

doi: 10.7541/2023.2022.0257

台风利奇马对海水贝塘浮游生物群落的影响

魏军丞^{1,2} 张翔² 蔡逸龙² 蔡景波² 肖国强^{1,2}

(1. 浙江海洋大学, 舟山 316022; 2. 浙江省海洋水产养殖研究所, 浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室, 温州市海洋生物遗传育种重点实验室, 温州 325005)

摘要: 为了揭示台风前后海水池塘贝类养殖过程中浮游生物群落结构的变化, 对养殖水体环境基因组DNA中16S和18S rRNA基因进行了高通量测序和生物信息学分析。结果显示, 原核生物OTU数(28728)明显高于真核生物(8498), 其中原核生物优势类群主要为变形菌门(Proteobacteria)、蓝藻门(Cyanobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)和绿菌门(Chlorobi)等; 真核生物优势类群为纤毛虫、鞭毛虫、原绿藻、杯鞭藻、隐藻、棕鞭藻和硅藻等, 其中硅藻丰度占比在台风后显著性增加($P < 0.05$)。台风过后真核生物多样性均未发生显著改变, 原核生物Shannon指数和Simpson指数出现显著性差异($P < 0.05$), 表现为先降低后升高, 而OTU数和Chao I指数则未发生显著改变。PCoA分析显示, 台风后原核和真核生物群落结构均产生时间异质性, 但仅原核生物群落结构产生显著差异。ANOSIM显示, 真核和原核微生物群落在台风前后均存在显著性差异($P < 0.05$), 其中原核微生物每个时间点之间均有显著差异($P < 0.05$), 而真核微生物仅在10d后出现显著差异($P < 0.05$)。RDA分析显示, 水温对原核群落结构有显著影响($P < 0.05$), 而化学需氧量和活性磷酸盐则对真核生物群落结构有显著影响($P < 0.05$)。研究表明, 在台风扰动后, 海水池塘浮游生物群落在短期内均发生了显著改变, 原核生物群落改变大于真核生物, 细菌群落多样性水平在先显著降低, 后恢复至台风前水平, 表现出相较于真核微生物更强的敏感性, 且两者均未能恢复至台风前群落组成。因此, 在海水池塘贝类养殖中应对台风影响的重点措施应主要放在防止养殖生物对环境剧变产生应激, 并适当补充用于环境调节的益生菌制剂, 以弥补台风造成的菌相改变可能带来的生态功能缺失。

关键词: 浮游生物; 海水贝塘; 高通量测序; 16S rDNA; 18S rDNA

中图分类号: S917.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2023)08-1301-12



台风等极端天气会对海水池塘生态系统具有短暂和持久的影响, 与台风相关的强风和降水可以通过流域的短期径流和水体的物理混合来影响水环境, 并且浮游生物的多样性和组成受到环境因素的影响^[1,2]。台风过境所引起的强混合作用导致浮游生物垂向混合均匀, 待到水体稳定后, 浮游生物才开始大量生长^[3]。台风过境时会引发细菌群落的反复演替, 当经过多次台风影响时细菌群落会被反复、可预测地被重置; 但台风会中断浮游植物群落的演替, 不会重置浮游植物群落的演替, 并且每次

台风都会干扰浮游植物群落的演替; 台风过境时也会引起浮游生物群落结构的垂直变化^[4]。在台风过后, 海水混合增强, 表层海水温度降低, 盐度和营养盐增加, 改变浮游植物组成, 台风从下层卷挟上来的营养盐, 为浮游植物水华提供更多物质基础, 从而可能出现藻类水华^[5]。

海水贝类养殖池塘生态系统主要由浮游生物和养殖贝类组成, 其中原核浮游生物主要为细菌, 真核浮游生物主要包括浮游植物和浮游动物, 如真核藻类、原生动物、轮虫、枝角类和桡足类

收稿日期: 2022-06-23; **修订日期:** 2022-09-16

基金项目: 台州市重大农业科技“揭榜挂帅”研发攻关计划项目(NYJBGS202203); 浙江省重点研发计划(2019C02045); 温州市基础性农业科技项目(N20210021和KN20210008); 现代农业产业技术体系专项资金(CARS-49)资助 [Supported by Taizhou Agriculture Major Science and Technology R & D Project of China (NYJBGS202203); the Key Research and Development Program of Zhejiang Province (2019C02045); Wenzhou Scientific Research Program (N20210021 and KN20210008); the Earmarked Fund for CARS-49]

作者简介: 魏军丞(1997—), 男, 硕士; 主要从事水产微生物研究。E-mail: 1619251703@qq.com

通信作者: 肖国强, E-mail: xiaogq1978@163.com

等^[6-8]。在海水池塘养殖过程中,浮游生物对池塘养殖生态系统的物质循环和能量流动起着十分重要作用,不仅是生产者而且还是重要的分解者,能通过影响微食物环中的生物群落结构,改变和调节池塘养殖环境条件,进而影响整个池塘养殖生态系统健康状况^[9-13]。因此,海水养殖池塘中的水体微生物群落是衡量养殖环境优劣的重要指标,并且对养殖生态系统功能的维持具有重要作用^[14]。

海水池塘养殖的滩涂贝类主要靠滤食水中浮游微藻和有机颗粒为食,之前对于近岸海域贝类养殖区域浮游群落的研究表明,贝类滤食会降低浮游生物的数量^[15-17],而贝类选择性滤食会改变浮游生物群落结构^[18,19]等。而浮游生物群落的多样性和组成会受到环境因素的影响,且台风带来的环境变化对水体浮游生物群落的影响已有文献记载^[20],在南海东北部的一项研究显示,洛克和海棠台风过后,甲藻丰度较高,硅藻和蓝藻丰度较低^[21];Tseng等^[22]发现台风和降雨是影响亚热带淡水水库群落结构的主要环境因素;有研究表明台风会导致浮游植物群落和生物量的变化,从而影响赤潮的发生或发展,其中一些有害的藻类物种产生海洋生物毒素,可转移到滤食性贝类,从而导致疾病或死亡^[23,24]。目前关于海水贝塘浮游生物群落的研究主要集中于细菌种群分布规律及微生物群落多样性对环境因子的响应及与水产动物发病的关系^[17]、贝类养殖区中微型浮游生物群落组成特征等^[25],但对于台风对海水贝塘浮游生物群落的影响研究较少,因此阐明台风对海水贝塘养殖环境中浮游生物群落的影响,对于在台风过后贝类养殖管理及灾害防控具有重要的指导意义。本研究利用高通量测序技术分别对台风后海水贝塘水体环境基因组中的原核生物 16S rRNA 基因和真核生物 18S rRNA 基因进行测序分析,通过揭示台风后海水贝塘中浮游生物群落的时空变化规律,为海水贝类养殖灾后恢复管理提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 采样地点及样品采集

2019年8月10日台风“利奇马”于浙江台州登陆,登陆时中心附近最大风力有16级(52 m/s)。台州市三门县是浙江省海水养殖第一大县,海水池塘养殖面积近 $6.67 \times 10^3 \text{ hm}^2$ 。分别于台风前后,在三门县花桥镇海水养殖连片池塘区域(经度121.511169,纬度28.936265)进行养殖水体水样采集。选择其中呈“田”字形排布的4个面积和形状相似的滩涂贝类养殖海水池塘作为研究对象,分别编号A、B、C、D,

四个海水贝塘为实验重复,并且每个池塘面积约为 1.8 hm^2 。海水贝塘养殖品种为青蛤(*Cyclina sinensis*)和泥蚶(*Tegillarca granosa*),并且拥有相似的养殖密度(约为400个/ m^2)、滩面布局和养殖管理措施。日常养殖使用鲜杂鱼进行肥水,台风后环境调控采用商品芽孢杆菌液态制剂进行泼洒,制剂液体中芽孢杆菌浓度为 $2 \times 10^7 \text{ CFU/mL}$,按照泼洒后池塘水体中浓度为 $1 \times 10^3 \text{ CFU/mL}$ 进行施用;并于台风后第五日进行换水,换水量约为10%。

分别采集每个贝塘养殖水体的中层(深度50 cm)水样,采集时间分别为台风登陆前24h、台风登陆后5d和换水前10d。在每个池塘采用5点取样法采集等量水样,混匀后装入1 L采样瓶于12h内带回实验室进行预处理。将水样用 $0.22 \mu\text{m}$ 孔径无菌滤膜(MF-MilliporeTM)进行抽滤,抽滤水样1 L,将抽滤好的滤膜放入5 mL灭菌离心管中,于 -80°C 超低温冰箱保存,保存至全部采集完样品。

1.2 水质检测

主要检测了海水养殖过程中常规水质指标,包括温度(T)、溶解氧(DO)、化学需氧量(COD)、活性磷酸盐($\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$)、亚硝酸盐($\text{NO}_2^-\text{-N}$)、硝氮($\text{NO}_3^-\text{-N}$)、氨氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$)和总氮(TN)。采用便携式溶氧仪(Multi 3410 SET 5, 德国WTW)现场测定水温 and 溶解氧(DO)。其他指标在样品带回实验室24h内进行测定。氨氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$)含量采用靛酚蓝分光光度法测定;硝酸盐($\text{NO}_3^-\text{-N}$)含量采用锌-镉还原法测定;亚硝酸盐($\text{NO}_2^-\text{-N}$)含量采用N-(1-萘基)-乙二胺分光光度法测定;磷酸盐($\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$)含量采用磷钼蓝分光光度法测定;化学需氧量(COD)采用酸性高锰酸钾法测定。水质检测均按照国标GB17378.4-2007海洋监测规范方法进行。

1.3 DNA提取和MiSeq高通量测序

在水样采集完后,将抽滤好的滤膜从超低温冰箱取出,用灭菌手术剪适当剪小、剪碎并转移至灭菌离心管中,使用水体微生物DNA提取试剂盒Water DNA Kit(Omega)并依照其提取步骤提取样品水体的环境总DNA,将提取的DNA用1.5%琼脂糖凝胶电泳进行质量检测。

以引物515F(5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3')和907R(5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3')扩增16S rRNA基因V4区;以引物0817F(5'-TTAGCATGGAATAATRRAATAGGA-3')和1196R(5'-TCTGGACCTGGTGAGTTTCC-3')扩增18S rRNA基因的V5—V7区,每个样设置3个重复。PCR反应体系(20 μL): 5×FastPfu buffer, 4 μL ; 2.5 mmol/L dNTPs, 2 μL ; 5 $\mu\text{mol/L}$ 上、下游引物各0.8 μL ; FastPfu

DNA聚合酶, 0.4 μ L; 模板DNA 10 ng; 最后再加入灭菌ddH₂O补到20 μ L。PCR反应程序: 95℃条件下预变性3min; 95℃条件下变性30s, 55℃条件下退火30s, 72℃条件下延伸30s, 总共进行28个循环; 最后在72℃条件下再延伸10min。用2%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。

用琼脂糖凝胶回收试剂盒(AXYGEN)进行PCR产物回收纯化, 然后再用2%琼脂糖电泳进行检测。使用Illumina Miseq PE250平台对PCR产物进行高通量测序, 每个PCR产物至少要测10000条以上。

1.4 数据统计分析

Illumina MiSeq测序平台得到的原始数据(Raw data)经过拼接、数据过滤处理和嵌合体去除得到最终的有效数据(Effective data)。利用Uparse v7.0.1001软件对所有样品的全部有效序列进行聚类, 将高于97%相似性的非重复序列进行聚类。

每个OTU在数据分析中被视为一种微生物, OTU为不少于300个有效碱基且与数据库中序列相似性水平不低于97%的序列。OTU产生后, 统计样品中含有的OTU数量及每个OTU包含的序列数。同时, 将所有OTU序列与Silva 119库进行比对, 分析获得每个OTU的分类学信息。

利用R语言(R version 3.1.3)vegan程序包计算 α -多样性指数(Shannon, Simpson, Chao1和测序覆盖率), 以及使用pheatmap分析包绘制属水平的丰富度聚类热图。对于浮游生物群落结构计算加权和未加权的Unifrac距离矩阵, 并基于Unifrac距离进行主坐标分析(Principal coordinate analysis, PCoA)并作图。利用R语言(R version 4.2.0)中的Vegan 2.6-2包和MASS包基于不同样品间微生物群落的布雷-柯蒂斯(Bray-Curtis)相异度矩阵并进行统计学显著性分析。使用Canoco5.0软件进行RDA分析

微生物种群与环境因子之间的相关性并作图。使用R语言Indicspecie包分析基于指示值挑选显著性($P<0.05$)的标志物种, 通过XLSTAT 2019软件对指示种作多组别比较分析并作图。统计分析采用IBM SPSS Statistics 22进行单因素方差分析(LSD检验)。

2 结果

2.1 浮游生物群落结构 α -多样性分析

测序数据经过均一化处理后(表1), 其中浮游原核生物有效序列共计240355条, 浮游真核生物有效序列共计402041条。以97%的一致性将序列聚类成为OTU, 浮游原核生物共检出28728个OTU, 浮游真核生物共检出8498个OTU。

采用群落丰富度指数Chao I指数、群落多样性指数Shannon指数、Simpson指数和覆盖率Coverage指数对台风前后不同时间段内海水贝塘中浮游生物群落多样性进行分析。所有原核生物群落结构Coverage指数均在0.84以上(表1), 浮游真核生物群落结构Coverage指数均在0.92以上(表1), 说明样本测序结果可以反映样品的真实情况。

台风过境前后池塘水体样品中浮游原核生物平均OTU数为3057, Chao I指数平均值为12760.61, 不同时间点的样品OTU数和Chao I指数无显著性组间差异($P>0.05$), 这表明台风过后海水贝塘中细菌种群数量未发生显著改变。浮游原核生物群落Shannon指数平均值为6.67, Simpson指数平均值为0.94, 不同时间点的样品间Shannon指数和Simpson指数均有显著性差异($P<0.05$), 且表现为先降低后升高, 这可能由于台风引起了短暂的细菌群落多样性改变, 之后群落多样性呈现逐渐恢复的趋势(图1)。

浮游真核生物平均OTU数为977, Chao I指数平均值为1518.06, 不同时间点的样品中浮游真核生

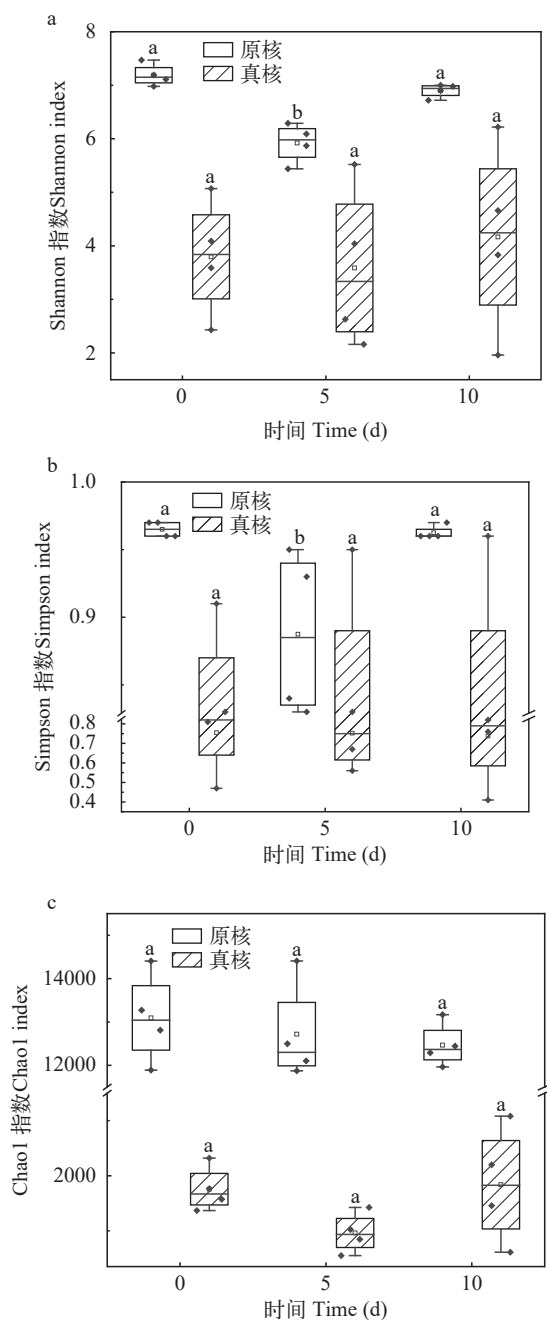
表1 各样品高通量测序数据结果分析

Tab. 1 Analysis of high-throughput sequencing data of each sample

样本编号 Sample ID	原核生物Prokaryotes			真核生物Eukaryotes		
	有效序列 Sequence number	OTU数 OTU number	覆盖率 Coverage (%)	有效序列 Sequence number	OTU数 OTU number	覆盖率 Coverage (%)
A0	28175	4658	0.84	20718	721	0.97
B0	19142	3338	0.84	14759	663	0.96
C0	10896	2085	0.84	10356	591	0.96
D0	13837	2350	0.85	32045	1652	0.94
A5	31634	4531	0.85	25262	823	0.97
B5	26063	3722	0.86	15424	439	0.98
C5	28977	3567	0.88	20937	849	0.96
D5	23841	3237	0.87	115705	1405	0.98
A10	20928	3172	0.86	8259	887	0.92
B10	13219	2144	0.86	82716	1141	0.98
C10	14119	2327	0.85	30116	1591	0.95
D10	9524	1558	0.87	25744	963	0.96

注: A、B、C、D为4个实验塘, 0为台风登陆前24h, 5和10分别为5d后和10d后样品; 左侧为原核生物, 右侧为真核生物

Note: A, B, C and D are experimental ponds, 0 is 24h after the typhoon, 5 and 10 are samples 5d and 10d after the typhoon; prokaryotes on the left and eukaryotes on the right

图1 α -多样性指数分析图Fig. 1 α -diversity index analysis chart

a为Shannon指数; b为Simpson指数; c为Chao I指数。字母不同表示不同时间之间存在显著性差异($P < 0.05$)

a. Shannon index; b. Simpson index; c. Chao I index. Different letters indicate significant differences between different times ($P < 0.05$)

物OTU数和Chao I指数无显著性差异($P > 0.05$), 这与原核生物群落分析结果类似, 表明台风过后海水贝塘中真核生物种群数量也未发生显著改变。真核生物群落群落Shannon指数平均值为3.85, Simpson指数平均值为0.75, 不同时间点的样品的Shannon指数和Simpson指数均无显著性差异($P > 0.05$), 这表明

相较于原核生物群落, 台风对真核生物群落的影响较小, 真核生物对于台风引起的环境扰动具有较强适应性。

2.2 浮游生物群落组成

经过对有效OTU的序列比对, 规定OTU序列相似性为97%, 结果显示, 在门水平上, 各个池塘中原核生物群落主要优势类群为变形菌门(Proteobacteria, 31.18%)、蓝藻门(Cyanobacteria, 23.75%)、拟杆菌门(Bacteroidetes, 15.27%)、放线菌门(Actinobacteria, 19.54%)和绿菌门(Chlorobi, 6.58%; 图2)。浮游真核生物优势类群中, 原生动物为纤毛虫(28.04%)、鞭毛虫(32.94%)、原绵虫(17.79%)和杯鞭虫(5.42%), 真核藻类为隐藻(3.63%)和棕鞭藻(3.85%)、硅藻(1.99%; 图3)。

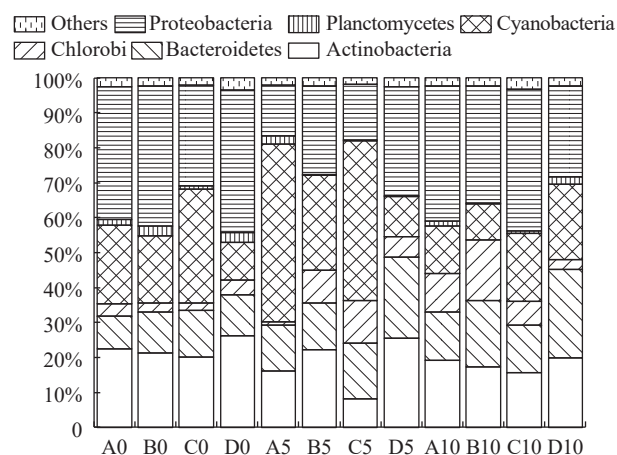


图2 不同池塘中浮游原核生物群落组成

Fig. 2 Composition of planktonic prokaryotes in different ponds

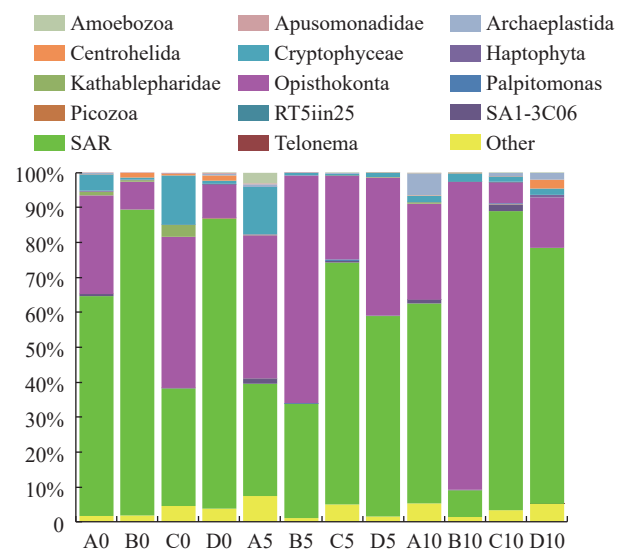


图3 不同池塘中浮游真核生物群落组成

Fig. 3 Composition of planktonic eukaryotic community in different ponds

在纲分类水平上, SAR超类群和泛植物两者之和占浮游真核生物的57.9%, 以真核藻类在SAR超类群和泛植物中的相对百分比构建箱形图(图4)。结果显示, 硅藻丰度占比在台风后发生显著性增加($P<0.05$), 而甲藻、绿藻和金藻在台风后未发生显著性变化($P>0.05$)。

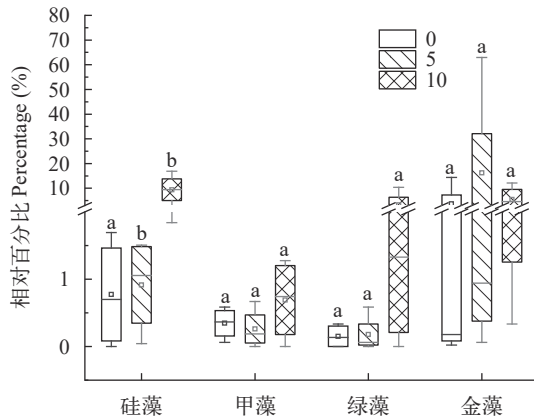


图4 台风前后不同优势藻类在丰度变化情况

Fig. 4 Changes in abundance of different dominant algae before and after typhoon

字母不同表示不同时间之间存在显著性差异($P<0.05$)

Different letters indicate significant differences between different times ($P<0.05$)

2.3 浮游生物群落结构分析

根据所有样品在属水平的物种注释及丰度信息, 选取优势属(丰度 $>1\%$)及其在每个样品中的丰度信息绘制Heatmap图, 并且以颜色梯度变化来表现丰度值的高低, 并从分类信息和样品间差异两个层面进行聚类分析。结果显示(图5和图6), 浮游原核生物群落中主要种群为聚球藻(*Synechococcus*)、Pelagibacteraceae、绿菌门(*Chlorobi*)和红杆菌科(*Rhodobacteraceae*)等; 浮游真核生物群落中主要种群为原绵虫(*Proterospongia*)、杯鞭虫(*Bicosoeca*)和纤毛虫环毛亚纲(*Choreotrichia*)。台风过境前海水池塘中初始浮游原核生物群落组成较为相似, 台风过境后随养殖时间出现差异, 且第10日恢复到与台风登陆前24h较为相似; 而海水贝塘(除D塘外)浮游真核生物群落在台风登陆前24h较为相似, 随养殖过程中出现差异, 但台风后未恢复到最初状态。

采用基于加权(群落组成差异)和未经加权(系统发育)Unifrac距离的PCoA分析衡量样本间群落物种组成的相似度(图7和图8)。分析结果显示, 在台风过境前, 初始水体中4口贝塘浮游原核和真核生物群落均较为相似。在台风过境后, 不同时间点的细菌群落组成和系统发育结构均产生了显著差异($P<0.05$), 呈现出明显时间异质性, 而样品组内差

异先增大而后缩小, 系统发育结构具有恢复的趋势。真核生物群落仅系统发育结构上出现时间异质性, 群落组成则无明显规律, 这可能由于浮游动物作为优势种群, 因其相对较强的游泳能力而分布不均, 引起组间差异加大。分析结果表明, 台风对海水贝塘中浮游生物群落产生了明显影响, 但随着养殖过程的进行, 在较短时间内可能得到恢复。

通过微生物群落结构相似性分析ANOSIM(Analysis of similarities), 对台风前后不同时间之间的差异进行了比较。结果显示, 真核和原核微生物均存在显著性差异($P<0.05$), 其中原核微生物在第0和第5天($R=0.7396$, $P=0.0330$)、第0和第10天($R=0.3229$, $P=0.0320$)、第5和第10天($R=0.8229$, $P=0.0330$)之间都有显著差异, 而真核微生物只有在第0和第10天($R=0.5208$, $P=0.0380$)之间有显著差异。

2.4 浮游生物群落组成与环境因子的关系

各采样点位水体环境因子监测指标如表2所示。为研究水体中微生物群落与环境因子的关系, 在门水平上对浮游生物与环境因子作RDA分析(图9), 坐标轴RDA1和RDA2对浮游原核生物群落结构分布的总解释度为86.81%, 对浮游真核生物群落结构分布的总解释度为99.46, 说明浮游生物群落和环境变量之间关系可靠。

RDA分析结果显示, 水温对浮游原核生物群落结构具有显著影响($P<0.05$), 而其他环境因子对浮游原核生物群落结构无显著性影响($P>0.05$); 化学需氧量(COD)和活性磷酸盐($\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$)对浮游真核生物群落结构具有显著性影响($P<0.05$)。

2.5 环境显著差异物种分析

为了筛选出能对台风前后海水池塘浮游生物群落中发生显著差异的特征物种, 通过物种指示值进行计算, 对采集的样品在 $P<0.05$ 显著性水平上进行指示种挑选, 共选出157种浮游原核生物OTU和27种浮游真核生物OTU。其中, 浮游原核生物的157个物种主要属于聚球藻科(*Synechococcaceae*)、远洋杆菌科(*Pelagibacteraceae*)、黄杆菌科(*Flavobacteriaceae*)和红杆菌科(*Rhodobacteraceae*); 浮游真核生物的27个物种主要属于鞭毛虫和部分未鉴定的SAR超类群。将其进行聚类分析(图10和图11), 结果显示, 不同时间点的原核生物群落指示物种未聚为一枝, 而受台风影响后浮游真核生物指示种与初始样品出现差异。

3 讨论

目前, 相对于原核生物16S rRNA基因数据库, 微型真核生物18S rRNA基因数据库所储存的信息

仍较少。大部分的真核生物OTU只能注释到目水平,少数可被注释到科水平,极少数可被注释至属,而绝大部分的细菌OTU可被注释到属水平,因此对于真核生物群落分析的准确度可能会低于原核生

物群落。在浮游生物鉴定经验和技术条件满足的情况下,显微鉴定所提供的浮游生物群落信息仍比18S rRNA基因高通量测序的结果更加准确。然而,在不具备足够鉴定经验时,18S rRNA基因高通量测

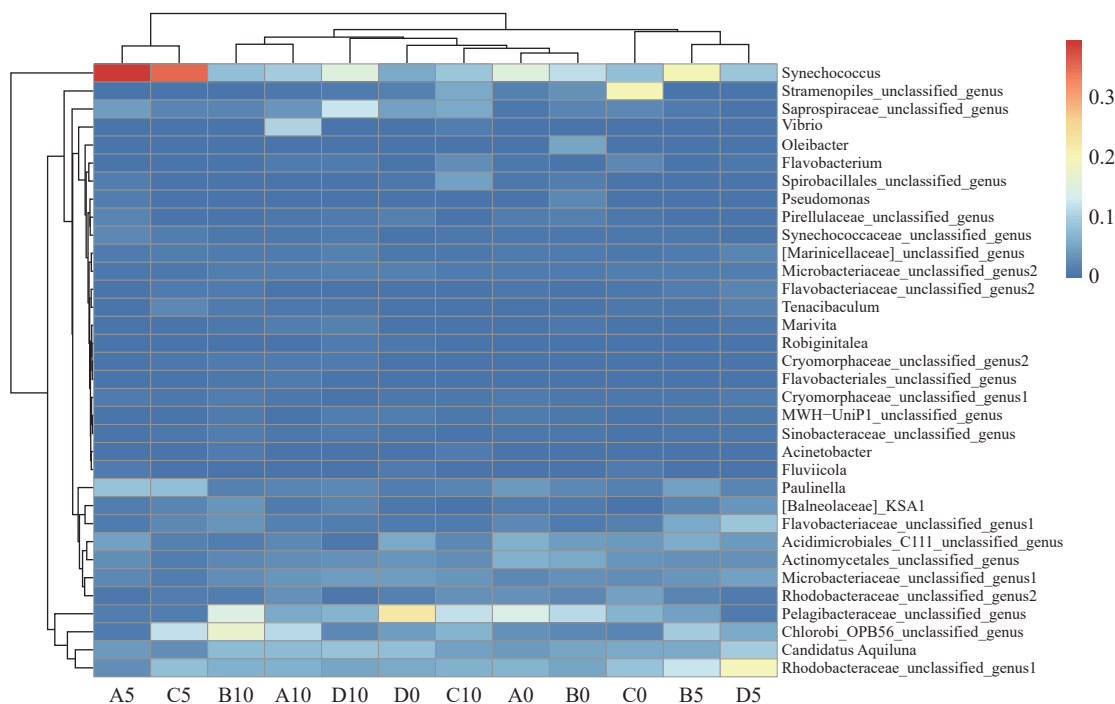


图5 不同池塘中浮游原核生物群落结构Heatmap图

Fig. 5 Heatmap of planktonic prokaryotes community structure in different ponds

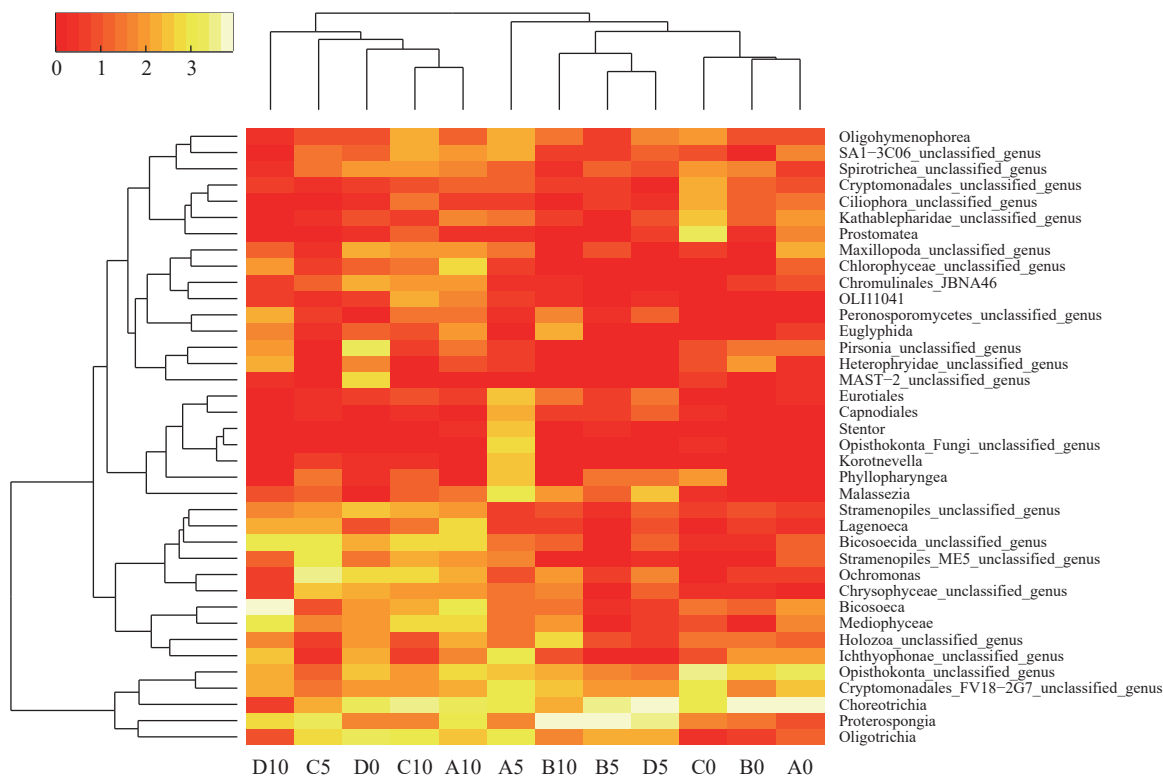


图6 不同池塘中浮游真核生物群落结构Heatmap图

Fig. 6 Heatmap of eukaryotic plankton community structure in different ponds

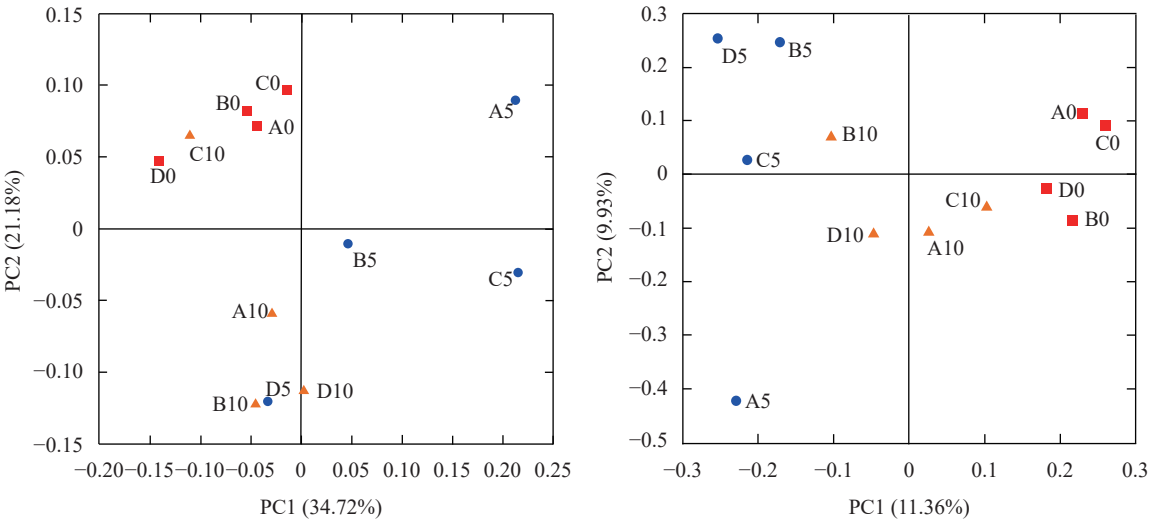


图 7 各个样点的原核生物群落结构(左)和系统发育(右)PCoA分析图

Fig. 7 PCoA analysis of prokaryotic community structure (left) and phylogeny (right) of each sample site

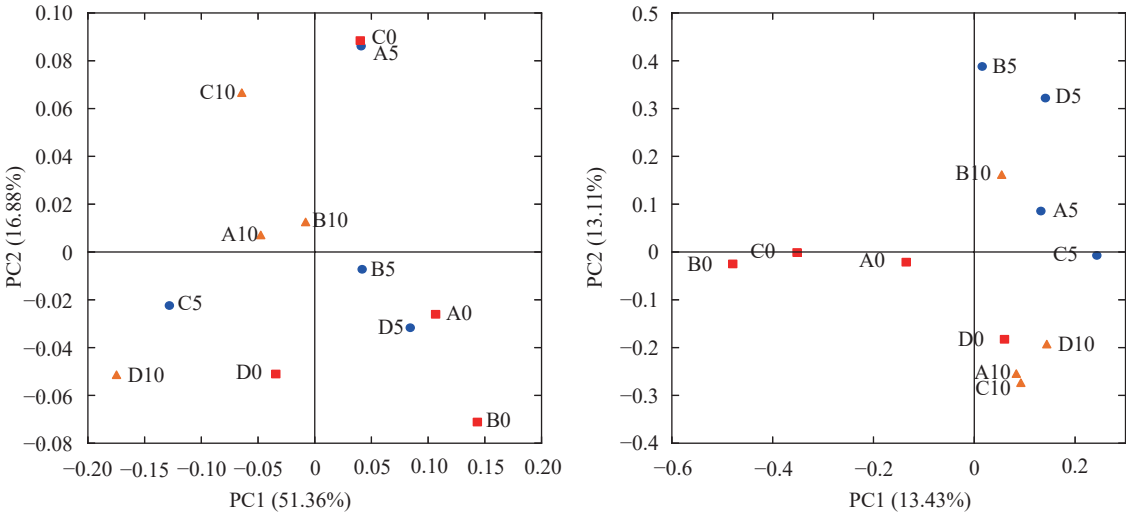


图 8 各个样点的真核生物群落结构(左)和系统发育(右)PCoA分析图

Fig. 8 PCoA analysis of eukaryotic community structure (left) and phylogeny (right) of each sample site

表 2 水质检测结果

Tab. 2 The result of water quality

样本编号 Sample ID	T (°C)	DO (mg/L)	COD (mg/L)	PO ₄ ³⁻ -P (mg/L)	NO ₂ ⁻ -N (mg/L)	NO ₃ ⁻ -N (mg/L)	NH ₄ ⁺ -N (mg/L)	TN (mg/L)
A0	28.1	5.16	3.92	0.0504	0.1501	0.4808	0.2690	0.8999
B0	28.8	5.27	2.00	0.0208	0.1717	0.5368	0.3521	1.0606
C0	28.3	5.25	2.00	0.0194	0.1496	0.5396	0.3493	1.0385
D0	28.6	5.50	2.08	0.0194	0.1748	0.5347	0.3995	1.1090
A5	30.8	6.08	2.64	0.0181	0.2128	0.6664	0.2542	1.1334
B5	30.9	6.17	3.84	0.0221	0.0414	0.1341	0.1124	0.2879
C5	30.8	6.15	3.04	0.0208	0.1501	0.4707	0.1255	0.7463
D5	31.1	6.24	4.48	0.0181	0.0847	0.3125	0.1329	0.5301
A10	30.1	7.02	4.00	0.0221	0.0098	0.0498	0.0248	0.0844
B10	30.3	6.48	4.80	0.0181	0.0082	0.0475	0.0487	0.1043
C10	30.1	6.93	4.40	0.0113	0.0049	0.0342	0.0901	0.1291
D10	30.0	6.78	3.20	0.0086	0.0500	0.1710	0.2801	0.5012

序技术提供了以前从未被揭示过的信息,从而增进了人们对养殖环境中真核生物群落的了解。

养殖水体中浮游生物群落通常包含了原核生物(细菌、古菌)群落和真核生物(真核藻类、原生动物、轮虫、枝角类和桡足类)群落,对于其中任何一类的种类鉴定都需要有较高的鉴定技术和相关经验,而利用基于16S和18S rRNA基因的高通量测序技术能够在不具备相应技术和经验的条件下,相对较好地完成对整个浮游生物群落的扫描,获得相应的群落结构图谱,并用于生态学统计分析。

3.1 台风过境前后对浮游生物群落组成的影响

变形菌门通常是水环境中主要的原核生物,主要由于变形菌门在原核生物表型分类或分子生物学分类中占据绝对优势^[26]。变形菌门包括光营养性、化能自养型和化能异养型细菌,在水体中变形菌门主要为 α -变形菌亚门,变形菌在很多养殖环境

中占据优势地位^[10, 27],其在大菱鲆养殖水体中为70%^[28]、南美白对虾养殖水体中为70.7%^[29]、拟穴青蟹养殖水体中为86.84%^[30]、贝类养殖水体中为59%^[31]。本研究中同样表现为相对丰度较高的优势菌门,其中变形菌门主要包括 α -变形菌、 β -变形菌、 γ -变形菌和 δ -变形菌,其分别占变形菌门的70.07%、4.89%、18.94%和4.91%。放线菌门和拟杆菌门同样也是水体中的主要微生物,在养殖水体中也具有重要的功能^[27],放线菌门可产生胞外酶、多种次生代谢物和溶藻活性物质等物质,并且在腐殖质形成中具有重要作用等^[32],而拟杆菌门具有产生胞外水解酶以降解几丁质、琼脂等生物大分子等功能^[33],本研究海水贝塘养殖水体样品中检测到大量的放线菌门和拟杆菌门细菌,推测这些细菌在海水池塘养殖中起到死亡藻类分解、饲料残余有机质分解的作用。之前有研究发现绿菌门中存在

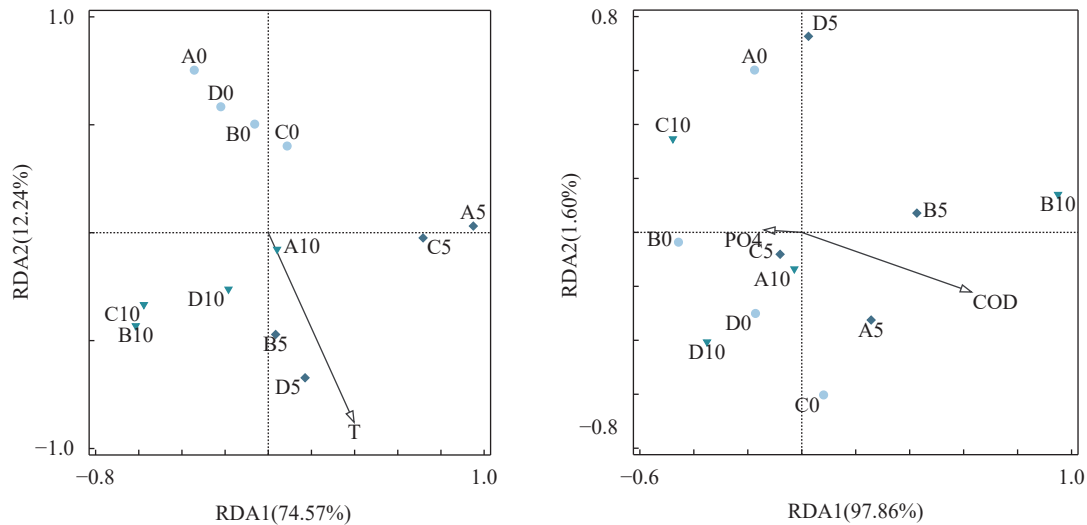


图9 各个样点的浮游生物(a. 浮游原核生物群落; b. 浮游真核生物群落)与环境因子的RDA分析

Fig. 9 Plankton at each sample site (a. planktonic prokaryotic community; b. planktonic eukaryotic community) and RDA analysis of environmental factors

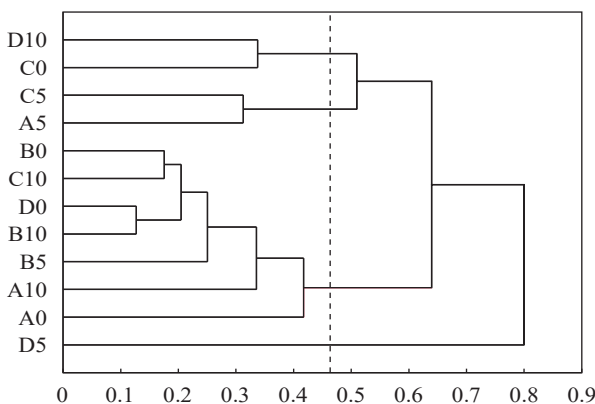


图10 浮游原核生物群落指示物种聚类分析图

Fig. 10 Cluster analysis diagram of indicator species in planktonic prokaryotic community

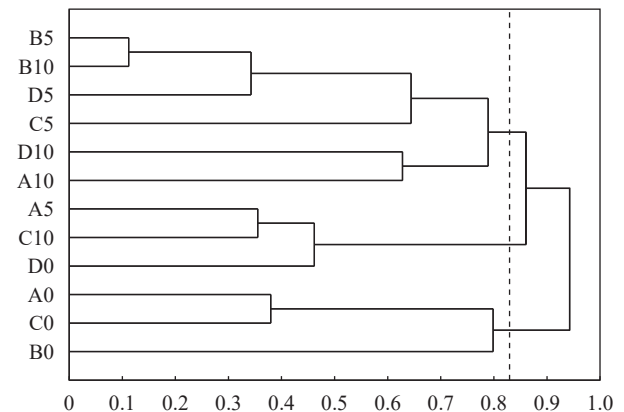


图11 浮游真核生物群落指示物种聚类分析图

Fig. 11 Cluster analysis diagram of indicator species in planktonic eukaryotic community

一些具有亚硝酸盐氧化作用的化能自养细菌^[34]。本研究中绿菌门含有大量与先前报道中近缘或同属的细菌种群, 且绿菌门的相对丰度略高于海水鱼类水体^[35], 这暗示海水贝塘中绿菌可能参与了池塘水体中氮素的生物地化循环, 起到了降低水体亚硝浓度的作用。对城市淡水系统的研究表明, 在台风登陆后, 变形菌门、蓝菌门和拟杆菌门的相对丰度增加, 而放线菌门的相对丰度下降^[20], 而在本研究中台风登陆后变形菌门相对丰度下降且浮游原核生物多样性降低, 相对于城市小型淡水湖泊, 海水池塘系统与之产生差异的可能原因为系统水体容量和初始浮游生物类型。

乔玲等^[25]发现扇贝养殖区隐藻是浮游植物的主要类群, 相对丰度较高的浮游动物是纤毛虫。这与本研究结果类似, 在海水池塘真核生物群落中, 纤毛虫、鞭毛虫、隐藻、棕鞭藻和硅藻占优势, 这可能暗示了海水养殖环境中真核生物受其近岸海区的影响。纤毛虫作为海洋微食物网的重要组成部分, 主要以微微型和微型浮游生物为食物, 但又被中型浮游动物和鱼类幼体等所摄食, 扮演着连接微食物网和经典食物链的重要角色^[36]。本研究发现, 贝塘水体中优势真核生物主要为纤毛虫, 其次为鞭毛虫, 而鞭毛虫随着环境变化程度较大, 这表明海水池塘中较为稳定的纤毛虫群落可能是海水池塘微食物网的关键环节。有研究表明, 台风过后盐度和营养盐增加, 从而导致浮游植物群落和生物量的变化, 进而有可能出现藻类水华^[37]。台风导致浮游植物群落由黄藻向硅藻的转变, 并且可能随后导致生物碳的加速下沉; 台风过后受陆地影响形成的富硅营养环境可能使硅藻在其他浮游植物类群(如甲藻)短暂增加后占优势^[38]。2016年台风“凯米”后南海海区中硅藻丰度增加^[5], 2019年台风“利奇马”后渤海海区的甲藻、硅藻增加, 并且在不久后观察到赤潮的发生^[39]。在本研究中台风过后硅藻在真核藻类中的相对丰度占比也显著性升高, 这表明台风对于能够快速利用水体中营养物质的藻类具有积极作用, 但也要注意在水体富营养化时产生水华的风险。有研究表明有毒藻类, 如伪菱形藻和链球藻可能会在台风后丰度增加^[23, 39], 因此在台风过后, 应重视该海域海水和动物中的海洋生物毒素, 防治危害池塘生物。

3.2 环境因子对浮游生物群落结构影响

浮游生物群落结构受多种环境因子的综合影响, 比如水温、溶氧、透明度和pH是影响浮游生物群落的直接因子, N、P等营养盐类可通过影响浮游植物生物量而间接影响浮游动物^[40—42]。有研

究表明水温是被广泛认为能够影响浮游生物分布的重要环境因子^[6], 并且温度、硝酸盐、硅酸盐和磷酸盐是近海浮游植物群落的主要控制因子^[21]。虽然台风持续时间较短, 但对环境、物种组成和群落结构带来的破坏和影响巨大^[20]。在本研究中, 台风登陆前24h不同池塘的浮游生物群落结构无明显差异, 台风登陆后浮游生物群落结构出现时间异质性, 其中海水池塘水体细菌群落随着养殖过程的进行发生改变, 并且原核微生物群落在每个时间点之间均有显著差异, 而真核微生物群落仅在10d后出现显著差异。细菌群落的多样性和组成受到环境因素的影响^[20], 在本研究中细菌群落的主要影响因素为水温, 台风及大雨搅动了池塘底质并同步降低了水体温度, 可能是导致细菌群落多样性发生改变, 但其种群丰富度未明显改变的原因。研究表明台风过境时会引发细菌群落的反复演替, 且细菌群落的演替会受台风的强度和次数所影响^[4]。台风带来的强降雨不仅会使水体pH下降、水体盐度降低, 造成水体温度和盐度的分层, 还会使病原微生物大量繁殖^[43], 因此在台风期间要时刻关注病原菌的情况。而对浮游真核生物群落结构具有显著性影响的化学需氧量和活性磷酸盐, 可能由于台风登陆时大风暴雨搅动了底泥从而释放沉积质中的残饵碎屑, 导致了水体中有机质浓度升高, 从而促进浮游微藻生长, 尤其是硅藻的大量生长, 引起真核微生物群落组成发生改变。

4 结论

综上, 台风导致海水贝类养殖池塘中浮游生物群落发生显著且不可逆的改变, 主要表现为: (1)群落多样性方面, 导致细菌群落多样性水平在5d内显著降低, 在10d后恢复至台风前水平, 而真核微生物则没有明显改变; (2)微生物群落组成方面, 细菌群落组成更快地发生显著性改变, 表现出较真核微生物更强的敏感性, 且两者均未能恢复至台风前群落组成。因此, 在海水池塘贝类养殖实践中, 应将台风后防灾重点措施主要放在防止养殖生物对环境剧变产生应激, 及时更换水体, 并适当补充用于环境调节的益生菌制剂, 以弥补台风造成的菌相改变可能带来的生态功能缺失。

参考文献:

- [1] Wang X, Wang W, Tong C. A review on impact of typhoons and hurricanes on coastal wetland ecosystems [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2016, 36(1): 23-29.
- [2] Jing X, Gou H, Gong Y, et al. Seasonal dynamics of the

- coastal bacterioplankton at intensive fish-farming areas of the Yellow Sea, China revealed by high-throughput sequencing [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2019(139): 366-375.
- [3] Zhang C. Simulation of responses of planktonic ecosystems to typhoons in the northern part of South China Sea [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010: 53-56. [张冲. 南海北部浮游生态系统对台风过程响应的模拟研究及影响因子的探讨 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010: 53-56.]
- [4] Jones S E, Chiu C Y, Kratz T K, *et al.* Typhoons initiate predictable change in aquatic bacterial communities [J]. *Limnology and Oceanography*, 2008, **53**(4): 1319-1326.
- [5] Li G, Wu Y, Gao K. Effects of Typhoon Kaemi on coastal phytoplankton assemblages in the South China Sea, with special reference to the effects of solar UV radiation [J]. *Journal of Geophysical Research*, 2009, **114**(G4): G04029.
- [6] Hu Y X, Jin L, Liu W, *et al.* Spatial distribution of eukaryotic plankton in the Lancang River basin and its diversity [J]. *Journal of Yangtze River Scientific Research Institute*, 2023, **40**(1): 60-66. [胡愈炘, 金磊, 刘威, 等. 澜沧江真核浮游生物的空间格局及其多样性 [J]. 长江科学院院报, 2023, **40**(1): 60-66.]
- [7] Chen H D. Population dynamics of parasites on grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) in salt-fresh water ponds and its relationship with ecological factors [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020: 2-3. [陈红雕. 咸淡水池塘草鱼寄生虫种群动态变化及其与生态因子的关系 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2020: 2-3.]
- [8] McManus M A, Woodson C B. Plankton distribution and ocean dispersal [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2012, **215**(6): 1008-1016.
- [9] Cai Z L, Qin M C, Zhao W, *et al.* Community structure and particle sizes of plankton in marine ponds with two polyculture models [J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2016, **31**(6): 663-672. [蔡志龙, 秦美川, 赵文, 等. 两种混养模式海水池塘浮游生物的群落结构及其粒径特征 [J]. 大连海洋大学学报, 2016, **31**(6): 663-672.]
- [10] Xu Z C, Deng Y F, Zhou J, *et al.* Structural and functional characteristics of microbial communities in aquaculture ponds of Chinese mitten crab *Eriocheir sisensis* L [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2021, **40**(7): 2223-2233. [许郑超, 邓燕飞, 周军, 等. 中华绒螯蟹养殖池塘菌群结构和功能特征 [J]. 生态学杂志, 2021, **40**(7): 2223-2233.]
- [11] Boutin S, Bernatchez L, Audet C, *et al.* Network analysis highlights complex interactions between pathogen, host and commensal microbiota [J]. *PLoS One*, 2013, **8**(12): e84772.
- [12] Zhang D, Wang X, Xiong J, *et al.* Bacterioplankton assemblages as biological indicators of shrimp health status [J]. *Ecological Indicators*, 2014(38): 218-224.
- [13] Tang C, Yi Y, Yang Z, *et al.* Planktonic indicators of trophic states for a shallow lake (Baiyangdian Lake, China) [J]. *Limnologia*, 2019(78): 125712.
- [14] Paerl H W, Dyble J, Moisander P H, *et al.* Microbial indicators of aquatic ecosystem change: current applications to eutrophication studies [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, **46**(3): 233-246.
- [15] Lin J, Li C, Zhang S. Hydrodynamic effect of a large offshore mussel suspended aquaculture farm [J]. *Aquaculture*, 2016(451): 147-155.
- [16] Qi Z H, Shi R J, Yu Z H, *et al.* Review of influences of filter-feeding bivalves aquaculture on planktonic community [J]. *South China Fisheries Science*, 2021, **17**(3): 115-121. [齐占会, 史荣君, 于宗赫, 等. 滤食性贝类养殖对浮游生物的影响研究进展 [J]. 南方水产科学, 2021, **17**(3): 115-121.]
- [17] Ma J X, Zhang P Y, Wang Z X, *et al.* Bacterial community structure diversity and environmental factors in the coastal shellfish culture area of Huangdao [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2022, **46**(6): 984-994. [马景雪, 张培玉, 王宗兴, 等. 黄岛近海岸贝类养殖区细菌群落结构多样性及与环境因子响应 [J]. 水产学报, 2022, **46**(6): 984-994.]
- [18] Jacobs P, Riegman R, Van der Meer J V. Impact of introduced juvenile mussel cultures on the pelagic ecosystem of the western Wadden Sea, The Netherlands [J]. *Aquaculture Environment Interactions*, 2016(8): 553-566.
- [19] Lucas L V, Cloern J E, Thompson J K, *et al.* Bivalve grazing can shape phytoplankton communities [J]. *Frontiers in Marine Science*, 2016(3): 3-14.
- [20] Feng X Q, Liu S Q, Han A X, *et al.* Effects of typhoon Lekima on microbial communities and antibiotic resistance genes in urban freshwater systems [J]. *Microbiology China*, 2022, **49**(7): 2428-2441. [丰新倩, 刘书绮, 韩阿祥, 等. 台风利奇马对城市淡水系统中微生物群落和抗生素耐药性基因的影响 [J]. 微生物学通报, 2022, **49**(7): 2428-2441.]
- [21] Mao Y, Sun J, Guo C, *et al.* Effects of typhoon Roke and Haitang on phytoplankton community structure in northeastern South China Sea [J]. *Ecosystem Health and Sustainability*, 2019, **5**(1): 144-154.
- [22] Tseng C H, Chiang P W, Shiah F K, *et al.* Microbial and viral metagenomes of a subtropical freshwater reservoir subject to climatic disturbances [J]. *The ISME Journal*, 2013, **7**(12): 2374-2386.
- [23] Jiang T, Liu L, Li Y, *et al.* Occurrence of marine algal toxins in oyster and phytoplankton samples in Daya Bay, South China Sea [J]. *Chemosphere*, 2017(183): 80-88.
- [24] Chung C C, Gong G C, Hung C C. Effect of Typhoon Morakot on microphytoplankton population dynamics in the subtropical Northwest Pacific [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2012, **448**: 39-49.
- [25] Qiao L, Yu J, Li Y, *et al.* Characteristics of eukaryotic nanoplankton community in the scallop culture area of

- Rongcheng by illumina sequencing [J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2018, **48**(2): 64-72. [乔玲, 于杰, 李迎, 等. 基于高通量测序分析的荣成扇贝养殖区微型浮游生物群落结构研究 [J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2018, **48**(2): 64-72.]
- [26] Gupta R S. The phylogeny of proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, **24**(4): 367-402.
- [27] Zhang Y J, Li K, Zhu H R, *et al.* Community structure of microorganisms and its seasonal variation in Beihai Lake [J]. *Environmental Science*, 2017, **38**(8): 3319-3329. [张雅洁, 李珂, 朱浩然, 等. 北海湖微生物群落结构随季节变化特征 [J]. 环境科学, 2017, **38**(8): 3319-3329.]
- [28] Martins P, Cleary D F R, Pires A C C, *et al.* Molecular analysis of bacterial communities and detection of potential pathogens in a recirculating aquaculture system for *Scophthalmus maximus* and *Solea senegalensis* [J]. *PLoS One*, 2013, **8**(11): e80847.
- [29] Chen Z, Chang Z Q, Zhang L, *et al.* Effects of water recirculation rate on the microbial community and water quality in relation to the growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. *BMC Microbiology*, 2019, **19**(1): 192.
- [30] Luo J F, Liao Y Y, Li S D, *et al.* Influence of temperature on microbial community structure in a *Scylla paramamosain* recirculating aquaculture system [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, **27**(4): 393-405. [罗金飞, 廖永岩, 李书迪, 等. 温度对拟穴青蟹循环水养殖系统微生物群落结构的影响 [J]. 中国水产科学, 2020, **27**(4): 393-405.]
- [31] Wang F F. Dynamic changes of bacterial community in shellfish culture and the immune function of CARD-containing protein in oyster *Crassostrea gigas* [D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2018: 35-37. [王飞飞. 贝类养殖水域细菌群落动态变化特征及长牡蛎含CARD基因免疫功能的初步研究 [D]. 大连: 大连海洋大学, 2018: 35-37.]
- [32] Stach E M, Bull A T. Estimating and comparing the diversity of marine Actinobacteria [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2005, **87**(1): 3-9.
- [33] Wang X F, Liu W C, Fan L P, *et al.* Bacterial community structure and its relationship with environmental factors in the purification channel of aquaculture tailwater in Tiaozini reclamation area [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2023, **32**(1): 150-162. [王雪峰, 刘文畅, 樊利鹏, 等. 条子泥垦区养殖尾水净化渠道的细菌群落结构及其与环境因子的关系 [J]. 上海海洋大学学报, 2023, **32**(1): 150-162.]
- [34] Wang Y J. Nitrification process control and anammox process performance and their microbial characteristics [D]. Shenyang: Northeastern University, 2017: 69-70. [王宇佳. 亚硝化过程控制与厌氧氨氧化工艺运行及其微生物特性 [D]. 沈阳: 东北大学, 2017: 69-70.]
- [35] Deng F, Yan Q P, Huang W Q, *et al.* Bacterial composition in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) culture water [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, **21**(6): 1277-1288. [邓霏, 鄢庆彬, 黄伟卿, 等. 大黄鱼网箱养殖水体的细菌群落结构 [J]. 中国水产科学, 2014, **21**(6): 1277-1288.]
- [36] Sun X X, Guo S J, Liu M T, *et al.* Research progress on phytoplankton and zooplankton ecology in indo-Pacific convergence region [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2021, **52**(2): 323-331. [孙晓霞, 郭术津, 刘梦坛, 等. 印太交汇区浮游植物和浮游动物生态学研究进展 [J]. 海洋与湖沼, 2021, **52**(2): 323-331.]
- [37] Cione J J, Uhlhorn E W. Sea surface temperature variability in hurricanes: implications with respect to intensity change [J]. *Monthly Weather Review*, 2003, **131**(8): 1783-1796.
- [38] Tsuchiya K, Kuwahara V S, Yoshiki T, *et al.* Phytoplankton community response and succession in relation to typhoon passages in the coastal waters of Japan [J]. *Journal of Plankton Research*, 2014, **36**(2): 424-438.
- [39] Jiang T, Wu G, Niu P, *et al.* Short-term changes in algal blooms and phytoplankton community after the passage of Super Typhoon Lekima in a temperate and inner sea (Bohai Sea) in China [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022(232): 113223.
- [40] Sun X M, Liu S P, Duan X B, *et al.* Plankton community structure and its relationship with environmental factors in the middle reaches of the Yangtze River [J]. *Freshwater Fisheries*, 2021, **51**(3): 3-12. [孙晓梅, 刘绍平, 段辛斌, 等. 长江中游江段浮游生物群落结构及其与环境因子的关系 [J]. 淡水渔业, 2021, **51**(3): 3-12.]
- [41] Li Z, Huo T B, Tang F J, *et al.* The relationship between community structure of plankton and environmental factors in ice-covered water in Harbin section of Songhua River [J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2014, **27**(6): 44-50. [李喆, 霍堂斌, 唐富江, 等. 松花江哈尔滨段冰下浮游生物群落结构与环境因子的相关分析 [J]. 水产学杂志, 2014, **27**(6): 44-50.]
- [42] Sun L K, Yang T, Wan X H, *et al.* Phytoplankton community structure and its relationship with environmental factors in Xi'an urban rivers system [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2023, **47**(4): 543-555. [孙来康, 杨涛, 万旭昊, 等. 西安城市河流浮游植物群落结构及其与环境因子的关系 [J]. 水生生物学报, 2023, **47**(4): 543-555.]
- [43] Hu X J, Li Z J, Cao Y C, *et al.* Influence of heavy rain on microbial community in *Litopenaeus vannamei* culture ponds in western Guangdong Province [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, **17**(5): 987-995. [胡晓娟, 李卓佳, 曹煜成, 等. 强降雨对粤西凡纳滨对虾养殖池塘微生物群落的影响 [J]. 中国水产科学, 2010, **17**(5): 987-995.]

IMPACT OF TYPHOON LEKIMA ON PLANKTON COMMUNITY IN SHELLFISH MARICULTURE POND

WEI Jun-Cheng^{1,2}, ZHANG Xiang², CAI Yi-Long², CAI Jing-Bo² and XIAO Guo-Qiang^{1,2}

(1. Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China; 2. Zhejiang Key Laboratory of Exploitation and Preservation of Coastal Bioresource; Wenzhou Key Laboratory of Marine Biological Genetics and Breeding, Zhejiang Mariculture Research Institute, Wenzhou 325005, China)

Abstract: In order to reveal the changes of plankton community structure during shellfish culture in seawater ponds before and after typhoon, 16S and 18S rRNA genes in the genomic DNA of aquaculture water environment were analyzed by high-throughput sequencing and bioinformatics. The results showed that the number of OTU in prokaryotes (28728) was significantly higher than that in eukaryotes (8498), and the dominant groups of prokaryotes were Proteobacteria, Cyanobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria and Chlorobi; the dominant groups of eukaryotes are ciliates, flagellates, protozoa, cup whipworms, cryptalgae, Phaeoflagellates, diatoms, etc., among which the diatom abundance increased significantly after typhoon ($P<0.05$). After the typhoon, biodiversity of eukaryotes did not change significantly, meanwhile the Shannon index and Simpson index of prokaryotes showed significant differences ($P<0.05$), which decreased in 5d and then increased with time, while the OTU number and Chao I index did not change significantly. The PCoA showed that the community structure of prokaryotic and eukaryotic organisms changed markedly after typhoon. ANOSIM showed that prokaryotic microbial communities were significantly different at each time point ($P<0.05$), while eukaryotic microbial communities significantly in 10d ($P<0.05$). Water temperature had a significant impact on prokaryotic community structure ($P<0.05$), while eukaryotic community was influenced by chemical oxygen demand and phosphat ($P<0.05$). The study suggested that after the typhoon disturbance, plankton communities markedly changed, prokaryotes was more sensitive than the eukaryotes. The diversity level of bacterial community decreased significantly at first, then returned to the level before typhoon, showing stronger sensitivity than that of eukaryote, and both of them failed to return to the community composition before typhoon. Therefore, the key measures to deal with the impact of typhoon in shellfish culture in seawater ponds should be mainly to prevent cultured organisms from causing stress to the drastic environmental changes, and to supply probiotics for environmental regulation appropriately, so as to make up for the loss of ecological functions possibly caused by the change of bacteria phase caused by typhoon.

Key words: Plankton community; Shellfish pond; High-throughput sequencing; 16S rRNA; 18S rRNA