



有效微生物菌群 (EM) 对蟹鲈混养模式下 养殖水体菌群结构的影响

李士恒¹, 聂志娟², 沈雷¹, 邵乃麟²,
孙毅², 徐钢春^{1,2}, 徐跑^{1,2*}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081)

摘要: 为探究定期添加有效微生物菌群 (EM) 对蟹鲈混养养殖水质和菌群结构的影响, 实验对混养水体进行了 I 期 (4 月 10 号)、II 期 (4 月 20 号)、III 期 (4 月 30 号) 和 IV 期 (5 月 10 号) 的监测, 并通过水质理化指标、16S *rRNA* 基因高通量测序技术分析了每个时期的水质和菌群结构。高通量测序结果显示, 实验期间水体主要优势菌门为变形菌门、放线菌门、厚壁菌门、蓝细菌门, 其中对照组蓝细菌门的相对丰度在 III、IV 期显著高于实验组; 实验组 I 期最优势菌属为 *Limnohabitans* (20.34%), 其余时期皆为微小杆菌属 (56.33%、38.11%、17.88%); 对照组 I 期最优势菌属为红育菌属 (10.37%), II 期为微小杆菌属 (47.67%), III 期和 IV 期皆为分枝杆菌属, 分别为 36.01% 和 42.27%; Sobs 和 PD 指数显示, 实验样品在 I 期、II 期差异不显著, 但在 III 期和 IV 期实验组显著高于对照组。相比于对照组, 添加 EM 的实验组在整个监测期总氮 (TN) 显著降低, 氨氮 ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) 在 I 期差异不显著, 在 II 期、III 期和 IV 期显著降低。关联分析显示, 总氮是对菌群群落影响程度最大的环境因子, 其中添加 EM 实验组的优势菌属微小杆菌属与总磷 (TP) 呈正相关, 与 TN、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、硝酸盐氮 ($\text{NO}_3^-\text{-N}$)、亚硝酸盐氮 ($\text{NO}_2^-\text{-N}$) 呈负相关。本研究表明, 蟹鲈混养模式下定期添加 EM 可以改善养殖水体水质, 有效抑制蓝细菌, 且显著优化菌群结构, 具有显著的水体原位修复功能, 实现了经济效益和生态效益的双赢, 为形成典型池塘混养模式的水质原位生态调控技术奠定基础, 促进我国水产养殖业的绿色生态可持续发展。

关键词: 有效微生物菌群; 菌群结构; 丰富度; 原位修复

中图分类号: S 917.1

文献标志码: A

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*), 又名大闸蟹, 肉质鲜美且营养丰富, 是我国重要的水产养殖经济动物^[1]。养殖水体的水质是影响中华绒螯蟹生长发育的重要因素^[2], 目前水草的种植在改善中华绒螯蟹养殖水体水质中的应用较多, 好的水质

有利于中华绒螯蟹的生长, 改善品质, 提高营养价值^[3]。大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 原产地为北美洲, 又名加州鲈, 是一种淡水肉食性鱼类, 肉质鲜美, 无肌间刺, 研究历史悠久^[4], 当前国内对于大口黑鲈的养殖主要以单养为主^[5], 传

收稿日期: 2021-01-06 修回日期: 2021-05-09

资助项目: 国家重点研发计划蓝色粮仓科技创新专项 (2019YFD0900301)

第一作者: 李士恒 (照片), 从事水产生态养殖模式研究, E-mail: 572953460@qq.com

通信作者: 徐跑, 从事水产动物健康养殖研究, E-mail: xup@ffrc.cn



统养殖模式下, 存在养殖密度高、养殖水体负担大等问题, 在水体自净能力有限的情况下, 亟需发展绿色生态养殖^[6]。

蟹鲈混养是一种生态养殖模式, 混养的概念源于范蠡的著作《养鱼经》, 从经典的鱼-鳖混养发展到现在有鱼-鳖-虾、鱼-虾-蟹等多种养殖模式^[7], 宋欣等^[8]对草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)、鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙 (*Aristichthys nobilis*)、鲤 (*Cyprinus carpio*) 和凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 进行了多元的混养实验, 结果显示, 混养能显著提高养殖产品的产量, 提高生态效益, 蟹鲈混养模式能够高效、充分地利用空间, 形成互惠互利的生态系统, 降低发病率, 改善环境, 提高生态效益^[9-10]。

有效微生物菌群 (EM) 是以光合细菌、酵母菌、乳酸菌和放线菌为主, 多种有益微生物复合而成的有效微生物群^[11], 在动植物种养等方面有着良好的应用效果^[12-13]。大量研究证实, EM 在水体、土壤、微生物等环境治理方面效果显著^[14-16]。EM 具有调水功能, 其有益菌具有易存活和繁殖周期短等特点, 能在短时间内成为优势菌群, 与病原菌竞争生长发育所需的物质, 从而抑制水体中病原微生物的生长发育, 可短时间分解水产养殖动物的剩余饵料和排泄物, 从源头上降低养殖水体中氨氮、亚硝酸盐等有害物质的含量, 优化水质, 为水产养殖动物创造良好的水生态环境^[17-18]。水体微生物是水域生态系统的重要组成部分, 微生物的群落结构与水质状况联系密切, 也是衡量水域生态系统稳定性的重要指标^[19], 通过分析养殖水体微生物的组成结构, 有助于了解养殖水体的生态环境和稳定性, 对改善水环境和选择养殖模式等具有重要意义。本实验以日本比嘉照夫发明的 EM 复合益生菌作为研究对象, 探究其对蟹鲈混养养殖水体原位修复效果, 及其对养殖水体菌群结构的影响, 以期形成“源头控制、过程净化和生态调控”典型池塘养殖模式水质原位生态调控技术, 真正实现绿色生态养殖, 促进我国水产养殖业的健康可持续发展。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验大口黑鲈购自安徽张林渔业有限公司; 中华绒螯蟹购自江苏诺亚方舟农业科技有限公司; EM 来源于江苏恒泰环保科技有限公司, 其

活菌总数经中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业农村部新渔药临床试验中心鉴定, pH 为 3.0~4.0; 乳酸菌数 $1.0 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^7$ CFU/mL; 酵母菌数 $1.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^5$ CFU/mL; 光合菌数 $1.0 \sim 2.0 \times 10^3$ CFU/mL; 放线菌数 $1.0 \sim 3.0 \times 10^3$ CFU/mL; 菌种数 > 80 种。

1.2 养殖方法

养殖实验在中国水产科学研究院淡水渔业研究中心扬中基地选取 6 个标准池塘开展, 池塘养殖面积为 $1\ 666.7\ \text{m}^2$, 实验分为 EM 蟹鲈混养实验组 (EMXL) 和蟹鲈混养对照组 (XL), 每组各 3 个重复池塘, 塘内皆种植水草。蟹的放养时间为 2020 年 2 月 22 号, 放养规格为 40 只/500 g, 放养密度为 $0.75\ \text{只}/\text{m}^2$; 大口黑鲈放养时间为 2020 年 4 月 2 号, 放养规格为 184 g/尾, 放养密度为 $2.25\ \text{尾}/\text{m}^2$ 。养殖实验期间, 大口黑鲈每天投喂 2 次, 喂料量为大口黑鲈体质量的 3%~5%; 中华绒螯蟹每 2 日投喂 1 次, 喂料量为蟹体质量的 3%~5%。实验开始后, EM 混养实验组 3 个池塘每隔 10 d 对全塘按 $0.75\ \text{g}/\text{m}^2$ 的比例进行 EM 泼洒, 对照组池塘不泼洒。每个养殖池塘均配备微孔增氧机, 夜间开启增氧设备, 维持塘内溶解氧含量不低于 $5\ \text{mg}/\text{L}$ 。

1.3 样品的采集和处理

EM 从 4 月 5 日开始泼洒, 每 10 d 泼洒 1 次; 实验水样的采集于 4 月 10 号 (EM 泼洒 5 d 后) 开始, 之后每隔 10 d 采集 1 次, 到 5 月 10 号为止 (表 1)。水样采集采用 5 点取样法, 采取水面 50 cm 下的水样。将每个水样混匀后, 取 1 L 用于水体水质理化指标的测定, 3 L 用于测定微生物。水质理化因子测定方法: 水体中的氨氮 ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) 采用纳氏试剂分光光度比色法, 亚硝酸氮 (NO_2^-N) 采用分光光度法 (GB/T 7493—1987), 硝氮 (NO_3^-N) 采用锌-铬还原法, 总氮 (TN) 采用碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法 (GB 11894—89), 总磷 (TP) 采用钼酸铵比色法 (GB 11893—89)、化学需氧量 (COD) 采用碱性高锰酸钾法 (GB 11914—89)。用于测定水体微生物的水样混匀后在 $4\ ^\circ\text{C}$ 、 $1\ 200\ \text{r}/\text{min}$ 离心 30 min, 取沉淀置于无菌离心管中, 标记于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 保存。

1.4 样品 DNA 提取及 PCR 扩增

根据 E.Z.N.A.[®] soil 试剂盒 (Omega Bio-tek,

表 1 不同日期水样采集信息
Tab. 1 Water sample collection information on different dates

采样日期 date of collection	样品标记 ID	组别 groups
2020-04-10/I 期	EW_1(1EW_1~1EW_3)	混养实验组 (EMXL)
	W_1(1W_1~1W_3)	对照组 (XL)
2020-04-20/II 期	EW_2(2EW_1~2EW_3)	混养实验组 (EMXL)
	W_2(2W_1~2W_3)	对照组 (XL)
2020-04-30/III 期	EW_3(3EW_1~3EW_3)	混养实验组 (EMXL)
	W_3(3W_1~3W_3)	对照组 (XL)
2020-05-10/IV 期	EW_4(4EW_1~4EW_3)	混养实验组 (EMXL)
	W_4(4W_1~4W_3)	对照组 (XL)

Norcross, GA, 美国) 说明书进行样本总 DNA 抽提, 利用 NanoDrop 2 000 检测 DNA 的浓度和纯度, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量; 用 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACH VGGGTWTCTAAT-3') 引物对细菌 16S *rRNA* 的 V3~V4 可变区进行 PCR 扩增, 扩增程序: 95 °C 预变性 180 s; 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 27 个循环; 72 °C 延伸 10 min。反应体系 (20 μL): 4 μL 5×FastPfu 缓冲液、2 μL 2.5 mmol/L dNTPs、0.8 μL 引物 (5 μmol/L)、0.4 μL FastPfu 聚合酶; 10 ng DNA 模板, 灭菌双蒸水补足 20 μL。

1.5 Illumina Miseq 测序

以 2% 的琼脂糖凝胶回收 PCR 产物, 利用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axygen, 美国) 进行纯化, 三(羟甲基)氨基甲烷 (Tris-HCl) 洗脱, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。通过 QuantiFluor™-ST

(Promega, 美国) 进行定量检测。根据 Illumina MiSeq 平台 (Illumina, San Diego, 美国) 标准操作规程将纯化后的扩增片段构建测序文库, 后利用 Illumina 公司的 Miseq PE300 平台进行高通量测序 (上海美吉生物医药科技有限公司)。

1.6 数据分析

原始测序序列使用 Trimmomatic 软件质控, 使用 FLASH 软件进行拼接: 设置 50 bp 的窗口, 当窗口内的平均质量低于 20 bp 时, 从窗口前端位置截去该碱基后端所有序列, 后再去除质控后长度低于 50 bp 的序列; 根据重叠碱基 (overlap), 将两端序列拼接, 长度需大于 10 bp, overlap 间的最大错配率是 0.2; 根据序列首尾两端的条形码 (barcode) 及引物将序列拆分到每个样本, barcode 匹配要精确, 引物可有 2 个碱基的容错, 去除模糊碱基序列。使用 UPARSE 软件, 根据 97% 的相似度水平对序列进行 OTU 聚类。使用单因素方差分析进行统计学检验, $P < 0.05$ 认为差异显著; 水体理化指标、微生物多样性指数及主要菌属的相对丰度间的差异通过 Canoco 5 软件分析。

2 结果

2.1 水质理化指标

水质指标测定结果显示, 实验组的总氮含量在整个测定期皆显著低于对照组 ($P < 0.05$), 且实验组 IV 期的含量与 I 期持平, 对照组 IV 期测定含量比 I 期增长了 83.9% (表 2), 结果表明, EM 对蟹鲈混养模式下养殖水体总氮的降除率较高, 可达 48.75%~69.75%; 在 II~IV 期, 实验组的氨氮含

表 2 不同养殖模式对水质指标的影响
Tab. 2 Effects of different farming modes on water quality indexes

样品 samples	$\text{NH}_4^+\text{-N}$	$\text{NO}_2^-\text{-N}$	$\text{NO}_3^-\text{-N}$	TN	TP	COD
EW_1	0.09±0.09	0.02±0.01	0.12±0.05	0.82±0.24 ^b	0.49±0.15 ^a	7.57±1.15
W_1	0.20±0.06	0.01±0.00	0.09±0.07	1.60±0.03 ^a	0.10±0.04 ^b	8.45±0.53
EW_2	0.34±0.04 ^b	0.03±0.01	0.16±0.02	1.17±0.36 ^b	0.70±0.21 ^a	8.19±1.35
W_2	0.74±0.13 ^a	0.02±0.00	0.08±0.02	2.47±0.13 ^a	0.14±0.07 ^b	9.13±1.17
EW_3	0.04±0.04 ^b	0.01±0.00	0.05±0.00	0.66±0.33 ^b	0.40±0.20 ^a	8.54±2.31
W_3	0.32±0.04 ^a	0.02±0.01	0.06±0.02	2.18±0.13 ^a	0.18±0.04 ^b	9.20±1.14
EW_4	0.38±0.04 ^b	0.04±0.01	0.10±0.03	0.85±0.13 ^b	0.51±0.08 ^a	7.76±0.56
W-4	1.60±0.50 ^a	0.07±0.02	0.18±0.04	2.81±0.27 ^a	0.26±0.04 ^b	8.24±0.24

注: 不同字母代表处理间存在显著差异 ($P < 0.05$); 下同

Notes: different letters mean that there are statistically significant differences between groups ($P < 0.05$); the same below

量显著低于对照组 ($P < 0.05$), 在 I 期差异不显著; 4 个时期对照组总磷的含量皆显著低于实验组 ($P < 0.05$), 实验组 IV 期总磷的测定含量与 I 期持平, 对照组的总磷含量逐渐上升, IV 期测定含量比 I 期增长了 166.7%; 亚硝酸氮、硝酸氮和 COD 在整个测定期差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.2 测序数据

测序结果质检后显示, 2 个处理组的 24 个样品有效序列数共有 1 029 593 条, 有效序列的平均长度为 417 bp。样品的物种覆盖率大于 98.99% (98.99%~99.54%) (表 3)。以 97% 相似水平对样品的测定序列进行了 OTU 划分, 可划分成 1 981 个 OTU, 物种注释结果显示为 33 门 93 纲 228 目 381 科 701 属 1 177 种。

表 3 测序信息

Tab. 3 Sequencing information

样品 samples	序列/条 reads	覆盖度/% coverage	分类单元/个 OTUs
W_1	42 482.00±2 511.05	99.53±0.04	469.33±60.35
EW_1	46 108.00±3 031.74	99.54±0.06	389.33±23.63
W_2	42 871.67±3 929.99	99.35±0.18	525.00±132.92
EW_2	4 0458.33±2 437.08	99.46±0.25	436.67±187.64
W_3	46 814.67±4 417.10 ^a	99.49±0.04 ^a	400.00±36.06 ^b
EW_3	3 9680.67±880.43 ^b	99.30±0.07 ^b	617.00±62.95 ^a
W_4	44 361.00±2 361.38	99.46±0.04 ^a	446.67±12.34 ^b
EW_4	4 0421.33±3 719.00	98.99±0.05 ^b	896.33±29.77 ^a

对样品测序结果构建了 Venn 图, 结果显示, 不同处理组不同时期共有的 OTU 数目为 164 个 (8.28%), 说明微生物种类的分布集中度较低, 养殖塘内水体菌群差异较大。在 I 期和 II 期, 对照组独有 OTU 数量大于实验组, 但 III 期和 IV 期, 实验组独有 OTU 数量大于对照组, 实验组的 OTU 初始测定值最低仅为 645 个, 但随着时间的增加其菌群数目不断增加, 最终测定菌群数为 1 340 个, 比初始测定时增加了 107.8%, 而对照组最终测定菌群数比初始测定时减少了 8.3% (图 1)。表明蟹鲈混养模式下在池塘中添加 EM 可以提高池塘水体细菌菌群种类。

2.3 菌群组成分析

对 2 组 4 个监测时期养殖水体样本中的微生物群落进行统计。实验组中丰度大于 1% 的菌门为变形菌门 (Proteobacteria 37.30%)、放线菌门

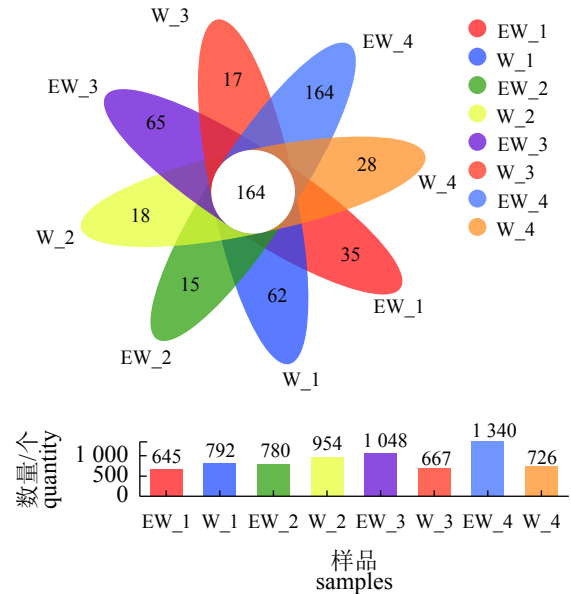


图 1 水体微生物 OTUs 的维恩图及数据统计柱形图

Fig. 1 Venn diagrams and column chart of data statistics of the OTUs of microflora in water

(Actinobacteria 31.70%)、拟杆菌门 (Bacteroidota 29.00%) (I 期); 厚壁菌门 (Firmicutes 57.81%)、变形菌门 (20.19%)、放线菌门 (17.29%)、蓝细菌门 (Cyanobacteria 2.50%) (II 期); 厚壁菌门 (48.19%)、放线菌门 (20.11%)、变形菌门 (19.34%)、拟杆菌门 (5.76%)、Deinococcota (4.99%) (III 期); 放线菌门 (45.13%)、厚壁菌门 (24.61%)、变形菌门 (22.88%)、Patescibacteria (2.05%)、Deinococcota (1.97%)、拟杆菌门 (1.62%) (IV 期)。其中, 放线菌门、变形菌门始终是实验组优势菌门, 厚壁菌门在除 I 期外的其余时期是优势菌门。对照组中丰度大于 1% 的菌门: I 期为变形菌门 (52.12%)、放线菌门 (24.26%)、厚壁菌门 (8.52%)、拟杆菌门 (8.17%)、蓝细菌门 (6.02%); II 期为厚壁菌门 (50.32%)、变形菌门 (23.91%)、放线菌门 (21.69%)、Deinococcota (1.32%)、拟杆菌门 (1.10%); III 期为放线菌门 (50.67%)、变形菌门 (31.20%)、厚壁菌门 (12.31%)、蓝细菌门 (2.93%)、疣微菌门 (1.94%), IV 期为放线菌门 (56.43%)、蓝细菌门 (20.90%)、变形菌门 (14.35%)、厚壁菌门 (3.84%)、SAR324-clade-Marine-group-B (1.10%), 其中放线菌门、变形菌门、厚壁菌门为对照组 4 个时期的优势菌门 (图 2)。

菌门差异分析结果显示, I 期 2 组中变形菌门、拟杆菌门、Bdellovibrionota 等丰富度存在显著差异 ($P < 0.05$); II 期主要菌门间差异不显著;

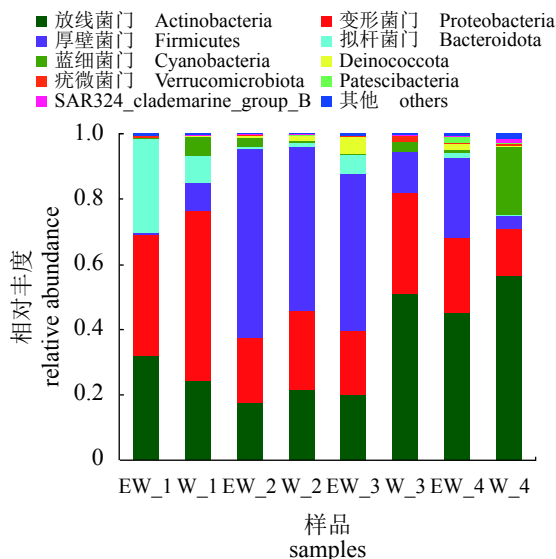


图2 基于门水平的细菌组成结构

Fig. 2 Microbiota composition at the Phylum level

Ⅲ期放线菌门、厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门等存在显著差异 ($P < 0.05$); Ⅶ期蓝细菌门、Patescibacteria、拟杆菌门等差异显著 ($P < 0.05$)。Ⅰ期和Ⅱ期2组在蓝细菌门相对丰度上没有显著差异, 但Ⅲ期对照组蓝细菌门的相对丰度显著高于实验组 ($P < 0.05$), 在Ⅳ期极显著高于实验组 ($P < 0.01$) (图3), 表明蟹鲈混养模式下定期添加EM对水体蓝细菌门有一定的抑制作用, 但是有一段响应时期, 间隔10 d天持续添加3次以上有显著抑制效果。

对2种养殖模式下水体样本中微生物群落丰度大于1%的菌属进行统计, 实验组和对照组水体中的优势菌属主要是微小杆菌属 (*Exiguobacterium*)、分枝杆菌属 (*Mycobacterium*)、*Aurantimicrobium* 等, 对照组Ⅰ期最优势菌属为红育菌属 (*Rhodospirillum rubrum*) (10.37%), Ⅱ期为微小杆菌属 (47.67%), Ⅲ期和Ⅳ期为分枝杆菌属且占比较大, 分别为36.01%和42.27%。实验组Ⅰ期最优势的菌属为 *Limnohabitans* (20.34%), 其余时期皆为微小杆菌属, 其中以Ⅱ期占比最高, 达56.33%; *Limnohabitans* 在Ⅰ期的实验组和对照组中占比较大, 分别为20.34%和4.09%, 在其他时期皆低于1% (图4)。

2.4 菌群多样性

Alpha多样性分析结果显示, 养殖水体微生物的 Sobs 指数和 PD 指数在Ⅰ期和Ⅱ期均无显著差异, 但在Ⅲ期和Ⅳ期实验组显著高于对照组 (图5), 说明蟹鲈混养模式下定期添加EM可以提

高养殖水体微生物群落数量和种类。

在属水平上进行了主坐标分析 (PcoA), 图中一个符号代表一个样品, 相同颜色的符号代表同一组, 横轴 (PC1) 贡献度为35.52%, 纵轴 (PC2) 贡献度为34.89%。符号间的距离代表了样品间微生物群落的差异, 距离越小差异越小, 反之则越大。在Ⅰ期和Ⅱ期, 实验组和对照组在 PcoA 图中的距离较小, 但Ⅲ期与Ⅳ期实验组和对照组在 PcoA 图中的距离较大, 群落差异较大 (图6)。表明, 定期添加EM对蟹鲈混养水体菌群结构的影响有一段响应时期, 间隔10 d持续添加3次以上可以发生显著变化。

2.5 菌群与水质理化因子相关性

每个时期选取6种主要差异 OTUs (表4) 进行冗余分析 (RDA 分析), 结果显示, 选取的差异 OTU 与水质指标 TN、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、TP 具有明显的相关性, 其中 OTU1981、OTU1857 和 OTU777 与 TN、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 呈正相关, 都出现在Ⅲ期和Ⅳ期, EM 实验组的丰度 (37.00~444.33) 显著低于对照组 (1565.33~7412.33), 属于分枝杆菌属 (图7)。

选取4个时期中10种主要优势菌属与环境因子进行 CCA 分析, 结果显示, 环境因子中 TN、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、COD 对水体微生物群落的影响最大, 其中 TN 对于水体细菌菌落的分布具有显著的影响 ($P < 0.05$), TN 对水体微生物群落变异的解释度为25.1% (图8), 可以认为 TN 是驱动水体群落变异的主要因子。图中 M5、M9 与 TP 呈正相关; M2、M3、M6、M7、M9 与 COD、TN、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 呈负相关, M1、M4、M8、M10 与 TN、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 呈正相关, 与 TP 呈负相关。

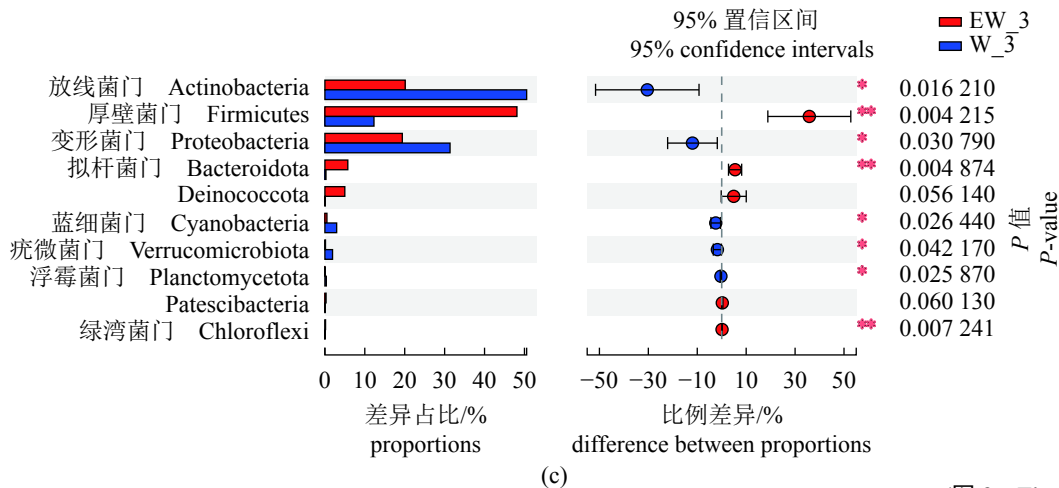
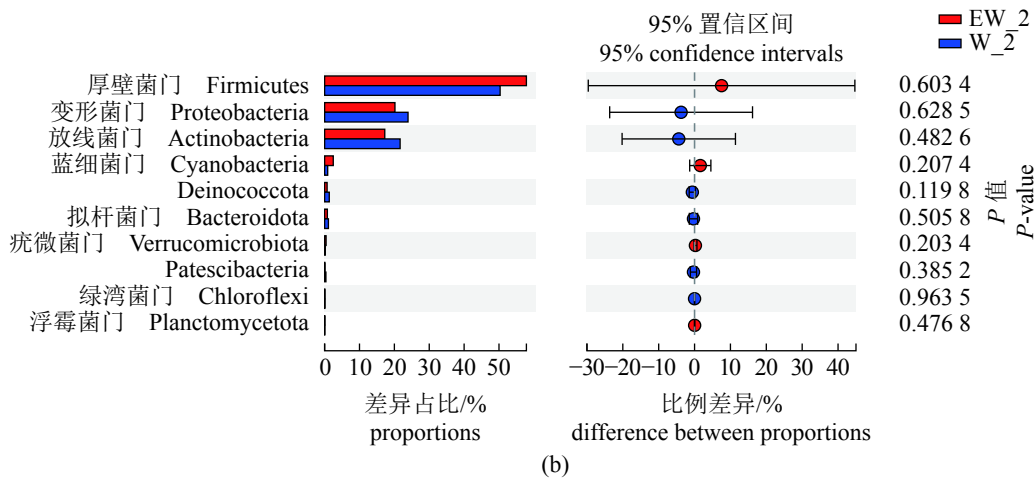
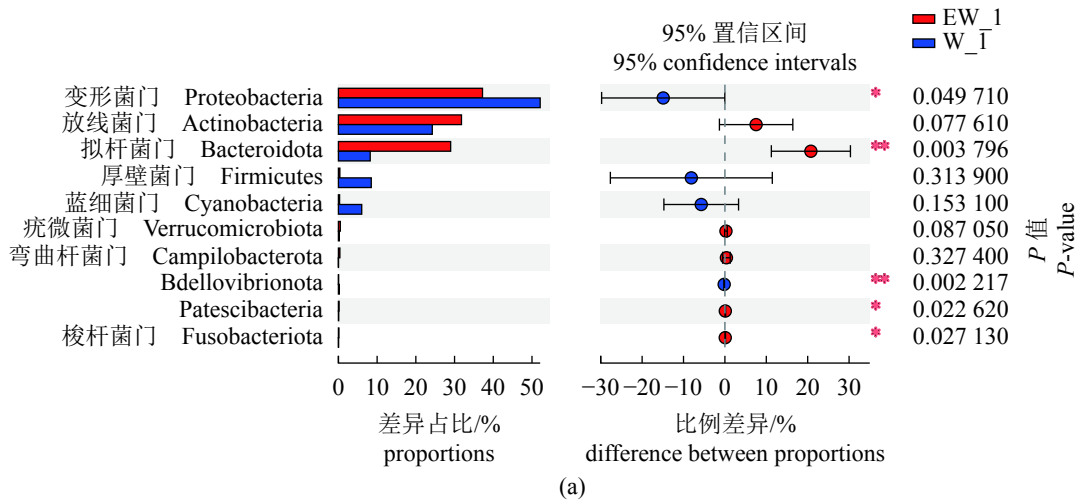
3 讨论

高密度的养殖会使水体负担加重, 导致水体恶化, 致使病害频发。传统池塘养殖需要大量换水, 不仅浪费资源, 还会影响周围水域环境^[20]。合理的混养可以在高密度养殖中起到调控水质的作用, 刘伟杰等^[21]研究发现, 混养模式下池塘 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、TN 等指标显著低于单养池塘。利用生物修复是发展可持续生态养殖的一种良好方法, 因为良好的生物修复系统能有效清除水中的碳化物、氮化废物等。水体添加有益微生物可以改善水质, 促进水体营养元素的去除, 减少有害菌的

增生^[22]。大量研究表明, EM 具有降低水中 TP、TN、NH₄⁺-N、NO₂⁻N 以及 COD 的作用^[23-24]。夏来根等^[24]研究发现, EM 调水剂能有效降低水体 COD、NH₄⁺-N 和 NO₂⁻-N 的含量。本实验结果表明, EM 可有效降低养殖水体氨氮和总氮的含量,

具有改善和调控水质的作用。

通过调节环境因子, 改善微生物群落的组成, 可抑制致病微生物的传播, 为疾病控制提供方向^[25], 因此, 探讨水产养殖过程中微生物群落的组成和多样性及其与环境因子的相互作用是必要



(图 3 Fig. 3)

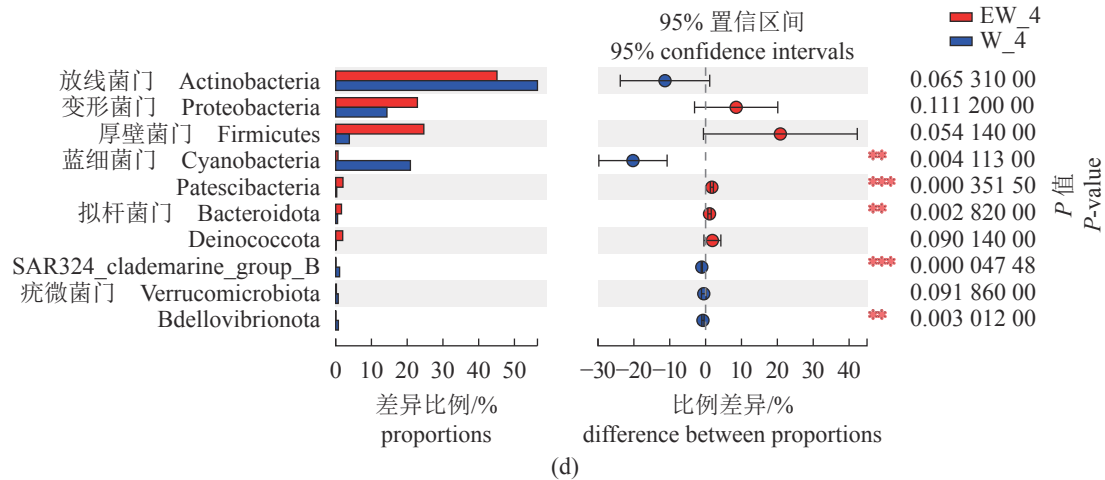


图 3 两种处理下的群落丰富度差异

(a) I 期, (b) II 期, (c) III 期, (d) IV 期; 下同

Fig. 3 Community richness was different under the two treatments

(a) phase I, (b) phase II, (c) phase III, (d) phase IV; the same below

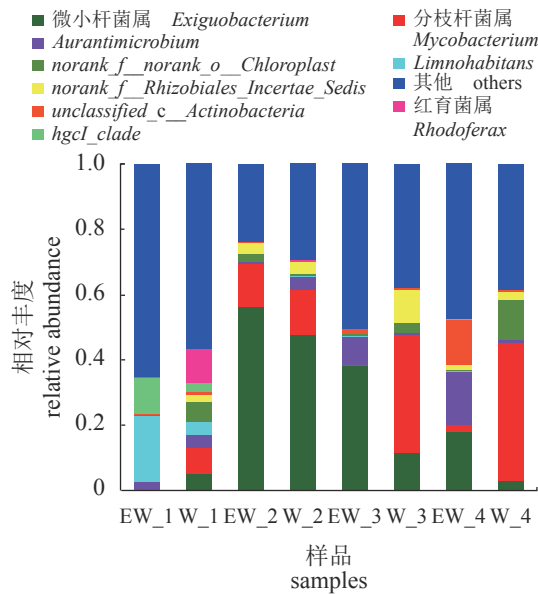


图 4 基于属水平的细菌群落组成

Fig. 4 Microbiota composition at genus level

的。水环境中的有益菌和病原菌存在拮抗作用, 有益菌群易存活、繁殖周期短, 能在短时间内成为优势菌群, 与病原菌竞争生长发育所需营养, 进而抑制水体中病原微生物等的生长发育^[26]。分枝杆菌属种类多, 多数为致病菌, 可引起人、畜等出现结核病、麻风病或其他慢性坏死病(如肉芽瘤肿病)^[27], 研究表明斑马鱼(*Danio rerio*)对分枝杆菌十分敏感, 严重时可导致斑马鱼暴发性死亡^[28]。本实验结果显示, 分枝杆菌属与水体总氮的含量呈正相关, 且对照组水体总氮含量显著高

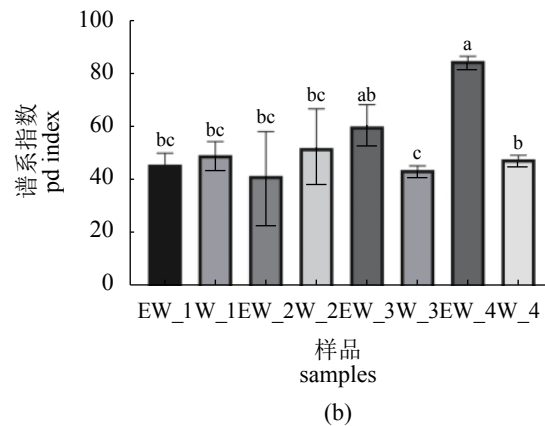
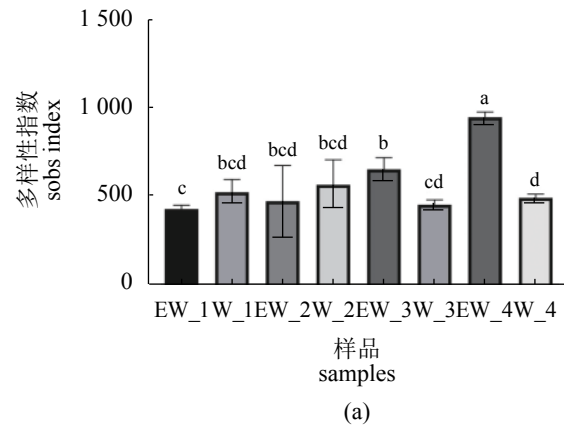


图 5 2 种处理下微生物的多样性

不同字母代表处理间存在显著差异 ($P < 0.05$)

Fig. 5 Diversity index in two treatments

Different letters mean that there are statistically significant differences between groups ($P < 0.05$)

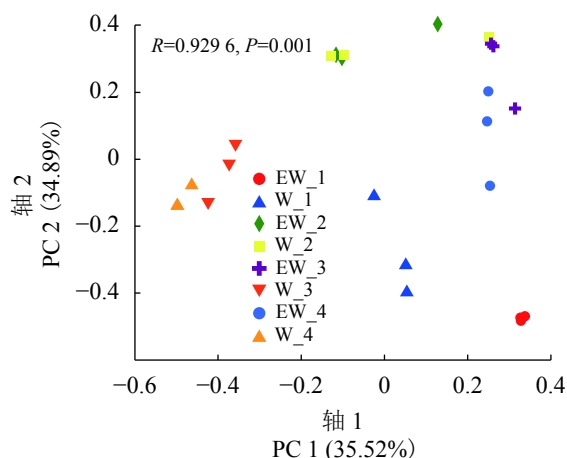


图 6 基于属水平的主坐标分析结果

Fig. 6 Result of principal co-ordinates analysis (PCoA) based on the genus level

于实验组, 表明在蟹鲈混养模式中添加 EM 可以有效降低池塘总氮的含量, 减少病害菌。与以往研究结果一致, 本研究结果得出总氮是影响细菌

群落结构的主要因素^[29]。微小杆菌属与总磷含量呈正相关, 它是一种多功能菌属, 多样性和适应能力强, 能促进植物生长、提高生产力, 可作为一种重要的资源来设计生态友好的生物替代品, 并促进农业的可持续发展^[30]。薛菲菲^[31]发现, 微小杆菌对养殖池塘的氨氮降解效果较好。本研究发现, 微小杆菌属在实验组的 II~IV 期含量较高, 这表明在蟹鲈混养模式下持续添加 EM 可以提高微小杆菌属的丰富度, 改善水体微生物菌群结构, 对氨氮、总氮的降解具有积极作用。有研究表明适量的磷含量有益于甲壳动物和浮游植物的生长^[32], 本实验中添加 EM 的养殖池塘总磷含量显著高于对照池塘, 更有利于中华绒螯蟹的生长; 蓝细菌门一般指蓝藻, 主要生长于淡水中, 是导致“水华”发生的元凶。蓝藻能分泌许多毒素, 使肌肉和神经等产生不可逆的病理变化, 对生殖系统和心脏等也有较多负面影响^[33], 研究结果表明, EM 对蓝细菌门有明显抑制作用, 但是需要一定的时间。

表 4 差异 OTU 信息表

Tab. 4 Differential OTU information

时期 periods	OTU 编号 OTU number	丰度 (实验组) richness (experimental group)	丰度 (对照组) richness (control group)	物种注释 classification result
I	OTU113	1 474.67	235.67	<i>g_Candidatus_Limnoluna</i>
I	OTU101	1 341.67	154.67	多核杆菌属 <i>g_Polynucleobacter</i>
I	OTU34	24.00	989.67	氢噬胞菌属 <i>g_Hydrogenophaga</i>
I	OTU61	31.67	175.00	食酸菌属 <i>g_Acidovorax</i>
I	OTU7	411.00	74.33	<i>g_Limnohabitans</i>
I	OTU331	11.67	3 322.67	红育菌属 <i>g_Rhodoferax</i>
II	OTU948	23.33	80.67	短波单胞菌属 <i>g_Brevundimonas</i>
II	OTU775	4.00	15.00	新鞘氨醇杆菌 <i>g_Novosphingobium</i>
II	OTU630	2.33	5.67	小单胞菌属 <i>g_Micromonospora</i>
II	OTU778	27.67	81.33	短波单胞菌属 <i>g_Brevundimonas</i>
II	OTU1 200	2.67	5.33	短芽孢杆菌属 <i>g_Brevibacillus</i>
II	OTU1 219	0.67	5.33	<i>g_Arenimonas</i>
III	OTU1 981	37.00	1 565.33	分枝杆菌属 <i>g_Mycobacterium</i>
III	OTU1 857	45.33	3 255.67	分枝杆菌属 <i>g_Mycobacterium</i>
III	OTU777	54.33	7 412.33	分枝杆菌属 <i>g_Mycobacterium</i>
III	OTU913	169.00	3.33	<i>g_unclassified_f_Rhodobacteraceae</i>
III	OTU218	7.67	2 611.00	<i>g_norank_f_norank_o_PeM15</i>
III	OTU1 186	3.00	477.00	<i>g_norank_f_norank_o_PeM15</i>
IV	OTU777	238.67	5 017.67	分枝杆菌属 <i>g_Mycobacterium</i>
IV	OTU1 981	84.00	3 222.00	分枝杆菌属 <i>g_Mycobacterium</i>
IV	OTU1 961	4.00	499.33	<i>g_Alsobacter</i>
IV	OTU1 188	11.00	267.67	<i>g_norank_f_norank_o_Microtrichales</i>
IV	OTU218	16.00	1 530.00	<i>g_norank_f_norank_o_PeM15</i>
IV	OTU1 857	444.33	6 045.00	分枝杆菌属 <i>g_Mycobacterium</i>

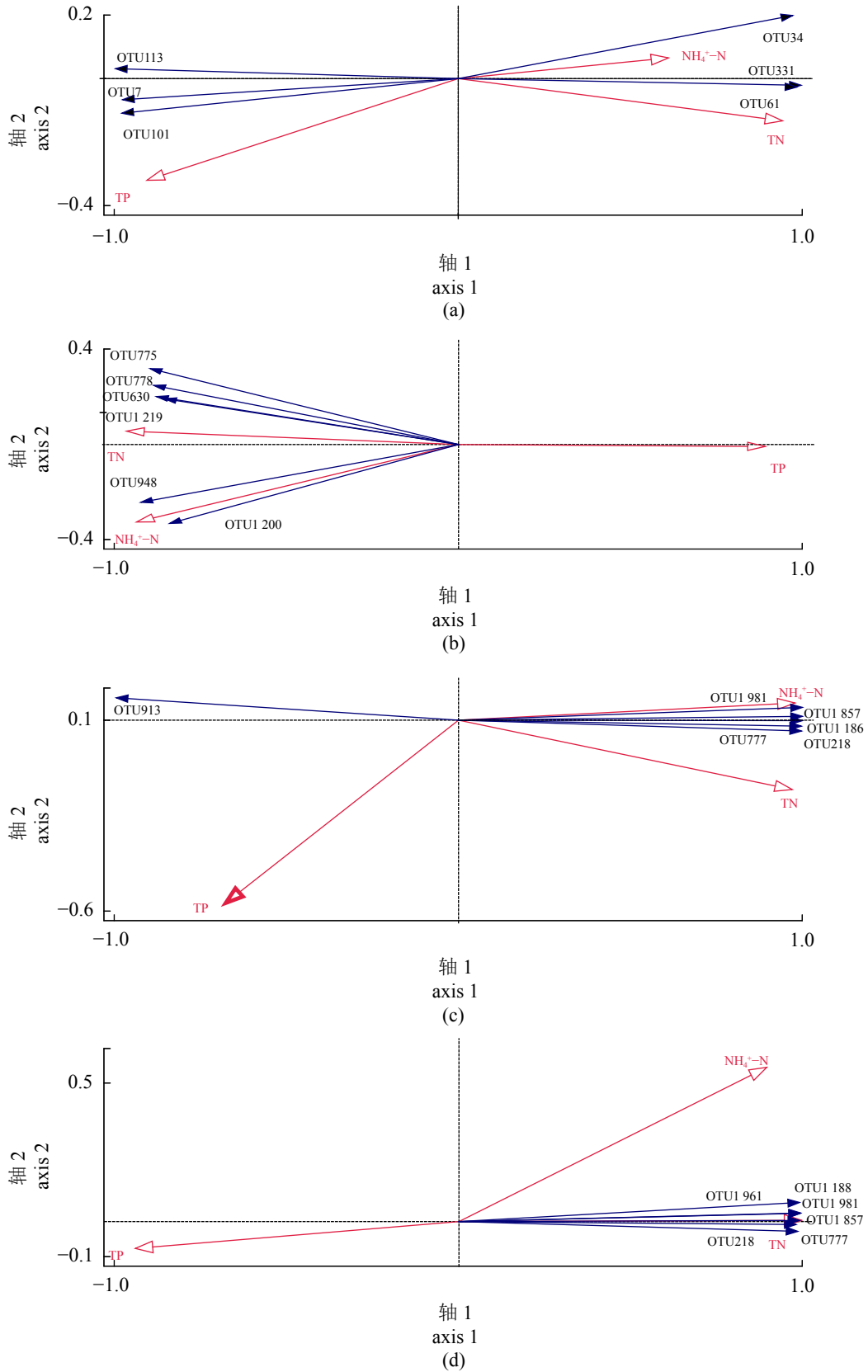


图 7 4 个时期差异菌属与环境因子之间的冗余关联分析

Fig. 7 Redundancy analysis (RDA) of water environment factors and differential microorganisms of four periods at genus level

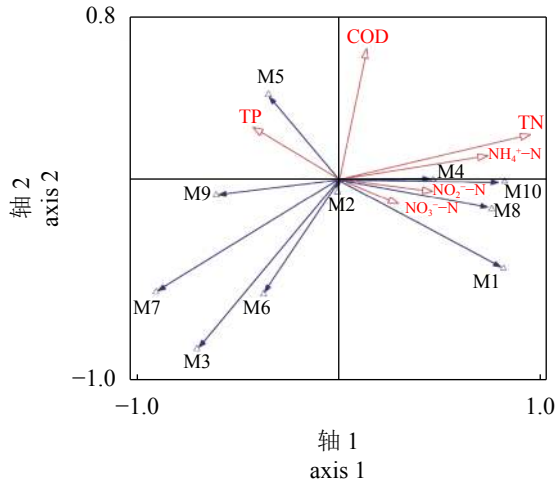


图 8 不同养殖模式下差异菌属与环境因子之间的典型关联分析

Fig. 8 Canonical correspondence analysis (CCA) of water environment factors and differential microorganisms of different cultural patterns at genus level

M1. *norank_f_norank_o_Chloroplast*; M2. *unclassified_f_Rhodobacteraceae*; M3. *Limnohabitans*; M4. *norank_f_Rhizobiales_Incertae_Sedis*; M5. *Exiguobacterium*; M6. *Polynucleobacter*; M7. *Candidatus_Limnoluna*; M8. *norank_f_norank_o_PeM15*; M9. *Aurantimicrobium*; M10. *Mycobacterium*

养殖池塘作为小型生态系统,其组成也包括水体的微生物,微生物种类和丰富度越高,其生态系统越复杂,稳定性也越强^[34]。生物多样性对于缓冲环境变化和干扰具有重要作用,同时对于巩固生态系统服务具有积极作用^[35]。裘琼芬等^[36]认为水环境的稳定与微生物丰富度密切相关,水体微生物丰富度下降,会使养殖病害的风险升高。本实验发现,蟹鲈混养模式下添加 EM 可以有效提高池塘水体微生物物种丰富度,提高有益菌群的数量,减少有害菌群的滋生,使养殖水体的生态系统稳定性有所提高。综上所述,EM 在蟹鲈混养模式中有着很好的应用效果,可以提高养殖池塘水体微生物丰富度,抑制蓝藻的生长,降低养殖水体总氨氮、总氮等指标的含量,对于改善水质和维持池塘水环境稳态具有积极作用。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

[1] Guo Y R, Gu S Q, Wang X C, *et al.* Nutrients and non-volatile taste compounds in Chinese mitten crab by-products[J]. *Fisheries Science*, 2015, 81(1): 193-203.

[2] 袁泉,任艳,周文宗,等.水蕹菜浮床对盐碱地池塘水质与中华绒螯蟹生长的影响[J].*淡水渔业*, 2019, 49(6): 94-99.

Yuan Q, Ren Y, Zhou W Z, *et al.* Effects of water spinach floating beds on water quality and growth of *Eriocheir sinensis* cultured in the ponds of saline-alkali soil[J]. *Freshwater Fisheries*, 2019, 49(6): 94-99 (in Chinese).

[3] 刘庆华,黄姝,岳武成,等.伊乐藻对中华绒螯蟹生长和营养品质的影响[J].*中国水产科学*, 2017, 24(1): 91-99.

Liu Q H, Huang S, Yue W C, *et al.* Effects of *Elodea nuttallii* on growth and nutritional quality of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(1): 91-99 (in Chinese).

[4] Huang X L, Liu S, Chen X, *et al.* Comparative pathological description of nocardiosis in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) and other Perciformes[J]. *Aquaculture*, 2021, 534: 736193.

[5] 白俊杰,李胜杰.我国大口黑鲈产业现状分析与发展对策[J].*中国渔业经济*, 2013, 31(5): 104-108.

Bai J J, Li S J. Current status and development trend on China largemouth bass industry[J]. *Chinese Fisheries Economics*, 2013, 31(5): 104-108 (in Chinese).

[6] 邱楚雯,施永海,王韩信.暗纹东方鲀不同养殖模式下的微生物群落结构[J].*水产学报*, 2021, 45(2): 209-220.

Qiu C W, Shi Y H, Wang H X. Microbial community structure in different cultural patterns of *Takifugu obscurus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(2): 209-220 (in Chinese).

[7] 韩枫,常志强,高勇,等.多营养层次生态养殖模式简析[J].*水产养殖*, 2021, 42(04): 24-30.

Han F, Chang Z Q, Gao Y, *et al.* Analysis of the integrated multi-trophic aquaculture model[J]. *Journal of Aquaculture*, 2021, 42(04): 24-30 (in Chinese).

[8] 宋硕,田相利,王芳,等.不同草鱼池塘混养系统结构优化的实验研究[J].*水生生物学报*, 2012, 36(4): 704-714.

Song Q, Tian X L, Wang F, *et al.* An experimental study on structure optimization for polyculture of grass carp with different species[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, 36(4): 704-714 (in Chinese).

[9] 徐金根,陈素文,张汉华,等.凡纳滨对虾不同池塘混养模式的弧菌数量变化[J].*广东农业科学*, 2012,

- 39(19): 156-159.
- Xu J G, Chen S W, Zhang H H, *et al.* The quantity change of *Vibrio* under different breeding modes for *Litopenaeus vannamei*[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2012, 39(19): 156-159 (in Chinese).
- [10] Tian X L, Li D S, Dong S L, *et al.* An experimental study on closed-polyculture of penaeid shrimp with tilapia and constricted tagelus[J]. *Aquaculture*, 2001, 202(1-2): 57-71.
- [11] 朱亮, 汪翔, 朱雪诞, 等. EM菌富集培养及降解污水试验研究[J]. *河海大学学报*, 2002, 30(2): 6-8.
- Zhu L, Wang H, Zhu X D, *et al.* Experimental study on EM enrichment cultivation and wastewater degradation[J]. *Journal of Hohai University*, 2002, 30(2): 6-8 (in Chinese).
- [12] 焦阳阳, 欧阳玥玲, 周宏超, 等. 有效微生物群对仔猪生产性能的影响初探[J]. *动物医学进展*, 2017, 38(2): 111-115.
- Jiao Y Y, Ouyang Y L, Zhou H C, *et al.* Effect of effective microorganisms (EM) on productive performance of piglets[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2017, 38(2): 111-115 (in Chinese).
- [13] 李维炯, 倪永珍, 黄宏坤, 等. 微生态制剂在生态畜牧业中应用效果 [J]. *中国农业大学学报*, 2003(S1): 85-92.
- Li W J, Ni Y Z, Huang H K, *et al.* A preliminary studies of micro-ecological agents on ecological livestock huabandry[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2003(Suppl.1): 85-92 (in Chinese).
- [14] Cui Q, Xia J B, Yang H J, *et al.* Biochar and effective microorganisms promote *Sesbania cannabina* growth and soil quality in the coastal saline-alkali soil of the Yellow River Delta, China[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 756: 143801.
- [15] Dondajewska R, Kozak A, Rosińska J, *et al.* Water quality and phytoplankton structure changes under the influence of effective microorganisms (EM) and barley straw-Lake restoration case study[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 660: 1355-1366.
- [16] Romeh A A. Synergistic use of *Plantago major* and effective microorganisms, EMI to clean up the soil polluted with imidacloprid under laboratory and field condition[J]. *International Journal of Phytoremediation*, 2020, 22(14): 1515-1523.
- [17] Zhou Q L, Li K M, Jun X, *et al.* Role and functions of beneficial microorganisms in sustainable aquaculture[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(16): 3780-3786.
- [18] Jin M, Wang X W, Gong T S, *et al.* A novel membrane bioreactor enhanced by effective microorganisms for the treatment of domestic wastewater[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 69(2): 229-235.
- [19] 朱婷婷, 田从魁. 水库底泥中微生物多样性及其与环境因子相关性分析[J]. *北京大学学报(自然科学版)*, 2018, 54(3): 625-632.
- Zhu T T, Tian C K. Analysis on microbial diversity in the sediments and its relationship with environmental factors in a reservoir[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis*, 2018, 54(3): 625-632 (in Chinese).
- [20] 邓来富, 江兴龙. 池塘养殖生物修复技术研究进展[J]. *海洋与湖沼*, 2013, 44(5): 1270-1275.
- Deng L F, Jiang X L. The application and research progress of bioremediation in pond aquaculture[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(5): 1270-1275 (in Chinese).
- [21] 刘伟杰, 吴健伟, 张跃东, 等. 河蟹、青虾、塘鳢混养和单养池塘水质变化比较[J]. *水产养殖*, 2014, 35(4): 16-20.
- Liu W J, Wu J W, Zhang Y D, *et al.* Comparison of dynamic water quality among crab, shrimp, gizzard fish polyculture and crab monoculture system[J]. *Journal of Aquaculture*, 2014, 35(4): 16-20 (in Chinese).
- [22] John E M, Krishnapriya K, Sankar T V. Treatment of ammonia and nitrite in aquaculture wastewater by an assembled bacterial consortium[J]. *Aquaculture*, 2020, 256: 735390.
- [23] 丁学锋, 蔡景波, 杨肖娥, 等. EM菌与水生植物黄花水龙(*Jussiaea stipulacea* Ohwi)联合作用去除富营养化水体中氮磷的效应[J]. *农业环境科学学报*, 2006, 25(5): 1324-1327.
- Ding X F, Cai J B, Yang X E, *et al.* Effects of EM-aquatic plant (*Jussiaea stipulacea* Ohwi) on removing N and P from polluted water[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, 25(5): 1324-1327 (in Chinese).
- [24] 夏来根, 宋学宏, 张磊磊, 等. 4种微生态制剂对虾池水质及青虾生长性能的影响[J]. *水生态学杂志*, 2012, 33(3): 101-106.
- Xia L G, Song X H, Zhang L L, *et al.* Effects of four

- microecological agents on water quality in culture ponds and growth performance of oriental river prawn[J]. *Journal of Hydroecology*, 2012, 33(3): 101-106 (in Chinese).
- [25] Zhang H, Sun Z L, Liu B, *et al.* Dynamic changes of microbial communities in *Litopenaeus vannamei* cultures and the effects of environmental factors[J]. *Aquaculture*, 2016, 455: 97-108.
- [26] Khouadja S, Haddaji N, Hanchi M, *et al.* Selection of lactic acid bacteria as candidate probiotics for *Vibrio parahaemolyticus* depuration in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*)[J]. *Aquaculture Research*, 2017, 48(4): 1885-1894.
- [27] Kanipe C, Palmer M V. *Mycobacterium bovis* and you: a comprehensive look at the bacteria, its similarities to *Mycobacterium tuberculosis*, and its relationship with human disease[J]. *Tuberculosis*, 2020, 125: 102006.
- [28] 张德锋, 李爱华. 斑马鱼分枝杆菌病的研究概况[J]. *实验动物科学*, 2009, 26(6): 64-67.
- Zhang D F, Li A H. Advances in research of mycobacteriosis of zebra fish[J]. *Laboratory Animal Science*, 2009, 26(6): 64-67 (in Chinese).
- [29] 金笑, 寇文伯, 于昊天, 等. 鄱阳湖不同区域沉积物细菌群落结构、功能变化及其与环境因子的关系[J]. *环境科学研究*, 2017, 30(4): 529-536.
- Jin X, Kou W B, Yu H T, *et al.* Environmental factors influencing the spatial distribution of sediment bacterial community structure and function in Poyang Lake[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2017, 30(4): 529-536 (in Chinese).
- [30] Pandey N. Chapter 10-*Exiguobacterium*[M]//Amaresan N, Senthil Kumar M, Annapurna K, *et al.* Beneficial microbes in agro-ecology: bacteria and fungi. Pittsburgh: Academic Press, 2020: 169-183.
- [31] 薛菲菲. 养殖池塘中氨氮降解有益微生物的分离与鉴定 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
- Xue F F. Isolation and identification of microorganisms beneficial to ammonia degradation in aquaculture ponds[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014 (in Chinese).
- [32] 李跃华, 葛家春, 彭刚, 等. 二种微生物制剂对青虾池水质和生长的影响[J]. *水产养殖*, 2009, 30(10): 65-67,70.
- Li Y H, Ge J C, Peng G, *et al.* Effects of two microecologies on water quality of ponds and growth of *Macrobrachium nipponense*[J]. *Journal of Aquaculture*, 2009, 30(10): 65-67,70 (in Chinese).
- [33] 谢平. 蓝藻水华及其次生危害[J]. *水生态学杂志*, 2015, 36(4): 1-13.
- Xie P. Cyanobacterial blooms and their secondary harms[J]. *Journal of Hydroecology*, 2015, 36(4): 1-13 (in Chinese).
- [34] Bullock J M, Aronson J, Newton A C, *et al.* Restoration of ecosystem services and biodiversity: conflicts and opportunities[J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 2011, 26(10): 541-549.
- [35] 李奇, 朱建华, 肖文发. 生物多样性与生态系统服务——关系、权衡与管理[J]. *生态学报*, 2019, 39(8): 2655-2666.
- Li Q, Zhu J H, Xiao W F. Relationships and trade-offs between, and management of biodiversity and ecosystem services[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2019, 39(8): 2655-2666 (in Chinese).
- [36] 裘琼芬, 张德民, 叶仙森, 等. 象山港网箱养殖对近海沉积物细菌群落的影响[J]. *生态学报*, 2013, 33(2): 483-491.
- Qiu Q F, Zhang D M, Ye X S, *et al.* The bacterial community of coastal sediments influenced by cage culture in Xiangshan Bay, Zhejiang, China[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(2): 483-491 (in Chinese).

Effect of effective microorganisms (EM) on aquatic bacterial community structure in polyculture mode of *Eriocheir sinensis* and *Micropterus salmoides*

LI Shiheng¹, NIE Zhijuan², SHEN Lei¹, SHAO Nailin²,
SUN Yi², XU Gangchun^{1,2}, XU Pao^{1,2*}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: To investigate the effects of addition of EM on the water quality and microbial community structure in polyculture of *Eriocheir sinensis* and *Micropterus salmoides*, one-month EM treatment experiment was conducted with period I (April 10th), period II (April 20th), period III (April 30th), and period IV (May 10th) under the analysis of water indexes and microbiome structure. The 16S *rRNA* high-throughput sequencing results showed that the dominant phyla were Proteobacteria, Actinobacteriota, Firmicutes and Cyanobacteria during the whole experiment period. Meanwhile, the relative abundance of Cyanobacteria in the control group was significantly higher than that of the experimental group in period III and IV. Compared with the control group, *Limnohabitans* (20.34%) was the most dominant at genus level in period I, whereas *Exiguobacterium* occupied the most abundant position in other three periods (56.33%, 38.11%, 17.88%). However, *Rhodospirillum rubrum* (10.37%), *Exiguobacterium* (47.67%), and *Mycobacterium* (36.01%, 42.27%) were the most abundant in each period of the control group. The Sobs and PD indexes of the experiment group were significantly higher than those of the control group in period III and IV. Compared with the control group, the total nitrogen (TN) of the experiment group was significantly decreased during the whole monitoring periods, moreover, the content of ammonia nitrogen decreased significantly in period II, III and IV. Correlation analysis of environmental factors showed that total nitrogen had the greatest impact on the bacterial community, and *Exiguobacterium* as the dominant probiotics in the experimental group were positively correlated with TP and negatively correlated with TN, NH₄⁺-N, NO₃⁻-N, NO₂⁻-N. Studies have shown that the addition of EM could improve the water quality of aquaculture water, effectively inhibit Cyanobacteria, significantly optimize the bacterial structure, and had significant in-situ water remediation function. It may promote green and sustainable development of aquaculture.

Key words: effective microorganisms (EM); microbial structure; richness; *in-situ* remediation

Corresponding author: XU Pao. E-mail: xup@ffrc.cn

Funding project: National Key Research and Development Plan Blue Granary Science and Technology Innovation Special Project (2019YFD0900301)