

# 海水养殖场沉积物中硝酸盐还原菌种群分析

王亚南<sup>1,2</sup> 王保军<sup>1</sup> 戴欣<sup>1</sup> 焦念志<sup>3</sup> 彭志英<sup>2</sup> 刘双江<sup>1\*</sup>

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)<sup>1</sup>

(华南理工大学食品与生物工程学院 广州 510641)<sup>2</sup>

(厦门大学海洋环境科学系 厦门 361000)<sup>3</sup>

**摘要:** 通过对福建省沿海海水养殖场沉积物中参与氮循环的各生理群细菌数量分析, 发现氨化和硝酸盐还原细菌是优势生理菌群, 同时, 表层泥样中的硝酸盐还原菌数量明显高于深层泥样。从该环境中分离获得 106 株细菌, 其中 58 株具有硝酸盐还原能力, 初步鉴定表明它们主要为芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、盐芽孢杆菌属 (*Halobacillus*)、短芽孢杆菌属 (*Brevibacillus*)、动性球菌属 (*Planococcus*) 和动性杆菌属 (*Planomicrobium*) 等革兰氏阳性细菌的成员; 16S rRNA 基因序列分析进一步证实该环境中的硝酸盐还原菌具有丰富的多样性。

**关键词:** 海水养殖, 沉积物, 氮循环, 硝酸盐还原菌

**中图分类号:** Q93    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0253-2654 (2004) 06-0073-04

## Analysis of Nitrate Reducing Community in a Near-shore Marine-cultural Sediments

WANG Ya-Nan<sup>1,2</sup> WANG Bao-Jun<sup>1</sup> DAI Xin<sup>1</sup> JIAO Nian-Zhi<sup>3</sup> PENG Zhi-Ying<sup>2</sup>

LIU Shuang-Jiang<sup>1\*</sup>

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)<sup>1</sup>

(Southern China Science and Technology University, Guangzhou 510641)<sup>2</sup>

(Department of Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361000)<sup>3</sup>

**Abstract:** The nitrogen-cycling bacteria in a near-shore marine-cultural sediments were investigated. Results indicated that ammonifying and nitrate-reducing bacteria (NRB) were the most abounding populations. The abundance of nitrate-reducing bacteria occurred in the surface layer of the sediment was higher than that in the bottom layer. 106 bacterial strains were obtained from sediment samples and were tested for their nitrate reducing ability. The results showed that 58 strains of them were able to reduce nitrate. The dominant nitrate-reducing strains were preliminarily identified as Gram positive bacteria and belong to the genus of *Bacillus*, *Halobacillus*, *Brevibacillus*, *Planococcus* and *Planomicrobium*. The richness of diversity of nitrate-reducing bacteria was further revealed by the analysis of the sequences of their 16S rRNA genes.

**Key words:** Marine-culture, Sediment, Nitrogen-cycling, Nitrate-reducing bacteria

目前全球范围海洋捕捞产量急剧下降, 海产品的增长更多地依靠迅速发展的海水养殖业。大规模的海水养殖, 增加了溶解态氮 (尤其是  $\text{NO}_3^-$ -N 和  $\text{NH}_4^+$ -N) 的输入, 是导致养殖病害和养殖区赤潮形成的潜在原因<sup>[1,2]</sup>。因此, 人们越来越多关注养殖海区局部环境中氮元素的转化。其中硝酸盐还原作用对于整个氮素循环极为关键, 该作用是通过硝酸盐还原菌 (nitrate-reducing bacteria, NRB), 即一类具有将环境中的硝酸盐还原成亚硝酸盐生理功能的细菌来完成的, 生成的亚硝酸盐可进一步还原为  $\text{N}_2$  或  $\text{N}_2\text{O}$  (即反硝化作用) 而进入大气得以循环, 或还原为氨氮 (同化硝酸盐还原作用) 而转化为

\*联系人 Tel: 010-62527118, E-mail: biotech@sun.im.ac.cn

收稿日期: 2004-02-23, 修回日期: 2004-04-30

有机氮化合物。以往对养殖环境中氮元素的转化研究多从环境条件变化（如季节变化、养殖池水源和换水强度、共生动植物类群）对水体和底泥中氨化细菌、硝化细菌和反硝化细菌的细菌总量的影响以及水体、底泥中各种形态氮素在不同环境条件下含量的变化等方面进行<sup>[1,3]</sup>，有关养殖环境中具有硝酸盐还原作用的生理群细菌的数量分布和种群结构的报道很少。本文对我国福建东山一海水养殖场沉积物中的硝酸盐还原菌的生物量及菌群结构进行了初步分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 底泥样品来源

样品采自福建东山一海水养虾场，深度为 0 cm ~ 12 cm 的一根底泥样品柱，每 2 cm 为一个样品，即 0 cm ~ 2 cm、2 cm ~ 4 cm、4 cm ~ 6 cm、6 cm ~ 8 cm、8 cm ~ 10 cm、10 cm ~ 12 cm 共 6 个样品。

### 1.2 细菌计数、分离与培养

1.2.1 细菌计数：参照文献 [4] 采用最大可能数量 (MPN) 法进行。

1.2.2 细菌基础培养基和培养条件：以人工海水培养基 (artificial seawater, ASW) 为基础培养基<sup>[5]</sup>，固体培养基中加入 15 g/L 琼脂粉。培养温度 30 。

1.2.3 细菌分离：泥样分别采用无菌生理盐水做 10 倍梯度稀释，在 ASW 平板上涂布分离、计数，同时挑取形态有差异的菌落经反复分离得到纯培养物，用于进一步生理生化实验和鉴定。

### 1.3 硝酸盐还原能力测定<sup>[4,6]</sup>

采用 Giess 试剂测定测试菌在硝酸盐还原培养基 (ASW + 1 g/L KNO<sub>3</sub>) 中生长后硝酸盐消失或者亚硝酸盐产生者为阳性。

### 1.4 细菌鉴定

1.4.1 形态特征和生理生化分析：细胞形态特征及其生理生化特性参照文献 [6]。

1.4.2 16S rRNA 基因的 PCR 扩增及序列分析：细菌基因组 DNA 的提取参考文献 [6]。PCR 扩增引物为 Pf: 5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 Pr: 5' -ACGGCTACCTGT-TACGACT-3'，它们分别对应 *E. coli* 16S rDNA 8-27 和 1495 ~ 1514 位；扩增产物约 1,500 bp。测定 5' 端序列并将序列通过 BLAST 与 GenBank 中序列进行相似性比对。

## 2 结果与讨论

### 2.1 底泥中与氮循环相关的各类细菌的数量

表 1 参与氮循环各生理类群细菌的数量

细菌类群	数量 (个/g 干泥)
好氧异养细菌	5.86 × 10 <sup>7</sup>
厌氧异养细菌	1.52 × 10 <sup>5</sup>
氨化细菌	6.23 × 10 <sup>6</sup>
硝化细菌	9.63 × 10 <sup>3</sup>
反硝化细菌	7.29 × 10 <sup>3</sup>
硝酸盐还原菌	1.18 × 10 <sup>4</sup>
亚硝酸盐还原菌	1.47 × 10 <sup>3</sup>

注：表中数据为 6 个底泥样品细菌计数结果的平均值

表 1 是底泥中各个生理类群细菌的数量。从中可以看出，底泥中与氮循环相关的细菌生物量从高到低的顺序为氨化细菌 > 硝酸盐还原菌 > 硝化细菌 > 反硝化细菌 > 亚硝酸盐还原菌。氨化作用是微生物分解有机氮化合物并将之转化为氨氮的过程，在人工养殖环境中，过剩饵料、生物代谢产物以及残体等大量有机氮的沉积<sup>[7]</sup>，都会导致该类细菌的大量增殖，因

此它们是该环境中参与氮循环的优势类群；同样，数量达  $10^4$  个/g 干泥的硝酸盐还原菌，也是该环境中参与氮循环的重要的细菌生理群。

## 2.2 硝酸盐还原菌在底泥中的分布

采用 MPN 法分析 6 个来自不同深度的泥样硝酸盐还原菌的数量表明（表 2），由底泥表面向深处的纵向分布上，表层泥样中（2 cm ~ 4 cm）的硝酸盐还原菌数量明显高于深层（4 cm ~ 12 cm）泥样。同时，从底泥不同深度样品中分离纯化得到 106 株异养细菌，其中 58 株具有硝酸盐还原能力，占分离株的 54.72%，表明该环境中的异养细菌利用硝酸盐的潜力比人们传统设想的要高得多，在其他海域海洋异养细菌中同样存在这一特征<sup>[8,9]</sup>。58 株硝酸盐还原菌在不同深度底泥中的数量分布和比例见表 2，其比例分布变化不明显，大致表现为表层（0 cm ~ 2 cm）、近表层（2 cm ~ 4 cm）和深层（10 cm ~ 12 cm）相对较高，中间层（4 cm ~ 10 cm）相对较低，有可能与不同深度硝酸盐浓度和溶解氧浓度等环境参数相关。

表 2 硝酸盐还原菌在底泥不同深度的分布

底泥深度	硝酸盐还原菌数量 <sup>*</sup>	菌株数及其比例 <sup>**</sup>
0 cm ~ 2 cm	25,000	12 (66.67%)
2 cm ~ 4 cm	30,900	11 (64.71%)
4 cm ~ 6 cm	4,500	6 (40.0%)
6 cm ~ 8 cm	2,670	11 (47.83%)
8 cm ~ 10 cm	2,970	7 (41.18%)
10 cm ~ 12 cm	4,500	11 (68.75%)

\* MPN 法获得的结果，\*\* 分离获得的具有硝酸盐还原能力的细菌数及其与该深度分离株总数之比

## 2.3 硝酸盐还原菌的种群构成

首先采用传统细菌鉴定方法，包括革兰氏染色、生芽孢培养和芽孢染色、菌落形态特征和生理生化特性等，对上述实验已经确定的具有硝酸盐还原能力的 58 株细菌进行初步鉴定，结果表明（表 3）分离得到的硝酸盐还原菌中除 4 株为革兰氏阴性细菌外，其余 54 株均为革兰氏阳性细菌，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）的成员。

表 3 56 株硝酸盐还原菌初步鉴定结果

菌群	菌株数	菌株编号
<i>Bacillus</i>	38	1-1 <sup>*</sup> , 1-6 <sup>*</sup> , 1-8 <sup>*</sup> , 1-9, 1-10, 1-18, 2-1, 2-5, 2-9 <sup>*</sup> , 2-10, 2-11, 2-12, 2-13, 2-15, 2-17, 3-10, 4-1, 4-2, 4-4, 4-6, 4-7 <sup>*</sup> , 4-11, 4-12 <sup>*</sup> , 4-14 <sup>*</sup> , 4-24, 5-1, 5-2, 5-7, 5-8 <sup>*</sup> , 5-13, 5-14, 6-2 <sup>*</sup> , 6-3 <sup>*</sup> , 6-6, 6-9 <sup>*</sup> , 6-12, 6-13, 6-14
<i>Halobacillus</i>	7	1-5 <sup>*</sup> , 2-16 <sup>*</sup> , 3-3 <sup>*</sup> , 3-8 <sup>*</sup> , 3-15 <sup>*</sup> , 4-15 <sup>*</sup> , 4-21 <sup>*</sup>
<i>Brevibacillus</i>	4	3-11, 5-4, 6-1, 6-4
<i>Planococcus</i>	1	1-15 <sup>*</sup>
<i>Planomicrobium</i>	1	3-12 <sup>*</sup>
<i>Actinomycetales</i>	3	1-14, 1-19 <sup>*</sup> , 1-20 <sup>*</sup>
发酵型革兰氏阴性细菌	3	2-18, 6-7, 6-17
非发酵型革兰氏阴性细菌	1	1-17

\* 测定 16S rRNA 基因部分序列的 22 株硝酸盐还原菌

表4 22株硝酸盐还原菌16S rRNA基因相似性分析

菌株 编号	测序 长度	Blast 最相似序列 及其 GenBank 收录号	相似性	备注*
6-3	539 bp	<i>Bacillus cereus</i> (AJ629413)	99.08 %	1-1
1-6	539 bp	<i>Bacillus firmus</i> (AF526919)	99.63 %	6-2
1-8	542 bp	<i>Bacillus jeotgali</i> (AF221061)	99.82 %	2-9, 4-7, 4-14
4-12	540 bp	<i>Bacillus baekryungensis</i> (AF541965)	99.44 %	5-8
6-9	557 bp	<i>Bacillus pumilus</i> (AB098578)	100 %	
1-5	560 bp	<i>Halobacillus karajensis</i> (AJ486874)	96.07 %	2-16, 3-3, 3-15, 4-15
4-21	538 bp	<i>Halobacillus karajensis</i> (AJ486874)	97.96 %	
3-8	560 bp	<i>Halobacillus locisalis</i> (AY190534)	99.82 %	
1-19	1486 bp	<i>Sanguibacter suarezi</i> ST50 (X79451)	96.84 %	
1-20	224 bp	<i>Dietzia maris</i> (Y18883)	99.55 %	
1-15	543 bp	<i>Planococcus maritimus</i> (AF500007)	98.16 %	
3-12	1510 bp	<i>Planomicrobium koreense</i> (AF144750)	97.9 %	

\* 16S rRNA 基因序列相同的菌株编号

对革兰氏阳性细菌中 22 株菌的 16S rRNA 基因部分序列进行了测定, 相似性分析结果(表 4)表明, 分离获得的参与硝酸盐还原作用的细菌具有丰富的多样性, 其最相似序列分别属于 4 个属 11 个种。另外, 菌株 1-5、2-16、3-3、3-15、4-15, 菌株 1-19 和 3-12 等, 16S rRNA 基因序列相似性分析表明它们与目前确定属种的微生物相似性偏低, 有可能是一些新的细菌菌种, 目前正在对它们进行进一步的分类鉴定。

**致谢** 本项研究得到了中国科学院知识创新工程项目 (KZCX1-SW-12-II) 和百人计划的支持, 在细菌分类过程中得到了中国科学院微生物研究所菌种保藏中心周宇光主任的指导, 特此鸣谢!

### 参考文献

- [1] 郭 丰, 聂 鑫, 黄凌风, 等. 海洋科学, 2002, 26 (4): 44 ~ 48.
- [2] 李秋芬, 袁有宪. 中国水产科学, 2000, 7 (2): 90 ~ 92.
- [3] 赵卫红, 焦念志, 赵增霞. 海洋与湖沼, 2000, 31 (1): 53 ~ 59.
- [4] 俞毓馨, 吴国庆, 孟宪庭. 环境工程微生物检验手册. 北京: 中国环境科学出版社, 1990.
- [5] Eguchi M, Ishikawa T, MacDonald K. Appl Environ Microbiol, 1996, 62: 1287 ~ 1294.
- [6] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [7] 周 毅, 杨红生, 张福绥. 中国水产科学, 2003, 10 (2): 165 ~ 168.
- [8] 赵三军, 肖 天, 岳海东. 海洋与湖沼, 2003, 34 (3): 295 ~ 305.
- [9] Allen A E, Booth M G, Frischer M E, et al. Appl Environ Microbiol, 2001, 67 (11): 5343 ~ 5348.