

# 葡萄糖和盐度对卤虫生长、养殖系统生物絮团形成及其微生物多样性的影响\*

王 娇 马灌楠 邓元告 隋丽英<sup>①</sup>

(天津科技大学 天津市海洋资源与化学重点实验室 天津 300456)

**摘要** 在零换水卤虫养殖系统中,研究葡萄糖和盐度对卤虫 *Artemia franciscana* 生长、卤水中生物絮团形成、水质及其微生物多样性的影响。实验设四组,每组三个平行,分别在盐度为 50、100 和 150 的养殖水体中添加葡萄糖(添加量随着卤虫的生长逐渐增加从每天 12mg/L 到 37mg/L),对照组盐度为 50 且不添加葡萄糖。单位养殖水体为 1L,卤虫起始密度约为 1200ind/L,投喂浓缩杜氏藻 *Dunaliella viridis*,养殖周期为 20 天。结果显示,添加葡萄糖可以显著提高生物絮团体积,降低水中的铵盐、亚硝酸盐、硝酸盐和总氮水平,提高卤虫总生物量( $P<0.05$ )。但随着盐度升高,卤虫生物量显著降低( $P<0.05$ ),亚硝酸盐和总氮水平显著升高( $P<0.05$ ),絮团体积有所升高。另外,葡萄糖添加和盐度对卤虫粗蛋白和脂肪酸含量无显著影响( $P>0.05$ )。PCR-DGGE 分析表明, $\gamma$ -变形菌纲( $\gamma$ -proteobacterium)为生物絮团中优势菌群且以海洋细菌为主。与对照组相比,添加葡萄糖和升高盐度显著降低菌群丰富度指数( $P<0.05$ ),环境承载力下降。本研究结果为高盐环境条件下生物絮团的形成机理及其在卤虫人工养殖中的应用提供了参考。

**关键词** 卤虫养殖;碳源;盐度;生物絮团;细菌多样性

**中图分类号** doi: 10.11693/hyhz20140500147

生物絮团(Biofloc)是以异养微生物为主体,经生物絮凝作用结合水体中颗粒有机物、原生动物和藻类等形成的絮状物(Avnimelech, 1999; Hargreaves, 2006)。生物絮团技术(Biofloc techniques, BFT)通过调节搅拌强度、溶解氧、pH、温度、有机碳和有机物负荷率等,促进养殖体系中排泄物及残饵吸收和转化,减少水中氮含量,并将其转化为微生物蛋白供养殖动物摄食,使饵料得以循环利用(De Schryver *et al*, 2008; Crab *et al*, 2012)。在养殖水体中添加碳源,通过有效提高水中碳氮比,使其中以自养细菌为主的微生物区系转变为以异养细菌为主的区系。而异养细菌数量的提高,有利于生物絮团的形成(Avnimelech, 1999; Wilén *et al*, 2003; Schneider *et al*, 2005)。研究表明,采用生物絮团技术可显著促进杂交

罗非鱼(Avnimelech, 2006; Crab *et al*, 2009)、日本囊对虾 *Marsupenaeus japonicus*(Zhao *et al*, 2012)、凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei*(Burford *et al*, 2003; Hari *et al*, 2004, 2006; Schweitzer *et al*, 2013)和巴西褐对虾 *Farfantepenaeus brasiliensis*(Emerenciano *et al*, 2012)等水产动物的生长,提高产量,减少饲料投入。

卤虫(*Artemia*)广泛分布于内陆盐湖和日晒盐场蒸发池中,是盐田生态系统中的主要消费者和生态调节者,也是水产苗种极佳的鲜活饵料(Sorgeloos *et al*, 2001)。作为非选择性滤食性动物,卤虫一般摄食小于 50 $\mu$ m 的食物颗粒(D'Agostino, 1980)。与海水和淡水养殖环境相比,针对高盐环境下生物絮团的形成及其在卤虫养殖中应用的相关研究较少。Ronald 等(2013)和 Sui 等(2013)通过向养殖水体中添加木薯

\* 科技部国际科技合作计划项目, 2010DFA32300 号; 天津市自然科学基金重点项目, 13JCZDJC28700 号。王娇, 硕士研究生, E-mail: wangjiao0610@163.com

通讯作者: 隋丽英, 教授, E-mail: suily@tust.edu.cn

收稿日期: 2014-05-17, 收修改稿日期: 2014-09-09

粉、鸡粪和米糠等, 显著提高了卤虫成虫和卤虫卵产量。Toi 等(2013)通过向养殖水体中添加蔗糖和淀粉, 显著降低了单胞藻投喂量。同位素标记结果显示, 添加的碳源可被卤虫利用。

本研究在高盐环境下, 研究碳源添加和不同盐度对卤虫生长、卤水中生物絮团形成、水质及其细菌多样性的影响, 为生物絮团技术在高盐养殖环境下水产养殖中的应用提供理论依据, 为其在卤虫养殖和盐田生态调控中的应用提供数据支撑。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

养殖用水取自天津汉沽盐场结晶池, 卤水盐度 250, 经过消毒和过滤后, 用自来水稀释到所需盐度。实验所用卤虫品系为 *Artemia franciscana* (VinhChau strain)。卤虫卵于盐度 30 海水中孵化 20h, 孵化温度 (27±0.5)°C, 光照强度 1000lx, 适量充气。收集初孵卤虫无节幼体, 在盐度 50 和(24±0.5)°C 条件下暂养 5d, 适量充气。每天早晚投喂适量浓缩杜氏藻 *Dunaliella viridis*。大量培养的 *D. viridis* 采用高速冷冻离心机浓缩(6000r/min, 4°C, 10min, Beckman), 浓缩藻液在 4°C 下保存。

### 1.2 实验设计

本研究以葡萄糖为碳源。考虑到卤虫在盐田中的适宜生长盐度, 实验组盐度设定为 50、100 和 150, 分别表示为“50+Glu”、“100+Glu”和“150+Glu”, 对照组(Control)不添加葡萄糖且盐度为 50, 每组三个平行。单位养殖体系为 1L 锥形塑料瓶, 卤虫起始密度约为 1200ind/L。实验养殖条件与卤虫暂养条件相同, 实验周期为 20 天。每天向养殖水体中补充一次蒸馏水, 以维持盐度稳定。

*D. viridis*投喂量及葡萄糖添加量见表1, 碳氮比(C/N)设定为20。*D. viridis*投喂量为Vanhaecke等(1984)建议的最适投喂量的60%, 葡萄糖添加量参考Avnimelech(1999)提出的计算方法, 即

$$\Delta CH = (\text{Feed} \times N_{\text{feed}} \times N_{\text{excretion}}) / 0.05$$

式中,  $\Delta CH$ 为系统中碳水化合物的添加量; Feed为饲料投喂量;  $N_{\text{feed}}$ 为饲料中氮含量(40%);  $N_{\text{excretion}}$ 为养殖动物排氮量占饲料含氮量的比例(一般为50%); 0.05为常数。

### 1.3 指标测定

养殖过程中每天测定水体pH (Mettler Toledo FE20)

表 1 单胞藻 *Dunaliella viridis* 投喂量及葡萄糖添加量  
Tab.1 The feeding schedules of *Dunaliella viridis* and the amount of glucose addition

卤虫养殖天数(d)	杜氏藻( $10^8$ cell/(L·d))	葡萄糖(mg/(L·d))
7—8	5.04	12
9—10	6.30	17
11—12	7.56	21
13—14	8.82	25
15—16	10.08	29
17—18	11.34	33
19—20	12.60	37

和溶解氧(YSI DO200)。实验结束时用 100 目滤网收集卤虫, 除去杂质, 用蒸馏水洗净虫体表面盐分, 用滤纸吸去外部水分, 称取卤虫总生物量。将卤虫冷冻干燥, 用于生化组分的测定。将收获卤虫后的养殖水体沉降 4h, 倾掉上清, 将沉积物转入 Imhoff 管中, 再沉降 24h, 测定生物絮团体积(Biofloc volume, BFV) (Avnimelech, 2012)。从上清中取水 50mL, 分别采用重氮-偶氮法、锌镉还原法、次溴酸钠氧化法和过硫酸钾氧化法测定水体中亚硝酸盐、硝酸盐、铵盐和总氮浓度(GB/T12763.4-200X)。

卤虫总蛋白采用凯氏定氮法测定(GB 5009.5-2010)。卤虫脂肪酸的测定采用内标法, 内标脂肪酸为 C2:2 n-6。总脂肪抽提和脂肪酸甲酯化采用 Lepage 等(1984)提出的方法, 甲酯化脂肪酸(FAME)组成和含量用气相色谱测定(Shimatzu)。色谱条件: 毛细柱(CBP20-25-50, 50m×0.25mm×0.2μm), 载气为高纯氮气, 程序升温初始 180°C, 以 6°C/min 速率升至 240°C 保持 20min; 气化室温度 280°C; FID 检测器, 温度 280°C; 柱压 182.2kPa; 分配比率 20 : 1。

### 1.4 变性梯度凝胶电泳(DGGE)

实验结束后在无菌条件下采集生物絮团, 置于 -20°C 保存。取 500μL 絮团样本, 8000r 离心 10min, 用 DNA 提取试剂盒(Promega)提取基因组 DNA, 对细菌 V3 区域进行 16S rDNA 特异性扩增(Yu *et al*, 2004)。PCR 扩增引物 338F-GC: 5'-CGCCCCGCCGCCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCGCCCCGCCGCTACGGGAGGCAGCAG-3', 534R: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3' (Muyzer *et al*, 1993)。PCR 反应体系为: 10μL 10× PCR 缓冲液 (不含 MgCl<sub>2</sub>), 1.5mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 200μmol/L dNTP, 2.5U Taq DNA 聚合酶(Promega), 双向引物 0.5μmol/L, 400ng/μL 牛血清蛋白(Promega), 100ng DNA 模板, 加 PCR 水(Sigma)至 50μL。

PCR 扩增程序为: 94°C 预变性 5min, 变性 1min,

53°C 退火 1min, 72°C 延伸 1min, 30 个循环, 72°C 延伸 10min。使用 Bio-Rad DCodeTM 系统(Hercules)对扩增产物进行变性梯度凝胶电泳(DGGE) (Boon *et al*, 2002), 将 PCR 产物上样在变性梯度 45%—60%的变性凝胶孔内, 变性凝胶浓度为 8%(w/v)。电泳 16h, 温度 60°C, 电压 38V。电泳结束后用 1× Gel Red 核酸染液(1:10000 稀释) (FMC)染色 20min。采用 Bio-Rad ChemiDoc MP 成像系统(Hercules)获得 DGGE 图谱。

### 1.5 条带回收与序列比对

从 DGGE 凝胶上切下差异条带于无菌 PCR 水中捣碎, -20°C 过夜。使用无 GC 夹的 338F 和 518R 扩增引物对上清液进行 16S rDNA-PCR 扩增。PCR 扩增程序为 94°C 预变性 5min, 94°C 变性 1min, 53°C 退火 1min, 72°C 延伸 1min, 25 个循环, 72°C 延伸 10min (Boon *et al*, 2002)。用 1.5% 琼脂糖凝胶以 DNA marker DL-2000 为标准观察扩增片段所在位置。PCR 产物若被确认为在 DGGE 凝胶的相同位置, 则进行测序(华大基因公司), 测序结果参照 GenBank 进行序列 BLAST 比对。

### 1.6 数据分析

采用 SPSS19.0 软件对数据进行统计分析。统计分析前, 采用 Levene 法进行方差齐性检验, 当不满足齐性方差时, 对数据进行反正弦或平方根处理。采用单因子方差分析(One way ANOVA)对实验结果进行分析, 用 Tukey 法进行多重比较( $P < 0.05$ )。

DGGE 条带多样性用加权丰富度指数(Range-weighted richness, Rr)描述:  $Rr = (N^2 \times Dg)$  式中,  $N$  为 DGGE 图谱中总条带数,  $Dg$  为图谱第一条与最后一个条带之间的变性梯度(Marzorati *et al*, 2008)。

## 2 结果

### 2.1 添加葡萄糖和不同盐度对卤虫生物量的影响

添加葡萄糖对卤虫总生物量具有显著促进作用(图 1), 50+Glu 组卤虫生物量显著高于对照组, 分别为 682.5mg 和 228.4mg ( $P < 0.05$ )。随盐度的升高, 卤虫生物量显著减少, 50+Glu 组卤虫生物量显著高于 100+Glu 和 150+Glu, 分别为 297.9mg 和 271.5mg ( $P < 0.05$ )。

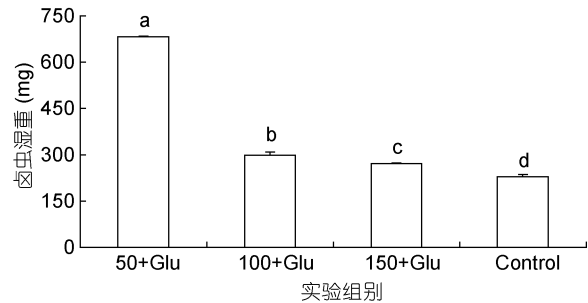


图 1 添加葡萄糖和盐度 50, 100 和 150 条件下卤虫总生物量

Fig. 1 Total biomass of *Artemia* cultured with glucose enrichment at salinities 50, 100, and 150  
不同上标字母表示单因子方差分析(One Way ANOVA)得出的显著差异( $P < 0.05$ )

### 2.2 添加葡萄糖和不同盐度对卤虫粗蛋白含量和脂肪酸组成的影响

添加葡萄糖和养殖盐度对卤虫成虫粗蛋白含量无显著影响( $P > 0.05$ , 表 2)。除 C16:0 含量明显高于对照组( $P < 0.05$ )外, 添加葡萄糖对其它饱和及不饱和脂肪酸含量无显著影响( $P > 0.05$ )。除 100+Glu 组 C22:0 显著高于其它组别外, 盐度变化对卤虫脂肪酸含量

表 2 添加葡萄糖和盐度 50, 100 和 150 条件下卤虫粗蛋白含量和脂肪酸组成  
Tab.2 Protein content and fatty acid profile of *Artemia* cultured with glucose enrichment at salinities 50, 100, and 150

实验组别	50+Glu	100+Glu	150+Glu	对照组	
粗蛋白(% dw)	59.49±0.92	59.09±2.32	54.99±2.31	53.95±2.86	
C14:0	0.59±0.05	-	0.75±0.10	-	
C14:1	1.18±0.48	1.85±0.52	0.56±0.14	1.62±0.61	
C15:0	0.54±0.14	-	0.57±0.04	0.45±0.32	
C16:0	10.09±1.63 <sup>ab</sup>	12.46±1.25 <sup>a</sup>	9.79±0.76 <sup>ab</sup>	7.83±0.88 <sup>b</sup>	
C16:1	4.82±0.87	4.98±0.17	3.97±0.60	3.89±0.22	
C17:0	0.89±0.06	-	0.62±0.05	0.82±0.32	
脂肪酸	C18:0	6.99±0.78	6.66±0.25	6.07±0.33	6.03±1.30
(mg/g dw)	C18:1	20.30±1.85	21.00±0.55	18.56±0.72	19.72±2.96
	C18:2	4.43±1.65	6.43±0.87	5.51±0.43	6.48±1.65
	C18:3	5.15±2.72	6.00±0.95	6.09±0.74	8.69±2.72
	C20:0	-	-	0.62±0.14	1.06±0.52
	C20:1	-	-	1.04±0.60	0.99±0.48
	C20:5	1.61±0.25	5.98±1.14	3.54±1.49	2.19±0.82
	C22:0	1.30±0.56 <sup>b</sup>	3.97±0.11 <sup>a</sup>	2.15±0.59 <sup>ab</sup>	1.63±0.43 <sup>b</sup>

不同上标字母表示单因子方差分析(One Way ANOVA)得出的显著差异( $P < 0.05$ )

均无显著影响( $P>0.05$ )。

### 2.3 添加葡萄糖和不同盐度对养殖系统中生物絮团体积的影响

添加葡萄糖对生物絮团形成有明显促进作用(图 2), 50+Glu 组絮团体积(BFV)显著高于对照组, 分别为 6.3mL 和 4.8mL ( $P<0.05$ )。随盐度升高, BFV 无显著差异, 100+Glu 组为 6.7mL, 150+Glu 组为 7.0mL ( $P>0.05$ )。

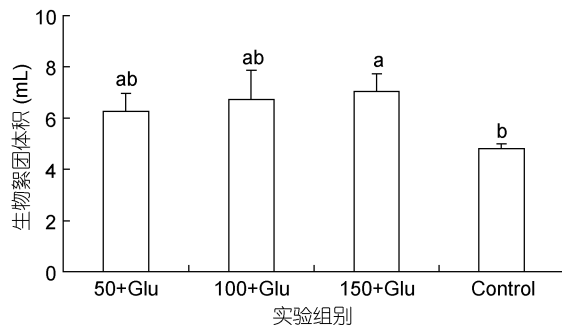


图 2 添加葡萄糖和盐度 50, 100 和 150 条件下生物絮团体积

Fig.2 Biofloc volume in the culture medium enriched with glucose at salinities 50, 100 and 150  
不同上标字母表示单因子方差分析得出的显著差异( $P<0.05$ )

### 2.4 添加葡萄糖和不同盐度对养殖系统中水质的影响

养殖过程中水体 pH 稳定在 7.86—8.03 之间, 溶解氧稳定在 6.6—7.1mg/L 之间。添加葡萄糖明显降低水中亚硝酸盐浓度(图 3a), 50+Glu 组亚硝酸盐浓度为

12.47 $\mu\text{mol/L}$ , 明显低于对照组 23.66 $\mu\text{mol/L}$  ( $P<0.05$ )。随盐度升高亚硝酸盐浓度升高, 50+Glu 组最低, 100+Glu 和 150+Glu 组分别为 20.02 $\mu\text{mol/L}$  和 25.62 $\mu\text{mol/L}$ , 但差异不显著( $P>0.05$ )。

添加葡萄糖明显降低水中硝酸盐浓度(图 3b), 50+Glu 组硝酸盐浓度为 87.47 $\mu\text{mol/L}$ , 明显低于对照组 117.59 $\mu\text{mol/L}$  ( $P<0.05$ )。硝酸盐浓度随着盐度升高有降低趋势, 50+Glu 最高, 100+Glu 和 150+Glu 组分别为 77.42 $\mu\text{mol/L}$  和 67.97 $\mu\text{mol/L}$ , 但差异不显著( $P>0.05$ )。

添加葡萄糖降低水中铵盐浓度(图 3c), 50+Glu 组铵盐浓度为 32.72 $\mu\text{mol/L}$ , 低于对照组 38.46 $\mu\text{mol/L}$ 。铵盐浓度随盐度升高而降低, 50+Glu 组铵盐浓度最高, 100+Glu 和 150+Glu 组分别为 17.14 $\mu\text{mol/L}$  和 14.58 $\mu\text{mol/L}$ , 但差异不显著( $P>0.05$ )。

添加葡萄糖明显降低水中总氮浓度(图 3d), 50+Glu 组总氮浓度为 232.26 $\mu\text{mol/L}$ , 明显低于对照组 629.89 $\mu\text{mol/L}$  ( $P<0.05$ )。总氮浓度随着盐度升高而升高, 50+Glu 最低, 100+Glu 和 150+Glu 组分别为 313.55 $\mu\text{mol/L}$  和 412.85 $\mu\text{mol/L}$ , 差异显著( $P<0.05$ )。

### 2.5 添加葡萄糖和不同盐度对生物絮团细菌多样性的影响

生物絮团基因组 16S rDNA PCR-DGGE 条带聚类分析表明, 同一实验组别平行样分别聚在一起, 相似度 $>85\%$ 。不同实验组别生物絮团的细菌组成为

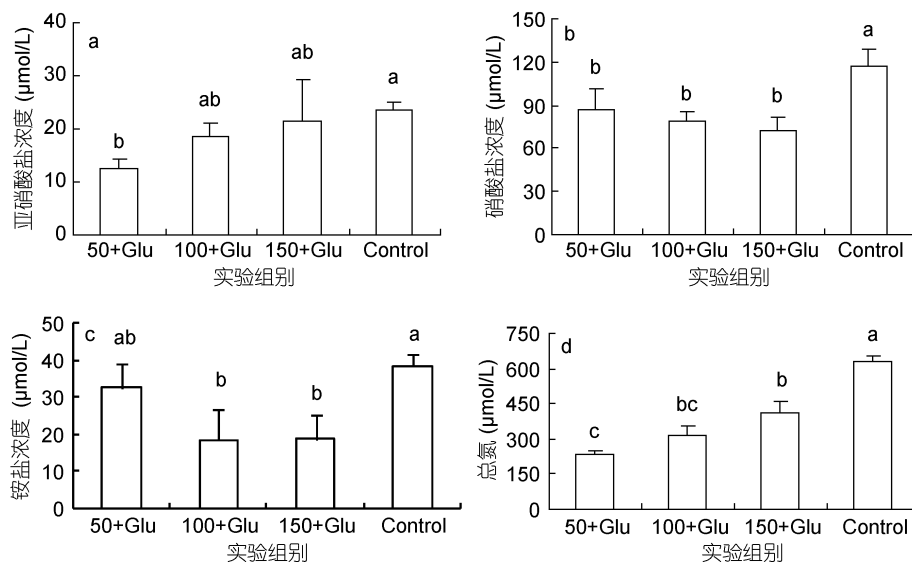


图 3 添加葡萄糖和盐度 50, 100 和 150 条件下水体中亚硝酸盐(图 3a)、硝酸盐(图 3b)、铵盐(图 3c)及总氮浓度(图 3d)

Fig.3 Concentrations of nitrite (a), nitrate (b), ammonium (c), and total nitrogen (d) in the culture volume enriched with glucose at salinities 50, 100, and 150  
不同上标字母表示单因子方差分析得出的显著差异( $P<0.05$ )

两大类, 分别是较高盐度(100 和 150)与较低盐度(50)的养殖体系, 相似性仅为 42%(见图 4)。其中盐度 100 与 150 的养殖体系相似性为 69%, 盐度 50 养殖体系中对照组与添加葡萄糖组的相似性为 60%。说明葡萄糖添加和盐度对生物絮团微生物区系均有影响, 但盐度的影响较为显著。

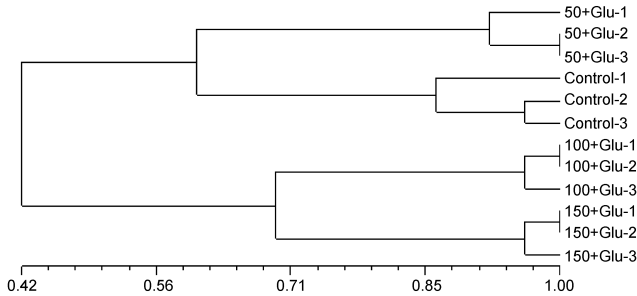


图 4 添加葡萄糖和盐度 50, 100 和 150 条件下基因组 16S rDNA PCR-DGGE 条带聚类分析

Fig.4 16S rDNA PCR-DGGE clustering analysis on bioflocs with glucose enrichment at salinities 50, 100, and 150

DGGE 目的条带基因片段的切割和序列比对结果见图 5 和表 3。BLAST 结果显示, 对照组的特异性条带较多。所有实验组别中  $\gamma$ -变形菌纲细菌( $\gamma$ -proteobacterium)为优势菌群, 条带 1、6 和 10 均为  $\gamma$ -proteobacterium, 相似性为 97%—99%(Liu *et al*, 2010); 条带 5 和 8 为海洋  $\gamma$ -proteobacterium, 相似性分别为 96%和 95% (Ben-Dov *et al*, 2009), 存在于较高盐度实验组中。条带 12 为  $\alpha$ -变形菌纲( $\alpha$ -proteobacterium), 相似性为 99% (Harwati *et al*, 2007)。条带 2、3、4、7、9 和 11 分别为海栖杆菌属 *Maritalea*, 根瘤菌属 *Rhizobiales*, 海杆菌属 *Marinobacter*, 冷弯菌属 *Psychroflexus*, 海岸单胞菌属 *Litorimonas* 和 *Maribacter*。条带 13 为不能培养的细菌克隆, 存在于酸性泥炭地中(Chen *et al*, 2008)。

根据 DGGE 图谱计算的细菌菌群丰富度指数( $R_r$ )见图 6。不添加碳源对照组  $R_r$  最高为 15.38, 添加葡萄糖的实验组中随盐度升高而显著降低, 分别为 10.10, 7.09 和 2.04( $P < 0.05$ )。

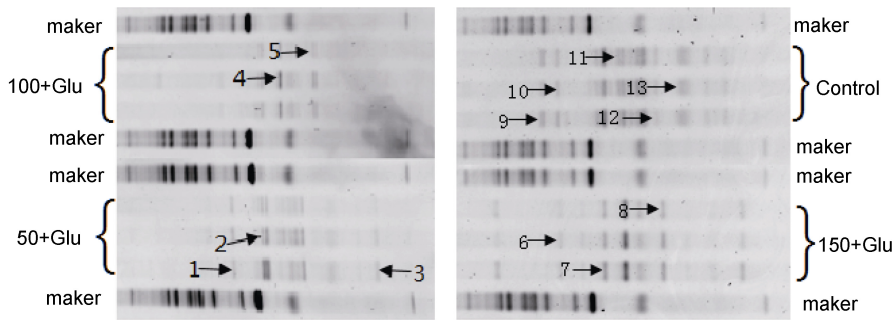


图 5 DGGE 凝胶割胶回收条带

Fig.5 Bands recovered from the DGGE gels

表 3 DGGE 凝胶割胶回收条带 16S rDNA-V3 序列与 GenBank 中最相近菌种的序列相似性比对

Tab.3 Similarity of 16S rDNA-V3 sequence recovered from the respective bands in DGGE gels to the closest relatives in GenBank database

条带号	GenBank 登录号	菌种名称	相似性(%)
Band 1	FJ999568.1	$\gamma$ -proteobacterium HLSB119	99
Band 2	JX418291.1	<i>Maritalea</i> sp. BAN8	98
Band 3	DQ272468.1	Rhizobiales bacterium ADC1	97
Band 4	FJ984873.1	<i>Marinobacter</i> sp. YCSA52	100
Band 5	DQ097285.1	Marine $\gamma$ -proteobacterium RS.Sph.011	96
Band 6	FJ999568.1	$\gamma$ -proteobacterium HLSB119	99
Band 7	JQ390292.1	<i>Psychroflexus</i> sp. MIC 1008	99
Band 8	DQ097285.1	Marine $\gamma$ -proteobacterium RS.Sph.011	95
Band 9	KC582601.1	<i>Litorimonas</i> sp. JNU-L075	98
Band 10	FJ999568.1	$\gamma$ -proteobacterium HLSB119	97
Band 11	JN642274.1	<i>Maribacter</i> sp. KJ4	98
Band 12	AB302385.1	$\alpha$ -proteobacterium B27 gene	99
Band 13	KC896684.1	Uncultured bacterium clone HL7711_P4B6	97

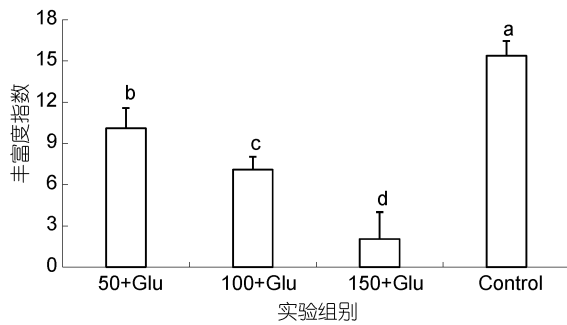


图 6 添加葡萄糖和盐度 50, 100 和 150 条件下生物絮团中细菌菌群的加权丰富度指数 ( $P < 0.05$ )

Fig. 6 Range-weighted richness of bioflocs with glucose enrichment at salinities 50, 100, and 150 ( $P < 0.05$ )

### 3 讨论

#### 3.1 碳源对生物絮团的形成和卤虫生长的影响

生物絮团对水体中的氮转化和利用起到至关重要的作用。在碳氮平衡的条件下, 源自养殖动物排泄物及残饵的氮的转化可通过藻类的光能自养、自养微生物的硝化作用和异养微生物的同化作用等途径实现(Hargreaves, 2006)。碳源过剩时( $C/N > 10$ ), 异养细菌对氮的固定能力是自养微生物的 10 倍, 因此添加碳水化合物或直接投放高碳饲料可促进异养细菌的生长, 将水体中更多的铵氮转化为微生物蛋白, 大大降低水中氮的浓度(Avnimelech, 1999; Wilén *et al.*, 2003; Schneider *et al.*, 2005)。碳源种类在很大程度上决定生物絮团的结构和稳定性(Oehmen *et al.*, 2005), 同时碳源的成本也决定着生物絮团的利用价值。实验室研究常用乙酸、甘油、葡萄糖、蔗糖、淀粉等作为碳源(Schneider *et al.*, 2005; Crab *et al.*, 2009; 邓应能等, 2012), 而糖浆、木薯粉、麦麸、玉米粉和高粱粉等廉价农业副产品是规模化养殖的首选(Crab *et al.*, 2009; Emerenciano *et al.*, 2012)。本研究中向卤虫养殖系统中添加葡萄糖, 与对照组相比, 显著提高了卤虫生物量和 BFV, 降低了水中无机氮和总氮水平, 说明添加葡萄糖有利于水中异养微生物大量繁殖, 将氮氮转化为微生物蛋白, 为卤虫提供充足的食物, 促进了卤虫的生长。该结果与前人针对罗非鱼(Crab *et al.*, 2009), 凡纳滨对虾(Xu *et al.*, 2012)和日本囊对虾(赵培, 2011)的研究结果一致。

#### 3.2 盐度对生物絮团形成和卤虫生长的影响

盐度作为主要环境生态因子对水生生物的生长有重要影响。高盐环境中藻类数量及种类减少, 同时卤虫需要消耗能量泵出细胞中的钠离子以保持体内恒定的渗透压, 不利于卤虫的生长和存活(Triantaphyllidis

*et al.*, 1995; 王婧等, 2012; 隋丽英等, 2013)。微生物在高盐环境中为平衡自身渗透压消耗大量能量, 新陈代谢速度降低, 生长缓慢, 对底物利用率降低(崔有为等, 2004; Crump *et al.*, 2004)。本研究中随盐度升高, 卤虫总生物量减少, 主要与盐度对卤虫生长和存活的胁迫作用有关。另外盐度升高使异养细菌生长缓慢, 对卤虫排泄物的分解和利用降低; 同时高盐条件下卤虫摄食量降低, 致使 BFV 增加。

盐度对水中氮浓度的影响与养殖动物的代谢及水中异养细菌有关。盐度升高, 卤虫生长缓慢, 新陈代谢下降, 水中无机氮水平较低。本研究中盐度升高, 总氮浓度升高, 但对无机氮水平的影响无明显差异, 可能由于异养细菌利用无机氮与卤虫排泄无机氮水平的能力相近, 但机理需作进一步研究。

黄凯等(2004)指出, 随着盐度升高, 凡纳滨对虾要失去一部分水分来平衡体内渗透压, 虾体蛋白质明显增加。而作为细胞膜磷脂双分子层的主要组成部分, 多不饱和脂肪酸(PUFA)和高不饱和脂肪酸(HUFA)的增加, 有利于鱼类和对虾细胞膜的柔韧性和渗透压调节(Watanabe, 1993; Palacio *et al.*, 2004)。本研究中不同盐度下, 卤虫虫体粗蛋白含量、PUFA 和 HUFA 组成变化不明显, 可能与卤虫作为广盐性甲壳动物本身具有较好的渗透压调节能力有关。细菌中缺乏 PUFA 和 HUFA, 16:1 n-7 和 18:1 n-7 为细菌主要的脂肪酸成分(Intriago *et al.*, 1993)。本研究中虽然没有显著差异, 但添加碳源和较低盐度条件下培养的卤虫中两种脂肪酸的含量均比对照和“Glu+150”组有所提高, 说明卤虫摄食和利用了生物絮团中的细菌(Toi *et al.*, 2013)。

#### 3.3 碳源和盐度对生物絮团细菌多样性的影响

Marzorati 等(2008)指出, 加权丰富度指数  $R_r$  反映环境中菌群丰富度和环境的承载力(Carrying capacity)。 $R_r < 10$  表明菌群丰富度低, 环境承载力差, 如污染的土壤或深海热泉生态系统;  $10 < R_r < 30$  表明菌群丰富度和环境承载力处于中等水平;  $R_r > 30$  则表明菌群丰富度高, 环境承载力大, 如活性污泥或种植土壤生态系统。本研究中碳源和盐度对絮团微生物多样性均有显著影响,  $R_r$  随着碳源的添加和盐度的升高而降低, 葡萄糖的添加有利于利用这种碳源的细菌生长, 而且较高盐度对耐盐和嗜盐细菌的生长有利, 因此菌群丰富度逐渐降低, 系统承载力减弱。

部分特异性 DGGE 条带胶回收测序结果表明, 变形菌门细菌  $\gamma$ -proteobacterium 在各实验组中均为优

势菌群。Zhao 等(2012)和夏耘等(2012)针对日本囊对虾和草鱼的研究均发现变形菌门细菌在生物絮团中占优势,但  $\alpha$ -proteobacterium 高于  $\gamma$ -proteobacterium。变形菌门细菌的主要功能是清除污水中的有机物(Wanger *et al*, 1995; Witzig *et al*, 2002)。本研究中  $\gamma$ -proteobacterium 占优势,表明该条件下形成的生物絮团对卤虫养殖水体具有有效的调节作用。

#### 4 结语

综上所述,在零换水卤虫养殖系统中,添加葡萄糖可显著促进生物絮团的形成,提高卤虫生物量,降低水体中的氮浓度。盐度升高,卤虫生物量降低,生物絮团体积显著增加,亚硝酸盐和总氮水平升高。添加碳源和不同盐度对卤虫的粗蛋白和脂肪酸含量无显著影响。生物絮团中以  $\gamma$ -变形菌纲细菌为优势菌群,添加碳源和升高盐度显著降低细菌菌群的加权丰富度指数(Rr)。今后可针对不同碳源和采用异养细菌调控等方面,深入研究高盐条件下生物絮团的形成机制。考虑到生产实际,应进一步实验农业和食品工业的副产品等低成本碳源在卤虫养殖中的应用前景。

**致谢** 本研究中生物絮团 DGGE 分析在比利时根特大学 Laboratory of Aquaculture & Artemia Reference Center 进行,得到 Prof. Gilbert van Stappen, Prof. Peter Bossier, Dr. Peter de Schryver 和 Dr. Yufeng Niu 的大力支持,天津农学院、天津市水产生态及养殖重点实验室王晓梅教授和天津科技大学王静副教授在 DGGE 条件摸索和数据处理等方面提供帮助,谨致谢忱。

#### 参 考 文 献

- 王 婧, 隋丽英, 贺 华等, 2012. 山东埭口盐场海欣分场卤虫种群生态调查. 生态学杂志, 31(11): 2848—2854
- 邓应能, 赵 培, 孙运忠等, 2012. 生物絮团在凡纳滨对虾封闭养殖试验中的形成条件及作用效果. 渔业科学进展, 33(2): 69—75
- 赵 培, 2011. 生物絮团技术在海水养殖中的研究与应用. 上海: 上海海洋大学博士学位论文
- 夏 耘, 郁二蒙, 谢 骏等, 2012. 基于 PCR-DGGE 技术分析生物絮团的细菌群落结构. 水产学报, 36(10): 1563—1571
- 黄 凯, 王 武, 卢 洁等, 2004. 盐度对南美白对虾的生长及生化成分的影响. 海洋科学, 28(9): 20—25
- 崔有为, 王淑莹, 宋学起等, 2004. NaCl 盐度对活性污泥处理系统的影响. 环境工程, 22(1): 19—21
- 隋丽英, 王 婧, 贺 华等, 2013. 盐度对不同卤虫品系存活和生殖性能的影响. 海洋科学, 37(11): 41—47
- Avnimelech Y, 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. Aquaculture, 176(3—4): 227—235
- Avnimelech Y, 2006. Bio-filters: the need for an new comprehensive approach. Aquaculture Engineering, 34(3): 172—178
- Avnimelech Y, 2012. Biofloc Technology. Baton Rouge, LA: World Aquaculture Society, 48
- Ben-Dov E, Kramarsky-Winter E, Kushmaro A, 2009. An in situ method for cultivating microorganisms using a double encapsulation technique. FEMS Microbiology Ecology, 68(3): 363—371
- Boon N, De Windt W, Verstraete W *et al*, 2002. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. FEMS Microbiology Ecology, 39(2): 101—112
- Burford M A, Thompson P J, McIntosh R P *et al*, 2003. Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. Aquaculture, 219(1—4): 393—411
- Chen Y, Dumont M G, Neufeld J D *et al*, 2008. Revealing the uncultivated majority: combining DNA stable-isotope probing, multiple displacement amplification and metagenomic analyses of uncultivated *Methylocystis* in acidic peatlands. Environmental Microbiology, 10(10): 2609—2622
- Crab R, Defoirdt T, Bossier P *et al*, 2012. Biofloc technology in aquaculture: beneficial effects and future challenges. Aquaculture, 356—357: 351—356
- Crab R, Kochva M, Verstraete W *et al*, 2009. Bio-flocs technology application in over-wintering of tilapia. Aquaculture Engineering, 40(3): 105—112
- Crump B C, Hopkinson C S, Sogin M L *et al*, 2004. Microbial biogeography along an estuarine salinity gradient: combined influences of bacterial growth and residence time. Applied and Environmental Microbiology, 70(3): 1494—1505
- D'agostino A S, 1980. The vital requirements of *Artemia*: physiology and nutrition. In: Persoon G, Sorgeloos P, Roels O *et al* eds. The Brine Shrimp *Artemia*. Vol 2, Physiology, Biochemistry, Molecular Biology. Wetteren: Universa Press, 55—82
- De Schryver P, Crab R, Defoirdt T *et al*, 2008. The basics of bio-flocs technology: the added value for aquaculture. Aquaculture, 277(3—4): 125—137
- Emerenciano M, Ballester E L C, Cavalli R O *et al*, 2012. Biofloc technology application as a food source in a limited water exchange nursery system for pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817). Aquaculture Research, 43(3): 447—457
- Hargreaves J A, 2006. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. Aquaculture Engineering, 34(3): 344—363
- Hari B, Madhusoodana K B, Varghese J T *et al*, 2004. Effects of carbohydrate addition on production in extensive shrimp culture systems. Aquaculture, 241(1—4): 179—194
- Hari B, Madhusoodana K B, Varghese J T *et al*, 2006. The effect of carbohydrate addition on water quality and the nitrogen budget in extensive shrimp culture systems. Aquaculture, 252(2—4): 248—263
- Harwati T U, Kasai Y K, Susilaningsih D *et al*, 2007. Characterization of diverse hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Indonesian Seawater. Microbes and Environments, 22(4): 412—415
- Intriago P, Jones D A, 1993. Bacteria as food for *Artemia*. Aquaculture, 113(1—2): 248—263

- Lepage G, Roy C C, 1984. Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *Journal of Lipid Research*, 25(12): 1391—1396
- Liu W C, Li C Q, Zhu P *et al*, 2010. Phylogenetic diversity of culturable fungi associated with two marine sponges: *Haliclona simulans* and *Gelliodes carnosa*, collected from the Hainan Island coastal waters of the South China Sea. *Fungal Diversity*, 42(1): 1—15
- Marzorati M, Wittebolle L, Boon N *et al*, 2008. How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. *Environmental Microbiology*, 10(6): 1571—1581
- Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinden A G, 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3): 695—700
- Oehmen A, Yuan Z, Blackall L L *et al*, 2005. Comparison of acetate and propionate uptake by polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 91(2): 162—168
- Palacios E, Bonilla A, Pérez A *et al*, 2004. Influence of highly unsaturated fatty acids on the responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae to low salinity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 299(2): 24—215
- Ronald L, Van Stappen G, Van Hoa N *et al*, 2013. Effect of carbon/nitrogen ratio manipulation in feed supplements on *Artemia* production and water quality in solar salt ponds in the Mekong Delta, Vietnam. *Aquaculture Research*, 45(12): 1906—1912, <http://dx.doi.org/10.1111/are.12135>
- Schneider O, Sereti V, Eding E H *et al*, 2005. Analysis of nutrient flows in integrated intensive aquaculture systems. *Aquaculture Engineering*, 32(3—4): 379—401
- Schveitzer R, Arantes R, Costódio P F S *et al*, 2013. Effect of different biofloc levels on microbial activity, water quality and performance of *Litopenaeus vannamei* in a tank system operated with no water exchange. *Aquaculture Engineering*, 56: 59—70
- Sorgeloos P, Dhert P, Candreva P, 2001. Use of the brine shrimp *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture*, 200 (1—2): 147—159
- Sui L Y, Wang J, Nguyen V H *et al*, 2013. Increased carbon and nitrogen supplementation in *Artemia* culture ponds results in higher cyst yields. *Aquaculture International*, 21(6): 1343—1354
- Toi H T, Boeckx P, Sorgeloos P *et al*, 2013. Bacteria contribute to *Artemia* nutrition in algae-limited conditions: A laboratory study. *Aquaculture*, 388—391: 1—7
- Triantaphyllidis G V, Pouloupoulou K, Abatzopoulos T J *et al*, 1995. International study on *Artemia* XLIX. Salinity effects on survival, maturity, growth, biometrics, reproductive and lifespan characteristics of a bisexual and a parthenogenetic population of *Artemia*. *Hydrobiologia*, 302(3): 215—227
- Vanhaecke P, Siddall S E, Sorgeloos P, 1984. International study on *Artemia* XXXII. Combined effects of temperature and salinity on the survival of *Artemia* of various geographical origin. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 80(3): 259—275
- Wanger M, Erhart R, Amann R *et al*, 1995. *In situ* identification of ammonia-oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 18(2): 251—264
- Watanabe T, 1993. Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. *Journal of the World Aquaculture Society*, 24(2): 152—161
- Wilén B M, Jin B, Lant P, 2003. The influence of key chemical constituents in activated sludge on surface and flocculating properties. *Water Research*, 37(9): 2127—2139
- Witzig R, Manz W, Rosenberger S *et al*, 2002. Microbiological aspects of a bioreactor with submerged membranes for aerobic treatment of municipal wastewater. *Water Research*, 36(2): 394—402
- Xu W J, Pan L Q, 2012. 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. *Aquaculture*, 356—357: 147—152
- Yu Z T, Morrison M, 2004. Comparisons of different hypervariable regions of *rrs* Genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8): 4800—4806
- Zhao P, Huang J, Wang X H *et al*, 2012. The application of bioflocs technology in high-intensive, zero exchange farming systems of *Marsupenaeus japonicus*. *Aquaculture*, 354—355: 97—106



## EFFECTS OF GLUCOSE AND SALINITY ON *ARTEMIA* GROWTH, BIOFLOC FORMATION, AND MICROBIAL DIVERSITY IN CULTURE

WANG Jiao, MA Guan-Nan, DENG Yuan-Gao, SUI Li-Ying

(Tianjin University of Science & Technology, Tianjin Key Laboratory of Marine Resources & Chemistry, Tianjin 300457, China)

**Abstract** We studied the effects of glucose addition at different salinities on *Artemia* growth, water quality, biofloc formation, and the microbial biodiversity in the culture without water exchange. Four treatments were set in triplicates. The amount of glucose addition was gradually increased in 20-day culture from 12mg/L to 37mg/L daily in salinities 50, 100 and 150. The control was in salinity 50 without glucose enrichment. *Artemia* were cultured in 1L-plastic cone at initial density of approximately 1200ind/L and fed the concentrated *Dunaliella viridis* at C/N ratio of 20. The results show that glucose enrichment promoted significantly the total *Artemia* biomass, increased the biofloc volume, and reduced the concentration of ammonium, nitrite, nitrate and total nitrogen in the culture medium ( $P<0.05$ ). On the other hand, increasing salinity decreased significantly the total *Artemia* biomass and increased the levels of nitrite and total nitrogen ( $P<0.05$ ), and biofloc volume. However, glucose addition and salinity showed no significant effect on crude protein content and fatty acid profile of *Artemia* ( $P>0.05$ ). 16S rDNA PCR-DGGE analysis showed that  $\gamma$ -proteobacterium was the predominant bacterial population in the bioflocs, and most of them were marine bacteria. Against the control, glucose addition and salinity reduced significantly the range-weighted richness ( $P<0.05$ ), thus negatively affected the carrying capacity of ecosystem. Therefore, results of this study may guide the utilization of biofloc in hypersaline condition, particularly in *Artemia* culture system.

**Key words** carbon source; salinity; bioflocs; *Artemia* culture; microbial diversity