

循环水养殖黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)水体中 循环率对水质因子和细菌群落多样性的影响*

李卢国¹ 骆云慧¹ 徐善良^{1, 2①}

(1. 宁波大学海洋学院 宁波 315211; 2. 宁波大学海洋生物工程浙江省重点实验室 宁波 315211)

摘要 为探讨循环水养殖系统中循环率对水质因子和细菌群落多样性的影响, 以黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)为研究对象, 研究了 4 次/天(低循环率)、8 次/天(中循环率)、12 次/天(高循环率)三个流量下, 养殖桶和生物过滤桶两部分细菌群落结构、多样性以及细菌群落与环境因子的相关性。高通量测序结果表明: 黑鲷循环水养殖中优势细菌类群为变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)、疣微菌门(Verrucomicrobia)和厚壁菌门(Firmicutes)。流量的升高可增加系统的细菌多样性, 且高循环率过滤桶中具有净化水质降低营养盐功能的有益菌属更为多样化及丰度更高, 同时, 其系统去氨氮和总氮效果更好, 去除率分别是 49.5%和 22.3%, 氨氮去除率是低循环率组的 2.9 倍和中循环率的 3.6 倍, 总氮去除率是低循环率组的 8.2 倍和中循环率组的 20.5 倍。PCoA 分析和聚类分析结果表明, 各实验组养殖桶与生物过滤桶中细菌群落组成有着明显的差异, 中、高循环率组过滤桶菌落结构与低循环率的有明显的差异。环境因子与细菌群落结构相关性分析结果表明, 总磷、活性磷酸盐、亚硝酸盐和总氮等指标对细菌群落结构影响相对较大, 但未发现两者间有很显著的相关性。

关键词 黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*); 循环水养殖; 细菌群落; 高通量测序; 循环率

中图分类号 S965 **doi:** 10.11693/hyh20191100209

黑鲷 (*Acanthopagrus schlegelii*), 属硬骨鱼纲 (Osteichthyes)、鲈形目(Perciformes)、鲷科(Sparidae), 系暖温性近海底层鱼类, 分布于北太平洋西部、中国沿海, 以黄、渤海产量较多(朱德芬, 1993), 现有黑鲷养殖以网箱和池塘为主(蒋万钊, 2011)。循环水养殖提供了一种高效利用水资源的养殖方式, 可大大降低养殖业对环境的污染程度, 且又具有养殖系统自身水质稳定、防病能力强等优势(王威等, 2012; 王峰等, 2013; Wold *et al*, 2014)。循环率作为循环水养殖系统中一个重要的技术参数, 其可有效地影响循环水系统细菌多样性和去氨氮和亚硝态氮等营养盐的能力, 为很多研究者所重视, 如李雪晴(2018)、Fivelstad 等(1994)、姚延丹等(2011)等。而对黑鲷循环水养殖模

式的研究尚未见报道, 探究黑鲷循环水养殖中适合的循环率不仅可以提高黑鲷循环水饲养的效率, 同时还可避免能源浪费。

水产动物生活的水环境中有着丰富的微生物群落, 其对去除有害营养盐, 维持水环境稳态具有重要作用。当养殖环境水体理化性质改变时, 微生物群落结构会相应产生变化(Moriarty, 1997; Sugita *et al*, 2005; Balc á zar *et al*, 2006)。基于 16S rRNA 的高通量测序技术, 主要基于细菌 16S rRNA 基因在功能上的高度保守性以及对应序列不同位点的高变性, 能够真实全面地反映样品中微生物群落结构的基本特征, 检测到纯培养和其他非培养技术未能发现的低丰度微生物种类(汤学敏等, 2012; Chen *et al*, 2018;

* 国家自然科学基金项目, 31872586 号; 浙江省自然科学基金项目, LY18C190008 号; 宁波市科技攻关项目, 2017C110003 号。李卢国, 硕士研究生, E-mail: 1059154834@qq.com

① 通信作者: 徐善良, 教授, 博士生导师, E-mail: xushanliang@nbu.edu.cn

收稿日期: 2019-11-08, 收修改稿日期: 2019-12-11

Xu *et al.*, 2019)。这方面的相关研究已有报道, 并发现不同循环率与养殖系统中的细菌群落及多样性具有相关性(Leonard *et al.*, 2000; 姚延丹等, 2011; 张翔等, 2016)。

本文比较了不同循环率下黑鲷循环水养殖系统中水质和菌群结构及其多样性, 旨在为黑鲷的循环水养殖模式推广及健康养殖系统的建立提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 循环水系统构建与试验设计

本实验在象山港湾水产苗种有限公司进行, 黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)幼鱼平均体重 35 ± 10 g, 购自该公司。每个黑鲷循环水养殖系统由 500L 养殖圆桶和一个生物过滤桶通过出入水管组装而成。实验共设计 3 个循环率实验组, 每组 3 个重复共 9 个系统。每个养殖系统水体 300L, 黑鲷幼鱼放养密度为 6.5kg/m^3 。低循环率组(A), 4 次/天; 中循环率组(B), 8 次/天; 高循环率组, 12 次/天(C)。

实验鱼在各自调节好流速的实验桶中暂养 5d 后开始实验, 实验周期为 6 周。实验期间, 水温 $18^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$, 连续充气, $\text{DO} \geq 5.9 \text{mg/L}$, 盐度 25 ± 1 , $\text{pH} 7.3 \pm 0.2$, 自然光照。投喂海龙牌海水鱼饲料(粗蛋白 $\geq 44\%$, 粗脂肪 $\geq 5\%$)。每天上午 9:00 和下午 16:00 各投喂 1 次, 日投喂量为鱼体重的 1%。每天上午投喂前进行吸污, 并补水 10% 左右。

1.2 样品采集

1.2.1 水样采集 分别在实验开始第 2、7、14、21、28、35、42 天采集水样。在上午投喂后 4h, 分别用 500mL 水样瓶从每个系统的养殖桶和过滤桶出水口采集水样, 及时带回实验室用于分析氮磷营养盐指标。

1.2.2 微生物样品采集 在实验中期的第 3 周(第 21 天), 分别采集三个实验组养殖桶水样中微生物(A1、B1、C1)和生物过滤桶中的微生物(A2、B2、C2)样品。分别在每个养殖桶采集 1L 水样, 同时每个过滤桶中取滤料上的微生物样品, 每个滤桶样品约 20g, 将滤料剪碎放入 50mL 离心管, 注入 PBS 缓冲液震荡, 使微生物脱离滤料表面, 收集水样。然后将养殖桶水样和过滤桶样品, 用 $0.22 \mu\text{m}$ 的无菌纤维素滤膜真空抽滤, 将抽滤后的滤膜取出放置于 10mL 的无菌离心管中, -80°C 冰箱保存待送测。

1.3 氮磷营养盐检测

水质指标氨氮(NH_3)、亚硝酸盐(NO_2)、硝酸盐(NO_3)、磷酸盐(PO_4)、总氮(TN)、总磷(TP)。按照 GB/T 12763.4-2007 海洋调查规范测定各水样营养盐含量(中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局等, 2008)。经 $0.45 \mu\text{m}$ 纤维滤膜抽滤取 25mL 水样滤清液进行分析, 每个水样三个重复。

1.4 DNA 提取及扩增测序

利用水体环境基因组提取试剂盒 Water DNA kit (Omega)对样本的基因组 DNA 进行提取 1.5%琼脂糖凝胶电泳进行质量检测。以获取的 DNA 为模板, 用 16S rRNA V3—V4 区保守区通用引物进行 PCR 扩增。PCR 产物使用 2%浓度的琼脂糖凝胶进行电泳检测并剪切纯化回收产物后建库并测序。测序由诺和致源生物信息公司完成。

1.5 生物信息学分析

对测序数据的预处理: (1) 通过Cutadapt低质量部分剪切reads, 比对Barcode区分出样品分类数据, 经简化得到原始数据(raw reads); (2) 为了得到有效数据(clean reads), 还需根据物种注释数据库比对 Reads序列去除其中的嵌合体序列; (3) 各样品OTUs (Operational Taxonomic Units)是通过Uparse软件以 97%的一致性将clean reads聚类, 其后而成。

统计分析: (1) 对OTUs序列进行物种注释分析得到各样本在各分类水平上的群落组成。(2) 最后以样品中数据量最少的为标准对各样品的数据均一化处理, 所得的数据通过Qiime软件(Version 1.9.1)计算各样品数据的多样性指数和Unifrac距离、构建UPGMA样本聚类树。使用R软件(Version 2.15.3)绘制PCoA图。(3) 对于环境因子关联分析, 使用vegan包对环境因子进行CCA分析。

2 结果与分析

2.1 不同循环率对水质指标的影响

三个循环率组的水质因子变化如图 1 所示, 活性磷酸盐浓度的变化范围在 $0.7\text{—}4.61 \text{mg/L}$, 其浓度随着循环率的增大有上升趋势, 随着养殖时间的延长, 三个流量组的变化规律一致, 呈逐渐上升的趋势。亚硝酸盐浓度的变化范围在 $0.08\text{—}0.95 \text{mg/L}$, 在实验期间三个流量组之间亚硝酸浓度并没有显著性差异($P > 0.05$), 3 组的变化规律也相似, 都先上升后下降的趋势, 在 21d 时达峰值; 硝酸盐浓度的变化范围在

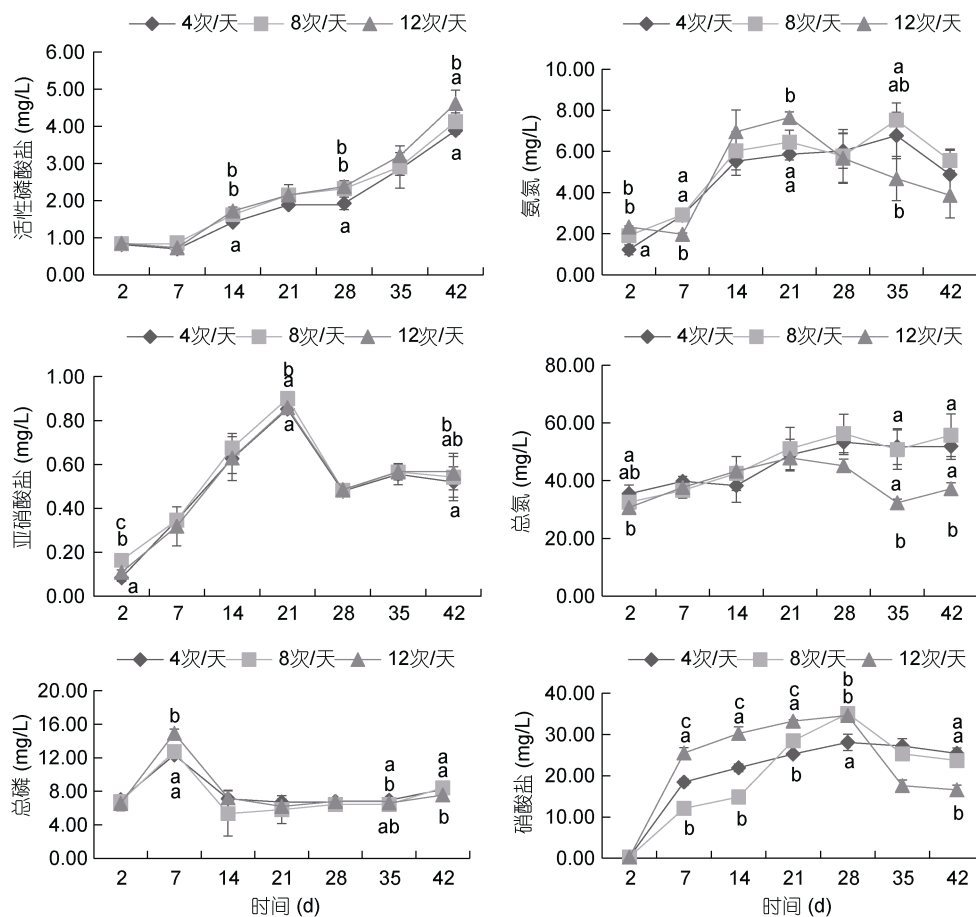


图1 各实验组营养盐浓度

Fig.1 The nutrient concentration of different experimental groups

注: 数据上标不同表示组间存在显著差异($P < 0.05$)

0.31—35.05mg/L, 在实验早期浓度波动较大, 在实验末高流量组显著低于低中流量组($P < 0.05$); 氨氮浓度的变化范围在 1.22—7.65mg/L, 在实验第 14 天和第 21 天时, 高流量组氨氮浓度大于其他两组, 而在第 28 天后, 高流速组氨氮浓度均在中低流速组之下, 其中第 35 天时, 差异显著($P < 0.05$)。总氮的变化范围在 30.69—56.32mg/L, 高流速组总氮含量在第 21 天后开始下降, 低、中流速组则呈逐渐上升趋势; 总磷的变化范围在 5.34—14.92mg/L, 3 组变化趋势相同, 呈现先上升后下降的趋势, 在第 7 天达到最大值。

2.2 细菌群落 α 多样性分析

通过对测序结果整理分析, 经过均一化的处理后, 如表 1 所示, 6 个样品最后得到有效序列在 52418—80137 条之间, 序列平均长度在 402—408bp 之间, 各组获得的有效 OTU 数量平均值为 357.16, 其中各流量组养殖桶中的水环境 OTU 少于平均值, 生物桶中滤料上的 OTU 则多于平均值, 说明生物过滤桶中细

菌丰富度更高。物种丰富度指数 chao1、ACE、shannon 指数显示, 生物过滤桶中的细菌群落丰富度和多样性均高于养殖桶, 其中, 高流量组和中流量组的生物过滤桶中细菌群落的丰富度和多样性要低于低流量组的。而在高流量组和中流量组的养殖桶中细菌群落的丰富度和多样性却高于低流量组的。三个实验组样品的测序覆盖率都超过了 0.99, 说明测序数据覆盖了大部分 OTU, 能很好地反映物种多样性。

2.3 细菌群落结构分析

选取每个样本门水平(Phylum)上最大丰度排名前 10 的物种, 生成物种相对丰度柱形累加图, 6 个样品中的物种注释结果如图 2 所示, 可以看出各样品细菌群落结构组成比较相似, 但同一类群的相对丰度存在较大区别。各样品中细菌种群主要分布在变形菌门(Proteobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes), 在 6 个样品中所占的比例分别为 58%—86%和 8%—19%, 其他几个优势菌门分别是放线菌门(Actinobacteria,

0.8%—14%)、疣微菌门(Verrucomicrobia, 0.5%—3%)、厚壁菌门(Firmicutes, 0.2%—2%)等。

在属水平上, 选取最大相对丰度排名前 30 的物种, 生成如图 2 所示柱型累加图。在 6 个样品中 *Lentibacter* (0.3%—19%)、*Marivita* (0.09%—17%)、*Donghicola* (0.1%—15%)、*Sulfitobacter* (1%—12%)、*Ruegeria* (0.09%—11%) 5 个属的相对丰度最高, 其中来自红细菌科(Rhodobacteraceae)的 *Lentibacter* 和 *Marivita* 在养殖桶中占比(8%—19%, 3%—17%)明显高于过滤桶中的(0.3%—1%, 0.09%—0.7%)。

表 1 细菌群落多样性指数

Tab.1 The diversity index of bacterial communities

样品	有效序列	OTU	Chao1 指数	ACE 指数	香农 指数	测序覆盖 率
A1	80137	265	334.512	338.572	4.189	0.998
B1	80108	300	373.077	373.71	4.617	0.998
C1	52418	353	375.021	379.518	4.732	0.999
A2	80038	438	474.833	469.108	6.024	0.999
B2	80083	398	426.826	432.182	5.476	0.999
C2	68400	389	440.771	442.323	5.895	0.998

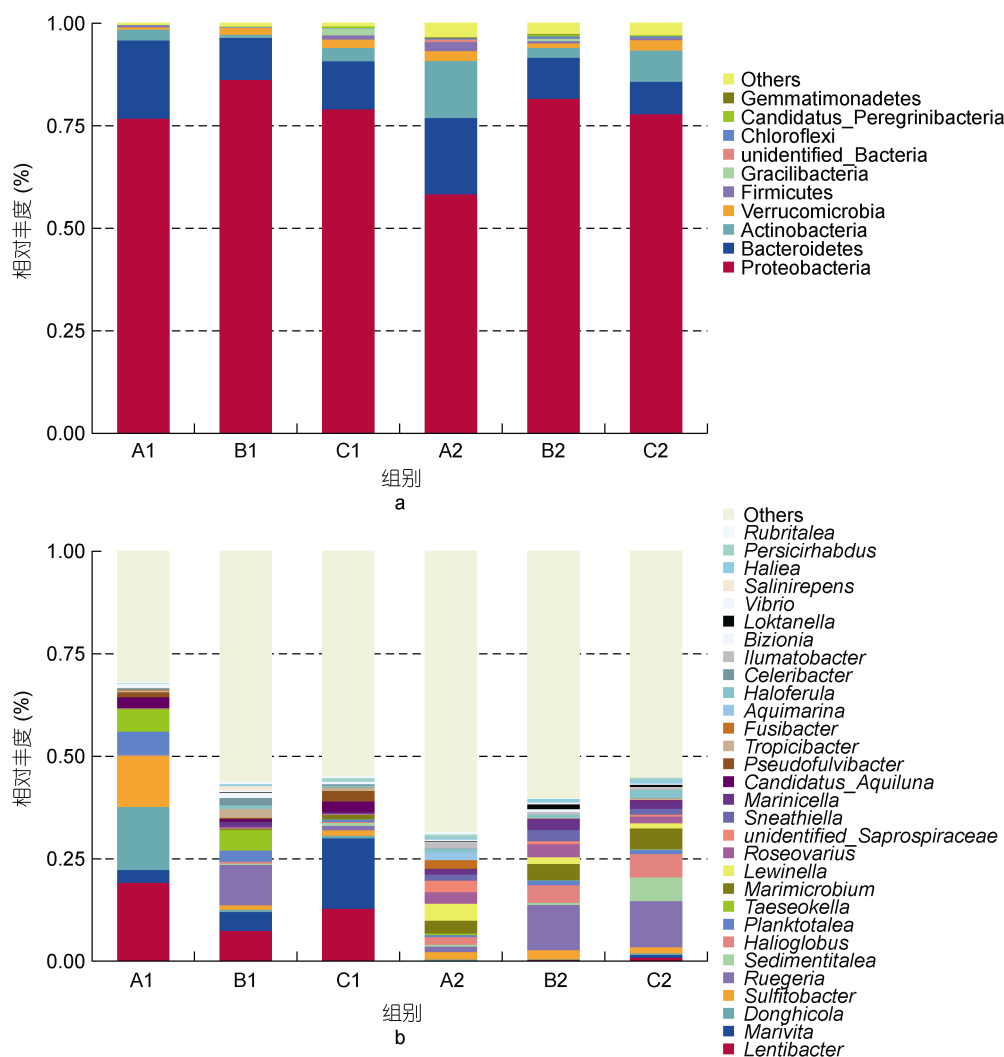


图 2 门水平(a)和属水平(b)上各样品细菌群落结构组成

Fig.2 Bacterial community composition of each samples at levels of phylum (a) and genus (b)

根据所有样本在属水平的物种注释及丰度信息, 选取丰度排名前 35 的属, 根据其在每个样本中的丰度信息进行聚类。聚类热图如图 3 所示, 可以看出 3 组

系统环境微生物中, 随着流量的上升, 斯氏弓形菌属(*Arcobacter*, 0.51%)、小纺锤状菌属(*Fusibacter*, 2.2%)、*Aquimarina* (2.1%)、弧菌属(*Vibrio*, 1.3%)、硫酸盐杆菌

属(*Sulfitobacter*, 14%)、*Donghicola* (15.3%)相对丰度明显下降。而中、高流速组系统分别在系统内部环境微生物中少数几种属丰度明显升高, 中流量中包括陆丹氏菌属(*Loktanella*, 1.2%)、*Bizionia* (1.7%)、*Salinirepens* (1.1%)、乙醇速生杆菌属(*Celeribacter*, 2%)、*Tropicibacter* (2.1%); 高流量组中包括 *Sedimentitalea* (6.7%)、*Haloferula* (2.5%)、*Marivita* (17.7%)。另外, 筛选出若干丰度不高, 但对水环境净化以及对水生物病害防控起到重要作用的功能性细菌以及对鱼体存在潜在致病性的细菌, 如图 4 所示。可以看出, 样品中可检测到的条件致病菌为链球菌属(*Streptococcus*)。参与氮循环及与硝化功能相关的属包括亚硝化单胞菌属

(*Nitrosomonas*)、黄杆菌属和蓝细菌(*unidentified-Cyanobactia*)。具有还原硫酸盐功能的属假单胞菌属(*Pseudomonas*)。具有调控水体微生物及病害防控功能的属乳杆菌属(*Lactobacillus*)。其中, 链球菌属的相对丰度随流量的升高而上升, 由 0.075%上升至 0.41%。亚硝化单胞菌属的相对丰度随流量的升高先下降后上升, 变化范围在 0.003%—0.023%。黄杆菌属和蓝细菌的相对丰度都随流量的升高而上升, 分别由 0.09%上升至 0.3%和由 0.07%上升至 0.16%。假单胞菌属的相对丰度随流量的上升先上升后下降, 变化范围在 0.08%—0.2%。乳杆菌属的相对丰度则随流量的上升先下降后上升, 变化范围在 0.19%—0.5%。

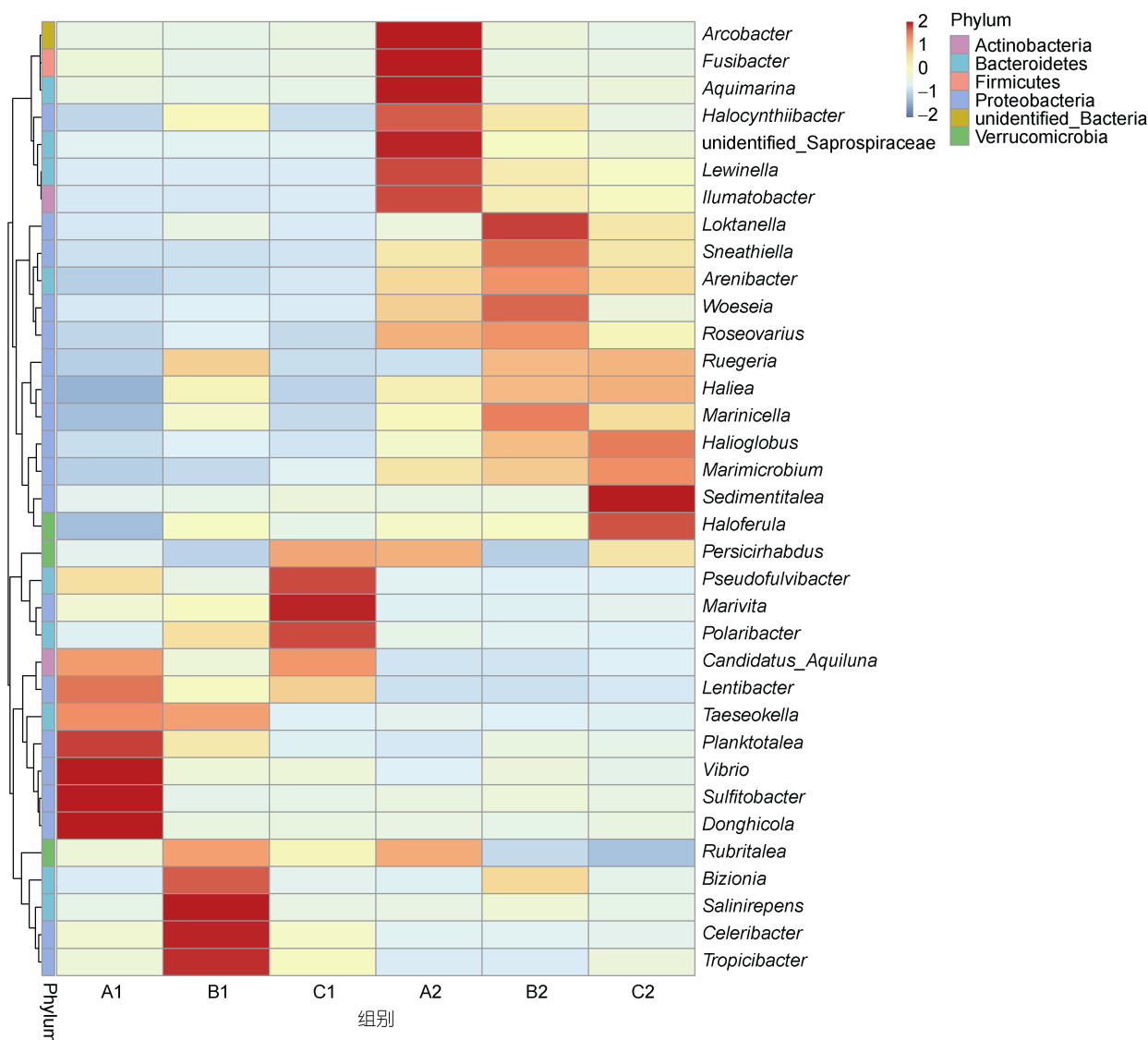


图 3 各样品优势细菌物种丰度热图

Fig.3 Heatmap of the dominant bacteria in water samples of each samples

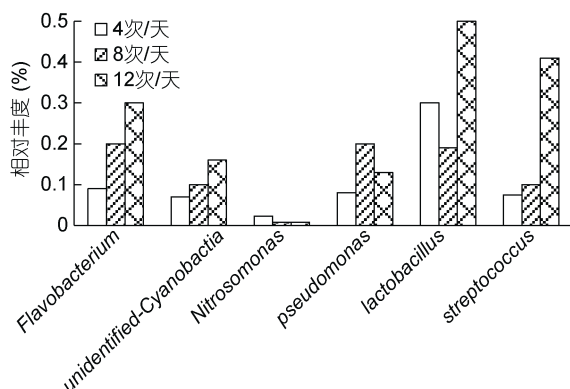


图4 各组细菌特定属相对丰度变化

Fig.4 Relative abundance changes of specific genus of each group

2.4 细菌群落相似性分析

主坐标分析(PCoA, Principal Co-ordinates Analysis),

是通过一系列的特征值和特征向量排序从多维数据中提取出最主要的元素和结构, 是一种研究数据相似性或差异性的可视化方法。本研究, PC1 贡献率为 70.25%, PC2 贡献率为 18.06%, 累计贡献率达到了 88.31%。由图 5a 显示, 三个流量组的养殖水环境和生物过滤桶中的细菌群落存在明显差异。随着流速的升高, 其养殖桶中细菌群落结构不发生明显的改变, 而生物过滤桶中的细菌群落随着流速的上升, 中、高流速组相较于低流速组细菌群落结构发生了较明显的变化。

对 6 个样本细菌群落结构进行聚类分析, 构建如图 5b 所示的聚类树。结果显示, 三个流速组的养殖桶菌群落聚为一类, 与 3 个流速组的生物过滤桶菌群有较大差异。在三组养殖桶菌群结构中, 中流量组又与低、高流量组有所不同; 而在各组生物过滤桶中, 低流速组则与中和高流速组有所差异。

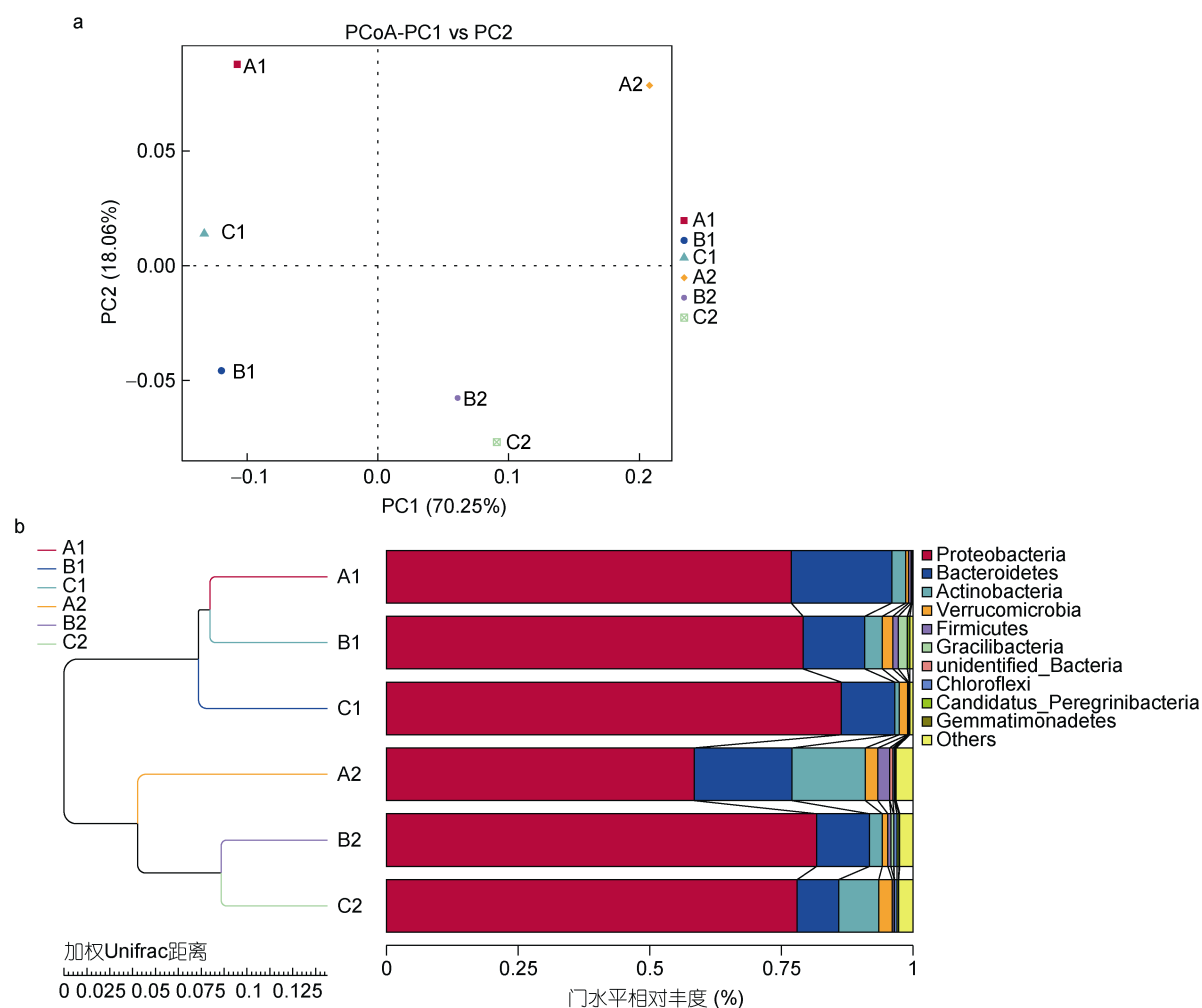


图5 细菌群落主坐标分析图(a)和聚类分析图(b)

Fig.5 PCoA (a) and cluster (b) analysis plots of bacterioplankton

2.5 细菌群落与环境因子的相关性分析

菌群结构与环境因子的相关性结果可由多元直接梯度分析(CCA 分析)所得, 该分析方法可反映整体菌群数据与实验环境因子的关系, 并进一步得到影响样本分布的重要环境驱动因子。从表 2 可以看到细菌与环境之间的关系累积变化值达到了 65.31%(第一排序轴 CCA1 和第二排序轴 CCA2 贡献率之和), 表中 r^2 代表了环境因子对物种分布的决定系数, 其值与环境因子对物种分布影响程度呈正相关。Pr 表示相关性的显著性检验。6 个环境因子中, 总磷、活性磷酸盐、亚硝酸盐和总氮含量与细菌群落丰富度和多样性密切相关。其中 TN、TP 与第一排序轴呈正相关, 其他营养盐与其呈负相关。但是总体而言, 这 6 个营养盐因子与菌群的分布无显著性影响($P>0.05$)。

表 2 环境因子与细菌群落相关性

Tab.2 Correlation between environmental factors and bacterial communities

理化因子	CCA1	CCA2	r^2	Pr(>r)
PO_4^{3-} -P	-0.046	-0.999	0.524	0.283
NO_2^- -N	-0.331	-0.944	0.624	0.214
NO_3^- -N	-0.119	-0.993	0.156	0.760
NH_4^+ -N	-0.020	-1.000	0.074	0.885
TN	0.359	-0.933	0.517	0.292
TP	0.469	0.883	0.831	0.072

3 讨论

循环率是循环水养殖系统中一个重要的技术参数, 适合的流量不仅有助于生物滤桶内基质的扩散和接触, 还可促进氨氧化菌的生长。Franco-Nava 等(2004)和曹涵(2008)认为一定的流速会提高生物滤器的去除能力从而改善水质。本研究中, 三个实验组水质营养盐浓度检测结果显示, 在实验后期高流量组对氨氮和总氮的去除能力明显比其他两组强, 氨氮属于有害营养盐, 而总氮与水体有机物含量密切相关(Klausmeier *et al*, 2004; 文世勇等, 2009)。这表明, 在系统运行稳定后, 高流量组对氨氮的去除能力及对水质的净化效果较其他两组更佳。在第 21 天的生物膜菌群也显示出中、高流量组中优势菌种氨氧化菌属 *Ruegeria* 相对丰度(21%, 12%)要明显高于低流速组(1.09%), *Ruegeria* 是 α -Proteobacteria 纲中 Rhodobacteraceae 红杆菌科中的一种紫色非硫菌, 可通过氨化作用降低水中化学需氧量(COD)(钦颖英等, 2007; 黄志涛等, 2016)。但在实验中期(21d), 高流速

组的氨氮含量却显著高于其他两组, 这可能跟高流速组黑鲷摄食能力更强, 日投饵量和代谢能力要高于其他两组, 加之功能菌群的滞后行使净化功能有关。另外, 在分析实验中期的 3 组系统环境菌群结构中发现高流速组中具有固氮作用功能菌属蓝细菌(*unidentified-Cyanobacteria*)的丰度升高以及具有硝化作用功能的亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)丰度下降, 也造成了该时期高流量养殖系统中的氨氮更严重得积累。有研究表明循环水系统中溶解氧浓度会随流量的升高而升高(李雪晴, 2018), 在低流量下, 更易形成区域缺氧环境, 可能发生活跃的脱氮作用, 使环境硝酸盐含量降低, 并有利于具有脱氮作用的兼性厌氧菌的生长。本研究中低流速组的硝酸盐含量在第 21 天时显著低于其他两组, 可能原因就在于此, 并发现了低流量组优势菌种中具有反硝化功能的兼性厌氧菌的相对丰度要明显高于其他两组, 包括了斯氏弓形菌属(*Arcobacter*)、*Woeseia* 和 *Donghicola*。结合三组氨氮及亚硝酸盐浓度都在第 21 天开始下降, 推断三个流量组的生物过滤桶循在此时间点开始建立稳态的细菌生物膜并能有效地净化水质。随后, 对各实验组进行环境菌群取样, 分析三组之间细菌群落结构和多样性的差异以及其与环境因子相互关联分析。

鉴于微生物在海洋生态系统中的重要性, 微生物生态学的关键问题之一是微生物群落如何响应环境的变化。周洪玉等(2017)研究指出, 养殖环境中细菌群落的高多样性更有利于水体稳态, 减少病害的暴发。姚延丹等(2011)对比人工湿地-池塘养殖系统和传统养殖池塘的水体生物特征, 发现随着循环水的流量增大, 水环境中的细菌多样性也随之提高(姚延丹等, 2011)。本研究中, Alpha 多样性分析结果显示, 随着流量的增加, 养殖桶中的 OTU 数量随之增加, 这与细菌多样性指数 ACE、Chao1 和 Shannon 指数的变化相同。而生物过滤桶中的 OTU 随着流量的升高呈下降趋势, 且高流量组的细菌多样性指数也比其他两组的要低。以上结果表明, 高流量虽然提高了养殖水环境细菌的多样性和丰度, 但却降低了生物过滤桶中细菌多样性和丰度。分析原因可能是: 已有相关报道表明生物池过滤后的水样中细菌 OTU 总数较过滤前会有所提高(Leonard *et al*, 2000; 张翔等, 2016), 这说明附着在滤料上的细菌会脱落进入水环境中, 而流量的提高会时细菌更容易脱落(姚延丹等, 2011)。但总体而言, 高流量组养殖水环境和生物滤桶

中 OTU 数量之和(496)大于低流量组的 OTU 总数(486)和中流量组的 OTU 总数(460)。说明高流量更有利于水体稳态,使水环境中的高浓度有害营养盐更快通过硝化作用回归正常值,这与在第 21 天后的水质结果基本相似。另外,本实验中,对比了 3 组系统养殖桶和循环桶中优势菌群的相对丰度发现,属上相对丰度最高且无运动能力的 4 个属 *Lentibacter*、*Marivita*、*Donghicola*、*Sulfitobacter* 在养殖桶中占比(最高分别是 19%, 17%, 15%, 12%)要明显高于循环桶(最高分别是 1%, 0.7%, 0.4%, 1%),这是否与无运动能力的细菌遇到水流的作用更易脱落进入养殖桶中有关还需要进一步研究。

对海洋微生物群落的研究表明, *Proteobacteria* 和 *Bacteroidetes* 是世界各地不同季节海水中的主要微生物群体(Gilbert *et al*, 2009; Tinta *et al*, 2015)。在淡水生境中,许多关于河流、湖泊和水库沉积物中细菌群落的报道已经显示出来类似的结果(Cheng *et al*, 2014)。在本研究中,3 个流量组中不管是养殖桶还是生物过滤桶中, *Proteobacteria*(58%—86%)丰度都是最高的。伴随着流量的提高,3 个组总体 γ -*Proteobacteria* 丰度也随之升高。据文献报道, γ -*Proteobacteria* 类群广泛存在于循环水健康养殖池及一些鱼类的皮肤、腮、肠道中(Roeselers *et al*, 2011),且养殖水体好坏的与其丰度存在正相关,丰度越高越有利于养殖动物的健康生长(Hu *et al*, 2007; Schreier *et al*, 2010; 吴越等, 2017)。

有研究表明,环境微生物的分布存在显着的区域差异,具有类似功能的微生物往往聚集在一起(Xu *et al*, 2019)。本研究中,三组流量组系统中丰度相似的优势属有 9 个。包括 *Marinicella*、*Roseovarius*、*Rubritalea*、*Lentibacter* 等功能性有益菌。另外 14 个优势属在三组系统中差异较大。其中,低流量组优势属有 6 个,包括条件致病菌斯氏弓形菌(*Arcobacter*)和弧菌属(*Vibrio*),弧菌可引起大规模水产疾病发生并造成严重死亡(Higgins *et al*, 2007; Zhang *et al*, 2013); 中流量组优势属有 5 个,包括可降解多环芳烃的乙醇速生杆菌(*Celeribacter*)、*Tropicibacter*; 高流量组优势属有 3 个,包括可生产细菌叶绿素 *a* 的 *Marivita*。说明流量的变化会使环境微生物结构产生一些差异。通过聚类分析也可看出这一现象,三组生物过滤桶细菌群落相似性要高于过滤桶和养殖桶之间的相似性,说明在过滤桶这样更为复杂的环境中,由于溶氧、光照、有无附着滤料等条件制约下,会形

成与养殖桶截然不同的细菌结构,这与吴越等(2017)的研究发现相一致。在过滤桶中,中、高流量组细菌群落聚为一类。暗示了流量的升高会使生物滤膜趋向于选择和形成相似的细菌结构。而在低丰度菌群中,黄杆菌属(*Flavobacterium*)、*Haloferula* 和 *Lactobacillus* 有益菌在高流量组系统中占比相较于其他两组更高,假单胞菌属(*Pseudomonas*)则在中流量组更高。有研究表明 *Flavobacteriu* 能在某些条件下将硝酸盐转化为各种还原性产物,可降低养殖水体含氮量(Ma *et al*, 2013; McBride, 2014; 张海耿等, 2017); *Haloferula* 属于绿弯菌门,其可通过自身生产的细菌叶绿素 *a* 进行光合作用(黄志涛等, 2016); *Lactobacillus* 代谢可以产生有机酸、细菌素、过氧化氢、双乙醚等多种天然抑菌物质,具有调节水体菌群平衡,并可提高鱼体免疫力等多种功能(韩俊华, 2003)。假单胞菌属(*Pseudomonas*)可通过还原的硫酸盐来降低水体硫的含量。通过 CCA 分析,发现环境因子和微生物种群之间相关性并没有显著相关性,分析其原因可能是实验期间只探究了其实验中期一个时间点水质与环境微生物的相关性($P>0.05$),会因为样本量过少造成相应的误差。

4 结论

综上所述,在本实验循环水条件运行过程中,3 个循环率组养殖桶中氨氮和亚硝态氮浓度均在实验开始后第 21 天开始下降,说明 3 个组生物膜在第 21 天都已经挂膜稳定。3 个循环率组养殖桶中菌群结构差异不明显,而与 3 组过滤桶生物膜中菌群结构有较大差异,且随着循环率增大,生物膜中细菌结构也发生较明显的改变。其中有益菌属 *Marivita*、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、*Ruegeria* 和 *Haloferula* 等在高循环率组中占比变高,而潜在致病菌斯氏弓形菌(*Arcobacter*)和弧菌属(*Vibrio*)在中、高循环率组中占比变低。通过分析水样中营养盐与群落分布的相关性发现,总磷、总氮、活性磷酸盐和亚硝酸盐含量虽然与细菌群落丰度和多样性密切相关,但没有显著性差异。本研究全面了解了不同循环率下养殖桶和循环桶中细菌群落结构和多样性。但由于微生物挂膜应该是一个动态的过程,而此次试验仅在实验中期一个时间点采样,今后应该研究增大采样时间点(比如实验系统运行后的前、中、后期)来改进,全面了解水体各功能群体动态变化。

参 考 文 献

- 王 威, 曲克明, 朱建新等, 2012. 3 种滤料生物滤器的挂膜与黑鲷幼鱼循环水养殖效果. 中国水产科学, 19(5): 833—840
- 王 峰, 雷霖霖, 高淳仁等, 2013. 国内外工厂化循环水养殖研究进展. 中国水产科学, 20(5): 1100—1111
- 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会, 2008. GB 17378.4-2007 海洋监测规范 第 4 部分: 海水分析. 北京: 中国标准出版社
- 文世勇, 赵冬至, 赵 玲等, 2009. 基于氮磷比的赤潮灾害危险度评估方法研究. 中山大学学报(自然科学版), 48(2): 84—89
- 朱德芬, 1993. 沿海鱼池黑鲷养殖试验. 水产学报, 17(1): 64—67
- 汤学敏, 郑 江, 郝聚敏等, 2012. 现代微生物识别技术在水产养殖环境研究中的应用. 微生物学通报, 39(6): 835—842
- 李雪晴, 2018. 循环水养殖系统中水流速度及多营养级复合养殖的实验研究. 青岛: 青岛理工大学硕士学位论文
- 吴 越, 马建忠, 郑伊诺等, 2017. 石斑鱼循环水养殖系统微生物群落结构. 中国水产科学, 24(5): 1045—1054
- 张 翔, 闫茂仓, 肖国强等, 2016. 虾-贝-红树林耦合循环水养殖系统中微生物群落分析. 水生生物学报, 40(3): 557—564
- 张海耿, 宋红桥, 顾川川等, 2017. 基于高通量测序的流化床生物滤器细菌群落结构分析. 环境科学, 38(8): 3330—3338
- 周洪玉, 韩梅琳, 仇天雷等, 2017. 不同生物过滤系统铵态氮转化速率及生物膜特性分析. 环境科学, 38(6): 2444—2451
- 钦颖英, 李道棠, 杨 虹, 2007. 给水生物预处理反应器的细菌种群多样性和群落结构. 应用与环境生物学报, 13(1): 104—107
- 姚延丹, 李 谷, 陶 玲等, 2011. 复合人工湿地-池塘养殖生态系统细菌多样性研究. 环境科学与技术, 34(7): 50—55
- 黄志涛, 宋协法, 李 勋等, 2016. 基于高通量测序的石斑鱼循环水养殖生物滤池微生物群落分析. 农业工程学报, 32(S1): 242—247
- 曹 涵, 2008. 循环水养殖生物滤池滤料挂膜及其水处理效果研究. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文
- 蒋万钊, 2011. 黑鲷养殖实用技术研究. 河北渔业, (9): 22—23
- 韩俊华, 2003. 嗜酸乳杆菌的益生特性及其在乳品中的应用. 保定: 河北农业大学硕士学位论文
- Balcázar J L, De Blas I, Ruiz-Zarzuela I *et al*, 2006. The role of probiotics in aquaculture. Veterinary Microbiology, 114(3—4): 173—186
- Chen X Y, Shao T Y, Long X H, 2018. Evaluation of the effects of different stocking densities on the sediment microbial community of juvenile hybrid grouper (♀ *Epinephelus fuscoguttatus* × ♂ *Epinephelus lanceolatus*) in recirculating aquaculture systems. PLoS One, 13(12): e0208544
- Cheng W, Zhang J X, Wang Z *et al*, 2014. Bacterial communities in sediments of a drinking water reservoir. Annals of Microbiology, 64(2): 875—878
- Fivelstad S, Binde M, 1994. Effects of reduced waterflow (increased loading) in soft water on Atlantic salmon smolts (*Salmo salar* L.) while maintaining oxygen at constant level by oxygenation of the inlet water. Aquacultural Engineering, 13(3): 211—238
- Franco-Nava M A, Blancheton J P, Deviller G *et al*, 2004. Effect of fish size and hydraulic regime on particulate organic matter dynamics in a recirculating aquaculture system: elemental carbon and nitrogen approach. Aquaculture, 239(1—4): 179—198
- Gilbert J A, Field D, Swift P *et al*, 2009. The seasonal structure of microbial communities in the Western English Channel. Environmental Microbiology, 11(12): 3132—3139
- Higgins D A, Pomianek M E, Kraml C M *et al*, 2007. The major *Vibrio cholerae* autoinducer and its role in virulence factor production. Nature, 450(7171): 883—886
- Hu Z Y, Li Y, 2007. *Pseudidiomarina sediminum* sp. nov., a marine bacterium isolated from coastal sediments of Luoyuan Bay in China. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57(11): 2572—2577
- Klausmeier C A, Litchman E, Daufresne T *et al*, 2004. Optimal nitrogen-to-phosphorus stoichiometry of phytoplankton. Nature, 429(6988): 171—174
- Leonard N, Blancheton J P, Guiraud J P, 2000. Populations of heterotrophic bacteria in an experimental recirculating aquaculture system. Aquacultural Engineering, 22(1—2): 109—120
- Ma J X, Wang Z W, Yang Y *et al*, 2013. Correlating microbial community structure and composition with aeration intensity in submerged membrane bioreactors by 454 high-throughput pyrosequencing. Water Research, 47(2): 859—869
- McBride M J, 2014. The family Flavobacteriaceae. In: Rosenberg E, DeLong E F, Lory S *et al* eds. The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and the Archaea. Berlin, Heidelberg: Springer
- Moriarty D J W, 1997. The role of microorganisms in aquaculture ponds. Aquaculture, 151(1—4): 333—349
- Roeselers G, Mittge E K, Stephens W Z *et al*, 2011. Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. The ISME Journal, 5(10): 1595—1608
- Schreier H J, Mirzoyan N, Saito K, 2010. Microbial diversity of biological filters in recirculating aquaculture systems. Current Opinion in Biotechnology, 21(3): 318—325
- Sugita H, Nakamura H, Shimada T, 2005. Microbial communities associated with filter materials in recirculating aquaculture systems of freshwater fish. Aquaculture, 243(1—4): 403—409
- Tinta T, Vojvoda J, Mozetič P *et al*, 2015. Bacterial community shift is induced by dynamic environmental parameters in a changing coastal ecosystem (northern Adriatic, northeastern Mediterranean Sea) - a 2-year time-series study. Environmental Microbiology, 17(10): 3581—3596
- Wold P A, Holan A B, Øie G *et al*, 2014. Effects of membrane filtration on bacterial number and microbial diversity in marine recirculating aquaculture system (RAS) for Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) production. Aquaculture, 422—423:

69—77

Xu H C, Wang L, Bao X Y *et al*, 2019. Microbial communities in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) culture pond and the effects of environmental factors. *Aquaculture Research*,

50(4): 1257—1268

Zhang L L, Orth K, 2013. Virulence determinants for *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Current Opinion in Microbiology*, 16(1): 70—77

EFFECTS OF FLOW RATE ON WATER QUALITY FACTORS AND MICROBIAL COMMUNITY IN RECIRCULATING AQUACULTURE SYSTEM FOR *ACANTHOPAGRUS SCHLEGELII*

LI Lu-Guo¹, LUO Yun-Hui¹, XU Shan-Liang^{1,2}

(1. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Zhejiang Key Laboratory of Marine Bioengineering, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract In order to investigate the effects of flow rate on water quality factors and bacterial community diversity in recirculating aquaculture systems, black cockroach (*Acanthopagrus schlegelii*) was taken as the research object, on which the bacterial community structure, diversity, and the correlation between bacterial communities and environmental factors of the culture barrel and biological filter barrel were studied in three flow rates of 4 (low), 8 (medium), and 12 times/d (high). High-throughput sequencing was used. Results showed that the dominant bacterial groups in the circulatory aquaculture were Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Verrucomicrobia and Firmicutes. The increase of flow rate enhanced the bacterial diversity of the system. The beneficial bacteria capable of purifying water and reducing nutrient salt in high-flow filter bucket were more diverse and richer, with which the system had better effects on removing ammonia nitrogen and total nitrogen and the removal rates were 49.5% and 22.3%, respectively. The ammonia nitrogen removal rate was 2.9 times of the low rate group and 3.6 times of the medium rate group, and the total nitrogen removal rate was 8.2 times of low rate group. Double and 20.5 times of the medium rate group. Results of PCoA analysis and cluster analysis revealed significant differences in bacterial community composition between the culture barrels and the biological filter barrels. In addition, a significant difference was observed in colony structure of the biological filter barrel between the medium-high rate groups and the low rate group. Correlation analysis showed that total phosphorus, active phosphate, nitrite, and total nitrogen had relatively significant effects on bacterial community structure, but no significant correlation was found between the environmental factors and the bacterial community structure.

Key words *Acanthopagrus schlegelii*; recirculating aquaculture; bacterial community; high-throughput sequencing; flow rate