



凡纳滨对虾生物絮团养殖系统中不同生境细菌群落特征

罗楠^{1,2}, 卢贵盟^{1,2}, 高繁^{1,2}, 陈琛³, 张德民^{1,2}, 郭海朋^{1,2*}

1 宁波大学 农产品质量安全危害因子与风险防控国家重点实验室, 浙江 宁波 315211

2 宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211

3 浙江省海洋水产研究所, 浙江 温州 325005

罗楠, 卢贵盟, 高繁, 陈琛, 张德民, 郭海朋. 凡纳滨对虾生物絮团养殖系统中不同生境细菌群落特征[J]. 微生物学报, 2024, 64(5): 1455-1468.

LUO Nan, LU Guimeng, GAO Fan, CHEN Chen, ZHANG Demin, GUO Haipeng. Characteristics of bacterial communities in different habitats of the biofloc-based culture system of *Penaeus vannamei*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(5): 1455-1468.

摘要:【目的】凡纳滨对虾生物絮团养殖系统(biofloc-based culture system, BFS)是一种基于培育和调控微生物群落的新生态养殖模式。然而,目前对于 BFS 在不同生境中的微生物群落特征及其构建过程还不清楚。【方法】采用 16S rRNA 基因测序技术探究 BFS 在 3 种不同生境(水体、絮团和对虾肠道)的细菌群落组成;通过溯源分析和中性模型等方法,探究不同生境细菌群落的特征及其构建过程。【结果】3 种生境的微生物群落多样性和组成具有显著性差异,絮团和对虾肠道的群落结构和组成最为相似,溯源结果显示对虾肠道有 98.76%的细菌类群来自絮团,仅有 0.83%的细菌类群来自水体;3 种生境共有的细菌主要为鲁杰氏菌(*Ruegeria*),在水体、絮团和对虾肠道中的丰度分别为 1.72%、7.34%和 6.00%,水体中特有的扩增子变异序列(amplicon sequence variants, ASV)数量为 89 个,主要属于海茎状菌(*Maricaulis*)和欧文威克斯菌(*Owenweeksia*),絮团中有 56 个,主要为莱茵海默氏菌(*Rheinheimera*),而对虾肠道中仅有 10 个,主要属于玫瑰杆菌(*Roseobacter*);中性模型结果表明,水体、絮团和对虾肠道细菌群落构建均符合中性模型,表明 3 种生境中细菌群落构建均受中性过程主导。【结论】在 BFS 系统中,不同生境的微生物群落具有显著差异,对虾肠道细菌主要来自生物絮团,而 3 种生境的细菌群落构建过程由中性过程主导。这些结果为调控生物絮团养殖系统中微生物群落提供了理论依据。

关键词: 凡纳滨对虾; 生物絮团养殖系统; 不同生境; 细菌群落; 构建过程

资助项目: 宁波市农业重大专项(2021Z105); 温州市重大科技创新攻关(ZN2021001)

This work was supported by the Ningbo Major Agricultural Project (2021Z105) and the Wenzhou Major Scientific and Technological Innovation Project (ZN2021001).

*Corresponding author. E-mail: guohaipeng@nbu.edu.cn

Received: 2023-11-02; Accepted: 2024-02-29; Published online: 2024-03-05

Characteristics of bacterial communities in different habitats of the biofloc-based culture system of *Penaeus vannamei*

LUO Nan^{1,2}, LU Guimeng^{1,2}, GAO Fan^{1,2}, CHEN Chen³, ZHANG Demin^{1,2}, GUO Haipeng^{1,2*}

1 State Key Laboratory for Managing Biotic and Chemical Threats to the Quality and Safety of Agro-products, Ningbo University, Ningbo 315211, Zhejiang, China

2 School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, Zhejiang, China

3 Zhejiang Marine Fisheries Research Institute, Wenzhou 325005, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] The biofloc-based culture system (BFS) of *Penaeus vannamei* is a new ecological shrimp production mode based on the concept of cultivating and regulating the microbial community in the aquaculture system. However, the characteristics and assembly processes of microbial communities in different habitats of the BFS remain unclear. [Methods] The 16S rRNA gene sequencing was employed to explore the bacterial community composition in three different habitats (water, bioflocs, and shrimp gut) of the BFS. SourceTracker and the neutral model were adopted to explore the characteristics and assembly processes of bacterial communities in different habitats. [Results] The bacterial community diversity and composition varied significantly in the three habitats, and the structures and composition of bacterial communities were similar between bioflocs and shrimp gut. SourceTracker results showed that 98.76% of bacterial taxa in the shrimp gut were sourced from bioflocs, and only 0.83% were derived from water. *Ruegeria* existed in all the three habitats, with the relative abundance of 1.72%, 7.34%, and 6.00% in water, bioflocs, and shrimp gut, respectively. The unique amplicon sequence variants (ASVs) showed the maximal number of 89 in water, mainly belonging to *Mariculis* and *Owenweeksia*. Bioflocs contained 56 ASVs, which were mainly *Rheinheimera*. Only 10 ASVs were present in the shrimp gut, mainly belonging to *Roseobacter*. The bacterial communities in water, bioflocs, and shrimp gut were all fit to the neutral model, which indicated that the bacterial communities in the three habitats were dominated by the neutral process. [Conclusion] The microbial communities in different habitats of the BFS were significantly different, and the intestinal bacteria of shrimp mainly came from bioflocs. The assembly processes in the three habitats were dominated by neutral processes. The results provide a theoretical basis for regulating the microbial community in the BFS.

Keywords: *Penaeus vannamei*; biofloc-based culture system; different habitats; bacterial community; assembly process

凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)是我国重要的水产养殖经济物种, 2021年中国凡纳滨对虾养殖产量达 197.74 万 t^[1]。然而随着对虾高密度、

集约化、工厂化的养殖^[2], 以高产为目的的高密度养殖模式弊端逐渐呈现。集约化、高密度养殖极易引起水质恶化, 导致病害频发, 严重制约了

我国对虾养殖业的可持续发展。生物絮团技术通过在水体中添加额外的碳源,促使水体中形成絮团悬浮物,已被广泛地用于降低集约化养殖系统中对虾病害的发生^[3-4]。该养殖系统有利于维持环境的可持续性和生态系统的稳定性,在很大程度上依赖于系统中的微生物群落,特别是高碳氮比刺激下的异养细菌^[5]。

生物絮团养殖系统(biofloc-based culture system, BFS)中异养细菌的积累,不仅有效地将氨或有机氮废物转化为细菌的蛋白质,形成的絮团悬浮物还可以被对虾摄食,进而降低饲料成本^[6-7]。水体环境的改善又对养殖系统微生物菌群的稳定性产生了积极的影响,从而为对虾提供了有利的生存环境。此外,水体和絮团中的微生物群落可以通过摄食进入对虾肠道,进而显著影响对虾肠道的微生物群落结构^[8]。之前研究表明,对虾肠道菌群与环境微生物密切相关,尤其是在 BFS 中^[9]。然而,更深层次地理解环境微生物如何影响肠道菌群,以及对虾肠道与环境微生物的相互作用仍很缺乏。

基于此,本研究通过向对虾养殖系统中添加葡萄糖进行生物絮团养殖,系统地分析了葡萄糖添加对水体、絮团和肠道细菌群落结构和组成的差异,以及不同生境中微生物群落的互作特征及

构建过程,以期为 BFS 中微生物群落的定向调控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验设计和样品采集

本实验在宁波市咸祥镇(121°48'34"E, 29°40'18"N)某水产养殖场进行。采用规范一致的对虾养殖体系(600 L),该体系为经简易改装的圆形养殖桶,均配备增氧、排污和补水装置。葡萄糖按商品饲料添加量的 64.5%添加葡萄糖(C 含量为 40.0%),以维持输入碳氮比约为 10^[10],设置 6 个重复。养殖第 10 天开始产生生物絮团(图 1),至第 24 天,生物絮团量趋于稳定,维持在 30 mL/L 左右。在养殖第 32 天时,分别采集 BFS 水环境(水体和絮团)和对虾肠道微生物样品。具体方法如下:每桶采集 1 000 mL 表层水,水样先用 100 μm 筛绢过滤,收集筛绢上的絮状物,即为絮团样品。收集 100 μm 筛绢过滤后的滤液,再用孔径为 0.22 μm 的碳酸纤维素酯滤膜(Millipore 公司)过滤,滤膜收集的为水体微生物样品。每桶采集 15 只对虾,用灭菌牙签挑取对虾肠道,每 5 只对虾肠道混为一个样品,装入灭菌 EP 管中,即为对虾肠道样品。所有采集样品置于-80 °C 冰箱中保存。

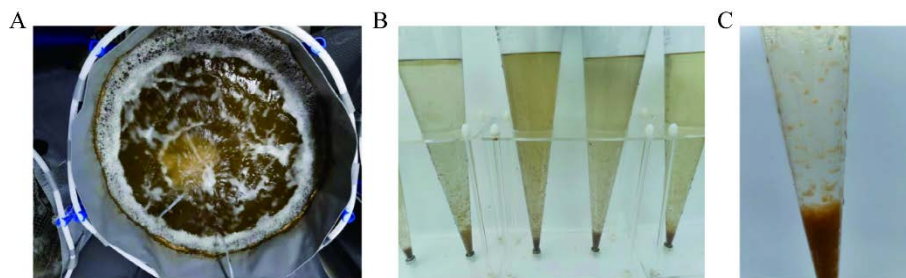


图 1 生物絮团养殖系统及生物絮团 A: 生物絮团养殖桶及养殖水体. B: 英霍夫锥形桶进行生物絮团沉降. C: 生物絮团颜色及形状

Figure 1 Biofloc culture system and bioflocs. A: Biological floc culture barrels and aquaculture water bodies. B: Inhofer conical barrels for biofloc sedimentation. C: The color and shape of the bioflocs.

1.2 DNA 提取、PCR 扩增及高通量测序

按照试剂盒说明书, 使用 PowerSoil DNA (MOBIO 公司) 提取水体和絮团样品的核酸 DNA, 使用 QIAamp DNA (QIAGEN 公司) 试剂盒提取对虾肠道样品核酸 DNA。用分光光度计 (NanoDrop 公司) 测定 DNA 浓度和纯度。选用带 barcode 的通用引物 338F (5'-ACTCCTACGGAG GCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGT WTCTAAT-3') 扩增细菌 16S rRNA 基因的 V4 区^[11]。PCR 扩增体系: 上、下游引物 (10 mmol/L) 各 0.5 μ L, 2 \times Mix 12.5 μ L, DNA 模板 2 μ L, ddH₂O 9.5 μ L, 每个样品设置 3 个重复。PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 27 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物使用试剂盒 (TaKaRa 公司) 进行纯化, 用 Agilent 2100 生物测定仪 (Agilent 公司) 检测片段大小, 然后用 Qubit 2.0 荧光光度计 (Life Technologies 公司) 定量。最后, 对 PCR 产物进行等摩尔量混合, 在 Illumina MiSeq 平台上进行测序。

1.3 测序数据处理

利用 QIIME 2 平台对测序数据进行处理, 使用 DADA2 方法鉴定和去除序列中的嵌合体。将相似性为 100% 的序列归为同一扩增子变异序列 (amplicon sequence variants, ASV)^[12]。与 SILVA138 数据库进行比对, 以获取物种分类信息, 去除古菌 (archaea)、叶绿体 (chloroplast)、线粒体 (mitochondria) 及不能分类到的细菌界的序列, 并生成各个分类水平的物种组成信息, 随后每个样品随机选取 35 860 条序列进行分析。

1.4 数据分析

使用 R 语言“Vegan”函数计算各样品中细菌群落的 α 多样性指数, 并使用 IBM SPSS Statistics 27 进行方差分析 (one-way analysis of

variance, one-way ANOVA) 检验水体、絮团及肠道微生物群落的差异; 利用“Vegan”函数对不同组别的细菌用基于 Bray-Curtis 非相似性的主坐标分析 (primary coordinate analysis, PCoA) 对水体、絮团及肠道微生物群落组成的整体变化进行可视化, 并通过聚类分析进一步展现各组间群落 Bray-Curtis 距离; 在细菌属水平 (至少在一个样品中平均相对丰度 > 1%) 水平分析优势细菌群落组成; 使用 Venn 图分析水体、絮团和对虾肠道菌群的差异和联系; 利用 SourceTracker 分析不同生境中总细菌群落的来源^[13]; 根据 Dufrene 和 Legendre^[14] 计算特异性和占有率, 特异性 (公式 1) 定义为生境 (H) 样本中物种的平均丰度 (S); 占有率 (公式 2) 定义为 S 在 H 的样本中出现的相对频率。

$$\text{Specificity} = \frac{N_{\text{individuals}_{S,H}}}{N_{\text{individuals}_S}} \quad (1)$$

$$\text{Occupancy} = \frac{N_{\text{sites}_{S,H}}}{N_{\text{sites}_H}} \quad (2)$$

公式 1 中, $N_{\text{individuals}_{S,H}}$ 为生境 H 所有样本中 ASV 个体的平均数量, 而 $N_{\text{individuals}_S}$ 是所有栖息地的平均个体数 S 的总和; 公式 2 中, $N_{\text{sites}_{S,H}}$ 为 H 中存在 S 的样本数, 而 N_{sites_H} 为 H 中样本总数。这两个指标随后被用作 SPEC-OCCU 图中的轴。为了评估不同养殖生境微生物群落组装的生态过程, 使用 Burns 等^[15] 的 R 包构建中性模型。

2 结果与分析

2.1 BFS 中不同生境细菌群落的多样性

三种生境的细菌群落 α 多样性指数 (Richness、Shannon 指数、Chao1 指数、PD_whole_tree 指数) 显著不同。水体细菌群落的 Richness 和 Chao1 指数显著高于絮团和对虾肠道, 对虾肠道细菌群落最低, 絮团细菌群落的 Shannon 指数显著高于水体和对虾肠道 ($P < 0.05$)

(图 2)。PCoA 结果表明不同生境细菌群落结构明显分离, 水体细菌群落显著偏离絮团和对虾肠道, 而絮团和对虾肠道细菌群落联系较为紧密(图 3A)。相较于絮团和对虾肠道, 水体的细菌

类群波动性更大, 稳定性较差, 组内变异更大(图 3B)。水体微生物群落与絮团、对虾肠道微生物距离较远且具有显著性差异, 絮团和对虾肠道的距离更为接近(图 3C)。

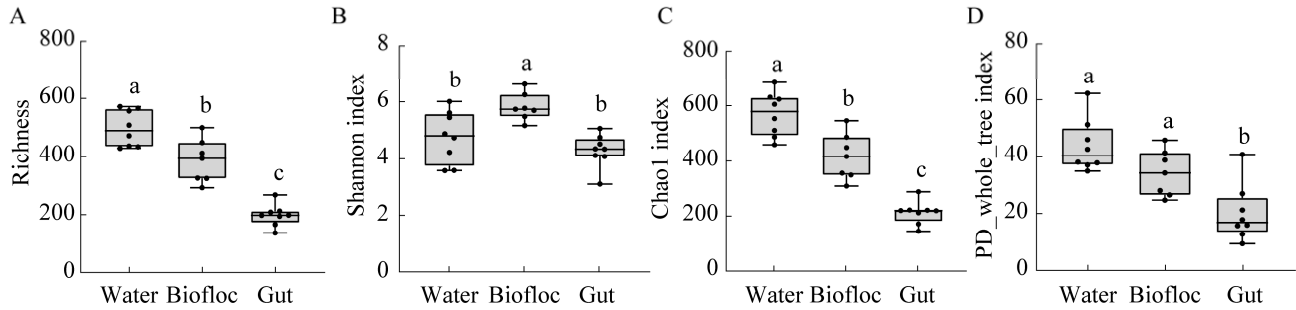


图 2 不同生境细菌群落 α 多样性指数 A: Richness. B: Shannon 指数. C: Chao1 指数. D: PD_whole_tree 指数. 不同字母表示各组之间在 $P < 0.05$ 水平上有显著性差异

Figure 2 Bacterial communities alpha diversity indices in different habitats. A: Richness. B: Shannon index. C: Chao1 index. D: PD_whole_tree index. Different letters indicate a significant difference between groups at the $P < 0.05$ level.

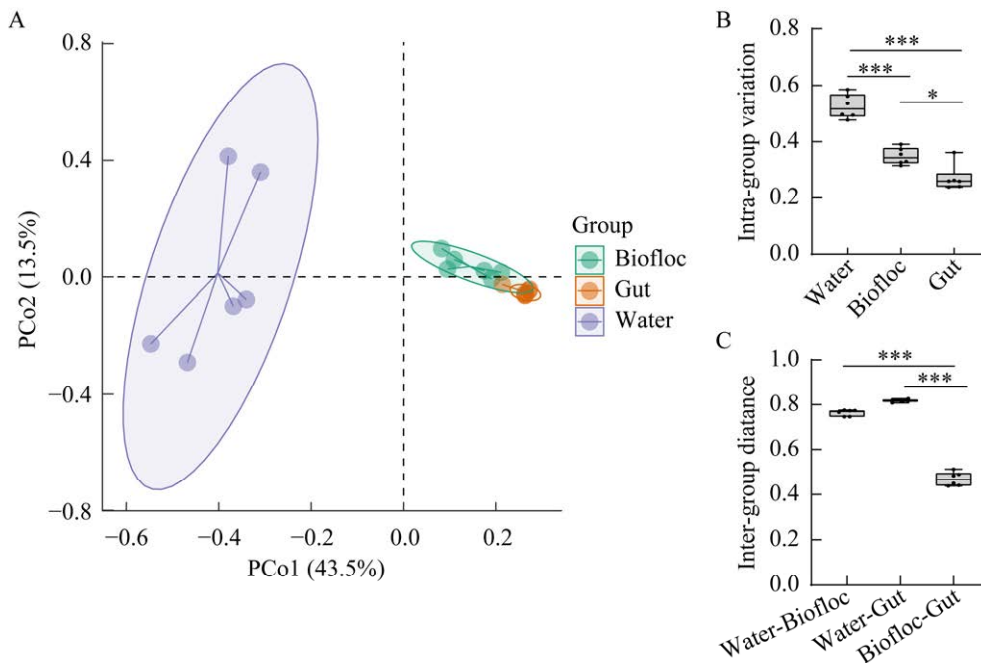


图 3 不同生境细菌群落的 β 多样性分析 A: 不同生境间的 PCoA 聚类分析. B: 不同生境样本组内距离. C: 不同生境之间两两比较的距离. *表示在不同水平上有显著性差异(*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$)

Figure 3 Analysis of the β diversity of bacterial communities in different habitats. A: PCoA cluster analysis between different habitats. B: Distances within sample groups in different habitats. C: Distances between different habitats. * indicates significant differences at different levels (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$).

2.2 BFS 不同生境的细菌群落组成

BFS 不同生境的细菌优势类群在属水平上显著不同(图 4)。水体中最丰富的类群为海生杆菌 (*Marivita*, 35.14%)、潮滩杆状菌 (*Aestuariibacter*, 11.39%)、海胞菌(*Marinicella*, 4.20%)和鲁杰氏菌(*Ruegeria*, 3.11%); 絮团中最丰富的类群为弧菌(*Vibrio*, 22.14%)、*Ruegeria* (12.75%), 假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas*, 6.68%)、运动单胞菌(*Motilimonas*, 6.06%)、*Marinicella* (5.31%)和黏着杆菌(*Tenacibaculum*, 4.59%); 在对虾肠道生境中最丰富的类群为 *Vibrio* (32.46%)、*Pseudoalteromonas* (16.35%)、*Ruegeria* (15.33%)和 *Roseobacter_clade_CHAB-I-5_lineage* (6.24%)。以上结果表明, 絮团和对虾肠道的细菌组成更相似, 主要优势类群为弧菌、假交替单胞菌和鲁杰氏菌, 而它们与水体微生物群落组成差异较大。

在 ASV 水平上, 水体、絮团和对虾肠道 3 种

生境共享的 ASV 数为 223 个, 特有的 ASV 数分别为 792、418 和 159 个(图 5A)。共享 223 个 ASV 的相对丰度在水体、絮团和对虾肠道中分别为 74.38%、94.93%和 99.77%, 其中水体中的优势类群主要为 *Marivita* (23.50%)、*Marinicella* (1.92%)、*Ruegeria* (1.72%) 和小海员杆菌 (*Nautella*, 1.43%); 絮团中主要为 *Vibrio* (12.52%)、*Ruegeria* (7.34%)、*Pseudoalteromonas* (4.10%)、*Motilimonas* (3.59%) 和 *Marinicella* (3.42%); 对虾肠道中主要为 *Vibrio* (12.74%)、*Pseudoalteromonas* (6.76%)、*Ruegeria* (6.00%)、*Motilimonas* (2.90%) 和 *Roseobacter_clade_CHAB-I-5_lineage* (2.47%) (图 5B)。SourceTracker 分析结果表明对虾肠道中的 98.76%的细菌类群来自于生物絮团, 仅有 0.83%的细菌群落来自于水体。此外, 75.07%絮团细菌类群来自于对虾肠道, 7.56%的来自于水体(图 5C)。

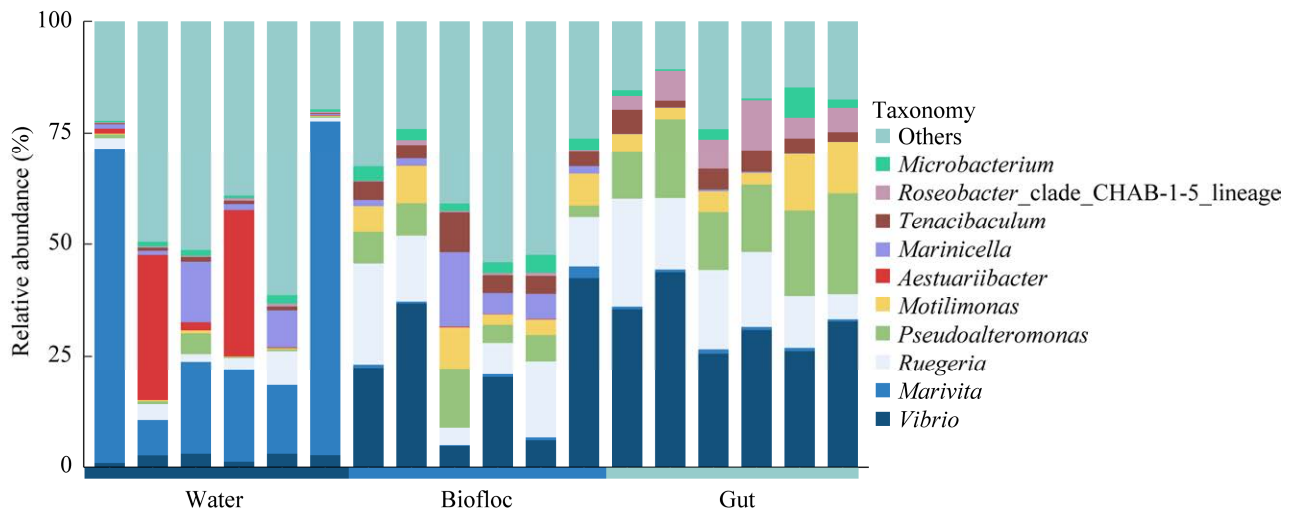


图 4 不同生境中优势细菌属(至少在一个样品中平均相对丰度>1%)的平均相对丰度

Figure 4 Mean relative abundance of dominant bacterial genera (average relative abundance>1% in at least one sample) in different habitats.

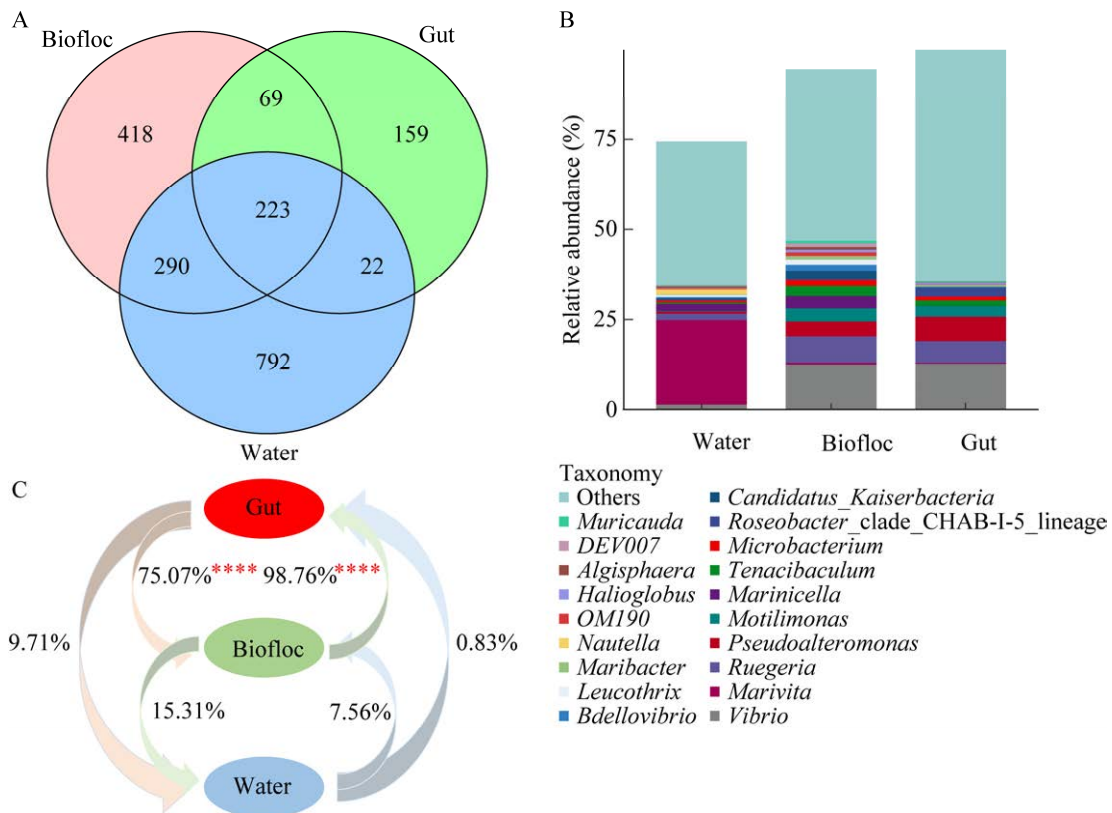


图 5 水体、生物絮团和对虾肠道细菌群落核心微生物及其来源分析 A: 不同生境 ASV 水平的细菌群落的 Venn 分析. B: 水体、生物絮团、对虾肠道所共有的属水平细菌类群的相对丰度. C: 基于 SourceTracker 分析不同生境中细菌来源的贡献百分比

Figure 5 Analysis of core microorganisms and their sources in the intestinal bacterial communities of water, biofloc and gut. A: Venn analysis of bacterial communities at ASV levels in different habitats. B: Relative abundance of genus-level bacterial taxa common to water, biofloc, and gut. C: Analysis of the percentage of contribution of bacterial sources in different habitats based on SourceTracker.

2.3 BFS 不同生境的标志性类群

细菌类群特异性和占有率结果表明, 不同生境间的 ASV 都具有均匀的占有率, 即在所有样点的 ASV 数量都相似。为了找到归属于每种生境的特殊物种, 选择了特异性和占用率大于或等于 0.7 的 ASV (图 6A 中的点框)。这些特异性 ASV 的数量在水体、絮团和对虾肠道 3 个生境间差异显著, 分别为 89、56 和 10 个(图 6B)。在属水平对这些特异性 ASV 组成进行分析发现, 在水体中

海茎状菌(*Maricaulis*, 6.16%)、欧文威克斯菌(*Owenweeksia*, 3.83%)、斯塔普氏菌(*Stappiaceae*, 2.21%) 的相对丰度较高; 在生物絮团中 *Rheinheimera* (1.96%) 的相对丰度较高; 对虾肠道中 *Roseobacter_clade_CHAB-I-5_lineage* (2.47%)、*Vibrio* (1.23%)、*Pseudoalteromonas* (1.20%) 的相对丰度较高(图 6C)。该结果表明, 在不同生境之间其特异性 ASV 数量不同, 特异性微生物类群组成也不同, 凸显了不同生境之间的独特性。

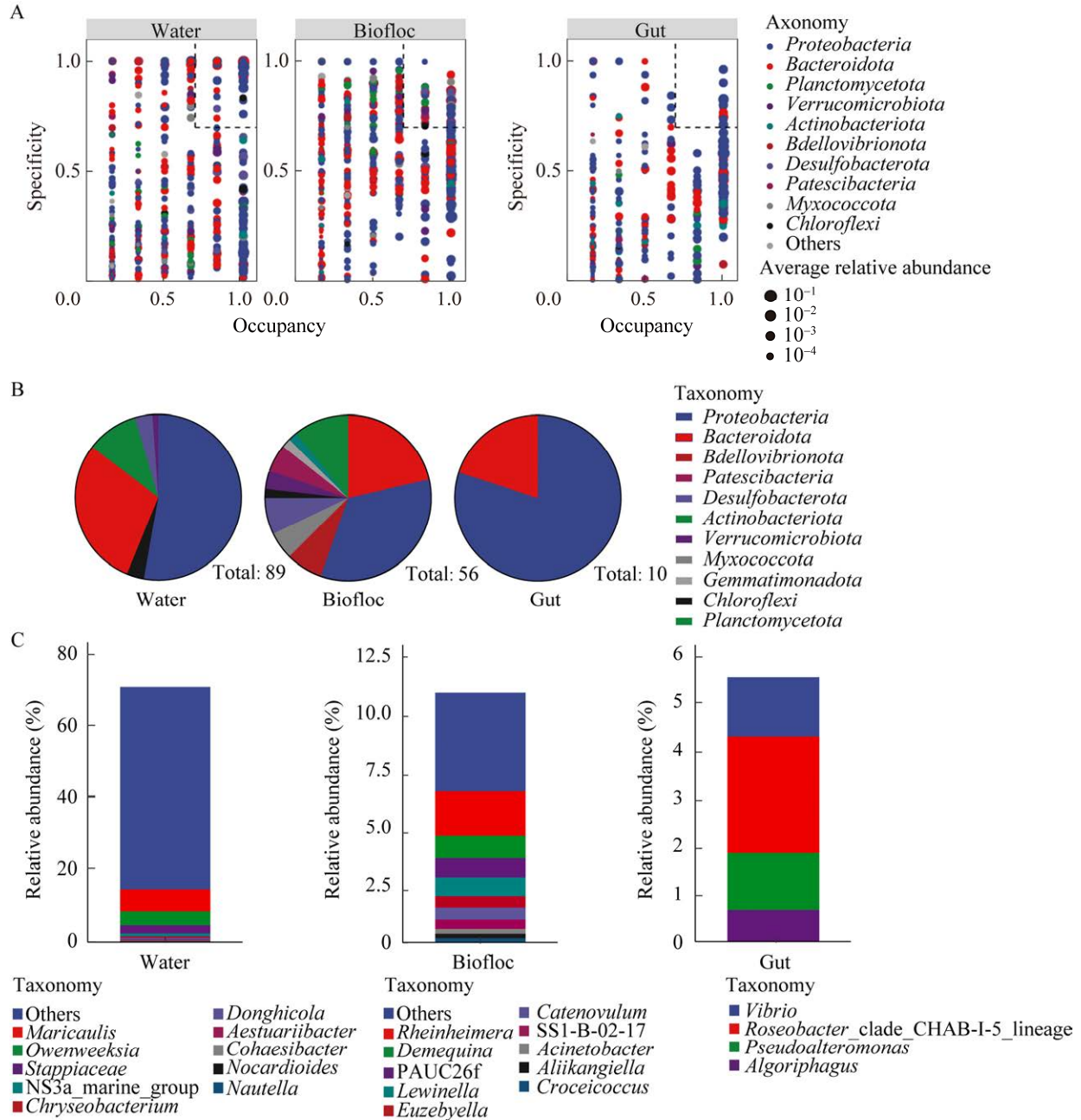


图 6 水体、生物絮团和对虾肠道细菌群落物种的特异性-占有率(SPEC-OCCU 图) A: 3 种生境 ASV 的 SPEC-OCCU 图, x 轴代表占用率, 即 ASV 在所有样本中的分布情况; y 轴代表特异性, 即这些 ASV 是否存在于其他样本中. B: 饼状图显示 3 种生境特异性 ASV 数量. C: 3 种生境的特异种属水平的类群组成

Figure 6 Specificity-occupancy of species in the intestinal bacterial communities of water, biofloc, and gut (SPEC-OCCU figure). A: SPEC-OCCU plots of ASVs in three habitats, with the x -axis representing the occupancy rate, the distribution of ASV in all samples; The y -axis represents specificity, whether these ASVs are present in other samples. B: Pie plots showing the number of ASVs specific to the three habitats. C: Taxonomic composition at the level of specific species of the three habitats.

2.4 BFS 不同生境细菌群落的构建过程

三种生境的细菌群落构建过程均符合中性模型($R^2>0$), 表明 BFS 不同生境的细菌群落的构建主要由中性过程主导(图 7)。中性群落模型成功地估计了 ASV 的出现频率与其相对丰度变化之间的大部分关系, 在水体、絮团中均有很高的解释率, 分别为 0.630 和 0.694, 而肠道解释率最低, 为 0.340。此外, 细菌类群在水体的 Nm 值($Nm=2\ 599$)高于絮团($Nm=1\ 343$)和对虾肠道($Nm=327$), 表明细菌的物种扩散在水体中高于絮团和对虾肠道。在高于中

性预测部分中絮团和对虾肠道的组成更为相似, 水体中占相对丰度较高的为 *Tenacibaculum* 和 *Marinicella*, 絮团和对虾肠道中主要为 *Vibrio* 和 *Ruegeria*; 低于中性预测部分中各生境之间的组成差异较大, 水体中主要为 *Marivita* 和 *Aestuariibacter*, 絮团为 *Vibrio* 和 *Marinicella*, 对虾肠道大部分都为 *Vibrio*; 在符合中性预测的部分中, 絮团和对虾肠道更为相似, 水体主要为 *Marivita* 和 *Aestuariibacter*, 絮团和对虾肠道丰度较高的为 *Vibrio*、*Ruegeria* 和 *Pseudoalteromonas* (图 8)。

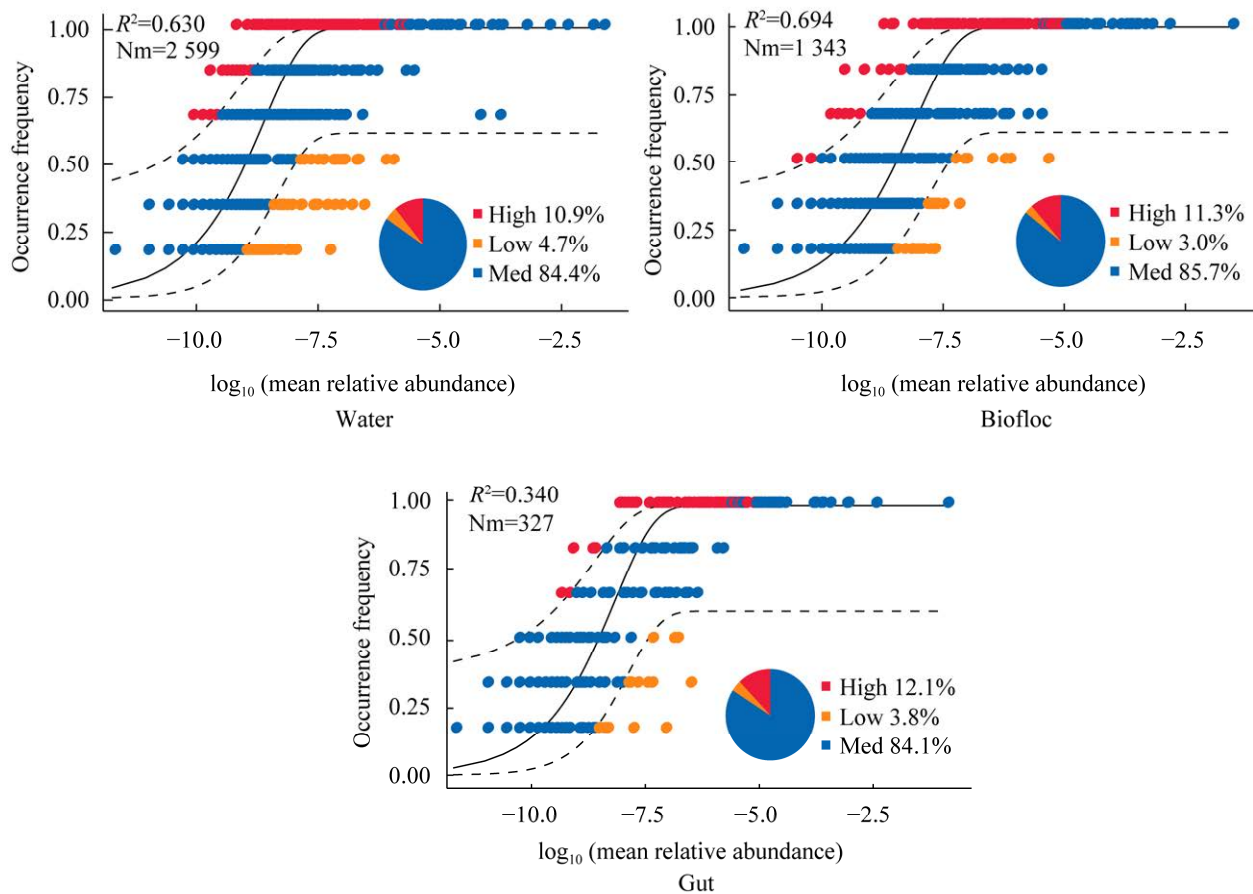


图 7 水体、生物絮团和对虾肠道细菌群落构建过程的中性模型 Nm 表示元群落与迁移率的乘积

Figure 7 Neutral model of the construction process of intestinal bacterial communities in water, biofloc, and gut. Nm represents the product of metacommunity and migration rate.

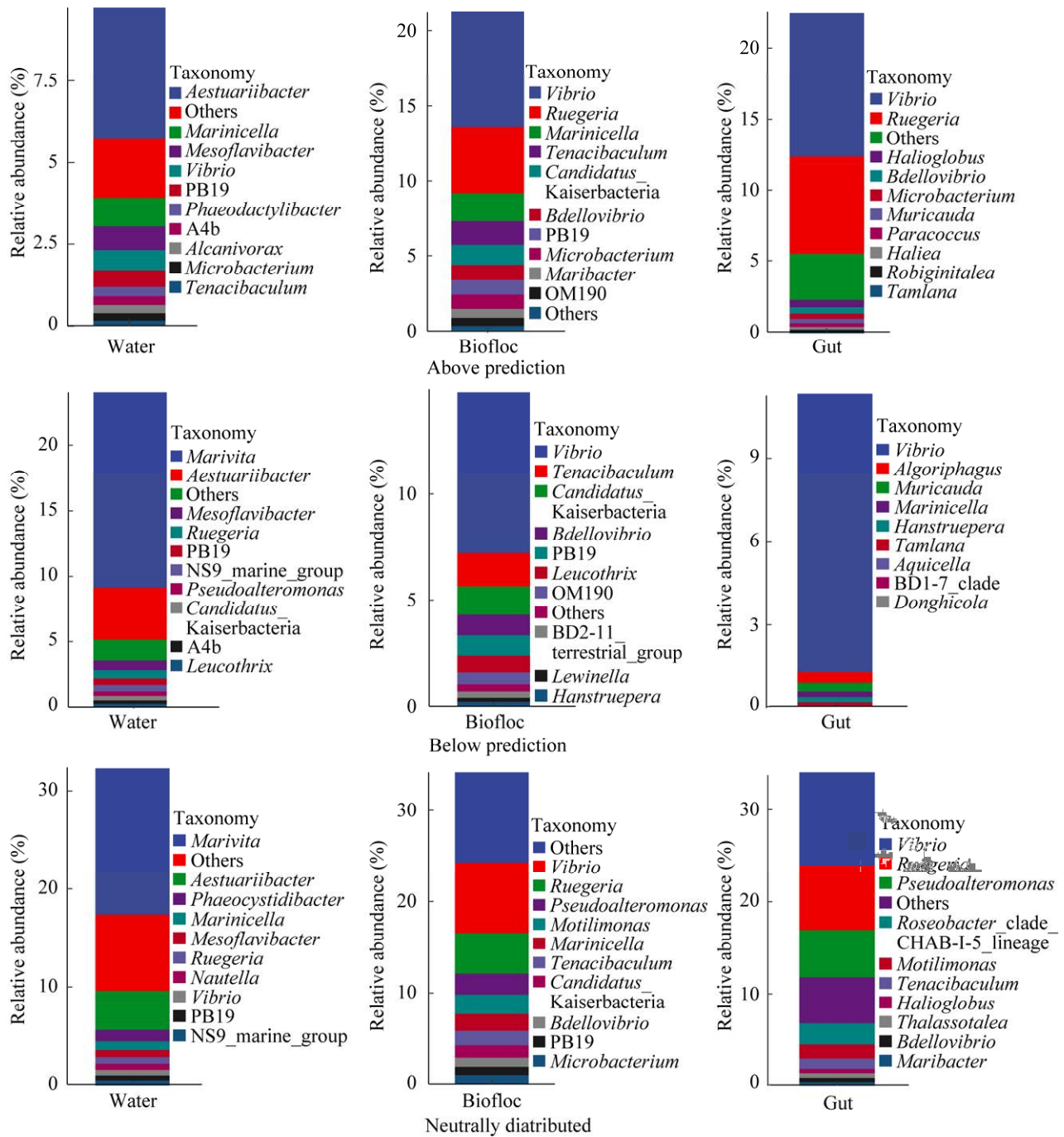


图 8 水体、生物絮团和对虾肠道中性模型不同部分属水平的相对丰度

Figure 8 Relative abundance of water, biofloc, and gut level of different parts of the gut-neutral model.

3 讨论

3.1 BFS 不同生境细菌群落结构不同

凡纳滨对虾的健康生长与养殖环境的微生物群落变化密切相关^[16]，细菌群落在养殖中起着关键作用，在许多生态系统中微生物作为关键的驱动因素，在养分循环、有机物分解、水生动物的共生和致病中发挥着重要作用^[17-18]，尤其是

物群落变化密切相关^[16]，细菌群落在养殖中起着关键作用，在许多生态系统中微生物作为关键的驱动因素，在养分循环、有机物分解、水生动物的共生和致病中发挥着重要作用^[17-18]，尤其是

在 BFS 中, 通过添加碳源调节碳氮比(C/N)可以有效地改善养殖环境, 减少养殖水体中有机物的积累, 降低有毒氮素对养殖动物产生的胁迫^[6]。本研究发现, BFS 三种生境的 α 多样性显著不同, 养殖水体微生物群落结构发生明显改变, 絮团与对虾肠道的微生物群落结构更为相似。现有的研究表明, 在养殖系统中添加葡萄糖、淀粉和木薯渣等碳源, 可以显著改变对虾养殖系统的细菌群落结构和组成^[19]。在水体中添加碳源会显著富集某些特异性细菌类群, 从而使养殖水体的细菌群落产生较大差异^[20]。葡萄糖添加使絮团与对虾肠道的多样性更加相似, 这可能与养殖过程中对虾会摄食絮团有关。这与之前的研究结果相似, 絮团可以被对虾摄食, 因此改变对虾肠道微生物群落, 这种现象在自然养殖系统也同样存在, 肠道的细菌群落更接近于沉积物而不是养殖水体^[21-22]。在属水平群落组成中发现, 养殖水体与絮团和对虾肠道明显不同, 在水体中海滨海命菌、潮滩杆状菌和鲁杰氏菌属为优势类群, 而絮团和对虾肠道中的优势类群为弧菌、鲁杰氏菌和假交替单胞菌。絮团和对虾肠道的优势类群更为相似, 这与前面不同生境多样性的结果一致。溯源分析也进一步证明了对虾肠道细菌主要来自于生物絮团, 极少部分来自于养殖水体。絮团作为对虾的天然饵料, 其排泄物和生物絮团中的各种微生物可能会增加肠道细菌群落与絮团的相互作用, 使肠道细菌群落与絮团的关系更为密切。此外, 先前的研究也发现, 商业饲料与生物膜的结合可以塑造虾的肠道微生物类群^[23]。对虾养殖系统中的絮团包括许多产生物膜的细菌, 这些细菌可能在形成肠道微生物群中起重要作用^[24]。

3.2 BFS 不同生境 ASV 水平的特异性及其构建过程

在对虾养殖系统中, 由于养殖水体、絮团和

对虾处于同一环境中, 因此各生境之间的微生物类群具有较大的交换机会。然而, 各生境也具有其不同的环境特征, 因此推测不同生境会聚集其生境特异性的类群, 以此来适应不同生境的营养物质或环境^[25-26]。Grossart^[27]研究也发现, 许多水生细菌可以经常在水体和固着物之间交替生活, 这是由于水环境中有机物的高度复杂性和时空变异性, 促进了细菌对环境的适应进化。在本研究中, 部分 ASV 高度特定于一种生境类型, 在养殖水体中特异性 ASV 最多有 89 个, 其次是生物絮 56 个, 对虾肠道中最少仅有 10 种特异性 ASV。不同生境的特异性 ASV 在属水平上所占比度也具有较大差异, 在养殖水体中特异性 ASV 所占比度为 70.01%, 絮团为 10.78%, 对虾肠道为 5.55%, 养殖水体的特异性 ASV 显著高于絮团和对虾肠道, 这可能与养殖水体环境波动大且复杂, 可以积极地选择特异性的类群有关, 而絮团和对虾肠道其环境相对稳定, 因此对特异性的类群选择力较小^[28-29]。

微生物多样性是养殖系统中生物多样性的的重要组成部分, 揭示养殖系统不同生境微生物群落的构建过程是解析生物多样性产生和维持的关键^[30]。本研究发现, BFS 不同生境细菌群落中类群的发生频率总体上符合中性模型, 表明各生境的细菌群落构建主要由中性过程主导。在斑马鱼的实验中发现, 中性过程的相对重要性随斑马鱼的发育降低, 中性过程足以在斑马鱼发育期间产生肠道微生物群落的实质性变化^[31-33]。而在成虾养殖体系中发现, 中性过程随对虾发育变得更为重要^[34]。在本研究中, 不同生境的大多数 ASV 的分布都遵循相同的基本趋势, 即丰富的分类群普遍存在。但在不同生境中仍然有许多偏离中性预测分布的类群, 在水体中有 33.83% 的细菌类群偏离中性过程, 絮团中有 33.80%, 对虾肠道中有 36.17%。这些类群并非随机分布在

整个群落中,这可能意味着这些细菌群落的功能是截然不同的,可能包括与群落中其他成员以及宿主强烈相互作用的类群。高于中性模型预测且比预期更频繁出现的类群,可能是适合于宿主环境并由宿主积极选择的类群,这些 ASV 具有更大的竞争优势,相对于其他细菌类群具有更强的扩散能力^[35],偏离中性模型的类群可能具有更强的宿主内增殖和生境间扩散的能力,这些 ASV 可能是潜在的益生菌。由 Sloan 等^[36]提出的中性群落模型在量化随机过程重要性方面发挥了重要作用,但是由于中性模型假设本地群落(单个样本)中所有物种均来自整个群落(所有样本)的扩散与定殖,这可能导致其在量化养殖系统微生物群落构建有局限性。尽管每一个养殖系统都是相互独立,连通性不好,但每一个养殖系统都采用统一的管理,投入品和进水基本一致,不同养殖系统中微生物群落相似,可以理解为整体群落一致。此外,中性模型在预测群落构建过程时主要关注物种丰度,忽略了不同类群之间的进化关系,在预测微生物群落构建过程中有一定的局限性,可能需要更多的预测模型解析养殖系统中微生物群落的构建过程。

4 结论

BFS 三种生境的细菌群落多样性存在显著差异,养殖水体细菌群落显著偏离絮团和对虾肠道,絮团和对虾肠道的相似性更高。在属水平上,不同生境的细菌群落组成也存在显著差异,絮团和对虾肠道的优势类群更为相似,3 种生境的共享微生物类群也具有相同的现象。溯源分析表明,对虾肠道的微生物类群主要来自于生物絮团。不同生境的特异性 ASV 数量差异显著,养殖水体最高,对虾肠道最低,丰富度整体上呈现丰富度下降趋势。此外,中性模型也表明不同生境的群落构建主要受中性过程主导,部分偏离中

性预测分布的 ASV (如 *Marinicella*、*Rguegeria*、*Vibrio* 和 *Tenacibaculum* 等)可能是宿主积极选择的类群。该研究为 BFS 细菌群落的定向调控提供了科学依据。

参考文献

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局,全国水产技术推广总站,中国水产学会编制.中国渔业统计年鉴 2022[M].北京:中国农业出版社,2022:22-24. Fisheries and Fishery Administration of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Aquatic Technology Promotion Station, Compiled by the Chinese Fisheries Society. China Fishery Statistical Yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2022: 22-24 (in Chinese).
- [2] SUN SM, KORHEINA DKA, FU HT, GE XP. Chronic exposure to dietary antibiotics affects intestinal health and antibiotic resistance gene abundance in oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*), and provokes human health risk[J]. *The Science of the Total Environment*, 2020, 720: 137478.
- [3] AVNIMELECH Y. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems[J]. *Aquaculture*, 1999, 176(3/4): 227-235.
- [4] LEE C, KIM S, LIM SJ, LEE KJ. Supplemental effects of biofloc powder on growth performance, innate immunity, and disease resistance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 2017, 20: 15.
- [5] SOAUDY MR, GHONIMY A, GRECO LSL, CHEN Z, DYZENCHAUZ A, LI J. Total suspended solids and their impact in a biofloc system: current and potentially new management strategies[J]. *Aquaculture*, 2023, 572: 739524.
- [6] HUANG HH, LIAO HM, LEI YJ, YANG PH. Effects of different carbon sources on growth performance of *Litopenaeus vannamei* and water quality in the biofloc system in low salinity[J]. *Aquaculture*, 2022, 546: 737239.
- [7] KHANJANI MH, SHARIFINIA M. Biofloc technology with addition molasses as carbon sources applied to *Litopenaeus vannamei* juvenile production under the effects of different C/N ratios[J]. *Aquaculture International*, 2022, 30(1): 383-397.
- [8] CHE HASHIM NF, MANAN H, OKOMODA VT, IKHWANUDDIN M, KHOR W, ABDULLAH SRS,

- KASAN NA. Inoculation of bioflocculant-producing bacteria for enhanced biofloc formation and pond preparation: effect on water quality and bacterial community[J]. *Aquaculture Research*, 2022, 53(4): 1602-1607.
- [9] FU XZ, HE JK, WANG J, SHEN FG, QIU JY, CHEN C, ZHANG DM, GUO HP. Specific gut bacterial taxa inhabited in healthy shrimp (*Penaeus vannamei*) confer protection against *Vibrio parahaemolyticus* challenge[J]. *Aquaculture*, 2024, 579: 740192.
- [10] HUANG HH, LI CY, LIANG T, LEI YJ, YANG PH, WU MX. Effects of carbon-to-nitrogen ratio (C:N) on water quality and growth performance of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in the biofloc system with a salinity of 5‰[J]. *Aquaculture Research*, 2022, 53(15): 5287-5299.
- [11] ZHU YY, WANG SP, HUANG L, YAN MC, DONG PS, CHEN C, GUO HP, ZHANG DM. Effects of sucrose addition on water quality and bacterioplankton community in the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) culture system[J]. *Aquaculture Research*, 2021, 52(9): 4184-4197.
- [12] AMIR A. Microbiome analysis using 16S amplicon sequencing: from samples to ASVs[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2021, 2243: 123-141.
- [13] MCGHEE JJ, RAWSON N, BAILEY BA, FERNANDEZ-GUERRA A, SISK-HACKWORTH L, KELLEY ST. Meta-SourceTracker: application of Bayesian source tracking to shotgun metagenomics[J]. *PeerJ*, 2020, 8: e8783.
- [14] DUFRENE M, LEGENDRE P. Species assemblages and indicator species: the need for a flexible asymmetrical approach[J]. *Ecological Monographs*, 1997, 67(3): 345.
- [15] BURNS MB, MONTASSIER E, ABRAHANTE J, PRIYA S, NICCUM DE, KHORUTS A, STARR TK, KNIGHTS D, BLEKHMANN R. Colorectal cancer mutational profiles correlate with defined microbial communities in the tumor microenvironment[J]. *PLoS Genetics*, 2018, 14(6): e1007376.
- [16] 高远, 李蕊, 董登攀, 郑延璇, 宋协法, 刘心田. 凡纳滨对虾养殖系统中异养和自养型生物絮团的微生物特性及其与养殖水环境的关系[J]. *中国水产科学*, 2022, 29(6): 864-873.
- GAO Y, LI M, DONG DP, ZHENG YX, SONG XF, LIU XT. Microbial characteristics of heterotrophic and autotrophic biofloc in *Litopenaeus vannamei* culturing systems and their relationship with water quality[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2022, 29(6): 864-873 (in Chinese).
- [17] YUN HS, KIM DH, KIM JG, KIM YS, YOON HS. The microbial communities (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.
- [18] XIONG JB, WANG K, WU JF, QIUQIAN LL, YANG KJ, QIAN YX, ZHANG DM. Changes in intestinal bacterial communities are closely associated with shrimp disease severity[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(16): 6911-6919.
- [19] GUO HP, DONG PS, GAO F, HUANG L, WANG SP, WANG RY, YAN MC, ZHANG DM. Sucrose addition directionally enhances bacterial community convergence and network stability of the shrimp culture system[J]. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 2022, 8: 22.
- [20] CARDONA E, GUEGUEN Y, MAGRÉ K, LORGEUX B, PIQUEMAL D, PIERRAT F, NOGUIER F, SAULNIER D. Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system[J]. *BMC Microbiology*, 2016, 16(1): 157.
- [21] 宋红桥, 管崇武, 张宇雷. 生物絮团养殖模式养殖密度对南美白对虾生长和水质的影响[J]. *中国农学通报*, 2023, 39(23): 116-120.
- SONG HQ, GUAN CW, ZHANG YL. Effects of culture density on growth of *Penaeus vannamei* and water quality in biofloc model[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2023, 39(23): 116-120 (in Chinese).
- [22] HOU D, HUANG Z, ZENG S, LIU J, WENG S, HE J. Comparative analysis of the bacterial community compositions of the shrimp intestine, surrounding water and sediment[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2018, 125(3): 792-799.
- [23] NOBLE TH, TRUONG HH, ROMBENSO A, SIMON CJ, WADE NM, WYNNE JW. Effect of sample type and the use of high or low fishmeal diets on bacterial communities in the gastrointestinal tract of *Penaeus monodon*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(3): 1301-1313.
- [24] ORTIZ-ESTRADA ÁM, MARTÍNEZ-PORCHAS M, MARTÍNEZ-CÓRDOVA LR, VARGAS-ALBORES F, BURGOS-HERNANDÉZ A, SCHEUREN-ACEVEDO SM, GOLLAS-GALVÁN T. Bacterial communities and predicted nitrogen metabolism of heterotrophic- and

- probiotic-based biofilms used for super-intensive indoor shrimp culture[J]. *Aquaculture Research*, 2021, 52(1): 334-344.
- [25] RUIZ-GONZÁLEZ C, NIÑO-GARCÍA JP, del GIORGIO PA. Terrestrial origin of bacterial communities in complex boreal freshwater networks[J]. *Ecology Letters*, 2015, 18(11): 1198-1206.
- [26] GWEON HS, BOWES MJ, MOORHOUSE HL, OLIVER AE, BAILEY MJ, ACREMAN MC, READ DS. Contrasting community assembly processes structure lotic bacteria metacommunities along the river continuum[J]. *Environmental Microbiology*, 2021, 23(1): 484-498.
- [27] GROSSART HP. Ecological consequences of bacterioplankton lifestyles: changes in concepts are needed[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2010, 2(6): 706-714.
- [28] WANG YT, WANG K, HUANG L, DONG PS, WANG SP, CHEN HP, LU Z, HOU DD, ZHANG DM. Fine-scale succession patterns and assembly mechanisms of bacterial community of *Litopenaeus vannamei* larvae across the developmental cycle[J]. *Microbiome*, 2020, 8(1): 106.
- [29] HOU DW, ZHOU RJ, ZENG SZ, WEI DD, DENG XS, XING CG, WENG SP, HE JG, HUANG ZJ. Stochastic processes shape the bacterial community assembly in shrimp cultural pond sediments[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(12): 5013-5022.
- [30] ZHOU JZ, NING DL. Stochastic community assembly: does it matter in microbial ecology?[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 2017, 81(4): e00002-e00017.
- [31] STEPHENS WZ, BURNS AR, STAGAMAN K, WONG S, RAWLS JF, GUILLEMIN K, BOHANNAN BJM. The composition of the zebrafish intestinal microbial community varies across development[J]. *The ISME Journal*, 2016, 10(3): 644-654.
- [32] BURNS AR, STEPHENS WZ, STAGAMAN K, WONG S, RAWLS JF, GUILLEMIN K, BOHANNAN BJM. Contribution of neutral processes to the assembly of gut microbial communities in the zebrafish over host development[J]. *The ISME Journal*, 2016, 10(3): 655-664.
- [33] WONG S, STEPHENS WZ, BURNS AR, STAGAMAN K, DAVID LA, BOHANNAN BJM, GUILLEMIN K, RAWLS JF. Ontogenetic differences in dietary fat influence microbiota assembly in the zebrafish gut[J]. *mBio*, 2015, 6(5): e00687-15.
- [34] XIONG JB. Progress in the gut microbiota in exploring shrimp disease pathogenesis and incidence[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(17): 7343-7350.
- [35] LOUDON AH, VENKATARAMAN A, van TREUREN W, WOODHAMS DC, PARFREY LW, McKENZIE VJ, KNIGHT R, SCHMIDT TM, HARRIS RN. Vertebrate hosts as islands: dynamics of selection, immigration, loss, persistence, and potential function of bacteria on salamander skin[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 333.
- [36] SLOAN WT, LUNN M, WOODCOCK S, HEAD IM, NEE S, CURTIS TP. Quantifying the roles of immigration and chance in shaping prokaryote community structure[J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(4): 732-740.