

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54(9):1053-1062; 4 September 2014
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicroen
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.09.010

以聚羟基丁酸戊酸共聚酯为碳源去除循环水养殖系统的硝酸盐及生物膜中微生物群落动态

张兰河¹, 刘丽丽^{1,2}, 仇天雷², 高敏², 韩梅琳², 袁丁³, 王旭明^{2*}

¹ 东北电力大学化学工程学院, 吉林 吉林 132012

² 北京市农林科学院生物技术研究中心, 农业基因资源与生物技术北京市重点实验室, 北京 100097

³ 北京市水产科学研究所, 北京 100068

摘要:【目的】利用聚羟基丁酸戊酸共聚酯(PHBV)作为固体碳源和生物膜载体,去除循环水养殖系统的硝酸盐,并研究固体碳源反硝化反应器不同运行阶段生物膜中微生物群落结构的动态变化。【方法】采用PCR-DGGE技术对反硝化反应器中微生物群落结构的动态变化进行了分析,采用传统纯培养方法分离反应器中降解PHBV的细菌。【结果】连接固相反硝化反应器能使循环水养殖系统中积累的硝酸盐显著降低,并维持在较低水平(小于10 mg/L),而常规循环水养殖系统中硝酸盐浓度持续增加。系统发育树聚类分析结果表明,反硝化反应器生物膜细菌归属于变形菌门(β -proteobacteria、 γ -proteobacteria和 δ -proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidetes)。反应器运行初期(40 d)的优势种群主要为*Acidovorax*和*Bacillus*;运行后期(150 d)的优势种群依次为*Clostridium*、*Desulfitobacterium*、*Dechloromonas*、*Pseudoxanthomonas*和*Flavobacterium*。从反应器中分离到的PHBV降解菌株分别归属于*Acidovorax*、*Methylibium*、*Pseudoxanthomonas*和*Dechloromonas*。【结论】利用PHBV为碳源能有效去除循环水养殖系统的硝酸盐。明确了反硝化反应器在运行过程中,碳源表面生物膜的优势菌群及其动态变化。

关键词:循环水养殖系统,硝酸盐,PHBV,反硝化,PCR-DGGE,群落结构

中图分类号:Q938 **文章编号:**0001-6209(2014)09-1053-10

循环水产养殖与传统养殖方式相比,具有节水、节地、高密度集约化和排放可控的特点,是未来水产养殖方式转变的必然趋势^[1-3]。在循环水养殖系统中,通过常规水处理技术(沉淀、过滤和生物净化),能有效去除水中的有机物,并把氨氮转化为硝酸盐

(硝化作用),使水质得到一定程度的改善。但由于不具备反硝化功能,常造成系统中硝酸盐的大量积累^[4]。相对于氨氮和亚硝态氮而言, $\text{NO}_3\text{-N}$ 对养殖对象的毒性相对较低,但是高浓度 $\text{NO}_3\text{-N}$ 仍会造成水生动物的生长速度降低、易患病、成活率降低等问

基金项目:国家自然科学基金(21077014);“十二五”农村领域国家科技计划课题(2012BAD25B03);北京市科技计划课题(Z121100001512008);北京市农林科学院科技创新能力建设专项(KJ CX201204006)

* 通信作者。Tel: +86-10-51503804; Fax: +86-10-51503980; E-mail: wangxuming@baafs.net.cn

作者简介:张兰河(1971-),男,黑龙江双鸭山人,博士,教授,主要从事水污染控制研究。E-mail: zhanglanhe@163.com

收稿日期:2013-11-22; **修回日期:**2014-01-24

题^[5-6]。养殖生产中往往靠换水来降低硝酸盐浓度,不但造成了水资源和能源的巨大浪费,而且富含硝酸盐废水的直接排放,加剧了对环境的污染。

利用微生物的反硝化作用去除硝酸盐是一种常规的污水脱氮工艺。该工艺通常需要外加甲醇、乙醇、葡萄糖等可溶性碳源为反硝化提供还原力,但需要复杂的碳源投加控制系统,而且存在碳源易过量影响出水水质的风险^[7]。固相反硝化是一种新型的反硝化工艺,该工艺利用可生物降解聚合物同时作为反硝化微生物的碳源和生物膜载体,具有简单、易调控的优点^[8-10]。Boley等^[7]在循环水养殖系统中增加了一个固相反硝化单元,能有效降低系统的硝酸盐浓度,而常规的循环水养殖系统(对照)中,硝酸盐浓度持续增加。李秀辰等^[11]研究了固体废物为碳源去除循环水养殖系统的硝酸盐,获得了较高的反硝化效率。以上研究虽然实现了固相反硝化在循环水养殖系统中的应用,但对于决定系统脱氮效率的微生物群落结构及其动态变化知之甚少。

本文以聚羟基丁酸戊酸共聚酯(PHBV)作为反硝化的碳源和生物膜载体,以去除循环水产养殖系统的硝酸盐,并利用PCR-DGGE技术分析了反硝化反应器生物膜中微生物群落的动态变化,旨在为固相反硝化工艺在循环水养殖系统中的应用提供理论与实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 养殖品种: 金鱼 (*Carassius auratus*), 体长 3.5 cm - 6 cm。

1.1.2 固体碳源: 采用宁波天安生物材料有限公司提供的 PHBV 颗粒(灰白色,比表面积 2 m²/kg,直径 3 mm)作为反硝化反应器的固体碳源,PHBV 粉末作为分离培养基的碳源。

1.1.3 主要仪器和试剂: 水质快速测定仪 [5B-3 (B), 连华科技], 紫外可见分光光度计 (756P, 上海光谱仪器), TOC 分析仪 (vario, 大昌华嘉商业有限公司), 扫描电镜 (S-3400N, HITACHI), PCR 扩增仪 (EDC-810, 东升国际贸易有限公司), Alphamager HP 凝胶成像系统 (Protein Simple, USA), 变性梯度凝胶电泳系统 (Bio-Rad)。引物由上海生工合成, The PowerSoil DNA Isolation Kit (MO-BIO

Laboratorie), 细菌基因组提取试剂盒 (Tiangen Biotech), pGEM-T Easy System I kit (Promega), PCR 试剂购自北京全式金生物技术有限公司, PHBVN 培养基 (KNO₃ 2 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, K₂HPO₄ 0.5 g, NH₄Cl 0.3 g, PHBV 粉末 5 g, 蒸馏水 1000 mL, 琼脂 1.8% - 2.0%, 调节 pH 约 7.2, 121℃ 灭菌 20 min)。

1.2 实验装置

1.2.1 循环水养殖系统: 采用 2 个水族箱 (RS-380A, 日胜电器有限公司) 作为循环水养殖系统, 水族箱的有效体积为 24 L。水族箱自带生物过滤器 (滤料为化学纤维合成的过滤棉), 用于去除 COD、氨氮和亚硝酸盐。1 个水族箱连接反硝化反应器以去除系统中的硝酸盐 (图 1), 1 个作为对照。

1.2.2 反硝化反应器: 采用固体碳源填充床反应器 (图 1), 材质为有机玻璃, 内径 4 cm, 高 40 cm, 加入 185 g PHBV 颗粒, 反应器有效容积为 0.38 L。升流式进水, 流速由蠕动泵 (BT100-2J, 保定兰格恒流泵有限公司) 控制, 流速为 0.15 L/h。反应器进水来自水族箱, 出水经生物过滤器自动回流水族箱。

1.3 循环水养殖系统的运行

每个水族箱加入 20 L 经过晾晒 48 h 的陈化自来水, 按常规方法各饲养 8 条金鱼。水族箱内水温由加热棒控制在 29 ± 2℃, 溶解氧 (DO) 浓度不低于 6 mg/L, pH 值 7 - 8。每天补加由于蒸发损失的水量 (补充水为经过晾晒 48 h 的陈化自来水), 不换水。定期取水样, 经 0.45 μm 滤膜过滤后测定氨氮、NO₃-N、NO₂-N 和可溶解有机碳 (DOC) 浓度: 氨氮采用水质快速测定仪测定; NO₃-N 和 NO₂-N 分别采用紫外分光光度法和盐酸萘乙二胺比色法测定; DOC 用 TOC 分析仪测定。当水族箱中 NO₃-N 浓度达到 20 mg/L 以上时, 开启反硝化反应器, 对照水族箱仍按常规方式运行。

1.4 生物膜和碳源表面形态观察

在稳定运行的反硝化反应器中取具有完整生物膜的碳源颗粒, 用 2.5% 戊二醛固定过夜, 然后采用不同梯度的乙醇脱水, 干燥后用扫描电镜观察生物膜中的微生物形态; 另一部分采用超声波剥离生物膜, 然后用蒸馏水冲洗干净, 50℃ 下烘干, 用扫描电镜观察 PHBV 原材料和脱膜后的 PHBV 颗粒的表面形态。

1.5 微生物群落结构分析

在反硝化反应器运行的不同时期采集固体碳源

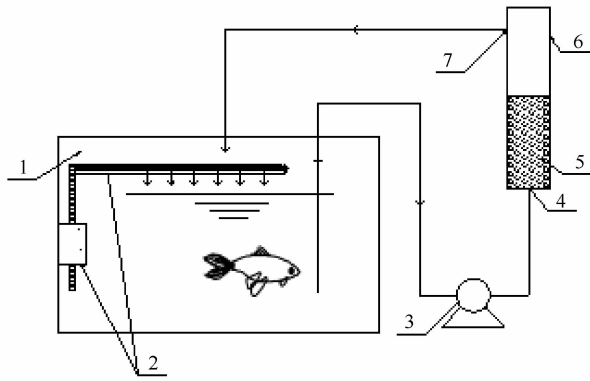


图 1. 试验装置示意图

Figure 1. Schematic representation of the experimental set-up. 1-aquarium, 2-biofilter, 3-peristaltic pump, 4-inlet port, 5- solid carbon source, 6-exhaust port, 7-outlet port.

颗粒,超声波剥离生物膜,弃掉固体碳源,10000 × g 离心 5 min,弃掉上清液,沉淀部分即为含有 PHBV 表面生物膜的样品, -20℃ 保存,用于微生物群落结构分析。

1.5.1 样品总 DNA 的提取:生物膜的基因组 DNA 采用 The PowerSoil DNA Isolation Kit (MO-BIO Laboratorie) 提取,获得的基因组 DNA 用 1% 凝胶电泳检测。

1.5.2 细菌 16S rRNA 保守区的扩增:通过含有 GC 夹 (CGCCCGCCGCGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCACGGGGGG) 的细菌通用引物 BAC341F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 534R (5'-ATTACC GCGGCTGCTGG-3') 扩增细菌 16S rDNA V3 区片段^[12-13]。扩增体系为 50 μL: 引物 (0.01 mol/L) 1 μL, 2 × TransStart™ FastPfu PCR SuperMix 25 μL, ddH₂O 22 μL。PCR 反应程序: 94℃ 3 min; 94℃ 40 s, 55℃ 1 min, 72℃ 2 min, 循环 30 次; 72℃ 10 min, 电泳检测。

1.5.3 PCR 产物的 DGGE 分析:制备 8% 聚丙烯酰胺胶,变性剂浓度 35% - 70% (100% 的变性剂为 7 mol/L 的尿素和 40% 去离子甲酰胺的混合物),上样量为 25 μL。电泳条件:1 × TAE (20 mmol/L Tris, 10 mmol/L 冰醋酸, 0.5 mmol/L EDTA, pH7.5) 缓冲液, 130 V, 电泳 6 h。电泳结束后,使用 SUPER Green I 染液凝胶染色 30 min, 拍照。

1.5.4 DGGE 条带的序列分析及系统发育树的构建:切胶回收目的条带,捣碎悬浮于 100 μL ddH₂O 中,4℃ 放置过夜,以上清作为 PCR 模板,用引物

BAC341F 和 534R 扩增,PCR 体系及反应条件同 1.5.2。PCR 产物用 pGEM-T 载体连接,热击转化,经蓝白筛选,挑克隆后送至中科希林公司测序。测序结果经 Nucleotide Blast 软件 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 比对,下载相似序列,进行多序列比对 (ClustalX),并构建系统发育树 (Neighbor-Joining, MEGA4.0)。

1.5.5 DGGE 图谱分析:采用 Quantity One 分析软件 (Bio-Rad) 比较相似性系数 (Cs),分析 3 个样品指纹图谱的相似性^[14],Cs 值变化范围为 0 - 100;分析各样品条带的相对灰度,获得不同时期生物膜样品各条带细菌在种群中所占的比例。

1.6 PHBV 降解菌的分离纯化与 16S rDNA 序列分析

生物膜取样方法同 1.5。将生物膜样品用无菌生理盐水进行系列稀释,选择适宜稀释度的菌悬液涂布 PHBVN 琼脂平板,于 28℃ 倒置培养 7 d。挑取有透明圈的菌落进行划线纯化。采用细菌基因组提取试剂盒提取纯化菌株的 DNA。以基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 16S rDNA。引物为细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACCTTGTACACTT-3')。PCR 反应程序同 1.5.2。PCR 产物送至中科希林公司测序。测序结果经 Nucleotide Blast 软件 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 与已知序列进行比对。

2 结果和分析

2.1 循环水养殖系统中硝酸盐的去除

2 个水族箱在运行过程中,NO₃-N 浓度以相似方式逐渐升高,45 d 后达到 20 mg/L 左右 (图 2)。第 46 天开启反硝化反应器,另 1 水族箱 (对照) 仍按常规方式运行。从图 2 可以看出,对照系统中 NO₃-N 浓度持续增加,最高值达到 100.1 mg/L (第 195 天);而连接反硝化反应器水族箱中的 NO₃-N 在 51 d 达到最大 (21.4 mg/L),随后持续下降,100 d 后浓度一直维持在 10 mg/L 以下。2 个水族箱中的氨氮和 NO₂-N 浓度分别低于 0.5 和 0.05 mg/L, DOC 浓度为 6 - 9 mg/L。这一结果表明,以 PHBV 为碳源的固相反硝化反应器能使循环水养殖系统中的硝酸盐维持在较低水平。

从 PHBV 颗粒表面生物膜的扫描电镜 (SEM)

照片(图3)可以看出,在反应器的运行过程中,微生物能够在 PHBV 表面附着并形成生物膜,生物膜中的微生物以杆菌为主。图4为剥离生物膜后 PHBV 颗粒(取自运行 150 d 的反硝化反应器)表面形态与 PHBV 原颗粒表面形态的比较。从图 4-B 可以看出,PHBV 颗粒表面光滑,被生物膜中的微生物利用

后(图 4-A),表面变得粗糙,出现了很多孔洞状结构。以上结果表明,养殖系统中的微生物能在 PHBV 表面附着形成生物膜,并分解利用 PHBV 为反硝化作用提供小分子有机碳源,从而实现硝酸盐的去除。

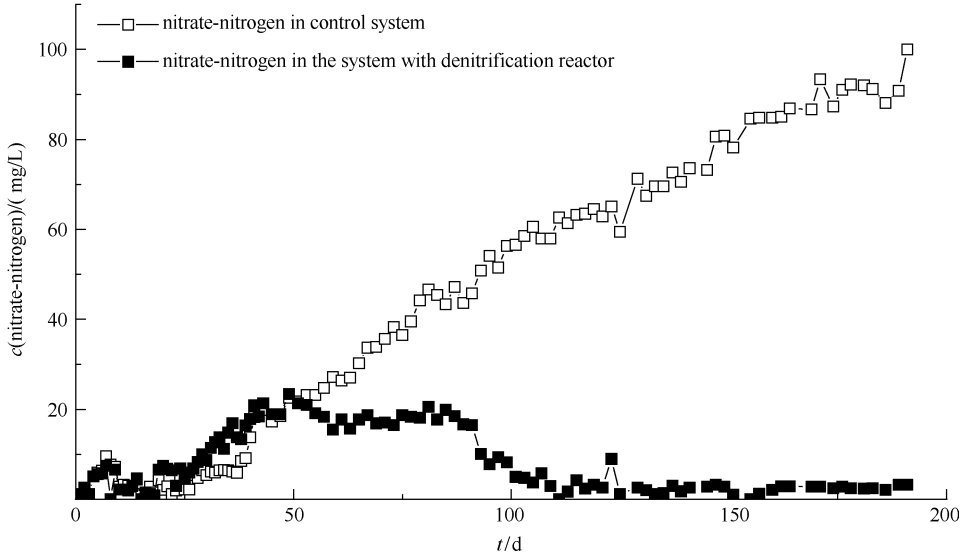


图 2. 循环水养殖系统中 $\text{NO}_3\text{-N}$ 的变化

Figure 2. Changes of $\text{NO}_3\text{-N}$ concentrations in recirculating aquaculture systems.

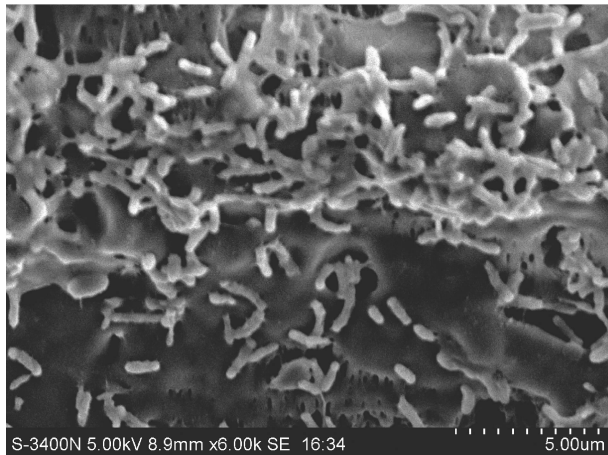


图 3. PHBV 颗粒表面生物膜的扫描电镜照片

Figure 3. SEM photo of biofilm coating onto the surface of PHBV granule.

2.2 DGGE 图谱分析

变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 常被用来对环境样品中微生物群落结构进行分析^[15-16],在聚丙烯酰胺凝胶的基础上,加入了变性剂(尿素和甲酰胺)能把

不同碱基组成的 DNA 片段区分开来。为了解反硝化反应器中细菌群落结构的动态变化,分别于反应器运行的不同时间(40、80、150 d)采集生物膜样品,进行 PCR-DGGE 分析,结果如图 5 所示。

从图 5 可以看出,40 d 生物膜样品的条带数明显少于 80 d 和 150 d 的条带数。条带 8、9、10、12 只在前期存在,后期亮度逐渐变暗或消失,可见它们所代表的细菌在反硝化的过程中逐渐减少。条带 3、4、5、6、7 只在后期的样品中亮度较高,可知它们所代表的细菌在反硝化反应器的运行初期数量可能较小,而随着反应器的运行,其数量逐渐增多,这些细菌能够很好地适应反硝化反应器的环境及水质,与生物膜中一直存在的优势菌群(1、2、11 条带)共同构成稳定期的微生物生态系统。

表 1 是用戴斯系数 (Dice coefficient) 计算出的各样品相似性的矩阵表。用该表可以对各样品之间的相似性进行比较。由表 1 可知,40 d 样品和 80 d、150 d 样品的相似性较低 (38.1% - 62.4%),80 d 和 150 d 样品之间的相似性较高 (73.6% -

76.3%)。

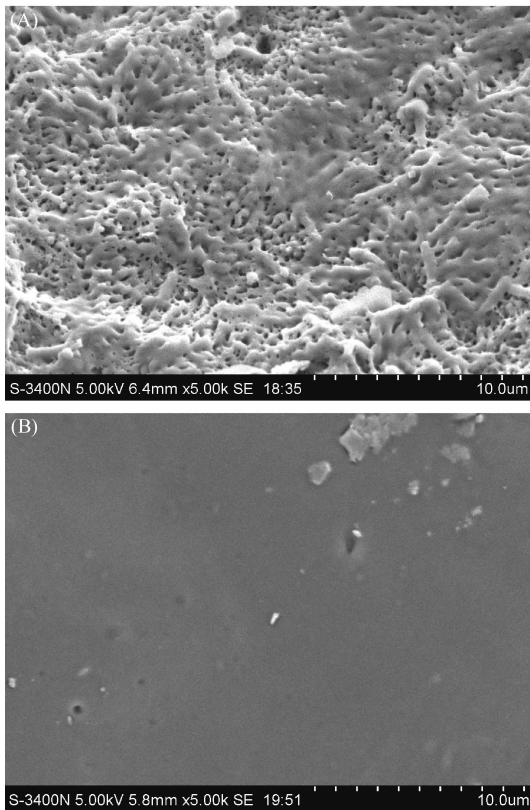


图 4. 剥离生物膜后 (A) 及初始 PHBV 颗粒的表面形态 (B)

Figure 4. PHBV granule after biofilm development (A) and Surface of fresh PHBV granule (B).

表 1. 相似性矩阵表

Table 1. Dice coefficients (Cs) comparing the similarities of PCR-DGGE fingerprints

lane	A1	A2	B1	B2	C1	C2
A1	100.0					
A2	91.8	100.0				
B1	75.9	76.3	100.0			
B2	73.7	73.6	93.0	100.0		
C1	44.5	45.7	59.2	62.4	100.0	
C2	38.1	40.0	53.2	55.8	80.0	100.0

2.3 DGGE 凝胶优势条带回收测序及序列分析

将 DGGE 图谱中的 12 条优势条带切胶回收、测序。测序结果递交 GenBank 数据库,与已知序列进行比对(表 2),并构建系统发育树(图 6)。从图 5、6 和表 2 的结果可以看出,生物膜中的细菌主要分为 5 大类群:β-变形菌纲 (Betaproteobacter)、γ-变形菌纲 (Gammaproteobacteria)、δ-变形菌纲 (Deltaproteobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes) 和拟杆

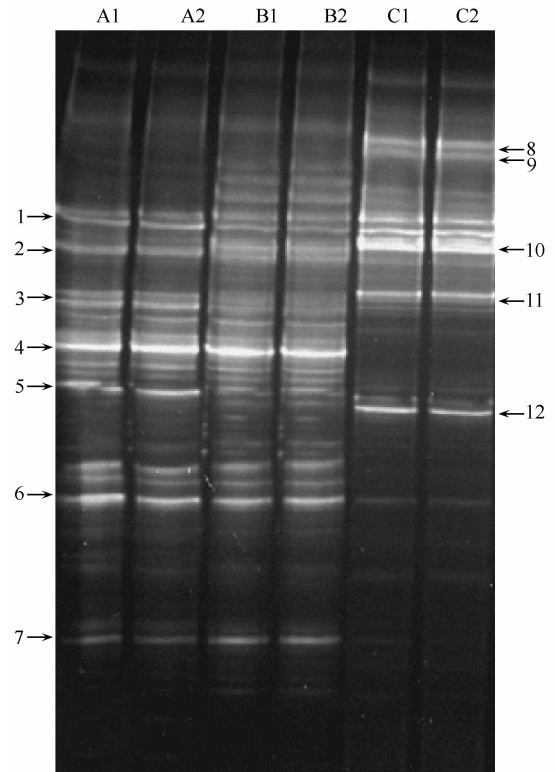


图 5. 不同样品 16S rDNA 基因扩增产物的变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 图谱

Figure 5. DGGE profiles of 16S rDNA gene amplification products from different samples. Lanes A1 and A2 are representatives for the 150th day samples, lanes B1 and B2 are representatives for the 80th day samples, lanes C1 and C2 are representatives for the 40th day samples, and 1 - 12 are representatives for the twelve bands isolated from the samples.

菌门 (Bacteroidetes)。反应器运行初期 (40 d), PHBV 表面生物膜的主要特征菌群包括 *Acidovorax*、*Bacillus*、*Diaphorobacter*、*Comamonas* 和 *Bdellovibrio*, 其中 *Acidovorax* 和 *Bacillus* 丰度最高,在种群中所占比例分别为 26.79% 和 26.7%;反应器运行中后期 (80 和 150 d), 优势菌群包括 *Acidovorax*、*Bacillus*、*Desulfotobacterium*、*Flavobacterium*、*Dechloromonas*、*Diaphorobacter*、*Pseudoxanthomonas* 和 *Clostridium*。80 d 时,在种群中所占比例最高的为 *Clostridium* (27.04%), 其次分别为 *Bacillus* (14.48%)、*Pseudoxanthomonas* (12.46%) 和 *Flavobacterium* (11.09%);150 d 时,优势种群依次为 *Clostridium* (21.72%)、*Desulfotobacterium* (13.76%)、*Dechloromonas* (12.84%)、*Pseudoxanthomonas* (12.7%) 和 *Flavobacterium* (12.19%)。

表 2. 不同时期生物膜样品 DGGE 切胶条带的序列比对结果及其在种群中所占的比例

Table 2. Sequence alignment results and the proportional in population of DGGE sequenced clone of the samples in different periods

band	closest organism	similarity/ %	GenBank accession No.	class group	proportion/%		
					40 d	80 d	150 d
1	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i> ATCC 19860 (NR_102856)	100	KF809859	β -proteobacteria	13.1	8.5	9.38
2	<i>Desulfotobacterium dichloroeliminans</i> LMG P-21439 (NR_102483)	97	KF809860	Clostridia	0	8	13.76
3	<i>Flavobacterium cheniae</i> (NR_044198)	100	KF809862	Flavobacteriia	6.45	11.09	12.19
4	<i>Clostridium aestuarii</i> (NR_043569)	99	KF809861	Clostridia	0	20.73	18.26
5	<i>Dechloromonas aromatica</i> RCB (NR_074748)	100	KF809868	β -proteobacteria	0	8.78	12.84
6	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> (NR_025105)	100	KF809864	γ -proteobacteria	3.05	12.46	12.7
7	<i>Clostridium vincentii</i> (NR_026336)	100	KF809870	Clostridia	2.23	6.31	3.46
8	<i>Acidovorax defluvi</i> (NR_026506)	100	KF809866	β -proteobacteria	13.5	0	0
9	<i>Comamonas nitrivorans</i> (NR_025376)	100	KF809865	β -proteobacteria	12.42	0	0
10	<i>Bacillus sralis</i> (NR_028709)	100	KF809867	Bacilli	26.79	14.48	8.53
11	<i>Diaphorobacter oryzae</i> (NR_044472)	100	KF809860	β -proteobacteria	13.13	9.66	8.87
12	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> str. Tiberius (NR_102470)	100	KF809863	δ -proteobacteria	9.32	0	0

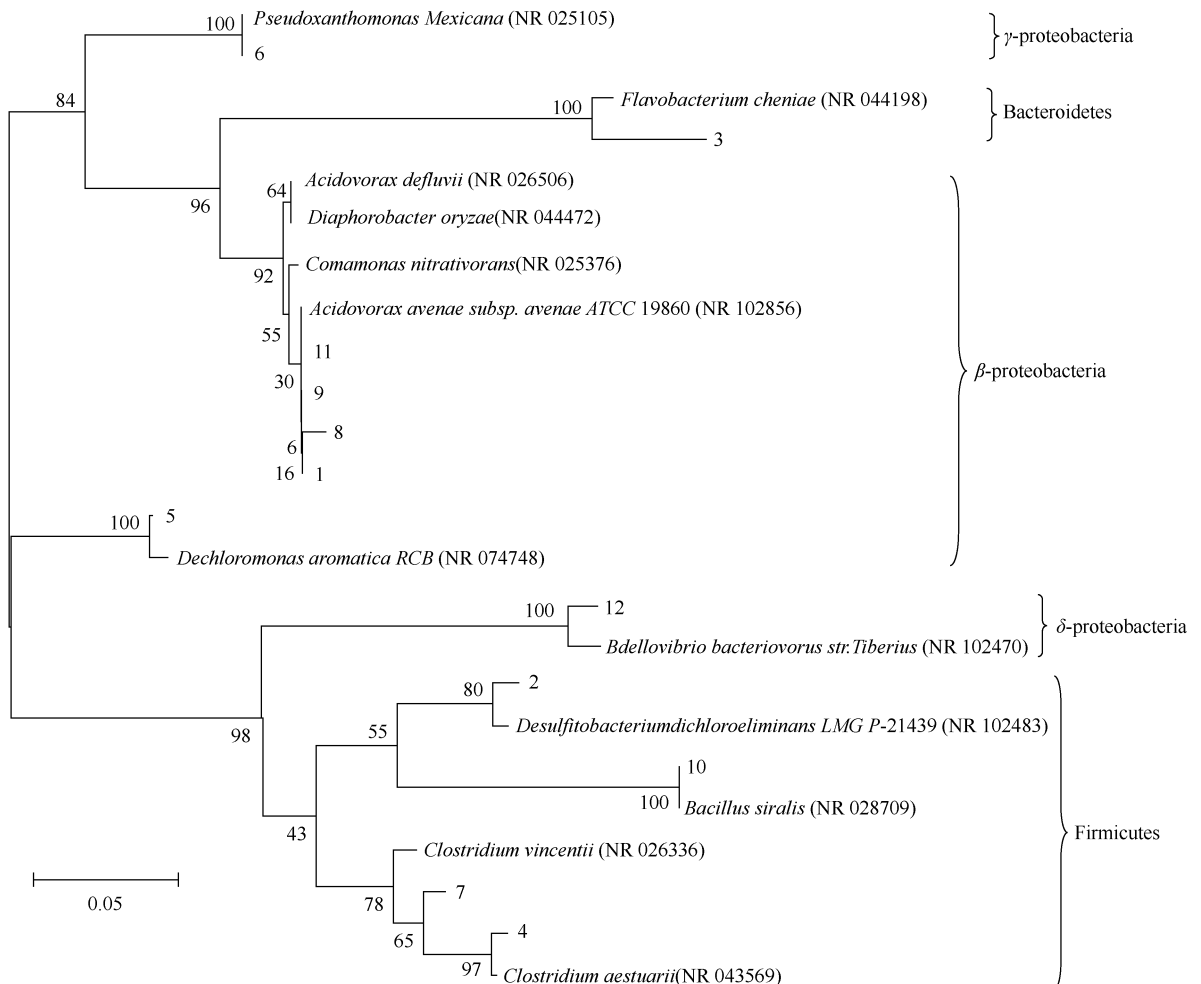


图 6. 生物膜样品 DGGE 切胶条带的系统发育树

Figure 6. Phylogenetic tree of sequences from DGGE bands of biofilm samples. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The scale bar: 5% sequence divergence.

2.4 反硝化反应器中功能菌株的分离鉴定

以 PHBV 为唯一碳源,从生物膜样品中共分离到 18 株能在分离平板上形成透明圈的细菌,其 16S

rDNA 序列比对的结果(表 3)表明,分离得到的细菌包括 *Acidovorax*、*Methylibium*、*Pseudoxanthomonas* 和 *Dechloromonas*。

表 3. 降解 PHBV 菌株 16S rDNA 序列比对结果

Table 3. Results of 16S rDNA sequence alignment of the strains degrading PHBV isolated from denitrification reactor

bacterial No.	closest organism	similarity /%	class group	transparent circle diameter/cm
B1、B2、B8、B11、B13、B15	<i>Acidovorax citrulli</i> AAC00-1 (NR_074638)	97 - 98	β -proteobacteria	1 - 1.5
B17	<i>Methylibium petroleiphilum</i> PM1 (NR_041768)	98	β -proteobacteria	0.8
B 3、B 4、B 6、B 7、B9、 B 10、B 12、B16、B18	<i>Acidovorax facilis</i> (NR_024935)	96 - 98	β -proteobacteria	0.6 - 1.7
B 5	<i>Dechloromonas agitata</i> (NR_024884)	98	β -proteobacteria	1
B 14	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> (NR_025105)	98	γ -proteobacteria	1

3 讨论

循环水产养殖中,水质净化是核心技术^[17-18]。本研究在循环水产养殖系统常规水处理的基础上,连接采用 PHBV 为碳源的填充床反应器,去除系统中的硝酸盐。采用 PCR-DGGE 技术研究了反应器在运行过程中,生物膜中细菌群落的动态变化,并采用纯培养方法分离鉴定了生物膜中的能分解 PHBV 的菌株。

按常规方式运行的循环水养殖系统,在近 200 d 的运行过程中,硝酸盐浓度逐渐增加,这与 Boley 等的研究结果相同^[7]。连接固相反硝化单元的养殖系统,在稳定运行过程中,硝酸盐浓度(以 N 计)一直低于 10 mg/L,氨氮、亚硝酸盐氮和 DOC 浓度与常规养殖系统相当。这一结果说明,以 PHBV 为碳源的固相反硝化能使循环水养殖系统维持较低的硝酸盐浓度,而且不会影响其他污染物的去除。

固相反硝化对硝酸盐的去除,首先是由于生物膜中的微生物分解固体碳源释放小分子可溶性有机物,随后被反硝化细菌利用作为电子供体,使硝酸盐还原^[19-22]。因此生物膜中微生物的群落结构及其动态变化将决定系统的稳定运行^[23]。

DGGE 图谱及测序结果揭示了反硝化反应器中微生物的动态变化规律,明确了群落结构及优势种群,根据这些信息,可以更深入地解释反硝化反应器的运行机制。运行初期(40 d)生物膜的优势菌群与运行中后期(80 d、150 d)差别较大,说明在反应器运行的前 40 d,生物膜的微生物群落结构还不稳定。80 d 和 150 d 生物膜的细菌组成相近,形成较稳定的群落结构。

随反应器运行,初期丰度较高,后期逐渐消失的细菌有 *Comamonas* (条带 9) 和 *Bdellovibrio* (条带 12)。Claudia 等^[24]发现 *Comamonas* 不利用任何糖类物质作为碳源,厌氧和好氧条件下都可以还原硝酸盐。*Bdellovibrio* 能清除水产动物常见的致病菌,对预防鱼病有一定的作用^[25]。

反应器运行中后期生物膜主要含有以下几个种属的细菌:(1) *Acidovorax* (条带 1 和条带 8) 和 *Diaphorobacter* (条带 11): 在 3 个时期的生物膜中一直丰度较高,是反应器运行过程中的主要特征菌群。二者均属丛毛单胞菌科(Comamonadaceae)。研究表明,*Acidovorax* 和 *Diaphorobacter* 能分泌胞外 PHB 解聚酶,使 PHB 和 PHBV 降解,同时进行反硝化^[26];(2) *Flavobacterium* (条带 3): 随反应器的运行丰度逐渐提高,150 d 时占到种群的 12.19%。*Flavobacterium* 为兼性厌氧细菌,能降解 PHBV^[27]。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,有机物同时被氧化^[28];(3) *Bacillus* (条带 10): 反应器中一直存在,但初期丰度较高,占种群的 26.79%,后期逐渐下降。*Bacillus* 能够降解 PHBV^[27],并显著降低水体中亚硝酸盐的浓度,从而降低水体的氮素水平。海养虾场底泥中的细菌数量和类群的调查,发现有超过 50% 的细菌生物量是芽孢细菌^[29];(4) *Clostridium* (条带 4 和条带 7): *Clostridium* 在反应器运行初期丰度较低,在稳定期成为优势种群。Mergaert 等^[27]证明了 *Clostridium* 能够降解 PHBV。(5) *Dechloromonas* (条带 5): 随反应器的运行丰度逐渐增加,是稳定期的优势菌。与条带 5 最接近的菌株 *Dechloromonas aromatica* RCB 是从波托马克河分离到的具有反硝化作用的细菌^[30],属于红环菌科

(Rhodocyclaceae); (6) *Pseudoxanthomonas* (条带 6): 在反应器运行初期丰度较低(占 3.05%), 在中后期成为优势种群之一。*Pseudoxanthomonas* 能将亚硝酸盐还原为 N_2O , 但不能还原硝酸盐^[31], 因此在系统中对 NO_2-N 的去除贡献较大。(7) *Desulfitobacterium* (条带 2): 随反应器的运行, 丰度逐渐增加并成为稳定期的优势种群之一。*Desulfitobacterium* 为严格厌氧菌, 在土壤、污泥中广泛存在, 能利用有机酸或醇作为电子供体还原硝酸盐^[32]。以上菌属均为杆菌, 与生物膜 SEM 照片(图 3)中的菌体形态一致。

采用传统微生物学分离纯化的方法, 从稳定运行反应器的生物膜中分离到能降解 PHBV 的细菌 18 株, 经鉴定分别为 *Acidovorax*、*Methylibium*、*Pseudoxanthomonas* 和 *Dechloromonas*。除 *Methylibium* 外, 获得纯培养的 PHBV 降解菌都被 DGGE 证明是生物膜中的优势菌群。研究表明, *Methylibium* 是一种高效降解菌, 能降解水相中的甲基叔丁基醚 (MTBE)^[33]。Kalyuzhnaya 等^[34] 发现 *Methylibium* 可以进行反硝化, 但未见该菌属降解 PHBV 的报道。本研究首次证明 *Methylibium* 能降解 PHBV, 其降解特性还有待深入研究。

参考文献

- [1] Rejish Kumar VJ, Sukumaran V, Achuthan C, Joseph V, Philip R, Bright Singh IS. Molecular characterization of the nitrifying bacterial consortia employed for the activation of bioreactors used in brackish and marine aquaculture systems. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2013, 78: 74-81.
- [2] Blanchetona JP, Attramadala KJK, Michaud LE, Roque d'Orbecastel E, Vadstein O. Insight into bacterial population in aquaculture systems and its implication. *Aquacultural Engineering*, 2013, 53: 30-39.
- [3] Schreier JH, Mirzoyan N, Saito K. Microbial diversity of biological filters in recirculating aquaculture systems. *Current Opinion in Biotechnology*, 2010, 21: 318-325.
- [4] Parent S, Morin A. N budget as water quality management tool in closed aquatic microcosm. *Water Research*, 2000, 34 (18): 46-55.
- [5] Hamlin JH, Moore CB, Edwards MT, Iskande LV, Larkin AB, William JH, Kevan LM, Louis J, Guillette J. Nitrate-induced elevations in circulating sex steroid concentrations in female Siberian sturgeon (*Acipenserbaeri*) in commercial aquaculture heather. *Aquaculture*, 2008, 281: 118-125.
- [6] Hamlin J. Nitrate toxicity in Siberian sturgeon (*Acipenserbaeri*). *Aquaculture*, 2006, 25 (3): 688-693.
- [7] Boley A, Muller WR, Halder G. Biodegradable polymers as solid substrate and biofilm carrier for denitrification in recirculated aquaculture systems. *Aquacultural Engineering*, 2000, 22: 75-85.
- [8] Wang X, Wang J. Removal of nitrate from raw drinking water using solid-phase denitrification process. *China Water & Wastewater*, 2008, 24 (6): 6-10. (in Chinese) 王旭明, 王建龙. 利用固相反硝化工艺去除饮用水原水中的硝酸盐. *中国给水排水*, 2008, 24 (6): 6-10.
- [9] Wang X, Sun L, Qiu T, Zhang L. Research progress on the simultaneous removal of nitrate and pesticides from groundwater using solid-phase denitrification process. *China Biotechnology*, 2012, 32 (12): 125-129. (in Chinese) 王旭明, 孙立娇, 仇天雷, 张兰河. 固相反硝化技术同时去除地下水中的硝酸盐与农药进展. *中国生物工程杂志*, 2012, 32 (12): 125-129.
- [10] Wu WZ, Yang FF, Yang LH. Biological denitrification with a novel biodegradable polymer as carbon source and biofilm carrier. *Bioresource Technology*, 2012, 118: 136-140.
- [11] Li X, Li LL, Zhang G, Mou X, Mu G. Denitrification of wastewater with external carbon source of solid wastes in recirculating marine culture system. *Journal of Agricultural Engineering*, 2010, 44 (26): 275-279. (in Chinese) 李秀辰, 李俐俐, 张国琛, 牟晨晓, 母刚. 养殖固体废物作碳源的海水养殖废水反硝化净化效果. *农业工程学报*, 2010, 44(26): 275-279.
- [12] Kjellerup BV, Veeh RH, Sumithratne P. Monitoring of microbial souring in chemically treated produced-water biofilm systems using molecular techniques. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2005, 32(4): 163-170.
- [13] Ferris MJ, Muyzer G, Ward DM. Denaturant gradient gelelectrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62 (2): 340-346.
- [14] Murray A E, Hollibaugh JT, Orrego C. Phylogenetic composition of bacterioplankton from two California Estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62 (7): 2676-2680.

- [15] Ji GD, Liao B, Tao HC. Analysis of bacteria communities in an up-flow fixed-bed (UFB) bioreactor for treating sulfide in hydrocarbon wastewater. *Bioresource Technology*, 2009, 100 (21): 5056-5062.
- [16] Fandino LB, Riemann L, Steward GF, Long RA, Azam F. Variations in bacterial community structure during a dinoflagellate bloom analyzed by DGGE and 16S rDNA sequencing. *Aquatic Microbial Ecology*, 2001, 23 (1): 119-130.
- [17] Michaud L, Giudice AL, Troussellier M, Smedile F, Bruni V, Blancheton JP. Phylogenetic characterization of the heterotrophic bacterial communities inhabiting a marine recirculating aquaculture system. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 107: 1935-1946.
- [18] van Kessel MAHJ, Harhangi HR, van de Pas-Schoonen K, van de Vossenberg J, Flik G, Jetten MSM, Klaren PHM, Op den Camp HJM. Biodiversity of N-cycle bacteria in nitrogen removing moving bed biofilters for freshwater recirculating aquaculture systems. *Aquaculture*, 2010, 306: 177-184.
- [19] Harish A, Khan ST. Application of polyhydroxyalkanoates for denitrification in water and wastewater treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 61: 103-109.
- [20] Tan H, Lan C, Luo G, Sun D, Ruan Z, Zhou W. Using biodegradable polymers as carbon source for nitrate removal in marine re-circulated aquaculture systems. *Marine Science*, 2010, 34 (6): 22-27. (in Chinese)
谭洪新, 赖才胜, 罗国芝, 孙大川, 阮贇杰, 周炜. 以可生物降解聚合物为碳源去除海水闭循环养殖系统中的硝酸盐. *海洋科学*, 2010, 34 (6): 22-27.
- [21] Fan Z, Wang J. Denitrification using polylactic acid as solid carbon source. *Environmental Science*, 2009, 30 (8): 2315-2319. (in Chinese)
范振兴, 王建龙. 利用聚乳酸作为反硝化固体碳源的研究. *环境科学*, 2009, 30 (8): 2315-2319.
- [22] Lan C, Tan H, Luo G, Ruan Z, Zhou W, Sun D. Denitrification and kinetic characteristics using biodegradable polymers as carbon source and biofilm carrier. *Environmental Science*, 2010, 31 (8): 1839-1845. (in Chinese)
赖才胜, 谭洪新, 罗国芝, 阮贇杰, 周炜, 孙大川. 利用可生物降解聚合物为碳源和生物膜载体脱氮及其动力学特性研究. *环境科学*, 2010, 31 (8): 1839-1845.
- [23] Dong M, Luo G, Liu Q, Deng P, Sun D, Tan H. Study on the denitrogenate effect and microbial community dynamic change of PBS-filled denitrification reactor. *Environmental Pollution and Control*, 2011, 33 (10): 48-54. (in Chinese)
董明来, 罗国芝, 刘倩, 邓鹏文, 孙大川, 谭洪新. 聚丁二酸丁二醇酯反硝化反应器的脱氮效果及微生物群落变化研究. *环境污染与防治*, 2011, 33 (10): 48-54.
- [24] Claudia E, Maria I, Patrick D, Rene M, Lucia M. *Comamonas nitrivorans* sp. nov., a novel denitrifier isolated from a denitrifying reactor treating landfill leachate. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 5 (1): 977-983.
- [25] Zhang L. *Bdellovibrio* in aquaculture. *Inland Fisheries*, 2003, (3): 41. (in Chinese)
张梁. 蛭弧菌在水产养殖中的应用. *内陆水产*, 2003, (3): 41.
- [26] Zhang T, Chaudhry MT, Liu ZP. Genetic and biochemical characterization of poly 3-hydroxybutyrate depolymerase from *Diphorobacter* sp. PCA039. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 26 (10): 1803-1811.
- [27] Mergaert J, Swings J. Biodiversity of microorganisms that degrade bacterial and synthetic polyesters. *Journal of Industrial Microbiology*, 1996, 17 (5-6): 463-469.
- [28] 池振明. 微生物生态学. 济南: 山东大学出版社, 1999.
- [29] Wang Y, Wang B, Dai X, Jiao N, Peng Z, Liu S. Ecological characterization of bacilli in sediment from a near-shore marine horticultural region. *Applied and Environmental Biology*, 2004, 10 (4): 484-488. (in Chinese)
王亚南, 王保军, 戴欣, 焦念志, 彭志英, 刘双江. 近海养虾场底泥中产芽孢细菌的生态特征. *应用与环境生物学报*, 2004, 10 (4): 484-488.
- [30] Coates JD, Chakraborty R, Lack JG, O'Connor SM, Cole KA, Bender KS, Achenbach LA. Anaerobic benzene oxidation coupled to nitrate reduction in pure culture by two strains of *Dechloromonas*. *Nature*, 2001, 411 (6841): 1039-1043.
- [31] Thierry S, Macarie H, Iizuka T, Geissdörfer W, Assih EA, Spanevello M, Verhe F, Thomas P, Fudou R, Monroy O, Labat M, Ouattara AS. *Pseudoxanthomonas mexicana* sp. nov. and *Pseudoxanthomonas japonensis* sp. nov., isolated from diverse environments, and emended descriptions of the genus *Pseudoxanthomonas* Finkmann et al. 2000 and of its type species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54 (6): 2245-2255.
- [32] Villemur R, Lanthier M, Beaudet R, Lépine F. The

Desulfitobacterium genus. *FEMS Microbiology Reviews*, 2006, 30 (5): 706-733.

- [33] Cheng Z, Fu L, Jiang Y, Chen J, Zhang R. Biodegradation of methyl *tert-butyl* ether by stabilized immobilized *Methylibium petroleiphilum* PM1 cells and its biodegradation kinetics analysis. *Environmental Science*, 2011, 32 (5): 1511-1517. (in Chinese)
成卓韦, 傅凌霄, 蒋轶锋, 陈建孟, 张荣. 强化固定化 *Methylibium petroleiphilum* PM1 细胞降解 MTBE 及动力

学特性分析. *环境科学*, 2011, 32 (5): 1511-1517.

- [34] Kalyuzhnaya MG, Lapidus A, Ivanova N, Copeland AC, McHardy AC, Szeto E, Salamov A, Grigoriev IV, Suciuc D, Levine SR, Markowitz VM, Rigoutsos I, Tringali SG, Bruce DC, Richardson PM, Lidstrom ME, Chistoserdova L. High-resolution metagenomics targets specific functional types in complex microbial communities. *Nature Biotechnology*, 2008, 26 (9): 1029-1034.

Nitrate removal from recirculating aquaculture system using polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate as carbon source

Lanhe Zhang¹, Lili Liu^{1,2}, Tianlei Qiu², Min Gao², Meilin Han², Ding Yuan³, Xuming Wang^{2*}

¹School of Chemical Engineering, Northeast Dianli University, Jilin 132012, Jilin Province, China

²Beijing Key Laboratory of Agricultural Genetic Resources and Biotechnology, Beijing Agro-Biotechnology Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China

³Beijing Fisheries Research Institute, Beijing 100068, China

Abstract: [**Objective**] Polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate (PHBV) was used as solid carbon source and biofilm carrier to remove nitrate from recirculating aquaculture system (RAS). Dynamics of microbial community structure in biofilm coating on carbon source packed into denitrification reactor were investigated. [**Methods**] Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) was used to analyze the microbial community in biofilm from denitrification reactor. Bacteria degrading PHBV were isolated from the reactor using pure culture method. [**Results**] Nitrate decreased remarkably in the RAS connected with denitrification reactor. In contrast, Nitrate increased continuously in the conventional RAS without denitrification reactor. According to the phylogenetic analysis, the microbes in the biofilm samples from denitrification reactor were divided into Proteobacteria (β -proteobacteria, γ -proteobacteria and δ -proteobacteria), Firmicutes and Bacteroidetes. The major advantageous populations were *Acidovorax* and *Bacillus* in the 40-day reactor. The advantageous populations in the 150-day reactor were in order of *Clostridium*, *Desulfitobacterium*, *Dechloromonas*, *Pseudoxanthomonas* and *Flavobacterium*. Pure cultures of bacteria degrading PHBV isolated from denitrification reactor were classified into *Acidovorax*, *Methylibium*, *Pseudoxanthomonas* and *Dechloromonas*. [**Conclusion**] Nitrate could be removed effectively from RAS using PHBV as carbon source. Advantageous bacteria and their dynamic changes were ascertained in biofilm from denitrification reactor packed with PHBV.

Keywords: recirculating aquaculture system, nitrate, Polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate (PHBV), denitrification, Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE), microbial community

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Nature Science Foundation (21077014), by the 12th Five-Year Guideline for National Science and Technology Project in Rural Areas (2012BAD25B03), by the Beijing Municipal Science and Technology Project (Z121100001512008) and by the Special Program for Creative Ability of Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences (KJCX201204006)

* Corresponding author. Tel: +86-10-51503804; Fax: +86-10-51503980; E-mail: wangxuming@baafs.net.cn

Received: 22 November 2013/Revised: 24 January 2014