

文章编号: 1000-0615(2019)03-0639-11

DOI: 10.11964/jfc.20171211099

不同碳源对凡纳滨对虾育苗标粗水体生物絮团的结构、营养成分、细菌群落及其水质的影响

张哲¹, 杨章武^{1*}, 葛辉¹, 陈辉辉¹, 卓吓晃²

(1. 福建省水产研究所福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室, 福建 厦门 361013;

2. 厦门市厦兴龙水产种苗有限公司, 福建 厦门 361026)

摘要: 为研究凡纳滨对虾育苗标粗阶段生物絮团形成所需要的适合碳源, 设计3种不同碳源添加组(葡萄糖组、淀粉组和蔗糖组), 每个处理组设置3个重复, 实验期20 d, 以分析不同碳源添加后对水体生物絮团的形成、营养成分、细菌群落结构及水质指标的影响。结果显示, 在碳源添加量均为投喂量的80%时, 形成的生物絮团可有效调节水质, 降低水体中的氨氮和亚硝酸盐氮水平。3个碳源添加组水样中氨氮、亚硝酸盐氮和硝酸盐氮浓度显著低于对照组, 淀粉组水样中氨氮、亚硝酸盐氮和硝酸盐氮浓度显著高于葡萄糖组和蔗糖组; 最终对虾存活率统计结果显示, 葡萄糖组、淀粉组、蔗糖组和对照组分别为72.9%、54.2%、69.8%和44.3%; 淀粉组的生物絮团沉降体积(BFV)显著低于葡萄糖组, 蔗糖组BFV最高, 在13~15 d后3组均趋于稳定; 葡萄糖组和蔗糖组的粗蛋白含量均显著高于淀粉组, 葡萄糖组和蔗糖组则差异不显著; 葡萄糖组和蔗糖组生物絮团中组氨酸、精氨酸、蛋氨酸等必需氨基酸和天冬氨酸、谷氨酸、丙氨酸等非必需氨基酸含量都显著高于淀粉组; 葡萄糖组、淀粉组和蔗糖组的必需氨基酸指数(EAAI)值分别为0.93、0.89和0.92。3种类型生物絮团在门级水平的细菌群落共有18余种, 其中变形菌门和拟杆菌门在各组占有比例均最高, 淀粉组拟杆菌门含量显著高于其他2组, 蔗糖组浮霉菌门和放线菌门含量显著高于葡萄糖组和淀粉组。研究表明, 添加不同碳源可影响水体生物絮团的形成、营养成分、细菌群落结构和多样性, 不同程度地改善水质。以必需氨基酸指数及存活率为评价指标, 则葡萄糖和蔗糖都是凡纳滨对虾育苗标粗水体中适宜的碳源选择。

关键词: 凡纳滨对虾; 生物絮团; 碳源; 氨基酸; 群落结构; 宏基因组测序

中图分类号: S 965

文献标志码: A

近年来, 生物絮团技术(biofloc technology, BFT)被引入了水产养殖业, 它是一项新兴的环境友好型水产养殖新技术。通过这一技术不仅实现了节能减排, 还能提高经济效益及生物安全^[1-3]。生物絮团(BF)是生物絮团技术的核心, 它以多种微生物聚合的形式提供诸如“天然蛋白质”^[4]、脂类^[1]、氨基酸类^[5]和脂肪酸^[6-7]等营养物质, 可全

天候作为食物来源, 减少人工饲料的投入和成本^[8-9]。目前, 生物絮团技术已普遍应用在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[10-11]、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)^[12]、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[13]、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)^[14]和鳙(*Aristichthys nobilis*)^[15]等水产动物的养殖中。研究表明, 生物絮团的结构和稳定性

收稿日期: 2017-12-19 修回日期: 2018-03-29

资助项目: 凡纳滨对虾品种创新与健康种苗繁育产业化工程项目(2017-2020); 海洋公益性行业科研专项(201205019-3); “十三五”厦门市海洋经济创新发展示范项目(16 PFW034 SF02); 2017年福建省海洋与渔业结构调整专项(2017 HYJG02)

通信作者: 杨章武, E-mail: yzw6010163@163.com

在一定程度上取决于有机碳源的选择^[16-17], 不同类型碳源影响生物絮团的组成, 因此有机碳源的类型也决定了生物絮团的用途^[18]。另外, Crab等^[19]的研究表明, 不同的碳源对生物絮团的蛋白质、脂类、碳水化合物和脂肪酸组成带来差异, 生物絮团作为生产者和消费者、养分回收者、其他生物的食物供给者, 发挥着关键作用^[20-22]。因此, 分析生物絮团结构和功能将有助于了解不同生物絮团的营养差异。

凡纳滨对虾原产于中南美太平洋海域, 目前是我国最重要的对虾养殖品种, 养殖产量占我国对虾养殖总产量的85%。福建是我国重要的凡纳滨对虾种苗生产基地, 虾苗产量占全国的70%以上^[23]。将生物絮团技术应用于凡纳滨对虾育苗标粗生产, 可防止滥用药物, 是提高生物安全的重要技术手段。关于生物絮团技术在对虾育苗标粗阶段中的应用研究报道很少, 而且有关碳源选择及絮团营养评价方面的研究尚未报到。本研究以3种碳水化合物作为不同的添加碳源, 进行生物絮团技术标粗凡纳滨对虾苗实验, 并对不同碳源产生的生物絮团结构、组分、细菌群落及功能进行了分析, 旨在探索凡纳滨对虾育苗生产中如何有效使用生物絮团技术, 以及不同碳源选择对生物絮团营养价值的评估, 从而为凡纳滨对虾生态化、规模化标粗育苗技术工艺提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验设计与材料

实验地点设在福建厦门海沧区厦兴龙水产种苗有限公司的种苗基地进行。实验桶为容积1 m³, 水深70 cm的圆形玻璃钢桶, 每桶设置气石2个, 1 kW加热棒及控温仪1套(精确度为±1 °C)。现场配备溶氧仪、pH计、显微镜、水质分析仪及英霍夫锥形管等测量仪器。实验养殖对象选择同一批凡纳滨对虾无节幼体在统一育苗条件下育成的P₅仔虾[规格(5.43±0.62) mm], 碳源材料为普通食用蔗糖、葡萄糖和淀粉, 均购自超市。添加的异养菌为芽孢杆菌(*Bacillus* spp.), 由中国水产科学院南海水产研究所研发, 主要成分为地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*), 菌含量1×10¹⁰ CFU/g。

实验设3种碳源(葡萄糖、淀粉和蔗糖), 分3个实验组, 1个对照组, 每组3个平行。每个实验桶投放2×10⁴尾P₅仔虾, 对照组正常投喂饲

料, 实验组除正常投喂饲料外, 分别添加葡萄糖、淀粉和蔗糖, 同时添加芽孢杆菌。根据文献报道^[19]。及前期实验结果, 碳源添加量设定为每日投饵量的80%, 与饵料混合投喂。芽孢杆菌每3日添加1次, 每次添加量按1.5×10⁵ CFU/mL, 菌粉提前4 h用海水活化, 然后均匀泼洒入池。实验进行20 d。

实验海水为海区抽取, 通过沉淀、砂滤、紫外灭菌处理后进入养殖池, 实验期间保持水温为28 °C, 溶解氧>5 mg/L, 盐度27.3, 水体持续均匀充气。饲料投喂每日8次, 以虾片为主, 辅以藻粉、黑粒粉等, 根据水色、虾苗密度等不同情况灵活调整, 前期投饵量约2 g/m³, 后期增至3~5 g/m³。实验桶初始进水600 L, 实验进行5日后每日少量加水5%, 实验期间不排水。

1.2 水质及对凡纳滨对虾存活率测定

实验期间, 每天测定溶解氧、pH; 每3 d测定1次氨氮、亚硝酸盐氮和硝酸盐氮等水质指标。溶解氧采用哈希HQ30 D便携式溶氧仪测定, pH采用PHB-1型pH计测定; 水体氨氮、亚硝酸盐氮和硝酸盐氮浓度测定参照国家海洋局《海洋监测规范第4部分: 海水分析》(2007年)进行。

实验结束时, 统计各组凡纳滨对虾的存活率。存活率(%)=终末尾数/初始尾数×100%。

1.3 生物絮团体积和形态结构观测

实验期间, 每3 d同一时间将1 L水样加入英霍夫锥形管中测定絮团体积, 取样后20 min读出积累在锥形管底部的絮状物体积(mL/L)。然后, 从锥形管尖底的旋扭上收集絮状物, 利用生物显微镜(DH-2, Olympus)观察絮团的形态结构, 并通过显微视频成像装置进行拍照。

1.4 生物絮团的组分分析

对不同类型的生物絮团进行组分分析。在实验结束后, 用10 μm的尼龙网袋^[24]收集每个实验桶的生物絮团样本。样本放入烤箱, 在105 °C条件下干燥, 直到恒定重量来计算干物质含量; 采用凯氏定氮法(GB/T 6432 - 1994)来检测样品的粗蛋白含量(AOAC, 1999); 应用马弗炉550 °C灼烧法(GB/T 6438 - 1992)测定灰分含量; 利用索氏抽提法(GB/T 6432 - 1994)即采用乙醚抽脂来测定粗脂肪含量。粗蛋白、粗脂肪和灰分含量表示为生物絮团干重的百分比含量。根据下列公式计算总碳水化合物的量:

碳水化合物(%)=100%-[粗蛋白质(%) + 粗脂肪(%) + 灰分含量(%)]^[25]。

通过高效液相色谱法(HPLC), 测定生物絮团的氨基酸组成。通过测定必需氨基酸总量中每种氨基酸的百分比作为每种必需氨基酸(EAA)的必需氨基酸比值(E/A)^[26]。根据Peñaflorida^[27]的方法, 利用下列公式计算必需氨基酸指数(EAAI):
 $EAAI = \sqrt[9]{aa1/AA1 \times aa2/AA2 \times \dots \times aa9/AA9}$
 式中, aa为生物絮团中必需氨基酸比(E/A), AA为生物体内的E/A比, 1, 2, 3, ..., 9为每一种必需氨基酸。

1.5 细菌MisSeq宏基因组测序和生物信息学分析

实验结束后, 在每个实验桶的同一位置取1 L水样, 先沉淀后离心收集絮团样本。采用超微量分光光度计(Nano drop2000, 美国Thermo Scientific公司)和琼脂糖凝胶电泳对提取的细菌基因组DNA进行质量检测。MisSeq宏基因组测序和生物信息学部分由上海派森诺生物科技股份有限公司利用测序仪(MisSeq System SY-410-1003, 美国Illumina公司)完成, 进行MisSeq宏基因组测序和生物信息学分析。在门水平上统计样本的物种分布。

1.6 统计分析

利用Excel数据处理软件进行数据处理, 使用SPSS 18.0软件对实验参数进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)。实验数据用平均值±标准差(mean±SD)表示, $P < 0.05$ 为差异性显著。

2 结果

2.1 水质变化

3种碳源添加组及对照组中育苗水体pH值无

显著差异($P > 0.05$); 不同实验组的溶解氧表现为对照组>淀粉组>葡萄糖组>蔗糖组, 其中对照组和淀粉组溶解氧与另2组差异显著($P < 0.05$), 葡萄糖组和蔗糖组差异不显著; 不同组的氨氮、亚硝酸盐氮和硝酸盐氮总体表现为对照组>淀粉组>蔗糖组>葡萄糖组, 淀粉组的氨氮、亚硝酸盐氮和硝酸盐氮的浓度分别为葡萄糖组的1.6、2.5、4.2倍和蔗糖组的1.3、1.9、3.0倍, 与这2组差异显著($P < 0.05$), 葡萄糖组和蔗糖组差异不显著, 对照组氨氮、亚硝酸盐氮和硝酸盐氮的浓度分别为淀粉组的1.7、1.7和1.6倍, 与其他3组差异显著($P < 0.05$)(表1)。

2.2 凡纳滨对虾存活率测定

凡纳滨对虾对虾养殖20 d后, 统计各组的存活率(图1)。葡萄糖组、淀粉组、蔗糖组和对照组的存活率分别为72.9%、54.2%、69.8%和44.3%。差异显著性分析表明, 葡萄糖组和蔗糖组之间无显著性差异($P > 0.05$), 但显著高于淀粉组($P < 0.05$), 对照组存活率显著低于其他3个碳源添加组($P < 0.05$)。

2.3 生物絮团的形成

经过5~10 d的培养, 不同碳源组出现不同的水色。葡萄糖组水色呈现淡黄色, 淀粉组水色为橙黄色, 蔗糖组水色为棕色。实验期间, 生物絮团的沉降体积随时间延长逐步增加(图2)。3个实验组生物絮团生长呈现刚开始生长缓慢, 培养7~9 d后生物絮团生长迅速, 13~15 d后, 沉降体积变化较小, 趋于稳定。

葡萄糖组絮团形成较快, 实验1~7 d后絮团体积增加较蔗糖和淀粉组多0.9和3.1 mL/L, 第9天时, 蔗糖组絮团体积超过葡萄糖组, 且增加

表 1 添加不同碳源的生物絮团对水质指标的影响

Tab. 1 Effect of different carbohydrate sources on water quality

项目 items	葡萄糖组 glucose	淀粉组 starch	蔗糖组 sucrose	对照组 control
溶解氧/(mg/L) DO	7.04±0.43 ^a	7.53±0.26 ^b	6.87±0.32 ^a	7.82±0.28 ^b
pH	7.9±0.3 ^a	7.7±0.2 ^a	7.8±0.2 ^a	8.0±0.2 ^a
氨氮/(mg/L) TAN	0.16±0.06 ^a	0.25±0.06 ^b	0.19±0.08 ^a	0.42±0.13 ^c
亚硝酸盐氮/(mg/L) NO ₂ -N	0.06±0.03 ^a	0.15±0.03 ^b	0.08±0.02 ^a	0.26±0.06 ^c
硝酸盐氮/(mg/L) NO ₃ -N	0.17±0.02 ^a	0.72±0.04 ^b	0.24±0.03 ^a	1.13±0.12 ^c

注: 结果均以平均值±标准差表示; 表格中同一行不同字母表示有显著差异($P < 0.05$)

Notes: each value represents (mean±SD); different letters in the same row mean significant differences($P < 0.05$)

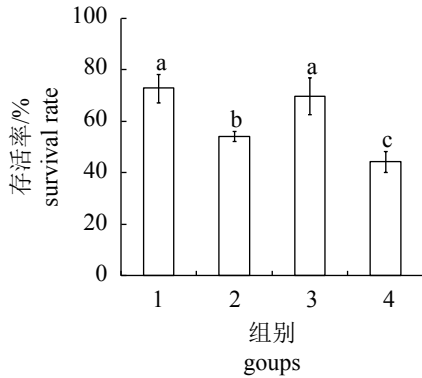


图1 各实验组凡纳滨对虾存活率

1.葡萄糖组, 2.淀粉组, 3.蔗糖组, 4.对照组; 图中误差线为标准差, 不同字母表示对应的组间有显著差异(P<0.05); 下同

Fig. 1 Survival rate of experimental *L.vannamei*

1.gulucose, 2.starch, 3.sucrose, 4.control; error bars (SD) with different letters mean significant differences(P<0.05);the same below

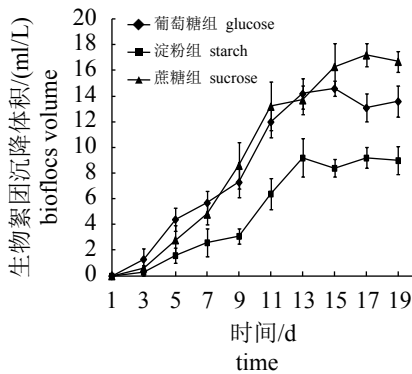


图2 不同碳源组生物絮团沉降体积的变化

Fig. 2 Changes in bioflocs volume of different carbohydrate sources throughout the experiment period

较葡萄糖组多1.3 mL/L, 后期蔗糖组与葡萄糖组絮团体积差异慢慢增大。与葡萄糖和蔗糖组的生物絮团相比, 淀粉组在整个实验期间絮团体积显著小于其他2组(P<0.05)。

经显微镜观察发现, 各组生物絮团具有不规则形状、絮团边缘有丝状菌、表面附着原生动物、内部有晶体状颗粒, 且不同碳源影响生物絮团的形态和结构, 其中蔗糖组絮团密度小、个体大、淀粉组密度大、个体小, 但絮团量少(图3-1、2和3)。

2.4 不同碳源组生物絮团的组分

不同碳源组生物絮团组分存在显著性差异(P<0.05)(图4), 葡萄糖组和蔗糖组生物絮团的粗蛋白含量比分别为32.2%±0.8%和29.5%±1.2%, 显

著高于淀粉组生物絮团中粗蛋白含量, 其占比仅为21.5%±0.6%; 葡萄糖组生物絮团的粗脂肪含量为6.3%±0.3%, 淀粉组粗脂肪含量为8.9%±0.2%, 蔗糖组为8.8%±0.6%, 葡萄糖组显著低于淀粉组和蔗糖组; 淀粉组和蔗糖组的灰分含量分别为18.4%±0.2%和18.6%±0.3%, 差异不明显, 葡萄糖组的生物絮团灰分含量显著低于其他实验组(P<0.05); 淀粉组的生物絮团碳水化合物含量水平最高, 为51.2%±0.3%, 蔗糖组的生物絮团碳水化合物含量最低, 为43.1%±0.2%, 3组之间碳水化合物含量的差异性显著(P<0.05)。

3种生物絮团中, 葡萄糖组和蔗糖组生物絮团中组氨酸、精氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸和赖氨酸含量都显著高于淀粉组(P<0.05)。蔗糖组中苏氨酸含量高于淀粉组低于葡萄糖组, 但均无显著性差异。葡萄糖组中缬氨酸含量高于淀粉组低于蔗糖组, 但均无显著性差异。葡萄糖组和淀粉组中异亮氨酸含量显著高于蔗糖组(P<0.05)。3种生物絮团蛋白质中蛋氨酸和组氨酸含量都较低, 亮氨酸和赖氨酸含量都较高。另外, 必需氨基酸指数(EAAI)计算结果为0.93(葡萄糖组)>0.92(蔗糖组)>0.89(淀粉组)(图5)。

3种生物絮团中非必需氨基酸含量显示, 葡萄糖组和蔗糖组中天冬氨酸、谷氨酸、丙氨酸和甘氨酸含量显著高于淀粉组(P<0.05), 葡萄糖组和蔗糖组无显著性差异。葡萄糖组中丝氨酸含量低于蔗糖组高于淀粉组, 但均无显著性差异。蔗糖组中脯氨酸含量显著高于其他组(P<0.05)。3组中酪氨酸无显著性差异, 且含量都相对较低(图6)。

2.5 细菌群落分析

3种类型的生物絮团在门级水平的细菌群落共有18余种(图7), 变形菌门(Proteobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)占有比例均最高, 为各组优势菌门。淀粉组细菌群落有11种, 其中拟杆菌门含量较葡萄糖组高15.7%, 较蔗糖组高25.3%; 蔗糖组细菌群落有18种, 其中浮霉菌门(Planctomycetes)和放线菌门(Actinobacteria)含量显著高于葡萄糖组和淀粉组, 分别高出6.1%、12.7%和2.3%、2.5%; 葡萄糖组细菌群落有17种, 其中变形菌门和拟杆菌门为优势菌, 占比分别为42.7%和40.0%。据统计, 葡萄糖组和蔗糖组的细菌群落要比淀粉组更加多样化。

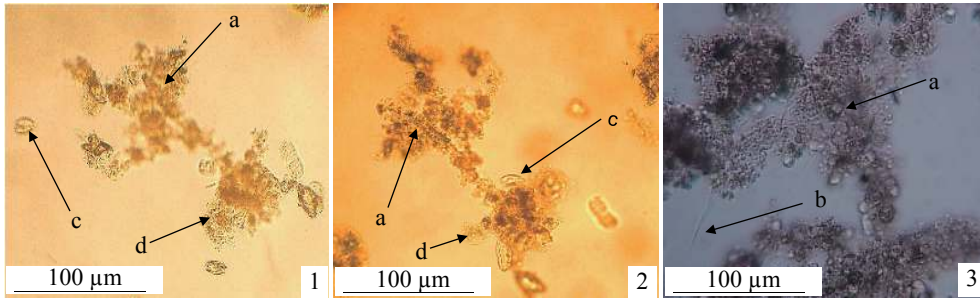


图3 不同组生物絮团的形态观察

1~3.示葡萄糖组、淀粉组和蔗糖组生物絮团形态; a.有机碎屑; b.丝状菌; c.浮游动物; d.藻类

Fig. 3 The morphology of bioflocs in different groups by microscope observation

1-3. the morphology of bioflocs form in glucose, starch and sucrose groups; a. organic detritus; b. filamentous bacteria; c. zooplankton; d. algae

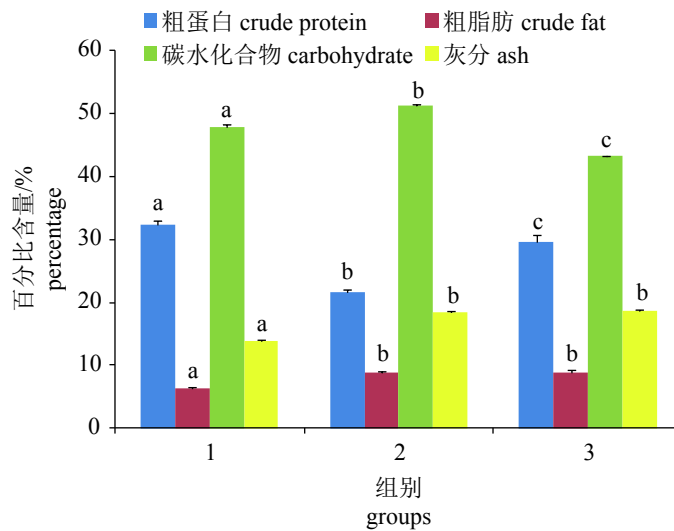


图4 不同碳源组生物絮团营养成分变化

1.葡萄糖组, 2.淀粉组, 3.蔗糖组; 下同

Fig. 4 The changes in nutrition of bioflocs in different groups

1.gulucose, 2.starch, 3.sucrose; the same below

3 讨论

本研究表明, 不同碳源组生物絮团对养殖水质有显著影响, 其中就溶解氧而言, 葡萄糖组和蔗糖组较低, 这可能是其存在较多异养微生物群落, 增加了有限二氧化碳的水体中浓度, 从而带来较高的呼吸速率所导致^[28]。研究表明, 不添加碳源的对照组中3种形式氮指标显著高于碳源添加组; 在形成生物絮团的养殖系统中, 应用不同碳水化合物作为碳源产生的效果也不同^[29], 淀粉组的水质指标要显著高于葡萄糖组和蔗糖组, 可能是由于葡萄糖和蔗糖为单糖和二糖, 淀粉为多糖, 单糖和二糖会使脱氮更为迅速, 而多糖则需要更多的时间分解为单糖,

从而导致脱氮速度较慢, 这可能造成淀粉组中的氨氮水平较高于葡萄糖组和蔗糖组, 这与Van等^[30]研究结果相符, 且添加碳水化合物可以降低水体里的氨氮和亚硝酸盐氮浓度, 同时减少排放到环境中的氮^[31]。因此, 添加碳源培育生物絮团对氨氮的快速异养转化的功能在水产养殖中具有重要意义^[32]。对虾的存活率统计显示, 碳源添加组存活率显著高于对照组, 说明较低的3种形式氮水平有利于提高对虾存活率。同样, 在对虾育苗标粗生产中, 养殖户为了提高存活率, 通常以频繁换水来降低3种形式氮水平, 相比之下, 添加碳源技术可有效节约用水。因此, 生物絮团技术能够在低换水条件下, 有效降低3种形式氮水平, 增加凡纳滨对虾

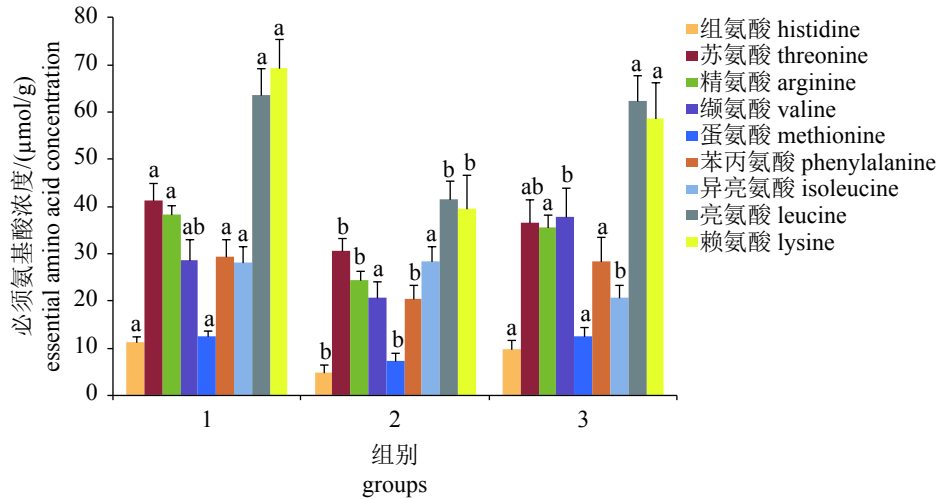


图 5 不同组生物絮团中必须氨基酸组成

Fig. 5 Essential amino acid patterns of bioflocs in different groups

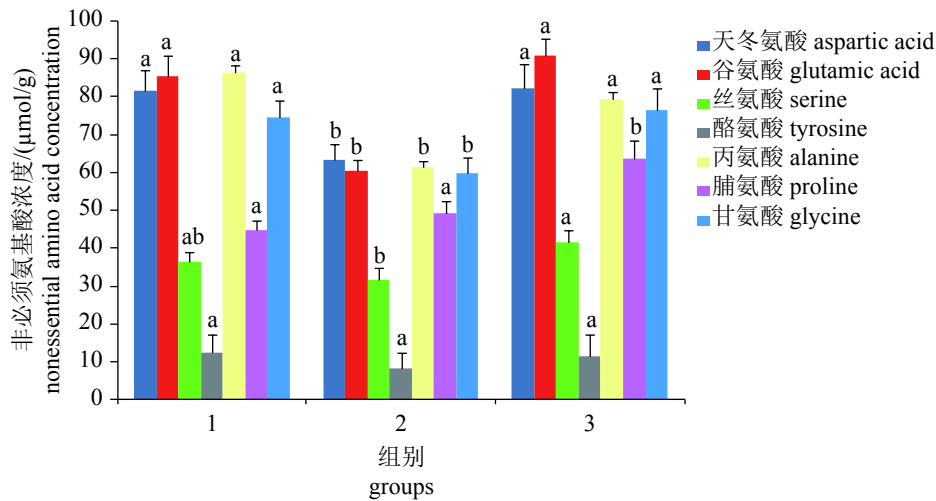


图 6 不同组生物絮团中非必需氨基酸组成

Fig. 6 Nonessential amino acid patterns of bioflocs in different groups

的存活率和产量^[33]。

本实验中，3个实验组生物絮团生长过程先缓慢后快速，最后平稳，这与细菌的生长曲线类似^[34]，实验第13~15天后，沉降体积趋于稳定，这与Xu等^[35]研究结果吻合。另外，在本研究中，淀粉组生物絮团更为密集且个体较小，这可能与该组较高的溶解氧有关。Ebeling等^[36]认为溶解氧是影响悬浮絮团产生的重要因素，足够的溶解氧不仅对好氧细菌代谢活性非常重要，而且可以影响絮团结构^[37]，较高的溶解氧还会诱导产生更为紧密的絮团^[38]。另外，淀粉组溶解氧较高说明水体曝气均匀充分，而曝气产生的剪切力会不断作用于悬浮在水体中的絮团颗粒，

使之不容易聚合成尺寸较大的絮团颗粒。

Wilén等^[39]研究表明，添加碳源繁殖的异养细菌含有较高的菌体蛋白，Carb等^[19]在罗氏沼虾实验中，添加葡萄糖形成的生物絮团粗蛋白含量为28%±3%，Ballester等^[40]利用不同粗蛋白饲料喂养圣保罗对虾(*Farfantepenaeus paulensis*)，形成的生物絮团平均粗蛋白含量为30.4%，Azim等^[41]在尼罗罗非鱼实验中，投喂粗蛋白含量为24%的饲料时，形成的生物絮团粗蛋白为38.41%。在本实验中，粗蛋白含量低于Azim等^[41]的结果，但与Carb等^[19]结果相似。这可能是由于生物絮团技术使用上存在差异，比如碳源、C/N比和接种菌等不同产生的差异。本实验3种生物絮团有良好

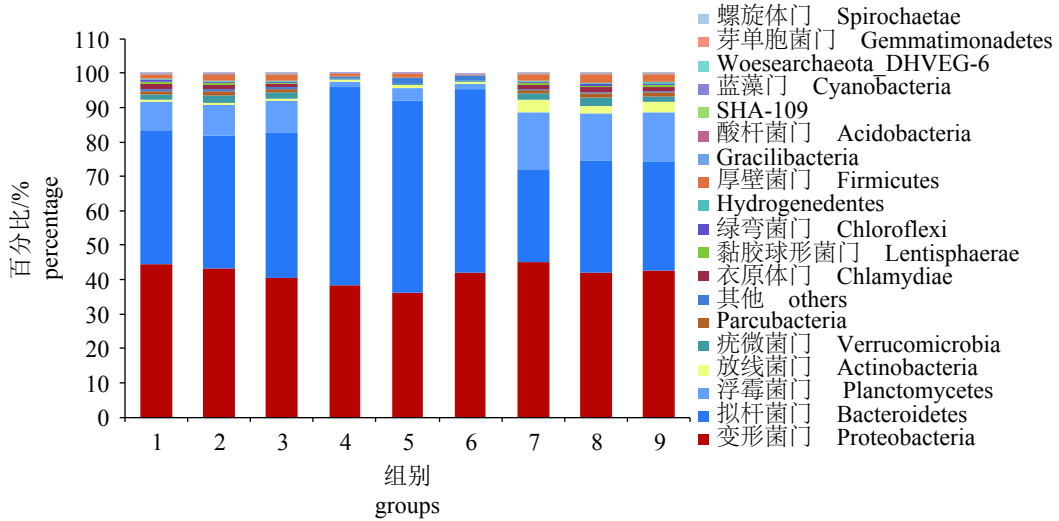


图 7 不同组生物絮团在门水平上的菌群结构

1.葡萄糖1组, 2.葡萄糖2组, 3.葡萄糖3组, 4.淀粉1组, 5.淀粉2组, 6.淀粉3组, 7.蔗糖1组, 8.蔗糖2组, 9.蔗糖3组

Fig. 7 Bacterial community structure of different biofloc types at phylum level

1. gulucose 1, 2.gulucose 2, 3.gulucose 3, 4.starch 1, 5.starch 2, 6.starch 3, 7.sucrose 1, 8.sucrose 2, 9.sucrose 3

的营养价值, 其中葡萄糖组中的粗蛋白含量最高, 其次是蔗糖组和淀粉组, 造成差异的原因可能是由于胞外聚合物(EPS)的浓度不同所致, 它约占絮团中有机物的80%~95%, 不同碳源产生的EPS差异较大^[42]。葡萄糖组中的粗脂肪含量较低, 淀粉组和蔗糖组较高, 这可能是由于淀粉组和蔗糖组有较多的藻类^[43-44], 藻类能够在有阳光和二氧化碳的条件下, 产生大量的脂类和碳氢化合物^[45]。淀粉组中碳水化合物含量相对较高, 这可能是淀粉溶解性差, 淀粉颗粒仍可能存在于絮团中的原因。上述结果表明, 生物絮团质量受到外加碳源的显著影响, 参与生物絮团组成的微生物从这些碳源中获益的方式可能存在差异^[46]。

氨基酸组成成分和其生物利用度决定了水产养殖业饲料的蛋白质质量。根据营养需求和机体进行氨基酸合成的能力, 氨基酸被分为必需和非必需氨基酸。由于氨基酸是蛋白质的组成成分, 因此, 最佳蛋白质的合成是由每日饮食的氨基酸谱决定的^[47]。据报道, 特定水生生物的每日饲料氨基酸需要量强烈依赖于其机体的氨基酸组成^[48]。Peñafiorida等^[27]建议计算EAAI来评价相对于动物EAA组成的饲料EAA谱, 并确定质量良好的饲料(EAAI>0.9), 有用的饲料EAAI值为0.7~0.9, 当该值小于0.7时则认为不适当饲料。根据凡纳滨对虾的EAA组成, 计算葡萄糖组、淀粉组和蔗糖组的EAAI值分别为0.93、0.89

和0.92。这表明3种生物絮团中EAA成分可以满足凡纳滨对虾仔虾养殖的要求。基于这个指标, 本研究中产生的生物絮团可以被看做是对虾良好的蛋白质来源。葡萄糖组和蔗糖组生长的生物絮团的EAAI值要高于淀粉组, 表明在实验条件下, 葡萄糖组和蔗糖组在EAA质量方面要优于淀粉组。氨基酸测定结果表明, 不同组生物絮团富含亮氨酸、赖氨酸、天冬氨酸等, 这也是凡纳滨对虾机体蛋白的重要组成^[49]。因此, 生物絮团可以作为一种饲料添加剂, 促进对虾健康生长, 减少人工饲料成本。

Ballester等^[40]研究表明, 生物絮团系统中微生物在为系统提供必需的营养物质方面发挥着重要作用。变形菌门和拟杆菌门是各组的优势菌, 在所有类型的生物絮团中占据了很大比例。葡萄糖组和蔗糖组中变形菌门和浮霉菌门比例较大, 变形菌门被认为是水产养殖中的共生菌^[50], 而变形菌门和浮霉菌门都具有去除污水中有机物的作用^[51-52], 尤其是在生物絮团的污水处理中, 变形菌门在细菌组成中占支配地位^[53-54]。所以生物絮团应用于养殖生产时, 能有效调节养殖用水水质。放线菌门是一种常见的益生菌, 可以在特定环境中产生有益物质^[55], 3种生物絮团中放线菌门均占一定比例, 蔗糖组较多。总体来看, 在凡纳滨对虾养殖中, 添加碳源可提高系统中微生物群落的丰富度, 包括变形菌门、放线菌门及厚壁菌门(Firmicutes)等中有益菌

的比例,同时降低假交替单胞菌属及弧菌属等条件致病菌的比例;系统中微生物群落结构随添加碳源的不同会发生一定的变化,关于不同微生物利用碳源的方式以及有益菌和致病菌的比例控制还需进一步研究。

参考文献:

- [1] Wasielesky W, Atwood H, Stokes A, *et al.* Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Aquaculture*, 2006, 258(1): 396-403.
- [2] Avnimelech Y. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds[J]. *Aquaculture*, 2007, 264(1): 140-147.
- [3] 赵志刚, 罗亮, 王常安, 等. 不同鲤养殖模式生物絮团系统中鱼体的生长及水质[J]. *水产学报*, 2017, 41(1): 99-108.
- Luo Z G, Luo L, Wang C A, *et al.* Fish growth performance and water quality in different carp stocking modes biofloc systems[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(1): 99-108(in Chinese).
- [4] Emerenciano M, Ballester E L, Cavalli R O, *et al.* Effect of biofloc technology (BFT) on the early postlarval stage of pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*: Growth performance, floc composition and salinity stress tolerance[J]. *Aquaculture International*, 2011, 19(5): 891-901.
- [5] Ju Z Y, Forster I, Conquest L, *et al.* Determination of microbial community structures of shrimp floc cultures by biomarkers and analysis of floc amino acid profiles[J]. *Aquaculture Research*, 2008, 39(2): 118-133.
- [6] Izquierdo M, Forster I, Divakaran S, *et al.* Effect of green and clear water and lipid source on survival, growth and biochemical composition of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2006, 12(3): 192-202.
- [7] Ekasari J, Crab R, Verstraete W. Primary nutritional content of bio-flocs cultured with different organic carbon sources and salinity[J]. *HAYATI Journal of Biosciences*, 2010, 17(3): 125-130.
- [8] Browdy C L, Bratvold D, Stokes A D, *et al.* Perspectives on the application of closed shrimp culture systems[M]. USA: The World Aquaculture Society Baton Rouge, 2001, pp. 20-34.
- [9] 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.
- [10] Burford M A, Thompson P J, McIntosh R P. The contribution of flocculated material to shrimp(*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero-exchange system[J]. *Aquaculture*, 2004, 232(1-4): 525-537.
- [11] 李卓佳, 杨莺莺, 杨铿, 等. 对虾养殖水处理专题之四: 对虾养殖水环境无公害高效调控技术[J]. *中国水产*, 2008(9): 55-57.
- Li Z J, Yang Y Y, Yang J, *et al.* The fourth technology of water environmental pollution control of shrimp aquaculture[J]. *China Fisheries*, 2008(9): 55-57(in Chinese).
- [12] 刘杜娟, 潘晓艺, 尹文林, 等. 生物絮团在罗氏沼虾育苗中的应用[J]. *上海海洋大学学报*, 2013, 22(1): 47-53.
- Liu D J, Pan X Y, Yin W L, *et al.* Bio-flocs technology application in breeding of *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2013, 22(1): 47-53(in Chinese).
- [13] Crab R, Kochva M, Verstraete W, *et al.* Bio-flocs technology application in over-wintering of tilapia[J]. *Aquaculture Engineering*, 2009, 40(3): 105-112.
- [14] 卢炳国, 王海英, 谢骏, 等. 不同C/N对草鱼池生物絮团的形成及水质的影响研究[J]. *水产学报*, 2013, 37(8): 1220-1228.
- Lu B G, Wang H Y, Xie J, *et al.* Effect of C/N ratio on bioflocs formation and water quality in zero-water exchange grass carp tanks[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(8): 1220-1228(in Chinese).
- [15] 李朝兵. 生物絮团作为鲮饵料的研究与应用[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.
- Li C B. The study and application of bioflocs as *Aristichthys nobilis* Richardson bait[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012(in Chinese).
- [16] Hollender J, van der Krol D, Kornberger L, *et al.* Effect of different carbon sources on the enhanced biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2002, 18(4): 359-364.
- [17] Oehmen A, Yuan Z, Blackall L L, *et al.* Short-term

- effects of carbon source on the competition of polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms[J]. *Water Science and Technology*, 2004, 50(10): 139-144.
- [18] Wilén B M, Nielsen J L, Keiding K, *et al.* Influence of microbial activity on the stability of activated sludge flocs[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2000, 18(2): 145-156.
- [19] Crab R, Chielens B, Wille M, *et al.* The effect of different carbon sources on the nutritional value of bioflocs, a feed for *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae[J]. *Aquaculture Research*, 2010, 41(4): 559-567.
- [20] 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.
- [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] Martínez-Córdova L R, Martínez-Porchas M, Emerenciano M G C, *et al.* From microbes to fish the next revolution in food production[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2017, 37(3): 287-295.
- [23] 农业部渔业局. 2013中国渔业年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2013: 165-210.
Bureau of Fisheries of the Ministry of Agriculture. China Fishery Statistical Yearbook 2013[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2013: 165-210(in Chinese).
- [24] Xu W J, Pan L Q. Effects of bioflocs on growth performance, digestive enzyme activity and body composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* in zero-water exchange tanks manipulating C/N ratio in feed[J]. *Aquaculture*, 2012, 356-357: 147-152.
- [25] Manush S M, Pal A K, Das T, *et al.* Dietary high protein and vitamin C mitigate stress due to chelate claw ablation in *Macrobrachium rosenbergii* males[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2005, 142(1): 10-18.
- [26] Arai S. A purified test diet for Coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, fry[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1981, 47(4): 547-550.
- [27] Peñaflores V D. An evaluation of indigenous protein sources as potential component in the diet formulation for tiger prawn, *Penaeus monodon*, using essential amino acid index(EAAI)[J]. *Aquaculture*, 1989, 83(3-4): 319-330.
- [28] 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.
- [29] Avnimelech Y. Biofloc Technology: A Practical Guide Book[M]. 2nd ed. Baton Rouge, US: The World Aquaculture Society, 2012.
- [30] Van Wyk P, Scarpa J. Water quality requirements and management[M]//Van Wyk P, Davis-Hodgkins M, Laramore R, *et al.* Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems. Tallahassee, FL, USA: Florida Department of Agriculture and Consumer Services, 1999: 141-162.
- [31] 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.
- [32] Schneider O, Sereti V, Eding E H, *et al.* Analysis of nutrient flows in integrated intensive aquaculture systems[J]. *Aquacultural Engineering*, 2005, 32(3-4): 379-401.
- [33] Asaduzzaman M, Wahab M A, Verdegem M C J, *et al.* C/N ratio control and substrate addition for periphyton development jointly enhance freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* production in ponds[J]. *Aquaculture*, 2008, 280(1-4): 117-123.
- [34] 沈萍. 微生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 129-134.
Shen P. Microbiology[M]. Beijing: Advanced Education Press, 2000: 129-134(in Chinese).
- [35] Xu W J, Pan L Q, Sun X H, *et al.* Effects of bioflocs on water quality, and survival, growth and digestive enzyme activities of *Litopenaeus vannamei* (Boone) in zero-water exchange culture tanks[J]. *Aquaculture Research*, 2013, 44(7): 1093-1102.

- [36] Ebeling J M, Timmons M B, Bisogni J J. An engineering analysis of the stoichiometry of autotrophic, heterotrophic bacterial control of ammonia-nitrogen in zero-exchange marine shrimp production systems[J]. *International Journal of Recirculating Aquaculture*, 2009, 10(1): 28-37.
- [37] De Schryver P, Crab R, Defoirdt T, *et al.* The basics of bio-flocs technology: the added value for aquaculture[J]. *Aquaculture*, 2008, 277(3-4): 125-137.
- [38] Wilén B M, Balmér P. The effect of dissolved oxygen concentration on the structure, size and size distribution of activated sludge flocs[J]. *Water Research*, 1999, 33(2): 391-400.
- [39] Wilén B M, Jin B, Lant P. The influence of key chemical constituents in activated sludge on surface and flocculating properties[J]. *Water Research*, 2003, 37(9): 2127-2139.
- [40] Ballester E L C, Abreu P C, Cavalli R O, *et al.* Effect of practical diets with different protein levels on the performance of *Farfantepenaeus paulensis* juveniles nursed in a zero exchange suspended microbial flocs intensive system[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2010, 16(2): 163-172.
- [41] 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.
- [42] Wilén B M, Onuki M, Hermansson M, *et al.* Microbial community structure in activated sludge floc analysed by fluorescence in situ hybridization and its relation to floc stability[J]. *Water Research*, 2008, 42(8-9): 2300-2308.
- [43] Sharathchandra K, Rajashekhar M. Total lipid and fatty acid composition in some freshwater cyanobacteria[J]. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 2011, 2(2): 83-97.
- [44] Maslova I P, Mouradyan E A, Lapina S S, *et al.* Lipid fatty acid composition and thermophilicity of cyanobacteria[J]. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2004, 51(3): 353-360.
- [45] Verma N M, Mehrotra S, Shukla A, *et al.* Prospective of biodiesel production utilizing microalgae as the cell factories: a comprehensive discussion[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2010, 9(10): 1402-1411.
- [46] Bodík I, Blšťáková A, Sedláček S, *et al.* Biodiesel waste as source of organic carbon for municipal WWTP denitrification[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(8): 2452-2456.
- [47] Mente E, Coutteau P, Houlihan D, *et al.* Protein turnover, amino acid profile and amino acid flux in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei*. Effects of dietary protein source[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2002, 205(20): 3107-3122.
- [48] 杨元昊, 李维平, 龚月生, 等. 兰州鲇肌肉生化成分分析及营养学评价[J]. *水生生物学报*, 2009, 33(1): 54-60.
- Yang Y H, Li W P, Gong Y S, *et al.* Analysis of biochemical composition and evaluation of nutritive quality in muscles of *Silurus lanzhouensis*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, 33(1): 54-60(in Chinese).
- [49] 怀明燕, 王晨辉, 李坤林. 凡纳滨对虾对蛋白质和氨基酸营养需求的研究进展[J]. *饲料工业*, 2010, 31(S1): 55-60.
- Huai M Y, Wang C H, Li K L. A review on the requirements of protein and amino acids of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Feed Industry*, 2010, 31(S1): 55-60(in Chinese).
- [50] Sakami T, Fujioka Y, Shimoda T. Comparison of microbial community structures in intensive and extensive shrimp culture ponds and a mangrove area in Thailand[J]. *Fisheries Science*, 2008, 74(4): 889-898.
- [51] Wagner M, Amann R, Lemmer H, *et al.* Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(5): 1520-1525.
- [52] Miura Y, Hiraiwa M N, Ito T, *et al.* Bacterial community structures in MBRs treating municipal wastewater: Relationship between community stability and reactor performance[J]. *Water Research*, 2007, 41(3): 627-637.
- [53] Wagner M, Rath G, Amann R, *et al.* *In situ* identification of ammonia-oxidizing bacteria[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 1995, 18(2): 251-264.
- [54] Daims H, Brühl A, Amann R, *et al.* The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all *Bacteria*: development and evaluation of a more comprehensive probe set[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 1999, 22(3): 434-444.
- [55] Das S, Ward L R, Burke C. Prospects of using marine actinobacteria as probiotics in aquaculture[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 81(3): 419-429.

Effects of different carbon sources on the biofloc formation, nutritional ingredients and bacterial community and water quality in *Litopenaeus vannamei* culture tank

ZHANG Zhe¹, YANG Zhangwu^{1*}, GE Hui¹, CHEN Huihui¹, ZHUO Xiahuang²

(1. Key Laboratory of Cultivation and High-value Utilization of Marine Organisms in Fujian Province, Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361013, China;

2. Xiamen Xiaxinglong Seed Production Co., Ltd., Xiamen 361026, China)

Abstract: In order to study the suitable carbon source required by the biofloc formation in *Litopenaeus vannamei* culture tank, 3 groups added with 3 carbon sources (glucose group, starch group and sucrose group) were designed. Each treatment group set up 3 replicates. The culture period was 20 d. The experiment analyzed influences of adding different carbon sources on biofloc formation, nutritional ingredients, microflora and water quality indexes. The findings showed that when carbon additive amount was 80% of feeding, the biofloc formation could effectively regulate water quality and reduce ammonia nitrogen and nitrite nitrogen level in water body. The concentrations of ammonia nitrogen, nitrite nitrogen and nitrate nitrogen concentrations in three carbon sources addition groups were significantly lower than those of control group. The ammonia nitrogen, nitrite nitrogen and nitrate nitrogen concentrations in the starch group were significantly higher than those of the glucose group and sucrose group. The survival rates of the glucose group, starch group, sucrose group and control group were 72.9%, 54.2%, 69.8% and 44.3% respectively. The biofloc settling volume (BFV) in the starch group was significantly lower than the glucose group, while BFV in the sucrose group was the highest. After 13–15 d, three groups tended to be stable. Crude protein contents in glucose group and sucrose group were significantly higher than that of the starch group. There was no significant difference in the glucose group and sucrose group. The essential amino acids-histidine, arginine, methionine and the nonessential amino acids-aspartate, glutamate, alanine in the starch group was lower than the glucose group and sucrose group. The essential amino acid index (EAAI) in the glucose group, starch group and sucrose group was calculated at 0.93, 0.89 and 0.92, respectively. The high-throughput sequencing results showed that there were more than 18 species of bacterial community at the phylum level. Proteobacteria and Bacteroidetes in three types of Biofloc had the highest ratio. In the starch group, Bacteroidetes content was significantly higher than other groups, while Planctomycetes and Actinobacteria contents in the sucrose group were obviously higher than the glucose group and starch group. Therefore, different additions of carbon sources in the *L. vannamei* culture tank affected the biofloc formation, nutritional ingredients, microbial community structure and diversities and improved water quality in different degrees. With the EAAI as the evaluation index, glucose and sucrose can be used as the suitable carbon source choices for *L. vannamei* culture pond.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; biofloc; carbon sources; amino acid; microbial community structure; metagenome sequencing

Corresponding author: YANG Zhangwu. E-mail: yzw6010163@163.com

Funding projects: Aquatic Seed Innovation and Healthy Seedlings Breeding Industrialization Project of *Litopenaeus vannamei* (2017-2020); Special Funds for Research on Marine Public Welfare Industry (201205019-3); Marine Economic Innovation and Development of Demonstration Projects of Xiamen in the 13 th Five-Year (16 PF034 SF02); The Special Funds of Fujian Ocean and Fisheries Structure Adjustment (2017 HYJG02)