

## 基于高通量测序的 4 种硝化细菌富集培养物 微生物群落结构分析

梁沪莲<sup>1</sup> 郭小雅<sup>2</sup> 刘洋<sup>1</sup> 刘传丽<sup>1</sup> 宋志文<sup>1\*</sup> 徐爱玲<sup>1</sup>

(1. 青岛理工大学环境与市政工程学院 山东 青岛 266033)

(2. 山东省胶东调水局 山东 济南 250100)

**摘要:**【目的】比较分析 4 种硝化细菌富集培养物(以铵盐为氮源的淡水富集物 A、以亚硝酸盐为氮源的淡水富集物 B、以铵盐为氮源的低温淡水富集物 C 和以亚硝酸盐为氮源的海水富集物 D)的微生物群落结构与组成。【方法】分别提取样品的总 DNA, 采用高通量测序技术, 分析微生物群落的组成、丰度和多样性。【结果】在不同微生物的分类水平, 4 个样品共检测到 24 门 47 纲 129 属。4 个样品的优势菌门均为变形菌门; 样品 A、B、C 的优势菌纲为  $\beta$ -变形菌纲和  $\gamma$ -变形菌纲, 样品 D 的优势菌纲为  $\gamma$ -变形菌纲、 $\delta$ -变形菌纲和芽孢杆菌纲; 而优势菌属各不相同, 其中样品 A 为亚硝化单胞菌属(24.56%), 样品 B 为链霉菌属(7.15%), 样品 C 为噬菌弧菌属(19.36%)和类诺卡氏菌属(19.35%), 样品 D 为嗜酸菌属(13.6%)和柄杆菌属(11.5%)。共检测出 7 种具有硝化功能的细菌, 其中样品 A、B 和 D 中主要是亚硝化单胞菌属, 占比分别为 24.56%、4.94%和 0.63%, 样品 C 主要为 *Nitrospirillum* (0.69%)和硝化螺旋菌属(0.69%)。此外在样品中还检测到红灯食烷菌、羽扇豆根瘤菌等有益菌, 以及弧菌属、伯克霍尔德菌等致病菌。【结论】阐述了 4 个样品微生物群落结构的多样性, 确定了不同培养物中起主要作用的硝化细菌类群以及其它与环境物质循环相关或具有特殊生理特性的菌群, 研究结果为硝化细菌富集培养物的实际应用奠定了基础。

**关键词:** 硝化细菌, 富集培养物, 微生物群落结构, 高通量测序

### Microbial community of four nitrobacteria enrichments by high-throughput sequencing

LIANG Hu-Lian<sup>1</sup> GUO Xiao-Ya<sup>2</sup> LIU Yang<sup>1</sup> LIU Chuan-Li<sup>1</sup>  
SONG Zhi-Wen<sup>1\*</sup> XU Ai-Ling<sup>1</sup>

(1. School of Environmental & Municipal Engineering, Qingdao University of Technology, Qingdao, Shandong 266033, China)

(2. Jiaodong Water Transfer Bureau of Shandong Province, Jinan, Shandong 250100, China)

**Abstract:** [Objective] To analyze and compare the microbial community composition and structure of

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31570541)

\*Corresponding author: Tel: 86-532-85071236; E-mail: songzhiwen@qtech.edu.cn

Received: December 28, 2016; Accepted: May 04, 2017; Published online (www.cnki.net): May 09, 2017

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31570541)

\*通讯作者: Tel: 86-532-85071236; E-mail: songzhiwen@qtech.edu.cn

收稿日期: 2016-12-28; 接受日期: 2017-05-04; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-05-09

four nitrobacteria enrichments *i.e* A: enrichment using ammonium as nitrogen source in freshwater, B: enrichment using nitrite as nitrogen source in freshwater, C: enrichment using ammonium as nitrogen source in freshwater at low temperature and D: enrichment using nitrite as nitrogen source in seawater. **[Methods]** The DNA of microbes in four samples were extracted, then high-throughput sequencing technology was used to analyze bacterial communities, abundance and diversity. **[Results]** The results showed that the microbial community was dominated by phylum Proteobacteria.  $\beta$ -Proteobacteria and  $\gamma$ -Proteobacteria were the dominant bacteria of sample A, B and C, while  $\gamma$ -Proteobacteria,  $\delta$ -Proteobacteria and Bacilli were the dominant bacteria of sample D. The dominant genera were different in four nitrobacteria enrichments, the dominant species of sample A was *Nitrosomonas* (24.56%), the dominant species of sample B was *Streptomyces lushanensis* (7.15%), the dominant species of sample C were *Bacteriovorax stolpii* (19.36%) and *Nocardioides daecheongensis* (19.35%), while the dominant species of sample D were *Acidovorax anthurii* (13.6%) and *Caulobacter segnis* (11.5%). 7 groups of nitrobacteria were detected in 4 samples, the majority genus of sample A, B and D was *Nitrosomonas*, accounting for 24.56%, 4.94% and 0.63% relative abundance, respectively; *Nitrospirillum* (0.69%) and *Nitrospira* (0.69%) were the dominant bacteria of sample C. Apart from that, there were beneficial bacteria and pathogens detected in samples, such as *Alcanivorax*, *Bradyrhizobium*, *Vibrio* and *Burkholderia* etc. **[Conclusion]** Bacterial diversity, the group of nitrifying bacteria which played a main role in nitrification and other microbial groups related to environmental cycling or special physiological characteristics laid a foundation for its practical application.

**Keywords:** Nitrobacteria, Enrichments, Microbial community structure, High-throughput sequencing

硝化细菌是一类广泛存在于自然界且在氮循环过程中起到重要作用的微生物,包括氨氧化菌和亚硝酸盐氧化菌两个生理菌群<sup>[1-2]</sup>,二者能通过硝化作用把氨转化为亚硝酸盐,再进一步转化为硝酸盐。硝化细菌具有好氧、附着生长、代时长、生长繁殖速度慢、对环境因素敏感等特点<sup>[3-4]</sup>,导致其在污水处理系统和水产养殖系统中含量较低,从而直接影响系统的硝化效果和脱氮效率。由于硝化细菌浓度与硝化速率成正比<sup>[5]</sup>,因此建立高效硝化细菌富集培养方法,在污水处理、水产养殖和水体富营养化治理等领域具有重要的意义。

传统的硝化细菌生态学研究主要是通过富集、纯化培养,借助显微镜观察,根据细胞形态构造和生理生化特点来进行,使得对硝化细菌生态学的研究基本停留在总体计数水平,很难为其可靠的种群结构研究和系统发育分析提供证据,并且往往不能正确反映自然环境样品的真实情况<sup>[6-7]</sup>。随着现代分子生物学技术的发展,一些学者采用高通量测序方法<sup>[8-9]</sup>,通过控制温度、pH、盐度和载体等条件富集培养硝化细菌,并对微生物群落结构进行分析,可最大限度地保留原有微生物群落结构组成和分布特征。

不同应用领域对硝化细菌富集培养物的要求不同,如在污水处理领域主要考虑去除氨氮,水产养殖领域则要重点解决去除亚硝酸盐的问题。另外,由于硝化细菌对环境条件敏感,在淡水、常温条件下富集得到的培养物通常不适于低温、海水等环境。本研究利用前期建立的一种硝化细菌富集培养方法<sup>[10-11]</sup>,分别制备以铵盐为氮源的淡水富集物 A、以亚硝酸盐为氮源的淡水富集物 B、以铵盐为氮源的低温淡水富集物 C 和以亚硝酸盐为氮源的海水富集物 D,这些富集培养物在常温、低温、高盐等环境条件下表现出较高的氨氧化或亚硝酸盐氧化活性,同时采用高通量测序方法比较分析 4 种富集培养物的微生物群落结构组成。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 主要试剂和仪器

土壤 DNA 提取试剂盒,美国 Omega Bio-Tek 公司。台式离心机,德国 Sigma 公司;超微量分光光度计,德国 Implen 公司。

### 1.2 硝化细菌富集培养方法

硝化细菌的富集培养方法参考钱生财等<sup>[10-11]</sup>,污泥来源及培养条件见表 1。

表 1 污泥来源及富集培养条件

Table 1 The source and enrichment culture conditions of sludge

样品 Sample	污泥来源 Sludge source	能源物质 Energy substance	温度 Temperature (°C)	盐度 Salinity (%)	周期 Period (d)
富集培养物 A Enrichment culture A	夏季污水处理厂 曝气池污泥	NH <sub>4</sub> Cl 初始浓度 200 mg/L	28	0.3	20
富集培养物 B Enrichment culture B	夏季污水处理厂 曝气池污泥	NaNO <sub>2</sub> 初始浓度 200 mg/L	28	0.3	20
富集培养物 C Enrichment culture C	冬季污水处理厂 曝气池污泥	NH <sub>4</sub> Cl 初始浓度 200 mg/L	15	0.3	40
富集培养物 D Enrichment culture D	海岸泥沙	NaNO <sub>2</sub> 初始浓度 200 mg/L	28	3.0	40

### 1.3 DNA 提取

分别取 4 种硝化细菌富集培养物 15 mL, 用 10% 盐酸预处理后置于 100 mL 离心管 13 000×g 离心 20 min, 弃去上清液收集沉淀于 2 mL 离心管中, 采用上述土壤 DNA 提取试剂盒提取 DNA, 提取得到的 DNA 在 -20 °C 冻存储存。DNA 浓度和纯度通过超微量分光光度计测定。

### 1.4 高通量测序

委托上海派森诺生物科技股份有限公司, 利用 Illumina MiSeq 平台对 16S rRNA 基因 V4 区进行高通量测序, 采用滑动窗口法对双端的 FASTQ 序列做质量过滤, 利用软件 FLASH (version 1.2.7, <http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>)<sup>[12]</sup>对通过质量过滤的序列进行连接, 对连接上的序列进行过滤和去除嵌合体, 得到优质序列。基于 OTU 聚类和分析的结果, 绘制稀释曲线, 进行多样性指数分析, 并在各分类水平上进行群落结构的统计分析和物种丰度差异分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 样品取样验证及多样性分析

在原核生物分子生态学研究中, 基于 16S rRNA 基因的菌群多样性分析会引起一定程度的高估, 通常用来进行焦磷酸测序区域中的 V4-V5 区域显示了最低的高估程度(约为 3.0%), 而 V6 区域的高估程度最高(约 13%)<sup>[13-14]</sup>。本研究 4 个样品细菌 16S rRNA 基因的 V4 区域更适合作为焦磷酸

测序的目的片段, 也是细菌多样性研究中常用的区域。通过测序总计测得原始序列 155 250 条, 经去杂分析得到优质序列 147 851 条。在 97% 相似度下将其聚类为用于物种分类的 OTU, 共产生 2 634 个 OTU, 各样品测序信息结果见表 2。采用 Alpha 多样性指标中的香农指数(Shannon index)和 Chao1 指数估算样品群落的异质性和物种总数<sup>[15]</sup>。由表 2 可以看出, 不同培养物 Simpson、Shannon 差别较小, 但培养物 C 的 OTU 数、Chao1、ACE 指数明显高于其它 3 个样品, 具有较高的微生物多样性和总体丰度, 说明低温条件有助于保护微生物多样性, 与邹雨璇等<sup>[16]</sup>的研究结果一致。

### 2.2 样品中细菌群落分布特征分析

4 个样品中的细菌总共分布在 24 个门, 具体情况见图 1。变形菌门(Proteobacteria)占绝对优势, 占比分别为 73.64%、55.06%、60.89%和 74.71%, 与顾锦钊<sup>[17]</sup>对海洋低温硝化细菌富集培养物的研究结果一致; 样品 B 和 C 中的拟杆菌门(Bacteroidetes)和异常球菌-栖热菌门(Deinococcus-Thermus), 样品 A 中的放线菌门(Actinobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes), 以及样品 D 中的厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidetes)也占一定优势; 其它占比较大的门还包括绿弯菌门(Chloroflexi)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、浮霉菌门(Planctomycetes)等。在 24 个门中, 14 个门为 4 个样品所共有, Ignavibacteriae、厚壁菌门

表 2 4 种硝化细菌富集培养物测序数据统计及 Alpha 多样性指数  
Table 2 The sequencing data and the Alpha diversity index of 4 nitrobacteria enrichments

样品 Sample	原始序列数 Original sequence number	优质序列数 High quality sequence number	OTUs	Chao1	ACE	Simpson	Shannon
A	37 038	33 372	965	344.0	371.76	0.93	5.36
B	47 127	45 555	929	321.0	411.53	0.96	5.44
C	30 318	29 630	1 194	466.0	513.34	0.94	5.83
D	40 767	39 294	773	309.0	352.81	0.95	5.43

(Firmicutes)和 *Caldithrix* 为样品 B 所特有, 热脱硫杆菌门(*Thermodesulfobacteria*)和黏胶球形菌门(*Lentisphaerae*)为样品 C 所特有, 样品 A、D 没有特有门。

4 个样品中细菌总共分布在 47 个纲, 具体情况见图 2。由图 2 可以看出, 样品 A、B 的优势菌纲均为  $\beta$ -变形菌纲(*Betaproteobacteria*)、 $\gamma$ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)和  $\alpha$ -变形菌纲(*Alphaproteobacteria*); 样品 C 的优势菌纲为  $\beta$ -变形菌纲(*Betaproteobacteria*)、 $\gamma$ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)和**黄杆菌纲**(*Flavobacteriia*); 样品 D 的优势菌纲为  $\gamma$ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)、 $\delta$ -变形菌纲(*Deltaproteobacteria*)和**芽孢杆菌纲**(*Bacilli*)。样品 D

与其它样品差别较大的原因可能与其取自海洋环境样品有关。4 个样品中其它占比较大的有放线菌纲(*Actinobacteria*)、热微菌纲(*Thermomicrobia*)、梭菌纲(*Clostridia*)、异常球菌纲(*Deinococci*)等。在 47 个纲中, 有 24 个纲为 4 个样品所共有, 全噬菌纲(*Holophagae*)为样品 A 所特有, 球杆菌亚纲(*Sphaerobacteridae*)、*Dehalococcoidetes* 和 *Caldithrixae* 为样品 B 所特有, 热脱硫杆菌纲(*Thermodesulfobacteria*)、集球藻亚纲(*Synechococcophycideae*)、颤藻亚纲(*Oscillatoriophyycideae*)、纤线杆菌纲(*Ktedonobacteria*)、厚壁菌纲(*Firmicutes*)、产芽孢菌纲(*Erysipelotrichi*)、红螬菌纲(*Coriobacteriia*)、绿弯菌纲(*Chloroflexi*)为样品 C 所特有, 样品 D 没有特有纲类。

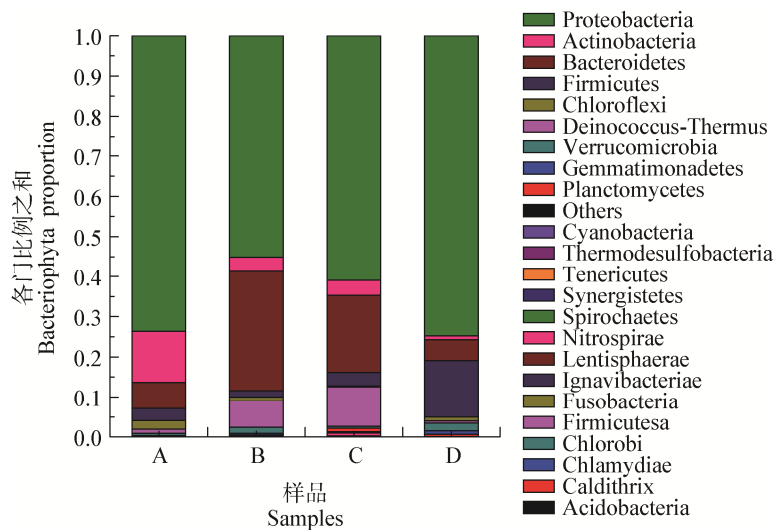


图 1 4 种硝化细菌富集培养物的细菌门水平组成  
Figure 1 The composition of 4 kinds of nitrobacteria enrichments at phyla level

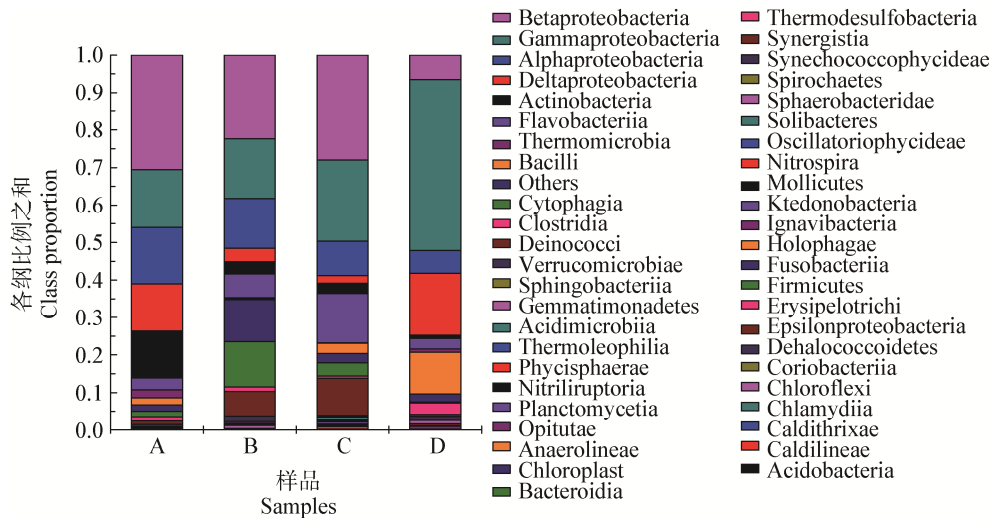


图 2 4 种硝化细菌富集培养物的细菌纲水平组成

Figure 2 The composition of 4 kinds of nitrobacteria enrichments at classes level

4 个样品中细菌总共分布在 129 个属,不同样品优势菌属均不同,其中样品 A 为亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*, 24.56%)、*Halobacteriovorax litoralis* (7.97%)和大洋单胞菌属(*Oceanimonas doudoroffii*, 4.47%) 样品 B 为链霉菌属(*Streptomyces lushanensis*, 7.15%)、新疆盐地杆菌属(*Salinibacterium xinjiangense*, 6.67%)和 *Tistrella bauzanensis* (6.34%); 样品 C 为噬菌弧菌属(*Bacteriovorax stolpii*, 19.36%)、类诺卡氏菌属(*Nocardioides daecheongensis*, 19.35%)和 *Polycyclovorans algicola* TG408 (8.26%); 样品 D 为嗜酸菌属(*Acidovorax anthurii*, 13.6%)、柄杆菌属(*Caulobacter segnis*, 11.5%)和蛭弧菌属(*Bdellovibrio bacteriovorus* str. Tiberius, 6.03%)。

### 2.3 样品中功能菌群分析

4 个样品中共检测出 7 种具有硝化功能的类群,样品 A、B、C、D 分别含 5、3、4、4 种,具体情况见表 3。其中亚硝化单胞菌属菌株 *N. eutropha* C91 为 4 个样品所共有; *Nitrospirillum amazonense* 为 3 个样品所共有; *N. europaea* ATCC 19718 为 2 个样品所共有; 硝化螺旋菌属菌株 *N. japonica* 为样品 C 所特有。此外,样品 A、C 和 D 中还检测到蜡芽孢杆菌(*Bacillus cereus* ATCC 14579), 占比分别为 0.21%、0.18%和 0.44%; 样

品 C 中检测到红育菌属(*Rhodofera antarcticus* ANT. BR), 占比为 1.39%, 有研究显示它们均可以通过同化作用利用氨<sup>[18-21]</sup>。

4 个样品中还检测出其它与环境物质循环相关或具有特殊生理特性的菌群,如样品 D 中的红灯食烷菌(*Alcanivorax hongdengensis* A-11-3)和噬

表 3 4 个样品中具有硝化功能的类群

Table 3 The bacteria with nitrification function in 4 kinds of samples

硝化细菌 Nitrifying bacteria	属名 Genus	百分比 Percentage (%)			
		A	B	C	D
<i>Nitrosococcus watsonii</i>	亚硝化球菌属	-	-	0.55	0.38
<i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC 19718	亚硝化单胞菌属	0.65	-	-	0.16
<i>Nitrosomonas eutropha</i> C91		2.48	4.64	0.26	0.47
<i>Nitrosomonas halophila</i>		1.24	0.18	-	-
<i>Nitrosomonas</i> sp. AL212		20.19	0.12	-	-
<i>Nitrospirillum amazonense</i>	<i>Nitrospirillum</i>	0.18	-	0.69	0.42
<i>Nitrospira japonica</i>	硝化螺旋菌属	-	-	0.69	-
总计 Total		24.74	4.94	2.19	1.43

注: - : 样品中细菌占比为 0.

Note: -: The proportion of bacteria in the samples was zero.

甲基菌属(*Methylophaga nitratreducenticrescens*)等为石油等降解菌或潜在降解菌,羽扇豆根瘤菌(*Bradyrhizobium lupini*)具有固氮作用,特吕珀菌属(*Truepera radiovictrix* DSM 17093)具有较强耐辐射能力等<sup>[22]</sup>。

样品中也检测出部分致病菌或条件致病菌,比如:弧菌属(*Vibrio*)某些菌株可能导致霍乱样疾病或轻度腹泻;伯克霍尔德菌属(*Burkholderia*)某些菌株可能导致惠特莫尔氏病;费克蓝姆菌属(*Facklamia*)菌株可引起抵抗力低下宿主的机会感染。

### 3 结论与讨论

硝化细菌包括氨氧化菌和亚硝酸盐氧化菌两个生理菌群,尽管二者生理特性相似,但系统发育具有高度的多样性,其中氨氧化菌分为两个不同的系统发育组:一组为氨氧化菌主要成员,属于 $\beta$ -变形菌亚纲( $\beta$ -Proteobacteria),包括亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)、亚硝化叶菌属(*Nitrosolobus*)、亚硝化螺菌属(*Nitrosospira*)和亚硝化弧菌属(*Nitrosovibrio*);另外一组为亚硝化球菌属(*Nitrosococcus*),属 $\gamma$ -变形菌亚纲着色菌目(Chromatiales)着色菌科(Chromatiaceae)。亚硝酸盐氧化菌则由进化上截然不同的四类菌群构成:(1) $\alpha$ -变形菌亚纲( $\alpha$ -Proteobacteria)的根瘤菌目(Rhizobiales)慢生根瘤菌科(Bradyrhizobiaceae)硝酸菌属(*Nitrobacter*);(2) $\gamma$ -变形菌亚纲( $\gamma$ -Proteobacteria)的着色菌目(Chromatiales)外硫红螺旋菌科(Ectothiorhodospiraceae)硝化球菌属(*Nitrococcus*);(3) $\delta$ -变形菌亚纲( $\delta$ -Proteobacteria)的脱硫杆菌目(Desulfobacterales)脱硫盒菌科(Desulfoarculaceae)硝化刺菌属(*Nitrospina*);(4)硝化螺旋菌门(Nitrospira)硝化螺旋菌纲(Nitrospira)硝化螺旋菌科(Nitrospiraceae)硝化螺旋菌属(*Nitrospira*)<sup>[23-24]</sup>。

在本研究中,由于不同富集培养物的污泥来源及富集条件不同,所以其微生物多样性组成存在差异。不同培养物优势菌门均为变形菌门,样品 A、B、C 的优势菌纲为 $\beta$ -变形菌纲和 $\gamma$ -变形菌纲,样品 D

优势菌纲为 $\gamma$ -变形菌纲和 $\delta$ -变形菌纲,在属水平上差异较大,主要细菌类群分别为亚硝化单胞菌属、链霉菌属、噬菌弧菌属和嗜酸菌属。硝化细菌对光照、温度、盐度等环境因子敏感,多数硝化细菌的生长温度在 15–35 °C 之间,当温度降至 15 °C 以下时,硝化细菌的生长和硝化速率均会显著降低;不同硝化细菌种类对盐度需求也存在较大差异,可分为需盐种、非需盐种和嗜盐种,导致其在不同生态系统中分布不同<sup>[25-27]</sup>。海洋环境盐度高,硝化菌群贫乏<sup>[16]</sup>,使得样品 D 经过 40 d 的富集培养,具有硝化功能的类群占比仅为 1.43%。Yao 等<sup>[28]</sup>通过逐级增加溶解氧浓度,富集低温异氧硝化-好氧反硝化细菌,分析表明优势菌纲为变形菌纲,与本研究结果一致;但是在富集培养过程中细菌群落多样性明显降低,其中 $\alpha$ -变形菌纲、 $\delta$ -变形菌纲和拟杆菌门占比减少,而 $\gamma$ -变形菌纲中的假单胞菌属和 $\beta$ -变形菌纲中的红育菌属成为优势菌属,与本研究结果不同。分析原因可能是他们富集的是异养硝化菌群,在富集过程中加入了有机碳源,而本研究富集的是自养硝化细菌,培养过程中无有机碳源加入。

本研究样品中起主要作用的亚硝酸盐氧化菌(NO<sub>2</sub>-氧化菌)为硝化螺旋菌属(*Nitrospira*)和 *Nitrospirillum*,前者在污水处理系统和反应器中经常被检出。样品 A 中有硝化功能菌群的比例最高,占比 24.74%,且主要为亚硝化单胞菌属细菌,与其富集培养过程中的能源物质及适宜的温度、盐度和 pH 条件有关。Yao 等<sup>[29]</sup>利用活性污泥,通过昼夜交替间歇运行、连续进氨方式富集培养硝化细菌,经过 25 d 富集培养,硝化细菌群落多样性得到提高,亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)和硝化螺旋菌属(*Nitrospira*)占比也从 2.94%提高到了 60.66%。Young 等<sup>[30]</sup>研究硝化 MBBR 反应器不同氨负荷下细菌群落结构,表明亚硝化单胞菌属占优势地位。侯爱月等<sup>[31]</sup>利用 PCR-DGGE 分析好氧颗粒污泥中微生物群落结构,表明氨氧化菌(AOB)均为 $\beta$ -变形菌纲的亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)。在本研究中,*N. eutropha* C91 为非需盐种,但可耐受 3% NaCl<sup>[32-33]</sup>,在 4 个样品

中均被检测到; *Nitrosomonas* sp. AL212<sup>[34]</sup> 常见于淡水环境, 在样品 A 中占比达 20.19%。亚硝化球菌属菌株 *N. watsonii* 是一种新型海洋厌氧氨氧化菌, 为需盐种<sup>[35-36]</sup>, 在样品 C 和 D 中被检测到。此外, 本研究还检测到具有脱氮作用的异养菌, 如对温度和盐度等具有较强适应能力的芽孢杆菌属<sup>[37]</sup>, 在样品 A、C、D 中均被检测到; 红育菌属(*R. antarcticus* ANT. BR) 属耐寒物种, 低温有利于其生长<sup>[38]</sup>, 在样品 C 中被检测到, 与 Yao 等<sup>[28]</sup> 研究结果一致。样品中检测到的红灯食烷菌是海洋环境中重要的烷烃降解菌, *Alcanivorax hongdengensis* A-11-3 分离自马六甲海峡表层海水, 是一种石油降解新种<sup>[39]</sup>; 胚芽乳酸杆菌(*Lactococcus plantarum*)<sup>[40]</sup> 可分解养殖塘底的有机物; *Aequorivita sublithicola* 则是潜在的有机物降解菌。

本研究仅针对 4 种富集培养物中细菌多样性进行了分析, 近年来随着对氨氧化古菌(AOA)研究的深入, 发现其广泛存在于土壤、自然水体、污水处理厂、垃圾渗滤液等环境中, 甚至在某些环境中占主导地位<sup>[41-43]</sup>。因此, 对于 4 种培养物富集过程中微生物多样性的变化, 特别是古菌的群落结构变化将是后续研究的重点。

综上所述, 本研究富集了 4 种不同条件下的培养物, 采用 Illumina MiSeq 高通量测序方法比较分析了 4 种硝化细菌富集培养物微生物群落结构及多样性差异, 确定了在不同培养物中起主要作用的硝化细菌类群以及部分有益菌和致病菌类群, 研究结果为硝化细菌富集培养物的实际应用奠定了基础。

## 参 考 文 献

- [1] Qu JN, Jin ZG, He QB, et al. Research on enrichment and cultivation technology of high-efficient nitrifying bacteria[J]. Journal of Tongji University, 1996, 27(3): 351-354 (in Chinese)  
屈计宁, 金志刚, 何群彪, 等. 高效硝化细菌的富集技术研究[J]. 同济大学学报, 1996, 27(3): 351-354
- [2] Ma Y, Qian LM, Wang YS, et al. Progress in molecular ecology of nitrifying bacteria[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(5): 872-879 (in Chinese)  
马英, 钱鲁闽, 王永胜, 等. 硝化细菌分子生态学研究进展[J]. 中国水产科学, 2007, 14(5): 872-879
- [3] Song ZW, Xu M, Wen SP, et al. Effect of nitro bacteria preparation on water purification of freshwater aquarium[J]. Hebei Fisheries, 2007(11): 29-31, 60 (in Chinese)  
宋志文, 徐敏, 温少鹏, 等. 硝化细菌制剂对淡水水族箱水质的净化效果[J]. 河北渔业, 2007(11): 29-31, 60
- [4] Luo XX, Gao JZ, Chen ZZ. The research and application of nitrifying bacteria enrichment culture[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2013, 40(6): 320-323 (in Chinese)  
罗小溪, 高建忠, 陈再忠. 硝化细菌富集培养及应用研究进展[J]. 水产科技情报, 2013, 40(6): 320-323
- [5] Wang XJ, He CP, Wang Z, et al. Screening and characteristics of an efficient nitro bacterium[J]. China Environmental Science, 2013, 33(2): 286-292 (in Chinese)  
王小菊, 何春平, 王震, 等. 高效硝化细菌的筛选及特性研究[J]. 中国环境科学, 2013, 33(2): 286-292
- [6] Cho KH, Kim JO, Kang S, et al. Achieving enhanced nitrification in communities of nitrifying bacteria in full-scale wastewater treatment plants via optimal temperature and pH[J]. Separation and Purification Technology, 2014, 132: 697-703
- [7] Peng L, Ni BJ, Erler D, et al. The effect of dissolved oxygen on N<sub>2</sub>O production by ammonia-oxidizing bacteria in an enriched nitrifying sludge[J]. Water Research, 2014, 66: 12-21
- [8] Zhang ZD, Gu MY, Wang W, et al. Analysis of bacterial community in radiation polluted soils by high-throughput sequencing[J]. Microbiology China, 2016, 43(6): 1218-1226 (in Chinese)  
张志东, 顾美英, 王玮, 等. 基于高通量测序的辐射污染区细菌群落特征分析[J]. 微生物学通报, 2016, 43(6): 1218-1226
- [9] Qin N, Li DF, Yang RF. Next-generation sequencing technologies and the application in microbiology—a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(4): 445-457 (in Chinese)  
秦楠, 栗东芳, 杨瑞馥. 高通量测序技术及其在微生物学研究中的应用[J]. 微生物学报, 2011, 51(4): 445-457
- [10] Qian SC, Xu M, Wen SP, et al. The influence of different carriers on nitrifying bacteria enrichment process[J]. Hebei Fisheries, 2013(2): 1-4, 16 (in Chinese)  
钱生财, 徐敏, 温少鹏, 等. 载体对硝化细菌富集培养过程的影响[J]. 河北渔业, 2013(2): 1-4, 16
- [11] Wang W, Tan XY, Sun XF, et al. A study on marine nitrifying bacteria enrichment cultivation process[J]. Journal of Qingdao Technological University, 2006, 27(3): 67-70 (in Chinese)  
王玮, 谭潇也, 孙贤凤, 等. 海洋硝化细菌富集培养过程研究[J]. 青岛理工大学学报, 2006, 27(3): 67-70
- [12] Magoč T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2957-2963
- [13] Sun DL, Jiang X, Wu QL, et al. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(19): 5962-5969
- [14] Jin L, Gao XM, Du JH, et al. Peat bacterial diversity and community structure in Gahai Lake wetland in Gan'nan[J]. Microbiology China, 2016, 43(11): 2396-2404 (in Chinese)  
靳亮, 高学梅, 杜建华, 等. 杂海湖湿地泥炭细菌多样性分析[J]. 微生物学通报, 2016, 43(11): 2396-2404
- [15] Amato KR, Yeoman CJ, Kent A, et al. Habitat degradation impacts black howler monkey (*Alouatta pigra*) gastrointestinal microbiomes[J]. The ISME Journal, 2013, 7(7): 1344-1353
- [16] Zou YX. Enhance ammonia removal effect in constructed

- wetland at low temperature[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin University, 2014 (in Chinese)  
邹雨璇. 低温条件下人工湿地氨氮强化脱氮机理的研究[D]. 长春: 吉林大学硕士学位论文, 2014
- [17] Gu JZ. Study on enrichment process and influence factors analysis of marine low temperature nitrifying bacteria[D]. Qingdao: Master's Thesis of Qingdao University of Technology, 2014 (in Chinese)  
顾锦钊. 海洋低温硝化细菌的富集培养过程及影响因素分析[D]. 青岛: 青岛理工大学硕士学位论文, 2014
- [18] Zhou YQ, Xin X, Yao L, et al. Isolation and identification of a heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria with high efficiency and its denitrification characteristics[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2013, 7(10): 4127-4132 (in Chinese)  
周迎芹, 信欣, 姚力, 等. 一株高效异养硝化-好氧反硝化菌的分离鉴定及脱氮性能[J]. 环境工程学报, 2013, 7(10): 4127-4132
- [19] Yang L, Ren YX, Liang X, et al. Nitrogen removal characteristics of a heterotrophic nitrifier *Acinetobacter junii* YB and its potential application for the treatment of high-strength nitrogenous wastewater[J]. Bioresource Technology, 2015, 193: 227-233
- [20] Mols M, de Been M, Zwietering MH, et al. Metabolic capacity of *Bacillus cereus* strains ATCC 14579 and ATCC 10987 interlinked with comparative genomics[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(12): 2933-2944
- [21] Madigan MT, Jung DO, Woese CR, et al. *Rhodoferrax antarcticus* sp. nov., a moderately psychrophilic purple nonsulfur bacterium isolated from an Antarctic microbial mat[J]. Archives of Microbiology, 2000, 173(4): 269-277
- [22] Katipoglu-Yazan T, Merlin C, Pons MN, et al. Chronic impact of sulfamethoxazole on the metabolic activity and composition of enriched nitrifying microbial culture[J]. Water Research, 2016, 100: 546-555
- [23] Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG, et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[M]. 2nd Edition. USA: Springer-Verlag, 2005: 137-153
- [24] Liu ZP, Liu SJ. Advances in the molecular biology of nitrifying microorganisms[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2004, 10(4): 521-525 (in Chinese)  
刘志培, 刘双江. 硝化作用微生物的分子生物学研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2004, 10(4): 521-525
- [25] Kuhn DD, Drahos DD, Marsh L, et al. Evaluation of nitrifying bacteria product to improve nitrification efficacy in recirculating aquaculture systems[J]. Aquacultural Engineering, 2010, 43(2): 78-82
- [26] Ward BB, Arp DJ, Klotz MG. Nitrification[M]. Washington, DC, USA: ASM Press, 2011
- [27] John RC, Okpokwasili GC. Crude oil-degradation and plasmid profile of nitrifying bacteria isolated from oil-impacted mangrove sediment in the Niger Delta of Nigeria[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2012, 88(6): 1020-1026
- [28] Yao S, Ni JR, Chen Q, et al. Enrichment and characterization of a bacteria consortium capable of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature[J]. Bioresource Technology, 2013, 127: 151-157
- [29] Yao RD, Yang H, Yu MY, et al. Enrichment of nitrifying bacteria and microbial diversity analysis by high-throughput sequencing[J]. RSC Advances, 2016, 3(15): 113959-113966
- [30] Young B, Delatolla R, Kennedy K, et al. Low temperature MBBR nitrification: microbiome analysis[J]. Water Research, 2017, 111: 224-233
- [31] Hou AY, Li J, Wang CW, et al. Characteristics of microbial community structure in different aerobic granular sludge[J]. China Environmental Science, 2016, 36(4): 1136-1144 (in Chinese)  
侯爱月, 李军, 王昌稳, 等. 不同好氧颗粒污泥中微生物群落结构特点[J]. 中国环境科学, 2016, 36(4): 1136-1144
- [32] Kjeldal H, Pell L, Pommerening-Röser A, et al. Influence of *p*-cresol on the proteome of the autotrophic nitrifying bacterium *Nitrosomonas europaea* C91[J]. Archives of Microbiology, 2014, 196(7): 497-511
- [33] Stein LY, Arp DJ, Berube PM, et al. Whole-genome analysis of the ammonia-oxidizing bacterium, *Nitrosomonas europaea* C91: implications for niche adaptation[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(12): 2993-3007
- [34] Yuichi S, Norton JM, Bollmann A, et al. Genome sequence of *Nitrosomonas* sp. strain AL212, an ammonia-oxidizing bacterium sensitive to high levels of ammonia[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(18): 5047-5048
- [35] Fečkaninová A, Koščová J, Mudroňová D, et al. The use of probiotic bacteria against *Aeromonas* infections in salmonid aquaculture[J]. Aquaculture, 2017, 469: 1-8
- [36] Campbell MA, Chain PSG, Dang HY, et al. *Nitrosococcus watsonii* sp. nov., a new species of marine obligate ammonia-oxidizing bacteria that is not omnipresent in the world's oceans: calls to validate the names '*Nitrosococcus halophilus*' and '*Nitrosomonas mobilis*'[J]. Microbiology Ecology, 2011, 76(1): 39-48
- [37] Huang X, Bai J, Li KR, et al. Characteristics of two novel cold- and salt-tolerant ammonia-oxidizing bacteria from Liaohu Estuarine Wetland[J]. Marine Pollution Bulletin, 2017, 114(1): 192-200
- [38] Song ZW, Li T, Wang QX, et al. Influence of microbial community structure of seed sludge on the properties of aerobic nitrifying granules[J]. Journal of Environmental Sciences, 2015, 35: 144-150
- [39] Wang WP, Shao ZZ. Genes involved in alkane degradation in the *Alcanivorax hongdengensis* strain A-11-3[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 94(2): 437-448
- [40] Beck BR, Kim D, Jeon J, et al. The effects of combined dietary probiotics *Lactococcus lactis* BFE920 and *Lactobacillus plantarum* FGL0001 on innate immunity and disease resistance in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 42(1): 177-183
- [41] Spang A, Hatzenpichler R, Brochier-Armanet C, et al. Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing archaea supports the phylum Thaumarchaeota[J]. Trends in Microbiology, 2010, 18(8): 331-340
- [42] Liu ZH, Li DH. Ammonia-oxidizing archaea and their contribution to global nitrogen cycling: a review[J]. Microbiology China, 2015, 42(4): 774-782 (in Chinese)  
刘正辉, 李德豪. 氨氧化古菌及其对氮循环贡献的研究进展[J]. 微生物学通报, 2015, 42(4): 774-782
- [43] Zhou LL, Zhu GB, Wang SY, et al. Abundance, biodiversity and contribution to ammonia oxidization of ammonia-oxidizing archaea in littoral sediments of Dongting Lake[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2013, 33(6): 1741-1747 (in Chinese)  
周磊榴, 祝贵兵, 王衫允, 等. 洞庭湖岸边带沉积物氨氧化古菌的丰度、多样性及对氨氧化的贡献[J]. 环境科学学报, 2013, 33(6): 1741-1747