



青鱼和鲇肠道排泄物对养殖水体铜绿微囊藻休眠体复苏的影响及作用途径

邹万生^{1*}, 王智², 宋齐生³, 刘良国¹,
韩庆¹, 王文彬¹, 杨品红¹

(1. 湖南文理学院, 水产高效健康生产湖南省协同创新中心, 洞庭湖生态经济区建设与
发展湖南省协同创新中心, 动物学湖南省高校重点实验室, 湖南 常德 415000;

2. 湖南师范大学生命科学学院, 湖南 长沙 410000;

3. Division of Plant Sciences, University of Missouri Columbia, Missouri Columbia, USA MO65211)

摘要: 为探讨养殖水体底栖鱼类肠道排泄物对铜绿微囊藻休眠体复苏的影响, 将青鱼和鲇肠道排泄物与铜绿微囊藻休眠体用野外养殖水域沉积物(底泥)混匀包埋, 在 10、15 和 20 °C 梯度温度下进行休眠体复苏实验。结果显示, 铜绿微囊藻休眠体主要复苏期为第 3~15 天, 在 10 和 15 °C 条件下, 青鱼排泄物组(MP)、鲇排泄物组(SA)和青鱼-鲇排泄物混合组(MP-SA)铜绿微囊藻休眠体复苏率均显著高于对照组(CK), 且 MP 组也显著高于 SA 组和 MP-SA 组; 在 20 °C 条件下, MP 组铜绿微囊藻休眠体复苏率显著高于 SA 组、MP-SA 混合组和 CK 组, 但 SA 组和 MP-SA 组与 CK 组复苏率并无显著性差异。实验过程中 MP 组沉积物中优势菌群以假单胞菌为主, SA 组和 MP-SA 组优势菌群分别以芽孢杆菌和厚壁菌为主, 第 0~12 天为菌群增殖期, 且此期间沉积物-水体界面(SWI)实验 MP 组、SA 组和 MP-SA 组溶解氧含量(DO)和氮磷比(N/P)均显著低于对照组。研究表明, 青鱼和鲇肠道排泄物能促进铜绿微囊藻休眠体复苏, 且这种促复苏效果在低温区间(10~15 °C)更显著, 可能是排泄物中菌群在生长增殖期降低了沉积物-水体界面 N/P 和 DO 的结果。研究结果对养殖水体底泥清淤和春季铜绿微囊藻水华防控具有一定的理论意义。

关键词: 青鱼; 鲇; 铜绿微囊藻; 鱼类排泄物; 休眠体; 复苏; 溶解氧; 氮磷比

中图分类号: S 917.1

文献标志码: A

随着水产养殖业的快速发展, 特别是高密度养殖(精养)模式的推广, 养殖水体富营养化加剧, 各类养殖水体微囊藻水华暴发日趋严重, 尤其是有毒铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)水华, 不仅影响养殖鱼类的繁育和产量, 也影

响鱼类的品质。铜绿微囊藻是一种在养殖水域和淡水湖泊频繁暴发水华的蓝藻, 铜绿微囊藻水华之所以频繁暴发, 得益于铜绿微囊藻细胞具有休眠和复苏特性, 是铜绿微囊藻维持种群延续的重要生活史对策^[1], 在外界环境胁迫下,

收稿日期: 2020-02-05 修回日期: 2020-08-28

资助项目: 国家自然科学基金(31600315, 31572619); 湖南省教育厅重点项目(19A340)

通信作者: 邹万生(照片), E-mail: zwsksy@163.com



铜绿微囊藻细胞能形成营养休眠体,并下沉至水域沉积物(底泥)表层渡过环境恶劣期,环境条件改善后休眠体再以“种源”形式从沉积物表层复苏进入上覆水体,通过种间竞争形成优势种群,在适宜的环境条件下再次暴发水华^[2-3]。因此,铜绿微囊藻休眠体从沉积物表层复苏是养殖水体水华暴发的关键环节,同时复苏率也是评价水华暴发概率的核心参数。当复苏率提高、进入上覆水体微囊藻的细胞丰度增加,种间竞争能力增强,铜绿微囊藻会在一定条件下形成优势种群,最终实现种群暴发、形成水华^[4-5];反之,休眠体复苏率低、上覆水体铜绿微囊藻细胞丰度和暴发水华的概率相对也低^[6]。为此,研究和探索养殖水域中影响铜绿微囊藻休眠体复苏及复苏率的环境因子十分必要,也为从源头防控养殖水体铜绿微囊藻水华暴发提供理论依据。

目前针对铜绿微囊藻休眠体复苏的生态环境因子研究主要集中在温度^[7]、光照强度^[8-9]、营养盐^[10-12]、水动力^[13]、底栖动物物理扰动^[14]以及底栖微生物^[15-16]等领域,但对同一水域其他生物排泄或代谢产物因子涉及甚少,特别是探讨水域底栖鱼类对微囊藻休眠体复苏的影响及其机理研究未曾报道。底栖鱼类活动在养殖水域底层,生长过程中会产生大量的排泄物,尤其是高密度底栖鱼类肠道排泄物中含有大量的氮(N)、磷(P)等有机营养物质和肠道微生物,这些排泄物绝大部分会途经沉积物吸附沉入沉积物表层^[17],使沉积物-水体界面(sediment-water interface, SWI)富含大量的植物性营养元素和微生物菌群。对于沉积物-水体界面环境极为复杂的养殖水域,底栖鱼类肠道排泄物是否对铜绿微囊藻休眠体复苏上浮和复苏率产生影响目前不得而知。为此,本实验拟利用底栖鱼类青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)和鲇(*Silurus asotus*)肠道排泄物作为对象,通过在沉积物中接种高活性铜绿微囊藻休眠体藻泥,设置对照组模拟外界水域环境进行复苏实验,考察青鱼和鲇肠道排泄物在梯度温度条件下对铜绿微囊藻休眠体复苏的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

鱼类肠道排泄物与实验用沉积物采集

从西洞庭冲天湖养殖水域采购青鱼和鲇,解剖

后收集它们的肠道排泄物,青鱼收集离排泄口5 cm段的肠道排泄物,鲇为3 cm段,从一端轻轻地向另一端压挤出排泄物(粪便),排泄物用预先灭菌的500 mL搪瓷碗进行盛装,待收集完排泄物后,用孔径为125 μm的不锈钢网筛(法斯特公司)进行过滤预处理,排泄物滤水沥干后(含水率均为35%)用无菌塑料袋(Dreure 康迪)装袋,在4 °C条件下冷藏备用。实验用沉积物(底泥)全部取自该养殖水域,沉积物取样时采用柱状KC-沉积物取样器(直径=6.5 cm, KC-Denmark),在搪瓷盘中将表层4 cm厚沉积物用孔径为125 μm的不锈钢网筛进行过滤预处理,将沉积物中的大型原生动物和部分无机颗粒物过滤掉,然后用无菌塑料袋装袋,在4 °C的聚乙烯便捷式冰盒(丹麦NUNC公司)中保存带回实验室。为避免取回的沉积物中的原生浮游生物和土著菌群影响实验结果,在复苏实验开始前,沉积物需进行灭菌预处理(121 °C, 25 min)。

实验用培养液 实验用培养液采用处理后的养殖湖水(与沉积物取样地点一致),取样时,采用单管Micros-水样采样器(Monotube, HYDRO-BIOS, Germany)进行反复取样,为过滤掉大型的浮游动植物和悬浮颗粒物,采用孔径10 μm的不锈钢网筛(法斯特公司)进行水样预处理,然后加入由纯净水制成的冰块进行冷藏处理,运回实验室。为了在进行复苏实验时满足实验过程中铜绿微囊藻复苏期间的营养需求,在每升湖水中加入1 mL硝酸钠(NaNO₃, 0.16 g/L)补充氮源,加入1 mL磷酸氢二钾(K₂HPO₄, 0.07 g/L)补充磷源。同时为防止取回湖水中原有土著微生物的干扰,在处理后对湖水进行灭菌操作(121 °C, 20 min),处理灭菌后的实验培养液理化性质如表1。湖水与沉积物采样同步进行,处理后的湖水在4 °C条件下冷藏备用^[18]。

铜绿微囊藻休眠体 从频繁暴发春季铜绿微囊藻水华的冲天湖水域采集水样带回实验室,对水样中铜绿微囊藻细胞进行分离纯化,

表1 处理后的实验培养液理化性质
Tab. 1 Physical and chemical properties of experimental culture medium after treatment of lake water

pH	treatment of lake water		COD _{Mn}
	可溶性无机氮 DIN	可溶性活性磷 SRP	
7.02	17.81	0.96	15.70

按 2 : 8 的比例接种到已经灭菌的实验用培养液中, 并在无菌人工智能气候箱中 (MMM Climacell, Germany) 培养 25 d, 培养期间温度 30 °C, 光照强度 50 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 以此步骤对铜绿微囊藻进行扩大培养。将扩大培养的藻液用 1000 mL 棕色三角瓶装瓶, 贴通气封口膜 (艾研生物, 16 cm \times 16 cm) 后静置于温度 4 °C、黑暗条件下 3 个月 (海尔冰箱, BCD-471WDEA), 使用时移去上清液, 浓缩制备成休眠体藻泥, 检测并记录藻泥的藻细胞 (休眠体) 浓度, 备用^[18]。

1.2 实验方法

复苏实验设计 复苏实验按梯度温度设对照组 (CK) 进行分组实验, 青鱼排泄物实验组为 MP 组, 鲇排泄物实验组为 SA 组, 同时还设一组混合排泄物实验组为 MP-SA 组 (此组青鱼-鲇排泄物体积比为 1 : 1), 以不加排泄物设为对照组 (CK), 实验过程每个样品组均设 3 个平行样。

对于实验组, 先将野外取回待用的沉积物 300 mL 均匀平铺在特制圆柱形玻璃器皿 (直径 15 cm, 高 50 cm) 底部, 再将另外 200 mL 沉积物与 50 mL 青鱼或鲇排泄物 (混合组各取 25 mL) 和 50 mL 铜绿微囊藻休眠体藻液混匀包埋, 然后加铺到特制圆柱形玻璃器皿中 (图 1), 柱形玻璃器

皿中沉积物总体积为 600 mL。再将 6000 mL 实验用培养液沿圆柱玻璃器皿壁缓慢加入玻璃器皿中, 最后用无菌透气纤维膜 (直径 25 cm) 进行盖封培养。对于对照组, 将 50 mL 待用沉积物替代 50 mL 青鱼-鲇排泄物, 并用硝酸钠 (NaNO_3 , 0.16 g/L) 和磷酸氢二钾 (K_2HPO_4 , 0.07 g/L) 调节氮磷浓度, 使其与各实验组排泄物氮磷浓度相当。所有实验组和对照组均置于人工智能气候箱 (MMM Climacell, Germany) 中培养 24 d, 光照强度为 10 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ (与春秋季节野外湖泊沉积物表层自然光强相当), 光暗比为 12 h : 12 h, 设 10、15 和 20 °C 3 个温度梯度。

当复苏实验开始时, 立即从玻璃器皿沉积物表层用微型封闭式沉积物采样器 (Becker, PUS-SEN) 取 5 g 沉积物, 1 g 用于测定沉积物细菌种群结构和占比, 4 g 用于测定沉积物中铜绿微囊藻休眠体浓度 (用叶绿素 *a* 表示); 从沉积物-水体界面 (SWI) 取水样测定可溶性无机氮 (dissolved inorganic nitrogen, DIN, mg/L) 和可溶性活性磷 (soluble reactive phosphorus, SRP, mg/L), 以 DIN/SRP 作为氮磷比值 (N/P); 从圆柱形玻璃器皿上覆水体中取 9 mL 水样 (上、中、下层水体各取 3 mL 混匀) 测定复苏后的铜绿微囊藻浓度 (用叶绿素 *a* 表示); 溶解氧含量 (DO, mg/L) 直接用溶解氧测定仪当场测定。

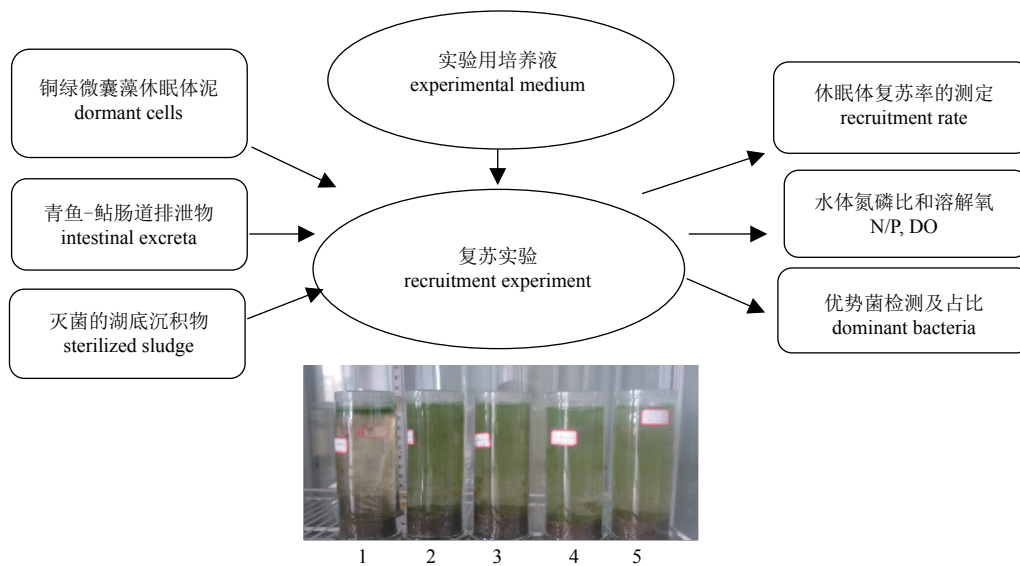


图 1 复苏实验简易示意图

图中瓶号 1、2 和 3 分别为 CK、MP 和 SA 组, 4 和 5 为 MP-SA 组

Fig. 1 Simple diagram of recruitment experiment for *M. aeruginosa*

The bottle numbers 1, 2 and 3 in the figure are CK, MP and SA groups, respectively, and the bottle numbers 4 and 5 are MP-SA groups

各项检测指标每3天检测1次,每次取样检测时间为当天上午10:00,为防止玻璃器皿中已经复苏的铜绿微囊藻细胞再次增殖而影响上覆水中铜绿微囊藻浓度测定的准确度,每3天检测完后,从玻璃器皿中用微型抽液器抽出5 500 mL上覆水,再用实验用培养液补充至原刻度处继续共培养,上覆水体中第*N*天的总复苏藻细胞浓度为该天以前测定的浓度之和。复苏实验简易示意图见图1。

沉积物中铜绿微囊藻休眠体的浮提 为将特制圆柱形玻璃器皿沉积物中的铜绿微囊藻休眠体提纯出来,以测定沉积物中叶绿素*a*浓度(Chl.*a*用于标示沉积物中的铜绿微囊藻休眠体浓度)而采用细胞浮提方法,具体浮提过程参照Verspagen等^[19]的方法进行,即从圆柱形玻璃器皿中用微型取样器(Becker, PU-SEN)取4 g沉积物,然后与16 mL硅石胶态悬浮液percoll(30%percoll配制:30%的percoll原液+10%的8.5%的NaCl+60%的双蒸水)进行充分混匀,以1 800 r/min离心15 min,离心后将分层的上层液体(下层为沉积物)用孔径为25 μm的醋酸纤维滤膜(赛多利斯,直径25 cm)进行过滤,将捕获的铜绿微囊藻休眠体再与5 mL实验用培养液进行充分混匀,立即进行叶绿素*a*浓度检测。

沉积物与上覆水中叶绿素*a*的检测 沉积物中铜绿微囊藻休眠体浓度与上覆水样复苏的铜绿微囊藻细胞浓度均以叶绿素*a*为参数进行表示,叶绿素*a*浓度检测采用丙酮提取法:即用移液枪(雷布斯,0~1 000 μL)吸取2 mL含铜绿微囊藻休眠体或铜绿微囊藻复苏藻细胞的藻液于离心机(德国Eppendorf, 5430R)中,在12 000 r/min的条件下离心5 min。用移液枪吸去上清液,剩下的藻饼(离心后的藻细胞团)加入2 mL 80%的丙酮(奥斯邦, AR)进行重新悬浮,再用锡箔纸完全包裹离心管,并在暗光、水温55 °C条件下水浴(OLABO恒温水浴锅HH-s4)30 min,再次在12 000 r/min的条件下离心5 min,吸出上清液转移至标准10 mL刻度试管中,用80%丙酮定容至5 mL后用紫外可见分光光度计(岛津UV-2600)在波长663 nm处测定吸光度值,测定结果按照 $CA=OD_{663/82}$,计算出叶绿素的含量(mg/L)。沉积物中铜绿微囊藻休眠体浓度还需将丙酮提取液中叶绿素的浓度(mg/L)再换算成沉积物中叶绿

素*a*的浓度(μg/g FW, FW表示沉积物鲜重),具体步骤参照Berrendero等^[20]。

沉积物细菌群落结构与占比测定 复苏实验开始后,每3天从玻璃器皿沉积物表层取沉积物1 g进行细菌群落和占比测定,细菌分离、计数和纯化均采用平板划线方法,即取1 g沉积物样品经过充分混匀后加入到10 mL无菌蒸馏水中(用25 mL刻度试管)进行梯度稀释,以此方法稀释梯度范围为 10^{-1} ~ 10^{-7} ,从各稀释梯度 10^{-5} ~ 10^{-7} 样品溶液中吸取0.1 mL于FWA淡水培养基(购于北京陆桥技术有限责任公司)进行平板涂布,培养48 h后选择合适的梯度平板进行计数。对菌株进行纯化后,采用16S rDNA技术进行细菌分子生物学鉴定(送北京诺禾致源科技股份有限公司检验)。根据菌群在整个实验过程中的平均丰度(选取大于或等于2%作为优势菌)筛选优势菌群,再以各优势菌在总菌群中所占百分数为占比(%),本实验MP组、SA组和MP-SA组测得的沉积物中起始总菌浓度分别为 5.2×10^5 、 4.5×10^5 和 4.7×10^5 cfu/g。

SWI氮磷比与溶解氧测定 取沉积物-水体界面水样进行SRP、DIN及DO等理化指标测定,SRP采用钼酸铵分光光度法进行测定,即取6支50 mL具塞比色管,分别加入2 μg/mL磷酸盐(天津大茂化学试剂厂, AR)标准溶液0、1.00、3.00、5.00、10.00和15.00 mL,加水稀释至标线。向各比色管中加入4 mL 50 mg/mL过硫酸钾(济南盛茉莉化工试剂厂, AR)溶液,混匀消解30 min,冷却稀释至标线(50 mL处)后,先加入1 mL 100 mg/mL的抗坏血酸(天津金汇太亚化学公司, AR)溶液,30 s后加2 mL钼酸铵(天津金汇太亚化学公司, AR)溶液,充分混匀。静置15 min后,在室温20 °C条件下用30 mm比色皿,以水或零浓度空白管为参比,用紫外可见分光光度计(岛津UV-2600)测定吸光度,并绘制校准工作曲线。水样经孔径为0.45 μm的滤膜抽滤,得到澄清的水样,再分取25 mL水样于50 mL比色皿中,按照绘制校准工作曲线的步骤进行测定。DIN采用碱性过硫酸钾法测定,测定步骤与SRP类似,即先用硝酸盐氮(天津大茂化学试剂厂, AR)10 μg/mL标准溶液测绘标准工作曲线(在120~124 °C下消解30 min,纯水作参比测定吸光度,用校正的吸光度绘制标准曲线)。检测

水样时先利用孔径 0.45 μm 醋酸纤维膜(赛多利斯, 直径 25 cm)抽滤, 得到澄清水样, 按照标准曲线绘制步骤操作, 在标准曲线上查出相应的可溶性无机氮量。DO 采用便捷式多功能水质测定仪 (HACH-HQ40D, USA) 直接测定。氮磷比采用 DIN 与 SRP 浓度之比作为标示参数 (N : P = DIN : SRP)。

数据分析 铜绿微囊藻复苏细胞、休眠体、细菌、氮磷以及溶解氧等测定的最终数据以平均值 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示, 数据作图采用 Excel 2010 软件, 数据统计分析采用 SPSS 14.0 软件, 实验期间各检测指标的动态变化情况采用单因素方差分析 (ANOVA) 及 Duncan 氏多重比较分析处理, 以 $P < 0.05$ 作为差异显著性水平。

2 结果

2.1 不同温度下各组铜绿微囊藻休眠体复苏状况

在梯度温度 10、15 和 20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, MP、SA、MP-SA 和 CK 组铜绿微囊藻休眠体均从第 6 天开始启动复苏, 从沉积物表层复苏进入上覆水体中 (图 2, 图 3)。在温度 10 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, MP、SA 和 MP-SA 组铜绿微囊藻休眠体复苏率均显著高于 CK 组 ($P < 0.05$), 且 MP 组显著高于 SA 组, 又显著高于 MP-SA 组 (图 4-a)。在温度 15 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, MP、SA 和 MP-SA 组铜绿微囊藻休眠体

复苏率也均显著高于 CK 组 ($P < 0.05$), 且 MP 组显著高于 SA 和 MP-SA 组 ($P < 0.05$), SA 和 MP-SA 组之间无显著性差异 ($P > 0.05$) (图 4-b)。当实验温度为 20 $^{\circ}\text{C}$ 时, MP 组休眠体复苏率显著高于 SA、MP-SA 和 CK 组 ($P < 0.05$), 但 SA、MP-SA 和 CK 组两两之间无显著性差异 ($P > 0.05$) (图 4-c)。

从梯度温度实验看, CK 组和实验组 (排泄物组) 均随着温度的升高其休眠体复苏率也不断提升, 在 10 $^{\circ}\text{C}$ 时, CK、MP、SA 和 MP-SA 组铜绿微囊藻休眠体复苏率分别为 14%、45%、36% 和 28%; 在 15 $^{\circ}\text{C}$ 时, 复苏率分别为 43%、60%、51% 和 50%; 在 20 $^{\circ}\text{C}$ 时, 复苏率分别为 49%、61%、52% 和 51%。对于对照组和 3 个实验组 (排泄物组), 15 和 20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下的休眠体复苏率均显著高于各自在 10 $^{\circ}\text{C}$ 条件下的复苏率 ($P < 0.05$), 但各组在 15 和 20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下的休眠体复苏率均无显著性差异 ($P > 0.05$) (图 5)。

2.2 不同温度条件下各实验组优势菌群及占比

从各实验组中取沉积物进行细菌菌群检测和占比分析。对于 MP 组, 在 10 $^{\circ}\text{C}$ 时, 沉积物中的优势菌为假单胞菌 (*Pseudomonas*)、梭菌 (*Fusobacteria*)、芽孢杆菌 (*Bacillus*)、弧菌 (*Vibrio*)、变形菌 (*Proteobacteria*) 和厚壁菌 (*Firmicute*), 各自在沉积物总菌中的占比分别为 33%、13%、9%、7%、4% 和 4% (表 2), 优势菌占比为 70% (图 6-a); 在 15 和 20 $^{\circ}\text{C}$ 时, 假单胞菌、梭菌、芽孢杆菌、

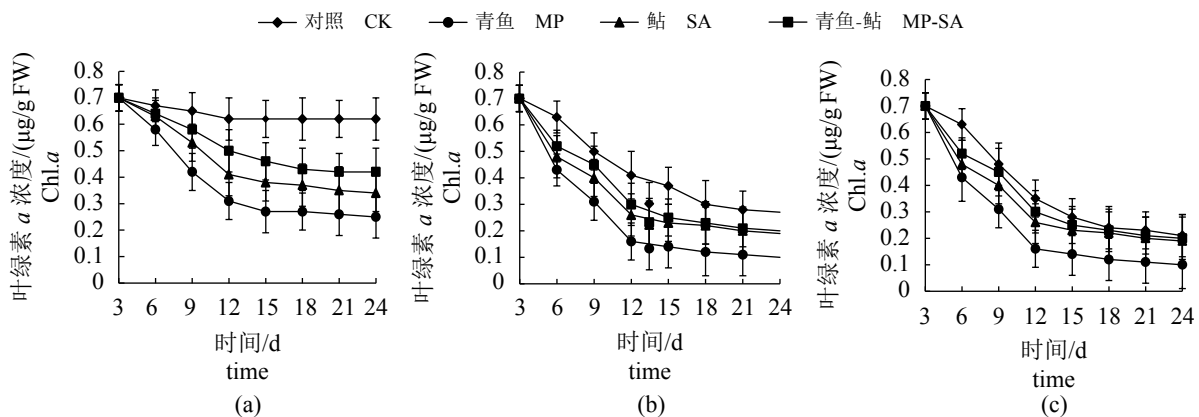


图 2 不同温度下沉积物中铜绿微囊藻休眠体浓度

CK 表示对照组, MP 表示青鱼排泄物组, SA 表示鲈排泄物组, MP-SA 表示青鱼和鲈排泄物混合组, 下同。(a), (b) 和 (c) 分别表示温度 10、15 和 20 $^{\circ}\text{C}$ 条件, 图 4, 图 7 和图 9 同

Fig. 2 Chlorophyll a (Chl. a) concentration of dormant *M. aeruginosa* cells in sediment

CK, MP, SA and MP-SA indicate the control groups, *M. piceus* excreta groups, *S. asotus* excreta groups and mixed excreta groups, respectively, the same below. (a), (b) and (c) are different temperatures of 10, 15 and 20 $^{\circ}\text{C}$, respectively, the same as Fig. 4, Fig. 7 and Fig. 9

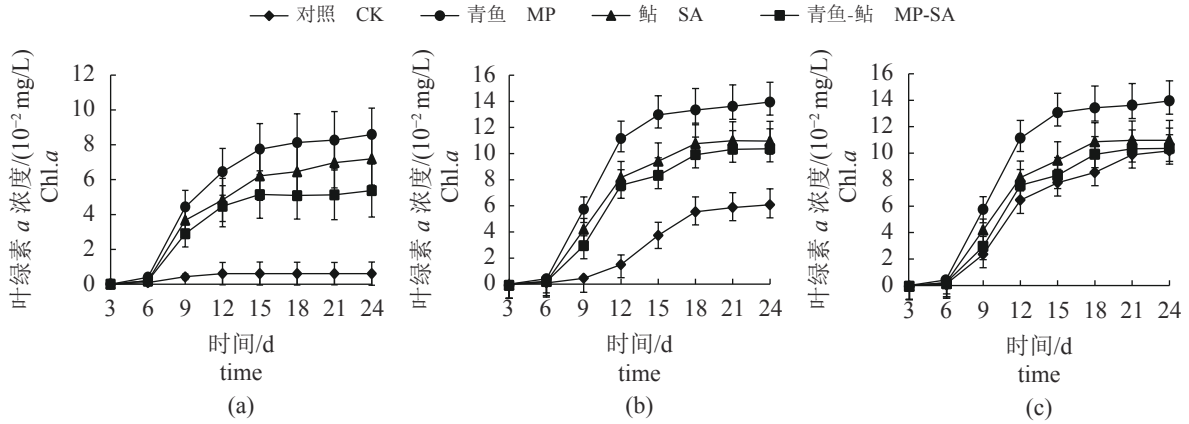


图 3 不同温度下上覆水体中铜绿微囊藻的细胞浓度

Fig. 3 Chlorophyll a (Chl. a) concentration of *M. aeruginosa* cells in overlying water

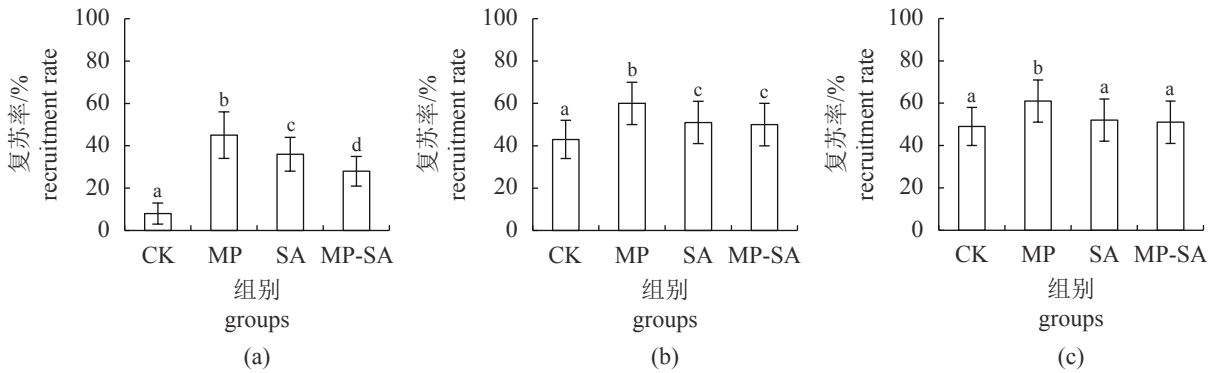


图 4 同一温度下各组铜绿微囊藻休眠体复苏率及显著性分析

图中不同小写字母表示组间复苏率具有显著性差异 ($P < 0.05$)

Fig. 4 Recruitment rate of *M. aeruginosa* cells at the end phase of the experiment at the same temperature

Different lowercase letters in figure denote there was significant difference in the recruitment rates of *M. aeruginosa* among experimental groups at the same temperature ($P < 0.05$)

弧菌和厚壁菌仍处于优势地位，而变形菌退出优势菌行列，微小杆菌 (*Exiguobacterium*) 成为优势菌 (表 2)，15 和 20 °C 条件下优势菌占比分别为 61% 和 54%(图 6-a)；在 MP 组，整个实验过程中假单胞菌处于绝对优势地位，但随着温度升高，其占比下降，芽孢杆菌占比上升 (表 2)，这可能与假单胞菌比芽孢杆菌等更适应低温环境有关。对于 SA 组，在 10、15 和 20 °C 条件下，沉积物中的优势菌均为芽孢杆菌、双歧杆菌 (*Bifidobacterium*)、乳酸菌、厚壁菌、弧菌和假单胞菌，优势菌占比分别为 64%、50% 和 42%(图 6-b)；在 3 个梯度温度条件下，绝对优势菌均为芽孢杆菌和双歧杆菌，随着温度的上升，各自在菌群中的丰度和占比逐渐下降。对于 MP-SA 组，在 10、15 和 20 °C 条件下，沉积物中的优势菌均为芽孢

杆菌、双歧杆菌、乳酸菌、厚壁菌、变形菌和假单胞菌，它们在总菌中占比分别为 50%、45% 和 43%(图 6-c)，其中绝对优势菌为厚壁菌和芽孢杆菌。假单胞菌、芽孢杆菌、弧菌和厚壁菌在实验组 MP、SA 均处于优势地位 (表 2)，说明这些菌是青鱼-鲈肠道排泄物中主要的细菌类群，只是绝对优势菌存在差异；在 MP-SA 组中，在 MP 和 SA 中处于绝对优势地位的假单胞菌和芽孢杆菌占比均显著下降，而厚壁菌处于绝对优势地位。各实验组沉积物中的总菌浓度均随着温度的升高而增加，且 15 和 20 °C 时的总菌浓度显著高于 10 °C ($P < 0.05$)(图 6)。在 10、15 和 20 °C 条件下，菌群的主要增殖期为实验开始的前 12 d (第 0~12 天)。

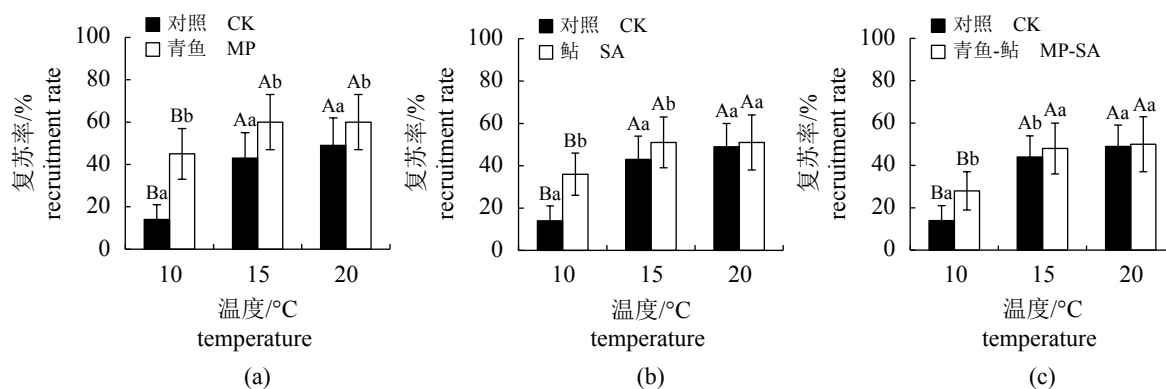


图 5 不同温度下实验组与对照组复苏率对比及显著性分析

柱状图上不同大写字母表示不同温度下的同组之间具有显著性差异 ($P < 0.05$), 不同小写字母表示相同温度下实验组与对照组之间具有显著性差异 ($P < 0.05$)

Fig. 5 Recruitment rate of *M. aeruginosa* cells at the end phase of the experiment between fish-excrement and control groups at different temperature

Different capital letters in figure denote there was significant difference in the recruitment rates of *M. aeruginosa* for fish-excrement or control groups at different temperature ($P < 0.05$), different lowercase letters in figure denote there was significant differences in the recruitment rates of *M. aeruginosa* between fish-excrement and control groups at the same temperature ($P < 0.05$)

表 2 不同温度条件下各实验组优势菌群及占比

温度/°C temperautre	青鱼 MP		鲇 SA		青鱼-鲇 MP-SA	
	优势菌 dominant bacteria	占比 rate	优势菌 dominant bacteria	占比 rate	优势菌 dominant bacteria	占比 rate
10	假单胞菌 <i>Pseudomonas</i>	33	芽孢杆菌 <i>Bacillus</i>	20	芽孢杆菌 <i>Bacillus</i>	12
	梭菌 <i>Fusobacteria</i>	13	双歧杆菌 <i>Bifidobacterium</i>	13	双歧杆菌 <i>Bifidobacterium</i>	8
	芽孢杆菌 <i>Bacillus</i>	9	乳酸菌 <i>Lactobacillus algidus</i>	10	厚壁菌 <i>Firmicute</i>	14
	弧菌 <i>Vibrio</i>	7	厚壁菌 <i>Firmicute</i>	10	变形菌 <i>Proteobacteria</i>	7
	变形菌 <i>Proteobacteria</i>	4	弧菌 <i>Vibrio</i>	7	乳酸菌 <i>Lactobacillus algidus</i>	6
	厚壁菌 <i>Firmicute</i>	4	假单胞菌 <i>Pseudomonas</i>	4	假单胞菌 <i>Pseudomonas</i>	4
15	假单胞菌 <i>Pseudomonas</i>	25	芽孢杆菌 <i>Bacillus</i>	18	芽孢杆菌 <i>Bacillus</i>	9
	梭菌 <i>Fusobacteria</i>	9	双歧杆菌 <i>Bifidobacterium</i>	9	双歧杆菌 <i>Bifidobacterium</i>	5
	芽孢杆菌 <i>Bacillus</i>	12	乳酸菌 <i>Lactobacillus algidus</i>	7	厚壁菌 <i>Firmicute</i>	15
	弧菌 <i>Vibrio</i>	5	厚壁菌 <i>Firmicute</i>	9	变形菌 <i>Proteobacteria</i>	7
	微小杆菌 <i>Exiguobacterium</i>	5	弧菌 <i>Vibrio</i>	4	乳酸菌 <i>Lactobacillus algidus</i>	5
	厚壁菌 <i>Firmicute</i>	5	假单胞菌 <i>Pseudomonas</i>	5	假单胞菌 <i>Pseudomonas</i>	5
20	假单胞菌 <i>Pseudomonas</i>	22	芽孢杆菌 <i>Bacillus</i>	15	芽孢杆菌 <i>Bacillus</i>	9
	梭菌 <i>Fusobacteria</i>	8	双歧杆菌 <i>Bifidobacterium</i>	8	双歧杆菌 <i>Bifidobacterium</i>	6
	芽孢杆菌 <i>Bacillus</i>	12	乳酸菌 <i>Lactobacillus algidus</i>	7	厚壁菌 <i>Firmicute</i>	13
	弧菌 <i>Vibrio</i>	6	厚壁菌 <i>Firmicute</i>	7	变形菌 <i>Proteobacteria</i>	7
	微小杆菌 <i>Exiguobacterium</i>	4	弧菌 <i>Vibrio</i>	2	乳酸菌 <i>Lactobacillus algidus</i>	6
	厚壁菌 <i>Firmicute</i>	3	假单胞菌 <i>Pseudomonas</i>	3	假单胞菌 <i>Pseudomonas</i>	2

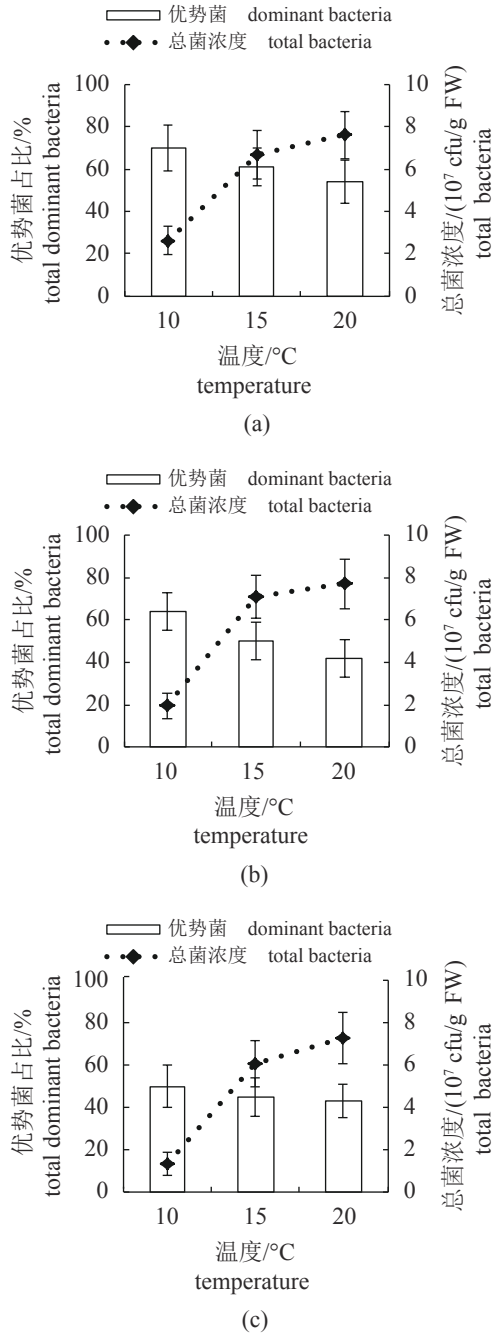


图6 不同温度条件下优势菌在各实验组总菌中的比例

(a)、(b)和(c)分别代表青鱼组、鲈组和青鱼-鲈混合组

Fig. 6 Proportion of dominant bacteria in total bacteria of each experimental group under different temperature conditions

(a), (b) and (c) represent MP, SA and MP-SA groups, respectively

2.3 SWI 溶解氧含量变化

在实验温度 10、15 和 20 °C 条件下，MP、SA 和 MP-SA 的 DO 变化趋势都基本类似(图 7)。

在 0~9 d, 各实验组溶解氧含量急剧下降, 且 15 和 20 °C 条件下的溶解氧下降速率显著快于 10 °C, 第 12 天后均逐渐回升, 但溶解氧始终低于起始含量。在 3 个梯度温度条件下, CK 组溶解氧含量变化不大, 都没有急剧下降阶段(图 7)。在实验温度 10、15 和 20 °C 条件下, MP、SA 和 MP-SA 组在整个实验阶段的平均溶解氧含量均显著低于对照组 ($P < 0.05$), 特别是在 3~12 d 实验阶段(图 8)。在相对较低温度 10 °C 时, 不仅 MP、SA 和 MP-SA 组与 CK 组之间平均溶解氧含量存在显著性差异 ($P < 0.05$), 3 个实验组之间也相互具有显著性差异 ($P < 0.05$)(表 3), 它们的溶解氧含量从高到低排序依次为 CK>MP-SA>SA>MP。而在 15 和 20 °C 时, 3 个实验组的平均溶解氧含量显著低于对照组 ($P < 0.05$), 3 个实验组之间却不具有显著性差异 ($P > 0.05$)(表 3)。

2.4 SWI 氮磷比值变化

在实验温度 10、15 和 20 °C 条件下, 实验过程中 MP、SA 和 MP-SA 组的 N:P 值在实验阶段第 0~9 天快速下降, 第 9 天前达到最低点, 第 12 天后均逐渐回升, 15~24 d 基本维持在一定的水平, 但氮磷比始终低于起始比值。在 3 个梯度温度下, 第 0~9 天, 同期 N/P 值下降最快的是 MP 组, 其次依次为 SA、MP-SA 组和 CK 组, CK 组 N/P 值全程无显著变化(图 9), 此阶段 3 个实验组与 CK 组 N/P 值均存在显著性差异 ($P < 0.05$), 3 个实验组之间彼此也存在显著性差异 ($P < 0.05$)(表 4)。15 和 20 °C 条件下, 实验组 N/P 值下降速率明显快于 10 °C, 且各实验组的最小 N/P 值也低于同期 10 °C 条件下的 N/P 值, 15 °C 时 MP、SA 和 MP-SA 组 N/P 最小值分别为 10.1、12.5 和 14.5, 20 °C 时最小值分别为 9.9、12.4 和 14.3, 而 10 °C 时的最小值分别为 12.8、15.0 和 15.3(图 9)。

3 讨论

3.1 不同温度和排泄物条件下铜绿微囊藻休眠体复苏

当养殖水体发生富营养化时, 只要光照强度和水温适宜, 铜绿微囊藻就会快速生长、增殖并暴发水华, 而进入冬季时, 水华自然消退^[2], 正是由于低温胁迫促使铜绿微囊藻细胞进入休眠状态、以营养休眠体形式下沉至水域沉积物

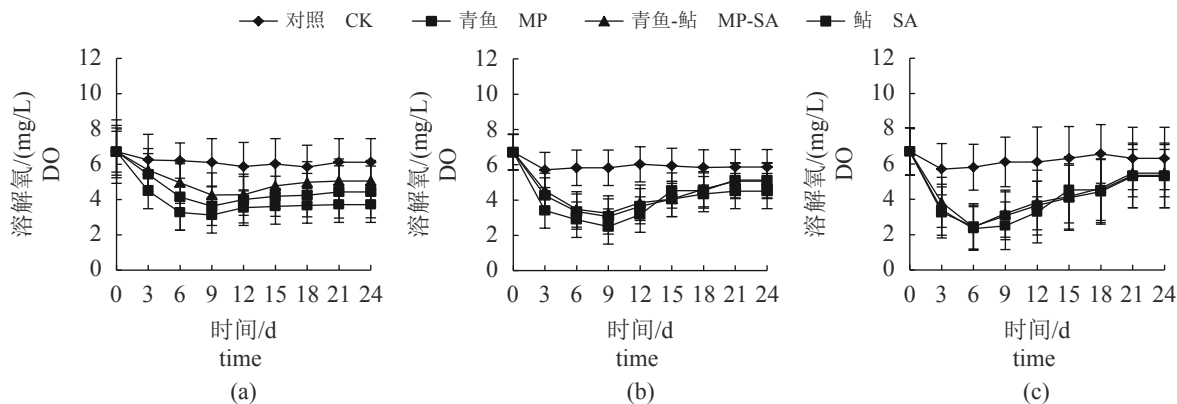


图7 不同温度条件下沉积物-水体界面溶解氧含量变化趋势

Fig. 7 Concentration of dissolved oxygen (DO) in the sediment-water interface of each container with different fish-excrement

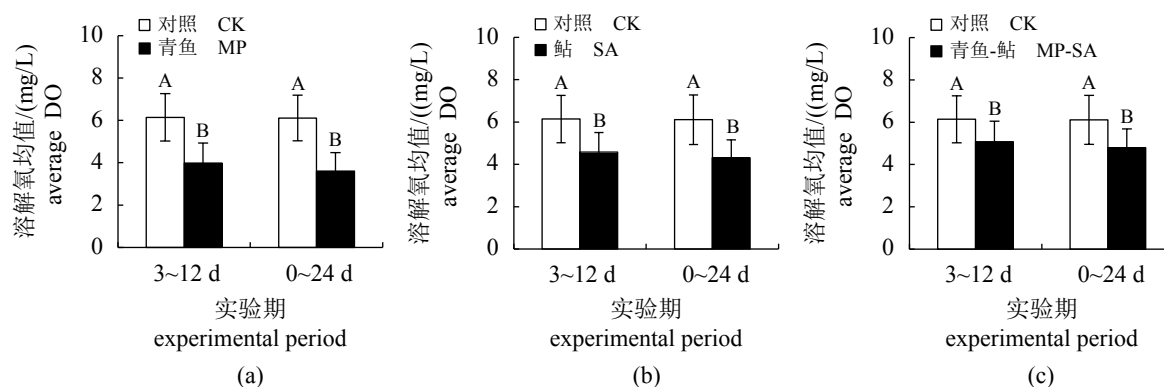


图8 梯度温度下对照组和实验组平均溶解氧含量差异显著性分析

不同大写字母表示组间具有显著性差异 ($P < 0.05$)

Fig. 8 Analysis of the significant difference about average DO concentration between the control group and the experimental groups

Different capital letters showed significant difference between the control group and the experimental groups ($P < 0.05$)

表3 不同温度条件下第3~12天实验期各组溶解氧含量均值及差异性分析

Tab. 3 Difference analysis on the mean value of DO in the experimental period of the 3rd-12th day under different temperature conditions

温度/°C temperature	组别 groups			
	对照 CK	青鱼 MP	鲇 SA	青鱼-鲇 MP-SA
10	6.14±0.42 ^a	3.61±0.25 ^b	4.32±0.28 ^c	4.31±0.32 ^d
15	6.09±0.31 ^a	3.92±0.22 ^b	3.96±0.24 ^b	4.12±0.35 ^b
20	6.11±0.37 ^a	3.89±0.31 ^b	3.95±0.33 ^b	4.11±0.29 ^b

注: 同温条件下不同小写字母表示组间差异性显著 ($P < 0.05$), 下同

Notes: different small letters indicate significant difference between groups under the same temperature conditions ($P < 0.05$), the same below

(底泥) 表层越冬^[3]。因此, 铜绿微囊藻休眠体要重新上浮至上覆水体以“种源”形式扩大种群规模, 则必须经历伴随水温回升的复苏阶段。只有沉积物表层水温不低于铜绿微囊藻休眠体生长阈

值下限它们才会开始启动复苏, 但水温的高低也制约着铜绿微囊藻休眠体的复苏率^[7]。因而, 水温对铜绿微囊藻休眠体复苏具有重要意义。

本复苏实验中设计的最低实验温度为 10 °C,

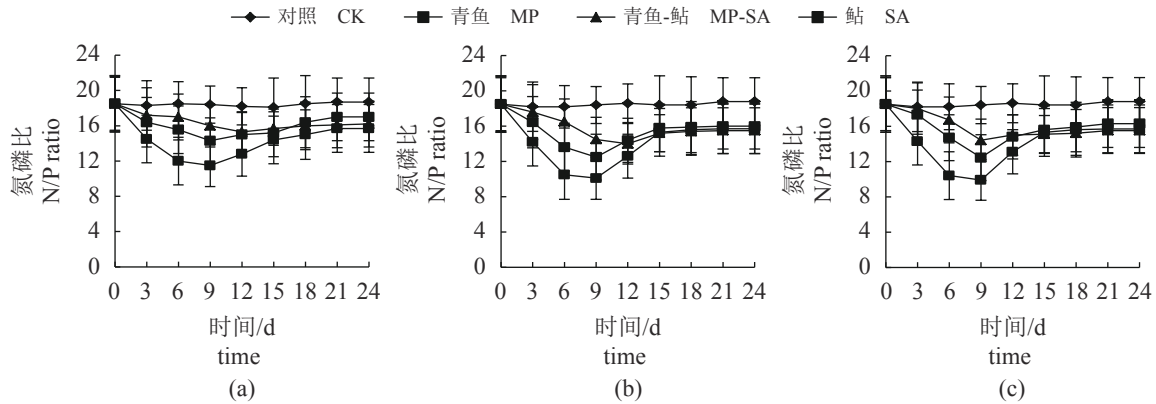


图9 不同温度条件下沉积物-水体界面氮磷比(N/P)变化趋势

Fig. 9 Dynamics of N/P ratios in the sediment-water interface of each container under different fish-excrement conditions

表4 不同温度条件下第3~12天实验期各组氮磷比均值及差异性分析

Tab. 4 Difference analysis on the mean value of N/P ratio in the experimental period of the 3rd-12th day under different temperature conditions

温度/°C temperature	组别 groups			
	对照 CK	青鱼 MP	青鱼-鲎 MP-SA	鲎 SA
10	18.31±2.12 ^a	12.71±2.03 ^b	16.43±2.46 ^c	15.33±1.95 ^d
15	18.35±2.34 ^a	11.93±1.95 ^b	15.75±2.19 ^c	14.27±1.88 ^d
20	18.28±2.27 ^a	11.89±1.34 ^b	16.01±2.32 ^c	14.81±1.79 ^d

从图2和图3可以得知, 10 °C 条件下的铜绿微囊藻休眠体(对照组)能复苏进入上覆水体, 但复苏率仅为8%(图4), 显著低于15 °C(复苏率43%)和20 °C(复苏率49%)时的复苏率, 说明水温是铜绿微囊藻休眠体复苏的制约因素。

目前, 关于铜绿微囊藻休眠体复苏的具体水温阈值和适宜水温学界一直存在很大争议。Tsumimura 等^[13]认为铜绿微囊藻休眠体复苏的最低水温为9 °C, 并且通过实验表明当休眠体持续处于水温低于5 °C 的环境中时, 休眠体会失活, 即水温回升, 微囊藻休眠体也不能再复苏。Tsukada^[21]认为铜绿微囊藻休眠体复苏的最适温度约为15 °C, 当水温为7 °C 时休眠体就开始启动复苏、缓慢生长, 但复苏率低于1.40%。但又有研究表明, 即使水温达到10 °C, 沉积物(底泥)表层中的铜绿微囊藻休眠体也无法复苏进入上覆水体, Tan 等^[7]对太湖沉积物中的微囊藻休眠体复苏情况进行了调查研究, 发现其复苏温度需在12.5 °C 以上。Lehman 等^[22]在对瑞典Limmaren湖微囊藻水华进行研究时, 发现铜绿微囊

藻休眠体野外复苏的水温不具确定性, 有些年份铜绿微囊藻休眠体在春季10 °C 左右就启动复苏, 而有些年份15 °C 也没能从上覆水体中检测到复苏的铜绿微囊藻细胞。研究者们之所以对铜绿微囊藻休眠体复苏的水温得出差异性结论, 主要是各自研究对象所处的环境差异性太大, Tan 等^[7]是以中国太湖的铜绿微囊藻复苏为研究对象, Lehman 等^[22]研究的是瑞典Limmaren水域, 而Tsumimura 等^[13]研究的是日本Biwa水域, 而且同一水域不同时期的水体理化性质也存在显著差异。邹万生等^[23]曾利用2株冲天湖的促藻菌对铜绿微囊藻休眠体进行模拟复苏实验, 发现菌浓度与水温之间存在一定的补偿关系但不可替代, 即高浓度菌群条件下铜绿微囊藻休眠体复苏的水温可以低于无菌条件下1~1.5 °C。这些充分说明铜绿微囊藻休眠体复苏的温度还受到其他环境因子的综合影响。

从本复苏实验中可以看出, 当在较低水温10 °C 时, 添加了鱼类排泄物的实验组复苏率显著高于对照组, 特别是青鱼排泄物组的复苏率

高达45%, 鲇排泄物和混合排泄物组的复苏率也分别达到36%和28%(图4), 即使在较高温度15和20℃条件下, 青鱼排泄物实验组复苏率也均显著高于对照组的复苏率(图5), 这说明水温是影响铜绿微囊藻休眠体复苏和复苏率的重要因子, 但相同温度条件下沉积物中鱼类排泄物也会对铜绿微囊藻休眠体复苏和复苏率产生影响。

3.2 鱼类排泄物菌群与铜绿微囊藻休眠体复苏

从本实验结果可以看出, 在10和15℃时, 添加鱼类排泄物的实验组铜绿微囊藻休眠体复苏率显著高于对照组, 特别是青鱼排泄物组休眠体复苏率在20℃条件下也显著高于对照组(图4)。由于本实验属控制性实验, 在进行复苏实验时, 除了青鱼-鲇排泄物外, 其他实验材料均进行了灭菌处理, 故实验组沉积物中的菌群都来自青鱼-鲇肠道排泄物。这就说明青鱼-鲇肠道排泄物在较低温度条件下能促进沉积物中铜绿微囊藻休眠体复苏并提升其复苏率, 同时也表明这种促进休眠体复苏的现象很可能与排泄物中的菌群有关。

铜绿微囊藻休眠体复苏是否与沉积物表层中的底栖菌群密切相关, 目前相关文献较少。最早的相关报道是关于蓝藻水华暴发时底栖菌群动态关系, Berg等^[15]对与蓝藻水华相关的水生菌群进行了研究, 发现蓝藻水华暴发过程中异养菌多样性指数显著高于其他菌群, 且92%的异养菌均为兼性细菌, 但文献没有讨论异养菌与蓝藻水华暴发之间的内在关系。Boltovskoy等^[24]对Limnoperma水域的藻菌关系调查研究结果具有类似性。随后, Wang等^[25]证实了部分异养菌在微囊藻形成优势种群过程中所起的重要作用, 且表明异养菌浓度在微囊藻种群暴发前后差异显著。底栖异养菌是否会协助铜绿微囊藻成为优势种群, Li等^[5]在铜绿微囊藻和惠氏微囊藻(*M. wesenbergii*)种间竞争实验中发现, 水生菌群组成是影响它们成为优势藻的重要环境因子, 虽然藻菌之间的作用机理未见报道, 但充分说明了水生底栖菌对铜绿微囊藻休眠体复苏和形成优势藻产生了重要影响。邹万生等^[23]对频繁暴发春季铜绿微囊藻水华的西洞庭冲天湖水域进行了藻菌关系季节动态调查研究, 发现冲天湖水域底泥表层铜绿微囊藻休眠体复苏与水生底栖优势菌群消涨存在一定时空关系。同

时, 邹万生等^[18]利用底栖优势菌中分离出的1株微小杆菌和1株芽孢杆菌, 并与铜绿微囊藻休眠体包埋后进行复苏实验, 结果表明2菌株具有促进铜绿微囊藻休眠体复苏的能力。随后Zou等^[16]对2菌株促进铜绿微囊藻休眠体复苏的作用机理也进行了研究。

从本实验检测的各组菌群来看, 青鱼排泄物组、鲇排泄物组和青鱼-鲇混合组优势菌中都包含假单胞菌、芽孢杆菌和厚壁菌(表2), 每个实验组的菌群在较低温度下(10和15℃)都具有促进铜绿微囊藻休眠体复苏的能力, 但在较高温度下(20℃), 只有青鱼排泄物组具有促进作用(图2, 图3)。对于芽孢杆菌, 已经有过相关促复苏实验的研究报道^[16], 但假单胞菌、厚壁菌以及其他优势菌等是否能促进铜绿微囊藻休眠体复苏, 目前还未见相关文献报道。至于青鱼-鲇混合排泄物组铜绿微囊藻休眠体复苏率低于青鱼和鲇排泄物组, 可能是两种排泄物菌群之间存在竞争关系而非协作关系, 有研究表明, 即使同一种鱼类, 在不同健康状态下, 其肠道排泄物菌群也存在差异^[26]。

3.3 SWI理化性质与铜绿微囊藻休眠体复苏

本实验进程中第0~9天, 排泄物实验组SWI处的DO和N/P值(DIN/SRP)均出现大幅度下调, 然后回升形成凹形动态趋势(图7, 图9), 此阶段的DO和N/P值显著低于对照组, 而此阶段正是菌浓度快速增殖期, 由于实验中没有其他生物因子影响, 因此可以推断是排泄物中菌群的增殖导致。有相关文献报道, 养殖水体水生底栖菌的快速增殖会引起沉积物表层水体DO、DIN和SRP、特别是N/P值(DIN/SRP)的变化, 不仅改变养殖水体理化性质, 还影响水生生物种群结构以及藻类的生长^[27-28]。同时有研究表明, 富营养化(高浓度DIN和SRP)条件下, 较低N/P值能显著促进铜绿微囊藻休眠体的复苏率^[5, 29]。本实验开始的前9天, 沉积物中的总菌浓度不断增加, 说明细菌在不断利用沉积物中的营养物质进行增殖, 沉积物中的DIN和SRP浓度均会逐渐下降, DIN浓度下降的速率可能大于SRP(N/P值下降), 这可能是菌群利用DIN的能力要强于SRP, 有研究表明, 芽孢杆菌在低富营养化水体中, 能够显著降解水体中的DIN^[30]。另外, 有研究表明, 好氧条件下沉积物中的SRP会不

断向表层水体(上覆水)释放,而厌氧条件下反而抑制 SRP 的释放^[31]。本实验中细菌的大量增殖会消耗沉积物表层的 DO 而加速 SWI 厌氧环境的形成(图 7),可能使 SRP 无法释放出来,这种水域化学作用在一定程度上可能会促使 SWI 水体的 N/P 值下降。

实验中 DO 与 N/P 值的变化趋势基本一致,但 SWI 中 DO 的变化也被认为是影响铜绿微囊藻休眠体复苏的重要因子。还有研究表明,低 DO 在铜绿微囊藻休眠体复苏的过程中起着促进作用,水底缺氧和缺氧层面的扩大被认为能刺激铜绿微囊藻休眠体的复苏^[15]。但是野外调查过程中的缺氧环境以及缺氧的程度作为微囊藻休眠体复苏的驱动因子没有得到进一步的验证。而室内实验的结果表明,溶解氧含量较低、光照强度较弱有助于铜绿微囊藻休眠体的安全越冬和复苏^[32-34]。这些实验证实了 SWI 的低 DO 有助于铜绿微囊藻休眠体复苏,但没有从更深层次探讨促进铜绿微囊藻休眠体复苏的作用机理。沉积物菌群是直接作用于休眠体还是通过降低 SWI 的 N/P 值和 DO 间接地对休眠体起促进作用目前尚不清楚。因此,对于精养底栖鱼类的水域要定期清淤,减少水域沉积物中鱼类肠道排泄物聚集,从源头防控养殖水体暴发水华。

4 结论

青鱼排泄物组在 10、15 和 20 °C 条件下均能显著促进铜绿微囊藻休眠体复苏 ($P < 0.05$),鲇排泄物组在 10 和 15 °C 条件下能显著促进铜绿微囊藻休眠体复苏 ($P < 0.05$),而青鱼-鲇排泄物混合组只有在较低温度 10 °C 条件下能显著提升铜绿微囊藻休眠体的复苏率 ($P < 0.05$)。

假单胞菌、芽孢杆菌和厚壁菌等都是青鱼与鲇排泄物中的优势菌群,复苏实验中利用氮、磷等营养元素快速增殖,导致沉积物-水体界面局部水体的溶解氧含量和氮磷比快速下降,与对照组形成显著性差异,这可能是青鱼与鲇肠道排泄物促进铜绿微囊藻休眠体复苏的主要原因,但这种促复苏作用在低温(10 和 15 °C)条件下更显著,具体作用机理有待进一步研究。

参考文献 (References):

[1] Wan N, Tang J, Li Q M, *et al.* The responses of *Micro-*
<https://www.china-fishery.cn>

cystis to sediment environments and the assessment for its overwintering—a simulation study in a novel device[J]. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2008, 17(12): 2146-2151.

[2] Rolland D C, Vincent W F. Characterization of phytoplankton seed banks in the sediments of a drinking water reservoir[J]. *Lake and Reservoir Management*, 2014, 30(4): 371-380.

[3] Borges H, Wood S A, Puddick J, *et al.* Intracellular, environmental and biotic interactions influence recruitment of benthic *Microcystis* (Cyanophyceae) in a shallow eutrophic lake[J]. *Journal of Plankton Research*, 2016, 38(5): 1289-1301.

[4] Zhai C, Song S, Zou S, *et al.* The mechanism of competition between two bloom-forming *Microcystis* species[J]. *Freshwater Biology*, 2013, 58(9): 1831-1839.

[5] Li M, Xiao M. Environmental factors related to the dominance of *Microcystis wesenbergii* and *Microcystis aeruginosa* in a eutrophic lake[J]. *Environmental Earth Science*, 2016, 75(8): 1675.

[6] Ma J R, Qin B Q, Paerl H W, *et al.* The persistence of cyanobacterial (*Microcystis* spp.) blooms throughout winter in Lake Taihu, China[J]. *Limnology and Oceanography*, 2016, 61(2): 711-722.

[7] Tan X, Kong F X, Zhang M, *et al.* Recruitment of phytoplankton from winter sediment of lake Taihu: a laboratory simulation[J]. *Journal of Freshwater Ecology*, 2009, 24(2): 339-341.

[8] 汤俊, 宋丽荣, 孙松松, 等. 低光低温联合作用对铜绿微囊藻复苏能力的影响[J]. *环境科学*, 2010, 31(12): 2932-2937.

Tang J, Song L R, Sun S S, *et al.* Recruitment ability of *Microcystis aeruginosa* under low light-low temperature combination[J]. *Chinese Journal of Environmental Science*, 2010, 31(12): 2932-2937(in Chinese).

[9] Misson B, Latour D. Influence of light, sediment mixing, temperature and duration of the benthic life phase on the benthic recruitment of *Microcystis*[J]. *Journal of Plankton Research*, 2012, 34(2): 113-119.

[10] Xie L Q, Xie P, Tang H J. Enhancement of dissolved phosphorus release from sediment to lake water by *Microcystis* blooms—an enclosure experiment in a hyper-eutrophic, subtropical Chinese lake[J]. *Environmental*
中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- [Pollution](#), 2003, 122(3): 391-399.
- [11] Schöne K, Jähnichen S, Ihle T, *et al.* Arriving in better shape: benthic *Microcystis* as inoculum for pelagic growth[J]. [Harmful Algae](#), 2010, 9(5): 494-503.
- [12] 张娟, 李春华, 叶春, 等. 沉水植物黑藻腐解对微囊藻休眠体复苏的影响[J]. [环境科学研究](#), 2012, 25(1): 43-50.
- Zhang J, Li C H, Ye C. Effects of *Hydrilla verticillata* decomposition on recruitment of the dormant *Microcystis* spp.[J]. [Research of Environmental Sciences](#), 2012, 25(1): 43-50(in Chinese).
- [13] Tsujimura S, Tsukada H, Nakahara H, *et al.* Seasonal variations of microcystis populations in sediments of lake Biwa, Japan[J]. [Hydrobiologia](#), 2000, 434(1): 183-192.
- [14] Yamamoto Y. Effect of temperature on recruitment of cyanobacteria from the sediment and bloom formation in a shallow pond[J]. [Plankton & Benthos Research](#), 2009, 4(3): 95-103.
- [15] Berg K A, Lyra C, Sivonen K, *et al.* High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms[J]. [The ISME Journal](#), 2009, 3(3): 314-325.
- [16] Zou W S, Wang Z, Song Q S, *et al.* Recruitment-promoting of dormant *Microcystis aeruginosa* by three benthic bacterial species[J]. [Harmful Algae](#), 2018, 77: 18-28.
- [17] Hernandez J P, De-Bashan L E, Rodriguez D J, *et al.* Growth promotion of the freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by the nitrogen-fixing, plant growth-promoting bacterium *Bacillus pumilus* from arid zone soils[J]. [European Journal of Soil Biology](#), 2009, 45(1): 88-93.
- [18] 邹万生, 王智, 宋齐生, 等. 两株浅层底泥菌对铜绿微囊藻休眠体复苏的调控作用[J]. [环境科学学报](#), 2017, 37(11): 4160-4169.
- Zou W S, Wang Z, Song Q S, *et al.* Regulation of two benthic bacteria on the recruitment of dormant *Microcystis aeruginosa* in upper sediment[J]. [Acta Scientiae Circumstantiae](#), 2017, 37(11): 4160-4169(in Chinese).
- [19] Verspagen J M H, Snelder E O F M, Visser P M, *et al.* Recruitment of benthic *Microcystis* (Cyanophyceae) to the water column: internal buoyancy changes or resuspension?[J]. [Journal of Phycology](#), 2004, 40(2): 260-270.
- [20] Berrendero E, Valiente E F, Perona E, *et al.* Nitrogen fixation in a non-heterocystous cyanobacterial mat from a mountain river[J]. [Scientific Reports](#), 2016, 6: 30920.
- [21] Tsukada H A. Study on the life history and the factor affecting the dominance of *Microcystis* in eutrophic lakes[D]. Kyoto: Kyoto University, 2006.
- [22] Lehman P W, Teh S J, Boyer G L, *et al.* Initial impacts of *Microcystis aeruginosa* blooms on the aquatic food web in the San Francisco Estuary[J]. [Hydrobiologia](#), 2010, 637: 229-248.
- [23] 邹万生, 王智, 刘良国, 等. 冲天湖底泥表层微囊藻休眠体复苏与菌群动态[J]. [生态学报](#), 2017, 37(19): 6597-6606.
- Zou W S, Wang Z, Liu L G, *et al.* Relationship between recruitment of *Microcystis dormant* in sediment and annual dynamics of bacterial flora in Lake Chongtian[J]. [Acta Ecologica Sinica](#), 2017, 37(19): 6597-6606(in Chinese).
- [24] Boltovskoy D, Correa N, Bordet F, *et al.* Toxic *Microcystis* (cyanobacteria) inhibit recruitment of the bloom-enhancing invasive bivalve *Limnoperna fortunei*[J]. [Freshwater Biology](#), 2013, 58(9): 1968-1981.
- [25] Wang W J, Shen H, Shi P L, *et al.* Experimental evidence for the role of heterotrophic bacteria in the formation of *Microcystis* colonies[J]. [Journal of Applied Phycology](#), 2016, 28(2): 1111-1123.
- [26] 熊向英, 王贤丰, 彭银辉, 等. 健康和患病卵形鲳鲂肠道菌群结构的差异[J]. [水产学报](#), 2019, 43(5): 1317-1325.
- Xiong X Y, Wang X F, Peng Y H, *et al.* Variance analysis of intestinal bacterial community between healthy and diseased *Trachinotus ovatus*[J]. [Journal of Fisheries of China](#), 2019, 43(5): 1317-1325(in Chinese).
- [27] Steffen M M, Dearth S P, Dill B D, *et al.* Nutrients drive transcriptional changes that maintain metabolic homeostasis but alter genome architecture in *Microcystis*[J]. [The ISME Journal](#), 2014, 8(10): 2080-2092.
- [28] Yang Z, Zhang M, Shi X L, *et al.* Nutrient reduction magnifies the impact of extreme weather on cyanobacterial bloom formation in large shallow lake Taihu (China)[J]. [Water Research](#), 2016, 103: 302-310.
- [29] Paterson M J, Schindler D W, Hecky R E, *et al.* Comment: Lake 227 shows clearly that controlling inputs of nitrogen will not reduce or prevent eutrophication of

- lakes[J]. *Limnology and Oceanography*, 2011, 56(4): 1545-1547.
- [30] 陆洋, 郁二蒙, 谢骏, 等. 添加芽孢杆菌对池塘中理化因子和细菌群落结构的影响分析[J]. 水产学报, 2020, 44(1): 130-141.
- Lu Y, Yu E M, Xie J, *et al.* Analysis of the effect of adding *Bacillus* on the physicochemical factors and bacterial community structure in ponds[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(1): 130-141(in Chinese).
- [31] Paerl H W, Xu H, McCarthy M J, *et al.* Controlling harmful cyanobacterial blooms in a hyper-eutrophic lake (Lake Taihu, China): the need for a dual nutrient (N & P) management strategy[J]. *Water Research*, 2011, 45(5): 1973-1983.
- [32] Karlson A M L, Nascimento F J A, Suikkanen S, *et al.* Benthic fauna affects recruitment from sediments of the harmful cyanobacterium *Nodularia spumigena*[J]. *Harmful Algae*, 2012, 20: 126-131.
- [33] Blottière L, Rossi M, Madricardo F, *et al.* Modeling the role of wind and warming on *Microcystis aeruginosa* blooms in shallow lakes with different trophic status[J]. *Theoretical Ecology*, 2014, 7: 35-52.
- [34] Li W, Qin B Q, Zhu G W. Forecasting short-term cyanobacterial blooms in Lake Taihu, China, using a coupled hydrodynamic-algal biomass model[J]. *Ecology*, 2014, 7(2): 794-802.

Effect and track of *Mylopharyngodon piceus* and *Silurus asotus* intestinal excreta on the recruitment of dormant *Microcystis aeruginosa* in aquaculture water

ZOU Wansheng^{1*}, WANG Zhi², SONG Qisheng³, LIU Liangguo¹,
HAN Qing¹, WANG Wenbin¹, YANG Pinhong¹

(1. Collaborative Innovation Center for Efficient and Health Production of Fisheries in Hunan Province,
Hunan Province Cooperative Innovation Center for the Construction and Development of
Dongting Lake Ecological Economic Zone, Zoology Key Laboratory of Hunan Higher Education,
Hunan University of Arts and Science, Changde 415000, China;
2. School of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410000, China;
3. Division of Plant Sciences, University of Missouri Columbia, Columbia MO65211, USA)

Abstract: *Microcystis aeruginosa* is a kind of cyanobacteria that can bloom in freshwater lakes and slow-flowing water, especially in freshwater aquaculture waters. A large amount of feces will be excreted by benthic fish in the growth process, which may provide conditions for the recovery and increment of *M. aeruginosa*. To explore the effects and track of the fish intestinal excreta (*Mylopharyngodon piceus* and *Silurus asotus*) on the recruitment of dormant *M. aeruginosa* from the sediment, and to find potential factors and mechanism, simulation experiments on the recruitment of *M. aeruginosa* cells from sediment were performed in the presence or absence of the fish intestinal excreta. The intestinal excreta of *M. piceus* or *Silurus asotus* were fully mixed with cells of dormant *M. aeruginosa*, and then they were all buried in the lake sediments. The co-culture and recruitment experiments were carried out at the gradient temperatures of 10 °C, 15 °C and 20 °C. The results showed that the recruitment rate of dormant *M. aeruginosa* cells in *M. piceus* excreta group (MP), *S. asotus* excreta group (SA) and *M. piceus* or *S. asotus* excreta mixture group (MP-SA) were all significantly higher than that in the control group (CK) ($P < 0.05$), and the recruitment rate of dormant *M. aeruginosa* cells in the MP group was significantly higher than those in the SA group and the MP-SA group. At 20 °C, the recruitment rate of dormant cells of *M. aeruginosa* in MP group was significantly higher than that in SA group, MP-SA mixed group and CK group, however, there was no significant difference in the recruitment rate between SA group and CK group ($P > 0.05$), and there was no significant

difference between MP-SA group and CK group. From the point of view of gradient experiment temperature, the recruitment rate of dormant *M. aeruginosa* cells both in the control group and in the experimental group (excreta group) increased with the increase of temperature. At 10 °C, recruitment rate of dormant *M. aeruginosa* cells in the control group, the *Mylopharyngodon piceus* excreta group (MP), the *S. asotus* excreta group (SA) and the mixed group (MP-SA) was 14%, 45%, 36% and 28%, respectively, and at 15 °C, recruitment rate of dormant *M. aeruginosa* was 43%, 60%, 51%, 50%, respectively, at the experimental temperature of 20 °C, recruitment rate of dormant *M. aeruginosa* was 49%, 61%, 52%, 51%, respectively. For the control group and the three experimental groups (excreta group), recruitment rate of dormant *M. aeruginosa* at 15 °C and 20 °C was significantly higher than that at 10 °C, but there was no significant difference in the recruitment rate of dormant *M. aeruginosa* cells at 15 °C and 20 °C ($P > 0.05$). At the same time, the main recruitment period of dormant *M. aeruginosa* was from day 3 to day 15. During the experiment at 10 °C, 15 °C and 20 °C, the dominant bacteria of MP group were mainly *Pseudomonas*, and the dominant bacteria of SA group and MP-SA group were mainly *Bacillus* and *Firmicute*, respectively. In the MP group, at 10 °C, the dominant bacteria in the sediment were *Pseudomonas*, *Fusobacteria*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Proteobacteria* and *Firmicute*, which accounted for 33%, 13%, 9%, 7%, 4% and 4%, respectively, the proportion of dominant bacteria was 70% in total bacteria. They accounted for 61% and 54% at 15 and 20 °C, respectively. For the *S. asotus* excreta group (SA), at 10 °C, 15 °C and 20 °C, the dominant bacteria in the sediment were *Bacillus*, *Bifidobacterium*, lactic acid bacteria, *Firmicute*, *Vibrio* and *Pseudomonas*, which accounted for 64%, 50% and 42% of the total bacteria respectively. For MP-SA group, at 10, 15 and 20 °C, the dominant bacteria in the sediment were *bacillus*, *Bifidobacterium*, lactic acid bacteria, *Firmicute*, *Proteobacteria* and *Pseudomonas*, and their proportions in the total bacteria were 50%, 45% and 43%, respectively. The concentration of total bacteria in the sediment of each experimental group increased with the increase of temperature, and the concentration of total bacteria at 15 °C and 20 °C was significantly higher than that at 10 °C. 0-12 d was the period of bacterial proliferation. The physical and chemical indexes of the sediment-water interface (SWI) were measured and it was found that the the N/P(DIN : SRP) ratio of MP group, SA group and MP-SA group were significantly lower than those of the control group during the period of day 3 to day 12. At the three gradient temperatures, in the same period of 0-9 d, the nitrogen-phosphorus ratio decreased the fastest in *M. piceus* excreta group, followed by *S. asotus* excreta group, the mixed group and the control group (CK). There was no significant change of nitrogen-phosphorus ratio in the whole process for the control group. In the same period, there were significant differences between the three experimental groups and the control group ($P < 0.05$), and there were also significant differences among the three experimental groups. During all experiments, the change trend of dissolved oxygen (DO) concentration was basically the same as that of nitrogen-phosphorus ratio, and dissolved oxygen. The results showed that the intestinal excreta of *M. piceus* or *S. asotus* could promote the recruitment of dormant *M. aeruginosa*, which may be the result of the decline of N/P ratio and dissolved oxygen concentration caused by flora in the excreta during the growth and proliferation period, and the effect of promoting-recruitment was more significant in the lower temperature range (10-15 °C). The results are of theoretical significance for the recruitment of dormant *M. aeruginosa* cells, clearing the pond of silt, and the mechanism of bloom outbreak of *M. aeruginosa* in spring. It also provides a new way to prevent and control the bloom of *M. aeruginosa* in aquaculture waters.

Key words: *Mylopharyngodon piceus*; *Silurus asotus*; *Microcystis aeruginosa*; fish intestinal excreta; dormancy; recruitment; dissolved oxygen; N/P ratio

Corresponding author: ZOU Wansheng. E-mail: zwsksy@163.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31600315, 31572619); Key projects of Education Department of Hunan Province (19A340)