



## 牡蛎壳作为生物絮凝养殖系统缓释碱度源的效果

蒙浩焱<sup>1</sup>, 胡鑫<sup>1</sup>, 吴霞<sup>1</sup>, 谭洪新<sup>1,2,3</sup>, 罗国芝<sup>1,2,3\*</sup>

(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:** 为优化生物絮凝系统碱度调控策略, 实验研究了在生物絮凝—罗非鱼养殖系统中牡蛎壳补充碱度的可行性。在系统启动阶段评估了不同牡蛎壳添加量 0 g/L(对照组, A 组)、0.36 g/L(B 组)和 0.72 g/L(C 组)补充碱度的可行性。结果显示, C 组碱度、pH 和钙离子水平显著高于 A 组, 但 B 与 C 组间的水质差异不显著, 牡蛎壳补充碱度效果明显。在生物絮凝系统启动阶段的基础上, 对比研究了两种形态的牡蛎壳[(壳粉, E 组)、(壳, F 组)]为生物絮凝在罗非鱼养殖系统中补充碱度的效果。各组的水质指标、鱼体酶活免疫性能以及细菌群落组成均无显著差异, 牡蛎壳及壳粉对罗非鱼生长没有明显的负面影响, 可以被应用到生物絮凝养殖系统中, 但补充碱度效果不明显。牡蛎壳补充碱度与形态无关。研究表明, 在目前实验条件下, 牡蛎壳在生物絮凝养殖系统中不能完全替代碳酸氢钠, 还需进一步优化相关工艺。

**关键词:** 吉富罗非鱼; 生物絮凝技术; 牡蛎壳; 碱度; 酶活免疫; 细菌群落组成

**中图分类号:** S 959

**文献标志码:** A

生物絮凝技术 (bio-floc technology, BFT) 是可以实现高密度水产养殖的零污染排放的养殖技术, 是近年来水产养殖领域研究和实践的热点之一<sup>[1-2]</sup>。生物絮凝技术主要特征是添加碳源, 提高水体碳氮比 (C/N), 培养水体中可利用总氨氮 (total ammonia nitrogen, TAN) 异养同化的细菌<sup>[3]</sup>。但生物絮凝系统日常管理除了碳源调控之外, 还需要关注碱度调控, 因为生物絮凝系统处理氮素会消耗水体碱度<sup>[3-5]</sup>。在没有额外的碱度补充下, 水体的碱度过低会导致生物絮凝系统处理氮素的能力下降<sup>[6]</sup>。常用的碱度调控方式是定期向水体投入碳酸氢钠, 利用碳酸氢钠可溶于水的特性, 溶解并释放碳酸氢根离子, 以便提高生物絮凝处理氮素所需的碱度<sup>[4,7]</sup>。但添加碳酸氢钠存在耗费人力、定期添加和操作复杂等问题。因此寻找一个自动释放碱度的材料

来替代碳酸氢钠十分必要。

随着贝类水产养殖行业的发展, 人工养殖牡蛎的规模越来越大, 继而产生剩余价值不高、大量废弃的牡蛎壳, 对环境造成严重的污染<sup>[8]</sup>。如何利用和开发废弃的牡蛎壳已然成为一个重要的课题。目前牡蛎壳被广泛应用于城市污水处理, 牡蛎壳具有吸附 TAN、净化水质的能力, 有助于提高曝气生物滤池的硝化率<sup>[9]</sup>, 由牡蛎壳制成的壳粉亦可吸附 TAN<sup>[10]</sup>。研究发现牡蛎壳可以为硝化反应提供碱度<sup>[9,11]</sup>。牡蛎壳主要成分是碳酸钙 (CaCO<sub>3</sub>), 其含量高达 90%<sup>[12]</sup>。在酸性、弱酸性条件下, 牡蛎壳具有一定的溶解性, 牡蛎壳粉末的溶解性能更强<sup>[13]</sup>。生物絮凝系统 pH 为 6.5~8.0<sup>[14-15]</sup>, 理论上牡蛎壳可以补充生物絮凝的碱度, 但是目前没有相关的研究报道。因此, 本研究在生物絮凝系统启动阶段, 评估不同的

收稿日期: 2019-06-30 修回日期: 2019-10-04

资助项目: 国家自然科学基金 (31202033)

通信作者: 罗国芝, E-mail: gzhluo@shou.edu.cn

牡蛎壳添加量补充碱度的可行性, 并在此基础上, 比较了在生物絮凝养殖阶段两种形态的牡蛎壳补充碱度的效果, 以为生物絮凝技术的碱度调控提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 系统运行和实验设计

设置 9 个养殖水槽, 水槽上部为圆柱体, 下部为圆锥体, 直径 110 cm, 锥体高 38 cm, 总高度 110 cm, 工作体积为 500 L(图 1)。每 3 个养殖水槽由一台 750 W 罗伯茨鼓风机均匀提供曝气, 以保证水体溶解氧充足和絮体悬浮。

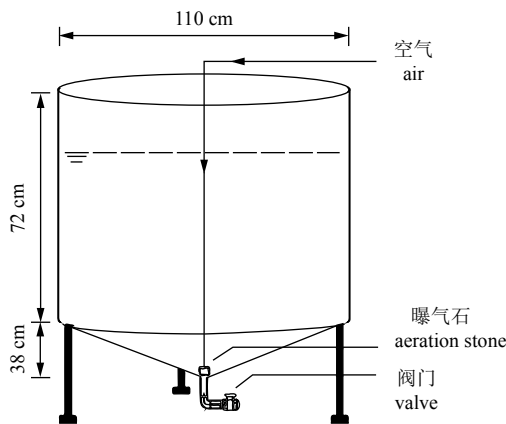


图 1 生物絮凝系统养殖水槽的示意图

Fig. 1 Diagram of tank in biofloc aquaculture system

采用中国辽宁某海域海滩上直径 7~8 cm 的废弃天然牡蛎壳。用自来水、纯水多次清洗, 洗净其表面的污泥等杂质后晾干; 用中药粉碎机粉碎至粒径为 50~100  $\mu\text{m}$  的牡蛎壳粉, 并装于 800 目纱布内, 即牡蛎壳粉袋。

本次实验由两部分组成, 实验周期共 55 d。第一部分是评估系统启动过程中牡蛎壳补充碱度的可行性, 即系统启动阶段, 周期为 25 d。实验分为 3 组, 每组 3 个平行: 不投放牡蛎壳为对照组 (A 组); 投放由尼龙绳包裹的牡蛎壳 (B 组), 投放量 0.36 g/L; 投放由尼龙绳包裹的牡蛎壳 (C 组), 投放量 0.72 g/L。

第二部分是研究生物絮凝养殖系统中不同形态的牡蛎壳补充碱度的效果, 即养殖阶段, 周期为 30 d。实验分为 3 组, 每组 3 个平行: 不投放牡蛎壳为对照组 (D 组), 投放由尼龙绳包裹的牡蛎壳粉 (E 组), 投放由尼龙绳包裹的牡蛎壳 (F 组)。由于养殖阶段氮素投入较大, 牡蛎壳投

放量均增加至 3 g/L。

生物絮团由磨碎的罗非鱼饲料 (广东中山统一企业有限公司) 培养, 主要成分: 粗蛋白 ( $\geq 33\%$ )、粗脂肪 ( $\geq 2\%$ )、粗纤维素 ( $\leq 8\%$ ) 和灰分 ( $\leq 12\%$ ); 生物絮凝系统的碳源为食品级葡萄糖 (古阜丰生物科技有限公司, 内蒙古), 碱度补充材料为牡蛎壳和碳酸氢钠。当碱度低于 40 mg/L, 添加碳酸氢钠以调整碱度为 150 mg  $\text{CaCO}_3/\text{L}$ 。养殖期间每 10 天调整 1 次总悬浮固体物质 (total suspended solids, TSS), 保持其水平为 500~800 mg/L。

### 1.2 养殖管理

养殖品种为吉富罗非鱼 (GIFT *Oreochromis niloticus*)。2019 年 1 月 11 日向 9 个养殖水槽移入罗非鱼 450 尾, 规格 (100.91 $\pm$ 34.91) g, 每个养殖水槽中鱼体总质量一致, 初始放养密度 10.09  $\text{kg}/\text{m}^3$ 。饲料由广东中山统一企业有限公司提供, 主要成分: 粗蛋白 ( $\geq 33\%$ )、粗脂肪 ( $\geq 2\%$ )、粗纤维素 ( $\leq 8\%$ ) 和灰分 ( $\leq 12\%$ )。每日分 3 次投喂饲料, 分别为 7:00、13:00 和 18:00。日投喂量为 3%。每 10 天调整 1 次投喂量, 养殖过程中及时捞出死鱼, 并补充体质量相同、数量一致的罗非鱼, 以确保 3 组的氮素投入在同一水平。

### 1.3 实验参数的测定方法

水质参数 在系统启动阶段, 每 2 天取 1 次水样, 10:00 检测水温 (T)、pH、溶解氧 (DO) (WTW Multi 3430, 德国), 测定总氮 (TN) 和碱度 (以  $\text{CaCO}_3$  计, 酸碱滴定指示法)。水样离心 (4 000 $\times$ g, 10 min) 后测定溶解性总有机氮 (dissolved total nitrogen, DTN)、TAN、亚硝酸氮 ( $\text{NO}_2^-$ -N)、硝酸氮 ( $\text{NO}_3^-$ -N)、溶解性有机碳 (dissolved organic carbon, DOC) 和钙离子 (Thermo fisher-ICS 1100, 美国) 浓度。TN、DTN 采用过硫酸钾氧化—紫外分光光度法 (型号 UV2000, 上海尤尼柯, 下同) 测定。TAN 浓度采用次溴酸钠氧化法测定,  $\text{NO}_2^-$ -N 浓度采用重氮—偶氮法测定,  $\text{NO}_3^-$ -N 浓度使用紫外分光光度法测定<sup>[6]</sup>。

在养殖阶段, 每天 10:00 取水样, 检测 T、pH、DO 和碱度。水样离心 (4 000 $\times$ g, 10 min) 后测定 TAN、 $\text{NO}_2^-$ -N、 $\text{NO}_3^-$ -N、DTN、DOC 和钙离子浓度, 每 3 天检测 TN、DTN, 测定方法同上。

消化酶活性与免疫性能 实验第 55 天, 每个水槽中实验鱼停食 24 h, 随机抽取 5 尾罗非鱼并称量, 麻醉后抽血。在采样 1 min 内, 从尾

静脉采集血液。从捕获到采血的时间为 5 min。血样放入 1.5 mL 非肝素化微量离心管中, 在 4 °C 条件下, 12 000 r/min 离心 5 min。取血清样本分配到 1.5 mL 微离心管中, 储存在 -20 °C 冰箱内; 抽血后解剖鱼体, 取出鱼体的胃、肠、肝胰腺、头肾和背脊肌肉。在 0 °C 下, 使用电动搅拌机 8 000 r/min 匀浆 3 次, 持续 30 s, 然后 2 500 r/min, 离心 10 min, 取上清液分配到离心管中, 并储存在 -20 °C 冰箱内, 待后期采用 Zhang 等<sup>[17]</sup>的方法测量。

**絮体参数与细菌群落组成** 实验第 25、35、45 和 55 天测量 TSS、絮体体积 (FV30)。第 26 和 55 天分别对 9 个水槽随机取 50 mL 养殖水, 立即放置于 -80 °C 冰箱保存, 养殖水样的 DNA 根据 Fast DNA<sup>®</sup> SPIN kit DNA 提取试剂盒 (Qiagen, CA, 美国) 提供的标准步骤进行提取。采用 Nanodrop-1000 (Thermo Fisher Scientific, 美国) 测定其浓度和质量。提取的 DNA 样品首先利用 ABI Gene Amp<sup>®</sup> 9700 PCR 仪进行扩增, 扩增区域为细菌 16S rRNA V3~V4 区, 所用引物为 338F (5'-ACT CCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGA CTACHVGGGTWTCTAAT-3')。反应条件: 95 °C 3 min; 27 个循环包括 95 °C 30 s, 55 °C 30 s 和 72 °C 45 s, 最终 72 °C 延伸 10 min。产物经电泳跑胶并经 Axy Prep DNA Gel Extraction Kit (Axygen BiCciences) 纯化后, 在上海美吉生物医药科技有限公司进行测序, 测序平台为 Illumina Mi Seq PE300 (Illumina, 美国)。

## 1.4 数据分析

实验数据采用 Excel 软件进行结果统计, 用 Origin 9 和 Adobe Illustrator CC 2019 软件进行图表绘制。采用 SPSS 22.0 统计软件对数据进行 ANOVA 单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异显著, 实验数值用平均值±标准差 (mean±SD) 的形式表示。

## 2 结果

### 2.1 水质参数

实验期间, 每个养殖水槽的水温均保持在 (25±1)°C, DO 均不低于 7.00 mg/L。系统启动阶段, 前 12 天系统 TAN 先上升后下降, A、B 和 C 组 TAN 峰值分别为 (4.91±1.93)、(4.35±0.78) 和 (6.54±0.49) mg/L (表 1)。当 TAN 下降, NO<sub>2</sub>-N 开始上升, 前 20 天 3 组的 NO<sub>2</sub>-N 波动上升, 随后下降, 同时 3 组的 NO<sub>3</sub>-N 开始上升。启动阶段, 3 组的三态氮差异均不显著 ( $P > 0.05$ )。B、C 组碱度、pH 和钙离子浓度均高于 A 组 (表 1), C 组碱度显著高于 A 和 B 组 ( $P < 0.05$ ), 但 A、B 组组间差异不显著 ( $P > 0.05$ ); B、C 组 pH 和钙离子显著高于 A 组 ( $P < 0.05$ )。

养殖阶段, E、F 组 pH 和钙离子浓度显著高于 D 组 ( $P < 0.05$ ), 但 E、F 组组间差异不显著 ( $P > 0.05$ ) (表 2)。第 33 天, E、F 组 TAN 分别为 (0.47±0.32) 和 (0.41±0.26) mg/L, D 组 TAN 开始上升, 于第 34 天升至 (2.76±0.47) mg/L (图 2-a), 均高于当天 E、F 组, 且差异显著 ( $P < 0.05$ )。E、F 组碱度

表 1 系统启动阶段水质指标的变化  
Tab. 1 Changes of water quality parameters at system start-up

指标 parameters	A		B		C	
	mean ± SD	变化范围 range	mean ± SD	变化范围 range	mean ± SD	变化范围 range
总氨氮/(mg/L) TAN	1.17±1.69 <sup>a</sup>	0.05~4.91	1.06±1.54 <sup>a</sup>	0.02~4.35	1.71±2.06 <sup>a</sup>	0.03~6.54
亚硝氮/(mg/L) NO <sub>2</sub> -N	3.90±3.30 <sup>a</sup>	0.00~9.47	4.18±2.84 <sup>a</sup>	0.03~8.00	2.87±2.34 <sup>a</sup>	0.01~6.72
硝氮/(mg/L) NO <sub>3</sub> -N	3.06±3.16 <sup>a</sup>	0.49~9.88	2.92±3.00 <sup>a</sup>	0.61~10.75	1.75±2.04 <sup>a</sup>	0.48~6.99
水温/°C temperature	25.97±1.43 <sup>a</sup>	23.37~29.20	26.17±1.52 <sup>a</sup>	23.57~29.20	25.62±1.53 <sup>a</sup>	23.10~28.50
pH	8.03±0.13 <sup>b</sup>	7.68~8.21	8.17±0.17 <sup>a</sup>	8.00~8.31	8.12±0.09 <sup>a</sup>	8.01~8.32
溶解氧/(mg/L) DO	8.14±0.25 <sup>a</sup>	7.69~8.67	8.13±0.22 <sup>a</sup>	7.69~8.59	8.01±0.22 <sup>a</sup>	7.78~8.70
钙离子/(mg/L) calcium	32.66±2.37 <sup>b</sup>	27.67~35.69	38.83±4.57 <sup>a</sup>	29.67~46.16	39.29±6.16 <sup>a</sup>	26.67~48.98
碱度/(mg/L) alkalinity	102.08±16.18 <sup>b</sup>	82.59~127.67	106.75±9.67 <sup>b</sup>	94.31~130.67	112.95±11.55 <sup>a</sup>	95.50~129.67

注: 同行不同上标小写字母表示数值差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下同

Notes: values in the same row with different lowercase superscript letters are significantly different ( $P < 0.05$ ), the same below

分别降至 (56.03±7.25) 和 (61.08±2.80) mg/L, D 组则降至 (39.60±2.27) mg/L, 当天 E、F 组均高于 D 组 (图 2-b), 且差异显著 ( $P<0.05$ ), 但 E、F 组组间差异不显著 ( $P>0.05$ ); pH 持续下降, E、F

组 pH 分别降至 6.25±0.14 和 6.20±0.14, 均高于当天 D 组的 5.97±0.12(图 2-e), 但 3 个组没有显著差异 ( $P>0.05$ ); E、F 组钙离子浓度均高于 D 组 (图 2-f), 仅 F 组与 D 组差异显著 ( $P<0.05$ )。

表 2 系统养殖阶段水质指标的变化  
Tab. 2 Changes of water quality parameters in system culture stage

n=3

指标 parameters	D		E		F	
	mean ± SD	变化范围 range	mean ± SD	变化范围 range	mean ± SD	变化范围 range
总氨氮/(mg/L) TAN	4.44±4.18 <sup>b</sup>	0.32~13.03	2.19±2.48 <sup>a</sup>	0.01~8.99	2.07±1.93 <sup>a</sup>	0.07~6.12
亚硝氮/(mg/L) NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N	1.97±3.85 <sup>a</sup>	0.05~15.14	2.38±4.13 <sup>a</sup>	0.03~14.07	2.07±3.49 <sup>a</sup>	0.01~15.14
硝氮/(mg/L) NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	180.52±80.41 <sup>a</sup>	65.08~340.17	173.04±79.17 <sup>a</sup>	50.27~327.93	171.65±81.49 <sup>a</sup>	53.92~324.00
水温/°C temperature	24.97±0.36 <sup>a</sup>	24.03~25.37	24.97±0.39 <sup>a</sup>	23.97~25.40	24.95±0.36 <sup>a</sup>	23.93~25.37
酸碱度 pH	6.79±0.78 <sup>a</sup>	5.61~8.44	6.96±0.67 <sup>a</sup>	6.01~8.37	6.96±0.64 <sup>a</sup>	6.22~8.37
溶解氧/(mg/L) DO	7.38±0.47 <sup>a</sup>	6.68~8.49	7.14±0.53 <sup>a</sup>	6.26~8.30	7.20±0.46 <sup>a</sup>	6.58~8.39
钙离子/(mg/L) calcium	73.27±19.34 <sup>b</sup>	29.92~92.06	93.85±23.02 <sup>a</sup>	50.45~120.58	93.39±24.18 <sup>a</sup>	45.76~120.58
总悬浮固体物质/(mg/L) TSS	704.92±217.57 <sup>a</sup>	337.00~931.00	710.83±224.44 <sup>a</sup>	335.00~1 058.00	663.75±213.74 <sup>a</sup>	325.00~955.00
絮体体积/(mL/L) FV <sub>30</sub>	31.90±12.58 <sup>a</sup>	12.00~45.00	30.61±12.61 <sup>a</sup>	9.00~46.00	29.21±12.36 <sup>a</sup>	9.00~44.00
碱度/(mg/L) alkalinity	77.22±56.17 <sup>a</sup>	25.66~219.9	81.66±53.79 <sup>a</sup>	30.53~209.82	81.53±49.00 <sup>a</sup>	30.05~197.47

在添加了碳酸氢钠, 3 组的碱度均回到同一水平后, D 组 TAN 开始下降, 于第 35 天降至 (0.73±0.77) mg/L。3 组的碱度随 TAN 下降而降低, 但 E、F 组碱度均高于 D 组。当碱度低于 40 mg/L, 系统 TAN 出现积累。实验第 38 天, 第 2 次添加碳酸氢钠后, 3 组的 TAN 下降, 3 组的碱度随之降低 (图 2-b)。第 40 天, E、F 组碱度分别降至 (65.55±1.86) 和 (52.91±10.74) mg/L, 均高于当天 D 组, D 组碱度下降明显, 碱度为 (39.60±7.25) mg/L (图 2-b), E 组碱度与 D、F 组差异明显 ( $P<0.05$ ), 但 F 组和 D 组差异不明显 ( $P>0.05$ ); 3 组的钙离子浓度差异不明显 ( $P>0.05$ )。重复添加碳酸氢钠后, 3 组的碱度变化与之前相同, E、F 组钙离子浓度变化趋于稳定 (图 2-f)。养殖阶段, E、F 组 TAN 一直低于 D 组, D 组 TAN 峰值可达 (13.01±0.84) mg/L, 与 E、F 组差异显著 ( $P<0.05$ )。实验期间, 系统各组 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 在第 10 天后一直在较低的水平波动, 浓度最高不超过 2 mg/L, 且各组间无显著差异 ( $P>0.05$ ); NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 浓度一直上升, 且各组间无显著差异 ( $P>0.05$ )。

## 2.2 消化酶活性与免疫性能

E、F 组肠道脂肪酶活性均高于 D 组 (图 3-c), 且差异显著 ( $P<0.05$ )。E 组胃蛋白酶、胃脂肪酶

活性分别高于 D 和 F 组 (图 3-a, 3-b), 但无显著差异 ( $P>0.05$ )。E、F 组头肾碱性磷酸酶活性明显高于 D 组 (图 4-a), 且差异显著 ( $P<0.05$ )。E 组肝胰腺碱性磷酸酶活性显著高于 F、D 组 (图 4-d), 各组间差异不显著 ( $P>0.05$ )。3 组的血清碱性磷酸酶活性差异不明显 (图 4-g)。但是 E 组血清溶菌酶活性显著高于 D 和 F 组 (图 4-h), 差异显著 ( $P<0.05$ )。E 组肝胰腺溶菌酶活性均高于 D 和 F 组 (图 4-e), 但无显著差异 ( $P>0.05$ )。3 组的头肾溶菌酶活性差异不大 (图 4-b)。3 组的头肾、肝胰腺超氧化物歧化酶活性差异不大 (图 4-c, 4-f)。但 D 和 F 组血清超氧化物歧化酶活性显著高于 E 组 (图 4-i)。

## 2.3 细菌群落组成

对样本序列在 97% 的相似水平下进行聚类分析, 得到细菌 OTU 水平的物种韦恩图 (图 5), D、E 和 F 组中 OTU 分别为 1 273、1 184 和 1 030 个, 其中 3 组共有 OTU 为 728 个, 占 3 组总数的 20.88%, F 组独有 OTU 为 240 个, 占 F 组的 23.30%。E、F 组共有 OTU 为 213 个, D、E 组共有 OTU 为 85 个, D、F 组共有 OTU 为 92 个。E、F 组共有 OTU 明显高于 D、E 组和 D、F 组

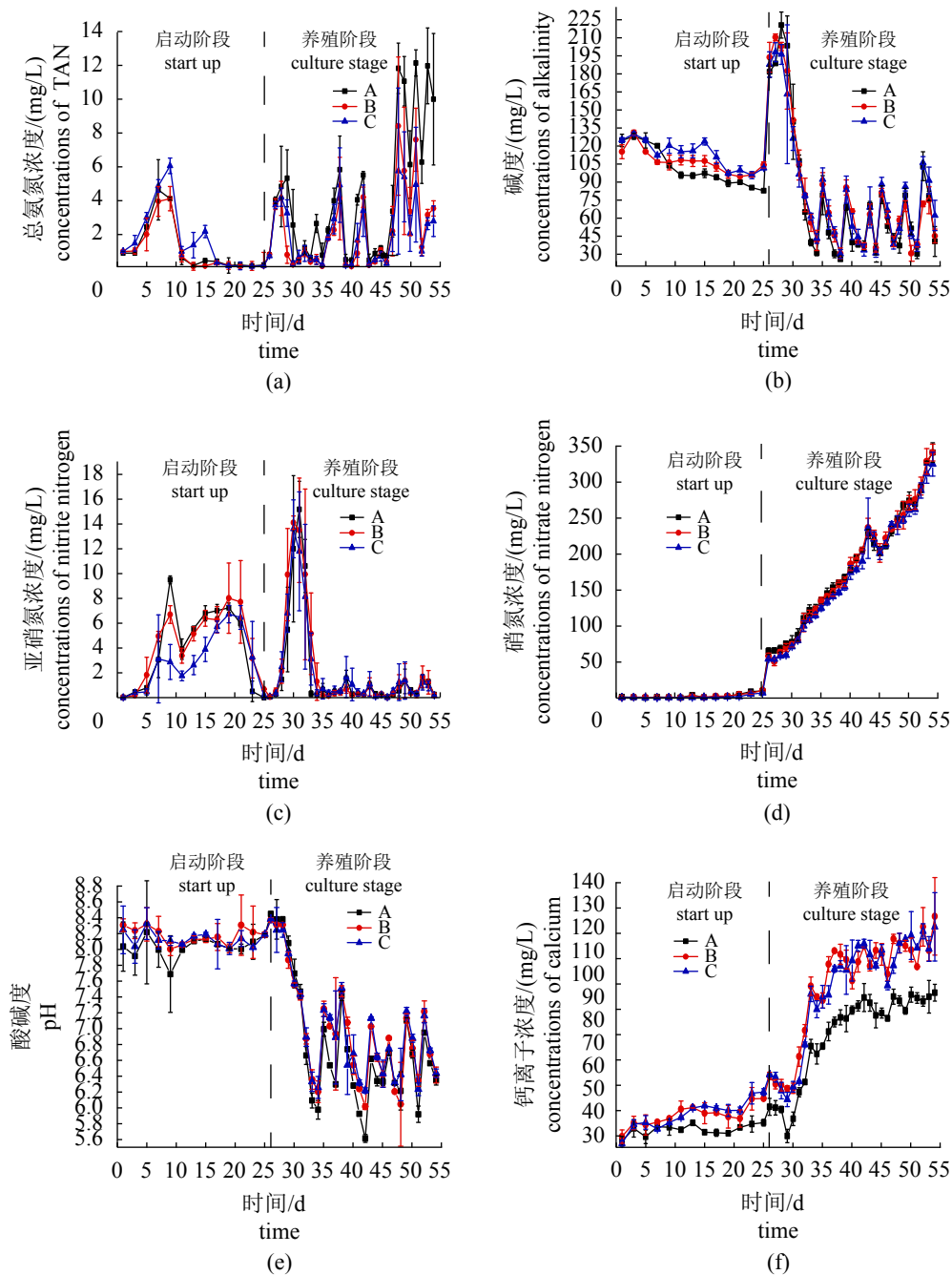


图2 整个实验期间内总氨氮 (a)、碱度 (b)、亚硝氮 (c)、硝氮 (d)、酸碱度 (e) 和钙离子 (f) 的动态变化

Fig. 2 Dynamic changes of total ammonia nitrogen (a), alkalinity (b), nitrite (c), nitrate (d), pH (e) and calcium (f) during the whole experiment period (n=3)

共有 OTU。

通过 Alpha 多样性分析研究细菌群落的多样性和丰度, 反映群落多样性的常用指数有 Shannon (Shannon 值越大, 群落多样性越高) 和 Simpson (Simpson 值越大, 群落多样性越低) 指数。反映群落丰度的常用指数有 Chao 和 Ace 指数。E、F 组多样性均高于 D 组, 但无明显差异; 根据 Chao、Ace 指数, 发现 D 组细菌群落组成的丰度低于 E、

F 组 (表 3)。

门水平上, 3 组生物絮凝系统中优势菌群均为变形菌门 (Proteobacteria), 其丰度在 D 组占 52.23%, 在 E 组占 38.86%, 在 F 组占 40.33% (图 6-a)。纲水平上, 3 组的优势菌群都以  $\alpha$ -变形菌纲 (Alpha-proteobacteria) 为主, 其丰度在 D、E 和 F 组中分别占 26.01%、18.42% 和 19.72% (图 6-b)。

属水平上, 养殖阶段氨氧化细菌 (AOB) 和

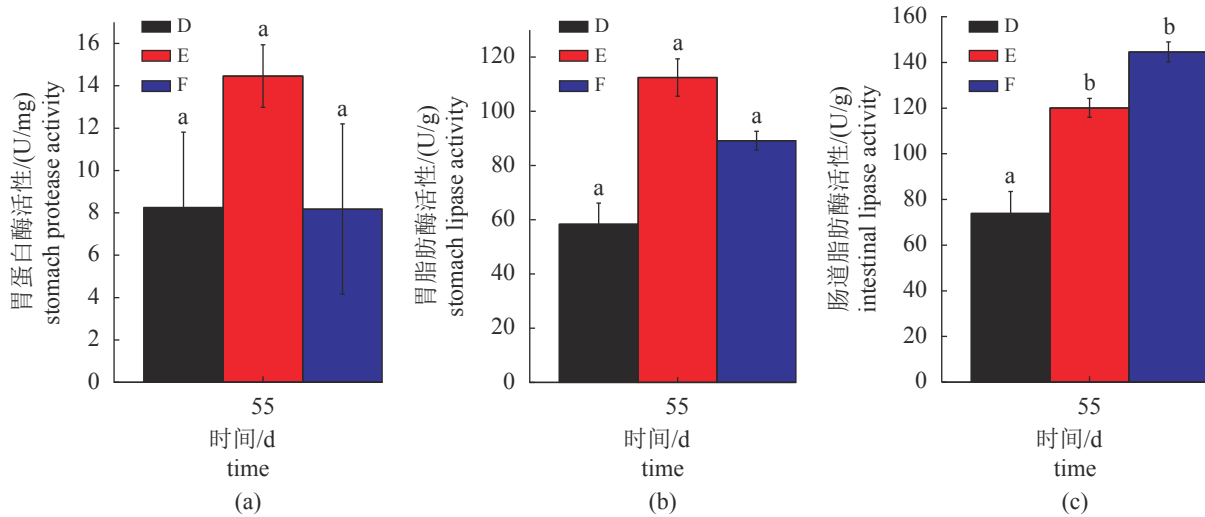


图3 养殖阶段吉富罗非鱼蛋白酶与脂肪酶活性

不同小写字母表示数值差异显著 ( $P < 0.05$ )

Fig. 3 Activities of protease and lipase of GIFT *O. niloticus* in culture stage

Values with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ) ( $n=3$ )

亚硝酸氧化细菌 (NOB) 菌属的含量均一直处于较低水平, 但 NOB 的硝化螺旋菌属 (*Nitrospira*) 在第 25 天时的丰度比第 55 天时高 (表 4)。D 组优势菌属以 *Cetobacterium*、*norank\_f\_SaprBiraceae* 和 *Nannocystis* 为主, 丰度分别为 11.99%、5.28% 和 6.49%; E 组优势菌属以 *norank\_f\_SaprBiraceae* 和 *norank\_f\_Cytophagaceae* 为主, 丰度分别为 9.29% 和 5.78%; F 组优势菌属以 *Cetobacterium* 和 *norank\_f\_Cytophagaceae* 为主, 丰度分别为 7.18% 和 5.85% (图 6-c)。

### 3 讨论

碱度主要由碳酸盐和重碳酸盐组成<sup>[5]</sup>, 牡蛎壳的碳酸钙成分含有碳酸根离子, 牡蛎壳溶解并向水体释放碱度<sup>[9, 18]</sup>。系统启动阶段, 添加牡蛎壳的实验组碱度、钙离子水平显著高于对照组, 表明牡蛎壳在生物絮凝系统中溶解, 增加了水体的碱度和钙离子浓度。但牡蛎壳补充碱度的过程是缓慢的, 碱度的变化为持续下降 (图 2-b)。Chen 等<sup>[6]</sup>认为在硝化反应过程中, 碱度应维持在 200 mg/L 以上。考虑到养殖阶段日投饵量会导致系统的 TAN 增加, 系统处理 TAN 消耗的碱度过大, 因此在养殖阶段需提高牡蛎壳的添加量, 同时采用表面积更大的牡蛎壳粉作为实验材料, 研究在养殖实验中补充碱度的效果。

养殖阶段, 3 组的 TAN 均低于 2 mg/L,  $\text{NO}_2^-$ -N

低于 0.5 mg/L,  $\text{NO}_3^-$ -N 出现了明显的积累, 均  $\geq 50$  mg/L。表明以硝化反应主导的生物絮凝养殖系统已经形成<sup>[14-15, 19-20]</sup>。随后调配 3 组的碱度为 200 mg/L, TSS 为 300 mg/L。养殖阶段前 8 天, 系统的碱度持续降低, 但 E、F 组碱度仍高于 D 组, 钙离子浓度升高, 说明牡蛎壳溶解了一部分碳酸钙, 碱度得到一定的补充。生物絮凝系统的碱度低于 70 mg/L 时, 对絮体和硝化反应起到负面的影响<sup>[21]</sup>, 因此在实验第 34、38、41、45、48、51 天, 一共 6 次, 分别向 9 个养殖水槽中添加能维持生物絮凝系统良好水质的碳酸氢钠<sup>[22]</sup>。重复添加碳酸氢钠后, 3 组的碱度变化差异不大, E、F 组钙离子变化趋于稳定, TAN 再次上升, 推测是水体体积过大, 3 g/L 的牡蛎壳提供的碱度无法维持系统处理 TAN, 表明在生物絮凝养殖系统中牡蛎壳提供的碱度有限, 未来还需继续增加牡蛎壳的投放量。养殖阶段 E、F 组碱度差异不显著, 表明牡蛎壳补充碱度与其形态无关。

实验后期, D 组 TAN 显著高于 E、F 组, 可能是牡蛎壳具有吸附 TAN 的能力<sup>[23-25]</sup>。实验期间, 3 组的钙离子变化呈上升趋势, 因为投喂的饲料中含有钙元素<sup>[26]</sup>。但 3 组投喂量一致, 因此可忽略。实验第 29 天, D 组钙离子浓度降低至 (29.96 $\pm$ 2.89) mg/L, E、F 组钙离子下降不明显, 分别为 (45.76 $\pm$ 3.09) 和 (50.45 $\pm$ 1.21) mg/L, 3 组之间没有显著差异 ( $P > 0.05$ )。推测为 D 组 TAN 积

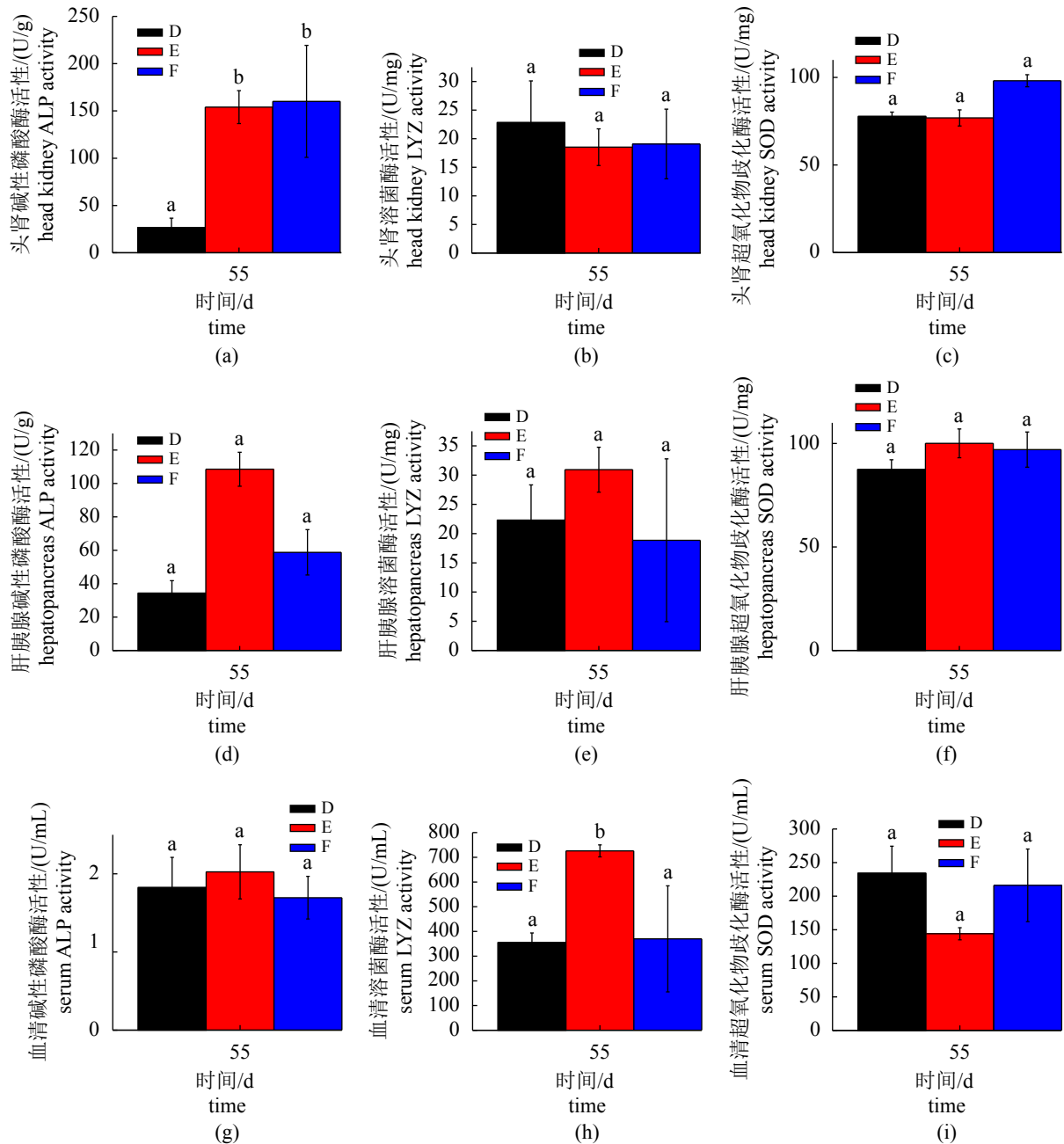


图4 养殖阶段罗非鱼碱性磷酸酶、溶菌酶和超氧化物歧化酶活性

Fig. 4 Alkaline phosphatase, lysozyme and SOD activities of GIFT *O. niloticus* in culture stage (n=3)

累, 吉富罗非鱼摄入水体中的钙元素, 以维持生长发育。钙元素可以维持鱼类的生长发育, 并参与血液凝固、神经传导、渗透压调节和多种酶反应等过程, 具有维持酸碱平衡的作用<sup>[27-28]</sup>。

3组的吉富罗非鱼胃、肠道蛋白酶和脂肪酶差异不显著, 可能与3组的生物絮凝成分差异不大有关。碱性磷酸酶是一种重要的代谢调控酶, 直接参与钙磷代谢, 也可作为机体免疫状态的指示, 是免疫标志酶之一<sup>[29]</sup>。实验中E、F组肝

胰腺、头肾和血清碱性磷酸酶活性显著高于D组, 这与陈家长等<sup>[30]</sup>研究的结果相同, 推测是牡蛎壳溶解, 罗非鱼可利用参与代谢的钙元素增多。溶菌酶可用来表示环境因素对水产动物健康的影响, 是表明鱼类生理防御水平的一个重要标志<sup>[30]</sup>。超氧化物歧化酶与生物的免疫水平密切相关, 能够反映机体抵御自由基损伤的能力<sup>[31]</sup>。本实验中, 牡蛎壳粉对吉富罗非鱼血清溶菌酶活性有一定的促进作用, 但在其他方面

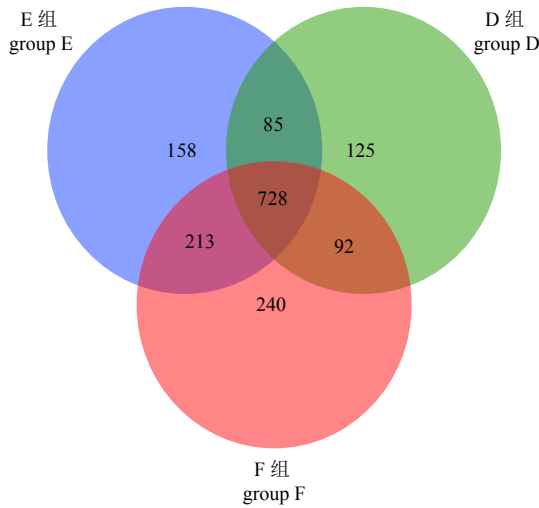


图 5 3 组的细菌韦恩图

Fig. 5 Venn diagram of bacteria in the three groups

的作用不大。牡蛎壳对罗非鱼的影响主要是通过水质介导。当牡蛎壳提供碱度不足, 系统碱度过低导致水体 TAN 积累, 继而对罗非鱼造成危害。其次, 牡蛎壳是良好的去除 TAN 的材料,

添加牡蛎壳可以去除部分的 TAN, 减少对鱼的影响。总体上, 认为牡蛎壳的添加对吉富罗非鱼的消化酶活性与免疫性能的影响不大。

牡蛎壳对生物絮凝养殖系统中细菌群落组成的影响主要为增加了系统中细菌群落组成的多样性, 但优势菌属差异不显著。3 组的 *Cetobacterium* 均有很高的丰度, 这可能与实验的养殖品种有关<sup>[32-33]</sup>。*norank\_f\_Saprospiraceae* 被认为是城市污水处理方面的优势菌属, 与水体有机物的蛋白质代谢有关<sup>[34]</sup>。*Saprospiraceae* 消化有机物的能力强于一些菌属和藻类<sup>[35]</sup>。因此 3 组的 *Saprospiraceae* 的丰度均较高。*Nannocystis* 被认为是在属水平方面促进絮体形成的菌属<sup>[36-37]</sup>。E、F 组 *Nannocystis* 丰度值均低于 D 组, 推测是由于牡蛎壳的吸附能力, 絮体在形成过程中受到了牡蛎壳吸附的影响。*norank\_f\_Cytophagaceae* 是以消化蛋白质和多糖等大分子为主的菌属<sup>[38]</sup>, E、F 组 *norank\_f\_Cytophagaceae* 的丰度均高于 D 组, 表明 E、F 组絮体成分中多糖等大分子较多。本研究中, 养殖系统硝化细菌群落结构单一, 养殖阶段氨氧化细菌 (AOB) 以亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*) 和一类尚未分类的菌属为主, 但丰

表 3 3 组的细菌丰度和多样性

Tab. 3 Abundance and diversity of bacteria in three groups

组别 group	Shannon 指数 Shannon index	Simpson 指数 Simpson index	Ace 指数 Ace index	Chao 指数 Chao index
D	4.14±0.50	0.06±0.03	819.43±100.24	855.03±102.59
E	4.49±0.12	0.03±0.01	1 006.58±18.86	1 015.50±22.33
F	4.62±0.13	0.03±0.00	1 028.68±47.62	1 030.55±52.00

表 4 养殖阶段硝化细菌在属水平的丰度变化

Tab. 4 Change of abundance of nitrifying bacteria at the genus level in culture stage(n=3)

硝化细菌分类 nitrifying bacteria taxonomy	硝化细菌属分类 nitrifying bacteria genera taxonomy	丰度/% abundance			
		25 d		55 d	
氨氧化细菌(AOB) ammonium oxidizing bacteria	亚硝化单胞菌属 <i>Nitrosomonas</i>	D组	0±0	D组	0±0
		E组	0±0	E组	0±0
		F组	0±0	F组	0±0
	<i>g_norank_f_Nitrosomonadaceae(f)</i>	D组	0±0	D组	0±0
		E组	0±0	E组	0±0
		F组	0±0	F组	0±0
亚硝化盐氧化细菌(NO) nitrite oxidizing bacteria	硝化螺旋菌属 <i>Nitrospira</i>	D组	0.01±0	D组	0±0
		E组	0.01±0	E组	0±0
		F组	0.01±0	F组	0±0



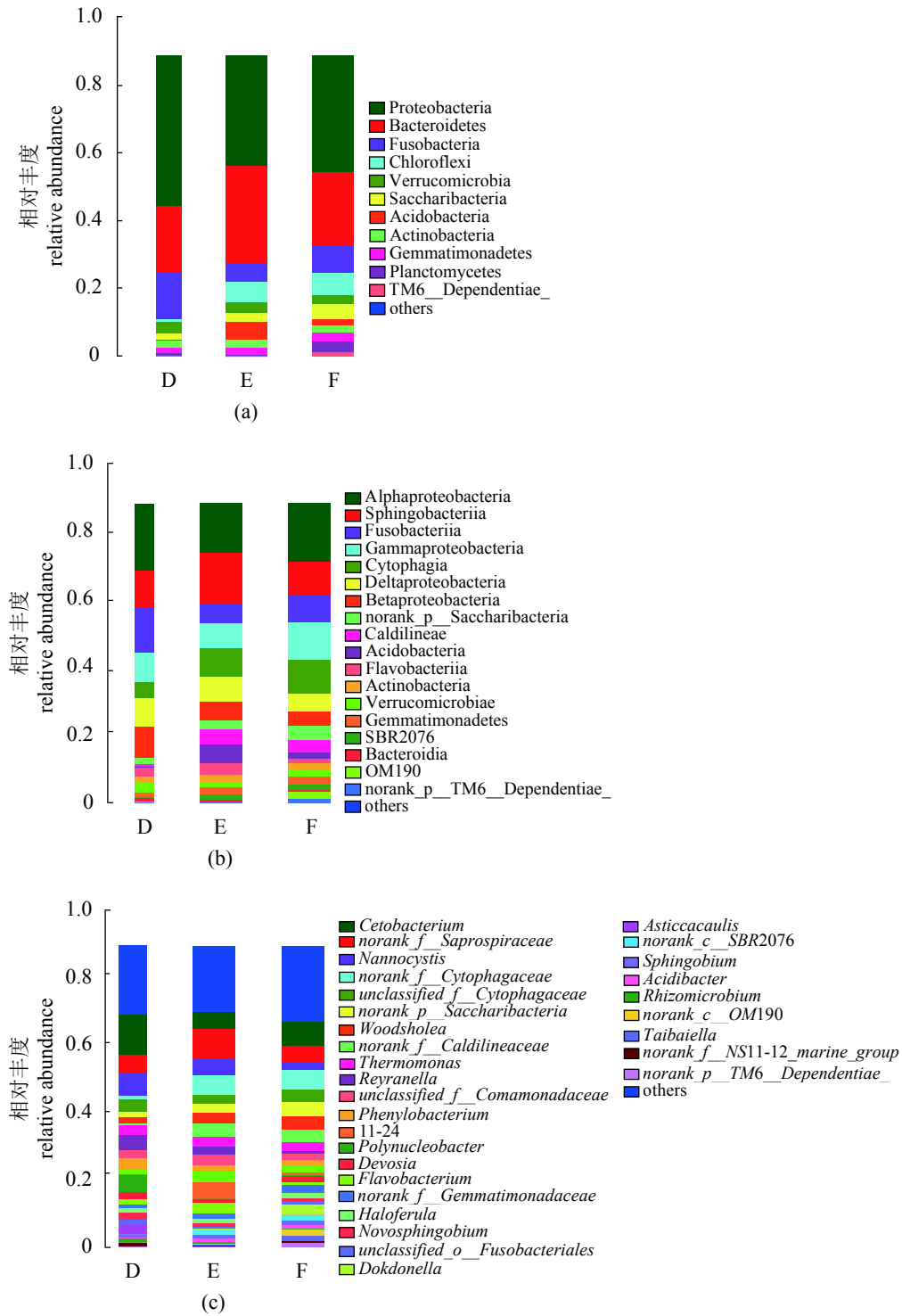


图 6 3 组细菌群落分布在门水平 (a)、纲水平 (b) 和属水平 (c) 上的比例

Fig. 6 Percentages of bacterial communities of three groups at phylum level (a), class level (b) and genus level (c)

度值极低。*Nitrospira* 是亚硝化盐氧化细菌 (NOB) 唯一的菌属，尽管养殖阶段结束时 *Nitrospira* 丰度值高于开始，但水平极低，推测为通过目前的 16S rRNA 的细菌分析引物难以有效地获得硝化细菌的变异信息。

### 4 结论

本实验评估了生物絮凝系统启动阶段中牡蛎壳补充碱度的可行性，并在此基础上，比较研究了养殖阶段中两种形态的牡蛎壳补充碱度的效果。在启动阶段，牡蛎壳添加量分别为

0.72 和 0.36 g/L 的实验组在碱度、pH 和钙离子浓度方面显著高于不添加牡蛎壳组,但 0.72 和 0.36 g/L 组间差异不显著 ( $P>0.05$ )。牡蛎壳补充碱度效果明显,可作为启动阶段的碱度补充材料。但在养殖阶段,3 个组的水质指标、鱼体酶活性免疫性能以及细菌群落组成方面均无显著差异。牡蛎壳对吉富罗非鱼的生长没有明显的消极影响,可以应用于生物絮凝养殖系统中,但牡蛎壳及壳粉补充碱度效果均不明显,牡蛎壳补充碱度与形态无关,并不能完全替代碳酸氢钠。未来牡蛎壳作为生物絮凝养殖系统的碱度补充材料,还需要进一步评估其添加量以及牡蛎壳的前处理等相关工艺。

### 参考文献:

- [1] García-Ríos L, Miranda-Baeza A, Coelho-Emerenciano M G, *et al.* Biofloc technology (BFT) applied to tilapia fingerlings production using different carbon sources: emphasis on commercial applications[J]. *Aquaculture*, 2019, 502: 26-31.
- [2] Poli M A, Legarda E C, De Lorenzo M A, *et al.* Pacific white shrimp and Nile tilapia integrated in a biofloc system under different fish-stocking densities[J]. *Aquaculture*, 2019, 498: 83-89.
- [3] Avnimelech Y. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems[J]. *Aquaculture*, 1999, 176(3-4): 227-235.
- [4] Crab R, Avnimelech Y, Defoirdt T, *et al.* Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production[J]. *Aquaculture*, 2007, 270(1-4): 1-14.
- [5] 罗国芝,陈晓庆,谭洪新. 水产养殖水体循环利用过程中碱度的变化及调控[J]. *淡水渔业*, 2018, 48(2): 100-106.
- Luo G Z, Chen X Q, Tan H X. Changes and control of alkalinity in the process of utilize recycling aquaculture water[J]. *Freshwater Fisheries*, 2018, 48(2): 100-106(in Chinese).
- [6] 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.
- [7] 马涛,罗国芝,谭洪新,等. 碱度对水产养殖絮体生物学特性及氨氮转化的影响[J]. *水产科学*, 2017, 36(4): 421-428.
- Ma T, Luo G Z, Tan H X, *et al.* Effect of alkalinity on nitrogen conversion and biological characterization of bioflocs in bioflocculation process in aquaculture[J]. *Fisheries Science*, 2017, 36(4): 421-428(in Chinese).
- [8] 葛柳钦. 贝壳粉体的功能化及其在吸附材料和高分子复合材料中的应用[D]. 杭州: 浙江大学, 2018: 4-5.
- Ge L Q. Functionalization of shell waste and its application in adsorbents and polymer composites[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2018: 4-5(in Chinese).
- [9] 熊小京,叶志隆. 贝壳与球形塑料填料曝气生物滤池的硝化特性比较[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2005, 44(4): 538-541.
- Xiong X J, Ye Z L. Comparison of nitrification behavior between shell and plastics ball carrier in aerated biofilter[J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2005, 44(4): 538-541(in Chinese).
- [10] Han Z Y, Li C W, Fan R, *et al.* Ammonia nitrogen removal using oyster shell as alkalinity-releasing media in a biological nitrification system[J]. *Transactions of the ASABE*, 2017, 60(5): 1721-1728.
- [11] 叶志隆,熊小京,芦敏. 贝壳填料曝气生物滤池的硝化特性研究[J]. *中国给水排水*, 2006, 22(3): 1-3, 8.
- Ye Z L, Xiong X J, Lu M. Study on nitrification behavior of aerated biofilter with oyster shell carrier[J]. *China Water & Wastewater*, 2006, 22(3): 1-3, 8(in Chinese).
- [12] 陈玉枝,林舒. 牡蛎壳与龙骨成分的分析[J]. *福建医科大学学报*, 1999, 33(4): 432-434.
- Chen Y Z, Lin S. Analysis of components in *Os draconis* and oyster shells[J]. *Journal of Fujian Medical University*, 1999, 33(4): 432-434(in Chinese).
- [13] 施建臣,熊小京. 牡蛎壳粉末投加UASB反应器的运行特性[J]. *环境工程学报*, 2014, 8(7): 2925-2930.
- Shi J C, Xiong X J. Study on operational characteristics of UASB reactor with adding oyster shell powder[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2014, 8(7): 2925-2930(in Chinese).
- [14] Liu W C, Luo G Z, Chen W, *et al.* Effect of no carbohydrate addition on water quality, growth performance and microbial community in water-reusing biofloc systems for tilapia production under high-density cultivation[J]. *Aquaculture Research*, 2018, 49(7): 2446-2454.
- [15] Liu W C, Luo G Z, Li L, *et al.* Nitrogen dynamics and biofloc composition using biofloc technology to treat aquaculture solid waste mixed with distillery spent wash[J]. *North American Journal of Aquaculture*, 2017,

- 79(1): 27-35.
- [16] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法 [M]. 第4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.  
State Environmental Protection Administration. Water and wastewater monitoring analysis method[M]. 4th ed. Beijing: China Environmental Science Press, 2002(in Chinese).
- [17] Zhang N, Luo G Z, Tan H X, *et al.* Growth, digestive enzyme activity and welfare of tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in a biofloc-based system with poly- $\beta$ -hydroxybutyric as a carbon source[J]. *Aquaculture*, 2016, 464: 710-717.
- [18] 熊小京, 叶均磊. 牡蛎壳粉末投加UASB反应器的启动特性[J]. *环境卫生工程*, 2009, 17(5): 21-23, 27.  
Xiong X J, Ye J L. Starting characteristic of UASB reactor by adding oyster shell powder[J]. *Environmental Sanitation Engineering*, 2009, 17(5): 21-23, 27(in Chinese).
- [19] 谭洪新, 庞云, 王潮辉, 等. 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*, 2017, 26(4): 490-500.  
Tan H X, Pang Y, Wang C H, *et al.* Preliminary study on domesticating nitrifying bio-flocs to rear *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2017, 26(4): 490-500(in Chinese).
- [20] 潘云峰, 罗国芝, 谭洪新, 等. 不同碳源对水产养殖固体颗粒物生物絮凝效果的比较[J]. *水处理技术*, 2011, 37(11): 20-25.  
Pan Y F, Luo G Z, Tan H X, *et al.* The comparison of different carbon sources impact on the bioflocs formation of solid waste of aquaculture[J]. *Technology of Water Treatment*, 2011, 37(11): 20-25(in Chinese).
- [21] Furtado P S, Poersch L H, Wasielesky Jr W. Effect of calcium hydroxide, carbonate and sodium bicarbonate on water quality and zootechnical performance of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in Bio-Flocs Technology (BFT) systems[J]. *Aquaculture*, 2011, 321(1-2): 130-135.
- [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] Shih P K, Chang W L. The effect of water purification by oyster shell contact bed[J]. *Ecological Engineering*, 2015, 77: 382-390.
- [24] 刘耀兴, 吴晓云, 廖再毅, 等. 牡蛎壳填料曝气生物滤池对城市生活污水的处理[J]. *水处理技术*, 2014, 40(4): 83-86.  
Liu Y X, Wu X Y, Liao Z Y, *et al.* Treatment of municipal wastewater with oyster shell as medium used in biological aerated filter[J]. *Technology of Water Treatment*, 2014, 40(4): 83-86(in Chinese).
- [25] 王建国, 关瑞章, 江兴龙, 等. 不同曝气工况对养殖污水处理效果的影响[J]. *集美大学学报(自然科学版)*, 2011, 16(1): 1-6.  
Wang J M, Guan R Z, Jiang X L, *et al.* The effects of different aeration conditions on the treatment of aquaculture wastewater[J]. *Journal of Jimei University (Natural Science Edition)*, 2011, 16(1): 1-6(in Chinese).
- [26] 姚鹰飞, 文华, 蒋明, 等. 吉富罗非鱼饲料钙磷比研究[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2012, 40(4): 38-46.  
Yao Y F, Wen H, Jiang M, *et al.* Dietary calcium/phosphorus ratio requirement of GIFT tilapia fingerling, *Oreochromis niloticus*[J]. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 2012, 40(4): 38-46(in Chinese).
- [27] 林浩然. 鱼类生理学 [M]. 广州: 广东高等教育出版社, 1999: 28-29.  
Lin H R. Fish physiology[M]. Guangzhou: Guangdong Higher Education Press, 1999: 28-29(in Chinese).
- [28] 李爱杰. 水产动物营养与饲料学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 57-83.  
Li A J. Nutrition and feed of aquatic animals[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1996: 57-83(in Chinese).
- [29] Dunier M, Siwicki A K, Demaël A. Effects of organophosphorus insecticides: effects of trichlorfon and dichlorvos on the immune response of carp (*Cyprinus carpio*). III. *In vitro* effects on lymphocyte proliferation and phagocytosis and *in vivo* effects on humoral response[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1991, 22(1): 79-87.
- [30] 陈家长, 臧学磊, 胡庚东, 等. 氨氮胁迫下罗非鱼(GIFT *Oreochromis niloticus*)机体免疫力的变化及其对海豚链球菌易感性的影响[J]. *生态环境学报*, 2011, 20(4): 629-634.  
Chen J Z, Zang X L, Hu G D, *et al.* The immune response of GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) under ammonia nitrogen stress and its effect on the susceptibility of tilapia to *Aeromonas hydrophila* infection[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2011, 20(4): 629-634.

- response of GIFT *Oreochromis niloticus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in different ammonia[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2011, 20(4): 629-634(in Chinese).
- [31] Hermes-Lima M, Storey J M, Storey K B. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1998, 120(3): 437-448.
- [32] Burgos M J G, Romero J L, Pulido R P, *et al.* Analysis of potential risks from the bacterial communities associated with air-contact surfaces from tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish farming[J]. *Environmental Research*, 2018, 160: 385-390.
- [33] Chang X L, Li H, Feng J C, *et al.* Effects of cadmium exposure on the composition and diversity of the intestinal microbial community of common carp (*Cyprinus carpio* L.)(J). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 171: 92-98.
- [34] Gao D W, Fu Y, Ren N Q. Tracing biofouling to the structure of the microbial community and its metabolic products: a study of the three-stage MBR process[J]. *Water Research*, 2013, 47(17): 6680-6690.
- [35] McIlroy S J, Nielsen P H. The family *Saprospiraceae*[M]//Rosenberg E, DeLong E F, Lory S, *et al.* The prokaryotes: other major lineages of bacteria and the Archaea. 4th ed. Berlin: Springer, 2014: 863-889.
- [36] Zhang J, Liu Z, Wang S, *et al.* Characterization of a biofloculant produced by the marine myxobacterium *Nanocystis* sp. NU-2[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 59(4-5): 517-522.
- [37] Cheng C, Zhou Z, Pang H J, *et al.* Correlation of microbial community structure with pollutants removal, sludge reduction and sludge characteristics in micro-aerobic side-stream reactor coupled membrane bioreactors under different hydraulic retention times[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 260: 177-185.
- [38] McBride M J, Liu W F, Lu X M, *et al.* The family *Cytophagaceae*[M]//Rosenberg E, DeLong E F, Lory S, *et al.* The prokaryotes: other major lineages of bacteria and the Archaea. 4th ed. Berlin: Springer, 2014: 577-593.

## Effects of oyster shell as slow-release alkalinity source in biofloc technology culture system

MENG Haoyan<sup>1</sup>, HU Xin<sup>1</sup>, WU Xia<sup>1</sup>, TAN Hongxin<sup>1,2,3</sup>, LUO Guozhi<sup>1,2,3\*</sup>

(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:** Oyster shell was used as alkalinity supplementary material to study the feasibility of supplementing alkalinity with oyster shell in biofloc technology-tilapia(GIFT *Oreochromis niloticus*)culture system. At the start-up stage, the feasibility of supplementing alkalinity with different oyster shell dosages of 0 g/L (control group, group A), 0.36 g/L (group B) and 0.72 g/L (group C) was evaluated. The results showed that the level of alkalinity, pH and calcium in group C were significantly higher than those in group A, but there was no significant difference between groups B and C, so the effect of supplement alkalinity with oyster shell is obvious. Based on the results of the start-up of biofloc system, the effects of supplementing alkalinity to tilapia culture system with two forms of oyster shell (shell powder, group E) and (shell, group F) were studied. There were no significant differences in water quality, digestive enzyme activity, immunity and bacterial community composition among the three groups. Oyster shell and shell powder had no significant negative effects on the growth of tilapia and could be applied to the biofloc aquaculture system, but there is no obvious effect of supplementing alkalinity with oyster shell in culture stage. The supplementation of alkalinity had nothing to do with forms of oyster shell. Under the current experimental conditions, oyster shell can not completely replace sodium bicarbonate in the biofloc aquaculture system, and the related technology needs to be further optimized.

**Key words:** GIFT *Oreochromis niloticus*; biofloc technology; oyster shell; alkalinity; enzyme immunization; bacterial community composition

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

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31202033)