



保存温度对生物絮团硝化性能和形态结构的影响

姜泽建¹, 刘文物^{1,2*}, 谭洪新^{1,2,3*}, 罗国芝^{1,2,3}, 孙大川^{1,2}

(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, 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;

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: 为探究生物絮团适宜的保存温度, 通过单因素实验设计, 将絮团在常温 (25 °C)、冷藏 (4 °C) 和冷冻 (-20 °C) 条件下分别密封保存了 7、14、21 和 28 d。结果显示, 随着保存时间的延长, 絮团的硝化性能在 3 种温度保存条件下较初始硝化性能均有不同程度的下降。在 4 °C 保存 28 天的絮团中, 氨氧化速率为 (0.16±0.10) mg/(L·h), 显著高于 25 °C 条件下的 (0.08±0.09) mg/(L·h) 和 -20 °C 条件下的 (0.01±0.09) mg/(L·h), 其中, -20 °C 保存条件下的絮团在第 7 天几乎丧失氨氧化活性, 较初始氨氧化速率下降了 99.52%。在第 28 天, 4 °C 下保存的絮团亚硝态氮氧化速率为 (0.19±0.03) mg/(L·h), 显著高于 25 °C 保存条件下的 (0.10±0.05) mg/(L·h) 和 -20 °C 保存条件下的 (0.14±0.02) mg/(L·h)。显微观察的结果显示, 25 °C 保存条件下絮团结构松散, 絮团的体积平均粒径由初始的 (245.92±21.51) μm 减小到第 28 天的 (148.50±9.90) μm; 在 -20 °C 保存条件下, 絮团的体积平均粒径由 (245.92±21.51) μm 增大到 (310.82±29.67) μm; 4 °C 保存条件下, 絮团的形态结构和粒径均未受到显著变化。研究表明, 4 °C 的保存条件可作为生物絮团的保存温度。本研究为生物絮团适宜的保存温度和保存时间提供了参考依据, 有利于生物絮团在实际生产中的保存和再使用。

关键词: 生物絮团; 硝化性能; 保存; 温度

中图分类号: S 959

文献标志码: A

生物絮团技术 (biofloc technology, BFT) 是借鉴于城市污水处理的活性污泥技术^[1], 其本质上是一种水质调控技术, 通过微生物吸收利用含氮有毒废物 (氨和亚硝酸盐), 或者将其转化为毒性较低硝酸盐, 从而最大限度地减少养殖用水的交换。Azim 等^[2] 在尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 养殖中应用 BFT 实现了零换水。

BFT 养殖系统分为异养细菌为主的异养型和化学自养细菌为主硝化型, 维持异养型的 BFT 养殖系统需要一直投入大量碳源促进异养型细菌

生长^[3], 通过调控碳氮比 (C/N) 来维持异养菌的数量及硝化性能^[4]。BFT 养殖系统一旦构建成功, 则不需要投入额外碳源, 在降低生产成本的同时又减少溶解氧的消耗^[5]。

然而 BFT 养殖系统存在启动时间长、搁置浪费、稳定性下降等问题, 在实际养殖过程中受到很大程度的限制。培养水处理能力良好、性能稳定的絮团通常需要耗时数周。Correia 等^[6] 在硝化型生物絮团系统的前期构建中发现, 直至培养 4~7 周后, 系统中亚硝态氮浓度才显著下降。田

收稿日期: 2022-06-04 修回日期: 2022-06-25

资助项目: 上海市科学技术委员会扬帆人才计划 (22YF1416400); 上海水产养殖工程技术研究中心能力提升项目 (19DZ2284300)

第一作者: 姜泽建 (照片), 从事循环水养殖工程和技术研究, E-mail: 975883461@qq.com

通信作者: 刘文物, 从事工厂化养殖系统工程与污染调控研究, E-mail: liuwenchang2012@126.com;

谭洪新, 从事循环水养殖系统与工程研究, E-mail: hxtan@shou.edu.cn



道贺等^[7]对硝化型生物絮团进行了定向培养, 32 d 后才形成稳定的硝化型絮团。已有相关研究表明, 在 BFT 养殖系统启动阶段接种成熟絮团^[8], 可缩短系统构建时间, 并取得了较好的水处理能力^[9]。因此对生物絮团保存技术的研究极其重要。

目前已有研究者通过保存活性污泥来克服生物絮团系统启动难的问题。保存温度和保存时间是影响活性污泥保存的两个重要因素, Wilén 等^[10]在活性污泥保存的研究中发现, 在 4 °C 保存环境下会导致絮状物的解絮, 并认为这可能是由于低温环境抑制了微生物的生理活动。Adav 等^[11]通过观察不同温度下保存的颗粒污泥发现, 在 20 °C 左右的室温保存后, 颗粒污泥出现解体现象, 但在 -20 °C 保存 3 个月后颗粒污泥依然完整。污泥保存时间越长, 其性能及稳定性就越差, 经过长时间的静置保存后, 颗粒污泥就会出现稳定性降低和结构被破坏的现象^[12]。

本研究结合 BFT 养殖系统的实际需求及国内外对活性污泥保存方法的研究, 将硝化型生物絮团在不同温度条件下进行保存, 研究保存时间对生物絮团硝化性能、形态结构与粒径的影响, 为絮团的保存与应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 絮团的来源与收集

待保存絮团来自上海海洋大学循环水研发平台内 BFT 模式下养殖尼罗罗非鱼 60 d 后剩余絮团, 养殖过程中总氨氮 (total ammonia nitrogen, TAN) 平均浓度 0.39 mg/L, 亚硝态氮 (NO_2^- -N) 平均浓度 0.58 mg/L, 硝态氮 (NO_3^- -N) 平均浓度 133.74 mg/L。采用 200 目筛网对其进行收集, 收集到的絮团含水率为 $88.10\% \pm 3.32\%$ [含水率 (%) = (絮团湿重 - 絮团干重) / 絮团湿重]。

1.2 絮团的保存方案

将收集的絮团使用保鲜自封袋进行密闭分装, 在常温 (25 °C)、冷藏 (4 °C)、冷冻 (-20 °C) 条件下分别保存 7、14、21 和 28 d, 每个处理组 4 个重复。样本分组编号、保存时间和保存温度见表 1。

1.3 硝化性能测试前处理

取各阶段保存的絮团添加去离子水至 100 mL, 充分混合后置于 250 mL 锥形瓶中, 实验结束后, 测得各实验组总悬浮颗粒 (total suspended solids,

表 1 絮团保存温度及指标测定时间分布

Tab. 1 Distribution of storage temperature and index measurement time of biofloc

测定时间/d measurement time	25 °C	4 °C	-20 °C
0	保存前絮团 BS		
7	NS7	LS7	FS7
14	NS14	LS14	FS14
21	NS 21	LS21	FS21
28	NS 28	LS28	FS28

TSS) 平均浓度为 (977 ± 19) mg/L。

1.4 氨氧化性能评测

将取完样品的锥形瓶置于摇床 (150 r/min), 每个锥形瓶添加 1 mL 的 NH_4Cl 溶液 (3.821 4 g/L), 1 mL 的 NaClO_3 溶液 (106.5 g/L) 作为抑制剂^[13], 抑制 NO_2^- -N 转化为 NO_3^- -N 的反应, 添加 5 mL 的 NaHCO_3 溶液 (10 g/L) 补充碱度。分别在 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、4.0、6.0、8.0、10.0 和 12.0 h 进行 TAN 浓度测定。

1.5 亚硝态氮氧化性能评测

将取完样品的锥形瓶置于摇床, 摇动频率设置为 150 r/min, 每个锥形瓶移入 1 mL 的 NaNO_2 溶液 (4.928 5 g/L) 和 1 mL 的 3,4-二甲基吡啶磷酸盐溶液 (10 g/L), 以抑制硝化作用^[14], 添加 5 mL 的 NaHCO_3 溶液 (10 g/L) 补充碱度。分别在 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、4.0、6.0、8.0、10.0 和 12.0 h 进行 NO_2^- -N 浓度测定。

1.6 絮团结构分析与粒径分布

通过 LIVE/DEAD BACLIGHT 对絮团进行染色, 使用共聚焦激光显微镜 (Leica TCS SP8) 对凋亡细胞进行观察。使用尼康显微镜 (ECLIPES 80i) 进行絮团形状观察。使用激光粒度分析仪 (MS2000) 对絮团粒径分布进行分析。

1.7 水质指标测定方法

TAN 浓度采用水杨酸法进行测定, NO_2^- -N 浓度采用 N-(1-萘基)-乙二胺分光光度法进行测定。

1.8 数据分析

用 Excel 软件对实验数据进行统计, Origin 8.5 软件进行图表绘制, 用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 为显著性差异。根据不同时间测定的 TAN、

NO_2^- -N 的浓度值, 使用 Excel 软件绘制 (时间-浓度) 线性回归曲线, 得到一次方程: $y=-kx+a$, y 值表示浓度 (mg/L), x 值表示时间 (h), a 值表示常数, k 值表示各处理组的氨氧化速率、亚硝态氮氧化速率 [mg/(L·h)]。实验数值用平均值 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示。

2 结果

2.1 氨氧化速率

絮团在 3 种不同保存条件下, 其氨氧化性能随着保存时间的延长均有不同程度的下降 (图 1)。在第 7 天, 4 °C 保存条件下的絮团在 12 h 反应期间由初始氨氮浓度 (8.19 \pm 0.25) mg/(L·h) 下降至 (2.48 \pm 0.28) mg/(L·h), 与保存前絮团氨氮的变化无明显

差异; -20 °C 保存条件下的絮团处理组由初始氨氮浓度 (8.18 \pm 0.27) mg/(L·h) 下降至 (7.80 \pm 0.30) mg/(L·h), 氨氧化能力几乎丧失。在第 28 天, 4 °C 处理组显著高于 25 和 -20 °C 处理组的氨氮降解量, 25 °C 保存条件下的絮团处理组由初始氨氮浓度 (8.01 \pm 0.24) mg/(L·h) 下降至 (6.07 \pm 0.41) mg/(L·h), 4 °C 保存条件下的絮团处理组由初始氨氮浓度 (8.01 \pm 0.28) mg/(L·h) 下降至 (4.07 \pm 0.54) mg/(L·h), -20 °C 保存条件下的絮团处理组由初始氨氮浓度 (8.16 \pm 0.17) mg/(L·h) 下降至 (7.96 \pm 0.33) mg/(L·h)。

絮团在 3 种保存条件下其氨氧化速率随着时间的延长较初始硝化性能均有不同程度的下降 (表 2)。在第 7 天, 25 °C 保存条件下的絮团氨氧化速率为 (0.26 \pm 0.05) mg/(L·h), 与 4 °C 保存条件

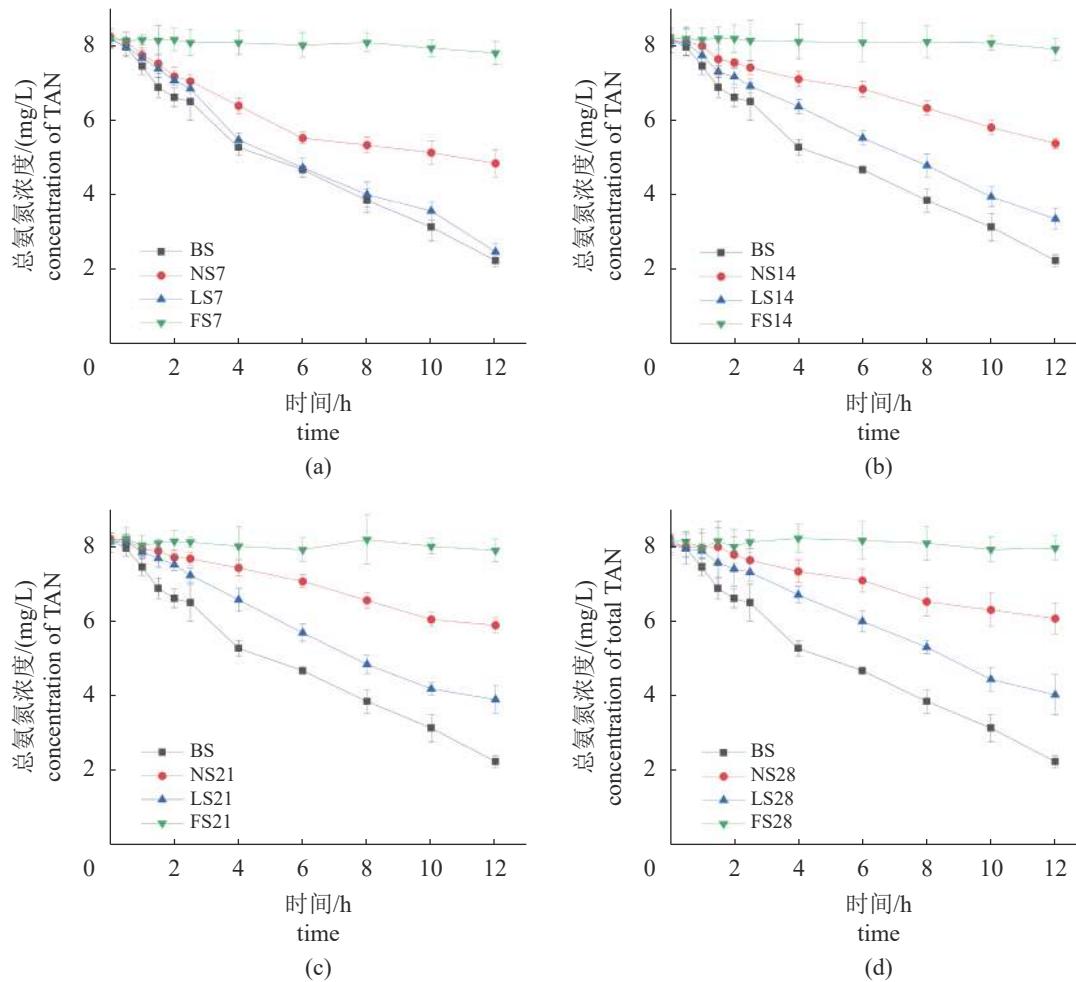


图 1 絮团在不同保存温度和保存时间后的氨氮转化

(a)-(d) 分别代表絮团保存 7、14、21 和 28 d 后的实验过程, 下同。

Fig. 1 Ammonia nitrogen conversion of ammonia nitrogen by bioflocs after different storage temperatures and storage times

(a)-(d) represent the experimental process during 12 h after 7, 14, 21 and 28 days of floc storage respectively, the same below.

下的 (0.28±0.07) mg/(L·h) 无显著差异 ($P>0.05$), 而-20 °C 条件下保存的絮团氨氧化速率为 (0.01±0.04) mg/(L·h), 较初始絮团氨氧化速率下降 99.52%, 氨氧化速率大幅下降。在第 28 天, 4 °C 保存条件

下的絮团其氨氧化速率为 (0.16±0.10) mg/(L·h), 显著高于 25 °C 保存条件下的 (0.08±0.09) mg/(L·h) 和-20 °C 条件下的 (0.01±0.09) mg/(L·h)。

表 2 氨氮转化 2.5 h 期间的氨氧化速率

Tab. 2 Ammonia oxidation rate during 2.5 h of ammonia nitrogen conversion

保存时间/d preservation time	25 °C		4 °C		-20 °C	
	氨氧化速率/[mg/(L·h)] ammonia oxidation rate	降幅/% decline	氨氧化速率/[mg/(L·h)] ammonia oxidation rate	降幅/% decline	氨氧化速率/[mg/(L·h)] ammonia oxidation rate	降幅/% decline
0	0.37±0.10 ^{Aa}	0	0.37±0.10 ^{Aa}	0	0.37±0.10 ^{Aa}	0
7	0.26±0.05 ^{Ba}	23.84	0.28±0.07 ^{BCa}	23.32	0.01±0.04 ^{Bb}	99.52
14	0.16±0.06 ^{BCb}	51.35	0.25±0.08 ^{BCa}	25.89	0.01±0.04 ^{Bc}	97.83
21	0.12±0.03 ^{Cb}	63.54	0.19±0.03 ^{Ca}	45.92	0.01±0.04 ^{Bc}	97.30
28	0.08±0.09 ^{Cb}	81.65	0.16±0.10 ^{Ca}	55.27	0.01±0.09 ^{Bc}	99.28

注: 不同小写字母表示组间差异显著($P<0.05$), 不同大写字母表示组内差异显著($P<0.05$); 降幅(%)=(保存前氨氧化速率-保存后氨氧化速率)/保存前氨氧化速率, 下同。

Notes: Different superscript lowercase letters indicate significant difference between peers ($P<0.05$), different superscript capital letters indicate significant difference between the same columns ($P<0.05$). Rate of decrease (%) = (rate of ammonia oxidation before preservation - rate of ammonia oxidation after preservation)/rate of ammonia oxidation before preservation, the same below.

2.2 亚硝态氮氧化速率

絮团在 3 种不同温度保存条件下其亚硝态氮氧化性能随着保存时间的延长均有不同程度的下降(图 2)。在第 7 天, 25 °C 保存条件下的絮团在 12 h 反应期间由初始亚硝态氮浓度 (9.24±0.18) mg/(L·h) 下降至 (0.51±0.15) mg/(L·h), 4 °C 保存条件下的絮团处理组由初始亚硝态氮浓度 (9.31±0.15) mg/(L·h) 下降至 (0.11±0.03) mg/(L·h), 二者亚硝态氮浓度均可降至较低水平。在第 28 天, 25 °C 和-20 °C 保存条件下的絮团亚硝态氮氧化性能大幅下降, 其中 25 °C 保存条件下的絮团处理组由初始的亚硝态氮浓度 (9.44±0.27) mg/(L·h) 下降至 (5.23±0.35) mg/(L·h), -20 °C 保存条件下的絮团处理组由初始亚硝态氮浓度 (9.23±0.20) mg/(L·h) 下降至 (5.33±0.33) mg/(L·h), 而 4 °C 保存条件下的絮团处理组由初始亚硝态氮浓度 (9.40±0.19) mg/(L·h) 下降至 (0.35±0.09) mg/(L·h), 仍有较强的亚硝态氮氧化性能。

絮团在 3 种保存条件下其亚硝态氮氧化速率随着时间的延长较初始硝化性能均有不同程度的下降(表 3)。第 7 天, 4 °C 条件下保存的絮团其氧化速率为 (0.65±0.05) mg/(L·h), 显著高于 25 °C 保存条件下的 (0.41±0.05) mg/(L·h) 和-20 °C 保存条件下的 (0.35±0.07) mg/(L·h)。第 28 天, 絮团

在 4 °C 条件保存下亚硝态氮氧化速率为 (0.19±0.03) mg/(L·h), 显著高于 25 °C 保存条件下的 (0.10±0.05) mg/(L·h) 和-20 °C 条件下的 (0.14±0.02) mg/(L·h)。

2.3 絮团外观形态与细胞凋亡

保存前的絮团颗粒紧致, 充满有机碎屑; 25 °C 保存条件下的絮团随着保存时间的延长, 结构变得松散, 边缘模糊, 含大量丝状菌; -20 °C 保存条件下的絮团由于冷冻的原因, 絮体结构受到破坏, 边缘模糊; 与保存前的絮团相比, 4 °C 保存条件下的絮团形态结构未出现显著变化(图版 I)。

使用荧光染料对絮团进行染色后, 共聚焦激光显微镜观察, 发现保存前絮团活细胞比例最高, 只有少量死细胞。在第 28 天, 4 °C 保存条件下的絮团活细胞比例显著高于 25 和-20 °C(图版 II)。

2.4 絮团粒径变化

通过对保存前和保存第 28 天絮团的粒径分析, 25、4 和-20 °C 三种不同温度条件下保存的絮团粒径有着不同的变化趋势。25 °C 保存条件下的絮团体积平均粒径由初始的 (245.92±21.51) μm 减小到第 28 天的 (148.50±9.90) μm, d(0.1)、d(0.5)、d(0.9) 也同等程度地减少(表 4); 在-20 °C 保存条件下, 絮团的体积平均粒径由 (245.92±21.51) μm

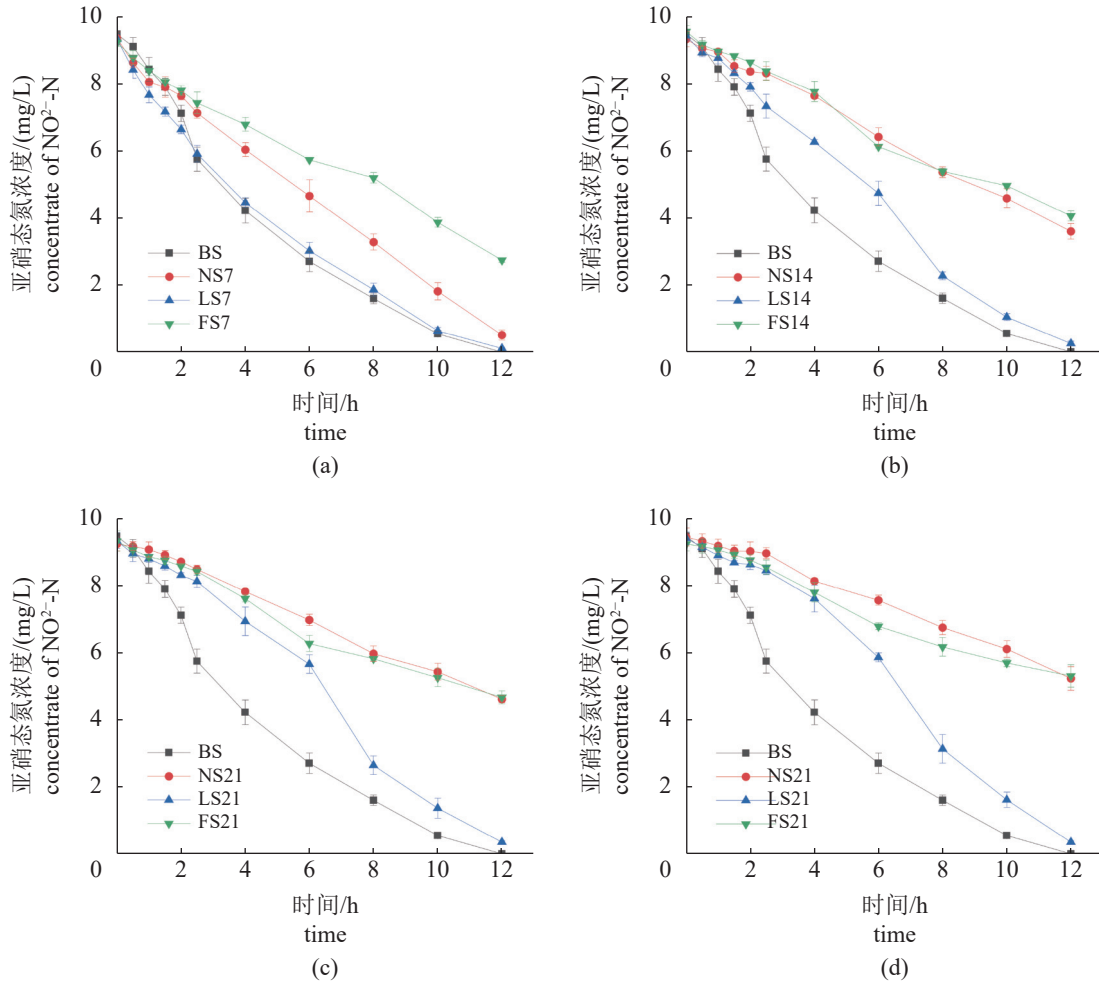


图 2 絮团在不同保存温度和保存时间后的亚硝态氮转化

Fig. 2 Nitrite nitrogen conversion of bioflocs after different storage temperatures and storage times

表 3 亚硝态氮转化 2.5 h 期间的亚硝态氮氧化速率

Tab. 3 Nitrite oxidation rate during 2.5 h of nitrite nitrogen conversion

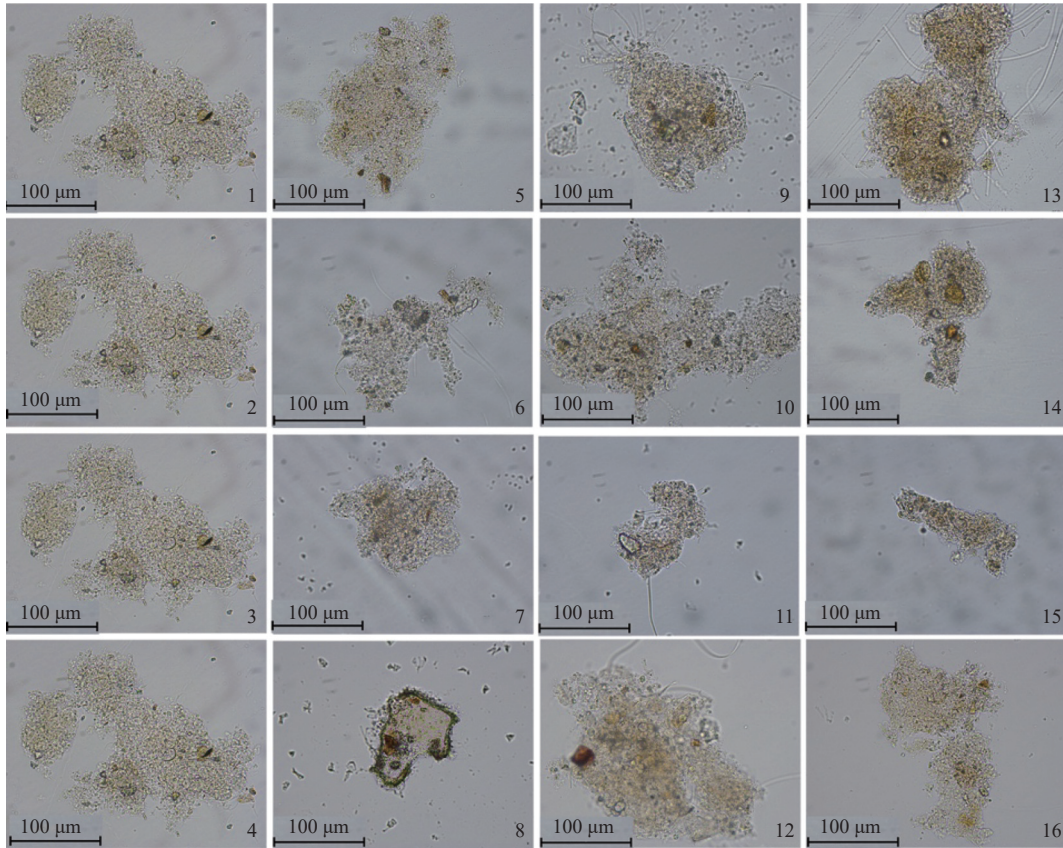
保存时间/d preservation time	25 °C		4 °C		-20 °C	
	亚硝态氮氧化速率/[mg/(L·h)] nitrite oxidation rate	降幅/% decline	亚硝态氮降解速率/[mg/(L·h)] nitrite oxidation rate	降幅/% decline	亚硝态氮降解速率/[mg/(L·h)] nitrite oxidation rate	降幅/% decline
0	0.72±0.02 ^{Aa}	0	0.72±0.02 ^{Aa}	0	0.72±0.02 ^{Aa}	0
7	0.41±0.05 ^{Bb}	43.19	0.65±0.05 ^{Aa}	8.92	0.35±0.07 ^{Bb}	51.28
14	0.22±0.02 ^{Cb}	69.94	0.40±0.06 ^{Ba}	43.91	0.22±0.03 ^{Cb}	69.83
21	0.15±0.04 ^{Db}	78.92	0.23±0.07 ^{Ca}	67.50	0.16±0.01 ^{CDb}	77.00
28	0.10±0.05 ^{Db}	86.09	0.19±0.03 ^{Ca}	73.67	0.14±0.02 ^{Db}	80.79

增大到 (310.82±29.67) μm , d (0.5)、d (0.9) 有不同等程度的增加, 其中 d (0.1)、d (0.5)、d (0.9) 为粒径大小的参数, 代表的含义为小于某粒径的絮团含量分别为 10%、50% 和 90% 时所对应的粒径; 而 4 °C 保存条件下的絮团体积平均粒径为 (237.75±13.38) μm , 与保存前的 (245.92±21.51) μm 无显著差异 ($P>0.05$) (图 3)。

3 讨论

3.1 温度对絮团氨氧化作用的影响

由表 2 可知, 4 °C 保存条件下的絮团其氨氧化速率为 (0.16±0.10) mg/(L·h), 显著高于 25 °C 保存条件下的 (0.08±0.09) mg/(L·h) 和 -20 °C 条件下的 (0.01±0.09) mg/(L·h), 表明 4 °C 保存条件下絮



图版 I 絮团的结构形态变化

1~4. 保存前, 5~8. 25 °C 条件下保存 7、14、21 和 28 天, 9~12. 4 °C 条件下保存 7、14、21 和 28 天, 13~16. -20 °C 条件下保存 7、14、21 和 28 天, 下同。

Plate I Structural morphological changes of bioflocs

1-4. before storage, 5-8. indicate 7, 14, 21 and 28 d at 25 °C, 9-12. indicate 7, 14, 21 and 28 d at 4 °C, 13-16. indicate 7, 14, 21 and 28 d at -20 °C, respectively, the same below.

团氨氧化能力得到较多保留。在好氧颗粒不同储存策略的研究中, Gao 等^[15]考察了贮藏温度在 25 °C、4 °C 和室温情况下的再活化性能, 发现 4 °C 保存条件下的颗粒获得了最好的恢复性能。有研究指出, 4 °C 是保持污泥中生物量、细胞活性的最佳保存温度^[16], 由于氨氧化反应主要由氨氧化微生物氨氧化古菌 (ammonia-oxidizing archaea, AOA) 和氨氧化细菌 (ammonia-oxidizing bacteria, AOB) 发挥作用^[17], 可以推测 4 °C 下能够更好地保持 AOA、AOB 的活性。

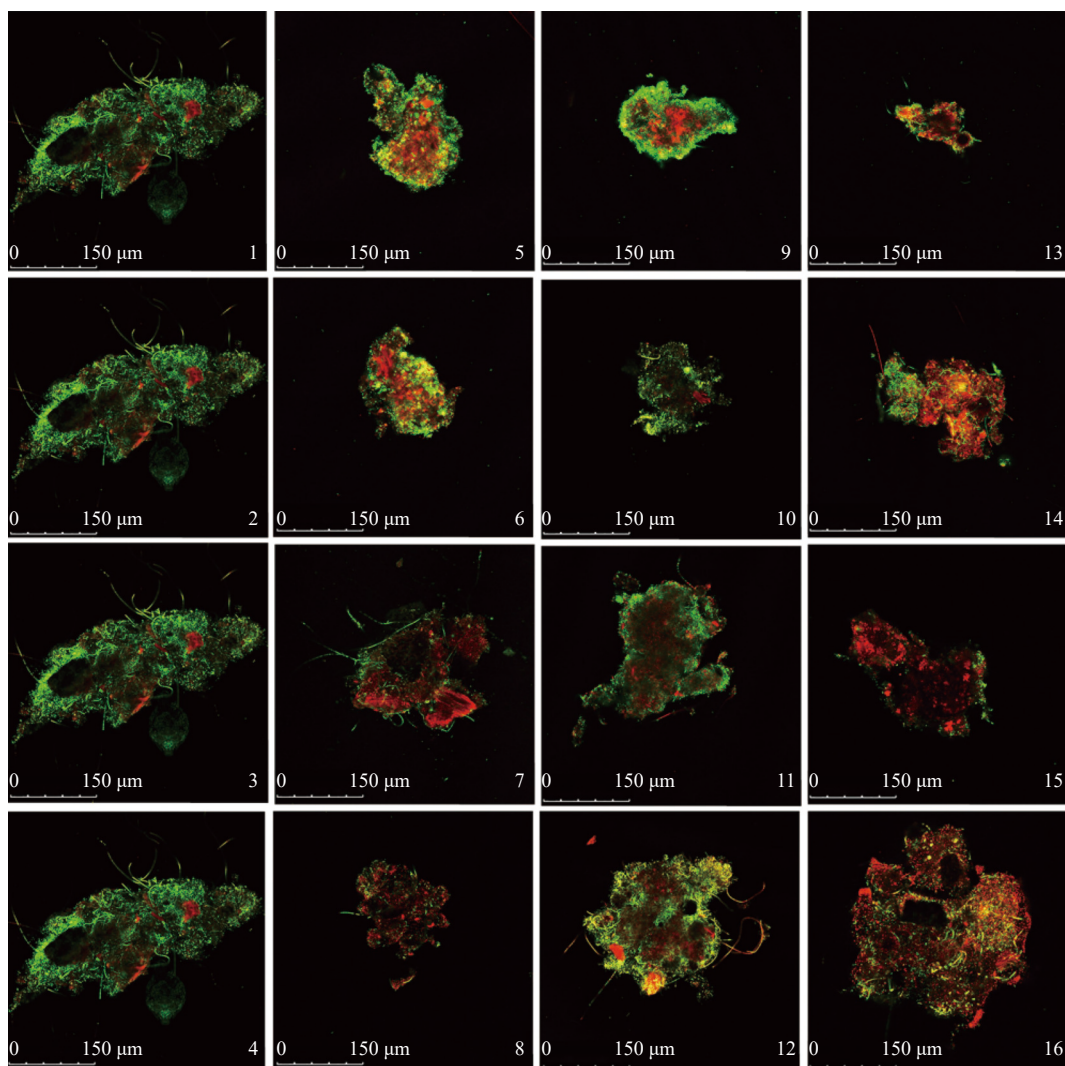
25 °C 保存条件下的絮团氨氧化速率下降较快, 是因为较高的储存温度引起污泥细胞的水解和内源性呼吸速率增加, 从而导致微生物活性的快速丧失^[18], 所以氨氧化细菌活性的降低导致了氨氮降解速率的骤降。絮团在第 14 天出现臭味是因为随着保存时间的延长, 微生物新陈代谢加快, 且在厌氧的环境中有机物腐烂, 厌氧发酵产生了

硫酸盐、甲烷和硫化氢^[18-19]。在 -20 °C 保存条件下, 絮团氨氮降解速率接近于零, 可能是絮体内细菌细胞在冷冻环境下发生破裂, 大量细菌死亡, 表明氨氧化细菌无法在冷冻条件下生存。

3.2 温度对絮团亚硝态氮降解的影响

亚硝态氮氧化作用主要由亚硝酸盐氧化细菌 (nitrite-oxidizing bacteria, NOB) 利用亚硝酸氧化还原酶将亚硝酸盐氧化为硝酸盐^[20]。在第 7 天, 4 °C 下保存的絮团氨氧化速率为 $(0.65 \pm 0.05) \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{h})$, 显著高于 25 °C 条件下的 $(0.41 \pm 0.05) \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{h})$ 和 -20 °C 条件下的 $(0.35 \pm 0.07) \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{h})$; 随着保存时间的延长, 亚硝态氮浓度在第 14、21 和 28 天仍可以降到较低水平, 这表明此温度条件下能很好地维持 NOB 的活性。

25 和 4 °C 保存条件下的絮团在第 7 天时亚硝态氮氧化速率无显著差异 ($P > 0.05$), 而在第 14、



图版 II 絮团的细胞凋亡观察

绿色代表活细胞比例, 红色代表死细胞比例。

Plate II Observation of apoptotic cell death in bioflocs

Green represents the proportion of live cells, red represents the proportion of dead cells.

表 4 不同保存条件下絮团 d (0.1)、d (0.5) 和 d (0.9)

Tab. 4 Bioflocs at different preservation conditions d (0.1)、d (0.5)、d (0.9)

指标/ μm parameters	BS	NS28	LS28	FS28
d (0.1)	79.26 \pm 4.81 ^a	23.97 \pm 2.26 ^c	55.25 \pm 3.42 ^b	51.01 \pm 7.16 ^b
d (0.5)	225.11 \pm 20.33 ^{ab}	108.00 \pm 8.14 ^c	208.37 \pm 11.05 ^b	260.94 \pm 31.46 ^a
d (0.9)	445.45 \pm 43.95 ^b	335.56 \pm 20.56 ^c	461.61 \pm 26.71 ^b	645.04 \pm 54.19 ^a

注: d (0.1)、d (0.5)和d (0.9) 分别定义为小于某粒径的絮团含量分别为10%、50%和90%时所对应的粒径。

Notes: d (0.1)、d (0.5) and d (0.9) are defined as the corresponding particle size when the floc content less than a certain particle size is 10%, 50% and 90%, respectively.

21 和 28 天其亚硝态氮氧化速率下降明显, 可能是由于絮体中营养物质的匮乏致使相关细菌活性降低。-20 °C 条件下亚硝态氮氧化能力没有像氨

氧化能力一样全部丧失, 有研究表明, 硝化污泥在-80 °C 条件下保存 3 个月, 亚硝化细菌仍可保留 60% 的活力^[21]。汪采华等^[22]发现, 冷冻状态下

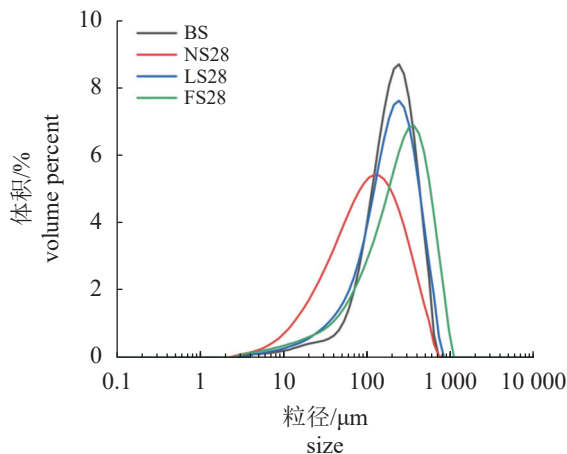


图3 不同保存条件下絮团粒径分布

Fig. 3 Particle size distribution of bioflocs under different preservation conditions

对亚硝化细菌保存 150 d, 其活性仍能保留 20.8%, 这表明亚硝酸盐氧化细菌比氨氧化细菌环境适应能力更强。

3.3 温度对絮团形态结构和细胞死亡比例的影响

絮团的形态结构受培养过程中有机负荷、基质成分、剪切力、沉淀时间和运行周期等因素的影响, 其中剪切力的影响最大^[23-27]。本研究表明, 在不同保存温度及时间条件下絮体结构也发生了改变。显微观察到的结果显示, 4 °C 保存条件下的絮体结构未受到显著变化(图版 I), 死细胞比例增加也较为缓慢(图版 II)。25 °C 保存条件下的絮团随着保存时间的增加结构逐渐变得松散, 这可能是由于前 7 天絮团内细菌活力旺盛, 在之后的阶段, 微生物在没有营养物质的情况下利用自身物质维持生命活动, 最终导致细菌逐渐解体^[28], 死细胞比例增加。丝状菌的生成是由于絮体在密封状态下形成低溶解氧、低 pH 的环境^[29-30]。在冷冻条件下, 絮团结构受到破坏, 是因为冷冻条件下絮团中的细菌细胞破裂^[31], 所以显微镜下观察到絮体边缘模糊。

3.4 温度对絮团粒径变化的影响

25 °C 保存条件下的絮团平均体积粒径随着时间延长其粒径逐渐变小, 这是因为经过长时间的保存, 絮团内部微生物在缺乏营养和得不到氧气的情况下与外部微生物结合松散, 絮体颗粒内、外生物体分离, 导致粒径变小^[32], 并且较高的保存温度也会引起微生物较高的水解和内源性呼吸

速率, 导致微生物活性的快速丧失和絮团颗粒的快速解体^[15]。4 °C 保存条件下的絮团的体积平均粒径与保存前无显著差异 ($P>0.05$), 表明该条件下有利于维持絮体粒径的大小, 这是因为低温环境下可抑制微生物活性, 减缓絮团内部营养物质的消耗, 从而维持絮团颗粒在保存过程中的稳定性。-20 °C 保存条件下的絮团平均体积粒径随着时间延长逐渐变大, 这可能是由于在恶劣的冷冻环境下菌群聚集成团^[33], 也可能是因为絮团抵抗外界压力而分泌出大量高分子黏稠聚合物^[34], 从而导致粒径增大。此外絮团的硝化作用可能受到絮团粒径大小的影响, 在其他活性污泥粒径的研究中, 也表明粒径的变化会影响污泥的脱氮性能^[35]及稳定性^[36]。

4 结论

在 4 °C 条件下保存的絮团, 其氨氧化性能、亚硝态氮氧化性能都优于 25 和 -20 °C。-20 °C 条件下保存的絮团氨氧化性能几乎丧失, 亚硝态氮氧化性能仍有保留, 表明 NOB 的环境耐受能力比 AOB 更强。4 °C 条件下保存的絮团, 其形态结构和粒径较保存前均无显著变化。冷藏 (4 °C) 密封缺氧保存可作为生物絮团短期内 (≤ 28 d) 经济有效的保存方式。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Avnimelech Y. Biofloc technology: a practical guidebook[M]. 2nd ed. Baton Rouge: The World Aquaculture Society, 2012.
- [2] 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.
- [3] Liu W C, Du X Z, Tan H X, et al. Performance of a recirculating aquaculture system using biofloc biofilters with convertible water-treatment efficiencies[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 754: 141918.
- [4] 陈伟, 谭洪新, 罗国芝, 等. 构建硝化型生物絮凝系统中凡纳滨对虾养殖密度对水质与生长的影响[J]. *上海海洋大学学报*, 2019, 28(2): 247-256.
Chen W, Tan H X, Luo G Z, et al. Effects of stocking density on water quality and growth of *Litopenaeus van-*
中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- namei* during construction of nitrifying biofloc system[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2019, 28(2): 247-256 (in Chinese).
- [5] 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.
- [6] Correia E S, Wilkenfeld J S, Morris T C, *et al.* Intensive nursery production of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* using two commercial feeds with high and low protein content in a biofloc-dominated system[J]. *Aquacultural Engineering*, 2014, 59: 48-54.
- [7] 田道贺, 桂福坤, 李华, 等. 硝化型生物絮团的驯化培养[J]. *南方水产科学*, 2019, 15(4): 39-45.
Tian D H, Gui F K, Li H, *et al.* Domestication and cultivation of nitrifying bio-floc[J]. *South China Fisheries Science*, 2019, 15(4): 39-45 (in Chinese).
- [8] 刘文畅, 谭洪新, 罗国芝, 等. 碳源添加方式对循环水养殖系统中微生物悬浮生长反应器水处理的影响[J]. *水产学报*, 2019, 43(8): 1798-1807.
Liu W C, Tan H X, Luo G Z, *et al.* Effects of feeding methods of carbon sources on the water treatment of suspended growth reactors in a recirculating aquaculture system[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(8): 1798-1807 (in Chinese).
- [9] Liu W C, Ke H Y, Xie J, *et al.* Characterizing the water quality and microbial communities in different zones of a recirculating aquaculture system using biofloc biofilters[J]. *Aquaculture*, 2020, 529: 735624.
- [10] 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.
- [11] Adav S S, Lee D J, Tay J H. Activity and structure of stored aerobic granules[J]. *Environmental Technology*, 2007, 28(11): 1227-1235.
- [12] 钱飞跃, 王琰, 王建芳, 等. 长期储存亚硝化颗粒污泥的活化及菌群结构变化[J]. *中国环境科学*, 2016, 36(4): 1052-1058.
Qian F Y, Wang Y, Wang J F, *et al.* Reactivation performance of nitrosation granular sludge after long-term storage and microbial community variation[J]. *China Environmental Science*, 2016, 36(4): 1052-1058 (in Chinese).
- [13] 翁永根, 邢永, 张长新, 等. 3种重金属离子对海水中亚硝化、硝化作用的影响[J]. *大连水产学院学报*, 2006, 21(1): 51-54.
Weng Y G, Xing Y, Zhang C X, *et al.* Effects of three heavy metal ions on nitrosification and nitrification in sea water[J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2006, 21(1): 51-54 (in Chinese).
- [14] 杨韦玲, 胡佳杰, 胡宝兰. 抑制剂在氨氧化微生物研究中的应用[J]. *微生物学报*, 2018, 58(10): 1722-1731.
Yang W L, Hu J J, Hu B L. Application of inhibitors in research of ammonia oxidizing microorganisms[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(10): 1722-1731 (in Chinese).
- [15] Gao D W, Yuan X J, Liang H. Reactivation performance of aerobic granules under different storage strategies[J]. *Water Research*, 2012, 46(10): 3315-3322.
- [16] Xing B S, Guo Q, Jiang X Y, *et al.* Influence of preservation temperature on the characteristics of anaerobic ammonium oxidation (anammox) granular sludge[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(10): 4637-4649.
- [17] 张苗苗, 沈菊培, 贺纪正, 等. 硝化抑制剂的微生物抑制机理及其应用[J]. *农业环境科学学报*, 2014, 33(11): 2077-2083.
Zhang M M, Shen J P, He J Z, *et al.* Microbial mechanisms of nitrification inhibitors and their application[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2014, 33(11): 2077-2083 (in Chinese).
- [18] Liu Q S, Liu Y, Tay S T L, *et al.* Startup of pilot-scale aerobic granular sludge reactor by stored granules[J]. *Environmental Technology*, 2005, 26(12): 1363-1370.
- [19] Zhu J R, Wilderer P A. Effect of extended idle conditions on structure and activity of granular activated sludge[J]. *Water Research*, 2003, 37(9): 2013-2018.
- [20] 郑平, 冯孝善. 硝化作用的生化原理[J]. *微生物学通报*, 1999, 26(3): 215-217.
Zheng P, Feng X S. Biochemical principles of nitrification[J]. *Microbiology Bulletin*, 1999, 26(3): 215-217 (in Chinese).
- [21] Vogelsang C, Gollembiewski K, Østgaard K. Effect of preservation techniques on the regeneration of gel entrapped nitrifying sludge[J]. *Water Research*, 1999, 33(1): 164-168.

- [22] 汪彩华, 郑平, 唐崇俭, 等. 硝化污泥保藏特性的研究[J]. 环境科学学报, 2011, 31(3): 560-566.
Wang C H, Zheng P, Tang C J, *et al.* Influence of storage on the characteristics of nitrifying sludge[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2011, 31(3): 560-566 (in Chinese).
- [23] Tay J H, Liu Q S, Liu Y. Microscopic observation of aerobic granulation in sequential aerobic sludge blanket reactor[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2001, 91(1): 168-178.
- [24] 王建龙, 张子健, 吴伟伟. 好氧颗粒污泥的研究进展[J]. 环境科学学报, 2009, 29(3): 449-473.
Wang J L, Zhang Z J, Wu W W. Research advances in aerobic granular sludge[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2009, 29(3): 449-473 (in Chinese).
- [25] 罗国芝, 李文清, 陈佳捷, 等. 生物絮凝技术在我国水产养殖中的应用研究现状和发展趋势分析[J]. 中国水产, 2013(11): 64-67.
Luo G Z, Li W Q, Chen J J, *et al.* Analysis of the current situation and development trend of biofloc technology in aquaculture in China[J]. *China Fisheries*, 2013(11): 64-67 (in Chinese).
- [26] Awang N A, Shaaban G. Effect of reactor height/diameter ratio and organic loading rate on formation of aerobic granular sludge in sewage treatment[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2016, 112: 1-11.
- [27] 艾石基, 解庆林, 马丽丽, 等. 好氧颗粒污泥颗粒化影响因素及应用现状[J]. 环境科学与管理, 2009, 34(5): 64-68.
Ai S J, Xie Q L, Ma L L, *et al.* Factors affecting and application of aerobic granular sludge[J]. *Environmental Science and Management*, 2009, 34(5): 64-68 (in Chinese).
- [28] Malamis S, Katsou E, Frison N, *et al.* Start-up of the completely autotrophic nitrogen removal process using low activity anammox inoculum to treat low strength UASB effluent[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 148: 467-473.
- [29] 刘文畅, 罗国芝, 谭洪新, 等. 生物絮凝反应器对中试循环水养殖系统中污水的处理效果[J]. 农业工程学报, 2016, 32(8): 184-191.
Liu W C, Luo G Z, Tan H X, *et al.* Treatment efficiency of wastewater in pilot test of biofloc reactor in recirculating aquaculture systems[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2016, 32(8): 184-191 (in Chinese).
- [30] 王凤祥, 龙腾锐, 郭劲松. 活性污泥膨胀的影响因素及调控措施研究[J]. 重庆建筑大学学报, 2007, 29(1): 117-121.
Wang F X, Long T R, Guo J S. Study on factors affecting the activated sludge bulking and its control[J]. *Journal of Chongqing Jianzhu University*, 2007, 29(1): 117-121 (in Chinese).
- [31] Van Niftrik L, Geerts W J C, Van Donselaar E G, *et al.* Combined structural and chemical analysis of the anammoxosome: a membrane-bounded intracytoplasmic compartment in anammox bacteria[J]. *Journal of Structural Biology*, 2008, 161(3): 401-410.
- [32] 刘宏波, 杨昌柱, 濮文虹, 等. 好氧颗粒污泥活性恢复的试验研究[J]. 中国给水排水, 2008, 24(19): 16-19.
Liu H B, Yang C Z, Pu W H, *et al.* Experimental research on activity recovery of aerobic granular sludge[J]. *China Water & Wastewater*, 2008, 24(19): 16-19 (in Chinese).
- [33] Votyakova T V, Kaprelyants A S, Kell D B. Influence of viable cells on the resuscitation of dormant cells in *Micrococcus luteus* cultures held in an extended stationary phase: the population effect[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(9): 3284-3291.
- [34] Wang Z P, Liu L L, Yao J, *et al.* Effects of extracellular polymeric substances on aerobic granulation in sequencing batch reactors[J]. *Chemosphere*, 2006, 63(10): 1728-1735.
- [35] Di Bella G, Torregrossa M. Simultaneous nitrogen and organic carbon removal in aerobic granular sludge reactors operated with high dissolved oxygen concentration[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 142: 706-713.
- [36] Verawaty M, Tait S, Pijuan M, *et al.* Breakage and growth towards a stable aerobic granule size during the treatment of wastewater[J]. *Water Research*, 2013, 47(14): 5338-5349.

Effect of preservation temperature on the nitrification performance and morphological structure of bioflocs

JIANG Zejian¹, LIU Wenchang^{1,2*}, TAN Hongxin^{1,2,3*}, LUO Guozhi^{1,2,3}, SUN Dachuan^{1,2}

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

2. Shanghai Collaborative Innovation Center for Cultivating Elite Breeds and Green-culture of Aquaculture Animals, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. National Experimental Teaching Demonstration Centre for Aquatic Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: This study aimed to determine the optimal storage temperature for bioflocs. A One-Way experimental design was employed, where bioflocs were stored at room temperature (25 °C), refrigerated (4 °C) and frozen (−20 °C) for periods of 7, 14, 21 and 28 d. The nitrification performance of bioflocs declined under all three conditions as storage time increased. After 28 d, the ammonia oxidation rate at 4 °C was (0.16±0.10) mg/(L·h), significantly higher than the rates at 25 °C (0.08±0.09) mg/(L·h) and −20 °C (0.01±0.09) mg/(L·h). Bioflocs stored at −20 °C had almost no ammonia oxidation activity by day 7, with a 99.52% reduction from the initial rate. The nitrite oxidation rate at 4 °C after 28 d was (0.19±0.03) mg/(L·h), which was significantly higher than that of bioflocs stored at 25 °C (0.10±0.05) mg/(L·h) and −20 °C (0.14±0.02) mg/(L·h). Microscopic observation revealed that of bioflocs stored at 25 °C became looser, with a decrease in volume average size from (245.92±21.51) μm to (148.50±9.90) μm by day 28. Conversely, bioflocs stored at −20 °C increased in size from (245.92±21.51) μm to (310.82±29.67) μm. No significant changes in structure or particle size were observed for bioflocs stored at 4 °C. In conclusion, a storage temperature of 4 °C is recommended for bioflocs. This study provides insights into appropriate storage conditions and duration, which can inform the storage and reuse of bioflocs in practical applications.

Key words: bioflocs; nitrification performance; preservation; temperature

Corresponding authors: LIU Wenchang. E-mail: liuwenchang2012@126.com;

TAN Hongxin. E-mail: hxtan@shou.edu.cn

Funding projects: Sailing Project of Shanghai Science and Technology Commission (22YF1416400); Shanghai Aquaculture Engineering Technology Research Centre Capacity Enhancement Project (19DZ2284300)