

宋景华,李谷,张世羊,等. 循环水养殖池塘微生物群落的碳源代谢特性和功能多样性[J]. 江苏农业科学,2013,41(9):305-309.

循环水养殖池塘微生物群落的碳源代谢特性和功能多样性

宋景华¹, 李谷², 张世羊², 陶玲², 张春雪³

(1. 上海海洋大学海洋科学学院, 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 湖北武汉 430223;

3. 华中农业大学水产学院, 湖北武汉 430070)

摘要:利用 Biolog Eco 微板技术,以循环水养殖池塘和对照塘为试验对象,研究池塘水环境中微生物群落的碳源利用代谢特性和功能多样性,探讨生态调控措施对养殖池塘微生物群落的影响。结果表明,对照塘 P7、P8 和循环塘 P1、P2 细菌总数、微生物代谢活性、多样性指数较其他循环塘高,其次是 P3、P4、P5、P6 最低。各池塘微生物对糖类的利用率最高(31.0%~48.7%),其次为羧酸(13.4%~18.0%)、氨基酸(10.1%~20.5%)和聚合物(9.4%~17.0%),胺类和酚类的利用率分别为 5.7%~9.7%、4.95%~7.50%。主成分分析可将不同池塘的微生物群落明显区分开来,说明不同池塘的微生物群落有着不同的碳源代谢特性,受影响最大的是含氮化合物和聚合物的代谢。

关键词:养殖池塘;微生物;碳源代谢特性;功能多样性

中图分类号: S917.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)09-0305-05

复合池塘循环水养殖系统(integrated pond recirculating aquaculture system, IPRAS)是运用生态学原理,将人工湿地、生态沟渠、生物塘等生态工程技术和池塘养殖有机结合构建的一种具有节水和生态安全的新型池塘养殖系统^[1]。研究结果表明,该系统作为一种新的池塘养殖生产方式,在提高养殖产品品质、改善养殖产品质量、节约水资源及有效解决废水排放等方面均具有明显的理论和实践意义^[2]。

Biolog-Eco 微平板最开始是被用于鉴定菌种,1989年, Biolog 公司根据细菌代谢的氧化还原过程推出了适于环境、临床细菌鉴定的 Biolog Microstation 自动鉴定系统,该系统自推出之日起便因其方便、快捷、廉价而备受瞩目^[3]。1991年, Garland 和 Mills 将 Biolog 微平板用于微生物群落结构的研究,这一应用受到微生物生态学学者的广泛关注^[4]。

Biolog 是一种较为先进的研究不同环境微生物碳源代谢、群落结构和多样性的方法^[5],已广泛应用于鉴定和分析土壤、水体、生物反应器中的微生物群落结构^[6-8]。目前,有少许将该方法应用于人工湿地基质微生物群落结构多样性研究的报道。本研究用 Biolog 方法研究复合池塘养殖系统池塘中微生物群落的碳源代谢特性和群落代谢功能多样性,同时,分析湿地系统对循环池塘微生物代谢情况的影响,为进一步解析湿地净化富营养化水体机理、提高生态处理效果提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验系统

复合池塘循环水养殖系统建于中国水产科学研究院长江水产研究所窑湾试验场。该系统由一组沟渠湿地和连片池塘组成。沟渠湿地由位于池塘边的 1 条狭长空地构建完成,分为 4 级,逐级串联(图 1)。一级湿地池底坡降为 0.333%,其他 3 级湿地坡降均为 0.167%。一、二级湿地的长×宽×深=30 m×3.1 m×1.5 m,栽种植物分别为再力花(*Thalia dealbata*)和花叶芦竹(*Arundo donax f. versicolor* Mill. Beetle);三、四级湿地长×宽×深=30 m×2.4 m×1.5 m,三级湿地栽种植物为花叶芦苇(*Phragmites australis*),四级湿地填充基质较浅,并于出水端插一立管高出基质平面约 40 cm,便于蓄水,蓄水后在池内栽种沉水植物狐尾藻(*Myriophyllum* sp.)及少量的睡莲(*Nymphaea alba* L.),用于对含氧量较低的前一级湿地出水进行复氧。湿地植物栽种于 5 月初,一至三级湿地植物栽种密度设置为:行距和株距在 30~40 cm 之间;狐尾藻行距和株距为 80~100 cm,睡莲行距和株距为 5~8 m。各级湿地设计深度为 1 m,填充基质为陶粒,前面 3 级湿地填充基质深度为 80 cm,最后一级填充深度为 40 cm。养殖池塘由连片 8 口规格大小一致的池塘组成,依次为 P1 至 P8 塘,其中 P1 至 P6 为逆水流方向排列,P7、P8 为对照塘。池塘长×宽=33.0 m×20 m,平均水深 1.5 m 以上。塘底为泥土,塘壁为垂直砖混结构。

经泵从 P1 塘提水入蓄水池,然后依落差流入一级湿地、二级湿地、三级湿地和四级湿地,最后湿地出水经跌水入 P6 塘,塘与塘之间通过涵管连接,水流依次从 P6 流至 P1(如图 1 所示)。

1.2 采样

于 2012 年 6 月 8 日采集水样,水样为池中心和四周的混合样,保存在 500 mL 容量的无菌玻璃瓶中。所有样品低温保

收稿日期:2013-01-13

基金项目:国家现代农业产业技术体系建设专项(编号:CARS-46);

国家科技支撑计划(编号:2012BAD25B05、2012BAD25B01);国家公益性行业(农业)科研专项(编号:201203083)。

作者简介:宋景华(1986—),女,河南商丘人,硕士研究生,研究方向为池塘微生物。E-mail: an2006jinghua@163.com。

通信作者:李谷,博士,研究员,硕士生导师,从事渔业环境保护和水产健康养殖研究。E-mail: ligu667@yahoo.com

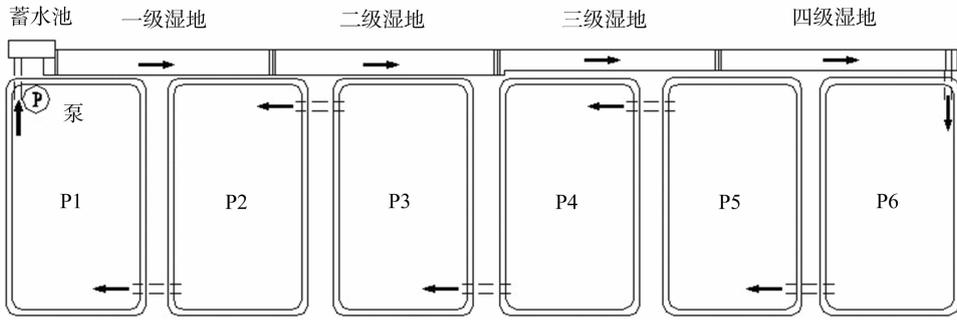


图1 复合池塘养殖生态系统平面布置图(P1至P6为循环塘;箭头为水流方向)

存带回实验室,马上测定。

1.3 样品处理及分析

1.3.1 水质分析指标及分析方法 水质指标包括水温 T 、pH 值和溶氧 (DO) 等。用美国奥立龙水质分析仪在线测定。铵氮 ($\text{NH}_4^+ - \text{N}$)、总氮 (TN)、总磷 (TP) 和高锰酸盐指数 (COD_{Mn}) 测定按文献[9]的方法。

1.3.2 细菌总数的测定 细菌总数的测定采用荧光显微镜计数法。根据参考文献[10]加以改进,除去底泥的前处理步骤,取 80 μL 样品计数液到 200 μL 的离心管中,加入 10 μL 10 \times 的 SYBR Green I 荧光染料,避光染色 1 min 后加入 10 μL 抗褪色剂,制成染色样品;然后在荧光显微镜下观察计数。

1.3.3 Biolog Eco 微板反应 将水样直接倾倒在无菌加样槽中,用 8 孔加样器把水样加入 Biolog Eco 微板中,每孔加 150 μL ,每个水样重复 3 次。28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温避光培养;用 BiologReader (Biolog Inc, USA) 读取培养 0、24、48、72、96、120、144、168 h 各水样于 590 nm (颜色 + 浊度) 和 750 nm (浊度) 波长处的吸光度^[11-12]。

1.4 数据分析方法

微生物群落平均活性 AWCD (average well color development) 即颜色平均变化率可以用来评判微生物群落的碳源利用能力,指示微生物群落的代谢活性。其计算公式参照文献[4],即先将单孔在 590 nm 和 750 nm 的吸光度分别减去对照孔吸光度,再用每个对应孔 590 nm 的吸光度减去 750 nm 的吸光度 (表示为 $C_{590-750}$),得到单孔实际颜色反应的吸光度,其中,数值小于 0.06 时按 0 处理;则单孔颜色平均值 $\text{AWCD}_{590-750} = \sum (C_{590-750}) / 31$,其中,31 为 Biolog Eco 板上供试碳源的种类数。

为最大程度地体现各样点之间的差异,并保证各样点均进入了 AWCD 对数增长期而未到稳定期,选择 72 h 的数据来计算各样点的 AWCD、Shannon、Simpson 和 McIntosh 多样性指数,其公式参考文献[13-14]。

部分数据采用 Microsoft Excel 2003、Origin 7.0 处理并作图。微生物群落对碳源利用多样性采用主成分分析 (principle components analysis, PCA),运用 SPSS 13.0 完成。

2 结果与分析

2.1 微生物整体代谢活性

AWCD 值反映了微生物群落对不同碳源代谢的总体情况,其变化速率反映了微生物群落的代谢活性^[15]。AWCD 值

增加越快,表明微生物群落的代谢活性越高。不同时间的平均色度变化如图 2 所显示,可见在 24 h 之内 AWCD 变化较小,24 h 之后急剧上升,反映碳源的利用主要在 24 h 之后。在 120 h 之后,逐渐趋于一个稳定值。对比各池塘数据,各池塘微生物群落 AWCD 值变化速率不同,且差异显著 ($P < 0.05$)。P1、P2 的代谢活性是最高的,其次是对照塘 P8、P7,再次是 P3、P4、P5、P6 的代谢活性是最底的。各池塘微生物群落代谢功能的差别可能是由于沟渠湿地对循环池塘水环境的处理导致。就对照塘和循环塘来说,对照塘 P8、P7 的代谢活性高于循环塘 P3、P4、P5 和 P6;而在循环塘之间比较,P1、P2 的代谢活性是最高的,其次是 P3、P4、P5,最低的是 P6。不同池塘的微生物群落利用碳源能力的差异与不同样品单位体积内的微生物生物量有关,而循环塘和对照塘的差别可能是由于沟渠湿地对水进行循环处理造成的。循环塘的水体是从沟渠湿地经过净化之后流出来的,水质较好,有机质相对较少,池塘微生物数量也较低,因而微生物群落的代谢活性也较低。对照塘中的水体是不流动的,水体中有机质等相对较多,细菌等微生物也多,因此代谢活性也高。就循环塘之间来比较,微生物群落代谢活性沿水流方向有一个整体明显升高的趋势,循环塘的水质随水流方向代谢物越来越丰富,细菌数量也逐渐增加,因而代谢活性越来越高,最后 2 个池塘 P1 和 P2 的代谢物和细菌总数比对照塘还要高,因此 P1 和 P2 的微生物代谢活性也是最高的。

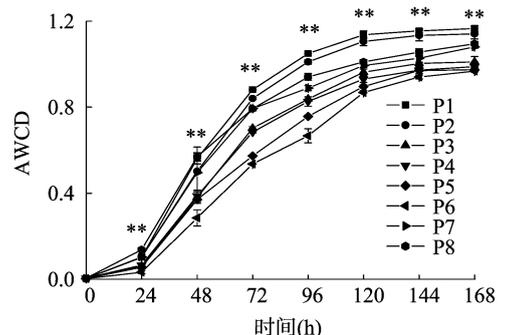


图2 各池塘微生物群落的AWCD变化

2.3 微生物群落代谢功能多样性

对培养 72 h 的水样吸光度根据多样性指数公式进行计算,经单因素方差分析,各池塘间有显著性差异 (表 1)。采用 Shannon 指数和 Shannon 均度评估水样中微生物的丰度和均度。由表 1 可知,P1、P2 是最高的,其次是对照塘 P7、P8,再次是 P3、P4、P5、P6 是最底的。这与细菌总数的结果相一致。

Simpson 指数是评估某些最常见种的优势度指数, P1 和 P2 是循环塘的最后 2 个池塘, 前几个循环塘的代谢营养物质在此累积, 这里有着最适合于微生物生长的环境, 使该池塘微生物群落存在对某类碳源利用较强的优势菌种, 因而优势度指数较

高; P7 和 P8 是对照塘, 水体不流动, 池塘环境比较稳定, 也有一定量代谢营养物质积累, 优势度指数仅次于 P1 和 P2; P6 的 Simpson 指数是最低的, 这与其细菌数量和微生物代谢活性都是一致的。

表 1 各池塘微生物多样性指数

类型	池塘号	Shannon 指数	Shannon 均度	Simpson 指数	McIntosh 指数	McIntosh 均度
循环塘	P1	3.31 ± 0.013a	1.01 ± 0.017a	25.92 ± 0.33a	5.37 ± 0.049a	1.00 ± 0.006a
	P2	3.31 ± 0.005a	1.00 ± 0.014ab	25.54 ± 0.12a	5.16 ± 0.025b	0.99 ± 0.005a
	P3	3.24 ± 0.004c	0.99 ± 0.008ab	22.89 ± 0.16c	4.55 ± 0.045e	0.98 ± 0.003ab
	P4	3.24 ± 0.007c	1.00 ± 0.019a	24.46 ± 0.24b	4.29 ± 0.046f	0.99 ± 0.008a
	P5	3.15 ± 0.009d	0.97 ± 0.012b	20.83 ± 0.18d	3.90 ± 0.027g	0.97 ± 0.005bc
	P6	3.10 ± 0.011e	0.96 ± 0.034b	19.01 ± 0.37e	3.81 ± 0.038g	0.96 ± 0.012c
对照塘	P7	3.29 ± 0.012b	1.01 ± 0.004a	24.00 ± 0.24b	5.03 ± 0.049c	0.99 ± 0.001a
	P8	3.28 ± 0.017b	0.99 ± 0.027ab	24.73 ± 0.51b	4.92 ± 0.135d	0.99 ± 0.011a

注: 同列数据后不同字母间表示有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.4 微生物群落对不同类碳源的利用

Biolog Eco 板含有 31 种不同种类的碳源, 其中糖类 10 种、羧酸类 7 种、氨基酸 6 种、胺类 2 种、酚类 2 种、聚合物 4 种。图 3 表示不同池塘对微孔板上 6 大碳源的相对利用率。由图 3 可见, 各池塘对胺类、酚类和羧酸的相对利用率差异不大, 特别是胺类和酚类碳源种类较少, 不具有较强的代表性, 在此仅供参考。P5、P6 对糖类的利用率很高, 而对氨基酸和

聚合物的利用率很低; P1、P2、P7 和 P8 对碳源的利用率相对较平均, 其中对胺类和酚类的利用率稍低。整体而言, 各池塘微生物对糖类的利用率最高 (31.0% ~ 48.7%), 其次为羧酸 (13.4% ~ 18.0%)、氨基酸 (10.1% ~ 20.5%) 和聚合物 (9.4% ~ 17.0%), 胺类和酚类的平均利用率分别为 5.7% ~ 9.7%、4.95 ~ 7.5%。

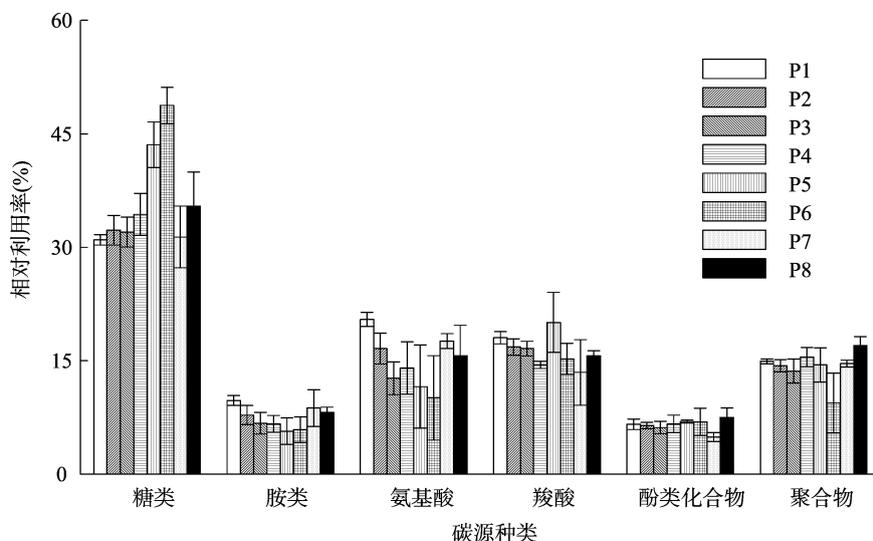


图 3 循环池塘微生物群落对 6 类碳源的相对利用率

2.5 不同池塘微生物对同一碳源的利用

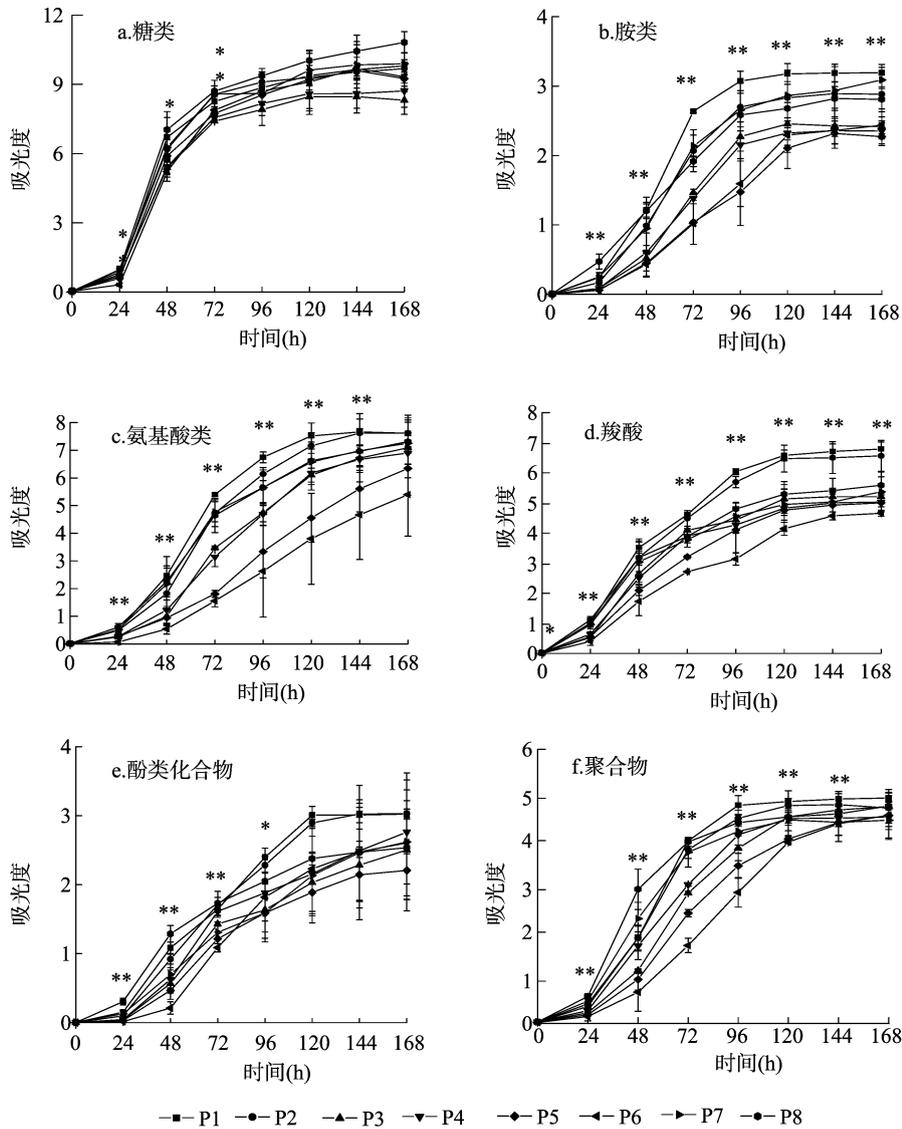
如图 4 所示, 比较各池塘对 6 类碳源的利用可知, 各个池塘微生物对胺类、氨基酸、羧酸、酚类化合物和聚合物的利用在各时间点均有差异 ($P < 0.05$), 对糖类的利用仅在 24、48、72 h 有差异 ($P < 0.05$)。

2.6 微生物群落对碳源利用多样性的主成分分析

主成分分析是区别微生物群落碳源利用多样性的有力工具^[16-17]。主成分分析 (PCA) 可以将碳源代谢的多元变量转换为互不相关的主元向量, 并在降维后的主元向量空间中用不同的位置直观反映不同微生物群落代谢的特征。为研究各池塘微生物群落碳源利用多样性的特点, 选择 72 h 作为时间点, 对 Biolog 测试获得的数据进行主成分分析。分析可知主

元向量的前 3 个主成分 (分别以 PC1、PC2 和 PC3 表示) 即可累积特征值贡献率接近 70%。而前 2 个主成分 (PC1 和 PC2) 的累积贡献率分别为 40.57%、16.80%。取前 2 个主成分 (PC1 和 PC2) 作图表征不同池塘微生物群落碳源代谢特征 (如图 5 所示)。

从图 5 中可以看出, 不同池塘微生物群落之间有很好的分离, 微生物代谢特征表现出较大差异。池塘 P1、P2、P7 和 P8 均在 PC1 的正端, P5 和 P6 位于 PC1 的最左端。对于所有养殖条件完全一致的对照塘 P7、P8 和循环塘 P3、P4, 也有很好的分离, 分别位于第一象限和第三象限。这反映了不同池塘的微生物群落具有不一样的群落结构和特点, 从而产生了不同的碳源代谢特性。



“*”表示同一时间点不同池塘有显著差异 ($P < 0.05$), “**”表示同一时间点不同池塘有极显著差异 ($P < 0.01$)

图4 循环池塘微生物群落对同一碳源的利用特点

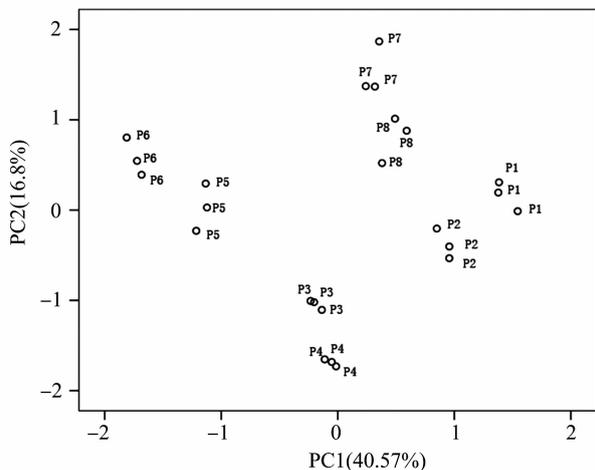


图5 微生物碳源利用特性的主成分分析

与主成分1和主成分2具有较高相关系数的碳源见表2。由表2可以看出对主成分1和主成分2起分离作用的主

要碳源分别是氨基酸、胺类和聚合物,另外还有少量的糖类和羧酸。

3 讨论

Biolog系统作为一种快速、简单的研究微生物群落功能多样性的方法,近些年来被广泛应用于环境微生物群落功能研究^[8,12,18],包括环境微生物群落的比较研究、外源添加物对环境微生物群落的影响评价及环境修复效果与处理效果评价等^[19]。本研究通过沟渠湿地循环塘和对照塘作对比,研究了池塘水环境中微生物群落对碳源利用的代谢特性和功能多样性,来探讨生态调控措施对养殖池塘微生物群落的影响,为揭示沟渠湿地对池塘水质的净化机制和池塘的建设提供参考。就循环塘和对照塘来讲,对照塘P7、P8和循环塘P1、P2微生物总数、代谢活性、多样性指数较循环塘高,其次是P3、P4、P5、P6是最低的。这和沟渠湿地对池塘水质的循环处理的作用是分不开的。沟渠湿地净化了水质,降低了 $\text{NH}_4^- - \text{N}$ 、 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 、TN、TP、COD等理化指标,同时细菌总数也随着降

表2 样品中与 PCA1 和 PCA2 相关显著的碳源

PCA1		PCA2	
氨基酸		糖类	
A4:L-精氨酸	0.598	A2: β -甲基D-葡萄糖苷	0.899
B4:L-天冬酰胺酸	0.749	A3:D-半乳糖内酯	0.812
C4:L-苯基丙氨酸	0.808	G1:D-纤维二糖	0.721
D4:L-丝氨酸	0.847		
F4:甘氨酸-L-谷氨酸	0.762		
胺类			
G4:苯乙基胺	0.963		
H4:腐胺	0.677		
聚合物			
C1:吐温 40	0.772		
D1:吐温 80	0.788		
E1: α -环式糊精	0.912		
F1:肝糖	0.676		
羧酸			
F3:衣康酸	0.859		
H3:D-苹果酸	0.808		

低,因此微生物代谢活性、多样性指数也随之降低;但是由于 P1、P2 位于循环塘的最后 2 级,累积了大量代谢营养物质,形成一些对某种碳源利用较强的优势菌种,其代谢活性和多样性指数比对照塘 P7、P8 还要高。主成分分析也很好地将不同池塘之间的差异表现出来,同时也表明,受影响最大的碳源主要是氨基酸、聚合物和胺类,另外还有少量的糖类和羧酸。池塘微生物对糖类(31.0%~48.7%)和羧酸(13.4%~18.0%)的相对利用率都很高,但却不是受影响最大的,受影响最大的是含氮化合物和聚合物的代谢。

就循环池塘来看,P1、P2 的水质已经受到代谢物的影响,也就是说沟渠湿地的处理有限,4 个循环塘的效果刚好,不宜再增加循环塘的数量;另外也可以根据各池塘的水质情况,在 P1、P2、P7、P8 肥一点的环境中放养一些滤食性鱼类,在 P3、P4、P5、P6 中放养吃食性鱼类,这样可以增加养殖效益。

Biolog 代谢多样性的变化与接种微生物组成和密度的变化相关。Biolog 微生物群落代谢反应速度和最终能达到的程度既与群落内能利用单一碳底物的微生物的数目和种类相关,即与微生物群落的生物量和结构相关,又与其生理活性相关^[4]。影响池塘微生物多样性的因素很多,主要有 TN、TP、COD、PH 等,关于微生物多样性指数、微生物活性和水质理化因子的关系还需进一步研究。

参考文献:

- [1]李谷.一种兼具节水和安全功能的池塘养殖复合系统:中国,ZL270051740.8[P].2007-08-29.
- [2]曾梦兆.人工湿地基质酶及其活性与净化养殖废水效果相关性研究[D].武汉:华中农业大学,2008:1-50.

- [3]田雅楠,王红旗. Biolog 法在环境微生物功能多样性研究中的应用[J]. 环境科学与技术,2011,34(3):50-57.
- [4]Garland J L, Mills A L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(8):2351-2359.
- [5]Raphael C, Karine L, Sylvie B. Analysis of the potential functional diversity of the bacterial community in soil; a reproducible procedure using sole-carbon-source utilization profiles[J]. European Journal of Soil Biology, 2005, 41(1/2):11-20.
- [6]Crove J A, Kautola H, Javadpour S, et al. Assessment of changes in the microorganism community in a biofilter[J]. Biochemical Engineering Journal, 2004, 18(2):111-114.
- [7]Andrea K B, Peter V, Gabor C, et al. Bacterial activities in the sediment of Lake Velencei, Hungary[J]. Hydrobiologia, 2003(1/2/3):721-728.
- [8]Graham M H, Hayne R J. Catabolic diversity of soil microbial communities under sugarcane and other land uses estimated by Biolog and substrate-induced respiration methods[J]. Applied Soil Ecology, 2005, 29(2):155-164.
- [9]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.
- [10]廖明军,何绪刚,谢从新,等.一种检测土壤和沉积物中细菌数量的荧光显微计数方法:中国,201110187705.5[P].2012-01-18.
- [11]Wijnhoven S, Sijm A T, Hummel H. Historic developments in macrozoobenthos of the Rhine-Meuse estuary: From tidal inlet to a freshwater lake[J]. Estuarine Coastal and Shelf Science, 2008, 76:95-110.
- [12]杨莺莺,李卓佳,梁晓华,等.芽胞杆菌对鱼池微生物群落代谢功能的影响[J].微生物学杂志,2009,29(3):11-17.
- [13]杨永华,姚健,华晓梅.农药污染对土壤微生物群落功能多样性的影响[J].微生物学杂志,2000,20(2):23-25,47.
- [14]Zak J C, Willig M R, Moorhead D L, et al. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1994, 26(9):1101-1108.
- [15]邓欢欢,杨长明,李建华,等.人工湿地基质微生物群落的碳源代谢特性[J].中国环境科学,2007,27(5):698-702.
- [16]Hackett C A, Griffiths B S. Statistical analysis of the time-course of Biolog substrate utilization[J]. Journal of Microbiological Methods, 1997, 30(1):63-69.
- [17]Garland J L. Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential C source utilization[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1996, 28(2):213-221.
- [18]De F L, Sexton A J. Differential response of size-fractionated soil bacteria in BIOLOG[®] microtitre plates[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2001, 33(11):1547-1554.
- [19]席劲斐,胡洪营,钱易. Biolog 方法在环境微生物群落研究中的应用[J].微生物学报,2003,43(1):138-141.