



糖蜜添加对凡纳滨对虾养殖水体菌群结构的影响

何润端, 宁为民, 温崇庆, 闵冠杰, 朱 锋, 王成桂*, 薛 明*
(广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524088)

摘要: 为探索糖蜜对凡纳滨对虾生长及其水体菌群的影响, 实验利用 16S *rDNA* 扩增子高通量测序技术, 比较了添加糖蜜调节水体碳氮比的处理组 (C/N=16.0) 与无添加的对照组 (C/N=8.5) 这 2 种模式下第 4、13 和 34 天时水体菌群结构差异, 并通过 PICRUST2 软件对菌群功能进行预测。结果显示, 尽管糖蜜添加对凡纳滨对虾体长和体质量无显著影响, 但可显著提高对虾存活率; 第 4 天时水体菌群 Shannon 多样性与均匀度指数均显著上升, 第 13 与 34 天时均显著下降。添加糖蜜后, 处理组 α -变形菌纲和放线菌门相对丰度均极显著高于对照组, 蓝细菌门和 γ -变形菌纲丰度则显著低于对照组, β -变形菌纲丰度在第 4 和 34 天时也显著低于对照组, 拟杆菌门丰度在第 4 和 13 天时分别显著高于和低于对照组。科水平上, 处理组第 4、13 和 34 天时微杆菌科相对丰度均显著高于对照组; 第 4 天时红杆菌科和黄杆菌科丰度均极显著高于对照组, 而德沃斯氏菌科、产碱菌科和列文氏菌科丰度均极显著低于对照组; 第 13 天时海仙菌科和环杆菌科丰度均极显著低于对照组; 脱醯菌科丰度在第 34 天时显著高于对照组。添加糖蜜后, 处理组芽殖杆菌属和脱醯菌属等优势属的丰度显著高于对照组, 而海仙菌属等丰度则显著下降。菌群功能预测结果显示, 第 34 天时, 丰度排序前 20 的代谢功能项在处理组的富集程度均明显优于对照组, 尤其糖酵解/糖异生等 8 项属于碳水化合物代谢或能量代谢的功能均高度富集。研究表明, 糖蜜适量添加可显著影响凡纳滨对虾养殖水体优势菌群相对丰度, 优化水体菌群结构, 并增强其碳水化合物和能量代谢通路功能, 从而提高对虾存活率。本研究为糖蜜作为有机碳源应用于对虾生物絮团养殖提供了理论依据。

关键词: 凡纳滨对虾; 糖蜜; 生物絮团; 水体菌群; 功能预测

中图分类号: S 963.73

文献标志码: A

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 又称南美白对虾, 是目前全球最重要的养殖虾种之一, 其养殖产量分别占世界和我国甲壳类养殖总产量的 53% 和 66%^[1-2]。传统对虾养殖模式需大量换水以避免含氮废物积累带来的负面影响, 但大量换水导致养殖废水直接排放, 不仅造成沿海水域污染, 也会进一步加剧对虾病害发生, 严重影响其产

量^[3]。因此亟需探索更加环保健康的养殖模式。甘蔗糖蜜主要成分为蔗糖, 是制糖业主要副产品之一, 在我国年产 800 万 t 以上, 作为优质廉价的有机碳源, 广泛应用于尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[4]、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)^[5]、凡纳滨对虾^[6] 和罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergi*)^[7] 等的生物絮团技术 (BFT) 养殖中。

收稿日期: 2021-03-26 修回日期: 2021-07-02

资助项目: 国家重点研发计划“蓝色粮仓”科技创新重点专项 (2020YFD0900205); 广东海洋大学 2019 年度创新强校专项 (230419095)

第一作者: 何润端 (照片), 从事海洋和水产微生物学研究, E-mail: 15875989249@163.com

通信作者: 王成桂, 从事对虾选育与养殖技术研究, E-mail: longshore@163.com;

薛明, 从事海洋和水产微生物学研究, E-mail: xuemtc@163.com



BFT 最早由以色列学者 Avnimelech 提出, 是一种比传统养殖更加高效、安全、清洁的养殖模式, 因其具有净化水质、为水产动物提供饵料并增强其消化、免疫能力等优点而得到快速发展, 目前已成功应用于大规模虾场与小型温棚养虾模式中, 在以色列和美国等的对虾养殖中取得较大成功^[8]。该技术基于异养细菌能够吸收养殖水体中的无机氮合成自身蛋白的原理, 通过外源添加有机碳促进异养细菌生长以消耗水体中过多的无机氮, 从而减缓氨氮与亚硝酸盐氮等的积累, 达到少换水甚至不换水也能维持对虾健康生长的目的^[9]。此外, 添加有机碳可有效促进异养细菌生长, 并抑制有害菌群增殖^[10-11], 从而减少药物特别是抗生素在对虾养殖中的使用。Abreu 等^[12]证实了对虾可摄食生物絮团中的异养细菌。Xu 等^[13]发现生物絮团技术养殖的对虾消化能力和免疫力显著高于对照组。

目前, 研究者已从有机碳源种类^[14-16]、碳氮比^[17]和养殖密度^[18]等角度研究了 BFT 在凡纳滨对虾养殖中的作用, 主要聚焦于对水质和生物絮团菌群等的影响, 而糖蜜对养殖期间水体菌群结构的影响尚无系统报道。本实验利用高通量测序技术, 研究糖蜜调控碳氮比对凡纳滨对虾养殖水体菌群结构演替的影响, 以期从水体菌群的角度为生物絮团技术在对虾养殖中的应用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 凡纳滨对虾、饲料与糖蜜

凡纳滨对虾虾苗来源于广东湛江中联养殖有限公司, 体长为 (0.80 ± 0.05) cm, 体质量为 (0.010 ± 0.001) g。饲料为广东东腾饲料有限公司生产的对虾配合饲料, 粗蛋白含量 38%。甘蔗糖蜜为广隆糖蜜生物科技有限公司生产。

1.2 实验设计和管理

本实验在广西东兴市万尾岛 ($21^{\circ}31' N$, $108^{\circ}10' E$) 6 个大小为 $4 m \times 2 m \times 1.2 m$ 的聚乙烯帆布围隔池中进行, 水深 0.6 m, 备有充气管, 由罗茨鼓风机供气。设计 1 个对照组和 1 个处理组, 每组 3 个重复池; 处理组通过添加糖蜜调控碳氮比 (C/N), 使 $C/N=16.0$, 对照组不添加糖蜜, 投喂等量相同配合饲料, $C/N=8.5$, 调控参考 Avnimelech^[19]的方法。

实验池中投放虾苗密度为 310 尾/ m^2 , 养殖过

程不换水, 仅补充自然蒸发损失的水分。暂养 6 d 后进行第 1 次采样, 从各池多点采集水样混合于无菌聚乙烯瓶。采样后处理组每天早上 8:00 添加糖蜜, 在添加糖蜜的第 4、13 和 34 天分别采集水样。4 个采样时间点的对照组编号分别为 C0、C4、C13 和 C34, 处理组分别编号为 M0、M4、M13 和 M34。最后一次采样时测定对虾体长、体质量并统计存活率。取各时间点每一池水样 1 L, 经 $0.22 \mu m$ 滤膜过滤, 滤膜 $-20^{\circ} C$ 冻存备用。

1.3 主要环境因子检测

每次采样时各池盐度和 pH 分别使用便携式盐度计和 pH 计测定, 溶解氧和水温使用哈希 HQ30d 便携式溶解氧仪测定。氨氮含量参考《海洋监测规范》第 4 部分: 海水分析 (GB 17378.4—2007)^[20]方法测定。

1.4 水样 DNA 提取和 PCR 扩增

滤膜上的水样总 DNA 采用 OMEGA 公司 Water DNA Kit (D5525-01) 试剂盒进行提取, 使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop2000 检测 DNA 的提取效果。以带有标签序列的细菌 16S *rDNA* V3~4 区引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCA-GCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCT-AAT-3'), 通过 ABI GeneAmp[®] 9700 PCR 仪扩增水样 DNA, 每个样本 3 个重复。扩增程序: $95^{\circ} C$ 3 min; $95^{\circ} C$ 30 s, $55^{\circ} C$ 30 s, $72^{\circ} C$ 30 s, 27 个循环; $72^{\circ} C$ 10 min。PCR 反应体系: $5 \times$ Fast Pfu Buffer 4 μL , 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL , 正反向引物 (5 $\mu mol/L$) 各 0.8 μL , TransStart FastPfu DNA Polymerase 0.4 μL , 模板 DNA 10 ng, 补足 ddH₂O 至 20 μL 。

1.5 Illumina MiSeq 测序

将同一样本的 PCR 产物混合后使用 2% 琼脂糖凝胶回收 PCR 产物, 利用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axygen Biosciences, AP-GX-250) 进行回收产物纯化, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物委托上海美吉生物医药科技有限公司通过利用 Illumina MiSeq 测序平台采用 MiSeq Reagent Kit v3 (600-cycle) PE300 进行高通量测序。测序原始数据上传至国家生物信息中心 GSA 数据库 (<https://bigd.big.ac.cn/gsa/>), 登录号为 CRA002930。

1.6 数据分析

使用 FASTP (<https://github.com/OpenGene/fastp>, version 0.20.0) 软件对原始测序序列进行质控, 并

用 FLASH (<http://www.cbcb.umd.edu/software/flash>, version 1.2.7) 软件进行拼接, 采用 UPARSE 软件 (<http://drive5.com/uparse/>, version 7.1) 根据 97% 的相似度对序列进行分类操作单元 (OTU) 聚类并剔除嵌合体。利用 RDP classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/>, version 2.2) 对 OTU 序列进行物种分类注释, 并通过 EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net>) 16S-based ID 程序修正部分 OTU 的分类单元。通过 R 语言包对 OTU 表再抽样 (resampling), 使各样品序列数目一致, 计算 OTU 覆盖度 (coverage)、Shannon 多样性指数、Shannon 均匀度指数以及丰富度 Sobs 指数和 Chao1 指数。

用 Excel 软件统计水体菌群在门、科、属、种和 OTU 上的分类单元数, 对在任意样品中相对丰度 $\geq 5\%$ 的优势门、科和属进行比较分析。利用美吉云平台 (<https://cloud.majorbio.com/index.html>) 对 OTU 进行主坐标分析 (principal co-ordinates analysis, PCoA), 比较水体菌群不同阶段的差异和变化趋势; 对序列丰度前 50 的 OTUs 组成分布情况进行热图分析; 采用软件 PICRUST2 (<https://github.com/picrust/picrust2/>) 预测和比较菌群代谢功能的差异。成对样本差异采用 SPSS 22.0 软件独立样本 t 检验, 检验标准为 $P < 0.05$ 显著差异或 $P < 0.01$ 极显著差异。

2 结果

2.1 主要环境因子

采样时水体主要环境因子如表 1 所示。实验期间, 盐度、pH 和水温总体呈上升趋势, 溶解氧总体呈下降趋势。氨氮在 0 d 时低于检测限, 在 4 d 后可检测到并维持相对稳定。同一时期对照组

与糖蜜组间各指标均无显著差异, 说明本研究添加糖蜜量对水质影响不大。

2.2 添加糖蜜对凡纳滨对虾生长及存活的影响

添加糖蜜处理 34 d 时对虾体长和体质量的检测结果显示, 对照组体长为 (7.7 ± 0.7) cm, 体质量为 (2.5 ± 0.5) g, 处理组体长为 (7.7 ± 0.7) cm, 体质量为 (2.6 ± 0.7) g。2 组间的体长和体质量均无统计学差异 ($P > 0.05$), 表明添加糖蜜对对虾的体长和体质量无显著影响, 但处理组对虾存活率 $(54.7\% \pm 0.8\%)$ 显著高于对照组存活率 $(49.4\% \pm 1.5\%)$ ($P < 0.05$)。

2.3 糖蜜对水体菌群多样性影响

对 Illumina MiSeq 测序原始数据处理后, 处理组和对照组 4 个时期水样共获得 946 795 条高质量序列。通过 UPARSE 软件生成去除 singleton 的 OTU 表, 各样品序列数再均一化为 23 973 条, 在 97% 相似性水平上共获得 1 374 个 OTUs。本实验所有样品的测序覆盖度均达到 99% 以上, 说明测序深度已有效覆盖样品菌群。糖蜜对水体菌群多样性影响结果显示, 在添加糖蜜前 (0 d), 处理组和对照组水体菌群多样性差异不明显。添加糖蜜后, 丰富度 Chao1 指数 (图 1-a) 和 Sobs 指数 (图 1-b) 变化趋势相似, 处理组和对照组在时间上都呈先降低后升高再维持相对稳定的变化趋势。13 d 时, 处理组 Chao1 指数和 Sobs 指数均极显著低于对照组 ($P < 0.01$)。34 d 时, 处理组 Chao1 指数显著低于对照组 ($P < 0.05$)。Shannon 多样性 (图 1-c) 和均匀度指数 (图 1-d) 变化趋势相似, 对照组先降低后升高再维持相对稳定, 而处理组则先升高后下降。处理组 Shannon 多样性和均匀度指数在 4 d 时极显著高于对照组 ($P < 0.01$), 在 13 与 34 d

表 1 凡纳滨对虾养殖水体中主要环境因子

Tab. 1 Main environmental factors in *L. vannamei* rearing water

组别 groups	盐度 salinity	pH	氨氮/(mg/L) NH ₃ -N	溶解氧/(mg/L) DO	水温/°C temperature
C0	9.17±1.44	7.53±0.03	—	8.28±0.05	28.1±0.1
M0	10.00±0.00	7.43±0.07	—	8.16±0.08	28.1±0.0
C4	8.50±1.80	7.25±0.05	0.43±0.12	5.58±0.70	31.2±0.1
M4	9.67±0.58	7.23±0.03	0.40±0.00	5.50±0.25	31.3±0.1
C13	10.83±0.83	8.42±0.26	0.30±0.10	8.72±0.45	31.3±0.1
M13	10.93±1.21	7.89±0.48	0.43±0.12	7.51±0.97	31.3±0.0
C34	13.00±1.00	7.66±0.16	0.43±0.35	3.62±0.92	32.2±0.1
M34	12.17±0.76	7.92±0.50	0.33±0.40	4.11±0.54	32.1±0.1

注: “—”表示低于检测限

Notes: “—” means below detection limit

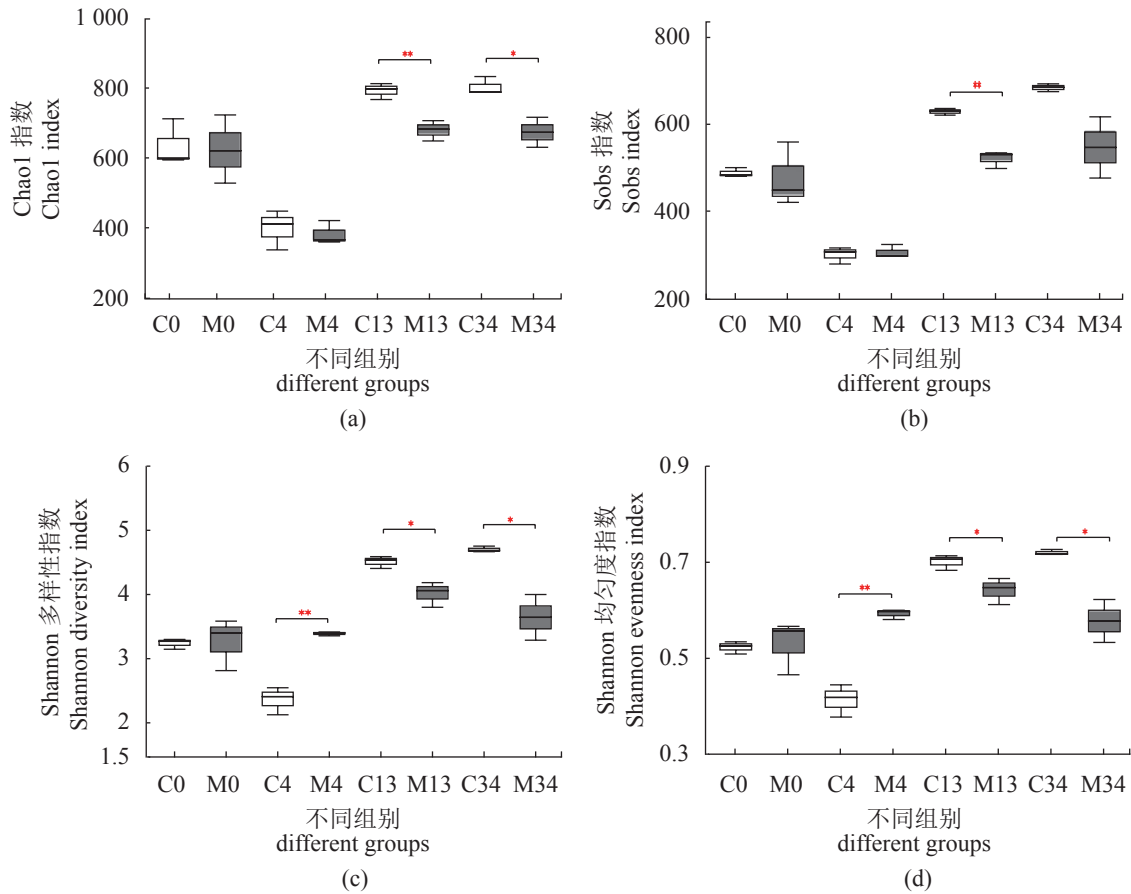


图 1 凡纳滨对虾养殖水体细菌群落多样性指数

C0、C4、C13、C34 和 M0、M4、M13、M34 分别代表对照组和糖蜜处理组第 0、4、13 和 34 天的样品; *和**分别表示同一阶段处理组与对照组间呈显著差异 ($P<0.05$) 和极显著差异 ($P<0.01$), 下同

Fig. 1 Diversity indices of bacterial communities in *L.vannamei* rearing water

C0, C4, C13, C34 and M0, M4, M13, M34 represent the samples of control and molasses treatment groups at 0, 4, 13 and 34 days; * and ** respectively mean significant difference ($P<0.05$) and extremely significant difference ($P<0.01$) between the treatment and control groups at the same stage, the same below

时显著低于对照组 ($P<0.05$)。

2.4 糖蜜对水体菌群结构的影响

OTU 水平上的水体细菌群落 PCoA 结果显示, PC1 为 30.9%, PC2 为 23.7%, 可较大程度解析数据的差异变化。0、4 与 13 和 34 d 数据点分散成 3 个区域, 其中 0 和 4 d 在 PC2 上距离较远, 二者与 13、34 d 在 PC1 上距离也较远, 13 和 34 d 虽距离较近, 但明显分开, 表明菌群结构呈阶段性变化(图 2)。在添加糖蜜前, 处理组和对照组数据点交错在一起, 说明起初 2 组水体菌群结构极其相似。糖蜜处理 4 和 13 d 时, 2 组数据点均明显分开, 只是 13 d 时分开的距离略小, 表明 4 和 13 d 时处理组和对照组的菌群结构差异明显。添加糖蜜第 34 天, 处理组和对照组数据点又有所交错, 说明后期 2 组水体菌群结构有所趋同。以上结果

说明养殖时间决定水体菌群总体变化趋势, 同时糖蜜在一定阶段明显影响了菌群结构。

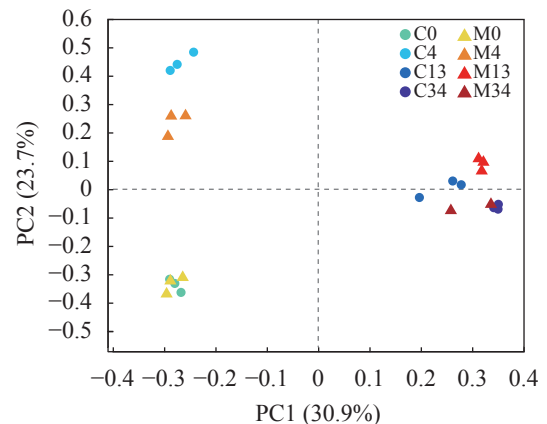


图 2 凡纳滨对虾养殖水体细菌群落主坐标分析

Fig. 2 Principal coordinate analysis of bacterial communities in *L. vannamei* rearing water

2.5 糖蜜对水体优势菌群的影响

序列分析显示, 本研究水体菌群 OTU 序列在分类上均属于细菌域, 主要包含在 31 门 50 纲 111 目 210 科和 302 属, 另有部分 OTU 属于不同分类单元中分类未定的 (unclassified) 序列。在门水平上, 共有 6 个相对丰度 $\geq 5\%$ 的优势细菌门/纲 (变形菌门以纲表示), 其中变形菌门 (Proteobacteria) 在各时期丰度均占绝对优势, 并以 α -、 β -和 γ -变形菌纲为主 (图 3)。添加糖蜜前, 处理组与对

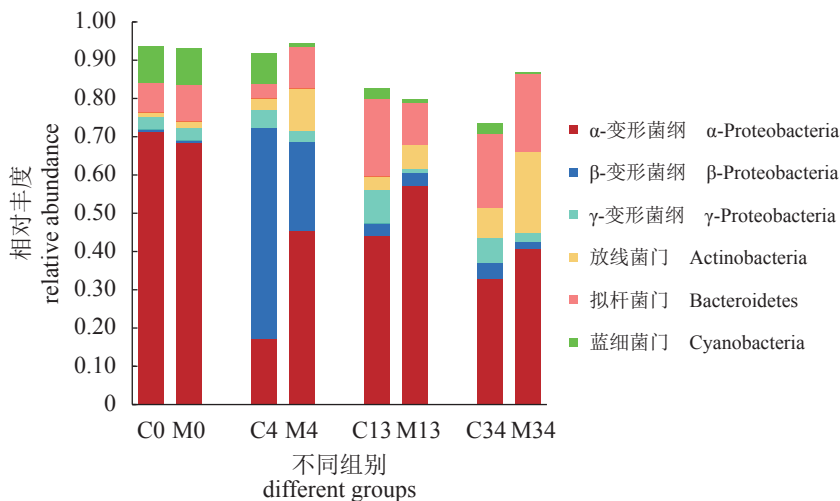


图 3 糖蜜对凡纳滨对虾养殖水体优势细菌门相对丰度的影响

Fig. 3 Effect of molasses on relative abundances of dominant bacterial phyla in *L. vannamei* rearing water

照组间各优势门/纲丰度均无显著差异 ($P>0.05$)。添加糖蜜后, 处理组 α -变形菌纲和放线菌门 (Actinobacteria) 丰度均极显著高于对照组 ($P<0.01$), 蓝细菌门 (Cyanobacteria) 和 γ -变形菌纲丰度则显著低于对照组, β -变形菌纲丰度在第 4 和 34 天时也显著低于对照组, 拟杆菌门 (Bacteroidetes) 在第 4 和 13 天时, 丰度分别显著高于和低于对照组 ($P<0.05$)。可见, 添加糖蜜后凡纳滨对虾养殖水体菌群优势门/纲丰度发生了显著变化。

科水平上, 水体菌群共有 10 个优势细菌科, 分布结果显示, 0 d 时, 处理组和对照组各优势科丰度均无显著差异。处理组添加糖蜜后, 变形菌门下的红杆菌科 (Rhodobacteraceae) 第 4 天时相对丰度为 39.2%, 极显著高于对照组 (6.5%), 而德沃斯氏菌科 (Devosiaceae) 和产碱菌科 (Alcaligenaceae) 第 4 天以及海仙菌科 (Halieaceae) 第 13 天时丰度均极显著低于对照组 ($P<0.01$)。处理组拟杆菌门下的黄杆菌科 (Flavobacteriaceae) 在第 4 天时丰度为 8.3%, 极显著高于对照组 (0.6%), 列文氏菌科 (Lewinellaceae) 和环杆菌科 (Cyclobacteriaceae) 分别第 4、13 天时丰度均极显著低于对照组 ($P<0.01$)。第 4、13 和 34 天时, 放线菌门下的微杆菌科 (Microbacteriaceae) 丰度在处理组分别为 7.5%、3.6% 和 6.3%, 均显著高于对照组, 脱醌菌科 (Demequinaceae) 第 34 天时丰度也显著高于对照组 ($P<0.05$) (图 4)。添加糖蜜后, 凡纳滨对虾养殖水体菌群优势科丰度发生了显著变化, 且第 4 天时较多优势科丰度与对照组出现显著差异。

属水平上, 水体菌群共包含 20 个优势细菌

属, 分布情况如表 2 所示。处理组和对照组各优势属初始相对丰度均无显著差异 ($P>0.05$), 添加糖蜜后, 处理组芽殖杆菌属 (*Gemmobacter*)、脱醌菌属 (*Demequina*) 在不同养殖时间的丰度均显著 ($P<0.05$) 或极显著 ($P<0.01$) 高于对照组。第 4 天时, 处理组栖东海菌属 (*Donghicola*)、鲁杰氏菌属 (*Ruegeria*)、黄杆菌属 (*Flavobacterium*)、红月形菌属 (*Rhodoluna*) 和红杆菌科下 2 个分类未定属 (OTU1 和 OTU1092) 的丰度均显著高于对照组, 而克斯特氏菌属 (*Kerstesia*) 和德沃斯氏菌属 (*Devosia*) 丰度显著低于对照组 ($P<0.05$)。第 13 天时, 处理组芽殖杆菌属、脱醌菌属和微杆菌属 (*Microbacterium*) 丰度显著高于对照组, 而鲁杰氏菌属、噬冷菌属 (*Algoriphagus*) 和海仙菌属 (*Haliea*) 等丰度显著低于对照组 ($P<0.05$)。第 34 天时, 鲁杰氏菌属、脱醌菌属、微杆菌属、假鲁杰氏菌属 (*Pseudoruegeria*) 和黄杆菌科下一个分类未定属 (OTU416) 丰度均显著高于对照组, 原绿球藻属 (*Prochlorococcus*) 和污水单胞菌属 (*Defluviimonas*) 等丰度则显著低于对照组 ($P<0.05$)。可见, 添加糖蜜可显著影响凡纳滨对虾养殖水体优势细

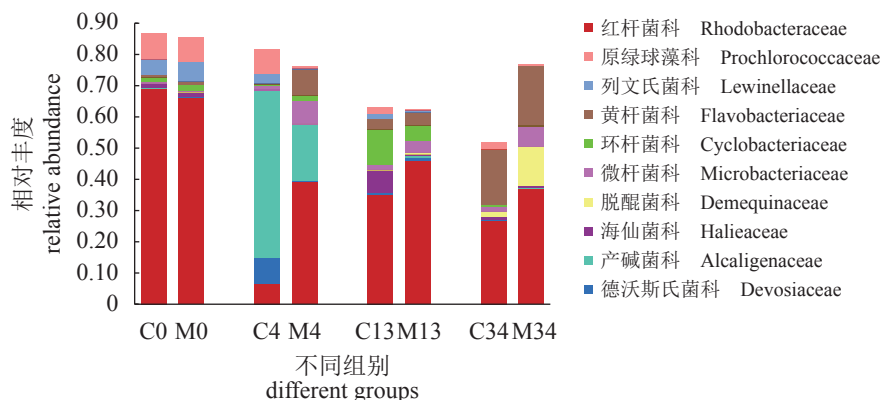


图 4 糖蜜对凡纳滨对虾养殖水体优势细菌科相对丰度的影响

Fig. 4 Effect of molasses on relative abundance of dominant bacterial families in *L. vannamei* rearing water

表 2 糖蜜对凡纳滨对虾养殖水体优势细菌属相对丰度的影响

Tab. 2 Effect of molasses on relative abundance of dominant bacterial genera in *L. vannamei* rearing water

科 family	属 genus	0 d		4 d		13 d		34 d	
		C0	M0	C4	M4	C13	M13	C34	M34
德沃斯氏菌科 Devosiaceae	德沃斯氏菌属 <i>Devosia</i>	0.23±0.07	0.22±0.07	8.26±3.61	0.20±0.04**	0.68±0.12	0.94±0.17	0.02±0.02	0.16±0.06
红杆菌科 Rhodobacteraceae	污水单胞菌属 <i>Defluviimonas</i>	0.07±0.03	0.05±0.02	0.00±0.01	0.03±0.01*	0.38±0.10	0.63±0.09	5.31±0.26	1.58±0.99*
	栖东海菌属 <i>Donghicola</i>	37.18±4.23	36.48±8.52	0.80±0.32	4.57±0.94**	1.56±1.41	0.42±0.19	0.64±0.05	1.00±0.71
	芽殖杆菌属 <i>Gemmobacter</i>	0.42±0.07	0.30±0.05	0.08±0.09	0.29±0.07*	5.79±2.35	20.49±6.09**	0.04±0.02	0.53±0.20*
	假鲁杰氏菌属 <i>Pseudoruegeria</i>	2.25±0.10	2.01±0.39	0.11±0.08	0.24±0.15	0.30±0.05	0.06±0.02**	0.67±0.03	12.67±8.64*
	红细菌属 <i>Rhodobacter</i>	0.72±0.14	0.45±0.05	1.02±0.21	1.53±0.11	5.74±1.15	9.18±2.08	0.13±0.02	0.11±0.05
	鲁杰氏菌属 <i>Ruegeria</i>	2.49±0.13	2.43±0.35	0.61±0.20	2.19±0.63**	2.81±0.58	1.43±0.26*	8.62±2.24	13.14±1.51*
	方心芳氏菌属 <i>Xinfangfangia</i>	0.98±0.11	0.74±0.12	0.16±0.15	0.13±0.05	6.97±1.61	5.58±0.62	0.38±0.02	0.20±0.19
	分类未定 unassigned (OTU1)	7.88±0.60	8.47±1.76	0.25±0.06	7.02±3.19*	0.15±0.07	0.04±0.02	0.53±0.20	0.03±0.01
	分类未定 unassigned (OTU1092)	4.90±0.26	4.10±0.32	0.92±0.09	16.45±2.81*	0.95±0.46	0.10±0.03	0.50±0.11	0.20±0.06
产碱菌科 Alcaligenaceae	克斯特氏菌属 <i>Kerstersia</i>	0.04±0.01	0.06±0.04	53.70±4.42	18.18±3.57*	0.09±0.05	0.79±0.66	0.00	0.06±0.05
海仙菌科 Halieaceae	海仙菌属 <i>Haliea</i>	1.13±0.04	0.96±0.39	0.11±0.03	0.00*	6.54±2.35	0.34±0.01**	0.12±0.04	0.04±0.03*
脱醌菌科 Demequinaceae	脱醌菌属 <i>Demequina</i>	0.01±0.01	0.01±0.01	0.00	0.02±0.01*	0.12±0.04	0.66±0.25**	1.83±0.25	12.65±6.58*
微杆菌科 Microbacteriaceae	微杆菌属 <i>Microbacterium</i>	0.02±0.01	0.01±0.02	0.01±0.01	0.05±0.04	0.06±0.06	1.19±0.30**	0.13±0.01	6.10±0.82**
	红月形菌属 <i>Rhodoluna</i>	0.30±0.05	0.31±0.13	1.07±0.10	5.80±1.21**	1.29±0.17	2.00±1.10	1.33±0.66	0.11±0.06
环杆菌科 Cyclobacteriaceae	噬冷菌属 <i>Algoriphagus</i>	0.87±0.08	1.23±0.50	0.19±0.04	0.36±0.03**	9.13±4.04	2.97±0.49*	0.39±0.10	0.04±0.01*
黄杆菌科 Flavobacteriaceae	黄杆菌属 <i>Flavobacterium</i>	0.07±0.02	0.09±0.05	0.29±0.07	6.14±0.99**	0.09±0.03	0.20±0.12	3.57±3.49	0.74±0.72
	分类未定 unclassified (OTU416)	0.00	0.01±0.00	0.02±0.01	0.00	0.14±0.06	0.19±0.11	2.37±0.32	10.21±10.82**
列文氏菌科 Lewinellaceae	褐指藻杆菌属 <i>Phaeodactylibacter</i>	4.26±0.61	5.42±2.40	0.81±0.27	0.18±0.03*	1.47±0.60	0.79±0.35	0.00	0.00
原绿球藻科 Prochlorococcaceae	原绿球藻属 <i>Prochlorococcus</i>	8.42±6.33	7.78±4.23	7.81±5.80	0.86±0.12	0.40±0.79	0.27±0.26*	1.36±0.42	0.34±0.21*

注: *和**分别表示同一阶段糖蜜处理组与对照组间呈显著性差异($P<0.05$)和极显著性差异($P<0.01$); C0、C4、C13、C34和M0、M4、M13、M34分别代表对照组和处理组第0、4、13和34天时的样品

Notes: * and ** respectively mean significant difference ($P<0.05$) and extremely significant difference ($P<0.01$) between the molasses treatment group and control group at the same stage; C0, C4, C13, C34 and M0, M4, M13, M34 represent the samples of control group and treatment group at 0, 4, 13 and 34 days

菌属的相对丰度。

基于丰度前 50 的 OTUs 构建热图, 色块按丰

度的对数值 \lg 显示颜色 (图 5)。横向样品聚类显

示, 4 个时间点各自聚为一类, 0 和 4、13 和 34 d

分别再各自聚为一大类，即同一时间的处理组和对照组聚为一支。表明水体菌群优势 OTU 按 4 个采样时间呈阶段性变化，且 0~4 d、13~34 d 又可作为 2 个大阶段。纵向 OTU 聚类显示，OTU593 独自为一类，在 4d 时丰度较高；OTU966 和 OTU101 等 8 个 OTU 构成的分支以红杆菌科为主，在 0 d 有较高丰度；OTU1281 和 OTU494 等 13 个 OTU 构成的分支主要为红杆菌科和黄杆菌科，在 34 d 有较高丰度；OTU1168 和 OTU33 等 18 个 OTU 构成的分支也以红杆菌科为主，在 13 d 有较高丰度。热图显示，处理组优势 OTU 丰度 0 d 时与对照组无显著差异；添加糖蜜第 4、13 和 34 天时，分别有 19、14 和 8 个优势 OTU 丰度与对照组有显著差异。可见，添加糖蜜后，不同阶段处理组较多优势 OTU 丰度与对照组呈显著差异，且从显著差异的优势 OTU 数量上看，早期 (4 d) 的影响

更强，其作用效果随时间逐渐衰减。

2.6 糖蜜对水体菌群功能的影响

PICRUSt2 预测结果显示，共获得 347 个预测的 KEGG Pathway Level 3 功能，丰度前 20 的功能种类和分布情况如图 6 所示。功能种类中，ABC 转运体丰度最高，属于膜转运的一种，群体感应属于原核生物群落类功能，双组分系统参与信号转导，核糖体参与翻译。其余 16 项均属新陈代谢功能。其中，氧化磷酸化、碳固定途径和甲烷代谢 3 项属于能量代谢，糖酵解/糖异生、丁酸代谢、丙酮酸代谢、丙酸盐代谢、乙醛酸和二羧酸代谢 5 项属于碳水化合物代谢。功能分布显示，添加糖蜜 0 d 时，处理组中丰度前 20 的功能丰度与对照组无显著差异。4 d 时，群体感应丰度显著低于对照组。13 d 时，ABC 转运体和群体感应丰

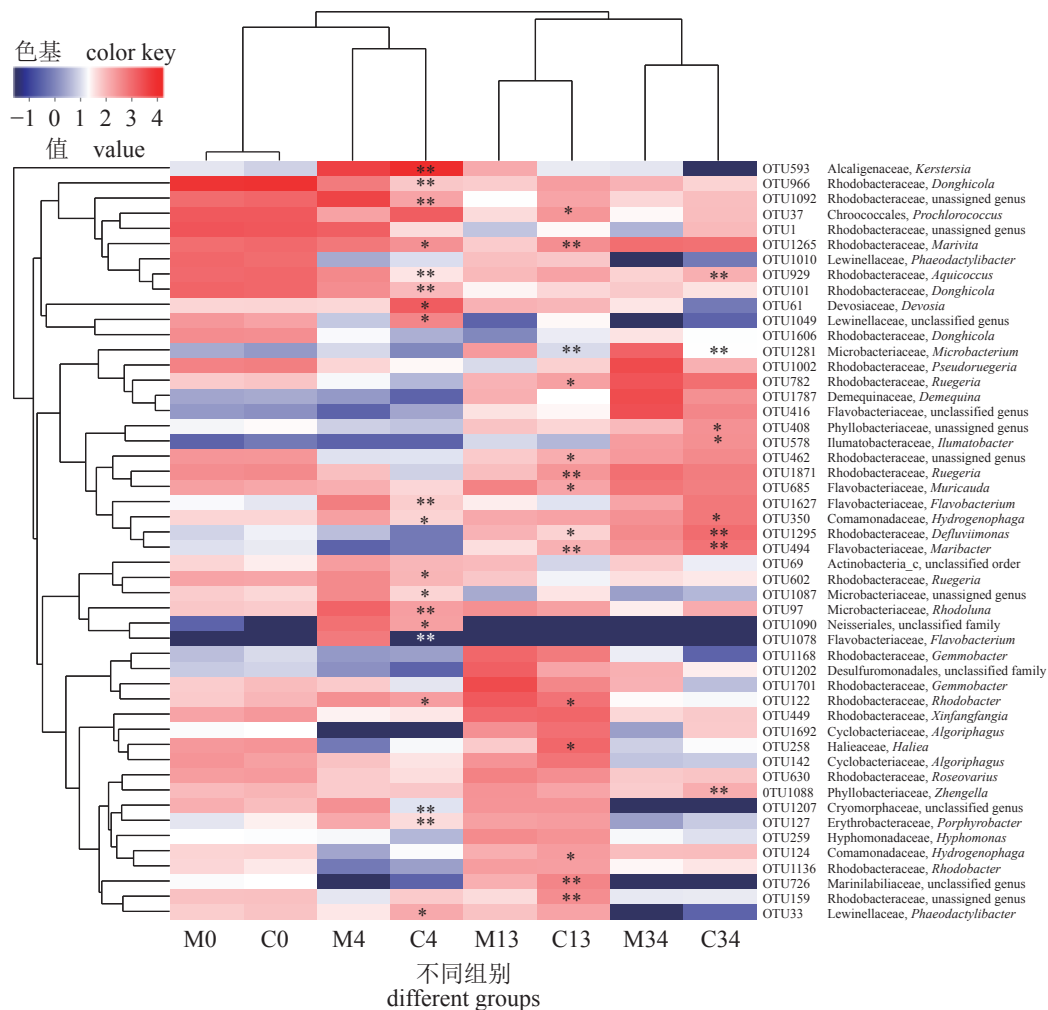


图 5 凡纳滨对虾养殖水体菌群优势 OTU 聚类分析热图

Fig. 5 Heatmap analysis of the bacterial communities at dominant OTU from *L. vannamei* rearing water

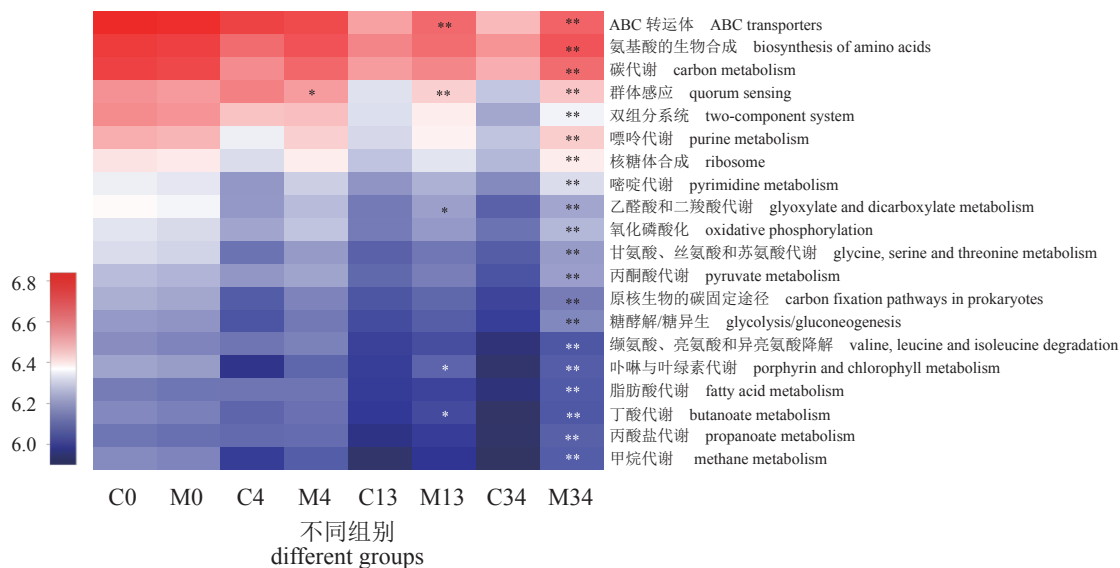


图6 糖蜜对凡纳滨对虾养殖水体菌群富集代谢途径的影响

Fig. 6 Effect of molasses on metabolic pathway enrichment in aquatic microbiota of *L. vannamei* rearing water

度极显著高于对照组 ($P < 0.01$), 乙醛酸和二羧酸代谢、卟啉与叶绿素代谢、丁酸代谢显著高于对照组 ($P < 0.05$)。34 d 时, 前 20 项功能丰度均极显著高于对照组, 表明在糖蜜的持续作用下, 其对水体菌群代谢通路功能丰度显著增加, 以碳水化合物和能量代谢为主的新陈代谢功能被高度富集。

3 讨论

3.1 糖蜜对水体菌群多样性的影响

养殖水体菌群多样性是衡量水体环境稳定性的重要指标。本实验结果显示, 添加糖蜜调控水体 C/N=16 时, 菌群多样性较对照组呈先升高后下降趋势。这与李杰等^[6]的研究结果相似, 该研究结果显示, 糖蜜调控对虾混养水体 C/N=25 时, 菌群多样性较对照组呈先升高后低变化。水体菌群多样性与水中营养物质种类和含量有关, 水中营养物质含量较低、种类较少时, 菌群多样性也会比较低, 在一定范围内, 菌群多样性随营养物质种类和含量的增加而增大, 营养物质含量过高则会受到抑制^[21-22]。在养殖初期, 水体中营养物质种类和含量均较少, 添加糖蜜调控碳氮比可提高水体营养物质含量, 为细菌生长和增殖提供碳源, 增加水体菌群多样性, 提高养殖生态系统稳定性, 有利于对虾的存活; 随着养殖的进行, 残饵和虾粪等同样可增加水体营养物质含量和种类, 使水体菌群多样性升高。当水体中营养物质种类和含量相对稳定后, 继续添加糖蜜不再提高水体

菌群多样性, 反而进一步富集能利用糖蜜的细菌, 而另一部分菌群在竞争中被抑制或被淘汰, 因而会造成菌群多样性下降, 若降低过多可能会影响池塘生态系统的稳定性^[23]。同样, 王娇等^[24]对葡萄糖影响养殖系统生物絮团形成及其微生物多样性的研究表明, 葡萄糖添加有助于利用这种碳源的细菌生长, 从而导致菌群多样性降低。本研究养殖 13 和 34 d 时处理组水体菌群多样性虽然都显著低于对照组, 但仍维持在比较高的水平。另一方面, 添加糖蜜调控水体 C/N 可使细菌消耗水中无机氮并形成生物絮团被对虾食用, 消除氨氮等对对虾的毒害且为对虾提供营养。本实验结果显示, 添加糖蜜调控水体 C/N=16 时可显著提高凡纳滨对虾的存活率, 利大于弊。

3.2 水体优势菌群的潜在功能

菌群组成及丰度变化可影响水质和对虾生长。本研究显示, 处理组 α -变形菌纲和放线菌门丰度显著高于对照组, 而蓝细菌门等丰度显著低于对照组。 α -变形菌纲中, 较多菌群可有效分解水体有机质, 避免水体富营养化; 放线菌门以产生包括抗生素在内的多种活性物质而闻名, 是水产生菌的重要来源^[25]。蓝细菌门在对照组中为优势, 在碳、氮循环中起重要作用, 但有些种类会释放藻毒素对对虾造成伤害^[22]。

科/属水平上, α -变形菌纲下的红杆菌科是最优势科, 在处理组中相对丰度达 37% 以上, 且极显著高于对照组。薛明等^[26]发现该科在凡纳滨对

虾育苗水体无节V期到仔虾I期的相对丰度均在20%以上。胡东等^[27]发现,在凡纳滨对虾养殖第40~131天,红杆菌科相对丰度保持在5%以上,是对虾养殖水体重要组成菌群。这可能归因于红杆菌科在水体碳、氮循环中起重要作用,同时能产生多种次生代谢活性物质^[28]。红细菌属(*Rhodobacter*)、栖东海菌属、鲁杰氏菌属、芽殖杆菌属和污水单胞菌属是本研究红杆菌科中的优势菌属。红细菌属是紫色非硫细菌的重要成员,能利用多种有机物进行异养光合作用^[29],芽殖杆菌属和污水单胞菌属具有较好的反硝化脱氮能力^[30-31]。这些菌群在碳、氮含量充足的水体中很可能具有较强竞争能力,在本研究养殖后期水体中形成丰度优势,对净化水质起重要作用。鲁杰氏菌属能分泌环二肽等多种生物活性分子,对弧菌生长起抑制作用^[32]。栖东海菌属的相关功能报道较少,Xue等^[33]研究表明,该属是凡纳滨对虾健康苗池中的优势菌群。因此,红杆菌科及其优势属可能对提高凡纳滨对虾的存活率发挥重要作用。

此外,拟杆菌门中黄杆菌科是处理组中次优势科,丰度也显著高于对照组。黄杆菌科中的一些种是某些鱼类的重要病原菌^[34-35]。但尚未见黄杆菌科对对虾具有致病性的研究报道,相反,黄杆菌科在对虾育苗期^[36]和本实验养殖中后期水体中为优势菌,且对虾生长情况良好,因此,黄杆菌科在对虾养殖中可能是潜在有益菌群。微杆菌科属于放线菌门,在处理组的丰度始终高于对照组,该科红月形菌属在凡纳滨对虾健康苗池中有极高丰度,可作为健康苗池的指示菌种^[36]。

3.3 糖蜜对水体菌群功能的影响

水体菌群功能预测结果显示,丰度排序前20的功能项在处理组中普遍比对照组高,其中ABC转运体丰度最高,乙醛酸和二羧酸代谢等5项参与碳水化合物代谢,氧化磷酸化等3项参与能量代谢。这与张哲等^[14]的研究结果相似,ABC转运体在育苗水体生物絮团中丰度最高,乙醛酸和二羧酸代谢等4项碳水化合物代谢和氧化磷酸化等2项能量代谢的丰度也是位于前20。ABC转运体是最大的一类转运蛋白,既可以将离子、糖类、维生素、氨基酸和多肽等运进细胞内,也可以将蛋白毒素、脂质和药物等运出细胞^[37]。在本实验中,ABC转运体的一个作用为吸收水体中的糖蜜,在菌体内进行糖酵解等碳水化合物代谢,

进一步通过氧化磷酸化等能量代谢为菌群的生长和增殖提供充足的能量;另一个作用是吸收水中的无机氮,为氨基酸的合成提供氮元素。水体菌群在生长和增殖过程中吸收营养物质,可起到改善水质并为对虾生长提供菌体蛋白等作用,有利于对虾的生长和存活。

综上所述,添加糖蜜调控水体C/N=16可显著提高凡纳滨对虾存活率和养殖水体中红杆菌科、黄杆菌科和微杆菌科等菌群丰度,同时加强ABC转运体和碳水化合物代谢等功能。说明添加适量糖蜜可优化对虾养殖水体菌群结构,富集菌群碳水化合物和能量代谢功能,从而加快对虾养殖水体中的物质循环,减少养殖水体富营养化状态。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action[M]. Rome: FAO, 2020: 23.
- [2] 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. 2019中国渔业年鉴[M]. 北京:中国农业出版社, 2020: 22-23.
The Bureau of Fishery Administration of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China fisheries yearbook 2019[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2020: 22-23 (in Chinese).
- [3] 范鹏程,徐武杰,文国樑,等. 基于生物絮团技术构建的零换水养殖系统对凡纳滨对虾高密度养殖效果分析[J]. 南方农业学报, 2019, 50(12): 2833-2840.
Fan P C, Xu W J, Wen G L, et al. Production trial and analysis of *Litopenaeus vannamei* based on biofloc technology at a high density in zero-water exchange systems[J]. Journal of Southern Agriculture, 2019, 50(12): 2833-2840 (in Chinese).
- [4] 杨淞,冯健,宁毅,等. 尼罗系吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)幼鱼实用日粮中蔗糖糖蜜的养殖效果与血糖代谢变化[J]. 海洋与湖沼, 2012, 43(1): 78-83.
Yang S, Feng J, Ning Y, et al. Aquaculture performance of sugarcane molasses in practical diets and change of blood sugar on juvenile genetic improvement of farmed tilapia strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(1): 78-83 (in Chinese).
- [5] 郭小洋,唐艳强,侯玉洁,等. 糖蜜对草鱼混养池塘水质和细菌群落结构的影响[J]. 水产科学, 2019, 38(5): 616-623.
Guo X Z, Tang Y Q, Hou Y J, et al. Effects of molasses

- supplementation on water quality and microbial community structure in polyculture ponds of grass carp[J]. *Fisheries Science*, 2019, 38(5): 616-623 (in Chinese).
- [6] 李杰, 田相利, 董双林, 等. 添加糖蜜对虾蟹混养系统水体细菌群落结构的影响[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2016, 46(5): 38-49.
- Li J, Tian X L, Dong S L, *et al.* Effect of molasses addition on microbial community structure in the polyculture system of *Portunus trituberculatus* and *Litopenaeus vannamei*[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2016, 46(5): 38-49 (in Chinese).
- [7] 朱锦裕, 卜弘毅, 胡冲冲, 等. 泼洒糖蜜对池塘养殖罗氏沼虾生长和水质的影响[J]. *水产科学*, 2017, 36(2): 202-206.
- Zhu J Y, Bu H Y, Hu C C, *et al.* Effects of molasses supplementation on growth and water quality in giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* ponds[J]. *Fisheries Science*, 2017, 36(2): 202-206 (in Chinese).
- [8] 龙丽娜, 陆诗敏, 刘晃. 基于生物絮团技术的养殖系统细菌群落结构研究进展[J]. *中国农学通报*, 2019, 35(8): 146-151.
- Long L N, Lu S M, Liu H. The bacterial community structure of culture system based on biofloc technology: a review[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2019, 35(8): 146-151 (in Chinese).
- [9] 陈亮亮, 董宏标, 李卓佳, 等. 生物絮团技术在对虾养殖中的应用及展望[J]. *海洋科学*, 2014, 38(8): 103-108.
- Chen L L, Dong H B, Li Z J, *et al.* Review of the application and perspective of biofloc technology in shrimp culture[J]. *Marine Sciences*, 2014, 38(8): 103-108 (in Chinese).
- [10] Burford M A, Thompson P J, McIntosh R P, *et al.* Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize[J]. *Aquaculture*, 2003, 219(1-4): 393-411.
- [11] Epp M A, Ziemann D A, Schell D M. Carbon and nitrogen dynamics in zero - water exchange shrimp culture as indicated by stable isotope tracers[J]. *Aquaculture Research*, 2002, 33(11): 839-846.
- [12] Abreu P C, Ballester E L C, Odebrecht C, *et al.* Importance of biofilm as food source for shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*) evaluated by stable isotopes ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$)[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2007, 347(1-2): 88-96.
- [13] Xu W J, Pan L Q. Effects of bioflocs on growth performance, digestive enzyme activity and body composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* in zero-water exchange tanks manipulating C/N ratio in feed[J]. *Aquaculture*, 2012, 356-357: 147-152.
- [14] 张哲, 杨章武, 葛辉, 等. 凡纳滨对虾育苗水体中三种生物絮团的菌群多样性及Tax4Fun基因功能预测分析[J]. *水生生物学报*, 2019, 43(4): 786-796.
- Zhang Z, Yang Z W, Ge H, *et al.* Impacts of *Litopenaeus vannamei* on microbial diversity of three biofloc and predictive analysis of Tax4Fun gene function during hatchery period in water[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, 43(4): 786-796 (in Chinese).
- [15] 张哲, 杨章武, 葛辉, 等. 不同碳源对凡纳滨对虾育苗标粗水体生物絮团的结构、营养成分、细菌群落及其水质的影响[J]. *水产学报*, 2019, 43(3): 639-649.
- Zhang Z, Yang Z W, Ge H, *et al.* Effects of different carbon sources on the biofloc formation, nutritional ingredients and bacterial community and water quality in *Litopenaeus vannamei* culture tank[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(3): 639-649 (in Chinese).
- [16] 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[J]. *河北渔业*, 2019(4): 28-30.
- Liu K M, You H Z, Ma L, *et al.* Effects of biofloc grown with different carbon sources on culture of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Hebei Fisheries*, 2019(4): 28-30 (in Chinese).
- [17] Samocha T M, Patnaik S, Speed M, *et al.* Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*[J]. *Aquacultural Engineering*, 2007, 36(2): 184-191.
- [18] 张许光, 赵培, 王国成, 等. 不同放苗密度凡纳滨对虾生物絮团养殖的环境和产出效应[J]. *渔业科学进展*, 2013, 34(3): 111-119.
- Zhang X G, Zhao P, Wang G C, *et al.* The environmental and production effect of bio-floc aquaculture of *Litopenaeus vannamei* at different stocking densities[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(3): 111-119 (in Chinese).
- [19] Avnimelech Y. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems[J]. *Aquaculture*, 1999, 176(3-4): 227-235.
- [20] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB 17378.4—2007 海洋监测规范第4部分: 海水分析[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. GB 17378.4—2007 The specification for marine monitoring—Part 4: Seawater analysis[S]. Beijing: China Standard Press, 2007 (in Chinese).
- [21] 有小娟, 李秋芬, 张艳, 等. 象山港内西沪港海域沉积环境细菌群落结构的时空变化及其主要环境影响因子[J]. *应用与环境生物学报*, 2013, 19(5): 742-749.
- You X J, Li Q F, Zhang Y, *et al.* Spatial and temporal variation of bacterial community structures and their

- main environmental influencing factors in sediment environment of Xihu Area in Xiangshan Bay[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2013, 19(5): 742-749 (in Chinese).
- [22] 冯胜, 秦伯强, 高光. 细菌群落结构对水体富营养化的响应[J]. *环境科学学报*, 2007, 27(11): 1823-1829.
Feng S, Qin B Q, Gao G. Response of bacterial communities to eutrophic water in Lake Taihu[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2007, 27(11): 1823-1829 (in Chinese).
- [23] Schneider O, Sereti V, Machiels M A M, *et al.* The potential of producing heterotrophic bacteria biomass on aquaculture waste[J]. *Water Research*, 2006, 40(14): 2684-2694.
- [24] 王娇, 马灌楠, 邓元告, 等. 葡萄糖和盐度对卤虫生长、养殖系统生物絮团形成及其微生物多样性的影响[J]. *海洋与湖沼*, 2015, 46(2): 372-380.
Wang J, Ma G N, Deng Y G, *et al.* Effects of glucose and salinity on *Artemia* growth, biofloc formation, and microbial diversity in culture[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(2): 372-380 (in Chinese).
- [25] Das S, Ward L R, Burke C. Prospects of using marine actinobacteria as probiotics in aquaculture[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 81(3): 419-429.
- [26] 薛明, 何瑶瑶, 邱孟德, 等. 高通量测序分析凡纳滨对虾育苗期水体菌群结构特征[J]. *水产学报*, 2017, 41(5): 785-794.
Xue M, He Y Y, Qiu M D, *et al.* Characterization of aquatic bacterial community of *Litopenaeus vannamei* larvae during hatchery period with high-throughput sequencing[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(5): 785-794 (in Chinese).
- [27] 胡东, 王丽萍, 赵苒, 等. 福建漳浦凡纳滨对虾海水养殖中后期水体细菌群落多样性分析[J]. *海洋学报*, 2017, 39(8): 89-98.
Hu D, Wang L P, Zhao R, *et al.* The diversity changes of bacterial community in mariculture water of *Litopenaeus vannamei* at Zhangpu, Fujian Province[J]. *Haiyang Xuebao*, 2017, 39(8): 89-98 (in Chinese).
- [28] Pujalte M J, Lucena T, Ruvira M A, *et al.* The family *Rhodobacteraceae*[M]//Rosenberg E, DeLong E F, Lory S, *et al.* The Prokaryotes. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014: 439-512.
- [29] Idi A, Nor M H M, Wahab M F A, *et al.* Photosynthetic bacteria: an eco-friendly and cheap tool for bioremediation[J]. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 2015, 14(2): 271-285.
- [30] 王思宇, 李军, 王秀杰, 等. 添加芽孢杆菌污泥反硝化特性及菌群结构分析[J]. *中国环境科学*, 2017, 37(12): 4649-4656.
Wang S Y, Li J, Wang X J, *et al.* Denitrification characteristics of *Bacillus subtilis* sludge and analysis of microbial community structure[J]. *China Environmental Science*, 2017, 37(12): 4649-4656 (in Chinese).
- [31] Foessel B U, Drake H L, Schramm A. *Defluviimonas denitrificans* gen. nov., sp. nov., and *Pararhodobacter aggregans* gen. nov., sp. nov., non-phototrophic *Rhodobacteraceae* from the biofilter of a marine aquaculture[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2011, 34(7): 498-502.
- [32] Miura N, Motone K, Takagi T, *et al.* *Ruegeria* sp. strains isolated from the reef-building coral *Galaxea fascicularis* inhibit growth of the temperature-dependent pathogen *Vibrio coralliilyticus*[J]. *Marine Biotechnology*, 2019, 21(1): 1-8.
- [33] Xue M, Liang H F, He Y Y, *et al.* Characterization and *in vivo* evaluation of potential probiotics of the bacterial flora within the water column of a healthy shrimp larviculture system[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2016, 34(3): 484-491.
- [34] Loch T P, Faisal M. Emerging flavobacterial infections in fish: a review[J]. *Journal of Advanced Research*, 2015, 6(3): 283-300.
- [35] 黄进强, 刘哲, 王建福, 等. 盐碱池塘养殖鲤肠道菌群的分子分析[J]. *农业生物技术学报*, 2013, 21(6): 707-715.
Huang J Q, Liu Z, Wang J F, *et al.* Molecular analysis of intestinal microflora in common carp (*Cyprinus carpio* L.) from saline-alkali Ponds[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2013, 21(6): 707-715 (in Chinese).
- [36] 黄雪敏, 温崇庆, 梁华芳, 等. 健康和发病凡纳滨对虾糠虾期育苗池水体的菌群结构比较[J]. *广东海洋大学学报*, 2018, 38(4): 27-34.
Huang X M, Wen C Q, Liang H F, *et al.* Comparison of bacterial community structure in larval rearing water between healthy and diseased *Litopenaeus vannamei* mysis[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2018, 38(4): 27-34 (in Chinese).
- [37] 杨一帆. 金黄色葡萄球菌二元信号系统和 ABC 转运体功能研究 [D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2015.
Yang Y F. Functional study of two-component system and ABC transporter in *Staphylococcus aureus*[D]. Hefei: University of Science and Technology of China, 2015 (in Chinese).

Effects of molasses addition on bacterial community structure of rearing water of *Litopenaeus vannamei*

HE Runduan, NING Weimin, WEN Chongqing, MIN Guanjie,
ZHU Feng, WANG Chenggui*, XUE Ming*

(College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: As an effective, safe and eco-friendly aquaculture mode, biofloc technology (BFT) is receiving more and more attention nowadays. So far, the impacts of BFT on performances of *Litopenaeus vannamei* regarding organic carbon sources, C/N ratio and culture density have been reported, which especially focusing on water quality and biofloc microflora. However, the effect of molasses on the aquatic microbiota during shrimp culture has not been systematically evaluated. In order to investigate the effects of molasses on shrimp growth and aquatic microbiota during culture of *L. vannamei*, high-throughput sequencing of 16S *rDNA* amplicons was used to compare the differences of bacterial community structure between the treatment group with molasses (C/N=16.0) and the control group (C/N=8.5) on the 4th, 13th and 34th days respectively, and the microflora function was predicted by PICRUSt2. The results showed that although molasses addition had no significant effects on body length and body weight of shrimp, the shrimp survival rate was significantly enhanced. Compared with the control group, the Shannon diversity and evenness indices of aquatic microbiota in treatment group increased significantly on the 4th day, while decreased markedly on the 13th and 34th days. After adding molasses, the relative abundances of α -Proteobacteria and Actinobacteria in the treatment group were very significantly higher than those in the control group, whereas the abundances of Cyanobacteria and γ -Proteobacteria presented an opposite trend. The abundance of β -Proteobacteria was also significantly lower than that of the control group on the 4th and 34th days. Additionally, the abundance of Bacteroidetes was significantly higher and lower than that of the control group on the 4th and 13th days, respectively. At the family level, the relative abundance of Microbacteriaceae in the treatment group was significantly higher than that in the control group on the 4th, 13th, and 34th days. On the 4th day, the relative abundances of Rhodobacteraceae and Flavobacteriaceae were extremely significantly higher than those of the control group, while the abundances of Devosiaceae, Alcaligenaceae and Lewinellaceae exhibited conversely. On the 13th day, the abundances of Halieaceae and Cyclobacteriaceae were significantly lower than that of the control group. On the 34th day, the abundance of Demequinaceae was significantly higher than that of the control group. The abundances of dominant genera such as *Gemmobacter* and *Demequina* in the treatment group were significantly higher than those in the control group, while the abundances of some genera such as *Haliea* decreased significantly. The functional prediction of aquatic microflora showed that the top 20 items in the treatment group presented extremely significant metabolic function enrichment on the 34th day, and eight of these items, including glycolysis/gluconeogenesis, were highly enriched, which mainly act on carbohydrate or energy metabolism. The results indicated that the proper amount of molasses could significantly affect the relative abundances of dominant bacterial communities in rearing water of *L. vannamei*, optimize the microflora structure by enriching the functions of carbohydrate and energy metabolism pathways, and thus improve the survival rate of shrimp. This study provides key and practical references for application of molasses as an organic carbon source in shrimp biofloc aquaculture.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; molasses; biofloc; aquatic microbiota; functional prediction

Corresponding authors: WANG Chenggui. E-mail: longshore@163.com;

XUE Ming. E-mail: xuemt@163.com

Funding projects: National Key Research and Development Program of China (2020YFD0900205); Guangdong Ocean University's Special Fund for Strengthening the University through Innovation in 2019 (230419095)