

## 复合益生菌对草鱼养殖水体水质和菌群结构的影响

郑佳佳, 彭丽莎, 张小平, 孙健栋, 傅罗琴,  
王一冰, 胡彩虹, 李卫芬\*

(浙江大学动物科学学院, 浙江 杭州 310058)

**摘要:**为研究草鱼养殖水体中添加复合益生菌水质调节剂对水体水质和菌群的调节作用, 实验采用氮磷等指标监测水质, 采用 454 焦磷酸盐测序方法分析菌群结构, 结果显示, 处理组的氨氮、亚硝酸盐氮和总氮浓度一直低于对照组, 但差异不显著; 处理组硝酸盐氮浓度低于对照组, 且在 18 d 下降了 56.59%; 处理组的总无机氮含量低于对照组, 且在 15 d 下降了 28.75%。处理组正磷酸盐和总磷浓度略低于对照组, 无显著差异。15 d 水样的 454 焦磷酸盐测序结果与对照组相比, 处理组菌群多样性更高, 厚壁菌门和变形菌门分别减少了 91.21% 和 21.75%, 拟杆菌、放线菌和蓝细菌分别增加了 288%、435% 和 848%。在变形菌门中,  $\alpha$ -变形杆菌和  $\beta$ -变形杆菌分别比对照组提高了 318% 和 18%,  $\gamma$ -变形杆菌比对照组降低了 78.82%。研究表明, 该复合益生菌具有一定水质调控功能, 且能显著改变菌群结构。

**关键词:**草鱼; 复合益生菌; 水质; 菌群结构

**中图分类号:** S 917.1

**文献标志码:** A

水产养殖业是我国渔业的重要组成部分, 多年来, 我国的水产养殖基本以静水、不排污的池塘养殖为主, 养殖对象的活动、摄食、排泄都在同一池塘中进行, 切断了自然生态系统的食物链<sup>[1]</sup>。随着人们对水产品需求的增加, 养殖水平不断提高, 养殖规模逐渐扩大, 养殖户过于追求经济利益而盲目增加养殖密度, 大量投喂的人工饲料、施加的有机肥料、水产养殖动物排泄的粪便、死亡动植物的残骸构成了水体中有机物来源的主体。有研究表明, 在池塘养殖投喂的湿饲料中, 5%~10% 未被鱼类食用<sup>[2]</sup>, 而被鱼类食用的饲料中又有 25%~30% 以粪便形式排出<sup>[3]</sup>。水体中未被利用的蛋白质等有机物被产蛋白酶的微生物迅速有效分解形成氨氮等化合物, 对养殖生物产生很强的毒性, 导致水体富营养化<sup>[4]</sup>。而磷几乎以各种磷酸盐的形式存在于水体中, 研究表明, 每千克鱼饵平均含磷 10 g<sup>[5]</sup>。臧维玲等<sup>[6]</sup>认为鱼饵中的磷仅 15%~30% 被鱼类利用, 16%~26% 溶于水中,

51%~59% 以颗粒态存在。水体中磷的含量过高 (超过 0.2 mg/L), 可造成藻类的过度繁殖, 加速水体富营养化。由此可见, 养殖与水域生态环境的矛盾越来越突出, 养殖水体的污染问题已成为我国水产养殖可持续发展的瓶颈<sup>[1]</sup>。

调节或控制好水质是养殖的关键。目前微生物技术是当前环境治理尤其是水环境污染治理的研究热点<sup>[7]</sup>。以往对于脱氮的研究主要停留在单一菌株的分离及特性的理论研究, 在实际应用当中, 由于外界环境多变, 单株菌抵御外界冲击能力有限, 导致降解能力下降<sup>[8]</sup>, 而多种类的益生菌配制成的复合微生物制剂, 各种微生物在其生长过程中分泌的物质, 成为微生物群体相互生长的基质和原料, 通过这种相互共生增殖关系, 形成了一个复杂而稳定的微生物系统, 发挥多种功能<sup>[9]</sup>, 使水体得到净化和修复, 对提高水产养殖经济效益, 促进绿色水产养殖的健康发展有着重要意义。本实验以实验室配制的复合益生菌作为

收稿日期: 2012-04-12 修回日期: 2012-12-05

资助项目: 国家“九七三”重点基础研究发展规划 (2009CB118705); 公益性行业 (农业) 科研专项 (201203083)

通信作者: 李卫芬, E-mail: wfli@zju.edu.cn

研究对象,考察其对池塘水体几种常见有害物质的降解效果,及其对水样菌群结构的影响,为养殖水体的氮污染物去除探索一种更为有效的方法。

## 1 材料与方

### 1.1 实验材料

草鱼 (*Ctenoparyngodon idellus*) 由浙江绍兴县大畈水产合作社提供。

复合益生菌由浙江大学微生物与基因工程实验室配制,由 1 株具硝化功能和 2 株具反硝化功能的枯草芽孢杆菌按等比例混合而成,菌含量为  $10^8$  CFU/g。

### 1.2 实验方法

实验在浙江绍兴县大畈水产合作社进行。草鱼用 2.5% 的食盐水浸泡 10 min,饲养 10 d 后,选取草鱼 120 尾,初始质量为  $(14.58 \pm 0.8)$  g,随机分为 2 组,每组设 3 个重复,每个重复 20 尾鱼:对照组水中不添加任何菌,处理组每 7 天分别向水中添加 2 g 的复合益生菌,所有组饲料相同饲料(表 1)。实验鱼在圆形水桶中饲养,养殖实际水体积为 340 L,氧气泵连续增氧。每天 9:00 和 17:00 两次投饵,日投饵量为体质量的 2%。每天观察鱼的活动情况,实验时间为 21 d。水源为浙江省绍兴县孙端镇大畈河(经纬度:30°03'38"N, 120°40'52"E)河水。

表 1 基础饵料的原料组成和营养成分

Tab.1 Ingredients and nutritional composition of the basal diet

原料组成 feedstock composition	比例/% proportion	营养成分 nutrients	比例/% proportion
鱼粉 fish meal	2	水分 moisture	9.72
全脂大豆 soybean meal	5	粗蛋白 crude protein	29.36
棉籽粕 cottonseed meal	23	粗脂肪 crude fat	3.35
菜籽粕 rapeseed meal	27	粗灰分 crude ash	10.88
小麦 wheat flour	17	钙 calcium	0.71
全脂米糠 rice bran	8	总磷 total phosphonium	1.21
酒糟粉 lee powder	6		
麦芽根 malt root	6		
预混料 premix	5		
添加剂 additive	1		
合计 total	100		

水样采集和测定方法 水样的采集和测定参考《水和废水检测分析方法》(第四版)<sup>[10]</sup>,每

天测水温,每 3 天测定一次 pH、透明度、TDS、硬度和碱度。上午投饵前采样,采集前将水桶中的养殖水充分混合均匀,在离水面 15 cm 处取水样,每次采集点相同。采集水样 100 mL,于 5 000 r/min,离心 5 min,取上清液,用纳氏试剂光度法测定氨氮( $\text{NH}_4^+$ -N)、N-(1-萘基)-乙二胺光度法测定亚硝酸盐氮( $\text{NO}_2^-$ -N)、紫外分光光度法测定硝酸盐氮( $\text{NO}_3^-$ -N)、过硫酸钾—硼酸—氢氧化钠加压联合消化法测定总氮(TN)、总磷(TP)、钼锑抗分光光度法测定正磷酸盐(orthophosphate)等。总无机氮(TIN)浓度为氨氮、亚硝酸盐氮、硝酸盐氮三者浓度之和。

DNA 提取 根据水质测定结果(对照组和处理组差异显著)取第 15 天水样 100 mL,经 SARTORIUS(德国赛多利斯)三联微生物滤器 0.22  $\mu\text{m}$  过滤,将含有水样细菌的滤膜保存于  $-20$  °C 冰箱。

取 1.5 mL eppendorf 管,加入 582  $\mu\text{L}$  灭菌双蒸水,160  $\mu\text{L}$  0.5 mol/L 的 EDTA 二钠,40  $\mu\text{L}$  10% SDS,8  $\mu\text{L}$  pH 9.0 Tris-HCl,一张充分剪碎含有水样细菌的滤膜。再加入 8  $\mu\text{L}$  20 mg/mL 的溶菌酶,1.6  $\mu\text{L}$  RNA 酶 A。37 °C 水浴 1 h,每 10 min 混匀一次。加入 8  $\mu\text{L}$  蛋白酶 K,55 °C 水浴 4 h 或过夜。室温 13 000 r/min 离心 5 min,取上清液移入 2 mL eppendorf 管内,加入等体积 Tris 酚,混匀 10 min,4 °C 13 000 r/min 离心 5 min。取上清移入 2 mL eppendorf 管,加入等体积 25:24:1 的酚:氯仿:异戊醇,混匀 10 min,4 °C 13 000 r/min 离心 5 min。取上清移入 1.5 mL eppendorf 管,加入等体积氯仿,轻轻混匀 10 min,4 °C 13 000 r/min 离心 5 min。取上清移入 2 mL eppendorf 管,加入 1 200  $\mu\text{L}$  无水乙醇,轻轻来回颠倒,会发现溶液中出现 DNA 絮状沉淀。用弯钩的枪头将粘稠的絮状沉淀转入 1.5 mL 预先加入 70% 无水乙醇的 eppendorf 管中。4 °C 13 000 r/min 离心 5 min,收集沉淀,弃上清,在超净台中吹风烘干 30 min。DNA 沉淀中加入 30  $\mu\text{L}$  灭菌双蒸水或 pH 8.0 TE 缓冲液,于 75 °C 水浴 10 min,  $-20$  °C 保存<sup>[11-12]</sup>。

ROCHE454 测序 本实验使用 16S rDNA 的 V3 区域作为目标 DNA 序列,进行 PCR 扩增(扩增片段在 16S rRNA 基因上的位置为 341 ~ 534),分别设计了 6 对特异引物,这 6 对引物都含

有 16S rDNA V3 区域的上下游引物,并在 V3 上下游引物的 5'端各自加一个 8 碱基长的标签序列,每种特异标签序列都对应特异的样品。引物序列见表 2。使用上海生工生物工程公司货物编号为 SK2701 的 2 × PCR 试剂,PCR buffer 10 μL,引物 0.8 μL,DNA 模板 0.4 μL,灭菌双蒸水 8.8

μL。PCR 反应条件为 94 °C 5 min,94 °C 40 s,55 °C 50 s,72 °C 40 s,35 个循环。PCR 产物割胶回收,测定 DNA 浓度。对于每个样品的 PCR 产物,分别取 100 ng 等量混合,用于 454 GS FLX Titanium 测序。

表 2 试验所用引物和样品标记序列  
Tab.2 Primer and sample-specific barcode sequences

	引物 primer	条码序列 barcode sequence	引物序列 primer sequence
实验组 treatment	V3-26F	ATGAGAGT	ATGAGAGTCCTACGGGAGGCAGCAG
	V3-26R		ATGTCAGTCCTACGGGAGGCAGCAG
	V3-27F	ATGTCTAG	ATGTCTAGCCTACGGGAGGCAGCAG
	V3-27R		ATGTCTAGATTACCGCGGCTGCT
	V3-28F	ATGTCTGT	ATGTCTGTCTACGGGAGGCAGCAG
	V3-28R		ATGTCTGTATTACCGCGGCTGCT
对照组 control	V3-29F	ATGTCGAT	ATGTCGATCCTACGGGAGGCAGCAG
	V3-29R		ATGTCGATATTACCGCGGCTGCT
	V3-30F	ATGTCGTG	ATGTCGTGCCTACGGGAGGCAGCAG
	V3-30R		ATGTCGTGATTACCGCGGCTGCT
	V3-31F	ATGCTATG	ATGCTATGCCTACGGGAGGCAGCAG
	V3-31R		ATGCTATGATTACCGCGGCTGCT

由上海同达科信生物技术发展有限公司进行测序,采用 454 高通量测序技术对水体中微生物 16S rRNA 基因的 V3 区进行了测序,将获得的序列通过 Mothur 软件<sup>[13]</sup>,去除低质量的 DNA 序列,计算序列之间距离,一个微生物可操作单元 (OUT)为序列相似度大于 97% 的 DNA 序列。分别对对照组和复合益生菌处理组的样品进行菌群多样性分析和聚类分析,使用 RDP 库对所有 OUT 的代表性序列进行物种匹配,并对样品中各个门的组成进行统计。与 Silva 和 RDP 数据库进行比对分析,得到菌群分析结果<sup>[12,14]</sup>。

### 1.3 数据的统计与分析

利用 Excel 数据处理软件进行数据处理,实验数据用平均数 ± 标准差表示;采用 SPSS 16.0 统计软件。

## 2 结果

### 2.1 水质理化因子测定

从实验开始至第 16 天,水温维持在 29 °C 左右,由于天气的变化,从第 17 天开始,水温降至 19 ~ 23 °C。在 21 d 的试验期间,复合益生菌组与

对照组水体的 pH、透明度、TDS、硬度和碱度均趋于一致,无显著差异。

### 2.2 复合益生菌对草鱼养殖水体氨氮、亚硝酸盐氮和硝酸盐氮的影响

水样氨氮在 15 d 前呈现先上升后下降的趋势,15 d 后缓慢上升(图 1-a)。处理组养殖水体中的氨氮始终低于对照组,12 d 差值最大,分别为 (1.008 ± 0.037) 和 (1.363 ± 0.096) mg/L,但无显著差异 ( $P = 0.085$ )。

亚硝酸盐氮在 9 d 前,对照组与处理组均几乎检测不到亚硝酸盐氮(图 1-b)。12 d 后,随着时间的延长,亚硝酸盐氮逐渐升高,且处理组的浓度低于对照组,9 d 对照组与处理组相差最大,亚硝酸盐氮浓度分别为 (3.550 ± 0.895) 和 (2.692 ± 0.210) mg/L,但无显著差异 ( $P = 0.097$ )。

硝酸盐氮在 15 d 前,两组硝酸盐氮浓度均维持在 0.5 mg/L 以下,对照组 15 d 后、处理组 18 d 后随着时间的推移,硝酸盐氮的含量逐渐上升(图 1-c)。处理组硝酸盐氮浓度低于对照组,且第 18、21 天分别降低了 56.59% ( $P < 0.05$ ) 和 26.76% ( $P < 0.05$ )。

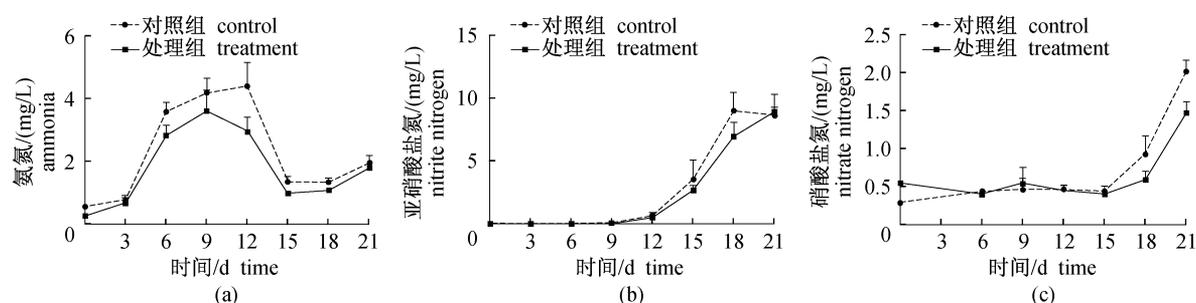


图1 水体氨氮、亚硝酸盐氮和硝酸盐氮的含量变化

Fig. 1 Change of ammonia nitrogen (a), nitrite nitrogen (b) and nitrate nitrogen (c) in aquatic water

### 2.3 复合益生菌对草鱼养殖水体总无机氮和总氮的影响

两组总无机氮浓度6 d前基本不变,6 d后上升,9 d后趋于平缓,18 d后急剧上升(图 2-a)。处理组的总无机氮含量一直低于对照组,且15 d、21 d差异显著,处理组分别比对照组降低了28.75% ( $P < 0.05$ )和28.43% ( $P < 0.05$ )。

随时间推移,两组总氮浓度整体呈波动上升,

12 d后浓度下降,15 d又上升(图 2-b)。试验期间,处理组总氮浓度一直低于对照组。

### 2.4 复合益生菌对草鱼养殖水体正磷酸盐和总磷的影响

水样正磷酸盐浓度一直呈现上升的趋势,两组正磷酸盐浓度基本一致,无显著性差异(图 3-a)。总磷(图 3-b)与正磷酸盐的结果相似。

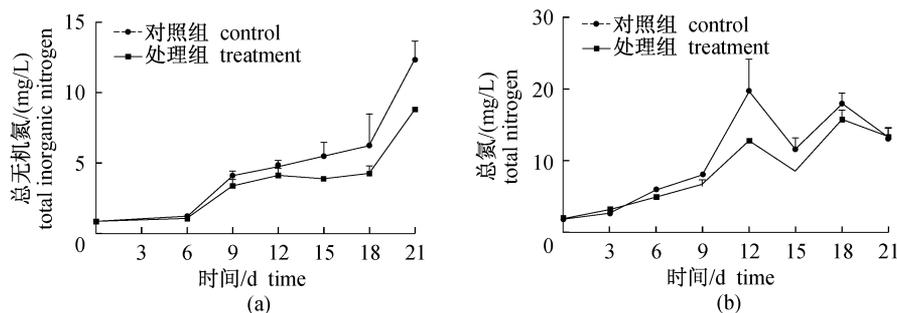


图2 水体总无机氮和总氮的含量变化

Fig. 2 Change of total inorganic nitrogen (a) and total nitrogen (b) in aquatic water

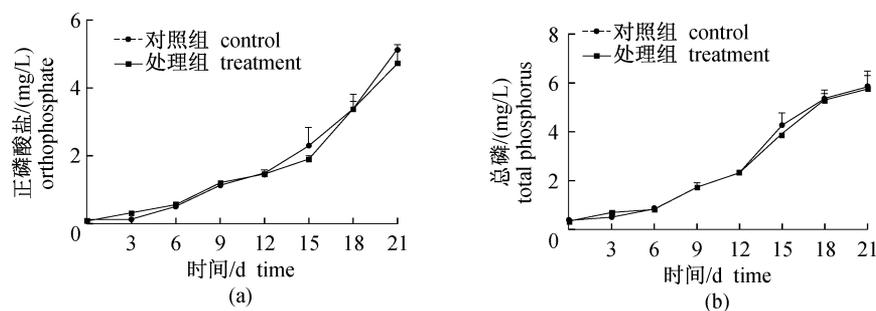


图3 水体正磷酸盐和总磷的含量变化

Fig. 3 Change of orthophosphate (a) and total phosphorus (b) in aquatic water

### 2.5 复合益生菌对水样菌群结构的影响

**稀疏曲线分析** 采用454高通量测序技术对水样中微生物16S rRNA基因的V3区进行了

测序,通过Mothur软件对比。

图4为对照组和处理组两条稀疏曲线,相同序列数时处理组比对照组的菌群OUTs高,表明

处理组菌群多样性高于对照组,说明复合益生菌能增加水体菌群多样性。

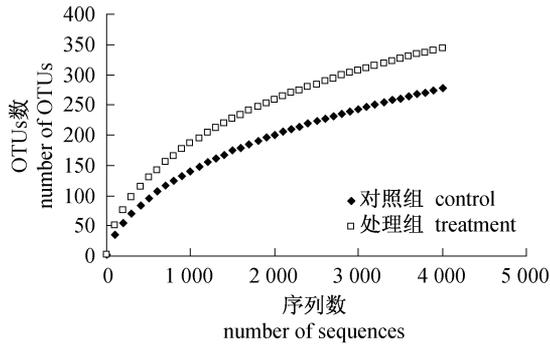


图4 对照组和处理组的稀疏曲线分析图  
Fig.4 Rarefaction results for control and treatment groups

聚类分析图分析 数据经 Mothur 等软件分析后得出 OTU 聚类分析图(图5)。由图可见,对照组和添加复合益生菌处理组这2种环境样品在聚类图上各自聚为一簇,其中样品 Control31 和 Control30、Treatment27 和 Treatment26 相似性最高,各自聚为一类。Treatment27 和 Treatment26 与 Treatment28 也有一定程度的相似性,接着该类又与 Control29 聚为一大类,最后与 Control31 和 Control30 相关联,说明来自同一环境的样品间其细菌群落组成十分相近。

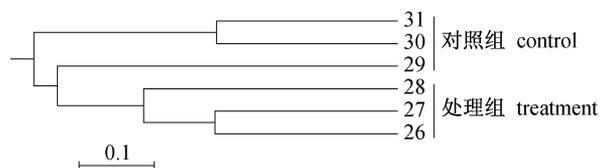


图5 对照组和处理组样品的聚类分析  
Fig.5 The cluster analysis of the control and treatment group samples

菌群结构分析 对照组水样中,优势菌为变形杆菌 (*Proteobacteria*)、厚壁菌 (*Firmicutes*)、拟杆菌 (*Bacteroidetes*)、放线菌 (*Actinobacteria*) 和蓝细菌 (*Cyanobacteria*), 分别占全部菌群的 10.58%、82.17%、3.39%、3.13% 和 0.22%。处理组中该五类菌仍为优势菌,但与对照组相比,变形菌减少了 21.75%,厚壁菌减少了 91.21% ( $P < 0.01$ ),拟杆菌增加了 288% ( $P < 0.01$ ),放线菌增加了 435% ( $P < 0.01$ ),蓝细菌增加了 848% ( $P < 0.01$ )。其中,变形杆菌菌群结构的变化较明显,

处理组变形杆菌占总菌群的 64.30%。与对照组相比, $\alpha$ -变形杆菌和  $\beta$ -变形杆菌分别提高了 318% ( $P < 0.01$ ) 和 18.41%, $\gamma$ -变形杆菌降低了 78.82% ( $P < 0.01$ ) (图7)。

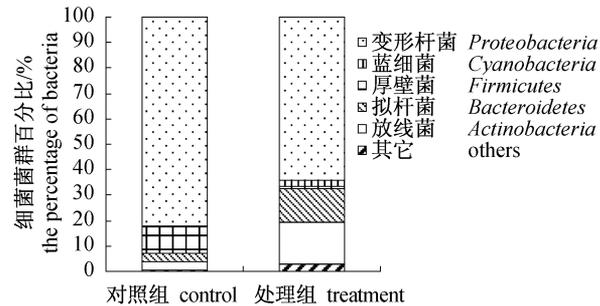


图6 复合益生菌对水体菌群结构的影响  
Fig.6 Effect of complex probiotics on the community structure of aquatic water

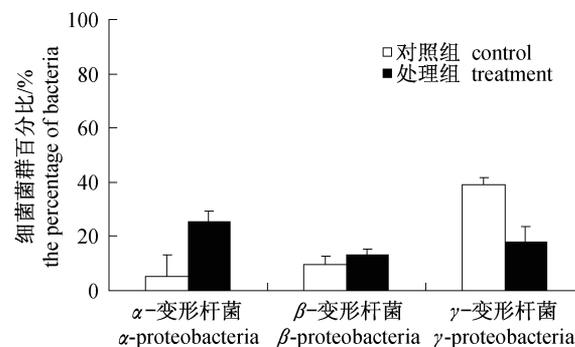


图7 复合益生菌对变形杆菌菌群结构的影响  
Fig.7 Effect of complex probiotics on the community structure of *Proteobacteria* in aquatic water

### 3 讨论

#### 3.1 复合益生菌的脱氮作用

氨化细菌、硝化细菌、反硝化细菌等以及它们组成的复合微生物均有改善富营养化水体的报道。如肖晶晶等<sup>[15]</sup>研究了由氨化菌、亚硝化菌、硝化菌和反硝化菌构成的氮循环菌,在代谢过程中可将室内模拟富营养化水样中的含氮物质最终转化为无害的氮气释放到空气中,有效地降低水体中氮的浓度。闫海等<sup>[16]</sup>研究的自养和异养菌的混合微生物能有效去除氨氮和亚硝酸盐氮。

本研究中,处理组加入微生态复合菌制剂后,复合菌制剂在池中大量繁殖,分泌相关酶,分解含氮物质,故  $\text{NH}_4^+ \text{-N}$  一直低于对照组,控制在较低水平。同时,处理组中  $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 、TIN 和

TN的含量也明显低于对照组。由于气温变化等原因的影响,总氮的含量有一定的起伏,但总体上实验组水环境各项指标一直优于未加复合益生菌制剂的对照组。这说明该复合菌在一定程度上能减少水中无机氮的产生或转化无机氮为其他氮形态,具有一定的水质调控功能。

实验最后各指标都有增加的现象,可能是由于气体中氮气或饲料等含氮磷有机物经过微生物降解生成了水溶性氮磷,并且超过了微生物能够利用的量,从而使得水溶性氮磷在水体中不断的积累。

### 3.2 菌群结构改变对水质的影响

本研究中,养殖水体的菌群结构分析结果显示,厚壁菌、放线菌、变形杆菌、拟杆菌和蓝细菌占99%以上,为水体菌群主要组成成份<sup>[17-18]</sup>。

本研究中,复合益生菌添加到对水体中,打破了原有水体的微生态平衡,复合益生菌与之竞争,形成优势种群,改良水质条件。基于菌群结构分析,复合益生菌加到水中,水体中的蓝细菌数量有一定程度的增加,拟杆菌和放线菌数量大幅增加,逐渐成为优势菌群,得以生长繁殖并保持一定的数量,群落结构组成逐渐改变,而厚壁菌和变形杆菌被优势菌所代替,数量有所减少。

蓝藻1 000多种,其中有固氮能力的不过20余种。它们含有叶绿素,在氮、磷丰富的水体中生长旺盛,以硝酸盐或氨作为氮源,进行光合作用<sup>[19]</sup>,在自然界的氮素平衡中起了重要的作用,在水环境保护中,利用蓝细菌吸收废水中氮、磷和其他化合物,可起一定的净化作用。根据Wagner等<sup>[20]</sup>关于废水生物处理反应器中细菌群落结构的研究,拟杆菌一直是废水处理系统中的最优势类群。放线菌是一种广泛分布于自然界的有分枝倾向或能形成分枝菌丝且可产生孢子的特殊菌种类型,能够产生种类繁多的抗生素、维生素和酶,它的生长能改善水体的气味并对水体有消毒作用,对病原微生物有抑制作用,特别是能够抑制腐败菌的生长繁殖,转化氮、磷等元素。近年来,采用放线菌修复养殖水体取得了一定成效,王梦亮<sup>[21]</sup>的研究证明放线菌对养殖水体的氨氮有高效地去除效果。

在各种环境的微生物多样性调查中都发现,变形杆菌是主要的类群<sup>[22-23]</sup>。在真菌和细菌中,反硝化最常出现在 $\alpha$ -变形杆菌中,许多 $\alpha$ -变形杆

菌为已知的反硝化菌<sup>[24]</sup>。Baek等<sup>[25]</sup>从 $\alpha$ -变形杆菌中检测到部分反硝化基因nirK。Shapleigh等<sup>[26]</sup>在 $\alpha$ -变形杆菌鉴定得到NO<sub>2</sub><sup>-</sup>还原酶基因nirK和nirS、NO还原酶基因cnorB及NO<sub>3</sub><sup>-</sup>还原酶基因NapA,Fernandes等<sup>[27]</sup>鉴定到来源于 $\alpha$ -变形杆菌的N<sub>2</sub>O还原酶基因nosZ。也有研究指出污水处理系统脱氮的主要菌群为 $\beta$ -变形杆菌<sup>[28]</sup>,Jones等<sup>[29]</sup>在 $\beta$ -变形杆菌鉴定得到NO<sub>2</sub><sup>-</sup>还原酶基因nirK、NO还原酶基因cnorB和qnorB及N<sub>2</sub>O还原酶基因nosZ。本实验中, $\alpha$ -和 $\beta$ -变形杆菌都有所增加,同时水质也有所改善。

复合益生菌中的一些菌可能对水体本身的变形菌和厚壁菌有竞争性,或其分泌的产物对 $\gamma$ -变形菌和厚壁菌有抑制功能,导致 $\gamma$ -变形菌显著变少,厚壁菌几乎消失。

水体中的微生物菌群既有分解性细菌,又有合成性细菌;且厌氧菌、兼性菌、好氧菌并存,各种有益微生物依靠相互间的共生增殖及协同作用,集合多种酶促活性,通过一系列生理生化反应降低水体的氮磷含量,净化和改善养殖环境,促进水体物质循环和能源流动,创造良好的养殖环境。

### 参考文献:

- [1] 易弋,容元平,程谦伟,等. 养殖水体氨氮降解菌的分离和初步鉴定[J]. 贵州农业科学, 2011, 39(2): 154-157.
- [2] 刘长发,綦志仁,何洁,等. 环境友好的水产养殖业——零污水排放循环水产养殖系统[J]. 大连水产学院学报, 2002, 17(3): 220-226.
- [3] 温志良,张爱军,温琰茂. 集约化淡水养殖对水环境的影响[J]. 水利渔业, 2000, 4(20): 19-20.
- [4] 宋霖霞,王素英. 海水养殖废水中氨氮降解菌的诱变及培养条件[J]. 水产科学, 2011, 30(3): 148-151.
- [5] 王立明,刘德文. 网箱养殖对潘家口水库水质的影响分析[J]. 河北渔业, 2008(6): 42-44, 49.
- [6] 臧维玲,姚庆祯,戴习林. 上海地区水产养殖和长江口与杭州湾水域环境的关系[J]. 上海水产大学学报, 2003, 12(3): 219-226.
- [7] 张庆华,封永辉,王娟. 地衣芽孢杆菌对养殖水体氨氮、残饵降解特性研究[J]. 水生生物学报, 2011, 35(3): 498-503.
- [8] 韩丽华,张绍璐. 好氧脱氮菌群的筛选驯化及PCR-DGGE分析[J]. 东北林业大学学报, 2011, 39(8): 90-93.

- [9] 比嘉照夫. 拯救地球大变革[M]. 北京:中国农业大学出版社,1996.
- [10] 国家环境保护局编委会. 水和废水监测分析方法[M]. 北京:中国环境科学出版社,2002.
- [11] 朱雅楠. 养殖水体中细菌遗传多样性研究[D]. 广州:华南理工大学,2010.
- [12] Buée M, Reich M, Murat C, *et al.* 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity [J]. *New Phytologist*,2009,184(2):449–456.
- [13] 华蔚颖. 应用 454 测序技术分析菌群结构的方法学研究[D]. 上海:上海交通大学,2010.
- [14] Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T, *et al.* Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009,75(23):7537–7541.
- [15] 肖晶晶,朱昌雄,郭萍,等. 氮循环菌群的构建鉴定及其脱氮性能研究[J]. *农业环境科学学报*,2009,28(12):2680–2687.
- [16] 闫海,林毅雄,孙建新. 海水微生物菌群去除铵氮和亚硝酸氮研究[J]. *环境污染治理技术与设备*, 2003,4(11):44–47.
- [17] Warnecke F, Amann R, Pernthaler J. Actinobacterial 16 S rRNA genes from freshwater habitats cluster in four distinct lineages [J]. *Environmental Microbiology*,2004,6(3):242–253.
- [18] Kirchner D L. The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments [J]. *FEMS Microbiology Ecology*,2002,39(2):91–100.
- [19] Paerl H W. Physiological ecology and regulation of N<sub>2</sub> fixation in natural waters [J]. *Advances in Microbiology Ecology*,1990,11:305–344.
- [20] Wagner M, Loy A. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13 (3): 218–227.
- [21] 王梦亮,王京伟,苏小睿. 脱氮微生物对养殖水体有机氮去除作用的研究[J]. *水处理技术*,2007,33(6):45–48,52.
- [22] Hugenholtz P, Pitulle C, Hershberger K L, *et al.* Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring [J]. *Journal of Bacteriology* 1998,180(2):366–376.
- [23] O'Sullivan L A, Weightman A J, Fry J C. New degenerate *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*-specific 16S ribosomal DNA targeted oligonucleotide probes reveal high bacterial diversity in river *Taft* epilithon [J]. *Applied and Environmental Microbiology*,2002,68(1):201–210.
- [24] Labbé N, Laurin V, Juteau P, *et al.* Microbiological community structure of the biofilm of a methanol-Fed, marine denitrification system, and identification of the methanol-utilizing microorganisms [J]. *Microbiology Ecology*,2007,53(4):621–630.
- [25] Baek S H, Rajashekara G, Splitter G A, *et al.* *Brucella* denitrification genes regulate virulence in mice [J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186 (18): 6025–6031.
- [26] Shapleigh J P. Oxygen control of nitrogen oxide respiration, focusing on  $\alpha$ -*proteobacteria* [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2011, 39 (1): 179–183.
- [27] Fernandes S O, Michotey V D, Guasco S, *et al.* Denitrification prevails over anammox in tropical mangrove sediments (Goa, India) [J]. *Marine Environmental Research*,2012,74(1):9–19.
- [28] Yoshie S, Makino H, Hirose H, *et al.* Molecular analysis of halophilic bacterial community for high-rate denitrification of saline industrial wastewater [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006,72(1):182–189.
- [29] Jones C M, Stres B, Rosenquist M, *et al.* Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification [J]. *Molecular Biology and Evolution*,2008,25(9):1955–1966.

## Effects of complex probiotics on water quality and microbial communities in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) culture

ZHENG Jiaia, PENG Lisha, ZHANG Xiaoping, SUN Jiandong,  
FU Luoqin, WANG Yibing, HU Caihong, LI Weifen\*  
(College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

**Abstract:** This experiment was conducted to study the effects of complex probiotics on water quality and microbial community structure in grass carp culture. The results of water quality determination showed that compared with the control group, the concentration of ammonia nitrogen, nitrite nitrogen and total nitrogen in treatment group was lower in the whole experiment, respectively; On 18th d, the concentration of nitrate nitrogen in treatment group was decreased by 54.49% ( $P < 0.05$ ). On 15th d, the concentration of total inorganic nitrogen in treatment group was decreased by 28.75% ( $P < 0.05$ ). Orthophosphate and total phosphorus had no difference between the two groups. The 454-Pyrosequencing results showed that the composition of bacterial communities was highly variable between control and treatment groups, and microbial diversity of treatment was higher than that of control. *Firmicutes* and *Proteobacteria* decreased by 91.21% ( $P < 0.01$ ) and 21.75% ( $P < 0.01$ ) respectively. *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* and *Cyanobacteria* increased by 288% ( $P < 0.01$ ), 435% ( $P < 0.01$ ) and 848% ( $P < 0.01$ ) respectively. Among *Proteobacteria*, *Alphaproteobacteria* and *Betaproteobacteria* was elevated by 318% ( $P < 0.01$ ) and 18% respectively, while *Gammaproteobacteria* was reduced by 78.82% ( $P < 0.01$ ).

**Key words:** *Ctenopharyngodon idellus*; complex probiotics; water quality; microbial community structure

**Corresponding author:** LI Weifen, E-mail: wfli@zju.edu.cn