



## 罗非鱼-鱼腥草共生系统中鱼菜不同配比对池塘水质及细菌群落结构的影响

可小丽<sup>1</sup>, 李庆勇<sup>2</sup>, 黄秋标<sup>2</sup>, 王 淼<sup>1</sup>, 衣萌萌<sup>1</sup>, 刘志刚<sup>1</sup>, 卢迈新<sup>1\*</sup>

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业农村部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室, 广东省水产动物免疫技术重点实验室, 广东 广州 510380;  
2. 惠州市渔业研究推广中心, 广东 惠州 516002)

**摘要:** 为了解罗非鱼-鱼腥草共生系统中鱼草不同配比对池塘水质及细菌群落结构的影响, 实验构建了相同池塘覆盖面积不同鱼腥草种植密度 (350、450、600 和 0 g/m<sup>2</sup>) (M1) 和相同种植密度不同池塘覆盖面积占比 (5%、10%、15% 和 0%) (M2) 的两种养殖模式。通过在以上两种模式养殖条件下, 研究各组对罗非鱼养殖池塘水质以及水体和鱼体肠道微生物群落的影响, 探讨了罗非鱼-鱼腥草池塘共生系统中鱼草的相对最佳搭配比例。结果显示, 在 M1 实验模式下, 不同密度组鱼腥草浮床均能显著改善养殖水体氨氮 (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N)、亚硝酸 (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N)、硝酸氮 (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N)、总氮 (TN)、总磷 (TP)、正磷酸盐 (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P) 等水质指标, 且在 3 个月养殖周期内, 初始种植密度为 450 g/m<sup>2</sup> 的鱼腥草浮床组与 350 和 600 g/m<sup>2</sup> 实验组相比, 效果相对更加稳定。16S rRNA V4 区的高通量测序分析显示, M1 模式下各组鱼腥草均能显著优化鱼体肠道和水体的菌群结构, 并增加菌群多样性, 且养殖时间越长, 优化效果越明显。相同月份中, 实验组 450 和 350 g/m<sup>2</sup> 比 600 g/m<sup>2</sup> 优化效果相对更稳定。在不同月份下, 环境变化对罗非鱼肠道及水体细菌多样性的影响大于鱼腥草浮床对养殖水体的影响。在 M2 实验模式中, 各组鱼腥草浮床均能显著净化罗非鱼养殖池塘水质, 其 TN、TP、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 和 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P 等均呈曲线变化。研究表明, 在该养殖周期内, 鱼腥草覆盖面积为 10% 的实验组对养殖水体 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N、TN、TP 以及 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P 等指标的净化效率较实验组 5% 和 15% 稳定。高通量测序分析结果表明, 不同覆盖面积鱼腥草浮床均能增加养殖水体和鱼体肠道的微生物多样性, 相对而言, 10% 覆盖面积组的效果更稳定。此结果为完善罗非鱼-鱼腥草共生养殖模式的鱼草配比提供了数据支撑。

**关键词:** 罗非鱼; 鱼菜共生; 鱼腥草; 16S rRNA; 生物浮床; 微生物群落多样性

**中图分类号:** S 965.125

**文献标志码:** A

集约化水产养殖业所带来的环境问题日益严峻。罗非鱼养殖是集约化养殖的典型代表, 其因耐低氧、生长快、繁殖力强等优点, 在我国南方广泛养殖, 是中国的重要出口品种<sup>[1]</sup>。但其在养殖过程中, 养殖者易盲目增加养殖密度, 过度追

求产量, 从而导致养殖水质恶化。恶化的养殖废水主要含有有机碳、氮、磷等<sup>[2]</sup>。其中有机物呈现为溶解性和颗粒性两种状态, 有机物的大量蓄积会导致养殖水体异养菌和病原菌的大量繁殖, 消耗水体氧气, 增加养殖动物缺氧和患病的机率<sup>[3-4]</sup>。

收稿日期: 2021-05-25 修回日期: 2022-03-07

资助项目: 广东省促进经济发展专项 (粤农 2019B8); 现代农业产业技术体系专项 (CARS-46)

第一作者: 可小丽 (照片), 从事水产养殖与选育种研究, E-mail: xiaolike2012@163.com

通信作者: 卢迈新, 从事水产养殖与选育种研究, E-mail: mx-lu@163.com



颗粒性物质则容易吸附在鱼鳃上,通过损伤鱼鳃等影响鱼类的生长<sup>[5]</sup>。有机氮易转化为氨氮<sup>[6-7]</sup>,超标的氨氮易损害鱼体的鳃组织,并改变其各器官表皮的通透性,从而造成其组织功能损伤,代谢失调,引起鱼体中毒<sup>[8-10]</sup>。亚硝态氮易促使鱼体血液中的亚铁血红蛋白氧化成高铁血红蛋白,其含量过高会使鱼体组织缺氧<sup>[11-12]</sup>,而硝酸盐和磷酸盐含量过多,则会引起水体富营养化。

养殖水体的修复和循环利用是水产可持续发展的重要内容,针对以上养殖水体的污染现状,养殖水体修复技术也得到了快速发展。在循环水产养殖系统中,养殖废水的修复一般可分为原位修复和异位修复。原位修复主要包括固着生物处理<sup>[13-15]</sup>、生物絮凝<sup>[16-18]</sup>和微生态制剂调控<sup>[19-22]</sup>,三种方法可单独使用,也可交替混合使用。异位修复则主要包括生物过滤法(也称生物膜法)、间歇生化反应法(sequence batch reaction, SBR)、人工湿地以及氧化塘法<sup>[23]</sup>。虽然养殖废水的异位修复技术日趋成熟,但其处理效率、稳定性以及如何降低成本等关键问题仍有待解决。对于以池塘为单元的养殖体系来说,原位修复处理技术在易操控性、稳定性及成本节约上则更具优越性。

鱼菜共生属于原位修复,是一种养殖水体固着生物处理技术,通过生物浮床技术可将植物种植于池塘表面,植物生长过程中可吸收、吸附养殖水体中的氮、磷等营养物质<sup>[24]</sup>,既可以实现养殖水体的净化,同时由于浮床植物的生长也额外带来了一定的经济和生态效益。通常认为,植物浮床的种植面积越大,种植密度越高,水体净化效果就会越明显,所带来的经济效益也会越大。但无限制地提高植物浮床的种植比例或种植密度,对池塘养殖并无好处,因为当植物浮床的覆盖率达到池塘的一定比例后,由于“水呼吸”的影响,会导致水体中其他生物与养殖鱼类竞争水体中有限的溶解氧,从而影响鱼类的正常生长。研究表明,鱼菜共生的主要原理是氮素循环<sup>[13, 15, 25]</sup>,浮床植物同化吸收氮素的同时,其浮床基质及根系也为各类脱氮微生物提供了适宜的氧化-还原环境<sup>[26]</sup>。养殖水体中氮素的去除仍然主要依赖微生物降解<sup>[25, 27-30]</sup>,取决于氮素转化相关功能微生物<sup>[31]</sup>,因此要减轻或消除养殖池塘废氮蓄积的危害,建立健康平衡的养殖水体氮循环体系,最终还需依靠微生物作用<sup>[32-33]</sup>。所以鱼菜共生系统中微生物群落结构也是优化该系统的一个重要的参考因素。

基于此,本研究以鱼菜共生系统中水质调节和细菌微生物群落结构优化为对象,构建了两种鱼菜共生模式,即相同池塘覆盖面积不同鱼腥草(*Houttuynia cordata*)种植密度(350、450、600和0 g/m<sup>2</sup>) (M1)和相同种植密度不同池塘覆盖面积占比(5%、10%、15%和0%) (M2)。通过研究以上两种模式条件下鱼菜共生分别对罗非鱼养殖池塘水质及水体和鱼体肠道微生物群落的影响,探讨了罗非鱼-鱼腥草池塘共生系统中鱼草的相对最佳搭配比例,以期优化罗非鱼健康生态养殖模式提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验鱼和鱼腥草

以尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)为对象,正常网箱暂养2周,持续充气,商业颗粒饲料投喂,日投喂量约为体质量的3%,经常规细菌和寄生虫检测正常后,用于实验。鱼腥草幼苗源于惠州市当地的品种。

### 1.2 鱼腥草种植及鱼草共生养殖系统构建

鱼腥草通过生态浮床种植于罗非鱼养殖池塘水面,鱼菜共生系统构建分为两种模式(M1和M2)。M1实验模式,保持相同池塘覆盖面积,探讨鱼腥草不同种植密度的影响:选用12个标准化水泥池塘(长×宽×深=1.6 m×1.6 m×2.0 m),常规清塘后放养同等规格的罗非鱼[体长(9.5±0.5) cm,体质量(16.0±2.4) g],初始放养密度均为60尾/池。鱼腥草浮排规格为长×宽×高=80 cm×80 cm×3 cm,鱼腥草生物量分为3个梯度,分别为0、350、450及600 g/m<sup>2</sup>,鱼腥草覆盖率约为25%,每个处理组均设3个平行,对照组3个平行不种植鱼腥草,实验时间为4—6月。

M2实验模式,保持单位面积鱼腥草种植密度相同,探讨不同种植覆盖面积占比的影响:选用12个标准化池塘(长×宽×深=10.0 m×5.0 m×2.5 m),放养同等规格的罗非鱼[体长(19.3±1.9) cm,体质量(253.0±47.0) g],初始放养密度均为120尾。鱼腥草浮床覆盖面积分别占池塘的5%、10%、15%和0%(对照组,不种鱼腥草),鱼腥草种植密度约为450 g/m<sup>2</sup>,每组设置3个平行,实验时间为7—9月。

所有实验组和对照组日常管理程序一致,每天投料2次,日投饵量约为体质量的3%。

### 1.3 养殖池塘水样采集及其理化指标测定

养殖池塘水样的采集和理化指标的测定方法参考《水和废水检测分析方法》(第四版)进行<sup>[34]</sup>。氨氮( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ )测定依照纳氏试剂光度法。亚硝氮( $\text{NO}_2^-\text{-N}$ )测定依据 N-(1-萘基)-乙二胺光度法。硝酸氮( $\text{NO}_3^-\text{-N}$ )测定使用紫外分光光度法。化学需氧量(COD)测定使用酸性高锰酸钾法。使用氯化亚锡还原分光光度法测定总磷(TP)。使用钼锑抗分光光度法测定正磷酸盐( $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ )等。各指标测定均设立3个平行, M1和M2实验模式水质均为2周测1次。

### 1.4 鱼体肠道、水样采集及总DNA提取

**鱼体肠道采集** 每个池塘随机取3尾健康罗非鱼,共36尾,无菌操作取出完整肠道,用70%乙醇漂洗3次,做好标记, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。M1实验模式,4—6月每个月采集1次,共3次。M2实验模式,7—8月每个月采集1次,共2次。

**DNA水样采集** 利用有机玻璃采水器(型号2.5 L)分别在池塘中心和四角采集水深20~30 cm处水样,各水样混合均匀后,利用真空抽滤泵,抽滤至微孔滤膜(0.45  $\mu\text{m}$ ),置于15 mL灭菌离心管中, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。DNA水样采集, M1实验模式,4—6月每个月采集1次,共3次。M2实验模式,7—8月每个月采集1次,共2次。

依据试剂盒 Stool DNA Kit 和 water DNA Kit (Omega, 美国),按操作说明提取鱼体肠道和养殖水体的总DNA。每个样品重复3次,以100  $\mu\text{L}$  TE缓冲液洗脱DNA, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。以Nano-Drop所测260与280 nm吸光度比值(260/280)评估所提DNA纯度,并检测DNA含量,以达到高通量测序要求。M1实验模式,4—6月每月采集1次,共3次。4月第1次采样的肠道样品,分别标为CD.1(对照组)、CS350.1、CS450.1、CS600.1;5月第2次采集的肠道样品标为CD.2、CS450.2、CS350.2、CS600.2;6月第3次采集的肠道样品标为CD.3、CS450.3、CS350.3、CS600.3。水体采集4—6月样品标号依次类推,标为SS.1、SS350.1、SS450.1以及SS600.1;SD.2、SS350.2、SS450.2、SS600.2;SD.3、SS350.3、SS450.3、SS600.3。

### 1.5 16S rDNA V4 区序列扩增和高通量测序

首先将各样品DNA浓度稀释至2 ng/ $\mu\text{L}$ 作为模板,利用细菌16S rDNA V4区通用引物515F(5'-GTGYCAGCMGCCGCGTAA-3')和806R(5'-

GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')扩增各样品。各阳性样品PCR产物以等摩尔量混合后,进行回收。通过Illumina公司TruSeq DNA PCR-Free Sample Prep Kit构建文库,使用Illumina公司HiSeq Rapid SBS Kit v2(FC-402-4023 500 Cycle)试剂盒测序。

### 1.6 生物信息学分析及数据分析

对测序获得的原始数据进行有效拼接后,利用拼接好的有效数据进行OTUs聚类分析,同时将OTU和物种注释结合,得到每个样品的OTUs及分类谱系。再根据OTUs进行丰富度以及多样性指数分析:首先在97%的相似性水平上,利用UPARSE算法进行OTU的聚类;使用Silva等数据库进行物种分类信息分析;使用PyNAST算法对代表性序列进行比对,并通过FastTree构建进化树;最后在群落组成(compositional)水平和系统发育(phylogenetic)水平上使用QIIME、Mothur和R等软件对各样本进行多样性(Chao1、Shannon、Simpson和ACE指数)分析<sup>[35-39]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 M1模式下不同生物量鱼腥草对罗非鱼养殖池塘水质的影响

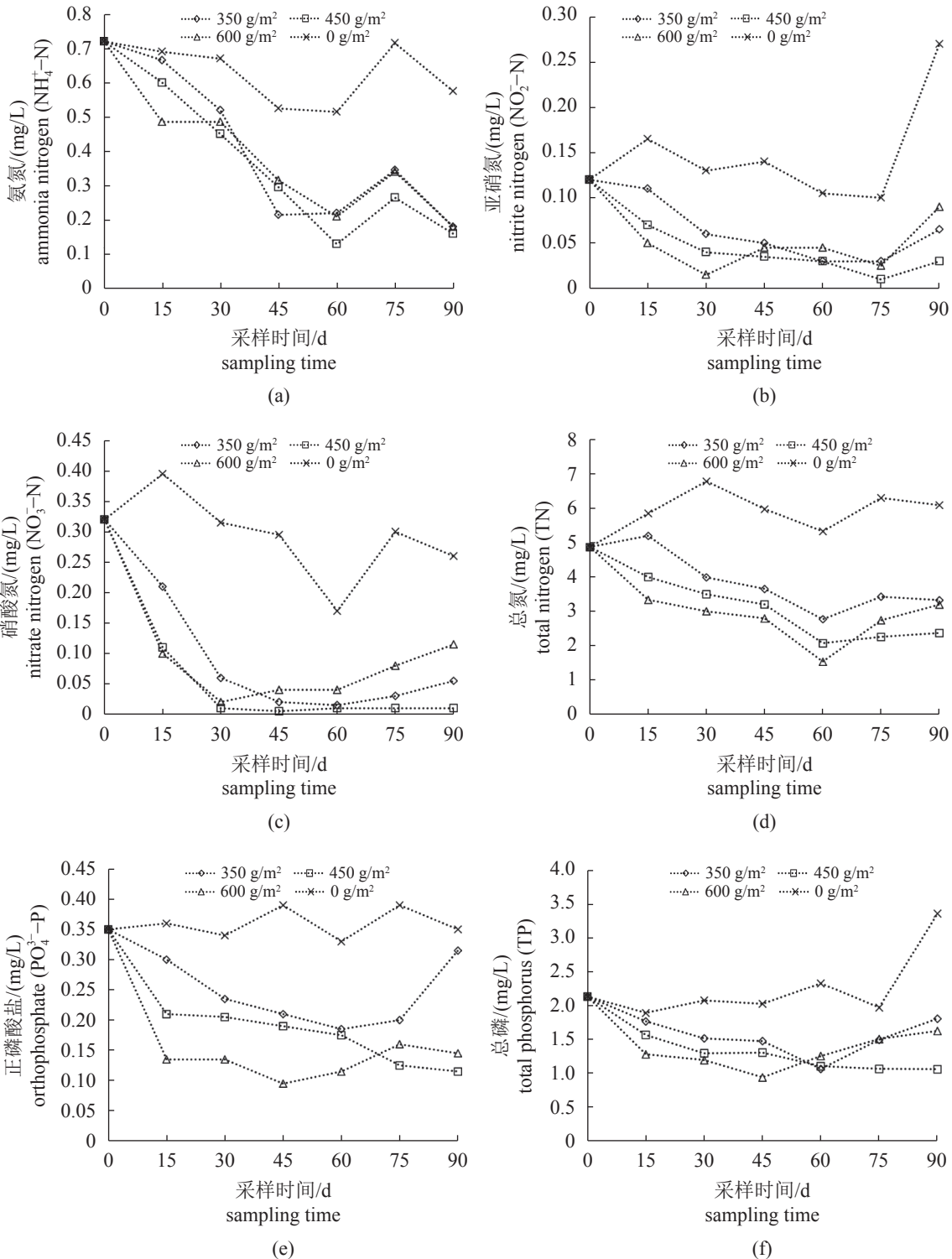
生物浮床覆盖面积相同的情况下,不同种植密度的鱼腥草浮床均能有效降低罗非鱼养殖池塘 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 、TN、TP、 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 和COD,各实验组水质指标虽呈曲线变化,但均明显低于对照组,且养殖时间越长,效果越明显(图1)。各组之间比较发现,15天之前, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、TN、TP和COD等指标水平表现为对照组 $>350\text{ g/m}^3 > 450\text{ g/m}^3 > 600\text{ g/m}^3$ ,这种状态在部分指标,如 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 中可持续30 d,在TP中持续45 d,在TN以及 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 中持续60 d。60 d之后,实验组 $450\text{ g/m}^2$ 中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度则依次低于实验组 $350$ 、 $600\text{ g/m}^2$ 以及对照组。75 d之后,实验组 $450\text{ g/m}^2$ 中 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、TN、TP、 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 以及COD均持续低于实验组 $350$ 、 $600\text{ g/m}^2$ 以及对照组。

其次,各实验组溶解氧含量与对照组呈反曲线趋势变化,第0~15天,各组溶解氧均呈下降趋势,第15~45天,各组溶解氧含量对比发现, $350\text{ g/m}^2 > 450\text{ g/m}^2 > 600\text{ g/m}^2 >$ 对照组。第45天后,对照组溶解氧含量逐渐升高,实验各组溶解氧仍呈下降趋势。第60天后,各组溶解氧含量变化为对照组 $>450\text{ g/m}^2 > 600\text{ g/m}^2 > 350\text{ g/m}^2$ 。第75天后,各

实验组溶解氧含量呈上升趋势, 对照组则呈逐渐下降趋势, 至第 90 天, 各组溶解氧含量为  $350 \text{ g/m}^2 > 450 \text{ g/m}^2 > 600 \text{ g/m}^2 >$  对照组。鱼腥草浮床虽能改变罗非鱼养殖池塘的溶解氧含量, 但不稳定, 且改善罗非鱼养殖池塘溶解氧含量的效果并不明显。

### 2.2 M1 模式下不同生物量鱼腥草对罗非鱼肠道及养殖水体细菌多样性及群落结构的影响

M1 模式下, 养殖水体 Alpha 多样性分析见表 1, 4 月实验组 SS450.1 中 Chao1、ACE 以及 Shannon 指数均为最高, Simpson 指数最低。5 月,



(图 1 Fig. 1)

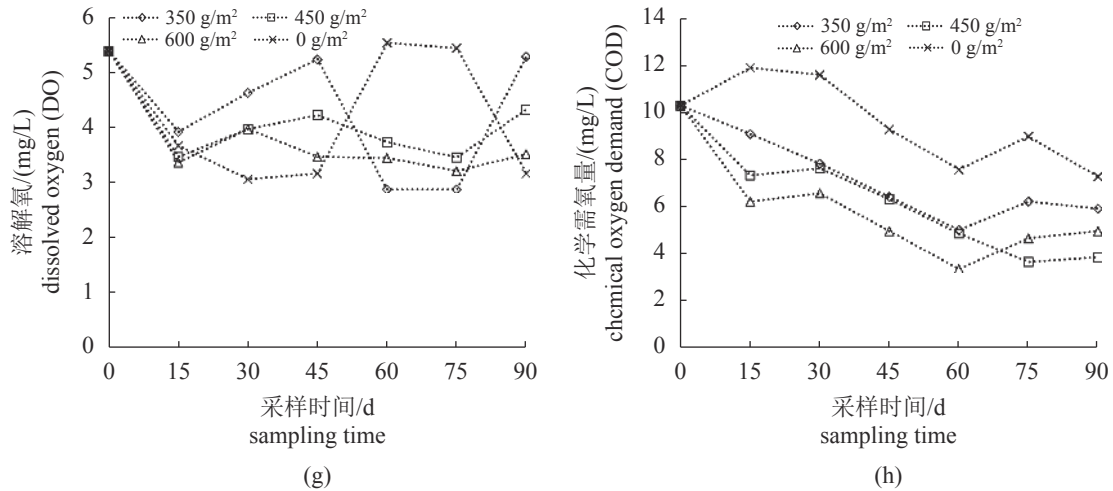


图 1 M1 模式下不同鱼腥草密度组 (350 g/m<sup>2</sup>、450 g/m<sup>2</sup>、600 g/m<sup>2</sup> 和 0 g/m<sup>2</sup>) 的池塘水质

Fig. 1 Water quality trend based on different densities (350 g/m<sup>2</sup>, 450 g/m<sup>2</sup>, 600 g/m<sup>2</sup> and 0 g/m<sup>2</sup>) at different sampling days in M1 culture model

(a) NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N, (b) NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N, (c) NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N, (d) TN, (e) PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P, (f) TP, (g) DO, (h) COD, the same as Fig. 3

实验组 SS350.2 和 SS450.2 中反映物种丰富度的 Chao1 和 ACE 指数, 以及多样性指数 Shannon 指数最高, 且两组中 Simpson 指数最低。6 月与 5 月具有相同的结果, 即实验组 SS350.3 和 SS450.3 中反映物种丰富度的 Chao1 和 ACE 指数, 以及多样性指数 Shannon 指数最高, 且两组中 Simpson 指数最低。4 月 450 g/m<sup>2</sup> (SS450.1) 组养殖水体物种丰富度和均匀度均优于 350 g/m<sup>2</sup> (SS350.1)、600 g/m<sup>2</sup> (SS600.1) 以及对照组 0 g/m<sup>2</sup> (SD.1)。5—6 月水体样品物种丰度相对于 4 月明显提高, 且实验

组 450 g/m<sup>2</sup> (SS450.2、SS450.3) 和 350 g/m<sup>2</sup> (SS350.2、SS350.3) 的多样性要优于 600 g/m<sup>2</sup> (SS600.2、SS600.3) 和 0 g/m<sup>2</sup> (SD.2、SD.3), 而实验组 450 g/m<sup>2</sup> (SS450.2、SS450.3) 和 350 g/m<sup>2</sup> (SS350.2、SS350.3) 差异不显著 ( $P>0.05$ )。

罗非鱼肠道的 Alpha 多样性分析结果显示, 4 月对照组 CD.1 中 Chao1、ACE 以及 Shannon 指数均为最高, Simpson 多样性指数最低, 丰富度和多样性趋势: 对照组 (CD.1) > 450 g/m<sup>2</sup> (CS450.1) > 350 g/m<sup>2</sup> (CS350.1) > 600 g/m<sup>2</sup> (CS600.1)。5 月, 实

表 1 M1 模式下养殖水体的微生物群落 Alpha 多样性分析

Tab. 1 Alpha diversity analysis of microbial communities from the pond water in M1 culture model

月份 month	处理组 groups	样品编码 sample ID	α多样性 Alpha diversity			
			Chao1	ACE	Shannon	Simpson
4月 April	0 g/m <sup>2</sup>	SD.1	4 234.968 421 <sup>b</sup>	6 293.246 226 <sup>b</sup>	4.132 948 <sup>b</sup>	0.042 827 <sup>c</sup>
	350 g/m <sup>2</sup>	SS350.1	2 950.025 000 <sup>b</sup>	4 030.817 790 <sup>b</sup>	3.156 037 <sup>b</sup>	0.111 191 <sup>a</sup>
	450 g/m <sup>2</sup>	SS450.1	7 722.002 331 <sup>a</sup>	11 232.269 940 <sup>a</sup>	4.951 382 <sup>a</sup>	0.025 413 <sup>b</sup>
	600 g/m <sup>2</sup>	SS600.1	2 455.263 393 <sup>b</sup>	3 410.518 572 <sup>b</sup>	3.113 625 <sup>b</sup>	0.105 827 <sup>a</sup>
5月 May	0 g/m <sup>2</sup>	SD.2	69 827.611 200 <sup>c</sup>	143 741.087 900 <sup>c</sup>	7.535 805 <sup>b</sup>	0.007 813 <sup>a</sup>
	350 g/m <sup>2</sup>	SS350.2	100 625.649 600 <sup>a</sup>	206 953.621 500 <sup>a</sup>	8.140 034 <sup>a</sup>	0.003 548 <sup>c</sup>
	450 g/m <sup>2</sup>	SS450.2	92 100.737 120 <sup>a</sup>	190 282.653 500 <sup>a</sup>	8.033 208 <sup>a</sup>	0.003 271 <sup>c</sup>
	600 g/m <sup>2</sup>	SS600.2	78 280.112 480 <sup>b</sup>	166 707.320 400 <sup>b</sup>	7.799 991 <sup>b</sup>	0.004 631 <sup>b</sup>
6月 June	0 g/m <sup>2</sup>	SD.3	17 494.464 980 <sup>c</sup>	33 024.415 750 <sup>c</sup>	6.554 623 <sup>b</sup>	0.007 127 <sup>b</sup>
	350 g/m <sup>2</sup>	SS350.3	65 771.161 640 <sup>a</sup>	134 577.402 200 <sup>a</sup>	7.438 774 <sup>a</sup>	0.004 092 <sup>c</sup>
	450 g/m <sup>2</sup>	SS450.3	63 964.124 930 <sup>a</sup>	127 475.028 100 <sup>a</sup>	7.394 275 <sup>a</sup>	0.006 413 <sup>c</sup>
	600 g/m <sup>2</sup>	SS600.3	46 352.694 400 <sup>b</sup>	103 556.088 800 <sup>b</sup>	7.287 827 <sup>a</sup>	0.008 184 <sup>a</sup>

注: 相同月份不同处理组的水体样品中不同字母上标表示差异显著 ( $P<0.05$ ), 下同  
Notes: in each month, the water samples sharing the different superscripts represent significant difference ( $P<0.05$ ), the same below

验组 CS450.2 和 CS350.2 中 Chao1、ACE 以及 Shannon 指数最高, 且这两组中 Simpson 多样性指数最低, 两组间差异不显著 ( $P>0.05$ )。6 月, 实验组 350 g/m<sup>2</sup> (CS350.3) Chao1、ACE 以及 Shannon 指数最高, Simpson 指数最低, 其次是 450

g/m<sup>2</sup> (CS450.3) 处理组, 且 350 g/m<sup>2</sup> (CS350.3) 和 450 g/m<sup>2</sup> (CS450.3) 中 Simpson 指数无显著差异 ( $P>0.05$ ) (表 2)。同月份中 600 g/m<sup>2</sup> (CS600.3) 组, 丰富度指数 Chao1 和 ACE 均高于对照组, 反映多样性的 Simpson 指数也相对高于对照组 (CD.3)。

表 2 M1 模式下罗非鱼肠道内容物的微生物群落 Alpha 多样性分析

Tab. 2 Alpha diversity analysis of microbial communities from the tilapia intestinal contents in M1 culture model

月份 month	处理组 groups	样品编码 sample ID	α多样性 Alpha diversity			
			Chao1	ACE	Shannon	Simpson
4月 April	0 g/m <sup>2</sup>	CD.1	114 228.256 700 <sup>a</sup>	253 375.908 500 <sup>a</sup>	8.228 362 <sup>a</sup>	0.006 111 <sup>c</sup>
	350 g/m <sup>2</sup>	CS350.1	4 410.130 435 <sup>e</sup>	6 972.270 278 <sup>c</sup>	3.365 483 <sup>c</sup>	0.082 774 <sup>a</sup>
	450 g/m <sup>2</sup>	CS450.1	6 321.329 049 <sup>b</sup>	9 251.907 636 <sup>b</sup>	4.489 214 <sup>b</sup>	0.030 538 <sup>b</sup>
	600 g/m <sup>2</sup>	CS600.1	4 139.659 389 <sup>e</sup>	6 312.750 687 <sup>e</sup>	3.149 598 <sup>c</sup>	0.186 464 <sup>a</sup>
5月 May	0 g/m <sup>2</sup>	CD.2	3 814.595 395 <sup>e</sup>	5 535.228 217 <sup>e</sup>	3.700 472 <sup>c</sup>	0.082 896 <sup>b</sup>
	350 g/m <sup>2</sup>	CS350.2	70 657.260 660 <sup>a</sup>	137 059.012 400 <sup>a</sup>	6.001 413 <sup>a</sup>	0.074 224 <sup>c</sup>
	450 g/m <sup>2</sup>	CS450.2	71 423.719 020 <sup>a</sup>	155 353.944 500 <sup>a</sup>	6.961 554 <sup>a</sup>	0.027 793 <sup>c</sup>
	600 g/m <sup>2</sup>	CS600.2	31 316.031 050 <sup>b</sup>	66 386.446 710 <sup>b</sup>	4.010 910 <sup>b</sup>	0.187 892 <sup>a</sup>
6月 June	0 g/m <sup>2</sup>	CD.3	28 942.661 680 <sup>e</sup>	53 815.817 230 <sup>e</sup>	6.391 716 <sup>b</sup>	0.027 223 <sup>b</sup>
	350 g/m <sup>2</sup>	CS350.3	60 026.645 620 <sup>a</sup>	125 738.513 900 <sup>a</sup>	6.482 313 <sup>a</sup>	0.020 874 <sup>c</sup>
	450 g/m <sup>2</sup>	CS450.3	47 389.281 760 <sup>b</sup>	88 954.705 490 <sup>b</sup>	6.372 726 <sup>b</sup>	0.021 040 <sup>c</sup>
	600 g/m <sup>2</sup>	CS600.3	43 231.947 690 <sup>b</sup>	84 583.554 770 <sup>b</sup>	6.031 838 <sup>b</sup>	0.039 001 <sup>a</sup>

通过聚类分析及物种分布堆叠图分析发现, 水体样品中 4 月第 1 次采集的样品 SS600.1、SS350.1 和 SD.1 聚为一支, 菌群结构相似, 优势菌群为梭状芽孢杆菌 (Clostridiales) (图 2)。5 月采集的样品 SS350.2、SS450.2、SS600.2 和 SD.2 聚为一支, 各组菌群结构类似, 目分类水平上的优势菌群依次为伯克霍尔德氏菌目 (Burkholderiales)、酸微菌目 (Acidimicrobiales)、放线菌目 (Actinomycetales)、拟杆菌目 (Bacteroidales)、聚球菌目 (Synechococcales)、嗜甲基菌目 (Methylophilales)。6 月采集的样品 SS350.3、SS450.3、SS600.3 和 SD.3 聚为一支, 优势菌群为伯克霍尔德氏菌目、聚球藻菌目 (Synechococcales)、立克次体目 (Rickettsiales)、酸微菌目、放线菌目、拟杆菌目、黄杆菌目 (Flavobacteriales)、鞘酯杆菌目 (Sphingobacteriales)。此后 5 月和 6 月采集的样品聚为一大支, SS450.1 单独聚为一支。

肠道内容物样品中 4 月采集的 CS350.1、CS450.1 和 CS600.1 聚为一支, 菌群结构相对较接近, 主要优势菌群为梭状芽孢杆菌 (Clostridiales)。5 月采集的 CS600.2、CS450.2 和 CS350.2 聚为一支, 优势菌目为梭杆菌目 (Fusobacteriales)、伯克

霍尔德氏菌目、拟杆菌目以及放线菌目。6 月采集的样品 (CS600.3、CS450.3、CD.3) 仍然聚为一支, 优势菌目为梭杆菌目 (Fusobacteriales)、梭状芽孢杆菌目、乳酸杆菌目 (Lactobacillales)、拟杆菌目和放线菌目。对照组 CD.1 和实验组 CS350.3 分别聚为一小支。对照组 CD.2 单独聚为一支。

### 2.3 M2 模式下不同鱼腥草浮床覆盖面积对罗非鱼养殖池塘水质的影响

M2 模式下, 各鱼腥草处理组均能有效降低罗非鱼养殖池塘的 TP、PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N、TN 和 COD (图 3)。各组水质指标虽呈曲线变化, 但均明显低于对照组, 且养殖时间越长, 效果越明显。各实验组之间比较发现, 30 d 之前, 除 DO 之外, 其他主要水质指标 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、TN、TP 和 COD 等监测水平在不同实验组中表现为对照组 >5% >10% >15%。30~45 d, 不同组之间的 COD、PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P 以及 TP 仍然维持同样的水平。45 d 后, 各组水质呈波动变化, 60 d 后, 覆盖率为 10% 的实验组 COD、PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P、TP、TN、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 的监测水平则明显低于 5%、15% 实验组以及对照组。

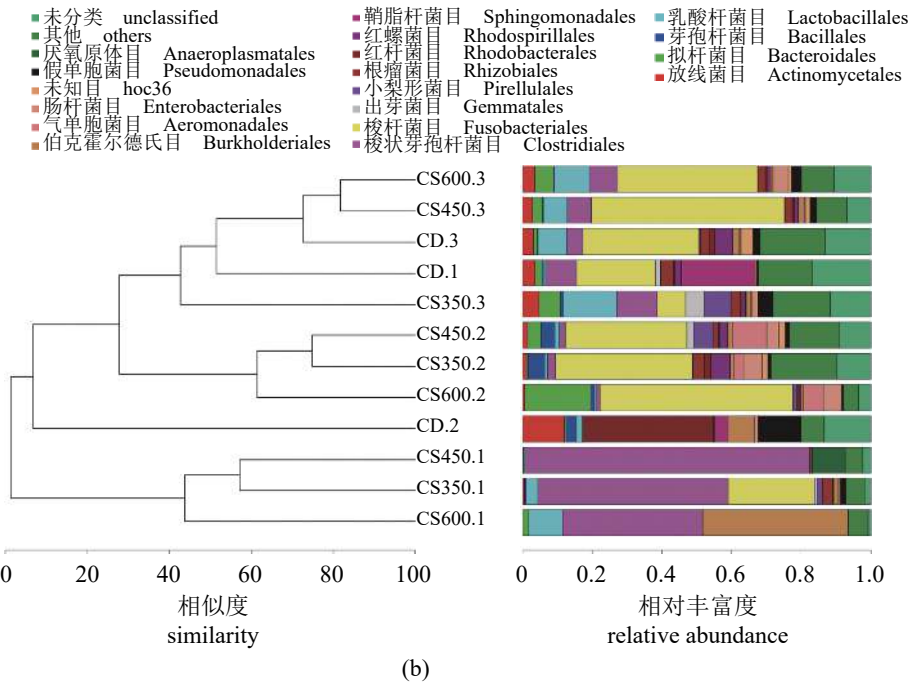
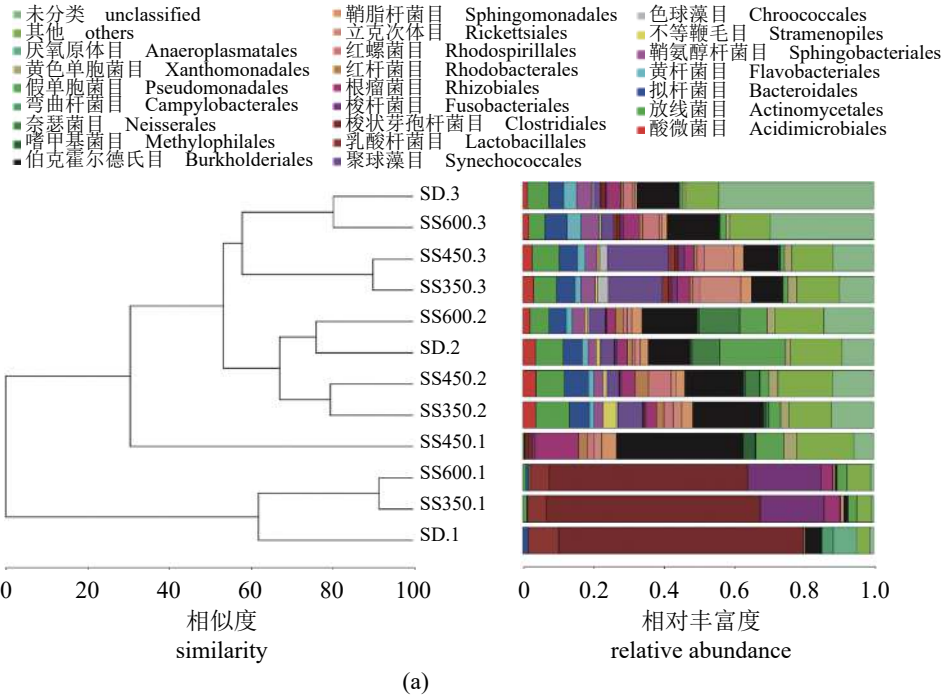


图 2 M1 模式下不同处理组 (350 g/m<sup>2</sup>、450 g/m<sup>2</sup>、600 g/m<sup>2</sup> 和 0 g/m<sup>2</sup>) 不同月份养殖水体 (a) 和鱼体肠道内容物 (b) 最佳分类水平 Bray 距离聚类分析及物种组成堆叠图

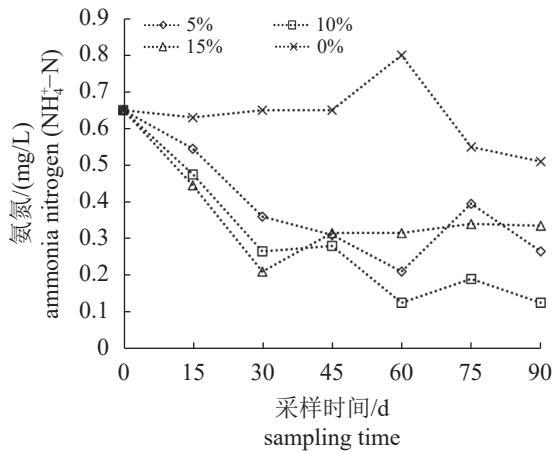
4 月水体样品为 SD.1、SS350.1、SS450.1 以及 SS600.1; 5 月水体样品为 SD.2、SS350.2、SS450.2、SS600.2; 6 月水体样品为 SD.3、SS350.3、SS450.3、SS600.3。4 月肠道样品为 CD.1、CS350.1、CS450.1、CS600.1; 5 月肠道样品为 CD.2、CS450.2、CS350.2、CS600.2; 6 月肠道样品为 CD.3、CS450.3、CS350.3、CS600.3

Fig. 2 Stacked species composition and Bray distance cluster analysis of bacteria microorganism from pool water (a) and fish guts (b) of different treatments (350 g/m<sup>2</sup>, 450 g/m<sup>2</sup>, 600 g/m<sup>2</sup> and 0 g/m<sup>2</sup>) at different months in M1 culture model

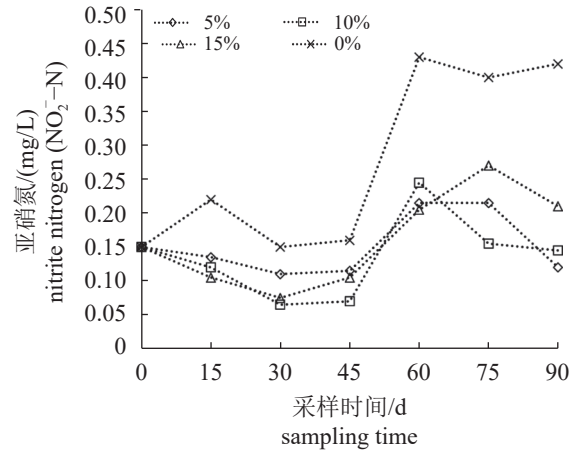
SD.1, SS350.1, SS450.1 and SS600.1 are water samples taken in April; SD.2, SS350.2, SS450.2 and SS600.2 are water samples taken in May; SD.3, SS350.3, SS450.3 and SS600.3 are water samples taken in June. CD.1, CS350.1, CS450.1 and CS600.1 are fish gut samples taken in April; CD.2, CS450.2, CS350.2 and CS600.2 are fish gut samples taken in May; CD.3, CS450.3, CS350.3 and CS600.3 are fish gut samples taken in June

各实验组溶解氧含量与对照组呈反曲线趋势变化, 第 0~15 天, 各组溶解氧均呈下降趋势, 第 15~45 天, 各组溶解氧含量对比发现, 对照组 >10% 实验组 >15% 实验组 >5% 实验组。第 45 天, 对照组溶解氧含量逐渐降低, 实验各组仍呈上升

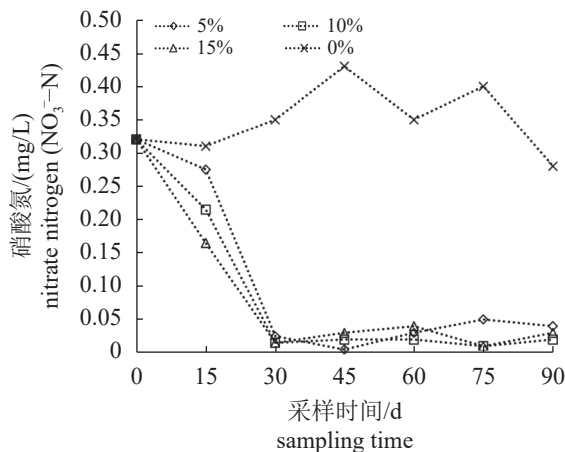
趋势。第 60 天, 各组溶解氧含量变化为 5% 实验组 >10% 实验组 >15% 实验组 >对照组。第 75 天, 各组溶解氧含量则呈现为对照组 >10% 实验组 >15% 实验组 >5% 实验组。第 90 天, 各组溶解氧含量为 5% 实验组 >10% 实验组 >15% 实验组 >对照组。



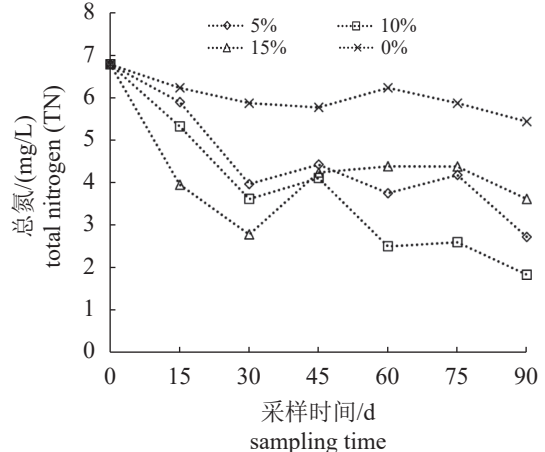
(a)



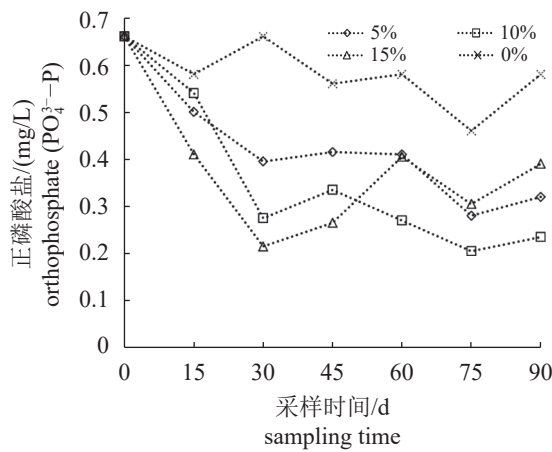
(b)



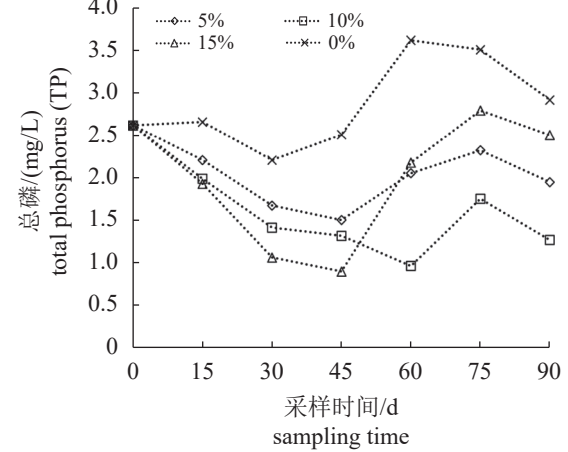
(c)



(d)



(e)



(f)

(图 3 Fig. 3)



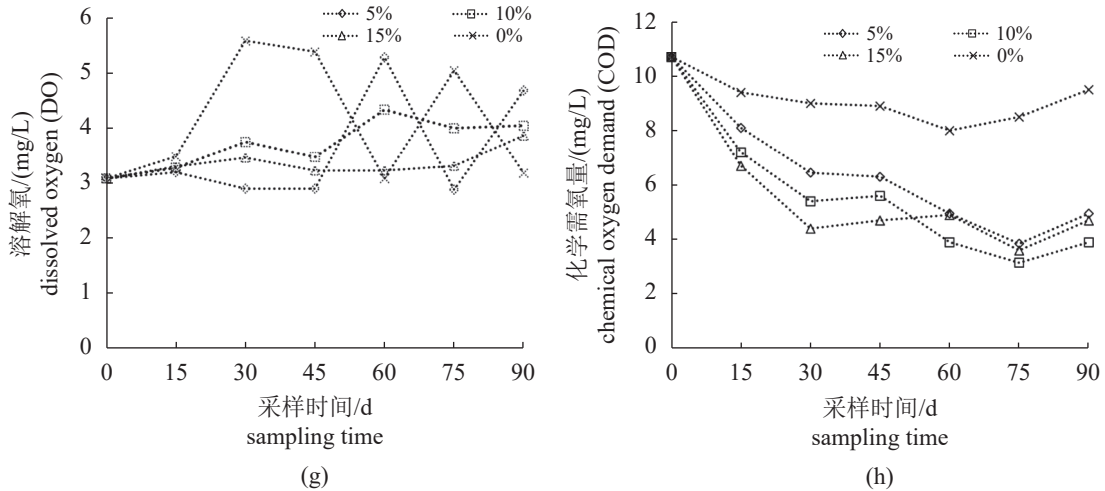


图3 M2模式下不同鱼腥草覆盖比例(5%、10%、15%和0%)的池塘水质

Fig. 3 Water quality trend based on different treatments (5%, 10%, 15% and 0%) at different sampling days in M2 culture model

2.4 M2模式下不同鱼腥草浮床覆盖面积对罗非鱼肠道及其养殖水体细菌群落结构的影响

M2模式下,不同鱼腥草浮床覆盖面积对罗非鱼肠道及其养殖水体细菌群落结构的影响见表3和图4。第18天,不同实验组水体样品Alpha多样性指数Chao1、ACE以及Shannon指数表现为15%组>对照组>5%组>10%组,Simpson指数则呈现相反的趋势,其中5%和10%组之间无显著差异( $P>0.05$ ),15%组和对照组之间差异也不显著( $P>0.05$ )。此时,不同处理组罗非鱼肠道Alpha多样性Chao1和ACE指数表现为对照组>15%组>10%组>5%组,Shannon指数则表现为15%组>对照组>5%组>10%组,其中对照组和15%处理

组之间无显著差异( $P>0.05$ ),10%和5%处理组之间无显著差异( $P>0.05$ )。肠道各组Simpson指数之间均无显著差异( $P>0.05$ )。

对多样性指数Chao1、ACE、Shannon以及Simpson等数据分析发现,第45天各指数指示的相对丰富度具有相同趋势,在养殖水体样品中,10%实验组相对丰富度最高,与15%实验组之间差异不显著( $P>0.05$ )。5%实验组和对照组菌群丰富度显著低于10%和15%实验组( $P<0.05$ )。Simpson和Shannon指数分析显示,群体丰富度和均匀度趋势与指数指示结果一致。尽管不同处理组中优势细菌群体及其相对生物量有差别,但是各处理组(5%、10%、15%)丰富度和多样性均显著优于对照组(0%)( $P<0.05$ )。10%处理组物种丰富度和

表3 M2模式下第18天池塘水体和罗非鱼肠道内容物的微生物群落Alpha多样性分析

Tab. 3 Alpha diversity analysis of microbial communities from pond water and tilapia intestinal contents in M2 culture model on 18<sup>th</sup> day

样品编码 sample ID	α多样性 Alpha diversity			
	Chao1	ACE	Shannon	Simpson
5%水样 5% water sample	516.448 108 <sup>b</sup>	521.440 565 <sup>b</sup>	1.493 945 <sup>b</sup>	0.533 945 <sup>a</sup>
10%水样 10% water sample	413.188 631 <sup>b</sup>	486.251 983 <sup>b</sup>	1.633 222 <sup>b</sup>	0.476 528 <sup>a</sup>
15%水样 15% water sample	945.472 830 <sup>a</sup>	1 028.148 148 <sup>a</sup>	4.306 267 <sup>a</sup>	0.055 246 <sup>b</sup>
对照水样 control water sample	773.301 162 <sup>a</sup>	834.019 552 <sup>a</sup>	4.337 609 <sup>a</sup>	0.045 735 <sup>b</sup>
5%肠道 5% gut sample	951.604 287 <sup>b</sup>	997.802 959 <sup>b</sup>	4.907 026 <sup>b</sup>	0.032 412 <sup>a</sup>
10%肠道 10% gut sample	1 158.052 531 <sup>a</sup>	1 211.060 834 <sup>a</sup>	4.894 347 <sup>b</sup>	0.022 382 <sup>a</sup>
15%肠道 15% gut sample	1 273.210 849 <sup>a</sup>	1 342.480 266 <sup>a</sup>	5.296 933 <sup>a</sup>	0.016 386 <sup>a</sup>
对照肠道 control gut sample	1 349.632 176 <sup>a</sup>	1 420.589 759 <sup>a</sup>	5.070 079 <sup>a</sup>	0.025 850 <sup>a</sup>

注:不同水体或肠道处理组数据右上标不同字母表示差异显著( $P<0.05$ ),下同  
Notes: in the water or gut samples, datas in each column sharing the different superscripts mean significant difference ( $P<0.05$ ), the same below

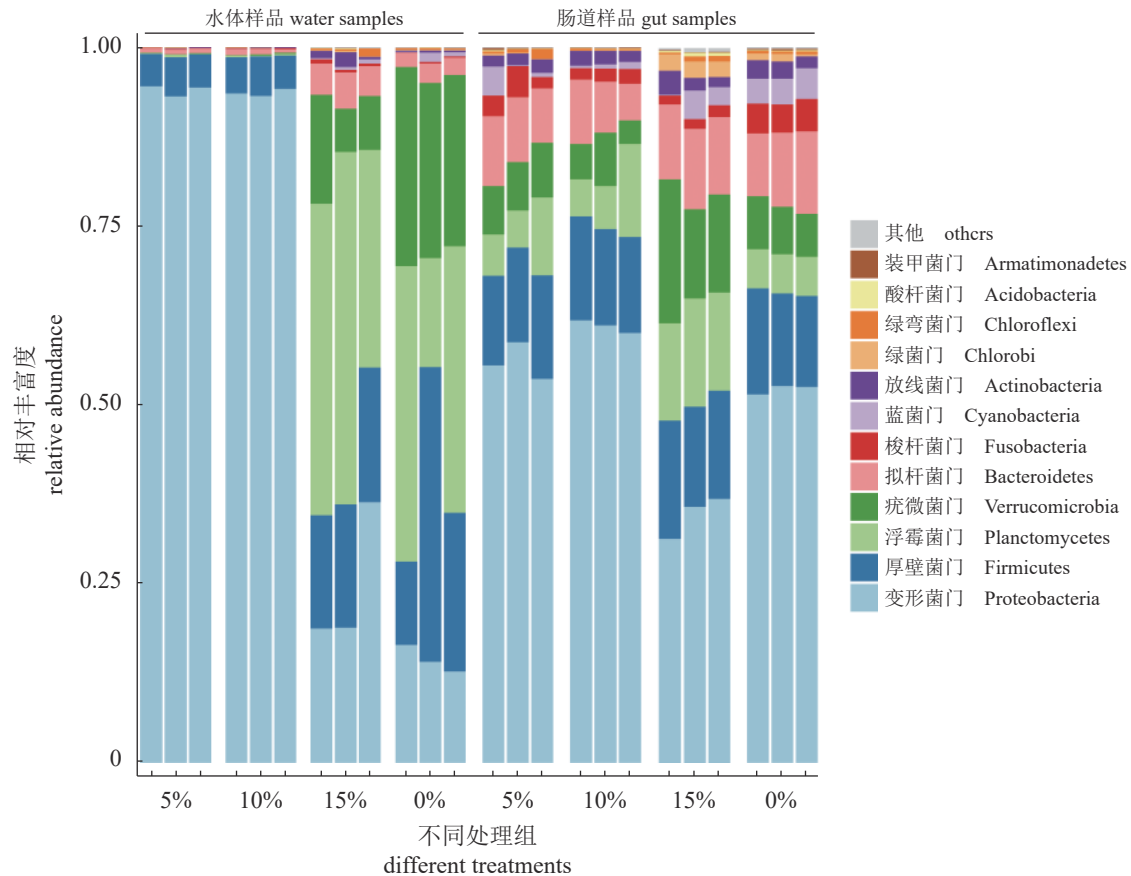


图 4 M2 模式下第 18 天不同处理组 (5%、10%、15% 和 0%) 水体及肠道样品的优势细菌门和丰富度分析

Fig. 4 Dominant bacterial phyla and abundance analysis of water and gut content samples in different treatments (5%, 10%, 15% and 0%) in M2 model on 18<sup>th</sup> day

多样性均相对最高。对于肠道内容物样品, 各组样品物种丰富度和多样性优劣趋势与水体样品相同, 即处理组 (5%、10%、15%) 丰富度和多样性均显著优于对照组 (0%) ( $P < 0.05$ ), 且 10% 组物种丰富度和多样性相对最优 (表 4, 图 5)。

### 3 讨论

鱼菜复合养殖, 俗称鱼菜共生, 是一种复合耕作体系, 它整合了水产养殖与水生植物两种不同的农耕模式, 通过巧妙的生态设计, 实现了动植物和微生物之间的和谐共存。目前国内外鱼菜共生系统的循环工艺主要可分为 3 种: 第一种是直接共生, 利用浮排、浮床等, 直接在养殖池塘表面栽培水生植物, 实现鱼、虾和植物共生, 如本研究中的鱼腥草与罗非鱼共生。第二种是桑基鱼塘模式, 也称开环共生, 即养殖池塘的废水可直接用来灌溉种植蔬菜, 养殖池塘和植物种植床之间不形成闭路循环, 不进行回流, 只需定期对养殖池塘补充新水即可。第三种是闭环共生模式,

养殖系统排放的废水经微生物硝化处理后, 进入植物栽培系统, 经过植物根系的吸收和过滤后的水再回流至养殖系统。水在养殖池、过滤床和植物栽培系统之间形成闭路循环。这种形式可用于大规模生产, 节约水资源, 目前在国外应用较多, 国内近年来也逐年发展起来, 但是目前这种闭环共生系统的工艺维护和管理费用相对较高, 风险较大<sup>[40-41]</sup>。我国目前水产养殖主要以池塘养殖为主, 因此第一种直接共生方式, 在可操作性、节约土地、水资源成本以及控制风险等方面具有较好的优越性。直接共生模式最典型的应用之一便是结合生物浮床技术的鱼菜复合养殖模式。

鱼菜共生模式在养殖鱼类和蔬菜种类上有一定的选择性, 其中鲈形目 (Perciformes) 特别是罗非鱼是国内外使用最多的鱼种<sup>[42]</sup>, 可选的蔬菜种类相对较多, 如番茄 (*Lycopersicon esculentum*)、莴苣 (*Lactuca sativa*) 和空心菜 (*Ipomoea aquatica*) 等<sup>[43]</sup>。鱼腥草是一种药食两用植物, 隶属于三白草科 (Saururaceae), 广泛分布于热带及亚热带地

表 4 M2 模式下第 45 天池塘水体和罗非鱼肠道内容物的微生物群落 Alpha 多样性分析

Tab. 4 Alpha diversity analysis of microbial communities from pond water and tilapia intestinal contents in M2 culture model on 45<sup>th</sup> day

样品编码 sample ID		α多样性 Alpha diversity			
		Chao1	ACE	Shannon	Simpson
5%水样	5% water sample	706.404 304 <sup>a</sup>	720.268 700 <sup>b</sup>	3.006 445 <sup>b</sup>	0.123 591 <sup>b</sup>
10%水样	10% water sample	760.580 674 <sup>a</sup>	793.416 700 <sup>a</sup>	3.279 118 <sup>a</sup>	0.098 051 <sup>a</sup>
15%水样	15% water sample	692.098 858 <sup>a</sup>	749.729 200 <sup>ab</sup>	3.292 509 <sup>ac</sup>	0.103 832 <sup>ac</sup>
对照水样	control water sample	615.543 998 <sup>b</sup>	681.021 600 <sup>c</sup>	2.871 935 <sup>d</sup>	0.188 559 <sup>d</sup>
5%肠道	5% gut sample	937.028 800 <sup>b</sup>	968.268 900 <sup>b</sup>	4.295 879 <sup>b</sup>	0.052 335 <sup>b</sup>
10%肠道	10% gut sample	1 165.416 000 <sup>a</sup>	1 203.943 000 <sup>a</sup>	4.825 217 <sup>a</sup>	0.026 768 <sup>a</sup>
15%肠道	15% gut sample	1 149.538 000 <sup>a</sup>	1 198.279 000 <sup>a</sup>	4.020 471 <sup>c</sup>	0.078 808 <sup>c</sup>
对照肠道	control gut sample	972.680 100 <sup>b</sup>	1 002.716 000 <sup>b</sup>	4.028 445 <sup>c</sup>	0.082 468 <sup>c</sup>

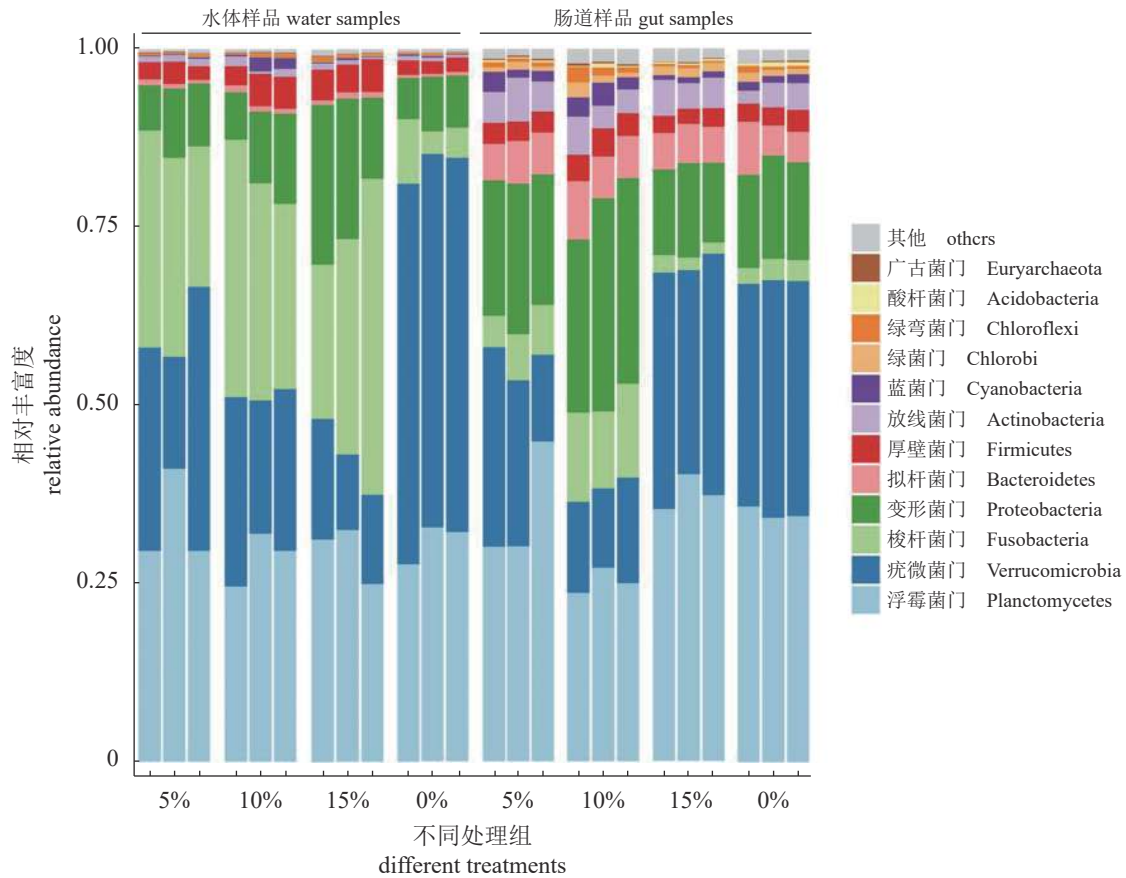


图 5 M2 模式下第 45 天不同处理组 (5%、10%、15% 和 0%) 水体和肠道样品的优势细菌门及丰富度分析

Fig. 5 Dominant bacterial phyla and abundance analysis of water and gut content samples in different treatments (5%, 10%, 15% and 0%) in M2 model on 45<sup>th</sup> day

区<sup>[44]</sup>, 具有很多药理学活性, 包括利尿、抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化等<sup>[45]</sup>, 近年来还发现其对鱼类促生长方面具有较大的潜力<sup>[44]</sup>, 因此鱼腥草具有重要的经济价值。本团队前期构建了鱼腥草和罗非鱼共生池塘养殖系统, 发现该系统对改

善罗非鱼养殖池塘水质, 特别是降低氨氮磷效果十分显著, 对罗非鱼链球菌病的发病率也有一定的抑制效果<sup>[46-47]</sup>。为进一步完善该模式, 探讨该模式中罗非鱼和鱼腥草的相对最佳搭配比例, 本研究设计了两种共生实验模式 M1 和 M2。

在 M1 模式中,所有生物浮床覆盖池塘的面积相同,但鱼腥草种植密度不同,在实验期间 4—6 月,所有实验组均能显著改善各项水质指标,其中 40 d 之前表现为实验组 600 g/m<sup>2</sup> 优于 450 g/m<sup>2</sup>,实验组 450 g/m<sup>2</sup> 优于 350 g/m<sup>2</sup>。60 d 之后,实验组 450 g/m<sup>2</sup> 在改善 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、TN、TP 和 COD 等指标上优于实验组 350 和 600 g/m<sup>2</sup>。说明在 M1 模式下,实验组 350、450 及 600 g/m<sup>2</sup> 都能较好地改善罗非鱼养殖池塘水质,其中初始生物量为 450 g/m<sup>2</sup> 鱼腥草浮床在改善水质方面,相对于实验组 350 g/m<sup>2</sup> 和 600 g/m<sup>2</sup>,效果相对更稳定和持久。

养殖水体菌群结构研究结果表明,4—6 月,随着时间的推移,不同密度鱼腥草浮床实验组的菌群多样性和均匀度都逐渐增加,其中 5 月优于 4 月,6 月优于 5 月。在堆叠图中,4 月第 1 次采集的样品 SS600.1、SS350.1 和 SD.1 聚为一支,SS450.1 单独聚为一支。5 月和 6 月采集的样品聚为一大支。分析单月份结果,4 月 SS450.1 组的养殖水体细菌丰富度和生物多样性均显著优于 SS600.1、SS350.1 以及对照组 SD.1; 5 月,SS350.2 和 SS450.2 的生物丰富度和多样性优于 SS600.2 和 SD.2; 6 月,SS450.3 和 SS350.3 的丰富度和多样性仍然优于 SS600.3 和 SD.3。这说明在罗非鱼初始养殖密度为 187.5 g/m<sup>2</sup> 时,相同单位种植面积下,不同鱼腥草种植密度(350、450 及 600 g/m<sup>2</sup>) 均可显著改变罗非鱼养殖池塘的细菌丰富度和多样性,且影响程度随养殖季节和养殖时间而变化。450 和 350 g/m<sup>2</sup> 密度组在调节水体细菌丰富度和多样性上要优于 600 g/m<sup>2</sup> 组,450 g/m<sup>2</sup> 与 350 g/m<sup>2</sup> 之间则相对差异不显著。总体而言,各实验组对养殖水体菌群的影响不及环境变化对罗非鱼养殖水体菌群变化的影响大。

4 月第 1 次采样发现,对照组鱼体肠道菌群丰富度和多样性均优于各实验组,5 月 450 和 350 g/m<sup>2</sup> 密度组在调节鱼体细菌丰富度和多样性方面优于实验组 600 g/m<sup>2</sup> 和对照组; 6 月,CS350.3 组的细菌丰富度优于 CS600.3 和 CS450.3 以及 CD.3,CS600.3 和 CS450.3 的丰富度优于 CD.3。聚类分析结果显示,与养殖水体样品相似,各实验组对鱼体肠道菌群的影响不及环境变化对罗非鱼肠道菌群变化的影响大。对优势菌群分析发现,鱼体肠道的优势菌群与养殖水体的优势菌群呈直接相关,这与 Wang 等<sup>[48]</sup> 的报道类似。

在 M2 模式中,不同覆盖面积鱼腥草浮床

均能有效降低罗非鱼养殖水体的 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N、TN、TP 以及 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P 等指标,该结果与史丽娜等<sup>[46]</sup> 的一致。进一步分析发现,不同覆盖面积鱼腥草浮床对养殖水体 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N、TN、TP 以及 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P 的优化效果随着养殖时间的变化而变化。随着养殖时间的延长,不同覆盖面积组的 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N、TN、TP 以及 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P 净化效果均逐渐增大,但各组之间的净化效率也有差异。45 天之前,各实验组 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N、TN、TP 以及 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P 净化水平为 15% 组 > 10% 组 > 5% 组。45 天之后,各实验组 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N、TN、TP 以及 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P 净化水平为 10% 组 > 5% 组 > 15% 组。75 天之后,5% 组和 10% 组 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 的优化效果优于 15% 组。结果表明,在该养殖周期内,鱼腥草覆盖面积为 10% 组对养殖水体 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N、TN、TP 以及 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P 等指标的净化效果较 5% 和 15% 组更稳定。

细菌相对丰度分析发现,第 18 天,通过  $\alpha$  多样性分析可知,不同覆盖面积鱼菜共生池塘的养殖水体和鱼体肠道的细菌丰富度及多样性趋势一致,均表现为 15% 组 > 对照组 > 5% 组 > 10% 组,其中 5% 组和 10% 组间无显著差异。45 天之后,不同覆盖面积鱼腥草组水体样品中,各实验组和对照组前 5 位的优势菌群丰度虽然不一样,但是菌群种类相同,分别为浮霉菌门(Planctomycetes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、梭杆菌门、变形菌门(Proteobacteria)以及厚壁菌门(Firmicutes)。在肠道样品中,0%、5%、10% 以及 15% 组前 7 位的优势菌群均分别为浮霉菌门、疣微菌门、变形菌门、梭杆菌门、拟杆菌(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)以及厚壁菌门,但是依据基于 OTUs、Chao1、ACE、Shannon 以及 Simpson 等  $\alpha$  多样性指数分析发现,10% 处理组的养殖水体和鱼体肠道菌群多样性均高于其他组别。各实验组之间多样性差异不显著( $P > 0.05$ ),但均显著高于对照组 0% ( $P < 0.05$ )。鱼体肠道内容物细菌丰富度和多样性分析发现,其与养殖水体多样性分布有相似的趋向性,10% 处理组的细菌多样性和丰富度均高于其他组。以上结果说明不同覆盖面积鱼腥草浮床均能增加罗非鱼养殖池塘和鱼体肠道的细菌多样性和丰富度,且在 M2 模式中,10% 覆盖面积组的鱼腥草浮床效果相对最明显。

由此可见,基于罗非鱼和鱼腥草的鱼菜共生系统能够有效增加细菌多样性和丰富度。很多研究者也报道过植物水培系统的氨氮去除效果<sup>[49-50]</sup>。

这些结果显示, 不仅植物本身能够直接去除氨氮, 而且该系统中的硝化/反硝化、 $\text{NH}_3$ 挥发、细菌和藻类的固氮和营养利用等都可以有效促进氨氮的去除<sup>[51]</sup>。

综上所述, 不同模式的鱼腥草浮床均能显著改善罗非鱼养殖池塘水质, 同时优化养殖水体和鱼体肠道的菌群结构。在 M1 模式中, 鱼腥草不同种植密度条件下, 450 和 350  $\text{g}/\text{m}^2$  组对罗非鱼养殖水体和肠道菌群结构的优化程度无显著差异, 但均优于实验组 600  $\text{g}/\text{m}^2$ 。而且 450  $\text{g}/\text{m}^2$  组的鱼腥草浮床在改善养殖水质方面, 相对于实验组 350 和 600  $\text{g}/\text{m}^2$ , 效果相对更加稳定。在 M2 模式中, 鱼腥草覆盖面积为 10% 的实验组, 无论对养殖水体  $\text{NH}_4^+-\text{N}$ 、 $\text{NO}_3^--\text{N}$ 、TN、TP 和  $\text{PO}_4^{3--}\text{P}$  等指标的优化还是改善微生物菌群结构方面, 均较 5% 和 15% 组稳定。该结果为罗非鱼养殖池塘生态浮床的构建及应用提供了理论基础。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

#### 参考文献 (References):

- [1] 卢迈新, 黎炯, 叶星, 等. 广东与海南养殖罗非鱼无乳链球菌的分离、鉴定与特性分析[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(5): 766-774.
- Lu M X, Li J, Ye X, *et al.* Identification and characterizations of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia cultured in Guangdong and Hainan Provinces[J]. *Microbiology China*, 2010, 37(5): 766-774 (in Chinese).
- [2] Nora'aini A, Mohammad A W, Jusoh A, *et al.* Treatment of aquaculture wastewater using ultra-low pressure asymmetric polyethersulfone (PES) membrane[J]. *Desalination*, 2005, 185(1-3): 317-326.
- [3] Chávez-Crooker P, Obreque-Contreras J. Bioremediation of aquaculture wastes[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2010, 21(3): 313-317.
- [4] La Rosa T, Mirto S, Mazzola A, *et al.* Benthic microbial indicators of fish farm impact in a coastal area of the Tyrrhenian Sea[J]. *Aquaculture*, 2004, 230(1-4): 153-167.
- [5] Magor B G. Gill histopathology of juvenile *Oncorhynchus kisutch* exposed to suspended wood debris[J]. *Canadian Journal of Zoology*, 1988, 66(10): 2164-2169.
- [6] 赵诣. 三株异养硝化细菌的分离、特征及其对水产养殖废水脱氮作用研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2010.
- Zhao Y. Isolation and characteristic of three heterotrophic nitrifiers and its application in aquaculture wastewater treatment[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2010 (in Chinese).
- [7] Zhang L, Xiong D M, Li B, *et al.* Toxicity of ammonia and nitrite to yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)[J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2012, 28(1): 82-86.
- [8] 张延青, 李雪莹, 秦菲, 等. 大型藻类应用于循环水养殖的研究进展[J]. *粮食科技与经济*, 2018, 43(10): 115-117.
- Zhang Y Q, Li X Y, Qin F, *et al.* Research progress on the application of macroalgae to recirculating aquaculture[J]. *Grain Science and Technology and Economy*, 2018, 43(10): 115-117 (in Chinese).
- [9] 万红, 宋碧玉, 杨毅, 等. 水产养殖废水的生物处理技术及其应用[J]. *水产科技情报*, 2006, 33(3): 99-103.
- Wan H, Song B Y, Yang Y, *et al.* Biological treatment technique of waste water from aquaculture and its application[J]. *Fisheries Science & Technology Information*, 2006, 33(3): 99-103 (in Chinese).
- [10] Miron D D S, Moraes B, Becker A G, *et al.* Ammonia and pH effects on some metabolic parameters and gill histology of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae)[J]. *Aquaculture*, 2008, 277(3-4): 192-196.
- [11] Hargreaves J A. Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds[J]. *Aquaculture*, 1998, 166(3-4): 181-212.
- [12] 王玥, 胡义波, 姜乃澄. 氨态氮、亚硝态氮对罗氏沼虾免疫相关酶类的影响[J]. *浙江大学学报(理学版)*, 2005, 32(6): 698-705.
- Wang Y, Hu Y B, Jiang N C. Effects of ammonia-N and nitrite-N on immune enzymes of *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Journal of Zhejiang University (Science Edition)*, 2005, 32(6): 698-705 (in Chinese).
- [13] De Holanda Cavalcante D, da Silva S R, Pinheiro P D, *et al.* Lab-scale periphyton-based system for fish culture[J]. *Ciencia Rural*, 2011, 41(12): 2177-2182.
- [14] Richard M, Trottier C, Verdegem M C J, *et al.* Submersion time, depth, substrate type and sampling method as variation sources of marine periphyton[J]. *Aquaculture*, 2009, 295(3-4): 209-217.
- [15] Richard M, Maurice J T, Anginot A, *et al.* Influence of periphyton substrates and rearing density on *Liza aurata* growth and production in marine nursery ponds[J]. *Aquaculture*, 2010, 310(1-2): 106-111.

- [16] De Schryver P, Crab R, Defoirdt T, *et al.* The basics of bio-flocs technology: the added value for aquaculture[J]. *Aquaculture*, 2008, 277(3-4): 125-137.
- [17] Schneider O, Sereti V, Eding E H, *et al.* Analysis of nutrient flows in integrated intensive aquaculture systems[J]. *Aquacultural Engineering*, 2005, 32(3-4): 379-401.
- [18] Crab R, Avnimelech Y, Defoirdt T, *et al.* Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production[J]. *Aquaculture*, 2007, 270(1-4): 1-14.
- [19] 范玲玉, 林美芬, 郑毅. 水产养殖业微生物制剂应用研究进展[J]. *食品与发酵科技*, 2021, 57(1): 99-101,121.  
Fan L Y, Lin M F, Zheng Y. Research progress in the application of microbial preparation in aquaculture[J]. *Food and Fermentation Sciences & Technology*, 2021, 57(1): 99-101,121 (in Chinese).
- [20] 李卫芬, 邓斌, 陈南南, 等. 芽孢杆菌对草鱼生长和肠粘膜抗氧化功能及养殖水质的影响[J]. *水生态学杂志*, 2012, 33(1): 65-70.  
Li W F, Deng B, Chen N N, *et al.* Effects of bacillus on water quality, growth and antioxidant activity of intestinal mucosa of *Ctenopharyngodon idellus*[J]. *Journal of Hydroecology*, 2012, 33(1): 65-70 (in Chinese).
- [21] 孟睿, 何连生, 席北斗, 等. 芽孢杆菌与硝化细菌净化水产养殖废水的试验研究[J]. *环境科学与技术*, 2009, 32(11): 28-31.  
Meng R, He L S, Xi B D, *et al.* Experimental study on purifying aquaculture wastewater between bacillus and nitrifying bacteria[J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 32(11): 28-31 (in Chinese).
- [22] 易弋, 黎娅, 容元平, 等. 利用微生物净化鱼塘养殖污水的研究[J]. *湖北农业科学*, 2010, 49(10): 2509-2511.  
Yi Y, Li Y, Rong Y P, *et al.* Decontamination of aquaculture sewage by microorganisms[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2010, 49(10): 2509-2511 (in Chinese).
- [23] 邹俊良. 生物集成系统净化水产养殖废水的研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2013.  
Zou J L. Study on purification of aquaculture wastewater using a biological integrated system[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013 (in Chinese).
- [24] 陈家长, 孟顺龙, 胡庚东, 等. 空心菜浮床栽培对集约化养殖鱼塘水质的影响[J]. *生态与农村环境学报*, 2010, 26(2): 155-159.  
Chen J Z, Meng S L, Hu G D, *et al.* Effect of *Ipomoea aquatica* cultivation on artificial floating rafts on water quality of intensive aquaculture ponds[J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2010, 26(2): 155-159 (in Chinese).
- [25] Wang J L, Chu L B. Biological nitrate removal from water and wastewater by solid-phase denitrification process[J]. *Biotechnology Advances*, 2016, 34(6): 1103-1112.
- [26] 范洁群, 邹国燕, 宋祥甫, 等. 不同类型生态浮床对富营养河水脱氮效果及微生物菌群的影响[J]. *环境科学研究*, 2011, 24(8): 850-856.  
Fan J Q, Zou G Y, Song X F, *et al.* Effects of FCEFB and TFB on the nitrogen removal and nitrogen cycling microbial community in a eutrophic river[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2011, 24(8): 850-856 (in Chinese).
- [27] Peterson S B, Teal J M. The role of plants in ecologically engineered wastewater treatment systems[J]. *Ecological Engineering*, 1996, 6(1-3): 137-148.
- [28] 靖元孝, 杨丹菁. 风车草(*Cyperus alternifolius*)人工湿地系统氮去除及氮转化细菌研究[J]. *生态科学*, 2004, 23(1): 89-91.  
Jing Y X, Yang D J. Nitrogen removal and nitrogen-transformation bacteria in *Cyperus alternifolius* constructed wetland[J]. *Ecologic Science*, 2004, 23(1): 89-91 (in Chinese).
- [29] Christianson L, Lepine C, Tsukuda S, *et al.* Nitrate removal effectiveness of fluidized sulfur-based autotrophic denitrification biofilters for recirculating aquaculture systems[J]. *Aquacultural Engineering*, 2015, 68: 10-18.
- [30] Han H Y, Li Z K. Effects of macrophyte-associated nitrogen cycling bacteria on ANAMMOX and denitrification in river sediments in the Taihu Lake region of China[J]. *Ecological Engineering*, 2016, 93: 82-90.
- [31] Zheng X F, Zhang D D, Qin J G, *et al.* The effect of C/N ratio on bacterial community and water quality in a mussel-fish integrated system[J]. *Aquaculture Research*, 2018, 49(4): 1699-1708.
- [32] Canfield D E, Glazer A N, Falkowski P G. The evolution and future of earth's nitrogen cycle[J]. *Science*, 2010, 330(6001): 192-196.
- [33] Miao L L, Liu Z P. Microbiome analysis and-omics studies of microbial denitrification processes in wastewater

- treatment: Recent advances[J]. *Science China Life Sciences*, 2018, 61(7): 753-761.
- [34] 国家环境保护总局, 水和废水监测分析方法编委会. 水和废水监测分析方法 [M]. 第 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- State Environmental Protection Administration of China, Editorial Committee of Water and Wastewater Monitoring and Analysis Methods. Determination methods for examination of water and wastewater[M]. 4th ed. Beijing: China Environmental Science Press, 2002 (in Chinese).
- [35] Shannon C E. A mathematical theory of communication[J]. *The Bell System Technical Journal*, 1948, 27(3): 379-423.
- [36] Shannon C E. A mathematical theory of communication[J]. *The Bell System Technical Journal*, 1948, 27(4): 623-656.
- [37] Simpson E H. Measurement of diversity[J]. *Nature*, 1949, 163(4148): 688.
- [38] Chao A N, Yang M C K. Stopping rules and estimation for recapture debugging with unequal failure rates[J]. *Biometrika*, 1993, 80(1): 193-201.
- [39] Chao A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population[J]. *Scandinavian Journal of Statistics*, 1984, 11: 265-270.
- [40] Bosma R H, Lacambra L, Landstra Y, *et al.* The financial feasibility of producing fish and vegetables through aquaponics[J]. *Aquacultural Engineering*, 2017, 78: 146-154.
- [41] Greenfeld A, Becker N, Mcilwain J, *et al.* Economically viable aquaponics? Identifying the gap between potential and current uncertainties[J]. *Review in Aquaculture* 2019, 11(3): 848-862.
- [42] Knaus U, Palm H W. Effects of fish biology on ebb and flow aquaponical cultured herbs in northern Germany (Mecklenburg Western Pomerania)[J]. *Aquaculture*, 2017, 466: 51-63.
- [43] Maucieri C, Nicoletto C, Junge R, *et al.* 2018. Hydroponic systems and water management in aquaponics: a review[J]. *Italian Journal of Agronomy*, 2018, 13(1): 1012.
- [44] Garg C K, Sahu N P, Shamna N, *et al.* Effect of dietary *Houttuynia cordata* leaf meal and leaf extract on the growth performance, nutrient utilization and expression of IGF-I gene in *Labeo rohita*[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2019, 25(3): 702-711.
- [45] Sekita Y, Murakami K, Yumoto H, *et al.* Anti-bacterial and anti-inflammatory effects of ethanol extract from *Houttuynia cordata* poultice[J]. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2016, 80(6): 1205-1213.
- [46] 史丽娜, 可小丽, 刘志刚, 等. 鱼腥草浮床对养殖水质及罗非鱼非特异免疫力的影响[J]. *生态科学*, 2015, 34(4): 105-113,130.
- Shi L N, Ke X L, Liu Z G, *et al.* Effect of *Houttuynia cordata* floating-bed on water quality and non-specific immunity of GIFT tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. *Ecological Science*, 2015, 34(4): 105-113,130 (in Chinese).
- [47] 祝璟琳, 季桓涛, 肖炜, 等. 鱼腥草对无乳链球菌引起吉富罗非鱼肝脏损伤的修复作用[J]. *水产学报*, 2020, 44(7): 1187-1197.
- Zhu J L, Ji H T, Xiao W, *et al.* Protective effects from *Houttuynia cordata* against *Streptococcus agalactiae*-induced liver injury of GIFT *Oreochromis niloticus* strain[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(7): 1187-1197 (in Chinese).
- [48] Wang A R, Ran C, Ringø E, *et al.* Progress in fish gastrointestinal microbiota research[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2018, 10(3): 626-640.
- [49] Zheng Z C, Li T X, Zeng F F, *et al.* Accumulation characteristics of and removal of nitrogen and phosphorus from livestock wastewater by *Polygonum hydropiper*[J]. *Agricultural Water Management*, 2013, 117: 19-25.
- [50] Nhan H T, Tai N T, Liem P T, *et al.* Effects of different stocking densities on growth performance of Asian swamp eel *Monopterus albus*, water quality and plant growth of watercress *Nasturtium officinale* in an aquaponic recirculating system[J]. *Aquaculture*, 2019, 503: 96-104.
- [51] Zimmo O R, van der Steen N P, Gijzen H J. Nitrogen mass balance across pilot-scale algae and duckweed-based wastewater stabilisation ponds[J]. *Water Research*, 2004, 38(4): 913-920.

## Effects of planting density or proportion on water quality and bacterial microbiota in the tilapia and *Houttuynia cordata* aquaponics

KE Xiaoli<sup>1</sup>, LI Qingyong<sup>2</sup>, HUANG Qiubiao<sup>2</sup>, WANG Miao<sup>1</sup>,  
YI Mengmeng<sup>1</sup>, LIU Zhigang<sup>1</sup>, LU Maixin<sup>1\*</sup>

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

2. Fisheries Research & Extension Center of Huizhou, Huizhou 516002, China)

**Abstract:** Intensive aquaculture is generally characterized by the addition of nutritionally enriched diets. High-protein feed inputs thus lead to an inefficient use of nitrogen, and the waste of the natural resources, mostly fishmeal, from which this nitrogen originated. With increasing concentration, ammonia and nitrite can be toxic to aquatic life. Previous studies demonstrated that *Houttuynia cordata* floating bed could significantly reduce ammonia and nitrogen (N) in tilapia intensive aquaculture, but little information is available about the effective planting density or proportion of *H. cordata* and its effects on water quality and microbiota in tilapia co-culturing pond system. For this, this study constructed two aquaponic models (M1 and M2) based on *H. cordata* and tilapia, and respectively investigated their effects on water quality and bacterial microbiota in the tilapia intestinal tract and the pond water system. The M1 model included four density treatments (350 g/m<sup>2</sup>, 450 g/m<sup>2</sup>, 600 g/m<sup>2</sup>, and 0 g/m<sup>2</sup>): the control 0 g/m<sup>2</sup> (no *H. cordata* floating bed), treatment 350 g/m<sup>2</sup> (planting 350 g *H. cordata* per square meter pond water), treatment 450 g/m<sup>2</sup>, and treatment 600 g/m<sup>2</sup>. The M2 model included four cover ratio treatments: the control 0 % (with no *H. cordata* floating bed), treatment 5 % (growing 5% *H. cordata* with floating bed), treatment 10%, and treatment 15%. Results showed in the M1 model the water quality trends based on chemical oxygen demand (COD), ammonia nitrogen (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N), nitrite nitrogen (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N), nitrate nitrogen (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N), total nitrogen (TN), total phosphorus (TP) and ortho phosphate (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P) in treatment groups were significantly lower than those in the control groups. And in the three experimental months, the effect of treatment 450 g/m<sup>2</sup> was relatively more stable than treatments 350 g/m<sup>2</sup> and 600 g/m<sup>2</sup>. High-throughput sequencing analysis based on  $\alpha$ -diversity indices (Chao1, ACE, Shannon and Simpson) showed different *H. cordata* floating bed treatments (350 g/m<sup>2</sup>, 450 g/m<sup>2</sup>, and 600 g/m<sup>2</sup>) could significantly improve the bacterial microbiota composition and increase the bacterial microbiota diversity. And these effects were more obvious along with the extension of co-cultured time. In same month, the effects of treatments 450 g/m<sup>2</sup> and 350 g/m<sup>2</sup> ( $P < 0.05$ ) were more stable than that of treatment 600 g/m<sup>2</sup> ( $P > 0.05$ ). Among different months, the effect from seasonal variation on bacterial composition of fish gut or water was greater than the effect from *H. cordata* floating bed. In the M2 model, results showed that the *H. cordata* floating bed with different cover ratios could effectively improve the pond water quality and increase the bacterial community richness and diversity in tilapia ponds and fish guts. And the effect of treatment 10% was relatively more stable. These results demonstrated that using *H. cordata* floating beds in aquaponics could improve the pond water quality and increase the richness and diversity of the bacterial community in tilapia ponds and in fish guts. In this study, the density 450 g/m<sup>2</sup> was more stable than densities of 350 g/m<sup>2</sup> and 600 g/m<sup>2</sup>, and a 10% cover ratio of *H. cordata* floating bed was superior to ratios of 15% and 5%. These results provide a scientific basis for the application of aquaponics based on *H. cordata* and tilapia.

**Key words:** tilapia; aquaponics; *Houttuynia cordata*; 16S rRNA; bio-floating bed; microbiota diversity

**Corresponding author:** LU Maixin. E-mail: mx-lu@163.com

**Funding projects:** Provincial Special Project for Promoting Economic Development (YueNong 2019B8); China Agriculture Research System (CARS-46)