

应用 PCR 技术快速筛选和鉴定 *Nitrosomonas* 属细菌\*李 霜 沈珈琦 范伟平<sup>†</sup>

(南京工业大学制药与生命科学学院, 南京 210009)

PCR BASED TECHNOLOGY FOR RAPID ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *Nitrosomonas* sp.Li Shuang Shen Jiaqi Fan Weiping<sup>†</sup>

(College of Pharmacy and Life Science, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

关键词 *amoA*; 16 S rDNA 序列; *Nitrosomonas*; 筛选; 鉴定

中图分类号 S154.3 文献标识码 A

化能自养氨氧化细菌(Ammonia oxidizing bacteria, AOB)能将氨氧化为亚硝酸盐,这一反应是硝化过程中的限速步骤,在污水氨氮脱除中有着重要作用<sup>[1]</sup>。氨氧化细菌主要由 *Nitrosomonas*、*Nitrospirillum*、*Nitrosolobus*、*Nitrosovibrio*、*Nitrosococcus* 等种属组成,其中 *Nitrosomonas* 为主要的和常见的氨氧化细菌<sup>[2]</sup>。由于化能自养菌具有生长速率低和生物量低等特点,使得采用常规的筛选和鉴定方法极为耗时和繁琐。AOB 细胞产生的氨单加氧酶(Ammonia monoxygenase, AMO)在有氧条件下能将氨氧化成羟氨,是氨氮脱除的重要环节<sup>[3]</sup>。AMO 操纵元由 *amoA*、*amoB* 和 *amoC* 三个结构基因构成,其中由于 *amoA* 具有一定的序列保守性,而被作为 AMO 功能的标记<sup>[3]</sup>。目前将 *amoA* 基因作为对污水或污泥等复杂体系中微生物菌群及相关分子生态学的研究较多<sup>[2, 4- 8]</sup>,而将其作为具有氨氧化功能细菌筛选指标的研究鲜有报道。本文以活性污泥中富集培养分离获得的菌株作为研究对象,采用 PCR 技术对 *Nitrosomonas* 属细菌的 *amoA* 和 16 S rDNA 进行扩增,快速筛选和鉴定具有氨氧化功能的细菌,并采用常规方法进行对比和验证。

## 1 实验材料和检测方法

## 1.1 菌株分离培养基

采用斯凯尔曼亚硝化假单胞杆菌液体培养基<sup>[9]</sup>及其培养基硅胶平板<sup>[10]</sup>,所不同的是在中和、凝结硅酸钠溶液制作硅胶平板时,本实验中用硫酸溶液取代盐酸溶液。

## 1.2 氮的定量测定

氨氮、亚硝酸盐氮、硝酸盐氮和总氮的含量分别采用纳氏试剂光度法<sup>[11]</sup>、N-(1-萘基)-乙二胺光度法<sup>[11]</sup>、酚二磺酸光度法<sup>[11]</sup>和过硫酸钾氧化-紫外分光光度法<sup>[11]</sup>进行检测。

## 2 实验方法

## 2.1 菌株分离

由南京某城市污水处理厂序批式处理系统(SBR)取来活性污泥悬浮液,按常规微生物学菌种分离方法分离亚硝化菌株,得到 17 株菌。作者已有文章说明<sup>[12]</sup>,在此不再赘述。

## 2.2 应用 PCR 技术对菌株进行筛选和鉴定

## 2.2.1 细菌基因组 DNA 的提取 采用华舜细菌

\* 江苏省自然科学基金项目(BK2002019)资助

† 通讯作者: 范伟平教授, E-mail: Fwzhu@sohu.com; 电话: 025-8358 7339

作者简介: 李 霜(1976-),女,讲师,博士研究生,研究方向为微生物与基因工程

收稿日期: 2004-08-16; 收到修改稿日期: 2004-12-27

基因组提取试剂盒提取基因组 DNA。

**2.2.2 PCR 扩增 *amoA* 基因** 引物设计根据文献报道<sup>[2,3]</sup>,采用如下引物:

*amoA*F, 5'-GTTTATTTTCCAATTCT3'

*amoA*R, 5'-GATGTCCCATGTAATCAGCC3'

引物由上海博亚生物有限公司合成。

PCR 反应体系及程序: PCR 反应由 1μl 基因组 DNA, *amoA* 引物各 0.5 μl, 脱氧三磷酸核苷酸 (dNTP) 0.5 μl, 2.5 mmol L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> 1.5 μl, 10 × PCR 反应缓冲液 2.5 μl, Taq 酶 0.3 μl, 补加双蒸水至总体积为 25μl。

PCR 反应程序如下: 第一步, 94 °C 变性 2 min; 第二步, 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 第二步进行 30 个循环; 第三步, 72 °C 延伸 5 min。

PCR 结束后, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 检测结果。

**2.2.3 PCR 扩增部分 16 S rDNA 序列及 DNA 测序** 根据已在 GenBank 中公布的 *Nitrosomonas* 种属细菌的 16 S rDNA 序列经 AlignX 软件分析, 设计其 16 S rDNA 特异引物如下:

NitF, 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT3'

NitR, 5'-GGACTACCAGGGTATCTAATCC3'

引物由上海博亚生物有限公司合成。

PCR 反应体系及程序: 将 PCR 扩增的 *amoA* 呈阳性菌株再进行部分 16 S rDNA 的 PCR 扩增。PCR 反应体系同 2.2.2 所述。

PCR 反应程序如下: 第一步, 94 °C 变性 2 min; 第二步, 94 °C 变性 1 min, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 第二步进行 30 个循环; 第三步, 72 °C 延伸 5 min。

PCR 结束后, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 检测结果。

PCR 产物 DNA 测序: 将 16 S rDNA PCR 扩增产物经纯化后连接至 pMD18-T 载体 (TaKaRa 公司提供), 选择阳性克隆送上海博亚生物有限公司测序。

**2.3 应用传统方法筛选验证**

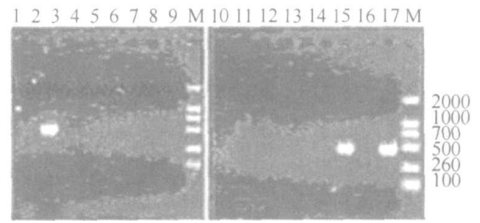
按《伯杰氏系统细菌学手册》相关内容进行, 详细操作见文献[12]。

## 3 结果与讨论

### 3.1 PCR 扩增 *amoA* 基因

对分离获得的 17 个菌株进行 PCR 扩增 *amoA* 基因, 结果如图 1 所示; 其中编号 2、15 和 17 均在

500 bp 处有特异性条带出现, 表明这 3 株菌与 *Nitrosomonas* 属细菌的 *amoA* 基因具有较好的同源性, 其余菌株的 *amoA* PCR 扩增呈阴性表示其同源性较差。



泳道 1~ 17: 编号 1~ 17 菌株 PCR 扩增产物  
泳道 M: DL2000 marker

图 1 PCR 扩增 *amoA* 基因

### 3.2 部分 16 S rDNA 基因扩增结果及其序列分析

对编号 2、15 和 17 菌株进行部分 16 S rDNA 基因的扩增, 3 株菌均在 770 bp 处有扩增条带出现。

16 S rDNA 扩增产物经 DNA 测序后, 与 GenBank 中已公布的 *Nitrosomonas* 属细菌相关 16 S rDNA 序列比对, 经 Vector NTI7.0 软件分析, 结果如图 2 所示。结果表明: 编号 2 和 15 序列一致, 均与 *Nitrosomonas europaea* 具有 98.9% 的相似性, 编号 17 与 *Nitrosomonas nitrosa* 具有 99.3% 的同源性。以上结果表明, 编号 2 和 15 菌株均为 *Nitrosomonas europaea*, 编号 17 菌株为 *Nitrosomonas nitrosa*。如上所述 *amoA* PCR 反应呈阳性的为编号 2、15 和 17 菌株, 均为 *Nitrosomonas* 属细菌。

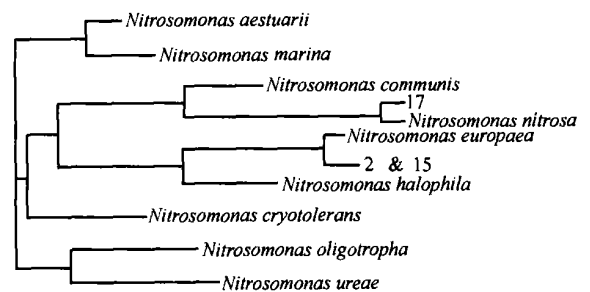


图 2 基于 16 S rDNA 序列同源性的 *Nitrosomonas* 属细菌系统发育树

### 3.3 常规方法筛选鉴定及氨氮脱除实验结果

将初筛获得的 17 株菌经过进一步筛选, 获得 6 株具有较强的氨氮降解能力的菌株。将 6 株菌接入斯凯尔曼液体培养基中, 并以空白样 (氨氮含量为 130 mg L<sup>-1</sup>) 为参比对象, 摇瓶培养一周后测定氨氮降解情况如表 1 所示。

表 1 6 菌株降解氨氮能力检测结果

菌株编号	氨氮剩余含量 (mg L <sup>-1</sup> )			菌株号	氨氮剩余含量 (mg L <sup>-1</sup> )		
	3d	5d	7d		3d	5d	7d
2	105.2	82.23	62.12	11	111.6	86.59	66.53
3	109.2	91.33	64.01	13	104.3	88.77	72.12
15	110.1	88.16	65.70	17	113.0	90.83	68.42

从表 1 中可以看出, 各菌株都有较强的氨氮降解能力。对照《伯杰氏系统细菌学手册》, 根据菌种的形态特征和生理生化特性对上述 6 菌株进行初步鉴定。编号 2、15 和 17 菌株各种特性十分相似, 初步认定可能同属 *Nitrosomonas*, 其余 3 菌株都能利用有机碳源, 编号 11 和 13 菌株可能属 *Pseudomonas*, 编号 3 菌株属 *Hyphomicrobium*。

常规筛选方法获得的结果与采用 PCR 扩增 *amoA* 和 16 S rDNA 筛选和鉴定的结果相符。以上实验结果表明, 将 *amoA* 作为功能标记进行筛选具有氨氧化功能的细菌是可信的。

采用单一碳源等常规方法筛选和鉴定亚硝化菌至少要花 4 周以上时间才能完成, 且自养菌培养困难, 往往易失败故需多次重复试验。而采用 PCR 扩增 *amoA* 和 16 S rDNA 的方法只需要 10 d 左右即可得到结果, 既缩短了实验时间, 还大大降低了实验工作量, 有明显的优越性。

## 4 结 论

本文采用 PCR 扩增 *amoA* 基因和 16 S rDNA 序列分析, 从城市污水序批式曝气处理系统(SBR)的活性污泥中, 筛选和鉴定出 3 株具有氨氧化功能的 *Nitrosomonas* 属的细菌, 与常规方法筛选、鉴定获得的 3 株菌结果相符; 实验结果表明采用 PCR 扩增 *amoA* 和 16 S rDNA 的技术进行筛选和鉴定亚硝化细菌的方法快捷可信。

## 参 考 文 献

[ 1 ] Mike S M J, Michael W, John F, *et al.* Microbiology and application

of the anaerobic ammonium oxidation ('anammox') process. Environmental Biotechnology, 2001, 12: 283~ 288

- [ 2 ] Ulrike P, Andreas P R, Stefan J, *et al.* Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16 S rDNA and *amoA* sequence analysis: Implications for molecular diversity surveys. Appl. Environ. Microbiol., 2000, 66: 5 368~ 5 382
- [ 3 ] Rotthauwe J H, Witzel K P, Liesack W. The ammonia monoxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine scale analysis of natural ammonia oxidizing populations. Appl. Environ. Microbiol., 1997, 63: 4704~ 4712
- [ 4 ] 许玫英, 曾国驱, 任随周, 等. 分子检测技术对活性污泥中氨氧化细菌的比较研究. 微生物学报, 2003, 43(3): 371~ 378
- [ 5 ] Alzerreca J, Norton J M, Klotz M G. The *amo* operon in marine, ammonia oxidizing  $\gamma$ -proteobacteria. FEMS Microbiology Letters, 1999, 180: 21~ 29
- [ 6 ] Juretschko S, Timmemann G, Schmid M, *et al.* Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: Nitrosococcus mobilis and nitrospiral like bacteria as dominant populations. Appl. Environ. Microbiol., 1998, 64: 3042~ 3051
- [ 7 ] Jeanette M, Norton J, Alzerreca J, *et al.* Diversity of ammonia monoxygenase operon in autotrophic ammonia oxidizing bacteria. Arch Microbiol., 2002, 177: 139~ 149
- [ 8 ] Sinigalliano C D, Kuhn D N, Jones R D. Amplification of the *amoA* gene from diverse species of the ammonium oxidizing bacteria and from indigenous bacterial population from seawater. Appl. Environ. Microbiol., 1995, 61: 2702~ 2706
- [ 9 ] 中国科学院微生物研究所. 菌种保藏手册. 北京: 科学出版社, 1980
- [ 10 ] 郭爱莲, 李振海, 黄淑菊. 硝化细菌的分离研究. 西北大学学报(自然科学版), 1996, 26(1): 83~ 86
- [ 11 ] 国家环境保护总局. 《水和废水监测方法》编委会. 水和废水监测分析方法. 北京: 中国环境科学出版社, 1997
- [ 12 ] 沈珈琦, 方苹, 范伟平. 亚硝化菌株的筛选及其初步鉴定. 生物加工过程, 2004, 2(1): 30~ 34