

DOI: 10.12264/JFSC2022-0076

不同氮素形式的 C/N 对生物絮团氨氮转化效率及营养组分的影响

徐金祥¹, 李佳洋¹, 俞奇力², 谭洪新^{1,3}, 罗国芝^{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. 杭州萧山东海养殖有限责任公司, 浙江 杭州 311200;

3. 上海市水产动物良种创制与绿色养殖协同创新中心, 上海 201306

摘要: 碳氮比(C/N)调控是生物絮团养殖的核心技术特征, 相关研究和实践中 C/N 中的碳和氮有不同的表征形式, 本研究用溶解有机碳(dissolved organic carbon, DOC)表征碳, 分别用总氮(total nitrogen, TN)、溶解无机氮(dissolved inorganic nitrogen, DIN)、总氨氮(total ammonia nitrogen, TAN)表征氮, 比较了相同 C/N、不同氮素形式条件下生物絮团的氨氮去除能力、基本营养组分、氮代谢相关功能基因及总异养菌数量。实验设置 A 组 DOC/TN 为 20, B 组 DOC/DIN 为 20, C 组 DOC/TAN 为 20。各实验组 8 h 内可将 10 mg/L 氨氮降低到 1 mg/L 以下, TAN 去除速率分别为(2.11±0.05) mg TAN/gTSS·h、(2.00±0.02) mgTAN/gTSS·h 和(2.09±0.02) mgTAN/gTSS·h, A 组显著高于 B 组($P<0.05$), C 组与 A、B 组无显著差异。各组絮团粗蛋白含量无显著差异, C 组絮团粗脂肪含量显著高于 B 组和 A 组($P<0.05$), 主要氨基酸和脂肪酸组分含量差异不明显。A 组 *napA* 基因拷贝数显著低于 B 组, *nirS* 基因明显低于 B 组和 C 组($P<0.05$), B 组和 C 组间无明显差异; *nosZ* 基因拷贝数无显著差异。C 组总异养菌数量和弧菌显著低于 A 组和 B 组($P<0.05$)。本研究表明, 根据不同的氮素形式添加碳源对生物絮团的氨氮处理效率、功能和营养组分总体上影响在生产可接受范围之内, 考虑实际操作可行性, 建议可根据水体中总氨氮浓度估算需要的碳源添加量。

关键词: 生物絮团; 碳氮比; 氨氮转化速率; 功能基因

中图分类号: S966

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2023)01-0096-10

生物絮团技术(Biofloc technology, BFT)通过调控碳/氮(C/N), 促使细菌同化养殖水体中的氨氮大量生长, 形成以细菌为主、原生动物、藻类和有机颗粒物等共同组成的生物絮团(下文简称絮团)^[1]。絮团可被滤食性养殖动物直接摄食, 实现饲料蛋白氮的重复利用^[2]絮团中的细菌可去除氨氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$)、亚硝酸氮($\text{NO}_2^-\text{-N}$)和硝酸氮($\text{NO}_3^-\text{-N}$), 省去了相关的水处理装备。随着我国水产养殖尾水达标排放的硬性政策出台, BFT 养殖技术的推广和应用正越来越引起关注。

维持适宜的 C/N(大于 10)、促使 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 被同化成微生物物质被认为是 BFT 的主要特征^[3-4]。但

较多研究表明, 即使在 C/N 为 20 时, 仍然发生了明显的硝化过程^[5]。Azim 等^[6]发现 C/N 为 10~20 的生物絮团养殖罗非鱼系统中硝酸盐氮累积达到 97.28~101.51 mg/L^[7]。这可能是因为理论上对异养细菌适宜的 C/N 中的碳和氮都是细菌可直接利用的形式, 但实际测定到的 C/N 中的 C 和 N 并不一定都是细菌可以利用的形式, 系统中可能存在碳不足的问题^[5]。C/N 中的“C”一般指溶解有机碳(dissolved organic carbon, DOC), 较常见的“N”形式包括总氮(total nitrogen, TN)、溶解无机氮(dissolved inorganic nitrogen, DIN, 氨氮、亚硝酸氮和硝酸氮的浓度和)和总氨氮(total ammonia

收稿日期: 2022-08-22; 修订日期: 2022-09-25.

基金项目: 上海市科学技术委员会项目(19DZ2284300)

作者简介: 徐金祥(1991-), 男, 硕士研究生, 从事零交换水产养殖系统研究. E-mail: 1097081361@qq.com

通信作者: 罗国芝, 教授. E-mail: gzhluo@shou.edu.cn

nitrogen, TAN)^[8-9]。相同的养殖系统根据不同形式的氮添加碳, 添加的碳源量不同, 可能会影响生物絮团的性能、进而影响水体中的氨氮转化途径。我们研究水体中 DOC/TAN、DOC/TN 和 DOC/DIN 为 20 时, 形成的絮团的去除氨氮效率、主要功能基因活性及对絮团组分的影响, 为生物絮凝养殖碳源添加策略提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验装置及材料

9 个工作体积为 10 L 圆柱状聚乙烯悬浮式微生物反应器, 罗茨鼓风机(HG-370, 森森集团股份有限公司, 中国)为每个反应器提供氧气并保持絮团悬浮。

1.2 实验设计与管理

各组反应器中接种成熟生物絮团, 用陈化自

来水稀释至絮团浓度 500~800 mg/L(总悬浮颗粒物, total suspended solids, TSS), 保证各组反应器中水质指标基本一致(表 1)。

A 组 DOC 与 TN 比值为 20 (DOC/TN=20), B 组 DOC 与 DIN 比值为 20(DOC/DIN=20), C 组 DOC 与 TAN 比值为 20(DOC/TAN=20), 每组 3 个平行。在 A、B、C 组分别加入一水葡萄糖 2.09, 6.54 和 0.52 g/L 以满足相应的 C/N 设定要求。因原水体中氨氮和亚硝酸氮浓度较低, 为提高 B 组和 C 组的区分度, 在 B 组中添加 100 mg/L 硝态氮(添加硝酸钠), 提高 DIN 和 TAN 的浓度差。添加碳酸氢钠使碱度维持在 200 mgCaCO₃/L 左右, 溶解氧(dissolved oxygen, DO)维持在 6 mg/L 以上。向各反应器中添加氯化铵使加入的 TAN 浓度为 10 mg/L, 检测各反应器 TAN 去除效率。加入的 10 mg/LTAN 被计算进各组设定的 C/N 中氮素总量。

表 1 实验开始时各实验组主要水质指标的平均值、最小值和最大值

Tab. 1 The initial values of average value, minimum and maximum values of each water quality parameter in treatment groups
n=3; $\bar{x}\pm SD$

水质指标 water quality parameters	处理组 treatment group		
	A	B	C
溶解氧/(mg/L) dissolved oxygen	8.21±0.02 ^a	8.20±0.02 ^a	8.22±0.02 ^a
	8.19, 8.22	8.18, 8.22	8.20, 8.23
温度/℃ temperature	24.43±0.15 ^a	24.30±0.10 ^a	24.36±0.12 ^a
	24.30, 24.60	24.20, 24.40	24.30, 24.50
总氨氮/(mg/L) total ammonia nitrogen	0.01±0.01 ^a	0.01±0.01 ^a	0.01±0.01 ^a
	0.01, 0.02	0.00, 0.02	0.00, 0.02
亚硝酸氮/(mg/L) nitrite nitrogen	0.00±0.00 ^a	0.01±0.01 ^a	0.01±0.01 ^a
	0.00, 0.00	0.00, 0.03	0.00, 0.03
硝酸氮/(mg/L) nitrate nitrogen	9.58±0.28 ^a	9.65±0.21 ^a	9.58±0.16 ^a
	9.38, 9.90	9.43, 9.85	9.40, 9.73
总氮/(mg/L) total nitrogen	28.60±0.80 ^a	28.77±0.29 ^a	28.25±0.46 ^a
	27.70, 29.25	28.55, 29.10	27.85, 28.75
溶解有机碳/(mg/L) dissolved organic carbon	13.04±0.88 ^a	12.54±0.47 ^a	12.74±0.26 ^a
	12.21, 13.97	12.08, 13.01	12.45, 12.93
总悬浮颗粒物/(mg/L) total suspended solids	529.33±30.73 ^a	529.67±13.65 ^a	528.00±10.54 ^a
	501.00, 562.00	515.00, 542.00	517.00, 538.00
30 min 絮团体积指数/(mg/L) flocs volume index in 30 min	34.83±2.08 ^a	32.67±1.76 ^a	34.67±1.53 ^a
	32.50, 36.50	31.00, 34.50	36.00, 33.00
碱度 CaCO ₃ /(mg/L) alkalinity	189.25±0.90 ^a	190.05±1.96 ^a	190.00±2.04 ^a
	188.40, 190.20	188.70, 192.30	188.40, 192.30

注: 同行数据上标不同表示组间存在显著差异(P<0.05).
Note: Different superscripts on the same row indicate significant differences between groups (P<0.05).

每小时测定水体中 TAN、亚硝态氮($\text{NO}_2\text{-N}$)、硝态氮($\text{NO}_3\text{-N}$)和 TN。实验前后测定絮团比好氧速率(specific oxygen uptake rate, SOUR)、粗灰分和粗脂肪含量、C/N、TSS、挥发性固体颗粒物浓度(volatile suspended solids, VSS)、DOC 以及硝化、反硝化相关功能基因,并根据氮素含量估算絮团粗蛋白含量。

1.3 指标测试及分析方法

1.3.1 水质指标及测试方法 水样经 0.45 μm 滤膜过滤后测定相关水质指标。水杨酸-次氯酸盐法测 TAN, N-1-(萘基)-乙二胺比色法测 $\text{NO}_2\text{-N}$, 紫外法测 $\text{NO}_3\text{-N}$ ^[10], 总有机碳分析仪(Multi N/C 2100, 德国)测 DOC, 便携式多功能参数水质分析仪(Multi 3430, WTW, 德国)测定水体中的 DO、温度($^{\circ}\text{C}$)和 pH。

1.3.2 絮团指标测试方法 使用差重法测定反应器中的 TSS 浓度。在水体混合均匀的情况下取反应器水体 1 L 于英霍夫管,待其静置 30 min 后记录沉淀的絮团体积,为 30 min 絮团体积指数(FVI-30),以 mL/L 表示。絮团经 65 $^{\circ}\text{C}$ 电热鼓风干燥箱烘干至恒重,使用碳、氮元素分析仪(elementar vario max CNS, 德国)测定絮团中碳氮元素百分比。粗蛋白含量为氮素的 6.25 倍^[11]。采用 Floch 萃取法提取絮团中的粗脂肪^[12]。粗灰分测定参照(GB/T6438-92)方法。VSS 为 TSS 与粗灰分重量差。参照直接甲酯化法测定絮团脂肪酸组成^[13]。

水解氨基酸测定参照(GB/T 5009.124-2003)^[14]上机测定(氨基酸分析仪 L-8800, 日立)。

1.3.3 生物絮体微生物多样性和功能基因样本的采集与测定 采用实时荧光定量多聚核苷酸链式反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR)定量分析水体中硝化和反硝化功能基因(*nxrB*、*narG*、*napA*、*nirk*、*nirs*、*nosZ*)。将总 DNA 提取样品送上海美吉生物科技有限公司测定,引物见表 2^[15]。PCR 反应体系为:模板总 DNA 1 μL 、引物 F 0.8 μL (5 $\mu\text{mol/L}$)、引物 R 0.8 μL (5 $\mu\text{mol/L}$)、2 $\times$ Taq PCR Master Mix 10 μL 、灭菌双蒸水 7.4 μL ;反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 变性 30 s, 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分离,切胶回收、与克隆载体 pMD18-T 连接、蓝白斑筛选、用质粒提取纯化试剂盒制备质粒,测定质粒 OD₂₆₀ 值,计算起始浓度($\text{ng}/\mu\text{L}$)和拷贝数(copy/mL),10 倍梯度稀释,进行 qPCR 反应,以拷贝数和 CT 值绘制标准曲线。qPCR 反应体系为:模板总 DNA 2 μL 、引物 F 0.8 μL (5 $\mu\text{mol/L}$)、引物 R 0.8 μL (5 $\mu\text{mol/L}$)、2 $\times$ qPCR 预混液(ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix)16.4 μL ;反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 变性 5 s, 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s, 40 个循环。扩增完毕后,进行熔解曲线分析,以确定引物的特异性,含阴性对照。实验得到样品荧光定量的 C_T 值,根据标准曲线进行换算,最终计算得到每

表 2 实时荧光定量 qPCR 参考引物
Tab. 2 Primers used for the quantification of bacterial numbers and specific genes by qPCR

酶 enzyme	编码基因 Coding gene	引物名称 primers	引物序列 5'-3' primer sequence 5'-3'	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ annealing temperature	参考文献 reference
氨氮加氧酶 ammonia nitrogen oxygenase	<i>amoA</i>	amoA1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	50	[16]
		amoA-2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC		
亚硝酸盐氧化酶 nitrite oxidase	<i>nxrB</i>	nxrB-F	TACATGTGGTGGAACA	58	[17]
		nxrB-R	CGGTCTCGGTCRATCA		
硝酸盐还原酶 nitrate reductase	<i>napA</i>	nap A-F	AAYATGGCVGARATGCACCC	58	[18]
		nap A-R	GRTRAARCCCATSGTCCA		
	<i>narG</i>	narG-F	TCGCCSATYCCGGCSATGTC	58	[19]
		narG-R	GAGTTGTACCAGTCRGCSGAYTCSG		
亚硝酸盐还原酶 nitrite reductase	<i>nirS</i>	cd3aF	AACGYSAAGGARACSGG	58	[20]
		R3cd	GASTTCGGRTGSGTCTTSAYGAA		
氧化亚氮还原酶 nitrous oxide reductase	<i>nosZ</i>	nosZ2F	CGCRACGGCAASAAGGTSMSSGT	58	[20]
		nosZ2R	CAKRTGCAKSGCRTGGCAGAA		

毫升水体样本中某基因的拷贝数(copy/mL)。

1.3.4 絮团中异养细菌的生物群落估算 实验结束后用平板计数法测定反应器中异养细菌的群落数量。在无菌操作台中将采集的 1 mL 水样, 根据初测菌群数量以无菌生理盐水确定水样稀释倍数。将稀释后的水样涂布于大豆酪蛋白琼脂培养基(青岛海博生物科技有限公司, 中国), 将涂布后的平板在恒生化养箱(SHP-250, 上海精宏实验设备有限公司, 中国)中 35 °C 培养 24 h 后进行菌落计数。通过平板上菌落数量乘以稀释倍数计算菌落形成数量(CFU/mL)。

1.3.5 氨氮去除效率和氨氮去除速率计算公式

$\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除效率计算公式:

$$R=100\% \times (C_i - C_e)/C_i$$

式中, R — $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的去除效率, %; C_i —初始的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 质量浓度, mg/L; C_e —终末的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 质量浓度, mg/L。

$\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除速率计算公式:

$$S=(C_i - C_e)/(T \times t)$$

式中, S — $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的去除速率, mg TAN/gTSS·h; C_i —初始的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 质量浓度, mg/L; C_e —终末的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 质量浓度, mg/L; T —TSS 浓度, mg/L; t —氨氮变化的时间, h。

1.4 数据统计分析

实验数据采用 Excel 软件进行结果统计, 由 Origin、Adobe Illustrator 软件进行相关图表的绘制。实验数值用平均值±标准差(Mean±SD)形式表示, 采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 并结合 Duncan 氏法进行多重比较, $P<0.05$ 为差异性显著。

2 结果与分析

2.1 氨氮去除效率及相关水质指标

加入 10 mg/L TAN 8 h 后各组反应器的 TAN 去除效率分别达到了 99.40%(A 组), 99.47%(B 组)和 99.73%(C 组), TAN 去除速率分别(2.11±0.05) mgTAN/gTSS·h (A 组)、(2.00±0.02) mgTAN/gTSS·h (B 组)和(2.09±0.02) mgTAN/g TSS·h (C 组), A 组和 B 组转化速率差异显著($P<0.05$), C 组与 A、B 组之间无显著性差异(图 1a)。实验期间各组亚硝

态氮的变化趋势基本一致。在加入 10 mg/L TAN 4 小时后各组亚硝酸盐菌降低至 0.05 mg/L 以下, 第 5 小时上升, 直到实验结束。B 组亚硝酸盐浓度显著高于 A 组和 C 组($P<0.05$), A 组和 B 组之间无显著性差异(图 1b)。整个实验期间各组硝态氮浓度均没有明显变化(图 1c)。

实验过程中各组 DOC 含量均下降(图 1d), A 组在实验期间 DOC 消耗量(76.33±11.10) mg/L, 和 B 组(60.00±26.46) mg/L 无显著差异; C 组 DOC 消耗量(142.00±21.26) mg/L, 显著高于 A 组和 B 组($P<0.05$)。根据氨氮浓度变化情况, 可估算出 A 组转化每毫克 TAN 所需 DOC 为(8.62±1.51) mg/L, B 组为(7.52±3.40) mg/L, C 组为(16.15±2.23) mg/L, C 组显著高于 A 组和 B 组($P<0.05$), A 组和 B 组之间差异不显著。实验结束时各组 TN 与初始浓度变化不明显(图 2)。

2.2 絮团比呼吸耗氧率

实验结束时 A 组 SOUR 值为(10.35±0.60) mg(O₂)/gMLSS·h, B 组为(7.24±2.82) mg(O₂)/gMLSS·h, C 组为(1.54±0.18) mg(O₂)/gMLSS·h, 3 组差异显著($P<0.05$)(图 3)。A 组和 C 组的 SOUR 值均显著高于实验初始值。

2.3 絮团主要组分

实验结束 C 组 TSS 浓度(760.00±22.11) mg/L 显著低于 B 组(938.33±65.58) mg/L 和 A 组(864.00±35.68) mg/L, A 组和 B 组间无显著性差异(图 4)。C 组絮团 C/N(8.02)显著差异低于 A 组和 B 组, 且 B 组显著高于 A 组和 C 组($P<0.05$)。C 组 VSS/TSS 显著低于 A 组和 B 组, A、B 间差异不显著。C 组粗灰分含量和粗脂肪含量显著高于 A 组和 B 组($P<0.05$)(表 3)。A 组和 B 组的粗脂肪含量差异不显著。各组絮团粗蛋白组成差异不显著。

各组氨基酸除亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸相对含量外, 其他组分差异不明显(表 4)。A 组亮氨酸 Leu 显著高于 B 组和 C 组, B 和 C 之间无显著差异。B 组 Pro 脯氨酸显著低于 A、C 组($P<0.05$), A 和 C 间无显著差异。B 组的 Phe 苯丙氨酸显著低于 A 组, 与 C 组间差异不显著, A 和 C 组间差异不显著。

絮团中共检测出 18 种脂肪酸, 表 5 列出了含

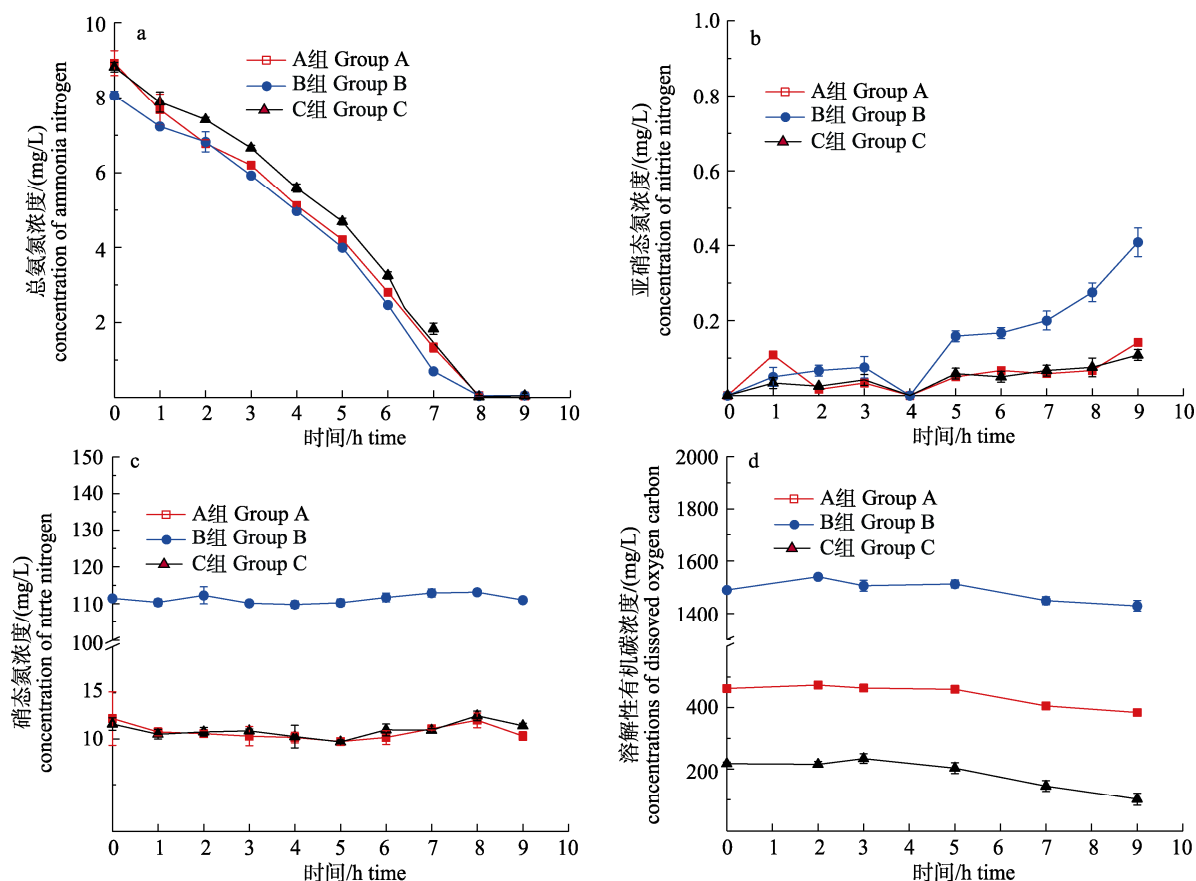


图 1 各实验组反应器中三态氮(a, b, c)及溶解性有机碳(d)

A 组: 溶解性有机碳比总氮为 20; B 组: 溶解性有机碳比溶解性无机氮为 20; C 组: 溶解性有机碳比总氮氮为 20.

Fig. 1 Total ammonium nitrogen (TAN, a), nitrite nitrogen (NO₂-N, b), nitrate nitrogen (NO₃-N, c) and dissolved oxygen carbon (DOC, d) in the experimental groups

Group A: ratio of dissolved organic carbon (DOC) to total nitrogen is 20; Group B: Ratio of DOC to dissolved inorganic nitrogen is 20; Group C: ratio of DOC to total ammonium nitrogen is 20.

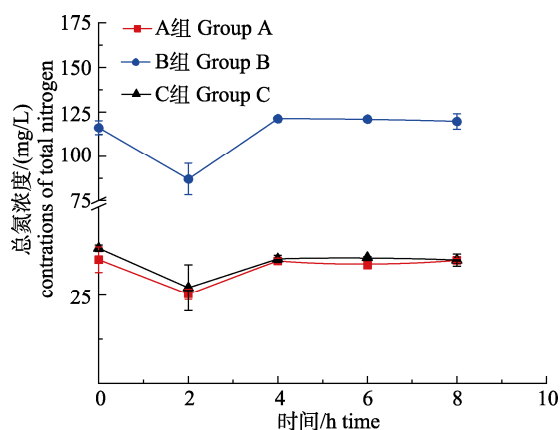


图 2 各实验组反应器中的总氮

A 组: 溶解性有机碳比总氮为 20; B 组: 溶解性有机碳比溶解性无机氮为 20; C 组: 溶解性有机碳比总氮氮为 20.

Fig. 2 Total nitrogen in the experimental groups

Group A: ratio of dissolved organic carbon (DOC) to total nitrogen is 20; Group B: Ratio of DOC to dissolved inorganic nitrogen is 20; Group C: ratio of DOC to total ammonium nitrogen is 20.

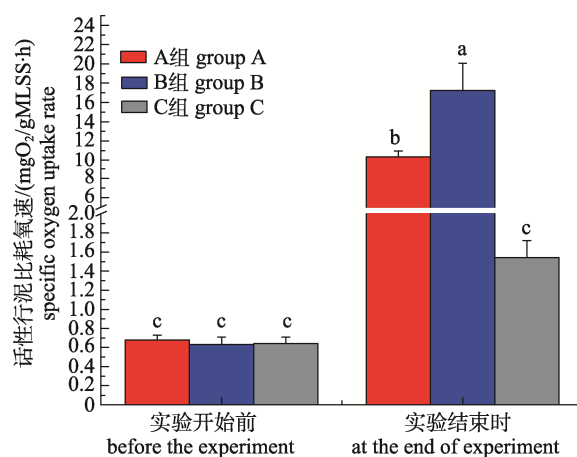


图 3 各实验组反应器中絮团的比氧呼吸代谢率

A 组: 溶解性有机碳比总氮为 20; B 组: 溶解性有机碳比溶解性无机氮为 20; C 组: 溶解性有机碳比总氮氮为 20.

Fig. 3 Specific oxygen uptake rate of bioflocs of the groups Group A: ratio of dissolved organic carbon (DOC) to total nitrogen is 20; Group B: Ratio of DOC to dissolved inorganic nitrogen is 20; Group C: ratio of DOC to total ammonium nitrogen is 20.

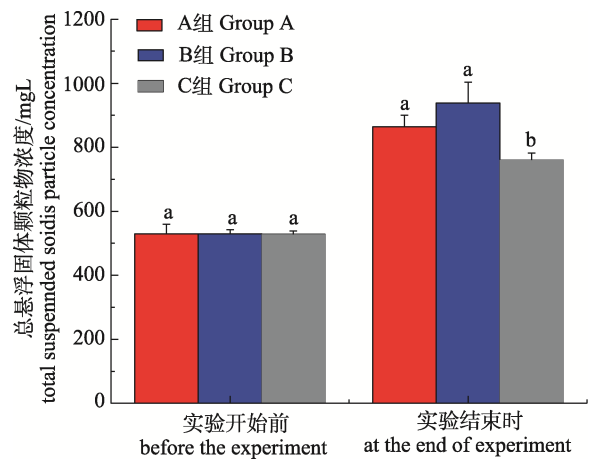


图 4 实验开始前、后各组总悬浮颗粒物浓度
A 组: 溶解性有机碳比总氮为 20; B 组: 溶解性有机碳比溶解性无机氮为 20; C 组: 溶解性有机碳比总氮氮为 20.
Fig. 4 Total suspended solids in each group before and after experiment
Group A: ratio of dissolved organic carbon (DOC) to total nitrogen is 20; Group B: Ratio of DOC to dissolved inorganic nitrogen is 20; Group C: ratio of DOC to total ammonium nitrogen is 20.

量前 8 的脂肪酸。C 组的 C18:0 显著低于 A 组和 B 组, A、B 组间差异不显著。C 组的 C18:1n9t 显著高于 A 和 B 组, A、B 间差异不显著。B 组的 C18:1n9c 显著低于 A 组和 C 组, 后两者间差异不显著。

2.4 硝化、反硝化功能基因

实验结束时各组絮团中均检出一定的 *amoA*、*nxB*、*napA*、*nirS* 和 *nosZ* 丰度(图 5), 其中硝化基因 (*amoA*、*nxB*) 丰度范围为 $2.4\times10^4\sim1.9\times10^5$ copy/mL, 反硝化功能基因(*narG*、*napA*、*nirS* 和 *nosZ*)丰度范围为 $2.2\times10^6\sim4.7\times10^7$ copy/mL。三组间 *amoA* 基因拷贝数和 *nxB* 基因拷贝数无明显差异($P>0.05$)。A 组的 *napA* 基因显著低于 B 组($P<$

0.05), *nirS* 基因明显低于 B 组和 C 组, B 组和 C 组间这两种基因的拷贝数无明显差异。各实验组的 *nosZ* 基因拷贝数无显著差异。

2.5 生物絮团中总异养细菌的生物群落数量

C 组异养菌数量和弧菌数量明显低于 A 组和 B 组, A 组和 B 组间无显著差异。

3 讨论

C/N 是影响水体中的微生物群落、氮氮转化途径、养殖动物生长性能和福利状态的主要环境因子之一^[21]。BFT 中常用的 C/N 调控依据来源于 Avnimelech^[22]的理论估算结果。根据细菌的 C/N 比(5)和氮的转化效率(40%~60%), 提出的数据: Avnimelech^[22]提出, 当控制 C/N 为 20 时, 氮氮可以被异养同化为微生物质。Gao 等^[23]纯培养实验研究表明, 当 C/N 为 9 : 1 至 12 : 1 时, 氮氮主要通过硝化过程转化, C/N 比为 15 至 18 时, 氮氮主要通过异养同化过程转化, 当 C/N 在 18 以上时, 全部氮氮会被异养同化。但是, 较多研究表明, 即使输入的 C/N 为 20, 仍然有可能发生硝化作用而造成硝酸盐的明显积累^[5]。这可能因为测得的 C/N 中部分碳和氮是以细菌不能完全利用的形式, 细菌实际能利用的 C 或 N 要低于测定的 C 或 N。实验系统尤其是纯培养实验中提供的碳和氮通常都是可直接被细菌利用的形式。实际的 BFT 系统不能保证有机碳的连续供应, 且有机碳极易被消耗。BFT 系统中死亡的细菌等微生物中的氮可能会被降解释放到水体中, 造成水体中氮氮增加。这将导致可用的 C/N 比小于测量值, 无法满足氮氮异养同化的有机碳源需求。因此, 在实际 BFT

表 3 实验结束时絮团 C/N、VSS/TSS、粗蛋白、粗灰分、粗脂肪含量
Tab. 3 The contents of C/N, VSS/TSS, crude protein, ash and crude fat in flocs at the end of the experiment

处理组 treatment group	絮团指标 flocs index				
	C/N (w/w)	粗蛋白/% crude protein	VSS/TSS/%	粗灰分/% crude ash	粗脂肪/%crude fat
接种絮团 seeding bioflocs	5.60±0.02 ^d	31.06±1.03 ^a	65.56±0.12 ^d	34.44±0.12 ^a	4.12±0.72 ^c
A 组 group A	8.28±0.09 ^b	26.86±0.09 ^b	80.06±0.37 ^b	19.94±0.37 ^c	7.10±0.70 ^b
B 组 group B	8.70±0.08 ^a	25.92±0.45 ^b	82.08±1.16 ^a	17.92±1.16 ^d	7.56±1.02 ^b
C 组 group C	8.02±0.03 ^c	26.23±0.30 ^b	76.76±1.18 ^c	23.24±1.18 ^b	8.98±0.22 ^a

注: 同列数据上标不同表示组间存在显著差异($P<0.05$). VSS: 挥发性悬浮颗粒物; TSS: 总悬浮颗粒态.
Note: Different superscripts on the same row indicate significant differences between groups ($P<0.05$).

表 4 接种絮团和实验后各组氨基酸相对含量
Tab. 4 The relative contents of amino acids in each group after inoculation and experiment

%; n=3; $\bar{x} \pm SD$

氨基酸 amino acid	实验前絮团 seeding bioflocs	处理组 treatments		
		A 组 group A	B 组 group B	C 组 group C
Asp 天冬氨酸	3.79±0.15 ^a	2.87±0.04 ^b	2.66±0.10 ^b	2.84±0.12 ^b
Thr 苏氨酸	1.54±0.06 ^a	1.19±0.04 ^b	1.11±0.03 ^b	1.16±0.05 ^b
Ser 丝氨酸	1.45±0.06 ^a	1.08±0.03 ^b	1.01±0.03 ^b	1.07±0.04 ^b
Glu 谷氨酸	3.83±0.14 ^a	3.70±0.04 ^{ab}	3.58±0.04 ^b	3.60±0.20 ^{ab}
Gly 甘氨酸	2.29±0.08 ^a	1.66±0.04 ^b	1.55±0.04 ^b	1.65±0.07 ^b
Ala 丙氨酸	2.80±0.18 ^a	2.10±0.05 ^b	2.01±0.04 ^b	2.00±0.09 ^b
Cys 胱氨酸	0.07±0.05 ^a	0.07±0.01 ^a	0.05±0.01 ^a	0.07±0.01 ^a
Val 缬氨酸	1.90±0.05 ^a	1.56±0.02 ^b	1.46±0.04 ^b	1.50±0.09 ^b
Met 蛋氨酸	0.31±0.04 ^a	0.21±0.01 ^b	0.18±0.00 ^b	0.18±0.01 ^b
Ile 异亮氨酸	1.04±0.03 ^a	0.87±0.04 ^b	0.82±0.02 ^b	0.82±0.05 ^b
Leu 亮氨酸	1.80±0.05 ^a	1.53±0.06 ^b	1.39±0.03 ^c	1.39±0.06 ^c
Tyr 酪氨酸	0.95±0.08 ^a	0.76±0.01 ^b	0.67±0.03 ^b	0.74±0.04 ^b
Phe 苯丙氨酸	1.49±0.02 ^a	1.15±0.05 ^b	1.04±0.02 ^c	1.11±0.06 ^{bc}
His 组氨酸	1.78±0.03 ^a	1.28±0.04 ^b	1.20±0.03 ^b	1.27±0.05 ^b
Lys 赖氨酸	0.10±0.00 ^a	0.06±0.01 ^b	0.06±0.00 ^b	0.06±0.00 ^b
Arg 精氨酸	4.50±0.27 ^a	3.85±0.07 ^b	3.83±0.11 ^b	3.96±0.04 ^b
Pro 脯氨酸	1.17±0.05 ^a	0.88±0.04 ^b	0.78±0.03 ^c	0.89±0.04 ^b

注：同列数据上标不同表示组间存在显著差异(P<0.05).
Note: Different superscripts on the same row indicate significant differences between groups (P<0.05).

表 5 各组絮团脂肪酸相对含量
Tab. 5 The relative contents of flocs fatty acid at the beginning of the experiment and after the experiment

%; n=3; $\bar{x} \pm SD$

脂肪酸 fatty acids	接种絮团 seeding bioflocs	处理组 treatments		
		A 组 Group A	B 组 Group B	C 组 Group C
十四碳酸 C14:0	2.06±0.25 ^a	3.06±0.34 ^a	3.67±0.68 ^a	2.58±0.06 ^a
十六碳酸 C16:0	22.75±2.25 ^a	23.51±0.80 ^a	26.07±2.08 ^a	20.11±0.37 ^a
十六碳一酸 C16:1n7	9.76±0.54 ^b	14.26±0.37 ^a	13.52±1.36 ^{ab}	15.26±0.20 ^a
十八碳酸 C18:0	11.27±2.13 ^{ab}	8.79±0.34 ^a	9.52±1.09 ^{ab}	7.14±0.13 ^b
十八碳一烯酸 C18:1n9t	22.95±2.06 ^b	25.25±0.50 ^b	24.60±1.47 ^b	27.99±0.69 ^a
十八碳一烯 C18:1n9c	15.43±1.70 ^{ab}	17.32±0.59 ^b	16.53±3.7 ^{ab}	19.67±0.40 ^a
十八碳二烯酸 C18:2n6t	9.32±0.83 ^a	5.00±0.28 ^b	5.06±1.27 ^{ab}	5.23±0.13 ^{ab}
二十碳四烯酸 C20:4n6	6.46±0.25 ^a	2.82±0.13 ^b	3.00±0.15 ^b	2.89±0.56 ^b

注：同列数据上标不同表示组间存在显著差异(P<0.05).
Note: Different superscripts on the same row indicate significant differences between groups (P<0.05).

系统中通常无法保证氨氮异养同化需要的有机碳源量。本研究的目的是寻求一种能够满足实际BFT系统需求的有机碳源添加方式。本研究结果表明，根据水体中氨氮浓度调整 C/N，碳源的添加量最少，且能保持良好的絮团性能，实际生产过程中测定氨氮浓度比测定总氮和总溶解无机氮

浓度更容易，可以成为 BFT 系统实际应用过程中的碳源添加方式。
硝化细菌是自养细菌，一般认为有机碳会抑制硝化细菌活性。本研究结果表明添加碳源后测得的硝化功能基因拷贝数和添加碳源前无明显差异，各实验组之间虽然碳源添加量不同，但硝化

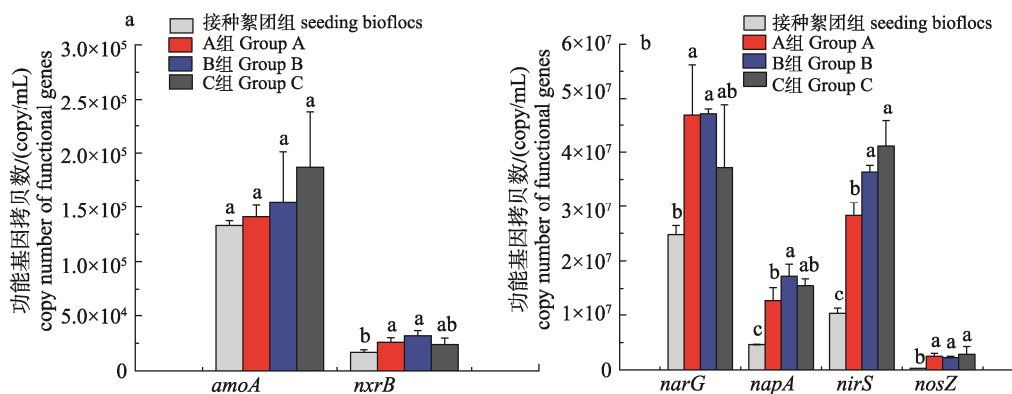


图 5 实验前絮团和实验后各组絮团硝化和反硝化基因拷贝数

A 组: 溶解性有机碳比总氮为 20; B 组: 溶解性有机碳比溶解性无机氮为 20; C 组: 溶解性有机碳比总氮为 20.

Fig. 5 Copy number of nitrification and denitrification genes in flocs before and after the experiment

Group A: ratio of dissolved organic carbon (DOC) to total nitrogen is 20; Group B: Ratio of DOC to dissolved inorganic nitrogen is 20; Group C: ratio of DOC to total ammonium nitrogen is 20.

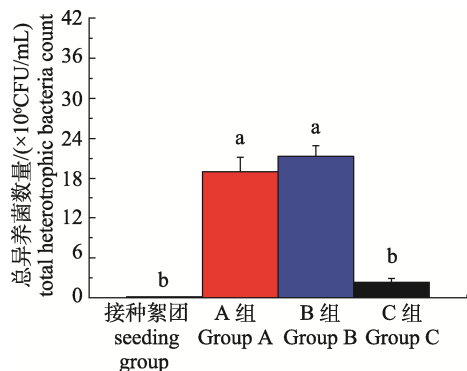


图 6 实验前和实验后各组水样中的总异养菌数量

A 组: 溶解性有机碳比总氮为 20; B 组: 溶解性有机碳比溶解性无机氮为 20; C 组: 溶解性有机碳比总氮为 20.

Fig. 6 Total number of heterotrophic bacteria in water samples before and after the experiment

Group A: ratio of dissolved organic carbon (DOC) to total nitrogen is 20; Group B: Ratio of DOC to dissolved inorganic nitrogen is 20; Group C: ratio of DOC to total ammonium nitrogen is 20.

功能基因拷贝数没有明显差异, 这说明添加有机碳源未对絮团硝化功能产生明显的影响。Zhu 等^[24]研究表明, C/N 从 0 升到 1 或 2 时, 硝化效率下降 70%; 但 C/N 高于 1 时, 随着有机碳浓度的增加, 有机碳对硝化作用的抑制效果降低。本实验中各处理组中的 DOC 浓度均高于 50 mg/L, C/N 均远高于 1。因此, 本实验中有机碳源对硝化作用的抑制效果不明显。但是, 有机碳源的添加明显增加了异养细菌和弧菌的数量(图 6)。有研究表明异养细菌数量决定于环境因子中有机质含量, 且异养细菌的数量和有机物含量呈正相关^[25-26]。本实验

中 C 组碳源添加量最少, 异养细菌和弧菌的数量均少于 A 组和 B 组。本实验中只测定了弧菌的数量, 未进一步坚定测得的弧菌是否具有致病性, 需要在后续的研究中进一步深入研究。

生物絮团干物质中一般含有 25%~50%的粗蛋白和 0.5%~15%的粗脂肪^[27]。本实验 3 个组生物絮团的粗蛋白含量虽然在已报道的范围内, 但属于较低水平。生物絮团的粗蛋白、粗脂肪以及灰分与其微生物群落结构组成相关, C/N 对生物絮团的微生物群落结构有显著影响。从而导致了营养组成上的差异^[27]。本研究没有测定各实验组的菌群结构, 在后续研究中需要进一步补充。

4 结论

在相同 C/N 条件, 根据不同形式的无机氮添加碳源, 对絮团氮转化能力、营养组分、硝化和反硝化功能基因总体上影响不明显, 但对絮团中异养细菌和弧菌数量有显著影响, 但这些影响在生产可接受范围之内。考虑实际操作的可行性, 本研究建议可根据水体中的总氮浓度估算需要的碳源添加量。

参考文献:

- [1] Zhao Q, Zhang L P. Study on quantitative methods of self-pollution of mariculture[J]. Marine Environmental Science, 2004, 23(3): 77-80. [赵清, 张路平. 海水养殖自身污染的量化研究[J]. 海洋环境科学, 2004, 23(3): 77-80.]
- [2] Luo G Z, Gao Q, Wang C H, et al. Growth, digestive activity,

- welfare, and partial cost-effectiveness of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in a recirculating aquaculture system and an indoor biofloc system[J]. *Aquaculture*, 2014, 422-423: 1-7.
- [3] Ouyang F, Zhai H Y, Ji M, et al. Physiological and transcriptional responses of nitrifying bacteria exposed to copper in activated sludge[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2016, 301: 172-178.
- [4] Henry S, Texier S, Hallet S, et al. Disentangling the rhizosphere effect on nitrate reducers and denitrifiers: Insight into the role of root exudates[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11): 3082-3092.
- [5] Luo G Z, Xu J X, Meng H Y. Nitrate accumulation in biofloc aquaculture systems[J]. *Aquaculture*, 2020, 520: 734675.
- [6] 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.
- [7] Arantes R, Schweitzer R, Seiffert W Q, et al. Nutrient discharge, sludge quantity and characteristics in biofloc shrimp culture using two methods of carbohydrate fertilization[J]. *Aquacultural Engineering*, 2017, 76: 1-8.
- [8] 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.
- [9] Krummenauer D, Samocha T, Poersch L, et al. The reuse of water on the culture of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in BFT system[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2014, 45(1): 3-14.
- [10] State Environmental Protection Administration of China. Methods of monitoring and analyzing for water and wastewater[M]. 4th ed. Beijing: China Environmental Science Press, 2002: 836. [国家环保总局. 水和废水监测分析方法第 4 版[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 836]
- [11] 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. [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.]
- [12] Folch J, Lees M, Stanley G H S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1957, 226(1): 497-509.
- [13] 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.
- [14] Ministry of Health of the People's Republic of China, Standardization Administration Determination of Amino Acids in Foods: GB/T 5009. 124—2003[S]. Beijing: Standards Press of China, 2004. [中华人民共和国卫生部, 国家标准化管理委员会. 食品中氨基酸的测定: GB/T 5009.124—2003[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.]
- [15] Li J B, Huang G H, Lv M, et al. Effect of combined treatment of bacteria and algae on the seedling raising of *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Hebei Fisheries*, 2012(8): 7-9. [黎建斌, 黄光华, 吕敏, 等. 菌藻联合处理对罗氏沼虾育苗的影响[J]. *河北渔业*, 2012(8): 7-9.]
- [16] Xia M M. Study on effect of soil properties on nitrogen removal of bioretention system[D]. Beijing: Beijing University of Civil Engineering and Architecture, 2020. [夏蒙蒙. 土壤性质对生物滞留系统脱氮效果的影响研究[D]. 北京: 北京建筑大学, 2020.]
- [17] Ouyang F, Zhai H Y, Ji M, et al. Physiological and transcriptional responses of nitrifying bacteria exposed to copper in activated sludge[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2016, 301: 172-178.
- [18] Henry S, Texier S, Hallet S, et al. Disentangling the rhizosphere effect on nitrate reducers and denitrifiers: Insight into the role of root exudates[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11): 3082-3092.
- [19] Bru D, Sarr A, Philippot L. Relative abundances of proteobacterial membrane-bound and periplasmic nitrate reductases in selected environments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(18): 5971-5974.
- [20] Su Q X, Ma C, Domingo-Félez C, et al. Low nitrous oxide production through nitrifier-denitrification in intermittent-feed high-rate nitrification reactors[J]. *Water Research*, 2017, 123: 429-438.
- [21] Xu W J. Research and application of functional effects of biofloc in zero-water exchange *Litopenaeus vannamei* culture system[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014. [徐武杰. 生物絮团在对虾零水交换养殖系统中功能效应的研究与应用[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.]
- [22] Avnimelech Y. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems[J]. *Aquaculture*, 1999, 176(3-4): 227-235.
- [23] Gao L, Shan H W, Zhang T W, et al. Effects of carbohydrate addition on *Litopenaeus vannamei* intensive culture in a zero-water exchange system[J]. *Aquaculture*, 2012, 342-343: 89-96.
- [24] Zhu S M, Chen S L. Effects of organic carbon on nitrification rate in fixed film biofilters[J]. *Aquacultural Engineering*, 2001, 25(1): 1-11.
- [25] Li Q S, Cai Q H, Hong K, et al. Comparative study on community structure and physiological characteristics of heterotrophic bacteria in the Donghu Lake and the ground water[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1992, 16(4): 336-345. [李勤生, 蔡庆华, 洪葵, 等. 湖泊和地下水中异养细菌群落结构和生理特征的比较研究[J]. *水生生物学报*, 1992, 16(4):

- 336-345.]
- [26] Li H D, Meng W, Zheng B H, et al. Oxygen consumption characteristics of the sediment-water interface in Dagu River Estuary of Bohai Bay[J]. Research of Environmental Sciences, 2004, 17(5): 19-22. [李捍东, 孟伟, 郑丙辉, 等. 渤海大沽河河口底质-水界面耗氧特性[J]. 环境科学研究, 2004, 17(5): 19-22.]
- [27] Xu W J. Research and application of functional effects of biofloc in zero-water exchange *Litopenaeus vannamei* culture system[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014. [徐武杰. 生物絮团在对虾零水交换养殖系统中功能效应的研究与应用[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.]

Effects of carbon-to-nitrogen ratio and carbon source addition to different expressions of nitrogen concentrations in the aquacultural water on the conversion rate of ammonia nitrogen and nutrient components of bioflocs

XU Jinxiang¹, LI Jiayang¹, YU Qili², TAN Hongxin^{1,3}, LUO Guozhi^{1,2,3}

1. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Hangzhou Xiaoshan Donghai Breeding Co., Ltd, Hangzhou 311200, China;

3. Shanghai Collaborative Innovation Center for Cultivating Elite Breeds and Green-culture of Aquaculture Animals, Shanghai 201306, China

Abstract: The regulation of the carbon-to-nitrogen ratio (C/N) is the core technical feature of biofloc culture. In related research and practice, carbon and nitrogen in C/N have different characterization forms. In this study, dissolved organic carbon (DOC) was used to characterize the organic carbon using total nitrogen (TN), dissolved inorganic nitrogen (DIN), and total ammonia nitrogen (TAN) to characterize nitrogen, respectively, and compare the same C/N under different nitrogen form conditions. The ammonia nitrogen removal capacity, basic nutrient components, functional genes related to nitrogen metabolism, and the total number of heterotrophic bacteria of the lower biofloc were evaluated. In the experiment, the DOC/TN of group A was 20, the DOC/DIN of group B was 20, and the DOC/TAN of group C was 20. In each experimental group, 10 mg/L ammonia nitrogen could be reduced to less than 1 mg/L within 8 hours, and the TAN removal rates were (2.11±0.05) mg TAN/gTSS·h, (2.00±0.02) mgTAN/gTSS·h, and (2.09±0.02) mgTAN/h, respectively. The removal rates of group A was significantly higher than group B ($P<0.05$), and there was no significant difference between group C and groups A and B ($P>0.05$). There was no significant difference in the crude protein content of flocs among each group. The crude fat content of flocs in group C was significantly higher than that in groups B and A ($P<0.05$), and the content of major amino acids and fatty acids was not significantly different ($P>0.05$). The abundance of denitrification function genes *narG*, *napA*, *nirS*, and *nosZ* in flocs in each group ranged from 2.2×10^6 to 4.7×10^7 copy/mL. The *napA* gene in group A was significantly lower than that in group B. The *nirS* gene was significantly lower than that in group B and C ($P<0.05$) and there was no significant difference between group B and group C ($P>0.05$). There was no significant difference in the *nosZ* gene copy factor ($P>0.05$). The total number of heterotrophic bacteria and *Vibrio* in group C were significantly lower than those in groups A and B ($P<0.05$). This study shows that adding carbon sources according to different nitrogen forms has an overall effect on the ammonia nitrogen treatment efficiency, function, and nutrient composition of bioflocs within the acceptable range of production. Considering the feasibility of actual operation, it is recommended that the total ammonia nitrogen concentration estimate the amount of carbon source addition required.

Key words: biofloc; carbon and nitrogen ratio; ammonia nitrogen conversion; functional genes

Corresponding author: LUO Guozhi. E-mail: gzhluo@shou.edu.cn