

## 草鱼养殖池塘生物膜固着微生物群落碳代谢 Biolog 分析

李志斐, 王广军, 谢 骏\*, 郁二蒙, 余德光, 夏 耘, 魏 南

(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)

**摘要:** 为了探索池塘生态系统中生物膜形成过程固着微生物对碳源的需求特征,以生态基为生物膜载体材料,以草鱼养殖池塘为生物膜培养环境,利用 Biolog 技术,分析了生物膜形成过程中(第 0、15、30、45 和 60 天)微生物群落碳代谢特征。结果表明,不同采样时间生物膜固着微生物样品平均颜色变化率(average well color development, AWCD)均在培养 168 h 后达到稳定,并且 5 个采样时间点的 AWCD 值即对单一碳源的利用能力存在显著差异,生物膜固着微生物的碳代谢能力在 15、30、45 d 时最强,显著高于 0 和 60 d( $P < 0.05$ );多样性指数也呈现出与 AWCD 值相同的规律,15、30 和 45 d 生态基的 4 类多样性指数(Shannon 指数、Pielou 指数、McIntosh 指数和丰富度指数)均显著高于 0 和 60 d( $P < 0.05$ );同一采样时间生物膜固着微生物对多聚物类和碳水化合物类的利用率明显高于胺类、氨基酸类、酚类和羧酸类;随着生物膜的形成,固着微生物提高了对  $\alpha$ -D-葡萄糖-1-磷酸、L-丝氨酸、N-乙酰-D-葡萄糖氨、吐温 40、D-甘露醇等碳源的利用率;生物膜微生物代谢特征 PCA 分析表明,主成分 1(PC1)贡献度为 33.9%,主成分 2(PC2)贡献度为 21.1%,15、30 和 45 d 的固着微生物群落差异较小,碳源代谢差异不显著,而与 0 和 60 d 的碳代谢差异显著。池塘生态系统中生物膜固着微生物在 15~45 d 代谢能力最强,且对碳源的利用是有选择性的。

**关键词:** 草鱼; 生物膜; 碳代谢; 单一碳源利用; 主成分分析

**中图分类号:** Q 938.8; S 965

**文献标志码:** A

生物膜是一种依附于载体材料的特殊微生物群落聚集体<sup>[1]</sup>,是由 10% 的微生物和 90% 的胞外多聚物(extracellular polymeric substances, EPS)构成<sup>[2]</sup>。生物膜的形成过程是通过细菌鞭毛、纤毛和菌丝等细胞结构在载体表面的附着<sup>[3-4]</sup>、EPS 对细胞和载体的粘附<sup>[2]</sup>、小菌落的形成<sup>[5]</sup>以及菌落不断的生长等几个生长阶段来完成的<sup>[6]</sup>。成熟的生物膜具有良好的好氧、兼性和厌氧等微生物生存环境<sup>[7]</sup>,为生物脱氮好氧硝化反应和厌氧反硝化反应提供必要的环境条件。生物膜在水动力的条件下截留水体中悬浮物质,并将其氧化和分解,从而达到水质净化作用<sup>[8]</sup>。

随着我国水产养殖集约化程度的不断加大,养殖污染物氮(N)、磷(P)等不断的积累<sup>[9-10]</sup>,养

殖环境污染日趋加重,给养殖水环境修复提出了更高的要求。生物膜法修复技术作为一种微生物修复技术,因其具有水生态友好、运行成本低、性能稳定、操作简单等特点,在水处理与环境水体原位修复方面得到大量应用<sup>[11-14]</sup>,在水产养殖业上还可以起到提高鱼类产量的效果<sup>[15-16]</sup>。然而,生物膜法在实际应用中存在挂膜启动时间长、启动阶段水处理效率低下、污染物去除率提升慢等缺点,在养殖系统中生物膜的形成通常需要 30~40 d 甚至更长<sup>[17-18]</sup>,已成为养殖系统中生物膜应用的制约环节。已有研究表明,营养物质对生物膜组成成分、结构以及功能有不同程度的影响<sup>[19-20]</sup>,人们通过试错法初步筛选了一些可以缩短生物膜挂膜时间的有机碳源<sup>[21-22]</sup>,但这些碳源

收稿日期:2014-08-21 修回日期:2014-10-31

资助项目:公益性行业(农业)科研专项(201203083);现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46-17);国家科技支撑计划(2012BAD25B01,2012BAD25B04)

通信作者:谢 骏, E-mail: xj00773@163.com

的筛选盲目性大,未能从生物膜附着微生物碳源需求本身进行研究,因此了解生物膜形成过程中本底微生物群落对碳源的需求情况显得十分重要。

Biolog 技术是一种通过测试微生物对单一碳源利用程度,反映微生物群体水平的生理功能轮廓以及描述微生物群落水平多样性 (community-level physiological profiling, CLPP) 的分析方法,是目前已知的研究微生物代谢功能多样性的有效的方法之一<sup>[23-24]</sup>。本研究尝试以生态基为载体材料,并应用于草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 池塘养殖中,利用 biolog 微生态板技术研究生物膜形成过程中微生物群落功能多样性,旨在探索草鱼池塘特定环境下生物膜形成过程中碳代谢动态差异,从微生物碳代谢角度了解生物膜的生态功能,对揭示池塘系统中生物膜载体材料运行的机理和提高生物膜技术运行性能具有重要意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

实验所用生物膜载体为生态基,由惰性材料编织而成,在水中不会分解,对环境无污染。其材料厚度 0.2 cm,比重 240 g/m<sup>2</sup>,比面积可达 20 m<sup>2</sup>/m<sup>2</sup>,生态基每块长 10 m,宽 1 m,保持其长边的一端完整并从另一端剪成 0.05 m × 1 m 的长条状。

池塘系统:选取广东省佛山市通威生态养殖有限公司草鱼高产池塘为试验池塘,水源为西江水,经过滤沉淀后使用。池塘面积 0.667 hm<sup>2</sup>,有效水深为 3.0 m,养殖容量为 22 500 kg/hm<sup>2</sup> (配合少量鲢、鳙),每日投喂 450 kg 左右的膨化饲料 (粗蛋白约 30%)。

生态基布局:池塘两端打桩 2 个用于固定钢丝绳,池塘右侧岸边固定木桩一排,15 m 长的尼龙绳将生态基悬挂于养殖池塘中,并保持其垂直悬浮的状态。同时池塘安装 2 台增氧机和一台车轮式水车,水车固定于池塘右下侧,搅动方向向右,使池塘形成逆时针的水流,可使池塘中悬浮物充分流经悬挂的生态基,有利于悬浮物的附着。在整个实验周期内,池塘内未使用任何药物,也不换水。

### 1.2 样品采集

在生态基放置后每隔 15 d 取样一次,共取样 5 次 (0、15、30、45 和 60 d)。每次随机选取 3 处剪

取 3 条生态基 (0.05 m × 1 m 条),每条上中下各剪取一小块,上中下 3 块混样作为一个样品,样品放入 50 mL 容量的无菌离心管中,低温带回实验室,立即进行微生物群落功能多样性分析。在采集生态基样品的同时对生态基周边养殖池塘水样进行采集,用事先灭菌好的 500 mL 水样瓶收集,现场测定草鱼池塘部分水质指标。

### 1.3 测定方法

水质指标的测定 实验期间,每隔 15 天同步测定水质指标,测定指标包括水温、溶氧、电导率、总氮 (TN) 等。温度、溶氧和电导率采用多功能水质分析仪 (PRO-PLUS) 现场测定,pH 采用 pH 计 (PSH-3C),水中 TN 的测定采用紫外分光光度法。

基于 Biolog-ECO 的微平板操作 选取 Biolog-ECO 板进行生物膜固着微生物碳代谢特征研究。在无菌条件下称取定量载体材料样品放入灭菌的 0.9% 生理盐水,充分震荡后按比例配置成微生物加样液,将加样液倾倒在无菌加样槽中,加入 25 °C 预热的 Biolog-ECO 微板中,每孔加 150 mL。将加好样的 Biolog-ECO 微平板加盖,25 °C 恒温培养,每隔 24 h 读取各孔在 590 nm 波长下的光密度,直至光密度值稳定为止,总共培养时间为 192 h。根据 Tiquia<sup>[25]</sup> 的测定方法,选取 72 h 的 Biolog 平均光密度吸收值进行后续数据的处理。

### 1.4 计算方法

平均颜色变化率 (AWCD) 计算 对 Biolog 所测的吸光度数据进行 AWCD 计算,即:  $AWCD = \sum (C_i - R) / n$ ,式中  $C_i$  为所测定的 31 个碳源孔的吸光值; $R$  为对照孔的吸光值; $n$  为碳源的总数目,ECO 板中  $n$  为 31,然后绘制 AWCD 随时间变化的曲线。

生态基固着微生物多样性计算 丰富度指数是指被利用的碳源的总数目,为每孔中 (C-R) 的值大于 0.25 的孔个数。

Shannon-Wiener 指数 ( $H'$ ) 计算公式:

$$H' = - \sum (P_i \times \log P_i)$$

式中, $P_i$  为有培养基的孔和对照孔的光密度值差与整板总差的比值,即  $P_i = (C_i - R) / \sum (C_i - R)$ <sup>[26]</sup>。

Simpson 指数 ( $D$ ) 又称优势度指数,是对多样性方面的集中性度量,其计算公式:

$$D = 1 - \sum P_i^2$$

Pielou 均匀度指数 ( $J_{sw}$ ) 是群落实测多样性与最大多样性的比率。Pielou 均匀度指数计算公式:

$$J_{sw} = H' / \log S$$

式中,  $S$  为被利用碳源总数目,  $\log$  选用  $e$  为底。

McIntosh 指数 ( $U$ ) 是基于群落物种多维空间上的 Euclidian 距离的多样性指数。McIntosh 指数计算公式:

$$U = \sqrt{\sum n_i^2}$$

式中,  $n_i$  是第  $i$  孔的相对吸光值 (C-R)。

生物膜固着微生物碳源利用率计算 Biolog 技术通过分布于 96 孔中的碳源底物来分析评价水体微生物生理代谢特征, Biolog<sup>TM</sup> 的 ECO 测试板 (ECO MicroPlate, 美国 Matrix Technologies Corporation) 含有 3 套 31 种不同碳源 (其中氨基酸 6 种、糖类 12 种、羧酸 5 种、聚合物 4 种、2 种胺类和 2 种酚类), 一个板可以测 3

个重复。根据孔变色情况, 确定附着微生物对碳源利用的强弱, 5 个时间点中 6 类碳源中 AWCD 的平均值最大为 100%, 以此计算不同时间点 6 类碳源的相对利用率。为了更清晰掌握每一种碳源的利用强弱规律, 将每一种碳源的利用率与 31 种的总利用率的比率定为每一种碳源的相对利用率, 并做出矩阵图进行对比分析。

### 1.5 统计方法

数据统计和绘图采用 Microsoft Office 2007 进行, 主成分分析采用 Canoco 4.5 进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 池塘水质基本情况

实验期间, 草鱼池塘水温维持在 30 °C 左右, pH 在 7.63 左右, 溶氧保持在 5.0 mg/L 以上, 电导率维持在 (0.55 ± 0.06 ~ 0.61 ± 0.08) ms/cm, TN 保持在 (4.05 ± 0.27 ~ 5.36 ± 0.42) mg/L, 水质基本稳定 (表 1)。

表 1 草鱼池塘水质基本情况

Tab. 1 The physical-chemical characteristics of the water in fishponds

时间/d time	水温/°C temperature	溶解氧/(mg/L) dissolved oxygen	电导率/(ms/cm) conductivity	pH	TN/(mg/L)
0	29.8 ± 0.5	5.51 ± 0.13	0.57 ± 0.08	7.30 ± 0.05	4.36 ± 0.11
15	29.0 ± 0.8	5.26 ± 0.17	0.60 ± 0.15	7.67 ± 0.08	4.72 ± 0.25
30	31.2 ± 1.0	6.37 ± 0.09	0.61 ± 0.08	7.73 ± 0.04	5.36 ± 0.42
45	30.8 ± 0.2	5.06 ± 0.25	0.55 ± 0.06	7.77 ± 0.10	4.05 ± 0.27
60	28.9 ± 0.7	7.04 ± 0.05	0.61 ± 0.03	7.69 ± 0.15	4.35 ± 0.30

### 2.2 碳源 AWCD

AWCD 值从功能代谢水平反映微生物群落结构多样性, 是用来衡量微生物对单一碳源的利用能力, 它提供了在相同碳源下不同微生物对碳源利用相比较的可能性, 是表现微生物活性的重要指标<sup>[27]</sup>。生物膜上固着微生物活性随培养时间的延长而升高, 不同采样时间 AWCD 值在 24 h 以内差异很小, 24 h 后 AWCD 值开始迅速升高, 48 h 进入指数期, 144 h 后进入稳定期 (图 1)。对比生物膜形成的不同采样时间固着微生物 AWCD 值发现, 不同阶段固着微生物对碳源的利用存在较大差异, 其对 31 种碳源的总利用能力大小顺序为: 30 d ≈ 15 d ≈ 45 d > 60 d > 0 d; 15 d 至 45 d 间固着微生物群落对碳源的利用性最强, 60 d 次之, 0 d 最低; 实验结束时, 生物膜固着微生物碳源利用强弱顺序为: 30 d (1.791) > 15 d (1.701) > 45 d (1.659) >

60 d (1.495) > 0 d (1.395); 生物膜在形成过程中对碳源的总利用率表现为先上升后回落的趋势。

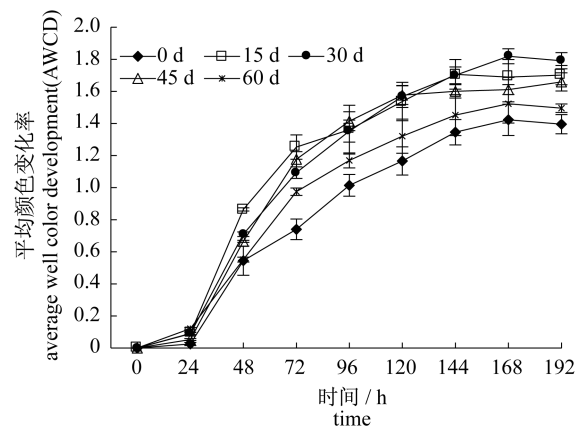


图 1 生物膜形成过程中固着微生物 AWCD 值变化  
Fig. 1 AWCD variation of adherent microbes during biofilm formation

### 2.3 生物膜形成过程固着微生物群落功能多样性分析

根据 ECO 板培养 72 h 光密度数据 ( $C-R$ ) 值, 计算 Shannon 指数、Simpson 指数、Pielou 指数、McIntosh 指数和丰富度指数 (表 2)。结果显示, 不同采样时间生物膜固着微生物的 5 种多样性指数均存在一定的差异。Shannon 指数: 15、30 和 45 d 显著高于 0 和 60 d ( $P < 0.05$ ); Simpson 指数: 0 d 指数水平最高, 其次是 15 和 30 d, 45 和 60 d 最低; Pielou 指数: 0、15、30 和 45 d 显著高于 60 d ( $P < 0.05$ ); McIntosh 指数: 45 d > 15 d > 30 d > 60 d > 0 d; 丰富度指数: 0 和 60 d 处于较低水平。结果显示, 除 Simpson 指数外, 15、30 和 45 d 生物膜固着微生物碳代谢 4 类多样性指数明显高于 0 和 60 d, 总体表现为 15、30、45 d 的生物膜形成过程固着微生物多样性指数处于较高水平。

### 2.4 固着微生物对碳源利用分析

生物膜固着微生物对多聚物类和碳水化合物类代谢具有明显优势, 其次是胺类和氨基酸类, 而对酚类和羧酸类代谢程度最低 (图 2)。不同采样时间生物膜固着微生物对多聚物类碳源的利用程

度存在显著差异 ( $P < 0.05$ ), 0、15、30、45、60 d 的多聚物类利用率分别为 54.6%、96.6%、100%、92.2% 和 88.5%, 强弱顺序为 30 d > 15 d > 45 d > 60 d > 0 d, 多聚物类碳源在生物膜不同采样时间内利用规律与碳水化合物类、胺类以及氨基酸类基本相同。而在不同采样时间内对酚类碳源利用情况也存在较大差异, 0、15、30、45、60 d 的酚类利用率分别为 13.8%、47.1%、25.4%、24.8% 和 33.9%, 代谢强弱为: 15 d > 60 d > 30 d > 45 d > 0 d。羧酸类碳源利用程度差异不显著, 强弱顺序为 45 d > 15 d > 0 d > 60 d > 30 d。从采样时间看, 0 d 生物膜固着微生物量较小, 代谢程度也较低, 随着时间的延长微生物固着量的增加, 生物膜固着微生物加强了对胺类、多聚物类、氨基酸类、碳水化合物类以及酚类的代谢强度, 而没有增加对羧酸类代谢程度, 意味着生物膜固着微生物利用碳源的偏好。总体而言, 生物膜固着微生物对多聚物类和碳水化合物类有代谢偏好, 同时随着固着微生物量的加大, 对胺类、多聚物类、氨基酸类、碳水化合物类以及酚类的代谢加强。

表 2 生物膜形成过程固着微生物群落多样性指数

Tab. 2 Diversity and evenness indices for adherent microbes during biofilm formation

时间/d time	Shannon index	Simpson index	Pielou index	McIntosh index	丰富度指数 richness index
0	3.009 ± 0.058 <sup>b</sup>	0.986 ± 0.001 <sup>c</sup>	0.979 ± 0.008 <sup>b</sup>	5.609 ± 0.211 <sup>a</sup>	21.67 ± 1.53 <sup>ab</sup>
15	3.188 ± 0.032 <sup>c</sup>	0.981 ± 0.001 <sup>b</sup>	0.975 ± 0.012 <sup>b</sup>	8.225 ± 0.795 <sup>c</sup>	26.33 ± 0.58 <sup>c</sup>
30	3.138 ± 0.022 <sup>c</sup>	0.980 ± 0.001 <sup>b</sup>	0.987 ± 0.009 <sup>b</sup>	7.488 ± 0.096 <sup>bc</sup>	24.00 ± 0.00 <sup>b</sup>
45	3.103 ± 0.035 <sup>c</sup>	0.977 ± 0.002 <sup>a</sup>	0.981 ± 0.017 <sup>b</sup>	8.090 ± 0.238 <sup>bc</sup>	23.67 ± 1.15 <sup>b</sup>
60	2.766 ± 0.053 <sup>a</sup>	0.973 ± 0.005 <sup>a</sup>	0.929 ± 0.029 <sup>a</sup>	7.358 ± 0.337 <sup>b</sup>	19.67 ± 2.08 <sup>a</sup>

注: 同列不同字母表示在  $P < 0.05$  水平上差异显著,  $n = 3$

Note: The same column with different letters mean significant difference among treatments at  $P < 0.05$ .  $n = 3$

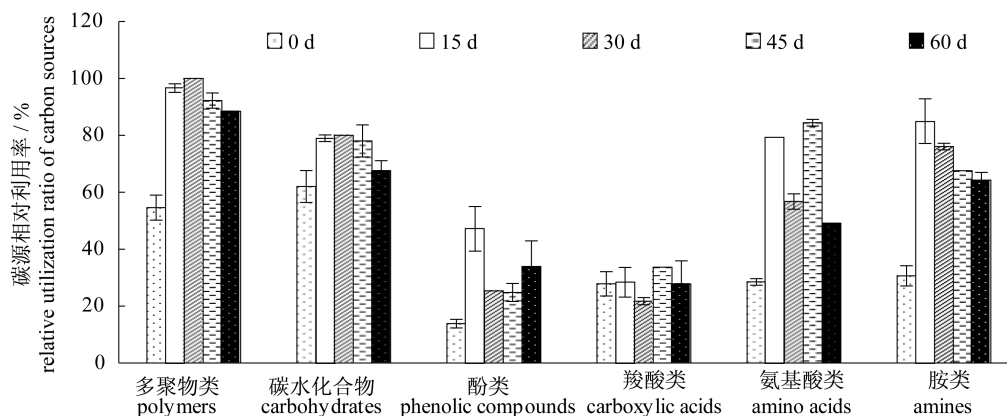


图 2 生物膜附着微生物对 6 类碳源的相对利用率

Fig. 2 Relative utilization ratio in six groups of carbon sources by adherent microbes

生物膜形成过程中固着微生物对 31 种碳源的利用率图谱展示了固着微生物的群落水平生理特征,结果显示,固着微生物对 31 种碳源的利用率存在较大差异(图 3),揭示了不同采样时间和不同碳源间附着微生物代谢的差异性和相似性。尽管 31 种

碳源在所有样点中大多得到了微生物的利用,但每个碳源 AWCD 值的相关丰度是不同的。低利用率相应的碳源预示着微生物对其利用能力的衰退,高利用率的碳源表明微生物对其利用需求较强。本研究选取每板总利用值的 4% 为碳源利用的基准。

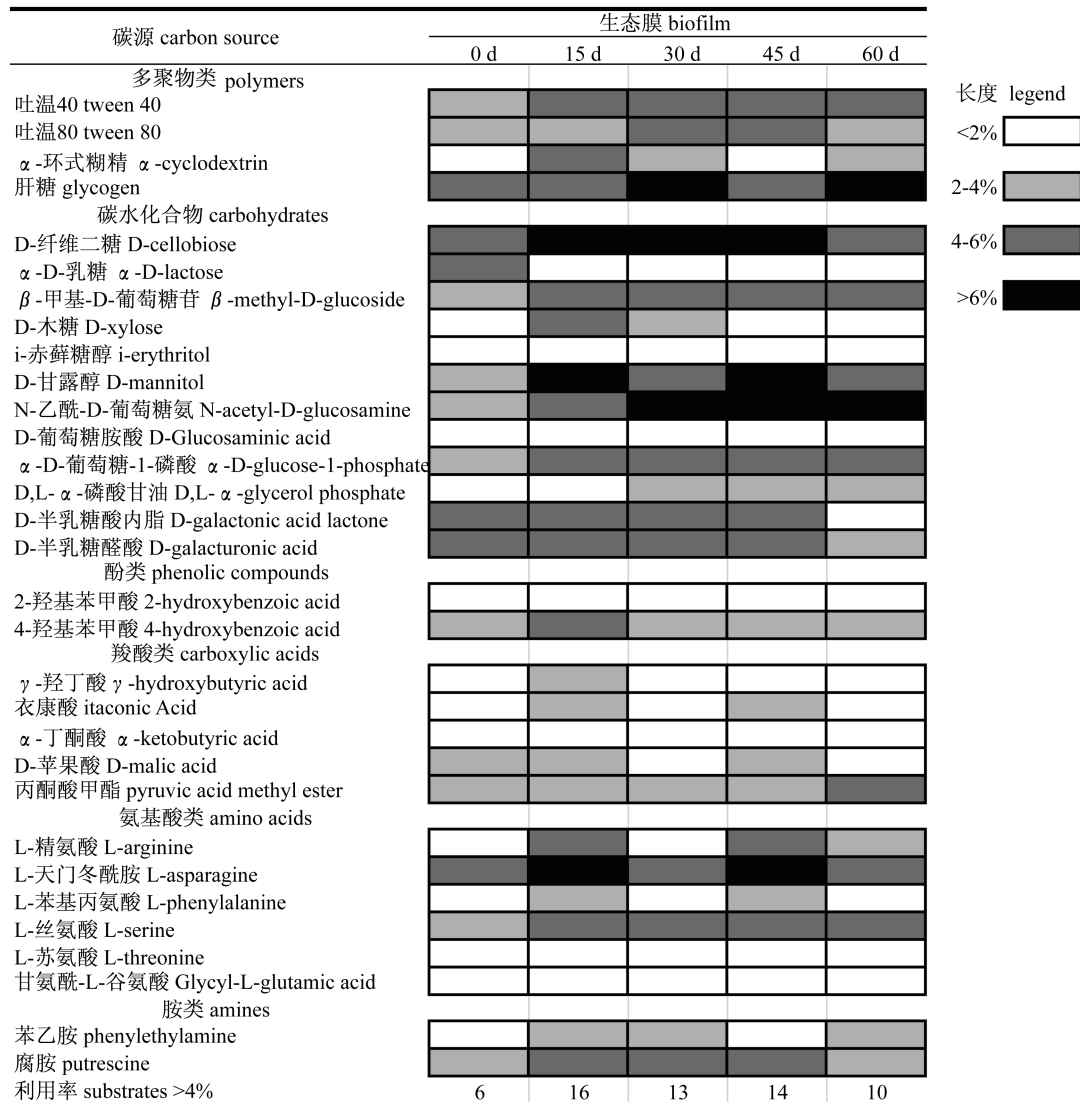


图 3 生物膜固着微生物对 31 种碳源的利用率矩阵图

Fig. 3 Pattern of utilization (based on AWCD) of the 31 carbon substrates by Adherent microbes in biofilm

结果显示,0 d 时生物膜固着微生物高利用碳源(>4%)数量最少,为 6 种,15 d 最高有 16 种,30 d 开始回落为 13 种,45 d 为 14 种,60 d 则下降到 10 种(图 3)。生物膜形成的不同阶段高利用碳源(>4%)数量规律与 AWCD 活性变化规律相似,为 15、45 和 30 d 明显高于 0 和 60 d ( $P < 0.05$ ),表现为随着微生物附着时间延长高利用碳源(>4%)先上升后下降。0 d 的生物膜固着

微生物代谢活性最低,高利用碳源数量最少,这是由于 0 d 生物膜上微生物固着量最少,生物膜还没有形成(图 1,图 3)。根据微生物利用碳源的强弱对比 0 d 与其他 4 个阶段,发现随着生物膜形成,生物膜固着微生物代谢活性明显提高的有  $\alpha$ -D-葡萄糖-1-磷酸 > L-丝氨酸 > N-乙酰-D-葡萄糖胺 > 吐温 40 > D-甘露醇 >  $\beta$ -甲基-D-葡萄糖苷 > 苯乙胺 > L-精氨酸 > 吐温 80 > 肝糖 > 腐胺 >

L-天门冬酰胺 > D-纤维二糖;随着生物膜形成,生物膜形成过程中微生物代谢活性明显降低的有 $\alpha$ -D-乳糖和 D-葡萄糖胺酸;生物膜整个形成过程中微生物碳源利用率较低 (<2%) 的有 2-羟基苯甲酸 <  $\alpha$ -丁酮酸 < i-赤藓糖醇 < D-葡萄糖胺酸 < L-苏氨酸 < 甘氨酸-L-谷氨酸,其中不利用的碳源 (AWCD < 0.1) 有 2-羟基苯甲酸和  $\alpha$ -丁酮酸(图 3)。

### 2.5 生物膜固着微生物群落代谢功能主成分分析(PCA)

为研究生物膜形成过程中固着微生物群落碳源代谢多样性的特点,选择 72 h 作为取样时间点,对 Biolog 测试获得数据进行标准化变换后,应用 Canoco for Windows 4.5 进行主成分分析。提取了 4 个主成分,第 1 主成分(PC1)为 33.9%,第 2 主成分(PC2)为 21.1%,第 3 主成分(PC3)为 9.5%,第 4 主成分(PC4)为 7.7%,将前 2 个主成分得分作图,表征不同基质微生物群落碳源代谢特征(图 4),其中,前 2 个主成分积累贡献率达 55.0%。PC1 荷载大于 0.55 的基质有 19 种,荷载大于 0.85 的基质有 2 种;PC2 荷载大于 0.55 的基质有 7 种,荷载大于 0.85 的基质仅 1 种。因此,生物膜不同阶段固着微生物碳代谢功能群落结构的差异性主要取决于 PC1 (19 种) 和 PC2 (7 种) 中荷载值较高的基质。主成分分析中样方间

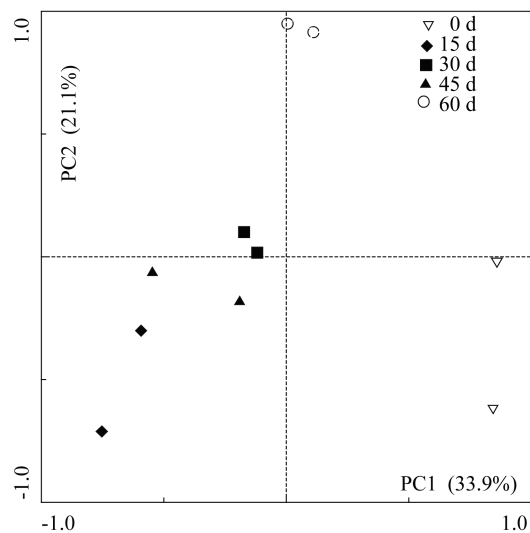


图 4 生物膜固着微生物对 Biolog 板中底物碳源代谢主成分分析

Fig. 4 Patterns of microbial communities in biofilm as revealed by principal component analysis (PCA) of Biolog plate data profiles

距离的大小表示样方间的相似程度,距离越近相似程度越高,15、30、45 d 的固着微生物群落相近,碳代谢差异较小,而这三个时间阶段与 0 和 60 d 的类群散点距离较大,说明 0 和 60 d 的固着微生物群落与其他 3 个阶段差异性较大,碳代谢功能差异显著(图 4)。

### 3 讨论

池塘生态系统生物膜形成过程中固着微生物对碳源需求能力呈现先增强后回落的趋势。生物膜形成过程中,15 ~ 45 d 固着微生物群落对碳源的代谢活性 (AWCD) 最强,60 d 次之,0 d 最低;微生物代谢多样性指数也表现出相同的变化趋势。同时,本实验也发现生物膜形成过程中固着微生物对单一碳源的需求也发生了改变,生物膜形成过程中固着微生物明显提高了对  $\alpha$ -D-葡萄糖-1-磷酸、L-丝氨酸和 N-乙酰-D-葡萄糖氨等 13 种碳源利用率,同时明显降低了对  $\alpha$ -D-乳糖和 D-葡萄糖胺酸的利用;形成后的生物膜微生物对胺类、多聚物类、氨基酸类、碳水化合物类以及酚类的代谢能力加强。

生物膜固着微生物对碳源需求量的变化差异与生物膜定植微生物种类、数量和活性有关。在河流生物膜研究中,发现河流源微生物仅有部分种类固着在生物膜上,生物膜上定植微生物仅占河流源的 14.3% ~ 33.3%<sup>[28]</sup>, Besemer 等<sup>[29]</sup> 同样对比了河流与河流生物膜微生物群落结构,发现河流生物膜是另外一种不同的微生物群落存在形式,而生物膜微生物群落与河流中微生物群落不同是由于微生物对基质可利用性和竞争造成的<sup>[30]</sup>。Asaduzzaman 等<sup>[31]</sup> 在养殖水体放置载体材料 60 d 实验中发现,载体材料上总异养细菌前一个月稳定增加,接着持续降低。本实验中生物膜固着微生物代谢活性和多样性呈现出先升后降的规律,峰值出现在 30 d,表明生物膜形成过程中附着微生物数量与代谢活性和多样性的变化规律保持一致。尽管池塘生态系统中生物膜附着微生物种类极有可能少于池塘水体中的微生物种类,但由于微生物可以随着定植其总量逐渐上升,因此,其代谢活性仍处于较高的水平。

生物膜形成过程中固着微生物选择性定植势必会导致固着微生物对碳源利用的选择性。本实

验结果表明,随着生物膜的形成,固着微生物提高了对  $\alpha$ -D-葡萄糖-1-磷酸、L-丝氨酸、N-乙酰-D-葡萄糖氨、吐温 40、D-甘露醇、 $\beta$ -甲基-D-葡萄糖苷、苯乙胺、L-精氨酸、吐温 80、肝糖、腐胺、L-天门冬酰胺、D-纤维二糖等的利用率。其中  $\alpha$ -D-葡萄糖-1-磷酸是羟基被磷酸取代的活化的葡萄糖,糖原、蔗糖合成的中间体,乳酸发酵的中间体,参与糖酵解和糖异生过程<sup>[32-33]</sup>。而固着微生物对  $\alpha$ -D-葡萄糖-1-磷酸代谢活性最高,表明生物膜上葡萄糖发酵作用较强,这可能与生物膜厌氧层(如酵母菌)发酵分解有机质有关<sup>[34]</sup>;生物膜对 5 种氨基酸中的 3 种(L-丝氨酸、L-精氨酸和 L-天门冬酰胺)利用率有明显提高,表明生物膜形成后微生物对氨基酸的利用较强,实验池塘中随着水体搅动残饵等营养物质会在生物膜上吸附,这些营养物质含有大量氨基酸,氨基酸的富集会强化生物膜上嗜氨基酸类细菌活性;N-乙酰-D-葡萄糖氨是几丁质、粘多糖、糖蛋白的单体之一,也是细菌和许多真菌细胞壁的组成成分<sup>[35-36]</sup>,为水体细菌的生长提高了必要的条件,生物膜对其利用率的提高,反映出生物膜有大量微生物繁殖;吐温 40 和吐温 80 主要作为解脂微生物的选择培养基,生物膜对吐温利用率提高,表明生物膜强化了解脂微生物的活性<sup>[37]</sup>。随着生物膜的形成,附着微生物代谢活性明显降低的有  $\alpha$ -D-乳糖和 D-葡萄糖胺酸。 $\alpha$ -D-乳糖可被乳酸菌类微生物利用,分解成乳酸,但酵母不能利用<sup>[38]</sup>,而  $\alpha$ -D-乳糖在生物膜中利用率降低,这可能是生物膜上乳酸菌类含量较少的原因;不利用的碳源(AWCD < 0.1)有 2-羟基苯甲酸和  $\alpha$ -丁酮酸。其中 2-羟基苯甲酸又名水杨酸,李志斐等<sup>[39]</sup>研究发现养殖水体微生物对 2-羟基苯甲酸也未利用,表明淡水养殖系统中不存在利用 2-羟基苯甲酸的微生物。通过利用群落水平多样性(community-level physiological profile)来关注微生物对碳源利用模式,着重关注对某一碳源的绝对利用情况,结合其生态学意义,就能更好地了解微生物群落分解代谢特征。同时,从生物膜单一碳源代谢特征可以寻找到强化生物膜挂膜的碳源,其中利用率较高的碳源将是我们碳源筛选的重要参考。

生物膜固着微生物对碳源的利用规律直接反映了固着微生物的代谢偏好,从 31 种碳源的六大类分类来看,固着微生物对多聚物类和碳

水化合物类有代谢偏好,同时随着生物膜上固着微生物量的加大,对胺类、多聚物类、氨基酸类、碳水化合物类以及酚类的代谢加强。通过对华南地区高产池塘水体微生物碳代谢发现,水体微生物对碳水化合物类和多聚物类有代谢偏好,其中代谢强度碳水化合物类 > 多聚物类<sup>[39]</sup>。本实验中生物膜固着微生物对多聚物类的代谢强度强于碳水化合物类,表明了水体微生物被生物膜固着后碳代谢的差异。在水生态环境中厌氧反硝化作用作为生物脱氮的最为重要途径,反硝化的发生是以碳源为电子供体的,在池塘生态系统中,碳源不足时反硝化受阻,养殖水体中  $\text{NO}_2^-$ -N 和  $\text{NO}_3^-$ -N 浓度偏高<sup>[40-41]</sup>,可以说碳源是生物脱氮速率的限制因子<sup>[43-44]</sup>,碳源限制时会影响微生物群落的代谢能力,进而影响有机废物减量化和资源化<sup>[45-46]</sup>。

本研究进行了 5 个阶段微生物碳源代谢的主成分(PCA)分析,从总体上寻找代谢规律,结果表明,5 个不同采样时间的样方各自相对集中,样方分布在不同区域,其中 15、30 和 45 d 聚在一起,与 0 和 60 d 分成 3 个样点群。样点间距离越近,相似性越高<sup>[47]</sup>。样点间的离散和聚集,表明样点在微生物代谢功能上存在一定的差异性和相似性,因此,生物膜成熟期(15 ~ 45 d)固着微生物代谢规律相同,而与初期和末期存在较大的差异性。0 d 为生物膜初期,固着微生物量较小,生物膜尚未形成。15、30 和 45 d 为固着微生物代谢旺盛期,微生物量不断加大,代谢活性也最大,生物膜趋于成熟。60 d 为生态基定植微生物稳定期,微生物在生物膜上定植有选择性,仅有特定种类微生物会在生态基上稳定定植,形成了优势种群,限制了其他种类的生长繁殖,选择性定植后细菌种类减少,可能会影响生物膜附着微生物总体活性,也会影响附着微生物对单一碳源的利用情况。

综上所述,本实验根据淡水池塘生态系统中生物膜形成过程中固着微生物碳源代谢特征,寻找到了固着微生物代谢活性较高的碳源,可以为生物膜挂膜强化剂筛选提供数据参考,并为生物膜高效运行提供可尝试的方法。但高效碳源的实用性还有待进一步验证,后续研究应聚焦于高利用率碳源挂膜应用研究上,验证本实验得出的有利于提高生物膜代谢能力的碳源是否能在生产上提高挂膜效果、提高污染物去除能力,为研究成果

转化于生产提供直接的数据参考。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Qi H Y, Wang W B, Zheng Y, *et al.* Mechanism of biofilm formation and analysis of influencing factors [ J ]. *Microbiology China*, 2013, 40 ( 4 ): 677 - 685. [ 戚韩英, 汪文斌, 郑昱, 等. 生物膜形成机理及影响因素探究. *微生物学通报*, 2013, 40 ( 4 ): 677 - 685. ]
- [ 2 ] Flemming H C, Wingender J. The biofilm matrix [ J ]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8 ( 9 ): 623 - 633.
- [ 3 ] Bullitt E, Makowski L. Structural polymorphism of bacterial adhesion pili [ J ]. *Nature*, 1995, 373 ( 6510 ): 164 - 167.
- [ 4 ] Thomas W E, Nilsson L M, Forero M, *et al.* Shear-dependent ' stick-and-roll ' adhesion of type 1 fimbriated *Escherichia coli* [ J ]. *Molecular Microbiology*, 2004, 53 ( 5 ): 1545 - 1557.
- [ 5 ] Harmsen M, Yang L A, Pamp S J, *et al.* An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance and dispersal [ J ]. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2010, 59 ( 3 ): 253 - 268.
- [ 6 ] Renner L D, Weibel D B. Physicochemical regulation of biofilm formation [ J ]. *MRS Bulletin*, 2011, 36 ( 5 ): 347 - 355.
- [ 7 ] Song X F, Xue S S, Chen Y M. Effect of nanocobase on treatment of aquaculture wastewater [ J ]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2012, 6 ( 7 ): 2231 - 2236. [ 宋协法, 薛松松, 陈义明. 纳米生态基对水产养殖污水的处理效果. *环境工程学报*, 2012, 6 ( 7 ): 2231 - 2236. ]
- [ 8 ] Xu Y T. Microbial characteristics and performance of biological film system [ J ]. *Shanghai Environmental Sciences*, 1997, 16 ( 3 ): 20 - 23. [ 徐亚同. 生物膜系统的微生物特征和运行管理. *上海环境科学*, 1997, 16 ( 3 ): 20 - 23. ]
- [ 9 ] Zhang Q Z, Achal V, Xu Y T, *et al.* Aquaculture wastewater quality improvement by water spinach (*Ipomoea aquatica Forsskal*) floating bed and ecological benefit assessment in ecological agriculture district [ J ]. *Aquacultural Engineering*, 2014, 60 ( 4 ): 48 - 55.
- [ 10 ] Tang J Y, Wang Y, Dai Y X. Effects of co-culturing freshwater pearl *Hyriopsis cumingii* in a fish polycultural system on fish yield and water quality [ J ]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38 ( 2 ): 208 - 217. [ 唐金玉, 王岩, 戴杨鑫. 在淡水鱼类混养系统中吊养三角帆蚌对养殖产量和水质的影响. *水产学报*, 2014, 38 ( 2 ): 208 - 217. ]
- [ 11 ] Khatoon H, Yusoff F, Banerjee S, *et al.* Formation of periphyton biofilm and subsequent biofouling on different substrates in nutrient enriched brackishwater shrimp ponds [ J ]. *Aquaculture*, 2007, 273 ( 4 ): 470 - 477.
- [ 12 ] Qin Y T, Zhang X W, Ren H Q, *et al.* Population dynamics of ammonia oxidizing bacteria in an aerated submerged biofilm reactor for micro-polluted raw water pretreatment [ J ]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 79 ( 1 ): 135 - 145.
- [ 13 ] Wu W Z, Liu Y, Zhu Q, *et al.* Remediation of polluted river water by biological contact oxidation process using two types of carriers [ J ]. *International Journal of Environment and Pollution*, 2009, 38 ( 3 ): 223 - 234.
- [ 14 ] Abbasnezhad H, Gray M, Foght J M, *et al.* Influence of adhesion on aerobic biodegradation and bioremediation of liquid hydrocarbons [ J ]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 92 ( 4 ): 653 - 675.
- [ 15 ] Dam A A V, Beveridge M C M, Azim M E, *et al.* The potential of fish production based on periphyton [ J ]. *Fish Biology and Fisheries*, 2002, 12 ( 1 ): 1 - 31.
- [ 16 ] Umesh N R, Shankar K M, Mohan C V. Enhancing growth of common carp, rohu and Mozambique tilapia through plant substrate; the role of bacterial biofilm [ J ]. *Aquaculture International*, 1999, 7 ( 4 ): 251 - 260.
- [ 17 ] Feng Z H, Xu J T, Li Y, *et al.* Study on the biofilm formation process of biofilter in a closed seawater recirculating aquaculture system [ J ]. *Journal of Huaihai Institute of Technology: Natural Science*, 2010, 19 ( 4 ): 79 - 82. [ 冯志华, 徐军田, 李玉, 等. 封闭循环海水养殖生物滤池生物膜形成过程研究. *淮海工学院学报: 自然科学版*, 2010, 19 ( 4 ): 79 - 82. ]
- [ 18 ] Liu Y H, Luo G Z, Zhu X B. Microbial characteristics of biofilter in a closed marine system [ J ]. *Journal of Agro-Environment Sciences*, 2004, 23 ( 3 ): 540 - 544. [ 刘艳红, 罗国芝, 朱学宝. 海水闭合循环系统生物滤池微生物特性研究. *农业环境科学学报*, 2004, 23 ( 3 ): 540 - 544. ]
- [ 19 ] Liboriussen L, Jeppesen E. Structure, biomass, production and depth distribution of periphyton on artificial substratum in shallow lakes with contrasting



- nutrient concentrations [ J ]. *Freshwater Biology*, 2006, 51(1):95 – 109.
- [20] Bellinger B J, Gretz M R, Domozych D S, *et al.* Composition of extracellular polymeric substances from periphyton assemblages in the florida everglades [ J ]. *Journal of Phycology*, 2010, 46(3):484 – 496.
- [21] Satoh H, Okabe S, Norimatsu N, *et al.* Significance of substrate C/N ratio on structure and activity of nitrifying biofilms determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes [ J ]. *Water Science and Technology*, 2000, 41(4 – 5):317 – 321.
- [22] Wang W, Qu K, Zhu J X, *et al.* Effect of carbon sources on biofilm cultivation and its nitrification-denitrification performance [ J ]. *Chinese Journal of Applied Environmental Biology*, 2013, 19(3):495 – 500. [王威, 曲克明, 朱建新, 等. 不同碳源对陶环滤料生物挂膜及同步硝化反硝化效果的影响研究. *应用与环境生物学报*, 2013, 19(3):495 – 500.]
- [23] Grove J A, Kautola H, Javadpour S, *et al.* Assessment of changes in the microorganism community in a biofilter [ J ]. *Biochemical Engineering Journal*, 2004, 18(2):111 – 114.
- [24] Garland J L, Mills A L, Young J S. Relative effectiveness of kinetic analysis vs single point readings for classifying environmental samples based on community-level physiological profiles (CLPP) [ J ]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2001, 33(7/8):1059 – 1066.
- [25] Tiquia S M. Metabolic diversity of the heterotrophic microorganisms and potential link to pollution of the Rouge River [ J ]. *Environmental Pollution*, 2010, 158(5):1435 – 1443.
- [26] Grizzle H W, Zak J C. A microtiter plate procedure for evaluating fungal functional diversity [ J ]. *Mycologia*, 2006, 98(2):353 – 363.
- [27] Choi K H, Dobbs F C. Comparison of two kinds of Biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities [ J ]. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 36(3):203 – 213.
- [28] Katharina B, Hannes P, Jürg B L, *et al.* Unraveling assembly of stream biofilm communities [ J ]. *The ISME Journal*, 2012, 6(1):1459 – 1468.
- [29] Besemer K, Singer G, Limberger R, *et al.* Biophysical controls on community succession in stream biofilms [ J ]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(15):4966 – 4974.
- [30] Jackson C R, Churchill P F, Roden E E. Successional changes in bacterial assemblage structure during epilithic biofilm development [ J ]. *Ecology*, 2001, 82(2):555 – 566.
- [31] Asaduzzaman M, Wahab M A, Verdegem M C J, *et al.* Effects of addition of tilapia *Oreochromis niloticus* and substrates for periphyton developments on pond ecology and production in C/N-controlled freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* farming systems [ J ]. *Aquaculture*, 2009, 287(3 – 4):371 – 380.
- [32] Hanes C S. The reversible formation of starch from glucose-1-phosphate catalysed by potato phosphorylase [ J ]. *Proceedings of the Royal Society-Part B: Biological Sciences*, 1940, 129(855):174 – 208.
- [33] Ohdan K, Fujii K, Yanase M, *et al.* Enzymatic synthesis of amylose [ J ]. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2006, 24(1 – 2):77 – 81.
- [34] Zhao Z H, Jin C J, Zhang P, *et al.* Influence of yeast on anaerobic fermentation of kitchen waste for producing acetic acid [ J ]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2009, 3(10):1885 – 1888. [赵振焕, 金春姬, 张鹏, 等. 酵母菌对厨余垃圾厌氧发酵产乙酸的影响. *环境工程学报*, 2009, 3(10):1885 – 1888.]
- [35] Manoj K D, Samir K R, Debi P S. Characterization of anti-N-acetyl-d-glucosamine antibodies elicited through haptenated liposomes [ J ]. *Carbohydrate Research*, 1984, 128(2):335 – 340.
- [36] Du R Y, Bai J, Wang S Z, *et al.* Response of soil microbial community function to chemical-aided remediation of multi-metal contaminated soils using *Jatropha curcas* [ J ]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2011, 31(3):575 – 582. [杜瑞英, 柏珺, 王诗忠, 等. 多金属污染土壤中微生物群落功能对麻疯树化学联合修复的响应. *环境科学学报*, 2011, 31(3):575 – 582.]
- [37] Zhang Y Y, Qu L Y, Chen L D. An amendment on information extraction of biolog EcoPlate™ [ J ]. *Microbiology China*, 2009, 36(7):1083 – 1091. [张燕燕, 曲来叶, 陈利顶. Biolog EcoPlate™ 实验信息提取方法改进. *微生物学通报*, 2009, 36(7):1083 – 1091.]
- [38] Dong Q, Yan X F, Zheng M H, *et al.* Characterization of an extremely thermostable but cold-adaptive  $\beta$ -galactosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* for

- use as a recombinant aggregation for batch lactose degradation at high temperature [ J ]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2014, 117 ( 6 ): 706 – 710.
- [ 39 ] Li Z F, Xie J, Yu E M, *et al.* Carbon metabolic diversity of Microbial communities in intensive ponds for hybrid snakehead and large mouth bass based on Biolog-ECO plates [ J ]. *Journal of Agro-Environment Sciences*, 2014, 33 ( 1 ): 185 – 192. [李志斐, 谢骏, 郁二蒙, 等. 基于 Biolog-ECO 技术分析杂交鳊和大口黑鲈高产池塘水体微生物碳代谢特征. *农业环境科学学报*, 2014, 33 ( 1 ): 185 – 192. ]
- [ 40 ] Wang L L, Zhan L. Influence of different carbon source and ratio of carbon and nitrogen for water denitrification [ J ]. *Environmental Protection Science*, 2004, 24 ( 1 ): 45 – 47. [王丽丽, 赵林. 不同碳源及其碳氮比对反硝化过程的影响. *环境保护科学*, 2004, 24 ( 1 ): 45 – 47. ]
- [ 41 ] Aslan S, Turkman A E. Combined biological removal of nitrate and pesticides using wheat straw as substrates [ J ]. *Process Biochemistry*, 2005, 40 ( 2 ): 935 – 943.
- [ 42 ] Shao L, Xu Z X, Jin W, *et al.* Rice husk as carbon source and biofilm carrier for water denitrification [ J ]. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2009, 18 ( 4 ): 693 – 699.
- [ 43 ] Revsbec N P, Sorensen J. Denitrification in soil and sediment [ M ]. New York and London: Plenum Press, 1990: 65 – 73.
- [ 44 ] Zhao G Z, Li W H, Tian G M, *et al.* Study of influential elements on nitrate removal from simulated groundwater by biofilm electrode reactor [ J ]. *Journal of Zhejiang University: Science Edition*, 2012, 39 ( 6 ): 659 – 665. [赵国智, 李文红, 田光明, 等. 电极生物膜法脱除地下水中硝酸盐氮的影响因素研究. *浙江大学学报: 理学版*, 2012, 39 ( 6 ): 659 – 665. ]
- [ 45 ] Lpez M J, Elorrieta M A, Vargas-Garca M C, *et al.* The effect of aeration the biotransformation of lignocellulosic wastes by white-rot fungi [ J ]. *Bioresource Technology*, 2002, 81 ( 2 ): 123 – 129.
- [ 46 ] Dignac M F, Houot S, Francou C, *et al.* Pyrolytic study of compost and waste organic matter [ J ]. *Organic Geochemistry*, 2005, 36 ( 7 ): 1054 – 1071.
- [ 47 ] Hadwin A K M, Rio D L F, Pinto L J, *et al.* Microbial communities in wetlands of the Athabasca oil sands: genetic and metabolic characterization [ J ]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2006, 55 ( 1 ): 68 – 78.

## Microbial carbon metabolic characteristics of biofilm communities in the grass carp culture pond based on Biolog-ECO plates

LI Zhifei, WANG Guangjun, XIE Jun\*, YU Ermeng, YU Deguang, XIA Yun, WEI Nan  
(Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application & Cultivation, Ministry of Agriculture, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Guangzhou 510380, China)

**Abstract:** Microbial biofilm can be defined as multi-cellular aggregates adhering to carrier material, and has been widely used in water restoration. Despite prior research, the metabolic function of biofilm remains poorly understood. Using Eco-substrates as biofilm support, we evaluated the carbon requirements of microbial biofilm communities during biofilm formation (0, 15, 30, 45, 60 d) in the grass carp culture pond by Biolog-ECO plates. Our result showed that average well color development (AWCD) reached stationary phase after 168 h cultivation in all five selected sampling stages, and there were significant differences in sole carbon utilization characterized as AWCD value among five stages, and the higher carbon utilization capacity was observed in biofilm communities from 15 d to 45 d, it is higher than that observed in 0 and 60 d significantly. And the diversity indexes (Shannon index, Pielou index, McIntosh index, richness index) had the same rule of dynamic changes with AWCD. In addition, the polymers' and carbohydrates' utilization capacity of biofilm microbes was significantly higher than that of Phenolic compounds, carboxylic acids, amino acids, amines in all five sampling stages. With the biofilm formation, the utilization of  $\alpha$ -D-glucose-1-phosphate, L-serine, N-acetyl-D-glucosamine, Tween 40, D-mannitol, etc. in biofilm microbes improved. The principal component analysis of microbial metabolic characteristics in biofilm communities showed that principal components 1 (PC1) accounted for 33.9%, and principal components 2 (PC2) accounted for 21.1% respectively. Based on samples' distance, most similar characters in carbon metabolism of microbial community were found among 15, 30 and 45 d, but with significant differences in 0 and 60 d. Microbial biofilm communities had the strongest metabolic ability from 15 d to 45 d in the grass carp culture pond, and utilized carbon sources selectively.

**Key words:** *Ctenopharyngodon idella*; biofilm; carbon metabolism; sole carbon utilization; principal component analysis

**Corresponding author:** XIE Jun. E-mail: xj00773@163.com