

学校编码: 10384

密级____

学号: 22420091151155

廈門大學

硕士学位论文

贝类生态综合养殖池塘细菌多样性研究

Study of Bacterial diversity in Integrated Multi-trophic

Aquaculture (IMTA) Systems for Shellfish

马冬艳

指导教师姓名: 朱小明 副教授

专业名称: 海洋生物学

论文提交日期: 2012年6月

论文答辩时间: 2012年6月

2012年6月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ ）课题（组）的研究成果，获得（ ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

| | |
|---|-----------|
| 摘 要..... | I |
| Abstract..... | III |
| 第 1 章 绪论 | 1 |
| 1.1 贝类养殖现状..... | 1 |
| 1.2 养殖生态系统脆弱性的根源..... | 2 |
| 1.2.1 池塘养殖生态环境的特殊性..... | 2 |
| 1.2.2 池塘养殖生态环境中的物质流转..... | 3 |
| 1.2.3 养殖生态环境的污染..... | 3 |
| 1.3 池塘生态综合养殖..... | 4 |
| 1.4 微生物在养殖生态系统中的重要性..... | 5 |
| 1.5 养殖生态环境微生物多样性研究的意义..... | 6 |
| 1.6 微生物多样性研究方法的进展..... | 7 |
| 1.6.1 荧光原位杂交(Fluorescence in situ hybridization, FISH)..... | 7 |
| 1.6.2 宏基因组克隆技术(Metagenomics)..... | 8 |
| 1.6.3 限制酶切片长度多态性法(RFLP)..... | 8 |
| 1.6.4 限制性酶切末端片段长度多态性法(T-RFLP)..... | 8 |
| 1.6.5 实时定量 PCR(Real-time quantitative PCR)..... | 9 |
| 1.6.6 变性梯度凝胶电泳技术(DGGE)..... | 9 |
| 1.7 本研究工作的意义及研究思路..... | 11 |
| 第 2 章 养殖池塘细菌群落多样性 | 13 |
| 2.1 材料和方法..... | 13 |
| 2.1.1 材料..... | 13 |
| 2.1.2 方法..... | 15 |
| 2.2 结果与分析..... | 26 |
| 2.2.1 样品总 DNA 的提取..... | 26 |
| 2.2.2 16S rRNA-V3 高变区的 PCR 扩增..... | 27 |

| | | |
|--------------|----------------------------------|-----------|
| 2.2.3 | DGGE 指纹图谱分析 | 27 |
| 2.2.4 | 显著性条带回收测序..... | 36 |
| 2.3 | 小结..... | 40 |
| 第 3 章 | 养殖池塘细菌丰度及其时空变化..... | 43 |
| 3.1 | 材料和方法..... | 43 |
| 3.1.1 | 样品采集..... | 43 |
| 3.1.2 | 主要试剂和主要仪器..... | 43 |
| 3.1.3 | 方法..... | 43 |
| 3.2 | 结果和分析..... | 43 |
| 3.2.1 | 显微镜视野下的细菌..... | 44 |
| 3.2.2 | 细菌丰度时空差异..... | 44 |
| 3.3 | 小结..... | 47 |
| 第 4 章 | 养殖池细菌群落多样性与水环境因子的关系 | 49 |
| 4.1 | 材料和方法..... | 49 |
| 4.1.1 | 样品采集..... | 49 |
| 4.1.2 | 水环境因子的测定..... | 49 |
| 4.1.3 | 统计软件及分析..... | 49 |
| 4.2 | 结果和分析..... | 49 |
| 4.2.1 | 水环境因子的统计学分析..... | 49 |
| 4.2.2 | 细菌群落和水环境因子的关系..... | 53 |
| 4.2.3 | 细菌丰度和细菌 OTUs 的关系..... | 57 |
| 4.3 | 小结..... | 57 |
| 第 5 章 | 结论和展望..... | 59 |
| 5.1 | 主要结论..... | 59 |
| 5.2 | 创新..... | 60 |
| 5.3 | 不足与展望..... | 60 |
| | 参考文献..... | 62 |

致 谢.....68

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Contents

| | |
|--|-----|
| Abstract in Chinese | I |
| Abstract in English | III |
| Chapter 1. Introduction | 1 |
| 1.1 Clam aquaculture situation | 1 |
| 1.2 The roots of aquaculture ecosystem fragility | 2 |
| 1.2.1 The particularity of the aquaculture ecological environment | 2 |
| 1.2.2 The material flow in the aquaculture ecological environment..... | 3 |
| 1.2.3 The pollution in the aquaculture ecological environment..... | 3 |
| 1.3 The integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) | 4 |
| 1.4 The important effects of microorganisms on the aquaculture ecological environment | 5 |
| 1.5 Studies on the microbial diversity in the aquaculture ecological environment | 6 |
| 1.6 Studies on microbial diversity | 7 |
| 1.6.1 Fluorescence in situ hybridization | 7 |
| 1.6.2 Metagenomics | 8 |
| 1.6.3 RFLP | 8 |
| 1.6.4 T-RFLP..... | 8 |
| 1.6.5 Real-time quantitative PCR | 9 |
| 1.6.6 DGGE | 9 |
| 1.7 Contents and significances of this research | 11 |
| Chapter 2. Bacterial diversity of ecological system | 13 |
| 2.1 Materials and methods | 13 |
| 2.1.1 Materials | 13 |
| 2.1.2 Methods..... | 15 |
| 2.2 Results and analysis | 26 |
| 2.2.1 Extracting total DNA from samples..... | 26 |

| | |
|---|----|
| 2.2.2 The results of PCR | 27 |
| 2.2.3 DGGE profiles..... | 27 |
| 2.2.4 The sequencing of dominant bands..... | 36 |
| 2.3 Summary | 39 |
| Chapter 3. The temporal and spatial variation of bacteria abundance of ecological system | 43 |
| 3.1 Materials and methods | 43 |
| 3.1.1 Sample sources..... | 43 |
| 3.1.2 Regents and equipments | 43 |
| 3.1.3 Methods..... | 43 |
| 3.2 Results and analysis | 43 |
| 3.2.1 Micrograph bacteria | 44 |
| 3.1.2 Regents and equipments | 44 |
| 3.3 Summary | 47 |
| Chapter 4. Coorelation study between the bacterial diversity and the water factors | 49 |
| 4.1 Materials and methods | 49 |
| 4.1.1 Sample sources..... | 49 |
| 4.1.2 Determination of Water factors | 49 |
| 4.1.3 Statistical analysis software | 49 |
| 4.2 Results and analysis | 49 |
| 4.2.1 Statistical analysis of the water factors | 49 |
| 4.2.2 Coorelations between the bacterial diversity and the water factors.... | 53 |
| 4.2.3 Coorelations between the bacterial diversity and OUTs..... | 57 |
| 4.3 Summary | 57 |
| Chapter 5. Conclusions and Prospects | 59 |
| 5.1 The main conclusions | 59 |
| 5.2 The innovations | 60 |

| | |
|--|----|
| 5.3 The shortages and the prospects | 60 |
| References | 62 |
| Acknowledgements | 68 |

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

本论文于2011年4月至2011年10月就福建云霄县贝类综合养殖池塘细菌群落多样性开展研究, 利用PCR-DGGE微生态技术和DAPI染色-荧光显微镜计数研究了水体和沉积物中细菌群落的多样性和丰度的变化, 并分析了其与相关水环境因子的关系, 为养殖池塘生态监测及其人工调控提供科学依据。主要研究结果如下:

1)应用Quantity One软件对DGGE图谱进行排除背景干扰, 识别泳道条带, 全自动相似性分析, 结果显示: 养殖水体中含有丰富的微生物, 其细菌群落结构复杂, 不同月份的水体在细菌群落结构上存在较大差异, 但是细菌群落结构昼夜变化不大, 处于相对稳定的状态。

2) UPGMA 聚类分析结果显示: 贝类池水体不同采样时间样品菌群结构相似性系数低于藻类池, 表明贝类池水体的细菌群落结构变化幅度较藻类池水体的大; 而贝类池沉积物不同采样时间样品的细菌群落结构比贝类池水体的相似性系数更大, 表明贝类池沉积物的细菌群落结构较水体的细菌群落结构更稳定。

3) 通过显著性条带回收测序, 结果检测出有 7 个基因序列属于 α -变形杆菌亚群(*α -Proteobacteria*), 4 个基因序列属于厚壁菌群(*Firmicutes*), 3 个基因序列属于 γ -变形杆菌亚群(*γ -Proteobacteria*), 1 个基因序列属于放线菌群(*Actinobacteria*), 1 个基因序列属于蓝细菌(*Cyanobacterium*)以及有 6 个基因序列属于环境样品(environmental samples), 这些细菌都是养殖环境中的常见物种。

4) 通过DAPI-荧光显微镜计数对细菌数量进行统计, 结果显示: 贝类池和藻类池细菌丰度的月变化没有明显的规律性, 贝类池细菌丰度在 1.01×10^6 - 4.35×10^6 cell/mL之间, 藻类池则不同, 藻类池细菌丰度变化在 1.09×10^6 - 6.61×10^6 cell/mL, 整个过程不规律波动。2011年10月1-2日检测结果表明贝类池和藻类池细菌丰度存在明显的昼夜变化, 最大值出现在15:00, 最小值出现在06:00和18:00。

5) 应用主成分分析(PCA)和相关性分析结果显示: 贝类池水环境因子第一主成分反应了盐度、叶绿素 *a* 和总磷之间存在显著相关性。藻类池水环境因子通过第一、二主成分反应了温度、盐度、总磷、叶绿素 *a* 和总氮的相关性。

6) 通过分析细菌丰度变化、细菌OTUs与水环境因子的关系结果显示, 2011

年4月到2011年10月贝类池细菌丰度与叶绿素 a 、总氮、总磷、温度和盐度相关性不显著。藻类池细菌丰度与叶绿素 a 、温度呈显著负相关，与总氮、总磷和盐度无显著相关性。

2011年4月到2011年10月贝类池和藻类池细菌OTUs与多数水环境因子相关性不显著，贝类池的细菌OTUs与盐度呈显著负相关。细菌OTUs和细菌丰度无显著相关性。

关键词：PCR-DGGE；生态综合养殖池塘；细菌多样性；细菌丰度；水环境因子

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

In this paper, the bacterial diversity analysis was carried out in an integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) pond in Yunxiao County, Zhangzhou, Fujian Province from April to October 2011. The variations of bacterial diversity and abundance according to the results of PCR-DGGE and DAPI dyeing-fluorescence, and their relationships with water factors were analyzed so as to provide some scientific basis for artificially monitoring and regulating the ecosystem of aquaculture ponds. The main results are as follows:

1. The elimination of background interference, identification of lanes and bands and automatic similarity analysis were carried out by software Quantity One. Our results showed that the bacterial community structures in samples collected from different months varied a lot, while the diurnal variation of bacterial community structures was much less and exhibited a relatively stable state.

2. The results of UPGMA cluster analysis indicated that the similarity coefficient of bacterial community structure of water in clam pond was less than that in algae pond, which implied that the bacterial community structure in clam pond varied larger than that in algae pond. However, the similarity coefficient of bacterial community structure of sediment collected in clam pond was larger than that in algae pond, which implied that the bacterial community structure in clam pond were more stable than that in algae pond.

3. The sequencing of dominant bands excised from the DGGE patterns revealed that there were 7 gene sequences belonging to α -proteobacteria, 4 gene sequences belonging to the Firmicutes group, 3 gene sequences belonging to γ -proteobacteria, 1 gene sequences belonging to Actinomyces group, 1 gene sequence belonging to the Cyanobacterium and 6 genes sequences of environmental samples. Such bacteria were all common species in aquaculture water.

4. The number of bacteria was counted by DAPI- fluorescence microscopy, and the results showed that there was no significant rhythmicity for monthly variation in

bacterial abundance both in clam pond and alage pond. The bacterial abundance varied from 1.01×10^6 to 4.35×10^6 cell/mL in clam pond, and from 1.09×10^6 to 6.61×10^6 cell/mL in alage pond. However, there was diurnal significant variation both in clam pond and alage pond, The maximum and minimum of bacterial abundance were found at 15:00 and the time after water exchange, respectively.

5. According to the results of principal component analysis (PCA) and correlation analysis, the first principal component of water factors explained the significant correlation between salinity, chlorophyll-a and total phosphorus in clam pond, while the first and second principal component of water factors explained the correlation between temperature, salinity, total phosphorus, chlorophyll-a and total nitrogen in alage pond.

6. The correlation analysis in the variation of the bacterial abundance, OTUs and water factors implied that there was no significant correlation between bacterial abundance and chlorophyll-a, total nitrogen, total phosphorus in the clam pond from April to October. While the bacterial abundance in alage pond was negatively correlated to chlorophyll-a and temperature, and showed no significant correlation with total nitrogen and total phosphorus.

The bacterial OTUs both in clam pond and alage pond were not significantly correlated with water factors. However, there was a significant negative correlation between bacterial OTUs and salinity in clam pond, while there was no significant correlation between bacterial OTUs and bacterial abundance.

Key words: PCR-DGGE; integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) pond; bacterial diversity; bacterial abundance; water factor.

第 1 章 绪论

水产捕捞和水产养殖是水产业的两大支柱。随着人们对鱼、虾、贝类产品需求的不断上升,近海渔业捕捞产量持续下降,渔业资源总体上出现了全球性衰退趋势,近海渔业资源衰退现象的日益加剧,使海洋食物来源更大比例地诉求于海水养殖,促进了海水养殖的快速发展。然而,伴随养殖规模的不断扩大,养殖过程中过量投饵、投药、养殖密度过大和养殖结构不合理等制约水产养殖业健康持续发展的问題也日益突显,直接影响到养殖产品的质量和养殖环境的健康。因此,发展以资源节约、环境友好、生态健康的养殖模式势在必行。

1.1 贝类养殖现状

我国是世界上唯一养殖产量高于捕捞产量的国家,自 20 世纪 80 年代以来,我国水产养殖业逐步走向了规模化、多样化发展,水产养殖对水产品生产的贡献日益增大^[1]。从 20 世纪 50 年代海带自然光育苗技术开发成功开始,60 年代紫菜育苗养殖技术的成功,70 年代解决了贻贝采苗养殖技术,80 年代开发对虾工厂化育苗以及海湾扇贝的引种成功,到 90 年代初,中国对虾,扇贝养殖总产量跃居世界第一,实现了藻、虾、贝三次产业浪潮。据联合国粮农组织统计,1993 年我国养殖产量首次超过捕捞产量。1998 年,我国渔业养殖产量占世界养殖产量的 68%,成为全球最大的渔业养殖国。至 2010 年,我国渔业养殖产量达 3828.84 万吨,占全国渔业总产量的 71.26%。我国逐渐成为世界主要水产品输出国。

贝类养殖在我国水产养殖业中占有非常重要的地位,2010 年我国贝类产量达 1011.8 万吨,增长幅度最大,贝类近年来逐步成为中国水产品产出中的主要组成部分^[2]。因此,贝类产品质量安全状况直接影响水产品的整体安全水平。由于贝类的生长位置比较固定,同时具有特殊的生物特性,一旦遇到水质环境污染,较难回避^[3]。并且,在我国传统滩涂贝类养殖中,由于养殖模式与布局的不合理、养殖区域水体的富营养化、沿岸生态系统的退化以及各种消毒剂与抗菌素的大量使用,使得贝类养殖业的发展受到巨大的影响,由此引发的环境问题也愈发突出。因此,为了实现贝类养殖业的可持续发展,在养殖过程中应通过不断跟新养殖技

术和改善管理措施，以提高资源利用率，从而协调养殖生物和养殖环境的关系，实现养殖产品优质高值化和养殖环境洁净化。

1.2 养殖生态系统脆弱性的根源

1.2.1 池塘养殖生态环境的特殊性

池塘养殖生态系统是封闭或半封闭的生态系统，属于人工或半人工生态系统。其生态系统结构比自然海洋生态系统要简单得多，边界较明确，生物组成较简单、生物多样性较低、生物之间的种间竞争强度低，养殖的动、植物在生物群落中占绝对优势，生物之间的自我调节和人工调节并存^[4]。因而池塘养殖生态系统有其与一般自然生态系统不同的特殊性。

第一，池塘养殖生态系统是一个结构简单的生态系统。仅包括大量要获取的养殖动物和一些自由存在的生物，如浮游植物、浮游动物和微生物，其余各种生物生长容易受到阻碍，进而可能导致物质循环受阻。比如，在贝类池塘中贝类的数量大大增加，而其他生物的数量则很少，导致整个池塘生态系统食物链过于简单或者不完整，物质循环不能顺利进行。

第二，池塘养殖生物的能量主要来源是人工投喂的饵料，很少是池塘水域提供的天然饵料，在人工投饵过程中，需根据不同养殖对象及规模调整投饵种类、投饵数量以及投饵方法。比如以藻类为饵料的养殖对象，其养殖生态环境中藻类的过量繁殖将导致养殖水体缺氧，水质恶化，影响养殖动物生长，严重时可导致养殖动物大量死亡^[5, 6]。

第三，池塘养殖生态系统缺乏以有机碎屑为食物的底栖动物^[7]。池塘养殖生态系统的食物链简单，养殖过程中产生的大量有机物只能靠其生态环境中的土著微生物分解，故池塘养殖生态环境中的土著微生物分解能力就决定了养殖生态环境的有机污染物的净化能力。当土著微生物的分解能力低于净化系统产生有机污染物的能力，养殖生态环境就会受到污染，生态平衡受到破坏。因此有必要投放微生物制剂改善池塘养殖生态系统的菌群结构，提高其自身净化能力^[8]。

第四，高产而脆弱的生态平衡。池塘生态系统是在人为干扰下形成的，其目的是产出质量优规模大的养殖动物，获得最大的经济效益，因此，养殖户通过人为增加系统能量输入、把池塘生态系统中养殖动物的敌害和竞争物种减少到最低

程度等方法大大增加养殖动物的产出，使池塘养殖具有高产的特点。同时，由于上述人为干扰使池塘养殖生态系统结构过于简单，自我调节能力差，故其生态系统的稳定性较低，池塘生态系统的稳定性必然使生态平衡易于打破，因此，该生态系统又具有脆弱性的特点。所以，当人为调节作用有效时，则生态平衡表现为高产性，当人为调节作用无效时，则生态平衡表现为脆弱性。再者，生态系统的结构简单，也决定了人工调节部分替代生态系统自我调节的必然性^[9, 10]。

1.2.2 池塘养殖生态环境中的物质流转

1.2.2.1 养殖生态环境中物质的输入

①进水：养殖池塘进水过程，多种物质随水流流入，带来养殖环境水质的变化；②投放养殖动物苗种；③养殖过程中不断投入的饲料、施加的肥料和一些药物；④降水；⑤生物固氮及固碳。

1.2.2.2 养殖生态环境中物质的输出

①排水；②渗漏沉降；③收获养殖动物；④生物脱氮作用和生物的呼吸作用。

1.2.3 养殖生态环境的污染

从生态学角度来看，任何生态系统对外来物质都具有一定的环境自净能力，对污染物具有一定的负荷量，但如果某种污染物质超过了生态环境对该物质的净化能力，就造成了环境污染，从而对生态系统产生危害。目前养殖生态环境正受到外来物质污染和本身由于养殖需要而产生养殖自身污染^[11]，养殖自身污染主要包括养殖过程中营养物的污染、药物的使用污染以及沉积物的富集污染等^[12]。池塘养殖过程中，投饵不科学、剩残过量、底泥恶化、污染水体以及细菌、病毒大量繁殖、疫病频发等养殖自身污染问题日益严重^[13]。

就集约化养殖水体而言，营养物污染已成为制约水产养殖环境的主要胁迫因子，大量氮磷进入养殖水体后导致水体富营养化，它们被浮游生物利用，而使浮游生物大量繁殖形成水华或赤潮，引起水体发臭，水中的溶解氧被大量消耗，造成鱼、虾等养殖动物大量死亡^[14]。此外，在养殖生态环境中，土著微生物将高浓度的有机污染物进行氨化、硝化，产生对养殖动物有害的氨态氮、亚硝态氮等有害物质，并且水产养殖动物一般是排氨类生物，即氮素在其体内代谢的最终产物是氨态氮，并以氨态氮的形式排出体外，这样必然增加水体中铵态氮的含量。过高的铵态氮、亚硝酸盐对养殖动物具有很强的毒性^[15, 16]。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

廈門大學博碩士論文摘要庫