

# 不同模式凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)养殖池塘沉积物酶活性及其微生物群落结构分析\*

李越蜀<sup>1</sup> 郑忠明<sup>1</sup> 翟海佳<sup>1</sup> 华建权<sup>2</sup> 周朝生<sup>3</sup> 陈辉煌<sup>1</sup>

(1. 宁波大学 教育部应用海洋生物技术重点实验室 宁波 315211; 2. 慈溪市水产技术推广中心 慈溪 315000; 3. 浙江省海洋水产养殖研究所 浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室 温州 325005)

**提要** 采用现场测定、磷脂脂肪酸(PLFA)法及基质脱氢酶活性测定等方法,对 4 种不同养殖模式的凡纳滨对虾池塘的水质、沉积物酶活性及微生物群落结构进行了分析和研究。结果表明:养殖末期,凡纳滨对虾淡水混养和海水混养池塘水质较好,海水集约化池塘水质最差;其中海水集约化池塘沉积物基质中有机质含量、微生物生物量、微生物活性和酶活性都很高,真菌、G<sup>+</sup>菌的相对含量则很低。主成分分析(PCA)表明:第一主成分主要与脲酶、有机质含量、微生物活性、总 PLFA、B/F 有显著的正相关关系( $r>0.9$ ),而与 Gram<sup>+</sup>/Gram<sup>-</sup>、pH、18:1 $\omega$ 9C/T、单不饱和/支链却存在显著的负相关关系( $r>0.9$ );第二主成分主要与脱氢酶有显著正相关关系( $r>0.8$ ),四种池塘在 PCA 图中分散开,说明其微生物群落结构及环境状况存在明显差异。

**关键词** 凡纳滨对虾,沉积物,酶活性,PLFA,微生物群落结构

**中图分类号** Q938.8; S967.4

沉积物是水生生态系统中最活跃和最具影响力的组分之一,与养殖水体环境和养殖生物密切相关。在河湖底泥生态系统中,沉积物是水体中营养物质、污染物迁移转化的载体、归宿和蓄积库(金相灿,1992),同时底泥中的细菌、真菌及原生动物等微生物是底部食物网、有机物分解、营养循环的重要组成部分,通过其广泛的分布、多样性的代谢及高效的酶促活性对维持生态系统的生态平衡起着极其重要的作用(高健等,2011)。微生物及基质酶活性对环境变化的灵敏度高,对其进行相关的研究,有助于提早发现异常状况,指导生产;同时还能获得特殊的微生物资源,应用于生态养殖和环境修复。王亚南(2004)<sup>1</sup>对养殖场底泥细菌进行了详细的群落结构和功能研究,同时发现了一株具有特殊功能的细菌,并对其进行了分类鉴

定。然而由于底泥微生物种类的多样性、数量的庞大性和底泥环境的复杂性,人们对底泥微生物的认识还非常有限。据报道,土壤中 80%—90%的反应与土壤微生物相关(Nannipieri *et al.*, 1990)。

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)具有个体大、生长快、营养需求低、抗病力强等优点,对水环境因子变化的适应能力较强,是集约化高产养殖的优良品种。不同养殖模式的养殖池塘,其池底沉积物状况会因养殖水域环境和养殖生物的差异而发生不同改变。伴随着沉积物结构和理化性质改变的同时,参与沉积物环境物质循环和能量代谢的微生物群落结构与酶活性也将发生相应的变化。有关沉积物中微生物的研究已有较多报道,翟海佳等(2011)对覆膜凡纳滨对虾养殖池塘在整个养殖周期中沉积物微生物群落

\* 国家科技支撑计划项目,2011BAD13B08 号;宁波市海洋与渔业局项目,2012-1-6 号;宁波市自然科学基金项目,2012A610168 号。李越蜀, E-mail: 82146944@qq.com

1) 王亚南, 2004. 近海养殖场底泥微生物区系结构和功能的研究. 广州: 华南理工大学博士学位论文, 76—83

通讯作者: 郑忠明, 教授, E-mail: zhengzhongming@nbu.edu.cn

收稿日期: 2012-01-26, 收修改稿日期: 2012-03-23

结构的变化情况和与环境因子的相关性进行了分析研究。孙芳等(2011)比较研究了蓝藻水华暴发水体与无蓝藻水华暴发水体的沉积物的微生物活性(FDA)、碱性磷酸酶活性(APA),发现 APA 与 FDA 活性之间相关性极显著,暗示碱性磷酸酶的分泌受微生物活性影响。本研究通过应用磷脂脂肪酸技术(PLFA)分析不同模式养殖方式下沉积物微生物群落结构的变化,并进一步探讨不同环境状况、微生物群落结构和代谢活性之间的关系,为不同模式养殖池塘的生态状况以及对环境造成的影响提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 沉积物样品的采集和处理

于 2011 年 4—10 月在浙江省宁波市沿海养殖区,选择了四种不同模式养殖池塘,包括:(1)淡水大棚集约化对虾养殖池(简称:淡水集约化,面积 3000m<sup>2</sup>):精养对虾,其放养密度为 160 尾/m<sup>2</sup>;(2)海水大棚集约化水泥养殖池(简称:海水集约化,面积 2500m<sup>2</sup>):精养对虾,其放养密度为 195 尾/m<sup>2</sup>;(3)淡水对虾混养池(简称:淡水混养,面积 13000m<sup>2</sup>):除主养对虾外,还混养了一定数量的甲鱼和银鲫,对虾放养量为 120 尾/m<sup>2</sup>;(4)海水对虾混养池(简称:海水混养,面积 15000m<sup>2</sup>):养殖品种主要为对虾和泥蚶,密度分别为 60 尾/m<sup>2</sup>和 0.06kg/m<sup>2</sup>。在养殖末期,分别在池塘中部设置的 3 个点收集池塘底部表层底泥或沉积物(0—5cm),然后放入 4℃ 泡沫塑料冷藏箱中保存,并在采样后的 4h 内进行冷冻干燥处理。同时,分别采集四个养殖池塘的中间和四周底层的水样,水样中氨氮、亚硝酸盐、硝酸盐、总氮、总磷等指标用“HACH(DR/2800)”水质检测仪检测,测定方法按照《海洋调查规范》(国家技术监督局,2007)进行。

### 1.2 沉积物微生物生物量及种类分析

在养殖末期,采集各池塘沉积物用于微生物数量及种类的测定,采用磷脂脂肪酸(PLFA)标记法。PLFA 是活体微生物细胞膜恒定组分,其对环境因素敏感且在生物体外迅速降解,因此特定菌群 PLFA 数量变化可反映出原位土壤细菌、真菌活体生物量与菌群结构(Liu *et al.*, 2006; Vestal *et al.*, 1989; Zelles, 1999)。具体操作采用 White 等(1979)基础上改进后的方法(孙芳等, 2012; 翟海佳等, 2011)。

GC 型号: Agilent 6890; 毛细管柱: CP-Sil 5CB

Low Bleed(30m×0.25mm×0.25μm)。GC 条件:进样口温度 260℃,检测器温度 260℃,不分流进样。PLFAs 定量根据外标标样,选用 Supelco 公司的 Bacterial Acid Methyl Esters Mix 和 478852-U,包含 37 种 FAMES (fatty acid methyl esters)脂肪酸甲酯混合标样,可涵盖沉积物 PLFAs 范围。

脂肪酸的命名:以“X:YωZ(c/t)”表示,其中“X”代表脂肪酸分子的碳原子总数,“Y”代表不饱和烯键的数目,“Z”为烯键或环丙烷链的位置,“ω”代表烯键距离羧基的位置。前缀 i(iso)表示顺式支链, a(antieso)表示反式支链,“cy”代表环丙基支链,后缀“c”和“t”分别代表顺式和反式双键。

特征脂肪酸是不同微生物类群的生物标志物,根据现有的研究成果(Steinberger *et al.*, 1999; Frostegard *et al.*, 1996; Hill *et al.*, 2000)总结,细菌源脂肪酸为 14:0、15:0、16:0、17:0、i15:0、a15:0、i16:0、16:1ω9、i17:0、cy17:0;真菌源脂肪酸以 18:1ω9c+t、18:2ω6c+t、18:3ω3 表示;革兰氏阴性菌(G<sup>-</sup>)以 cy17:0 表示;革兰氏阳性菌(G<sup>+</sup>)以 i15:0、a15:0、i16:0 和 i17:0 表示。

### 1.3 沉积物基质酶及微生物活性的检测

采用关松荫(1986)的方法测定基质脱氢酶活性(TTC 法)、酸性磷酸酶活性(磷酸苯二钠比色法)及脲酶活性。微生物活性采用荧光素双醋酸酯法(金相灿等, 1990)。

沉积物基质 pH 和有机质含量的测定:取沉积物置于 105℃ 下, 4h 烘干, 将其在 1:5 土壤/0.01mol/L CaCl<sub>2</sub> 浸提液中混合, 并将混合物放在离心管中并置于振荡仪上, 振摇 1h, 使土体充分散开, 然后静置片刻, 取上清液测定 pH (王亚芬, 2007)<sup>1)</sup>。将烘干的沉积物(105℃ 下 4h)在 550℃ 下马弗炉中烧 5h, 前后损失的质量与原有干的沉积物的质量比为沉积物中有机质含量。

### 1.4 数据分析

用 SPSS18.0 统计软件对实验数据进行方差分析和相似性分析, 用 CANOCO For windows 4.5 对 PLFA 数据进行主成分分析, 同时对环境因子和微生物群落结构因子的相关性进行 RDA 冗余分析, 相关结果用 Origin8 作图。

## 2 结果

### 2.1 不同养殖池塘的水质情况

由表 1 可知, 淡水混养池塘的溶解氧、pH、透明

1) 王亚芬, 2007. 应用磷脂脂肪酸技术解析人工湿地微生物群落结构的研究. 武汉: 中国科学院水生生物研究所硕士学位论文, 59—60

度在养殖末期依然保持在较高水平,明显高于其它三组;海水集约化和淡水集约化这两类池塘,由于是高密度的单养模式,溶解氧、透明度、pH 在养殖末期都相对比较低,海水混养池塘的水体只有 pH 为 6.95,呈现了弱酸性。两类混养池塘的三态氮以及总氮、总磷相对较低,且差异性不显著( $P>0.05$ );海水集约化池塘氨氮相对不高,但  $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、TN、TP 均高于其它三组,且硝酸盐含量很高,达 24.3mg/L,总氮和总磷分别为 28.5mg/L 和 18.45mg/L,显著高于其它三组( $P<0.05$ )。

## 2.2 沉积物基质理化指标

四种不同模式的养殖池塘养殖末期的沉积物基质 pH 以淡水混养池塘为最高,明显呈现碱性, pH 最低的则是海水集约化池塘,已经接近酸性状态,其它两种池塘则为弱碱性(表 2)。四类池塘沉积物有机质的含量差异性比较明显,海水集约化养殖池塘底部为混凝土,其沉积物全部由养殖过程积累,有机质含量较高,达 32.68%;淡水集约化养殖池塘底部为底泥,其有机质含量为 16.69%。海水混养和淡水混养池塘有机质含量不高,只为海水集约化养殖池塘的 22.5%和 28.4%(表 2)。

## 2.3 沉积物基质酶活性及微生物活性

将三种沉积物基质酶活以及微生物活性作为微生物指标,以反映不同模式养殖池塘中沉积物微生物的数量与功能。不同池塘的脱氢酶、脲酶、磷酸酶和微生物活性的变化如表 3 所示。在整个养殖周期过程中,养殖池塘到了末期环境会发生极大的变化,同样三种基质酶在末期也因不同的环境状况而表现出显著的差异( $P<0.05$ )。四种养殖池塘的脱氢酶活性以海水集约化养殖池塘为最高,达到了(165.28±7.53)  $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$ ,海水混养池塘、淡水混养池塘以及淡水集约化池塘分别为海水集约化池塘的 87.3%、63.6%、38.4%。脲酶活性除海水集约化养殖池塘外 [(39.1±3.23)  $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$ ],其它三种池塘的差异性不大。酸性磷酸酶活性同样是海水集约化池塘最高,达到了(95.56±3.38)  $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$ ,而淡水混养池塘最低,仅为海水集约化池塘的 15.7%。微生物活性指标因与微生物生物量密切相关,因此同样为海水集约化池塘最高,淡水混养池塘最低。

## 2.4 沉积物基质微生物群落结构组成

应用 PLFA 技术分析不同养殖模式下池塘在养殖末期时沉积物基质微生物群落结构,共检测出 C14—

表 1 不同养殖模式池塘各项水质指标(平均值+标准差)

Tab.1 The main water quality parameters in the ponds with different aquaculture modes (mean±SD)

池塘类型	pH	透明度(cm)	溶解氧(mg/L)	氨氮(mg/L)	硝酸盐(mg/L)	亚硝酸盐(mg/L)	总氮(mg/L)	总磷(mg/L)
淡水混养	8.39	30	5.77	0.34±0.24 <sup>a</sup>	2.34±0.34 <sup>c</sup>	0.322±0.112 <sup>a</sup>	3.76±0.54 <sup>c</sup>	0.88±0.11 <sup>c</sup>
淡水集约化	7.76	15	3.12	0.52±0.21 <sup>a</sup>	6.31±0.44 <sup>b</sup>	0.416±0.243 <sup>a</sup>	8.52±1.13 <sup>b</sup>	1.65±0.43 <sup>b</sup>
海水混养	8.02	25	4.28	0.40±0.17 <sup>a</sup>	3.34±0.69 <sup>c</sup>	0.151±0.065 <sup>b</sup>	4.36±0.64 <sup>c</sup>	0.66±0.52 <sup>c</sup>
海水集约化	6.95	15	2.53	0.41±0.26 <sup>a</sup>	24.3±3.58 <sup>a</sup>	0.582±0.226 <sup>a</sup>	29.5±3.34 <sup>a</sup>	18.45±5.18 <sup>a</sup>

注:表中同一列标有不同字母的平均数表示差异显著( $P<0.05$ )

表 2 不同模式养殖池塘末期沉积物 pH 及有机质含量(平均值+标准差)

Tab.2 pH and organic matter contents in the pond sediment of different aquaculture modes in late culture period (mean±SD)

池塘类型	淡水混养	淡水集约化	海水混养	海水集约化
pH	8.22	7.61	7.98	6.92
有机质含量(%)	7.34±0.32 <sup>c</sup>	16.49±1.47 <sup>b</sup>	9.31±0.87 <sup>c</sup>	32.68±3.28 <sup>a</sup>

注:表中同一列标有不同字母的平均数表示差异显著( $P<0.05$ )

表 3 不同模式养殖池塘末期沉积物基质酶及微生物活性(平均值+标准差)

Tab.3 Matrix enzyme and microbial activity in the pond sediment of different aquaculture modes in late culture period (mean±SD)

池塘类型	脱氢酶[ $\mu\text{g TE}/(\text{g}\cdot\text{h})$ ]	脲酶[ $\mu\text{g NH}_4^+\text{-N}/(\text{g}\cdot\text{h})$ ]	酸性磷酸酶[ $\mu\text{g Phenol}/(\text{g}\cdot\text{h})$ ]	微生物活性[ $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$ ]
淡水混养	105.06±8.02 <sup>b</sup>	3.80±0.44 <sup>b</sup>	15.07±1.13 <sup>d</sup>	4.34±0.72 <sup>c</sup>
淡水集约化	63.50±3.21 <sup>c</sup>	3.48±0.37 <sup>b</sup>	26.85±2.64 <sup>c</sup>	10.61±2.34 <sup>b</sup>
海水混养	144.28±2.23 <sup>a</sup>	3.52±0.62 <sup>b</sup>	37.54±3.21 <sup>b</sup>	6.43±0.33 <sup>c</sup>
海水集约化	165.28±7.53 <sup>a</sup>	39.10±3.23 <sup>a</sup>	95.56±3.38 <sup>a</sup>	20.41±3.57 <sup>a</sup>

注:表中同一列标有不同字母的平均数表示差异显著( $P<0.05$ )

C20 共 20 种脂肪酸, 根据对指示不同微生物类群的特征脂肪酸进行归纳和总结, 可以分为细菌和真菌两大类, 其中细菌还可以分为  $G^+$ 、 $G^-$ 、好氧菌等几类。从表 4 中可以看出, 海水集约化池塘微生物总量最高, 为 143.2ng/g, 并且各种类型的微生物脂肪酸含量整体也很高, 远远高于其它三组。淡水混养池塘微生物

总量仅为最高池塘的 34%, 各类型脂肪酸含量也比较低。总的来说, 各类微生物脂肪酸含量大小顺序为: 海水集约化>淡水集约化>海水混养>淡水混养。通过比较细菌 PLFA/真菌 PLFA 发现, 真菌相对含量大小则为: 淡水混养>海水混养>淡水集约化>海水集约化。

表 4 不同模式养殖池塘沉积物各类微生物的生物量(ng/g)  
Tab.4 Types and concentrations of PLFAs in the pond sediment of different aquaculture modes (ng/g)

脂肪酸	淡水混养	淡水集约化	海水混养	海水集约化
微生物总量	48.7±3.2 <sup>c</sup>	95.2±7.4 <sup>b</sup>	55.7±4.2 <sup>c</sup>	143.2±12.3 <sup>a</sup>
细菌(14:0, 15:0, 16:0, 17:0, i15:0, a15:0, i16:0, 16:1ω9, i17:0, cy17:0)	36.2±2.2 <sup>c</sup>	75.4±3.5 <sup>b</sup>	43.5±5.1 <sup>c</sup>	118.8±7.9 <sup>a</sup>
革兰氏阳性(i15:0, a15:0, i16:0, i17:0)	5.1±1.2 <sup>c</sup>	9.7±2.3 <sup>b</sup>	6.8±1.9 <sup>c</sup>	16.4±3.4 <sup>a</sup>
革兰氏阴性(cy17:0)	1.2±0.6 <sup>b</sup>	2.3±0.4 <sup>b</sup>	1.8±0.5 <sup>b</sup>	7.9±2.1 <sup>a</sup>
好氧细菌(15:0, 17:0)	10.3±3.6 <sup>c</sup>	16.9±3.1 <sup>b</sup>	14.1±2.7 <sup>b</sup>	20.7±5.3 <sup>a</sup>
真菌(18:1ω9c+t, 18:2ω6c+t, 18:3ω3)	8.0±1.3 <sup>c</sup>	12.3±1.1 <sup>b</sup>	8.1±1.5 <sup>c</sup>	17.3±3.5 <sup>a</sup>

注: 表中同一列标有不同字母的平均数表示差异显著( $P<0.05$ )

本实验比较了各实验组细菌/真菌、单不饱和/饱和、18:1ω9c/18:1ω9 值的大小, 以探讨不同养殖模式下的池塘环境状况, 见图 1。单不饱和脂肪酸/支链脂肪酸的比值大小可以反映好氧细菌与厌氧细菌的相对优势, 从图 1 中可以看出, 四类池塘中沉积物好氧细菌在养殖末期还是占主要优势的, 虽然淡水混养池塘好氧细菌数量不多, 只有 10.3ng/g, 却是沉积物微生物中的主导菌群, 占 21.1%。在细菌/真菌方面, 淡水混养池塘的比值最小, 为 4.55, 明显低于集约化池塘。反式结构脂肪酸与顺式结构脂肪酸的比值是最比较常用的环境压力指标(Wick, 2003; Mazumder *et al*, 2000), 本文选用 18:1ω9c/18:1ω9t 来评价养殖末期环境状况, 从图 1 可知, 四种养殖池塘的沉积物环境压力由大到小顺序依次为, 海水集约化>淡水集约化>海水混养>淡水混养(图 1)。

## 2.5 微生物指标与环境因子主成分分析

不同养殖模式池塘末期沉积物基质环境因子(pH、DO、有机质含量)与微生物活性因子(脲酶、脱氢酶、酸性磷酸酶、微生物活性、total PLFA、B/F、Gram<sup>+</sup>/Gram<sup>-</sup>、18:1ω9C/T、单不饱和/支链)的主成分(PCA)分析, 如图 2。其中第一主成分 PC1 的贡献率为 85.6%, 第二主成分 PC2 的贡献率为 12.4%, 两个主成分之和达到了 98.0%。根据主成分分析原理, 当累积方差贡献率大于 80%时, 即可用于反映系统的变异信息, 可见, 用第一、第二主成分两个因素即可代表系统内的变异状况。由主成分的组成因素可知,

第一主成分主要与酸性磷酸酶和脲酶、有机质含量、微生物活性、total PLFA、B/F 有显著的正相关关系( $R>0.9$ ), 与 Gram<sup>+</sup>/Gram<sup>-</sup>、pH、18:1ω9C/T、单不饱和/支链有显著的负相关关系( $R>0.9$ ); 第二主成分主要与脱氢酶有显著的正相关关系( $R>0.8$ )。由图 2 可知, 不同模式池塘在 PCA 图中分散开, 说明其微生物群落结构及环境状况存在明显差异。其中海水集约化和淡水混养池塘在 PC1 上有较高的荷载值, 因此这两

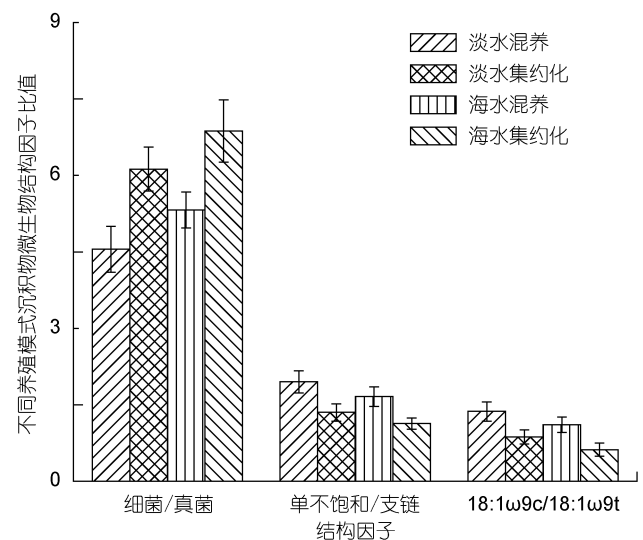


图 1 不同养殖模式沉积物 18:1 ω9c/18:1 ω9、单不饱和/饱和、细菌/真菌比值

Fig.1 The ratios of 18:1ω9c/18:1 ω9, monounsaturated/saturated and bacteria/fungus in the pond sediment of different aquaculture modes

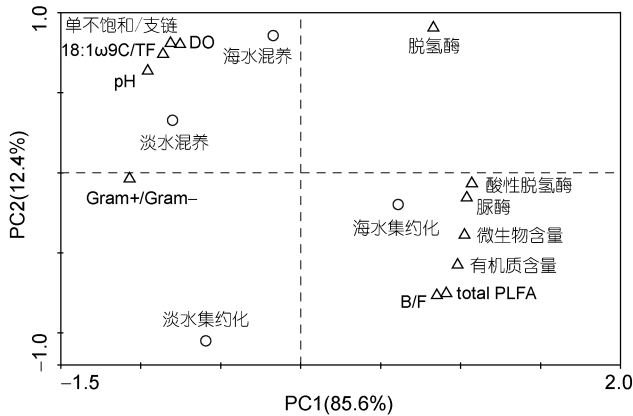


图2 不同养殖模式池塘末期沉积物基质环境因子与微生物活性因子的PCA分析

Fig.2 PCA Plot of Matrix of environmental factors and microbial community structure factor under different cultivation pattern ponds sediment

种池塘的差异可以在PC1上解释,相对的,淡水集约化和海水混养池塘在PC2上有较高的荷载值,可以在PC2上解释。

### 3 讨论

#### 3.1 不同养殖模式下养殖池塘水质分析

在养殖末期,四种不同模式的养殖池塘环境压力都比较大,尤其是海水集约化养殖池塘和淡水集约化养殖池塘,为两种典型的人工调控较为直接的养殖模式,属于高密度养殖池塘,养殖期间饵料投放量较大,水体严重富营养化,生态环境受到人工干预和影响较大,因此末期水质恶劣,水体表现为明显的黑褐色,且透明度及溶解氧较低,pH也较低;淡水混养池塘和海水混养池塘为两种新型环境调控型养殖模式,主要是在生态系统水平上合理利用养殖生物之间的关系,使池塘不同水层,不同生态位及营养、能量得到充分的利用,减低养殖自身污染,构建良好底质与水域环境,同时属于露天养殖,养殖面积大,对环境产生的影响较小,在养殖末期依然能保持较好的生态环境。

#### 3.2 不同养殖模式下沉积物有机质与微生物群落结构的关系分析

有机质含量高低决定活性有机碳积累程度,进而提高微生物数量、改变土壤微生物群落结构及其生态功能(Bohme *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005)。从本实验看,在四种不同模式养殖池塘的养殖末期,沉积物中有机质含量高低顺序为,海水集约化>淡水集约化>海水混养>淡水混养,造成这样的结果可能是因为

在养殖初期投饵量不大的情况下,除海水集约化池塘外其它三个池塘的底部都为底泥,有大量微生物存在,不易导致有机物的积累。同样,通过对微生物PLFA的分析,代表微生物总量的总PLFA也符合这个顺序(Wu *et al.*, 2010; 孙芳等, 2012)。细菌/真菌的比值可反映细菌和真菌含量的变化范围和两个种群的相对丰富程度,还有研究表明土壤真菌相对数量和真菌/细菌(F/B)的提高与土壤健康程度增强有较好的一致性(Wu *et al.*, 2010)。翟海佳等(2011)调查了对虾覆膜养殖池塘不同时期沉积物的细菌PLFAs和真菌PLFAs后发现:在整个养殖周期内,虽然沉积物中微生物是以细菌为主体的群落结构,但随着养殖的进行,细菌生物量的比重在不断降低。本实验中,对比四种池塘发现,淡水生态池塘的沉积物中真菌相对数量和F/B值都最高,说明其环境状况较好。海水集约化池塘则很低,表明末期的环境状况比较恶劣。一般认为, $G^-/G^+$ 比值与沉积物的有机质含量正相关关系,沉积物的机质含量越高,则 $G^-/G^+$ 比值越大(邱莉萍等, 2004; Peacock *et al.*, 2001)。四种模式的养殖池塘,以海水集约化养殖池塘的 $G^-$ 细菌类群的比例最高, $G^-/G^+$ 比值最大,这可能是由于到了养殖末期沉积物中有机质的大量积累使可利用碳源增加,而 $G^-$ 对基质碳源变化非常敏感,从中受益而导致数量增多, $G^+$ 则更适应于饥饿环境(裴雪霞等, 2010)。另外, $G^-$ 大多是能够快速生长的类型,因此对养分变化比其它类型的微生物敏感, $G^-$ 还与土壤生态功能关系密切(Vestal *et al.*, 1989; Turpeinen *et al.*, 2004)。淡水混养池塘、海水混养池塘因其利用独特的鱼、虾、贝生态系综合养殖方式,充分利用环境资源,使沉积物基质中好氧细菌数量增多,占绝对优势;而养殖末期的海水集约化养殖池塘由于沉积基质中积累的了高负荷的有机物,而分解这些有机质需要消耗大量的溶解氧极易形成厌氧环境,从而使好氧细菌的相对含量偏低。

#### 3.3 不同养殖模式下沉积物酶活性与微生物群落结构的关系分析

基质酶活性的变化一般会呈现季节性,这通常是因为温度或湿度的变化。不同酶类,随基质的独特类型和生态系统的差异,会表现出不同的季节变化特征。本实验中的四种养殖池塘虽然养殖周期分布在不同的月份,但因养殖对象对温度的要求,所以温度基本控制同一水平(25—30℃),因此,季节因素照成的影响并不大。

基质活性酶主要来源于基质微生物, 参与许多重要的生物化学过程, 酶活变化的程度在一定程度上能够反映出基质微生物活性的变化(Tripathi *et al*, 2006)。并且基质酶会对其所处环境的干扰表现出一定的敏感性, 其活性变化能够及时的反映出土壤质量所发生的变化。脱氢酶是一种胞内氧化还原酶, 能催化有机物脱氢, 发挥着氢的中间传递体的作用, 只存在于完整的活细胞中, 被认为是指示土壤质量的灵敏指标(Madejon *et al*, 2007)。因此, 在一定程度上脱氢酶活性的高低可以用来指示活性微生物生物量的高低, 并与总微生物生物量直接相关。本实验结果表明, 四种池塘的脱氢酶活性与其用于表征微生物生物量的总 PLFA 呈正相关。脲酶是一种将酰胺态有机氮化物水解转化为植物可以直接吸收利用的无机氮化物的酶, 在氮素循环中起重要作用, 它的活性在某些方面可以反映土壤的供氮水平与能力(Robertson *et al*, 2007)。本研究中, 海水的集约化养殖池塘的脲酶含量比其它三种池塘明显高出很多, 而同时该池塘水质中三态氮及总氮含量也维持在较高的水平, 这两者都表明了该模式的养殖池塘在末期氮源积累明显, 水体营养化程度成分较高。磷酸酶也是土壤基质中广泛存在的一种水解酶, 能够催化磷酸脂或磷酸酐的水解反应, 对土壤基质中磷素的转化利用起重要作用, 还可以作为土壤的供磷能力的重要指标之一。同样海水集约化养殖池塘在酸性磷酸酶、微生物活性方面依然明显高于其它三类池塘, 这充分体现了微生物活性、有机质含量、酸性磷酸酶和总 PLFA 之间的相关关系。有研究表明, 底泥微生物活性与 APA、有机质含量相关性显著(孙芳等, 2011), 高的底泥有机质含量可能促进沉积物中微生物生长, 从而使得微生物活性和碱性磷酸酶活性增强(王建军等, 2004)。

### 参 考 文 献

- 王建军, 范成新, 张路等, 2004. 太湖底泥间隙水中金属离子分布特征及相关性. *中国环境科学*, 24(1): 120—124
- 关松荫, 1986. 土壤酶及其研究方法. 北京: 农业出版社, 260—344
- 孙芳, 郑忠明, 陆开宏等, 2011. 底泥微生物活性对蓝藻水华水柱及沉积物间隙水氮磷分布的影响. *生态科学*, 30(3): 217—222
- 孙芳, 郑忠明, 陆开宏等, 2012. 铜锈环棱螺生物扰动对藻华水体沉积物微生物群落结构的影响. *海洋与湖沼*, 43(2): 357—362
- 邱莉萍, 刘军, 王益权等, 2004. 土壤酶活性与土壤肥力的关系研究. *植物营养与肥料学报*, 10(3): 277—280
- 国家技术监督局, 2007. GB/T 12763.4-2007 海洋调查规范-第四部分: 海水化学要素调查. 北京: 中国标准出版社, 13—28
- 金相灿, 1992. 沉积物污染化学. 北京: 中国环境科学出版社, 309—312
- 金相灿, 屠清瑛, 1990. 湖泊富营养化调查规划(第二版). 北京: 中国环境科学出版社, 278—279
- 高健, 邓先余, 许爱清等, 2011. 湘江长沙段污染沉积物中微生物群落结构与污染物关联性的研究. *海洋与湖沼*, 42(2): 237—243
- 裴雪霞, 周卫, 梁国庆等, 2010. 长期施肥对黄棕壤性水稻土生物学特性的影响. *中国农业科学*, 43(20): 4198—4206
- 翟海佳, 郑忠明, 金中文等, 2011. 凡纳滨对虾覆膜养殖池塘沉积物微生物群落的磷脂脂肪酸谱图分析. *水产学报*, 35(12): 1866—1869
- Bohme L, Langer U, Bohme F, 2005. Microbial biomass, enzyme activities and microbial community structure in two European long-term field experiments. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 109: 141—152
- Frostegard A, Baath E, 1996. The use of phospholipids fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biology and Fertility of Soil*, 22: 59—65
- Hill G T, Mitkowski N A, Aldrich W L *et al*, 2000. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology*, 15: 25—36
- Liu B R, Jia G M, Chen J *et al*, 2006. A review of methods for studying microbial diversity in soil. *Pedosphere*, 16: 18—24
- Madejon E, Moreno F, Murilloj M *et al*, 2007. Soil biochemical response to long-term Conservation tillage under semi-arid Mediterranean conditions. *Soil Till Res*, 94: 346—352
- Mazumder R, Pinkart H C, Alban P S *et al*, 2000. Low-substrate regulated microaerophilic behavior as a stress response of aquatic and soil bacteria. *Current Microbiology*, 41(2): 79—83
- Nannipieri P, Grego S, Ceccanti B, 1990. Ecological significance of the biological activity in soil. *Soil Biochemistry*, 6: 293—355
- Peacock A D, Mullen M D, Ringelberg D B *et al*, 2001. Soil microbial community responses to dairy manure or ammonium nitrate applications. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 1011—1019
- Robertson G P, Gpofflian P M, 2007. Nitrogen transformations. In: Paul E A ed. *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*. Academic Press is an Imprint of Elsevier, 341—364
- Steinberger Y, Zelles L, Bai Q Y *et al*, 1999. Phospholipid fatty acid profiles as indicators for community structure in soil along a climatic transect in the Judean Desert. *Biology and Fertility of Soil*, 28: 292—300
- Tripathi S, Kumari S, Chakraborty A *et al*, 2006. Microbial biomass and its activities in salt-affected coastal soils. *Biol Fertil Soils*, 42: 273—277

- Turpeinen R, Kåresalo T, Haggblom M M, 2004. Microbial community structure and activity in arsenic-, chromium- and copper-contaminated soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 47(1): 39—50
- Vestal J R, White D C, 1989. Lipid analysis in microbial ecology—Quantitative approaches to the study of microbial community. *Biology Science*, 39: 535—541
- White D C, Davis W M, Nickels J S *et al*, 1979. Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate. *Oecologia*, 40: 51—62
- Wick L Y, Pelz O, Bernasconi S M *et al*, 2003. Influence of the growth substrate on ester-linked phosphor- and glycolipids fatty acids of PAH-degrading *M.sp.LB501T*. *Environmental Biology*, 5(8): 672—680
- Wu Y P, YU X S, Wang H Z *et al*, 2010. Does history matter? Temperature effects on soil microbial biomass and community structure based on the phospholipid fatty acid (PLFA) analysis. *Journal of Soils Sediments*, 10: 223—230
- Zelles L, 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: A review. *Biology and Fertility of Soils*, 29: 111—129
- Zhang J S, Guo J F, Chen G S *et al*, 2005. Soil microbial biomass and its controls. *Journal of Forestry Research*, 16(4): 327—330

## STUDY ON MICROBIAL ENZYME ACTIVITY AND MICROBIAL COMMUNITY STRUCTURE IN THE SEDIMENT OF *LITOPENAEUS VANNAMEI* CULTURED PONDS WITH DIFFERENT MODELS

LI Yue-Shu<sup>1</sup>, ZHENG Zhong-Ming<sup>1</sup>, ZHAI Hai-Jia<sup>1</sup>, HUA Jian-Quan<sup>2</sup>,  
ZHOU Chao-Sheng<sup>3</sup>, CHEN Hui-Huang<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo, 315211;  
2. Promotion Center of Fisheries in Cixi City, Cixi, 315000; 3. Zhejiang Mariculture Research Institute,  
Zhejiang Key Laboratory of Exploitation and Preservation of Coastal Bio-resource, Wenzhou, 325005)

**Abstract** Water quality, physical-chemical factors, microbial enzymes activity, and microbial community structure were studied in last phase's sediment of greenhouse intensive culture and ecological culture ponds for *Litopenaeus vannamei* from April to October in 2011 in Ningbo. The results showed that water quality in the ponds for ecological culture mode was better than that for intensive culture, and even more worst environment of seawater intensive ponds. Seawater intensive ponds had high value of organic matter, microbial biomass, microbial activity and enzymatic activity, and lower fungi and gram-positive bacteria biomass in sediment. Principal component analysis (PCA) showed that: the first principle component were significantly correlated with urease, organic matter content, microbial activity, B/F and total PLFA ( $r > 0.9$ ), but assumes the remarkable inverse correlation with Gram<sup>+</sup>/Gram<sup>-</sup>, pH, 18:1 $\omega$ 9C/T and single unsaturated/Branched chain ( $r > 0.9$ ). The second principle component were significantly correlated with dehydrogenase ( $r > 0.8$ ). The scattered points representing cultured ponds with different models showed significant differences in the PCA figure.

**Key words** *Litopenaeus vannamei*, Sediment, Enzymatic activity, PLFA, Microbial community structure