

研究报告

高脱氮活性海洋着色菌 YL28 生物膜特性

周广静 张晓波 朱笔通 赵春贵* 杨素萍*

(华侨大学生物工程与技术系 福建 厦门 361021)

摘要:【背景】细菌生物膜在废水处理领域显示出良好的前景,但目前应用于海水养殖水体处理的菌株主要源自淡水菌株,存在难以适应海水高盐环境的问题。源自红树林的海洋着色菌(*Marichromatium gracile*) YL28 应用于海水养殖水体处理,不仅具有高效除氮能力,而且趋光贴壁能力很强。【目的】阐明海洋着色菌(*Marichromatium gracile*) YL28 的生物膜形成特性和规律,以期为海水养殖水体生物膜反应系统的开发和应用提供参考。【方法】以生物膜和游离菌体生物量、脱氢酶活性、生物膜多糖含量和蛋白含量、无机三态氮去除活性为测定指标,在光照厌氧环境中研究海洋着色菌 YL28 菌株的生物膜形成规律、生物活性和脱氮效果。【结果】随着时间延长,4 000 lx 光照时游离菌体生物量逐渐升高,但在稳定期前快速降低,而成膜生物量经过延滞期后逐渐升高并趋于稳定,表明培养过程中游离菌体能趋光贴壁生长并形成生物膜。在 0–5 000 lx 光照范围内培养 4 d,低光照强度(500 lx)时成膜率(71.21%)最高,1 000–4 000 lx 光照强度下成膜率虽然不是最高(54.64%–68.66%),但适宜菌体成膜,膜生物量干重达到 0.60–0.80 mg/cm²。除了 5 000 lx 光照对成膜菌体脱氢酶活性有不利影响外,成膜菌体和游离菌体脱氢酶活性随光照强度升高而升高,而且没有明显差异。生物膜的形成会导致光反应器内部光照受限,但反应器内部游离菌体的脱氢酶活性并没有降低,由此表明,培养液中的菌体主要在生物膜及其界面生长并游离扩散至培养液中。随光照强度(1 000–5 000 lx)和培养时间(4–10 d)的变化,胞外复合物(Extracellular polymeric substances, EPS)中蛋白含量变异较大,多糖含量变化较小;随时间延长,蛋白含量升高,其中 3 000 lx 时蛋白含量最高;4 000 lx 时生物膜菌体与游离菌体脱氮活性相比,单位质量菌体的氨氮和亚硝氮去除活性未受到明显影响,而硝氮去除活性有所降低。【结论】海洋着色菌 YL28 具有良好的生物膜形成能力,其成膜过程主要是菌体趋光贴壁生长成膜,成膜菌体具有良好的脱氮活性,这为利用生物膜系统消除海水养殖水体氮污染奠定了基础。

关键词: 紫细菌, 海洋着色菌, 生物膜, 脱氮

Foundation items: National Marine Public Industry Research of China (201505026); Natural Science Foundation of Fujian Province (2018J01049, 2015J01137); Subsidized Project for Cultivating Postgraduates Innovative Ability in Scientific Research of Huaqiao University

*Corresponding authors: Tel: 86-592-6166178

E-mail: ZHAO Chun-Gui: chungui@hqu.edu.cn; YANG Su-Ping: yangsuping@hqu.edu.cn

Received: March 16, 2018; **Accepted:** June 14, 2018; **Published online** (www.cnki.net): June 14, 2018

基金项目: 国家海洋公益性行业科研专项(201505026); 福建省自然科学基金(2018J01049, 2015J01137); 华侨大学研究生科研创新能力培育项目

*通信作者: Tel: 86-592-6166178

E-mail: 赵春贵: chungui@hqu.edu.cn; 杨素萍: yangsuping@hqu.edu.cn

收稿日期: 2018-03-16; **接受日期:** 2018-06-14; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2018-06-14

Biofilm formation characteristics in marine purple sulfur bacterium *Marichromatium gracile* YL28 with high nitrite removal efficiency

ZHOU Guang-Jing ZHANG Xiao-Bo ZHU Bi-Tong ZHAO Chun-Gui* YANG Su-Ping*

(Department of Bioengineering and Biotechnology, Huaqiao University, Xiamen, Fujian 361021, China)

Abstract: [Background] The bacterial biofilm has gained widespread application in waste water treatment field. However, the bacterial strains used in marine aquaculture are lack of the adaption to the high salt environment. *Marichromatium gracile* YL28 isolated mangrove is a true salt-requirement marine bacterium. Strain YL28 not only exhibits effective inorganic nitrogen removal ability, moreover, it has better biofilm-forming traits in response to illumination. **[Objective]** This work aims to investigate the characterizations of biofilm formation in marine purple sulfur bacterium *Marichromatium gracile* YL28 with the basis for the development and application of biofilm bioreactor in marine aquaculture. **[Methods]** The characteristics of biofilm formation and nitrogen removal of YL28 were examined by measuring biomass, dehydrogenase activity, polysaccharide content, protein content and inorganic nitrogen removal in simulated seawater system under anaerobically in the light condition. **[Results]** The planktonic bacterial biomass in culture suspension increased gradually with increasing time at 4 000 lx and followed by a rapid decrease in biomass before stationary period, and the biofilm-forming bacterial biomass reached a stabilization after stationary period, indicating that the planktonic bacteria had phototaxis and formed biofilm on the vessel wall. The biofilm forming rate of YL28 was highest (71.21%) under lower light illumination condition (500 lx) for 4 d. The light illumination in the range from 1 000–4 000 lx benefited for biofilm formation (0.60–0.80 mg/cm² dry weight) although its biofilm forming rate (54.64%–68.66%) was not higher than low light condition. The light illumination of 5 000 lx had negative effect on the dehydrogenase activity of biofilm-forming bacteria. The activity of dehydrogenase of both the biofilm-forming bacteria and planktonic bacteria increased with the increasing light intensity, no significant difference in dehydrogenase activity between biofilm-forming bacteria and planktonic bacteria. The biofilm formation limited the illumination penetration into the vessel reactor, however, dehydrogenase activity of planktonic bacteria had not been greatly affected, indicating that the planktonic bacteria in culture suspension mainly grow on the surface of the biofilm and diffused freely to the culture fluid. With the changes in light intensity (1 000–5 000 lx) and incubation time (4–10 d), protein contents in extracellular polymeric substances (EPS) varied significantly. The highest protein content was observed at 3 000 lx, while polysaccharide content had little change. At 4 000 lx, the removal efficiency to ammonium and nitrite had no obvious difference between biofilm-forming bacteria and planktonic bacteria in culture suspension, whereas the nitrate removal efficiency by biofilm-forming bacteria was higher than that by planktonic bacteria. **[Conclusion]** YL28 had better biofilm-forming traits, and the mechanism of biofilm formation was that bacteria grew on the vessel wall in response to illumination. The biofilm-forming bacteria were capable of efficiently removing ammonium and nitrite. This study shows great application potential for eliminating nitrogen pollution in marine aquaculture.

Keywords: Purple bacteria, *Marichromatium gracile*, Biofilm, Nitrogen removal

细菌生物膜(Bacterial biofilm, BF)是微生物通过胞外细胞器和 EPS 附着在物体表面形成的高度密集化的群落结构^[1]。这种结构广泛存在于自然界

中,是细菌在漫长的进化过程中通过信息交流形成的对环境具有更强适应性的一种存在方式或手段。现有研究表明,生物膜具有双重效应。一方面,人

类、经济植物和动物的许多致病菌(如人类致病菌 *Pseudomonas aeruginosa*、*Pseudomonas fluorescens* 和 *Staphylococcus aureus*)可通过群体感应效应形成生物膜,这是顽固性疾病难以根治的主要原因^[2-3];船舶、桥梁、渔网、管道等与海水接触,其表面可形成生物膜,是生物污损和锈蚀的重要原因^[4]。面对这种危害,群体感应淬灭机制被认为是有效的解决策略,如 *Bacillus thuringiensis* 可通过分泌酯酶降解 *Klebsiella pneumoniae* 产生的群体感应信号分子,从而避免细菌生物膜的形成,有效缓解病症^[5-6]。目前,群体感应淬灭已在农业、水产养殖、医疗、海洋生物污损等领域有着广泛和深入的研究,取得了长足进展,也被认为是新药开发或现有农药的可能替代方案或补充策略^[7]。另一方面,生物膜中的菌体密度大、代谢活力强,能抵抗抗生素和消毒剂等,环境适应性强,在污染环境治理和物质转换等方面已呈现出良好的应用前景^[8]。目前,生物膜在环境治理等方面的研究主要涉及生物膜的形成过程、组成分析、影响因素、生物膜吸附材料及生物膜反应器的研究与应用等,例如在生物膜反应器研究方面,目前有序批式、移动床、平板、管式和柱式等生物膜反应器,处理的废水包括处理猪场沼液、鱼虾养殖废水、丁腈橡胶废水、市政废水、高氨氮废水、煤气化废水、炼油污水以及含萘酚和氯酚等,结果显示利用生物膜可有效去除废水中的化学需氧量(Chemical oxygen demand, COD)、氮素及污染物,同时也能产氢^[9-10];在生物膜吸附材料方面,考察了陶瓷、有机纤维、玻璃纤维和丝瓜络等表面电荷、亲疏水性、形貌和功能性化学修饰等物化特性对细胞粘附和生物膜形成的影响^[11-12];在生物膜形成影响因素方面,探求了微生物本身特性(如运动性、趋向性、分泌物等)、环境因素(如温度、pH、氧气、光照和营养物)以及生长抑制剂(紫外线和香草醛等)等的影响^[5,11];在菌株方面,目前报道的菌株主要有 *Bacillus subtilis*、*Rhodopseudomonas palustris* CQK01、*Rhodospirillum rubrum* ATCC25903 和 *Rhodobacter sphaeroides*

O.U.001 等纯菌株^[9-10,13],也有活性污泥混合菌群^[14],但这些菌株大多源自陆源或属于淡水种类,难以应用于含盐海水养殖废水处理或脱氮,而且在培养过程中菌体细胞主要呈游离态分布于培养容器内,仅有少部分菌体在反应器表面形成生物膜。因此,针对性地开发和研究成膜能力强、具有应用价值的耐盐菌株是非常必要的。

本课题组前期研究中,从福建泉州洛阳桥红树林中分离获得了一株需盐的海洋不产氧光合细菌(Anoxygenic phototrophic bacteria, APB) YL28 菌株,被鉴定为海洋着色菌(*Marichromatium gracile*)^[15]。该菌株能够有效去除海水养殖水体中高浓度的无机三态氮^[16-17]尤其是亚硝氮,是目前亚硝氮去除最有效的 APB 菌株之一^[18]。研究过程中我们还发现该菌株具有很强的成膜能力,60%的菌体在培养系统中能够成膜且成膜时间较短。鉴于此,本研究在适宜条件(温度、盐度和 pH)下,着重研究了光照强度对 *Marichromatium gracile* YL28 生物膜形成、生物活性和胞外复合物中多糖和蛋白组分的影响;同时,选择最适光照强度着重比较了成膜菌体和培养液中游离菌体对无机三态氮的脱氮活性。本研究对海水养殖水体生物膜反应系统的开发和应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

海洋着色菌(*Marichromatium gracile*) YL28 分离自福建泉州洛阳桥红树林潮间带泥水样,其 16S rRNA 基因的 GenBank 登录号为 JF719917,由本实验室鉴定与保藏^[15]。

1.2 主要试剂、仪器和培养基

酵母浸出粉购自 Thermo Fisher Oxoid 公司;海藻寡糖采用酶法降解龙须菜琼胶所得,单糖聚合度主要为 1、3、4 和 6,纯度达 95%以上,由国家海洋局第三海洋研究所提供;其他化学试剂均为国产分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。紫外可见分光光度计,翱艺仪器(上海)有限公司;台式高速离心机,Eppendorf 公司;数控超声波清洗器,

昆山市超声仪器有限公司。

液体培养基(g/L): 在 Pfenning 培养基基础上^[15], 添加酵母浸出粉 2.0, 海藻寡糖 2.0, NaCl 30.0, 调节 pH 约为 7.0。

1.3 菌种悬液的制备

将 YL28 菌种接种在液体培养基中, 30 °C 光照厌氧培养 3 d, 8 000 r/min 离心 5 min 收集菌体细胞, 用无菌 2.0% NaCl 洗涤菌体 1 次, 配制成 OD_{660} 约 2.5 的菌悬液作为生物膜形成的菌种。

1.4 生物量测定

培养液中游离菌体生物量测定采用比浊法, 使用光程为 10 mm 比色杯, 在分光光度计上测定 OD_{660} 。

生物膜菌体生物量的测定: 按 2.0% (体积比) 接种量将菌悬液接种到含有培养基的蓝盖瓶内, 总容积为 140 mL, 接种后用无菌培养基充满培养容器, 在设定的光照强度下 30 °C 厌氧培养, 将菌悬液取出移至另一个容器中, 然后用 2.0% NaCl 漂洗培养瓶中的生物膜 1 次, 弃去漂洗液, 再加入 2.0% NaCl 溶液, 室温 80 W 超声波连续处理 15 min, 将培养容器内的生物膜洗下来, 用无菌玻璃珠打散生物膜, 100 目尼龙网过滤取滤液, 培养瓶和玻璃珠用 2.0% NaCl 洗涤, 合并滤液与洗涤液定容至 140 mL, 用于生物膜菌体生物量测定。培养容器中生物膜生物量(OD_2)和培养液中游离菌体生物量(OD_1)之和表示培养容器中总生物量(OD_1+OD_2), 采用公式 $R(\%) = OD_2 / (OD_1 + OD_2) \times 100\%$ 计算生物膜的成膜率。

干重(Dry weight, DW)的测定: 取 100 mL 菌悬液 8 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 105 °C 烘干 24 h, 称质量。菌体质量与培养容器内表面积的比值表示单位面积内生物膜质量(mg/cm^2)。

1.5 生物膜胞外复合物蛋白和多糖含量测定

刮取培养容器中的生物膜, 105 °C 烘干 4 h, 取样, 加入含有 2.0% NaCl 的 2.0% EDTA 溶液, 振荡提取 4 h^[20], 用考马斯亮蓝法和苯酚-硫酸法测定蛋白质和多糖含量^[9]。

1.6 脱氢酶活性测定

将生物膜和游离菌体细胞用 2.0% NaCl 洗涤 1 次, 制备成 OD_{660} 约 2.0 的菌悬液, 按照干重与 OD_{660} 关系计算菌悬液中菌体的质量。取 5.0 mL 菌悬液, 采用氯化三苯基四氮唑(TTC)法^[19]测定样品脱氢酶活性。脱氢酶能将 TTC 还原成甲瓞(TF), 以单位质量菌体产生 TF 的量表示其脱氢酶活性, 单位为 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。

1.7 脱氮活性测定

分别用 2.0% 的 NaCl 溶液洗涤生物膜菌体和游离菌体 1 次, 制备成 OD_{660} 为 2.0 的菌悬液, 将菌悬液按 2.0% (体积比) 分别接种在含有无机三态氮的培养基中, 其中氨氮、硝氮和亚硝氮浓度分别为 6.22、6.14 和 4.52 mmol/L, 接种后于 30 °C、3 000 lx 条件下光照厌氧培养。培养体系为 140 mL 蓝盖瓶, 每个样品设置 3 个重复。培养过程中取样, 8 000 r/min 离心 5 min 取上清液, 采用次溴酸钠氧化法(GB12763.4-91)、N-(1-萘基)-乙二胺分光光度法(GB13580.7-92)和紫外分光光度法(HJ/T3462007)分别测定氨氮、亚硝氮和硝氮含量。无机三态氮的含量均以氮素的含量计算, 无机氮残留率(r)依据公式 $r(\%) = c_t / c_0 \times 100$ 计算, 式中 c_0 和 c_t 分别表示无机三态氮初始和测定时的浓度(mmol/L)^[16]。

1.8 显著性分析

使用 SPSS16.0 软件中单因素方差分析(One-way ANOVA)对测定指标进行显著性分析, 显著性水平设为 0.05。

2 结果与分析

2.1 海洋着色菌 YL28 生物膜形成曲线

培养容器中生物膜和游离菌体生物量(OD_{660})随时间变化曲线如图 1A 所示。在 4 000 lx 光照时, 随着时间延长, 游离菌体生物量逐渐升高, 约 42 h 时达到最大, 然后快速降低, 约 168 h 后生物量又逐渐呈现上升趋势; 而生物膜生物量约在 48 h 内快速增加, 之后逐渐趋于稳定, 168 h 后也逐渐降低。由此可见, 游离菌体的生长不符合典型的生长

曲线,未见到明显的稳定期,42 h 生物量开始降低,168 h 呈现升高的趋势。这种生长特性可能是趋光贴壁成膜细菌的生长特性,其主要原因可能是培养开始时,培养容器中菌体密度低、透光良好,培养液中菌体快速生长,在经过短暂的延滞期(18 h)后,趋光贴壁成膜菌体也快速生长,培养至 42 h 时,贴壁成膜生物量达到了特定的菌密度(OD_{660} 为 0.774),在容器表面形成肉眼可见的生物膜,透光率降低,菌体在膜表面或膜附近生长速率较高,并趋光贴附在生物膜上,导致培养液中游离菌体生物量逐渐降低,而贴壁成膜生物量仍然快速升高,至 78 h 时趋于稳定, OD_{660} 维持在约 1.400,168 h 后成膜生物量逐渐降低,观察到部分生物膜从容器表面脱落,从而导致培养液中菌体生物量升高。

培养容器中菌体成膜率随时间变化曲线如图 1B 所示。在经过明显的延滞期后,生物膜成膜率快速升高,之后趋于稳定达到成熟期,然后又进入老化脱落阶段。在低光照强度(1 000 lx)时,延滞期较长(24 h);随光照强度升高(如 4 000 lx),延滞期缩短(18 h);进一步提高光照强度(5 000 lx),延滞期又明显延长(44 h)。尽管延滞期有明显不同,但不同光照强度下达到最大成膜率的时间相近,约在 96 h 趋于稳定,其成膜率分别是 64.07% (1 000 lx)、68.66% (4 000 lx)和 45.04% (5 000 lx)。由此可见,低光照强度时成膜率较高,高光照强度时成膜率较低。

2.2 光照强度对生物膜形成及其脱氢酶活性的影响

为了进一步阐明光照强度变化和成膜的关系,继续研究光照强度对生物膜形成和脱氢酶活性的影响。光照强度对培养 4 d 的 YL28 生物膜和游离菌体生物量及成膜率的影响如图 2A 所示。在选择的光照强度范围内,随着光照强度的增加,总生物量、生物膜生物量和成膜率呈先升高后逐步降低的趋势,游离菌体生物量则呈先升高后趋于稳定的趋势。低光照强度(500 lx)时成膜率最高(71.21%),但总生物量较低,贴壁生物量并不高。

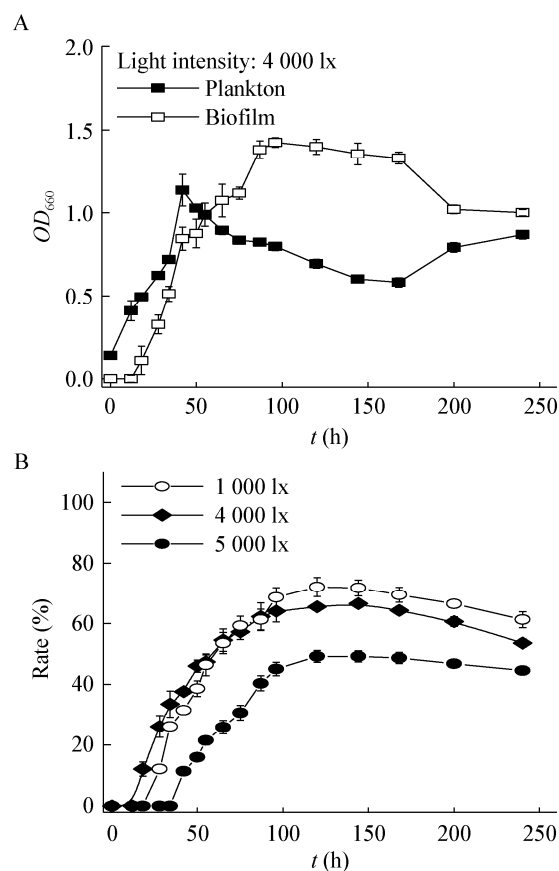


图 1 培养容器中生物膜和菌悬液中菌体生物量(A)和菌体成膜率(B)

Figure 1 The biomass (A) and biofilm-forming rate (B) in biofilm and plankton, respectively

1 000–4 000 lx 是适宜菌体生长和生物膜形成的光照强度范围,3 000 lx 时总生物量最大(OD_{660} 为 2.386),1 000 lx 时贴壁生物量最大(OD_{660} 为 1.501)。当光照强度达到 5 000 lx 时,由于光损伤增强,体系中总生物量和贴壁生物量降低,而游离菌体生物量(OD_{660} 为 1.033)未见明显降低($P < 0.05$),表明高光照强度对生物膜形成具有抑制作用。膜生物量通常用单位面积上的菌体质量来表示,图 2C 是光照强度对单位面积生物膜的影响,其变化规律与比浊法测定的规律一致,呈先升高后逐步降低的趋势。

光照强度对脱氢酶活性影响的结果如图 2B 所示。与游离菌体相比,在 500–4 000 lx 光照强度范

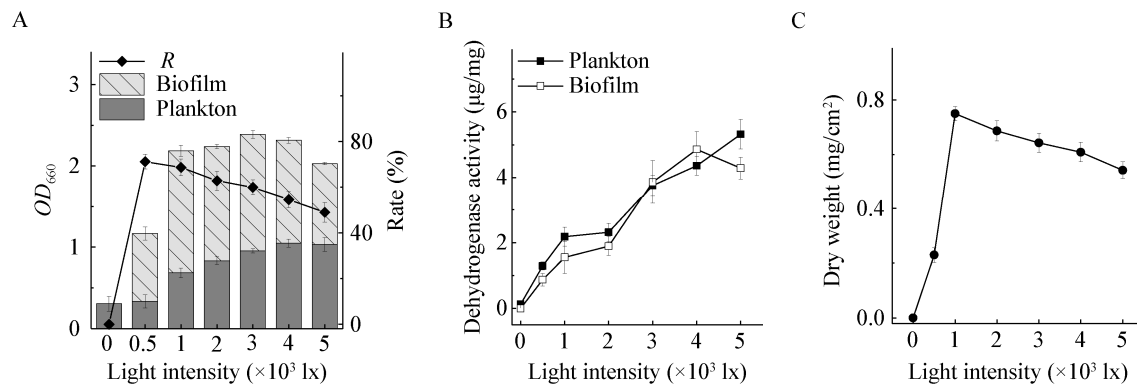


图 2 光照强度对生物膜和游离菌体生物量和成膜率(A)、脱氢酶活性(B)和生物膜干重(C)的影响(4 d)

Figure 2 Effects of light intensity on bacterial biomass and biofilm-forming rate (A), dehydrogenase activity (B) and dry weight of biofilm (C) in biofilm and plankton (4 d)

围内,生物膜菌体脱氢酶活性未见明显降低。随着光照强度增加,生物膜和游离菌体的脱氢酶活性均升高,表明菌体代谢活性随光照强度的升高而增强。当光照强度达 5 000 lx 时,生物膜菌体脱氢酶活性受到明显抑制($P < 0.05$),而游离菌体脱氢酶活性未受影响。这一结果与高光照强度对菌体生长代谢影响的规律一致^[14]。生物膜贴附于受光面的表面,由于生物膜的阻挡作用,一般认为培养液中游离菌体比生物膜菌体及其界面所接受的光照强度弱,因此游离菌体的脱氢酶活性理论上应该低于生物膜菌体,而本研究在 500–4 000 lx 光照强度范围内,游离菌体的脱氢酶活性并未明显降低,其原因可能是菌体趋光形成生物膜并在生物膜及其界面生长之后再扩散到培养液中。

2.3 生物膜胞外复合物蛋白和多糖含量的测定

已有研究表明,EPS 主要包括细菌表面的胞外蛋白(Protein, PN)和胞外多糖(Polysaccharide, PS)等聚合物,它可以改变细胞表面的物理化学特性,对于生物膜的形成和稳定性具有非常重要的作用^[21]。本文研究了光照强度对贴壁生物膜 EPS 的影响,结果如图 3 所示。在不同的光照强度和培养时间下, EPS 中 PN 含量变化较大, PS 含量变化很小, EPS (PN+PS)含量主要受 PN 含量变化的影响。在培养 4 d 和 10 d 时,随着光照强度的变化,

生物膜 EPS 含量、PN 含量以及 PN 与 PS 比值(PN/PS)呈现出一致的变化规律,即在适宜光照强度(3 000 lx)时,菌体代谢活性高,菌体合成 PN 能力高,而在低光照强度(1 000 lx)和高光照强度(5 000 lx)时,PN 合成能力较低, EPS 含量也较低。其原因是光照不足时,光合作用能力较低,菌体代谢活性也较低;而光照强度过高时,光辐射损伤导致菌体代谢活性降低。趋于成熟的生物膜继续培养,如从第 4 天继续培养到第 10 天时,生物膜菌体仍在合成 EPS, PN 含量大幅度升高。现有研究表明, EPS 有助于生物膜的稳定,能增强微生物

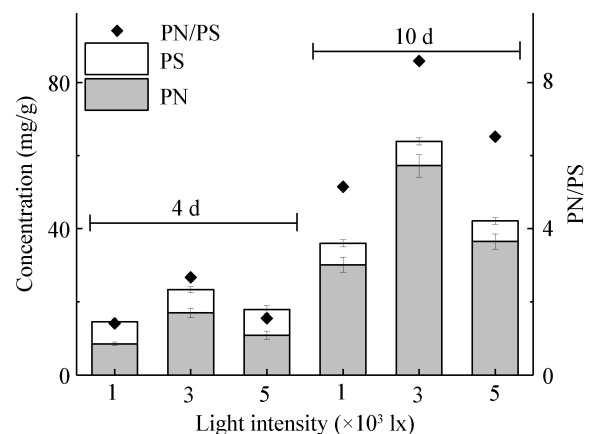


图 3 光照强度对生物膜胞外复合物(EPS)含量的影响

Figure 3 Effects of light intensity on the contents of EPS

对外界环境的抵抗能力以及胞外蛋白酶的积累^[9]。

由此可见,适当地延长培养时间,能够提高生物膜中 EPS 含量,进而增强生物膜的稳定性,提高生物膜的抗逆能力和胞外水解能力,将有利于膜生物反应器的高效应用。

2.4 生物膜的脱氮活性

YL28 菌株具有良好的脱氮能力,那么其形成的生物膜是否也具有良好的脱氮活性?考虑到生物膜中的菌体活性是影响膜生物反应器效率的关键因素,依据 2.2 的结果选择 4 000 lx 下脱氢酶活力最高的生物膜研究其脱氮活性。如图 4 所示,游离菌体对无机三态氮氨氮、硝氮和亚硝氮去除率分别为 59.73%、91.20%和 100% (3 d);与游离菌体相比,生物膜菌体对氨氮和亚硝氮去除能力并未受到明显影响($P>0.05$),对硝氮的去除速率虽有所降低,1.5 d 时影响明显,但 7 d 也能将之完全去除。由此可见,在无机三态氮共存体系中,YL28 生物膜菌体在 4 000 lx 光辐射下仍保持了良好的无机三态氮去除活性。虽然去除硝氮能力受到明显影响,但仍具有良好活性,这也可能是由于将硝氮还原为亚硝氮的硝酸盐还原酶对光敏感所致。生物膜对膜菌体的光损伤具有保护作用,表现在菌体细胞氨氮和亚硝氮转化酶的活性没有受到光的影响。

3 讨论与结论

高密度和集约化水产养殖的快速发展,在带来经济效益的同时也付出了惨重环境代价,如养殖水体的富营养化、有毒有害物质(氨氮和亚硝氮等)不能及时转化和去除等问题,不仅破坏了水体的生态平衡,也严重制约了养殖业的发展,养殖废水外排也对环境水体造成了严重的影响。如何及时有效地去除水体中的有毒有害物质,恢复养殖水体的微生态平衡,以及养殖外排水体和循环养殖水体的处理,是解决这些问题的关键。微生物水体治理和修复技术对此已经发挥出重要作用^[22]。近年来,生物膜废水治理和修复技术的研究及应用取得了明显进展。与传统的以碎石、陶粒、玻璃和有机纤维为填料的生物滤池相比,生物膜反应器具具有受环境影响小、传质条件好和生物膜更稳定等优势^[23]。目前应用膜生物反应器的菌株主要是陆源淡水种,难以适应高浓度含盐海水废水的处理。另外,目前报道在平板生物膜反应器中,光合细菌 13 d 才能形成成熟的光合生物膜,3 000–5 000 lx 光照培养时,其膜生物量干重在 0.4–0.6 mg/cm² 范围内^[14],而本研究中 *M. gracile* YL28 在 1 000–4 000 lx 光照下培养 4 d,其生物膜干重即可达到 0.6–0.8 mg/cm²,而且该菌株具有高耐盐和高效率去除海水养殖水体中无机三态氮的能力^[16–18]。由此可见,YL28 具有

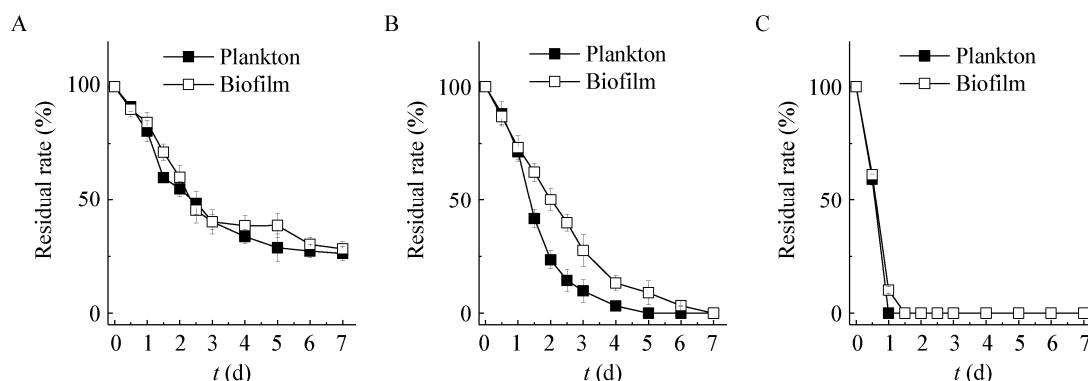


图 4 生物膜菌体(□)和培养液菌体(■)对氨氮(A)、硝氮(B)和亚硝氮(C)去除活性的比较

Figure 4 A comparison of the removal activities of ammonia (A), nitrate (B) and nitrite (C) between biofilm (□) and planktonic (■)

良好的成膜特性,有望开发成能适应于高盐海水水体膜生物反应器的优良菌株。

Sauer 等^[24]和 Friedlander 等^[25]利用显微观测技术研究细菌生物膜的形成过程,发现生物膜脱落后,游离菌体可以重新吸附于载体表面形成新的生物膜。Stoodley 等^[26]比较分析了 *Pseudomonas aeruginosa* 在不同培养时期生物膜菌体和浮游菌体的蛋白质组成,结果显示从生物膜上脱落细菌的蛋白质组成与浮游细菌很相近,说明膜菌体可以转换成游离菌体,游离菌体又可以进一步生长形成新的生物膜,但贴附在膜上的菌体由于胞外聚合物的存在而在功能上与游离菌体有很大差异,生物膜菌体释放毒力因子有利于致病菌的感染。Watnick 等^[27]研究了水体自然菌群在岩石等固体表面的生物膜形成,提出了动态的生物膜模型,即菌体不断地从生物膜中游离出来,占据新的位点,形成新的生物膜。本文的特色和创新之处是以一株真正海洋或需盐生长的不产氧光合细菌 *M. gracile* YL28 为模型生物,以生物膜和游离菌体的生物量及脱氢酶活性为指标,研究了其生物膜形成过程,阐明了光合细菌生物膜的形成规律。本研究表明:生物膜形成过程中,随着培养时间的延长,培养容器中游离菌体生物量逐渐升高,而在稳定期前生物量又快速降低,成膜生物量则经过延滞期后逐渐升高后趋于稳定。由此可见,培养过程中游离菌体能趋光贴壁生长并形成生物膜。光照在 1 000–4 000 lx 范围内,随着光照强度升高,成膜菌体和培养液游离菌体脱氢酶活性升高,而且成膜菌体和培养液游离菌体脱氢酶没有呈现明显差异。由于生物膜的形成导致培养容器内部光照受到严重限制,反应器内部游离菌体脱氢酶活性理论上应该降低,但检测结果并没有降低,由此推测,培养液中的菌体主要是在生物膜及其界面生长之后再游离扩散到培养液中。黑暗时该菌体生长速率很低,也未检测到明显的生物膜形成。综合分析表明,该菌株生物膜形成过程主要是游离菌体趋光贴壁生长,在容器内表面形成生物膜,进而导致反应器内部光照受限,甚至成为暗

区,而该菌株在黑暗环境中基本不能生长,由此说明,游离菌体更容易在受光的生物膜表面生长并贴附在膜上,也能游离分散在菌悬液中。

综上所述, *M. gracile* YL28 具有良好的生物膜形成能力,该菌株的成膜规律是游离菌体趋光贴壁生长成膜,由于光照受限原因,游离菌体更容易在膜表面生长并贴附在膜上,也能游离分散到菌悬液中;与菌悬液游离菌体相比,成膜菌体的脱氢酶活性、氨氮和亚硝氮去除活性未受到明显影响,硝氮去除活性受到影响。本文为海水养殖水体处理光合细菌生物膜反应器研究提供了理论参考,也为光生物膜的形成机制提供了研究菌株。

REFERENCES

- [1] O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development[J]. Annual Review of Microbiology, 2000, 54(1): 49-79
- [2] Von Klitzing E, Ekmekci I, Bereswill S, et al. Intestinal and systemic immune responses upon multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* colonization of mice harboring a human gut microbiota[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 2590
- [3] Kan JH, An L, Wu Y, et al. A dual role for proline iminopeptidase in the regulation of bacterial motility and host immunity[J]. Molecular Plant Pathology, 2018, 19(8): 2011-2024
- [4] Chen XF, Hou J, Mu ZJ, et al. Study on the adhesion and variety of marine fouling organisms[J]. Development and Application of Materials, 2011, 26(1): 24-28 (in Chinese)
陈翔峰, 侯健, 穆振军, 等. 海洋污损生物变化及附着规律研究[J]. 材料开发与应用, 2011, 26(1): 24-28
- [5] Wang Y, Yu YM, Zhang JJ, et al. Exploitation and application of quorum sensing and quorum quenching in marine microorganisms[J]. Biotic Resources, 2017, 39(6): 413-422 (in Chinese)
王岩, 于雅萌, 张静静, 等. 海洋微生物群体感应与群体感应淬灭的开发利用[J]. 生物资源, 2017, 39(6): 413-422
- [6] Dong YH, Xu JL, Li XZ, et al. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(7): 3526-3531
- [7] Mansfield J, Genin S, Magori S, et al. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology[J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(6): 614-629
- [8] Garrett TR, Bhakoo M, Zhang ZB. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces[J]. Progress in Natural Science, 2008, 18(9): 1049-1056
- [9] Xue YQ, Guo JB, Lian J, et al. Effects of a higher hydraulic shear force on denitrification granulation in upflow anoxic sludge

- blanket reactors[J]. Biochemical Engineering Journal, 2016, 105: 136-143
- [10] Tian X, Sun SP, Zhou CB, et al. Improving hydrogen production and substrate degradation in a photobioreactor coupling with a membrane-aerated biofilm reactor[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2017, 11(1): 613-619 (in Chinese)
田鑫, 孙少鹏, 周崇波, 等. 光合产氢-膜曝气生物膜反应器耦合系统产氢与底物降解特性[J]. 环境工程学报, 2017, 11(1): 613-619
- [11] Tuson HH, Weibel DB. Bacteria-surface interactions[J]. Soft Matter, 2013, 9(18): 4368-4380
- [12] Xiong FZ, Zhao XX, Liao YH, et al. Effects of surface properties on biofilm formation and the related applications[J]. Microbiology China, 2018, 45(1): 155-165 (in Chinese)
熊富忠, 赵小希, 廖胤皓, 等. 材料表面特征对生物膜形成的影响及其应用[J]. 微生物学通报, 2018, 45(1): 155-165
- [13] Basak N, Das D. Photofermentative hydrogen production using purple non-sulfur bacteria *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 in an annular photobioreactor: a case study[J]. Biomass and Bioenergy, 2009, 33(6/7): 911-919
- [14] Cao JS, Lu WT, Feng Q, et al. Effect of light on cultivation of phototrophic biofilm[J]. China Water & Wastewater, 2011, 27(3): 20-23, 28 (in Chinese)
操家顺, 陆文涛, 冯骞, 等. 光照对光能自养生物膜培养的影响[J]. 中国给水排水, 2011, 27(3): 20-23, 28
- [15] Zhao JY, Fu YN, Zhao CG, et al. Identification and characterization of a purple sulfur bacterium from mangrove with rhodopin as predominant carotenoid[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(10): 1318-1325 (in Chinese)
赵江艳, 傅英楠, 赵春贵, 等. 一株高含玫红品的红树林海洋紫色硫细菌分离鉴定及特性[J]. 微生物学报, 2011, 51(10): 1318-1325
- [16] Zhang XB, Zhu BT, Chan ZH, et al. Effect of organic carbons on the removal of inorganic nitrogen coexisting in marine aquaculture by a marine purple sulfur bacterium, *Marichromatium gracile* YL28[J]. Microbiology China, 2017, 44(5): 1017-1027 (in Chinese)
张晓波, 朱笔通, 产竹华, 等. 有机碳对海洋着色菌 YL28 去除无机三态氮的影响[J]. 微生物学通报, 2017, 44(5): 1017-1027
- [17] Zhou GJ, Zhang XB, Zhu BT, et al. Effects of nitrogen removal in polluted mariculture water containing sediments by *Marichromatium gracile* YL28[J]. Biotic Resources, 2017, 39(6): 441-447 (in Chinese)
周广静, 张晓波, 朱笔通, 等. 海洋着色菌 YL28 对含沉积物的海水养殖水体氮污染去除效应的研究[J]. 生物资源, 2017, 39(6): 441-447
- [18] Jiang P, Zhao CG, Jia YQ, et al. Inorganic nitrogen removal by a marine purple sulfur bacterium capable of growth on nitrite as sole nitrogen source[J]. Microbiology China, 2014, 41(5): 824-831 (in Chinese)
蒋鹏, 赵春贵, 贾雅琼, 等. 以亚硝氮为唯一氮源生长的海洋紫色硫细菌去除无机三态氮[J]. 微生物学通报, 2014, 41(5): 824-831
- [19] Ceyhan N, Ozdemir G. Extracellular polysaccharides produced by cooling water tower biofilm bacteria and their possible degradation[J]. Biofouling, 2008, 24(2): 129-135
- [20] Frølund B, Palmgren R, Keiding K, et al. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin[J]. Water Research, 1996, 30(8): 1749-1758
- [21] Sheng GP, Yu HQ, Li XY. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review[J]. Biotechnology Advances, 2010, 28(6): 882-894
- [22] Bharti A, Velmourougane K, Prasanna R. Phototrophic biofilms: diversity, ecology and applications[J]. Journal of Applied Phycology, 2017, 29(6): 2729-2744
- [23] Zhu GJ. Analysis of effective application of biofilm technology in wastewater treatment[J]. Resources Economization & Environmental Protection, 2014(12): 50, 61 (in Chinese)
朱国军. 生物膜法技术在污水处理中的有效应用分析[J]. 资源节约与环保, 2014(12): 50, 61
- [24] Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, et al. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(4): 1140-1154
- [25] Friedlander RS, Vlamakis H, Kim P, et al. Bacterial flagella explore microscale hummocks and hollows to increase adhesion[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(14): 5624-5629
- [26] Stoodley P, Wilson S, Hall-Stoodley L, et al. Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(12): 5608-5613
- [27] Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(10): 2675-2679