

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220322003

http://www.yykxjz.cn/

裴泓霖, 谭八梅, 王萃, 夏兴龙, 郝振林, 丁君, 常亚青. 冻融期刺参养殖池塘沉积物菌群结构特征及其影响因素. 渔业科学进展, 2023, 44(4): 121-134

PEI H L, TAN B M, WANG L, XIA X L, HAO Z L, DING J, CHANG Y Q. Composition of the bacterial community in the sediment of ponds for culturing sea cucumber (*Apostichopus japonicus*): Influence of environmental factors during ice-melting period. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(4): 121-134

冻融期刺参养殖池塘沉积物菌群结构特征 及其影响因素*

裴泓霖¹ 谭八梅¹ 王萃^{1①} 夏兴龙¹ 郝振林¹ 丁君^{1,2} 常亚青¹

(1. 大连海洋大学 农业农村部北方海水增养殖重点实验室 辽宁 大连 116023;

2. 南方海洋科学与工程广东省实验室(广州) 广东 广州 511458)

摘要 本研究以我国北方典型岸基半开放刺参(*Apostichopus japonicus*)养殖池塘为对象, 利用高通量测序技术构建冻融期刺参养殖池塘沉积物菌群 16S rRNA 基因测序文库, 解析封冰期、融冰期和化冰期刺参养殖池塘沉积物菌群结构特征, 并查明影响菌群结构的主导环境因子。结果显示, 冻融期刺参养殖池塘沉积物菌群丰度和多样性表现为整体下调趋势, 在融冰初期呈现显著性波动($P<0.05$)。冻融期刺参养殖池塘沉积物菌群结构呈现显著性差异, 封冰期、融冰期和化冰期差异菌群分别隶属于厚壁菌门(Firmicutes)、酸杆菌门(Acidobacteria)和软壁菌门(Tenericutes)。尽管不同阶段微生物相对丰度比例不同, 但第一优势菌门均隶属于变形菌门(Proteobacteria), 相对丰度高于49.04%; 次优势菌门则呈现出显著性变化, 其中, 封冰期为拟杆菌门(Bacteroidetes), 融冰期为绿弯菌门(Chloroflexi)和放线菌门(Actinobacteria), 化冰期为浮霉菌门(Planctomycetes)。环境因子与菌群相关性分析表明, 冻融期刺参养殖池塘沉积物菌群结构与环境因子具有显著相关性($P<0.05$), 温度、盐度、总氮和总有机碳是沉积物菌群的主导环境因子。本研究将为刺参养殖池塘精细化管理提供理论依据。

关键词 刺参; 冻融期; 沉积物; 高通量测序; 菌群结构

中图分类号 S966.9 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)04-0121-14

刺参(*Apostichopus japonicus*)具有较高的经济价值, 是我国北方重要的海水养殖品种(Roggatz *et al.*, 2018)。随着刺参养殖产业的不断发展, 封闭或半封闭的池塘养殖已成为刺参增养殖的主要模式(Yuan *et al.*, 2007)。

冻融期是我国北方地区因初春气温回升导致池

塘表面冰层融化的一段特殊时期。冻融期冰层的融化使养殖池塘水体环境由封闭状态逐渐转变为对外交换状态, 由此引起养殖池塘水体出现温跃层、盐跃层和溶解氧分层等现象(Giliehinsky *et al.*, 2002)。调查显示, 冰层融化导致的池塘跃层会引起池塘底部水质恶化及病原菌暴发, 进而危害养殖生物的健康(黄华伟

* 国家自然科学基金(31902395)、国家重点研发计划(2018YFD0901604)、大连市青年科技之星项目(2020RQ115)和南方海洋科学与工程广东省实验室(广州)人才团队引进重大专项(GML2019ZD0402)共同资助。

裴泓霖, E-mail: 897544591@qq.com

① 通信作者: 王萃, 副研究员, E-mail: dlouwangluo@sina.com

收稿日期: 2022-03-22, 收修改稿日期: 2022-04-14

等, 2011)。

沉积物菌群在养殖池塘生态系统中占据着重要地位, 在生态系统平衡、水质调控、养殖生物疾病防控等方面均发挥着重要作用(Deng *et al.*, 2009; Michaud *et al.*, 2009; Blancheton *et al.*, 2013; 范立民, 2015; 姜燕等, 2022)。李步先(2015)研究表明, 从虾蟹养殖池塘沉积物中分离得到的盐单胞菌属(*Halomonas*)能改善养殖环境、有效降解养殖环境中的氨态氮、防止因氮污染滋生病原菌引起养殖生物患病, 且具有修复环境污染的功能。从刺参养殖池塘沉积物中分离得到的益生菌菌株 YQ-2 和 DY-6 能有效抑制刺参病原菌——灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)和假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas nigrifaciens*)的生长繁殖(杜佗等, 2017; 王金燕等, 2018)。然而, 养殖池塘生态系统极易受到外部理化因子的影响, 季节变动、营养物质输入等变化均可造成池塘养殖环境菌群种类和丰度的改变(Bentzon-Tilia *et al.*, 2016; 谭八梅等, 2021)。例如, 高温条件能提高微生物体内的酶活性、提高微生物代谢水平、加速有机物分解, 进而促进养殖环境物质循环(李彬等, 2010)。水体透明度直接决定光照射入池塘水体的深度, 控制了水中微生物的光合作用强度, 进而改变养殖环境物质循环状态(龚骏等, 2013)。pH 是生物地球转换的重要调控因子, 能够通过调节菌群对水中离子和微量金属的利用率, 从而改变代谢效率(Lindstöm *et al.*, 2012)。外部理化环境因子变化剧烈的冻融期是刺参健康养殖的关键时期, 但关于养殖池塘冻融期菌群结构方面的研究还鲜有报道。

因此, 本研究以中国北方典型岸基半开放刺参养殖池塘为对象, 利用高通量测序技术解析冻融期刺参养殖池塘沉积物菌群结构特征及其影响因素, 旨在为刺参养殖池塘精细化管理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 采集样品

本研究选取中国北方典型岸基半开放刺参养殖池塘(40°37'46"N; 122°8'59"E)为对象, 利用采泥器分别采集封冰期、融冰期和化冰期同一刺参养殖池塘表层 3~5 cm 沉积物样品, 采样信息见表 1。样品装入无菌离心管中, -80 °C 冰箱冷冻保存, 用于细菌总 DNA 的提取。所有样品来自同一池塘并设置 3 个平行, 池塘面积约为 0.07 km², 水深约为 4 m, 刺参密度约为 5 头/m², 全年未使用微生物制剂。

表 1 样品信息

Tab.1 Sampling information

采样时期 Sampling period		样品信息 Sample information
封冰期 Icebound period		C-1、C-2、C-3
融冰期 Melting period	融冰第 1 天	R1-1、R1-2、R1-3
	融冰第 3 天	R3-1、R3-2、R3-3
	融冰第 5 天	R5-1、R5-2、R5-3
化冰期 Ablation period	化冰第 7 天	R7-1、R7-2、R7-3
	化冰第 14 天	R14-1、R14-2、R14-3

注: 封冰期是指冰层未融化的时期; 融冰期是指冰层开始融化至冰层完全融化的时期; 化冰期是指冰层完全消失后的时期。

Note: Icebound period refer to the period when the ice does not melt. Melting period refers to the period from the beginning of melting to the complete melting of ice. Ablation period refers to the period after the complete disappearance of ice.

1.2 环境因子测定

采用 HACH (HQd)水质分析仪器(HACH 公司, 美国), 现场测定养殖池水的温度(*T*)、盐度(*S*)和酸碱度(pH), 其他理化参数测定均依据中华人民共和国《海洋沉积物质量标准(GB18668-2002)》进行。沉积物总有机碳(TOC)的测定采用重铬酸钾氧化-还原容量法, 总氮(TN)采用过硫酸钾氧化法, 总磷(TP)采用钼锑抗分光光度法, 氨氮(NH₄⁺-N)采用次溴酸盐氧化法, 硝酸盐(NO₃⁻-N)采用镉柱还原法, 亚硝酸盐(NO₂⁻-N)采用萘乙二胺分光光度法, 磷酸盐(PO₄³⁻-P)采用磷钼蓝分光光度法, 硫化物采用亚甲基蓝分光光度法。

1.3 DNA 提取、扩增和测序

选用 OMEGA Soil DNA 试剂盒(D5625)提取沉积物总 DNA。提取的 DNA 用 NanoDrop2000 分光光度计检测浓度和纯度, 为确保 DNA 无降解无污染, DNA 浓度要求 ≥ 50 ng/μL, 纯度 OD_{260 nm}/OD_{280 nm}=1.8~2.0。利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, DNA 条带清晰且带型完整无拖尾现象, 表明所提 DNA 无蛋白质污染、无降解发生。

以细菌 16S rRNA 基因 V3~V4 片段 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3')和 805R(5'-GACTACHVGGTATCTAATCC-3')作为扩增引物进行 PCR 扩增, 使用带 barcode 的特异引物, TaKaRa 公司的 Tks Gflex DNA 聚合酶进行 PCR, 确保扩增效率和准确性。

将上述 PCR 扩增后获得的细菌 16S rRNA 基因产物送生工生物工程(上海)股份有限公司, 采用

Illumina Miseq 2×300 bp 测序平台进行高通量测序。

1.4 数据处理与分析

用 FASTP (版本 0.18.0) (Guo *et al.*, 2017)对 Illumina 平台的原始数据进行过滤, 标准如下: 去除含有未知核苷酸(N)≥10%的 reads; 去除 phred 质量评分≤20 的碱基≥50%的 reads; 删除含接头的 reads。对低质量 tag 过滤得到 clean tag (Bokulich *et al.*, 2013)。参照 QIIME (Caporaso *et al.*, 2010)的 tags 质量控制流程。使用 UCHIME 算法(Edgar *et al.*, 2011)进行 tag 的嵌合体检查。过滤嵌合体后得到的 effective tag 进行 OTU 丰度统计和其他后续分析。选取丰度最高的 tag 序列作为每个操作分类单元(operational taxonomic units, OTUs)的代表序列。采用 Usearch (8.1.1831)软件, 按照序列相似性为 97%的阈值进行 OTUs 聚类。采用 Mothur (1.30.1)软件对样品序列进行 α 多样性分析。采用 RDP Classifier (2.12)软件对样品合格序列进行物种分类操作, 阈值设置为 0.8, 低于该阈值的分类结

果被划归为 unclassified 一类。使用 R 语言(版本 2.5.3)进行环境因子相关性分析, 以明确环境因素对群落组成的影响, 获得不同水平各 rank 的丰度值。环境因素与物种之间的 Pearson 相关系数使用 R 语言 psych 包(版本 1.8.4)计算(Revelle *et al.*, 2010)。使用 SPSS19.0 软件对样本进行单因素方差分析(one-way ANOVA)。

2 结果

2.1 环境因子监测

本研究对中国北方典型岸基半开放刺参养殖池塘封冰期、融冰期和化冰期沉积物环境理化因子进行监测(表 2)。结果显示, 融冰期温度和盐度呈现显著性升高($P<0.05$), TOC 在融冰期第 1 天达到最高, TOC 在第 3 天开始显著下降, 至融冰期达到最低点($P<0.05$), 随后保持稳定。TP、NO₃-N 和 PO₄³⁻-P 含量在冻融期间呈逐渐下降的趋势。化冰后期环境因子波动较小, 温度和盐度基本保持稳定。

表 2 冻融期刺参养殖池塘沉积物环境理化因子

Tab.2 Environment factors of the sediment of ponds for culturing sea cucumber during ice-melting period

环境因子 Environmental factor	封冰期 Icebound period		融冰期 Melting period		化冰期 Ablation period	
	C	R1	R3	R5	R7	R14
底层水温 $T/^\circ\text{C}$	5.60±0.09 ^b	7.50±0.40 ^a	6.90±0.07 ^{ab}	8.30±0.21 ^a	8.10±0.13 ^a	8.00±0.10 ^a
盐度 S	28.80±2.11 ^b	30.80±0.52 ^a	33.80±0.62 ^a	33.20±0.74 ^a	31.30±0.26 ^a	31.30±0.13 ^a
溶解度 DO/(mg/L)	12.75±0.11 ^a	12.92±0.48 ^a	12.87±0.25 ^b	12.94±0.27 ^b	13.30±0.53 ^b	10.62±0.62 ^c
酸碱度 pH	7.79±0.20 ^a	7.79±0.15 ^a	7.82±0.04 ^a	7.85±0.11 ^a	7.43±0.09 ^a	7.74±0.03 ^a
总氮 TN/(mg/kg)	1.650±0.131 ^a	1.732±0.032 ^a	1.195±0.053 ^b	1.427±0.242 ^{ab}	1.512±0.108 ^{ab}	1.244±0.241 ^b
总磷 TP/(mg/kg)	0.047±0.001 ^a	0.033±0.000 ^a	0.031±0.011 ^a	0.003±0.000 ^b	0.036±0.012 ^a	0.024±0.044 ^a
氨氮 NH ₄ ⁺ -N/(mg/kg)	0.046±0.010 ^a	0.033±0.000 ^a	0.036±0.001 ^a	0.030±0.001 ^a	0.037±0.000 ^a	0.043±0.023 ^a
硝酸氮 NO ₃ ⁻ -N/(mg/kg)	2.550±0.540 ^a	0.353±0.012 ^b	0.374±0.102 ^b	0.139±0.193 ^b	0.501±0.232 ^b	0.293±0.171 ^b
磷酸盐 PO ₄ ³⁻ /(mg/kg)	1.927±0.012 ^a	1.164±0.071 ^a	1.080±0.034 ^a	0.239±0.143 ^b	0.249±0.031 ^b	0.196±0.011 ^b
硫化物 Sulfide/(mg/kg)	0.008±0.000 ^b	0.020±0.012 ^b	0.008±0.000 ^b	0.007±0.000 ^b	4.637±1.376 ^a	5.269±0.835 ^a
总有机碳 TOC/(mg/kg)	7.855±0.032 ^a	8.949±0.143 ^a	3.372±0.924 ^b	4.487±0.571 ^b	0.014±0.572 ^c	0.005±0.000 ^c
氧化还原电位 ORP/(mV)	-62±3 ^b	-121±7 ^a	-127±3 ^a	-93±1 ^{ab}	-95±1 ^{ab}	-101±2 ^{ab}

注: 表中数据为平均数±标准差; 同行不同字母表示不同时期的差异达到显著水平($P<0.05$)。

Note: Data in the table are Mean±SD; Data with different superscripts in the same row are significantly different ($P<0.05$).

2.2 高通量测序结果

冻融期不同阶段共 18 个样品所得原始测序序列为 45 106~79 040 条, 原始序列经质量控制、嵌合体和非靶区域序列去除后, 得到有效序列为 42 993~76 635 条(表 3)。

2.3 α 多样性分析

通过比较不同时期样本 α 多样性指数得出(图 1), 刺参养殖池塘冻融期间沉积物菌群丰度和多样性呈总体下降的趋势, 融冰前期则呈显著性波动($P<0.05$), 融冰后期菌群呈回升趋势, 在冰层完全消失的化冰期

表3 刺参养殖池塘沉积物菌群高通量测序结果

Tab.3 High throughput sequencing results of bacteria in the sediment of ponds for culturing sea cucumber

样品 Sample	原始序列 Original sequence	质量控后序列 Quality control sequence	非靶区序列 Not target sequence	嵌合体序列 Chimeric sequence	有效序列 Effective sequence	OTU 数目 OTU number
C-1	53 771	53 492	14	433	53 045	4 042
C-2	54 122	53 851	8	452	53 391	4 289
C-3	47 742	47 502	17	664	46 821	3 956
R1-1	66 119	65 745	17	282	65 446	3 728
R1-2	52 576	52 337	35	756	51 546	3 200
R1-3	59 108	58 705	12	1 327	57 366	4 068
R3-1	79 040	78 919	34	2 250	76 635	5 297
R3-2	64 976	64 942	28	674	64 240	4 707
R3-3	47 306	47 267	18	497	46 752	4 399
R5-1	77 450	77 336	48	2 994	74 294	4 580
R5-2	47 175	47 137	19	2 252	44 866	3 546
R5-3	68 082	67 993	15	1 883	66 095	4 313
R7-1	57 329	57 247	25	5 763	51 459	3 808
R7-2	46 641	46 596	30	3 305	43 261	3 323
R7-3	54 086	54 021	4	4 262	49 755	3 688
R14-1	45 106	45 077	7	2 077	42 993	3 751
R14-2	64 018	63 988	19	2 674	61 295	4 430
R14-3	55 559	55 508	15	1 623	53 870	3 866

菌群丰度和多样性再次下调。

2.4 β 多样性分析

在 OTU 水平上,根据加权 Unifrac 距离不同对封冰期、融冰期和化冰期样本进行主成分分析(图 2)。其中,PCA1 (principal component analysis)、PCA2 和 PCA3 的贡献率分别为 94%、2%和 1%,总贡献率为 97%。各组分样品聚集在 PCA1,显示出较好的生物学重复性。不同时期样品分布分散,说明组间群落结构存在差异。

2.5 菌群结构特征分析

门水平上(图 3a),相对丰度排名前 5 的菌门分别为变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)、浮霉菌门(Planctomycetes)、酸杆菌门(Acidobacteria)。冻融期刺参养殖池塘沉积物第一优势菌门均为变形菌门(相对丰度>49.04%)。次优势菌门存在显著性差异,其中,封冰期次优势菌门为拟杆菌门(相对丰度>6.80%),融冰期次优势菌门为绿弯菌门(Chloroflexi)和放线菌门;化冰期次优势菌门则演替为浮霉菌门。

属水平上(图 3b),封冰期优势菌属主要隶属于海泥大海球菌(*Halioglobus*)、硫卵菌属(*Sulfurovum*)、*Desulfopila*、*Lutimonas*、硫深海菌属(*Thiopfundum*);

融冰期优势菌属主要隶属于 *Sulfurovum*、*Thiopfundum*、*Desulfopila*;化冰期优势菌属主要隶属于 *Sulfurovum*、*Desulfopila*、*Thiopfundum*。值得注意的是,在冻融期间检测出刺参条件致病菌假交替单胞杆菌(*Pseudoalteromonas*) (相对丰度为 0.9%)。

线性判别法 LEfSe 分析显示(图 4),不同分类水平下共有 244 个细菌类群在冻融期存在差异。封冰期刺参养殖池塘沉积物差异菌门主要隶属于厚壁菌门,其代表菌属为盐厌氧杆菌(*Halanaerobium*)和嗜盐菌属(*Halocella*)。融冰期沉积物差异菌门隶属于酸杆菌门,其代表性差异菌属分别为 GP7、GP17 和 GP26。化冰期沉积物差异菌门隶属于软壁菌门(Tenericutes),其代表性差异菌属为 *Haloplasma*。

2.6 COG 功能预测分析

基于 COG 数据库(图 5),对比 25 组功能蛋白,刺参养殖池塘沉积物菌群在冻融期共有 18 组功能蛋白存在显著性差异($P<0.05$)。与封冰期相比,融冰期沉积物菌群在一般功能预测(general function prediction only) [R], 次生代谢物生物合成、运输和分解代谢(secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism) [Q], 辅酶的运输和代谢(coenzyme transport and metabolism) [H], 碳水化合物的运输和代谢(carbohydrate transport and metabolism) [G], 核苷

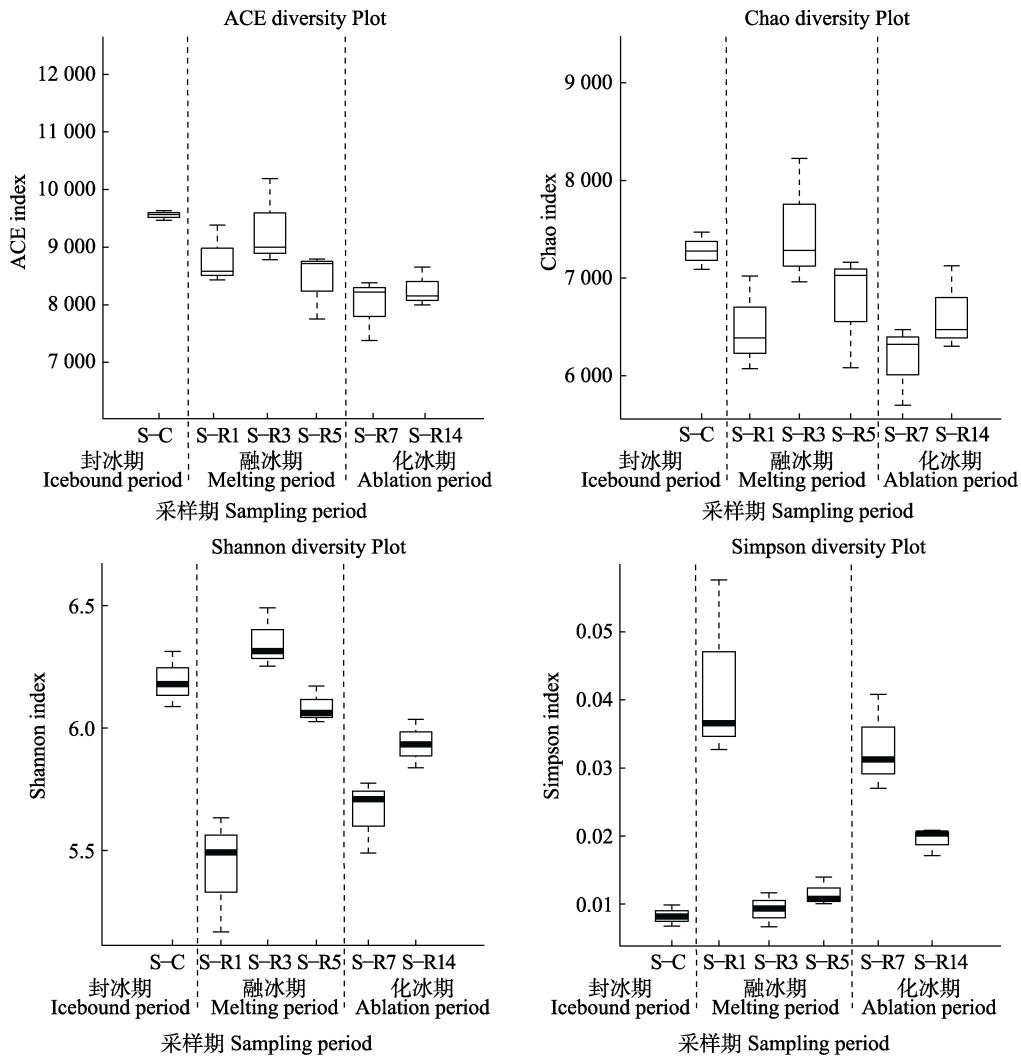


图 1 刺参养殖池塘沉积物菌群 α 多样性指数

Fig.1 α Diversity index in sea cucumber culture pond during ice-melting period

S-R1、S-R3、S-R5 分别为融冰期的第 1、3、5 天；S-R7、S-R14 分别为化冰期的第 7、14 天。
 S-R1, S-R3, and S-R5 indicate the first, third and fifth day of the melting period, respectively;
 S-R7 and S-R14 indicate the 7th and 14th day of the ablation period.

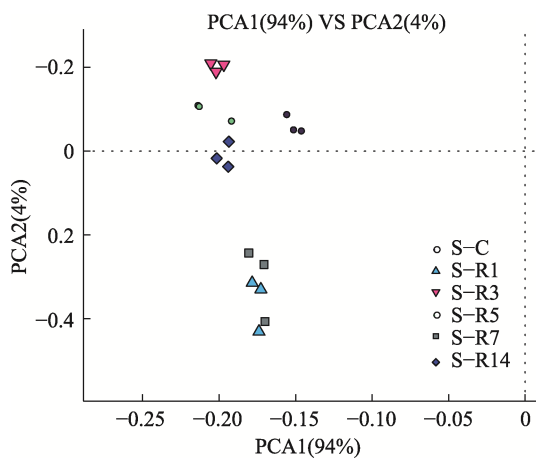


图 2 刺参养殖池塘沉积物菌群 PCA 分析图

Fig.2 PCA analysis diagram in sea cucumber culture pond during ice-melting period

酸的运输和代谢(nucleotide transport and metabolism) [F], 能量产生与转化(energy production and conversion) [C], 复制、重组和修复(replication, recombination and repair) [L], 转录(transcription) [K], 染色质结构及作用方式(chromatin structure and dynamics) [B], RNA 加工与修饰(RNA processing and modification) [A], 细胞外结构功能(extracellular structures) [W], 细胞骨架(cytoskeleton) [Z], 防御机制(defense mechanisms) [V], 信息转导机制(signal transduction mechanisms) [T], 细胞膜、细胞壁、包膜生物发生(cell wall/membrane/envelope biogenesis) [M], 细胞周期控制、细胞分裂、染色体分区(cell cycle control, cell division, chromosome partitioning) [D] 16 个方面呈现出显著性上调($P < 0.05$)。

化冰期，沉积物菌群在染色质结构及作用方式(chromatin structure and dynamics) [B], RNA 加工与修饰(RNA processing and modification) [A], 碳水化合物的运输和代谢(carbohydrate transport and metabolism) [G], 细胞周期控制、细胞分裂、染色体分区(cell cycle control, cell division, chromosome partitioning) [D], 细胞外结构功能(extracellular structures) [W], 信息转导机制(signal transduction mechanisms) [T], 一般功能预测(general function prediction only) [R], 转录(transcription) [K], 次生代谢物生物合成、运输和分解代谢(secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism) [Q] 9 组功能蛋白中表现为显著性下调($P < 0.05$)。

2.7 菌群结构与环境因子相关性分析

冻融期刺参养殖池塘沉积物菌群与环境因子

CCA 分析结果见图 6。如图 6 所示，封冰期刺参养殖池塘沉积物菌群单独聚为一类，融冰期和化冰期沉积物菌群则聚为另一类。根据环境因子箭头与原点连线的长度可知，刺参养殖池塘沉积物菌群排名前 4 的主导环境因子分别为温度、盐度、TN 和 TOC。其中，温度和盐度与封冰期沉积物菌群呈负相关，与融冰期沉积物菌群呈正相关。TOC 和 TN 与封冰期沉积物菌群相对丰度呈正相关。

冻融期刺参养殖池塘沉积物优势菌门与主导环境因子间相关性分析结果见表 4。其中，拟杆菌门与盐度呈极显著负相关($P < 0.001$), 表明拟杆菌门受沉积物盐度影响较大。绿弯菌门与温度和盐度呈极显著正相关($P < 0.001$), 与 TOC 含量呈极显著负相关($P < 0.001$)。浮霉菌门与温度和盐度等环境因子均未表现出显著相关性($P > 0.05$)。放线菌门与盐度呈极显著正相关($P < 0.01$), 与 TOC 含量呈极显著负相关($P < 0.01$)。

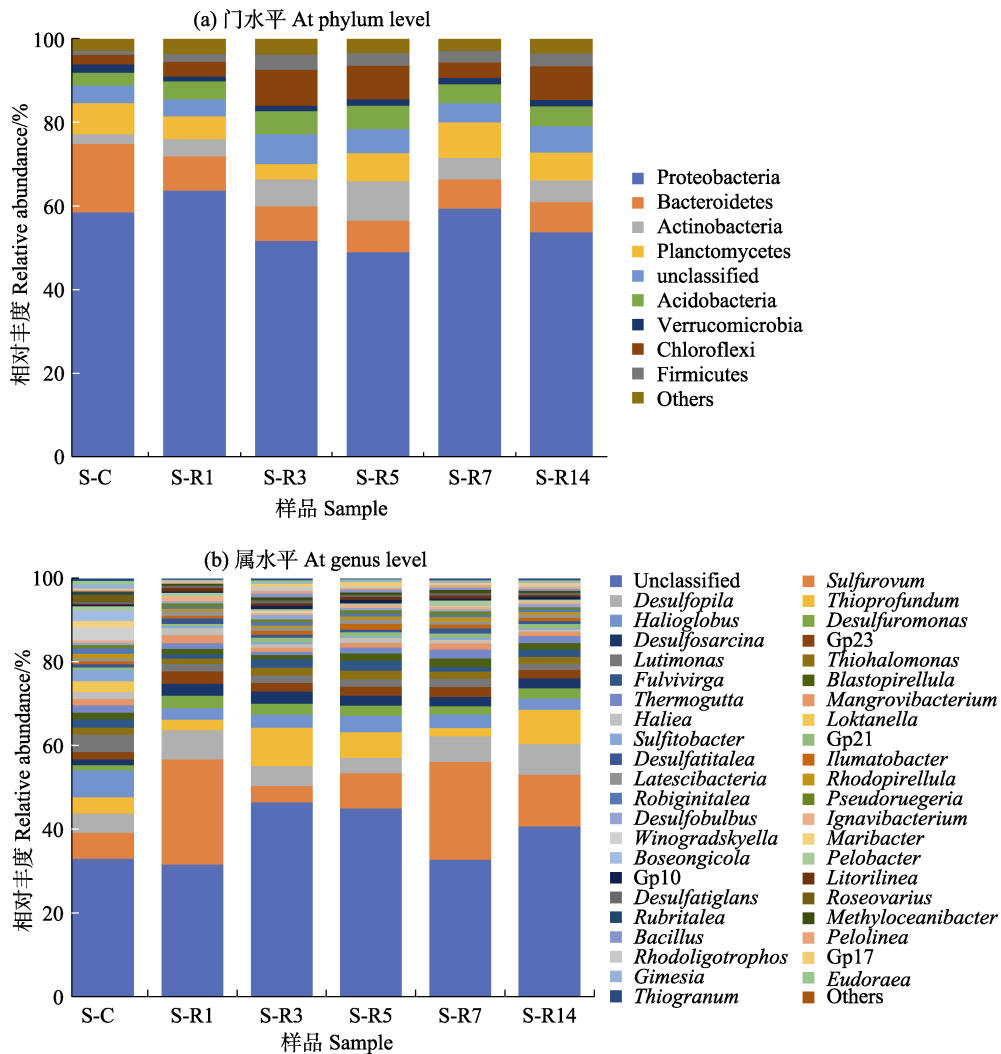


图 3 沉积物菌群结构相对丰度图
Fig.3 Relative abundance of sediment bacterial community

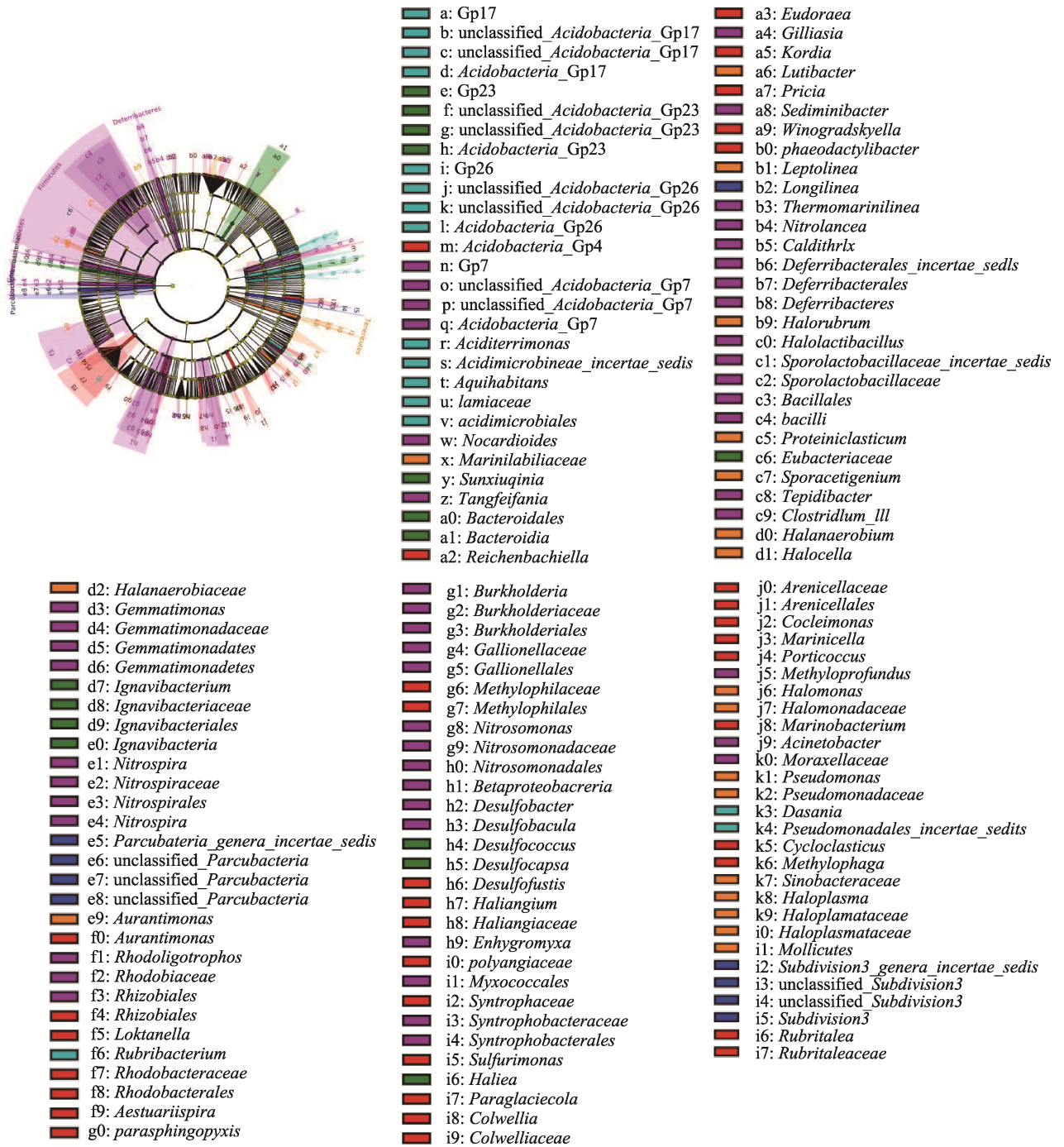


图 4 冻融期刺参养殖池塘沉积物菌群 LefSe 分析

Fig.4 LefSe analysis of the sediment bacterial community in sea cucumber culture pond during ice-melting period

3 讨论

3.1 冻融期刺参养殖池塘沉积物菌群丰度和多样性

微生物作为养殖池塘生态系统的生产者和分解者,在生态系统物质循环和能量流动过程中发挥着重要作用(Langenheder *et al.*, 2006; Adams *et al.*, 2010; 金笑等, 2017)。菌群生长繁殖所需的营养物质主要依靠环境中的无机盐和有机物,其群落组成对环境因子

的变化有较强的敏感性(王轶南等, 2010; Bell *et al.*, 2013; 李建光等, 2014; Yang *et al.*, 2015; Amabebe *et al.*, 2020)。本研究表明,冻融期刺参养殖池塘沉积物菌群丰度和多样性总体呈下调趋势,但融冰初期则出现显著波动。相较于封冰期,温跃层及盐跃层的出现引起底部水层环境因子发生剧烈变化(姜森颖等, 2015)。温度的升高为更多微生物提供了适宜的生态位,能加速酶促反应,进而促进微生物代谢(Tang *et al.*,

2014; Cardona *et al*, 2016), 造成融冰初期菌群丰度及多样性上调。同时, 盐度作为海水养殖中的重要环境因素, 能干扰水体微生物新陈代谢, 影响沉积物中微生物的多样性(Jackson *et al*, 2009)。倪蒙等(2019)对不同盐度罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)养殖池塘调查显示, 高盐度组菌群丰度与多样性显著高于低盐度组。环境因子的大幅改变, 破坏了封冰期沉积物

原有的菌群结构, 引起冻融期微生物丰度和多样性出现波动, 随着气温回升, 养殖环境温度和盐度变化趋势减小, 养殖池塘环境因子和菌群结构也趋于稳定。

相比于融冰期, 化冰期菌群丰度及多样性呈下调趋势。微生物能通过碳循环获取能量, 而有机碳作为环境中碳源的指标之一, 能在一定程度上反映环境微生物丰度。李谷等(2013)对养殖池塘群落的碳源代谢

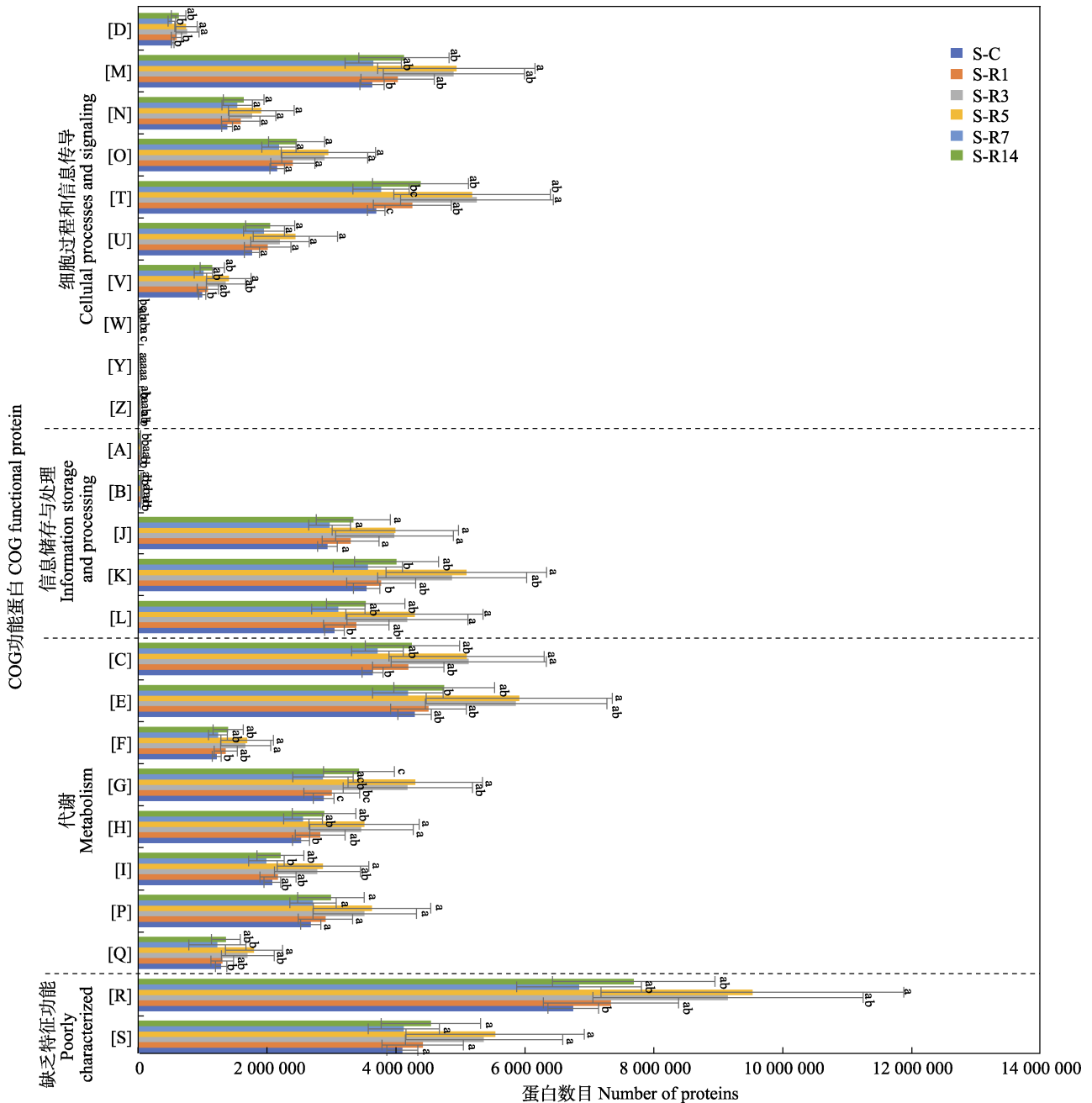


图5 基于 COG 数据库注释沉积物菌群功能

Fig.5 Function abundances of sediment bacterial based on COG database

同一组中上标不同字母表示平均值间差异显著($P < 0.05$), 各组上标相同字母表示组间差异不显著($P > 0.05$)。

In the same group, there is a significant difference between the mean values indicated by different superscripts ($P < 0.05$), while there is no significant difference between groups indicated by the same superscripts ($P > 0.05$).

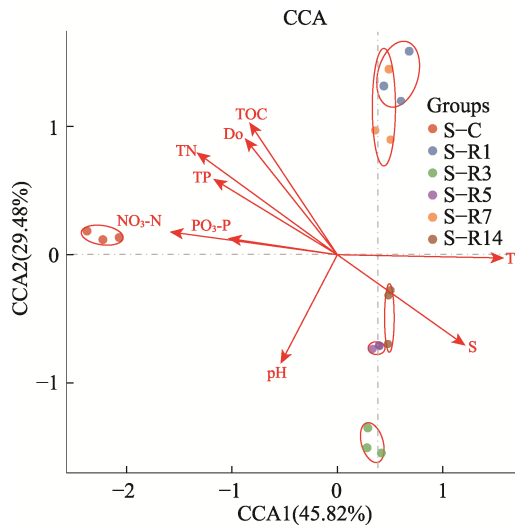


图 6 沉积物菌群与环境因子 CCA 分析图

Fig.6 CCA analysis of sediment bacterial community and environmental factors

特性和功能多样性进行调查,发现养殖池塘水体微生物群落对不同碳源有不同程度的利用。高浓度有机碳更适合微生物大量繁殖栖息(Ram *et al*, 1982)。本研究中,化冰期沉积物 TOC 含量显著下降(仅为 0.014 mg/kg)。TOC 含量过低抑制了微生物的生长繁殖,进而限制了微生物的丰度及其多样性,可能是引起化冰期微生物丰度及多样性出现下调的原因。

表 4 沉积物优势菌群与主导环境因子相关性分析

Tab.4 Correlation analysis between dominant bacterial community and environment factors in sediment

优势菌群 Dominant bacterial community	环境因子 Environment factors					
	温度 <i>T</i>	总氮 TN	盐度 <i>S</i>	总有机碳 TOC	硫化物 Sulfide	酸碱度 pH
拟杆菌门 Bacteroidetes	-0.515**	0.375*	-0.634***	0.452*	-0.120	0.341
绿弯菌门 Chloroflexi	0.596***	-0.550**	0.607***	-0.668***	0.453*	0.241
浮霉菌门 Planctomycetes	-0.040	0.221	0.845	0.062	-0.151	-0.251
放线菌门 Actinobacteria	0.425*	-0.299	0.550**	-0.494**	0.194	-0.016

注: 同列中标有***表示差异极显著($P < 0.001$); **表示差异显著($P < 0.01$); *表示差异显著($0.01 < P < 0.05$); 无标注则为差异不显著($P > 0.05$)。

Note: In the same column, *** indicates extremely significant difference ($P < 0.001$), ** indicates highly significant difference ($P < 0.01$), * indicates significant difference ($0.01 < P < 0.05$), and no marked indicates no significant difference ($P > 0.05$).

菌门中的 GP7 和 GP17 相对丰度与 pH 呈显著正相关关系。结合环境因子数据,与融冰期沉积物较高 pH 条件相符。化冰期刺参养殖池塘沉积物差异菌以软壁菌门为代表,而目前有关于软壁菌门的研究还鲜有报道。值得注意的是,冻融期间刺参养殖池塘沉积物中发现假交替单胞杆菌,相对丰度为 0.9%,该菌是刺参腐皮综合征的主要致病菌(李强等, 2013),发病时的死亡率可达 90%。因此,冻融期养殖环境管理十

3.2 冻融期刺参养殖池塘沉积物菌群结构特征及其影响因素

本研究中,冻融期刺参养殖池塘沉积物菌群结构呈现显著的演替特征,但变形菌门始终为冻融期沉积物第一优势菌门。变形菌门作为刺参养殖池塘丰度最高的菌群(丁斯予等, 2019; 任利华等, 2015; 窦妍等, 2016),主要是由其在原核生物分子生物学分类中的绝对优势所决定的(Gupta, 2000)。August 等(2009)研究表明, α -变形菌纲通过光合作用储存能量,用于生长代谢、 CO_2 和 N 的固定。厌氧条件下,一些 γ -变形菌可以和厌氧环境中的动物产生共生关系,对环境中的 C、N 和 S 循环起着重要作用(Olav *et al*, 1989; Bakunina *et al*, 2000; Manzoni *et al*, 2008)。

此外,不同时期菌群存在显著性差异,且各时期差异菌群与其生境环境因子之间显著相关。闫法军等(2014)研究表明,微生物作为生境的反映,与环境理化性质密切相关且相互限制影响。其中,封冰期刺参养殖池塘沉积物差异菌以厚壁菌门为代表。厚壁菌门可以形成抗逆性芽孢,具有极强的环境适应性,温度越低,厚壁菌门的相对丰度越大(宋兆齐等, 2015, 与封冰期的低温条件相符。酸杆菌门作为融冰期特异性菌群的代表,与 pH 值密切相关。Jones 等(2009)对北美和南美的共 87 个土壤样品大尺度分析发现,酸杆

分重要,建议定期向水中投放水质改良剂,防止水质恶化。同时加入免疫增强剂促进诱发宿主防御反应,增强刺参抗病能力。

3.3 冻融期刺参养殖池塘沉积物菌群 COG 功能分析

微生物参与多种物质循环,与次生代谢物生物合成、运输和分解代谢、碳水化合物运输和代谢、能量产生与转化、转录、RNA 加工与修饰等功能息息

相关(Rungrassamee *et al*, 2016; Xiong *et al*, 2016)。放线菌门与绿弯菌门作为融冰期的两大优势菌门与该时期 COG 功能蛋白的上调具有一定相关性。放线菌门具有降解淀粉和蛋白质等大分子的功能,在氮磷循环、有机物降解及矿化过程中也具有重要作用,其发酵产物能抗菌抗病毒,能够抑制部分革兰氏阳性菌发挥功能(李文均等, 2002; 凌春耀等, 2020; Bull *et al*, 2005)。绿弯菌门营养方式和代谢途径十分丰富,是 C、N、S 等元素的生物地球化学循环的重要参与者(鲜文东等, 2020),如 CO₂ 固定、CO、CH₄、NO₂ 氧化及纤维素等大分子的降解,这些功能与碳水化合物的运输和代谢、能量产生与转化等功能息息相关。其部分次级代谢产物具有高效的细胞毒性和抗菌作用,具有成为益生菌的潜力(Nett *et al*, 2006)。这些优势菌群功能与 COG 蛋白中次生代谢物合成、运输和分解代谢、碳水化合物的运输代谢、能量产生与转化等功能相吻合,说明冻融期独特的优势菌门可能是其功能蛋白显著上调的原因。开展冻融期沉积物菌群 COG 功能分析,能够反映出菌群整体代谢水平及其生理偏向。

4 结 论

本研究利用高通量测序技术首次探究冻融期刺参养殖池塘沉积物菌群结构和功能的演替特征,并查明影响沉积物菌群结构的主导环境因子。研究表明,环境因子改变不利于养殖池塘沉积物菌群结构的稳定,易导致潜在致病菌增殖,加大养殖生物患病风险。因此,在养殖过程中应注重融冰期养殖池塘环境的管理,避免水质恶化与病害暴发。

参 考 文 献

- ADAMS H E, CRUMP B C, KLING G W. Temperature controls on aquatic bacterial production and community dynamics in arctic lakes and streams. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(5): 1319–1333
- AMABEBE E, ROBERT F O, AGBALALAH T. *et al*. Microbial dysbiosis-induced obesity role of gut microbiota in homeostasis of energy metabolism. *British Journal of Nutrition*, 2020, 123(10): 1127–1137
- AUGUET J C, BARBERAN A, CASAMAYOR E O. Global ecological patterns in uncultured archaea. *International Society for Microbial Ecology Journal*, 2009, 4(2): 182–190
- BAKUNINA I, SHEVCHENKO L S, NEDASHKOVSKAIA O I, *et al*. Screening of marine bacteria for fucoidan hydrolases. *Mikrobiologiya*, 2000, 69(3): 370–376
- BELL T H, YERGEAU E, MAYNARD C, *et al*. Predictable bacterial composition and hydrocarbon degradation in Arctic soils following diesel and nutrient disturbance. *International Society for Microbial Ecology Journal*, 2013, 7(6): 1200–1210
- BENTZON-TILIA M, SONNENSCHNEIN E C, GRAM L. Monitoring and managing microbes in aquaculture-towards a sustainable industry. *Microbial Biotechnology*, 2016, 9(5): 576–584
- BLANCHETON J P, ATTRAMADAL K J K, MICHAUD L, *et al*. Insight into bacterial population in aquaculture systems and its implication. *Aquacultural Engineering*, 2013, 53: 30–39
- BOKULICH N A, SUBRAMANIAN S, FAITH J J, *et al*. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature Methods*, 2013, 10(1): 57–59
- BULL A T, STACH J E M, WARD A C, *et al*. Marine actinobacteria: Perspectives challenges future directions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2005, 87(1): 65–79
- CAPORASO J G, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, *et al*. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335–336
- CARDONA E, GURGUEN Y, MAGRÉ K, *et al*. Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. *BMC Microbiology*, 2016, 16: 157
- DENG H, HE C B, ZHOU Z C, *et al*. Isolation and pathogenicity of pathogens from skin ulceration disease and viscera ejection syndrome of the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Aquaculture*, 2009, 287(1/2): 18–27
- DING S Y, WANG L, XU H C, *et al*. Bacterial community structure and function in the intestinal tracts and culture environment of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Chinese Journal of Ecology*, 2019, 38(1): 210–220 [丁斯予, 王萃, 徐翰晨, 等. 刺参肠道及养殖环境菌群结构与功能. *生态学杂志*, 2019, 38(1): 210–220]
- DOU Y, ZHAO X W, DING J, *et al*. Application of high-throughput sequencing for analyzing bacterial communities in earthen ponds of sea cucumber aquaculture in northern China. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2016, 47(1): 122–129 [窦妍, 赵晓伟, 丁君, 等. 应用高通量测序技术分析北方刺参养殖池塘环境菌群结构. *海洋与湖沼*, 2016, 47(1): 122–129]
- DU T, LI B, WANG Y G, *et al*. Screening and characteristic analysis of potential probiotics from large water ponds used for sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) farming. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(3): 180–187 [杜佗, 李彬, 王印庚, 等. 刺参(*Apostichopus japonicus*)大水面养殖池塘环境中优势益生菌筛选及其特性分析. *渔业科学进展*, 2017, 38(3): 180–187]
- EDGAR R C, HASS B J, CLEMENTE J C, *et al*. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 2011, 27(16): 2194–2200

- FAN L M. Microbial community in tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultural ponds. Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2015 [范立民. 吉富罗非鱼养殖池塘微生物群落研究. 南京农业大学博士研究生学位论文, 2015]
- GILIEHINSKY D A. Permafrost model of extraterrestrial habitat. *Astrobiology*, 2002, 125–142
- GONG J, ZHANG X L. Contribution and mechanism of microbe-driving nitrogen cycling processes in coastal ecosystems. *Microbiology China*, 2013, 40(1): 44–58 [龚骏, 张晓黎. 微生物在近海氮循环过程的贡献与驱动机制. *微生物学通报*, 2013, 40(1): 44–58]
- GUPTA R S. The phylogeny of proteobacteria: Relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, 24(4): 367–402
- HUANG H W, WANG Y G, CHEN X, *et al.* Relationship between the occurrence of rotten skin syndrome and environmental factors in cultured *Apostichopus japonicus* at low temperature. *Fisheries Science and Technology Information*, 2011, 38(6): 292–297 [黄华伟, 王印庚, 陈霞, 等. 低温期养殖刺参腐皮综合征的发生与环境因子间的关系. *水产科技情报*, 2011, 38(6): 292–297]
- JACKSON C, VALLAIRE S. Effects of salinity and nutrients on microbial assemblages in Louisiana wetland sediments. *Wetlands*, 2009, 29(1): 277–287
- JIANG S H, LIU S F, CAI X, *et al.* Annual variation characteristics of main ecological factors in the culture ponds of *Apostichopus japonicus* Selenka. *Fishery Modernization*, 2015, 42(5): 1–7 [姜森颖, 刘双凤, 蔡勋. 刺参养殖池塘主要生态因子周年变化特征. *渔业现代化*, 2015, 42(5): 1–7]
- JIANG Y, LI C Y, XU Y J, *et al.* Responses of microbiota structure in the intestinal tract and pond culture environment of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) to probiotics. *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(2): 137–146 [姜燕, 李存玉, 徐永江, 等. 池塘养殖牙鲆肠道和环境菌群结构对益生菌制剂的响应. *渔业科学进展*, 2022, 43(2): 137–146]
- JIN X, KOU W B, YU H T, *et al.* Environmental factors influencing the spatial distribution of sediment bacterial community structure and function in Poyang Lake. *Research of Environmental Sciences*, 2017, 30(4): 529–536 [金笑, 寇文伯, 于昊天, 等. 鄱阳湖不同区域沉积物细菌群落结构、功能变化及其与环境因子的关系. *环境科学研究*, 2017, 30(4): 529–536]
- JONES R T, ROBESON M S, LAUBER C L, *et al.* A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. *ISME Journal*, 2009, 3: 442–453
- LANGENHEDER S, LINDSTROM E S, TRANVIK L J. Structure and function of bacterial communities emerging from different sources under identical conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(1): 212–220
- LI B X. A primary study on isolation, screening and removal characteristics of probiotics in ponds of shrimp and crab. Master's Thesis of Ocean University of China, 2015 [李步先. 虾蟹养殖池塘益生菌的分离筛选及降解特性初步分析研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2015]
- LI B, RONG X J, LIAO M J, *et al.* Bacteria community in the intestine and culture environment of *Apostichopus japonicus* in winter. *Marine Sciences*, 2010, 34(4): 64–69 [李彬, 荣小军, 廖梅杰, 等. 冬季刺参养殖环境与肠道内细菌菌群的研究. *海洋科学*, 2010, 34(4): 64–69]
- LI G, SONG J H, LI X L, *et al.* Metabolic characteristics and functional diversity of carbon source in microflora of ponds with recirculating aquaculture system. *Agricultural Science and Technology*, 2014, 15(2): 278–282, 299 [李谷, 宋景华, 李晓莉, 等. 循环水养殖池塘微生物群落的碳源代谢特性和功能多样性研究. *农业科学与技术(英文版)*, 2014, 15(2): 278–282, 299]
- LI J G, XU Y P, LI X Y, *et al.* Characterization of bacterial communities associated with the intestinal tracts and culture environment of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) in different culture seasons. *Fisheries Science*, 2014, 33(9): 562–568 [李建光, 徐永平, 李晓宇, 等. 不同养殖季节仿刺参肠道与养殖环境中菌群结构的特点. *水产科学*, 2014, 33(9): 562–568]
- LI Q, SUN K T, ZHANG X Y, *et al.* Research progress on “skin ulceration syndrome” of *Apostichopus japonica*. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2013, 15(6): 40–45 [李强, 孙康泰, 张昱昱. 刺参“腐皮综合征”研究进展. *中国农业科技导报*, 2013, 15(6): 40–45]
- LI W J, ZHANG Z Z, JIANG C L. The advance on taxonomic of genus *Thermoactinomyces*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2002, 42(6): 759–763 [李文均, 张忠泽, 姜成林. 高温放线菌属分类研究进展. *微生物学报*, 2002, 42(6): 759–763]
- LIN C Y, HUANG H B, GAO C H, *et al.* Antibacterial anthracimycins from *Streptomyces pratensis* SCSIO LCY05 isolated from Ascidian. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2020, 39(3): 7–14 [凌春耀, 黄洪波, 高程海, 等. 海鞘来源放线菌 *Streptomyces pratensis* SCSIO LCY05 中 anthracimycin 类化合物及其抗菌活性研究. *中国海洋药物*, 2020, 39(3): 7–14]
- LINDSTÖM E S, LANGENHEDER S. Local and regional factors influencing bacterial community assembly. *Environmental Microbiology Reports*, 2012, 4(1): 1–9
- MANZONI S, JACKSON R B, TROFYMOW J A, *et al.* The global stoichiometry of litter nitrogen mineralization. *Science*, 2008, 321(5889): 684–686
- MICHAUD L, LO GIUDICE A, TROUSSELLIER M, *et al.* Phylogenetic characterization of the heterotrophic bacterial communities inhabiting a marine recirculating aquaculture system. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 107(6): 1935–1946

- NETT M, EROL Ö, KEHRAUS S, *et al.* Siphonazole, an unusual metabolite from *Herpetosiphon* sp. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2006, 45(23): 3863–3867
- NI M, GAO Q, YUAN J L, *et al.* Effect of salinity on the water quality and microbial community structure of the water for young *Macrobrachium rosenbergii* rearing. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2019, 41(5): 976–985 [倪蒙, 高强, 原居林, 等. 不同盐度罗氏沼虾育苗水体水质及微生物群落结构研究. *江西农业大学学报*, 2019, 41(5): 976–985]
- OLAV V, OLSEN Y. Chemical composition and phosphate uptake kinetics of limnetic bacterial communities cultured in chemostats under phosphorus limitation. *Limnology and Oceanography*, 1989, 34(5): 939–946
- RAM N M, ZUR O, AVNIMELECH Y. Microbial changes occurring at the sediment-water interface in an intensively stocked and fed fish pond. *Aquaculture*, 1982, 27(1): 63–72
- REN L H, LI B, SUN G H, *et al.* Structure of bacterial community in biofloc from *Apostichopus japonicus* breeding ponds revealed by 16S rRNA clone library. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(1): 197–205 [任利华, 李斌, 孙国华, 等. 16S rDNA 克隆文库解析仿刺参(*Apostichopus japonicus*)苗种培育池中生物絮团的细菌群落结构. *海洋与湖沼*, 2015, 46(1): 197–205]
- REVELLE W, REYELLE M W. Package ‘psych’. *The Comprehensive R Archive Network*, 2010
- ROGGATZ C C, GONZÁLEZ-WANGÜEMERT M, PEREIRA H, *et al.* A first glance into the nutritional properties of the sea cucumber *Parastichopus regalis* from the Mediterranean Sea (SE Spain). *Natural Product Research*, 2018, 32(1): 116–120
- RUNGRASSAMEE W, KLANCHUI A, MAIBUNKAEW S, *et al.* Bacterial dynamics in intestines of black tiger shrimp and the Pacific white shrimp during *Vibrio harveyi* exposure. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2016, 133: 12–19
- SONG Z Q, WANG L, LIU X H, *et al.* Diversities of Firmicutes in four hot springs in Yunnan and Tibet. *Biotechnology*, 2015, 25(5): 481–486, 436 [宋兆齐, 王莉, 刘秀花, 等. 云南和西藏四处热泉中的厚壁菌门多样性. *生物技术*, 2015, 25(5): 481–487, 436]
- TAN B M, WANG L, PEI H L, *et al.* The seasonal structural and functional characteristics of bacterial community in *Apostichopus japonicus* culture pond water. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(3): 77–88 [谭八梅, 王萃, 裴泓霖, 等. 不同季节刺参养殖池塘水体菌群结构与功能特征研究. *渔业科学进展*, 2021, 42(3): 77–88]
- TANG Y Y, TAO P Y, TIAN J G, *et al.* Identification of bacterial community composition in freshwater aquaculture system farming of *Litopenaeus vannamei* reveals distinct temperature-driven patterns. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(8): 13663–13680
- WANG J Y, LI B, WANG Y G, *et al.* Screening and characteristic analysis of *Bacillus velezensis* from sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) ponds. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(3): 567–575 [王金燕, 李彬, 王印庚, 等. 刺参养殖池塘一株贝莱斯芽孢杆菌的分离及其生理特性. *中国水产科学*, 2018, 25(3): 567–575]
- WANG Y N, ZHU S W, CHANG Y Q, *et al.* PCR-DGGE analysis of bacterial community composition in the intestine and aquaculture pond of *Apostichopus japonicus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(3): 119–122 [王轶南, 朱世伟, 常亚青, 等. 刺参肠道及养殖池塘菌群组成的 PCR-DGGE 指纹图谱分析. *渔业科学进展*, 2010, 31(3): 119–122]
- XIAN W D, ZHANG X T, LI W J, *et al.* Research status and prospect on bacterial phylum *Chloroflexi*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(9): 1801–1820 [鲜文东, 张潇橦, 李文均. 绿弯菌的研究现状及展望. *微生物技术与生态理论*, 2020, 60(9): 1801–1820]
- XIONG J B, DAI W F, LI C H. Advances, challenges, and directions in shrimp disease control: The guidelines from an ecological perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(16): 6947–6954
- YAN F J, TIAN X L, DONG S L, *et al.* Seasonal variation of functional diversity of aquatic microbial community in *Apostichopus japonicus* cultural pond. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2014, 25(5): 1499–1505 [闫法军, 田相利, 董双林, 等. 刺参养殖池塘水体微生物群落功能多样性的季节变化. *应用生态学报*, 2014, 25(5): 1499–1505]
- YANG Y Y, WANG Z, HE T, *et al.* Sediment bacterial communities associated with anaerobic biodegradation of bisphenol A. *Microbial Ecology*, 2015, 70(1): 97–104
- YUAN X T, YANG H S, WANG L L, *et al.* Effects of aestivation on the energy budget of sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) (Echinodermata: Holothuroidea). *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(8): 3155–3161

(编辑 马瑾艳)

Composition of the Bacterial Community in the Sediment of Ponds for Culturing Sea Cucumber (*Apostichopus japonicus*): Influence of Environmental Factors During Ice-Melting Period

PEI Honglin¹, TAN Bamei¹, WANG Luo^{1①}, XIA Xinglong¹,
HAO Zhenlin¹, DING Jun^{1,2}, CHANG Yaqing¹

(1. Dalian Ocean University, Agriculture Department Key Laboratory of Mariculture and Stock Enhancement in North China Sea, Dalian 116023, China; 2. Guangdong Provincial Laboratory of Southern Marine Science and Engineering (Guangzhou), Guangzhou 511458, China)

Abstract The sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) has high economic value and is one of the important mariculture species in northern China. With the continuous development of aquaculture industry, closed or semiclosed pond aquaculture has become the main sea cucumber culture method. The ice-melting period is a special period when the ice on the pond surface melts due to the temperature rise in early spring in northern China. During this period, the ice-melting layer gradually changes the water environment of pond aquaculture from a closed state to external exchange state, resulting in the formation of thermocline and halocline areas and dissolved oxygen stratification in pond aquaculture waters. Some investigations have shown that the thermocline of pond water caused by ice-melting will cause the deterioration of water quality at the bottom of the pond and the outbreak of pathogenic bacteria, which will endanger the health of cultured organisms. Microorganisms are an important part of the pond aquaculture ecosystem. They play an important role in the ecosystem's material circulation and energy flow and are significant to maintaining its balance. As an important part of the pond aquaculture ecosystem, sediment bacteria not only play a great role in the material circulation and energy flow processes but correlate with the growth, digestion, immunity, and diseases of aquaculture organisms. However, external physical and chemical factors easily affect the pond aquaculture ecosystem's bacterial structure. Seasonal changes and nutrient input can modulate the species and abundance of bacteria in the pond aquaculture environment, and indirectly affect the growth and health of aquaculture organisms. In recent years, investigations have been carried out on the bacterial community structure in ponds water and sediment. Nonetheless, only few reports comprise the structure and function of the bacterial community during the ice-melting period. Therefore, it is of great theoretical and practical significance to study the structural and functional characteristics of the sea cucumber sediment bacterial community in the pond aquaculture during the ice-melting period. Therefore, this study used the typical shore-based semi-open sea cucumber pond culture in northern China as its research object. A 16S rRNA sequencing library was constructed based on the sediment bacterial community during the icebound, melting, and ablation periods and analyzed using high-throughput sequencing technology. These sequences were used to evaluate the structural characteristics of these bacterial communities and identify the dominant environmental factors affecting them. The results showed that the abundance and diversity of sediment bacterial

① Corresponding author: WANG Luo, E-mail: dlouwangluo@sina.com

communities showed an overall downward trend in the ice melting period, fluctuating significantly in the early stage of ice-melting ($P<0.05$). Compared with the icebound period, the appearance of thermocline and halocline caused drastic changes in the environmental factors of the bottom water layer. The temperature increase provides a suitable habitat for more microorganisms, accelerating enzymatic reactions and promoting microbial metabolism, which results in the up-regulation of bacteria abundance and diversity in the early melting period. As an important environmental factor in mariculture, salinity can interfere with the metabolism of microorganisms in the water and affect its diversity in sediments. This investigation showed that the bacterial community abundance and diversity in high-salinity conditions were significantly higher than those in low salinity. The substantial changes in the environmental factors destroyed the original sediment bacterial structure during the icebound period, resulting in microbial abundance and diversity fluctuation during the ice-melting period. With the gradual disappearance of the thermocline and salt layers, the pond aquaculture's environmental factors and bacterial structure tended to be stable. In the ice-melting period, there were significant differences in the structure of sediment bacteria. The differential bacterial communities in the icebound, melting, and ablation periods were Firmicutes, Acidobacteria, and Tenericutes, respectively. Although the relative abundance ratio of microorganisms in different stages is distinct, the first dominant bacteria belong to Proteobacteria, and the relative abundance is higher than 49.04%. The secondary dominant bacteria included Bacteroides in the icebound period, Chloroflexi and Actinobacteria in the melting period, and Planctomycetes in the ablation period. The environmental factors and bacterial community structure showed significant correlation in the sea cucumber culture pond during the ice-melting period ($P<0.05$). Temperature, salinity, total nitrogen, and total organic carbon were the dominant environmental factors affecting sediment bacteria. This study will provide a theoretical basis for effectively managing sea cucumber pond aquaculture.

Key words *Apostichopus japonicus*; Ice-melting period; Sediment; High-throughput sequencing; Bacterial community