

# 循环水养殖系统 (RAS) 生物载体上微生物群落结构变化分析

张海耿<sup>1,2</sup>, 马绍赛<sup>2\*</sup>, 李秋芬<sup>2</sup>, 傅雪军<sup>1,2</sup>, 张艳<sup>2</sup>, 曲克明<sup>2</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 山东省渔业资源与生态环境重点实验室, 青岛 266071)

**摘要:**为研究循环水养殖系统(recirculating aquaculture systems,RAS)生物滤池挂膜及运行过程中生物载体上微生物群落结构的变化及其脱氮机制,采用传统微生物培养方法,对不同时期生物载体上的异养细菌、氨氧化细菌及硝化菌进行培养计数.并通过变性梯度凝胶电泳技术,对细菌的 16S rDNA V3 可变区的 PCR 扩增片段进行分离,分析了所得到的细菌群落特征 DNA 指纹图谱,对其中的优势菌属使用序列数据进行同源性分析并建立系统发育树.结果表明,随着时间的推移,3 类细菌的数量都呈现出先增加后逐渐降低直至达到稳定的趋势.各个时期生物载体上微生物群落的组成非常丰富,Shannon 指数分别为 1.53、1.44、1.57、1.08、1.27 和 1.30.不同时期生物载体上微生物的种类有一定的变化,但 2 个相邻时期的  $C_s$  值(相似性指数)都比较高,说明微生物群落的变化与演替是缓慢而有规律的.生物载体上存在多类细菌共同作用于养殖水体污染物的去除,出水水质能达到高密度养殖的要求,其主要优势种群以 Proteobacteria 和 Flavobacteria 为主,分离鉴定出了亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)及黄杆菌(Flavobacteriaceae bacterium)等兼性厌氧细菌,表明生物滤池中可能同时存在硝化和脱氮途径.

**关键词:**生物载体;生物挂膜;微生物群落结构;循环水养殖系统(RAS);PCR-DGGE

中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2011)01-0231-09

## Analysis of the Changes of Microbial Community Structure on Bio-carrier of Recirculating Aquaculture Systems(RAS)

ZHANG Hai-geng<sup>1,2</sup>, MA Shao-sai<sup>2</sup>, LI Qiu-fen<sup>2</sup>, FU Xue-jun<sup>1,2</sup>, ZHANG Yan<sup>2</sup>, QU Ke-ming<sup>2</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Shandong Provincial Key Laboratory of Fishery Resources and Environment, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Qingdao 266071, China)

**Abstract:**In order to study the variation of microbial community structure and the mechanism of denitrification on bio-carrier in recirculating aquaculture systems(RAS) during the periods of bio-film formation and operation the systems, traditional microbiological methods were applied to count the quantity of heterotrophic bacteria, ammonia oxidize bacteria and nitrite oxidize bacteria. The amplified products of variable V3 region of bacterial 16S rDNA were separated by using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). And bacterial community DNA fingerprint was obtained. The sequences retrieved from the DGGE bands were used for homology analysis and construction of phylogenetic tree. It presented a trend that the quantity of the three types of bacteria increased gradually to a top and then fallen slowly to a stable level. The composition of microbial community of bio-carrier was very abundant in all periods, and the Shannon index was 1.53, 1.44, 1.57, 1.08, 1.27 and 1.30, respectively. During different periods, there was a certain shift in the microbial community structure, while the  $C_s$  value(similar index) in two adjacent periods was high, indicating the variation and succession of the microbial community was slow and regular. Several bacteria had an effect on removal of pollutants for farming water and the effluent water quality could meet the requirements of high-density culture. Among them, Proteobacteria and Flavobacteria were main communities. The *Nitrosomonas* and some other facultative anaerobic bacteria(Flavobacteriaceae bacterium) were identified, which indicated that there may be coexisted pathways of nitrification and denitrification in bio-filter.

**Key words:**bio-carrier; bio-film formation; microbial community structure; recirculating aquaculture systems(RAS); PCR-DGGE

循环水养殖系统(RAS)因其具有高效、可控、节水省地、对环境污染小等特点,正逐渐在世界各国水产养殖业中得到重视和应用,它汇集水产养殖学、微生物学、环境科学、信息与计算机科学等众多学科知识于一体,是未来水产养殖业可持续发展的主要方向之一. RAS 中水处理单元之一的生物滤池对控制

整个系统中的有机物、 $\text{NH}_4^+$ -N、 $\text{NO}_2^-$ -N 和  $\text{NO}_3^-$ -N 浓

收稿日期:2010-03-31;修订日期:2010-06-17

基金项目:国家科技支撑计划项目(2006BAD09A03);国家高技术研究发展计划(863)项目(2006AA100305)

作者简介:张海耿(1986~),男,硕士研究生,主要研究方向为循环水养殖及水处理,E-mail: zhanghaigeng1986@126.com

\* 通讯联系人, E-mail: mass@ysfri.ac.cn

度起着关键作用<sup>[1]</sup>,而生物滤池里生物膜的培养与维护是整个系统有效运行的重要环节,也是水处理研究中的难点和热点.近年来国内外的一些学者对RAS的构建进行了大量的研究,对各个水处理单元的工艺设计与具体参数也有了深入的认识<sup>[2-4]</sup>.但对于RAS运行时生物滤池里的微生物群落结构的研究报道较少,而生物膜上各时期细菌的群落结构变化和代谢情况与养殖循环水中营养物质的去除效果是紧密相关的.现代分子生物学为深入研究环境中的微生物提供了先进的技术手段,其中变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)技术通过不依赖分离培养的核酸信息来检测微生物群落的复杂性,已被广泛地用于比较微生物群落的多样性和监视种群动态<sup>[5-7]</sup>.运用此技术研究RAS生物滤池中微生物群落的报道还很鲜见.本研究采用微生物传统培养方法并结合PCR-DGGE技术对RAS生物膜各个时期的微生物群落结构进行了分析,旨在摸清RAS生物载体上微生物群落结构变化、种类及作用,以期为RAS生物膜的维持及

其高效运行提供依据和保障.

## 1 材料与方 法

### 1.1 RAS 处理工艺

封闭RAS由山东海阳市黄海水产有限公司2008年改建而成,其水处理工艺流程如图1所示,由养鱼池、微滤机、臭氧-蛋白质分离器、生物滤池、紫外线消毒、高效液态氧及水质在线监测七大部分组成.其中生物滤池内均匀悬挂生物载体,该载体是利用化学纤维丝条(直径为0.5 mm,比表面积约为 $360\text{ m}^2/\text{m}^3$ )加工而成,形似毛刷,具有弹性,不仅能使自然微生物均匀地附着在每一根丝条上,而且能使氧气、水、自然微生物之间充分接触,获得较大的比表面积.系统运行前利用养鱼水中的自然微生物辅助一定的微生态制剂及营养盐进行生物挂膜.由于养鱼池水体蒸发及排污等均会导致系统内水体的损失,因此,每天需补充总水体10%的水量,以保持系统水位的平衡和稳定.

### 1.2 样品的采集

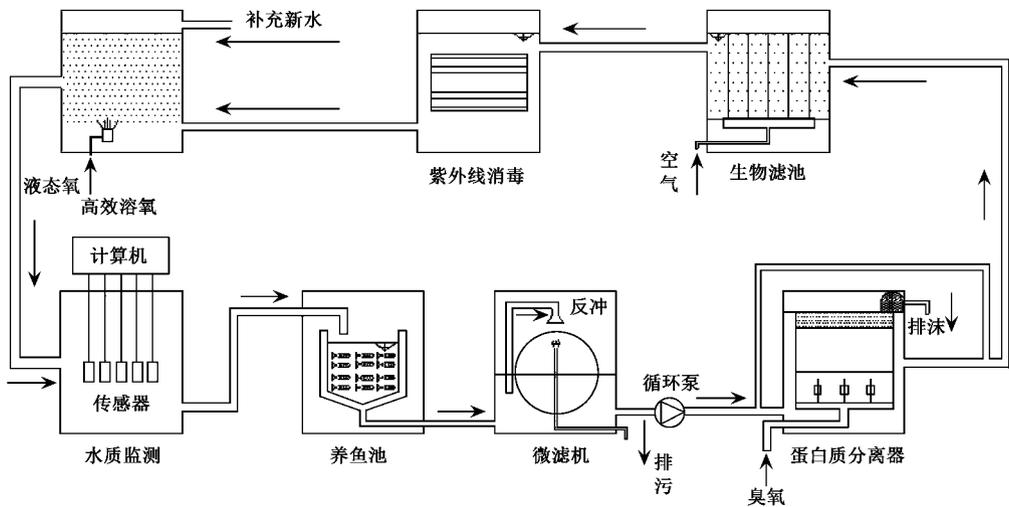


图1 封闭循环水养殖系统水处理工艺流程

Fig.1 Water treatment process of closed recirculating aquaculture system

从生物挂膜开始,每隔1周在生物滤池中剪取2份10 g左右的生物载体,放入50 mL离心管中,并立即存放于冰盒,带回实验室,一份在48 h内将菌种接种到培养基上,另一份暂时存放于 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱,等样品全采集完了一起提取基因组总DNA.同时定期剪取生物载体在显微镜下观察挂膜情况.所用取样器具均进行了灭菌处理.

样品共采集6次,生物膜形成过程期间4次,编号为A1~A4;生物膜成熟后,在循环水系统运行期

间取样2次,编号为B1、B2.

### 1.3 细菌的培养计数

异养细菌的培养采用平板涂布法(2216E培养基)<sup>[8]</sup>, $28^{\circ}\text{C}$ 下培养48 h后计数.氨氧化细菌和硝化细菌的培养采用MPN法计数,先将样品放于装有90 mL无菌陈海水的玻璃瓶中,充分振荡混匀,然后再逐级稀释4个浓度梯度,每个梯度设置5个平行.取1 mL稀释液加入到装有氨氧化细菌培养基和硝化细菌培养基<sup>[8]</sup>的试管中, $28^{\circ}\text{C}$ 暗培养28 d,用Griesst

和二苯胺试剂进行检测,根据检测结果查 MPN 表<sup>[9]</sup>,然后推算每 g 生物载体上细菌的数量。

#### 1.4 生物膜总 DNA 的提取与纯化

采集的生物载体样品解冻后,加入 5 mL 灭菌蒸馏水,高速涡旋振荡 5 min;加入 1 mL 250 mmol/L Tris-HCl(含 100 mg 溶菌酶)和 4 mL DNA 提取液(100 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L EDTA, 100 mmol/L Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 1.5 mol/L NaCl, pH 8.0);30℃ 振荡 30 min;37℃ 再振荡 30 min;加入 20 μL 蛋白酶 K(100 mg/mL),37℃ 振荡 1 h;加入 20% 的 SDS 溶液 100 μL,85℃ 水浴 30 min,每 10 min 轻轻颠倒 3 次;5 800 r/min,室温离心 15 min,取上清液于另一 50 mL 离心管中;加入 1/2 体积的 7.5 mol/L 乙酸铵,轻轻混匀,冰上放置 15 min;7 600 r/min 4℃ 离心 15 min,取上清液于另一 50 mL 离心管中;加入 2 倍体积无水乙醇并在 -20℃ 沉淀过夜;7 600 r/min 4℃ 离心 30 min,弃上清液;用 2 mL 70% 乙醇清洗;7 600 r/min 4℃ 离心 10 min,用 2 mL 95% 乙醇清洗,7600 r/min 4℃ 离心 10 min,将沉淀用无菌水重新溶解,即获得 DNA 初提液。

所得 DNA 初提液采用 Takara 公司的胶回收试剂盒进行纯化。电泳检测所得的基因组 DNA 片断大小略大于 20 kb,与细菌基因组的大小相同<sup>[10]</sup>,以此为模板,进行 PCR 扩增。

#### 1.5 PCR 扩增及变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析

采用由上海生工生物工程有限公司合成的细菌 16S rDNA 通用引物 U341F(5' CCTACGGGAGGC AGCAG 3')<sup>[11]</sup>和 U758R(5' CTACCAGGTATCTAA TCC 3')<sup>[12]</sup>直接对总 DNA 进行 PCR 扩增,其中在 U341F 的 5' 端有 50 bp GC(5' CGCCGCGCGCG CGGCGGGCGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAG GCAG 3')<sup>[12]</sup>,用于后续的 DGGE。PCR 扩增体系(50 μL):dNTP(2 μmol/L, Fermentas)为 5 μL,10 倍反应缓冲液(不含 MgCl<sub>2</sub>)为 5 μL,MgCl<sub>2</sub>(25 mmol/L, Fermentas)为 3 μL,BSA(Amresco, USA)溶液(20 mg/mL)为 1.0 μL,引物各为 1.0 μL(25 μmol/L),Taq DNA 聚合酶(Fermentas)0.5 μL,模板为 2 μL(稀释 5 倍),最后加灭菌的 Milli-Q 水至体积为 50 μL。PCR 反应在 Mastercycler gradient(eppendorf)上进行,反应采用降落式 PCR 策略<sup>[13]</sup>,即 95℃ 预变性 5 min,然后 94℃ 变性 1 min,65℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 2 min,每个循环退火温度降低 1℃ 直至 55℃,循环 10 次;然后 94℃ 变性 1 min,55℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 2 min,循环 20 次,在 72℃

保持 10 min,最后 4℃ 保温。

以上 PCR 产物经 1.4% 琼脂糖电泳检测均可得到一条清晰的目标条带,用 E. Z. N. A.™ 胶回收试剂盒(Omega Bio-tek)回收,溶解于无菌水中。取 12 μL 纯化后的 PCR 产物(约 800 ng)在通用突变检测系统(Bio-Rad, USA)上进行电泳,变性梯度范围为 30%~65%,聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8%,电压为 80 V,电泳时间为 16 h,温度恒定在 60℃。电泳结束后,凝胶以 0.5 μg/mL 的 SYBR Green 溶液染色,洗涤数次后于 Gel Doc1000 凝胶成像系统(BioRad, USA)上成像观察、拍照。

#### 1.6 PCR-DGGE 图谱统计分析

根据 DGGE 图谱上条带的强度(用吸光度表示)和位置,由式(1)计算各个样品的多样性指数(Shannon 指数,  $H$ )<sup>[14]</sup>,由式(2)计算 2 个样品之间的相似性指数( $C_s$ )<sup>[15]</sup>。

$$H = - \sum (n_i/N) \lg(n_i/N) \quad (1)$$

式中,  $n_i$  为样品上各个条带吸收峰的面积;  $N$  为样品上所有条带吸收峰的总面积。

$$C_{sAB} = 2L_{AB}/(L_A + L_B) \times 100 \quad (2)$$

式中,  $C_{sAB}$  为泳道 A 和泳道 B 之间的相似性系数;  $L_{AB}$  为泳道 A 上的与泳道 B 上位置相同的条带数;  $L_A$  为泳道 A 上的条带数;  $L_B$  为泳道 B 上的条带数。

#### 1.7 目的条带回收、重扩增、测序及序列系统发育树构建

在蓝光照射下切下 DGGE 胶上比较亮的特征条带,浸泡于 60 μL 无菌水中,37℃ 过夜,以上清液作为重扩增的模板。取 1 μL 模板(条带回收原液稀释 2 倍)用不带 GC 发夹结构的引物进行 PCR 扩增。用 1.4% 琼脂糖凝胶电泳检测,确认为单一条带后,送交生物公司(三博,北京)测序。使用 GenBank 的 Sequin win32 软件将测序结果提交给 GenBank 注册,并获得接受号(GU992422 ~ GU992454)。使用 NCBI 的 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)对所得序列进行同源性分析,并使用 ClustalX1.83 软件进行多序列匹配排列(Multiple alignments),通过 MEGA3.1 采用邻接法(neighbour-joining-analysis)构建系统发育树。

## 2 结果与讨论

### 2.1 生物膜生长及系统运行情况

生物滤池中生物膜的培养与成熟是 RAS 能否正常运行的关键。微生物在载体表面附着并实现固定化是微生物表面与载体表面间的相互作用过程,

它与微生物的自身特性有关,同时也与固定载体的物理化学特性及环境因素(pH值、离子强度、水力剪切力、温度等)密切相关<sup>[16]</sup>.该系统生物滤池中的pH稳定在7.5~8.0之间,DO $\geq$ 5 mg/L,盐度为30,水温控制在24.0 $\pm$ 2.0 $^{\circ}$ C之间.生物膜培养直接采用养鱼池的水,在生物挂膜初期,为了使自然微生物能够快速生长并附着于生物载体,添加了一定量的微生物制剂和营养物质(C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>、CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、NaNO<sub>2</sub>、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、MnSO<sub>4</sub>等).定期剪取生物载体在显微镜下进行观察,第1~7 d,白色的生物载体表面开始有浅黄色的斑点出现;第7~14 d,生物载体表面形成一层呈黄褐色状的薄膜物质,镜检发现载体上的菌类增加,开始以菌胶团的形式存在;第14~21 d,生物载体上的附着物生长增长,颜色由黄褐色慢慢变成深黄色,镜检发现载体上布满菌胶团;第21~28 d,生物膜的颜色继续加深,菌胶团的厚度也进一步增加,标志生物膜已成熟.挂膜4个星期后,进行封闭循环水养殖半滑舌鲷,日循环为5~6个量程,生物滤池的水力停留时间约为3h.连续一个月每天监测生物滤池进出口水的NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N和COD浓度的变化,系统运行稳定.养殖水先经过该系统微滤机和臭氧-蛋白质分离器的处理后,其养殖水体污染物的浓度,特别是COD负荷已不是很高,生物滤池能够在较低进水NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、COD、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N的负荷下,起到较好的去除NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、COD、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N作用,使养殖水体污染物的浓度在运行过程中维持较低的水平(图2、3),经过生物滤池后的水质能达到高密度养殖的要求.

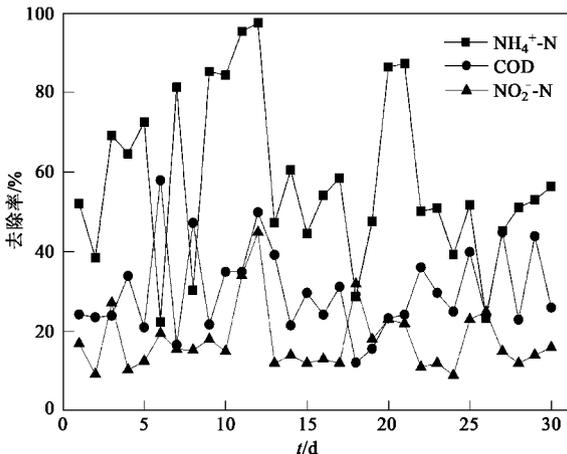


图2 生物滤池对NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、COD和NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N的去除率

Fig. 2 Remove ratio of ammonia-nitrogen, chemical oxygen demand and nitrite-nitrogen

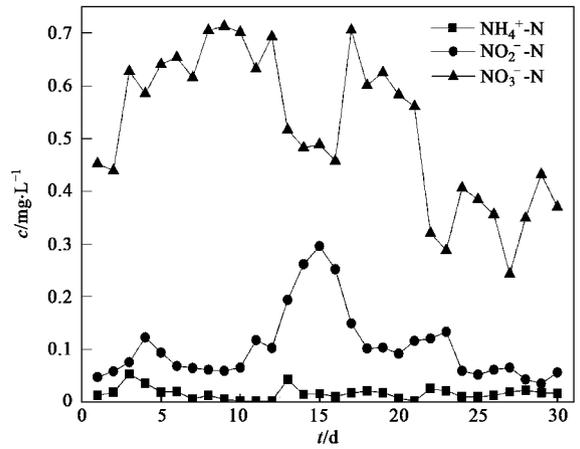


图3 生物滤池出水水质状况

Fig. 3 Effluent water quality of bio-filter

## 2.2 生物载体上细菌的动态变化

由表1可看出,挂膜1周,细菌便开始大量地繁殖与生长起来,随着挂膜天数的增加,3大类细菌都呈现出先增加后逐渐减少直至达到稳定的趋势.异养细菌先于其它细菌生长起来,并且高出1~2个数量级,可能是由于其对氧和营养竞争占优势.与异养细菌相比,氨氧化细菌和硝化菌虽都能在氧化过程中获得生长所需要的能量,但其能量利用率不高,故生长较缓慢,其平均世代(即细菌繁殖一代所需要的时间)在10 h以上<sup>[17]</sup>.挂膜成熟后系统运行期间生物滤池中载体上异养细菌的数量为 $4.10 \times 10^6$  CFU/g,与Leonard等<sup>[18,19]</sup>报道的狼鲈循环水养殖系统生物滤器中载体上的异养细菌数量为 $10^6$  CFU/g和 $10^5$  CFU/g基本一致.氨氧化细菌表现出稳定生长的状态,在生物挂膜期及系统运行过程中对NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N的去除一直很明显.硝化菌在挂膜第28 d,数量达到顶峰,NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N浓度开始下降,这是生物膜成熟的标志.此时微生物代谢旺盛,水的净化能力强,出水水质良好.

## 2.3 细菌群落指纹图谱分析

不同时期细菌群落16S rDNA的PCR反应产物的DGGE图谱如图4所示,其中编号A1~A4为生物膜形成过程期,B1、B2为循环水系统运行期.6个样品生物多样性指数(H)都较高(表2),在生物挂膜初期,最先适应此环境的细菌迅速繁殖起来.A1期的H值比较高,而后有所降低,在A3期H值达到最高,说明经过一段时期的培养,有更多种类的细菌附着到载体上,如band 12、band 22等,其种类与数量都达到顶峰.而后在A4期其H值有一定的下降,

是因为此时生物滤池里的营养盐浓度很低,特别是无机氮浓度已低于养鱼池水的浓度,大量的细菌竞争,导致有些细菌无法继续在载体上生长而被淘汰脱落,如 band 8、band 9 等. 系统运行后,生物滤池中的营养盐浓度趋于稳定,一部分细菌在竞争中淘汰后,另一些细菌慢慢成为优势种群,如 band 27、band 28 等,其  $H$  值也逐渐趋于稳定. 在 6 个样品的图谱中,有些条带是一直出现的,如 band 18、band 19 等,这些可被视为生态幅较为广泛的种属,在生物滤池这个小型生态系统中对物质和能量的代谢发挥着重要的作用. 有些条带,如 band 16、band 17 在前 5 个时期都有,在 B2 期突然消失了,是何原因造成这种

现象,还有待进一步研究. 随着时间的推移,2 个时期的  $C_s$  值在逐渐降低,如 A1 期与 A2 期的  $C_s$  值大于 A1 期与 A3 期的  $C_s$  值,但是除 A4 期与 B1 期  $C_s$  值偏低外,其余任何 2 个相邻的时期  $C_s$  值都很大,表明不同时期生物载体上微生物的群落结构是在变化的,但是演替的过程是缓慢而有规律的,这样驯化成功的生物膜不容易脱落,比较稳定(表 3). 张斌等<sup>[20]</sup>对膜-生物反应器中微生物群落结构多样性的演变过程研究表明,接种污泥期与系统运行期间微生物的群落发生了较大的改变,与本研究有所不同,原因可能是其污水处理工艺的改变影响了膜-生物反应器内部微生物种群的结构.

表 1 不同时期生物载体上 3 类细菌数量的动态变化

Table 1 Quantity of dynamic variation of three types of bacteria on bio-carrier in different periods

细菌类别	细菌数量/CFU·g <sup>-1</sup>					
	7 d	14 d	21 d	28 d	40 d	50 d
异养细菌	$7.77 \times 10^5$	$2.02 \times 10^7$	$2.08 \times 10^7$	$9.04 \times 10^6$	$4.10 \times 10^6$	$1.43 \times 10^6$
氨氧化细菌	$6.08 \times 10^4$	$4.81 \times 10^6$	$6.92 \times 10^6$	$1.55 \times 10^6$	$3.42 \times 10^5$	$2.23 \times 10^5$
硝化菌	$2.11 \times 10^4$	$3.85 \times 10^5$	$1.01 \times 10^6$	$1.12 \times 10^7$	$1.65 \times 10^6$	$2.32 \times 10^6$

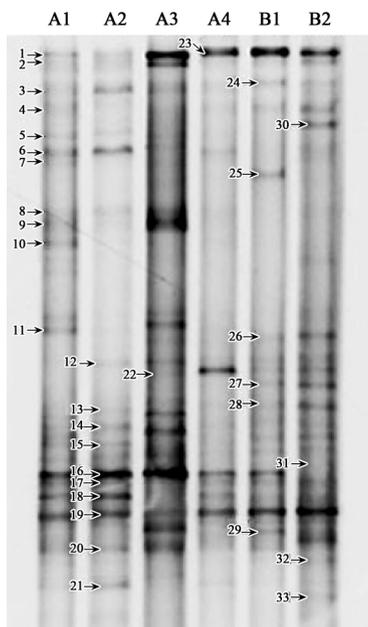


图 4 不同时期细菌群落组成 DGGE 分离图谱

Fig. 4 DGGE profiles of bacterial community composition in different periods

表 2 不同时期生物载体上微生物群落 Shannon 多样性指数

Table 2 Shannon index of microbial population on bio-carrier in different periods

A1	A2	A3	A4	B1	B2
1.53	1.44	1.57	1.08	1.27	1.30

表 3 不同时期生物载体上微生物群落相似性指数

Table 3 Comparability index of microbial population on bio-carrier in different periods

	A1	A2	A3	A4	B1	B2
A1	100					
A2	82.6	100				
A3	77.6	88.4	100			
A4	46.2	60.6	66.7	100		
B1	44.5	52.6	53.7	58.1	100	
B2	40.8	41.9	43.5	44.4	73.2	100

## 2.4 目的条带的系统发育分析

生物滤池中细菌的种类繁多,采用细菌 16S rDNA 通用引物进行扩增,可以对生物载体上的细菌类群有一个全面的了解. 将图 4 中主要条带进行切胶测序后,在 GenBank 中进行比对,获得 33 条带的同源性信息,除 band 6、band 22 外,大部分条带所含的 DNA 序列与 GenBank 中已知序列拥有较高的相似度 (>96%),见表 4. 33 条带分别属于变形菌门 (Proteobacteria) 的  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -变形菌纲 (Proteobacteria) (17 个 OTUs), 厚壁菌门 (Firmicutes) 的芽孢杆菌纲 (Bacilli) (1 个 OTUs) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes) 的黄杆菌纲 (Flavobacteria) (15 个 OTUs), 见图 5. 不同时期生物载体上主要的菌属分布情况如表 5 所示.

Proteobacteria 在整个细菌种类中占有了很大的

表 4 33 条带 16S rDNA 序列比对结果

Table 4 Results of 33 16S rDNA sequences using BLAST in GenBank

条带 编号	序列长 度/bp	GenBank 接受号	GenBank 中亲缘关系最近序列细菌			
			GenBank 登录号	物种名	所属细菌类群	相似度/%
1	416	GU992422	GQ331112	<i>Formosa</i> sp. EM151	Flavobacteria	98
2	413	GU992423	AY883939	<i>Gaetbulibacter saemankumensis</i>	Flavobacteria	98
3	412	GU992424	FJ716799	<i>Bizionia</i> sp. KMM 6177	Flavobacteria	99
4	416	GU992425	FJ596337	<i>Olleya</i> sp. UST050418-038	Flavobacteria	100
5	417	GU992426	FJ868613	<i>Tenacibaculum</i> sp. RAS53	Flavobacteria	100
6	412	GU992427	AB261012	<i>Marixanthomonas ophiurae</i>	Flavobacteria	95
7	402	GU992428	FJ176555	<i>Arenibacter</i> sp. TG409	Flavobacteria	100
8	399	GU992429	FJ161251	<i>Cellulophaga</i> sp. D4012	Flavobacteria	96
9	385	GU992430	FJ229467	<i>Maribacter</i> sp. KLE1063	Flavobacteria	97
10	402	GU992431	FN330974	<i>Weissella cibaria</i>	Bacilli	100
11	392	GU992432	FJ196064	<i>Thalassobius</i> sp. ZS6-18	$\alpha$ -Proteobacteria	99
12	416	GU992433	EF092216	Uncultured <i>Nitrosomonas</i> sp.	$\beta$ -Proteobacteria	98
13	401	GU992434	FJ222605	<i>Albidovulum</i> sp. S1K1	$\alpha$ -Proteobacteria	100
14	391	GU992435	FJ161311	<i>Thalassobius mediterraneus</i>	$\alpha$ -Proteobacteria	98
15	388	GU992436	FJ868596	<i>Ruegeria</i> sp. RAS15	$\alpha$ -Proteobacteria	99
16	414	GU992437	FJ161344	<i>Nautella</i> sp. D7042	$\alpha$ -Proteobacteria	100
17	389	GU992438	FJ161324	<i>Thalassobius aestuarii</i>	$\alpha$ -Proteobacteria	96
18	398	GU992439	FJ952830	<i>Rhodobacter</i> sp.	$\alpha$ -Proteobacteria	99
19	408	GU992440	DQ675021	<i>Pseudoruegeria aquimaris</i>	$\alpha$ -Proteobacteria	97
20	397	GU992441	EF033448	Alpha <i>Proteobacterium</i> 36G5	$\alpha$ -Proteobacteria	99
21	397	GU992442	DQ915615	<i>Oceanicola batsensis</i>	$\alpha$ -Proteobacteria	99
22	391	GU992443	AF069963	<i>Endosymbiont of Acanthamoeba</i> sp. UWC8	$\alpha$ -Proteobacteria	95
23	417	GU992444	AY167341	<i>Psychroserpens</i> sp. ARK10236	Flavobacteria	99
24	384	GU992445	FM162948	Flavobacteriaceae bacterium ACEMC 1F-10	Flavobacteria	98
25	399	GU992446	AM945570	<i>Polaribacter</i> sp. MOLA 340	Flavobacteria	98
26	410	GU992447	AM941176	Uncultured <i>Pseudoalteromonas</i> sp.	$\gamma$ -Proteobacteria	96
27	406	GU992448	FJ868592	<i>Agrobacterium</i> sp. RAS8	$\alpha$ -Proteobacteria	99
28	409	GU992449	FN297835	Phyllobacteriaceae bacterium AMV1	$\alpha$ -Proteobacteria	99
29	391	GU992450	DQ915607	<i>Leisingera methylohalidivorans</i>	$\alpha$ -Proteobacteria	99
30	407	GU992451	FJ425226	<i>Winogradskyella</i> sp. K7-7	Flavobacteria	97
31	394	GU992452	EF988631	<i>Maritalea myrionectae</i>	$\alpha$ -Proteobacteria	99
32	409	GU992453	AM709741	<i>Roseobacter</i> sp. SOEmb11	$\alpha$ -Proteobacteria	100
33	389	GU992454	FJ786105	Uncultured bacterium	$\alpha$ -Proteobacteria	97

表 5 不同时期生物载体上主要的细菌种类

Table 5 Species of main bacteria on bio-carrier in different periods

时期	主要细菌类别	条带
A1	<i>Formosa</i> sp., <i>Gaetbulibacter saemankumensis</i> , <i>Bizionia</i> sp., <i>Olleya</i> sp., <i>Tenacibaculum</i> sp., <i>Marixanthomonas ophiurae</i> , <i>Arenibacter</i> sp., <i>Cellulophaga</i> sp., <i>Maribacter</i> sp., <i>Weissella cibaria</i> , <i>Thalassobius</i> sp., <i>Nautella</i> sp., <i>Rhodobacter</i> sp., <i>Pseudoruegeria aquimaris</i>	Band 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、16、18、19
A2	<i>Bizionia</i> sp., <i>Marixanthomonas ophiurae</i> , <i>Cellulophaga</i> sp., Uncultured <i>Nitrosomonas</i> sp., <i>Thalassobius mediterraneus</i> , <i>Ruegeria</i> sp., <i>Nautella</i> sp., <i>Rhodobacter</i> sp., <i>Pseudoruegeria aquimaris</i> , <i>Oceanicola batsensis</i>	Band 3、6、8、12、14、15、16、18、19、21
A3	<i>Formosa</i> sp., <i>Bizionia</i> sp., <i>Cellulophaga</i> sp., <i>Maribacter</i> sp., Uncultured <i>Nitrosomonas</i> sp., <i>Albidovulum</i> sp., <i>Thalassobius mediterraneus</i> , <i>Nautella</i> sp., <i>Rhodobacter</i> sp., <i>Pseudoruegeria aquimaris</i> , <i>Endosymbiont of Acanthamoeba</i> sp.	Band 1、3、8、9、12、13、14、16、18、19、22
A4	<i>Marixanthomonas ophiurae</i> , Uncultured <i>Nitrosomonas</i> sp., <i>Nautella</i> sp., <i>Thalassobius aestuarii</i> , <i>Rhodobacter</i> sp., <i>Pseudoruegeria aquimaris</i> , <i>Psychroserpens</i> sp., Flavobacteriaceae bacterium	Band 6、12、16、17、18、19、23、24
B1	Uncultured <i>Nitrosomonas</i> sp., <i>Nautella</i> sp., <i>Thalassobius aestuarii</i> , <i>Rhodobacter</i> sp., <i>Pseudoruegeria aquimaris</i> , <i>Psychroserpens</i> sp., Flavobacteriaceae bacterium, <i>Polaribacter</i> sp., Uncultured <i>Pseudoalteromonas</i> sp., <i>Agrobacterium</i> sp., Phyllobacteriaceae bacterium	Band 12、16、17、18、19、23、24、25、26、27、28
B2	<i>Olleya</i> sp., Uncultured <i>Nitrosomonas</i> sp., <i>Rhodobacter</i> sp., <i>Pseudoruegeria aquimaris</i> , <i>Psychroserpens</i> sp., Flavobacteriaceae bacterium, Uncultured <i>Pseudoalteromonas</i> sp., <i>Agrobacterium</i> sp., Phyllobacteriaceae bacterium, <i>Winogradskyella</i> sp., <i>Roseobacter</i> sp.	Band 4、12、18、19、23、24、26、27、28、30、32

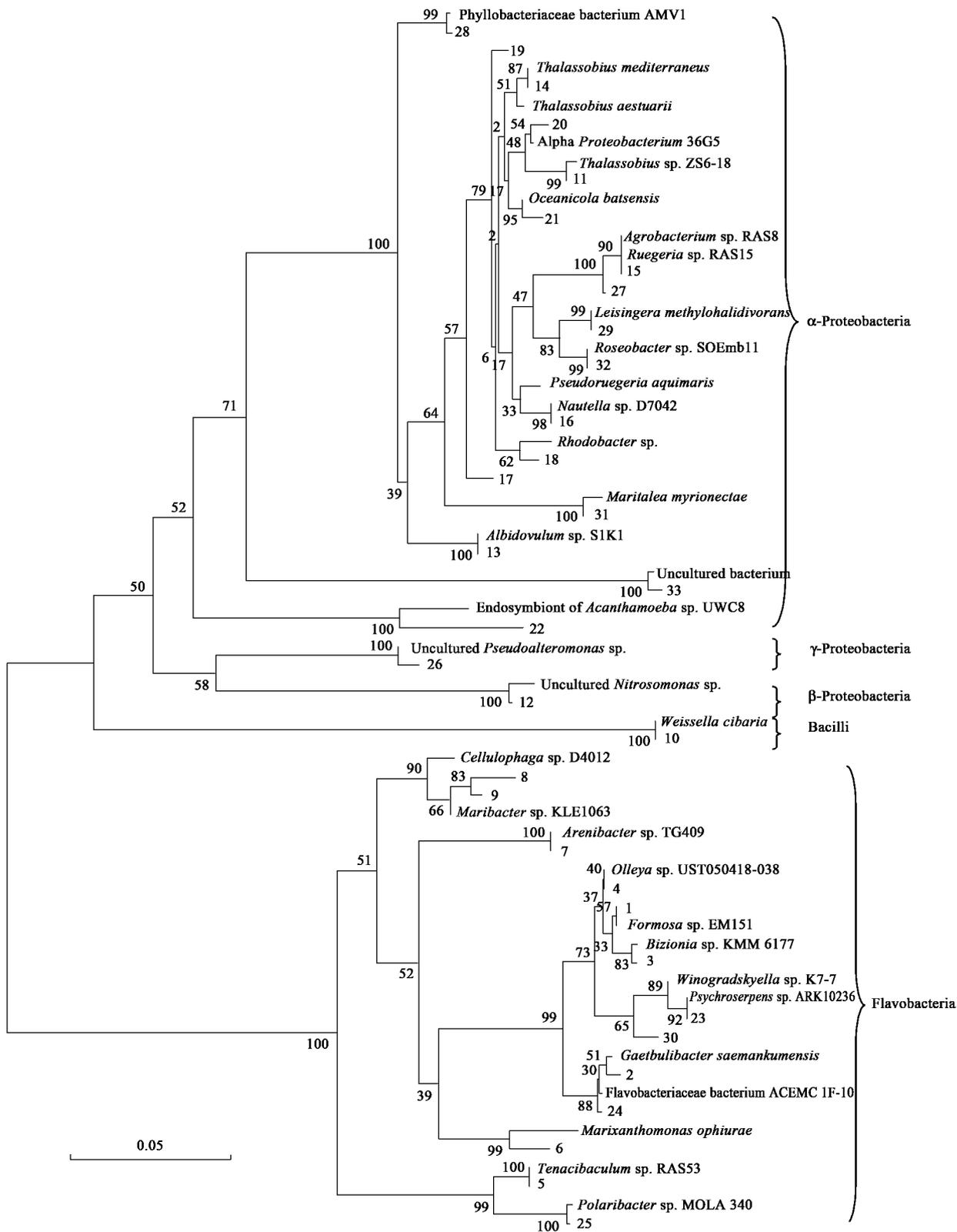


图 5 基于 DGGE 条带 16S rDNA 序列的不同时期细菌系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of bacteria in different periods based on the 16S rDNA sequences of DGGE bands

比例,其主要的细菌类群是 α-Proteobacteria 纲.许多学者研究表明<sup>[21,22]</sup>,α-Proteobacteria 中包含的很多

菌属都能生存于不同的环境中.占 α-Proteobacteria 一定比例的 *Rhodobacter* 菌群是一种紫色非硫细菌

(purple nonsulfur bacteria), 这种细菌的最大特点是能够利用多种有机物作为碳源进行异养的光合代谢反应<sup>[23]</sup>, 基质利用的多样性使得它们在生物滤池中具有竞争优势, 从而成为优势菌属出现在生物膜的不同时期中.  $\beta$ -Proteobacteria 一直是废水处理系统中去除含氮污染物最重要的类群<sup>[24]</sup>, 其中的亚硝化螺菌属 (*Nitrosospira*) 和亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*) 是较常见的氨氧化菌<sup>[25]</sup>. 本研究分离得到的与 *Nitrosomonas* sp. 相似的细菌在降低氨氮浓度方面起了重要作用, 并逐渐成为生物膜上的优势种群. 在微生物挂膜期及系统正式运行期, 生物滤池对  $\text{NH}_4^+$ -N 和  $\text{NO}_2^-$ -N 一直保持一定的去除率, 说明生物滤池内部存在着一定的硝化作用.  $\gamma$ -Proteobacteria 偏好于高营养盐环境, 并且易于吸收低分子量的溶解性有机物<sup>[26,27]</sup>. RAS 运行后, 养鱼池水中的营养物质相对比较丰富, 经过 *Pseudoalteromonas* sp. 这些菌的胞外酶作用, 可将营养盐分解成水溶性低分子的氨基酸、单糖和无机酸等. 另外, 由于硝化作用耗氧以及曝气的不均匀性, 生物滤池中总会形成一定程度的低氧或缺氧区域, 当  $\text{DO} < 2 \text{ mg/L}$  时, DO 可以成为硝化反应的限制因素<sup>[28]</sup>, 这就为反硝化脱氮创造了有利的条件. 黄杆菌 (*Flavobacteriaceae* bacterium) 等兼性厌氧细菌主要分布于生物膜的内层, 在低氧或无氧条件下, 它们能利用硝酸盐或亚硝酸盐作为最终电子受体进行无氧呼吸, 即异化性硝酸还原作用, 在这期间硝酸盐被转化成各种还原性产物, 而有机物同时被氧化<sup>[29]</sup>, 这说明在生物滤池中除传统的硝化途径外, 同时还存在着好氧或厌氧反硝化作用于硝酸盐的去除过程, 从而使生物滤池中硝酸盐的浓度稳定在一定水平. 这些功能性的微生物能够较好地适应 RAS 中的环境, 对于水处理效果的提高起了至关重要的作用. 若能将这些微生物进行分离培养, 以一定的比例同时投加到生物滤池中, 可能会实现 RAS 的“跳跃式启动”<sup>[30]</sup>.

本研究通过 PCR-DGGE 技术没有分离出大量的氨氧化细菌与硝化菌, 这可能与设计的引物有关. 针对某一特定功能的亚纲类细菌, 采用特异性更强的引物进行 Nested PCR-DGGE 分析, 可能会更加细致地了解这一亚纲类细菌的种类.

### 3 结论

(1) 经过 4 周左右的生物挂膜, 生物载体上形成了微生物种类丰富, 群落结构比较稳定的生物膜.

不同时期经传统生物培养的异养细菌, 氨氧化细菌, 硝化菌的数量都呈现出先增加后逐渐减少直至达到稳定的趋势. 在 RAS 运行时, 生物滤池能较好地降低水体中  $\text{NH}_4^+$ -N、 $\text{NO}_2^-$ -N 和 COD 的浓度, 使养殖水体污染物的浓度维持在较低的水平.

(2) 在生物膜形成过程中及系统运行时期, 生物载体上的微生物种类有一定的变化, 不同时期存在一些各自特有的种属和共有的种属. 除 A4 期与 B1 期  $C_s$  值偏低外, 其余任何 2 个相邻时期的  $C_s$  值都很大, 说明微生物群落的变化与演替是缓慢而有规律的, 从而保证了水处理效果的稳定性.

(3) 生物滤池中微生物种群分布较为广泛, 主要优势种群以 Proteobacteria 和 Flavobacteria 为主, 存在多类细菌共同作用于养殖水体污染物的去除, 其中 *Nitrosomonas* 参与了系统的硝化过程, 参与反硝化过程的主要是黄杆菌 (*Flavobacteriaceae* bacterium) 等兼性厌氧细菌. 这些功能性细菌在整个系统的运行中起了非常重要的作用.

#### 参考文献:

- [1] Nijhof M, Bovendeur J. Fixed film nitrification characteristics in sea-water recirculation fish culture systems [J]. *Aquaculture*, 1990, **87**(2): 133-143.
- [2] 曲克明, 杜守恩. 海水工厂化高效养殖体系构建工程技术 [M]. 北京: 海洋出版社, 2010.
- [3] Guerdat T C, Losordo T M, Classen J J, et al. An evaluation of commercially available biological filters for recirculating aquaculture systems [J]. *Aquacultural Engineering*, 2010, **42**(1): 38-49.
- [4] Wolters W, Masters A, Vinci B, et al. Design, loading, and water quality in recirculating systems for Atlantic Salmon (*Salmo salar*) at the USDA ARS national cold water marine aquaculture center [J]. *Aquacultural Engineering*, 2009, **41**(2): 60-70.
- [5] Ji G D, Liao B, Tao H C. Analysis of bacteria communities in an up-flow fixed-bed (UFB) bioreactor for treating sulfide in hydrocarbon wastewater [J]. *Bioresource Technology*, 2009, **100**(21): 5056-5062.
- [6] 孙富姣, 左剑恶, 李建平, 等. 厌氧颗粒污泥中微生物种群变化的分子生物学解析 [J]. *中国环境科学*, 2006, **26**(2): 183-187.
- [7] Fandino L B, Riemann L, Steward G F, et al. Variations in bacterial community structure during a dinoflagellate bloom analyzed by DGGE and 16S rDNA sequencing [J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 2001, **23**(1): 119-130.
- [8] 李卓棣, 喻子牛, 何绍江. 农业微生物实验技术 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1996. 305-308.
- [9] Meynell G G, Meynell E. Theory and practice of experimental bacteriology [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1965. 204-209.
- [10] Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of

- diverse composition [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**(2): 316-322.
- [11] Muyzer G, Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, **59**(3): 695-700.
- [12] Juck D, Driscoll B T, Charles T C. Effect of experimental contamination with the explosive hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine on soil bacterial communities [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, **43**(2): 255-262.
- [13] Erik J, Van H, Gabriel Z, *et al.* Changes in Bacterial and Eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with viruses [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65**(2): 795-801.
- [14] Shannon C E, Weaver W. The mathematical theory of communication[M]. Urbana: University of Illinois Press, 1964. 365-368.
- [15] Magurran A E. Ecological diversity and its measurement [M]. New Jersey: Princeton University Press, 1988. 265-266.
- [16] Nicolella C, Loosdrecht M C M, Heijnen J J. Wastewater treatment with particulate biofilm reactors [J]. *Journal of Biotechnology*, 2000, **80**(1): 1-33.
- [17] Okabe S, Oozawa Y, Hirata K, *et al.* Relationship between population dynamics of nitrifiers in biofilms and reactor performance at various C: N ratios [J]. *Water Research*, 1996, **30**(7):1563-1572.
- [18] Leonard N, Blancheton J P, Guiraud J P. Populations of heterotrophic bacteria in an experimental recirculating aquaculture system [J]. *Aquacultural Engineering*, 2000, **22**(1-2): 109-120.
- [19] Leonard N, Guiraud J P, Gasset E, *et al.* Bacteria and nutrients-nitrogen and carbon-in a recirculating system for sea bass production [J]. *Aquacultural Engineering*, 2002, **26**(2): 111-127.
- [20] 张斌,孙宝盛,季民,等. MBR 中微生物群落结构的演变与分  
析[J]. *环境科学学报*, 2008, **28**(11):2192-2199.
- [21] Wobus A, Bleul C, Maassen S, *et al.* Microbial diversity and functional characterization of sediments from reservoirs of different trophic state[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, **46**(3): 331-347.
- [22] Williams M M, Domingo J W S, Meckes M C, *et al.* Phylogenetic diversity of drinking water bacteria in a distribution system simulator [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, **96**(5): 954-964.
- [23] 钦颖英,李道棠,杨虹. 给水生物预处理反应器的细菌种群多样性和群落结构[J]. *应用与环境生物学报*, 2007, **13**(1): 104-107.
- [24] Kapley A, Prasad S, Purohit H J. Changes in microbial diversity in fed-batch reactor operation with wastewater containing nitroaromatic residues [J]. *Bioresource Technology*, 2007, **98**(13): 2479-2484.
- [25] Ballinger S J, Head I M, Curtis T P, *et al.* Molecular microbial ecology of nitrification in an activated sludge process treating refinery wastewater [J]. *Water Science and Technology*, 1998, **37**(4-5): 105-108.
- [26] Naganuma T, Fukai I, Murakami Y, *et al.* Effect of ultraviolet radiation on the bioavailability of marine diatom-derived low-molecular-weight dissolved organic matter [J]. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 2000, **3**(1): 163-166.
- [27] Pinhassi J, Hagstrom A. Seasonal succession in marine bacterioplankton [J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 2000, **21**(3): 245-256.
- [28] 王淑莹,曾薇,董文艺,等. SBR 法短程硝化及过程控制研究 [J]. *中国给水排水*, 2002, **18**(10):1-5.
- [29] 池振明. 微生物生态学[M]. 济南: 山东大学出版社, 1999. 91-93.
- [30] Stamper D M, Walch M, Jacobs R N. Bacterial population changes in a membrane bioreactor for graywater treatment monitored by denaturing gradient gel electrophoretic analysis of 16S rRNA gene fragments [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**(2): 852-862.