

文章编号:1000-0615(2007)05-0692-07

· 研究简报 ·

凡纳滨对虾养殖池水中氨化细菌的鉴定及系统发育分析

张庆华¹, 戴习林¹, 李 怡², 赵 勇³,
曾胡龙¹, 张军玉¹, 潘迎捷³

(1. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090;

2. 上海水产大学农业部渔业动植物病原库, 上海 200090;

3. 上海水产大学食品学院, 上海 200090)

关键词: 凡纳滨对虾; 氨化细菌; 16S rDNA; PCR; 序列分析; 鉴定; 系统发育

中图分类号: S 941.42

文献标识码: A

Identification and phylogenesis of ammonifying bacteria from pond water of *Litopenaeus vannamei*

ZHANG Qing-hua¹, DAI Xi-lin¹, LI Yi², ZHAO Yong³,
ZENG Hu-long¹, ZHANG Jun-yu¹, PAN Ying-jie³

(1. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;

2. Aquatic Pathogen Collection Center of the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;

3. College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: So far studies have focused on bacteria isolation aimed at establishing causes of fish diseases and medication methods. Now, more and more attention has been given to the composition of the microflora, its variations in time, and effect on whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). This is why the problem of bacterial flora in water ought to be studied. The major role of ammonifying bacteria is to break down nitrogenous organic matter to ammoniac nitrogen. The research of ammonifiers in the pond water of *Litopenaeus vannamei* is increasing with the demand for environment friendly aquaculture. Four bacterial strains (No. zjs01, zjs02, zjs03 and zjs04), isolated from the pond water of *Litopenaeus vannamei* in Jinshan district of Shanghai, were cultured in ammonifying bacteria rich medium and identified by two methods. One is the sequence analysis of 16S rDNA, the other is bacteria identification system. First, sequence analysis of the 16S rDNA was done. Genomic DNA of four strains was isolated respectively, then their full length of the 16S rDNA were amplified by PCR respectively, using universal primers to the 16S rDNA. After purification by gel extraction, the PCR products were cloned and subsequently sequenced by Shanghai Invitrogen Biotechnology Company (SIBC). The phylogenetic trees were constructed, based on the result

收稿日期: 2006-09-19

资助项目: 上海市科技兴农重点攻关项目[沪农科攻字(2005)第4-2号]; 上海水产大学重点学科建设专项科研项目(03SC12); 上海市教委青年基金项目(04KC13); 上海市重点学科建设项目(Y1101); 上海高校优秀青年教师后备人选项目资助

作者简介: 张庆华(1972-), 女, 河北沧州人, 副教授, 主要从事水产动物疾病的研究。Tel: 021-65710526, E-mail: qhzhang@shfu.edu.cn

通讯作者: 潘迎捷, Tel: 021-65710860, E-mail: yjpan@shfu.edu.cn

of online alignment. At the same time, the four sequences of 16S rDNA were submitted to NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) in order to obtain accession number of strains of zjs01, zjs02, zjs03 and zjs04. Then the API 2000 Bacteria Identification System (Biomerieux Company) was applied in assessment the identification result of zjs01, zjs02, zjs03 and zjs04 by molecular method. Finally the 4 strains were identified as, zjs01: *Brevundimonas diminuta*, zjs02 and zjs03: *Alcaligenes faecalis*, zjs04: *Enterobacter aerogenes*. And the accession number of the strains (zjs01, zjs02, zjs03 and zjs04) is DQ857897, DQ857898, DQ857895, DQ857896 respectively. The method of detecting bacterial 16S rDNA using PCR technique is specific, sensitive, rapid and accurate in detecting bacterium in culture pond. Also an interesting thing should be indicated, it is absolutely necessary that the 16S rDNA PCR products should be cloned before DNA sequencing. This paper will establish theory groundwork for application of ammonifiers microbiological preparation to bioremediation of the polluted culture water.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; ammonifying bacteria; 16S rDNA; PCR; sequence analysis; identification; phylogenesis

2004年上海地区凡纳滨对虾养殖业遭受到了毁灭性的病害冲击。杨先乐等^[1]认为2004年上海及周边地区凡纳滨对虾病害暴发流行的病原较为复杂,有可能是原来所发现的病毒,也可能是变异株或新的病原体,还可能是多种病原的混合感染。虽然目前凡纳滨对虾的疾病主要表现为病毒性疾病,但病毒与细菌混合感染的情况也不可忽略。以往我们主要关注病原的分离及防治方法的研究,而未注意到养殖环境中微生物区系组成的变化时刻影响养殖对象的健康状况^[2]。所以细菌在养殖水体中所扮演的角色鲜为人知,进一步研究水体细菌的种类、数量和养殖对象发病之间的关系具有重要意义。

在养殖水体中,由于高蛋白的残饵不能及时清除,造成氮污染日趋严重,破坏了生态平衡。氮的自净主要由氮循环系统来实现。氮循环包括生物固氮、氨化、硝化、反硝化及同化等作用,其中氨化细菌的氨化作用十分重要^[3-4]。氨化细菌是一类将含氮有机物通过氧化、水解、还原作用释放出氨气的细菌总称,属于异养细菌。氨化细菌是有机物质无机化的主要生理类群,在养鱼塘中,它与溶解氧高度相关^[5]。因此,分离鉴定出高代谢活性的氨化细菌类群制成微生物制剂,用于污染养殖环境的生物修复,将是今后的一个重要研究方向^[6]。

最近,国内外已有学者研究了氮循环细菌对水体的环境及养殖对象的影响,如刘东山等^[7]分析了东湖氨化细菌、反硝化细菌、硝化和亚硝化细菌的分布及其作用,涉及的养殖种类有沙蚕^[6]、

牙鲆^[8-9]、贝类^[10-11]、欧白鲑^[2]。宛立等^[12]采用平板分离和常规鉴定方法对凡纳滨对虾肠道细菌的菌群组成进行了分析。本研究用16S rDNA序列分析和细菌鉴定系统两种方法对凡纳滨对虾养殖塘水体中分离的氨化细菌进行种类鉴定,为进一步将其制成微生物制剂,用于污染养殖环境的生物修复奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

λ DNA/*Hind* III、100 bp DNA Ladder VII、引物合成(27f、1492r)(上海鼎国生物技术有限责任公司),小量细菌基因组 DNA 快速抽提纯化试剂盒(W6511)(上海华舜生物工程有限公司),PCR 扩增试剂盒(SK2492)、UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒(SK1132)(上海生工生物工程技术有限公司),EPS-300A 电泳仪(上海伯奥生物科技有限公司 C0030),Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems),API 2000 细菌鉴定系统(法国生物梅里埃公司),其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 氨化细菌的分离纯化

用无菌试管自上海金山室内集约化凡纳滨对虾健康成虾养殖池(6.25 m × 2.90 m × 1.28 m,水深0.90 m,pH 8.06~8.80,水温25~33℃)采集1 mL水样接种到含9 mL灭菌氨化细菌液体培养基^[13]的试管中,30℃,1~2周进行氨化细菌的富集培养。然后取菌液接种到氨化细菌固体平板上进行涂布分离。30℃经过3~7 d培养,待固

体平板上长出菌落后初步选择菌落特征(颜色、大小、透明度、边缘形态、表面光泽度、表面凹凸情况等)差异较大,且为优势生长的氨化细菌进一步纯化,如此反复几次,便可以得到纯种。4℃冰箱保存待鉴定。

1.3 细菌的分子鉴定

菌株的 16S rDNA 提取、核酸序列存取号(accession number)及比对、序列分析及数据处理参照张庆华等^[14]的方法进行,略有改动。PCR 产物割胶回收后交由上海英骏生物技术有限公司(SIBC)先进行 DNA 克隆,再由 3730 全自动 DNA 测序仪进行测序。

1.4 细菌的 API 表型鉴定

先将菌株进行革兰氏染色以及氧化酶试验,根据结果选择细菌鉴定系统的反应板。按说明书要求操作,挑单菌落调成 0.5 麦氏浊度。用无菌注射器将 zjs01, zjs02, zjs03 加入 ID 32 GN 试条,用费氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)作为对照菌株,将 zjs04 加入 ID 32 E 试条,用大肠杆菌(*Escherichia coli*)作为对照菌株。35℃ 孵育 18~24 h 后,在 API 鉴定系统上判读结果,获取系统报告。

2 结果

2.1 细菌分离纯化结果

共获得 4 种优势氨化细菌,编号为 zjs01, zjs02, zjs03 和 zjs04。在氨化细菌培养基上 30℃, 48 h 的菌落特征是: zjs01 菌落较小(1 mm 左右),淡黄色,湿润,有光泽,边缘圆整; zjs02 和 zjs03 的菌落与 zjs01 相似,只是生长速度较快; zjs04 的菌落较大(2 mm 左右),浅奶白色,湿润,有光泽,边缘圆整,生长速度较快,挑起时呈粘丝状,鼻涕状。

2.2 细菌基因 DNA 提取与 16S rRNA 基因的 PCR 扩增

经与 λ DNA/*Hind* III Marker 比对,可以确定位于 DNA Marker 23 130 bp 附近的 4 条亮带是菌株 zjs01~zjs04 的基因组 DNA 片段(图 1)。经与 Marker 比对,PCR 扩增产物(即 16S rDNA)片段大小约为 1 500 bp(图 2)。胶回收纯化后的 PCR 产物在 0.8% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检验,电泳条带单一清晰,回收效果很好。

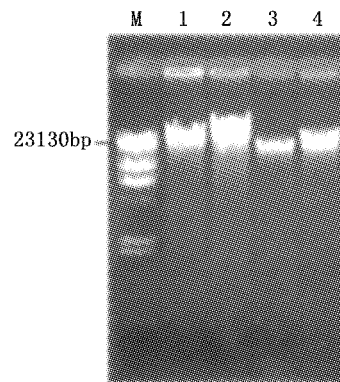


图 1 4 种细菌的总 DNA 电泳图

Fig. 1 Electrophoresis profile of total DNA of 4 strains

1. zjs01, 2. zjs02, 3. zjs03, 4. zjs04, M. Marker

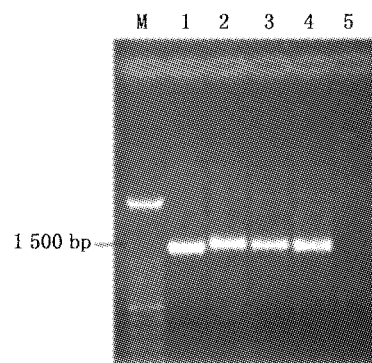


图 2 4 种细菌的 16S rDNA 电泳图

Fig. 2 Electrophoresis profile of 16S rDNA of 4 strains

1. zjs01, 2. zjs02, 3. zjs03, 4. zjs04, M. Marker

2.3 DNA 测序和进化树分析

经测定 zjs01, zjs02, zjs03 和 zjs04 菌株的 16S rDNA 片段大小分别为 1424 bp, 1500 bp, 1500 bp 和 1501 bp。GenBank 中注册序列号分别为: DQ857897, DQ857898, DQ857895, DQ857896。4 株细菌的 16S rDNA 全序列分别在 NCBI 网上(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)进行 BLAST, 共获得 28 条相似性较高的参考株序列, 使用 BioEdit7.0.5 和 MEGA 3 软件, 制作成进化树(图 3), 确定了 4 株细菌的分类地位。

网上比对结果是 zjs01 与缺陷短波单胞菌参考株(*Brevundimonas diminuta*, X87274)的亲缘关系最近, 两者的相似性最高达 99.79%。zjs02 和 zjs03 与粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*, AF155147)亲缘关系最近, 发现其相似性分别为 99.87% 和 99.73%。对 zjs02 和 zjs03 进行单核

苷酸比对,发现它们的 16S rDNA 序列长度相同,均为 1 500 bp,核苷酸序列有 6 个碱基不同,分别在第 456,466,683,941,1001,1016 位碱基上,相似性为 99.60%。zjs02 菌株在上述位点的碱基分别为:C,G,G,T,G,C。zjs03 菌株在上述位点的

碱基分别为:T,A,A,C,C,G。zjs04 与产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes* NCTC10006T) (AJ251468)的亲缘关系最近,两者的相似性最高为 99.39% (图 3)。

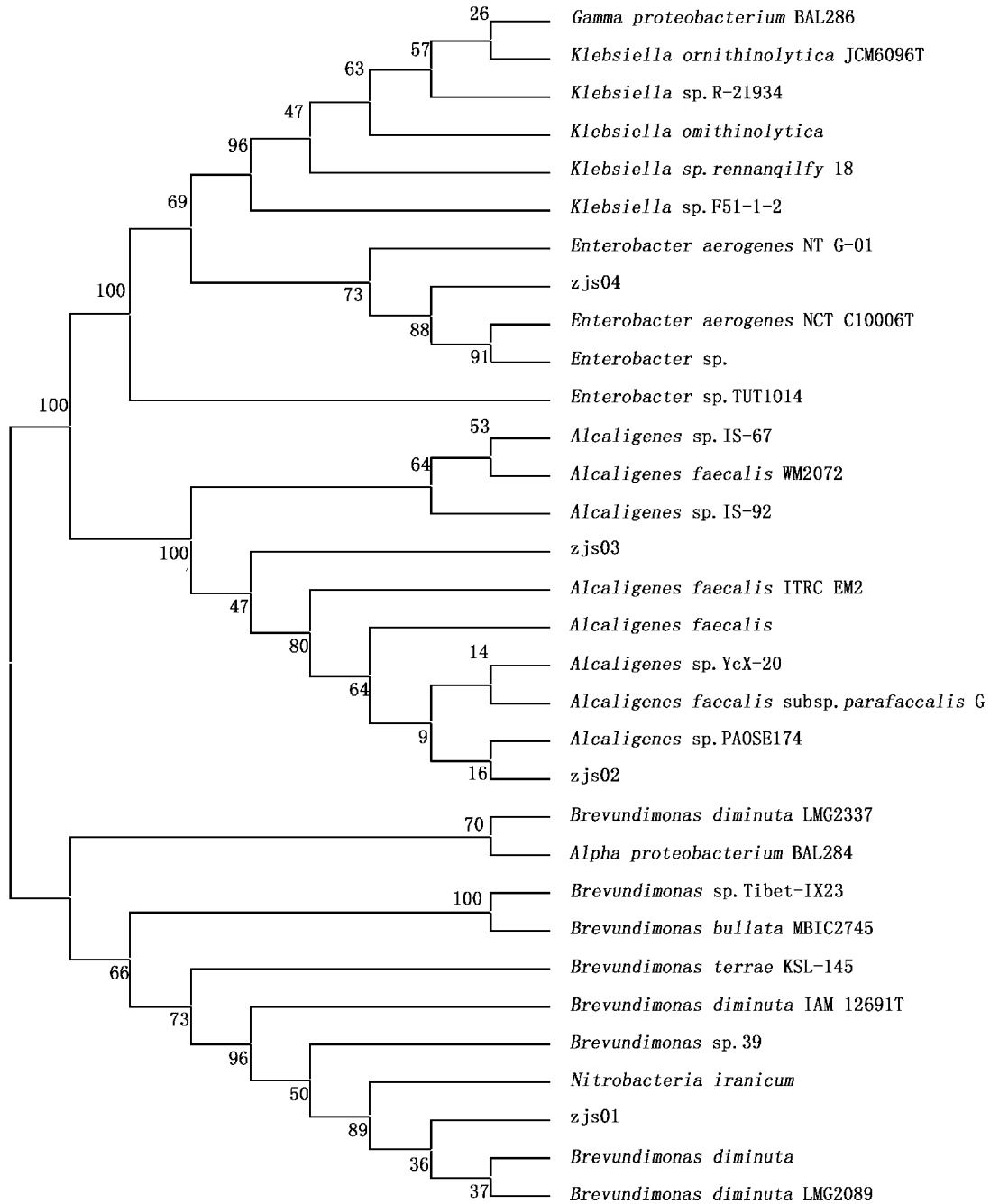


图 3 zjs01 ~ zjs04 与 28 个参考株构建的 16S rDNA 系统进化树

Fig. 3 The 16S rDNA phylogenetic tree of 28 validly described bacteria and zjs01 – zjs04

2.4 细菌 API 表型鉴定结果

zjs01 ~ zjs04 菌株的革兰氏染色结果均为阴性,氧化酶除 zjs04 菌株外,其它均为阳性(表 1)。从细菌鉴定系统报告(表 2)可以看出,zjs01 ~ zjs04 菌株分别为:缺陷短波单胞菌 (*Brevundimonas diminuta*),粪产碱杆菌

(*Alcaligenes faecalis*),粪产碱杆菌 (*Alcaligenes faecalis*),产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*),符合率分别为:99.6%,96.8%,99.4%,97.9%,这与 16S rDNA 序列分析的分子鉴定结果完全一致。

表 1 4 株细菌的革兰氏染色及氧化酶试验结果

Tab.1 Result of Gram stain and oxidase test of the 4 strains

菌株	strain	zjs01	zjs02	zjs03	zjs04
革兰氏染色	Gram stain	-	-	-	-
氧化酶	oxidase test	+	+	+	-

表 2 API 2000 细菌鉴定系统报告

Tab.2 Reports of API 2000 bacteria identification system for the Gram negative strains

试条编码 ID 32 GN V3.0 number of test plate ID 32 GN V3.0					试条编码 ID 32E V2.0 number of test plate ID 32E V2.0		
鉴定项目 identification item	费氏柠檬酸杆菌 <i>Citrobacter freundii</i>	zjs01	zjs02	zjs03	鉴定项目 identification item	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	zjs04
鼠李糖 RHA	+	-	-	-	鼠李糖 RHA	+	+
蔗糖 SAC	+	-	-	-	蔗糖 SAC	-	+
麦芽糖 MAL	+	-	-	-	麦芽糖 MAL	+	+
甘露醇 MAN	+	-	-	-	甘露醇 MAN	+	+
肌醇 INO	-	-	-	-	肌醇 INO	-	+
5-酮基-葡萄糖酸盐 5KG	+	-	-	-	5-酮基-葡萄糖酸盐 5KG	-	-
D-核糖 RIB	+	-	-	-	葡萄糖 GLU	+	+
D-葡萄糖 GLU	+	-	-	-	α-葡萄糖 α-GLU	-	-
D-蜜二糖 MEL	+	-	-	-	海藻糖 TRE	+	+
L-岩藻糖 FUC	+	-	-	-	纤维二糖 CEL	-	+
L-阿拉伯糖 ARA	+	-	-	-	L-阿拉伯糖 LARA	+	+
糖原 GLYG	-	-	?	-	山梨醇 SOR	+	+
D-山梨醇 SOR	+	-	-	-	D-阿拉伯糖醇 DARL	-	+
L-脯氨酸 PRO	+	-	+	+	侧金盏花醇 ADO	-	+
L-丙氨酸 ALA	+	-	+	+	L-阿拉伯糖醇 LARL	-	-
水杨酸 SAL	-	-	-	-	丙二酸 MNT	-	+
意康酸 ITA	-	-	-	-	α-麦芽糖甙酶 α-MAL	-	-
组氨酸 HIS	-	+	?	+	酚红 RP	+	+
L-丝氨酸 SER	+	-	-	-	吲哚 IND	+	-
乙酸盐 ACE	+	?	+	+	脲酶 URE	-	-
癸酸盐 CAP	-	-	+	+	脂肪酶 LIP	-	-
戊酸盐 VALT	-	-	+	+	α-半乳糖甙酶 α-GAL	+	+
柠檬酸盐 CIT	+	-	+	+	β-乳糖甙酶 β-GAL	+	+
3-羟基-苯甲酸盐 mOBE	+	-	-	-	β-葡萄糖酸酶 β-GUR	+	-
2-酮葡萄糖酸盐 2KG	+	-	?	-	N-乙酰-β-葡萄糖甙酶 β-NAG	-	+
3-羟基-丁酸盐 3OBU	+	+	+	+	β-葡萄糖甙酶 β-GLU	-	+
4-羟基-苯甲酸盐 pOBE	-	-	+	+	L-天门冬素芳胺酶 ASPA	-	-
辛二酸盐 SUB	-	-	-	-	猪肝酯酶 PLE	-	+

· 续表 2 ·

试条编码 ID 32 GN V3.0 number of test plate ID 32 GN V3.0					试条编码 ID 32E V2.0 number of test plate ID 32E V2.0		
鉴定项目 identification item	费氏柠檬酸杆菌 <i>Citrobacter freundii</i>	zjs01	zjs02	zjs03	鉴定项目 identification item	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	zjs04
丙二酸盐 MNT	-	-	+	+	鸟氨酸脱羧酶 ODC	+	+
DL-乳酸盐 LAT	+	-	+	+	精氨酸双水解酶 ADH	-	-
N-乙酰葡萄糖胺 NAG	+	-	-	-	赖氨酸脱羧酶 LDC	+	+
丙酸盐 PROP	+	+	+	+	半乳糖酸盐 GAT	+	+
鉴定(%)ID	99.8	99.6	96.8	99.8	鉴定(%)ID	100	98.6
结果 result	费氏柠檬酸杆菌 <i>Citrobacter freundii</i>	缺陷短波单胞菌 <i>Brundimonas diminuta</i>	粪产碱杆菌 <i>Alcaligenes faecalis</i>	粪产碱杆菌 <i>Alcaligenes faecalis</i>	结果 result	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	产气肠杆菌 <i>Enterobacter aerogenes</i>

注: -, 阴性反应; +, 阳性反应; ?, 反应不定; ID ≥ 99.9, 为极好的鉴定; 99.8 ≤ ID ≤ 99.0, 为很好的鉴定; 90.9 ≤ ID ≤ 98.9, 为好的鉴定; 80.0 ≤ ID ≤ 89.9, 为可接受的鉴定; ID < 80 为低分辨率

Notes: -, negative; +, positive; d, variable; ID ≥ 99.9, excellent identification; 99.8 ≤ ID ≤ 99.0, very good identification; 90.9 ≤ ID ≤ 98.9, good identification; 80.0 ≤ ID ≤ 89.9, acceptable identification; ID < 80, unacceptable identification

3 讨论

现代细菌学大都采用多相分析对细菌作鉴定,实际常用细菌的基因型特征结合表型特征进行分类,公认的方法是依据细菌 16S rRNA 序列进行分类。到目前为止,GenBank 上可获得的细菌 16S rRNA 序列达 273 300 多条,而且每月都在更新,故数据库越来越强大。一般认为,全序列相似性在 99% ~ 100% 的细菌,判定为同一个种,相似性 97% ~ 99% 定为同一个属^[15-16]。在表型方面要测定一些重要的形态和生理生化特性,API (analytic products INC) 细菌鉴定系统是一种生化系统,是法国梅里埃公司推出的微生物快速鉴定系统,可鉴定的细菌近 600 种,为国际微生物学所公认的快速鉴定系统。API 系统对各种菌群设计了 15 个鉴定系列,涵盖了传统的生化实验,因此与传统手工实验相比较,实验更全面、结果更准确,因具有简易化、微量化、快速化、电脑化的优点,在国内也是应用最多的一个系统。随着被微生物学者的广泛应用,法国梅里埃 API 系列已成为国际上公认的鉴定细菌表型的参考标准。解决了人员少、工作量大这一难题,减少了中间环节,避免了实验的盲目性,减少了实验的摸索过程,同时大大避免了室内感染。当然由于各种原因,也会出现不能鉴定 (unidentification) 问题^[17]。因此,结合 16S rRNA 序列分析和 API 细菌鉴定系统对于有条件的单位而言,是准确、快速鉴定细菌的首选方法。本研究将分离纯化的 4 株氨化细菌

进行了 16S rRNA 序列和 API 系统鉴定,并都得到了是一致的可靠结果,为进一步深入研究其氨化效果提供了良好的实验菌株。

采用益生菌类生物制剂虽然有利于养殖生产和养殖环境的生态平衡,但是这些菌群对环境生态安全性的影响也不容忽视。王亚南等^[18]对近海养殖场底泥细菌的研究,发现来源于陆生的芽孢杆菌属细菌在养殖池底泥中占优势地位,并造成了多量氨、亚硝酸盐和 H₂S 的产生,给养殖环境的元素循环带来压力。因此,从保证养殖产品品质、养殖环境的生态平衡,以及环境的可持续性发展等方面考虑,应在池塘养殖环境的土著菌群中筛选具有益生作用的菌株,开发养殖环境中生长的益生菌剂,并对其在环境中的功能、作用及生物安全性等方面进行全面的,以防止应用中出现于此有益,于彼无益或有害的现象发生。

本研究从凡纳滨对虾健康养殖塘中所分离得到的 4 株 3 种氨化细菌,为来源于养殖环境的土著菌,其应用不会对环境造成二次污染。但其降解有机物,调节水质的效果,有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 杨先乐,郑宗林. 南美白对虾病害流行的新动向及其思考[J]. 淡水渔业, 2005, 35(3): 3-6.
- [2] Zmystowska I, Lewandowska D, Nowakowski T, et al. Occurrence of bacteria in water and in vendace (*Coregonus albula*) during rearing in tanks [J]. Polish Journal of Environmental Studies, 2001,

- 10(1):51-56.
- [3] Matulewich V A, Finstem M S. Distribution of autotrophic nitrifying bacteria in a polluted river(the Passaic) [J]. Appl Environ Micmbiol, 1978, 35(1):67-71.
- [4] Northup R R, Yu Z, Dahlgren R A, *et al.* Polyphenol control of nitrogen release from pine litter[J]. Nature, 1995, 377(2):227-229.
- [5] X Jun, F Xiuzheng, Y Tongbing. Physico-chemical factors and bacteria in fish ponds [J]. Naga, The ICLARM Quarterly, 2000, 23(4):16-20.
- [6] 马悦欣, 邵华, 周一兵, 等. 沙蚕闭合循环式养殖系统中细菌的数量及其代谢活性[J]. 大连水产学院学报, 2005, 20(3):174-180.
- [7] 刘东山, 罗启芳. 东湖氮循环细菌分布及其作用[J]. 环境科学, 2002, 23(3):29-35.
- [8] 马悦欣, 洪明煜, 何洁, 等. 牙鲆自净式水槽氨化细菌数量及氨化速率[J]. 中国水产科学, 2000, 7(3):115-116.
- [9] 马悦欣, 许兵玲, 何洁, 等. 牙鲆自净式养殖槽中异养细菌和硝化细菌数量及硝化速率[J]. 中国水产科学, 2001, 8(1):33-36.
- [10] 王美珍, 王国良, 薛超波, 等. 杭州湾南岸滩涂贝类养殖环境中微生物数量分布及其类群[J]. 水产学报, 2005, 29(5):682-687.
- [11] 薛超波, 王国良, 金珊, 等. 滩涂贝类养殖环境中细菌生态分布的初步研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(10):1191-1193.
- [12] 宛立, 王吉桥, 高峰, 等. 南美白对虾肠道细菌菌群分析[J]. 水产科学, 2006, 25(1):13-15.
- [13] 陈绍铭, 郑福寿. 水生微生物学实验法(上)[M]. 北京:海洋出版社, 1985:238-239.
- [14] 张庆华, 熊清明, 肖琳琳, 等. 大黄鱼溃烂病的一种致病菌-奇异变形杆菌 ZXS02 菌株[J]. 水产学报, 2005, 29(6):824-830.
- [15] Drancourt M, Bollet C, Carlouz R, *et al.* 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38:3623-3630.
- [16] Janda J M, Abbott S L. Bacterial identification for publication: when is enough? [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40:1887-1891.
- [17] 徐志康, 方渝, 刘和录, 等. VITEK-32GNI 鉴定卡连续出现“不能鉴定的细菌”的分析与处理[J]. 医疗卫生装备, 2005, 26(6):50-51.
- [18] 王亚南, 彭志英, 刘双江. 养殖场底泥中芽孢杆菌属细菌的生态学研究[J]. 湛江海洋大学学报, 2004, 24(4):23-27.