

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20240830001

http://www.yykxjz.cn/

胡采芹, 胡铁焕, 刘乾甫, 杨婉玲, 曾艳艺, 高原, 李海燕, 麦永湛, 王超. 添加碳源对大口黑鲈养殖池塘水质及细菌群落结构和功能的影响. 渔业科学进展, 2025, 46(2): 189–203

HU C Q, HU T H, LIU Q F, YANG W L, ZENG Y Y, GAO Y, LI H Y, MAI Y Z, WANG C. Effect of carbon sources addition on water quality and bacterial community structure and function in *Micropterus salmoides* aquaculture ponds. Progress in Fishery Sciences, 2025, 46(2): 189–203

添加碳源对大口黑鲈养殖池塘水质及 细菌群落结构和功能的影响*

胡采芹^{1,3} 胡铁焕^{1,2} 刘乾甫^{1,3,4} 杨婉玲^{1,3,4} 曾艳艺^{1,3}
高原^{1,3,4} 李海燕^{1,3} 麦永湛^{1,3,4} 王超^{1,3,4}①

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所 广东 广州 510380; 2. 天津农学院 天津市水产生态及养殖重点实验室 天津 300384; 3. 农业农村部珠江流域渔业生态环境监测中心 广东省水产动物免疫与绿色养殖重点实验室 广东 广州 510380; 4. 国家渔业资源环境广州观测实验站 广东 广州 510380)

摘要 为探讨添加碳源对大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)养殖池塘水质和水体细菌群落结构和功能的影响,在室外池塘分别构建特种碳源和缓释碳源添加实验组以及无碳源添加对照组,开展为期6周的培养实验。对实验期间水体样品进行16S rRNA基因高通量测序,同时测定水质参数。结果显示,实验组水体中总氮(TN)、氨氮(NH₄⁺)、亚硝酸盐(NO₂⁻)和硝酸盐(NO₃⁻)浓度均显著低于对照组,且实验组细菌总菌落数(BA)和生物絮团沉积量(BFV)分别约为对照组的5倍和2倍,说明向大口黑鲈养殖池塘水体中添加特种碳源和缓释碳源均可促进生物絮团的形成,显著降低水体含氮类营养盐浓度,达到净化水质的效果。在细菌群落结构方面,大口黑鲈养殖池塘水体的优势门类群为放线菌(Actinobacteria)、变形菌(Proteobacteria)和拟杆菌(Bacteroidetes),分别占比47.8%、31.6%和16.6%;而hgcI_clade、CL500-29_marine_group和MWH-UniP1_aquatic_group为优势属,分别占比43.8%、10.3%和6.6%。RDA分析表明,溶解氧(DO)、NO₃⁻、TN、总磷(TP)和水温(WT)等是驱动细菌群落结构演替的关键环境因子。此外,添加碳源可引起水体细菌群落结构发生显著变化,导致栖湖菌属(*Limnohabitans*)、沉积物杆状菌属(*Sediminibacterium*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、红杆菌属(*Rhodobacter*)和新鞘脂菌属(*Novosphingobium*)等参与水体氮循环与碳循环的关键细菌类群占比升高,以及与碳水化合物代谢、脂质代谢、细胞活性和膜运输等相关的功能基因相对丰度升高,说明添加碳源可通过改变水体细菌群落结构,增强其对碳、氮元素的代谢活性,有利于细菌对水体含氮类营养盐的转化、利用以及对有机碳的降解。本研究可为大口黑鲈的低碳健康养殖提供一定的理论参考和实践指导意义,并为生物絮团技术在室外池塘养殖生产中的进一步应用奠定基础。

关键词 添加碳源; 大口黑鲈; 池塘养殖; 水质; 细菌群落

中图分类号 S917.1 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2025)02-0189-15

* 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2023SJHX5; 2024SJRC4)、热带海洋环境国家重点实验室(中国科学院南海海洋研究所)开放课题(LTO2326)、农业农村部财政专项:珠江流域渔业资源与栖息地调查和广州市科技计划(2023A04J0897)共同资助。胡采芹, Email: hcaiqin@126.com

① 通信作者: 王超, 研究员, Email: chaowang@prfri.ac.cn

收稿日期: 2024-08-30, 收修改稿日期: 2024-10-10

池塘养殖是我国传统的水产养殖方式,近年来,我国的水产养殖进入到一个以高密度、集约化池塘养殖模式为主的快速发展阶段(金渝钦等, 2023)。然而,现阶段的池塘养殖模式为追求产量和经济效益,大量的饲料、肥料和药物投入以及养殖鱼类代谢沉积,导致水体中的无机氮浓度通常处于较高水平,养殖生态环境恶化(莽琦等, 2022)。因此,开展池塘养殖环境调控技术模式研究是我国池塘渔业发展的重要方向。生物絮团技术(biofloc technology, BFT)调控养殖池塘水质是近年来应用较为广泛的新兴技术,是指在养殖过程中无换水的基础上,通过添加有机碳调节养殖水体中的碳氮比,促进水体中异养细菌大量繁殖(Kumar et al, 2024),而异养细菌可将养殖水体中的氨氮、亚硝酸盐等有害物质转化为可被养殖生物直接利用的生物絮凝颗粒,从而达到降低水体含氮类营养盐浓度、改善养殖水质的目的(Faizullah et al, 2019)。以色列水产养殖专家 Avnimelech (1999)首次系统阐述了添加碳源技术,形成了生物絮团技术在水产养殖中应用的理论基础。添加碳源对水产养殖的核心在于微生物同化无机氮,实现对氨氮、亚硝酸盐的快速异养转化,减少养殖水体中有毒有害物质的积累(Raza et al, 2024),同时实现营养物质的再次循环利用,提高饲料利用率,减少换水量,提高养殖鱼类成活率(李乐康等, 2015)。目前,多国的水产研究机构均对添加碳源和生物絮团技术进行了诸多研究,并在虾类和鱼类养殖中取得了一定成效(Yu et al, 2023)。

细菌在生物絮团介导的有机物分解、氮磷等营养元素转化、养殖生物饵料供给等过程中,发挥着重要的功能(Padeniya et al, 2022)。因此,对养殖池塘水质及细菌群落的研究,不仅可以了解养殖环境给养殖生物带来的潜在风险,也是促进养殖生物与池塘环境和谐发展的关键环节(张旭等, 2024)。近年来,国内外学者针对添加碳源对养殖池塘水质及细菌群落演变这一前沿热点课题已开展众多研究。在罗非鱼(*Tilapia*) (Khanjani et al, 2022)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*) (Tayyab et al, 2023)、福瑞鲤(*Cyprinus carpio* var. *Furui*) (刘艳辉等, 2021)和凡纳对虾(*Penaeus vannamei*) (廖栩峥等, 2020)等养殖水体中,添加碳源均可显著降低池塘水体中过高的氨氮,并对降低亚硝酸盐和化学需氧量也具有一定作用。Crab等(2009)和夏耘等(2012)采用 PCR-DGGE 技术分别研究了应用添加碳源及生物絮团技术的罗非鱼杂交种(*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*)和草鱼养殖系统中的细菌群落结构,表明 α -变形菌纲(Alphaproteobacteria)、放线菌纲(Actinobacteria)、芽孢杆菌纲(Baccilli)和拟杆菌纲

(Bacteroidetes)是其中的优势类群。Wei 等(2016)和 Panigrahi 等(2018)比较探究了添加不同种类碳源及不同碳氮比(C/N)的生物絮团对细菌群落的影响,发现细菌多样性及群落组成具有显著区别,说明添加碳源的种类和性质对水体细菌群落具有显著影响。

大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)隶属于鲈形目(Perciformes),俗称加州鲈,原产于北美洲,属于典型的淡水肉食性经济鱼类,由于其生长速度快、对环境的适应性强、味道鲜美、无肌间刺等优点,深受市场青睐。目前,在我国大口黑鲈养殖生产中,由于残饵及其排泄物得不到及时分解,水体中的氮经常处于高水平(王珂珂等, 2021)。近年来,对大口黑鲈养殖的研究多集中在饲料配比(江坤生等, 2023; 王凯等, 2024)、病害防治(李顺等, 2023)和养殖模式(逯冠政等, 2022; 李素芳等, 2024)等方面,对于利用添加碳源技术改善大口黑鲈养殖池塘水质的相关研究则鲜有报道。因此,本研究通过开展大口黑鲈养殖池塘受控实验,对比研究添加不同种类碳源对大口黑鲈养殖过程中水质及细菌群落结构和功能的影响,以期实现为大口黑鲈高效养殖池塘的构建提供一定的理论参考依据。

1 材料与方法

1.1 采样地点与养殖情况

本研究实验池塘为中国水产科学研究院珠江水产研究所芳村养殖基地内 8 个室外养殖池塘(单个面积约 200 m²)。干塘后使用生石灰泼洒池壁池底,浸泡后,再用花地河自然河水冲洗干净,注入花地河河水待用。本实验选用养殖生物为大口黑鲈。试水鱼在池塘内 1 h 无异常现象之后,再大批量布鱼。苗种下池前用 2%~4% 的食盐水浸洗鱼体 5 min,称重后随机分放,每池约 200 尾鱼,平均体重约为 100 g。

本研究为对比分析 2 种水产养殖产业中常用碳源材料对大口黑鲈养殖水体水质及细菌群落结构和功能的影响,分别选用特种碳源“菌来”和缓释碳源“PHB”为外加碳源(2 种碳源均由广州先得生物科技有限公司研发并提供)。其中,特种碳源“菌来”为多糖类食品原料的发酵产物,富含高生物活性有机碳、有机酸、酶等物质,对促进益生菌生长繁殖、抑制有害细菌、促进生物絮团形成具有显著效果。缓释碳源“PHB”主要成分为聚- β -羟基丁酸酯,是由细菌合成的一种酯类天然产物,可对养殖生物的肠道微生物和免疫基因产生显著影响,亦可作为媒介促进水体中的细菌形成生物絮团(吴霞等, 2021)。特种碳源“菌来”为白色粉末,易溶于水;缓释碳源“PHB”为由

人工合成高分子材料包裹的白色米粒状结晶颗粒, 不溶于水, 在水体中碳源缓慢溶出。

按照产品说明书, 实验前 2 周(第 1~2 周)每周向特种碳源和缓释碳源组每个池塘分别添加 300 g “菌来”和 300 g “PHB”, 实验中期(第 3~4 周)每周向特种碳源和缓释碳源组每个池塘分别添加 600 g “菌来”和 600 g “PHB”, 实验后 2 周(第 5~6 周)每周向特种碳源和缓释碳源组每个池塘分别添加 900 g “菌来”和 900 g “PHB”, 实验期间 2 种碳源添加量相同。添加碳源受控实验从 2023 年 10 月开始, 实验周期为 6 周。每日 09:00 投喂饲料, 每次 30 min 左右, 至鱼不再摄食并游开为止。

碳源添加方法: 将特种碳源“菌来”和缓释碳源“PHB”分别用池塘水稀释搅匀后全池均匀泼洒, 添加时开启增氧机。每周添加 1 次, 连续添加 6 周。每周一 09:00 采集池塘水样后, 将事先称重的碳源粉末用池水混匀, 全池泼洒。其中, A、B 两个池塘为对照组, 不另加碳源; C、E、G 三个池塘为添加特种碳源组(实验 T 组); D、F、H 三个池塘为添加缓释碳源组(实验 H 组)。每次在添加碳源前取离水面约 0.5 m 深处的水样并测定水质指标, 同时监测池塘水体总菌落数(bacterial abundance, BA)、生物絮团沉积量(bioflocs volume, BFV)等参数。在培养初始时(第 1 周)、培养中期(第 3 周)和培养结束时(第 6 周)采集细菌群落结构样品。

1.2 样品采集与测定

水质指标: 实验期间, 每周测定水体理化指标一次。水温(water temperature, WT)、盐度(salinity, Sal)、电导率(conductivity, Cond)、总溶解固体(total dissolved solids, TDS)、氧化还原电位(oxidation-reduction potential, ORP)、溶解氧(dissolved oxygen, DO)、pH 值等参数用水质分析仪(YSI, 美国)现场测定; 采用有机玻璃采水器分别在池塘中心和四角采集水深 20~30 cm 处水样, 混合均匀后用于水质及细菌样品测定。采集约 100 mL 水样用于叶绿素 *a* (Chl *a*)浓度的测定, 总氮(total nitrogen, TN)、氨氮(NH₄⁺)、亚硝酸盐(NO₂⁻)、硝酸盐(NO₃⁻)、总磷(total phosphorus, TP)和磷酸盐(PO₄³⁻)等营养盐参数使用营养盐自动分析仪(Skalar, 荷兰), 测定具体方法参照《水和废水监测分析方法(第四版)》。采用稀释涂布平板计数法测定水体 BA(石鹤, 2010)。使用英霍夫式锥形管测定 BFV, 样品体积为 1 L, 经 30 min 沉降后记录沉积物的体积, 每组取 3 份平行。采用全自动显微镜(蔡司, 德国)拍照记录生物絮团的微观结构。

细菌群落: 采集水样 500 mL 经孔径为 0.22 μm 聚碳酸酯滤膜(Whatman, 美国)过滤后, 滤膜置于无菌冻存管中放置于液氮速冻后保存于-80 °C 冰箱, 用于后续 DNA 提取, 每组 2 个平行。采用 DNeasy PowerWater 试剂盒(美国)进行基因组 DNA 提取后, 利用 NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, 美国)检测 DNA 的纯度和浓度。提取的基因组 DNA 送至广州美格生物科技有限公司进行测序。将 DNA 浓度稀释至 2 ng/μL 作为模板, 利用细菌 16S rDNA V3~V4 区通用引物 341F(5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3')和 806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')进行 PCR 扩增。PCR 产物以等摩尔量混合后回收, 在 Illumina 二代测序平台(Illumina Inc, 美国)测序。

1.3 数据分析

对测序获得的原始数据进行有效拼接后, 利用拼接好的有效数据进行 OTUs (operational taxonomic unit)聚类分析, 同时将 OTU 和物种注释结合, 得到每个样品的 OTUs 及分类谱系。再根据 OTUs 进行丰富度以及多样性指数分析: 首先在 97%的相似性水平上, 利用 UPARSE 算法进行 OTU 聚类; 使用 SILVA 等数据库进行物种分类信息分析。使用 PICRUST 软件, 基于 OTU 的物种注释和丰度信息, 将 KEGG 数据库中已有基因组的原核生物 16S rRNA 序列与 SILVA 数据库中 16S rRNA 序列进行关联, 然后将 KEGG 数据库已有的原核物种基因组进行序列打断, 利用 UProC 对所有基因组的 KO 序列进行统计和 KEGG 预测(杜宛璘等, 2020)。采用非度量多维尺度(NMDS, nonmetric multidimensional scaling)方法分析细菌群落组间差异及时空分布特征。基于群落 Bray-Curtis 相异度, 采用 RStudio 程序包 vegan 和 grid 进行 RDA 分析, 评估细菌与环境因子之间的关系(杜宛璘等, 2020)。采用基于群落 Bray-Curtis 距离的 Adonis、ANOSIM 和 MRPP 分析法检验组间群落结构的差异及其显著性。两组间的环境因子差异分析采用 SPSS 软件中 *t*-test 检验法。原始数据已上传至 MCBISRA 数据库, 登录号: PRJNA1153802。

2 结果与分析

2.1 水质指标

实验期间特种碳源和缓释碳源组中 Cond 整体呈持续升高的变化趋势。在培养结束时, 特种碳源组和缓释碳源组中 Cond 显著高于对照组($P < 0.05$)。实验前 3 周, 缓释碳源组 Cond 低于特种碳源组, 第 3 周

之后,缓释碳源组 Cond 显著高于特种碳源组($P<0.05$) (图 1A)。与 Cond 变化趋势相似,对照组和实验组的 TDS 随实验进行整体呈升高趋势。第 4 周后,实验组 TDS 显著高于对照组($P<0.05$),其中,缓释碳源组 TDS 在实验结束时较特种碳源组更高,但二者差异并不显著($P>0.05$) (图 1B)。实验期间,对照组和实验组中 ORP 降低,在实验结束时,对照组、特种碳源组和缓释碳源组 ORP 分别降低为初始值的 30.16%、41.76%和 54.61%,且特种碳源组和缓释碳源组 ORP 显著高于对照组($P<0.05$) (图 1C)。人工泵氧和生物消耗氧气使得 DO 保持基本稳定。实验前 5 周,对照组 DO 显著高于实验组($P<0.05$) (图 1D)。对照组和实验组水体 pH 值均呈先升高后降低再升高的变化趋势,实验结束

时,实验组 pH 显著低于对照组($P<0.05$) (图 1E)。实验期间,对照组 Chl *a* 浓度显著高于实验组($P<0.05$),且在第 4 周达到最高值 82.17 $\mu\text{g/L}$ 后降低。特种碳源组和缓释碳源组中 Chl *a* 浓度在实验期间略有降低并基本保持稳定,且两组之间无显著性差异($P>0.05$) (图 1F)。对照组 BA 在实验期间基本保持稳定,实验组 BA 持续升高,到培养结束时,实验组 BA 约为对照组的 5 倍,且特种碳源组和缓释碳源组间无显著差异($P>0.05$) (图 1G)。实验期间,实验组与对照组的 BFV 均有不同程度的升高,实验组较对照组升高幅度更大,在实验结束时,特种碳源组和缓释碳源组 BFV 分别为对照组的 2.7 倍和 2.2 倍,且两组实验组间存在显著差异($P<0.05$) (图 1H)。

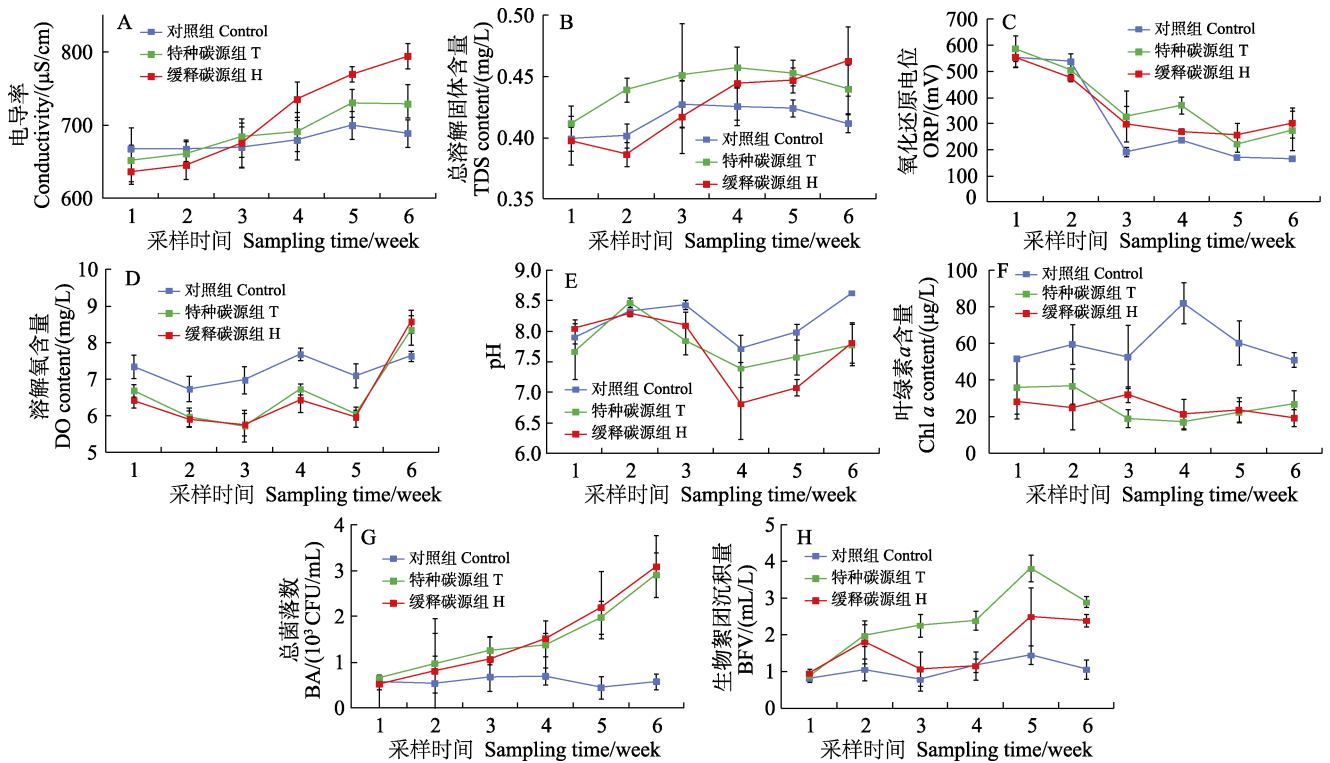


图 1 添加碳源对水质指标的影响

Fig.1 Effect of adding carbon sources on water quality parameters

T: Special carbon source addition; H: Slow-release carbon source addition. The same below.

实验期间,对照组和实验组 TN、 NH_4^+ 和 NO_3^- 整体呈升高趋势。实验结束时,对照组、特种碳源组和缓释碳源组 TN 浓度分别较初始值升高了 2.9 倍、2.6 倍和 2.7 倍(图 2A),实验组中含氮类营养盐浓度均显著低于对照组($P<0.05$),且特种碳源组中 TN、 NH_4^+ 和 NO_2^- 浓度显著低于缓释碳源组($P<0.05$)。实验组和对照组中 TP 和 PO_4^{3-} 浓度呈先升高后降低的变化

趋势,培养结束时,3 组间 TP 和 PO_4^{3-} 浓度无显著差异($P<0.05$) (图 2)。实验结束时,实验组中 pH、Chl *a*、TN、 NH_4^+ 、 NO_2^- 和 NO_3^- 均显著低于对照组($P<0.05$),而 BA 和 BFV 显著高于对照组($P<0.05$)。特种碳源组 Chl *a*、BFV 和 NO_3^- 显著高于缓释碳源组($P<0.05$),特种碳源组 TN、 NH_4^+ 和 NO_2^- 显著低于缓释碳源组($P<0.05$) (图 1 和图 2)。

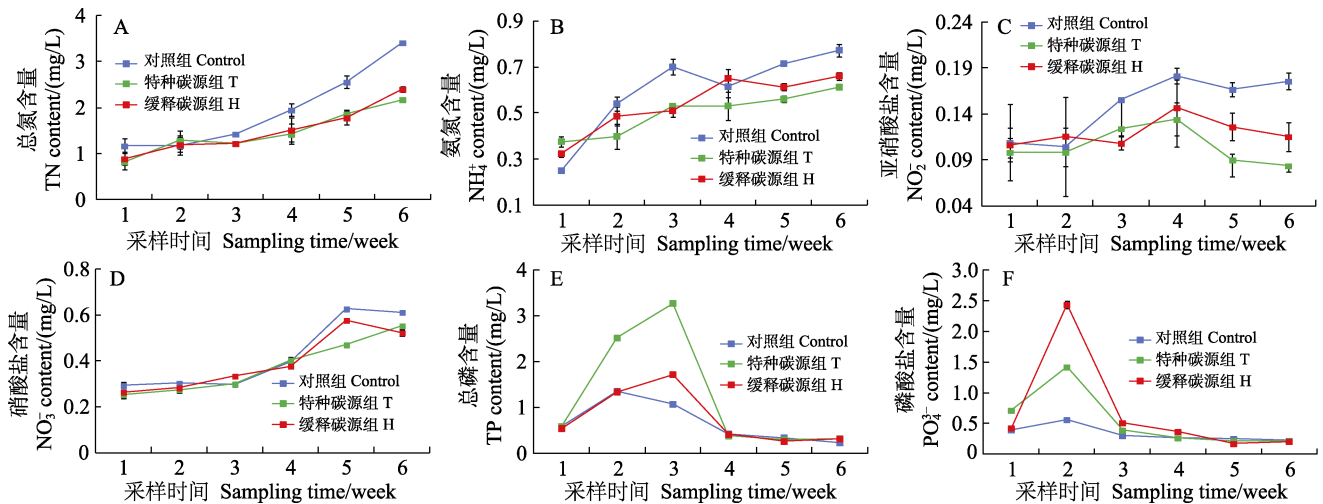


图 2 添加碳源对营养盐的影响

Fig. 2 Effect of adding carbon sources on nutrients

2.2 细菌群落结构

对培养实验期间 3 个时间点(第 1、3 和 6 周)的大口黑鲈养殖池塘水样进行 16S rRNA 基因高通量测序, 共得到 4 904 810 条有效序列, 注释到 6 317 个 OTUs, 每个样本的 OTU 数目在 771~1 654 之间。本研究重点讨论平均相对丰度高于 0.5% 的细菌门类群和属类群。

在门水平上, 放线菌(Actinobacteria)、变形菌(Proteobacteria)和拟杆菌(Bacteroidetes)是主要类群, 其平均相对丰度分别为 47.8%、31.6%和 16.6%; 其次为疣微菌(Verrucomicrobia)和蓝细菌(Cyanobacteria)。随着培养的进行, 放线菌门相对丰度显著降低, 变形菌、拟杆菌和疣微菌相对丰度升高。培养初始时(第 1 周), 缓释碳源组放线菌相对丰度(平均为 60.6%)显著高于对照组(平均为 55.0%)和特种碳源组(平均为 50.5%); 培养结束时(第 6 周), 缓释碳源组放线菌相对丰度(平均为 30.0%)显著低于对照组(平均为 39.9%)和特种碳源组(平均为 33.5%)。培养初始时, 对照组变形菌相对丰度(平均为 30.9%)显著高于特种碳源组(平均为 30.2%)和缓释碳源组(平均为 25.2%); 而在培养结束时对照组变形菌相对丰度(平均为 28.3%)显著低于特种碳源组(平均为 37.6%)和缓释碳源组(平均为 38.3%) (图 3A)。

在属水平上, hgcI_clade (平均相对丰度 43.8%)、CL500-29_marine_group (平均相对丰度 10.3%)、MWH-UniP1_aquatic_group (平均相对丰度 6.6%)和多核杆菌属(*Polynucleobacter*) (平均相对丰度 6.2%)为主要优势类群。随着培养的进行, hgcI_clade、CL500-

29_marine_group 和 MWH-UniP1_aquatic_group 相对丰度降低, 沉积物杆状菌属(*Sediminibacterium*)、栖湖菌属(*Limnohabitans*)和 *Fluviicola* 相对丰度升高。培养结束时, 特种碳源和缓释碳源组中栖湖菌属、沉积物杆状菌属、*Fluviicola*、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、红杆菌属(*Rhodobacter*)和新鞘脂菌属(*Novosphingobium*)等细菌类群相对丰度显著高于对照组, 而 hgcI_clade 和 CL500-29_marine_group 等细菌类群相对丰度显著低于对照组(图 3B)。

NMDS 分析(图 4A)和基于群落 Bray-Curtis 距离的 Adonis、ANOSIM 和 MRPP 分析显示(表 1), 随着培养的进行, 对照组、特种碳源组和缓释碳源组的细菌群落结构均发生显著变化。且在培养初始(第 1 周)、培养中期(第 3 周)和培养结束时(第 6 周), 对照组、特种碳源组和缓释碳源组 3 组间细菌群落结构均存在显著差异。基于细菌群落结构与环境因子间的 RDA 分析显示, 轴 1 和轴 2 分别可解释环境因子影响的 81.6%和 9.2%。所有环境因子中, DO($R^2=0.72$, $P<0.05$)、NO₃⁻($R^2=0.57$, $P<0.05$)、TN($R^2=0.55$, $P<0.05$)、TP ($R^2=0.52$, $P<0.05$)、WT($R^2=0.42$, $P<0.05$)、Cond ($R^2=0.34$, $P<0.05$)、NH₄⁺ ($R^2=0.16$, $P<0.05$)和 Sal ($R^2=0.12$, $P<0.05$)对细菌群落结构具有显著性影响(图 4B)。在门水平上, 变形菌和拟杆菌均与 DO、TN、NO₃⁻、NH₄⁺、Cond 和 TDS 显著正相关, 与 WT 和 TP 负相关; 放线菌则与之相反, 与 DO、TN、NO₃⁻、NH₄⁺、Cond 和 TDS 显著负相关, 与 WT、TP 和 Sal 显著正相关(图 5A)。在属水平上, 栖湖菌属与 DO、NO₃⁻和 Cond 显著正相关, 与 Chl *a*、pH、NO₂⁻、Sal、TP 和 WT 显著负相关; 沉积物杆状菌属与 Chl *a*、pH、NO₃⁻和

Sal 显著负相关；新鞘脂菌属与 pH、NO₂和 Sal 显著负相关；黄杆菌属与 DO 和 NO₃显著正相关，与 NO₂、Sal、TP 和 WT 显著负相关；红杆菌属与 Cond 和 TDS 显著正相关。而 hgcI_clade 和 CL500-29_marine_group 则与 Sal、TP 和 WT 显著正相关，与 DO、TN、NO₃、NH₄⁺、Cond 和 TDS 显著负相关。MWH-UniP1_aquatic_group 与 TP 和 WT 显著正相关，与 DO、TN、NO₃ 和 Cond 显著负相关(图 5B)。

2.3 细菌群落功能预测基因

培养期间池塘水体细菌群落 KEGG 功能基因预测结果显示，氨基酸代谢(amino acid metabolism)、碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)和辅助因子和

维生素的代谢(metabolism of cofactors and vitamins)等是细菌群落主要功能基因。培养结束时，特种碳源组和缓释碳源组中与碳水化合物代谢、脂质代谢(lipid metabolism)、异种生物降解和代谢(xenobiotics biodegradation and metabolism)、膜运输(membrane transport)、细胞活性(cell motility)、信号转导(signal transduction)、环境适应(environmental adaptation)等相关的功能基因相对丰度显著高于对照组。而特种碳源组和缓释碳源组中与辅助因子和维生素的代谢、能量代谢(energy metabolism)、复制和修复(replication and repair)、折叠分选与降解(folding sorting and degradation)和翻译(translation)等相关的功能基因相对丰度显著低于对照组(图 6)。

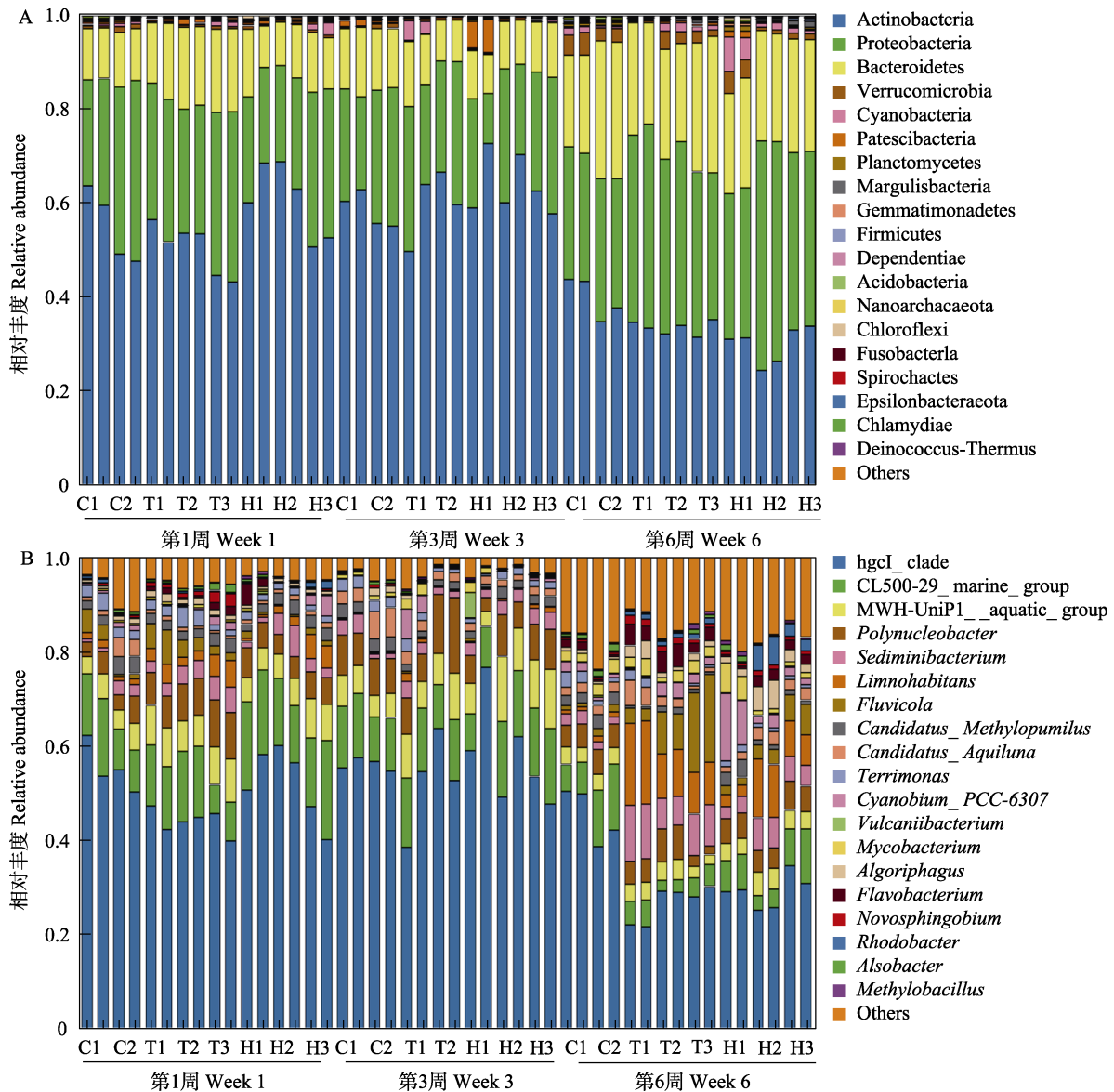


图 3 添加碳源对细菌群落结构在门水平(A)和属水平(B)分布的影响

Fig.3 Effect of adding carbon sources on bacterial community structure at phylum level (A) and genus level (B)

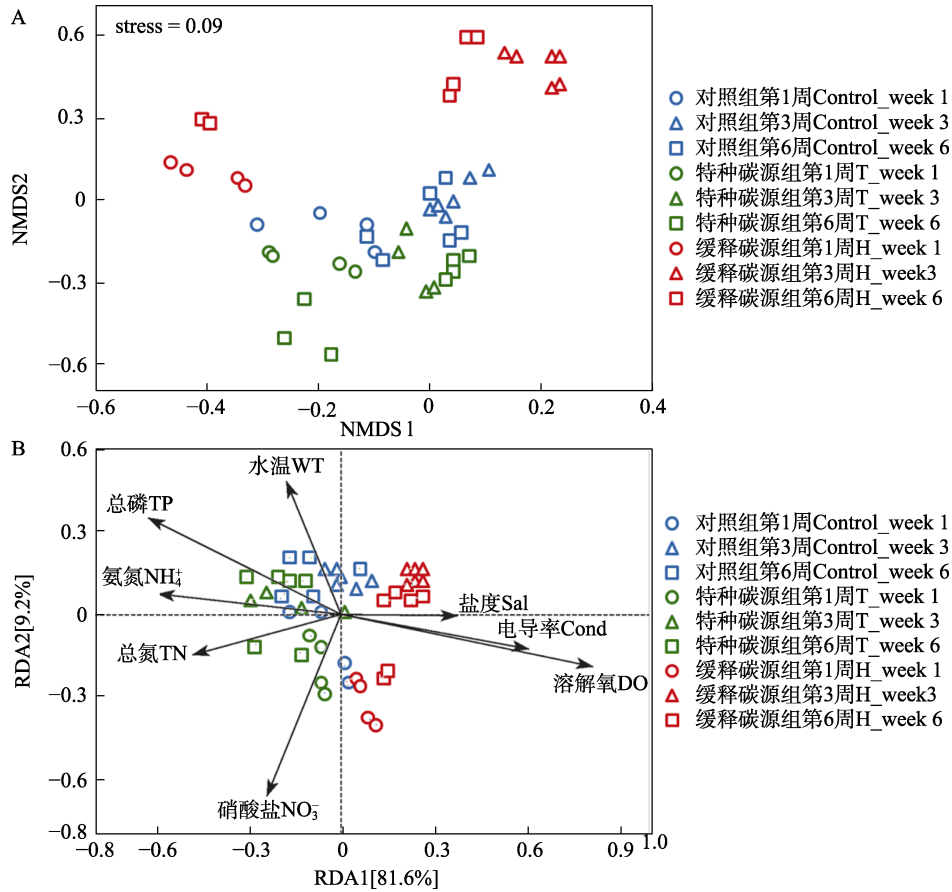


图 4 细菌群落结构的 NMDS(A)和 RDA 分析(B)

Fig.4 NMDS (A) and RDA (B) of bacterial community structure

表 1 不同组别间细菌群落结构显著性差异分析($P < 0.05$ 表示具有显著性差异)

Tab.1 Significant difference analysis of bacterial community structure between different groups ($P < 0.05$ indicating significant difference)

组别 Group	Adonis		ANOSIM		MRPP	
	R^2	P	R^2	P	exceped-delta	P
对照组第 1 周 vs. 缓释碳源组第 1 周 Control_week 1 vs. H_week 1	0.25	0.051	0.37	0.056	0.35	0.324
对照组第 1 周 vs. 特种碳源组第 1 周 Control_week 1 vs. T_week 1	0.36	0.068	0.64	0.044	0.33	0.070
缓释碳源组第 1 周 vs. 特种碳源组第 1 周 H_week 1 vs. T_week 1	0.18	0.130	0.21	0.086	0.31	0.287
对照组第 1 周 vs. 对照组第 3 周 Control_week 1 vs. Control_week 3	0.37	0.024	0.44	0.030	0.32	0.036
对照组第 1 周 vs. 对照组第 6 周 Control_week 1 vs. Control_week 6	0.50	0.037	0.82	0.034	0.36	0.024
对照组第 3 周 vs. 对照组第 6 周 Control_week 3 vs. Control_week 6	0.56	0.024	0.48	0.028	0.32	0.030
特种碳源组第 1 周 vs. 特种碳源组第 3 周 T_week1 vs. T_week3	0.24	0.003	0.15	0.006	0.45	0.001
特种碳源组第 1 周 vs. 特种碳源组第 6 周 T_week 1 vs. T_week 6	0.50	0.006	0.72	0.004	0.39	0.006

续表 1

组别 Group	Adonis		ANOSIM		MRPP	
	R^2	P	R^2	P	exceped-delta	P
特种碳源组第3周 vs. 特种碳源组第6周 T_week 3 vs. T_week 6	0.41	0.003	0.32	0.003	0.56	0.003
缓释碳源组第1周 vs. 缓释碳源组第3周 H_week 1 vs. H_week 3	0.23	0.003	0.05	0.047	0.35	0.008
缓释碳源组第1周 vs. 缓释碳源组第6周 H_week 1 vs. H_week 6	0.38	0.002	0.44	0.002	0.45	0.006
缓释碳源组第3周 vs. 缓释碳源组第6周 H_week 3 vs. H_week 6	0.51	0.003	0.81	0.003	0.50	0.002
对照组第3周 vs. 缓释碳源组第3周 Control_week 3 vs. H_week 3	0.31	0.011	0.37	0.050	0.33	0.019
对照组第3周 vs. 特种碳源组第3周 Control_week 3 vs. T_week 3	0.25	0.124	0.29	0.072	0.48	0.019
缓释碳源组第3周 vs. 特种碳源组第3周 H_week3 vs. T_week3	0.17	0.095	0.10	0.120	0.45	0.100
对照组第6周 vs. 缓释碳源组第6周 Control_week 6 vs. H_week 6	0.41	0.016	0.34	0.007	0.43	0.012
对照组第6周 vs. 特种碳源组第6周 Control_week 6 vs. T_week 6	0.65	0.005	0.71	0.006	0.45	0.005
缓释碳源组第6周 vs. 特种碳源组第6周 H_week 6 vs. T_week 6	0.25	0.004	0.13	0.001	0.40	0.002

3 讨论

3.1 添加碳源对池塘水质的影响

本研究结果显示,大口黑鲈对营养物质的代谢排放以及投入饵料的积累使得本次实验期间养殖池塘中 Cond 和 TDS 较实验初始时更高, ORP 较实验初始时更低(图 1)。在实验前 3 周,缓释碳源组 Cond 和 TDS 低于特种碳源组;第 3 周后,缓释碳源组 Cond 显著高于对照组和特种碳源组,且缓释碳源组 TDS 显著高于对照组(图 1A 和 1B),其中可能的原因是缓释碳源释放有机碳的速率较慢,到实验后期才大量释放有机碳,促进细菌生长代谢及无机营养盐的排放,导致更高的水体 Cond 和 TDS (杨泳等, 2023)。ORP 是反映水体氧化还原性能的指标, ORP 越高,表示水体的氧化性越强;反之, ORP 越低,还原性越强。且 ORP 对指示水体自净能力具有重要意义,较高的 ORP 将有利于好氧微生物的生长和有机污染物的分解,从而增强水体的自净能力;相反,低的 ORP 则有利于厌氧菌的繁殖,可能导致水体的恶化(Lima, 2002)。本实验结束时,特种碳源组和缓释碳源组 ORP 显著高于对照组(图 1C),可间接印证添加碳源有助于养殖水体自净。实验第 2 周后,实验组水体 pH 显著低于

对照组(图 1E),其原因可能是,一方面,对照组中 Chl *a* 浓度高,浮游植物生长旺盛,吸收水体 CO₂、释放 O₂,引起水体 pH 值升高;另一方面,实验组中添加碳源可促进异养细菌生长,消耗水体氧气,释放 CO₂,导致水体 pH 值降低;此外,实验组中细菌更加活跃的硝化作用会产生酸性代谢物,也将进一步导致水体 pH 下降(李莉等, 2019)。这种添加碳源导致鳙鱼(*Aristichthys nobilis*) (Jiang *et al*, 2020)、南美白对虾(*Penaeus vannamei*) (刘克明等, 2019)、凡纳对虾(Huang *et al*, 2022)和中华锯齿米虾(*Neocaridina denticulata sinensis*) (岳强等, 2012)等养殖池塘水体 pH 降低的现象已被广泛报道。

实验结束时,特种碳源组和缓释碳源组中 BA 和 BFV 均显著高于对照组(图 1G 和 1H),说明添加碳源促进了养殖水体细菌生长及生物絮团的形成。大量研究表明,向养殖水体中添加碳源后,异养细菌被激活,快速繁殖并大量附着于水体悬浮颗粒上,异养细菌富集的颗粒同时会附着藻类、原生动物以及大分子有机质等,形成生物絮团(李志斐等, 2015; Kumar *et al*, 2024)。显微镜观测结果显示,本研究中生物絮团中充满较多细菌、藻类和原生动物(图 7)。

实验结束时,实验组 BFV 显著高于对照组(图 1H),而 TN、NH₄⁺和 NO₂⁻浓度显著低于对照组

(图 2), 说明此时生物絮团已基本稳定形成并发挥降氮作用, 从而调节养殖系统的水质。这与龙丽娜等 (2022) 在低盐度条件下开展的生物絮团对凡纳对虾养殖池塘水质的影响结果一致, 即生物絮团在 15 d 左右形成并逐步稳定。实验结束时, 对照组、特种碳源组和缓释碳源组 TN 浓度分别较初始值升高了 2.9 倍、2.6 倍和 2.7 倍(图 2A), 这是因为随着鱼体的生长, 通过代谢排出体外的含氮类无机营养盐含量增加, 且

投饲量增大, 水体中残饵、粪便等有机物增多, 细菌将其分解产生的含氮类无机营养盐含量也相应增多 (Liu *et al*, 2022)。实验前 2 周, 3 组池塘水体 NO_3^- 和 NO_2^- 浓度基本稳定, 这是由于养殖前期, 鱼体较小, 耗氧量较少, 且饲料投喂量较少, 养殖生物排泄和残饵形成的 NO_3^- 和 NO_2^- 尚未在养殖池中大量积累。实验结束时, 实验组中 TN、 NH_4^+ 、 NO_2^- 和 NO_3^- 浓度均显著低于对照组, 说明添加特种碳源和缓释碳源均可达

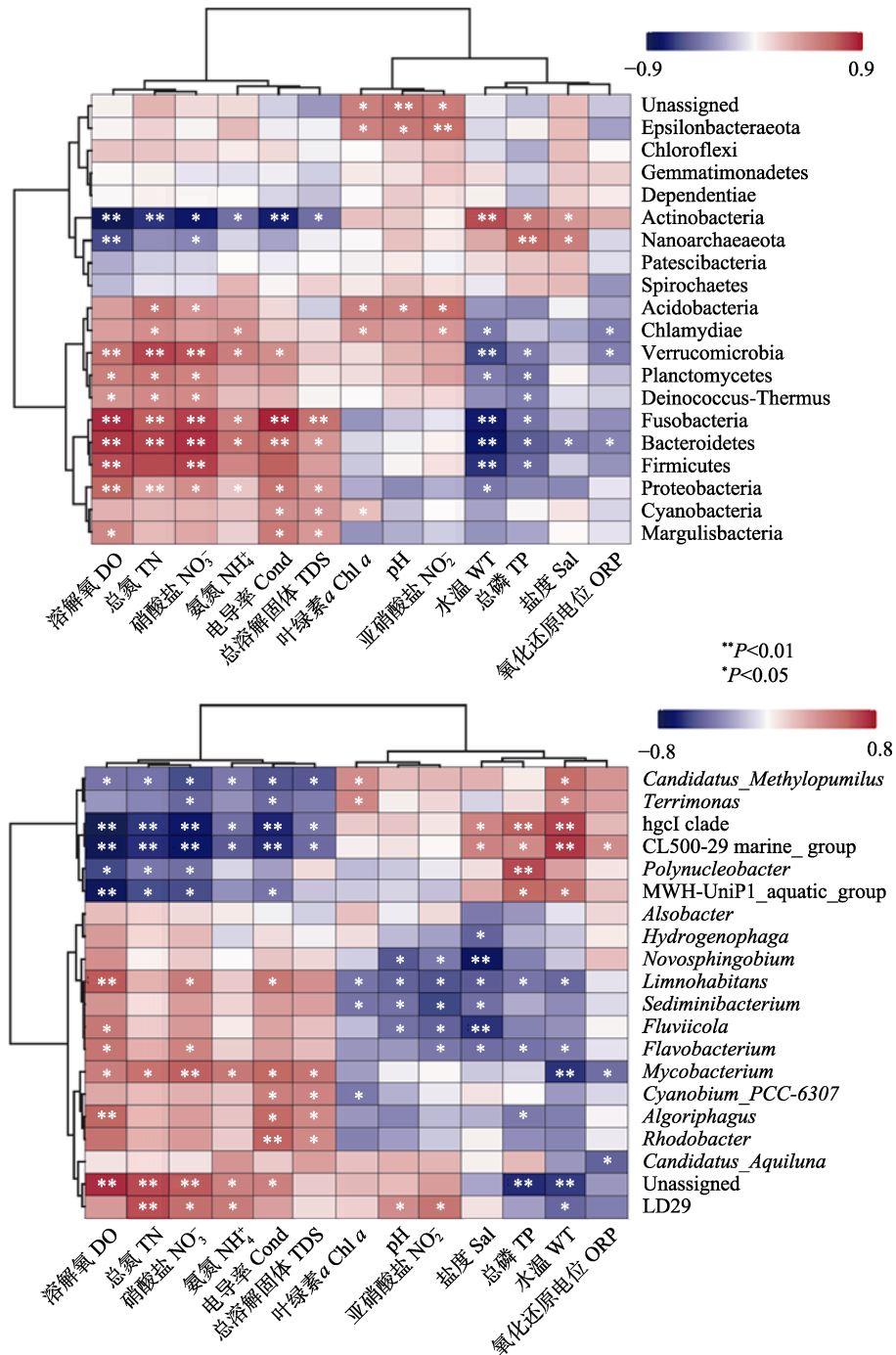


图 5 细菌群落结构与环境因子在门水平(A)和属水平(B)相关性

Fig.5 Correlation between bacterial community structure and environmental factors at phylum level (A) and genus level (B)

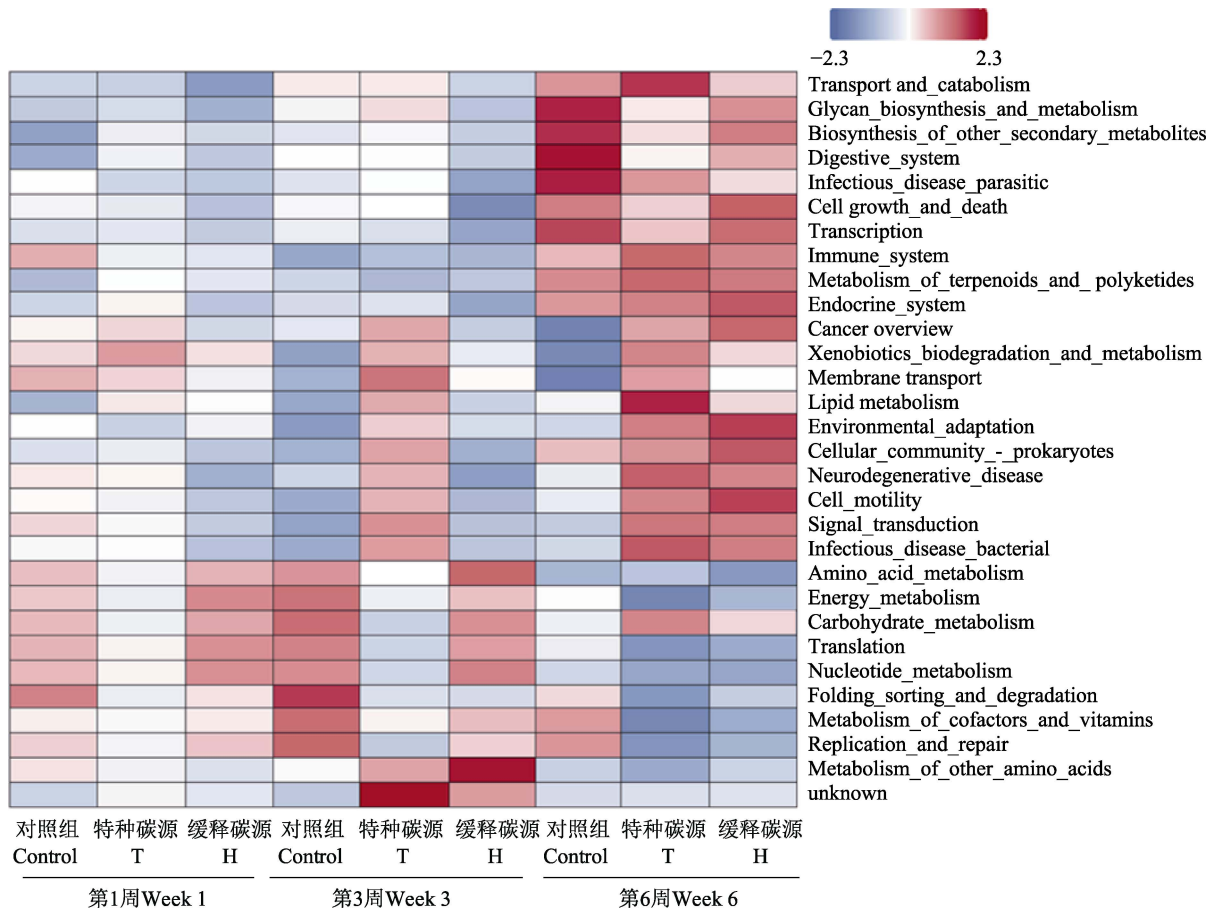


图 6 添加碳源对细菌群落功能预测基因的影响

Fig.6 Effect of adding carbon sources on bacterial community functional gene prediction

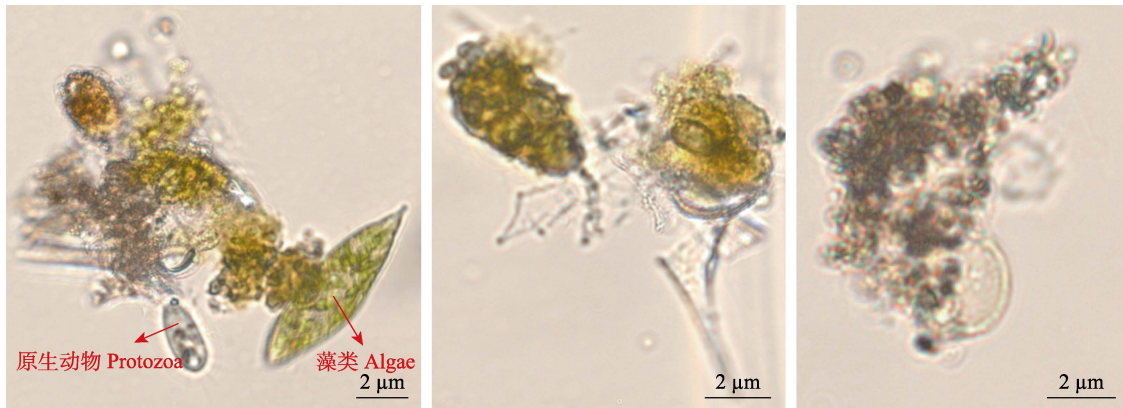


图 7 显微镜观测生物絮团的形态结构

Fig.7 Morphology of biofloc under microscope

到降低水体氮含量的效果，且添加特种碳源对 TN、NH₄⁺和 NO₂⁻的降低效果较缓释碳源更显著(图 2)。众多研究也表明，添加碳源能将罗非鱼(Mali *et al.*, 2024)、凡纳对虾(Huang *et al.*, 2021; 龙丽娜等 2022)、松浦镜鲤鱼(*Cyprinus specularis* Songpu) (赵志刚等, 2013)和草鱼(Lu *et al.*, 2013; 夏耘等, 2014)养殖池塘水体含氮类营养盐浓度控制在较低且稳定的水平，说

明添加碳源后形成的生物絮团对含氮类营养盐的控制效果较好，生物絮团系统中的异养细菌能将系统中的无机氮转化为自身蛋白，维持良好的养殖水质(Avnimelech *et al.*, 2012)。实验结束时，特种碳源组 BFV 显著高于缓释碳源组(图 1H)，且特种碳源组 TN、NH₄⁺和 NO₂⁻显著低于缓释碳源组(图 2)，说明特种碳源“菌来”的添加对生物絮团的形成产生更加显著的

促进作用, 且其改善养殖水质的效果较缓释碳源“PHB”更优。这可能是由于经发酵过的复合特种碳源“菌来”中包含大分子有机质如多糖、蛋白质等, 以及氨基酸和单糖等小分子有机质, 可供细菌快速吸收后大量繁殖并形成生物絮团; 而缓释碳源“PHB”不溶于水, 依靠胞外水解酶降解产生可溶性有机单体或低聚物, 再供细菌利用(Li C *et al.*, 2022), 因此, 缓释碳源对本研究中大口黑鲈养殖池塘水质的影响不及特种碳源所产生的影响显著。

3.2 添加碳源对细菌群落结构与功能的影响

本研究结果显示, 在大口黑鲈养殖池塘水体中, 放线菌、变形菌和拟杆菌是主要门类群, 这与廖栩峥等(2020)、夏耘等(2015)的研究结果一致。在培养初始, 实验组变形菌相对丰度低于对照组, 而到培养结束时, 实验组中变形菌相对丰度显著高于对照组(图 3A), 这可能与多核杆菌属和栖湖菌属等 β -变形菌的生长有关(图 3B)。多核杆菌属和栖湖菌属均可高效利用水体有机碳(Watanabe *et al.*, 2010; Avila *et al.*, 2019), 本研究中向大口黑鲈养殖池塘添加碳源, 促进了这两类细菌生长, 导致其相对丰度升高。且变形菌门包含绝大多数反硝化功能菌群, 参与脱氮除磷过程, 对有机物的降解具有重要的作用(Yang *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2022), 这可能是本研究中添加碳源组中含氮类营养盐 TN、 NH_4^+ 、 NO_2^- 和 NO_3^- 浓度均显著低于对照组的原因之一。随着培养的进行, hgcI_clade 和 CL500-29_marine_group 等细菌相对丰度降低(图 3B)。Gomez-Consarnau 等(2012)发现 hgcI-clade 和 CL500-29_marine_group 是参与自然水体碳循环的重要细菌类群, 对有机质具有强降解能力, 且偏好富营养化的水体。本研究中, 这两类细菌相对丰度与 TN、 NO_3^- 和 NH_4^+ 之间存在显著负相关性(图 5B), 推测培养期间养殖池塘水体中 TN、 NO_3^- 和 NH_4^+ 浓度的升高可能是导致这两类细菌相对丰度降低的重要原因。培养结束时, 实验组中栖湖菌属、沉积物杆状菌属、黄杆菌属、红杆菌属和新鞘脂菌属等细菌类群相对丰度显著高于对照组(图 3B), 且这几类细菌相对丰度均与 NO_2^- 浓度显著负相关(图 5B), 说明实验组中生物絮团的形成引起水体 NO_2^- 的降低、进而促进这几类细菌的生长。栖湖菌属是参与氨氧化过程的主要细菌, 而黄杆菌属和红杆菌属对水体反硝化过程具有促进作用, 且黄杆菌属作为噬纤维菌-黄杆菌-拟杆菌亚纲(Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroidia, CFB)细菌之一, 对大分子难降解有机碳具有高效降解功能(Li D *et al.*, 2022)。沉积物杆状菌属能够在好氧条件下降解

和去除有机碳, 在环境污染的处理中具有很大的潜力(宋雅丽, 2018)。添加碳源后, 这些参与水体氮循环与碳循环的关键细菌类群相对丰度的升高, 说明添加碳源可改善了水体细菌种群结构, 增强细菌代谢活性, 有利于水体中的有机碳及营养盐的分解、转化。

培养结束时, 相较于对照组, 特种碳源组和缓释碳源组中与碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)、脂质代谢(lipid metabolism)、细胞活性(cell motility)和膜运输(membrane transport)等相关的功能基因相对丰度显著升高(图 6), 这与李志斐等(2015)通过 Biolog-ECO 技术分析生物絮团对水体微生物代谢功能的结果一致, 即生物絮团可增强水体微生物的代谢活性, 尤其是对多聚物和碳水化合物的利用活性。此外, 在培养结束时, 特种碳源组和缓释碳源组中与能量代谢(energy metabolism)及复制和修复(replication and repair)等相关的功能基因相对丰度显著低于对照组(图 6), 说明添加碳源导致细菌群落在有机碳富足的水体中维持自身基础生长代谢所需耗能降低, 细菌生长效率(bacterial growth efficiency, BGE)升高, 细菌吸收的有机碳更多地以细菌生产力的形式转换成细菌生物量(Carlson *et al.*, 2007), 这也是实验组中细菌丰度显著高于对照组的重要原因之一。

4 结论

本研究表明, 添加碳源可促进大口黑鲈养殖池塘水体中生物絮团的形成, 降低 TN、 NH_4^+ 、 NO_2^- 和 NO_3^- 浓度, 导致细菌群落结构发生显著变化, 参与水体氮循环与碳循环的关键细菌类群占比升高, 同时, 与碳、氮代谢等相关的功能预测基因相对丰度升高, 说明添加碳源有助于细菌对水体中的含氮类营养盐及有机碳的降解利用。因此, 添加碳源技术可有效改善养殖池塘水质, 增强细菌代谢活性, 促进养殖水体碳氮循环过程。且相较于缓释碳源, 特种碳源对生物絮团的形成产生了更加显著的促进作用, 且其改善养殖水质的效果更优。

参 考 文 献

- AVILA M P, BRANDAO L P, BRIGHENTI L S, *et al.* Linking shifts in bacterial community with changes in dissolved organic matter pool in a tropical lake. *Science of the Total Environment*, 2019, 672: 990–1003
- AVNIMELECH Y, SCHRYVER P D, EMMERECIANO M, *et al.* Baton Rouge: The World Aquaculture Society. *Biofloc Technology*, 2012, 50

- AVNIMELECH Y. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*, 1999, 176(3/4): 227–235
- CARLSON C A, GIORGIO P, HERNDL G J, *et al.* Microbes and the dissipation of energy and respiration: From cells to ecosystems. *Oceanography*, 2007, 20(2): 89–100
- DU W L, SUN J H, MAI Y Z, *et al.* Spatial and temporal distribution characteristics of bacterioplankton community structure in the downstream of Pearl River. *Journal of Lake Sciences*, 2020, 32(2): 380–394 [杜宛璘, 孙金辉, 麦永湛, 等. 珠江下游浮游细菌群落结构的时空分布特征. *湖泊科学*, 2020, 32(2): 380–394]
- CRAB R, KOCHVA M, VERSTRAET W, *et al.* Bio-flocs technology application in over-wintering of Tilapia. *Aquacultural Engineering*, 2009, 40: 105–112
- FAIZULLAH M M, RAJAGOPALSAMY C, AHILAN B, *et al.* Application of biofloc technology (BFT) in the aquaculture system. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 2019, 7(4): 204–212
- GOMEZ-CONSARNAU L, LINDH M V, GASOL J M, *et al.* Structuring of bacterioplankton communities by specific dissolved organic carbon compounds. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(9): 2361–2378
- HUANG H H, LIAO H M, LEI Y J, *et al.* Effects of different carbon sources on growth performance of *Litopenaeus vannamei* and water quality in the biofloc system in low salinity. *Aquaculture*, 2022, 546: 737239
- JIANG K S, CHEN F, ZHANG G R, *et al.* Effects of dietary animal protein source composition on the growth performance, intestinal health, and protein metabolism of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Progress in Fishery Sciences*, 2023, 44(5): 33–44 [江坤生, 陈芳, 张关荣, 等. 大口黑鲈配合饲料中 3 种动物蛋白源的不同添加比例对其生长性能、肠道健康及蛋白质代谢的影响. *渔业科学进展*, 2023, 44(5): 33–44]
- JIANG Y X, YANG J, GUAN G P, *et al.* Effects of different carbon sources on the water of *Aristichthys nobilis* Richardson aquaculture by biofloc. *Agricultural Science and Technology*, 2020, 21(4): 58–62
- JIN Y Q, CHEN X, MENG S L, *et al.* The research progress on nitrogen and phosphorus budget of typical pond culture model. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2023, 39(36): 140–147 [金渝钦, 陈曦, 孟顺龙, 等. 典型池塘养殖模式的氮磷收支研究进展. *中国农学通报*, 2023, 39(36): 140–147]
- KHANJANI M H, SHARIFINIA M, HAJIREZAEI S. Recent progress towards the application of biofloc technology for Tilapia farming. *Aquaculture*, 2022, 552: 738021
- KUMAR S, SRIVASTAVA P K, SETH K C S. Biofloc technology: A sustainable approach towards wastewater utilization and fish production. *Lakes and Reservoirs: Research and Management*, 2024, 29(1): e12449
- LI C, WANG H, YAN G, *et al.* Initial carbon release characteristics, mechanisms and denitrification performance of a novel slow release carbon source. *Journal of Environmental Science*, 2022, 118(8): 32–45
- LI D, HE Y, ZHENG Y, *et al.* Metaproteomics reveals unique metabolic niches of dominant bacterial groups in response to rapid regime shifts during a mixed dinoflagellate bloom. *Science of the Total Environment*, 2022, 823: 153557
- LI L K, OUYANG J F, WANG J M, *et al.* A review on the application of biofloc technology in aquaculture. *Jiangxi Fisheries Science and Technology*, 2015(4): 46–48 [李乐康, 欧阳剑锋, 王建民, 等. 生物絮团技术在水产养殖中的应用研究综述. *江西水产科技*, 2015(4): 46–48]
- LI L, LI W Q, TAN H X, *et al.* Effects of pH on ammonium nitrogen conversion efficiency and bacteria activity of microbial flocs. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2019, 28(5): 671–679 [李莉, 李文清, 谭洪新, 等. pH 对微生物絮团氨氮转化效率及细菌活性的影响. *上海海洋大学学报*, 2019, 28(5): 671–679]
- LI S F, CHENG M Z. Current situation and discussion on breeding patterns of black perch in Henan. *China Fisheries*, 2024(1): 83–85 [李素芳, 程明珠. 河南大口黑鲈养殖模式现状及探讨. *中国水产*, 2024(1): 83–85]
- LI S, YANG Q. Key points of disease control of California perch. *Fisheries Wealth Guide*, 2023(8): 56–60 [李顺, 杨卿. 加州鲈鱼的病害防治要点. *渔业致富指南*, 2023(8): 56–60]
- LI Z F, WANG G J, YU D G, *et al.* Effect of bioflocs on water quality and metabolic functions of microbial community in zero-water exchange tanks. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2015, 24(4): 503–512 [李志斐, 王广军, 余德光, 等. 生物絮团对养殖水体水质和微生物群落功能的影响. *上海海洋大学学报*, 2015, 24(4): 503–512]
- LIAO X Z, CHEN J R, QIN H P, *et al.* Changes of physical and chemical factors and bacterial indexes of water body in the biological biofloc breeding pond of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Aquaculture*, 2020, 41(1): 22–27 [廖栩峥, 陈金荣, 秦海鹏, 等. 凡纳滨对虾室外生物絮团养殖池水体理化因子和细菌的变化. *水产养殖*, 2020, 41(1): 22–27]
- LIMA L M Q. Oxidation; reduction potential a review. John Wiley and Sons, Inc. 2002
- LIU K M, YOU H Z, MA L, *et al.* Experiment on the influence of culturing biofloc with different carbon sources on the culture of *Penaeus vannamei*. *Hebei Fisheries*, 2019(4): 28–30 [刘克明, 尤宏争, 马林, 等. 不同碳源培养生物絮团对南美白对虾养殖影响试验. *河北渔业*, 2019(4): 28–30]
- LIU Q, LI J, SHAN H, *et al.* Metagenomic insights into the structure of microbial communities involved in nitrogen cycling in two integrated multitrophic aquaculture (IMTA) ponds. *Journal of Marine Science and Engineering*, 2022, 10(2): 171
- LIU Y H, GAO C S, LIU T G, *et al.* Effect of adding carbon source on growth of fish and water quality in pond for

- Cyprinus carpio* var. Furui No.2. Hebei Fisheries, 2021(4): 11–14 [刘艳辉, 高春山, 刘铁钢, 等. 添加碳源对福瑞鲤 2 号苗种生长及养殖池塘水质的影响. 河北渔业, 2021(4): 11–14]
- LONG L N, LU S M, LIU H. Effects of different low salinity conditions on water quality and physiological indexes of *Litopenaeus vannamei* in biofloc technology system. Journal of Agriculture, 2022, 12(11): 50–54 [龙丽娜, 陆诗敏, 刘晃. 生物絮团系统中不同低盐度条件对水质及凡纳滨对虾生理指标的影响. 农学学报, 2022, 12(11): 50–54]
- LU B, WANG H, XIE J, *et al.* Effect of C/N ratio on bioflocs formation and water quality in zero-water exchange grass crap tanks. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(8): 1220
- LU G Z, YAO Z L, LAI Q F, *et al.* Growth performance, blood parameters, and texture characteristics of juvenile largemouth bass (*Micropterus salmoides*) exposed to highly saline-alkaline water. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(4): 1–11 [逯冠政, 么宗利, 来琦芳, 等. 高盐碱环境下大口黑鲈幼鱼生长性能、血液生理指标与质构特征研究. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 1–11]
- MALI P, GHOSH S, DASH G C S. Effects of different carbon-to-nitrogen ratios on Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* in the biofloc rearing system. Fisheries Science, 2024, 90(2): 239–256
- MANG Q, XU G C, ZHU J, *et al.* Developmental status and prospective vision for China's aquaculture. Fishery Modernization, 2022, 49(2): 1–9 [莽琦, 徐钢春, 朱健, 等. 中国水产养殖发展现状与前景展望. 渔业现代化, 2022, 49(2): 1–9]
- PADENIYA U, DAVIS D A, WELLS D E, *et al.* Microbial interactions, growth, and health of aquatic species in biofloc systems. Water, 2022, 14(24): 4019–4019
- PANIGRAHI A, SARANYA C, SUNDARAM M, *et al.* Carbon: Nitrogen (C:N) ratio level variation in fluences microbial community of the system and growth as well as immunity of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in biofloc based culture system. Fish and Shellfish Immunology, 2018, 81: 329–337
- RAZA B, ZHENG Z M, YANG W. A review on biofloc system technology, history, types, and future economical perceptions in aquaculture. Animals, 2024, 14(10): 1489
- SHI H. Microbiology experiment. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology Press, 2010, 42–44 [石鹤. 微生物学试验. 武汉: 华中科技大学出版社, 2010, 42–44]
- SONG Y L. The polyphasic taxonomic studies of *Sediminibacterium roseum* SYL130T. Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2018 [宋雅丽. 橘红海生杆菌 SYL130T 的多相分类学鉴定. 华中农业大学硕士研究生学位论文, 2018]
- TAYYAB K, ASLAM S, GHAURI M A, *et al.* Consequential study on different levels of C/N ratios used in biofloc-based aquaculture system. Brazilian Journal of Biology, 2023, 83: e248878
- WANG K K, ZHANG K, XIE J, *et al.* The effect of periphyton substrate on the accumulation of nitrogen and phosphorus in the *Micropterus salmoides* aquaculture ponds. Freshwater Fisheries, 2021, 51(3): 48–52 [王珂珂, 张凯, 谢骏, 等. 生态基对大口黑鲈养殖池塘氮、磷累积的影响. 淡水渔业, 2021, 51(3): 48–52]
- WANG K, LIANG H L, HUANG D Y, *et al.* Research progress of diet nutrition requirement and fish meal replacement for largemouth bass (*Micropterus salmoides*). Feed Industry, 2024, 45(6): 62–71 [王凯, 梁化亮, 黄东宇, 等. 大口黑鲈饲料营养需求及鱼粉替代研究进展. 饲料工业, 2024, 45(6): 62–71]
- WATANABE K, NOBUYUKI K, YUICHI I, *et al.* Effective isolation of bacterioplankton genus *Polynucleobacter* from freshwater environments grown on photochemically degraded dissolved organic matter. FEMS Microbiology Ecology, 2010(1): 57–68
- WEI Y F, LIAO S A, WANG A L. The effect of different carbon sources on the nutritional composition, microbial community and structure of bioflocs. Aquaculture, 2016, 465: 88–93
- WU X, WU C S, WANG G Q, *et al.* The effect of different addition amounts of poly- β -hydroxybutyrate acid (PHB) as a slow-release carbon source in biological flocculation. Fishery Modernization, 2021, 48(6): 19–27 [吴霞, 吴长胜, 王国庆, 等. 不同添加量的聚- β -羟基丁酸酯作为生物絮凝缓释碳源的应用效果. 渔业现代化, 2021, 48(6): 19–27]
- XIA Y, QIU L J, YU E M, *et al.* Dynamic changes of water quality factors and composition of prokaryotic and eukaryotic microorganisms during culturing of bio-floc. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(1): 75–83 [夏耘, 邱立疆, 郁二蒙, 等. 生物絮团培养过程中养殖水体水质因子及原核与真核微生物的动态变化. 中国水产科学, 2014, 21(1): 75–83]
- YANG C, ZHANG W, LIU R H, *et al.* Phylogenetic diversity and metabolic potential of activated sludge microbial communities in full-scale wastewater treatment plants. Environmental Science and Technology, 2011, 45(17): 7408–7415
- YANG Y, SHI L L, CHU Y Y, *et al.* Effects of sustained release of medium on water quality and microbial metabolism of Tilapia culture water. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2023(14): 125–132 [杨泳, 史磊磊, 初禹瑶, 等. 培养基缓释对罗非鱼养殖水体水质及微生物代谢状况的影响. 中国农学通报, 2023(14): 125–132]
- YU Y B, LEE J H, CHOI J H. The application and future of biofloc technology (BFT) in aquaculture industry: A review. Journal of Environmental Management, 2023, 342: 118237
- YUE Q, LI Y Q, CAO Y J, *et al.* Influence of biological floc on the growth of *Neocaridina denticulata sinensis* and the water quality in the culture water. Hebei Fisheries, 2012(2): 3–6 [岳强, 李彦芹, 曹杰英, 等. 生物絮团对中华锯齿米虾生长及水质的影响. 河北渔业, 2012(2): 3–6]

ZHANG X, ZHOU L, CAI M, *et al.* Metagenomics-based analysis of microbial community structure and function composition in aquaculture pond for Chinese mitten crab. *Progress in Fishery Sciences*, 2024, 45(4): 112–124 [张旭, 周丽, 蔡敏, 等. 基于宏基因组学的中华绒螯蟹养殖池塘水体微生物群落结构和功能组成分析. *渔业科学进展*, 2024, 45(4): 112–124]

ZHAO Z H, XU Q Y, LUO L, *et al.* Effect of adding carbon source on growth of fish and water quality in Songpu mirror Carp (*Cyprinus specularis* Songpu) pond. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2013, 44(9): 105–112 [赵志刚, 徐奇友, 罗亮, 等. 添加碳源对松浦镜鲤养殖池塘鱼体生长及水质影响. *东北农业大学学报*, 2013, 44(9): 105–112]

(编辑 冯小花)

Effect of Carbon Sources Addition on Water Quality and Bacterial Community Structure and Function in *Micropterus salmoides* Aquaculture Ponds

HU Caiqin^{1,3}, HU Tiehuan^{1,2}, LIU Qianfu^{1,3,4}, YANG Wanling^{1,3,4}, ZENG Yanyi^{1,3}, GAO Yuan^{1,3,4}, LI Haiyan^{1,3}, MAI Yongzhan^{1,3,4}, WANG Chao^{1,3,4}^①

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China; 2. Tianjin Agricultural University, Tianjin Key Laboratory of Aqua-Ecology and Aquaculture, Tianjin 300384, China; 3. Fishery Ecological Environment Monitoring Center of Pearl River Basin, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Animal Immunology and Sustainable Aquaculture, Guangzhou 510380, China; 4. National Agricultural Scientific Observing and Experimental Station for Fisheries Resources and Environment, Guangzhou 510380, China)

Abstract *Micropterus salmoides* is an important freshwater species in China. Developing zero-exchange aquaculture ponds for *M. salmoides* is of considerable significance. Recently, carbon source technology was introduced into aquaculture as an emerging environment-friendly production method. Adding carbon sources to aquaculture water can promote the formation of bioflocs, which creates economic and environmental benefits by reducing effluent discharges and artificial feed supply and improving bio-security. In this study, bioflocs were applied to aquaculture ponds of *M. salmoides*, and the effects of adding carbon sources on the water quality, bacterial community structure, and function were evaluated to provide a theoretical basis for the healthy and efficient green aquaculture of *M. salmoides*. Specifically, two experimental groups were established by adding special and slow-release carbon sources in outdoor ponds, respectively, and a control group without carbon source addition was also set up. A 6-week cultivation experiment was conducted. The bacterial community structure and functional prediction were explored using 16S rRNA high-throughput sequencing technology, and water quality parameters were also measured. Our results showed that the water quality parameters pH, chlorophyll *a* (Chl *a*), total nitrogen (TN), ammonia (NH₄⁺), nitrite (NO₂⁻), and nitrate (NO₃⁻) concentrations in the experiment groups were significantly lower than that in the control group. Bacterial abundance (BA) and bioflocs volume (BFV) in the experiment groups were approximately 5 and 2 times higher than those in the control group, respectively. This result indicated that adding special and slow-release carbon sources to the water of *M. salmoides* ponds promoted the formation of bioflocs and significantly reduced the concentration of nutrients, improving water quality. In addition, Chl *a*, BFV, and NO₃⁻ in the special carbon source group were significantly higher than that in the slow-release carbon source group. In

① Corresponding author: WANG Chao, Email: chaowang@prfri.ac.cn

contrast, TN, NH_4^+ , and NO_2^- in the special carbon source group were significantly lower than that in the slow-release carbon source group. This indicated that the addition of the special carbon source had a more positive effect on the formation of bioflocs, and its impact on improving the water quality of *M. salmoides* aquaculture ponds was more significant than that of slow-release carbon source adding. This phenomenon probably resulted from the fermented organic compounds in special carbon sources, including macromolecular matter such as polysaccharides and proteins, and micromolecular matter such as amino acids and monosaccharides, which could be rapidly utilized for bacterial production and bioflocs formation. Regarding bacterial community structure, Actinobacteria, Proteobacteria, and Bacteroidetes were the dominant phyla of *M. salmoides* ponds, accounting for 47.8%, 31.6%, and 16.6%, respectively, whereas hgcI_clade, CL500-29_marine_group, and MWH-UniP1_aquatic_group were dominant genera, accounting for 43.8%, 10.3%, and 6.6%, respectively. RDA analysis showed that dissolved oxygen, nitrate, total nitrogen, total phosphorus, and water temperature were the key environmental factors driving bacterial community structure succession. The relative abundance of Proteobacteria in the experiment groups increased more significantly than that in the control group, which might be due to the incremental organic carbon stimulating the growth of several species in Proteobacteria, such as *Polynucleobacter* and *Limnohabitans*. Adding carbon sources expanded the ecological niche of Proteobacteria, promoting the proliferation of several bacteria groups that could efficiently use organic carbon, such as α -Proteobacteria. Moreover, Proteobacteria comprise most of the bacteria with denitrification functions, contributing to nitrogen removal processes and playing an important role in the degradation of organic matter. This might have resulted in significantly lower TN, NH_4^+ , NO_2^- , and NO_3^- concentrations in the experiment groups. Additionally, the addition of carbon sources resulted in an increased relative abundance of *Limnohabitans*, *Sediminibacterium*, *Flavobacterium*, *Rhodobacter*, and *Novosphingobium*. The relative abundance of these bacteria was significantly and negatively correlated with NO_2^- concentration, indicating that the formation of bioflocs in the experiment groups decreased NO_2^- and promoted the growth of these bacteria. The addition of carbon sources increased the relative abundance of functional genes related to carbohydrate metabolism, lipid metabolism, cell motility, and membrane transport, suggesting bioflocs enhanced the metabolic activity of the bacterial communities, particularly in the utilization of carbohydrates and lipids. Moreover, the relative abundance of functional genes related to energy metabolism and replication and repair in the experiment groups was significantly lower than that in the control group, suggesting that adding carbon sources reduced the energy consumption required by the bacterial community to maintain its basic growth and metabolic activity. Bacterial growth efficiency (BGE) increased correspondingly, implying that a larger amount of organic carbon absorbed by bacteria was converted into bacterial biomass by bacterial production. This likely explains why the bacterial abundance in the experiment groups was significantly higher than that in the control group. Our results suggested that adding carbon sources could significantly change the aquatic bacterial community structure and enhance bacterial metabolic activity by degrading carbon and nitrogen compounds. Our study provides theoretical reference and practical guidance for the low-carbon healthy aquaculture of *M. salmoides*. It establishes a basis for the further application of bioflocs technology in outdoor aquaculture production.

Key words Carbon sources addition; *Micropterus salmoides*; Pond aquaculture; Water quality; Bacterial community