

罗非鱼养殖系统潜在有机物降解菌的筛选及其降解能力测定

胡晓娟¹, 曹煜成¹, 文国樑¹, 袁翠霖^{1,2}, 杨莺莺¹, 林小涛², 李卓佳^{1*}

(1.中国水产科学研究院南海水产研究所 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室 广东省渔业生态环境重点实验室, 广州 510300; 2.暨南大学水生生物研究所 广东省高校水体富营养化与赤潮防治重点实验室, 广州 510632)

摘要:为筛选新的益生菌菌源,从罗非鱼养殖系统分离筛选6株有机物降解菌,研究其对罗非鱼饲料浸出液和饲料原液的降解能力以及菌株对碳源的利用能力。结果表明6株菌对饲料浸出液的有机物均有明显的降解作用,实验72 h后,菌株D51对饲料浸出液有机物的降解率最高,达53.49%,其次为菌株D11,降解率为48.83%。各菌株对饲料原液的有机物均具有明显降解作用,菌株D51、D11和D45的降解效果最好,实验15 d饲料原液的COD分别降低了52.46%、46.03%和46.03%,饲料干重分别减少了58.25%、53.08%和52.08%。各菌株对碳源的利用能力有所差异,菌株D45对31种碳源表现出很强的代谢活性,菌株D51和D11次之,菌株D52和D53对碳源的利用能力相对较低。经分子生物学鉴定,菌株D11属于芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.),菌株D45、D51、D52和D53属于微小杆菌属(*Exiguobacterium* sp.)。鉴于菌株D11、D45和D51对有机物具有较强的降解能力,可将其作为降解养殖池塘有机物的备选菌株开展后续研究。

关键词:有机物降解菌株;罗非鱼养殖系统;降解率;碳源利用

中图分类号:X172 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2014)06-1233-07 doi:10.11654/jaes.2014.06.026

Isolation of Potential Organic Matter-degrading Bacteria and Their Degradation Ability in Tilapia Culture System

HU Xiao-juan¹, CAO Yu-cheng¹, WEN Guo-liang¹, YUAN Cui-lin^{1,2}, YANG Ying-ying¹, LIN Xiao-tao², LI Zhuo-jia^{1*}

(1.Key Lab. of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture; Key Lab. of Fishery Ecology and Environment, Guangdong Province; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 2.Key Laboratory of Aquatic Eutrophication and Control of Harmful Algal Blooms of Guangdong Higher Education Institutes, Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Enhanced degradation of organic matter in aquaculture systems has drawn increasing interests. A study was performed to screen and identify organic-matter-degrading probiotic bacteria from tilapia culture system using 16S rDNA method. Their ability to degrade and utilize organic carbon in leachate and original solution of tilapia feed was also determined using COD and ECO microplate method, respectively. Six strains were found to significantly degrade organic matter in the leachates. After 72 h incubation, the degradation rates of organic matter were up to 53.49% for the strain D51, followed by the strain D11 (48.83%). The strains D51, D11 and D45 also had high abilities to degrade organic matter in the original feed solution. After 15 d incubation, they decreased COD values in the original feed solution by 52.46%, 46.03% and 46.03%, respectively. The strain D45 showed significantly stronger carbon utilization than the other strains did, with the strains D52 and D53 being the lowest. 16S rDNA identification showed that D11 was *Bacillus* sp. and the strain D45, D51, D52 and D53 were *Exiguobacterium* sp. These results suggest that the strains D11, D45 and D51 have great organic degradation potential and warrant more indepth studies.

Keywords: organic-matter-degrading bacteria; tilapia culture system; degradation rate; utilization of carbon source

收稿日期:2013-12-13

基金项目:现代农业(虾)产业技术体系建设专项资金(CARS-47);国家公益性行业(农业)科研专项(201103034);广东省科技计划(2012B020308003);南海水产研究所中央级科研院所基本科研专项(2013ZD02、2014TS04);广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 13470002-2);广东省海洋渔业推广专项(A201201B02);农业科技成果转化资金项目(2012GB23260551)

作者简介:胡晓娟(1984—),女,湖南沅陵人,助理研究员,博士,主要从事养殖水环境与微生物调控研究。E-mail:xinr129@163.com

*通信作者:李卓佳 E-mail:zhuojiali609@163.com

在池塘养殖生产中,为促进养殖对象的生长,需要投入大量的饲料。这些饲料进入养殖系统后,除部分被养殖对象利用外,其余转化形成各种代谢产物累积于池塘中,易造成养殖环境的有机物污染。据报道,在玉筋鱼(*Ammodytes personatus*)养殖中,代谢产物和残饵分别占投饵量的20%~35%和10%~40%^[1]。研究表明,每生产1 kg 的鱼类生物量约能产生162 g 有机粪便废物,其中包括50 g 蛋白质、31 g 脂质和81 g 碳水化合物^[2]。随着养殖的不断进行,在养殖末期可能出现有机物污染严重、水质恶化或水体富营养化等问题^[3]。可见,养殖水体中有机污染物的大量存在,一方面造成了营养物质的大量浪费,养殖成本升高;另一方面加重了养殖环境污染。因此,养殖水体的有机物污染成为制约水产养殖业健康、可持续发展的关键因素之一^[4]。

微生物作为池塘养殖生态系统的分解者,在物质循环和能量流动中发挥着重要作用^[5-6]。研究表明,在罗非鱼(*Tilapia nilotica* × *T. aurea*)养殖过程中,有机物质不断积累,但养殖池塘微生物群落的代谢能力并未显著升高^[7]。可见池塘固有微生物群落不足以分解累积的有机物,通过人为的措施提高养殖池塘的自净能力极其必要。水产养殖生态环境的有益微生物能分解累积的大量残余饵料、排泄物、动植物残体以及有害气体(氨、硫化氢)等^[8-9]。袁翠霖等^[10]研究表明,在养殖前期投放芽孢杆菌制剂有利于改善罗非鱼养殖池塘微生物群落的代谢功能,尤其有利于提高底泥微生物群落的代谢能力。

本研究对罗非鱼养殖系统潜在有机物降解菌株进行分离筛选,研究其对罗非鱼饲料浸出液、饲料原液的降解效果及其对碳源的利用能力,以期水产养殖业提供新的益生菌菌源,通过将其加以应用,提高池塘养殖系统的微生物群落代谢能力,减轻池塘环境污染、提高饲料利用。

1 材料和方法

1.1 菌株来源

从广州市番禺区新一代渔业有限公司罗非鱼养殖池塘的水体、底泥和罗非鱼肠道分离优势菌株。选择其中6株产酶菌株作为本研究的实验菌株,各菌株对氧的需求特性和产酶能力如表1所示。除来自肠道的菌株D55是兼性厌氧菌外,另外5株均为好氧菌。在菌株的产酶能力方面,菌株D11、D45、D51和D55具有较高的蛋白酶活力和较高的淀粉酶活力,菌株

表1 菌株来源及其蛋白酶和淀粉酶活力

Table 1 Sources of experimental strains and their activities of proteinase and amylase

菌株编号	菌株的氧需求特性	菌株来源	蛋白酶活力/ U·mL ⁻¹	淀粉酶活力/ U·mL ⁻¹
D11	好氧	底泥	49.40	74.91
D45	好氧	水体	51.07	74.74
D51	好氧	水体	70.15	267.86
D52	好氧	水体	—	190.52
D53	好氧	水体	75.70	18.64
D55	兼性厌氧	肠道	53.34	79.93

D52具有较高的淀粉酶活力,菌株D53具有较高的蛋白酶活力。

1.2 菌株对饲料浸出液的降解

1.2.1 饲料浸出液的制备

将市售的罗非鱼饲料(广东粤海饲料集团,主要营养成分为粗蛋白31%,粗脂肪3%,灰分7%)粉碎之后,用无菌水浸泡24 h,过滤。将过滤的饲料浸出液稀释。饲料浸出液的初始COD值设置为(22.93±0.53) mg·L⁻¹,接近一般池塘水体在养殖过程中达到的COD峰值^[7]。将配制好的饲料浸出液以50 mL·瓶⁻¹的量分装于150 mL的三角瓶,121 °C灭菌20 min。

1.2.2 实验设计

将纯化的各菌株经斜面活化后,分别转接于装有饲料浸出液的三角瓶,28 °C振荡培养12 h进行二次活化,再以1%的接种量转接于装有50 mL饲料浸出液的三角瓶,28 °C摇床培养72 h,每株菌(每组)均设置3个平行。检测初始和结束时每组饲料浸出液的COD值(采用高锰酸钾法)^[11],比较菌株对饲料浸出液的降解能力,以降解率表示。

降解率=(饲料浸出液的初始COD值-72 h 饲料浸出液的COD值)/饲料浸出液的初始COD值

1.3 菌株对罗非鱼饲料的降解

1.3.1 饲料原液的配制

将罗非鱼饲料进行烘干、粉碎处理,称取12 g 饲料粉末,放入装有600 mL水的1000 mL三角瓶内,121 °C灭菌20 min,制成饲料原液。

1.3.2 实验设计

将纯化的各菌株经斜面活化后,分别接种于饲料原液,以未接菌的饲料原液作为对照,28 °C恒温培养15 d,每组均设置3个平行。每3 d检测各组饲料原液的COD值;实验初始和结束时,测定各组的饲料原液的COD值和饲料干重,计算各组饲料原液COD值的变化率和饲料干重的变化率。

饲料原液 COD 的变化率=(培养 15 d 时饲料原液 COD 值-饲料原液的初始 COD 值)/饲料原液的初始 COD 值

饲料干重的变化率=(培养 15 d 时的饲料干重-初始饲料干重)/初始饲料干重

1.4 菌株对碳源的利用能力比较

选择降解能力较强的菌株 D11、D45、D51、D52 和 D53 进行纯培养,当菌浓度达 10^5 CFU·mL⁻¹ 时,对菌液进行 10 倍稀释,将稀释菌液倾倒在无菌加样槽(所测样品的菌浓度为 10^4 CFU·mL⁻¹),用八道移液器把稀释菌液分别加入 Biolog ECO 微板的微孔中。每孔 150 μ L,每株菌均设置 3 个平行。加好样后,将 ECO 微板加盖放于 25 $^{\circ}$ C 恒温培养,分别在第 0 h、24 h、48 h、72 h、96 h、120 h、144 h、168 h 时测定 OD₅₉₀ 值^[12]。

根据每孔每个时间点的吸光值,计算 31 孔的平均吸光值(Average well color development, AWCD)。其计算公式如下^[13]:

$$AWCD = [\sum (C_i - R)] / 31$$

式中: C_i 为除对照孔外各孔的吸光值, R 为对照孔吸光值。

根据 Biolog ECO 微板的六大类碳源分类,以校正后的数据计算各菌株对六大类碳源的总吸光值,来分析不同菌株对同一碳源的利用差异^[14]。

1.5 菌株的分子生物学鉴定

1.5.1 细菌总 DNA 的提取

对降解能力较强的五株菌 D11、D45、D51、D52 和 D53 进行分子生物学鉴定。采用天根生化科技(北京)有限公司生产的细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取。

1.5.2 PCR 扩增

16S rDNA 的扩增采用细菌 16S rDNA 通用引物 8F (5'-AGAGTTTGATCC TGGCTCAG-3') 及 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。反应体系:50 μ L 体系中含有 10 \times PCR buffer 5 μ L, dNTPs (各 2.5 mol·L⁻¹) 4 μ L, 引物各 1 μ L, 模板 DNA 2 μ L, Taq 酶 1 μ L, ddH₂O 补足。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 48 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共 30 个循环;最后再 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增结束后,PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后,送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.5.3 序列分析

测序所得的 16S rDNA 基因序列通过 BLAST 在 GenBank 基因库中进行同源性比较,并申请序列号。利用 Mega 4.0 软件构建菌株的系统发育树。

1.6 数据分析

采用 SPSS 软件的方差分析法(ANOVA)检验不同菌株之间降解能力的显著性差异,显著性水平设置为 $P < 0.05$ 。

2 结果和分析

2.1 各菌株对饲料浸出液的降解效果

6 株菌株在 72 h 时对饲料浸出液的降解情况如表 2 所示。从表中可以看出,6 株菌株在 72 h 的饲料浸出液 COD 值均显著低于饲料浸出液的初始 COD 值(22.93 ± 0.53) mg·L⁻¹ ($P < 0.05$),说明 6 株菌对饲料浸出液中的有机物均有明显的降解作用,但不同菌株的降解能力有所不同。以菌株 D51 和 D11 的降解效果最明显,降解率分别为 53.49% 和 48.83%,显著高于其他菌株($P < 0.05$)。其次是菌株 D53 和 D52,降解率分别为 41.86% 和 36.43%。菌株 D55 和 D45 的降解率最低,分别仅为 15.61% 和 18.60%。

表 2 各菌株在 72 h 时对饲料浸出液的降解情况
Table 2 Degradation of organic matter in leachate from feed by strains at 72 h

菌株编号	COD/mg·L ⁻¹	对饲料浸出液的降解率/%
D11	11.73 \pm 0.53	48.83 \pm 0.02a
D45	18.31 \pm 0.53	18.60 \pm 0.02c
D51	11.38 \pm 1.60	53.49 \pm 0.07a
D52	14.93 \pm 0.82	36.43 \pm 0.04b
D53	13.33 \pm 0.53	41.86 \pm 0.02b
D55	16.00 \pm 1.41	15.61 \pm 0.03c

注:不同字母表示各菌株之间差异显著($P < 0.05$);数值为平均值 \pm 标准差(mean \pm SD)。

2.2 各菌株对饲料原液的降解效果

将 6 株菌株接种于饲料原液,28 $^{\circ}$ C 恒温培养后发现,三角瓶中的饲料原液出现明显的分层现象,底部的溶液较上部的浑浊且饲料粉末都沉淀在三角瓶底部。随着培养时间的延长,加菌组的饲料原液逐渐澄清,其中菌株 D45、D11 和 D51 组的饲料原液在第 6 d 时明显比对照组澄清。各组饲料原液 COD 值随培养时间的动态变化如图 1 所示。从图中可以看出,对照组饲料原液 COD 值在实验期间的变化不大,各取样时间点之间均无显著性差异($P > 0.05$)。加菌组的饲料原液 COD 值在实验第 15 d 均显著低于对照组($P < 0.05$),其中菌株 D45、D11 和 D51 组的饲料原液 COD 值在实验第 3 d 出现了显著性降低($P < 0.05$),第 6 d 较第 3 d 再次出现了显著性降低($P < 0.05$),而后略有

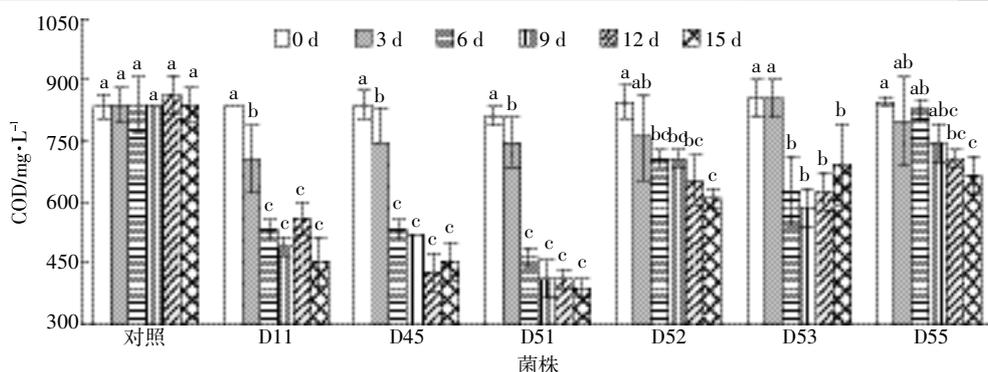


图1 各组饲料原液中 COD 值的动态变化

Figure 1 Dynamic changes of COD values in feed original solution

降低。菌株 D55 和 D52 组的饲料原液 COD 值随实验时间的延长逐渐降低；菌株 D53 组的饲料原液 COD 值在实验第 6 d 出现了显著性降低 ($P < 0.05$)，第 6 d 到第 15 d 期间变化不显著 ($P > 0.05$)。

各菌株在实验第 15 d 对饲料原液的降解情况如表 3 所示。从表中可以看出，对照组的饲料原液 COD 值在第 15 d 较实验开始时增加了 0.80%，而各菌株组的饲料原液 COD 值则分别降低了 18.75%~52.46% 不等，说明 6 株菌对饲料原液的有机物降解能力有所不同，其中以菌株 D51、D11 和 D45 的降解能力较强，其对原液 COD 的去除率均大于 45%。

从饲料干重物质的变化来看，对照组的饲料干重在实验第 15 d 较初始时降低了 38.92%，加菌组的饲料干重物质分别降低了 44.75%~58.25% 不等 (表 3)。各加菌组饲料干重的降解率均显著高于对照组 ($P < 0.05$)，除菌株 D55 外，其他 5 株菌的降解率超过 50%。饲料干物质的减少可能与两方面因素有关，一方面是由于细菌对饲料粉末的降解作用，另一方面则可能是因为在配制饲料原液时饲料加水后的散失导

致干重物质的减少。

2.3 各菌株对碳源的利用能力比较

AWCD 值表征了异养细菌代谢活性^[15]。由图 2 可以看出，不同菌株的代谢活性差异较大。菌株 D45 对碳源的利用能力强于其他菌株，培养 168 h AWCD 值可达 1.29。其次为菌株 D51 和 D11，168 h 的 AWCD 值分别为 0.63 和 0.49。菌株 D52 和 D53 对碳源的利用能力较弱，其 AWCD 值低于 0.2。

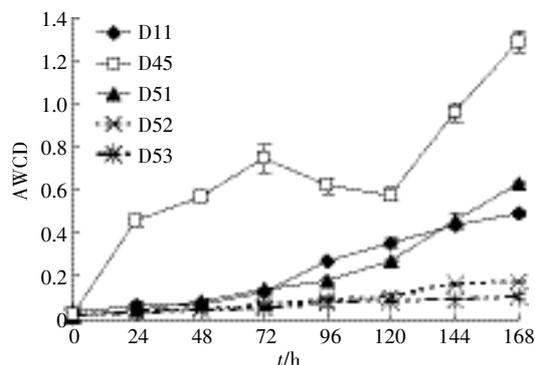


图2 各菌株 AWCD 值的比较

Figure 2 Comparison of AWCD among different strains

表3 各菌株在培养 15 d 时对饲料的降解情况

Table 3 Degradation of organic matter in original feed solution by strains at 15 d of incubation

菌株编号	变化率	
	饲料原液中 COD 值/%	饲料干重/%
D11	-(46.03±0.07) a	-(53.08±0.03) a
D45	-(46.03±0.05) a	-(52.08±0.02) a
D51	-(52.46±0.03) a	-(58.25±0.05) a
D52	-(27.56±0.03) b	-(52.83±0.03) a
D53	-(18.75±0.12) b	-(50.92±0.08) a
D55	-(21.26±0.05) b	-(44.75±0.04) b
对照	+(0.80±0.05) c	-(38.92±0.02) c

注：“+”表示增加，“-”表示降低；同列不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)；数值为平均值±标准差 (mean±SD)。

Biolog ECO 微板包括六大类，共 31 种碳源。六大类碳源分别包括聚合物、羧酸、氨基酸、糖类、胺类和其他类碳源。如图 3 所示，5 株菌对六大类碳源的利用率不同，菌株 D45 对糖类的利用率最高，120 h 可达 10.15，其次是对氨基酸、其他类、羧酸和胺类，对聚合物的利用率最低；菌株对糖类、羧酸和其他类碳源的利用率曲线与 AWCD 值的变化趋势类似。菌株 D11 在 72 h~168 h 呈现出糖类>氨基酸>羧酸>胺类>其他类>聚合物的趋势；菌株 D51 在 168 h 对六大类碳源的利用率为羧酸>糖类>氨基酸>胺类>聚合物>其他类。菌株 D52 和 D53 对六大类碳源的利用能力较弱，与 AWCD 值的变化一致。

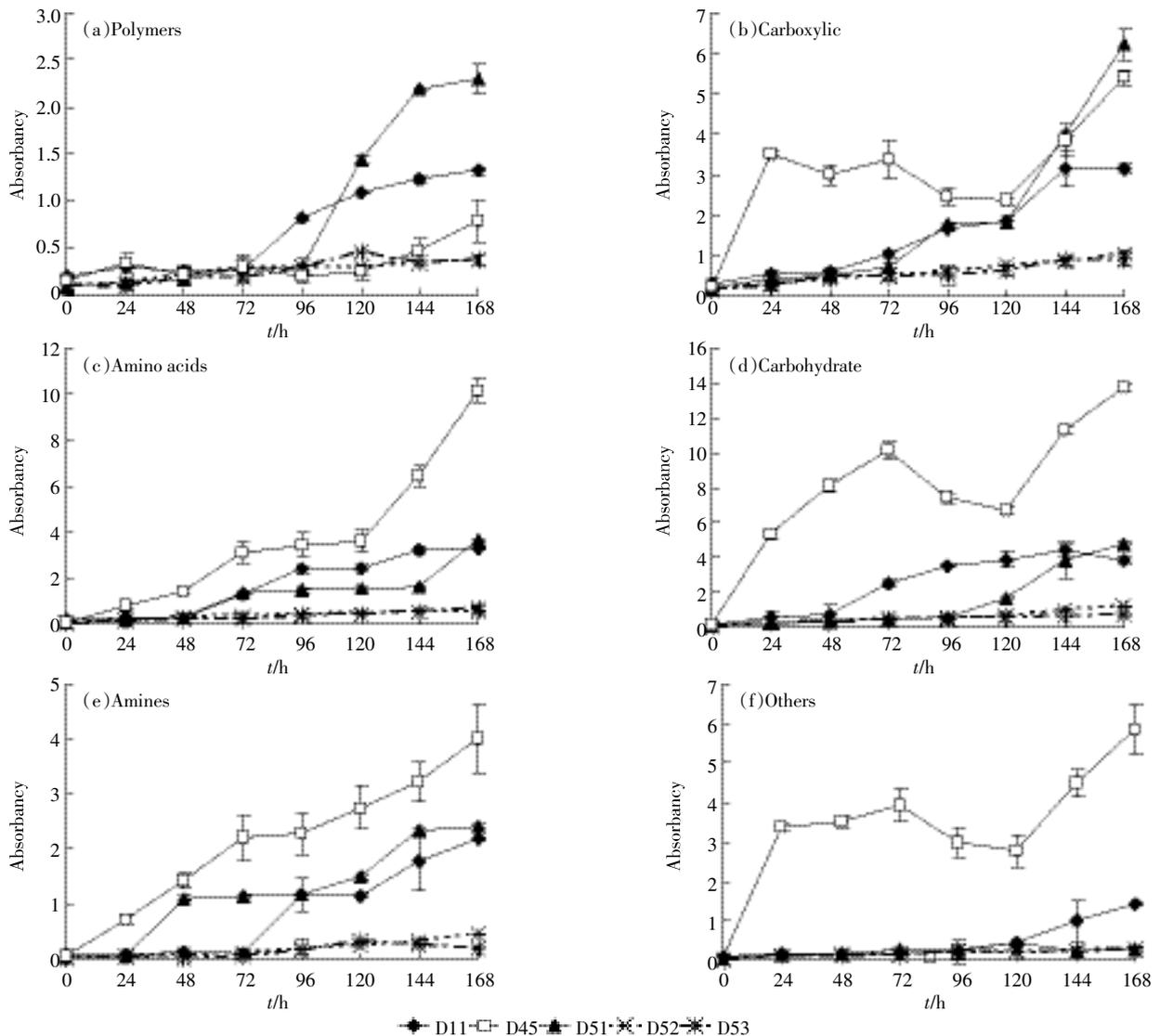


图3 各菌株对六大类碳源的利用情况

Figure 3 Utilization of six carbon sources by different strains

2.4 菌株的分子生物学鉴定

将降解能力较强的5株菌D11、D45、D51、D52和D53的16S rDNA序列与GenBank中源性较高的其他种经Clustal比对,采用Mega 4.0软件构建系统发育树。结果显示,菌株D11在系统发育树上与已报道的*Bacillus nanhaiensis*亲缘关系最近,同源性达99%以上(图4)。菌株D45、D51、D52和D53与*Exiguobacterium sp.*亲缘关系最近(图5),表明菌株D11属于芽孢杆菌属(*Bacillus sp.*),菌株D45、D51、D53和D52属于微小杆菌属(*Exiguobacterium sp.*)。

3 讨论

在养殖池塘中,投喂的饲料、施用的有机肥料、养殖生物的排泄物和浮游动植物残体等构成了水体有

机物的主体,这些有机物在分解过程中需消耗大量的溶解氧,产生硫化氢、氨氮等有害物质,严重污染水体,易导致疾病爆发,甚至养殖生物死亡^[16]。因此,控制养殖水体的有机污染势在必行。水产养殖生态制剂因其具有分解有机物,降低氨氮和亚硝氮浓度,抑制有害微生物的繁殖,改善养殖生态环境的作用,已被广泛应用^[8-10]。本研究从罗非鱼养殖系统分离筛选了6株产酶菌株,研究了菌株对饲料的降解效果。结果显示,6株菌对饲料浸出液的有机物均有降解作用,其中以菌株D51的降解率最高,达53.49%,表明此菌株对养殖水体的高COD具有潜在去除作用。菌株D45、D11和D51对饲料原液COD的去除率达45%以上,加菌组饲料原液的干重物质与对照组相比均显著降低($P<0.05$),说明筛选菌株对饲料原液中溶

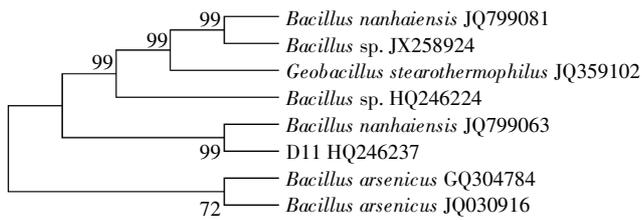


图4 基于16S rDNA序列和邻接法构建的菌株D11的系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of strain D11 based on 16S rDNA sequences and neighbor-joining analysis

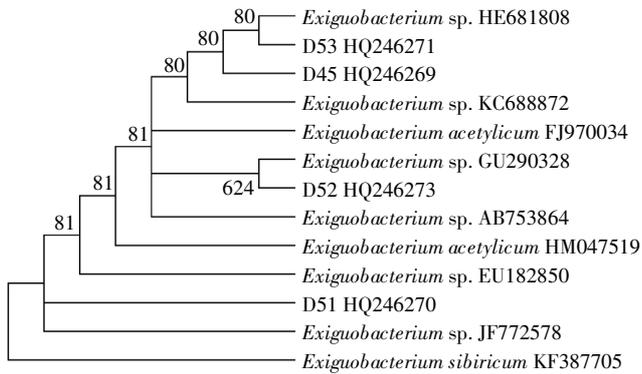


图5 基于16S rDNA序列和邻接法构建的菌株D45、D51、D52、D53的系统发育树

Figure 5 Phylogenetic tree of strains D45, D51, D52 and D53 based on 16S rDNA sequences and neighbor-joining analysis

解性的有机物和饲料粉末都有明显的降解作用,具有对养殖水体、养殖底泥和罗非鱼肠道中的饲料有机物进行降解的潜在能力。

Biolog ECO 微板用于分析异养细菌代谢活性及其对不同碳源的潜在利用能力^[15]。本研究中,以菌株D45对碳源的利用能力最强,培养168 h AWCD值可达1.29,其次为菌株D51和D11,分别为0.63和0.49,远高于笔者在大型海藻龙须菜栽培体系筛选的菌株(仅为0.25)^[12],说明从罗非鱼养殖系统筛选的酶产生菌对碳源的利用能力更强。由此可见,在不同的生境条件下,菌株的功能特性差异明显,从罗非鱼养殖系统筛选土著菌株,更有利于后续将其重新应用于养殖生态系统。在对六大类碳源的利用研究中,菌株D45、D11和D51对糖类和氨基酸的利用率高于其他几类碳源。研究表明,糖类和氨基酸是水体微生物有机质、悬浮和沉积颗粒,以及溶解有机物的重要组成成分^[17-18]。由此可见,D45、D11和D51具有较强的分解利用有机物的能力和潜力。

芽孢杆菌是一类好氧或兼性厌氧的革兰氏阳性

细菌,能分泌高活性的胞外酶,可降解养殖水体中的有机污染物,有效促进养殖环境的生态良性循环^[19]。近十几年来,以芽孢杆菌为主导菌的微生物制剂已被广泛应用于水产养殖业^[20]。本研究中,菌株D11(*Bacillus* sp.)在降解饲料浸出液、饲料原液以及利用多种类型碳源等方面都表现出较高的能力,可作为较好的益生菌菌源。微小杆菌则是一类兼性厌氧的革兰氏阳性细菌:冯旭明等^[21]报道了菌株*Exiguobacterium* sp. C2具有产低温淀粉酶特性;刘建福等^[22]选取微小杆菌、乳杆菌、棒杆菌等多种菌株,经混合培养后形成复合菌群,应用于生物反应器中,可显著提高对木薯酒精废液的COD去除率。本研究中,菌株D45、D51、D53和D52均属于微小杆菌。目前,微小杆菌作为水产养殖微生态制剂菌源暂未见报道,鉴于其对有机物具有较强的降解能力,又来源于养殖系统,可考虑将其作为应用于降解养殖池塘有机物的备选菌株,后续将开展菌株的生物安全性研究。

4 结论

(1)6株菌对饲料浸出液的有机物均有明显的降解作用。实验72 h后,菌株D51对饲料浸出液有机物的降解率最高,达53.49%,其次为菌株D11,降解率为48.83%。

(2)各菌株对饲料原液的有机物均具有明显降解作用。菌株D51、D11和D45的降解效果最好,在实验第15 d饲料原液的COD分别降低了52.46%、46.03%和46.03%,饲料干重分别减少了58.25%、53.08%和52.08%。

(3)各菌株对碳源的利用能力差异显著。菌株D45对31种碳源表现出很强的代谢活性,菌株D51和D11次之,菌株D52和D53对碳源的利用能力相对较低。

(4)经鉴定,菌株D11属于芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.),菌株D45、D51、D52和D53属于微小杆菌属(*Exiguobacterium* sp.)。

(5)鉴于菌株D11、D45和D51对有机物具有较强的降解能力,又来源于养殖系统,可将其作为降解养殖池塘有机物的备选菌株开展后续研究。

参考文献:

[1] 李 振. 水产养殖中水体污染的营养控制措施[J]. 广东饲料, 2004, 13(2):41-42.

LI Zhen. Nutrition control measures for water pollution in aquaculture

- [J]. *Guangdong Feed*, 2004, 13(2):41-42.
- [2] 刘柱岩,熊彦辉.水产养殖对水域环境的影响及其治理措施[J].安徽农业科学,2007,35(23):7258-7259.
LIU Zhu-yan, XIONG Yan-hui. Effect of aquaculture on aquatic environment and its control measures[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2007, 35(23):7258-7259.
- [3] 李树国.内陆水产养殖的水域污染及其防治对策[J].水产科学,2005,24(3):34-35.
LI Shu-guo. Water pollution and its countermeasures in inland aquaculture[J]. *Fisheries Sciences*, 2005, 24(3):34-35.
- [4] 吴伟,余晓丽,李咏梅.不同种属的微生物对养殖水体中有机物质的生物降解[J].湛江海洋大学学报,2001,21(3):67-70.
WU Wei, YU Xiao-li, LI Yong-mei. Biodegradation of different microorganisms in aquaculture on organic matter[J]. *Journal of Zhanjiang Ocean University*, 2001, 21(3):67-70.
- [5] 胡晓娟,李卓佳,曹煜成,等.强天气干扰条件下粤西凡纳滨对虾养殖池塘细菌群落动态特征[J].南方水产科学,2012,8(5):52-59.
HU Xiao-juan, LI Zhuo-jia, CAO Yu-cheng, et al. Dynamic characteristics of bacterial community in culture ponds for *Litopenaeus vannamei* in western Guangdong under influence of severe weather[J]. *South China Fisheries Science*, 2012, 8(5):52-59.
- [6] Azam F, Malfatti F. Microbial structuring of marine ecosystems[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, 5:782-791.
- [7] 袁翠霖.罗非鱼养殖系统微生物群落生态研究及潜在有益菌的筛选[D].广州:暨南大学,2011.
YUAN Cui-lin. The research on microbial community ecology and the screening of potential probiotics in tilapia culture system[D]. Guangzhou: Jinan University, 2011.
- [8] Gatesoupe F J. The use of probiotics in aquaculture[J]. *Aquaculture*, 1999, 180:147-165.
- [9] 李卓佳,周海平,杨莺莺,等.乳酸杆菌(*Lactobacillus* spp.)LH对水产养殖污染物的降解研究[J].农业环境科学学报,2008,27(1):342-349.
LI Zhuo-jia, ZHOU Hai-ping, YANG Ying-ying, et al. The Degradation of aquiculture contaminants by LH(*Lactobacillus* spp.)[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2008, 27(1):342-349.
- [10] 袁翠霖,李卓佳,杨莺莺,等.芽孢杆菌制剂对养殖前期罗非鱼池塘微生物群落代谢功能的影响[J].生态学杂志,2010,29(12):2464-2470.
YUAN Cui-lin, LI Zhuo-jia, YANG Ying-ying, et al. Effects of *Bacillus* preparation on metabolic function of microbial communities in tilapia ponds at early stock stage[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2010, 29(12):2464-2470.
- [11] 国家环保局《水和废水监测分析方法》编委会.水和废水监测分析方法[M].四版.北京:中国环境科学出版社,2002.
State Environmental Protection Administration of China. Water and waste water monitoring analytic method[M]. 4th edition. Beijing:China Environmental Science Press, 2002.
- [12] 胡晓娟.广东典型海域微生物群落特征分析[D].广州:暨南大学,2013.
HU Xiao-juan. Analysis on microbial community characteristics in the typical sea areas in Guangdong Province[D]. Guangzhou:Jinan University, 2013.
- [13] Garland J L, Mills A L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level, sole-carbon-source utilization[J]. *Applied Environment Microbiology*, 1991, 57:2351-2359.
- [14] 李卓佳,林亮,杨莺莺,等.芽孢杆菌制剂对虾池环境微生物群落的影响[J].农业环境科学学报,2007,26(3):1183-1189.
LI Zhuo-jia, LIN Liang, YANG Ying-ying, et al. Influence of *Bacillus* on the microbial communities in shrimp ponds[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(3):1183-1189.
- [15] Choi K H, Dobbs F C. Comparison of two kinds of Biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 36:203-213.
- [16] 赵永坤.淡水养殖水质调查及微生物修复养殖有机物污染的研究[D].南昌大学,2008.
ZHAO Yong-kun. Investigation on water quality of freshwater aquaculture and research in microbial remediation of the organic pollution in aquaculture[D]. Nanchang University, 2008.
- [17] Hernes P J, Hedges J I, Peterson M L, et al. Neutral carbohydrate geochemistry of particulate material in the central equatorial Pacific[J]. *Deep-Sea Research. Part II:Topical Studies in Oceanography*, 1996, 43:1181-1204.
- [18] He B, Dai M, Huang W, et al. Sources and accumulation of organic carbon in the Pearl River Estuary surface sediment as indicated by elemental, stable carbon isotopic, and carbohydrate compositions[J]. *Biogeosciences*, 2010, 7:3343-3362.
- [19] 曹煜成,李卓佳,冯娟,等.地衣芽孢杆菌胞外产物消化活性的研究[J].热带海洋学报,2006,24(6):6-12.
CAO Yu-cheng, LI Zhuo-jia, FENG Juan, et al. A study on digestive activities of extracellular products of *Bacillus Licheniformis*[J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2006, 24(6):6-12.
- [20] 梁晓华,杨莺莺,李卓佳,等.芽孢杆菌 K1 降解亚硝酸盐的特性研究[J].海洋环境科学,2008,27(3):228-230,235.
LIANG Xiao-hua, YANG Ying-ying, LI Zhuo-jia, et al. Studies on degradation of nitrite by *Bacillus* K1[J]. *Marine Environmental Science*, 2008, 27(3):228-230, 235.
- [21] 冯旭明,迟乃玉,张庆芳.低温淀粉酶菌株 C2 的分离鉴定及其产低温淀粉酶的酶学性质[J].微生物学通报,2011,38(12):1762-1767.
FENG Xu-ming, CHI Nai-yu, ZHANG Qing-fang. Screening and identification of cold-active amylase strain C2 and its amylase characterization[J]. *Microbiology China*, 2011, 38(12):1762-1767.
- [22] 刘建福,王平,李捍东,等.高效复合菌在木薯酒精废液处理中的应用研究[J].安全与环境学报,2006,6(2):45-49.
LIU Jian-fu, WANG Ping, LI Han-dong, et al. Research and application of dominant bacteria in treatment of alcohol wastewater[J]. *Journal of Safety and Environment*, 2006, 6(2):45-49.