



生态浮床池塘水体核心微生物种类及氮循环功能研究

曲疆奇, 张清靖, 俞文钰, 刘盼, 杨慕, 贾成霞, 朱华

引用本文:

曲疆奇,张清靖,俞文钰,刘盼,杨慕,贾成霞,朱华. 生态浮床池塘水体核心微生物种类及氮循环功能研究[J]. 农业资源与环境学报, 2023, 40(2): 302–313.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13254/j.jare.2022.0190>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

增氧方式对水芹菜-微生物联合作用处理冬季养殖废水的影响

刘方剑, 杨海龙, 陈晓露, 李琳秋, 周化斌

农业资源与环境学报. 2020, 37(5): 770–776 <https://doi.org/10.13254/j.jare.2019.0345>

硒对油菜根际土壤微生物的影响

程勤, 胡承孝, 明佳佳, 蔡苗苗, 刘康, 汤艳妮, 赵小虎

农业资源与环境学报. 2021, 38(1): 104–110 <https://doi.org/10.13254/j.jare.2020.0061>

施氮量对番茄根际土壤细菌群落及氮转化功能的影响

杨祺, 李洁, 李刚, 吴梦莉, 赖欣, 居学海, 张贵龙

农业资源与环境学报. 2023, 40(2): 403–411 <https://doi.org/10.13254/j.jare.2022.0207>

3种耐盐植物对滨海盐土化学性质及微生物群落结构的影响

刘雅辉, 孙建平, 马佳, 姚玉涛, 吕晶晶, 张宏伟

农业资源与环境学报. 2021, 38(1): 28–35 <https://doi.org/10.13254/j.jare.2020.0049>

深松和秸秆还田对灌耕灰钙土土壤细菌多样性和群落结构的影响

温美娟, 杨思存, 王成宝, 霍琳

农业资源与环境学报. 2023, 40(2): 423–433 <https://doi.org/10.13254/j.jare.2022.0209>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

曲疆奇, 张清靖, 俞文钰, 等. 生态浮床池塘水体核心微生物种类及氮循环功能研究[J]. 农业资源与环境学报, 2023, 40(2): 302-313.

QU J Q, ZHANG Q J, YU W Y, et al. Core microbiome and nitrogen cycling in ecological floating-bed ponds[J]. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2023, 40(2): 302-313.

生态浮床池塘水体核心微生物种类及氮循环功能研究

曲疆奇¹, 张清靖^{1*}, 俞文钰^{1,2}, 刘盼¹, 杨慕¹, 贾成霞¹, 朱华¹

(1.北京市农林科学院水产科学研究所, 渔业生物技术北京重点实验室, 北京 100068; 2.天津农学院水产学院, 天津 300392)

摘要:为探索生态浮床池塘水体微生物对氮循环的贡献及其潜在驱动机制,本研究采用16S rRNA基因扩增子测序和宏基因组测序技术联合解析有无生态浮床水体中微生物群落结构及氮循环功能差异。群落结构分析结果表明,与无浮床水体相比,浮床水体中变形菌门(Proteobacteria)微生物占主要优势。微生物群落结构发生明显改变,浮床水体中C39、甲基杆菌属(*Methylobacter*)、栖湖菌属(*Limnohabitans*)、多核杆菌属(*Polynucleobacter*)和黄杆菌属(*Flavobacterium*)的相对丰度显著增加($P<0.05$)。试验期间,浮床水体微生物Shannon多样性指数显著降低($P<0.05$),而Chao丰富度指数显著升高($P<0.05$)。甲基杆菌、热单胞菌(*Caldimonas*)和伯克氏菌(*Bulkholderia*)是浮床水体脱氮过程中关键核心微生物组。氮循环功能研究结果表明,铺设生态浮床后,浮床水体氮代谢活动能力显著增强($P<0.05$),以固氮(*nifH*、*nifD*、*nifK*)、反硝化(*narG*、*napA*、*nirS*、*norB*和*nosZ*)和异化硝酸盐还原过程(*nrfA*、*nrfH*)为主的氮循环功能基因丰度显著提高($P<0.05$)。核心微生物组促进了水体生物固氮、反硝化和异化硝酸盐还原过程,提升了养殖池塘水体氮循环的能力,显著降低了池塘水体中总氮、硝态氮和亚硝态氮含量($P<0.05$)。研究表明,生态浮床核心微生物组介导的固氮和反硝化作用是实现池塘水体氮素转化和迁移的重要途径,促进了养殖池塘水体氮循环,有利于养殖池塘生态环境保护和含氮污染物的去除。

关键词:养殖池塘;生态浮床;水体微生物;氮循环;功能

中图分类号:X714

文献标志码:A

文章编号:2095-6819(2023)02-0302-12

doi: 10.13254/j.jare.2022.0190

Core microbiome and nitrogen cycling in ecological floating-bed ponds

QU Jiangqi¹, ZHANG Qingjing^{1*}, YU Wenyu^{1,2}, LIU Pan¹, YANG Mu¹, JIA Chengxia¹, ZHU Hua¹

(1. Beijing Key Laboratory of Fishery Biotechnology, Fishery Science Institute of Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100068, China; 2. College of Fisheries, Tianjin Agricultural College, Tianjin 300392, China)

Abstract: To explore the contribution of microorganisms to the nitrogen cycle and the potential driving mechanism in ecological floating bed ponds, 16S rRNA gene amplicon sequencing and metagenomic sequencing technology were used to analyze the characteristics of microbial community structure and nitrogen cycling function. Compared with the non-floating-bed water, Proteobacteria dominated in the floating bed water microbial community. The microbial community structure changed significantly, as the relative abundances of C39, *Methylobacter*, *Limnohabitans*, *Polynucleobacter* and *Flavobacterium* in the floating bed water were significantly increased ($P<0.05$). During the experiment, microbial alpha diversity Shannon index decreased significantly ($P<0.05$). However, the Chao richness index increased significantly in the floating-bed ponds ($P<0.05$). At the genus level, *Methylobacter*, *Caldimonas*, and *Bulkholderia* were the core microbiomes in the denitrification process. Nitrogen cycling results revealed nitrogen metabolism activity significantly increased in the floating-bed ponds ($P<0.05$). The nitrogen fixation gene *nifH*, *nifD*, and *nifK*, denitrification genes *narG*, *napA*, *nirS*, *norB*, and *nosZ*, and

收稿日期:2022-04-11 录用日期:2022-05-11

作者简介:曲疆奇(1985—),男,辽宁沈阳人,硕士,副研究员,从事水产养殖环境微生物研究。E-mail:quqi20122012@163.com

*通信作者:张清靖 E-mail:zhangqjhs@126.com

基金项目:北京市农林科学院青年科研基金(QNJJ202020);国家重点研发计划项目(2020YFD0900103);现代农业产业技术体系北京市渔业创新团队项目(BAIC07-2022-06)

Project supported: Young Scientists Fund of the Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences(QNJJ202020);The National Key R&D Program(2020YFD0900103);Beijing Modern Agriculture Industrial Technology System Project(BAIC07-2022-06)

dissimilatory nitrate reduction gene *nrfA* and *nrfH* were all significantly increased in relative abundance ($P < 0.05$). The core microbiomes promoted the biological nitrogen fixation, denitrification, and dissimilatory nitrate reduction processes, improved the capacity of nitrogen cycling, and significantly reduced the contents of total nitrogen, nitrate nitrogen and nitrite nitrogen in the ecological floating-bed ponds ($P < 0.05$). Our study has shown that nitrogen fixation and denitrification mediated by the core microbiome is the important way to realize the transformation and migration of nitrogen in ecological floating bed ponds, which promotes the nitrogen cycle and is beneficial to the environment protection and nitrogen pollutants removal.

Keywords: aquaculture pond; ecological floating-bed; microbiome; nitrogen cycle; function

生态浮床(人工浮岛)因其造价成本较低、适用性广、管理维护方便等特点已成为养殖池塘水质调控设施的重要组成部分^[1]。研究表明,生态浮床不仅可以通通过浮床植物的同化作用吸收去除污水中的氮、磷等,而且可吸附水体中的悬浮物、降解有毒物质和重金属等^[2]。近年来,研究人员通过在生态浮床下方配挂生物填料等水质净化材料,不仅有效提升了生态浮床在水体中空间利用价值,而且强化了污染水体中总氮、总磷的去除效果^[3]。因此,在当前低碳经济环保力度逐步强化的背景下,应用不同形态的生态浮床技术可以有效降低养殖水环境中氮、磷污染物浓度,减少能耗,实现水产养殖业高效绿色发展。

微生物功能群在生物脱氮过程中发挥着关键的作用^[4]。目前陆地环境^[5]、河湖水环境^[6]、湿地系统^[7]和水质净化生物反应器^[8]等微生物氮循环过程得到了广泛研究。为研究微生物多样性以及群落功能对宿主的潜在影响,Shade等^[9]从四个维度(物种组成、系统发育与功能、群落结构变化和相互作用关系)提出了核心微生物组的概念,即一类显著影响宿主健康和生态系统功能的关键物种。Karl等^[10]从组成上将核心微生物组分为三类,即优势种类(相对丰度 $>10\%$)、丰富种类(相对丰度在 $3.5\% \sim 10\%$ 之间)和稀有种类(相对丰度 $<3.5\%$)。目前,核心微生物组参与浮床系统的物质循环与生物地球化学过程潜在机制尚不明晰。因此,确定生态浮床系统中核心功能微生物组成及其对微生物氮循环功能的有益贡献,将有助于深入了解生态浮床系统中核心微生物在水质净化过程中的生物脱氮机制。

微生物的各种生物地球化学循环及其自身敏感性能够对生态环境变化及时作出响应^[11]。利用16S rRNA分子的多样性或选定的功能基因生物标记物可较客观地揭示生态系统中微生物的多样性、种群结构动态变化及功能等方面的信息^[12]。因此,本研究利用16S rRNA基因扩增子测序和宏基因组测序(Metagenomics sequencing)对比研究有无生态浮床水

体微生物的多样性、群落结构及代谢功能差异,试图确定在生态浮床系统氮循环中起重要作用的功能基因及其关键核心微生物类群,揭示生态浮床水体氮循环核心微生物及其潜在生物脱氮机制,旨在为今后生态浮床原位修复水体污染提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料与样本采集

试验于2021年5—8月在北京市农林科学院水产科学研究所示范基地养殖尾水净化池塘(长 \times 宽 \times 深=60 m \times 50 m \times 2 m)进行。试验选用的生态浮床和水生植物均购自河北廊坊莲韵苑水环境景观有限公司。如图1所示,在养殖尾水池塘中铺设总面积为250 m²的生态浮床,浮床上栽种黄花鸢尾(*Iris wilsonii* C. H. Wright)和千屈菜(*Lythrum salicaria* L.)等水生植物,栽种密度为16株 \cdot m⁻²。待水生植物生长稳定后,将池塘用不透水围隔切割成有生态浮床和无生态浮床两块区域,有浮床组标记为T组,无浮床组标记为C组,试验期间保持池塘管理一致。每月分别采集两个



图1 生态浮床养殖池塘尾水处理系统

Figure 1 The ecological floating-bed systems for aquaculture tailwater treatment

区域的前、中、后水体样本各 500 mL, 作为一组重复样本, 试验期间共采集 24 个样本, 经过滤除杂后用于微生物 DNA 提取。现场使用英国 Aquaread AP-700 多参数便携式水质分析仪测定水温 (Water Temperature, WT)、溶解氧 (Dissolved Oxygen, DO)、pH 值和总固体悬浮物 (Total Dissolved Solids, TDS) 等水质指标。取等量的 500 mL 水样带回实验室, 参照《水和废水监测分析方法》^[13] 测定总氮 (Total Nitrogen, TN)、氨氮 (Ammonia Nitrogen, NH_4^+-N)、硝态氮 (Nitrate Nitrogen, NO_3^--N) 和亚硝态氮 (Nitrite Nitrogen, NO_2^--N) 等水化指标。

1.2 微生物 DNA 提取和宏基因组测序分析

使用 FastDNA™ Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, 美国) 提取水体样本微生物 DNA, 待所有样本 DNA 浓度和纯度检验合格后, 用干冰保存寄送至上海美吉生物医药科技有限公司进行 16S rRNA 基因扩增子高通量测序和宏基因组测序。基于 Illumina Miseq PE 300 高通量测序技术对微生物群落结构和多样性特征进行研究。同时, 利用 NEXTflex™ Rapid DNA-Seq (Bioo Scientific, 美国) 构建 PE 文库, 使用 Hiseq Xten (Illumina, 美国) 进行宏基因组测序、拼接、构建非冗余基因集, 对得到的基因进行 NR (Amino acid sequence of non-redundant protein) 物种注释和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 功能注释等, 并筛选与氮循环代谢相关的基因类群及其相对丰度信息。

1.3 统计与分析

使用 Excel 2007 和上海美吉生物云平台对试验数据进行数据处理和作图。参考 Zhao 等^[14] 的方法, 对微生物氮循环及其功能基因差异倍数进行分析, 并采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 检验分析不同

氮循环所有功能基因拷贝数的差异, 其中 * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$, *** 表示 $P < 0.001$ 。

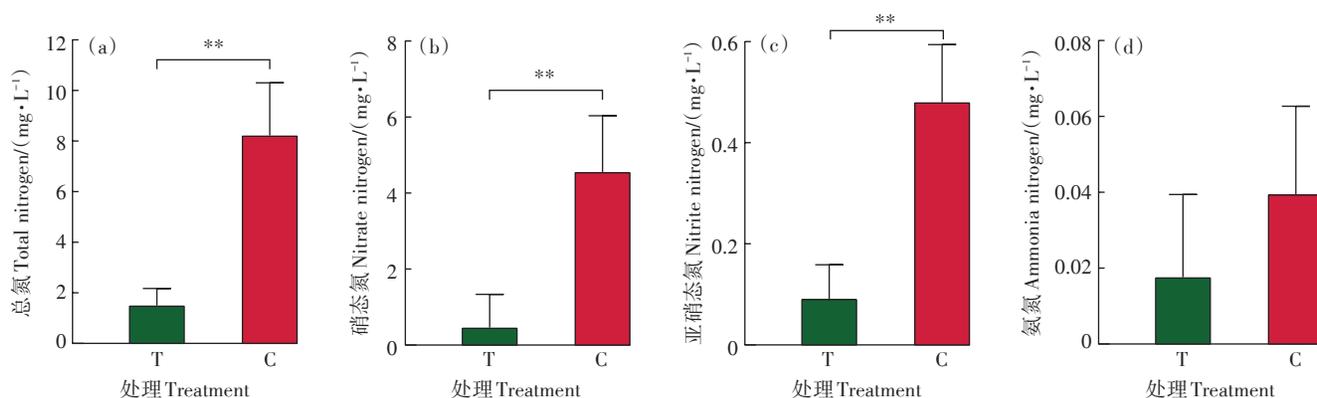
2 结果与分析

2.1 水质变化特征

试验期间, 浮床水体 (T 组) 的温度为 $(24.50 \pm 2.81) ^\circ\text{C}$ 、溶解氧浓度为 $(5.60 \pm 2.13) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、总固体悬浮物浓度为 $(327.00 \pm 18.12) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 值为 7.70 ± 0.27 ; 而无浮床水体 (C 组) 的温度、溶解氧、总固体悬浮物浓度、pH 值分别为 $(24.20 \pm 2.19) ^\circ\text{C}$ 、 $(5.60 \pm 0.43) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $(397.00 \pm 42.88) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 7.70 ± 0.59 , 上述各常规水质指标在两组中无显著性差异 ($P > 0.05$)。如图 2a~图 2c 所示, 浮床组总氮、硝态氮和亚硝态氮含量极显著低于无浮床组 ($P < 0.01$), 同时氨氮也有明显下降趋势 (图 2d), 说明铺设生态浮床可以有效去除水体含氮污染物。

2.2 微生物多样性和群落结构差异特征

本研究通过 16S rDNA 高通量测序共获得 1 089 110 条有效 16S rRNA 基因序列, 序列划分为 9 965 个 OTUs, 基于物种 OTUs 相对丰度分析了微生物 α 多样性和 β 多样性特征, 结果如图 3a~图 3c 所示。与无浮床水体相比, 浮床水体中微生物 α 多样性 Shannon 指数显著降低 ($P < 0.05$), 而 Chao 丰富度指数显著升高 ($P < 0.05$)。 β 多样性主坐标分析 (PCoA, Principal Coordinates Analysis) 结果表明, 浮床水体与无浮床水体微生物群落结构存在显著差异 ($P = 0.001$), 但组内月份间的样品分别聚集在各自的置信圈内, 说明组内的这些样本差异性小, 具有较高相似性。如图 3d 所示, 在门水平上, 变形菌门 (Proteobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria) 和蓝细菌门 (Cyanobacteria) 是池塘水



*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$, ***表示 $P < 0.001$ 。下同。
*indicate $P < 0.05$, **indicate $P < 0.01$, ***indicate $P < 0.001$. The same below.

图2 池塘水体化学特征

Figure 2 The nutrients' concentrations in the ponds

体中主要菌群(相对丰度>5%),但变形菌门在浮床水体中占绝对优势(相对丰度>60%),且相对丰度显著高于无浮床的池塘水体($P<0.01$);而在无浮床水体中,放线菌门和蓝细菌门的相对丰度较高,且放线菌门相对丰度显著高于有浮床水体($P<0.05$)。上述结果表明,浮床水体中变形菌门是绝对的优势门类,这可能是造成水体微生物多样性降低的原因,但生态浮床的水质调控作用明显增加了微生物的丰富度,且对蓝细菌有一定的抑制作用。如图3e所示,排名前10的优势属中,浮床水体中的C39、*Methylobacter*(甲基杆菌)、*Limnohabitans*(栖湖菌)、*Polynucleobacter*(多核杆菌)和*Flavobacterium*(黄杆菌)的相对丰度显著高于无浮床水体($P<0.01$)。

2.3 微生物代谢功能及其氮代谢关键酶的差异特征

本研究在KEGG level 3层级上,对相对丰度>1%的主要代谢功能通路进行差异性分析。结果(图4)显示,与无浮床水体相比,浮床水体微生物主要在氮代谢(Nitrogen metabolism)途径上与之有显著差异

($P<0.01$)。由此可见,配置生态浮床可以显著增强水体中的氮循环相关代谢能力。除氮代谢外,精氨酸生物合成(Arginine biosynthesis)、乙醛酸和二羧酸代谢(Glyoxylate and dicarboxylate metabolism)、谷氨酸能系统(Glutamatergic synapse)、 γ -氨基丁酸能系统(GABAergic synapse)等生理功能在无浮床水体中所占相对丰度明显高于浮床水体($P<0.05$)。针对氮代谢通路进一步分析氮循环关键酶差异特征,结果如图5所示。与无浮床水体相比,浮床水体氮代谢途径中的钼铁固氮酶(Nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain, EC: 1.18.6.1)、同化型亚硝酸还原酶(Nitrite reductase (NADH) large subunit, EC: 1.7.1.15)、硝酸盐还原酶(Nitrate reductase, EC: 1.7.5.1)和一氧化氮还原酶(Nitric oxide reductase subunit B, EC: 1.7.2.5)等关键酶信号强度显著提升($P<0.05$)。由此可见,浮床水体微生物在氮固定、同化/异化硝酸盐还原和反硝化作用等氮循环过程发挥了重要的作用。

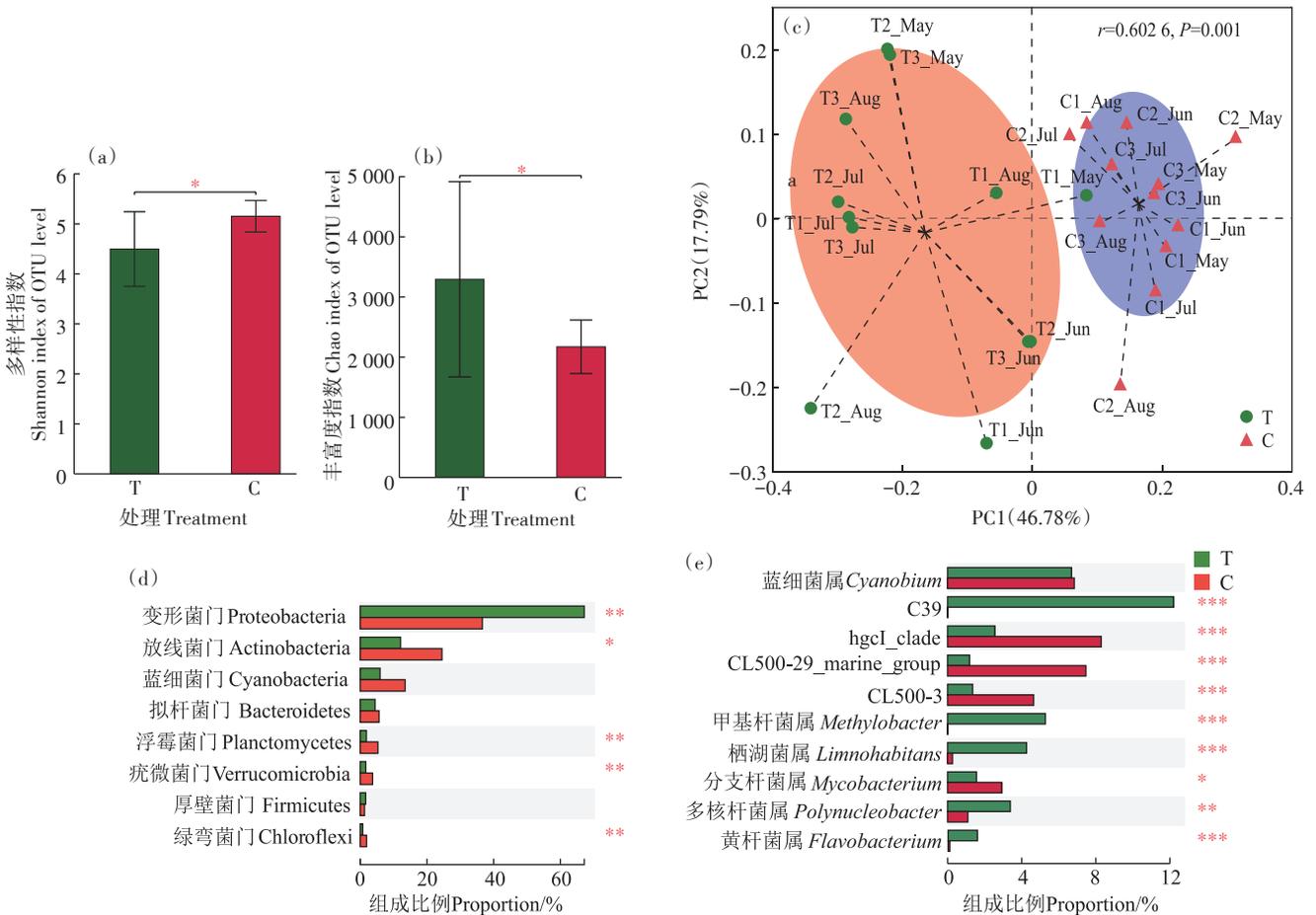


图3 微生物多样性及群落结构差异特征

Figure 3 Differences in microbial diversity and community structure

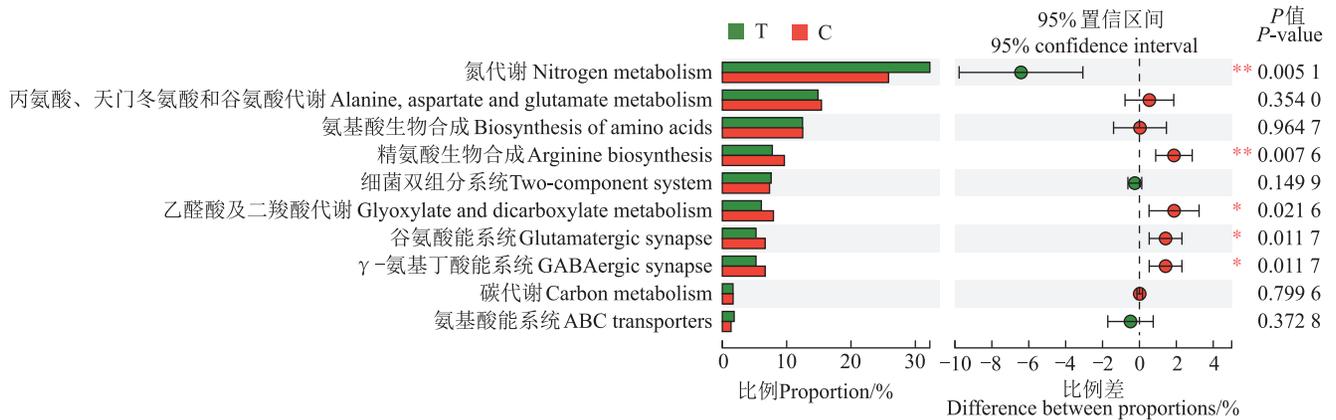


图4 微生物代谢功能差异特征

Figure 4 Differential characteristics of microbial metabolic functions

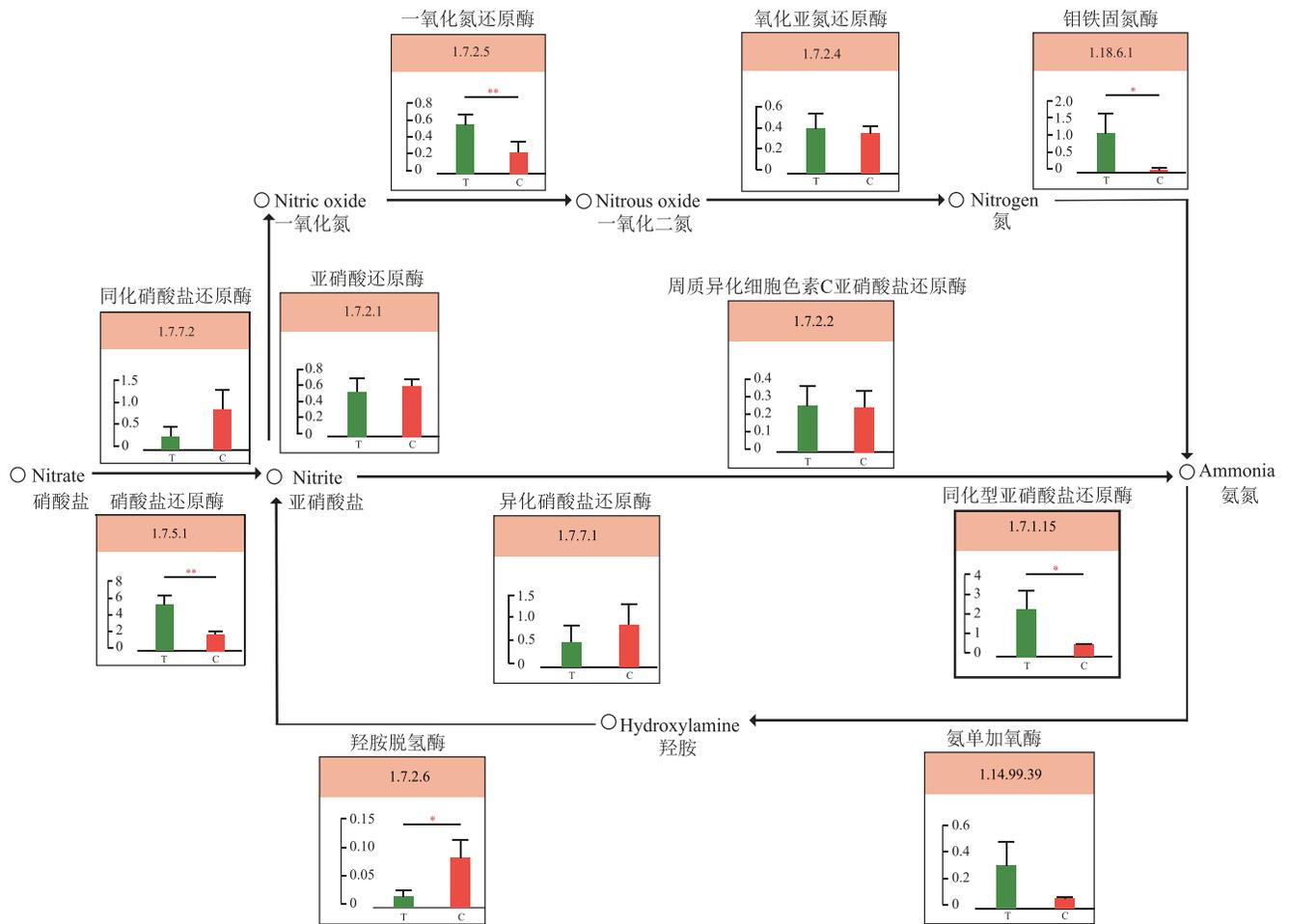


图5 微生物氮代谢通路主要关键酶差异特征(信号强度)

Figure 5 Differential characteristics(signal strength) of main key enzymes in microbial nitrogen metabolism pathways

2.4 微生物氮循环过程及其主要功能基因

如图6所示,池塘水体微生物参与的氮循环过程主要包括氮固定、硝化作用、反硝化作用以及异化硝酸盐和同化硝酸盐还原作用等5种途径。其中,与无

浮床水体相比,生态浮床池塘水体氮固定、硝化作用、反硝化作用和异化硝酸盐还原作用等氮循环途径发生显著变化($P < 0.05$)。同时,参与氮循环的功能基因丰度也发生明显变化,如参与硝化作用的 *amoA* 基因

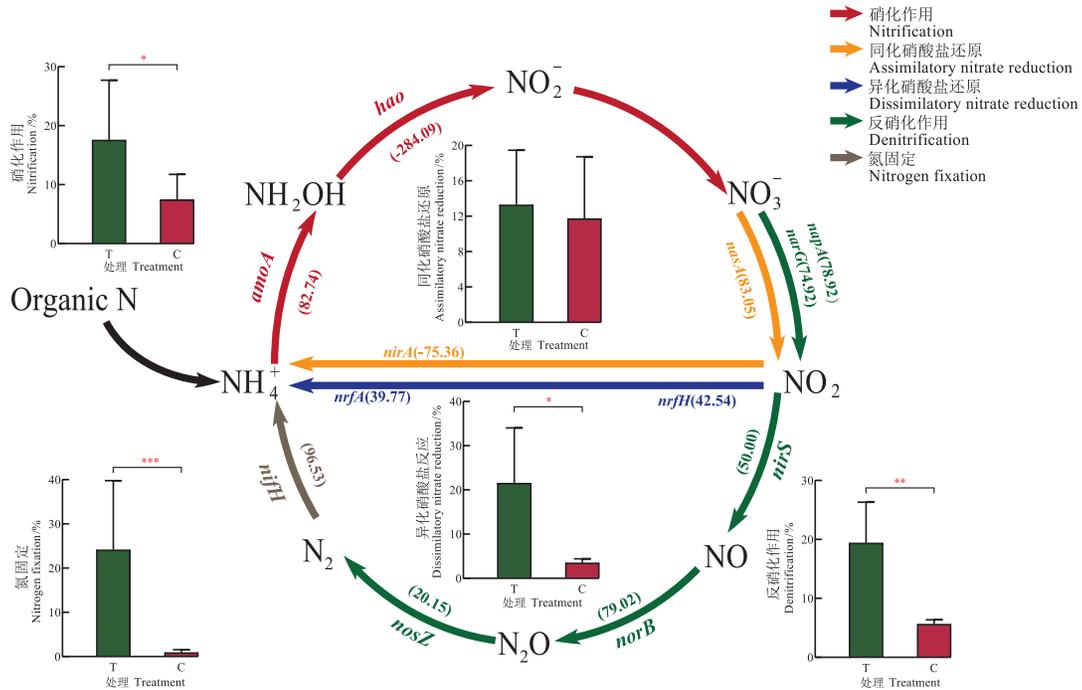


图6 池塘水体微生物参与的主要氮循环过程
Figure 6 Major microbial nitrogen cycling in the pond

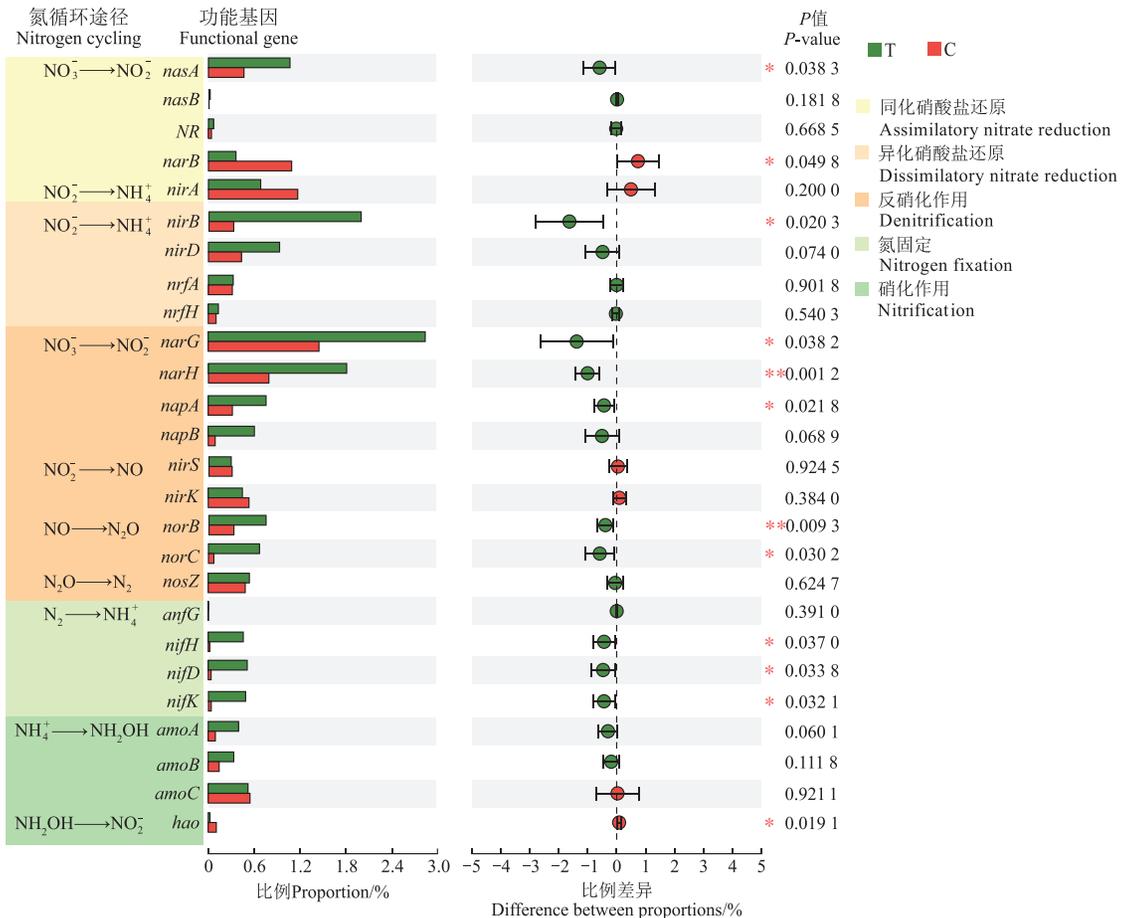


图7 微生物氮循环功能基因差异特征
Figure 7 Differential characteristics of microbial nitrogen cycle functional gene

丰度增加了0.8倍。如图7所示,在所有参与氮循环的功能基因中,共检测到12个氮循环功能基因在有浮床水体中存在显著性差异($P<0.05$)。其中,浮床水体中有10个功能基因相对丰度显著高于无浮床水体($P<0.05$),主要包括氮固定功能基因 *nifH*、*nifD* 和 *nifK*,反硝化作用和异化硝酸盐还原作用的 *narG*、*narH*、*napA*、*norB*、*norC* 和 *nirB* 基因以及同化硝酸盐还

原功能基因 *nasA* 和 *narB*。而硝化作用 *hao* 功能基因在无浮床水体中相对丰度较高($P<0.05$)。

2.5 氮循环途径核心微生物组及其与功能基因、水质的关系

分析物种对氮循环功能的贡献度可以确定浮床水体参与氮循环途径的核心微生物组。如图8a所示,在属水平上共筛选出11种核心微生物分别在氮

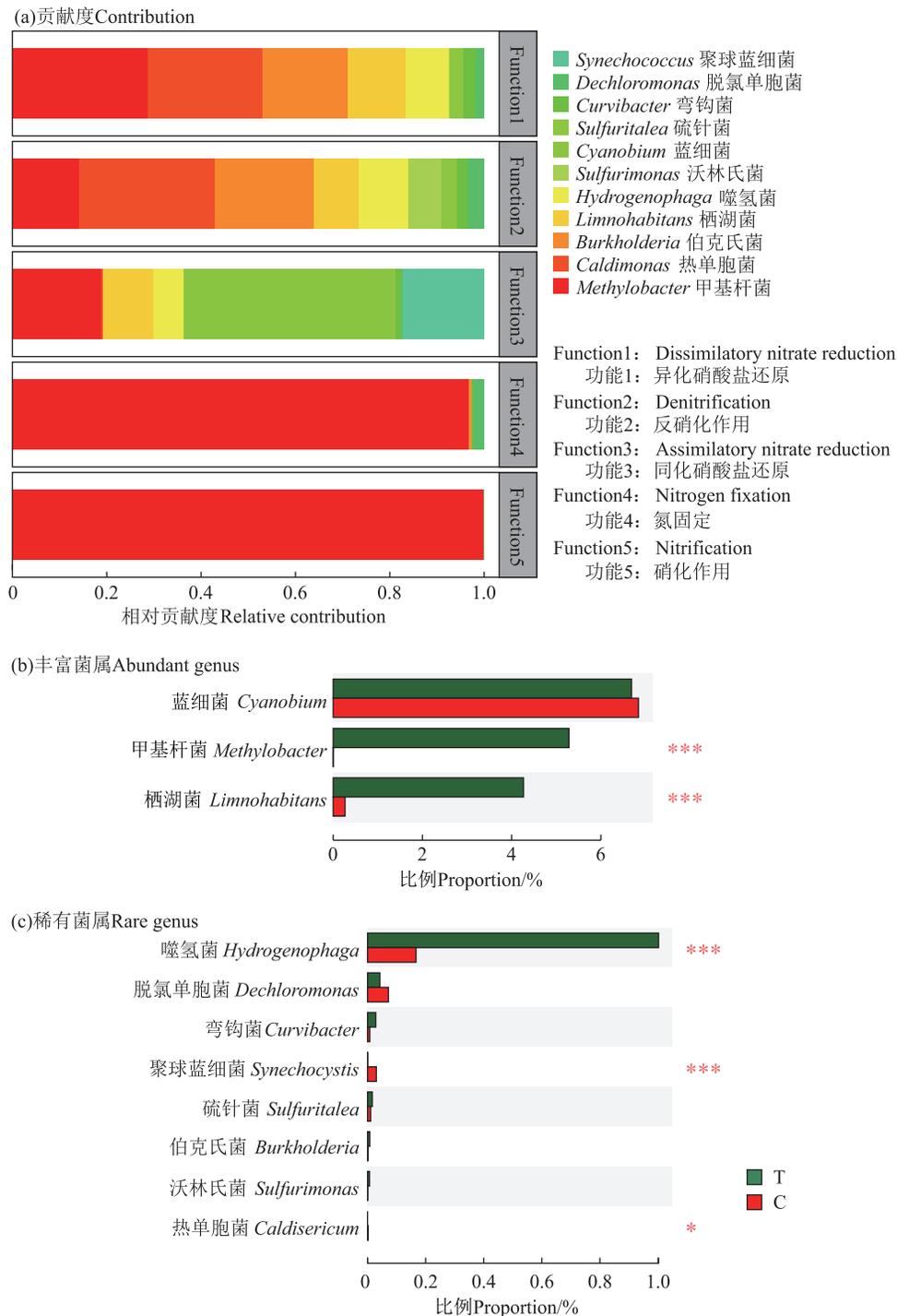


图8 浮床水体参与氮循环途径的核心微生物组

Figure 8 Core microbes involved in nitrogen cycle pathway in the floating bed water

固定、硝化作用、反硝化作用、异化硝酸盐和同化硝酸盐还原作用途径发挥主要作用。甲基杆菌属(*Methylobacter*)在氮固定和硝化作用中贡献比例最高。有9种微生物参与了反硝化作用途径,其中热单胞菌(*Caldimonas*)和伯克氏菌(*Burkholderia*)贡献比例较大。参与异化硝酸盐还原作用的核心微生物为甲基杆菌(*Methylobacter*)、热单胞菌(*Caldimonas*)和伯克氏菌(*Burkholderia*);参与同化硝酸盐还原作用的核心微生物主要为蓝细菌(*Cyanobium*)和聚球蓝细菌(*Synechococcus*)。此外,16S rRNA高通量测序结果(图8b、图8c)显示,*Cyanobium*、*Methylobacter*和*Limnohabitans*为丰富菌属,而其他均为稀有菌属。从氮循环功能基因与核心微生物相关性热图结果(图9)可以看出,硝化作用功能基因*amoA*和*amoB*与甲基杆菌(*Methylobacter*)呈显著正相关;反硝化作用和异化硝酸盐还原作用功能基因*narG*、*nirS*、*nrfA*、*nrfH*与热单胞菌(*Caldimonas*)和硫杆菌(*Sulfuritalea*)呈显著正相关;同化硝酸盐还原作用功能基因*narB*和*nirA*与蓝细菌(*Cyanobium*)和聚球蓝细菌(*Synechococcus*)呈

显著正相关,但与弯钩菌(*Curvibacter*)呈极显著负相关。从核心微生物与水质相关性热图结果(图10)可以看出,这些核心微生物组与总氮、硝态氮、亚硝态氮和氨氮呈显著负相关。上述结果表明核心微生物组在水体含氮污染物去除中发挥了明显作用,促进了水体氮素循环。

3 讨论

3.1 生态浮床对池塘水体微生物群落组成与多样性的影响

随着水产养殖业规模化、集约化发展,排放到周围自然水体中的养殖尾水往往富含有机和无机营养物质,因此会扰乱水生生态系统的自然平衡,导致自然水体环境不断恶化^[15]。实践证明,利用生态浮床原位修复技术可以去除水中氮和其他营养物质以减缓富营养化进程^[16]。本研究结果表明,铺设生态浮床后池塘水体微生物多样性和群落结构发生明显变化(图3),微生物物种丰富度显著增加(图3b),变形菌门相对丰度占绝对优势(图3d)。Deng等^[17]的研究结果表

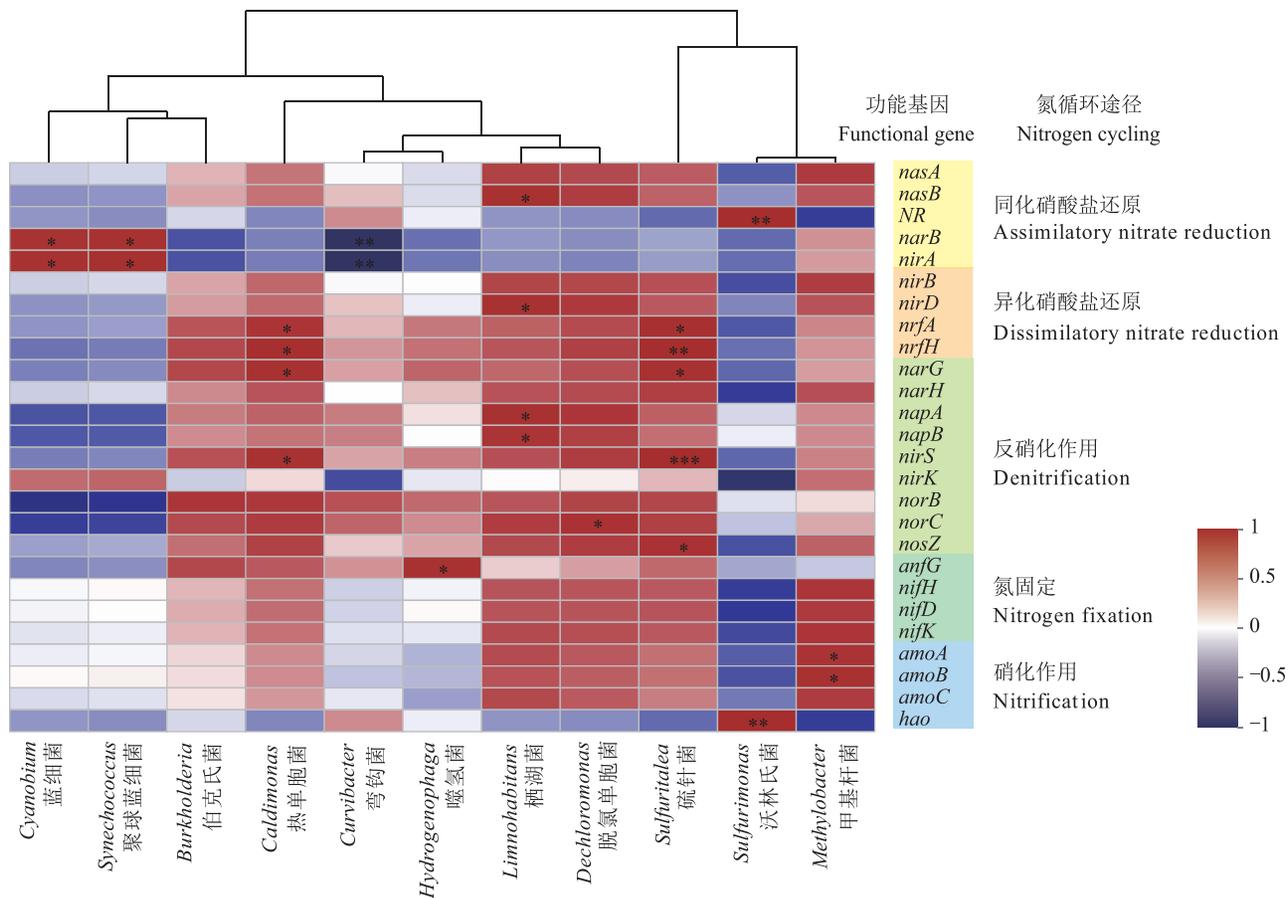


图9 氮循环功能基因与核心微生物相关性热图

Figure 9 Spearman correlation heatmap between the nitrogen cycling genes and core microorganisms

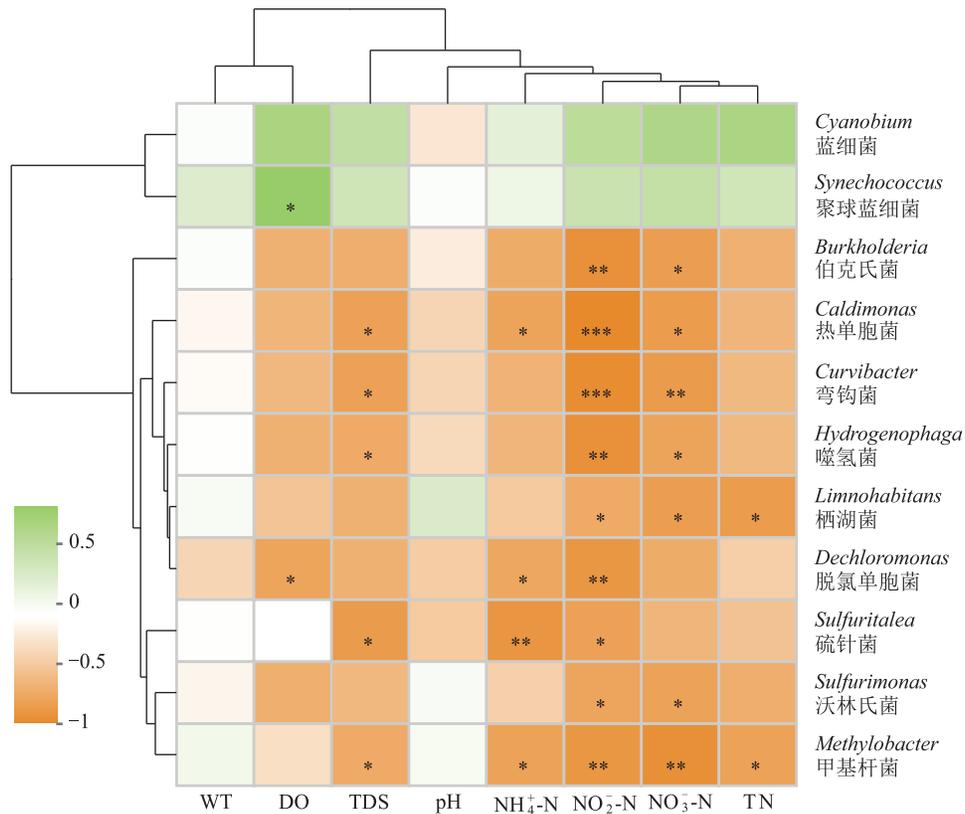


图 10 核心微生物组与水质相关性热图

Figure 10 Spearman correlation heatmap between the core microbes and water quality

明,在典型的草鱼养殖池塘里水体中微生物以变形菌门、放线菌门和蓝细菌门为优势门类,这一结果与本研究一致。变形菌门是地球上最主要的微生物种类,具有丰富的生态功能,能够通过介导氢氧化、甲烷氧化、反硝化作用和硫酸盐还原等作用驱动氮、碳、硫等物质循环^[18]。变形菌门对废水中固体悬浮物、总有机碳和氨氮等污染物具有较好的去除能力^[19],且在人工湿地中变形菌门微生物丰度显著高于自然湿地^[7]。放线菌门是微食物网营养和能量流动的重要参与者^[20]。研究发现,放线菌门是富营养化浅水湖泊中的优势菌群^[21]。养殖池塘中富含有机物和营养物质(如氮和磷),可为放线菌门和蓝细菌门增殖提供物质基础^[22]。本研究中,试验期间浮床水体放线菌门和蓝细菌门丰度有所降低(图 3d),说明生态浮床吸收了水体中的营养物质,对这些微生物群落增殖产生影响,起到了水质调控作用。在属水平上,铺设生态浮床后池塘水体中放线菌门的 C39 菌相对丰度显著增加(图 3e)。研究发现,C39 是浮萍载体生物膜污水处理系统中去除含氮污染物的主要功能菌属之一^[23]。值得注意的是,核心微生物组中不占主导地位稀有种类

在浮床水体反硝化作用过程中发挥了重要的作用(图 8、图 10)。

3.2 生态浮床对池塘水体微生物氮循环功能的影响

3.2.1 对固氮作用的影响

微生物是驱动自然环境中氮循环过程的重要引擎。本研究结果表明生态浮床水体中微生物氮代谢活动明显增强(图 4)。从图 5 生态浮床水体氮代谢通路图可以看出,固氮途径上钼铁固氮酶起到了关键作用。氮还原为氨是一个复杂的过程,是由复合金属酶的固氮酶催化的。固氮酶由铁蛋白(Fe-protein)和铁钼蛋白(Fe-Mo protein)组成^[24]。在活性位点金属簇(铁钼辅助因子)环境中,将金属簇的铁前体转化为成熟的金属簇后传递到 *nifDK* 中的目标位置^[25]。而钼铁固氮酶是一种不稳定的金属酶,由 *nifDK* 和 *nifH* 蛋白组成,其生物合成需要许多 *nif* 基因产物。活性 *nifDK* 的表达需要 *nifH*、*nifD*、*nifK* 等功能基因产物,其中 *nifH* 被广泛用于检测环境样本中固氮微生物多样性^[26]。如图 6 和图 7 所示,铺设浮床后浮床水体固氮能力显著提升 ($P < 0.001$),固氮功能基因 *nifH*、*nifD*、*nifK* 相对丰度

显著高于无浮床水体($P<0.05$),说明铺设生态浮床可以显著提高水体生物固氮能力。本研究结果表明,甲基杆菌(*Methylobacter*)与*nifH*、*nifD*、*nifK*相对丰度呈强正相关性(图9),是浮床水体生物固氮的主要贡献者(图8)。*Methylobacter vinelandii*、*Methylobacter chroococcum*、*Methylobacter bovis*、*Methylobacter marinus*等菌株中均可检测到高度保守的*nif*基因序列,说明甲基杆菌具有固氮潜力^[27]。

3.2.2 对硝化作用的影响

鱼类排泄物和饵料残渣使得养殖水体氨氮、亚硝酸盐和硝酸盐等含氮化合物浓度不断累积导致水质恶化,产生的毒性效应会损害鱼类机体的生理机能^[28]。微生物的硝化作用是去除水体中氨氮的重要途径,限速步骤氨氧化作用是硝化作用的第一步。从图5可以看出,氨在氨单加氧酶作用下氧化为羟胺。氨单加氧酶由*amoA*、*amoB*和*amoC*多肽亚基组成,其中*amoA*具有较强的保守性,常被用来检测氨氧化微生物的群落组成、分布及活性特征^[29]。本研究结果表明,与无浮床水体相比,浮床水体硝化作用功能基因*amoA*相对丰度增加了0.8倍,说明铺设生态浮床提升了水体硝化作用的潜力。据图8和图9可知,生态浮床水体中甲基杆菌(*Methylobacter*)是硝化作用的主要贡献者,且与功能基因*amoA*和*amoB*丰度呈显著正相关。研究发现,利用甲基杆菌参与甲烷氧化与硝化结合的脱氮途径,并通过结合氨氧化可开发出应用于废水氮去除的AME-D工艺^[30]。

3.2.3 对反硝化、异化/同化硝酸盐还原作用的影响

反硝化和异化硝酸盐还原作用均可还原硝酸盐氮,是废水处理中生物脱氮的关键途径^[31]。本研究结果显示,甲基杆菌是反硝化和异化硝酸盐还原作用的主要贡献者(图8a),且与浮床水体中总氮、氨氮、硝态氮和亚硝态氮含量呈显著负相关(图10)。研究发现,甲基杆菌基因组含有硝酸盐(*narG*)、亚硝酸盐(*nirK*)和一氧化氮(*norB*)等关键功能基因,能够将甲烷氧化与硝酸盐还原相结合^[32]。因此,甲基杆菌在浮床水体生物脱氮过程中发挥着重要的作用。此外,核心微生物组中热单胞菌(*Caldimonas*)和伯克氏菌(*Bulkkholderia*)也是参与反硝化和异化硝酸盐还原作用的重要菌属(图8a),均与氨氮、硝态氮和亚硝态氮含量呈显著负相关(图10)。研究证实,*Caldimonas*属微生物与焦化废水处理系统中芳香烃降解、硝化和反硝化过程相关^[33]。伯克氏菌(*Bulkkholderia*)是一种重要的除氮特效菌,部分具有聚磷作用,可氧化分解

多糖、双糖、单糖,并可作为唯一碳源,具有较强的反硝化生物脱氮能力^[34]。研究发现,*narI/JHG*、*aniA*及*petABC*是控制伯克氏菌反硝化作用的重要功能基因^[35]。此外,功能基因*nrfA*是造成异化硝酸盐还原途径差异的关键生物因子,也是废水处理中维持厌氧氨氧化过程从而强化脱氮的关键步骤^[36]。据图9可知,硫杆菌(*Sulfuritalea*)与功能基因*nirS*、*nrfA*和*nrfH*相对丰度呈显著正相关。研究表明,亚硝酸盐还原酶*nrfAH*在硫酸盐还原菌中普遍存在,能够利用多种无机电子供体还原硫化化合物和氢气驱动完全脱氮过程^[37]。

与异化硝酸盐还原不同,同化硝酸盐还原是在有氧环境下利用硝酸盐作为氮源并将其合成有机氮的过程^[6]。本研究结果显示,无浮床水体中富集了较多*nasB*和*nirA*类型细菌(图7)。物种对功能贡献度结果(图8a)表明,蓝细菌(*Cyanobium*)和聚球蓝细菌(*Synechococcus*)是同化硝酸盐还原作用的主要贡献者,且与功能基因*narB*和*nirA*显著相关(图9)。研究发现,硝酸盐同化细菌(NAB)广泛分布于海洋表层、深海和沉积物中,在氮循环中起着重要作用^[38]。蓝细菌中的硝酸盐同化基因通常会形成一个*nir*(亚硝酸盐还原酶)-通透酶基因-*narB*(硝酸盐还原酶)操纵子的结构。硝酸盐通过硝酸盐(*narB*)和亚硝酸盐还原酶(*nirA*),并由*ntcA*和*ntcB*基因调控参与氮同化途径或异囊分化^[39]。

综上,本研究推测的生态浮床水体微生物氮循环潜在机制如图11所示。与无浮床相比,铺设生态浮床能够促进水体氮素循环,显著提升水体自身的固氮和反硝化能力,并可通过功能微生物的反硝化和异化硝酸盐还原途径实现对含氮污染物的去除。

4 结论

(1)本研究采用高通量测序的方法研究了有无生态浮床养殖池塘水体微生物群落结构,发现养殖水体主要由变形菌门、放线菌门和蓝细菌门组成。其中浮床水体中变形菌门占绝对优势,而无浮床水体中以放线菌门和蓝细菌门为主。浮床水体丰富度指数较高,群落组成结构发生明显变化。

(2)宏基因组功能分析结果表明,铺设生态浮床后,水体具有更强的氮循环能力,核心微生物组促进了浮床水体固氮、硝化、反硝化和异化硝酸盐还原作用过程,有利于池塘水体氮素迁移转化和含氮污染物的去除,可明显改善养殖池塘水体环境。

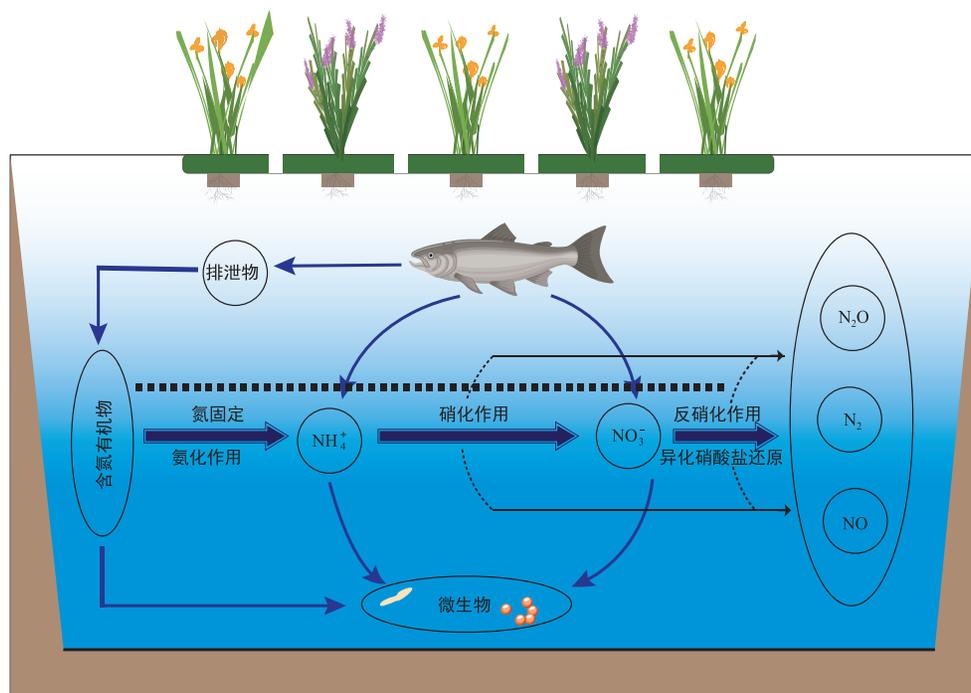


图 11 生态浮床池塘水体微生物氮循环潜在机制

Figure 11 Potential mechanism of microbial nitrogen cycle in the ecological floating-bed ponds

参考文献:

[1] 胥丁文, 陈玲娜, 马前. 生态浮床技术的应用及研究新进展[J]. 中国给水排水, 2010, 26(14): 11-15. XU D W, CHEN L N, MA Q. Application and new research progress of ecological floating bed technology[J]. *China Water & Wastewater*, 2010, 26(14): 11-15.

[2] 张莹琦, 贺菊花, 程刚. 生态浮岛技术用于河湖污染修复进展研究[J]. 环境科学与管理, 2015, 40(6): 138-142. ZHANG Y Q, HE J H, CHENG G. Application of ecological floating island technology in lake systems remediation[J]. *Environmental Science and Management*, 2015, 40(6): 138-142.

[3] 崔贺, 张欣, 董磊. 生态浮床技术流域水环境治理中的研究与应用进展[J]. 净水技术, 2021, 40(S1): 343-350. CUI H, ZHANG X, DONG L. Research and application progress of ecological floating bed technology in river basin water environment treatment[J]. *Water Purification Technology*, 2021, 40(S1): 343-350.

[4] 王彤, 汪涵, 周明达, 等. 污水脱氮功能微生物的组学研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, 48(12): 4844-4870. WANG T, WANG H, ZHOU M D, et al. Advances in omics of functional microorganisms for nitrogen removal in wastewater[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(12): 4844-4870.

[5] 祝贵兵. 陆地和淡水生态系统新型微生物氮循环研究进展[J]. 微生物学报, 2020, 60(9): 1972-1984. ZHU G B. Microorganisms and their involvement in element cycling in oceans, lakes and wet lands[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(9): 1972-1984.

[6] 陶怡乐, 温东辉. 细菌硝酸盐异化还原成铵过程及其在河口生态系统中的潜在地位与影响[J]. 微生物学通报, 2016, 43(1): 172-181. TAO Y L, WEN D H. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium: The potential and impacts in estuarine regions[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(1): 172-181.

[7] ANSOLA G, ARROYO P, DE MIERA L E S. Characterisation of the soil bacterial community structure and composition of natural and constructed wetlands[J]. *Science of the Total Environment*, 2014, 473/474: 63-71.

[8] TANIKAWA D, NAKAMURA Y, TOKUZAWA H, et al. Effluent treatment in an aquaponics-based closed aquaculture system with single-stage nitrification-denitrification using a down-flow hanging sponge reactor[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2018, 132: 268-273.

[9] SHADE A, HANDELSMAN J. Beyond the Venn diagram: The hunt for a core microbiome[J]. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(1): 4-12.

[10] KARL U, JOHN S G. Lognormal distributions and the concept of community equilibrium[J]. *Oikos*, 1982, 39(2): 171-178.

[11] 房平, 李雨娥, 魏东洋, 等. 污水处理过程中微生物群落多样性及其对环境因子响应的研究进展[J]. 微生物学通报, 2020, 47(9): 3004-3020. FANG P, LI Y E, WEI D Y, et al. Microbial community diversity and its response to environmental factors during sewage treatment[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(9): 3004-3020.

[12] 张军毅, 朱冰川, 徐超, 等. 基于分子标记的宏基因组 16S rRNA 基因高变区选择策略[J]. 应用生态学报, 2015, 26(11): 3545-3553. ZHANG J Y, ZHU B C, XU C, et al. Strategy of selecting 16S rRNA hypervariable regions for metagenome-phylogenetic marker genes based analysis[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2015, 26(11): 3545-3553.

[13] 国家环境保护总局. 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: 243-284. State Environmental Protection Administration. Methods for monitoring and analysis of water and

- wastewater[M]. 4th Edition. Beijing: China Environmental Science Press, 2002:243-284.
- [14] ZHAO M, XUE K, WANG F, et al. Microbial mediation of biogeochemical cycles revealed by simulation of global changes with soil transplant and cropping[J]. *The ISME Journal*, 2014, 8(10):2045-2055.
- [15] TURCIOS A E, PAPENBROCK J. Sustainable treatment of aquaculture effluents: What can we learn from the past for the future?[J]. *Sustainability*, 2014, 6(2):836-856.
- [16] CHÁVEZ-CROOKER P, OBREQUE-CONTRERAS J. Bioremediation of aquaculture wastes[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2010, 21(3):313-317.
- [17] DENG M, HOU J, SONG K, et al. Community metagenomic assembly reveals microbes that contribute to the vertical stratification of nitrogen cycling in an aquaculture pond[J]. *Aquaculture*, 2020, 520:1-10.
- [18] ZHOU Z C, TRAN P Q, KIEFT K, et al. Genome diversification in globally distributed novel marine Proteobacteria is linked to environmental adaptation[J]. *The ISME Journal*, 2020, 14(8):2060-2077.
- [19] LI W, LIU M, SIDDIQUE M S, et al. Contribution of bacterial extracellular polymeric substances (EPS) in surface water purification[J]. *Environmental Pollution*, 2021, 280:116998.
- [20] PARVEEN B, REVEILLIEZ J P, MARY I, et al. Diversity and dynamics of free-living and particle-associated *Betaproteobacteria* and *Actinobacteria* in relation to phytoplankton and zooplankton communities [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2011, 77(3):461-476.
- [21] VAN DER GUCHT K, VANDEKERCKHOVE T, VLOEMANS N, et al. Characterization of bacterial communities in four freshwater lakes differing in nutrient load and food web structure[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 53(2):205-220.
- [22] ALONSO-RODRÍGUEZ R, PÁEZ-OSUNA F. Nutrients, phytoplankton and harmful algal blooms in shrimp ponds: A review with special reference to the situation in the Gulf of California[J]. *Aquaculture*, 2003, 219(1):317-336.
- [23] CHEN G, HUANG J, FANG Y, et al. Microbial community succession and pollutants removal of a novel carriers enhanced duckweed treatment system for rural wastewater in Dianchi Lake basin[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 276:8-17.
- [24] KEABLE S M, VERTEMARA J, ZADVORNY O A, et al. Structural characterization of the nitrogenase molybdenum-iron protein with the substrate acetylene trapped near the active site[J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2018, 180:129-134.
- [25] KAISER J T, HU Y L, WIIG J A, et al. Structure of precursor-bound NifEN: A nitrogenase FeMo cofactor maturase/insertase[J]. *Science*, 2011, 331(6013):91-94.
- [26] CURATTI L, RUBIO L M. Challenges to develop nitrogen-fixing cereals by direct *nif*-gene transfer[J]. *Plant Science*, 2014, 225:130-137.
- [27] MO Y, QI X E, LI A, et al. Active methanotrophs in suboxic alpine swamp soils of the Qinghai-Tibetan Plateau[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11:580866.
- [28] ROBLES-PORCHAS G R, GOLLAS-GALVÁN T, MARTÍNEZ-PORCHAS M, et al. The nitrification process for nitrogen removal in biofloc system aquaculture[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2020, 12(4):2228-2249.
- [29] 刘晶静, 吴伟祥, 丁颖, 等. 氨氧化古菌及其在氮循环中的重要作用[J]. *应用生态学报*, 2010, 21(8):2154-2160. LIU J J, WU W X, DING Y, et al. Ammonia-oxidizing archaea and their important roles in nitrogen biogeochemical cycling: A review[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2010, 21(8):2154-2160.
- [30] CAO Q, LI X, XIE Z, et al. Compartmentation of microbial communities in structure and function for methane oxidation coupled to nitrification-denitrification[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 341:125761.
- [31] 张博雅, 余珂. 微生物基因数据库在氮循环功能基因注释中的应用[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(9):3021-3038. ZHANG B Y, YU K. Application of microbial gene databases in the annotation of nitrogen cycle functional genes[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(9):3021-3038.
- [32] SMITH G J, ANGLE J C, SOLDEN L M, et al. Members of the genus *Methylobacter* are inferred to account for the majority of aerobic methane oxidation in oxic soils from a freshwater wetland[J]. *mBio*, 2018, 9(6):e00815-18.
- [33] ZHU X, TIAN J, LIU C, et al. Composition and dynamics of microbial community in a zeolite biofilter-membrane bioreactor treating coking wastewater[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(19):8767-8775.
- [34] 张琼琼, 黄兴如, 郭道宇. 基于T-RFLP技术的不同水位梯度植物根际细菌群落多样性特征分析[J]. *生态学报*, 2016, 36(14):4518-4530. ZHANG Q Q, HUANG X R, GUO X Y. Analysis of the characteristics of rhizosphere bacterial diversity from plants with different water level gradients based on T-RFLP[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2016, 36(14):4518-4530.
- [35] VITALE A, PASZTI S, TAKAHASHI K, et al. Mapping of the denitrification pathway in *Burkholderia thailandensis* by genome-wide mutant profiling[J]. *Journal of Bacteriology*, 2020, 202(23):e00304-20.
- [36] WANG Q, DING C, TAO G, et al. Analysis of enhanced nitrogen removal mechanisms in a validation wastewater treatment plant containing anammox bacteria[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(3):1255-1265.
- [37] KUMAR S, HERRMANN M, BLOHM A, et al. Thiosulfate- and hydrogen-driven autotrophic denitrification by a microbial consortium enriched from groundwater of an oligotrophic limestone aquifer[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2018, 94(10):fy141.
- [38] 姜雪霞, 焦念志. 海洋异养细菌硝酸盐同化研究进展[J]. *中国科学:地球科学*, 2016, 46(2):199-266. JIANG X X, JIAO N Z. Nitrate assimilation by marine heterotrophic bacteria[J]. *Scientia Sinica Terrae*, 2016, 46(2):199-266.
- [39] FLORES E, FRÍAS J E, RUBIO L M, et al. Photosynthetic nitrate assimilation in cyanobacteria[J]. *Photosynthesis Research*, 2005, 83(2):117-133.