

文章编号: 1674-5566(2020)02-0218-08

DOI:10.12024/jso.20190102525

添加芽孢杆菌对草鱼池塘中真核微生物的影响

陆 洋^{1,2}, 郁二蒙^{1,3}, 王广军^{1,3}, 谢 骏^{1,3}, 张 凯¹, 李志斐¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所 农业农村部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室, 广东 广州 510380; 2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 3. 广东省水产养殖污染修复生态工程技术研究中心, 广东 广州 510380)

摘 要: 为了研究添加芽孢杆菌对池塘中真核微生物群落结构和理化因子的影响, 采用高通量测序技术分析了对实验组(添加芽孢杆菌池塘)与对照组(普通池塘)水体真核微生物群落结构, 同时分析了两组池塘的水体理化指标。结果表明: 8、9 月实验组池塘水体中 TN、NH₄⁺-N、NO₃⁻-N 含量显著低于对照组($P < 0.05$)。水体中梅尼小环藻(*Cyclotella meneghiniana*)、红囊藻(*Hedriocystis*)、蓝隐藻(*Chroomonas*)、丝孢酵母属(*Trichosporon*)和小环藻属(*Cyclotella*)真核微生物丰度显著高于对照组($P < 0.05$)。实验组池塘水体真核微生物 Chao1 指数和 Shannon 指数显著高于对照组($P < 0.05$)。实验结果证实: 通过向池塘添加芽孢杆菌, 可以改变水体中真核微生物群落的结构, 从而实现池塘理化因子的调节。研究结果对于降低水产养殖尾水对水域环境的污染具有一定的意义。

关键词: 真核微生物群落结构; 芽孢杆菌; 水质; 高通量测序; 草鱼池塘

中图分类号: S 968.1; S 917.1 **文献标志码:** A

池塘养殖已成为我国水产养殖的主要方式, 其产量占全国养殖总产量的 49%。其中, 淡水池塘养殖产量占淡水养殖总产量的 72%^[1]。养殖池塘作为一个人为控制的封闭生态系统, 随着养殖生产的进行, 进入池塘的残饵、排泄物、生物残体等有机物越来越多, 水产养殖尾水的随意排放造成了严重的环境污染问题。

草鱼作为我国养殖量最大的鱼类, 同时也是目前世界上产量居第 2 位的淡水鱼类, 2016 年占全国淡水鱼产量的 20.95%, 年产量已达 589 万 t^[1]。研究^[2]表明: 草鱼主养池塘随尾水排放而带来氮、磷排放量分别为 86.55 kg/hm² 和 10.21 kg/hm², 对周围水域环境造成了一定的污染。据统计, 我国每年约有 4.77 × 10⁴ t 含氮和 3.75 × 10³ t 含磷的养殖尾水直接排放到临近水域中^[3]。有研究^[4]表明水体真核微生物结构的变化可以改善养殖水质, 进而减少养殖尾水对周围水域生

态环境的污染。FAN 等^[5]和 ALKHAMIS 等^[6]的研究结果显示浮游生物可以吸收氨氮和硝酸盐用于自身生长, 从而降低水体中的氨氮等营养物质。同时, 在水体中添加外源益生菌可以通过改变水体真核生物群落结构进而改善水质, 李卓佳等^[7]和张庆等^[8]研究表明在养殖池塘中添加芽孢杆菌制剂, 可以通过改善水环境微生物群落的生物量和结构来改善整个虾池的水质环境; 古长庆等^[9]和张云^[10]的研究表明在池塘中添加复合微生物制剂可以改变藻类种群的组成、数量和生物量, 从而降低养殖水体中硝酸盐和氨氮的含量。但关于添加芽孢杆菌对草鱼池塘真核微生物的影响未见报道。

为了研究添加芽孢杆菌对草鱼池塘水体中真核微生物群落结构和理化因子影响, 探明在草鱼养殖中真核微生物群落结构与池塘水体理化因子的关系, 本研究比较分析了中山市民众镇的

收稿日期: 2019-01-31 修回日期: 2019-08-07

基金项目: 广东省省级农业科技创新及推广项目(2019KJ150); 广州市科技计划(201804010163); 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-45-21); 广东省省级科技计划(2017B090906002); 广东省自然科学基金(2018A030313412)

作者简介: 陆 洋(1993—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产健康养殖。E-mail: www.luyang1992@qq.com

通信作者: 王广军, E-mail: gjwang@prfri.ac.cn

3 个实验组(添加芽孢杆菌池塘)和 3 个对照组(普通池塘)表层和底层水体理化指标,并采用高通量测序技术对表层和底层水体中真核微生物群落进行了研究,以期了解添加芽孢杆菌池塘与普通池塘真核微生物群落构成差异以及理化因素的差异,为分析评价添加芽孢杆菌对池塘真核微生物群落结构和养殖环境的影响提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 样品的采集和处理

2017 年 8 月和 9 月两次采集于中山市民众镇华辰养殖场的 3 个实验组池塘(面积 1 hm^2 , 平均水深 1.80 m , 养殖密度约为 $37\,500 \text{ 尾}/\text{hm}^2$), 每天分 3 次向全部实验组池塘拌饲投喂共 80 g 含量为 $1.0 \times 10^{10} \text{ cfu}/\text{g}$ 的芽孢杆菌制剂(广州先得生物技术有限公司), 主要成分为地衣芽孢杆菌, 选择与其临近且管理模式相同和放养密度接近的 3 个池塘作为对照池塘(面积 0.97 hm^2 , 平均水深 1.85 m)。使用 5 点采样法(先确定池塘对角线的中点作为中心采样点, 再在池塘对角线上选择 4 个与中心采样点距离相等的点作为采样点), 采集表层水(深度为 0.2 m)和底层水(深度为 1.2 m)各 200 mL , 采集后对 5 个采样点水样进行混合。一部分样品被用来立即测量物理化学指标, 另一部分样品采集后置于含冰袋的恒温箱中, 运回实验室进一步处理, 并在水样采集后 12 h 内将这些水样通过 $0.22 \mu\text{m}$ 核孔过滤器(直径为 47 mm)过滤, 然后保存在 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 直到 DNA 提取。

1.2 理化因子测定

用 YSI (ProPlus, USA) 对每个池塘的温度(T)、溶解氧(DO)、酸碱度(pH)进行原位测量。采用国标法测定水体中的氨氮($\text{NH}_4^+ \text{-N}$)、硝酸盐($\text{NO}_3^- \text{-N}$)、磷酸盐($\text{PO}_4^- \text{-P}$)、总氮(TN)和总磷(TP)的含量^[11]。

1.3 MetaVx™文库构建和 Illumina MiSeq 测序

高通量测序文库的构建和基于 Illumina MiSeq 平台的测序由 GENEWIZ 公司(苏州, 中国)完成。本研究使用 Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA)检测 DNA 样品的浓度, 使用 MetaVx™文库构建试剂盒(GENEWIZ, Inc., South Plainfield, NJ, USA)构建测序文

库^[12]。

用水体 DNA 提取试剂盒(Omega, USA)提取水体微生物总 DNA。将提取的水体总 DNA 送至苏州金唯智生物科技有限公司, 以 $50 \sim 100 \text{ ng}$ DNA 为模板, PCR 扩增真菌 18S rDNA 上包括 V7 和 V8 的 2 个高度可变区。采用包含“CGWTAACGAACGAG”序列的上游引物和包含“AICCATTCAATCGG”序列的下游引物扩增全长 V7 和 V8 区。另外, 通过 PCR 向 18S rDNA 的 PCR 产物末端加上带有 Index 的接头, 以便进行 NGS 测序^[12]。使用 Agilent 2100 生物分析仪(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)检测文库质量, 并且通过 Qubit 检测文库浓度。DNA 文库混合后, 按 Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA)使用说明书进行 PE250/300 双端测序, 由 MiSeq 自带的 MiSeq Control Software (MCS)读取序列信息^[12]。

1.4 数据分析

双端测序得到的正反向 reads 首先进行两组装连接, 过滤拼接结果中含有 N 的序列, 保留序列长度大于 200 bp 的序列。经过质量过滤, 去除嵌合体序列, 最终得到的序列用于 OTU 分析, 使用 VSEARCH(1.9.6)进行序列聚类(序列相似性设为 97%), 比对的 18S rRNA 参考数据库是 Silva 128^[13]。然后用 RDP classifier (Ribosomal Database Program)贝叶斯算法对 OTU 的代表性序列进行物种分类学分析, 并在不同物种分类水平下统计每个样本的群落组成。基于 OTU 的分析结果, 采用对样本序列进行随机抽样的方法, 分别计算 Shannon、Chao1 等 α 多样性指数。

所有数据均以平均值 \pm 标准差(mean \pm SD)表示。采用单向方差分析方法对两种池塘样品中水体理化指标及水体中真核微生物属、种的丰度差异进行比较分析。采用 CANOCO 4.5 对池塘微生物群落组成与环境因子进行 CCA 分析。

2 结果

2.1 实验池塘和对照池塘水体理化指标测定

由表 1 可知, 8 月实验组池塘水体中 TN、 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 含量显著低于对照组($P < 0.05$), 而 T、DO、pH、TP、 $\text{PO}_4^- \text{-P}$ 含量无明显差异($P > 0.05$)。9 月实验组池塘水体中 TN、TP、 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 含量显著低于对照组($P <$

0.05), 而 T、DO、pH、 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 含量无明显差异 ($P > 0.05$)。8、9 月份两组池塘表层与底层水体

中 T、DO、pH、TN、TP、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 、 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 含量无明显差异 ($P > 0.05$)。

表 1 实验组和对照组水体理化指标

Tab. 1 Water physical and chemical indicators of experimental group and control group

$n = 3; \bar{x} \pm \text{SD}$

样品名 Sample name	温度 T/ ℃	溶解氧 DO/ (mg/L)	酸碱度 pH/ (mg/L)	氨氮 $\text{NH}_4^+\text{-N}/$ (mg/L)	硝酸盐 $\text{NO}_3^-\text{-N}/$ (mg/L)	磷酸盐 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}/$ (mg/L)	总氮 TN/ (mg/L)	总磷 TP/ (mg/L)
Z1B	30.38 ± 1.60	5.47 ± 1.44	7.53 ± 0.44	0.30 ± 0.17 *	1.64 ± 0.82 *	0.03 ± 0.02	10.26 ± 1.40 *	2.01 ± 0.85
N1B	29.53 ± 0.15	6.39 ± 0.24	7.69 ± 0.09	1.17 ± 0.52	2.31 ± 0.88	0.03 ± 0.01	15.25 ± 3.29	1.70 ± 0.73
Z1D	30.01 ± 0.08	6.08 ± 0.22	7.46 ± 0.47	0.30 ± 0.17 *	1.33 ± 0.52 *	0.04 ± 0.02	10.90 ± 2.39 *	1.91 ± 0.85
N1D	29.93 ± 0.11	6.11 ± 0.52	7.54 ± 0.21	1.30 ± 1.03	2.28 ± 0.66	0.03 ± 0.01	15.79 ± 2.32	1.61 ± 0.73
Z2B	31.18 ± 0.27	6.92 ± 1.65	7.29 ± 0.18	0.44 ± 0.25 *	1.19 ± 0.37 *	0.06 ± 0.04	11.04 ± 1.15 *	0.66 ± 0.17 *
N2B	31.03 ± 0.06	7.38 ± 1.22	7.46 ± 0.43	1.23 ± 0.38	1.88 ± 0.36	0.05 ± 0.04	16.01 ± 2.95	1.58 ± 0.36
Z2D	31.01 ± 0.09	6.58 ± 1.41	7.71 ± 0.52	0.37 ± 0.18 *	1.07 ± 0.27 *	0.09 ± 0.03	10.70 ± 1.03 *	0.61 ± 0.12 *
N2D	31.10 ± 0.12	7.92 ± 1.01	7.66 ± 0.33	1.05 ± 0.58	1.74 ± 0.34	0.05 ± 0.04	15.33 ± 1.89	1.55 ± 0.38

注: Z1B 表示 8 月实验组池塘表层样品; N1B 表示 8 月对照组池塘表层样品; Z1D 表示 8 月实验组池塘底层样品; N1D 表示 8 月对照组池塘底层样品; Z2B 表示 9 月实验组池塘表层样品; N2B 表示 9 月对照组池塘表层样品; Z2D 表示 9 月实验组池塘底层样品; N2D 表示 9 月对照组池塘底层样品。标加 * 表示与同列下一个数据存在显著差异 ($P < 0.05$)

Notes: Z1B represents the surface layer sample of the experimental group in August; N1B represents the surface layer sample of the control group in August; Z1D represents the bottom layer sample of the experimental group in August; N1D represents the bottom layer sample of the control group in August; Z2B represents the surface layer sample of the experimental group in September; N2B represents the surface layer samples of the control group in September; Z2D represents the bottom sample of the experimental group in September; N2D represents the sample of the bottom layer of the control group in September. Marking * indicates a significant difference from the next data in the same column ($P < 0.05$)

2.2 真核微生物群落多样性

由表 2 可知, 8 月和 9 月实验组池塘水体真核微生物 Shannon 多样性指数和 Chao1 多样性指数显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

表 2 两组池塘水体真核微生物群落多样性指数

Tab. 2 Eukaryotic microbial community diversity index in water of two kinds of ponds

$n = 3; \bar{x} \pm \text{SD}$

样品名 Sample name	Chao1	Shannon
Z1	2098.87 ± 30.37 *	7.42 ± 0.88 *
N1	1237.79 ± 92.25	5.21 ± 0.39
Z2	1978.52 ± 28.89 *	7.82 ± 0.59 *
N2	1189.28 ± 33.41	5.34 ± 0.31

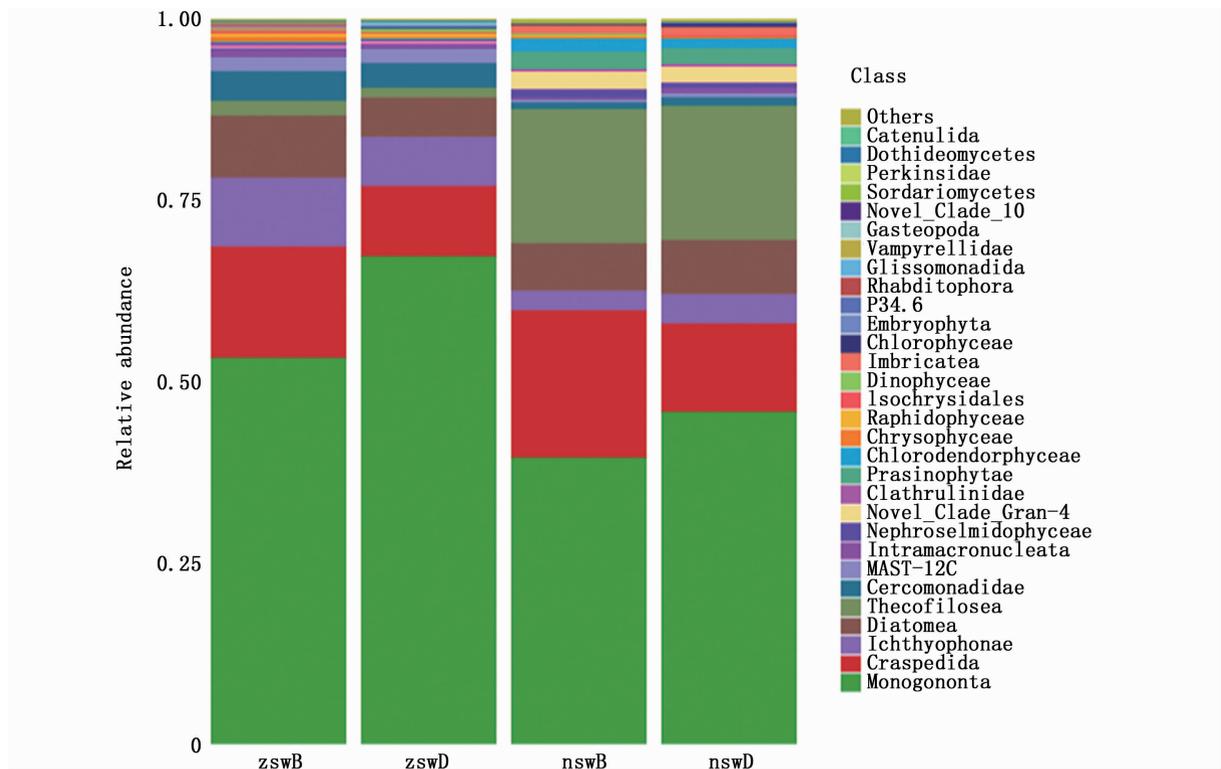
注: Z1 表示 8 月实验组水体样品; N1 表示 8 月对照组水体样品; Z2 表示 9 月实验组水体样品; N2 表示 9 月对照组水体样品。标加 * 表示与同列下一个数据存在显著差异 ($P < 0.05$)

Notes: Z1 represents the water samples of experimental group ponds in August; N1 represents the water samples of control ponds in August; Z2 represents the water samples of experimental group ponds in September; N2 represents the water samples of control ponds in September. Marking * indicates a significant difference from the next data in the same column ($P < 0.05$)

2.3 真核微生物群落组成

由图 1 可知, 在纲水平下, 实验组和对照组

池塘表层水体真核微生物群落结构与底层水体真核微生物群落结构均无显著差异 ($P > 0.05$)。实验组池塘水体真核微生物构成按照相关丰富度由高到低排序依次为单巢纲 (Monogononta)、Craspedida、Ichthyophonae、硅藻纲 (Diatomea)、Cercomonadidae、MAST-12C、Thecofilosea、Intramacronucleata。对照组池塘水体真核微生物构成按照相关丰富度由高到低排序依次为单巢纲、Thecofilosea、Craspedida、硅藻纲、Prasinophytae、Chlorodendrophyceae、Imbricatea、Cercomonadidae。实验池塘水体真核微生物中单巢纲、Craspedida、硅藻纲、Ichthyophonae、Cercomonadidae、Intramacronucleata、MAST-12C、金藻纲的绝对丰富度显著高于对照组池塘 ($P < 0.05$)。实验组池塘水体真核微生物中 Thecofilosea、Imbricatea、Isochrysidales、Chlorodendrophyceae、Prasinophytae 的绝对丰富度显著低于对照组池塘 ($P < 0.05$)。实验组池塘水体真核微生物中酵母纲 (Saccharomycetes)、子囊菌纲 (Sordariomycetes)、外担菌纲 (Exobasidiomycetes)、银耳纲 (Tremellomycetes)、Nephroselmidophyceae 的绝对丰富度与对照组无显著差异 ($P > 0.05$)。



zswB 代表 8 月和 9 月实验组池塘的水体表层样品, zswD 代表 8 月和 9 月份实验组池塘的水体底层样品, nswB 代表 8 月和 9 月对照组池塘的水体表层样品, nswD 代表 8 月和 9 月对照组池塘的水体底层样品

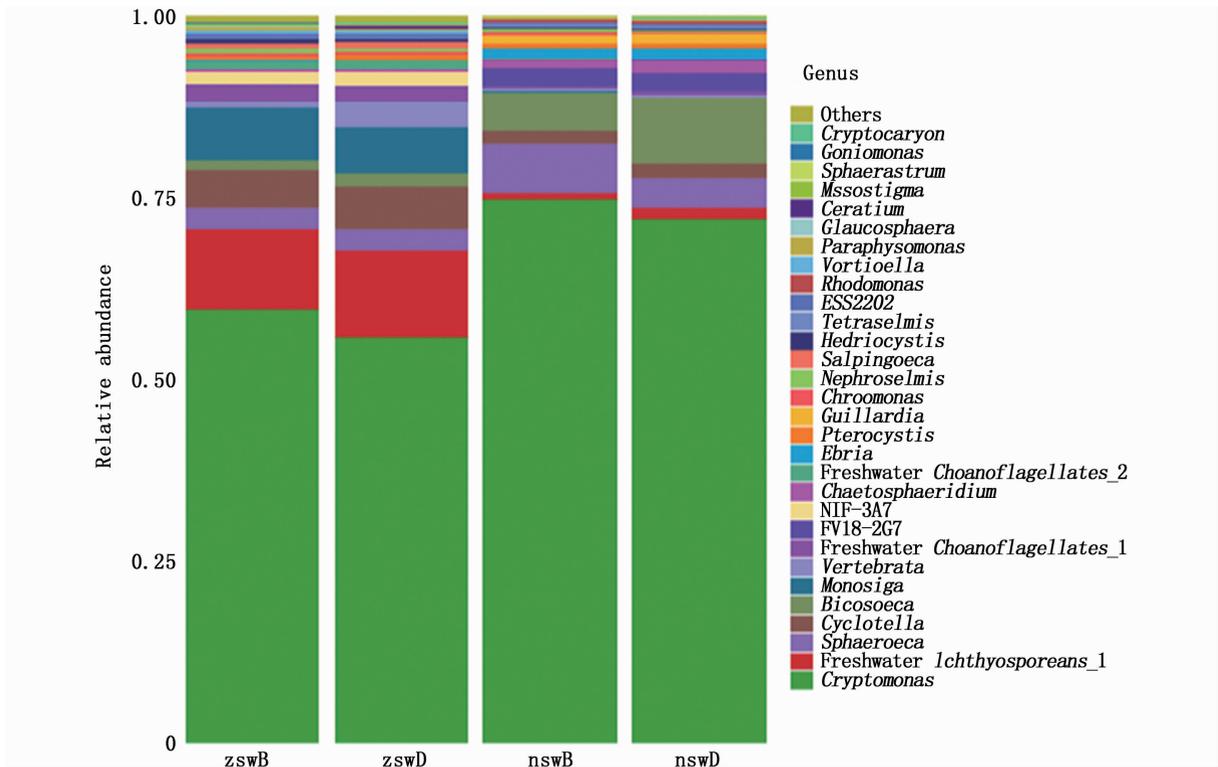
zswB represents the water surface samples of experimental group ponds in August and September, zswD represents the water bottom samples of experimental group ponds in August and September, and nswB represents the water surface samples of control ponds in August and September. nswD represent the water bottom samples of control ponds in August and September

图 1 纲水平下两组池塘水体真核微生物群落结构

Fig. 1 Composition of eukaryotic microbial communities in two types of ponds water bodies at the class level

由图 2 可知,实验组池塘表层水体真核微生物群落结构与底层水体真核微生物群落结构无显著差异($P > 0.05$),对照组池塘表层水体真核微生物群落结构与底层水体真核微生物群落结构也无显著差异($P > 0.05$)。在属水平下,实验组池塘水体真核微生物构成按照相关丰富度由高到低排序依次为隐藻属(*Cryptomonas*)、Freshwater *Ichthyosporeans* 1、单领鞭毛虫属(*Monosiga*)、小环藻属(*Cyclotella*)、*Sphaeroeca*、*Vertebrata*、NIF-3A7、Freshwater *Choanoflagellates* 1。对照组池塘水体真核微生物构成按照相关丰富度由高到低排序依次为隐藻属、杯鞭虫属(*Bicosoeca*)、*Sphaeroeca*、FV18-2G7、小环藻属、毛

球藻属(*Chaetosphaeridium*)、*Ebria*、*Guillardia*。在属水平下,实验组池塘水体真核微生物中的 *Vertebrata*、小环藻属、单领鞭毛虫属、NIF-3A7、丝孢酵母属(*Trichosporon*)、管鞭毛虫属(*Salpingoeca*)、蓝隐藻属(*Chroomonas*)、红囊藻属(*Hedriocystis*)的绝对丰富度显著高于对照组池塘($P < 0.05$),但隐藻属、杯鞭虫属、*Sphaeroeca*、FV18-2G7、毛球藻属、*Ebria*、*Guillardia* 的绝对丰富度显著低于对照组池塘($P < 0.05$),两组池塘中 Freshwater *Choanoflagellates* 1、*Mesostigma*、*Pterocystis*、*Nephroselmis* 的绝对丰富度无显著差异($P > 0.05$)。



zswB 代表 8 月和 9 月实验组池塘的水体表层样品, zswD 代表 8 月和 9 月份实验组池塘的水体底层样品, nswB 代表 8 月和 9 月对照组池塘的水体表层样品, nswD 代表 8 月和 9 月对照组池塘的水体底层样品

zswB represents the water surface samples of experimental group ponds in August and September, zswD represents the water bottom samples of experimental group ponds in August and September, and nswB represents the water surface samples of control ponds in August and September. nswD represent the water bottom samples of control ponds in August and September

图 2 属水平下两组池塘水体真核微生物群落结构

Fig. 2 Composition of eukaryotic microbial communities in two types of ponds water bodies at the genus level

由表 3 可知,在种水平下,实验组池塘水体真核微生物中的梅尼小环藻 (*Cyclotella meneghiniana*)、*Catenaria uncinata*、*Monosiga ovata* 的绝对丰富度显著高于对照组池塘 ($P < 0.05$), 但 *Chroomonas caudata*、*Cyanophora paradoxa* 的绝

对丰富度显著低于对照组池塘 ($P < 0.05$)。两组池塘中 *Moniliella* sp. BH010、*Clonostachys rosea*、*Rhizophydium* sp. JEL317 等 26 种真核微生物没有显著差异。

表 3 实验组池塘水体和对照组池塘水体中存在显著差异的真核微生物种类的绝对丰富度 ($P < 0.05$)

Tab. 3 Absolute abundance of eukaryotic microorganism in the experimental group ponds water and ordinary pond water at the species level ($P < 0.05$)

$n = 3; \bar{x} \pm SD$

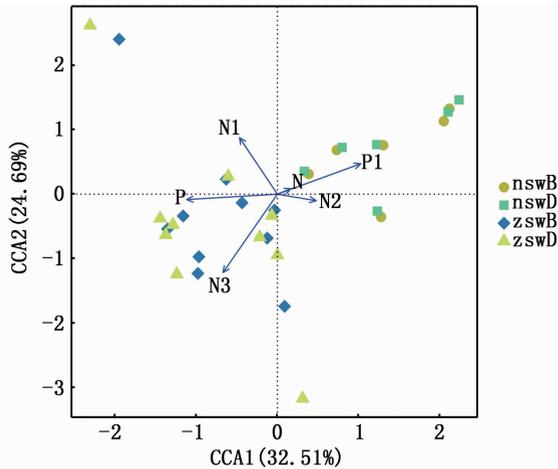
样品 Sample	梅尼小环藻 (<i>Cyclotella meneghiniana</i>)	<i>Catenaria uncinata</i>	<i>Chroomonas caudata</i>	<i>Monosiga ovata</i>	<i>Cyanophora paradoxa</i>
z1	130.75 ± 24.25 *	68.75 ± 18.51 *	341 ± 58 *	5.75 ± 2.22 *	0 *
n1	75.50 ± 11.90	0	1 426 ± 325	0	155.33 ± 56.21
z2	241.25 ± 29.74 *	41.00 ± 6.06 *	305.5 ± 43 *	51.25 ± 10.44 *	0 *
n2	29.94 ± 3.46	0	1 337 ± 412	0	18.21 ± 10.43

注: z1 代表 8 月实验组池塘水样; n1 代表 8 月对照组池塘水样; z2 代表 9 月实验组池塘水样; n2 代表 9 月对照组池塘水样; 标加 * 表示与同列下一个数据存在显著差异 ($P < 0.05$)

Notes: z1 represents experimental group ponds water sample in August; n1 represents the control ponds water sample in August; z2 represents experimental group ponds water sample in September; and n2 represents the September control ponds water sample. Marking * indicates a significant difference from the next data in the same column ($P < 0.05$)

2.4 水体真核微生物群落构成与理化因子的相关性

由图 3 可知,实验组池塘水体真核微生物群落组成与对照组池塘差异显著,而两组池塘表层水体和底层水体真核微生物群落组成相似。影响两组池塘水体真核微生物构成的理化因子主要是总磷、磷酸盐、氨氮、硝酸盐。



环境变量用箭头表示。zswB 代表实验组池塘水体表层样品; zswD 代表实验组池塘水体底层样品; nsWB 代表对照组池塘水体表层样品; nsWD 代表对照组池塘水体底层样品。N1 代表氨氮; N2 代表亚硝酸盐; N3 代表硝酸盐; N 代表总氮; P 代表总磷; P1 代表磷酸盐

Environmental variables were indicated as arrows. zswB represents experimental group ponds water surface sample; zswD represents experimental group ponds water bottom sample; nsWB represents the control ponds water surface sample; nsWD represents the control pond water bottom sample. N1 represents ammonia nitrogen; N2 represents nitrite nitrogen; N3 represents nitrate nitrogen; N represents total nitrogen; P represents total phosphorus; P1 represents phosphate

图 3 环境变量相关的真核微生物群落的典范对应分析(CCA)排序图

Fig. 3 Canonical correspondence analysis (CCA) ordination diagram of eukaryotic microbial community associated with environmental variables

3 讨论

养殖尾水排放给周围环境带来的污染现已成为被广泛关注的热点,特别是新修订的《水污染防治法》在全国推行之后。张大弟等^[14]调查表明每公顷精养池塘通过排放尾水而释放的 TN 和 TP 的量分别为 101 kg 和 11 kg;戴修赢^[2]共调查了 432.18 hm² 的草鱼主养池塘,得出草鱼主养池

塘因换水而造成的氮、磷排放量分别为 86.55 kg/hm² 和 10.21 kg/hm²;PÁEZ-OSUNA 等^[15]的研究表明,每公顷虾池通过养殖废水释放的氮和磷的量分别为 15.2 kg 和 13.5 kg。因此,调控养殖池塘水质、减少养殖尾水的排放对有效保护养殖水域周围的生态环境有重要意义。而水体中真核微生物的代谢分解对水体中营养物质的分解有显著影响,有研究^[7-10]表明通过向养殖池塘中添加外源益生菌可以改变真核微生物群落结构,从而达到对养殖水体水质的改善。

微生物群体感应(quorum sensing)是微生物通过释放自诱导信号分子来协调群体行为的通讯系统。当环境中信号分子浓度达阈值时,微生物表面或胞内特定受体与之结合,从而引起级联反应,多效调控微生物的次级代谢产物合成和形态分化等重要生理过程^[16]。有研究^[17]表明一些微生物群落丰度的变化会引起微生物之间的群体感应,从而导致微生物群落中其他某些种类的微生物增加或者减少。因此推测添加外源益生菌改变真核微生物群落结构可能是通过微生物群落间的群体感应来实现的。

实验组池塘水体真核微生物群落多样性显著高于对照组池塘。而物种多样性越丰富,其所在的生态系统越稳定^[18-19]。这说明实验组池塘生态系统相对于对照组池塘生态系统更加稳定。

实验组池塘水体中的氨氮和硝酸盐含量显著低于对照组,而氨氮和硝酸盐等营养物质的含量与水体中藻类的种类和数量息息相关^[6]。实验组池塘水体真核微生物在种水平下的梅尼小环藻、*Catenaria uncinata*、*Monosiga ovata* 的绝对丰富度显著高于对照组池塘。BERMAN 等^[20]用不同种类的氮源培养藻类,研究结果表明小环藻属可以有效吸收氨氮和硝酸盐用于自身生长。黄光华等^[21]通过在育苗水体中接种小环藻调节育苗水质,结果表明小环藻属对水质有显著的调节作用,可以减少水体中的氨氮和亚硝酸盐。由于梅尼小环藻属于小环藻属,推测其也可能有较强的吸收氨氮和硝酸盐的功能。因此可以推断,梅尼小环藻在两组不同模式池塘丰度的差异性可能是实验组池塘水体总氮、氨氮和硝酸盐含量低于对照组池塘的主要原因之一。

在属水平下,实验组池塘水体真核微生物中的 *Vertebrata*、小环藻属、*Sphaeroeca*、单领鞭毛虫

属、*Freshwater Choanoflagellates* 1、*NIF-3A7*、丝孢酵母属、管鞭毛虫属、蓝隐藻、红囊藻的绝对丰富度显著高于对照组池塘。LIU 等^[22]通过 A2O 和 AO 工艺处理污水,发现丝孢酵母属可以去除污水中硝酸盐。还有研究^[20-21]表明小环藻属有除去硝酸盐的作用。因此我们推断出实验组池塘水体中丝孢酵母属、蓝隐藻属、红囊藻属和小环藻属丰度高于对照组池塘,可能是造成实验组池塘水体中的总氮、硝酸盐和氨氮含量显著低于对照组池塘的主要原因。

同时,本研究表明,实验组和对照组表层与底层水体微生物构成及理化指标无显著差异,说明目前集约化养殖池塘由于养殖设备(如增氧机等)的使用,导致水体理化指标上下差距不大。有研究^[23]表明水产养殖池塘中不同深度的水体的微生物构成非常相似,FAN 等^[24]在罗非鱼的密集养殖中得出的结果进一步证实了这一结论,并进一步推测水产养殖池塘不同水体的微生物构成十分相似可能是和水体相似的理化条件有关^[23]。这与本研究的结果一致。

参考文献:

- [1] 张显良,肖放,李书民,等. 中国渔业统计年鉴 2017 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2017.
ZHANG X L, XIAO F, LI S M, et al. China fisheries statistical yearbook 2017 [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2017.
- [2] 戴修赢. 苏州地区七种养殖池塘水质及其氮、磷收支研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2010.
DAI X Y. Studies on the water quality and nitrogen, phosphorus budgets of seven types of aquaculture ponds in Suzhou region [D]. Suzhou: Soochow University, 2010.
- [3] YANG P, LAI D Y F, JIN B S, et al. Dynamics of dissolved nutrients in the aquaculture shrimp ponds of the Min River estuary, China: Concentrations, fluxes and environmental loads [J]. Science of the Total Environment, 2017, 603-604: 256-267.
- [4] SU X M, STEINMAN A D, XUE Q J, et al. Temporal patterns of phyto- and bacterioplankton and their relationships with environmental factors in Lake Taihu, China [J]. Chemosphere, 2017, 184: 299-308.
- [5] FAN C, GLIBERT P M, ALEXANDER J, et al. Characterization of urease activity in three marine phytoplankton species, *Aureococcus anophagefferens*, *Prorocentrum minimum*, and *Thalassiosira weissflogii* [J]. Marine Biology, 2003, 142 (5): 949-958.
- [6] ALKHAMIS Y, QIN J G. Comparison of N and P requirements of *Isochrysis galbana* under phototrophic and mixotrophic conditions [J]. Journal of Applied Phycology, 2015, 27 (6): 2231-2238.
- [7] 李卓佳,林亮,杨莺莺,等. 芽孢杆菌制剂对虾池环境微生物群落的影响 [J]. 农业环境科学学报, 2007, 26 (3): 1183-1189.
LI Z J, LIN L, YANG Y Y, et al. Influence of *Bacillus* on the microbial communities in shrimp ponds [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2007, 26 (3): 1183-1189.
- [8] 张庆,李卓佳,陈康德. 复合微生物对养殖水体生态因子的影响 [J]. 上海水产大学学报, 1999, 8 (1): 43-47.
ZHANG Q, LI Z J, CHEN K D. The effects of microbiological compound on ecological factors in culture waters [J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 1999, 8 (1): 43-47.
- [9] 古长庆,李君文,晁福寰,等. 微生物制剂在水产养殖中应用的研究 [J]. 水产科学, 2004, 23 (3): 21-25.
GU C Q, LI J W, CHAO F H, et al. Studies on microbiological preparation applied in aquatic product [J]. Fisheries Science, 2004, 23 (3): 21-25.
- [10] 张云. 不同类群代表性浮游植物对尿素的生理生态响应 [D]. 广州: 暨南大学, 2013.
ZHANG Y. Comparative study on the ecophysiological responses of different groups of phytoplankton to urea [D]. Guangzhou: Jinan University, 2013.
- [11] 国家环境保护总局,《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法 [M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 236-257.
The State Environmental Protection Administration, The Water and Wastewater Monitoring Analysis Method Editorial Board. Water and wastewater monitoring analysis method [M]. 4th ed. Beijing: China Environmental Science Press, 2002: 236-257.
- [12] MARGULIES M, EGHOLM M, ALTMAN W, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors [J]. Nature, 2005, 437 (7057): 376-380.
- [13] CAPORASO J G, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data [J]. Nature Methods, 2010, 7 (5): 335-336.
- [14] 张大弟,张晓红,章家骥,等. 上海市郊区非点源污染综合调查评价 [J]. 上海农业学报, 1997, 13 (1): 31-36.
ZHANG D D, ZHANG X H, ZHANG J Q, et al. Integrated research and evaluation on nonpoint source pollution in Shanghai suburbs [J]. Acta Agriculturae Shanghai, 1997, 13 (1): 31-36.
- [15] PÁEZ-OSUNA F, GUERRERO-GALVÁN S R, RUIZ-FERNÁNDEZ A C. Discharge of nutrients from shrimp farming to coastal waters of the gulf of California [J]. Marine Pollution Bulletin, 1999, 38 (7): 585-592.
- [16] SCHIKORA A, SCHENK S T, HARTMANN A. Beneficial effects of bacteria-plant communication based on quorum

- sensing molecules of the N-acyl homoserine lactone group [J]. *Plant Molecular Biology*, 2016, 90(6): 605-612.
- [17] 齐枝花, 于鑫, 余萍, 等. 细菌细胞间通讯的群感效应 [J]. *微生物学通报*, 2005, 32(2): 128-133.
- QI Z H, YU X, YU P, et al. Quorum-sensing: a mechanism of bacterial cell-to-cell communication [J]. *Microbiology*, 2005, 32(2): 128-133.
- [18] TILMAN D, REICH P B, KNOPS J M. Biodiversity and ecosystem stability in a decade-long grassland experiment [J]. *Nature*, 2006, 441(7093): 629-632.
- [19] FLÖDER S, JASCHINSKI S, WELLS G, et al. Dominance and compensatory growth in phytoplankton communities under salinity stress [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2010, 395(1/2): 223-231.
- [20] BERMAN T, CHAVA S, OCEANOGRAPHIC I. Algal growth on organic compounds as nitrogen sources [J]. *Journal of Plankton Research*, 1999, 21(8): 1423-1437.
- [21] 黄光华, 江林源, 卢小花, 等. 小环藻在罗氏沼虾人工育苗中的应用研究 [J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(13): 7849-7850, 7853.
- HUANG G H, JIANG L Y, LU X H, et al. Study on the application of *Cyclotella* sp. in the artificial breeding of *Macrbrachium rosenbergii* [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(13): 7849-7850, 7853.
- [22] LIU X C, YANG M, ZHANG Y, et al. Microbial community comparison of different biological processes for treating the same sewage [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, 23(1): 135-143.
- [23] FAN L M, BARRY K, HU G D, et al. Bacterioplankton community analysis in tilapia ponds by Illumina high-throughput sequencing [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, 32(1): 10.
- [24] FAN L M, CHEN J Z, MENG S L, et al. Characterization of microbial communities in intensive GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) pond systems during the peak period of breeding [J]. *Aquaculture Research*, 2017, 48(2): 459-472.

Effect of *Bacillus* on eukaryotic microorganism in grass carp ponds

LU Yang^{1,2}, YU Ermeng^{1,3}, WANG Guangjun^{1,3}, XIE Jun^{1,3}, ZHANG Kai¹, LI Zhifei¹

(1. Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application and Cultivation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Pearl River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Guangzhou 510380, Guangdong, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Guangdong Ecological Remediation of Aquaculture Pollution Research Center, Guangzhou 510380, Guangdong, China)

Abstract: In order to study the effect of *Bacillus* on eukaryotic microbial community structure and physical and chemical factors in grass carp ponds, high-throughput sequencing technology was used to analyze the eukaryotic microbial community structure in the experimental group (*Bacillus* added pond) and control group (ordinary pond). At the same time, the physical and chemical indicators of the two ponds were analyzed. The results showed that the contents of TN, NH₄⁺-N and NO₃⁻-N in the pond water of the experimental group were significantly lower than those in the control group in August and September ($P < 0.05$). The results showed that the abundance of *Cyclotella meneghiniana*, *Trichosporon*, *Chroomonas*, *Hedriocystis* and *Cyclotella* in the pond water of the experimental group was significantly higher than that in the control pond ($P < 0.05$). The Chao1 index and Shannon index of the eukaryotic microbes in the experimental group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). The experimental results confirmed that by adding *Bacillus* to the pond, the structure of the eukaryotic microbial community in the water body could be changed, thereby realizing the adjustment of the physical and chemical factors of the pond. The research results could provide some theoretical support for reducing the pollution of tailwater tailwater to the water environment.

Key words: eukaryotic microbial community structure; *Bacillus*; physical and chemical factors; high-throughput sequencing; grass carp pond