

文章编号: 1674-5566(2010)04-0540-07

盐度驯化对海水生物过滤器功能的影响

罗国芝, 谭洪新, 齐巨龙, 黄霞峰, 孙大川

(上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 采用盐度变化法将已建立完全硝化功能的淡水生物过滤器驯化为具完全硝化功能的海水生物过滤器。在水温 25℃ 的培养条件下, 用盐度 25 的海水直接培养生物过滤器, 建立完整硝化功能需 70 d 先用淡水培养生物过滤器, 待硝化作用完全建立后, 用盐度 25 的海水驯化, 则建立完整硝化功能的海水生物过滤器需要 61 d 将已经建立完整功能的淡水生物过滤器, 先用盐度 10 的海水驯化, 待建立完整硝化功能后, 再用盐度 25 的海水驯化, 则建立完整硝化功能的海水生物过滤器共需要 56 d。运用 PCR-DGGE 技术分析盐度冲击前后生物膜细菌群落结构的变化, 运用荧光素-荧光素酶法检测盐度冲击前后生物膜微生物 ATP 含量变化。结果表明, 经盐度冲击后, 生物膜的细菌群落结构发生了明显变化, 优势菌群由 β 变形菌纲细菌和 δ 变形菌纲 (*Delta proteobacteria*) 细菌转变成 γ 变形菌纲和 α 变形菌纲细菌; 盐度冲击 24 h 后, 生物膜微生物 ATP 总量分别下降了 17.4% (盐度 15) 和 47.7% (盐度 25)。

关键词: 生物过滤器; 生物膜; 细菌群落结构; 生物膜活性; 盐度驯化

中图分类号: S 969.38 **文献标识码:** A

Effect of salinity change on microbial communities structure and activity of nitrifying biofilm

LUO Guo-zhi TAN Hong-xin QI Ju-long HUANG Xia-feng SUN Da-chuan

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

Abstract: Freshwater nitrification biofilter was domesticated to seawater nitrification biofilter by salinity gradient change method. Microbial community structure response to salinity domestication process was determined by denaturing gel gradient electrophoresis (DGGE) profiles of 16S rDNA V3 region. ATP contents were determined with luciferin-Luciferase mixtures method under different salinity impact. Results showed that microbial community of the biofilm changed significantly before and after the salt change; the dominant species of freshwater biofilm were Beta proteobacteria and Delta proteobacteria; after the salt flush, the dominant species of the biofilter came into Stenotrophomonas of Gamma proteobacteria, Alpha proteobacteria and Paenibacillus etc. The biofilms' ATP contents decreased by 17.4% (salinity 15) and 47.7% (salinity 25) after different salinity flush separately. In 25℃ biofilm cultivation condition, it takes 70 days to cultivate nitrifying biofilm in salinity 25 seawater; it takes 61 days that freshwater nitrifying biofilm domesticated directly for salinity 25 seawater nitrifying biofilm; it takes 56 days that freshwater nitrifying biofilm domesticated for salinity 10 seawater nitrifying biofilm firstly, then started for salinity 25 seawater nitrifying

收稿日期: 2009-07-22

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2006BAD03B06); 上海市重点学科建设项目 (Y1101)

作者简介: 罗国芝 (1974-), 女, 副教授, 博士, 主要从事水产养殖与水环境保护方面的研究。E-mail: gzhuo@shou.edu.cn

通讯作者: 谭洪新, E-mail: hxtan@shou.edu.cn

biofilm.

Key words: biofilter; biofilm; microbial communities structure; biofilm activity; salinity domestication

水处理技术是循环水水产养殖模式的关键技术,主要包括生物过滤、固液分离、臭氧消毒等,而生物过滤是循环水水产养殖用水处理技术的核心。生物过滤通过氨化、亚硝化和硝化过程,将氨氮转化为硝酸盐氮。完整的硝化功能是指生物过滤器的氨化、亚硝化和硝化同时进行,系统不会出现明显的氨氮和亚硝酸氮的积累。生物过滤器完整硝化功能的建立是发挥其处理效能的前提和关键。研究表明,20℃左右,淡水生物过滤器建立完整的硝化功能需要11~20 d^[1-5],而盐度35的海水生物过滤器需要60~75 d^[6-8]。因为建立完整硝化功能时间较长,制约了海水生物过滤器在实际生产中的应用,也制约了依赖此技术的相关产业的发展,比如海水循环水养殖的发展。因此,开展有效缩短生物过滤器的完整硝化功能建立时间的研究非常必要。已有很多研究报道了加速海水生物过滤器硝化功能的建立方法,如在新建海水生物过滤器中添加已经建立完整硝化功能的滤器的滤料^[5]、添加活性污泥、添加商业菌及其它菌源^[8-10],由淡水生物过滤器盐度驯化^[11]等。在这些方法中,接种淡水活性污泥或商业硝化细菌被证明是无效或存在争议的;接种已稳定海水生物过滤器的滤料可以加速构建海水生物过滤器,并推荐滤料的接种量应大于10%。而对于新建的海水处理系统而言,获得已稳定海水生物过滤器的滤料相对困难,因此这种方法在实际应用中受到一定的限制。

本研究采用盐度梯度方法驯化已经建立硝化功能的淡水生物过滤器,培养具有完整硝化功能的海水生物过滤器;并通过变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术分析盐度变化前后生物过滤器滤料表面的细菌群落结构变化;利用荧光素-荧光素酶法测定不同盐度冲击前后生物膜微生物ATP量的变化。通过上述方面的研究,为海水生物过滤器的实际应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验装置

试验装置见图1。水泵将蓄水池水从过滤柱

入水口泵入,经生化环填料层后,从出水口回到蓄水池。过滤柱内径10 cm,柱高37 cm,容积2.9 L;蓄水池容积60 L;潜水泵功率12 W;加热装置功率200 W。过滤柱内填充玻璃生化环(双鹰水族特快清系列),填料堆积体积2 547.3 mL,湿重1 440 g,孔隙率69%。

1.2 实验系统工况控制

用商品海盐(以色列红海盐)将盐度调整到需要盐度;用加热棒调节保持在(25±1)℃;溶解氧控制在(6.5±1) mg/L; pH以NaHCO₃调节控制在7.5~8.5;3个处理均将流量调至(7.2±0.3) L/h,水力停留时间为0.28 h。

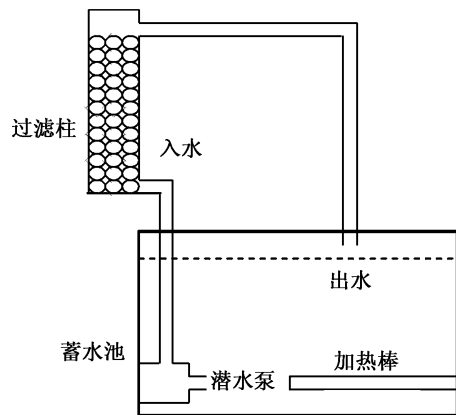


图1 实验系统

Fig. 1 Experimental system

1.3 试验设计

A、B为建立了完整硝化功能稳定运行一个月的淡水生物过滤器,C为稳定运行1 m的由淡水循环水系统驯化而来的盐度25的成熟海水生物过滤器。从A、B、C取样进行PCR-DGGE测试。D、E为稳定运行1个月的成熟淡水硝化系统,分别添加海盐至盐度15、25,测其过程中生物膜活性的变化。F由淡水生物过滤器进行接种培养,成熟后用盐度10和25进行2步法驯化;H由淡水生物过滤器进行接种培养,成熟后用盐度25进行1步法驯化;G盐度25,直接接种培养,作为对照组。

以亚硝氮出现明显下降趋势为判断系统成熟的标志,具体为亚硝氮浓度降低到0.02 mg/L。

为过滤器硝化功能成熟的标志;总氨氮浓度降低到 0.05 mg/L 为判断生物过滤器氨氧化功能成熟的标志^[9]。每一个盐度梯度处理都待生物过滤器硝化功能构建完成后才开始。

1.4 生物膜接种

1.4.1 人工污水配制

大量元素营养液 (g/L): NH_4Cl 7.641 4, K_2HPO_4 7.361 8, 微量元素营养液 (g/L): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.248, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.513, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.154, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.295^[12], 按试验设计添加营养液入蓄水池。实验期间补充的用水的营养液的浓度和实验开始时的营养液浓度一致。

1.4.2 接种

取上海海洋大学军工路校区苗圃内生菜地湿润表层土壤 500 g 加入 10 L 曝气自来水,在 25 °C 下曝气培养 5 d 后,分别取土壤上清液 500 mL 接种到 3 个处理的蓄水池中。

1.5 水质检测指标及方法

每日 9 时取蓄水池水样,每日检测氨氮(次溴酸钠氧化法)^[13]、亚硝酸盐氮(重氮-偶氮法)^[12];隔天检测硝酸盐氮(紫外分光光度法)^[14]、溶氧、pH、温度等理化指标(YSF56MPS 多参数水质测量仪)。

1.6 PCR-DGGE 法分析生物膜细菌群落结构

主要参考文献 [12-13] 中 PCR-DGGE 的方法。

1.6.1 细菌总 DNA 的提取

取 A、B 和 C 系统过滤器各 80 g 生化环加入到 100 mL 灭菌的纯水中,选用 T460H 型超声波清洗器,工作频率为 35 kHz, 25 °C 振荡 10 min, 取上清液以 0.2 μm 微孔滤膜进行抽滤。将滤膜放入 2 mL 裂解液 (10 mmol/L Tris pH 8.0, 100 mmol/L EDTA, 0.5% SDS), 加入溶菌酶至终浓度 4 mg/mL, 37 °C 处理 30 min, 加入蛋白酶 K 至终浓度 100 μg/mL, 50 °C 处理 3 h, 加入等体积的酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1), 混合两相, 离心 (6 000 r/min, 15 min), 取上清, 若蛋白质较多可加入等体积的氯仿:异戊醇 (24:1) 再抽提, 上清液以 2 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA, 0.5 h 后离心 (13 000 r/min, 10 min), 去上清, 70% 乙醇漂洗, 离心, 去上清, 室内自然风干, 加入适量无

水溶解, 取部分样品用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检查提取 DNA 的质量和片段大小^[15-16]。

1.6.2 细菌 16S rDNA 全长序列的扩增

用细菌通用引物 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') 和 1492R (5'-GGT TAC CCT GTT AGG ACT T-3')^[17] 直接扩增细菌总 DNA 中的 16S rDNA 全长序列。

1.6.3 细菌 16S rDNA V3 区序列的扩增

采用细菌通用引物 GC341F (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3') 和 534R (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') 扩增细菌 16S rDNA V3 区序列。

1.6.4 DGGE 分离

取 20 μL PCR 浓缩产物, 在 D-code System 电泳仪上 (Bio-Rad 公司) 进行 DGGE 电泳分离。变性梯度凝胶的浓度为 8%, 变性梯度 25% ~ 55% (7 mol/L 尿素和 40% 甲酰胺为 100% 变性)。电泳缓冲液为 1 × TAE。在电泳温度 60 °C, 电压 150 V 下电泳 4 h。电泳结束后, 将凝胶进行银染。

1.6.5 细菌 16S rDNA V3 区序列的克隆和序列测定

从变性梯度凝胶上切下 DGGE 条带 (当不同样品的条带处于凝胶上同一位置时, 代表序列一致, 故只切割其中的一条条带), 置于 20 μL 无菌水中, -20 °C 过夜, 经 12 000 r/min 离心 1 min, 收集上清, 然后以此作为 PCR 扩增的模板。具体的 PCR 扩增体系和条件同本节 1.6.3。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后, 切胶纯化, 然后连接到 pMD18-T 载体上 (Takara 公司), 经转化感受态大肠杆菌菌株 Top10 后, 37 °C 培养。阳性克隆经过鉴定以后, 送上海鼎安生物技术有限公司测序。

1.7 荧光素酶法检测生物膜 ATP 含量变化

1.7.1 微生物样品采集和活菌数目测定

D、E 两个系统盐度冲击前各取湿重 (40 ± 1) g 玻璃生化环放入无菌烧杯中, 加入 50 mL 无菌纯水, 选用 T460H 型超声波清洗器, 工作频率为 35 kHz, 25 °C 振荡 10 min, 取上清液 10 mL 作为样品测定 ATP 含量。同样取 E、F 两个系统盐度冲击后 1 d 微生物样品测定 ATP 含量。由于胞内 ATP 浓度在所有细菌类群都在一个相似的浓

度范围内,ATP因此可以反映细胞数目。大多数细菌每个细胞包含大约 2×10^{-18} mol ATP^[18]。本研究生物膜微生物类群中细菌为优势生物,假定经超声波振荡下来的生物膜微生物全部为细菌,据此可推算出生物膜活性细菌数目。

1.7.2 荧光素 荧光素酶法测定生物膜 ATP

按照微生物 ATP测定试剂盒 (BioThema公司, prod No 266-112)的操作步骤加入药品,通过 SK-2004736型荧光化学发光酶标仪进行测定。

2 结果

2.1 淡、海水过滤器生物膜微生物群落结构

2.1.1 16S rDNA V3区序列片段 DGGE 指纹图谱

A、B、C系统的生物膜细菌 16S rDNA V3区序列片段 DGGE电泳条带分布见图 2。A具有 8条可分辨条带,分别编号为 1、2、3、4、5、6、7和 8; B具有 9条可分辨条带,分别编号为 9、10、11、12、13、14、15、16和 17; C具有 7条可分辨条带,其中 6条条带 (11、13、14、15、16和 17)与 B共有,条带 18为 C特异性条带。

2.1.2 16S rDNA V3区序列比对与分析

对 A、B和 C生物膜细菌 DGGE图谱上的 11

条带进行切割后测序和分析,所获得的序列大小在 47~233 bp之间。在 Gen Bank数据库中找出与每条序列最相似的参考序列,相似性达 91%~100% (表 1)。

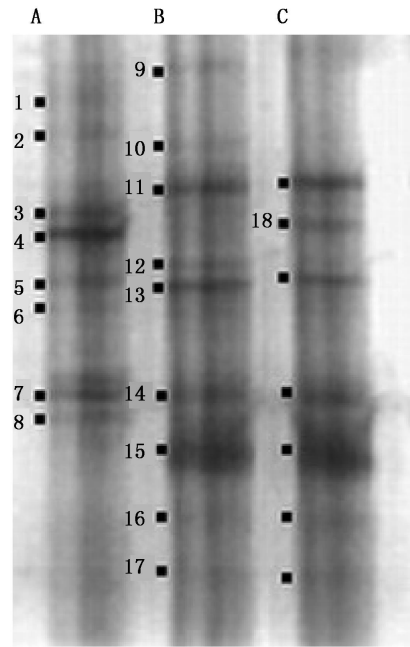


图 2 海、淡水生物过滤器生物膜细菌 16S rDNA V3区序列片段的 DGGE图谱

Fig 2 DGGE profiles of 16S rDNA V3 gene fragment from different biofilters

表 1 生物膜细菌 16S rDNA 特征片段序列比对结果

Tab 1 The most closely matched species of partial 16S rDNA sequences in GenBank

条带	序列长度 (bp)	相近序列及登录号	相似性
4	69	<i>Paenibacillus</i> sp. SMCC G938, EU446167.1	100%
6	232	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain 776, EU430096.1	100%
7	199	Uncultured bacterium clone MKC25, EF173356.1	99%
8	207	Uncultured alpha proteobacterium clone 630, AY960235.1	97%
9	222	Uncultured Nitrospira sp. clone OC6, EU499596.1	100%
10	187	Uncultured delta proteobacterium clone ADK-MOH02-66, EF520541.1	91%
11	233	Uncultured beta proteobacterium clone PRD18F08, AY948050.1	98%
13	212	Uncultured beta proteobacterium clone AS86, EU283393.1	99%
14	189	Uncultured soil bacterium clone 1-120, EF526284.1	98%
15	47	Uncultured bacterium clone 93-pc26-8, EF590280.1	100%
18	196	Uncultured Nitrosomonas A245756.1	95%

从以上的鉴定结果可知,除 7、14和 15条带比对的相似条带为未命名门属细菌外,其余 8条带分别隶属于 3个门:变形菌门 (Proteobacteria)、硝化螺菌门 (Nitrospirae) 和厚壁菌门 (Firmicutes)。A、B淡水系统生物膜细菌条带

11、13和 18为变形菌门 β 变形菌纲 (Beta proteobacteria)细菌。其中条带 18确定为亚硝化单胞菌属 (Nitrosomonas)细菌;条带 10为变形菌门 (Proteobacteria) δ 变形菌纲 (Delta proteobacteria)细菌;条带 9为硝化螺菌门

(Nitrospirae), 硝化螺菌属 (Nitrospira) 细菌。

C 海水系统生物膜条带 6 为变形菌门 (Proteobacteria), γ 变形菌纲 (Gamma proteobacteria), 寡养单胞菌属 (Stenotrophomonas) 细菌; 条带 8 为变形菌门 (Proteobacteria), α 变形菌纲 (Alpha proteobacteria) 细菌; 条带 4 为厚壁菌门 (Firmicutes), 芽孢杆菌纲 (Bacilli), 类芽孢杆菌属 (Paenibacillus)。

PCR-DGGE 分析结果表明, 生物过滤器盐度驯化前后生物膜细菌群落发生了明显的变化。

2.2 盐度冲击后各系统氨氮、亚硝酸氮变化

D、E 系统为生物膜成熟后的淡水生物过滤器, 分别投加人工污水至氨氮 10 mg/L。盐度冲击后系统中, 氨氮、亚硝酸氮浓度变化如图 3、图 4。盐度冲击后 D 系统水池的氨氮在 4 d 内降至 0.69 mg/L, E 系统水池的氨氮在 4 d 内降至 1.89 mg/L。4 d 内 D、E 系统内氨氮的日均降解速率分别为 46.45 g/(m³·d) 和 39.85 g/(m³·d); 氨氮的日均降解速率分别降低了 38.7% 和 56.2%。D、E 海水水池亚硝酸氮在 4 d 内均呈上升趋势, 第 4 天的峰值分别为 7.80 mg/L 和 6.36 mg/L。

2.3 盐度冲击后各系统微生物生物膜活性变化

D、E 生物过滤器生物膜微生物 ATP 含量及活性细菌数目变化见表 2。E 系统投加海盐至盐度 15, 24 h 后, 过滤器每克滤料生物膜微生物 ATP 量下降 17.4%, F 系统投加海盐至盐度 25,

24 h 后, 过滤器每克滤料生物膜微生物 ATP 量下降 47.7%。可见, 盐度对淡水生物过滤器生物膜细菌的影响比较明显。

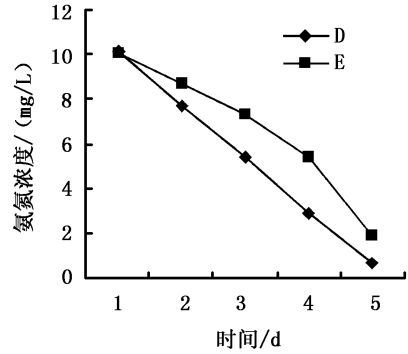


图 3 盐度冲击后 D、E 水体内氨氮浓度变化
Fig. 3 Changes of ammonia-N in D and E tanks after adding salinity

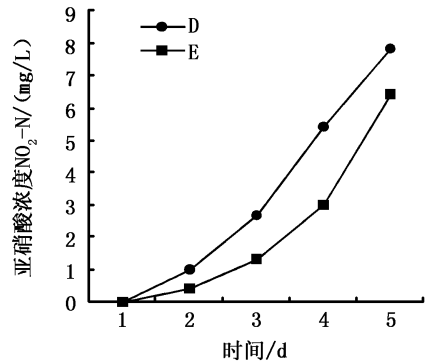


图 4 盐度冲击后 D、E 水体内亚硝酸氮浓度变化
Fig. 4 Changes of ammonia-N in D and E tanks after adding salinity

表 2 生物膜微生物 ATP 含量、活性细菌数目和滤器硝化功能变化

Tab. 2 Changes of the biofilm's ATP quantity, the number of the active bacteria and nitrification

项目	D			E		
	微生物 ATP 量 (mol/g)	活性细菌数目 (个/g)	氨氮日均降解率 [g/(m ³ ·d)]	微生物 ATP 量 (mol/g)	活性细菌数目 (个/g)	氨氮日均降解率 [g/(m ³ ·d)]
盐度冲击前	1.66 × 10 ⁻¹²	8.29 × 10 ⁵	75.75	1.40 × 10 ⁻¹²	6.98 × 10 ⁵	90.96
盐度冲击后	1.37 × 10 ⁻¹²	6.85 × 10 ⁵	46.45	7.30 × 10 ⁻¹³	3.65 × 10 ⁵	39.85
下降百分比	17.4%		38.7%	47.7%		56.2%

2.4 盐度驯化构建生物过滤器硝化功能建立

2.4.1 过滤器硝化功能的形成

不同盐度梯度驯化淡水生物过滤器的实验结果见表 3。盐度 25 海水直接构建过滤器硝化功能, 过滤器氨氧化功能成熟需 55 d (H 系统);

采用将成熟淡水生物过滤器驯化为盐度 10, 硝化功能恢复后再驯化为盐度 25 的方法, 氨氧化功能成熟需 21 d (F 系统); 将成熟淡水生物过滤器直接驯化为盐度 25 的方法氨氧化功能成熟需 48 d (G 系统)。

25℃, 盐度 25 海水直接构建硝化功能耗时 70 d 采用将成熟淡水生物过滤器驯化为盐度

10,硝化功能恢复后再驯化为盐度 25的方法构建海水生物过滤器硝化功能需要 57 d;将成熟淡水生物过滤器直接驯化为盐度 25的方法构建海水生物过滤器硝化功能需要 65 d。

25℃,成熟的盐度 25海水生物过滤器的氨氮日均降解率 [$57.71 \text{ g}/(\text{m}^3 \cdot \text{d}) \sim 98.63 \text{ g}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$]与成熟的淡水生物过滤器的氨氮日均降解率 [$68.57 \text{ g}/(\text{m}^3 \cdot \text{d}) \sim 90.96 \text{ g}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$]相似。

表 3 实验系统中生物过滤器硝化功能建立的时间

Tab. 3 The time of the station of nitrification function of experimental biofilter

项目		F			G		H
		0	10	25	0	25	25
稳定过程中浓度 高数值 (mg/L)	$\text{NH}_4\text{-N}$	2.48	2	1.92	2.48	1.78	2.05
	$\text{NO}_2\text{-N}$	4.98	0.87	1.56	4.98	2.01	2.41
氧化需要时间 (d)	$\text{NH}_4\text{-N}$	6	5	12	6	44	55
	$\text{NO}_2\text{-N}$	17	13	27	17	44	25
总共时间 (d)			57		65	70	

2.4.2 海水过滤器硝化功能构建完成后,氨氮负荷冲击系统水质变化比较

表 4 为 F、G 和 H 海水过滤器硝化功能构建完成后, 10 mg/L 氨氮负荷冲击系统水质变化结果。由表 4 可以看出,经过盐度驯化后,生物过滤器的处理效果非常明显,降解 10 mg/L 氨氮的时间分别为 4、7 和 5 d。各系统间的处理效果与生物过滤器硝化功能的构建方式没有明显的关系。

表 4 海水过滤器硝化功能构建完成后,氨氮负荷冲击系统水质变化比较

Tab. 4 The comparison of the changes of water quality after the sea water biofilters' nitrification completed

项目	F	G	H
氨氮高数值 (mg/L)	10.40	9.75	9.69
氨氮降解所需时间 (d)	2	3	2
亚硝酸达到峰值所需时间 (d)	2	3	2
亚硝酸高数值 (mg/L)	6.79	7.16	7.71
亚硝酸降解所需时间 (d)	2	4	3
亚硝酸日均降解率 [$\text{g}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$]	64.19	32.83	50.11
氨氮氧化为亚硝酸所需时间 (d)	4	7	5

3 讨论

海水生物过滤器在实际使用中亚硝酸氧化功能效率不高,效果不稳定。本实验表明,盐度冲击对生物过滤器亚硝酸氧化功能的影响比氨氧化功能的影响明显。根据笔者多年的研究,生物过滤器硝化功能的不完全建立是因素之一。建立完整硝化功能的海水生物过滤器,在长期运行过程中,只要负载不超过培养时的负载,亚硝酸盐氧化功能还是比较稳定的^[8-10],本次试验也证明这一点。因此,生物过滤器硝化功能的完整

建立是海水生物过滤器稳定运行的保障条件之一。

对海水生物过滤器的理论研究比淡水生物过滤器要少,利用分子微生物生态技术分析其生物膜微生物群落的研究尚未见报道。分析生物膜微生物的群落结构,了解其与环境的相互作用关系,有助于更深刻地认识海水生物过滤工艺的微观机理,从而为调控和优化微生物群落、提高处理效果、研究开发新型高效的海水生物过滤器提供理论指导。传统的微生物群落分析方法建立在微生物分离、纯种培养的基础上,通过对纯种微生物进行显微观察和生理生化特性研究来认识群落结构。由于环境中微生物群落结构非常复杂,物种多样性极高,纯种分离富集培养的方法不但费时费力,而且存在致命的方法学上的缺陷^[19]。所以,很有必要研究不依赖微生物培养来进行环境微生物群落分析的方法。本试验使用 PCR-DGGE 方法研究生物过滤器生物膜细菌的群落结构与环境变化的关系,结果表明海水冲击前后生物膜微生物结构发生了较为明显的变化,较好的解释了淡水生物过滤器驯化为海水生物过滤器需要的时间长短与其盐度梯度间的关系。但是,本次试验中应用 DGGE 技术的结果表明:DGGE 在实际应用中虽然很快,但因所选片段太短,在基因 Bank 里进行细菌比对时,有些条带只能比出粗略的哪类细菌,不能细化到种属,甚至会在比对时会出现符合好几类细菌的现象;而且 DGGE 反映的是所有的细菌的变化,包括已经死亡的细菌。细胞中 ATP 水平反映了细胞的代谢水平^[20],检测生物膜微生物的 ATP 含量,可以反映生物膜微生物的代谢活性。荧光素 荧光素

酶法检测 ATP 具有快速 (1 min 内), 高敏感性 (检出最低限为 10~17 mol ATP, 相当于 5 个细菌所含 ATP 的量) 等特点。成为检测细胞活性的最常用手段之一^[18], 本研究利用荧光素 荧光素酶法测定不同盐度冲击前后生物膜微生物 ATP 量的变化, 并结合硝化功能变化特征, 分析了不同盐度冲击对生物膜各功能菌群的影响。

由于时间和技术手段等的限制, 本研究对盐度驯化过程中海水对淡水生物过滤器生物膜硝化细菌的胁迫机理研究不够深入。今后可以从细胞生物化学的角度研究受盐度胁迫后的淡水硝化细菌细胞生理生化变化, 探究盐度对硝化细菌的胁迫机理, 为盐度驯化法构建海水生物过滤器硝化功能的条件优化建立更加系统的理论基础。

参考文献:

- [1] 滕济林, 李星伟, 殷杰, 等. 废水处理新型填料的挂膜试验研究 [J]. 电力建设, 2002, 23(2): 54-57.
- [2] 张娇, 徐晓军, 宋任达, 等. 生物滴滤池去除氨气的挂膜实验研究 [J]. 北方环境, 2005, 30(1): 19-21.
- [3] 杨书平, 严煦世. 软性填料用于膜法生物消化的性能研究 [J]. 上海环境科学, 1988, 7(11): 11-14.
- [4] 陈洪斌, 梅翔, 高廷耀, 等. 受污染源水生物预处理挂膜过程研究 [J]. 水处理技术, 2001, 27(4): 196-199.
- [5] Bower C, Tumer D. Accelerated nitrification in new seawater culture systems: effectiveness of commercial additives and seed media from established systems [J]. *Aquaculture* 1981, 24, 1-9.
- [6] Kawai A, Yoshida Y, Kinata M. Biochemical studies on the bacteria in aquarium with circulating systems. I. Changes of the qualities of breeding water and bacterial population of the aquarium during fish cultivation [J]. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 1964, 30, 65-71.
- [7] Hiayama K. Water control by filtration in closed systems [J]. *Aquaculture* 1974, 4, 369-385.
- [8] 刘艳红, 罗国芝, 朱学宝. 海水闭合循环系统生物滤器微生物特性研究 [J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(3): 540-544.
- [9] 罗国芝, 刘艳红, 谭洪新, 等. 新建海水生物滤器接种培养的研究 [J]. 农业环境保护, 2001, 20(6): 443-445, 451.
- [10] 罗国芝. 海水生物滤器功能形成机理及控制技术的研究 [D]. 上海: 上海水产大学, 2000.
- [11] Nijhof M, Bovendeur J. Fixed film nitrification characteristics in sea water recirculation fish culture systems [J]. *Aquaculture* 1990, 87, 133-143.
- [12] 陈声明, 张立钦. 微生物学研究技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2006, 231-234.
- [13] 国家技术监督局. GB/T 12763. 4-1991, 海洋调查规范海水化学要素观测 [S]. 北京: 中国标准出版社, 1991.
- [14] 韦进宝, 吴峰, 钱沙华, 等. 环境监测手册 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006, 103-105.
- [15] 杨桂梅, 唐文乔, 李会荣, 等. 利用 PCR-DGGE 法分析暗纹东方鲀的弧菌菌落组成 [J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(3): 257-263.
- [16] 滕齐辉, 曹慧, 崔中利, 等. 太湖地区典型菜地土壤微生物 16S rDNA 的 PCR-RFLP 分析 [J]. 生物多样性, 2006, 14(4): 345-351.
- [17] Juliar M, Takuichi S, Andrew J et al. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA [J]. *Applied and environmental microbiology* 1998, 64(2): 795-799.
- [18] Lundin A. Use of firefly luciferase in ATP related assays of biomass, enzymes and metabolites [J]. *Methods in Enzymology* 2000, 305, 346-370.
- [19] 余素林, 吴晓蕾, 钱易. 环境微生物群落分析的 TRFLP 技术及其优化措施 [J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(6): 861-868.
- [20] 刘雨, 赵庆良, 郑兴灿. 生物膜法污水处理技术 [M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 2000, 103-108.