



# 罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)养殖池塘沉积物中细菌、硫酸盐还原菌和硫氧化菌的垂直分布特征

邹松保<sup>1</sup>, 高强<sup>1</sup>, 程海华<sup>1</sup>, 倪蒙<sup>1</sup>, 胥晴<sup>1,2</sup>, 刘梅<sup>1</sup>, 周聃<sup>1</sup>, 周志明<sup>1</sup>, 原居林<sup>1\*</sup>

1 浙江省淡水水产研究所, 农业农村部淡水渔业健康养殖重点实验室, 浙江省鱼类健康与营养重点实验室, 浙江 湖州 313001

2 湖州师范学院生命科学学院, 浙江 湖州 313000

邹松保, 高强, 程海华, 倪蒙, 胥晴, 刘梅, 周聃, 周志明, 原居林. 罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)养殖池塘沉积物中细菌、硫酸盐还原菌和硫氧化菌的垂直分布特征. 微生物学报, 2022, 62(7): 2719–2734.

Zou Songbao, Gao Qiang, Cheng Haihua, Ni Meng, Xu Qing, Liu Mei, Zhou Dan, Zhou Zhiming, Yuan Julin. Vertical distribution of bacterial, sulfate-reducing and sulfur-oxidizing bacterial communities in sediment cores from freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) aquaculture pond. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(7): 2719–2734.

**摘要:** 沉积物中微生物介导的硫循环在有机物分解和养分循环中发挥重要作用, 但目前我们对水产养殖生态系统中的参与硫酸盐还原和硫氧化过程的微生物多样性及其调控机制仍知之甚少。【目的】探究硫酸盐还原菌(sulfate-reducing bacteria, SRB)和硫氧化菌(sulfur-oxidizing bacteria, SOB)的垂直分布特征及其主要的环境驱动因素。【方法】本研究利用高通量测序和荧光定量 PCR (qPCR)分析了罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)养殖池塘沉积物表层(0–1 cm)、中层(10–11 cm)和底层(20–21 cm)中的细菌、SRB 和 SOB 的丰度、多样性和群落组成。【结果】细菌(16S rRNA)、硫酸盐还原菌(*dsrB*)和硫氧化菌(*soxB*)的基因拷贝数呈现着从表层到中层急剧骤降的趋势(ANOVA,  $P < 0.05$ ), 但中层和底层样品之间的差异却并不显著( $P > 0.05$ ), 以及  $\alpha$  多样性分析显示 3 个群体的物种丰富度和均匀度都随深度而逐步降低, 这都说明硫循环过程主要发生于沉积物的表层。 $\gamma$ -、 $\delta$ -和  $\beta$ -变形菌分别是细菌、SRB 和 SOB 的优势类群; 其中 SRB 以 *Desulfobacca* 属和脱硫八叠球菌属(*Desulfosarcina*)为主, 前者在表层有着最低的比重, 而后者却与之相反; 硫杆菌(*Thiobacillus*)作为细菌和 SOB 的优势属, 更广泛地分布于中层沉积物中。RDA 分析和 Mantel

**基金项目:** 湖州市科技计划(2021YZ29); 浙江省重点研发项目(2019C02047); 国家重点研发计划(2019YFD0900302)

Supported by the Huzhou Science and Technology Plan Project (2021YZ29), by the Key Research and Development Program of Zhejiang Province (2019C02047) and by the National Key Technology Research and Development Program (2019YFD0900302)

\*Corresponding author. Tel: +86-572-2045722; E-mail: yuanjulin1982@163.com

Received: 9 November 2021; Revised: 3 January 2022; Published online: 11 February 2022

检验揭示了影响细菌群落的主要环境因子是  $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、TOC 和 TON，而 SRB 的群落变异主要是由 As、TON、 $\text{NO}_3^-$  和 Pb 所驱动，以及 SOB 的群落变化则主要响应了 TC、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NH}_4^+$  和 TON 浓度。【结论】养殖池塘底栖的细菌、SRB 和 SOB 的丰度、多样性和群落结构的垂直分布特征可能受到多种环境因素共同的影响。

**关键词：**罗氏沼虾；硫氧化菌；硫酸盐还原菌；多样性；垂直分布；驱动因素

## Vertical distribution of bacterial, sulfate-reducing and sulfur-oxidizing bacterial communities in sediment cores from freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) aquaculture pond

ZOU Songbao<sup>1</sup>, GAO Qiang<sup>1</sup>, CHENG Haihua<sup>1</sup>, NI Meng<sup>1</sup>, XU Qing<sup>1,2</sup>, LIU Mei<sup>1</sup>, ZHOU Dan<sup>1</sup>, ZHOU Zhiming<sup>1</sup>, YUAN Julin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory of Healthy Freshwater Aquaculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Fish Health and Nutrition of Zhejiang Province, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, Zhejiang, China

<sup>2</sup> College of Life Science, Huzhou University, Huzhou 313000, Zhejiang, China

**Abstract:** The sulfur cycle mediated by microbes in sediments plays an important role in the decomposition of organic matters and nutrient cycling. However, little is known about the microbial diversity and potential regulatory mechanisms involved in sulfate reduction and sulfur oxidation in aquaculture ecosystems. **[Objective]** To explore the vertical distribution pattern of sulfate-reducing bacteria (SRB) and sulfur-oxidizing bacteria (SOB) and their environmental driving factors. **[Methods]** In this study, the abundance, diversity and community composition of bacteria, SRB and SOB in surface (0–1 cm), middle (10–11 cm) and bottom (20–21 cm) sediments originated from a freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) aquaculture pond were investigated by high-throughput sequencing and real-time PCR (qPCR). **[Results]** The gene copy numbers of bacteria (16S rRNA), SRB (*dsrB*) and SOB (*soxB*) showed a trend of dramatic decline from the surface to the middle layer (analysis of variance,  $P < 0.05$ ), but the difference between the middle and bottom layers was not significant ( $P > 0.05$ ). The  $\alpha$ -diversity analysis showed that species richness and evenness of three microbial populations both gradually decreased with depth, implying that the microbial sulfur cycling processes mainly occur on the surface layer. The  $\gamma$ -,  $\delta$ - and  $\beta$ -proteobacteria were the dominant taxa of bacteria, SRB and SOB, respectively. Specifically, SRB was dominated by *Desulfobacca* and *Desulfosarcina*; the former has the lowest proportion in the surface layer, while the latter was the opposite. *Thiobacillus*, as the major genus of bacteria and SOB, was more abundant in the middle layer. Redundancy analysis and Mantel test revealed that the key environmental factors driving the variation of bacterial communities were  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , total organic carbon (TOC) and total organic nitrogen (TON), while the SRB community variation was mainly affected by arsenic (As), TON,  $\text{NO}_3^-$  and lead

(Pb), and SOB responded to the changes in total carbon (TC),  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  and TON. **[Conclusion]** The abundance, diversity and community structure of bacteria, SRB and SOB in aquaculture pond sediment exhibited distinct vertical distributions, which could be driven by multiple environmental factors.

**Keywords:** *Macrobrachium rosenbergii*; sulfur-oxidizing bacteria; sulfate-reducing bacteria; diversity; vertical distribution; environmental drivers

硫酸盐还原和硫氧化介导的硫循环在营养物代谢过程中发挥着关键作用。硫酸盐还原过程由严格厌氧的硫酸盐还原菌(sulfate-reducing bacteria, SRB)驱动, 它可以通过氧化有机化合物或分子氢( $\text{H}_2$ )来获得能量, 同时将硫酸盐( $\text{SO}_4^{2-}$ )还原为硫化氢( $\text{H}_2\text{S}$ )<sup>[1]</sup>, 多数的 SRB 隶属于  $\delta$  变形菌纲(*Deltaproteobacteria*), 其次是梭菌纲(*Clostridia*)<sup>[1]</sup>。硫氧化过程则是指将无机硫化物氧化成硫酸盐, 该过程由硫氧化菌(sulfur-oxidizing bacteria, SOB)催化, 由  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -和  $\epsilon$ -变形菌、绿菌纲(*Chlorobia*)和绿弯菌门(*Chloroflexi*)等诸多有着不同系统进化地位和多样功能的成员构成<sup>[2]</sup>。它们通常被认为是厌氧微生物食物网的重要组成部分, 在有机物的降解过程中发挥了重要的作用, 这表明 SRB 在硫和碳元素循环中发挥着重要的生态学功能。近年来, 沉积物中微生物介导硫循环的重要性逐渐得到认可<sup>[3]</sup>, 目前微生物介导的硫循环研究主要集中在海洋和淡水环境<sup>[3-4]</sup>, 相比而言, 我们对高密度的水产养殖生态系统却知之甚少。

中国是水产养殖第一大国, 养殖水产品占世界总产量的 60%以上, 是世界上唯一水产品总量超过捕捞总量的国家<sup>[5]</sup>。然而, 随着养殖业的迅猛发展, 养殖环境恶化问题日益加剧, 造成经济物种病害频发。过量的养分输入是水产养殖业增加产量的常见策略, 未被摄食的高蛋白饵料和排泄物沉降于养殖池塘底部, 造成养殖系统普遍呈现高营养负荷和低溶解氧的特征<sup>[6-7]</sup>。这样的底栖环境通常会促进 SRB 的大

量繁殖。此外, 近年来全球范围内淡水水体中硫酸盐( $\text{SO}_4^{2-}$ )浓度的不断升高更为 SRB 保证了充足的代谢底物<sup>[8-9]</sup>。在缺氧沉积物中, SRB 的异化硫酸盐还原过程是有机物矿化的最主要终端过程, 海洋沉积物中高达 50%的有机物矿化是通过硫酸盐还原作用而完成<sup>[10]</sup>。尽管 SRB 在有机物矿化和元素地球化学循环中至关重要, 但它们对饲料中多种有机质的降解和矿化, 会产生过量的溶解性硫化物(如  $\text{S}^{2-}$ 、 $\text{H}_2\text{S}$  和  $\text{HS}^-$ )并发生迁移扩散<sup>[11]</sup>, 导致水质的恶化<sup>[12]</sup>。调查发现, 我国许多养殖区水体和底泥环境硫化物污染严重, 制约着养殖产业的稳态发展<sup>[13-14]</sup>。尽管硫化物的产生不可避免, 但 SOB 可以通过直接氧化或间接沉降等过程减少或去除有毒硫化物 SRB 和 SOB 的动态关系对维持水环境健康和养殖生态系统的平衡至关重要。然而, 目前对淡水水产养殖生态系统中硫循环微生物多样性分布和群落组成的研究还十分匮乏, 这不仅限制了我们对于养殖系统中元素循环过程和机制的了解, 而且不利于检测和评估沉积物中养分分解对水质的影响程度。

沉积物深度是影响养殖池塘中有机物含量和组成的重要因素之一。通常来说, 有机碳和溶解氧等含量会随着沉积物深度加深而急剧降低, 而无机物含量则会随深度增加而升高。但在养殖系统中, 由于饵料的过度堆积, 可能会造成有机物在中下层沉积物中的叠加累积<sup>[15]</sup>, 影响着微生物的分布及功能。并且, 尽管高度厌氧的深层沉积物会极大限制微生物活性, 但

在沉积物深层仍存在部分厌氧微生物,在此分解有机质释放硫化物到水体,对养殖物种的生存形成胁迫。因此,深入了解水产养殖沉积物中微生物分布及硫循环的调控机制,对沉积物垂直剖面中 SRB、SOB 以及总细菌群落结构多样性的掌握必不可少。然而,目前对养殖沉积物微生物的研究主要集中在表层沉积物<sup>[13]</sup>,垂直剖面上的分布模式仍知之甚少。

罗氏沼虾(*Macrobrachium Rosenbergii*)是我国水产养殖的重要经济物种,作为一种大型淡水虾,年产量超过 13 万 t,占全球总产量的一半以上。在此前养殖过程中发现,水体中过多的硫化氢会对罗氏沼虾的免疫系统产生毒害,其浓度超过 0.2 mg/L 就会损害沼虾的组织和器官<sup>[16]</sup>。因此,本研究选取了一个连续 3 年养殖罗氏沼虾的池塘,采集了沉积物柱状样品,利用荧光定量 PCR 和高通量测序,旨在揭示养殖池塘沉积物中硫循环相关微生物及总细菌群落的垂直分布特征和环境驱动因素。研究结果将拓展我们对淡水养殖生态系统中微生物介导的硫循环过程的认识,为开发硫化物的生物修复提供微生物基础数据,并为绿色生态养殖管理提供新的见解。

## 1 材料与方 法

### 1.1 沉积柱采集

本研究于 2021 年 5 月在浙江省湖州市菱湖镇养殖罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)池塘内完成采样,池塘呈长方形(40 m×30 m),总面积约 1 200 m<sup>2</sup>。池塘中心位置配备有一台 1.5 kW 的桨轮曝气器,在距中心约 7 m 的外周选定一个三角形,样点之间间隔约 4 m,利用柱状采泥器(直径 5 cm),采集 3 根长 25 cm 的沉积物柱样。为了降低沉积柱在运输过程中的混合污染,每根沉积柱样品在现场严格将按照

每 1 cm 切割分层,不同层间隔 10 cm,得到表层(surface sample, SS; 0–1 cm)、中层(middle sample, MS; 10–11 cm)和底层(deep sample, DS; 20–21 cm)样品。9 个(3 柱状样×3 层)沉积物分层样品充分混匀后,用锡箔纸包裹,置于冰盒中运送回实验室,并保存于–80 °C,并在 1 周内完成环境 DNA 提取和沉积物理化性质的测定。

### 1.2 沉积物理化因子测定

沉积物中硫酸盐(SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)的含量利用超纯水浸提后(1:5 沉积物/纯水),使用离子色谱仪(DIONEX ICS 3 000)定量。沉积物总碳(TC)、总氮(TN)、总有机碳(TOC)和总有机氮(TON)含量都使用元素分析仪(Vario Micro Cube, Elementar)测定,但 TOC 和 TON 含量需要经过 1 mol/L 盐酸前处理去除无机碳氮。沉积物中三态氮(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)的浓度采用 2 mol/L 氯化钾溶液萃取后(1:10 沉积物/提取剂),使用连续流动分析仪 AA3 (Seal)测定。为了测定重金属(Cu、Zn、As、Cd、Pb、Cr、Mn、Fe、Co 和 Ni)的含量,沉积物需预先用 1 mol/L 盐酸浸提,然后用电感耦合等离子体质谱仪(ELAN DRC II, PerkinElmer)测定。

### 1.3 DNA 提取、PCR 扩增和高通量测序

每个沉积柱分层样品称取约 0.6 g,采用 EZNA<sup>®</sup> Soil DNA Kit 试剂盒(Omega Bio-tek),并根据生产商的说明书提取总 DNA。DNA 的浓度和纯度用微量紫外分光光度计 Nanodrop NC2 000 测定和 2%琼脂糖凝胶电泳验证。提取后的 DNA 冻存于–80 °C 用于后续的分子实验。16S rRNA、*dsrB* 和 *soxB* 基因的扩增引物参考表 1。PCR 扩增体系(25 μL)包括:5 μL 的 5×reaction buffer, 5 μL 的 5×GC buffer, 2 μL 的 dNTPs (2.5 mmol/L), 1 μL 的正向引物(10 μmol/L), 1 μL 的反向引物(10 μmol/L), 2 μL 的 DNA 模

表 1 本研究 16S rRNA、*dsrB* 和 *soxB* 基因扩增引物Table 1 Primer sets of 16S rRNA, *dsrB* and *soxB* genes used in this study

Primer	Target gene	Experimental function	Sequence (5'→3')	References
515F	16S rRNA	HTS; qPCR	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	[17]
806R	16S rRNA	HTS; qPCR	GGACTACNVGGGTWTCTAAT	[18]
DSRp2060-F	<i>dsrB</i>	HTS; qPCR	CAACATCGTYCAYACCCAGGG	[19]
DSR4-R	<i>dsrB</i>	HTS; qPCR	GTGTAGCAGTTACCGCA	[20]
soxB693-F	<i>soxB</i>	HTS; qPCR	ATCGGNCARGCNTTYCCNTA	[21]
soxB1164B-R	<i>soxB</i>	HTS	AARTTNCCNCGNCGRTA	[21]
soxB1164BK145-R	<i>soxB</i>	qPCR	AAGTTGCCDCGNCGRTA	[22]

HTS: high-throughput sequencing.

板, 8.75  $\mu\text{L}$  的  $\text{ddH}_2\text{O}$ , 和 0.25  $\mu\text{L}$  的 Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB)。PCR 反应使用 ABI 2720 PCR 仪运行, 反应程序: 98  $^\circ\text{C}$  预变性 2 min; 98  $^\circ\text{C}$  变性 15 s, 退火(16S rRNA, 53  $^\circ\text{C}$ ; *dsrB*, 50  $^\circ\text{C}$ ; *soxB*, 55  $^\circ\text{C}$ )维持 30 s, 72  $^\circ\text{C}$  延伸 1 min, 30 个循环; 72  $^\circ\text{C}$  总延伸 10 min; 最后 4  $^\circ\text{C}$  保存。16S rRNA (291 bp)和 *dsrB* (350 bp) 基因使用 NEB Next Ultra DNA Library Prep kit 试剂盒构建文库, 并在 Illumina Novaseq 平台上测序; 而 *soxB* (470 bp)基因则使用 Miseq Reagent Kit v3 试剂盒构建文库, 测序使用 Illumina Miseq 平台(派森诺, 上海)完成。

#### 1.4 荧光定量 PCR

基因丰度的绝对定量采用 AceQ<sup>®</sup> qPCR SYBR<sup>®</sup>Green Master Mix (Vazyme)反应体系。20  $\mu\text{L}$  的 qPCR 反应体系包含: 10  $\mu\text{L}$  的 2 $\times$ SYBR real-time PCR premixture, 0.4  $\mu\text{L}$  的 10  $\mu\text{mol/L}$  正向引物, 0.4  $\mu\text{L}$  的 10  $\mu\text{mol/L}$  反向引物(引物序列请参考表 1), 8.2  $\mu\text{L}$  的  $\text{ddH}_2\text{O}$  和 1  $\mu\text{L}$  的 DNA 模板。全部的 qPCR 反应均使用 Real-Time PCR 仪器(MA-6000, 苏州雅睿生物技术有限公司)完成, 程序如下: 95  $^\circ\text{C}$  预变性 5 min; 95  $^\circ\text{C}$  变性 15 s, 16S rRNA 在 52  $^\circ\text{C}$  退火 30 s (*dsrB*: 60  $^\circ\text{C}$  退火 40 s; *soxB*: 56  $^\circ\text{C}$  退火 45 s), 并且 72  $^\circ\text{C}$  延伸 45 s, 40 个循环; 在 72  $^\circ\text{C}$  进行数据

收集; 熔解曲线的绘制从 60  $^\circ\text{C}$  开始, 逐步增加 0.3  $^\circ\text{C}$  至 96  $^\circ\text{C}$ 。标准曲线的拷贝数进行 Log10 转换后与循环阈值( $C_t$ )进行线性回归分析(附图 1), 3 个基因有着较高的线性系数( $R^2 > 0.997$ ), 这表明标准质粒有着较好的梯度稀释; 基于公式  $E = (10^{-1/k} - 1) \times 100$ , 计算得到 16S rRNA、*dsrB*、*soxB* 基因的扩增效率分别是: 100.0%、92.0% 和 90.3%; 本实验中每个样品的定量都至少重复 3 次。

#### 1.5 高通量数据分析

原始序列的分析采用 QIIME2 流程, Cutadapt 用于切除引物序列<sup>[23]</sup>, 且筛选未成功匹配引物的序列; 数据的过滤、去噪、拼接、嵌合体的去除过程通过 DADA2 实现<sup>[24]</sup>, 此前的研究显示 DADA2 有着更为严格的质控和测序错误校正的优势<sup>[25]</sup>。获得的干净序列, 合并 ASVs 特征序列和 ASV 表格, 并去除 singletons。RDP FrameBot 用于功能基因 *dsrB* 和 *soxB* 移码突变(frameshift mutation)的校正和非目的片段的过滤<sup>[26]</sup>, 校正后的核酸序列用于后续分析。16S rRNA 基因的物种注释采用 SILVA SSU 138 版的数据库, 而 *dsrB* 和 *soxB* 基因使用非冗余蛋白(nr)数据库进行比对, 以获得物种的注释信息。对于生成的 ASV 丰度表, 基于最低序列数进行重采样, 使得样品达到一

致的深度。 $\alpha$  多样性指数的计算是基于重采样的丰度表, 包括了 Observed species、Chao1、Shannon 和 Evenness 4 个指数。为了检验微生物群落在不同深度上的差异, 基于 Bray-Curtis 矩阵, 利用 R 的 vegan 包进行了 PCoA 分析。RDA 分析和 Mantel 检验用于解析微生物群落与环境因子之间的关系, 蒙特卡罗置换检验 (Monte Carlo permutations test, 999) 被应用于筛选显著相关的环境因子和检验 RDA 模型的显著性。

### 1.6 统计分析

本研究中的基因拷贝数、理化因子、 $\alpha$  多样性和主要类群的相对丰度在不同深度的差异比较, 利用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 和 LSD 多重比较进行显著性检验 ( $P=0.05$ ), 这些统计分析均使用统计软件 SPSS

v.13.0 (IBM, Chicago, IL) 和 R 语言 (v.4.00) 完成。

### 1.7 数据可利用性

本研究所获得的原始数据已上传至 NCBI 数据库中, 生成 BioProject 号为 PRJNA778566。

## 2 结果与分析

### 2.1 沉积物的理化因子和基因拷贝数垂直分布差异

沉积物的理化性质呈现着明显的垂直分层特征 (表 2)。TON 的浓度随深度的增加而降低, 然而  $\text{NO}_2^-$ 、TN 和 TC 却有着相反的模式, 浓度随着深度而增加, 在底层达到最高浓度。表层沉积物中普遍检测到较高的重金属含量, 例如表层的 Mn、Cu 和 As 的含量是其他层的 1.1–2.8 倍。在中层, 铵态氮 ( $\text{NH}_4^+$ )、硝态氮 ( $\text{NO}_3^-$ )

表 2 养殖池塘中表层、中层和深层沉积物的理化性质 (平均值 $\pm$ 标准误,  $n=3$ )

Table 2 Shift in environmental factors of aquaculture pond sediments with depth (mean $\pm$ SE,  $n=3$ )

Environmental variable	SS	MS	DS
$\text{NH}_4^+$ /(mg/kg)	20.20 $\pm$ 2.16 <sup>a</sup>	12.70 $\pm$ 0.55 <sup>b</sup>	21.60 $\pm$ 1.78 <sup>a</sup>
$\text{NO}_3^-$ /(mg/kg)	1.40 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	1.00 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	1.30 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>
$\text{SO}_4^{2-}$ /( $\mu\text{g/mL}$ )	3.10 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	2.10 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	3.10 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>
TOC/%	1.40 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	1.50 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	1.40 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>
C:N	9.90 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	13.30 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	12.30 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>
TON/%	0.14 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.12 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.11 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>
$\text{NO}_2^-$ /(mg/kg)	0.20 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.20 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.50 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
TN/%	0.10 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.20 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.20 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
TC/%	1.60 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	1.50 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	1.80 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
Cr/(ng/mL)	26.40 $\pm$ 5.79	27.70 $\pm$ 3.31	32.20 $\pm$ 7.45
Mn/(ng/mL)	3 133.00 $\pm$ 303.80 <sup>a</sup>	1 115.70 $\pm$ 37.60 <sup>b</sup>	1 745.60 $\pm$ 161.90 <sup>b</sup>
Cu/(ng/mL)	122.60 $\pm$ 5.74 <sup>a</sup>	72.10 $\pm$ 2.16 <sup>b</sup>	74.20 $\pm$ 5.35 <sup>b</sup>
As/(ng/mL)	10.40 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	9.00 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>	7.70 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>
Pb/(ng/mL)	46.80 $\pm$ 2.65 <sup>b</sup>	57.90 $\pm$ 1.28 <sup>a</sup>	55.80 $\pm$ 3.73 <sup>a</sup>
Fe/(ng/mL)	41 524.30 $\pm$ 8 156.50	30 508.60 $\pm$ 2 746.80	42 466.20 $\pm$ 8 576.00
Co/(ng/mL)	18.00 $\pm$ 4.10	24.10 $\pm$ 2.17	25.90 $\pm$ 4.90
Ni/(ng/mL)	33.60 $\pm$ 8.10	45.30 $\pm$ 4.45	46.70 $\pm$ 9.28
Zn/(ng/mL)	92.50 $\pm$ 20.18	121.00 $\pm$ 10.71	125.00 $\pm$ 23.41
Cd/(ng/mL)	0.30 $\pm$ 0.00	0.30 $\pm$ 0.01	0.30 $\pm$ 0.01

Superscripts sharing no letters indicate significant differences ( $P<0.05$ ). SS: surface sample; MS: middle sample; DS: deep sample.

和硫酸盐( $\text{SO}_4^{2-}$ )浓度显著低于表层和底层( $P<0.05$ ),然而总有机碳(TOC)和C:N值则相反,在沉积物中层的浓度最高。

qPCR 分析显示(图 1), 沉积物样品的 16S rRNA 基因平均拷贝数高出 *dsrB* 和 *soxB* 基因 3 个数量级; 并且 3 个基因呈现着相似的垂直分层规律: 即从表层到中层呈现着急剧的骤降( $P<0.05$ ), 16S rRNA、*dsrB* 和 *soxB* 基因的变化范围分别是 $(0.49-17.58)\times 10^8$ 、 $(1.90-30.63)\times 10^5$  和  $(0.59-35.70)\times 10^5$  copies/g; 但是, 中层和底层样品之间的差异却并不显著( $P>0.05$ )。

## 2.2 沉积物深度对细菌、SRB 和 SOB 的 $\alpha$ 多样性的影响

扩增子测序分别为 16S rRNA、*dsrB* 和 *soxB* 基因产生 911 067、926 072 和 528 119 条原始序列, 经过一系列的数据质控后, 分别剩余 396 057、676 115 和 218 573 条干净序列。整体而言, 细菌(16S rRNA)和 SOB (*soxB*)的  $\alpha$  多样性呈现着相似的垂直分析规律, 都随着深度增加而降低; 尤其是物种丰富度(Observed species)指数, 表层要显著高于底层( $P<0.05$ ), 然而不同

于前者, SOB 的最低均匀度(Shannon 和 Evenness)指数出现在中层样品中。不同于前两者, SRB (*dsrB*)的最低丰富度和均匀度出现在中层样品中, 且统计学分析显示丰富度指数(Observed species 和 Chao1)在表层和中层之间均有着显著的差异( $P<0.05$ ), 但均匀度(Shannon 和 Evenness)的组间差异却不显著( $P>0.05$ ) (图 2)。

## 2.3 深度对细菌、SRB 和 SOB 的群落组成和结构的影响

在门水平上, 我们比较了优势类群(相对丰度 $>1\%$ )在不同深度上的差异, 发现细菌、SRB 和 SOB 优势类群分别由变形菌门中的不同纲所组成。在 16S rRNA 基因数据集中,  $\gamma$  变形菌(*Gammaproteobacteria*)是所有样品中的优势类群, 有着 27%–51%的比重, 但深度对该类群丰度的影响并不显著( $P>0.05$ )。 $\delta$  变形菌纲(*Deltaproteobacteria*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、硝化螺旋菌门(*Nitrospirae*)和螺旋体菌门(*Spirochaetes*)有着一致的分布规律, 即中层样品更为富集。酸杆菌门(*Acidobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)和厚壁菌门(*Firmicutes*)在表层

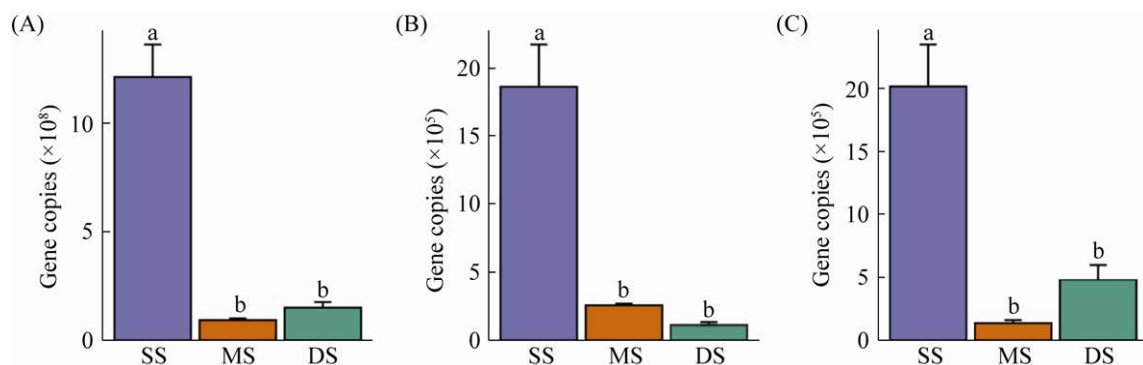


图 1 养殖池塘沉积物中细菌(16S rRNA)、硫酸盐还原菌(*dsrB*)和硫氧化菌(*soxB*)基因分别在表层、中层和底层沉积物样品中的拷贝数(copies/g)

Figure 1 The 16S rRNA (A), *dsrB* (B) and *soxB* (C) genes copies (copies/g) in surface (SS), middle (MS) and deep (DS) sediment samples originated from a prawn aquaculture pond. The data represented the mean $\pm$ standard error ( $n=3$ ). ANOVA with LSD *post hoc* were used to test the differences between groups, different letters above the bars indicating significant differences ( $P<0.05$ ).

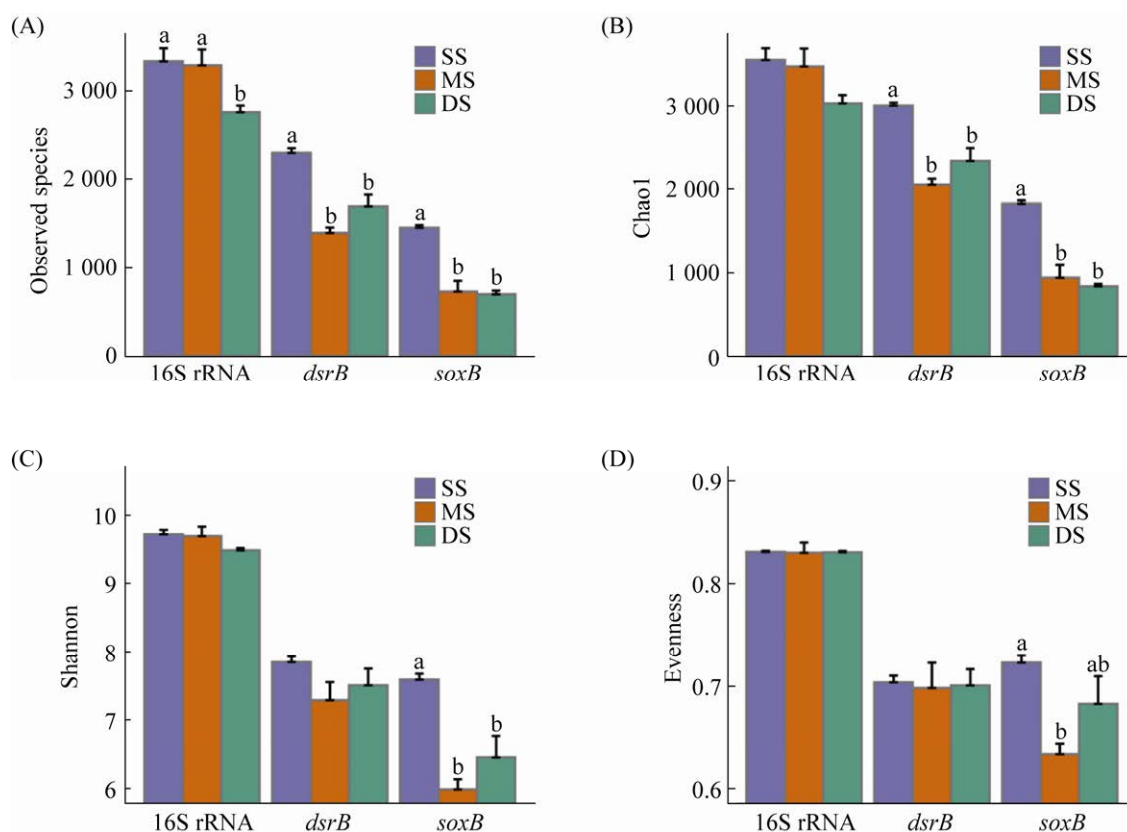


图2 养殖池塘沉积物中的微生物  $\alpha$  多样性在表层、中层和底层沉积物之间的差异

Figure 2 Variation in microbial  $\alpha$ -diversity in the sediment of aquaculture pond between surface (SS), middle (MS) and deep (DS) sediment sample. ANOVA with LSD *post hoc* were used to test the differences between groups, different letters above the bars indicating significant differences ( $P < 0.05$ ).

有着最高的丰度,  $\alpha$  变形菌(*Alphaproteobacteria*)和放线菌(*Actinobacteria*)在底层样品中有着最高的比重;然而,芽单胞菌门(*Gemmatimonadetes*)在组间的比较并没有显著的变化(图 3A)。对于 SRB,  $\delta$  变形菌纲是所有样品中的优势类群,它呈现着相对丰度随深度的增加而逐步升高的趋势(表: 约为 56%; 中: 约为 57%; 底: 约为 58%),但差异并不显著;其次是嗜酸杆菌纲(*Acidobacteriia*)和梭菌纲(*Clostridia*),两者在中层和底层呈现此消彼长的趋势(图 3B)。就 SOB 而言,  $\beta$  变形菌(*Betaproteobacteria*)是绝对的主导类群(84%–94%),而  $\alpha$  变形菌和

$\gamma$  变形菌则较为稀有,平均相对丰度低于 4% (图 3C)。

为了进一步探究微生物的细微差异,我们分析了属水平上的物种组成,并只关注相对丰度前 10 的属,去除了未注释的 ASV (图 4)。在细菌群落中(图 4A),硫杆菌(*Thiobacillus*)是所有样品中的优势属,其相对丰度在中层(平均丰度为 17.6%)要显著高于表层(5.4%)和底层(6.8%) (ANOVA,  $P < 0.05$ ),而溶杆菌(*Lysobacter*)在下层的平均相对丰度是 10.9%,要明显高于其他两层( $P < 0.05$ ; 表层 6.3%; 中层 1.1%)。就 SRB 而言(图 4B),*Desulfobacca* 和脱硫八叠球



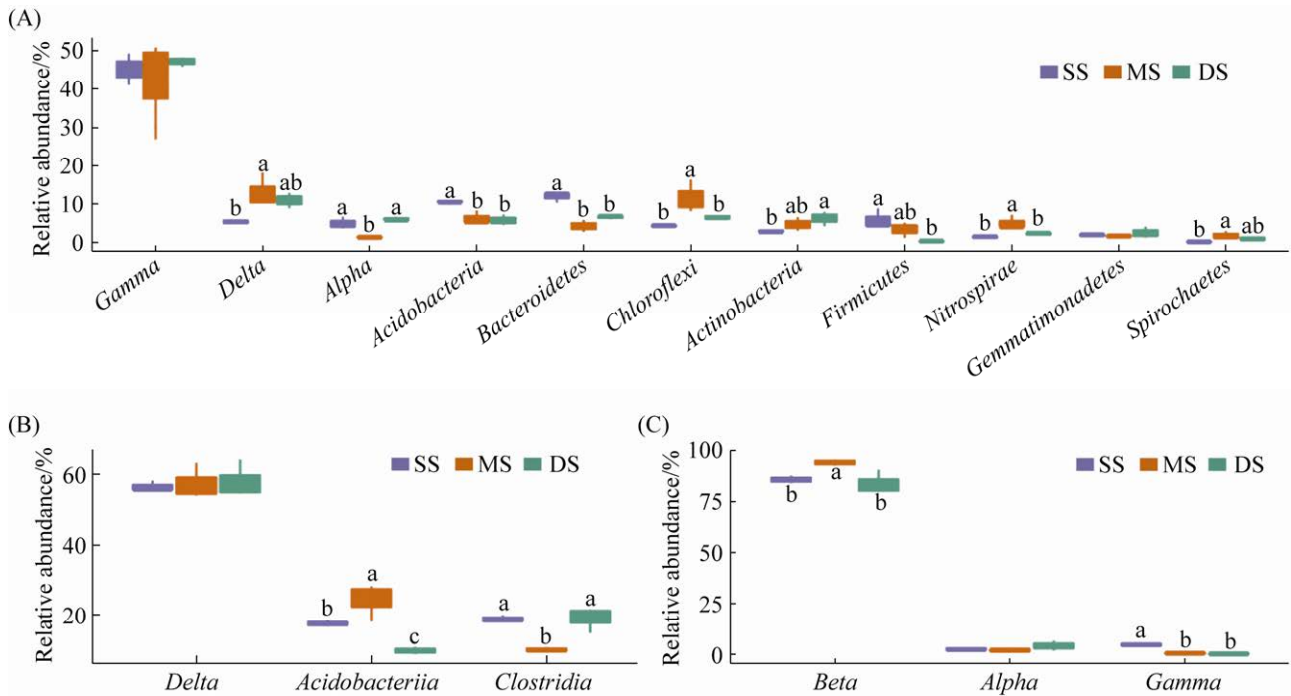


图3 细菌(A)、硫酸盐还原菌(B)和硫氧化菌(C)的优势类群(相对丰度>1%)在不同深度上的差异  
 Figure 3 Composition of major taxa (relative abundance>1%) of bacteria (16S rRNA gene, A), sulfate-reducing bacteria (*dsrB* gene, B) and sulfur-oxidizing bacteria (*soxB* gene, C) originated from different sediment depth layers at the phylum or class level. ANOVA and LSD *post hoc* were used to test the differences between groups, different letters above the bars indicating significant differences ( $P<0.05$ ). SS: surface sample; MS: middle sample; DS: deep sample. *Gamma*: *Gammaproteobacteria*; *Delta*: *Deltaproteobacteria*; *Alpha*: *Alphaproteobacteria*.

菌属(*Desulfosarcina*)是所有样品中的优势属;*Desulfobacca*在表层样品中的占比(约6.4%)只有其他两层的一半,而脱硫八叠球菌属却呈现与之相反的模式。类似于总细菌,硫杆菌同样是全部样品中SOB的主导类群(28.9%–70.8%),更广泛地分布于中层(图4C)。

PCoA分析揭示了细菌、SRB和SOB的群落结构都呈现着明显的垂直分化(图4D、E、F)。此外,基于Bray-Curtis距离的PERMANOVA检验也证实不同深度下的微生物群落结构差异显著( $R^2>0.65$ ;  $P<0.01$ )。这表明不论是SRB和SOB还是在整体细菌群落中,物种组成随着深度增加而改变的同时,群落结构也发生显著的变化。

## 2.4 细菌、SRB和SOB与环境驱动因子之间的相关性

RDA分析用于鉴定3个微生物类群变异的主要驱动因素, Monte Carlo置换检验筛选了显著相关的环境因子,旨在构建更可靠的环境因子与生物群落的模型。RDA的前两个轴显示了物种与环境因子之间较高的相关性(16S rRNA基因为49.8%和27.9%; *dsrB*基因为62.5%和12.9%; *soxB*基因为59.7%和25.8%) (图5)。NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>、TOC和TON是细菌群落的主要驱动因子(图5A), SRB的群落变异主要是由As、TON、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>和Pb所驱动(图5B),而SOB的群落响应了TC、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>和TON因素(图5C)。Mantel检验也进一步证实了不同类群与环境因子之间的相关性(表3)。

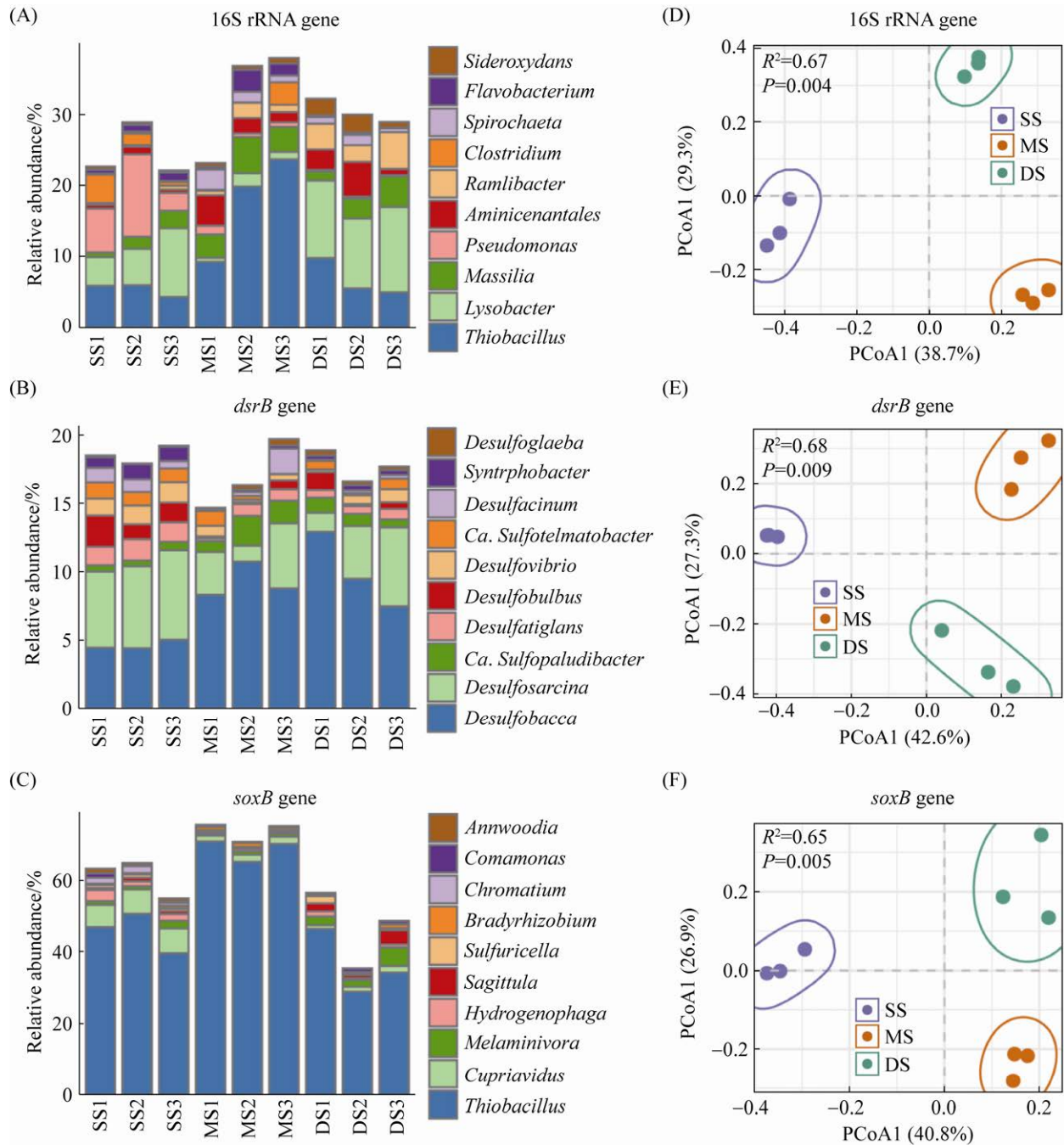


图 4 养殖池塘沉积物在不同深度下的微生物的物种组成及群落差异

Figure 4 Variation in microbial composition and structure in the aquaculture pond sediments at different depths. The relative abundance of top 10 genera from entire bacterial community (16S rRNA gene; A), sulfate-reducing bacteria (*dsrB* gene; B) and sulfur-oxidizing bacteria (*soxB* gene; C). PCoA analysis showing the distinct community structure of bacteria (D), sulfate-reducing bacteria (E) and sulfur-oxidizing bacteria (F) in the surface sediment (SS), middle sediment (MS) and deep sediment (DS) based on the Bray-Curtis distance. PERMANOVA was used to examine the difference between groups.

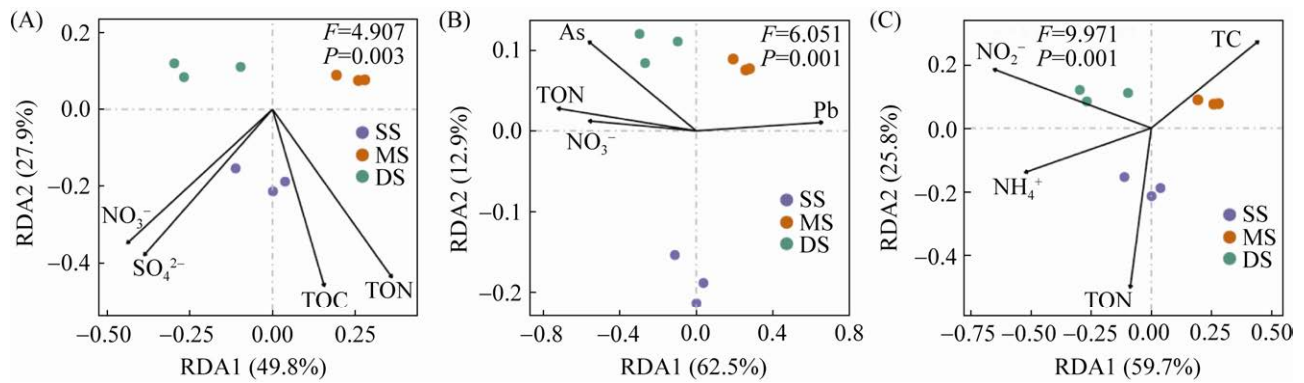


图 5 冗余分析显示细菌群落、硫酸盐还原菌和硫氧化菌与环境因子之间的关系

Figure 5 Redundancy analysis (RDA) ordination showing the relationship between bacterial communities 16S rRNA gene. Sulfate-reducing bacteria *dsrB* gene (A) and sulfur-oxidizing bacteria *soxB* gene (B) with environmental factors (C). SS, MS and DS represent the surface, middle and deep sediment, respectively.

表 3 基于 Bray-Curtis 距离矩阵的 Mantel 检验验证环境因子对微生物群落结构的影响

Table 3 Mantel test was used to examine the influences of environmental factors on microbial community structure based on Bray-Curtis matrix.

Simple mantel	16S rRNA gene		<i>dsrB</i> gene		<i>SoxB</i> gene	
	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>P</i>
All factors	0.561	<b>0.004</b>	0.541	<b>0.005</b>	0.244	0.078
TC	0.021	0.351	-0.179	0.899	0.469	<b>0.019</b>
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.359	<b>0.035</b>	0.276	<b>0.050</b>	0.364	<b>0.031</b>
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0.362	<b>0.048</b>	0.139	0.162	0.442	<b>0.024</b>
Depth	0.364	<b>0.031</b>	0.206	0.111	0.421	<b>0.030</b>
As	0.560	<b>0.016</b>	0.383	<b>0.047</b>	0.375	<b>0.032</b>
Pb	0.343	<b>0.043</b>	0.374	<b>0.032</b>	-0.054	0.560
TON	0.803	<b>0.002</b>	0.640	<b>0.004</b>	0.179	0.135
TOC	0.358	<b>0.046</b>	0.062	0.272	0.341	0.052
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	-0.082	0.638	-0.286	0.983	0.502	<b>0.018</b>

Significant differences ( $P \leq 0.05$ ) are highlighted in bold.

### 3 讨论

在水产养殖生态系统中, SRB 和 SOB 所介导的硫循环在营养物质的分解代谢中发挥了重要作用。本研究中 qPCR 定量和多样性分析共同揭示了: 养殖池塘中沉积物中的总细菌、SRB 和 SOB 的基因丰度、物种丰富度和均匀度都呈现着随深度增加而降低的趋势, 这表明了 SRB

和 SOB 主要分布于沉积物的表层, 且表层是硫循环发生的主要界面。微生物的丰度的垂直衰减可能是由于养分的扩散受阻和氧气浓度随深度衰减所导致, 如表 2 所示, TC 和 TN 在底层的含量要显著高于表层, 这表明大量有机质未被完全分解而沉降到深层<sup>[27]</sup>。郑鹏飞等报道了海草床沉积物中细菌和古菌的丰度在 15–25 cm 剖面上随深度而增加的趋势<sup>[28]</sup>, 这是由于光合

作用产生的氧气输送到根际,并最终渗透到根际沉积物中所导致的。因此在高生产力或高营养输入的生境中,除了营养扩散,氧气也是影响微生物垂直分布的重要原因。

本研究的 qPCR 分析显示,3 个基因的拷贝数都呈现着随深度而降低的趋势,这一结果类似于海洋沉积物柱中的垂直分布规律<sup>[22]</sup>。在罗氏沼虾养殖池塘中,*dsrB* 和 *soxB* 基因最高拷贝数均出现在表层样品,平均丰度分别是  $1.8 \times 10^6$  和  $2.0 \times 10^6$  copies/g (图 1),分别是饲养草鱼的养殖池塘沉积物中丰度的 1/10 和 1/100<sup>[29]</sup>。相对较低的 SOB 的丰度,预示着罗氏沼虾的底栖环境可能会累积更高浓度的毒害物质(H<sub>2</sub>S),这对虾的健康将产生不利的影响。这两种养殖池塘的差异可能是由于体积较大的草鱼的扰动,增加了底栖氧容量,进而促进了 SOB 群体的生长。

16S rDNA 基因序列的物种注释结果表明,淡水养殖池塘中沉积物的细菌群落是以  $\gamma$  变形菌纲为主(图 3A),这与之前的宏基因组测序的结果略有差异,在饲养草鱼的池塘沉积物中  $\delta$  变形菌纲(*Deltaproteobacteria*)是主导类群,其相对丰度要高于  $\gamma$  变形菌<sup>[30]</sup>,这可能是由于不同的测序策略,以及不同养殖品种的底栖生境所导致的。我们通过比较不同深度上的差异,尽管  $\gamma$  变形菌在表层有略高的占比,但差异却并不显著。这表明  $\gamma$  变形菌有着较广的生态适应性,不论是海水(例如海草床或红树林等)还是淡水环境, $\gamma$  变形菌都作为主导性类群且分布广泛<sup>[31-33]</sup>。溶杆菌(*Lysobacter*)作为  $\gamma$  变形菌纲中的主要成员,在本研究中发现底层中的相对丰度要远高于其他两层(图 4A)。它作为革兰氏阴性菌的成员,在土壤、根际和淡水生境中有着广泛的分布<sup>[34]</sup>,从生态学功能的角度看,溶

杆菌作为植物病原拮抗菌而被广泛地研究,例如 Postma 等报道了土壤中 3 种溶杆菌对植物病害性真菌(立枯丝核菌, *Rhizoctonia solani*)有着明显的抑制性<sup>[35]</sup>,但是在水产养殖系统中却鲜有报道。

尽管  $\delta$  变形菌纲在整个细菌群落中只是作为次要的优势类群(图 3A),但却绝对主导了 SRB 的组成(图 3B),与此前的报道相一致,大多数硫酸盐还原菌是隶属于  $\delta$  变形菌纲(约 23 个属),其次是革兰氏阳性的梭菌纲<sup>[1]</sup>。 $\delta$  变形菌纲呈现着相对丰度随深度的增加而逐步升高的趋势,这与 Acosta-González 等报道的被原油污染的海岸沉积物中的  $\delta$  变形菌纲类群随深度而增多的趋势一致<sup>[36]</sup>。我们进一步分析揭示了 *Desulfobacca* 和脱硫八叠球菌属主导了  $\delta$  变形菌纲类群(图 4B)。不同分层上的比较揭示了,脱硫八叠球菌属在表层沉积物的丰度最高(图 4B),这与此前在海水养殖对虾的池塘沉积物柱<sup>[37]</sup>以及潮间带的泥滩<sup>[38]</sup>的报道相符。*Desulfobacca* 作为 SRB 的一个代表性的属,在最近的一份水稻—鱼共生体系的研究中,*Desulfobacca* 作为主导性的 SRB 出现在养殖末期<sup>[39]</sup>。两个主导类群 *Desulfobacca* 和脱硫八叠球菌属在不同深度上的丰度存在着截然相反的模式,两者呈此消彼长的趋势,这表明两者可能存在着生态位竞争的关系。

对于 SOB 而言, $\beta$  变形菌作为主导类群,在全部样品中都呈现着绝对的高比重(84%–94%);在不同深度上, $\beta$  变形菌及其主导成员硫杆菌(*Thiobacillus*)都呈现一致的分布模式,即在中层样品中有着显著较高的丰度(图 4C)。类似的,Tourna 等在农业土壤中发现硫杆菌的序列在克隆文库中占绝大多数<sup>[40]</sup>。硫杆菌属隶属于嗜氢科(*Hydrogenophilaceae*),喜好微厌氧环境,在

硫化物氧化相关的研究中, 是被报道最多的 SOB 物种<sup>[41-44]</sup>。目前文献报道的大多数 SOB 是嗜温的化能自养型微生物, 而硫杆菌是同时包含嗜温和嗜热环境的唯一属<sup>[45]</sup>; 由于罗氏沼虾养殖池塘普遍会配备桨轮式曝气机和铺设底部曝气管, 这将增强表层沉积物—底层水体这一界面的溶氧。因此, 结合以上描述的以硫杆菌为主的 SOB 类群的特征, 这也较好地解释了 SOB 在微厌氧的中层而非表层沉积物中有着较多的分布。

水产养殖池塘沉积物中的微生物群落可能受到有机物富集的影响<sup>[46]</sup>。值得注意的是, 养分的富集受到了诸多因素的影响, 如养殖周期、放养密度、饲料成份及用量, 池塘的底质和外部引入的水质等<sup>[47]</sup>。然而, 先前的一项研究表明, 海洋沉积物中的 SRB 在不同有机物浓度之间没有表现出显著的差异<sup>[48]</sup>。在本研究中, 由于样品量的不足和技术上的阻碍, 我们只获得了沉积物  $\text{SO}_4^{2-}$  的浓度, 缺乏其他价态的硫及其化合物的数据。尽管如此, 我们的 RDA 分析和 Mantel 检验仍然揭示了有机物(TOC 和 TON)和营养盐( $\text{NO}_3^-$  和  $\text{SO}_4^{2-}$ )的含量与整个细菌群落结构有着强烈的相关性(图 5), 这表明未被摄食的饲料和累积的排泄粪便会对底栖微生物群落的塑造发挥着重要的作用。塘底富集的有机物通常会转化为溶解性的有机物(dissolved organic matter), 而后者几乎完全被异养型细菌所利用<sup>[49]</sup>, 因此在表层沉积物—水界面, 较高浓度的有机物和无机养分促进了异养和自养型微生物的生长, 这也解释了总细菌在表层有着最高的物种丰富度和基因拷贝数。而 SRB 群落不仅受到有机(TON)和无机氮含量( $\text{NO}_3^-$ )的影响, 重金属(As 和 Pb)同样也发挥着重要的作用。这表明沉积物中的有机和无机物的含量, 以及重金属共同塑造了 SRB 的群落组成。

## 参考文献

- [1] Muyzer G, Stams AJM. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(6): 441–454.
- [2] Ghosh W, Dam B. Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea. *FEMS Microbiology Reviews*, 2009, 33(6): 999–1043.
- [3] Wasmund K, Mußmann M, Loy A. The life sulfuric: microbial ecology of sulfur cycling in marine sediments. *Environmental Microbiology Reports*, 2017, 9(4): 323–344.
- [4] Zhu J, He Y, Zhu YS, Huang MS, Zhang YP. Biogeochemical sulfur cycling coupling with dissimilatory nitrate reduction processes in freshwater sediments. *Environmental Reviews*, 2018, 26(2): 121–132.
- [5] 陈国峰, 陆芸, 周乾宪. 我国成世界唯一养殖水产品总量超过捕捞总量的渔业国家. *中国食品*, 2019(22): 154–155.
- [6] Leigh C, Hiep LH, Stewart-Koster B, Vien DM, Condon J, Sang NV, Sammut J, Burford MA. Concurrent rice-shrimp-crab farming systems in the Mekong Delta: are conditions (sub) optimal for crop production and survival? *Aquaculture Research*, 2017, 48(10): 5251–5262.
- [7] Dien LD, Hiep LH, Hao NV, Sammut J, Burford MA. Comparing nutrient budgets in integrated rice-shrimp ponds and shrimp grow-out ponds. *Aquaculture*, 2018, 484: 250–258.
- [8] 周川乔, 彭宇, 邓杨, 吕成旭, 朋毛羊藏, 张思远, 许晓光, 王瑜, 张利民, 王国祥. 富营养化湖泊中硫酸盐对蓝藻衰亡产甲烷过程的影响. *湖泊科学*, 2021, 33(6): 1639–1649.  
Zhou CQ, Peng Y, Deng Y, Lv CX, Peng MYZ, Zhang SY, Xu XG, Wang Y, Zhang LM, Wang GX. Effects of sulfates on methane production during cyanobacteria decay processes in eutrophic lakes. *Journal of Lake Sciences*, 2021, 33(6): 1639–1649. (in Chinese)
- [9] Yu T, Zhang Y, Wu FC, Meng W. Six-decade change in water chemistry of large freshwater lake Taihu, China. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(16): 9093–9101.
- [10] Jørgensen BB. Mineralization of organic matter in the

- sea bed-the role of sulphate reduction. *Nature*, 1982, 296(5858): 643–645.
- [11] 赵阳国, 汤海松, 周弋铃, 高孟春, 郭亮, 王君鹏. 海水养殖生境中硫化物污染及控制技术研究进展. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2020, 50(3): 37–43. Zhao YG, Tang HS, Zhou YL, Gao MC, Guo L, Wang JP. Research progress of sulfide pollution and control technology in mariculture habitat. *Periodical of Ocean University of China*, 2020, 50(3): 37–43. (in Chinese)
- [12] Krishnani KK, Gopikrishna G, Pillai SM, Gupta BP. Abundance of sulphur-oxidizing bacteria in coastal aquaculture using *soxB* gene analyses. *Aquaculture Research*, 2010, 41(9): 1290–1301.
- [13] 陈敏. 胶州湾养殖区硫酸盐还原菌的群落结构与功能特征研究. 中国海洋大学, 青岛, 2013.
- [14] 王宗兴, 孙丕喜, 刘彩霞, 刘新杰, 连岩, 徐玉珊. 桑沟湾大型底栖动物生物多样性研究. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2011, 41(S2): 79–84. Wang ZX, Sun PX, Liu CX, Liu XJ, Lian Y, Xu YS. The species diversity of macrobenthic fauna in sanggou bay, China. *Periodical of Ocean University of China*, 2011, 41(S2): 79–84. (in Chinese)
- [15] 黄小平, 郭芳, 黄良民. 大鹏澳养殖区柱状沉积物中氮、磷的分布特征及污染状况研究. 热带海洋学报, 2010, 29(1): 91–97. Huang XP, Guo F, Huang LM. Distribution characteristics and pollution of nitrogen and phosphorus in core sediments of marine culture area in Dapeng Cove. *Journal of Tropical Oceanography*, 2010, 29(1): 91–97. (in Chinese)
- [16] 余静, 许燕, 王芳. 硫化氢对罗氏沼虾 4 种组织中 POD、PPO 酶活力的影响. 上海师范大学学报(自然科学版), 2011, 40(5): 546–550. Yu J, Xu Y, Wang F. Effects of hydrogen sulfide on the activities of POD and PPO in four tissues of *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Shanghai Normal University (Natural Sciences)*, 2011, 40(5): 546–550. (in Chinese)
- [17] Parada AE, Needham DM, Fuhrman JA. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(5): 1403–1414.
- [18] Apprill A, McNally S, Parsons R, Weber L. Minor revision to V4 region *SSU* rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, 2015, 75(2): 129–137.
- [19] Geets J, Borremans B, Diels L, Springael D, Vangronsveld J, Van Der Lelie D, Vanbroekhoven K. *DsrB* gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, 66(2): 194–205.
- [20] Wagner M, Roger AJ, Flax JL, Brusseau GA, Stahl DA. Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(11): 2975–2982.
- [21] Petri R, Podgorsek L, Imhoff JF. Phylogeny and distribution of the *soxB* gene among thiosulfate-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 197(2): 171–178.
- [22] Zhang Y, Wang XG, Zhen Y, Mi TZ, He H, Yu ZG. Microbial diversity and community structure of sulfate-reducing and sulfur-oxidizing bacteria in sediment cores from the East China Sea. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2133.
- [23] Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet Journal*, 2011, 17(1): 10–12.
- [24] Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 2016, 13(7): 581–583.
- [25] Zou SB, Fu R, Deng HW, Zhang QQ, Gentekaki E, Gong J. Coupling between ribotypic and phenotypic traits of protists across life cycle stages and temperatures. *Microbiology Spectrum*, 2021, 9: e01738-21.
- [26] Wang Q, Quensen JF, Fish JA, Lee TK, Sun YN, Tiedje JM, Cole JR. Ecological patterns of *nifH* genes in four terrestrial climatic zones explored with targeted metagenomics using FrameBot, a new informatics tool. *mBio*, 2013, 4(5): e00592–e00513.
- [27] Jiang LJ, Zheng YP, Peng XT, Zhou HY, Zhang CL, Xiao X, Wang FP. Vertical distribution and diversity of sulfate-reducing prokaryotes in the Pearl River estuarine sediments, Southern China. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, 70(2): 249–262.
- [28] 郑鹏飞, 张晓黎, 龚骏. 大叶藻(*Zostera marina*)海草床沉积物细菌和古菌丰度及组成的垂直剖面特征. 微生物学通报, 2020, 47(6): 1662–1674.

- Zheng PF, Zhang XL, Gong J. Vertical patterns of bacterial and archaeal abundance and community structure in seagrass (*Zostera marina*) meadow sediments. *Microbiology China*, 2020, 47(6): 1662–1674. (in Chinese)
- [29] Zhang KK, Zheng XF, He ZL, Yang T, Shu LF, Xiao FS, Wu YJ, Wang BH, Li Z, Chen PB, Yan QY. Fish growth enhances microbial sulfur cycling in aquaculture pond sediments. *Microbial Biotechnology*, 2020, 13(5): 1597–1610.
- [30] Deng M, Hou J, Song K, Chen JY, Gou JW, Li DP, He XG. Community metagenomic assembly reveals microbes that contribute to the vertical stratification of nitrogen cycling in an aquaculture pond. *Aquaculture*, 2020, 520: 734911.
- [31] Wang Y, Sheng HF, He Y, Wu JY, Jiang YX, Tam NFY, Zhou HW. Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater, intertidal wetland, and marine sediments by using millions of illumina tags. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(23): 8264–8271.
- [32] 刘鹏远, 张海坤, 陈琳, 孙延瑜, 王彩霞, 宋虹, 胡晓珂. 黄渤海海草分布区日本鳗草根际微生物群落结构特征及其功能分析. *微生物学报*, 2019, 59(8): 1484–1499.
- Liu PY, Zhang HK, Chen L, Sun YY, Wang CX, Song H, Hu XK. Rhizosphere microbial community structure and function of *Zostera japonica* in the distribution area of seagrass beds in the Yellow Sea and Bohai Sea. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(8): 1484–1499. (in Chinese)
- [33] Zhu P, Wang YP, Shi TT, Huang GQ, Gong J. Genetic diversity of benthic microbial eukaryotes in response to spatial heterogeneity of sediment geochemistry in a mangrove ecosystem. *Estuaries and Coasts*, 2018, 41(3): 751–764.
- [34] Reichenbach H. The genus *Lysobacter*. The Prokaryotes. New York, NY: Springer New York, 2006: 939–957.
- [35] Postma J, Nijhuis EH, Yassin AF. Genotypic and phenotypic variation among *Lysobacter capsici* strains isolated from *Rhizoctonia* suppressive soils. *Systematic and Applied Microbiology*, 2010, 33(4): 232–235.
- [36] Acosta-González A, Rosselló-Móra R, Marqués S. Characterization of the anaerobic microbial community in oil-polluted subtidal sediments: aromatic biodegradation potential after the prestige oil spill. *Environmental Microbiology*, 2013, 15(1): 77–92.
- [37] Van Duc L, Song B, Ito H, Hama T, Otani M, Kawagoshi Y. High growth potential and nitrogen removal performance of marine anammox bacteria in shrimp-aquaculture sediment. *Chemosphere*, 2018, 196: 69–77.
- [38] Mußmann M, Ishii K, Rabus R, Amann R. Diversity and vertical distribution of cultured and uncultured *Deltaproteobacteria* in an intertidal mud flat of the Wadden Sea. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(3): 405–418.
- [39] Herlambang A, Murwantoko M, Istiqomah I. Dynamic change in bacterial communities in the integrated rice-fish farming system in Sleman, Yogyakarta, Indonesia. *Aquaculture Research*, 2021, 52(11): 5566–5578.
- [40] Tourna M, Maclean P, Condrón L, O’Callaghan M, Wakelin SA. Links between sulphur oxidation and sulphur-oxidising bacteria abundance and diversity in soil microcosms based on *soxB* functional gene analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 88(3): 538–549.
- [41] Annachhatre AP, Suktrakoolvait S. Biological sulfide oxidation in a fluidized bed reactor. *Environmental Technology*, 2001, 22(6): 661–672.
- [42] Alcantara S, Velasco A, Muñoz A, Cid J, Revah S, Razo-Flores E. Hydrogen sulfide oxidation by a microbial consortium in a recirculation reactor system: sulfur formation under oxygen limitation and removal of phenols. *Environmental Science & Technology*, 2004, 38(3): 918–923.
- [43] Maestre JP, Rovira R, Álvarez-Hornos FJ, Fortuny M, Lafuente J, Gamisans X, Gabriel D. Bacterial community analysis of a gas-phase biotrickling filter for biogas mimics desulfurization through the rRNA approach. *Chemosphere*, 2010, 80(8): 872–880.
- [44] Ravichandra P, Ramakrishna M, Gangagni RA, Annapurna, J. Sulfide oxidation in a batch fluidized bed bioreactor using immobilized cells of isolated *Thiobacillus* sp. (iict-SOB-dairy-201) as biocatalyst. *Journal of Engineering Science and Technology*, 2006, 1(1): 21–30.
- [45] Krayzelova L, Bartacek J, Díaz I, Jeison D, Volcke EIP,

- Jenicek P. Microaeration for hydrogen sulfide removal during anaerobic treatment: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 2015, 14(4): 703–725.
- [46] Carroll ML, Cochrane S, Fieler R, Velvin R, White P. Organic enrichment of sediments from salmon farming in Norway: environmental factors, management practices, and monitoring techniques. *Aquaculture*, 2003, 226(1/2/3/4): 165–180.
- [47] 倪蒙, 陈雪峰, 高强, 程海华, 华建权, 戎华南, 周志明, 原居林. 放养密度对温棚养殖罗氏沼虾生长、生化指标、水质及养殖效益的影响. *大连海洋大学学报*, 2021, 36(3): 423–429.
- Ni M, Chen XF, Gao Q, Cheng HH, Hua JQ, Rong HN, Zhou ZM, Yuan JL. Effects of stocking density on growth performance, biochemical indices, water quality and economic benefits of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* in a greenhouse. *Journal of Dalian Ocean University*, 2021, 36(3): 423–429. (in Chinese)
- [48] Kawahara N, Shigematsu K, Miura S, Miyadai T, Kondo R. Distribution of sulfate-reducing bacteria in fish farm sediments on the coast of southern Fukui Prefecture, Japan. *Plankton and Benthos Research*, 2008, 3(1): 42–45.
- [49] Azam F, Malfatti F. Microbial structuring of marine ecosystems. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, 5(10): 782–791.

(本文责编 张晓丽)

## 补充材料

附图 1 定量 PCR 的标准曲线、扩增曲线和熔解曲线

本文补充材料见网络版 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>。补充材料为作者提供的原始数据，作者对其学术质量和内容负责。