

研究报告

罗氏沼虾亲虾越冬池中不同基质上微生物群落多样性分析

谢芹^{1,2} 江敏^{1,2*} 胡成枫¹ 张健龙^{1,2} 王城峰³ 童晓岚³顾德平⁴ 胡伟国⁴ 于忠利⁴ 戴习林¹

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

(2. 上海市水产养殖工程技术研究中心 上海 201306)

(3. 陶氏化学(中国)投资有限公司 上海 201203)

(4. 上海市奉贤区水产技术推广站 上海 201499)

摘要:【目的】了解罗氏沼虾亲虾越冬时循环养殖系统对水质的调控效果, 探明其中微生物群落的作用。【方法】采集循环养殖系统运行 88 d 后的越冬池池水、池中人工水草(普通纤维膜)以及外置式生物滤器中的纳米纤维膜等 3 种不同基质上的微生物, 利用 DNA 抽提、PCR 扩增和定量以及高通量 MiSeq 测序技术等对 3 种不同基质上的微生物进行 16S rRNA 基因序列 V4-V5 区的测定和分析, 并根据测序得到的双端测序读长(Pair-end reads)进行质量控制和过滤, 之后进行操作分类单元(OTU)聚类分析, 并基于 OTU 对微生物群落的多样性指数和群落结构进行分析; 每 3–4 d 对越冬池池水水质进行监测。【结果】养殖池塘的水质保持在良好的状态, 其中氨氮和亚硝氮浓度控制在 0.17 ± 0.08 mg/L 和 0.28 ± 0.15 mg/L; 不同基质上的微生物组成和多样性都不相同。在 3 种基质上共检测并鉴定出细菌 64 种, 隶属于 9 门 64 属, 包括变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、绿弯菌门(Chloroflexi)、厚壁菌门(Firmicutes)、浮霉菌门(Planctomycetes)、硝化螺旋菌门(Nitrospirae)、酸杆菌门(Acidobacteria)和绿菌门(Chlorobi)。从属水平上对 3 种基质上的细菌进行分析, 发现养殖池水中含量最高的为丛毛单菌科下的一个未分类类群(Comamonadaceae_unclassified), 其也是 3 种基质的共有优势类群; 普通纤维膜上为 *Inhella*, 纳米纤维膜上则是小纺锤状菌属(*Fusibacter*)。3 种基质上细菌群落多样性顺序为: 纳米纤维膜>普通纤维膜>养殖池水。通过对亲虾越冬养殖全过程的水质监测, 发现越冬期间亲虾池水质始终保持在良好状态, 并且在循环水系统开启约 40 d 后水质达到了相对稳定的状态。【结论】通过在育苗池中悬挂人工水草, 配合内含纳米纤维膜的外置式生物滤器, 可使罗氏沼虾越冬亲虾池保持良好的水质。随着新型材料科学的发展, 开发出适用于水产养殖业的滤料很有必要。

关键词: 生物膜, 高通量测序, 微生物群落多样性, 罗氏沼虾, 水质

Foundation item: Shanghai Shrimp Industry Technology System Program [Hunongkechanzi (2014-5)]; Key Discipline Project of Shanghai Municipal Education Commission (No. J50701); Project of Shanghai Universities' Knowledge Service Platform (No. ZF1206)

***Corresponding author:** Tel: 86-23-61900232; E-mail: mjjiang@shou.edu.cn

Received: January 28, 2016; **Accepted:** June 13, 2016; **Published online** (www.cnki.net): July 19, 2016

基金项目: 上海市虾类产业技术体系建设项目[沪农科产字(2014)第 5 号]; 上海市教委重点学科建设项目(No. J50701); 上海市高校知识服务平台项目(No. ZF1206)

***通讯作者:** Tel: 86-23-61900232; E-mail: mjjiang@shou.edu.cn

收稿日期: 2016-01-28; **接受日期:** 2016-06-13; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-07-19

Microbial community diversity on different substrates in *Macrobrachium rosenbergii* over-wintering cultivation

XIE Qin^{1,2} JIANG Min^{1,2*} HU Cheng-Feng¹ ZHANG Jian-Long^{1,2} WANG Cheng-Feng³
TONG Xiao-Lan³ GU De-Ping⁴ HU Wei-Guo⁴ YU Zhong-Li⁴ DAI Xi-Lin¹

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

(2. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai 201306, China)

(3. DOW Chemical (Chinese) Investment Company Limited, Shanghai 201203, China)

(4. Fengxian District Shanghai Fishery Technology Extension Station, Shanghai 201499, China)

Abstract: [Objective] The aim of this study was to check the effect of water quality control by RAS (Recirculating Aquaculture System) and analyze the function of microbial community on different substrates during the period of *Macrobrachium rosenbergii* over-wintering cultivation. **[Methods]** The microbial samples were collected from pond water, artificial aquatic plants which were composed of normal fiber membrane and nano fiber membrane in external biofilter after RAS being operated for 88 days. The V4 and V5 regions of 16S rRNA gene on three different substrates microbial were analyzed using DNA extraction, PCR amplification and quantification, high-throughput MiSeq sequencing technology. Sequence data was processed by read trimming and identification of V4–V5 sequences, followed by filtering and assigning the operation taxonomic units (OTU). Based on the OTU analyzed the microbial community diversity index and structure. Water quality was monitored every 3–4 days with the national standard method. **[Results]** The pond water quality maintained in a good condition that ammonia-nitrogen and nitrite-nitrogen kept at 0.17 ± 0.08 mg/L and 0.28 ± 0.15 mg/L, respectively. Bacteria composition and community diversity varied in three substrates and 64 species were identified which belonged to 64 genus and 9 phylum including Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Firmicutes, Planctomycetes, Nitrospirae, Acidobacteria and Chlorobi. On the level of genus, Comamonadaceae_unclassified was the most dominant genus in pond water which both appeared in the other two substrates. *Inhella* dominated in surface of normal fiber while *Fusibacter* was predominant in nano fiber membrane surface. Nano fiber membrane had the highest bacteria community diversity, followed by normal fiber membrane and then pond water. Water quality of over-wintering cultivation maintained at a relatively steady state after operating recirculating aquaculture system for 40 days. **[Conclusion]** It is viable to regulate and control water quality of over-wintering cultivation by using fiber membrane as a microbial substrate. With the development of new material science, it is necessary to develop a filter material suitable for aquaculture.

Keywords: Biofilm, High-throughput sequencing, Microbial community diversity, *Macrobrachium rosenbergii*, Water quality

高密度集约化水产养殖常因残饵、养殖生物代谢废物量大等原因产生水质恶化快、病原微生物易滋生等诸多问题。在养殖水体中放置可供微生物附着的基质或载体,或将养殖水经过装有不同载体的外置式生物滤器,可在这些基质或载体表面形成生物膜,利用生物膜中微生物的同化作用,将有机物分解合成自身生长所需的营养物质,可有效去除水中有机物和有害的非离子氨、亚硝酸盐等物质,以

满足养殖对象的生存条件。

不同基质所形成的生物膜水质净化效果也不同^[1],黄志涛利用软性滤料、半弹性滤料和弹性滤料作为载体处理养殖废水,发现3种滤料的氨氮去除能力不同^[2]。蒋轶峰等^[3]采用沸石滤料曝气生物滤池处理养殖废水,结果表明COD和 NH_4^+ 的去除率稳定在85%和70%。臧维玲等^[4]研究了细沙、活性炭等组成的简易装置对罗氏沼虾亲虾越冬池水

质的净化效果；江敏等^[5]研究了多种微生物与生物滤器联合净化罗氏沼虾亲虾越冬池的水质，结果发现，依靠生物滤器中形成的生物膜可有效维持罗氏沼虾越冬池的水质。

对生物膜上的微生物群落结构已有报道。如蒋建文等^[6]利用 PCR-DGGE 技术研究了池塘中无纺布载体表面与水体中微生物多样性的差异；董远湘^[7]研究了 SHARON 生物膜上微生物群落多样性随时间、水力停留时间和溶解氧改变而发生变化的情况；李志斐等^[8]研究了以草鱼养殖池水为培养环境形成生物膜的过程中微生物群落的代谢特征；Schreier 等^[9]研究了循环水养殖系统中微生物群落的多样性，指出了解生物滤器的微生物群落的特征对于管理循环系统和控制水质具有重要作用；Itoi 等^[10]研究了河豚循环水养殖系统中改变生物滤料的环境微生物群落的变化，发现在整个实验条件发生变化时，硝化细菌一直未变化，从而表明了硝化细菌在循环水养殖系统的重要性。

在罗氏沼虾亲虾越冬池中对不同基质形成的生物膜上功能微生物群落多样性的研究还未见报道，辛建美等^[11]研究了生物膜在罗氏沼虾育苗系统中水体的净化作用，结果表明在育苗早期，生物膜对水中污染物去除率较高，但该研究也仅介绍了生物膜固着生物量的变化，未涉及生物膜上微生物群落的具体分析。

本文利用高通量测序方法分析罗氏沼虾亲虾

越冬过程中，养殖池水、普通纤维膜和纳米纤维膜 3 种不同基质上的微生物群落多样性，并对部分具有特殊功能的微生物群落进行了分析，研究结果可为罗氏沼虾乃至其他水产动物养殖过程中的水质调控提供基础数据，为生物膜载体的选择提供参考。

1 材料与方法

1.1 罗氏沼虾亲虾越冬基本情况

试验于 2014 年 10 月–2015 年 3 月在上海申漕特种水产有限公司进行，罗氏沼虾亲虾越冬水泥池面积为 700 m²，水深 0.9±0.1 m，水温稳定在 27±1 °C。越冬期间水处理流程如图 1 所示。越冬池内悬挂人工水草(普通纤维膜) 20 片(1.8 m×5.0 m)作为微生物附着基质。水自池中经水泵抽提至外置式生物滤器顶部，经顶部布水管均匀分布到各层纳米纤维材料表面，之后经出水口排入越冬池，水流量约 9.0 m³/h。外置式生物滤器规格为 1.4 m×1.4 m×2.0 m 的钢骨架结构，其内部挂有 52 层 1 m×2 m 纳米纤维材质的材料，该材料具有较高的孔隙率且双面透氧。

2014 年 10 月 17 日向亲虾越冬池投入罗氏沼虾雌虾 500 kg (规格 50 尾/500 g)，约 5 万尾，雄虾 250 kg (规格 40 尾/500 g)，约 2 万尾。每天投喂 2 次，合计约 35 kg 的饲料。试验期间共抓抱卵虾 6 次，分别是开启外置式生物滤器(2014 年 12 月 9 日)后的第 4、41、54、62、72 和 82 天，平均每次抓抱卵虾约 5 000 尾，产卵后亲虾放回越冬池。

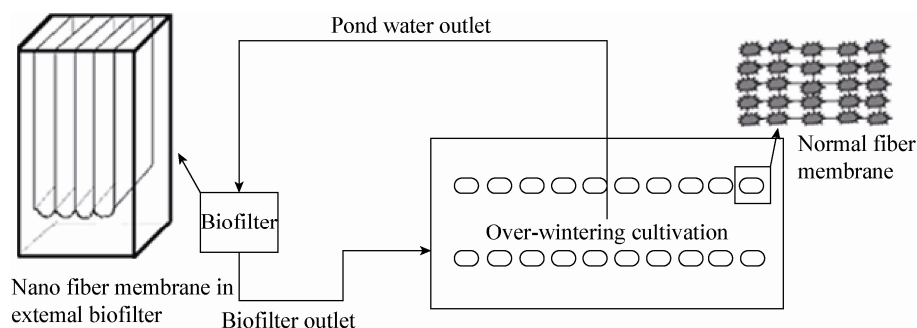


图 1 罗氏沼虾亲虾越冬养殖水处理系统模式图

Figure 1 The mode pattern of recirculating aquaculture system in parent prawn of *Macrobrachium rosenbergii* over-wintering cultivation

1.2 主要试剂和仪器

水质指标所使用主要试剂均按照国家标准执行。E.Z.N.A Soil DNA Kit (D5625-01), 美国 OMEGA BioTek 公司; Qybit2.0 DNA 检测试剂盒 Q10212 美国 Life Technologies 公司; AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒, 美国 AXYGENT 公司。台式离心机 Pico21, 美国 Thermo Fisher 公司; 漩涡混合器 GL88B, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; 混匀型干式恒温器 TND03-H-H, 深圳拓能达科技有限公司; PCR 仪 ABI GeneAmp[®]9700, 美国 Queensland 公司; 蓝色荧光定量系统 QuantiFluor[™]-ST, 美国 Promega 公司;

1.3 水质及微生物检测方法

自外置式生物滤器开启之日起, 每 3–4 d 采集 1 次越冬池内水样, 按照国家标准方法测定氨氮 (NH₃-N) (HJ535-2009)、亚硝氮 (NO₂-N) (GB7493-87)、硝氮 (NO₃-N) (HJ/T346-2007)、水温 (GB13195-91)、高锰酸盐指数 (COD) (HY003.4-91)、活性磷酸盐 (AP) (GB11893-89)、溶解氧 (DO) 和 pH^[12]。

亲虾越冬养殖至 2015 年 3 月 6 日, 即外置式生物滤器运行 88 d 后, 采集养殖池水、普通纤维膜网片和纳米纤维膜这 3 种基质上的微生物及附着基质至无菌离心管, 并迅速冻存。经 DNA 抽提、PCR 扩增^[10]和实时荧光定量 PCR 检验之后进行 MiSeq 测序。

DNA 抽提: 准备 1 mL 样品, 按照 E.Z.N.A Soil DNA Kit (OMEGA) 使用说明书进行操作。

PCR 扩增: 引物为 515F (5'-GTGCCAGCMGCC GCGG-3') 及 907R (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGT TT-3')。

本实验是针对 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增, 采用 TransStart FastPfu DNA Polymerase, 20 μL 反应体系: 5×FastPfu Buffer 4 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL, Forward Primer (5 μmol/L) 0.8 μL, Reverse Primer (5 μmol/L) 0.8 μL, FastPfu Polymerase 0.4 μL, Template DNA 10 ng, 加 ddH₂O 至 20 μL。PCR 反应参数: 95 °C 2 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s,

72 °C 30 s, 25 个循环; 72 °C 5 min。扩增产物用含有 SYBR[®] Safe DNA 凝胶染料的 TBE 缓冲液在 2.0% 的琼脂糖凝胶进行合并及可视化操作。

最后使用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒切胶回收 PCR 产物, Tris-HCl 洗脱; 2% 琼脂糖电泳检测, 参照电泳初步定量结果, 将 PCR 产物用 QuantiFluor[™]-ST 蓝色荧光定量系统进行检测定量。最后送至上海美吉生物医药科技有限公司完成细菌的 16S rRNA 基因 V4–V5 区序列测定。

1.4 数据处理

常规水质分析的数据用 Excel 进行统计分析。通过 MiSeq 测序平台得到的 PE reads 根据重叠 (Overlap) 关系进行拼接, 同时对序列质量进行质控和过滤, 之后进行 OTU 聚类分析。OTU (Operation Taxonomic Units), 即分类操作单元, 是在系统发生学研究或群体遗传研究中, 为了便于进行分析, 人为地给出某一个分类单元如品系、种、属等同一标志。OTU 产生后, 统计各个样品含有 OTU 情况及每个 OTU 中含有序列的数目。同时, 将所有序列与 Silva (<http://www.arb-silva.de>) 数据库比对, 在分析相似性水平在 97% 的条件下, 通过寻找最近祖先方法, 得到每个 OTU 的分类学信息。以 α -多样性指标来表征微生物多样性, 具体参数包括丰富度指数、Shannon 指数、Simpson 指数、ACE 指数、Chao 指数^[13–15]以及反映样本文库覆盖率的 Coverage 深度指数^[13]。其中 Coverage 指数数值越高, 则样本中序列被测出的概率越高, 反之则样本中序列被测出的概率越低。该指数反映了测序结果是否代表了样本中微生物的真实情况。分析软件: Mothur^[16], 利用 R 语言工具制作曲线图。(Version v.1.30.1 http://www.mothur.org/wiki/Schloss_SOP#Alpha_diversity)。

2 结果与分析

2.1 罗氏沼虾亲虾越冬池水质

开启生物滤器之后, 罗氏沼虾亲虾越冬池 pH 维持在 7.64±0.31, DO 维持在 6.01±0.31 mg/L, 符合亲虾越冬所需。由图 2 可知, 活性磷早期一直处在波动

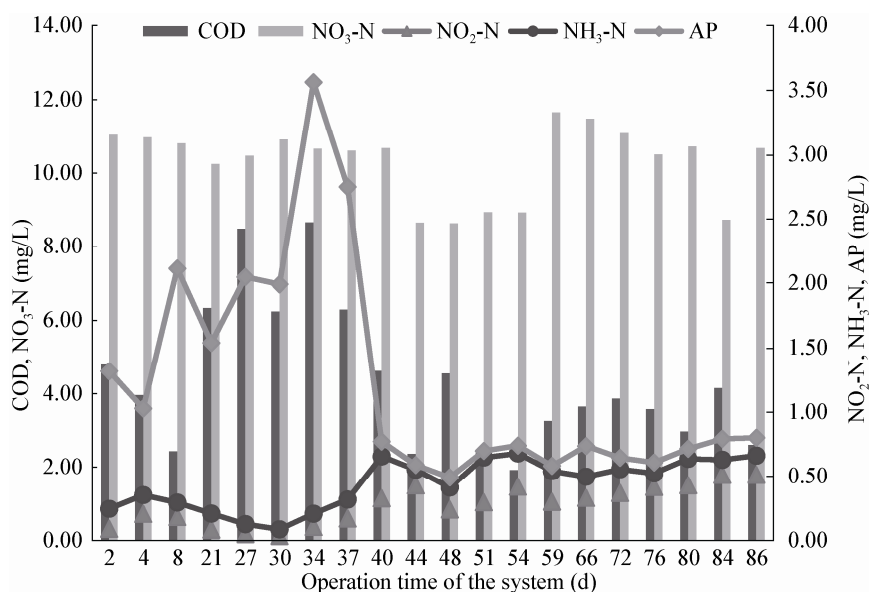


图2 罗氏沼虾亲虾池开启外置式生物滤器后水质的变化情况

Figure 2 Water quality of *Macrobrachium rosenbergii* over-wintering cultivation

上升趋势,自滤器开启后第34天开始明显下降,到40 d左右保持在相对较低的水平(0.10 ± 0.06 mg/L);氨氮(0.17 ± 0.08 mg/L)和亚硝氮(0.28 ± 0.15 mg/L)总体呈现缓慢上升的趋势,但均在亲虾安全浓度以下,在第40天之后保持在一个相对较高的水平;硝氮(10.32 ± 0.98 mg/L)含量是水中最主要的无机氮形式,其含量一直相对较高,呈平稳波动状态。

2.2 微生物群落分析

2.2.1 微生物群落组成及丰度:对测序结果进行初筛和分类学鉴定,结果列于表1。在属水平上,3种基质共有的微生物类群有56个属,具体见表1中带星号的微生物,微小杆菌 *Exiguobacterium* 是仅在养殖池水和普通纤维膜上的共有微生物,仅在普通纤维膜和纳米纤维膜上共有的微生物类群主要分布在4个属,分别是鞘脂单胞菌科 *Sphingomonadaceae_unclassified*、*Phycisphaera*、*B79_norank*及*GR-WP33-30_norank*;只在纳米纤维膜上检测到的微生物有2个属为 *Marinicella*和*CCM11a_norank*,只在养殖池水检测到的微生物有1个属为 *Perlucidibaca*。

2.2.2 微生物群落多样性指数:通过高通量测序获得序列划分 OTU 后,采用5种不同指标表征3种

基质上微生物的多样性(表2),纳米纤维膜上的微生物多样性相对最高,而养殖池水的微生物多样性最低。3个样品的 Coverage 指数均在0.98之上,说明样品中的序列被测出的概率较高。

2.3 优势菌群

3种基质上共检测并鉴定出9个门类的微生物(图3),分别为变形菌门、放线菌门、拟杆菌门、绿弯菌门、厚壁菌门、浮霉菌门、酸杆菌门、硝化螺旋菌门和绿菌门。其中变形菌门、拟杆菌门和浮霉菌门在3种基质上均占有明显的群落优势,3者丰度依次为:变形菌门>拟杆菌门>浮霉菌门。比较其在3种基质上的丰度可知,变形菌门在养殖池水中的丰度高于其在另外两种基质上的丰度,普通纤维膜上浮霉菌门的丰度高于其在养殖池水和纳米纤维膜上的值,而厚壁菌门在纳米纤维膜上的丰度则显著高于另外两种基质;在普通纤维膜和纳米纤维膜上均有酸杆菌门,在养殖池水中未检测到,且普通纤维膜和纳米纤维膜上的微生物类群种类差别并不大,普通纳米纤维膜上特有微小杆菌,而纳米纤维膜上特有 *Marinicella*和*CCM11a_norank*两个属,但微生物的含量,特别是一些具有重要作用的功能微生物的含量具有一定的差别。

表 1 微生物群落主要组成及其在不同基质中的丰度
Table 1 Microbial community composition and its abundance on different substrates

序号 No.	属类 Genus	养殖池水 Pond water (%)	普通纤维膜 Normal fiber membrane (%)	纳米纤维膜 Nano fiber membrane (%)
1	*氨基酸杆菌属(<i>Acidaminobacter</i>)	0.02	0.03	2.38
2	*厌氧蝇菌科(<i>Anaerolineaceae_uncultured</i>)	0.13	0.54	2.00
3	*暖蝇科属(<i>Caldilineaceae_uncultured</i>)	1.00	1.39	1.35
4	*绿弯菌门(<i>Chloroflexi_unclassified</i>)	0.05	1.09	0.27
5	*丛毛单胞菌科(<i>Comamonadaceae_unclassified</i>)	16.42	5.57	5.51
6	*噬纤维细菌科(<i>Cytophagaceae_uncultured</i>)	0.48	0.55	2.67
7	*黄杆菌属(<i>Flavobacterium</i>)	7.06	3.14	1.59
8	*变形菌(<i>Gammaproteobacteria_unclassified</i>)	0.78	0.02	0.08
9	*出芽菌属(<i>Gemmata</i>)	0.32	0.45	1.00
10	*束縛杆菌属(<i>Haliscomenobacter</i>)	2.51	0.18	0.18
11	*盐单胞菌(<i>Halomonas</i>)	0.02	0.09	1.15
12	*噬氢菌属(<i>Hydrogenophaga</i>)	8.42	3.43	0.99
13	*生丝微菌属(<i>Hyphomicrobium</i>)	0.07	1.24	0.18
14	*乳球菌属(<i>Lactococcus</i>)	0.85	1.81	0.27
15	*侏囊菌属(<i>Nannocystis</i>)	0.38	0.41	0.22
16	*亚硝化单胞菌(<i>Nitrosomonas</i>)	1.22	0.11	0.92
17	*硝化螺旋菌属(<i>Nitrospira</i>)	0.45	0.25	2.82
18	*副球菌属(<i>Paracoccus</i>)	1.69	0.54	0.24
19	*短小核菌属(<i>Parvularcula</i>)	0.06	0.15	0.42
20	*小梨形菌属(<i>Pirellula</i>)	2.77	1.39	0.90
21	*浮霉状菌属(<i>Planctomyces</i>)	0.86	8.02	2.22
22	*浮霉菌科(<i>Planctomycetaceae_unclassified</i>)	0.23	0.66	0.31
23	*浮霉菌科(<i>Planctomycetaceae_uncultured</i>)	0.06	1.06	0.49
24	*假单胞菌(<i>Pseudomonas</i>)	1.88	3.61	0.81
25	*根杆菌属(<i>Rhizobacter</i>)	1.25	1.44	0.74
26	*红杆菌科(<i>Rhodobacteraceae_unclassified</i>)	9.71	0.73	0.92
27	*古字状菌属(<i>Runella</i>)	0.25	0.15	0.17
28	*腐螺旋菌科(<i>Saprospiraceae_uncultured</i>)	4.59	3.19	6.71
29	*热单胞菌属(<i>Thermomonas</i>)	0.51	2.60	1.17
30	*黄单胞菌科(<i>Xanthomonadaceae_unclassified</i>)	0.22	1.03	0.75
31	*黄色单胞菌目(<i>Xanthomonadales_uncultured</i>)	0.17	0.46	2.31
32	*小纺锤状菌属(<i>Fusibacter</i>)	0.03	0.03	7.17
33	*黄色单胞菌(<i>Arenimonas</i>)	0.07	0.22	3.19
34	*芽殖小小梨形菌属(<i>Blastopirellula</i>)	0.12	2.78	1.49
35	* <i>Defluviimonas</i>	0.38	0.54	1.08
36	* <i>Denitratisoma</i>	0.08	0.11	1.83
37	* <i>Haliangium</i>	0.01	0.06	0.36
38	* <i>Inhella</i>	3.92	12.89	0.97
39	* <i>Limnohabitans</i>	1.78	0.11	0.08

(待续)

(续表)				
40	* <i>Rheinheimera</i>	0.54	1.05	0.08
41	* <i>Vogesella</i>	4.00	0.90	0.01
42	*A0839_norank	0.01	0.16	0.17
43	*Candidate_division_TM7_norank	0.01	0.23	0.43
44	*Candidate_division_WS3_norank	0.01	0.02	0.29
45	*Chitinophagaceae_uncultured	0.19	0.29	1.41
46	*GR-WP33-58_norank	0.21	0.19	0.10
47	*hgcI_clade	1.30	0.01	0.01
48	*NS11-12_marine_group_norank	2.59	0.22	0.32
49	*NS9_marine_group_norank	0.73	5.27	1.18
50	*OM190_norank	0.28	0.17	1.29
51	*PHOS-HE51_norank	0.17	0.13	2.35
52	*Pla4_lineage_norank	0.01	0.01	1.17
53	*SC-I-84_norank	0.10	0.13	1.76
54	*SM1A02	0.03	0.03	0.20
55	*Subgroup_17_norank	0.02	0.01	0.45
56	*Subgroup_6_norank	0.08	0.68	1.03
57	微小杆菌(<i>Exiguobacterium</i>)	0.02	1.29	—
58	鞘脂单胞菌科 Sphingomonadaceae_unclassified	—	0.03	0.32
59	<i>Phycisphaera</i>	—	0.01	0.08
60	B79_norank	—	0.03	0.14
61	GR-WP33-30_norank	—	0.22	0.26
62	<i>Marinicella</i>	—	—	0.07
63	CCM11a_norank	—	—	0.01
64	<i>Perlucidibaca</i>	1.49	—	—
65	Other	17.40	26.86	28.93

注：%：该种细菌占全部细菌的比例；—：未检出此种细菌；Norank：在分类学谱系中，出现的一些没有科学名称的中间等级；Unclassified：在统计 OTU 时，某些分类谱系在某一分类级别的分值较低，分类学比对后根据置信度阈值的筛选，以 Unclassified 标记；Saprospiraceae_uncultured：在科水平上的注释是 Saprospiraceae；数据库也没有属水平上信息，但知道是不可培养的细菌，所以 Saprospiraceae_uncultured：这个物种属水平的信息；*：3 种基质共有微生物。

Note: %: Indicates richness of the bacteria to the total bacteria; —: Indicates not identified; Norank: Indicates middle class that have no scientific name appears; Unclassified: Indicates classification lineages has a lower level in a classification grade; Saprospiraceae_uncultured: Indicates the bacteria is uncultured and no information on the genus level in database; *: Indicates the common bacteria in 3 substrates.

表 2 不同基质上的微生物群落多样性指数
Table 2 Microbial community diversity index on different substrates

Substrate	Reads	OTUs	Ace	Chao	Coverage	Shannon	Simpson
养殖池水 Pond water	20 048	615	814	808	0.988	4.33	0.039
普通纤维膜 Normal fiber membrane	34 676	757	883	888	0.989	5.12	0.018
纳米纤维膜 Nano fiber membrane	30 665	980	1 110	1 120	0.987	5.58	0.011

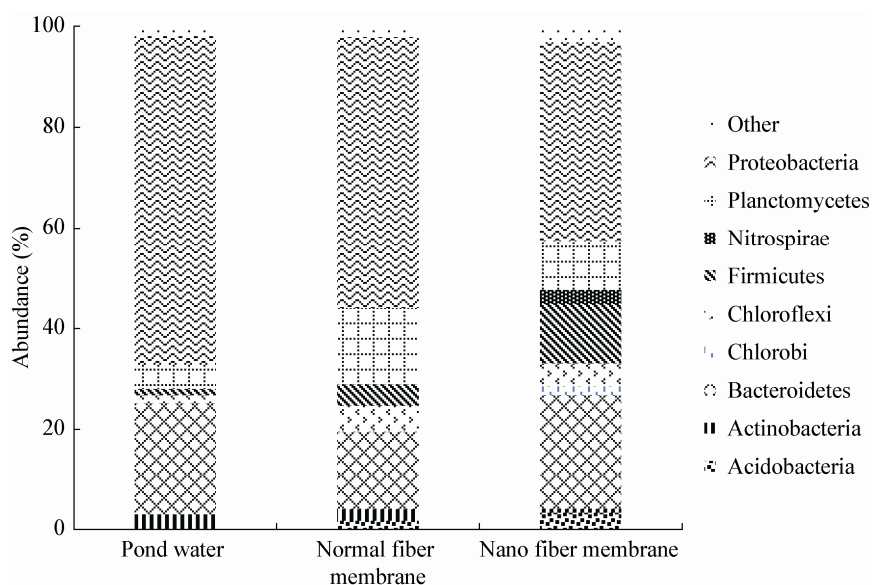


图3 不同基质上各门微生物的丰度

Figure 3 The relative abundance of microbial on the level of phylum on different substrates

按丰度 $>0.7\%$ 作为优势菌群标准,在分类学属这一级别上,养殖池水、普通纤维膜和纳米纤维膜分别有22、22和33种微生物优势菌属,优势菌属占对应基质整个微生物群落的比例分别为38%、36%和53%。分析丰度值前10位的优势细菌群落可知(图4)3种基质共同含有丛毛单胞菌和腐螺旋菌。养殖池水中含量最高的为丛毛单胞菌科的一个属(*Comamonadaceae_unclassified*),占池水全部细菌群落的16%;普通纤维膜上含量最高的细菌群落为*Inhella*,占13%;纳米纤维膜上最高含量的优势菌群为小纺锤状菌属,占7%。

3 讨论

3.1 微生物对养殖池水水质的影响

亲虾越冬期间,养殖池水的水质保持良好的状态,其中氨氮(0.17 ± 0.08 mg/L)和亚硝氮(0.28 ± 0.15 mg/L)均得到了有效控制。3种基质中均检测到亚硝化单胞菌和硝化螺旋菌属。亚硝化单胞菌属为氨氧化菌(*Ammonia oxidizing bacteria*, AOB),主要将氨氧化为亚硝酸盐,硝化螺旋菌属为亚硝酸盐氧化菌(*Nitrite oxidizing bacteria*, NOB),

参与硝化作用的第二阶段,将亚硝酸盐氧化为硝酸盐。在已培养出的4种NOB中,硝化螺旋菌属对亚硝酸盐具有更高的亲和力。有研究表明,实际处理工艺时,硝化细菌一般只占微生物总量的0.2%~2.0%,即使是高氨氮废水处理也仅占微生物总量的20%^[17];孟睿等发现硝化细菌对养殖废水中的 NO_2^- -N和 NH_4^+ -N去除率可达到81.44%和99.38%^[18]。

本实验中3种基质均检测到优势菌属浮霉状菌属,且在普通纤维膜上为前10种优势菌属之一。浮霉状菌属、出芽菌属和小梨形菌属都隶属于浮霉状菌门。浮霉状菌参与氨化、硝化、反硝化等作用,在缺氧条件下,以 NO_3^- 和 NO_2^- 为电子受体^[19],进行厌氧氨氧化作用。有研究表明,浮霉状菌还有更多可能的功能,比如可利用有机酸将硝酸盐和亚硝酸盐氧化为 N_2 ^[20]。浮霉状菌广泛分布在海洋、淡水、湖泊、土壤等环境中且基于其在细胞、生理及分子生物学上的特点,浮霉状菌已被公认为是一类极其重要的微生物,是目前研究最热门的细菌之一^[21]。3种基质共有的丛毛单胞菌科是一类可进行反硝化作用,将硝酸盐和亚硝酸盐转化为 N_2O 或 N_2 的革

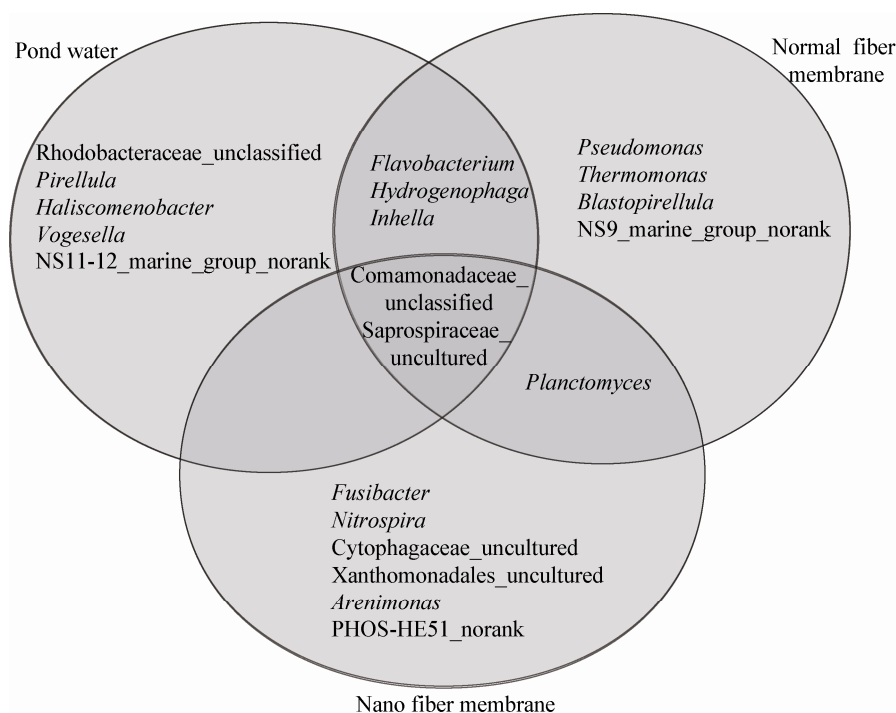


图 4 3 种基质中前 10 种优势菌群

Figure 4 Top ten kinds of the dominant communities on three substrates

兰氏阴性细菌。而假单胞菌和黄杆菌属可引起海水养殖虾类烂鳃病、甲壳溃疡病、红腿病等细菌性疾病^[22]，也有研究认为假单胞菌直接或间接具有杀藻作用^[23]。噬氢菌属为具有更强适应性的好氧反硝化细菌^[24]。腐螺旋菌科在很多研究中都有报道，高大文等在研究 MBR 膜污染时发现，在整个膜污染周期中都有腐螺旋菌科的存在^[25]；黄兴等认为，活性污泥在营养缺乏的条件下，微生物种群结构会发生变化，其中腐螺旋菌科能通过产生蛋白质和多糖水解酶实现对有机物的降解^[26]。有研究表明，反硝化作用主要存在于有机物丰富、溶解氧少的沉积物层，可将含氮有机物以 N_2 、 N_2O 等形式去除^[27]，这有利于水体的净化。

硝化细菌和反硝化细菌的存在，不仅对水体净化有着非常重要的作用，也说明了同步硝化反硝化作用 (Simultaneous Nitrification and Denitrification, SND) 的存在。同步硝化反硝化作用具有缩短脱氮时间、降低动力消耗和节省碳源等优

点。很多研究学者都已经对同步硝化反硝化的影响因素做了研究，发现 C/N、溶解氧浓度、温度等都影响着 SND 效果^[28]，而 DO 和微生物絮体的形态是影响同步硝化反硝化的关键因素^[29]。

3.2 不同基质之间细菌群落的多样性讨论

本研究中，采用的普通纤维由于制作原料、制作方法等因素长时间浸泡在水里容易腐烂，后期的净水效果不太理想，水产养殖上很少普遍采用，而纳米纤维材料主要是应用了静电纺技术制备，制备出的纳米纤维具有比表面积大、机械稳定性好、孔隙率高、吸附性好等优点，已成为有害物质监控、污水处理等环境领域中具有重要潜在应用价值的新型材料^[30]。

可以看到静置在水体中的普通纤维膜和处于流动水体中的纳米纤维膜上微生物群落种类差异性不大。但由于外部环境的水力停留时间和水力剪切力不同，3 种不同基质上微生物群落多样性大小呈现不同值，养殖池水最小，其次是普通纤维膜，

最高的是纳米纤维膜。

在生物处理系统中，微生物膜以微生物聚集体为有效功能单位。微生物聚集体的结构、形态、功能、特性都与水处理效果相关。其形成除了与自身的表面特性、水体电解质的浓度以及外部环境相关，还与水力停留时间、水力剪切力、有机负荷率、pH、温度、溶解氧等有关^[31]。本实验中，纳米纤维膜的微生物多样性高于其他两种基质，除了在于纳米纤维膜本身具有比表面积大、质量轻、孔隙率高、优良的力学性质等优良特点外^[32-33]，也可能是因为纳米纤维膜是悬挂于外置式生物滤器中，水自上而下以特定的流速流经其表面，而普通纤维膜悬挂在养殖池塘水体中，被池水全部浸没，前者的水力停留时间、水力剪切力以及有机负荷率等可能更有利于微生物聚集体的形成。另外，微生物群落多样性主要由微生物群落的分布决定。而微生物群落的分布机制有两种观点，一是 Beijerinck 认为微生物具有全球分布的特点，只有当环境条件适合才能大量繁殖^[34]；另一个是 Meta-群落假说，认为细菌群落组成是由扩散作用而聚集在一起的一类本地群落

的集合，它受内部环境因子即物种本身之间的相互作用和外部环境因子如环境温度、pH 和营养盐水平等非生物环境因子影响^[35]。由以上两种观点，普通纤维膜和纳米纤维膜所处的水体环境差异性不大，因此都能够大量繁殖，而微生物群落的差异性可能是由微生物群落本身之间的相互作用造成的。

相对于传统的挂膜基质，纳米材料具有质量轻、力学性能好、清洗方便、占地面积小等优点，但纳米材料等其他具有潜力的新兴材料应用于水产养殖的研究仍较少。随着材料科学的不断发展，有必要加强适用于水产养殖循环水处理的特性材料的开发。

3.3 与其他不同基质上微生物群落多样性研究的比较

表 3 所示研究结果中，变形菌门基本上占据了优势地位。王威^[36]和张海耿等^[37]使用不同的生物滤料作为生物膜生成的载体，通过生物膜上的氨氧化细菌、硝化细菌等微生物的共同作用能较好地对养殖水体中的亚硝氮、氨氮起到脱氮净化作用，使得养殖水体维持在一个相对稳定的环境。

表 3 对照其他不同方法分析不同基质生物膜微生物群落多样性 Table 3 Microbial diversity on other substrates using different methods					
品种 Aquaculture objects	基质 Substrate	检测方法 Methods	鉴定出的微生物 Identification of microorganisms	优势菌门(属) Dominant phylum (genus)	参考文献 Reference
黑鲟幼鱼 <i>Sparus macrocephalus</i>	陶环滤料	PCR-DGGE	α 变形菌纲、 β 变形菌纲、 黄杆菌纲、芽孢菌纲、黄 杆菌(Flavobacteriaceae bacterium)、泥滩杆菌属 (<i>Gaetbulibacter</i> sp.)和玫瑰 杆菌属(<i>Roseobacter</i> sp.)	未见	[36]
鱼池,但未提及具体 鱼类 Fish pond, unmentioned species	循环水养殖系 统生物滤料	微生物培养技 术、DGGE	变形菌门、Flavobacteria、 亚硝化单胞菌属 (<i>Nitrosomonas</i>)、黄杆菌 (Flavobacteriaceae bacterium)	变形菌门、 <i>Flavobacteria</i>	[37]
南美白对虾 <i>Penaeus vannamei</i> <i>Boone</i>	池塘水体	高通量测序 (Roche 454 和 Illumina MiSeq 测序平台)	23 门	变形菌门、蓝细菌门、 放线菌门、拟杆菌门	[38]

4 结论

由于不同基质的性质如亲水性、表面粗糙度等影响着生物膜上微生物的固着量,而不同环境条件如溶解氧浓度、温度、水温、水体流速和水力停留时间等又影响着微生物群落的多样性,因此如何选择一种适用于循环水养殖的生物滤料以及如何控制环境条件形成最有益的功能微生物群落显得尤为重要。目前改变基质表面与细菌之间的作用主要通过“化学修饰”来完成,相信随着新型材料科学的发展,更多的科学技术将应用于开发水产养殖的生物滤料,从而完善水产养殖生物滤料的发展。

参考文献

- [1] Yang P, Pan YL, He L. Development of biofilm formation and kinetics models in the process of wastewater treatment[J]. Research of Environmental Science, 2000, 13(5): 50-53 (in Chinese)
杨平, 潘永亮, 何力. 废水生物处理中生物膜的形成及动力学模型研究进展[J]. 环境科学研究, 2000, 13(5): 50-53
- [2] Huang ZT. Study on the media of the biofilters in the recirculating aquaculture system[D]. Qingdao: Master's Thesis of Ocean University of China, 2007 (in Chinese)
黄志涛. 封闭式循环水养殖系统生物滤池及滤料的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2007
- [3] Jiang YF, Liu DH, Sun TX, et al. Process characteristics of zeolite media biological aerated filter for treating aquaculture wastewater[J]. Environmental Science, 2010, 31(3): 703-708 (in Chinese)
蒋轶锋, 刘大华, 孙同喜, 等. 沸石滤料曝气生物滤池处理水产养殖废水的工艺特性[J]. 环境科学, 2010, 31(3): 703-708
- [4] Zang WL, Zhu ZG, Zhang JD, et al. The purification of the water quality in the overwintering parent shrimp pond for *Macrobrachium rosenbergii* by using the simple filter apparatus[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 1995, 4(1): 20-26 (in Chinese)
臧维玲, 朱正国, 张建达, 等. 简易过滤装置对罗氏沼虾亲虾越冬池水质的净化作用[J]. 上海水产大学学报, 1995, 4(1): 20-26
- [5] Jiang M, Zang WL, Dai XL, et al. The application of microorganisms and recycling filter to overwintering cultivation of *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2000, 27(1): 13-18 (in Chinese)
江敏, 臧维玲, 戴习林, 等. 微生物及生物过滤器在罗氏沼虾亲虾越冬中的应用[J]. 水产科技情报, 2000, 27(1): 13-18
- [6] Jiang JW, Lin WH, Wang YJ, et al. Comparison on the difference of microbial diversity between artificial biofilm and water in pond by DGGE technique[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2008, 36(21): 8956-8959 (in Chinese)
蒋建文, 林文辉, 王亚军, 等. 应用 DGGE 技术比较池塘人工生物膜与水体微生物多样性差异[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(21): 8956-8959
- [7] Dong YX. The diversity of microorganism of partial nitrification biofilm from a continuously aerated laboratory-scale SHARON reactor[D]. Changsha: Master's Thesis of Hunan University, 2006 (in Chinese)
董远湘. SHARON 生物膜中微生物多样性的研究[D]. 长沙: 湖南大学硕士学位论文, 2006
- [8] Li ZF, Wang GJ, Xie J, et al. Microbial carbon metabolic characteristics of biofilm communities in the grass carp culture pond based on Biolog-ECO plates[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(12): 1895-1995 (in Chinese)
李志斐, 王广军, 谢骏, 等. 草鱼养殖池塘生物膜固着微生物群落碳代谢 Biolog 分析[J]. 水产学报, 2014, 38(12): 1895-1995
- [9] Schreier HJ, Mirzoyan N, Saito K. Microbial diversity of biological filters in recirculating aquaculture systems[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2010, 21(3): 318-325
- [10] Itoi S, Niki A, Sugita H. Changes in microbial communities associated with the conditioning of filter material in recirculating aquaculture systems of the pufferfish *Takifugu rubripes*[J]. Aquaculture, 2006, 256(1/4): 287-295
- [11] Xin JM, Li Q, Zhou ZM, et al. Water purification effect of biofilter in *Macrobrachium rosenbergii* seeds nursery system[J]. Environmental Chemistry, 2014, 33(5): 850-854 (in Chinese)
辛建美, 李倩, 周志明, 等. 罗氏沼虾育苗系统中生物滤池对水质的净化作用[J]. 环境化学, 2014, 33(5): 850-854
- [12] State Environmental Protection Administration. Methods for the Monitoring and Analysis of Water and Wastewater[M]. 4th Edition. Beijing: China Environmental Science Press, 2002: 200-629 (in Chinese)
国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 第 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 200-629
- [13] Li YY, Chen LQ, Wen HY. Changes in the composition and diversity of bacterial communities 13 years after soil reclamation of abandoned mine land in eastern China[J]. Ecological Research, 2015, 30(2): 357-366
- [14] Chao AN, Bunge J. Estimating the number of species in a stochastic abundance model[J]. Biometrics, 2002, 58(3): 531-539
- [15] Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(23): 7537-7541
- [16] Schloss PD, Gevers D, Westcott SL. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies[J]. PLoS One, 2011, 6(12): e27310
- [17] Li HY, Zhang Y, Gao F, et al. Effects of hydraulic retention time (HRT) on nitrification performance and microbial community of conventional activated sludge (CAS)[J]. Environmental Science, 2006, 27(9): 1862-1865 (in Chinese)
李红岩, 张昱, 高峰, 等. 水力停留时间对活性污泥系统的硝化性能及其生物结构的影响[J]. 环境科学, 2006, 27(9): 1862-1865
- [18] Meng R, He LS, Xi BD, et al. Experimental study on purifying aquaculture wastewater between *Bacillus* and nitrifying bacteria[J]. Environmental Science & Technology, 2009, 32(11): 28-31 (in Chinese)
孟睿, 何连生, 席北斗, 等. 芽孢杆菌与硝化细菌净化水产养殖废水的试验研究[J]. 环境科学与技术, 2009, 32(11): 28-31
- [19] Ma Y, Qian LM, Wang YS, et al. Progress in molecular ecology of nitrifying bacteria[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(5): 872-879 (in Chinese)
马英, 钱鲁闽, 王永胜, 等. 硝化细菌分子生态学研究进展[J]. 中国水产科学, 2007, 14(5): 872-879
- [20] Wagner M, Horn M. The *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae* and sister phyla comprise a superphylum with biotechnological and medical relevance[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2006, 17(3): 241-249
- [21] Huang PB, Jiao NZ, Feng J, et al. Research progress on *Planctomycetes*' diversity and ecological function in marine environments[J]. Microbiology China, 2014, 41(9): 1891-1902 (in Chinese)

- 黄佩蓓, 焦念志, 冯洁, 等. 海洋浮霉菌多样性与生态学功能研究进展[J]. 微生物学通报, 2014, 41(9): 1891-1902
- [22] Sun SY. Investigation on bacterial diversity in *Portunus trituberculatus* rearing pond by cultivation-dependent and independent approaches[D]. Ningbo: Master's Thesis of Ningbo University, 2011 (in Chinese)
孙苏燕. 培养与免培养结合研究三疣梭子蟹养殖池塘细菌多样性[D]. 宁波: 宁波大学硕士学位论文, 2011
- [23] Wang XL, Gong LY, Liang SK, et al. Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Harmful Algae, 2005, 4(2): 433-443
- [24] Li YP. Diversity and nitrogen removal characteristic of denitrifying bacteria in the sediments of estuary around Dianchi lake[D]. Kunming: Master's Thesis of Yunnan University, 2015 (in Chinese)
李亚平. 入滇池河口沉积物中反硝化细菌的多样性及其脱氮性能的研究[D]. 昆明: 云南大学硕士学位论文, 2015
- [25] Gao DW, Xin XD. Analysis of microbial community structure and metabolites during the MBR membrane fouling process[J]. Journal of Harbin Institute of Technology, 2014, 46(2): 26-32 (in Chinese)
高大文, 辛晓东. MBR 膜污染过程中微生物群落结构与代谢产物分析[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2014, 46(2): 26-32
- [26] Huang X, Sun BS, Sun JM, et al. EPS, SMP and microbial biodiversity under the oligotrophic environment[J]. Environmental Science, 2009, 30(5): 1468-1474 (in Chinese)
黄兴, 孙宝盛, 孙井梅, 等. 贫营养条件下 EPS、SMP 和微生物多样性的研究[J]. 环境科学, 2009, 30(5): 1468-1474
- [27] Wang CY. Research on diversity of given functional microorganism in polluted environments[D]. Dalian: Doctoral Dissertation of Dalian Maritime University, 2008 (in Chinese)
王春艳. 污染环境中特定功能微生物多样性调查研究[D]. 大连: 大连海事大学博士学位论文, 2008
- [28] Guo JB, Zhang LH, Chen W, et al. The regulation and control strategies of a sequencing batch reactor for simultaneous nitrification and denitrification at different temperatures[J]. Bioresource Technology, 2013, 133: 59-67
- [29] Lu YY. The study on simultaneous nitrification and denitrification of domestic sewage[D]. Beijing: Master's Thesis of Beijing Jiao Tong University, 2014 (in Chinese)
卢阳阳. 生活污水同步硝化反硝化脱氮研究[D]. 北京: 北京交通大学硕士学位论文, 2014
- [30] Ding B, Si Y, Yu JY. Progress in the research of electrospun nanofibers for environmental applications[J]. Materials China, 2013, 32(8): 492-502 (in Chinese)
丁彬, 斯阳, 俞建勇. 静电纺纳米纤维材料在环境领域中的应用研究进展[J]. 中国材料进展, 2013, 32(8): 492-502
- [31] Feng Q. Study on the preparation of functional Nanofibers and their applications for enzyme immobilization[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2012 (in Chinese)
凤权. 功能性纳米纤维的制备及固定化酶研究[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2012
- [32] Brendan Logue J, Lindström ES. Biogeography of bacterioplankton in inland waters[J]. Freshwater Reviews, 2008, 1(1): 99-114
- [33] Ren LJ, He D, Xing P, et al. Bacterial diversity and ecological function in lake water bodies[J]. Biodiversity Science, 2013, 21(4): 421-432 (in Chinese)
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
- [34] Liu XM. Interactions and formation mechanisms of microbial aggregates[D]. Hefei: Doctoral Dissertation of University of Science and Technology of China, 2008 (in Chinese)
刘晓猛. 微生物聚集体的相互作用及形成机制[D]. 合肥: 中国科学技术大学博士学位论文, 2008
- [35] Xue X. Application of functional Nanofiber materials in water filtration[D]. Wuhan: Master's Thesis of Wuhan Textile University, 2013 (in Chinese)
薛潇. 功能性纳米纤维材料在水过滤中的应用[D]. 武汉: 武汉纺织大学硕士学位论文, 2013
- [36] Wang W. Research on microbial biofilm of biological stuffings and effect of water treatment in marine recirculating aquaculture system[D]. Qingdao: Master's Thesis of Ocean University of China, 2012 (in Chinese)
王威. 海水循环水养殖系统中生物滤料的微生物挂膜与水处理效果研究[D]. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2012
- [37] Zhang HG, Ma SS, Li QF, et al. Analysis of the changes of microbial community structure on bio-carrier of recirculating aquaculture systems (RAS)[J]. Environmental Science, 2011, 32(1): 231-239 (in Chinese)
张海耿, 马绍赛, 李秋芬, 等. 循环水养殖系统(RAS)生物载体上微生物群落结构变化分析[J]. 环境科学, 2011, 32(1): 231-239
- [38] Zhang H. The dynamic changes of microbial communities in aquaculture environment and interactions with water environment[D]. Suzhou: Master's Thesis of Soochow University, 2015 (in Chinese)
张皓. 养殖环境微生物群落的动态变化及与水环境的互作[D]. 苏州: 苏州大学硕士学位论文, 2015