

文章编号: 1674-5566(2017)04-0490-11

DOI:10.12024/jsou.20161101909

驯化硝化型生物絮体养殖南美白对虾的初步研究

谭洪新^{1,2,3}, 庞云¹, 王潮辉¹, 罗国芝^{1,2,3}, 刘文畅^{1,2}

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 上海水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306; 3. 水产动物遗传育种上海市协同创新中心, 上海 201306)

摘要: 尝试在养殖中期逐渐降低碳源添加量至零, 探讨驯化硝化型生物絮体对生物絮凝高密度南美白对虾养殖系统的水质、生物絮体细菌群落动态变化和对虾生长性能的影响。实验在 3 个跑道式养殖系统中进行, 放养密度均为 685 尾/ m^3 。水质结果表明养殖前 1~45 d, 每日按日投饵量的 100%~150% 添加葡萄糖, 能很好地降低氨氮的浓度, 但对亚硝酸盐氮处理效果不明显。投糖量下降至零后, 氨氮仍能维持在较低水平, 亚硝酸盐氮浓度明显下降。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。检测结果表明在门水平上, 异养型和硝化型生物絮体的主要优势菌群都是 Proteobacteria(变形菌门)和 Bacteroidetes(拟杆菌门)。在纲水平上, 异养型生物絮体的优势菌群是 Alphaproteobacteria(α -变形菌纲), 而硝化型生物絮体的优势菌群有 Alphaproteobacteria(α -变形菌纲)、Flavobacteria(黄杆菌纲)和 Gammaproteobacteria(γ -变形菌纲)。系统在 65 d 后不添加碳源情况下, 生物絮体的异养细菌丰度减少, 硝化螺旋菌属(*Nitrospiral*)开始快速增多并发展成为硝化细菌的优势菌群属, 异养型生物絮体逐渐转变为硝化型生物絮体。实验结束时, 总投糖量占总投饵量的 $41.03\% \pm 7.86\%$ 。南美白对虾的存活率和产量分别为 $43.35\% \pm 7.57\%$ 和 $(3.03 \pm 0.59) \text{ kg}/\text{m}^3$ 。研究表明驯化硝化型生物絮体能优化高密度零水交换对虾养殖系统生物絮体的细菌群落结构和丰度, 改善养殖水环境, 保证对虾的生长和存活, 节约成本。

关键词: 生物絮凝养殖系统; 硝化型生物絮体; 南美白对虾; 水质; 生长; 细菌群落

中图分类号: S 968.2 **文献标志码:** A

生物絮凝养殖系统因具有水处理效果好, 蛋白质利用效率高, 能提高养殖对象的免疫力等特点, 已成为国内外研究的热点^[1-2]。目前, 国内应用生物絮凝技术养殖南美白对虾的研究开始由实验阶段过渡到中试规模的养殖试验^[3-4], 这种养殖系统的运行需要满足定期添加碳源, 充分的搅拌混合和充足的溶氧等条件, 以保证异养细菌的稳定繁殖和生物絮体悬浮^[5]。

1999 年, AVNIMELECH^[6] 首次将 C/N 在水产养殖中的应用量化, 通过饲料蛋白的溶失率、微生物同化效率和碳源的含 C 量等计算出投喂 1 kg 饲料(30%~45% CP)需要添加 465.0~697.5 g 碳源(含 C 量 50%), 氨氮(TAN)才能被微生物有效地同化成为微生物蛋白。EBELING 等^[7] 通过化学计量工程分析的方式得出异养细菌代谢 1

kg 饲料(30%~45% CP)中的氨氮需要添加 380.0~710.0 g $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (含 C 量 40%)。在高密度的养殖系统中, 若按以上公式计算每日投糖量, 在养殖后期, 每日需要投入大量的碳源, 且需要不间断地补充纯氧和定期去除悬浮固体才能保持养殖水体充足的溶氧。这大大增加了工作量和养殖成本。RAY 等^[8] 研究发现自养系统的总悬浮固体物(Total suspended solids, TSS)含量明显要比异养系统的低, 而且整个养殖过程不需要添加碳源, 耗氧量也少。目前, COHEN 等^[9] 研究已证实生物絮凝养殖过程中不仅发生了异养细菌的同化作用, 也发生了自养细菌的硝化作用, 这两种途径均能有效地把有毒性的 TAN 转化, 使得养殖水质环境安全可控。但在系统构建前期, 异养同化作用发生的时间远比自养硝化作

收稿日期: 2016-11-28 修回日期: 2017-04-11

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划课题(2012BAD25B03); 上海市科学技术委员会项目(16DZ2281200, 14320501900)

作者简介: 谭洪新(1968—), 男, 教授, 博士, 博士生导师, 研究方向为循环水养殖系统与工程。E-mail: hxtan@shou.edu.cn

用要早。因此,通过调整投糖量,在养殖前期建立以异养同化为主,中期转换成以自养硝化为主的水处理途径,应用在高密度养殖南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*)的生物絮凝系统中具有重要意义。

本实验在养殖前期通过添加碳源,提升系统的生物絮体含量,养殖中期降低碳源添加量至零,驯化异养型生物絮体转化成硝化型生物絮体,探索整个养殖过程系统的水质变化、生物絮体的细菌群落结构变化和南美白对虾的生长情况,为硝化型生物絮体在对虾养殖系统的应用提供了技术参考。

1 材料与方 法

1.1 实验地点及设施

实验于2015年10月—2016年1月(100 d)在江苏省南通市启东市王鲍镇畴丰农业有限公司的室内养殖场进行,跑道式养殖系统由上海海洋大学设施与渔业实验室设计(图1)。系统主要由跑道式混凝土养殖池(图1-2)、生物滤池(图1-11)和气液混合装置3部分组成(图1-12)。养殖池主体尺寸为18 m × 2.5 m × 1.3 m,两端各有一个直径为2.5 m的半圆区,池子中间的隔墙(图1-3)厚度为0.18 m,高1.3 m,池底两边各有两个斜板集污槽(图1-4),集污槽中间有排污口(图1-5),池子水深1 m,有效养殖水体体积为39 m³。每个跑道水池配置一台叶轮(功率为0.37 kW/h,转速为30 r/min,图1-1),以推动水体沿跑道循环流动。

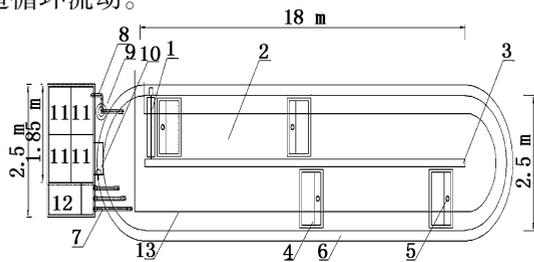


图1 跑道式养殖系统的平面图

Fig.1 The plan of runway culture system

1. 叶轮; 2. 养殖池; 3. 隔墙; 4. 集污槽; 5. 排污口; 6. 池壁;
7. 出水管; 8. 进水管; 9. 水泵; 10. 生物絮体驯化槽; 11. MBBR 生物滤池; 12. 气液混合装置; 13. 热水管道

养虾池一侧配有一套外置水处理设备。外置水处理设备经水泵(功率0.18 kW/h;流速10 T/h,图1-9)、进水管(图1-8)和出水管(图1-7)与养殖池相连,构成循环跑道式系统。外置水处理设备规格为长2.5 m × 1.40 m × 1.65 m,由4个依次底部连通的生物滤池(总工作体积3 m³,图1-11)、一个低压气液混合装置(工作体积50 L,流量:3 L/min,图1-12)和一个生物絮体驯化槽(工作体积30 L,图1-10)构成。

本次实验采用3套跑道式养殖系统,每个养殖池底部布置12个纳米曝气盘,连接一台罗茨鼓风机(功率2.2 kW/h),用于养殖池水体和生物滤池的增氧,同时配置一个锅炉,沿跑道池底一圈铺有加热管道(图1-13),水管连接锅炉水,用于水体加温。

1.2 实验用水预处理

养殖池放进少量的井水后,按20 mg/L的浓度泼洒漂白粉,全池消毒12 h后,排干。海水(盐度25)经100目网袋过滤后进入蓄水池,经消毒-曝气-沉淀处理后转移到3个养殖池中,每个养殖池进海水约16 m³,然后补充自来水淡化盐度至10。每池接种20 L的驯化成熟的浓缩絮体(上海海洋大学循环水养殖系统研发平台提供),每三天补充100 g粉料/池,每日添加50 g C₆H₁₂O₆/池,运行两周后,开始放苗。

1.3 实验的设计和养殖管理

不带特定病原的虾苗购自海南省的育苗场,2015年10月28号晚上放苗,虾苗规格为(0.8 ± 0.1) cm,每池放养密度为685尾/m³。放苗前一小时停止叶轮运行,第二天后再开启。以后每次投喂饲料前,停叶轮1.5 h后再开启。放苗后第二天开始投喂第一顿,养殖所用的饲料购自正大饲料有限公司(CP ≥ 42%,南美白对虾配合饲料)。

每天分5次投喂饵料,分别在6:00、10:00、14:00、18:00、24:00。体长小于1 cm时,投饵量占体质量的10% ~ 15%;体长1 ~ 3 cm时,投饵量占体质量的7.0% ~ 10.0%;体长3 ~ 7 cm时,投饵量占体质量的3.0% ~ 4.5%;体长7 ~ 10 cm时,投饵量占体质量3% ~ 4.5%,体长大于10 cm时,投饵量占体质量的2.0% ~ 3.0%。为了准确掌握投饵量,每个养殖池放2个食台,1.5 h后查看料台。

表 1 日投糖量的参考表

Tab. 1 The reference of daily addition of glucose

养殖天数/d Culture days	日投糖量/日投饵量 Daily addition of carbon source/Daily ration
0 ~ 50	100% ~ 150%
51 ~ 65	0% ~ 100%
>65	0%

养殖过程所用的碳源是一水葡萄糖 ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$, 纯度 $\geq 99\%$, 含 C 量 36.0%, 呼伦贝尔东北阜丰生物科技有限公司生产), 用小苏打 ($NaHCO_3$, 总碱度: 99.0% ~ 100.5%, 桐柏博源新型化工有限公司生产) 调节 pH 和碱度。葡萄糖添加时间为每天 11:00 和 16:00, 日投糖量参考 AVNIMELEMCH^[6] 和 EBELING 等^[7] 总结的碳源添加量计算公式并结合水质情况调整 (表 1)。当投糖量较多时, 投糖前补充纯氧。当 pH 低于 7.8 时, 补充 $NaHCO_3$, 慢慢调节 pH 至 8.0。每 3 天补充一次微量元素。整个养殖期间不换水也不去除部分 TSS, 每隔两周添加一次自来水, 补充蒸发掉的水分。

1.4 样品的采集与测定

1.4.1 水样的采集和水质指标的测定

每天上午 7:00 用 WTW 便携式多参数水质分析仪 (Multi 3430, 德国) 测池水 pH、溶解氧 (DO)、温度 (T)、盐度 (Salinity)。每 5 天上午 8:00 取水样, 经 $0.45 \mu m$ 滤膜过滤后测定总氨氮 (TAN), 亚硝酸盐氮 ($NO_2^- - N$)、硝酸盐氮 ($NO_3^- - N$)、正磷酸盐 ($PO_4^{3-} - P$) 和碱度 (Alkalinity)。每 5 天测量一次总悬浮颗粒物 (Total Suspended Solids, TSS) 和絮体体积 (Floc Volume, FV)。TAN 含量的测定采用水杨酸-次氯酸盐光度法 (752S 紫外可见分光光度计, 上海棱光技术有限公司生产, 下同), $NO_2^- - N$ 含量的测定采用 N-(1-萘基)-乙二胺分光光度法, $NO_3^- - N$ 含量的测定采用紫外分光光度法, $PO_4^{3-} - P$ 含量的测定采用钼锑抗光度法, 碱度的测定采用酸碱指示剂滴定法, TSS 含量的测定采用称重法^[10]。FV 的测定参考 AVNIMELEMCH 和 KOCHBA^[11] 使用的方法, 用英霍夫管取 1 000 mL 水样, 静置 30 min 后, 悬浮物的沉积量即为 FV。

1.4.2 生物絮体细菌样品的采集与测序

生物絮体菌样的采集 根据实验的进程每池每次随机取 50 mL 养殖水, 保存于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱

中。实验结束后送样至上海欧易生物医学科技有限公司进行高通量测序。

生物絮体的细菌 DNA 提取和 PCR 扩增 使用 E. Z. N. A.[®] soil DNA Kit (Omega Bio-tek, Norcross, GA, U. S.) 提取生物絮体的细菌 DNA, 使用 16S rDNA 的 V3V4 区特异引物 343F 和 798R 进行 PCR 扩增。每个样本重复 3 次。

IlluminaMiSeq 测序 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳测定, 回收目标条带。使用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axygen Biosciences, Union City, CA, U. S.) 进行纯化并使用 QuantiFluor[™]-ST (Promega, U. S.) 进行定量, 纯化的产物进行相应比例的混合后在 IlluminaMiSeq 平台进行 equimolarand 双末端测序。

测序数据处理由 Illumina Miseq 测序所得数据进行去杂并拼接, 使用 Trimmomatic 软件对原始双端序列进行去杂。去杂后的双端数据使用 FLASH 软件进行拼接。拼接后的原始数据接着进行精准去杂, 去除低质量的碱基序列以及模糊碱基序列。随后对去杂后的数据采用 usearch 去除嵌合体序列, 最终得到较优质的序列, 进行下游分析。

OTU 聚类 and 物种注释 首先进行挑选 OTU 步骤, 即对所有的优质序列使用 CD-HIT 方法以 97% 相似度进行 OTU 分类, 97% 相似度即对应物种分类到属的一个水平分类标准。随后统计各个样品包含的 OTU 种类以及每个 OTU 中含有的序列的比例。并且对每个 OTU 挑选出代表序列, 同时, 将所有代表序列与 Greengenes 数据库比对, 通过 RDPclassifier Naive Bayesian 分类算法对代表序列进行分类注释。分别在门 (phylum)、纲 (class) 和属 (genus) 的分类水平上统计样本的群落丰度和组成。

1.4.3 南美白对虾生长性能的测定

实验结束, 随机捞起南美白对虾 50 尾/池, 测量虾的体质量、体长。记录每个养殖系统南美白对虾的总产量 (Total Production, kg/m^3)、成活率 (Survival Rate, $R_s, \%$)、特定生长率 (Specific Growth Rate, $R_{sc}, \%$)、饲料系数 (Feed Coefficient Rate, R_{fc})。计算公式如下:

$$R_s (\%) = 100 \times (N_f / N_i) \quad (1)$$

$$R_{sc} (\% / d) = 100 \times [\ln (W_1) - \ln (W_0)] /$$

$$(T_1 - T_0) \quad (2)$$

$$R_{FC} = F / (W_f - W_i) \quad (3)$$

式中: N_f 和 N_i 分别为终末存活尾数和初始投放尾数, T_0 和 T_1 分别为养殖第一天和最后一天, W_1 和 W_0 分别为时间 T_1 和 T_0 的平均体质量(g), F 为饲料总投喂量, W_f 和 W_i 分别为终末总质量和初始总质量。

1.5 数据的分析与处理

采用 SPSS 17.0 对数据进行单因素方差分析,实验结果用平均值 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 表示。

2 结果

2.1 日常水质的变化

本套系统采取 24 h 鼓风增氧结合投糖前补充纯氧的增氧方式,整个养殖期间溶解氧能够保持在 (6.80 \pm 0.70) mg/L,变化范围为 5.13 ~ 7.97 mg/L。高的溶解氧水平保证系统顺利进行高密度养殖对虾。系统利用锅炉加热能较好地保持养殖水体的温度在 (27.90 \pm 1.30) $^{\circ}$ C,变化范围为 23.8 ~ 29.5 $^{\circ}$ C,保证南美白对虾顺利越冬。养殖期间,养殖水体的 pH 为 7.80 \pm 0.13,碱度为 (237.90 \pm 67.40) mg CaCO₃/L,能满足硝化型生物絮体的驯化和南美白对虾的生长需求。

TAN 浓度在 0 ~ 25 d 处于上升阶段。25 d, TAN 浓度达到最高 (0.81 \pm 0.14) mg/L。25 ~ 40 d, TAN 浓度快速下降,40 ~ 99 d 略有上升后逐渐趋于稳定水平(图 2a)。NO₂⁻-N 浓度在养殖 0 ~ 20 d 一直处于较低水平。随着投饵量的增加,从 20 d 开始 NO₂⁻-N 浓度快速上升并在第 45 天到达最高 (8.08 \pm 1.85) mg/L 后快速下降(图 2b)。NO₃⁻-N 和 PO₄³⁻-P 浓度变化的趋势相似(图 2c 和 2d),在 0 ~ 40 d 都保持较低浓度,在 40 d 以后开始快速上升,直至 99 d,NO₃⁻-N 和 PO₄³⁻-P 最高浓度分别达到 (207.13 \pm 35.10) mg/L 和 (22.18 \pm 2.87) mg/L。

养殖前期, FV 和 TSS 的含量同时增加(图 3)。随着投糖量的减少,在养殖 55 ~ 75 d, FV 和 TSS 含量出现缓慢下降。但随着投喂量的持续增加,75 d 后即使没有添加碳源, FV 和 TSS 含量仍

出现上升,在养殖 99 d 时,最高浓度分别达到 (53.67 \pm 6.03) mL/L 和 (709.5 \pm 95.46) mg/L。

2.2 养殖期间生物絮体的细菌群落的动态变化

由图 4 可知,在门水平上,整个养殖期间, Proteobacteria(变形菌门)和 Bacteroidetes(拟杆菌门)一直都是主要的优势菌群,其次是 Actinobacteria(放线菌门)和 Planctomycetes(浮霉菌门)。TM7 门在养殖 32 d 和 51 d 成为主要优势菌群。Cyanobacteria(蓝藻细菌门)和 Firmicutes(厚壁菌门)在养殖周期内的变化趋势相似,在养殖 1、15 d 的丰度远高于养殖 32 ~ 99 d 的丰度。Nitrospirae(硝化螺旋菌门)在养殖 1 d 和 15 d 时,丰度较低,60 d 开始呈上升趋势。

由图 5 可知,纲水平上,整个养殖期间丰度一直比较高的优势菌群是 α -变形菌纲(Alphaproteobacteria)。黄杆菌纲(Flavobacteria)和 γ -变形纲(Gammaproteobacteria)在 60 ~ 99 d 的含量要比 1 ~ 51 d 的要高。其中 TM7-3 在养殖 32 d 和 51 d 时含量较高,成为主要优势菌群之一。Bacilli(芽孢杆菌纲)在养殖 1 d、15 d 的含量较高,32 ~ 100 d 的含量较低。放线菌纲(Actinobacteria)在 32 d 成为优势菌群之一。硝化螺旋菌纲(Nitrospira)在养殖 1 ~ 51 d 含量一直很低,但在 60 ~ 99 d,一直在增加。

氨氧化细菌(AOB)和亚硝酸氧化细菌(NO₂)⁻在 60 ~ 99 d 的丰度明显要比 0 ~ 51 d 的丰度要高(表 2)。Nitrosomonas(亚硝化单胞菌属)和 Nitrosovibrio(亚硝化弧菌属)的含量极低,其中有一类属于亚硝化单胞菌科的尚未分类的菌属成为系统氨氧化细菌(AOB)的优势菌属。亚硝酸氧化细菌(NO₂)⁻中,Nitrospira(硝化螺旋菌属)的含量在 1 ~ 51 d 一直处于较低水平。随着投糖量减少至零,在 51 ~ 72 d,其丰度快速增长,72 ~ 99 d,其丰度增长速度减缓。另一类尚未分类属的亚硝酸氧化细菌(NO₂)⁻在 0 ~ 71 d 尚未检测到,但在 81 ~ 99 d 呈增加的趋势。0 ~ 32 d,总硝化细菌的丰度波动明显,32 ~ 60 d,总硝化细菌的丰度呈多倍数量增长,60 ~ 99 d,总硝化细菌的丰度增长变化趋于平缓。

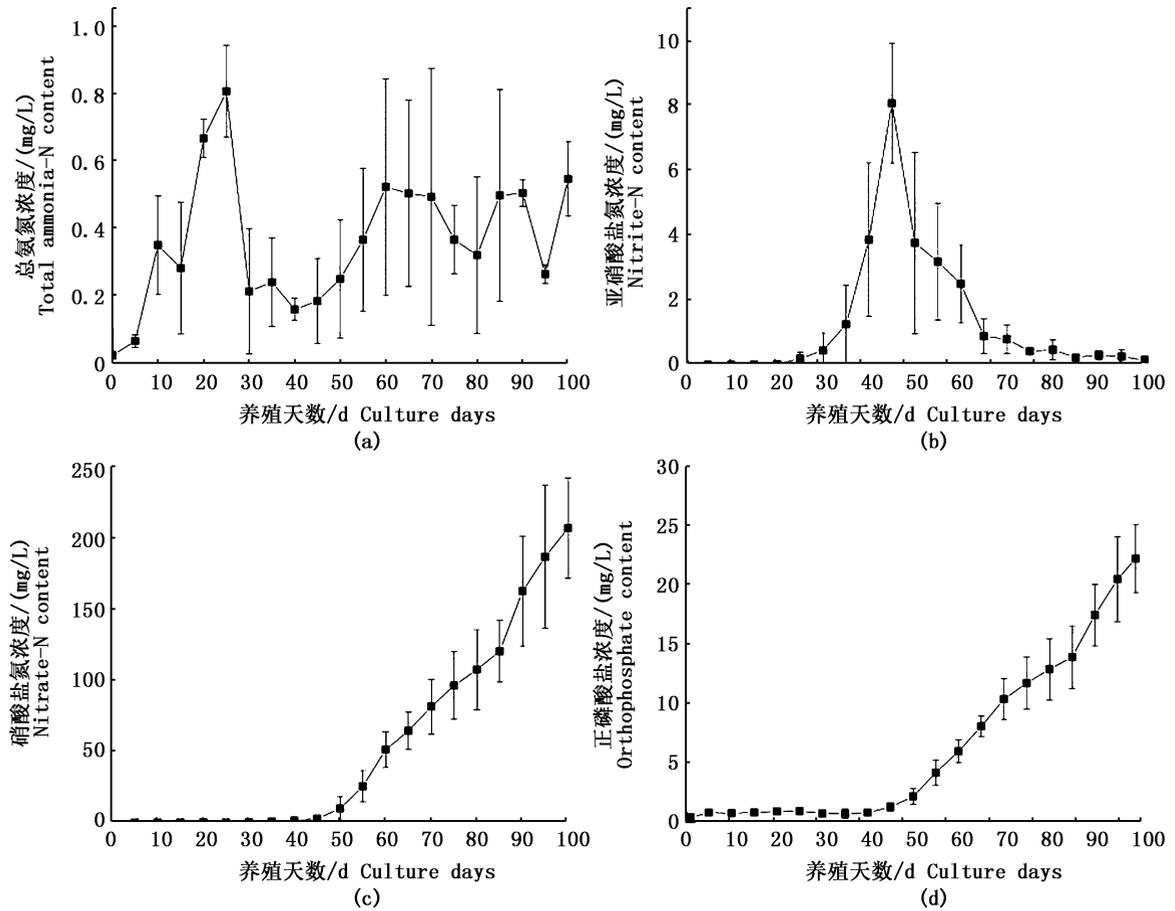


图2 养殖期间 TAN,NO₂⁻-N,NO₃⁻-N 和 PO₄³⁻-P 的动态变化

Fig.2 Dynamic changes of total ammonia nitrogen (TAN, a), nitrite nitrogen (NO₂⁻-N, b), nitrate nitrogen (NO₃⁻-N, c), orthophosphate (PO₄³⁻-P, d) throughout the culture period

数据表示为实验组3个重复的平均值 ± 标准差,图3-5 同

Values are the means(± standard deviation) of the three replications in the experiment group, the same in fig. 3-5

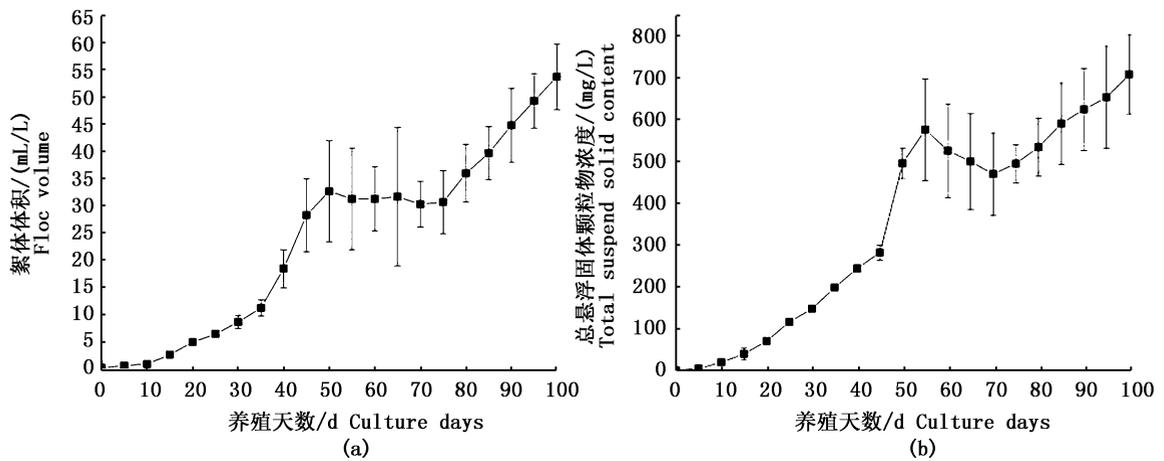


图3 养殖期间 FV、TSS 的动态变化

Fig.3 Dynamic changes of floc volume (FV, a), total suspended solids(TSS, b) throughout the culture period

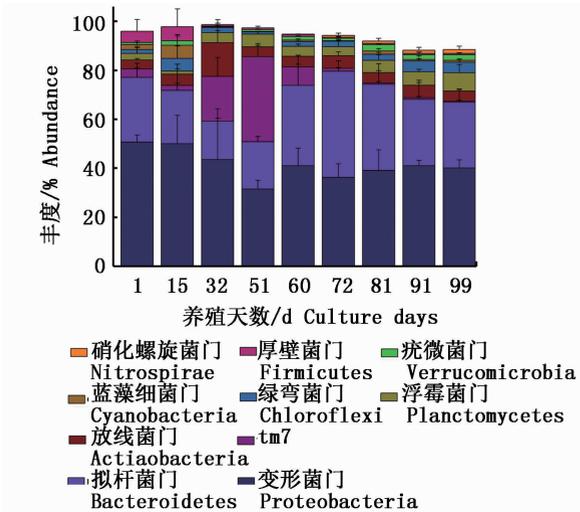


图 4 养殖期间生物絮体的优势菌群在门水平的分布
Fig. 4 Predominant bacterial composition at phylum level of bio-floc throughout the culture period

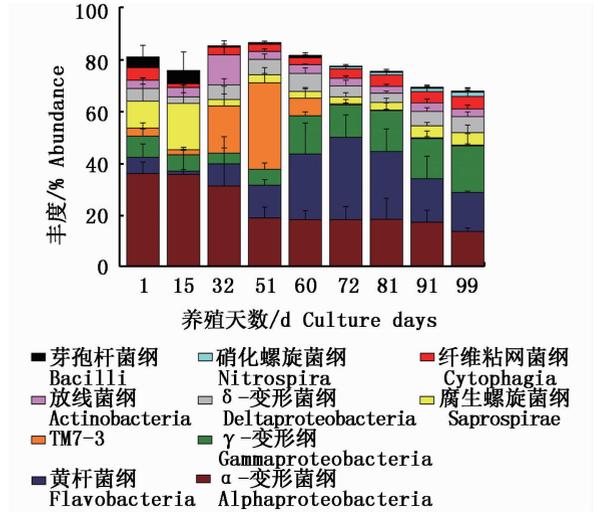


图 5 养殖期间生物絮体优势菌群在纲水平的分布
Fig. 5 Predominant bacterial community at class level of bio-floc throughout the culture period

表 2 养殖周期内生物絮体的硝化细菌在属水平的丰度变化

Tab. 2 The change of abundance at the genus level of bio-floc nitrifying bacteria throughout the culture period

硝化细菌分类 Nitrifying bacteria taxonomy	硝化细菌属分类 Nitrifying bacteria genera taxonomy	丰度/% Abundance								
		0 d	15 d	32 d	51 d	60 d	72 d	81 d	91 d	99 d
	Other	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0.01	0±0	0.02±0.01	0.02±0.03
氨氧化细菌 (AOB)	Nitrosomonas (亚硝化单胞细菌属)	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0.01	0±0	0±0	0±0
	Nitrosovibrio (亚硝化弧菌属)	0±0	0±0	0±0	0±0.01	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
	unclassified_Nitrosomonadaceae (f)	0.22±0.33	0.01±0.02	0.02±0.02	0.19±0.03	0.87±0.21	0.75±0.20	0.06±0.16	0.44±0.26	0.44±0.30
亚硝酸盐氧化细菌 (NOB)	Nitrospira (硝化螺旋菌属)	0.01±0.01	0±0	0±0	0.01±0.01	0.08±0.06	0.79±0.95	1.03±1.08	1.06±1.25	1.23±1.40
	unclassified__Nitrospiraceae (f)	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0.02±0.02	0.23±0.20	0.39±0.40

注:数据表示为实验组 3 个重复的平均值 ± 标准差
Note: Values are the means (± standard deviation) of the three replications in the experiment group

2.3 南美白对虾的生长情况

本次实验在放养密度 685 尾/m³ 条件下,养殖 100 d 后,总 C₆H₁₂O₆ · H₂O 和总 NaHCO₃ 添加量分别占总投饵量的 41.03% ± 7.86% 和

27.56% ± 1.93%,南美白对虾的存活率和产量分别为 43.35% ± 7.57% 和 (3.03 ± 0.59) kg/m³ (表 3)。

表 3 南美白对虾在驯化硝化型生物絮体的养殖系统的生长情况

Tab. 3 Growth performance of Litopenaeus vannamei in culture system with domesticating nitrifying bio-flocs

生长性能 Growth performance	初始个体质量/ (g/尾) Initial individual weight	终末个体质量/ (g/尾) Final individual weight	存活率/% Survival rate	产量/ (kg/m ³) Production	特定生长率/% Specific growth rate	饲料转化率/% Feed coefficient rate
参数 Parameters	0.01 ± 0.00	10.18 ± 0.51	43.35 ± 7.57	3.03 ± 0.59	7.15 ± 0.05	1.68 ± 0.21

注:数据表示为实验组 3 个重复的平均值 ± 标准差
Note: Values are the means (± standard deviation) of the three replications in the experiment group

3 讨论

3.1 驯化硝化型生物絮体对养殖南美白对虾的零水交换系统的水质变化影响

生物絮凝养殖系统中,异养细菌利用碳源增殖需要消耗养殖水体中大量的溶解氧^[7]。本研究在养殖 30~65 d,每次添加碳源前都需要补充纯氧,才能保证溶解氧大于 5.0 mg/L。但在 65 d 后不再添加碳源情况下,仅需要鼓风增氧就能满足高密度对虾的生长需求,节省了碳源成本和供氧成本。

残饵和粪便的积累往往会导致养殖水体 TAN 和 NO_2^- -N 含量升高,严重时可引起对虾中毒,影响对虾生长。GAONA 等^[12]研究表明富含絮体的养殖水可以维持低水平的 TAN 和 NO_2^- -N。但也有一些研究发现在高密度的零水交换养殖系统里,仅靠异养同化为主的水处理方式,仍然出现 TAN 和 NO_2^- -N 积累^[13]。本研究发现养殖前期,随着葡萄糖持续添加,促使了异养细菌生长,降低了 TAN 的浓度,但是对 NO_2^- -N 的积累没起到很好的抑制效果,这与 ARNOLD 等^[14]研究的结果相似。猜测可能因为养殖前期,异养细菌利用 TAN 的效率远比 NO_2^- -N 要高,而且亚硝酸盐氧化细菌比氨氧化细菌挂膜速度要慢,导致了 NO_2^- -N 的积累^[15]。养殖第 45 天开始, NO_2^- -N 快速下降并伴随着 NO_3^- -N 的明显积累,这表明硝化细菌尤其是亚硝酸盐氧化细菌 (NOB) 已经在生物絮体中挂膜成功。随着碳源的添加量减少(51~65 d),TAN 浓度先升高后再次出现下降, NO_2^- -N 浓度并没有出现明显积累。因此综合 TAN、 NO_2^- -N 和 NO_3^- -N 浓度随碳源添加量减少而变化的规律,可以初步判断硝化型生物絮体在 60 d 时已被驯化成熟。自养细菌的硝化作用比异养细菌的同化作用能更好抑制 NO_2^- -N 浓度的积累,保证养殖水环境的安全稳定。

在养殖南美白对虾的生物絮凝系统中, NO_3^- -N 和 PO_4^{3-} -P 常常是积累的^[16]。SAMOCHA 等^[17]在高密度零水交换养殖系统中利用沉降池去除 TSS 的方式,在养殖周期内平均 NO_3^- -N 浓度为(220 ± 84) mg/L。本次研究中, NO_3^- -N 浓度最高达到(207.23 ± 35.10) mg/L,接近 KUHN 等^[18]建议的 NO_3^- -N 安全浓度(220

mg/L)。 PO_4^{3-} -P 含量在养殖 0~40 d 时,一直维持较低,可能是生物絮体中的聚磷菌吸收了部分的可溶性磷^[19]。

随着饲料和碳源添加量的增加,异养细菌可利用碳素和氮素快速增加细菌生物量,从而增加絮体含量。SAMOCHA 等^[20]研究表明 TSS > 500 mg/L 时仍然适合养殖南美白对虾。本研究在 100 d 的养殖周期内,系统不交换水也不去除部分 TSS, TSS 的含量最高达到(709.5 ± 95.46) mg/L。随着投糖量的减少, FV 和 TSS 浓度缓慢下降,推测可能因为投糖量的减少,部分异养细菌死亡,导致生物絮体浓度下降,但是随着投喂量的持续增加,养殖后期 TSS 的浓度仍会升高。受碳源、搅拌程度和细菌群落结构等因素的影响,不同的养殖环境,絮体的粒径以及疏松程度存在差异,相同 FV 的含量,对应的 TSS 含量往往不同。RAY 等^[21]研究表明通过外置沉降室的生物絮凝系统去除 59% TSS, NO_3^- -N 可以减少 60%,本研究在 65 d 以后不再添加碳源,系统形成了以自养硝化为主的水处理途径。这说明驯化硝化型生物絮体的高密度零水交换的对虾养殖系统在不去除部分 TSS 的情况下,仍能保证 NO_3^- -N 和 TSS 浓度在适合对虾生长的范围内。

自养细菌和异养细菌的繁殖都需要消耗碱度,但相比异养细菌,自养细菌消耗的碱度更多^[7]。FURTADO 等^[22]研究发现在零水交换的系统中,碱度在 70 mg CaCO_3 /L 以上, $\text{pH} \geq 7.38$ 的条件下才能保证絮体的形成和硝化细菌的挂膜。CHEN 等^[23]建议要保证零水交换的系统中高效率的硝化作用,碱度应维持高于 200 mg CaCO_3 /L。DAVIDSON 等^[24]报道在低水交换率的循环水系统中每投喂 1 kg 饲料(CP ≥ 41%)需要添加大约 0.15~0.22 kg NaHCO_3 ,以维持碱度接近 200 mg CaCO_3 /L。本次研究中,总 NaHCO_3 的添加量占饲料(CP ≥ 42%)投喂量的 27.56% ± 1.93%,可以维持 pH 和碱度分别在 7.80 ± 0.13 和(237.90 ± 67.40) mg CaCO_3 /L。造成较高的投碱量可能因为硝化型生物絮体的形成消耗了大量的碱度以及养殖水体长期维持较高水平的 pH 所致。

3.2 驯化硝化型生物絮体对生物絮体的细菌群落变化的影响

碳源的添加量影响生物絮体的细菌群落结

构^[25]。异养型生物絮体养殖系统内生物絮体的细菌群落主要优势菌是变形菌^[26-28]。变形菌成为优势菌群,有利于促进系统的有机物分解和营养物质去除。本研究中利用高通量测序技术分析养殖南美白对虾的系统中驯化硝化型生物絮体对细菌群落在整个养殖周期内的丰度变化的影响,分析结果发现受碳源添加量的影响,生物絮体的细菌群落丰度发生明显改变,厚壁菌门和硝化螺旋菌门的细菌丰度变化呈两极分化。60 d 时,硝化螺旋菌门的丰度开始增加,厚壁菌门丰度下降。72 d 时,因缺乏外源碳源的添加,硝化螺旋菌门的丰度(0.79% ± 0.95%)开始超过厚壁菌门(0.43% ± 0.11%)的丰度。在门水平上,异养型和硝化型生物絮体始终占优势的菌群都是 Proteobacteria(变形菌门)和 Bacteroidetes(拟杆菌门)。在纲水平上,异养生物絮体的优势菌群是 Alphaproteobacteria(α-变形菌纲),而硝化型生物絮体的优势菌群有 Alphaproteobacteria(α-变形菌纲)、Flavobacteria(黄杆菌纲)和 Gammaproteobacteria(γ-变形纲)。本次研究检测到整个养殖过程都存在芽孢杆菌。但随着养殖的进行,因外源碳源的缺乏,芽孢杆菌的增长受到抑制。值得注意的是,本次研究在生物絮体养殖系统中首次检测到丰富的待定门 TM7。TM7-3 纲属于 TM7 门的一个分支,属于一类环境耐受力超强的异养型细菌,可以利用碳源增长并与酸杆菌、厚壁菌等发生竞争关系,极易大量繁殖且具致病性^[29]。本研究中 TM7-3 在 32、51 d 期间发展成优势菌群之一,分别占 18.06% 和 33.23%。这可能是养殖前期碳源的添加也刺激了 TM7-3 的增长,导致芽孢杆菌等异养菌等增长受抑制而含量较低。这表明高含碳量的养殖水体也存在一定的风险,可能会促使某些致病性异养细菌在竞争中处于优势。

养殖系统的硝化细菌往往需要 5~7 周的时间去培养才能显著减低 TAN 和 NO_2^- -N 的浓度^[9,14,30]。本次研究中,整个系统中硝化细菌群落结构比较单一,氨氧化细菌(AOB)仅有一类属于亚硝化单胞菌科的尚未分类的菌属在整个养殖周期内是优势菌属(0.01%~1.06%)。硝化螺旋菌门的 *Nitrospira*(硝化螺旋菌属)属于亚硝酸盐氧化菌(NO_B)的主要优势菌属,参与氧化 NO_2^- -N 成为 NO_3^- -N 的过程^[31]。尽管高通量检

测发现在养殖初期已存在氨氧化细菌,但 *Nitrospira*(硝化螺旋菌属)含量极低,甚至在养殖 15 d 和 32 d 检测不到它们的丰度,在 72 d 后发展成为生物絮体中硝化细菌的优势菌属(0.79%~1.23%)。猜测可能是受外源碳源添加的影响,异养细菌的繁殖抑制硝化螺旋菌属的增长,导致 NO_2^- -N 在养殖前期出现积累。直到 45 d, NO_2^- -N 的浓度开始出现下降,这与前人的研究发现基本一致。猜测可能是一方面高浓度的 NO_2^- -N 刺激了亚硝酸盐氧化细菌的快速增长,另一方面 TSS 的持续增加为硝化细菌的顺利挂膜提供充足的场所。微生物的生长需要经历延迟期、对数期、稳定期和衰亡期。由硝化细菌的丰度变化趋势可知,本研究中硝化细菌在 60~72 d,开始由对数期(32~60 d)进入稳定期(72~99 d),硝化细菌的丰度的增长速度减缓并趋于平稳波动,TAN 和 NO_2^- -N 浓度均处于较稳定的低水平,标志着成熟的硝化型生物絮体已被成功驯化。

3.3 驯化硝化型生物絮体对南美白对虾生长性能的影响

研究证实生物絮体能为养殖对象提供营养来源^[32-34]。自养型生物絮体和异养型生物絮体均能提升南美白对虾的生长和存活^[35]。

蒲利云等^[36]利用循环系统养殖南美白对虾成虾,养殖周期为 152 d,对虾的存活率为 48.16%~56.72%,产量为 2.99~3.47 kg/m³。张许光等^[37]研究在异养型生物絮体系统养殖南美白对虾,每天按饲料(42% CP)投喂量的 70% 在水体中添加赤砂糖,养殖周期 113 d,对虾的存活率为 25.0%~75.3%,产量为 1.53~4.01 kg/m³。本次研究在驯化硝化型生物絮体系统中养殖南美白对虾,65 d 后不添加碳源的情况下,直至收获时,总投糖量/总投饵量为 41.03% ± 7.86%,产量(3.03 kg/m³)和存活率(43.35%)与上述报道结果相近,但均高于刘军等^[38]利用温棚高位池换水系统养殖南美白对虾的产量(0.6~0.7 kg/m³)和存活率(32.3%~38.9%)。这表明对虾生活在富含硝化型生物絮体的系统中,也能保证健康生长和存活,提高养殖效益。本次研究表明养殖前期利用碳源的添加,提升异养型生物絮体的含量,使系统顺利渡过硝化细菌缓慢增长期并为硝化细菌的附着提供场所,直至

NO₂⁻-N 浓度下降, NO₃⁻-N 浓度升高, 开始逐渐降低投糖量至零, 系统转为培养硝化型生物絮体的调控方式, 可以有效地调控水质, 保持稳定的养殖水环境, 促进对虾的健康生长, 降低投入成本和提高养殖利润, 这对生物絮凝养殖系统管理的更新具有重要推进作用。

参考文献:

- [1] HARI B, MADHUSOODANA KURUP B, VARGHESE J T, et al. The effect of carbohydrate addition on water quality and the nitrogen budget in extensive shrimp culture systems[J]. *Aquaculture*, 2006, 252(2/4): 248-263.
- [2] XU W J, PAN L Q. Enhancement of immune response and antioxidant status of *Litopenaeus vannamei* juvenile in biofloc-based culture tanks manipulating high C/N ratio of feed input[J]. *Aquaculture*, 2013, 412-413: 117-124.
- [3] 高磊. 碳氮比调节在对虾养殖中的作用及优化[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
GAO L. The effect and optimization of adjusting C/N ratio in the shrimp culture system [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012.
- [4] 王超, 潘鲁青, 张开全. 生物絮团在凡纳滨对虾零水交换养殖系统中的应用研究[J]. *海洋湖沼通报*, 2015(2): 81-89.
WANG C, PAN L Q, ZHANG K Q. Research and application of bioflocs in zero water exchange system for *Litopenaeus vannamei* [J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2015(2): 81-89.
- [5] 罗国芝, 朱泽闻, 潘云峰, 等. 生物絮凝技术在水产养殖中的应用[J]. *中国水产*, 2010(2): 62-63.
LUO G Z, ZHU Z W, PAN Y F, et al. Application of biofloc technology in Aquaculture [J]. *China Fisheries*, 2010(2): 62-63.
- [6] AVNIMELECH Y. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems[J]. *Aquaculture*, 1999, 176(3/4): 227-235.
- [7] 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.
- [8] RAY A J, LOTZ J M. Comparing a chemoautotrophic-based biofloc system and three heterotrophic-based systems receiving different carbohydrate sources [J]. *Aquacultural Engineering*, 2014, 63: 54-61.
- [9] COHEN J M, SAMOCHA T M, FOX J M, et al. Characterization of water quality factors during intensive raceway production of juvenile *Litopenaeus vannamei* using limited discharge and biosecure management tools [J]. *Aquacultural Engineering*, 2005, 32(3/4): 425-442.
- [10] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
State Environmental Protection Administration of China. *Methods of Monitoring and Analyzing for Water and Wastewater* [M]. 4th ed. Beijing: China Environmental Science Press, 2002.
- [11] AVNIMELECH Y, KOCHBA M. Evaluation of nitrogen uptake and excretion by *tilapia* in bio floc tanks, using 15N tracing [J]. *Aquaculture*, 2009, 287(1/2): 163-168.
- [12] GAONA C A P, POERSCH, L H, KRUMMENAUER D, et al. The effect of solids removal on water quality, growth and survival of *Litopenaeus vannamei* in a biofloc technology culture system [J]. *International Journal of Recirculating Aquaculture*, 2011, 12: 54-73.
- [13] 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 biofloc formation and its effects in closed culture system of *Litopenaeus vannamei* [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(2): 69-75.
- [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] 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.
- [16] RAY A J, SEABORN G, LEFFLER J W, et al. Characterization of microbial communities in minimal-exchange, intensive aquaculture systems and the effects of suspended solids management [J]. *Aquaculture*, 2010, 310(1/2): 130-138.
- [17] SAMOCHA T M, WILKENFELD J S, MORRIS T C, et al. Intensive raceways without water exchange analyzed for white shrimp culture [J]. *Global Aquaculture Advocate*, 2010, 13(E2): 22-24.
- [18] KUHN D D, SMITH S A, BOARDMAN G D, et al. Chronic toxicity of nitrate to Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: Impacts on survival, growth, antennae length, and pathology [J]. *Aquaculture*, 2010, 309(1/4): 109-114.
- [19] ZUBKOV M V, MARY I, WOODWARD E M S, et al. Microbial control of phosphate in the nutrient-depleted North Atlantic subtropical gyre [J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(8): 2079-2089.
- [20] 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.

- [21] RAY A J, LEWIS B L, BROWDY C L, et al. Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems [J]. *Aquaculture*, 2010, 299(1/4): 89-98.
- [22] FURTADO P S, POERSCH L H, WASIELESKY Jr W. The effect of different alkalinity levels on *Litopenaeus vannamei* reared with biofloc technology (BFT) [J]. *Aquaculture International*, 2015, 23(1): 345-358.
- [23] CHEN S L, LING J, BLANCHETON J P. Nitrification kinetics of biofilm as affected by water quality factors [J]. *Aquacultural Engineering*, 2006, 34(3): 179-197.
- [24] DAVIDSON J, GOOD C, BARROWS F T, et al. Comparing the effects of feeding a grain- or a fish meal-based diet on water quality, waste production, and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* performance within low exchange water recirculating aquaculture systems [J]. *Aquacultural Engineering*, 2013, 52: 45-57.
- [25] 李杰. 碳氮比调控对虾蟹混养系统细菌群落结构及其功能多样性影响的研究[D]. 青岛:中国海洋大学, 2015.
- LI J. Studies on the effects of carbon regulation on the structure and functions of bacterial community in the polyculture system of *Portunus trituberculatus* and *Litopenaeus vannamei* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2015.
- [26] 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.
- [27] 夏耘, 郁二蒙, 谢骏, 等. 基于PCR-DGGE技术分析生物絮团的细菌群落结构[J]. *水产学报*, 2012, 36(10): 1563-1571.
- XIA Y, YU E M, XIE J, et al. Analysis of bacterial community structure of Bio-floc by PCR-DGGE [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(10): 1563-1571.
- [28] 杨章武, 杨铿, 张哲, 等. 基于宏基因组测序技术分析凡纳滨对虾育苗中生物絮团细菌群落结构[J]. *福建水产*, 2015, 37(2): 91-97.
- YANG Z W, YANG K, ZHANG Z, et al. Research on the biofloc bacterial community structure during larval rearing of *Litopenaeus vannamei* using metagenome sequencing [J]. *Journal of Fujian Fisheries*, 2015, 37(2): 91-97.
- [29] WINSLEY T J, SNAPE I, MCKINLAY J, et al. The ecological controls on the prevalence of candidate division TM7 in polar regions [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 345.
- [30] KUHN D D, DRAHOS D D, MARSH L, et al. Evaluation of nitrifying bacteria product to improve nitrification efficacy in recirculating aquaculture systems [J]. *Aquacultural Engineering*, 2010, 43(2): 78-82.
- [31] EHRICH S, BEHRENS D, LEBEDEVA E, et al. A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, *Nitrospira moscoviensis* sp. nov. and its phylogenetic relationship [J]. *Archives of Microbiology*, 1995, 164(1): 16-23.
- [32] MCINTOSH D, SAMOCHA T M, JONES E R, et al. The effect of a commercial bacterial supplement on the high-density culturing of *Litopenaeus vannamei* with a low-protein diet in an outdoor tank system and no water exchange [J]. *Aquacultural Engineering*, 2000, 21(3): 215-227.
- [33] TACON A G J, CODY J J, CONQUEST L D, et al. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2002, 8(2): 121-137.
- [34] CARDONA E, LORGEUX B, GEFFROY C, et al. Relative contribution of natural productivity and compound feed to tissue growth in blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) reared in biofloc: Assessment by C and N stable isotope ratios and effect on key digestive enzymes [J]. *Aquaculture*, 2015, 448: 288-297.
- [35] BECERRA-DÓRAME M J, MARTÍNEZ-PORCHAS M, MARTÍNEZ-CÓRDOVA L R, et al. Production response and digestive enzymatic activity of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) intensively pregrown in microbial heterotrophic and autotrophic-based systems [J]. *Scientific World Journal*, 2012, 2012: 723654.
- [36] 蒲利云, 杨明秋, 何玉贵, 等. 南美白对虾工厂化循环水养殖技术 [J]. *水产科技情报*, 2016, 43(2): 75-78.
- PU L Y, YANG M Q, HE Y G, et al. Technology of industrialized recirculating aquaculture on *Litopenaeus vannamei* [J]. *Fisheries Science & Technology Information*, 2016, 43(2): 75-78.
- [37] 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.
- [38] 刘军, 戴习林, 臧维玲. 凡纳滨对虾温室高位池养殖密度及简易水质调控措施效果研究 [J]. *上海海洋大学学报*, 2016, 25(2): 189-197.
- LIU J, DAI X L, ZANG W L. Research of breeding density and water quality control measures in *Litopenaeus vannamei* greenhouse high-intensive ponds [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2016, 25(2): 189-197.

Preliminary study on domesticating nitrifying bio-flocs to rear *Litopenaeus vannamei*

TAN Hongxin^{1,2,3}, PANG Yun¹, WANG Chaohui¹, LUO Guozhi^{1,2,3}, LIU Wenchang^{1,2}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Aquacultural Engineering Research Center, Shanghai 201306, China; 3. Shanghai Collaborative Innovation For Aquatic Animal Genetics and Breeding, Shanghai 201306, China)

Abstract: This study tries to gradually reduce the addition of carbon source to zero, and to explore the effect of domesticating nitrifying bio-flocs on water quality, bacterial community dynamics of bio-floc and the growth performance of shrimp in high-intensive culture system. Experiment was carried out in three runway aquaculture systems at stocking density of 685 shrimp/m³. Water quality results showed that daily addition of glucose at 100% -150% of feed, which can decrease the concentration of TAN, but the concentration of NO₂⁻-N was not decreased obviously. When the addition of glucose dropped to zero, TAN can be maintained at lower level, and the NO₂⁻-N concentration decreased significantly. The bacterial community structure was analyzed by using high throughput sequencing technology. At the phylum level, experiment results showed that both the main advantage microflora of heterotrophic bioflocs and nitrifying bioflocs are Proteobacteria and Bacteroidetes. At the class level, dominant microflora of heterotrophic biofloc is Alphaproteobacteria, and dominant microflora of nitrifying bioflocs are Alphaproteobacteria, Flavobacteria and Gammaproteobacteria. After 65 d, study found that without adding carbon source, nitrifying bio-flocs can limit the abundance of heterotrophic bacteria, *nitrospira* was rising, and developing into dominant bacteria. At the end of the experiment, glucose which is 41.03% ± 7.86% of feed was added throughout the culture period. The survival rate and harvest of *Litopenaeus vannamei* respectively were 43.35% ± 7.57% and (3.03 ± 0.59) kg/m³. The domestication of nitrifying bio-flocs not only saved cost, but also effectively optimized the structure of bacterial communities, and contributed to better water environment which results in the higher growth and survival of shrimp.

Key words: bio-floc culture system; nitrifying bio-floc; *Litopenaeus vannamei*; water quality; growth; bacterial community