

零换水条件下枯草芽胞杆菌和糖蜜 对水质和罗非鱼生长的影响

唐汇娟¹ 张轩豪¹ 孔重敏¹ 郝乐² 李博星¹ 余祥勇¹ 刘丽¹

1. 华南农业大学海洋学院/华南农业大学海洋生物研究中心, 广州 510640;

2. 广东省农科院畜牧兽医研究所, 广州 510640

摘要 在零换水条件下采用全池泼洒枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)菌液并添加甘蔗糖蜜作为碳源, 研究其对罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)生长性能和水质的影响。研究共设置4组: 空白组、单独添加糖蜜组(C组)、单独添加枯草芽胞杆菌组(Y组)、同时添加糖蜜和枯草芽胞杆菌组(C+Y组)。试验持续6周, 期间水温26~31℃, pH为6.5~7.5。研究结果显示, 糖蜜和枯草芽胞杆菌的添加显著降低了养殖水体中的溶氧含量, 糖蜜的添加提高了总氮的含量($P < 0.05$), 相对于空白组, 枯草芽胞杆菌和蜜糖的联合使用能显著降低水体亚硝酸盐氮、硝酸盐氮和反应性磷的含量。在整个养殖期间, 空白组和实验组浮游植物丰度都比较低($10^4 \sim 10^6$ 个/L)。但相对而言, 3个处理组浮游植物丰度在养殖后期要远远高于空白组, 以鞭毛藻(隐藻 *Cryptomonas* 和甲藻 *Gymnodinium*)和硅藻(Bacillariophyta)为主。枯草芽胞杆菌和碳源的添加在一定程度上提高了罗非鱼的存活率、生长率以及饲料转化效率, 但并未达到显著水平。

关键词 罗非鱼; 枯草芽胞杆菌; 糖蜜; 水质; 生长

中图分类号 S 917 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)03-0082-05

在当前的集约化养殖条件下, 高密度及大量投饵造成有害氮(氨氮和亚硝酸盐氮)积累的问题尤其突出, 导致养殖生物体质下降、病害频发^[1-2]。传统的精养系统主要通过大量的排水和换水来减除养殖池内有毒氮, 造成水资源的浪费和受纳水体的污染。生物絮团技术作为一种零换水的水产养殖技术, 其原理是借鉴城市污水活性污泥的处理方法, 通过向水环境中添加有机碳源来调节水体中的C/N以提高异养细菌的数量, 利用这些异养微生物同化养殖动物有毒害作用的氨氮和亚硝酸氮转化成可以被利用的絮团微生物蛋白, 能够为虾和鱼提供额外的饵料^[3-5]。芽胞杆菌可以迅速、有效地分解池底沉积的排泄物、残饵等有机废物, 降低水体中的亚硝酸盐、氨氮和硫化氢浓度, 被广泛应用于改善养殖水体的水质。Zokaefar等^[6]将芽胞杆菌加入养虾池中, 芽胞杆菌作用后能有效降低水中氨氮、亚硝酸盐氮和硝酸盐氮的含量, 提高对虾的特定生长率、饲料转化率。因此, 可以设想, 通过添加碳源形成生物絮团的

同时通过向水体中泼洒芽胞杆菌强化芽胞杆菌在絮团中的定植能加强对养殖水体的改善, 同时形成的絮团又能为养殖生物提供额外的饵料, 从而达到健康零排放的水产养殖。本研究以罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)为试验对象, 全池泼洒枯草芽胞杆菌菌液并添加甘蔗糖蜜作为碳源, 研究其对罗非鱼生长性能和水质影响, 为集约化、零换水条件下的健康养殖提供一定参考。

1 材料与方法

1.1 试验场地

试验用罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)由广州市罗非鱼良种厂提供, 规格一致, 大小为(18.6 ± 0.6) g/尾, 体质健壮。养殖试验前驯化2周。商品的罗非鱼饲料由海大集团提供, 粗蛋白含量为36.5%, 枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)来源于广州博仕奥水产饲料科技有限公司, 活性浓度是 10^{11} cfu/g, 将10 g 枯草芽胞杆菌用1 kg 红糖激活, 加

收稿日期: 2017-11-26

基金项目: 广东省渔业厅发展专项(A201601B02); 教育部留学回国人员启动基金; 华南农业大学大学生创新计划(国家级)以及温氏股份有限公司横向课题

唐汇娟, 博士, 副教授. 研究方向: 养殖水环境. E-mail: tanghj@scau.edu.cn

通信作者: 刘丽, 博士, 教授. 研究方向: 水产动物种质资源开发与利用. E-mail: liuli@scau.edu.cn

曝气自来水或养殖水 20 kg, 混合后浸泡 2 h 使用, 每周使用 3 次, 间隔 1 d, 全池泼洒, 此用量为 666.67 m² 的用量, 根据实际面积调整芽胞杆菌和红糖的用量。碳源为含碳量 70% 的稠密糖蜜溶液, 由海大集团提供。根据 Avnimelech^[3] 总结的生物絮团养殖系统的碳氮比公式计算得出碳源的添加量, 根据饲料碳氮含量以及投喂量调整糖蜜的添加量以控制各组的碳氮比 10:1, 具体的计算方法参考 Schryver 等^[7] 方法。

1.2 试验设计

试验共设 4 个处理: 空白组 (blank), 只投喂基础饲料; C 组 (molasses), 投喂饲料, 添加碳源; Y 组 (*Bacillus subtilis*), 投喂饲料, 泼洒枯草芽胞杆菌; Y+C 组 (*Bacillus subtilis* + molasses), 投喂饲料, 同时添加碳源和泼洒枯草芽胞杆菌。试验场地为广东省农科院畜牧兽医研究所室外水泥池 (长 2.4 m, 宽 1.8 m, 高 1.2 m), 一共 4 个水泥池, 每个水泥池为 1 个处理, 每池设 3 个小围隔作为重复, 试验用水为自来水。选取规格相近的 600 尾罗非鱼苗随机分成 12 组, 每天分别于 09:00 和 17:00 进行 2 次等量投喂, 投喂量占鱼体质量的 3%。每半月根据鱼体质量调整投喂量。试验从 8 月 17 日开始, 为期 55 d, 养殖期间 24 h 充氧, 不换水。

1.3 水样的采集处理

水样采集于试验开始的当天 (8 月 17 日), 之后每周采样 1 次, 一直到养殖试验结束 (10 月 15 日), 其中 9 月 8 日到 9 月 25 日之间因为暴雨频繁, 未采样。每次采样的时间是上午的 09:00, 采样点选择在对角线位置混合采样, 采集表层水样。现场用便携式仪器测定温度 (T)、溶氧 (DO) 和 pH。水样采集之后, 对水样进行过滤, 过滤的水样置于 4 °C 冰箱中, 24 h 之内全部测完。总氨 (TAN)、亚硝酸盐氮 (NO₂⁻-N)、硝酸盐氮 (NO₃⁻-N)、溶解态反应性磷 (SRP) 分别采用纳氏试剂分光光度法、N-(1-萘基)-乙二胺分光光度法、紫外分光光度法、磷钼蓝分光光

度法进行测定。水样采集的同时采集浮游植物样品, 用 1% 鲁哥试液固定, 静置 48 h 后浓缩, 于显微镜下对浮游植物进行鉴定及计数。

1.4 生长指标的测定方法

试验结束时先停止投喂 24 h, 然后进行采样。采样时每个围隔的所有鲫鱼都被捞出, 称总体质量、确定总条数, 以计算均质量。其中每个围隔中随机取 5 条测定鱼体质量和全长, 并计算增质量、饲料系数、存活率和肥满度, 具体的分析方法参考 Chen 等^[8] 方法。

1.5 统计方法

用 SPSS Statistics 22 软件对不同处理组的理化指标 DO、TAN、NO₂⁻-N、NO₃⁻-N 和 SRP 的平均值以及生长指标初质量、末质量、存活率、肥满度、增质量以及饲料系数进行单因素方差分析 (ANOVA), 如果差异显著 ($P < 0.05$), 对平均值进行 Duncan's 多重比较, 结果用平均值 ± 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 水质状况

在试验阶段, 鱼池水温在 26 ~ 31 °C, pH 在 6.5 ~ 7.5 变动。空白组 (blank)、碳组 (C)、芽胞杆菌组 (Y) 及碳加芽胞杆菌组 (Y+C) 在试验期间的平均溶氧含量依次为 4.3、3.3、3.4 和 3.5 mg/L, 空白组的溶氧含量要显著高于其他组 ($P < 0.05$)。试验期间, 空白组的总氨含量最低, 但与单纯添加芽胞杆菌组没有显著差异 ($P > 0.05$), 且这 2 组总氨平均值含量要显著低于添加碳源的 C 组与 C+Y 组 ($P < 0.05$)。试验期间 Y+C 组亚硝酸盐氮和硝酸盐氮含量最低, 亚硝酸盐氮的平均含量要显著低于 C 组和 Y 组 ($P < 0.05$), 但与空白组没有显著差异 ($P > 0.05$)。硝酸盐氮含量则显著低于空白组和 Y 组。反应性磷的平均值的含量也是 Y+C 组最低, 要显著低于其他 3 个实验组 (表 1)。

表 1 不同处理组的水质参数的多重比较

Table 1 Multiple comparisons of water quality parameters in different treatments

水质参数 Water quality parameters	空白组 Blank	C 组 Molasses	Y 组 <i>Bacillus subtilis</i>	(Y+C) 组 <i>Bacillus subtilis</i> + molasses
溶氧 DO	4.30 ± 0.12a	3.28 ± 0.18b	3.52 ± 0.11b	3.40 ± 0.11b
总氨 TAN	0.75 ± 0.17a	2.87 ± 0.44b	1.41 ± 0.31a	3.77 ± 0.43b
亚硝酸盐氮 NO ₂ ⁻ -N	0.34 ± 0.09bc	0.69 ± 0.15a	0.54 ± 0.15ab	0.17 ± 0.03c
硝酸盐氮 NO ₃ ⁻ -N	0.48 ± 0.08a	0.38 ± 0.08ab	0.48 ± 0.12a	0.20 ± 0.05b
可溶性反应性磷 SRP	0.57 ± 0.08a	0.40 ± 0.08ab	0.37 ± 0.06b	0.15 ± 0.02c

注 Note: 数值为 3 个重复的平均值 ± 标准误 Values represent mean ± MSE ($n = 3$) of three replicates. 数字旁不同字母表示不同处理差异显著 ($P < 0.05$) Different small letters mean significant difference among treatments ($P < 0.05$).

试验初期,浮游藻类种群的密度在 4 个处理中都保持比较低的水平,在空白处理组,较低的浮游植物丰度一直保持到试验结束(图 1),初期藻类以蓝藻门的色球藻属(*Chroococcus*)为主,试验末期主要以隐藻(*Cryptomonas*)占据优势。而在 3 个实验组,较低的浮游植物丰度维持了 4 周,在 10 月上旬,浮游植物的丰度迅速上升,在 C 组和 Y 组,隐藻成

为绝对的优势种,而在 Y+C 组中,浮游植物的优势主要由小环藻属 *Cyclotella*、舟形藻属 *Navicula* 等硅藻及裸甲藻 *Gymnodinium* 所组成。

2.2 不同处理对罗非鱼生长的影响

各处理组饵料系数低于空白组,增重率和存活率要高于空白组,但是各组的生长性能指标之间的差异均未达到显著水平($P>0.05$)(表 2)。

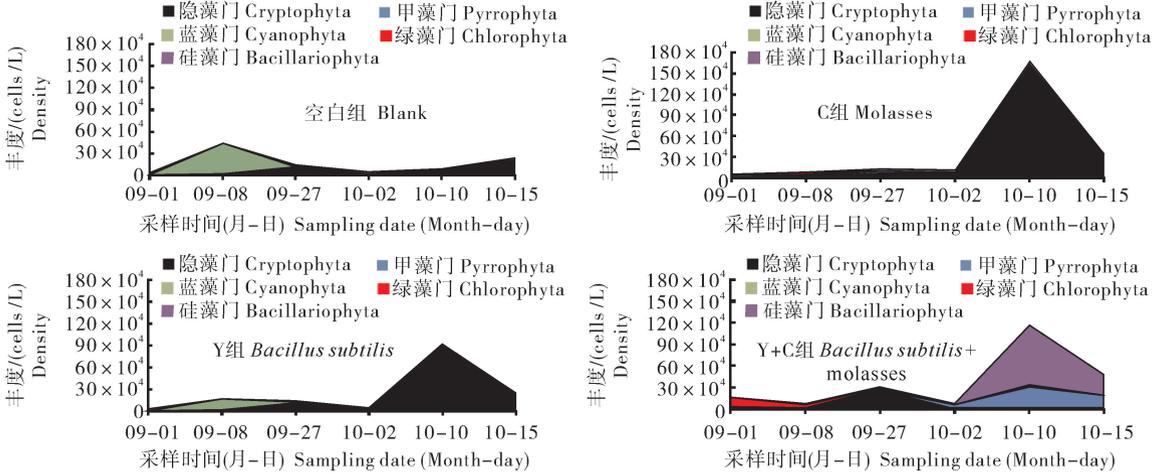


图 1 试验期间各处理组浮游植物丰度组成的动态

Fig.1 Dynamics in composition of phytoplankton density during the experimental period

表 2 不同处理组罗非鱼的生长情况

Table 2 Growth performance of Nile tilapia in different treatments

项目 Item	空白组 Blank	C 组 Molasses	Y 组 <i>Bacillus subtilis</i>	(Y+C) 组 <i>Bacillus subtilis</i> + molasses
初质量/g Initial weight	18.3±0.8	18.8±0.8	18.6±0.6	18.8±0.5
末质量/g Final weight	58.0±1.9	62.3±3.2	63.3±3.4	63.1±3.3
存活率/% Survive rate	89.0±2.0	95.0±1.0	95.0±1.0	96.0±1.0
肥满度/% Condition factor	3.0±0.0	3.1±0.0	3.2±0.1	3.4±0.1
增质量/% Weight gain	2.2±0.2	2.31±0.1	2.35±0.1	2.37±0.3
饵料系数 FCR	1.21±0.1	1.07±0.1	1.08±0.1	1.10±0.1

注:数值为 3 个重复的平均值±标准误 Note: Values represent mean±MSE ($n=3$) of three replicates.

3 讨论

3.1 不同处理对鱼池水质的影响

本次试验中,温度(26~31 °C)和 pH(6.5~7.5)处于罗非鱼生长的适宜范围。空白组溶氧含量显著高于 3 个实验组,这是因为碳源和芽胞杆菌的添加会增加水体的耗氧,导致实验组溶氧含量的下降,Pérez-Fuentes 等^[9]发现,当添加的糖蜜超过 0.12 g/L 时,导致溶氧由 3.2 mg/L 迅速下降至 1.5 mg/L。总氨是养殖水体中最重要的有害物质,渔业水质标准为水体中非离子氨不得超过 0.02 mg/L。总氨含量较高,其中加碳组(C 组、Y+C 组)氨氮含量平均值超过了 2.8 mg/L,但观察罗非鱼并未表现外在的不适,这主要是由于总氨的存在状态跟水体

pH 密切相关,当 pH 含量在 8 以下时,总氨以离子态的形式存在,并不会对罗非鱼产生直接的毒害作用^[10]。大量研究表明,碳源的添加能促进水体中异养微生物为主的生物絮团的形成^[3],而枯草芽胞杆菌的添加能为水体提供异养菌种的来源,生物絮团的形成以及芽胞杆菌能够有效降低水体氨氮^[11-13]。然而,在 Dibyendu 等^[14]、Mansour 等^[15]的研究中,添加碳源的生物絮团组总氨的含量要显著高于空白组,这与本研究的结果一致,各处理组总氨含量显著高于空白组,并且以 Y+C 组氨氮含量最高。亚硝酸盐氮是总氨不完全氧化的中间产物,而硝酸盐氮是总氨和亚硝酸盐硝化作用的最终产物。在本试验中,氨氮含量最高的 Y+C 组亚硝酸盐氮和硝酸盐氮含量最低,氨氮含量较低的空白组其亚硝酸盐和

硝酸盐氮含量较高,这表明在3个实验组(尤其是Y+C组)中氨氮的氧化受阻。氨的氧化作用主要受到硝化细菌的影响,一般在生物絮团养殖中,硝化作用不占主导地位^[16],并且硝化细菌为好氧菌,需要消耗大量氧气,而在本研究中,处理组溶氧的平均含量均不超过4 mg/L,跟其他类似的养殖系统^[11-12]相比,溶氧含量过低,也不利于耗氧的异养细菌对氨氮的利用,因此,在本次养殖试验中,无论是在空白组和处理组,溶解态的无机氮都主要以氨氮的形式存在。

在本研究中,虽然可利用的氮磷营养盐含量很高,但是浮游藻类的丰度并不高,尤其在试验开始的4周里,浮游植物总丰度大约为 10^5 个/L,远远低于Martins等^[17]报道的对虾絮团养殖水体,其浮游植物总丰度超过了 10^8 个/L。相对空白组,各处理组浮游植物的丰度在试验的后期达到高峰(10^6 个/L),远高于空白组,且主要以鞭毛藻(隐藻和甲藻)和硅藻为主,鞭毛藻一般为混合营养,在有机质含量较高的水体中容易占据优势,碳源添加和伴随着芽胞杆菌而带入的有机碳提高了3个实验组有机质的含量,导致隐藻和甲藻丰度升高。但整体而言,本次试验中浮游植物的丰度偏低。藻类的丰度主要受营养盐水平、水温、光照等因素的影响,但在本次试验中,营养和光照充足,温度适宜。藻类丰度较低主要由于试验用水为自来水,并且在试验之初进行了水体和鱼体消毒,导致养殖水体藻种缺乏,藻类种群难以建立进而因光合作用不足引起溶氧含量偏低。

3.2 不同处理对罗非鱼生长的影响

枯草芽胞杆菌能够提高增重率,减小饵料系数,主要是因为其菌体本身含有丰富的蛋白质,可以被鱼体直接食用,也能产生胞外酶(蛋白酶、脂肪酶以及淀粉酶等),提高鱼体消化率。潘康成等^[18]在鲤的养殖试验中,饲料添加0.1%枯草芽胞杆菌对于其生长具有明显的促进作用。周洪琪等^[19]在异育银鲫的养殖中,枯草芽胞杆菌在饲料中浓度不同,造成各组间生长显著不同。夏耘等^[20]和孙振等^[21]研究发现,滤食性的虾类能够有效利用养殖水体中的生物絮团,降低饵料系数,提高生长率。C组、Y+C组、Y组在存活率、肥满度、增重率以及饲料利用率方面均比其他组要高,饵料系数较低,因而它们的饲料利用率相对较高,3个实验组较高的浮游植物丰度可能起到了补充饵料的作用。但生长指标并未

达到显著水平($P>0.05$),添加碳源和芽胞杆菌促进生长的效果不明显。

综上所述,在罗非鱼养殖水体中泼洒枯草芽胞杆菌和添加碳源的生物絮团技术虽然被广泛地报道能降低水体氨氮和亚硝酸盐的含量,改善水质,并且通过产生絮团给罗非鱼提供额外的饵料从而促进罗非鱼的生长,但是在本研究中效果并不显著,其原因可能主要在于养殖水泥池中溶氧含量相对不足,不利于异养菌的生长以及对氨氮和亚硝酸盐氮的利用。在本系统中,由于早期水体消毒导致水体浮游植物种源缺乏,浮游植物丰度过低,光合作用强度不够,所以水体的溶氧很大程度上依赖于增氧设备。因此,通过人工或天然的手段增加水体溶氧可能是生物絮团系统成败的关键。

参 考 文 献

- [1] 方金龙.氨氮和亚硝基氮胁迫下凡纳滨对虾对WSSV的易感性研究[D].上海:上海海洋大学,2016.
- [2] GUTIERREZ-WING M T, MALONE R. Biological filters in aquaculture: trends and research directions for freshwater and marine applications[J]. Aquacultural engineering, 2006, 34(3): 163-171.
- [3] AVNIMELECH Y. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems[J]. Aquaculture, 1999, 176(3): 227-235.
- [4] CRAB R, LAMBERT A, DEFOIRDT T, et al. The application of bioflocs technology to protect brine shrimp (*Artemia franciscana*) from pathogenic *Vibrio harveyi*[J]. Journal of applied microbiology, 2010, 109(5): 1643-1649.
- [5] CRAB R, DEFOIRDT T, BOSSIER P. Biofloc technology in aquaculture: beneficial effects and future challenges[J]. Aquaculture, 2012, 356/357: 351-356.
- [6] ZOKAEIFAR H, BABAIE N, SAAD C R, et al. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. Fish & shellfish immunology, 2014, 36(1): 68-74.
- [7] SCHRYVER P, CRAB R, DEFOIRDT T, et al. The basics of bioflocs technology: the added value for aquaculture[J]. Aquaculture, 2008, 277: 125-137.
- [8] CHEN M H, SUN Y, KONG C M, et al. Effect of dietary phosphorus levels on growth and body composition of crucian carp, *Carassius auratus* under indoor and outdoor experiments [J]. Aquacult Nutr, 2017, 23: 702-709.
- [9] PEREZ-FUENTES J A, HERNANDEZ-VERGARA M P, PEREZ-ROSTRO C L, et al. C:N ratios affect nitrogen removal and production of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised in a biofloc

- system under high density cultivation [J]. *Aquaculture*, 2016, 452: 247-251.
- [10] 徐杨. 尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 对氨氮和亚硝酸盐氮胁迫的生理响应 [D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- [11] SCHNEIDER O, SERETI V, EDING E H, et al. Molasses as C source for heterotrophic bacteria production on solid fish waste [J]. *Aquaculture*, 2006, 61: 1239-1248.
- [12] RAJKUMAR M, PANDEY P K, ARAVIND R, et al. Effect of different biofloc system on water quality, biofloc composition and growth performance in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) [J]. *Aquaculture research*, 2016, 47: 3432-3444.
- [13] DENG M, CHEN J, GOU J W, et al. The effect of different carbon sources on water quality, microbial community and structure of biofloc systems [J]. *Aquaculture*, 2018, 482: 103-110.
- [14] DIBYENDU K, MITILA D, PRASENJIT P, et al. Biofloc technology application in indoor culture of *Labeo rohita* (Hamilton, 1822) fingerlings: the effects on inorganic nitrogen control, growth and immunity [J]. *Chemosphere*, 2017, 182: 8-14.
- [15] MANSOUR A T, ANGELES E M. Effects of carbon sources and plant protein levels in a biofloc system on growth performance, and the immune and antioxidant status of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Fish & shellfish immunology*, 2017, 64: 202-209.
- [16] BURFORD M A, THOMPSON P J, MCINTOSH R P, et al. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero-exchange system [J]. *Aquaculture*, 2004, 232(1/2/3/4): 525-537.
- [17] MARTINS T G, ODEBRECHT C, JENSEN L V. The contribution of diatoms to bioflocs lipid content and the performance of juvenile *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in a BFT culture system [J]. *Aquaculture research*, 2016, 47: 1315-1326.
- [18] 潘康成, 何明清, 刘克琳. 微生物添加剂对鲤鱼生长和消化酶活性的影响研究 [J]. *饲料工业*, 1997(10): 42-43.
- [19] 周洪琪, 邱小琼, 华雪铭. 水产动物的营养与免疫、抗病能力 [J]. *内陆水产*, 2000(5): 20-21.
- [20] 夏耘, 邱立疆, 郁二蒙, 等. 生物絮团培养过程中养殖水体水质因子及原核与真核微生物的动态变化 [J]. *中国水产科学*, 2014, 21(1): 75-83.
- [21] 孙振, 王秀华, 黄捷. 一种微生物絮团的生化分析及其对凡纳滨对虾免疫力的影响 [J]. *水产学报*, 2013, 37(3): 473-480.

Effects of *Bacillus subtilis* and molasses on water quality and growth of tilapia under zero-water exchange

TANG Huijuan¹ ZHANG Xuanhao¹ KONG Chongmin¹
HAO Le² LI Boxing¹ YU Xiangyong¹ LIU Li¹

1. College of Marine Sciences, South China Agricultural University /
Marine Biology Research Center, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China ;
2. Institute of Animal Health, Guangdong Academy of Agricultural Sciences,
Guangzhou 510640, China

Abstract This study was carried out to evaluate the effects of *Bacillus subtilis* and molasses on water quality and growth of tilapia (*Oreochromis niloticus*) under zero-water exchange. Four experimental groups including treatments with molasses alone (C), *Bacillus subtilis* alone (Y), molasses and *Bacillus subtilis* (C+Y) and the negative blank were designed. During the experiment, water temperature ranged from 26 to 31 °C and pH ranged from 6.5 to 7.5. The mean dissolved oxygen was significantly higher in the blank than the 3 treatments ($P < 0.05$). The groups with utilization of molasses alone and together with *B. subtilis* had significantly higher total ammonia contents ($P < 0.05$). Combined utilization of molasses and *B. subtilis* showed the lowest level of nitrite, nitrate nitrogen and soluble reactive phosphorus. Overall, phytoplankton density in all groups was rather low (10^4 - 10^6 cells/L), but the three treatments showed higher phytoplankton density than the blank during the late period of the experiment. Survival rate, growth rate of tilapia and feed efficiency were higher in the 3 treatments than that in the blank, but the difference is not significant ($P > 0.05$).

Keywords *Oreochromis niloticus*; *Bacillus subtilis*; molasses; water quality; growth

(责任编辑: 边书京)