

过硫酸氢钾复合物对对虾养殖底泥硝化作用、氨氧化微生物丰度和群落结构的影响

赵 珍^{1,3}, 王宝杰^{1,2}, 刘 梅^{1,2,4}, 蒋克勇^{1,2}, 王 雷^{1,2,4}

(1. 中国科学院海洋研究所 中国科学院实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 海洋大科学中心, 山东 青岛 266071; 3. 中国科学院大学, 北京 100049; 4. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋生物学与生物技术功能实验室, 山东 青岛 266237)

摘要: 采用在模拟池塘中投放过硫酸氢钾复合物(KMPS)进行对比实验的方法, 探究 KMPS 对养殖底质硝化作用的影响。通过对氨氮和亚硝态氮含量的检测, 探究对不同时期氮素转化的影响, 低频率高剂量投放组中的氨氮和亚硝态氮含量显著降低, 而高频率低剂量组中氨氮和亚硝态氮的含量显著上升。高频率低剂量 KMPS 的投放使氨氧化古菌(AOA)和氨氧化细菌(AOB)丰度降低, 而低频率高剂量 KMPS 的投放不会造成丰度降低, 而且还表现出部分时期 AOB 丰度的上升。进一步对群落结构进行分析发现 KMPS 的投放使 AOA 群落中 *Nitrosopumilu* 属相对丰度降低, *Nitrososphaera* 属的相对丰度上升, 这种相对丰度的变化与 KMPS 的投放方式无关; 但 AOB 群落受到 KMPS 投放方式的影响, 低频率高剂量的 KMPS 投放下 AOB 群落优势属相对丰度显著提高。以上结果均说明低频率高剂量 KMPS 的投放起到了促进底质硝化作用的效果。同时, 可为 KMPS 用于对虾养殖池塘底质改良开辟一个新的途径。

关键词: 过硫酸氢钾复合物; 硝化作用; *amoA* 基因丰度; 微生物群落结构

中图分类号: S968.22 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2021)11-0054-08

DOI: 10.11759/hyxx20210228002

对虾产业不仅为人类提供优质的蛋白质来源, 而且还是全球水产养殖产值增长的主要推动力。随着水产养殖业的集约化发展, 越来越多的养殖污染问题随着而来, 其中一个主要的问题就是养殖过程中含氮化合物的积累。这些含氮化合物包括有机氮和无机氮(氨氮、亚硝酸盐和硝酸盐), 主要来源于虾类排泄物和未被食用的饲料^[1]。在集约化养殖中被大量使用的肥料和补充饲料都是含氮量很高的有机物质, 但这些物质中只有 15%~30% 能够被虾吸收利用, 其余未被吸收和利用的部分会沉积在养殖池塘底部的水-泥界面。沉积物中过量的氮不仅会破坏水产养殖环境, 对养殖生物产生毒害, 而且排放还会影响周围水体^[2]。因此去除沉积物中多余的氮是非常重要的。

硝化作用是生态系统氮素循环过程中的一个重要过程, 整个过程包括两个步骤, 氨氧化和亚硝酸盐氧化。其中氨氧化是硝化反应的第一步也是限速步骤, 该步骤由氨氧化微生物-氨氧化古菌(AOA)和氨氧化细菌(AOB)共同介导进行。该步骤中起重要作用的酶——氨单加氧酶 (*ammonia monooxygenase*,

AMO)由 A、B、C 三个亚基组成, 其中编码 A 亚基的 *amoA* 基因具有一定序列保守性, 为所有氨氧化微生物共有的基因, 因此常被作为分子标记应用于氨氧化微生物的研究^[3-5]。氮素浓度、温度、盐度等环境因子的变化以及施肥和化学物质干扰等都可能引起 AOA 和 AOB 的数量和群落结构的变化^[6-8]。

长期以来围绕着氮素污染防治进行了大量的研究, 过硫酸氢钾复合物 $2\text{KHSO}_5 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$ (KMPS) 溶于水后发生链式反应, 产生活性氧, 羟基自由基、硫酸自由基等多种活性成分^[9], 广泛的用作水产中的消毒剂使用。KMPS 可以降解多种有机物, 并且可以将 NH_4^+ 氧化为亚硝酸, 因此可用于降低池塘中氨氮、亚硝酸盐、硫化氢等有害物质的浓度, 用于养殖

收稿日期: 2021-02-28; 修回日期: 2021-03-23

基金项目: 国家重点研发计划课题(2019YFD0900401); 中国科学院科技支撑项目(2019T3035)

[Foundation: Supported by National Key R&D Program of China, No. 2019YFD0900401; STS program supporting project of Chinese Academy of Sciences of China, No. 2019T3035]

作者简介: 赵珍(1996—), 女, 黑龙江人, 硕士研究生, 主要从事水产养殖病害防控的研究, E-mail: 15232168709@163.com; 王雷(1966—), 通信作者, E-mail: leiwang@qdio.ac.cn

水体的治理和底质改造^[10]。目前 KMPS 在水产养殖中的研究多集中作为消毒剂对水产致病菌的抑菌作用^[11]，而其对底质氮素污染防治的研究有所欠缺。本研究通过对表层底泥中氨氮、亚硝态氮水平变化进行检测，分析 KMPS 对氮素含量的影响，并通过 qPCR、16s 高通量测序等分子生物学技术对底泥中 AOA 和 AOB 数量和群落结构进行分析，以期揭示 KMPS 对硝化作用的影响。

1 材料与amp;方法

1.1 实验设计及养殖管理

实验在中国山东省东营市黄河三角洲海洋科技有限公司研发实验室进行，从 8 月 3 日至 9 月 14 日共进行 6 周，为模拟封闭池塘的养殖环境，准备 9 个柱形养殖桶(500 L)，桶内铺设 10 cm 新鲜底泥，覆入盐度为 34 的海水静置 24 h 后使用。实验所用的凡纳滨对虾养殖至重量 0.3 g，体长 1.5 cm 后被随机分配至每桶 300 只对虾。暂养 1 周之后将 9 个养殖桶分成 3 个组，分别为：处理组 A 为高频率低剂量组：以 5 g/m³ 的剂量，每 2 周投放 3 次 KMPS；处理组 B 为低频率高剂量组：以 15 g/m³ 的剂量，每 2 周投放 1 次 KMPS；对照组 C：除日常养殖管理外不进行其他处理。养殖期间，每日按体重的 8%，分别于 6: 00 am、12: 00 am、6: 00 pm、12: 00 pm 投喂商品饲料。每周少量换水 10 cm，本研究使用的 KMPS 为片剂，由山东嘉源环保科技有限公司提供，纯度为 100%。

1.2 样品的采集及前处理

使用自制的采集器采集 0.5~2 cm 的表层底泥^[12]，分别于实验开始时和实验结束时采集 1 次，实验期间每周采集 1 次。采集的底泥样品一部分用于氨氮、亚硝氮检测，另一部分迅速置于液氮中保存，之后送回实验室保存在-80 °C 冰箱待之后的分子生物学实验分析使用。

1.3 氨氮、亚硝态氮的测定

取 5 g 新鲜样品置于 50 mL 离心管中，加入 25 mL，2 mol/L 的 KCl 溶液，25 °C 摇床浸提 1 h，之后泥浆经 3 000 r 离心 10 min，取上清液测定营养盐含量。按照海洋监测规范的标准采用次溴酸盐氧化法、萘乙二胺分光光度法分别检测氨氮和亚硝酸盐浓度^[13]。

1.4 DNA 的提取和 PCR 扩增

采用 Fast DNA Spin Kit For soil(MPbio)，美国

试剂盒进行底泥样品中微生物 DNA 提取，具体操作步骤按照说明书进行。在下一步分析前将提取的基因组 DNA 储存在-20 °C。提取后的 DNA 的浓度和质量分别使用 NanoDrop ND-1000 分光光度计(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)和琼脂糖凝胶电泳进行检测。选用引物 Arch-amoA26F(5'-GACTACATMTTCTAYACWGAYTGGGC-3') 和 Arch-amoA417R(5'-GGKGTCA TRTATGGWGGYAA YGTTGG-3')扩增 AOA-*amoA* 基因；引物 amoA1F(5'-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3') 和 amoA2R(5'-CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3')扩增 AOB-*amoA* 基因。PCR 反应体系为：5×反应 buffer 5 μL，5×GC buffer 5 μL，dNTP(2.5mmol·L⁻¹)2 μL，上游和下游引物各(10 μmol·L⁻¹)1 μL，DNA 模板 2 μL，ddH₂O 8.75 μL，Q5 DNA 聚合酶 0.25 μL；反应程序：98 °C 2 min，98 °C 15 s，55 °C 30 s，72 °C 30 s，72 °C 5 min，共进行 35 个循环，琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.5 荧光定量 PCR

将上述 PCR 产物回收，连接至 pMD18-T 载体，转化至大肠杆菌 DH5α 感受态中，用含有 Amp⁺ 的 LB 琼脂平板培养基筛选阳性克隆，并对阳性克隆测序分析，分别提取含 AOA-*amoA* 和 AOB-*amoA* 基因的质粒，用 NanoDrop2000(Thermo) 测定质粒浓度，计算 AOA 和 AOB *amoA* 基因拷贝数，将标准质粒进行一系列 10 倍浓度稀释(标准质粒范围 AOA-*amoA* 10²~10⁸，AOA-*amoA* 10~10⁶)用于构建 qPCR 标准曲线。各标准曲线 R² 均超过 0.99，在本研究使用的浓度范围内呈良好的线性关系。使用 TransStar Top Green qRT-PCR Supermix(北京全式金生物科技有限公司)试剂盒进行 AOA 和 AOB *amoA* 基因丰度测定，具体操作按说明书进行。

1.6 Illumina MiSeq 高通量测序及分析

采用 Illumina 平台对群落 DNA 片段进行双端(paired-end)测序。利用 QIIME(QIIME, v1.8.0)软件进行 DADA2 对测序数据进行质量过滤、降噪和去除嵌合体获得高质量序列^[14]。高质量序列通过 UCLUST 软件按照 97% 的序列同源性聚集成操作分类单元(OTUs)^[15]。序列数据分析主要使用 QIIME 和 R 包(v3.2.0)基于 OUT 表计算 alpha 多样性指数，以 Chao1^[16] 和 Observed species 指数表征丰富度，以 Shannon^[17] 和 Simpson^[18] 指数表征多样性。通过 OUT 表计算不同样本在各分类水平所含有的分类单元的数目，实现所有样本在各分类水平上组成分布的可

可视化,以堆叠柱状图呈现分析结果。

1.7 统计分析

所有数据以“平均值 ± 标准差”表示。用 SPSS 25.0(IBM Corp, Armonk, NY, USA)统计软件中的单因素变量方差分析方法(One-Way ANOVA)对数据进行统计学分析。以 $P < 0.05$ 代表差异显著。

2 结果与分析

2.1 底泥中氨氮及亚硝态氮含量变化

对照组和实验组的氨氮及亚硝态氮变化如图

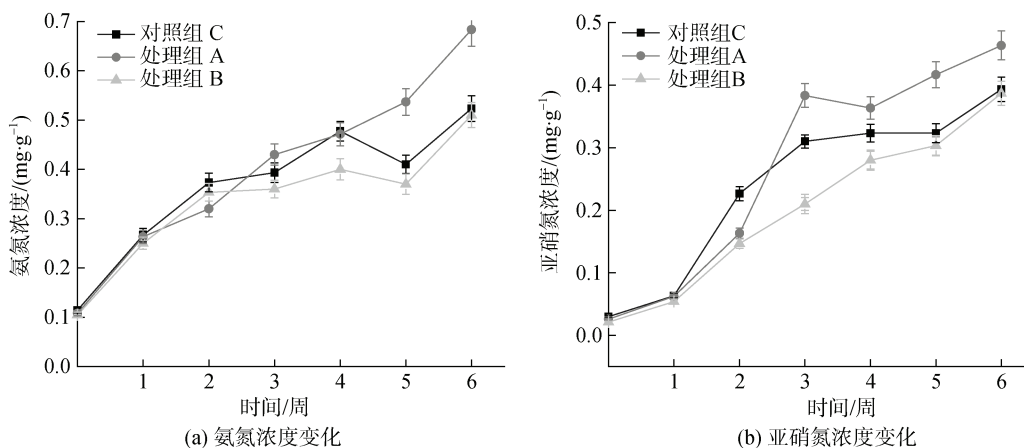


图 1 不同处理组中氨氮(a)亚硝氮(b)浓度变化

Fig. 1 Variations in ammonia (a) and nitrite (b) concentrations under different treatments

注: C: 对照组; A: 高频率低剂量组; B: 低频率高剂量组

在实验刚开始的前两周,与对照组相比两个处理组的氨氮和亚硝氮的含量均下降,证明 KMPS 的投放能够降低底泥中氨氮和亚硝氮的含量,一方面可能是因为 KMPS 对含氮有机物的降解,使进入硝化作用的含氮有机物减少,从而使氨氮和亚硝氮的含量降低,另一方面 KMPS 的强氧化作用改善了底泥中的氧化还原状态,并且还能够释放氧气,进一步促进了硝化作用。但是处理组 A 以少量多次进行 KMPS 的持续性的投放,却没有使氨氮和亚硝氮降低,反而高于对照组中氨氮和亚硝氮的含量。推测持续性的 KMPS 的投放可能对硝化作用微生物存在持续的抑制。硝化作用无法顺利进行,造成氨氮和亚硝氮的积累。

2.2 AOA 和 AOB 微生物丰度变化

氨单加氧酶 *amoA* 基因的丰度可以用来表征环境中氨氧化微生物的数量, AOA-*amoA* 基因拷贝数为

1a 和图 1b 所示,整个实验期间各组的氨氮和亚硝氮均呈现上升的趋势。处理组 B 中的氨氮和亚硝氮在整个实验期间处于较低水平并且低于其他 2 组。实验开始的前 2 周,对照组 C 中的氨氮水平高于 2 个处理组,随着实验的进行,对照组和实验组 B 中的氨氮含量先上升后下降,而实验组 A 中的氨氮含量持续上升。对于亚硝氮,前 2 周各组的水平与氨氮相似,在对照组中最高。从第 3 周开始处理组 A 中的亚硝氮浓度快速上升,迅速超过对照组 C 和处理组 B。

$2.3 \times 10^4 \sim 3.31 \times 10^5 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$, AOB-*amoA* 基因拷贝数为 $1.48 \times 10^3 \sim 2.68 \times 10^4 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$ 。同期的 AOA-*amoA* 比 AOB-*amoA* 基因拷贝数高 1~2 个数量级,此时环境中的 AOA 数量高于 AOB。养殖的前 2 周处理组和对照组之间 AOA-*amoA* 基因拷贝数没有显著性差异(图 2a)($P > 0.05$),第 3 周处理组 B 和对照组 C 中拷贝数上升,显著高于同期处理组 A 中该基因的拷贝数($P < 0.05$)。之后各组的 AOA-*amoA* 基因拷贝数均持续上升,且处理组 B 和对照组 C 中基因拷贝数显著高于同期处理组 A 中基因的拷贝数。除第 4 周对照组 C 中 AOA-*amoA* 基因拷贝数显著高于处理组 B 中外,其余时期该基因拷贝数在 2 个组之间没有显著差异($P > 0.05$)。各组 AOB-*amoA* 基因拷贝数逐渐上升(图 2b),前四周各组间没有显著差异($P > 0.05$);后两周处理组 B 和对照组 C 中该基因的拷贝数显著高于处理组 A,实验结束时的处理组 B 中基因拷贝数最高,随后是对照组 C($P < 0.05$)。

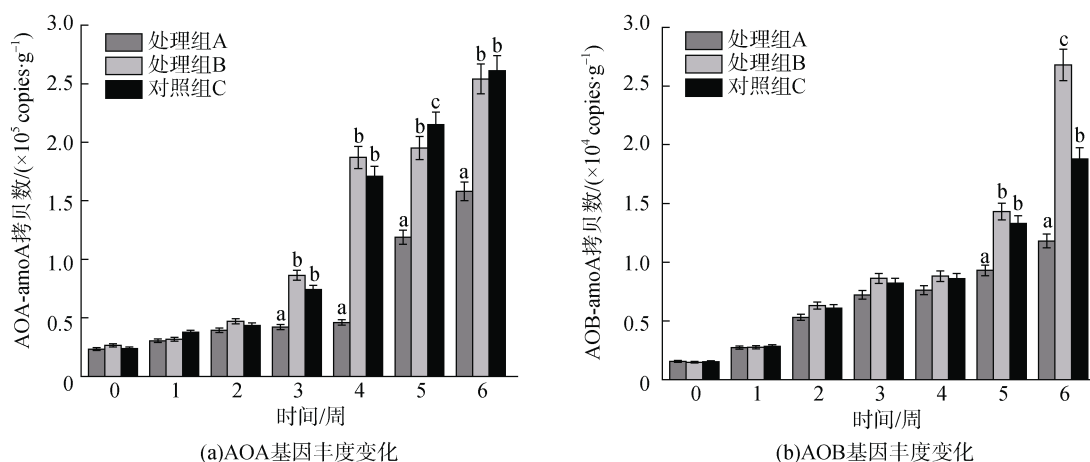


图 2 不同处理组中 AOA(a)和 AOB(b) *amoA* 基因丰度变化

Fig. 2 Variations in AOA and AOB *amoA* gene abundance under different treatments

2.3 高通量测序结果及 AOA 和 AOB 群落 Alpha 多样性分析

对实验结束时的 3 个组的 9 个样品进行高通量测序分析, 平均每个样品获得高质量的 AOA *amoA* 基因序列 78 344 条, AOB *amoA* 基因序列 52 568 条。将以上获得的序列按照 97% 的相似度进行聚类, 分别输出 OTU 代表序列。从表 1 的结果可以看出处理组 A 的 AOA 和 AOB 的 OUT 数均显著低于其他 2 个

组($P < 0.05$)。通过 alpha 多样性指数对不同处理组的 AOA 和 AOB 微生物群落丰富度和多样性进行评估。对照组 C 的 AOA 微生物群落的丰富度指数(Chao1 和 ACE 指数)显著高于两个处理组($P < 0.05$), 但各组的多样性指数(Shannon 和 Simpson 指数)没有显著的差异($P > 0.05$)。AOB 微生物群落结果显示处理组 A 的丰富度指数显著低于对照组和处理组 B, 多样性指数各组间没有显著的差异($P > 0.05$)。

表 1 不同处理组氨氧化微生物群落 Alpha 多样性指数

Tab. 1 Alpha index of ammonia oxidizers in different treatments

处理	序列数	操作分类单元	ACE 指数	Chao1 指数	Shannon 指数	Simpson 指数
氨氧化古菌群落						
MA	79 851	136 ^a	68.43±1.59 ^a	83.29±5.35 ^a	3.15±0.56	0.86±0.15
MB	65 322	212 ^b	105.30±1.85 ^a	111.01±1.73 ^a	2.51±0.67	0.74±0.11
MC	89 860	222 ^b	150.43±6.27 ^b	181.68±2.95 ^b	2.79±0.79	0.72±0.18
氨氧化细菌群落						
MA	65 545	59 ^a	24.70±2.36 ^a	37.93±1.47 ^a	1.99±0.43	0.69±0.19
MB	56 694	165 ^b	62.26±1.93 ^b	81.07±1.51 ^b	1.59±0.82	0.49±0.16
MC	35 467	129 ^b	55.96±1.33 ^b	64.92±2.43 ^b	2.62±1.13	0.73±0.23

注: 同一列内标有不同字母表示差异显著($P < 0.05$)

2.4 AOA 和 AOB 群落物种组成分析

为了了解样本中 AOA 和 AOB 群落的具体组成, 对抽平后的 ASV/OTU 表格进行统计计算之后获得每个样本在属水平组成和丰度分布表, 并以柱状图呈现分析结果。AOA 群落组成如图 3a 所示, 共有 3 个属组成该群落, 分别为 *Nitrosopumilus* 属、*Nitrososphaera* 属和 *Candidatus Nitrosocosmicus* 属,

其中的优势属(相对丰度>1%)是 *Nitrosopumilus* 属和 *Nitrososphaera* 属, 分别占 AOA *amoA* 基因总序列的 64.02%~91.05%和 8.1%~27.4%。对照组 C 中 *Nitrosopumilus* 属的相对丰度显著高于处理组 A 和 B ($P < 0.05$), 在两个处理组之间没有显著差异($P > 0.05$)。而对照组 C 中的 *Nitrososphaera* 属的相对丰度显著低于处理组 A 和 B, 同样在 2 个处理组中没有显著差异。

Candidatus Nitrosocosmicus 属占 AOA *amoA* 基因总序列的比例较低且在各组的相对丰度没有显著差异 ($P>0.05$)。AOB 微生物群落共由 6 个属组成(图 3b), 其中 *Nitrosospira* 属和 *Nitrosomonas* 属为主要优势属, 分别占 AOB *amoA* 基因总序列的 39.5%~67.6%和 10.7%~50.1%。与对照组相比处理组的 *Nitrosospira*

属的相对丰度显著上升, 而处理组 A 中 *Nitrosomonas* 属的相对丰度显著下降($P<0.05$)。在 2 个处理组之间处理组 B 中 *Nitrosomonas* 属和 *Nitrosospira* 属的相对丰度均显著高于处理组 A 中($P<0.05$)。另外的 4 个属占 AOB *amoA* 基因总序列的比例较低且在各组的相对丰度没有显著差异($P>0.05$)。

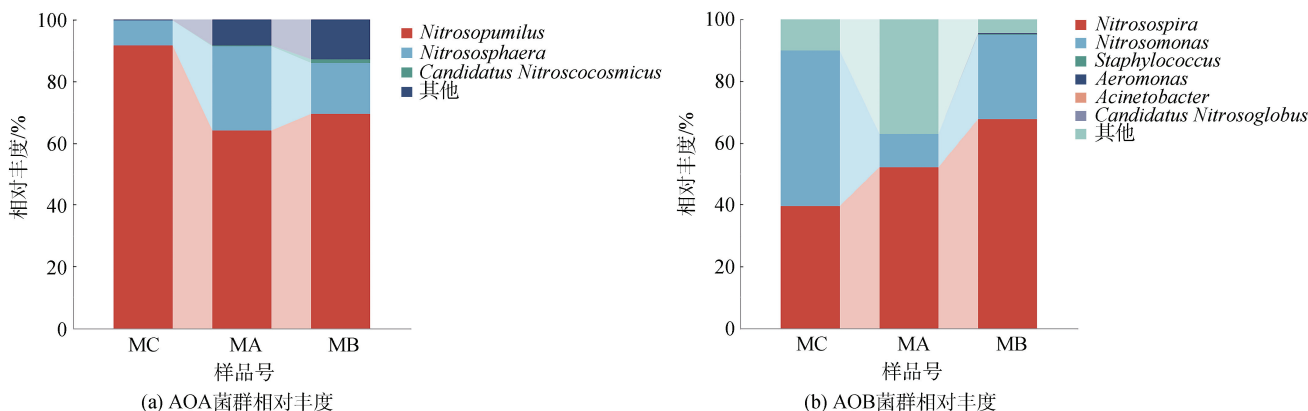


图 3 不同处理组 AOA(a) 和 AOB(b)在属水平的菌群相对丰度

Fig. 3 Relative abundance of the AOA (a) and AOB (b) microbiota under different treatments at the genus level

注: MC 对照组; MA: 高频率低剂量组; MB: 低频率高剂量组

3 讨论

养殖水体和底泥中的氨氮和亚硝氮是微生物利用含氮有机物进行硝化作用过程中产生的重要中间产物, 可以作为判断养殖环境好坏的重要指标^[12]。对虾的排泄物、残余的饵料等的腐烂性分解会沉积在水-底泥界面, 容易造成界面的缺氧状态。硝化作用是需氧的氧化还原反应, 一定的氧含量是介导硝化作用的微生物进行硝化作用所必须的^[19]。沉积在水-泥界面的对虾粪便、未利用的饵料等都是高含氮量的有机物, 致使底泥中氨氮和亚硝氮比水中高几个数量级^[20]。随着养殖的进行各组的氨氮和亚硝氮含量均有不同程度的上升, 其中处理组 A 中氨氮和亚硝氮含量上升速度最快, 随后是对照组 C; 第 3 周开始处理组 A 中的氨氮和亚硝氮含量持续高于对照组 C 和处理组 B, 而且在处理组 B 中含量最低。这表明单次高剂量 KMPS 的投放, 可以有效的降低底泥中氨氮和亚硝氮的含量。这可能是因为 KMPS 片剂在水-泥界面分解释放氧气, 促进了硝化作用, 同理于过碳酸钠的施用下分解释放氧气, 溶解氧的增加促进氨氮的硝化作用, 进而促进了氮的循环^[21]; 而且研究表明, KMPS 可以直接与氨氮发生反应, 生成亚

硝酸盐; 另外 KMPS 在污泥处理中可以降解多种复杂的有机物^[22], 对底泥中的有机物也可能存在同样的作用。但是高频率低剂量 KMPS 的投放反而不利于硝化作用, 可能是连续的投放对硝化作用微生物产生持续性的抑制作用, 导致中间产物氨氮和亚硝氮的积累。

氨氧化微生物介导的有机物氨氧化过程作为限速步骤, 在整个硝化作用中起到决定性的作用。驱动氨氧化作用的微生物 AOA 和 AOB 广泛分布于几乎所有土壤、淡水、湖泊底泥和海洋环境中; 并且在许多环境中 AOA 比 AOB 更加丰富^[23-26]。在我们实验环境中, AOA 数量明显高于 AOB, 推测 AOA 在此环境下的硝化作用中发挥着主导作用。随着养殖地进行, 介导氨氧化作用的 AOA 和 AOB 丰度均增长, 但同期高频率低剂量 KMPS 投放组的 AOA 和 AOB 丰度显著低于对照组, 表明高频率低剂量 KMPS 的投放对二者存在部分抑制作用。养殖开始的前两周 KMPS 的投放没有对 AOA 数量造成影响, 从第 3 周开始至实验结束时, 期间处理组 A 中的 AOA 数量始终低于其他两组, 表明高频率低剂量的 KMPS 投放持续对 AOA 造成影响。KMPS 在水中能够在短时间内快速分解, 对很多微生物产生抑制作用^[11]。除第

5 周外, 对照组 C 和处理组 B 中 AOA 数量没有显著差异, 推测单次高剂量 KMPS 投放对 AOA 的抑制作用不持续存在, 随着抑制的解除 AOA 可以恢复生长和繁殖。与 AOA 相比 AOB 在养殖的前中期的较长时间内对 KMPS 的投放并不敏感, 但从第 4 周开始在投放频率与投放量积累的双重作用下, 处理组 A 中 AOB 数量显著低于其余两组。

与基因丰度检测结果相似, alpha 分析结果显示, 处理组 A 中的 AOA 和 AOB 相对丰度显著低于对照组 C 和处理组 B, 表明高频率低剂量的 KMPS 投放对 AOA 和 AOB 起到抑制的作用。AOA 和 AOB 的多样性在各组间没有显著差异, 表明 KMPS 投放与否以及投放的方式对氨氧化微生物的多样性不产生影响。KMPS 对不同种微生物可产生不同作用, 可对某些微生物产生抑制而对其他一些微生物无影响^[27]。当前的养殖环境中检测到 AOA 的种类较少, 优势属分别为 *Nitrosopumilus* 属、*Nitrososphaera* 属, 这与之前的研究中表明 *Nitrosopumilus* 属和 *Nitrososphaera* 属是组成 AOA 群落主要的属一致^[28-30]。本研究结果显示 KMPS 对二者的影响不同, 与对照组相比 KMPS 的投放降低了底泥中 *Nitrosopumilus* 属的丰度, 提升了 *Nitrososphaera* 属的丰度; 但在 2 个处理组之间 2 个优势属的相对丰度没有显著差异, 表明 KMPS 对 AOA 的影响与投放的方式关系不大。AOB 微生物群落共由 6 个属组成, 其中 *Nitrosospira* 属和 *Nitrosomonas* 属为主要优势属, 与之前对水产养殖池塘沉积物^[31]和淡水湖沉积物^[32]的研究类似。与对照组相比, KMPS 的投放提升了 *Nitrosospira* 属的相对丰度, 降低了处理组 A 中 *Nitrosomonas* 属的相对丰度。在 2 个处理组中, 处理组 B 中 *Nitrosomonas* 属和 *Nitrosospira* 属的相对丰度均显著高于处理组 A 中, 表明不仅是 KMPS 的投放与否, 投放的方式也会对 AOB 产生不同的影响, 低频率高剂量 KMPS 投放对 AOB 具有促进的作用。

4 结论

本实验首次探究了 KMPS 投放对养殖底泥中氮素循环及氨氧化作用的影响。实验结果表明, 不同的投放方式产生的影响有明显的差别, 高频率低剂量 KMPS 投放对底泥中 AOA 和 AOB 的生长产生部分抑制作用, 使其不能够满足氮素转化的需求, 而低频率高剂量 KMPS 投放对 AOA 丰度没有明显影响, 对 AOB 群落生长表现出积极的作用, 因此促进硝化

作用顺利进行。以上结果为 KMPS 可作用于底质中氮素的降解提供了理论依据, 同时为虾类养殖环境改善提供了更多的可选择办法。

参考文献:

- [1] SRITHEP P, KHINTHONG B, CHODANON T, et al. Communities of ammonia-oxidizing bacteria, ammonia-oxidizing archaea and nitrite-oxidizing bacteria in shrimp ponds[J]. *Annals of Microbiology*, 2014, 65(1): 267-278.
- [2] DAI L, LIU C, YU L, et al. Organic matter regulates ammonia-oxidizing bacterial and archaeal communities in the surface sediments of *ctenopharyngodon idellus* aquaculture ponds[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2290.
- [3] VENTER J C, REMINGTON K, HEIDELBERG J F, et al. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea[J]. *Science*, 2004, 304: 66-74.
- [4] TREUSCH A H, LEININGER S, KLETZIN A, et al. Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling[J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(12): 1985-1995.
- [5] WU R N, MENG H, WANG Y F, et al. A more comprehensive community of ammonia-oxidizing archaea (AOA) revealed by genomic DNA and RNA analyses of *amoA* gene in subtropical acidic forest soils[J]. *Microbial Ecology*, 2017, 74(4): 910-922.
- [6] LIU H, LI J, ZHAO Y, et al. Ammonia oxidizers and nitrite-oxidizing bacteria respond differently to long-term manure application in four paddy soils of south of China[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 633: 641-648.
- [7] LIMPIYAKORN T, SHINOHARA Y, KURISU F, et al. Distribution of ammonia-oxidizing bacteria in sewage activated sludge: analysis based on 16S rDNA sequence[J]. *Water Science & Technology*, 2004, 50(8): 9-14.
- [8] LIMPIYAKORN T, KURISU F, SAKAMOTO Y, et al. Effects of ammonium and nitrite on communities and populations of ammonia-oxidizing bacteria in laboratory-scale continuous-flow reactors[J]. *Fems Microbiology Ecology*, 2007, 60(3): 501-512.
- [9] ERMER O, RÖBKE C. Crystal structure and chemical stabilization of the triple salt $(\text{KHSO}_3)_2 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$ [J]. *Helvetica Chimica Acta*, 2003, 86(8): 2908-2913.
- [10] 唐兴刚, 魏文康, 罗胜军, 等. 过硫酸钾复合物在畜牧水产中的应用研究进展[J]. *中国兽药杂志*, 2020, 54(8): 1002-1280.
TANG Xingang, WEI Wenkang, LUO Shengjun, et al. Advances in research of potassium peroxomonosulfate

- compound on animal husbandry and aquatic[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2020, 54(8): 1002-1280.
- [11] 曾晓丹, 曹阳, 张盈娇, 等. 单过硫酸氢钾粉对 5 种水产常见致病菌的体内外抑菌作用[J]. 渔业科学进展, 2014, 35(2): 104-109.
ZENG Xiaodan, CAO Yang, ZHANG Yingjiao, et al. Bacteriostasis in vitro and in vivo of potassium monopersulfate powder on five strains of common pathogenic bacteria in aquaculture[J]. Progress in Fishery Sciences. 2014, 35(2): 104-109.
- [12] 邵长清, 高勤峰, 董双林, 等. 过碳酸钠对刺参养殖底质改良和生长效果的研究[J]. 海洋湖沼通报, 2018(4): 126-132.
SHAO Changqing, GAO Qinfeng, DONG Shuanglin, et al. Effect of sodium percarbonate on growth of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) and sediment environment[J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2018(4): 126-132.
- [13] SOA of China. Specification for Marine Monitoring GB 17378, 4-2007[S]. 2007a.
- [14] CALLAHAN B J, MCMURDIE P J, ROSEN M J, et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data[J]. Nature Methods, 2016, 13(7): 581-583.
- [15] EDGAR R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST[J]. Bioinformatics, 2010, 26(19): 2460-2461.
- [16] CHAO A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population[J]. Scandinavian Journal of Statistics, 1984, 11: 265-270.
- [17] SHANNON C E. A mathematical theory of communication[J]. Bell System Technical Journal, 1948, 27(3): 379-423.
- [18] SIMPSON E H. Measurement of Diversity[J]. Nature, 1949, 163: 688-688.
- [19] LU S, LIAO M, XIE C, et al. Removing ammonium from aquaculture ponds using suspended biocarrier-immobilized ammonia-oxidizing microorganisms[J]. Annals of Microbiology, 2015, 65(4): 2041-2046.
- [20] AVNIMELECH Y. Shrimp and fish pond soils: processes and management[J]. Aquaculture, 2003, 220(1/4): 549-567.
- [21] 熊代群, 杜晓明, 唐文浩, 等. 海河天津段与河口海域水体氮素分布特征及其与溶解氧的[J]. 环境科学研究, 2005, 18(3): 1-4, 19.
XIONG Daiqun, DU Xiaoming, TANG Wenhao, et al. Nitrogen distribution in the water of the Haihe River mainstream and estuary seawater and its relationship with water dissolved oxygen levels[J]. Research of Environmental Sciences. 2005, 18(3): 1-4, 19.
- [22] KHAN N E, ADEWUYI Y G. Absorption and oxidation of nitric oxide (NO) by aqueous solutions of sodium persulfate in a bubble column reactor[J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2010, 49: 8749-8760.
- [23] BEMAN J M, FRANCIS C A. Diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the sediments of a hypereutrophic subtropical estuary: Bahia del Tobari, Mexico[J]. Applied Environmental Microbiology, 2006, 72(12): 7767-7777.
- [24] SAHAN E, MUYZER G. Diversity and spatio-temporal distribution of ammonia-oxidizing Archaea and Bacteria in sediments of the Westerschelde estuary[J]. Fems Microbiology Ecology, 2008, 64(2): 175-186.
- [25] SUN W, XIA C, XU M, et al. Distribution and abundance of archaeal and bacterial ammonia oxidizers in the sediments of the Dongjiang River, a drinking water supply for Hong Kong[J]. Microbes Environments, 2013, 28(4): 457-465.
- [26] LIU Y, ZHANG J, ZHAO L, et al. Distribution of sediment ammonia-oxidizing microorganisms in plateau freshwater lakes[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99: 4435-4444.
- [27] MAINOUS M E, SMITH S A, KUHN D D. Effect of common aquaculture chemicals against *Edwardsiella ictaluri* and *E. tarda*[J]. Journal of Aquatic Animal Health, 2010, 22(4): 224-228.
- [28] PESTER M, RATTEI T, FLECHL S, et al. *amoA*-based consensus phylogeny of ammonia-oxidizing archaea and deep sequencing of *amoA* genes from soils of four different geographic regions[J]. Environmental Microbiology, 2012, 14(2): 525-539.
- [29] ZHENG Y, HOU L, LIU M, et al. Diversity, abundance, and activity of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in Chongming eastern intertidal sediments[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97: 8351-8363.
- [30] YANG Y, ZHANG J, ZHAO Q, et al. Sediment ammonia-oxidizing microorganisms in two plateau freshwater lakes at different trophic states[J]. Microbiology Ecology, 2016, 71(2): 257-265.
- [31] LU S, LIU X, MA Z, et al. Vertical segregation and phylogenetic characterization of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in the sediment of a freshwater aquaculture pond[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 1539.
- [32] BAO Linlin, WANG Xiaoyan, CHEN Yongjuan. Abundance and distribution of ammonia-oxidizing microorganisms in the sediments of Beiyun River, China[J]. Annals of Microbiology, 2016, 66(3): 1075-1086.

Effects of potassium monopersulfate on the nitrification, abundance, and community structure of ammonia-oxidizing microorganisms in shrimp culture sediments

ZHAO Zhen^{1, 3}, WANG Bao-jie^{1, 2}, LIU Mei^{1, 2, 4}, JIANG Ke-yong^{1, 2}, WANG Lei^{1, 2, 4}

(1. CAS Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 4. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266237, China)

Received: Feb. 28, 2021

Key words: Potassium monopersulfate; nitrification; *amoA* gene abundance; microbial community structure

Abstract: The effects of potassium monopersulfate (KMPS) on the nitrification of aquaculture substrates were investigated by adding KMPS into a simulated pond. To investigate the effects of KMPS on nitrogen conversion, ammonia nitrogen and nitrite nitrogen contents were measured. The contents of ammonia nitrogen and nitrite nitrogen in the low-frequency and high-dose groups were significantly decreased, whereas those in the high-frequency and low-dose groups were significantly increased. The application of high-frequency and low-dose KMPS reduced the abundance of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and ammonia-oxidizing bacteria (AOB), whereas the application of low-frequency and high-dose KMPS increased the abundance of AOB in some periods. Further analysis of community structures showed that the relative abundance of *Nitrosopumilu* decreased, whereas that of *Nitrososphaera* increased in AOA due to the application of KMPS; this change was independent of the application mode of KMPS. However, the AOB community was affected by the application mode of KMPS, and the relative abundance of dominant genera in AOB significantly increased under low-frequency and high-dose KMPS. These results indicate that the application of low-frequency and high-dose KMPS can promote sediment nitrification. This study can also open a new possibility for KMPS to be used for aquaculture sediment improvement.

(本文编辑: 赵卫红)