

厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)养殖海域与天然生长海域的微生物群落比较研究*

李斯远¹ 何治江¹ 吕泓玥¹ 汤秋晗¹ 廖智¹
王健鑫¹ 严小军^{1, 2①} 张晓林^{1, 2①}

(1. 浙江海洋大学海洋科学与技术学院 舟山 316022; 2. 浙江海洋大学 国家海洋设施养殖工程技术研究中心 舟山 316022)

摘要 为研究厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)生长海域微生物群落的结构与多样性特征,初步探究海域微生物群落及共生菌对贻贝生长的影响,分别采集舟山市东极镇庙子湖岛和嵊泗县枸杞岛厚壳贻贝养殖区和野生生长区海水样品,利用 16S rRNA 扩增子测序技术,比较分析不同海域微生物群落的组成及丰度特征以及微生物群落的差异;同时对厚壳贻贝体内的微生物进行了初步的分离鉴定。研究结果显示,嵊泗厚壳贻贝野生生长海域 10 m 水深的微生物丰富度显著大于 5 m 水深,东极厚壳贻贝养殖区海域 10 m 水深微生物丰富度也而明显大于 5 m 水深。东极和嵊泗厚壳贻贝的生长海域形成了较为稳定微生物群落结构,嵊泗海域主要优势菌群为十八杆菌属 *Octadecabacter*、假交替单胞菌属 *Pseudoalteromonas*、厌氧氨氧化菌属 *Candidatus_Portiera*、沉积物陆丹氏菌属 *Loktanella* 和弧菌 *Vibrio*;东极海域主要优势菌群为厌氧氨氧化菌属 *Candidatus_Portiera*、海洋氨氧化古菌属 *Nitrosopumilus*、蓝细菌聚球藻属 *Synechococcus* 和弧菌属 *Vibrio*。PCA 分析结果表明东极和嵊泗两个海域的厚壳贻贝野生生长区的微生物群落相似度明显低于养殖区的微生物群落相似度,且这种差异在嵊泗海域尤为明显。同时在贻贝体内分离出了假交替单胞菌、黏着杆菌以及弧菌,而这三种菌在海水样品中也大量存在,由此可初步判定这三类细菌能够随水流进入贻贝体内,并可能对贻贝的附着、生长以及防病等生理功能产生一定的影响。

关键词 16S rRNA; 厚壳贻贝; 生长海域; 微生物群落

中图分类号 Q938.2 **doi:** 10.11693/hyhz20200700217

厚壳贻贝 *Mytilus coruscus* 属软体动物门 Mollusca、双壳纲 Bivalvia、异柱目 Anisomyaria、贻贝科 Mytilidae、贻贝属 *Mytilus*(叶莹莹等, 2011), 俗称淡菜, 为温水性种, 主要分布在我国黄海、渤海和东海沿岸, 以浙江沿海资源量最大。厚壳贻贝具有肉质鲜美、营养丰富、蛋白质含量高、生长繁殖快、抗病能力强、易于人工养殖等诸多优点, 是浙江舟山海域具有重

要经济价值的养殖贝类之一(徐晴晴等, 2018)。目前厚壳贻贝主要养殖区域为浙江嵊泗海域和东极海域。厚壳贻贝在养殖过程中, 对于海域环境中的藻类和微生物多样性具有较强的依赖性; 一方面, 藻类是贻贝的主要食物来源(朱雨瑞等, 2010), 另一方面, 贻贝在养殖过程中对海域微生物群落具有特异的富集作用(陈瑜等, 2016), 但目前尚不清楚微生物群落对

* 浙江省属高校基本科研业务费(一般), 2019J00041 号; 舟山市科技项目, 2019F12004 号; 国家自然科学基金国际(地区)合作与交流项目, 42020104009 号; 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”重点专项, 2019YFD0901305 号。李斯远, 硕士研究生, E-mail: 250095114@qq.com

通信作者: 张晓林, 博士, 助理研究员; E-mail: zhangxiaolin@zjou.edu.cn; 严小军, 教授, 博士生导师, E-mail: yanxj@zjou.edu.cn

收稿日期: 2020-07-22, 收修改稿日期: 2020-09-11

贻贝的养殖具有哪些影响。

但近年来,随着厚壳贻贝的养殖区域的不断扩展和养殖密度逐渐增加,其养殖过程显现种种问题,例如贻贝个体的肥满度下降,生长速度下降,贻贝逃苗和病害也时有发生(林永添,2007)。有研究显示,微生物群落变化能够影响贻贝的附着和防病(杨娜,2018;梁箫等,2020)。国内外已有针对不同贝类生长区海域浮游群落的调查研究(陈雷等,2013;尹洁慧,2013;金雷等,2015; Fogel *et al.*, 2015),但其主要焦点集中于海域中浮游植物的种类和丰度对贝类摄食以及营养价值的影响。关于海域微生物群落与贻贝生长过程以及生理生化的影响尚未见报道。厚壳贻贝作为我国东部海域最重要的养殖贝类之一,其生存环境的微生物群落调查以及与其体内微生物群落的对比分析将对贻贝养殖具有重要研究意义。为此,本文将针对厚壳贻贝生长海域的微生物群落结构特征及其体内微生物组成开展研究,以期为厚壳贻贝的健康、生态养殖提供重要的理论依据。

本研究主要以厚壳贻贝为对象,首先将调查嵊泗县枸杞岛和东极镇庙子湖岛厚壳贻贝养殖区和野生区海域的微生物群落的结构特征,并与厚壳贻贝

体内分离到的微生物组成情况相结合进行比较分析,以探明厚壳贻贝生长海域的微生物群落分布特征以及养殖和野生生长海域的微生物组成差异。本论文的研究结果一方面能够为厚壳贻贝的人工养殖和野生驯化的海域选择提供强有力的参考,另一方面可以维持海域微生物群落的动态平衡,促进贝类养殖产业的健康、可持续发展。

1 材料与方法

1.1 厚壳贻贝生存海域的海水微生物群落分析

1.1.1 实验材料 于2019年5—6月,选择嵊泗县枸杞岛(30°42'N, 122°46'E)厚壳贻贝养殖区海域 5、10 m 水深和厚壳贻贝野生生长区海域 5、10 m 水深;东极镇庙子湖岛(30°11'N, 122°41'E)厚壳贻贝养殖海域 5、10 m 水深和厚壳贻贝野生生长区海域 5、10 m 水深,共计 8 个点位,具体采样位置见图 1。在调查期间,每个点位采集 3 个平行海水样本,送往实验室经静置沉淀并过滤后进行 16S rRNA 扩增子测序。

1.1.2 实验方法 取质量合格的基因组 DNA 样品 30 ng 及对应的融合引物配置 PCR 反应体系,设置 PCR 反应参数进行 PCR 扩增,使用 Agencourt

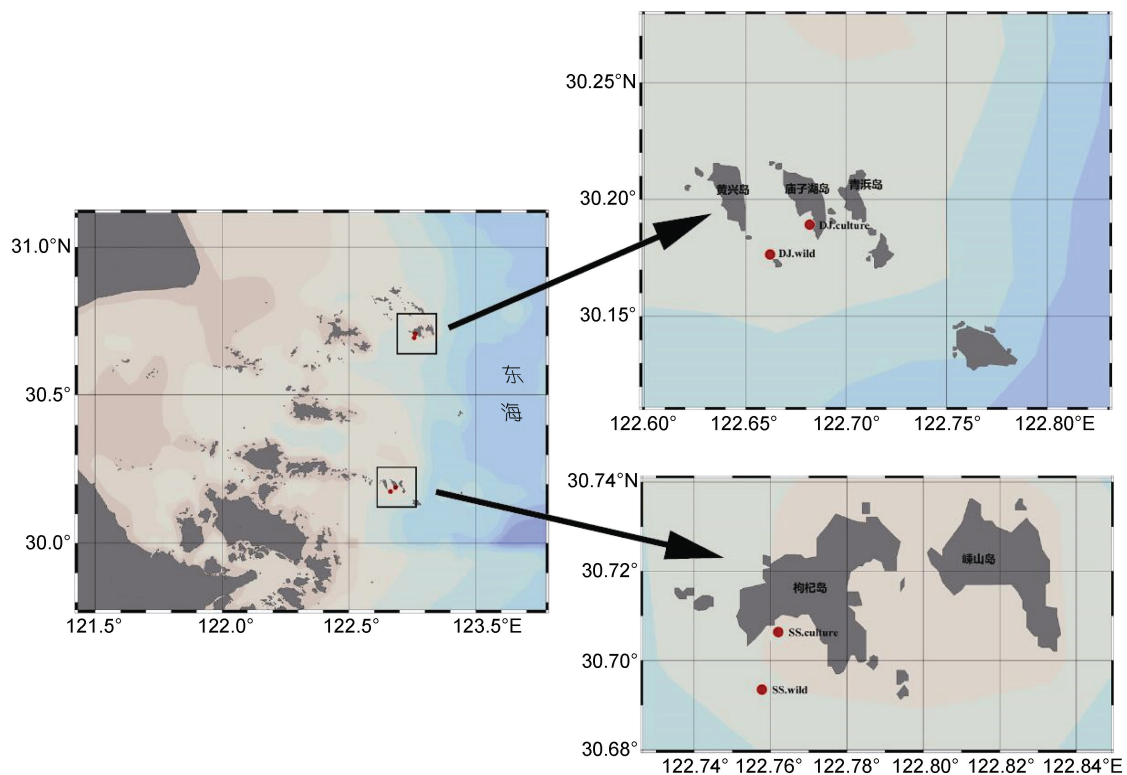


图 1 枸杞岛(右下)和东极岛(右上)厚壳贻贝养殖和野生生长海域采样站位图

Fig.1 Location of the sampling points for *M. coruscus* in natural and cultured regions in Gouqi Island (lower right) and Dongji Island (upper right)

AMPure XP 磁珠对 PCR 扩增产物进行纯化, 并溶于 Elution Buffer, 贴上标签, 完成建库。使用 Agilent2100 Bioanalyzer 对文库的片段范围及浓度进行检测。检测合格的文库根据插入片段大小, 选择 HiSeq 平台进行测序。然后对所有样品的全部序列进行聚类, 以 97% 的相似度将序列聚类成 OTU, 然后对 OTU 的代表序列进行物种注释, 确定 16S rRNA 序列对应的微生物名称(赵立君等, 2019)。

1.1.3 生物信息学分析 下机数据过滤, 剩余高质量的 Clean data 用于后期分析(Magoc *et al*, 2011); 通过 reads 之间的 overlap 关系将 reads 拼接成 Tags; 将 Tags 聚类成 OTU 并与数据库比对、物种注释; 基于 OTU 和注释结果进行样品物种复杂度分析, 组间物种差异分析等。再利用 UCHIME(v 4.2.40)将 PCR 扩增产生的嵌合体从 OTU 代表序列中去除, 使用 usearch_global 方法将所有 Tags 比对回 OTU 代表序列(Wang *et al*, 2007), 对每个样品的 OTU 丰度、多样性指数等进行分析, 同时对物种注释在门分类水平上进行群落结构的统计分析。在以上分析的基础上, 进行基于 OTU 的主成分分析(PCA)。

1.2 厚壳贻贝体内组织微生物分离与鉴定

1.2.1 培养基制备 第一类分离选用 2216E 普通海水培养基。为还原贻贝组织的营养成分, 尽可能分离到贻贝体内全部种类的微生物, 选取足量的厚壳贻贝全组织进行匀浆并过滤, 120°C、21 min 高温高压处理, 加入适量琼脂制备成厚壳贻贝肉汤培养基, 用于第二类分离。

1.2.2 微生物分离与筛选 选取来自同一生长环境的厚壳贻贝 10 只, 解剖取其鳃、性腺、消化腺、外套膜、足并用无菌海水轻轻冲洗去除组织表面杂质, 使用两种不同方式分离微生物: (1) 第一类分离针对贻贝组织表面附着的微生物, 用无菌棉签分别刮取不同组织的表面, 将棉签伸至于放有玻璃珠的三角瓶中并加入少量无菌海水, 常温振荡培养 1 h。(2) 第二类次分离针对可能在贻贝体内生长的微生物, 分别将上述 5 类组织匀浆后, 加入放有玻璃珠的三角瓶中, 常温振荡培养 1 h。两次分离都根据选用的不同组织分成 5 组, 每组 3 次重复。

取上述适量处理过的培养液接种到对应的培养基中, 28°C 过夜培养, 分别挑取不同细胞形态、大小、颜色的菌落至海水 LB 培养基上, 反复纯化三次。

1.2.3 微生物鉴定 使用试剂盒 (TaKaRa MiniBEST Bacteria Genomic DNA Extraction Kit)分

别提取筛选菌落的基因组 DNA, 选用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3')PCR 扩增 16S rDNA, PCR 产物送至生工生物工程(上海)有限公司进行进一步的分析和鉴定。

2 结果与分析

2.1 海水样品测序结果

如表 1、表 2 所示, 两个海域的所有样品优化后序列占优化前序列的 80% 以上, 因此可以很好地用于后续的进一步分析。

表 1 东极海域微生物群落 16S rRNA 扩增子测序序列结果优化对比

Tab.1 Comparison of microbes 16S rRNA sequencing in the Dongji sea area

样品名称	优化前序列数	优化后序列数	序列优化百分比
culture.10m	74974	60785	81.07%
culture.5m	74917	61905	82.63%
wild.10m	74949	60756	81.06%
wild.5m	74912	62122	82.93%

表 2 嵊泗海域微生物群落 16S rRNA 扩增子测序序列结果优化对比

Tab.2 Comparison of microbes 16S rRNA sequencing in the Shengsi sea area

样品名称	优化前序列数	优化后序列数	序列优化百分比
culture.10m	74937	61514	82.09%
culture.5m	74919	64847	86.56%
wild.10m	74902	61326	81.87%
wild.5m	74906	62122	82.93%

2.2 各海域微生物群落多样性特征

通过多样性指数可以对两个海域海水样品中微生物多样性进行分析。从表 3 可得, 东极海域海水样品有效序列共计 245568 条, 其中养殖区海域 10 m 水深样品包含 60785 条, OTU 数 674 个; 养殖区海域 5 m 水深样品包含 61905 条, OTU 数 616 个; 野生生长区海域 10 m 水深样品包含 60756 条, OTU 数 635 个; 野生生长区海域 5 m 水深样品包含 62122 条, OTU 数 535 个。

从表 4 可得, 嵊泗海域海水样品有效序列共计 249809 条, 其中养殖区海域 10 m 水深样品包含 61514 条, OTU 数 592 个; 养殖区海域 5 m 水深样品包含 64847 条, OTU 数 584 个; 野生生长区海域 10 m 水深样品包含 61326 条, OTU 数 623 个; 野生生长区海域 5 m 水深样品包含 62122 条, OTU 数 570 个。

综上可以得, 东极海域养殖区微生物(OTU 为

表 3 东极海域样品 OTU 数及多样性指数
Tab.3 The OTU and diversity index in the Dongji sea area

样品名称	有效序列	OTU 数	Sobs	Chao	Ace	Shannon	Simpson	Coverage
culture.10m	60785	674	674	754.70	758.30	4.35	0.0267	0.9988
culture.5m	61905	616	616	681.58	680.68	4.34	0.0254	0.9988
wild.10m	60756	635	635	638.10	701.45	4.43	0.0217	0.9988
wild.5m	62122	535	535	656.92	658.79	4.04	0.0386	0.9982

表 4 嵊泗海域样品 OTU 数及多样性指数
Tab.4 The OTU and diversity index in the Shengsi sea area

样品名称	有效序列	OTU 数	Sobs	Chao	Ace	Shannon	Simpson	Coverage
culture.10m	61514	592	592	631.30	648.59	4.32	0.0274	0.9986
culture.5m	64847	584	584	622.14	649.05	4.25	0.0324	0.9986
wild.10m	61326	623	623	648.71	657.24	4.36	0.0322	0.9989
wild.5m	62122	570	570	612.50	625.54	4.18	0.0348	0.9987

616—674)丰富度大于野生生长区微生物(OTU 为 535—635), 10 m 水深微生物(OTU 为 635—674)丰富度大于 5 m 水深微生物(OTU 为 535—616); 嵊泗海域野生生长区微生物(OTU 为 535—674)丰富度大于养殖区微生物(OTU 为 584—592), 10 m 水深微生物(OTU 为 592—623)丰富度大于 5 m 水深微生物(OTU 为 570—584)。嵊泗海域总体微生物(OTU 为 570—623)丰富度大于东极海域(OTU 为 535—674)。

本文通过包括 Sobs 指数、Chao 指数、ACE 指数、Shannon 指数、Simpson 指数以及 Good-coverage 指数的 Alpha 多样性来分析海水样品中微生物多样性差异(Schloss *et al.*, 2009)。Sobs 指数、Chao 指数和 ACE 指数反映样品中群落的丰富度, 而 Shannon 指数以及 Simpson 指数反映群落的多样性, Good-coverage 反映了样品文库的覆盖率。其中, Sobs 指数、Chao 指数和 ACE 指数和 Shannon 指数越大, Simpson 指数越小, 说明样品中的物种越丰富; Good-coverage 数值越高, 则表明样品中序列没有被测出来的概率越低, 该值反映了测序结果是否代表样品的真实情况, 所有样品的 Good-coverage 指数均在 0.998 以上, 因此本次测序结果代表了样本中微生物的真实情况。

由此可得, 东极海域不同采样点微生物丰富度及多样性由大到小分别为 culture.10m > wild.10m > culture.5m > wild.5m; 嵊泗海域不同采样点微生物丰富度及多样性由大到小分别为 wild.10m > culture.10m > culture.5m > wild.5m。

Core-Pan OTU 以花瓣图展示所有样本共有和特有的 OTU, 分析数据与维恩图相同, 但相比于维恩图只展示 5 组(或 5 个样品)以内的数据, 花瓣图可以

展示任意组(或样品), 因此可以尽可能多的展示组间 OTU 的异同。

从图 2 可知, 东极海域样品微生物 OTU 数为 440—473, 共有 OTU 达到 436, 说明东极海域总体上微生物组成相似度较高, 养殖区海域 10 m 水深特有 OTU 最高, 达到 37; 野生生长区 5 m 水深特有 OTU 最低, 仅达到 4。从图 3 可知, 嵊泗海域样品微生物 OTU 数为 455—473, 共有 OTU 达到 439, 说明嵊泗海域总体上微生物组成相似度也较高, 野生生长区海域 10m 水深特有 OTU 最高, 达到 34; 养殖区海域特有 OTU 均最低, 仅达到 16。

2.3 各海域微生物群落门分类水平组成分析

物种柱状图可以直观地展示各样本物种组成及比例, 反映样本间物种的变化情况。通过与数据库进行比对, 对 OTU 进行物种分类, 本文选取在门分类水平上(物种丰富度均大于 0.5%)对各样品所作的物种丰度柱状图。

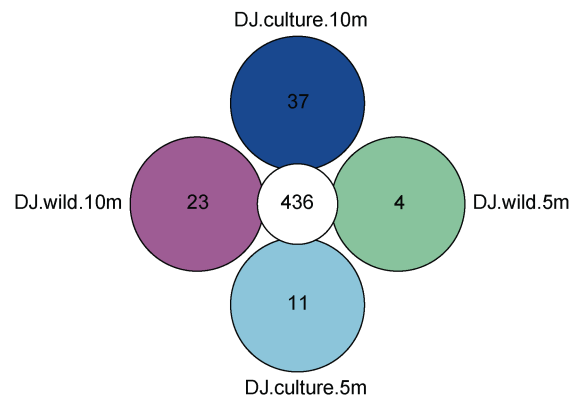


图 2 东极海域样品 OTU 分布 Core-Pan 图

Fig.2 The Core-pan diagram of OTU distribution in the Dongji sea area

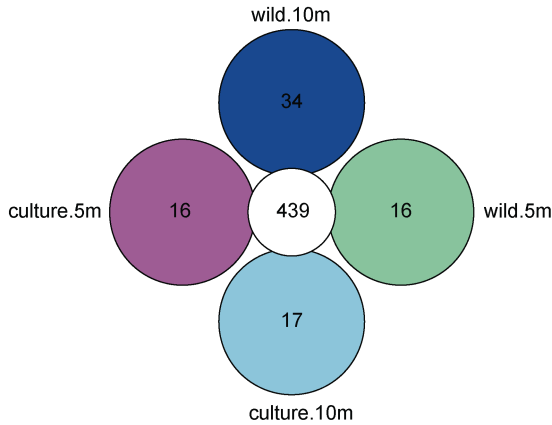


图 3 嵊泗海域样品 OTU 分布 Core-Pan 图

Fig.3 The Core-pan diagram of OTU distribution in the Shengsi sea area

从图 4 可知, 东极海域主要包含变形菌门 Proteobacteria、拟杆菌门 Bacteroidetes、广古菌门 Euryarchaeota、放线菌门 Actinobacteria、泉古菌门 Crenarchaeota 等在内的 30 个门类, 其中变形菌门是四个采样点的最大优势门类, 其在野生生长区 10 m 水深、野生生长区 5 m 水深、养殖区 10 m 水深、养殖区 5 m 水深的百分比分别为 37.58%、28.53%、36.26%、37.13%, 拟杆菌门(19.72%—26.41%)、放线菌门(9.23%—20.86%)是东极海域第二、第三优势细菌门, 这三大优势细菌门类占据东极海域细菌比例的 60%以上。

此外, 东极养殖区海域和野生生长区海域微生物门类无明显差异, 但可明显得知野生生长区海域各类优势细菌门所占比例大于养殖区海域各类优势

细菌门所占比例。

从图 4 可知, 东极海域主要包含变形菌门 Proteobacteria、拟杆菌门 Bacteroidetes、广古菌门 Euryarchaeota、放线菌门 Actinobacteria、泉古菌门 Crenarchaeota 等在内的 27 个门类, 其中变形菌门是四个采样点的最大优势门类, 其在野生生长区 10 m 水深, 野生生长区 5 m 水深, 养殖区 10 m 水深, 养殖区 5 m 水深的百分比分别为 51.48%、54.66%、61.88%、60.46%, 拟杆菌门(17.48%—19.72%), 放线菌门(9.08%—11.99%)是嵊泗海域第二、第三优势细菌门, 这三大优势细菌门类占据东极海域细菌比例的 80%以上。

同样, 嵊泗养殖区海域和野生生长区海域微生物门类无明显差异, 但可明显得知野生生长区海域各类优势细菌门所占比例大于养殖区海域各类优势细菌门所占比例。

综合图 4、图 5 可知, 东极海域总体微生物丰富度要大于嵊泗海域, 但是在同样优势菌门的条件下, 嵊泗海域各类优势菌门所占的微生物总比例远高于东极海域的各类优势菌门。

2.4 各海域微生物群落属分类水平组成分析

从图 6 可知, 东极海域主要包含厌氧氨氧化菌属 *Candidatus Portiera* (5.57%—8.03%), 海洋氨氧化古菌属 *Nitrosopumilus* (5.27%—6.94%), *Fluviicola* (4.21%—6.34%), 蓝细菌聚球藻属 *Synechococcus* (1.82%—3.09%), 弧菌属 *Vibrio* (0.33%—2.50%)等在内的 9 个属类。从表 5 可知, 东极海域厚壳贻贝养殖区和野生生长区属分类水平微生物丰度之间的比较无明显规律。

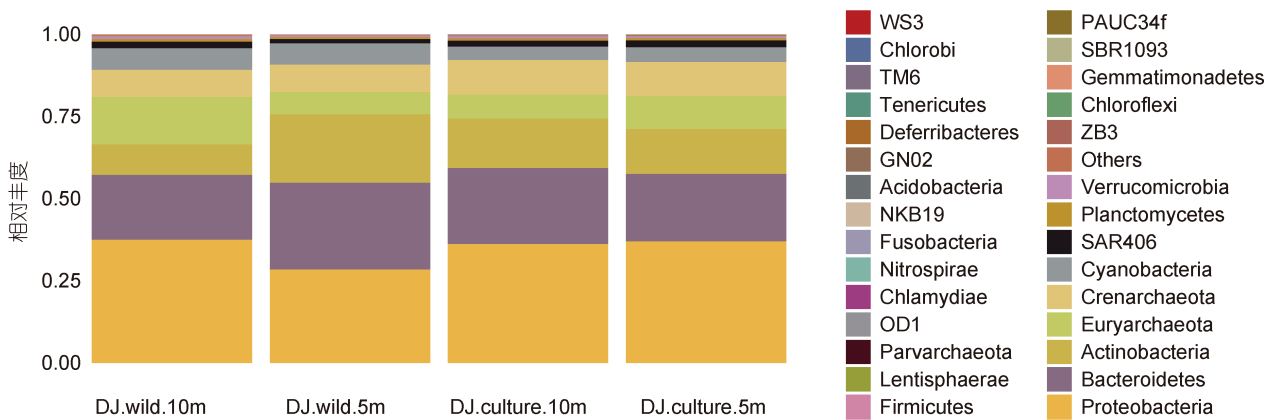


图 4 东极海域微生物门分类水平物种丰度柱状图

Fig.4 The phylum abundance in the Dongji sea area

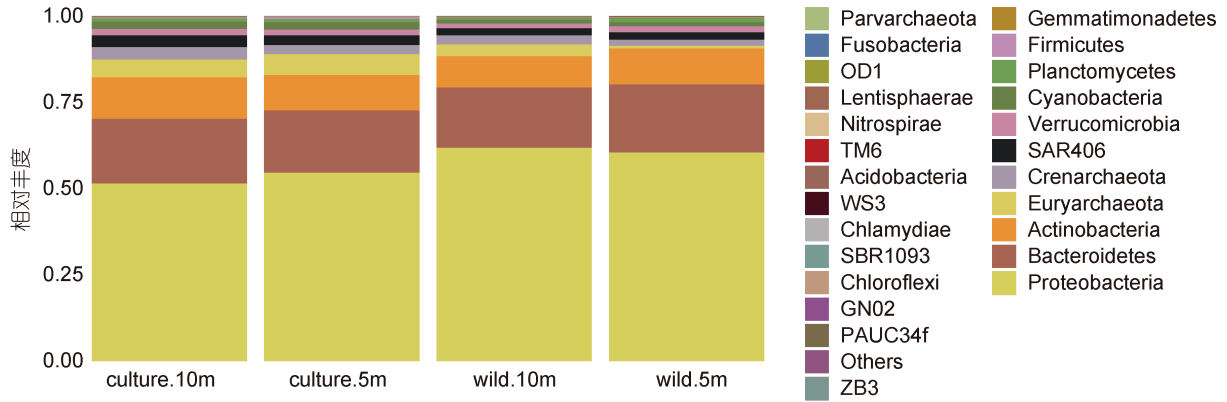


图 5 嵊泗海域微生物门分类水平物种丰度柱状图

Fig.5 The phylum abundance in the Shengsi sea area

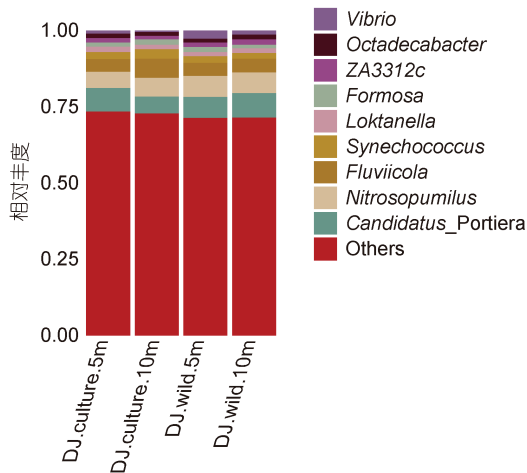


图 6 东极海域微生物属分类水平物种丰度柱状图

Fig.6 The genus abundance in the Dongji sea area

从图 7 可知, 嵊泗海域主要包含十八杆菌属 *Octadecabacter* (10.80%—15.04%), 假交替单胞菌属 *Pseudoalteromonas* (2.41%—8.77%), 厌氧氨氧化菌属 *Candidatus_Portiera* (3.57%—6.69%), *ZA3312c*

(1.80%—3.21%), 沉积物陆丹氏菌属 *Loktanella* (3.26%—4.29%), 弧菌属 *Vibrio* (0.21%—6.36%)等在内的 13 个属类。

从表 6 可知, 嵊泗海域厚壳贻贝养殖区和野生生长区属分类水平微生物丰度之间可观察到明显的规律, 总体上养殖区海域各类优势属微生物丰度大于野生生长区海域。

2.5 各海域微生物群落相似度分析

本文采用主成分(PCA)分析, 通过分析不同样品在图上的分散和聚集的情况, 根据离散程度可以了解不同样品的组成是否具有相似性(Jolliffe, 1986; Avershina *et al*, 2013)。从图 8 可知: 轴 1 (PC1)贡献值为 72.72%, 轴 2 (PC2)贡献值为 13.13%, 总贡献值为 85.85%。从整体上来看, 东极和嵊泗海域之间的微生物群落存在明显差异, 两个海域的野生生长区 5 m 和 10 m 之间的微生物群落相似度明显低于养殖区 5 m 和 10 m 的微生物群落相似度, 而这种差异在嵊泗海域尤为明显。

表 5 东极海域微生物群落 16S rRNA 扩增子测序属分类水平微生物群落结构表

Tab.5 The community structure in genus level in the Dongji sea area

Taxon 分类	wild.10m	wild.5m	culture.10m	culture.5m
<i>Candidatus_Portiera</i>	0.077605504	0.055680757	0.067911491	0.080268153
<i>Nitrosopumilus</i>	0.052686154	0.060896301	0.069392120	0.067845893
<i>Fluviicola</i>	0.042102838	0.063407488	0.042905322	0.044875212
<i>Synechococcus</i>	0.022977155	0.030874730	0.021107181	0.018140699
<i>Loktanella</i>	0.018105208	0.015051029	0.013868553	0.016444552
<i>ZA3312c</i>	0.014698137	0.011396929	0.014526610	0.017381472
<i>Vibrio</i>	0.008460070	0.003332153	0.025055524	0.011873031

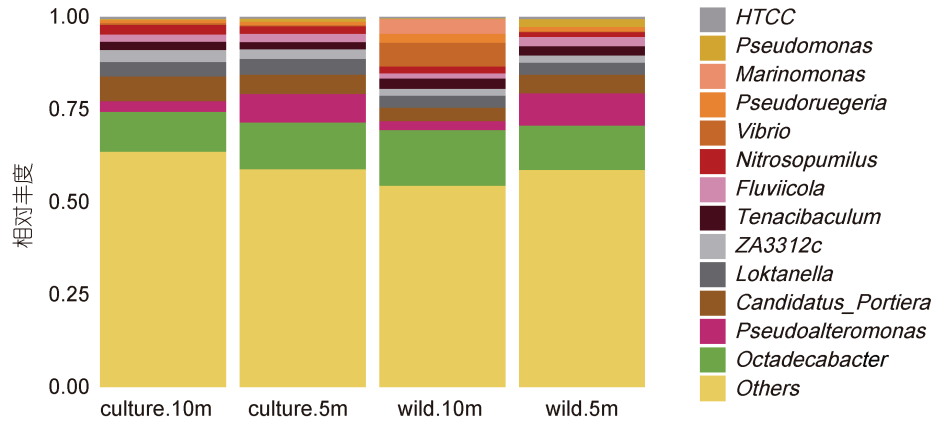


图 7 嵊泗海域微生物属分类水平物种丰度柱状图
Fig.7 The genus abundance in the Shengsi sea area

表 6 嵊泗海域属分类水平微生物群落结构表
Tab.6 The community structure in genus level in the Shengsi sea area

Taxon 分类	wild.10m	wild.5m	culture.10m	culture.5m
<i>Octadecabacter</i>	0.150388529	0.120236865	0.107963996	0.126734490
<i>Candidatus_Portiera</i>	0.035422831	0.049300662	0.066888432	0.051930073
<i>Loktanella</i>	0.032935592	0.032568970	0.039053582	0.042899456
<i>ZA3312c</i>	0.018028416	0.019769612	0.032074487	0.026077718
<i>Pseudoalteromonas</i>	0.024124590	0.087667895	0.028748002	0.076848781
<i>Nitrosopumilus</i>	0.018841239	0.012830200	0.025551968	0.019880236
<i>Vibrio</i>	0.063611536	0.002143507	0.004565763	0.002865330

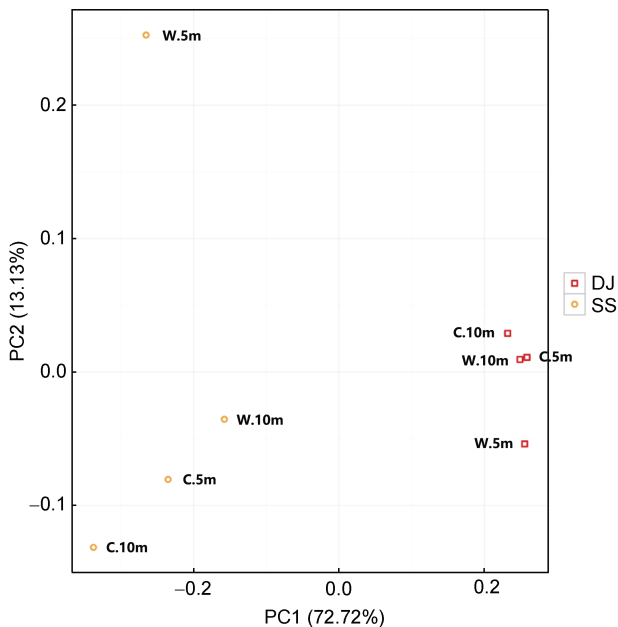


图 8 各海域样品 PCA 分析图
Fig.8 The PCA analysis diagram of sea area samples

2.6 厚壳贻贝体内分离微生物组成分析

由表 7 可知, 从厚壳贻贝的鳃、性腺、足、消化

腺中均分离出微生物, 主要包括: 黏着杆菌属 *Tenacibaculum* sp., 蜡样芽孢杆菌属 *Bacillus cereus*, 红色杆菌属 *Erythrobacter* sp., 鲁杰氏菌属 *Ruegeria* sp., 弧菌属 *Vibrio* sp., 巨型弧菌属 *Vibrio gigantis*, 假交替单胞菌属 *Pseudoalteromonas* 这 7 类菌属。

结合上文图 7 可发现, 在厚壳贻贝生长海域水体中检测分析得到的假交替单胞菌属 *Pseudoalteromonas*, 黏着杆菌属 *Tenacibaculum* sp. 以及弧菌属 *Vibrio* sp. 均在厚壳贻贝体内组织中检测到, 且这三类菌属都出现于厚壳贻贝的鳃组织中。

3 讨论

3.1 厚壳贻贝养殖环境及其体内微生物群落多样性分析

嵊泗海域总体微生物丰富度大于东极海域。嵊泗海域不同采样点微生物丰富度由大到小分别为 wild.10m > culture.10m > culture.5m > wild.5m, 其中嵊泗海域野生生长区 10 m 水深微生物丰富度最高, 野生生长区 5 m 水深微生物丰富度最低; 东极海域不同采样点微生物丰富度由大到小分别为 culture.10m

表 7 厚壳贻贝体内分离微生物组成表
Tab.7 The microbial composition inside the *Mytilus coruscus*

分离方式	分离组织	菌属名	相似度(%)	覆盖度(%)
第一类	鳃、消化腺	弧菌 <i>Vibrio</i> sp.	99.79	99
	鳃	蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	99.86	97
	鳃、性腺	红色杆菌 <i>Erythrobacter</i> sp.	99.71	99
	足、消化腺	鲁杰氏菌 <i>Ruegeria</i> sp.	99.71	99
第二类	鳃、性腺	弧菌 <i>Vibrio</i> sp.	100.00	99
	消化腺	巨型弧菌 <i>Vibrio gigantis</i>	99.93	100
	鳃、性腺	蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	99.66	99
	鳃	假交替单胞菌 <i>Pseudoalteromonas</i>	99.58	98

> wild.10m > culture.5m > wild.5m, 东极海域养殖区 10 m 水深微生物丰富度最高, 野生生长区 10 m 水深微生物丰富度最低。

从属分类水平来看, 东极海域的优势微生物群落主要为厌氧氨氧化菌属 *Candidatus_Portiera*、海洋氨氧化古菌属 *Nitrosopumilus*、*Fluviicola*、蓝细菌聚球藻属 *Synechococcus* 以及弧菌属 *Vibrio*; 嵊泗海域的优势微生物群落主要为十八杆菌属 *Octadecabacter*、假交替单胞菌属 *Pseudoalteromonas*、厌氧氨氧化菌属 *Candidatus_Portiera*、*ZA3312c*、沉积物陆丹氏菌属 *Loktanella* 以及弧菌属 *Vibrio*。

总体上, 东极海域 4 个取样点的微生物群落相似度比嵊泗海域高。由于受到厚壳贻贝长期选择性摄食的影响, 东极和嵊泗两个海域的野生生长区 5m 和 10m 之间的微生物群落相似度明显低于养殖区 5m 和 10m 的微生物群落相似度, 且这种差异在嵊泗海域尤为明显。这可能是受嵊泗近海海域厚壳贻贝的大面积养殖的影响。从已有的文献中可知(王芳等, 1998; 刘绪博, 2011; 周曦杰, 2014), 包括贻贝在内的许多双壳贝类有着选择性滤食的习性, 即这些贝类会优先选择摄食水体中的一类浮游生物, 因而导致该区域水体中浮游生物种类相对单一, 相似度较高。相比于嵊泗海域, 东极海域 4 个取样点的微生物群落相似度较高, 而东极近海海域厚壳贻贝的养殖规模远不如嵊泗海域大, 因此近海微生物群落受厚壳贻贝的摄食影响较小, 和野生生长区微生物群落相比, 相似度就更高。

Vezzulli 等人对位于意大利利古里亚海的地中海贻贝养殖场的水体微生物群落进行了分析, 发现弧菌属和假交替单胞菌属是该海域的主要优势微生物 (Vezzulli *et al.*, 2018), 这与本文嵊泗海域的主要优势微生物结果相一致。而东极海域也发现假交替单胞菌

这一种优势微生物, 同时也间接印证了东极海域的微生物丰富度不如嵊泗海域。

在厚壳贻贝生长海域以及厚壳贻贝体内组织都鉴定到了假交替单胞菌属 *Pseudoalteromonas*、黏着杆菌属 *Tenacibaculum* sp. 以及弧菌属 *Vibrio* sp. 这三类微生物, 初步推测厚壳贻贝和这些自然水域中存在的微生物产生了某种共生关系, 有报道说海洋双壳贝类会将某些环境中的细菌甚至是致病菌富集在鳃上, 以此到达帮助宿主摄食消化、阻止其他病原体侵入的作用, 这也是贻贝不易染病的原因之一 (Yu *et al.*, 2019)。相似的研究在紫贻贝中也有报道, 通过对土耳其伊兹密尔沿海生长的紫贻贝体内微生物进行宏基因组分析, 结果发现紫贻贝中也存在弧菌、变形杆菌、摩根氏菌等在内的 34 种菌属 (Bozcal *et al.*, 2020)。

3.2 贻贝及其共生微生物的独特适应性

无论是厚壳贻贝生长海域, 还是其体内均分离鉴定到大量弧菌。而之前的报道显示在紫贻贝体内也大量存在弧菌 (Bozcal *et al.*, 2020)。其中弧菌是水产养殖中常见的致病菌, 在紫贻贝和厚壳贻贝体内都存在大量的弧菌, 说明贻贝对弧菌具有特殊的适应性, 其特殊的适应机制和病原识别模式还有待于进一步研究。目前关于弧菌和宿主的共生已有一些研究, 例如有报道显示在海洋鱼类中, 弧菌会在进入宿主肠道系统后, 通过其 VI 型分泌系统分泌一些效应分子, 刺激宿主肠道产生收缩使得宿主肠道内原有的常驻菌群被迫排出, 最终弧菌在宿主肠道微生物群落中占据主导地位, 然而在这一肠道微生物群落更替变化中似乎并不会对宿主的健康产生损害, 弧菌本身似乎也不受肠道运动增强的影响 (Logan *et al.*, 2018); 而 Vezzulli 等人认为贻贝体内的弧菌与其宿主经历了一段较为漫长的共同进化史 (Vezzulli *et al.*, 2018); Septer 等人的研究表明, 夏威夷鲑鱼在孵化后的数个小时内

就会被费氏弧菌所感染,这种感染将逐渐演变成一种共生,并且持续至宿主的一生,而这种共生关系和夏威夷鱿鱼的发光器官有直接的联系(Septer, 2019)。

4 结论

总的来说,目前对于海洋双壳贝类共生菌的报道尚比较匮乏,其识别微生物的机理及共生机制尚不完全明确,本文从厚壳贻贝体内分离得到的微生物是否和厚壳贻贝发生了共生关系,亦或是对厚壳贻贝的某些生理功能产生影响等问题,还需进一步探索。

参 考 文 献

- 王 芳,董双林,范瑞青等,1998. 四种滤食性贝类滤食器官鳃的扫描电镜观察. 青岛海洋大学学报, 28(2): 240—244
- 尹洁慧, 2013. 獐子岛海域浮游动物群落时空变化特征及其与环境因子之间的关系. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士学位论文
- 叶莹莹,徐梅英,吴常文, 2011. 几种环境因子对厚壳贻贝浮游幼虫生长与存活的影响. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 30(4): 292—296
- 朱雨瑞,徐继林,严小军, 2010. 5种微藻对4种滩涂贝类稚贝生长的影响. 海洋学研究, 28(3): 60—66
- 刘绪博, 2011. 双壳贝类滤食对浮游植物——沉水植物种间关系的影响. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文
- 杨 娜, 2018. 厚壳贻贝肠道细菌群落组成及肠道细菌对稚贝附着的作用研究. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文
- 陈 瑜,金 雷,朱敬萍等, 2016. 双壳贝类微生物富集能力及环境水体对其影响分析. 山东化工, 45(17): 13—14, 17
- 陈 雷,许传才,刘海映等, 2013. 葫芦岛贝类养殖区浮游生物的群落结构和时空分布. 大连海洋大学学报, 28(2): 199—205
- 林永添, 2007. 紫贻贝(*Mytilus edulis* Linnaeus)大量死亡原因的初步研究. 现代渔业信息, 22(3): 26—28
- 金 雷,陈雪昌,陈 瑜等, 2015. 乐清湾滩涂养殖贝类微生物富集及海水净化研究. 安徽农业科学, 43(32): 80—81, 84
- 周曦杰, 2014. 枸杞岛典型生境螺贝类代表种——角蝶螺、紫贻贝摄食生态初步研究. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文
- 赵立君,刘云根,王 妍等, 2019. 砷污染湖滨湿地底泥微生物群落结构及多样性. 中国环境科学, 39(9): 3933—3940
- 徐晴晴,赵 晟, 2018. 海水盐度对厚壳贻贝呼吸和钙化的影响. 浙江海洋大学学报(自然科学版), 37(5): 400—404
- 梁 箫,童 欢,彭莉华等, 2020. 纤维素对海洋细菌生物被膜形成及厚壳贻贝幼虫附着变态的调控. 大连海洋大学学报, 35(1): 75—82
- Avershina E, Frisli T, Rudi K, 2013. De novo semi-alignment of 16S rRNA gene sequences for deep phylogenetic characterization of next generation sequencing data. *Microbes and Environments*, 28(2): 211—216
- Bozcal E, Dagdeviren M, 2020. Bacterial metagenome analysis of *Mytilus galloprovincialis* collected from Istanbul and Izmir coastal stations of Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment*, 192(3): 186
- Fogel J, Kelly T, Charnigo R, *et al*, 2015. Predictors of the response to oral 9-THC in regular cannabis users: focus on sex differences. *Drug and Alcohol Dependence*, 146: e279—e280
- Jolliffe I T, 1986. Principal component analysis. *Journal of Marketing Research*, 87(100): 513
- Logan S L, Thomas J, Yan J Y *et al*, 2018. The *Vibrio cholerae* type VI secretion system can modulate host intestinal mechanics to displace gut bacterial symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(16): E3779—E3787
- Magoc T, Salzberg S L, 2011. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 27(21): 2957—2963
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T *et al*, 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23): 7537—7541
- Septer A N, 2019. The *Vibrio*-squid symbiosis as a model for studying interbacterial competition. *mSystems*, 4(3): e00108-19
- Vezzulli L, Stagnaro L, Grande C *et al*, 2018. Comparative 16S rDNA gene-based microbiota profiles of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from a shellfish farm (Ligurian Sea, Italy). *Microbial Ecology*, 75(2): 495—504
- Wang Q, Garrity G M, Tiedje J M *et al*, 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16): 5261—5267
- Yu J J, Wang M X, Liu B Z *et al*, 2019. Gill symbionts of the cold-seep mussel *Bathymodiolus platifrons*: composition, environmental dependency and immune control. *Fish & Shellfish Immunology*, 86: 246—252

COMPARATIVE STUDY ON MICROBIAL COMMUNITY IN MUSSEL *MYTILUS CORUSCUS* BODY AND SEAWATER OF ITS NATURAL AND CULTURAL SEA AREA IN ZHOUSHAN, ZHEJIANG

LI Si-Yuan¹, HE Zhi-Jiang¹, LYU Hong-Yue¹, TANG Qiu-Han¹, LIAO Zhi¹,
WANG Jian-Xin¹, YAN Xiao-Jun^{1,2}, ZHANG Xiao-Lin^{1,2}

(1. School of Ocean Science and Technology, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China; 2. National Engineering Research Center of Marine Facilities Aquaculture, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

Abstract To understand the structure and diversity of planktonic community in the natural and farming sea areas of *Mytilus coruscus* in Zhoushan City, Zhejiang, East China, and to explore the relationship between endosymbiotic bacteria and *M. coruscus*, seawater samples were collected at the depths of 5m and 10m in the natural and cultural inhabiting areas in Miaozihu Island, Dongji Town, and Gouqi Island, Shengsi County, in the eastern Zhejiang Province. 16S rRNA amplicon sequencing technology was used. The compositions of microbial community in the sampled *M. coruscus* were analyzed. Results show that the microbial richness was the greatest at 10 m depth in the wild growth sea area of Shengsi and at 10 m depth in the cultural area in Dongji Island. The microbial community structure was formed in the farming areas of Dongji and Shengsi were relatively stable and diversified. The dominant flora in Shengsi area included *Octadecabacter*, *Pseudoalteromonas*, *Candidatus Portiera*, *Loktanella*, and *Vibrio*, while that in Dongji area were *Candidatus Portiera*, *Nitrosopumilus*, *Synechococcus*, and *Vibrio*. PCA results show that the similarity of microbial communities in the Dongji and Shengsi areas was significantly lower in the natural growth areas than in the farming areas, particularly in the Shengsi sea area. Meanwhile, *Pseudoalteromonas*, *Tenacibaculum*, and *Vibrio* were isolated from the mussel tissues, and in seawater samples as well. It was preliminarily speculated that the microorganisms in these environments were enriched in mussels and had a certain symbiotic relationship with the *M. coruscus*. This study deepened the understanding of the microbial communities associated with the *M. coruscus*, and provided a scientific basis for disease prevention and healthy mariculture of the *M. coruscus*.

Key words 16S rRNA; *Mytilus coruscus*; sea area; microbial community