

硝化细菌分子生态学研究进展

马英¹, 钱鲁闽², 王永胜², 吴成业¹

(1. 集美大学 水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 国家海洋局第三海洋研究所, 福建 厦门 361021)

摘要:硝化细菌在促进水域生态系统的氮循环、保持健康水产养殖环境方面发挥着巨大作用。本文分析了硝化细菌分子生态学研究的意义, 介绍了硝化细菌的主要种类及其系统进化关系, 综述了硝化细菌分子生态学研究进展, 并对中国的研究现状进行了分析。结合作者的工作实践, 认为中国应加强对水产养殖环境硝化细菌分子生态学研究, 为养殖环境的污染防治和微生态制剂的研制等提供理论依据。[中国水产科学, 2007, 14 (5): 872–879]

关键词:硝化细菌; 分子生态学; 水产养殖环境

中图分类号: X17

文献标识码: A

文章编号: 1005–8737–(2007)05–0872–08

硝化作用在 N 素循环中扮演着重要角色。生物圈中各个生态系统的氮素循环一般通过生物固氮, 以氨的形式输入氮素; 经过同化、氨化、硝化、异化性硝酸盐还原等生物转化作用及其相伴的迁移运动; 最终借助反硝化作用, 以氮气的形式输出氮素。因此, 硝化细菌在促进水域生态系统的氮循环、进而缓解环境压力、保持健康水产养殖环境中发挥着巨大作用。此外, 硝化细菌作为单细胞微生物, 还是环境变化的敏感指标, 比大型动、植物更宜于指示环境状况的变化。多年来, 硝化细菌生态学一直是国际上研究热点。

传统的硝化细菌生态学研究主要是通过富集、纯化培养, 借助显微镜观察, 根据细胞的形态构造和生理生化特点来进行, 使得对硝化细菌生态学的研究基本停留在总体计数水平, 很难为其可靠的种群结构研究和系统发育分析提供证据; 另一方面, 由于硝化细菌的生长非常缓慢 (氨氧化菌生长周期为 8~24 h), 许多种难以培养或至今尚未分离得到纯菌株, 从而影响了这类微生物的深入研究。此外, 分离培养的菌种并不能代表环境样品中的细菌多样性^[1], 因此, 用分离培养方法来研究硝化细菌往往不能正确反映自然环境样品的真实情况。

分子生物学的发展、进步以及在生态学研究领域的应用, 使人们对硝化细菌生态学的研究进入了一个崭新的阶段。运用分子生物学手段进行生态学

研究的突出特点是不需纯化培养, 可以直接分析环境样品, 灵敏度高, 而且由于这种方法是从分子水平来认识生物物种分化的内在原因和物质基础, 因而更具科学性。此外, 由于硝化细菌中的主要类群 (如 β -变形菌亚纲的氨氧化菌) 在系统进化树上是单源的, 使得它在某种程度上成为微生物分子生态学研究的模式种。因此, 国内外在硝化细菌分子生态学方面的研究进展很快, 每年都有较多相关文献涌现。

1 硝化细菌的种类及其系统进化关系

硝化作用 (Nitrification) 是将氨氧化成亚硝酸 (盐), 再氧化成硝酸 (盐) 的过程。前者主要是由自养性的亚硝酸菌或氨氧化菌 (Ammonia-oxidizing bacteria, AOB) 完成, 后者是由硝酸菌或亚硝酸盐氧化菌 (Nitrite-oxidizing bacteria, NOB) 完成。由于基质上的联系, 人们一直把亚硝酸细菌 (冠以 Nitroso-) 和硝酸细菌 (冠以 Nitro-) 联系在一起; 并把它们归入同一个科——硝化杆菌科 (Nitrobacteriaceae)。但从进化谱系上看, 它们之间的亲缘关系并不密切。

1.1 氨氧化菌 (亚硝酸菌)

早期的有关研究主要是借助分离培养, 并根据细胞形态以及内细胞膜的排列方式对氨氧化菌进行菌种分类。共有 16 株氨氧化菌分布在 5 个属中: 亚硝化单胞菌属 (Nitrosomonas)、亚硝化球菌属

收稿日期: 2006–05–17; 修订日期: 2006–11–30.

基金项目: 福建省科技厅资助省属高校项目 (2005K055); 集美大学科研基金项目.

作者简介: 马英 (1968–), 女, 副教授, 博士, 主要从事海洋微型生物分子生态学研究. Tel: 0592–6183006; E-mail: maying@jmu.edu.cn

(*Nitrosococcus*)、亚硝化螺菌属(*Nitrosospira*)、亚硝化弧菌属(*Nitrosovibrio*)、以及亚硝化叶菌属(*Nitrosolobus*)^[2]。近年来通过对 16S rRNA 基因序列的比较,将自养性 AOB 分为两大类:一类是自养性 AOB 主要成员,属于 β -变形菌亚纲(β -Proteobacteria),主要由亚硝化单胞菌群(*Nitrosomonas*, 包括运动亚硝化球菌 *Nitrosococcus mobilis* 和亚硝化螺菌属(*Nitrosospira*, 包括亚硝化叶菌属 *Nitrosolobus* 和亚硝化弧菌属 *Nitrosovibrio*) 2 个分枝组成^[3]。在《伯杰氏系统细菌学手册》第 2 版中^[4],将这些亚硝酸盐细菌合并归入亚硝化单胞菌目(*Nitrosomonadales*),亚硝化单胞菌科(*Nitrosomonadaceae*),亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)和亚硝化螺菌属(*Nitrosospira*)。另有少数氨氧化菌在 γ -变形菌亚纲(γ -Proteobacteria)中单独形成一个谱系分枝——亚硝化球菌属(*Nitrosococcus*)^[5],它们广泛存在于海洋或半咸水环境^[6-7],在《伯杰氏系统细菌学手册》第 2 版中^[4],将其归入着色菌目(*Chromatiales*),着色菌或红硫菌科(*Chromatiaceae*),见图 1。

除了自养性亚硝酸盐菌外,有些异养性的细菌,如产碱菌属(*Alcaligenes*)和节杆菌属(*Arthrobacter*),以及真菌如曲霉属(*Aspergillus*),也具有硝化作用^[8]。相对于自养性的硝化菌而言,异养性菌种虽有较低的分解速率,但由于它在环境中的数量往往大于自养性细菌,而且有些异养性菌种可同时进行硝化和反硝化(脱硝)作用,因此也是硝化作用中不可或缺的一个群体^[9]。

近年来还发现了厌氧氨氧化现象,是由浮霉菌门(*Planctomycetes*)一类分支很深的浮霉菌在缺氧条件下以 NO_3^- 或 NO_2^- 为电子受体将氨氧化的过程。这类细菌生长非常缓慢,用常规细菌分离培养方法无法分离到纯种,只有用梯度密度离心技术才成功分离到纯菌株^[10]。因此,分子生物学技术在厌氧氨氧化细菌研究中发挥了重要作用。目前,已在海洋陆架区^[11]、近岸河口和港湾沉积物^[12]中检测到这类细菌的普遍存在,并被证明是 N 循环中一个重要的过程。在循环海水养殖系统的污泥和生物过滤器中也检测到厌氧氨氧化菌及其活性,为利用厌氧氨氧化途径净化海水养殖废水奠定了基础^[13]。

1.2 亚硝酸盐氧化菌(硝酸菌)

硝化作用的第二步是由硝酸菌或亚硝酸盐氧化菌(*Nitrite-oxidizing bacteria*, NOB)完成,它是由进化上截然不同的 4 类菌构成(图 1):① α -变形菌亚纲

(α -Proteobacteria)的根瘤菌目(*Rhizobiales*)、慢生根瘤菌科(*Bradyrhizobiaceae*)、硝酸菌属(*Nitrobacter*);② γ -变形菌亚纲(γ -Proteobacteria)的着色菌目(*Chromatiales*)、外硫红螺旋菌科(*Ectothiorhodospiraceae*)、硝化球菌属(*Nitrococcus*);③ δ -变形菌亚纲(δ -Proteobacteria)的脱硫杆菌目(*Desulfobacterales*)、脱硫盒菌科(*Desulfoarculaceae*)、硝化刺菌属(*Nitrospina*)^[14];④另外一个独立的门——硝化螺旋菌门(*Nitrospira*)、硝化螺旋菌纲(*Nitrospira*)、硝化螺旋菌科(*Nitrospiraceae*)、硝化螺旋菌属(*Nitrospira*)^[15]。

氨氧化菌与亚硝酸盐氧化菌的亲缘关系如图 1。由图 1 可以清楚地看出,在两个菌群之间,除了 γ -变形菌亚纲中亚硝化球菌属与硝化球菌属的亲缘关系相距较近(同目不同科)外,其他菌株的亲缘关系都相距很远(不同纲或门)。因此在自然生境中,氨氧化菌与亚硝酸盐氧化菌彼此为邻并无进化关系上的必然性。

2 硝化细菌分子生态学研究方法

目前,能扩增整个 β -变形菌亚纲(β -Proteobacteria)AOB 的通用引物和特异探针^[5]、扩增 γ -变形菌亚纲(γ -Proteobacteria)AOB 的通用引物和探针^[16-17]已经广泛应用于硝化细菌分子生态研究中。除了 16S rRNA 基因以外,催化氨氧化的氨单加氧酶 α 亚基基因(*amoA*)也被广泛用做自然环境中 AOB 遗传多样性及丰度研究的分子标记。相关研究结果显示,两种分子标记的研究结果比较一致。异养性硝化细菌广泛分布在各类菌群中,缺乏一致的功能性基因,因此传统的培养技术、如特殊培养基的筛选、菌种的富集化、纯化分离等更适合相关研究^[18]。

NOB 是由进化关系上相去甚远的几类菌构成,因此,目前能扩增整个 NOB 种群的特异引物尚不存在,但针对 NOB 不同属的引物或探针^[19-20]已有不少报道,使得用分子方法研究 NOB 的主要种群成为可能。最近,首个亚硝酸盐氧化菌——维氏硝化细菌(*Nitrobacter winogradskyi*)的全基因组序列已经得到破译^[21],这将为用分子生物学方法研究这类菌提供更多的序列信息,并有助于更好地阐明控制亚硝酸盐氧化的分子和细胞学过程、揭示亚硝酸盐氧化与其他 N 循环过程间的关系。

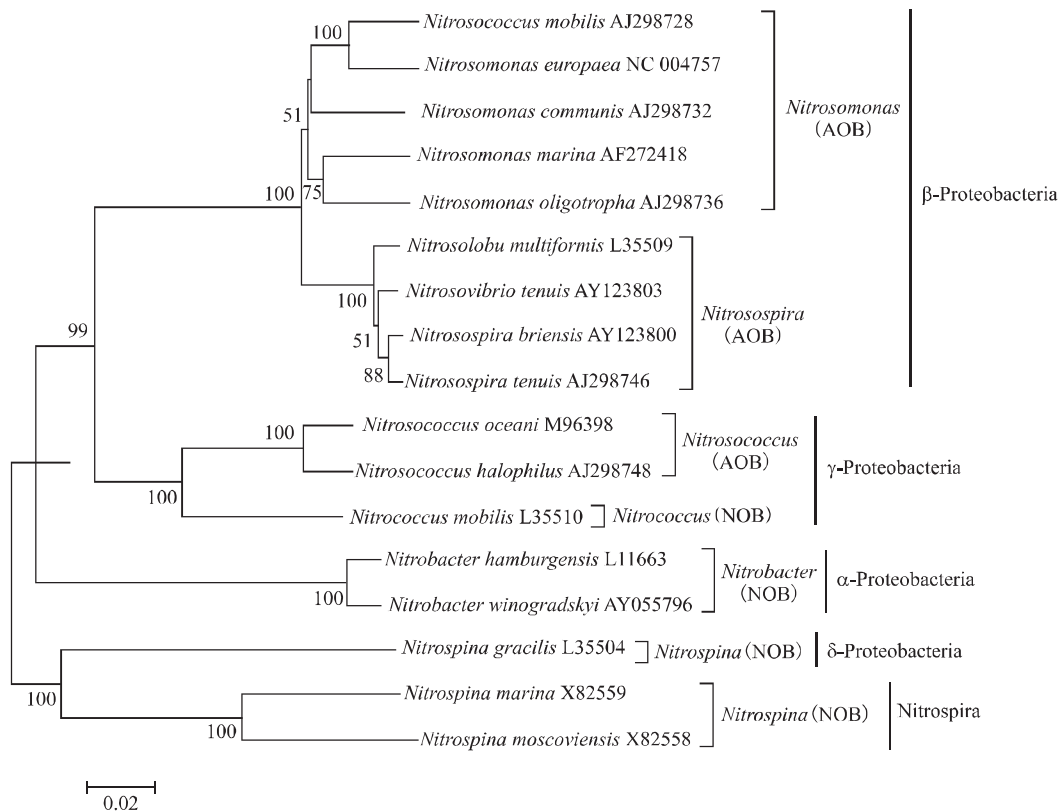


图 1 亚硝酸菌(氨氧化菌)与硝酸菌(亚硝酸盐氧化菌)16S rDNA 序列进化关系

注:进化树中的序列来自 GenBank 数据库,核酸序列号分别标注在相应的硝化细菌名称后面;进化枝上的数字代表 bootstrap 值,仅显示大于 50 的 Bootstrap 值(100 次重复);树左下方的刻度代表核酸变异的百分率。

Fig.1 Neighbor-joining tree showing phylogenetic relationship of 16S rDNA sequences of ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and nitrite-oxidizing bacteria (NOB)

Note: All the sequences were obtained from GenBank and the accession numbers are shown behind the corresponding nitrifying bacteria. Numbers on the branches refer to bootstrap values, only values above 50 are shown (100 replicates). Scale bar represents the nucleotide substitution percentage

3 硝化细菌分子生态学研究概况

3.1 国外研究概况

近年来,随着分子生物学手段的不断完善,国际上对硝化细菌种群结构的动态变化及与环境间关系进行了一系列研究。Stephen 等^[1]通过 16S rDNA 序列多样性分析、结合纯培养研究法,对农田土壤和海洋沉积物中 β-变形菌亚纲的 AOB 进行了比较研究。结果表明,纯培养的代表种与克隆文库的代表种不一致,富集培养中包含了许多亚硝化单胞菌(Nitrosomonas-like)种,而克隆文库中更常见的是亚硝化螺菌属(Nitrospira-like)克隆子。两种环境下的氨氧化菌种群也各不相同。1998 年,Stephen

等^[17]又用变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)结合 Southern 杂交的方法研究了土壤 pH 值对 AOB 种群结构的影响,充分显示了 DGGE 在快速分析环境样品 AOB 种群结构动态变化中的作用;同年,Prinčič 等^[22]研究了污水处理厂硝化系统反应器中 NH₃ 浓度、pH 值和 O₂ 浓度对硝化细菌活性的影响。结果表明,高浓度 NH₃ 下刺激了一类亚硝化单胞菌属(Nitrosomonas)细菌的生长,而极端 pH 值(pH 6.0 和 pH 8.2),从某种程度上筛选了另一类种群,但其他条件未见种群结构发生明显变化。无论是高 NH₄⁺ 浓度还是极端 pH 值,导致硝化细菌种群结构发生变化的时间都比较长(74 d 以上)。Avrahami 和 Conrad^[23]则研究了牧

场土壤中氨氧化菌随土壤温度变化情况,指出土壤温度变化及N肥的多少都会对氨氧化菌的种类和数量产生影响。

1999年,Phillips等^[24]用最大可能数计数法(most-probable-number counts, MPN)计数、16S rDNA克隆文库构建,结合探针杂交的方法对西北地中海地区附着和浮游的 β -变形菌亚纲(β -Proteobacteria)氨氧化菌的种群结构进行了比较研究,结果表明,亚硝化单胞菌(*Nitrosomonas*)类和亚硝化螺菌(*Nitrospira*)类可能占据海洋中两类截然不同的生态位,附着氨氧化菌以亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)细菌为优势菌,而浮游氨氧化菌多与亚硝化螺菌类(*Nitrospira*)相关,这种不同可能源于两类AOB生理特性和环境条件的不同,因而导致它们在N循环中的效率也不同。2000年,Phillips等^[25]还用DGGE结合杂交方法研究了不同农业措施和植物种群对土壤中氨氧化菌群体多样性的影响;Cébron等^[26-27]用定量竞争PCR(cPCR),*amoA*基因克隆文库构建等方法研究了污水排放对塞纳河硝化细菌种类、活性及数量的影响,指出污水流入的同时引入了许多外来污水中的硝化细菌。

目前,国际上还对沙丘^[16]、富营养淡水湖^[28]、污水处理系统^[29]、硝化反应器^[30]、盐湖^[31]、农牧场土壤^[32]、饮用水供水系统^[33]等多种环境条件下的硝化细菌进行了研究,但是对水产养殖环境下硝化细菌分子生态学方面的研究较少。

淡水养殖环境硝化细菌的研究工作仅见于Hovance研究小组的报道^[20-34]。这些研究表明,淡水养鱼池(水族箱)AOB在进化关系上主要与海洋亚硝化单胞菌(*Nitrosomonas marine*)类、亚硝化螺菌属、欧洲亚硝化单胞菌(*Nitrosomonas europaea*)和运动亚硝化球菌(*Nitrosococcus mobilis*)紧密相连。其中海洋亚硝化单胞菌类AOB硝化效率最高,仅2%甚至更少的细胞就能发挥较好的硝化作用。传统研究认为,NOB主要成员是 α -变形菌亚纲(α -Proteobacteria)的硝酸菌属(*Nitrobacter*)细菌,然而研究表明,淡水养鱼池(水族箱)中NOB的优势种是硝化螺旋菌属(*Nitrospira*)细菌,而并非通常所认为的硝酸菌属(*Nitrobacter*)细菌。自然环境中的硝化作用可能比这些简单生态系统中的情况更为复杂。在海水养鱼池中,欧洲亚硝化单胞菌(*Nitrosomonas europaea*)与其近缘种占总细菌种群的相当组分,而维氏硝酸细菌(*Nitrobacter winogradskyi*)则低于检

测限^[35]。Mccaig等^[36]报道了海水养鱼池底质中 β -亚群氨氧化菌群与污染之间的关系,指出富氮的有机污染养鱼环境抑止了硝化和反硝化作用,使氮循环显著受阻;AOB和NOB的数量随污染程度的不同发生显著变化;污染环境还为一些氨氧化菌的种类提供了选择压,比如一些氨氧化菌——亚硝化单胞菌(*Nitrosomonas*),仅在污染严重沉积物中检测到,且其相对丰度受污染程度的影响,而在非污染区的洁净沉积物中没有检测到。以上研究结果表明,硝化细菌随不同环境因子变化而存在不同类群或者数量变化,从而影响其硝化速率;硝化细菌对氨氮浓度响应明显。

最近,Könneke等^[37]从海水养鱼池分离到一株具硝化活性的嗜泉古菌(*Crenarchaeota*,古菌的一个主要分支之一)。Wuchter等^[38]对北海、大西洋海水中的嗜泉古菌的研究表明,嗜泉古菌丰度与氨氧化成亚硝酸盐的过程相关,并且发现古菌*amoA*基因的拷贝数比其他硝化细菌*amoA*基因的拷贝数多1~3个数量级。这些研究表明,一些嗜泉古菌在海洋环境的N循环中也扮演着重要角色。

3.2 国内研究概况

中国目前对养殖环境污染问题多采用换水、施药等一些物理或化学措施来解决,不仅不能从根本上解决问题,还大幅度增加了养殖成本、造成沿海近岸水域污染和抗生素抗药性问题。采用益生菌类生物制剂来改善养殖环境也有报道,但是这些外来细菌菌群使用后与原生态环境中土著菌的关系还不清楚,对环境生态的安全性影响尚不可知,盲目使用微生物制剂未必有效^[39-40]。设法提高养殖系统中原有有益菌,或添加土著有益菌,并为它们的发展提供或创造合适的条件,相信能取得比使用外来菌更好的效果。因此,从养殖环境的土著菌群中筛选有益生作用的菌株,开发海水养殖环境中生长适宜的益生菌剂,对改善进而治理养殖环境具有重要意义。

实现这一目标的前提是对养殖环境中的硝化细菌种群结构、优势类群、动态变化及其与环境间、与人类养殖行为间的关系即硝化细菌的生态学要有深入的了解。目前,与国际水平相比,中国在养殖环境硝化细菌生态学研究方面比较落后。对硝化细菌的研究多集中在简单的计数、分离培养、初步鉴定和硝化活性测定等方面^[41-44]。近年来,虽然在应用微生物制剂消除水体有机污染、改善养殖环境等方面

取得了一些进展^[45-47],但运用分子生物学方法进行相关基础理论研究刚刚起步,且多限于工业硝化池和废水处理系统。陈岭等^[48]用PCR技术研究了硝化池中氨氧化菌的 *amoA* 基因的多样性,认为在污水处理系统中,欧洲亚硝化单胞菌 (*Nitrosomonas europaea*) 是氨氧化过程中起主导作用的细菌。孙寓姣等^[49]则用 FISH 等技术原位观察了废水生物脱氮反应器颗粒污泥中硝化细菌的空间分布,并用荧光实时定量 PCR 对 AOB 进行了量化研究。更多的研究报道仅仅停留在研究方法的建立和对硝化细菌的鉴定阶段^[50-53],对环境中细菌随环境因子的动态变化研究很少。罗鹏等^[54]用 PCR-DGGE 技术对凡纳滨对虾咸淡水养殖系统内各种环境的细菌群落组成进行了比较研究,发现从海湾沿海、养殖池、对虾粪便到对虾肠壁,细菌群落的多样性由高到低,无论是在哪种环境,群落优势种都十分明显,同一环境下个样品间的细菌群落非常相似,而不同环境样品中细菌群落组成有较大的差异。这些研究结果充分显示了 PCR-DGGE 技术在快速、大量分析水生环境微生物群落结构研究中的优势。在硝化细菌动态变化研究方面,仅见于张丹等^[55-56]对生物脱氮系统中硝化菌群多样性及其随溶解氧降低的种群变化规律研究。水产养殖环境中硝化细菌的分子生态学研究尚未见报道。

作者于 2005 年 7 月对对虾养殖池中细菌进行了初步研究。结果表明,对虾养殖池沉积物中细菌遗传多样性非常丰富,各克隆子单酶切的 RFLP 图谱几乎没有重复(图 2)。且其中 41% 细菌的 16S rDNA 序列与 GenBank 库中的序列相似性小于等于 94%,说明该环境中存在大量未知(或未曾发现)序列,急需对该环境中特殊功能细菌进行研究。研究还检测到一类克隆子序列,它们与一个分离自富营养的近岸海洋沉积物中的亚硝化单胞菌 (*Nitrosomonas* sp. NS20)^[57] 间相似性为 98%,说明对虾养殖池沉积物中至少存在亚硝化单胞菌属的氨氧化菌

(图 3)。此外,Shao 等^[58]构建了对虾养殖池沉积物中古细菌 16S rDNA 文库,采用 RFLP 和基因序列测定法,对对虾养殖池沉积物中古细菌的遗传多样性进行研究,结果表明,该环境中古细菌的遗传多样性也非常丰富,系统发育分析发现大部分新发现的古细菌克隆子属于未培养或尚未鉴定的新谱系,分属于嗜泉古菌 (Crenarchaeota) 和广域古菌 (Euryarchaeota) 两个门类,其中嗜泉古菌在种群结构上占优势 (72.2%),广域古菌仅占 27.8%。近年来,越来越多的证据表明,嗜泉古菌含有 *amoA* 基因^[59],具有氨氧化的能力,并且这些嗜泉古菌在海洋水域、海洋沉积物、海水养鱼池^[37]、硝化反应器^[60]、富营养的亚热带河口区^[61]等环境中广泛存在。在对虾养殖池中检测到的这些嗜泉古菌在 N 循环中是否也扮演了重要角色是值得进一步深入研究的课题。

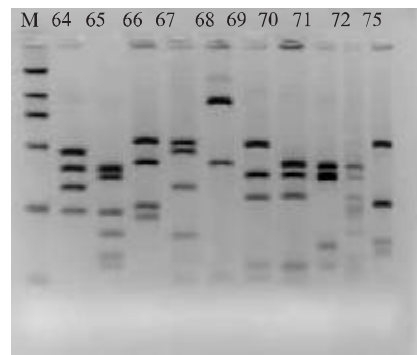


图 2 对虾养殖池沉积物细菌 16S rRNA 基因扩增产物 *Hha* I 酶切的 RFLP 图谱

注:各克隆之间无重复带型,显示该环境中细菌丰富的遗传多样性。

Fig.2 Restriction endonuclease *Hha* I digests of the 16S rRNA gene PCR products of bacteria from prawn aquafarm sediment

Note: All of the RFLP types occurred only once, indicating the richness of bacterial genetic diversity in this environment.

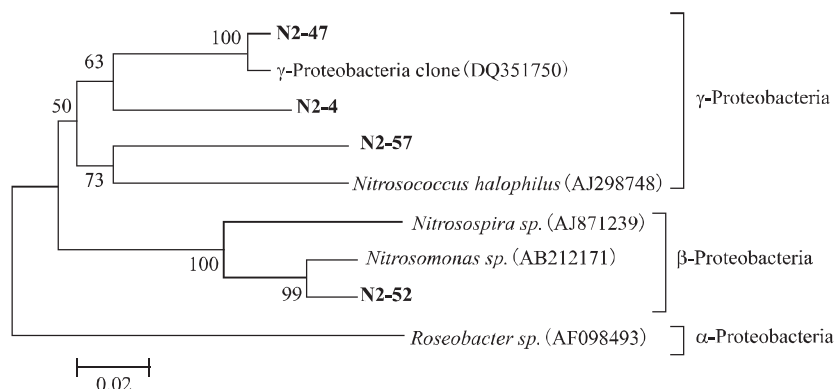


图3 对虾养殖池沉积物样品中部分细菌 16S rDNA 序列与 GenBank 库中相关序列间的系统进化树图

注:来自养殖池的克隆子用粗体标识,克隆子 N2-52 与 *Nitrosomonas* sp. (AB212171) 间相似性为 98%。参照序列来自 GenBank 数据库,核酸序列号分别标注在相应的参照序列名称后面。进化枝上的数字代表 Bootstrap 值,仅显示大于 50 的 Bootstrap 值 (100 次重复);树左下方的刻度代表核酸变异的百分率。

Fig.3 Neighbor-joining tree showing phylogenetic relationship of 16S rDNA sequences of bacteria from the shrimp aqua-farm sediment and from the GenBank

Note: Clones from the aquafarm sediment are shown in bold, and clone N2-52 shows 98% sequence similarity to one ammonia-oxidizing bacteria *Nitrosomonas* sp. (AB212171). Reference sequences were obtained from GenBank and the accession numbers are shown behind the corresponding sequences. Numbers on the branches refer to bootstrap values, only values above 50 are shown (100 replicates). Scale bar represents the nucleotide substitution percentage.

4 建议

今后应加强对中国水产养殖环境硝化细菌的数量、分布、种群结构及其随环境因子的动态变化进行系统研究,阐明人类养殖活动对硝化细菌种群结构的影响,分离培养养殖环境优势硝化菌群,并对其硝化效率进行研究,为科学养殖和养殖环境的质量评价、污染防治、生态调控以及微生物制剂研制等提供理论依据。另一方面,加强中国水产养殖环境硝化细菌分子生态学基础研究工作、提高学术水平,争取有所突破,使中国在国际水产养殖环境生态基础研究方面占有一席之地。

参考文献:

- [1] Stephen J R, Mccraig A E, Smith Z, et al. Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to β -subgroup ammonia-oxidizing bacteria[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62 (11): 4 147-4 154.
- [2] Watson S W, Bock E, Harm H, et al. Nitrifying bacteria[M]// Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989, 3: 1 808-1 834.
- [3] Utaker J B, Nes I F. A qualitative evaluation of the published oligonucleotides specific for the 16S rRNA gene sequences of

ammonia oxidizing bacteria [J]. Syst Appl Microbiol, 1998, 21 (1): 72-88.

- [4] Staley J T, Bryant M P, Pfennig N, et al. Bergey's manual of systematic bacteriology [M]. Baltimore: Williams & Wilkins, 2001, 3: 1 807-1 835.
- [5] Purkhold U, Pommerening-Roser A, Juretschko S, et al. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66 (12): 5 368-5 382.
- [6] Woese C R, Weisburg W G, Hahn C M, et al. The phylogeny of the purple bacteria: the gamma-subdivision[J]. Syst Appl Microbiol, 1985, 6: 25-33.
- [7] Ward B B, Gregory D O. Worldwide distribution of *Nitrosococcus oceanus*, a marine ammonia-oxidizing γ -proteobacterium, detected by PCR and sequencing of 16S rRNA and *amoA* Genes[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68 (8): 4 153-4 157.
- [8] Prosser J I. Autotrophic Nitrification in Bacteria[J]. Adv Microbiol Physiol, 1989, 30: 125-181.
- [9] Kuenen J G, Robertson L A. Combined nitrification-denitrification processes[J]. FEMS Microbiol Rev, 1994, 15: 109-117.
- [10] Strous M, Fuerst J A, Kramer E H, et al. Missing lithotroph identified as new planctomycete[J]. Nature, 1999, 400: 446-449.
- [11] Thamdrup B, Dalsgaard T. Production of N_2 through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68: 1 312-1 318.
- [12] Tal Y, Watts J E, Schreier H J. Anaerobic ammonia-oxidizing

- bacteria and related activity in Baltimore Inner Harbor Sediment [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71 (4): 1 816 – 1 821.
- [13] Tal Y, Watts J E, Schreier H J. Anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) bacteria and associated activity in fixed-film biofilters of a marine recirculating aquaculture system [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72 (4): 2 896 – 2 904.
- [14] Teske A, Alm E, Regan J M, et al. Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria [J]. *J Bacteriol*, 1994, 176 (21): 6 623 – 6 630.
- [15] Ehrich S, Behrens D, Lebedeva E, et al. A New obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, *Nitrospira moscoviensis* sp. nov. and its phylogenetic relationship [J]. *Arch Microbiol*, 1995, 164 (1): 16 – 23.
- [16] Kowalchuk G A, Stephen J R, De Boer W, et al. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β -subdivision of the class *Proteobacteria* in coastal sand dunes by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA Fragments [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63 (4): 1 489 – 1 497.
- [17] Stephen J R, Kowalchuk G A, Bruns M-A V, et al. Analysis of β -subgroup proteobacterial ammonia oxidizer populations in soil by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis and Hierarchical Phylogenetic Probing [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64 (8): 2 958 – 2 965.
- [18] Boer W D, Kowalchuk G A. Nitrification in Acid Soils: Micro-organisms and mechanisms [J]. *Soil Bio Biochem*, 2001, 33: 853 – 866.
- [19] Degrange V, Bardin R. Detection and Counting of *Nitrobacter* Populations in soil by PCR [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61 (6): 2 093 – 2 098.
- [20] Hovanec T A, Taylor L T, Blankis A, et al. *Nitrospira*-Like bacteria associated with nitrite oxidation in freshwater aquaria [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64 (1): 258 – 264.
- [21] Starkenburg S R, Chain P G, Sayavedra-Soto L A, et al. Genome sequence of the chemolithoautotrophic Nitrite-Oxidizing Bacterium *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72 (3): 2 050 – 2 063.
- [22] Prinčič A, Mahne I, Megušar F, et al. Effects of pH and oxygen and ammonium concentrations on the community structure of nitrifying bacteria from wastewater [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64 (10): 3 584 – 3 590.
- [23] Avrahami S, Conrad R. Patterns of community change among ammonia oxidizers in meadow soils upon long-term incubation at different temperatures [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69 (10): 6 152 – 6 164.
- [24] Phillips C J, Smith Z, Embley T M, et al. Phylogenetic differences between particle-associated and planktonic ammonia-oxidizing bacteria of the β -subdivision of the class *Proteobacteria* in the northwestern Mediterranean Sea [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65 (2): 779 – 786.
- [25] Phillips C J, Harris D, Dollhopf S L, et al. Effects of agronomic treatments on structure and function of ammonia-oxidizing communities [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66 (12): 5 410 – 5 418.
- [26] Cébron A, Berthe T, Garnier J. Nitrification and nitrifying bacteria in the Lower Seine River and Estuary (France) [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69 (12): 7 091 – 7 100.
- [27] Cébron A, Coci M, Garnier J, et al. Denaturing gradient gel electrophoretic analysis of ammonia-oxidizing bacterial community structure in the Lower Seine River: Impact of Paris Wastewater Effluents [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70 (11): 6 726 – 6 737.
- [28] Hastings R C, Saunders J R, Hall G H, et al. Application of molecular biological techniques to a seasonal study of ammonia oxidation in a eutrophic freshwater lake [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64 (10): 3 674 – 3 682.
- [29] Juretschko S, Timmermann G, Schmid M, et al. Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64 (8): 3 042 – 3 191.
- [30] Schramm A, de Beer D, van den Heuvel J C, et al. Microscale distribution of populations and activities of *Nitrospira* and *Nitrospira* spp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: quantification by in situ hybridization and the use of microsensors [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65 (8): 3 690 – 3 696.
- [31] Dollhopf S L, Hyun J H, Smith A C, et al. Quantification of ammonia-oxidizing bacteria and factors controlling nitrification in salt marsh sediments [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71 (1): 240 – 246.
- [32] Freitag T E, Chang L, Clegg C D, et al. Influence of inorganic nitrogen management regime on the diversity of nitrite-oxidizing bacteria in agricultural grassland soils [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71 (12): 8 323 – 8 334.
- [33] Martiny A C, Albrechtsen H J, Arvin E, et al. Identification of bacteria in biofilm and bulk water samples from a nonchlorinated model drinking water distribution system: detection of a large nitrite-oxidizing population associated with *Nitrospira* spp [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71 (12): 8 611 – 8 617.
- [34] Burrell P C, Phalen C M, Hovanec T A. Identification of bacteria responsible for ammonia oxidation in freshwater aquaria [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67 (12): 5 791 – 5 800.
- [35] Hovanec T A, Delong E F. Comparative analysis of nitrifying bacteria associated with freshwater and marine aquaria [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62 (8): 2 888 – 2 896.
- [36] Mccaig A E, Phillips C J, Stephen J R, et al. Nitrogen cycling and community structure of proteobacterial β -Subgroup ammonia-oxidizing bacteria within polluted marine fish farm sediments [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65 (1): 213 – 220.
- [37] Könneke M, Bernhard A E, Torre J R, et al. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon [J]. *Nature*, 2005, 437: 543 – 546.
- [38] Wuchter C, Abbas B, Coolen M L, et al. Archaeal nitrification in the ocean [J]. *PNAS*, 2006, 103 (33): 12 317 – 12 322.

- [39] Bower C E, Turner D T. Accelerated nitrification in new seawater culture systems: Effectiveness of commercial additives and seed media from established systems[J]. *Aquaculture*, 1981, 24: 1-9.
- [40] Paungfoo C, Prasertsan P, Intrasingkha N, et al. Enrichment of nitrifying microbial communities from shrimp farms and commercial inocula[J]. *Water Sci Technol*, 2003, 48 (8): 143-150.
- [41] 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): 34-36.
- [42] 刘其根, 孙红妹. 温室养鳖池底硝化细菌的分离及其硝化性能的初步研究[J]. *渔业现代化*, 2002 (5): 11-13.
- [43] 沈珈琦, 方苹, 范伟平. 亚硝化菌株的筛选及其初步鉴定[J]. *生物加工过程*, 2004, 2 (1): 30-34.
- [44] 林燕, 孔海南, 何义亮, 等. 异氧消化细菌的分离及其硝化特性试验研究[J]. *环境科学*, 2006, 27 (2): 324-328.
- [45] 宋志文, 王玮, 赵丙辰, 等. 海水养殖废水的生物处理技术研究进展[J]. *青岛理工大学学报*, 2006, 27 (1): 13-17.
- [46] 闫志英, 廖银章, 李旭东, 等. 新型废水生物脱氮的微生物学研究进展[J]. *应用与环境生物学报*, 2006, 12 (2): 292-296.
- [47] 蔡惠凤, 陆开宏, 金春华, 等. 养殖池塘污染底泥生物修复的室内比较实验[J]. *中国水产科学*, 2006, 13 (1): 140-145.
- [48] 陈岭, 明镇寰. 硝化池中氨氧化细菌 *amoA* 基因的检测及其多样性研究[J]. *浙江大学学报: 理学版*, 2004, 31 (5): 565-569.
- [49] 孙寓姣, 左剑恶, 杨洋, 等. 好氧亚硝化颗粒污泥中硝化细菌群落结构分析[J]. *环境科学*, 2006, 27 (9): 1 858-1 861.
- [50] 明镇寰, 岳春梅. 生物硝化池污水中硝化细菌的快速定量研究[J]. *环境科学学报*, 2002, 22 (6): 796-798.
- [51] 谢冰, 徐华, 徐亚同. 荧光原位杂交法在活性污泥硝化细菌检测中的应用[J]. *上海环境科学*, 2003, 22 (5): 363-365.
- [52] 黄正, 赵芳, 刘红艳, 等. 活性污泥中硝化细菌 16S rDNA 鉴定方法研究[J]. *华中科技大学学报: 医学版*, 2004, 33 (3): 269-272.
- [53] 朱琳, 尹立红, 浦跃朴, 等. 荧光原位杂交法检测环境硝化细菌实验条件优化及应用[J]. *东南大学学报: 自然科学版*, 2005, 35 (2): 266-270.
- [54] 罗鹏, 胡超群, 谢珍玉, 等. 凡纳滨对虾咸淡水养殖系统内细菌群落组成的 PCR-DGGE 分析[J]. *热带海洋学报*, 2006, 25 (2): 49-53.
- [55] 张丹, 徐慧, 刘耀平, 等. OLAND 生物脱氮系统运行及其硝化菌群的分子生物学检测[J]. *应用与环境生物学报*, 2003, 9 (5): 530-533.
- [56] 张丹, 刘耀平, 徐慧, 等. OLAND 生物脱氮系统中硝化菌群 16S rDNA 的 DGGE 分析[J]. *生物技术*, 2003, 13 (5): 1-3.
- [57] Urakawa H, Kurata S, Fujiwara T, et al. Characterization and quantification of ammonia-oxidizing bacteria in eutrophic coastal marine sediments using polyphasic molecular approaches and immunofluorescence staining[J]. *Environ Microbiol*, 2006, 8 (5): 787-803.
- [58] Shao P, Chen Y Q, Zhou H, et al. Phylogenetic diversity of Archaea in prawn farm sediment[J]. *Marine Biology*, 2004, 146: 133-142.
- [59] Weidler G W, Dornmayr-Pfaffenhuemer M, Gerbl F W, et al. Communities of Archaea and Bacteria in a subsurface radioactive thermal spring in the Austrian Central Alps, and Evidence of Ammonia-Oxidizing Crenarchaeota[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73 (1): 259-270.
- [60] Park H D, Wells G F, Bae H, et al. Occurrence of ammonia-oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactors[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72 (8): 5 643-5 647.
- [61] Beman J M, Francis C A. Diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the sediments of a hypernutrified subtropical estuary: Bah a del T bari, Mexico[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72 (12): 7 767-7 777.

Progress in molecular ecology of nitrifying bacteria

MA Ying¹, QIAN Lu-min², WANG Yong-sheng², WU Cheng-ye¹

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361021, China)

Abstract: Nitrifying bacteria have the ability of oxidizing ammonium in eutrophic aquaculture environments to nitrite and nitrate, which are easily assimilated by plants or returned to the atmosphere via denitrification, thus nitrifying bacteria are recognized to play a central role in removing nitrogen compounds from the environment and in maintaining a sustainable aquacultural systems. We here introduced the main species of nitrifying bacteria and their phylogenetic relationship, reviewed the progress of molecular ecology of nitrifying bacteria studies and analysed the current status in domestic study and application, and finally, gave a perspective into the future based on our understanding of the literature and our own work. [*Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14 (5): 872-879]

Key words: nitrifying bacteria; molecular ecology; aquaculture systems