

微生态制剂-生物膜对虾养殖系统水质净化效果研究

刘 洋, 宋志文, 李凌志, 徐爱玲

(青岛理工大学环境与市政工程学院, 山东 青岛 266033)

摘要:为提高对虾养殖系统水质净化能力,改善对虾养殖水环境,利用 3 种微生态制剂(枯草芽孢杆菌、硝化细菌、光合细菌)和 2 种生物膜载体(陶粒、纤维毛球)建立 4 个南美白对虾(*Penaeus vannamei*)养殖系统,比较不同养殖系统硝化功能的建立过程及对氨氮和亚硝酸盐氮的净化能力,采用高通量测序方法分析细菌群落结构。结果表明,各系统硝化功能建立后,24 h 氨氮去除率较初期分别提高 12.47%、13.95%、17.25%和 17.65%。以纤维毛球为载体,投加硝化细菌、枯草芽孢杆菌和光合细菌系统的氨氧化能力和亚硝酸盐氧化能力强于陶粒系统,24 h 氨氮去除率分别高 9.03%和 9.06%。投放虾苗后,在 30 d 养殖周期内,各系统氨氮和亚硝酸盐氮含量分别维持在 0.20 mg/L 和 0.15 mg/L 以下,硝酸盐氮含量呈缓慢上升趋势。细菌群落结构分析表明,养殖系统生物膜中优势菌门均为变形菌门,占比超 40%;优势菌纲为 α -变形菌纲、 β -变形菌纲、 γ -变形菌纲,系统中存在 *Nitrosomonas*、*Nitrospira* 和 *Nitrococcus* 等多种参与水体净化以及 *Algisphaera*、*Gemmatimonas* 和 *Paucibacter* 等参与有机质分解与对虾益生作用的类群。本研究可为减少养殖水体废物排放及降低水生环境污染风险提供参考。

关键词:南美白对虾;微生态制剂;生物膜;水质调控;细菌群落结构

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2020)01-0092-08

池塘养殖是我国对虾的主要养殖模式,多以粗放型为主。据估算,养殖 1 kg 对虾要消耗 20 m³ 的清洁水,未经处理的高污染负荷水体直接外排,对周边水源及生态环境造成威胁(安阳等,2012)。循环水养殖系统(Recirculating aquaculture systems, RAS)可将系统每天换水量降至 10%,但 RAS 投资、运营成本及技术要求相对较高,大面积推广难度较大(Twarowska et al,1997)。生物絮团技术(Bio-floc technology, BFT)是通过添加有机碳源,调节 C/N 比,提高水中异养菌数量,利用微生物同化无机氮,达到调控水质、促进营养物质循环、降低饲料系数的目的(Emerenciano et al, 2013; Lee et al, 2017; Manan et al, 2017);但该技术也存在技术操作和管理过程较为复杂,在实际生产中稳定控制难度较大等问题。

微生态制剂能够调节对虾养殖系统微生态平衡、改善对虾免疫系统、控制病原菌和病毒,在水产养殖中的应用越来越广泛。尽管微生态制剂已被大量应用,但现有产品仍然无法彻底解决对虾养殖过

程中氨和亚硝酸盐升高的问题。将微生态制剂与生物膜载体有效结合,充分利用对虾养殖系统空间,提高处理系统的高效性和稳定性,在养殖水质净化中具有可行性与利用价值(Ballester et al, 2007; 吴保承等, 2010; Kumar et al, 2016)。本研究将 3 种微生态制剂(枯草芽孢杆菌、硝化细菌、光合细菌)与 2 种载体(纤维毛球、陶粒)结合,构建自循环式对虾养殖系统,分析南美白对虾(*Penaeus vannamei*)高密度养殖过程中水质调控效果,并利用高通量测序方法,分析生物膜的菌群结构特征。通过构建新型养殖系统的同时,减少养殖换水量,降低养殖废水中有害物质排放,在保护水域生态环境方面具有一定的实际意义。

1 材料与方法

1.1 养殖系统构建

试验在 9 个长×宽×高=4.0 m×1.5 m×0.6 m 的养殖池中进行,试验期间控制温度 26~28℃,溶解氧 7.0~8.0 mg/L。将生物膜载体(纤维毛球、陶粒)装在筛绢袋中,悬挂于养殖池上方,浸没在水体中。筛绢袋由 200~300 目尼龙筛绢缝制而成,大小为长×宽×高=50 cm×40 cm×30 cm,筛绢袋内聚酯纤维毛球和陶粒堆积密度分别为 0.08 g/cm³和 0.93 g/cm³(图 1)。

收稿日期:2018-02-22
基金项目:山东省重点研发计划项目(2018GSF117022)。
作者简介:刘洋,1993 年生,男,硕士研究生,研究方向为环境微生物学。E-mail:liuyang9354@163.com
通信作者:宋志文,1966 年生,男,教授,主要从事环境微生物教研工作。E-mail:songzhiwen@qut.edu.cn

养殖用水为地下水,添加海水素使盐度为 3,养殖系统构建方式见表 1。其中,0 号为对照组(不添加微生物制剂与生物膜载体),其余每个系统设置 2 个平行组。硝化菌剂(由氢氧化菌与亚硝酸盐氧化菌混合制成,活菌浓度分别为 3.67×10^7 CFU/mL 和 4.13×10^7 CFU/mL)与光合菌剂(活菌浓度 4.32×10^6 CFU/mL)由实验室自行制备;枯草芽孢杆菌(活菌浓度 6.12×10^6 CFU/mL)购自青岛某公司。

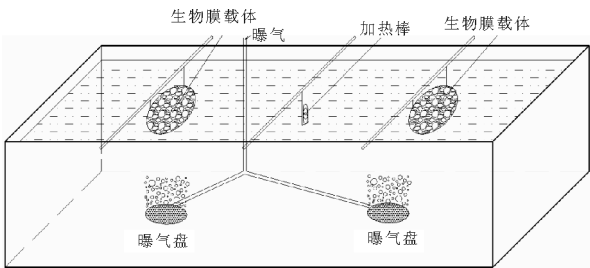


图 1 养殖系统构造

Fig.1 Schematic diagram of the probiotic-biofilm shrimp culture system

表 1 养殖系统构建方式

Tab.1 Four probiotic-biofilm treatments and a control group

系统编号	投菌方式	载体
0	无	无
1	枯草芽孢杆菌+硝化细菌	生物陶粒
2	枯草芽孢杆菌+硝化细菌+光合细菌	生物陶粒
3	枯草芽孢杆菌+硝化细菌	生化毛球
4	枯草芽孢杆菌+硝化细菌+光合细菌	生化毛球

1.2 养殖系统硝化功能建立与强化

各养殖系统按照试验设计第 1 天投加硝化细菌 2 000 mL、枯草芽孢杆菌 1 000 mL、光合细菌 1 000 mL。自第 2 天起,每日投加硝化细菌 200 mL、枯草芽孢杆菌 100 mL、光合细菌 100 mL。硝化细菌第 1 天添加至筛绢袋内,随后采取筛绢袋添加与全池泼洒方式交替进行,枯草芽孢杆菌与光合细菌均采用全池泼洒方式。菌剂投加 5 d 后,向各试验系统添加氯化铵,使氨氮含量达到 3 mg/L,待氨氮与亚硝酸盐氮含量下降至检测不出;之后继续添加氯化铵,使氨氮含量分别为 6 mg/L、9 mg/L,以强化系统的硝化能力,待强化阶段(30 d)完成后,投放虾苗进行养殖试验。试验过程中,每 24 h 测定系统温度、pH、DO、氨氮、亚硝酸盐氮等指标。

1.3 养殖过程管理

养殖阶段所用南美白对虾苗购自江苏省连云港市某育苗基地,平均体长(0.8±0.15) cm,平均体重(0.009±0.001) g。各养殖系统投放虾苗约 5000 尾,投放密度折合 1 666 尾/m³。对虾饵料(粗蛋白

≥50%)购自厦门某饲料公司,每日投喂 6 次,日投饵量约占虾苗总重的 7.7%。投苗后,各养殖系统每日微生物制剂添加方式与剂量同 1.1 和 1.2。整个试验周期(30 d)不换水并定期补充由于蒸发和渗漏缺失的水分。每 24 h 测定温度、pH、DO、氨氮和亚硝酸盐氮等指标,每 72 h 测定硝酸盐氮。

1.4 生物膜 DNA 提取与高通量测序

养殖周期结束后,分别取 1~4 号系统的生物膜载体样品,经刮取、震荡收集载体表面附着物,将处理后的固液混合物 15 mL 置于离心管,以 12 000 r/min 离心 20 min。收集离心沉淀物并弃去上清液,通过 E.Z.N.A. Soil DNA Kit 试剂盒(美国 OMEGA)提取沉淀物 DNA;使用超微量分光光度计(德国 Nanophotometer)测定 DNA 浓度和纯度。

委托上海派森诺生物科技公司,利用 Illumina MiSeq 平台对 DNA 样品进行高通量测序,并使用 NCBI Blast 对测序得到的所有序列的门以及前 0.2% 比例的属种进行分析。

1.5 水质检测分析

氨氮采用纳氏试剂分光光度法;亚硝酸盐氮采用 N-(1-萘基)乙二胺光度法;硝酸盐氮采用紫外分光光度法(国家环境保护总局,2002);DO 和 pH 使用哈希水质分析仪(HQ 30 d)测定。

1.6 指标计算

各系统硝化能力强弱以氨氧化强度(AOI)和 24 h 氨氮去除率(ARR)表示。AOI 代表日均氨氮浓度下降速率(mg/L),ARR 代表日均氨氮去除效率(%)。

$$AOI=(C_0-C_t)/t$$
$$ARR=[(C_0-C_t)/(C_0\cdot t)]\times100\%$$

式中:C₀ 为氨氮初始浓度(氨氮负荷);C_t 为试验进行第 t 天氨氮浓度;t 为氨氮初始浓度确定条件下反应完全时所需天数。

2 结果与分析

2.1 硝化功能建立与强化阶段氨氮转化

养殖系统硝化功能建立与强化阶段共计 30 d;其中,硝化功能建立阶段氨氮和亚硝酸盐氮含量变化见图 2-a,可见纤维毛球系统(3 号、4 号)和陶粒系统(1 号、2 号)氨氮含量分别于 6 d 和 8 d 降至 0.06 mg/L 以下,亚硝酸盐氮含量分别于 4 d 和 5 d 达到峰值,随后于 8 d 和 11 d 降至 0.02 mg/L 以下。

硝化功能强化阶段氨氮和亚硝酸盐氮含量变化见图 2-b 和 2-c。当氨氮负荷提高至 6 mg/L 时,

各系统将其转化为亚硝酸盐氮和硝酸盐氮的时间开始缩短,纤维毛球和陶粒系统氨氮含量分别于5 d和7 d降至 0.02 mg/L 以下,亚硝酸盐氮含量分别于4 d和5 d 达到峰值,随后于6 d 和9 d 降至 0.07 mg/L 以下;当氨氮负荷为 9 mg/L 时,纤维毛

球和陶粒系统氨氮含量分别于 3 d 和 4 d 降至 0.08 mg/L 以下,亚硝酸盐氮含量分别于 2 d 和 3 d 达到峰值,随后于 5 d 和 7 d 降至 0.04 mg/L 以下。总体来看,纤维毛球系统对无机氮转化能力优于陶粒系统。

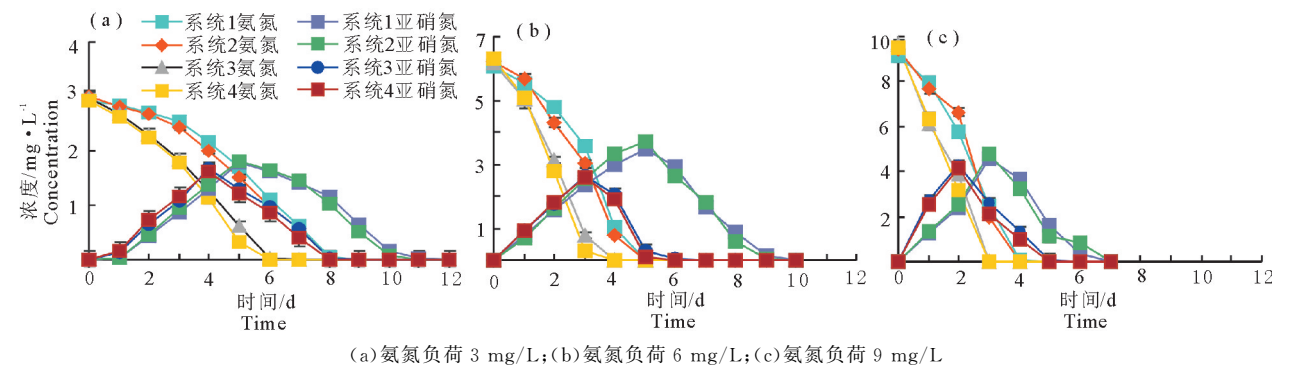


图2 各系统无机氮降解规律
(a)NH₃-N concentration of 3 mg/L; (b)NH₃-N concentration of 6 mg/L; (c)NH₃-N concentration of 9 mg/L

Fig.2 Nitrogen conversion for each treatment with different initial concentrations of NH₃-N

用氨氧化强度(以日均氨氮浓度下降速率计)和24 h 氨氮去除率评估各系统硝化能力,结果见图3。氨氮负荷为 3 mg/L 时,氨氧化强度与 24 h 氨氮去除率均较低。添加相同菌剂情况下,纤维毛球系统(3 号、4 号)对无机氮净化能力明显高于陶粒系统(1 号、2 号),纤维毛球系统平均氨氧化强度为陶粒系统的 1.4 倍,24 h 平均氨氮去除率较陶粒系统高 9.62%。相同载体情况下,添加光合细菌可提高系统对氨氮的转化能力,添加光合细菌系统(2 号、4 号)平均氨氧化强度为未添加(1 号、3 号)的 1.06 倍,24 h 平均氨氮去除率较未添加高 1.38%。

分别提高 12.47%、13.95%、17.25% 和 17.65%。纤维毛球系统、添加光合细菌系统对氨氮的转化能力优于其他系统。

2.2 养殖阶段的无机氮转化

对虾养殖 30 d,期间无机氮变化见图 4。可以看出,养殖期间 0 号系统(对照组)氨氮含量逐渐升高,养殖周期结束时,氨氮含量升至 3.0 mg/L 以上,1~4 号系统氨氮含量均维持在较低水平(<0.2 mg/L)。0 号系统亚硝酸盐氮含量变化波动较小,后期略有上升(>0.3 mg/L),1~4 号系统亚硝酸盐氮含量均先升高、后降低,亚硝酸盐氮含量低于 0.15 mg/L,并且纤维毛球系统(3 号、4 号)亚硝酸盐氮含量始终低于陶粒系统(1 号、2 号)。0 号系统硝酸盐氮含量变化较为稳定,1~4 号系统硝酸盐氮含量均呈现缓慢上升趋势。

2.3 生物膜的细菌群落结构

采用高通量测序方法分析各系统生物膜细菌群落结构,门水平组成见图 5。4 个养殖系统共检测出 32 个门,优势菌门均为变形菌门(Proteobacteria)、浮霉菌门(Planctomycetes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)和芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)。除了优势菌门外,还有绿弯菌门(Chloroflexi)、硝化螺旋菌门(Nitrospirae)等与养殖环境物质转化与循环关系比较密切的菌门;其中,变形菌门占绝对优势,在各系统中占比均超过 40%,浮霉菌门与拟杆菌门在各系统中占比分别为 9.75%~19.59%和 5.66%~11.84%,各系统门水平

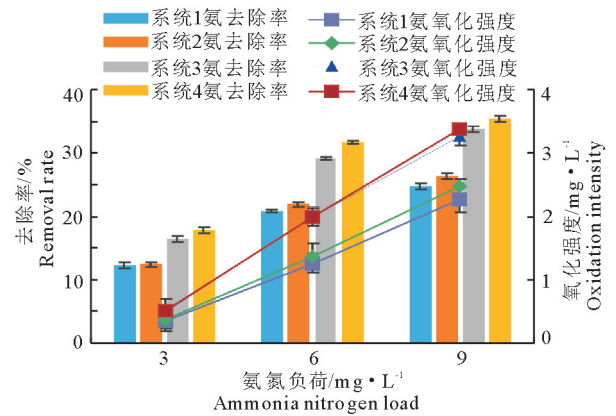


图3 各系统硝化能力变化趋势

Fig.3 Variation of nitrification capacity in each treatment with different initial concentrations of NH₃-N

当氨氮负荷为 6 mg/L、9 mg/L 时,各系统硝化能力均有提高,1~4 号系统氨氧化强度分别为初始阶段的 6.46、6.67、6.63 和 6.48 倍,24 h 氨氮去除率

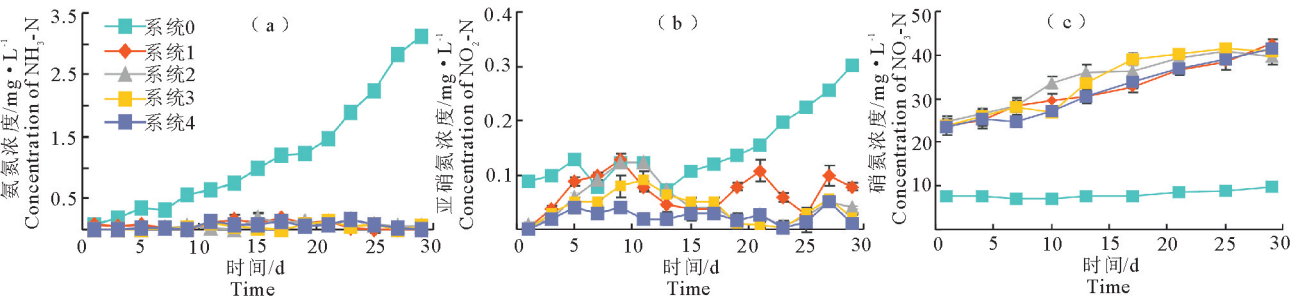


图 4 养殖阶段各系统氨氮、亚硝酸盐氮和硝酸盐氮的变化规律

Fig.4 Variation of NH₃-N, NO₂-N and NO₃-N in each system during the shrimp culture period

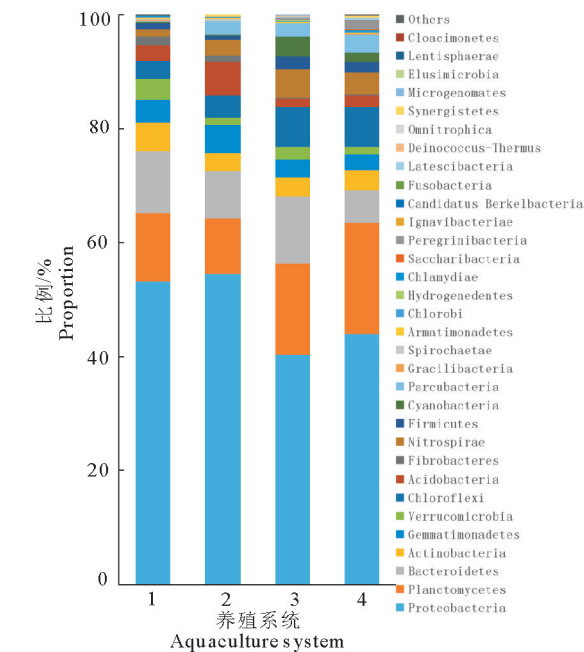


图 5 系统微生物群落门水平分析

Fig.5 Microbial community composition at the phylum level for each culture system

微生物群落结构组成大致相同,但占比差别较大。与氮循环密切相关的硝化螺旋菌门在 1~4 号系统占比分别为 1.29%、2.82%、5.01%、3.96%。

各系统优势属水平组成见图 6。可见在 4 个养殖系统的优势属中,具有硝化功能的类群有 4 种,分别为硝化螺旋菌属 *Nitrospira moscoviensis* 和 *Nitrospira lenta*、亚硝化球菌属 *Nitrococcus mobilis*、亚硝化单胞菌属 *Nitrosomonas aestuarii*。1~4 号系统具有硝化功能的类群分别有 2、4、2、2 种;其中 *Nitrococcus mobilis* 1 号、2 号系统特有属种,占比分别为 0.41% 和 0.44%;*Nitrosomonas aestuarii* 为 2 号系统特有属种,占比为 0.33%。4 个系统全部含有 *Nitrospira moscoviensis*,且在各系统中占比较大,分别为 1.08%、2.43%、2.18% 和 1.25%;同时,2~4 号系统中检出 *Nitrospira lenta*,占比分别为

0.20%、2.18% 和 1.99%,说明系统中负责对亚硝酸盐氮转化的细菌占较大比重。具有氨氧化作用的种类大多属亚硝化单胞菌属和亚硝化球菌属。

4 个系统中,具有有机质分解和对虾益生作用的类群众多;其中, *Algisphaera agarilytica*、芽单胞菌属 *Gemmatimonas phototrophica* 和微囊藻毒素降解菌属 *Paucibacter toxinivorans* 为多数系统共有优势属种。此外,各系统存在特有优势属种,芽孢杆菌属 *Bacillus thermozeamaize* 为 1 号系统所特有, *Adhaeribacter aerolatus* 和黄质菌属 *Flavobacterium aquaticum* 为 3 号系统所特有,外硫红螺菌属 *Ectothiorhodospira magna* 为 4 号系统所特有。

3 讨论

3.1 养殖系统硝化功能的建立

针对对虾养殖过程中氨和亚硝酸盐积累问题,利用微生态制剂和生物膜载体建立一种新型养殖系统,由于硝化细菌具有附着生长的特性,本研究采用纤维毛球和陶粒作为载体,在投加相同菌剂情况下,纤维毛球系统氨氮和亚硝酸盐氮的去除效果优于陶粒系统,这与载体材料性能(孔隙率、比表面积等)有关。有研究表明,载体表面粗糙度是影响微生物吸附与生物膜形成的主要因素之一(Welander et al, 1998);纤维毛球疏松多孔,比表面积大,与表面相对光滑的陶粒相比具有更好的吸附性能,挂膜后对水流冲击抗性高;其次,陶粒材料堆积密度大,易造成局部厌氧,抑制硝化细菌繁殖(何洁等,2003)。另外,投加光合细菌可提高系统净化效果,这与刘军义等(2003)的结果类似,说明光合细菌与其他菌群形成协同作用可促进无机氮转化。本研究利用生物膜载体吸附特性,为微生物提供附着生长的环境,促进生物膜形成,快速有效地建立养殖系统硝化功能,具有空间利用率高、抗冲击能力强等优势。

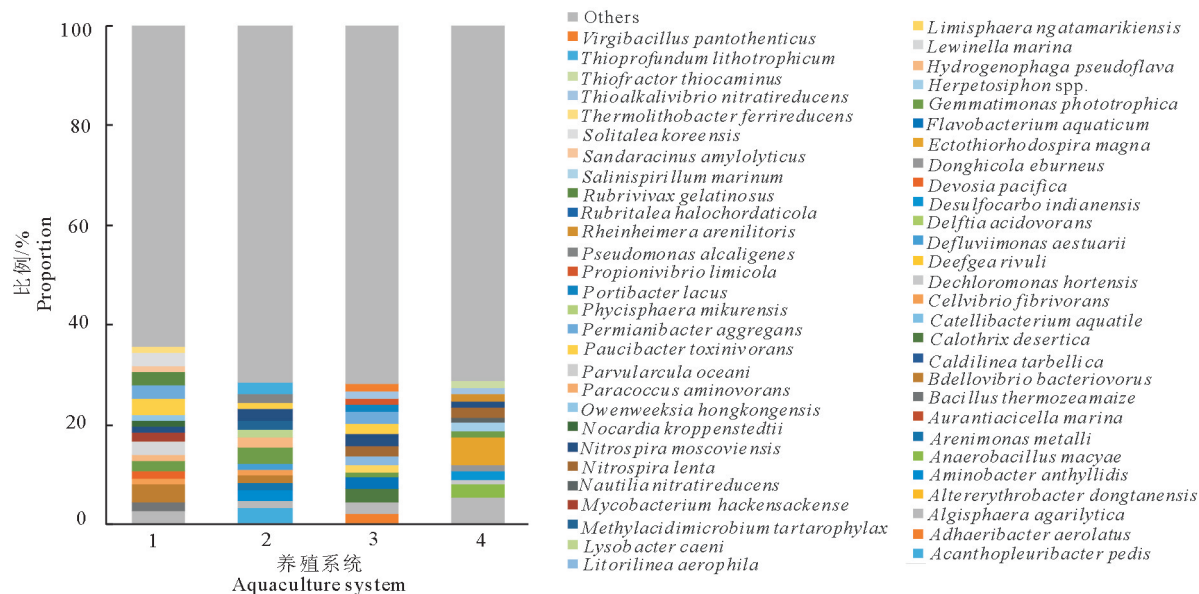


图6 系统微生物群落属水平分析

Fig.6 Microbial community composition at the genus level for each culture system

3.2 养殖系统水质净化效果

生物膜法是一种去除水体氨和亚硝酸盐的适当方法(Crab et al,2007)。Thompson 等(2002)证明了生物膜法在调控水质方面的重要性,生物膜中硝化细菌和微藻可吸收水体氨氮,促进水环境中的营养循环。养殖水体中投加载体可以提高系统对氨和亚硝酸盐的净化能力,但这些研究大多依靠养殖环境中土著菌群建立硝化系统,耗时长、稳定性差。本研究通过微生态制剂与生物膜载体结合,缩短了硝化功能建立时间。通过对养殖过程中氨氮和亚硝酸盐氮变化情况看,各养殖系统均维持在在对虾安全含量以下。残余饵料中有机氮可被异养菌分解为无机氨,再由硝化细菌逐渐转化为低毒性硝酸盐氮,与姚秀清等(2011)的研究结果一致;此外,谭洪新等(2017)通过对南美白对虾养殖水体中硝化型生物絮体的驯化,发现在养殖中后期无外界碳源添加的条件下,水体氨氮和亚硝酸盐氮含量得到有效控制,说明硝化系统的建立对于稳定水质的重要作用。本研究构建的微生态制剂-生物膜可有效净化对虾养殖系统水质,避免养殖过程中氨和亚硝酸盐有毒物质的积累,实现系统安全、稳定运行。

3.3 养殖系统生物膜细菌群落结构

生物膜作为养殖系统水处理的核心,其菌群结构多样性保证了各系统在复杂养殖环境下的稳定性,在有机物降解和氮素循环方面发挥了重要作用。本研究采用高通量测序方法分析对虾养殖系统生物膜菌群组成,发现4个系统中除变形菌门、浮霉菌

门、拟杆菌门、放线菌门、芽单胞菌门、疣微菌门、绿弯菌门等养殖环境中常见门类外(李越蜀等,2012),还检测到纤维杆菌门、蓝藻门、装甲菌门、异常球菌-栖热菌门、互养菌门、迷踪菌门和黏胶球形菌门等鲜有报导的门类,在各系统占比均不足1%。变形菌门为所有系统的优势门,作为细菌域中最大的一门,该门中细菌呼吸与代谢类型广泛(任利华等,2015),根据rRNA序列可分为 α 、 β 、 γ 、 δ 和 ϵ 5个变形菌纲。本研究中,1号系统优势菌纲为 β -变形菌纲和 α -变形菌纲,2~4号系统优势菌纲为 α -变形菌纲和 γ -变形菌纲,大部分具有硝化功能的菌种分布于这些纲中,其中具有氨氧化功能的*Nitrococcus mobilis*和*Nitrosomonas aestuarii*分属 γ -变形菌纲和 β -变形菌纲。从有机质降解角度来看, α -变形菌纲中大多数的属种能适应各类复杂环境,包含大多数光能异养菌,能够代谢碳、硫系有机物和氨等,由于底物代谢多样性,使其在复杂养殖环境中能够大量生存并成为优势; β -变形菌纲经常发现于废水脱氮处理过程, γ -变形菌纲微生物能吸收同化小分子溶解性有机物,适宜生长在某些高盐环境,对物质循环有促进作用(Naganuma et al,2000)。

本研究中,具有亚硝酸盐氧化功能的*Nitrospira moscoviensis*和*Nitrospira lenta*属于硝化螺旋菌门,裘钱玲琳等(2015)通过高通量测序分析对虾循环养殖系统生物滤器中细菌群落发现,其硝化螺旋菌门相对丰度不足0.3%,这与本试验研究结果有所不同,说明添加硝化细菌制剂在一定程度上改变

了养殖系统中生物膜细菌群落结构组成。拟杆菌门中的黄杆菌纲 (Flavobacteriia) 和鞘脂杆菌纲 (Sphingobacteriia) 与水体中蛋白质、氨基酸和脂类等分解相关,养殖过程中产生残饵、粪便,这些有机质的分解可能使拟杆菌门含量增多,成为次优势菌门的原因,与窦研(2016)的研究结果较为一致。本研究在各系统纲水平上检出芽孢杆菌纲,这与微生态制剂的添加有关,芽孢杆菌纲中细菌适应于各类恶劣复杂环境,在养殖过程中大分子有机物的分解和病原微生物的抑制等方面功效明显(陆家昌等, 2010;丁贤等,2004)。从属水平来看,各系统共有优势菌 *Algisphaera agarilytica* 可在好氧条件下水解氨基酸,*Gemmatimonas phototrophica* 能代谢酵母提取物、多肽、醋酸酯、明胶和苯甲酸等多种类型底物,*Paucibacter toxinivorans* 能够分解碳和氨基酸等物质,对于养殖过程产生的残饵、粪便等分解转化具有重要作用。此外,1 号系统中 *Bacillus thermozeamaize* 可利用复杂碳水化合物(如纤维素)进行产氢作用;3 号系统中 *Adhaeribacter aerolatus* 具有好氧反硝化功能,*Flavobacterium aquaticum* 能在复杂环境中产生过氧化氢酶和淀粉酶优化对虾肠道环境;4 号系统中 *Ectothiorhodospira magna* 为光能异养紫色硫细菌的一种,在厌氧条件下对氨和硫化氢的降解效果明显;蛭弧菌 *Bdellovibrio bacteriovorus* 在 1 号和 2 号系统中被检出,能在一定程度上抑制病原菌生长。本研究基于高通量测序技术,从分子生物学层面探究养殖系统水质净化机理,有助于微生态制剂修复养殖水体方面的研究。

4 结论

(1)纤维毛球系统净化效果优于陶粒系统,氨氧化强度较陶粒系统分别高 0.99 mg/L 和 0.90 mg/L, 24 h 氨氮去除率分别高 9.03% 和 9.06%;添加光合细菌系统较未添加系统氨氧化强度高 0.21 mg/L, 24 h 氨氮去除率高 1.61%。

(2)在对虾养殖阶段,微生态制剂-生物膜对虾养殖系统中氨氮和亚硝酸盐氮含量分别维持在 0.20 mg/L 和 0.15 mg/L 之下,硝酸盐氮含量呈缓慢上升趋势。

(3)养殖系统中优势菌门为变形菌门,存在 *Nitrosomonas*、*Nitrospira* 和 *Nitrococcus* 等多种参与水质调控类群以及 *Algisphaera*、*Gemmatimonas* 和 *Paucibacter* 等参与有机质分解与对虾益生作用的类群。

参考文献

- 安阳,曾国权,陈雪初,等,2012. 凡纳滨对虾养殖池塘水体原位复合生态净化技术研究[J]. 渔业现代化, 39(3): 28-33.
- 丁贤,李卓佳,陈永青,等,2004. 芽孢杆菌对凡纳对虾生长和消化酶活性的影响[J]. 中国水产科学, 11(6):580-584.
- 窦妍,赵晓伟,丁君,等,2016. 应用高通量测序技术分析北方刺参养殖池塘环境菌群结构[J]. 海洋与湖沼, 47(1):122-129.
- 国家环境保护总局,2002. 水和废水监测分析方法(4 版)[M]. 北京:中国环境科学出版社.
- 何洁,刘长发,张红霞,2003. 3 种载体上生物膜的硝化性能[J]. 中国水产科学, 10(1):65-68.
- 李越蜀,郑忠明,翟海佳,等,2012. 不同模式凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 养殖池塘沉积物酶活性及其微生物群落结构分析[J]. 海洋与湖沼, 43(6):1254-1260.
- 刘军义,罗兆飞,李腾昌,2003. 固定化浓缩光合细菌对氨氮降解作用的研究[J]. 水产科技情报, 30(5):195-197.
- 陆家昌,李活,黄翔鹤,2010. 枯草芽孢杆菌对水质及凡纳滨对虾幼体免疫指标影响的研究[J]. 南方水产科学, 6(1):19-24.
- 裘钱玲琳,徐如卫,朱建林,等,2015. 凡纳滨对虾土塘养殖与循环养殖系统细菌群落结构比较研究[J]. 生物学杂志, 32(6):45-49.
- 任利华,李斌,孙国华,等,2015. 16S rDNA 克隆文库解析仿刺参 (*Apostichopus japonicus*) 苗种培育池中生物絮团的细菌群落结构[J]. 海洋与湖沼, 46(1):197-205.
- 谭洪新,庞云,王潮辉,等,2017. 驯化硝化型生物絮体养殖南美白对虾的初步研究[J]. 上海海洋大学学报, 26(4):490-500.
- 吴保承,沈国强,杨春霞,等,2010. 微生态制剂在水质净化中的应用现状及展望[J]. 环境科学与技术, 33(S2): 408-410.
- 姚秀清,张全,王庆庆,2011. 硝化细菌对养殖水体处理技术的研究[J]. 化学与生物工程, 28(1):79-81.
- Ballester E L C, Jr W W, Cavalli R O, et al, 2007. Nursery of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* in cages with artificial substrates: Biofilm composition and shrimp performance. *Aquaculture*, 269 (1/4): 355-362.
- Crab R, Avnimelech Y, Defoirdt T, et al, 2007. Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production[J]. *Aquaculture*, 270(1):1-14.
- Emerenciano M, Cuzon G, Paredes A, et al, 2013. Evaluation of biofloc technology in pink shrimp *Farfante-*

- penaeus duorarum*, culture: growth performance, water quality, microorganisms profile and proximate analysis of biofloc[J]. *Aquaculture International*, 21(6): 1381–1394.
- Kumar V, Roy S, Meena D K, et al, 2016. Application of Probiotics in Shrimp Aquaculture: Importance, Mechanisms of Action, and Methods of Administration[J]. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 24(6): 342–368.
- Lee C, Kim S, Lim S J, et al, 2017. Supplemental effects of biofloc powder on growth performance, innate immunity, and disease resistance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. *Fisheries & Aquatic Sciences*, 20(1):15.
- Manan H, Moh J H Z, Kasan N A, et al, 2017. Identification of biofloc microscopic composition as the natural bioremediation in zero water exchange of Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, culture in closed hatchery system[J]. *Applied Water Science*, 7(5):2437–2446.
- Naganuma T, Fukai I, Murakami Y, et al, 2000. Effect of ultraviolet radiation on the bioavailability of marine diatom-derived low-molecular-weight dissolved organic matter[J]. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 3(1):163–166.
- Thompson F L, Abreu P C, Wasielesky W, 2002. Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture[J]. *Aquaculture*, 203(3/4):263–278.
- Twarowska J G, Westerman P W, Losordo T M, 1997. Water treatment and waste characterization evaluation of intensive recirculating fish production system[J]. *Aquacultural Engineering*, 16(3):133–147.
- Welander U, Henrysson T, Welander T, 1998. Biological nitrogen removal from municipal landfill leachate in a pilot scale suspended carrier biofilm process[J]. *Water Research*, 32(5):1564–1570.

(责任编辑 万月华)

Water Purification by Probiotic Biofilms in Shrimp Culture Systems

LIU Yang, SONG Zhi-wen, LI Ling-zhi, XU Ai-ling

(School of Environmental and Municipal Engineering, Qingdao University
of Technology, Qingdao 266033, P.R.China)

Abstract: Intensive shrimp culture has developed rapidly and become one of the leading food production sectors in China. However, large scale expansion of intensive shrimp culture faces challenges, including the deterioration of aquaculture water quality that threatens the aquatic environment. Probiotics, an eco-friendly and cost-effective supplement, have been widely applied in intensive shrimp culture to regulate the microecological balance of the culture system, improve culture water quality, boost the immune system of shrimp and control pathogenic bacteria and viruses. In this study, four shrimp (*Penaeus vannamei*) culture systems were established using different combinations of three probiotics (Bacillus, nitrifying bacteria, photosynthetic bacteria) and two biofilm carriers (ceramsite, fiber hair ball). Ammonia nitrogen (NH₃-N) was added at different initial concentrations (3, 6, 9 mg/L) to intensify nitrification in the culture system before shrimp were released into the culture pond. Healthy shrimp [body length, (0.8±0.15) cm; body weight, (0.009±0.001) g] were selected for the test at a density of 1 666 ind/m³. During the test, the probiotics and biofilm carriers for each treatment were added daily and water was not changed for 30 days. The water temperature, pH, DO, ammonia nitrogen (NH₃-N) and nitrite nitrogen (NO₂⁻-N) were determined daily and nitrate nitrogen (NO₃⁻-N) was determined at 72 h intervals. The nitrification process and purification capacity toward NH₃-N and NO₂⁻-N in the four different culture systems and control (no probiotics or biofilm carriers) were compared and the structure of the bacterial community was analyzed using high-throughput sequencing technology. After nitrification was established, the NH₃-N removal rates in the four treatment groups were higher than the control by 12.47%, 13.95%, 17.25% and 17.65%. Under the same probiotic treatment, NH₃-N and NO₂⁻-N oxidation capacities in the fiber hair ball system were higher than with ceramsite. After 24 hr, the NH₃-N removal rates in the fiber hair ball system were 9.03% and 9.06% higher than in the ceramsite system. During shrimp culturing, the concentrations of NH₃-N and NO₂⁻-N in each system remained under 0.20 mg/L and 0.15 mg/L, respectively, while the concentration of NO₃⁻-N slowly increased. Analysis of the bacterial community shows that Proteobacteria was the dominant taxa in the biofilm, accounting for 40% of the total, with α-Proteobacteria, β-Proteobacteria and γ-Proteobacteria as the dominant classes. In addition, *Nitrosomonas*, *Nitrospira* and *Nitrococcus* were identified in the bacterial community and were involved in water purification. *Algisphaera*, *Gemmatimonas* and *Paucibacter* were involved in the decomposition of organic matter and improved shrimp growth. This study provides a reference for reducing aquaculture waste discharge and the risks posed by aquatic pollution.

Key words: *Penaeus vannamei*; probiotics; biofilm; water purification control; bacterial community structure