

覃宝利, 韩光明, 吴雷明, 等. 繁殖养殖分离模式和繁殖养殖一体模式下春季稻虾种养系统细菌群落特征[J]. 江苏农业学报, 2025, 41(7):1388-1397.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2025.07.015

繁殖养殖分离模式和繁殖养殖一体模式下春季稻虾种养系统细菌群落特征

覃宝利, 韩光明, 吴雷明, 马林杰, 徐荣, 杨婷, 张诚信, 毕建花, 王守红, 朱凌宇, 张家宏, 寇祥明

(江苏里下河地区农业科学研究所, 江苏 扬州 225007)

摘要: 为了明确繁殖养殖一体模式和繁殖养殖分离模式下春季克氏原螯虾养殖系统细菌群落变化及其影响因素, 本研究利用 *16S rRNA* 基因测序对成熟期克氏原螯虾养殖系统水体、底泥和虾肠道细菌群落组成和多样性进行分析, 阐明两种养殖模式下养殖系统细菌群落特征及其与水质因子关系的差异。结果表明: 繁殖养殖一体模式水体为中度富营养化水平, 繁殖养殖分离模式水体为中营养水平。水体、底泥和虾肠道细菌群落多样性两种模式间无显著差异, 群落组成有显著差异。与繁殖养殖一体模式相比, 繁殖养殖分离模式显著提高了水体变形菌门细菌和底泥放线菌门细菌的相对丰度, 降低了水体蓝细菌门细菌和放线菌门细菌的相对丰度, 减少了肠道中潜在致病菌鲁氏不动杆菌的相对丰度, 降低了克氏原螯虾肠道遭受致病菌感染的风险。总氮(TN)含量、磷酸盐($PO_4^{3-}-P$)含量、叶绿素 a 含量和高锰酸盐指数(COD_{Mn})是繁殖养殖一体模式水体、肠道菌群组成的主要影响因子; 透明度、水温和水体溶解氧(DO)含量是繁殖养殖分离模式水体、肠道菌群组成的主要影响因子。本研究结果为克氏原螯虾养殖水质调控、疾病预防和稻虾种养绿色可持续发展提供了理论支撑。

关键词: 克氏原螯虾; 养殖模式; 细菌群落; 水质因子

中图分类号: S966.12 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2025)07-1388-10

Characteristics of bacterial communities in crayfish farming systems under the separation and integration of breeding and rearing modes

QIN Baoli, HAN Guangming, WU Leiming, MA Linjie, XU Rong, YANG Ting, ZHANG Chengxin, BI Jianhua, WANG Shouhong, ZHU Lingyu, ZHANG Jiahong, KOU Xiangming

(Institute of Agricultural Sciences of the Lixiahe District in Jiangsu Province, Yangzhou 225007, China)

Abstract: To clarify the changes in bacterial communities and their influencing factors in the spring rice-crayfish co-culture system (RCCS) under integrated and isolated breeding modes, *16S rRNA* gene sequencing was used to investigate the composition and diversity of bacterial communities in the pond water, sediment and gut of crayfish at mature stage. The bacterial community characteristics and their relationships with water quality factors were compared and studied under the separation and integration of breeding and rearing modes. The results showed that the water under the integrated mode reached a moderately eutrophic level, while the water under the separated mode main-

收稿日期: 2024-11-02

基金项目: 江苏省科技计划项目(BN2023054); 江苏现代农业(克氏原螯虾)产业技术体系项目[JATS(2023)241]; 扬州市科技计划项目(YZ2023046, YZ2023244); 江苏里下河地区农科所克氏原螯虾综合种养关键技术创新与应用项目[SJ(22)205]

作者简介: 覃宝利(1986-), 女, 河南鹤壁人, 硕士, 助理研究员, 主要从事稻渔综合种养技术研究。(E-mail) 20141602@jaas.ac.cn

通讯作者: 寇祥明, (E-mail) kouxiangming@163.com

ly reached a moderately eutrophic level, while the water under the separated mode main-

tained a mesotrophic state. Bacterial community diversity in water, sediment and crayfish gut samples showed no significant differences between the two modes, but community composition exhibited significant divergence. Compared to the integrated mode, the separated mode significantly increased the relative abundance of Proteobacteria in water and Actinobacteria in sediment and decreased the relative abundance of Cyanobacteria and Actinobacteria in water, reduced the relative abundance of potential pathogen *Acinetobacter lwoffii* in crayfish gut, and lowered the risk of pathogenic bacterial infection in crayfish gut. In the integrated breeding-cultivation mode, total nitrogen (TN) content, orthophosphate ($\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$) content, chlorophyll a content, and permanganate index (COD_{Mn}) were identified as the primary factors influencing bacterial community composition in both water and crayfish gut microbiota. In the separated breeding-cultivation mode, water transparency, temperature, and dissolved oxygen (DO) content were identified as the primary factors influencing bacterial community composition in aquatic environments and intestinal microbiota. This study provides a theoretical foundation for optimizing water quality management, preventing diseases, and advancing green sustainable development in rice-crayfish co-culture systems.

Key words: *Procambarus clarkii*; cultivation modes; bacterial community; water quality factor

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)是一种淡水甲壳类动物,原产于北美洲,1930年左右引入中国^[1]。由于其环境适应性强,营养美味,商业价值高,在中国被广泛养殖^[2],养殖模式大致包括稻虾种养、池塘养殖和藕田套养等,其中以稻虾种养为主^[3]。与传统的池塘养殖相比,稻虾种养系统利用低洼稻田冬季浅水环境和生产闲置期,提高了稻田的利用率和生产力,实现了生产效益最大化^[4]。2022年,中国克氏原螯虾产业综合产值约 4.5×10^{11} 元,养殖面积和产量再创新高,其中稻虾综合种养面积突破 1.53×10^6 hm²,克氏原螯虾年产量达 2.4×10^6 t,年产量同比增长9.09%,占克氏原螯虾养殖总产量的83.00%^[3]。随着稻虾种养规模的扩大,克氏原螯虾疾病频繁发生,特别是由病毒和细菌引起的疾病死亡率呈上升趋势^[5-7],严重威胁克氏原螯虾产业的可持续发展。

不能准确评估存塘虾量是目前克氏原螯虾养殖存在的一个主要难题。通常每只成熟雌虾抱卵200~300粒。不同于其他甲壳动物,克氏原螯虾为了避寒和保证繁殖产卵过程顺利完成,喜欢在洞穴中完成繁殖孵化过程,这是来年存塘虾量无法估计的主要原因。目前,克氏原螯虾养殖主要以传统的繁殖养殖一体(繁殖养殖同塘)为主,少部分养殖户尝试了繁殖养殖分离。繁殖养殖一体容易导致养殖密度不确定,进而引起高密度养殖、环境恶化等问题。而繁殖养殖分离是在单独水塘育苗,专养区域养虾,实现了养殖密度可控,有效提高了成虾的规格和质量,大幅度降低了饲料等投入品的使用^[8]。

近年来,越来越多的研究发现,微生物在水产养

殖池塘中发挥至关重要的作用,包括改善水质、维持虾体健康、促进生态平衡等,尤其是水生生物肠道微生物群落与宿主的发育、营养状况、免疫反应和抗病能力密切相关^[9-10]。由于微生物对环境条件的变化特别敏感,不同养殖密度、水草种植和饲料投喂量等均会引发池塘生态系统微生物群落结构发生强烈变化^[11-13]。研究表明,虾从饲料中吸收24%~37%的氮和11%~20%的磷^[14-15]。此外,15%的氮损失发生在饲料颗粒浸入池塘水后的前2 h^[16]。这些未使用的营养物质将导致水体和池塘沉积物pH值和溶解氧的变化、富营养化、细菌增殖以及颗粒有机物的增加^[17-18]。而水体水质指标变化会显著改变水体菌群结构,进而影响水生动物肠道菌群健康^[19],还可能导致水生动物发病。

本研究利用16S rDNA基因高通量测序技术,对繁殖养殖分离和繁殖养殖一体两种养殖模式下克氏原螯虾肠道和环境细菌群落结构特征和多样性及其与养殖水质环境因子之间的关系进行研究,旨在为更加全面认识两种模式下克氏原螯虾养殖系统细菌群落分布特征及关键环境影响因子,以期为稻虾综合种养健康发展提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 试验地点

采样点位于扬州市邗江区公道镇河东村和扬州市广陵区李典镇伏固村的稻虾种养基地,靠近邵伯湖和夹江,均为长江水系,土壤类型均为水稻土,周边均为农田,无工业污染和大型遮挡物,不会对试验结果造成影响。每个基地各选取面积相近的3块稻

田进行采样。于 2022 年 6 月 8 日(克氏原螯虾养殖成熟期)分别采集稻虾种养稻田养殖水体、底泥及虾肠道样品进行微生物组成、多样性及水质指标检测分析。供试克氏原螯虾饲料由江苏富裕达粮食制品股份有限公司生产,饲料中蛋白质含量为 32%。繁殖养殖分离模式(SM)下养殖区伊乐藻种植面积占 30%~40%,克氏原螯虾放养密度为 $1 \text{ hm}^2 \cdot 6.0 \times 10^4$ 尾,饲料投喂量为 $15.0 \sim 37.5 \text{ kg}/(\text{hm}^2 \cdot \text{d})$,成熟期克氏原螯虾体重在 $44.39 \text{ g} \pm 10.11 \text{ g}$ 。繁殖养殖一体模式(CM)区伊乐藻种植面积占 30%~40%,养殖密度为 $1 \text{ hm}^2 \cdot 1.2 \times 10^5 \sim 1.5 \times 10^5$ 尾,饲料投喂量为 $37.5 \sim 75.0 \text{ kg}/(\text{hm}^2 \cdot \text{d})$,成熟期克氏原螯虾体重在 $27.61 \text{ g} \pm 6.62 \text{ g}$ 。

1.2 采样方法

2022 年 6 月 8 日上午 8:00~10:00,现场用哈希水质分析仪(美国哈希公司产品)测定水体溶解氧(DO)含量、水温(T_{em})、透明度(SD)和 pH。使用有机玻璃采水器在稻田环沟和田间采用五点法各采集 5 L 水样(水深 0~50 cm),混合均匀后取 500 mL 水样,按照 Tang 等^[20]方法检测水体总氮(TN)含量、总磷(TP)含量、氨态氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$)含量、亚硝酸盐氮($\text{NO}_2^-\text{-N}$)含量、硝酸盐氮($\text{NO}_3^-\text{-N}$)含量、磷酸盐($\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$)含量、叶绿素 a 含量以及高锰酸盐指数(COD_{Mn})等水质指标。利用循环水式真空泵抽滤收集水体细菌,滤膜材质为混合纤维素(孔径为 $0.2 \mu\text{m}$,直径 50 mm),抽滤的体积为 250 mL,滤膜放入 15 mL 无菌离心管后, $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。用彼得森采泥器(武汉轩明宇环保科技发展有限公司产品)在池塘环沟和田间按照五点法采集 0~10 cm 深处的沉积物样品,等量混合均匀后取约 500 g 置于无菌密封样品袋中, $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。在塘口及环沟中用地笼捕捉克氏原螯虾,随机选取 30 尾作为样品带回实验室进行肠道菌群分析。无菌环境下每个塘口随机选取 10 尾健康克氏原螯虾,用 75% 乙醇消毒体表,提取全肠混合后置于 2 mL 无菌离心管中, $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

1.3 样品细菌 DNA 提取及测序方法

样品处理完成后,用装有干冰的保温盒寄送至上海派森诺生物科技股份有限公司进行 *16S rRNA* 基因测序。水体细菌样本采用 CTAB 方法提取 DNA。土壤细菌样本($0.2 \sim 0.5 \text{ g}$)和肠道细菌样本采用 OMEGA Soil DNA Kit 试剂盒(美国欧米茄生

物技术公司产品)提取 DNA。用 2% 琼脂糖凝胶电泳(北京六一生物科技有限公司产品)检测 DNA 的纯度。采用 Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA 定量检测试剂盒(美国英杰生命技术公司产品)对 PCR 产物在 Microplate reader 酶标仪(美国伯腾仪器有限公司产品)上进行定量,再利用 TruSeq® Nano DNA LT 文库制备试剂盒(美国因美纳公司产品)进行建库。然后采用 Illumina 平台进行双端测序,测序区:16S_V3V4,测序上游引物名称:338F,上游引物序列:5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3';下游引物名称:806R,下游引物序列:5'-GGACTACHVGGGT-WTCTAAT-3'。本研究获得的序列已上传到 NCBI SRA 数据库,登录号为 PRJNA1035625 和 PRJNA1119694。

1.4 数据分析

使用 QIIME2 (2019.4) 软件分析细菌群落生物学组成信息,R 软件和 QIIME 2 软件计算分析细菌群落多样性指数。采用单因素方差分析法检验池塘水体理化性质参数及不同样品细菌群落组成和多样性指数的差异。

2 结果与分析

2.1 不同养殖模式下克氏原螯虾养殖池塘水质指标

水质调查结果显示,本研究两种养殖模式下溶解氧含量($8.36 \sim 13.90 \text{ mg/L}$)、pH ($8.82 \sim 9.04$)、亚硝酸盐氮含量($0.0021 \sim 0.0028 \text{ mg/L}$)和氨态氮含量($0.47 \sim 0.62 \text{ mg/L}$)均在克氏原螯虾可以生存的范围。SM 模式水温和水体透明度显著高于 CM 模式($P < 0.05$),总氮含量、总磷含量、磷酸盐含量、叶绿素 a 含量和高锰酸盐指数显著低于 CM 模式($P < 0.05$),其他指标两种模式间无显著差异($P > 0.05$)(表 1)。采用综合营养状态指数法(TLI)^[21],以 TN 含量、TP 含量、叶绿素 a 含量、透明度和高锰酸盐指数 5 个指标综合评价养殖水体富营养化程度。计算得出,CM 模式水体综合营养指数为 61.70,属于中度富营养化,SM 模式水体综合营养指数为 35.60,属于中营养水平。

2.2 不同养殖模式下克氏原螯虾养殖系统细菌群落多样性和组成

从表 2 可见,克氏原螯虾养殖池塘底泥、水体、虾肠道细菌群落 α -多样性指数两种养殖模式间均无显著性差异($P > 0.05$)。

表 1 不同养殖模式下养殖池塘水质指标

Table 1 Pond water quality indexes under different cultivation modes

水质指标	繁殖养殖分离模式 (SM)	繁殖养殖一体模式 (CM)
温度(℃)	26.93±1.11a	24.30±0.01b
溶解氧含量(mg/L)	13.90±0.37a	8.36±3.87a
pH	9.04±0.36a	8.82±0.40a
总氮含量(mg/L)	2.65±0.53b	4.95±0.48a
总磷含量(mg/L)	0.04±0.01b	0.29±0.06a
硝酸盐氮含量(mg/L)	0.17±0.07a	0.18±0.07a
亚硝酸盐氮含量(mg/L)	0.002 8±0.000 5a	0.002 1±0.002 2a
氨态氮含量(mg/L)	0.47±0.21a	0.62±0.14a
磷酸盐含量(mg/L)	0.02±0b	0.13±0.04a
高锰酸盐指数(mg/L)	10.96±3.38b	32.79±9.04a
叶绿素 a 含量(μg/L)	6.66±1.94b	189.84±43.30a
透明度(cm)	65.00±5.00a	27.33±2.52b

同一行不同小写字母表示两种养殖模式间差异显著($P<0.05$);表中数据为平均值±标准差。

表 2 不同养殖模式下池塘底泥、水体和肠道细菌群落 α -多样性指数Table 2 The α -diversity indices of bacterial communities in pond sediment, water and crayfish gut under different cultivation modes

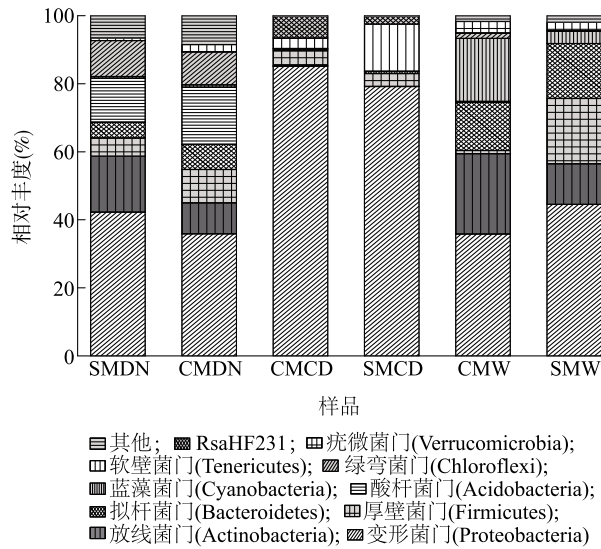
多样性指数	样品	繁殖养殖一体模式 (CM)	繁殖养殖分离模式 (SM)
Chao1 指数	底泥细菌群落	4 420.400 0±404.660 0a	3 563.440 0±1 679.510 0a
	水体细菌群落	2 195.970 0±1 064.080 0a	1 008.340 0±213.860 0a
	肠道细菌群落	438.330 0±266.790 0a	296.730 0±106.400 0a
Observed_species 指数	底泥细菌群落	4 131.200 0±293.040 0a	3 347.930 0±1 514.710 0a
	水体细菌群落	2 110.570 0±1 023.620 0a	969.030 0±193.050 0a
	肠道细菌群落	399.330 0±244.750 0a	269.170 0±91.840 0a
Shannon 指数	底泥细菌群落	10.510 0±0.240 0a	10.240 0±0.430 0a
	水体细菌群落	8.520 0±8.520 0a	6.540 0±0.600 0a
	肠道细菌群落	3.920 0±0.290 0a	3.650 0±0.430 0a
Simpson 指数	底泥细菌群落	0.996 0±0.001 8a	0.996 5±0.001 0a
	水体细菌群落	0.843 6±0.008 1a	0.840 0±0.039 5a
	肠道细菌群落	0.989 9±0.003 0a	0.950 4±0.035 2a

同一行不同小写字母表示两种养殖模式间差异显著($P<0.05$);表中数据为平均值±标准差。

在属水平上,对不同养殖模式(SM 模式和 CM 模式)样品中相对丰度前 10 的优势菌群分析作图(图 2)。结果显示,SM 模式和 CM 模式池塘底泥细菌群落中以 Subgroup_6 细菌为主;肠道细菌群落中以气单胞菌属(*Aeromonas*)细菌、不动杆菌属(*Acinetobacter*)细菌、*Candidatus* _ *Bacilloplasma* 细菌和 *RsaHF231* 细菌为主;水体细菌群落中以不动杆菌属细菌、微小杆菌属(*Exiguobacterium*)细菌、*hgcl*_clade

在门水平上,对不同养殖模式(SM 模式和 CM 模式)样品中相对丰度前 10 的优势菌群分析作图(图 1)。结果显示,SM 模式和 CM 模式池塘底泥细菌群落中均以变形菌门(Proteobacteria)细菌、厚壁菌门(Firmicutes)细菌、放线菌门(Actinobacteria)细菌、拟杆菌门(Bacteroidetes)细菌、酸杆菌门(Acidobacteria)细菌和绿弯菌门(Chloroflexi)细菌为主;肠道细菌群落中以变形菌门细菌、软壁菌门(Tenericutes)细菌和厚壁菌门细菌为主。以上主要细菌门相对丰度在 SM 模式和 CM 模式之间均无显著差异($P>0.05$),但 SM 模式底泥细菌群落中放线菌门细菌相对丰度比 CM 模式底泥细菌群落中放线菌门细菌相对丰度高 81.06%。SM 模式和 CM 模式水体细菌群落中以变形菌门细菌、放线菌门细菌、拟杆菌门细菌、蓝藻菌门(Cyanobacteria)细菌和厚壁菌门细菌为主,其中 SM 模式水体细菌群落中变形菌门细菌、厚壁菌门细菌相对丰度显著高于 CM 模式,放线菌门细菌和蓝藻菌门细菌相对丰度显著低于 CM 模式($P<0.05$)。

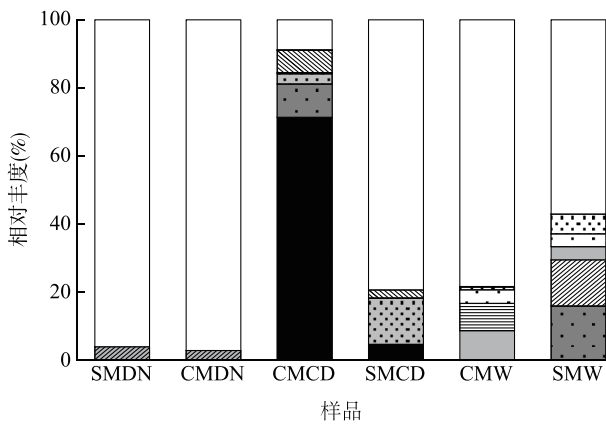
细菌、*Planktothrix*_NIVA-CYA_15 细菌、多核杆菌属(*Polynucleobacter*)细菌和 *Limnohabitans* 细菌为主。其中,SM 模式肠道细菌群落中气单胞菌属细菌相对丰度显著低于 CM 模式($P<0.05$),SM 模式水体细菌群落中 *hgcl*_clade 细菌和 *Planktothrix*_NIVA-CYA_15 细菌相对丰度显著低于 CM 模式($P<0.05$),不动杆菌属细菌和微小杆菌属细菌相对丰度在 SM 模式和 CM 模式水体之间无显著差异($P>0.05$)。



SMDN: 繁殖养殖分离模式底泥细菌群落; CMDN: 繁殖养殖一体模式底泥细菌群落; CMCD: 繁殖养殖一体模式肠道细菌群落; SMCD: 繁殖养殖分离模式肠道细菌群落; CMW: 繁殖养殖一体模式水体细菌群落; SMW: 繁殖养殖分离模式水体细菌群落。

图 1 不同养殖模式在门水平上的细菌群落组成

Fig.1 The composition of bacterial communities under different cultivation modes at phylum level



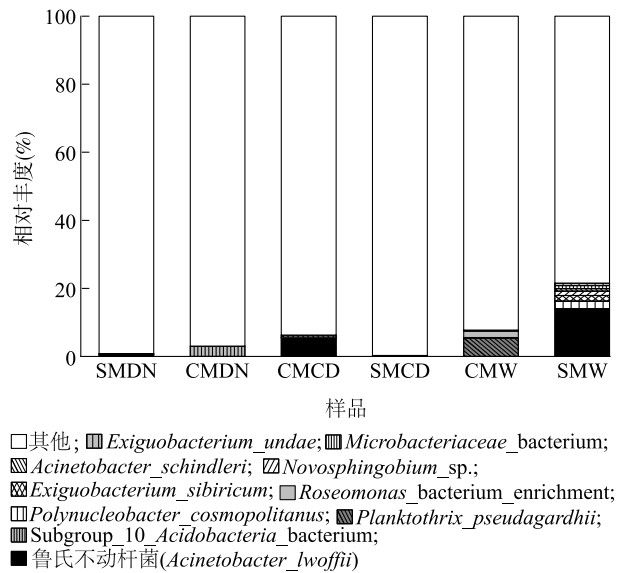
SMDN、CMDN、CMCD、SMCD、CMW、SMW 见图 1 注。

图 2 不同养殖模式在属水平上的细菌群落组成

Fig.2 The composition of bacterial communities under different cultivation modes at genus level

在种水平上,对不同养殖模式(SM 模式和 CM 模式)样品中相对丰度前 10 的优势菌种分析作图(图

3)。结果显示,SM 模式和 CM 模式池塘底泥细菌群落中以 Subgroup_10_Acidobacteria_bacterium 为主;肠道细菌群落中以鲁氏不动杆菌(*Acinetobacter_lwoffii*) 为主;水体细菌群落中以鲁氏不动杆菌、*Planktothrix_pseudagardhii*、*Polynucleobacter_cosmopolitanus*、*Roseomonas_bacterium_enrichment*、*Exiguobacterium_sibiricum* 和 *Novosphingobium_sp.* 为主。SM 模式克氏原螯虾肠道细菌群落中鲁氏不动杆菌的相对丰度明显低于 CM 模式;水体细菌群落中除 *Planktothrix_pseudagardhii* 相对丰度显著降低于 CM 模式 ($P < 0.05$) 之外,其他主要菌种相对丰度两种模式间均差异不显著 ($P > 0.05$)。值得注意的是,与 CM 模式相比,SM 模式水体细菌群落中鲁氏不动杆菌相对丰度明显更高。

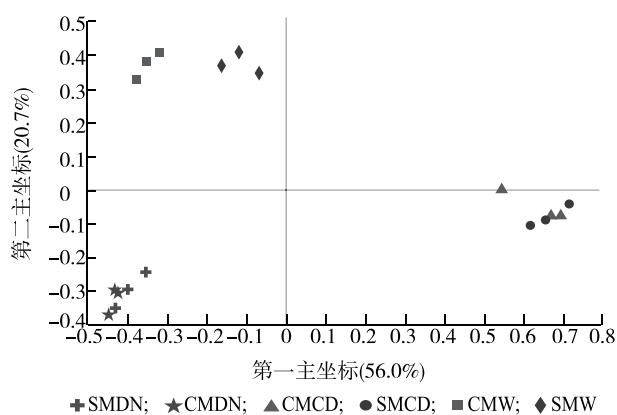


SMDN、CMDN、CMCD、SMCD、CMW、SMW 见图 1 注。

图 3 不同养殖模式在种水平上细菌群落的组成

Fig.3 The composition of bacterial communities under different cultivation modes at species level

在 OTU 水平上,采用主坐标 (PCoA) 分析对加权 UniFrac 距离度量矩阵进行加权,检验不同样品中细菌群落距离关系(图 4)。结果显示,第一主坐标和第二主坐标对样品差异的贡献率分别为 56.0% 和 20.7%。说明底泥细菌群落和水体细菌群落距离更近,这两类样品细菌群落组成结构相似度更高,而克氏原螯虾肠道细菌群落与水体和底泥细菌群落组成差异较大。不同模式下水体细菌群落相对分散,底泥和肠道细菌群落更聚集。



SMDN, CMDN, CMCD, SMCD, CMW, SMW 见图1注。

图4 不同养殖模式细菌群落的PCoA分析结果

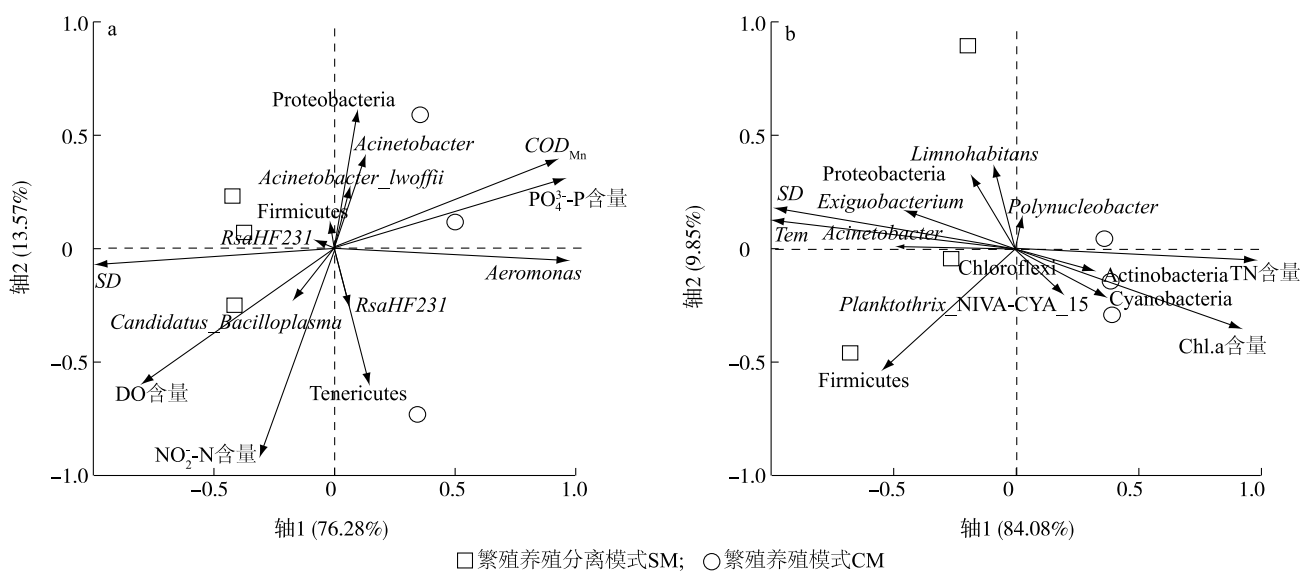
Fig.4 PCoA analysis of bacterial communities under different cultivation modes

2.3 不同养殖方式下克氏原螯虾养殖系统细菌群落的驱动因子

将两种养殖模式下克氏原螯虾肠道细菌群落和养殖水体细菌群落与环境因子进行冗余分析(图5)。从图5a可知,影响克氏原螯虾肠道细菌群落的主要环境因子为DO含量、NO₂⁻-N含量、PO₄³⁻-P含

量、COD_{Mn}和SD,它们对群落物种分布的影响均具有显著性($P < 0.05$),其中DO含量影响最显著($R^2 = 0.963\ 0, P = 0.005\ 6$),这5个环境因子对肠道优势菌群分布的累计解释率为89.85%。繁殖养殖一体模式下肠道细菌群落主要落在第一、第四象限,表明繁殖养殖一体模式下肠道细菌群落组成主要与COD_{Mn}和PO₄³⁻-P含量显著正相关;繁殖养殖分离模式下肠道细菌群落主要落在第二、第三象限,表明繁殖养殖分离模式肠道细菌群落组成主要与SD、NO₂⁻-N含量和DO含量显著正相关。

影响养殖水体细菌群落的环境因子主要有Tem、SD、TN含量、叶绿素a含量(图5b),其中Tem、SD、TN含量和叶绿素a含量的影响具有显著性($P < 0.05$),Tem的影响最显著($R^2 = 0.954\ 9, P = 0.018\ 1$)。这4个主要环境因子对优势菌群分布的累计解释率为93.93%。繁殖养殖一体模式下水体细菌群落主要落在第一、第四象限,表明繁殖养殖一体模式下水体细菌群落组成主要与TN含量和叶绿素a含量显著正相关;繁殖养殖分离模式下水体细菌群落主要落在第二、第三象限,表明繁殖养殖分离模式下水体细菌群落组成主要与SD和Tem显著正相关。



a: 肠道细菌群落与水质因子的冗余分析; b: 水体细菌群落与水质因子的冗余分析。Proteobacteria: 变形菌门; Acinetobacter: 不动杆菌属; Acinetobacter_lwoffii: 鲁氏不动杆菌; Firmicutes: 厚壁菌门; RsaHF231: 一种特定菌属; Candidatus_Bacilloplasma: 暂定为芽孢杆菌属; Aeromonas: 气单胞菌属; Tenericutes: 柔膜菌门; COD_{Mn}: 高锰酸盐指数; PO₄³⁻-P: 磷酸盐; Limnohabitans: 湖居菌属; Exiguobacterium: 微小杆菌属; Polynucleobacter: 多核杆菌属; Chloroflexi: 绿弯菌门; Actinobacteria: 放线菌门; Planktothrix_NIVA-CYA_15: 浮丝藻属 NIVA-CYA_15 菌株; Cyanobacteria: 蓝细菌门。SD: 透明度; DO: 溶解氧; NO₂⁻-N: 亚硝酸盐氮; Tem: 水温; TN: 总氮; Chl.a: 叶绿素 a。

图5 不同养殖模式下细菌群落与水质因子的冗余分析结果

Fig.5 Redundancy analysis of bacterial communities and water quality factors under different cultivation modes

3 讨论

3.1 不同养殖模式下稻虾种养系统细菌群落的差异

不同克氏原螯虾养殖模式影响养殖密度、饲料投入和水草生长等养殖过程。这些过程不同必然会影响养殖系统细菌群落组成和多样性^[11-12]。本研究调查了不同养殖模式下克氏原螯虾肠道、池塘水体和底泥 3 种生境的细菌群落组成和多样性,发现不同养殖模式下水体、底泥和克氏原螯虾肠道细菌群落多样性无显著差异,底泥和肠道优势细菌门组成大体相同,水体细菌群落组成有明显差异,PCoA 分析也印证了这一点。

前人研究发现,在水产养殖池塘底泥、稻田土壤和环沟底泥中变形菌门、拟杆菌门、厚壁菌门、绿弯菌门和酸杆菌门是普遍存在的优势菌群^[22-24],并且底泥含有丰富的营养元素,细菌菌群结构复杂且较稳定,底泥细菌丰富度受多种因素的制约^[25-26]。本研究繁殖养殖一体和繁殖养殖分离模式下底泥样品中主要优势菌群组成没有显著差异,说明不同养殖模式对底泥常见优势菌群的分布影响较小,但是繁殖养殖分离模式底泥中放线菌门相对丰度比繁殖养殖一体模式高出 81.06%。据报道,放线菌门细菌能分解许多有机物和无机物,对物质循环和能量流动至关重要,是维持池塘生态系统稳定的关键菌群^[25]。因此,推测繁殖养殖分离模式更有利于底泥中放线菌的增殖。

在大多数淡水生态系统中变形菌门细菌已被确定为优势菌群^[26]。这类菌群广泛存在于水生无脊椎动物的肠道中,是许多甲壳类动物肠道菌群的主要组成部分,在生理、形态和遗传学上都表现出高度的多样性。本研究两种养殖模式下克氏原螯虾肠道细菌群落中第一优势细菌门和优势细菌纲均为变形菌门和 γ -变形菌纲,相对丰度均无显著差异,但在属水平上,两种养殖模式下克氏原螯虾肠道细菌群落分类差别较大。如繁殖养殖分离模式下 γ -变形菌纲中沙雷氏菌属(*Serratia*)占比为 92.00%,繁殖养殖一体模式下 γ -变形菌纲中气单胞菌属占比为 84.00%。有研究者曾在克氏原螯虾肠道菌群中检测到一定量的沙雷氏菌属细菌(相对丰度 9.87%~20.86%)^[27]。这类菌群属于好氧或兼性厌氧发酵型革兰氏阴性杆菌,存在于自然环境(土壤、水和植物表面),其中有些菌株为机会性的人类病原体^[28]。

但本研究中沙雷氏菌属包含的种均未被鉴定到,即未发现致病菌。气单胞菌属是本研究繁殖养殖一体模式下肠道菌群的第一优势属,为水产养殖常见致病菌。分析发现,气单胞菌属中未被鉴定到的种占 99.7%,剩下的 0.3%为 *Aeromonas popoffii*,该细菌种也不在目前鉴定到的临床致病菌范围内^[29]。由于水生动物肠道菌群组成取决于宿主生理条件、健康状况和环境因素^[9]。同时,变形菌门在甲壳类动物肠道中的功能目前尚不清楚^[30]。因此,上述肠道细菌组成差异的原因需深入探究。

本研究两种养殖方式下水体主要优势菌门分布有一定差异。如繁殖养殖分离模式养殖水体变形菌门相对丰度显著高于繁殖养殖一体模式,相反,放线菌门和蓝藻菌门相对丰度低于繁殖养殖一体模式。变形菌门细菌包含硝化细菌、反硝化细菌及硫还原细菌在内,对碳、氮、磷循环至关重要^[31]。繁殖养殖分离模式下池塘水体变形菌门中 γ -变形菌纲占比高于繁殖养殖一体模式。 γ -变形菌纲中包含一些反硝化细菌,被认为是反硝化菌群之一^[32]。溶解氧能显著促进含氮功能菌的繁殖,促进水中氮的循环^[12]。水温升高能促进电厂附近海水中 γ -变形菌纲部分细菌丰度增加^[33]。本研究繁殖养殖分离模式水温显著高于繁殖养殖一体模式,溶解氧含量是繁殖养殖一体模式的 1.66 倍。因此,水温和溶解氧含量较高可能是繁殖养殖分离模式水体变形菌门相对丰度较高的原因之一。Chao 等^[34]研究发现,沉水植物重建后,变形菌群在浅层富营养化湖泊细菌群落中占比较高,而放线菌在裸区占比较高。Van Der Gucht 等^[35]研究发现放线菌和蓝藻菌是富营养化池塘水体中的优势菌群。本研究中繁殖养殖分离模式水体处于中营养水平,其水草面积始终维持在养殖水域的 30%~40%,而繁殖养殖一体模式水体处于中度富营养化状态,从养殖初期到成熟期其水草分布逐渐减少,尤其是在成熟期水草面积几乎接近 0。因此,缺少沉水植被可能也是繁殖养殖一体模式水体变形菌门相对丰度较低的一个原因,其水体蓝藻菌门和放线菌门高于繁殖养殖分离模式可能与水体富营养化有关。

鲁氏不动杆菌是重要的人类病原体,可以引起菌血症、肺炎、败血症和其他传染病^[36]。据报道,该菌是杂交鲟和裂胸属鱼类的病原体^[36-37]。本研究中鲁氏不动杆菌在繁殖养殖一体模式肠道菌群中相

对丰度比繁殖养殖分离模式高很多,说明繁殖养殖一体模式克氏原螯虾感染鲁氏不动杆菌的风险高于繁殖养殖分离模式。有学者指出,过度拥挤、饲料变化和水质变化可能是水产养殖动物易感染鲁氏不动杆菌的因素^[38]。由此推测,养殖密度高和水质富营养化可能是本研究繁殖养殖一体模式克氏原螯虾肠道鲁氏不动杆菌丰度较高的原因。另外,繁殖养殖分离模式水体细菌群落中鲁氏不动杆菌的相对丰度为 14.04%,繁殖养殖一体模式为 0。分析原因可能是繁殖养殖一体水体呈富营养化状态,其水体 *Planktothrix_pseudagardhii* 和 *hgcl_clade* 细菌占优势,导致鲁氏不动杆菌处于劣势地位而未被检测到。据报道,不动杆菌常见于河流、湖泊和水库等地表水中^[34,38]。水产养殖池塘中也有发现,如王树茂等^[39]发现,鲁氏不动杆菌存在于罗氏沼虾养殖水体,但在虾肠道中并未检测到。由此推测,本研究繁殖养殖一体模式克氏原螯虾肠道鲁氏不动杆菌的出现可能是由养殖水体传染所致,并且养殖密度过高、水质富营养化等环境压力可能会促进鲁氏不动杆菌丰度在养殖动物肠道中增加,进而导致患病风险提高。

3.2 水质因子对不同养殖模式下稻虾种养系统细菌群落结构的影响

水体细菌群落的多样性和丰度可能受到水温、pH、DO 含量、TN 含量和 TP 含量等多种环境因素的影响^[40-42]。在水产养殖中,池塘水体微生物群落与水质变化紧密相关^[41],如氨态氮含量和总氮含量是影响对虾养殖水体细菌群落结构的最大因子^[43]。Fan 等^[24]研究发现叶绿素 a 含量和 COD_{Mn} 与养殖高峰期养殖水体中近半数主要细菌门丰度的变化显著相关。本研究两种养殖模式水体细菌群落的主要影响因素是水温、透明度、TN 含量、叶绿素 a 含量,与上述报道不完全一致,可能与养殖品种和养殖方式不同有关。其中,繁殖养殖一体模式水体细菌群落组成与 TN 含量和叶绿素 a 含量显著正相关,繁殖养殖分离模式水体细菌群落组成与透明度和温度显著正相关。饲料通常是水产养殖中氮、磷输入的主要来源^[43]。繁殖养殖一体模式由于养殖密度过高,养殖户为了追求产量,往往会过量投入饲料,进而导致池塘水体氮、磷含量超标。氮、磷营养的增加能促进养殖水体浮游细菌丰度的增加^[44-45]。叶绿素 a 是衡量浮游植物生物量的关键指标^[46],浮游植物细胞释放有机物促进水体细菌生长,水体细菌分解有机

碳释放无机碳源,促进浮游植物生长^[47]。繁殖养殖一体模式水体氮、磷营养丰富、藻类大量繁殖,因此, TN 含量和叶绿素 a 含量的变化主导繁殖养殖一体模式水体细菌群落结构,而繁殖养殖分离模式水体不存在富营养化现象,水质较好,氮、磷营养不再是主导因素。

水质因子不仅影响养殖水体菌群结构,也会影响水产动物肠道的菌群结构。目前有关水质因子对虾类肠道细菌群落影响的研究较少,仅见董学兴等^[48]对罗氏沼虾肠道菌群的研究,结果发现 TP 含量对罗氏沼虾肠道菌群具有显著影响;Huang 等^[49]指出,无环沟养殖模式下水深和 DO 含量是决定克氏原螯虾肠道微生物群落分布的主要水质因子。本研究发现繁殖养殖一体模式下克氏原螯虾肠道细菌群落组成主要与 COD_{Mn} 和 PO_4^{3-} -P 含量显著正相关。 COD_{Mn} 是反映水体受污染程度的常用指标,过量的活性磷酸盐 (PO_4^{3-} -P 含量超过 0.2 mg/L) 进入水体中易造成水体富营养化^[50-51],这与繁殖养殖一体模式水体富营养化的结果相符。 COD_{Mn} 、 PO_4^{3-} -P 含量与水体氮、磷含量有关,与饲料输入有关^[43,52]。因此,繁殖养殖一体模式主要是通过饲料输入导致水体 COD_{Mn} 和 PO_4^{3-} -P 含量超标进而影响克氏原螯虾肠道微生物群落结构。繁殖养殖分离模式下克氏原螯虾肠道细菌群落组成主要与 SD 和 DO 含量显著正相关,说明繁殖养殖分离模式主要是通过水体透明度和溶解氧含量影响克氏原螯虾肠道微生物群落结构。透明度是反映水体中浮游微藻密度和有机物含量的重要指标,透明度高,说明水体中浮游藻类密度和有机物含量低。水体含氧量高能够改善水质,降低水体有害物质的浓度,促进养殖动物的新陈代谢,加快生长速度。因此,对比两种模式下克氏原螯虾肠道菌群与水质因子的关系可知,繁殖养殖分离模式优于繁殖养殖一体模式。

4 结论

本研究通过基因测序对成熟期克氏原螯虾不同养殖模式下养殖系统水体、底泥和虾肠道细菌群落组成和多样性进行分析,结果表明,繁殖养殖分离和繁殖养殖一体两种模式下克氏原螯虾养殖水体水质有较大差异,繁殖养殖一体模式易造成水体富营养化,进而导致克氏原螯虾肠道潜在致病菌丰度增加,疾病风险增加,危害克氏原螯虾养殖业健康发展,而

繁殖养殖分离模式水质健康,成虾规格大。因此,在生产中应倡导采用繁殖养殖分离模式,推动克氏原螯虾产业绿色可持续发展。

参考文献:

- [1] MANFRIN C, TOM M, DE MORO G, et al. The eyestalk transcriptome of red swamp crayfish *Procambarus clarkii* [J]. *Gene*, 2015, 557(1):28-34.
- [2] CHU X H, YANG T T, LIU Y, et al. Transcriptome analysis of differential expressed genes in hepatopancreas of *Procambarus clarkii* challenged with peptidoglycan [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 86:311-318.
- [3] 于秀娟,郝向举,杨霖坤,等. 中国小龙虾产业发展报告(2023) [J]. *中国水产*, 2023, 572(7):26-31.
- [4] SI G H, PENG C L, YUAN J F, et al. Changes in soil microbial community composition and organic carbon fractions in an integrated rice-crayfish farming system in subtropical China [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1):2856.
- [5] WU Z B, ZHANG Q Q, ZHANG T L, et al. Association of the microbiota dysbiosis in the hepatopancreas of farmed crayfish (*Procambarus clarkii*) with disease outbreaks [J]. *Aquaculture*, 2021, 536:736492.
- [6] XU L L, YUAN J F, CHEN X X, et al. Screening of intestinal probiotics and the effects of feeding probiotics on the digestive enzyme activity, immune, intestinal flora and WSSV resistance of *Procambarus clarkii* [J]. *Aquaculture*, 2021, 540:736748.
- [7] CHEN H L, WANG Y J, ZHANG J, et al. Intestinal microbiota in white spot syndrome virus infected red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) at different health statuses [J]. *Aquaculture*, 2021, 542:736826.
- [8] 白志毅,冯建彬,崔文涛,等. 繁养分离稻虾种养模式的优势及实践 [J]. *中国水产*, 2020(12):81-83.
- [9] RAJEEV R, ADITHYA K K, KIRAN G S, et al. Healthy microbiome: a key to successful and sustainable shrimp aquaculture [J]. *Reviews in Aquaculture*, 2021, 13(1):238-258.
- [10] SUN F L, WANG Y S, WANG C Z, et al. Insights into the intestinal microbiota of several aquatic organisms and association with the surrounding environment [J]. *Aquaculture*, 2019, 507:196-202.
- [11] ALFIANSAH Y R, HASSENRÜCK C, KUNZMANN A, et al. Bacterial abundance and community composition in pond water from shrimp aquaculture systems with different stocking densities [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9:2457.
- [12] NIE Z J, ZHENG Z W, ZHU H J, et al. Effects of submerged macrophytes (*Elodea nuttallii*) on water quality and microbial communities of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) ponds [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 13:1050699.
- [13] WANG J L, ZHOU W C, HUANG S, et al. Promoting effect and mechanism of residual feed organic matter on the formation of cyanobacterial blooms in aquaculture waters [J]. *Journal of Cleaner Production*, 2023, 417:138068.
- [14] FUNGE-SMITH S J, BRIGGS M R P. Nutrient budgets in intensive shrimp ponds: implications for sustainability [J]. *Aquaculture*, 1998, 164(1/2/3/4):117-133.
- [15] SAHU B C, ADHIKARI S, DEY L. Carbon, nitrogen and phosphorus budget in shrimp (*Penaeus monodon*) culture ponds in eastern India [J]. *Aquaculture International*, 2013, 21(2):453-466.
- [16] SMITH D M, BURFORD M A, TABRETT S J, et al. The effect of feeding frequency on water quality and growth of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. *Aquaculture*, 2002, 207(1/2):125-136.
- [17] AVNIMELECH Y, KOCHVA M, DIAB S. Development of controlled intensive aquaculture systems with a limited water exchange and adjusted carbon to nitrogen ratio [J]. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 1994, 46(3):119-131.
- [18] MARTIN J M, VERAN Y, GUELORGET O, et al. Shrimp rearing: stocking density, growth, impact on sediment, waste output and their relationships studied through the nitrogen budget in rearing ponds [J]. *Aquaculture*, 1998, 164(1/2/3/4):135-149.
- [19] 丁兰,徐胜南,罗金萍,等. 对虾肠道菌群功能、影响因素与应用研究进展 [J]. *海洋渔业*, 2023, 45(2):248-256.
- [20] TANG J Y, DAI Y X, LI Y M, et al. Can application of commercial microbial products improve fish growth and water quality in freshwater polyculture? [J]. *North American Journal of Aquaculture*, 2016, 78(2):154-160.
- [21] 金相灿. 中国湖泊环境 [M]. 北京:海洋出版社,1995.
- [22] JIANG X, MA H, ZHAO Q L, et al. Bacterial communities in paddy soil and ditch sediment under rice-crab co-culture system [J]. *AMB Express*, 2021, 11(1):163.
- [23] HERLAMBANG A, MURWANTOKO M, ISTIQOMAH I. Dynamic change in bacterial communities in the integrated rice-fish farming system in Sleman, Yogyakarta, Indonesia [J]. *Aquaculture Research*, 2021, 52(11):5566-5578.
- [24] FAN L M, BARRY K, HU G D, et al. Characterizing bacterial communities in tilapia pond surface sediment and their responses to pond differences and temporal variations [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2017, 33(1):1.
- [25] 秦伟. 不同放养密度和水草覆盖度下底埋培养基的克氏原螯虾池塘底泥微生物群落特征 [D]. 上海:上海海洋大学, 2015.
- [26] JIANG T T, SUN S N, CHEN Y N, et al. Microbial diversity characteristics and the influence of environmental factors in a large drinking-water source [J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 769:144698.
- [27] 张诗雨,谢梦琪,许荔立,等. 壳寡糖对克氏原螯虾消化酶活性、肠道菌群结构、血清非特异性免疫指标及抗病力的影响 [J]. *动物营养学报*, 2020, 32(12):5864-5874.
- [28] MAHLEN S D. *Serratia* infections: from military experiments to

- current practice[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2011, 24(4): 755-791.
- [29] FERNÁNDEZ-BRAVO A, FIGUERAS M J. An update on the genus *Aeromonas*: taxonomy, epidemiology, and pathogenicity[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(1): 129.
- [30] ZHANG Z T, LIU J L, JIN X X, et al. Developmental, dietary, and geographical impacts on gut microbiota of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) [J]. *Microorganisms*, 2020, 8(9): 1376.
- [31] ZHANG J X, YANG Y Y, ZHAO L, et al. Distribution of sediment bacterial and archaeal communities in plateau freshwater lakes[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(7): 3291-3302.
- [32] UCHIDA Y, MOGI H, HAMAMOTO T, et al. Changes in denitrification potentials and riverbank soil bacterial structures along Shibetsu River, Japan[J]. *Applied and Environmental Soil Science*, 2018, 2018: 2530946.
- [33] 陈梦齐, 刘紫丹, 戴文芳, 等. 象山港电厂温排水增温对浮游细菌群落空间分布的影响[J]. *生态学报*, 2016, 36(20): 6574-6582.
- [34] CHAO C X, WANG L G, LI Y, et al. Response of sediment and water microbial communities to submerged vegetations restoration in a shallow eutrophic lake[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 801: 149701.
- [35] VAN DER GUCHT K, VANDEKERCKHOVE T, VLOEMANS N, et al. Characterization of bacterial communities in four freshwater lakes differing in nutrient load and food web structure[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 53(2): 205-220.
- [36] ZHANG M J, DOU Y Q, XIAO Z D, et al. Identification of an *Acinetobacter lwoffii* strain isolated from diseased hybrid sturgeon (*Acipenser baerii* ♀ × *Acipenser schrenckii* ♂) [J]. *Aquaculture*, 2023, 574: 739649.
- [37] CAO S Q, GENG Y, YU Z H, et al. *Acinetobacter lwoffii*, an emerging pathogen for fish in *Schizothorax* genus in China [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 65(6): 1816-1822.
- [38] LI N, FAN X Y, LI X. Unveiling the characteristics of free-living and particle-associated antibiotic resistance genes associated with bacterial communities along different processes in a full-scale drinking water treatment plant[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2024, 476: 135194.
- [39] 王树茂, 王秀华, 朱娜, 等. 江苏高邮罗氏沼虾池塘养殖可培养微生物组成调查[J]. *中国水产科学*, 2022, 29(6): 890-902.
- [40] ZHANG Q Q, JIAN S L, LI K M, et al. Community structure of bacterioplankton and its relationship with environmental factors in the upper reaches of the Heihe River in Qinghai Plateau[J]. *Environmental Microbiology*, 2021, 23(2): 1210-1221.
- [41] 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[J]. *安全与环境学报*, 2015, 15(1): 280-284.
- [42] CHEN C Z, LI P, LIU L, et al. Exploring the interactions between the gut microbiome and the shifting surrounding aquatic environment in fisheries and aquaculture: a review[J]. *Environmental Research*, 2022, 214: 114202.
- [43] 金渝钦, 陈曦, 孟顺龙, 等. 典型池塘养殖模式的氮磷收支研究进展[J]. *中国农学通报*, 2023, 39(36): 140-147.
- [44] 严瑶仙, 梁柱源, 朱泉剑, 等. 大亚湾南澳海域浮游细菌丰度对营养盐添加的响应[J]. *浙江万里学院学报*, 2014, 27(1): 1-9.
- [45] VAN MOOY B A S, ROCAP G, FREDRICKS H F, et al. Sulfolipids dramatically decrease phosphorus demand by picocyanobacteria in oligotrophic marine environments[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(23): 8607-8612.
- [46] 李安艳, 黄先飞, 田源斌, 等. 贵州草海草-藻型稳态转换过程中叶绿素 a 的变化及其影响因子[J]. *植物生态学报*, 2023, 47(8): 1171-1181.
- [47] PORUBSKY W P, VELASQUEZ L E, JOYE S B. Nutrient-replete benthic microalgae as a source of dissolved organic carbon to coastal waters[J]. *Estuaries and Coasts*, 2008, 31(5): 860-876.
- [48] 董学兴, 吕林兰, 赵卫红, 等. 不同养殖模式下罗氏沼虾肠道菌群结构特征及其与环境因子的关系[J]. *上海海洋大学学报*, 2019, 28(4): 501-510.
- [49] HUANG X L, LI M H, HUANG Y, et al. Microbiome analysis reveals microecological advantages of emerging ditchless rice-crayfish co-culture mode[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 892026.
- [50] 倪琳琳. 红鳍东方鲀工厂化养殖尾水中活性磷酸盐的去除研究[D]. 大连: 大连海洋大学, 2024.
- [51] 国家环境保护总局水和废水监测分析方法编委会. 水和废水监测分析方法[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [52] 杨婉玲, 赖子尼, 刘乾甫, 等. 不同养殖品种池塘化学耗氧量 (COD_{Mn}) 变化趋势及环境影响因素[J]. *广东农业科学*, 2014, 41(8): 161-165.

(责任编辑: 黄克玲)