

# 지채(*Triglochin maritimum*)입식에 따른 바이오플락 사육수 내 세균 군집의 변화

조재황 · 김수경 · 임현호 · 김대희 · 한현섭<sup>1\*</sup>

국립수산과학원 서해수산연구소 양식산업과, <sup>1</sup>군산대학교 해양생명과학과

## Changes in the Biofloc Bacterial Community Caused by Planting of *Triglochin maritimum*

Jea-Hwang Cho, Su-Kyoung Kim, Hyeon-Ho Lim, Dea-Hee Kim and Hyon-Sob Han<sup>1\*</sup>

West Sea Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science, Taean 32132, Republic of Korea

<sup>1</sup>Gunsan National University, Department of Fisheries Science, Gunsan 54150, Republic of Korea

In this study, changes in biofloc-related and pathogenic bacteria in both low and high concentration biofloc breeding water planted with the halophyte (*Triglochin maritimum*) were investigated. In the low-concentration biofloc breeding water, the ratio of bacteria related to the nitrogen cycle was initially 59.57% and, it decreased to 26.57% at the end of the experiment while other bacteria (excluding nitrogen-cycling bacteria and *vibrios*) increased from 38.75% to 73.43%. However, the planted experimental group maintained a relatively high ratio of nitrogen cycling bacteria at 58%. In the high-concentration experimental group, bacteria related to the initial nitrogen cycle, non-pathogenic vibrios, and pathogenic vibrios were 11.60, 36.28, and 20.14%, respectively. Finally, nitrogen-cycling bacteria were 36.47% in the control group and 37.55% in the planted group. The total number of vibrios decreased by 46.54% in the planted group and 48.01% in the control group, indicating a significant decrease in both experimental groups. However, the residual rate of pathogenic *vibrios* was 4.48% in the control group and 0.54% in the planted group. Overall, the planted group showed decreasing harmful bacteria and increasing useful bacteria.

Keywords: Biofloc, 16S rDNA metabarcoding, Marine plants, Bioremediator

### 서론

바이오플락 기술(biofloc technology, BFT)은 자가영양세균 (autotroph bacteria), 타가영양세균(heterotrophic nitrification aerobic denitrification bacteria, HNAD), 미세 조류(microalgae)를 비롯한 다양한 미생물을 이용하여 양식생물 사육 중 발생하는 유해 질소를 처리하는 양식기법이다(Abakari et al., 2020). BFT은 탄소원 투입을 통해 이를 전자공여원으로 활용하는 HNAD를 이용하여 빠르고 효율적으로 유해 질소를 처리하여 사육수 교환을 최소화하고, 이를 통해 환경 오염 및 유입수에 의한 질병 감염을 줄일 수 있다(Zhao et al., 2014). 그러나, HNAD는 무기 질소를 직접적으로 동화하여 세균 단백질 형성을 하는 과정에서 많은 양의 산소를 소모하고, 부유물을 생

성하며 이는 양식 생물에게 위협 요소가 될 수 있다(Ray et al., 2011). 따라서 바이오플락 양식에서는 이러한 미생물들을 복합적으로 활용하는 것이 안정적이다(Ray and Lotz, 2014). 그러나, 자가영양세균에 의한 질산화 과정은 최종산물로 질산염(NO<sub>3</sub>-N)을 생성하는데, 질산염은 일반적인 호기성 양식 환경에서의 저감은 거의 이루어지지 않으며, 바이오플락 사육수 내 질소의 59%가 질산염의 형태로 잔존한다(Hargreaves, 2013; Luo et al., 2020). 고농도의 질산염은 hemoglobin과 hemocyanin을 산소를 운반할 수 없는 형태로 산화시켜 조직 내 저산소증을 유발할 수 있다. 또한, 수생 생물의 체내 주요 음이온인 Cl<sup>-</sup>와 길항적으로 경쟁하여 체내로 유입되며, Na-Cl-K Cotransporter와 같은 체내 이온 조절 시스템에 교란을 유발하여 독성으로 작용한다(Cho et al., 2020; Valencia-Castañeda et al., 2020).

\*Corresponding author: Tel: +82. 63. 469. 1834 Fax: +82. 504. 310. 0008

E-mail address: Smartfish@kunsan.ac.kr



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2023.0099>

Korean J Fish Aquat Sci 56(1), 99-108, February 2023

Received 2 November 2022; Revised 1 December 2022; Accepted 7 January 2023

저자 직위: 조재황(주무관), 김수경(연구사), 임현호(연구원), 김대희(연구관), 한현섭(교수)

국내 바이오플락 양식 주요 대상종인 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)의 양식 기간은 일반적인 환경에서 6개월 이내로, 사육 기간 중 질산염의 농도는 840 mg/L의 농도까지 상승하나 (Schveitzer et al., 2013), 질산염 독성에 의한 대량 폐사가 이루어지기 전 수확이 이루어지진다(Cho et al., 2010). 그러나, 광염성 종인 흰다리새우는 최근 양식 적지 확대 요구에 따라 저염분 사육에 대한 연구가 활발히 검토되고 있다(Kim et al., 2017). 수중 생물의 Cl<sup>-</sup> 흡수 경로는 질산염과 같은 경로를 사용하며, 염분이 낮아질수록 질산염의 체내 유입량이 높아져 독성 한계 범위는 낮아질 수 있다(Valencia-Castañeda et al., 2018). 흰다리새우를 2,014.4 mg/L의 42일간 질산염에 노출시킨 후 2 ppt에서는 21일만에 전량 폐사하였으나, 9 ppt에서는 42일 후 16.7±11.1%, 18 ppt에서는 44.4±5.6% 생존하였다(Kuhn et al., 2010). 또한, 국내 주요 해산 어류의 양식 기간은 모두 15개월 이상으로(NIFS, 2016, 2019, 2020) 해산어류 중 가장 높은 비중을 차지하는 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 바이오플락 사육 중 질산염은 678 mg/L 이상으로 축적될 수 있다(Shin et al., 2020). 넙치의 질산염에 대한 만성독성 실험은 이루어진 바 없으나, 넙치와 같은 가자미목(Order: *Pleuronectiformes*) 해산 어류이며, 대체 양식 품종으로 도입된 종인 turbot *Scophthalmus maximus*을 269.14 mg/L의 질산염에 15일간 노출하자 triglyceride, cortisol, SOD (superoxide dismutase), GPX (glutathione peroxidase)와 같은 스트레스 지표에서 유의미한 변화를 나타냈다(Yu et al., 2021). 따라서 사육수 교환이 적은 양식 방법인 BFT을 적용하는 대상 종의 확대 및 기존 바이오플락에서 발생하는 고농도 질산염 축적에 대한 방안이 필요하다.

질산염을 줄이기 위한 기존 방법으로는 이온 교환(ion exchange), 역삼투(reverse osmosis) 및 활성탄 흡착(carbon adsorption) 등이 있으나 비용이 많이 들고, 별도 폐기물이 발생하는 문제가 있다(Mook et al., 2012). 최근 양식시설에서 질산염을 줄이기 위하여 제안되는 기법은 해양식물에 의한 생물적 환경정화(bioremediator)다. 생물적 환경정화는 다른 처리 기법에 비해 상대적으로 저렴하고 친환경적이며 생산된 해양식물을 활용 가능하다는 장점이 있다(Brito et al., 2016)

본 연구에서는 예비 실험을 통해 지체가 해수 중의 질산염을 저감할 수 있을 뿐 아니라, 실내 적용 능력이 뛰어난 것을 확인하여 본 실험의 대상 종으로 선정하였다. 지체(*Triglochin maritimum*)는 단자엽식물강, 택사목, 지체과에 속하는 다년생 초본으로, 만조 시 식물체가 침수되는 조간대 지역에 서식하는 습생 염생식물이다. 또한, 광염성 종으로써 다양한 양식 생물에게 적용이 가능하다(Boestfleisch and Papenbrock, 2017). 지체는 건강 기능성 원료, 미용 원료 등으로 활용이 검토되고 있어 향후 고부가가치 작물로도 활용이 가능하다(Lee, 2018; Jeong, 2020).

일반적으로 해양식물의 뿌리를 비롯한 조직기관에는 다양한 상호작용을 하는 내생세균이 존재하며, 양식시스템에서 해양

식물을 이용해 수질 환경 정화를 할 경우 질소 순환과 관련된 주요 세균들이 더욱 증가할 수 있으며(Nicholaus et al., 2021), 이는 기존 바이오플락 사육수 내 우점종 변화에 영향을 미칠 수 있다(Panigrahi et al., 2020). 그러나 바이오플락 시스템에 해양식물을 입식할 경우 일어나는 세균 군집 변화에 대한 연구는 거의 이루어진 바 없는 실정이다.

따라서 본 실험에서는 지체를 입식한 바이오플락 사육수와 일반 바이오플락 사육수의 세균 군집을 비교하여 해양식물과 함께 유입된 세균이 경쟁적 배타작용(competitive exclusion principle)으로 인한 기존 미생물 군집에 미치는 영향을 확인하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험식물 및 실험환경

본 실험에 이용된 지체는 충남 서산시 대산읍 오지리에서 채집하였다. 채집 시 삽을 이용해 뿌리부가 손상되지 않도록 저질째 채집하였고 실험실에서 이물질을 제거 후 실험에 이용하였다. 실험은 실내에서 약 10일간 순치 후 실시하였다. 실험 수조는 20 L 아크릴 수조를 이용하였으며, 각 수조별 사육수를 15 L만큼 채워 실험에 돌입하였다. 실험구별 입식량은 약 50±1.4 g이었으며 각 수조에는 암소시 호흡을 위한 에어레이션을 설치하였다. 모든 실험은 3반복으로 시행하였다. 수온은 적용 예상 사육생물인 넙치의 적수온인 21–24°C로 설정하였다(NIFS, 2016). 조명은 3,300 Lux의 시판용 LED 조명(Bestlighting, Seongnam, Korea)을 이용하였고 광주기는 해당 해수온 범위 내에서 평균 일장 주기인 14L (light):10D (dark)로 설정하였다(KMA, 2020). 실험구 구성은 저농도 및 고농도 두 개 구간을 설정하였으며, 저농도 바이오플락 사육수(질산염 203 mg/L)는 양식생물 입식 전 조성한 사육수였으며, 고농도 바이오플락 사육수는 90일 이상 사육수로 활용하여 질산염이 축적된 사육수(질산염 627 mg/L)를 이용하였다. 실험 기간은 12일간 진행하였다. 실험 기간 중 수질(수온, 용존산소, 염분, pH)은 YSI-Professional Plus (YSI, Yellow Springs, OH, USA)를 이용하여 매일 측정하였다. 암모니아 및 아질산 측정은 해양환경공정시험방법에 따라 각각 인도페놀법과 다이아조화법을 통해 반응시킨 후, 흡광광도계(Spectramax i3; Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 이용하여 640, 543 nm에서 측정하였다. 질산염은 해수용 질산염 임상 kit (Merck, Rahway, NJ, USA)를 매뉴얼에 따라 반응시킨 후 흡광광도계(Spectroquant prove 300; Merck)를 통해 500 nm에서 측정하였다. 실험 시작 수질 값은 Table 1과 같다. 16S rDNA 분석을 위한 sampling은 각 실험구별 사육수는 실험 개시 시점과 종료 시점에 멸균 채수병(New International Gwahaksangsa, Namyangju, Korea)을 이용하여 sampling하였으며, 식물체는 종료 시점에 전체를 50 mL Conical tube (SPL Life Sciences, Pocheon, Korea)를

이용해 sampling 하였다. 시료량은 사육수 2 L, 식물체는 10 g 이었으며 분석 전까지 초저온 냉동고(MDF594; Sanyo, Tokyo, Japan)에서 보관하였다.

원핵생물 군집 분석

해양식물 입식에 따른 바이오플락 원핵생물 군집 변화를 분석하기 위해 16S rDNA metagenomics 분석을 실시하였다. 환경 DNA (deoxyribo nucleic acid) 추출을 위해 초저온 냉동고에 보관된 BFT 사육수와 해양식물 시료를 실온에서 해동하였다. 해양식물 시료에는 멸균해수 500 mL을 넣고 흔들어 부착된 세균을 분리하였다. 준비된 시료는 여과기 세트에 나이트로셀룰로스 막 여과지(Mixed Cellulose Ester Circle WME Range; Whatman, Maidstone, UK)을 장착하고 BFT 사육수 시료 2 L와 해양식물 시료 500 mL을 농축하였다. Metal Beads (OMNI International, Kennesaw, GA, USA)와 DNeasy® Blood & Tissue Kits (Qiagen, Hilden, Germany)의 Proteinase K 20 µL과 PBS (phosphate buffered saline) 180 µL를 이용해 vortexing하였고, 시료균질기(Bead Ruptor 12; OMNI International)을 이용하여 60초 간격으로 8회 반복하여 막여과지를 잘게 절단하고 60°C에서 8시간 이상 반응시킨 후 상등액을 반복 추출하여 환경 DNA를 추출하였다.

AccuPower® Pfu PCR Master Mix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 PCR (polymerase chain reation) 반응액을 만들었다. 세균 16S rDNA 영역의 DNA metabarcoding용 PCR primer조합을 사용하였다. 사용한 primer 정보는 Table 2에 기재하였다.

1차 PCR 증폭은 ProFlex PCR System (Life Technologies

Corporation, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 수행하였다. 1차 PCR 증폭이 이루어진 시료를 대상으로 Herculase II Fusion DNA Polymerase 및 Nextera XT Index Kit V2 (Illumina, San Diego, CA, USA)를 이용하여 2차 PCR 증폭 절차를 수행하였다. DNA metabarcoding 분석용 NGS (next generation sequencing) 라이브러리를 제작 후 sequencing 절차를 수행하고 National Center for Biotechnology Information BLAST 검색을 통해 동정하였다.

바이오플락에서 KEGG pathway를 통해 추론한 질소 순환과 관련된 주요 세균 Phylum은 *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, *Firmicutes*로 알려져 있으며, 해당 분류군은 암모니아가 glutamate로 전환되는 기능의 48.5%를 차지하며, 질소 산화와 관련된 기능의 18.04%를 차지한다(Huang et al., 2022). 본 연구에서는 위 4개 Phylum과 함께 NOB (nitrite oxidizing bacteria)인 *Nitrospira* (Phylum: *Nitrospirae*)가 다수 발견되어 5개 Phylum을 바이오플락 주요 세균 Phylum으로 보고 분석하였다.

통계분석

세균 16S rDNA 영역의 DNA metabarcoding 분석을 통해 최종적으로 생성된 OTU (operational taxonomic unit) 수와 reads 수의 정보를 바탕으로 relative abundance를 산출하였다. 실험 분석 결과에 대한 통계학적 유의성은 SPSS 통계 프로그램을 이용하여 종로 시점에서 실험구와 대조구에 대해 student's t -test를 실시하여 P<0.05일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

Phylum 단위로 분석한 원핵생물 군집의 변화

본 실험에서는 기존에 알려진 질소 순환과 관련된 바이오플락 4개 Phylum 중 *Proteobacteria*에 속하는 NOB인 *Nitrobacter* (Class: *Alphaproteobacteria*), *Nitrococcus* (Class: *Gammaproteobacteria*)는 전 실험구에서 평균적으로 0.05% 이하로 발견되었으나, 별도의 Phylum을 형성한 NOB인 *Nitrospira* (Vijayan et al., 2021)가 저농도 실험구 시작 시점에 43.53%로 우점하여 4개 Phylum 외에 추가적으로 *Nitrospirae*를 더하여 산출하였다(Fig. 1).

이후 하위 분류 단계 분석을 통해 상호 검증한 결과 개시 시점에서 고농도 실험구에는 병원성 세균을 포함한 그룹인 *Vibrio* (Genus: *Vibrio*)가 다수 발견되었으며, 전체 *Proteobacteria*중

Table 1. The chemical components of biofloc water and experimental condition used in the experiments

Experimental groups	Biofloc (low concentration)	Biofloc (high concentration)
Temperature (°C)	23.4±0.14	21.4±0.87
pH	8.57±1.12	8.52±4.16
Salinity (PSU)	30.79±1.45	30.14±1.21
Dissolved oxygen (mg/L)	7.21±0.45	7.65±0.53
Ammonia (mg/L)	0.09±0.02	0.05±0.01
Nitrite (mg/L)	0.032±0.08	0.21±0.07
Nitrate (mg/L)	203±3.53	627±4.42

Table 2. Primer information used in the experiments

Primer name	Reference	Direction	Sequence (5'→3')	Amplicon size (bp)
Meta-BAC-16S-0340f	Klindwort et al. (2013)	Forward	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG	512
Meta-BAC-16S-0784r	Klindwort et al. (2013)	Reverse	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC	512

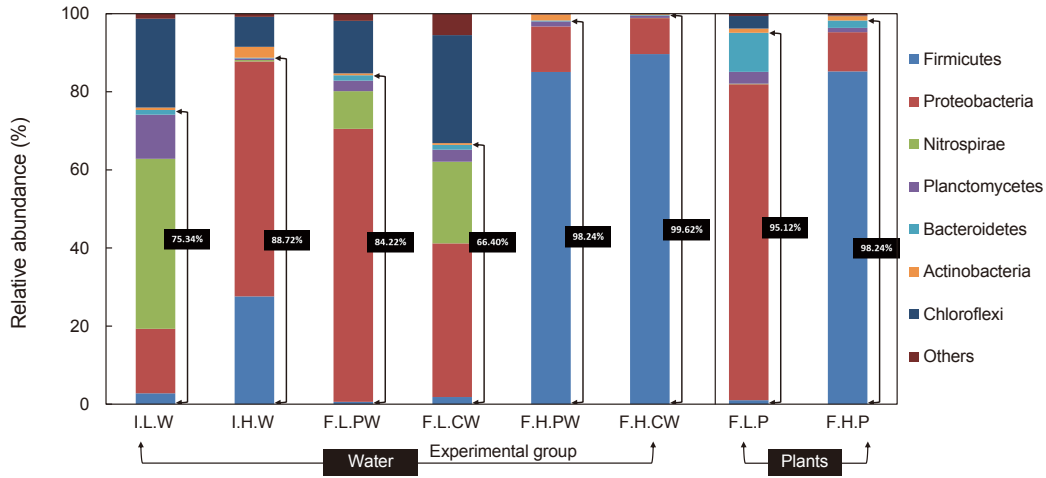


Fig. 1. Composition ratio at the phylum level through 16S rDNA metabarcoding analysis. I.L.W, Initial low concentration water (nitrate 203 mg/L); I.H.W, Initial high concentration water (nitrate 627 mg/L); F.L.PW, Final low concentration planted water; F.L.CW, Final low concentration control water; F.H.PW, Final high concentration planted water; F.H.CW, Final high concentration control water; F.L.P, Final low concentration plants; F.H.P, Final high concentration plants.

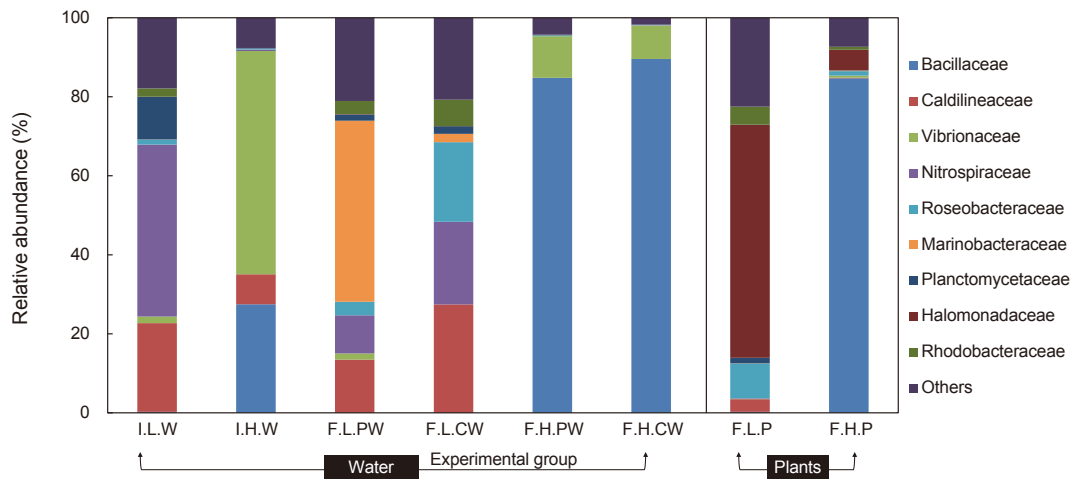


Fig. 2. Composition ratio at the family level through 16S rDNA metabarcoding analysis. I.L.W, Initial low concentration water (nitrate 203 mg/L); I.H.W, Initial high concentration water (nitrate 627 mg/L); F.L.PW, Final low concentration planted water; F.L.CW, Final low concentration control water; F.H.PW, Final high concentration planted water; F.H.CW, Final high concentration control water; F.L.P, Final low concentration plants; F.H.P, Final high concentration plants.

93.78%를 차지하였고, *Gammaproteobacteria* 내에서 98.94%에 달했다. 따라서, 유익균과 유해균이 혼합된 시점에서 phylum 단위로 해석을 실시하면 결과 도출에 오류가 발생할 것으로 판단되어 하위 분류 단계로 추가적인 분석을 실시하였다.

### Family 단위로 분석한 원핵생물 군집의 변화

Family 단위로 원핵생물 군집을 분석한 결과 저농도 실험구는 NOB인 *Nitrospira*가 43.5%를 차지하는 자가영양우세(chemoautotrophic dominant system)의 사육수였다. 해당 사육수

는 사육생물 입식 전 바이오플락 미생물군 중 doubling time이 80시간으로 증식속도가 가장 느린 NOB (Luo et al., 2020)를 고 밀도로 증식시키기 위해 사육수에  $\text{NaNO}_2$ 를 반복 투입한 사육수였다. 반면 고농도 실험구는 사육 생물을 90일 이상 사육하며 탄소원을 지속적으로 투입하고 있는 상태였으며, 바이오플락 사육수 내에서 HNAD로 분류되는 *Bacillus* (Genus: *Bacillus*)를 포함하는 *Bacillaceae*가 27.46%를 차지하였으며, HNAD 및 병원성 세균으로 구성된 *Vibrio*를 포함한 *Vibrionaceae*가 56.50%를 차지하는 타가영양우세(heterotrophic dominant

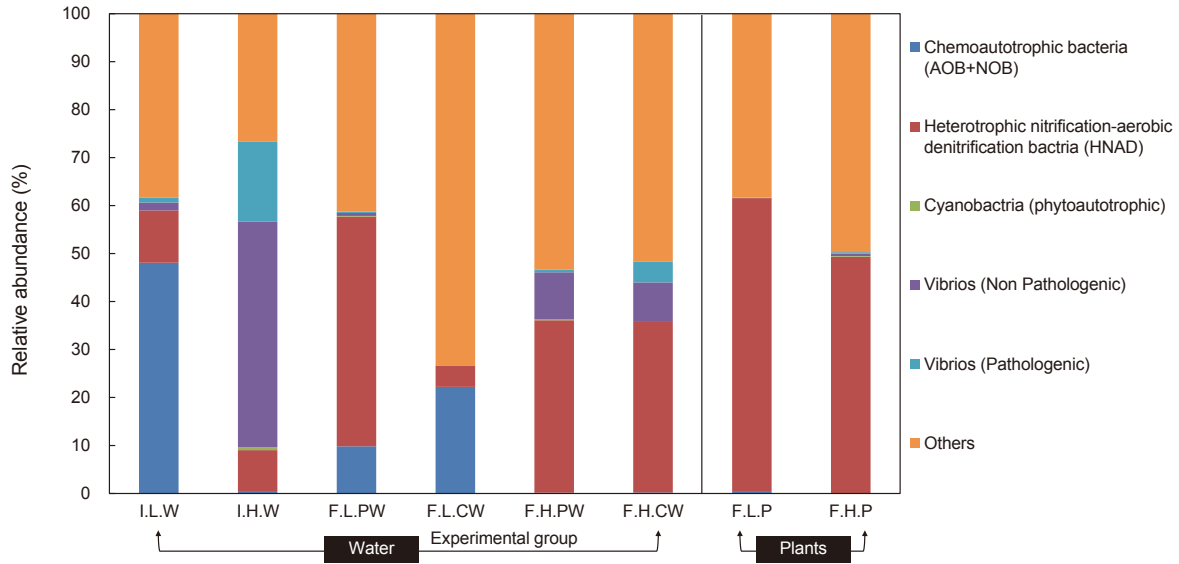


Fig. 3. Changes of bacterial community by function associated with biofloc. I.L.W, Initial low concentration ater (nitrate 203 mg/L); I.H.W, Initial high concentration water (nitrate 627 mg/L); F.L.PW, Final low concentration planted water; F.L.CW, Final low concentration control water; F.H.PW, Final high concentration planted water; F.H.CW, Final high concentration control water; F.L.P, Final low concentration plants; F.H.P, Final high concentration plants.

system)의 사육수였다(Fig. 2).

저농도 실험구에서 지체를 입식한 F.L.PW (final low concentration planted water)사육수는 *Nitrospira*가 33.89% 감소하여 9.65%로 크게 감소하였으나, HNAD이자, 병원성 *Vibrio*와 길항작용으로 양식시설에서 probiotics로 활용이 검토되고 있는 *Marinobacter* (Dou et al., 2022)가 45.80%로 우점종이 바뀐 것을 확인할 수 있었다. 대조구인 F.L.CW (final low concentration control water)에서 *Nitrospira*는 20.90%로 상대적으로 높은 비율을 유지하였으나 *Marinobacter*는 2.11%로 F.L.CW 와 F.L.PW간 큰 차이가 나타났다.

고농도 실험구에서는 초기 사육수인 I.H.W (initial high concentration water)에서 *Bacillaceae*가 84.79%, *Vibrionaceae*가 6.89%였으며, 종료 시점 대조구 사육수인 F.H.CW (final high concentration control water)에서는 각 89.57%, 0.08%로 F.H.PW (final high concentration planted water)와 F.H.CW 모두 종료 시점에 *Vibrionaceae*가 크게 줄고 *Bacillaceae*가 크게 늘어났다. 식물 조직의 우점종은 *Halomonadaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Bacillaceae*가 우점하였으며 이들 세균 종은 해양식물과 긍정적인 상호작용을 하는 HNAD로 알려져 있으며(Li et al., 2018), 기존의 연구 결과와 유사한 분포를 보였다.

Table 3. Changes in bacterial communities by type in low concentration water (nitrate 203 mg/L)

	Initial	Final			
		With halophytes		Control	
		Type of bacteria (%)	Change rate (%)	Type of bacteria (%)	Change rate (%)
AOB+NOB	48.55±3.61	9.84±2.60 <sup>a</sup>	38.71▲	22.22±3.00 <sup>b</sup>	26.33▲
HNAD+DB	11.02±3.68	48.02±6.89 <sup>b</sup>	37.01▽	4.36±0.37 <sup>a</sup>	6.66▲
<i>Cyanobacteria</i> (Phytoautotrophic)	0	0.13±0.03 <sup>b</sup>	0.13▽	0 <sup>a</sup>	0
<i>Vibrio</i> spp. (Non pathogenic)	0.69±0.30	0.37±0.07 <sup>b</sup>	0.32▲	0 <sup>a</sup>	1.68▲
<i>Vibrio</i> spp. (Pathogenic)	0.98±0.18	0.25±0.06 <sup>b</sup>	0.74▲	0 <sup>a</sup>	0.98▲
Others	38.75±6.55	41.38±3.7 <sup>a</sup>	2.63▽	73.43±4.85 <sup>b</sup>	34.67▽
Associated with the nitrogen cycle	59.57±7.28	58.00±9.52 <sup>b</sup>	1.57▲	26.57±3.37 <sup>a</sup>	32.99▲

AOB, Ammonia oxidizing bacteria; NOB, Nitrite oxidizing bacteria; HNAD, Heterotrophic nitrification aerobic denitrification bacteria; DB, Denitrification bacteria. Significant difference at P<0.05 using Student's t-test to compare between control and planted groups.

### 기능별로 분석한 원핵생물 군집의 변화

해양식물 입식에 따른 바이오플락 주요 미생물군의 변화를 확인하기 위하여 생물학적 분류와 별개로 기능별 7개 유형으로 분류하고, Genus, Species 단위로 세균을 Count하여 분석하였다(Fig. 3, Table 3, 4, 5, 6). 자가영양세균(chemoautotrophic bacteria)에서 AOB (ammonia oxidizing bacteria)는 *Nitrosomonas*, *Nitrospira*가 검출되었으며, NOB는 *Nitrococcus*, *Nitrospira*, *Nitrobacter*가 확인되었다.

HNAD 및 탈질 세균(denitrification bacteria)은 *Bacillus*, *Caldilinea*, *Clostridium*, *Flavobacterium*, *Hydrogenimonas*, *Paracoccus*, *Planctomyce taceae*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Rhodobacter*, *Marinobacter*, *Halomonas*가 확인되었다(Pang et al., 2016; Baskaran et al., 2020; Huang et al., 2021). 병원성 *Vibrio*로 *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. diabolus*, *V. antiquarius*, *V. vulnificus*가 확인되었으며(Amaro et al., 2015; Alaboudi et al., 2016; Cai et al., 2018), 비병원

성 *Vibrio*는 *V. chemaguriensis*, *V. hyugaensis*, *V. azureus*, *V. natriegens*, *V. agarivorans*, *V. mytili*, *V. hibernica*, *V. crosai*가 확인되었다(Darshane et al., 2012; Woods et al., 2020). *Vibrio* 외 병원성 세균으로 알려진 *Edwardsiella*, *Streptococcus*, *Flexibacter maritimus* 등은 발견되지 않았다.

유익균류의 증감을 확인하기 위해 자가영양세균, 타가영양세균, *Cyanobacteria*을 모두 더해 질소 순환 세균(associated with the nitrogen cycle)으로 분류하고 실험구별 변동을 확인하였다.

저농도 실험구에서 질소 순환 세균은 대조구인 F.L.CW에서는 32.99%가 줄어든 반면 실험구인 F.L.PW에서는 1.57%만큼 감소하여 유의적 차이(P<0.05)를 나타내었다. 병원성 *Vibrio*의 감소율은 각각 0.74%, 0.98%로 유의적 차이는 없었다. 고농도 실험구에서 질소 순환 세균의 변동은 실험구인 F.H.PW에서 24.87% 증가하였고(Table 5), 대조구인 F.H.CW 또한 25.95% 증가하여 유의적 차이는 없었다. 병원성 *Vibrio*의 감소율은 각각 19.60, 15.66%로 F.H.PW에서 유의적 차이(P<0.05)를 나타내었다.

Table 4. Changes in bacterial communities by type in low concentration plants (attached to halophytes, nitrate 203 mg/L)

	Type of bacteria (%)
AOB+NOB	0.50±0.13
HNAD+DB	61.08±2.94
<i>Cyanobacteria</i> (Phytoautotrophic)	0.06±0.03
<i>Vibrio</i> spp. (Non pathogenic)	0.04±0.01
<i>Vibrio</i> spp. (Pathogenic)	0.02±0.01
Others	38.30±4.37
Associated with the nitrogen cycle	61.64±3.10

AOB, Ammonia oxidizing bacteria; NOB, Nitrite oxidizing bacteria; HNAD, Heterotrophic nitrification aerobic denitrification bacteria; DB, Denitrification bacteria.

### 고 찰

해양식물을 이용한 양식시설의 생물적 환경정화는 저렴하고 친환경적이며, 생산된 해양식물을 활용할 수 있는 효율적인 처리기법이다(Kang et al., 2021). 그러나, 바이오플락 내 세균 군집의 구성은 조건 변화에 따라 크게 변동할 수 있으며(Luo et al., 2020), 해양식물 입식에 따른 내생 세균의 입식은 경쟁적 배타 작용에 의해 바이오플락 주요 기능 세균 군집에 영향을 줄 가능성이 있으나 이에 대한 연구는 부족하다. 따라서, 본 실험에서는 예비 실험을 통해 질산염 저감 효과를 확인한 지체를 저농도 바이오플락(질산염 203 mg/L), 고농도 바이오플락(질산염 627 mg/L)에 입식 후 바이오플락과 관련된 세균 및 병원성 세균의 변동을 확인하였다.

Table 5. Changes in bacterial communities by type in high concentration water (nitrate 627 mg/L)

	Initial	Final			
		With halophytes		Control	
		Type of bacteria (%)	Change rate (%)	Type of bacteria (%)	Change rate (%)
AOB+NOB	0.38±0.14	0.16±0.03 <sup>ns</sup>	0.22▲	0.21±0.01	0.17▲
HNAD+DB	10.48±1.41	36.14±4.44 <sup>ns</sup>	25.66▽	37.34±5.18	26.87▽
<i>Cyanobacteria</i> (Phytoautotrophic)	0.75±0.14	0.17±0.04 <sup>b</sup>	0.57▲	0 <sup>a</sup>	0.75▲
<i>Vibrio</i> spp. (Non pathogenic)	36.28±2.93	9.34±1.30 <sup>b</sup>	26.94▲	3.92±0.54 <sup>a</sup>	32.36▲
<i>Vibrio</i> spp. (Pathogenic)	20.14±2.70	0.54±0.08 <sup>a</sup>	19.60▲	4.48±0.08 <sup>b</sup>	15.66▲
Others	31.98±2.46	53.64±6.56 <sup>ns</sup>	21.67▽	54.04±3.69	22.07▽
Associated with the nitrogen cycle	11.60±1.70	36.47±4.43 <sup>ns</sup>	24.87▽	37.55±5.16	25.95▽

<sup>ns</sup>=nonsignificant. AOB, Ammonia oxidizing bacteria; NOB, Nitrite oxidizing bacteria; HNAD, Heterotrophic nitrification aerobic denitrification bacteria; DB, Denitrification bacteria. Significant difference at P<0.05 using Student's t-test to compare between control and planted groups.

저농도 실험구의 초기 질소 순환과 관련된 세균의 비율은 59.57%였으나 종료 시점에서 F.L.CW는 26.57%로 크게 줄었으며, 질소 순환과 관련 없는 기타 세균이 38.75%에서 73.43%로 크게 늘었다. 반면, F.L.PW는 질소 순환 세균이 58%로 상대적으로 높은 비중을 유지하였으며, *Nitrospira*와 같은 자가영양 세균이 38.71% 감소한 만큼 *Marinobacter*와 같은 타가영양 세균이 37.01% 증가한 것에 의한 것으로 판단된다. 바이오플락 세균의 군집 변화는 환경 변화에 따라 빠르게 변화하며(Kathia et al., 2017; Tabarrok et al., 2020), 투입되는 탄소:질소 비율에 따라 더욱 급격히 변할 수 있다(Deng et al., 2019). 실험 기간 중 아질산의 추가적인 공급이 없었던 만큼 우점종인 *Nitrospira*의 개체수는 줄어들었고, 미생물 사멸로 인해 늘어난 무기 질소는 추가적인 탄소원이 없었던 F.L.CW에서는 NOB로 다시 생성되어 상대적으로 높은 자가영양세균 비율을 유지할 수 있었던 것으로 추정되며, F.L.PW에서는 식물 대사에 의해 생성된 유기탄소로 인해 해양식물과 상호작용을 하는 타가영양세균인 *Marinobacter*의 개체수의 증가로 나타난 것으로 판단된다(Yuan et al., 2016)

*Vibrio*가 56.42%로 높은 비중을 차지하였던 고농도 실험구에서는 초기 질소 순환 관련 세균은 11.60%였으며, 비병원성 *Vibrio*는 36.28%, 병원성 *Vibrio*는 20.14%였다. 종료 시점에서 질소 관련 세균은 F.H.CW에서 36.47%, F.H.PW에서 37.55%로 F.H.CW에서 1.08% 높게 나타났으나 유의적 차이는 없었다. *Vibrio*는 F.H.PW에서 46.54% 감소하고 F.H.CW에서 48.01% 감소하여 양 실험구 모두 크게 줄어 유의적 차이는 없었으나, 병원성 *Vibrio*의 잔존율은 F.H.CW에서 4.48%, F.H.PW에서 0.54%로 F.H.CW가 3.94% 높아 유의적 차이(P<0.05)를 보였다. 비병원성 *Vibrio* 중 일부는 유용 HNAD와 유사한 대사 경로를 통해 유해 질소를 비롯한 유기물을 저장하며(Duan et al., 2015; Ren et al., 2021), 일부는 probiotics로 기능한다(Carraturo et al., 2006; Wood et al., 2020). 본 실험에서 비병원성 *Vibrio*는 HNAD로써 count하지 않았으나, 비병원성 *Vibrio* 또

한 바이오플락 군집에서 긍정적인 역할을 수행할 가능성이 있으며, F.H.PW의 비병원성 *Vibrio* 비율이 F.H.CW에 비해 높은 것 또한 긍정적인 요인으로 평가할 수 있을 것으로 판단된다.

식물 조직의 내생 세균 중 질소 순환 관련 세균은 저농도 실험구인 F.L.P (final low concentration plants)에서 61.64%였으며, 고농도인 F.H.P (final high concentration plants)에서 49.62%였다. 본 실험 중 종료 시점에서 크게 늘어난 HNAD는 해양식물과 공생 작용을 하는 것으로 알려진 *Halomonas*, *Marinobacter*, *Bacillus*였다. 위 HNAD는 병원성 *Vibrio*와 길항작용을 통해 probiotics로 기능하는 것으로 알려져 있으며(Zhang et al., 2009; Velmurugan et al., 2013; Carreira et al., 2018; Dou et al., 2022) 본 연구에서 유해균류는 줄어들고, 유익균류가 증가하는 것은 이와 같은 세균과 식물과의 상호작용으로 인한 긍정적인 효과라 판단된다.

현화식물의 뿌리는 다양한 기능을 수행하는 주요 기관으로, 광합성을 통해 생성한 산소와 유기물은 뿌리를 통해 지하로 전달되어 공생 세균에게 산소 및 유기탄소와 황화합물인 DMSP (dimethylsulfoniopropionate)등을 제공한다(Shieh and Yang, 1997; Aoki and McGlathery, 2018; Tarquinio et al., 2019). 공생세균은 유기물을 분해하여 해양식물에게 적합한 무기물의 형태로 제공하며, 경쟁 조류의 생장을 제한하는 agarase를 생성하고, 식물에게 독성으로 작용하는 황화물을 제거한다(Crump et al., 2018; Martin et al., 2018). 또한 식물 노화 및 성숙 호르몬인 ethylene의 전구체인 ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid)분해 효소를 생성하여 암모니아 및  $\alpha$ -ketobutyrate로 전환하여 조직 내 ethylene 감소를 통해 성장을 촉진하며, IAA (indole-3-acetic acid)생성을 통해 염분 내성을 증가시키는 등 긍정적인 상호작용을 수행한다(Li et al., 2018).

현대리새우 양식시설의 오염폐수 정화를 갯끈풀(*Spartina anglica*)을 이용한 인공습지와 biofilm, sedimentation 기법과 비교하였을 때 FAPROTAX pathway (functional annotation of prokaryotic taxa)를 통해 분석한 결과 chemheterotrophy, aerobic-chemoheterotrophy 및 denitrification 작용기의 발현은 다른 실험구 대비 염생식물 습지가 유의미하게 높았으며, canonical correspondence analysis를 통해 영양염류의 감소와 미생물 군집구조의 상관관계를 분석한 결과 사육수질의 개선은 염생식물 인공습지에서 가장 양호했다. 이는 본 실험에서의 결과와 유사한 공생세균과 염생식물 간의 긍정적인 상호작용으로 인한 결과로 판단된다(Nicholaus et al., 2021). BFT은 자체적으로 유해 질소를 저장하고, 병원균류의 유입을 차단하는 시스템이지만, 서론에 언급한 바와 같이 HNAD의 과도한 증가는 부유물의 증가 및 용존 산소의 감소를 일으킬 수 있으며(Kim et al., 2019), 자가영양세균의 비중이 너무 높은 경우 질산염이 과도하게 증가할 수 있다(Ebeling et al., 2006). 또한, 사육수 보충, 기구 사용 등의 과정 중에 병원균이 유입될 수 있으며(Park and Kim, 2021), 병원균이 유입될 경우 부영양화 상태인 바이오플

Table 6. Changes in bacterial communities by type in low concentration plants (attached to halophytes, nitrate 627 mg/L)

	Type of bacteria (%)
AOB+NOB	0
HNAD+DB	49.49±7.42
<i>Cyanobacteria</i> (Phytoautotrophic)	0.14±0.04
<i>Vibrio</i> spp. (Non pathogenic)	0.21±0.01
<i>Vibrio</i> spp. (Pathogenic)	0.31±0.04
Others	49.85±8.34
Associated with the nitrogen cycle	49.62±7.47

AOB, Ammonia oxidizing bacteria; NOB, Nitrite oxidizing bacteria; HNAD, Heterotrophic nitrification aerobic denitrification bacteria; DB, Denitrification bacteria.

락 사육수는 병원성 세균이 빠르게 전파될 수 있다(da Silva et al., 2021). 따라서 유해 질소를 저감을 보조할 뿐 아니라 유익 균류와 공생 작용을 하여 유익균류에 의한 우점 상태를 가능하게 하는 해양식물에 의한 바이오플락 사육수 생물 정화 기술은 BFT의 단점을 보완할 수 있을 것으로 기대된다.

본 실험에서 해양식물 입식에 따른 바이오플락 세균 군집의 변동을 확인한 결과 질소 저감을 수행하거나, probiotics로써 작용하는 유익균은 증가하는 경향을 보였고 병원성 *Vibrio*는 감소하는 경향을 보여 해양식물 입식이 바이오플락 환경 내에 긍정적인 영향을 나타낼 가능성이 있을 것으로 판단된다. 본 연구는 양식생물이 입식 되지 않은 사육수를 이용한 결과로, 향후 양식생물이 입식된 사육수에 적용한 연구가 수행되어야 한다.

## 사 사

이 논문은 2022년 국립수산물과학원 ‘바이오플락을 이용한 해수양식 기술개발(대하, 넙치)(R2022014)’의 지원으로 수행된 연구입니다.

## References

- Abakari G, Luo G and Kombat EO. 2020. Dynamics of nitrogenous compounds and their control in biofloc technology (BFT) systems: A review. *Aquac Fish* 6, 441-447. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2020.05.005>.
- Alaboudi AR., Ababneh M, Osaili TM and Shloul KA. 2016. Detection, identification, and prevalence of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in fish and coastal environment in Jordan. *J Food Sci* 81, M130-M134. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13151>.
- Amaro C, Sanjuán E, Fouz B, Pajuelo D, Lee, CT, Hor LI and Barrera R. 2015. The fish pathogen *Vibrio vulnificus* biotype 2: Epidemiology, phylogeny, and virulence factors involved in warm-water vibriosis. *Microbiol Spectrum* 3, 1-23. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ve-0005-2014>.
- Aoki LR and McGlathery KJ. 2018. Restoration enhances denitrification and DNRA in subsurface sediments of *Zostera marina* seagrass meadows. *Mar Ecol Prog Ser* 602, 87-102. <https://doi.org/10.3354/meps12678>.
- Baskaran V, Patil PK, Antony ML, Avunj S, Nagaraju VT, Ghate SD and Vijayan KK. 2020. Microbial community profiling of ammonia and nitrite oxidizing bacterial enrichments from brackishwater ecosystems for mitigating nitrogen species. *Sci Rep* 10, 5201. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62183-9>.
- Boestfleisch C and Papenbrock J. 2017. Changes in secondary metabolites in the halophytic putative crop species *Crithmum maritimum* L., *Triglochin maritima* L. and *Halimione portulacoides* (L.) Aellen as reaction to mild salinity. *PLoS One* 12, e0176303. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176303>.
- Brito LO, Chagas AM, da Silva EP, Soares RB, Severi W and Gálvez AO. 2016. Water quality, *Vibrio* density and growth of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) in an integrated biofloc system with red seaweed *Gracilaria birdiae* (G reville). *Aquacult. Res* 47, 940-950. <https://doi.org/10.1111/are.12552>.
- Cai S, Cheng H, Pang, H, Jian J and Wu Z. 2018. AcfA is an essential regulator for pathogenesis of fish pathogen *Vibrio alginolyticus*. *Vet Microbiol* 213, 35-41. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.11.016>.
- Carraturo A, Raieta K, Ottaviani D and Russo GL. 2006. Inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* by a bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) produced by *Vibrio mediterranei* 1. *J Appl Microbiol* 101, 234-241. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02909.x>.
- Carreira C, Mestre O, Nunes RF, Moura I and Pauleta, SR. 2018. Genomic organization, gene expression and activity profile of *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* denitrification enzymes. *PeerJ* 6, e5603. <https://doi.org/10.7287/peerj.5603v0.1/reviews/2>.
- Cho JH, Kim SR, Hur YB, Lee KM and Kim JH. 2020. Tolerance limit of nitrite exposure to hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*♀× *E. lanceolatus*♂): Hematological parameters and plasma components. *Korean J Environ Biol* 38, 93-100. <https://doi.org/10.11626/kjeb.2020.38.1.093>.
- Cho YR, Kim BR and Jang IK. 2010. Super-intensive culture of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), in HDPE-lined ponds with no water exchange. *Korean J Fish Aquat Sci* 43, 331-339. <https://doi.org/10.5657/kfas.2010.43.4.331>.
- Crump BC, Wojahn JM, Tomas F and Mueller RS. 2018. Metatranscriptomics and amplicon sequencing reveal mutualisms in seagrass microbiomes. *Front Microbiol* 9, 388. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00388>.
- da Silva AEM, Brito LO, da Silva DA, de Lima PCM, da Silva Farias R, Galvez AO and da Silva SMBC. 2021. Effect of *Brachionus plicatilis* and *Navicula* sp. on Pacific white shrimp growth performance, *Vibrio*, immunological responses and resistance to white spot virus (WSSV) in nursery biofloc system. *Aquaculture* 535, 736335. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736335>.
- Darshanee Ruwandeepika HA, Sanjeewa Prasad Jayaweera T, Paban Bhowmick P, Karunasagar I, Bossier P and Defoirdt T. 2012. Pathogenesis, virulence factors and virulence regulation of vibrios belonging to the *Harveyi* clade. *Rev Aquac* 4, 59-74. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2012.01061.x>.
- Deng Y, Xu X, Yin X, Lu H, Chen G, Yu J and Ruan Y. 2019. Effect of stock density on the microbial community in biofloc water and Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) gut microbiota. *Appl Microbiol Biotechnol* 103, 4241-4252. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09773-4>.



- Dou L, Zhang M, Pan L, Liu L and Su Z. 2022. Sulfide removal characteristics, pathways and potential application of a novel chemolithotrophic sulfide-oxidizing strain, *Marinobacter* sp. SDSWS8. *Environ Res* 212, 113176. <https://doi.org/10.2139/ssrn.3973723>.
- Duan J, Fang H, Su B, Chen J and Lin J. 2015. Characterization of a halophilic heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium and its application on treatment of saline wastewater. *Bioresour Technol* 179, 421-428. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.057>.
- Ebeling JM, Timmons MB and Bisogni JJ. 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture* 257, 346-358. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.019>.
- Hargreaves JA. 2013. Biofloc Production Systems for Aquaculture. SRAC Publication No. 4503, Southern Regional Aquaculture Center, Stoneville, MS, U.S.A., 1-12.
- Huang HH, Li CY, Lei YJ, Kuang WQ, Zou WS and Yang PH. 2022. Bacterial composition and inferring function profiles in the biofloc system rearing *Litopenaeus vannamei* post-larvae at a low salinity. *bioRxiv* 2022, 474705. <https://doi.org/10.1101/2022.01.01.474705>.
- Huang HH, Luo T, Lei YJ, Kuang WQ, Zou WS and Yang PH. 2021. Water quality, shrimp growth performance and bacterial community in a reusing-water biofloc system for nursery of *Penaeus vananmei* rearing under a low salinity condition. *Aquac Rep* 21, 100894. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100894>.
- Jeong JW. 2020. Effect of halophyte extracts on skin moisturization and barrier function. M.S. Thesis, National university of Incheon, Incheon, Korea.
- Kathia CM, del Carmen MDM, Aida HP, Jorge CM and Daniel BC. 2017. Probiotics used in biofloc system for fish and crustacean culture: A review. *Int J Fish Aquat Sci* 5, 120-125.
- Kang YH, Kim S, Choi SK, Lee HJ, Chung IK and Park SR. 2021. A comparison of the bioremediation potential of five seaweed species in an integrated fish-seaweed aquaculture system: Implication for a multi-species seaweed culture. *Rev Aquac* 13, 353-364. <https://doi.org/10.1111/raq.12478>.
- Kim SR, Jang JW, Kim BJ, Jang IK, Lim HJ and Kim SK. 2019. Urban aquaculture of catfish, *Silurus asotus*, using biofloc and aquaponics systems. *Korean J Environ Biol* 37, 545-553. <https://doi.org/10.11626/kjeb.2019.37.4.545>.
- Kim SK, Shim NY, Jang JW, Jun JC, Kim SK and Shin YK. 2017. Effect of acclimation methods on physiological status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae to low salinities. *Korean J Environ Biol* 35, 6-12. <https://doi.org/10.11626/kjeb.2017.35.1.006>.
- Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M and Glöckner FO. 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* 41, e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>.
- KMA (Korea Meteorological Administration). 2020. Abnormal Climate Report. KMA, Seoul, Korea, 1-190.
- Kuhn DD, Smith SA, Boardman GD, Angier MW, Marsh L and Flick Jr GJ. 2010. Chronic toxicity of nitrate to Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: Impacts on survival, growth, antennae length, and pathology. *Aquaculture* 309, 109-114. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.09.014>.
- Lee YK. 2018. Isolation and structural analysis of bioactive compounds from two west coast halophyte species. M.S. Thesis, National university of Kunsan, Kunsan, Korea.
- Li Y, Kong Y, Teng D, Zhang X, He X, Zhang Y and Lv G. 2018. Rhizobacterial communities of five co-occurring desert halophytes. *PeerJ* 6, e5508. <https://doi.org/10.7287/peerj.5508v0.1/reviews/3>.
- Luo G, Xu J and Meng H. 2020. Nitrate accumulation in biofloc aquaculture systems. *Aquaculture* 520, 734675. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734675>.
- Martin BC, Gleeson D, Statton J, Siebers AR, Grierson P, Ryan MH and Kendrick GA. 2018. Low light availability alters root exudation and reduces putative beneficial microorganisms in seagrass roots. *Front Microbiol* 8, 2667. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02667>.
- Mook WT, Chakrabarti MH, Aroua MK, Khan GMA, Ali BS, Islam MS and Hassan MA. 2012. Removal of total ammonia nitrogen (TAN), nitrate and total organic carbon (TOC) from aquaculture wastewater using electrochemical technology: A review. *Desalination* 285, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.09.029>.
- Nicholaus R, Lukwambe B, Yang W and Zheng Z. 2021. The relationship between benthic nutrient fluxes and bacterial community in Aquaculture tail-water treatment systems. *bioRxiv* 2021, 456883. <https://doi.org/10.1101/2021.08.18.456883>.
- NIFS (National Institute of Fisheries Science). 2016. Standard Manual of Olive Flounder Culture. NIFS, Busan, Korea.
- NIFS (National Institute of Fisheries Science). 2019. Technical Manual for the Mullet Culture. NIFS, Busan, Korea.
- NIFS (National Institute of Fisheries Science). 2020. Technical Manual for the Sea Bream Aquaculture. NIFS, Busan, Korea.
- Park JJ and Kim S. 2021. Effect of antibiotics treatment for edwardsiellosis of olive flounder *Paralichthys olivaceus* in biofloc environment. *J Fish Pathol* 34, 225-231. <https://doi.org/10.7847/jfp.2021.34.2.225>.
- Panigrahi A, Das RR Sivakumar MR, Saravanan A, Saranya C, Sudheer NS and Gopikrishna G. 2020. Bio-augmentation of heterotrophic bacteria in biofloc system improves growth, survival, and immunity of Indian white shrimp *Penaeus indicus*. *Fish Shellfish Immunol* 98, 477-487. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.01.021>.

- Pang S, Zhang S, Lv X, Han B, Liu K, Qiu C and He Z. 2016. Characterization of bacterial community in biofilm and sediments of wetlands dominated by aquatic macrophytes. *Ecol Eng* 97, 242-250. <https://doi.org/10.1016/j.ecoeng.2016.10.011>.
- Ray AJ, Dillon KS and Lotz JM. 2011. Water quality dynamics and shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production in intensive, mesohaline culture systems with two levels of biofloc management. *Aquac Eng* 45, 127-136. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2011.09.001>.
- Ray AJ and Lotz JM. 2014. Comparing a chemoautotrophic-based biofloc system and three heterotrophic-based systems receiving different carbohydrate sources. *Aquac Eng* 63, 54-61. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2014.10.001>.
- Ren J, Ma H, Liu Y, Ruan Y, Wei C, Song J and Han R. 2021. Characterization of a novel marine aerobic denitrifier *Vibrio* spp. AD2 for efficient nitrate reduction without nitrite accumulation. *Environ Sci Pollut Res* 28, 30807-30820. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12673-8>.
- Schweitzer R, Arantes R, Costódio PFS, do Espírito Santo CM, Arana LV, Seiffert WQ and Andreatta ER. 2013. Effect of different biofloc levels on microbial activity, water quality and performance of *Litopenaeus vannamei* in a tank system operated with no water exchange. *Aquac Eng* 56, 59-70. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2013.04.006>.
- Shin SK, Kim SK, Kim JH, Han T, Yarish C and Kim JK. 2020. Effects of stocking density on the productivity and nutrient removal of *Agarophyton vermiculophyllum* in *Paralichthys olivaceus* biofloc effluent. *J Appl Phycol* 32, 2605-2614. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-02014-1>.
- Shieh WY and Yang JT. 1997. Denitrification in the rhizosphere of the two seagrasses *Thalassia hemprichii* (Ehrenb.) Aschers and *Halodule uninervis* (Forsk.) Aschers. *J Exp Mar Biol Ecol* 218, 229-241. [https://doi.org/10.1016/s0022-0981\(97\)00076-2](https://doi.org/10.1016/s0022-0981(97)00076-2).
- Tabarrok M, Seyfabadi J, Salehi Jouzani G and Younesi H. 2020. Comparison between recirculating aquaculture and biofloc systems for rearing juvenile common carp (*Cyprinus carpio*): Growth performance, haemato-immunological indices, water quality and microbial communities. *Aquac Res* 51, 4881-4892. <https://doi.org/10.1111/are.14817>.
- Tarquinio F, Hyndes GA, Laverock B, Koenders A and Säwström C. 2019. The seagrass holobiont: Understanding seagrass-bacteria interactions and their role in seagrass ecosystem functioning. *FEMS Microbiol Lett* 366, fnz057. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz057>.
- Valencia-Castañeda G, Frías-Espericueta MG, Vanegas-Pérez RC, Chávez-Sánchez MC and Páez-Osuna F. 2020. Physiological changes in the hemolymph of juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* to sublethal nitrite and nitrate stress in low-salinity waters. *Environ Toxicol Pharmacol* 80, 103472. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103472>.
- Valencia-Castañeda G, Frías-Espericueta MG, Vanegas-Pérez RC, Pérez-Ramírez JA, Chávez-Sánchez MC and Páez-Osuna F. 2018. Acute toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to shrimp *Litopenaeus vannamei* postlarvae in low-salinity water. *Bull Environ Contam Toxicol* 101, 229-234. <https://doi.org/10.1007/s00128-018-2355-z>.
- Velmurugan S, Raman K, Viji VT, Donio MBS, Jenifer JA, Babu MM and Citarasu T. 2013. Screening and characterization of antimicrobial secondary metabolites from *Halomonas salifodinae* MPM-TC and its *in vivo* antiviral influence on Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus* against WSSV challenge. *J King Saud Univ Sci* 25, 181-190. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.03.002>.
- Vijayan A, Vattiringal Jayadrathan RK, Pillai D, Prasanna Geetha P, Joseph V and Isaac Sarojini BS. 2021. *Nitrospira* as versatile nitrifiers: Taxonomy, ecophysiology, genome characteristics, growth, and metabolic diversity. *J Basic Microbiol* 61, 88-109. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000485>.
- Woods DF, Kozak IM and O'Gara F. 2020. Microbiome and functional analysis of a traditional food process: Isolation of a novel species (*Vibrio hibernica*) with industrial potential. *Front Microbiol* 11, 647. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00647>.
- Yuan Z, Druzhinina IS, Labbé J, Redman R, Qin Y, Rodriguez R and Lin F. 2016. Specialized microbiome of a halophyte and its role in helping non-host plants to withstand salinity. *Sci Rep* 6, 32467. <https://doi.org/10.1038/srep32467>.
- Yu J, Xiao Y, Wang Y, Xu S, Zhou L, Li J and Li X. 2021. Chronic nitrate exposure cause alteration of blood physiological parameters, redox status and apoptosis of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Environ Pollut* 283, 117103. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117103>.
- Zhang L, Mai K, Tan B, Ai Q, Qi C, Xu W and Ma H. 2009. Effects of dietary administration of probiotic *Halomonas* sp. B12 on the intestinal microflora, immunological parameters, and midgut histological structure of shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *J World Aquac Soc* 40, 58-66. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2008.00235.x>.
- Zhao Z, Xu Q, Luo L, Li J and Wang L. 2014. Effect of feed C/N ratio promoted bioflocs on water quality and production performance of bottom and filter feeder carp in minimum-water exchanged pond polyculture system. *Aquaculture* 434, 442-448. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.006>.