

典型对虾养殖水体中参与硝化与反硝化过程的微生物群落结构

李敬源, 林炜铁*, 罗剑飞, 田国梁

华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510006

摘要: 【目的】本研究旨在分析典型虾塘养殖水体中参与氮循环关键过程的菌群多样性, 为指导实际对虾养殖水体中 NH_4^+ 和 NO_2^- 的微生物降解、水体氮素污染控制以及虾塘养殖氮素循环的有效管理提供科学依据。【方法】使用聚合酶链式反应及变性梯度凝胶电泳技术 (Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, PCR-DGGE) 从 8 个不同地点的虾塘水样中确定代表性水样, 以此为典型水样进行研究, 构建了氨单加氧酶基因 (*amoA*)、亚硝酸盐氧化还原酶基因 (*nxrA*)、亚硝酸盐还原酶基因 (*nirS*) 的克隆文库。利用限制性片段长度多态性 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) 技术将克隆文库进行酶切分析。【结果】通过序列多态性分析, 表明 *amoA* 基因克隆文库中所有序列都属于变形杆菌门 β 亚纲 (β -Proteobacteria), 分别为亚硝化单细胞菌属 (*Nitrosomonas*) (81%) 和亚硝化螺旋菌属 (*Nitrospira*) (19%) 2 个属。*nxrA* 基因克隆文库检测到 α -Proteobacteria 和 δ -Proteobacteria 两个亚纲, 其中硝化杆菌属 (*Nitrobacter*) 是优势菌群, 占整个文库的 92%, 仅有一个类群属于 δ 亚纲的脱硫杆菌科 (Desulfobacteraceae) (8%)。*nirS* 基因文库群落结构相对于 *amoA* 和 *nxrA* 基因文库较复杂, 分别为 α -Proteobacteria、 β -Proteobacteria 亚纲和 Actinobacteria, 序列分析表明 25% 的类群为固氮弧菌属 (*Azoarcus*) 25% 的类群为 (*Polymorphum*) 20% 的类群为需氧去氮菌属 (*Thauera*), 10% 的类群为 (*Sophophora*), 10% 的类群为链霉菌属 (*Streptomyces*) 5% 的类群为 (*Brachymonas*) 5% 的类群为 (*Ruegeria*)。【结论】典型虾塘养殖水环境中氮素循环关键过程的菌群多样性丰富, 其中亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*) 和硝化杆菌属 (*Nitrobacter*) 分别是此环境中主要的氨氧化作用推动者和亚硝酸盐氧化作用推动者, 而在反硝化重要环节中, 固氮弧菌属等多种菌群都起着推动作用。关键词: PCR-DGGE, 氨单加氧酶基因 (*amoA*), 亚硝酸盐氧化还原酶基因 (*nxrA*), 亚硝酸盐还原酶基因 (*nirS*), 克隆文库, 系统发育树

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 04-0478-11

N 循环包括生物固氮、氨氧化、亚硝酸盐氧化、反硝化及同化等作用^[1-2]。其中氨氧化过程和亚硝酸盐氧化过程由氨氧化菌 (AOB) 和亚硝酸盐氧化

菌 (NOB) 推动, 氨单加氧酶 (Amo) 和亚硝酸盐氧化还原酶 (Nxr) 是这两个过程中的关键酶^[3]。其编码基因 (*amoA*) 和 (*nxrA*) 常用于 AOB 和 NOB 多样性

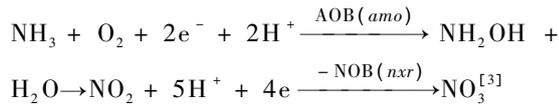
基金项目: 国家自然科学基金 (21076090)

* 通信作者。Tel: +86-20-39380658; E-mail: weitie@21.cn.com

作者简介: 李敬源 (1987-), 女, 四川人, 硕士研究生, 研究方向为环境微生物学。E-mail: teddy087@163.com

收稿日期: 2011-12-03; 修回日期: 2012-02-23

的研究^[4-6]。



反硝化作用包括 4 个步骤,由硝酸盐还原酶(Nar),亚硝酸盐还原酶(Nir),氧化氮还原酶(Nor),氧化亚氮还原酶(Nos)将 NO_3^- 还原为 N_2 。在反硝化细菌的功能基因中研究最多的是关键酶基因 *Nir*, *Nir* 基因有两种类型 *nirS* 和 *nirK*, *NirS* 的分布更广,已用于反硝化菌群落的研究^[7]。



虾养殖塘环境是一个典型的生物硝化系统,高浓度氨对鱼虾等具有毒害作用,氨的积累危害到水产养殖业的健康发展,成为绿色水产养殖的瓶颈^[8]。目前有关水产养殖 N 的研究主要集中于 N 在系统中的收支平衡以及氨氮、亚硝酸盐累积对鱼虾毒害等方面,而有关 N 的生物转化及其相关微生物的研究尚少见报道^[9-10]。关于氮循环微生物的研究,在生物化学和生物信息学的发展基础上,解析参与氮循环不同代谢过程的功能酶与功能基因,利于从微生物功能基因多样性角度深入研究氮循环过程及其影响机制^[5]。

本研究通过对不同地点虾塘养殖水样的 PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, PCR-DGGE) 图谱进行

分析,确定典型水样为研究对象,再以水体 N 循环中的氨氧化、硝化、反硝化限速步骤中的三种关键酶:氨单加氧酶(AmoA)、亚硝酸盐氧还酶(NxrA)、亚硝酸盐还原酶(NirS) 3 种酶基因为靶标,构建克隆文库,利用限制性片段长度多态性(RFLP) 技术将克隆文库进行酶切分析,通过序列多态性分析较全面地揭示典型虾养殖水中参与氮循环硝化和反硝化关键过程的群落结构,并从功能基因水平了解各菌群在硝化和反硝化过程中的作用。为指导实际水产养殖环境中 NH_4^+ 和 NO_2^- 的微生物降解、水体氮素污染控制以及虾塘养殖氮素循环的有效管理提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集:对珠三角地区江门市、珠海市、中山市、台山市的 8 个不同地点的对虾养殖场进行不同空间养殖塘水的采样,采样时间为 2010 年 11 月。采用正方形 5 点取样法,使用经高温湿热灭菌处理的有机玻璃采水器,将表层水样灌入瓶中并在溢流状态下旋紧瓶盖,使取样瓶内尽量不含空气。水样立即置于 4℃ 保存,并运送回实验室处理检测。提取基因组 DNA 并于 -20℃ 保存。各水样采集信息如表 1 所示。

表 1 不同空间取样养殖水的基本信息

Table 1 Information of samples from different areas

Sample number	Sampling site	Area/m ²	c(Total N)/(mg/L)	Pond age/year
1	No. 01, Shi Jiaozui Village, Haiyan Town, Taishan City (台山市海宴镇石角嘴村 01 号)	6667	7.85	2
2	No. 02, Lianhe Village, Muzhou Town, Jiangmen City (江门市睦洲镇联合村 02 号)	5333.6	5.48	2.5
3	No. 01, Shatou Village, Hongqi Town, Zhuhai City (珠海市红旗镇沙头围村 01 号)	7333.7	6.17	2
4	No. 01, Xianan Village, Gangkou Town, Zhongshan City (中山市港口镇下南村 01 号)	11333.9	6.06	3
5	No. 01, Silian Village, Banfu Town, Zhongshan city (中山市板芙镇四联村 01 号)	6667	7.17	3
6	No. 02, Da aoyi Village, Daao Town, Jiangmen City (江门市大鳌镇大鳌一村 02 号)	8000.4	7.85	3
7	No. 02, Shawei Village, Haiyan Town, Taishan City (台山市海晏镇沙尾村 02 号)	8000.4	5.46	2
8	No. 01, Xiazhou Village, Lianzhou Town, Zhuhai City (珠海市莲洲镇下洲村 01 号)	6667	6.59	2

1.1.2 试剂和仪器:BIO-RAD DCodeTM Universal Mutation Detection System、Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 (TaKaRa)、pMD19-T simple Vector (TaKaRa)、*Msp* I、*Hae* III (TaKaRa)、*Taq* I (TaKaRa)、引物 (Invitrogen)、金属浴、PCR 仪 (BIO-RAD)、核酸电泳仪 (BIO-RAD)、凝胶成像仪 (BIO-

RAD)。

1.2 样品基因组 DNA 的提取与 16S rRNA PCR 扩增

虾塘水 8000 × g 离心收集菌体,再以溶菌酶结合 CTAB 法提取基因组^[11],用 DNA 凝胶纯化试剂盒 (TaKaRa) 纯化 DNA。

以提取的总 DNA 为模板,用 341F-GC-clamp 和 518R 引物对^[12]对 16SrDNA 进行扩增,引物:341F-GC:5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGG GCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3', 518R: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'。PCR 反应程序采用降落式 PCR^[13]。

1.3 DGGE 与 DGGE 图谱分析

采用 BIO-RAD DCodeTM Universal Mutation Detection System 基因突变检测系统对 PCR 产物进行 DGGE 分析,丙烯酰胺凝胶浓度为 10%,检测 16S rRNA PCR 产物变性剂浓度为 40% - 60%。在 80 V、60℃ 条件下电泳 12 h。电泳结束后,小心取出凝胶,按银染色法染色,再用扫描仪拍摄成像。并用 BIO-RAD 公司的 Quantity One 软件对图谱进行分析,经过泳道(Lane)识别、条带(Band)识别和配对(Match)和结果输出(report)4 个步骤,对图谱中的条带进行分析得到不同样品之间的对比分析结果,主要包括泳道对比图、相似性矩阵图和半定量分析结果,以此确定典型水样。

1.4 典型样品 *amoA* 基因、*nxrA* 基因、*nirS* 基因的扩增与纯化

1.4.1 *amoA* 基因的 PCR 扩增:引物:*amoA*-1F(5'-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3'), *amoA*-2R (5'-CCCC TCKGSAAAGCCTTCTTC-3')^[14];扩增条件为:94℃ 4 min 94℃ 1 min 55℃ 45 s 72℃ 1 min 30 个循环,72℃ 10 min。

1.4.2 *nxrA* 基因的 PCR 扩增:引物:*nxrA*-F(5'-CAGACCGACGTGTGCCAAAG-3'), *nxrA*-R (5'-TCYACAAGGAACGGAAGGTC-3')^[15];扩增条件为:94℃ 4 min 94℃ 45 s 55℃ 45 s 72℃ 1 min 30 个循环,72℃ 10 min。

1.4.3 *nirS* 基因的 PCR 扩增:引物:*nirS*1F(5'-CCTAYTGCCGCCRCART-3'), *nirS*6R (5'-CGTTG AACTTRCCGGT-3')^[16];扩增条件为:94℃ 4 min, 94℃ 45 s,51℃ 45 s,72℃ 1 min,30 个循环,72℃ 10 min。

1.4.4 PCR 产物的纯化:使用 DNA 纯化试剂盒(Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 (TaKaRa))进行 PCR 产物的纯化。

1.5 克隆文库的构建及阳性克隆子的筛选

参照试剂盒说明,将纯化后的 PCR 产物连接到 pMD19-T simple Vector,(0.5 μL Vector,2.5 μL

DNA 2 μL ddH₂O 5 μL Solution I),将连接好的载体转化入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞。在涂有 40 μL X-gal(20 mg/mL)和 20 μL IPTG(50 mg/mL)的 LB-Amp(100 μg/mL)平板上培养 12 - 16 h 后进行蓝白斑筛选,随机挑取白色克隆子,采用特异引物 RV-M 和 M13-47 的 PCR 扩增进行插入片段的筛选。菌落 PCR 条件:94℃ 8 min,94℃ 1 min,55℃ 45 s,72℃ 1 min,30 个循环,72℃ 10 min。菌落 PCR 产物片段长度为所需长度的克隆子鉴定为阳性克隆子。

1.6 克隆子的分类、测序及序列分析

将阳性克隆子的 PCR 产物稀释 1000 倍后作为模板,进行二次 PCR。所得较纯 PCR 产物进行 RFLP 分析,分别用两种限制性内切酶进行酶切 90 min, *amoA* 基因用 *Msp* I、*Taq* I 进行酶切, *nirS* 基因用 *Msp* I、*Hae* III 进行酶切, *nxrA* 基因用 *Msp* I、*Hae* III 进行酶切。酶切产物进行核酸电泳后将带型一致的克隆子归为 1 个分类操作单元(OTU),计算其文库覆盖率及多样性指数。文库覆盖率的计算公式为: $C = [1 - (n1/N)] \times 100\%$, (N 代表阳性克隆子总数, n1 代表仅含单个克隆子的 OTU 数)^[17]。多样性指数 Shannon-Wiener 指数, Simpson 指数, Evenness J 指数的计算公式分别为: Shannon-Wiener $H = - \sum (Pi) (\ln Pi)$, Simpson $D = 1 / \sum Pi^2$, ($Pi = Ni/N$, Ni 指各个 OTU 的克隆子数, N 指文库的总阳性克隆子数), Evenness $J = H'/H'_{max}$ (H' 为 Shannon-Wiener H 指数, $H'_{max} = \ln N$)。Shannon-Wiener H, Simpson D 可估算群落多样性的高低, Evenness J 用来描述文库中个体的均一度^[18]。从每个 OTU 中选出 1 个克隆子进行测序,测序由北京六合华大基因科技股份有限公司完成。

克隆子测序后,将所得核苷酸序列在 NCBI 数据库中进行 BlastX 同源搜索,找出与其相似性最高的同源氨基酸序列(相似度 ≥ 98%)作为进化树参考序列。使用 MEGA version 4.1 软件将测序所得的各基因核苷酸序列转换为氨基酸序列,将各文库所得的氨基酸序列与搜索到的同源氨基酸序列运用 Neighbor-Joining 方法共同构建系统进化树。

将 3 个文库所得基因序列提交 GenBank, *amoA* 基因登录号为: JN936443-JN936458, *nxrA* 基因登录号为: JN969901-JN969913, *nirS* 基因登录号为: JN969914-JN969933。

2 结果和分析

2.1 DGGE 指纹图谱分析

各地样品的 16S rRNA PCR 扩增产物 DGGE 图谱如图 1-A 所示,由图 1 可看出各地样品的条带分布模式虽存在一定差异,但有较多条带存在于相同位置且相对数量趋势相同。用 quantity one 进行分析 4 号样品检测到 18 个条带,基本包括了其他 7 个样品的条带。将 4 号样品作为标准样,用 Quantity One 软件输出 diagram 图,图 1-B。将各样品条带的相似度转化为二元相似性矩阵,结果如表 2 所示,只有 4 号样和 5 号样与其他的样相似性最高 4 号样与其他 7 个样中的 4 个样品相似度在 50% 以上,5 号样与其他 7 个样中的 5 个样品相似度在 50% 以上。采用轨迹定量法进行半定量分析,以 100% 作为各泳道内含量最高条带的含量标准,而本泳道内其他条带相对于此条带的量如表 3 所示,此含量值百分比仅针对同一条泳道有效,可显示各样品的优势菌群。由表 3 可知,1 号样的优势菌群位于 band 12,2 号样分别位于 band 10、band 11、band 13、band 15,3 号样分别位于 band 7、band 11、band 15,4 号样分别位于 band 7、band 8、band 11、band 12、band 14、band 15,band 16,5 号样分别位于 band 5、band 8、band 11、band 16,6 号样分别位于 band 5、band 14,7 号样分别位于 band 11、band 14、band 16,8 号样分别位于 band 4 和 band 5。据此分析可知 4 号样的优势条带包括了 1 号样、3 号样、7 号样所有的优势条带,另包括 2 号样 50% 的优势条带,5 号样 75% 的优势条带,6 号样的 50% 的优势条带。

4 号样的菌群条带基本包括了其他 7 个样的所

有条带,条带相似度与其他 7 个样相似度较高,相对于其他 7 个样,其优势菌群能更大程度地包括除自身以外样品的优势菌群。综上分析,4 号样具有代表性,因此为典型水产养殖环境,可用于进一步分析参与氮素循环的微生物群落结构。

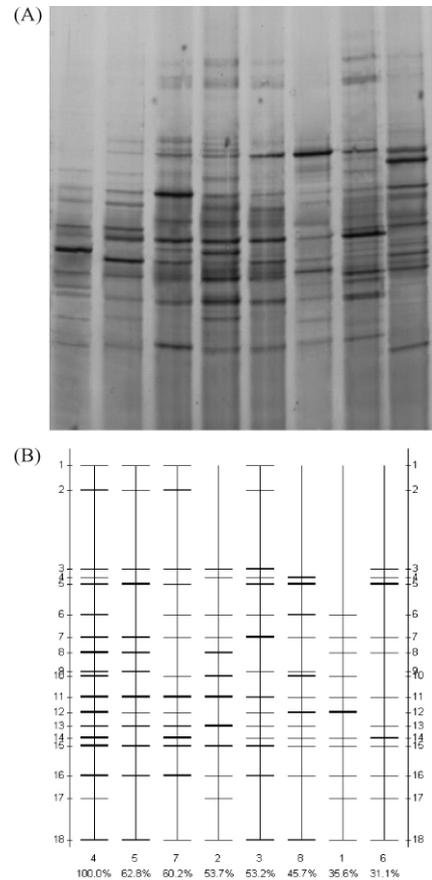


图 1 染色胶的扫描图 (A) 及 Quantity One 软件对泳道和条带的分析图 (B)

Fig.1 scanogram of dyed gel (A), lanes and bands analysis by Quantity One(B).

表 2 不同空间样品的相似性矩阵

Table 2 Calculation Method Dice Coefficient

Lane	Similarity (1000-seed weight 100%)							
1	100.0	35.1	34.1	35.6	35.4	27.8	30.2	29.1
2	35.1	100.0	49.3	53.7	56.4	25.3	57.8	30.9
3	34.1	49.3	100.0	53.2	61.9	39.2	48.4	47.7
4	35.6	53.7	53.2	100.0	62.8	31.1	60.2	45.7
5	35.4	56.4	61.9	62.8	100.0	40.7	56.2	50.6
6	27.8	25.3	39.2	31.1	40.7	100.0	28.4	57.4
7	30.2	57.8	48.4	60.2	56.2	28.4	100.0	32.7
8	29.1	30.9	47.7	45.7	50.6	57.4	32.7	100.0

表3 各泳道条带轨迹半定量分析结果

Table 3 Contour Qty of bands in all lanes

Band type	Contour Qty							
1	-	-	1.499	11.766	1.771	-	28.348	-
2	-	-	2.666	45.627	13.656	-	37.047	-
3	-	13.456	33.415	10.831	8.343	5.695	3.762	-
4	-	8.862	16.159	27.944	-	20.078	-	65.863
5	-	-	38.857	44.405	100.000	100.000	6.168	100.000
6	1.396	5.855	2.020	37.796	-	-	14.859	43.134
7	10.658	28.320	100.000	66.071	34.277	7.588	26.916	20.167
8	18.148	41.767	-	100.000	60.500	1.819	-	-
9	-	-	21.064	47.943	53.512	-	-	19.639
10	4.109	64.509	-	46.624	-	-	22.314	35.823
11	20.061	96.916	56.414	96.660	84.781	22.674	100.000	13.466
12	100.000	-	14.174	86.800	31.392	-	10.129	34.736
13	-	100.000	29.519	40.879	53.040	4.374	56.065	25.691
14	7.900	-	16.777	86.503	-	48.142	68.132	23.540
15	25.260	60.622	49.680	98.294	39.628	8.490	39.401	5.936
16	27.738	26.241	33.595	95.148	60.274	2.188	70.081	5.905
17	7.083	14.530	-	32.933	-	12.758	-	-
18	12.528	18.782	51.245	33.427	46.611	18.268	1.318	34.973

2.2 典型样品 *amoA* 基因、*nxrA* 基因、*nirS* 基因的扩增与纯化

以提取到的基因组 DNA 为模板,各基因对应的引物和 PCR 条件进行 PCR 扩增。获得的 *amoA* 基因、*nxrA* 基因、*nirS* 基因的 PCR 产物片段长度分别为 490bp、320bp、830bp(图 2)。

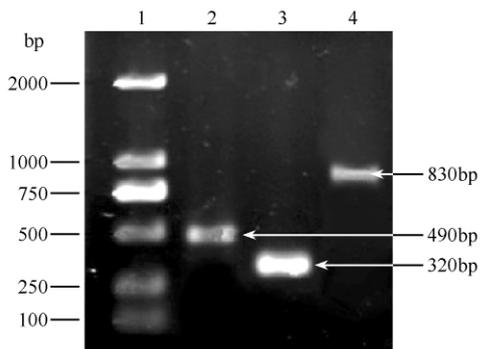
图2 *amoA*、*nxrA*、*nirS* PCR 产物电泳图

Fig. 2 Electrophoretogram of *amoA*, *nxrA*, *nirS* PCR products. 1. Marker (2000DL); 2. *amoA*; 3. *nxrA*; 4. *nirS*.

2.3 文库的构建与 RFLP 分析

通过蓝白斑筛选 *amoA* 文库挑选出 125 个阳性克隆子, *nxrA* 文库挑选出 80 个阳性克隆子, *nirS* 文库挑选出 105 个阳性克隆子。 *amoA* 文库阳性克隆子的菌落 PCR 产物分别用 *Msp* I、*Taq* I 酶切后共得到 16 个 OTUs, 有两个优势 OTUs 克隆子数分别为

37 和 39 个, 另有一个 OTU 克隆子数为 19 个, 其余的 OTUs 克隆子数均介于 1-5 个之间(如图 3-A)。 *nxrA* 文库阳性克隆子的菌落 PCR 产物用 *Msp* I、*Hae* III 酶切后共得到 13 个 OTUs, 其中有 3 个优势 OTUs 的克隆子数分别为 18 个、23 个和 14 个, 其余的均介于 1-10 个之间(如图 3-B)。 *nirS* 文库阳性克隆子的菌落 PCR 产物, 用 *Msp* I、*Hae* III 酶切后得到 20 个 OTUs, 其中有一个 OTU 克隆子数为 19 个, 其余 OTUs 克隆子数都介于 1-10 个之间(如图 3-C)。其中 *amoA* 文库覆盖率为 95.2%, *nxrA* 文库覆盖率为 93.8%, *nirS* 文库覆盖率为 98.1%。

amoA、*nxrA*、*nirS* 基因文库的 Shannon-Wiener 指数、Simpson 指数、Evenness 指数如表 4 所示。从表 4 可看出 *nirS* 基因文库的 3 种指数均高于 *amoA* 基因和 *nxrA* 基因文库, 其中 *nirS* 文库的 Shannon-Wiener 指数为 2.59, *nxrA* 文库为 2.00, *amoA* 文库为 1.96, 说明 *nirS* 文库的菌群多样性比 *nxrA* 和 *amoA* 高。

2.4 基因序列测定及系统发育树分析

2.4.1 *amoA* 基因克隆文库系统发育分析: 利用 RFLP 技术对 *amoA* 基因克隆文库的 125 个阳性克隆子进行归类分析, 得到 16 个 OTUs。每个 OTU 类型选一个进行测序, 选取文库所测序列与已知环境中的样品共同构建进化树(图 4)。从系统发育树可看出, 有 13 个 OTUs 属于变形杆菌门 β 亚纲 (β -

Proteobacteria) 中的亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*), 占整个类群的 81%, 其中 Cluster I 的序列与环境中的活性污泥、稻田土壤、废水泥沙的基因序列聚在同一分支上, Cluster II 的序列与环境中的湖泊水、稻田土壤、沉积泥的基因序列聚在同一分

支上, Cluster III 的序列与 *Nitrosomonas halophila* 和 *Nitrosomonas europaea* 聚在同一分支上。另有 3 个 OTUs 属于变形杆菌门 β 亚纲 (β -Proteobacteria) 中的亚硝化螺旋菌属 (*Nitrosospira*), 占整个文库类群的 19%。

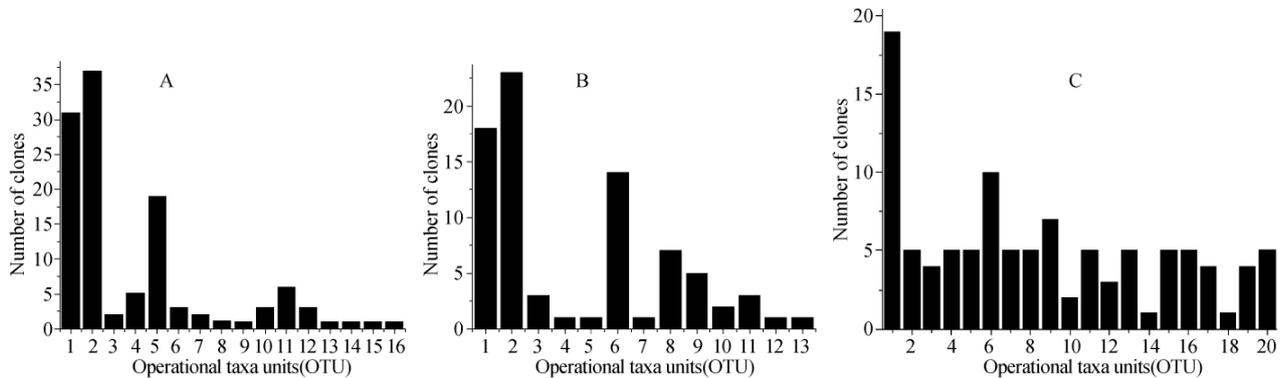


图 3 *amoA* (A)、*nxrA* (B)、*nirS* (C) 克隆子的 OTU 分布

Fig. 3 OTUs distribution in *amoA* (A), *nxrA* (B) and *nirS* (C).

表 4 *amoA*、*nxrA*、*nirS* 基因克隆文库多样性指数

Table 4 Diversity properties of the *amoA*, *nxrA*, *nirS* gene clone libraries

Gene	OTU number	Library coverage	Shannon-Wiener index	Simpson index	Evenness index
<i>amoA</i>	16	95.2%	1.96	0.80	0.45
<i>nxrA</i>	13	93.8%	2.00	0.82	0.57
<i>nirS</i>	20	98.1%	2.59	0.89	0.66

2.4.2 *nxrA* 基因克隆文库系统发育分析: 利用 RFLP 技术对 *nxrA* 基因克隆文库的 80 个阳性克隆子进行归类分析, 得到 13 个 OTUs。每个 OTU 类型送一个进行测序, 选取文库所测序列与已知环境中的样品共同构建进化树 (图 5)。从系统发育树可看出, 有 12 个 OTUs 属于变形杆菌门 α 亚纲 (α -Proteobacteria) 的硝化杆菌属 (*Nitrobacter*), 占整个类群的 92%, 其中 Cluster I 的序列主要与环境中的不可培养菌群的基因序列聚在一起, Cluster II 的序列主要与 *Nitrobacter alkalicus* 等已知菌基因序列聚在一起。另有 1 个 OTU 属于 δ 亚纲的脱硫杆菌科 (Desulfobacteraceae), 占整个类群的 8%。

2.4.3 *nirS* 基因克隆文库系统发育分析: 利用 RFLP 技术对 *nirS* 基因克隆文库的 105 个阳性克隆子进行归类分析, 得到 20 个 OTUs。每个 OTU 类型送 1 个进行测序, 选取文库所测序列与已知环境中的样品共同构建进化树 (图 6)。*nirS* 基因文库中有 12 个 OTUs 属于变形杆菌门 β 亚纲 (β -Proteobacteria), 其中固氮弧菌属 (*Azoarcus*) 占整个

类群的 25%, 需氧去氮菌属 (*Thauera*) 占整个类群的 30%, *Brachymonas* 占整个类群的 5%, 另有 6 个 OTUs 属于 α 亚纲, 其中 *Polymorphum* 占整个类群的 25%, *Ruegeria* 占整个类群的 5%, 此外还有 2 个 OTUs 属于放线菌纲 (Actinobacteridae) 的链霉菌属 (*streptomyces*), 占整个类群的 10%。

3 讨论和分析

用传统方法最容易分离到、研究最多的氨氧化细菌是亚硝化单胞菌属细菌, 如欧洲亚硝化单胞菌 (*Nitrosomonas europaea*), 但是分子微生物生态学研究表明, 数量最多、分布最广的氨氧化细菌是亚硝化螺旋菌属 (*Nitrosospira*) 及亚硝化球菌 (*Nitrosococcus*)^[19-20]。而对虾塘底泥中氨氧化细菌的研究表明, 从底泥的 *amoA* 基因文库检测到 *Nitrosomonas* 和 *Nitrosomonas*-like, 未发现 *Nitrosospira*^[21]。本研究根据测序结果分析, 所研究水体中的氨氧化细菌除了亚硝化单胞菌属

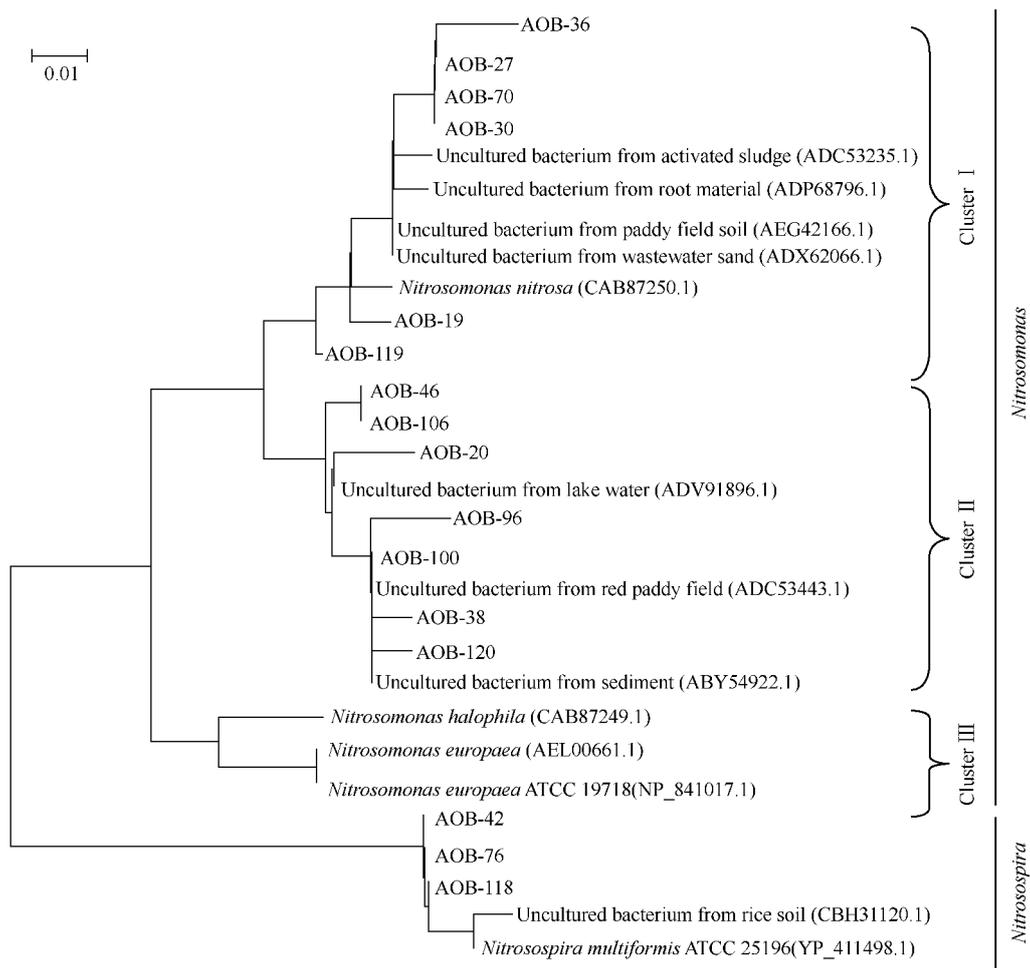


图4 *amoA* 基因的系统发育树 (Neighbor-joining tree)

Fig. 4 Neighbor-joining phylogenetic tree generated from *amoA* gene. Clones in this study were represented by AOB. Accession numbers are shown in parentheses. Significant bootstrap values above 50 (1000 iterations) are displayed at branch nodes. Scale bars represent the nucleotide substitution percentage.

(*Nitrosomonas*) 外,还存在亚硝化螺旋菌属 (*Nitrospira*)。其中亚硝化单胞菌属细菌占绝对优势,仅有1个 OTU 为亚硝化螺旋菌属细菌。通过序列比对进化树分析,*AmoA* 的基因序列与已知环境中的稻田土壤、废水泥沙、活性污泥和湖泊水中获得的一些序列具有较高同源性,说明淡水养殖环境中的氨氧化细菌(AOB)与泥土及湖泊中的 AOB 有相似近缘关系。其中优势菌群亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*) 是对虾养殖环境中主要的氨氧化作用推动者。

和单源群 AOB 相比,亚硝酸盐氧化菌(NO₂)分布更广泛,包括 α -Proteobacteria, γ -Proteobacteria 和 δ -Proteobacteria 的硝化杆菌属 (*Nitrobacter*),硝化球菌属 (*Nitrococcus*),硝化脊菌属 (*Nitrospina*) 和硝化

螺旋菌属 (*Nitrospira*)^[22]。本研究从虾塘水养殖环境的 *nrxA* 基因文库中检测到 α -Proteobacteria 和 δ -Proteobacteria 两个亚纲的菌群,其中有12个类群为 α 亚纲菌群的硝化杆菌属 (*Nitrobacter*),为优势菌群。有一个类群为 δ 亚纲的脱硫杆菌科 (Desulfobacteraceae),脱硫细菌属 (*Desulfobacterium*)。优势菌群硝化杆菌属 (*Nitrobacter*) 是对虾养殖环境中主要的亚硝酸盐氧化作用推动者。

具有反硝化能力的细菌就目前所知分布于50多个属,约有150余种,绝大部分属于变形菌纲 (Proteobacteria) 中的 α 和 β 簇群。在城市污水厂中,丛毛单胞菌科 (Comamonadaceae) 和红环菌科 (Rhodocyclaceae) 是主要的反硝化菌群^[23]。本研究

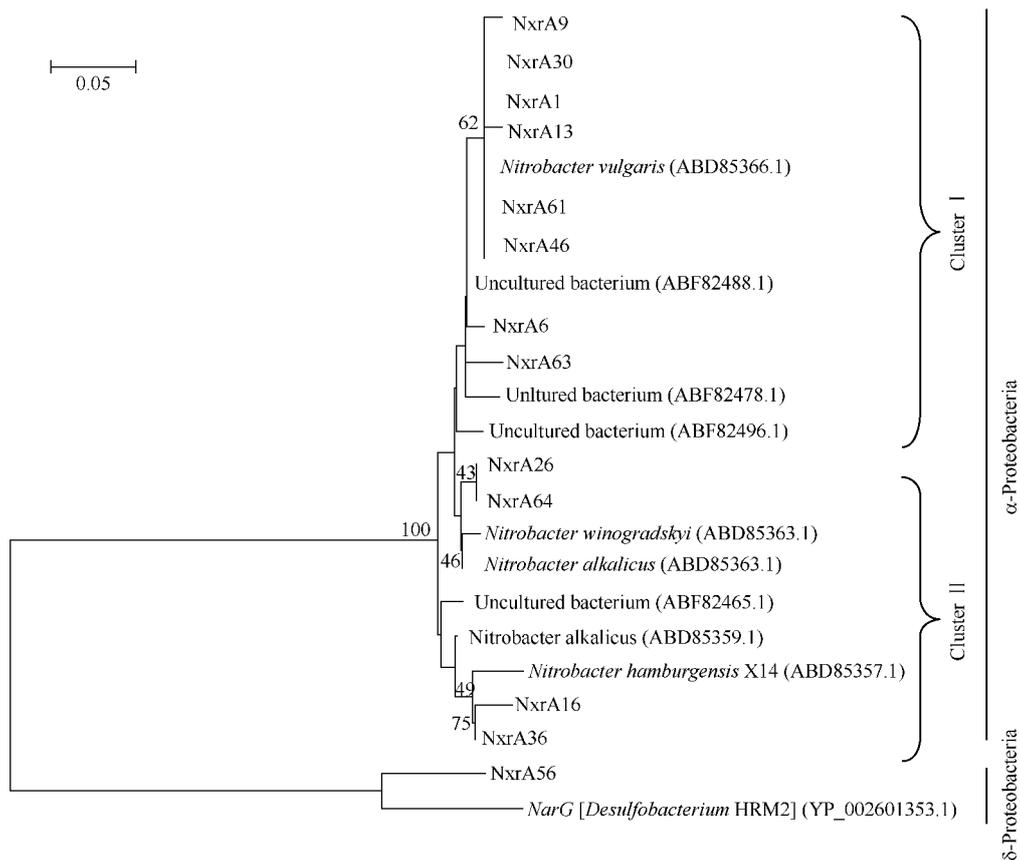


图5 *nxrA* 基因的系统发育树 (Neighbor-joining tree)

Fig. 5 Neighbor-joining phylogenetic tree generated from *nxrA* gene. Clones in this study were represented by NxrA. Accession numbers are shown in parentheses. Significant bootstrap values above 50 (1000 iterations) are displayed at branch nodes. Scale bars represent the nucleotide substitution percentage.

除了检测到常见的 α -Proteobacteria、 β -Proteobacteria 2 个亚纲外,其中 25% 的类群为红环菌科的固氮弧菌属 (*Azoarcus*) 20% 的类群为需氧去氮菌属 (*Thauera*) ,5% 的类群为丛毛单胞菌科 (Comamonadaceae) 的分支单胞菌属 (*Branchymonas*) 5% 的类群为 *Ruegeria* 还检测到占整个类群 10% 的放线菌亚纲 (Actinobacteridae) 的链霉菌属 (*Streptomyces*)。相对于 *amoA* 和 *nxrA* 文库检测到的菌群, *nirS* 文库的多样性指数较高,菌群类别更多,少数研究不多的链霉菌属 (*Streptomyces*) 菌群也可能在虾塘养殖水环境氮循环过程中起着重要作用。

时间变化对养殖水体中的菌群结构影响较大,对同一对虾养殖场不同时间的样品进行 DGGE 图谱分析,反映出同一养殖环境的细菌群落组成随时间推移很可能产生了连贯性的变化,而温度、pH

值、氨氮、总磷、溶氧、亚硝酸盐几项指标对细菌群落结构也起着非常重要的作用^[24]。本研究对特定时间点典型养殖水体中的群落结构进行了分析,水体中的群落结构随时间的变化是否有规律、池塘养殖环境下可大量增生参与 N 循环的优势细菌以及陆源引入的优势细菌的确定都还需进行深入研究,本文所得数据可为进一步的研究提供参考依据。

参考文献

- [1] Matulewich VA, Finstein MS. Distribution of autotrophic nitrifying bacteria in a polluted river (the Passaic). *Applied and Environmental Microbiology*, 1978, 35 (1): 67-71.
- [2] Northup RR, Yu Z, Dahlgren RA. Polyphenol control of nitrogen release from pine litter. *Nature*, 1995, 377 (2): 227-229.

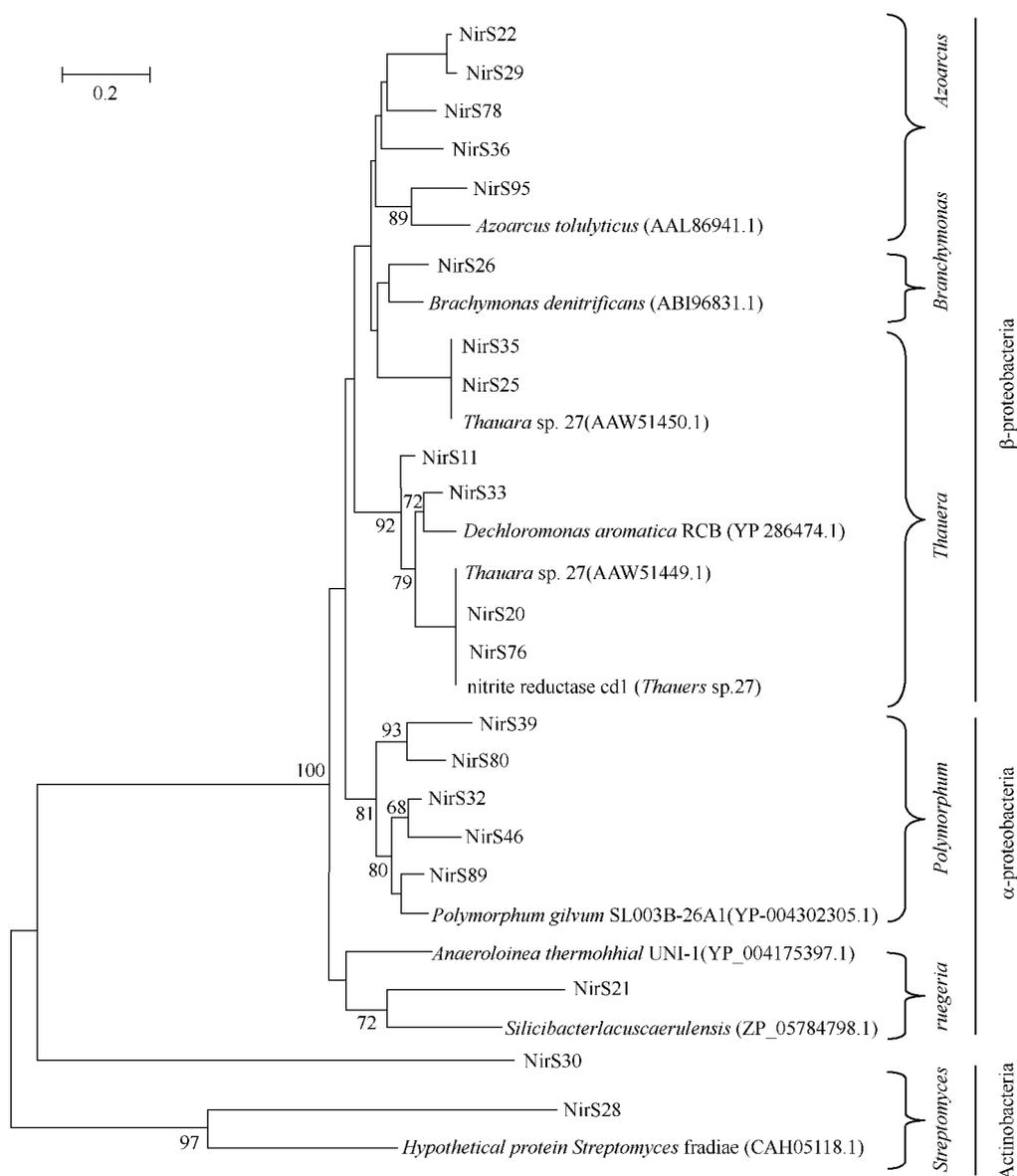


图 6 *nirS* 基因的系统发育树 (Neighbor-joining)

Fig. 6 Neighbor-joining phylogenetic tree generated from *nirS* gene. Clones in this study were represented by NirS. Accession numbers are shown in parentheses. Significant bootstrap values above 50 (1000 iterations) are displayed at branch nodes. Scale bars represent the nucleotide substitution percentage.

- [3] KK Krishnani. Detection and diversity of nitrifying and denitrifying functional genes in co-astal aquaculture. *Aquaculture*, 2010, 302: 57-70.
- [4] Kowalchuk GA, Stienstra AW, Heilig GH, JohnR. Stephen. Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacteria in soil of successional grasslands of the Drentsche (The Netherlands). *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology*, 2000, 31: 207-215.

- [5] Norton JM, Alzerreca J J, Suwa YC, Yuichi Suwa. Diversity of ammonia monooxygenase operon in autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. *Archives Microbiol*, 2002, 177: 139-149.
- [6] Meincke, ME Bock, D Kastrau, PMH Kroneck. Nitrite oxidoreductase from nitrobacter hamburgensis: Redox centers and their catalytic role. *Archives Microbiology*, 1992, 158: 127-131.
- [7] 辛明秀, 赵颖, 周军. 反硝化细菌在污水脱氮中的作用

- 用. 微生物学通报 (*Microbiology china*). 2007, 34(4): 773-776.
- [8] Tovar A, Moreno C, Manuel-Vez MP, Garcia-Vargas M. Environmental impacts of intensive aquaculture in marine waters. *Water Research*, 2000, 34(1): 334-342.
- [9] 李谷, 吴振斌, 侯燕松等. 养殖水体氮的生物转化及其相关微生物研究进展. 中国生态农业学报 (*Chinese Journal of Eco-Agriculture*) 2006, 14(1): 11-15.
- [10] 谢骏, 方秀珍, 郝桐炳. 池塘氮循环中各种细菌与理化因子的相关性研究. 水生生物学报 (*Acta Hydrobiologica Sinica*) 2002, 26(2): 180-187.
- [11] Picard C, Ponsonnet C, Paget E, Nesme X, Simonet P. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Applied Environment Microbiology*, 1992, 58(9): 2717-2722.
- [12] Bao, H-F, Wang, N. Diversity of Predominant Bacteria During Ensiling. *Microbiology china*, 2010, 37(8): 1247-1251.
- [13] Lin Weitie, Luo Jianfei, Guo Yong. Comparison and characterization of microbial communities in sulfide-rich wastewater with and without propidium monoazide treatment. *Current Microbiology*, 2011, 62: 374-381.
- [14] Rothauwe JH, Witze KP, Liesack W. The Ammonia Monoxygenase structural gene amoA as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(2): 4704-4712.
- [15] Sophie Wertz, Franck Poly, Xavier Le Roux. Development and application of a PCR-denaturing gradient gel electrophoresis tool to study the diversity of Nitrobacter-like nxrA sequences in soil. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology*, 2008, 63: 261-271.
- [16] Ingela Noredal Throback, Karin Enwall, Asa Jarvis, Sara Hallin. Reassessing PCR primers targeting nirS, nirK and nosZ genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology*, 2004, 49: 401-417.
- [17] Wagner M, Loy A. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13: 218-227.
- [18] Keyluck, CJ. Simpson diversity and the Shannon-Wiener index as special cases of a generalized entropy. *Oikos*, 2005, 109: 203-207.
- [19] Kowalchuk G A, Stienstra A W, Heilig G H J. Molecular analysis of ammonia-oxidising bacteria in soil of successional grass lands of the Drentsche (The Netherlands). *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology*, 2000, 31: 207-215.
- [20] Konneke M, Bernhard AE, de la Torre JR. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 2005, 437: 543-546.
- [22] 高利海, 林炜铁. 南美白对虾养殖底泥中氨氧化细菌与氨氧化古菌多态性分析. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2011, 51(1): 75-82.
- [22] Orso S, Gouy M, Navarro E & Normand P. Molecular phylogenetic analysis of Nitrobacter spp. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1994, 44: 83-86.
- [23] Roberto Garcia, Sarah N, Pattinson. Kinetic Parameter of Denitrification in a River Continuum. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(7): 533-2538.
- [24] 张星. 典型养殖水体中细菌群落结构的 DGGE 分析及其与环境因子相关性研究. 华南理工大学学位论文, 2010.

Community structure of microbes involved in nitrification and denitrification in typical shrimp-farming water

Jingyuan Li , Weitie Lin^{*} , Jianfei Luo , Guoliang Tian

School of Biological Science and Engineering , South China University of Technology , Guangzhou 510006 , China

Abstract: [**Objective**] We analyzed the community and diversity of microorganisms involved in nitrification and denitrification of nitrogen cycle in typical aquaculture water in order to manage microbiological degradation of NH_4^+ and NO_2^- , to control nitrogen pollution and nitrogen cycle in shrimp-farming water. [**Methods**] Samples were analyzed by Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE) graph. We constructed clone libraries of the typical sample based on the functional gene ammonia monooxygenase gene (*amoA*) , nitrite oxidoreductase gene (*nxrA*) , and nitrite reductase gene (*nirS*). These three libraries were analyzed by using Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). [**Results**] Phylogenetic analysis showed that all sequences from *amoA* library were clustered into β -Proteobacteria , including *Nitrosomonas* (81%) and *Nitrospira* (19%) . Clones from *nxrA* library were clustered into α -Proteobacteria and δ -Proteobacteria , including *Nitrobacter* (92%) and Desulfobacteraceae (8%) . Clones from *nirS* library were clustered into α -Proteobacteria , β -Proteobacteria and Actinobacteria. β -Proteobacteria was the dominant group that consisted of *Azoarcus* (25%) , *Brachymonas* (5%) , and *Thauera* (20%) . In α -Proteobacteria group , *Sophophora* (10%) , *Polymorphum* (25%) , *Ruegeria* (5%) were detected. In the Actinobacteria group , *Streptomyces* (10%) was detected. [**Conclusion**] Microorganisms involved in nitrification and denitrification of nitrogen cycle were abundant. In the aquaculture water , *Nitrosomonas* was the main performer of ammoxidation , *Nitrobacter* was the main performer of nitrification , and many kinds of populations played important roles in the denitrification.

Keywords: PCR-DGGE , Ammonia monooxygenase gene (*amoA*) , Nitrite oxidoreductase gene (*nxrA*) , Nitrite reductase gene (*nirS*) , clone library , phylogenetic tree

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (21076090)

^{*} Corresponding author. Tel: +86-20-39380658; E-mail: weitie @ 21cn.com

Received: 3 December 2011 / Revised: 23 February 2012