

# 荧光定量 PCR 技术检测红壤稻田土壤厌氧氨氧化细菌

宋亚娜, 林智敏, 陈在杰, 刘晓强

(福建省农业科学院生物技术研究所, 福建 福州 350003)

**摘要:** 利用厌氧氨氧化细菌 16S rDNA 基因特异引物对红壤稻田土壤总 DNA 进行扩增、PCR 产物纯化、克隆和测序, 得到属浮霉菌 (*Planctomycetes*) 的厌氧氨氧化细菌的部分 16S rDNA 序列 (长度为 502 bp)。以含该序列的重组质粒作为荧光定量 PCR 的标准品, 对水稻不同生育期红壤稻田土壤中的厌氧氨氧化细菌数量进行检测。结果表明水稻各生育期内稻田表层和根层土壤中均存在一定数量的厌氧氨氧化细菌, 且其数量随水稻生长有所变化。表土中的数量随水稻生长呈逐渐增加的趋势, 根层土的数量在水稻生长前期变化不大, 孕穗期后明显增加。红壤稻田土壤中存在的厌氧氨氧化细菌对稻田土壤的硝化作用可能具有一定贡献。

**关键词:** 红壤稻田; 厌氧氨氧化细菌; 荧光定量 PCR

中图分类号: S 154.3

文献标识码: A

## Real-time PCR quantification of anaerobic ammonia-oxidizing microorganisms in red paddy soil

SONG Yana, LIN Zhimin, CHEN Zajie, LIU Xiaqiang

(Institute of Biological Technologies, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China)

**Abstract:** DNA in red paddy soil was amplified by polymerase chain reaction (PCR) through specific primers of 16S rDNA gene of anaerobic ammonia-oxidizer. PCR product was purified, cloned and sequenced. A 502 bp sequence of 16S rDNA gene of anaerobic ammonia-oxidizer belonging to *Planctomycetes* was obtained. Quantity of anaerobic ammonia-oxidizer in the red paddy soil during the rice growing season was monitored by the real-time PCR. The standard curve was made using the plasmid DNA with this rDNA sequence. The results showed that anaerobic ammonia-oxidizers existed in the surface as well as the root zone of the red paddy soil. The quantity changed during the rice growth season. The quantity of anaerobic ammonia-oxidizers in the surface soil increased gradually during the growing season. On the other hand, in the root zone, the number of the bacteria in the soil increased only at the late stage after booting. The anaerobic ammonia-oxidizers might contribute to the nitrification in the red paddy soil.

**Key words:** red paddy soil; anaerobic ammonium-oxidizer; real-time PCR

厌氧氨氧化作用 (ANAMMOX-Anaerobic ammonium oxidation) 是指在厌氧条件下, 微生物以  $\text{NO}_2^-$  为电子受体,  $\text{NH}_4^+$  为电子供体, 将  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_2^-$  转变为氮气的生化过程<sup>[1-2]</sup>。在这一过程中起作用的厌氧氨氧化细菌对氧极度敏感、生长非常缓慢, 并且在较高细菌浓度条件下才表现出厌氧氨氧化活性, 因此用传统的微生物分离、纯化培养方法研究厌氧氨氧化菌非常困难。目前, 分子生物学方法已成为研究环境中厌氧氨氧化菌的高效快捷的手段。Strous 等最先测定了一种厌氧氨氧化细菌的 16S rDNA 序列, 并确定了其在细菌系统进化树中的位置属于浮霉菌 (*Planctomycetes*), 命名为 *Candidatus Brocadia anammoxidans*<sup>[3]</sup>。

厌氧氨氧化过程已经在海洋沉积物、海冰和淡水湖等很多生态环境中发现<sup>[4-7]</sup>。水稻生长过程中稻田土壤长期处于淹水状态, 可为厌氧氨氧化细菌生长提供有利环境。因此, 稻田土壤中也可能存在厌氧氨氧化过程。本研究以福建省红壤稻田土壤为供试材料, 运用荧光定量 PCR 技术检测水稻生长期稻田土壤中的厌氧氨氧化细菌及其数量, 为进一步深入研究红壤稻田厌氧氨氧化过程奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

选择位于福州市闽侯县南屿镇的早稻田为采样

收稿日期: 2009-11-20 初稿; 2010-01-05 修改稿

作者简介: 宋亚娜 (1973-), 女, 副研究员, 博士, 主要从事微生物分子生态学研究 (E-mail: syan a@ sina. com)

基金项目: 福建省科技项目-公益类科研院所基本科研专项 (2009R10035-9); 福建省科技计划重点项目 (2008N0110)

地。供试地点属暖湿的亚热带季风气候, 无霜期长达 326 d, 年平均气温为 19.6 ℃、平均湿度 77%、年均降水量 1 342.5 mm。供试土壤基本理化性状为: 有机质含量 31.5 g · kg<sup>-1</sup>、pH 6.10、全氮 1.96 g · kg<sup>-1</sup>、全磷 0.61 g · kg<sup>-1</sup>、全钾 17.27 g · kg<sup>-1</sup>、碱解氮 183.9 mg · kg<sup>-1</sup>、有效磷 11.8 mg · kg<sup>-1</sup>、速效钾 123.6 mg · kg<sup>-1</sup>。分别于早稻汕优 016 (*Oryza sativa* L. Xianyou016) 的分蘖期、孕穗期和成熟期采集 0~5 cm 的表土和 10~20 cm 的根层土壤。早稻栽培的水肥等田间管理均按当地常规进行。在约 500 m<sup>2</sup> 的田块中采用 5 点法采集土样, 将 5 点采集的土壤去除根系、杂草、土壤动物和石块等杂质后混匀, 然后分成 3 份重复。土壤装入 50 mL 塑料离心管中-20 ℃冷冻保存用于土壤微生物荧光定量 PCR 的分析。

## 1.2 方法

1.2.1 土壤微生物总 DNA 提取 采用 FastDNA SPIN Kit For Soil (Q · BIOgene) 的试剂盒方法, 称取 0.5 g 的土壤样品, 按试剂盒的试验步骤进行土壤微生物总 DNA 的提取, DNA 样品-20 ℃冰箱保存待用。

1.2.2 样品 PCR 扩增 选用厌氧氨氧化细菌 16S rDNA 基因特异引物 Pla46: 5'-GGATTAGGCCAT-GCAAGTG-3' 和 Anammox2: 5'-TCTGTATTAG-CGCGGCT-3'<sup>[8]</sup>, 对不同取样时期的稻田表土和根层土 DNA 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 25 μL, 其中 2 μL DNA 模板加反应液 23 μL, 反应液包括 0.5 μL *Taq* DNA 聚合酶 (2.5 U · μL<sup>-1</sup>, 天根生物公司, 北京), 2.5 μL dNTPs (2 mmol · L<sup>-1</sup> 各碱基, 上海生物工程公司, 上海), 2.5 μL 10 × PCR-buffer (10 倍的 PCR 缓冲液) (天根生物公司, 北京), 前、后引物各 2 μL (5 pmol · μL<sup>-1</sup>, 上海生物工程公司, 上海) 和 13.5 μL 超纯水。反应程序为 95 ℃ 予变性 5 min, 94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 1 min, 35 个循环, 最后 72 ℃ 延伸 10 min。用 1.5% 的琼脂糖电泳溴化乙锭染色检测 PCR 产物。

1.2.3 PCR 产物克隆 将各生育期表土和根层土的 PCR 扩增产物混合后, 使用 E. Z. N. A. Gel Extraction Kit (OMEGA, 美国, USA) 胶回收试剂盒纯化。再按试剂盒方法用 pMD18-T 载体连接 PCR 纯化产物, 以大肠杆菌 DH5α 制备的感受态细胞转化连接产物, 在氨苄青霉素平板上进行蓝白斑试验筛选阳性克隆。再用厌氧氨氧化细菌 16S rDNA 基因的特异引物对阳性克隆菌的菌液进行 PCR 鉴定, 琼脂糖电泳结果显示 (图 2) 阳性克隆菌的菌液能够扩增出单一的目的片段, 表明厌氧氨氧化细菌 16S rDNA 基因重组质粒构建成功。

GenBank 上进行 Blast 同源性比对分析。

1.2.4 荧光定量 PCR 检测标准曲线制备 利用 E. Z. N. A. Plasmid Mini Kit (OMEGA, 美国, USA) 试剂盒提取上述阳性克隆重组质粒 DNA, 然后用 Nanodrop (美国, UAS) 测定重组质粒 DNA 的质量浓度。根据已知重组质粒全序列和阿伏伽德罗常数 ( $6.02 \times 10^{23}$  分子数 · mol<sup>-1</sup>) 计算拷贝数为  $7.86 \times 10^{10}$  cells · μL<sup>-1</sup>。以 10 倍梯度稀释重组质粒:  $7.86 \times 10^9$  ~  $7.86 \times 10^2$  cells · μL<sup>-1</sup> 做为标准曲线进行荧光定量 PCR 检测。

1.2.5 样品的荧光定量 PCR 检测 对以上述重组质粒 DNA 构建的标准曲线样品和各生育期表土和根层土 DNA 样品进行绝对荧光定量 PCR 检测。每个样品进行 3 次重复。采用了 SYBR<sup>®</sup> Premix *Ex Taq*<sup>TM</sup> (宝生物工程公司, TakaRa, 大连) 试剂盒于 ABI PRISM 7500 Real Time PCR System 扩增仪上进行绝对定量 PCR 分析。荧光定量 PCR 反应体系 25 μL, 其中稀释 5 倍的 DNA 模板 2 μL, 反应液 23 μL, 反应液包括 12.5 μL SYBR Premix *Ex Taq*<sup>TM</sup> (2x), 0.5 μL ROX Reference Dye II (50x), 前、后引物各 1 μL (5 pmol · L<sup>-1</sup>, 英骏生物工程公司, 上海) 和 8 μL 超纯水。反应程序为 95 ℃ 予变性 30 s, 94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 1 min, 40 个循环。

1.2.6 数据分析 利用 SPSS13.0 软件进行数据方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 厌氧氨氧化细菌的 PCR 扩增

利用厌氧氨氧化细菌 16S rDNA 基因的特异引物对红壤稻田土壤 DNA 进行扩增, 琼脂糖电泳结果显示 (图 1) 各个样品中都能得到目的片段, 目的片段大小约为 500 bp, 且所有样品均只扩增到单一的目的片段条带。

### 2.2 PCR 产物克隆

将上述扩增得到的 6 个样品的 PCR 产物进行混合后再纯化, 用 pMD18-T 载体连接 PCR 纯化产物, 以大肠杆菌 DH5α 制备的感受态细胞转化连接产物, 在氨苄青霉素平板上进行蓝白斑试验筛选阳性克隆。再用厌氧氨氧化细菌 16S rDNA 基因的特异引物对阳性克隆菌的菌液进行 PCR 鉴定, 琼脂糖电泳结果显示 (图 2) 阳性克隆菌的菌液能够扩增出单一的目的片段, 表明厌氧氨氧化细菌 16S rDNA 基因重组质粒构建成功。

将该质粒菌液送往上海英骏生物工程有限公司

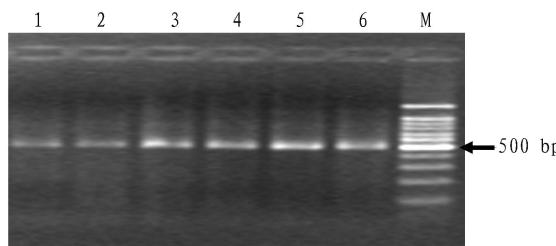


图 1 红壤稻田土壤厌氧氨氧化细菌 16S rDNA 基因扩增

Fig 1 PCR of 16S rDNA gene of anaerobic ammonium oxidizers in red paddy soil

注: 1- 分蘖期表土; 2- 孕穗期表土; 3- 成熟期表土; 4- 分蘖期根层土; 5- 孕穗期根层土; 6- 成熟期根层土; M - 100 bp DNA ladder

进行测序, 获得大小为 502 bp 克隆片段序列。测序结果在 GenBank 上进行 Blast 同源性比对显示: 该克隆序列与 GenBank 已公布的厌氧氨氧化细菌同属浮霉细菌 [Uncultured planctomycete (GQ443694)] 同源性为 94%。结果表明该重组质粒 DNA 可以作为厌氧氨氧化细菌荧光定量 PCR 检测的标准样品。以含有该序列的重组质粒作为标准 DNA 进行了红壤稻田土壤的厌氧氨氧化细菌的荧光定量 PCR 检测。

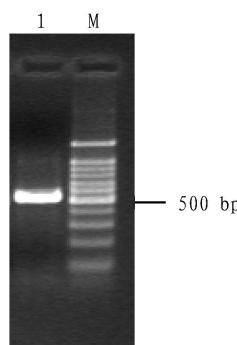


图 2 克隆菌的菌液 PCR 扩增

Fig 2 PCR of positive clone

注: 1- 克隆菌菌液; M - 100 bp DNA ladder。

### 2.3 厌氧氨氧化细菌的荧光定量 PCR 检测

运用 SYBR 染料法荧光定量 PCR 检测了水稻各生育期红壤稻田表土和根层土中的厌氧氨氧化细菌数量。待测样品和标准曲线样品均重复 3 次, 图 3-a 显示了待测样品和不同稀释倍数的重组质粒 DNA 的扩增曲线, 图 3-b 显示了根据重组质粒所制定的标准曲线, 其  $R^2$  为 0.995、斜率 -3.39、截距 40.78, 线性范围可达到 8 个数量级 ( $7.86 \times 10^2 \sim 7.86 \times 10^9 \text{ cells} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )。通过该标准曲线

计算可获得各生育期土壤待测样品中的厌氧氨氧化细菌数量。

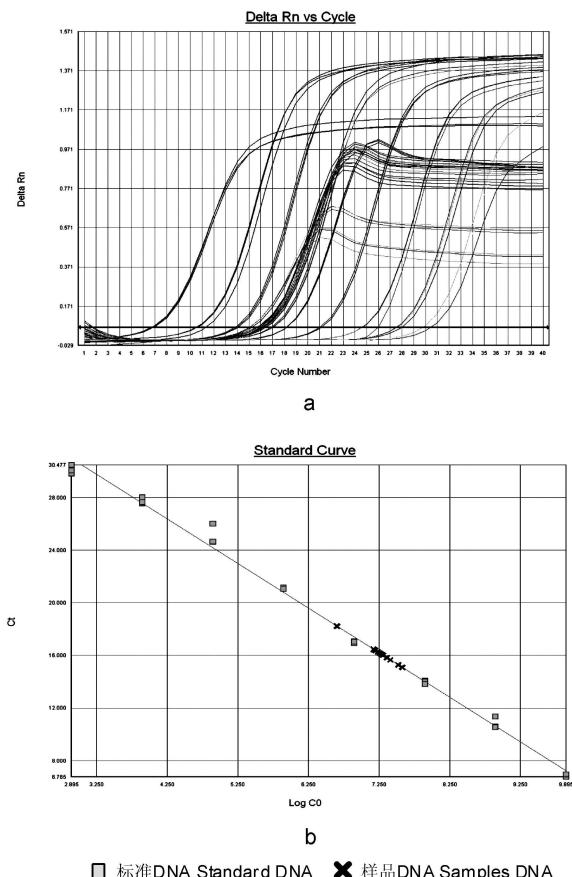


图 3 荧光定量 PCR 扩增曲线(a)和标准曲线(b)

Fig 3 Amplification curve (a) and standard curve (b) of real-time PCR

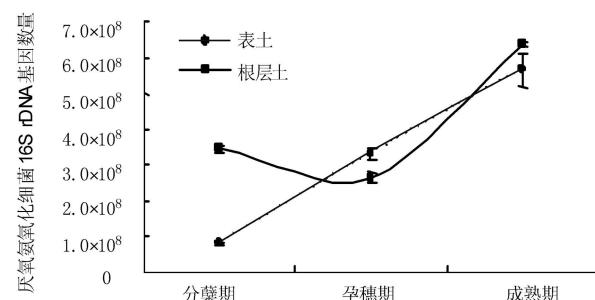


图 4 不同生育期稻田土壤厌氧氨氧化细菌数量变化

Fig 4 Changes in number of anaerobic ammonium oxidizers in paddy soil during rice growing season

水稻不同生育期内土壤厌氧氨氧化细菌数量如图 4 所示。由此可见, 红壤稻田土壤的厌氧氨氧化细菌数量在  $1.0 \times 10^8 \sim 7.0 \times 10^8 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1} \text{ dry soil}$ , 且水稻生育期内稻田表土和根层土中的厌氧氨氧化细菌数量都具有增加趋势, 其中表土中细菌

数量呈明显的线性增加 ( $P < 0.05$ )，而根层土中细菌数量在生育中前期变化不大，生育后期才显著增加 ( $P < 0.05$ )。

### 3 结论与讨论

厌氧氨氧化脱氮过程与硝化、反硝化过程相比能节省大量氧气和有机碳，格外值得关注。虽然研究表明厌氧氨氧化细菌应在自然环境中广泛存在，但由于目前这类菌的分离培养还十分困难，使得对于厌氧氨氧化细菌的生理生态特性及其在自然界中可能存在的新种的描述都还很不够。应用分子生物学方法通过对 16S rDNA 基因的研究能够鉴定环境中的厌氧氨氧化细菌，为这类微生物的研究提供了技术<sup>[9-10]</sup>。稻田土壤长期淹水，具有进行厌氧氨氧化过程的条件，而稻田土壤中的好氧/厌氧界面又能为厌氧氨氧化微生物提供理想的生境。因此稻田土壤中有可能存在厌氧氨氧化过程及其相关微生物。本研究通过利用厌氧氨氧化细菌 16S rDNA 基因特异引物，从稻田土壤中扩增到与厌氧氨氧化细菌同属分枝很深的浮霉菌的 16S rDNA 基因片段，并以含有此片段序列的重组质粒 DNA 为标准品，运用荧光定量 PCR 技术检测到稻田土壤中存在较丰富的该基因片段。结果表明稻田土壤中应存在一定数量的厌氧氨氧化细菌，而这些厌氧氨氧化细菌的种类组成、是否含有新种、是否具有厌氧氨氧化活性及其对土壤硝化作用的影响等问题都还有待进一步研究。

### 参考文献:

- [1] JETTEN M S M, STROUS M, VAN DE PAS- SCHOOSEN K T, et al. The anaerobic oxidation of ammonium [J]. FEMS Microbiol Rev, 1999, 22 (5): 421- 437.
- [2] DRAAF A A, MULDER A, PETER DE B, et al. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process [J]. Appl Environ Microbiol, 1955, 61 (4): 1246- 1251.
- [3] STROUS M, FUERST J A, KRAMER E H M, et al. Missing lithotroph identified as new planctomycete [J]. Nature, 400: 446- 449.
- [4] THAM DRUP B, DALSGAARD T. Production of N<sub>2</sub> through an aerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68 (3): 1312- 1318.
- [5] RYSGAARD S, GLUD R N, RISGAARD- PETERSEN N, et al. Denitrification and anammox activity in Arctic marine sediments [J]. Limnol Oceanogr, 49 (5): 1493- 1502.
- [6] RYSGAARD S, Glud R N, RISGAARD- PETERSEN N, et al. Anaerobic N<sub>2</sub> production in Arctic sea ice [J]. Limnol Oceanogr, 49 (1): 86- 94.
- [7] SCHUBERT C J, DU RISCH- KAISER E, WEHRLI B, et al. Anaerobic ammonium oxidation in a tropical freshwater system (Lake Tanganyika) [J]. Environ Microbiol, 8 (10): 1857- 1863.
- [8] 任宏洋, 张代钧, 丛丽影, 等. 一种未见报道的厌氧氨氧化细菌分子生物学鉴定 [J]. 环境工程学报, 2008, 2 (3): 314- 318.
- [9] 秦玉洁, 周少奇. 厌氧氨氧化菌的研究进展 [J]. 生态学杂志, 2007, 26 (11): 1867- 1872.
- [10] 贾振杰, 杨清香, 刘如钢. 厌氧氨氧化菌的研究进展 [J]. 微生物学杂志, 2006, 26 (6): 74- 79.

(责任编辑: 林海清)