

# 南美白对虾养殖系统中氨氧化菌多样性研究

马少杰 赵勇 戴习林 潘迎捷\* (上海水产大学食品学院, 上海200090)

**摘要** [目的] 为解决养殖水体的氨氮污染问题提供依据。[方法] 研究南美白对虾养殖池塘底泥中的氨氧化菌的多样性和种群分布及其 *amoA* 基因的多样性, 并与池塘周边土壤中的氨氧化菌群落结构进行比较。[结果] 不同样品中氨氧化菌数量差异显著, 其中池塘周边土壤中最多, 达到  $4.5 \times 10^5$  cfu/g, 其次是池塘底泥和水体。来自土壤和底泥两个 DNA 样品均扩增到了预期长度(491bp, 517bp) 的 *amoA* 基因片段。底泥样品的 DGGE 条带数明显多于池塘周边土壤样品。土壤和底泥样品仅有 1 个共同的氨氧化菌种属, 其序列与 *Nitrosospira* sp. 相似性达 96%。池塘周边土壤的氨氧化菌种属序列与 *Nitrosospira* sp. 都有高度同源性。池塘底泥中 *Nitrosomonas* sp. 为氨氧化菌的优势菌群。[结论] 构建的 *amoA* 基因克隆文库能较好反映南美白对虾养殖系统中氨氧化菌的多样性。

**关键词** 氨氧化菌; 最大可能数法; 变性梯度凝胶电泳(DGGE); 多样性

中图分类号 S932.5+1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)10-04107-04

## Study on the Diversity of Ammonia Oxidizing Bacteria in the Culture System of the Southern American White Prawn

MA Shao-jie et al (College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090)

**Abstract** [Objective] The research aimed to provide basis for solving the problem of ammonia nitrogen contamination in culture water. [Method] The diversity and population distribution of ammonia oxidizing bacteria and the diversity of its *amoA* gene in the subsoil of the pond for culturing the southern American white prawn were studied. And it was compared with the community structure of ammonia oxidizing bacteria in the soil around the pond. [Result] The amount of ammonia oxidizing bacteria had a significant difference among different samples, in which that in the soil around the pond was most, reaching  $4.5 \times 10^5$  cfu/g, following by pond subsoil and water body. The fragment of *amoA* gene with the expected length (491bp, 517bp) was amplified from two DNA samples from both soil and the subsoil. The DGGE band number from the subsoil samples was obviously more than that from the soil samples around the pond. The soil and subsoil samples only had 1 common genera of ammonia oxidizing bacteria and its sequence similarity with *Nitrosospira* sp. reached 96%. The sequence of ammonia oxidizing bacteria genera in the soil around the pond all had higher homology with *Nitrosospira* sp. *Nitrosospira* sp. was the dominant bacteria in the subsoil of the pond. [Conclusion] The established *amoA* gene clone library could better reflect the diversity of ammonia oxidizing bacteria in the culture system of the southern American white prawn.

**Key words** Ammonia oxidizing bacteria; Maximum probable number method; Denaturing gradient gel Electrophoresis; Diversity

氨氮污染是制约水产养殖环境的主要胁迫因子<sup>[1]</sup>, 也是重要的环境问题, 生态问题, 食品安全问题。去除养殖水中污染物的最佳方法是应用微生物技术将污染物降解。氨氧化菌的种群分析一直都是人们关注的重点, 其中种群多样性的研究是氨氧化细菌生态学研究的基础<sup>[2-5]</sup>。笔者首次利用不依赖于培养的分子生态学技术, 针对南美白对虾养殖池塘底泥中的氨氧化菌的多样性、种群分布及功能基因的多样性进行分析。并与池塘周边土壤中的氨氧化菌群落结构进行对比分析, 旨在了解氨氧化菌在养殖池塘不同环境中的种群分布、氨氧化菌的生态结构和机制、氨氮在水产养殖系统中生物学的去除行为, 以期为解决养殖水体的氨氮污染问题提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 样品采集** 样品采自上海市金山区南美白对虾养殖池塘。水样用 25 L 采水器采集。底泥和池塘周边土壤样品采集使用自制取样器, 取样器为灭菌的透明聚乙烯管, 管内直径 3 cm, 取样深度 4 cm, 样品采集后立即置于冰盒内, 带回实验室分析。

**1.2 氨氮含量的测定** 水样直接用钠氏试剂分光光度法<sup>[6]</sup>测定, 土壤样品及底泥样品采用氯化钾提取法测定, 用 2 mol/L KCl 以 1:10 (W/V) 比例浸提土壤, 浸提液用钠氏试剂分光光度法测定。所有数据测定 3 次作为测定平均值。用

MPN Giess 法对氨氧化菌计数<sup>[7]</sup>。

**1.3 样品 DNA 的提取** 土壤及底泥样品采用 Fast DNA SPIN Kit for Soil (Bio101, USA) 进行 DNA 提取。水样前处理: 在无菌条件下, 取 1 L 水样, 经 0.45  $\mu$ m 滤膜, 以真空泵抽滤, 使水样中的细菌富集到滤膜上。将滤膜剪成碎片后用上述试剂盒提取 DNA, 提取的 DNA 使用 0.8% 琼脂糖 (W/V) 电泳, TAE 缓冲液, EB 染色后在凝胶成像系统 (BioRad, Bio-Rad Laboratories, America) 下观察。

**1.4 PCR 扩增 *amoA* 基因** 参照 Møtte 等方法<sup>[8]</sup> 进行。以提取的总 DNA 为模板, 采用氨氧化菌特异的 *amoA* 引物对 *amoA* 1F 和 *amoA* 2R 进行 PCR 扩增<sup>[9]</sup>。 *amoA* 2R 5' 端加 GC 夹子 (CGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGCG) 扩增得到的产物用于 DGGE 分析。反应体系为: 10  $\times$  PCR 反应缓冲液 2.5  $\mu$ l, dNTP (2.5 mmol/L of each dNTP) 2  $\mu$ l, 上游引物 (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ l, 下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ l, Taq DNA polymerase 2U (0.4  $\mu$ l), 模板 DNA 1  $\mu$ l, 终体积 25  $\mu$ l。反应条件: 94  $^{\circ}$ C, 4 min; 94  $^{\circ}$ C, 1 min; 57  $^{\circ}$ C, 90 s; 72  $^{\circ}$ C, 90 s, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C, 10 min。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析, 选择目的 DNA 片段回收纯化。PCR 产物的回收纯化采用上海生工柱式胶回收试剂盒进行。PCR 试剂及 PCR 引物均由上海生工生物公司提供。

**1.5 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 分析及片段序列测定** 参照文献 Myzer 的方法<sup>[10]</sup>, PCR 产物通过聚丙烯酰胺凝胶 (浓度 7.5%, 变性梯度: 35% 到 55%) 在通用突变检测系统 BioRad) 中进行电泳。电泳条件: 电泳缓冲液为 1  $\times$  TAE, 60 V、120 V 电泳 6 h。经 SyBR green I 染色后, 在 UVR 凝胶成像系统下观察结果。每个样品的 PCR 产物和克隆得到的单菌的 PCR 产物同时在 1 块胶上样, 作 DGGE 分析, 比对混合样品和单克隆, 对不对应的混合样品条带进行回收测序。

**基金项目** 上海市科技兴农重点攻关项目 (沪农科攻字 2005 第 4-2 号; 沪农科攻字 2006 第 10-5 号); 上海市重点学科建设项目 (T1102); 上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金 (677171401)。

**作者简介** 马少杰 (1982-), 女, 山东龙口人, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术。\* 通讯作者。

**收稿日期** 2007-12-19

**1.6 amoA 基因克隆文库的构建及序列分析** 参照 pGEM T 载体试剂盒说明和文献 [11] 的方法进行。测序由上海生工生物公司完成。测序结果提交 GeneBank 进行 blast 分析。进化分析使用 MEGA version 4.0 软件绘制系统发育树。根据序列相似性大于或等于 99% 以上的归为一个操作分类单元 (OTU)。在 NCBI 数据库中搜索最邻近的序列。以覆盖率 (Coverage) 来评估所构建的文库对氨氧化菌多样性的体现<sup>[12]</sup>, 计算公式为:  $C = [1 - (n/N)] \times 100$ ; 其中,  $n$  代表具有不重复序列的克隆数,  $N$  代表所分析的克隆数。所测序列提交到 GenBank database 中, 登录号为 EU275264 ~ EU275270,

EU275272, EU275274, EU275276, EU275277, EU275281, EU275284。

## 2 结果与分析

**2.1 不同生态位点样品的理化和微生物性状** 采用 MPN-Griess 法计算样品中氨氧化菌数量, 不同样品中的氨氧化菌数量见表 1。不同样品中氨氧化菌数量处于不同的数量级, 差异显著。其中池塘周边土壤中氨氧化菌最多, 达到  $4.5 \times 10^5$  cfu/g; 底泥中数量为  $9.5 \times 10^4$  cfu/g; 水体中数量为  $2.0 \times 10^3$  cfu/ml。

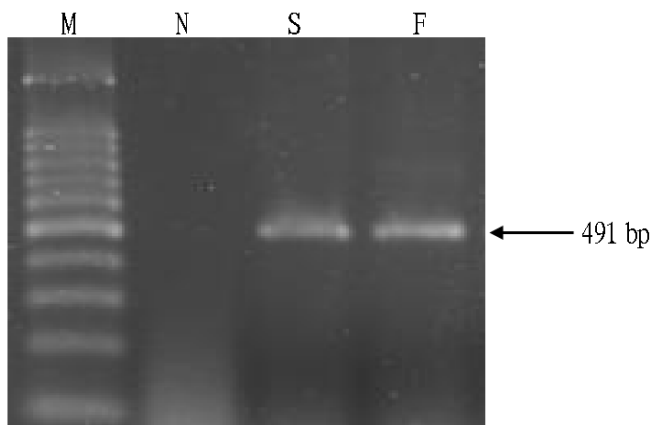
表 1 不同样品的理化和微生物性状 (n=3)

Table 1 The chemical and microbial properties of different samples

样品 Samples	pH 值 pH value	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	细菌 Bacteria	AOB
水样 Water sample	6.81 ± 0.21	(1.28 ± 0.30) ng/L	(5.78 ± 0.73) × 10 <sup>4</sup> cfu/ml	2.0 × 10 <sup>3</sup> cfu/ml
底泥 Bottom mud	7.33 ± 0.10	(4.65 ± 0.82) ng/kg	(6.92 ± 0.91) × 10 <sup>5</sup> cfu/g	9.5 × 10 <sup>4</sup> cfu/g
池塘周边土壤 Soil around the pond	7.89 ± 0.13	(3.23 ± 0.75) ng/kg	(2.21 ± 0.33) × 10 <sup>6</sup> cfu/g	4.5 × 10 <sup>5</sup> cfu/g

**2.2 amoA 基因的扩增** 利用引物 amoA1F 和 amoA2R 对提取得到的环境样品 DNA 进行扩增, 产物用于克隆文库组成分析。利用引物 amoA1F 和 amoA2R-GC 对环境样品 DNA 进行扩增, 产物用于 DGGE 分析。扩增产物作琼脂糖凝胶电泳。土壤和底泥两个 DNA 样品均扩增到了预期长度 (491、517 bp) 的 DNA 片段 (图 1、2), 水体样品没有得到预期片段。

扩增产物与克隆分离得到的单克隆的 PCR 产物同时在一块胶上样, 作 DGGE 对比分析, 结果显示, 条带 3 对应的单克隆的条带序列与 *Nitrosospira* sp. Nsp17 (AY123825) 相似性达到 96%。土壤样品中其他条带都与 *Nitrosospira* 属有较高相似性, 而底泥样品中其他条带与 *Nitrosomonas* 属序列具有高度相似性。



注: M 为 Marker, N 为阴性对照, S 为土壤样品, F 为底泥样品。下同。

Note: M, Marker; N, negative control; S, soil sample; F, bottom mud sample. The same as below.

图 1 PCR 扩增 amoA 基因

Fig. 1 PCR amplification on amoA gene

**2.3 引物的优化** 试验过程中先以氨氧化菌特异的 amoA 引物对 amoA1F 5' 端加 GC 夹子和 amoA2R 进行 PCR 扩增。将扩增得到的产物用于 DGGE 分析时, 条带无法分离 (数据未显示), 而将 GC 夹子连接到 amoA2R 上, 以 amoA2R-GC 和 amoA1F 为引物进行扩增, 产物进行 DGGE 分析时得到了清晰的各条带分离的可分析图谱 (图 3)。

**2.4 不同样品中氨氧化菌区系 DGGE 分析** 图 3 为底泥和土壤样品中 DNA 进行 AOB 特异的 amoA 基因扩增后的 DGGE 图谱, 每种样品都重复 2 次, DGGE 条带重现性都很好。虽然同属池塘系统, 底泥样品的 DGGE 条带数量明显多于池塘周边土壤样品的 DGGE 条带数, 且 2 个样品的氨氧化菌群落组成有着明显的差异。2 个样品的 amoA 扩增序列的 DGGE 图谱共有 8 条条带。池塘周边土壤样品有条带 3、5、6; 底泥有条带 1、2、3、4、7、8。2 个样品之间只有一条共同条带 3。为确定每个条带所代表的氨氧化菌, 将 2 个样品的 PCR

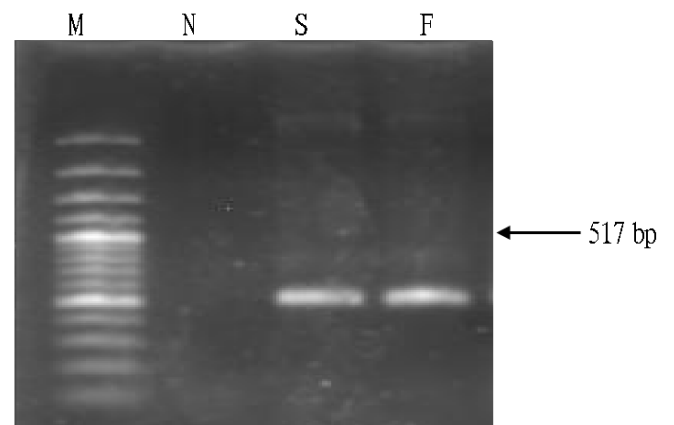
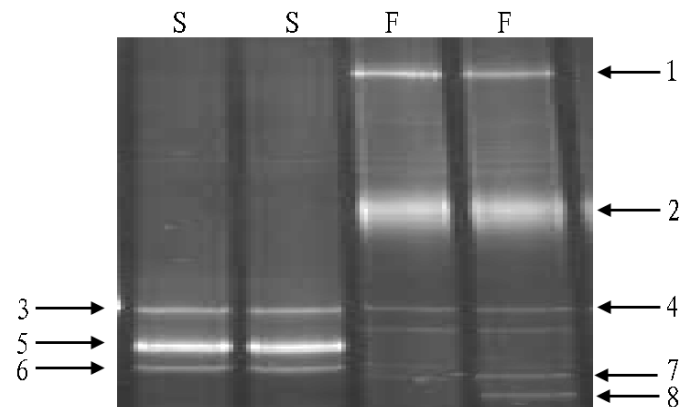


图 2 PCR 扩增 amoA 基因带 GC 夹板

Fig. 2 PCR amplification on amoA gene with GC clamp



注: 图中标注数字条带用于序列测定。

Note: The bands marked with number were used for sequencing.

图 3 不同样品 amoA 基因 PCR 产物 DGGE 分析结果

Fig. 3 DGGE analysis of PCR products of amoA gene from different samples

**2.5 不同样品中氨氧化菌群克隆文库组成分析** 从文库中挑选白色菌落各 100 个纯化后菌液以 amoA1F 和 amoA2R 为引物进行 PCR 检测阳性克隆。PCR 扩增产物为 491bp。共获得阳性克隆 145 个, 其中底泥样品的阳性率为 76%, 池塘周边土壤样品的阳性率为 69%。每个样品随机挑选 30 个阳性

克隆由上海生工生物公司进行测序。

根据序列相似性大于或等于99%以上的归为1个操作分类单元(OTU),共获得了13个OTU,底泥样品序列编号为OTU-F1至OTU-F9,土壤样品序列编号为OTU-S1至OTU-S4。计算结果表明所构建的 $amoA$ 基因克隆文库覆盖率分别达到90.0%,96.7%。从覆盖率分析可以说明所构建的 $amoA$ 基因克隆文库能够较完整地反映所属环境中的氨氧化菌多样

性状况。

图4是对2个样品中氨氧化菌群系统发育分析的比较。池塘底泥样品9个OTU中,OTU-F8与其他序列之间的相似性低于61%,与*Nitrosospira* sp.(AY123825)相似性达到96%。其他OTU都与*Nitrosomonas*属序列具有高度相似性。土壤样品得到4种OTU,它们之间的最低的相似性为90%,所有的序列都与*Nitrosospira*属序列具有高度相似性。

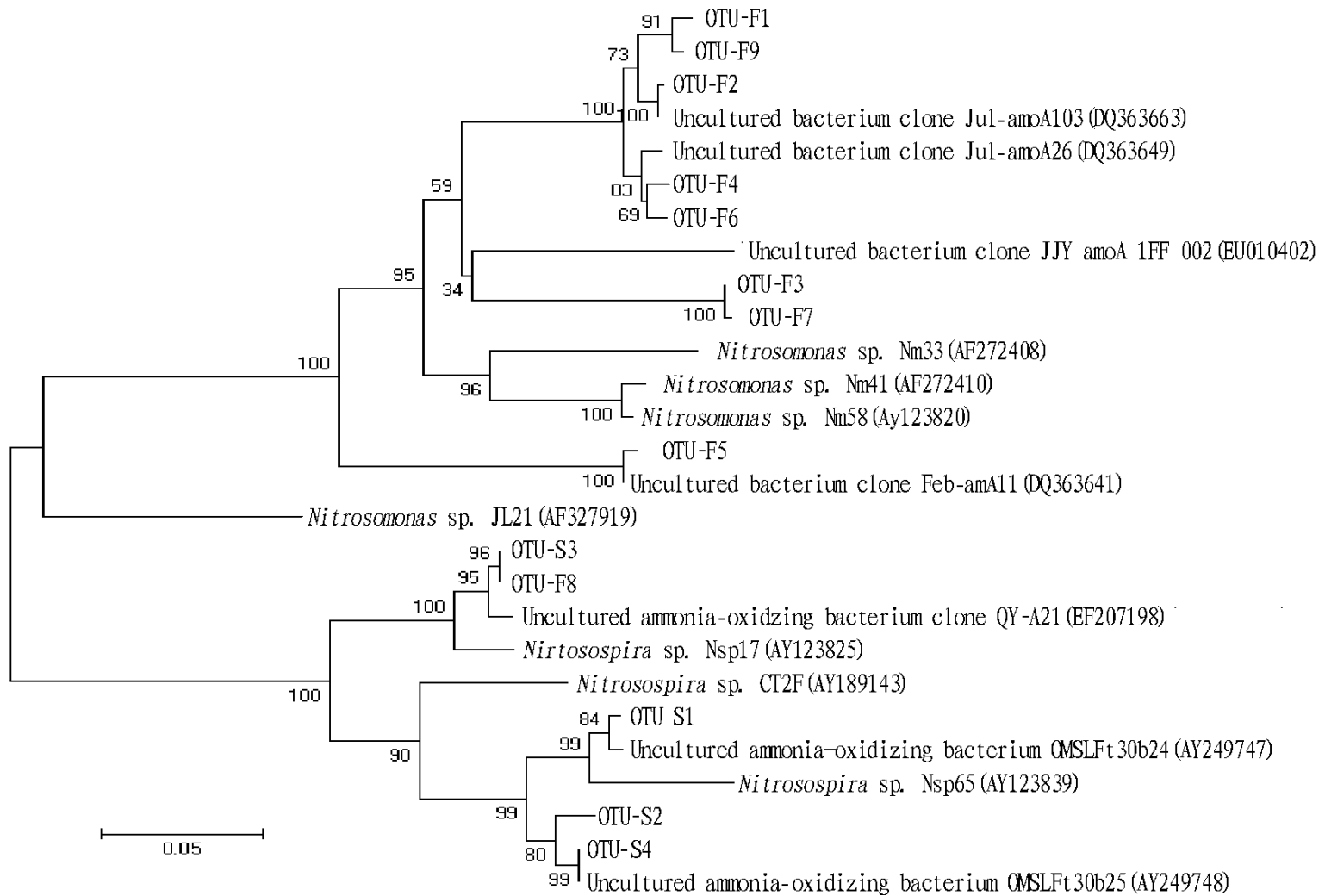


图4 2个样品中氨氧化菌群系统发育分析

Fig.4 Phylogenetic tree of AOB in two samples based on analysis of  $amoA$  sequences

对2个样品序列进行比较分析,发现2个样品中只有OTU-S3和OTU-F8之间的相似性大于99%,遗传距离小于0.01,2个样品的其他序列之间的相似性都小于71%。而OTU-S3和OTU-F8的单菌的PCR产物与混合样品在同一DGGE胶上样,条带能够与条带3相对应。对于条带3,克隆文库分析的结果与DGGE分析结果互相吻合。克隆文库分析得到13个OTU,而DGGE图谱中总共只有8个条带,可能这些条带反映的是氨氧化菌群落中的优势菌群,而弱势菌群因为数量少,DNA含量达不到DGGE检测限,遗传信息被样品中数量较多的种属所掩盖而未被显示出来。

克隆文库分析结果显示,与试验得到的序列相似度最高的序列都是未培养的氨氧化菌序列,相似度高的已培养的氨氧化菌序列也只能确定其属的水平,而未能确定种。这也充分表明难培养的氨氧化菌群有复杂的生态结构还未被人们所认识,需要人们进一步深入的研究。

### 3 讨论

(1) 试验虽然能够提取水体中细菌的总DNA,但是未能扩增得到水体中氨氧化菌的 $amoA$ 基因片段。可能是水体中氨氧化菌基因组DNA所占比例太小所致。也可能是水体中抑制物质的存在,妨碍了其扩增。对水体中氨氧化菌 $amoA$ 基因的扩增条件的摸索在进行中,相关结果将在后续文章中予以报道。

(2) 采用DGGE技术分析不同样品中氨氧化菌的多样性,结果显示,土壤中的氨氧化菌只得到3个条带,而底泥中样品得到5个条带,两者之间只有1个种属相似度大于99%。克隆文库分析结果显示,这2个样品中分别有4,9个不同OTU。这些序列在DGGE泳道并未完全表现出来,这可能是由于该序列代表的氨氧化菌在样品中细胞数目较少,其DNA含量达不到DGGE检测限,遗传信息被样品中数量较多的种属所掩盖而未被显示出来。

(3) Myzer(1993)首次将DGGE技术应用于微生物生态的研究<sup>[10]</sup>,现在已被广泛应用于各种环境微生物生态的研究。这一技术能够提供群落中优势种类信息和同时分析多个样品,具有可重复和容易操作等特点,适合于调查种群的时空变化,并且可通过对切下的带进行序列分析与特异性探针杂交分析鉴定群落成员。DGGE是分析微生物群落的一种有力的工具,但是同其他分子生物学方法一样(DGGE)也有缺陷<sup>[13]</sup>,它只能分离较小的片段,使用于系统发育分析比较和探针设计的序列信息量受到了限制。在某些情况下,由于所用基因的多拷贝导致1个种类多于1条带,因此不易鉴定群落结构到种的水平。

(4) 克隆文库组成分析技术可以对1个系统里微生物组成的整体状况进行“人口普查式”的研究,能够提供比较全面的菌种组成信息<sup>[14]</sup>,是微生物分子生态学中用来调查环境

中微生物组成的常用方法之一。但是该技术工作量比较大,不适合微生物多样性的动态监测。克隆文库组成分析与 DGGE 技术结合起来能够减少两种技术的缺陷,能够更详细地观察微生物的群落结构和功能。

(5) 试验中底泥和土壤中都检测到 *Nitrosospira* 属氨氧化菌的存在,印证了环境中 *Nitrosospira* 属的存在具有普遍性这一结论。土壤氨氧化菌序列与 *Nitrosospira* 属的序列具有高度亲源性,这结果与以往的结论:土壤环境中硝化细菌以 *Nitrosospira* 属为主,而非 *Nitrosomonas* 属<sup>[15]</sup>相一致。

(6) Horns 等利用特异引物对 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增和特异探针杂交<sup>[16]</sup>,检测到富集培养的湖水和沉积样品中存在 *Nitrosomonas* 属。而试验利用 *amoA* 基因特异引物对南美白对虾养殖池塘系统样品进行扩增,得到底泥样品中存在大量与 *Nitrosomonas* 属相似的氨氧化菌序列。这一结果与养殖系统本身的环境特点是密不可分的。

(7) 虽然 MPN 法计数表明土壤中氨氧化菌数量更多,但是底泥中的氨氧化菌种属比土壤中氨氧化菌种属差异更大,且 *Nitrosomonas* 属成为优势菌属。不同形态特征的菌属生理结构不一样,适应环境的能力不同,对环境变化反应的快慢也不同,在土壤或底泥中可能会占据不同的位点。不同样品氨氧化菌种属差异可能是环境对氨氧化菌种属长期选择的结果。

#### 参考文献

- [1] ANTONIO T, CARLOS M. Environmental impacts of intensive aquaculture in marine waters[J]. *Wat Res*, 2000, 34(1): 334-342.
- [2] PURKHOLD U, POMMERENING ROGER A, JURETSCHKOS, et al. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66: 5368-5382.

(上接第4066页)

花、蟹爪兰、昙花等。研究发现,在 8~10 m<sup>2</sup> 的室内,1 盆吊兰就相当于一个空气净化器。10 m<sup>2</sup> 以上的房间。宜选少量大型植物与中小型植物相结合组景,如卵叶鹅掌藤、散尾葵、苏铁、龟背竹、棕竹、白鹤芋、君子兰、金边虎皮兰、绿宝石等。有研究表明,如果 15 m<sup>2</sup> 的室内摆放 2~3 盆金边虎皮兰,每天就能吸收室内 80% 以上的有害气体。

#### 5 结语

在目前尚没有先进技术手段有效净化室内空气污染物的情况下,利用植物的生物特性吸收空气中的污染物,是非常好的净化技术选择<sup>[2]</sup>。正确选择和摆放能净化室内空气污染物的观赏植物,不仅可改善室内空气环境质量,充分展

- [3] 周娟,李君文,郑金来. 亚硝酸细菌研究进展[J]. *环境科学与技术*, 2001, 24(9): 8-10.
- [4] JURETSCHKOS, TIMMERMANN G, SCHMID M, et al. Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterial diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrosospira*-like bacteria as dominant populations[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64: 3042-3051.
- [5] GEORGE A K, JOHN R S. Ammonia oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology[J]. *Annu Rev Microbiol*, 2001, 55: 485-529.
- [6] 国家环境保护总局编. 水和废水监测分析方法[M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [7] 马放,任南琪,杨基先. 污染控制微生物学实验[M]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 2003.
- [8] METTE H N, NEILS B R. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia oxidizing bacteria[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2002, 50: 189-203.
- [9] ROTHAUWE J H, WIZEL K P, LIEACK W. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia oxidizing populations[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63: 4704-4712.
- [10] MUJZER G, DEWAAL E C, UTTERLINDEN A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59: 695-700.
- [11] SAMLRICK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. 分子克隆实验指南[M]. 2 版. 金冬雁,黎孟枫,等,译. 北京: 科学出版社, 1996.
- [12] SINGLETON D R, FURLONG M A, RATHBUN S L, et al. Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 4374-4376.
- [13] MUJZER G, SMALLA K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1998, 73: 127-141.
- [14] ZHOU J Z, XI A B C, HUANG H S, et al. Microbial diversity and heterogeneity in sandy subsurface soils[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70: 1723-1734.
- [15] KOVALCHUK G A, STEPHEN J R, DEBOER W, et al. Changes in the community structure of ammonia oxidizing bacteria during secondary succession of calcareous grasslands[J]. *Environ Microbiol*, 1997, 63: 1489-1497.
- [16] HORNS W D, HASTINGS R C, HEAD I M, et al. Amplification of 16S ribosomal RNA genes of autotrophic ammonia oxidizing bacteria[J]. *Microbiology*, 1995, 141: 2793-2800.

示室内植物的自然美,还可在一定程度上消除人们生活与工作时的疲劳、缓解压力,营造和谐美的绿化空间,愉悦室内活动的人们的心情。

#### 参考文献

- [1] 国家环境保护总局科技标准司,中国环境科学学会. 室内环境与健康[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2004.
- [2] EJELD T. The effect of indoor foliage plants on health and discomfort symptoms among office workers[J]. *Indoor Built Environment*, 1998, 7: 204-209.
- [3] Wanderley Rodrigues Bastos. Mercury persistence in indoor environments in the Amazon Region, Brazil[J]. *Environmental Research*, 2004, 76: 235-238.
- [4] TAKASH O. Characteristics of potted plants for removing offensive odors[J]. *Sensors and Actuators B*, 2003(89): 131-136.
- [5] WOLVERTON B C. How to grow fresh air[M]. New York: Penguin Books, 1996.