水产学报
JOURNAL OF FISHERIES OF CHINA
DOI: 10.11964/jfc.20250414942
Science Press

周佳峥, 吴清洋, 史策, 等. 三疣梭子蟹养殖底质恶化的表型和理化特征及其与细菌群落的相关性 [J]. 水产学报, 2026, 50(1): 019611.

Zhou J Z, Wu Q Y, Shi C, *et al*. Phenotypic and physicochemical characteristics of sediment deterioration during the culture of the swimming crabs (*Portunus trituberculatus*) and their correlations with bacterial community [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2026, 50(1): 019611 (in Chinese).

三疣梭子蟹养殖底质恶化的表型和理化特征及其与细菌群落的相关性

周佳峥[1]，吴清洋[1,2]，史　策[1,2]，母昌考[1]，王春琳[1]，叶央芳[1*]

(1. 宁波大学海洋学院，浙江 宁波　315832；
2. 宁波大学，水产生物技术教育部重点实验室，浙江 宁波　315832)

摘要：【目的】探究三疣梭子蟹养殖底质的恶化特征及其与细菌群落的相关性。**【方法】**以海沙为底质，模拟开展了 28 d 的三疣梭子蟹室内帆布池养殖。实验观察和分析了底质表观及其理化指标的时序变化特征，采用 16S rRNA 基因扩增子测序分析了底质细菌群落结构变化，并利用冗余分析探究了底质理化指标和底质细菌群落之间的相关性，最后采用 FAPROTAX 功能预测和定量聚合酶链式反应技术分析了底质细菌群落的功能变化。**【结果】**在三疣梭子蟹养殖过程中，底质颜色由初始的灰褐色转变为深黑褐色，并伴有刺激性气味产生。梭子蟹甲壳颜色由青灰色变为黄褐色，且在甲壳和螯足表面出现黑褐色斑点，存活率降至 38.1%。氨氮（NH_4^+-N）、分子氨（NH_3）和亚硝态氮（NO_2^--N）含量呈现先升高后降低的变化趋势，并分别在第 14 和 21 天达到峰值，而硝态氮（NO_3^--N）和硫化氢（H_2S）含量在 28 d 中持续累积。底质细菌群落结构呈现养殖前、养殖中和养殖后 3 个阶段，且优势菌群由 γ-变形菌纲转为 α-变形菌纲。功能分析显示底质的硝化和反硝化作用在第 14 和 21 天达到峰值，其中硝化作用主要与硝化螺菌属和硝化刺菌属细菌相关；而硫化合物呼吸在第 28 天显著增强，主要与脱硫豆菌属、梭形杆菌属和脱硫弧菌属等细菌相关。**【结论】**底质理化指标及其细菌群落之间相互影响，协同驱动底质恶化。本研究可为三疣梭子蟹绿色健康养殖提供基础数据和理论参考。

关键词：三疣梭子蟹；底质恶化；理化特征；细菌群落；功能基因

中图分类号：S 968.25$^+$2　　**文献标志码：**A

三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 是我国重要的海水养殖经济蟹类[1]，具有在浅海近岸的泥、泥砂或砂质底质中栖息的行为特性，尤其喜砂质和砂泥质底质，因此室内工厂化养殖中常铺

收稿日期：2025-04-02　　**修回日期：**2025-05-04
资助项目：宁波市公益研究计划重点项目 (2023S008)；国家自然科学基金 (32373150)
第一作者：周佳峥，从事三疣梭子蟹健康养殖技术研究，E-mail：3055912470@qq.com
通信作者：叶央芳，从事蟹类代谢和微生态调控机制研究，E-mail：yeyangfang@nbu.edu.cn

沙以供梭子蟹栖息[2-4]。底质不仅是梭子蟹栖息的场所，还是其觅食和进食的场所，因此底质在养殖系统的营养物质循环中扮演着“汇”和“源”的重要角色[5]。在底质中，除了养殖动物梭子蟹外，还栖息着细菌、古菌和真菌等微生物，它们通过参与碳 (C)、氮 (N)、磷 (P)、硫 (S) 的生物地球化学循环，影响着养殖系统的营养供应和生态平衡[6-7]。然而，随着养殖周期的延长，水产动物的排泄物、食物残渣和残体逐渐在底质中累积，造成底质的有机负荷增加，引起底质微生物的过度繁殖，导致微生物群落失衡和生态功能改变，引发底质恶化[8-10]。底质恶化主要表现为泡沫聚集增加、恶臭、底质颜色变黑、溶解氧含量降低，硫化物、重金属和硫化氢 (H_2S) 有毒有害物质积累等[11-13]。

底质恶化不利于水产动物的健康，甚至威胁着水产动物的生存。例如，底质中的硫化物会对中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 的呼吸和能量代谢产生负面影响，可导致鳃组织细胞色素氧化酶活性下降，而血糖和乳酸浓度上升[14]。由于底质与水体间存在密切的物质交换，底质恶化往往伴随着水体的富营养化、pH 下降以及氨态氮 (NH_4^+-N)、亚硝态氮 (NO_2^--N) 和硝态氮 (NO_3^--N) 等指标的升高[8-9]。例如，NH_4^+-N 过高会导致凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 的鳃丝肿胀，毛细血管网结构形态改变，鳃组织破裂[15]。

作为 CNPS 元素循环的重要驱动者[16]，微生物与养殖水体的水质变化密切相关。在三疣梭子蟹养殖水体中，酸化导致的水体细菌群落结构和功能改变对水体的 NH_4^+-N、NO_2^--N 和 NO_3^--N 水平具有重要贡献[17]。而在拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 育苗水体中，循环水养殖系统水体富集的橙黄褐指藻杆菌 (*Phaeodactylibacter*)、黏着杆菌 (*Tenacibaculum*) 和氢嗜菌 (*Hydrogenophaga*) 可能通过同步硝化和反硝化作用去除水体中的含氮污染物[18]。然而，目前仅有少量研究涉及甲壳类动物养殖底质恶化的表观现象[12, 19]，鲜有底质恶化相关的微生物群落结构和功能的研究报道。

为此，本研究采用海沙为底质，模拟开展了为期 28 d 的三疣梭子蟹成蟹的室内帆布池养殖，分析了养殖底质在表观及理化指标的时序变化特征；同时采用 16S rRNA 基因扩增子测序、FAPROTAX 功能预测和定量聚合酶链式反应 (qPCR) 技术分析了底质细菌群落结构和功能的动态变化，以探究梭子蟹养殖底质的恶化特征及其微生态原因，为三疣梭子蟹绿色健康养殖提供基础数据和理论参考。

1　材料与方法

1.1　实验材料、化学品和仪器

三疣梭子蟹成蟹共 50 只 (108.98±22.56) g，于 2023 年 10 月采购自宁波市咸祥一水产养殖场，以避光和充氧的方式在 1 h 内运至宁波大学中试基地。把梭子蟹平均分布到 5 个帆布池 (长 1.5 m×宽 1.0 m×高 0.6 m) 中暂养。每个帆布池装有 300 L 天然海水 (盐度 23~24，水温 27~28℃，pH 8.3~8.4，NH_4^+-N < 0.5 mg/L)。实验所用底质取自宁波梅山湾沿海滩涂沙子，经风干、过筛去掉大颗粒杂物后铺在池底，厚度约 5 cm。对海水进行 24 h 曝气，使溶解氧含量维持在 6.5~6.6 mg/L。在为期 1 周的暂养期间，每日 16:00—18:00 按蟹体重的 5% 投喂新鲜菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*)，喂食后 1 h 清除死蟹并清理残饵。

100 μm 孔径的无菌尼龙网购自北京兰杰柯科技有限公司，0.45 和 0.22 μm 孔径的聚碳酸酯膜购自美国 Millipore 公司，哈希试剂购自美国 Danaher 公司，土壤基因组 DNA 提取试剂盒购自美国 MP Biomedicals 公司，DNA 纯化试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂 (SYBR Premix Ex *Taq* Ⅱ) 和 pMD19-T 载体均购自日本 TaKaRa 公司，ROX 参比染料 II (50×ROX Reference Dye Ⅱ) 购自上海翌圣生物科技股份有限公司，灭菌双蒸水 (ddH_2O) 购自上海圻明生物科技有限公司。

TD20002 电子天平 (余姚市金诺天平仪器有限公司)；彼得森抓斗式采泥器 (济宁市裕泽工业科技有限公司)；厘米刻度尺 (宁波得力集团有限公司)；超声波清洗机 (广州科盟清洁技术有限公司)；纯水仪 (杭州景元科技有限公司)；Spectrum IQ150 土壤原位 pH 计 (Spectrum Technologies，美国)；YSI 便携式多参数水质分析仪 (Yellow Springs，美国)；NanoDrop2000 分光光度计 (Thermo Fisher，美国)；哈希 DR900 多参数便携式比色计 (HACH，美国)；梯度 PCR 仪 (Thermo Fisher，美国)；琼脂糖凝胶电泳仪 (北京六一仪器厂)；MiSeq 高通量测序仪 (Illumina，美国)，低温高速离心机 (Eppendorf，德国)，Roche480 荧光定

量 PCR 仪 (Roche，瑞士)。

1.2　实验方法

实验设置和样品采集　选取 42 只暂养后的梭子蟹，称重，重新分布到 6 个帆布池中，每个帆布池 7 只，进行为期 28 d 的养殖实验，养殖管理同暂养，整个养殖期间不换水。采用彼得森抓斗式采泥器分别于第 0、7、14、21 和 28 天从各帆布池的四角和中央采集梭子蟹活动区沙样，采样深度 3 cm，单次采样面积约 0.2 m^2，混合均匀后分成 6 份，每份约 80 g，分别放入无菌袋中。得到实验的重复数 $n = 6$，共获得 30 个底质样品，用冰盒保存后运至实验室。把沙样先置于超声波清洗机内超声 15 min，经 100 μm 无菌尼龙网过滤去掉杂质后，分成 2 份。一份经 0.45 μm 孔径的聚碳酸酯膜过滤后冷藏于 4℃，用于底质理化指标分析；另一份经 0.22 μm 孔径的聚碳酸酯膜过滤后冻藏于–80℃，用于细菌 DNA 提取。本研究获得了宁波大学实验动物伦理委员会 (IACUC) 批准，实验过程中操作人员严格遵守宁波大学实验动物伦理规范，并按照宁波大学实验动物伦理委员会制定的规章制度执行。

理化指标测定　在现场采集沙样时使用美国 Spectrum IQ150 土壤原位 pH 计直接测定底质的温度和 pH。使用 YSI 便携式多参数水质分析仪紧贴池底，测定沉积物-水界面的溶解氧 (DO) 含量。使用 HACH 试剂测定沙样滤液的 NH_4^+-N、NO_2^--N、NO_3^--N 和 H_2S 含量。分子氨 (NH_3) 浓度根据 Bower 等[20] 的公式计算得到。

DNA 提取、PCR 扩增、Illumina 测序和序列处理　用无菌剪刀剪碎滤膜，根据试剂盒说明书提取底质膜样的总 DNA。经 DNA 纯化试剂盒纯化后，采用 NanoDrop 2000 测定 DNA 浓度及纯度，检测合格的 DNA 用于 PCR 扩增。采用细菌通用引物对 (338F：5′-ACTCCTAC GGGAGGCAGCAG-3′和 806R：5′-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3′)PCR 扩增 16S rRNA 基因的 V3~V4 区[21]。用 1% 琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 分光光度法分析 PCR 产物质量。将 PCR 扩增产物进行等摩尔合并，在 MiSeq 平台上进行测序。按照 USEARCH 流程 (https://www.drive5.com/usearch/) 处理扩增子测序数据。简言之，将原始数据与细菌标签合并，并聚类到具有 100% 序列相似性的种水平操作分类单元 (zOTUs)。使用 QIIME2 将序列与 Silva 数据库 (v123)(https://www.arb-silva.de/) 的系统发育信息进行比对，以获得分类注释信息。为消除样本间测序深度不一致造成的偏差，所有样本数据作最小深度的归一化处理，用于后续分析。本研究的原始 16S rRNA 基因测序数据已上传至美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 序列读取档案 (SRA) 数据库，登录号为 PRJNA1252452。

氮循环和硫循环相关功能基因表达的定量 PCR 分析　以底质细菌基因组 DNA 为模版，以 16S rRNA 基因为内参，采用 N 循环和 S 循环相关基因的特征性引物[22-37](表 1) 进行 qPCR 分析。本研究扩增的 N 循环相关基因包括固氮酶还原酶亚基基因 (*nifH*)、氨单加氧酶亚基 B 基因 (*amoB*)、亚硝酸氧化还原酶 α 亚基基因 (*nxrA*)、硝酸还原酶基因 (*narG*)、亚硝酸还原酶基因 (*nirK*1-3 和 *nirS*1-3)、氧化亚氮还原酶基因 (*nosZ*1-2)、硝酸还原酶基因 (*napA*) 和谷氨酸脱氢酶基因 (*gdhA*)；S 循环相关基因包括异化型亚硫酸还原酶 A/B 亚基基因 (*dsrA* 和 *dsrB*) 和腺苷酸硫酸盐还原酶 A/B 亚基基因 (*aprA* 和 *aprB*)。PCR 体系共 20 μL，包含 cDNA 模板 2 μL，SYBR Premix Ex *Taq* Ⅱ (2×)10 μL，每个引物 0.2 μmol/L，ROX Reference Dye or Dye II(50×) 0.4 μL 和 ddH_2O 6 μL。qPCR 反应程序设置如下：95℃ 预变性 30 s 激活 DNA 聚合酶并变性双链 DNA，95℃ 变性 5 s，60℃ 退火 30 s，共 40 个循环。每个样品设置 3 次 PCR 重复。以 pMD19-T 为载体，从沙样中扩增的 393 bp 细菌靶向片段，构建标准质粒，经 10 倍稀释串联得到 16S rRNA 基因标准曲线，计算标准曲线方程与 R^2 值。其中，根据标准曲线生成的 16S rRNA 基因拷贝数定义为绝对原核微生物生物量。N 循环和 S 循环功能基因丰度的计算方法参照公式：

$$GR = 10^{(31-C_T)(10/3)}$$

式中，GR 为相对基因丰度，C_T 为 qPCR 结果，31 为检出限。

$$GA_{Fun} = (GA_{16S} \times GR_{Fun}) / GR_{16S},$$

式中，GA 表示基因绝对丰度，16S 和 Fun 分别表示 16S rRNA 基因和功能基因[38-39]。

数据分析　采用 ggplot2 包和 ggalt 包对梭子蟹的存活曲线进行可视化。采用 vegan 包计算每个样本的 Shannon 指数，并用 BH (Benjamini-Hochberg) *P* 值校正和 Kruskal-Wallis 检验来比较各组间 Shannon 指数的统计差异。基于 Bray-

表 1　本研究使用的引物序列

Tab. 1　Primer sequences used in this study

基因 genes	引物序列(5′-3′) primer sequences (5′-3′)	参考文献 references
nifH	F: 5′-AAAGGYGGWATCGGYAARTCCACCAC-3′	[22]
	R: 5′-TGSGCYTTGTCYTCRCGGATBGGCAT-3′	
amoB	F: 5′-TGGTAYGACATKAWATGG-3′	[23]
	R: 5′-RCGSGGCARGAACATSGG-3′	
nxrA	F: 5′-CAGACCGACGTGTGCGAAAG-3′	[24]
	R: 5′-TCCACAAGGAACGGAAGGTC-3′	
narG	F: 5′-TAYGTSGGGCAGGARAAACTG-3′	[25]
	R: 5′-CGTAGAAGAAGCTGGTGCTGT-3′	
*nirK*1	F: 5′-GGMATGGTKCCSTGGCA-3′	[26]
	R: 5′-GCCTCGATCAGRTTRTGGTT-3′	
*nirK*2	F: 5′-ATGGCGCCATCATGGTNYTNCC-3′	[27]
	R: 5′-TCGAAGGCCTCGATNARRTTRTG-3′	
*nirK*3	F: 5′-TGCACATCGCCAACGGNATGTWYGG-3′	
	R:5′-GGCGCGGAAGATGSHRTGRTCNAC-3′	
*nirS*1	F: 5′-GTSAACGTSAAGGARACSGG-3′	[28]
	R:5′-GASTTCGGRTGSGTCTTGA-3′	
*nirS*2	F: 5′-ATCGTCAACGTCAARGARACVGG-3′	[27]
	R:5′-TTCGGGTGCGTCTTSABGAASAG-3′	
*nirS*3	F: 5′-TGGAGAACGCCGGNCARGTNTGG-3′	
	R: 5′-GATGATGTCCACGGCNACRTANGG-3′	
*nosZ*1	F: 5′-CGCRACGGCAASAAGGTSMSSGT-3′	[29]
	R: 5′-CAKRTGCAKSGCRTGGCAGAA-3′	
*nosZ*2	F: 5′-CGYTGTTCMTCGACAGCCAG-3′	[30]
	R: 5′-CGSACCTTSTTGCCSTYGCG-3′	
napA	F: 5′-CCVAAYGCCTGYGGYGGYGT-3′	[31]
	R: 5′-CCGGTRTGCCAGTGMKCRA-3′	
gdhA	F: 5′-GCCATCGGYCCWTACAAGGG-3′	[32]
	R: 5′-ATGTCRCCNGCCGGAACGTC-3′	
dsrA	F: 5′-ACSCACTGGAAGCACG-3′	[33]
	R: 5′-GGTGGAGCCGTGCATGTT-3′	
dsrB	F: 5′-CAACATCGTYCAYACCCAGGG-3′	[34]
	R: 5′-GTGTAGCAGTTACCGCA-3′	
aprA	F: 5′-TGGCAGATCATGATYMAYGG-3′	[35]
	R: 5′-GCGCCAACYGGRCCRTA-3′	
aprB	F: 5′-CATGTACATCTGCCCCAACG-3′	[36]
	R: 5′-TGGGGAACTTGAAACGCTTG-3′	
16S rRNA gene	F: 5′-GTGCCAGCMGCCGCGG-3′	[37]
	R: 5′-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3′	

Curtis 相似性距离矩阵的主坐标分析 (PCoA) 可视化组间的底质细菌群落差异。利用冗余分析 (RDA) 探究底质理化指标和底质细菌群落之间的相关性。用“FAPROTAX”程序包预测底质细菌群落的功能潜力[40]。对于 qPCR 结果，采用 Kruskal-Wallis 检验分析 N 循环和 S 循环功能基因的绝对拷贝数，以 $P<0.05$ 表示组间差异显著，并采用 ggplot2 包进行可视化。所有数据分析都在 R 软件 (v4.3.2)中完成 (http://www.r-project.org)。

2　结果

2.1　三疣梭子蟹养殖过程中底质和梭子蟹的表观特征及存活率变化

经 28 d 的梭子蟹养殖，底质颜色由初始的灰褐色转变为深黑褐色，并伴有刺激性气味产生 (图 1-a)。梭子蟹的甲壳颜色由青灰色转变为黄褐色，且在甲壳和螯足表面出现分布不均的黑褐色斑点，这些斑点边缘清晰、中心凹陷，符合典型的甲壳溃疡病症状[41]。同时梭子蟹的活动和摄食量减少，部分个体甚至出现附肢脱落的现象。梭子蟹的存活率随着养殖时间的延长大幅下降，存活率的下降主要发生在养殖前 8 天和后 12 天，最终降至 38.1%(图 1-b)。

2.2　底质的理化指标变化

底质的温度、pH 和 DO 含量整体呈下降趋势 (图 2-a~c)，而 NH_4^+-N、NH_3 和 NO_2^--N 含量呈现先升高后降低的趋势。其中，NH_4^+-N 和 NH_3 含量在 14 d 时达到峰值，分别为 0.47 和 0.03 mg/L (图 2-d~e)，而 NO_2^--N 含量在 21 d 时达到最高值 (图 2-f)。此外，底质的 NO_3^--N 和 H_2S 含量均随养殖时间的延长显著上升 ($P<0.05$)，至 28 d 时分别达到 2.51 和 0.20 mg/L(图 2-g~h)。综合上述结果，可以判断养殖底质已发生了恶化。

2.3　三疣梭子蟹养殖过程中底质细菌群落结构变化

在梭子蟹养殖过程中，底质细菌群落的 Shannon 指数呈现先上升后下降的变化趋势，并在第 7 天达到峰值，到第 28 天已基本恢复到初始水平 (图 3-a)。在 β 多样性上，基于加权距离 Bray-Curtis 距离构建的 PCoA 图显示，细菌群落在底质恶化过程中发生了明显的动态变化 (图 3-b)。整体来看，群落结构在暂养初期变化较大，随后变化减缓，7 和 14 d 样本表现出一定程度的重叠，与

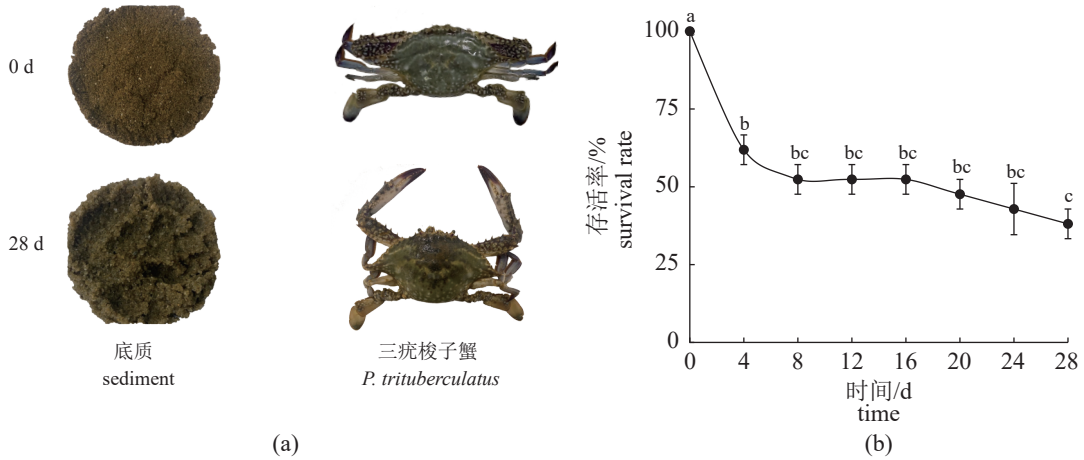

图 1　养殖过程中底质和三疣梭子蟹表观及存活率变化

(a) 底质和梭子蟹表观；(b) 存活率。不同小写字母表示时间点间存在显著差异 (P<0.05)，下同。

Fig. 1　Changes in the appearances of sediment and *P. trituberculatus* and the survival rate during the whole period of rearing

(a) appearances of sediment and *P. trituberculatus*; (b) survival rate. Different lowercase letters indicate a significant difference between time points (P<0.05), the same below.

21 d 样本稍有区分，直到第 28 天又出现较大变化。粗略地表现出恶化前 (0 天)、恶化中 (7~21 d) 和恶化后 (28 d) 这 3 个阶段性过程。

在组成上，底质细菌群落也发生了较大改变 (图 3-c)。在第 0 天，底质细菌群落的优势菌为 γ-变形菌纲，其相对丰度高达 50.7%，其次是 α-变形菌纲 (20.6%)、拟杆菌门 (6%)、放线菌门 (5.5%) 和糖细菌门 (4.6%)。到第 7 天，α-变形菌纲已取代 γ-变形菌纲成为底质的优势菌群，其相对丰度升至 31.8%，其次是拟杆菌门 (19.5%) 和 γ-变形菌纲 (18.8%)，放线菌门 (6.2%) 和 δ-变形菌纲 (4.9%) 的相对丰度也有所增加。到第 14 天时，γ-变形菌纲 (30.5%) 重新成为主要优势菌群，拟杆菌门 (27.5%) 和 α-变形菌纲 (23.4%) 的相对丰度也较高。在随后的两个时间点 (21 天和 28 天)，α-变形菌纲的相对丰度始终维持在 30% 以上，成为最稳定的优势菌群，其次为 γ-变形菌纲和拟杆菌门。值得注意的是，到第 28 天，尽管 α-变形菌纲 (33.1%) 的相对丰度保持稳定，但 γ-变形菌纲 (11.3%) 和 δ-变形菌纲 (2.9%) 的相对丰度下降，而厚壁菌门的相对丰度增至 14.8%，表明恶化后底质细菌群落发生了演替。

2.4　底质理化指标与细菌群落的相关性

RDA 分析的第一和第二主轴共解释了 57.28% 的细菌群落分布变异 (图 4)。在环境因子中，pH (R^2= 0.15) 与底质细菌群落的变化关系最为密切，其次是温度 (R^2= 0.13)、H_2S(R^2= 0.12)、NH_4^+-N(R^2= 0.12)、NO_3^--N(R^2= 0.12)、NH_3(R^2= 0.12)、DO(R^2= 0.11) 和 NO_2^--N(R^2= 0.10)。此外，从第 14~21 天，NO_2^--N、NH_3、NH_4^+-N 和 H_2S 含量与细菌群落呈正相关，pH、温度和 DO 与细菌群落呈负相关。这些结果表明，底质理化因子与其细菌群落存在较大的相关性。

2.5　底质细菌群落的代谢功能变化

为了揭示底质细菌群落在 N 和 S 元素生物地球化学循环中的功能潜力变化，本研究利用 FAPROTAX 工具对所有底质 zOTUs 进行了功能预测。共预测到 7 种与 N 循环相关的代谢功能，包括固氮作用、好氧氨氧化、好氧亚硝酸盐氧化、硝化作用、硝酸盐还原、硝酸盐呼吸和氮呼吸 (图 5-a)，这些功能潜力在底质恶化过程中发生了显著变化 (P<0.05)。其中，底质细菌群落的固氮作用在第 7 天显著增强 (P<0.05)，随后逐渐回落。好氧氨氧化、好氧亚硝酸盐氧化和硝化作用的功能潜力分别在第 7 和 21 天显著高于 0 天水平 (P< 0.05)，而在第 28 天显著降低 (P<0.05)，回复到初始水平。相比之下，硝酸盐还原作用在暂养 7~21 d 都维持较高的功能潜力，而硝酸盐呼吸和氮呼吸主要在暂养的 14 d 开始升高。

本研究还预测到 9 种与 S 循环相关的代谢功

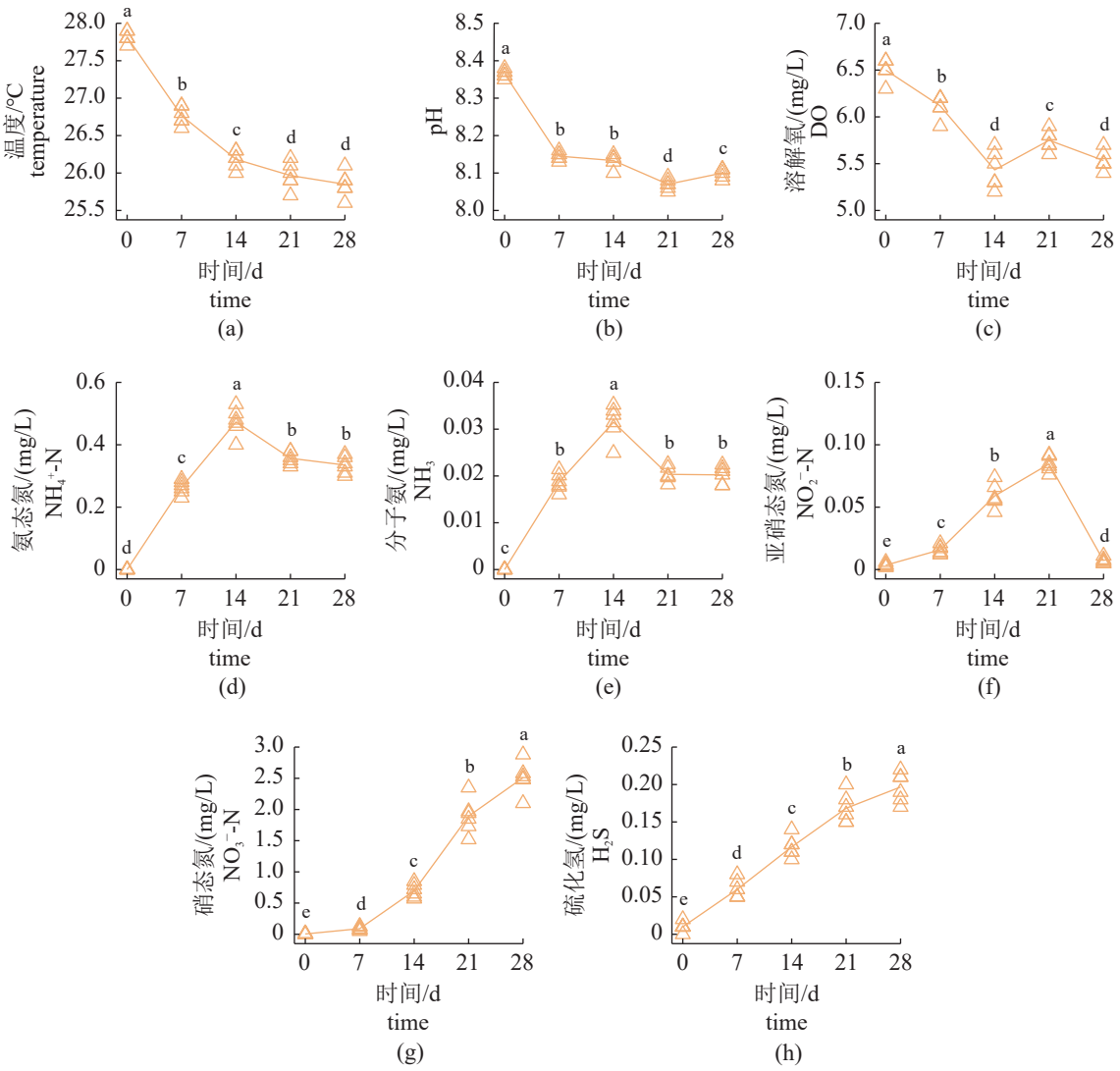

图 2　三疣梭子蟹养殖过程中底质的理化指标变化

(a) 温度；(b) pH；(c) DO；(d) NH_4^+-N；(e) NH_3；(f) NO_2^--N；(g) NO_3^--N；(h) H_2S。

Fig. 2　Changes in physicochemical indexes of sediment during the rearing of *P. trituberculatus*

(a) temperature; (b) pH; (c) DO; (d) NH_4^+-N; (e) NH_3; (f) NO_2^--N; (g) NO_3^--N; (h) H_2S.

能，包括硫暗氧化、硫代硫酸盐暗氧化、亚硫酸盐暗氧化、硫化合物暗氧化、硫呼吸、硫代硫酸盐呼吸、亚硫酸盐呼吸、硫酸盐呼吸和硫化合物呼吸。其中，亚硫酸盐呼吸、硫酸盐呼吸及硫化合物呼吸的功能丰度均在第 28 天达到峰值。

本研究采用 qPCR 技术进一步分析了底质细菌群落中氮循环和硫循环相关功能基因在不同时间点的拷贝数动态变化。结果显示，14 个氮循环功能基因和 4 个硫循环功能基因在底质恶化过程中发生了较大变化 (图 5-b)。具体而言，除了 *narG*、*nirK*1 和 *nirS*1 在第 0 天呈现较高表达水平外，其余 N、S 循环功能基因的初始表达水平均较低。在氮循环功能基因中，硝化 (*amoB* 和 *nxrA*)、反硝化 (*nirK*1、*nirK*2、*nirK*3 和 *nirS*3)、异化氮还原 (*napA*) 和有机氮矿化 (*gdhA*) 的基因表达均呈现先上升后下降的变化趋势，且表达峰值都出现在第 14 天；而部分反硝化基因，如 *nosZ*1 和 *nosZ*2 的表达水平在 14 天到达峰值后维持在相近水平波动。在硫循环功能基因方面，异化硫酸盐还原 (*dsrA*、*dsrB* 和 *aprB*) 的基因表达呈现波动上升趋势，峰值均出现在第 28 天；而 *aprA* 基因表达则表现为先上升后下降的变化模式，峰值出现在第 21 天。这些结果进一步佐证了底质恶化过程中底质细菌群落的 N、S 循环功能。

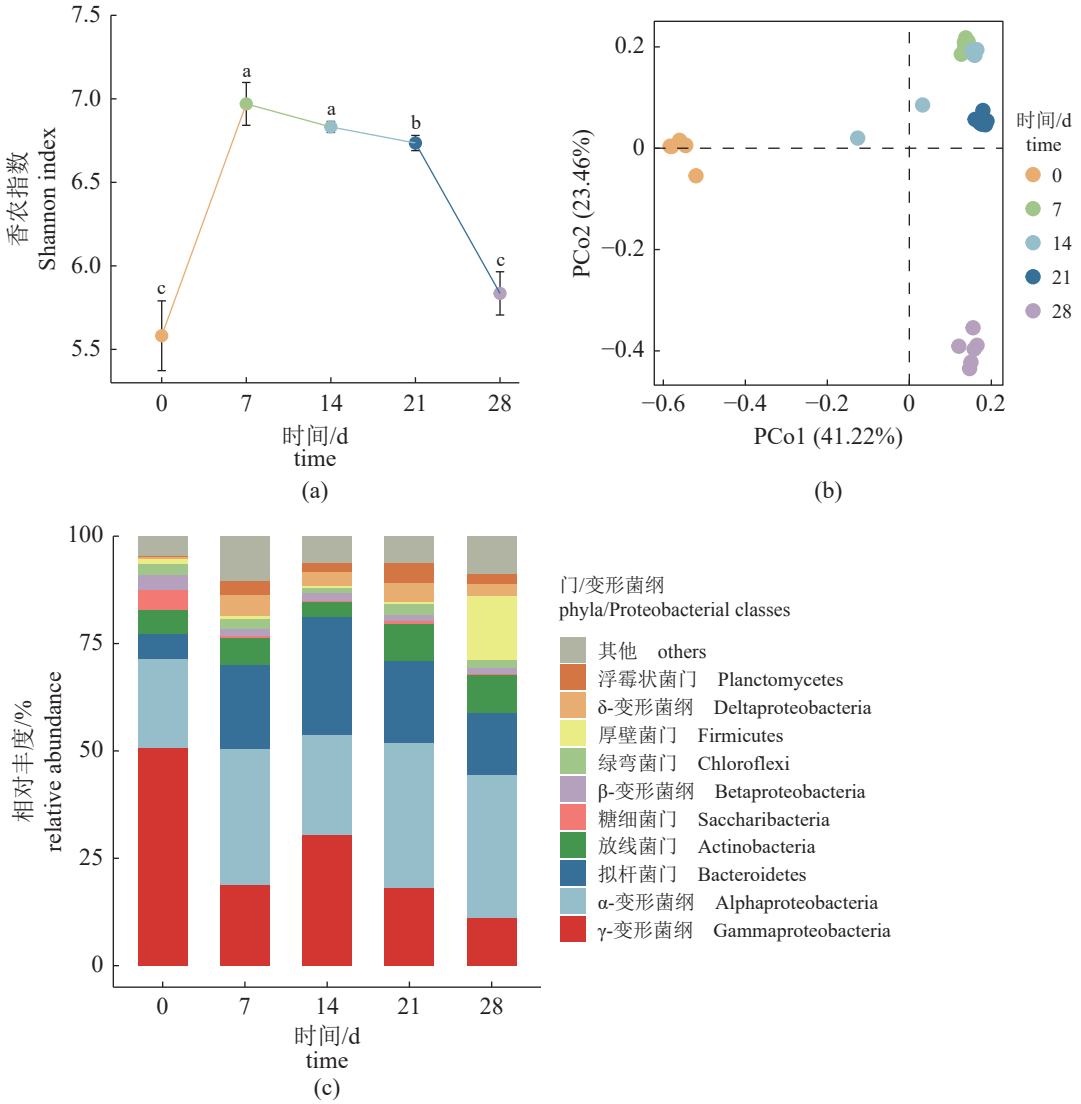

图 3　底质恶化过程中底质细菌群落结构的变化

(a) 香农指数；(b) 基于 Bray-Curtis 距离的主坐标分析 (PCoA) 可视化底质细菌群落差异；(c) 前 10 的门或变形菌纲。

Fig. 3　Structural changes of sediment bacterial communities during the process of sediment deterioration

(a) Shannon index; (b) principal coordinate analysis (PCoA) plot visualizes dissimilarities of sediment bacterial community based on the Bray-Curtis similarity distance; (c) top 10 of phyla or Proteobacterial classes.

鉴于硝化作用对底质氨氮和亚硝态氮等指标的重要影响，进一步分析了其在底质恶化过程中的变化及在第 21 天对该功能具有贡献的细菌。结果发现，除了第 14 天，该功能的绝对丰度整体呈现先上升后下降的趋势，其丰度也在第 21 天达到峰值，且显著高于 0 天 (图 6-a)。此时硝化作用功能潜力的提高主要归因于硝化螺菌属 (*Nitrospira*)、硝化刺菌属 (*Nitrospina*)、亚硝化球菌属 (*Nitrosococcus*)、亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*) 和亚硝化单胞菌科 (Nitrosomonadaceae) 细菌 (图 6-b)。

在底质 S 循环过程中，硫化合物呼吸是微生物利用硫化物 (如硫酸盐、亚硫酸盐、硫代硫酸盐等) 作为终端电子受体的厌氧呼吸过程，以 H_2S 作为主要最终产物。为此，实验深入分析了其在底质恶化过程中的动态变化及其第 28 天的相关贡献菌。结果显示，硫化合物呼吸功能的绝对丰度在第 7、14 和 28 天均显著高于 0 天 (P<0.05)，并在第 28 天大幅提升，达到峰值 (图 7-a)。此时硫化合物呼吸功能潜力的提高主要归因于脱硫豆菌属 (*Desulfofaba*)、梭形杆菌属 (*Fusibacter*)、脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*)、脱硫杆菌属 (*Desulfobacter*) 和脱硫杆菌科 (Desulfobacteraceae) 细菌 (图 7-b)。

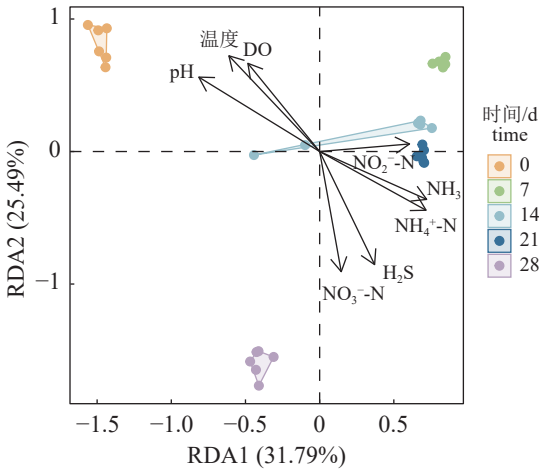

图 4　冗余分析 (RDA) 显示底质理化因子对底质细菌群落变化的影响

Fig. 4　Redundancy analysis (RDA) shows the impact of physicochemical factors on the changes in sediment bacterial community

3　讨论

在养殖系统中，底质是底栖动物赖以生存的环境基质，然而底质恶化将直接影响着动物的健康和存活。在本研究中，28 d 的梭子蟹养殖导致了底质恶化，这与养殖鱼虾的底质恶化情况相似，都发生了如变黑、发臭、DO 下降和 H_2S 累积等情况[11-13]。在单一的梭子蟹养殖系统中，梭子蟹是消费者，而底质微生物是分解者，是底质各种营养素分解和回收的关键参与者，也是养殖系统 CNPS 生物地球化学循环的重要驱动者[42-45]。因此，底质的表型和理化指标变化应该与底质微生物密切相关。

底质细菌群落的高通量测序结果发现，底质细菌群落结构在梭子蟹养殖过程中发生了显著变化，类似的结果也发生在草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 养殖的底质中[46]。在本研究中，底质细菌群落的 α-多样性在底质恶化过程中呈现先上升后下降的变化趋势，这可能是有机物 (主要是饲料) 的投入为底质细菌提供了丰富的营养，促进了细菌的大量繁殖，16S rRNA 基因拷贝数的先上升后下降变化佐证了上述推测。细菌的繁殖推动了底质细菌群落的种群演替，导致细菌群落的 α-多样性和 β-多样性产生特征性改变。这种变化可能是多种环境因子协同作用的结果。在群落组成上，梭子蟹养殖底质细菌群落的初始最优势菌群为 γ-变形菌纲。γ-变形菌纲细菌能够在底质的厌氧条件下进行光合作用，同化 CO_2，并将硫化物氧化为单质硫[47]。随着底质恶化的进行，γ-变形菌纲

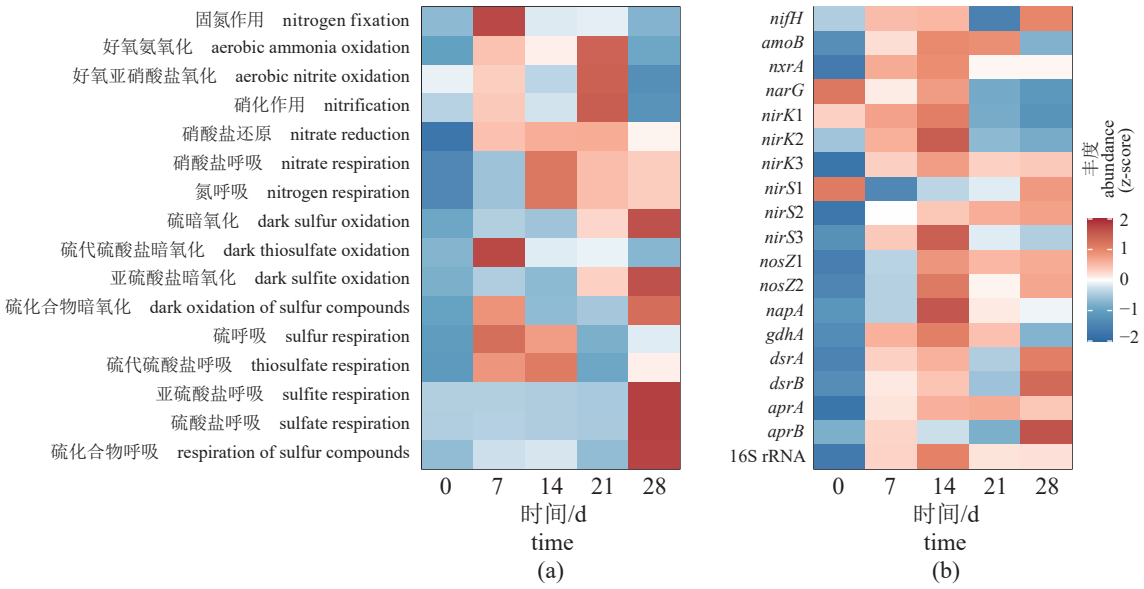

图 5　底质恶化过程中底质细菌群落的 N、S 循环功能的变化

(a) 预测 N、S 功能的潜力；(b) N、S 循环基因和 16S rRNA 基因的绝对丰度。蓝色到红色表示丰度 (z-score)，范围从−2 到 2。

Fig. 5　Changes in N and S cycling functions of sediment bacterial communities during the process of sediment degradation

(a) predicted N and S functional potentials; (b) the absolute abundance of N and S cycling genes. Blue to red indicates abundance (z-score), ranging from −2 to 2.

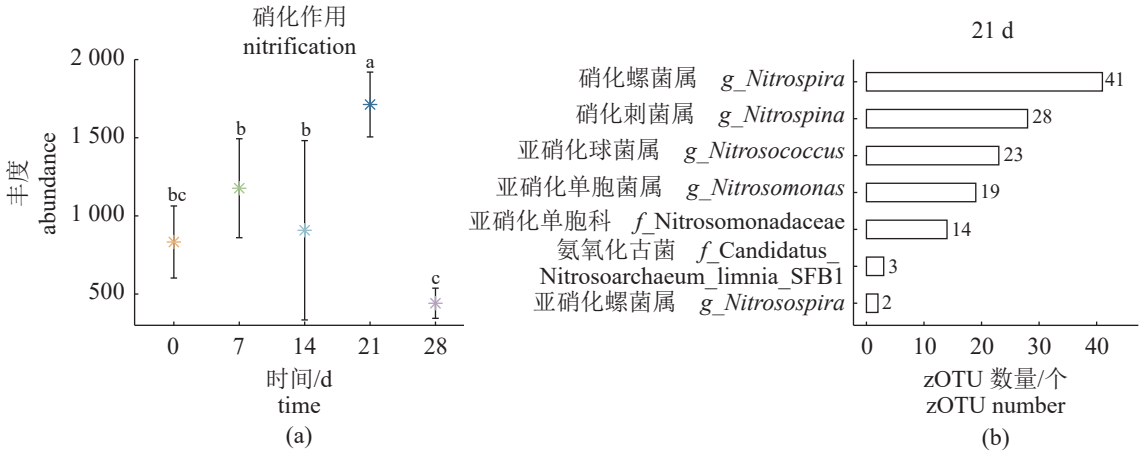

图 6　底质恶化过程中硝化作用功能丰度变化 (a) 及其第 21 天的贡献菌 (b)

图 (b) 中，条形的长度与 zOTU 个数呈正比，条形右边的数字表示 zOTU 个数，下同。

Fig. 6　The changes in the functional abundance of nitrification during the process of sediment degradation (a) and its contributing bacteria at 21 d (b)

The length of the bars is proportional to the number of zOTUs in (b), with the numbers on the right side indicating the corresponding zOTU count, the same below.

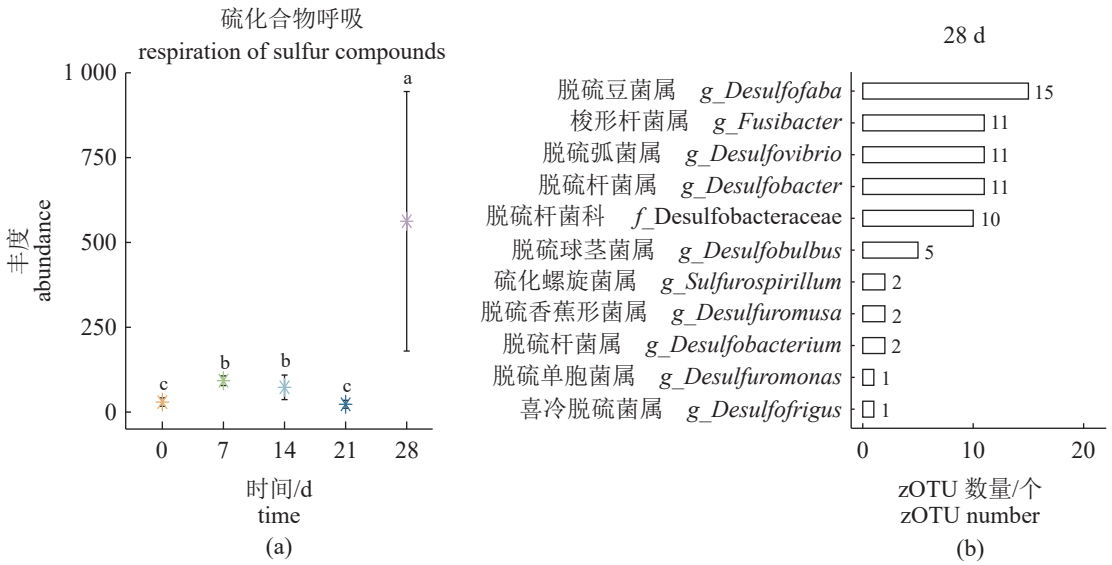

图 7　底质恶化过程中硫化合物呼吸功能丰度变化 (a) 及其第 28 天的贡献菌 (b)

Fig. 7　The changes in the functional abundance of respiration of sulfur compounds during the process of sediment degradation (a) and its contributing bacteria at 28 d (b)

细菌的最优势地位逐渐被 α-变形菌纲细菌取代，这反映了底质环境变化对细菌群落结构的强烈选择压力。值得注意的是，第 28 天厚壁菌门的相对丰度显著上升，这一现象与蓝藻水华降解末期的细菌群落变化相似[48]，表明该菌在恶化环境中具有特殊的生态适应性。冗余分析结果表明 pH 和温度与底质细菌群落变化的关系最为密切。pH 能调控细胞膜电荷平衡和胞外酶活性，只有特定酸碱环境的适应菌才能生长和存活[49-50]；而温度也调节酶的活性，影响着有机物降解和营养物质循环的速率[51-52]。因此，pH 和温度的下降可能影响了底质细菌群落的分布结构。DO 也是底质细菌群落变化的驱动因子。尽管底质 DO 的下降幅度只有 1 mg/L，且仍维持较高的水平，但流通性较差的底质可能导致局部缺氧，降低的底质 DO 和 pH 有利于厌氧菌的繁殖[53]，促进有机质的厌氧发酵产生硫化物，本研究中硫酸盐还原菌 (SRB) 和硫还原菌的生长及 H_2S 浓度的持续升高佐证了上

述观点。H_2S 和 NH_4^+-N 是驱动底质细菌群落变化的两个主要化学指标。其中，H_2S 的积累会选择性富集硫化物耐受菌群，如脱硫单胞菌属和脱硫香蕉形菌属[54]。尽管这些严格厌氧菌在底质细菌群落中的相对丰度较低，但对整个群落的硫化合物呼吸功能潜力具有重要贡献。此外，NH_4^+-N 的升高促进了氨氧化细菌的生长，产生 NO_2^-，进而促进亚硝酸盐氧化细菌的生长[55]。总之，细菌栖息的底质环境变化会影响细菌群落的演替，细菌群落的演替会改变其介导的元素循环功能[17-18]，从而反过来影响底质环境。

FAPROTAX 功能预测和 qPCR 分析均表明，底质细菌群落的 N 循环和 S 循环相关功能潜力和功能基因表达量发生了明显的时序变化。其中 *amoB* 基因是编码氨单加氧酶的关键基因之一。在氨氧化细菌中，氨单加氧酶能催化 NH_3 与氧气反应，将其转化为羟胺 (NH_2OH)[56]。在本研究中，*amoB* 在底质恶化中期的高表达表明底质的氨氧化作用主要由好氧的氨氧化细菌执行，其具有将 NH_4^+氧化为 NO_2^-的能力[57-58]。底质中有机质降解导致的 NH_4^+-N 浓度升高，为氨氧化细菌提供了充足底物[59]。*nxrA* 基因编码亚硝酸还原酶的一个亚基。在硝化细菌中，*nxrA* 基因参与 NO_2^-转化为 NO_3^-过程中电子传递等的反应环节。该基因在底质恶化中期的高表达，表明底质的 NO_2^-被进一步氧化为 NO_3^-。在底质的好氧亚硝酸盐氧化作用中起主要作用的是亚硝酸盐氧化细菌，其具有将 NO_2^-转化为 NO_3^-的功能[58, 60]。值得注意的是，本研究发现在底质的硝化作用中起主要作用的为硝化螺菌属、硝化刺菌属、亚硝化球菌属、亚硝化单胞菌属和亚硝化单胞菌科的细菌类群，其中硝化刺菌属是底质细菌群落的优势属。此外，反硝化基因 (*nirK*、*nirS*3 和 *nosZ*) 在底质恶化中期和后期达到表达峰值，表明底质细菌也发挥着反硝化功能。反硝化细菌的代谢激活可能与底质中氧化还原电位持续下降有关[61]。

与 N 循环功能的快速响应不同，S 循环相关功能潜力包括硫酸盐呼吸、亚硫酸盐呼吸、硫化合物呼吸则表现出明显的滞后，这一现象在 S 循环相关功能基因 (主要是 *dsrA* 和 *dsrB*) 的表达水平中也得到了印证。*dsrAB* 基因簇编码的蛋白是异化硫酸盐还原酶 (Dsr) 的核心组成部分。其中，DsrA 亚基负责传递电子，DsrB 亚基则直接参与将硫酸根 (SO_4^{2-}) 还原为 H_2S 的反应[62]。这两个基因的表达峰值均出现在底质恶化后期，与底质的 H_2S 含量持续升高相符。对硫化合物呼吸具有重要贡献的底质细菌类群分属于脱硫豆菌属、梭形杆菌属、脱硫弧菌属和脱硫杆菌属等。这些细菌都属于 SRB，其中脱硫豆菌属、脱硫弧菌属和脱硫杆菌属细菌都含有 *dsrAB* 基因，能执行异化硫酸盐还原反应，产生 H_2S[63-66]。尽管梭形杆菌属细菌也是 SRB[67]，是化能有机营养型的严格厌氧菌，能把腺苷酰硫酸和硫代硫酸盐还原成为 H_2S，但执行该功能的基因是 *aprAB* 和 *sudhAB* 基因[68]。大多数 SRB 需要严格的厌氧条件才能达到最佳活性[69]，这解释了 S 循环相关功能滞后的原因。

（作者声明本文无利益冲突）

参考文献 (References):

[1] 潘鲁青, 王奎琪. 三疣梭子蟹幼体消化酶活力及氨基酸组成的研究 [J]. 水产学报, 1997, 21(3): 246-251.
Pan L Q, Wang K Q. Studies on digestive enzyme activities and amino acid in the larvae of *Portunus trituberculatus*[J]. Journal of Fisheries of China, 1997, 21(3): 246-251 (in Chinese).

[2] 徐永健, 申屠基康, 丁张妮. 砂粒粒径与砂层厚度对单体筐养养殖系统中三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 幼蟹摄食行为与生长特性的影响研究 [J]. 海洋与湖沼, 2015, 46(1): 233-239.
Xu Y J, Shentu J K, Ding Z N. Grain size and thickness of sand bottom affect the growth of swimming crab *Portunus trituberculatus* in single-crab basket-culture system[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2015, 46(1): 233-239 (in Chinese).

[3] Zhu B S, Zhang H Z, Liu D P, *et al*. Importance of substrate on welfare in swimming crab (*Portunus trituberculatus*) culture: a territorial behavior perspective[J]. Aquaculture Reports, 2022, 24: 101113.

[4] Xiong T H, Mu C K, Wang C L, *et al*. Environmental enrichment improves survival and growth of *Portunus trituberculatus* in recirculating aquaculture system by reducing energy expenditure and stress responses[J]. Aquaculture, 2024, 582: 740544.

[5] 黄丽, 吴松, 覃东立, 等. 淡水养殖池塘水质评价及与底质相关性分析 [J]. 水产学杂志, 2024, 37(2): 90-97,125.
Huang L, Wu S, Qin D L, *et al*. Water quality evaluation and correlation analysis with sediment in freshwater intensive culture ponds[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2024, 37(2): 90-97,125 (in Chinese).

[6] Dai L L, Liu C Q, Peng L, *et al*. Different distribution patterns of microorganisms between aquaculture pond sediment and water[J]. Journal of Microbiology, 2021, 59(4): 376-388.

[7] Mallik S K, Pathak R, Shahi N. Sediment microbiology in the aquatic environment[M]//Pandey P K, Mallik S K, Yumnam R. Handbook of aquatic microbiology. Boca Raton: CRC Press, 2024: 56-76.

[8] Moncada C, Hassenrück C, Gärdes A, *et al*. Microbial community composition of sediments influenced by intensive mariculture activity[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2019, 95(2): fiz006.

[9] Kalantzi I, Rico A, Mylona K, *et al*. Fish farming, metals and antibiotics in the eastern Mediterranean Sea: is there a threat to sediment wildlife?[J]. Science of the Total Environment, 2021, 764: 142843.

[10] Chen Z, Li J, Zhai Q Q, *et al*. Nitrogen cycling process and application in different prawn culture modes[J]. Reviews in Aquaculture, 2024, 16(4): 1580-1602.

[11] 丁庆秋, 王田, 程辉辉. 从“改底”入手解决水产养殖难题 [J]. 当代水产, 2020, 45(12): 74, 76.
Ding Q Q, Wang T, Cheng H H. Starting with "substrate improvement" to solve aquaculture challenges[J]. Current Fisheries, 2020, 45(12): 74, 76 (in Chinese).

[12] 王新叶, 郑述河, 赵玉静, 等. 鱼虾养殖池塘底质恶化的原因及改良措施 [J]. 水产养殖, 2022, 43(7): 62-63.
Wang X Y, Zheng S H, Zhao Y J, *et al*. Causes of sediment deterioration in fish and shrimp ponds and improvement measures[J]. Journal of Aquaculture, 2022, 43(7): 62-63 (in Chinese).

[13] 刘慧玲, 柴欣如, 许文军, 等. 缢蛏对虾-蟹混养池塘底质微生物数量和活性的影响 [J]. 浙江海洋大学学报 (自然科学版), 2023, 42(1): 50-56.
Liu H L, Chai X R, Xu W J, *et al*. Effect of *Sinonova culaconstricta* on the quantity and activity of microorganism in the sediment of crab-shrimp polyculture ponds[J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science), 2023, 42(1): 50-56 (in Chinese).

[14] 顾顺樟. 硫化物对中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 雌性亲体胁迫效应的研究 [D]. 上海: 华东师范大学, 2007.
Gu S Z. Studies on the stress effect of sulfide on adult Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis* female[D]. Shanghai: East China Normal University, 2007 (in Chinese).

[15] 顾楠. 氨氮胁迫对凡纳滨对虾生长、生理指标、鳃和肝胰腺显微结构和相关基因表达的影响 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.
Gu N. Effects of ammonia nitrogen stress on growth, physiological and biochemical properties, gill and hepatopancreas gene expression and microstructure of *Penaeus vannamei*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020 (in Chinese).

[16] Falkowski P G, Barber R T, Smetacek V. Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production[J]. Science, 1998, 281(5374): 200-206.

[17] Lin W C, Lu J Q, Yao H Y, *et al*. Elevated pCO_2 alters the interaction patterns and functional potentials of rearing seawater microbiota[J]. Environmental Pollution, 2021, 287: 117615.

[18] Lu Z B, Lin W C, Li Q, *et al*. Recirculating aquaculture system as microbial community and water quality management strategy in the larviculture of *Scylla paramamosain*[J]. Water Research, 2024, 252: 121218.

[19] Zhang M Y, Pan L Q, Huang F, *et al*. Metagenomic analysis of composition, function and cycling processes of microbial community in water, sediment and effluent of *Litopenaeus vannamei* farming environments under different culture modes[J]. Aquaculture, 2019, 506: 280-293.

[20] Bower C E, Bidwell J P. Ionization of ammonia in seawater: effects of temperature, pH, and salinity[J]. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 1978, 35(7): 1012-1016.

[21] Castrillo G, Teixeira P J P L, Paredes S H, *et al*. Root microbiota drive direct integration of phosphate stress and immunity[J]. Nature, 2017, 543(7646): 513-518.

[22] Rösch C, Bothe H. Improved assessment of denitrifying, N_2-fixing, and total-community bacteria by terminal restriction fragment length polymorphism analysis using multiple restriction enzymes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(4): 2026-2035.

[23] Calvó L, Garcia-Gil L J. Use of *amoB* as a new molecular marker for ammonia-oxidizing bacteria[J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 57(1): 69-78.

[24] Wertz S, Poly F, Le Roux X, *et al*. Development and application of a PCR-denaturing gradient gel electrophoresis tool to study the diversity of *Nitrobacter*-like *nxrA* sequences in soil[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2008, 63(2): 261-271.

[25] López-Gutiérrez J C, Henry S, Hallet S, *et al*. Quantification of a novel group of nitrate-reducing bacteria in the environment by real-time PCR[J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 57(3): 399-407.

[26] Braker G, Fesefeldt A, Witzel K P. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998,

64(10): 3769-3775.

[27] Wei W, Isobe K, Nishizawa T, *et al*. Higher diversity and abundance of denitrifying microorganisms in environments than considered previously[J]. The ISME Journal, 2015, 9(9): 1954-1965.

[28] Jung J, Yeom J, Kim J, *et al*. Change in gene abundance in the nitrogen biogeochemical cycle with temperature and nitrogen addition in Antarctic soils[J]. Research in Microbiology, 2011, 162(10): 1018-1026.

[29] Henry S, Bru D, Stres B, *et al*. Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG, nirK*, and *nosZ* genes in soils[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(8): 5181-5189.

[30] Throbäck I N, Enwall K, Jarvis Å, *et al*. Reassessing PCR primers targeting *nirS, nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 49(3): 401-417.

[31] Gittel A, Kofoed M V W, Sørensen K B, *et al*. Succession of *Deferribacteres* and *Epsilonproteobacteria* through a nitrate-treated high-temperature oil production facility[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2012, 35(3): 165-174.

[32] Zheng B X, Zhu Y G, Sardans J, *et al*. QMEC: a tool for high-throughput quantitative assessment of microbial functional potential in C, N, P, and S biogeochemical cycling[J]. Science China Life Sciences, 2018, 61(12): 1451-1462.

[33] Ben-Dov E, Brenner A, Kushmaro A. Quantification of sulfate-reducing bacteria in industrial wastewater, by real-time polymerase chain reaction (PCR) using *dsrA* and *apsA* genes[J]. Microbial Ecology, 2007, 54(3): 439-451.

[34] Geets J, Borremans B, Diels L, *et al*. *DsrB* gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria[J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 66(2): 194-205.

[35] Meyer B, Kuever J. Molecular analysis of the diversity of sulfate-reducing and sulfur-oxidizing prokaryotes in the environment, using *aprA* as functional marker gene[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(23): 7664-7679.

[36] Clark M E, He Z L, Redding A M, *et al*. Transcriptomic and proteomic analyses of *Desulfovibrio vulgaris* biofilms: carbon and energy flow contribute to the distinct biofilm growth state[J]. BMC Genomics, 2012, 13: 138.

[37] Zhou J Z, Wu L Y, Deng Y, *et al*. Reproducibility and quantitation of amplicon sequencing-based detection[J]. The ISME Journal, 2011, 5(8): 1303-1313.

[38] Looft T, Johnson T A, Allen H K, *et al*. In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(5): 1691-1696.

[39] Zhu Y G, Zhao Y, Li B, *et al*. Continental-scale pollution of estuaries with antibiotic resistance genes[J]. Nature Microbiology, 2017, 2(4): 16270.

[40] Sansupa C, Wahdan S F M, Hossen S, *et al*. Can we use functional annotation of prokaryotic taxa (FAPROTAX) to assign the ecological functions of soil bacteria?[J]. Applied Sciences, 2021, 11(2): 688.

[41] 周俊芳, 李新苍, 王江勇, 等. 中国海水蟹主要流行性疾病及其病原分析 [J]. 海洋科学, 2014, 38(6): 102-106.
Zhou J F, Li X C, Wang J Y, *et al*. Analysis of major infectious diseases and their causative agents of Chinese sea crabs[J]. Marine Sciences, 2014, 38(6): 102-106 (in Chinese).

[42] Wang F, Dong W Y, Zhao Z L, *et al*. Heavy metal pollution in urban river sediment of different urban functional areas and its influence on microbial community structure[J]. Science of the Total Environment, 2021, 778: 146383.

[43] Nho S W, Abdelhamed H, Paul D, *et al*. Taxonomic and functional metagenomic profile of sediment from a commercial catfish pond in Mississippi[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2855.

[44] Zhang Z M, Deng Q H, Wan L L, *et al*. Bacterial communities and enzymatic activities in sediments of long-term fish and crab aquaculture ponds[J]. Microorganisms, 2021, 9(3): 501.

[45] Xu M, Xu R Z, Shen X X, *et al*. The response of sediment microbial communities to temporal and site-specific variations of pollution in interconnected aquaculture pond and ditch systems[J]. Science of the Total Environment, 2022, 806: 150498.

[46] Hou Y R, Li B, Xu G C, *et al*. Dynamic and assembly of benthic bacterial community in an industrial-scale in-pond raceway recirculating culture system[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 797817.

[47] Gray J P, Herwig R P. Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(11): 4049-4059.

[48] 李建松, 王广军, 龚望宝, 等. 蓝藻水华发生过程中细菌群落结构的动态变化 [J]. 中国农业大学学报, 2017, 22(7): 134-142.
Li J S, Wang G J, Gong W B, *et al*. Dynamic changes of bacterial community structure in the occurrence process of cyanobacterial bloom[J]. Journal of China Agricultural University, 2017, 22(7): 134-142 (in Chinese).

[49] Fierer N, Jackson R B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(3): 626-631.

[50] Jani S A, Parekh Y M, Parmar T N, *et al*. Screening and characterization of alkaline protease producing *Bacillus* strain B-4 *Bacillus flexus* and study of its potential for alkaline protease production[J]. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 2016, 5(5): 767-787.

[51] 姜泽建, 刘文畅, 谭洪新,等. 保存温度对生物絮团硝化性能和形态结构的影响 [J]. 水产学报, 2024, 48(11): 119512.
Jiang Z J, Liu W C, Tan H X, *et al* . Effect of preservation temperature on the nitrification performance and morphological structure of bioflocs[J]. Journal of fisheries of china, 2024, 48(11): 119512(in Chinese).

[52] Li M Y, Li Q, Wang S R, *et al*. The diversity and biogeography of bacterial communities in lake sediments across different climate zones[J]. Environmental Research, 2024, 263: 120028.

[53] Herlina N, Lubis M T, Husin A, *et al*. Studies on decreasing Chemical Oxygen Demand (COD) on artificial laundry wastewater using anaerobic-aerobic biofilter dipped with bio ball media[J]. MATEC Web of Conferences, 2019, 276: 06015.

[54] Diakiv S V, Hnatush S O, Moroz O M, *et al*. Sulfur reducing bacteria from coal pits waste heaps of chervonograd mining region[J]. Біологічні Студії/Studia Biologica, 2016, 10(2): 63-76.

[55] Sepehri A, Sarrafzadeh M H. Activity enhancement of ammonia-oxidizing bacteria and nitrite-oxidizing bacteria in activated sludge process: metabolite reduction and CO_2 mitigation intensification process[J]. Applied Water Science, 2019, 9(5): 131.

[56] Wu M R, Hou T T, Liu Y, *et al*. Novel *Alcaligenes ammonioxydans* sp. nov. from wastewater treatment sludge oxidizes ammonia to N_2 with a previously unknown pathway[J]. Environmental Microbiology, 2021, 23(11): 6965-6980.

[57] Preena P G, Kumar V J R, Singh I S B. Nitrification and denitrification in recirculating aquaculture systems: the processes and players[J]. Reviews in Aquaculture, 2021, 13(4): 2053-2075.

[58] Moschos S, Kormas K A, Karayanni H. Prokaryotic diversity in marine and freshwater recirculating aquaculture systems[J]. Reviews in Aquaculture, 2022, 14(4): 1861-1886.

[59] Kuypers M M M, Marchant H K, Kartal B. The microbial nitrogen-cycling network[J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, 16(5): 263-276.

[60] Sun X, Kop L F M, Lau M C Y, *et al*. Uncultured *Nitrospina*-like species are major nitrite oxidizing bacteria in oxygen minimum zones[J]. The ISME Journal, 2019, 13(10): 2391-2402.

[61] Vuono D C, Read R W, Hemp J, *et al*. Resource concentration modulates the fate of dissimilated nitrogen in a dual-pathway actinobacterium[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 3.

[62] 王亚鑫, 吴玉, 张洪琳, 等. 微生物硫代谢及其驱动下建立的生物生态关系 [J]. 微生物学报, 2022, 62(3): 930-948.
Wang Y X, Wu Y, Zhang H L, *et al*. Microbial sulfur metabolism and the bioecological relationships driven by sulfur metabolism[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(3): 930-948 (in Chinese).

[63] Larsen Ø, Lien T, Birkeland N K. Characterization of the desulforubidin operons from *Desulfobacter vibrioformis* and *Desulfobulbus rhabdoformis*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2000, 186(1): 41-46.

[64] Rey F E, Gonzalez M D, Cheng J Y, *et al*. Metabolic niche of a prominent sulfate-reducing human gut bacterium[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(33): 13582-13587.

[65] Gao P, Zhang X T, Huang X M, *et al*. Genomic insight of sulfate reducing bacterial genus *Desulfofaba* reveals their metabolic versatility in biogeochemical cycling[J]. BMC Genomics, 2023, 24(1): 209.

[66] Singh S B, Carroll-Portillo A, Lin H C. *Desulfovibrio* in the gut: the enemy within?[J]. Microorganisms, 2023, 11(7): 1772.

[67] Smii L, Hania W B, Cayol J L, *et al*. *Fusibacter bizertensis* sp. nov. , isolated from a corroded kerosene storage tank[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(Pt_1): 117-121.

[68] Brioukhanov A L, Kadnikov V V, Beletsky A V, *et al*. Aerotolerant thiosulfate-reducing bacterium *Fusibacter* sp. strain WBS isolated from littoral bottom sediments of the white sea-biochemical and genome analysis[J]. Microorganisms, 2023, 11(7): 1642.

[69] Muyzer G, Stams A J M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria[J]. Nature Reviews Microbiology, 2008, 6(6): 441-454.

Phenotypic and physicochemical characteristics of sediment deterioration during the culture of the swimming crabs (*Portunus trituberculatus*) and their correlations with bacterial community

ZHOU Jiazheng [1], WU Qingyang [1,2], SHI Ce [1,2], MU Changkao [1], WANG Chunlin [1], YE Yangfang [1*]

(1. *School of Marine Sciences*, *Ningbo University*, *Ningbo* 315832, *China*;
2. *Key Laboratory of Aquacultural Biotechnology*, *Ministry of Education*, *Ningbo University*, *Ningbo* 315832, *China*)

Abstract: Deteriorating sediment quality adversely affects the health of aquatic organisms and even threatens their survival. Sediment microorganisms, key drivers of carbon, nitrogen, phosphorus, and sulfur (CNPS) cycling, are closely correlated with water quality changes in aquaculture systems. Yet, studies on the microbial community structure and function associated with sediment deterioration remain scarce. To explore the deterioration characteristics of the sediment during the culture of the swimming crab *Portunus trituberculatus* and their correlations with bacterial community, a 28-day crab farming trial was simulated in indoor canvas tanks using sea sand as the sediment. We monitored temporal changes in sediment appearance and physicochemical parameters. Using 16S rRNA gene amplicon sequencing, we profiled the sediment bacterial community, and applied redundancy analysis to examine its correlation with the physicochemical factors. Finally, we assessed functional changes via FAPROTAX and quantitative polymerase chain reaction techniques. The results showed that the color of sediment changed from initial grayish-brown to dark brownish-black, accompanied by the generation of an irritating odor. The shell color of swimming crabs changed from bluish-gray to yellowish-brown, and blackish-brown spots appeared on the surface of the shell and chelipeds, with the survival rate dropping to 38.1%. The temperature, pH, and dissolved oxygen content of the sediment continuously decreased, while the levels of ammonia nitrogen (NH_4^+-N), unionized ammonia (NH_3), and nitrite nitrogen (NO_2^--N) first increased and then decreased, peaking at day14 and day 21, respectively. In contrast, the levels of nitrate nitrogen (NO_3^--N) and hydrogen sulfide (H_2S) continuously increased over 28 days. Meanwhile, the α-diversity of the sediment bacterial community first increased and then decreased, while the β-diversity exhibited three typical stage-specific characteristics: before deterioration (day 0), during deterioration (days 7-21), and after deterioration (day 28). Additionally, the dominant bacteria in the sediment shifted from Gammaproteobacteria to Alphaproteobacteria. The dynamic changes in the sediment bacterial community were driven by the synergistic effects of physical indicators such as pH and temperature, as well as chemical indicators such as H_2S and NH_4^+-N. Functional analysis revealed that the nitrogen cycling functions (nitrification and denitrification) of the sediment bacterial community peaked at day 14 and day 21, with *Nitrospira* and *Nitrospina* being the main contributors to nitrification potential. In contrast, sulfur cycling functions significantly increased at day 28, with *Desulfofaba*, *Fusibacter*, *Desulfovibrio*, and other bacteria being the primary contributors to sulfur compound respiration. qPCR analysis revealed significant changes in the expression of 14 nitrogen-cycle and 4 sulfur-cycle functional genes during sediment deterioration, with nitrification (*amoB* and *nxrA*) and denitrification genes (*nirK*1-3 and *nirS*3) peaking at day 14, while sulfate reducing genes (*dsrA*, *dsrB* and *aprB*) peaked at day 28. These findings indicate that physicochemical indicators of the sediment and its bacterial community interact with each other, jointly driving the deterioration of the sediment. This study can provide basic data and theoretical references for the green and healthy aquaculture of *P. trituberculatus*.

Key words: *Portunus trituberculatus*; sediment deterioration; physicochemical characteristics; bacterial community; functional gene

Corresponding author: YE Yangfang. E-mail: yeyangfang@nbu.edu.cn

Funding projects: Key Project of Ningbo Public Welfare Research Program (2023S008); National Natural Science Foundation of China (32373150)