



大豆低聚糖替代葡萄糖对生物絮团系统菌群结构的影响

周航先^{1,2,3}, 陶明伟^{1,2,3}, 魏杰^{1,2,3}, 赵建华^{1,2,3*}, 徐奇友^{1,2,3*}

(1. 湖州师范学院生命科学学院, 浙江 湖州 313000;

2. 湖州师范学院, 水生动物繁育与营养国家地方联合工程实验室, 浙江 湖州 313000;

3. 湖州师范学院, 浙江省水生生物资源养护与开发技术研究重点实验室, 浙江 湖州 313000)

摘要: 为了筛选出对生物絮团系统水质及菌群结构有积极作用的适宜浓度, 本研究通过使用不同浓度的大豆低聚糖 (SBOS) 替代葡萄糖 (GLU) 作为生物絮团的碳源, 对照组碳源为葡萄糖, 实验组分别设置 2.5%、5.0%、7.5% 和 10.0% SBOS (SBOS-2.5、SBOS-5.0、SBOS-7.5、SBOS-10.0 组) 替代葡萄糖为碳源。氯化铵为氮源, C/N 为 15, 并添加枯草芽孢杆菌促进生物絮团系统形成。结果显示, 各实验组与对照组均有效降低水中氨氮、亚硝态氮、硝态氮、总氮的浓度, 各组之间均无显著差异。基于 16S *rRNA* 高通量测序, 在门水平下, 14 d 时各实验组及对照组的优势菌门为变形菌门。28 d 时, 变形菌门与拟杆菌门的比例相近。属水平下, 14 d 时, SBOS-2.5 组与 SBOS-10.0 组均显著提高芽孢杆菌属的丰度, 显著降低气单胞菌科的丰度。28 d 时, SBOS-2.5 组与对照组和 SBOS-10.0 组相比显著提高黄杆菌属的丰度, 各实验组与对照组相比显著降低金黄杆菌属的丰度。将菌群组成与环境因子关联分析, 发现部分菌群对氮的硝化与反硝化有重要作用。研究表明, 2.5% 和 10.0% 的 SBOS 替代葡萄糖作为生物絮团的碳源均可有效提高有益菌丰度, 降低有害菌丰度, 有利于维持水体中细菌群落的稳定性。综合实验结果与生产应用成本, SBOS 替代葡萄糖的推荐比例为 2.5%。本研究为 SBOS 作为碳源应用于生物絮团系统提供基础, 并为后续研究提供参考。

关键词: 生物絮团; 大豆低聚糖; 碳源; 菌群结构

中图分类号: S 966.9

文献标志码: A

近年来, 随着水产养殖业的快速发展, 水产动物生产效率迅速提高, 然而随着养殖密度与饲料投入量的不断增加, 导致水体含氮量随之升高, 水体污染日趋严重^[1]。生物絮团技术 (biofloc technology, BFT) 是一种基于微生物的培养系统, 可有效降低水体中氮的含量^[2]。通过异养细菌生长促进氮吸收, 将水体中含氮废物转换为菌体蛋白, 在提高饲料利用率的同时有效进行水质净化^[3-4]。

BFT 系统中异养细菌能够通过消耗有机碳作为能源, 将水体中的无机氮, 包括氨氮、亚硝态氮和硝态氮直接转化为细菌生物量^[5]。许多研究证明生物絮团系统内复杂的微生物相互作用可能对水生生物的免疫反应具有重要影响^[6-8], 有益微生物对动物健康有积极影响^[9-10], 有害微生物对动物的健康有负面影响^[11-13]。芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 是目前研究最深入的宿主相关益生菌, 较多地应用于

收稿日期: 2023-06-27 修回日期: 2023-09-01

资助项目: 浙江省农业重大技术协同推广计划 (2022XTTGSC01); 浙江省自然科学基金 (LTGN23C190002)

第一作者: 周航先 (照片), 从事水产动物营养与饲料研究, E-mail: zhxjournal@163.com

通信作者: 赵建华, 从事水产养殖研究, E-mail: zhaojianhua@zjhu.edu.cn;

徐奇友, 从事动物营养与饲料研究, E-mail: 02655@zjhu.edu.cn



循环水产养殖系统 (RAS)、BFT 等科学养殖技术中, 可有效提高水质以及养殖动物的免疫性能^[14]。

添加碳源对系统内的微生物群落有积极影响^[15], 有机碳源是异养微生物不可缺少的能量物质来源之一^[16]。但养殖水体中的碳源不足以满足异养细菌的生长繁殖需要, 一般通过人工添加碳源的方式进行调控。已有研究表明, 不同类型的碳源会影响生物絮团的营养成分、形态结构和水体中的微生物群落^[17-18], 其中使用最多的是葡萄糖、淀粉和糖蜜等常见的有机碳源, 并且均已经被证明在 BFT 中添加可以有效降低水体中的氮含量^[19-20]。Vilani 等^[21]发现, 水体中的细菌群落对不同碳源代谢后产生的终产物有一定的相似性, 说明不同类型的碳源被微生物吸收后能进行相似的代谢行为。添加不同种类的碳源都能有效降低水体中有害氮的含量, 但其水质净化效率与水体中微生物群落会有一定差异, 可对碳源的选择进行更深入的研究, 来挑选更能促进水质净化及对微生物具有“益生菌”偏向型的碳源。

低聚糖是含有少量 (通常为 3~10 个) 单糖的糖聚合物^[22], 此类聚合物对动物肠道健康和免疫系统具有有益作用, 例如免疫调节活性、抗癌活性和补体激活^[23]。Hu 等^[24]的研究表明, 饲料中添加低聚果糖可提高对虾肠道微生物的多样性, 抑制肠道中的弧菌属 (*Vibrio*) 等潜在病原菌。目前, 各种来源的功能性低聚糖已被广泛用于养殖业, 饲料中添加低聚糖可以有效增加有益菌的丰度, 减少有害菌的丰度^[25]。因此, 低聚糖有作为生物絮团系统中的新型碳源的潜力。大豆低聚糖 (soybean oligosaccharides, SBOS) 是大豆或其他豆科植物中含有的可溶性低聚糖的总称, 广泛存在于大豆籽粒中, 主要由棉子糖、水苏糖和蔗糖组成^[26]。研究证明 SBOS 的添加对动物免疫以及肠道菌群有积极影响, SBOS 可改善有益肠道微生物的组成^[27], 但也有研究显示 SBOS 在家禽日粮中的添加会导致动物肠道受损, 进而影响营养物质的利用^[28]。以添加碳源建立生物絮团方式可避免 SBOS 直接进入动物肠道内造成的损伤, 缓解动物肠道消化 SBOS 的过程中带来的负面影响, 通过调节水体中的微生物群落结构进而间接影响动物的肠道群落^[29]。目前对于生物絮团系统中添加 SBOS 作为碳源对水体细菌群落影响的研究还相对较少。因此, 本实验探究不同比例的 SBOS 替代葡萄糖对生物絮团系统水质以及菌群结构的

影响, 以期能寻找到最经济高效的比例, 并为生物絮团的相关研究提供参考。

1 材料与方法

实验用无水葡萄糖 (AR) 购于国药集团化学试剂有限公司。氯化铵 (99.8%) 购于上海麦克林生化科技有限公司。SBOS (BR) 购于上海源叶生物科技有限公司。

1.1 实验设计

实验在湖州师范学院生命科学学院水循环温室养殖系统 20 个水体容积为 80 L 的玻璃缸中进行。实验以 100% 葡萄糖 (glucose, GLU) 为对照, 实验组为 2.5%、5.0%、7.5%、10.0% 的 SBOS 等比例替代葡萄糖作为碳源, 共计 1 个对照组和 4 个实验组, 分别记为 GLU、SBOS-2.5、SBOS-5.0、SBOS-7.5 和 SBOS-10.0, 每组 4 个重复。实验选用湖州师范学院德清湖水作为实验水体, 湖水中氨氮 ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) 含量为 0.03 mg/L, 亚硝态氮 ($\text{NO}_2^-\text{-N}$) 含量为 0.03 mg/L, 硝态氮 ($\text{NO}_3^-\text{-N}$) 含量为 1.39 mg/L, 总氮 (TN) 含量为 1.48 mg/L, 总磷 (TP) 含量为 0.31 mg/L。每个实验缸添加 80 L 湖水, 并以氯化铵作为氮源, 根据 Avnimelech^[2]的公式调整 C/N 比为 15 : 1, 同时向实验缸中添加等量的枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 促进絮凝, 添加 1.54×10^8 CFU/mL 的菌液 10 mL 至实验水体中, 控制水体中菌液浓度为 1.9×10^4 CFU/mL^[30-31]。通过日光灯提供光照, 保持 12 h 照明 12 h 黑暗。实验自 2023 年 3 月 3 日开始, 至 2023 年 4 月 1 日结束, 周期为 28 d。

1.2 水质检测

每日利用 YSI Pro Plus 便携式多参数水质检测仪测试水体中的 pH、水温和溶解氧 (DO), 在实验第 0、3、7、14、21、28 天分别取 100 mL 水样经过 0.45 μm 滤膜过滤后使用 QC8500 流动注射水质分析仪测定水体中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 和 TN 含量。通过英霍夫锥形管测量生物絮团的体积, 取 1 000 mL 水样, 在水平台面上放置的英霍夫锥形管中自然沉降 30 min 后记录絮体的体积^[32]。使用 wtw430 浊度仪检测水体的浑浊度, 使用国标法 (GB 11901—89) 测量水体中总固体悬浮物 (TSS) 的浓度, 将 100 mL 水样通过 0.45 μm 的滤膜过滤, 将滤纸在 105 $^\circ\text{C}$ 烘箱中干燥至恒重, 称量计算。

1.3 微生物菌群结构分析

实验分别选取第 14、28 天的样品进行检测, 每个实验缸取 100 mL 水样, 经 0.22 μm 滤膜抽滤直至滤膜表面有明显附着物, 将滤膜放置无菌离心管中, 置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱保存。分别取 GLU、SBOS-2.5 与 SBOS-10.0 组的样品, 由上海美吉生物医药科技有限公司采用 16S *rRNA* 高通量测序技术进行微生物多样性分析。以门、属、操作分类单元 (operational taxonomic units, OTU) 三个水平进行分析。细菌丰度通过 Chao 指数和 Ace 指数来衡量, 当细菌种类越丰富时, Chao 和 Ace 值也会相应增加。细菌群落的多样性通过 Shannon 指数来衡量, 当存在更多不同种类的细菌时, Shannon 指数值也会增加。

1.4 数据分析

采用 IBM SPSS Statistics 26.0 统计软件, 使用单因素方差分析 (ANOVA) 进行数据分析。 $P<0.05$ 表示结果具有显著差异。实验结果以平均值 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD) 的形式表示。对于高通量测序技术数据, 采用 Kruskal-Wallis 秩和检验进行多重比较, 其中 $P<0.05$ 表示组间差异具有显著性, $P<0.01$ 表示组间差异具有极显著性。

2 结果

2.1 对水质的影响

实验期间保持水体 pH 7.75 ± 0.08 , 温度 $(24.03\pm 0.26)\text{ }^{\circ}\text{C}$, 溶解氧含量为 $(6.29\pm 0.46)\text{ mg/L}$ 。氨氮整体呈下降趋势 (图 1-a), 并且前 3 天浓度迅速降低,

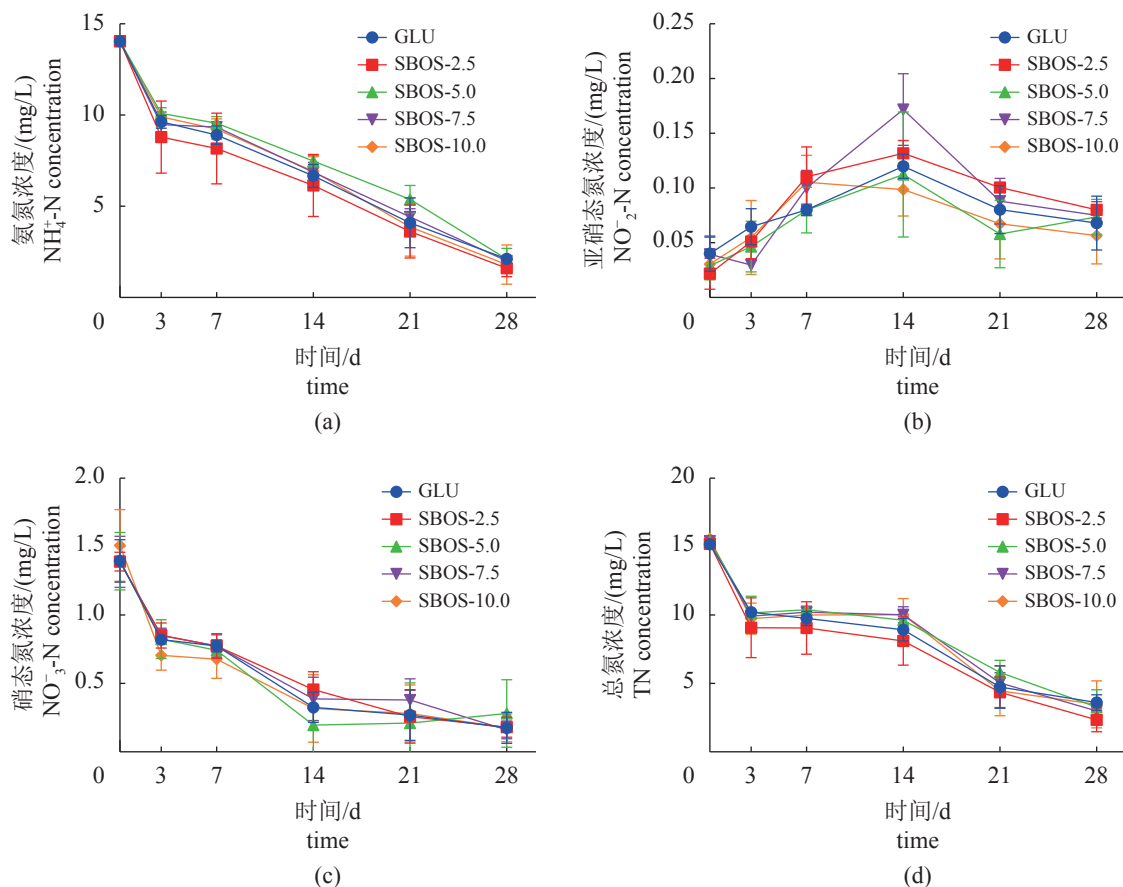


图 1 氨氮 (a)、亚硝态氮 (b)、硝态氮 (c)、总氮 (d) 浓度变化情况

GLU 为添加葡萄糖的对照组, SBOS-2.5 为 2.5% 大豆低聚糖替代葡萄糖的实验组, SBOS-5.0 为 5.0% 大豆低聚糖替代葡萄糖的实验组, SBOS-7.5 为 7.5% 大豆低聚糖替代葡萄糖的实验组, SBOS-10.0 为 10.0% 大豆低聚糖替代葡萄糖的实验组; 下同。

Fig. 1 Concentration changes of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (a), $\text{NO}_2^-\text{-N}$ (b), $\text{NO}_3^-\text{-N}$ (c) and TN (d)

GLU is the control group with added glucose, SBOS-2.5 is the experimental group with glucose replaced with 2.5% SBOS, SBOS-5.0 is the experimental group with glucose replaced with 5.0% SBOS, SBOS-7.5 is the experimental group with glucose replaced with 7.5% SBOS, SBOS-10.0 is the experimental group with glucose replaced with 10.0% SBOS; the same below.

各组氨氮浓度均显著降低 ($P<0.05$)。各实验组与对照组相比氨氮水平无显著差异 ($P>0.05$)，各实验组之间相比差异不显著 ($P>0.05$)。亚硝态氮整体呈现先升高后降低的趋势 (图 1-b)，SBOS-7.5 组在 14 d 时亚硝态氮含量高于对照组与其他实验组，但无显著差异 ($P>0.05$)。硝态氮与氨氮变化水平相似 (图 1-c)，整体呈下降趋势。各组前 3 d 总氮浓度迅速降低，3~14 d 缓慢降低，14~28 d 又迅速降低 (图 1-d)。总体来看，各实验组与对照组在氨氮、亚硝态氮、硝态氮、总氮的浓度变化方

面较为相似。

2.2 生物絮团及悬浮颗粒物含量分析

浊度与絮团体积的变化趋势大致相同，均先升高，后下降，并在 21 d 达到最高 (图 2-a, b)。实验过程中发现絮团多黏附在壁上，游离在水体中的较少。SBOS-10.0 的浊度在 21 d 相较于其余实验组和对照组较高，但无显著差异 ($P>0.05$)。TSS 含量总体呈现先上升后下降，再上升后下降的趋势，以 14 d 为一个周期 (图 2-c)。

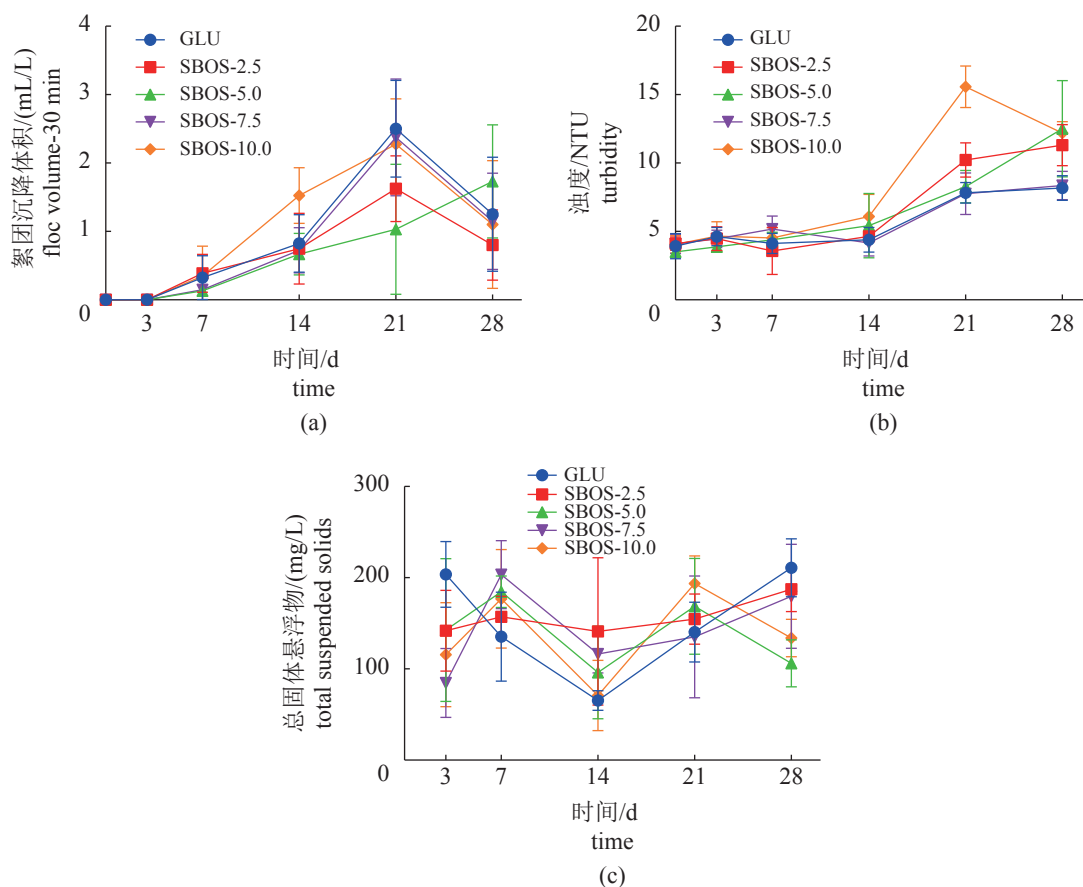


图 2 絮团体积 (a)、浊度 (b)、总固体悬浮物含量 (c) 的变化情况

Fig. 2 Changes of floc volume (a), turbidity (b) and total suspended solids (c)

2.3 生物絮团系统微生物多样性及丰度

在实验 14 d 与 28 d 采集样本，利用高通量测序技术检测分析系统内的菌群结构与多样性，多样性指数结果见表 1。门水平上，14 d 的 GLU 组检测出 20 个细菌门，SBOS-2.5 组 20 个细菌门，SBOS-10.0 组 19 个细菌门；28 d 的 GLU 组检测出 22 个细菌门，SBOS-2.5 组 20 个细菌门，SBOS-10.0 组 19 个细菌门。属水平上，14 d 的 GLU 组检测出 274 个细菌属，SBOS-2.5 组 251 个细菌属，SBOS-10.0 组 242 个细菌属；28 d 的 GLU 组检测

出 228 个细菌属，SBOS-2.5 组 193 个细菌属，SBOS-10.0 组 195 个细菌属。从多样性指数分析，14 d 时，SBOS-2.5 与 SBOS-10.0 的 OTU 值相较于对照组较低，但并无显著差异 ($P>0.05$)。从其余多样性指数分析，各实验组相较于对照组均降低微生物的多样性指数，各实验组之间差异不显著 ($P>0.05$)。28 d 时，实验组与对照组的微生物多样性无显著差异 ($P>0.05$)，情况与 14 d 类似。韦恩图分析结果显示，随着实验的进行，各实验组与对照组的共有群落逐渐减少，丰度逐渐降低 (图 3)。

表 1 生物絮团中微生物多样性与丰度

Tab. 1 Microbial diversity and abundance in bioflocs

时间/d time	组别 groups	门数量 phylum numbers	属数量 genus numbers	OTU	Ace	Chao	Shannon
14	GLU-1	20	274	596	772.40±36.41	746.60±24.53	3.39±0.31
	SBOS-1-2.5	20	251	515	613.70±46.20	596.00±48.88	3.20±0.41
	SBOS-1-10.0	19	242	469	574.30±49.30	563.00±51.05	3.04±0.32
28	GLU-2	22	228	449	556.50±41.30	552.90±29.72	3.11±0.54
	SBOS-2-2.5	20	193	358	472.50±20.25	466.90±29.92	2.06±0.42
	SBOS-2-10.0	19	195	372	494.10±92.61	484.00±73.77	2.49±0.46

注: GLU-1为14 d对照组, SBOS-1-2.5为14 d SBOS-2.5实验组, SBOS-1-10.0为14 d SBOS-10.0实验组; GLU-2为28 d对照组, SBOS-2-2.5为28 d SBOS-2.5实验组, SBOS-2-10.0为28 d SBOS-10.0实验组, 下同。

Notes: GLU-1 is the 14 d control group, SBOS-1-2.5 is the 14 d SBOS-2.5 experimental group, and SBOS-1-10.0 is the 14 d SBOS-10.0 experimental group; GLU-2 is 28 d control group, SBOS-2-2.5 is 28 d SBOS-2.5 experimental group, SBOS-2-10.0 is 28 d SBOS-10.0 experimental group, the same below.

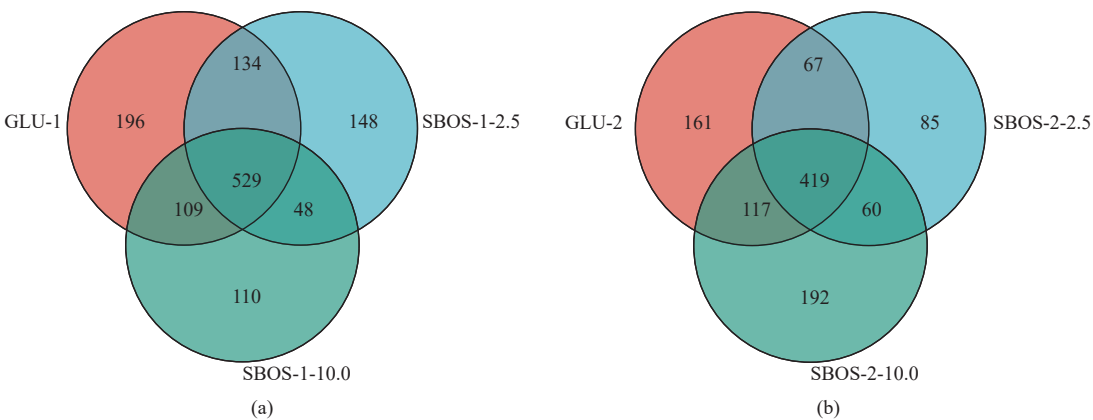


图 3 水体微生物 OTU 的维恩图

Fig. 3 Venn diagram of microbial OTU in water

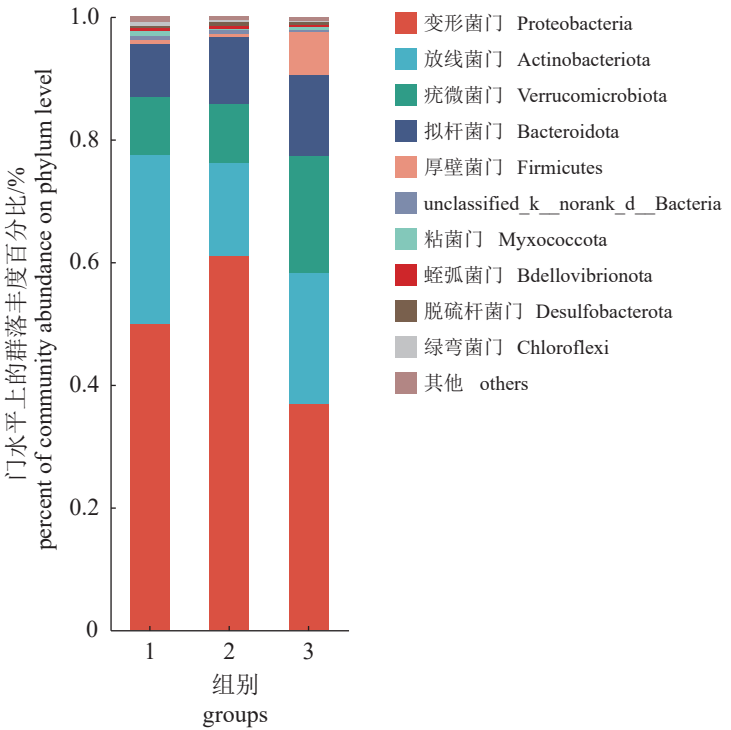
2.4 生物絮团中细菌群落组成

通过对两个时期相同组进行微生物测序统计分析。在实验 14 d 时, 门水平下的实验组和对照组中, 排名前 5 位的优势菌群包括变形菌门 (Proteobacteria)、放线菌门 (Actinobacteriota)、疣微菌门 (Verrucomicrobiota)、拟杆菌门 (Bacteroidota) 和厚壁菌门 (Firmicutes) (图 4-a)。变形菌门在各组中均有较大优势, 丰度最高, 在各组中占比 SBOS-2.5>GLU>SBOS-10.0。各实验组与对照组放线菌门丰度较为相似。疣微菌门在 SBOS-10.0 组中的丰度高于其余实验组与对照组, 但无显著差异 ($P>0.05$)。拟杆菌门在各个实验组与对照组之间的丰度相似。实验 28 d 时, 门水平上 (图 4-b) 排名前 5 位的优势菌群包括拟杆菌门、变形菌门、放线菌门、疣微菌门和 Patescibacteria。拟杆菌门与变形菌门为 28 d 实验的优势菌门, 各组中拟杆菌门的丰度都不同程度地增加, SBOS-2.5 丰度最高;

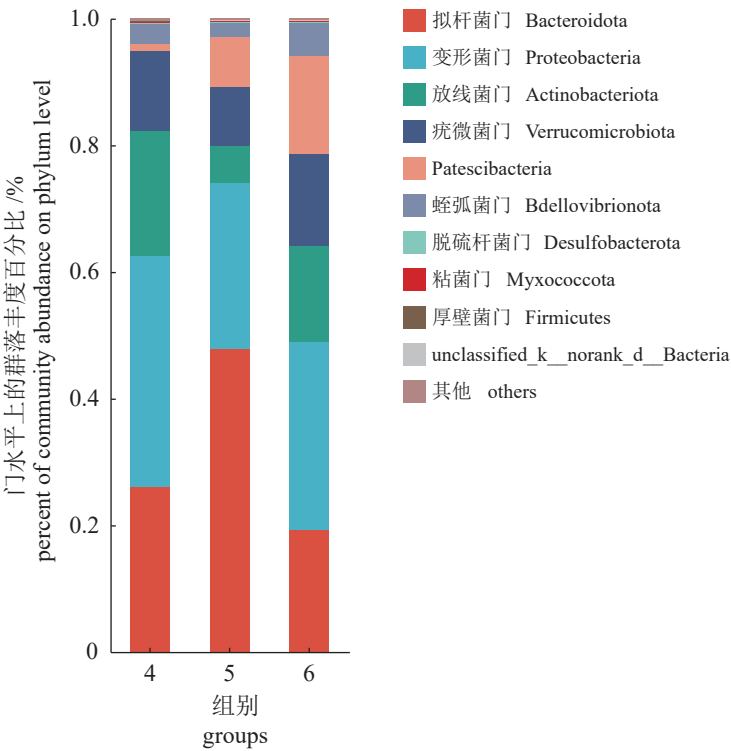
变形菌门的丰度有所降低。属水平上, 14 d 时排名前 5 的优势菌群为微杆菌属 (*Microbacterium*)、*Elstera*、*norank_f_SM2D12*、*Terrimicrobium* 和黄杆菌属 (*Flavobacterium*) (图 5-a)。SBOS-2.5 相比 SBOS-10.0 与对照组 *norank_f_SM2D12* 的丰度较高, SBOS-10.0 与对照组和 SBOS-2.5 相比 *Terrimicrobium* 丰度相对较高。28 d 时排名前 5 的优势菌群为黄杆菌属、微杆菌属、*Terrimicrobium*、红螺菌目下未命名的属 (*norank_f_norank_o_Rhodospirillales*) 和 *norank_f_SM2D12* (图 5-b)。SBOS-2.5 黄杆菌属的丰度要显著高于对照组与 SBOS-10.0 ($P<0.05$)。

2.5 生物絮团系统中细菌群落差异

基于样本中群落丰度数据, 对各实验组与对照组进行显著性差异分析。本实验中 14 d 与 28 d 在门水平下各组之间均无显著差异 ($P>0.05$)。各实验组与对照组相比, 芽孢杆菌属的丰度显著升



(a)



(b)

图 4 门水平群落结构柱形图

1. 14 d 对照组 GLU-1, 2. 14 d SBOS-2.5 实验组 SBOS-1-2.5, 3. 14 d SBOS-10.0 实验组 SBOS-1-10.0; 4. 28 d 对照组 GLU-2, 5. 28 d SBOS-2.5 实验组 SBOS-2-2.5, 6. 28 d SBOS-10.0 实验组 SBOS-2-10.0。下同。

Fig. 4 Horizontal community structure histogram

1. 14-day control group GLU-1, 2. 14-day SBOS-2.5 experimental group SBOS-1-2.5, 3. 14-day SBOS-10.0 experimental group SBOS-1-10.0; 4. 28-day control group GLU-2, 5. 28-day SBOS-2.5 experimental group SBOS-2-2.5, 6. 28-day SBOS-10.0 experimental group SBOS-2-10.0, the same below.

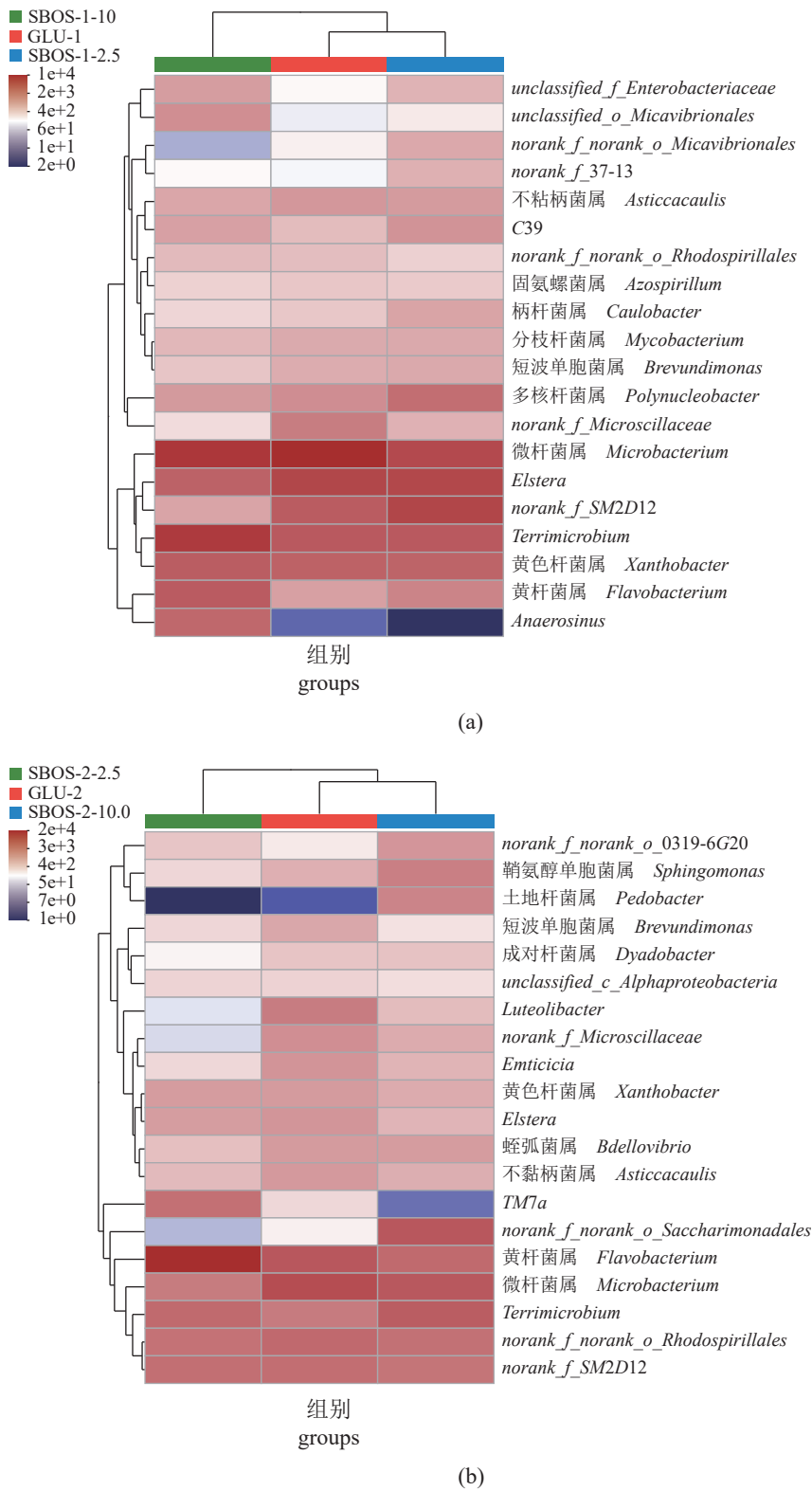


图 5 属水平群落结构热图

Fig. 5 Heatmap of community structure at genus level

高 ($P<0.05$), SBOS-2.5 极显著提高芽孢杆菌属的丰度 ($P<0.01$) (图 6-a)。SBOS-2.5 与对照组相比, 气

单胞菌科下未分类的属 (*unclassified_f_Aeromonadaceae*) 的丰度极显著降低 ($P<0.01$), SBOS-10.0

与对照组相比, 气单胞菌科下未分类的属的丰度显著降低 ($P<0.05$) (图 6-b)。实验 28 d, SBOS-2.5 与 SBOS-10.0 相比, 黄杆菌属的丰度极显著升高 ($P<0.01$), 与对照组相比, 黄杆菌属的丰度显著升高 ($P<0.05$) (图 6-c), SBOS-2.5 与 SBOS-10.0 与对照组相比金黄杆菌属 (*Chryseobacterium*) 的丰度均极显著降低 ($P<0.01$) (图 6-d)。通过 PCoA 图谱进行分析, 14 d 时, SBOS-10.0 与 SBOS-2.5 和对照组有分离的趋势, 但无显著差异 ($P>0.05$), 28 d

时 SBOS-2.5 与对照组相比也有分离趋势, 同样无显著差异 ($P>0.05$) (图 7)。

2.6 不同形态的氮对水体微生物的影响

通过相关性热图显示出属水平下的细菌与三态氮(氨氮、硝态氮、亚硝态氮)之间的关系(图 8)。14 d 图谱显示, 分枝杆菌属与硝态氮呈显著正相关, *norank_f_SM2D12* 和 *norank_f_37-13* 与亚硝态

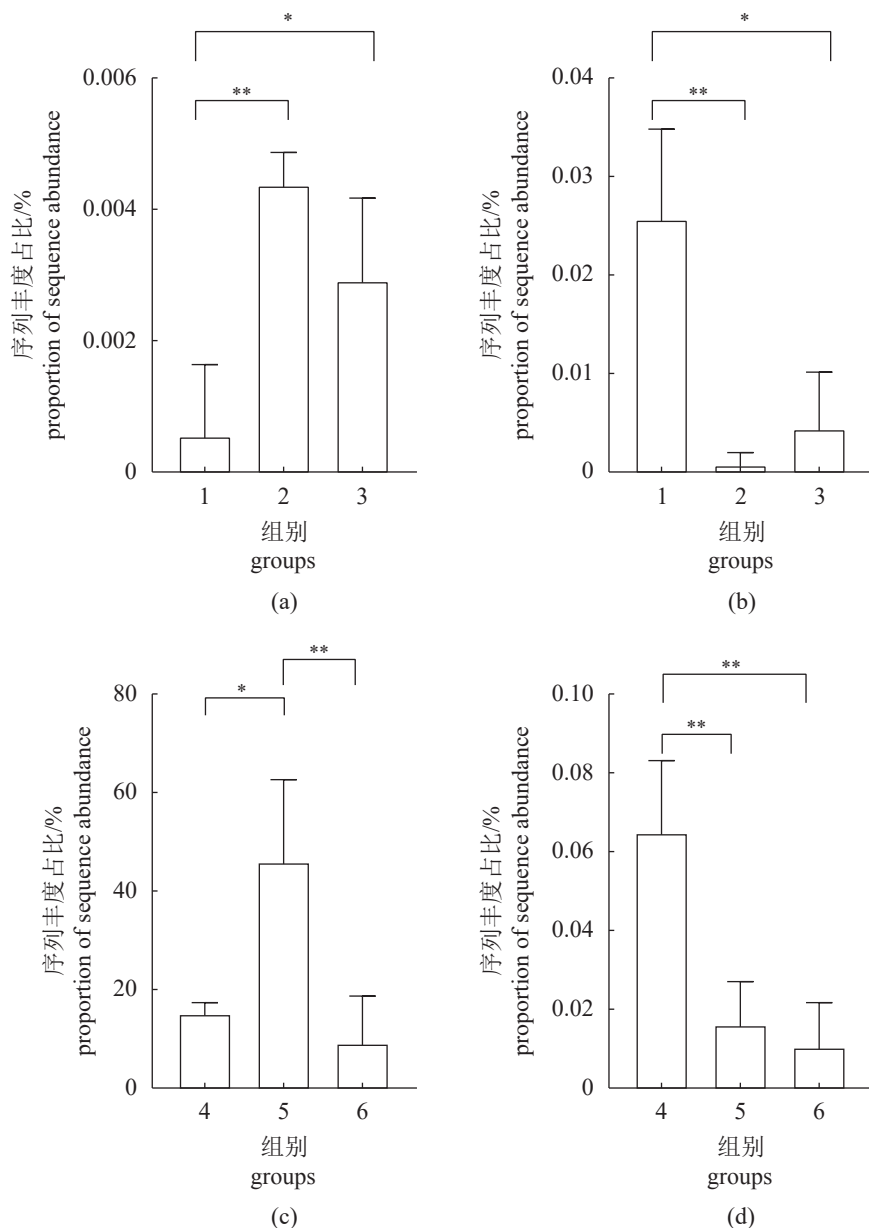


图 6 细菌群落属水平差异

(a) 芽孢杆菌属, (b) 气单胞菌科下未分类的属, (c) 黄杆菌属, (d) 金黄杆菌属; “*”代表差异显著, $P<0.05$; “**”代表差异极显著, $P<0.01$ 。

Fig. 6 Differences of bacterial community at genus level

(a) *Bacillus*, (b) *unclassified_f_Aeromonadaceae*, (c) *Flavobacterium*, (d) *Chryseobacterium*; “*” represents significant difference, $P<0.05$; “**” represents a very significant difference, $P<0.01$.

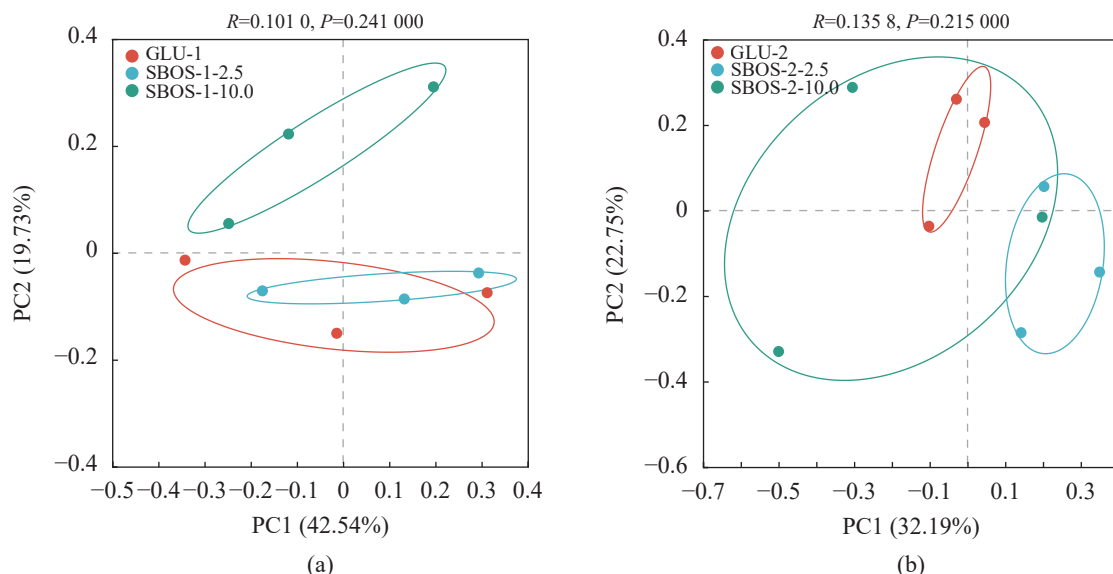


图7 细菌群落 PCoA 分析

Fig. 7 PCoA analysis of bacterial community

氮呈显著正相关(图8-a)。28 d 图谱显示, 鞘氨醇单胞菌属与氨氮呈显著正相关, *norank_f_norank_o_0319-6G20* 与亚硝态氮呈显著负相关, 蛭弧菌属与亚硝态氮和硝态氮均呈显著负相关, 成对杆菌属与亚硝态氮呈极显著负相关, 与硝态氮呈显著负相关, α -变形菌纲 (*unclassified_c_Alphaproteobacteria*) 与亚硝态氮和硝态氮呈显著正相关, *norank_f_Microscillaceae* 与氨氮呈显著正相关。

3 讨论

3.1 SBOS 的添加对生物絮团水质的影响

水体中氨氮与亚硝态氮会对水产动物的生长健康造成严重威胁^[33], 在生物絮团中使用碳源可以有效净化水质, 降低氨氮、硝态氮、亚硝态氮的含量^[34]。Deng 等^[35]认为 BFT 的系统中的有机碳源能增加微生物群落的数量和多样性, 导致氨氮浓度显著降低。Avnimelech^[36]认为使用单糖可以快速去除游离氨, 而更复杂的碳水化合物需要更多时间才能降解为单糖, 从而导致氨的减少速率变慢。这可能是由于复杂的多糖较难被微生物分解代谢。本实验发现各实验组与对照组均能有效降低氨氮、亚硝态氮、硝态氮的含量。提高浊度与絮团沉降体积, 絮团沉降体积是衡量生物絮团系统中絮凝能力强弱的重要指标^[36]。以上结果说明添加 SBOS 在水质净化与絮团形成量方面同样能得到相对良好的结果, 表明 SBOS 替代葡萄糖作为生物絮团系统中的碳源是可行

的^[37]。这与 Kishawy 等^[38]和 Qiu 等^[39]的研究结果一致, 添加低聚糖可有效降低水中氨氮、硝态氮的积累。

3.2 SBOS 的添加对生物絮团水体菌群的影响

碳源的添加不仅会影响水体微生物群落结构^[40]和生物絮团的营养价值^[41], 还对养殖动物的免疫性能有一定影响^[42], 添加不同种类的碳源会产生不同的结果。目前已经有研究证明, 添加低聚糖可以改善养殖动物的肠道菌群结构^[43], 低聚糖在肠道内会被益生菌优先利用^[44]。功能性低聚糖作为饲料添加剂对水产动物的生长免疫具有积极作用^[45], 作为碳源添加到生物絮团系统中可以有效改善水质和肠道微生物菌群, 提高水产养殖动物肠道中有益菌的丰度, 降低有害菌的丰度^[38]。本实验中, 各组共有菌落数量逐渐减少, 这可能是由于实验中仅添加 1 次碳源, 14 d 时水体中的碳源仍能维持足够的异养细菌进行同化代谢等生理活动, 28 d 时水体中的碳源含量已经不足。额外添加的碳源逐渐被异养细菌利用, 由于没有持续补充碳源, 实验后期 C/N 比逐渐降低, 对有害菌的抑制作用减弱。这与 Qiu 等^[46]的观点相同, 较高的 C/N 比可以改善微生物对氮的同化, 更有利于抑制弧菌、克雷伯氏菌 (*Klebsiella*) 等病原菌的繁殖。

本研究中, 添加 SBOS 的实验组与对照组相比, 可有效降低有害菌的丰度, 提高有益菌的丰

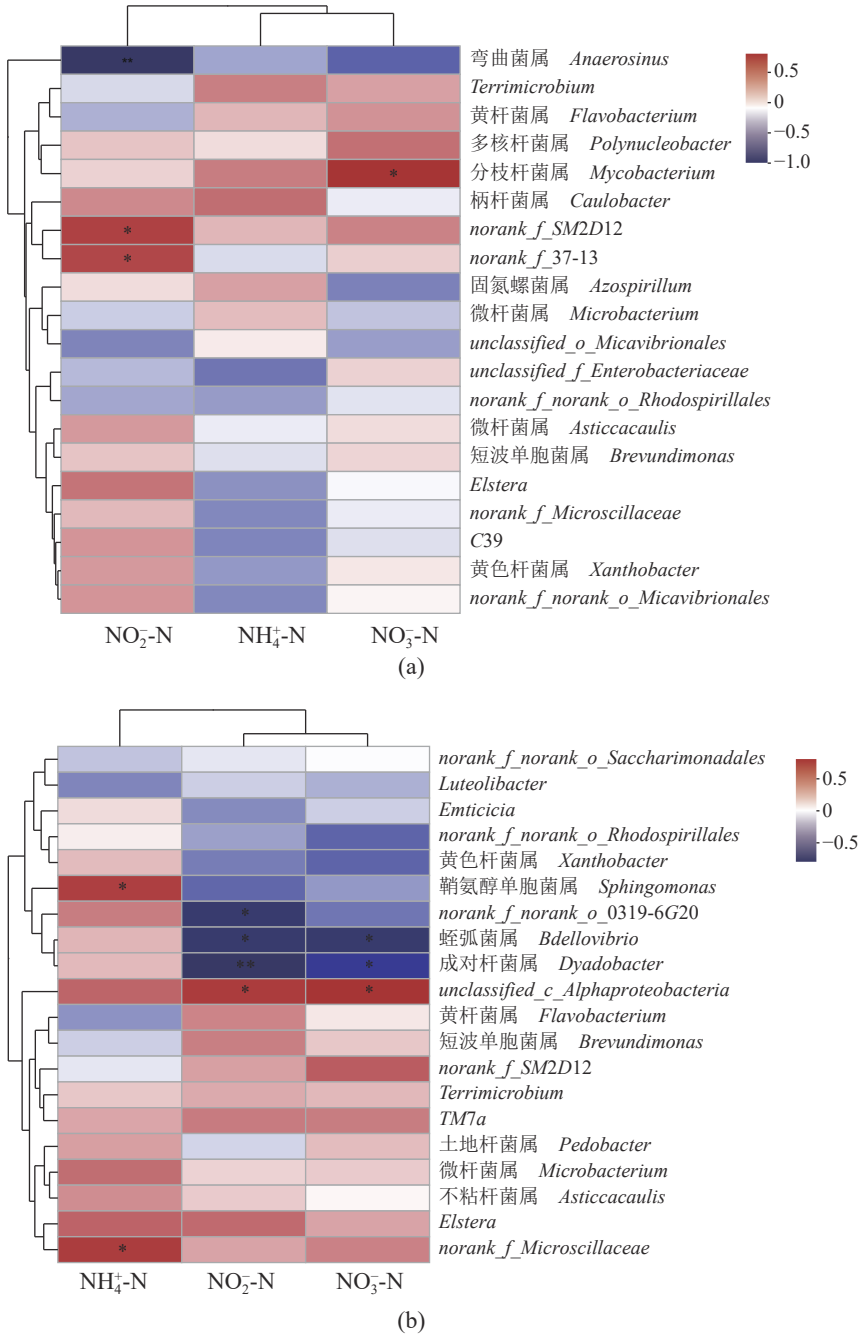


图 8 三态氮与细菌群落相关性热图

(a) 14 d 时不同形态的氮与细菌丰度之间的关系, (b) 28 d 时不同形态的氮与细菌丰度之间的关系。

Fig. 8 Heat map of correlation between tri-state nitrogen and bacterial community

(a) the relationship between different forms of nitrogen and bacterial abundance at 14 d, (b) the relationship between different forms of nitrogen and bacterial abundance at 28 d.

度。14 d 时各实验组的变形菌门丰度均较高, 28 d 时拟杆菌门的丰度有较大提高, 这与仇宗胜等^[47]的结果相似, 拟杆菌门是人体微生物的核心菌群之一, 在有益代谢物产生和免疫方面发挥重要作用^[48]。14 d 时, 2.5% 与 10.0% SBOS 都显著提高芽孢杆菌属的丰度。各实验组均显著降低气单胞

菌科 (Aeromonadales) 下未分类的属的丰度, 气单胞菌科中有些物种是蛙、鱼和人的致病菌, 是一种重要致病菌属^[49]。说明 2.5% 和 10.0% 的 SBOS 都能抑制有害菌的繁殖, 降低其丰度。这与 Qiu 等^[39] 和仇宗盛等^[47] 的研究结果相似, Qiu 等^[39] 发现在水体中添加 5.0% 和 10.0% SBOS 替代葡萄糖

作为碳源能抑制鲫 (*Carassius auratus*) 肠道中假单胞菌和弧菌 (*Vibrio*) 的丰度。添加 SBOS 的实验组在 14 d 并未显著降低金黄杆菌属的丰度, 但在 28 d 显著降低该菌属的丰度, 金黄杆菌属目前已经被认为是脑膜炎、菌血症等其他感染疾病的病原体^[50]。以上结果说明 SBOS 可以提高有益菌的丰度, 降低有害菌的丰度, 并帮助有益菌在水体中形成优势菌群。此外, 益生菌 (芽孢杆菌属) 在水中增殖, 丰度增加, 可能是导致有害菌 (气单胞菌科下未分类的属、金黄杆菌属) 丰度减少的原因之一, 这与 Sheikh 等^[51] 与 Krummenauer 等^[52] 的发现类似。

水体环境中的核心菌群丰度的增加有助于维持水体中细菌群落的稳定性, 进而对水体环境的稳定起到积极作用。系统的生态稳定性对养殖动物的健康具有重要意义, 因为它有助于有益微生物在系统中长期稳定的存在^[53]。28 d 时, 2.5% SBOS 与对照组相比, 黄杆菌属的丰度显著提高, 与 10.0% SBOS 相比极显著提高。说明 2.5% SBOS 的添加有效提高了黄杆菌属这一核心菌群的丰度。这与 Guo 等^[54] 的发现相似, 蔗糖的添加会提高放线菌科 (Actinomycetaceae)、红杆菌科 (Rhodobacteraceae) 和黄杆菌科 (Flavobacteriaceae) 的丰度。Gullian-Klanian 等^[55] 也发现使用 BFT 的水体会增加黄杆菌属、微杆菌属的丰度。养殖动物的肠道菌群是其肠道生理活动以及水体群落长期共同作用的结果, 会随着肠道生理活动及水体细菌群落结构的不同呈现不同的菌群结构^[56]。因此 2.5% SBOS 可能是较为理想的对养殖动物以及水体菌群稳定性有积极作用的浓度。但水体中的细菌群落较为复杂, 需要更进一步研究确定内在运行机制。

氮转换一般有两个过程: 氨氧化细菌 (ammonia-oxidising bacteria, AOB) 将氨氮氧化为亚硝态氮, 亚硝酸盐氧化细菌 (nitrite-oxidising bacteria, NOB) 将亚硝态氮氧化为硝态氮^[57-58]。因此, 通过评估氨氮、亚硝态氮、硝态氮与微生物群落的关系可能对调控微生物群落以及净化水质有一定的参考意义。14 d 时, 分枝杆菌属与硝态氮显著正相关, 这与 Dong 等^[59] 研究结果相似, 分枝杆菌在反硝化过程中发挥重要作用。*norank_f_SM2D12* 与 *norank_f_37-13* 与亚硝态氮显著正相关, 说明这些菌属可能对硝化过程有一定的积极作用。28 d 时成对杆菌属对亚硝态氮与硝态氮显著负相关,

可能是由于该细菌对氮有较强的还原能力, 这与 Bal 等^[60] 的研究结果相似, 成对杆菌属的某个菌株显示出持续的高乙炔还原活性, 证明成对杆菌属在固氮上有较高的潜力。

4 结论

综上所述, 2.5% SBOS 与 10.0% SBOS 均能有效降低有害菌的丰度, 提高有益菌的丰度, 从实验结果与经济实用性分析考虑, SBOS 替代葡萄糖作为生物絮团的碳源的最适浓度应为 2.5%。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Boyd C E. Guidelines for aquaculture effluent management at the farm-level[J]. *Aquaculture*, 2003, 226(1-4): 101-112.
- [2] Avnimelech Y. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems[J]. *Aquaculture*, 1999, 176(3-4): 227-235.
- [3] Burford M A, Thompson P J, McIntosh R P, *et al.* The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero-exchange system[J]. *Aquaculture*, 2004, 232(1-4): 525-537.
- [4] Liu W C, Ke H Y, Xie J, *et al.* Characterizing the water quality and microbial communities in different zones of a recirculating aquaculture system using biofloc biofilters[J]. *Aquaculture*, 2020, 529: 735624.
- [5] 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.
- [6] Kim S K, Pang Z G, Seo H C, *et al.* Effect of bioflocs on growth and immune activity of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* postlarvae[J]. *Aquaculture Research*, 2014, 45(2): 362-371.
- [7] Martins M A, Poli M A, Legarda E C, *et al.* Heterotrophic and mature biofloc systems in the integrated culture of Pacific white shrimp and Nile tilapia[J]. *Aquaculture*, 2020, 514: 734517.
- [8] Yun H S, Kim D H, Kim J G, *et al.* The microbial com-

- munities (bacteria, algae, zooplankton, and fungi) improved biofloc technology including the nitrogen-related material cycle in *Litopenaeus vannamei* farms[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 10: 883522.
- [9] Pacheco-Vega J M, Cadena-Roa M A, Leyva-Flores J A, *et al.* Effect of isolated bacteria and microalgae on the biofloc characteristics in the Pacific white shrimp culture[J]. *Aquaculture Reports*, 2018, 11: 24-30.
- [10] El-Sayed A F M. Use of biofloc technology in shrimp aquaculture: a comprehensive review, with emphasis on the last decade[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2021, 13(1): 676-705.
- [11] Aguilera-Rivera D, Rodríguez-Fuentes G, Escalante-Herrera K S, *et al.* Differential expression of immune-related genes in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, previously reared in biofloc and challenged with *Vibrio harveyi*[J]. *Aquaculture Research*, 2019, 50(8): 2039-2046.
- [12] Aguilera-Rivera D, Prieto-Davó A, Rodríguez-Fuentes G, *et al.* A vibriosis outbreak in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* reared in biofloc and clear seawater[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2019, 167: 107246.
- [13] Aguilera-Rivera D, Escalante-Herrera K, Gaxiola G, *et al.* Immune response of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, previously reared in biofloc and after an infection assay with *Vibrio harveyi*[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2019, 50(1): 119-136.
- [14] James G, Das B C, Jose S, *et al.* *Bacillus* as an aquaculture friendly microbe[J]. *Aquaculture International*, 2021, 29(1): 323-353.
- [15] Ahmad H I, Verma A K, Rani A M B, *et al.* Growth, non-specific immunity and disease resistance of *Labeo rohita* against *Aeromonas hydrophila* in biofloc systems using different carbon sources[J]. *Aquaculture*, 2016, 457: 61-67.
- [16] Hollender J, van der Krol D, Kornberger L, *et al.* Effect of different carbon sources on the enhanced biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2002, 18(4): 359-364.
- [17] 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[J]. *Aquaculture*, 2016, 465: 88-93.
- [18] Mansour A T, Ashry O A, El-Neweshy M S, *et al.* Effect of agricultural by-products as a carbon source in a biofloc-based system on growth performance, digestive enzyme activities, hepatopancreas histology, and gut bacterial load of *Litopenaeus vannamei* post larvae[J]. *Journal of Marine Science and Engineering*, 2022, 10(10): 1333.
- [19] da Rocha A F, Barbosa V M, Wasielesky Jr W, *et al.* Water quality and juvenile development of mullet *Mugil liza* in a biofloc system with an additional carbon source: dextrose, liquid molasses or rice bran?[J]. *Aquaculture Research*, 2022, 53(3): 870-883.
- [20] Soliman A M, Abdel-Tawwab M. Effects of different carbon sources on water quality, biofloc quality, and the productivity of Nile tilapia reared in biofloc-based ponds[J]. *Annals of Animal Science*, 2022, 22(4): 1281-1289.
- [21] Vilani F G, Schweitzer R, da Fonseca Arantes R, *et al.* Strategies for water preparation in a biofloc system: effects of carbon source and fertilization dose on water quality and shrimp performance[J]. *Aquacultural Engineering*, 2016, 74: 70-75.
- [22] Pan L, Farouk M H, Qin G X, *et al.* The influences of soybean agglutinin and functional oligosaccharides on the intestinal tract of monogastric animals[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(2): 554.
- [23] Zhao C, Wu Y J, Liu X Y, *et al.* Functional properties, structural studies and chemo-enzymatic synthesis of oligosaccharides[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2017, 66: 135-145.
- [24] Hu X, Yang H L, Yan Y Y, *et al.* Effects of fructooligosaccharide on growth, immunity and intestinal microbiota of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed diets with fish meal partially replaced by soybean meal[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2019, 25(1): 194-204.
- [25] Xu Q, Chao Y L, Wan Q B. Health benefit application of functional oligosaccharides[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 77(3): 435-441.
- [26] Fei B B, Ling L, Hua C, *et al.* Effects of soybean oligosaccharides on antioxidant enzyme activities and insulin resistance in pregnant women with gestational diabetes mellitus[J]. *Food Chemistry*, 2014, 158: 429-

- 432.
- [27] Ma Y, Wu X Z, Giovanni V, *et al.* Effects of soybean oligosaccharides on intestinal microbial communities and immune modulation in mice[J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2017, 24(1): 114-121.
- [28] Coon C N, Leske K L, Akavanichan O, *et al.* Effect of oligosaccharide-free soybean meal on true metabolizable energy and fiber digestion in adult roosters[J]. *Poultry Science*, 1990, 69(5): 787-793.
- [29] Ringø E, Olsen R E, Gifstad T Ø, *et al.* Prebiotics in aquaculture: a review[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2010, 16(2): 117-136.
- [30] 贺希, 罗国芝, 谭洪新. 枯草芽孢杆菌添加剂对生物絮团菌群结构和营养成分的影响 [J]. 上海海洋大学学报, 2022, 31(4): 873-882.
- He X, Luo G Z, Tan H X. Effect of adding *Bacillus subtilis* on the microbial community structure and nutrition of bioflocs[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2022, 31(4): 873-882 (in Chinese).
- [31] Wang M Y, Liu Y, Luo K, *et al.* Effects of *Bacillus pumilus* BP-171 and carbon sources on the growth performance of shrimp, water quality and bacterial community in *Penaeus vannamei* culture system[J]. *Water*, 2022, 14(24): 4037.
- [32] Avnimelech Y, Kochba M. Evaluation of nitrogen uptake and excretion by tilapia in biofloc tanks, using ^{15}N tracing[J]. *Aquaculture*, 2009, 287(1-2): 163-168.
- [33] Dauda A B. Biofloc technology: a review on the microbial interactions, operational parameters and implications to disease and health management of cultured aquatic animals[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2020, 12(2): 1193-1210.
- [34] Abakari G, Luo G Z, Kombat E O, *et al.* Supplemental carbon sources applied in biofloc technology aquaculture systems: types, effects and future research[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2021, 13(3): 1193-1222.
- [35] 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.
- [36] Avnimelech Y. Biofloc technology: a practical guide book[M]. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2009.
- [37] Nootong K, Pavasant P, Powtongsook S. Effects of organic carbon addition in controlling inorganic nitrogen concentrations in a biofloc system[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2011, 42(3): 339-346.
- [38] Kishawy A T Y, Sewid A H, Nada H S, *et al.* Mannan-oligosaccharides as a carbon source in biofloc boost dietary plant protein and water quality, growth, immunity and *Aeromonas hydrophila* resistance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Animals*, 2020, 10(10): 1724.
- [39] Qiu Z S, Zhao J H, Luo Q H, *et al.* Effects of soybean oligosaccharides instead of glucose on growth, digestion, antioxidant capacity and intestinal flora of crucian carp cultured in biofloc system[J]. *Aquaculture Reports*, 2023, 29: 101512.
- [40] Wei Y F, Wang A L, Liao S A. Effect of different carbon sources on microbial community structure and composition of ex-situ biofloc formation[J]. *Aquaculture*, 2020, 515: 734492.
- [41] Crab R, Chielens B, Wille M, *et al.* The effect of different carbon sources on the nutritional value of bioflocs, a feed for *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae[J]. *Aquaculture Research*, 2010, 41(4): 559-567.
- [42] Ekasari J, Azhar M H, Surawidjaja E H, *et al.* Immune response and disease resistance of shrimp fed biofloc grown on different carbon sources[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 41(2): 332-339.
- [43] Han Y, Ma H R, Liu Y L, *et al.* Effects of goat milk enriched with oligosaccharides on microbiota structures, and correlation between microbiota and short-chain fatty acids in the large intestine of the mouse[J]. *Journal of Dairy Science*, 2021, 104(3): 2773-2786.
- [44] Gibson G R, Roberfroid M B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics[J]. *The Journal of Nutrition*, 1995, 125(6): 1401-1412.
- [45] Wu H X, Li W J, Shan C J, *et al.* Oligosaccharides improve the flesh quality and nutrition value of Nile tilapia fed with high carbohydrate diet[J]. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 2021, 3: 100040.
- [46] Qiu M, Liao S A, Wang B, *et al.* Effect of carbon source and C/N ratio on microbial community and function in ex situ biofloc system with inoculation of nitrifiers and aerobic denitrifying bacteria[J]. *Aquaculture Research*, 2021, 52(9): 4498-4511.

- [47] 仇宗胜, 钱仁东, 罗巧华, 等. 不同低聚糖对生物絮团形成及其菌群结构的影响[J]. 水产学报, 2024, 48(10): 109413-109413.
- Qiu Z S, Qian R D, Luo Q H, *et al.* Effects of different oligosaccharides on the formation of bioflocs and the structure of bacterial community[J]. Journal of Fisheries of China, 2024, 48(10): 109413-109413 (in Chinese).
- [48] Oliphant K, Ali M, D'Souza M, *et al.* *Bacteroidota* and *Lachnospiraceae* integration into the gut microbiome at key time points in early life are linked to infant neurodevelopment[J]. Gut Microbes, 2021, 13(1): 1997560.
- [49] Austin B, Austin D A. Aeromonadaceae representative (*Aeromonas salmonicida*)[M]//Austin B, Austin D A. Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish. 6th ed. Cham: Springer, 2016: 215-321.
- [50] Kirby J T, Sader H S, Walsh T R, *et al.* Antimicrobial susceptibility and epidemiology of a worldwide collection of *Chryseobacterium* spp.: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001)[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(1): 445-448.
- [51] Krummenauer D, Poersch L, Romano L A, *et al.* The effect of probiotics in a *Litopenaeus vannamei* biofloc culture system infected with *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Journal of Applied Aquaculture, 2014, 26(4): 370-379.
- [52] AftabUddin S, Siddique M A M, Sein A, *et al.* First use of biofloc technology for *Penaeus monodon* culture in Bangladesh: effects of stocking density on growth performance of shrimp, water quality and bacterial growth[J]. Aquaculture Reports, 2020, 18: 100518.
- [53] Coyte K Z, Schluter J, Foster K R. The ecology of the microbiome: networks, competition, and stability[J]. Science, 2015, 350(6261): 663-666.
- [54] Guo H P, Dong P S, Gao F, *et al.* Sucrose addition directionally enhances bacterial community convergence and network stability of the shrimp culture system[J]. npj Biofilms and Microbiomes, 2022, 8(1): 22.
- [55] Gullian-Klanian M, Quintanilla-Mena M, Hau C P. Influence of the biofloc bacterial community on the digestive activity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Aquaculture, 2023, 562: 738774.
- [56] Sugita H, Shibuya K, Shimooka H, *et al.* Antibacterial abilities of intestinal bacteria in freshwater cultured fish[J]. Aquaculture, 1996, 145(1-4): 195-203.
- [57] Abakari G, Luo G Z, Kombat E O. Dynamics of nitrogenous compounds and their control in biofloc technology (BFT) systems: a review[J]. Aquaculture and Fisheries, 2021, 6(5): 441-447.
- [58] Ward B B, Bouskill N J. The utility of functional gene arrays for assessing community composition, relative abundance, and distribution of ammonia-oxidizing bacteria and archaea[J]. Methods in Enzymology, 2011, 496: 373-396.
- [59] Dong S, Li Y, Huang F, *et al.* Enhancing effect of *Platyomonas* addition on water quality, microbial community diversity and shrimp performance in biofloc-based tanks for *Penaeus vannamei* nursery[J]. Aquaculture, 2022, 554: 738057.
- [60] Bal A, Anand R, Berge O, *et al.* Isolation and identification of diazotrophic bacteria from internal tissues of *Pinus contorta* and *Thuja plicata*[J]. Canadian Journal of Forest Research, 2012, 42(4): 807-813.

Effect of replacing glucose with soybean oligosaccharides on microbial community structure in biofloc system

ZHOU Hangxian^{1,2,3}, TAO Mingwei^{1,2,3}, WEI Jie^{1,2,3}, ZHAO Jianhua^{1,2,3*}, XU Qiyu^{1,2,3*}

(1. School of Life Science, Huzhou University, Huzhou 313000, China;

2. National and Local Joint Engineering Laboratory of Aquatic Animal Breeding and Nutrition, Huzhou University, Huzhou 313000, China;

3. Zhejiang Provincial Key Laboratory for Conservation and Development of Aquatic Biological Resources, Huzhou University, Huzhou 313000, China)

Abstract: The study investigated the effects of soybean oligosaccharides (SBOS) on the microbial community structure within a biofloc system and identified the optimal concentration. The control group utilized glucose as carbon source, whereas experimental groups replaced it with 2.5%, 5.0%, 7.5%, and 10.0% SBOS, respectively. Ammonium chloride served as the nitrogen source with C/N ratio of 15, and *Bacillus subtilis* was introduced to establish the biofloc system. The results indicated that total nitrogen, ammonia nitrogen, nitrite nitrogen, and nitrate nitrogen concentrations in the water were reduced, with no significant differences observed among all groups ($P>0.05$). High-throughput 16S *rRNA* sequencing revealed that Proteobacteria was the dominant phylum at 14 days in both experimental and control groups. By 28 days, Proteobacteria and Bacteroidota proportions were similar. At the genus level, *Bacillus* abundance significantly increased in the SBOS-2.5 and SBOS-10.0 groups at 14 days ($P<0.05$), while *Aeromonadaceae* abundance significantly decreased ($P<0.05$). At day 28, *Flavobacterium* abundance significantly increased in the SBOS-2.5 and SBOS-10.0 groups compared to the control group ($P<0.05$). Additionally, *Chryseobacterium* abundance in all experimental groups was significantly lower than control group ($P<0.05$). Some bacteria may be crucial in the nitrification and denitrification of nitrogen in water, according to a correlation analysis between bacterial composition and environmental conditions. In conclusion, substituting glucose with 2.5% and 10.0% SBOS as the carbon source in bioflocs effectively enhanced the abundance of beneficial bacteria and reduced that of harmful bacteria, thus promoting the stability of bacterial communities in water. Considering experimental outcomes and application costs, a 2.5% SBOS replacement ratio for glucose is recommended. This study provides a foundation for the practical application of SBOS as a carbon source in the biofloc systems and offers insights for future research.

Key words: biofloc; soybean oligosaccharide; carbon source; flora structure

Corresponding authors: ZHAO Jianhua. E-mail: zhaojianhua@zjhu.edu.cn;

XU Qiyu. E-mail: 02655@zjhu.edu.cn

Funding projects: Zhejiang Province Agricultural Major Technology Cooperative Promotion Plan (2022XTTGSC01); Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LTGN23C190002)