

文章编号: 1674-5566(2019)02-0257-10

DOI:10.12024/jsou.20180202222

碳源添加方式对海水生物絮凝系统启动效率的影响

柳泽锋¹, 罗国芝^{1,2,3}, 谭洪新^{1,2,3}, 蒙浩焱¹

(1. 上海海洋大学 上海水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306; 3. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

摘要:合理地添加碳源有利于生物絮凝系统的构建。为快速完成海水生物絮凝系统启动,在盐度为 30 的生物絮凝系统启动阶段探究了 3 种添加碳源(葡萄糖)方式对启动效率的影响。第一种在实验初始时一次性添加葡萄糖到生物絮凝系统中,使碳与总氮质量比达到 15 以上;第二种在系统运行的第 1~10 天,每天加入 A 组所添加葡萄糖总量的 10%,此后若氨氮(TAN)上升至 1 mg/L 以上,则按照 C/TAN 为 6 来添加葡萄糖;第三种每天按照 C/TAN 为 6 来添加葡萄糖。结果显示:3 个处理组的氨氮在实验期间总体上处于较低水平,亚硝酸氮和硝酸氮均有明显积累,但在系统运行第 59 天时降至最低水平。3 组系统中絮体的胞外聚合物和粗蛋白等营养指标均呈现下降趋势。利用高通量测序技术对生物絮体的细菌群落结构进行分析,检测结果表明:3 组生物絮体的主要优势菌群都属于变形菌门(Proteobacteria),持续添加碳源能够丰富生物絮凝系统中微生物种类。实验进行第 55 天时,3 个处理组的生物絮凝系统启动完成。实验表明:在启动初始阶段以 DOC/TN 为 15 的比例添加葡萄糖及在系统运行期间按 DOC/TAN 为 6 的比例添加葡萄糖能够更好地形成生物絮凝系统。

关键词:生物絮凝养殖系统;碳氮比;碳源添加方式;胞外聚合物;细菌群落

中图分类号: S 912 **文献标志码:** A

生物絮凝技术(bioflocs technology, BFT)通过添加有机碳源的方式调节养殖水体碳氮比(C/N),促进异养细菌的优势生长,利用养殖水体中的粪便、残饵重新形成生物絮体,从而达到提高饲料蛋白的利用率和净化养殖水环境的目的^[1]。在生物絮凝养殖系统的情况下,C/N > 20 是絮体形成的最佳条件^[2]。一般地,粗蛋白含量为 30%~35%的饲料中 C/N 约为 9~10^[3],达不到异养同化氨氮的需求。需要额外添加有机碳源来促进水体中异养细菌的大量繁殖。

在新的生物絮凝养殖系统中,异养同化细菌和自养硝化细菌的生长以及生物絮体的形成通常需要几周时间来完成^[3]。众多研究^[4-6]表明,高盐度水体 BFT 系统的构建时间通常比淡水 BFT 系统的构建时间要长,并且在构建过程中,常常会伴随氨氮(TAN)和亚硝酸氮(NO₂⁻-N)的积累。除此之外,微生物的大量生长及絮体的形

成会导致水体浑浊,在碳源大量添加时导致水体溶解氧急剧降低,这些都给养殖对象带来负面影响^[7]。新的生物絮凝系统需构建稳定的微生物群落,这决定了生物絮凝系统的运行效率,并且能够防止养殖对象因水质不稳而产生的应激^[8]。但较长的生物絮凝系统启动时间不利于实际生产,因此需要探究出快速构建生物絮凝养殖系统的方法。

碳源的添加对生物絮凝系统中微生物群落的构建至关重要^[9],如何添加碳源影响着生物絮凝系统的形成以及转化氮素的途径。KRUMMENAUER 等^[10]在利用生物絮凝技术养殖凡纳滨对虾过程中,按水体中每产生 1 g TAN 添加 6 g C 的比例添加糖蜜能够有效降低水体中的 TAN 和 NO₂⁻-N。这说明合理的碳源添加方式能够促使生物絮凝系统更有效率地去除水体中有害氮素。通过调控碳源的添加方式,或许能够成

收稿日期: 2018-02-09 修回日期: 2018-08-16

基金项目: 上海水产养殖工程技术研究中心项目(16DZ2281200)

作者简介: 柳泽锋(1992—),男,硕士研究生,研究方向为水产养殖用水循环利用。E-mail: M150101068@st.shou.edu.cn

通信作者: 罗国芝, E-mail: gzluo@shou.edu.cn

为快速稳定水质,缩短生物絮凝启动时间的有效方法。

本实验在海水生物絮凝养殖系统启动阶段,以葡萄糖作为碳源,在前人研究的基础上总结了3种不同的添加方式,旨在探究不同添加碳源方式对海水生物絮凝系统启动效率的影响,从而总结出能够缩短启动时间的碳源添加方式。

1 材料与方 法

1.1 实验装置及材料

本实验在上海海洋大学循环水养殖工程研发平台内的养殖水槽(图1)中进行,容器上部为圆柱体,下部为圆锥体,直径110 cm,锥体高38 cm,总高度110 cm,其工作体积为500 L,共9个。用于培养生物絮凝系统的原料为凡纳滨对虾饲料(常熟泉兴营养添加剂有限公司,江苏),其主要成分:粗蛋白 $\geq 42\%$,粗纤维 $\leq 12\%$,粗脂肪 $\geq 4\%$,粗灰分 $\leq 18\%$,赖氨酸 $\geq 2.2\%$,水分 $\leq 12\%$,钙 $\leq 5\%$,总磷 $\geq 1.0\%$ (数据由厂家提供)。添加食品级葡萄糖(古阜丰生物科技有限公司,内蒙古)调节C/N。

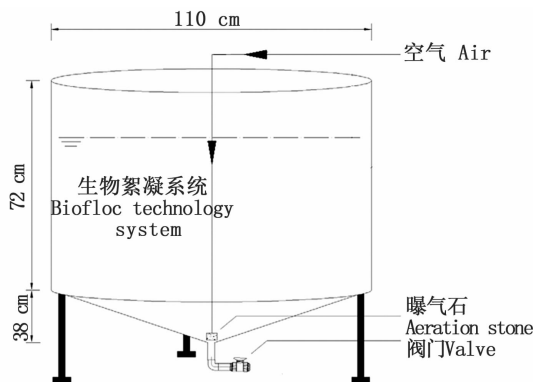


图1 生物絮凝系统养殖水槽的示意图

Fig.1 Schematic diagram of the culture tanks with bioflocs technology

1.2 实验设计

实验开始前在9个养殖水槽中各蓄盐度为30的海水500 L,分别投入500 g磨碎后的对虾饲料(此后不再添加),初始总固体悬浮颗粒物(total suspended solids, TSS)为1 000 mg/L。通过添加 NaHCO_3 调控碱度保持在100 mg CaCO_3/L 。实验期间除了补充因蒸发而损失的水分,不换水。1台750 W罗茨鼓风机供氧,采用间歇式曝气方式(曝气8 h停止16 h)将系统进行闷曝72 h

后开始添加碳源^[11]。

按照不同的碳源添加策略将9个水槽分为A、B、C组,每组3个平行。A组添加策略为实验开始时一次性投入足够的葡萄糖,使系统中C/TN(系统中的总氮)为15。B组添加策略为系统运行的第1~10天每天加入A组所添加葡萄糖总量的10%,此后若氨氮(TAN)上升至1 mg/L以上,则按照C/TAN为6来添加碳源。C组添加策略为每天按照C/TAN为6来添加葡萄糖。

1.3 实验指标与测定方法

1.3.1 水质指标的测定

每隔1 d检测水体的温度(T)、pH、溶解氧(DO)、氧化还原电位(ORP)(WTW Multi 3430,德国),并测定总氮(TN)、氨氮(TAN)、亚硝酸氮(NO_2^- -N)、硝酸氮(NO_3^- -N)和溶解性有机碳(dissolved organic carbon, DOC)。TN采用过硫酸钾氧化—紫外分光光度法(型号UV 2000,上海尤尼柯)测定。水样经0.45 μm 滤膜抽滤后测定三态氮及DOC。 NO_2^- -N含量采用重氮-偶氮法测定, NO_3^- -N含量采用锌隔还原法测定,TAN含量测定采用次溴酸钠氧化法,DOC含量使用多功能C/N分析仪(Multi N/C 2100,德国)测定。每周测1次碱度(酸碱滴定指示法)。

1.3.2 絮体成分指标的测定

每7 d进行生物絮体指标测定。TSS采用沉重法测定,5 min内絮体沉降体积(floc volume, FV)使用英霍夫式锥形管取1 L水样静置5 min后读数。絮体经65 $^{\circ}\text{C}$ 烘干后使用碳元氮素分析仪测定粗蛋白。胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)采用超声波破碎法提取;EPS中多糖采用蒽酮-硫酸比色法测定(标准物为葡萄糖),蛋白质(标准物为牛血清蛋白)和腐殖质(标准物为腐殖酸)采用改良型Lowry法测定(试剂盒购自南京建成生物公司)。

1.3.3 生物絮体微生物样品的采集与测序

系统运行第60天时,分别在各个处理组取50 mL水样,于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,实验结束后送至上海安诺优达生物科技有限公司进行高通量测序。

使用E. Z. N. A. Soil DNA Kit(Omega,美国)试剂盒对各处理组样品进行DNA提取;1%的琼脂糖电泳检测DNA样品是否有降解以及杂质;NanoPhotometer分光光度计检测样品纯度;

Qubit 2.0 Fluorometer 检测 DNA 样品浓度。取用 10 ng 的 DNA 模板,对目的区域进行扩增:根据测序区域的不同,选择对应区域的扩增引物:V3 区引物为 338F-533R, V3 + V4 区引物为 341F-805R, V6 区引物为 967F-1046R;使用 TaKaRa 的 EXTaq 酶,确保扩增效率和准确性。继而对扩增出的目的片段进行富集,同时加入特异 index 序列。文库构建完成后,先使用 Qubit 2.0 进行初步定量,稀释文库至 1 ng/ μ L,随后使用 Agilent 2100 对文库的 insert size 进行检测,insert size 符合预期后,使用 Bio-RAD CFX 96 荧光定量 PCR 仪, Bio-RAD KIT iQ SYBR GRN 进行 QPCR,对文库的有效浓度进行准确定量,以保证文库质量。检测合格的文库后,采用 Miseq 进行测序,测序策略为 PE250。

1.4 数据分析

实验数据采用 Excel 软件进行结果统计,由

Origin 软件进行相关图表的绘制。实验数值用平均值 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 形式表示,采用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行 ANOVA 单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异性显著。

2 结果

2.1 氨氮、亚硝酸氮和硝酸氮的动态变化

实验期间,pH、DO、T、ORP 等水质指标如表 1 所示,各组水温(T)为 22 ~ 30 $^{\circ}$ C。A 组 pH 和 DO 在实验第 3 天到第 5 天时低至 4.4 和 2.8 mg/L 左右,之后 A 组与其余 2 个处理组 pH 均在 7.1 ~ 8.6 波动,组间差异不显著($P > 0.05$)。各组溶解氧(DO)为 6 ~ 8 mg/L。pH 和 DO 均无明显变化规律。3 个处理组的碱度均维持在 100 mg/L 以上,A 组和 B 组碱度最高均至 250 mg/L 左右,C 组碱度最高至 194.3 mg/L,显著低于前两组($P < 0.05$)。

表 1 实验期间 3 个处理组中各水质指标的平均值、最小值和最大值

Tab. 1 Mean, min and max values of the important water quality parameters in the 3 different biofloc treatment groups during the experimental period ($n = 3; \bar{x} \pm SD$)

指标 Index	平均值、最小值与最大值 Means, min and max	处理组 Treatment		
		A 组 Group A	B 组 Group B	C 组 Group B
pH	平均值	8.0 \pm 0.3 ^a	7.8 \pm 0.2 ^a	7.9 \pm 0.3 ^a
	最小值,最大值	4.4, 8.6	7.4, 8.2	6.7, 8.5
溶解氧 DO/(mg/L)	平均值	7.6 \pm 0.5 ^a	8.1 \pm 1.0 ^a	7.8 \pm 0.3 ^a
	最小值,最大值	2.8, 8.3	6.0, 8.2	4.9, 8.4
温度 T/ $^{\circ}$ C	平均值	26.3 \pm 1.3 ^a	26.8 \pm 1.5 ^a	26.6 \pm 1.5 ^a
	最小值,最大值	22.3, 28.4	23.6, 29.8	23.5, 29.8
氧化还原电位 ORP/mV	平均值	143.9 \pm 24.2 ^a	159.3 \pm 17.8 ^b	158.9 \pm 20.5 ^b
	最小值,最大值	84.3, 201.1	101.2, 231.5	106.0, 221.6
亚硝酸氮 NO ₂ ⁻ -N/(mg/L)	平均值	10.2 \pm 0.7 ^a	8.5 \pm 1.7 ^b	10.6 \pm 1.5 ^a
	最小值,最大值	0.02, 33.9	0.0, 33.3	0.0, 33.6
总氨 TAN/(mg/L)	平均值	0.9 \pm 0.1 ^a	2.3 \pm 0.4 ^b	1.1 \pm 0.1 ^a
	最小值,最大值	0.0, 5.0	0.0, 16.4	0.0, 5.7
硝酸氮 NO ₃ ⁻ -N/(mg/L)	平均值	14.1 \pm 2.3 ^a	8.3 \pm 0.5 ^a	5.9 \pm 1.4 ^a
	最小值,最大值	0.0, 21.8	0.0, 34.7	0.0, 34.9
总氮 TN/(mg/L)	平均值	48.4 \pm 2.6 ^a	51.7 \pm 2.5 ^a	48.0 \pm 0.9 ^a
	最小值,最大值	28.3, 72.4	32.0, 68.4	24.8, 71.6
溶解性有机碳 DOC/(mg/L)	平均值	64.9 \pm 5.5 ^a	33.7 \pm 2.3 ^b	23.9 \pm 1.2 ^c
	最小值,最大值	12.9, 935.5	9.7, 182.3	8.4, 75.0
碱度 Alk/(mg/L CaCO ₃)	平均值	160.0 \pm 4.0 ^a	152.6 \pm 9.5 ^a	160.5 \pm 5.1 ^a
	最小值,最大值	108.5, 252.1	117.4, 252.6	120.0, 194.3

注:同行数据不同小写字母表示组间存在显著差异($P < 0.05$)

Notes: Values in the same row with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$)

如图 2 所示,整个实验期间一次性添加碳源的处理组(A)和每天添加碳源的处理组(C)的 TAN 浓度都维持在较低水平,并且都在第 25 天

时达到峰值(5.01 \pm 0.09) mg/L 和(5.69 \pm 0.06) mg/L。均匀添加碳源的处理组 B 的 TAN 浓度在第 31 天时达到峰值(16.36 \pm 3.02) mg/L

L, 显著高于 A 组和 C 组 ($P < 0.05$)。A 组和 B 组的 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 在第 41 天时达到峰值, 分别是 $(33.08 \pm 5.28) \text{ mg/L}$ 和 $(28.17 \pm 5.61) \text{ mg/L}$ 。C 组 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 在第 31 天达到峰值 $(33.58 \pm 1.44) \text{ mg/L}$, 明显早于其他两组。但是 3 个处理组的

$\text{NO}_2^- \text{-N}$ 均都在第 55 天时降至最低水平。3 个处理组的 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 在系统运行的第 25 天开始积累, 上升至 20 mg/L 左右后起伏不定, 在第 50 至 60 天内降至较低水平 (5 mg/L 以下)。

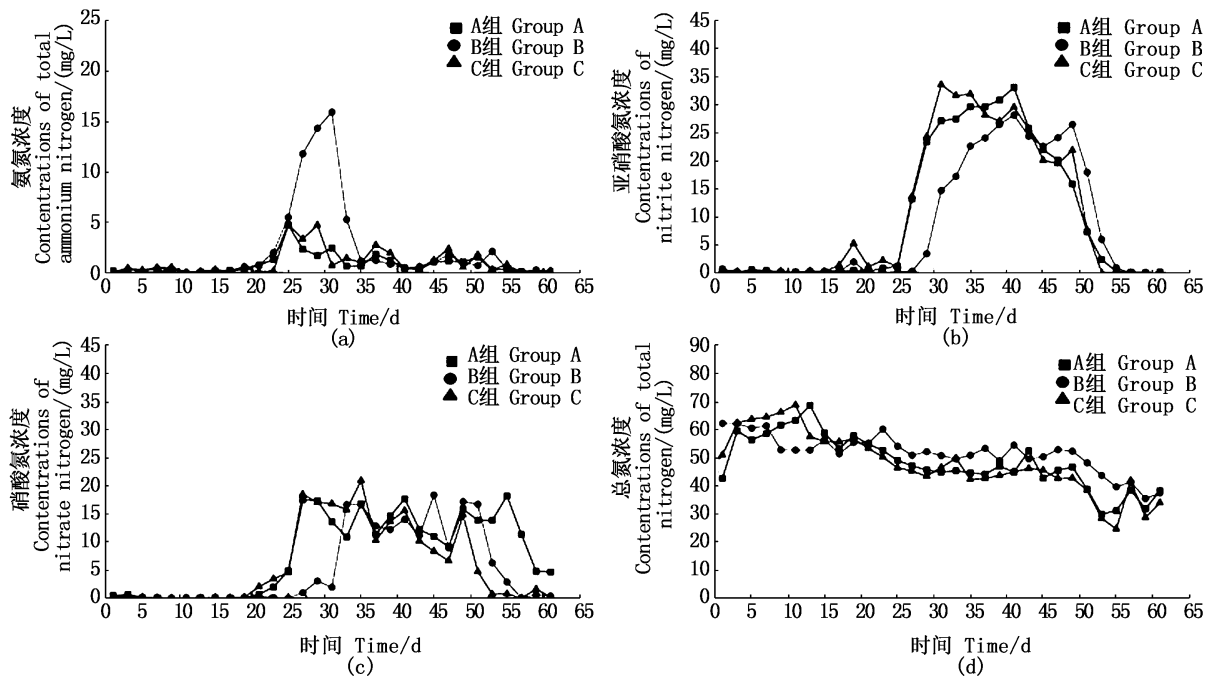


图 2 3 个处理组中氨氮 (a)、亚硝酸氮 (b)、硝酸氮 (c) 及总氮 (d) 的动态变化

Fig. 2 Dynamics of total ammonium-N (a), nitrite-N (b), nitrate-N (c) and total nitrogen (d) in the 3 different groups

2.2 溶解性有机碳 (DOC) 与 DOC/DIN 及 DOC/TN 的变化

由图 3a 可知, 在系统运行前 10 天内, 3 个处理组的 DOC 浓度表现出显著差异 ($P < 0.05$)。A 组在一次性添加大量葡萄糖后 DOC 浓度升至 $(935.50 \pm 31.93) \text{ mg/L}$; B 组在持续添加葡萄糖过程中, DOC 浓度先升高至 $(182.29 \pm 17.12) \text{ mg/L}$, 然后迅速降低; C 组因为 TAN 浓度较低, 因此添加的葡萄糖较少, DOC 在 50 mg/L 以下。但是在系统运行第 10 天之后直至结束, 3 组 DOC 变化趋于一致, 均在 20 mg/L 左右浮动。从图 3b 和 3c 可以看出, DOC 与溶解性无机氮 (DIN) 的比值在系统运行的前 20 天处于较高水平 (15 以上), 第 55~60 天内 B、C 两组的 DOC/DIN 迅速升高又降低, A 组波动幅度较小, 除此之外 3 组 DOC/DIN 均保持极低水平; 整个实验期间 3 组的 DOC/TN 均处于较低水平, 只有 A 组在第 3 天

时, DOC/TN 达到 15 以上。

2.3 絮体沉降体积与总固体悬浮物含量

由图 4a 可知, 系统运行的前 4 周, 3 组絮体沉降体积 FV-5 min 波动幅度较大; 在实验中后期, A、B 两组变化趋势较为一致, 沉降体积比分别从 $(83.3 \pm 14.4) \text{ mL/L}$ 和 $(93.3 \pm 17.8) \text{ mL/L}$ 降低至 $(17.7 \pm 14.4) \text{ mL/L}$ 和 $(35.0 \pm 10.0) \text{ mL/L}$; C 组絮体沉降体积比在这一期间较为稳定, 维持在 43.4 mL/L 左右。整个实验期间, B 组 FV-5 普遍高于其他两组。由图 4b 可知, 3 组 TSS 变化规律较为一致, 总体呈上升趋势; A、B、C 3 组的 TSS 含量分别从 $(0.625 \pm 0.089) \text{ g/L}$ 、 $(0.708 \pm 0.078) \text{ g/L}$ 和 $(0.406 \pm 0.073) \text{ g/L}$ 增长至 $(1.905 \pm 0.054) \text{ g/L}$ 、 $(2.334 \pm 0.02) \text{ g/L}$ 和 $(1.8 \pm 0.074) \text{ g/L}$ 。整体上看, B 组 TSS 普遍高于 A 组和 C 组。

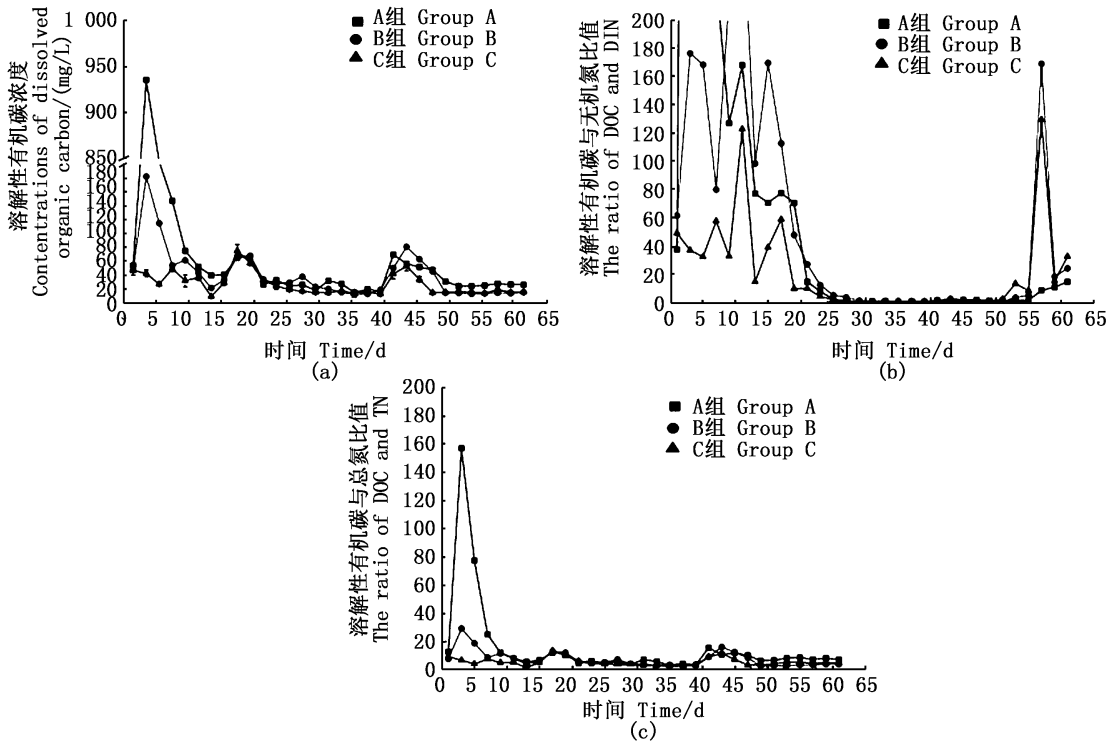


图3 3个处理组中溶解性有机碳含量(a)及其与溶解性无机氮(b)和总氮(c)比值的动态变化
Fig.3 Variations s of DOC(a) ,DOC/ DIN(b) ,and DOC/ TN(c) in the 3 different groups

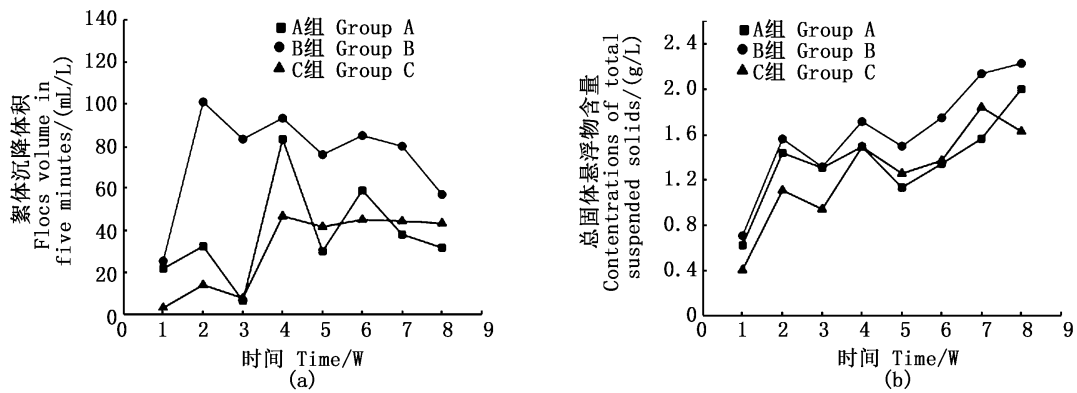


图4 絮体沉降体积(5 min)(a)与总固体悬浮物含量(b)的动态变化

Fig.4 Dynamic changes of flocs volume (FV-5 min, a) ,total suspended solids(TSS, b) in the 3 different groups

2.4 絮体胞外聚合物组分与粗蛋白含量

本实验分别在系统运行的第30天、60天时测定了各处理组絮体的胞外聚合物和粗蛋白成分。由表2可以看出,本实验3个处理组的生物絮体胞外聚合物中蛋白质和腐殖质含量占较大

比例,在实验第30天时,蛋白质和腐殖质的含量达到80 mg/L以上,远高于同组的多糖含量。由表2可观察到,随着系统运行时间越久,生物絮体中粗蛋白含量和胞外聚合物各组分含量均呈现下降趋势。

表 2 实验第 30 天、60 天时絮体的胞外聚合物组分、粗蛋白和水体中总氮含量
 Tab. 2 The content of EPS component and crude protein in biofloc and total nitrogen in water on the 30th and 60th days of the experiment ($n=3; \bar{x} \pm SD$)

时期 Period	处理组 Treatment	多糖 Polysaccharide/(mg/g)	蛋白质 Protein/ (mg/g)	腐殖质 Humus/ (mg/g)	粗蛋白 Crude protein/%	总氮 Total nitrogen/ (mg/L)
30 d	A	18.7 ± 8.9 ^a	82.1 ± 23.5 ^a	89.4 ± 24.1 ^a	39.4 ± 1.9 ^a	45.7 ± 2.3 ^a
	B	50.9 ± 6.8 ^b	83.9 ± 18.3 ^a	83.5 ± 20.0 ^a	34.9 ± 2.6 ^a	52.3 ± 4.0 ^b
	C	17.9 ± 7.8 ^a	81.7 ± 18.5 ^a	66.0 ± 12.1 ^b	38.0 ± 0.5 ^a	43.5 ± 1.1 ^a
60 d	A	7.56 ± 5.34 ^b	122.7 ± 44.5 ^a	28.8 ± 2.3 ^a	30.0 ± 4.2 ^b	41.9 ± 2.5 ^a
	B	14.5 ± 2.5 ^a	34.9 ± 5.0 ^b	18.2 ± 4.0 ^b	24.5 ± 0.6 ^a	37.6 ± 0.9 ^b
	C	15.9 ± 1.9 ^a	56.7 ± 15.5 ^c	30.2 ± 15.0 ^a	26.9 ± 0.7 ^a	34.1 ± 0.7 ^c

注: 同列数据上标不同表示组间存在显著差异($P < 0.05$)

Notes: Values in each column with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$)

2.5 3 个处理组生物絮凝系统中微生物多样性

由图 5 可知,在门水平(phylum level)上,3 组生物絮凝系统中优势菌群均为变形菌门(Proteobacteria),其丰度在 A 组占 95%, B 组为 94%, C 组为 67%。C 组菌群结构相对于 A 组和 B 组较为丰富,拟杆菌门(Bacteroidetes)和浮霉菌门(Planctomycetes)在 C 组也是优势菌群,其丰度分别占 16% 和 13%。在纲的水平(class level)上, A 组和 B 组中优势菌群都以 γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)为主,其丰度在 A 组和 B 组中分别占 94% 和 92%。C 组中优势菌群为 γ -变形菌纲和 α -变形菌纲(Alphaproteobacteria),其次还有黄杆菌纲(Flavobacteria)和 Phycisphaerae 纲等都在 C 组中被明显观察到。B 组中黄杆菌纲也占有 4% 左右。由表 3 可以看出,3 组生物絮凝系统在科水平(family level)上相对丰度大于 5% 的物种仅有 4 种,其中弧菌科(Vibrionaceae)在 A 组和 B 组中占绝对优势地位,而 C 组因物种较为丰富,没有相对丰度超过 20% 的菌群;鱼立克次体科(Piscirickettsiaceae)占比最多,接近 20%,弧菌科(Vibrionaceae)仅占 3.3%,黄单胞菌科(Xanthomonadaceae)和黄杆菌科(Flavobacteriaceae)均占 6.8% 左右。

3 讨论

3.1 不同碳源添加策略对生物絮凝系统启动过程中水质的影响

本研究处理组 A 是根据 AVNIMELECH^[9] 提出的养殖水体中 C/N 对养殖系统水质调控作用的理论而设计的,即同时向水槽中添加葡萄糖和凡纳滨对虾饲料(CP ≥ 42%),使系统中 C/N 达到 15。理论上,系统运行后若不再添加氮源,也

就不需再添加碳源。A 组水体中溶解氧(DO)和 pH 在实验开始后第 3 ~ 5 天内处于较低的水平,可能是因为一次性投入充足甚至过量的葡萄糖,系统中微生物在短时间内密集增殖,EBELING 等^[12] 的研究表明,异养细菌利用有机碳源进行增殖的过程中需要消耗养殖水体中大量的溶解氧和碱度。B 处理组的碳源添加方式基于 A 处理组,即将 A 组所投入的碳源总质量平均分 10 次进行添加。有研究^[13] 表明,C/N 不同会影响到异养细菌与氨氧化菌竞争底物和溶解氧,通常高有机物负荷会使氨氧化效率下降。通过系统运行中期的水质变化可知, A 组和 B 组在 TAN 水平上有显著差异($P < 0.05$)。C 处理组是根据饲料在水体中降解后积累的 TAN 浓度来添加葡萄糖。由异养细菌同化作用公式: $\text{NH}_4^+ + 1.18 \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + \text{HCO}_3^- + 2.06\text{O}_2 \rightarrow \text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N} + 6.06 \text{H}_2\text{O} + 3.07 \text{CO}_2$ 可知,同化 1 g 氨氮,需要消耗 6.07 g 有机碳^[12],换算成葡萄糖质量即需要消耗 15 g 葡萄糖。C 组的碳源添加方式是为了充分满足异养细菌的生长需求,从而快速构建完成生物絮凝系统。

整体上看,3 个处理组的 TAN 浓度均处于低水平,而 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 在系统运行 20 ~ 40 天内迅速上升,说明生物絮凝系统中 C/N 的调控能迅速降低 TAN 浓度,但不能很快处理 $\text{NO}_2^- - \text{N}$,这与 ARNOLD 等^[14] 研究的结果相似。在系统运行后期(50 ~ 60 天内), $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 浓度很快降至较低水平。这可能是在生物絮凝系统形成过程中,异养细菌对 TAN 的利用效率远比 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 要快,而且亚硝酸盐氧化细菌比氨氧化细菌的生长速率要慢^[14],导致 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 积累到一定时期后才能很快被处理掉。本实验中 3 个处理组均有 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 积

累,这一现象与 AZIM 等^[15] 在有限光照的生物絮凝养殖系统中的发现是一致的。这表明生物絮凝系统中存在硝化类细菌,系统水体中同时进行了异养吸收和自养硝化的氨氮转化过程。在实验中期,A、B 两个处理组的 NO₃⁻-N 浓度在一定范围内波动,C 处理组的 NO₃⁻-N 浓度则呈下降趋势,这表明在生物絮凝系统中持续添加碳源会抑制硝化作用;实验后期 3 个处理组中 NO₃⁻-N

急剧降低,可能是因为在这期间按照 DOC/DIN 为 15 的比例向系统中添加葡萄糖,在碳源充足条件下,NO₃⁻-N 也被异养细菌利用。JORGENSEN 等^[16] 研究发现,异养细菌对可溶性氮素的利用中,TAN 占吸收总氮的 55%~99%,NO₃⁻-N 最高占吸收氮源的 23%。此现象同时也说明在 3 个处理组的生物絮凝系统转化氮素均以同化作用为主。

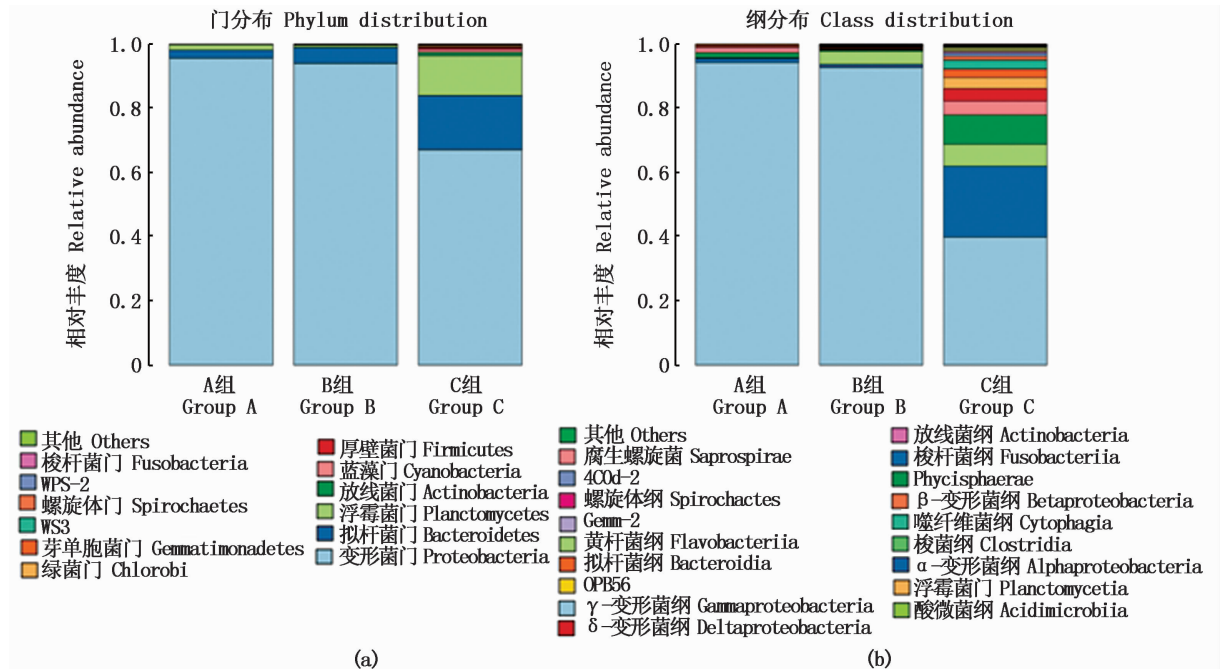


图 5 实验第 60 天时 3 个处理组的生物絮凝系统优势菌群在门和纲水平上的分布

Fig. 5 Predominant bacterial community at phylum and class levels in 3 different treatments BFT system of the 60th day

表 3 科水平 3 组样品中物种(相对丰度 >5%) 的优势度指数

Tab. 3 The dominance index of species(relative abundance >5%) at family level in the samples of 3 groups

优势菌 Prevailing bacteria	优势度指数 Dominance index		
	A 组 Group A	B 组 Group B	C 组 Group C
弧菌科 Vibriaceae	94.03%	90.71%	3.36%
黄单胞菌科 Xanthomonadaceae	-	0.01%	6.82%
鱼立克次体科 Piscirickettsiaceae	0.15%	1.73%	19.94%
黄杆菌科 Flavobacteriaceae	0.12%	4.12%	6.82%

注:“-”表示未检测出含量
Notes:“-” means not detected

3.2 不同碳源添加策略下生物絮凝系统启动过程中 C/N 的变化

本实验 3 个处理组的 DOC 浓度在系统运行前期的差异是因碳源的添加量不同,但在系统运行的中后期,3 组的 DOC 浓度趋于一致,且较为

稳定。C 组虽然持续添加葡萄糖,但很快被利用,其 DOC 才会与其他两组无显著差异($P > 0.05$)。但 3 组 DOC 在整个实验期间始终保持一定浓度,且 DOC/TAN 远大于 15,说明水体中有部分 DOC 可能不被异养细菌利用,LIM 等^[17] 研究认为该部

分 DOC 可能是很难被细菌降解的腐殖酸,也有研究认为是一些烷烃类有机碳^[18]。实际上,在水产养殖水体的碳源和氮源是以多种形态共存的,而且这些不同形态的碳或氮会互相转化,如果仅用总碳和总氮的比值去调控水体中 C/N,是无法准确投入适量的碳源来满足微生物的生长需求的。因此,本实验将 DOC 与 DIN 和 TN 进行比较,发现 DOC/DIN 和 DOC/TN 的变化规律与 DOC 的浓度变化较为相似。这是因为系统中 DIN 和 TN 浓度相对较为稳定,因此不能作为一个 C/N 是否满足异养细菌生长的判断标准。此外,由于整个实验期间 TAN 浓度都处于相对较低水平,因此 3 组系统中 DOC/TAN 在大多数时间都处于极高状态,且后续碳源的添加,导致 DOC/TAN 波动极大。通过实时监测发现,DOC/TAN 甚至出现高达数万的情况,且毫无变化规律,这是由于某些时间内 TAN 浓度极低甚至接近于零,即使水体中 DOC 浓度不高,也会造成极高比值。由此说明,不能通过某一时刻监测的 DOC/TAN 来推断水体中 C/N 是否满足异养细菌的生长需求。

3.3 不同碳源添加策略对启动过程中生物絮体的影响

生物絮凝系统在添加有机碳源的过程中会促进其有机颗粒物和生物絮体的积累^[19]。可以看出本实验中 3 个处理组的 TSS 在系统运行前期增长较为迅速。B 组 TSS 在整体水平上高于 A 组和 C 组,可能是由于在实验前期持续投入较为适量的碳源使系统中的异养细菌快速增长,而在实验中期由于 B 组 TAN 有所积累,因此得到碳源的补充,从而进一步增长 TSS 含量。与此相对应,B 组 FV-5 min 也高于另外两组,赵霞等^[20]研究证明充足碳源的添加,会使生物絮体更加膨胀。在系统运行的中后期,A 组和 B 组的 FV-5 min 略微有所下降,C 组则保持稳定状态,而 A、B 和 C 3 组的 TSS 均呈上升趋势,这表明 3 个处理组的絮体沉降性能在上升。

在生物絮凝系统中,胞外聚合物(EPS)对絮体的凝聚性、沉降性和脱水性有重要的影响^[21]。一般认为,EPS 的主要组分为糖类和蛋白质^[22]。在本实验中,提取 3 个处理组絮体中的 EPS 后,经检测发现腐殖质的含量十分接近蛋白质的含量,甚至高于多糖的含量,LIU 等^[23]研究也表明腐殖质在 EPS 中占有较高比例,因此 EPS 中的腐

殖质成分不能被忽略。从整体上看,EPS 随着系统运行时间越长,其总体含量越低。SHENG 等^[24]认为,EPS 的含量在细菌处于对数生长期时会迅速增加,而在稳定期则迅速降低。由其他指标可以判断:本实验在前 30 d 时异养细菌繁殖迅速,因此 EPS 的含量在系统运行第 30 天时处于较高的状态;而实验中后期,系统逐渐稳定,因此 EPS 含量有所下降。EPS 的变化趋势与絮体沉降性能相反,可能是因为 EPS 含量的降低,絮体的沉降性得到提升。ERIKSSON 等^[25]的研究也表明 EPS 不利于絮体的沉降。

3.4 不同碳源添加策略对生物絮凝系统启动过程中微生物菌群结构的影响

MICHAUD 等^[26]研究发现碳源的添加量会影响生物絮体的细菌群落结构。本实验在结束时对系统微生物高通量测序,结果显示 3 个处理组中的优势菌群都属于变形菌门(Proteobacteria),但持续添加碳源的系统中,微生物种类明显较多,由此可见,碳源的添加可以增加生物絮凝系统中菌群的丰度。在科水平上,A 组和 B 组中弧菌科(Vibrionaceae)占 90% 以上,而在 C 组中弧菌科所占比例则较少,可能是因为弧菌在 C/N 为 5 和 10 的基质中生长较好^[27],C 组由于持续添加碳源,抑制了它的生长。从微生物群落的发展角度来看,持续而少量地添加碳源对于生物絮凝系统的构建更为合理。

参考文献:

- [1] AVNIMELECH Y. Bio-filters: the need for a new comprehensive approach [J]. *Aquacultural Engineering*, 2006, 34(3): 172-178.
- [2] GOLDMAN J C, CARON D A, DENNETT M R. Regulation of gross growth efficiency and ammonium regeneration in bacteria by substrate C : N ratio [J]. *Limnology and Oceanography*, 1987, 32(6): 1239-1252.
- [3] AVNIMELECH Y. *Biofloc Technology: A Practical Guide Book* [M]. Baton Rouge, LA: World Aquaculture Society, 2012: 182.
- [4] 邓应能, 赵培, 孙运忠, 等. 生物絮团在凡纳滨对虾封闭养殖试验中的形成条件及作用效果 [J]. *渔业科学进展*, 2012, 33(2): 69-75.
DENG Y N, ZHAO P, SUN Y Z, et al. Conditions for bio-floc formation and its effects in closed culture system of *Litopenaeus vannamei* [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(2): 69-75.
- [5] CORREIA E S, WILKENFELD J S, MORRIS T C, et al.

- Intensive nursery production of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* using two commercial feeds with high and low protein content in a biofloc-dominated system[J]. Aquacultural Engineering, 2014, 59: 48-54.
- [6] LUO G Z, LI W Q, TAN H X, et al. Comparing salinities of 0, 10 and 20 in biofloc genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) production systems[J]. Aquaculture and Fisheries, 2017, 2(5): 220-226.
- [7] DE SCHRYVER P, CRAB R, DEFOIRD T, et al. The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture[J]. Aquaculture, 2008, 277(3/4): 125-137.
- [8] LUO G Z, AVNIMELECH Y, PAN Y F, et al. Inorganic nitrogen dynamics in sequencing batch reactors using biofloc technology to treat aquaculture sludge [J]. Aquacultural Engineering, 2013, 52: 73-79.
- [9] AVNIMELECH Y. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems[J]. Aquaculture, 1999, 176(3/4): 227-235.
- [10] KRUMMENAUER D, POERSCH L H, FÖES G, et al. Survival and growth of *Litopenaeus vannamei* reared in BFT System under different water depths [J]. Aquaculture, 2016, 465: 94-99.
- [11] LUO G Z, LIANG W Y, TAN H X, et al. Effects of calcium and magnesium addition on the start-up of sequencing batch reactor using biofloc technology treating solid aquaculture waste[J]. Aquacultural Engineering, 2013, 57: 32-37.
- [12] EBELING J M, TIMMONS M B, BISOGNI J J. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems[J]. Aquaculture, 2006, 257(1/4): 346-358.
- [13] SATOH H, OKABE S, NORIMATSU N, et al. Significance of substrate C/N ratio on structure and activity of nitrifying biofilms determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes[J]. Water Science and Technology, 2000, 41(4/5): 317-321.
- [14] ARNOLD S J, COMAN F E, JACKSON C J, et al. High-intensity, zero water-exchange production of juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*: An evaluation of artificial substrates and stocking density[J]. Aquaculture, 2009, 293(1/2): 42-48.
- [15] AZIM M E, LITTLE D C. The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: Water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Aquaculture, 2008, 283(1/4): 29-35.
- [16] JØRGENSEN N, KROER N, COFFIN R B, et al. Relations between bacterial nitrogen metabolism and growth efficiency in an estuarine and an open-water ecosystem [J]. Aquatic Microbial Ecology, 1999, 18(3): 247-261.
- [17] LIM M H, SNYDER S A, SEDLAK D L. Use of biodegradable dissolved organic carbon (BDOC) to assess the potential for transformation of wastewater-derived contaminants in surface waters[J]. Water Research, 2008, 42(12): 2943-2952.
- [18] SIMSEK H, KASI M, OHM J B, et al. Impact of solids retention time on dissolved organic nitrogen and its biodegradability in treated wastewater[J]. Water Research, 2016, 92: 44-51.
- [19] BURFORD M A, LORENZEN K. Modeling nitrogen dynamics in intensive shrimp ponds: the role of sediment remineralization [J]. Aquaculture, 2004, 229(1/4): 129-145.
- [20] 赵霞, 赵阳丽, 陈忠林, 等. 好氧颗粒污泥发生丝状菌污泥膨胀的控制措施[J]. 中国给水排水, 2012, 28(3): 15-19.
- ZHAO X, ZHAO Y L, CHEN Z L, et al. Control of filamentous sludge bulking in aerobic granular sludge SBR process[J]. China Water & Wastewater, 2012, 28(3): 15-19.
- [21] WILÉN B M, JIN B, LANT P. The influence of key chemical constituents in activated sludge on surface and flocculating properties[J]. Water Research, 2003, 37(9): 2127-2139.
- [22] FRÖLUND B, PALMGREN R, KEIDING K, et al. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin[J]. Water Research, 1996, 30(8): 1749-1758.
- [23] LIU H, FANG H H P. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludge [J]. Journal of Biotechnology, 2002, 95(3): 249-256.
- [24] SHENG G P, YU H Q, WANG C M. FTIR-spectral analysis of two photosynthetic H₂-producing strains and their extracellular polymeric substances[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 73(1): 204-210.
- [25] ERIKSSON L, ALM B. Study of flocculation mechanisms by observing effects of complexing agent on activated sludge properties[J]. Water Science & Technology, 1991, 24(7): 21-28.
- [26] MICHAUD L, LO GIUDICE A, INTERDONATO F, et al. C/N ratio-induced structural shift of bacterial communities inside lab-scale aquaculture biofilters [J]. Aquacultural Engineering, 2014, 58: 77-87.
- [27] 高磊, 包卫洋, 张天文, 等. 水体碳氮比对芽孢杆菌、乳酸菌与弧菌生长、拮抗作用及菌体碳氮比的影响[J]. 中国海洋大学学报, 2013, 43(1): 34-40.
- GAO L, BAO W Y, ZHANG T W, et al. Effect of water C: N ratio on the growth, antagonism and C: N Ratio of bacillus, lactic acid Bacteria and vibrio [J]. Periodical of Ocean University of China, 2013, 43(1): 34-40.

Effect of carbohydrates addition methods on start-up efficiency of seawater biofloc technology system

LIU Zefeng¹, LUO Guozhi^{1,2,3}, TAN Hongxin^{1,2,3}, MENG Haoyan¹

(1. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Raising the carbon/nitrogen ratios of Biofloc technology (BFT) aquaculture system by providing carbohydrates can promote the growth of heterotrophic bacteria, and reform bioflocs with feces and lures in cultured water, so as to improve the utilization rate of feed protein and purify the aquaculture water. However, there is no uniform view on how to add carbohydrates. In order to prevent the aquaculture animals from being poisoned by ammonia nitrogen and nitrite nitrogen during the construction of BFT system, it is necessary to set the start-up stage of the BFT system. Therefore, a 60 days experiment was carried out to investigate three strategies of carbohydrates providing at the start-up stage of the biofloc system with salinity of 30 ppt, aiming at optimizing the adding strategy of glucose, so as to shorten the formation period of the biofloc system and stabilize the water quality quickly. The first method is to add glucose to the biofloc technology (BFT) system (group A) at a one-time to make the C/TN (total nitrogen) be 15 (group A). The second is 10% total glucose of group A was added every day from 1st to 10th day, after that, if the total ammonia nitrogen (TAN) increased to above 1 mg/L, the glucose was added according to C/TAN of 6. The third is to add glucose every day according to C/TAN of 6. The results showed TAN in A and C treatment groups was generally at a low level during the experiment period. TAN in B group reached a peak value of (16.36 ± 3.02) mg/L on the 31st days, nitrite nitrogen ($\text{NO}_2^- - \text{N}$) and nitrate nitrogen ($\text{NO}_3^- - \text{N}$) had a significant accumulation, but dropped to the lowest level on the 59th day. The three treatment groups both had assimilation and nitrification, but the nitrification was obviously inhibited in the system with continuous addition of carbohydrates. The extracellular polymeric substances (EPS) and crude protein of bioflocs in the three treatment groups showed the trend of decreasing during the experiment period, and the settling velocity of bioflocs of the three treatment groups becomes better. The bacterial community of bioflocs was analyzed by high-throughput sequencing. The results showed that, at the phylum level the main dominant microflora of the 3 different groups were Proteobacteria. Besides, Bacteroidetes and Planctomycetes were also found in group C. At the class level, the main advantage microflora in group A and group B were mainly Gammaproteobacteria, while the main dominant microflora in group C are Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Flavobacteria and Phycisphaerae. Thus, continuous addition of carbon sources can enrich microbial species. The experiment shows that the three carbohydrates additions can stabilize the water quality in about 55 days in a seawater aquaculture system using bioflocs technology. It can be concluded that the best method for the start-up of seawater BFT system is maintaining C/N 15 initially, then adding carbon source to 6 of C/N when TAN was up to 1 mg/L.

Key words: Biofloc technology aquaculture system; carbon/nitrogen ratio; carbohydrates addition method; extracellular polymeric substance; bacterial community