

基于 Biolog-ECO 技术分析杂交鳢和大口黑鲈 高产池塘水体微生物碳代谢特征

李志斐, 谢 骏, 郁二蒙, 王广军*, 余德光, 夏 耘, 王海英, 龚望宝, 魏 南

(农业部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室, 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广州 510380)

摘 要: 为了研究华南地区高产池塘高峰养殖季节微生物群落碳代谢特征, 运用 Biolog-ECO 技术, 分析了华南地区杂交鳢(*Channa maculata* ♀ × *Channa argus* ♂) 和大口黑鲈(*Micropterus salmoides*) 两种养殖池塘的水体微生物群落功能多样性。结果表明: 杂交鳢和大口黑鲈两种池塘不同水层多样性指数(Shannon-Wiener 指数、Simpson 指数和丰富度指数) 存在一定程度的差异, 但在增氧机条件下, 每种池塘的上、中、底 3 水层间水体微生物活性(AWCD) 均无显著性差异($P>0.05$), 且两种池塘间的 AWCD 为杂交鳢池塘强于大口黑鲈池塘; 两种池塘水体微生物对 6 类碳源利用率规律相似, 碳源的代谢利用率由强到弱为碳水化合物类>聚合物类>氨基酸类>羧酸类>胺类>酚类。水体微生物代谢特征 PCA 分析表明, 两种池塘间的样方分布在不同区域, 但池塘间样点间离散程度较大, 表明两种池塘水体微生物存在一定的代谢差异性。决定两种池塘间代谢差异的碳源有: D-半乳糖酸内酯(D-Galactonic Acid Lactone)>D-纤维二糖(D-Cellobiose)>肝糖(Glycogen)>D-木糖(D-Xylose)>L-丝氨酸(L-Serine)。Biolog-ECO 技术可用于分析养殖水体微生物群落碳代谢差异, 以及造成代谢差异的决定因素, 同时可有效识别容易被养殖水体微生物利用的碳源类型。

关键词: Biolog-ECO; 碳源利用; 池塘养殖; 微生物群落代谢; 杂交鳢; 大口黑鲈

中图分类号: X172 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2014)01-0185-08 doi:10.11654/jaes.2014.01.024

Carbon Metabolic Diversity of Microbial Communities in Intensive Ponds for Hybrid Snakehead and Largemouth Bass Based on Biolog-ECO Plates

LI Zhi-fei, XIE Jun, YU Er-meng, WANG Guang-jun*, YU De-guang, XIA Yun, WANG Hai-ying, GONG Wang-bao, WEI Nan

(Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application & Cultivation, Ministry of Agriculture, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Guangzhou 510380, China)

Abstract: Carbon types usually affect microbial carbon metabolism. Carbon metabolic diversity of bacteria in intensive ponds for hybrid snakehead (*Channa maculata* ♀ × *Channa argus* ♂) and largemouth bass (*Micropterus salmoides*) was investigated using the Biolog-ECO plates. The Shannon-Wiener index, Simpson index and richness index were different between two ponds and different water depths. There were no differences for average well color development (AWCD) in water layers of each pond with an aerator, but AWCD was higher in the ponds of hybrid snakehead than of largemouth bass. The most utilized carbon sources by microorganisms were similar in both ponds, and were in order of carbohydrates > Polymers > Amino acids > Carboxylic acids > Phenolic compounds > Amines. The principal components analysis showed that those carbon determining microbial utilization differences in two ponds were as follows: D-Galactonic Acid Lactone > D-Cellobiose > Glycogen > D-Xylose > L-Serine. The results demonstrate that Biology-ECO plates could be useful in differentiating carbon metabolic diversity between microbial communities of fishery water and identifying factors that most influence community variation and substrates that are most utilized by the communities in aquaculture ponds.

Keywords: Biolog-ECO; carbon utilization; pond culture; microbial community metabolism; hybrid snakehead (*Channa maculata* ♀ × *Channa argus* ♂); largemouth bass (*Micropterus salmoides*)

收稿日期: 2013-05-13

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201203083); 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46-17); 广东省海洋渔业科技推广项目(A201201E05); “十二五”农村领域国家科技计划课题(2012BAD25B01)

作者简介: 李志斐(1983—), 男, 河南安阳人。E-mail: lzf262307@163.com

* 通信作者: 王广军 E-mail: wgj5810@163.com

在集约化养殖池塘中,由于养殖鱼类仅吸收投喂饲料中约30%的氮素,剩余70%以氨氮、粪便的形式释放到水体中^[1]。有机碳中的碳素大部分以CO₂的形式从池塘水体中释放出去,氮素仅在厌氧条件下少量以N₂、N₂O的形式释放^[2],最终氮素会以无机氮的形式(氨氮、亚硝酸盐等)积累在水中,从而增加对养殖鱼类的毒性^[3]。以色列学者Avnimelech^[4]提出通过向水体添加碳源培育异养微生物,异养微生物可将无机氮合成转化为自身细菌蛋白,将鱼类不可利用的氮素转化为可以利用的细菌蛋白,再通过鱼类收获的方法,最终将氮素移出池塘水体。碳源类型不同对微生物异养转化效率也不同,其中易降解碳源比稳定碳源更容易促进微生物生长^[5],Otani等^[5]研究发现具有高效脱氮能力的*Alcaligenes faecalis*只能利用醋酸钠或者乙醇做为碳源才会充分去除硝酸。为了掌握养殖池塘水体本底微生物对碳源利用情况,以及找出强化池塘异养微生物的高效碳源,可借助Biolog法来了解池塘微生物群落功能多样性^[6]。李卓佳等^[7-8]利用Biolog技术研究了罗非鱼池塘应用芽胞杆菌对水体微生物群落代谢功能的影响,发现芽胞杆菌可以提高养殖水体微生物活性和多样性指数。田相丽等^[9]利用Biolog技术研究了草鱼混养系统养殖模式下水体微生物群落功能多样性,发现三元混养系统中微生物功能多样性和代谢活性显著高于单养和二元模式。

杂交鳢(*Channa maculata* ♀ × *Channa argus* ♂)和大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)是国内特别是华南地区重要的肉食性养殖鱼类,是华南地区高产池塘养殖的典型,在养殖模式上多为零换水养殖模式,其养殖技术和产量均处于国际领先水平。为了掌握华南地区高峰养殖季节典型高产养殖池塘微生物碳代谢特征,找出池塘微生物代谢规律,选取华南地区典型高产(杂交鳢、大口黑鲈)池塘作为研究对象,运用Biolog-ECO技术,对大口黑鲈和杂交鳢养殖池塘进行水体微生物功能多样性研究,旨在探讨肉食性鱼类高产池塘水体微生物功能多样性的特征,为掌握集约化养殖池塘水体对碳源利用情况及C/N平衡理论提供数据支撑,为提高养殖水体微生物分解和矿化能力提供技术支撑,为养殖水环境修复提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 池塘概况

试验于2012年8月在广东省佛山地区选择杂交鳢和大口黑鲈两种池塘各3口,水源为当地河水,经过滤沉淀后使用。大口黑鲈养殖池塘面积0.467 hm²左右,有效水深2.7 m,养殖容量75 000 kg 鱼·hm⁻²,每日饲喂冰鲜野杂鱼并掺杂少量成品饲料(1500 kg 冰鲜野杂鱼·hm⁻²·d⁻¹);杂交鳢池塘面积0.467 hm²左右,有效水深1.5 m,养殖容量90 000 kg 鱼·hm⁻²,每日饲喂膨化饲料(4500 kg·hm⁻²·d⁻¹)。两种池塘均属于华南地区典型的高产高投入养殖模式,其水体水质基本情况见表1。

1.2 样品采集与 Biolog-ECO 实验

每个池塘分3层采样,分层方法参考文献[10],分别在池中心和四周5点采样,然后混合,每个池塘不同水层各取2个样品,水样保存在50 mL容量的无菌离心管中。所有样品在低温下带回实验室,立即进行Biolog分析。

Biolog技术通过分布于96孔中的碳源底物来分析评价水体微生物生理代谢特征,Biolog™的ECO测试板(ECO MicroPlate,美国Matrix Technologies Corporation)含有3套31种不同碳源(其中氨基酸6种、糖类10种、羧酸7种、聚合物4种、胺类2种和酚类2种),一个板可以测3个重复。将水样按照一定比例用0.9%生理盐水稀释后,倾倒在无菌加样槽中,加样于25℃预热的Biolog-ECO微板中,每孔加入150 mL。将加好样的Biolog-ECO微平板加盖,25℃恒温培养,每隔24 h读取各孔在590 nm波长下的光密度,连续测定8 d,每个样品做3个重复。

1.3 微生物群落功能多样性计算

水体微生物群落利用碳源的整体能力,用平均吸光值AWCD表示,其计算公式为:

$$AWCD = \sum (C_i - R) / n$$

式中: C_i 为所测定的31个碳源孔的吸光值; R 为对照孔的吸光值; n 为培养基碳源总数(本研究为31)。

丰富度指数是指被利用的碳源的总数,为每孔中(C-R)的值大于0.25的孔个数^[11]。

表1 鱼塘水体水质基本情况

Table 1 Physical-chemical characteristics of water in fishponds

养殖模式	水温/℃	透明度/cm	叶绿素 a/mg·L ⁻¹	pH 值	溶解氧/mg·L ⁻¹	总氨氮/mg·L ⁻¹	亚硝酸盐氮/mg·L ⁻¹
大口黑鲈	32.0±0.6	32~38	0.112±0.054	8.0~8.5	4.9~9.3	0.65~0.85	0.15~0.48
杂交鳢	31.2±0.6	18~28	0.287±0.092	7.5~7.8	5.6~11.2	2.62~2.89	0.19~0.36

Shannon-Wiener 指数: $H' = -\sum (P_i \cdot \log P_i)$

式中: P_i 为有培养基的孔和对照孔的光密度值差与整板总差的比值, 即 $P_i = (C_i - R) / \sum (C_i - R)$ [12]。

Simpson 指数 (D) 又称优势度指数, 是对多样性方面的集中性度量, D 称为 Gini 指数 (1921 年 Gini 提出)。

Simpson 指数: $D = 1 - \sum P_i^2$

Pielou 均匀度指数是群落实测多样性与最大多样性的比率。Pielou 均匀度指数计算公式为:

$J_{sw} = H' / \ln S$

式中: S 为被利用的碳源总数。

1.4 数据统计分析

用主成分分析法 (Principal Component Analysis, PCA) 和方差分析 (Analysis of Variance, ANOVA) 确定不同采样点间水中微生物群落结构的相异程度, 统计分析通过 Canoco 4.5 和 SPSS 18.0 统计软件实现。

2 结果与分析

2.1 水样微生物利用碳源动力学分析

2.1.1 不同水层水体微生物平均吸光值 (AWCD) 变化特征

AWCD 随时间的变化可以用来表示微生物的代谢平均活性, 能直观的体现微生物群落反应速度和最终达到的程度。两种池塘水层 (上、中、底) 平均吸光值随培养时间动态变化曲线见图 1, 可以看出两种池塘水体微生物总体变化趋势为: 24 h 内水体微生物活性较低, 24 h 以后随着培养时间延长微生物活性逐步增加, 144 h 后微生物活性趋于平稳。对比两种水体微生物活性强弱可以明显看出养殖水体微生物活性杂交鳊池塘强于大口黑鲈池塘。192 h 时杂交鳊池塘微生物活性为大口黑鲈池塘的 1.25 倍。每种池塘中上、

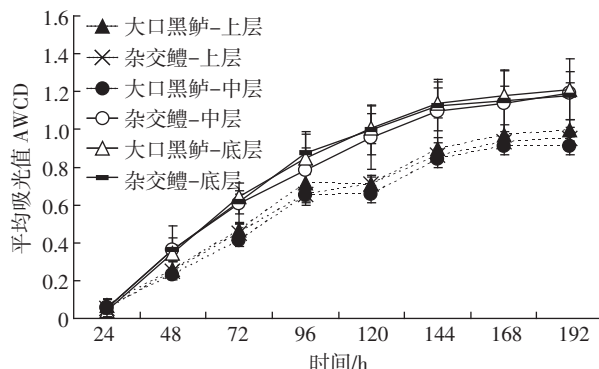


图 1 两种养殖模式水体微生物平均吸光值 (AWCD) 变化特征
Figure 1 Average well color development (AWCD) of the Biolog-ECO plates for two ponds

中、底 3 层水体的 AWCD 没有显著性差异 ($P > 0.05$), 均呈现出相同的变化趋势。

2.1.2 水体微生物对 6 类碳源的利用特征

按化学基团的性质, 将 ECO 板上的 31 种碳源分成 6 类, 即羧酸类、氨基酸类、碳水化合物类、聚合物类、胺类、酚类。将两种池塘不同水层的 6 大类碳源的 C-R 值进行平均, 绘制图 2。由图 2 可知: 从总体代谢活性来看, 大口黑鲈池塘和杂交鳊池塘的水体微生物对 6 类碳源利用由强到弱是: 碳水化合物类 > 聚合物类 > 氨基酸类 > 羧酸类 > 胺类 > 酚类, 平均吸光值均随时间的延长而增强, 两种模式的上、中和底层水体对聚合物类、酚类、氨基酸类和胺类利用率没有明显区别, 而对碳水化合物类和羧酸类的利用率均表现出杂交鳊模式强于大口黑鲈模式。

2.2 水样微生物多样性指数比较分析

根据 ECO 板培养 96 h 光密度数据 (C-R) 值, 计算 96 h 的 Shannon-Wiener 指数、Pielou 均匀度指数、Simpson 指数、丰富度指数, 结果见表 2。从表 2 可以看出, 除 Pielou 指数外, 两种池塘不同水层多样性指

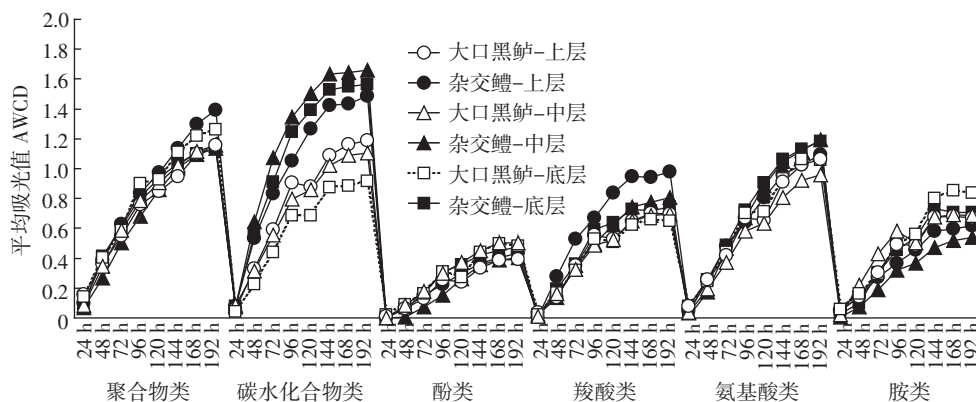


图 2 水体微生物对 6 类碳源的利用特征

Figure 2 Changes in AWCD for six substrate categories

数存在一定的差异。Shannon-Wiener 指数:大口黑鲈模式中层高于底层水体,杂交鳢模式 3 层水体没有明显差异($P>0.05$);Simpson 指数:大口黑鲈模式 3 层水体和杂交鳢模式 3 层水体均没有明显差异($P>0.05$),仅有杂交鳢模式底层水体高于大口黑鲈模式底层;丰富度指数:仅有大口黑鲈模式底层处于最低水平。可以看出杂交鳢池塘不同水层 4 类多样性指数均没有明显差异($P>0.05$),大口黑鲈池塘不同水层在 Shannon-Wiener 指数、Simpson 指数、丰富度指数上存在一定差异,总体表现为底层水体微生物功能多样性处于较低水平。

表 2 不同模式不同水层微生物群落多样性指数

Table 2 Diversity indices of microorganism communities in two ponds at different water depths

模式与水层	Shannon-Wiener 指数	Pielou 指数	Simpson 指数	丰富度指数
大口黑鲈池塘				
上层	3.05±0.05ab	0.97±0.00a	0.993±0.001ab	23.50±0.86b
中层	3.09±0.09b	0.99±0.01a	0.994±0.000ab	23.25±2.84ab
底层	2.85±0.08a	0.99±0.01a	0.992±0.001a	18.25±1.97a
杂交鳢池塘				
上层	3.07±0.07b	0.99±0.01a	0.993±0.001ab	23.16±1.88b
中层	3.00±0.02ab	0.97±0.01a	0.993±0.000ab	21.33±0.84ab
底层	3.14±0.04b	0.99±0.02a	0.994±0.000b	25.50±1.87b

注:同列不同字母表示在 $P<0.05$ 水平上差异显著, $n=3$ 。

Note: Means with different letters in a column indicate significant differences at $P<0.05$. $n=3$.

2.3 水样微生物功能多样性主成分分析

为研究两种模式不同水层微生物群落碳源利用多样性的特点,选择 96 h 作为取样时间点,对 Biolog 测试获得数据进行标准化变换后,应用 Canoco for Windows 4.5 实施主成分分析。分别提取 4 个主成分,第 1 主成分(PC1)为 29.2%,第 2 主成分(PC2)为 12.7%,第 3 主成分(PC3)为 9.2%,第 4 主成分(PC4)为 7.6%,其中前两个主成分累积贡献率达 41.9%。将前两个主成分得分作图,表征不同基质微生物群落碳源代谢特征(图 3);样方间距离的大小表示样方间的相似程度,距离越近相似程度越高。如图 3 所示,两种模式的样方间分布在不同区域,且模式间样点离散程度较大,其中杂交鳢池塘样点主要分布在第二和第三象限,即分布图的左侧,与 PC1 呈负相关;大口黑鲈池塘样点主要分布在第一象限,与 PC1 和 PC2 均呈正相关。

与 PC1 和 PC2 相关性较大的碳源(相关系数 $r>0.5$)如表 3 所示,其中与 PC1 相关性较大的碳源有 6

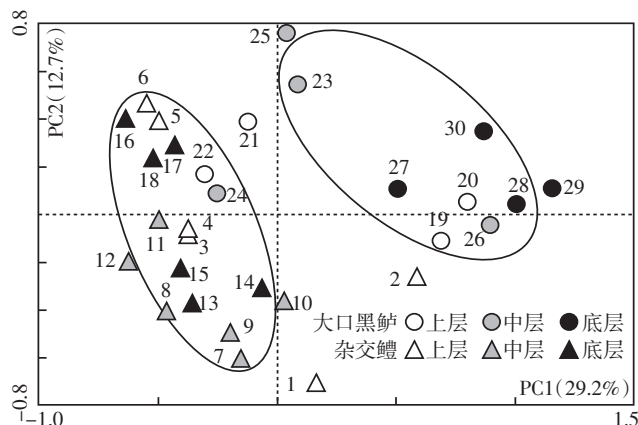


图 3 两种养殖模式水体微生物功能多样性 PCA 分析

Figure 3 Ordination diagrams of CLPPs from Principal component analysis of carbon source utilization profiles of two ponds

种,与 PC2 相关性较大的碳源也有 6 种。表 3 列出了 31 种碳源与前两个主成分之间的相关系数,相关系数越高对于区分样品的差异性越重要,相关系数越高意味着样品之间该碳源利用率差异性越高。在对两种模式 PCA 分析中,发现造成不同模式微生物代谢多样性差异的碳源(按贡献大小)为 D-半乳糖胺内脂>D-纤维二糖>肝糖>D-木糖>L-丝氨酸。同时对于 PC1 来说,微生物代谢差异大部分是在碳水化合物类上,而在 PC2 上代谢差异大部分是从羧酸类和聚合物类反映出来。

表 4 列出了两种养殖模式中利用率较高的碳源和未被利用的碳源,其中杂交鳢模式利用率较高的碳源有 11 种,大口黑鲈为 7 种;未被利用的碳源杂交鳢有 1 种,大口黑鲈 2 种。杂交鳢和大口黑鲈两种模式利用率较高的共同碳源有 6 种,分别为 D-半乳糖醛酸、N-乙酰-D-葡萄糖氨、D-纤维二糖、吐温 40、丙酮酸甲酯、L-天门冬酰胺。两种模式均未利用的碳源有 1 种为 2-羟基苯甲酸。

为了获得大口黑鲈和杂交鳢养殖池塘准确的微生物群落碳源代谢特征,对两种模式的 30 个样点实施聚类分析,并将具有相似代谢特性的碳源进行重新分类(图 4)。由图 4 可以看出,当聚类距离 ≤ 15 时,整个 UPGMA 分为 3 束,第一束由 5 个大口黑鲈样点和 5 个杂交鳢样点组成,第二束全部由 12 个杂交鳢样点组成,第三束由 7 个大口黑鲈样点和 1 个杂交鳢样点组成,3 个聚类束分布特点与 PCA 分析图相呼应。

3 讨论

3.1 不同水层水体微生物碳源利用的空间差异

Biolog 碳源利用平均值 AWCD 可以反映微生物

表 3 不同碳源类型与前两个主成分的相关系数

Table 3 Correlation coefficients of different carbon sources with the first two principal components(PC1 and PC2)

碳源类型	r	
	PC1	PC2
聚合物类		
吐温 40(Tween 40)		0.558 5
吐温 80(Tween 80)		0.540 6
α-环式糊精(α-Cyclodextrin)		
肝糖(Glycogen)	-0.795 9	
碳水化合物类		
D-纤维二糖(D-Cellobiose)	-0.801 1	
α-D-乳糖(α-D-Lactose)		
β-甲基-D-葡萄糖苷(β-Methyl-D-Glucoside)		
D-木糖(D-Xylose)	-0.700 2	
i-赤藓糖醇(i-Erythritol)		
D-甘露醇(D-Mannitol)	-0.617 0	
N-乙酰-D-葡萄糖胺(N-Acetyl-D-Glucosamine)		
D-葡萄糖胺酸(D-Glucosaminic Acid)		0.617 8
α-D-葡萄糖-1-磷酸(α-D-Glucose-1-Phosphate)		
D,L-α-磷酸甘油(D,L-α-Glycerol Phosphate)		
D-半乳糖酸内脂(D-Galactonic Acid Lactone)	-0.827 0	
D-半乳糖醛酸(D-Galacturonic Acid)		
酚类		
2-羟基苯甲酸(2-Hydroxybenzoic Acid)		
4-羟基苯甲酸(4-Hydroxybenzoic Acid)		
羧酸类		
γ-羟丁酸(γ-Hydroxybutyric Acid)		0.563 4
衣康酸(Itaconic Acid)		
α-丁酮酸(α-Ketobutyric Acid)		0.568 1
D-苹果酸(D-Malic Acid)		0.508 5
丙酮酸甲酯(Pyruvic Acid Methyl Ester)		
氨基酸类		
L-精氨酸(L-Arginine)		
L-天门冬酰胺(L-Asparagine)		
L-苯基丙氨酸(L-Phenylalanine)		
L-丝氨酸(L-Serine)	-0.554 3	
L-苏氨酸(L-Threonine)		
甘氨酸-L-谷氨酸(Glycyl-L-Glutamic Acid)		
胺类		
苯乙胺(Phenylethylamine)		
腐胺(Putrescine)		

群落对单一碳源的整体能力,它提供了在相同碳源下不同微生物对碳源利用相比较的可能性^[13]。从图 1 对比同一模式 3 层水体的 AWCD 得出,上、中、底 3 层水体的 AWCD 没有显著性差异($P>0.05$),且呈现出相同变化趋势。两种模式水源均来自珠江水系的西江,Gao 等^[14]对西江水体碳源调查中发现西江相同季节水体理化性质存在一定的同源性,因此本实验调查的两种池塘的水源存在一定的相似性。本实验中两种池塘空间上水体微生物 AWCD 总活性表现出的无差异现象,表明同一养殖模式下养殖水体在空间上微生物代谢活性没有太大差异,这一现象与实际生产中使用大功率增氧机、耕水机等设备有直接关系,增氧机在增氧的同时也增加了池塘上下水层的搅动,可以消除池塘的氧跃层和温跃层^[15],再加上高密度池塘中鱼类活动对水体的带动使得池塘水体充分混合,因此本实验所调查池塘均出现不同水层水体的 AWCD 没有显著性差异的现象。

3.2 养殖模式间水体微生物碳源利用的差异

微生物群落的代谢能力是影响有机废物减量化、资源化的关键因素^[16-17],由两种养殖模式间水体微生物碳源总体利用能力(AWCD)对比发现,两种水体微生物活性杂交鳢池塘强于大口黑鲈池塘,实验结束时,杂交鳢池塘总体活性为大口黑鲈池塘的 1.25 倍,表明了杂交鳢池塘微生物群落对碳源的总体利用能力强于大口黑鲈养殖模式,预示杂交鳢池塘微生物污染物氮素的净化效率更高效^[18]。

通过 Shannon-Wiener 指数、Simpson 指数、Pielou 指数和丰富度指数对两种模式中环境菌群代谢功能多样性进行了比较分析,Shannon-Wiener 指数用于评估群落的丰富度^[19],Simpson 指数则反映群落中某些常见种的优势度,Pielou 指数是群落物种均一性的度量,是群落实测多样性与最大多样性的比率^[20]。本研究杂交鳢池塘不同水层 4 类多样性指数均没有明显差异($P>0.05$),大口黑鲈池塘不同水层在 Shannon-Wiener 指数、Simpson 指数和丰富度指数存在一定差

表 4 两种高产池塘对 31 种碳源(基质)利用情况

Table 4 Utilization(based on mean AWCD>1.00 or <0.10) of the 31 carbon substrates by microbes in two intensive ponds

养殖模式	利用率较高的碳源(AWCD>1.00)	未利用的碳源(AWCD<0.10)
杂交鳢池塘	D-纤维二糖(2.045)、D-半乳糖酸内脂(1.984)、D-半乳糖醛酸(1.882)、N-乙酰-D-葡萄糖胺(1.737)、D-甘露醇(1.599)、α-D-葡萄糖-1-磷酸(1.343)、β-甲基-D-葡萄糖苷(1.311)、丙酮酸甲酯(1.286)、肝糖(1.103)、吐温 40(1.038)、L-天门冬酰胺(1.033)	2-羟基苯甲酸(0.003)
大口黑鲈池塘	D-半乳糖醛酸(2.229)、N-乙酰-D-葡萄糖胺(1.407)、吐温 80(1.293)、D-纤维二糖(1.177)、吐温 40(1.099)、丙酮酸甲酯(1.080)、L-天门冬酰胺(1.079)	2-羟基苯甲酸(0.009)、α-丁酮酸(0.086)

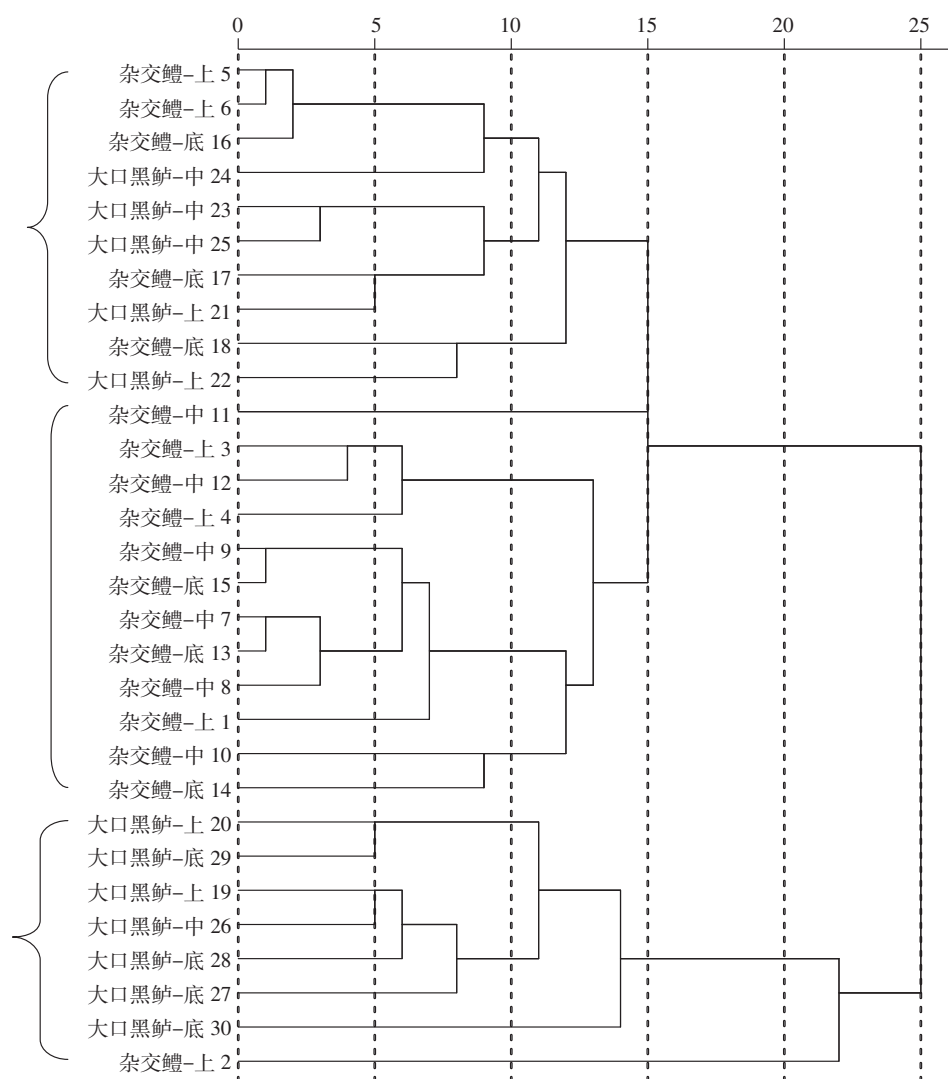


图4 2类模式每个样点聚类分析图

Figure 4 Clustering analysis based on the Biolog-ECO plates at 96 h for all samples

异,总体表现为底层水体微生物功能多样性处于较低水平,两种池塘间进行比较也只有大口黑鲈底层水体微生物功能多样性处于较低水平,因此微生物多样性指数方法不能用于区别两种模式的代谢多样性。Weber 等^[21]研究了酸矿水对人工湿地微生物群落代谢多样性的影响,发现酸矿水处理的水体 AWCD、Shannon-Wiener 指数、Pielou 指数和 Simpson 指数均发生显著性变化。本实验中杂交鳊池塘不同水层 4 类多样性指数均没有明显差异($P>0.05$),可能是由于杂交鳊池塘本身水体较浅、增氧水体搅动较大引起的,而大口黑鲈底层水体微生物功能多样性处于较低水平,可能是由于池塘水体较深、溶氧水平低以及水体营养状态差异导致的。同时,两种模式对 6 大类碳源利用呈现出与总 AWCD 相同的变化规律,其中碳水

化合物和聚合物类的利用最好,而酚类和胺类的利用最弱,这将为我们了解池塘微生物营养需求提供数据支持,并为以后养殖水体异养微生物定向强化提供可靠依据,以利于养殖池塘水体 C/N 平衡和物质循环。

通过两种模式间对 Biolog 生态板上 31 种单一碳源利用的主成分(PCA)分析,从图 4 可以看出,两种模式的样方间分布在不同区域,且模式间样点离散程度较大,说明两种模式在微生物代谢功能上存在一定的差异性。提取的前两个主成分(PC1/PC2)积累贡献率为 41.9%,主成分因子涵盖率较低,没有涵盖影响池塘微生物碳代谢的全部因子,甚至可能有重要因素没有提取出来,这可能与池塘生态系统的复杂性以及池塘环境生态因子的波动性较大有关。尽管提取的主成分信息量仅为 41.9%,但还是可以进行两种模式间

的碳代谢相互比较,为以后继续探讨两者之间的关系做基础。从图 4(聚类分析)可以看出,所有样点聚为三束,第二束为杂交鳊样点,第三束为大口黑鲈样点,仅有第一束由杂交鳊和大口黑鲈样点共同组成。聚类距离越远,相似性越低^[22-23],聚类结果同样表明了两种养殖模式对碳源的利用均存在选择性偏好差异,这可能与两种模式的饲养策略有关。大口黑鲈是以冰鲜野杂鱼为主来投喂的(饲料系数在 3.6~4.0 之间),而杂交鳊投喂的是膨化配合饲料,在营养物质配比上存在较大差异,两种饲料在粗脂肪、粗灰分、粗蛋白以及粗纤维等营养成分上都存在较大差异^[24],不同营养成分饲料投入会直接促使水体微生物生长差异,进而导致水体微生物群落结构差异^[25],这可能是两种模式存在代谢差异的最重要原因。根据导致两种模式代谢多样性差异的单一碳源贡献大小,可以看出两种模式间的代谢差异是由碳源利用差异造成的^[26]。就池塘养殖水体而言,微生物环境受到自然环境条件、养殖管理(增氧、投喂策略等)因素共同影响,而人类养殖操作通常具有较大的波动性,所以导致养殖水体微生物代谢多样性差异的主要原因是模式间的养殖管理差异。

群落水平多样性 (Community-level physiological profile) 不仅要关注微生物对碳源利用模式,更要关注其中某一碳源的绝对利用情况,再结合其生态学意义,就能更好地了解微生物群落分解代谢特征。本实验研究发现,杂交鳊和大口黑鲈两种模式高利用率 (AWCD>1) 的共同碳源有 6 种,为 N-乙酰-D-葡萄糖氨、D-半乳糖醛酸、D-纤维二糖、吐温 40、丙酮酸甲酯、L-天门冬酰胺。N-乙酰-D-葡萄糖氨是几丁质、粘多糖、糖蛋白的单体之一,也是细菌和许多真菌细胞壁的组成成分^[23],为水体细菌的生长提高了必要的条件。Miki 等^[27]研究发现酵母细胞壁的 N-乙酰-D-葡萄糖氨对许多微生物细胞及其他带负电荷的粒子都具有极强的絮凝力,可作为絮凝剂,这也为我们研究碳源强化微生物调控技术提供了数据支撑;D-纤维二糖为纤维素的水解产物,也是纤维素的构成单元^[23],当水体加入纤维素时,可以诱导细菌纤维素酶的合成,从而提高养殖水体对 D-纤维二糖的利用,同时两种养殖模式中纤维素的主要来源为浮游植物和配合饲料,推测杂交鳊和大口黑鲈两种模式水体细菌对浮游植物具有较高的分解力,这也可能与杂交鳊和大口黑鲈两种模式具有较高浓度的浮游植物有关;D-半乳糖醛酸是构成聚半乳糖醛酸的构件分子,聚半乳糖醛酸是果胶物质的组分之一,主要存在于植物

初生细胞壁和细胞之间的中层^[23],养殖池塘中植物大多为藻类,而两种模式均对 D-半乳糖醛酸有较高的利用效率,表明两种模式水体微生物对藻类具有较强的分解能力,这同样与两种模式具有较高浓度的浮游植物有关;Biolog-ECO 板代表性地选取了 5 种不同类型的氨基酸,全面涵盖了氨基酸所有类型,L-天门冬酰胺属于酸性氨基酸^[23],本实验对 L-天门冬酰胺利用率高于其他的氨基酸,表明两种模式对酸性氨基酸利用率高于碱性和中性氨基酸;吐温又称聚山梨酯,吐温 40 中的棕榈酸为饱和脂肪酸,吐温 80 中的油酸为不饱和脂肪酸,进行解脂微生物的分离实验时,多以吐温为底物,本实验中两种模式微生物对吐温 40 的利用率高于吐温 80,表明两种模式水体微生物对饱和脂肪酸的利用率高于不饱和脂肪酸。另外,两种模式均未利用的碳源有 1 种为 2-羟基苯甲酸,又名水杨酸,表明养殖水体细菌对该类物质不予利用。

4 结论

池塘增氧设备的使用和池塘鱼类活动等因素使得池塘水体充分混合,消除了温跃层和氧跃层的影响,使养殖水体不同水层的 AWCD 没有显著性差异。对杂交鳊和大口黑鲈两种养殖模式水体微生物代谢活性研究发现杂交鳊模式微生物活性大于大口黑鲈模式,说明了杂交鳊池塘微生物群落对碳源的总体利用能力强于大口黑鲈养殖模式。PCA 分析结果表明两种模式养殖水体微生物代谢功能多样性存在一定的差异性,这可能与池塘养殖管理方式的不同(如饲料投喂等)有直接关系。杂交鳊和大口黑鲈两种模式在单一碳源利用上有一定相似性,利用率 (AWCD>1) 均较高的碳源共有 6 种(N-乙酰-D-葡萄糖氨、D-半乳糖醛酸、D-纤维二糖、吐温 40、丙酮酸甲酯、L-天门冬酰胺),两种模式均未利用的碳源只有 1 种(2-羟基苯甲酸)。Biolog-ECO 技术可用于分析养殖水体微生物群落碳代谢差异,以及造成代谢差异的决定因素,同时可有效识别容易被养殖水体微生物利用的碳源类型。

参考文献:

- [1] Avnimelech Y. Bio-filters; The need for an new comprehensive approach[J]. *Aquacultural Engineering*, 2006, 34(3): 172-178.
- [2] Amit Gross, Claude E B, Wood C W. Nitrogen transformations and balance in channel catfish ponds[J]. *Aquacultural Engineering*, 2000, 24(1): 1-14.
- [3] Beatriz T B. Organic matter decomposition in simulated aquaculture

- ponds[D]. Holland: Wageningen University, 2005.
- [4] Avnimelech Y. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems[J]. *Aquaculture*, 1999, 176(3-4):227-235.
- [5] Otani Y, Hasegawa K, Hanaki K. Comparison of aerobic denitrifying activity among three cultural species with various carbon sources[J]. *Water Science and Technology*, 2004, 50(8):15-22.
- [6] Grove 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] 袁翠霖, 李卓佳, 杨莺莺, 等. 芽孢杆菌制剂对养殖前期罗非鱼池塘微生物群落代谢功能的影响[J]. 生态学杂志, 2010, 29(12):2464-2470.
- YUAN Cui-lin, LI Zhuo-jia, YANG Ying-ying, et al. Effects of *Bacillus* preparation on metabolic function of microbial communities in tilapia ponds at early stock tag[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2010, 29(12):2464-2470.
- [8] 杨莺莺, 李卓佳, 梁晓华, 等. 芽孢杆菌对鱼池微生物群落代谢功能的影响[J]. 微生物杂志, 2009, 29(3):11-17.
- YANG Ying-ying, LI Zhuo-jia, LIANG Xiao-hua, et al. Influences of *Bacillus* on metabolic function of microbial communities in fishponds[J]. *Journal of Microbiology*, 2009, 29(3):11-17.
- [9] 田相丽, 郑媛媛, 柳炳俊, 等. 草鱼混养系统细菌数量变动和群落功能多样性研究[J]. 中国海洋大学学报, 2012, 42(11):19-27.
- TIAN Xiang-li, ZHENG Yuan-yuan, LIU Bing-jun, et al. Abundance dynamics and community functional diversity of bacteria in grass carp polyculture systems[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2012, 42(11):19-27.
- [10] 包文仲, 刘振琦, 申玉春, 等. 鱼池不同水层细菌的密度、昼夜波动及其与主要环境因子的关系[J]. 水产科技情报, 1993, 20(3):101-104.
- BAO Wen-zhong, LIU Zheng-qi, SHEN Yu-chun, et al. Bacterial density and its fluctuation within 24 h together with correlation to main environmental factors in different water-layer of fish-pond[J]. *Fisheries Science & Technology Information*, 1993, 20(3):101-104.
- [11] Rogers B F, Tate R L. Temporal analysis of the soil microbial community along a toposequence in Pineland soils[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2001, 33(10):1389-1401.
- [12] Dobranic J K, Zak J C. A microtiter plate procedure for evaluating fungal functional diversity[J]. *Mycologia*, 1999, 91(5):756-765.
- [13] Choi K H, Dobbs F C. Comparison of two kinds of Biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 36(3):203-213.
- [14] Gao Quan-zhou, Tao Zhen, Shen Cheng-de, et al. Riverine organic carbon in the Xijiang River(South China):Seasonal variation in content and flux budget[J]. *Environmental Geology*, 2002, 41(7):826-832.
- [15] 金中文, 郑忠明, 吴松杰, 等. 底充式增氧对改善池塘水质效果的初步研究[J]. 南方水产, 2010, 6(6):20-25.
- JIN Zhong-wen, ZHENG Zhong-ming, WU Song-jie, et al. Preliminary study on improvement of pond water quality by bottom aeration[J]. *South China Fisheries Science*, 2010, 6(6):20-25.
- [16] Lpez M J, Elorrieta M A, Vargas-García M C, et al. The effect of aeration on the biotransformation of lignocellulosic wastes by white-rot fungi[J]. *Bioresource Technology*, 2002, 81(2):123-129.
- [17] Dignac M F, Houot S, Francou C, et al. Pyrolytic study of compost and waste organic matter[J]. *Organic Geochemistry*, 2005, 36(7):1054-1071.
- [18] 魏成, 刘平. 人工湿地污水净化效率与根际微生物群落多样性的相关性研究[J]. 农业环境科学学报, 2008, 27(6):2401-2406.
- WEI Cheng, LIU Ping. Relationship between wastewater purification and diversity of rhizosphere microorganism in the constructed wetland[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2008, 27(6):2401-2406.
- [19] Magurran A E. Ecological diversity and its measurement [M]. Princeton: Princeton University Press, 1988:141-162.
- [20] Atlas R M. Diversity of microbial communities[J]. *Advances in Microbial Ecology*, 1984, 7:1-47.
- [21] Weber K P, Matthias G, Raymond L L. Assessment of changes in the microbial community of constructed wetland mesocosms in response to acid mine drainage exposure[J]. *Water Research*, 2008, 42(1):180-188.
- [22] Hadwin A K M, Del R L F, Pinto L J, et al. Microbial communities in wetlands of the Athabasca oil sands:Genetic and metabolic characterization[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2006, 55(1):68-78.
- [23] 张燕燕, 曲来叶, 陈利顶. Biolog EcoPlate™ 实验信息提取方法改进[J]. 微生物学通报, 2009, 36(7):1083-1091.
- ZHANG Yan-yan, QU Lai-ye, CHEN Li-ding. An amendment on information extraction of Biolog ecoPlate™[J]. *Microbiology*, 2009, 36(7):1083-1091.
- [24] 杨家坚, 梁军能, 卢智发, 等. 三角鲤几种常见天然饵料的营养分析与评价[J]. 广西农学报, 2007, 22(3):1-4.
- YANG Jia-jian, LIANG Jun-neng, LU Zhi-fa, et al. Analyses and evaluation the nutrition of some common natural diets on *Cyprinus multi-taeniata* pellegrinet chevey[J]. *Journal of Guangxi Agriculture*, 2007, 22(3):1-4.
- [25] Salomo S, Munch C, Roske I. Evaluation of the metabolic diversity of microbial communities in four different filter layers of a constructed wetland with vertical flow by Biolog™ analysis [J]. *Water Research*, 2009, 43(18):4569-4578.
- [26] 王晓娟, 张荣社. 人工湿地微生物硝化和反硝化强度对比研究[J]. 环境科学学报, 2006, 26(2):225-229.
- WANG Xiao-juan, ZHANG Rong-she. Study on intensity of microorganism nitrification and denitrification in constructed wetlands[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2006, 26(2):225-229.
- [27] Miki B L A, Poon N H, James A P, et al. Repression and induction of flocculation interactions in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1982, 150(2):878-889.