

封闭循环养殖系统中 β 变形菌亚纲氨氧化细菌的引物特异性

裴芳芳¹, 朱鹏¹, 闵航², 陆开宏¹, 叶央芳^{1*}

¹宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室, 宁波 315211

²浙江大学生命科学学院 杭州 310029

摘要:【目的】为探讨 4 对不同的引物对封闭循环养殖系统生物膜中 β 变形菌亚纲氨氧化细菌 (β -AOB) 的特异性差异。【方法】采用 16S rDNA 文库克隆技术对 β -AOB 的多样性进行了分析。【结果】以引物 CTO189f/CTO654r 扩增构建的文库中所含 β -AOB 比例最高, 可达 67.3%。不同封闭循环养殖系统的生物膜对引物的扩增效率有明显的影响, 其中以养殖尼罗罗非鱼的封闭循环养殖系统生物膜为 DNA 来源的, 引物均有较高的扩增效率。【结论】针对封闭循环养殖系统生物膜中的 β -AOB, 特异性最高的是 CTO189f/CTO654r 引物。

关键词: β 亚纲氨氧化细菌, 16S rDNA, 克隆文库, 引物特异性

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011) 10-1342-09

随着分子生态学技术的发展, 非培养手段如变性梯度凝胶电泳 (DGGE)^[1]、末端限制性片段长度多态性 (T-RFLP)^[2]、单链构象多态性 (SSCP)^[3] 和 16S rDNA 基因文库构建^[4] 等方法被广泛应用于环境微生物群落结构的检测和分析。这些方法主要依赖于目的基因的 PCR 扩增^[5], 而 PCR 扩增的有效性受到多种因素的影响, 其中引物的特异性是最重要的影响因素之一, 它直接决定特定基因的 PCR 扩增效率, 进而干扰微生物多样性的评估^[6]。

氨氧化细菌 (ammonia-oxidizing bacteria, AOB) 是一类化能自养型的微生物, 其进行的氨氧化作用是硝化过程中必不可少的第一个步骤, 同时也是其限速反应^[7-9]。在封闭循环养殖系统中, AOB 和亚硝酸盐氧化细菌 (NOB) 将水中的氨氮及亚硝态氮氧化为无毒的硝酸盐, 从而实现水体的净化。因此循环养殖系统中 AOB 的研究受到广泛关注。基于 16S rRNA 的系统发育分析表明 AOB 的系统发育比

较简单, 均属于变形菌纲的 β -亚纲和 γ -亚纲^[10-11]。其中属于 β -亚纲的 AOB (β -AOB) 又可分为 2 个类群: 亚硝化单胞菌群 (*Nitrosomonas*) 和亚硝化螺菌群 (*Nitrosospira*)。而 *Nitrosospira* 包括亚硝化叶菌属 (*Nitrosolobus*) 和亚硝化弧菌属 (*Nitrosovibrio*)^[12-13]。另有少数具有氨氧化能力的细菌是亚硝化球菌属 (*Nitrosococcus*), 属于变形菌纲的 γ -亚纲, 但至今只在海洋中发现了该属的 2 个种: *N. oceanus* 和 *N. halophilus*^[14-15]。目前已报道的基于 16S rDNA 序列研究 β -AOB 的引物和探针共有 32 个, 但相当部分是针对 AOB 特定菌属的, 只有少数是 β -AOB 的通用引物或探针, 且其特异性存在较大差异^[16], 主要表现在不同引物扩增获得的 β -AOB 群落结构各不相同。特异性较好的 β -AOB 的引物或探针包括 β AMOf、 β AMOr、NitA、NitB、CTO189f、CTO654r、Am β 和 Nso1225^[17], 但这些评估仅仅建立在依靠 GenBank 中已有序列的比对分析上, 而在实际样品

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (2007AA10Z409); 浙江省自然科学基金 (Y3090046); 宁波大学学科项目 (xkl09120)

* 通信作者。Tel: +86-574-87600549; Fax: +86-574-87600458; E-mail: yeyangfang@nbu.edu.cn

作者简介: 裴芳芳 (1985-), 女, 山东泰安人, 硕士研究生, 研究方向为微生物生态学。E-mail: peifangfang1234@163.com

收稿日期: 2011-04-05; 修回日期: 2011-06-03

检测中的评价少有报道。仅有 Junier 等^[6]用 4 对特异性引物对 4 个环境样品中的 β -AOB 进行 PCR 扩增和构建克隆文库, 结果发现, 不同引物所构建的克隆文库中 β -AOB 所占比例各异, 同样的引物在不同环境中扩增的 β -AOB 多样性也有较大差异。

因此, 为了获得高效扩增封闭循环养殖系统生物膜中 β -AOB 的特异性引物, 本文采用 16S rDNA 克隆文库方法, 分析比较了常见引物对 β AMOf/ β AMOr^[18]、NitA/NitB^[19]、Nso1225r/Eub338f^[20-21]和 CTO189f/CTO654r^[22]所构建的 β -AOB 16S rDNA 克隆文库, 以期为进一步分析封闭循环养殖系统生物膜的 β -AOB 多样性提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: DNA 提取试剂盒 (Ver. 3.0 广谱基因组 DNA 抽提试剂盒)、连接试剂盒 (pMD18-T Vector 试剂盒)、Taq DNA 聚合酶、dNTP、DNA Marker 等购于 TaKaRa 大连宝生物工程有限公司; 胶回收试剂盒 (GenClean 离心柱型琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒) 购自上海捷瑞生物工程公司; PCR 扩增引物合成及样品测序由上海英潍捷基贸易有限公司完成, 引物序列见表 1。琼脂糖购自基因科技 (上海) 有限公司; X-Gal 购自 INALCO SPA 公司; Amp 购自杭州昊天生物技术有限公司。Master cycler PCR 仪, 购自德国 Eppendorf 公司; YLN-200SR 凝胶成像分析系统, 购自北京市亚力恩机电技术研究所; DELTA 320 pH 计, 购自 Mettler-Toledo 公司。

1.1.2 样品来源: 本实验采集了 2 个分别养殖尼罗罗非鱼 (*Tilapia nilotica*) 和宝石鲈 (*Scortum barcoo*) 的封闭循环养殖系统中的生物膜样品, 依次标记为 T 样品和 S 样品。为保证样品中微生物的原始形态, 用无菌采样袋在现场取样后立即冷藏并带回实验室, 于 -20°C 保存备用。

1.2 封闭循环养殖系统中的生物膜特征指标的测定

生物膜的 pH 测定采用 DELTA 320 pH 计; 生物膜污泥指数 (SVI) 测定按照文献提供的标准方法进行^[23]; 亚硝化细菌的数量测定采用最大或然数 (MPN) 法^[24], 用每克生物膜干重含多少菌落形成单

位 (cfu) 表示。生物膜硝化能力测定方法如下: 取 100 g 生物膜样品, 用蒸馏水稀释至 1 L, 向其中添加 0.5 g 硫酸铵, 搅拌混匀并调节 pH 至 7.4, 记为 0 时刻。然后对水样进行磁力搅拌 6.5 h, 测定 0 时刻和 6.5 h 水样中的 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 和 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 含量。同时以蒸馏水作为空白对照。 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 和 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 的测定分别采用纳氏试剂光度法和 N-(1-萘基)-乙二胺光度法^[23]。

1.3 样品总基因组 DNA 的提取

称取生物膜样品 0.1 g, 用 DNA 提取试剂盒提取细菌的总基因组 DNA (方法参考试剂盒使用说明), 并用分光光度计检测其 A260/A280 值, 该值达到 1.8 以上的 DNA 保存于 -20°C , 用于后续的 PCR 扩增。

1.4 β -AOB 16S rDNA 特异片段的 PCR 扩增

扩增样品中 β -AOB 16S rDNA 特异片段采用巢式 PCR。在第一轮 PCR 扩增中, DNA 模板采用样品的总 DNA, 引物采用真细菌部分 16S rRNA 基因的通用引物 27f 和 1492r^[25]。反应体系为 25 μL 。具体组成如下: 2.5 μL 的 10 \times PCR 缓冲液 (含 Mg^{2+})、2 μL dNTP 混合物 (25 mmol/L), 0.2 μL Taq DNA 聚合酶 (U/L), 100 ng DNA 模板, 和各 1 μL 的正反向引物 (0.01 mmol/L), 最后加无菌双蒸水至 25 μL 。扩增反应在 Master cycler PCR 仪中进行, 具体运行条件如下: 95°C 预变性 5 min, 95°C 变性 1 min, 55°C 退火 1 min, 72°C 延伸 90 s, 35 个循环, 最后 72°C 终延伸 10 min。PCR 产物的检测采用含 EB 的 1.0% 琼脂糖凝胶电泳。在第二轮 PCR 扩增中, 以第一轮 PCR 产物为模板, 分别以 β AMOf/ β AMOr、NitA/NitB、Nso1225r/Eub338f 和 CTO189f/CTO654r 为引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系组成和具体运行条件同上, 退火温度有所差别 (表 1)。PCR 产物的检测方法同上。

1.5 PCR 产物的克隆及重组质粒的筛选

PCR 产物用胶回收试剂盒纯化回收, 具体操作按照说明书进行。纯化回收的 DNA 片段与 pMD18-T 载体连接, 16°C 反应过夜后, 转化到感受态的大肠杆菌 DH5 α 细胞中。在含 Amp/IPTG/X-gal 的新鲜固体 LB 平板上进行蓝白斑筛选, 随机挑取白色菌斑 (重组质粒) 于 1 mL 含 Amp 的 LB 液体培养基中, 37°C 振荡培养过夜, 每个克隆文库共挑选约 50 个阳性克隆子。克隆子的 DNA 测序委托上海英潍捷基贸易有限公司完成。

表1 本研究所用的引物序列
Table 1 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Positions	Annealing temperature / °C	References
27f	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	8-27	55	[25]
1492r	GGTACCTTGTACGACTT	1510-1492		[25]
βAMOf	TGGGGRATAACGCAYCGAAAGI	142-162	57	[18]
βAMOr	AGACTCCGATCCGGACTACG	1295-1314		[18]
NitA	CTTAAGTGGGGAATAACGCATCG	137-159	58	[19]
NitB	TTACGTGTGAAGCCCTACCCA	1214-1234		[19]
Nso1225r	CGCCATTGTATTACGTGTGA	1225-1244	60	[20]
Eub338f	ACTCCTACGGGAGGCAGC	338-355		[21]
CTO189f	GGAGRAAAGYAGGGATCG	189-207	57	[22]
CTO654r	CTAGCYTTGTAGTTCAAACGC	632-653		[22]

¹R: A or G, Y: C or T.

1.6 序列同源性分析

测序得到的 DNA 序列同源性分析在 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 利用 Blast 软件检索, GenBank 将按照与测得序列的相似性高低列出已知序列名单、相似性程度以及这些序列相对应的微生物种类, 从而建立各克隆子序列的同源性信息。

2 结果

2.1 封闭循环养殖系统的生物膜特性

来自 2 个封闭循环养殖系统的生物膜特性如表 2 所示。T 样品的 pH 呈中性, 而 S 样品的 pH 呈弱碱性; 2 个生物膜污泥指数 (SVI) 约在 60-70 mL/g 之间; 生物膜内所含氨氧化细菌数量较多, 在每克干生物膜中可达 10^7-10^8 数量级; 2 个生物膜样品对外源 NH_4^+-N 的去除率均较高, 在 6.5 h 的处理过程中, NH_4^+-N 的去除率达到 90% 左右。

表 2 封闭循环养殖系统的生物膜特性

Table 2 Characteristics of biofilm in recirculation aquaculture systems

Biofilm	pH	SVI/ (mL/g)	AOB/(cfu/g dry biofilm)	Removal rate of $\text{NH}_4^+-\text{N}/\%$
T sample	7.1 ± 0.4	70.23 ± 2.75	5.4×10^7	89.35 ± 1.89
S sample	7.8 ± 0.3	62.19 ± 3.92	2.2×10^8	96.77 ± 2.61

2.2 T 样品中 β-AOB 克隆文库分析

4 对引物分别对 T 样品中 β-AOB 16S rDNA 进行 PCR 扩增、克隆文库构建和序列同源性分析, 结果如表 3、图 1 所示。在由不同引物扩增构建成的 4 个克隆文库中均只检测到 1 种属于 β-AOB 的克隆子序列, 即 *Nitrosospira* sp., 但该序列克隆子在各文

库中所占的比例各不相同。其中, 在由 CTO189f/CTO654r 构建的克隆文库中, 所检测到的比例最高, 为 67.3%。其次是由 Nso1225r/Eub338f 扩增构建的文库, 含有 46.9% 的 β-AOB 细菌。而由 βAMOf/βAMOr 和 NitA/NitB 构建的克隆文库中, 检测到的 β-AOB 细菌克隆子分别仅占总克隆子的 6.7% 和 8.2%, 大量的克隆子来自非 β-AOB 细菌, 如 *Hydrogenophaga* sp. (42.2%) 和 *Vogesella perlucida* (28.6%)。表 3 结果还表明, 特异性相对较高的 CTO189f/CTO654r 引物所构建的克隆文库中非 β-AOB 细菌的克隆子的种类也相对较少, 仅为 4 个属。因此, 针对 T 样品, 建议选用 CTO189f/CTO654r 引物来分析 β-AOB 的多样性。

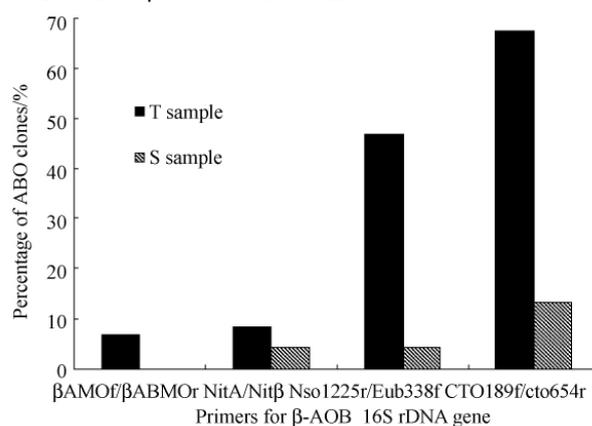


图 1 用不同引物对构建 PCR 克隆文库所获得的 AOB 细菌

Fig. 1 Recovery of AOB in clone libraries of PCR products prepared with different primer pairs.

2.3 S 样品中 β-AOB 克隆文库分析

同样, 本实验也利用 4 对引物分别对 S 样品中 β-AOB 的群落结构进行了分析 (表 4、图 1)。结果

表 3 四对引物构建的 T 样品中的 β -AOB 克隆文库
Table 3 β -AOB clone libraries constructed with 4 primers pairs in T sample

Primers	BLAST hit	Accession No.	Similarity /%	No. of clones		
β AMOf/ β AMOr	β -Proteobacteria	<i>Hydrogenophaga</i> sp.	AB476725	92 - 99	19	
		<i>Nitrospira</i> sp.	GQ255603	90 - 99	3	
		Environmental clones	FJ946566	95	1	
	γ -Proteobacteria	<i>Acinetobacter</i> sp.	GU233818	92 - 99	12	
		<i>Raoultella</i> sp.	DQ839331	98	1	
		<i>Enterobacter</i> sp.	GU201549	99	1	
		<i>Pseudomonas</i> sp.	GU563752	92	1	
		<i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>sobria</i>	GU990233	100	1	
		<i>Steroidobacter</i> sp.	EU665094	92	1	
		Acidobacteria	<i>Acidobacterium</i> sp.	FJ901680	92 - 93	3
	Clostridia	Acidobacteriales bacterium	EU449670	93	1	
		<i>Clostridium</i> sp.	FJ957505	97	1	
	NitA/NitB	β -Proteobacteria	<i>Vogesella perlucida</i>	EF626691	93 - 94	14
			Nitrosomonadaceae bacterium	EF019260	90 - 95	8
			<i>Nitrospira</i> sp.	GQ255608	91 - 97	4
<i>Ideonella</i> sp.			DQ664241	93 - 97	4	
<i>Ralstonia</i> sp.			HQ222281	97	3	
<i>Thiobacter subterraneus</i>			NR_024834	91 - 92	2	
<i>Leptothrix</i> sp.			AB458235	96 - 97	2	
<i>Burkholderia</i> sp.			HQ222273	98	2	
<i>Janthinobacterium</i> sp.			GU201564	91 - 92	2	
<i>Rubrivivax gelatinosus</i>			AF487435	97	1	
<i>Aquicola tertiarycarbonis</i>			DQ656489	95	1	
<i>Thiobacillus denitrificans</i>			EU546130	92	1	
<i>Thiobacter</i> sp.			HM145961	91	1	
<i>Methylibium aquaticum</i>		DQ664244	98	1		
γ -Proteobacteria		<i>Aquicella siphonis</i>	NR_025764	95 - 96	2	
		<i>Aeromonas veronii</i>	HQ407242	99	1	
Nso1225r/Eub338f		β -Proteobacteria	<i>Nitrospira</i> sp.	GQ255602	91 - 96	23
			Nitrosomonadaceae bacterium	EF019754	93 - 96	5
			<i>Herbaspirillum</i> sp.	GU201559	97	3
			<i>Polynucleobacter</i> sp.	HM856413	95	3
	<i>Collimonas</i> sp.		AB531412	96	2	
	<i>Azospira restricta</i>		DQ974114	97	2	
	<i>Dechloromonas</i> sp.		AY032611	99	1	
	<i>Polynucleobacter necessarius</i> subsp.		AB599919	99	1	
	<i>Flavobacterium</i> sp.		AM934661	93	1	
	<i>Methylotenera mobilis</i>		DQ287786	95	1	
	Environmental clones	DQ676290	97	1		
	γ -Proteobacteria	<i>Acinetobacter</i> sp.	DQ322071	94	1	
		Uncultured bacterium	EU778828	89	4	
	Environmental clones	Environmental clones	HM845909	94	1	
		Environmental clones	HM845909	94	1	
CT0189f/CT0654r	β -Proteobacteria	<i>Nitrospira</i> sp.	GU097360	92 - 97	33	
		<i>Aquaspirillum</i> sp.	FM204981	96 - 97	2	
		<i>Azospira</i> sp.	GQ183420	96 - 99	2	
	Opiritae	<i>Opiritus</i> sp.	AM940800	93 - 95	10	
	γ -Proteobacteria	<i>Thermomonas</i> sp.	GU257718	92 - 93	2	

表 4 四对引物构建的 S 样品中的 β -AOB 克隆文库
Table 4 β -AOB clone libraries constructed with 4 primers pairs in S sample

Primers		BLAST hit	Accession No.	Similarity /%	No. of clones		
β AMOf/ β AMOr	β -Proteobacteria	<i>Undibacterium</i> sp.	HQ003430	97 – 99	5		
		<i>Polynucleobacter necessarius</i> subsp.	FN556008	94 – 99	4		
		<i>Curvibacter</i> sp.	HM357758	98	3		
		<i>Azospira</i> sp.	EU214546	97 – 98	2		
		<i>Uliginosibacterium</i> sp.	HM124379	93 – 97	2		
		<i>Duganella</i> sp.	GU138381	99	2		
		<i>Dechloromonas</i> sp.	AF170355	98	1		
		<i>Propionivibrio</i> sp.	GQ420923	98	1		
		<i>Aquaspirillum</i> sp.	GU257813	98	1		
		<i>Rhodocyclus</i> sp.	GU560169	96	1		
β AMOf/ β AMOr	γ -Proteobacteria	<i>Acidovorax</i> sp.	HQ259135	98	1		
		<i>Marinobacter</i> sp.	FJ984869	90 – 91	9		
		<i>Acinetobacter</i> sp.	HQ246231	99	5		
		<i>Pseudomonas</i> sp.	GQ183242	96 – 97	4		
		<i>Rhizobacter</i> sp.	GQ369084	99	1		
		<i>Cellvibrio</i> sp.	FJ889286	98	1		
		<i>Acinetobacter junii</i>	DQ859984	99	1		
		<i>Thermomonas</i> sp.	GU257718	95	1		
		δ -Proteobacteria	Environmental clones	FJ569938	93	1	
		NitA/NitB	β -Proteobacteria	<i>Vogesella perlucida</i> strain	EF626691	92 – 93	14
<i>Polynucleobacter necessarius</i> subsp.	AB468976			99	13		
<i>Aquabacterium</i> sp.	EU706220			93 – 97	5		
Nitrosomonadaceae bacterium	EF019260			91 – 93	2		
<i>Nitrospira</i> sp.	GQ255602			93	2		
<i>Azospira restricta</i>	DQ974114			93 – 98	2		
<i>Methyloversatilis universalis</i>	DQ923115			92	2		
<i>Curvibacter</i> sp.	HQ008595			93	1		
<i>Polynucleobacter</i> sp.	AB599847			93	1		
<i>Vogesella indigofera</i>	HM236169			92	1		
NitA/NitB	β -Proteobacteria	<i>Dechloromonas</i> sp.	AF170354	98	1		
		Opiritae	<i>Opiritus</i> sp.	FJ477567	87	2	
		γ -Proteobacteria	Environmental clones	AJ318123	94	1	
		Fusobacteria	<i>Cetobacterium somerae</i>	NR_025533	93	1	
		Nso1225r/Eub338f	β -Proteobacteria	Alcaligenaceae bacterium	AM936094	92 – 98	21
				<i>Thiobacter subterraneus</i>	NR_024834	91 – 93	11
				<i>Methylophilus leisingeri</i>	AB193725	94 – 99	4
				Burkholderiaceae bacterium	AM936570	93 – 94	3
				Oxalobacteraceae bacterium	EF018081	97	2
				<i>Nitrospira</i> sp.	GQ255602	90 – 94	2
Nitrosomonadaceae bacterium	AM936044			93	1		
<i>Azospira</i> sp.	GQ421081			92	1		
Rhodocyclusaceae bacterium	EF019994			92	1		
<i>Sideroxydans lithotrophicus</i>	DQ386859			93	1		
Nso1225r/Eub338f	β -Proteobacteria	<i>Thiobacillus</i> sp.	GQ329483	93	1		
		CTO189f/CTO654r	γ -Proteobacteria	<i>Saccharospirillum</i> sp.	FM175353	91 – 94	25
				<i>Achromobacter</i> sp.	GQ418019	84 – 99	13
		CTO189f/CTO654r	β -Proteobacteria	<i>Nitrospira</i> sp.	AM773611	92 – 95	6
				<i>Comamonas</i> sp.	GQ246691	98	1

表明,在由不同引物构建的 4 个克隆文库中也均只检测到 1 种属于 β -AOB 的克隆子序列,即 *Nitrosospira* sp., 但该序列克隆子在各文库中所占的比例均较低,甚至在 β AMOf/ β AMOr 构建的克隆文库中没有发现 β -AOB 克隆子。在其他 3 个引物构建的克隆文库中 β -AOB 所占比例最高的是 CTO189f/CTO654r 文库,占 13.3%;另 2 对引物都只能扩增到 4.2% 的 β -AOB 细菌。从表 4 可见,以引物 β AMOf/ β AMOr、NitA/NitB、Nso1225r/Eub338f 和 CTO189f/CTO654r 扩增构建的 4 个克隆文库中,丰度最高的克隆子序列都是非 β -AOB 序列,分别属于 *Marinobacter* sp. (19.6%)、*Vogesella perlucida* (29.2%)、*Alcaligenaceae bacterium* (43.8%) 和 *Saccharospirillum* sp. (55.6%)。而且这 4 个克隆文库所含的非 β -AOB 序列属于多个细菌种属,但在特异性相对较高的 CTO189f/CTO654r 克隆文库中,非特异性扩增到的细菌多样性最少,仅为 3 个属。因此,针对 S 样品,同样可选用 CTO189f/CTO654r 引物来分析 β -AOB 的多样性。

3 讨论

为了评估引物 β AMOf/ β AMOr、NitA/NitB、Nso1225r/Eub338f 和 CTO189f/CTO654r 针对封闭循环养殖系统生物膜中 β -AOB 的特异性,本文采用 16S rDNA 文库克隆方法,分析比较了这 4 对引物所构建的 β -AOB 16S rDNA 克隆文库的特征。结果表明,不同引物对封闭循环养殖系统生物膜样品构建的克隆文库中, β -AOB 所占比例各不相同。其中由 CTO189f/CTO654r 构建的克隆文库所检测到的 β -AOB 比例最高,其次是 Nso1225r/Eub338f 和 NitA/NitB,对 β -AOB 扩增效率最低的是 β AMOf/ β AMOr 引物。尽管 CTO189f/CTO654r 引物能特异性地扩增到所有已知的 β -AOB^[26],但本研究中 CTO189f/CTO654r 引物扩增到的 β -AOB 均属于 *Nitrosospira*,这可能是由于该引物更偏向于扩增 *Nitrosospira* 所致^[16]。此外,CTO189f/CTO654r 引物难以扩增到属于 *Nitrosomonas oligotropha* 和 *Nitrosomonas communis* 的 β -AOB^[27],所以即使封闭循环养殖系统生物膜样品中存在 *N. oligotropha* 和 *N. communis* 细菌,也难以被检测到。但即使存在偏向性,

CTO189f/CTO654r 引物相比于其他 3 对引物仍然扩增到了最高的 β -AOB 比例,而且对 T 样品的扩增效率显著高于 S 样品,其原因可能是 S 样品本身所含的 β -AOB 丰度较低所致。因为环境中 AOB 的存在量较少的时候,CTO189f/CTO654r 引物会扩增出非 β -AOB 序列^[28],而且这些非 β -AOB 序列大多数属于 γ -变形菌亚纲^[29]。确实,本研究的 S 样品中,CTO189f/CTO654r 引物扩增出的绝大部分非 β -AOB 克隆子来自 γ -变形菌亚纲。

Mahmood 等^[26]在对土壤和海洋沉积物的研究时,发现 CTO189f/CTO654r 引物扩增 β -AOB 的效率要高于 β AMOf/ β AMOr 引物,而且还表明 β AMOf/ β AMOr 引物扩增到的 β -AOB 群落表现出较高的多样性,但扩增到的大多数细菌是非 β -AOB,这与本研究对封闭循环养殖系统生物膜样品的研究结果相一致,甚至在 S 样品中 β AMOf/ β AMOr 引物未能检测到 β -AOB。 β AMOf/ β AMOr 引物对 β -AOB 的低扩增效率以及对不同样品表现出具有差异的特性,也在 Junier 等^[6]的研究中得到了证实,而且 β AMOf/ β AMOr 引物也未能扩增到 Plußsee 样品中的 β -AOB。

本研究中,引物 Nso1225r/Eub338f 和 NitA/NitB 对 β -AOB 的扩增效率介于引物 CTO189f/CTO654r 和 β AMOf/ β AMOr 之间,但远远低于已有文献报道的扩增效率。根据对 Nso1225 探针的序列分析表明该探针针对 β -AOB 具有高度特异性^[16-17],而且 Nso1225 探针也被广泛应用于特异性扩增各种环境中的 β -AOB^[30-31]。然而这种特异性已被遭到质疑,因为在对 4 个水体样品中的 β -AOB 进行 PCR 扩增和克隆文库构建时发现,由 Nso1225 构建的文库中 β -AOB 比例最低^[6]。同样, NitA/NitB 引物也被认为具有对 β -AOB 的高度特异性^[19,32]。如 Ma 等^[32]采用 NitA/NitB 引物扩增虾养殖池沉积物中的 β -AOB 时,90% 以上的克隆子均来自亚硝化单胞菌 (*Nitrosomonas*),其余为亚硝化螺菌属 (*Nitrosospira*)。而且由 NitA/NitB 引物扩增构建的来自 4 个水体样品中的 β -AOB 文库均具有较高的 β -AOB 比例^[6]。但针对本研究中的封闭循环养殖系统的生物膜,该引物并没有表现出较高的特异性,显然, NitA/NitB 引物的高特异性并非针对所有环境样品。

尽管在 4 对引物中,CTO189f/CTO654r 对封闭循环养殖系统的生物膜中 β -AOB 的特异性最高,但其克隆文库中均扩增出较多的非 β -AOB 序列,表明对 β -AOB 的敏感性和特异性仍不够理想,寻找更适

合封闭循环养殖系统的生物膜中 β -AOB 的特异性引物, 还需要做更多的引物设计及其对封闭循环养殖系统的生物膜样品的特异性试验工作。此外, 值得一提的是, 尽管引物的非特异性扩增是造成封闭循环养殖系统生物膜克隆文库中 β -AOB 丰度低的一个重要因子, 但是不能排除实际样品中确实只存在低丰度 β -AOB 的情况。如果在这种情况下, 应考虑其他氨氮去除的途径, 如厌氧氨氧化途径^[33]。厌氧氨氧化是由浮霉状菌目(Planctomycetales)细菌以亚硝酸盐作为电子受体将氨氮氧化成氮气的过程, 几乎存在于任何含氮低氧的生态系统中。因此, 在氨氮去除良好的封闭循环养殖系统中低丰度的 β -AOB 可能预示着厌氧氨氧化作用的存在, 而非 β -AOB 引物非特异性扩增所致。

4 结论

(1) 4 对引物 β AMOf/ β AMOr、NitA/NitB、Nso1225r/Eub338f 和 CTO189f/CTO654r 对同一封闭循环养殖系统生物膜中 β -AOB 的特异性有较大差异, 其中 CTO189f/CTO654r 引物对 β -AOB 的特异性最高, 最适合用于分析封闭循环养殖系统生物膜中 β -AOB 的多样性研究。

(2) 同一引物对来自不同封闭循环养殖系统生物膜中 β -AOB 的特异性也存在差异, 所以分析特定环境中的 β -AOB 多样性需要选择相适合的特异性引物, 宜在选择引物前应进行多对引物评估, 以寻找特异性最高的引物。但鉴于每对引物具有对 β -AOB 的不同扩增效率, 采用多对引物同时扩增目的基因, 很可能得到更加全面的 β -AOB 多样性结果。

参考文献

- [1] Dias ACF, Andreote FD, Rigonato J, Fiore MF, Melo IS, Araújo WL. The bacterial diversity in a Brazilian non-disturbed mangrove sediment. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2010, 98(4): 541-551.
- [2] Bae H, Park JH, Jun KS, Jung JY. The community analysis of ammonia-oxidizing bacteria in wastewater treatment plants revealed by the combination of double labeled T-RFLP and sequencing. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 2011, 46(4): 345-354.
- [3] Liu T, Li D, Zhang J. Phylogenetic and microbial community analysis based on *amoA* gene and 16S rDNA in nitrification biofilm reactor. *Advanced Materials Research*, 2011, 183-485: 1051-1056.
- [4] Kriwy P, Uthicke S. Microbial diversity in marine biofilms along a water quality gradient on the Great Barrier Reef. *Systematic and Applied Microbiology*, 2011, 34(2): 116-126.
- [5] Nocker A, Burr M, Camper AK. Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. *Microbial Ecology*, 2007, 54(2): 276-289.
- [6] Junier P, Kim OS, Hadas O, Imhoff JF, Witzel KP. Evaluation of PCR primer selectivity and phylogenetic specificity by using amplification of 16S rRNA genes from beta-proteobacterial ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(16): 5231-5236.
- [7] Oved T, Shaviv A, Goldrath T, Mandelbaum RT, Minz D. Influence of effluent irrigation on community composition and function of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(8): 3426-3433.
- [8] Könneke M, Bernhard AE, de la Torre JR, Walker CB, Waterbury JB, Stahl DA. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 2005, 437(7058): 543-546.
- [9] Nicol GW, Schleper C. Ammonia-oxidizing Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle? *Trends in Microbiology*, 2006, 14(5): 207-212.
- [10] Head IM, Hiorns WD, Embley TM, McCarthy AJ, Saunders JR. The phylogeny autotrophic ammonia-oxidising bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. *Journal of General Microbiology*, 1993, 139(6): 1147-1153.
- [11] Stephen JR, McCaig AE, Smith Z, Prosser JI, Embley TM. Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to β -subgroup ammonia-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(11): 4147-4154.
- [12] Purkhold U, Wagner M, Timmermann G, Pommerening AR, Koops HP. 16S rRNA and *amoA*-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing isolates: extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonads. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53(5): 1485-1494.

- [13] Teske A, Alm E, Regan JM, Toze S, Rittmann BE, Stahl DA. Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(21): 6623-6630.
- [14] 董莲华, 杨金水, 袁红莉. 氨氧化细菌的分子生态学研究进展. 应用生态学报 (*Chinese Journal of Applied Ecology*), 2008, 19(6): 1381-1388.
- [15] Koops HP, Bottcher B, Moller UC, Röser AP, Stehr G. Description of a new species of *Nitrosococcus*. *Archives of Microbiology*, 1990, 154(3): 244-248.
- [16] Purkhold U, Pommerening-Röser 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 and Environmental Microbiology*, 2000, 66(12): 5368-5382.
- [17] Utåker JB, Nes IF. A qualitative evaluation of the published oligonucleotides specific for the 16S rRNA gene sequences of the ammonia-oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 1998, 21(1): 72-88.
- [18] McCaig AE, Embley TM, Prosser JI. Molecular analysis of enrichment cultures of marine ammonia oxidisers. *FEMS Microbiology Letters*, 1994, 120(3): 363-367.
- [19] Voytek MA, Ward BB. Detection of ammonium-oxidizing bacteria of the beta-subclass of the class Proteobacteria in aquatic samples with the PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(4): 1444-1450.
- [20] Mobarry BK, Wagner M, Urbain V, Rittmann BE, Stahl DA. Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(6): 2156-2162.
- [21] Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA. Combination of 16S ribosomal RNA targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56(6): 1919-1925.
- [22] Kowalchuk GA, Stephen JR, Boer WD, Prosser JI, Embley TM, Woldendorp JW. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(4): 1489-1497.
- [23] APHA, AWWA, WEF. Standard Methods for Water and Wastewater Examination. 20th ed, Washington DC, New York: American Public Health Association, 1998.
- [24] 李卓棣, 喻子牛, 何绍江. 农业微生物学实验技术. 北京: 中国农业出版社, 1996.
- [25] Hiraishi A. Direct automated sequencing of 16S rDNA amplified by polymerase chain reaction from bacterial cultures without DNA purification. *Letters in Applied Microbiology*, 1992, 15(5): 210-213.
- [26] Mahmood S, Freitag TE, Prosser JI. Comparison of PCR primer-based strategies for characterization of ammonia oxidizer communities in environmental samples. *FEMS Microbiology Ecology*, 2006, 56(3): 482-493.
- [27] Koops HP, Pommerening-Röser A. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 37(1): 1-9.
- [28] Cébron A, Coci M, Garnier J, Laanbroek HJ. Denaturing gradient gel electrophoretic analysis of ammonia-oxidizing bacterial community structure in the lower Seine River: impact of Paris wastewater effluents. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(11): 6726-6737.
- [29] Bäckman JSK, Hermansson A, Tebbe CC, Lindgren PE. Liming induces growth of a diverse flora of ammonia-oxidising bacteria in acid spruce forest soil as determined by SSCP and DGGE. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, 35(10): 1337-1347.
- [30] Wittebolle L, Vervaeren H, Verstraete W, Boon N. Quantifying community dynamics of nitrifiers in functionally stable reactors. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(1): 286-293.
- [31] Vlaeminck SE, Terada A, Smets BF, van der Linden D, Boon N, Verstraete W, Carballa M. Nitrogen removal from digested black water by one-stage partial nitrification and anammox. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(13): 5035-5041.
- [32] Ma Y, Wang L, Qian LM. Community structure of β -Proteobacterial ammonia-oxidizing bacteria in prawn farm sediment. *Progress in Natural Science*, 2008, 18(6): 679-684.
- [33] Francis CA, Beman JM, Kuypers MM. New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *The ISME Journal*, 2007, 1(1): 9-27.

Comparing the primer specificity for betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacteria in recirculation aquaculture systems

Fangfang Pei¹, Peng Zhu¹, Hang Min², Kaihong Lu¹, Yangfang Ye^{1*}

¹ Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology (Ningbo University), Ministry of Education, Ningbo 315211, China

² College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

Abstract: [Objective] To analyze the difference of specificity of four primers for betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacteria (β -AOB) 16S rDNA gene from the biofilm of closed recirculation aquaculture systems. [Methods] We used 16S rDNA clone libraries to describe the β -AOB diversity. [Results] CTO189f/CTO654r produced the highest frequency of β -AOB-like sequences (67.3%). The amplification performance of primer was noticeably influenced by the biofilm samples. Hereinto, the biofilm of closed recirculation aquaculture systems of *Tilapia nilotica* resulted in the higher amplification performance of primers. [Conclusion] CTO189f/CTO654r exhibited the highest specific for β -AOB 16S rDNA gene from the biofilm of closed recirculation aquaculture systems.

Keywords: betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacteria, 16S rDNA, clone library, specificity of primers

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2007AA10Z409), by the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (Y3090046) and by the Academic Discipline Project of Ningbo University (xkl09120).

* Corresponding author. Tel: +86-574-87600549; Fax: +86-574-87600458; E-mail: yeyangfang@nbu.edu.cn.

Received: 5 April 2011/Revised: 3 June 2011

Looking for a director of research & development laboratory

Rong Xi Science & Technology Company is a high-tech company devoted to introducing advanced biotech products to the market, with a registered capital of 50 million Chinese Yuans. The company owns well-equipped molecular biology labs with a total floor space of 525 square meters in Shingjingshan District, Beijing.

The candidate must have:

1. Ph.D. in molecular biology, microbiology or biochemistry;
2. 5-10 years work experience;
3. 1-3 years oversea work experience;
4. Passion for success;
5. Dedication to the field pursued.

The candidate is responsible for:

1. Writing proposal;
2. Persuading board to invest in the project;
3. Hiring research associate or technician;
4. Carrying out and supervising the research;
5. Submitting monthly progress report to the president;
6. Communication to outsiders if needed.

If you meet above requirements, please send your CV and at least three names of references to RXKJ0808@163.com

The benefits:

1. Salary is negotiable;
2. Free two-bed room apartment within 10 minutes walk to the lab;
3. Bonus according to contribution;
4. All other conditions are negotiable.