

# 太湖沉积物中氮循环菌的微生物生态

岳冬梅 田梦 宋炜 肖琳\* 杨柳燕

(污染控制与资源化国家重点实验室 南京大学环境学院 江苏 南京 210093)

**摘要:** 采用荧光原位杂交(FISH)技术, 对梅梁湾和贡湖湾湖区沉积物中微生物的主要种群, 及氮循环功能微生物的数量和分布进行了研究, 发现随着深度增加, 细菌和古菌数量均逐渐减少, 但古菌在总菌数中所占比例有所增加; 梅梁湾沉积物中氨氧化细菌及亚硝酸氧化细菌的数量均高于贡湖湾, 随深度增加, 两者数量均逐渐减少, 但在贡湖湾其占总菌数的比例高于梅梁湾, 表明水生植物可能对沉积物中微生物组成及氮循环有重要影响。泉古菌在太湖沉积物中普遍存在且数量高于氨氧化细菌, 说明其在淡水湖泊中对氮循环可能有重要作用。

**关键词:** 沉积物, 氮循环, 原位荧光杂交(FISH), 泉古菌

## Research on the micro-ecology of nitrogen cycling bacteria in sediments of Lake Taihu

YUE Dong-Mei TIAN Meng SONG Wei XIAO Lin\* YANG Liu-Yan

(State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210093, China)

**Abstract:** The amount and distribution of nitrogen cycling bacteria in sediments of Meiliang Bay and Gonghu Bay of Lake Taihu were studied by FISH analysis. The amount of archaea decreased along the sediment depth, however, its ratio to total microorganisms increased. The amount of Ammonia oxidizing bacteria (AOB) and nitrite oxidizing bacteria (NOB) in Meiliang Bay was higher than that in Gonghu Bay although the amount of both bacteria decreased along the sediment depth. Our results indicated that the existence of aquatic macrophyte in Gonghu Bay might affiliate transformation of nitrogen. Crenarchaeota was universally detected in surface sediments and overnumbered AOB, which indicated that it might play an important role in nitrogen cycling.

**Keywords:** Sediment, Nitrogen cycling, Fluorescence in situ hybridization (FISH), Crenarchaeota

氮是水生态系统初级生产力的限制性生源要素, 微生物是氮循环的驱动泵, 硝化及反硝化是微

生物特有的过程, 也是氮的生物地球化学循环过程中最为关键的步骤。硝化作用分 2 个阶段, 氨氧化

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30770414); 国家 973 计划项目(No. 2008CB418003)

\* 通讯作者: Tel: 86-25-89680556; 邮箱: xiaolin@nju.edu.cn

收稿日期: 2010-12-28; 接受日期: 2011-02-24

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

细菌进行氨的氧化,亚硝酸氧化细菌完成亚硝酸盐的氧化。同时,在土壤、海洋等环境中,氨氧化古菌(AOA)广泛存在,根据对细菌和古菌来源的氨单加氧酶 $\alpha$ 亚基编码基因(*amoA*)的定量分析表明,大多环境中 AOA 的丰度常常远高于氨氧化细菌(AOB)<sup>[1-6]</sup>,地下水处理过程中也发现,氨的去除与 AOA 的数量有很大相关性<sup>[7]</sup>。沉水植物在水生生态系统中有着非常重要的作用<sup>[8]</sup>,除自身的代谢外,沉水植物与水体及沉积物中微生物之间也存在着密切的关系,通过影响微生物的数量、活性和分布参与水体的生态过程。沉水植物是水体中微生物的重要载体,水生植物根系能促进硝化细菌的数量和活性<sup>[9]</sup>,从而影响水体中氮的循环转化。

由于氨氧化和亚硝酸氧化微生物的生长都非常缓慢,使得分离纯化困难,所以采用传统的分离培养分析检测法难以对其存在和功能进行鉴别和评价。近年来荧光原位杂交(Fluorescence in situ Hybridization, FISH)技术为研究环境中微生物群落结构提供了一个非常有效的手段,但由于沉积物中存在较多的杂质,会造成背景荧光,干扰结果的判读,需要对沉积物的 FISH 试验条件进行优化。本文通过对 FISH 条件进行优化,有效降低了背景荧光的干扰,并对梅梁湾和贡湖湾沉积物中典型微生物的数量和丰度进行了检测,结果表明水生植物能够影响沉积物中微生物的组成;硝化杆菌可能是太湖沉积物中的主要亚硝酸氧化细菌;泉古菌在沉积物中普遍存在且数量高于氨氧化细菌,说明其在淡水湖泊中对氮循环可能有重要作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品的采集和处理

2006年4月采集自太湖梅梁湾(2#: N31°30.306', E120°13.370')和贡湖湾(5#: N31°23.767', E120°19.471')。利用柱状采样器采集30 cm沉积物柱,采样后立即带回实验室进行分层。前10 cm分为一层,10 cm-20 cm每2 cm分为一层,20 cm以下每5 cm分为一层,分别装入封口袋并贴上标签,置冰箱内保存。

### 1.2 沉积物样品的原位荧光杂交(FISH)

取0.2 g底泥样品于离心管中,14 000 r/min冷冻离心10 min,去上清;然后加入1 mL PBS缓冲液,充分混合后,离心,去上清,重复3次后加入等体积4%多聚甲醛固定液,充分混合,4 °C过夜,离心,在沉淀中加入1 mL PBS缓冲液充分混合后,离心,去上清,加入1 mL 98%乙醇/PBS (1:1)混合液,混匀,超声充分分散后,取10  $\mu$ L均匀涂布在APES包被的载玻片上,置37 °C烘箱干燥1-2 h,然后将干燥后的玻片按50%、80%和98%的酒精浓度顺序脱水各3 min,放置5-10 min,自然干燥。

将20  $\mu$ L含有探针的杂交缓冲液滴到载玻片上,46 °C杂交1.5-3 h后,进行DAPI染色,用荧光显微镜观察。细菌丰度(cells/g)为 $AS_1/(S_2V)$ ,其中A为视野中细菌平均数, $S_1$ 为样品涂抹面积, $S_2$ 为视野面积,V为样品体积。

本文所用探针分别为:NIT3/CNIT3<sup>[10]</sup>(亚硝酸氧化细菌),NSO190<sup>[10]</sup>(氨氧化细菌),ARCH915<sup>[11]</sup>(古菌),CREN537<sup>[12]</sup>(泉古菌),ALF1b<sup>[11]</sup>(变形菌 $\alpha$ 亚纲),BET42a<sup>[11]</sup>(变形菌 $\beta$ 亚纲),GAM42a<sup>[11]</sup>(变形菌 $\gamma$ 亚纲)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 沉积物中微生物 FISH 分析条件的优化

与纯培养菌液及活性污泥不同,沉积物样品组成成分复杂,沉积物中的含钙物质等会产生自发荧光,对FISH的结果产生影响。本试验在多聚甲醛固定后,添加了0.2 mol/L HCl处理的步骤,可以有效去除样品中碳酸钙等物质,消除部分自发荧光的发生,减小背景值。此外,利用DAPI与DNA双链凹槽处特异性结合后在紫外光下发出蓝紫色荧光的特性,探针杂交后对样品进行DAPI染色,然后进行镜检,一些沉积物中自发荧光的物质经DAPI染色后无荧光产生,但微生物却有荧光,从而进一步控制假阳性的产生。

杂交反应的时间也会对FISH的结果产生影响,杂交时间过短会造成杂交不完全,杂交时间过长会增加非特异性着色,本文中的杂交时间为1.5-3.0 h。

同时, 盐浓度过高或过低也会对杂交结果造成影响, 洗脱液中 NaCl 的浓度根据杂交缓冲液中去离子甲酰胺含量的不同而有所变化, 因此对于每种探针, 选取了与文献报道相近的 3 个不同 NaCl 浓度进行条件优化, 并最终确定了本试验所采用的浓度。

## 2.2 FISH 检测结果及分析

FISH 技术基于碱基互补的原则, 利用荧光素标记的探针与待测核酸序列进行专一性结合, 通过检测荧光来显示特定核酸序列的存在、数目和定位。采用表 1、表 2 所列探针分别与两采样点不同深度的样品进行杂交, 检测不同微生物种群的数量及分布情况。

表 1 探针杂交缓冲液成分  
Table 1 Ingredient of hybridization buffer

探针 Probe	去离子甲酰胺 DAF (%)	SDS (%)	Tris-HCl (pH 8.0) (mmol/L)	NaCl (mol/L)
NIT3	40	0.01	20	0.9
CNIT3	40	0.01	20	0.9
NSO190	55	0.01	20	0.9
CREN537	20	0.01	20	0.9
ALF1b	40	0.01	20	0.9
BET42a	35	0.01	20	0.9
GAM42a	40	0.01	20	0.9
ARCH915	35	0.01	20	0.9

表 2 探针杂交洗脱液成分  
Table 2 Ingredient of washing buffer

探针 Probe	SDS (%)	EDTA (pH8.0) (mmol/L)	Tris-HCl (pH8.0) (mmol/L)	NaCl (mmol/L)
NIT3	0.01	5	20	56
CNIT3	0.01	5	20	56
NSO190	0.01	5	20	40
CREN537	0.01	5	20	147
ALF1b	0.01	5	20	60
BET42a	0.01	5	20	80
GAM42a	0.01	5	20	60
ARCH915	0.01	5	20	80

**2.2.1 梅梁湾和贡湖湾沉积物中总菌数及古菌数分析:** 由图 1 看出, 在梅梁湾和贡湖湾沉积物样品中, 古菌均广泛存在, 且其数量约占总菌数的 15%–20% 左右。随着深度增加, 古菌数量逐渐减少, 但在总菌数中所占比例有所增加。这是由于随深度增加, 氧

化还原电位降低, 环境趋向厌氧, 而很多古菌能够生长在如高温、厌氧等相对恶劣的生境中<sup>[13]</sup>, 因此, 在厌氧的环境下, 古菌较细菌更易生存。沉积物中总菌数及古菌数量都随深度增加而减少, 但在贡湖湾其减少的趋势比在梅梁湾平缓得多, 同时发现, 表层 7 cm 左右, 梅梁湾沉积物中的古菌所占比例高于贡湖湾。这可能是由于两采样点沉积物不同理化性质所致, 梅梁湾是典型富营养化湖区, Eh 随沉积深度增加急剧下降, 环境迅速趋于厌氧, 贡湖湾是草藻过渡型湖区, Eh 高于梅梁湾<sup>[14]</sup>, 且采样点有较高的水生植被覆盖率, 水生植物能够将氧输送到根部, 提高根系周围的 Eh 及氧含量, 同时还能释放有机碳<sup>[15]</sup>, 在一定程度上缓解了厌氧环境对微生物造成的压力。

**2.2.2 梅梁湾和贡湖湾变形菌分布分析:** 变形菌门 (Proteobacteria) 是细菌中最大的一门, 包含多种代谢种类, 大多数细菌营兼性或者专性厌氧及异养生活, 但也有很多例外。现今内陆发现的亚硝化细菌大多属于变形菌纲的  $\beta$  亚纲, 而海洋中发现的则属于变形菌纲的  $\beta$  亚纲和  $\gamma$  亚纲。亚硝酸氧化细菌主要有硝化杆菌属、硝化刺菌属和硝化球菌属, 其中前者属于变形菌  $\alpha$  亚纲, 后两者属于变形菌的  $\gamma$  亚纲和  $\delta$  亚纲<sup>[16]</sup>。

由图 2 看出, 变形菌  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  亚纲在沉积物中广泛存在, 其中以  $\beta$  亚纲所占比例最大。 $\beta$ -变形菌数量随深度的变化趋势在梅梁湾与总菌数的变化相似, 在贡湖湾沉积物 6.5 cm 以下减少趋势则更平缓些。在梅梁湾沉积物中, 4.5 cm 以上  $\alpha$ -变形菌的数量高于  $\gamma$ -变形菌, 但在 4.5 cm 以下至 15 cm,  $\gamma$ -变形菌的数量开始超过  $\alpha$ -变形菌, 而在贡湖湾, 两者的比例随深度增加无巨大变化。原因可能在于梅梁湾沉积物有机质含量丰富, 降解消耗大量氧, 随沉积深度增加迅速趋于厌氧环境,  $\gamma$ -变形菌在趋于厌氧的环境中适应能力比较强<sup>[17]</sup>, 随深度增加减少得很缓慢, 以致在 4.5 cm 以下超过了  $\alpha$ -变形菌的数量; 在贡湖湾, 由于其富营养化水平低于梅梁湾, 且有水生植物的存在,  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  3 个亚纲的菌数随深度减少得比较平缓, 之间比例也未发生巨大变化。

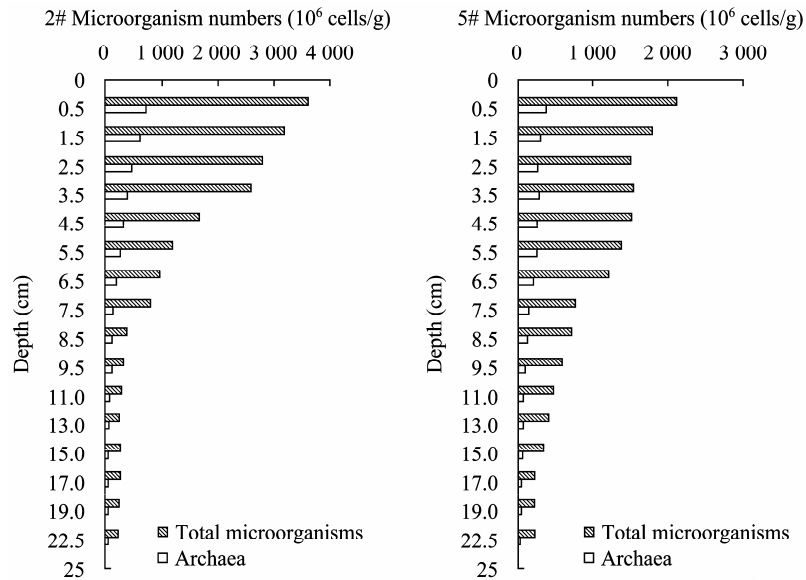


图 1 梅梁湾和贡湖湾沉积物中总菌数与古菌分布

Fig. 1 Total amount of bacteria and archaea in sediments of Meiliang Bay and Gonghu Bay

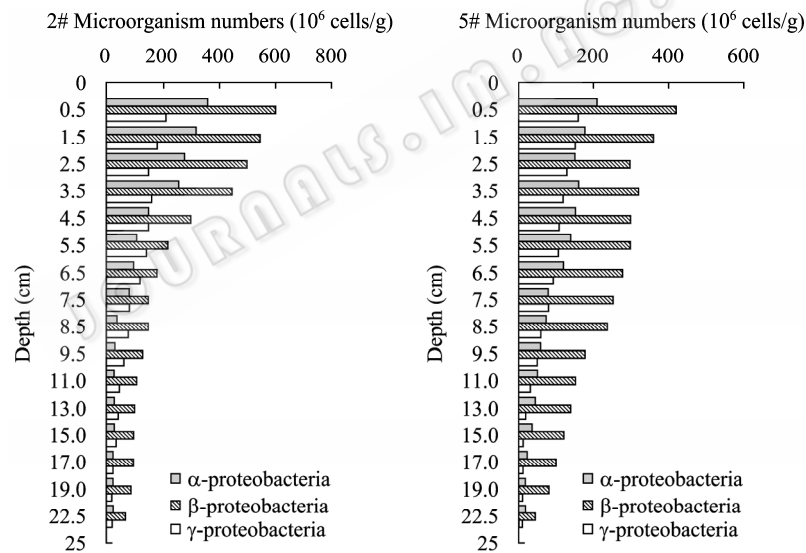


图 2 梅梁湾与贡湖湾沉积物中变形菌  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  亚纲细菌分布

Fig. 2 Amount of  $\alpha$ -,  $\beta$ -and  $\gamma$ -proteobacteria in sediments of Meiliang Bay and Gonghu Bay

**2.2.3 梅梁湾和贡湖湾氨氧化细菌、亚硝酸氧化细菌及泉古菌数量分析:** 对沉积物中氨氧化细菌、亚硝酸氧化细菌和泉古菌的分析(图 3)可以看出, 梅梁湾氨氧化细菌及亚硝酸氧化细菌的数量均高于贡湖湾, 这是由于梅梁湾有机质含量高于贡湖湾<sup>[14]</sup>, 在好氧分解菌的作用下产生大量的氨氮, 为氨氧化细菌提供了丰富的底物, 而在氨氧化细菌的作用下,

氨氮转化为亚硝态氮, 又为亚硝酸氧化细菌提供了底物, 因此, 亚硝酸氧化细菌的总量也高于贡湖湾。但其在贡湖湾占总菌数的比例却高于梅梁湾, 这是由于贡湖湾水质相对较好, 污染较轻, Eh 高于梅梁湾<sup>[14]</sup>, 有利于硝化细菌的生存。随沉积深度增加, 亚硝酸氧化细菌和氨氧化细菌数量均逐渐减少, 但在贡湖湾两者减少的趋势均比在梅梁湾平缓。这

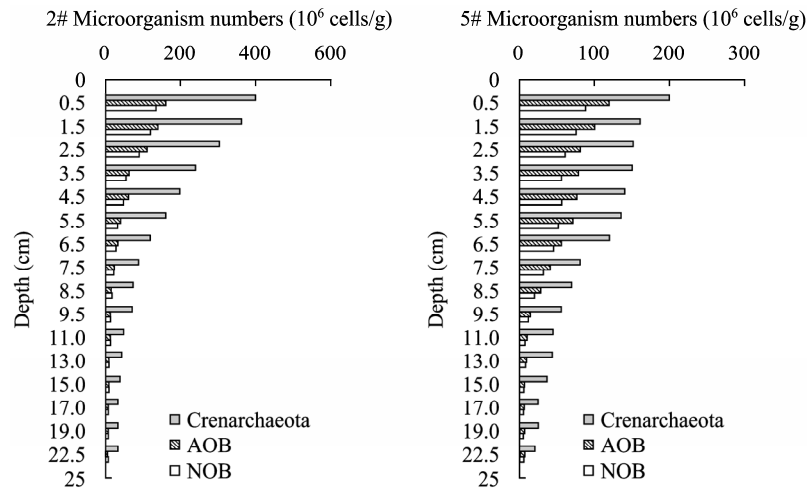


图 3 梅梁湾与贡湖湾沉积物中氨氧化细菌、亚硝酸氧化细菌及泉古菌数量

Fig. 3 Amount of AOB, NOB and Crenarchaeota in sediments of Meiliang Bay and Gonghu Bay

是由于亚硝化和硝化过程主要发生在好氧环境中, 随深度增加, 沉积物趋向于厌氧, 抑制了亚硝化及亚硝酸氧化细菌的生长及硝化作用的进行, 而贡湖湾水生植物丰富, 水生植物根系能促进硝化细菌的数量和活性<sup>[9]</sup>, 我们的结果也表明水生植物的存在对湖泊沉积物中氮的循环转化有重要影响。

由图 3 看出, 泉古菌在沉积物中普遍存在, 且数量高于氨氧化细菌。环境基因组学研究发现泉古菌含有氨氧化关键功能基因(*amoA*), 纯培养研究则清楚证实了泉古菌的氨氧化潜力<sup>[18]</sup>。太湖沉积物样品中, 泉古菌数量普遍高于氨氧化细菌, 由于氨氧化过程是硝化过程的限速步骤, 说明在太湖沉积物氮循环过程中, 泉古菌可能起着重要作用。但目前关于 AOA 和 AOB 对硝化作用的相对贡献评价不一, 有研究表明, 在农田土壤中 AOB 是氨氧化过程的主要作用者<sup>[19]</sup>, 而在海洋环境中, AOA 是氨氧化过程的重要驱动者, Martens-Habben 等<sup>[20]</sup>通过分析 *Nitrosopumilus maritimus* SCM1 的氨氧化动力学特性, 发现这株 AOA 具有极高的底物亲和力,  $K_m$  值仅为  $0.133 \mu\text{mol/L}$ , 远低于已知最低的硝化细菌  $K_m$  值 ( $1.9\text{--}4.2 \mu\text{mol/L}$ ), 表明古菌对氨态氮的氧化具有较高的竞争优势, 在原位海洋氨氧化过程中发挥着重要作用。目前涉及淡水生态系统中 AOA 的研究还较少, 对其在湖泊尤其是富营养化湖泊的氮循环中所发挥的作用尚缺乏全面的认识。本文研究结果

表明, 氨氧化古菌在太湖沉积物中普遍存在, 可能对沉积物中的氮循环具有重要的作用, 但还需进一步研究。

## 参考文献

- [1] Leininger S, Urich T, Schloter M, et al. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils[J]. *Nature*, 2006, 442(7104): 806–809.
- [2] Adair KL, Schwartz E. Evidence that ammonia-oxidizing archaea are more abundant than ammonia-oxidizing bacteria in semiarid soils of Northern Arizona, USA[J]. *Microb Ecol*, 2008, 56(3): 420–426.
- [3] Bernhard AE, Landry ZC, Blevins A, et al. Abundance of ammonia-oxidizing archaea and bacteria along an estuarine salinity gradient in relation to potential nitrification rates[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(4): 1285–1289.
- [4] Wuchter C, Abbas B, Coolen MJL, et al. Archaeal nitrification in the ocean[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2006, 103(33): 12317–12322.
- [5] Beman JM, Kathryn JR, Wegley L, et al. Distribution and diversity of archaeal ammonia monooxygenase genes associated with corals[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(17): 5642–5647.
- [6] Shen JP, Zhang LM, Zhu YG, et al. Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam[J]. *Environ Microbiol*, 2008, 10(6): 1601–1611.
- [7] van der Wielen PWJJ, Voost S, van der Kooij D. Ammonia-oxidizing bacteria and archaea in groundwater treatment

- and drinking water distribution systems[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(14): 4687–4695.
- [8] Ewel JJ. Restoration is the ultimate test of ecology theory[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1987: 31–33.
- [9] Bodelier PLE, Libochant JA, Laanbroek HJ, et al. Dynamics of nitrification and denitrification in root- oxygenated sediments and adaptation of ammonia-oxidizing bacteria to low-oxygen or anoxic habitats[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(11): 4100–4107.
- [10] Schramm A, De Beer D, Gieseke A, et al. Microenvironments and distribution of nitrifying bacteria in a membrane-bound biofilm[J]. *Environ Microbiol*, 2000, 2(6): 680–686.
- [11] Pichon D, Gaia V, Norman MD, et al. Phylogenetic diversity of epibiotic bacteria in the accessory nidamental glands of squids (Cephalopoda: Loliginidae and Idiosepiidae)[J]. *Marine Biology*, 2005, 147(6): 1323–1332.
- [12] Teira E, Reinthaler T, Pernthaler A, et al. Combining catalyzed reporter deposition-fluorescence in situ hybridization and microautoradiography to detect substrate utilization by bacteria and archaea in the deep ocean[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(7): 4411–4414.
- [13] Schleper C, Jurgens G, Jonuscheit M. Genomic studies of uncultivated archaea[J]. *Nature Rev Microbiol*, 2005, 3: 479–488.
- [14] 赵兴青, 杨柳燕, 尹大强, 等. 不同空间位点沉积物理化性质与微生物多样性垂向分布规律[J]. *环境科学*, 2008, 29(12): 3537–3545.
- [15] Karjalainen H, Stefansdottir G, Tuominen L, et al. Do submersed plants enhance microbial activity in sediment[J]? *Aquat Bot*, 2001, 69(1): 1–13.
- [16] 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.
- [17] Ravcheev DA, Gerasimova AV, Mironov AA, et al. Comparative genomic analysis of regulation of anaerobic respiration in ten genomes from three families of gamma-proteobacteria (Enterobacteriaceae, Pasteurellaceae, Vibrionaceae)[J]. *BMC Genomics*, 2007, 8: 54.
- [18] 贾仲君, 翁佳华, 林先贵, 等. 氨氧化古菌的生态学研究进展[J]. *微生物学报*, 2010, 50(4): 431–437.
- [19] Jia ZJ, Conrad R. Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil[J]. *Environ Microbiol*, 2009, 11(7): 1658–1671.
- [20] Martens-Habbena W, Berube PM, Urakawa H, et al. Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria[J]. *Nature*, 2009, 461(7266): 976–979.

## 书 讯

### 父亲和我们

——纪念中国首批青霉素的研制者和命名者樊庆笙教授百年诞辰

本书作者樊真美以女儿的视角叙述了父亲坎坷的不平凡的一生,也记录了儿女们受父母的影响和教育曲折的成长过程。凸显了父亲这样一个老一代知识分子赤诚的爱国之心,为实现强国梦付出毕生心血的奉献精神 and 历经磨难的不屈不挠的奋斗精神。

本书由北京时代文献出版社出版。

定价: 38 元

邮费: 1 本 5.5 元, 2 本 7 元, 3 本 9 元(一律加挂号费 3 元)

需购者请与作者樊真美联系。

地址: 南京嫩江路 20 号四季园 23 号 402 室

邮编: 210036

电话: 010-83418856