

珠三角养殖水体中参与氮循环的微生物群落结构

蔡小龙, 罗剑飞, 林炜铁*, 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】为了研究珠三角地区养殖水体中各种含氮化合物循环转化的特征及其相关功能微生物的群落结构。【方法】构建人工模拟养殖系统, 采用¹⁵N-稳定性同位素探测技术 (stable isotope probing, ¹⁵N-SIP) 标记参与氮素迁移的微生物, 通过氯化铯-溴化乙锭密度梯度超高速离心法分离¹⁵N 标记的 DNA, 并以此构建含¹⁵N-DNA 的细菌和古菌 16S rRNA 基因克隆文库。【结果】¹⁵N 标记的基因组 DNA 经过超高速密度梯度离心后成功与¹⁴N-DNA 分离; 对克隆文库序列的分析表明: 细菌文库得到的 19 个可操作分类单元 (Operational Taxa Units, OTUs) 分别归为变形菌门 (Proteobacteria) 和浮霉菌门 (Planctomycetes)。变形菌门为绝对优势类群, 占整个细菌克隆文库的 99.2%, 其中优势菌群为丛毛胞菌属 (*Comamonas*) (15.7%)、亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*) (12.4%)、肠杆菌科 (Enterobacteriaceae) (11.5%) 和硝化杆菌属 (*Nitrobacter*) (11.5%); 古菌文库得到的 9 个 OTUs 归为奇古菌门 (Thaumarchaeota)、泉古菌门 (Crenarchaeota) 和广古菌门 (Euryarchaeota)。【结论】将¹⁵N-SIP 技术应用于珠三角养殖水体氮素循环微生物群落结构的研究中, 得到了丰富的氮素循环微生物群落的组成, 这些信息为进一步分离纯化氮素降解微生物提供了重要的参考, 为营造健康的水产养殖环境提供科学依据。

关键词: 氮素循环, ¹⁵N-稳定性同位素探测技术, 16S rRNA 基因克隆文库

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 05-0645-09

氮素循环是生物地球化学中重要的元素循环之一, 是整个生物圈物质与能量循环的关键组成, 主要由 4 个过程组成: 固氮作用、氨氧化作用、硝化作用和反硝化作用 (图 1)^[1]。微生物是氮素循环的主要驱动者, 在氮素循环中扮演着极其重要的角色。固氮微生物利用固氮酶打开 N₂ 分子的三键, 生成氨态氮^[2]。氨氧化作用通过氨氧化细菌 (ammonia-oxidizing bacteria, AOB) 和氨氧化古菌 (ammonia-oxidizing archaea, AOA) 将氨氧化为亚硝酸盐来完成。硝化作用是硝化细菌将亚硝酸盐氧化为硝酸

盐。反硝化作用或由厌氧微生物通过无氧呼吸完成, 或在有氧条件下通过将 NO₂⁻ 还原为 NO, 进而还原为氮气。另外, 有机质降解时氨的释放和氨化作用也是细菌参与氮循环的途径。

过去几十年的研究结果表明, 微生物介导的氮循环的相关研究还远未完成: 1989 年, Mulder^[3] 在进行反硝化试验时发现了厌氧氨氧化作用 (anammox); 2003 年, Kuypers 等^[4] 报道了厌氧氨氧化是海洋氮损失的主要原因; 2005 年, Konneke 等^[5] 分离出了第一株氨氧化古菌 (AOA); 2010 年, 本团

基金项目: 国家自然科学基金 (21076090)

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

作者简介: 蔡小龙 (1987-), 男, 广西人, 硕士研究生, 研究方向为环境微生物学。E-mail: alancai2011@163.com

收稿日期: 2011-11-16; 修回日期: 2012-02-28

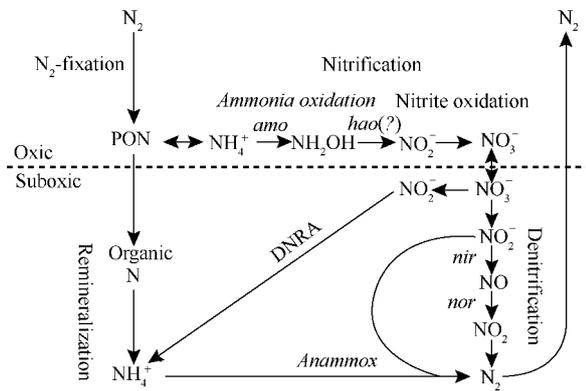


图1 微生物参与的氮循环过程^[1]

Fig.1 Schematic processes of global nitrogen cycle driven by microorganisms^[1].

队在珠三角养殖底泥中探测到 AOA 的存在,并且在养殖周期内 AOA 细胞数量始终高于 AOB 细胞数量 1-2 个数量级,但 AOA 菌群类型及丰度低于 AOB^[6]。可见,微生物介导的氮循环中还隐藏着很多未知的生物多样性和氮素迁移途径的多样性。

稳定性同位素探测技术(stable isotope probing, SIP)是通过生物体摄入含¹³C 或¹⁵N 的特异性底物,同化为其自身的核酸,在经过超高速离心后,由于具有不同的浮力密度(buoyant density, BD),¹³C 或¹⁵N 标记的与未标记的 DNA 或 RNA 被分离,最后通过分子生物学技术对标记的核酸进行分析,从而得到具有特殊功能的微生物菌群的信息。DNA-SIP 技术最初主要应用于甲基营养菌(甲烷营养菌和甲醇营养菌等)的研究中,直到 2005 年,Georg 等^[7]研究了¹⁵N-DNA-SIP 的技术方案,结果表明该技术也适用于纯培养和土壤微生物生态研究,从而掀起了¹⁵N-DNA-SIP 在环境微生物分子生态领域的研究热潮。

氮循环是水产养殖生态系统中重要的物质循环,氮的含量对水产养殖生态系统中物质能量的转化和养殖生物的生长具有举足轻重的作用。珠三角地区是养殖集中区,复杂的水产养殖微生态环境为不同习性的微生物提供了生长繁殖的生境,从而使系统中的氮素循环微生物和氮素循环途径具有丰富的多样性。本文应用 SIP 技术将微生物的研究对象限定在参与氮素循环的功能菌群上,通过 16S rRNA 基因克隆文库分析该功能微生物的群落结构。以期更深入了解和补充氮的生物地球化学循环,为后期研究水产养殖环境中 NO₂⁻ 和 NH₄⁺ 等的

微生物降解打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集:地点为珠三角地区水产养殖业较集中的广东省中山市港口镇某南美白对虾养殖场(E 113°25', N 22°36'),该塘塘龄为 3 年,本次养殖时长为 6 个月,采样时间为 2010 年 11 月,水体温度为 26℃。

1.1.2 SIP 标记基础培养基如文献[8]所述。

1.1.3 主要试剂和仪器:¹⁵N-氯化铵(99 at% ¹⁵N, 上海化工研究院)、pMD19-T simple Vector 与限制性核酸内切酶(TaKaRa)、引物(Invitrogen 公司)、离心机与离心管(HITACHI CP-80MX)、T1 Thermocycler PCR 仪(德国 Biometra 公司),¹⁵N 丰度由上海化工研究院测定。

1.2 样品采集与预处理

采用正方形 5 点取样法,用经无菌的有机玻璃采水器在水深约 0 至 1 米处垂直取样,每个点取样量约为 500 mL,均匀混合后再从其中取出 500 mL,立即置于 4℃ 保存,并尽快运送回实验室,抽滤除去藻类和颗粒杂质,8000 × g 离心收集菌体。

1.3 SIP 实验

建立一个人工养殖生态系统,进行 SIP 实验。人工生态系统也称为微宇宙,它利用实验仪器控制环境条件以模拟生态环境,具有良好的真实性。

人工生态系统即为一个容积约为 20 L 的水族箱,加入 15 L SIP 标记培养基,投入离心收集的菌体。培养条件模拟取样现场的环境条件,温度控制在 25℃-28℃,pH 7.0-8.0,溶氧 0-5 mg/L,以满足每种微生物对不同溶氧的需求。每两天补充一次因蒸发和取样而减少的水分。待系统稳定 3 天后开始投入终浓度为 3 mmol/L 的¹⁵NH₄Cl,当浓度降至约 1 mmol/L 时再次投入补充。当亚硝氮和硝氮浓度累积到达平台期时(12 d),水中¹⁵N 丰度为 79.94%,根据 Georg 等人的研究^[7],当样品中¹⁵N 丰度达到 80% 左右时,超高速离心可使¹⁴N-DNA 和¹⁵N-DNA 得到较好的分离效果,因此此时停止 SIP 实验,离心收集菌体提取 DNA。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)用最适培养基培养,分别以¹⁴N 和¹⁵N 标记的氯化铵(3 mmol/L)为唯一

氮源,葡萄糖为碳源,加入 SIP 标记基础培养基,37℃ 培养过夜,¹⁵N 标记的培养基转接两次,以得到更高¹⁵N 丰度的菌体。离心收集菌体提取总 DNA 用于后续分析。

每 24 h 取样测定氨氮、亚硝氮和硝氮浓度。氨氮测定采用纳氏试剂比色法,亚硝氮采用格里斯试剂比色法,硝氮测定采用酚二磺酸光度法。

1.4 总 DNA 提取与氯化铯-溴化乙锭超高速密度梯度离心

标记实验结束后,取 200 mL 系统水样 8000 × g 离心 8 min 收集菌体,采用溶菌酶-蛋白酶 K-SDS-CTAB 法^[9]提取基因组总 DNA,以 1% 琼脂糖凝胶电泳检验其 DNA 浓度。

¹⁴N-DNA 和¹⁵N-DNA 通过氯化铯密度梯度离心进行分离,具体操作参考 Stefan Radajewski 等^[10],10 mL 的离心管中加入 CsCl 和 EB 溶液(10 mg/mL)至终浓度分别为 1 g/mL 和 0.2 mg/mL,用 TE 缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl 50 mmol/L EDTA, pH 8.0)溶解,用 CsCl 严格配平各离心管。20℃ 离心后,在紫外光灯下用无菌的 18 号皮下注射针头缓慢吸出目的 DNA 约 0.3 mL。

E. coli (约 51% G + C 含量)被用于作为离心指示 DNA,以指示¹⁴N-DNA 和¹⁵N-DNA 在离心管中的相对位置。

¹⁵N-DNA 的回收纯化:收集的 DNA 溶液中的溴化乙锭经等体积的水饱和异戊醇重复萃取去除,CsCl 用乙醇沉淀法去除,室温挥发。用 TE 溶解 DNA 沉淀,-20℃ 保存备用。

1.5 细菌和古菌 16S rRNA 基因的 PCR 扩增

以回收纯化的¹⁵N-DNA 为模板,分别利用 27F/1492R 和 21F/915R 两个引物进行特异性扩增。各引物信息如表 1 所示。

表 1 本实验所使用的 PCR 引物

Table 1 PCR primers used in this experiment		
Primer names	Primer sequences (5'→3')	References
Bacteria 27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	[11]
Bacteria 1492R	TACCTTGTACGACTT	[11]
Archaea 21F	TTCCGGTTGATCCYGCCGGA	[12]
Archaea 915R	ACKGCTCAGTAACACCT	[12]

PCR 反应体系为 50 μL,含有 10 × PCR Buffer 5 μL,模板 DNA 2 μL,dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μL,正、

反引物各 0.5 μL(20 μmol/L),Taq DNA 聚合酶(5 U/μL) 1 μL,其余用超纯无菌水补齐。反应程序:94℃ 3 min;94℃ 45 s,55℃ 1 min,72℃ 1 min,30 个循环;72℃ 7 min。

1.6 细菌和古菌克隆文库的构建与阳性克隆的筛选

克隆文库的构建及阳性克隆的筛选:按照试剂盒(TaKaRa)说明书,将经凝胶回收试剂盒纯化回收后的 PCR 产物与载体连接,将连接好的载体转化入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,37℃ 培养过夜。用 X-gal 和 IPTG 进行蓝白斑筛选,随机挑取克隆子,采用特异引物 RV-M 和 M13-47 进行菌落 PCR,以筛选阳性克隆子。

1.7 RFLP 分型测序与进化树分析

对克隆文库中阳性克隆子的菌落 PCR 产物进行限制性片段长度多态性分析(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP),其中细菌克隆文库用限制性内切酶 *Msp* I 和 *Taq* I 分别酶切,古菌克隆文库用 *Hae* III 和 *Taq* I 分别进行酶切分析。经 2.5% 的琼脂糖凝胶电泳后,酶切图谱相同的克隆子作为一个可操作分类单元(Operational Taxa Unit, OTU)。

从每个 RFLP 型中挑取一个典型克隆子,用载体通用引物 M13-47 进行测序分析,测序工作由华大基因科技股份有限公司完成。在 NCBI 数据库中对测序结果进行相似性比对分析,相似度 ≥ 98% 的 RFLP 型归为一个 OTU,运用 MEGA version 4.1 软件中的 Neighbor-Joining 方法构建进化树。各序列已提交 GenBank 数据库,登录号为:JN977473-JN977500。

2 结果和分析

2.1 SIP 实验与氮素迁移特征

构建养殖水体的人工模拟生态系统,定时监测系统中氨氮、亚硝氮和硝氮浓度,得出其浓度随时间变化的规律曲线(图 2)。如图 2-A 所示,氨氮在每次加入后都以一定的速率降解,说明水体中含有大量活跃的氨氧化菌,硝化作用稳定。由图 2-B 可知,由于硝化细菌的硝化作用和反硝化菌的反硝化作用,随着氨氮的不断加入与降解,亚硝氮和硝氮不断累积,最后进入停滞阶段。

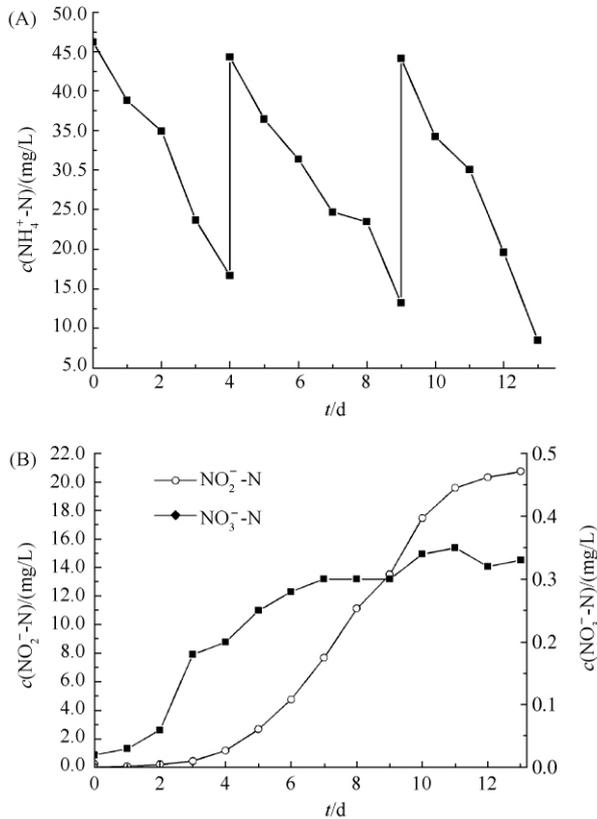


图2 氨氮、亚硝氮和硝酸氮随时间的变化

Fig.2 Changes of concentration of ammonia-nitrogen, nitrite-nitrogen and nitrate-nitrogen with time. Arrows indicate adding ammonium.

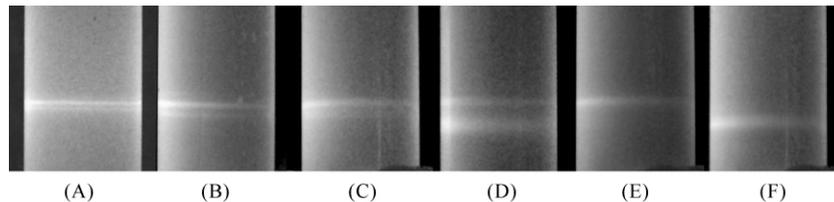


图3 ^{14}N -DNA 和 ^{15}N -DNA 的氯化铯密度梯度离心分离

Fig.3 Separation of the ^{14}N -DNA and ^{15}N -DNA in CsCl gradients. (A) *E. coli*- ^{14}N - ^{15}N -DNA, $265000 \times g$, 24 h. (B) *E. coli*- ^{14}N - ^{15}N -DNA, $140000 \times g$, 35 h. (C) *E. coli*- ^{14}N - ^{15}N -DNA, $140000 \times g$, 50 h. (D) *E. coli*- ^{14}N -DNA and SIP-DNA, $140000 \times g$, 50 h. (E) *E. coli*- ^{14}N -DNA, $140000 \times g$, 50h. (F) SIP-DNA, $140000 \times g$, 50h.

2.3 16S rRNA 基因克隆文库的 RFLP 分析

以分离得到的水样 ^{15}N -DNA 为模板进行细菌和古菌 16S rRNA 基因的 PCR 扩增,得到长度分别约为 1500 bp 和 900 bp 的特异片段,构建 TA 克隆文库。

对 121 个细菌克隆子和 78 个古菌阳性克隆子分别进行 RFLP 分型分析,细菌文库共得到 19 个

2.2 氯化铯-溴化乙锭超高速密度梯度离心

为了研究不同离心条件下, ^{14}N -DNA 和 ^{15}N -DNA 在 CsCl 梯度液中的分离效率,指示其在离心管中的相对位置,用 *E. coli* (约 51% G+C 含量) 作为离心指示 DNA。

分别提取 $^{14}\text{NH}_4^+$ 培养的 *E. coli* DNA、 ^{15}N 标记的 *E. coli* DNA 和标记培养的水样 DNA (SIP-DNA),在 3 种不同离心力和离心时间条件下,经氯化铯-溴化乙锭密度梯度超高速离心分离,结果如图 3。图 3-A 中, *E. coli ^{14}N - ^{15}N -DNA 在 $265000 \times g$ 的离心力下离心 24 h 后,在 CsCl 梯度溶液中呈现出两条 DNA 带,距离约为 1 mm;图 3-B 中,离心力减少为 $140000 \times g$,离心时间增加到 35 h,两条 DNA 带的距离增大至约 2 mm;图 3-C 中,离心时间增加为 50 h,两条带的距离继续增大,约 2.8 mm,在此条件下, *E. coli ^{14}N -DNA 与水样 DNA 成功分离,重带和轻带距离达到约 3.5 mm,如图 3-D。**

最后以 $140000 \times g$ 的离心力离心 50 h,结果如图 3-F 所示,在重带的位置出现一条可见的 DNA 带,而在轻带位置未出现肉眼可见带,这可能是因为在模拟系统中未被 ^{15}N 标记的 DNA 所占比率太小,以致于其在离心管中未达到可见的浓度。

OTUs,古菌文库共 9 个 OTUs。对测序结果和 NCBI 数据库中的已知序列进行 BLAST 比对分析发现,细菌和古菌核苷酸序列的相似性均大于 95%。如表 2 所示,细菌文库的 Shannon 指数、Simpson 指数和 Evenness 指数均高于古菌文库,说明系统中细菌的多样性比古菌高,而两者均匀度皆偏高,说明各类菌群含量较均匀,没有绝对优势菌群。

表 2 细菌和古菌 16S rRNA 基因克隆文库多样性指数

Table 2 Diversity indices of the 16S rRNA gene clone libraries of bacteria and archaea

	OTUs	Coverage / %	Shannon	Simpson	Evenness
Bacteria	19	93.4	2.559	0.907	0.6799
Archaea	9	96	1.753	0.7903	0.6416

2.4 序列测定及系统发育树分析

将文库序列与数据库中的已知序列比对, 构建系统发育树(图 4 和图 5)。由图 4 可知, 细菌的序列可分为 4 大类群: β -变形菌纲 (β -proteobacteria) (53.7%)、 γ -变形菌纲 (γ -proteobacteria) (32.2%)、

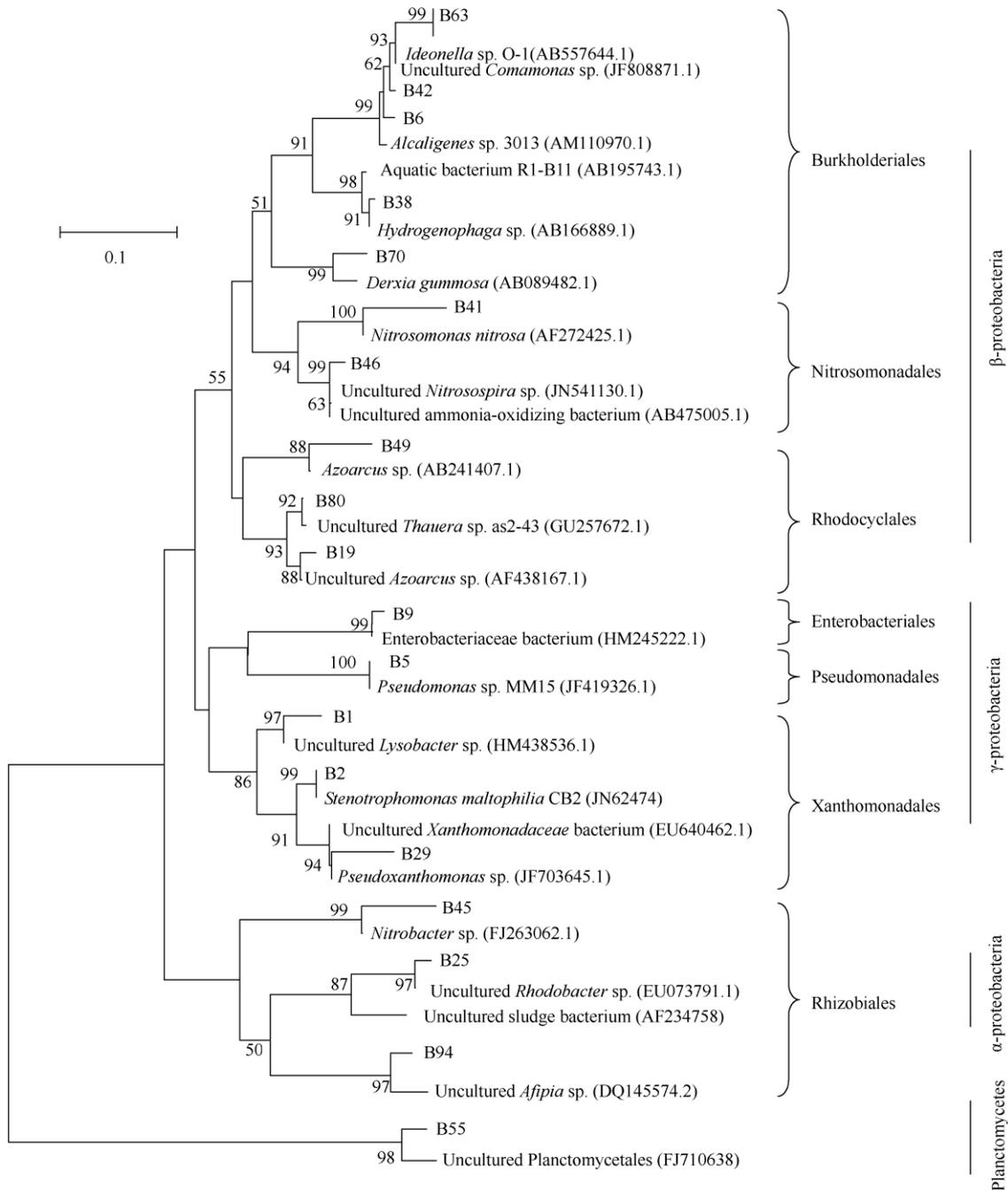


图 4 细菌 16S rRNA 基因的 Neighbor-joining 系统发育树

Fig. 4 Neighbor-joining phylogenetic tree generated from 16S rRNA gene of Bacteria. Clones in this study were began with B. Accessions numbers are shown in parentheses. Numbers on the nodes are the bootstrap values based on 1000 replicates. Scale bars represent the nucleotide substitution percentage.

α -变形菌纲 (α -proteobacteria) (13.2%) 和浮霉菌门 (Planctomycetes) (0.8%), 共有 18 个属。其中 β -proteobacteria 为优势菌群, 优势属为丛毛胞菌属 (*Comamonas*) (15.7%) 和亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*) (12.4%)。 γ -proteobacteria 所占比例也较大, 优势菌群包括肠杆菌科 (Enterobacteriaceae) (11.5%)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) (8.0%) 和溶杆菌属 (*Lysobacter*) (7.4%)。而 α -proteobacteria 所占比例较少, 除了硝化杆菌属 (*Nitrobacter*) (11.5%) 外, 其他的都只有一个克隆子。 OTU-B55 单独构成一个分支, 属于 Planctomycetes 门, 也只有一个克隆子。

由图 5 可知, 所获得的古菌序列可分为 3 大类

群, 分别为奇古菌门 (Thaumarchaeota) (53.8%)、泉古菌门 (Crenarchaeota) (34.7%) 和广古菌门 (Euryarchaeota) (11.5%)。其中, Thaumarchaeota 门的克隆子最多, 且 3 个 OTUs 都属于 Nitrososphaeraceae 目的 Nitrososphaera 科, 皆为氨氧化古菌。与 OTU-A8 同源的 *Candidatus Nitrososphaera gargensis*, 由 Hatzenpichler 等富集分离得到。与 Crenarchaeota 门同源的两个 OTUs 都为未培养古菌, 同源菌来源有蓄水层、沉积物和土壤等。归类于 Euryarchaeota 门的 4 个 OTUs 中, 与未培养广域古菌 (Uncultured euryarchaeote) 同源的两个 OTUs 为优势菌, 另两个 OTUs 均只有一个克隆子, 与未培养的甲烷微菌纲 (Methanomicrobia) 古菌相似性最高。

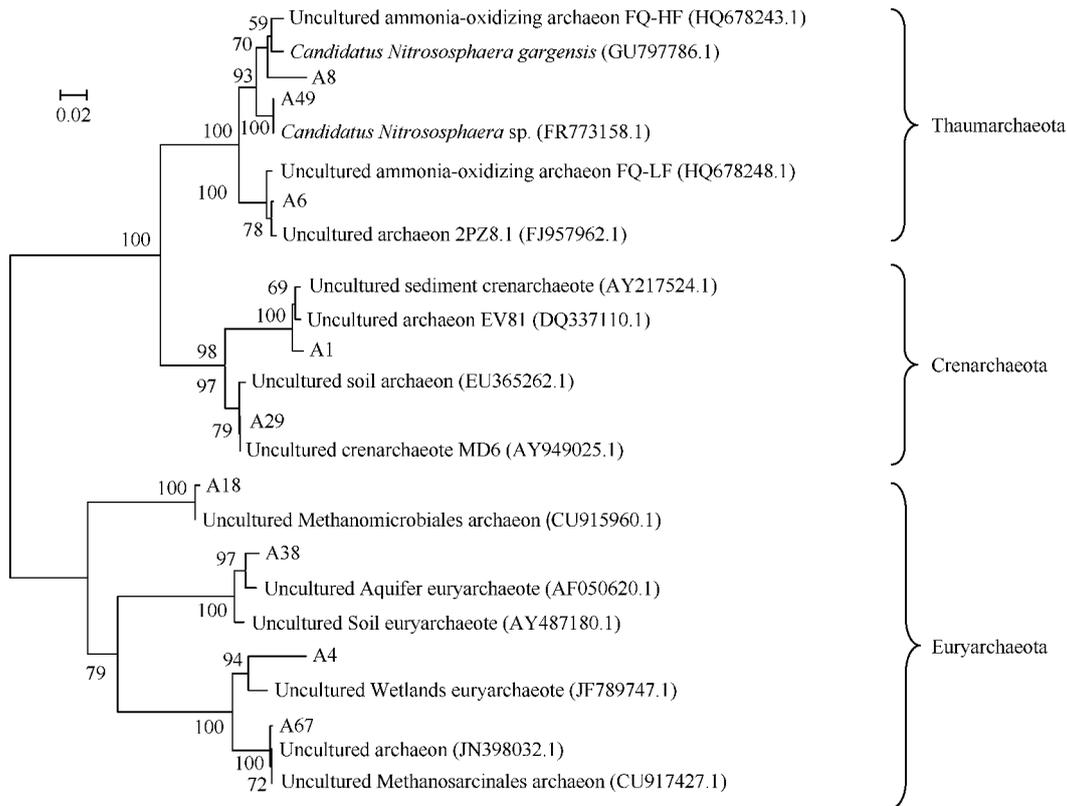


图 5 古菌 16S rRNA 基因的 Neighbor-joining 系统发育树

Fig. 5 Neighbor-joining phylogenetic tree generated from 16S rRNA gene of archaea. Clones in this study were began with A. Accessions numbers are shown in parentheses. Numbers on the nodes are the bootstrap values based on 1000 replicates. Scale bars represent the nucleotide substitution percentage.

3 讨论

环境中绝大部分的微生物还未能得到纯培养物, 因此传统的分离纯化培养不能得到真实的菌群

结构, 而由于某种功能的实现途径具有多样性和复杂性, 以某种代表性的酶基因设计引物来研究菌群, 必然会忽略某些非经典途径的功能微生物。稳定性同位素探测技术只需要简单的原位培养就能得到活性微生物信息, 因此越来越多地被用于环境微生物

分子生态领域的研究。但由于 N 在 DNA 中的含量相对较低,加上 G + C 百分比的影响,使得¹⁵N-DNA 和¹⁴N-DNA 在离心梯度液中的分离效率较低,传统的超速离心条件并不适用于¹⁵N-DNA 的研究,Roh^[13]等改进了超速离心条件,以更小的离心力和更长的离心时间得到更大的分辨率,他们的研究结果表明,¹⁵N-DNA-SIP 适用于纯培养和环境微生物生态研究。本文的研究结果也证明了这一点,图 3 中,分别以传统的条件(265000 × g, 24 h)和改进后的条件(140000 × g, 50 h)离心后,*E. coli*¹⁴N-DNA 与¹⁵N-DNA 在 CsCl 梯度溶液中的距离从约 1 mm 增至约 2.8 mm,这个距离足以将¹⁵N 标记与未标记的 DNA 分离,以作进一步分析。

通过对细菌和古菌克隆文库的系统发育分析可知,珠三角养殖水体中的氮素循环微生物主要有变形菌门(Proteobacteria)和 Planctomycetes 门的细菌,以及 Thaumarchaeota 门、Crenarchaeota 门和 Euryarchaeota 门的古菌。变形菌门为细菌文库中的绝对优势类群,占整个细菌克隆文库的 99.2%;而古菌文库中 Thaumarchaeota 门和泉古菌门为优势类群,分别占 53.8% 和 34.7%。

将细菌和古菌克隆文库 OTUs 的同源菌可能执行的功能进行归类分析,我们发现 22 个 OTUs (82.9% 的克隆子)的同源序列分别具有主要的 4 种氮素循环功能:氨氧化作用、硝化作用、反硝化作用和固氮作用,其余 5 个 OTUs (17.1% 的克隆子)无法确定其相关功能。

氨氧化菌:本实验检测到 4 种氨氧化细菌(OTU-B41、B42、B46、B55)和 3 种氨氧化古菌(OTU-A6、A8、A49)克隆子数占总文库的 41.2%,为最大的功能类群。除了常见的 *Nitrosomonas* 和 *Nitrososphaera* 属,本文还发现了与 *Comamonas* 属和浮霉状菌目(Planctomycetales)同源的 OTUs。李正魁等^[14]发现,丛毛单胞菌属的一些种,如水生丛毛单胞菌(*Comamonas aquatica*)具有短程硝化功能。浮霉状菌目是最早发现的具有厌氧氨氧化活性的菌群^[15]。与古菌文库 OTU-A8 和 A49 同源的 *Candidatus Nitrososphaera* 属是文库中唯一可培养的菌属。

硝化菌:克隆文库中检测到 5 个 OTUs (B1、B5、B6、B42、B45)的同源菌具有硝化功能,克隆子数占总文库的 30.2%。其中丰度最大的为 *Nitrobacter* 属菌群,它是硝化作用的主要推动者。此外,与典型克隆

子同源的 *Pseudomonas* 属、*Comamonas* 属、*Lysobacter* 属和产碱杆菌属(*Alcaligenes*)的某些菌株也具有硝化作用的功能^[14, 16, 17]。

反硝化菌:目前已经发现超过 50 个属、130 个种的微生物能进行反硝化作用,分布在系统发育树上的不同簇,正是如此丰富的多样性,使得许多反硝化菌也执行氮素迁移的其他功能。本文发现 12 个 OTUs 的同源菌具有反硝化作用,归类于 11 个属,克隆子数占总文库的 36.2%。其中 *Pseudomonas* 属常被作为反硝化的模式生物,同时它还兼有硝化作用^[16]。另外还有 4 个 OTUs 的同源菌兼具其他 3 种氮迁移功能,如 *Comamonas* 属兼有氨氧化、硝化和反硝化 3 种功能;*Alcaligenes* 属和固氮弧菌属(*Azoarcus*)同时具有固氮和反硝化功能。另外,其他菌群:噬氢菌属(*Hydrogenophaga*)、红细菌属(*Rhodobacter*)、陶厄氏菌属(*Thauera*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)和阿菲彼亚杆菌属(*Afipia*)等,也分别以相似或相异的代谢途径执行着反硝化的功能^[16, 18-20]。

固氮菌:本实验发现了 5 种固氮菌(6 个 OTUs),占克隆文库的 11.6%,包括典型的固氮菌:*Azoarcus* 属与德氏固氮菌属(*Derxia*),但除了 *Azoarcus* 属,其他菌属在克隆文库中比例较小,只有 1 至 4 个克隆子,这可能与同位素标记实验条件有关,¹⁵N 元素要经过反硝化菌的作用生成¹⁵N₂,才能被固氮菌同化,而 N₂ 在水中的溶解度较小,因此导致固氮菌生长缓慢。此外,在古菌文库中,OTU-A67 与广古菌门甲烷微菌纲(Methanomicrobia)甲烷八叠球菌目(Methanosarcinales)同源性较高,甲烷八叠球菌目中有一些种如巴氏甲烷八叠球菌(*Methanosarcina barkeri*)等具有固氮活性^[21]。

除上述功能外,仍有 5 个古菌 OTUs 未见报道具有氮素迁移相关功能,这也与古菌的纯种分离鉴定研究还不够深入,导致信息不全有关。如 OTU-A1 和 A29 与未培养的泉古菌 crenarchaeote 同源,Hatzenpichler 等^[22]成功分离到的氨氧化古菌 *Candidatus Nitrososphaera gargensis* 最初被划分在 Crenarchaeota 门的 MGI (Marine Group I) 类群中,因此 Crenarchaeota 门被认为是氨氧化古菌的重要来源。直到 2008 年,基于系统发育分析,Brochier-Armanet 等人^[23]提出将 MGI 类群归入一个新的分类单元:Thaumarchaeota 门。但 Crenarchaeota 门仍保留着部分氨氧化古菌类群,因此本文得到的 OTU-

A1 和 A29 ,和其他未能确定功能的类群仍可能与氨氧化作用有关 ,或者执行了氮素循环的其他功能。

在 SIP 标记过程中 ,氨氮处于持续降解的状态 ,同时亚硝氮和硝氮不断累积 ,且浓度变化曲线呈现为“S”形 ,出现了迟缓阶段、最大速率阶段和停滞阶段 3 个典型阶段 ,这与鲍俊丹等^[24]的结果基本一致。在人工模拟系统中 ,含氮化合物的迁移转化是由微生物主导的 ,其变化规律与检测到的各种功能菌群的组成有一定的相关性。氨氮被系统中大量(41.2%)活跃的氨氧化菌高效降解 ,一部分合成菌体成分 ,另一部分转化为亚硝氮 ,导致亚硝氮的高速累积 ;同时亚硝氮被硝化菌转化为硝氮 ,但整个过程中硝氮浓度保持在较低浓度水平 ,这可能是由于系统中含有丰富的(36.2%)反硝化菌 ,且反硝化速率明显大于硝化速率 ,导致累积的硝氮快速被反硝化消耗 ;反硝化作用生成的氮气逸出系统 ,或被固氮微生物吸收 ,因此克隆文库中也检测到了一定量的(11.6%)固氮微生物。

本文将稳定性同位素探测技术应用于水体微生物群落研究中 ,对养殖水体氮素循环微生物群落结构进行了系统分析 ,得到了丰富的相关功能微生物的信息 ,这些微生物在模拟系统中以含最高还原态 N 的 NH_4^+ 为氮素迁移的起点 ,经过氨氧化、硝化和反硝化等微生物转化作用及其相伴的迁移运动 ,最终借助固氮作用重新输入氮素 ,从而完成整个氮素循环。

参考文献

- [1] Arrigo KR. Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature* ,2005 ,437: 349-355.
- [2] Postgate JR. Biological nitrogen fixation. *Nature* ,1970 ,226: 25-27.
- [3] Mulder A , van de Graaf AA , Robertson LA. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol Ecology* ,1995 ,16(3):177-184.
- [4] Kuypers MMM , Sliemers AO , Lavik G , Schmid M , Jorgensen BB , Kuenen JG , Damste JSS , Strous M , Jetten MSM. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature* ,2003 ,422: 608-611.
- [5] Konneke M , Bernhard AE , de la Torre JR , Christopher BW , John BW , David AS. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* ,2005 ,437: 543-546.
- [6] 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.
- [7] Cadisch G , Espana M , Causey R , Richter M , Shaw E , Morgan JA , Rahn C , Bending GD. Technical considerations for the use of¹⁵ N-DNA stable-isotope probing for functional microbial activity in soils. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* ,2005 ,19: 1424-1428.
- [8] Verhagen FJM and Laanbroek HJ. Competition for ammonium between nitrifying and heterotrophic bacteria in dual energy-limited chemostats. *Applied and Environmental Microbiology*. 1991 ,57(11): 3255-3263.
- [9] Luo JF , Lin WT , Guo Y. Method to detect only viable cells in microbial ecology. *Applied Microbiology and Biotechnology* ,2009 ,86(1): 377-384.
- [10] Radajewski S , Ineson P , Parekh NR , Murrell JC. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature* ,2000 ,403(6770): 646-649.
- [11] Frank JA , Claudia I. Shobha S , Weisbaum JS , Wilson BA , Olsen GJ. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* ,2008 ,74(8): 2461-2470.
- [12] DeLong EF. Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* ,1992 ,89(12): 5685-5689.
- [13] Roh H , Yu CP , Fuller ME. Identification of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine-degrading microorganisms via¹⁵ N-stable isotope probing. *Environmental Toxicology and Chemistry* ,2009 ,43(7): 2505-2511.
- [14] 李正魁 ,杨竹攸 ,赖鼎东 ,张晓姣 ,石鲁娜 ,王月明 ,吴凯 ,陈祈春. 影响固定化纯种氨氧化细菌 *Comamonas aquatica* LNL3 短程硝化过程因素动力学分析. *核技术 (Nuclear Techniques)* ,2009 ,32(4): 292-297.
- [15] Fuerst J A , Sagulenko E. Beyond the bacterium: planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function. *Nature Reviews Microbiology* ,2011 ,9(6): 403-413.
- [16] 肖晶晶 ,郭萍 ,霍炜 ,于江 ,朱昌雄. 反硝化微生物在污水脱氮中的研究及应用进展. *环境科学与技术 (Environmental Science & Technology)* ,2009 ,32(12): 98-102.

- [17] 林常婧. 府河水体微生物分布特征及优势硝化细菌研究. 北京师范大学学位论文, 2009.
- [18] Hoshino T, Terahara T, Tsuneda S, Hirata A, Inamori Y. Molecular analysis of microbial population transition associated with the start of denitrification in a wastewater treatment process. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 99(5): 1165-1175.
- [19] Laempe D, Jahn M, Breese K, Schaegger H, Fuchs G. Anaerobic metabolism of 3-hydroxybenzoate by the denitrifying bacterium. *Thauera aromatica*. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183: 968-979.
- [20] Green SJ, Prakash O, Gihring TM, Akob DM, Jasrotia P, Jardine PM, Watson DB, Brown SD, Palumbo AV, Kostka JE. Denitrifying bacteria isolated from terrestrial subsurface sediments exposed to mixed-waste contamination. *American Society for Microbiology*, 2010, 76(10): 3244-3254.
- [21] Chien YT, Auerbuch V, Brabban AD, Zinder SH. Analysis of genes encoding an alternative nitrogenase in the archaeon *Methanosarcina barkeri* 227. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(11): 3247-3253.
- [22] Hatzenpichler R, Lebedeva EV, Spieck E. A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeota from a hot spring. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(6): 2134-2139.
- [23] Brochier-Armanet C, Boussau B, Gribaldo S, Forterre P. Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(3): 245-252.
- [24] 鲍俊丹, 石美, 张妹婷, 梁东丽, 吴雄平. 中国典型土壤硝化作用与土壤性质的关系. *中国农业科学 (Scientia Agricultura Sinica)*, 2011, 44(7): 1390-1398.

Microbial community in nitrogen cycle of aquaculture water of the Pearl River Delta

Xiaolong Cai, Jianfei Luo, Weitie Lin^{*}, Guoliang Tian

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

Abstract [Objective] In order to study the characteristic of nitrogen transport, the community structure and diversity of related microorganisms in aquaculture water of the Pearl River Delta. [Methods] We established an artificial aquaculture ecosystem to study the microbial community of ¹⁵N-stable isotope probing (¹⁵N-SIP) labeled nitrogen transport microorganisms. The ¹⁵N-labeled DNA was separated by CsCl-ethidium bromide density gradient centrifugation, and was used to construct 16S rRNA gene clone libraries of bacteria and archaea. [Results] Phylogenetic analysis shows that 19 Operational Taxonomic Units (OTUs) from bacterial library were clustered in Proteobacteria and Planctomycetes. Proteobacteria (99.2%) was the dominant group, mainly consisted of *Comamonas* (15.7%), *Nitrosomonas* (12.4%), Enterobacteriaceae (11.5%) and *Nitrobacter* (11.5%). From archaeal library 9 OTUs were divided into 3 phyla: Thaumarchaeota, Crenarchaeota and Euryarchaeota. [Conclusion] We successfully elucidated the microbial community of nitrogen transport microorganisms in aquaculture water of Pearl River Delta by using ¹⁵N-SIP. The data of the community will provide essential information for isolating nitrogen degrading microorganism, and provide scientific basis for creating a healthy aquaculture environment.

Keywords: nitrogen cycling, ¹⁵N-stable isotope probing, 16S rRNA gene clone library, aquaculture

(本文责编: 王晋芳)

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

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

Received: 16 November 2011 / Revised: 28 February 2012