

生态基对草鱼生长性能、肠道及水体微生物的影响

夏 耘¹, 王一飞², 郁二蒙¹, 谢 骏^{1*}, 王广军¹, 余德光¹, 吉 红²

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

2. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 将无纺布生态基应用于草鱼养殖生产中, 研究生态基对草鱼生长、免疫和养殖水质的影响, 并利用 PCR-DGGE 技术分析了草鱼肠道和养殖水体微生物群落结构的动态变化。结果显示, 实验组草鱼的末重、增重率均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 饲料系数显著低于对照组 ($P < 0.05$); 草鱼血清碱性磷酸酶 (AKP)、酸性磷酸酶 (ACP)、超氧化物歧化酶 (SOD)、溶菌酶 (LSZ) 活性水平均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 诱导型一氧化氮合酶 (iNos) 和总一氧化氮合酶 (tNos) 均显著低于对照组 ($P < 0.05$); 除了在第 30 天时实验组 TSS 水平显著低于对照组 ($P < 0.05$), 整个过程挂设无纺布生态基对养殖水质参数影响不明显 ($P > 0.05$)。PCR-DGGE 检测结果显示: *Cetobacterium somerae* 是对照组养殖水体和对照组草鱼肠道特异细菌; 维氏气单胞菌是养殖水体和对照组草鱼肠道特异细菌, 对照组养殖水体的分布明显比实验组丰富, 在生态基中不存在; 生态基的细菌群落构成和挂设生态基的实验组养殖水体相似性较高, 最高时达到 63%; 绿弯菌占生态基细菌总量的 10% 左右, 而在养殖水体中仅为 5%。研究表明, 生态基的应用有效促进了草鱼的生长, 降低了饲料系数, 提高了草鱼的非特异性免疫功能, 降低养殖水体 TSS 浓度。生态基的应用改变了水体细菌群落组成, 减少了养殖水体和草鱼肠道中一些条件致病菌的存在。

关键词: 草鱼; 生态基; 微生物群落; 生长; 组成

中图分类号: S 965

文献标志码: A

草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 是我国大宗淡水主要养殖品种之一, 2013 年我国草鱼产量已达到 480 万 t, 占淡水养殖鱼类年产量的 20%^[1]。随着放养密度的提高, 高的饵料投入和低的饵料利用率使得大量有机及无机残余物积累在养殖系统内, 造成水体污染加剧^[2-3]。近年来, 生物絮团技术成为解决上述问题的研究热点。已有研究发现, 该技术不仅可以改善水质而且可为养殖对象提供额外的食物来源^[4-6]。但是, 为了使絮团悬浮颗粒能持续生成, 在实际应用中需要 24 h 不间断的充气和搅拌^[7-8]。草鱼养殖周期长, 应用生物絮团技术时能耗相对较大。以往研究将生物絮团技术应用于草鱼养殖中仅改善了草鱼养殖的水质, 而对草鱼的促生长作用不明显^[9-10]。生态基

技术由于其易维护、成本低及效果显著等优点备受 关注^[11]。Haque 等^[12] 对罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 的研究表明, 由于生态基为虾类生长提供了额外空间和天然食物, 比生物絮团技术获得了更好的养殖效果。

生态基作为载体材料可分为有机和无机部分, 都可以应用于改善养殖水质^[13-15]; 同时生态基上由细菌、真菌、原生动物、植物、浮游动物、底栖生物和碎屑构成的生物膜能给养殖对象提供额外的食物来源^[16]。有机载体是生态基技术中使用的主要载体材料。本实验使用的无纺布生态基, 采用平面织物材料, 具有巨大的比表面积和精密的三维孔洞结构, 以利于细菌、藻类、浮游动物和其他水生生物的生长和繁殖^[17], 促进某类喜欢

收稿日期: 2014-06-10 修回日期: 2014-07-08

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项 (nycytx-49-13); 公益性行业 (农业) 科研专项 (201203083); “十二五”农村领域国家科技计划 (2012BAD25B04)

通信作者: 谢 骏, E-mail: xiejunhy@hotmail.com

<http://www.scxuebao.cn>

定植于某表面的细菌如硝化细菌的生长^[18]。生态基在虾类养殖中得到了广泛应用,并在改善养殖水质和促进虾类生长中效果显著^[19-20],但对养殖水体中生态基的微生物群落结构特征尚不清楚。本实验将生态基技术首次应用于草鱼养殖中,应用 PCR-DGGE 技术对这一过程组成生态基的微生物群落及其动态变化做了相关研究,从细菌群落构成的角度分析生态基的作用;同时监测养殖对象生长性能以及生态基引起的养殖水体及草鱼肠道微生物构成的变化,对生态基在水质调节及促进养殖对象健康生长中的作用做了较深入的分析,以期生态基技术应用于草鱼养殖生产提供指导。

1 材料与方法

1.1 实验管理

实验于 2013 年 9 月 6 日—10 月 6 日在珠江水产研究所精准基地进行,共 30 天。实验草鱼体质量为 (300 ± 4.3) g,每口池放养 62 尾鱼,饲喂粗蛋白为 30% 的某商品饲料,日投喂 2 次,投喂量为体质量的 2.5% 左右。实验共使用 6 口正方形水泥池,规格为 2.5×2.5 m,养殖水深为 1 m,使用曝气圆盘增氧方式,整个养殖期间不换水并持续对水体溶氧、pH 和温度进行监测。

实验使用的无纺布生态基由阿科蔓 (AquaMats) 公司生产,比表面积均值为 $152.9 \text{ m}^2/\text{m}^2$,单位面积质量为 $494 \text{ g}/\text{m}^2$,厚度 5.49 mm,pH 值为 6.5,梳状构造。每块生态基面积为 1 m^2 ($100 \text{ cm} \times 100 \text{ cm}$),实验时垂直悬挂于养殖水体中,底部系坠石,使其完全展开。以不挂设生态基的养殖池为对照 (C1、C2、C3),实验组挂设生态基 (T1、T2、T3),挂设密度为 $0.32 \text{ m}^2/\text{m}^3$ 水体,即每个养殖池挂设生态基的数量为 2 块,平行放置于中间。

1.2 采样与指标测定

水质指标测定 从挂设生态基第一天开始每 5 天采水样一次,每次采样时间均为 10:00,4 h 内在实验室进行分析化验,测定水体氨氮 (NH_4^+-N)、亚硝酸盐氮 (NO_2^--N)、硝酸盐氮 (NO_3^--N),测定采用 merckPharo100 多参数水质分析仪 (德国)。在实验开始第 5 天和第 30 天时测定水体总固体悬浮物浓度 (TSS)。

微生物基因组 DNA 提取 从第 1 天开始

每 5 天取 100 mL 水样用 $0.2 \mu\text{m}$ 滤膜真空抽滤,将滤膜用灭菌剪刀剪碎保存于 50 mL 灭菌离心管中备用。从第 5 天开始每 5 天收集生态基样本,每次称取湿重 2 g,于锥形瓶中用 200 mL 灭菌去离子水摇床震荡 2 h,洗脱生态基载体,而后采取和水样相同的处理方法。在实验结束时每个水泥池随机采集 3 条草鱼,并将相同水泥池草鱼肠道样本混合备用。水体和生态基微生物基因组 DNA 的提取方法参照 OMEGA 水体细菌 DNA 提取试剂盒 (美国) 的具体操作步骤,加入蛋白酶的同时加入 200 μL 15% 的 SDS,最后用 50 μL 的灭菌去离子水洗脱 DNA,总 DNA 用 1% 琼脂糖检测, -20°C 保存备用。用 OMEGA 粪便细菌 DNA 提取试剂盒 (美国) 提取肠道 DNA。

草鱼生长性能测定 在养殖周期结束时测定养殖对象的各项生长指标,包括成活率 (SR)、增重率 (WGR)、饲料系数 (FCR),同时测定其血液非特异性免疫标,包括碱性磷酸酶 (AKP)、酸性磷酸酶 (ACP)、超氧化物歧化酶 (SOD)、溶菌酶 (LYZ)、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 和总一氧化氮合酶 (tNOS),测定均采用南京建成试剂盒。

1.3 细菌 PCR-DGGE 及序列分析

将同组同时时间点的 3 个平行样品细菌基因组 DNA 混合,采用针对 16S rDNA 基因的通用引物 (F338-GC 和 R534) 对 7 个时间点的样品微生物进行 PCR-DGGE 指纹分析^[21],其中 16S rDNA 目的片段的变性梯度范围为 30% ~ 60%^[22]。电泳温度控制在 60°C ,用 200 V 电压预电泳 5 min,接着在 110 V 条件下电泳 12 h。电泳结束后,在室温条件下用稀释 10 000 倍的 Genefinder 核酸染料摇床上染色 30 min。用 BIO-RAD 成像系统获得 DGGE 图谱,并对图谱中的部分条带进行序列分析。

1.4 数据分析

利用 Excel 数据处理软件进行数据处理,使用 SPSS 17.0 软件中的独立样本 t 检验对数据进行分析;实验数据用平均值 $\pm$ 标准差 ($\text{mean} \pm \text{SD}$) 表示, $P < 0.05$ 为差异显著。

利用 BIO-RAD Quantity One 软件获取 DGGE 图谱的数字化信息,微生物群落结构的相似性通过 Dice 相似系数来比较,非加权配对算术平均法聚类 (UPGMA) 和主成分分析 (PCA) 由软件 XLSTAT-Pro 来完成。

2 结果

2.1 水质指标

整个养殖过程不同组间水质参数差异不显著 ($P > 0.05$), 整个养殖过程, 分子氮最高为 0.018 mg/L , 均处于安全浓度范围 (表 1)。第 5 天时, 对照组和实验组养殖水体 TSS 浓度均较低, 两者差异不显著 ($P > 0.05$)。第 30 天时, 对照组养殖水体 TSS 浓度显著升高, 约为 $(0.3 \pm 0.06) \text{ g/L}$, 显著高于此时实验组 TSS 浓度 ($P < 0.05$)。

表 1 养殖水质参数
Tab.1 Water quality parameters

参数 parameter	对照组 control group	实验组 treatment group
T/°C	27.25 ± 1.49 (25, 29.5)	27.38 ± 1.45 (25.2, 29.4)
DO/(mg/L)	6.11 ± 0.78 (4.18, 7.36)	6.23 ± 0.58 (5.39, 7.17)
pH	7.3 ± 0.69 (6.42, 8.26)	7.42 ± 0.56 (6.57, 8.23)
$\text{NH}_4^+ / (\text{mg/L})$	0.43 ± 0.36 (0.1, 1.16)	0.49 ± 0.52 (0.07, 1.48)
$\text{NO}_2^- / (\text{mg/L})$	0.48 ± 0.63 (0.08, 1.96)	0.22 ± 0.19 (0.03, 0.87)
$\text{NO}_3^- / (\text{mg/L})$	10.78 ± 10.14 (1.5, 35.6)	10.45 ± 8.03 (2.9, 36.5)
TSS/(g/L)	0.16 ± 0.02 (5 d) 0.30 ± 0.06^b (30 d)	0.09 ± 0.04 (5 d) 0.15 ± 0.04^a (30 d)

注: 表中同一列数据中不同字母上标表示显著性差异 ($P < 0.05$), 括号内数据为整个过程测定的最高值和最低值
Notes: Different superscript letters in the same column donate significant differences between treatments ($P < 0.05$), Data in brackets is the highest and lowest values measured for the entire process

2.2 对草鱼生长和血清非特异性免疫影响

实验结束时 (30 天), 对草鱼取样称量, 对草鱼的各项生长指标及饵料系数进行单因素方差分析 (ANOVA), 实验组草鱼的末重、增重率均显著高于对照组 ($P < 0.05$)。实验组草鱼饲料系数显著低于对照组 ($P < 0.05$)。实验结束时, 对草鱼血清学非特异性免疫指标进行了检测分析, 发现挂设生态基的实验组草鱼血清 AKP、ACP、SOD、LSZ 活性水平均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 试验组草鱼血清 iNOS 和 tNOS 均显著低于对照组 ($P < 0.05$) (表 2)。

表 2 对照组和实验组草鱼生长及非特异性免疫指标
Tab.2 Growth and nonspecific immune parameters for grass carp in control and treatment groups

项目 items	对照组 control group	实验组 treatment group
成活率/% SR	97.92 ± 2.95	100 ± 0
初重/kg initial weight	14.00 ± 0.22	14.00 ± 0.15
末重/kg final weight	18.65 ± 0.21^a	19.23 ± 0.13^b
增重率/% WGR	33.21 ± 1.51^a	37.36 ± 0.91^b
饲料系数 FCR	2.51 ± 0.13^b	2.24 ± 0.04^a
AKP/(U/100 mL)	39.50 ± 10.42^a	58.49 ± 11.25^b
ACP/(U/100 mL)	99.57 ± 0.19^a	99.90 ± 0.20^b
SOD/(U/mL)	61.24 ± 11.64^a	69.58 ± 6.1^b
LSZ/(U/mL)	5.97 ± 2.28^a	10.45 ± 3.78^b
iNOS/(U/mL)	8.06 ± 1.32^b	5.28 ± 0.88^a
tNOS/(U/mL)	49.41 ± 2.48^b	41.51 ± 2.33^a

注: 表中同一列数据中不同字母上标表示显著性差异 ($P < 0.05$)
Notes: Different superscript letters in the same column mean significant differences between treatments ($P < 0.05$)

2.3 微生物群落 PCR-DGGE 及序列分析

PCR-DGGE 指纹图谱构建及分析 每 5 天采样一次, 获得 0 ~ 30 d 养殖水体及生态基不同时期微生物 16S rDNA 基因的 DGGE 指纹图谱 (图 1)。其中对照组养殖水体从第 5 天到第 30 天获得的可鉴别条带平均为 25 条; 实验组养殖水体获得的可鉴别条带平均为 23 条; 生态基获得可鉴别条带均数为 26; 养殖水源水体获得 19 条可鉴别条带, 说明挂设生态基后实验组养殖水体细菌谱带减少。对照组养殖水体条带数在 0 到 15 天呈上升趋势, 在第 15 天时条带数量达到峰值为 31, 此后逐渐下降, 30 天时仅为 22 条, 对照组水体细菌群落多样性呈先升后降的趋势; 实验组养殖水体条带数量在第 20 天时达到峰值为 28, 比对照组相对滞后; 生态基可鉴别条带第 20 天时同样达到峰值为 31。依据 DGGE 指纹谱带的丰富度和峰值分别对不同时期养殖水体及生态基细菌群落结构进行基于 Dice 系数的 UPGMA 聚类分析, 水源水 (Y0)、对照组养殖水体第 5 天 (C5) 和第 10 天 (C10)、生态基实验组养殖水体第 5 天 (T5) 和第 10 天 (T10) 及生态基第 5 天 (J5) 细菌群落构成聚为一支; 对照组养殖水体细菌群落构成第 15 天至 30 天 (C15, C20, C25, C30) 聚为一支; 生态基细菌群落构成第 10 天至 30 天 (J10, J20, J25, J30) 聚为一支; 挂设无纺布生态基的实验组养殖水体细菌群落构成第 25 天 (T25) 和 30 天 (T30) 聚为一支。其中第一支单独聚为一簇,

后三支单独聚为一簇(图 1)。养殖水体前 10 天细菌群落构成主要受水源(Y0)本土微生物的影响,同水源水体相似性较高,约为 42%;对照组养殖水体从 15 天开始细菌群落构成受到养殖试验的影响发生改变,C15,C20,C25,C30 与 Y0 的相似系数平均不到 30%;生态基的细菌群落构成和挂设生态基的实验组养殖水体相似性较高,最高时达到 63%。

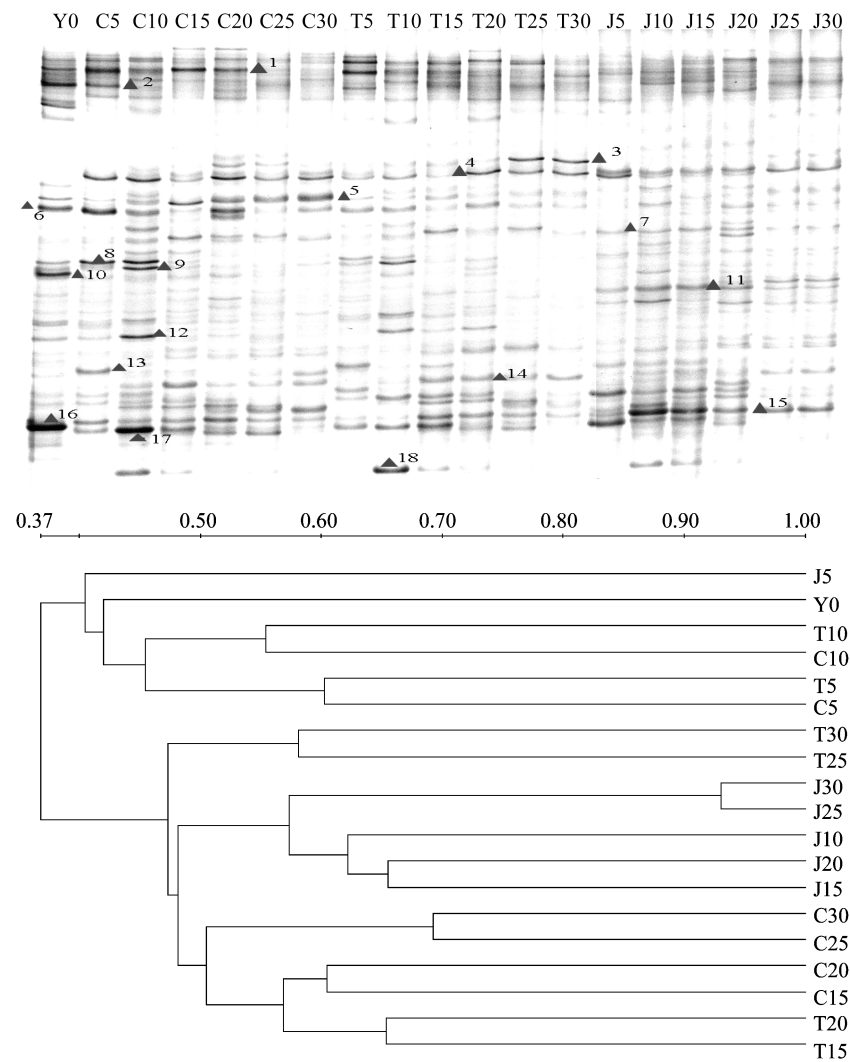


图 1 对照组和实验组养殖水体及生态基细菌群落结构动态变化 DGGE 指纹图谱及聚类分析(UPGMA)
Y. 水源; C. 对照组养殖水体; T. 实验组养殖水体; J. 生态基
0~30 数字代表 0 到 30 天
Fig.1 DGGE profiles and UPGMA clustering of 16S rDNA genes from water and biofilm of different time
Y stands for source of water; C stands for control water; T stands for treatment water; J stands for eco-substrates
Numbers 0-30 stand for 0 to 30 days

DGGE 图谱的 PCA 分析结果显示,样品之间的距离代表了它们的差异大小。主成分因子 1(PC1)的贡献率为 22.6%,主成分因子 2(PC2)的贡献率为 12.7%。实验开始前水源水体(Y0)细菌群落与其他各样品差异均较大,说明细菌群落受养殖实验的影响明显(图 2)。实验组养殖水体和生态基不同时间样品均聚在同一区域,并在 PC1 和 PC2 方向分布较均匀,实验组养殖水体和生态基细菌群落相似性高且整个养殖过程较稳定。实验组养殖水体细菌群落在养殖初期和对照组养殖水体相似性高,具体表现样品 T5 和 C5、C10 较集中。对照组养殖水体在整个养殖过程变化较明显,PC1 及 PC2 方向分布均较分散。在 0~20 d 对照组与实验组养殖水体及生态基的细

菌群落多样性指数呈上升趋势(图3)。生态基的生物多样性指数在10 d之后均高于对照组和实验组养殖水体,实验组养殖水体细菌群落多样性低于对照组。由此可知,实验组细菌群落主要集中在生态基上,水体中细菌种类相对较少。在20 d后,三者的细菌多样性指数均呈现下降的趋势,这可能与实验记录显示的期间 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 及pH的较大波动有关,水质变化较大对实验中细菌群落多样性有一定的影响。并且在这一过程中实验组养殖水体的生物多样性指数最低,而生态基仍然保持较高的状态,在第30天时生态基细菌多样性指数在三者中最高。

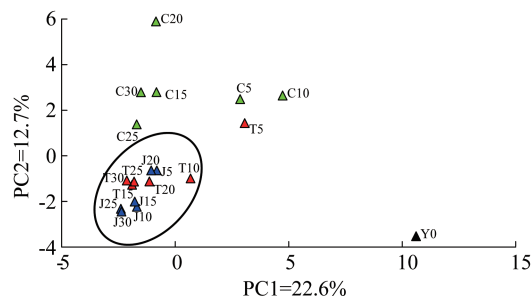


图2 不同时期对照组和实验组养殖水体及生态基细菌群落PCA分析

Y. 水源; C. 对照组养殖水体; T. 实验组养殖水体; J. 生态基
0~30 数字代表0到30天

Fig.2 Principal component analysis (PCA) analysis of the 16S rDNA (A) genes' DGGE band patterns of water and eco-substrates at different time

Y stands for source of water; C stands for control water; T stands for treatment water; J stands for eco-substrates
Numbers 0-30 stand for 0 to 30 days

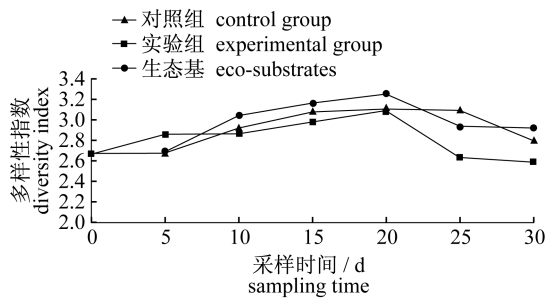


图3 不同时期对照组和实验组草鱼养殖水体及生态基细菌群落多样性指数

Fig.3 Bacterial community diversity index of water and eco-substrates at different time

草鱼肠道样品PCR-DGGE图谱及聚类分析发现,对照组草鱼肠道微生物相似性较高,均在

70%左右;实验组草鱼肠道微生物相似性在90%以上;对照组草鱼和实验组草鱼肠道微生物相似性约为30%(图4)。

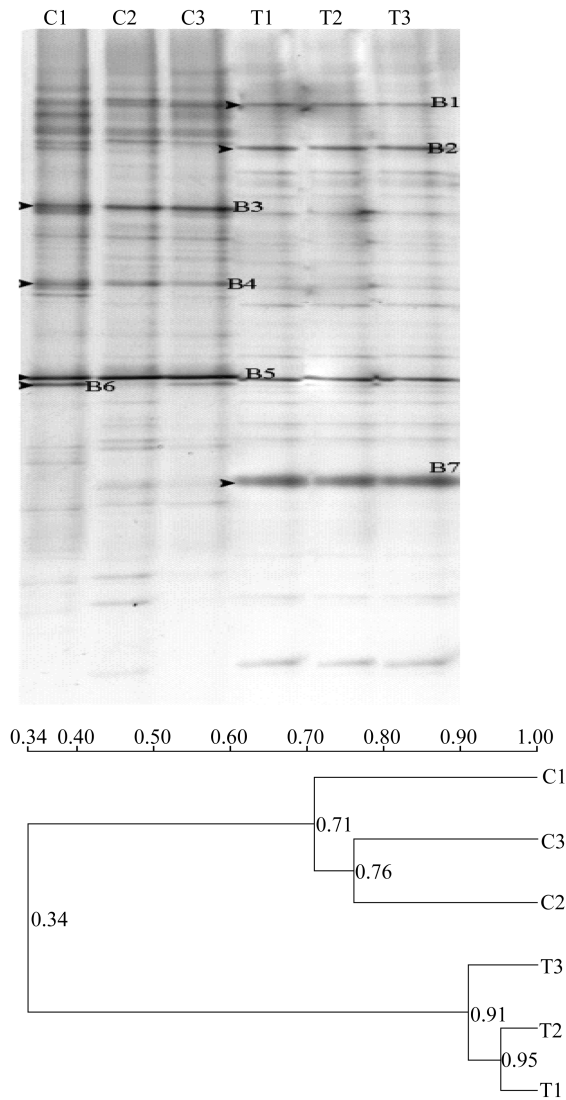


图4 草鱼肠道细菌群落结构DGGE指纹图谱及聚类分析(UPGMA)

C. 对照组; T. 实验组

Fig.4 DGGE profiles and UPGMA clustering of intestinal microfauna of grass carp

C stands for control group; T stands for treatment group

目的条带的克隆测序 为了进一步分析养殖水体及生态基不同时期细菌群落结构和多样性,对图1中蓝色三角形标记的18个特征条带进行切胶回收及克隆测序。最终得到14个序列的阳性克隆(表3),14个条带所代表序列在GenBank中的登录序列号为KJ862006-KJ862006,其中条带2和8与NCBI中的环境样品中的某未知未培养放线菌

表 3 对照组和实验组养殖水体、生态基及草鱼肠道 DGGE 目的条带的克隆测序结果
Tab.3 The sequencing results of the prokaryote DGGE objective bands from water, eco-substrates and grass carp intestine samples

条带号 band name	序列长度 sequences length	名称 name	GenBank 数据库中最相近的菌种名称(登录号) closest relatives found in the GenBank database(accession number)	相似性/% similarity
1	176	Fusobacteria	<i>Cetobacterium somerae</i> partial 16S rRNA gene, strain 23 (HG326498.1)	100
2	177	Actinobacteria	Uncultured Actinobacterium clone DSH4B1-63 16S ribosomal RNA gene,partial sequence(KF543139.1)	100
3	197	Betaproteobacteria	<i>Curvibacter</i> sp. JJ010 16S ribosomal RNA gene, partial sequence(JN679217.1)	100
4	176	Gammaproteobacteria	Uncultured <i>Cellvibrio</i> sp. clone B8-K26 16S ribosomal RNA gene,partial sequence(KC535158.1)	99
5	197	Gammaproteobacteria	<i>Aeromonas veronii</i> strain B7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence(KF661548.1)	100
6	192	Sphingobacteria	Uncultured <i>Runella</i> sp. clone 112 16S ribosomal RNA gene,partial sequence(GU123143.1)	100
8	172	Actinobacteria	Uncultured Actinobacterium clone XSLD031 16S ribosomal RNA gene,partial sequence(KC246282.1)	100
9	197	Betaproteobacteria	Uncultured <i>Herbaspirillum</i> sp. clone 2S78 16S ribosomal RNA gene,partial sequence(GU074355.1)	99
10	192	Sphingobacteria	Uncultured Sphingobacteriales bacterium clone M7N67 16S ribosomal RNA gene,partial sequence(KC006387.1)	100
13	192	Gammaproteobacteria	Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. clone S2P4055 16S ribosomal RNA gene,partial sequence(KF145843.1)	95
14	173	Alphaproteobacteria	Uncultured <i>Hyphomicrobium</i> sp. clone bf2-73 16S ribosomal RNA gene,partial sequence(GU257860.1)	99
15	173	Caldilineae	Uncultured Chloroflexi bacterium clone UVmen3_21 16S ribosomal RNA gene,partial sequence(JQ701155.1)	99
			Uncultured <i>Caldilinea</i> sp. clone CNY _ 01794 16S ribosomal RNA gene,partial sequence(JQ401635.1)	98
16	172	Alphaproteobacteria	Uncultured <i>Methylocella</i> sp. clone Pad-43 16S ribosomal RNA gene,partial sequence(JX505290.1)	99
17	197	Gammaproteobacteria	<i>Escherichia coli</i> strain GutB7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence(KF684037.1)	100
B1	198	Bacilli	<i>Lactococcus lactis</i> isolate TIL37 16S ribosomal RNA gene,partial sequence(JX893593.1)	99
B2	178	Unknow	Uncultured bacterium clone FAIR _ SPR _ 12F 16S ribosomal RNA gene,partial sequence(KC358066.1)	99
B3	176	Fusobacteria	<i>Cetobacterium somerae</i> partial 16S rRNA gene, strain 23 (HG326498.1)	100
B4	197	Gammaproteobacteria	<i>Aeromonas veronii</i> strain FZMH 16S ribosomal RNA gene,partial sequence(KC633849.1)	100
B5	192	Unknow	Uncultured bacterium clone 16SOTU12 16S ribosomal RNA gene,partial sequence(KF978763.1)	97
B6	198	Bacteroidetes	Uncultured Bacteroidaceae bacterium gene for 16S rDNA, partial sequence, clone: L16(AB665785.1)	99
B7	173	Bacilli	<i>Lactococcus piscium</i> strain MARL41 16S ribosomal RNA gene,partial sequence(JN226415.1)	99

(Uncultured actinobacterium)相似性达到 100%;条带 10 与 NCBI 中未培养的鞘脂杆菌目(Sphingobacteriales)同源性高达 100%;条带 13 属于 γ -变形菌(Gammaproteobacteria),与 NCBI 已知的未培养假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)同源性为 95%;其余 10 个序列均与 NCBI 中已知菌种基因序列同源性达到 99% 以上。

对图 4 草鱼肠道 DGGE 图谱中三角形标记的 7 个优势条带进行克隆测序,7 个条带所代表序列在 GenBank 中的登录序列号为 KJ862020-KJ862026(表 3),其中 B3 和 B4 为对照组草鱼肠道的共有优势条带,测序结果显示, B3 为 *Cetobacterium somerae*, B4 为维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*),可能与前面研究中这两种菌在对照组养殖水体有较多分布有关。B1 和 B7 在两组草鱼肠道中都存在,测序结果显示为芽孢杆菌纲的乳球菌属(*Lactococcus* sp.)。

3 讨论

本次研究中使用生态基的实验组草鱼的增重率显著高于对照组($P < 0.05$),且实验组的饵料系数显著低于对照组($P < 0.05$)。Weerasooriya^[23]将无纺布生态基应用于尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)幼苗养殖过程,发现生态基并没有促进尼罗罗非鱼幼苗生长及产量的提高,在投喂饵料的情况下使用无纺布生态基降低了尼罗罗非鱼幼苗的产量和成活率。在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)养殖实验中发现,无纺布生态基也没有促进虹鳟个体生长和虹鳟鳍条的生长,只有当生态基平行于池长放置时,在养殖中期对虹鳟鳍条的生长有短暂的促进作用^[17]。无纺布生态基的应用提高了凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的产量,其原因归于养殖水体较低的氨氮浓度及丰富的可利用食物来源^[19,24]。本次实验中,对照组和实验组水体水质指标变化趋势并不存在明显差异,整个实验过程各水质参数均处于安全浓度范围,但无纺布生态基显著降低了实验组水体 TSS 浓度($P < 0.05$)。无纺布生态基水草型设计既能营造平缓的水力环境,增加颗粒物与生物膜的接触机会,又能大大增加与水体的有效接触,增加颗粒物与生物膜的接触机会。水中的悬浮固体在与生物膜碰撞的过程中动能迅速下降,促使其充分沉降;同时由于悬浮式生物膜表面

生物絮凝作用,使部分悬浮固体被吸附和携带并最终随生物膜脱落降至水底^[25]。本次实验生态基的应用显著降低了饵料系数,使得饲料利用率提高,但生态基上形成的生物膜吸附和沉淀的有机悬浮颗粒是否为草鱼提供了额外的食物需要通过进一步的摄食观察或肠道内容物镜检等途径来验证。

鱼类血清中 AKP、ACP、SOD、LSZ 为非特异性免疫指标,这些指标在实验组草鱼中都得到显著性提高($P < 0.05$),说明无纺布生态基的应用能提高草鱼的非特异性免疫功能。一些抗氧化酶活性的提高不仅保持细胞免受伤害,还能促进细胞正常合成各种酶类^[26];另一些酶,如 AKP 与动物体内磷酸物质的转移、消化、吸收等有关^[27],既促进机体非特异性免疫能力提高,又能促进生长。iNOS 为非钙依赖性酶,只在细胞受刺激被激活后才表达,尤其巨噬细胞和中性粒细胞被激活时,可表达大量 iNOS,产生大量的 NO,NO 能与 O_2^- 结合形成神经毒性很强的过氧亚硝酸阴离子($ONOO^-$),直接损伤 DNA、蛋白质,破坏细胞膜、细胞骨架及核结构,从而发挥细胞毒和神经毒作用^[28-29]。实验组草鱼 iNOS 活性显著低于对照组($P < 0.05$),说明挂设无纺布生态基的草鱼机体抗炎反应得到提高。本实验中,无纺布生态基的应用促进草鱼血清非特异性免疫功能的提高,同时降低了草鱼的应激性,这可能是促进草鱼生长的直接原因。

从 DGGE 技术能监测到的水平显示,实验开始后实验组养殖水体微生物多样性低于对照组,而生态基的微生物多样性比养殖水体高。细菌经历特殊环境条件的刺激(如提供营养丰富的载体)而触发向表面附着生长,这一转变是生态基上生物膜形成的开端^[30]。生物膜能形成于水环境的任一表面,在各个领域已经得到广泛研究^[31],说明生物膜形成过程伴随着细菌群落向生态基的附着生长,无纺布生态基对微生物的固着具有一定作用,水体中的细菌群落有向生态基定居的趋势。对细菌组成的聚类分析及主成分分析显示,生态基和实验组养殖水体细菌群落组成相似性高,且实验组养殖水体细菌群落随时间的变化没有对照组明显,说明生态基细菌构成主要受养殖水体影响,其应用促进了养殖水体细菌群落的相对稳定。本研究结果与 Besemer 等^[32]对溪

流中生物膜的研究结果有所不同,这可能与水体丰富的微生物来源和当时形成的生物膜时间较短有关。流体动力学的诱导是溪流生物膜微生物构成的一个潜在选择机制^[33]。本实验是在静态的水泥池进行,流体动力学影响较小,微生物构成受水源影响较大。

生态基的应用改变了某些特殊细菌种类的分布。维氏气单胞菌(条带5)存在于0~30 d对照组和实验组水体,在生态基样品中不存在,且在对照组水体的分布明显比实验组丰富。维氏气单胞菌是一种食源性致病菌,能引起鱼类、动物及人类的感染^[34-35]。Nawaz等^[36]的研究指出,从人工养殖鲶(*Silurus asotus*)中分离出来的维氏气单胞菌大部分都是毒性菌株,因此人工养殖鲶是致病性维氏气单胞菌的重要来源。维氏气单胞菌为鱼类细菌性暴发性流行病病原,能引起鱼体出血病症和死亡^[37-38],而对细菌性疾病治疗主要依靠抗生素。因此,生态基的应用可能会减少养殖生产中针对这类病原的抗生素的使用,实现健康养殖。本实验中,绿弯菌(*Chloroflexi*)(条带15)是对照组和实验组养殖水体及生态基共有细菌,占生态基细菌总量的10%左右,在养殖水体中仅为5%,说明这类菌有向生态基聚集的趋势^[39]。绿弯菌是工厂废水处理中常见细菌,与COD的去除具有很好的相关性^[40]。在进一步研究中需要结合养殖水体COD指标对无纺布生态基是否具有降低水体COD的功能做出合理评价。

无纺布生态基的使用同样改变了草鱼肠道微生物组成,*Cetobacterium somerae*是对照组草鱼肠道的优势细菌(B3),在实验组草鱼肠道中极少,对养殖水体的研究发现,*Cetobacterium somerae*(条带1)是对照组养殖水体特异优势细菌。维氏气单胞菌在对照组养殖水体的分布明显比实验组丰富,无纺布生态基的使用不仅降低了维氏气单胞菌在养殖水体的分布,同时也减少了草鱼肠道细菌中这类菌的存在。*Aeromonas* spp.是多种水产动物重要病原菌,在适宜条件下大量繁殖,当具有高细胞密度时受群感效应控制产生许多毒力因子,不利于养殖对象健康生长^[41],说明本实验中无纺布生态基对草鱼肠道致病菌的控制可能是促进草鱼生长的一个重要原因。

4 结论

无纺布生态基的应用有效促进了草鱼的生

长,降低了饲料系数,提高了草鱼的非特异性免疫功能,降低养殖水体TSS浓度。无纺布生态基的应用改变了水体细菌群落构成,减少了养殖水体和草鱼肠道中一些条件致病菌的存在,改善了草鱼肠道细菌构成。

参考文献:

- [1] Fisheries Bureau of Ministry of Agriculture. China fishery statistical yearbook [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2013. [农业部渔业局. 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2013.]
- [2] Azim M E, Verdegem M C J, Singh M, et al. The effects of periphyton substrate and fish stocking density on water quality, phytoplankton, periphyton and fish growth [J]. Aquac Research, 2003, 34 (9): 685 - 695.
- [3] Avnimelech Y. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds [J]. Aquaculture, 2007, 264 (1 - 4): 140 - 147.
- [4] Crab R, Kochva M, Verstraete W. Bio-flocs technology application in over-wintering of tilapia [J]. Aquacultural Engineering, 2009, 40 (2): 105 - 112.
- [5] Wasielesky W, Atwood H, Stokes A, et al. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. Aquaculture, 2006, 258 (1 - 4): 396 - 403.
- [6] Avnimelech Y, Kochba M. Evaluation of nitrogen uptake and excretion by tilapia in biofloc tanks, using 15N tracing [J]. Aquaculture, 2009, 287 (1 - 2): 163 - 168.
- [7] Xu W J, Pan L Q. Effects of bio flocs on growth performance, digestive enzyme activity and body composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* in zero-water exchange tanks manipulating C/N ratio in feed [J]. Aquaculture, 2012, 356 - 357: 147 - 152.
- [8] Zhao P, Huang J, Wang X H, et al. The application of bio flocs technology in high-intensive, zero exchange farming systems of *Marsupenaeus japonicus* [J]. Aquaculture, 2012, 354 - 355: 97 - 106.
- [9] Xia Y, Qiu L J, Yu Er M, et al. Dynamic changes of water quality factors and composition of prokaryotic and eukaryotic microorganisms during culturing of bio-floc [J]. Journal of Fishery Sciences of China,

- 2014, 21(1): 75 – 83. [夏耘, 邱立疆, 郁二蒙, 等. 生物絮团培养过程中养殖水体水质因子及原核与真核微生物的动态变化. 中国水产科学, 2014, 21(1): 75 – 83.]
- [10] Lu B G, Wang H Y, Xie J, *et al.* Effect of C/N ratio on bioflocs formation and water quality in zero-water exchange grass carp tanks[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(8): 1220 – 1228. [卢炳国, 王海英, 谢骏, 等. 不同 C/N 水平对草鱼池生物絮团的形成及其水质的影响. 水产学报, 2013, 37(8): 1220 – 1228.]
- [11] Xu X Y, Feng L J, Zhu L, *et al.* Biofilm formation and microbial community analysis of the simulated river bioreactor for contaminated source water remediation [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2012, 19(5): 1584 – 1593.
- [12] Haque M R, Islam M A, Rahman M M, *et al.* Effects of C/N ratio and periphyton substrates on pond ecology and production performance in giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) and tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) polyculture system [J]. Aquaculture Research, 2013, 1 – 17.
- [13] Huggett M J, Nedved B T, Hadfield M G. Effects of initial surface wettability on biofilm formation and subsequent settlement of *Hydroides elegans* [J]. Biofouling, 2009, 25(5): 387 – 399.
- [14] Khatoon H, Yusoff F, Banerjee S, *et al.* Formation of periphyton biofilm and subsequent biofouling on different substrates in nutrient enriched brackishwater shrimp ponds [J]. Aquaculture, 2007, 273(4): 470 – 477.
- [15] Bratvold D, Browdy C L. Effects of sand sediment and vertical surfaces (AquaMats™) on production, water quality, and microbial ecology in an intensive *Litopenaeus vannamei* culture system [J]. Aquaculture, 2001, 195(1–2): 81 – 94.
- [16] Azim M E, Wahab M A. Periphyton-based pond polyculture[M]//Azim M E, Verdegem M C J, van Dam A A, Beveridge M C M, ed. Periphyton: Ecology, Exploitation and Management. UK: CABI Publishing, 2005: 207 – 222.
- [17] Arndt R E, Routledge M D, Wagner E J, *et al.* The use of AquaMats to enhance growth and improve fin condition among raceway cultured rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) [J]. Aquaculture Research, 2002, 33(5): 359 – 367.
- [18] Stehr G, Bottcher B, Dittberner P, *et al.* The ammonia-oxidizing nitrifying population of the River Elbe estuary [J]. FEMS Microbiology Ecology, 1995, 17(3): 177 – 186.
- [19] Huang Z T, Wan R, Song X F, *et al.* Assessment of AquaMats for removing ammonia in intensive commercial Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* aquaculture systems [J]. Aquaculture International, 2013, 21(6): 1333 – 1342.
- [20] Audelo-Naranjo J M, Martínez-Córdova L R, Voltolina D. Nitrogen budget in intensive cultures of *Litopenaeus vannamei* in mesocosms, with zero water exchange and artificial substrates [J]. Revista de Biología Marina y Oceanografía, 2010, 45(3): 519 – 524.
- [21] Lee D G, Lee J H, Kim S J. Diversity and dynamics of bacterial species in a biofilm at the end of the Seoul water distribution system [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2005, 21(2): 155 – 162.
- [22] Liu L, Yang J, Zhang Y. Genetic diversity patterns of microbial communities in a subtropical riverine ecosystem (Jiulong River, southeast China) [J]. Hydrobiologia, 2011, 678(1): 113 – 125.
- [23] Weerasooriya A C, Yi Y. Effects of aquaMats™ on growth of le tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry in earthen ponds at AIT, Thailand [J]. Tropical Agricultural Research, 2002, 14: 72 – 79.
- [24] Audelo-Naranjo J M, Martinez-Cordova L R, Gomez-Jimenez S, *et al.* Intensive culture of *Litopenaeus vannamei* without water exchange and with an artificial substrate [J]. Hidrobiologica, 2012, 22(1): 1 – 7.
- [25] Zhao W. Trial research of Jinyang Lake water treated by suspended biofilm [P]. Taiyuan: Taiyuan University of Technology, 2009. [赵伟. 悬浮式生物膜法处理晋阳湖水试验研究. 太原: 太原理工大学. 2009.]
- [26] Zhang W N, Lin X, Wang S K, *et al.* Effects of astragalus polysaccharide on nonspecific immunity and endocrine function in stomach and foregut of Tilapia [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2010, 22(2): 401 – 409. [张伟妮, 林旋, 王寿昆, 等. 黄芪多糖对罗非鱼非特异性免疫和胃肠内分泌功能的影响. 动物营养学报, 2010, 22(2): 401 – 409.]
- [27] Sun J Q, Xu Y, Zhang H Q, *et al.* Study on cytochemical location of acid phosphatase and alkaline phosphatase of *Litopenaeus vannamei* [J].

- Journal of Fudan University: Natural Science, 2007, 46(6):947-951. [孙静秋,许燕,张慧琦,等. 凡纳滨对虾体内 ACP、AKP 酶的细胞化学定位. 复旦学报:自然科学版,2007,46(6):947-951.]
- [28] Xu Y, Tao Y X. Involvement of the NMDA receptor/nitric oxide signal pathway in platelet-activating factor-induced neurotoxicity [J]. Neuropharmacology and Neurotoxicology, 2004, 15(2):263-266.
- [29] Moro M A, Cárdenas A, Hurtado O, *et al.* Role of nitric oxide after brain ischaemia[J]. Cell Calcium, 2004,36(3-4):266-75.
- [30] O'Toole G, Kaplan H B, Kolter R. Biofilm formation as microbial development [J]. Annual Review Microbiology, 2000,54:49-79.
- [31] Marshall K C. Biofilms; an overview of bacterial adhesion, activity, and control at surfaces [J]. American Society for Microbiology News, 1992,58:202-207.
- [32] Besemer K, Peter H, Logue J B, *et al.* Unraveling assembly of stream biofilm communities [J]. International Society for Microbial Ecology, 2012,6(8):1459-1468.
- [33] Besemer K, Singer G, Hödl I, *et al.* Bacterial community composition of stream biofilms in spatially variable-flow environments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(22):7189-7195.
- [34] Austin B, Austin D A. Bacterial fish pathogens; disease of farmed and wild fish[M]. Springer, 2007.
- [35] Janda J M, Abbott S L. Human pathogens [M]. London: Wiley, 1996:173.
- [36] Nawaz M, Khan S A, Khan A A. Detection and characterization of virulence genes and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish [J]. Food Microbiology, 2010,27(3):327-331.
- [37] Song T, Claudia T, Noboru N, *et al.* Aerolysin is activated by metal loprotease in *Aeromonas veronii biovar sobria*[J]. Journal of Medical Microbiology, 2004,53(6):477-482.
- [38] Rahman M, Colque N P, Kflhn I, *et al.* Identification and characterization of pathogenic *Aeromonas veronii biovar sobria* associated with epizotic ulcerative syndrome in fish in Bangladesh [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(2):650-655.
- [39] Pajares S, Eguiarte L E, Bonilla-Rosso G, *et al.* Drastic changes in aquatic bacterial populations from the Cuatro Cienegas Basin (Mexico) in response to longterm environmental stress [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2013,104(6):1159-1175.
- [40] Yang X L, Zhou N, Chen M, *et al.* Analysis of microbial community structure in MBR with different ammonia concentrations using fluorescence *in situ* hybridization [J]. Journal of Southeast University: Natural Science Edition, 2013,43(2):380-385.
- [41] Swift S, Karlyshev A V, Durant E L, *et al.* Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*; Identification of the LuxRI homologues AhyRI and AsaRI and their cognate signal molecules [J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(17):5271-5281.

Effects of eco-substrates on growth performance, intestine and water bacterial community composition of *Ctenopharyngodon idella*

XIA Yun¹, WANG Yifei², YU Ermeng¹, XIE Jun^{1*}, WANG Guangjun¹, YU Deguang¹, JI Hong²

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

2. College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: Eco-substrates technology is known to improve water quality and promote growth of breeding objects in aquaculture. In this study, a 30-day experiment was conducted to investigate the effectiveness of the non-woven eco-substrates for maintaining good water quality and promoting growth in *Ctenopharyngodon idella* of high density. At the same time, the fish nonspecific immunity, fish intestinal microbial composition, water microbial composition and microbial composition of eco-substrates were analysed in this research. Microbial communities were analyzed by using the PCR-DGGE (PCR-denaturing gradient gel) technology. In treatment group, the non-woven eco-substrates were placed in farming ponds with the density $0.32 \text{ m}^2/\text{m}^3$, which was produced by AquaMats Company. By the end of the test, final fish weight, weight gain and growth rate in treatment group were significantly higher ($P < 0.05$) than control, feed conversion ratio between the two groups was opposite ($P < 0.05$). The serum AKP, ACP, SOD and LSZ activities for treatment group were significantly higher ($P < 0.05$) than control, but iNos and tNOS were significantly lower ($P < 0.05$) in treatment group. At the end of the test, the TSS in treatment group was significantly lower ($P < 0.05$) than control. However, no differences were found between control and treatment group with respect to other water quality parameters. *Cetobacterium somerae* and *Aeromonas veronii* were the specific bacteria in control grass carp intestine, which didn't exist in intestine of treatment group. Bacterial community composition similarity between eco-substrates and treatment group water was much higher, and peaked at 63%. *Cetobacterium somerae* was specific dominant bacteria in control water. *Aeromonas veronii* existed only in water, and the distribution in control was higher than that in treatment group. Chloroflexi accounted for about 10% of the total bacteria for eco-substrates, but only 5% in water. The results demonstrated that non-woven eco-substrates could be considered a good tool for grass carp, mainly by promoting growth, reducing feed conversion ratio, improving nonspecific immunity and reducing TSS of water. The use of non-woven eco-substrates changed water bacterial community composition, reduced the number of opportunistic pathogens in water and intestine of grass carp.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; eco-substrates; growth; bacterial community composition

Corresponding author: XIE Jun. E-mail: xiejunhy@hotmail.com