

虾池中具有降解硝酸盐或 亚硝酸盐能力的细菌多样性

王安利¹, 郑桂丽³, 廖绍安^{1,*}, 黄洪辉², 孙儒泳¹

(1. 华南师范大学生命科学学院, 广州 510631; 2. 农业部渔业生态环境重点开放实验室, 广州 510300;

3. School of Medicine, University of Maryland Baltimore, MD 21201, USA)

摘要 水产养殖过程中, 氮素积累日益严重, 而其中亚硝酸盐由于转化速度低, 毒性强, 对养殖的危害更加突出。对从对虾养殖池中通过反硝化条件选择性富集培养得到的具有去除硝酸盐及亚硝酸盐能力的细菌进行筛选, 结果分离到 27 株能够还原硝酸盐的异养细菌, 其中 24 株在 7d 内能有效地降低硝酸盐和亚硝酸盐浓度, 特别是 LZX22、LZX27、LZX23、LZX21 等 4 株使硝酸盐氮由起始的 422.25mg/L 降至 4.00mg/L 以下, 亚硝酸盐浓度也降至 0.40mg/L 以下。对这些菌株进行 16S rDNA 系统发育分析, 结果显示 27 株菌分属于 5 个不同的类群, α -Proteobacteria (1), γ -Proteobacteria (10), Actinobacteria (12), Firmicutes (3) 和 Bacteroides (1); 它们在系统发育上分别与 11 个属相近, 分别是 *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Acinetobacter*, *Paracoccus*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Cellulosimicrobium*, *Bacillus*, *Stenotrophom* 和 *Sphingobacterium*。表明所分析的虾池中具有去除硝酸盐和亚硝酸盐能力的细菌具有较高的多样性, 特别是多株细菌为首次报道具有去除硝酸盐和亚硝酸盐的能力, 为下一步筛选亚硝酸盐高效去除细菌提供了丰富的菌种资源。

关键词 细菌多样性, 亚硝酸盐, 硝酸盐, 16S rDNA, 系统发育

文章编号: 1000-0933(2007)05-1937-08 中图分类号: Q178, Q955.7, Q958.8, X52 文献标识码: A

Diversity analysis of bacteria capable of removing nitrate/nitrite in a shrimp pond

WANG An-Li¹, ZHENG Gui-Li³, LIAO Shao-An^{1,*}, HUANG Hong-Hui², SUN Ru-Yong¹

1 College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

2 Key Laboratory of Fishery Ecology Environment, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510300, China

3 School of Medicine, University of Maryland Baltimore, MD 21201, USA

Acta Ecologica Sinica 2007, 27(5): 1937-1944.

Abstract: Nitrogen accumulation is a serious concern in aquaculture. Among other forms of nitrogen nitrite is more harmful because of its low transformation rate and high toxicity. In this study, 27 strains, which can reduce nitrate to nitrite, were isolated from a shrimp pond by using selective enrichment cultures under alternating oxic-anoxic denitrifying conditions. Among these strains, 24 strains effectively decreased nitrate and nitrite concentrations during a 7-day test. The strains LZX21, LZX22, LZX23, LZX27 decreased nitrate concentrations from 422.25mg/L to lower than 4.00mg/L, and decreased nitrite concentrations to lower than 0.40mg/L. Sequence analysis of 16S rDNA indicated that the 27 strains belonged to five separate groups of α -proteobacteria (1), γ -proteobacteria (10), Actinobacteria (12), Firmicutes (3), and bacteroides

基金项目: 广东省自然科学基金项目资助 (021098, 5005909); 国家农业部渔业生态环境重点开放实验室开放基金资助项目 (2003-3)

收稿日期: 2006-08-24; 修订日期: 2007-04-10

作者简介: 王安利 (1957 ~), 男, 河北滦南人, 教授, 主要从事水产养殖动物生理生态学和健康养殖生态研究。E-mail: wanganl@senu.edu.cn

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: liaosha@senu.edu.cn

Foundation item: The project was financially supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 021098, 5005909), The Opening Foundation of Key Laboratory of Fishery Ecology Environment, Ministry of Agriculture (No. 2003-3)

Received date 2006-08-24; **Accepted date** 2007-04-10

Biography: WANG An-Li, Ph. D., Professor, mainly engage in physioecology of aquaculture animals. E-mail: wanganl@senu.edu.cn

(1). Moreover, these strains were classified into or showed close relationship to 11 genera including *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Acinetobacter*, *Paracoccus*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Cellulosimicrobium*, *Bacillus*, *Stenotrophom*, and *Sphingobacterium*. These data suggest that a high diversity of bacteria capable of removing nitrate/nitrite was present in the shrimp pond. Several species were reported for the first time to have capability of nitrate/nitrite removal. These strains provide a plentiful resource for further selecting nitrite cleaners.

Key Words : bacterial diversity ; nitrite ; nitrate ; 16S rDNA ; phylogenetic analysis

在水产养殖过程中,随着高密度养殖的发展,特别是在水温较高的夏秋季节,氮磷元素含量过高而造成的富营养化情况频繁出现,除使水质恶化及破坏其中的生物平衡外,其中的氨氮和亚硝态氮对养殖动物具有较强毒性,特别是亚硝态氮在养殖条件下转化速率低,使得高密度养殖的水体中亚硝酸盐积累极为突出,尤其是大雨过后,亚硝酸盐含量极其容易严重超标,由其造成的水产养殖动物病害甚至死亡现象已多见报道^[1,2]。

亚硝酸盐对水产养殖动物有较强的毒性,可导致水产养殖动物在呼吸作用、离子调节、心血管压力调节、内分泌及排泄等多种生理代谢紊乱^[3]。有报道指出养殖水体中高浓度的亚硝酸盐会降低南美白对虾的免疫能力,明显降低南美白对虾的抗病能力甚至导致严重死亡^[4,5]。较高浓度的亚硝酸盐在氨氮存在时,对中国对虾的慢性毒性会导致试验虾肝胰腺、胃、中肠和鳃等组织的细胞出现肿胀、空泡化、坏死等一系列组织病理学变化^[6]。亚硝酸盐是硝化、反硝化及产铵异化硝酸盐还原(DNRA dissimilatory nitrate reduction to ammonia)等多个过程的中间产物,参与这些反应的主要包括具有硝化能力的自养细菌和具有反硝化作用或产铵异化硝酸盐还原能力的异养细菌。养殖水体中亚硝酸盐的浓度与这些细菌的组成直接相关。虽然对水产养殖池塘中的氮循环已有长期的研究^[7],但是对其中具备产生或去除亚硝酸盐能力的细菌的多样性极少见报道^[8]。虽然在其他环境如土壤、活性污泥、海洋中的研究相对较多,但亦主要直接集中在反硝化细菌的研究上,多为不经细菌分离直接分析反硝化还原酶基因 *nirK* 或 *nirS* 的多样性^[9]对其进行多样性探讨,或是结合分离培养和 16S rDNA 序列分析^[10,11]对其进行区系分析。不经细菌分离而直接分析环境样品中反硝化还原酶基因多样性的方法虽然速度快,信息量大,但终究不能直接将功能基因信息与特定细菌及菌株的实际活性联系起来,因此本文选择通过选择性富集分离、代谢检测及 16S rDNA 序列分析的方法,对对虾养殖池中具备去除硝酸盐或亚硝酸盐能力的细菌的多样性进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 富集与分离

1.1.1 样品采集

用 500ml 虾池水(盐度 12)冲洗被持续曝气的虾池悬浮化学纤维棉上的生物膜,收集样品于 2000ml 无菌容器中。

1.1.2 富集与分离

将 121℃ 灭菌 30min 的基本培养基(醋酸钠 40 mmol/L,葡萄糖 60 mmol/L,NaNO₃ 20 mmol/L, K₂HPO₄ 2.8 g, KH₂PO₄ 5.4 g, NaCl 5.0 g, 2% MgSO₄ 溶液 10ml, FeSO₄ 8mmol/L, pH 7.6, 12‰ 虾池水 1000ml)冷却至室温,取 500ml 加入到样品中,混匀。间歇曝气,室温下富集培养 2 个月。NaNO₃ 根据消耗程度补充。

向基本培养基中加入 18g/L 琼脂粉,加热溶解后 121℃ 灭菌 30min,制作分离平板培养基。富集培养物被系列稀释后涂布平板,32℃ 培养。根据菌落特征差异挑选单菌落再次划线培养,菌株纯化后保存备用。

1.2 硝酸盐和亚硝酸盐代谢检测

上述液体培养基组分除 NaNO₃ 的浓度改为 30mmol/L 外其他不变,配制完毕,按照 180ml/培养瓶(250ml)分装,121℃ 灭菌 30min,冷却至室温后保存备用。依照分离培养基组分制作固体斜面培养基,接种挑选的菌株活化,用无菌的 12‰ 人工海水洗下,调节各菌浓度一致(OD₆₀₀ ≈ 0.45),每株接种 5ml,32℃,150r/min 振荡

培养 7d。每隔 24h 检测一次 NO_3^- -N、 NO_2^- -N 及 NH_4^+ -N 浓度。硝酸盐检测用紫外分光光度法,亚硝酸盐检测用盐酸萘乙二胺法,氨氮检测用次溴酸钠氧化法。筛选出可以还原 NO_3^- -N 至 NO_2^- -N 或还可以进一步去除 NO_2^- -N 的菌株,涂布到分离培养基平板上于 32℃ 再次培养备用。

1.3 系统发育分析

1.3.1 扩增和测序

从平板上直接挑取一环单菌落菌苔,加至 100 μl 灭菌去离子水中,吹打混匀,100℃ 水浴 10min,12000r/min 4℃ 离心 10min,取上清于 4℃ 保存备用,直接作为 PCR 扩增模板。16S rDNA 扩增引物为:上游引物 BSF8/20 5'-AGA-GTT-TGA-TCC-TGG-CTC-AG-3';下游引物 BSR814/21 5'-TAC-AGC-GTG-GAC-TAC-CAG-GGT-3',由上海生工生物工程有限公司合成。扩增体系:2 \times Premix Taq (Ex Taq™ Version, TaKaRa 公司) 25 μl ,引物各 0.5 $\mu\text{mol/L}$,模板 1 μl ,灭菌去离子水补至 50 μl 。采用 PE2400 PCR 扩增仪,反应程序为 94℃ 变性 10min,94℃ 变性 40s,56℃ 退火 50s,72℃ 延伸 1min,30 个循环,72℃ 再次延伸 10min 后,4℃ 保存。PCR 产物以含 0.15 $\mu\text{g/ml}$ 溴化乙锭的 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,凝胶图像分析系统 (Bio-Rad Gel Doc 2000) 记录结果。用 Microcon-PCR Purification Kit (Millipore) 纯化扩增产物,由 Invitrogen 公司采用 ABI 377 DNA 测序仪完成测序,测序引物为 BSF8/20。

1.3.2 系统发育分析

测序结果提交 GenBank,序列号分别为:LZX01 DQ359923,LZX02 DQ359924,LZX03 DQ359925,LZX04 DQ359926,LZX05 DQ359927,LZX06 DQ359928,LZX07 DQ359929,LZX08 DQ359930,LZX09 DQ359931,LZX10 DQ359932,LZX11 DQ359933,LZX12 DQ359934,LZX13 DQ359935,LZX14 DQ359936,LZX15 DQ359937,LZX16 DQ359938,LZX17 DQ359939,LZX18 DQ359940,LZX19 DQ359941,LZX20 DQ359942,LZX21 DQ359943,LZX22 DQ359944,LZX23 DQ359945,LZX24 DQ359946,LZX25 DQ359947,LZX26 DQ359948,LZX27 DQ359949。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^[6]。

采用 BLASTN 程序及 FASTA 程序进行同源性检索,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 Clustal W 多重比对结果,采用 Neighbour Joining 方法构建系统发育树。构建系统发育树所用的参照序列如下:*Arthrobacter nicotianae* X80739,*Acinetobacter baumannii* 25001 CMCC (B) AY738400,*Acinetobacter* sp. EVA14 AJ410290,*Aeromonas bestiarum* CIP 7430 X60406,*Bacillus pseudofirmus* A-40-2 AB201795,*Bacillus* sp. KYJ963 AF217809,*Bacillus subtilis* JH5 DQ232747,*Cellulosimicrobium cellulans* AS 4.1333 AY114178,*Chromohalobacter israelensis* ATCC 43985 T AJ295144,*Citrococcus muralis* 4-0 AJ344143,*Halomonas* sp. ws31 AJ551141,*Microbacterium flavescens* Y17232,*Microbacterium* sp. YK18 AB070467,*Micrococcus luteus* BCNU121 DQ229318,*Moraxella canis* AJ247225,*Oceanimonas denitrificans* F13-1 DQ097665,*Paracoccus marcusii* Y12703,*Pseudomonas beteli* ATCC 19861T AB021406,*Pseudomonas stutzeri* UP-1 AY364327,*Pseudomonas stutzeri* UP-2 AY364328,*Rhodobacter blastica* D16429,*Salinicoccus roseus* X94559,*Sphingobacterium multivorum* AB100739,*Sphingobacterium* sp. R550 AF489284,*Stenotrophomonas maltophilia* AB008509,*Subtercola frigoramans* AF224723。

2 结果

2.1 硝酸盐和亚硝酸盐代谢检测

对富集后分离的菌株经过硝酸盐液体培养基培养,检测各菌株对 NO_3^- -N 和 NO_2^- -N 的代谢情况,计算各自每天的 NO_3^- -N 和 NO_2^- -N 的去除速率、 NO_3^- -N 平均去除速率、 NO_2^- -N 的平均表观去除速率及 NO_3^- -N 和 NO_2^- -N 的终浓度(见表 1)。结果有 27 株细菌被证实可以还原 NO_3^- -N 为 NO_2^- -N,其中 24 株能够进一步去除 NO_2^- -N,有 3 株(分别为 LZX15、LZX18、LZX19)不能降低 NO_2^- -N,氨氮检测结果显示这些菌株在整个检测过程中始终没有氨氮积累。8 株具有较高的 NO_2^- -N 最大去除效率,分别是 LZX06、LZX12、LZX16、LZX17、LZX21、LZX22、LZX23 和 LZX27,其中以 LZX22 (106.718 $\text{mg N-NO}_3^- \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$) 去除速率最高,除了 LZX16 外,其余 7 株去除硝酸盐的能力明显高于其他菌株,特别是 LZX21、LZX22、LZX23 和 LZX27,它们去除亚硝酸盐

的能力也强于其他菌株。除了 LZX06 外,其余 7 株去除亚硝酸盐的平均表观速率都比较高。另外,因为亚硝酸盐的产生和去除是个连续过程,平均表观去除速率不能全面反映各菌株去除亚硝酸盐的真实能力,故将最终硝酸盐及亚硝酸盐浓度亦列于表 1 中。总体上看,去除硝酸盐和亚硝酸盐能力都较强的有 4 株,依次分别是 LZX22、LZX27、LZX23、LZX21,它们使 NO_3^- -N 由起始的 422.25 mg/L (30 mmol/L) 各自降至 0.323、0.379、1.163、3.501 mg/L,实验结束时亚硝酸盐浓度也都较低,分别为 0.031、0.117、0.354、0.212 mg/L。

表 1 各菌株培养过程中 NO_3^- -N 及 NO_2^- -N 去除速率Table 1 Removal rate of NO_3^- -N and NO_2^- -N by the isolates

菌株编号 No. of isolate	NO_3^- medium					
	NO_3^- -N 去除速率 ($\text{mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$)		NO_2^- -N 去除速率 ($\text{mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$)		最终浓度 (mg L^{-1})	
	Removal rate of nitrate		Removal rate of nitrite		Final concentration	
	最大去除速率 a Maximum rate	平均去除速率 c Average rate	最大去除速率 b Maximum rate	平均表观去除速率 d Average apparent rate	NO_3^- -N	NO_2^- -N
LZX01	33.027	9.975	10.122	2.571	350.400	12.242
LZX02	33.920	12.429	11.336	2.178	333.222	13.825
LZX03	13.173	7.895	5.127	2.887	364.960	14.087
LZX04	96.536	27.988	19.312	13.321	224.309	14.595
LZX05	33.804	16.241	14.526	4.125	306.538	18.562
LZX06	115.196	55.213	27.444	19.191	33.734	4.335
LZX07	23.492	11.114	10.241	4.241	342.427	12.456
LZX08	46.743	15.776	11.258	4.528	309.793	10.307
LZX09	25.145	13.425	9.547	5.547	326.250	10.729
LZX10	91.872	20.301	10.097	9.949	278.118	11.591
LZX11	89.423	21.417	10.615	10.154	270.306	10.191
LZX12	135.442	57.122	61.227	25.065	20.371	7.456
LZX13	36.897	9.579	5.103	3.634	353.172	15.634
LZX14	27.143	9.237	6.691	3.498	355.566	12.498
LZX15	148.212	27.489	NR	NR	227.802	167.574
LZX16	38.153	21.362	25.128	5.412	270.691	8.011
LZX17	72.644	51.774	39.255	13.096	57.807	5.096
LZX18	114.605	23.084	NR	NR	258.637	136.723
LZX19	79.113	17.492	NR	NR	297.781	96.425
LZX20	21.334	13.430	12.351	5.238	326.215	10.238
LZX21	72.644	59.532	51.207	19.913	3.501	0.212
LZX22	155.796	59.986	106.718	29.987	0.323	0.031
LZX23	141.956	59.866	77.645	25.061	1.163	0.354
LZX24	39.274	21.443	23.156	8.929	270.124	7.929
LZX25	17.789	13.325	11.774	6.196	326.950	9.169
LZX26	37.326	25.274	18.936	7.568	243.307	12.977
LZX27	201.035	59.978	95.919	26.548	0.379	0.117

NR: 实验期间亚硝酸盐浓度持续增加 Nitrite concentrations was increasing during the period;

a: 最大去除速率 = (第 n 次(天测得的)硝酸盐浓度 - 第 $n+1$ 次(天测得的)硝酸盐浓度) 的最大值/L·d Maximum rate = maximum difference in the minus between N and $(N+1)$ nitrate concentrations

b: 最大去除速率 = (第 n 次(天测得的)亚硝酸盐浓度 - 第 $n+1$ 次(天测得的)亚硝酸盐浓度) 的最大值/L·d Maximum rate = maximum difference in the minus between N and $(N+1)$ nitrite concentrations

c: 平均去除速率 = (起始浓度 - 终浓度) / 7d Average rate = initial concentration plus final concentration / 7 d

d: 平均表观去除速率 = 每天表观去除速率之和 / 7d Sum of apparent rate / 7

2.2 16S rDNA 序列分析

所获 27 株细菌的 16S rDNA 部分序列长度介于 727 ~ 837bp 之间,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 88.7% ~ 100.0% 之间,最接近的细菌有 13 种,分属于 11 个属(表 2)。与各自最近似菌株的相似度高于 99.0% 的有 LZX14、LZX15、LZX22 和 LZX25,它们的最近似菌株分别是 *Bacillus flexus* (AB021185)、*Cellulosimicrobium cellulans* (AY114178)、*Stenotrophomonas maltophilia* (AB021406) 及 *Pseudomonas stutzeri* (AF094748),据此将它们归于各自对应的已知种。根据 99% > 相似度 \geq 97% 划分属,有 6 株被归于相应的属,分别是 LZX07、LZX10 和 LZX11 属于 *Arthrobacter*, LZX17 属于 *Halomonas*, LZX18 和 LZX19 属于 *Microbacterium*。

表 2 27 株细菌 16S rDNA 部分序列的同源检索结果

Table 2 Homology analysis of 27 isolates based on partial 16S rDNA sequences

菌株编号 Strains No.	最近似菌株 Clost organism	序列号 Accession No.	相似度 Similarity (%)
LZX01	<i>Acinetobacter</i> sp. 'anoxic'	AY055373	95.276
LZX02	<i>Acinetobacter</i> sp. p13F2	AJ495087	94.248
LZX03	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	X80739	95.399
LZX04	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	X80739	95.455
LZX05	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	X80739	95.269
LZX06	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	X80739	94.899
LZX07	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	X80739	97.443
LZX08	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	X80739	95.093
LZX09	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	X80739	93.741
LZX10	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	X80739	97.627
LZX11	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	X80739	98.852
LZX12	<i>Bacillus pseudofirmus</i>	AB201795	91.785
LZX13	<i>Bacillus pseudofirmus</i>	AB201795	95.119
LZX14	<i>Bacillus flexus</i>	AB021185	99.868
LZX15	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	AY114178	100.000
LZX16	<i>Halomonas aquamarina</i>	AJ306888	92.394
LZX17	<i>Halomonas aquamarina</i>	AJ306888	97.724
LZX18	<i>Microbacterium esteraromati</i>	AB099658	98.65
LZX19	<i>Microbacterium esteraromati</i>	AB099658	98.661
LZX20	<i>Oceanimonas denitrificans</i> F13-1	DQ097665	92.16
LZX21	<i>Paracoccus carotinifaciens</i>	AB006899	95.7
LZX22	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	AB021406	99.737
LZX23	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	AF094748	94.109
LZX24	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	AF094748	95.62
LZX25	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	AF094748	99.06
LZX26	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	AF094748	88.701
LZX27	<i>Sphingobacterium</i> sp. R550	AF489284	92.666

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 1),从图中可看出 27 株细菌分属于不同的 5 个类群,分别是 α -Proteobacteria, γ -Proteobacteria, Firmicutes, Acinetobacteria, 和 Bacteriodes,各包括 1、10、3、12 及 1 株细菌,所占比例分别为 3.7%、37%、11.1%、44.4% 和 3.7%。

3 讨论

通过选择性富集和分离是获得特定生理功能类群细菌的一种有效手段,如在硝化细菌^[12]和反硝化细菌^[13]的研究上。本文通过选择性富集、分离及活性检测筛选获得 27 株异养细菌,均能还原硝酸盐为亚硝酸盐,其中 24 株能进一步有效去除亚硝酸盐。去除亚硝酸盐的细菌主要有 3 类,即反硝化细菌、亚硝酸盐氧化菌和产铵异化硝酸盐还原菌^[14]。本文所筛选菌株是在反硝化条件下富集所得,其中 24 株有去除亚硝酸盐的

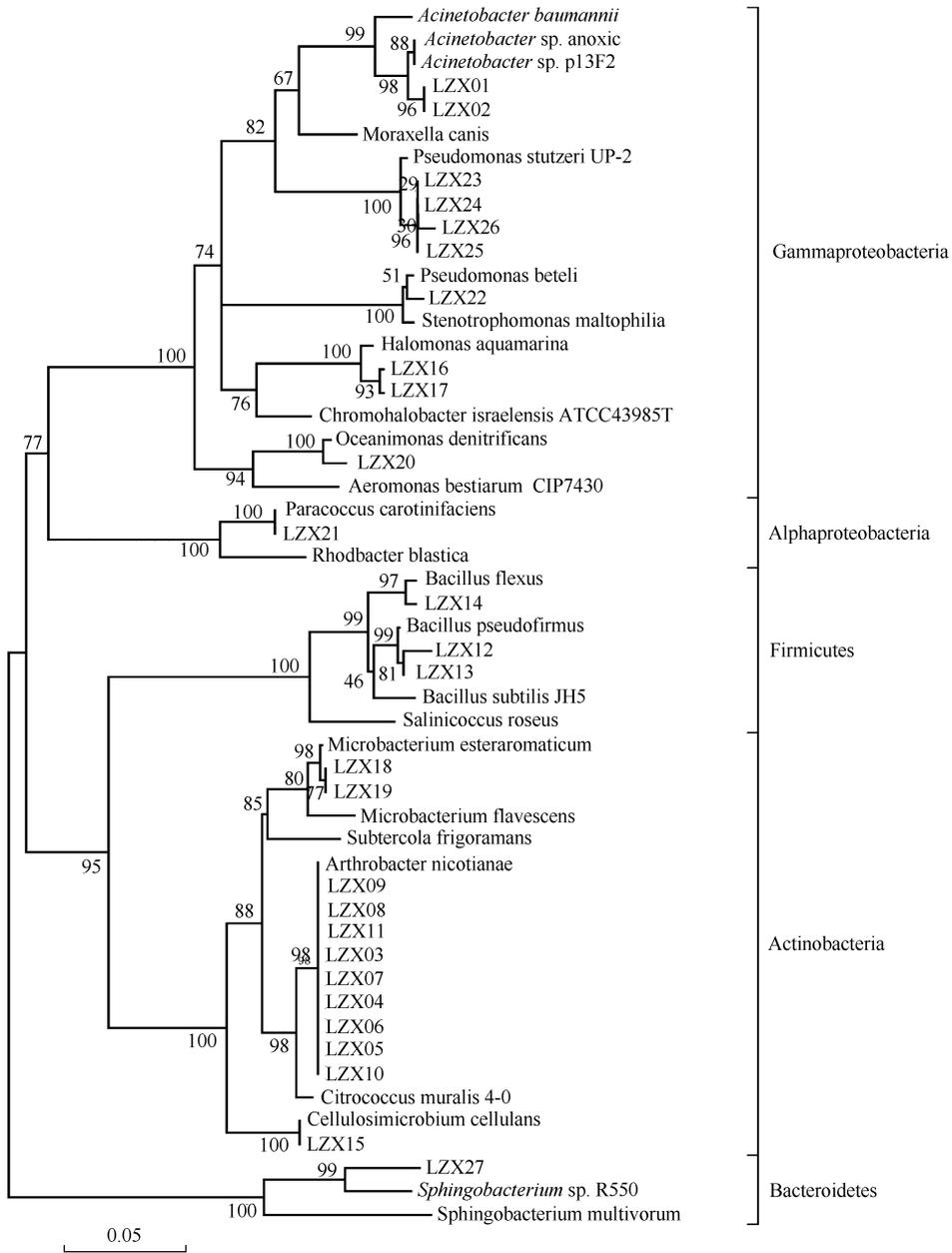


图1 基于所筛选的27株细菌的16S rDNA部分序列构建的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree constructed by the Neighbour Joining method on the basis of partial 16S rDNA sequences of 27 isolates. Bootstrap numbers indicate the value of 1000 replicates

能力,作者推测这些菌株可能主要是反硝化细菌,但由于尚未进行功能基因的检测,不能从代谢途径上对这些菌株作进一步的鉴别证实,有报道称某些菌株可以集反硝化和产铵异化硝酸盐还原的能力于一身^[15,16],虽然结果显示整个检测过程中始终没有氨氮积累,但由于不能完全排除产生氨氮被细菌完全快速吸收,部分菌株属于产铵异化硝酸盐还原菌的可能,因此本文没有对其作最终具体的定论。

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^[17],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^[18,19]。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 $99\% > \text{相似度} \geq 97\%$ ^[20]或 $99\% > \text{相似度} \geq 95\%$ ^[21]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,与这 27 株细菌最近似的菌株归属于 5 大类群,包括 *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Cellulosimicrobium*, *Halomonas*, *Microbacterium*, *Oceanimonas*, *Paracoccus*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* 和 *Sphingobacterium* 等 11 个属。这些属中除了 *Microbacterium* 及 *Cellulosimicrobium* 两个属没有反硝化细菌的报道外,其余 9 属中均已有报道,特别是 *Pseudomonas*, *Paracoccus* 和 *Bacillus* 等 3 个属^[22]。与参考菌 *Arthrobacter nicotianae* (X80739) 最近似的有 9 株,其中 3 株相似度高于 97%。*Arthrobacter* 属细菌通常被认为是绝对好氧菌,发现该属某些菌株在好氧条件下能还原硝酸盐^[23],而且其中的 *A. globiformis* (CECT 4500) 及 *A. nicotianae* 在厌氧条件下亦能还原硝酸盐进行厌氧生长^[24]。与 *P. stutzeri* (AF094748) 最近似的 4 株还原硝酸盐和亚硝酸盐能力不是所分离菌株中最强的,包括相似度高于 99% 的 LZX25,尽管 *P. stutzeri* 是研究反硝化的经典模式生物^[25, 26]。LZX18、LZX19 与 *Microbacterium esteraromati* (AB099658) 的相似度高于 98%,可以归为 *Microbacterium* 属,该属细菌只有少数菌株硝酸盐还原阳性^[27];而 LZX15 与 *Cellulosimicrobium cellulans* 的相似度高达 100%,检测结果显示它具有较高的硝酸盐还原能力,但在所试条件下不具备亚硝酸盐去除能力,此前未曾报道过 *C. cellulans* 具有硝酸盐或亚硝酸盐还原能力。嗜麦芽寡养单胞菌以前也从未有过反硝化方面的报道,但本文所分到的嗜麦芽寡养单胞菌株 LZX22 具有极强的硝酸盐还原及亚硝酸盐去除能力,在所试条件下 10hr 内即可将亚硝酸盐去除到检测不出的水平。

在水生生态系统中,参与硝酸盐和亚硝酸盐去除细菌的研究主要集中在反硝化细菌上,虽然反硝化细菌广泛分布于各种环境中,但是一些研究结果显示随着盐度升高反硝化细菌的多样性逐渐降低^[28]。海水养殖系统中硝酸盐还原菌和亚硝酸盐还原菌分类多样性研究不多,王亚南等^[8]的研究结果显示海水养殖沉积物中硝酸盐还原菌主要是 Gram⁺ (93.1%),传统细菌鉴定结果表明它们分别属于芽孢杆菌属 (*Bacillus*) (38 株)、盐芽孢杆菌属 (*Halobacillus*) (7 株)、短芽孢杆菌属 (*Brevibacillus*) (4 株)、动性球菌属 (*Planococcus*) (1 株)、动性杆菌属 (*Planomicrobium*) (1 株) 以及放线细菌 (*Actinomycetales*) (3 株) 其中 22 株的 16S rDNA 序列分析结果显示这些菌株与 4 个属的 11 个种最相似。本文结果显示所选盐度为 12‰ 的对虾淡化养殖池中具备去除硝酸盐和亚硝酸盐能力的细菌具有较高的多样性。

对水产养殖池塘中硝酸盐和亚硝酸盐去除菌进行多样性分析,可以了解养殖水体中硝酸盐或亚硝酸盐的积累或转化提供重要线索,为养殖水体中硝酸盐和亚硝酸盐积累的有效控制提供重要指引。本文筛选得到多株具备去除亚硝酸盐能力的细菌,为下一步在水产养殖环境中亚硝酸盐去除方面的应用提供了丰富的待选资源。下一步计划将从功能基因和其他生态生理特征的角度对它们作进一步的研究,以对其代谢及和环境的相互影响作进一步的了解。

References :

- [1] Ni J Y, Gu B, Shao C S. A case of detoxication of nitrite poisoning *Litopenaeus vannamei*. *Scienti. Fish Farming*, 2004, 4 : 49.
- [2] Xu P F, Zeng X K. Aalysis of nitrite harm for farming *Litopenaeus vannamei* in freshwater and countermeasure. *Fishery Modernization*, 2006, 2 : 38 - 39.
- [3] Jensen F B. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 2003, 135 : 9 - 24.
- [4] Tseng I T, Chen J C. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under nitrite stress. *Fish Shellfish Immunol.*, 2004, 17 (4) : 325 - 333.
- [5] Huang X H, Li C L, Zheng L, et al. The toxicity of NO₂-N on *Litopenaeus vannamei* and effects of NO₂-N on factors relating to the anti-disease ability. *Acta Hydrobiol. Sin.*, 2006, 30 (4) : 466 - 471.
- [6] Wu Z H, Liu C B, Liu C R, et al. Histopathological research on chronic poisoning of *Penaeus chinensis* by nitrite and ammonia. *J. Central China Normal Univ. Natur. Sci.*, 1999, 33 (1) : 119 - 122.
- [7] Hargreaves J A. Nitrogen Biogeochemistry of Aquaculture Ponds. *Aquaculture*, 1998, 166 : 181 - 212.
- [8] Wang Y N, Wang B J, Dai X, et al. Analysis of nitrate reducing community in a near-shore marine-cultural sediments. *Microbiology*, 2004, 31 (6) : 73 - 76.

- [9] Braker G, Zhou J, Wu L, *et al.* Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific Northwest marine sediment communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66: 2096–2104.
- [10] Chèneby D, Philippot L, Hartmann A, *et al.* 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2000, 34: 121–128.
- [11] Lim Y W, Lee S A, Kim S B, *et al.* Diversity of denitrifying bacteria isolated from Daejeon Sewage Treatment Plant. *J. Microbiol.*, 2005, 43(5): 383–390.
- [12] Spieck E, Hartwig C, McCormack I, *et al.* Selective enrichment and molecular characterization of a previously uncultured Nitrospira-like bacterium from activated sludge. *Environ. Microbiol.*, 2006, 8(3): 405–415.
- [13] Heylen K, Vanparys B, Wittebolle L, *et al.* Cultivation of denitrifying bacteria: optimization of isolation conditions and diversity study. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(4): 2637–2643.
- [14] Maier R M. Biochemical cycling. In: Maier R M ed. *Environmental Microbiology*. San Diego: Academic Press, 2000. 319–346.
- [15] Samuelsson M O. Dissimilatory nitrate reduction to nitrate, nitrous oxide, and ammonium by *Pseudomonas putrefaciens*. *Appl Environ Microbiol*, 1985, 50(4): 812–815.
- [16] Smith M S. Dissimilatory Reduction of NO_2^- to NH_4^+ and N_2O by a Soil *Citrobacter* sp. . *Appl Environ Microbiol.*, 1982, 43(4): 854–860.
- [17] Rosselló-Mora, R. Updating prokaryotic taxonomy. *J. Bacteriol.*, 2005, 187(18): 6255–6257.
- [18] Rosselló-Mora R, and Amann R. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2001, 25: 39–67.
- [19] Coenye T, Gevers D, Van de Peer Y, *et al.* Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2005, 29: 147–167.
- [20] Drancourt M, Bollet C, Carlioz 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.
- [21] 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.
- [22] Zumft W G. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1997, 61: 533–616.
- [23] Carter J P, Hsiao Y H, Spiro S, *et al.* Soil and sediment bacteria capable of aerobic nitrate respiration. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, 61(8): 2852–2858.
- [24] Eschbach M, Möbitz H, Rompf A, *et al.* Members of the genus *Arthrobacter* grow anaerobically using nitrate ammonification and fermentative processes: anaerobic adaptation of aerobic bacteria abundant in soil. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2003, 223(2): 227–230.
- [25] Yan Y, Yang J, Chen L, *et al.* Structural and functional analysis of denitrification genes in *Pseudomonas stutzeri* A1501. *Sci. China C Life Sci.*, 2005, 48(6): 585–592.
- [26] Philippot L. Denitrifying genes in bacterial and Archaeal genomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, 1577(3): 355–376.
- [27] Funke G, Falsen E, Barreau C, *et al.* Primary identification of *Microbacterium* spp. encountered in clinical specimens as CDC coryneform group A-4 and A-5 bacteria. *J. Clin. Microbiol.*, 1995, 33(1): 188–192.
- [28] Yoshie S, Noda N, Tsuneda S, *et al.* Salinity decreases nitrite reductase gene diversity in denitrifying bacteria of wastewater treatment systems. *Appl. Environ. Microbiol*, 2004, 70(5): 3152–3157.

参考文献:

- [1] 倪进玉, 顾斌, 邵成树. 南美白对虾亚硝酸盐中毒解救实例. *科学养鱼* 2004(4): 49
- [2] 徐培峰, 曾宪凯. 南美白对虾淡水养殖中亚硝酸盐危害分析与对策. *渔业现代化* 2006, 2: 38~39.
- [5] 黄翔鹤, 李长玲, 郑莲, 等. 亚硝酸盐氮对凡纳滨对虾毒性和抗病相关因子影响. *水生生物学报* 2006, 30(4): 466~471
- [6] 吴中华, 刘昌彬, 刘存仁, 等. 中国对虾慢性亚硝酸盐和氨中毒的组织病理学研究. *华中师范大学学报(自然科学版)* 2006, 2: 38~39.
- [8] 王亚南, 王宝军, 戴欣, 等. 海水养殖场沉积物中硝酸盐还原菌群分析. *微生物学通报* 2004, 31(6): 73~76.