

枯草芽孢杆菌添加剂对生物絮团菌群结构和营养成分的影响

贺希, 罗国芝, 谭洪新

Effect of adding *Bacillus subtilis* on the microbial community structure and nutrition of bioflocs

HE Xi, LUO Guozhi, TAN Hongxin

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20210403407>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

国产鱼粉饲料中添加卵黄抗体、丁酸钠和枯草芽孢杆菌对中华鳖生长和摄食偏好的影响

Effect of egg yolk antibody, sodium butyrate and *Bacillus subtilis* supplementation in domestic fish meal based feed on growth and feeding preference of China soft-shelled turtle

上海海洋大学学报. 2017, 26(3): 376 <https://doi.org/10.12024/jsou.20160801848>

两种不同方法处理粪便对生物絮团组分的影响

Effect of processing fish droppings in two different ways on biofloc components

上海海洋大学学报. 2018, 27(4): 494 <https://doi.org/10.12024/jsou.20170502070>

枯草芽孢杆菌和空心菜对鳝虾稻共作池塘水质的影响

The effects of *Bacillus subtilis* and *Ipomoea aquatica* Forsk on water quality in the pond for co-farming of rice-crayfish-finless eel

上海海洋大学学报. 2016, 25(3): 415 <https://doi.org/10.12024/jsou.20150501428>

不同剪切力对生物絮团粒径及其水处理效果的影响

Effect of different shear forces on the particle size of biofloc and its water treatment effect

上海海洋大学学报. 2021, 30(4): 691 <https://doi.org/10.12024/jsou.20200202918>

pH对微生物絮团氨氮转化效率及细菌活性的影响

Effects of pH on ammonium nitrogen conversion efficiency and bacteria activity of microbial flocs

上海海洋大学学报. 2019, 28(5): 671 <https://doi.org/10.12024/jsou.20180702359>

文章编号: 1674-5566(2022)04-0873-10

DOI:10.12024/jsou.20210403407

枯草芽孢杆菌添加剂对生物絮团菌群结构和营养成分的影响

贺 希¹, 罗国芝^{1,2,3}, 谭洪新^{1,2,3}

(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 农业农村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: 为探究枯草芽孢杆菌添加剂对生物絮团菌群结构、絮团营养以及生物絮团培养过程中水质的影响, 在生物絮团反应器中添加 4 种不同剂量的枯草芽孢杆菌。生物絮凝系统构建过程中, 枯草芽孢杆菌的添加剂量分别为 A 组 10^6 CFU/mL、B 组 10^5 CFU/mL、C 组 10^4 CFU/mL 和 D 组 0 CFU/mL。结果表明: 生物絮凝系统构建过程中, 枯草芽孢杆菌添加剂量对絮团总悬浮颗粒物 (total suspended solids, TSS)、5 min 内絮团沉降体积 (floc volume, FV) 影响显著; 对絮团氨基酸含量、粗蛋白含量、絮团碳氮比影响显著, 对絮团粗脂肪、粗灰分含量影响不显著; 添加枯草芽孢杆菌絮团中氨基酸、粗蛋白含量高于不添加枯草芽孢杆菌组; 枯草芽孢杆菌添加剂量对絮团门、属水平菌群差异物种相对丰度有显著影响, 增加枯草芽孢杆菌添加剂浓度, 絮团中芽孢杆菌浓度也随之升高。枯草芽孢杆菌能在生物絮团上得到有效富集, 在生物絮凝系统构建过程中添加枯草芽孢杆菌能提高絮团粗蛋白和氨基酸含量, 有利于为养殖对象提供蛋白源。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 添加剂量; 絮团营养; 菌群结构

中图分类号: S 968.22 **文献标志码:** A

在水产养殖过程中降低过剩氮素一直是环境保护研究的热点, 生物絮凝技术通过提高水体的碳氮比, 促进异养细菌的生长, 形成了具有特定结构和功能的生物絮团, 并通过菌群的同化和硝化作用有效降低水体氮素、提高了饵料利用率、促进养殖对象的生长。在生物絮凝养殖系统构建过程中, 由于异养细菌生长快于自养细菌, 养殖水质常常伴随着氨氮和亚硝酸盐的积累, LUO 等^[1]认为在利用生物絮凝技术进行养殖以前有必要增加生物絮凝系统启动阶段, 以此来稳定微生物群落和养殖水质。生物絮凝系统中氨氮和亚硝氮维持低浓度时再进行养殖, 避免对养殖对象造成危害。

有关生物絮凝系统构建过程中的研究主要为碳源的添加方式和控制总悬浮颗粒物 (total suspended solids, TSS) 浓度两个方面。柳泽锋等^[2]认为以溶解性有机碳浓度/总氮浓度为 15 的比例添加葡萄糖, 以及在系统运行期间按溶解性总氮浓度/氨氮浓度为 6 的比例添加葡萄糖能

够更好地形成生物絮凝系统; 陈晓庆^[3]认为碳氮比 (Carbon/Nitrogen, C/N) 为 20 能很好地构建生物絮凝系统, 生物絮凝系统构建过程中不同的 TSS 对生物絮凝启动效率影响不明显。

目前以益生菌为添加剂, 探究益生菌对生物絮凝系统构建过程以及絮团的菌群结构、营养成分的研究较少。研究^[4]表明以植物乳杆菌为添加剂, 在 pH 8.5、温度 35 °C、好氧条件下生物絮凝系统达到稳定的时间最短, 在污水处理系统中通过添加特定功能菌可以有效改善出水水质^[5], 提高系统抗负荷冲击能力和系统稳定性^[6], 以及工作效率^[7]。生物絮凝养殖系统中高浓度固体悬浮物的水体环境适合枯草芽孢杆菌等异养细菌生长, 研究^[8]表明在生物絮凝养殖系统中添加复合芽孢杆菌能促进絮团上芽孢杆菌的生长。CRAB 等^[9]发现添加枯草芽孢杆菌影响了生物絮体粗灰分含量, 枯草芽孢杆菌在水产养殖中应用广泛, 且具有很好的益生效果。本实验通过以枯草芽孢杆菌作为生物絮凝系统构建过程的添加

收稿日期: 2021-04-21 修回日期: 2021-06-15

基金项目: 上海市科学技术委员会项目 (14320501900)

作者简介: 贺 希 (1995—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产养殖水环境调控及养殖用水重复利用。E-mail: 945954756@qq.com

通信作者: 罗国芝, E-mail: gzhluo@shou.edu.cn

剂,探究枯草芽孢杆菌添加剂在生物絮团上的富集效果,以及枯草芽孢杆菌添加剂量对絮团营养成分和菌群结构的影响,为生物絮凝系统功能优化与调节提供新的策略。

1 材料与方法

1.1 实验装置与材料

实验在上海海洋大学循环水养殖工程与技术实验室进行。生物絮团反应器为 12 个有效容积为 5 L 的有机玻璃圆锥体反应器,12 个反应器搭配曝气量为 100 L/min 的气泵(ACO-008),每个反应器中放入 3 个曝气石,均匀曝气,以 12 W 日光灯作为光源。

1.2 实验设计

实验开始时按照系统 DOC/TN 为 15 添加葡萄糖,并在各个桶中加入凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)粉料,每个反应器的饲料投加量为 700 mg/L,进行生物絮团培养。其主要成分:粗蛋白 $\geq 48\%$,粗纤维 $\leq 12\%$,粗脂肪 $\geq 4\%$,粗灰分 $\leq 17\%$,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)。实验周期为 33 d,实验期间维持 CaCO_3 碱度为 150 mg/L。依据枯草芽孢杆菌的添加剂量将 12 个反应器分为 4 组,每组 3 个平行。A 组的枯草芽孢杆菌添加剂量为 10^6 CFU/mL, B 组的枯草芽孢杆菌添加剂量为 10^5 CFU/mL, C 组枯草芽孢杆菌添加剂量为 10^4 CFU/mL,添加频率为 3 d/次, D 组不添加枯草芽孢杆菌。

1.3 菌株来源与计数

实验用枯草芽孢杆菌购自中国微生物菌种网。以 2% 的接种量将种子液接入 100 mL 的 2216E 培养液中,进行摇瓶发酵培养。培养时间为 20 h。采用 LB 培养基平板计数法。按照稀释倍数 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 进行稀释,用涂布棒快速地均匀涂布稀释后的菌液,每个稀释度做 2 个重复,培养 20 h,采用 30 ~ 300 CFU/mL 的平板计数,根据菌落数目和稀释倍数计算出待测样含菌数。

1.4 水质指标的测定

每天上午 9 点进行取样,检测水体的温度(T)、pH、溶解氧(DO),并测定总氮(TN)、氨氮(TAN)、亚硝酸氮(NO_2^- -N)、硝酸氮(NO_3^- -N),水样经 0.45 μm 滤膜抽滤后测定三态氮。TN 采

用过硫酸钾氧化-紫外分光光度法(上海尤尼柯 UV 2 000 分光光度计,中国)测定。其中 NO_2^- -N 含量采用重氮-偶氮法测定, NO_3^- -N 含量采用铈还原法测定,TAN 含量测定采用次溴酸钠氧化法,碱度采用酸碱滴定指示法测定,每 6 天测定 1 次。

1.5 絮团指标的测定

实验至第 33 天时,取 2 L 生物絮团反应器水样,沉淀 30 min 后倒掉上清液,取下层生物絮团。絮团经 65 $^{\circ}\text{C}$ 烘干后使用碳、氮元素分析仪(Elmenter ELMENTER VARIO MAX,德国)测定絮团中碳、氮元素质量^[10],粗蛋白含量为氮元素含量乘以 6.25^[11]。5 min 内絮团沉降体积(floc volume, FV)使用英霍夫式锥形管取 1 L 水样静置 5 min 后读取。粗灰分根据 GB/T 6438—2007^[12-13] 称重法进行测量。总脂肪采用氯仿-甲醇法^[14] 进行测定^[15]。水解氨基酸参照 GB/T 5009.124—2003^[16],上机测定(日立, L-8800,氨基酸分析仪)。

1.6 菌群多样性检测

实验至第 33 天时,取 50 mL 水样经 0.22 μm 无菌微孔滤膜过滤用以收集浮游细菌,将滤膜剪碎置于 5 mL 无菌离心管中,于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,送至上海美吉生物有限公司进行检测。

细菌 DNA 的提取与检测:使用 E. Z. N. A. Soil DNA Kit (Omega,美国)试剂盒进行 DNA 提取;将提取的 DNA 样品利用 1% 的琼脂糖电泳检测是否有降解及杂质;Nano Photometer 分光光度计检测样品纯度;Qubit 2.0 Fluorometer 检测 DNA 样品浓度。

16S rDNA 文库制备:取 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。

库检与测序: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/ μL ,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。

1.7 数据处理

实验数据采用 Excel 软件进行结果统计,由 Origin 8.5 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) 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 絮团培养期间三态氮以及溶解氧、pH 的变化

如表 1 所示,实验期间,各处理组的 pH 为 8.07 ~ 8.45,溶解氧为 7.28 ~ 7.96 mg/L。D 组的溶解氧低于其他各处理组。生物絮团系统构建阶段,各组水温维持在 21.2 ~ 26.5 $^{\circ}\text{C}$ 。枯草芽孢杆菌添加剂量对 TSS 浓度和 FV-5min 影响显著 ($P < 0.05$),A 组 TSS 和 FV-5min 都显著低于对照组 D 组 ($P < 0.05$)。

如图 1 所示,实验前期,碳源逐渐被消耗,生物絮团中同化作用较弱,反应器中氨氮和亚硝氮出现积累。随着硝化细菌的富集,氮素转化以硝

化作用为主导,氨氮和亚硝氮稳定维持在低水平,硝态氮逐渐积累。枯草芽孢杆菌添加剂量对三态氮最高浓度无显著影响 ($P < 0.05$)。絮团培养过程中,枯草芽孢杆菌添加剂量对各实验组三态氮浓度变化趋势有影响,枯草芽孢杆菌添加剂量对各组氨氮浓度和亚硝酸态氮升高至最高浓度的时间有影响。A 组在第 8 天氨氮浓度最高,对照组在第 11 天氨氮浓度最高。氨氮浓度升高至最高浓度的时间受枯草芽孢杆菌添加剂量影响:枯草芽孢杆菌添加剂量越高,氨氮最高浓度出现时间越早。亚硝酸态氮浓度的动态变化特征与氨氮浓度变化特征一致:A 组在第 17 天亚硝酸态氮浓度最高为 17.98 mg/L,B 组在第 22 天亚硝酸态氮浓度最高为 18.75 mg/L,C 组在第 23 天亚硝酸态氮浓度最高为 17.13 mg/L,D 组在第 24 天亚硝酸态氮浓度最高为 17.78 mg/L。各实验组亚硝酸态氮降至低水平时间有区别:A 组第 24 天,B 组第 31 天,C 组第 31 天,D 组第 30 天。结果表明,枯草芽孢杆菌添加剂能缩短生物絮团系统构建时间。

表 1 实验期间 3 个处理组中各水质指标的平均值

Tab. 1 Mean values of the water quality in 3 different groups during the experimental period

指标 Index	组别 Groups			
	A 组 Group A	B 组 Group B	C 组 Group C	D 组 Group D
pH	8.22 \pm 0.10	8.23 \pm 0.10	8.25 \pm 0.08	8.27 \pm 0.10
溶解氧 DO/(mg/L)	7.75 \pm 0.17	7.71 \pm 0.17	7.77 \pm 0.13	7.71 \pm 0.18
温度 T/ $^{\circ}\text{C}$	23.34 \pm 0.98	23.61 \pm 1.09	23.94 \pm 1.52	23.85 \pm 1.47
总固体悬浮物 TSS/(mg/L)	301.67 \pm 16.41 ^a	306.83 \pm 13.35 ^{ab}	310.17 \pm 10.12 ^b	309.58 \pm 11.75 ^b
絮团沉降体积 FV-5min/(mL/L)	5.03 \pm 2.11 ^a	5.80 \pm 2.54 ^{ab}	5.92 \pm 2.73 ^{ab}	6.48 \pm 2.78 ^b
亚硝酸氮 NO ₂ ⁻ -N/(mg/L)	6.24 \pm 7.32	8.25 \pm 7.90	7.33 \pm 6.86	7.51 \pm 7.31
硝酸氮 NO ₃ ⁻ -N/(mg/L)	8.17 \pm 7.68	6.33 \pm 6.99	5.68 \pm 6.55	5.35 \pm 6.52
总氨氮 TAN/(mg/L)	2.13 \pm 4.56	3.02 \pm 5.15	2.92 \pm 4.85	2.27 \pm 4.44
总氮 TN/(mg/L)	42.59 \pm 2.56	41.04 \pm 2.49	41.05 \pm 1.93	41.27 \pm 2.07

注:同行数据上标不同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 ($P < 0.05$).

2.2 絮团营养成分分析

生物絮团系统构建完成后,对各组生物絮团进行营养成分检测,结果如表 2 所示,不添加枯草芽孢杆菌组的粗灰分含量高于其他 3 个实验组,粗灰分含量为 30.40% \pm 1.87%。枯草芽孢杆菌添加组的粗蛋白含量显著高于不添加枯草

芽孢杆菌组 ($P < 0.05$),且粗蛋白含量随着枯草芽孢杆菌添加浓度的升高而升高,A 组粗蛋白含量最高为 34.45% \pm 1.81%。添加剂量为 10⁶ CFU/mL 实验组与添加剂量为 10⁵ CFU/mL 组的絮团粗蛋白含量差异不显著 ($P > 0.05$)。

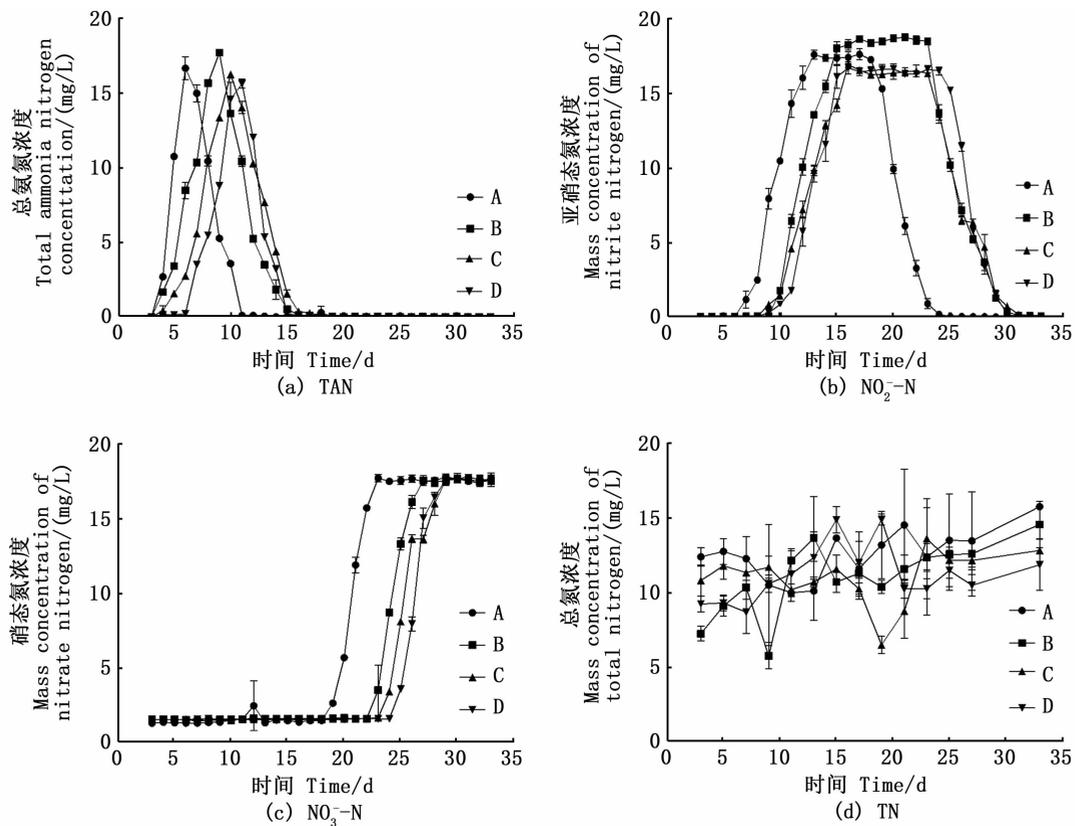


图1 3个处理组中三态氮及总氮的动态变化

Fig. 1 Dynamics of nitrite-N, total ammonium-nitrate-N and total nitrogen in the water of 3 different groups

表2 絮团中粗蛋白、粗脂肪、粗灰分含量和 C/N

Tab. 2 Crude protein, crude fat, crude ash content and C/N in biofloc

指标 Index	组别 Groups			
	A 组 Group A	B 组 Group B	C 组 Group C	D 组 Group D
粗脂肪 Crude fat /%	1.73 ± 0.30 ^a	1.60 ± 0.40 ^a	2.00 ± 0.50 ^a	1.60 ± 0.40 ^a
粗灰分 Crude ash /%	29.67 ± 1.41 ^a	29.60 ± 2.99 ^a	29.39 ± 1.80 ^a	30.40 ± 1.87 ^a
粗蛋白 crude protein /%	34.45 ± 1.81 ^a	34.31 ± 2.78 ^a	33.80 ± 1.13 ^a	26.97 ± 5.43 ^b
絮团碳氮比 C/N	6.20 ± 0.08 ^a	6.32 ± 0.10 ^a	6.79 ± 0.19 ^{ab}	7.71 ± 0.96 ^b

注: 同行数据上标不同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 ($P < 0.05$).

生物絮凝系统构建完成后,对絮团 17 种氨基酸含量进行检测,结果如表 3 所示。枯草芽孢杆菌添加剂量对絮团中组氨酸的含量无显著影响 ($P > 0.05$),对其余 16 种氨基酸含量影响显著 ($P < 0.05$)。

枯草芽孢杆菌添加组生物絮团中天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、丙氨酸、胱氨酸、缬氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、精氨酸含量高于不添加枯草芽孢杆菌实验组。B 组絮团中丝氨酸、谷氨酸、胱氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、组氨酸和精氨酸 8 种氨基酸含量高于 A 组。

A 组絮团中天冬氨酸、苏氨酸、甘氨酸、丙氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和脯氨酸含量高于 B 组。A 组生物絮团中总必需氨基酸和总非必需氨基酸含量均显著高于 C、D 组 ($P < 0.05$),实验结果表明絮团培养过程中添加枯草芽孢杆菌有利于提高生物絮团中各氨基酸含量。

2.3 絮团微生物多样性与丰度

生物絮凝系统构建完成后,利用高通量测序技术对生物絮团的微生物菌群结构与多样性进行检测,结果见表 4。各组 OUT 数随着枯草芽孢杆菌添加剂量的增加而减少,最高浓度枯草芽孢

杆菌添加组 A 组具有最低 OUT 数(615)。通过比较群落丰度指数和 Shannon 指数可知,均为 $A > B > C$ 。

表 3 絮团中 17 种氨基酸含量
Tab.3 Contents of 17 amino acids in biofloc

指标 Index	组别 Groups			
	A 组 Group A	B 组 Group B	C 组 Group C	D 组 Group D
必需氨基酸 EAA				
苏氨酸 Thr	1.02 ± 0.04 ^c	0.99 ± 0.02 ^c	0.87 ± 0.05 ^b	0.61 ± 0.04 ^a
缬氨酸 Val	1.05 ± 0.04 ^c	1.05 ± 0.05 ^c	0.86 ± 0.05 ^b	0.51 ± 0.04 ^a
蛋氨酸 Met	1.18 ± 0.11 ^c	0.85 ± 0.07 ^b	0.59 ± 0.08 ^a	0.66 ± 0.14 ^{ab}
异亮氨酸 Ile	0.93 ± 0.06 ^c	0.90 ± 0.06 ^c	0.76 ± 0.05 ^b	1.35 ± 0.14 ^a
亮氨酸 Leu	1.49 ± 0.09 ^c	1.48 ± 0.10 ^c	1.22 ± 0.09 ^b	0.50 ± 0.01 ^a
苯丙氨酸 Phe	0.94 ± 0.06 ^{bc}	0.99 ± 0.07 ^c	0.83 ± 0.04 ^b	0.61 ± 0.06 ^a
赖氨酸 Lys	0.83 ± 0.05 ^b	0.92 ± 0.07 ^b	0.83 ± 0.06 ^b	0.49 ± 0.06 ^a
组氨酸 His	0.31 ± 0.04 ^a	0.35 ± 0.04 ^a	0.29 ± 0.03 ^a	0.30 ± 0.05 ^a
精氨酸 Arg	0.76 ± 0.02 ^{bc}	0.83 ± 0.05 ^c	0.66 ± 0.05 ^{ab}	0.61 ± 0.03 ^a
总必需氨基酸 Total EAA	8.51 ± 0.50 ^a	8.34 ± 0.53 ^a	6.92 ± 0.39 ^b	5.65 ± 0.07 ^c
非必需氨基酸 NEAA				
酪氨酸 Tyr	0.64 ± 0.05 ^b	0.66 ± 0.05 ^b	0.59 ± 0.03 ^b	0.32 ± 0.03 ^a
脯氨酸 Pro	1.99 ± 0.05 ^b	1.71 ± 0.21 ^{ab}	1.44 ± 0.23 ^a	1.80 ± 0.08 ^{ab}
丝氨酸 Ser	1.63 ± 0.11 ^{ab}	1.72 ± 0.19 ^b	1.37 ± 0.10 ^a	1.31 ± 0.06 ^a
谷氨酸 Glu	2.49 ± 0.51 ^a	2.52 ± 0.52 ^a	1.97 ± 0.51 ^{ab}	0.89 ± 0.60 ^b
甘氨酸 Gly	1.47 ± 0.07 ^b	0.92 ± 0.38 ^a	1.28 ± 0.08 ^{ab}	1.25 ± 0.12 ^{ab}
丙氨酸 Ala	0.62 ± 0.03 ^b	0.61 ± 0.06 ^b	0.55 ± 0.07 ^{ab}	0.43 ± 0.05 ^a
胱氨酸 Cys	0.24 ± 0.01 ^{ab}	0.27 ± 0.01 ^b	0.24 ± 0.01 ^{ab}	0.17 ± 0.07 ^a
天冬氨酸 Asp	0.95 ± 0.04 ^c	0.84 ± 0.02 ^{bc}	0.82 ± 0.04 ^b	0.65 ± 0.06 ^a
总非必需氨基酸 Total NEAA	10.02 ± 0.76 ^a	9.25 ± 0.26 ^{ab}	8.26 ± 0.93 ^{bc}	6.82 ± 0.45 ^c

注:同行数据上标不同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 ($P < 0.05$).

表 4 絮团微生物丰度与多样性
Tab.4 Abundance and diversity of bacteria in biofloc

组别 Groups	OUT	Ace	Chao	Shannon
A 组 Group A	615	614.56 ± 23.40	625.12 ± 15.58	4.01 ± 0.20
B 组 Group B	656	560.36 ± 32.78	566.05 ± 39.39	3.65 ± 0.24
C 组 Group C	664	508.78 ± 62.99	527.36 ± 53.29	3.49 ± 0.35
D 组 Group D	644	568.06 ± 30.20	574.46 ± 42.11	4.01 ± 0.16

2.4 优势物种

对生物絮团门水平优势菌群进行分析,结果如表 5 所示,絮团优势菌为厚壁菌门(Firmicutes)、绿湾菌门(Chloroflexi)、变形菌门(Proteobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、黏球菌门(Myxococcota)。5 种优势菌占絮团总菌相对丰度的 85.82% ~ 91.44%。B, C, D 组中变形菌门(Proteobacteria)相对丰度占比最高。

对生物絮团属水平优势菌群进行分析,结果如表 6 所示:芽孢杆菌属为絮团主要优势群属,相对丰度占比最高(31.98%)。A 组相对丰度前 5 优势菌属为芽孢杆菌属(*Bacillus*)31.98%、囊

菌属(*Nannocystis*)10.56%、微杆菌属(*Microbacterium*)8.46%、固氮螺菌属(*Azospirillum*)1.59%、马赛菌属(*Massilia*)1.41%。B 组优势菌属为芽孢杆菌属(*Bacillus*)20.01%、囊菌属(*Nannocystis*)2.62%、微杆菌属(*Microbacterium*)5.25%、固氮螺菌属(*Azospirillum*)6.95%、暖绳菌属(*Caldilineaceae*)13.65%。C 组优势菌属为芽孢杆菌属(*Bacillus*)19.64%、囊菌属(*Nannocystis*)9.09%、微杆菌属(*Microbacterium*)3.11%、固氮螺菌属(*Azospirillum*)13.64%、暖绳菌属(*Caldilineaceae*)3.17%。D 组优势菌属为芽孢杆菌属(*Bacillus*)

12.03%、囊菌属(*Nannocystis*)13.92%、微杆菌属(*Microbacterium*)18.99%、固氮螺菌属(*Azospirillum*)0.97%、暖绳菌属(*Caldilineaceae*)3.02%。絮团芽孢杆菌属含量与枯草芽孢杆菌

添加剂含量呈正相关。絮团芽孢杆菌相对丰度分别为: A 组 31.98%、B 组 20.01%、C 组 19.64%、D 组 12.03%。

表 5 絮团门水平相对丰度前 5 菌群

Tab. 5 Relative abundance of microflora structure of biofloc (phylum level, top 5) %

组别 Groups	门水平菌群前 5 相对丰度 Microflora structure (phylum level, top 5)				
	变形菌门 Proteobacteria	厚壁菌门 Firmicutes	酸杆菌门 Acidobacteria	黏球菌门 Myxococota	绿湾菌门 Chloroflexi
A 组 Group A	25.71	33.43	11.51	11.18	3.99
B 组 Group B	46.83	22.25	9.44	4.15	5.53
C 组 Group C	41.39	23.76	6.62	12.31	6.06
D 组 Group D	28.47	14.90	25.12	16.49	6.46

表 6 絮团属水平相对丰度前 5 菌群

Tab. 6 Relative abundance of microflora structure of biofloc (genus level, top 5) %

组别 Groups	属水平相对丰度前 5 菌群 Microflora structure (genus level, top 5)				
A 组 Group A	<i>Bacillus</i>	<i>Nannocystis</i>	<i>Microbacterium</i>	<i>Azospirillum</i>	<i>Massilia</i>
	31.98	10.56	8.46	1.59	1.41
B 组 Group B	<i>Bacillus</i>	<i>Nannocystis</i>	<i>Microbacterium</i>	<i>Azospirillum</i>	<i>Caldilineaceae</i>
	20.01	2.62	5.25	6.95	13.65
C 组 Group C	<i>Bacillus</i>	<i>Nannocystis</i>	<i>Microbacterium</i>	<i>Azospirillum</i>	<i>Caldilineaceae</i>
	19.64	9.09	3.113	13.64	3.17
D 组 Group D	<i>Bacillus</i>	<i>Nannocystis</i>	<i>Microbacterium</i>	<i>Azospirillum</i>	<i>Caldilineaceae</i>
	12.03	13.92	18.99	0.97	3.02

2.5 物种差异

生物絮凝系统构建过程中,枯草芽孢杆菌添加剂量对生物絮团门水平菌群相对丰度的影响差异显著($P < 0.05$),B 组变形菌门(*Proteobacteria*)相对丰度显著高于其他处理组($P < 0.05$)。见图 2。

枯草芽孢杆菌添加剂浓度对生物絮团属水平菌群相对丰度影响显著($P < 0.05$)。固氮螺菌属(*Azospirillum*)、马赛菌属(*Massilia*)、剑菌属(*Ensifer*)、副球菌属(*Paracoccus*)在各处理组中差异显著。C 组固氮螺菌属(*Azospirillum*)相对丰度显著高于其他组($P < 0.05$),B 组马赛菌属(*Massilia*)相对丰度显著高于其他组($P < 0.05$),C 组剑菌属(*Ensifer*)相对丰度显著高于其他组($P < 0.05$),B 组副球菌属(*Paracoccus*)相对丰度显著高于其他组($P < 0.05$)。

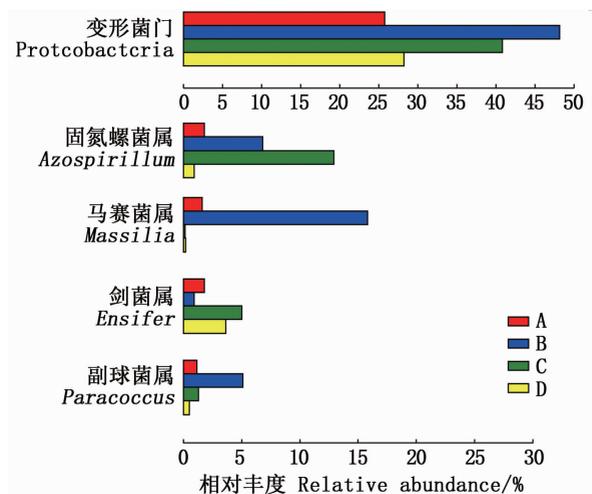


图 2 微生物在门水平和属水平上相对丰度差异显著物种组成

Fig. 2 Composition of significant difference of mean proportions at the phylum level and genus level

3 讨论

3.1 枯草芽孢杆菌添加剂量对生物絮凝系统启动过程中水质的影响

实验中,pH 的平均值随着枯草芽孢杆菌添加剂量的升高而降低(A 组 > B 组 > C 组 > D 组)。研究^[5]表明,生物絮凝系统中 pH 降低与细菌同化作用消耗碱度有关。可能原因是在生物絮凝系统启动过程中,絮团枯草芽孢杆菌附着浓度高的实验组絮团生物活性更强,导致消耗水体总碱度更多。在生物絮凝系统启动过程中,溶解氧和水温均能维持在安全范围以内,溶解氧为 7.28 ~ 7.98 mg/L,水温为 21.2 ~ 26.3 °C。

氨氮和亚硝酸氮是水产养殖过程中重要的指标,在利用生物絮凝系统养殖过程中为了避免高浓度亚硝酸氮和氨氮峰对养殖品种的毒害作用,有必要进行生物絮凝的启动过程,等生物絮凝系统亚硝态氮、氨氮降至低水平时,再进行养殖^[2]。实验结果表明,通过对生物絮凝系统启动过程添加枯草芽孢杆菌,缩短了系统稳定时间。可能原因是高浓度枯草芽孢杆菌添加剂缩短了前期生物絮团形成时间。为缩短生物絮凝系统稳定时间,建议枯草芽孢杆菌添加剂量为 10⁶ CFU/mL。枯草芽孢杆菌添加剂量对生物絮凝系统构建过程中氨氮和亚硝酸盐的均值有影响,各组氨氮浓度均值:A 组(2.13 ± 4.56) mg/L、B 组(3.02 ± 5.15) mg/L、C 组(2.92 ± 4.85) mg/L、D 组(2.27 ± 4.44) mg/L。亚硝酸氮浓度的均值:A 组(6.24 ± 7.32) mg/L、B 组(8.25 ± 7.90) mg/L、C 组(7.33 ± 6.86) mg/L、D 组(7.51 ± 7.31) mg/L。这与鲁璐等^[17]的研究结果一致,向生物絮团反应器中添加一定浓度的复合芽孢杆菌能有效地降低水体中的氨氮浓度。孙运忠等^[18]在日本囊对虾(*Penaeus japonicus*)养殖过程中添加枯草芽孢杆菌,实验结果显示,养殖过程中添加枯草芽孢杆菌的实验组水体中无机氮浓度和化学需氧量(COD)远低于对照组。这表明在养殖水体中枯草芽孢杆菌可有效降低水体中氨氮浓度。

3.2 枯草芽孢杆菌添加剂量对絮团营养组成的影响

研究^[19]表明絮团的粗蛋白含量为 38.5% ~ 57.4%,粗灰分 < 20%,粗脂肪为 20% ~ 35%,能

量在 20 ~ 25 kJ/g,本研究表明枯草芽孢杆菌添加剂对生物絮团的粗蛋白含量、氨基酸含量和絮团 C/N 比影响显著($P < 0.05$)。A 组为枯草芽孢杆菌添加剂量最高组,粗蛋白含量最高。此结果与 SCHNEIDER 等^[20]和李莉等^[21]得出的水体中提高异养细菌的含量,可以起到提高水体蛋白质和减少水体中营养物质浪费的效果一致,C 组具有最高粗灰分含量,此结果与 CRAB 等^[9]研究结果不一致,CRAB 等通过对絮团接种不同浓度的枯草芽孢杆菌,发现接种枯草芽孢杆菌的絮团粗灰分含量显著高于其他实验组,可能原因是本研究中培养絮团的底物粗灰分含量不一样所致。对比各组絮团氨基酸含量发现,枯草芽孢杆菌添加剂量为 10⁶ CFU/mL 实验组与枯草芽孢杆菌添加剂量为 10⁵ CFU/mL 实验组各氨基酸含量均高于其他实验组。D 组絮团中异亮氨酸显著高于其他各实验组,可能与絮团中优势微生物的氮代谢途径有关,具体作用机理有待探究。相关研究^[22-23]也表明絮团菌群结构中的优势微生物会影响絮团的营养成分的组成,其原因是不同的优势微生物具有不同的胞外聚合物^[24-25],从而影响了絮团的营养成分组成。结果表明利用生物絮凝技术进行水产养殖时,添加枯草芽孢杆菌有利于为养殖对象提供蛋白源。

3.3 枯草芽孢杆菌添加剂量对絮团微生物的影响

芽孢杆菌在修复水体方面具有很高的应用价值^[26],此外芽孢杆菌常用于水体中氨氮的去除研究^[27],有学者^[28]通过投加功能菌,优化污泥菌群体系,起到很好的效果。通过添加益生菌形成的生物絮团能降低养殖水体中的致病菌,促进有益微生物的生长,提高絮体中有益菌的比例^[29-31]。对絮团微生物菌群进行高通量测序分析,结果表明枯草芽孢杆菌添加剂量最高组 A 组菌群丰度指数高于其他实验组。通过对各实验组差异微生物进行比较分析,结果表明变形菌门在各组间相对丰度差异显著($P < 0.05$),属水平上固氮螺菌属(*Azospirillum*)、马赛菌属(*Massilia*)、剑菌属(*Ensifer*)、副球菌属(*Paracoccus*)在各处理组中相对丰度差异显著($P < 0.05$)。而门水平的优势物种为厚壁菌门(Firmicutes)、绿湾菌门(Chloroflexi)、变形菌门(Proteobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、黏球

菌门 (Myxococcota)。絮团门水平微生物组成情况与陈晓庆^[3] 研究结果一致。由此可知,对生物絮凝系统启动阶段枯草芽孢杆菌添加剂没有影响絮团微生物群落结构,原因可能是在生物絮凝系统启动阶段,各组水质环境因子差异不显著有关。枯草芽孢杆菌对各组间优势物种相对丰度有显著影响 ($P < 0.05$)。属水平下,絮团芽孢杆菌相对丰度与枯草芽孢杆菌添加剂量呈正相关。芽孢杆菌相对丰度:A组 31.98%,B组 20.01%,C组 19.64%,D组 12.03%。可知在生物絮凝系统构建阶段,枯草芽孢杆菌添加剂能在絮团上富集生长,且生长富集效果与枯草芽孢杆菌添加剂量呈正相关。添加更高剂量的枯草芽孢杆菌对絮团菌群微生物的影响还有待探讨。

4 结论

当枯草芽孢杆菌添加剂量为 10^4 CFU/mL ~ 10^6 CFU/mL 时,枯草芽孢杆菌能在絮团上有效富集,生物絮团上的芽孢杆菌相对丰度随着枯草芽孢杆菌添加剂量的增加而增加,固氮螺菌属 (*Azospirillum*)、马赛菌属 (*Massilia*)、剑菌属 (*Ensifer*)、副球菌属 (*Paracoccus*) 在各处理组中差异显著。枯草芽孢杆菌添加剂能降低生物絮凝系统构建过程中氨氮浓度、缩短生物絮凝系统启动时间、提高絮团粗蛋白含量更加有利于为养殖对象提供蛋白源。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 柳泽锋, 罗国芝, 谭洪新, 等. 碳源添加方式对海水生物絮凝系统启动效率的影响 [J]. *上海海洋大学学报*, 2019, 28(2): 257-266.
- LIU Z F, LUO G Z, TAN H X, et al. Effect of carbohydrates addition methods on start-up efficiency of seawater biofloc technology system [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2019, 28(2): 257-266.
- [3] 陈晓庆. 絮团粒径、碳源添加方式和絮团量对生物絮凝养殖系统氨氮控制的影响研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2019.
- CHEN X Q. Study on the effects of floc particle size, carbon source addition methods and flocs level on ammonia nitrogen control in bioflocs system [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019.

- [4] 王世亨, 谭洪新, 罗国芝, 等. 温度、pH、溶氧对添加植物乳杆菌构建生物絮凝系统的影响 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(6): 2628-2637.
- WANG S H, TAN H X, LUO G Z, et al. Effects of temperature, pH and dissolved oxygen on the construction of biofloc system by lactobacillus plantarum [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2020, 39(6): 2628-2637.
- [5] LIU C, HUANG X, WANG H. Start-up of a membrane bioreactor bioaugmented with genetically engineered microorganism for enhanced treatment of atrazine containing wastewater [J]. *Desalination*, 2008, 231(1/3): 12-19.
- [6] MOHAN S V, RAO N C, SARMA P N. Low-biodegradable composite chemical wastewater treatment by biofilm configured sequencing batch reactor (SBBR) [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, 144(1/2): 108-117.
- [7] 郭静波, 崔凤国, 杨世东, 等. 生物强化技术在污水处理中的应用研究现状及发展展望 [J]. *东北电力大学学报*, 2011, 31(5/6): 1-8.
- GUO J B, CUI F G, YANG S D, et al. Application of bioaugmentation in wastewater treatment: review and prospects [J]. *Journal of Northeast Dianli University*, 2011, 31(5/6): 1-8.
- [8] 陈伟. 功能性生物絮团和 BFT 系统的构建及其在对虾养殖中的应用效果研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2018.
- CHEN W. The construction of functional biofloc and aquaculture system and they apply in shrimp culture [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2018.
- [9] CRAB R, CHELENS B, WILLE M, et al. The effect of different carbon sources on the nutritional value of bioflocs, a feed for *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae [J]. *Aquaculture Research*, 2010, 41(4): 559-567.
- [10] 陈英文, 赵冰怡, 刘明庆, 等. 碱度指示 MBR 中同步硝化反硝化的研究 [J]. *环境工程学报*, 2010, 4(2): 273-277.
- CHEN Y W, ZHAO B Y, LIU M Q, et al. Study on alkalinity as indicator for simultaneous nitrification and denitrification in MBR [J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2010, 4(2): 273-277.
- [11] 钟国才, 陈威, 吴军辉, 等. 利用元素分析仪测定大米粗蛋白含量的方法探讨 [J]. *食品工业*, 2014, 35(2): 158-160.
- ZHONG G C, CHEN W, WU J H, et al. The elemental analyzer method for determination of crude protein content in rice [J]. *The Food Industry*, 2014, 35(2): 158-160.
- [12] YANG W, QIU Q M, ZHOU L L, et al. General administration of quality supervision, inspection and quarantine of the People's Republic of China (AQSIQ) [J]. *Chinese Academy of Inspection*, 2011(14): 98-100.
- [13] International Standards Organization (ISO). ISO 5984: 2002 Animal feeding stuffs-determination of crude ash [S]. Geneva: ISO International Standards, 2002.
- [14] FOLCH J, LEES M, STANLEY G H S. A simple method for

- the isolation and purification of total lipides from animal tissues[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1957, 226(1): 497-509.
- [15] GRIFFITHS M J, VAN HILLE R P, HARRISON S T L. Selection of direct transesterification as the preferred method for assay of fatty acid content of microalgae[J]. *Lipids*, 2010, 45(11): 1053-1060.
- [16] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.124—2003 食品中氨基酸的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004: 115-119.
- Ministry of Health of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. GB/T 5009.124 - 2003 Determination of amino acids in foods[S]. Beijing: Standards Press of China, 2004: 115-119.
- [17] 鲁璐, 罗国芝, 谭洪新, 等. 生物絮凝技术处理水产养殖用水效果的初步研究[J]. *渔业现代化*, 2010, 37(6): 6-10, 14.
- LU L, LUO G Z, TAN H X, et al. Bio-flocs technology application in aquacultural water treatment [J]. *Fishery Modernization*, 2010, 37(6): 6-10, 14.
- [18] 孙运忠, 赵培, 王彦怀, 等. 添加红糖和芽胞杆菌对日本囊对虾室内集约化养殖水质的调控作用[J]. *渔业科学进展*, 2012, 33(3): 70-76.
- SUN Y Z, ZHAO P, WANG Y H, et al. Effect of brown sugar and *Bacillus* addition on water quality control for indoor intensive culture of *Marsupenaeus japonicus* [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(3): 70-76.
- [19] LAEMINCK S E, TERADA A, SMETS B F, et al. Aggregate size and architecture determine microbial activity balance for one-stage partial nitrification and anammox[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(3): 900-909.
- [20] 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.
- [21] 李莉, 谭洪新, 张楠, 等. 曝气方式对序批式反应器培养生物絮凝体的活性与营养组分的影响[J]. *广东农业科学*, 2014, 41(12): 95-99.
- LI L, TAN H X, ZHANG N, et al. Effects of aeration on the activity and nutritional component of bio-flocs in sequencing batch reactor[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2014, 41(12): 95-99.
- [22] ELRAZAK A A, WARD A C, GLASSEY J. Polyunsaturated fatty acid production by marine bacteria[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2013, 36(11): 1641-1652.
- [23] KURIHARA T, KAWAMOTO J, ESAKI N. Biosynthesis and function of long-chain polyunsaturated fatty acids in cold-adapted bacteria[J]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso Protein Nucleic Acid Enzyme*, 2010, 55(1): 94-99.
- [24] BURFORD M A, THOMPSON P J, MCINTOSH R P, et al. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero-exchange system[J]. *Aquaculture*, 2004, 232(1/4): 525-537.
- [25] KUHN D D, BOARDMAN G D, CRAG S R, et al. Use of microbial flocs generated from tilapia effluent as a nutritional supplement for shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in recirculating aquaculture systems[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2008, 39(1): 72-82.
- [26] DE OLIVEIRA P L, DUARTE M C T, PONEZI A N, et al. Use of *Bacillus pumilus* CBMAI 0008 and *Paenibacillus* sp. CBMAI 868 for colour removal from paper mill effluent[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2009, 40(2): 354-357.
- [27] 陈尚智, 胡勇有. 枯草芽孢杆菌对微污染水体的净化作用[J]. *环境科学学报*, 2011, 31(8): 1594-1601.
- CHEN S Z, HU Y Y. Use of *Bacillus subtilis* in purification of slightly-polluted water[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2011, 31(8): 1594-1601.
- [28] NICO B, TOP E M, VERSTRAETE W, et al. Bioaugmentation as a tool to protect the structure and function of an activated-sludge microbial community against a 3-chloroaniline shock load[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(3): 1511-1520.
- [29] ZHAO P, HUANG J, WANG X H, et al. The application of bioflocs technology in high-intensive, zero exchange farming systems of *Marsupenaeus japonicus* [J]. *Aquaculture*, 2012, 354-355: 97-106.
- [30] 孙盛明, 朱健, 戈贤平, 等. 零换水条件下养殖水体中碳氮比对生物絮团形成及团头鲂肠道菌群结构的影响[J]. *动物营养学报*, 2015, 27(3): 948-955.
- SUN S M, ZHU J, GE X P, et al. Effects of different carbon/nitrogen ratios in cultured water under zero-water exchange condition on bioflocs formation and intestinal microflora structure of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(3): 948-955.
- [31] CRAB R. Bioflocs technology: an integrated system for the removal of nutrients and simultaneous production of feed in aquaculture[D]. Gent: Ghent University, 2010.

Effect of adding *Bacillus subtilis* on the microbial community structure and nutrition of bioflocs

HE Xi¹, LUO Guozhi^{1,2,3}, TAN Hongxin^{1,2,3}

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

Abstract: In order to explore the effect of adding *Bacillus subtilis* on the microbial community structure, nutrition of bioflocs and water quality in the process of system construction, the biofloc technology-aquaculture system was completed, the additive concentration of *B. subtilis* was group A, 10⁶ CFU/mL, group B, 10⁵ CFU/mL, group C, 10⁴ CFU/mL, group D, 0 CFU/mL. The experimental results showed that: The concentration of *B. subtilis* had significant effect on the concentration of TSS and FV-30; The concentration of *B. subtilis* had a significant effect on the amino acid content and C/N of the floc; The concentration of *B. subtilis* had no significant effect on crude lipid and ash content; The amino acid and crude protein contents of adding *B. subtilis* groups were higher than those of the non-added group; The additive of *B. subtilis* had a significant effect on the relative abundance at phylum and genus level of bacteria; and increasing the concentration of *B. subtilis* additive led to an increase in the concentration of Bacillus in the biofloc. *B. subtilis* can be effectively enriched on bioflocs. The addition of *B. subtilis* can effectively improve the nutrient content of bioflocs, which is conducive to providing protein source for aquaculture.

Key words: *Bacillus subtilis*; additive amount; microbial community; biofloc nutrition