



上海海洋大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：孟霞

日期：2010年6月13日

上海海洋大学学位论文授权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权上海海洋大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ，在 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密

学位论文作者签名：孟霞

指导教师签名：[Signature]

日期：2010年6月13日

日期： 年 月 日

上海海洋大学硕士学位论文 答辩委员会成员名单

姓名	工作单位	职称	备注
杨宇峰	暨南大学	教授	主席
林钦	南海水产研究所	研究员	委员
李纯厚	南海水产研究所	研究员	委员
甘居列	南海水产研究所	研究员	委员
廖秀丽	南海水产研究所	助理研究员	秘书
答辩地点	南海水产研究所	答辩日期	2010-6-13

网箱养殖沉积物中有机物降解细菌 与硫化细菌的筛选及鉴定

摘 要

海水鱼类网箱养殖是一种开放式、人工营养型、高密度和集约化的科学养鱼方式,在我国经过近30年的发展,已成为广大沿海地区最重要的海水养殖产业之一。然而,海水鱼类网箱养殖方式自身又是一个对海域生态环境产生负面影响的污染源,尤其在浅海网箱养殖生产过程中产生的残饵和鱼类排泄物直接沉积在网箱底部并长期积累,已导致大多数网箱养殖场生态环境出现不同程度的恶化。其中,有机污染和硫化物污染是网箱养殖环境的主要污染特征,本研究从大亚湾大鹏澳网箱养殖场沉积环境中筛选出能将残饵有机物降解和硫化物转化为硫酸盐的高效土著细菌,为进一步探索网箱养殖环境微生物原位修复技术研究,解决网箱养殖业面临的重要环境制约问题有一定的科学意义。主要研究结果如下:

1、以网箱养殖饵料(野杂鱼鱼糜)作为选择压力,通过2个月的间歇曝气选择性富集,分离出6株细菌,通过测定其对野生杂鱼鱼糜饵料有机物的降解能力,进一步筛选出4株对鱼糜饵料有机物有快速、高效降解能力的细菌,7日培养生化需氧量(BOD_7) 在 $1040\sim 1140\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间,5日培养化学需氧量(COD_{Mn}) 去除率在 $13.58\%\sim 46.9\%$ 之间,有机物的可生化降解性(BOD_5/COD_0) 在 $81.56\%\sim 89.43\%$ 之间。4株细菌两两组合的5日培养 COD_{Mn} 平均去除率为 $64.91\pm 6.51\%$,是单株菌平均去除率($30.60\pm 13.63\%$)的2倍多;而 BOD_5/COD_0 在 $86.10\%\sim 89.13\%$ 之间,与单株菌间没有明显差。通过部分长度16S rDNA 序列分析,与 GenBank 和 EMBL 数据进行同源性检索,并结合细菌形态及生理生化特征,结果表明,有2株细菌分别隶属于表皮葡萄球菌属(*Staphylococcus* sp.) 和盐单胞菌属(*Halomonas* sp.),另2株分别与盐单胞菌属(*Halomonas* sp.) 和假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.) 相近。

2、以浓度为 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $\text{Na}_2\text{S}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 作为选择压力,通过2个月的间歇曝气选择性富集,分离筛选出10株能将硫化物高效转化为硫酸盐的细菌。筛选出来的细菌在浓度为 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硫代硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3\cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 液体培养基中连续培养8日,pH 值由最初的6.8下降到5.0以下后趋于稳定;硫化物质量浓度从最初的 $1280\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 降到 $374\sim 424\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间,硫化物去除率在 $66.9\%\sim 70.8\%$ 之间;硫酸根离子的质量浓度从最初的 $2327\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 增加到 $5903\sim 6243\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,硫酸根转化率在60%以上。

通过部分长度16S rDNA 序列分析，与GenBank和EMBL数据进行同源性检索，并结合细菌形态及生理生化特征，结果表明，有8株细菌属于盐硫杆状菌属 (*Halothiobacillus* sp.)，另外2株则属于食烷菌属 (*Alcanivorax* sp.)。

关键词：海水网箱养殖，有机物降解细菌，硫氧化细菌，细菌筛选，细菌鉴定

Screening and identification of bacteria for organic pollutant degradation and sulfuroxidation in sediment in marine cage fish farming area

ABSTRACT

Marine cage fish farming first began in Guangdong coastal waters of China at the end of 1970s, and it has grown dramatically during the last three decades, and become one of the important marine aquaculture industries in China. However, Marine cage fish farming generates high pollution loadings, especially in the sea bottom, where high sediment oxygen demand, anoxic sediments, production of toxic gases and a decrease in benthic diversity may result. In this study, local bacteria strains for organic pollutant degradation and sulfuroxidation were screened from the sediment in the marine cage fish farm in Dapeng Ao Cove in the east coast of Shenzhen City, it have some scientific significance to further explore the bioremediation for polluted sediment environment in marine cage farm, solve the environmental constraints for marine cage fish farming industry. The results are as following:

1. Six bacteria strains for organic pollutant degradation were isolated after 2 months of selective enrichment incubation with fish meat feed under intermittent aeration condition. Through the ability test for degradation to the liquid wild trash fish culture medium, four bacteria strains were obtained, which are capable of degrading the organic trash fish pollutant rapidly and efficiently, the 7d incubation of biochemical oxygen demand (BOD_7) were between $1\ 040\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\sim 1\ 140\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, the 5d incubation for the average COD_{Mn} removing rate ($1-COD_5/COD_0$) were between 13.58%~46.9%, and the biochemical degradation rate (BOD_5/COD_0) were between 81.56%~89.43%. The 5d incubation for average COD_{Mn} degradation rate of pair-strain mixed bacteria was $64.91\pm 6.51\%$, which was 2 times higher than that $30.60\pm 13.63\%$ of single strain; and BOD_5/COD_0 were between 86.10%~89.13%, there were no obvious differences compared with those of single strain. Sequence analysis based on partial 16S rDNA and performed by BLASTN and FASTA, combined with morphological and physiological biochemical characteristics of bacteria showed that 2 strains belonged to genus of *Staphylococcus* sp. and

Halomonas sp., the other 2 strains maybe belonged to genus of *Halomonas* sp. and *Pseudomonas* sp., respectively.

2. Ten bacteria strains for sulfuroxidation were isolated and purified after 2 months of selective enrichment incubation with $2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{S}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ under intermittent aeration condition. Through the ability test for sulfide removing in liquid medium with $5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, the ten bacteria strains are capable of removing sulfide rapidly and efficiently, after 8d incubation in liquid medium, the pH decreased from the initial 6.8 to 5.0; the sulfide concentration decreased from $1280\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ to $374\sim 424\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, and sulfide removing rate is between 66.9% and 70.8%; the sulfate concentration increased from $2327\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ to $5903\sim 6243\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Sequence analysis based on partial 16S rDNA and performed by BLASTN and FASTA, combined with morphological and physiological biochemical characteristics of bacteria showed that eight strains of bacteria are belonged to genus of *Halothiobacillus*.sp., and the other two are belonged to *Alcanivorax* sp.

Key words: marine cage fish farming, organic pollutant degrading bacteria, sulfuroxidation bacteria, screening, bacterial identification

目 录

中文摘要	I
英文摘要	III
第一章 引 言	1
1.1 我国海水网箱养殖面临的主要环境问题	1
1.2 海水网箱养殖主要污染物及其环境影响	1
1.2.1 有机物和营养盐	1
1.2.2 药物污染	2
1.3 水产养殖环境微生物修复研究进展	2
1.3.1 环境修复功能菌的筛选	3
1.3.2 海水养殖环境微生物修复技术的应用	4
1.3.3 固定化微生物修复技术研究	5
1.3.4 基因工程菌对水产养殖环境的修复研究	6
1.4 研究目的、意义和技术路线	7
1.4.1 研究目的和意义	7
1.4.2 技术路线	7
第二章 有机污染物降解菌的筛选与鉴定	9
2.1 材料和方法	9
2.1.1 培养基	9
2.1.2 菌种选择性富集、分离与纯化	9
2.1.3 有机物降解细菌的筛选	10
2.1.4 筛选菌株对饵料有机物的降解能力	10
2.1.5 筛选菌株对饵料有机物的联合降解能力	10
2.1.6 有机物降解细菌的鉴定	10
2.2 结果	11
2.2.1 菌种分离和纯化	11
2.2.2 有机物降解细菌的筛选	11
2.2.3 筛选菌株对饵料有机物的降解能力	11
2.2.4 菌株组合对饵料培养基的降解能力	13
2.2.5 菌株的鉴定	15
2.2.6 系统发育分析	21
2.3 讨论和小结	22
2.3.1 讨论	22
2.3.2 小结	23
第三章 硫氧化细菌的筛选和鉴定	24

3.1 材料和方法.....	24
3.1.1 试样来源.....	24
3.1.2 培养基.....	24
3.1.3 菌种选择性富集、分离与纯化.....	25
3.1.4 硫氧化细菌的筛选及其对硫化物降解性能试验.....	25
3.1.5 菌种鉴定.....	25
3.1.6 系统发育分析.....	25
3.1.7 分析方法.....	25
3.2. 结果与分析.....	26
3.2.1 菌种分离和纯化.....	26
3.2.2 硫氧化细菌的筛选及其对硫化物去除能力.....	26
3.2.3 细菌鉴定.....	28
3.2.4 系统发育分析.....	34
3.3 讨论和小结.....	34
3.3.1 讨论.....	34
3.3.2 小结.....	35
第四章 结论与研究展望.....	36
4.1 本论文研究的主要结论.....	36
4.2 本论文研究的创新之处.....	37
4.3 研究展望.....	37
参考文献.....	38
附 录.....	38
学术会议.....	45
参与的项目课题、社会活动.....	45
已发表论文.....	45
待发表论文.....	45
致 谢.....	46

第一章 引言

1.1 我国海水网箱养殖面临的主要环境问题

蓝色农业——海水养殖业是我国大农业中发展最快、活力较强、经济效益最高的产业之一。据统计,我国海水养殖产量已由1980年的不足45万吨发展到2008年的1307多万吨,已成为促进农(渔)业结构调整,发展和繁荣农(渔)村经济,富裕农(渔)民的重要产业^[1]。并且,随着我国海水养殖业的进一步调整、优化和发展,海水养殖业在我国农(渔)业经济发展过程中将具有更重要的地位,将发挥更重要的作用。

然而,海水养殖除受外界环境污染因素影响外(工业废水、生活污水、种植农业非点源污染,以及海岸(洋)工程等),海水养殖自身又是一个对养殖生态环境产生负面影响的污染源,易造成养殖“自身污染”,成为影响海水养殖可持续发展的重要制约因素。据《中国渔业生态环境质量公报》(农业部,国家环保总局,2008)^[1],2007年,我国海水重点养殖监测区有26.6%的面积达不到《渔业水质标准》的要求,其中无机氮、活性磷酸盐、化学需氧量和石油类等是主要超标因子,此外,据统计由于环境污染造成的渔业经济损失高达42.7亿元。

1.2 海水网箱养殖主要污染物及其环境影响

海水网箱养鱼是一种开放式、人工营养型、高密度和集约化的鱼类生产系统。这就意味着,养殖鱼类的生长完全依赖于人工投喂饲料,而养殖鱼类对饲料的利用有限,残饵、鱼类排泄物和代谢废物必将大量产生,并直接排放到海洋环境中。此外,养殖中使用的许多化学药品,如用于防治鱼病的消毒剂和抗生素,防止污损生物附着网衣的防污剂,作为营养添加剂的维生素等,以及养殖中的死鱼、生产废弃物、垃圾和废水等也会直接排入或散失到海洋环境中^[2,3]。

1.2.1 有机物和营养盐

海水网箱养鱼产生的主要环境污染物质是有机物和营养盐(N和P)^[2,3]。有关研究资料显示,海水网箱养鱼投喂的饲料中,只有少部分被鱼同化吸收并用于鱼体生长,大部分将进入环境中,约有80~84%的C、64~89%的N和48~92%的P最终将进入环境中。Paez-Osuna^[4]等研究了养殖海域底泥中的物质平衡,发现进入水体的总氮、总磷和颗粒物分别有24%、84%和93%沉积在底泥里,而富集在底泥里的这些污染物,在一定条件下又会重新释放到水体,成为水体污染最重要的内源。也就是说,有机质在底泥内的沉积会使得底泥成为营养物质库,即沉

积物中营养盐向上覆水中释放,在动力作用下营养盐再悬浮,从而造成内源污染或称之为“二次污染”。

海水网箱养殖区多为海湾、河口等浅海水域,水体交换条件有限,网箱养鱼产生的有机物、营养盐、维生素和微量元素等更易积累并促进藻类生长,引发局部海域的富营养化问题^[5-6],甚至引发赤潮灾害,给养殖生产带来重大经济损失。海水养殖废物(有机质)沉积到海底,被耗氧微生物利用分解,造成沉积物环境缺氧,氧化-还原电位(Eh)降低,在厌氧环境下,硫酸盐还原菌和反硝化细菌等厌氧菌将有机污染物分解转化为硫化氢和氨,使得局部水域底质和水体中硫化物和氨盐含量水平升高,进而对水生生物和养殖生物带来毒害。

1.2.2 药物污染

海水网箱养殖中,为了控制鱼病的发生、治疗鱼病、消毒、清除敌害生物和抑制网衣上的污损生物等,经常需要用到许多化学药品。如在配合饲料中添加防腐剂以延长饲料存放时间,加入维生素 B₁₂、人工色素、微量元素等饲料添加剂及抗生素(金霉素、土霉素和呋喃西林等)成分以满足养殖鱼类的营养需求,并提高鱼的抗病能力;对患病鱼类直接用药物(孔雀绿、福尔马林、硫酸铜和敌百虫等)进行消毒处理和治理;用于防止污损生物附着网衣,含有 TBT、铜、锌的防污剂等^[2-3]。这些化学药品将直接或间接(主要通过残饵和鱼粪)进入海洋环境,对海洋生态环境产生一定的影响。

养殖过程中药物的施放在杀灭病虫害的同时,也使水中的浮游生物和有益菌、藻类受到抑制、杀伤甚至死亡。例如,水中的微生物、单细胞藻类等具有抑制细菌繁殖的作用,有益微生物群落有助于提高对虾抗病能力。同时,多种药物大剂量重复使用,会使细菌发生基因突变或转移,容易产生抗药性;一些低浓度或性质稳定药物的残留,还可能在一些水生生物体内产生累积并通过食物链放大,由此对整个水体生态系统中的生物乃至水产品质量安全造成不利影响。

1.3 水产养殖环境微生物修复研究进展

环境修复技术有物理修复、化学修复法及生物修复。物理修复方法主要包括换水法、沉淀通气法、过滤法、清淤法、吸附法、磁分离方法。国内的很多学者利用沸石的吸附作用去除养殖水体中的 NH₄⁺收到了良好效果^[7-8]。但物理法对于污染物仅是稀释、聚集或不同环境中的迁移作用,而且运行费用较高。

化学修复方法包括絮凝法、中和法、络合法、氧化还原法等。使用的化学试剂容易造成二次污染,例如珠江三角洲沿岸曾经大量使用硫酸铜来治理虾病,造成该地区水环境中严重的铜离子污染^[9]。而且化学过程持续的时间往往较短,生态平衡维持时间较短,难以达到修复的目的,一般仅作应急处理。

生物修复方法是利用微生物、植物及其他生物,将环境中的危险性污染物降解为二氧化碳和水或转化为其他无害物质的工程技术系统,可分为原位修复和异位修复^[10]。相对于其他修复技术来说,生物修复具有费用低廉,处理操作简单以及安全性较高等优点,是一项发展潜力较大、环境友好的处理技术^[11-14]。生物修复技术应用到水产养殖环境修复中,对恢复和优化水产养殖环境,推动我国水产养殖业的可持续发展具有重大意义。

植物对污染物的修复研究最多的是关于植物对各种有机物污染、重金属污染的处理,均取得不错的效果。把植物修复应用到水产养殖环境的修复中主要是利用高等水生植物或者藻类的根系、茎叶等功能单位吸收提取养殖废水中的氮、磷等主要污染物以达到净化底质水质的目的。目前应用于水产养殖环境修复的植物主要为藻类,大型海藻江蕨、孔石莼及其红藻、微藻、硅藻、螺旋藻、鞭毛藻等均能显著降低养殖水体中的氮磷营养盐^[15-18]。

动物修复技术是利用搭养的腐食性和滤食性鱼类、贝类、多毛类、棘皮类、蚤类等消除或减轻水体中浮游植物和有机颗粒的污染^[19-27]。

相对于植物修复过程较慢,营养物质集中在植物体内并没有真正去除;滤食性生物等的假粪、生物沉降作用,生物密度过大会加快底质的有机污染来说;微生物修复的彻底性和安全性使得微生物修复更适合用于水产养殖环境的修复中。

微生物修复在生物修复中应用较早,早期生物修复(bioremediation)就是专指微生物修复。微生物修复的原理是以有机物作为微生物生长繁殖所需的碳源和能源,微生物各种酶的作用下,有机物经过厌氧或好氧分解,发生一系列的化学反应,最后降解转化为无害物质的过程^[28-29]。早在 100 多年前就有利用好氧微生物处理污水与废水的记载,但真正使用生物修复工程技术处理环境污染物至今不到 30 年的历史。微生物修复早期主要应用于石油泄漏造成的环境污染,Prichard 等利用微生物进行 Alaska 石油泄漏后的环境修复,取得很好的效果^[30-31]。

由于微生物修复的彻底性、安全性等优点,微生物修复逐渐应用到水产养殖的污染处理中。在养殖底质处理中主要是加快有机物的矿化,在水体中主要利用微生物的脱氮作用去除养殖污水的氮和分解有机污染物。

微生物修复技术在水产养殖中主要应用于养殖环境的原位修复中,主要处理底泥的有机污染和水体的富营养化问题。

1.3.1 环境修复功能菌的筛选

近年来国内外科学家筛选出了不少海水养殖环境有机碳、氮、硫和磷等降解细菌。在海水池塘养殖环境微生物修复研究方面,李秋芬、袁有宪等^[32]从虾池底质中分离、筛选出近 10 株虾池有机物降解菌,初步实验表明,在短时间内,

可降解虾池底部有机物 80%以上, 显示出良好的应用前景。Pinar^[33]等分离出一株细菌 *Klebsiella oxy toca*, 该细菌能够耐受浓度高达 1M 的硝酸盐, 并能有效去除硝酸盐。谢航等^[34]筛选出了一些水产养殖功能菌, 如地衣芽孢杆菌高效能降解残余饲料; 假丝酵母菌、荚膜红假单胞菌分别能高效降解养殖水体氨氮, 亚硝基氮。俞勇等^[35]在实验室条件下, 以 BOD_5/COD 的比值 $>45\%$ 作为可生化性好的指标, 用来衡量细菌降解饵料有机质的能力, 对 106 株虾池养殖环境有机污染物降解细菌进行筛选, 共获 30 株比值在 45%以上的菌株, 最终得到的分别属于弧菌属和芽孢杆菌属的 7 株细菌均能较好地降解对虾饵料。以 BOD 值表示细菌利用对虾饵料的能力时, 在 5d 的时间里 7 株菌都能利用 70%以上饵料, 当考察 COD 的去除率时发现 7 株菌的 COD 去除率在 59.6%~79.2%。

国内很多学者正在积极进行大水面网箱养殖区好氧反硝化菌、有机碳降解细菌、硫化细菌、磷酸盐降解细菌等功能菌的筛选及实践应用效果分析。日本科学家发现枯草菌能分解蛋白质和碳水化合物, 并且抑制海底硫化物的产生, 用该细菌处理海洋底泥有机物, 两个月可减少有机淤泥 20cm^[36]。王亚南^[37]从福建海域近海养殖场底泥筛选出了一些有机碳化合物降解菌及磷降解细菌。

1.3.2 海水养殖环境微生物修复技术的应用

目前, 有益微生物 (EM, Effective Microorganisms) 在海水养殖环境调控与修复, 尤其是池塘养殖环境中得到了广泛应用。由日本琉球大学比嘉照夫^[38]多年潜心研究开发出的一种新型复合微生物活性菌剂 (由光合菌类、醋酸杆菌类、放线菌类、乳酸菌类、酵母菌类等五大菌群 10 个属 125 种微生物组成), 被用做水产养殖的水质净化剂。中国水产科学研究院南海水研究所李卓佳等^[39-40]利用微生物制剂在鱼虾养殖中应用试验表明: 氨氮、亚硝酸盐氮、硫化氢含量比对照组降低 5%以上, 有效地改善了底质, 并能增加水体中的溶氧, 有效的抑制致病菌如弧菌的滋生。改善了养殖水体的菌群结构, 鱼虾的成活率和产量均能得到有效的提高。蔡惠凤等^[41]通过微生物制剂和实施水底界面曝气, 有效促进底泥中好氧微生物的生长, 加速底泥及其上覆水体中有机质的分解, 各实验组底泥的黑臭现象明显得到改善。吴伟^[42]使用假单胞菌和芽孢杆菌属为主的复合微生物制剂处理养殖水体, 硝氮、磷酸盐、硫离子的最大去处率达到 100%; 氨氮、COD_{Cr} 降幅达 95%, 悬浮物去处率达 74%, 溶氧上升 16%, 处理效果惊人。林新华^[43]等的研究表明经优势复合 EM 处理后使养殖水体能达到无污染排放。王彦波^[44]采用高活性生物修复菌制剂, 对养殖中后期的南美白对虾池塘进行了改善水体质量的试验, 结果表明: 水体 COD 和磷酸盐的含量分别降低 31.64%~49.71%和 30.58%~62.43%, 养殖水体的富营养化状态明显改善。

胡德蓉等^[45]调查了网箱养殖区的异氧细菌和硫酸盐还原菌的分布和数量变化情况,并用光合细菌与硫酸盐还原菌进行拮抗试验,初步探讨了用有益微生物修复海水网箱养殖环境。

1.3.3 固定化微生物修复技术研究

在应用与处理技术上,固定化细菌处理工艺等高效处理系统也在研究应用中,该技术是以化学或物理的手段将游离微生物定位或限制在一个特定的空间,使其保持活性,可以被反复利用,经过处理后微生物密度高、活性强、反应速度快,流失少,吴伟^[46]报道菌株固定后对养殖水体的氨氮和亚硝氮转化去处率明显优于游离细菌。郑耀通^[47]应用固定化光合细菌净化养鱼水质试验,发现固定化光合细菌可显著提高氨氮和 COD 的去除率,并能增加溶解氧。经 1 个月的鱼种饲养试验,固定化光合细菌组鱼体重显著大于对照组,成活率也高于对照组。为了降解虾池底部的有机物污染,以沸石为载体,沸石固定化菌对饵料浸出液的降解效果明显高于非固定化菌^[48]。

Sudeep Perumbakkam^[49]运用混合或纯培养群体生物膜中的自然基因转换来进行生物修复,并用共焦显微镜和 PCR 检测有利的显基因突变。J. Zamora-Castro^[50]以低密度聚酯为载体构件的生物膜来对沿海海洋环境的污水进行生物处理,此生物膜主要由 Cyanobacteria genera, Proteobacteria, 及真核生物 Nitzschia 组成。底泥中的各种氮,磷组分保证了生物膜各组分的连续生长。此生物膜在 48 h 内移除了 94%的磷酸盐,79%的铵态氮,78%的亚硝酸盐,83%的硝酸盐,是一种经济,环保的创新污染处理方法。Abbas Rezaee^[51]以醋菌属 *Acetobacter xylinum* 的细菌纤维素(MC)为载体固定假单胞菌 *Pseudomonas Stutzeri*,此技术在最佳缺氧环境条件下表现了高达 $1.6 \text{ kg NO}_3\text{-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ 的硝酸盐去除浓度。目前为止,还无人将细菌固定在 MC 上, MC 的多孔性和纯粹性,它对细菌固定的简易性和去除氮的高效性,使得其可作为一种新的细胞固定载体。周艳红,黄凤莲等^[52]应用阿科曼(AquaMats)生态基+复合微生物群落的处理方法来原位修复滩涂海水种植-养殖系统水体中的磷,发现此技术不仅能有效地降低种植-养殖系统水中的 TP 和 DP 浓度,又能维持较稳定的处理效果;而且对底泥中的磷也有一定的修复作用。李非里等^[53]用甲壳素作为微生物载体处理废水,取得了良好效果。

Hisashi 等^[54]用固定化光合菌处理合成废水表现出较高的去除效果:48 小时可有效的去除 COD(89%),磷(77%),硝态氮(99%), H_2S (99.8%)。Hisashi 等比较了 PvA 和海藻酸盐两种材料固定化光合细菌对鱼池水质净化与反硝化的效果。结果表明固定化 PVA 球比海藻酸盐固定化球的水质净化能力强。幸福言等^[55]从虾池底泥中分离、筛选了数株虾池环境生物修复作用菌,并对这些生物修复作用

菌包埋在海藻酸钠中进行固定化模拟应用;这些菌能以对虾饵料为唯一碳源和氮源生长,对对虾配合饵料具有较强降解能力,72 h 内 COD_{Mn} 去除率在 60%以上,并可在虾池环境条件下良好生长,对养殖对虾没有致病作用,且其中 6 株可显著提高中国对虾仔虾的成活率。该菌具有快速消除虾池底部有机质污染、修复对虾养殖环境的潜力。

由于养殖污染成分复杂加上环境因素的影响,目前,固定化微生物技术在养殖水体中的应用主要还处在室内试验阶段,把固定化微生物技术应用于生产中还需做进一步的研究。固定化微生物技术在养殖废水处理中的应用前景十分广阔,这也是废水生物处理由生物自然净化→人工培养微生物絮体(活性污泥)→人工强化高效微生物絮体(微胶囊)的必然发展阶段。

1.3.4 基因工程菌对水产养殖环境的修复研究

微生物修复优点明显,微生物修复已经逐渐从应用机理和基础研究转向实际应用方面并且取得了明显得效果但仍没能真正大规模大范围地应用到水产养殖的环境修复工程中。随着现代生物技术的快速发展,传统的微生物学与现代生物技术有机结合,大大提高了降解效力,扩大了降解范围。生物学家利用基因工程把不同的降解基因移植到同一菌株中,创造出了具有多种降解功能的超级微生物。海水养殖环境中主要污染物为蛋白质、脂肪酸和纤维素,降解或分解的中间物质有含氮化合物以及含硫化合物,也有氨氮、亚硝酸等有害无机物。因此,一种降解菌不可能完成所有物质的降解或转化,所以构建具有多种功能的“超级工程菌”在海水养殖环境修复中使用也是非常必要的^[56-57]。“超级工程菌”在海水中的使用,不仅可以更为有效地修复污染的养殖环境,也会大大降低使用成本。国内已用光合细菌与酵母融合子处理味精废水^[58]取得了良好效果由于生物修复技术在海水养殖环境中的应用历史短暂,国内国外超级工程菌的构建开展较少。

近年来对综合了两种或两种以上的修复技术的高效综合生物修复技术在水产养殖环境修复中的研究也越来越多。水生植物(小型藻类)与细菌的综合修复、沉淀—贝类过滤—藻类吸附的综合处理系统、扇贝-海藻-海参的生态养殖模式、人工湿地生态系统、由养殖生物和生物过滤器等组成的海水闭合循环养鱼系统等研究均能显著改善养殖环境的污染状况。

综合生物修复技术结合了多种修复技术的优点,能对养殖污水进行多方面处理,处理效率较高,并且养殖者能获得一定的额外经济效益,是一种有潜力的养殖废水处理技术。但综合生物修复技术相对复杂,需要更高的管理技术与工程技术,近年来的研究主要还是停留在实验水平上。

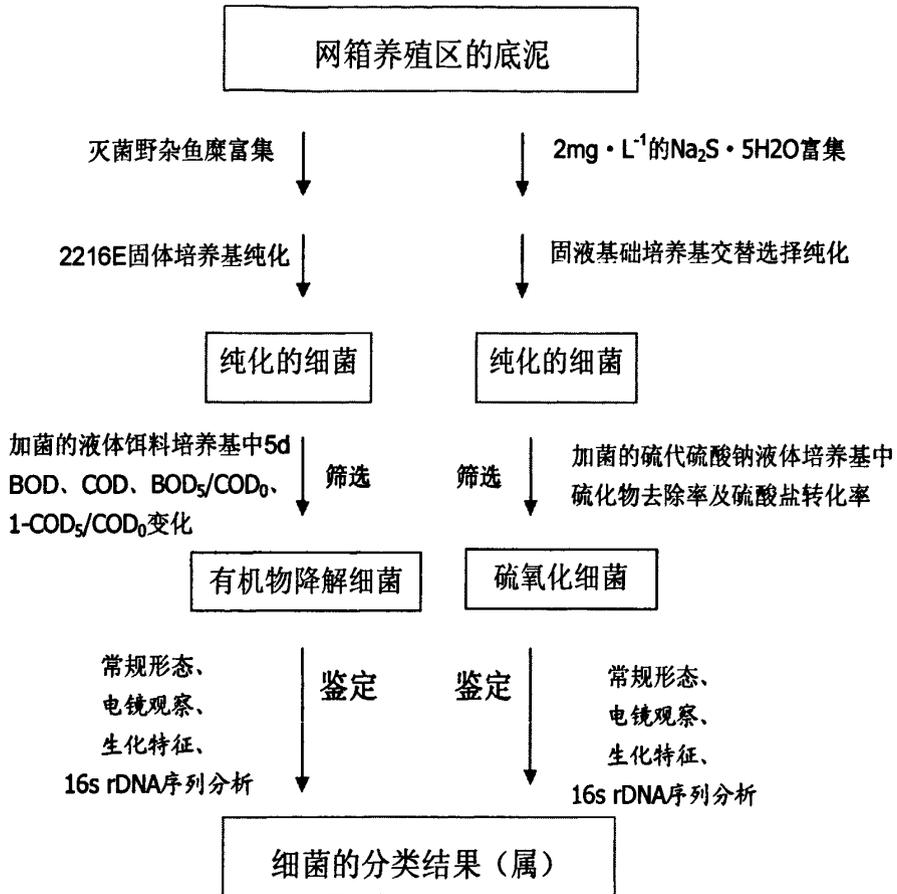
1.4 研究目的、意义和技术路线

1.4.1 研究目的和意义

我国的海水网箱养鱼目前还主要是以传统的浮筏式网箱为主,其抗风浪能力较差,一般都位于避风较好,但海水交换较差的内湾或港口内的浅海海域,网箱养殖场的生态环境自净化能力也较差。此外,养殖网箱一般成片布设,养殖技术也相对落后,尤其是鱼用饲料仍以鲜杂鱼或冰鲜杂鱼为主,人工配合饲料所占比例很少,饲料系数较高,养殖过程中产生的有机和无机废物量大,不但对海洋生态环境产生了较大的负面影响,而且随着养殖“自身污染”效应的长期积累,我国的大多数海水鱼类网箱养殖场自身的生态环境都出现了不同程度的恶化。其主要特征是:(1)网箱养殖场水体营养指数偏高,富营养化现象明显;(2)海水溶解氧偏低,底层水体贫氧现象较严重;(3)海底污染物累积,沉积物变黑发臭,硫化物、有机物和营养盐含量水平升高,成为了“二次污染源”和病原菌、病毒生存和繁殖的温床。海水鱼类网箱养殖场生态环境的恶化已使我国大多养殖场养殖病害频繁爆发,损失严重,遭受赤潮灾害损失的情况也有加重趋势,严重制约了我国海水网箱养鱼产业的可持续发展。

本研究针对我国海水网箱养殖场普遍存在的沉积环境有机污染和硫化物危害问题,通过从网箱养殖沉积环境筛选出能将残饵有机质降解和硫化物转化为硫酸盐的高效土著细菌,为进行网箱养殖环境微生物原位修复应用技术研究奠定基础,因此,具有重要的科学意义和实用价值。

1.4.2 技术路线



第二章 有机污染物降解菌的筛选与鉴定

海水鱼类网箱养殖是一种开放式、人工营养型、高密度和集约化的科学养鱼方式,在我国经过近 30 年的发展,已成为广大沿海地区最重要的海水养殖产业之一^[59]。然而,海水鱼类网箱养殖方式自身又是一个对海域生态环境产生负面影响的污染源^[60-61],尤其在浅海网箱养殖生产过程中产生的残饵和鱼类排泄物直接沉积在网箱底部并长期积累,已导致大多数网箱养殖场生态环境出现不同程度的恶化^[62-63],养殖病害和赤潮灾害频繁爆发,经济损失日趋严重^[64]。因此,开展海水鱼类网箱养殖沉积环境有机污染物高效降解方法研究,对解决网箱养殖业面临的重要环境制约问题有重要意义。

本研究从深圳大鹏澳海水鱼类网箱养殖区沉积环境中分离、筛选得到的能高效降解饵料有机物的土著细菌菌株,以期开展海水鱼类网箱养殖沉积环境微生物原位修复工作奠定基础。

2.1 材料和方法

2.1.1 培养基

选择性培养基:野生杂鱼糜 20g,陈海水 1000ml, pH 7.6~8.2, 121℃灭菌 20min。

分离培养基:采用 2216E 琼脂培养基^[65]:蛋白胨 5g,酵母膏 1g,磷酸高铁 0.1g,琼脂粉 20g,陈海水 1000ml, pH 7.6~8.2。

活化及扩大菌种培养基:采用 2216E 海水培养基:蛋白胨 5g,酵母膏 1g,磷酸高铁 0.1g,陈海水 1000ml, pH 7.6~8.2。

鱼糜液体饵料培养基:野生杂鱼糜 5g,陈海水 1000ml, pH 7.6~8.2, 121℃灭菌 20min。

2.1.2 菌种选择性富集、分离与纯化

从有 20 多年养殖历史的深圳市大鹏澳海水鱼类网箱养殖区用无菌器皿采表层底泥,冷藏带回实验室。在实验室取底泥 250g 加到 2L 的富集瓶中,加入灭菌海水 750ml,灭菌野生杂鱼糜 15g,并加入适量的纤维棉,在室温条件下连续曝气富集培养 2 个月,中间据情况不定期添加灭菌海水和灭菌野生杂鱼糜。挑取并直接冲洗细菌附着较大的纤维棉,得到富集菌液,适当稀释,涂布于分离平板培养基上,28℃培养 48h。连续平板划线分离、纯化培养优势菌株,菌种保藏于 4℃冰箱中备用。

2.1.3 有机物降解细菌的筛选

将分离纯化得到菌株接种到装有 2216E 海水培养基的锥形瓶中, 在 28℃ 控温培养箱中活化振荡培养 48h, 备用。取 5ml 活化培养菌液 (浓度约为 2.0×10^8 CFU/mL) 接种于装有 200ml 鱼糜液体饵料培养基的 BOD 瓶中, 用 BOD 测定仪 (HACH BOD Trak) 连续 7d 测定鱼糜液体饵料培养基的生化需氧量 (BOD), 筛选对饵料有机物降解能力强的菌株。

2.1.4 筛选菌株对饵料有机物的降解能力

取 5ml 筛选菌株的活化培养菌液接种于装有 200ml 鱼糜液体饵料培养基的 BOD 瓶中, 每株菌接种 5 瓶作为实验组, 另取一瓶不接种菌液鱼糜液体饵料培养基作为对照 (CK), 在 28℃ 控温培养箱中振荡。用 BOD 测定仪连续 5d 测定鱼糜液体饵料培养基的生化需氧量 (BOD), 同时每 24h 取鱼糜液体饵料培养基 20ml, 以 5000r/min 离心 5min, 取上清液用碱性高锰酸钾法测定化学需氧量 (COD_{Mn}), 连续测定 5d。通过测定鱼糜液体饵料培养基的 BOD 及 COD_{Mn} 值来衡量筛选菌株对鱼糜饵料有机物的利用能力, 以 COD 去除率 ($1 - COD_5 / COD_0$) 和有机物的可生化降解性 (BOD_5 / COD_0) 来表示 5d 时间里细菌利用鱼糜饵料有机物的降解能力。

2.1.5 筛选菌株对饵料有机物的联合降解能力

将筛选得到的菌株两两组合, 各取 2.5ml 活化培养菌液, 按 1.4 的方法测定菌株对鱼糜饵料有机物的联合降解能力。

2.1.6 有机物降解细菌的鉴定

将筛选得到的菌株保存斜面送交上海生工生物工程有限公司进行 16S rDNA 序列分析鉴定, 并结合常规形态观察、电镜观察和细菌生理生化鉴定。

16S rDNA 扩增上游引物为 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'), 下游引物为 1492R (5'-AAG TCG TAA CAA GGT AAC C-3'), 由上海生工生物工程有限公司合成。测序结果分别提交 GenBank 并采用 BLASTN 程序, 和 EMBL 并采用 FASTA 程序进行同源性检索。以 16S rDNA 序列相似度 $\geq 99\%$ 、 $99\% >$ 相似度 $\geq 97\%$ 分别作为种属水平上的鉴定划分标准^[66]。

2.1.7 系统发育分析

利用 MEGA3 软件, 将筛选菌株与部分参考菌株基于部分 16S rDNA 序列的 ClustalW 多重比对结果, 采用 Neighbour Joining 方法构建系统发育树。

2.2 结果

2.2.1 菌种分离和纯化

经选择性富集、分离和纯化后,从网箱养殖区底泥中分离出 6 株细菌作为下一步筛选的对象。

2.2.2 有机物降解细菌的筛选

通过实验,从分离出的 6 株细菌中筛选得 4 株对鱼糜饵料有机物利用能力强的菌株 C41-2、C41-4、C42-2 和 C42-4,培养到 7d 后, BOD_7 达到 $1040\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ~ $1140\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,明显高于另外 2 株菌株 C42-1 ($596\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 C42-3 ($192\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$),对照组的 BOD 值则一直维持在约 $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的稳定水平(图 2-1)。从图还可以看出,加有菌株的液体饵料培养基 BOD 值一般在培养的前 3d 增加较快,之后进入平缓期,而菌株 C42-2 则要 5d 后才进入平缓期。

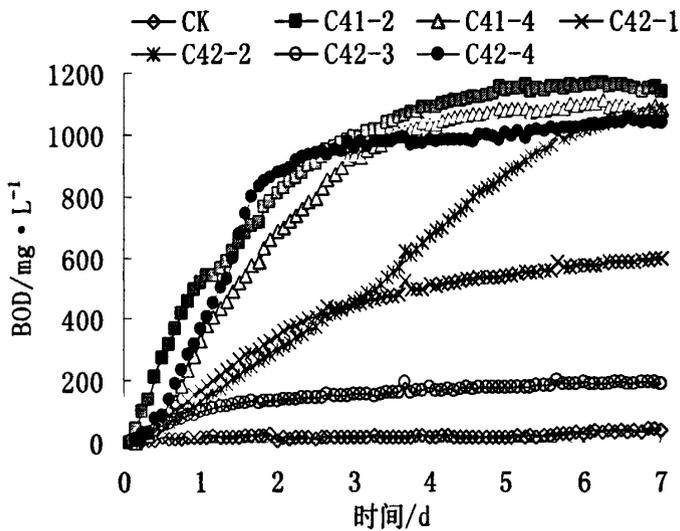


图 2-1 分离菌株对鱼糜饵料的利用能力比较

Fig 2-1 Comparison of trash fish meat feed utilization ability among isolated bacteria strains

2.2.3 筛选菌株对饵料有机物的降解能力

分别接种筛选得到的 4 株细菌 (C41-2、C41-4、C42-2 和 C42-4) 于鱼糜液体饵料培养基中进行 5 日培养实验,4 株细菌的 BOD_5 在 $1078\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ~ $1182\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间, BOD 值均呈对数增加的特征,即前 3d 增加较快,之后进入平缓期,而对照组 BOD 值维持在约 $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以内的低浓度水平(图 2-2a)。液体饵料培养基的 COD_{Mn} 值变化趋势则有较大差异,除菌株 C41-2 的 COD_{Mn} 值在前 3d 持续降

低, 之后维持在约 $700 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度水平外, 而其它 3 株菌的 COD_{Mn} 值在 1d~2d 内快速下降, 之后出现较大幅度的波动, 波动范围在 $724 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ~ $1124 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间, 但均明显低于对照组的 COD_{Mn} 值约 $1330 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的高浓度水平 (图 2-2b)。

4 株细菌对鱼糜液体饵料培养基有机物均具有较强的降解能力, 其中 5d 培养后菌株 C41-2 的 COD_{Mn} 去除率为 46.90%, 去除效果最好, 其次是菌株 C41-4 和 C42-2, 去除率分别为 30.06% 和 31.86%, 菌株 C42-4 的去除率最低, 为 13.58%; 5d 培养的有机物可生化降解性 ($\text{BOD}_5/\text{COD}_0$) 在 81.56%~89.43% 之间, 各菌株间差异较小 (表 2-1)。

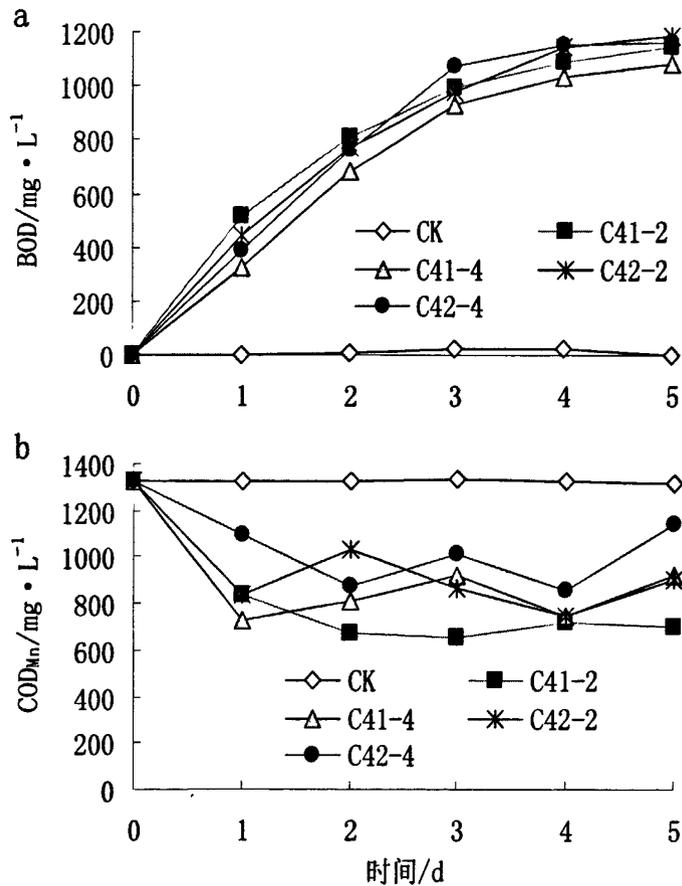


图 2-2 筛选菌株对鱼糜饵料的利用能力比较

Fig 2-2 Comparison of trash fish meat feed utilization ability among screened bacteria strains

表 2-1 菌株对鱼糜饵料培养基的 COD_{Mn} 去除率及有机物可生化降解率Table 2-1 COD_{Mn} removing and BOD_5/COD_0 degradation rate of test bacteria strains to trash fish culture medium

菌号	COD_{Mn} 去除率 ($1-COD_5/COD_0$) / %	有机物可生化降解率 (BOD_5/COD_0) / %
C41-2	46.90	86.40
C41-4	30.06	81.56
C42-2	31.86	89.43
C42-4	13.58	87.92
平均值	30.60 ± 13.63	86.33 ± 3.41

2.2.4 菌株组合对饵料培养基的降解能力

筛选得到的 4 株细菌两两组合培养实验显示, 5 日培养后 BOD_5 在 $1138 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ~ $178 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间, 均远高于对照组, 但与单株菌的培养实验结果无太大差异; BOD 值变化趋势也均呈对数增加的特征, 即前 3d 增加较快, 之后进入平缓期(图 2-3a)。各菌株组合间液体饵料培养基的 COD_{Mn} 值变化趋势则分为两类, 其中组合 C41-2:C41-4 和 C41-2:C42-2 在培养前 3d 分别快速下降至 $396 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $408 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 组合 C41-2:C42-4、C41-4:C42-2、C41-4:C42-4 和 C42-2:C42-4 则在培养前 1d 就快速下降至 $406 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ~ $480 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间, 之后均维持在约 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的较低浓度水平, 且较单株菌的 COD_{Mn} 低约 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ~ $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 2-3b)。

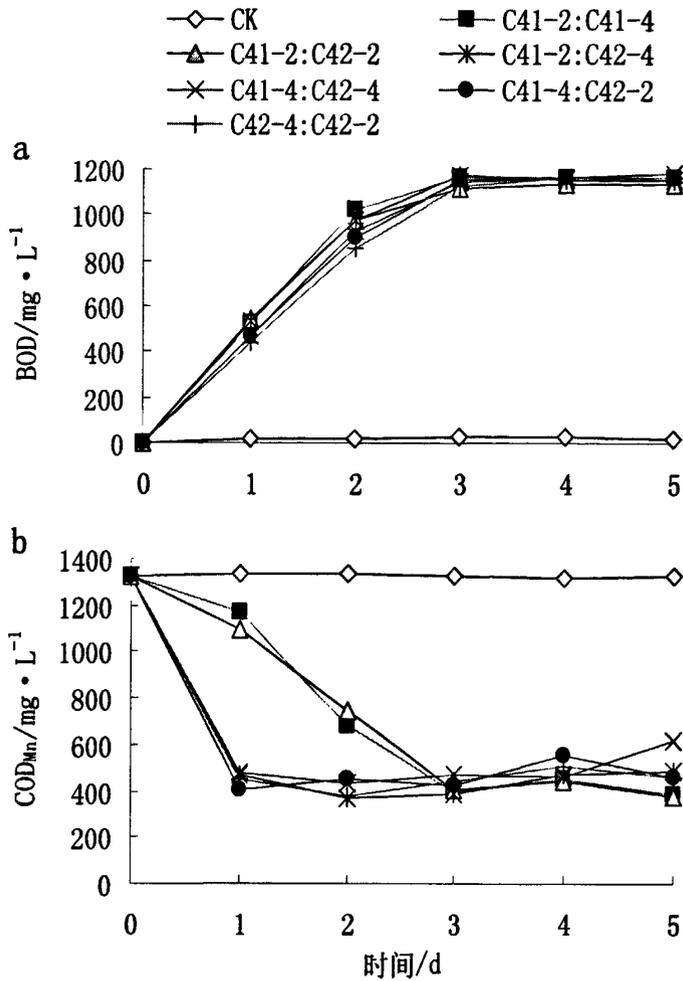


图 2-3 筛选菌株两两组合对鱼糜饵料的利用能力比较

Fig2-3 Comparison of trash fish meat feed utilization ability among pair-strain mixed bacteria

菌株两两组合 5d 培养后的 COD_{Mn} 去除率在 53.59%~71.68% 之间, 其中组合 C41-2:C41-4 和 C41-2:C42-2 的去除率最高, 分别为 70.72% 和 71.68%, 其次是组合 C41-2:C42-4、C41-4:C42-2 和 C42-2:C42-4, 去除率在 62.95%~65.45% 之间, 组合 C41-4:C42-4 最低, 为 53.59%; 各组合的 COD_{Mn} 平均去除率为 64.91%, 较单株细菌的平均去除率 (30.60%) 提高了 1 倍多。5d 培养的有机物的可生化降解率 (BOD₅/COD₀) 在 86.10%~89.13% 之间, 平均值为 87.74%, 菌株两两组合间的差异也不明显, 与单株细菌平均可生化降解率 (86.33%) 比也无明显差异 (表 2)。

表 2-2 菌株两两混合对鱼糜饵料培养基的 COD_{Mn} 去除率及有机物可生化降解率
 Table2-2 COD_{Mn} removing and BOD_5/COD_0 degradation rate of pair-strain bacteria to trash fish culture medium

菌株组合	COD_{Mn} 去除率 ($1-COD_5/COD_0$)/%	有机物可生化降解率 (BOD_5/COD_0)/%
C41-2:C41-4	70.72	88.07
C41-2:C42-2	71.68	86.10
C41-2:C42-4	62.95	87.01
C41-4:C42-2	65.07	89.13
C41-4:C42-4	53.59	88.22
C42-2:C42-4	65.45	87.92
平均值	64.91±6.51	87.74±1.05

2.2.5 菌株的鉴定

2.2.5.1 常规形态及电镜观察

细菌 C41-2 在选择性平板上菌落呈圆形，透明，边缘平整，表面光滑。电镜下观察细胞呈杆状，菌体大小为(726~1080)×(1080~2500)nm，单个或成对成链状排列，具有侧生鞭毛(见图 2-4)，革兰氏染色阴性。

细菌 C41-4 在选择性平板上菌落呈圆形，浅黄色半透明，边缘不平整，表面凹凸不平，由中心向外呈花纹状延伸。电镜下观察细胞呈杆状，菌体大小为(675~605)×(843~2180)nm，单个或成对成链状排列，无鞭毛(见图 2-5)，革兰氏染色阴性。

细菌 C42-2 在选择性平板上菌落呈圆形，黄色腊状，边缘平整，表面光滑，中心凸起。电镜下观察细胞呈短杆状，菌体大小为(667~817)×(726~1030)nm，单个或成对成簇状排列，无鞭毛(见图 2-6)，革兰氏染色阴性。

细菌 C42-4 在选择性平板上菌落呈圆形，白色腊状，边缘平整，表面光滑，中心凸起。电镜下观察细胞呈杆状，菌体大小为(555~857)×(817~2190)nm，单个或成对成链状排列，具有亚端生鞭毛，运动活泼(见图 2-7)，革兰氏染色阴性。

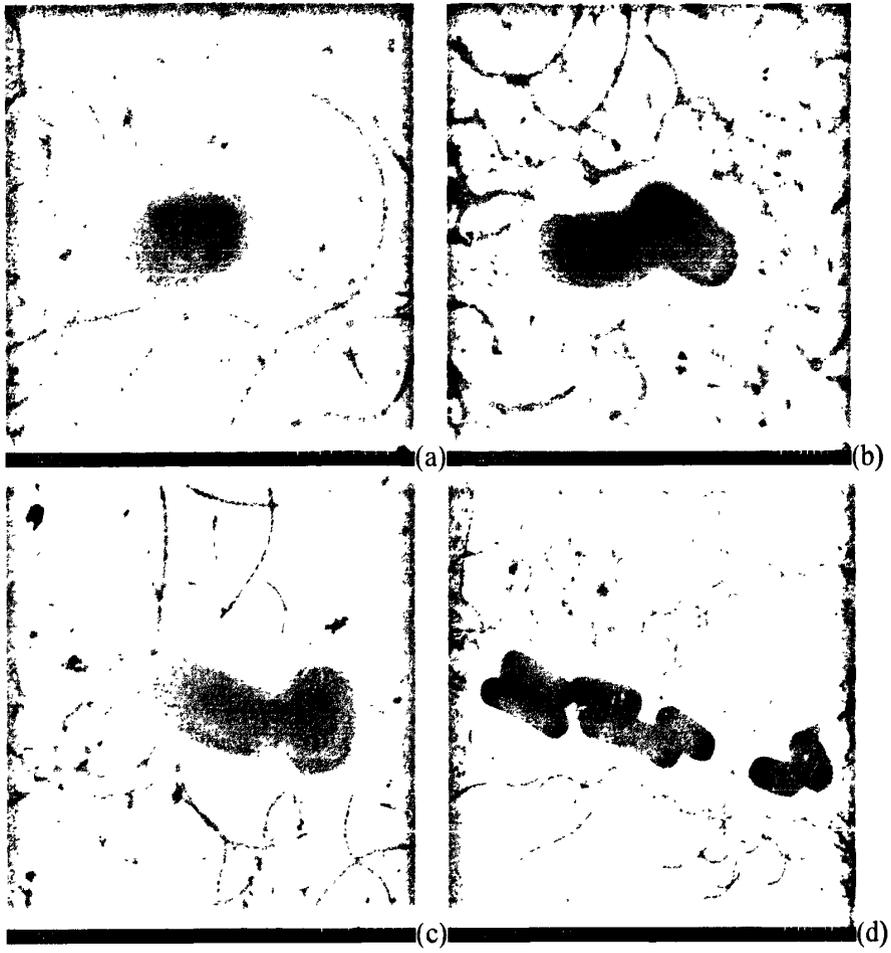


图 2-4 细菌 C41-2 的透射电镜图片 (包括(a)、(b)、(c)、(d))

Fig 2-4 The cell of strain C41-2 under Transmission Electron microscopy

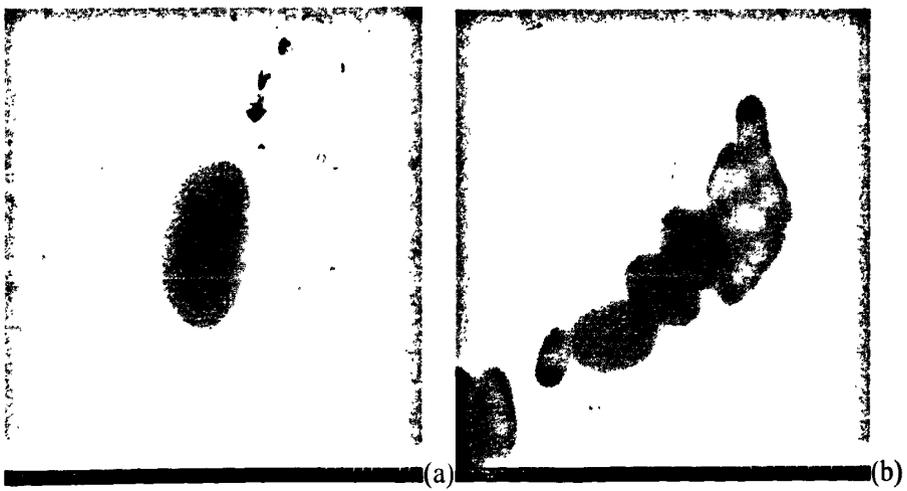




图 2-5 细菌 C41-4 的透射电镜图片 (包括(a)、(b)、(c))

Fig 2-5 The cell of strain C41-4 under Transmission Electron microscopy

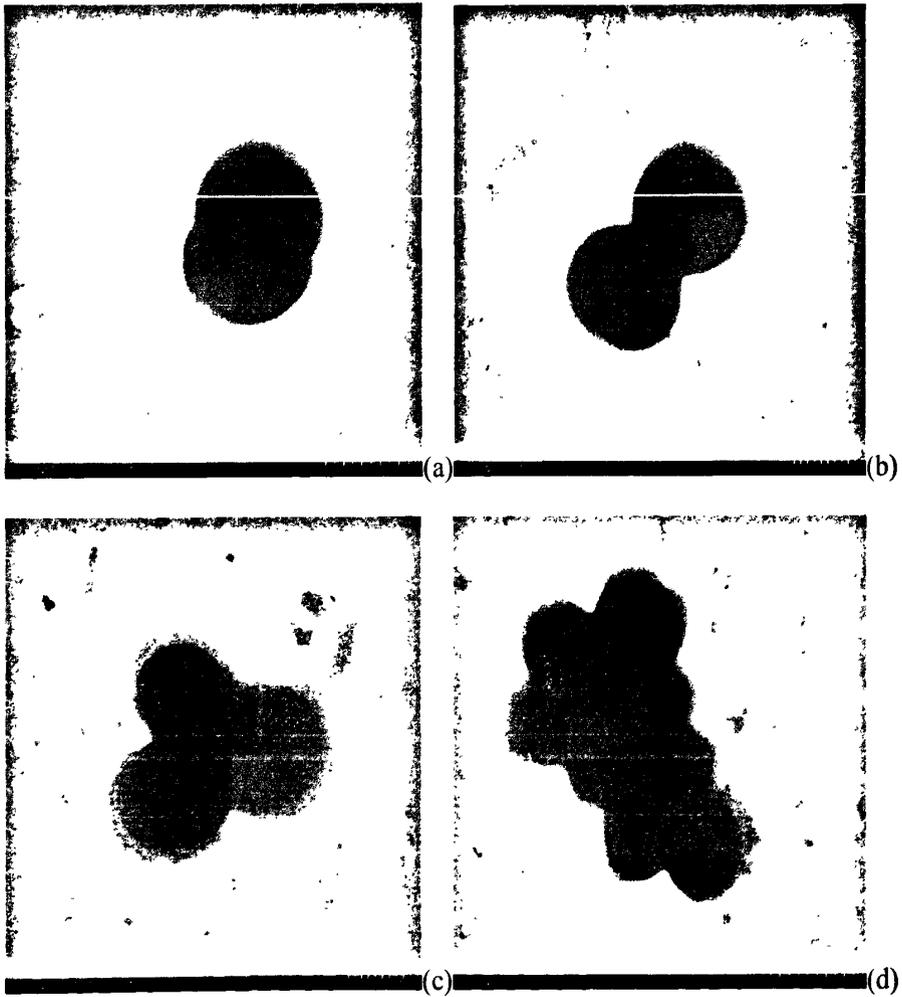


图 2-6 细菌 C42-2 的透射电镜图片 (包括(a)、(b)、(c)、(d))

Fig 2-6 The cell of strain C42-2 under Transmission Electron microscopy

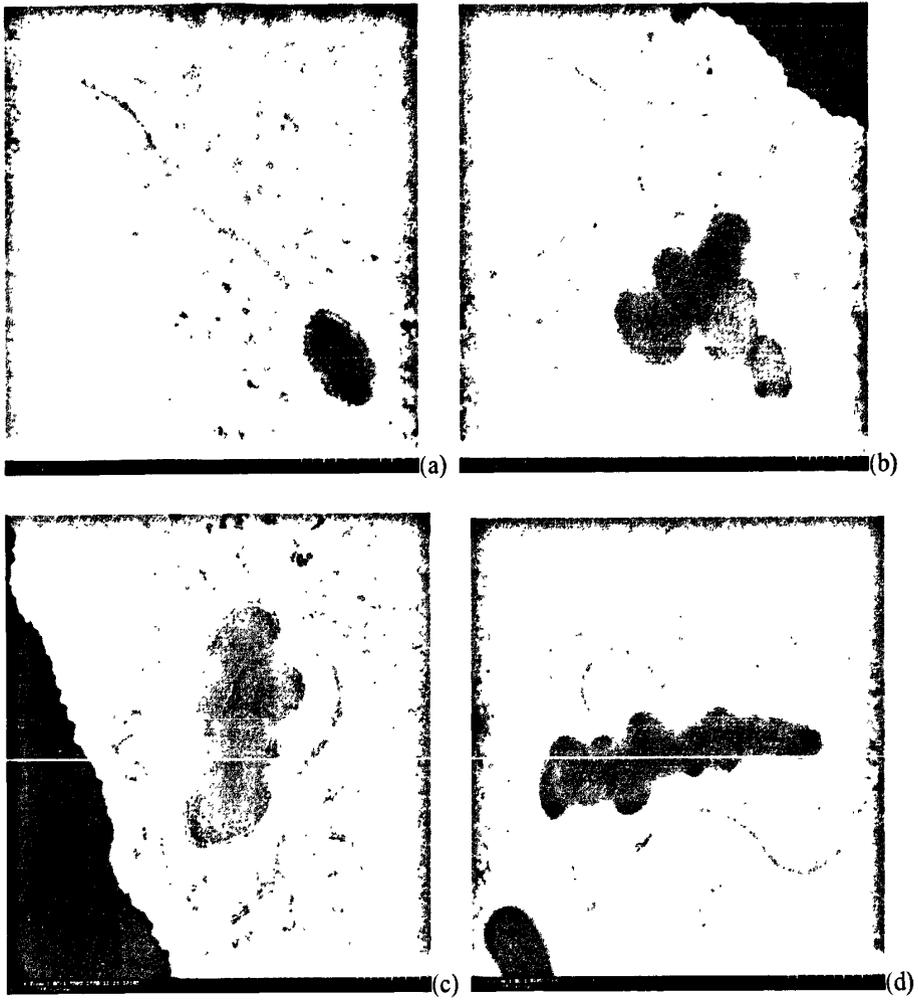


图 2-7 细菌 C42-4 的透射电镜图片 (包括(a)、(b)、(c)、(d))

Fig 2-7 The cell of strain C42-4 under Transmission Electron microscopy

2.2.5.2 细菌的生理生化特性

4 株细菌的主要生理生化特性如表 2-3。

表 2-3 筛选出的 4 株细菌的生物学特性
Table 2-3 Biological characteristics of the selected four strains

	氧化酶	接触酶	革兰氏染色	运动性	乳糖	葡萄糖	麦芽糖	乙醇	甘露醇	甲基红	V-P	ONP G	淀粉	硝酸盐还原	明胶	亚硝酸盐还原	葡萄糖氧化发酵	反硝化
C41-2	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
C41-4	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
C42-2	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
C42-4	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+

“+”表示反应呈阳性positive,“-”表示反应呈阴性negative

2.2.5.3 16S rDNA 序列分析

筛选所得 4 株细菌的 16S rDNA 部分序列长度介于 1498bp~1513bp 之间 (图 2-8), 尽管 16S rDNA 全序列对确定某些新种是必要的, 但起始的 500bp 对大多数菌株的鉴定已提供了足够丰富的信息^[67]。利用 BLASTN 及 FASTA 程序将这些序列与 GenBank 及 EMBL 数据库中的已知序列进行同源性检索, 发现与数据库中各自最近似序列的相似度介于 86.7%~98.4%之间, 最接近的细菌有 4 种, 分属于 3 个属(表 2-4)。根据 99%>相似度≥97%划分属, 菌株 C41-2 归于表皮葡萄球菌属 *Staphylococcus* sp., 菌株 C42-2 归于盐单胞菌属 *Halomonas* sp., 而菌株 C41-4 和 C42-4 分别与盐单胞菌属 *Halomonas* sp. 和假单胞菌属 *Pseudomonas* sp. 最相近。

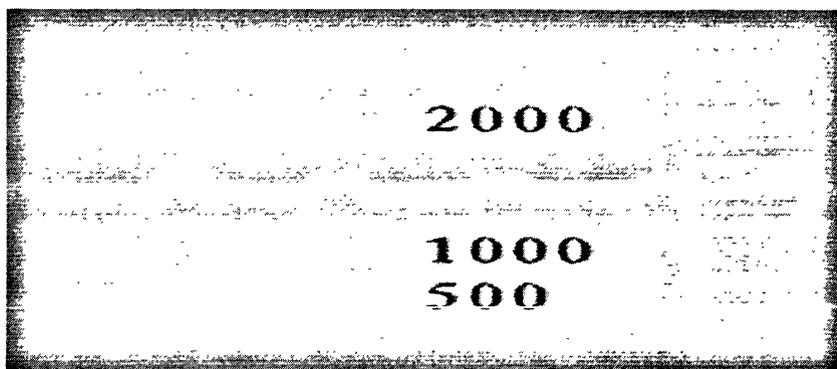


图 2-8 筛选菌株的 PCR 扩增结果

Fig 2-8. Amplification of selected strains

备注: Marker 是 MBI 生产的 #SM0331。样品从左往右分别为: C41-2、C41-4、C42-2、C42-4、Marker。

表 2-4 4 株细菌 16S rDNA 部分序列的同源检索结果

Table 2-4 Homology analysis of 4 screened bacteria strains based on partial 16S rDNA sequences

菌株编号	16S rDNA 序列 长度(bp)	最近似菌株	序列号	相似度 (%)
C41-2	1512	<i>Staphylococcus</i> sp.	ATCC146	97.5
C41-4	1499	<i>Halomonas salina</i>	LLM;DQ333297	93.4
C42-2	1499	<i>Halomonas shenglis</i>	SL0148-85T;EF121853	98.4
C42-4	1498	<i>Pseudomonas</i> sp.	IAM12022; D86001	86.7

2.2.6 系统发育分析

基于所筛选菌株的 16S rDNA 部分序列和从数据库中获取的参照序列构建系统发育树(图 2-9), 从图中可看出, 4 株细菌分属于不同的 3 个类群, 分别是 C41-2 属于 *Staphylococcus*, C41-4 和 C42-2 属于 *Halomonas*, C42-4 属于 *Pseudomonas*。

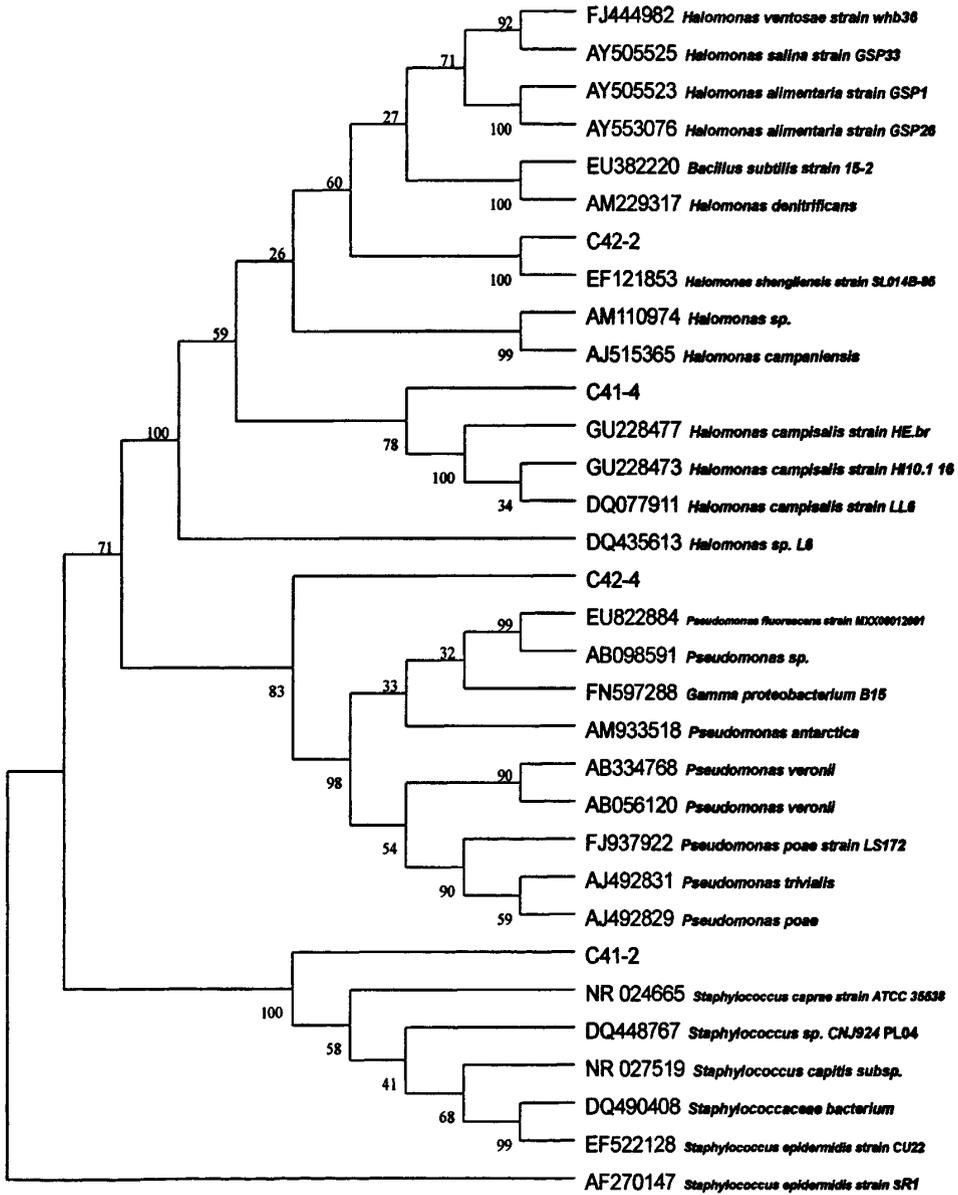


图 2-9 4 株细菌与参考细菌基于 16s rDNA 序列构建的系统发育树

Fig 2-9 Phylogenetic tree based on partial 16S rDNA sequences of four strains and the references

2.3 讨论和小结

2.3.1 讨论

(1) 自然条件下, 微生物通常营共生生活, 要得到某一种或某一类微生物, 先对环境样品进行有目的的富集和驯化, 可以大大提高分离效率, 富集、驯化条件是优势菌筛选的重要制约因素, 定时定量投加低浓度目标化合物是较好的驯化方式。本研究筛选的微生物目的是用于降解浅海鱼类网箱养殖系统沉积环境中的有机污染物, 因此选择了有机污染较重的网箱养殖场底泥作为菌种来源, 以网箱养殖主要有机污染物(灭菌的野杂鱼鱼糜)作为选择压力, 在室温条件下连续曝气富集培养 2 个月, 从而抑制杂菌生长, 刺激有机物降解菌大量繁殖成为优势菌, 最后分离纯化得到了 6 株细菌。

(2) 单一污染物降解菌的筛选常以该物质的减少量为指标。因浅海鱼类网箱养殖是以人工投喂野生杂鱼为主的, 网箱底部沉积物有机污染是以残饵为主^[68-69], 所以本研究以富集分离得到的菌株对野生杂鱼糜饵料液体培养基的 BOD、COD_{Mn}、COD_{Mn} 去除率和有机物的可生化降解性 (BOD₅/COD) 为指标, 从而筛选得到 4 株对鱼糜饵料有机物有快速、高效降解能力的目标土著菌株。

(3) 工业废水的可生化性常用 BOD₅/COD 的比值来表示, 如果 BOD₅/COD 的比值 >45% 表示可生化性好, 大于 30% 表示可以进行生化处理, 小于 30% 表示难以进行生化处理, 小于 25% 则不宜采用生化处理。该方法为筛选具有快速降解富营养有机物能力的菌株提供了一种定量的手段。在实验室条件下, 以 BOD₂/COD 的比值 >45% 作为指标来衡量细菌降解有机质的能力, 一方面可表示野杂鱼糜的可生化性好, 另一方面则能更准确地反应菌株快速分解野杂鱼糜有机物的情况。用此法筛选出的 6 株细菌比值均在 45% 以上, 表明细菌能很好地降解野杂鱼糜饵料, 有针对性降解网箱养殖区的沉饵, 改善沉积环境。

(4) 本实验筛选出来的 4 株细菌 5d 培养的 COD_{Mn} 去除率在 13.58%~46.9% 之间, 与李秋芬及俞荣分别筛选出来的对对虾配合饵料有较高 COD 去除率 (50%~70% 及 59.6%~79.2%) 的细菌相比, COD 去除率有所不同, 推测可能是由于筛选细菌的来源环境及所降解饵料物质的有机质成分的不同所致。

(5) 筛选过程中发现, 组合菌株 5d 培养后的 COD_{Mn} 平均去除率高达 64.91%, 是单株细菌平均去除率 (30.60%) 的 2 倍多, 从 COD_{Mn} 降解时间变化特征看, 组合菌株的 COD_{Mn} 呈迅速下降而后维持在相对较低的浓度水平, 而单一菌株则表现为下降之后又有较大波动的特征。这些说明组合菌株间具有一定的协同代谢作用, 加快了鱼糜饵料有机物的生物降解过程。

(6) 细菌 C41-2 与 C41-4、C42-2、C42-4 的组合去除率较其他组合要高,

均达 70%以上, 推测细菌 C41-2 的有机质降解效果较其他细菌要好, 并在与其他细菌的组合中起主要作用; 另外细菌两两混合的 5 日培养 COD_{Mn} 最高去除率大致可分为二个等级, C41-2:C41-4、C41-2:C42-2、C41-2:C42-4、C42-2:C42-4 的组合 >70%, C41-4:C42-2、C41-4:C42-4 >60%。

(7) 分子生物学手段应用于细菌鉴定越来越普遍, DNA-DNA 杂交和 16S rDNA 序列分析是目前细菌鉴定最重要的标准之一, 特别是 16S rDNA 序列分析应用日益普及^[70], 绝大部分细菌分类学家都认同 16S rDNA 序列分析作为原核生物分类的重要手段^[71-72]。La Scola 等认为该方法比传统方法在鉴定 *Bartonella* sp. 内各菌株时更准确。尽管基于 16S rDNA 序列分析对种属的判定还没有严格的统一标准, 在实际操作上通常以相似度 $\geq 99\%$ 和 $99\% > \text{相似度} \geq 97\%$ ^[73]或 $99\% > \text{相似度} \geq 95\%$ ^[74]作为种属的划分依据。本文选择相似度 $\geq 99\%$ 和 $99\% > \text{相似度} \geq 97\%$ 作为种属划分依据, 部分长度 16S rDNA 序列分析结果表明, 菌株 C41-2 隶属于表皮葡萄球菌属 (*Staphylococcus* sp.), 菌株 C42-2 隶属于盐单胞菌属 (*Halomonas* sp.), 而菌株 C41-4 和 C42-4 分别与盐单胞菌属 (*Halomonas* sp.) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.) 相近, 而这三个属均有报道能降解有机物。

(8) 本研究从网箱养殖沉积环境中筛选得到的 4 株土著有机物降解细菌具有快速、高效降解网箱养殖沉积环境中的有机污染物的潜力, 这是进行网箱养殖沉积环境微生物修复的基础。如要成功实施, 尚需对菌株引入网箱养殖沉积环境后的稳定性, 环境因子对菌株降解效能的影响, 各菌株间的协同关系, 与自然微生物种群间的相互影响, 及菌株大规模扩大培养和施用技术等做进一步研究。

2.3.2 小结

(1) 以网箱养殖主要有机污染物 (灭菌的野杂鱼鱼糜) 作为选择压力, 是从网箱养殖沉积环境中筛选土著有机物降解细菌的有效方法。

(2) 筛选出的 4 株有机污染物降解菌中, C41-2 隶属于表皮葡萄球菌属 (*Staphylococcus* sp.), C42-2 隶属于盐单胞菌属 (*Halomonas* sp.), C41-4 和 C42-4 分别与盐单胞菌属 (*Halomonas* sp.) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.) 相近。

(3) 4 株细菌两两组合的 5 日培养 COD_{Mn} 平均去除率为 64.91%, 是单株菌平均去除率 (30.60%) 的 2 倍多; 而有机物的可生化降解性在 86.10%~89.13% 之间, 与单株菌的 81.56%~89.43% 之间并没有明显差异。

第三章 硫氧化细菌的筛选和鉴定

海水网箱养殖产生的残饵和鱼类排泄物直接沉积在网箱底部并长期积累,使渔场老化底泥发黑发臭、硫化物、有机物和营养盐等含量升高,成为了“二次污染源”,导致我国大多数网箱养殖场生态环境出现不同程度的恶化,养殖病害频繁爆发,经济损失日趋严重^[75]。其中沉积物中的硫化物是养殖环境的最主要污染物之一,是造成渔场老化的主因^[76]。

在海水网箱养殖沉积环境中,有机质的污染导致溶解氧的降低,从而加速硫化物的生成,微生物代谢产生的硫化氢释放到水体中,对水生生物产生毒性效应,可导致水生生物鳃、肝等受损,硫化氢扩散与血红蛋白结合使生物呼吸困难甚至窒息死亡,不仅对养殖环境也对养殖对象严重危害^[77-81]。因此研究海水鱼类网箱养殖沉积环境中硫化物的微生物快速降解和转化方法,修复改善恶化的养殖环境,对促进我国网箱养殖业的可持续发展有重要意义。

硫氧化细菌可有效利用网箱养殖沉积环境中的有机质碳源将硫化物沉淀转化为硫酸盐,抑制硫酸盐还原菌的代谢减少硫化物污染,改善养殖环境。但目前对硫氧化细菌的研究主要集中在生物冶金浸矿、脱除 H_2S 和 SO_2 等气体、煤炭脱硫、酸性废水中重金属去除等领域^[82-89];水产养殖环境中也只有少量关于参与硫、磷元素代谢的微生物生物量、种群结果方面及其与污染方面的少量研究报道^[90-95],胡德蓉等研究过网箱养殖海域沉积环境中硫化物污染状况及硫酸盐还原菌生物学性质^[96-97],但通过筛选高效的土著硫氧化菌株降解海水鱼类网箱养殖沉积环境硫化物污染的研究尚未见报道。

本研究即着手于从深圳大鹏澳海水鱼类网箱养殖区沉积环境中分离、筛选得到的能高效降解硫化物的土著细菌菌株,以期开展海水鱼类网箱养殖沉积环境微生物原位修复工作奠定基础。

3.1 材料和方法

3.1.1 试样来源

从有 20 多年养殖历史的深圳市大鹏澳海水鱼类网箱养殖区用无菌器皿采表层底泥做为试样,冷藏带回实验室。

3.1.2 培养基

选择性培养基: $\text{Na}_2\text{S}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2g, 高纯水 1L, 121℃ 灭菌 20min。

基础培养基: $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 5g, K_2HPO_4 2.0g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0.1g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02g, 陈海水 1L, PH 7.6~8.2, 121℃蒸汽灭菌 20min。固体培养基在基础培养基基础上加 20g 琼脂粉。

3.1.3 菌种选择性富集、分离与纯化

取试样 250g 加到 2L 的富集瓶中, 加入灭菌陈海水 750ml, 并加入适量的纤维棉, 在室温条件下连续曝气富集培养 2 个月, 中间据情况不定期添加灭菌陈海水使瓶内培养基体积维持 1L 左右, 每两天加 1ml 选择性培养基到富集瓶中。挑取并直接冲洗细菌附着较大的纤维棉, 得到富集菌液, 适当稀释, 涂布于基础培养基平板上, 28℃培养 4d。连续平板划线分离、纯化培养优势菌株, 菌种保藏于 4℃冰箱中备用。

3.1.4 硫氧化细菌的筛选及其对硫化物降解性能试验

将分离纯化得到的菌株分别接种到装有 400ml 基础培养基的锥形瓶中, 另取一瓶不接种菌株的基础培养基作为对照(CK), 在 28℃控温培养箱中活化振荡培养 8d。分别测定培养基的初始及连续 8d 的溶液 pH 值、硫化物浓度及硫酸盐浓度。

3.1.5 菌种鉴定

将筛选得到的菌株保存斜面送交上海生工生物工程有限公司进行 16S rDNA 序列分析鉴定^[98], 并结合常规形态观察、电镜观察和细菌生理生化鉴定。

16S rDNA 扩增上游引物 27F(5'-AGA-GTT-TGA-TCC-TGG-CTC-AG-3'), 下游引物 1522R (5'-AAG-GAG-GTG-ATC-CAG-CCG-CA-3'), 由上海生工生物工程有限公司合成。测序结果分别提交 GenBank 并采用 BLASTN 程序, 和 EMBL 并采用 FASTA 程序进行同源性检索。以 16S rDNA 序列相似度 $\geq 99\%$ 、 $99\% >$ 相似度 $\geq 97\%$ 分别作为种属水平上的鉴定划分标准。

3.1.6 系统发育分析

利用 MEGA3 软件, 将筛选菌株与部分参考菌株基于部分 16S rDNA 序列的 ClustalW 多重比对结果, 采用 Neighbour Joining 方法构建系统发育树。

3.1.7 分析方法

溶液的 pH 值用酸度计测定; 硫化物浓度用碘量法测定^[99]; 硫酸盐浓度用 EDTA 络合滴定法测定^[100]。

3.2. 结果与分析

3.2.1 菌种分离和纯化

经选择性富集、分离和纯化后，从网箱养殖区底泥中分离出 12 株细菌作为下一步筛选的对象，分别为 S1-2、S1-4、S1-5、S1-6、S1-7、S1-8、S3-1、S3-2、S3-2(1)、S3-4、S4-4、S4-5。

3.2.2 硫氧化细菌的筛选及其对硫化物去除能力

将纯化的 10 株细菌分别在基础培养基中连续培养 8d，测得的培养液的 pH、硫化物质量浓度及硫酸盐质量浓度数据如下（图 3-1、图 3-2 及图 3-3）。

加入相应纯化菌株的培养液中，pH 值变化趋势相似，均有显著的降低从最初的 pH 为 6.8 降到 5 以下，并在 6d 以后趋于稳定，溶液由中性变为酸性，推测 pH 值降低是由于细菌大量增殖发生氧化作用使硫代硫酸钠中的硫离子转化为硫酸根离子，同时 Fe^{2+} 氧化为 Fe^{3+} 使得溶液的氧化还原电位升高（图 3-1）。

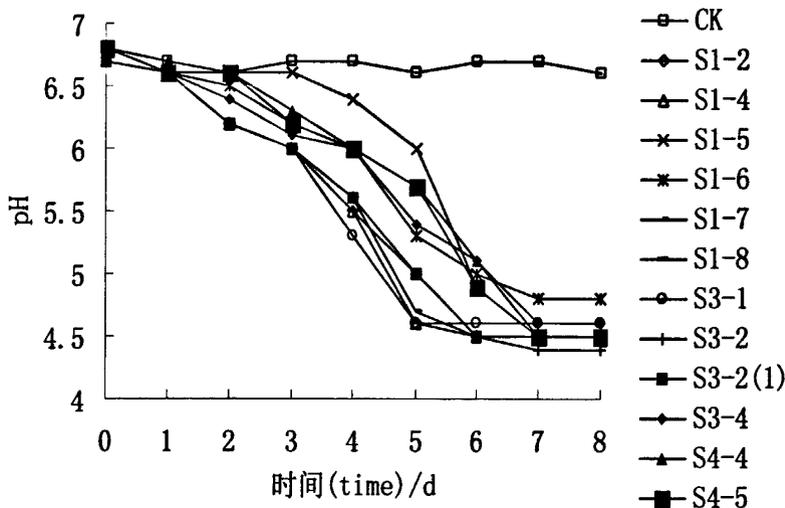


图 3-1 加菌培养后 pH 值的时间变化

Fig 3-1 pH value changes with time in plant liquid with single isolated bacteria

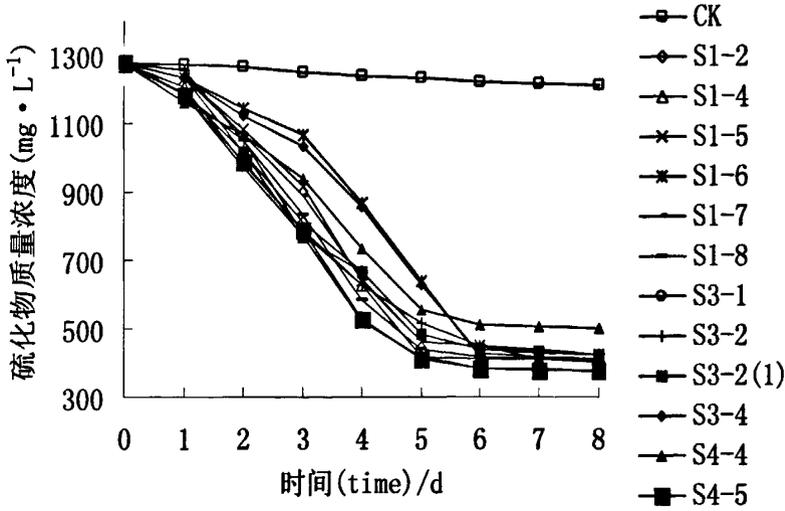


图 3-2 对应加入单株分离细菌的培养液中硫化物质量浓度随时间的变化

Fig 3-2 Sulfide concentration changes with time in plant liquid with single isolated bacteria

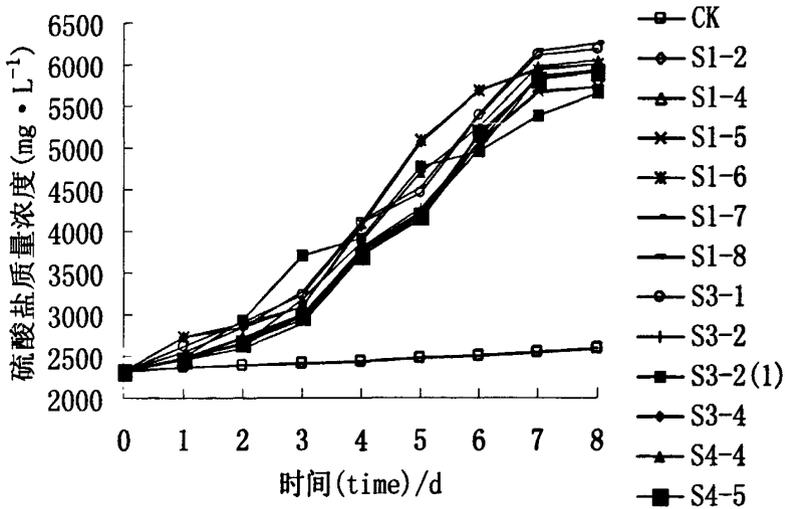


图 3-3 对应加入单株分离细菌的培养液中硫酸盐质量浓度随时间的变化

Fig 3-3 Sulfate concentration changes with time in plant liquid with single isolated bacteria

随着培养时间的延长，溶液中的硫化物浓度持续下降并在 6d 以后下降趋势趋于缓慢，硫化物浓度从最初的 $1280\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 降到 $400\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下，硫化物去除率达 69% 以上。其中菌株 S1-2、S1-4、S1-5、S1-7、S1-8、S3-1、S3-2、S3-2(1)、S4-4、S4-5 的硫化物浓度在前 5d 持续直线下降，之后进入平缓期；菌株 S1-6、S3-4 的硫化物浓度在前 6d 呈直线下降，之后进入平缓期；对照的硫化物浓度在 8d 内有略微降低，降到 $1209\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。硫酸根离子的浓度也在细菌的作用下持续

上升并在 7d 以后浓度趋于稳定, 硫酸根离子浓度也从最初的 $2327\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 升到 $5900\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上, 硫酸盐转换率达 60% 以上; 硫化物及硫酸根离子的浓度变化均呈对数趋势。

另外从图 3-2 及图 3-4 中可以看出纯化菌株 S1-6 及 S3-4 的硫化物及硫酸盐质量浓度随时间变化趋势相同, 与其他 6 株细菌相比在第 2d-6d 之间硫化物及硫酸盐质量浓度变化速率明显要大。菌株 S1-2、S1-4、S1-5、S1-7、S1-8、S3-1、S3-2、S3-2(1)、S4-4、S4-5 连续 7d 培养的硫化物及硫酸盐质量浓度随时间变化趋势相同。因此将细菌 S1-2 及 S1-6 做为目标筛选的菌株。

3.2.3 细菌鉴定

3.2.3.1 形态特征

筛选出来的 12 株细菌在固体基础培养基平板中, 28°C 恒温连续培养 4d 左右, 长出明显菌落, 菌落形态如下表 3-1。

表 3-1 菌落形态
Table.3-1 morphology of colony

名称	菌落形态
S1-2	圆形, 淡黄色, 边缘整齐, 表面光滑, 中心凸起, 中心颜色较深
S1-4	圆形, 白色, 边缘整齐, 表面光滑, 中心凸起
S1-5	圆形, 乳黄色, 边缘整齐, 表面光滑, 中心凸起
S1-6	圆形, 白色, 边缘整齐, 表面光滑, 中心凸起
S1-7	圆形, 白色, 边缘整齐, 表面光滑, 中心凸起
S1-8	圆形, 白色, 边缘整齐, 表面光滑, 中心凸起
S3-1	圆形, 白色, 边缘整齐, 表面光滑, 中心凸起
S3-2	圆形, 浅黄色, 边缘整齐, 表面光滑, 中心凸起
S3-2(1)	圆形, 乳白色, 边缘整齐, 表面光滑, 中心凸起
S3-4	圆形, 乳黄色, 边缘整齐, 表面光滑, 中心凸起
S4-4	圆形, 白色, 边缘整齐, 表面光滑, 中心凸起
S4-5	圆形, 白色, 边缘整齐, 表面光滑, 中心凸起

将 10 株筛选出来的细菌提交广东省微生物分析测试中心进行菌株细胞电镜观察, 菌株大小及形态特征见表 3-2 及图 3-4。

表 3-2 菌株细胞大小及形态
Table.3-2 Size and shape of strains

名称	大小 (nm)	细胞形态特征	细胞间排列方式	胞内有无硫粒
S1-2	(562~1050) × (994~1820)	杆状	单个或成对成簇成链状排列	有
S1-4	(863~748) × (975~1500)	杆状, 带端生鞭毛	单个或成对成簇成链状排列	有
S1-5	(747~591) × (1000~2610)	杆状, 带端生鞭毛	单个或成对成簇成链状排列	有
S1-6	(773~851) × (951~2050)	杆状, 带端生鞭毛	单个或成对成簇成链状排列	有
S1-7	(586~679) × (1250~2020)	杆状	单个或成对成簇排列	有
S1-8	(1040~1160) × (1060~2490)	杆状	单个或成对成簇排列	有
S3-1	(406~555) × (1450~2650)	杆状, 带端生鞭毛	单个或成对成簇排列	有
S3-2	(561~904) × (904~2470)	杆状	单个或成对成簇排列	有
S3-2 (1)	(1100~1050) × (1150~2270)	杆状	单个或成对成簇成链状排列	有
S3-4	(586~459) × (787~1760)	杆状, 带端生鞭毛	单个或成对成簇成链状排列	有
S4-4	(585~746) × (1310~2280)	杆状, 带端生鞭毛	单个或成对成簇成链状排列	有
S4-5	(578~642) × (1080~2090)	杆状, 带亚端生鞭毛	单个或成对成簇成链状排列	有

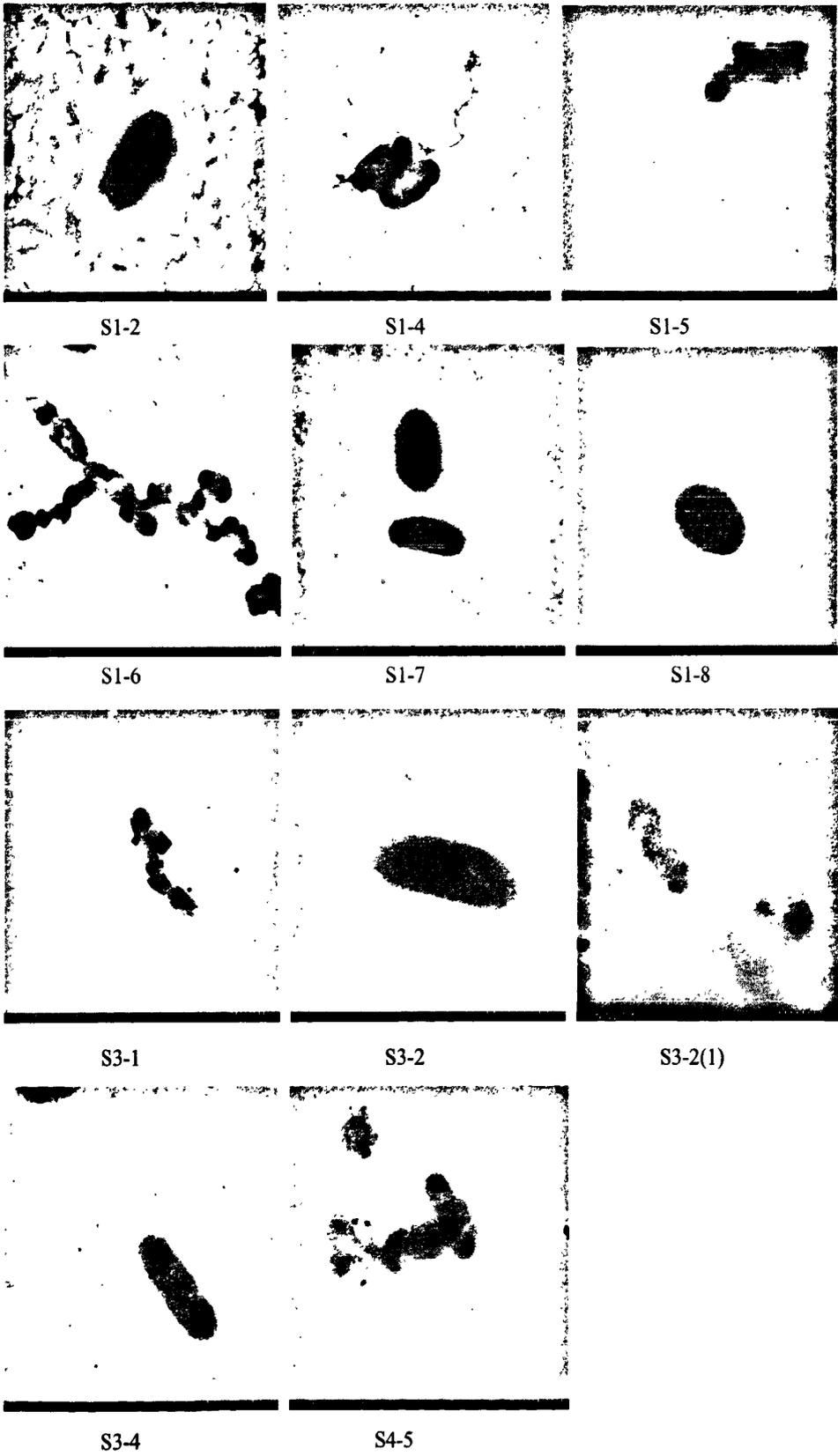


图 3-4 菌株电镜图片

Fig.3-4 The cell of strain under Transmission Electron microscopy

3.2.3.2 16S rDNA 序列分析

菌株 S1-2、S1-4、S1-5、S1-6、S1-7、S1-8、S3-1、S3-2、S3-2(1)、S3-4、S4-4、S4-5 的部分长度 16S rDNA 部分序列长度范围介于 1449~1459bp 之间 (图 3-5)。利用 BLASTN 及 FASTA 程序将这些序列与 GenBank 及 EMBL 数据库中的已知序列进行同源性检索,发现菌株 S1-2 与 *Halothiobacillus hydrothermalis* 相似性最高,同源性达 99%,与最相似的模式菌株 *Halothiobacillus* sp. HL1 同源性达 97%;菌株 S1-4、S1-5、S1-7、S1-8、S3-1、S3-2、S3-2(1)、S4-4、S4-5 均与 *Halothiobacillus hydrothermalis* 相似性最高,同源性达 99%,最相似的模式菌株均为 *Halothiobacillus halophilus* strain DSM6132,同源性分别为 97%、98%、98%、98%、98%、98%、98%、98%、98%。菌株 S1-6、S3-4 均与 *Alcanivorax* sp.相似性最高,同源性达 99%(表 3-3),与最相似的模式菌株 *Alcanivorax balearicus* strain MACL04 同源性达 98%。根据相似度 $\geq 99\%$ 和 $99\% >$ 相似度 $\geq 97\%$ 划分种属,结合细菌形态学特性,可将各菌株鉴定到属,其中菌株 S1-2、S1-4、S1-5、S1-7、S1-8、S3-1、S3-2、S3-2(1)、S4-4、S4-5 均属于盐硫杆菌属 (*Halothiobacillus* sp.),菌株 S1-6、S3-4 属于食烷菌属 (*Alcanivorax* sp.)。

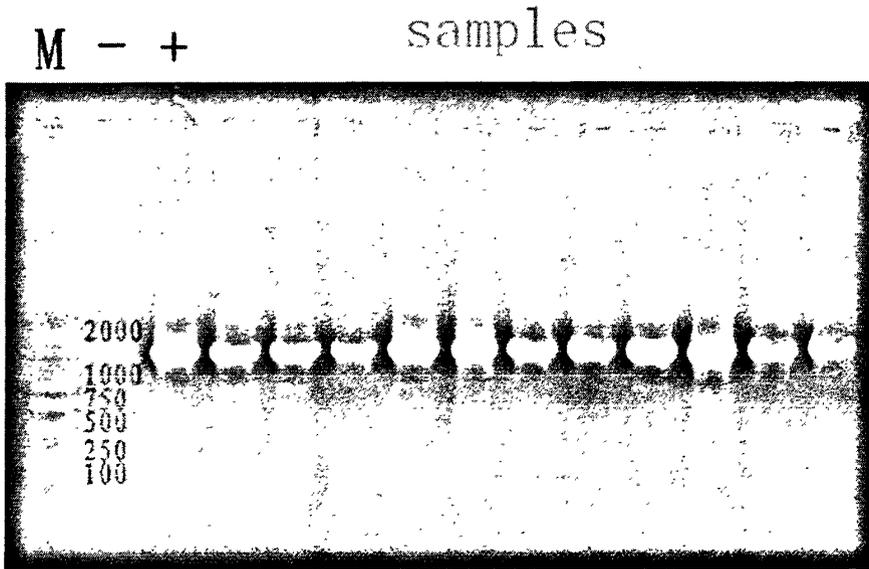


图3-5 筛选出的两株细菌的PCR扩增结果

Fig 3-5 Amplification of selected strains

备注:样品从左到右依次是:Marker、阳性对照、阴性对照、S1-2、S1-4、S1-5、S1-6、S1-7、S1-8、S3-1、S3-2、S3-2(1)、S3-4、S4-5;其中M是DL2000marker,分子量由上至下:2000,1000,750,500,250,100;+为阳性对照,-为阴性对照,其余为样品

表 3-3 细菌 16S rDNA 部分序列的同源检索结果

Table 3-3 Homology analysis of 4 isolates based on partial 16S rDNA sequences

菌株编号	16S rDNA 序列长度 (bp)	最近似菌株	序列号	相似度 (%)
S1-2	1451	<i>Halothiobacillus</i> sp.HL1	DQ469573	97
S1-4	1457	<i>Halothiobacillus halophilus</i> strain DSM6132	NR_026015	97
S1-5	1454	<i>Halothiobacillus halophilus</i> strain DSM6132	NR_026015	98
S1-6	1449	<i>Alcanivorax balearicus</i> strain MACL04	AY686709	98
S1-7	1455	<i>Halothiobacillus halophilus</i> strain DSM6132	NR_026015	98
S1-8	1458	<i>Halothiobacillus halophilus</i> strain DSM6132	NR_026015	98
S3-1	1456	<i>Halothiobacillus halophilus</i> strain DSM6132	NR_026015	98
S3-2	1451	<i>Halothiobacillus halophilus</i> strain DSM6132	NR_026015	98
S3-2(1)	1459	<i>Halothiobacillus halophilus</i> strain DSM6132	NR_026015	98
S3-4	1449	<i>Alcanivorax balearicus</i> strain MACL04	AY686709	97
S4-4	1454	<i>Halothiobacillus halophilus</i> strain DSM6132	NR_026015	98
S4-5	1459	<i>Halothiobacillus halophilus</i> strain DSM6132	NR_026015	98

3.2.3.3 细菌的生理生化特性

根据细菌常规形态、电镜观察及 16s rDNA 序列分析,可基本确定筛选出的 12 株细菌分属于盐硫杆菌属 (*Halothiobacillus* sp.) 及食烷菌属 (*Alcanivorax* sp.)。

由于各种细菌的新陈代谢类型不同,对不同物质利用后所产生的代谢产物有差异,所以常用生理生化反应来鉴别在形态或其他方面不易区分的微生物。细菌的生理生化反应是细菌分类鉴定的重要依据之一。因此实验选择两个属种的菌株 S1-2 及 S1-6,按《常见细菌系统鉴定手册》,对菌株 S1-2 和 S1-6 进行生理生化测定,结果见表 3-4。

两株细菌的主要生化反应特征:淀粉水解实验呈阴性;甲基红实验呈阴性;接触实验阴性;V-P 实验呈阴性;无机化能自养生长。但两种细菌的接触酶、亚硝酸盐还原、反硝化、葡萄糖氧化发酵反应不同。

根据已知的生理生化特性查阅伯杰细菌鉴定手册,并结合常规形态及 16s rDNA 序列分析,确定菌株 S1-2 为盐单胞菌属 (*Halomonas* sp.), 菌株 S1-6 食烷菌属 (*Alcanivorax* sp.)。

表 3-4 筛选出的两株细菌的生物学特性
Table 3-4 Biological characteristics of the selected two strains

	氧化酶	接触酶	革兰氏染色	运动性	乳糖	葡萄糖	麦芽糖	甲醇	乙醇	甘露醇	甲基红	V-P	ONP G	淀粉	硝酸盐还原	明胶	亚硝酸盐还原	葡萄糖氧化发酵	反硝化
S1-2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
S1-6	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-

“+”表示反应呈阳性positive,“-”表示反应呈阴性negative

3.2.4 系统发育分析

将菌株 S1-2 及 S1-6 基于 16S rDNA 部分序列和从数据库中获取的参照序列构建系统发育树 (图 3-6), 从图中可看出, 2 株细菌分属于 2 个不同的类群, 分别是 S1-2 属于 *Halothiobacillus*.sp, S1-6 属于 *Alcanivorax* sp.。

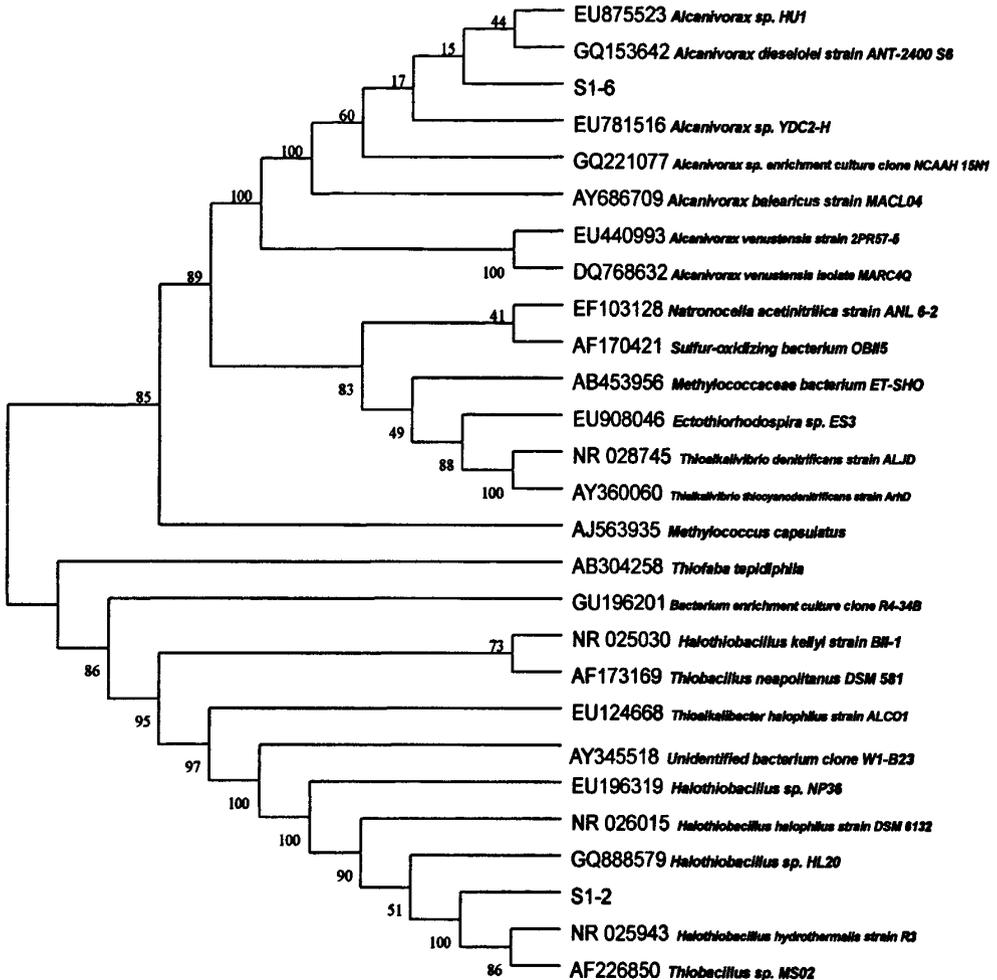


图 3-6 16s rDNA 序列构建的系统发育树

Fig 3-6. Phylogenetic tree based on partial 16S rDNA sequences of two strains and the references

3.3 讨论和小结

3.3.1 讨论

以深圳大鹏澳海水鱼类网箱养殖区硫化物含量高的底泥作为菌种来源, 以 $2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $\text{Na}_2\text{S}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 作为选择压力, 室温连续曝气富集培养 2 个月, 固液交替选

择培养的方法分离纯化得到细菌,并以分离得到的细菌对含硫代硫酸钠的液体培养基的pH、硫化物去除率及硫酸盐转化率为指标,从而筛选得到10株能将硫化物高效转化为硫酸盐的目标土著菌株。

筛选出来的细菌在含硫代硫酸钠 $5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的液体培养基中培养的过程中, pH值由最初的6.8下降到5以下后趋于稳定;硫酸根离子的质量浓度从最初的 $2327\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 增加到 $5900\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上,硫化物浓度从最初的 $1280\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 降到 $400\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下,硫酸根转化率及硫化物去除率达60%以上;且硫酸根及硫化物的质量浓度均呈对数增长。另外细菌的筛选过程中是以 Na_2S 作为选择压力^[101-106],说明实验筛选出来的两种细菌能将还原态的硫氧化成硫酸根离子,可以用于网箱养殖沉积环境中硫化物污染的改善修复。

3.3.2 小结

以深圳大鹏澳海水鱼类网箱养殖区硫化物含量高的底泥作为菌种来源,以 $2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $\text{Na}_2\text{S}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 作为选择压力,室温连续曝气富集培养2个月,固液交替选择培养,分离纯化筛选得到12株细菌。

筛选得到的细菌在含硫代硫酸钠的液体培养基中连续培养8d会使培养液的pH值从起始的6.8降到5.0以下,对硫化物的去除率及硫酸根的转化率均达60%以上。经16s rDNA序列分析,结合细菌形态及生理生化特征,确定筛选得到的12株细菌分属于盐硫杆状菌属(*Halothiobacillus*.sp)和食烷菌属(*Alcanivorax* sp)。两种细菌均为革兰氏阴性菌,呈短杆状,一种端生鞭毛,一种无鞭毛,两种细菌对有机碳源的利用能力不同。

第四章 结论与研究展望

4.1 本论文研究的主要结论

(1) 在养殖系统中, 细菌作为分解者能降解或氧化还原各种类型的有机和无机污染物, 同时本身又是其他水生生物的营养源, 在水生生态系统中占有重要位置。因此从养殖环境中筛选出有益微生物来分解和转化各种有机质及无机污染物, 能因地制宜地用于水产养殖环境的修复。

(2) 自然条件下, 微生物通常营共生生活, 要得到某一种或某一类微生物, 先对环境样品进行有目的的富集和驯化, 可以大大提高分离效率。富集、驯化条件是优势菌筛选的重要制约因素, 定时定量投加低浓度目标物是较好的驯化方式。通过不断增加污染物含量, 从而刺激降解菌的大量繁殖并成为优势菌。

筛选指标及方案的确定, 是决定筛选成功的关键因素。本研究筛选的微生物主要用于海水网箱养殖沉积环境的修复, 降解的目的污染物为有机质及硫化物。因此筛选过程中分别考察了 COD、BOD、COD 去除率及 pH、硫化物去除率、硫酸盐转换率, 最后筛选出 4 株有机物降解细菌及 12 株硫氧化细菌。

通过细菌常规形态及电镜观察、16S rDNA 序列分析, 结合细菌生理生化特征, 基本确定筛选出的 4 株有机污染物降解菌中, C41-2 隶属于表皮葡萄球菌属 (*Staphylococcus* sp.), C42-2 隶属于盐单胞菌属 (*Halomonas* sp.), C41-4 和 C42-4 分别与盐单胞菌属 (*Halomonas* sp.) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.) 相近; 筛选出来的 12 株硫氧化细菌分属于盐硫杆状菌属 (*Halothiobacillus* sp) 和食烷菌属 (*Alcanivorax* sp)。

(3) 通过对筛选出来的菌株进行其对目标底物的降解性能试验, 初步证明筛选出来的细菌对网箱养殖沉积环境中有机质及硫化物污染的降解可行性。

筛选得到的 4 株有机物降解细菌在液体饵料培养基中, 5 日培养化学需氧量 (COD_{Mn}) 去除率在 13.58%~46.9% 之间, 有机物的可生化降解性 (BOD₅/COD₀) 在 81.56%~89.43% 之间。4 株细菌两两组合的 5 日培养 COD_{Mn} 平均去除率为 64.91±6.51%, 是单株菌平均去除率 (30.60±13.63%) 的 2 倍多。筛选得到的 12 株硫氧化细菌均能将还原态硫转化为硫酸根离子, 在含硫代硫酸钠的液体培养基中连续培养 8d 会使培养液的 pH 值从起始的 6.8 降到 5 以下, 对硫化物的去除率及硫酸根的转化率均达 60% 以上。

4.2 本论文研究的创新之处

以网箱养殖区有机物及硫化物污染严重的底泥作为菌种来源,以网箱养殖主要有机污染物(灭菌的野杂鱼鱼糜)和硫化物(硫化钠)作为选择压力,在室温条件下连续曝气富集培养2个月,从而抑制杂菌生长,刺激有机物降解细菌和硫化物细菌大量繁殖成为优势菌,最后分离纯化和筛选得到了4株细菌对鱼糜饵料有机物和12株对硫化物有快速、高效降解能力的目标土著菌株。

4.3 研究展望

利用微生物修复水产养殖废水有良好的应用前景,随着水产养殖业的不断扩大集约化发展,水产养殖废水的有效处理方式不仅影响养殖系统周边的生态环境,也影响着渔业经济的可持续健康发展。本研究筛选出了几株能高效降解网箱养殖沉积环境中有机质及硫化物的细菌,初步试验证明了其进行养殖修复的可行性,但研究工作才刚刚起步,还有一系列的研究需继续开展。

(1) 微生物降解环境污染物是环境污染生物修复的重要研究方向之一。本研究只是筛选出了几株对网箱养殖沉积环境中的有机质及硫化物有较好降解效果的细菌,需要进一步研究已获得的细菌对水生生物有无致病性、细菌间有无拮抗性,及其混合培养与单株细菌对沉积物的降解活性差别。

(2) 需要进一步对已经筛选出来的细菌进行养殖修复室内模拟实验,得出高效修复所需要的最佳环境条件及细菌复合组合。另外要逐渐从室内模拟转向实际应用修复研究。

(3) 微生物的集中修复效果良好,但在实际应用中考虑到养殖水体的面积及水体的流动性,游离的微生物不能很好地发挥修复效果,需要将游离微生物固定化或将微生物修复与其他动植物修复结合以更好地发挥效用,这就需要考虑到具体的固定化条件及应用措施的良好选择。

(4) 环境中降解菌的种群动态、微生物的群落结构变化等特征对有机、无机污染物的水平以及生物修复的程度具有一定的指示作用。因此有必要建立养殖系统微生物群落结构变化的检测方法。

(5) 本研究主要针对于对网箱养殖沉积环境中有机质及硫化物的降解菌的筛选,还可以继续进行重金属、痕量难降解的有毒有机物等降解研究。

(6) 研究降解菌在生物降解过程中的特异性基因克隆、表达,利用生物技术手段构建高效的遗传工程菌并应用于水产养殖环境污染的治理。

参考文献

- [1] 农业部, 国家环保总局. 2008 年中国渔业生态环境质量公报.
- [2] Wu, R S S. The environmental impact of marine fish culture: towards a sustainable future [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 1995, 31:159-166.
- [3] Read P, Fernandes T. Management of environmental impacts of marine aquaculture in Europe [J]. *Aquaculture*, 226:139-163.
- [4] Paez-Osuna F. The environmental impact of shrimp aquaculture: a global perspective [J]. *Environmental Pollution*, 2001, 112(2):229-231.
- [5] Aure J, Stigebrandt A. Quantitative estimates of eutrophication effects of fish farming on fjords [J]. *Aquaculture*, 1990, 90:135-156.
- [6] Wu, S S S, Lam K S, MacKay D W, et al.. Impact of marine fish farming on water quality and bottom sediment: a case study of the sub-tropical environment [J]. *Marine environmental research*, 1994, 38:115-145.
- [7] 袁有宪. 天然沸石用于水产养殖的研究 I. 丝光沸石和斜法沸石对水中 NH_4^+ 的吸附 [J]. *海洋水产研究*, 1987(8):55-60.
- [8] 高红梅. 沸石去除养殖水体中氨氮的作用的研究 [J]. *北京水产*, 2005, 1:9-11.
- [9] 贾晓平, 蔡文贵, 林钦. 我国沿海水域的主要污染问题及其对海水增养殖的影响 [J]. *中国水产科学*, 1997, 4(4):78-82.
- [10] 马文漪, 杨柳燕. 环境微生物工程 [M]. 南京: 南京大学出版社, 1998.
- [11] Autry A R, Ellis G M. Bioremediation: An effective remedial alternative for petroleum hydrocarbon-contaminated soil [J]. *Environ Prog*, 1992, 11(4):318-323.
- [12] Hicks B N, Caplan J A. Bioremediation: A natural solution [J]. *Pollution Engineering*, 1993, 25(2):30-33.
- [13] Macdonald J A, Rittman B E. Performance standards for in situ bioremediation [J]. *Environ Sci Technol*, 1993, 27(10):1974-1979.
- [14] Sangamaheswaran A P, Kumar R S. Bioremediation technology for the treatment of shrimp farm effluent: an ecofriendly approach [J]. *Perspectives In Mariculture*, 2001, 413-420.
- [15] 杨宇峰, 费修纆. 大型海藻对富营养化海水养殖区生物修复的研究展望 [J]. *中国海洋大学学报*, 2003, 33 (1): 53-57.
- [16] Haglund K, Pedersen M. Outdoor pond cultivation of the subtropical marine red alga *Gracilaria tenuistipitata* in brackish water in Sweden. Growth, nutrient uptake, co-cultivation with rainbow trout and epiphyte control [J]. *Appl phycol*, 1993, 5:271-284.
- [17] Troell M, Halling C, Nilsson A, et al. Integrated marine cultivation of *Gracilaria*

- chilensis(Gracilariales,Rhodophyta)and salmon cage for reduced environmental impact and increased economic output[J].Aquaculture,1997,156:45-61.
- [18] Thompson Fabiano LoPes, Abreu Paulo Cesar, Wasielsky Wilson.Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimculture[J].Aqua.2002, 203(3-4): 263-278
- [19] 堤裕昭,等.鱼类养殖场直下堆积したヘドロ(有机汚泥)のイゴカイによる浄化の試み[J].Nippon Suisan Gakkaishi,1993,59(8):1343-1347.
- [20] Brooks K M,Stierns A R,Mahnken C V et al.Chemical and biological remediation of the benthos near Atlantic salmon farms [J].Aquaculture, 2003,219(1-4):355-377.
- [21] 付晚涛,张卫,金美芳,等.繁茂膜海绵滤食养殖水体中过剩饵料的研究[J].海洋环境科学,2006,35(3):29-32.
- [22] Martina Milanese, Elisabetta Cheloss,i Renata Mancon,i Antonio Sara, Marzia Sidr,i Roberto Pronzato. Biomolecular Engineering 2003, 20(4-6):363~368
- [23] 袁秀堂.刺参 *Apostichopus japonicus*(Selenka)生理生态学及其生物修复作用的研究[D].青岛:中国科学院海洋研究所,2005.
- [24] Jones A B,Preston N P,Dennison W C.The efficiency and condition of oysters and macroalgae used as biological filters of shrimp pond effluent[J].Aquaculture Research, 2002,33(1):1-19.
- [25] S Gifford, H Dunstan, WO Connor, GR Macfarlane.Marine Pollution Bulletin,2005,50(4):417-422.
- [26] OfficerCB, SmaydaT, Jand MannR Benthic filter feeding:a natural eutrophication control. [J]Mar Ecol Prog Ser1982, 9:203-210
- [27] Rodhouse, Roden Carbon budget for a coasta in let in relation to intensive cultivation of suspension-feeding bivalve molluses[J].Mar Ecol Prog Ser, 1987, 36:225-236
- [28] 马文漪, 杨柳燕环境微生物工程[M]南京:南京大学出版社, 1998.
- [29] 李秋芬, 袁有宪海水养殖环境生物修复技术的研究展望[J] 中国水产科学 2000, 7(2):90-92.
- [30] Pichard, et.al.Oill spill bioremediation:experience, lessons and results from the Exxon Valdex oill spill in Alaska[J].Biodegradation, 1992, 3(2-3):315-335.
- [31] Pichard, et.al.EPA, S Alaska oill spill bioremediation Projeet[J].Environ sci Technol.1991, 25(3):372-379.
- [32] 李秋芬, 曲克明, 辛福言. 袁有宪. 2001. 虾池环境生物修复作用菌的分离与筛选[J]. 应用与环境生物学报. 7(33): 281~285.
- [33] Pinar G.Removal of h igh concentrations of nitrate from industrial wastewaters by bacteria[J].Appl.Environ.Microbiol.1997,63:2071-2073.
- [34] 谢航. 水产养殖功能微生物的筛选与多菌种混合培养条件的研究[D].中国优秀博硕士学位论文

- 位论文全文数据库 (硕士),2005,(08).
- [35] 俞勇,李会荣,李筠,纪伟尚,徐怀恕. 虾池养殖环境有机污染物降解细菌的筛选[J].青岛海洋大学学报(自然科学版), 2003,(01).
- [36] 堤裕昭,等.鱼类养殖场直下堆积したヘドロ(有机汚泥)のイゴカイによる浄化の試み[J].Nippon Suisan Gakkaishi,1993,59(8):1343-1347.
- [37] 王亚南; 近海养殖场底泥微生物区系结构和功能的研究[D]; 华南理工大学,2004 年
- [38] 比嘉照夫著.拯救地球大变革[M].冯玉润译.北京:中国农业大学出版社,1997.10-30
- [39] 李卓佳,张庆,陈康德,等.应用微生物健康养殖斑节对虾的研究[J].中山大学学报(自然科学版),2000,39:229-232.
- [40] 李卓佳,张庆.有益微生物改善养殖生态研究 I. 复合微生物分解有机底泥及对鱼类的促生长效应[J].湛江海洋大学学报,1998,18 (1): 5-8.
- [41] 蔡惠凤,陆开宏,金春华,等.养殖池塘污染底泥生物修复的室内比较实验[J].中国水产科学, 2006, 13(1):140-145.
- [42] 吴伟.应用复合微生物制剂控制养殖水体水质因子初探[J].湛江海洋大学学报, 1997(1):16-20
- [43] 林新华,陈强等联合使用 3 种制剂净化特种养殖水体[J].中国水产科学, 2001, 8(4):82-86
- [44] 王彦波,许梓荣,郭笔龙.浙江大学学报(农业与生命科学版),2005,31(2):199~202.
- [45] 胡德蓉,林钦.硫酸盐还原菌(SRB)的生态特性及其检测方法研究进展[J].南方水产,2007,(03)
- [46] 吴伟,余晓丽.固定化微生物对养殖水体中 NH_4^+-N 和 NO_2-N 的转化作用[J]应用与环境生物学报,2001,(02).
- [47] 郑耀通,胡开辉.固定化光合细菌净化养鱼水质试验[J].中国水产科学,1999,6(4):54-58.
- [48] 邹玉霞,幸福言,李秋芬,等.对虾养殖池环境修复作用菌固定化的研究[J].海洋科学,2004,28(8):5-8,75.
- [49] Sudeep Perumbakkam(2006) A bioremediation approach using natural transformation in pure-culture and mixed-population biofilms[J].Biodegradation 17:545-557.
- [50] J. Zamora-Castro, J. Paniagua-Michel, C. Lezama-Cervantes(2007) A Novel Approach for Bioremediation of a Coastal Marine Wastewater Effluent Based on Artificial Microbial Mats[J].Marine biotechnology.
- [51] Abbas Rezaee ,Hatam Godini ,Said Dehestani(2008) Biological denitrification by *Pseudomonas stutzeri* immobilized on microbial cellulose. World [J] Microbiol Biotechnol 16:1-9.
- [52] 周艳红,黎颖治,黄凤莲,张寒冰,夏北成,陈桂珠.阿科蔓(AquaMats)生态基+复合微生物原位修复养殖水体中磷的动态[J].农业环境科学学报,2008,(03).

- [53] 李非里, 盛礼俊, 俞桂莲, 等. 甲壳素作为微生物载体在废水生化处理中的应用[J]. 浙江工业大学学报, 2006, 6, 28(2):152-159.
- [54] Hisashi N, Tasako H, Kenji et al. Treatment of aquarium water by denitrifying Photosynthetic bacteria using inumobilized Polyvinylalcohol beads[J]. Journal of Bioscience and bioengineering, 1999, 87(2):189-193.
- [55] 幸福言, 李秋芬, 邹玉霞, 曲克明, 袁有宪. 虾池环境生物修复作用菌的模拟应用[J]. 应用与环境生物学报, 2002, (01)
- [56] Pritchard P H, Costa C F. EPA's Alaska oil spill bioremediation project[J]. Environmental Science and Technology, 1991, 25(3):372-379.
- [57] 晏小霞, 唐文浩. 养殖水环境生物修复研究进展[J]. 热带农业科学, 2004, (02).
- [58] 程树培, 等. 光合细菌与酵母跨界融合(杂合)子发酵味精废水研究. 环境科学学报, 1996, 16(1):66-73.
- [59] 张雅芝, 苏永全. 论我国海水鱼类网箱养殖的可持续发展[J]. 海洋科学, 2001, 25(7):52-56.
- [60] WU R S S. The environmental impact of marine fish culture: towards a sustainable future[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 1995, 31(4-12):159-166.
- [61] 黄洪辉, 林钦, 王文质, 等. 大鹏澳海水鱼类网箱养殖对水环境的影响[J]. 南方水产, 2005, 1(3):9-17.
- [62] 何国民, 卢婉娴, 刘豫广, 等. 海湾网箱鱼场老化特征分析[J]. 中国水产科学, 1997, 4(5):76-79.
- [63] 黄洪辉, 林钦, 甘居利, 等. 大鹏澳海水鱼类网箱养殖对沉积环境的影响[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(1):75-80.
- [64] 黄长江, 董巧香, 郑磊. 1997年底中国东南沿海大规模赤潮原因生物的形态分类与生态学特征[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(6):581-590.
- [65] GB/T13909-92, 海洋调查规范第6部份: 海洋生物调查[S].
- [66] BOSSHARD P P, ABELS S, ZBINDEN R, et al. Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic gram-positive rods in the clinical laboratory (an 18-month evaluation)[J]. *Journal of Clinic Microbiology*, 2003, 41(9):4134-4140.
- [67] CLARRIDGE J E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases[J]. *Clinic. Microbiology Review*, 2004, 17(4): 840-862.
- [68] 田中啓陽. 自家汚染の機構—汚染物質の堆積過程[C]//日本水产学会编. 浅海养殖と自家汚染. 东京:恒星社厚生阁, 1977:42-51.
- [69] HALL P O J, ANDERSON L G, HOLBY O, et al. Chemical flux and mass balances in a marine fish cage farm I. Carbon[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 1990, 61:61-73.

- [70] Rossell Mora, R. Updating prokaryotic taxonomy. *J. Bacteriol.*, 2005, 187(18):6255-6257.
- [71] Rossell Mora R, and Amann R. The species concept for prokaryotes. *Microbiol. Rev.*, 2001, 25:39-67.
- [72] Coenye T, Gevers D, Van de Peer Y, et al. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2005, 29:147-167.
- [73] Drancourt M, Bollet C, Carlouz R, et al. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, 38(10):3623-3630.
- [74] Bosshard P P, Abels S, Zbinden R, et al. Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic gram-positive rods in the clinical laboratory (an 18 month evaluation). *J. Clin. Microbiol.*, 2003, 41(9):4134-4140.
- [75] 蔡惠文. 海岸带网箱养殖环境容量研究[D]. 中国海洋大学, 2007.
- [76] 甘居利, 贾晓平, 林钦, 李纯厚. 海水网箱渔场老化风险初探[J]. *中国水产科学*, 2001, (03)
- [77] 李晓敏, 曲克明, 孙耀, 张前前. 海水养殖沉积环境硫化物污染及修复[J]. *海洋水产研究*. 2005, 26(6).
- [78] 祁铭华, 马绍赛, 曲克明. 沉积环境中硫化物的形成及其与贝类养殖的关系[J]. *海洋水产研究*. 2001, 25(1): 85-89.
- [79] Hisashi Yokoyama . 2003 . Environmental quality criteria for fish farms in Japan. *Aquaculture*, 22: 645-656.
- [80] Malcolm.W. Clark, Mcconchie.D. , and Lewis.D. W . 1998. Redox stratification and heavy metal partitioning in Avicennia dominated mangrove sediments: A geochemical model. *Chemical Geology*. 149: 147-171.
- [81] Marius. C. B. Kiemer, Kenneth. D. Black. David Lussot, Alistair. M. Bullock. and Ivan Ezzi. 1995. The effects of chronic and acute exposure to hydrogen sulphide on Atlantic salmon. *Aquaculture*. 135: 311-327.
- [82] 王艳锦, 郑正, 周培国, 钟云, 彭晓成. 不同培养基中氧化亚铁硫杆菌生长及沉淀研究[J]. *生物技术*. 2006, 16(4):70-73.
- [83] 张兰河, 谢维民, 汪群慧, 王孝强, 夏波. 高效硫氧化菌的筛选及其应用[J]. *哈尔滨工业大学学报*, 2007(4):39
- [84] 杨显万, 沈庆峰, 郭玉霞. 微生物湿法冶金[M]. 北京:冶金工业出版社, 2003.
- [85] 袁欣, 袁楚雄, 钟康年, 等. 非金属矿物的微生物加工技术研究(I)——氧化亚铁硫杆菌及其生长规律研究[J]. *中国非金属矿工业导刊*, 2000, 15(3):12-14, 23.

- [86] 邹平, 杨家明, 周兴龙, 等. 嗜热嗜酸菌生物浸出低品位原生硫化铜矿[J]. 有色金属, 2003, 55(2):21-24.
- [87] 吴根, 任爱玲. 烟气脱硫细菌的筛选、培养及性能研究[J]. 河北科技大学学报, 2001, 22(2):19-21.
- [88] 王世梅, 周立祥, 黄峰源, 等. 耐酸性异养菌的分离及其在制革污泥重金属生物淋滤中的作用[J]. 环境科学, 2004, 25(5):153-157.
- [89] 周立祥, 方迪, 周顺桂, 等. 利用嗜酸性硫杆菌去除制革污泥中铬的研究[J]. 环境科学, 2004, 25(1):62-66.
- [90] 王亚南, 王保军, 戴欣, 焦念志, 彭志英, 刘双江. 海水养殖场底泥中转化硫和磷化合物的微生物及其多样性[J]. 环境科学, 2005, 26(2)
- [91] 孔祥平, 包木太, 等. 油田水中细菌群落分析[J]. 油田化学, 2003, 20(4):372-376.
- [92] 王桂春, 张兆琪, 等. 无机物对河蟹和罗氏沼虾毒性的研究进展[J]. 水利渔业, 2003, 20(6):21-23.
- [93] 张晋华, 王雷, 等. 水稻土中半胱氨酸分解产生含硫气体的研究[J]. 环境化学, 2001, 20(4):356-361.
- [94] Minami K, Kanda K, Tsurute H, Emission of biogenic sulfur gases from rice paddies in japan, in biogeochemistry and global change, edited by oremland R S, New York, USA:Chapman &Hall, 1993.405-419.
- [95] Turchyn A V, Schrag D P. Oxygen isotope constraints on the sulfur cycles over the past 10 million years[J]. Science, 2004, 303:2004-2007.
- [96] 胡德蓉, 林钦, 柯常亮. 大鹏澳网箱养殖区沉积物硫酸盐还原菌(SRB)及其与环境因子关系的初步研究[J]. 南方水产, 2007, (05).
- [97] 胡德蓉, 林钦. 硫酸盐还原菌(SRB)的生态特性及其检测方法研究进展[J]. 南方水产, 2007, (03).
- [98] John.G.Holt et al, Bergey's Manual of Determinative bacteriology 9th.ed.1994, 427-455.
- [99] 国家环境保护总局《水和废水分析检测方法》编委会. 水和废水分析检测方法[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [100] 鲁光四等. 水质分析方法, 学术书刊出版社, 1989, 81-103.
- [101] 马艳玲, 赵景联, 杨伯伦, 彭辉. 脱硫细菌的筛选及其对硫化氢降解性能研究[J]. 化工环保, 2004, 24: 8-10.
- [102] 邱丽娜, 李圆原, 弓爱君, 闫海, 王小宁. 一株硫氧化菌的筛选与表征[J]. 北京科技大学学报, 2007, 29(2):212-215.
- [103] 王玮. 一株脱硫自养菌的分离与特性研究[J]. 工业微生物, 1997, 27(4):30-33.
- [104] 周顺桂, 王世梅, 余素萍, 周立祥. 污泥中氧化亚铁硫杆菌的分离及其应用效果[J]. 环

境科学, 2003, 24(3):56-60.

[105] 骆海朋, 赵军, 杨晓红, 曹亚莉, 杨秀山. 嗜热氧化亚铁菌株的筛选及其特性研究.[J].

首都师范大学学报(自然科学版), 2002, 23(3):44-46.

[106] 张建斌, 张通, 马凯, 陈国华, 张冬艳, 魏雄辉. 一株耐高温碱性脱硫菌的分离及鉴

定[J].中国科学, 2007, 37(6):597-603.

附录

学术会议

- 1、孟霞，黄洪辉，贾晓平。微生物在海水养殖环境调控与修复中的研究进展，泛珠三角区域渔业经济合作论坛第三次年会，江西南昌，2008.11
- 2、孟霞，黄洪辉，贾晓平。网箱养殖沉积物种有机物降解细菌的筛选和鉴定，2009年中国水产学会年会，海南海口，2009.11

参与的科研课题

- 1、浅海养殖环境综合修复研究，中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金（中国水产科学研究院南海水产研究所）项目（2007ZD07）；
- 2、海水养殖环境综合修复技术研究，广东省科技计划项目（2006A36502003）；
- 3、海湾健康评价与生态修复技术研究，广东省海洋渔业科技推广专项项目（A200899J01）；
- 4、海湾养殖新型网箱研制与健康养殖技术研究，十一五国家科技支撑计划（2006BAD09A14）；
- 5、浅海典型生境高效生态增养殖技术与开发，十一五国家科技支撑计划（2006BAD09A02）；
- 6、珠海市珠江磨刀门青湾农业发展公司养殖环境现状调查与评价，珠海市金湾区农业局委托项目

已发表论文

- 1、孟霞，黄洪辉，贾晓平。微生物在海水养殖环境调控与修复中的研究进展，泛珠三角区域渔业经济合作论坛第三次年会会议论文集[C]，2008，73-80

待发表论文

- 1、孟霞，黄洪辉，古小莉，贾晓平。网箱养殖沉积环境中有机污染物降解细菌的筛选和鉴定（安全与环境科学学报，待刊）
- 2、孟霞，黄洪辉，古小莉，贾晓平。网箱养殖沉积环境中硫氧化细菌的筛选和鉴定（已投稿）

致 谢

本论文能够顺利完成,首先要感谢导师贾晓平研究员和黄洪辉副研究员!三年来,从论文的选题构思,实验设计和实施,样品的分析测试,以及论文撰写等,都倾注了两位导师大量的心血。导师渊博的学识,严谨的治学态度,求实创新的科研探索精神,以及对我生活上的细心关怀都给予了我莫大的支持和动力,激励和鞭策我在今后的学习和工作中要更加努力。

特别感谢古小莉师姐对我实验操作、仪器使用和生活等方面的帮助、关心和支持!感谢渔业环境研究室的杜飞雁、廖秀丽、齐占会、柯常亮、戴明、陈海刚和马胜伟等老师们,他们在我出海调查采样、实验操作和样品分析测试中给予我耐心指教与帮助!

感谢我的父母,他们给了我健康的身体、坚韧的性格和吃苦耐劳的品德!感谢我的亲人们,他们给了我很多鼓励和祝福!

在此,我还要对三年来所有关心和帮助过我的老师、同学和朋友们表示最衷心的感谢!

本论文研究得到了中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(中国水产科学研究院南海水产研究所)项目(2007ZD07);广东省科技计划项目(2006A36502003;2006B60202026;2007A032600004);广东省海洋渔业科技推广专项项目(A200899J01);十一五国家科技支撑计划(2006BAD09A14,2006BAD09A02)的联合资助。

孟 霞

2010年6月10日