

## 循环水养殖系统生物滤池细菌群落的 PCR-DGGE 分析

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

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

**摘要:** 通过模拟实验对循环水养殖系统中不同初始  $\text{NH}_4^+$ -N 浓度的生物滤池中生物膜上和水中的细菌数量及群落种类组成进行了研究。对成熟生物膜及水体样品中的异养菌、氨氧化菌、亚硝酸盐氧化菌的培养计数结果表明, 随着生物滤池初始氨氮浓度增大, 除异养细菌数量逐渐下降外, 生物膜上的氨氧化菌和亚硝酸盐氧化菌数量呈逐渐增加趋势, 且均高出水样 3~4 个数量级; 同时对上述样品的 16S rRNA 基因片段的 PCR 扩增产物进行变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 分析及其序列同源性分析的结果表明, 生物膜和水中都有较高的细菌多样性, 同一初始氨氮浓度的滤池中生物膜上的细菌多样性高于水中的。生物滤池中的细菌主要由拟杆菌门的黄杆菌纲和变形菌门的  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ - 变形菌纲的 15 种细菌组成。生物膜上的优势菌包括奥雷氏菌属、湖饲养者菌属、泥滩杆菌属、沉积杆菌属、雷辛格氏菌属、冷蛇形菌属和亚硝化单胞菌属等; 水体中的优势菌则有明显差异, 主要有蛋黄色杆菌属、*Nautella*, 玫瑰杆菌属和一种硫氧化菌等。初始氨氮越高的滤池中, 亚硝化单胞菌属的细菌在生物膜上所占比例越高, 逐渐成为优势菌之一。实验证实, 挂膜初期, 提高水体中初始氨氮浓度, 有利于硝化细菌的富集和固着, 提高生物滤池的除氮效率。

**关键词:** 循环水海水养殖系统; 变性梯度凝胶电泳; 细菌群落; 硝化细菌; 生物滤池; 生物膜  
**中图分类号:** Q 938; S 959 **文献标识码:** A

氨氮和亚硝酸氮是水产养殖环境的主要胁迫因子, 也是造成环境污染和生态问题的主要因子之一<sup>[1]</sup>。利用生物膜法去除养殖水体中的  $\text{NH}_4^+$ -N、 $\text{NO}_2^-$ -N 等有害污染物质, 已成为工厂化循环水养殖系统中最为有效的方法之一<sup>[2]</sup>。生物膜由微生物附着于载体而形成, 形成生物膜的过程称之为生物挂膜。生物挂膜通常有两种形式, 一种采用已筛选出的具有特殊功能的微生物进行挂膜; 另一种利用土著微生物进行自然挂膜, 后者因操作简便、节约成本而被广泛应用。弄清生物膜中微生物的数量、种类组成等重要信息, 对研究生物膜的反应机理、污染物降解和转化途径具有十分重要的学术价值, 同时对工厂化循环水鱼类养殖系统中生物滤池的构建及其脱氮效率的分析具有重要的指导意义。

PCR-DGGE 方法避免了传统培养过程中微生物培养性的限制, 可以通过特定核酸片段的序列获得微生物群落种类组成及其变化的信息, 从而成为一种快速且相对有效的研究微生物群落变化和对比的方法, 目前在环境科学领域已经得到了广泛的应用<sup>[3-5]</sup>。本文针对不同初始氨氮浓度的生物滤池中生物膜及水体, 在对特定生理类群细菌培养计数的基础上, 采用 PCR-DGGE 技术对其细菌种类组成差异进行了分析, 以期对循环水海水养殖系统生物滤池的净化机理和效率研究提供理论基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验设计

试验采用圆柱形的玻璃钢水槽作为生物滤

收稿日期: 2010-11-28 修回日期: 2011-02-11

资助项目: 国家科技支撑计划项目(2006BAD09A03); 国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA100305); 农业科技成果转化资金项目(2007GB23260387); 黄海所基本科研业务费项目(2007-qn-06)

通讯作者: 李秋芬, Tel: 0532-85836341, E-mail: liqf@ysfri.ac.cn

池,其直径为 1.0 m,高为 1.0 m,有效体积为 600 L,均匀悬挂生物载体,生物载体由化学纤维丝(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,不仅微生物能均匀地附着在每一根丝条上,而且能使气、水、微生物之间充分接触,获得较大的比表面积。

试验共布设 4 个生物滤池,挂膜实验前,用沙滤海水浸泡滤池两天后,泵入舌鳎养殖池的水,其水质指标如下:氨氮 0.14~0.17 mg/L,亚硝酸氮 0.015~0.032 mg/L,硝酸氮 0.31~0.36 mg/L,磷酸盐 0.046~0.058 mg/L,  $\text{COD}_{\text{Mn}}$  5.28~5.36 mg/L, pH 7.96~8.22,盐度 30。在 4 个生物滤池中加入不同浓度的氯化铵使其初始氨氮浓度分别为 2 mg/L(1#),5 mg/L(2#),10 mg/L(3#),20 mg/L(4#)。为了促进净化微生物繁殖与生长,同时在每个生物滤池中加入营养物质:葡萄糖、亚硝酸钠、磷酸氢二钾、磷酸二氢钠、硫酸锰等。然后将生物载体悬挂在滤池中,间断曝气,进行自然生物挂膜。

### 1.2 样品采集及细菌计数

水质指标达到稳定即可认为挂膜成熟,分别从 1#、2#、3#、4#生物滤池中取生物载体 10 g,放入 50 mL 灭菌离心管中(分别记为 1#、2#、3#、4#样品),同时从初始氨氮浓度为 10 mg/L 的生物滤池中取水样 100 mL 于灭菌瓶中(记为 5#样品),每个池取 3 个平行样。取一定量生物膜加水振荡后,取上清液和水样一起,立即进行梯度稀释,参照海洋调查规范(国家海洋局,1995),涂布 2216E 平板培养基,28 °C 培养 2 d 后,进行总异养菌计数;同时涂布氨氧化细菌、亚硝酸盐氧化菌平板培养基<sup>[6]</sup>,28 °C 培养一周,进行氨氧化菌和亚硝酸盐氧化菌计数,每个样品做 3 个重复;另一部分水样经孔径 0.22  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤后,将滤膜和其余生物膜冷冻于 -20 °C。

### 1.3 样品总 DNA 的提取

将水样的滤膜剪成碎片,生物膜样品解冻,参照 FORTIN 等<sup>[7]</sup>的化学-酶解法提取基因组 DNA,即分别加入 5 mL 灭菌蒸馏水,以最高速涡旋振荡 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  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ,1.5 mol/L NaCl,pH 8.0);30 °C 和 37 °C 各振荡 30 min;再加入 20  $\mu\text{L}$  蛋白酶 K(100

mg/mL),37 °C 振荡 1 h;加入 20% SDS 溶液 100  $\mu\text{L}$ ,85 °C 水浴 30 min,每 10 分钟轻轻颠倒几次;然后 5 800 r/min(3 084 g),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(5 295 g),4 °C 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,-20 °C 沉淀过夜;7 600 r/min(5 295 g),4 °C 离心 30 min,弃上清液;用 2 mL 70% 乙醇清洗沉淀两次;7 600 r/min(5 295 g),4 °C 离心 10 min,沉淀干燥后用 50  $\mu\text{L}$  无菌水溶解,即获得 DNA 提取液。

### 1.4 PCR 扩增

采用细菌通用引物 U341F(5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3')和 U758R(5'-CTACCA-GGTATCTAATCC-3')<sup>[8]</sup>(由上海生工有限公司合成)对总 DNA 进行 PCR 扩增,其中在 U341F 的 5' 端加有 50 bp 的 GC 链(5'-CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCAGGGGGG-3')<sup>[9]</sup>。PCR 扩增体系(50  $\mu\text{L}$ ):dNTP(2  $\mu\text{mol/L}$ ,Fermentas)5  $\mu\text{L}$ ,10 倍反应缓冲液(不含  $\text{MgCl}_2$ )5  $\mu\text{L}$ , $\text{MgCl}_2$ (25 mmol/L, Fermentas)3  $\mu\text{L}$ ,BSA(Amresco, USA)溶液(20 mg/mL)1.0  $\mu\text{L}$ ,引物各 1.0  $\mu\text{L}$ (25  $\mu\text{mol/L}$ ),Taq DNA 聚合酶(Fermentas)0.5  $\mu\text{L}$ ,模板 2  $\mu\text{L}$ ,最后加灭菌的 Milli-Q 超纯水至体积为 50  $\mu\text{L}$ 。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 °C 预变性 5 min,然后 94 °C 变性 1 min,65 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 2 min,每个循环退火温度降低 1 °C 直至 55 °C,循环 10 次;然后 94 °C 变性 1 min,55 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 2 min,循环 20 次,在 72 °C 保持 10 min,最后 4 °C 保温。PCR 扩增产物使用 1.4% 琼脂糖进行凝胶电泳,检查扩增效果。

### 1.5 DGGE 分析

PCR 产物用 E. Z. N. A.™ 胶回收试剂盒(Omega Bio-tech)回收,溶解于 60  $\mu\text{L}$  无菌水中。取 12  $\mu\text{L}$ (约 800 ng)纯化后的 PCR 产物在通用突变检测系统(Bio-Rad, USA)上进行电泳,按照仪器说明书,制备聚丙烯酰胺凝胶,浓度为 8%,变性剂梯度范围为 30%~70%,电泳电压为 80 V,电泳时间为 16 h,温度恒定为 60 °C<sup>[12]</sup>。电泳结束后,凝胶以 0.5  $\mu\text{g/mL}$  的 SYBR Green 溶液染色,洗涤数次后于 Gel Doc1000 凝胶成像系统

(BioRad, USA) 上观察、拍照。

### 1.6 目的条带回收、重扩增、测序及系统发育树构建

在蓝光照射下切下 DGGE 胶上比较亮的特征性条带,浸泡于 60  $\mu\text{L}$  无菌水中,37  $^{\circ}\text{C}$  过夜,以上清液作为模板,取 5  $\mu\text{L}$  模板(条带回收原液稀释 10 倍)用不带 GC 链的引物进行 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 NCBI 的 BLAST 检索系统 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 对得到的序列进行同源性分析,并使用 ClustalX 1.83 软件与从 GenBank 数据库中获得的序列相似性较高的菌株的序列进行多序列匹配排列 (Multiple alignments),使用软件 MEGA 3.1,采用邻接法 (Neighbor-Joining) 获得系统发育树,并通过 Bootstrap 法(1 000 次重复)检验。

## 2 结果

### 2.1 生物膜及水样中 3 个类群细菌的数量

为了解生物滤池中自然挂膜成熟的生物膜上具有代表性的细菌的数量,对提取的生物膜及水样中所含有的异养菌、氨氧化细菌、亚硝酸盐氧化菌进行培养计数。从表 1 可知,生物膜中异养菌总数随生物滤池初始氨氮浓度增大而减少,但均在  $10^8$  CFU/g 以上,氨氧化菌、亚硝酸盐氧化菌随着初始氨氮浓度增大而增多,均在  $10^7$  CFU/g 以上,其中 4# 高浓度氨氮组生物膜上氨氧化菌、亚硝酸盐氧化菌数量最多。而水样中的异养菌、氨氧化菌和亚硝酸盐氧化菌的数量分别只有  $1.12 \times 10^5$ 、 $2.31 \times 10^3$ 、 $1.57 \times 10^3$  CFU/mL,显著低于生物膜上细菌数量 ( $P < 0.05$ ),表明生物载体对细菌有良好的聚集和吸附作用,而且初始氨氮浓度越高,生物膜上氨氧化细菌和亚硝酸盐氧化菌的数量越高。

表 1 生物膜及水样中 3 类细菌的数量

Tab. 1 The numbers of 3 types of bacteria in bio-films and water samples

细菌类别 bacterial groups	细菌数量 (CFU/g) numbers of bacteria				
	1#	2#	3#	4#	5#
异养菌 heterobacteria	$(7.20 \pm 0.04) \times 10^8$	$(7.00 \pm 0.03) \times 10^8$	$(6.10 \pm 0.02) \times 10^8$	$(4.36 \pm 0.07) \times 10^8$	$(1.12 \pm 0.09) \times 10^5$
氨氧化菌 ammonium-oxidizing bacteria	$(2.65 \pm 0.05) \times 10^7$	$(3.90 \pm 0.08) \times 10^7$	$(5.60 \pm 0.05) \times 10^7$	$(1.23 \pm 0.03) \times 10^8$	$(2.31 \pm 0.03) \times 10^3$
亚硝酸盐氧化菌 nitrite-oxidizing bacteria	$(1.74 \pm 0.10) \times 10^7$	$(2.63 \pm 0.11) \times 10^7$	$(3.20 \pm 0.04) \times 10^7$	$(3.92 \pm 0.04) \times 10^7$	$(1.57 \pm 0.08) \times 10^3$

### 2.2 生物膜和水样总 DNA 的提取及 16S rDNA 的 PCR 扩增

生物膜及水样提取的总 DNA 通过 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检验,结果显示均得到条带(图 1-A),总 DNA 片段大小主要集中在 23 kb 左右,符合细菌基因组的大小<sup>[10]</sup>。因此,提取的 DNA 属于比较完整的细菌基因组 DNA,且所采用的提取方法可以顺利提取样品中的 DNA 片段。

采用细菌通用引物 (U341FGC/U758R) 对 16S rDNA 进行扩增所产生的 DNA 片段均为单一条带(图 1-B),片段大小约为 417 bp,符合引物设计的长度,表明扩增产物无明显的非特异性扩增现象。

### 2.3 细菌 16S rDNA 片段 DGGE 指纹图谱

从 DGGE 电泳图谱(图 2)中可知,成熟的生物膜上存在多种细菌,不同初始氨氮浓度下所形成的生物膜电泳条带数目和位置不完全相同,优势条带(比较亮的条带)也有差异。低浓度组生

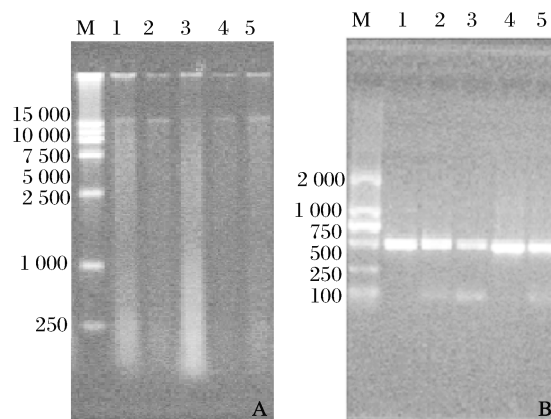


图 1 生物膜及水样中提取的总 DNA 及其 PCR 产物  
a. 总 DNA; b. PCR 产物; M. 分子量标志; 1. 1# 滤池生物膜; 2. 2# 滤池生物膜; 3. 3# 滤池生物膜; 4. 4# 滤池生物膜; 5. 3# 滤池水样。

Fig. 1 Total DNA extracted from bio-film and water samples and their PCR products

a. Total DNA; b. PCR products; M. Marker; 1. 1# bio-filter pond; 2. 2# bio-filter pond; 3. 3# bio-filter pond; 4. 4# bio-filter pond; 5. water samples from 3# bio-filter pond.

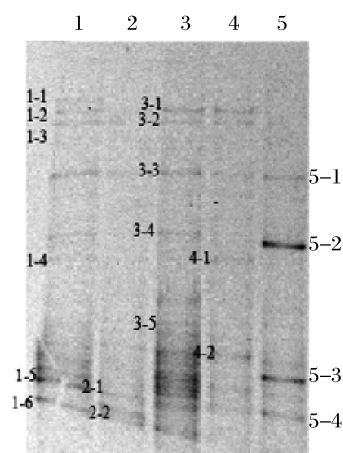


图2 不同样品 16S rDNA 基因扩增产物的变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 图谱

1. 1#滤池生物膜; 2. 2#滤池生物膜; 3. 3#滤池生物膜; 4. 4#滤池生物膜; 5. 3#滤池水样。

Fig. 2 DGGE profile of 16S rDNA gene amplification products from different samples

1. 1# bio-filter pond; 2. 2# bio-filter pond; 3. 3# bio-filter pond; 4. 4# bio-filter pond; 5. water samples from 3# bio-filter pond.

物滤池中 2#生物膜样品电泳条带数目较少,多样性较低;高浓度组生物滤池 3#样品电泳条带数目最多,表明不同初始氨氮浓度对生物滤池中不同细菌在生物载体上的附着、生长及形成优势菌有所影响;同一氨氮浓度的生物滤池中,生物膜样品(3#)的电泳条带数目比水样(5#)的电泳条带数目明显较多,表明生物膜上的附着细菌种类比水体中丰富,且丰度较均匀,水体中种类数较少,且优势条带明显。

#### 2.4 DGGE 条带的序列比对结果分析

从 DGGE 胶上切下 17 条条带,经 PCR 重扩增和测序,一共获得 17 条不同的 16S rDNA 序列,并通过 NCBI 基因库比对,得到与该序列最为相近的序列,初步判断其分类地位,一般认为 16S rDNA 序列同源性小于 98%,可以认为属于不同种的细菌,如果同源性小于 93%~95%,则可以认为属于不同的属<sup>[6]</sup>。根据序列比对结果和从数据库中获取的参照序列构建的系统发育树(图 3)可看出,生物滤池中存在至少 15 种细菌,它们分别属于拟

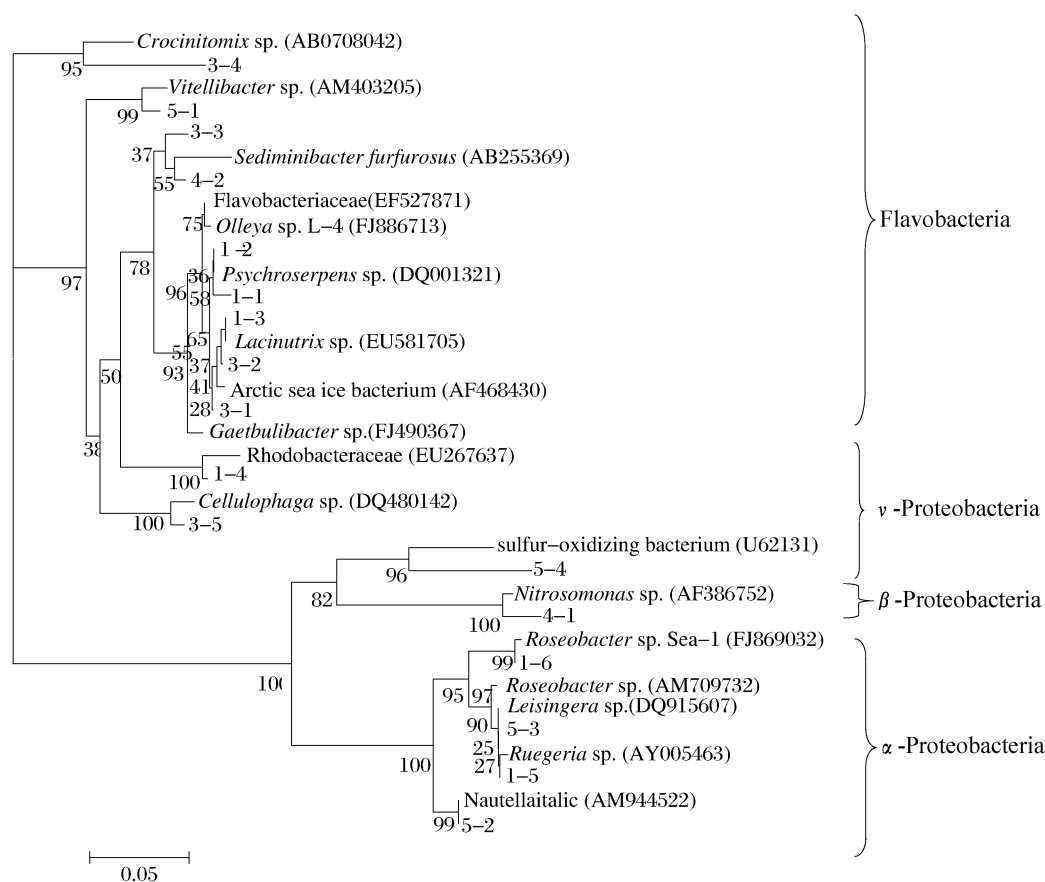


图3 基于 DGGE 条带 16S rDNA 序列的细菌系统发育树

图中的标尺代表遗传学距离。

Fig. 3 Phylogenetic tree of bacteria based on the 16S rDNA sequences of DGGE bands

Bar indicates genetic distance.

杆菌门(Bacterioidetes)黄杆菌纲(Flavobacteria)中的冷蛇形菌属(*Psychroserpens*)、奥雷氏菌属(*Olleya*)、湖饲养者菌属(*Lacinutrix*)、番红线菌属(*Crocinitomix*)、沉积杆菌属(*Sediminibacter*)、蛋黄色杆菌属(*Vitellibacter*)、泥滩杆菌属(*Gaetbulibacter*)和属不能确定的黄杆菌科细菌(Flavobacteriaceae bacterium),以及变形菌门(Proteobacteria)α-变形菌纲(α-Proteobacteria)的玫瑰杆菌属(*Roseobacter*)、雷辛格氏菌属(*Leisingera*)、*Nautella italica*、β-变形菌纲(β-Proteobacteria)的亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)、和γ-变形菌纲(γ-Proteobacteria)中的嗜纤维菌属(*Cellulophaga*)、红细杆菌科(Rhodobacteraceae)细菌和硫氧化菌(sulfur-oxidizing bacterium)。但是条带3-3、3-4分别与*Gaetbulibacter* sp.属和*Crocinitomix* sp.细菌的相似性在95%以下,条带1-3、1-4、3-1和5-4的分类学地位只能分到科或某一类菌,尚不能确定具体的属,有可能是尚未

培养鉴定的新属。

不同滤池的生物膜及水体中含有的细菌种类如表2所示,奥雷氏菌属(*Olleya* sp.)、湖饲养者菌属(*Lacinutrix* sp.)、泥滩杆菌属(*Gaetbulibacter* sp.)、淡棕沉积杆菌(*Sediminibacter furfurosus*)和雷辛格氏菌属(*Leisingera* sp.)存在于所有滤池的生物膜样品中,是生物膜上特有的优势菌,而冷蛇形菌属(*Psychroserpens* sp.)仅是初始氨氮浓度最低的1#样品的优势菌之一,亚硝化单胞菌属*Nitrosomonas* sp.的在生物膜上的优势度则随着初始氨氮浓度的提高逐渐明显。水样中的优势菌则与生物膜上的有显著差异,主要是蛋黄色杆菌属*Vitellibacter* sp.,*Nautella italica*,玫瑰杆菌属(*Roseobacter* sp.)和一种硫氧化菌(sulfur-oxidizing bacterium)。其中*Nautella italica*优势度最明显。

表2 循环水养殖系统生物膜及水体中优势菌种类及分布

Tab.2 Dominant bacteria and their distribution in bio-films and water of re-circulating culture system

序号	条带号 no. of bands	NCBI 最相近的菌种名称及其相似性 closest organisms in NCBI and their similarities	1#	2#	3#	4#	5#
1	1-1	<i>Psychroserpens</i> sp. (DQ001321)	+	-	-	-	-
2	1-2 同 3-1	<i>Olleya</i> sp. L-4 (FJ886713)	++	+	++	++	-
3	1-3 同 3-2	<i>Lacinutrix</i> sp. (EU581705)	++	+	++	++	-
4	3-3	<i>Gaetbulibacter</i> sp. (FJ490367)	++	+	++	+	-
5	5-1	<i>Vitellibacter</i> sp. (AM403205)	-	-	-	-	+
6	3-4	<i>Crocinitomix</i> sp. (AB0708042)	+	-	++	+	-
7	5-2	<i>Nautella italica</i> (AM944522)	-	-	-	-	+++
8	1-4	Rhodobacteraceae (EU267637)	+	-	-	-	-
9	4-1	<i>Nitrosomonas</i> sp. (AF386752)	-	+	+	++	-
10	3-5	<i>Cellulophaga</i> sp. (DQ480142)	-	-	+	-	-
11	4-2	<i>Sediminibacter furfurosus</i> (AB255369)	+	+	+	++	-
12	5-3	<i>Roseobacter</i> sp. (AM709732)	-	-	-	-	++
13	2-1(同 1-5)	<i>Leisingera</i> sp. (DQ915607)	+	+	+	+	-
14	5-4	sulfur-oxidizing bacterium (U62131)	-	-	-	-	+
15	2-2(同 1-6)	<i>Roseobacter</i> sp. Sea-1 (FJ869032)	+	+	+	-	-

注: + 优势菌之一, ++ 优势度较高, +++ 绝对优势菌, - 非优势菌。

Notes: + dominant, ++ more dominant, +++ the most dominant, - non-dominant.

### 3 讨论

从电泳图谱反映的优势菌种数来看,每个样品均具有4种以上的优势菌种。这是由于自然水体中含有多种分别具有不同生理功能的细菌,而生物载体具备可供附着的栖息条件,水体中一部

分营附着生活的细菌会逐渐附着于其上,形成生物膜上的优势菌群(图2)。不同初始氨氮浓度下,生物膜上优势菌种有所不同,与高浓度3#、4#相比,低浓度2#生物膜样品电泳条带数目较少,优势条带位置也不同,随着初始氨氮浓度增加,硝化细菌(*Nitrosomonas* sp.)的优势度逐渐明显,冷

蛇形菌属 (*Psychroserpens* sp.) 只在 1#泳道上出现, 玫瑰杆菌 (*Roseobacter* sp) 和红细杆菌科 (*Rhodobacteraceae*) 等异养菌的优势度逐渐下降, 这与培养法计数的结果一致, 说明初始氨氮浓度对生物膜上细菌的数量及优势菌种形成具有一定的影响, 初始氨氮越高, 越有利于硝化细菌的聚集, 生物膜上细菌数量及优势菌也越多, 这从挂膜过程中, 水质监测的数据也可反映出, 初始氨氮浓度越高的过滤池, 氨氮的去除率越高, 达到氨氮浓度稳定的时间越短, 2#滤池经过 40 d, 氨氮浓度从 5 mg/L 降至 0.025 mg/L, 高初始氨氮浓度的 4#滤池经过 35 d, 氨氮浓度从 20 mg/L 降至 0.86 mg/L, 而后维持在这一浓度。生物膜样品的电泳条带数目比水样的电泳条带数目多, 细菌种类更丰富, 优势菌也与水体中的优势菌有明显差异, 这表明生物载体对于细菌的生长、附着及优势菌群的形成起着重要作用, 生物膜载体对附着的细菌种类具有选择性, 水体中细菌只有一部分能附着于载体上, 水体中的优势菌, 并不一定能成为生物膜上的优势菌。

本研究通过对生物滤池中细菌 16S rRNA 基因片段的 DGGE 分离和测序表明, 生物滤池的生物膜及水样中包含的优势菌分别属于拟杆菌门的黄杆菌纲 (*Flavobacteria*) (9 个 OUTs) 和变形菌门的  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ -变形菌纲 (*Proteobacteria*) (8 个 OUTs)。这与 WAGNER 等<sup>[11]</sup>的研究成果很相似。雷辛格氏菌属 (*Leisingera*)、红细杆菌科 (*Rhodobacteraceae*) 细菌、亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*) 已在多种不同的污水生物处理工艺中被发现, 并被鉴定为对含氮污染物的去除具有主要作用的菌群<sup>[12-13]</sup>, 经这些菌的胞外酶作用, 可将大分子有机污染物降解成水溶性低分子的氨基酸、单糖和无机酸等, 从而使污染物得到降解。 $\beta$ -*Proteobacteria* 中的亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*) 是活性污泥中最常见的氨氧化菌之一<sup>[14-15]</sup>, PURKHOLD 等<sup>[16]</sup>亦报道许多废水处理系统中的氨氧化作用主要由  $\beta$  纲的 *Nitrosomonas* sp. 完成。条带 4-1 与 *Nitrosomonas* sp. 具有较高的相似性, 说明在微生物挂膜过程中, 随着初始氨氮浓度的提高, *Nitrosomonas* sp. 成为生物膜上的优势菌种, 对氨氮的去除起着主导作用, 最终挂膜成熟时氨氮浓度低于 0.02 mg/L<sup>[17]</sup>。另外, 黄杆菌科 (*Flavobacteriaceae*) 细菌、玫瑰杆菌

属 (*Roseobacter*)、泥滩杆菌属 (*Gaetbulibacter*) 等兼性厌氧细菌在低氧或无氧条件下, 能利用  $\text{NO}_3^-$  作为最终电子受体进行无氧呼吸, 即异养硝酸还原作用, 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, 这样在没有氧气存在或者低氧的条件下, 异养硝酸还原作用可以使有机物得到利用<sup>[18]</sup>, 这说明试验的生物滤池中富含多种细菌, 除了传统的硝化细菌外, 同时还存在着低氧或厌氧硝酸盐还原作用、利于硝酸盐去除的细菌。

#### 4 结论

自然挂膜成熟的生物滤池中, 生物膜上的细菌数量明显高于水中的, 且与水样中细菌的优势菌组成存在差异; 初始氨氮浓度越高, 生物膜上氨氧化细菌和亚硝酸盐氧化菌的数量越多, 而异养细菌数量则越少。

循环水养殖系统生物滤池中生物膜及水样中的优势菌分别属于拟杆菌门的黄杆菌纲 (*Flavobacteria*) (9 个 OUTs) 和变形菌门 (*Proteobacteria*) 的  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ -变形菌纲 (8 个 OUTs), 生物膜上和水体中的优势菌种类有较大差异。挂膜时, 适当提高初始氨氮的浓度, 有利于亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*) 等硝化细菌的繁殖和在载体上的积累, 提高生物滤池的除氮效果。

#### 参考文献:

- [1] 马少杰, 赵勇, 戴习林, 等. 南美白对虾养殖系统中氨氧化细菌多样性研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(10): 4107-4110.
- [2] NIJHOF M, BOVENDEUR J. Fixed film nitrification characteristics in sea-water recirculation fish culture systems[J]. Aquaculture, 1990, 87(2): 133-143.
- [3] 王峰, 夏四清, 史妍, 等. 硝化悬浮填料塔中氨氧化细菌群落稳定性特征分析[J]. 环境工程, 2006, 24(3): 10-13.
- [4] 赵兴青, 杨柳燕, 陈灿, 等. PCR-DGGE 技术用于湖泊沉积物中微生物群落结构多样性研究[J]. 生态学报, 2006, 26(11): 3610-3616.
- [5] 刘敏, 王子峰, 朱开玲, 等. 应用 PCR-DGGE 技术分析长江口低氧区的细菌群落组成[J]. 高技术通讯, 2008, 18(6): 650-656.
- [6] 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: 305-317.
- [7] FORTIN N, BEAUMIER D, LEE K, et al. Soil washing improves the recovery of total community

- DNA from polluted and high organic content sediments [ J ]. *J Microbiol Methods*, 2004, 56: 181 - 191.
- [ 8 ] 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 ]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59 ( 3 ): 695 - 700.
- [ 9 ] JUCK D, DRISCOLL B T, CHARLES T, *et al.* Effect of experimental contamination with the explosive hexahydro 1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine on soil bacterial communities [ J ]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2003, 43: 255 - 262.
- [ 10 ] ZHOU J Z, BRUNS M A, TIEDJE J M. DNA recovery from soils of diverse composition [ J ]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62( 2 ): 316 - 322
- [ 11 ] WAGNER M, AMANN R, LEMMER H, *et al.* Probing activated sludge with oligo nucleotides specific for proteobacteria; inadequacy of culture dependent methods for describing microbial community structure [ J ]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59( 5 ): 1520 - 1525.
- [ 12 ] HUANG L N, ZHU S, ZHOU H, *et al.* Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with the leachate of a closed municipal solid waste landfill [ J ]. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, 242 ( 2 ): 297 - 303.
- [ 13 ] KAPLEY A, PRASAD S, PUROHIT H. Changes in microbial diversity in fed batch reactor operation with wastewater containing nitroaromatic residues [ J ]. *Bioresource Tech*, 2007, 98( 13 ): 247922484.
- [ 14 ] 张斌, 孙宝盛, 刘慧娜, 等. 处理不同废水 MBR 系统中微生物群落结构的比较 [ J ]. *环境科学*, 2008, 29( 10 ): 2944 - 2949.
- [ 15 ] 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 Sci and Tech*, 1998, 37( 425 ): 105 - 108.
- [ 16 ] PURKHOLD U, ROSER A, JURETSCHKO S, *et al.* Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis; implications for molecular diversity surveys [ J ]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66( 12 ): 5368 - 5382.
- [ 17 ] 傅雪军, 马绍赛, 曲克明, 等. 循环水养殖系统中自然微生物生物膜形成过程实验 [ J ]. *海洋环境科学*, 2010, 29( 5 ): 713 - 717.
- [ 18 ] 池振明. *微生物生态学* [ M ]. 济南: 山东大学出版社, 1999: 91 - 93.

## PCR-DGGE analysis of bacterial communities in bio-filters of re-circulating mariculture system

LI Qiu-fen<sup>1\*</sup>, FU Xue-jun<sup>1,2</sup>, ZHANG Yan<sup>1</sup>, MA Shao-sai<sup>1</sup>

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Qingdao 266071, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** The numbers and composition of bacterial communities in bio-filters of re-circulating mariculture system were studied. The numbers of total heterotrophic bacteria, ammonium-oxidizing bacteria and nitrate-oxidizing bacteria on the matured bio-film samples from the 4 bio-filters with different initial ammonia-nitrogen concentrations (1#, 2#, 3#, 4#) and from the water sample (5#) of 3# bio-filter were counted. The results showed that, the numbers of ammonia-oxidizing bacteria and nitrate-oxidizing bacteria on the bio-films increased and the number of heterotrophic bacteria declined gradually with the increase of initial ammonia-nitrogen concentrations in bio-filters. The numbers of bacteria on bio-film were higher by 3 – 4 orders of magnitude than those of the water sample in the same bio-filter. The amplifying products of the fragments of 16S rRNA gene from above samples were analyzed with denaturing gradient electrophoresis (DGGE), and the sequences of DGGE bands were phylogenetic analyzed. The abundant bacterial diversity was found in bio-filters of re-circulating systems, and higher on biofilm than in water in the same bio-filter. The bacteria communities in bio-film and water samples were mainly made up with two bacterial groups: Flavobacteria, and  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Proteobacteria, including 15 genera. The predominant bacteria on bio-films were *Olleya*, *Lacinutrix*, *Gaetbulibacter*, *Sediminibacter*, *Leisingera*, *Psychroserpens* and *Nitrosomonas*. While those of water were significantly different, including *Vitellibacter*, *Nautella*, *Roseobacter*, and a sulfur-oxidizing bacterium. *Nitrosomonas* became predominant bacteria on bio-films gradually with the increase of initial ammonia-nitrogen concentrations. The results suggested that, during the maturation of bio-film, increasing the initial ammonia-nitrogen concentrations is beneficial to the gathering of nitrifying bacteria and the improvement of nitrogen removing efficiency.

**Key words:** recirculating mariculture system; denaturing gradient electrophoresis (DGGE); bacterial communities; nitrifying bacteria; bio-filter; bio-film

**Corresponding author:** LI Qiu-fen. E-mail: liqf@ysfri.ac.cn