

淡水水体底泥中厌氧氨氧化菌的原位鉴别

阮晓红^{1,2}, 张瑛¹, Markus C. Schmid³, Toine Smits⁴, 赵振华¹

(1. 河海大学水文水资源与水利工程科学国家重点实验室, 南京 210098; 2. 南京大学地球科学系, 南京 210093; 3. Department of Microbiology, Radboud University of Nijmegen, Toernooiveld 1, 6525 ED Nijmegen, The Netherlands; 4. Center for Water and Society, Radboud University of Nijmegen, Toernooiveld 1, 6500 GL Nijmegen, The Netherlands)

摘要: 采用 16S rRNA 方法对江苏省新沂河的底泥样品进行了厌氧氨氧化菌的原位检测, 建立了样品的 16S rRNA 克隆文库, 共包括 6 个 16S rRNA 克隆序列. 对文库中克隆序列利用 ARB 软件包进行了排队分析及系统发育树的绘制. 分析结果表明, 新沂河底泥样品中含有与已知厌氧氨氧化菌 *Candidatus* “*Brocadia anammoxidans*”相似性为 91% 的 16S rRNA 基因, 经鉴定为厌氧氨氧化菌 *Brocadia* 分支的新种类. 样品中还含有组成 *Planctomycetes* 新分支的 16S rRNA 基因, 它们与已知厌氧氨氧化菌序列的遗传距离较远, 其微生物特性还有待进一步研究. 厌氧氨氧化菌在淡水环境中的发现将有助于进一步研究厌氧氨氧化过程在受损淡水生态系统修复重建中的作用, 重新认识其中的氮循环过程.

关键词: 氮循环; 厌氧氨氧化菌; 淡水水体底泥; 分子生物学技术

中图分类号: X835 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)07-1420-04

In situ Identification of ANAMMOX Bacteria in Freshwater Sediments

RUAN Xiao-hong^{1,2}, ZHANG Ying¹, Markus C. Schmid³, Toine Smits⁴, ZHAO Zhen-hua¹

(1. State Key Laboratory of Hydrology-Water Resources and Hydraulic Engineering, Hohai University, Nanjing 210098, China; 2. Department of Earth Science, Nanjing University, Nanjing 210093, China; 3. Department of Microbiology, Radboud University of Nijmegen, Toernooiveld 1, 6525 ED Nijmegen, The Netherlands; 4. Center for Water and Society, Radboud University of Nijmegen, Toernooiveld 1, 6500 GL Nijmegen, The Netherlands)

Abstract: *In situ* identification of ANAMMOX bacteria was conducted using 16S rRNA approach for sediment samples from the Xinyi River in Jiangsu Province, China. 16S rRNA clone library including 6 clone sequences was constructed. The alignment of these sequences and treeing were conducted using ARB package. Results show that the sediment samples contained 16S rRNA genes closely related to the known ANAMMOX bacterium *Candidatus* “*Brocadia anammoxidans*” (similarity of 91%). They also contained 16S rRNA gene sequences from a new branch of *Planctomycetes* distantly related to the ANAMMOX sequence cluster. However, the microbiological characteristics of these *Planctomycetes* are to be studied in the future. The detection of ANAMMOX bacteria will lead to further research on ANAMMOX process in the remediation and restoration of freshwater aquatic ecosystems and new understanding of the nitrogen cycle.

Key words: nitrogen cycle; ANAMMOX bacteria; freshwater sediment; molecular techniques

由于氮素是引起富营养化的主要因素之一, 氮污染物向氮气的转化一直是污水处理和水污染控制的焦点问题. 最近, 由于厌氧氨氧化过程及厌氧氨氧化菌(ANAMMOX 菌)在实验室生物反应器以及自然生态系统中的发现及其对于氮素去除的高效性^[1,2], 已引起了越来越多研究者的关注. 人们对于厌氧氨氧化过程和 ANAMMOX 菌在污水处理系统中的重要作用已进行了大量的研究, 并已经把 ANAMMOX 菌的存在与自然生态系统的氮循环过程直接联系在一起^[3], 但对于 ANAMMOX 菌的生态学特性以及厌氧氨氧化过程在自然氮循环(尤其是在淡水水生态系统氮循环)中所起的作用研究还不够. 在更广阔的自然生态系统中探索这种新的氮转化途径, 从而更深入认识自然生态系统的氮循环过程, 可

为自然生态系统的保护提供更多的科学依据.

ANAMMOX 菌属于微生物分类中的浮霉菌门(*Planctomycetes*), 是化能无机自养菌. 由于环境样品中微生物群体的复杂性和 ANAMMOX 菌本身的特殊性(如世代周期长^[2]), 传统的微生物分析方法往往不能从环境样品中鉴别 ANAMMOX 菌. 分子生物学技术的发展为这方面的研究提供了有力的工具. 目前, 通过分子生物学技术已鉴定并暂时命名的 ANAMMOX 菌主要包括 *Candidatus* “*Brocadia*

收稿日期: 2005-07-10; 修订日期: 2005-09-15

基金项目: 国家“十五”重大科技专项基金项目(2003AA601070); 国家自然科学基金项目(40573051)

作者简介: 阮晓红(1961~), 女, 博士后, 教授, 主要研究方向为污染物迁移转化规律及污染水生态修复, E-mail: ruanxh@hhu.edu.cn

anammoxidans”^[4]、*Candidatus* “*Kuenenia stuttgartiensis*”^[5]、*Candidatus* “*Scalindua sorokinii*”^[3]、*Candidatus* “*Scalindua brodae*”和 *Candidatus* “*Scalindua wagneri*”^[6]等. 在国内, 研究者也开始对厌氧氨氧化过程和 ANAMMOX 菌进行了研究, 并试图将其应用于污水处理脱氮工艺的开发^[7,8]. 但较少将分子生物学技术应用于 ANAMMOX 菌(不管是污水处理系统还是自然生态系统)的研究.

基于以上研究背景, 本研究采用荧光原位杂交(FISH)、多聚酶链式反应(PCR)、DNA 克隆及 DNA 测序等分子生物学技术对淡水水体底泥中的厌氧氨氧化菌进行了原位检测, 一方面试图探讨淡水水体环境中的氮转化新途径——厌氧氨氧化过程是否存在; 另一方面从微生物学的角度来讲, 进一步扩充厌氧氨氧化菌的生态学特性.

1 材料与方法

1.1 采样点和底泥样品

2 个底泥样品采自江苏北部新沂河污水廊道沭阳大桥附近(见表 1), 其中 XYR1 采自岸边, XYR2

采自河中心.

表 1 供试底泥样品¹⁾
Table 1 Studied sediment samples

样品	<i>t</i> / °C	DO / mg·L ⁻¹	pH	含水量 / %	有机物 / %	水生环境
XYR1	11.1	8.24	7.1	34.04	4.26	鲤鱼科类 水葱
XYR2	11.1	7.27	6.4	31.95	2.36	鲤鱼科类 野生芦苇

1) 采样时间: 2003-11-12, pH、DO 为取样点地表水的 pH 和溶解氧, *t* 为取样点取样时的水温, 它们均为现场测定值. 含水量和有机物含量在实验室测定

1.2 ANAMMOX 菌原位检测方法

1.2.1 FISH

将样品固定, 使其与选定的杂交探针进行杂交后, 通过落射荧光显微镜观察结果. 其中杂交探针是指通过自动化学反应产生的长度约为 15~30 个碱基的 DNA 片段^[9], 通常在寡核苷酸探针的 5' 端通过共价键与简单荧光染料分子链接. 常用的荧光体包括荧光素(fluorescein)、四甲基罗丹明(tetramethylrhodamine)、更多的使用羰花青(carbocyanine, 如 Cy3 或 Cy5)等^[10]. 文中所用杂交探针详见表 2.

表 2 研究中用到的 FISH 探针
Table 2 FISH probes used in this study

探针	OPD ¹⁾ 名称	特异性	序列 5'-3'	甲酰胺 / %	NaCl / mmol·L ⁻¹	靶位点 ²⁾
BS820 ^[3]	S*-BS-820-arA-22	<i>S. wagneri</i> , <i>S. sorokinii</i>	TAATTCCTCTACTTAGTGCCC	20	225	16S, 820~841
AMX368 ^[4]	S*-Amx-0368-arA-18	所有 ANAMMOX 菌	CCTTTCGGGCATTGCGAA	15	338	16S, 368~385
PLA46 ^[5]	S-P-Planct-0046-arA-18	<i>Planctomycetales</i>	GACTTGCGATGCGCTAATCC	25	159	16S, 46~63
EUB338 ^[6]	S-D-Bact-0338-arA-18	细菌	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	0~50	900~28	16S, 338~355
AMX820 ^[7]	S*-Amx-0820-arA-22	<i>B. anammoxidans</i> , <i>K. stuttgartiensis</i>	AAAACCCCTCTACTTAGTGCCC	40	56	16S, 820~841

1) 寡核苷酸探针数据库^[11]; 2) *Escherichia coli* rRNA 位置^[12]

1.2.2 PCR

底泥样品的微生物 DNA 分离按照 Stephen 等^[13]的改进方法进行. 分离后的 DNA 采用表 3 所列引物对按照标准扩增程序进行 PCR 反应. PCR

产物在 TBE(Tris、硼酸和 EDTA 按一定比例配制的电解缓冲液)琼脂凝胶上电泳并用溴化乙锭染色后, 在 UV 照射下进行 PCR 产物的定性检测.

1.2.3 PCR 产物的 DNA 克隆及测序

表 3 PCR 试验中用到的引物对
Table 3 Primer pairs used in PCR

引物	序列 5'-3'	退火温度 / °C	靶位点 ¹⁾
PLA46F ^[5]	GGATTAGGCATGCAAGTC	58	16S rRNA 基因, 46~63
AMX368R ^[6]	CCTTTCGGGCATTGCGAA	52~58	16S rRNA 基因, 368~385
AMX820R ^[14]	AAAACCCCTCTACTTAGTGCCC	52~58	16S rRNA 基因, 820~841
1390R ^[5]	GACGGCGCGTGTGTACAA	58	16S rRNA 基因, 1390~1407

1) *E. coli* 16S rRNA 位置

对得到的 PCR 产物通过 TOPO TA 克隆试剂盒(Invitrogen, Groningen, The Netherlands)进行克

隆. 蓝/白筛选后菌落中的质粒 DNA 通过 Quiaprep spin miniprep 试剂盒(Quiagen, Hilden, Germany)

分离得到. 得到的质粒 DNA 使用引物 M13F(向前引物, 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3', 靶位点: 克隆载体, 391~406) 进行测序. 测序由 ABI Prism 3700 DNA 分析仪与 BIG Dye Terminator 试剂盒 (Applied Biosystems) 完成.

1.2.4 系统发育分析

首先将得到的 16S rRNA 序列送 GenBank 数据库 (NCBI BLAST database, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 寻找到相近序列, 然后将这些序列加入到 ARB 软件包(由德国慕尼黑技术大学微生物系开发)相应的数据组中, 通过 ARB 软件包中相应的工具自动排队分析后, 根据 16S rRNA 的二级结构人工进行校正, 并分析这些微生物种类与现存微生物种类的系统发育关系.

1.2.5 16S rRNA 基因 accession number

本研究得到的序列在公共数据库中的 accession number 分别为: DQ198370、DQ198371、DQ198372、DQ198373、DQ198374 和 DQ198375.

2 结果与讨论

采用 FISH 和 PCR 判断了实验样品中是否存在能与 ANAMMOX 菌特异性探针杂交的细菌 16S rRNA 基因, 样品中能与 ANAMMOX 菌特异性探针杂交的细菌的种属特性, 即微生物在系统发育树中的位置则通过 DNA 克隆及测序和碱基序列的系统发育判断.

2.1 ANAMMOX 菌的原位检测结果与分析

新沂河 2 个底泥样品的 FISH 实验结果见文献 [15] 和图 1. 图 1 中所用的探针为 AMX368 (Cy3 标记)、PLA46 (FLUOS 标记) 和 EUB338 (Cy5 标记). 由图 1 可知, 2 个样品中均含有与探针 AMX368、PLA46 和 EUB338 同时杂交的 16S rRNA 基因. 另外, 也发现 XYR2 样品中含有同时与探针 AMX820 和 PLA46 杂交的 16S rRNA 基因(图 2).

PCR 扩增实验表明, 这 2 个样品中存在能够与引物对 PLA46F-AMX820R 和 PLA46F-BS820R 杂交的目标扩增产物, 即大小约为 815bp 的 PCR 产物.

2.2 系统发育分析

对 XYR1 和 XYR2 样品中分离得到的 DNA 新鲜 PCR 扩增产物(引物对 PLA46F-AMX820R)进行了 DNA 克隆. 从蓝白筛选过程中挑选出的白色克隆菌落的质粒 DNA 经 EcoRI 消化后通过凝胶电泳检查, 从中挑选含有模板 DNA 插入体的质粒体

DNA, 用测序向前引物 M13F 进行了测序(得到克隆菌落序列为 XYR1 样品的克隆菌落 7、8、9 和 XYR2 样品的克隆菌落 3、5、6).

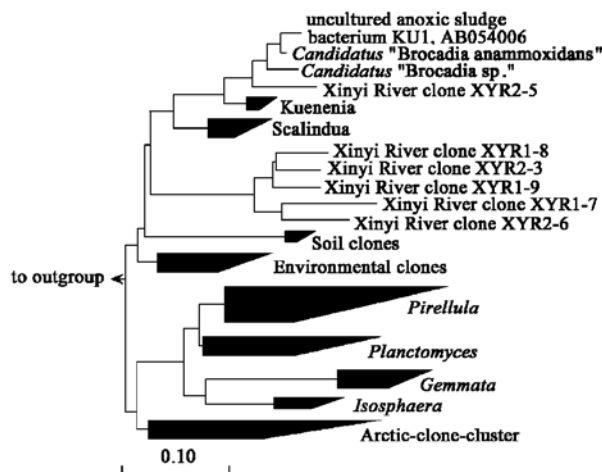
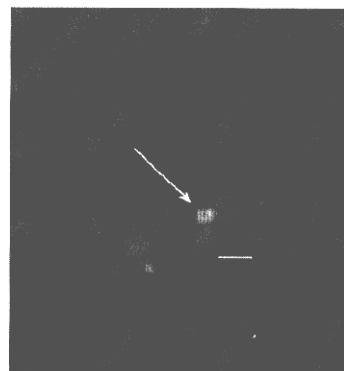


图 1 XYR1 样品的 3 个克隆和样品 XYR2 的 3 个克隆的系统发育位置

Fig. 1 Phylogenetic 16S rRNA gene tree of three clones of sample XYR1 and three clones of sample XYR2



使用的探针: AMX820 (Cy3 标记)、BS820 (FLUOS 标记) 和 PLA46 (Cy5 标记). 箭头所示为与 ANAMMOX 特异性基因探针杂交的细胞. 比例尺表示 2μm

图 2 XYR2 样品的落射荧光显微照片

Fig. 2 Epifluorescence images of sample XYR2

将所得到的碱基序列与 BLAST 已知微生物序列的相似性比较表明, 2 个样品中的细菌均与 *Planctomycetes* 相近. 其中 XYR2 样品进行测序的 3 个克隆之一与 *B. anammoxidans* 相似.

对 XYR1 和 XYR2 样品克隆的 16S rRNA 序列用 ARB 软件包进行的系统发育分析结果表明, XYR2 样品的克隆 5 的 16S rRNA 序列中, 在基于 *E. coli* 细胞 16S rRNA 碱基序列计数的第 368 个碱基(探针 AMX368 的靶位点)位置, 具有一个长度为 18bp 的插入体. 这是 ANAMMOX 菌的细胞区别于

其它细菌所具有的特殊插入体。另外,该序列与 *B. anammoxidans*^[4] (GenBank 登记号 AJ131819) 具有 91% 的相似性。XYR2 样品的其它 2 个克隆以及 XYR1 样品的 3 个克隆形成了 *Planctomycetes* 的一个新的分支,该分支与 ANAMMOX 菌遗传距离较远(如图 1 所示),但这一分支中微生物的功能和特性还是未知的。

至此,可以肯定 ANAMMOX 菌确实存在于 XYR2 样品中。从系统发育树可看出,发现的 ANAMMOX 菌是 ANAMMOX 菌分支中 *Brocadia* 的新种类(*Brocadia*、*Kuenenia* 和 *Scalindua* 是 3 组不同的 ANAMMOX 菌)。

另外,虽然 FISH 和 PCR 结果都表明在 XYR1 样品中同样存在能与 ANAMMOX 菌特异性探针杂交的类似于 ANAMMOX 菌的细胞,而系统发育分析却没有发现该样品中存在 ANAMMOX 菌,其中的原因有待进一步研究。

3 结论

应用分子生物学技术对新沂河淡水水体底泥 ANAMMOX 菌的原位鉴别说明,在新沂河这种淡水生态系统的底泥中含有 ANAMMOX 菌。该研究为厌氧氨氧化过程及 ANAMMOX 菌本身特性的研究,以及淡水水体氮转化新途径的研究提供了基础。对其在淡水受损生态系统氮循环中所起的作用还需要进一步地研究。样品中所发现的 *Planctomycetes* 新分支中微生物的功能特性也有待研究。

致谢:本论文试验部分工作是在荷兰 Radboud University of Nijmegen 的微生物实验室完成的,感谢该实验室为本论文提供的实验基础保障。

参考文献:

- [1] Mulder A, Van de Graaf A A, Robertson L A, *et al.* Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor [J]. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1995, **16**: 177~ 184.
- [2] Jetten M S M, Strous M, Van de Pas-Schoonen K T, *et al.* The anaerobic oxidation of ammonium [J]. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1999, **22**: 421~ 437.
- [3] Kuypers M M M, Sliekers A O, Lavik G, *et al.* Anaerobic ammonium oxidation by ANAMMOX bacteria in the Black Sea [J]. *Nature*, 2003, **422** (10): 608~ 611.
- [4] Strous M, Fuerst J A, Kramer E H M, *et al.* Missing lithotroph identified as new planctomycete [J]. *Nature*, 1999, **400**: 446~ 449.
- [5] Schmid M, Twachtman U, Klein M, *et al.* Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation [J]. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2000, **23**: 93~ 106.
- [6] Schmid M, Walsh K, Webb R, *et al.* *Candidatus "Scalindua brodae"*, sp. nov., *Candidatus "Scalindua wagneri"*, sp. nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria [J]. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2003, **26**: 529~ 38.
- [7] 阮文权, 邹华, 陈坚. Anammox 混培菌的获得及其运行条件 [J]. *重庆环境科学*, 2002, **24** (6): 30~ 33.
- [8] 胡勇有, 睢怀庆, 陈柱. Anammox 菌的培养与驯化研究 [J]. *华南理工大学学报(自然科学版)*, 2002, **30** (11): 160~ 164.
- [9] Amann R, Fuchs B M, Behrens S. The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridization [J]. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2001, **12**: 231~ 236.
- [10] Southwick P L, Ernst L A, Tauriello E W, *et al.* Cyanine dye labeling reagents - carboxymethylindocyanine succinimidyl esters [J]. *Cytometry*, 1990, **11**: 418~ 430.
- [11] Alm E W, Oerther D B, Larsen N, *et al.* The oligonucleotide probe database [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62**: 3557~ 3559.
- [12] Brosius J, Dull T J, Sleeter D D, *et al.* Gene organization and primary structure of a ribosomal operon from *Escherichia coli* [J]. *J. Mol. Biol.*, 1981, **148**: 107~ 127.
- [13] Stephen J R, McCaig A E, Smith Z, *et al.* Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to β -subgroup ammonio-oxidizing bacteria [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62**: 4147~ 4154.
- [14] Egli K, Fanger U, Alvarez P J, *et al.* Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate [J]. *Arch. Microbiol.*, 2001, **175** (3): 198~ 207.
- [15] 张瑛, 阮晓红. 分子生物学技术及其在环境样品微生物分析中的应用 [J]. *河海大学学报(自然科学版)*, 2005, **33** (3): 241~ 245.