

DOI: 10.12264/JFSC2023-0142

硝化型和光合自养型生物絮团对泥鳅生长、肠道菌群和水体微生物群落结构的影响

胡方正¹, 孙大川^{1,2,3}, 郭衍硕¹, 姚妙兰^{1,2,3}, 刘文畅^{1,2,3}, 谭洪新^{1,2,3}

1. 上海海洋大学, 上海水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306;
2. 上海市水产动物良种创制与绿色养殖协同创新中心, 上海 201306;
3. 科技部中国-东盟海水养殖技术“一带一路”联合实验室, 上海 201306

摘要: 为了解硝化型和光合自养型生物絮团对于泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)的养殖效果, 设置清水组(CW组)、硝化组(BFT组)和光合自养组(ABFT组)生物絮团养殖泥鳅 45 d, 比较泥鳅的生长和消化酶活性、两类絮团的营养组成情况, 以及养殖水体和泥鳅肠道微生物的群落结构。结果显示, BFT组和 ABFT组的饲料转化率、特定生长率和末均重没有显著性差异($P>0.05$)。与 CW组相比, 两实验组的饲料转化率显著降低; BFT组的终末密度与 CW组相比没有显著性差异($P>0.05$)。与 CW组相比, BFT组和 ABFT组生物絮团可以提供(36.69±1.17)%和(40.20±1.05)%的粗蛋白; 与 BFT组相比, ABFT组的生物絮团粗脂肪含量显著提高($P<0.05$), 并且促进脂肪酸由饱和向不饱和转化。ABFT的泥鳅胰蛋白酶和脂肪酶的活性显著高于另外两组($P<0.05$)。微生物群落分析表明, 添加藻类对成熟生物絮团 Alpha 多样性指数、群落门水平和属水平没有显著影响。泥鳅摄食生物絮团会导致肠道菌群 sobs 指数显著降低。BFT组肠道的优势菌群为变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteriota)和绿弯菌门(Chloroflexi); ABFT组为变形菌门和蓝藻门(Cyanobacteria)。属水平上, ABFT组检测到高水平的气单胞菌属(*Aeromonas*)。本研究表明, 硝化型和光合自养型生物絮团养殖均适合作为泥鳅绿色健康养殖的新模式。

关键词: 生物絮团; 泥鳅; 微生物; 絮团营养; 光合自养; 硝化

中图分类号: S963

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2023)10-1188-14

水产养殖产品能够为人类提供大量的优质动物蛋白^[1]。但养殖者过度追求经济效益导致的水环境污染、水产品质量安全等问题也在逐渐暴露^[2]。为实现水产养殖的高质量发展, 2020 年农业农村部开始实施水产绿色健康养殖“五大行动”^[3], 越来越多的环境友好型养殖模式被逐渐探索和推广。生物絮团技术(biofloc technology, BFT)利用有益微生物将有毒含氮化合物转化成鱼类可以食用的生物絮凝物, 显著加强养分和废弃物的回收再利用, 近年来在多种绿色水产养殖模式得到广泛

应用^[4]。目前, 生物絮团技术在尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)和凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)等品种的养殖中可以显著降低养殖成本、提高养殖对象的成活率, 具有巨大的经济效益^[5-6]。Wei 等^[7]指出生物絮团含有鱼虾生长所必需的氨基酸和脂肪酸等营养物质, 这使得其可以取代部分商品饲料, 并且降低饲料系数。

BFT 系统根据 3 种氮控机制进行了分类, 即化学自养(硝化型)、化学异养和光自养^[8]。其中, 以硝化作用控制有毒含氮化合物的硝化型生物絮

收稿日期: 2023-08-23; 修订日期: 2023-09-28.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFE0203900); 上海市水产动物良种创制与绿色养殖协同创新中心项目(A1-3408-23-0001).

作者简介: 胡方正(2000-), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产养殖污染调控. E-mail: 1744410047@qq.com

通信作者: 谭洪新, 教授, 研究方向为水产养殖污染调控. E-mail: hxtan@shou.edu.cn

凝系统最为常见^[4,9]。Xu 等^[10]研究发现硝化型生物絮团可以有效降低凡纳滨对虾养殖中产生的氨氮和亚硝氮,减少了尾排水的治理,同时提高了产量。此外,以化学异养将无机氮化合物转化为菌体蛋白的异养型生物絮凝养殖系统,也在不同养殖品种成功应用^[5,11]。藻类通过光自养直接利用水体中的氨氮,因此研究添加藻类的光自养型生物絮团有助于扩展生物絮团中的氮控机制^[12]。藻类能够利用无机碳转化为有机碳源,同时增加水体中的溶解氧;此外,藻类的补充也有助于生物絮团营养结构的调节^[13]。Ekasari 等^[14]证明,在生物絮团中补充小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)可以增加必需氨基酸指数。但 Jung 等^[15]的研究指出,补充微藻的生物絮团仅仅促进尼罗罗非鱼的免疫反应,但对其生长、存活率以及营养成分没有显著影响。因此在生物絮团中补充藻类的作用有待进一步研究。

泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)作为一种经济型淡水鱼类,具有高蛋白、低脂肪的特性,近几年市场需求量不断提升,2021 年全国产量 36 万余 t,作为适合多种养殖模式以及不同混养方式的特种养殖对象^[16],目前其在生物絮团系统中的养殖效果研究尚未有报道。本实验以泥鳅为养殖对象,比较了硝化型和光合自养型生物絮凝养殖模式作为营养补偿对泥鳅的生长效果、消化酶活性以及环境和肠道微生物群落的影响,以期为泥鳅与生物絮团养殖的结合提供理论依据,为特种水产品绿色健康养殖模式上的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 养殖与处理

实验中所使用的泥鳅购自中国四川成都银泉泥鳅繁育基地。养殖实验在上海海洋大学循环水养殖系统研发平台中试车间进行。选取 360 尾大小均匀[初始体重(1.25±0.06) g]的泥鳅,随机分配到 12 个 PVC 水箱(20 L,工作容积 15 L),在水箱中央设置一个曝气石。设置 3 个实验组,分别为清水换水组(CW),硝化型生物絮团组(BFT)和光合自养型生物絮团组(ABFT),每组下设 4 个平行,每个水箱 30 尾。每天投喂 4 次(9:00, 13:00, 17:00,

21:00),共计 45 d。泥鳅饲料(无锡通威生物科技有限公司)的主要产品成分为:粗蛋白≥38.00%,粗脂肪≥5.0%,粗纤维≤7.0%,粗灰分≤16.0%,总磷≥1.20%,赖氨酸≥1.90%,水≤12.0%。

CW 组按初始体重的 4% 饲喂,每 15 天随机称重 15 尾,并记录采食量(FI)。每天 9:00 和 21:00 换 30% 的水以保证水质稳定。温度:25~28 °C。光照强度小于 500 lx。实验构建的装置覆盖有黑纱网,以避免微藻通过光自养处理的空中交叉转移而增殖。

根据培养的生物絮团测定粗蛋白含量,絮团营养成分可替代泥鳅体重 1.5% 饲料中的氮,因此 BFT 组和 ABFT 组每日按体重的 2.5% 饲喂,每 15 天随机称重 15 尾,记录采食量(FI)。按总悬浮物(TSS) (525±25) mg/L 接种来自上海海洋大学水产养殖工程技术研究中心罗非鱼养殖两个月后的生物絮团,并在养殖期间维持 TSS 浓度。ABFT 组以密度为 1×10^5 cell/ml 接种小球藻。小球藻来自上海市水产养殖工程技术研究中心。该菌株在 BG-11 培养基中作为种液培养。温度:25~28 °C;碱度:(300±25) mg/L,实验期间由 NaHCO₃ 维持。BFT 组光照强度小于 500 lx。实验构建的装置覆盖有黑纱网。ABFT 组光照强度为 5000 lx,光周期:12 L : 12 D。

1.2 样品采集

45 d 实验结束时,对每个水箱内的泥鳅进行称重和计数。取样前用 0.1% MS222 麻醉泥鳅。每个水箱中随机选取 6 尾泥鳅,取全肠放入 1.5 mL 无菌离心管中,立即用液氮冷却,并转移至-80 °C 冰箱中保存备用。本研究的所有养鱼方法和取样方案均经上海海洋大学动物伦理委员会批准。实验结束后,水样经 0.22 μm 无菌滤膜过滤收集沉淀物,分析微生物多样性。将水样在 8000 r/min 下离心 5 min,取沉淀保存于-80 °C,用于营养成分近似组成分析。

1.3 分析方法

1.3.1 水质分析 每 5 天上午 9 点采集水样。用 0.45 μm 膜过滤,根据《水和废水的检测方法分析》第 4 版^[17],测定总氨氮(TAN),亚硝酸盐(NO₂-N),硝酸盐(NO₃-N),磷酸盐(PO₄³⁻-P),直接取水样测

定总氮(TN)和总磷(TP), 使用 WTW 多参数便携水质分析仪(Multi 3430, WTW, 德国)测定溶解氧(DO)、pH 值和水温。用恒重法测定总悬浮固体(TSS)浓度, 以 mg/L 表示。碱度用酸碱中和法测定。可沉降固体体积(FV)采用英霍夫锥(Brand Scientific, Wertheim, Germany)测定。在每个 BFT 组中取 1 L 水沉淀 15 和 30 min 后记录沉淀物质的体积, 记为 FV_{15} 和 FV_{30} (mL/L)。

1.3.2 小球藻数目和叶绿素 a 本研究采用叶绿素 a (Chl-a)浓度和小球藻的数量来代表藻类生物量的增长。采用丙酮分光光度法测定叶绿素 a 浓度^[18]。采用血细胞计数板法测定小球藻的数量。

1.3.3 生物絮团的营养测定 浓缩的生物絮团在 65 °C 下烘干至恒重, 使用 elemental 系统(Elementar vario MAX, 德国)测定氮含量。生物絮团粗蛋白含量为氮素的 6.25 倍。按 GB/T6438-2007、GB/T6432-2018、GB/T6434-2006 规定的方法测定生物絮团的粗灰分、粗脂肪和粗纤维。脂肪酸含量采用直接甲基酯化法测定^[13]。采用氨基酸分析仪(日立 L-8800, 日立, 日本), 按 GB/T5009.124-2003 测定氨基酸含量。粗蛋白质、粗脂肪、粗纤维、粗灰分和氨基酸的含量占生物絮团干重的百分比表示, 脂肪酸含量按该脂肪酸与总脂肪酸的相对含量表示。

1.3.4 肠道消化酶活性 胰蛋白酶(trypsin)、脂肪酶(lipase)和淀粉酶(amylase)采用试剂盒检测, 试剂盒购自南京建成生物工程研究所。货号为: No. A080-2、No. A054-1 和 No. C016-1, 操作按照试剂盒说明书进行。

1.3.5 水体和肠道 16S 高通量测序 泥鳅的全肠样本和水样的全基因组 DNA 提取、扩增并测序参照 Ren 等^[19]的研究。为了分析肠道菌群和水体菌群的多样性和组成, 提取后扩增细菌 16S rRNA 基因的 V3-V4 区域。16S rRNA 基因的通用引物对为 338F (5'-ACTCCTACGGAGGCAGCAG3')和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'), 利用 Illumina NovaSeq 平台进行测序。

1.4 数据计算

生长指标使用的计算公式:

$$B_G = W_F - W_1 \quad (1)$$

$$S_{GR} = [(\ln W_F - \ln W_1) / t] \times 100 \quad (2)$$

$$F_{AW} = W_F / N_F \quad (3)$$

$$F_{CR} = F_1 / (W_F - W_1) \quad (4)$$

$$S_R = (N_F / N_1) \times 100 \quad (5)$$

$$F_D = W_F / V \quad (6)$$

式中: B_G 为生物量的总增长, g; W_F 和 W_1 为终末和初始总重, g; S_{GR} 为特定生长率; F_{AW} 为平均最终质量, g; F_{CR} 为饵料系数; t 为总养殖周期, d; F_1 为总采食量, g; S_R 为成活率, %; N_1 和 N_F 为初始和终末泥鳅的总数; F_D 为实验结束时的密度, kg/m^3 ; V 为实验水体的总体积, L。

1.5 数据处理

实验数据采用 Excel 软件进行结果统计, 由 Origin 2021pro 软件绘制图形分析。实验数值用平均值±标准差(mean±SD)表示。采用 SPSS 26.0 软件对实验数据进行单因素方差分析。 $P < 0.05$ 认为差异显著。当发现有显著差异时, 采用邓肯多重比较来识别实验组之间的差异。不同的字母表示处理之间的显著差异($P < 0.05$)。

对于高通量测序数据, 采用克氏秩和检验组间各组肠道菌群之间的差异是否显著, 采用 Wilcoxon 秩和检验比较硝化型和光合自养型生物絮团之间的差异是否显著。 $P < 0.05$ 被认为差异显著。

2 结果与分析

2.1 养殖水体水质指标和絮团量

在 45 d 养殖周期中, CW 组、BFT 组和 ABFT 组各水质指标变化如图 1 (a~d) 所示。CW 组、BFT 组的 DO 和 pH 分别在 (8.13 ± 0.15) mg/L 和 (7.49 ± 0.16) mg/L 的范围内稳定波动; 而 ABFT 组的 DO 和 pH 随小球藻生物量的逐渐累积呈现上升的趋势。CW 组的 TAN 和 $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度分别稳定在 (0.16 ± 0.15) mg/L 和 (0.74 ± 0.49) mg/L; BFT 组和 ABFT 组 TAN 和 $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度分别维持在 (0.06 ± 0.08) mg/L 和 (0.01 ± 0.01) mg/L, (0.07 ± 0.09) mg/L 和 (0.01 ± 0.01) mg/L 的较低水平。实验结束后, BFT 组的 $\text{NO}_3\text{-N}$ 和 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 最终达到 (99.43 ± 5.32) mg/L 和 (48.63 ± 33.54) mg/L; ABFT 组的 $\text{NO}_3\text{-N}$ 和 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 最终达到 (49.25 ± 2.21) mg/L 和 (29.49 ± 2.25) mg/L。从图 1e 看出, 第 15 天开始藻细胞数量和叶绿素 a 浓度快速积累消耗大量营养盐, 使

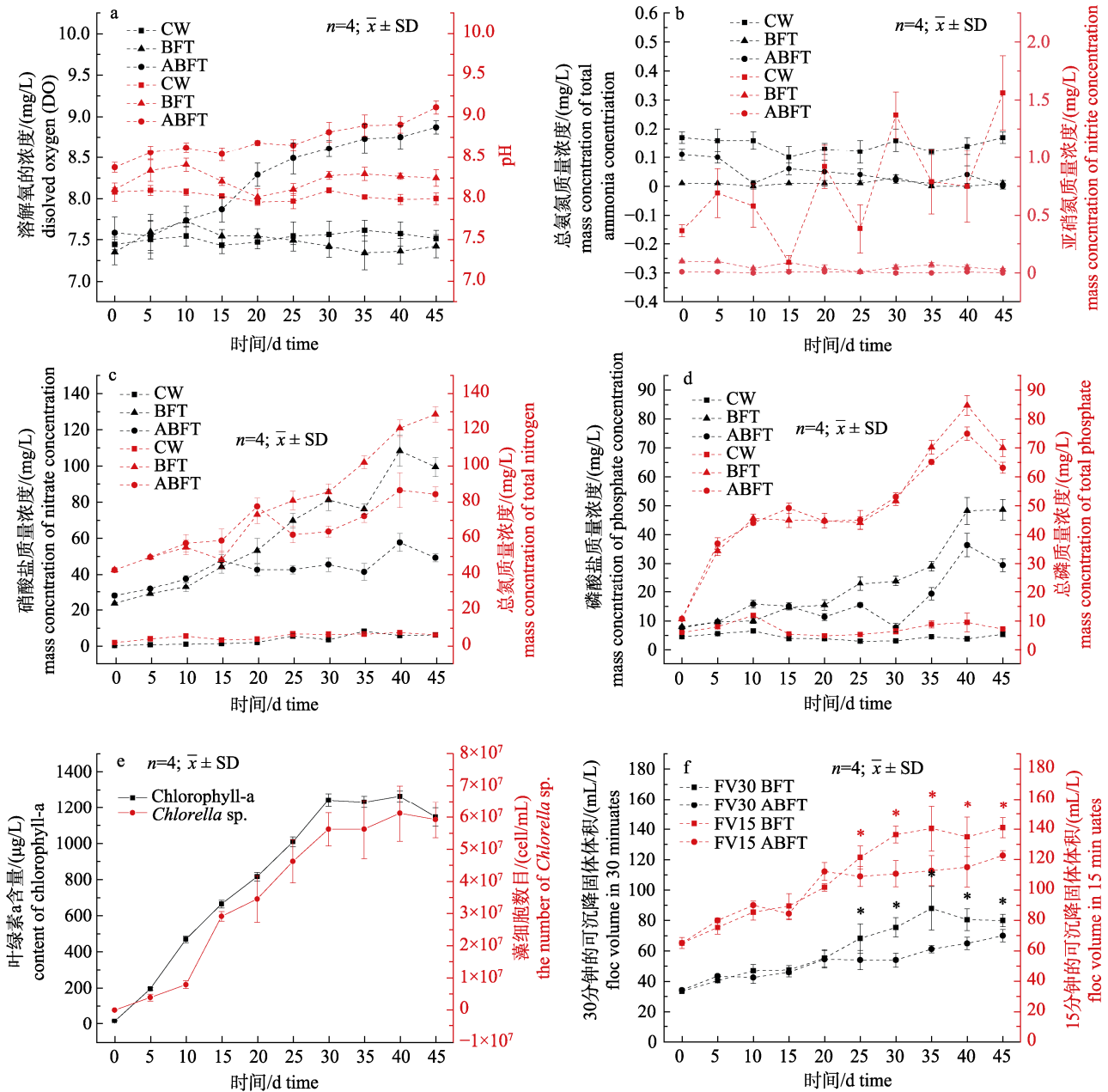


图 1 本研究养殖期间各组指标变化

各组水质指标的变化(a, b, c, d); ABFT 组叶绿素 a 含量和藻细胞数量变化(e); 实验期间 15、30 min 可沉降固体体积的变化(f).

*表示差异显著(P<0.05). BFT 组: 硝化型生物絮团组; ABFT 组: 光合自养型生物絮团组; CW 组: 清水换水组.

Fig. 1 Variation of basic index during culture in the study

Variations of water index in each group during culture (a, b, c, d); Variations in content of chlorophyll-a and the number of *Chlorella* sp. of group ABFT (e); Variations of settleable solids during the experimental period at minute 15 and minute 30 (f).

* Indicate significant differences (P<0.05). BFT group: nitrifying biofloc group; ABFT group: auto-photosynthetic biofloc group; CW group: clean water group.

得 ABFT 组的 NO₃-N、PO₄³⁻-P、TN 和 TP 水平低于 BFT 组。

BFT 组和 ABFT 组絮团量变化见图 1f。在前 20 d, BFT 组和 ABFT 组的 FV₁₅ 和 FV₃₀ 分别增至

(101.75±2.36) ml/L 和(55.25±5.74) ml/L, (112.25±5.91) ml/L 和(54.5±5.74) ml/L, 两组之间无显著性差异(P>0.05); 第 25 天后, BFT 组 FV₁₅ 和 FV₃₀ 显著高于 ABFT 组(P<0.05), 可沉降固体值随着

时间延长持续上升, 实验后期分别增至(141.00±6.63) ml/L 和(80.00±4.08) ml/L, (122.75±3.20) ml/L 和(70.00±4.08) ml/L。

2.2 生物絮团营养组成

实验结束后, 测定 BFT 组和 ABFT 组絮体的主要营养成分(表 1)、氨基酸(表 2)和脂肪酸(表 3)。ABFT 组粗蛋白质、粗脂肪和粗纤维含量分别为(40.20±1.05)%、(5.31±0.27)%和(4.48±0.14)%, 显著高于 BFT 组(P<0.05); ABFT 组粗灰分含量为(23.75±0.66)%, 显著低于 BFT 组(P<0.05)。

两组絮团共检测到 15 种氨基酸(表 2), BFT 组的丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸和缬氨酸含量显著高于 ABFT 组(P<0.05)。其他氨基酸组分之间差异不显著(P>0.05)。

两组絮团共检测出 18 种脂肪酸。表 3 列出了在两组中含量前 10 的脂肪酸, 其中 BFT 组的 C24 : 0, C18 : 1n9c, C18 : 0, C14 : 0 和 C12 : 0 的含量显著高于 ABFT 组(P<0.05); ABFT 组的 C20 : 3n3, C20 : 1n9, C18 : 2n6c 和 C16 : 1 的含量显著高于 BFT 组(P<0.05)。此外, ABFT 组两类不饱和脂肪酸含量显著高于 BFT 组(P<0.05)。

2.3 泥鳅生长状况

从表 4 可以看出, CW 组泥鳅的采食量、生物量增加、特定生长率、末均质量和成活率明显高

表 1 实验结束时絮团粗蛋白、粗脂肪、粗纤维、粗灰分含量(干重)

Tab. 1 The contents of crude protein, crude fat, crude fiber and ash in flocs at the end of the experiment (dry weight)

n=4; x̄ ±SD; %

Table with 3 columns: 絮团指标 flocs index, 实验组 BFT group, test group ABFT group. Rows include crude protein, crude fat, crude fiber, and crude ash.

注: 同列数据上标不同表示组间存在显著差异(P<0.05)。BFT 组: 硝化型生物絮团组; ABFT 组: 光合自养型生物絮团组。

Note: Different superscripts on the same row indicate significant differences between groups (P<0.05). BFT group: nitrifying biofloc group; ABFT group: auto-photosynthetic biofloc group.

表 2 接种和实验后各组氨基酸含量(干重) Tab. 2 The relative contents of amino acids in each group after experiment (dry weight)

n=4; x̄ ±SD; %

Table with 4 columns: 氨基酸 amino acid, 实验组 BFT group, test group ABFT group. Rows list various amino acids like Asp, Thr, Ser, Glu, Gly, Ala, Cys, Val, Met, Ile, Leu, Tyr, Phe, His, Lys, Arg, Pro.

注: 同列数据上标不同表示组间存在显著差异(P<0.05)。-表示由于缺少标准物质, 未检测到。BFT 组: 硝化型生物絮团组; ABFT 组: 光合自养型生物絮团组。

Note: Different superscripts on the same row indicate significant differences between groups (P<0.05). - indicates not detected because of missing standard substance. BFT group: nitrifying biofloc group; ABFT group: auto-photosynthetic biofloc group.

表 3 各组絮团脂肪酸与总脂肪酸相对含量 Tab. 3 The contents of flocs fatty acid relative to total flocs fatty acid after the experiment

n=4; x̄ ±SD; %

Table with 3 columns: 脂肪酸 fatty acid, 实验组 BFT group, test group ABFT group. Rows list fatty acids like C24:0, C20:3n3, C20:1n9, C18:2n6c, C18:1n9c, C18:0, C16:1, C14:0, C12:0, saturated and unsaturated fatty acids.

注: 同列数据上标不同表示组间存在显著差异(P<0.05)。BFT 组: 硝化型生物絮团组; ABFT 组: 光合自养型生物絮团组。

Note: Different superscripts on the same row indicate significant differences between groups (P<0.05). BFT group: nitrifying biofloc group; ABFT group: auto-photosynthetic biofloc group.

于 BFT 和 ABFT 组($P<0.05$); CW 组和 BFT 组的终末密度(FD)分别为(5.76 ± 0.05) kg/m^3 和(5.49 ± 0.29) kg/m^3 , 显著高于 ABFT 组($P<0.05$)。BFT 组和 ABFT 组饵料系数(FCR)分别为(1.38 ± 0.10)和(1.30 ± 0.09), 显著低于 CW 组($P<0.05$)。然而, BFT 组和 ABFT 组之间在采食量、特定生长率、末均质量和饵料系数方面没有显著性差异($P>0.05$)。

表 4 泥鳅的生长指标

Tab. 4 The growth performance of *Misgurnus anguillicaudatus* $n=4$; $\bar{x}\pm\text{SD}$

生长指标 growth index	对照组 control group	实验组 test group	
	CW 组 group CW	BFT 组 group BFT	ABFT 组 group ABFT
采食量/% food intake	87.02±0.70 ^a	52.52±3.45 ^b	45.27±4.33 ^b
生物量增加/g biomass gain	50.97±0.78 ^a	38.18±1.43 ^b	33.26±1.26 ^c
特定生长率/(%/d) specific growth rate	1.90±0.02 ^a	1.78±0.07 ^b	1.77±0.10 ^b
末均重/g final average weight	2.88±0.03 ^a	2.63±0.09 ^b	2.61±0.12 ^b
饵料系数 food coefficient	1.71±0.02 ^a	1.38±0.10 ^b	1.36±0.09 ^b
成活率/% survival rate	100.00±0.00 ^a	91.67±7.93 ^b	76.67±7.20 ^c
终末密度/(kg/m^3) final density	5.76±0.05 ^a	5.49±0.29 ^a	4.61±0.31 ^b

注: 同列数据上标不同表示组间存在显著差异($P<0.05$)。BFT 组: 硝化型生物絮团组; ABFT 组: 光合自养型生物絮团组; CW 组: 清水换水组。

Note: Different superscripts on the same row indicate significant differences between groups ($P<0.05$). BFT group: nitrifying biofloc group; ABFT group: auto-photosynthetic biofloc group; CW group: clean water group.

表 6 各组中微生物多样性分析

Tab. 6 Analysis of microbial community in each group

$n=4$; $\bar{x}\pm\text{SD}$

组别 group	丰富度指数 richness			多样性指数 diversity	
	Sobs	chao1	Ace	Simpson	Shannon
WCW	290.33±33.17 ^b	356.88±34.73 ^b	349.64±31.64 ^b	0.15±0.05 ^a	2.83±0.41 ^b
WBFT	586.00±16.99 ^a	684.42±17.55 ^a	667.64±20.13 ^a	0.04±0.01 ^b	4.24±0.18 ^a
WABFT	569.67±28.57 ^a	679.63±26.97 ^a	658.61±32.56 ^a	0.05±0.02 ^b	4.08±0.24 ^a
GCW	625.50±175.42 ^a	670.40±179.92 ^a	667.36±178.22 ^a	0.08±0.04 ^b	3.69±0.76 ^a
GBFT	328.75±115.19 ^b	430.79±154.82 ^a	394.66±54.96 ^a	0.28±0.23 ^{ab}	2.74±1.15 ^{ab}
GABFT	289.25±94.07 ^b	404.30±135.61 ^a	465.13±156.92 ^a	0.36±0.25 ^a	1.96±0.94 ^b

注: BFT 组: 硝化型生物絮团组; ABFT 组: 光合自养型生物絮团组; CW 组: 清水换水组。WCW、WBFT 和 WABFT 分别为 CW 组、BFT 组和 ABFT 组水体样本; GCW、GBFT 和 GABFT 分别为 CW 组、BFT 组和 ABFT 组肠道样本。同行数据上标不同表示组间存在显著差异($P<0.05$)。

Notes: BFT group: nitrifying biofloc group; ABFT group: auto-photosynthetic biofloc group; CW group: clean water group. WCW, WBFT and WABFT are water samples of group CW, BFT and ABFT respectively; GCW, GBFT and GABFT are gut samples of group CW, BFT and ABFT respectively. Values in the same row with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

2.4 泥鳅的消化酶活性

ABFT 组泥鳅胰蛋白酶活性和脂肪酶活性分别为(51.40 ± 2.37) U/mg (prot)和(41.43 ± 1.58) U/mg (prot), 显著高于 CW 组和 BFT 组($P<0.05$); 此外, BFT 组脂肪酶活性为(34.90 ± 3.04) U/mg (prot), 显著高于 CW 组($P<0.05$); 但各组间淀粉酶活性无显著性差异($P>0.05$)(表 5)。

表 5 各组泥鳅的消化酶活性

Tab. 5 Digestive enzyme activity of *Misgurnus anguillicaudatus* in each group

$n=4$; $\bar{x}\pm\text{SD}$

组别 group	消化酶 Digestive enzyme		
	胰蛋白酶/ [U/mg (prot)] Trypsin	脂肪酶/ [U/mg (prot)] Lipase	淀粉酶/ [U/mg (prot)] Amylase
CW 组 group CW	41.43±1.78 ^b	27.18±1.61 ^c	4.90±0.27 ^a
BFT 组 group BFT	40.63±2.56 ^b	34.90±3.04 ^b	4.49±0.63 ^a
ABFT 组 group ABFT	51.40±2.37 ^a	41.43±1.58 ^a	5.20±0.45 ^a

注: 同行数据上标不同表示组间存在显著差异($P<0.05$)。BFT 组: 硝化型生物絮团组; ABFT 组: 光合自养型生物絮团组; CW 组: 清水换水组。

Notes: Values in the same row with different superscripts are significantly different ($P<0.05$). BFT group: nitrifying biofloc group; ABFT group: auto-photosynthetic biofloc group; CW group: clean water group.

2.5 水体和肠道中微生物群落结构

2.5.1 水体和泥鳅肠道细菌的 Alpha 多样性分析

水体和肠道菌群的 Alpha 多样性结果见表 6。BFT 组、ABFT 组和 CW 组在水体微生物群的多样性和丰富度指数方面有显著性差异($P<0.05$)。然而, 这些指标在 BFT 组和 ABFT 组之间没有显著性差异($P>0.05$)。在肠道微生物群中, CW 组的微生物

数量(sobs)和 Shannon 指数显著高于 BFT 组和 ABFT 组, Simpson 指数显著低于 BFT 组和 ABFT 组($P<0.05$)。

2.5.2 水体和肠道细菌群落的差异 利用多变量统计分析来比较 BFT 组和 ABFT 组肠道和养殖水体细菌群落的操作分类单元(OTU)水平进行评估。通过基于 Bray-Curtis 距离算法进行主成分分析(PCoA), 如图 2, BFT 组和 ABFT 组养殖水环境聚集在主坐标相同的位置, 但两组肠道细菌群落聚集到主坐标的不同位置, 表明泥鳅肠道微生物群落有显著差异($P<0.05$)。

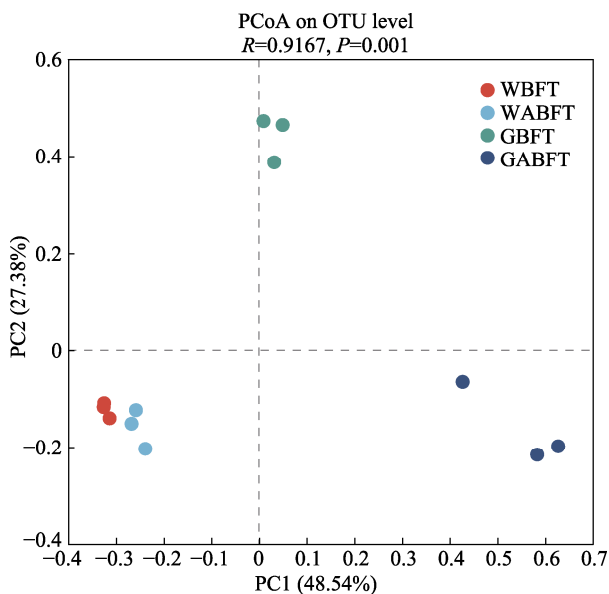


图 2 主成分细菌群落分析

BFT 组: 硝化型生物絮团组; ABFT 组: 光合自养型生物絮团组; CW 组: 清水换水组。WBFT 和 WABFT 分别为 BFT 组和 ABFT 组水体样本; GBFT 和 GABFT 分别为 BFT 组和 ABFT 组肠道样本。

Fig. 2 PCoA flora analysis

BFT group: nitrifying biofloc group; ABFT group: auto-photosynthetic biofloc group; CW group: clean water group. WBFT and WABFT are water samples of group BFT and ABFT respectively; GBFT and GABFT are gut samples of group BFT and ABFT respectively.

2.6 水体和泥鳅肠道微生物群落组成分析

养殖水体和泥鳅肠道中检测到的微生物种群如图 3 所示。水环境中, 在门水平上, 变形菌门(Proteobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、放线菌门(Actinobacteriota)和拟杆菌门(Bacteroidota)是本研究中 BFT 和 ABFT 组中的主要细菌门类。在属水

平上, BFT 组的优势菌是暖绳菌属(*Caldilineaceae*)、中村氏菌属(*Nakamurella*)和 JG30-KF-CM45; ABFT 组中的优势细菌是暖绳菌属, 中村氏菌属和根瘤菌属(*Rhizobiales_Incertae_Sedis*)。

泥鳅肠道中, 在门水平上, CW 组优势菌群为变形菌门和拟杆菌门, BFT 组优势菌群为放线菌门和变形菌门, ABFT 组优势菌群为变形菌门和蓝藻门(Cyanobacteria)。在属水平上, CW 组主要优势菌为根瘤菌科未知属和 *norank_f_JG30-KF-CM45*。BFT 组为分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、根瘤菌科未知属和 *norank_f_JG30-KF-CM45*。ABFT 组为气单胞菌属(*Aeromonas*)。

2.7 水体和肠道微生物群落差异性分析

如图 4, 显著性分析表明, 水体中 BFT 组和 ABFT 组在门水平上的优势种群没有显著性差异($P>0.05$)。属水平上前 15 个优势物种中, 文氏菌属(*Lewinella*), 寡曲菌属(*Oligoflexus*), 红螺菌属(*Rhodoacteraeae*)在 BFT 和 ABFT 组之间存在显著性差异($P<0.05$)。

肠道中, 门水平上, BFT 组较 CW 组和 ABFT 组, 放线菌门的丰度显著增加了($P<0.05$); CW 组和 BFT 组较 ABFT 组, 浮霉菌门(planctomycetota)的丰度显著增加($P<0.05$)。属水平上, ABFT 组与 BFT 组和 CW 组相比, 气单胞菌属的丰度显著增加($P<0.05$); BFT 组中 *JG30-KF-CM45*, 浮游菌科未知属(*norank_f_Gemmataceae*), 暖蝇菌科未知属(*norank_f_Caldilineaceae*), 阿马利球菌属(*Amaricoccus*), 黄杆菌科未知属(*unclassified_f_Xanthobacteraceae*), 真杆菌属(*Bauldia*)和 *norank_f_norank_o_0319-6G20*的丰度显著增加($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 BFT 和 ABFT 絮团对水质的影响

本研究中, 硝化型 BFT 系统和光合自养型 ABFT 系统都将水体中氨氮、亚硝氮维持在较低水平, 这与大多数针对 BFT 系统水质变化的研究类似^[20-23]。同时, ABFT 组较 BFT 组额外吸收了 40.93%的硝酸盐和 37.47%的磷酸盐, 原因在于 ABFT 系统中持续产生的无机氮化合物和磷酸盐可被小球藻作为营养底物利用。相关研究也发现

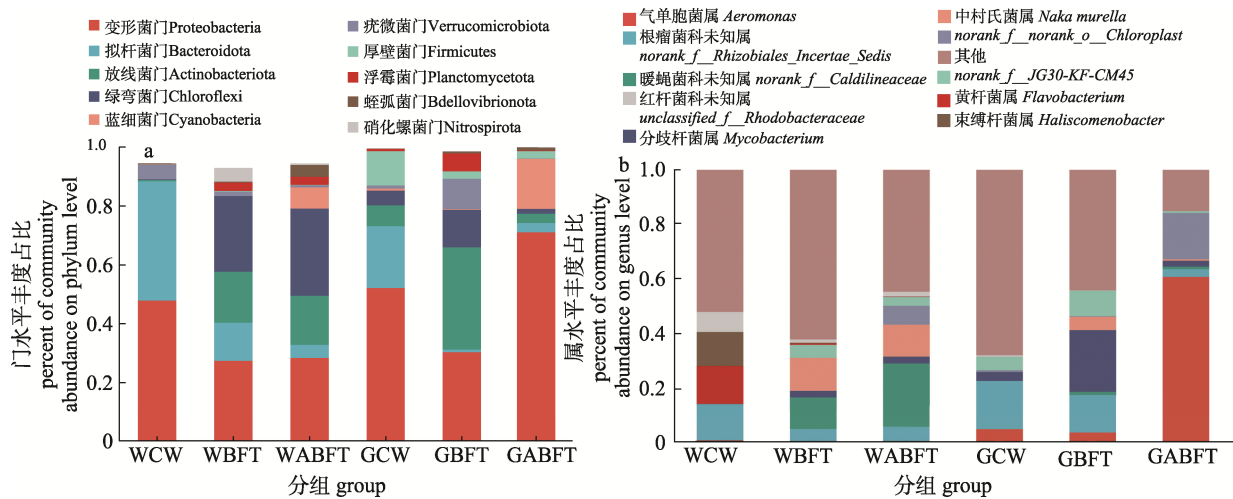


图 3 门水平(a)和属水平(b)微生物群落柱状图

BFT 组: 硝化型生物絮团组; ABFT 组: 光合自养型生物絮团组; CW 组: 清水换水组。WCW、WBFT 和 WABFT 分别为 CW 组、BFT 组和 ABFT 组水体样本; GCW、GBFT 和 GABFT 分别为 CW 组、BFT 组和 ABFT 组肠道样本。

Fig. 3 Microbiome histogram on phylum level (a) and genus level (b)

BFT group: nitrifying biofloc group; ABFT group: auto-photosynthetic biofloc group; CW group: clean water group. WCW, WBFT and WABFT are water samples of group CW, BFT and ABFT respectively; GCW, GBFT and GABFT are gut samples of group CW, BFT and ABFT respectively.

小球藻和斜生栅藻(*Tetrademus obliquus*)对于工业化循环水养殖废水(罗非鱼养殖密度为 17 kg/m^3)中的硝酸盐和磷酸盐具有较好的去除率, 分别为 78%、80%和 97%、99%^[15]。另外, 于永霞等^[24]研究发现, 在菌藻 ABFT 系统运行后期, 由于藻类大量死亡释放出的营养物质会导致罗非鱼养殖水质恶化。本实验养殖周期内尚未出现藻类大量死亡, 是否会随养殖周期延长而出现水质波动尚有待进一步研究。

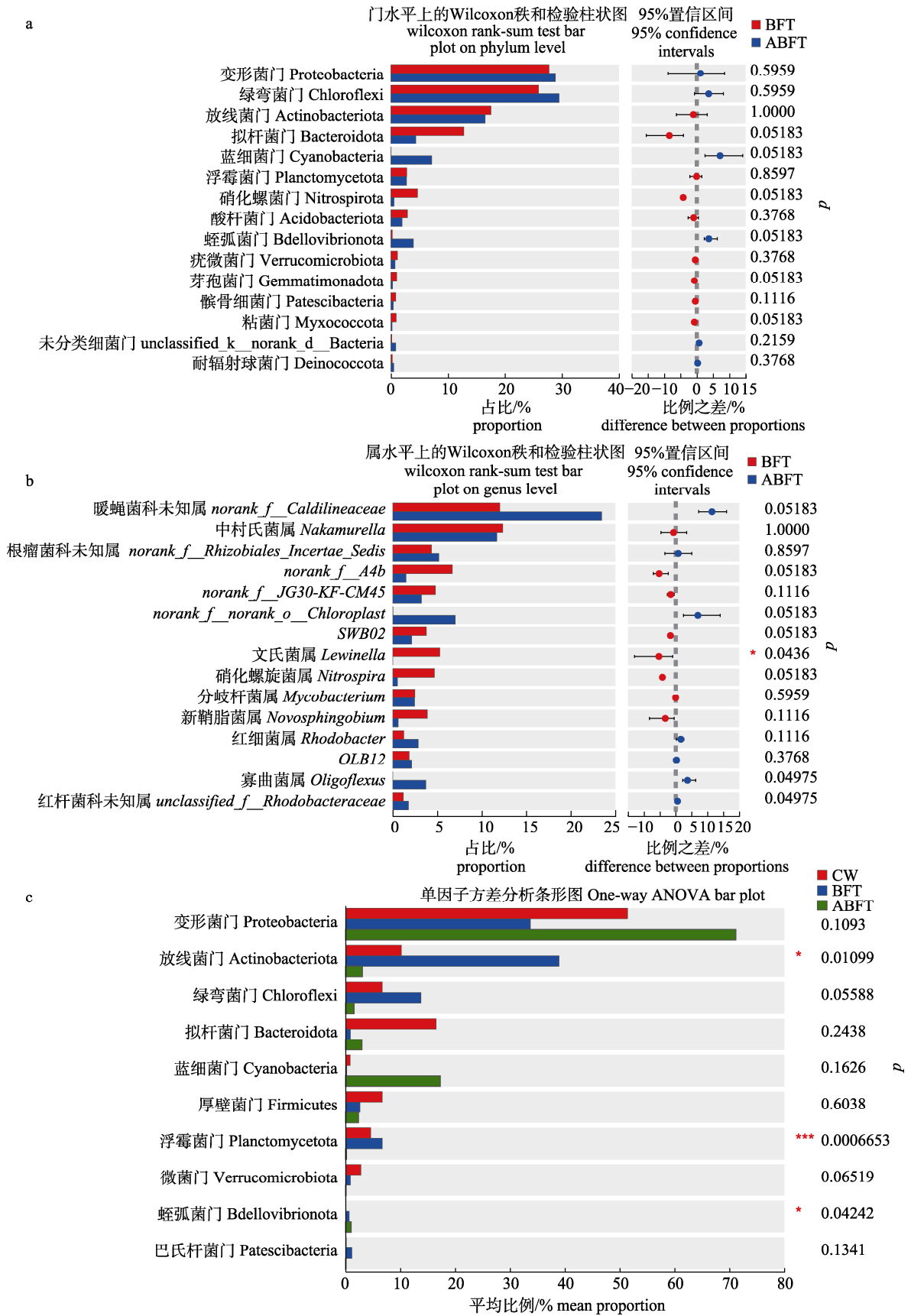
FV 是衡量生物絮凝体系中可沉降固体物浓度的指标^[25]。本实验养殖系统运行 20 d 后, BFT 组 FV_{15} 和 FV_{30} 显著高于 ABFT 组(图 1)。有相关研究表明, ABFT 系统随着小球藻生物量的累积, 藻类会逐渐成为 ABFT 系统的主导^[26], 并且同时增加絮凝体的体积和密度, 促进共生絮团的聚集和沉降^[27], 这与本实验研究结果相符。Hargreaves^[28]推荐 BFT 罗非鱼养殖系统中适宜 FV_{30} 为 25~50 mL/L; Pérez-Fuentes 等^[9]研究认为, 在以硝化为主的 BFT 养殖系统中 FV_{30} 为 20~75 mL/L 时可以实现最优硝化作用, 本实验 BFT 组养殖后期 FV_{30} 为 50~60 mL/L, 氨氮和亚硝氮也得到较好控制。

3.2 BFT 和 ABFT 絮团营养组成情况和对泥鳅生长的影响

Gogoi 等^[29]以螺旋藻为单一蛋白源制成含有

35%粗蛋白的饲料对皇后泥鳅(*Botia dario*)生长有明显的促进效果。本实验中, BFT 组和 ABFT 组絮团粗蛋白含量分别为 $(36.69 \pm 1.17)\%$ 和 $(40.20 \pm 1.05)\%$, 达到商业饲料粗蛋白含量水平; ABFT 组絮团中粗脂肪含量显著高于 BFT 组絮团($P < 0.05$), 说明添加小球藻可以提高生物絮团中粗脂肪的含量。Martins 等^[30]研究也证实了在生物絮团中添加藻类可以显著增加絮团中粗脂肪含量。此外, Gao 等^[31]认为向生物絮团中补充藻类有助于脂肪酸谱由饱和脂肪酸向不饱和转化, 使得脂肪酸质量和利用效率明显提高, 这些结论与本研究结果相同。

目前, 以罗非鱼为对象的生物絮团养殖研究案例较为广泛。从经济角度来看, 生物絮团在罗非鱼养殖中可以实现部分饲料替代($41.1\% \sim 58.9\%$)^[32]。Avnimelech 等^[33]通过同位素示踪发现罗非鱼每天可从浓度约为 200 mg/L 的生物絮团系统中摄取氮 242 mg/kg (相当于每天摄取 1.56 g 蛋白质)的微生物蛋白, 相当于罗非鱼正常蛋白质摄入量的 25%。本实验周期内, BFT 组和 ABFT 组较清水投饲 CW 组节约了 37.5%的饲料量, 泥鳅利用生物絮团中悬浮的微生物蛋白补充了生长需要的部分, 同样实现了部分营养替代和更高的饲料转化率, 且在养殖周期结束后, BFT 组和 CW 组的终末密度没有显著性差异。Castro 等^[6]在对



(待续 to be continued)

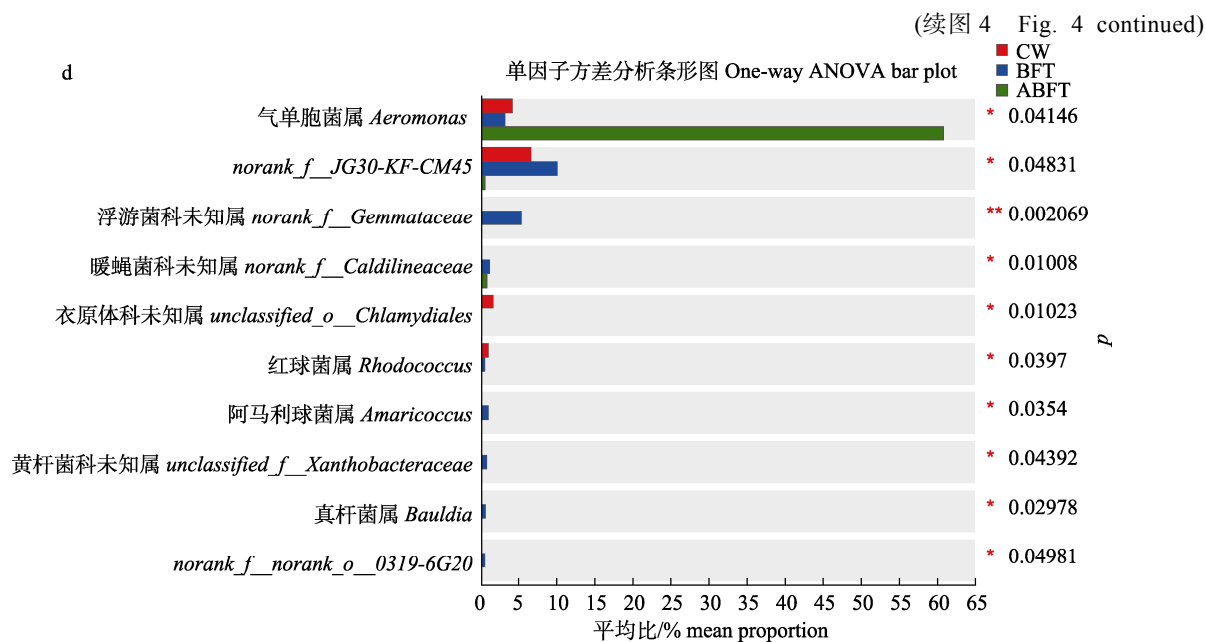


图 4 水体优势菌群在门水平(a)和属水平上的显著差异分析(b)以及肠道菌群在门水平(c)和属水平(d)上的显著差异分析
BFT 组: 硝化型生物絮团组; ABFT 组: 光合自养型生物絮团组; CW 组: 清水换水组; 显著性($P < 0.05$)用*表示。

Fig. 4 The significant difference analysis of dominant flora in water at phylum level (a) and genus level (b) and significant difference analysis of gut flora at phylum level (c) and genus level (d)
BFT Group: nitrifying biofloc group; ABFT group: auto-photosynthetic biofloc group;
CW group clean water group; significance ($P < 0.05$) indicated by *.

虾 BFT 养殖实验结束后认为, 饲料对对虾生长的营养贡献率超过 90%, 其余生长可归因于生物絮团的营养价值。并且, 在 BFT 和 ABFT 系统中, 异养细菌、自养细菌和藻类都可以很好地吸收转化由残饵、粪便以及养殖动物排泄产生的氨氮和亚硝氮, 减少为维持水质产生的换水频率^[15,21,33], 可节约 67.4%~75.5%的水质处理成本^[32]。

本实验对两组絮团营养成分中氨基酸分析显示, 絮团中泥鳅生长所需的赖氨酸含量较低。有研究指出, BFT 和 ABFT 系统絮团提供的必需氨基酸和脂肪酸不能完全满足养殖对象的营养需求^[11,33]。因此, 当部分饲料被絮团替代后, 会导致关键营养摄入不充分的问题。而本实验中由于絮团本身营养成分缺乏, 必需氨基酸含量较低, 这导致实验组泥鳅营养转化受限, 特定生长率和末均质量显著低于对照组($P < 0.05$)。所以商业养殖生产仍然建议搭配配合饲料进行, 这与 Poli 等^[34]和 Avnimelech 等^[33]得出的结论类似。

3.3 BFT 和 ABFT 絮团对泥鳅消化酶活性的影响

本实验中, ABFT 组养殖泥鳅的胰蛋白酶、脂肪酶活性均显著高于另外两组($P < 0.05$), 这可能与

ABFT 组絮团中营养成分含量(蛋白质和脂肪水平)较高有关。Adineh 等^[35]研究证明, 随着日粮蛋白质水平的增加, 生物絮团系统中养殖对象肠道胰蛋白酶活性也会增加。Luo 等^[36]对 BFT 养殖系统的研究认为生物絮团具有提高养殖对象蛋白酶和淀粉酶活性的潜力。本研究中, 较高的酶活性使得泥鳅对相应营养利用效率最高, 饵料系数最低, 但各组之间没有观察到淀粉酶活性存在显著性差异, 这可能与饲料提供了足够泥鳅利用的粗纤维有关。

3.4 BFT 和 ABFT 絮团细菌群落结构和对泥鳅肠道菌群的影响

BFT 系统培养初期的生物絮团中细菌群落结构会发生较大变化, 但环境稳定的成熟阶段, 浮霉菌门、变形菌门、拟杆菌门和厚壁菌门的微生物都可能成为优势菌群^[37]。本实验中, BFT 组和 ABFT 组养殖后期细菌群落结构中的优势菌群相似度较高且均为变形菌门, 其次是绿弯菌门和放线菌门。绿弯菌门微生物是菌藻共生生物膜稳定性能的主要贡献者^[38]; 放线菌门微生物被证实对复杂碳水化合物具有降解能力^[39]。清水 CW 组则以变形菌门(48.48%)和拟杆菌门(40.09%)为优势

种群(图 3)。Peiro-Alcantar 等^[40]研究认为添加不同底物只会影响生物絮团的形成过程,但对稳定阶段成熟絮体中细菌群落结构没有影响。本实验中 BFT 和 ABFT 组均使用接种成熟生物絮团的方式调配养殖用水,结果显示接种小球藻也并未影响养殖后期稳定生物絮团细菌在门属水平的结构和丰度,与 Peiro-Alcantar 等^[40]研究结果一致。

肠道微生物菌群结构和多样性对鱼类的健康至关重要^[41-42]。本实验通过对泥鳅肠道菌群高通量测序分析发现, BFT 和 ABFT 组中的肠道微生物多样性均较 CW 组减少,其中 ABFT 组减少显著($P < 0.05$),这可能与生物絮团中的微生物和藻类在肠道中定殖影响了原本肠道的菌群平衡有关。但 Dong 等^[43]向凡纳滨对虾幼体 BFT 养殖系统中添加扁藻属(*Platymonas*)增加了对虾肠道菌群的物种丰富度和多样性,从而提高了养殖对象的成活率;Huang 等^[42]的研究指出,只有在罗非鱼 BFT 养殖系统中添加少量小球藻才能提高养殖对象肠道菌群的 alpha 多样性,对罗非鱼肠道健康产生积极影响。本实验中,较高的光照强度促进藻类繁殖,导致 ABFT 组泥鳅成活率下降,这与上述研究结果不同。因此,实验后期 ABFT 系统中小球藻大量生长是否会导致泥鳅肠道菌群多样性受到影响有待进一步深入研究。

鱼类肠道是病原的重要载体之一,肠道微生物群落的研究对揭示鱼类病原入侵过程、肠道免疫、鱼类健康以及相关疾病防控有重要意义^[41]。生物絮团中含有大量微生物,当其作为额外的营养被养殖对象不同程度摄食利用时,部分细菌可在养殖对象肠道中定植^[20,44]。本研究中,各组泥鳅肠道微生物在门水平优势菌群都是变形菌门微生物,该门细菌在天然水体也大量存在,占据了海水细菌生物量的 64%和淡水的 40%^[45];其次,在 BFT 组泥鳅肠道中发现较高丰度的放线菌门微生物,这类细菌除了可以促进絮凝体的形成,还可提供针对鱼类病原体的二级保护外^[36,38];另外,ABFT 组被给予一定光照强度,水体和泥鳅肠道都检测出一定丰度的蓝藻门微生物,在 Miranda-Baeza 等^[46]的研究中,向养殖水体添加蓝藻会显著降低罗非鱼的成活率,这也可以佐证本实验 ABFT 组泥鳅较低的成活率。在属水平上,ABFT

组检测出高丰度的气单胞菌属,该细菌是杂食性鱼类肠道中的优势菌群^[47],该属细菌有较强致病性,在 ABFT 组泥鳅肠道中大量存在会使泥鳅肠道菌群失衡,患病概率增加,是导致该组泥鳅成活较低的重要原因之一。Yang 等^[48]针对泥鳅肠道菌群研究发现,在饲料中补充瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)可对泥鳅肠道中气单胞菌属微生物有抑制作用,在泥鳅絮凝养殖模式中可以作为肠道菌群调控手段。此外,在 CW 组和 BFT 组泥鳅肠道还检测出较高丰度的根瘤菌属微生物,同时,水体菌群也含有一定丰度的根瘤菌属,该属细菌是土壤中常见的优势菌群,通常起到固氮作用^[49],但在水产养殖中对养殖环境和养殖对象肠道中微生物平衡以及生物健康的影响尚不明确,仍有待进一步研究。

4 结论

综上所述,在硝化型 BFT 和光合自养型 ABFT 生物絮团系统中进行泥鳅养殖,絮团和菌藻共生体可以很好地控制水质,减少水资源消耗;絮体含有较高营养价值,可以被泥鳅摄食,部分替代饲料,减少饲料成本;泥鳅消化道酶活性提高,增加饲料转化率、提高养殖性能;成熟 BFT 和 ABFT 系统微生物群落构成稳定,会影响系统内养殖泥鳅肠道微生物群落结构。因此,这两种生物絮团养殖方式都可以作为泥鳅等特殊品种潜在的绿色健康养殖新模式,本文的研究结果为我国特种养殖对象与新养殖模式的结合提供了理论基础。

参考文献:

- [1] Bostock J, McAndrew B, Richards R, et al. Aquaculture: global status and trends[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2010, 365(1554): 2897-2912.
- [2] Yang L Y, Huang X F, Pan D X, et al. Current situation and control measures of organic pollution in pond aquaculture[J]. Modern Rural Science and Technology, 2023(1): 108-109. [杨羚钰, 黄兴粉, 盘道兴, 等. 池塘水产养殖有机污染的现状与控制措施[J]. 现代农村科技, 2023(1): 108-109.]
- [3] Notice of the General Office of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs on the Implementing the "Five Major Actions" of Green and Healthy Aquaculture in 2020[R]. Gazette of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, 2020(5): 86-87. [农业农村部办公厅关于实施 2020 年水产绿色健康养殖“五大行动”的通知[R]. 中华人民共和国农业农村部公报, 2020(5): 86-87.]

- [4] Yu Y B, Choi J H, Lee J H, et al. Biofloc Technology in Fish Aquaculture: A Review[J]. *Antioxidants*, 2023, 12(2): 398.
- [5] Khanjani M H, Sharifinia M, Hajirezaee S. Recent progress towards the application of biofloc technology for tilapia farming[J]. *Aquaculture*, 2022, 552: 738021.
- [6] Castro L F, Pinto R C C, Nunes A J P. Nutrient value and contribution of microbial floc to the growth performance of juvenile shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed fatty acid and amino acid-restrained diets under a zero-water exchange intensive system[J]. *Aquaculture*, 2021, 531: 735789.
- [7] Wei Y F, Liao S A, Wang A. The effect of different carbon sources on the nutritional composition, microbial community and structure of bioflocs[J]. *Aquaculture*, 2016, 465: 88-93.
- [8] 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.
- [9] Pérez-Fuentes J A, Hernández-Vergara M P, Pérez-Rostro C I, et al. C: N ratios affect nitrogen removal and production of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised in a biofloc system under high density cultivation[J]. *Aquaculture*, 2016, 452: 247-251.
- [10] 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.
- [11] Nisar U, Peng D, Mu Y, et al. A solution for sustainable utilization of aquaculture waste: a comprehensive review of biofloc technology and aquamimicry[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 8: 791738.
- [12] Angela D, Arbi S, Natrah F M I, et al. Evaluation of *Chlorella* sp. and *Ankistrodesmus* sp. addition on biofloc system performance in giant prawn culture[J]. *Aquaculture Research*, 2021, 52(12): 6052-6062.
- [13] Griffiths M J, Van Hille R P, Harrison S T L. Selection of direct transesterification as the preferred method for assay of fatty acid content of microalgae[J]. *Lipids*, 2010, 45: 1053-1060.
- [14] Ekasari J, Nugroho U A, Fatimah N, et al. Improvement of biofloc quality and growth of *Macrobrachium rosenbergii* in biofloc systems by *Chlorella* addition[J]. *Aquaculture International*, 2021, 29: 2305-2317.
- [15] Jung J Y, Damusaru J H, Park Y, et al. Autotrophic biofloc technology system (ABFT) using *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* positively affects performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Algal research*, 2017, 27: 259-264.
- [16] Zhang Y L, Fan Q X. Farming mode and management techniques of loach[J]. *Aminal. Farming Feed*, 2011, 9: 22-24.
- [17] State Environmental Protection Administration of China. Methods of monitoring and analyzing for water and wastewater[M]. 4th ed. Beijing: China Environmental Science Press, 2002: 836. [国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法第4版[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 836]
- [18] Lee C S, Lee S A, Ko S R, et al. Effects of photoperiod on nutrient removal, biomass production, and algal-bacterial population dynamics in lab-scale photobioreactors treating municipal wastewater[J]. *Water research*, 2015, 68: 680-691.
- [19] Ren Y, Yu G, Shi C P, et al. Majorbio Cloud: A one-stop, comprehensive bioinformatic platform for multiomics analyses[J]. *IMeta*, 2022, 1(2): e12.
- [20] Deng M, Chen J Y, Gou J W, et al. The effect of different carbon sources on water quality, microbial community and structure of biofloc systems[J]. *Aquaculture*, 2018, 482: 103-110.
- [21] Liu H K, Li H D, Wei H, et al. Biofloc formation improves water quality and fish yield in a freshwater pond aquaculture system[J]. *Aquaculture*, 2019, 506: 256-269.
- [22] Ray A J, Drury T H, Cecil A. Comparing clear-water RAS and biofloc systems: Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production, water quality, and biofloc nutritional contributions estimated using stable isotopes[J]. *Aquacultural Engineering*, 2017, 77: 9-14.
- [23] Zhang Y, Yang Y Z, Chen X Q, et al. Ammonia nitrogen treatment capacity and nutrient composition of bioflocs with different particle sizes[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(3): 295-306. [张扬, 杨逸尊, 陈晓庆, 等. 不同粒径的生物絮团氨氮处理能力和营养成分组成[J]. 中国水产科学, 2020, 27(3): 295-306.]
- [24] Yu Y X, Luo G Z, Liu W C, et al. Preliminary study on culturing tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*) with algal-bacterial biofloc technology[J]. *Freshwater Fisheries*, 2019, 49(5): 80-85, 92. [于永霞, 罗国芝, 刘文畅, 等. 罗非鱼藻菌共处型生物絮团养殖系统的初步探究[J]. 淡水渔业, 2019, 49(5): 80-85, 92.]
- [25] Fimbres-Acedo Y E, Magallón-Servín P, Garza-Torres R, et al. *Oreochromis niloticus* aquaculture with biofloc technology, photoautotrophic conditions and *Chlorella* microalgae[J]. *Aquaculture Research*, 2020, 51(8): 3323-3346.
- [26] Bilanovic D, Holland M, Starosvetsky J, et al. Co-cultivation of microalgae and nitrifiers for higher biomass production and better carbon capture[J]. *Bioresource technology*, 2016, 220: 282-288.
- [27] Lee J M, Cho D H, Ramanan R, et al. Microalgae-associated bacteria play a key role in the flocculation of *Chlorella vulgaris*[J]. *Bioresource technology*, 2013, 131: 195-201.
- [28] Hargreaves J A. Biofloc production systems for aquaculture[M]. Stoneville, MS: Southern Regional Aquaculture Center, 2013: 5.
- [29] Gogoi S, Mandal S C, Patel A B. Effect of dietary *Wolffia arrhiza* and *Spirulina platensis* on growth performance and pigmentation of Queen loach *Botia dario* (Hamilton, 1822)[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2018, 24(1): 285-291.
- [30] Martins T G, Odebrecht C, Jensen L V, et al. The contribution of diatoms to bioflocs lipid content and the performance of juvenile *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in a BFT culture system[J]. *Aquaculture Research*, 2016, 47(4): 1315-1326.
- [31] Gao F, Yang H L, Li C, et al. Effect of organic carbon to nitrogen ratio in wastewater on growth, nutrient uptake and

- lipid accumulation of a mixotrophic microalgae *Chlorella* sp.[J]. *Bioresource technology*, 2019, 282: 118-124.
- [32] García-Ríos L, Miranda-Baeza A, Coelho-Emerenciano M G, et al. Biofloc technology (BFT) applied to tilapia fingerlings production using different carbon sources: Emphasis on commercial applications[J]. *Aquaculture*, 2019, 502: 26-31.
- [33] Avnimelech Y, Kochba M. Evaluation of nitrogen uptake and excretion by tilapia in bio floc tanks, using ¹⁵N tracing[J]. *Aquaculture*, 2009, 287(1-2): 163-168.
- [34] Poli M A, Legarda E C, de Lorenzo M A, et al. Integrated multitrophic aquaculture applied to shrimp rearing in a biofloc system[J]. *Aquaculture*, 2019, 511: 734274.
- [35] Adineh H, Naderi M, Jafaryan H, et al. Effect of stocking density and dietary protein level in biofloc system on the growth, digestive and antioxidant enzyme activities, health, and resistance to acute crowding stress in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2022, 2022: 9344478.
- [36] Luo G Z, Gao Q, Wang C H, et al. Growth, digestive activity, welfare, and partial cost-effectiveness of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in a recirculating aquaculture system and an indoor biofloc system[J]. *Aquaculture*, 2014, 422: 1-7.
- [37] Garibay-Valdez E, Martínez-Córdova L R, Vargas-Albores F, et al. The biofouling process: The science behind a valuable phenomenon for aquaculture[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2023, 15(3): 976-990.
- [38] Zhang X Y, Ji B, Tian J L, et al. Development, performance and microbial community analysis of a continuous-flow microalgal-bacterial biofilm photoreactor for municipal wastewater treatment[J]. *Journal of Environmental Management*, 2023, 338: 117770.
- [39] Wirth R, Pap B, Dudits D, et al. Genome-centric investigation of anaerobic digestion using sustainable second and third generation substrates[J]. *Journal of Biotechnology*, 2021, 339: 53-64.
- [40] Peiro-Alcantar C I, Miranda-Baeza A, Garibay-Valdez E, et al. Mature biofloc harbor similar bacterial communities regardless of the vegetal floating substrates (oat, amaranth, or wheat) used as promoters[J]. *Aquaculture International*, 2023, 31(1): 141-155.
- [41] Xiong J B, Nie L, Chen J. Current understanding on the roles of gut microbiota in fish disease and immunity[J]. *Zoological research*, 2019, 40(2): 70.
- [42] Huang Z C, Gao J Y, Peng C Y, et al. The Effect of the Microalgae *Chlorella vulgaris* on the Gut Microbiota of Juvenile Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Is Feeding-Time Dependent[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(4): 1002.
- [43] Dong S, Li Y, Huang F, et al. Enhancing effect of *Platymonas* addition on water quality, microbial community diversity and shrimp performance in biofloc-based tanks for *Penaeus vannamei* nursery[J]. *Aquaculture*, 2022, 554: 738057.
- [44] Khanjani M H, Mozanzadeh M T, Sharifinia M, et al. Biofloc: A sustainable dietary supplement, nutritional value and functional properties[J]. *Aquaculture*, 2022, 562: 738757.
- [45] Battistuzzi F U, Hedges S B. A major clade of prokaryotes with ancient adaptations to life on land[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2009, 26(2): 335-343.
- [46] Miranda-Baeza A, Mariscal-López M A, López-Eliás J A, et al. Effect of inoculation of the cyanobacteria *Oscillatoria* sp. on tilapia biofloc culture[J]. *Aquaculture Research*, 2017, 48(9): 4725-4734.
- [47] Dong H T, Techatanakitarnan C, Jindakittikul P, et al. *Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* caused disease and mortality in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.)[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2017, 40(10): 1395-1403.
- [48] Yang G, Cui X L, Liu S, et al. Effects of dietary *Lactobacillus helveticus* on the growth rate, disease resistance and intestinal health of pond loach (*Misgurnus anguillicaudatus*)[J]. *Aquaculture*, 2021, 544: 737038.
- [49] Jia L P, Cheng X L, Fang L C, et al. Nitrogen removal in improved subsurface wastewater infiltration system: Mechanism, microbial indicators and the limitation of phosphorus[J]. *Journal of Environmental Management*, 2023, 335: 117456.

Effects of nitrification and photosynthetic autotrophic bioflocs on the growth, gut microbiome, and microbial community structure of Loach (*Misgurnus anguillicaudatu*)

HU Fangzheng¹, SUN Dachuan^{1,2,3}, GUO Yanshuo¹, YAO Miaolan^{1,2,3}, LIU Wenchang^{1,2,3}, TAN Hongxin^{1,2,3}

1. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Shanghai Collaborative Innovation Center for Cultivating Elite Breeds and Green Culture of Aquaculture Animals, Shanghai 201306, China

3. China-ASEAN “The Belt and Road” Joint Laboratory of Mariculture Technology, Shanghai 201306, China

Abstract: Biofloc technology (BFT), which is a recirculating aquaculture system, can significantly enhance nutrients and waste recycling. In addition, heterotrophic microorganisms in the BFT system can convert nitrogenous waste and residual bait produced by the metabolism of the culture species into nutrients, thereby reducing feed requirements. BFT systems are divided into three types based on the circulation of nitrogen: chemoautotrophic, heterotrophic and photoautotrophic. Common bioflocs are mainly chemoautotrophic, and control toxic nitrogen through nitrification. Additional sugars were supplemented to increase the C/N ratio to synthesize the nitrogen source into the biomass through assimilation. The bioflocs of these two energy metabolic pathways have been extensively studied. However, algae often play a prominent role in natural biofloc communities that cannot be explained simply by chemoautotrophy and heterotrophy. Algae absorb CO₂ through photosynthesis to produce O₂ and organic matter that can be used by bacteria. Moreover, it can utilize nitrate produced by nitrite-oxidizing bacteria as a nutritional substrate to support their growth. Loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) is an important freshwater species farmed in China. Traditional loach breeding techniques include pond, paddy, and cage farming. However, these farming methods rely on a substantial quantity of water to manage nitrogen-containing waste in the water body, which places great pressure on the environment and hinders the sustainable, eco-friendly development of aquaculture. To understand the breeding effects of nitrification and photoautotrophic bioflocs as compensatory nutrients, loach was grown in two types of bioflocs for 45 days. Growth performance, digestive enzyme activity, community structure of the water column, as well as gut microbiome and nutritional composition of the two types of flocs were compared. Nitrification and photoautotrophic groups significantly reduced the feed conversion rate compared with the clear water group. Meanwhile, the ABFT group exhibited an enhanced absorption of nitrate (40.93%) and phosphate (37.47%), compared with the BFT group. No significant differences were observed in feed conversion and specific growth rates, or mean final weight between the two groups. The mean final weight of both groups was reduced by 10% and no significant difference was observed in the final density of the nitrification group compared to that of the clear-water group. Nitrification and photoautotrophic bioflocs could provide 36.69±1.17% and 40.20±1.05% of crude protein, respectively. Photoautotrophic bioflocs increased crude fat content and promoted the conversion of saturated to unsaturated fatty acids. The higher protein and crude fat contents of the photoautotrophic group promoted the activity of trypsin and lipase in this group of loaches. Microbial community analysis showed that the addition of algae had no significant effect on the alpha diversity index of mature bioflocs at the phylum or genus level. The ingestion of bioflocs by loaches resulted in a significant decrease in the Sobs index of the intestinal flora. The dominant intestinal flora in the nitrification group were Proteobacteria, Actinobacteria, and Chloroflexi, and those in the photoautotrophic groups were Proteobacteria and Cyanobacteria. Increased concentrations of *Aeromonas* were observed in the ABFT group at the genus level. The high abundance of *Aeromonas* may have disrupted the balance of the intestinal flora of loaches in the ABFT group, leading to a lower survival rate. Additionally, the bacterial flora detected in both the water and gut reflected the influence of bioflocs on the gut health of the loaches. By substituting a portion of the feed with nitrification and photoautotrophic biofloc, it is possible to partly reduce the feed and most of the water treatment costs, which in turn, lowers the feed conversion rate. Therefore, both types of flocs demonstrate practical value in the breeding of specific species such as loaches. This study establishes a theoretical basis for advancing the integration of specialized aquatic products with innovative farming models.

Key words: biofloc; *Misgurnus anguillicaudatus*; microorganism; biofloc nutrition; photoautotrophy; nitrification

Corresponding author: Tan Hongxin. E-mail: hxtan@shou.edu.cn