

文章编号: 1000-0615(2018)09-1463-10

DOI: 10.11964/jfc.20170610889

## 红假单胞菌属光合细菌的一种规模化培养方法

王小冬, 魏布, 刘兴国\*, 陆诗敏, 顾兆俊, 金娇辉

(中国水产科学研究院渔业机械仪器研究所, 农业部渔业装备与工程技术重点实验室, 上海 200092)

**摘要:** 为了研究红假单胞菌属光合细菌的规模化培养方法, 2015年1月5日至2016年4月26日, 将淡水鱼配合饲料与自来水混合后放置在玻璃温室, 于有机玻璃柱中腐烂、发酵培养, 培养期间不添加其他物质, 也不添加菌种种源。实验过程中, 随着饲料的腐烂, 容器内壁上逐渐出现了暗红色物质附着, 并且附着面积逐渐扩散到整个内壁, 然后水体也逐渐转变为暗红色。结果显示, 饲料腐烂过程中, 水体TN、TP和TOC最高可分别达近1 200 mg/L、700 mg/L和2 700 mg/L, 随后水体TN、TP和TOC出现降低趋势。微生物高通量测序分析结果显示, 当水体呈现暗红色时, 附着态微生物样品和浮游态微生物样品均以红假单胞菌属为最大的优势属, 红假单胞菌属在附着态样品和浮游态样品中的相对丰度分别达到73.19%和54.31%, 即实现了浮游态和附着态红假单胞菌属光合细菌的高密度培养。推断本实验中红假单胞菌规模化培养方法的机理: 首先, 异养菌降解饲料原料为小分子物质, 随后在适当的水温、光照等物理因素的影响下, 其中高浓度的氮、磷、碳以及金属离子、维生素、微量元素等小分子物质满足了红假单胞菌的高密度生长需求而大量生长成为优势种类。这提供了一种利用水产配合饲料与水一起发酵进行红假单胞菌属光合细菌规模化培养的方法, 可为其他降解大分子有机物的异养菌的规模化培养提供参考。

**关键词:** 红假单胞菌; 光合细菌; 配合饲料; 培养方法

**中图分类号:** S 917.1

**文献标志码:** A

红假单胞菌属(*Rhodopseudomonas*)属于细菌门(Bacteroidetes), 红螺菌目(Rhodospirillales)的红螺菌科(Rhodospirillaceae)<sup>[1]</sup>。该菌是紫色非硫光合菌, 革兰氏阴性, 属于厌氧光能自养菌, 但有些种在无光的微好氧或者好氧条件下能进行氧化代谢<sup>[1]</sup>。按NCBI Taxonomy上的分类方法, 其又属于 $\alpha$ -变形菌门( $\alpha$ -Proteobacteria)<sup>[2]</sup>。

光合细菌(photosynthetic bacteria, PSB)在水生态系统的物质循环、能量转化和水体净化中起重要作用<sup>[3]</sup>。光合细菌尤其是红假单胞菌在水产养殖、污水处理中有多方面的作用<sup>[4-6]</sup>, 如降解有机质、将水体中氨态氮、硫化氢和其他有害物质吸收而净化水质, 通过吸收水体中的耗氧

因子而减少水体耗氧, 作为培养浮游动物的饵料和饲料添加剂等<sup>[7-8]</sup>。同时, 红假单胞菌能利用相当广泛的化合物作为碳源, 如糖、低脂肪酸、有机酸、混合醇类等, 处理有机废物的同时具有产氢的功能<sup>[9]</sup>, 而成为新能源研究中的一种模式微生物<sup>[10]</sup>。

目前, 红假单胞菌的培养一般使用固定的培养基<sup>[11-14]</sup>, 或者对固定的培养基进行适当优化后培养<sup>[15]</sup>, 而开敞条件下的大规模培养较少<sup>[16]</sup>。在实验室内利用人工配制的培养基进行小规模培养时, 其培养基中含多种成分<sup>[11-14]</sup>, 包括多种无机盐、营养物质丰富的酵母膏以及微量元素等, 并且一般以浮游状态而非附着状态生长。

收稿日期: 2017-06-30 修回日期: 2018-01-25

资助项目: 国家自然科学基金(41401580); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项(2017GH10); 国家科技基础条件平台——水产种质资源平台(2017DKA30470)

通信作者: 刘兴国, E-mail: liuxg1223@163.com

余伯良<sup>[16]</sup>对光合细菌的工厂化培养进行了简单的介绍,工厂化大规模培养时,培养基可选用工业有机废水、食品厂废渣、农副产物或动物粪便,并就以小麦麸为培养基的工艺流程进行了介绍,并且其需要添加酵母膏和菌种。

本研究在进行微生物培养实验时,发现不同营养盐水平下出现的优势生物种类不同:营养盐水平较低时以浮游植物为优势,而营养盐水平高达一定浓度时以细菌为优势。尤其自2015年1月5日开始将淡水鱼配合饲料和自来水混合后添加到有机玻璃柱中,搅拌发酵几个月后,有机玻璃柱中出现了附着态和浮游态高密度生长的暗红色微生物,经鉴定其为红假单胞菌属光合细菌。随后又进行了几次重复实验,水体中均出现了高浓度的暗红色微生物,且容器内壁上附着生长了约2~3 mm厚的暗红色微生物。本研究利用自然环境中的微生物群落,实现了红假单胞菌属光合细菌的高密度规模化培养,并对其规模化培养方法的原理进行分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验方法

2015年1月5日至2016年4月26日,利用浙江恒兴饲料有限公司生产的恒兴牌淡水鱼膨化配合饲料(8系列)为基础原料(该饲料的原料组成:优质鱼粉、豆粕、动物蛋白、酵母粉、面粉、磷酸二氢钙、微量元素、多种维生素、氨基酸等,其中粗蛋白含量为35%左右),添加自来水,让饲料泡水后发胀、腐烂以至沉底。培养时,不添加任何其他物质和菌种种源。整个实验于玻璃温室中进行。使用的无色透明有机玻璃柱是上部为圆柱状(半径20 cm,高100 cm)、下部为半球形的U型柱,并以3根有机玻璃管为支撑,固定在地面上的一个圆盘状有机玻璃板上。

共在不同季节进行多次不同添加比例实验,各个培养柱中,添加饲料和自来水后的总体积均约为130 L。培养期间,根据水的蒸发情况,不定期补充自来水至约130 L:

①2015年1月5日开始的实验:添加5 kg配合饲料到有机玻璃柱Z1中,培养至2016年3月16日,共培养436 d;②2015年9月8日开始的实验:添加6.6 kg配合饲料到有机玻璃柱Z2中;添加约3.3 kg配合饲料到有机玻璃柱Z3中;柱Z2和

Z3均培养至2016年4月26日,共培养231 d;③2015年10月30日开始的实验:添加4.6 kg配合饲料到有机玻璃柱Z4中,培养至2016年4月26日,共培养179 d。

为促进饲料的腐烂,在实验前期对沉淀在容器底部的饲料进行扰动、搅拌,并在每个容器中安装一个曝气头曝气,以促进饲料的腐烂发酵,并在2015年11月—2016年3月使用加热棒将柱Z2和Z3水温加热到25~32 °C培养,其他月份则利用自然温度培养。

### 1.2 测定指标与方法

**水质指标** 实验期间依据水体颜色的变化,不定期测定有机玻璃柱中水体总氮(TN)、总磷(TP)、总有机碳(TOC),TN、TP的测定采用过硫酸钾联合消解法<sup>[17]</sup>,TOC的测定使用德国耶拿Analytik Jena总有机碳(TOC)分析仪multiN/C UV。

**微生物指标** 选取2015年9月8日开始实验的有机玻璃柱Z2柱中样品:获取第55天、第75天、第118天的水样,用0.22 μm滤膜过滤水样后收集样品,依次编号为样品A、B、C;并刮取第118天的有机玻璃柱内壁上附着的暗红色泥浆状物,编号为样品D。在第55天和第75天时水体颜色为灰褐色至暗褐色,第118天时水体颜色为暗红色。对4个样品A、B、C、D进行DNA提取,并进行微生物多样性的高通量测序分析。

**DNA提取及片段扩增** DNA的提取使用E.Z.N.A.<sup>®</sup> Soil DNA Kit (Omega Bio-tek, Norcross, GA, U.S.)试剂盒。完成基因组DNA抽提后,利用1%琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组DNA。对细菌16S rRNA的V4~V5区进行PCR扩增,扩增的引物为515F(5'-barcode-GTGCCAGCMGC-CGCGG-3')和907R(5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3')。PCR扩增反应:4.0 μL的5×Fast-Pfu Buffer, 2.0 μL的2.5 mmol/L dNTPs, 0.8 μL的5 μmol/L引物, 0.4 μL的FastPfu聚合酶,加入10 ng DNA模板至20 μL反应体系。每个样本3个平行。

PCR扩增条件:95 °C预变性2 min;95 °C变性30 s,55 °C退火30 s,72 °C延伸30 s,25个循环;72 °C终延伸5 min。获得扩增产物后,利用2%的琼脂糖凝胶电泳分离后通过AxyPrep DNA试剂盒(Axygen Biosciences, Union City, CA, U.S.)纯

化,并用QuantiFluor™-ST蓝色荧光定量系统(Promega, U.S.)定量。使用TruSeq™ DNA Sample Prep Kit试剂进行MiSeq文库构建。纯化的扩增产物等物质的量混合后在Illumina MiSeq平台进行双末端测序,测序读长为2×250 bp。

**生物信息学分析** 测序下机后,利用QIIME (version 1.9.1)进行初步的质量筛选(去除接头污染及N超标的序列)<sup>[18]</sup>, MiSeq测序得到的是双端序列数据,首先根据PE reads之间的overlap关系,将成对的reads拼接(merge)成一条序列,同时对reads的质量和merge的效果进行质控过滤,根据序列首尾两端的barcode和引物序列区分样品得到有效序列,并校正序列方向。为了研究样品微生物组成的多样性,使用Usearch (version 7.1 <http://drive5.com/uparse/>)对所有样品的Effective tags进行聚类,以97%的一致性(identity)将序列聚类成为OTUs(operational taxonomic units)<sup>[19]</sup>。为了得到每个OTU对应的物种分类信息,采用RDP classifier贝叶斯算法(<http://rdp.cme.msu.edu/>)对97%相似水平的OTU代表序列进行分类学分析,并分别在各个分类水平:域(domain),界(kingdom),门(phylum),纲(class),目(order),科(family),属(genus),种(species)统计各样本的群落组成<sup>[20]</sup>。计算微生物 $\alpha$ 多样性指标,包括Chao、Ace、Simpson、Shannon指数,以及覆盖率。

## 2 结果

### 2.1 水质与现象

实验过程中水体的TN、TP和TOC含量均很高,尤其是实验前期水色为灰褐色或者黑褐色时TN、TP和TOC可分别高达近1 200 mg/L、700 mg/L和2 700 mg/L,随后水体TN、TP和TOC出现降低的趋势(表1)。

实验现象方面,首先是容器内壁上出现暗红色物质附着,具体表现:2015年1月5日开始的实验柱Z1,在2015年6月14日即第160天时,观察到容器内壁上附着暗红色物质;2015年9月8日开始的实验柱Z2、Z3,在2015年11月5日即第58天时,观察到容器内壁上受光照相对较多的一面内壁上局部出现暗红色物质附着;2015年10月30日开始的实验柱Z4,在2016年1月7日即第69天时,观察到容器内壁上受光照相对较多的一面内壁上局部出现暗红色物质附着。然后,容器内壁上出现暗红色物质附着的面积逐渐增大,直至扩散到整个容器内壁,而暗红色附着物最厚处有近2~3 mm。随着容器内壁上暗红色物质的增多,容器中水体颜色也逐渐成暗红色。

各个实验柱中水体颜色变化相似:随着水体饲料的腐烂,水体逐渐变成浅黄白色,并逐渐变臭;随后,水体逐渐变为浅灰色直至灰褐色或黑褐色,并且在约80~100 d后,水体会逐渐变为红褐色以及暗红色。在水体颜色表现为暗

表1 实验期间有机玻璃柱Z1、Z2、Z3和Z4水体中的TN、TP和TOC含量  
Tab. 1 The TN, TP and TOC content in the water from plexiglass column Z1, Z2, Z3

日期 date	and Z4 during the experiment												mg/L	
	有机玻璃柱Z1 the plexiglass column Z1			有机玻璃柱Z2 the plexiglass column Z2			有机玻璃柱Z3 the plexiglass column Z3			有机玻璃柱Z4 the plexiglass column Z4				
	TN	TP	TOC	TN	TP	TOC	TN	TP	TOC	TN	TP	TOC		
2015/7/7	1 095.76	208.34	2 072.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2015/9/25	836.12	230.25	1 989.20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2015/11/22	530.28	244.24	1 738.38	1 065.64	202.03	2 406.60	818.22	89.46	1 765.89	-	-	-	-	-
2015/12/11	655.17	291.16	1 661.66	522.24	110.88	1 051.05	895.72	81.20	1 827.28	1 016.90	368.12	2 662.66	-	-
2016/1/4	664.22	194.43	1 508.78	998.82	659.43	428.61	810.72	77.90	570.57	1 059.41	177.94	2 500.68	-	-
2016/3/16	764.60	42.72	-	-	-	-	-	-	-	1 126.33	141.66	-	-	-
2016/4/5	-	-	-	343.18	209.27	-	-	-	-	1 010.57	142.21	-	-	-
2016/4/26	-	-	-	27.35	66.71	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注:其中“-”表示没有测定相应指标

Notes: the “-” means that item has not been measured

红色后,随着水体中营养盐的减少,水体逐渐变为棕红色、棕褐色,之后水体逐渐变为浅棕色。用照片展示了实验期间有代表性的有机玻璃柱Z2和Z3内壁上出现暗红色附着物及其中水体颜色变成暗红色的变化过程(图1)。

附着在容器内壁上的暗红色物质比水体中的暗红色物质先出现,而且附着态的暗红色物质先在容器内壁上受光较多的一面出现,随后扩散到整个容器内壁上。附着态的暗红色物质在容器内壁上生长旺盛后,水体中才逐渐出现暗红色,之后水体全部变成暗红色。

## 2.2 微生物分析

**优化序列统计** 经过16S rRNA V4~V5区的Illumina MiSeq双末端测序,4个样品获得的序列长度有99.80%集中在381~400 bp,平均长度为395 bp。

**OTU分布统计与稀释性曲线** 采用对序列进行随机抽样的方法,以抽到的序列数与它们所能代表OTU的数目构建稀释性曲线(图2)。所有样品曲线均趋于平缓达到平台期,说明实际测序量足以覆盖群落物种组成,能够真实反

映群落各物种间的相对比例关系(图2)。

**多样性指数** 4个样品的 $\alpha$ 多样性指标与样本文库的覆盖率结果显示,从A依次到D的Chao值、ACE值和Shannon指数基本呈下降趋势,而Simpson指数则呈升高趋势,这表明,从A依次到D样品中微生物多样性逐渐降低(表2)。

**分类学分析** 统计微生物群落在门水平的分布,结果显示4个样品中微生物主要由变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)等组成,尤其是代表附着态生长的微生物样品D中,变形菌门的相对丰度达到92.40%,而浮游态生长的微生物样品C中,变形菌门的相对丰度达到58.58%,并且含有其他3个样品中不包含的绿菌门(Chlorobi)(相对丰度18.92%)(图3)。

统计微生物群落在属水平的分布,结果显示,样品C和D中微生物最丰富的一个属是变形菌门的红假单胞菌属(*Rhodopseudomonas*),相对丰度分别达到54.31%和73.19%,样品C有较多绿菌门的绿菌属(*Chlorobium*)(18.63%)微生物;在样品A和B中相对丰度较大的属是普氏菌属(*Prevotella*)、*Microvirgula*、弓形菌属(*Arcobacter*)、不动

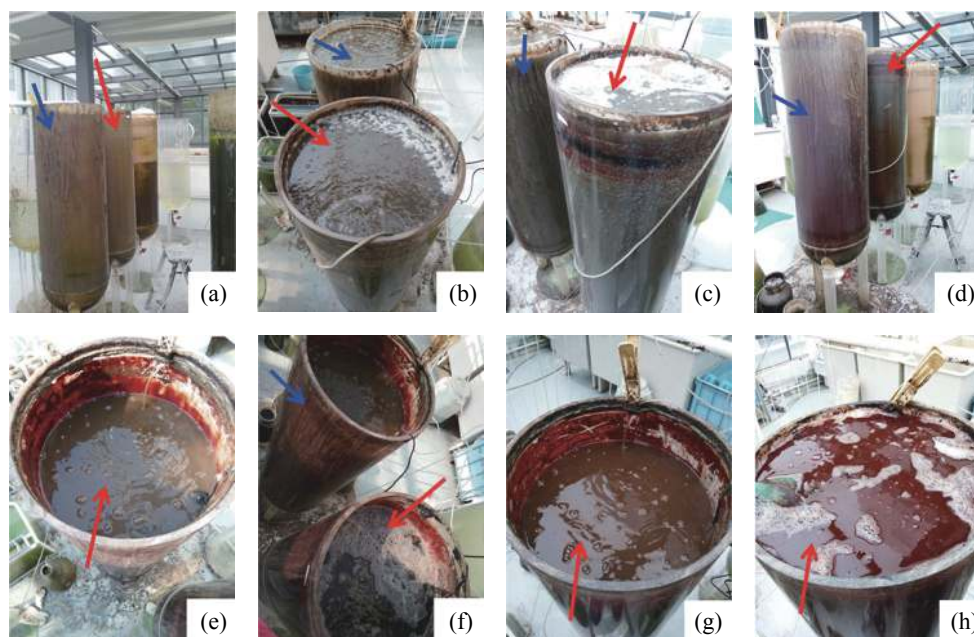


图1 有机玻璃柱Z2和Z3在不同时间的水色及附着物变化情况

图中红色箭头和蓝色箭头所指的分别为有机玻璃柱Z2、Z3; a~d分别表示第14、58、63和64天时的照片, e和g是柱Z2分别在第80天和96天时转移出部分水后的照片, f是柱Z2、Z3在第80天均转移出部分水之后的照片; h是柱Z2在第127天时的照片

Fig. 1 The changes in water color and the attached material in plexiglass column Z2 and Z3

The red arrow and the blue arrow point to the plexiglass column Z2 and Z3, respectively; a-b. the pictures in day 14, 58, 63 and 64; e and g. the column Z2 with part of the water moved away on day 80 and 96; f. column Z2 and Z3 with some water moved away on day 80; h. the column Z2 on day 127

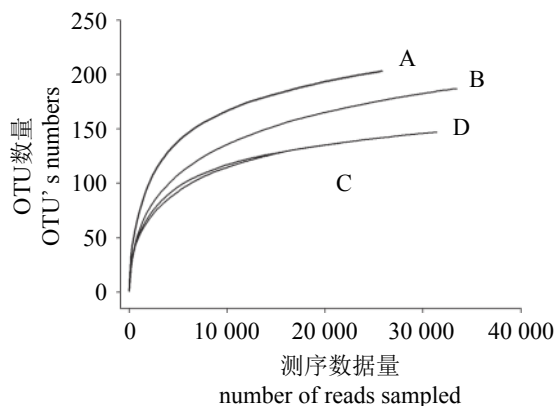


图2 测序数据量与它们所代表的OTU数目构建的稀释性曲线

A、B、C分别表示柱Z2中第55、75和118天时的水样, D表示Z2中第118天时的附着物样品, 下同

Fig. 2 Rarefaction curves for OTU and the number of reads sampled of the 4 samples

A, B, C indicates the water samples in column Z2 on day 55, 75 and 118, respectively, D indicates the attached sample of column Z2 on day 118, the same below

细菌属(*Acinetobacter*)、PL-11B8\_wastewater-sludge\_group\_norank、不动杆菌属(*Acinetobacter*)等(图4)。但是本实验方法不能将红假单胞菌属鉴别到具体的已知种。

样品C和D中出现了红假单胞菌属优势(图4), 即出现了浮游态和附着态生长的红假单胞菌属光合细菌。

表2 4个样品的α多样性指标与样本文库的覆盖率

Tab. 2 The alpha diversity index and the library coverage of the 4 samples

样品 samples	Ace	Chao	Shannon	Simpson	覆盖率 coverage
A	231.61	234.71	2.91	0.10	0.999
B	220.52	222.65	2.60	0.12	0.999
C	158.06	152.77	1.94	0.33	0.999
D	164.63	165.75	1.41	0.54	0.999

### 3 讨论

本实验中红假单胞菌属光合细菌优势形成的过程: 淡水鱼配合饲料在腐烂发酵后降解为含高浓度碳、氮、磷等营养的物质, 同时辅助以适宜的光照、水温等物理条件, 满足了红假单胞菌属光合细菌的大量生长需求, 从而促进了浮游态和附着态红假单胞菌属光合细菌的高密度培养。

实验期间TN、TP和TOC结果显示, 淡水鱼配合饲料腐烂后水体的TN、TP和TOC浓度非常高。常用的红假单胞菌培养基是van Niel紫色非硫光合细菌富集培养基与分离培养基<sup>[11]、13]</sup>、RCV-BN分离纯化基础培养基<sup>[12]</sup>等, 其中有高浓度的含氮、磷盐类, 钙盐或者镁盐, 酵母膏, 维生素, 微量元素等。单纯从碳、氮、磷等3种元素的浓度分析, 本实验培养后期, 水色因红假单

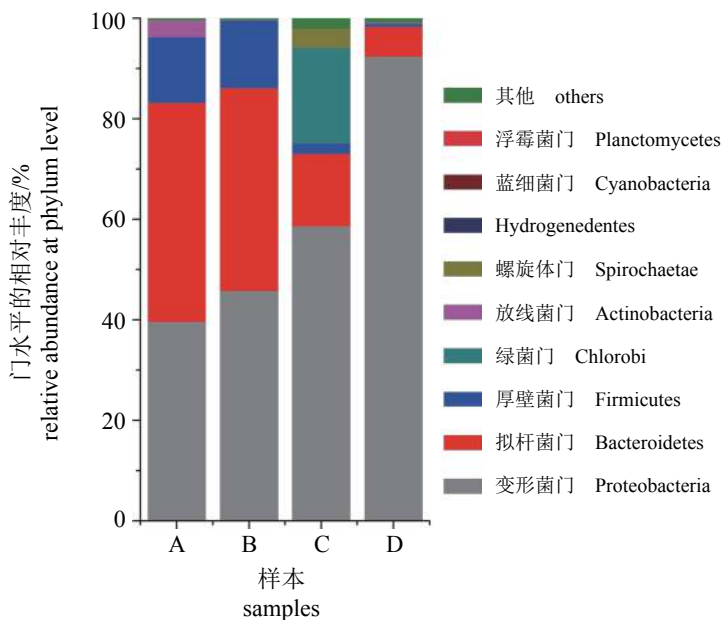


图3 4个样品中微生物在门水平的相对丰度

Fig. 3 Relative abundance of the microorganisms at phylum level of the 4 samples

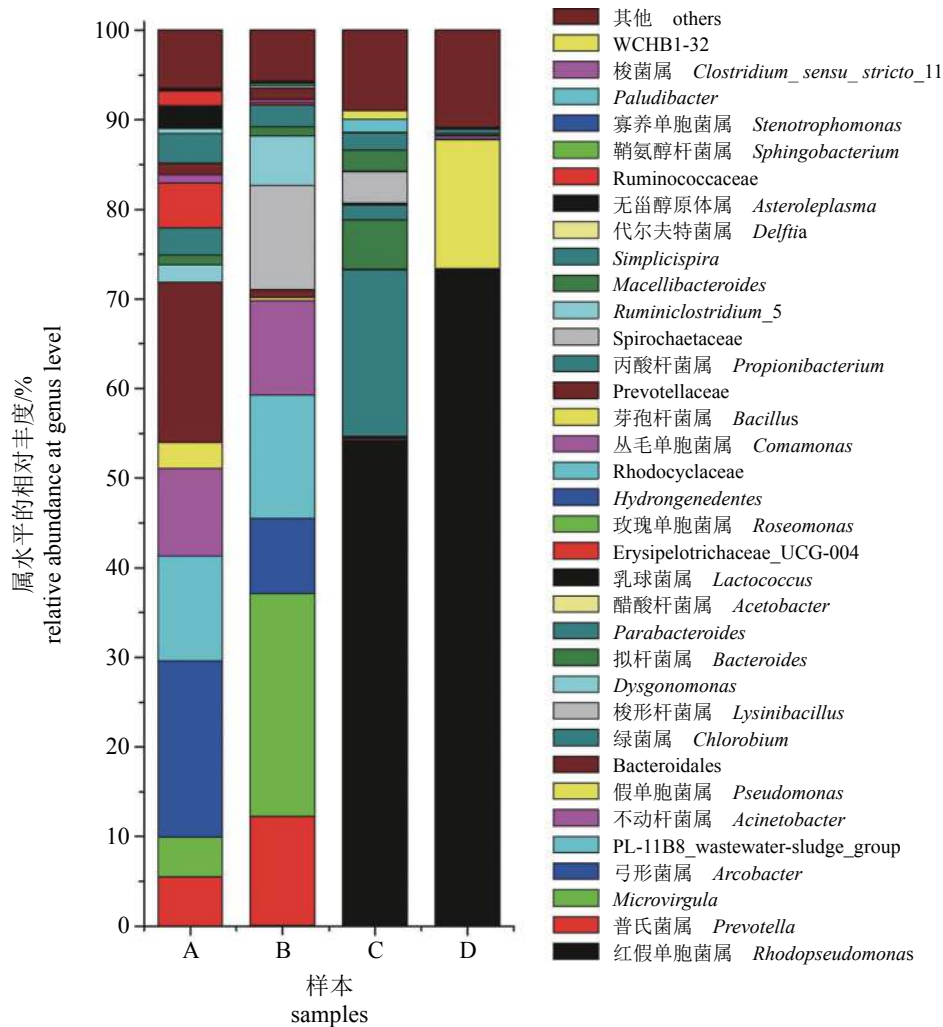


图4 4个样品中微生物在属水平的相对丰度

Fig. 4 Relative abundance of the microorganisms at genus level of the 4 samples

胞菌属光合细菌逐渐失去优势而变成棕色或浅棕色时,水体的碳、氮、磷浓度变得较低,其他阶段碳、氮、磷的浓度基本高于多种培养基中的浓度。而本实验以配合饲料为原料,与已公开的这些培养基成分看似有明显不同,但是红假单胞菌属光合细菌却在实验条件下大量生长成为优势种,其中应该有本质上的相似或相同之处,即其中的机理应该相同或者相似。

虽然文献中的红假单胞菌培养基与本实验的配合饲料成分不同,但红假单胞菌属的许多菌株能以有机物作为供氧体和碳源,具有分解和去除有机物的能力。朱章玉等<sup>[21]</sup>从上海佘山豆制品厂废水流经的底泥中分离得到一株红假单胞菌属菌株,其能有效处理豆制品厂的有机废水。俞吉安等<sup>[22]</sup>选取几株红假单胞菌属菌株用于处理生牛粪尿制作的高浓度有机废水,废液中

有机物的去除效果非常明显。李勤生<sup>[23]</sup>利用味精厂、淀粉厂、油脂厂的废水培养红假单胞菌均生长良好,并认为利用有机废水生产光合细菌制剂是一条有利于降低成本和兼具处理废水效益的途径。卢海凤等<sup>[24]</sup>从土壤中提取了一株红假单胞菌,能有效处理大豆加工废水。

刘如林<sup>[13]</sup>对光合细菌在有机废水处理中的应用进行了综述,尤其对其机理进行了详细介绍:复杂的有机物先经异养菌降解,生成低级脂肪酸等小分子物质,再由光合细菌降解,而红螺菌科的一些菌在光照或黑暗、有氧或无氧条件下均能利用小分子有机物迅速增殖。其中,光合细菌在处理有机废水时,为保证良好的水处理效果,需要维持基质的可溶化和保持系统中光合细菌的优势,并需要加大光合细菌接种量和及时补充菌体,以及适当加入锰、铁

等金属离子<sup>[13]</sup>。并且约2周后,光合细菌逐渐减少,由活性污泥微生物和绿藻所代替<sup>[13]</sup>。

由本实验可见附着态生长的红假单胞菌形成优势需要约60~80 d,而浮游态生长的红假单胞菌形成优势需要更长的时间,这段过程也是异养菌降解饲料原料为小分子物质,包括多糖、含氮有机化合物、脂肪和脂肪酸等大分子物质在有氧或者无氧环境下被细菌分解为有机酸、醇、醛、氨基酸、胺,甚至二氧化碳、氨、甲烷、硫化氢和水等<sup>[25]</sup>,然后红假单胞菌利用这些小分子物质大量生长成为优势菌。但是本实验中不用添加红假单胞菌作为菌种,不另外补充盐类或金属离子,而且其中红假单胞菌保持优势的生存时间长于文献中提到的2周<sup>[13]</sup>,这应该与添加了足量的配合饲料原料,且配合饲料原料中含有磷酸二氢钙(一般添加比例为1%<sup>[26]</sup>)、矿物质预混料(含多种金属元素,一般添加比例为0.3%<sup>[26]</sup>)、多种维生素、氨基酸等有关,其能满足红假单胞菌高密度生长对氮、磷、碳以及金属离子的需求。因此,推断本实验中红假单胞菌规模化培养方法的机理:随着配合饲料在水中浸泡时间的延长,异养菌降解饲料原料中的鱼粉、豆粕、动物蛋白、面粉等大分子有机物为小分子物质,并在适当的水温、光照等物理因素的影响下,其中小分子态的含氮、磷、碳等的物质及金属离子、维生素、微量元素的浓度满足了红假单胞菌的高密度生长需求,从而红假单胞菌大量生长成为优势种。

但是,本实验中暗红色物质(即红假单胞菌属光合细菌)先以附着态形式出现在容器内壁上,而后才在水体中大量出现,这表明容器内壁上的条件比水体中更有利于红假单胞菌属光合细菌大量生长。而容器内壁上的条件与水体中最大的不同就是光照强度,因此推断本实验中出现的红假单胞菌对光照有需求,只是具体需求范围不能在本实验中确定。

红假单胞菌是自然界含水环境中广泛分布的一类光合细菌,在多种水环境中都能发现,如李勤生等<sup>[8]</sup>在20世纪九十年代从武汉东湖水体中分离培养和筛选得到了红假单胞菌;杨素萍等<sup>[27]</sup>从污水处理厂及造纸厂的废水中分离得到不同种类的红假单胞菌;郭秒等<sup>[28]</sup>发现红假单胞菌在贫营养的阳宗海和富营养的滇池中广泛存在,并且是紫色非硫细菌中的优势种类;黄雪

娇等<sup>[29]</sup>从云南某一沼泽地中分离筛选出1株高效去除氨氮的红假单胞菌。由于红假单胞菌在自然界中广泛分布,也可断定本实验的饲料腐烂过程中存在红假单胞菌,这也成为本实验不用添加红假单胞菌种源的基本原因。

但是红假单胞菌在自然界中并不能天然形成优势种群,往往只是众多微生物种类中的一部分。微生物群落结构受到多种环境因素的影响,其中环境的营养水平是影响微生物群落结构尤其是不同的优势种类的一个重要因素<sup>[30-31]</sup>。在我国太湖,随着水体的富营养化,藻类水华尤其是蓝藻(蓝细菌)水华频繁发生<sup>[30]</sup>。由于富营养湖泊中氮、磷、碳等物质的浓度水平最高为几十毫克每升<sup>[31]</sup>,远低于本实验中的浓度,因此不能由富营养湖泊中的微生物现象直接推断本实验的微生物现象。但是,在发生严重蓝藻(蓝细菌)水华的太湖,其水环境能满足蓝细菌持续的高密度生长,太湖就如同一个自发培养蓝细菌的大容器;这与本实验红假单胞菌在适宜条件下自发形成优势有相似之处。

由我国太湖、滇池等富营养水体中蓝藻(蓝细菌)水华自发形成优势而大量暴发及本实验中红假单胞菌属光合细菌自发形成优势,可见尽管不同的生态环境中微生物群落结构和优势种类均可能存在差异,但是当相应的环境因子极大地满足某一类细菌生长繁殖的需求时,这类细菌可能出现高密度生长而成为优势种类。本实验中的配合饲料腐烂分解后导致水体的营养成分接近红假单胞菌的人工培养基,从而实现了红假单胞菌的规模化培养;但是本实验中实现浮游态红假单胞菌高密度生长的同时,还实现了容器内壁上成泥浆状附着态红假单胞菌的极高密度生长,从而不需浓缩和富集便可直接得到高密度的菌体。相当于以淡水鱼配合饲料腐烂发酵形成的高浓度有机废水可以作为红假单胞菌属光合细菌的优质培养基。这为红假单胞菌属的规模化培养提供了一种简单、高效的方法。

能够分解鱼粉、豆粕、动物蛋白、面粉等大分子有机物的异养菌种类有多种<sup>[25]</sup>,在本实验条件下逐渐形成了红假单胞菌优势而不是其他种类优势,还需要进一步研究,这可能与配合饲料成分降解后形成的碳、氮、磷、金属离子等物质的浓度范围、比例等有关,这也为可降

解蛋白质、碳水化合物、油脂等大分子有机物的不同种类微生物的规模化培养提供思路。

研究表明,以淡水鱼配合饲料为原料,与自来水配比后放置在玻璃温室中腐烂发酵培养时,不添加其他物质和菌种种源,实现了附着态和浮游态红假单胞菌属光合细菌的高密度生长。提供了一种利用水产配合饲料与水一起发酵进行红假单胞菌属光合细菌规模化培养的方法,为其他可降解大分子有机物的异养菌的规模化培养提供参考。

#### 参考文献:

- [1] 布坎南R E,吉本斯N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 第8版. 北京:科学出版社, 1984.  
Buchanan R E, Gibbons N E. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984(in Chinese).
- [2] Stackebrandt E, Murray R G E, Trüper H G, et al. *Proteobacteria* classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the "purple bacteria and their relatives" [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1988, 38(3): 321-325.
- [3] 马迪根M T, 马丁克J M, 帕克J. 微生物生物学[M]. 杨文博, 译. 北京: 科学出版社, 2001: 1-30.  
Madigan M T, Martinko J M, Parker J. Brock Biology of Microorganisms[M]. Yang B W, trans. Beijing: Science Press, 2001: 1-30(in Chinese).
- [4] 史家梁. 光合细菌(PSB)与日本的水产养殖[J]. 水产科技情报, 1995, 22(5): 212-216.  
Shi J L. Photosynthetic bacteria (PSB) and aquaculture in Japan[J]. Fisheries Science and Technology Information, 1995, 22(5): 212-216(in Chinese).
- [5] 黄雪娇, 杨冲, 罗雅雪, 等. 光合细菌在水污染治理中的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2014, 34(11): 119-124.  
Huang X J, Yang C, Luo Y X, et al. Research progress of photosynthetic bacteria in water pollution governance[J]. China Biotechnology, 2014, 34(11): 119-124(in Chinese).
- [6] 王小娟. 不产氧光合细菌在养殖水体生态系统恢复领域的研究进展[J]. 天津农业科学, 2016, 22(4): 40-45.  
Wang X J. Research progress of anoxygenic photosynthetic bacteria on recovery of aquatic ecosystem[J]. Tianjin Agricultural Sciences, 2016, 22(4): 40-45(in Chinese).
- [7] 李勤生. 光合细菌的基本特性及其在水产养殖中的应用研究概况[J]. 水利渔业, 1995(1): 3-5, 24.  
Li Q S. Basic characteristics of photosynthetic bacteria and their application in aquaculture[J]. Reservoir Fisheries, 1995(1): 3-5, 24(in Chinese).
- [8] 李勤生, 赵卫, 李军, 等. 湖光微生物饲料添加剂研究I. 菌种来源及鉴定[J]. 水生生物学报, 1995, 19(2): 164-170.  
Li Q S, Zhao W, Li J, et al. Study on the Huguang Microbial Additive I. Identification of photosynthetic bacteria isolated from the Donghu Lake in Wuhan[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1995, 19(2): 164-170(in Chinese).
- [9] Basak N, Jana A K, Das D. CFD modeling of hydrodynamics and optimization of photofermentative hydrogen production by *Rhodospseudomonas palustris* DSM 123 in annular photobioreactor[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2016, 41(18): 7301-7317.
- [10] 苟维超, 邓春浩, 何俊皓, 等. 光合细菌产氢研究进展与问题[J]. 可再生能源, 2013, 31(9): 94-101.  
Gou W C, Deng C H, He J H, et al. Progress and problems of hydrogen production by photosynthetic bacteria[J]. Renewable Energy Resources, 2013, 31(9): 94-101(in Chinese).
- [11] van Niel C B. Techniques for the enrichment, isolation, and maintenance of the photosynthetic bacteria[J]. Methods in Enzymology, 1971, 23: 3-28.
- [12] Weaver P F, Wall J D, Gest H. Characterization of *Rhodospseudomonas capsulata*[J]. Archives of Microbiology, 1975, 105(3): 207-216.
- [13] 刘如林. 光合细菌在有机废水处理中的应用[J]. 环境科学, 1991, 12(2): 63-67, 96.  
Liu R L. Application of photosynthetic bacteria (PSB) to the treatment of organic wastewater[J]. Environmental Science, 1991, 12(2): 63-67, 96(in Chinese).
- [14] 何春华. 光合细菌的分离鉴定和生长条件优化及应用初探[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2009.  
He C H. Research on separation, identification, growth conditions of photosynthetic bacteria and application Pre-Test[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2009(in Chinese).
- [15] 幸锋. 沼泽红假单胞菌辅酶Q<sub>10</sub>高产菌的筛选及发酵工艺优化研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2008.  
Xing F. Studies on screening of high productivity coenzyme Q<sub>10</sub> strain with *Rhodospseudomonas palustris* and optimization of the fermentation conditions[D]. Nan-



- chang: Nanchang University, 2008(in Chinese).
- [16] 余伯良. 光合细菌在养殖中的应用及培养方法[J]. 饲料与畜牧, 1998(4): 17-18.  
Yu B L. Application and cultivation method of photosynthetic bacteria (PSB) in agriculture[J]. Feed and Animal Husbandry, 1998(4): 17-18(in Chinese).
- [17] Gross A, Boyd C E. A digestion procedure for the simultaneous determination of total nitrogen and total phosphorus in pond water[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 1998, 29(3): 300-303.
- [18] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. Nature methods, 2010, 7(5): 335-336.
- [19] Edgar R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST[J]. Bioinformatics, 2010, 26(19): 2460-2461.
- [20] Amato K R, Yeoman C J, Kent A, *et al.* Habitat degradation impacts black howler monkey (*Alouatta pigra*) gastrointestinal microbiomes[J]. The ISME Journal, 2013, 7(7): 1344-1353.
- [21] 朱章玉,周国平,俞吉安,等. 用光合细菌处理高浓度有机废水的研究[J]. 上海交通大学学报, 1985, 19(6): 22-31, 118.  
Zhu Z Y, Zhou G P, Yu J A, *et al.* Treatment of highly concentrated organic waste water with photosynthetic bacteria[J]. Journal of Shanghai Jiaotong University, 1985, 19(6): 22-31, 118(in Chinese).
- [22] 俞吉安,李堃宝,张承康,等. 应用光合细菌处理高浓度有机废水的新技术-PSB法处理家畜排泄物的研究[J]. 环境科学, 1987, 8(3): 47-53.  
Yu J A, Li K B, Zhang C K, *et al.* A new technique for treating high concentration of organic wastewater by photosynthetic bacteria - PSB method for the treatment of livestock excreta[J]. Environmental Science, 1987, 8(3): 47-53(in Chinese).
- [23] 李勤生. 湖光微生物饲料添加剂研究 II. 光合细菌生产性培养的主要技术参数研究[J]. 水生生物学报, 1995, 19(4): 344-349.  
Li Q S. Study on the Huguang Microbial Additive II. Essential technical parameters in batch culture of photosynthetic bacteria[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1995, 19(4): 344-349(in Chinese).
- [24] 卢海凤,张光明,何春华. 一株光合细菌的鉴定及其处理大豆加工废水试验[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2011, 43(12): 72-76.  
Lu H F, Zhang G M, He C H. The identification of a strain of photosynthetic bacteria and its effect in treating soybean wastewater[J]. Journal of Harbin Institute of Technology, 2011, 43(12): 72-76(in Chinese).
- [25] 刘慧. 现代食品微生物学[M]. 第2版. 北京: 中国轻工业出版社, 2011.  
Liu H. Modern Food Microbiology[M]. 2nd ed. Beijing: China Light Industry Press, 2011(in Chinese).
- [26] 付闰吉,纪文秀,王岩,等. 不同饲料蛋白水平下点带石斑鱼对鸡肉粉、羽毛粉和血粉混合物的利用能力[J]. 水产学报, 2010, 34(10): 1525-1533.  
Fu R J, Ji W X, Wang Y, *et al.* The capacity of Malabar grouper in utilizing a blend of poultry by-product meal, feather meal and blood meal as fish meal substitutes at different dietary protein levels[J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(10): 1525-1533(in Chinese).
- [27] 杨素萍,张肇铭,赵春贵. 绿色红假单胞菌和绿硫红假单胞菌的分离与鉴定[J]. 微生物学报, 1995, 35(2): 91-96.  
Yang S P, Zhang Z M, Zhao C G. Isolation and identification of *Rhodopseudomonas viridis* and *Rhodopseudomonas sulfoviridis*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 1995, 35(2): 91-96(in Chinese).
- [28] 郭秒,王政昆,彭昌亚,等. 阳宗海和滇池中紫色非硫细菌数量和种群结构的比较[J]. 生态学报, 2005, 25(6): 1337-1340.  
Guo M, Wang Z K, Peng C Y, *et al.* The abundance and structure comparison of purple nonsulfur bacteria between Yangzonghai Lake and Dianchi Lake[J]. Acta Ecologica Sinica, 2005, 25(6): 1337-1340(in Chinese).
- [29] 黄雪娇,杨冲,倪九派,等. 1株高效去除氨氮的红假单胞菌的分离鉴定及特性[J]. 环境科学, 2016, 37(6): 2276-2283.  
Huang X J, Yang C, Ni J P, *et al.* Isolation, identification and characteristics of a *Rhodopseudomonas* with high ammonia-nitrogen removal efficiency[J]. Environmental Science, 2016, 37(6): 2276-2283(in Chinese).
- [30] Qin B Q, Gao G, Zhu G W, *et al.* Lake eutrophication and its ecosystem response[J]. Chinese Science Bulletin, 2013, 58(9): 961-970.
- [31] Xu H, Paerl H W, Qin B Q, *et al.* Nitrogen and phosphorus inputs control phytoplankton growth in eutrophic Lake Taihu, China[J]. Limnology and Oceanography, 2010, 55(1): 420-432.

## A method for mass culture of photosynthetic bacteria *Rhodopseudomonas*

WANG Xiaodong, WEI Bu, LIU Xingguo\*, LU Shimin, GU Zhaojun, JIN Jiaohui

(Key Laboratory of Fishery Equipment and Engineering, Ministry of Agriculture,  
Fishery Machinery and Instrument Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Shanghai 200092, China)

**Abstract:** In order to study a mass culture method for photosynthetic bacteria *Rhodopseudomonas*, from January 5, 2015 to April 26, 2016, the freshwater compound fish feed with tap water was put in plexiglass columns in a greenhouse for fermentation, and neither other substances nor bacteria strain was added during the culture. During the experiment, with the decay of the feed, a kind of dark red substance gradually appeared on the inner wall of the container, and the attachment area gradually spread to the entire inner wall, and then the water body gradually turned to dark red. The results showed that the highest content of TN, TP and TOC in the water was nearly 1 200 mg/L, 700 mg/L and 2 700 mg/L, respectively, during the feed decay, and then they decreased. The high throughput sequencing analysis for the microorganisms showed *Rhodopseudomonas* was the most dominant genus in either the attached microorganisms or the planktonic microorganisms, and the relative abundance reached 73.19% and 54.31%, respectively, when the water was dark red. It showed that the high density culture of the attached or planktonic *Rhodopseudomonas* was achieved. The massive culture mechanism for *Rhodopseudomonas* in this experiment was deduced here: firstly, the compound fish feed was degraded into micromolecule substances with heterotrophic bacteria, followed by the concentration of nitrogen, phosphorus, carbon, metal ions, vitamins, trace elements and other micromolecule, which met the demand of the high density growth of *Rhodopseudomonas* with the conditions of appropriate water temperature, light and other physical factors, and then *Rhodopseudomonas* massively grew to become the dominant genus. This research provides a method for mass culture of *Rhodopseudomonas* with fermentation of aquatic compound feed and water, which also provides useful information for the large-scale culture of other heterotrophic bacteria that can biodegrade macromolecules.

**Key words:** *Rhodopseudomonas*; photosynthetic bacteria; compound feed; culture method

**Corresponding author:** LIU Xingguo. E-mail: liuxg1223@163.com

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China(41401580); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS(2017GH10); National Infrastructure of Fishery Germplasm Resources(2017DKA30470)