

## 基于 PCR-DGGE 技术分析生物絮团的细菌群落结构

夏耘<sup>1,2</sup>, 郁二蒙<sup>1</sup>, 谢骏<sup>1\*</sup>, 余德光<sup>1</sup>,  
王广军<sup>1</sup>, 李志斐<sup>1</sup>, 王海英<sup>1</sup>, 龚望宝<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所,农业部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室,广东 广州 510380;  
2. 上海海洋大学水产与生命学院,上海 201306)

**摘要:** 在草鱼养殖过程中添加碳源(葡萄糖)维持水体 C:N 为 20:1 以培养生物絮团,通过对生物絮团细菌群落构成进行种类鉴定来评价生物絮团中功能微生物的组成。采用 PCR-DGGE(变性梯度凝胶电泳)技术分析生物絮团形成第 5、10 和 15 天的细菌群落结构。DGGE 指纹图谱结果分析表明:第 5 天和第 10 天的相似性最高,达 67.4%;第 5 天和第 15 天相似性系数最低仅为 40.5%。第 10 天时微生物多样性最高,第 15 天时多样性最低。对 DGGE 指纹图谱特征条带进行回收、克隆测序,结果表明,生物絮团培养过程主要微生物类群隶属于以下 6 个纲: $\alpha$ -变形菌纲(Alphaproteobacteria)、 $\gamma$ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)、 $\beta$ -变形菌纲(Betaproteobacteria)、放线菌纲(Actinobacteria)、芽孢杆菌纲(Bacilli)、拟杆菌纲(Bacteroidetes),其中  $\alpha$ - $\beta$ -及  $\gamma$ -变形菌占据主要位置。 $\alpha$ -proteobacteria 为 3 个阶段的共有优势菌,第 5 天时特异菌包括食酸菌属(*Acidovorax*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*),第 10 天和 15 天分别为芽孢杆菌属(*Bacillus*)与红球菌属(*Rhodococcus*)。研究首次发现,生物絮团应用于淡水养殖系统时细菌的组成和多样性都极其丰富,通过分析这些微生物的功能特点,为生物絮团技术在实际养殖生产中的进一步应用奠定基础。

**关键词:** 生物絮团;细菌群落结构; $\alpha$ -变形菌属;PCR-DGGE

**中图分类号:** Q 938.8; S 965

**文献标志码:** A

目前世界水产养殖业的迅速发展面临着两方面问题,一方面是饲喂蛋白的短缺,这一问题在发展中国家尤其突出<sup>[1-3]</sup>;另一方面,高密度养殖中过量的残余有机物质对养殖水体的污染,造成环境危害<sup>[4]</sup>。生物絮团技术为解决以上问题提供了新的方法。早在 1989 年,Avnimelech 等<sup>[5]</sup>通过<sup>13</sup>C 标记证明罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)能利用纤维素培养的细菌单细胞蛋白,此后作者进一步确认碳氮比例为 20:1 时,能促进微生物形成生物絮团合成菌体蛋白,节省部分饵料蛋白<sup>[6]</sup>;2007 年 Avnimelech<sup>[8]</sup>用<sup>15</sup>N 标记证实生物絮团能代替罗非鱼生长过程近 50% 的饲料蛋白,并能维持养殖用水水质稳定,养殖用水交换率显著降低。

Crab 等<sup>[9]</sup>在罗非鱼越冬期应用生物絮团技术,使日换水率从 24% 降为 10%。Azim 等<sup>[10]</sup>应用生物絮团技术,试验处理组罗非鱼个体的增重比对照组高 44%~46%,产量显著提高。在虾类养殖中,Burford 等<sup>[11]</sup>用<sup>15</sup>N 标记,研究发现,凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)日常摄食的 18%~29% 的 N 来源于生物絮团。在凡纳滨对虾养殖水体中培养生物絮团,能够显著提高幼体阶段的存活率、体质量及体长<sup>[12]</sup>,维护水体水质稳定<sup>[13]</sup>。生物絮团技术在养殖过程水质调节及饵料替代中已经取得了良好的效果<sup>[9,12-14]</sup>。

生物絮团是养殖水体中以异养微生物为主经生物絮凝作用结合水体中有机质、原生动物、藻

收稿日期:2012-02-23 修回日期:2012-07-10

资助项目:现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46-17);公益性行业科研专项(201203083);国家科技支撑计划课题(2012BAD25B04);广东省海洋渔业科技推广项目(A200901D04)

通讯作者:谢 骏,E-mail:xiejunhy@yahoo.com.cn

类、丝状菌等形成的絮状物。其主要技术是人为控制水体中碳氮比例,促进微生物群落对养殖水体中无机氮(氨氮、亚硝酸盐氮、硝酸盐氮)的同化吸收<sup>[15]</sup>。异养细菌是生物絮团系统中总氮氮去除的主要力量<sup>[16]</sup>。组成生物絮团的细菌群落结构特点和多样性已分别在污水处理和水产养殖领域进行了部分研究。生物絮团技术较早广泛应用于城市污水处理,有学者通过结合 PCR-DGGE(变性梯度凝胶电泳)技术揭示了化学生物絮团污水处理系统中的微生物种群结构,发现生物絮团系统中存在的主要细菌为变形菌纲的细菌,并通过与传统水处理方法细菌群落结构比较证实了化学生物絮团处理工艺具有较好的系统稳定性和缓冲性<sup>[17-20]</sup>。在水产养殖生产应用中,De Schryver 等<sup>[21]</sup>指出 PCR-DGGE 技术是进行生物絮团微生物构成研究的有效方法;Zhao 等<sup>[22]</sup>利用 DGGE 技术研究了日本囊对虾(*Marsupeneus japonicus*)养殖过程中利用蔗糖作为碳源培养的生物絮团细菌群落构成,发现构成生物絮团的细菌类群主要包括  $\alpha$ -变形菌和芽孢杆菌。Crab 等<sup>[9]</sup>利用 PCR-DGGE 技术研究了罗非鱼养殖过程中不同碳源处理生物絮团中微生物变化,构建了 DGGE 图谱并基于 DGGE 带型分析了细菌群落结构的相似性,发现生物絮团中细菌群落相似性与淀粉添加与否有关,而与饲料中蛋白含量以及养殖对象大小无关;但是,该研究未对鱼类养殖中生物絮团的微生物种类进行鉴定。本研究对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)养殖过程中利用葡萄糖作为碳源培养的生物絮团形成过程中细菌群落结构进行种类鉴定,为评价生物絮团中功能微生物的组成提供依据,并能进一步揭示生物絮团的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 生物絮团培养及收集

参照以色列 Avnimelech 团队的方法<sup>[17,19-20]</sup>,以消毒处理的自来水为养殖水源,在 50 L 有机玻璃养殖箱中放养健康的草鱼鱼种,平均体质量( $10.37 \pm 0.59$ ) g,放养密度为 90 尾/ $m^3$ ,每天按体质量的 3% 投喂配合饲料(含 30% 粗蛋白)。实验开始后每天向养殖水体添加葡萄糖,加入葡萄糖的量根据养殖水体的总氮氮来调节,总氮氮测定采用纳氏试剂分光光度法(GB/T

7479-1987),使整个过程的 C:N 理论上维持在 20:1;24 h 充氧,pH 7.2~7.8。根据预实验过程中对生物絮团沉积量的检测显示第 15 天以后沉积量基本保持不变,确定第 5 天、10 天、15 天为采样时间点。用 50 mL 离心管收集养殖水体,并于 8 000 r/min 离心 20 min 收集生物絮团,-20 °C 冰箱保存备用。另外根据实验需要,实验开始时收集草鱼肠道内容物,同样于 -20 °C 冰箱保存备用。

### 1.2 样品基因组总 DNA 的提取和测定

草鱼肠道内容物细菌总 DNA 的提取采用 E. Z. N. A Bacterial Kit (Omega, 美国)。生物絮团 DNA 的提取方法是称取 0.2 g 湿重的生物絮团于 200  $\mu$ L 1  $\times$  TE Buffer 中,最大转速 3 000 r/min 涡旋 5 min,接着参照 OMEGA 细菌 DNA 提取试剂盒的具体操作步骤,并适当加以改进,玻璃珠的量加大到 100 mg,加入蛋白酶的同时加入 20  $\mu$ L 15% 的 SDS,最后用 40  $\mu$ L 的 Elution Buffer 洗脱 DNA。总 DNA 用 1% 琼脂糖检测,-20 °C 保存备用。

### 1.3 16S rRNA 基因 PCR 扩增及 DGGE

根据细菌 16S rDNA V3 可变区设计一对通用引物<sup>[23]</sup>,PCR 反应体系及程序见参考文献[24]。取其中的 4  $\mu$ L 产物用 1% 琼脂糖检测产量及特异性,其余用于变性梯度凝胶电泳(DGGE)。变性梯度凝胶梯度范围为 35%~55% 之间(80% 的变性剂为 7 mol/L 的尿素和 40% 的去离子甲酰胺的混合物),胶浓度为 10%。电泳温度控制在 55 °C,用 200 V 电压预电泳 5 min,接着在 110 V 条件下电泳 12 h。分析方法见文献[22],BIO-RAD Quantity One 进行图像分析。

### 1.4 条带切胶回收与克隆测序及种系发生树构建

DGGE 条带的切割回收、克隆测序及序列分析参照罗鹏等<sup>[24]</sup>的操作。最后应用软件 MEGA 4 进行多重比对,以邻接法(Neighbor-Joining)构建种系发生树。

## 2 结果

### 2.1 基因组 DNA 的提取和 PCR 扩增

采用 Touchdown 降落 PCR 扩增策略以提高样品的扩增特异性。为了后续实验 DGGE 的操作,每个时间点基因组 DNA 扩增两管备用。根据 OMEGA 细菌基因组提取结果,最后得到 23 kb 的

DNA 条带(图 1)。不同时间点絮团样品的基因组 DNA 的 PCR 扩增产物具有极高特异性(图 2)。

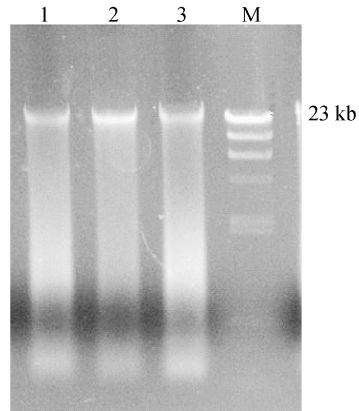


图 1 不同时期生物絮团样品基因组 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图谱

1~3. 第 5、10、15 天。

Fig. 1 Agarose gel (1%) electrophoresis of genomic DNA of bio-floc samples at different time

1-3. stands for the 5th, 10th, 15th day.

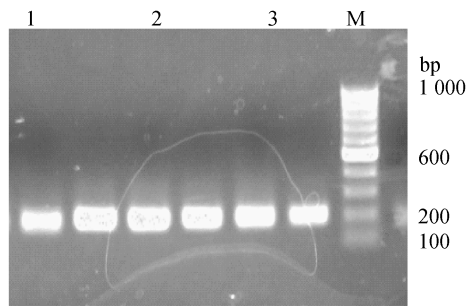


图 2 不同时期生物絮团样品 16S rDNA 基因组 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图谱

1~3. 第 5、10、15 天。

Fig. 2 Agarose gel (1%) electrophoresis of PCR amplified 16S rDNA of bio-floc samples at different time

1-3. stands for the 5th, 10th, 15th day.

## 2.2 DGGE 指纹图谱及分析结果

图 3 为草鱼肠道内容物的 DGGE 指纹图谱,显示有 9 条可鉴别条带(B1~B9)。条带亮度及多少反映了该草鱼肠道内容物菌群优势种类较集中。图 4 生物絮团 DGGE 指纹图谱及图 5 示意图分析显示,10 d 时,条带数目最多,为 32 条;5 d 时次之,有 30 条;15 d 时最少,仅 26 条,条带数量的多少一定程度上反映了细菌多样性程度。其中共性条带中的 Band 7、9、13、15 和 23 在第 15 天时亮度最大,说明这些细菌随着絮团的形成在 DNA 水平上有明显的改变,即生物絮团的形成过

程也是这些细菌繁殖扩增的过程;共性条带 Band 16 在整个过程中均较亮,为絮团形成整个过程中主要优势菌,随着絮团的形成丰度略有下降;Band 10、19、20、21 和 22 为第 5 天时的特异性条带,Band 8 和 Band 18 为絮团培养第 10 天时的特异性条带,Band 5 为第 15 天特有;有的条带(Band 4、6、14、17、24)为 5 和 10 d 时的共性条带或 10 和 15 d 时的共性条带(Band 1、2、3、11、12)。利用 BIO-RAD Quantity One 4.3.1 对生物絮团 DGGE 指纹图谱相似性分析如表 1 所示,5 和 10 d 絮团样品细菌群落结构相似性最高,达到 67.4%;第 5 天和第 15 天相似性系数在三者中最低,仅为 40.5%。

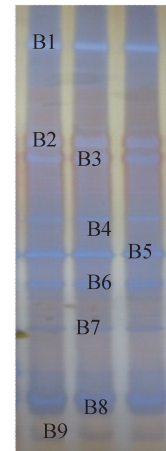


图 3 草鱼肠道内容物的变性梯度凝胶电泳(DGGE)分离图谱

Fig. 3 DGGE profile of intestinal content microflora of grass carp



图 4 不同时期生物絮团样品的变性梯度凝胶电泳(DGGE)分离图谱

Fig. 4 DGGE profile of bio-floc samples at different time

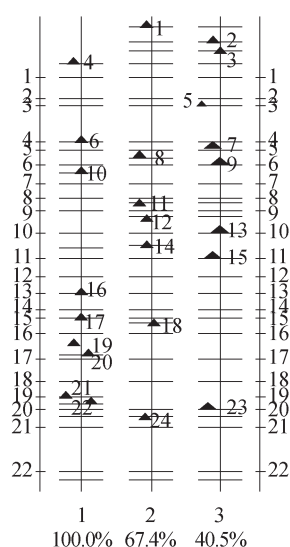


图5 不同时期生物絮团样品的变性梯度凝胶电泳(DGGE)示意图

1~3. 第5、10、15天。

Fig. 5 DGGE sketch map of bio-floc samples at different times

1-3. stands for the 5th, 10th, 15th day.

### 2.3 DGGE 目的条带基因片段的切割克隆、测序及序列比对结果分析

草鱼肠道内容物 DGGE 指纹图谱目的条带

表2 草鱼肠道内容物 DGGE 目的条带的克隆测序结果

Tab. 2 The sequencing results of the DGGE purpose bands from intestinal content microflora of the grass carp

条带号 band name	序列长度/bp sequence size	GenBank 数据库中最相近的菌种名称(登录号) closest relatives found in the GenBank database( Access number)	相似性/% similarity
Band 1	192	Uncultured <i>Bacteroides</i> sp. clone CGOF23 (GU222188.1)	95
Band 2	172	Uncultured bacterium clone LaYa9-55 (GU291764.1)	100
Band 3-1	198	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band B30 (GU301246.1)	100
Band 3-2	198	<i>Aeromonas hydrophila</i> gene( AB473042.1)	99
Band 4-1	177	Uncultured bacterium clone LL141-6G4 (FJ675051.1)	100
Band 4-2	178	Uncultured bacterium clone SC34 gene( GU293197.1)	100
Band 5	197	<i>Aeromonas</i> sp. 57S-5 (GU371697.1)	100
Band 6-1	198	<i>Aeromonas</i> sp. 57S-5 (GU371697.1)	100
Band 6-2	198	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band B30 (GU301246.1)	98
Band 7-1	198	Uncultured bacterium clone PB2_aai23g10 (EU777823.1)	100
Band 7-2	198	<i>Aeromonas sanarellii</i> strain A2-67 (FJ230076.1)	96
Band 7-3	198	Uncultured gamma proteobacterium clone 00YF9 (EU810892.1)	96
Band 8	198	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band B30 (GU301246.1)	99
Band 9	197	<i>Aeromonas allosaccharophila</i> strain JA07 (GU205199.1)	100

克隆测序结果如表2所示,表明草鱼肠道内容物已知细菌群落主要为气单胞菌属、未培养细菌以及拟杆菌属的细菌。

表1 不同时期絮团样品 DGGE 图谱相似性系数

Tab. 1 Similarity coefficient of DGGE profile of bio-floc samples at different time

	5 d	10 d	15 d
5 d	100.0		
10 d	67.4	100.0	
15 d	40.5	46.4	100.0

生物絮团 DGGE 的 24 个特征条带(图5)的克隆测序后,获得的 24 个条带所代表序列在 GenBank 中的登录序列号为 JN704120 - JN704143。24 个序列所代表的菌类种系发生树显示其隶属于  $\alpha$ -变形菌纲(Alphaproteobacteria)、 $\gamma$ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)、 $\beta$ -变形菌纲(Betaproteobacteria)、放线菌纲(Actinobacteria)、芽孢杆菌纲(Bacilli)及拟杆菌纲(Bacteroidetes)等6个纲(图6)。其中放线菌纲和变形菌纲为絮团形成过程中存在的主要细菌类群。

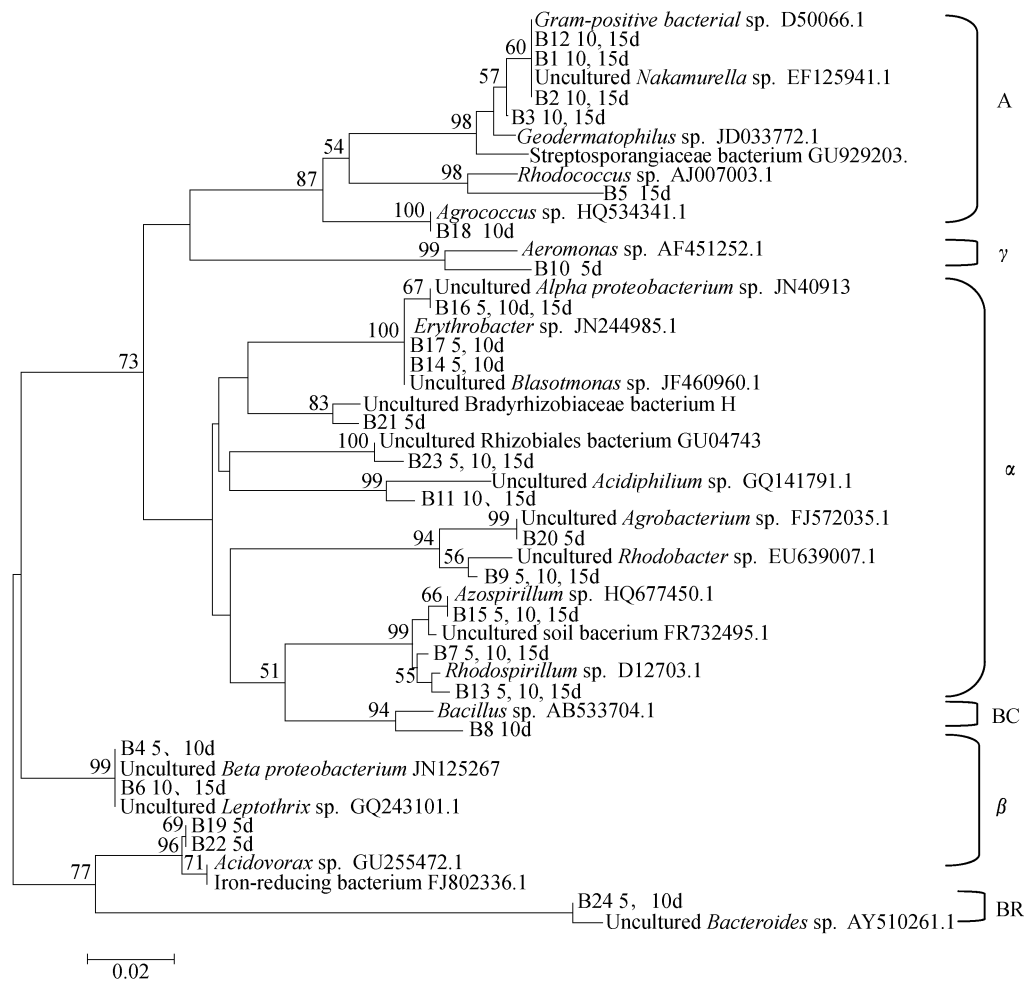


图 6 24 个序列与一些相似序列以 NJ 方法构建的种系发生树

A. 放线菌纲, γ. 变形菌纲, α. 变形菌纲, BC. 芽孢杆菌纲, β. 变形菌纲, BR. 拟杆菌纲。

Fig. 6 Phylogeny tree constructed by NJ method with 24 main sequences and similar sequences

A. Actinobacteria, γ. Gammaproteobacteria, α. Alphaproteobacteria, BC. Bacilli, β. Betaproteobacteria, BR. Bacterioidetes.

### 3 讨论

#### 3.1 生物絮团中细菌种类丰富度特征

草鱼肠道内容物排泄到水体后,可能对生物絮团细菌群落的组成具有一定影响。实验初始时草鱼肠道内容物细菌种群分析和分子鉴定发现,大部分归属于 γ-变形菌亚纲的气单胞菌属、拟杆菌纲及未培养细菌等。生物絮团的构成细菌种类中,变形菌在数量上占主导地位,这与 Zhao 等<sup>[22]</sup>的研究结果一致,其中 α-变形菌亚纲的 α-变形菌属是整个生物絮团形成过程中特优势种类,β-及 γ-变形菌亚纲的细菌在数量上低于 α-变形菌亚纲,随着生物絮团的形成,变形菌逐渐繁殖扩增与富集,成为了絮团形成 15 d 的优势种类。放线菌次之,芽孢杆菌和拟杆菌数量很少。本次研究中生物

絮团优势菌与草鱼肠道内容物细菌构成上有相似之处,说明草鱼肠道内容物排泄至养殖水体对生物絮团的细菌构成有一定影响。本实验生物絮团的细菌组成中变形菌纲占支配地位,这与以往研究污水处理结果一致<sup>[25-27]</sup>,其功能主要应是清除污水中有机物<sup>[28-29]</sup>,说明生物絮团应用于养殖生产时,能有效调节养殖用水水质。本研究中放线菌纲的菌属在絮团培养第 10 天后出现,为整个絮团的次要类群,其中放线菌纲的革兰氏阳性菌属种 (*Gram-positive bacterial sp.*) 为第 10 天和 15 天的共有优势种,第 15 天放线菌纲的地嗜皮菌属 (*Geodermatophilus*) 与嗜酸菌属 (*Acidiphilium*) 也是优势菌种。放线菌一般具有发育良好的分枝状菌丝体,有研究表明丝状菌因为具有基板水平低,表面积与体积比高,且菌丝可以伸到絮体以外

的空间接触到更高的底物浓度等优势,而成为絮团的骨架结构,是生物絮团结构的重要组成部分<sup>[6]</sup>,本研究中放线菌的生物学特点说明这类细菌可能在絮团骨架构成上发挥作用。

### 3.2 生物絮团共生菌种属鉴定

生物絮团的三个不同形成阶段中共有细菌均属于 $\alpha$ -变形菌纲的种类,包括 $\alpha$ -变形菌属(*α-proteobacterium*)、红螺菌属(*Rhodospirillum*)、固氮螺菌属(*Azospirillum*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)和红杆菌属(*Rhodobacter*)。 $\alpha$ -变形菌属细菌为絮团培养过程共有菌中的优势种类,有研究指出 $\alpha$ -变形菌属可能为化学-生物絮凝在污水处理中发挥作用的功能性微生物类群<sup>[18]</sup>,说明当生物絮团应用于水产养殖领域时 $\alpha$ -变形菌属可能具有同样重要的作用。红螺菌是光合细菌(Photosynthetic Bacteria, PSB)的一种,广泛分布于江河、湖泊、海洋等水域,尤其在有机物污染的积水处数量较多,它可利用水体中的残饵及粪便等有机物,也可以利用亚硝酸盐或硝酸盐进行不产氧的光合作用<sup>[30-31]</sup>,该菌作为饲料添加剂使用时对促进养殖动物的健康生长有很大的益处<sup>[32]</sup>。固氮螺菌属(*Azospirillum*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)的固氮作用能将水体中的分子态氮转化为可供水生植物利用的氨氮。红杆菌属(*Rhodobacter*)是一种紫色非硫细菌,其特点是基质利用的多样性,能利用多种基质作为碳源进行异养光合代谢反应<sup>[33]</sup>。因此,生物絮团中这些细菌的联合作用加速了养殖水体有机物的物质循环,避免了养殖水体有机物过剩的污染。对生物絮团的共生菌研究表明,生物絮团在水质改善及饵料替代安全中所发挥的作用是切实可行的。

### 3.3 生物絮团的不同阶段特异菌分析鉴定

在生物絮团的不同形成阶段存在着特异的细菌类群。絮团培养第5天的特异菌中气单胞菌(*Aeromonas*)和土壤杆菌(*Agrobacterium*)为重要的产絮菌<sup>[34-35]</sup>,其分泌的次级代谢产物能有效地将水体中的胶体和悬浮颗粒物相互聚集<sup>[36]</sup>。食酸菌(*Acidovorax*)亦为第5天时的特异菌,有研究指出其具有自凝聚能力,可产生胞外聚合物,在污水处理中对好氧颗粒污泥的形成和稳定运行具有重要作用<sup>[37]</sup>。以上的产絮菌通过利用环境中剩余营养物质,在一些特异性酶的作用下于胞内合成高分子量的聚合物,这些高分子物质从细胞

排出,直接进入环境中或依附于细胞表面形成囊状结构,通过这一过程将环境中简单的物质转化成复杂的聚合物<sup>[38]</sup>。并且对这些细菌来说,养殖水体中碳、氮等营养物质丰富且没有毒性<sup>[39]</sup>,可以节省资源。产絮菌的存在,促进了生物絮团絮体结构的生成,使本次研究中生物絮团从15 d开始达到较高的沉积量,并且此后基本保持不变,对维持该系统的稳定具有重要作用。 $\beta$ -变形菌(*Betaproteobacteria*)和拟杆菌(*Bacteroides*)存在于絮团培养的5和10 d,两者均为污水处理系统中常见优势种类<sup>[40]</sup>。拟杆菌是目前应用较为广泛的一类益生菌,在特定条件下能产生有利于养殖对象健康生长的一类物质(益生菌、益生元等)<sup>[41]</sup>。芽孢杆菌(*Bacillus*)为絮团培养至10 d时的特异菌,也是一类重要的产絮菌<sup>[42-43]</sup>。芽孢杆菌能改善养殖用水水质<sup>[44]</sup>,作为饲料添加剂使用时能促进养殖动物生长,提高机体免疫及抗病能力<sup>[45]</sup>。生物絮团作为一种替代饵料具有安全性。红球菌属(*Rhodococcus*)为絮团培养至15天时的特异菌,同样为重要的产絮菌<sup>[46]</sup>。Kurane等<sup>[46]</sup>采用从自然界分离出的红球菌属(*Rhodococcus* sp.)的S-1菌株制成絮凝剂,并在畜产废水、膨化污泥、砖场生产废水处理及废水脱色处理中取得了良好效果。生物絮团形成的不同阶段,细菌群落结构处于动态变化的过程。Fernandez等<sup>[47]</sup>对产甲烷反应器内微生物群落结构的研究说明,一个处于动态变化的生物群落维持着稳定的生态系统功能。生物絮团在形成过程的不同时期既存在着共同的微生物种属,同时也存在着各自独特的微生物种属,微生物种属之间的协同和竞争作用,形成了特定的生态位群落结构。生物絮团可能通过这种群落间的演替作用,实现群落类型的稳定及自身功能的稳定与可持续。但本次实验中微生物具体演替机制尚不明确,有待进一步研究。

### 3.4 生物絮团功能微生物的群感效应(quorum sensing)

本研究生物絮团细菌DGGE条带分析反映出絮团培养到第10天的微生物多样性最大,第5天与第10天的细菌群落结构相似性最高,第5天和第15天相似性最低。从第5天到第15天,生物絮团中细菌群落结构发生了显著改变。近年有研究发现,细菌群体内细菌生物膜形成、孢子产生等的

多种生物功能均是通过细菌群体感应调节系统(QS)实现的<sup>[48]</sup>。本研究中的 *Rhodobacter* sp. 及 *Agrobacterium* sp. 均可通过细菌群体感应能实现结合转移及胞外聚合的目的,这一特点可能与絮团的形成有关<sup>[49]</sup>。此外,*Bcillus* sp. 通过寡肽介导的群体效应实现自身能力维持及孢子的形成<sup>[50]</sup>。*Aeromonas* sp. 通过群体效应产生胞外蛋白酶,并能促进生物膜的形成,对絮团结构的维持可能起到一定作用<sup>[51]</sup>。本实验中的 *Rhizobium* sp. 通过群体效应产生根瘤结构、对根瘤数目进行调控,并维持整个结构的生存<sup>[52]</sup>。组成生物絮团的细菌群落是复杂多样的,需要借助功能基因的研究来揭示本次实验中细菌群体感应的影响机制及作用机理。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Gutierrez-Wing M T, Malone R F. Biological filters in aquaculture: trends and research directions for freshwater and marine applications [ J ]. Aquacultural Engineering, 2006, 34 ( 3 ): 163 - 171.
- [ 2 ] Matos J, Costa S, Rodrigues A, et al. Experimental integrated aquaculture of fish and red seaweeds in Northern Portugal [ J ]. Aquaculture, 2006, 252 ( 1 ): 31 - 42.
- [ 3 ] Subasinghe R P. Epidemiological approach to aquatic animal health management: opportunities and challenges for developing countries to increase aquatic production through aquaculture [ J ]. Preventive Veterinary Medicine, 2005, 67 ( 2 - 3 ): 117 - 124.
- [ 4 ] Piedrahita R H. Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation [ J ]. Aquaculture, 2003, 226 ( 1 - 4 ): 35 - 44.
- [ 5 ] Avnimelech Y, Mokady S, Schroeder G L. Circulated ponds as efficient bioreactors for single cell protein production [ J ]. Israeli Journal of Aquaculture, 1989, 41 ( 2 ): 58 - 66.
- [ 6 ] Avnimelech Y. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems [ J ]. Aquaculture, 1999, 176 ( 3 - 4 ): 227 - 235.
- [ 7 ] Avnimelech Y. Nitrogen control and protein recycle. Activated suspension pond [ J ]. The Advocate April, 2000, 8: 23 - 24.
- [ 8 ] Avnimelech Y. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds [ J ]. Aquaculture, 2007, 264 ( 1 - 4 ): 140 - 147.
- [ 9 ] Crab R, Kochva M, Verstraete W. Bio-flocs technology application in over-wintering of tilapia [ J ]. Aquacultural Engineering, 2009, 40 ( 2 ): 105 - 112.
- [ 10 ] Azim M E, Little D C. The biofloc technology ( BFT ) in indoor tanks: Water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia ( *Oreochromis niloticus* ) [ J ]. Aquaculture, 2008, 283, 29 - 35.
- [ 11 ] 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 - 4 ): 525 - 537.
- [ 12 ] Wasielesky W Jr, Atwood H, Stokes A, et al. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei* [ J ]. Aquaculture, 2006, 258: 396 - 403.
- [ 13 ] Kuhn D D, Boardman G D, Lawrence A L, et al. Microbial floc meal as a replacement ingredient for fish meal and soybean protein in shrimp feed [ J ]. Aquaculture, 2009, 296: 51 - 57.
- [ 14 ] Avnimelech Y, Kochba M. Evaluation of nitrogen uptake and excretion by tilapia in biofloc tanks, using <sup>15</sup>N tracing [ J ]. Aquaculture, 2009, 287: 163 - 168.
- [ 15 ] Azim M E, Little D C, Bron J E. Microbial protein production in activated suspension tanks manipulating C: N ratio in feed and the implications for fish culture [ J ]. Bioresource Technology, 2007, 99 ( 9 ): 3590 - 3599.
- [ 16 ] De Schryver P, Verstraete W. Nitrogen removal from aquaculture pond water by heterotrophic nitrogen assimilation in lab-scale sequencing batch reactors [ J ]. Bioresource Technology, 2009, 100: 1162 - 1167.
- [ 17 ] 史妍,傅以钢,夏四清. 化学 - 生物絮凝污水处理工艺中微生物群落结构变化分析 [ J ]. 应用与环境生物学报, 2006, 12 ( 1 ): 108 - 112.
- [ 18 ] 王峰,傅以钢,夏四清,等. PCR-DGGE 技术在城市污水化学生物絮凝处理中的特点 [ J ]. 环境科学, 2004, 25 ( 6 ): 74 - 79.
- [ 19 ] Xia S Q, Wang F, Fu Y G, et al. Biodiversity analysis of microbial community in the chem-biofloculation treatment process [ J ]. Biotechnology and Bioengineering, 2005, 89 ( 6 ): 656 - 659.
- [ 20 ] Wang F, Xia S Q, Yang D H. Effect of flocculant on microbial populations and function in Chem-Biofloculation ( CBF ) treatment process using PCR-

- DGGE[J]. International Journal of Environment and Pollution, 2009, 38(3): 235 - 244.
- [21] De Schryver P, Crab R, Defoirdt T, *et al.* The basics of bio-floc technology: the added value for aquaculture[J]. Aquaculture, 2008, 277(3-4): 125 - 137.
- [22] Zhao P, Huang J, Wang X H, *et al.* The application of bioflocs technology in high-intensive, zero exchange farming systems of *Marsupenaeus japonicus*[J]. Aquaculture, 354 - 355: 97 - 106.
- [23] Lee D G, Lee J H, Kim S J. Diversity and dynamics of bacterial species in a biofilm at the end of the Seoul water distribution system[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2005, 21: 155 - 162.
- [24] 罗鹏, 胡超群, 张吕平, 等. 凡纳滨对虾海水养殖系统内细菌群落的 PCR-DGGE 分析[J]. 中国水产科学, 2009, 16(1): 31 - 38.
- [25] Wanger M, Erhart R, Amann R, *et al.* In situ identification of ammonia-oxidizing bacteria [J]. Systematic and Applied Microbiology, 1995, 18: 251 - 264.
- [26] Daims H, Bruhl A, Amann R, *et al.* The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria; development and evaluation of a more comprehensive probe set Syst[J]. Applied Microbiology, 1999, 22(3): 434 - 444.
- [27] Witzig R, Manz W, Rosenberger S, *et al.* Microbiological aspects of a bioreactor with submerged membranes for aerobic treatment of municipal wastewater[J]. Water Research, 2002, 36(2): 394 - 402.
- [28] Wagner M, Amann R, Lemmer H, *et al.* Probing activated sludge with oligonucleotides specific for Proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure [J]. Applied and Environment Microbiology, 1993, 59(5): 1520 - 1525.
- [29] Miuraa Y, Hiraiwab M N, Itoc T, *et al.* Bacterial community structures in MBRs treating municipal wastewater: Relationship between community stability and reactor performance [J]. Water Research, 2007, 41: 627 - 637.
- [30] 刘慧玲, 张红莲, 李细钊, 等. 光合细菌 I 的分离及其对水体中亚硝酸盐降解的研究[J]. 水产科学, 2005, 24(6): 32 - 33.
- [31] 刘中, 于伟君, 刘义新, 等. 光合细菌在淡水养殖中的应用研究[J]. 水产科学, 1995, 14(4): 13 - 17.
- [32] 董闻琦, 刘必谦. 光合细菌在水产动物苗种培育中的应用[J]. 水产养殖, 2003, 24(2): 40 - 43.
- [33] 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.
- [34] 王镇, 王孔星, 谢裕敏, 等. 几株絮凝剂产生菌的特性研究[J]. 微生物学报, 1995, 35(2): 121 - 129.
- [35] Salehizadeh H, Shojaosadati S A. Extracellular biopolymeric flocculants recent trends and biotechnological importance [J]. Biotechnology Advances, 2001, 19(5): 371 - 385.
- [36] Kurae R, Takeda K, Suzuke T. Screening for and characteristics of microbial flocculants [J]. Agriculture Biochemistry, 1986, 50(9): 2301 - 2307.
- [37] 李建婷, 纪树兰, 刘志培, 等. 16S rDNA 克隆文库方法分析好氧颗粒污泥细菌组成[J]. 环境科学研究, 2009, 22(10): 1218 - 1223.
- [38] Deng S B, Bai R B, Hu X M, *et al.* Characteristics of a bioflocculant produced by *Bacillus mucilaginosus* and its use in starch wastewater treatment [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 60: 558 - 593.
- [39] 丁永良. 水族馆与养鱼工厂人造水体的净水微生物[J]. 现代渔业信息, 2000, 15(10): 6 - 1.
- [40] Wagner M, Loy A. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2002, 13: 218 - 227.
- [41] Fu D Y, Yu X T, Wang F. The effects of compound microorganisms on the growth and water quality in carps[J]. Feed Research, 2005, 8: 43 - 45.
- [42] Shih I L, Yan Y I, Yeh L C, *et al.* Production of a biopolymer flocculant from *Bacillus licheniformis* and its flocculation properties [J]. Bioresource Technology, 2001, 78(3): 267 - 272.
- [43] Vijayalashmi S P, Raichur A M. The Utility of *Bacillus subtilis* as a bioflocculant for fine coal[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2003, 29(1): 265 - 275.
- [44] 杨世平, 邱德全. 水产养殖水体水质污染及水质处理微生物制剂的研究和应用现状[J]. 中国水产, 2004, 47(8): 83 - 84.
- [45] 华雪铭, 周洪琪, 邱小琮, 等. 饲料中添加芽孢杆菌和硒酵母对异育银鲫的生长及抗病力的影响[J]. 水产学报, 2001, 25(5): 448 - 453.
- [46] Kurane R, Hatamochi K, Kakuno T, *et al.* Production of a bioflocculant by *Rhodococcus erythropolis* S21 grown on alcohols[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1994, 58(2): 428 - 429.



- [47] Fernandez A, Huang S, Seston S, *et al.* How stable is stable? Function versus community composition[J]. *Applied and Environment Microbiology*, 1999, 65(8):3697-3704.
- [48] 袁茵, 鲁欣. 具细菌群体感应抑制活性海洋细菌的筛选鉴定[J]. *生物技术*, 2006, 16(4):30-33.
- [49] 郭嘉亮, 陈卫民. 细菌群体感应信号分子与抑制剂研究进展[J]. *生命科学*, 2007, 19(2):224-232.
- [50] 陶金莉, 迟莉丽, 沈亚领, 等. 细菌的群体行为调控机制 - Quorum sensing[J]. *微生物学通报*, 2004, 31(4):106-110.
- [51] Swift S, Karlyshev A V, Fish L, *et al.* Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*: Identification of the LuxRI homologs AhyRI and AsaRI and their cognate *N*-acylhomoserine lactone signal molecules[J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179:5271-5281.
- [52] Gray K M. Intercellular communication and group behavior in bacteria [J]. *Trends in Microbiology*, 1997, 5:184-188.

## Analysis of bacterial community structure of Bio-Floc by PCR-DGGE

XIA Yun<sup>1,2</sup>, YU Er-meng<sup>1</sup>, XIE Jun<sup>1\*</sup>, YU De-guang<sup>1</sup>, WANG Guang-jun<sup>1</sup>,  
LI Zhi-fei<sup>1</sup>, WANG Hai-ying<sup>1</sup>, GONG Wang-bao<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application & Cultivation, Ministry of Agriculture, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

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

**Abstract:** Bio-Floc consists of phytoplankton, bacteria, aggregates of living and dead particulate organic matter, and grazers of the bacteria. It not only can regulate water quality, but also can supply the food protein for breeding animals. For the study of bacterial community structure of Bio-Floc in freshwater culture systems, the key technologies of Israeli Avnimelech team about Bio-Floc in the field of aquaculture were used in this paper. Glucose was added as the carbon source which makes a C:N ratio of 20:1 be maintained during the experiment. The bacterial communities of Bio-Floc were analyzed by using the PCR-DGGE (PCR-denaturing gradient gel electrophoresis) on the 5th, 10th, and 15th day, respectively. The results indicated that the similarity of bacterial communities was highest on the 5th day and 10th day which was 67.4%, and was lowest on the 5th day and 15th day which was 40.5%. Diversity of bacterial species in the Bio-Floc was maximal on the 10th day and minimal on the 15th day. The acquired sequences of 24 bands in DGGE gel were performed by BLAST searches against NCBI database, and the sequences including the closely related sequences were aligned with Clustal W program in BioEdit software for phylogenetic analysis. The main microbes represented by 24 main bands in DGGE gel were Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria, Actinobacteria, Bacilli and Bacteroidetes. Among these bacteria, the  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -proteobacteria are the major bacterial groups, but Actinobacteria bacteria exist on the 10th day and the 15th day.  $\alpha$ -proteobacteria was the dominant bacteria during the entire process. The specific bacteria at different stages were usually the flocculant-producing bacteria: *Acidovorax*, *Aeromonas*, *Agrobacterium* only for 5th day; *Bacillus*, *Rhodococcus* for 10th day and 15th day, respectively. This study first found that the composition and diversity of bacteria of the Bio-Floc used in freshwater aquaculture systems are extremely rich. The study of functional microbial composition of the Bio-Floc may help to lay the foundation for the further application of the bio-floc technology in actual aquaculture production.

**Key words:** Bio-Floc; bacterial communities;  $\alpha$ -proteobacteria; PCR-DGGE

**Corresponding author:** XIE Jun. E-mail: xiejunhy@yahoo.com.cn