

# 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

高利海, 林炜铁\*

华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510006

**摘要:**【目的】本研究旨在了解虾养殖底泥中氨氧化细菌与氨氧化古菌群落多态性。【方法】以功能基因为基础, 构建氨氧化细菌(AOB)与氨氧化古菌(AOA)的氨单加氧酶  $\alpha$  亚基基因(*amoA*)克隆文库。利用限制性片段长度多态性(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)技术将克隆文库阳性克隆子进行归类分析分成若干个可操作分类单元(Operational Taxa Units, OTUs)。【结果】通过序列多态性分析, 表明 AOB *amoA* 基因克隆文库中所有序列都属于变形杆菌门  $\beta$  亚纲( $\beta$ -Proteobacteria)中的亚硝化单细胞菌属(*Nitrosomonas*)及 *Nitrosomonas*-like, 未发现亚硝化螺旋菌属(*Nitrospira*)。AOA *amoA* 基因克隆文库中只有一个 OTU 序列属于未分类的古菌(Unclassified-Archaea), 其余序列都属于泉古菌门(*Crenarchaeote*)。AOA 群落结构单一且存在一个绝对优势类群 OTU3, 其克隆子数目占克隆文库的 57.45%。AOB 和 AOA *amoA* 基因克隆文库分别包括 13 个 OTUs 和 9 个 OTUs, 其文库覆盖率分别为 73.47% 和 90.43%。AOB *amoA* 基因克隆文库的 Shannon-Wiener 指数、Evenness 指数、Simpson 指数、Richness 指数均高于 AOA。【结论】虾养殖塘底泥中存在氨氧化古菌的 *amoA* 基因, 且多态性低于氨氧化细菌, 表明氨氧化古菌在虾养殖塘底泥的氮循环中可能具有重要的作用。

**关键词:** 氨氧化细菌(AOB), 氨氧化古菌(AOA), *amoA* 基因, PCR-RFLP 分析

**中图分类号:** Q938.1      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2011)01-0075-08

硝化作用在氮素的生物地球化学循环中起着重要的作用, 主要包括两个步骤, 第一步通过氨氧化细菌的氨氧化作用将氨氧化为亚硝酸盐, 第二步通过亚硝酸细菌的亚硝酸盐氧化作用将亚硝酸盐氧化为硝酸盐。其中氨氧化细菌介导的氨氧化是其限速步骤, 主要由属于变形杆菌门的  $\beta$ -亚纲和  $\gamma$ -亚纲 *Nitrosococcus halophilus* 和 *Nitrosococcus oceanus* 属的细菌来完成氨的氧化过程<sup>[1]</sup>。氨氧化细菌进行的氨氧化是由氨单加氧酶(ammonia monooxygenase, AMO)催化的, 编码 AMO 基因包括 *amoA*, *amoB* 和 *amoC*, 分别编码了 AMO 的 3 个亚基<sup>[2]</sup>。1997 年,

Rotthauwe 首次使用 *amoA*-PCR 的方法研究自养氨氧化细菌群落结构<sup>[3]</sup>。此后, *amoA* 基因被广泛运用于各种生态系统中自养氨氧化细菌的群落结构研究<sup>[3-4]</sup>。

随着对生物硝化作用的研究, 发现在海洋和陆地环境的一些嗜温和嗜热古菌中也含有 *amo* 基因的同系物, 并且能催化氨氧化反应<sup>[5-7]</sup>, 这一发现将参与氮素循环的微生物扩展到了古菌领域。研究进一步表明, 海洋中氨氧化古菌的数量占了整个微生物数量的 39%, 这些氨氧化古菌很有可能在海洋环境的硝化作用中起着重要的作用<sup>[8-9]</sup>。不过, 仅从

**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](mailto:weitie@21cn.com)

**作者简介:** 高利海(1985-), 男, 河北省人, 硕士研究生, 研究方向环境微生物学。E-mail: [aglh06@163.com](mailto:aglh06@163.com)

2010-07-12; 修回日期: 2010-08-15

基因序列信息还不能完全断定古菌是否可以进行氨氧化反应。近期,第一株 AOA-*Nitrosopumilus maritimus* 的成功培养<sup>[5]</sup>以及古菌 *amoA* 基因的 mRNA 对氨盐添加的响应<sup>[10]</sup>,强有力地证实 AOA 在自然界中的真实存在。到目前为止,富集培养 AOA 已有 4 种——*Nitrosopumilus maritimus*<sup>[5]</sup>, *Cenarchaeum symbiosum*<sup>[11]</sup>, *Nitrososphaera gargensis*<sup>[12]</sup> 和 *Nitrosocaldus yellowstonii*<sup>[6]</sup>,其中 *N. maritimus* [http://genome.jgipsf.org/draft\_microbes/nitma/nitma.info.html] 和 *Cenarchaeum symbiosum*<sup>[11]</sup> 的基因组测序工作已经完成。随着越来越多的证据显示自然界中氨氧化古菌的存在,这群独特的微生物迅速成为一个新的研究热点。

虾养殖塘环境是一个典型的生物硝化系统,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<sup>[13]</sup>。Ma 等基于 16S rRNA 基因研究了海水虾养殖塘底泥中氨氧化细菌的多样性,分析发现 *Nitrosomonas marina* cluster、*Nitrosomonas* sp. *Nitrosomonas* m143 及 *Nitrospira* 在海水虾养殖中氨的去除起重要作用<sup>[14]</sup>。Burreld 等利用培养基富集结合分子方法对淡水水族馆氨氧化细菌群落进行研究调查,表明氨氧化细菌主要由 *Nitrosomonas marina*, *Nitrosomonas europaea*-*Nitrosococcus mobilis* 组成<sup>[15]</sup>。随着氨氧化古菌的发现和环境中所占的数量,氨氧化古菌可能在虾养殖环境的氨氧化过程中起着重要甚至主要的作用。目前,对于这一假设的研究还未见报道。本实验针对上述假设,分别以氨氧化细菌和古菌氨单加氧酶  $\alpha$  亚基基因 *amoA* 为靶标,构建 *amoA* 基因克隆文库,研究虾养殖塘底泥中氨氧化细菌和氨氧化古菌的多样性,对了解氨氧化古菌在虾养殖塘底泥氮循环中的作用具有重要意义,对虾塘生态系统中氮素循环的有效管理提供参考依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品采集:**2009 年 12 月 5 日采集于广东省中山市东升镇南美白对虾养殖塘的底泥,采用正方形 5 点取样法,垂直取样 10 cm 深度的底泥,每个点取样量大体一致,均匀混合后装入灭菌的封口聚乙烯袋,存放于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱冻存。池塘温度  $20-25^{\circ}\text{C}$ 。底泥  $\text{pH}$  8.25,  $\text{NH}_4^+-\text{N}$  69.7 mg/kg,

$\text{NO}_2^- -\text{N}$  32.8  $\mu\text{g/kg}$ ,  $\text{NO}_3^- -\text{N}$  35.9 mg/kg, 有机质 25.3 g/kg。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 (TaKaRa)、pMD19-Tsimple Vector (TaKaRa)、*Msp* I 和 *Hae* III (TaKaRa)、PCR 仪 (BIO-RAD)、凝胶成像仪 (BIO-RAD)、电泳仪 (BIO-RAD)。

### 1.2 样品总 DNA 的提取

采用直接法提取虾塘底泥微生物总 DNA。首先将虾塘底泥进行预处理<sup>[16]</sup>,以溶菌酶、蛋白酶 K-SDS 结合 CTAB 法提取<sup>[17]</sup>,最后用 DNA 凝胶纯化试剂盒 (TaKaRa) 纯化 DNA。

### 1.3 *amoA* 基因扩增与克隆文库构建

**1.3.1 PCR 扩增 AOA *amoA* 基因的反应条件:**利用引物对 Arch-*amoA*F: 5'-STAATGGTCTGGCTTAGAC-G-3' 和 Arch-*amoA*R: 5'-GCGGCCATCCATCTGTATGT-3' 进行 AOA *amoA* 基因的扩增<sup>[6]</sup>。PCR 扩增条件:  $94^{\circ}\text{C}$  4 min;  $94^{\circ}\text{C}$  45 s,  $55^{\circ}\text{C}$  45 s,  $72^{\circ}\text{C}$  1 min, 30 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  10 min。

**1.3.2 PCR 扩增 AOB *amoA* 基因的反应条件:**利用引物对 *amoA*-1F: 5'-GGGGTTTCTACTGGT GGT-3' 和 *amoA*-2R: 5'-CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3' 进行 AOB *amoA* 基因的扩增<sup>[3]</sup>。PCR 扩增条件:  $94^{\circ}\text{C}$  4 min;  $94^{\circ}\text{C}$  45 s,  $60^{\circ}\text{C}$  45 s,  $72^{\circ}\text{C}$  1 min, 35 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  6 min。

**1.3.3 PCR 产物纯化:**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。

**1.3.4 克隆文库构建及阳性克隆的筛选:**纯化后 PCR 产物通过连接试剂盒连接到 pMD19-Tsimple Vector, 将连接好的载体转化入 DH5 $\alpha$  大肠杆菌感受态细胞。在涂有 X-gal 和 IPTG 的氨苄霉素的 LB 平板上进行蓝白斑筛选,随机挑取克隆子,采用特异引物 RV-M 和 M13-47 的 PCR 扩增进行插入片段的筛选。

### 1.4 克隆的测序和系统发育树构建

将鉴定为阳性克隆子的 *amoA* 基因 PCR 产物进行限制性片段长度多态性分析 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP), 分别用 2 种限制性内切酶 *Msp* I 和 *Hae* III 对 PCR 产物进行  $37^{\circ}\text{C}$  酶切 90 min, 综合双酶切图谱, 将阳性克隆分成若干个操作分类单元 (OTU), 统计 OTU 种类和各 OTU 所含

阳性克隆的数量,将每一个 OTU 类型送 1 个进行测序分析,测序工作由北京六合华大基因科技股份有限公司完成。

*amoA* 克隆子测序后,用 DNAMAN 软件将 *amoA* 基因核苷酸序列转化为氨基酸序列,在 NCBI 数据库 Blastx 进行比对分析,选取文库中 *amoA* 基因氨基酸序列和已知环境样品进行分析,共同构建系统发育树。运用 MEGA version4.1 软件中 Neighbor-Joining 方法构建系统发育树。

*amoA* 基因序列提交 GenBank,氨氧化古菌登录号为:HM018578- HM018586,氨氧化细菌登录号为:HM018587- HM018599。

## 2 结果和分析

### 2.1 环境总 DNA 提取和纯化

直接法提取的 DNA 更能代表样品的微生物群落,能够比较全面地了解、鉴定虾塘底泥中微生物的多样性。但是提取 DNA 同时也提取了其它有机成分,比如腐殖酸等。本实验在直接法的基础上对虾塘底泥进行预处理<sup>[16]</sup>,预处理的缓冲液中还有 PVP (聚乙烯吡咯烷酮)去除部分腐殖酸类物质;还有 EDTA 以络合金属离子,有效抑制核酸酶的活性。采用预处理的方法得到的 DNA 粗提液比较纯净。直接法提取的 DNA 大小主要集中在 23 kb,经核酸蛋白测定仪测定,含量达 46 μg/g 湿底泥,  $OD_{260}/OD_{280} = 1.67$ ,适合进行后续反应。

### 2.2 AOA 与 AOB *amoA* 基因的 PCR 扩增

采用 DNA 原液稀释的方法进行 DNA 样品 PCR 扩增,浓度稀释在 10—50 倍之间可达到较理想的扩增效果。本实验将 DNA 原液稀释 10 倍为模板,扩增底泥 AOA 和 AOB *amoA* 基因。结果分别得到 630 bp 和 490 bp 大小的条带。将得到目的片段的 PCR 产物用 DNA 纯化试剂盒纯化回收后连接到 pMD19-Tsimple Vector 上用于构建 AOA 和 AOB *amoA* 基因克隆文库。

### 2.3 AOA 与 AOB *amoA* 基因的 RFLP 分析

通过 *Hae* III 和 *Msp* I 两种限制性内切酶对阳性克隆子分别进行酶切归类分型, AOB *amoA* 基因得到 13 个 OTUs, AOA *amoA* 基因 得到 9 个 OTUs。AOA 与 AOB *amoA* 基因克隆文库的覆盖率分别为 90.43% 和 73.47% (表 1)。在 AOA *amoA* 基因文库中,有 1 个 OTU 是优势类群,其克隆子数目占据整

个克隆文库的 57.44%,有 2 个 OTUs 克隆数目为 10—20 之间,其余 6 个 OTUs 均在 1—3 之间(图 1-A)。在 AOB 的 *amoA* 基因克隆文库中,有 1 个 OTU 克隆数目为 10 个,有 3 个 OTUs 克隆数目在 7—8 之间(图 1-B)。在细菌与古菌的 *amoA* 文库中, AOB 的 *amoA* 基因克隆文库的 Shannon-Wiener 指数、Evenness 指数、Simpson 指数、Richness 指数均高于 AOA(表 1)。

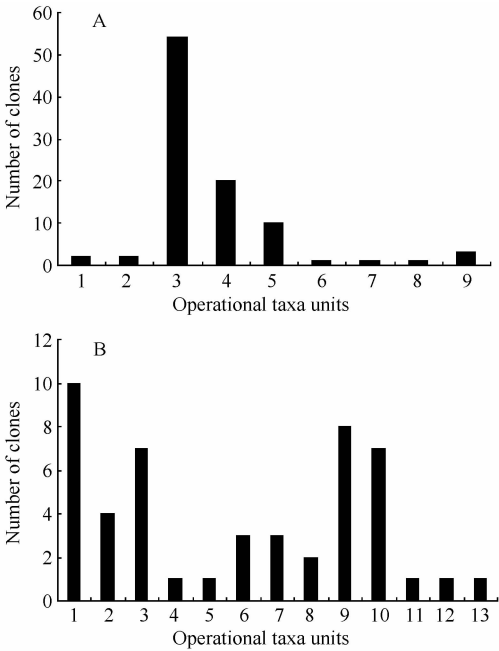


图 1 氨氧化古菌 (A) 和氨氧化细菌 (B) 克隆子的 OTU 分布

Fig. 1 *AmoA* OTUs distribution in archaeal (A) and bacterial (B) community.

表 1 *amoA* 克隆文库的多样性指数分析

Table 1 Diversity properties of AOB and AOA <i>amoA</i> clone library						
<i>amoA</i> gene	OTU number	Library coverage	Shannon-Wiener index	Evenness index	Simpson index	Richness index
AOB	13	73.47%	1.60	0.43	0.87	3.08
AOA	9	90.43%	1.30	0.41	0.61	1.76

### 2.4 AOA 与 AOB *amoA* 基因序列测定及系统发育树分析

**2.4.1 AOA *amoA* 基因克隆文库系统发育分析:**利用 RFLP 技术对 AOA *amoA* 基因克隆文库阳性克隆进行归类分型, AOA *amoA* 基因克隆文库包括 9 个 OTUs,每一个 OTU 类型送 1 个进行测序分析。选取文库所测序列与已知环境样品中的序列共同构建系统发育树(图 2)。AOA *amoA* 基因克隆文库包括

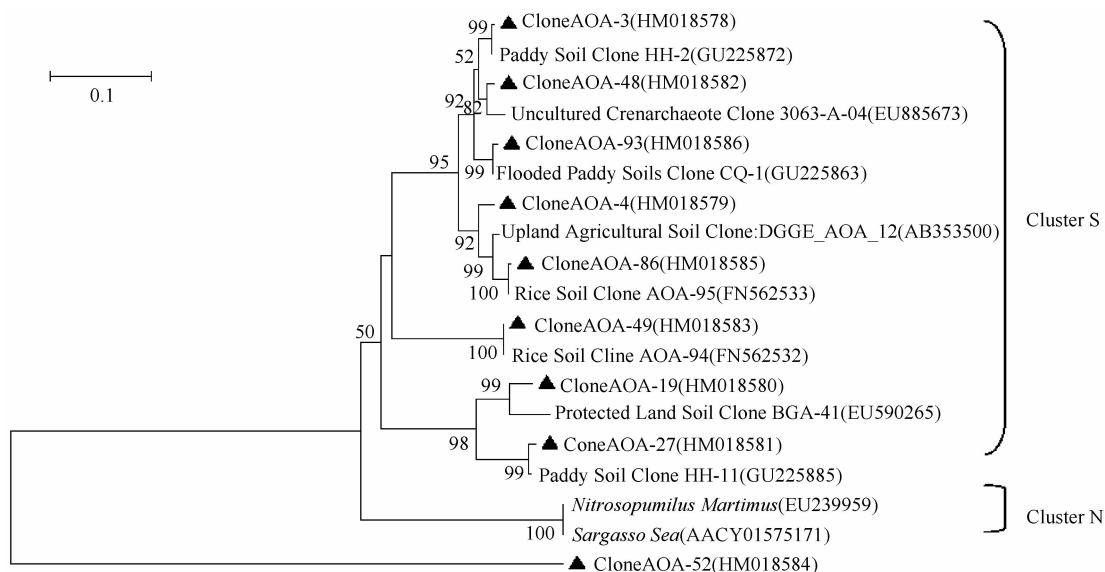


图2 基于氨氧化古菌 *amoA* 基因 182 个氨基酸序列片段构建的系统发育树 (Neighbor-joining tree)

Fig.2 Distance neighbor-joining tree generated from alignments of AOA *amoA* sequences based on 182 amino acid residues from shrimp farm sediment and representative references retrieved from GenBank. Accessions numbers are shown in parentheses.

Clones from this study are indicated in ▲. Significant bootstrap values above 50 (1000iterations) are displayed at branch nodes.

Scale bar represents the amino acid residues percentage.

*Crenarchaeota* 和 *Unclassified-Archaea*。

从系统发育树来看, AOA *amoA* 基因克隆文库中除有一个 OTU 序列属于 *Unclassified-Archaea* (未分类古菌), 与 NCBI 数据库中序列同源性较低外; 其余序列都属于不可培养 *Crenarchaeota* (泉古菌门)。Cluster S 的序列与来自稻田土壤、被保护绿化土壤的 AOA *amoA* 基因序列聚集在同一支上, 而与海水及海洋沉积物的 AOA *amoA* 基因序列相似性很低。

**2.4.2 AOB *amoA* 基因克隆文库系统发育分析:** 利用 RFLP 技术对 AOB *amoA* 基因克隆文库阳性克隆进行归类分型。AOB *amoA* 基因克隆文库包括 13 个 OTUs, 每一个 OTU 类型送 1 个进行测序分析。选取文库所测序列与已知环境样品中的序列共同构建系统发育树 (图 3)。AOB *amoA* 基因克隆文库包括  $\beta$ -Proteobacteria 中的 *Nitrosomonas* (61.54%) 和 *Nitrosomonas*-like (38.46%), 没有发现 *Nitrosospira* 及 *Nitrosospira*-like。

从系统发育树来看, *Nitrosomonas communis* cluster、*Nitrosomonas* sp. Nm148 cluster 的序列与来自淡水、沙丘底泥、河口底泥的 *amoA* 基因序列聚集在同一支上, 而与海水及海洋底泥的 *amoA* 基因序列距离较远。*Nitrosomonas*-like cluster 的序列与

来自长期施肥土壤的 *amoA* 基因序列聚集在一起。

### 3 讨论

在虾养殖期间, 经常在饲料中添加腐殖酸来提高饵料的利用率, 增强鱼类抗应激能力; 同时随着养殖的进行, 残饵、粪便及有机碎屑在底泥中也会积累形成大量的腐殖酸; 而腐殖酸的存在会影响后续的 PCR 扩增、限制性酶切等实验。以往环境微生物总 DNA 的提取总是先粗提 DNA, 再对其进行腐殖酸脱除<sup>[16-17]</sup>, 但对于腐殖酸含量较高的样品纯化过程会造成 63% 的 DNA 损失<sup>[16]</sup>, 使其后续 PCR 产物多样性分析的客观性可信度降低。本实验采用在微生物细胞裂解前将腐殖酸从反应体系中去除的新方法, 从根本上消除腐殖酸等杂质对 DNA 的污染, 提高 DNA 质量。因此, 在直接法的基础上用 TENP 缓冲液预处理虾塘底泥, 得到比较纯净的 DNA 粗提液, 后续 PCR 也扩增出较亮目的条带。

Purkhold 等基于 *amoA* 基因系统进化关系将氨氧化细菌中 *Nitrosomonas* 属分为 5 个簇<sup>[18]</sup>。本实验中只检测到 *Nitrosomonas communis* cluster (38.46%)、*Nitrosomonas* sp. Nm148 cluster (15.38%)、*Nitrosomonas oligotropha* cluster (7.69%) 及 *Nitrosomonas*-like (38.46%) (图 4), 未

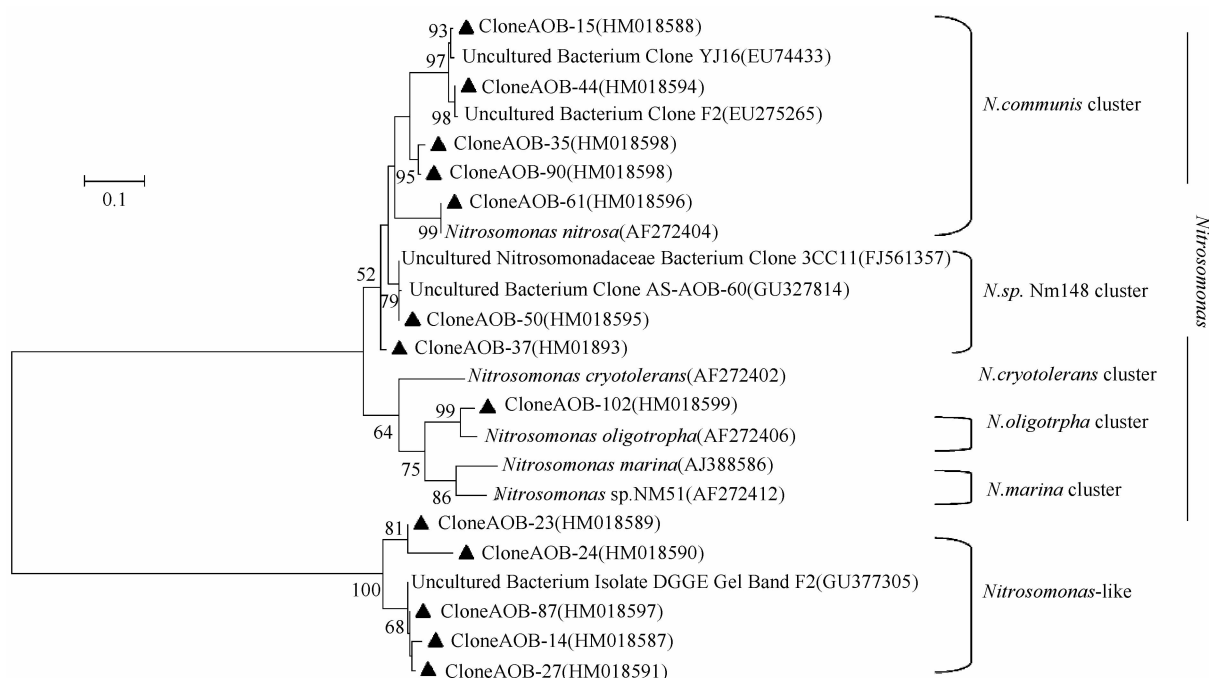


图3 基于 AOB *amoA* 基因 149 氨基酸序列片段构建的系统发育树 (Neighbor-joining tree)

Fig. 3 Distance neighbor-joining tree generated from alignments of AOB *amoA* sequences based on 149 amino acid residues from shrimp farm sediment and representative references retrieved from GenBank. Accessions numbers are shown in parentheses. Clones from this study are indicated in ▲. Significant bootstrap values above 50 (1000 iterations) are displayed at branch nodes. Scale bar represents the amino acid residues percentage.

发现其余的 *Nitrosomonas marina* cluster、*Nitrosomonas europaea* cluster 及 *Nitrospira* 属。*Nitrosomonas communis* cluster、*Nitrosomonas sp.* Nm148 cluster、*Nitrosomonas oligotropha* cluster 广泛存在于淡水及沙丘底泥、河口底泥<sup>[18-19]</sup>。Ma 等基于 16S rRNA 基因研究海水虾养殖塘底泥,检测到 *Nitrosomonas marina* cluster、*Nitrosomonas sp.* Nm143 cluster 及 *Nitrospira* cluster1<sup>[14]</sup>,而这 3 个簇也广泛存在于海水、海洋底泥<sup>[4]</sup>、河口污泥<sup>[19]</sup>、土壤<sup>[20]</sup>等环境。这些研究结果表明,同样水产养殖,海水养殖与淡水养殖,其虾塘底泥 AOB 群落结构有明显差异。McCaig 等研究海水鱼养殖底泥 AOB 群落结构发现 *Nitrospira* cluster1 是最丰富的,也只是检测到 *Nitrosomonas marina* cluster,而没有检测到 *Nitrosomonas communis* cluster、*Nitrosomonas oligotropha* cluster 等,并且还检测到 *Nitrospira* cluster 5<sup>[21]</sup>,海水养殖虾塘底泥与鱼塘底泥 AOB 菌群结构也不同。上述研究结果的差异可能主要原因是由于环境物理、化学因素改变影响了 AOB 菌群结构分布,尤其是盐度对 AOB 菌群结构多样性的影

响,Coci 等研究很好证实这一点。Coci 等考察盐度对 Scheld 河口沉积物中 AOB 种群的影响时发现,经淡水灌溉后原先的 *Nitrosomonas oligotropha* lineage 被同一 lineage 内的其它 AOB 代替;经含盐水灌溉后,表层约 1cm 内的 *Nitrosomonas oligotropha* 被 *Nitrosomonas marina* 代替,而经海水灌溉后所发生的 AOB 种群变化明显快于盐水<sup>[22]</sup>。Hovanec 等采用同一方法对海水和淡水中执行硝化作用的 AOB 进行检测,结果仅检测到海水中的 AOB,而无法检测到淡水中的 AOB<sup>[23]</sup>。因此,盐度是不同生境中 AOB 种群的重要选择因素之一,而盐度的变化差异还会对 AOB 种群的演替速率产生不同影响。氨氧化古菌(AOA)在氮素循环中的重要作用是近年才发现的。2004 年,Venter 等在马尾藻海的环境中首次发现了古菌 *amo* 基因的同源序列<sup>[24]</sup>。与此同时,挪威 Bergen 大学的 Schleper 研究小组在土壤环境基因组中也有类似发现<sup>[25]</sup>。2006 年,Leininger 等在 Nature 杂志上发表了对 12 个跨越 3 个气候带的原始土壤和农业土壤中的研究结果,发现在这些来源广泛的土壤样品中,泉古菌 *amoA* 基因的拷贝数高

达  $\beta$ -变形菌纲细菌的 3000 倍, *amoA* 基因的拷贝数与泉古菌特有的脂质(包括 crenarchaeol)含量呈正相关<sup>[26]</sup>。随后研究发现 AOA 普遍存在于土壤<sup>[16]</sup>、河口沉积物<sup>[14]</sup>、海水及沉积物<sup>[7]</sup>、陆地热泉口等自然环境中,且数量也超过 AOB。这些研究结果都提示着 AOA 在自然环境中氮的生物地球化学循环中具有重要作用。

本研究在虾养殖塘底泥中,同样证实 AOA 的存在,验证先前的假设。通过 RFLP 技术分型归类,代表性克隆子测序,序列比对构建系统发育树分析,表明所获得的 AOA *amoA* 基因序列都属于泉古菌门(*Crenarcharota*),只有 1 个 OTU 序列属于未分类的古菌(Unclassified-Archaea),与 NCBI 数据库中序列同源性较低。AOA 群落结构比较单一且存在绝对优势类群 OTU3,其克隆子数目占整个克隆文库的

57.45%,这与 AOB 的群落结构不同,并且群落多态性低于 AOB。2003 年 Avrahami 等依据 AOA 序列来源又细分为 cluster S(soil origin)和 cluster M(marine and sediment origin)<sup>[27]</sup>。AOA *amoA* 基因序列与已知环境中的稻田土壤、被保护绿化土壤中获得的一些序列具有很高同源性,都属于 cluster S,与海水及海洋沉积物中的 AOA *amoA* 基因序列相似性很低,未检测到 cluster M 序列。这提示着淡水虾养殖塘中 AOA 与土壤中 AOA 有着相似近缘关系。这些研究结果表明 AOA 在虾养殖塘的氮循环中有着重要的作用,拓展了虾塘生态系统氮素循环的理论认识,为其氮素循环的有效管理提供参考依据。当然只根据所得到的序列还不足以说明 AOB、AOA 与虾塘环境因子之间的响应关系,尤其是 AOA 在虾塘系统中的原位生态功能。

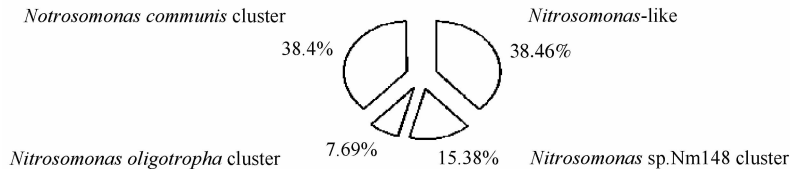


图 4 虾养殖底泥 AOB 种群结构组成

Fig. 4 Pie chart showing the community composition of AOB from shrimp farm sediment.

The percentage in parentheses indicated the abundance of clones of the respective AOB cluster in the pooled *amoA* gene library.

## 参考文献

- [1] Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA. Ber Gey's Manual of Determinative Bacteriology. 9<sup>th</sup> eds. Baltimore (USA): Williams & Wilkins Company, 1994: 447-450.
- [2] Arp DJ, Sayavedra-Soto LA, Hommes NG. Molecular biology and biochemistry of ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Archives of Microbiology*, 2002, 178(4): 250-255.
- [3] Rothhauwe JH, Witze KP, Liesack W. The *Ammonia Monooxygenase* 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.
- [4] Cébron A, Berthe T, Garnier J. Nitrification and nitrifying bacteria in the Lower Seine River and Estuary (France). *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(12): 7091-7100.
- [5] Könneke M, Bernhard AE, Torre JDL, Walker BC, Waterbury JB, Stahl DA. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 2005, 437(7058): 543-546.
- [6] Torre JDL, Walker CB, Ingalls AE, Könneke M, Stahl DA. Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(3): 810-818.
- [7] Wuchter C, Abbas B, Coolen MJL, Herfort L, Bleijswijk JV, Timmers P, Strous M, Teira E, Herndl GJ, Middelburg JJ, Schouten S, Damste JSS. Archaeal nitrification in the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(33): 12317-12322.
- [8] Agogue H, Brink M, Dinasquet J, Herndl GJ. Major gradients in putatively nitrifying and non-nitrifying Archaea in the deep North Atlantic. *Nature*, 2008, 456(7223): 788-791.
- [9] Karner MB, DeLong EF, Karl DM. Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature*, 2001,

- 409(6819): 507-510.
- [10] Nicol GW, Sehlaper C. Ammonia - oxidizing Crenarchaeota: Important players in the nitrogen cycle? *Trends in Microbiology*, 2006, 14(5): 207-212.
- [11] Hallam SJ, Konstantinidis KT, Putnam N, Sehlaper C, Watanabe YI, Sugahara J, Preston C, Torre JDL, Richardson PM, Delong EF. Genomic analysis of the uncultivated marine crenarchaeote *Cenarchaeum symbiosum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(48): 18296-18301.
- [12] Hatzenpichler R, Lebedeva EV, Spieck E, Stoecker K, Richter A, Daims H, Wagner M. A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeota from a hot spring. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(6): 2134-2139.
- [13] 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.
- [14] Ma Y, Wang L, Qian LM. Community structure of  $\beta$ -Proteobacterial ammonia-oxidizing bacteria in prawn farm sediment. *Progress in Natural Science*, 2008, 18(6): 679-684.
- [15] Burrell PC, Phalen CM, Hovanec TA. Identification of bacteria responsible for ammonia oxidation in freshwater aquaria. *Applied Environment Microbiology*, 2001; 67(12): 5791-800.
- [16] 傅莲英, 席峰, 袁建军, 王贵忠, 田蕴, 郑天凌. 海水养殖沉积环境微生物总 DNA 的提取方法研究. 厦门大学学报 (*Journal of Xiamen University*), 2006, 45(6): 841-846.
- [17] 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.
- [18] Purkhold U, Pommerening-Roser A, Juretschko S, Schmid MC, Koops HP, Wagner M. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Applied Environment Microbiology*, 2000, 66(12): 5368-82.
- [19] Freitag TE, Chang L, Prosser JI. Changes in the community structure and activity of betaproteobacterial ammonia-oxidizing sediment bacteria along a freshwater-marine gradient. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(4): 684-96.
- [20] Shen JP, Zhang LM, Zhu YG, Zhang JB, He JZ. Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(6): 1601-1611.
- [21] McCaig AE, Phillips CJ, Stephen JR, Kowalchuk GA, Harvey SM, Herbert RA, Embley TM, Prosser JI. Nitrogen cycling and community structure of proteobacterial beta-subgroup ammoniaoxidizing bacteria within polluted marine fish farm sediments. *Applied Environment Microbiology*, 1999, 65(1): 213-20.
- [22] Coci M, Riechmann D, Bodelier PLE, Stefani S, Zwart G, Laanbroek HJ. Effect of salinity on temporal and spatial dynamics of ammonia-oxidising bacteria from intertidal freshwater sediment. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 53(3): 359-368.
- [23] Hovanec TA, DeLong EF. Comparative analysis of nitrifying bacteria associated with freshwater and marine aquaria. *Applied Environment Microbiology*, 1996, 62(8): 2888-2896.
- [24] Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, Wu DY, Paulsen I, Nelson KE, Fouts DE, Levy S, Knap AH, Lomas MW, Nealson K, White O, Peterson J, Hoffman J, Parsons R, Baden-Tillson H, Pfannkoch C, Rogers YH, Smith HO. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 2004, 304(5667): 66-74.
- [25] Sehlaper C, Jurgens G, Jonuscheit M. Genomic studies of uncultivated archaea. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(6): 479-488.
- [26] Leininger S, Urich T, Schlöter M, Schwark L, Qi, Nicol GW, Prosser JI, Schuster SC, Sehlaper C. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 2006, 442(1038): 806-809.
- [27] Avrahami S, Conrad R. Patterns of community change among ammonia oxidizers in meadow soils upon long-term incubation at different temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(10): 6152-6164.

# Diversity of $\beta$ -Proteobacterial ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea in shrimp farm sediment

Lihai Gao, Weitie Lin \*

College of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China

**Abstract:** [ **Objective** ] In order to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and ammonia-oxidizing archaea (AOA) in shrimp farm sediment. [ **Methods** ] Total microbial DNA was directly extracted from the shrimp farm sediment. The clone library of *amoA* genes were constructed with  $\beta$ -Proteobacterial-AOB and AOA specific primers. The library was screened by PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis and clones with unique RFLP patterns were sequenced. [ **Results** ] Phylogenetic analyses of the *amoA* gene fragments showed that all AOB sequences from shrimp farm sediment were affiliated with *Nitrosomonas* (61.54%) or *Nitrosomonas-like* (38.46%) species and grouped into *Nitrosomonas communis* cluster, *Nitrosomonas* sp. Nm148 cluster, *Nitrosomonas oligotropha* cluster. All AOA sequences belonged to the kingdom *Crenarchaeote* except that one Operational Taxa Unit(OTU) sequence was Unclassified-Archaea and fell within cluster S (soil origin). AOB and AOA species composition included 13 OTUs and 9 OTUs. The clone coverage of bacterial and archaeal *amoA* genes was 73.47% and 90.43%. The Shannon-Wiener index, Evenness index, Simpson index and Richness index of AOB were higher than those of AOA. [ **Conclusion** ] These findings represent the first detailed examination of archaeal *amoA* diversity in shrimp farm sediment and demonstrate that diverse communities of *Crenarchaeote* capable of ammonia oxidation are present within shrimp farm sediment, where they may be actively involved in nitrification.

**Keywords:** Ammonia-oxidizing bacteria (AOB), Ammonia-oxidizing archaea (AOA), *AmoA* gene, PCR-RFLP analysis

( 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@21.cn.com

Received: 12 July 2010/ Revised: 15 August 2010