

文章编号: 1674-5566(2017)01-0064-11

DOI:10.12024/jsou.20160401729

Biolog-ECO 解析循环水鳗鲡养殖系统中不同生物降解工艺下的滤料微生物群落功能多样性特征

朱云昊^{1,2}, 谭洪新^{1,2,3}, 孙大川^{1,2,3}, 罗国芝^{1,2,3}, 王 姣¹, 刘 颖¹

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 上海水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306; 3. 上海高校知识服务平台上海海洋大学水产动物育种中心, 上海 201306)

摘 要: 为了解循环水鳗鲡养殖过程中调节 MBBR 生物滤池的工艺后微生物群落结构与代谢功能变化情况, 进而寻找能否在节能的工艺下, 生物滤池中的滤料微生物仍有良好的硝化作用, 通过改变生物滤池依次至 O²、A/O 和 O/A 工艺, 运用 Biolog-ECO 法分析各工艺稳定条件下生物滤池中微生物群落的代谢特征。结果显示: AWCD 值总体变化趋势上 O² 工艺二段明显最优, 其次是 A/O 工艺一段, 而 O/A 工艺一段的滤料微生物对碳源利用能力相对最差; 在对六类碳源的利用情况上, 不同工艺对氨基酸类和胺类代谢偏好明显, 其中 O² 工艺二段和 A/O 工艺一段的滤料微生物对六类碳源利用程度相对较高; O/A 工艺一段在多样性指数上处于最高水平, 其次是 O² 工艺二段和 O/A 工艺二段, O² 工艺一段在各多样性指数上均处于较低水平; 主成分分析显示, 不同工艺不同生物滤池段的滤料微生物代谢基质主成分 1 的贡献率为 32.89%, 主成分 2 为 25.91%, 主成分 1 相关系数 0.5 以上的碳源有 16 种, 主成分 2 有 14 种; 在滤料微生物对 31 种碳源的利用上, 利用明显偏好的 (>4%) 有氨基酸类的 L-天门冬酰胺和 L-精氨酸、碳水化合物中的 N-乙酰-D-葡萄糖胺、多聚物中的吐温 40 和吐温 80、酚酸类的 4-羟基苯甲酸和胺类的苯乙胺, 利用率较低的为羧酸类的 γ -羟基丁酸、碳水化合物的 D,L- α -磷酸甘油和酚酸类的 2-羟基苯甲酸。实验通过调节曝气情况改变生物滤池的工艺, 研究生物滤池中的微生物群落碳代谢特征, 为循环水养殖系统的进一步研究提供参考依据。

关键词: 循环水养殖系统; 生物滤池; Biolog-ECO; 微生物群落; 碳源代谢

中图分类号: S 965.2; Q 938.8 **文献标志码:** A

循环水养殖系统以其占地少、养殖密度高和污染小等优点被认为是 21 世纪水产养殖行业发展的主导方向之一^[1]。循环水养殖过程中会投喂大量饲料, 养殖对象仅利用饲料中约 30% 的氮素, 剩余 70% 以残饵、粪便和尿酸等形式落入养殖水体中^[2-3]。水体中的氮素在氨化细菌和硝化细菌的作用下以无机氮形式积累在水体中, 使循环水养殖系统中的 TAN、NO₂⁻-N 浓度增加^[4]。相关研究表明, 水体中非离子氨、亚硝酸氮等有毒物质浓度较高时, 会导致养殖对象活力下降、生长缓慢, 严重的会造成养殖动物的中毒死亡^[5-7]。循环水养殖系统的水处理核心主要是 MBBR 生物滤池, 生物滤池中大量附着在生物滤料上的微

生物在曝气适宜等条件下, 通过硝化作用将水体中的氨氮氧化成亚硝氮最终氧化成硝氮, 从而达到净化水体的目的^[8]。因此, 丰富生物滤池中的微生物种类和数量, 提高循环水养殖系统的水处理效率, 对鱼体的高密度养殖和系统的正常运行至关重要。

不同的曝气工艺可影响微生物的数量、种类等进而影响硝化效率, 孙大川等^[9]在有无曝气多种工况的条件下研究了循环水养殖系统中浮球式生物滤器的水处理效果; 丁文川等^[10]研究了序批式生物膜反应器中不同曝气量下生物膜的微生物特性; 张海耿等^[11]分析了循环水养殖系统生物滤池在不同运行时期生物载体上的微生物群

收稿日期: 2016-04-10 修回日期: 2016-05-14

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划课题(2012BAD25B03); 上海市科技委员会资助项目(13320502200)

作者简介: 朱云昊(1991—), 男, 硕士研究生, 研究方向为循环水水产养殖。E-mail: zyh2016@126.com

通信作者: 谭洪新, E-mail: hxtan@shou.edu.cn

落结构变化;刘颖等^[12]运用 Biolog-ECO 技术研究了循环水鳗鲡养殖系统生物滤池和滴滤式微珠生物过滤器中的微生物群落碳代谢特征,但循环水养殖系统不同曝气工艺下生物滤池的微生物功能多样性研究尚未见报道。近年来 Biolog 技术被广泛应用于环境微生物群落功能研究^[13-14],本文以生物滤池中的生物滤料微生物膜为对象,采用 Biolog-ECO 技术研究生物滤池不同曝气条件下微生物的群落特征,以期找出能够优化系统、提高硝化效率的生物滤池工艺,对揭示生物滤池机理和提高循环水养殖系统的性能具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验概况及样品采集

实验于上海海洋大学水产动物遗传育种中

心的循环水养殖系统生物滤池中进行,实验生物滤池为两段曝气式,有效水体共约 1.34 m³。循环水养殖池为 8 个圆形池,每池有效水体约为 1 m³,每个养殖池花鳗鲡 (*Anguilla marmorata*) 初始负载约 20 kg,循环水养殖系统补充水源由地下水抽至水塔中储备使用。

实验前,循环水养殖系统经过两个月的花鳗鲡养殖,使系统达到稳定状态。实验期间,调节两段式生物滤池(图 1)依次至 O²、A/O 和 O/A 工艺,循环水养殖系统在各工艺条件下运行三周,使生物滤池中附着在生物滤料上的微生物在各工艺下达到稳定状态,取生物滤池中两段滤槽的生物滤料(O² 工艺一段、二段均为曝气段;A/O 工艺一段为不曝气段,A/O 工艺二段为曝气段;O/A 工艺一段为曝气段,O/A 工艺二段为不曝气段),并迅速带回实验室进行微生物测定。

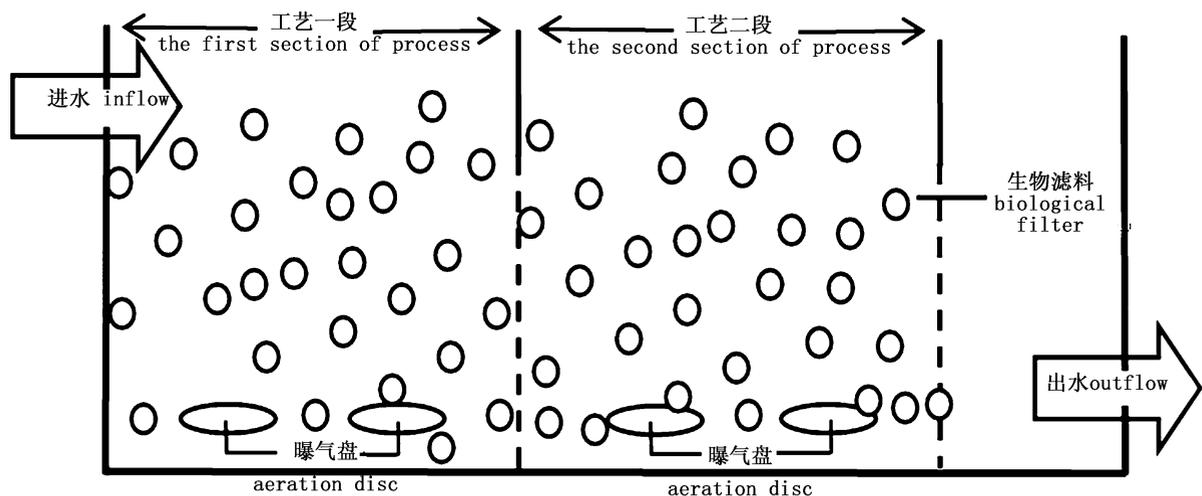


图 1 两段式生物滤池

Fig.1 2-stage biological filter

1.2 测定方法

微生物测定方法:将取得的样本震荡接种至 Biolog-ECO 平板中,每孔加入 600 nm 下吸光度为 0.05 的稀释液 150 μL,将接种的 Biolog-ECO 板置于 28 °C 恒温培养箱中培养,每隔 12 h 用 Biolog 微生物鉴定仪测量 590 nm 波长下的吸光值^[15]。

水质分析指标包括:(1)通过 WTW 水质分析仪测定 T、pH、S、DO 和 TDS 指标;(2)通过国家标准方法^[16]测定 TAN、NO₂⁻-N、NO₃⁻-N、PO₄³⁻-P、碱度和 TSS。

1.3 实验仪器

实验仪器为 Biolog Microstation 微生物鉴定仪。

1.4 数据处理

平均颜色变化率(AWCD)表示微生物的代谢强度,用 Shannon-Wiener 指数、Simpson 优势度指数、Pielou 均匀度指数、McIntosh 指数和丰富度指数来表示微生物的多样性指数。计算方法参照高晓奇等^[17]的计算方法。根据不同培养时间下微生物对碳源的利用情况,采用 96 h 的光密度(OD)值计算 AWCD、微生物群落的功能多样性

指数,并用 SPSS 22.0 进行单因素方差分析(ANOVA)、主成分分析(Principal Component Analysis,PCA)和聚类分析。

2 结果与分析

2.1 生物滤池水质基本情况

实验期间,生物滤池水温保持在(24.5 ~

29.5)℃,pH 维持在 6.3 ~ 7.9,盐度 1.4 ~ 1.8, TDS 保持在(2.75 ~ 3.48)g/L,碱度维持在 170 mg/L 以上(按 CaCO₃ 计),TSS 处于(0.007 ~ 0.017)g/L,HRT 为 8.93 min,生物滤料比表面积为 550 m²/m³,滤料填充率为 30.6%,滤池缺氧段 DO < 0.5 mg/L,好氧段 DO > 5.5 mg/L,表 1 为生物滤池的水处理效果。

表 1 生物滤池的水处理效果

Tab.1 Water treatment effect of moving bed biofilm reactor

监测指标 Monitoring indexes	O ² 工艺 进水/出水(去除率) O ² process input water/ effluent water(removal rate)	A/O 工艺 进水/出水(去除率) A/O process input water/ effluent water(removal rate)	O/A 工艺 进水/出水(去除率) O/A process input water/ effluent water(removal rate)
TAN(mg/L)	1.620/1.313(18.95%)	2.029/1.618(20.23%)	4.625/4.211(8.96%)
NO ₂ ⁻ -N(mg/L)	1.402/1.369(2.32%)	1.288/1.267(1.60%)	1.148/1.294(-12.73%)
NO ₃ ⁻ -N(mg/L)	39.315/39.331(-0.04%)	50.909/50.505(0.79%)	100.822/100.398(0.42%)
PO ₄ ³⁻ -P(mg/L)	6.141/6.120(0.34%)	9.066/9.041(0.27%)	24.828/24.962(-0.58%)

2.2 不同工艺滤料微生物对 31 种碳源的利用情况

表 2 根据高晓奇等^[17]的分类方法,将 31 种碳源分为六类,其中包括羧酸类 5 种,氨基酸类 6 种,碳水化合物 12 种,多聚物 4 种,酚酸 2 种,胺类 2 种。不同工艺下的滤料微生物对 31 种碳源的代谢生理特征如表 2 所示,表格中填充颜色越深表明滤料微生物对碳源的利用率越高,说明对碳源的代谢能力较好;填充颜色越浅表明滤料微生物对碳源的利用率越低,说明滤料微生物对此类碳源的需求较弱。从表中可直观地看出微生物对每种碳源的代谢能力,可知每种工艺的滤料微生物对 31 种碳源的利用率呈现较大的差异性,说明滤料微生物随着工艺和采样点的变化具有不一样的群落结构和特点。

2.3 不同工艺下滤料微生物对碳源的利用情况

2.3.1 滤料微生物平均吸光值(AWCD)变化特征

不同工艺不同取样点滤料微生物对碳源利用的总体情况用平均颜色变化率 AWCD 表示,AWCD 值的变化速率反映了滤料微生物的代谢活性。由图 2 可看出 3 种工艺下不同取样点的滤料微生物总体变化趋势为:24 h 内滤料微生物活性较低,24 h 后 AWCD 值开始迅速升高,各 AWCD 曲线在 24 ~ 96 h 斜率较大,之后随着培养时间延长 AWCD 值的增加不再显著。对比滤料生物膜上的微生物 AWCD 值发现,不同工艺不同

取样点的微生物对碳源的代谢水平存在较大差异,其总体对 31 种碳源的利用强弱顺序为:O² 工艺二段 > A/O 工艺一段 > O² 工艺一段 > A/O 工艺二段 ≈ O/A 工艺一段 > O/A 工艺二段;其中 0 ~ 156 h O/A 工艺一段滤料微生物对碳源的利用强度高于 A/O 工艺二段和 O/A 工艺二段,而在 156 h 之后一直低于两者;实验培养 240 h 时,各工艺取样点滤料微生物对碳源的利用能力为:O² 工艺二段 > A/O 工艺一段 > O² 工艺一段 > A/O 工艺二段 > O/A 工艺二段 > O/A 工艺一段。

2.3.2 滤料微生物对六类碳源的利用分析

如图 3 所示,选取培养 96 h 时间点下的不同工艺不同取样点滤料微生物对碳源利用光密度(OD)值进行分析。所有样品中滤料微生物对氨基酸类、多聚物和胺类的利用率均高于其他 3 种碳源,其次是碳水化合物类、酚酸类和羧酸类。在对各类碳源的利用水平上:O² 工艺二段和 A/O 工艺一段对羧酸类碳源利用率最高,O² 工艺一段利用率最差;对于氨基酸类碳源,O² 工艺二段和 A/O 工艺一段对其利用率最高,O/A 工艺一段最低;O² 工艺二段和 O² 工艺一段对碳水化合物类碳源的利用程度最高,A/O 工艺二段利用程度最低;对于多聚物,A/O 工艺一段和 O² 工艺一段对其碳源利用水平最高,O/A 工艺二段最低;O² 工艺二段和 O² 工艺一段对酚酸类利用程度最佳,O/A 工艺一段明显较差;O/A 工艺一段和 A/O

工艺一段对胺类的利用相对较高, O² 工艺一段则相对较低。总体而言, 滤料微生物对氨基酸类代谢偏好, 而 O² 工艺二段、A/O 工艺一段的滤料微生物总体对碳源利用程度较高。

表 2 不同工艺下滤料微生物对 31 种碳源的利用率

Tab. 2 Coefficient of utilization of micro-organisms to 31 carbon sources in different process

碳源 Carbon source	滤料微生物 Micro-organisms					
	O ² 工艺 1 The first section of O ² process	O ² 工艺 2 The second section of O ² process	A/O 工艺 1 The first section of A/O process	A/O 工艺 2 The second section of A/O process	O/A 工艺 1 The first section of O/A process	O/A 工艺 2 The second section of O/A process
羧酸类 Carboxylic acids						
γ-羟基丁酸 γ-Hydroxybutyric Acid						
衣康酸 Itaconic Acid						
α-丁酮酸 α-Ketobutyric Acid						
D-苹果酸 D-Malic Acid						
丙酮酸甲酯 Pyruvic Acid Methyl Ester						
氨基酸类 Amino acids						
L-天门冬酰胺 L-Asparagine						
L-苯基丙氨酸 L-Phenylalanine						
L-精氨酸 L-Arginine						
L-丝氨酸 L-Serine						
L-苏氨酸 L-Threonine						
甘氨酸-L-谷氨酸 Glycyl-L-Glutamic Acid						
碳水化合物 Carbohydrates						
β-甲基-D-葡萄糖苷 β-Methyl-D-Glucoside						
D-半乳糖酸内脂 D-Galactonic Acid Lactone						
D-纤维二糖 D-Cellobiose						
α-D-乳糖 α-D-Lactose						
i-赤藓糖醇 i-Erythritol						
α-D-葡萄糖-1-磷酸 α-D-Glucose-1-Phosphate						
D-木糖 D-Xylose						
D-甘露醇 D-Mannitol						
N-乙酰-D-葡萄糖胺 N-Acetyl-D-Glucosamine						
D,L-α-磷酸甘油 D,L-α-Glycerol Phosphate						
D-半乳糖醛酸 D-Galacturonic Acid						
D-葡萄糖胺酸 D-Glucosaminic Acid						
多聚物 Polymer						
α-环式糊精 α-Cyclodextrin						
肝糖 Glycogen						
吐温40 Tween 40						
吐温80 Tween 80						
酚酸类 Phenolic acids						
2-羟基苯甲酸 2-Hydroxy Benzoic Acid d						
4-羟基苯甲酸 4-Hydroxy Benzoic Acid d						
胺类 Amines						
苯乙胺 Phenylethylamine						
腐胺 Putrescine						

注:  四种类型单元格依次代表利用率<2%, 2%~4%, 4%~6%, >6%

Note:  Four types of cells represent the utilization of <2%, 2%~4%, 4%~6% and >6% in turn

and >6% in turn

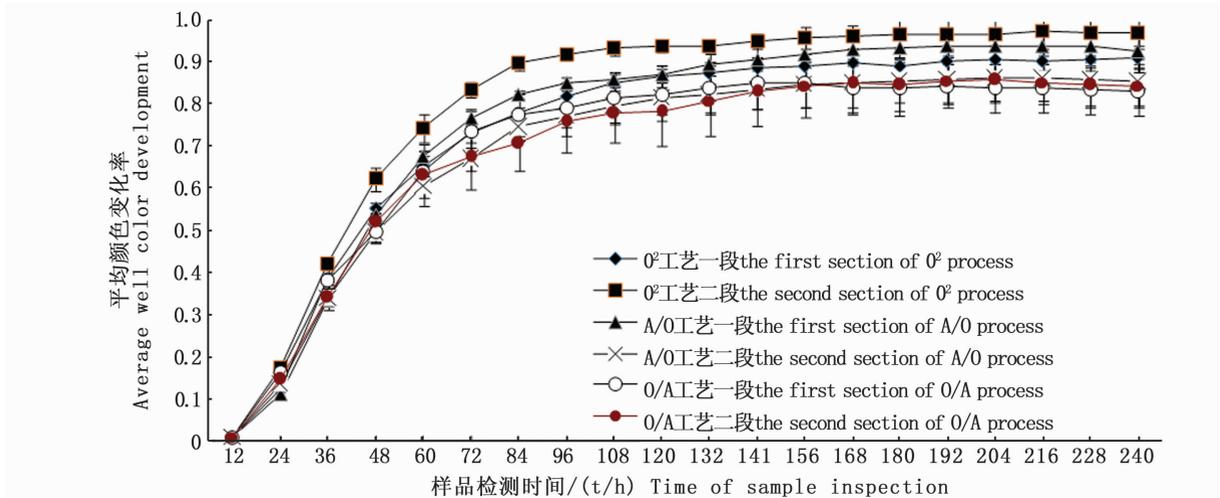


图2 不同工艺下滤料微生物群落 AWCD 值随培养时间的变化

Fig.2 AWCD of microbial communities cultured in different process

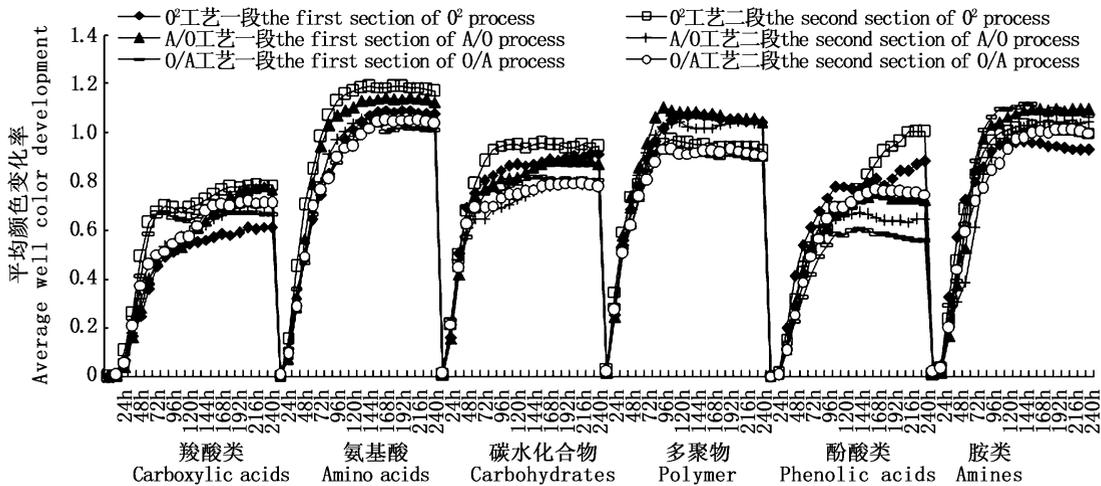


图3 不同工艺下微生物对六类碳源的利用情况

Fig.3 Metabolic response of micro-organisms for six carbon sources in different process

2.3.3 滤料微生物 96 h 时对六大类碳源的利用情况

如图 4 所示,选取培养 96 h 时间点下的循环水鳗鲡养殖系统不同采样点微生物对碳源利用情况进行分析。所有样品中微生物对多聚物、氨基酸类和胺类的利用率均高于其他 3 种碳源,其次是碳水化合物、酚酸类和羧酸类。在各工艺对碳源的利用水平上, O^2 工艺一段的滤料微生物利用率最高的是多聚物,其次是胺类,而对羧酸类利用效果最低; O^2 工艺二段的滤料微生物对氨基酸类利用效果最佳,其次是胺类,酚酸类利用效果最差; A/O 工艺一段、 A/O 工艺二段和 O/A 工艺二段的滤料微生物对碳源利用率最高的均为

多聚物,其次是氨基酸类,均对羧酸类利用水平最低; O/A 工艺一段的滤料微生物利用碳源最高的为胺类,其次是多聚物,同样对羧酸类利用程度最低。总体而言,96 h 时不同工艺下的滤料微生物对多聚物、氨基酸类有代谢偏好,除 O^2 工艺二段对酚酸类利用效果最低外,其他工艺均对羧酸类利用效果最差。

2.4 滤料微生物群落功能多样性指数分析

以 96 h 各项多样性指数计算作表 3。结果显示:在 Shannon-Wiener 指数、Simpson 优势度指数和 Pielous 均匀度 3 个多样性指数上, O^2 工艺一段、 A/O 工艺一段和 A/O 工艺二段下的滤料微生物群落无显著性差异 ($P > 0.05$),但显著低于 $O/$

A 工艺一段 ($P < 0.05$), 而 O^2 工艺二段和 O/A 工艺二段下的滤料微生物与其他 4 种情况下均差异不显著 ($P > 0.05$); 在 McIntosh 指数上, O^2 工艺二段显著高于 O^2 工艺一段的滤料微生物 ($P < 0.05$), O^2 工艺一段显著高于 O/A 工艺二段

($P < 0.05$); 所有工艺下的滤料微生物在丰富度指数上均无显著差异 ($P > 0.05$)。结果总体表现为: O/A 工艺一段在多样性指数上处于最高水平, 其次是 O^2 工艺二段和 O/A 工艺二段, O^2 工艺一段处于较低水平。

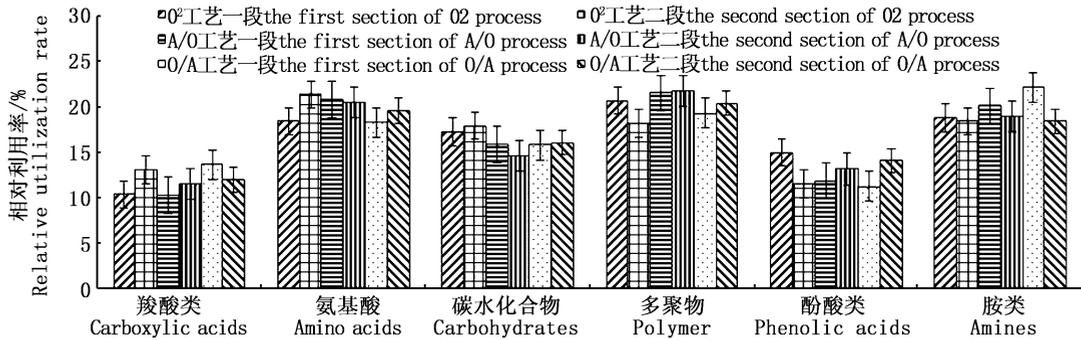


图 4 不同工艺下微生物 96 h 时对六类碳源的利用情况

Fig. 4 Metabolic response of micro-organisms for six carbon sources in different process (96h)

表 3 不同工艺下滤料微生物 96 h 时的群落多样性指数

Tab. 3 Micro-organism diversity indices of micro-organisms at 96 h in different process

样本 Sample	H'	D	J	U	R
O^2 工艺一段	3.311 ± 0.004^b	0.961 ± 0.000^b	0.964 ± 0.001^b	5.143 ± 0.143^{bc}	28.00 ± 1.000^a
O^2 工艺二段	3.335 ± 0.003^{ab}	0.962 ± 0.000^{ab}	0.971 ± 0.001^{ab}	5.612 ± 0.061^a	29.00 ± 1.000^a
A/O 工艺一段	3.316 ± 0.012^b	0.961 ± 0.001^b	0.966 ± 0.003^b	5.305 ± 0.005^{ab}	28.67 ± 1.155^a
A/O 工艺二段	3.324 ± 0.008^b	0.961 ± 0.000^b	0.968 ± 0.002^b	4.804 ± 0.180^{cd}	28.33 ± 0.577^a
O/A 工艺一段	3.349 ± 0.011^a	0.963 ± 0.001^a	0.975 ± 0.003^a	4.821 ± 0.281^{cd}	28.67 ± 1.155^a
O/A 工艺二段	3.329 ± 0.029^{ab}	0.962 ± 0.002^{ab}	0.969 ± 0.008^{ab}	4.720 ± 0.295^d	29.00 ± 1.000^a

注: 同列数据后不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。 H' . Shannon-Wiener 指数; D . Simpson 优势度指数; J . Pielous 均匀度指数; U . McIntosh 指数; R . 丰富度指数

Note: Different letters indicating significantly different between sampling sites using Duncan's multiple comparison ($P < 0.05$). H' . Shannon-Wiener index; D . Simpson index; J . Pielous index; U . McIntosh index; R . Richness index

2.5 微生物群落利用碳源的主成分分析

2.5.1 主成分分析下的特征值及贡献率

对所有工艺下两段生物滤池中的滤料微生物各碳源 OD_{590nm} 应用 SPSS 22.0 进行主成分分析 (96 h), 得到特征值大于 1 的主成分 5 个, 其方差贡献率及累计贡献率见表 4。由表可知, 通过主成分分析, 前 2 个主成分的累计贡献率达到 58.80%, 一般采用前两个主成分进一步分析导致这些差异的主要碳源^[18], 认为前两个主成分就可表征原来 31 个变量 (31 种碳源的 Biolog 数据) 的特征^[19], 故本研究取前两个主成分进一步分析导致这些碳源的差异性。

表 4 特征值大于 1 的主成分贡献率与累计贡献率 (96 h)

Tab. 4 Contribution rates and cumulative contribution of principal components which greater than 1 (96 h)

主成分 Principal components	特征值 Eigenvalues	贡献率 Contribution rates	累计贡献率 Cumulative contribution rate
1	10.20	32.89%	32.89%
2	8.03	25.91%	58.80%
3	6.21	20.04%	78.84%
4	3.95	12.75%	91.58%
5	2.61	8.42%	100.00%

2.5.2 主成分分析下的相关系数矩阵

由于第 1 主成分占总变异的 32.89%, 第 2 主成分占总变异的 25.91%, 以前两个主成分作为变异的主要来源。从 31 种碳源在两个主成分

上的系数矩阵(图5)可见,有16种碳源(相关系数的绝对值 > 0.50)均集中在第1主成分上,决定了主成分1的变异,其中碳水化合物占43.75%:D-纤维二糖(x24)、 α -D-乳糖(x28)、i-赤藓糖醇(x9)、D-木糖(x5)、N-乙酰-D-葡萄糖胺(x17)、D,L- α -磷酸甘油(x29)和D-葡萄糖胺酸(x21);氨基酸类占25%:L-苯基丙氨酸(x11)、L-精氨酸(x3)、L-丝氨酸(x15)和甘氨酸-L-谷氨酸(x23);羧酸类占18.75%: γ -羟基丁酸(x18)、 α -丁酮酸(x26)和丙酮酸甲酯(x4);多聚物占6.25%:吐温80(x12);酚酸类占6.25%:2-羟基苯甲酸(x10)。可见影响主成分1的主要为碳水化合物,其次是氨基酸类,而胺类对主成分1没有影响。决定主成分2变异的主要碳源有14种

(相关系数 > 0.50),其中含有6种碳水化合物:D-纤维二糖(x24)、 α -D-葡萄糖-1-磷酸(x25)、D-半乳糖酸- γ -内脂(x2)、D-甘露醇(x13)、D-半乳糖醛酸(x6)和D-葡萄糖胺酸(x21);2种氨基酸:L-苯基丙氨酸(x11)和甘氨酸-L-谷氨酸(x23);1种羧酸:D-苹果酸(x30);2种多聚物: α -环式糊精(x16)和吐温40(x8);1种酚酸:4-羟基苯甲酸(x14);2种胺类:苯乙胺(x27)和腐胺(x31)。综合第1、2主成分结果,被不同工艺下滤料微生物群落特异利用的碳源有:D-纤维二糖(x24)、D-葡萄糖胺酸(x21)和甘氨酸-L-谷氨酸(x23)与PC1和PC2均呈显著正相关;L-苯基丙氨酸(x11)与PC1呈显著负相关,而与PC2呈显著正相关。

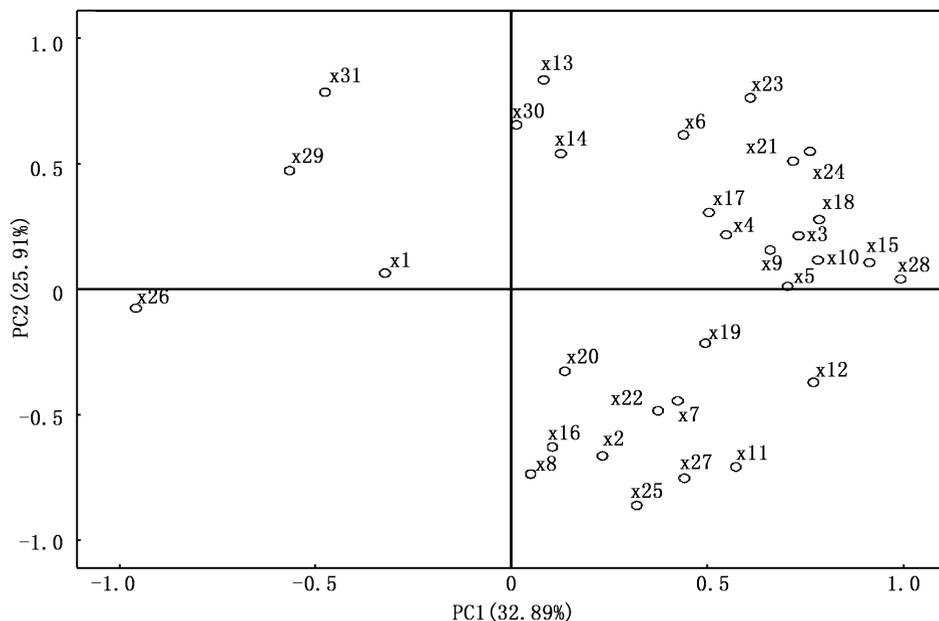


图5 不同碳源与前两个主成分的相关系数矩阵(96 h)

Fig. 5 Correlation coefficients matrix of different carbon sources with the first two principal components(96 h)

2.5.3 主成分分析下的散点图

主成分分析中各样本间距离的大小表示样本间的相似程度,距离越近相似程度越高,对碳源的利用能力就越近^[20-21]。如图6所示,图中的滤料微生物分布较为分散,说明随着生物滤池的工艺改变,其中的滤料微生物群落发生变化,对碳源的利用能力呈现出差异性,从而产生不同的碳代谢效果,出现不同的微生物群落特点。

3 讨论

研究循环水养殖系统中生物滤料微生物群落对31种不同碳源的利用能力差异可以深入了解生物滤池中的微生物群落变化趋势。根据Biolog数据表明不同曝气工艺下的滤料微生物在对碳源代谢水平上存在差异, O^2 工艺二段的滤料微生物利用单一碳源能力最强,表明其微生物群落对碳源代谢水平最高,这可能与 O^2 工艺下溶解氧较为充足,微生物能够生长旺、繁殖速度快

有关,这与于皓等^[22]在溶解氧对脱除碳氮硫工艺中的微生物群落影响解析发现相对较高浓度的溶解氧可以增加微生物的多样性相吻合。处于 O/A 工艺一段和 O/A 工艺二段的滤料微生物的 AWCD 值在总体水平上相对较低,同时 O/A 工艺下的 TAN 和 NO_2^- -N 去除率远低于 O^2 工艺和 A/O 工艺,说明此工艺下的环境因素抑制滤料微生物的生长繁殖,导致滤料微生物的种类和数量较少,滤料微生物对碳源的利用能力较差,微生物

的丰富程度相对其他工艺较低。不同工艺不同生物滤池段的滤料微生物 AWCD 值总体趋势相同,是因本研究的取样点来自同一套系统的同一处取样点,生物滤池的水环境没有发生剧烈调整。随着工艺的改变各生物滤池段的滤料微生物 AWCD 值有差异性,说明不同工艺条件下的微生物群落具有不一样的群落结构和特点,从而产生了不同的碳源代谢特征^[23-24],这与本研究主成分分析下的散点图分布较为分散相互吻合。

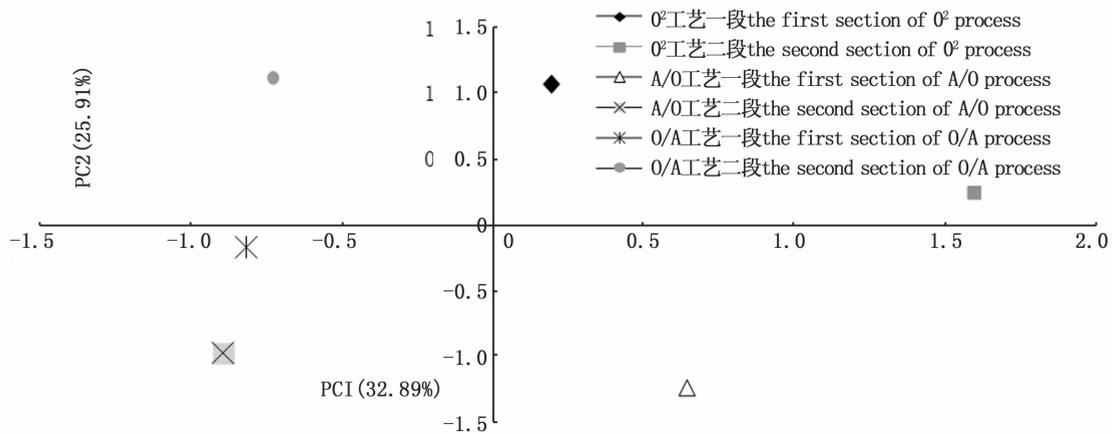


图 6 不同工艺下滤料微生物功能多样性主成分分析(96 h)

Fig. 6 Principal component analysis (PCA) for micro-organisms in different process(96 h)

不同工艺下的滤料微生物对不同单一碳源的利用不同,就六大类碳源而言,各工艺的滤料微生物在对氨基酸总类的利用上呈现明显偏好,其次是胺类、多聚物,说明养殖水体中的微生物在生长繁殖过程中对氨基酸类需求最高,杨莺莺等^[25]研究池塘水体微生物群落代谢功能时发现微生物优先利用氨基酸类,其次为羧酸类、糖类、聚合物类、胺类和其他碳源,王金花等^[26]在高浓度氮对自然生物膜群落结构的研究中同样发现微生物优先利用氨基酸类、羧酸、糖类,其次是多聚物、酚酸和胺类。结合滤料微生物培养 96 h 时的 OD 值可以看出,在培养期间滤料微生物对氨基酸类、胺类和多聚物类碳源利用水平均较高且差别不大,但远高于羧酸类和酚酸类,表明了滤料微生物偏好碳源。从滤料微生物培养 96 h 至结束,氨基酸类的微生物 OD 值逐渐高于胺类和多聚物,说明偏好此三大类碳源的微生物在数量上差别不大,但利用氨基酸类碳源能力高的微生物种类相对更加丰富。

本研究结果显示,3 种工艺下不同生物滤池

段的滤料微生物对 31 种碳源的利用存在差异性和相似性。从不同工艺滤料微生物对 31 种碳源的利用率来看, O^2 工艺一段滤料微生物对碳源利用率较高($>4\%$)的数量最多为 12 种,其次是 O^2 工艺一段有 11 种,A/O 工艺二段下的滤料微生物对碳源利用率较高的数量最少为 8 种。对于 31 种碳源,滤料微生物对其利用率均 $<2\%$ 的有羧酸类的 γ -羟基丁酸、碳水化合物的 D,L- α -磷酸甘油和酚酸类的 2-羟基苯甲酸,其中的 2-羟基苯甲酸属于不利用的碳源(AWCD <0.1),李志裴等^[27]在 Biolog 法研究高产池塘中的杂交鳢和大口黑鲈养殖中同样发现水体中 2-羟基苯甲酸未被利用;滤料微生物利用明显偏好的碳源($>4\%$)有氨基酸类的 L-天门冬酰胺和 L-精氨酸,碳水化合物中的 N-乙酰-D-葡萄糖胺、多聚物中的吐温 40 和吐温 80、酚酸类的 4-羟基苯甲酸和胺类的苯乙胺,碳源利用率高表示滤料微生物对这些碳源需求量较大。

本研究进行了不同工艺不同生物滤池段的 6 个样本微生物碳源代谢的主成分分析(PCA),某

种碳源的主成分相关系数越大表明其在 6 个样本对碳源的利用率上差异越大,相关系数越高的碳源对样本之间的差异比较越重要^[28]。不同碳源与前两个主成分的相关系数矩阵显示,3 种工艺下不同生物滤池段的滤料微生物代谢基质主成分 1 相关系数 0.5 以上的碳源有 16 种;主成分 2 相关系数 0.5 以上的碳源有 14 种,说明不同工艺不同生物滤池段的滤料微生物代谢功能群落结构的差异在两种主成分上体现均较明显。在对本研究的 6 个样本主成分分析中,发现造成不同工艺不同生物滤池段的滤料微生物在前两个主成分上出现代谢差异性的碳源贡献程度为:甘氨酸-L-谷氨酸 > D-纤维二糖 > L-苯基丙氨酸 > 腐胺 > D-葡萄糖胺酸,其中 D-纤维二糖、D-葡萄糖胺酸和甘氨酸-L-谷氨酸与 PC1 和 PC2 均呈显著正相关;L-苯基丙氨酸与 PC1 呈显著负相关,与 PC2 呈显著正相关。

在循环水养殖系统中,水处理核心是 MBBR 生物滤池的生物填料上附着的微生物,微生物硝化效率的高低在循环水能否持续运行过程中起着关键作用^[29]。从本研究的水质指标 TAN 和 NO₂⁻-N 去除率可以看出,O² 工艺和 A/O 工艺去除效果明显较好。在对碳源利用程度上,O² 工艺二段和 A/O 工艺一段的滤料微生物总体上利用水平较高,反映出此两种工艺下微生物种类和数量更为丰富,与氮磷的去除率相结合表明这两种工艺在此循环水养殖系统中更为实用。本研究旨在使滤料微生物膜上的微生物种类更加丰富,使滤料上的微生物数量更多,通过改变生物滤池的曝气情况从而影响微生物的生长、繁殖,以寻找出合理的系统运行工艺。运用 Biolog-ECO 技术对循环水养殖系统中 MBBR 生物滤池在不同曝气工艺下滤料表面微生物群落特征进行分析,对循环水养殖系统的进一步研究具有借鉴意义。

参考文献:

- [1] 宋奔奔,吴凡,倪琦. 国外封闭循环水养殖系统工艺流程设计现状与展望[J]. 渔业现代化, 2012, 39(3): 13-18, 39.
SONG B B, WU F, NI Q. Review of recirculating aquaculture system process flow designing in developed countries[J]. Fishery Modernization, 2012, 39(3): 13-18, 39.
- [2] AVNIMELECH Y. Bio-filters: The need for an new comprehensive approach [J]. Aquacultural Engineering,

2006, 34(3): 172-178.

- [3] PIEDRAHITA R H. Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation[J]. Aquaculture, 2003, 226(1/2/3/4): 35-44.
- [4] 郑乐云,杨求华,黄种持,等. 循环水养殖密度和氨氮对斜带石斑鱼生长和免疫力的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2013, 22(5): 706-712.
ZHENG L Y, YANG Q H, HUANG Z C, et al. Effect of the breeding density and ammonia-nitrogen on growth and immunity of *Epinephelus coioides* in recirculating system[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2013, 22(5): 706-712.
- [5] 胡萍华,金一春,曲学伟,等. 氨氮对白斑狗鱼成鱼的急性毒性研究[J]. 湖南农业科学, 2010(3): 109-111.
HU P H, JIN Y C, QU X W, et al. Acute toxicity of ammonia nitrogen on adult fish of *Esox lucius* [J]. Hunan Agricultural Sciences, 2010(3): 109-111.
- [6] 夏苏东,李勇,王文琪,等. 养殖自污染因子对虾蟹健康的影响及其机理与控制[J]. 水产科学, 2009, 28(6): 355-360.
XIA S D, LI Y, WANG W Q, et al. The Mechanism and control of self-pollution factors affecting health of prawn and crab[J]. Fisheries Science, 2009, 28(6): 355-360.
- [7] REDDY-LOPATA K, AUERSWALD L, COOK P. Ammonia toxicity and its effect on the growth of the South African abalone *Haliotis midae* Linnaeus [J]. Aquaculture, 2006, 261(2): 678-687.
- [8] 黄志涛. 封闭式循环水养殖系统生物滤池及滤料的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2007.
HUANG Z T. Study on the media of the biofilters in the recirculating aquaculture system [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2007.
- [9] 孙大川,罗国芝,谭洪新,等. 循环水工厂化养殖系统中浮球式生物滤器在不同工况下的水处理效果[J]. 上海水产大学学报, 2005, 14(4): 390-396.
SUN D C, LUO G Z, TAN H X, et al. Study on the water treatment efficiency of floating bead biological filter under different working conditions based on the recirculating aquaculture system [J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2005, 14(4): 390-396.
- [10] 丁文川,吴丹,曾晓岚,等. 不同曝气量对 SBBR 短程硝化微生物特性及氮转化的影响[J]. 环境科学学报, 2012, 32(9): 2112-2118.
DING W C, WU D, ZENG X L, et al. Effect of aeration flow on microbial characteristics and nitrogen transformation of shortcut nitrification processing in a sequencing batch biofilm reactor[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2012, 32(9): 2112-2118.
- [11] 张海耿,马绍赛,李秋芬,等. 循环水养殖系统(RAS)生物载体上微生物群落结构变化分析[J]. 环境科学, 2011, 32(1): 231-239.

- ZHANG H G, MA S S, LI Q F, et al. Analysis of the changes of microbial community structure on bio-carrier of recirculating aquaculture systems (RAS) [J]. *Environmental Science*, 2011, 32(1): 231-239.
- [12] 刘颖, 李丽, 孙大川, 等. 循环水养鳗系统生物过滤器中微生物群落的代谢特性[J]. *水产学报*, 2015, 39(10): 1539-1548.
- LIU Y, LI L, SUN D C, et al. Carbon metabolism of microbial communities in biofilters of recirculating aquaculture system cultured with *Anguilla marmorata* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(10): 1539-1548.
- [13] GRAHAM M H, HAYNES R J. Catabolic diversity of soil microbial communities under sugarcane and other land uses estimated by Biolog and substrate-induced respiration methods[J]. *Applied Soil Ecology*, 2005, 29(2): 155-164.
- [14] DE FEDE K L, SEXSTONE A J. Differential response of size-fractionated soil bacteria in BIOLOG[®] microtitre plates [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33(11): 1547-1554.
- [15] 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[J]. *环境科学*, 2005, 26(4): 165-170.
- 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.
- [16] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法 [M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 271.
- State Environmental Protection Administration of China. *Analisis in Water and Wastewater* [M]. 4th ed. Beijing: China Environmental Science Press, 2002: 271.
- [17] 高晓奇, 肖能文, 叶瑶, 等. 基于 Biolog-ECO 分析长庆油田土壤微生物群落功能多样性特征[J]. *应用与环境生物学报*, 2014, 20(5): 913-918.
- GAO X Q, XIAO N W, YE Y, et al. Analysis of microbial community functional diversity in the Changqing Oilfield based on Biology-ECO method [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2014, 20(5): 913-918.
- [18] 赵艳, 李锋民, 王昊云, 等. 不同结构好氧/厌氧潜流人工湿地微生物群落代谢特性[J]. *环境科学学报*, 2012, 32(2): 299-307.
- ZHAO Y, LI F M, WANG H Y, et al. Characteristics of microbial community metabolism in aerobic/anaerobic subsurface flow constructed wetland [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2012, 32(2): 299-307.
- [19] 邓欢欢, 葛利云, 顾国泉, 等. 垂直流人工湿地基质微生物群落的代谢特性和功能多样性研究[J]. *水处理技术*, 2007, 33(6): 18-21.
- DENG H H, GE L Y, GU G Q, et al. Analysis of metabolic characteristics and functional diversity of the microbial communities in vertical flow constructed wetlands [J]. *Technology of Water Treatment*, 2007, 33(6): 18-21.
- [20] 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.
- [21] HADWIN A M, Del Rio 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.
- [22] 于皓, 陈川, 张莉, 等. 溶解氧对碳氮硫共脱除工艺中微生物群落影响解析[J]. *环境科学*, 2013, 34(6): 2368-2374.
- YU H, CHEN C, ZHANG L, et al. Effect of dissolved oxygen on microbial community in simultaneous removal of carbon, nitrogen and sulfur process [J]. *Environmental Science*, 2013, 34(6): 2368-2374.
- [23] 刘长青, 李梅华, 曲燕慧, 等. 基于 Biolog 技术倒置/常规 A²/O 工艺不同碳源类型条件下微生物群落代谢活性的差异[J]. *城市环境与城市生态*, 2014, 27(4): 22-26.
- LIU C Q, LI M H, QU Y H, et al. A comparative study on metabolic activity of microbial communities between inverted/conventional A²/O processes based on Biolog technology under different carbon sources [J]. *Urban Environment & Urban Ecology*, 2014, 27(4): 22-26.
- [24] 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.
- [25] 杨莺莺, 李卓佳, 梁晓华, 等. 芽胞杆菌对鱼池微生物群落代谢功能的影响[J]. *微生物学杂志*, 2009, 29(3): 11-17.
- YANG Y Y, LI Z J, LIANG X H, et al. Influences of bacillus on metabolic functions of microbial communities in fishponds [J]. *Journal of Microbiology*, 2009, 29(3): 11-17.
- [26] 王金花, 吴永红, 冯彦房, 等. 高浓度氮磷对自然生物膜群落功能和结构的影响[J]. *生态环境学报*, 2013, 22(7): 1236-1243.
- WANG J H, WU Y H, FENG Y F, et al. Effects of hyper-entrophic nitrogen and phosphorus additions on the functional and formational diversity of periphyton biofilms [J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2013, 22(7): 1236-1243.
- [27] 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[J]. *农业环境科学学报*, 2014, 33(1): 185-192.
- LI Z P, 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.
- [28] 李志斐, 王广军, 余德光, 等. 生物絮团对养殖水体水质和微生物群落功能的影响[J]. *上海海洋大学学报*, 2015, 24(4): 503-512.
- LI Z P, WANG G J, YU D G, et al. Effect of bioflocs on

water quality and metabolic functions of microbial community in zero-water exchange tanks[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2015, 24(4): 503-512.

[29] SALOMO S, MÜNCH C, RÖSKE I. Evaluation of the

metabolic diversity of microbial communities in four different filter layers of a constructed wetland with vertical flow by BiologTM analysis [J]. Water Research, 2009, 43(18): 4569-4578.

Analysis of carbon metabolism diversity characters of moving bed biofilm reactor at different biodegradation process in recirculating aquaculture systems using Biolog-ECO method

ZHU Yunhao^{1,2}, TAN Hongxin^{1,2,3}, SUN Dachuan^{1,2,3}, LUO Guozhi^{1,2,3}, WANG Jiao¹, LIU Ying¹

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Aquacultural Engineering Research Center, Shanghai 201306, China; 3. Shanghai Ocean University Aquatic Animal Breeding Center, Shanghai University Knowledge Service Platform, Shanghai 201306, China)

Abstract: To learn the carbon metabolism of microbial communities of moving bed biofilm reactor which was adjusted to different process in recirculating aquaculture systems, and find out if microorganism had a better nitrification in moving bed biofilm reactor under the condition of energy conservation. Experiments changed the moving bed biofilm reactor to different process which were O²、A/O and O/A, respectively. Then, using Biolog-ECO method to analyse the characteristics of microorganism on the carbon source metabolism of moving bed biofilm reactor. The results showed that, the second section of O² process was the best of AWCD of microbial communities cultured in different process, then was the first section of A/O process, and the first section of O/A process was the worst. The utilization degree of carbon sources of microbial communities in different process show preference to amino acids and amines, the second section of O² process and the first section of A/O process were higher than the other process. The first section of O/A process was the highest in micro-organism diversity indices, then were the second section of O² process and the second section of O/A process, and the first section of O² process was the lowest. The PCA (principal component analysis) showed that contribution of PC1 of the micro-organisms in different process was 32.89%, PC2 was 25.91%, and there were 16 types of substrates in PC1 over 0.5 of load, and 14 in PC2. L-Asparagine and L-Arginine of amino acids, N-Acetyl-D-Glucosamine of carbohydrates, Tween 40 and Tween 80 of polymers, 4-Hydroxy Benzoic Acid of phenolic acids and Phenylethylamine of amines were better utilized by micro-organisms. γ -Hydroxybutyric Acid of carboxylic acids, D,L- α -Glycerol Phosphate of carbohydrates and 2-Hydroxy Benzoic Acid of phenolic acids were utilized worse. This experiment through changing the work conditions of moving bed biofilm reactor to study its carbon metabolism of microbial communities, which can provide a basis for further study of recirculating aquaculture system.

Key words: recirculating aquaculture system; moving bed biofilm reactor; Biolog-ECO method; microbial communities; carbon metabolism