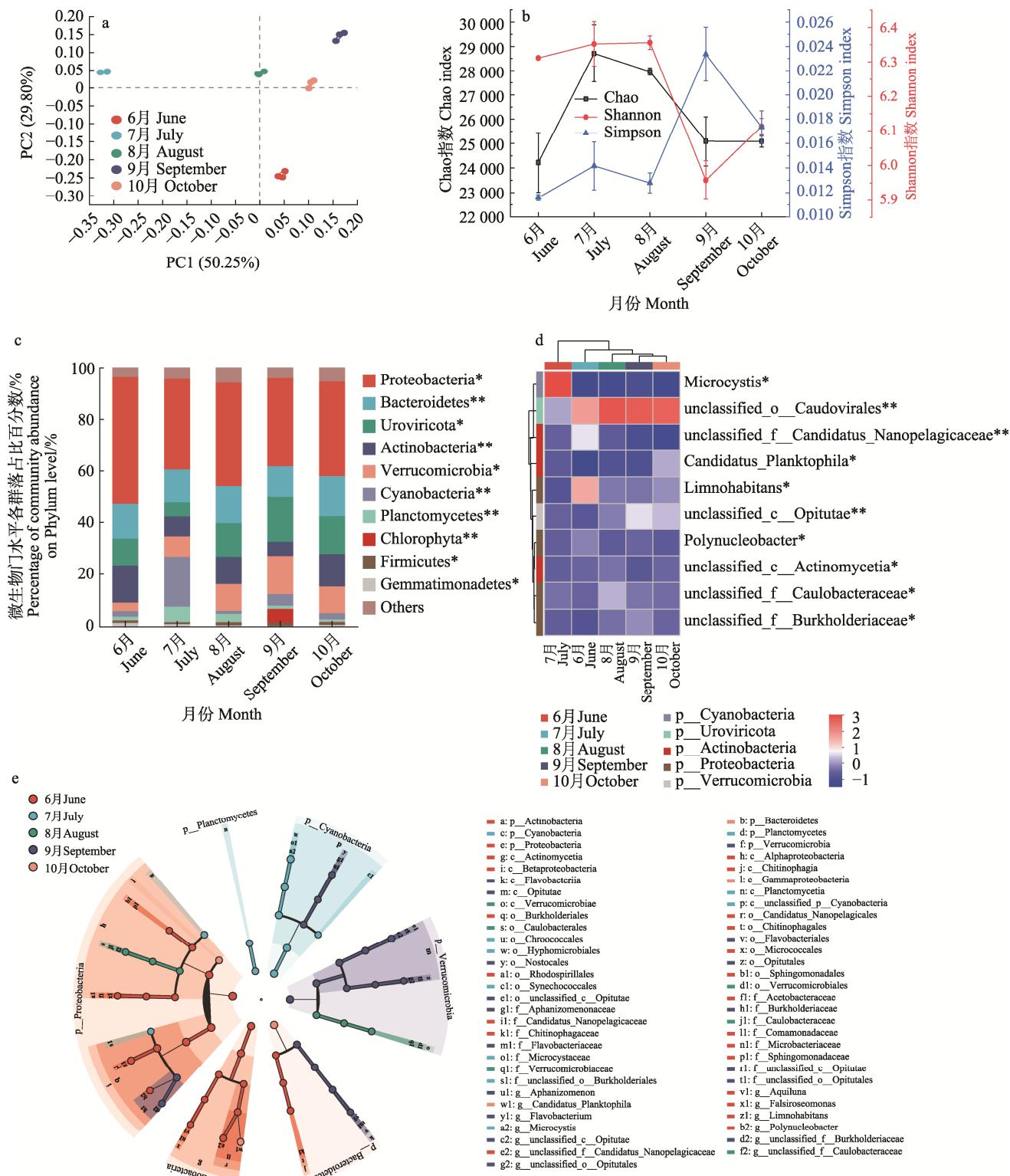


图1 养殖蟹塘水体中不同月份微生物: (a)属水平 PCoA; (b) α 多样性; (c)门水平群落占比(合并丰度>1%); (d)属水平群落占比(合并丰度>3%); (e)不同月份原核细菌从门到属水平的 LEfSe 物种层级图(多组比较策略为 all-against-all, LDA>4)

Fig.1 PCoA of microbial communities (a); α diversity indices (b); composition of bacterial communities at the phylum level (consolidation abundance >1%) (c); composition of bacterial communities at genus level (d) (consolidation abundance >3%); the LEfSe analysis results from phylum to genus level among water samples collected in different months of cultured crab pond (e) (all-against-all, LDA>4)

$0.01 < P \leq 0.05^*$, $0.001 < P \leq 0.01^{**}$, $P \leq 0.001^{***}$, 下同。 $0.01 < P \leq 0.05^*$, $0.001 < P \leq 0.01^{**}$, $P \leq 0.001^{***}$, the same as below.

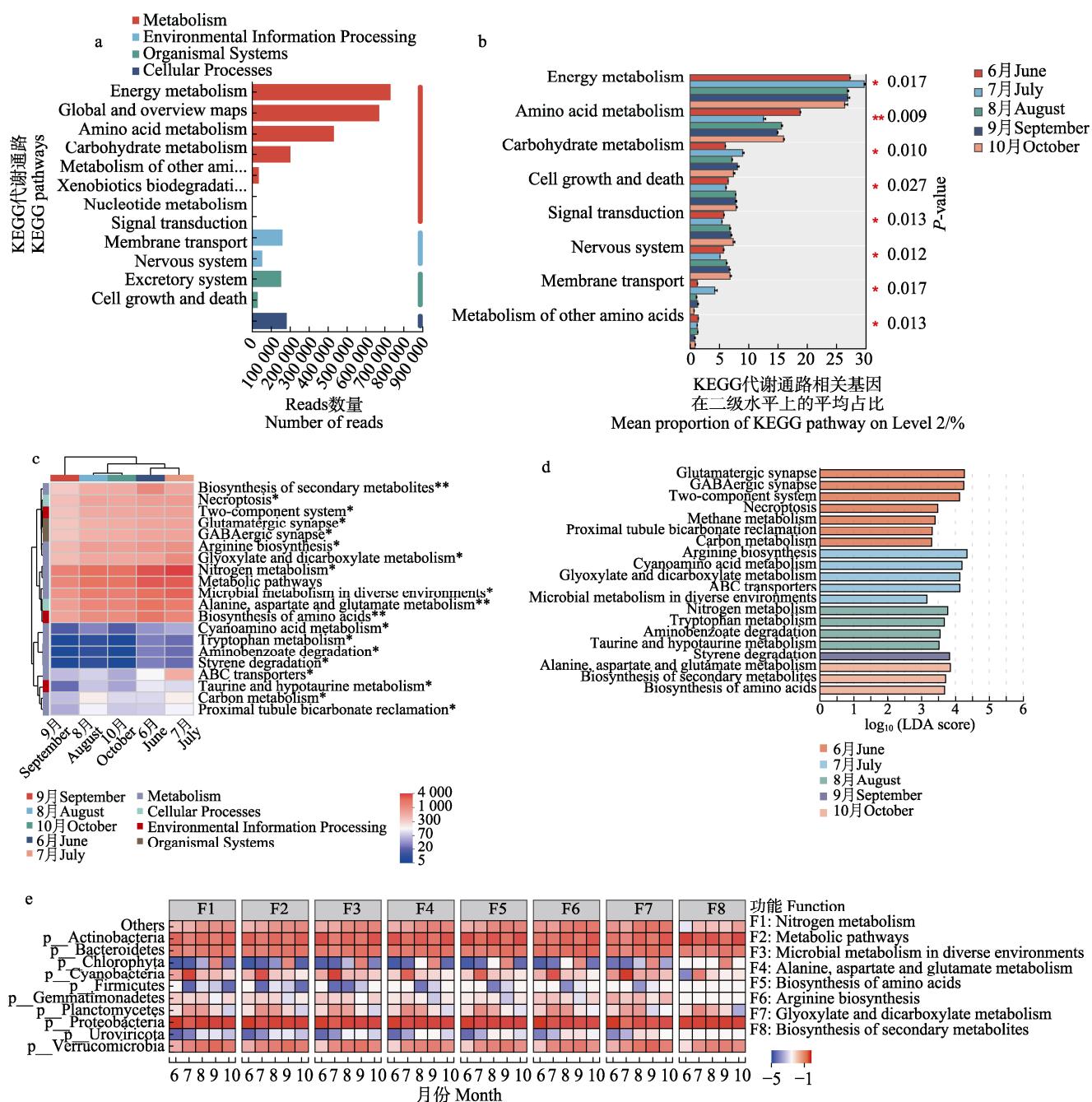


图2 养殖蟹塘水体中不同月份微生物: (a) KEGG功能注释基因丰度统计; (b) KEGG代谢通路在二级分类水平上的多组差异检验柱状图; (c) KEGG代谢通路在三级分类水平上的功能组成Heatmap图; (d) KEGG代谢通路在三级分类水平上的功能LEFSe分析($\text{LDA}>2$); (e) KEGG在三级分类水平上功能(排名前8)的门水平的物种贡献度Heatmap图

Fig.2 Statistics of the abundance of KEGG function annotation gene (a); Histogram analysis of multi-group difference test of KEGG pathway on Level 2 level (b); Heatmap analysis of KEGG pathway on Level 3 (c); LEfSe analysis of KEGG pathway on Level 3 level ($\text{LDA}>2$) (d); Heatmap analysis of the relative contribution of the microbial community (Phylum level) on KEGG function on Level 3 (e)

氮代谢(nitrogen metabolism)、不同环境的微生物代谢(microbial metabolism in diverse environments)等; 8月富集功能为精氨酸的生物合成(arginine biosynthesis)、碳代谢(carbon metabolism)等; 9月富集功能为坏死性凋亡(necroptosis); 10月富集功能为双组分系统

(two-component system)等。

结合不同月份微生物的物种注释结果,进行门水平物种与KEGG功能(三级分类水平上)贡献度分析可以得到不同功能的主要贡献物种(图2e)。变形菌门、放线菌门和拟杆菌门是所有月份中丰度排名前8的

功能的主要贡献者。除此之外,相对于其他月份,7月蓝细菌门细菌对功能贡献度较高,9月绿藻门(*Chlorophyta*)真核生物对功能贡献度较高。尾噬菌体门病毒在8—10月的功能贡献度高于其他月份;而对于次级代谢产物的生物合成功能,尾噬菌体门病毒在不同月份均有一定的贡献度。

2.4 微生物群落及功能组成与环境因子的关系

利用R语言对微生物门水平群落结构与环境因子进行去趋势对应分析(Detrended correspondence analysis, DCA)分析(图3),得出第一轴梯度长度为0.94(<4.0),因此,选择对微生物群落结构与水环境因子进行RDA分析。先通过VIF计算筛选VIF<10的环境因子为Chl-*a*、pH、DO、TN、NH₃-N、TP、IMn和BOD₅。RDA1和RDA2轴的约束解释量分别为51.29%和39.41%,共解释了90.70%的微生物群落变异程度。通过envfit函数分析环境因子和微生物群落的相关性可得,Chl-*a*和pH是对微生物群落结构影响最显著的环境因子($P<0.01$, $R^2>0.80$),DO、TP也与微生物群落结构显著相关,但影响作用稍弱($P<0.01$, $R^2<0.65$),而TN、NH₃-N、IMn、BOD₅与微生物群落结构无相关性($P>0.05$)。丰度占比最多的原核细菌中变形菌门、拟杆菌门、放线菌门均和pH、DO和BOD₅存在正相关关系;疣微菌门与pH、DO和BOD₅存在负相关关系,而与IMn和TP存在正相关关系;病毒中的尾噬菌体门与TP浓度密切相关。

利用R语言对微生物KEGG代谢通路相关功能基因组成(二级分类水平)与环境因子进行DCA分析(图4),得出第一轴梯度长度为0.26(<4.0),因此,选择对KEGG代谢通路功能基因组成与水环境因子

进行RDA分析。先通过VIF计算筛选VIF<10的环境因子为Chl-*a*、pH、DO、TN、NH₃-N、TP、IMn和BOD₅。RDA1和RDA2轴的约束解释量分别为95.26%和4.74%,共解释了100.00%的微生物群落变异程度。通过envfit函数分析环境因子和KEGG代谢通路在二级水平上的相关注释功能基因的相关性可得,Chl-*a*和pH是对KEGG代谢通路功能基因影响最显著的环境因子($P<0.01$, $R^2>0.80$),DO、TP也与KEGG注释功能显著相关,但影响作用稍弱($P<0.01$, $R^2<0.70$),而TN、NH₃-N、IMn、BOD₅与KEGG注释功能无相关性($P>0.05$)。占比较大的KEGG代谢通路相关功能基因均与RDA1呈负相关,沿着第一排序轴正方向,随着TP浓度的增加,KEGG代谢通路相关功能基因数量减少;氨基酸代谢与pH密切相关,pH和Chl-*a*会共同影响能量代谢。

2.5 致病菌的组成及差异分析

通过与PHI数据库对比,在5个月份的样本中共发现203种致病菌,其中178种为样本共有,共有物种占90%以上,这表明各样品中病原体的多样性没有显著差异。筛选数据库中以双壳类与硬骨鱼类典型养殖水产品为宿主的致病菌种类共有26种,其中在不同月份样本中丰度占比较大的为肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica*)、爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) (图4a)。利用Kruskal-Wallis秩和检验分析可知,丰度排名前12的致病菌种在不同月份之间均存在显著差异。6—7月水体中的致病菌相对丰度显著高于其他月,且丰度占比较大的3种致病菌在温度相对较低的10月丰度依然较高。另外,猪链球菌(*Streptococcus suis*)在

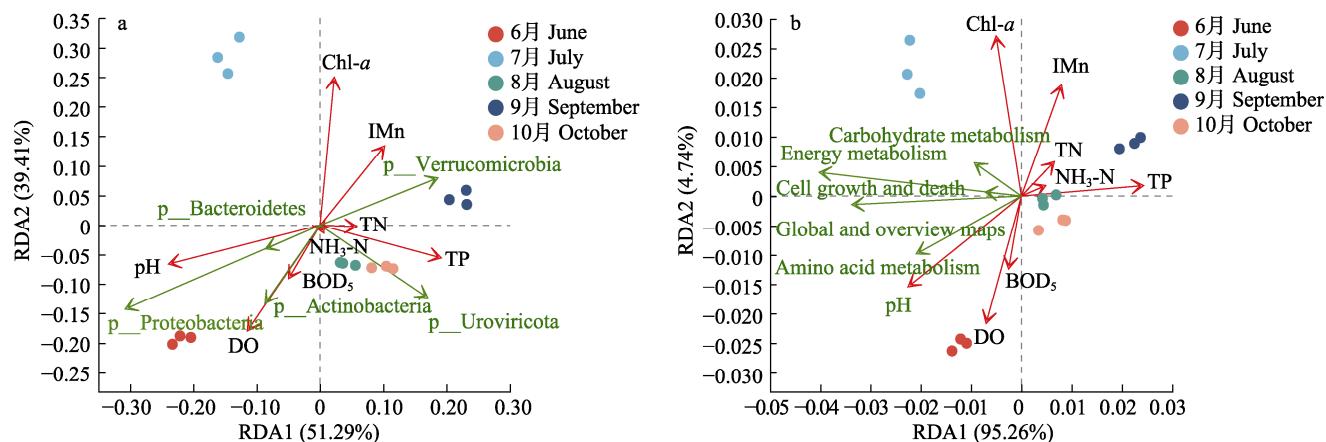


图3 微生物群落结构(门水平)与环境因子(a)及KEGG代谢通路(二级分类水平)与环境因子(b)的RDA分析

Fig.3 RDA analysis of microbial community on Phylum level and environmental factors (a) and RDA analysis of KEGG pathway (Level 2) and environmental factors (b)

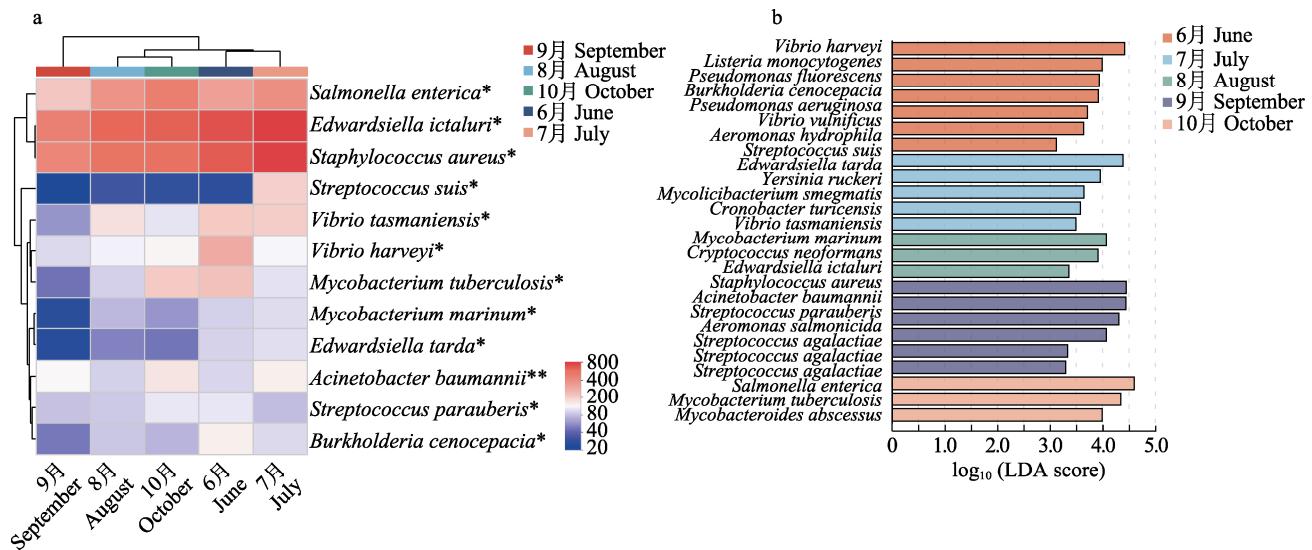


图4 不同月份养殖水体样品中致病菌种类水平的Heatmap图(a)和LEfSe分析(b)(多组比较策略为all-against-all, LDA>2)

Fig.4 Heatmap analysis on Pathogen_species level (a); LEfSe analysis on Pathogen_species level in water samples collected in different months of cultured crab pond (b) (all-against-all, LDA>2)

7月的丰度远高于其他月份；塔斯曼弧菌(*Vibrio tasmaniensis*)和哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)在6月的丰度远高于其他月份；结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)在6月和10月均占很大比重。LEfSe采用线性判别分析(LDA>2)来识别不同月份的关键致病菌种。如图4b所示,6月富集的致病菌种包括哈维氏弧菌、单核增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、伯克霍尔德菌(*Burkholderia cenocepacia*)等；7月富集的致病菌种为猪链球菌、迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)、鲁氏耶尔森菌(*Yersinia ruckeri*)等；8月富集的致病菌种为塔斯曼弧菌、海洋分枝杆菌原名(*Mycobacterium marinum*)、新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)；9月富集的致病菌种为爱德华氏菌、金黄色葡萄球菌、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)等；10月富集的致病菌种为肠道沙门氏菌、结核分枝杆菌、脓肿分枝杆菌(*Mycobacterium abscessus*)等。

3 讨论

3.1 微生物的群落结构及功能组成特征

本研究的中华绒螯蟹养殖塘水体中优势微生物包括细菌中的变形菌门、拟杆菌门、放线菌门、疣微菌门、蓝细菌门和病毒中的尾噬菌体门,尤其是变形菌门占比最大,为35.34%~49.11%。以上都是养殖水体中普遍存在的细菌,和其他典型养殖区的微生物群落结构具有相似性,比如宁波地区象山港三疣梭子蟹

养殖池塘内的细菌群落主要由变形菌门、拟杆菌门、放线菌门、蓝细菌门组成(陈逸斐等, 2015)。在典型贝类养殖区海水的优势细菌类群为变形菌门、蓝细菌门和放线菌门(黄文豪等, 2023)。虽然不同养殖品种由于宿主基因会产生对微生物的选择性(Adair *et al*, 2017),但养殖品种的微生物群系会和水体环境交互影响,参与水环境生态平衡建立,所以在不同水产品的养殖水体中微生物群落结构相似性较大。其中,6月变形菌门 *Limnohabitans* 属占比较大,已有研究表明, *Limnohabitans* 菌属在水中浮游细菌群落中扮演重要角色,因为此类菌不仅在藻类衍生机质上有很高的基质吸收和生长速率(罗芳等, 2019),而且具有反硝化功能,对改善水质,降低有机物污染具有积极作用(缪凡等, 2022)。7月蓝藻门中的微囊藻属占比较大,这与7月水体 Chl-a 浓度较高具有一致性。值得注意的是,和其他研究只关注细菌群落不同,本研究通过宏基因组测序发现了在养殖蟹塘水体内病毒中的尾噬菌体门占比也较大,为 5.67%~17.54%,尤其是一种未分类的有尾噬菌体目病毒在7月的丰度明显低于其他月份,而在8—10月的丰度明显升高。噬菌体是一类以细菌等为宿主的病毒,能够通过水平基因转移和调控宿主的微生物种群,从而调节微生物群落结构。超过95%的已知噬菌体隶属于有尾噬菌体目(Caudovirales),并且噬菌体的组分与微生物宿主分在门水平上相一致(孙立宇等, 2023)。已有研究表明,常见的养殖水体中的致病菌沙门氏菌、假单胞菌、金黄色葡萄球菌、李斯特菌等均可成为噬菌体的宿主(李托等, 2023),从而被噬菌体裂解,噬菌体已经成为

为抗生素替代品研究的热点。

通过 KEGG 功能注释可知, 养殖蟹塘水体的所有样本中代谢相关功能基因丰度最高超过了 70%, 水体中的微生物主要参与能量代谢、氨基酸代谢、碳水化合物代谢。虽然不同月份微生物群落的总体功能基本一致, 但仍然存在一定差异。比如 6、7 月微生物参与的主要功能为氨基酸代谢、能量代谢、碳水化合物代谢等, 而 8—10 月的主要功能为细胞生长和死亡、信号转导、神经系统功能等, 表明 6、7 月养殖水体中微生物碳代谢功能显著强于其他功能, 这可能是高温可以加快微生物碳代谢整体活性所致(闫法军等, 2014)。以上结果与针对河流地表水的研究结论相似, 认为可能是因为细菌功能对冬季低温环境有抵制机制, 夏季高温对代谢酶活性有所促进, 所以高温有利于促进代谢功能的发挥(刘幸春, 2021)。7 月蓝细菌门细菌对功能贡献度较高, 而 7 月在 KEGG 三级水平上的差异功能主要为氮代谢等, 因此, 推测蓝细菌门细菌对氮代谢功能发挥了重要作用。近年来的研究也显示, 蓝藻更易受到氮的刺激而快速增殖(杨小龙等, 2023), 且不同形态的氮对藻类的竞争存在明显差异。有研究表明, 真核藻类更易在 $\text{NO}_3\text{-N}$ 为主的水体中占据优势, 而 9 月 $\text{NO}_3\text{-N}$ 浓度明显高于其他月份, 这可能也是 9 月绿藻门(*Chlorophyta*)真核生物对功能贡献度较高的原因(Glibert *et al.*, 2016)。同时发现, 尾噬菌体门病毒在 8—10 月的功能贡献度高于其他月份。目前, 国内关于噬菌体用于水产养殖致病菌防控的报道逐年增多, 比如利用噬菌体 VPp1 可将工厂化养殖牡蛎中副溶血弧菌降低 1.11 个数量级(荣蓉, 2014); 利用裂解性噬菌体有效降低维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)(刘洋, 2022)等。8—10 月尾噬菌体门病毒占比较大, 并对水体中微生物主要功能贡献度高, 这可能也和 8—10 月的致病菌丰度显著低于 6—7 月密切相关。

3.2 微生物群落和功能组成与环境因子的关系

针对不同养殖水体, 环境因子对微生物群落和功能结构的影响也不尽相同。比如在凡纳滨对虾大棚养殖塘中对微生物群落结构影响较大的为 DO、pH、COD 和 TN, 其中 pH 影响最大(谢芹, 2017); 而也有研究认为, 在凡纳滨对虾养殖水体中, $\text{NH}_3\text{-N}$ 、COD 和 TN 对微生物群落结构影响较大, 其中, $\text{NH}_3\text{-N}$ 影响最大(Zhang *et al.*, 2016)。可见即使针对同一种养殖产品, 对微生物群落结构产生影响的环境因子也存在不同。本研究对微生物群落和功能结构与环境因子关系的分析均认为, Chl-a 和 pH 是影响最显著的环境

因子, 而 DO 和 TP 影响作用稍弱。 Chl-a 水平与水体中浮游植物总密度变化趋势大体一致(张俊彪, 2020), 而水体中浮游植物总密度直接影响水中微生物多样性及丰富度。有研究表明, 变形菌门细菌在蓝藻水华和绿藻水华期间相对丰度随水华暴发而降低(朱益辉, 2021), 本研究与以往的研究结果一致, 当 7 月蓝细菌门和 9 月绿藻门细菌丰度占比升高时, 变形菌门细菌丰度占比显著降低。pH 直接影响水生态系统中微生物的生命活力、代谢活力等, 进而对微生物群落结构产生影响(许瑞等, 2019), 比如在养殖水体中, 高 pH 组(8.5 和 7.5)水样中微生物群落多样性和群落丰度均高于低 pH 组(6.5)水样, 并且 pH 较高的水质条件更有利于和去污相关的微生物群落生长(江昊飞等, 2022)。这也是本研究中优势菌变形菌门、拟杆菌门、放线菌门丰度与 pH 存在正相关关系的原因。DO 是水产养殖中的重要指标, 对好氧及厌氧细菌种群、数量以及分布影响明显, 尤其是放线菌门和 DO 的正相关性最大, 这和大多数放线菌是好氧菌密切相关。此外, 微生物群落的代谢活性和代谢功能多样性及其对碳源的利用率均与磷元素呈显著负相关关系(曹煜成等, 2015)。本研究同样发现, TP 浓度与优势菌丰度以及主要功能基因数量均呈负相关关系。值得注意的是, 本研究发现, TN 和 $\text{NH}_3\text{-N}$ 对微生物群落结构和功能组成变化的影响并不显著, 这和其他研究中 TN 和 $\text{NH}_3\text{-N}$ 是改变水体中微生物群落结构的主要影响因素的结论不一致(张皓, 2015)。这可能是由于本研究中 TN 和 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度较高, 没有成为微生物尤其是浮游植物生长的限制因素, 对微生物群落和功能结构的影响较小。微生物群落结构决定了功能组成, 其中优势菌发挥着主要功能, 因此, 环境因子对微生物群落结构尤其是优势菌的影响趋势与对功能组成的影响趋势相同。

3.3 微生物群落结构变化对养殖过程的指导意义

普遍认为, 连续阴雨天、亚硝酸盐和氨氮浓度过高、藻相不好(尤其是蓝藻过度繁殖等)等是养殖过程病害发生的关联因子, 但这种关联因子的不确定性太大, 能否对养殖过程产生预测作用值得商榷。在环境因子-微生物-生态系统三者中, 微生物群落起着核心和纽带作用。一方面, 环境因子的变化会驱动养殖环境中微生物群落的动态变化, 而微生物群落变化则反过来会改变和调节养殖环境条件, 从而影响整个养殖生态系统的健康状况。因此, 研究微生物群落结构以及动态变化, 对健康养殖环境维持和病害防控有着积极意义。

本研究中华绒螯蟹养殖池塘水体内, 肠道沙门氏菌、爱德华氏菌和金黄色葡萄球菌为主要优势致病菌, 并且6—7月水体中的致病菌相对丰度显著高于其他月份, 同时发现丰度占比较大的3种优势致病菌在温度相对较低的10月丰度依然较高。6月, 2种弧菌(哈维氏弧菌和塔斯曼弧菌)的丰度明显高于其他月份。弧菌是一种典型的条件致病菌, 可引起大规模水产疾病发生并造成严重死亡, 是水产养殖中重要的致病菌。研究者普遍认为, 养殖水体中NH₃-N和NO₂-N含量较高易使弧菌数量增加(吴越等, 2017)。但在本研究中, 6月的NH₃-N和NO₂-N含量并不是最高的, 这可能是由于弧菌的生长除了受氮磷营养元素影响外, 温度也是关键因子(Chen *et al.*, 2020)。值得注意的是, 7月富集的致病菌为猪链球菌, 虽然链球菌是温度敏感性细菌, 容易在7月高温期发生, 但在水产养殖中常见的链球菌为海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)和副乳房链球菌(*Streptococcus parauberis*)等(梁前才等, 2023), 本研究养殖蟹塘水体中富集的猪链球菌, 可能是在养殖期间换水或者补水过程中引入的附近畜禽养殖废水中所含的细菌。9—10月富集的致病菌主要为优势菌, 包括肠道沙门氏菌、爱德华氏菌和金黄色葡萄球菌, 这说明以上3种相对丰度较高的致病菌在养殖过程中可以长期存活, 对传播致病性构成潜在风险。

养殖水体中的环境因子、水体微生物和养殖产品之间存在互动关系。养殖水体中的微生物一方面可以保护水生动物免受病原体的侵害, 另一方面则可能成为潜在的致病菌。致病菌和益生菌的数量与比例可以作为水体生态结构健康与否的生物标记。有研究认为, 蓝细菌(*Cyanobacteria*)、红细菌(*Rhodobacterales*)、浮游菌(*Planctomycetales*)、立克次氏体(*Rickettsiales*)和疣微菌(*Verrucomicrobiales*)等可以作为水生动物存在患病危险的指示菌类; 而黄杆菌(*Flavobacteriales*)、硫滴菌(*Thiotrichales*)、伯克霍尔德菌(*Burkholderiales*)、纤维菌(*Fibrobacterales*)、芽孢杆菌(*Bacillales*)和丙酸杆菌(*Propionibacteriales*)可以作为水生动物健康的指示菌类(Zhang *et al.*, 2014)。环境因子的调控会改变养殖水体中的微生物群落结构, 从而作用于水生动物所处的生态系统。因此, 研究养殖过程中的微生物群落结构和功能组成的变化, 对调控构建健康的养殖生态环境意义重大。

4 结论

本研究通过宏基因组学技术对中华绒螯蟹养殖池塘水体中的微生物群落进行分析发现, 6—8月微

生物群落多样性以及7—8月的微生物群落丰富度均高于9—10月。通过物种注释得到养殖水体微生物优势门主要为细菌中变形菌门、拟杆菌门、放线菌门、疣微菌门、蓝细菌门和病毒中的尾噬菌体门, 并且发现7月蓝藻门细菌和9月的绿藻门真核生物丰度占比明显高于其他月份。养殖水体中微生物功能主要集中在代谢功能中的能量代谢、全局和概览图和氨基酸代谢上, 而变形菌门、放线菌门和拟杆菌门优势细菌是微生物功能的主要贡献者。环境因子对微生物群落和功能结构的影响趋势一致, 其中Chl-a和pH是影响最显著的环境因子, DO、TP的影响作用稍弱。在养殖水体中的所有样本中共发现203种致病菌, 以常见的养殖水产品为宿主的致病菌种类共有26种, 其中丰度占比较大的为肠道沙门氏菌、爱德华氏菌和金黄色葡萄球菌, 丰度占比较大的典型弧菌致病菌主要富集在6月。本研究结果较为全面地分析了中华绒螯蟹养殖池塘水体中的微生物群落和功能结构, 明晰了关键影响因子, 分析了典型致病菌在养殖周期内的动态变化, 为养殖期间通过水质调控改变微生物群落及维持健康的养殖生态系统提供了理论指导。

参 考 文 献

- ADAIR K L, DOUGLAS A E. Making a microbiome: The many determinants of host-associated microbial community composition. *Current Opinion in Microbiology*, 2017, 35: 23–29
- ALTSCHUL S F, MADDEN T L, SCHÄFFER A A, *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(17): 3389–3402
- CAO Y C, WEN G L, LI Z J, *et al.* On the correlation between the water quality and the dynamic variation of the bacterial community metabolism in tilapia cultured pond. *Journal of Safety and Environment*, 2015, 15(1): 280–284 [曹煜成, 文国樑, 李卓佳, 等. 池塘水体微生物群落代谢活性的动态变化及其与水质的关系. 安全与环境学报, 2015, 15(1): 280–284]
- CHEN X, ZHAO H X, JIANG G L X, *et al.* Responses of free-living vibrio community to seasonal environmental variation in a Subtropical Inland Bay. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 610974
- CHEN Y F, WEI M, QIU Q F, *et al.* The seasonal variations of bacterioplankton in two types of ponds of *Portunus trituberculatus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(5): 119–125 [陈逸斐, 韦梦, 裴琼芬, 等. 两种三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)养殖塘中浮游细菌的季节变化. 渔业科学进展, 2015, 36(5): 119–125]
- GAO Q X, LI Y L, QI Z H, *et al.* Bacteria diversity in marine

- sediments of intensive aquaculture areas of China in autumn based on macrogenomics. *Marine Fisheries*, 2019, 41(3): 354–363 [高权新, 李云莉, 齐占会, 等. 基于宏基因组学的中国沿海密集养殖水域秋季底质细菌多样性研究. 海洋渔业, 2019, 41(3): 354–363]
- GLIBERT P M, WILKERSON F P, DUGDALE R C, et al. Pluses and minuses of ammonium and nitrate uptake and assimilation by phytoplankton and implications for productivity and community composition, with emphasis on nitrogen-enriched conditions: Pluses and minuses of NH_4^+ and NO_3^- . *Limnology and Oceanography*, 2016, 61(1): 165–197
- GONG H, CHEN P, QIN Z, et al. Analysis of water quality and bacterial community characterization in an industrialized recirculating aquaculture system of *Litopenaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2023, 44(1): 125–136 [宫晗, 陈萍, 秦桢, 等. 凡纳滨对虾工厂化循环水养殖系统水质指标及微生物菌群结构的分析. 渔业科学进展, 2023, 44(1): 125–136]
- HUANG W H, LIU T, ZHENG M G, et al. Characteristics and impact factors of seawater microbial community structure in Rizhao shellfish aquaculture area. *Advances in Marine Science*, 2023, 41(2): 295–308 [黄文豪, 刘婷, 郑明刚, 等. 日照贝类养殖区海水微生物群落结构特征及其影响因素. 海洋科学进展, 2023, 41(2): 295–308]
- JIANG H F, LI K, SHI W Z, et al. Effects of common fishery drugs and water pH on nitrification performance and microbial community structure of biochar filler system. *Journal of Fisheries of China*, 2022, 46(9): 1656–1668 [江昊飞, 李慷, 石文智, 等. 常用渔药及水体 pH 对生物炭填料系统硝化作用和微生物群落结构的影响. 水产学报, 2022, 46(9): 1656–1668]
- LI T, LI L P, QU L. Research progress in the structure of tailed bacteriophage and its receptors. *Biotechnology Bulletin*, 2023, 39(6): 88–101 [李托, 李陇平, 屈雷. 有尾噬菌体的结构及其受体研究进展. 生物技术通报, 2023, 39(6): 88–101]
- LIANG Q C, CHEN N Q, LI L, et al. Research progress and control strategy of streptococcosis in fish. *Guangdong Journal of Animal and Veterinary Science*, 2023, 48(4): 54–59 [梁前才, 车南青, 李玲, 等. 鱼类链球菌病的研究进展及防控策略. 广东畜牧兽医科技, 2023, 48(4): 54–59]
- LIU J F, LAI L Y, LIN J J, et al. Ranitidine and finasteride inhibit the synthesis and release of trimethylamine N-oxide and mitigates its cardiovascular and renal damage through modulating gut microbiota. *International Journal of Biological Sciences*, 2020, 16(5): 790–802
- LIU P M, LUO J P, GAO Q X. Research progress of environmental microorganisms in aquaculture. *Current Biotechnology*, 2022, 12(5): 690–695 [刘培敏, 罗金萍, 高权新. 水产养殖环境微生物研究进展. 生物技术进展, 2022, 12(5): 690–695]
- LIU X C. Study on the pollution characteristics and microbial community structure of the river entering Baiyangdian Lake. Master's Thesis of Hebei University, 2021 [刘幸春. 白洋淀入淀河流污染特征及微生物群落结构研究. 河北大学硕士学位论文, 2021]
- LIU Y. A study on screening and practicality of bacteriophage of *Aeromonas veronii* from *Pelteobagrus fulvidraco*. Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2022 [刘洋. 黄颡鱼源维氏气单胞菌噬菌体的筛选及实用性研究. 华中农业大学硕士研究生学位论文, 2022]
- LUO F, LU L H, LI Z, et al. Composition and functions of planktonic microbial communities based on metagenomic approach: A case study in Chongqing urban section of the Three Gorges Reservoir. *Ecology and Environmental Monitoring of Three Gorges*, 2019, 4(3): 1–10 [罗芳, 鲁伦慧, 李哲, 等. 基于宏基因组学的三峡库区重庆主城区段水体浮游微生物群落的组成和功能分析. 三峡生态环境监测, 2019, 4(3): 1–10]
- MIAO F, CHEN Y T, LIU X, et al. Analysis of microbial community structure in the water body of eel aquaculture tail water treatment system. *Fujian Agricultural Science and Technology*, 2022, 53(9): 1–10 [缪凡, 陈燕婷, 刘鑫, 等. 鳗鲡养殖尾水处理系统水体微生物群落结构分析. 福建农业科技, 2022, 53(9): 1–10]
- QU J Q, ZHANG Q J, YU W Y, et al. Core microbiome and nitrogen cycling in ecological floating-bed ponds. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2023, 40(2): 320–313 [曲疆奇, 张清靖, 俞文钰, 等. 生态浮床池塘水体核心微生物种类及氮循环功能研究. 农业资源与环境学报, 2023, 40(2): 320–313]
- QUAISER A, ZIVANOVIC Y, MOREIRA D, et al. Comparative metagenomics of bathypelagic plankton and bottom sediment from the Sea of Marmara. *ISME Journal*, 2011, 5(2): 285–304
- RONG R. The application in oyster depuration, large-scale preparation and preservation of *Vibrio parahaemolyticus* bacteriophage VPp1. Master's Thesis of Ocean University of China, 2014 [荣蓉. 副溶血弧菌噬菌体 VPp1 在牡蛎净化中的应用及其规模化制备和保存. 中国海洋大学硕士学位论文, 2014]
- State Environmental Protection Administration, Water and Wastewater Monitoring Analysis Method Editorial Board. *Water and wastewater monitoring analysis method*. 4th Edition. Beijing: China Environmental Science Press, 2002, 38–47 [国家环保总局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法. 第 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002, 38–47]
- SU J Y, CHEN C, LI W, et al. Water quality and microbial community structure of indoor industrial aquaculture system for Chinese softshell turtles (*Pelodiscus sinensis*) under two aeration methods. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2022, 42(5): 45–53 [苏俊宇, 陈辰, 李伟, 等. 2 种充气模

- 式中华蟹工厂化养殖水体水质及微生物群落结构. 广东海洋大学学报, 2022, 42(5): 45–53]
- SUN L Y, SHANG Y Y, LI Z L, et al. Characteristics of phages in water and sediments of Hanjiang River. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis*, 2023, 59(1): 125–132 [孙立宇, 尚韵依, 李治龙, 等. 汉江水体和沉积物中噬菌体特征研究. 北京大学学报(自然科学版), 2023, 59(1): 125–132]
- WU Y, MA J Z, ZHEN Y N, et al. Analysis of microbial community structure in recirculating aquaculture system for groupers (*Epinephelus*). *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. 中国水产科学, 2017, 24(5): 1045–1054]
- XIE Q. The microbial community diversity and water quality in culturing ponds of *Penaeus vannamei* and *Macrobrachium rosenbergii*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2017 [谢芹. 凡纳滨对虾和罗氏沼虾亲虾养殖塘水质及微生物群落多样性的研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2017]
- XU R, ZOU P, FU X P, et al. Effect of pH on purification efficiency and fungal community structure of black and odorous water bodies. *Environmental Engineering*, 2019, 37(10): 97–104 [许瑞, 邹平, 付先萍, 等. pH对黑臭水体净化效率及真菌群落结构的影响. 环境工程, 2019, 37(10): 97–104]
- YAN F J, TIAN X L, DONG S L, et al. Seasonal variation of functional diversity of microbial communities in sediment and shelter of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) cultural ponds. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34(11): 2990–3006 [闫法军, 田相利, 董双林, 等. 刺参池塘底质微生物群落功能多样性的季节变化. 生态学报, 2014, 34(11): 2990–3006]
- YANG X L, LIU L H, BI Y H, et al. Progress on photosynthetic nitrogen assimilation and its regulatory mechanisms in cyanobacteria. *Journal of Lake Sciences*, 2023, 35(3): 766–779 [杨小龙, 刘莉华, 毕永红, 等. 蓝藻光合氮同化的特征与分子调控机理研究进展. 湖泊科学, 2023, 35(3): 766–779]
- ZHANG D M, WANG X, XIONG J B, et al. Bacterioplankton assemblages as biological indicators of shrimp health status. *Ecological Indicators*, 2014, 38: 218–224
- ZHANG H, SUN Z L, LIU B, et al. Dynamic changes of microbial communities in *Litopenaeus vannamei* cultures and the effects of environmental factors. *Aquaculture*, 2016, 455: 97–108
- ZHANG H. The dynamic changes of microbial communities in aquaculture environment and interactions with water environment. Master's Thesis of Soochow University, 2015 [张皓. 养殖环境微生物群落的动态变化及与水环境的互作. 苏州大学硕士研究生学位论文, 2015]
- ZHANG J B. Study on water quality factors affecting chlorophyll-*a* concentration in water bodies and production management factors for reducing pond effluent: A case study of west Yangcheng Lake and fish and crab. Master's Thesis of Soochow University, 2020 [张俊彪. 影响水体叶绿素*a*水平的水质因素和减少养殖尾水排放的生产管理因素研究——以阳澄西湖及鱼、蟹池塘为例. 苏州大学硕士研究生学位论文, 2020]
- ZHU Y H. Study on the competition relationship among surface algae in low-salinity eutrophication waters and its impact on water microbial populations. Master's Thesis of Nanjing University of Information Science and Technology, 2021 [朱益辉. 低盐富营养化水域表层藻类竞争关系及其对水体微生物种群影响研究. 南京信息工程大学硕士研究生学位论文, 2021]

(编辑 冯小花)

Metagenomics-Based Analysis of Microbial Community Structure and Function Composition in Aquaculture Pond for Chinese Mitten Crab (*Eriocheir sinensis*)

ZHANG Xu^{1,2}, ZHOU Li^{1①}, CAI Min¹, CUI Naxin¹, PANG Si¹, ZOU Guoyan¹,
ZHAO Zhiyong³, YUAN Quan¹, HUANG Weiwei¹, ZHANG Yalei²

(1. Institute of Eco-Environmental Protection Research, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai Engineering Research Center of Low-Carbon Agriculture, Shanghai 201403, China; 2. State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, College of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China; 3. Institute for Agri-Food Standards and Testing Technology, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China)

Abstract The structure and function of microbial communities in aquaculture water bodies are important in the aquaculture ecosystem. To comprehensively and systematically evaluate the structure and functional composition of the microbial community in the water during Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) cultivation, the water quality indicators in the crab pond in Chongming District, Shanghai were monitored monthly from June to October 2022. The microbial species and functional structural characteristics in the water environment during the breeding period were analyzed based on metagenomics technology, and their relationships with environmental factors were discussed. The results showed that the major water quality indicators that exceeded the standard in the breeding pond were pH, permanganate index, total phosphorus, and total nitrogen. During the breeding period, the diversity of the microbial community in the water body from June to August and the richness of the microbial community from July to August were high, and the dominant microbial phyla in the water body were mainly Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Verrucomicrobia, Cyanobacteria, and Uroviricota. At the genus level, the top 10 dominant genera regarding abundance were significantly different among multiple groups. For example, the abundances of *Microcystis* bacteria in July and unclassified_o_Caudovirales viruses in August–October were significantly higher than those in other months. The primary function of microorganisms is metabolism, including energy metabolism, global and overview maps, and amino acid metabolism. Notable differences are present in the functional composition of different months; particularly, the abundance of metabolic pathways in June–July was significantly higher than that in August–October, and the dominant bacteria (*Proteobacteria*, *Actinobacteria*, and *Bacteroidetes*) were major contributors to the aforementioned functions. The influence trends of environmental factors on the structure and functional composition of microbial communities were consistent. Chlorophyll *a* and pH had the most significant impact on the structure and functional composition of microbial communities, whereas dissolved oxygen and total phosphorus had a slightly weaker impact. The pathogenic bacteria with a relatively large abundance in aquaculture water bodies are *Salmonella enterica*, *Edwardsiella ictaluri*, and *Staphylococcus aureus*. The research results provide basic data for the study of microbial community structure and functional composition in water bodies of Chinese mitten crab breeding ponds and can provide a theoretical basis for aquaculture water quality control and ecosystem construction.

Key words Aquaculture pond; Chinese mitten crab; Metagenomics; Microbial communities; Functions; Environmental factors

① Corresponding author: ZHOU Li, Email: zhouli@saas.sh.cn