

DOI: 10.12264/JFSC2021-0356

凡纳滨对虾养殖系统中异养和自养型生物絮团的微生物特性及其与养殖水环境的关系

高远¹, 李薨¹, 董登攀¹, 郑延璇², 宋协法¹, 刘心田³

1. 中国海洋大学水产学院, 山东 青岛 266073;
2. 乳山市海洋经济发展中心, 山东 乳山 264500;
3. 威海市渔业技术推广站, 山东 威海 264200

摘要: 生物絮团的群落结构特征与其营养类型密切相关, 并与系统水质相互影响。本研究应用高通量测序技术研究了凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)养殖系统中异养、自养型生物絮团的微生物群落结构特征, 讨论了絮团微生物与养殖水环境的相互作用。群落结构分析表明, 异养、自养型生物絮团的优势门类均为变形菌门(Proteobacteria, 相对丰度占比 24.2%~70.45%)、拟杆菌门(Bacteroidota, 相对丰度占比 8.45%~28.09%); 属水平上, 对构建生物絮团骨架起重要作用的亮发菌属(*Leucothrix*)相对丰度在两种生物絮团间无显著差异($P>0.05$); 此外, 注释为硝化螺旋菌门(Nitrospirota)的 OTU 仅存在于自养絮团。功能基因预测分析表明, 自养型生物絮团 *amoA*、*amoB* 等硝化基因的丰度(0.17%, 0.20%)明显高于异养型生物絮团(0.10%, 0.09%)。絮团微生物组成的变化改变了水体氮循环路径, 造成氨氮、亚硝酸盐、硝酸盐浓度的不同, 并受到水质差异的反作用。生物絮团的营养类型对对虾特定生长率无显著性影响。结论认为: 与异养型生物絮团相比, 自养型生物絮团硝化细菌和硝化基因的丰度、多样性明显升高, 微生物组成与功能更加合理, 能有效控制养殖水质, 维持养殖系统的平衡与良性发展。

关键词: 自养型生物絮团; 异养型生物絮团; 微生物群落; 凡纳滨对虾; 高通量测序

中图分类号: S968

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)06-0864-10

通过控制碳氮比来调节水体微生物组成, 利用不同微生物对氮的转化来调控养殖水质的生物絮团技术, 已成为水产养殖领域重要的研究课题^[1-2]。在利用生物絮团进行对虾养殖的实践中, 需要补充大量碳源, 保证水体碳氮比足够高($C/N \geq 15$), 使微生物能充分生长并同化氨氮, 从而净化水质^[3-5]。但大量添加碳源也造成养殖成本过高、水质不稳定等问题^[6]。研究发现, 应用生物絮团技术养殖对虾的过程中, 除异养细菌同化氨氮外, 也存在自养细菌通过硝化作用降解氨氮的机制。相比于异养型生物絮团, 硝化作用为主的自养型絮团有溶解氧和碳源需求低、使养殖水质

更稳定等优势, 因而逐渐受到研究者关注^[7]。但自养细菌生长缓慢, 难以快速发挥作用^[8]。研究表明, 若预先培育自养硝化型生物絮团, 待其成熟后进行对虾养殖, 可获得良好效果^[8]; 而若在自养硝化型絮团培育过程中进行对虾养殖, 则水质不稳定, 成活率不高^[9]。

目前, 国内有学者对前期异养同化、中后期自养硝化的生物絮团系统进行了初步研究^[10-12]。谭洪新等^[11]将养殖过程分为 3 个阶段, 逐阶段降低碳源补充量, 发现养殖后期亚硝酸盐浓度低于前期, 最优势菌群为变形菌门; 韩天骄等^[12]以红糖作为补充碳源养殖凡纳滨对虾(*Litopenaeus*

收稿日期: 2021-08-12; 修订日期: 2021-10-18.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFD0900505).

作者简介: 高远(1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向为生物絮团. E-mail: gaoyuan5582@stu.ouc.edu.cn

通信作者: 宋协法, 教授, 研究方向为设施渔业. E-mail: yuchuan@ouc.edu.cn

vannamei), 30 d 后停加红糖并继续养殖 28 d, 发现停加碳源对氨氮、亚硝酸盐、硝酸盐浓度变化没有显著影响, 但停加组饲料氮利用率更高。这些研究多集中于水质变化、氮收支等, 未对絮团微生物做深入细致的分析。但水质变化、氮收支等方面差别的根本原因是絮团微生物群落结构的差异^[13]。差异化的微生物改变了水体氮循环路径, 进一步造成水质、氮收支的不同, 同时水质等因子也对微生物结构、功能形成反作用^[14]。因此, 有必要对絮团微生物及其与水质的关系进行深入研究。

本研究应用自养型及异养型生物絮团养殖凡纳滨对虾, 采用高通量测序技术分析自养型及异养型絮团微生物的差异, 结合养殖水质、絮团生长、对虾收获等因素, 解析养殖水环境与絮团微生物间的相互影响, 以期对生物絮团养殖凡纳滨对虾提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 实验设计

实验于山东省乳山市聚鑫养殖场进行, 共持续 56 d (2020 年 7 月 16 日至 2020 年 9 月 9 日)。试验设置对照(CON)、异养(HETE)、自养(AUTO) 3 个处理组, 每组 3 个重复, 共 9 个养殖桶(聚乙烯材质, 上内径 0.80 m, 下内径 0.72 m, 高 0.6 m, 使用容积 200 L)。养殖用水为砂滤海水(盐度约 28)。实验开始前 5 d 进行生物絮团预培养^[9], 待水色棕黄、可见明显絮状物时放入虾苗, 实验正式开始。实验期间, 选取蔗糖(含碳量 40.69%, 含氮量 0.76%)为外加碳源, 异养组养殖全程均补充碳源, 保证水体碳氮比 ≥ 15 。自养组养殖前期补充碳源, 补充量同异养组; 水质稳定后(三日内, 氨氮浓度变化不超过 5%)停止添加碳源, 促使絮团向自养型转变。每日 9:00 称取碳源, 溶解于养殖水后泼洒入养殖桶。对照组只投喂饲料而不添加碳源, 每日换水 20% 保证水质稳定。

选取同一生长阶段的健康对虾作为实验对象。对虾初始体长(6.82 \pm 0.13) cm, 初始体重(4.75 \pm 0.11) g, 养殖密度为 200 尾/m³。饵料为正集团对虾配合饲料(粗蛋白含量 42%, 含碳量 43.43%, 含氮量 8.36%), 每日 6:00、10:00、14:00、18:00、

22:00 投喂 5 次, 投喂量根据对虾体长变化进行调整: 体长 6~10 cm 时, 占体重的 3%~4.5%; 体长大于 10 cm 时, 占体重的 2%~3%^[15]。所有系统全天曝气, 保证溶氧充足且水体搅动充分。自养、异养组养殖期间不换水, 只补充蒸发损失的水分。

1.2 微生物分析

实验结束后, 每个养殖桶取水样 0.5 L, 对照组取得水样记为 a1、a2、a3; 异养组记为 b1、b2、b3 (因 b1 桶取样当天出现了对虾的突然大量死亡, 故不将 b1 桶数据用于对虾生长及微生物分析); 自养组记为 c1、c2、c3。水样带回实验室, 将絮团抽滤富集到聚碳酸酯滤膜(0.45 μ m, Millipore, MA, USA)上。使用 FastDNA[®] Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA)提取样品基因组 DNA, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。

采用细菌通用引物 515F (5'-GTGYCAGCM-GCCGCGTAA-3')、806F (5'-GGACTACNVGGG-TWTCTAAT-3')对样品 16S rRNA 的 V3~V4 高变区进行扩增, 反应体系为 20 μ L, 扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 循环 27 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 冷却至 10 $^{\circ}$ C。PCR 产物回收后使用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测分析, 检查扩增效果。建库与高通量测序等工作交由上海美吉生物医药科技有限公司完成。

根据标记序列和扩增引物序列对测序原始序列进行拆分, 得到各个样品的数据。去除引物和标记序列后, 用 Flash 进行序列拼接, 用 fastp 进行检测与过滤。去除单序列后, 使用 Uparse 软件将有效序列以 97% 的一致性聚类为 OTU, 用 RDP Classifier 算法对 OTU 代表序列与 Silva_138 16S rRNA 数据库进行比对分析与物种注释。

1.3 水质与对虾指标测定

养殖期间, 每 4 d 取水样 1 次, 迅速运回实验室测定总氨氮、亚硝酸盐、硝酸盐、正磷酸盐、化学需氧量、总悬浮颗粒物、絮团体积, 取样时间为上午 8:00~9:00, 测定方法参照《海洋监测规范第 4 部分: 海水分析》(GB 17378.4-2007)。每天上午 8:00~9:00, 采用 YSI 多参数水质分析仪现场监测水温、溶解氧、pH。实验结束后排干养殖水收获对虾, 测定体长、体重, 计算存活率、增重率、

特定生长率、单位产量。计算公式如下:

存活率(%) = $100 \times (\text{终末存活尾数} / \text{初始放养尾数})$;

增重率(%) = $100 \times (\text{终末体重} - \text{初始体重}) / \text{初始体重}$;

特定生长率(%) = $100 \times (\ln \text{终末体重} - \ln \text{初始体重}) / \text{饲养时间}$;

单位产量(g/m^3) = $\text{终末体重} \times \text{终末存活尾数} / \text{养殖水体积}$ 。

1.4 统计分析

采用 Microsoft Excel 软件对水质、对虾数据进行统计分析, 数据以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm \text{SD}$)表

示。使用 IBM SPSS Statistics 25.0 软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 时, 认为差异显著。物种组成分析、功能基因预测分析、冗余分析及其可视化通过 R 语言的 vegan 和 ggplot2 包以及上海美吉生物医药科技有限公司 I-sanger 云平台完成。

2 结果与分析

2.1 不同系统絮团微生物群落结构特征

2.1.1 微生物群落物种组成分析 对 OTU 进行比对注释后, 共得到 30 个门, 447 个属, 667 个种。图 1 显示了门水平上组别与物种之间的关系。在此分类水平上, 不同组物种组成较为相似, 其中相

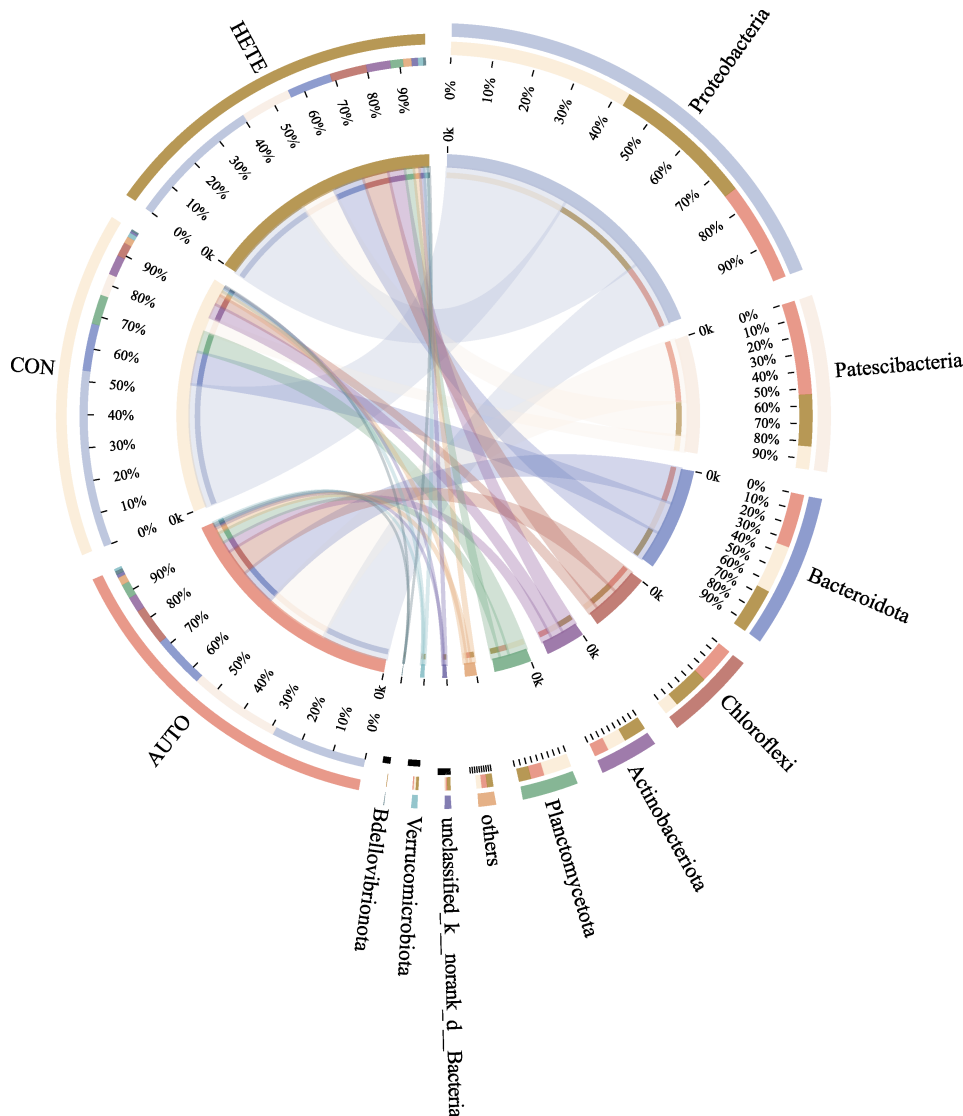


图 1 异养及自养生物絮团凡纳滨对虾养殖系统絮团微生物门水平物种组成

Fig. 1 Composition of the biofloc microbial community in *Litopenaeus vannamei* culture systems at phylum level

对丰度较高的门分别是变形菌门(Proteobacteria, 24.2%~70.45%)、拟杆菌门(Bacteroidota, 8.45%~28.09%)、Patescibacteria (4.92%~37.81%)、绿弯菌门(Chloroflexi, 4.82%~21.15%)、放线菌门(Actinobacteria, 1.09%~9.15%)和浮霉菌门(Planctomycetota, 1.3%~13.22%), 这 6 个门相对丰度之和达到 90%以上。单因素方差分析(one-way ANOVA)检验表明, 3 个菌门在各组的相对丰度存在显著性差异。异养组和自养组绿弯菌门相对丰度显著高于对照组, 厚壁菌门(Firmicutes)相对丰度显著低于

对照组($P<0.05$), 自养组有一未分类菌门的相对丰度极显著高于其余 2 组($P<0.01$)。

图 2 显示了相对丰度前 35 的属水平物种组成。相对丰度较高的属主要是红杆菌科未定属(unclassified_of_Rhodobacteraceae, 3.01%~32.79%)、TM7a (5.25%~17.69%)、亮发菌属(*Leucothrix*, 3.6%~7.29%)等。不同组之间属水平物种组成存在差异:norank_of_Devosiaceae、*Owenweeksia* 在异养组的丰度明显高于其余 2 组, *Marivita* 在自养组的相对丰度明显低于异养与对照组。

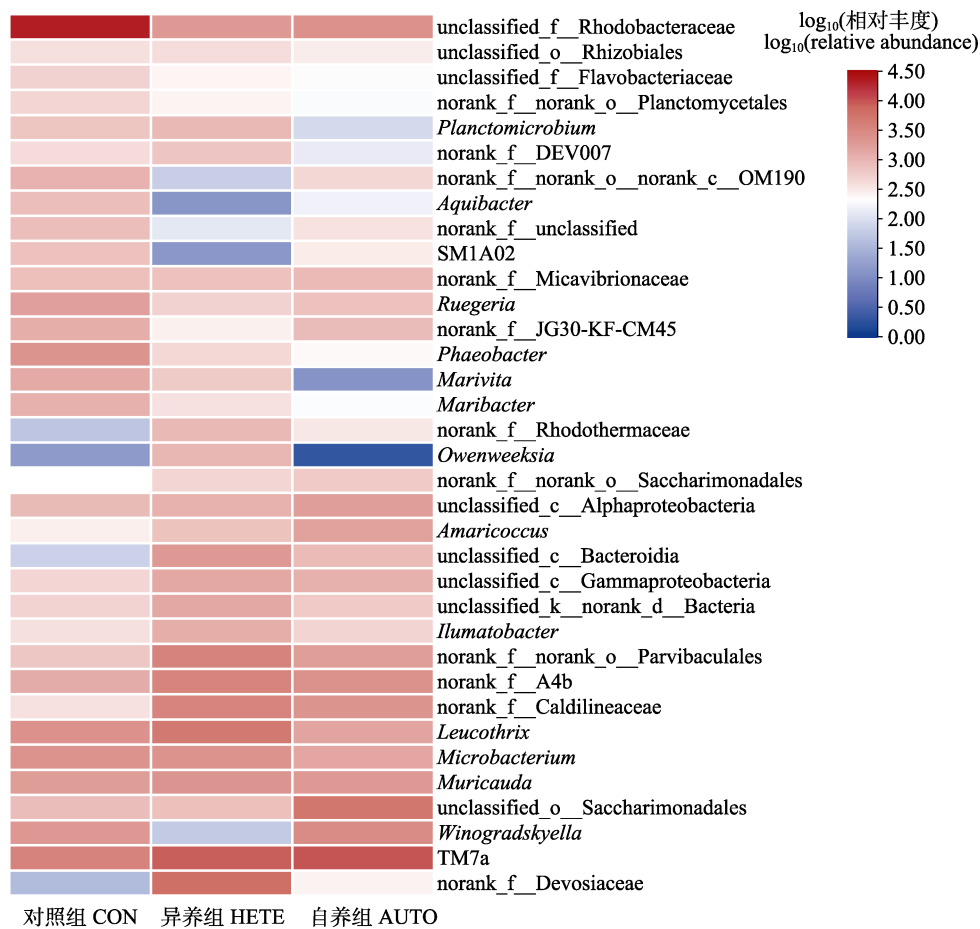


图 2 异养及自养生物絮团凡纳滨对虾养殖系统絮团微生物属水平物种组成
Fig. 2 Composition of biofloc in the *Litopenaeus vannamei* culture systems at genus level

2.1.2 功能基因预测分析 不同组微生物群落的氮代谢相关基因丰度如图 3 所示。在各组中, 仍然是以同化作用相关的基因(*gltB*、*gltD*、*glnA* 等)有最高的相对丰度(58.7%~64.3%)。与硝化作用相关的基因如 *amoA*、*amoB* 在自养组的丰富度

(0.17%, 0.20%)明显高于异养型生物絮团(0.10%, 0.09%), 但部分反硝化功能基因、同化和氮固定相关基因的丰度低于后两者。而对照组与异养组在各个基因上的丰度差别均不大。

2.1.3 微生物群落相似性分析 分析不同组之间

共有及特有 OTU, 结果如图 4a。其中, 691 个 OTU (50.96%)为 3 组共有, 94、67、128 个分别为自养、异养、对照组特有, 占比分别为 6.93%、4.94%、9.44%。

分析 691 个 3 组共有 OTU, 发现可以聚类为

28 个门(图 4b)。28 个门中, 相对丰度最高的是变形菌门(43.68%), 这与上述物种组成的结果相对应。对自养组特有的 OTU 分析发现, 自养组的 94 个 OTU 全部属于硝化螺旋菌门(Nitrospirota)的 Nitrospiria 和 Kapabacteria 两个纲, 进一步可以分

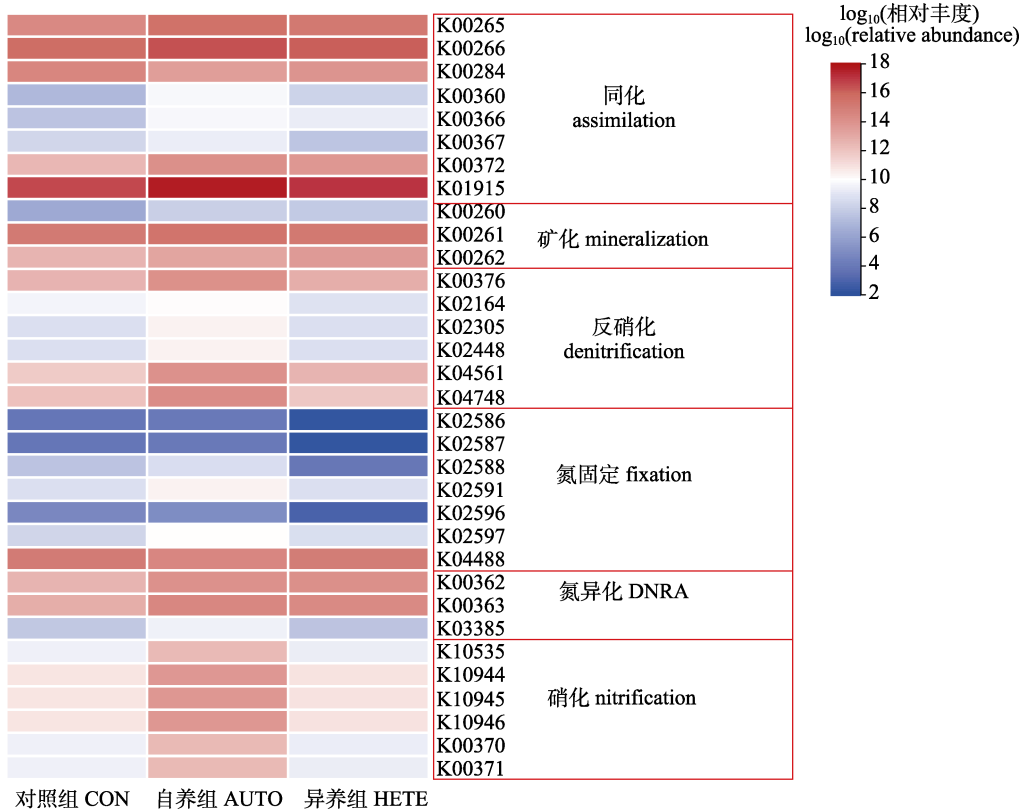


图 3 异养及自养生物絮团凡纳滨对虾养殖系统絮团微生物功能基因预测

Fig. 3 Functional gene prediction for biofloc microorganisms in the *Litopenaeus vannamei* culture systems

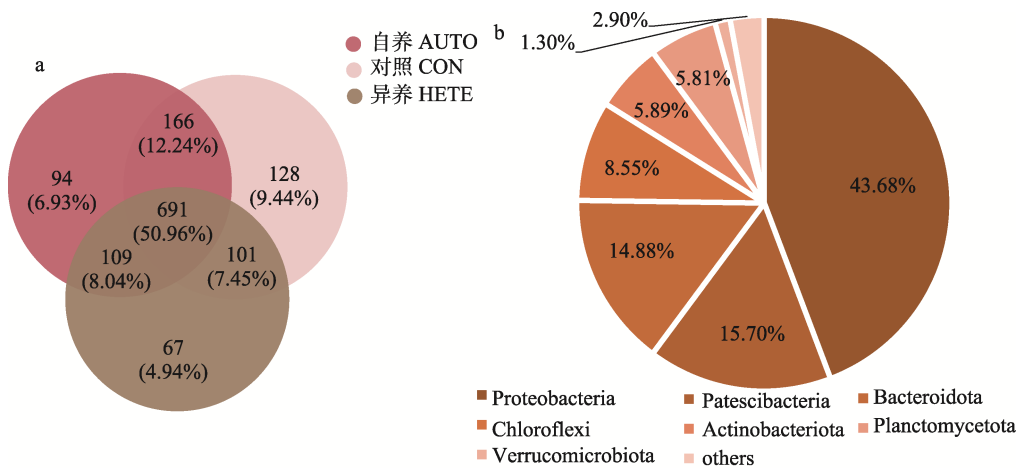


图 4 异养及自养生物絮团凡纳滨对虾养殖系统絮团微生物物种相似性比较(a)与共有物种组成(b)

Fig. 4 Similarity comparison (a) and shared species composition (b) of microorganisms of heterotrophic and autotrophic biofloc in *Litopenaeus vannamei* culture systems

为 Nitrospirales、Sneathiellales 等 9 个目, 其中又以 Nitrospirales 丰度略高, 为 3.45%。

2.2 水质、絮团及对虾生长差异

实验期间, 温度(25~28 °C)、溶解氧(5.0±0.5) mg/L、pH(8.0±0.5)均保持在凡纳滨对虾生长的适宜范围内。比较水质稳定后的部分水质指标, 其结果如表 1 所示。自养、异养组氨氮浓度均显著低于对照组($P<0.05$), 而异养组氨氮浓度稍高; 自养和异养组亚硝酸盐浓度显著低于对照组($P<0.05$); 自养组的硝酸盐浓度显著高于异养组与对照组($P<0.05$)。COD、正磷酸盐也存在显著差异: 异养组 COD 显著高于其余 2 组, 对照组正磷酸盐浓度显著高于其余 2 组($P<0.05$)。此外, 异养组与自养组的总悬浮颗粒物和絮团体积显著高于对照组($P<0.05$)。

表 1 异养及自养生物絮团凡纳滨对虾养殖系统水质指标差异

Tab. 1 Differences in water quality indicators between *Litopenaeus vannamei* culture systems containing heterotrophic and autotrophic biofloc

指标 index	对照组 CON	异养组 HETE	自养组 AUTO
温度/°C temperature	24.90±0.15	25.10±0.06	25.10±0.05
溶解氧/(mg/L) DO	5.08±0.11	5.56±0.47	4.97±0.35
pH	7.87±0.01 ^a	8.26±0.02 ^b	8.21±0.02 ^c
硝酸盐/(mg/L) NO ₃ -N	1.01±0.17 ^a	0.08±0.01 ^a	6.42±1.94 ^b
亚硝酸盐/(mg/L) NO ₂ -N	0.58±0.04 ^a	0.02±0.00 ^b	0.08±0.03 ^b
总氨氮/(mg/L) TAN	3.34±0.74 ^a	1.31±0.36 ^b	0.72±0.13 ^b
正磷酸盐/(mg/L) PO ₄ ³⁻	0.06±0.024 ^a	0.01±0.001 ^b	0.003±0.001 ^b
化学需氧量/(mg/L) COD	11.2±0.40 ^b	41.60±4.51 ^a	16.53±2.57 ^b
总悬浮颗粒物/(mg/L) TSS	240±30.55 ^a	550±145.29 ^b	573.33±40.55 ^b
絮团体积/(ml/L) FV	1.50±0.30 ^a	47.50±5.28 ^b	40.54±6.54 ^b

注: 同行数据上标不同表示组间存在显著差异($P<0.05$)。Note: Values in each column with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

不同养殖方式下, 对虾生长表现的差异如表 2 所示。可以看出自养组终末体长、终末体重、特定生长率、单位产量均稍大于其他两组, 而对对照组终末体重、增重率、特定生长率显著低于其他 2 组($P<0.05$), 终末体长、存活率没有显著差异($P<0.08$)。

2.3 细菌群落与水质变化相关性分析

对表 1 列出的环境因子作方差膨胀因子分析, 并过滤掉 VIF 值大于 10 的因子, 剩下硝酸盐、亚硝酸盐、正磷酸盐、COD、总悬浮颗粒物 5 个因子。经 Monte Carlo 置换检验, 发现亚硝酸盐、COD 与细菌群落有极显著的相关性, 其 P 值分别达到 0.003、0.001。用上述 5 个因子与微生物数据作属水平的冗余(RDA)分析, 结果如图 5 所示。

表 2 异养及自养生物絮团养殖凡纳滨对虾的生长表现
Tab. 2 Growth performance of *Litopenaeus vannamei* cultured with heterotrophic and autotrophic biofloc

指标 index	对照组 CON	异养组 HETE	自养组 AUTO
终末均体长/(cm) FL	11.10±0.15	11.10±0.25	11.53±0.13
终末均体重/(g) FW	18.39±0.21 ^b	21.58±0.36 ^a	22.18±0.69 ^a
存活率/(%) SR	80.00±3.78	69.67±2.03	76.00±5.29
增重率/(%) WR	289.47±8.64 ^b	344.95±12.43 ^a	367.04±19.54 ^a
特定生长率/(%/d) SGR	2.72±0.05 ^b	2.98±0.03 ^a	3.10±0.06 ^a
单位产量/(g/m ³)	2205.79±102.05 ^b	2255.11±65.63 ^{ab}	2528.90±101.65 ^a

注: 同行数据上标不同表示组间存在显著差异($P<0.05$)。Note: Values in each column with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

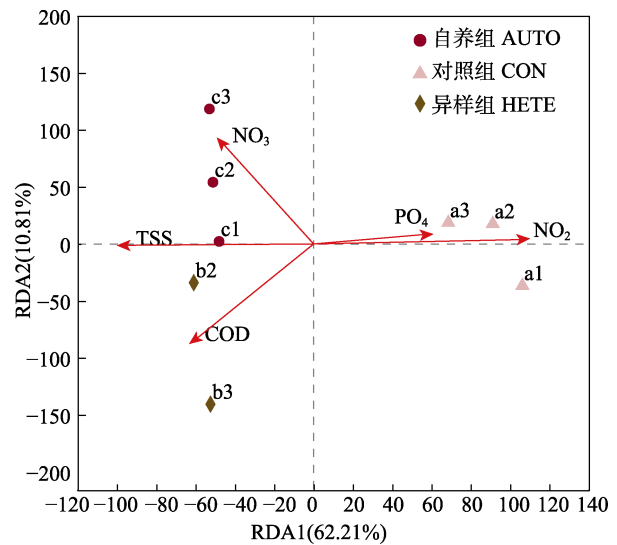


图 5 异养及自养生物絮团凡纳滨对虾养殖系统絮团微生物 RDA 分析

对照组: a1-a3; 异养组: b2-b3; 自养组: c1-c3.

Fig. 5 Redundancy analysis (RDA) of heterotrophic and autotrophic biofloc microorganisms in the *Litopenaeus vannamei* culture systems

CON: a1-a3; HETE: b2-b3; AUTO: c1-c3.

8 个样本分为 3 簇, 每组各一簇。对照组的一簇聚集较为紧密, 主要受到正磷酸盐、亚硝酸盐的影响; 自养组的一簇主要受硝酸盐的影响; 异养组只有 2 个样本点, 主要受到 COD 的影响。

3 讨论

3.1 物种组成差异性

研究发现, 变形菌门、拟杆菌门在各组中都占绝对优势。对各种模式的养殖水体来说, 变形菌门广泛分布且往往成为最优菌群^[16], 在生物絮团模式中, 变形菌门与拟杆菌门也往往是相对丰度最高的 2 个菌门^[14], 这在本研究中得到了验证。绿弯菌门中有多类在生物絮团结构中起到骨架作用的丝状菌^[17], 对照组全程不补充碳源, 异养的绿弯菌门丰度显著低于其余各组, 丝状菌丰度过低, 导致本组生物絮团体积也显著低于其余 2 组, 这从一定程度上解释了碳源添加与生物絮团形成之间的关系。

属水平上, 重要的丝状菌亮发菌属在各组中丰度均较高, 且尤以异养组最高(7.29%), 这类细菌细胞连成丝状, 成为生物絮团的骨架, 对生物絮团保持完整正常的结构有重要作用^[18], 测序还发现了其他丝状菌如 *Microbacterium* (2.5%~3.6%)^[19]。自养、对照组中碳源不充足, 故必须通过分解有机物才能获得能量的严格异养菌 *Owenweeksia* 丰度显著低于持续添加碳源的异养组^[20,21]。这些菌在不同组丰度的差异说明了各组絮团存在状态、生长周期的不同。

养殖池内持续有残饵粪便的存在, 细菌生长需要利用这些有机物合成自身蛋白, 故而执行合成谷氨酸、谷氨酰胺等功能的 *gltB*、*gltD*、*glnA* 等基因在每组中都有很高丰度^[22]。但不同组因碳源补充策略的不同, 有机物含量有显著差异, 这导致水体微生物组成的差别, 并进一步导致各组功能基因丰度的不同。自养组在中后期没有碳源补充的情况下, 硝化细菌丰度、多样性均较高, 而硝化作用相关的基因丰度也明显高于其余 2 组。自养组中后期碳源的缺乏以及高丰度硝化细菌对生境的竞争还导致组内异养菌、反硝化菌丰度的降低, 使本组同化和反硝化作用相关基因的丰度

也较其余 2 组更低。功能基因丰度的差异与物种组成的差异从不同角度进一步说明了有机物含量对水体物种组成的影响。

通过高通量测序仅在自养组中发现硝化螺旋菌门。研究表明高的碳氮比可以促进异养细菌生长, 抑制硝化细菌生长^[23]; 在一定范围内, 随碳氮比升高硝化作用效率降低^[24]。这些因素导致异养组中硝化细菌难以占到优势。自养组通过降低碳氮比的方式抑制了异养细菌的生长繁殖而促进硝化细菌生长, 硝化细菌的出现则会进一步影响到水体氮转化路径, 对水体水质产生重要影响。

3.2 水质、絮团及对虾生长与微生物群落组成的相互影响

对照组氨氮、亚硝酸盐浓度过高, 超出了对虾正常生长的耐受限度^[25], 而自养、异养组氨氮和亚硝酸盐浓度保持在对虾正常生长的承受范围内, 其水质远好于对照组。同时, 自养、异养两组的絮团生物量显著高于对照组, 说明生物絮团对水质的净化作用显著。异养组、自养组为对虾提供了良好的水质环境, 使对虾增重率、特定增长率、单位产量都高于对照组, 取得了更好的养殖效果^[26]。

水质和絮团生物量的差异是微生物物种组成的反映。上述结果表明, 自养组硝化细菌、硝化基因丰度高于对照组和异养组, 同化和反硝化基因丰度则较低。考虑到硝化作用的高活性^[10], 自养组硝化作用应当远高于其余 2 组, 且同化及反硝化水平更低, 这使本组氨氮、亚硝酸盐浓度较低, 而硝酸盐浓度很高。这样的水质差异也会反作用于微生物活性, 如在某些研究中, 亮发菌属丰度变化与亚硝酸盐浓度的相关性可达到 $P < 0.0001$ ^[27]。COD 是水体有机物含量的反映, 直接反映了不同碳源补充策略对水质的影响, COD 的差异将进一步影响微生物群落结构^[28-29]。而亮发菌属等丝状菌及其他细菌的丰度差异, 则是絮团生物量出现差异的直接原因。

Monte Carlo 检验和 RDA 分析表明, 微生物组成与亚硝酸盐和 COD 等水质因子之间有极显著的相关性。亚硝酸盐浓度与 COD 在每组之间有显著差异, 异养组 COD 显著高于其余 2 组, 对照

组亚硝酸盐显著高于其余 2 组。不同的碳源补充策略使水体有机物含量出现差别, 导致水体碳氮比不同, 而不同的碳氮比调节了异养、自养细菌生长, 使其相对丰度出现差异。这造成微生物组成与 COD 极显著的相关, 也成为微生物结构分化的根本原因。亚硝酸盐是硝化、反硝化过程的中间产物, 与氨氧化菌、亚硝酸盐氧化菌、反硝化菌的反应活性均有重要关系^[30-31], 不同组之间亚硝酸盐浓度的显著差异影响到多种微生物的生物活性, 成为水体微生物结构差异的重要原因。

4 结论

(1) 通过降低碳氮比的方式将异养型生物絮团转化为自养型后, 门水平上的微生物组成无显著差异, 均以变形菌门、拟杆菌门为主。

(2) 生物絮团由异养转化为自养型后, 絮团微生物物种组成与功能更加合理。对生物絮团保持正常结构有作用的丝状菌(如亮发菌属)丰度无明显变化, 某些无明显水质净化效果的细菌(*Owenweeksia*、*Marivita*)丰度降低, 自养硝化细菌(Nitrospirales、Nitrospiraceae), 硝化基因(*amoA*、*amoB*)的丰度和多样性明显升高。

(3) 自养型生物絮团的硝化细菌和硝化基因的丰度、多样性较高, 使絮团硝化作用更强, 表现为氨氮、亚硝酸盐浓度较低而硝酸盐浓度较高。亚硝酸盐等水质因子也对絮团群落结构和功能产生极显著的反作用。

参考文献:

- [1] Avnimelech Y. Biofloc Technology-A Practical Guide Book[M]. 2nd Edition. Louisiana: The World Aquaculture Society, 2012: 273-279.
- [2] Wasielesky W Jr, Froes C, Fóes G, et al. Nursery of *Litopenaeus vannamei* reared in a biofloc system: The effect of stocking densities and compensatory growth[J]. Journal of Shellfish Research, 2013, 32(3): 799-806.
- [3] Zhao P, Huang J, Wang X H, et al. The application of bioflocs technology in high-intensive, zero exchange farming systems of *Marsupenaeus japonicus*[J]. Aquaculture, 2012, 354-355: 97-106.
- [4] Emerenciano M, Ballester E L C, Cavalli R O, et al. Biofloc technology application as a food source in a limited water exchange nursery system for pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817)[J]. Aquaculture Research, 2012, 43(3): 447-457.
- [5] Avnimelech Y. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems[J]. Aquaculture, 1999, 176(3-4): 227-235.
- [6] Hari B, Kurup B M, Varghese J T, et al. Effects of carbohydrate addition on production in extensive shrimp culture systems[J]. Aquaculture, 2004, 241(1-4): 179-194.
- [7] Ebeling J M, Timmons M B, Bisogni J J. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems[J]. Aquaculture, 2006, 257(1-4): 346-358.
- [8] Ferreira G S, Santos D, Schmachtl F, et al. Heterotrophic, chemoautotrophic and mature approaches in biofloc system for Pacific white shrimp[J]. Aquaculture, 2021, 533: 736099.
- [9] Zhu Y C. Study on the application of nitrifying bio-flocs system in the *Litopenaeus vannamei* culture[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2018. [朱亦晨. 硝化型生物絮团系统在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)养殖中的应用探究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2018.]
- [10] Wang T, Liu Q S, Duan Y F, et al. Experimental study on autotrophic and heterotrophic nitrification performances of acclimated bio-floc with low C/N ratio[J]. Marine Fisheries, 2018, 40(5): 614-624. [王涛, 刘青松, 段亚飞, 等. 低 C/N 驯化生物絮团的自养和异养硝化性能研究[J]. 海洋渔业, 2018, 40(5): 614-624.]
- [11] Tan H X, Pang Y, Wang C H, et al. Preliminary study on domesticating nitrifying bio-flocs to rear *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2017, 26(4): 490-500. [谭洪新, 庞云, 王潮辉, 等. 驯化硝化型生物絮团养殖南美白对虾的初步研究[J]. 上海海洋大学学报, 2017, 26(4): 490-500.]
- [12] Han T J, Xu W J, Xu Y, et al. Effect of stopping adding brown sugar on water quality and nitrogen budget in biofloc systems cultured with *Litopenaeus vannamei*[J]. South China Fisheries Science, 2020, 16(6): 81-88. [韩天骄, 徐武杰, 徐煜, 等. 停加红糖对凡纳滨对虾生物絮团养殖系统水质和氮收支的影响[J]. 南方水产科学, 2020, 16(6): 81-88.]
- [13] Luo G Z, Zhang N, Cai S L, et al. Nitrogen dynamics, bacterial community composition and biofloc quality in biofloc-based systems cultured *Oreochromis niloticus* with poly- β -hydroxybutyric and polycaprolactone as external carbohydrates[J]. Aquaculture, 2017, 479: 732-741.
- [14] Luo G Z, Hou Z W, Tian L Q, et al. Comparison of nitrate-removal efficiency and bacterial properties using PCL and PHBV polymers as a carbon source to treat aquaculture water[J]. Aquaculture and Fisheries, 2020, 5(2): 92-98.
- [15] Chen W, Tan H X, Luo G Z, et al. Effects of stocking density

- on water quality and growth of *Litopenaeus vannamei* during construction of nitrifying biofloc system[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2019, 28(2): 247-256. [陈伟, 谭洪新, 罗国芝, 等. 构建硝化型生物絮凝系统过程中凡纳滨对虾养殖密度对水质与生长的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2019, 28(2): 247-256.]
- [16] Zhong L Q, Li B, Wang M H, et al. Analysis of microbial community structure and their environmental impact factors in the sediment of channel catfish ponds[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2020, 27(8): 893-905. [钟立强, 李冰, 王明华, 等. 斑点叉尾鮰养殖池塘底泥微生物群落结构特征及其影响因素[J]. 中国水产科学, 2020, 27(8): 893-905.]
- [17] Larsen P, Nielsen J L, Otzen D, et al. Amyloid-like adhesins produced by floc-forming and filamentous bacteria in activated sludge[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(5): 1517-1526.
- [18] Ao Q. Study on the control technology for filamentous bulking of activated sludge in municipal wastewater treatment plant[D]. Xi'an: Xi'an University of Architecture and Technology, 2020. [敖强. 城镇污水处理厂活性污泥丝状菌膨胀控制技术[D]. 西安: 西安建筑科技大学, 2020.]
- [19] Wang S, Li C B, Zhao G Z, et al. Advances in swelling biomes of activated sludge filamentous bacteria and their regulation[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2021, 27(6): 1-10. [王硕, 李长波, 赵国峥, 等. 活性污泥丝状菌膨胀生物群落及调控研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2021, 27(6): 1-10.]
- [20] Lau K W K, Ng C Y M, Ren J P, et al. *Owenweeksia hongkongensis* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium of the Phylum 'Bacteroidetes'[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55(Pt 3): 1051-1057.
- [21] Wei G S, Shan D P, Li G Z, et al. Prokaryotic communities vary with floc size in a biofloc-technology based aquaculture system[J]. Aquaculture, 2020, 529: 735632.
- [22] Deng M. The carbon and nitrogen cycling characteristic of intensive pond and the influence of organic carbon sources on the nitrogen removal of biofloc[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2018. [邓闵. 精养池塘碳氮循环特征及有机碳源对生物絮团降氮作用的影响机制[D]. 武汉: 华中农业大学, 2018.]
- [23] Okabe S, Oozawa Y, Hirata K, et al. Relationship between population dynamics of nitrifiers in biofilms and reactor performance at various C: N ratios[J]. Water Research, 1996, 30(7): 1563-1572.
- [24] Luo G Z, Wu H F, Tan H X. Progress on removing ammonia nitrogen from autotrophic nitrification in recirculating aquaculture system[J]. Freshwater Fisheries, 2019, 49(2): 78-83. [罗国芝, 吴慧芳, 谭洪新. 自养硝化过程去除循环水养殖系统水体中氨氮的研究进展[J]. 淡水渔业, 2019, 49(2): 78-83.]
- [25] Xiao W, Shan H W, Ma S, et al. Effects of chronic nitrite stress on body composition and glucose metabolism of *Litopenaeus vannamei*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(6): 74-81. [肖威, 单洪伟, 马牲, 等. 亚硝酸盐慢性胁迫对凡纳滨对虾体成分和糖代谢的影响[J]. 渔业科学进展, 2020, 41(6): 74-81.]
- [26] Xu W J, Morris T C, Samocha T M. Effects of C/N ratio on biofloc development, water quality, and performance of *Litopenaeus vannamei* juveniles in a biofloc-based, high-density, zero-exchange, outdoor tank system[J]. Aquaculture, 2016, 453: 169-175.
- [27] Cardona E, Gueguen Y, Magré K, et al. Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system[J]. BMC Microbiology, 2016, 16(1): 157.
- [28] Deng Y L, Xu X Y, Yin X W, et al. Effect of stock density on the microbial community in biofloc water and Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) gut microbiota[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(10): 4241-4252.
- [29] Jiang W W, Ren W J, Li L, et al. Light and carbon sources addition alter microbial community in biofloc-based *Litopenaeus vannamei* culture systems[J]. Aquaculture, 2020, 515: 734572.
- [30] Zheng P, Hu B L. Kinetics of anaerobic ammonia oxidation[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2001, 17(2): 193-198. [郑平, 胡宝兰. 厌氧氨氧化菌混培物生长及代谢动力学研究[J]. 生物工程学报, 2001, 17(2): 193-198.]
- [31] Li X, Wan W J, Zheng L X, et al. Community assembly mechanisms and co-occurrence patterns of nitrite-oxidizing bacteria communities in saline soils[J]. Science of the Total Environment, 2021, 772: 145472.

Microbial characteristics of heterotrophic and autotrophic biofloc in *Litopenaeus vannamei* culturing systems and their relationship with water quality

GAO Yuan¹, LI Meng¹, DONG Dengpan¹, ZHENG Yanxuan², SONG Xiefa¹, LIU Xintian³

1. College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266073, China;

2. Rushan Marine Economic Development Center, Rushan 264500, China;

3. Weihai Fishery Technology Extension Station, Weihai 264200, China

Abstract: The microorganisms in biofloc play vital roles in ensuring the stable operation of a culture system as a basis for mass conversion and energy flow. The characteristics and associated functions of a microbial community are largely influenced by the type of nutrition provided by the biofloc. The heterotrophic and autotrophic approaches are the two main methods that have been developed for culturing biofloc. However, the former method usually requires large amounts of organic matter, while the latter requires a long period of cultivation to achieve the function of the biofloc. Recently, the “hete-auto” method has been proposed, which involves the cultivation of biofloc using a combination of the heterotrophic and the autotrophic methods. This method avoids the negative effects of the above-mentioned methods when used alone. To date, most studies on this subject have focused on changes in water quality and nitrogen budgets, but the characteristics of the microbial community of such biofloc, compared to that obtained with conventional methods, remains unclear. Specifically, the effect of water quality on the microbial community of the “hete-auto” biofloc has not been reported. To fill this research gap, we constructed three *Litopenaeus vannamei* culture systems using “hete-auto” biofloc (AUTO), heterotrophic biofloc (HETE), and the flow-through method (CON), respectively. In the HETE group, sugar (i.e., an external carbon source) was supplied throughout the experiment; whereas in the AUTO group, sugar was added at the beginning of the experiment until the water quality had stabilized (i.e., ammonia nitrogen). In CON, no carbon source was added. Microbial characteristics of biofloc in the three culture systems were analyzed using high-throughput sequencing technology (Illumina MiSeq, Pudong, Shanghai), and the interactions between the microbial community and aquaculture water environment were also investigated. The results showed that Proteobacteria (24.2%–70.45%) and Bacteroidota (8.45%–28.09%) dominated in all treatments. At the genus level, no significant differences were observed between the groups in the relative abundance of the filamentous bacterium *Leucothrix* (essential for biofloc construction) (3.60%–7.29%). Notably, 94 OTUs classified as Nitrospirota (i.e., nitrifying bacteria) only existed in the AUTO biofloc; furthermore, the relative abundance of nitrifying genes such as *AmoA* and *AmoB* in the AUTO biofloc (i.e., 0.17% and 0.20%, respectively) were significantly higher than in the HETE biofloc (i.e., 0.10% and 0.09%, respectively). There were no significant differences in the specific growth rates of *L. vannamei* cultured with different nutrient types of biofloc. Differences in the microbial composition of the biofloc altered the pathways of nitrogen cycling, resulting in different concentrations of ammonia nitrogen, nitrite, and nitrate, which in turn were influenced by differences in water quality. This study demonstrates that changing the nutrient type results in biofloc with a more rational composition and function, which can effectively control water quality and keep the whole culture system balanced and benign.

Key words: autotrophic biofloc; heterotrophic biofloc; microbial community; *Litopenaeus vannamei*; high-throughput sequencing

Corresponding author: SONG Xiefa. E-mail: yuchuan@ouc.edu.cn