

循环水养鳗系统生物过滤器中微生物群落的代谢特性

刘 颖¹, 李 丽^{1,2*}, 孙大川¹, 朱云昊¹, 谭洪新¹, 徐 奔¹

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 中国海洋大学教育部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要: 为了研究鳗鱼循环水养殖系统不同水处理单元微生物群落的碳代谢特征, 实验采用 Biolog Eco 技术, 分析了流化床 2 个槽和滴流式微珠生物过滤器上、中、下 3 层的生物膜微生物群落功能多样性。结果显示, 流化床 2 个槽和滴流式微珠生物过滤器中、下层微生物多样性指数 (Shannon-Wiener 指数、Simpson 指数和 Pielou 指数) 无显著差异 ($P > 0.05$), 但均显著高于滴流式微珠生物过滤器上层 ($P < 0.05$)。平均色度变化 (AWCD) 与主成分分析 (PCA) 均证明滴流式微珠生物过滤器上层与其他采样点微生物代谢差异较大。各采样点微生物未对 ECO 板某一大类碳源表现出偏好, 但对衣康酸、D-半乳糖醛酸、L-精氨酸、L-天门冬酰胺、L-丝氨酸、D-甘露醇、D-木糖、N-乙酰-D-葡萄糖氨、吐温 40、吐温 80、苯乙胺等单一碳源利用较好; 而对 γ -羟丁酸、 α -丁酮酸、D,L- α -磷酸甘油和 1-磷酸葡萄糖利用较差。某些碳源种类如 D-葡萄糖胺酸、 α -D-乳糖、2-羟基苯甲酸仅能被部分采样点的微生物利用。本实验利用 Biolog EcoPlate™ 技术研究中试规模循环水处理单元微生物群落代谢特征, 研究结果为生物过滤器的调控提供了一种新的思路, 即可通过碳源调节来促进生物膜微生物群落结构的改变, 以此提高水处理效率。

关键词: 碳代谢; 生物膜; Biolog 方法; 循环水养殖系统

中图分类号: Q 938.8; S 965

文献标志码: A

循环水养殖利用物理、化学和生物方法去除水体中鱼类代谢产物和残饵, 使水质得以净化以实现养殖水的再利用, 具有节水、节地、高密度集约化和对环境友好等特点, 被认为是水产养殖发展的主导生产模式之一^[1]。养殖水体中, 氨氮和亚硝氮是主要的胁迫因子, 而循环水养殖系统的核心部件生物过滤器是氨氮、亚硝氮等有害污染物去除的主要场所。由于微生物的数量、种类及其代谢功能是影响污染物去除和生物过滤器运行效果的关键因素, 所以弄清生物过滤器中微生物群落代谢特征和功能对揭示生物过滤器的运行机理、污染物降解和转化途径具有十分重要的学术价值^[2]。

Biolog 检测技术是一种测定微生物对不同单一碳源利用能力的快速、简便方法。因该方法操

作简单, 产生的信息量大, 被广泛用于水体、土壤微生物群落代谢特征研究^[3-5]。近年来一些学者开始利用 Biolog EcoPlate™ 进行处理城市污水的生物过滤器微生物群落代谢研究, 发现该方法能很好地评估生物过滤器微生物群落代谢变化^[6-7]。

由于欧洲鳗鲡和日本鳗鲡种质资源日渐匮乏, 作为一种新的养殖品种, 花鳗 (*Anguilla marmorata*) 在我国南方大面积养殖。该品种经济价值高, 特别适合在循环水系统中养殖^[8]。本研究将 Biolog 检测技术应用到中试规模水产养殖水处理设备微生物群落代谢研究, 以运行稳定的花鳗循环水养殖系统为研究对象, 用 Biolog 方法研究流化床 2 个反应槽和滴流式微珠生物过滤器上层、中层、下层的微生物多样性。本研究通过分

收稿日期: 2015-01-27 修回日期: 2015-07-14

资助项目: 国家自然科学基金 (31402317); 上海市优秀青年教师资助计划 (ZZhy13006); 上海海洋大学博士启动基金

通信作者: 李 丽, E-mail: l_li@ouc.edu.cn

析生物膜微生物的碳代谢特征,为工厂化循环水养殖系统中生物滤池的构建提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 循环水养鳃系统

根据养殖花鳃的循环水系统工艺流程(图1),系统由养殖缸、固液分离机、流化床、滴流式微珠过滤器(后文称微珠滤器,图表同)、恒温机、紫外灯灭菌器等单元构成。养殖缸为圆柱形玻璃缸,缸的直径为 1.50 m,高为 0.78 m。该系统自 2014 年 5 月放养花鳃以来,运行稳定。流化床共有 3 槽,前 2 个槽(A 和 B)放置滤料并给予充足曝气,其内生物膜是硝化作用发生的主要场所;微珠滤器为圆柱形,滤料深 50 cm,取 0 ~ 5 cm、20 ~ 25 cm、40 ~ 45 cm 分别定义为上、中、下层。

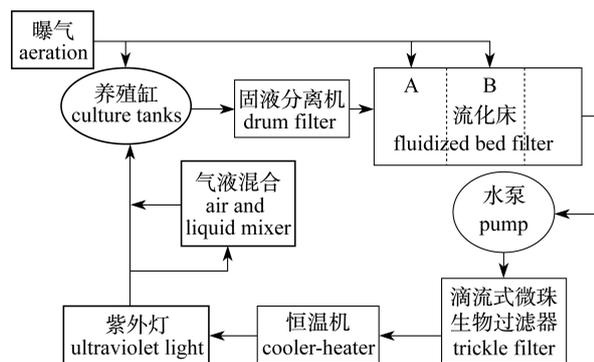


图 1 循环水养殖系统工艺流程图

Fig. 1 Flow chart of recirculating aquaculture system

1.2 微生物样品提取与 Biolog 方法操作

2014 年 11 月在运行稳定的花鳃循环水养殖系统流化床的 A、B 槽以及微珠过滤器上、中、下层分别取 2 ~ 3 g 填料。采用超声振荡法提取其中的微生物。具体步骤为,实验器材均采用高压蒸汽灭菌法进行灭菌处理(121 °C, 20 min);将所取填料置于 50 mL 无菌生理盐水(0.9% NaCl)中,对混合液超声震荡(频率 40 kHz,功率 100 W,每个样品超声处理 4 次,每次 15 s)后使填料表面的生物膜脱落分散到生理盐水中,形成均匀的微生物悬液,用无菌生理盐水将微生物悬液稀释至 600 nm 下的吸光度值为 0.05^[9]。

本研究选用 Biolog EcoPlate™ 测定微生物代谢特征,该平板包含 31 种碳源和空白对照,各 3 个重复,按 8 行(A、B、C…、H) 12 列(1、2、3…、

12) 排布,共计 96 孔。取稀释后的微生物悬液以每孔 150 μL 加入到各微孔中,然后将平板置于 25 °C 恒温培养箱中培养 10 d,培养期间每 12 h 用 Biolog 自动微生物鉴定系统(Biolog,美国)测定 96 个微孔在 590 nm 下的吸光度。

1.3 数据分析方法

经检测得到的每个吸光度值数据都是微生物对碳源利用的量值体现,这些量的差异主要由平均色度值(average well color development, AWCD)、Shannon-Wiener 多样性指数(H')、McIntosh 多样性指数(U)、Simpson 优势度指数(D)以及 Pielou 均匀度指数(J_{sw})来表征。其计算公式分别如下:

$$AWCD = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^n (C_i - R)$$

$$H' = \sum_{i=1}^n P_i \ln P_i$$

$$J_{sw} = \frac{H'}{\ln n}$$

$$D = 1 - \sum_{i=1}^n (C_i - R)^2$$

$$U = \sqrt{\sum_{i=1}^n (C_i - R)^2}$$

$$Rs_i = \frac{C_i - R}{AWCD}$$

式中, n 为培养基碳源种类数(本研究 $n = 31$), C_i 为第 i ($i = 1, 2, 3 \dots, 31$) 个非对照孔的吸光度值, R 为对照孔的吸光度值, P_i 为第 i 个非对照孔的吸光度值与所有非对照孔吸光度值总和的比值。为更直观的反映微生物对 31 种碳源的利用情况,对于某个微孔,将其吸光度值进行标准化,记为 Rs_i 。若 $Rs_i > 1$,则微生物对该孔内碳源利用较好,代谢呈阳性;反之若 $Rs_i < 1$,则为阴性。

利用主成分分析(PCA)对检测数据进行降维处理以更好地提取出有效评判因子,比较不同采样点间微生物群落对碳源利用情况的差异;对不同采样点的生物多样性指数进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),若 $P \leq 0.05$,则通过 Duncan 氏多重比较,具体区分各采样点间的差异。所有统计分析均通过 SPSS 17.0 进行。

2 结果

2.1 不同取样点微生物对碳源的利用情况

大类碳源利用情况 参照 Choi 等^[10]的分类,将 31 种碳源分为 6 大类,包括多聚物 4 种,碳水化合物 10 种,氨基酸 6 种,羧酸类 7 种,酚酸类

2 种,胺类 2 种(表 1)。结果显示,不同取样点的微生物对 6 类碳源的利用差异较大。以微珠滤器中层微生物为例,其对 6 类碳源利用由强到弱是:酚酸类 > 氨基酸 > 胺类 > 多聚物 > 碳水化合物 > 羧酸类;而流化床 B 槽微生物则对酚酸类利用最

差,对胺类利用较好(图 2)。不同取样点的微生物对酚酸类碳源利用差异很大,流化床 A 槽和微珠滤器中层微生物对酚酸类利用较好,而流化床 B 槽和微珠滤器上层微生物则对酚酸类利用较差。

表 1 Biolog 生态板 6 类碳源^[10]
Tab.1 Six carbon substrates in Biolog EcoPlateTM[10]

| 羧酸类 carboxylic acids | 氨基酸 amino acids | 碳水化合物 carbohydrates | 多聚物 polymers | 酚酸类 phenolic acids | 胺类 amines |
|-------------------------|--------------------|------------------------|-----------------|-----------------------|--------------|
| 丙酮酸甲酯 | L-精氨酸 | β-甲基-D-葡萄糖苷 | N-乙酰-D-葡萄糖氨 | 吐温 40 | 苯乙胺 |
| γ-羟丁酸 | L-天 门 冬 酰胺 | D-半乳糖酸-γ-内脂 | D-纤维二糖 | 吐温 80 | 腐胺 |
| 衣康酸 | L-苯丙氨酸 | D-木糖 | 1-磷酸葡萄糖 | α-环式 糊精 | |
| α-丁酮酸 | L-丝氨酸 | i-赤藓糖醇 | α-D-乳糖 | 肝糖 | |
| D-苹果酸 | L-苏氨酸 | D-甘露醇 | D,L-α-磷酸甘油 | | |
| D-葡糖胺酸 | 甘氨酸-L-谷 氨酸 | | | | |
| D-半乳糖醛酸 | | | | | |

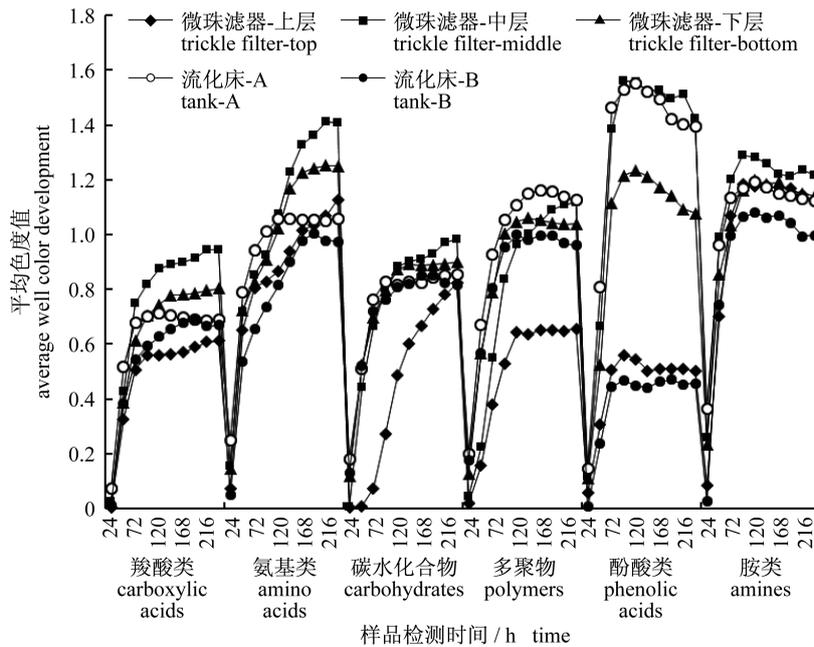


图 2 不同取样点微生物对 6 类碳源的利用特征
Fig.2 Metabolic response of micro-organisms for six carbon sources

EcoPlate 31 种碳源的利用情况 统计得到不同取样点微生物对 31 种碳源利用出现阳性的次数(表 2)。羧酸类的衣康酸、D-半乳糖醛酸,氨基酸中的 L-精氨酸、L-天门冬酰胺、L-丝氨酸,碳水化合物中的 D-甘露醇、D-木糖、N-乙酰-D-葡萄糖氨,多聚物中的吐温 40、吐温 80,胺类中的苯乙胺均能被所有样品中的微生物较好利用(阳性次

数 > 10)。而羧酸类的 γ-羟丁酸和 α-丁酮酸以及碳水化合物中的 D,L-α-磷酸甘油和 1-磷酸葡萄糖则基本不能被所有样品中的微生物利用(阳性次数 < 5)。有些碳源种类如 D-葡糖胺酸仅能被微珠滤器中层的微生物利用;α-D-乳糖则被流化床 B 槽和微珠滤器底层的微生物利用较好,而不能被流化床 A 槽和微珠滤器上层及中层的微生

物利用;2-羟基苯甲酸能被流化床 A 槽及微珠滤器中、下层的微生物很好地利用(阳性次数 >

10),而流化床 B 槽和微珠滤器上层微生物则不能利用该碳源(阳性次数 = 0)。

表 2 31 种碳源代谢呈阳性结果统计
Tab.2 Numbers of positive metabolic results for 31 carbon sources

| 阳性 次数 times | 碳源/次 carbon sources | | | | |
|-------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | 流化床-A tank-A | 流化床-B tank-B | 微珠滤器-上层 trickle filter-top | 微珠滤器-中层 trickle filter-middle | 微珠滤器-下层 trickle filter-bottom |
| 11 ~ 20 次 | 衣康酸(17) | 衣康酸(17) | 衣康酸(17) | 衣康酸(17) | |
| | 吐温 80(16) | 吐温 80(17) | 吐温 80(20) | 吐温 80(17) | 吐温 80(16) |
| | 吐温 40(16) | 吐温 40(18) | 吐温 40(17) | 吐温 40(16) | 吐温 40(16) |
| | 苯乙胺(19) | 苯乙胺(17) | 苯乙胺(18) | 苯乙胺(20) | 苯乙胺(19) |
| | N-乙酰-D-葡萄糖氨(19) | N-乙酰-D-葡萄糖氨(19) | N-乙酰-D-葡萄糖氨(11) | N-乙酰-D-葡萄糖氨(19) | N-乙酰-D-葡萄糖氨(20) |
| | L-天门冬酰胺(20) | L-天门冬酰胺(19) | L-天门冬酰胺(19) | L-天门冬酰胺(19) | L-天门冬酰胺(19) |
| | L-丝氨酸(18) | L-精氨酸(17) | L-丝氨酸(17) | L-丝氨酸(18) | L-丝氨酸(18) |
| | L-精氨酸(18) | D-木糖(16) | L-精氨酸(18) | L-精氨酸(19) | L-精氨酸(18) |
| | D-木糖(16) | D-甘露醇(19) | D-木糖(14) | D-木糖(14) | D-木糖(13) |
| | D-甘露醇(19) | D-半乳糖醛酸(18) | D-甘露醇(13) | D-甘露醇(17) | D-甘露醇(19) |
| | D-半乳糖醛酸(19) | D-纤维二糖(18) | D-半乳糖醛酸(18) | D-半乳糖醛酸(19) | D-半乳糖醛酸(18) |
| | D-纤维二糖(18) | α -D-乳糖(13) | 4-羟基苯甲酸(19) | D-纤维二糖(17) | D-纤维二糖(18) |
| | 丙酮酸甲酯(19) | 甘氨酸-L-谷氨酸(11) | 腐胺(12) | 丙酮酸甲酯(18) | 丙酮酸甲酯(11) |
| | 2-羟基苯甲酸(17) | 4-羟基苯甲酸(16) | | 4-羟基苯甲酸(19) | 4-羟基苯甲酸(19) |
| | D-半乳糖酸- γ -内脂(11) | | | 2-羟基苯甲酸(16) | 2-羟基苯甲酸(11) |
| 6 ~ 10 次 | | | | D-葡糖胺酸(15) | α -D-乳糖(17) |
| | | | | | 肝糖(20) |
| | 肝糖(6) | L-苯丙氨酸(7) | i-赤藓糖醇(6) | 肝糖(6) | i-赤藓糖醇(9) |
| 1 ~ 5 次 | 4-羟基苯甲酸(8) | L-丝氨酸(8) | L-苯丙氨酸(7) | i-赤藓糖醇(8) | L-苏氨酸(8) |
| | | i-赤藓糖醇(10) | D-纤维二糖(9) | 甘氨酸-L-谷氨酸(6) | 衣康酸(10) |
| | 腐胺(3) | 腐胺(3) | 丙酮酸甲酯(4) | 腐胺(4) | 腐胺(3) |
| 未被 利用 | D-苹果酸(2) | 丙酮酸甲酯(2) | α -丁酮酸(1) | D-苹果酸(3) | D-苹果酸(1) |
| | β -甲基-D-葡萄糖苷(3) | α -环式糊精(3) | D-半乳糖酸- γ -内脂(1) | β -甲基-D-葡萄糖苷(4) | 1-磷酸葡萄糖(1) |
| | α -环式糊精(2) | α -丁酮酸(3) | 肝糖(1) | 1-磷酸葡萄糖(1) | β -甲基-D-葡萄糖苷(5) |
| | i-赤藓糖醇(3) | D-半乳糖酸- γ -内脂(1) | L-苏氨酸(1) | L-苏氨酸(5) | |
| | | 肝糖(5) | | | |
| | β -甲基-D-葡萄糖苷(4) | | | | |
| | D,L- α -磷酸甘油(1) | | | | |
| | γ -羟丁酸(0) | γ -羟丁酸(0) | γ -羟丁酸(0) | γ -羟丁酸(0) | γ -羟丁酸(0) |
| | D-葡糖胺酸(0) | D-葡糖胺酸(0) | D-葡糖胺酸(0) | D,L- α -磷酸甘油(0) | D-葡糖胺酸(0) |
| | D,L- α -磷酸甘油(0) | 1-磷酸葡萄糖(0) | D,L- α -磷酸甘油(0) | α -环式糊精(0) | D,L- α -磷酸甘油(0) |
| | 甘氨酸-L-谷氨酸(0) | L-苏氨酸(0) | 甘氨酸-L-谷氨酸(0) | α -丁酮酸(0) | 甘氨酸-L-谷氨酸(0) |
| | α -丁酮酸(0) | D-苹果酸(0) | α -环式糊精(0) | α -D-乳糖(0) | α -环式糊精(0) |
| | α -D-乳糖(0) | 2-羟基苯甲酸(0) | α -D-乳糖(0) | L-苯丙氨酸(0) | α -丁酮酸(0) |
| | L-苯丙氨酸(0) | | 1-磷酸葡萄糖(0) | D-半乳糖酸- γ -内脂(0) | L-苯丙氨酸(0) |
| | 1-磷酸葡萄糖(0) | | D-苹果酸(0) | | D-半乳糖酸- γ -内脂(0) |
| | L-苏氨酸(0) | | 2-羟基苯甲酸(0) | | |
| | | | β -甲基-D-葡萄糖苷(0) | | |

注:表中括号内数字表示该碳源显示阳性次数

Notes;the number in table means the times of positive metabolic results.

碳源利用趋势 AWCD 值反映微生物对不同碳源的整体利用能力,其随时间的变化可直观体现微生物群落反应速度和最终达到的程度^[11]。结果显示,在前 24 h 微生物活性虽有增加,但表现出了一定的适应性;24h 后微生物活性以更快的速度增加;在前 96 h 内,流化床 A 槽的微生物表现出最快的反应速度,而微珠滤器上层的微生物群落活性最差;96 h 后,微珠滤器中层的微生物群落代谢活性以较高的反应速率进行,并超过流化床 A 槽;240 h 微生物活性趋于平稳,以微珠滤器中层微生物活性最高,其次分别是微珠滤器下层和流化床 A 槽,微珠滤器上层与流化床 B 槽微生物活性基本相同(图 3)。

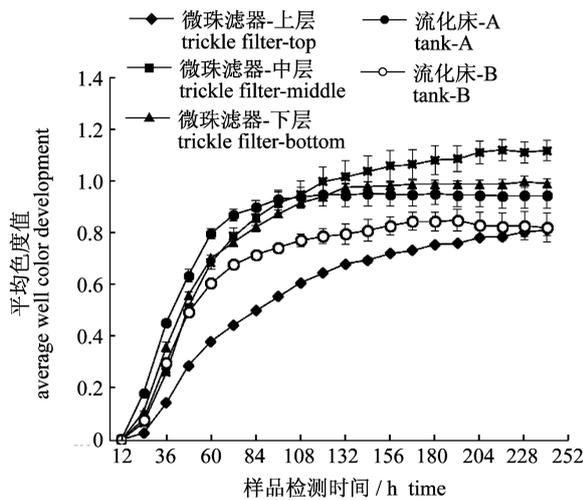


图3 不同取样点微生物 AWCD 值随培养时间变化情况
Fig.3 AWCD changes during incubation of microbial community from different sample sites

吸光度变化曲线 Biolog 生态板不同微孔内的吸光度变化曲线反映微生物对相应碳源的代谢和利用过程。绘制不同微孔内的吸光度随培养时间变化曲线,发现微生物对碳源的利用主要分为 4 种情况(图 4):① 微生物能较快地利用该碳源,在培养开始后反应就以较快的速度进行,并很快达到平衡,如微珠滤器中层微生物对 N-乙酰-D-葡萄糖氨的利用;② 微生物对碳源的利用需经过较长的适应期(48 h)后开始利用该碳源,且一般需要较长的时间达到平衡,如微珠滤器下层微生物对 L-苏氨酸的利用;③ 微生物对碳源的利用发生在培养的后期(约 156 h),如微珠滤器上层微生物对 β-甲基-D-葡萄糖苷的利用;④ 微生物不能(或基本不能)利用该碳源,微珠滤器上层微生物

对 γ-羟丁酸的利用就属此种情况。此 4 种情况,微生物对碳源的利用均发生在培养后的 24 h,表明微生物至少需要 24 h 的适应期才能开始很好地利用相应碳源。

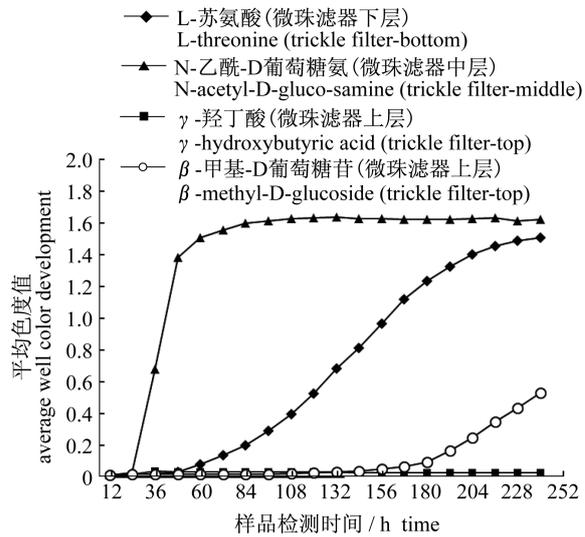


图4 微生物对不同碳源的主要利用模式
Fig.4 Changes of absorbance for four different carbon sources during incubation

2.2 微生物群落多样性

不同培养时间对微生物多样性指数影响巨大,相关研究表明培养时间选择处于 AWCD 曲线“拐点”处及以后,分析结果相对稳定^[12],因此根据 Biolog 生态板培养 132 h 及其以后(132、144、156、168、180、192、204、216 和 228 h)各指数平均值分别计算 Shannon-Winener 多样性指数、Simpson 优势度指数、Pielou 均匀度指数和 McIntosh 多样性指数(表 3)。结果显示,微珠滤器中层、微珠滤器下层、流化床 A 槽和 B 槽 4 个样点之间的 Shannon-Winener 指数、Simpson 指数、Pielou 均匀度指数均没有明显差异,但显著高于微珠滤器上层($P < 0.05$)。微珠滤器中、下层的 McIntosh 指数显著高于微珠滤器上层($P < 0.05$),流化床 A、B 槽的 McIntosh 指数分别与微珠滤器上层无显著差异($P > 0.05$)。

2.3 微生物的代谢特征指纹

根据 AWCD 值随培养时间变化情况曲线,72 h 前后吸光度数据能最大程度地反映不同采样点微生物代谢的差异性,因此将 72 h 检测的吸光度值标准化后进行主成分分析。得到前 6 个主成分的初始特征值(eigenvalue)大于1,影响力度

表 3 不同采样点微生物群落多样性指数(平均值 ± 标准误)

Tab. 3 Miroorganism diversity indices of different sampling sites (mean ± SE)

| 取样点 sample sites | Shannon-Winner 多样性指数 Shannon-Winner index | Simpson 优势度指数 Simpson index | Pielou 均匀度指数 Pielin index | McIntosh 多样性指数 McIntosh index |
|----------------------------------|--|--------------------------------|------------------------------|----------------------------------|
| 微珠滤器-上层 trickle filter-top | 3.010 ± 0.034 ^b | 0.945 ± 0.002 ^b | 0.877 ± 0.010 ^b | 5.506 ± 0.125 ^{bc} |
| 微珠滤器-中层 trickle filter-middle | 3.303 ± 0.022 ^a | 0.961 ± 0.001 ^a | 0.962 ± 0.007 ^a | 6.735 ± 0.315 ^a |
| 微珠滤器-下层 trickle filter-bottom | 3.283 ± 0.012 ^a | 0.960 ± 0.000 ^a | 0.956 ± 0.004 ^a | 6.272 ± 0.116 ^a |
| 流化床-A tank-A | 3.279 ± 0.010 ^a | 0.959 ± 0.001 ^a | 0.955 ± 0.003 ^a | 6.063 ± 0.256 ^{ab} |
| 流化床-B tank-B | 3.273 ± 0.007 ^a | 0.959 ± 0.000 ^a | 0.953 ± 0.002 ^a | 5.229 ± 0.233 ^c |

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

Notes: different letters indicating significantly different between sampling sites using Duncan's multiple comparison ($P < 0.05, n = 3$).

显著,可表征 86.6% 的原变量特征。其中第 1 主成分(PC1)可解释 49.3% 的总方差,第 2 主成分(PC2)可解释 13.1% 的总方差。以 PC1 和 PC2 做图表征不同采样点微生物群落碳源代谢特征(图 5),对第一个主成分,微珠滤器上层微生物对碳源利用与其他 4 个采样点差异较明显。而第一个主成分与碳水化合物大类中的 β -甲基-D-葡萄糖苷、D-甘露醇、N-乙酰-D-葡萄糖氨和 D-纤维二糖呈正相关,且相关性较高;与羧酸大类中的 D-半乳糖醛酸和衣康酸,氨基酸大类中的 L-精氨酸、L-天门冬酰胺和 L-丝氨酸,胺类中的腐胺呈较高的负相关(表 4)。通过第二个主成分可见,微珠滤器中层和流化床 B 槽微生物对碳源利用差异较明显,而微珠滤器中、下层微生物对碳源利用差异不大(图 5)。结合 PC1 和 PC2 分析,微珠滤器中层、下层和流化床 A 槽的样品没有表现出明显的空间分布差异,相似度较高,而微珠滤器上层的微生物代谢与其他采样点微生物代谢差异较大。

3 讨论

3.1 微生物对不同碳源的利用特征

席劲瑛等^[9]对处理甲苯气体的木屑和活性炭生物过滤塔中微生物群落代谢特性研究发现,微生物更容易利用羧酸类和氨基酸类物质,而对糖类碳源利用较差。本研究中不同取样点的微生物对 6 大类碳源的利用差异较大,但微生物并未表现出对某一大类碳源的偏好。例如羧酸类中的衣康酸、D-半乳糖醛酸能很好地被微生物利用,

而 γ -羟丁酸则完全不能被利用。

Biolog 生态板上共有 5 种常见氨基酸和 1 种简单的二肽,其中 3 种氨基酸(L-精氨酸、L-天门冬酰胺、L-丝氨酸)能很好地被微生物利用,这 3 种氨基酸均属于脂肪族氨基酸,其中 L-丝氨酸属于含羟基的氨基酸,L-天门冬酰胺是酸性氨基酸而 L-精氨酸是碱性氨基酸^[13]。李志裴等^[14]在对草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)养殖池塘生物膜固着微生物群落碳代谢分析时也发现微生物对这 3 种氨基酸利用较好,这与本研究结果一致。在养殖水体中,养殖过程中投入的大部分饲料营养不能被养殖动物所利用,在饲料转化率为 1.1 ~ 1.2 时,水产养殖动物摄食食物的 80% (干重)将以固、液、气态废物的形式被排出体外进入水体^[15],而这些未被利用的成分在水体中分解,会使水体中含氮化合物含量升高,可能会引起生物膜上嗜氨基酸类细菌的强化。碳水化合物中的 D-木糖、D-甘露醇、N-乙酰-D-葡萄糖氨是构成半纤维素和多糖等的重要单体,能被微生物较好地利用。D-木糖在自然界含量丰富,是构成半纤维素的重要单体之一;作为微生物的良好培养基之一,D-甘露醇是构成针叶材半纤维素的重要单体;N-乙酰-D-葡萄糖氨是一种氨基糖,它和 D-乳糖反应形成的 N-乙酰胞壁酸是细菌细胞壁结构多糖的构件分子之一,也是几丁质、粘多糖、糖蛋白的构成单体之一^[16]。多聚物中的吐温 40、吐温 80 利用率也很高。吐温是由山梨醇与高级脂肪酸所形成的酯,吐温 40 是棕榈酸酯,而吐温 80 是油酸^[16]。吐温可作为底物进行解脂

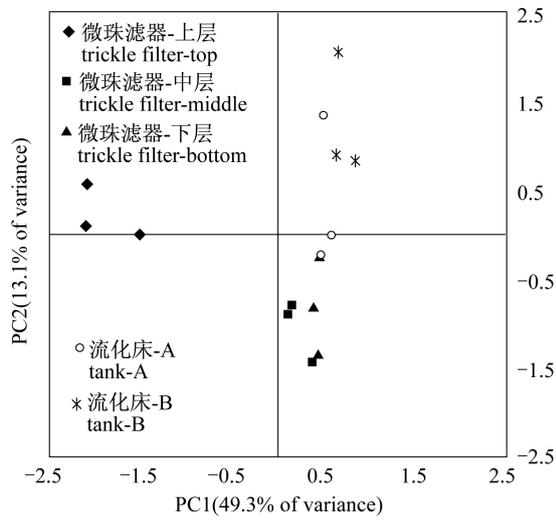


图 5 不同取样点微生物群落碳源代谢的 PCA 分析

Fig. 5 PCA analysis for microorganism from five sampling sites

微生物的分离,本研究中采样点微生物对吐温的利用较强,表明生物膜强化分解脂微生物。在对草鱼养殖池塘生物膜固着微生物的研究中,也有同样的发现^[14]。

不同采样点微生物对某些碳源表现出不同的利用程度。 α -D-乳糖是一种二糖,其水解产物可直接进入糖代谢;D-葡萄糖胺酸是 D-葡萄糖胺氧化产物,也可直接进入糖代谢^[16]。在本研究中,D-葡萄糖胺酸仅能被微珠滤器中层的微生物利用; α -D-乳糖能被流化床 B 槽和微珠滤器下层的微生物较好利用,而不能被流化床 A 槽和微珠滤器上层及中层的微生物利用。实验所使用的养殖系统已稳定运行半年,不同采样点对这 2 种碳源利用的差异反映微生物代谢的差异,如对 α -D-乳糖利用较差的生物膜上乳酸菌类含量可能较少。李志斐等^[14]在对草鱼养殖池塘生物膜形成过程的研究中(0~60 d),发现随着生物膜的形成,D-葡萄糖胺酸和 α -D-乳糖的的利用明显降低。

研究结果中 α -丁酮酸和羧酸中的 γ -羟丁酸不能或基本不能被利用,该 2 种碳源在所有样品中阳性次数 < 5。李志斐等^[14]发现草鱼养殖池塘生物膜固着微生物也不能利用 α -丁酮酸, γ -羟丁酸虽能被利用,但利用率较低。而另外一种碳源 2-羟基苯甲酸,又名水杨酸,能被流化床 A 槽、微珠滤器中层、下层的微生物很好地利用(阳性次数 > 10),流化床 B 槽和微珠滤器上层微生物则

表 4 31 种碳源 PC1 和 PC2 成份得分系数矩阵

Tab. 4 Matrix of component score coefficient for 31 carbon sources (on PC1 and PC2)

| CS. | PC1 | CS. | PC1 | CS. | PC2 | CS. | PC2 |
|-----|--------|-----|-------|-----|--------|-----|-------|
| B3 | -0.972 | C3 | 0.429 | B1 | -0.560 | G4 | 0.057 |
| B4 | -0.971 | E4 | 0.442 | C3 | -0.472 | G2 | 0.099 |
| H4 | -0.941 | B2 | 0.467 | F2 | -0.304 | H4 | 0.117 |
| D4 | -0.932 | G3 | 0.535 | C2 | -0.242 | B3 | 0.119 |
| A4 | -0.924 | F4 | 0.552 | A2 | -0.228 | F3 | 0.146 |
| F3 | -0.921 | F2 | 0.590 | D3 | -0.199 | E1 | 0.203 |
| G4 | -0.896 | H2 | 0.608 | E2 | -0.148 | C4 | 0.241 |
| D3 | -0.815 | E1 | 0.617 | H3 | -0.141 | E4 | 0.500 |
| C1 | -0.611 | C2 | 0.651 | D4 | -0.140 | A3 | 0.537 |
| D1 | -0.604 | F1 | 0.694 | G1 | -0.133 | C1 | 0.590 |
| B1 | -0.180 | G2 | 0.814 | F1 | -0.092 | G3 | 0.593 |
| H3 | -0.059 | A2 | 0.923 | B4 | -0.068 | B2 | 0.616 |
| E3 | 0.189 | E2 | 0.935 | D2 | -0.048 | D1 | 0.668 |
| C4 | 0.297 | D2 | 0.942 | A4 | -0.012 | E3 | 0.691 |
| A3 | 0.315 | G1 | 0.951 | H1 | 0.028 | F4 | 0.699 |
| H1 | 0.333 | | | H2 | 0.038 | | |

注:CS. 指代碳源,PC1 指第一主成分,PC2 指第二主成分
A2: β -甲基-D-葡萄糖苷; A3:D-半乳糖酸- γ -内脂; A4:L-精氨酸;
B1:丙酮酸甲酯; B2:D-木糖; B3:D-半乳糖醛酸; B4:L-天门冬酰胺;
C1:吐温 40; C2:i-赤藓糖醇; C3:2-羟基苯甲酸; C4:L-苯丙氨酸;
D1:吐温 80; D2:D-甘露醇; D3:4-羟基苯甲酸; D4:L-丝氨酸;
E1: α -环式糊精; E2:N-乙酰-D-葡萄糖胺; E3: γ -羟丁酸;
E4:L-苏氨酸; F1:肝糖; F2:D-葡萄糖胺酸; F3:衣康酸; F4:甘氨酸-L-谷氨酸;
G1:D-纤维二糖; G2:1-磷酸葡萄糖; G3: α -丁酮酸; G4:苯乙胺;
H1: α -D-乳糖; H2:D,L- α -磷酸甘油; H3:D-苹果酸; H4:腐胺

Notes:CS. is short for carbon sources,PC1 means the first principal component,PC2 means the second principal component

A2: β -Methyl-D-Glucoside; A3:D-Galactonic Acid γ -Lactone; A4:L-Arginine; B1:Pyruvic Acid Methyl Ester; B2:D-Xylose; B3:D-Galacturonic Acid; B4:L-Asparagine; C1:Tween 40; C2:i-Erythritol; C3:2-Hydroxy Benzoic Acid; C4:L-Phenylalanine; D1:Tween 80; D2:D-Mannitol; D3:4-Hydroxy Benzoic Acid; D4:L-Serine; E1: α -Cyclodextrin; E2:N-Acetyl-D-Glucosamine; E3: γ -Hydroxybutyric Acid; E4:L-Threonine; F1:Glycogen; F2:D-Glucosaminic Acid; F3:Itaconic Acid; F4:Glycyl-L-Glutamic Acid; G1:D-Cellobiose; G2: α -D-Glucose-1-Phosphate; G3: α -Ketobutyric Acid; G4:Phenylethylamine; H1: α -D-Lactose; H2:D,L- α -Glycerol Phosphate; H3:D-Malic Acid; H4:Putrescine

不能利用该碳源(阳性次数 = 0)。李志斐等^[11]研究发现杂交鳢 (*Channa maculate* ♀ × *Channa argus* ♂) 和大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 养殖池塘水体微生物和草鱼养殖池塘固着微生物均不能利用 2-羟基苯甲酸,并认为淡水养殖系统中可能不存在利用该碳源的微生物。本研究中养殖用水为半咸水,水的盐度为 1.4,各采样点对 2-羟基苯甲酸利用的差异表明利用该碳源的微生物的

生长与多种环境因子相关。

循环水养殖系统所使用饲料中碳水化合物组成的差异,也可能对生物过滤器中生物膜上的微生物产生影响。欧洲近期一项研究就发现,饲料中碳水化合物的组成(高淀粉含量或以其他形式多糖取代淀粉)可影响养殖虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的循环水系统生物过滤器的运行效果^[17]。碳源的差异,也会影响生物膜上一些反硝化细菌的生长。Otani 等^[18]的研究发现某些具有高效脱氮能力的细菌仅能利用特定的碳源才能去除硝酸盐。本研究利用 31 种碳源来培养生物膜上的微生物,初步发现微生物对羧酸类的衣康酸、D-半乳糖醛酸,氨基酸中的 L-精氨酸、L-天门冬酰胺、L-丝氨酸,碳水化合物中的 D-甘露醇、D-木糖、N-乙酰-D-葡萄糖氨,多聚物中的吐温 40、吐温 80,胺类中的苯乙胺利用较好,而基本不能利用 α -丁酮酸和 γ -羟丁酸。本研究结果为生物过滤器的调控提供了一种新的思路,即可通过碳源调节来促进生物膜微生物群落的改变以此提高水处理效率。

3.2 不同采样点微生物群落功能多样性对比

不同环境为微生物提供能源的形式不同,从而导致微生物对碳源利用模式的差异^[16]。由不同采样点微生物 AWCD 值随培养时间变化情况可知,各采样点微生物对碳源利用为微珠滤器中层 > 微珠滤器下层 > 流化床 A > 流化床 B > 微珠滤器上层,表明 5 个采样点中,微珠滤器中层的微生物代谢活力最高,而微珠滤器上层最差。本研究基于 Shannon 指数、Simpson 指数、Pielou 指数和 McIntosh 指数来比较各采样点的微生物群落功能多样性,其中 Shannon-Wiener 指数是反映群落丰富度和均匀度的综合指标,Simpson 多样性指数用来说明常见种的优势度,Pielou 均匀度指数是实测多样性与最大多样性之比率,McIntosh 指数是基于群落物种多维空间上的 Euclidian 距离的多样性指数^[14,19]。微珠滤器中、下层以及流化床 A 槽和 B 槽的 Shannon-Wiener 指数、Simpson 指数和 Pielou 指数无显著差异,但均显著高于微珠滤器上层($P < 0.05$)。流化床是硝化作用的主要发生场所,A 槽和 B 槽均给予充足的曝气。水流经流化床后进入微珠滤器,微珠滤器兼有对养殖水进行生物处理和过滤的作用,微珠滤器内部物理环境与流化床有一定差异,但本研

究发现其中、下层与流化床 A、B 槽微生物多样性基本一致。微珠滤器上层与其他各点微生物多样性差异较大的主要原因可能是上层滤料长期受进水水流冲击,微生物本身难以固着,导致细菌种类一直处于不断变化之中。

结合 PC1 和 PC2 的分析结果可知,微珠滤器中层、下层微生物对碳源代谢的相似度最高,分析值均落在第四象限,且与流化床 A 槽的样品相似度较高;而微珠滤器上层与其他采样点微生物代谢差异较大。这与 AWCD 值和多样性指数反应结果一致。结合 PCA 分析可知微珠滤器上层微生物对 β -甲基-D-葡萄糖苷、D-甘露醇、N-乙酰-D-葡萄糖氨和 D-纤维二糖等碳源利用相对较差,而对另外一些碳源如腐胺的利用又明显高于其他组。

4 结论

微珠滤器上层滤料由于长期受进水水流冲击,微生物多样性较流化床 A、B 槽和微珠滤器中、下层低。流化床 A 槽和 B 槽与微珠滤器中层、下层微生物多样性差异不大。5 个采样点微生物并未对某一大类碳源表现出偏好,对衣康酸、D-半乳糖醛酸、L-精氨酸、L-天门冬酰胺、L-丝氨酸、D-甘露醇、D-木糖、N-乙酰-D-葡萄糖氨、吐温 40、吐温 80、苯乙胺等单一碳源利用较好;而对 γ -羟丁酸和 α -丁酮酸以及 D,L- α -磷酸甘油和 1-磷酸葡萄糖利用较差。某些碳源种类如 D-葡糖胺酸、 α -D-乳糖、2-羟基苯甲酸仅能被部分采样点的微生物利用。本研究将 Biolog EcoPlateTM 技术应用到中试规模水产养殖水处理设备微生物群落代谢研究,分析不同水处理单元的碳代谢差异,为工厂化循环水养殖系统中生物滤池的构建提供理论依据。

参考文献:

- [1] Chen J, Xu H, Ni Q, et al. The development of recirculating aquaculture system in China[J]. Fishery Modernization, 2009, 36(4): 1-7. [陈军,徐皓,倪琦,等.我国工厂化循环水养殖发展研究报告.渔业现代化,2009,36(4):1-7.]
- [2] Li Q F, Fu X J, Zhang Y, et al. PCR-DGGE analysis of bacterial communities in bio-filters of recirculating mariculture system [J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(4): 579-586. [李秋芬,傅雪军,张

- 艳,等. 循环水养殖系统生物滤池细菌群落的 PCR-DGGE 分析. 水产学报,2011,35(4):579-586.]
- [3] Zhang C B, Ke S S, Wang J, *et al.* Responses of microbial activity and community metabolic profiles to plant functional group diversity in a full-scale constructed wetland [J]. *Geoderma*, 2011, 160 (3 - 4):503 - 508.
- [4] Takabe Y, Kameda I, Suzuki R, *et al.* Changes of microbial substrate metabolic patterns through a wastewater reuse process, including WWTP and SAT concerning depth [J]. *Water Research*, 2014, 60 : 105 - 117.
- [5] Tian J L, McCormack, Wang J, *et al.* Linkages between the soil organic matter fractions and the microbial metabolic functional diversity within a broad-leaved Korean pine forest [J]. *European Journal of Soil Biology*, 2015, 66 : 57 - 64.
- [6] 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.
- [7] Kong X, Wang C, and Ji M. Analysis of microbial metabolic characteristics in mesophilic and thermophilic biofilters using biolog plate technique [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2013, 230 : 415 - 421.
- [8] Luo M Z, Guan R Z, Li Z Q, *et al.* The effects of water temperature on the survival, feeding, and growth of the juveniles of *Anguilla marmorata* and *A. bicolor pacifica* [J]. *Aquaculture*, 2013, 400 : 61 - 64.
- [9] Xi J Y, Hu H Y, Jiang J, *et al.* Metabolic properties of the microbial community in the biofilters using biolog microplates [J]. *Environmental Science*, 2005, 26(4) : 165 - 170. [席劲瑛, 胡洪营, 姜健, 等. 生物过滤塔中微生物群落的代谢特性. 环境科学, 2005, 26(4) : 165 - 170.]
- [10] 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.
- [11] 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 Science*, 2014, 33(1) : 185 - 192. [李志斐, 谢骏, 郁二蒙, 等. 基于 Biolog-ECO 技术分析杂交鳢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.]
- [12] Jia X, Dong S M, and Zhou C J. Effects of biolog eco-plates incubation time on analysis results in microbial ecology researches [J]. *Journal of Basic Science and Engineering*, 2013, 21 (1) : 10 - 19. [贾夏, 董岁明, 周春娟. 微生物生态研究中 Biolog Eco 微平板培养时间对分析结果的影响. 应用基础与工程科学学报, 2013, 21(1) : 10 - 19.]
- [13] Kong B, and Yang X J. The principles and carbon sources of biolog eco plate [J]. *Journal of Green Science and Technology*, 2011, (7) : 231 - 234. [孔滨, 杨秀娟. Biolog 生态板的应用原理及碳源构成. 绿色科技, 2011, (7) : 231 - 234.]
- [14] Li Z F, Wang G J, Xie J, *et al.* Microbial carbon metabolic characteristics of biofilm communities in the grass carp culture pond based on Biolog-ECO plates [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38 (12) : 1985 - 1995. [李志斐, 王广军, 谢骏, 等. 草鱼养殖池塘生物膜固着微生物群落碳代谢 Biolog 分析. 水产学报, 2014, 38(12) : 1985 - 1995.]
- [15] Liu C F, Yao J Y, Yuan Y, *et al.* Ammonia-oxidizing bacterial community composition in the nitrifying biofilter of recirculating aquaculture system [J]. *Fishery Modernization*, 2012, 39 (3) : 1 - 7. [刘长发, 姚敬元, 袁媛, 等. 循环海水养殖系统硝化滤器中氨氧化微生物分析. 渔业现代化, 2012, 39(3) : 1 - 7.]
- [16] Zhang Y Y, Qu L Y, and Chen L D. An amendment on information extraction of Biolog EcoPlate™ [J]. *Microbiology*, 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.]
- [17] Meriac A, Eding E H, Schrama J, *et al.* Dietary carbohydrate composition can change waste production and biofilter load in recirculating aquaculture systems [J]. *Aquaculture*, 2014, 420 : 254 - 261.
- [18] Otani Y, Hasegawa K, Hanaki K. Comparison of aerobic denitrifying activity among three cultural species with various carbon sources [J]. *Water Science and Technology*, 2004, 50(8) : 15 - 22.
- [19] Sun R Y, Li Q F, Niu C J, *et al.* Basic ecology [M]. Beijing : Higher Education Press, 2002. [孙儒泳, 李庆芬, 牛翠娟, 等. 基础生态学, 北京 : 高等教育出版社, 2002.]

Carbon metabolism of microbial communities in biofilters of recirculating aquaculture system cultured with *Anguilla marmorata*

LIU Ying¹, LI Li^{1,2*}, SUN Dachuan¹, ZHU Yunhao¹, TAN Hongxin¹, XU Ben¹

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2. The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: The carbon metabolism of microorganisms in biofilters of a recirculating aquaculture system (RAS) cultured with *Anguilla marmorata* was investigated using Biolog Eco plates. The biofilms were collected from two different tanks of a fluidized bed filter and three different depths of a trickle filter (top, middle and bottom). The results showed that there is no significant difference for Shannon-Wiener index, Simpson index and Pielou index among the biofilms collected from two different tanks of fluidized bed filter and the middle and bottom of trickle filter ($P > 0.05$), all of which was significantly higher than that in the top of the trickle filter ($P < 0.05$). The average well color development (AWCD) and principal component analysis all demonstrated the carbon metabolism of microorganisms in the top of trickle filter was different from other four sample sites. Microorganisms in all sample sites didn't show any preference for any of the six categories of carbon sources. However, the Itaconic acid, D-Galacturonic acid, L-Arginine, L-Asparagine, L-Serine, D-Mannitol, D-xylose, N-Acetyl-D-Glucosamine, Tween 40, Tween 80 and Phenylethyl-amine could be well used by microorganisms from all the sample sites, while γ -Hydroxy butyric acid, α -Ketobutyric acid, D, L- α -Glycerol Phosphate and Glucose-1-Phosphate could not be used by most of microorganisms from all the sample sites. Some carbon sources such as D-Glucosamic Acid, α -D-Lactose, and 2-Hydroxy Benzoic Acid could only be used by microorganisms from certain sample sites. The present study illustrated the properties of carbon metabolism of microorganisms in biofilter of a RAS using Biolog Eco plates and gave a new possibility for water quality control in RAS, which will promote the microbial community changes through regulating the carbon sources in the system to manage the water quality.

Key words: carbon metabolism; biofilm; Biolog EcoPlateTM; recirculating aquaculture system

Corresponding author: LI Li. E-mail: l_li@ouc.edu.cn