

文章编号: 1674-5566(2020)04-0516-10

DOI:10.12024/jsou.20190302549

## 不同施肥模式下的稻-克氏原螯虾田块水体菌群初探

黄 锦<sup>1,2,3</sup>, 成永旭<sup>1,2,3</sup>, 王海锋<sup>1,2,3</sup>, 申浩然<sup>1,2,3</sup>, 陈焕根<sup>4</sup>, 李嘉尧<sup>1,2,3</sup>

(1. 上海海洋大学 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 水产科学国家实验教学示范中心, 上海 201306; 3. 上海海洋大学 上海水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306; 4. 江苏省渔业技术推广中心, 江苏 南京 210036)

**摘 要:** 为研究不同施肥模式对稻田养殖克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 田块水体细菌的影响, 通过采用 Illumina 高通量测序技术针对施用化肥 (CF)、有机肥 (OF) 和有机肥加腐熟鸡粪 (OM) 等 3 种施肥模式的水体细菌进行检测。高通量测序结果显示在 3 种不同施肥模式下的稻田中主要细菌门类均为变形菌门 (Proteobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、蓝藻门 (Cyanobacteria) 和厚壁菌门 (Firmicutes)。主要优势菌属为 *Sporichthyaceae hgcl\_clade*、*Limnhabitans*、*Polynucleobacter*、*Alpinimonas*、*Comamonadacea* 和 *Hydrogenophaga*。在 3 种模式中, 施用有机肥的田块细菌丰度显著高于施用化肥和有机肥加腐熟鸡粪的田块, 细菌物种多样性显著高于施用有机肥加腐熟鸡粪田块, 与施用化肥田块差异不显著。结果表明在施用有机肥模式下, 水体微生物具有更好的多样性, 生态系统更加稳定。有机肥与腐熟鸡粪配施虽然会降低水体细菌的物种多样性, 但是腐熟鸡粪与有机肥配施会大大降低蓝藻细菌的丰度。聚类分析结果显示有机肥组与有机肥加腐熟鸡粪组水体细菌群落相似度更高。对稻田水体细菌与水体理化因子关联分析发现, 对水体细菌影响最主要的环境因子是溶氧、总氮、pH 和总磷。研究结果为不同施肥处理对稻田水体生态环境的影响以及为稻田综合种养施肥模式优化提供理论依据。

**关键词:** 克氏原螯虾; 施肥模式; 稻田; 水体微生物; 群落

**中图分类号:** S 964.2      **文献标志码:** A

稻田综合种养是我国重要的生态养殖模式之一<sup>[1]</sup>, 可以有效地减少农药化肥的使用量, 并且获得较高的经济效益。随着稻田养殖技术的发展, 稻田综合种养的水产品种类也越来越多。目前稻-克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 的养殖模式已经成为了一种主要的稻田养殖模式。2017 年全国小龙虾养殖产量达到了 112 万 t, 养殖面积达 80 万  $\text{hm}^2$ , 其中稻田养殖面积约为 56.7 万  $\text{hm}^2$ , 占总养殖面积的 70.83%<sup>[2-3]</sup>。

微生物群落组成和结构直接影响着水产品的产量、水质土壤环境和动物疾病防控等方面<sup>[4]</sup>。不同肥料的施用会影响微生物的功能和数量<sup>[5-6]</sup>。我国现代农业施用的肥料主要是化

肥, 有机肥使用量仅有不到 20%<sup>[7]</sup>。化肥的过度施用会导致土壤酸化和水体富营养化等问题<sup>[8]</sup>。有机肥和鸡粪的施用则有利于提升土壤肥力和有机质<sup>[9-10]</sup>。在施肥模式对水产养殖的影响方面国内外学者已经进行了大量的研究<sup>[11]</sup>, 但是目前对稻田综合种养的影响研究较少。因此本研究通过对不同施肥模式下水体微生物的研究探索适合稻田综合养种的施肥模式。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验设计及地点

养殖场位于江苏省兴化市中堡镇东荡庄村香湖农庄 (119.871244°E, 33.128311°N), 位于江

收稿日期: 2019-03-06      修回日期: 2019-09-16

**基金项目:** 国家重点研发计划 (2019YFD0900304); 江苏省渔业科技类项目 (D2017-1-1); 上海市科委农业领域科技支撑项目 (15391912100); 上海市高水平大学建设研究项目 (A1-2801-18-1003); 水产高效生态养殖研究与支撑平台能力提升 (A1-3201-19-3003); 内江市科技孵化和成果转化专项 (2018KJFH022)

**作者简介:** 黄 锦 (1993—), 男, 硕士研究生, 研究方向为稻-克氏原螯虾共生生态效应。E-mail: 18040108602@163.com

**通信作者:** 李嘉尧, E-mail: jy-li@shou.edu.cn

苏省中部、长江三角洲北翼,年平均气温 $16.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,年总降水量 $938.0\text{ mm}$ ,年日照时数 $1\ 890.3\text{ h}$ 。克氏原螯虾的放养密度是 $8\ 000\text{ 尾}/667\text{ m}^2$ 。放养规格为 $200\text{ 尾}/\text{kg}$ 。实验采用随机大田块进行处理,设置施用化肥(CF)、有机肥(OF)和有机肥加鸡粪(OM)3个不同处理组。实验肥料分别为兴化市美乐复合肥,兴化市兴友牌发酵有机肥。肥料施用时间为2018年4月下旬。3个实验塘分别为 $6\ 003\text{ m}^2$ 、 $11\ 339\text{ m}^2$ 和 $26\ 680\text{ m}^2$ ,根据田块的大小分别采集了3、6、9个样品。3个实验塘分别施用复合肥 $40\text{ kg}/667\text{ m}^2$ 、有机肥 $25\text{ kg}/667\text{ m}^2$ 、有机肥 $10\text{ kg}$ 加腐熟鸡粪 $10\text{ kg}/667\text{ m}^2$ 。3个实验田块均挖有环沟,环沟深度在 $1.0\sim 1.4\text{ m}$ ,沟内培植水花生、伊乐藻等水草。

## 1.2 水体样品采集及处理

水体样品于2018年6月1日采集,采取水样深度为 $30\sim 40\text{ cm}$ 。水样采集后现场过 $200\text{ }\mu\text{m}$ 灭菌筛绢后用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜(millipore)进行微生物的提取。提取后的滤膜置入灭菌离心管中放入干冰盒中带回实验室放入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中等待DNA提取。

## 1.3 水体样品理化性质检测

水体温度、溶氧和pH现场采用多功能水质检测仪(HACH40d)进行检测,总氮采用碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法测定,总磷采用钼酸铵分光光度法测定,氨氮采用纳氏试剂分光光度法测定,亚硝态氮含量采用盐酸萘乙二胺比色法测定,硝态氮含量采用N-(1-萘基)-紫外分光光度法测定。

## 1.4 水体微生物总DNA提取

将滤膜剪碎后,使用快速提取试剂盒(E. Z. N. A. SoilDNAKit试剂盒)提取DNA,得到DNA样品。通过 $0.8\%$ 琼脂糖凝胶电泳检测DNA提取质量,同时采用紫外分光光度计对DNA进行定量。

## 1.5 PCR扩增及高通量测序

运用正向引物338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3')和反向引物806R(5'-GGACTAC HVGGGTWCTAAT-3')对16S rRNA基因高变区V3-V4进行扩增。PCR扩增体系为 $25\text{ }\mu\text{L}$ ,包括灭菌超纯水 $8.75\text{ }\mu\text{L}$ 包括 $12.25\text{ }\mu\text{L}$ 的 $2\times\text{ Taq PCR Star Mix with Loading Dye}$ ,正向引物( $10\text{ }\mu\text{mol}/\text{L}$ ) $1\text{ }\mu\text{L}$ 和反向引物( $10\text{ }\mu\text{mol}/\text{L}$ ) $1\text{ }\mu\text{L}$ 总DNA $2\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR循环顺序为 $98\text{ }^{\circ}\text{C}\ 2\text{ min}$ 预热,

$25\text{ }\text{个循环}\ 98\text{ }^{\circ}\text{C}\ 15\text{ s}, 55\text{ }^{\circ}\text{C}\ 30\text{ s}, 72\text{ }^{\circ}\text{C}\ 30\text{ s}$ ,最后在 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下延长 $5\text{ min}$ 。每份总DNA扩增3次,然后将3份PCR产物等浓度混合。PCR产物送往上海派森诺生物科技有限公司进行高通量测序,采用Illumina MiSeq平台,进行双末端测序。最后将得到的测序数据返回,进行数据处理和生物多样性分析。

## 1.6 数据分析

首先,将返回的双末端Fataq序列用fastqc软件对序列文件进行质量检测和质量过滤。然后利用Flash软件对质量过滤的序列进行拼接,用mothur<sup>[12]</sup>软件去除嵌合体序列。实验用Qiime软件中的uclust<sup>[13]</sup>对所得到的优质序列按照 $0.97$ 的相似度进行OTU(operational Taxonomic Units)聚类,选取每个OTU中最长序列为代表序列;用Qiime软件中获得的代表序列与Silva<sup>[14]</sup>数据库比对,获得OTU分类学信息。根据物种丰度,用mothur软件中求出每个样品的Chao、ACE、Shannon和Simpson指数。其中Chao和ACE指数是群落丰度(community abundance)指数,二者的值越大,说明群落丰富度越高;Shannon和Simpson指数是群落多样性(community diversity)指数,Simpson指数越大,说明群落多样性越低,Shannon指数越大,说明群落多样性越高。用Qiime软件,根据各样品的物种进化和丰度信息,进行Unifrac分析<sup>[15-16]</sup>,得到样品间差异距离矩阵,然后进行PCoA分析。根据精简后的OTU列表,用R软件中的pheatmap程序包进行属水平上的聚类分析,并绘制出heatmap<sup>[17-18]</sup>图。

运用SPSS 16.0软件进行单因素方差(One-Way ANOVA)分析3种模式下稻田水体理化性质数据的差异,用Duncan's法进行多重比较,同一列不同字母表示显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 水体理化性质

3个处理组pH为 $8.17\sim 8.36$ ,温度为 $19.8\sim 20.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。不同施肥模式下的水体理化性质(表1)差异较大。与CF组相比,OF组总氮含量明显较高,OM组的总氮、总磷含量明显较高,溶解氧含量明显较低( $P<0.05$ )。与OF组相比,OM组的总氮、总磷含量明显较高,溶氧含量明显较低( $P<0.05$ )。

表 1 3 种不同施肥模式下水体理化指标

Tab. 1 The water chemical parameters of paddy field in three fertilization models

处理组 Treatment	硝态氮 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N/(mg/L)	氨氮 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N/(mg/L)	亚硝态氮 NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/(mg/L)	总氮 TN/(g/L)	总磷 TP/(mg/L)	氮磷比 TN/TP	溶解氧 DO/(mg/L)
CF	0.76 ± 0.26	0.23 ± 0.15	0.01 ± 0.01	2.72 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.22 ± 0.05 <sup>a</sup>	12.61 ± 2.49 <sup>a</sup>	6.07 ± 0.58 <sup>a</sup>
OF	0.79 ± 0.09	0.26 ± 0.06	0.03 ± 0.03	9.99 ± 2.05 <sup>b</sup>	0.27 ± 0.06 <sup>a</sup>	38.26 ± 11.65 <sup>b</sup>	6.14 ± 1.01 <sup>a</sup>
OM	1.15 ± 0.44	0.27 ± 0.19	0.04 ± 0.03	18.49 ± 6.66 <sup>c</sup>	0.58 ± 0.35 <sup>b</sup>	38.33 ± 16.49 <sup>b</sup>	3.84 ± 0.82 <sup>b</sup>

注:同列中相同字母代表处理间不存在显著差异( $P > 0.05$ ),不同字母代表处理间存在显著差异( $P < 0.05$ )

Notes: The different letters in the same column mean that there are statistically significant differences ( $P < 0.05$ )

## 2.2 不同模式对水体微生物高通量结果及多样性分析

CF、OF 和 OM 等 3 种施肥模式的水体微生物高通量测序所获得的有效平均序列数分别为

63 999.00 ± 2 649.24, 54 557.56 ± 5 896.21 和 54 633.67 ± 4 052.70, 序列长度在 471.60 ~ 486.06 bp, 见表 2。获得的总的有效序列数为 1 174 718 条, 平均片段长度 458.00 bp。

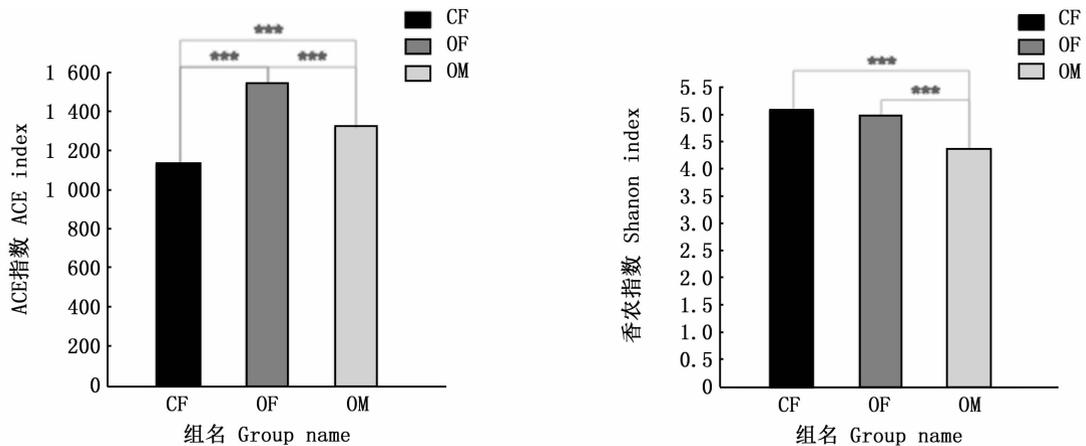
表 2 3 种施肥模式下水体微生物高通量测序结果

Tab. 2 The high throughput sequencing of water bacteria in paddy field in three fertilization models

样本名 Sample	序列数 Seq_num	碱基数 Base_num	平均长度 Mean_length/bp	最短序列长度 Min_length/bp	最长序列长度 Max_length/bp
CF	63 999.00 ± 2 649.24	29 313 665.33 ± 1 250 440.13	458.02 ± 0.66	267.00 ± 8.00	481.00 ± 1.73
OF	54 557.56 ± 5 896.21	24 971 489.33 ± 2 668 314.49	457.77 ± 1.54	280.44 ± 12.61	481.56 ± 4.50
OM	54 633.67 ± 4 052.70	25 025 674.78 ± 1 830 041.37	458.10 ± 1.25	286.22 ± 10.33	478.00 ± 6.40

3 个处理组水体微生物多样性(图 1)α 多样性分析结果显示:OF 组的 ACE 指数显著高于 CF 组和 OM 组,OM 组的 ACE 指数显著高于 CF 组( $P < 0.001$ )。Shannon 指数比较发现,CF 组和

OF 组均显著高于 OM 组( $P < 0.001$ )。OF 组和 OM 组的水体微生物多样性在丰度上明显高于 CF 组。在物种多样性上,CF 组和 OF 组明显高于 OM 组。



\* \* \* 表示有显著性差异,  $P < 0.001$

\* \* \* Indicates significant difference,  $P < 0.001$

图 1 3 种施肥模式下水体微生物多样性

Fig. 1 The diversity index of water microbe in three fertilization models

在 97% 的相似性下共得到 2 564 个 OTU(图 2),其中 3 个处理组共有的 OTU 占总 OTU 的 36.90%。OF 组和 OM 组共有的 OTU 占总 OTU 的 67.71%,OF 组与 CF 组共有的 OTU 占总 OTU 的 41.69%,OM 组与 CF 组共有的 OTU 占总 OTU 的 39.43%。这表明 3 个处理组共有的种类不是特别集中,并且 OF 组和 OM 组在微生物组成方面相似性明显更高。与 CF 组的共有 OTU 相对较少,相似度较低。结果表明施用不同肥料水体微生物组成有着明显的不同。

### 2.3 不同施肥模式下的水体微生物组成

在测序结果中得到的菌群分属 38 门 95 纲 192 目 378 科 798 属 1 399 种。得到的序列为细菌序列,在门水平上超过 97% 的 OTU 被分类。在细菌组成上 3 种模式下的细菌是相似的,主要门是变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Acfinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、蓝藻门(Cyanobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes),见图 3。这些细菌是组成水体细菌的主要成分,占据了 90% 以上的 OTU。对 3 种施肥模式下各个主要菌门的相对丰度分析可以看出,各菌群在门水平上有着较大差异:施用有机肥和鸡粪的田块中,

放线菌门的相对丰度明显高于施用化肥和施用有机肥的田块( $P < 0.001$ );蓝藻门的相对丰度明显低于施用化肥和施用有机肥的田块( $P < 0.001$ );拟杆菌门的相对丰度施用化肥的田块会明显低于另外 2 个田块( $P < 0.05$ )。

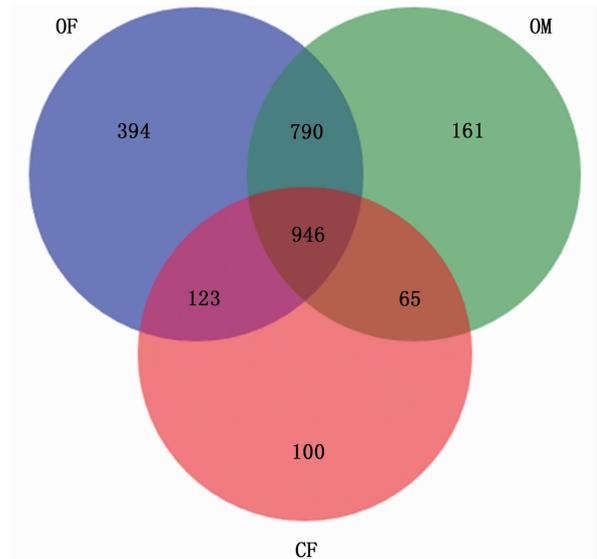
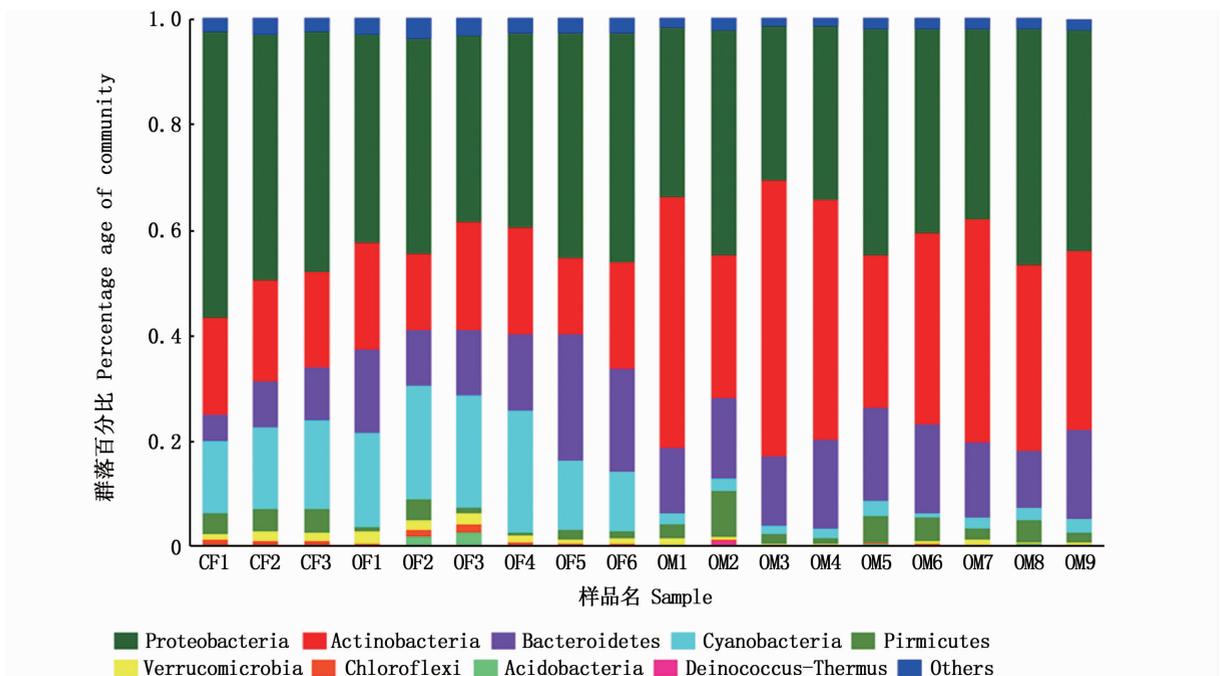


图 2 3 种施肥模式下水体微生物 OTU Venn 图  
Fig.2 The statistical result of OTU in three fertilization models



分析过程中将相对丰度低于 1% 的归于“其他”组内。CF1-3. 化肥组; OF1-6 有机肥组; OM1-9. 有机肥加鸡粪组  
Sequences whose relative abundance was lower than 1% were assigned as “others”. CF1-3. chemical fertilizer group; OF1-6. organic fertilizer group; OM1-9. organic fertilizer + fowl manure

图 3 3 种施肥模式下细菌门水平的细菌组成丰度图  
Fig.3 Abundance of bacterial composition at the level of phyla under three fertilization modes

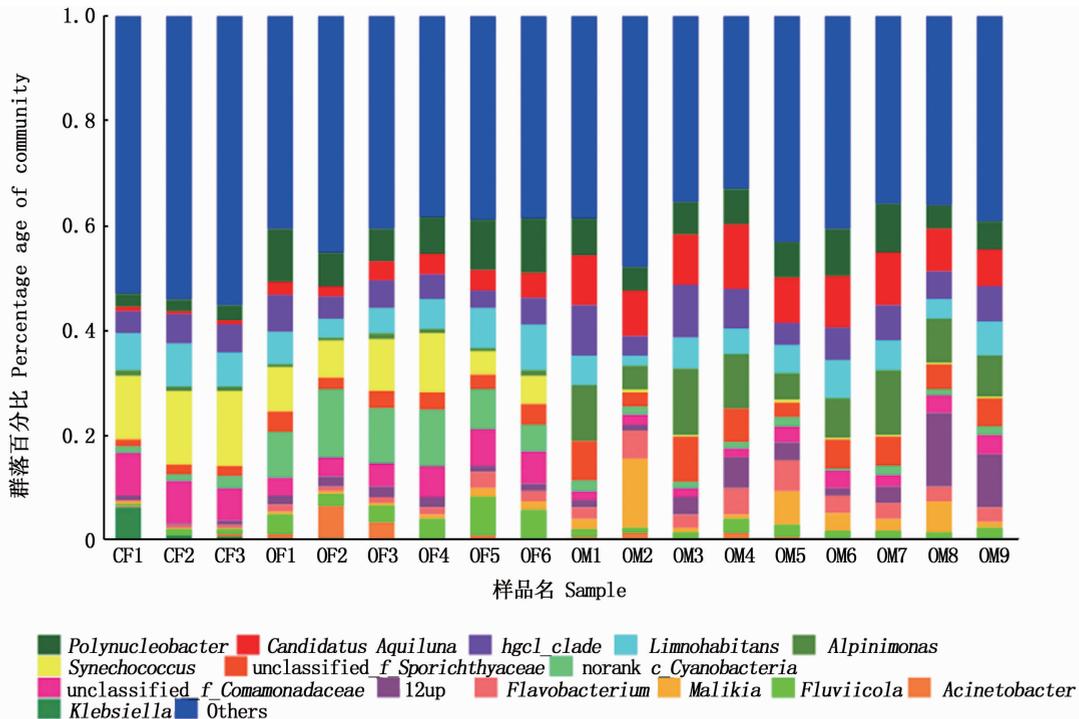
## 2.4 优势菌属分析

3 个处理组共得到 798 个属。56.89% 的菌属是 3 种模式共有的,CF 组和 OF 组、CF 组和 OM 组、OF 组和 OM 组共有的细菌分别占据总菌属的 59.77%、58.65%、83.21%。OF 组和 OM 组的相似度更高。对 3 种不同模式下的含量超过 0.1% 细菌进行丰度的排序(图 4)。3 种模式下 *Polynucleobacter*、*Candidatus\_Aquiluna*、*Sporichthyaceae hgcl\_clade*、*Limnohabitans*、*Synechococcus*、*Comamonadaceae*、*Alpinimonas*、*norank\_c\_Cyanobacteria* 等均为主要的菌属。聚球藻属(*Synechococcus*)是实验水体环境中平均相对丰度最高的属,在 3 个组中分别占据了 13.64%、7.82% 和 0.28%。*norank\_c\_Cyanobacteria*、*Comamonadaceae*、*Polynucleobacter*、*Candidatus\_Aquiluna*、*Sporichthyaceae*、*Flavobacterium*、*Alpinimonas*、*Klebsiella*、*Massilia*、

*Sphingomonas*、*Exiguobacterium* 等菌属在 3 个不同处理组中差异显著(表 3)。

表 3 3 种施肥模式下差异较大主要菌属  
Tab.3 The major bacteria with significant differences under the three fertilization modes %

	CF	OF	OM
<i>norank_c_Cyanobacteria</i>	1.56	9.29	1.40
<i>Synechococcus</i>	13.64	7.82	0.28
<i>Candidatus_Aquiluna</i>	0.75	3.55	9.33
<i>Comamonadaceae</i>	7.49	5.02	2.49
<i>Polynucleobacter</i>	2.60	8.24	6.60
<i>Sporichthyaceae</i>	1.74	3.26	5.54
<i>Flavobacterium</i>	0.50	1.65	3.65
<i>Alpinimonas</i>	0.82	0.80	8.88
<i>Klebsiella</i>	2.83	0.36	0.05
<i>Sphingomonas</i>	2.15	0.11	0.06
<i>Exiguobacterium</i>	1.56	0.18	0.54



分析过程中将相对丰度低于 1% 的归于“其他”组内。CF1-3. 化肥组; OF1-6 有机肥组; OM1-9. 有机肥加鸡粪组

Sequences whose relative abundance was lower than 1% were assigned as “others”. CF1-3. chemical fertilizer group; OF1-6. organic fertilizer group; OM1-9. organic fertilizer + fowl manure

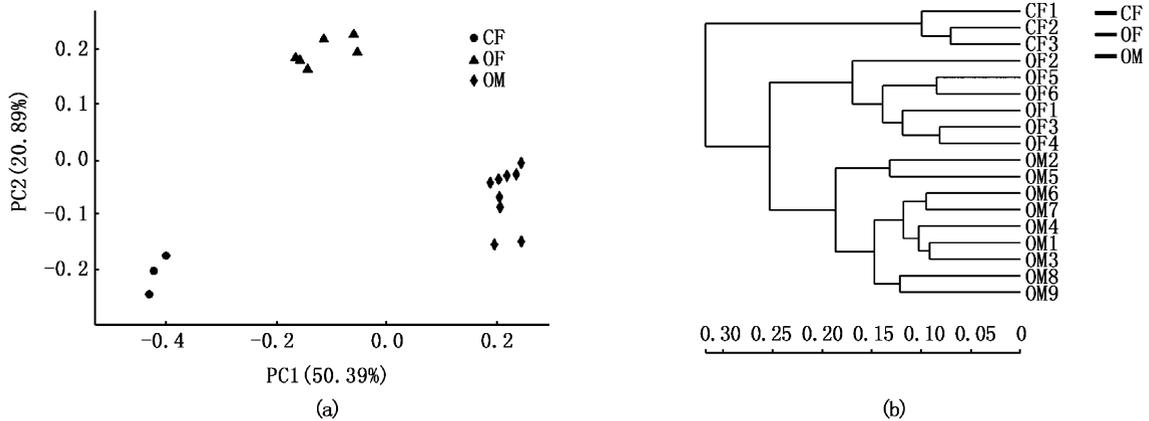
图 4 3 种施肥模式下细菌属水平的细菌组成丰度图

Fig.4 Abundance of bacterial composition at the level of genus under three fertilization modes

## 2.5 不同施肥模式下水体微生物群落相似性分析

对 3 种施肥模式下的水体微生物群落进行聚类分析,可以看出相同处理下的样本聚集在一起,表明了样品有很好的重复性,并且 PCoA 图中

OF 处理组和 OM 处理组的距离较近,表明 2 个组的相似性更高,见图 5a。在等级树中,OF 处理组和 OM 处理组聚集在一个分支上,而 CF 组独立于另外一个分支,同样表明了 OF 处理组和 OM 处理组更高的相似度,见图 5b。



CF1-3. 化肥组; OF1-6. 有机肥组; OM1-9. 有机肥加鸡粪组

CF1-3. chemical fertilizer group; OF1-6. organic fertilizer group; OM1-9. organic fertilizer + fowl manure

图5 基于 OTU 水平下水体微生物群落的主成分 (PCoA) 分析图 (a) 以及聚类分析树 (b)

Fig. 5 PCoA analysis diagram (a) and cluster analysis tree (b) at OTU level

## 2.6 不同施肥模式下水体微生物与环境因子相关性分析

为了解 3 种施肥模式下水体理化性质对与水体微生物的相关性,运用冗余分析(RDA)对这 3 种施肥模式下 10 种主要菌属和水体理化性质的相关性进行分析(图 6),结果显示:前 2 个排序轴的特征值分别为 0.485 9、0.139 0,硝态氮 0.485 9、氨氮 0.139 0、亚硝态氮 0.050 5、总氮 0.027 9、总磷 0.015 3、溶解氧 0.003 4 主要贡献于第一排序轴,pH 0.003 主要贡献于第二排序轴。对细菌组成和这些菌属主要的影响因子为溶氧、总氮、pH、总磷。图 6 中 *Polynucleobacter*、*Candidatus \_ Aquiluna*、*Sporichthyaceae hgcl \_ clade*、*Comamonadacea*、*Alpinimonas* 等菌属与硝态氮、氨氮、亚硝态氮、总氮、总磷、pH 呈现正相关,与溶氧呈负相关;*norank c\_Cyanobacteria*、*Synechococcus*、*Limnohabitans* 等菌属与溶氧呈现正相关,与硝态氮、氨氮、亚硝态氮、总氮、总磷、pH 呈负相关。

## 3 讨论

水生生物的多样性受到多方面的影响,包括人为因素和自然因素,以往对于水体微生物的研究多集中在自然水体如湖泊<sup>[19]</sup>、海洋<sup>[20]</sup>之中。有研究<sup>[21]</sup>表明养殖活动会改变群落结构。本研究中 OF 组与 OM 组的水体细菌丰度显著高于 CF 组。与施用化肥相比,施用有机肥能够有效提升微生物生物量,这与孙凤霞等<sup>[22]</sup>对土壤微生物的

研究结果一致。鸡粪与有机肥配施降低了水体细菌物种多样性,推测可能是由于鸡粪等畜禽粪便对抗生素和重金属等有吸附作用<sup>[23-24]</sup>,在腐熟鸡粪处理不完全时带入水体,抗生素和重金属会对菌群结构造成不利影响。生物多样性可以在一定程度上反映生态系统的稳定性。较高的生物多样性能够使得生态系统更加稳定<sup>[25]</sup>。由此可以推测 OF 组水体生态系统更加稳定。3 个处理组的 PCoA 图和聚类分析表明,同一处理组的样品细菌群落结构相似度较高,不同处理组的样品分离度很好,表明不同的施肥种类会对水体细菌有着很明显的影 响。聚类分析中,OF 组与 OM 组聚为 1 支,与 CF 组分离,表明鸡粪的配施对水体菌群的影响小于施用有机肥与化肥的差异。

水体生态系统的稳定与良好不仅与生物多样性有关,也与水体细菌组成及功能相关。本研究中主要的细菌组成在门水平上与之前的研究<sup>[26]</sup>基本一致,获得的变形菌门相对丰度更高。蓝藻门细菌在 3 个实验塘中均有广泛分布,与成敏玲等<sup>[26]</sup>对湖泊水体细菌组成研究结果一致。在 3 个处理组中蓝藻门细菌相对丰度差异显著。N、P 元素是决定蓝藻生长的营养元素,并且当 N/P 大于 7 时,P 元素是限制蓝藻生长的因素<sup>[27]</sup>。本实验处于养殖初期,底肥的施用导致 N、P 元素已经在水体中有较多的积累,不再是限制蓝藻生长的因素。OM 组蓝藻门细菌相对丰度显著低于其余 2 组,这与之前孟顺龙等<sup>[28]</sup>研究鸡粪的施用可以降低水体环境中蓝藻的含量结果一致。水

体细菌属水平上分析结果显示,黄杆菌属 (*Flavobacterium*) 广泛存在于养殖水体之中<sup>[29]</sup>。黄杆菌属是严格的好氧菌,本实验中 3 个处理组中均存在,表明 3 个处理组溶氧条件相对良好。CF 组中克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)、鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*)、微小杆菌属等菌属均显著高于 OF 组与 OM 组。克雷伯氏菌属具有降解氨

氮、去除有机物等作用<sup>[30]</sup>;鞘氨醇单胞菌属,常用于有机污染物的生物降解<sup>[31]</sup>;微小杆菌属 (*Exiguobacterium*) 在有机物污染、重金属处理等方面有着积极作用<sup>[32]</sup>。这些菌属的相对丰度较高可能是由于化肥在底肥施用前期较短时间内释放大量的营养元素和化肥施用的污染导致这些细菌的大量生长。

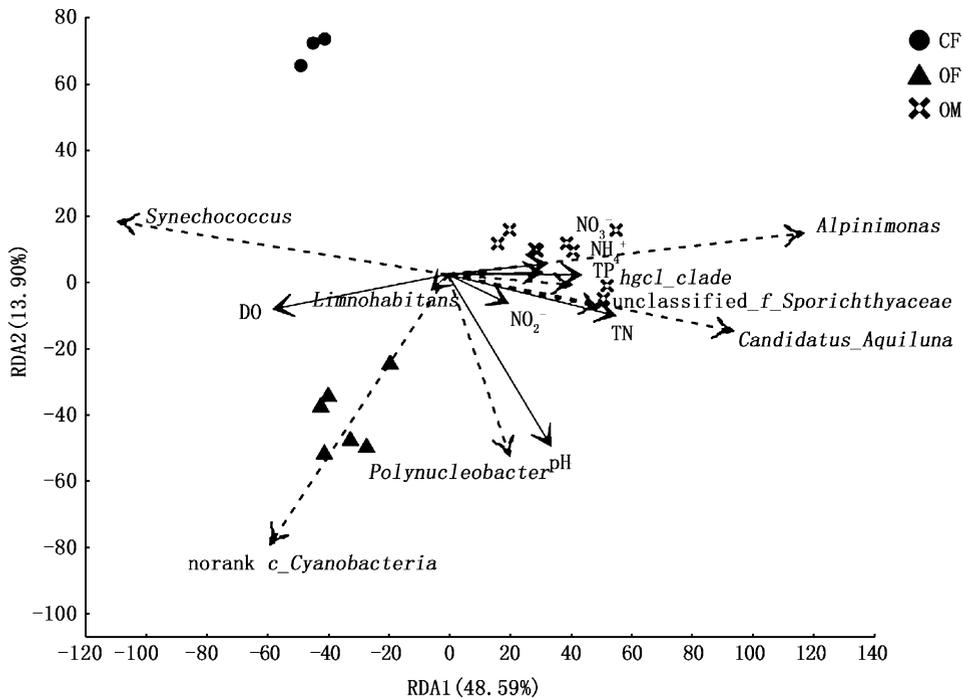


图 6 10 种主要菌属与水体环境因子的 RDA 排序图

Fig. 6 RDA sequencing diagram of 10 major genera and water environmental factors

水体理化因子是微生物群落的重要影响因素。在底肥施用 1 个月后,水体中 N、P 含量受到肥料的影响含量较高,此时水体处于富营养化的状态。OF 组与 OM 组总氮含量显著高于 CF 组,推测是由于化肥肥效短,释放速率快,有机肥和鸡粪肥效长,使得水体中 N、P 始终保持较高的含量。本研究将细菌结构和水体理化因子进行关联分析,发现溶氧、总氮、总磷和 pH 是影响水体细菌的主要因素。对湖泊水体细菌进行的研究<sup>[27,33]</sup>也发现 pH、水温和溶氧是影响细菌群落结构组成的主要因素。相较于湖泊,本实验中养殖水体面积小,不同田块水体温度无明显差异,温度对水体细菌群落结构的影响无法辨别。稻田综合种养由于施肥等人工活动 N、P 积累量大,并且有研究<sup>[34]</sup>表明水体营养是影响水体细菌

组成的主要因素。在本次研究中总氮和总磷也是影响水体细菌的主要环境因子之一。

综上所述,不同的施肥模式会影响水体的理化性质和改变细菌的群落结构组成。研究结果表明,相较于施用化肥与有机肥加鸡粪的田块,施用有机肥的田块水体生物多样性更高,生态系统更加稳定。有机肥与鸡粪配施虽然会降低水体细菌的物种多样性,但是会大大减少蓝藻细菌的丰度。溶氧、总氮、总磷、pH 是影响水体细菌群落结构的主要环境因子。

#### 参考文献:

- [1] XIE J, HU L L, TANG J J, et al. Ecological mechanisms underlying the sustainability of the agricultural heritage rice-fish coculture system [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011,

- 108(50): E1381-E1387.
- [2] 农业农村部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴—2018 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2018: 54-172.  
Fishery and Fishery Administration of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs. China fishery statistical yearbook-2018 [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2018: 54-172.
- [3] 佚名. 中国小龙虾产业发展报告(2018)[J]. 中国水产, 2018(7): 20-27.  
Non. China crayfish industry development report (2018) [J]. China Fisheries, 2018(7): 20-27.
- [4] HOU M H, XIONG J B, WANG K, et al. Communities of sediment ammonia-oxidizing bacteria along a coastal pollution gradient in the East China Sea [J]. Marine Pollution Bulletin, 2014, 86(1/2): 147-153.
- [5] 杨宇虹, 陈冬梅, 晋艳, 等. 不同肥料种类对连作烟草根际土壤微生物功能多样性的影响[J]. 作物学报, 2011, 37(1): 105-111.  
YANG Y H, CHEN D M, JIN Y, et al. Effects of different fertilizers on functional diversities of microbial flora in rhizospheric soil of monoculture tobacco [J]. Acta Agronomica Sinica, 2011, 37(1): 105-111.
- [6] 姬兴杰, 熊淑萍, 李春明, 等. 不同肥料类型对土壤酶活性与微生物数量时空变化的影响[J]. 水土保持学报, 2008, 22(1): 123-127, 133.  
JI X J, XIONG S P, LI C M, et al. Studies on spatial-temporal variations of soil enzyme activities and microorganism's number under different fertilizer types [J]. Journal of Soil and Water Conservation, 2008, 22(1): 123-127, 133.
- [7] 符纯华, 单国芳. 我国有机肥产业发展与市场展望[J]. 化肥工业, 2017, 44(1): 9-12, 30.  
FU C H, SHAN G F. Development of organic fertilizer industry in China and market outlook [J]. Chemical Fertilizer Industry, 2017, 44(1): 9-12, 30.
- [8] 黄国勤, 王祥祥, 钱海燕, 等. 施用化肥对农业生态环境的负面影响及对策[J]. 生态环境, 2004, 13(4): 656-660.  
HUANG G Q, WANG X X, QIAN H Y, et al. Negative impact of inorganic fertilizes application on agricultural environment and its countermeasures [J]. Ecology and Environment, 2004, 13(4): 656-660.
- [9] 汪吉东, 张辉, 张永春, 等. 连续施用不同比例鸡粪氮对水稻土有机质积累及土壤酸化的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2014, 20(5): 1178-1185.  
WANG J D, ZHANG H, ZHANG Y C, et al. Effect of different ratios of chicken manure N on organic matter accumulation and acidification of paddy soils [J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizers, 2014, 20(5): 1178-1185.
- [10] 吴清清, 马军伟, 姜丽娜, 等. 鸡粪和垃圾有机肥对苋菜生长及土壤重金属积累的影响[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(7): 1302-1309.  
WU Q Q, MA J W, JIANG L N, et al. Effect of poultry and household garbage manure on the growth of *Amaranth tricolor* L. and heavy metal accumulation in soils [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2010, 29(7): 1302-1309.
- [11] ZHOU L, BOYD C E. Bluegill yield in response to nitrogen and phosphorus versus phosphorus-only fertilization in ponds at different times since sediment removal [J]. Aquaculture, 2015, 446: 7-11.
- [12] ŠANTL-TEMKIV T, SAHYOUN M, FINSTER K, et al. Characterization of airborne ice-nucleation-active bacteria and bacterial fragments [J]. Atmospheric Environment, 2015, 109: 105-117.
- [13] EDGAR R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST [J]. Bioinformatics, 2010, 26(19): 2460-2461.
- [14] QUAST C, PRUESSE E, YILMAZ P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools [J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(D1): D590-D596.
- [15] LOZUPONE C, KNIGHT R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(12): 8228-8235.
- [16] LOZUPONE C, HAMADY M, KNIGHT R. UniFrac-an online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context [J]. BMC Bioinformatics, 2006, 7: 371.
- [17] ŠKUTA C, BARTUŇEK P, SVOZIL D. InChIlib-interactive cluster heatmap for web applications [J]. Journal of Cheminformatics, 2014, 6(1): 44.
- [18] DENG W K, WANG Y B, LIU Z X, et al. HemI: a toolkit for illustrating heatmaps [J]. PLoS One, 2014, 9(11): e111988.
- [19] 任丽娟, 何聃, 邢鹏, 等. 湖泊水体细菌多样性及其生态功能研究进展[J]. 生物多样性, 2013, 21(4): 421-432.  
REN L J, HE D, XING P, et al. Bacterial diversity and ecological function in lake water bodies [J]. Biodiversity Science, 2013, 21(4): 421-432.
- [20] 薛明, 何瑶瑶, 邱孟德, 等. 高通量测序分析凡纳滨对虾育苗期水体菌群结构特征[J]. 水产学报, 2017, 41(5): 785-794.  
XUE M, HE Y Y, QIU M D, et al. Characterization of aquatic bacterial community of *Litopenaeus vannamei* larvae during hatchery period with high-throughput sequencing [J]. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(5): 785-794.
- [21] 裘琼芬, 张德民, 叶仙森, 等. 象山港网箱养殖对近海沉积物细菌群落的影响[J]. 生态学报, 2013, 33(2): 483-491.  
QIU Q F, ZHANG D M, YE X S, et al. The bacterial community of coastal sediments influenced by cage culture in Xiangshan Bay, Zhejiang, China [J]. Acta Ecologica Sinica,

- 2013, 33(2): 483-491.
- [22] 孙凤霞, 张伟华, 徐明岗, 等. 长期施肥对红壤微生物生物量碳氮和微生物碳源利用的影响[J]. 应用生态学报, 2010, 21(11): 2792-2798.  
SUN F X, ZHANG W H, XU M G, et al. Effects of long-term fertilization on microbial biomass carbon and nitrogen and on carbon source utilization of microbes in a red soil[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2010, 21(11): 2792-2798.
- [23] 王阳, 章明奎. 畜禽粪对抗生素的吸附作用[J]. 浙江农业学报, 2011, 23(2): 373-377.  
WANG Y, ZHANG M K. Absorption of four antibiotics onto animal manures[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2011, 23(2): 373-377.
- [24] 刘秀春, 高艳敏, 范业宏, 等. 生物有机肥对重金属的吸附解吸作用的影响[J]. 土壤通报, 2008, 39(4): 942-945.  
LIU X C, GAO Y M, FAN Y H, et al. Adsorption and desorption of heavy metal ions by organic fertilizers [J]. Chinese Journal of Soil Science, 2008, 39(4): 942-945.
- [25] FRANK D A, MCNAUGHTON S J. Stability increases with diversity in plant communities: empirical evidence from the 1988 Yellowstone drought[J]. Oikos, 1991, 62(3): 360-362.
- [26] 成敏玲, 刘陈飞, 程丹逸, 等. 春夏季节东湖不同富营养化区域水体细菌群落的动态变化[J]. 华中农业大学学报, 2017, 36(5): 52-59.  
CHENG M L, LIU C F, CHENG D Y, et al. Dynamic changes of bacterial community in two eutrophic areas of Donghu Lake in spring and summer[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2017, 36(5): 52-59.
- [27] SMITH V H. Low nitrogen to phosphorus ratios favor dominance by blue-green algae in lake phytoplankton [J]. Science, 1983, 221(4611): 669-671.
- [28] 孟顺龙, 李丹丹, 裘丽萍, 等. 添加藻类和有机肥对罗非鱼养殖水体浮游植物群落结构的影响[J]. 农业环境科学学报, 2017, 36(10): 2099-2105.  
MENG S L, LI D D, QIU L P, et al. Effect of organic fertilizer and algae addition to tilapia aquaculture water on the community structure of phytoplankton [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2017, 36(10): 2099-2105.
- [29] 夏淑芬, 张甲耀, 陈厚华, 等. 氧化塘中细菌种群组成动态[J]. 水生生物学报, 1992, 16(2): 113-118.  
XIA S F, ZHANG J Y, CHEN H H, et al. Composition and population dynamics of bacteria in oxidation ponds [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1992, 16(2): 113-118.
- [30] 高宇, 刘文斌, 王莹, 等. 可用于水体污染控制的氨氮转化菌筛选及部分降解特性的实验研究 [J]. 环境工程学报, 2010, 4(4): 855-860.  
GAO Y, LIU W B, WANG Y, et al. Experimental study on screening and some characterization of an ammonia nitrogen transformation strain used for water pollution control [J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2010, 4(4): 855-860.
- [31] 李正魁, 周莉, 王月明, 等. 鞘氨醇单胞菌属菌株及其在水处理中的应用 [P]: CN102168054A. 2011-08-30.  
LI Z K, ZHOU L, WANG Y M, et al. *Sphingomonas* sp. strain and its application in water treatment [P]: CN102168054A. 2011-08-30.
- [32] 张莹, 石萍, 马炯. 微小杆菌 *Exiguobacterium* spp. 及其环境应用研究进展 [J]. 应用与环境生物学报, 2013, 19(5): 898-904.  
ZHANG Y, SHI P, MA J. *Exiguobacterium* spp. and their applications in environmental remediation [J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2013, 19(5): 898-904.
- [33] 刘倩纯. 鄱阳湖表层水体细菌群落结构时空变化 [D]. 南昌: 南昌大学, 2013.  
LIU Q C. Temporal-spatial variability of bacterial community structure in the surface water from Poyang Lake, China [D]. Nanchang: Nanchang University, 2013.
- [34] HAUKKA K, KOLMONEN E, HYDER R, et al. Effect of nutrient loading on bacterioplankton community composition in lake mesocosms [J]. Microbial Ecology, 2006, 51(2): 137-146.

## A preliminary study on the water bacteria of rice-crayfish co-culture paddy field in different fertilization modes

HUANG Jin<sup>1,2,3</sup>, CHENG Yongxu<sup>1,2,3</sup>, WANG Haifeng<sup>1,2,3</sup>, SHEN Haoran<sup>1,2,3</sup>, CHEN Huangen<sup>4</sup>,  
LI Jiayao<sup>1,2,3</sup>

(1. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Germplasm Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. National Experimental Teaching and Demonstration Center of Fisheries Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Shanghai Aquaculture Engineering Technology Research Center, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 4. Fisheries Technology Extension Center of Jiangsu Province, Nanjing 210036, Jiangsu, China)

**Abstract:** To study the effects of different fertilization modes on the water bacteria in rice-crayfish co-culture paddy field, Illumina high-throughput sequencing technology was used to detect the bacteria in the water body applying three fertilization modes: chemical fertilizer (CF), organic fertilizer (OF) and organic fertilizer added decomposed chicken manure (OM). The results showed that Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria and Firmicutes were the main phyla in all treatments. The main dominant genera were *Sporichthyaceae hgcl \_ clade*, *Limnohabitans*, *Polynucleobacter*, *Alpinimonas*, *Comamonadacea*, *Hydrogenophaga*. In the three models, the bacterial abundance of the OF group was significantly higher than that of the CF group and OM group, and the diversity of bacterial species of OF group was significantly higher than that of the OM group, and there was no significant difference between OF and CF groups. It indicated that in the mode of organic fertilizer application, water microorganisms had better diversity and its ecosystem was more stable. Although the OM treatment reduced the species diversity of bacteria in water, it also can greatly reduced the abundance of Cyanobacteria. Although the species diversity of bacteria in water was reduced under OM treatment, it also greatly reduced the abundance of Cyanobacteria compared to other treatments. The results of cluster analysis showed that the similarity of bacterial community in water was higher between the OF group and OM group. According to the RDA analysis, the dissolved oxygen, total nitrogen, pH and total phosphorus were the most important environmental factors affecting water bacteria. The aim is to understand the effects of different fertilization treatments on the ecological environment of paddy fields and provide a theoretical basis for the optimization of paddy field comprehensive fertility model.

**Key words:** *Procambarus clarkii*; fertilization mode; paddy; water microorganism; community