

宁波沿海陆源排污口假单胞菌属 (*Pseudomonas*)分布特点*

陈丽萍¹ 侯付景² 张迪骏¹ 何伟娜¹ 周君¹ 张春丹¹
童茜茜¹ 王中华¹ 李太武³ 苏秀榕¹

(1. 宁波大学海洋学院 宁波 315211; 2. 宁波绿之健药业有限公司 宁波 315505;
3. 宁波城市职业技术学院 宁波 315100)

摘要 采用高通量 454 焦磷酸测序方法对宁波沿海 2 个重点排污口、8 个一般排污口的 20 个站位水样进行分析, 得到 2011 年 3 月、5 月、8 月、10 月份各排污口假单胞菌属的分布情况。结果表明, 宁波沿海陆源排污口中存在较多的假单胞菌属。在检出的假单胞菌属中, 维罗纳假单胞菌(*Pseudomonas veronii*)和莓实假单胞菌(*Pseudomonas fragi*)的含量相对较多, 分别占 56.72%、13.904%; 排污口中假单胞菌属的数量存在季节性差异, 3 月份、5 月份假单胞菌的数量相对较多, 8 月份和 10 月份较少, 推测与季节性温度变化有关; 假单胞菌属的含量与排污口的主要污染物有关, 氨氮含量较高的排污口假单胞菌属的含量更高。

关键词 假单胞菌属; 454 焦磷酸测序; 陆源排污口; 聚类分析
中图分类号 X511

假单胞菌属(*Pseudomonas*)广泛分布于土壤、淡水、海水以及生物体中, 是一类生长适应能力较强的革兰氏阴性菌。假单胞菌属的部分菌种不仅是鱼、虾和甲壳类的病原菌, 而且极易引起人的急性腹泻和败血症, 因此也被称为人鱼共患的病原菌(许宏毅等, 1993)。

宁波是高速发展中的沿海城市, 也是水产品加工流通集散地, 水产养殖业对促进其经济发展起着至关重要的作用。由于区域地理限制, 目前有很大一部分陆源排污口设置在海水增养殖区邻近海域, 极易造成沉积物污染, 造成环境变化以及对底栖生物群落的影响(李玉等, 2010)。排污口问题不仅加快了排污口邻近增养殖区环境恶化, 而且导致水产品的食用安全风险增加, 因此加强对排污口处假单胞菌属的研究十分必要。本文选取宁波沿海 10 个主要的陆源排污口, 分别对排污口处和距排污口 50m 以外

的 20 个站位的水样进行分析。在 454 焦磷酸测序基础上(徐晓宇等, 2010; 林萍等, 2011), 根据不同采样月份各站位假单胞菌属检出频次的统计, 分析假单胞菌的分布概况。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

选取宁波沿海 2 个重点陆源排污口和 8 个一般陆源排污口作为采样站位(采样站位区域如图 1 所示)。分别于 2011 年 3 月、5 月、8 月、10 月进行采集。每次采集 4L 水样, 膜过滤后提取 DNA。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 取约 2L 海水, 以 0.22 μ m 的微孔滤膜富集微生物, 利用试剂盒提取基因组 DNA(美国 Omega 生物技术公司)。

1.2.2 PCR 扩增 根据细菌 16S rRNA 的保守序列,

* 海洋公益性行业专项经费资助项目, 201105007-4 号; 浙江省重大科技攻关项目, 2006C13089 号; 宁波市科技局资助项目, 2008C50027 号。陈丽萍, 硕士研究生, E-mail: chenliping.nbu@hotmail.com

通讯作者: 苏秀榕, 教授, 博士生导师, E-mail: suxiurong@nbu.edu.cn

收稿日期: 2012-12-21, 收修改稿日期: 2013-02-15

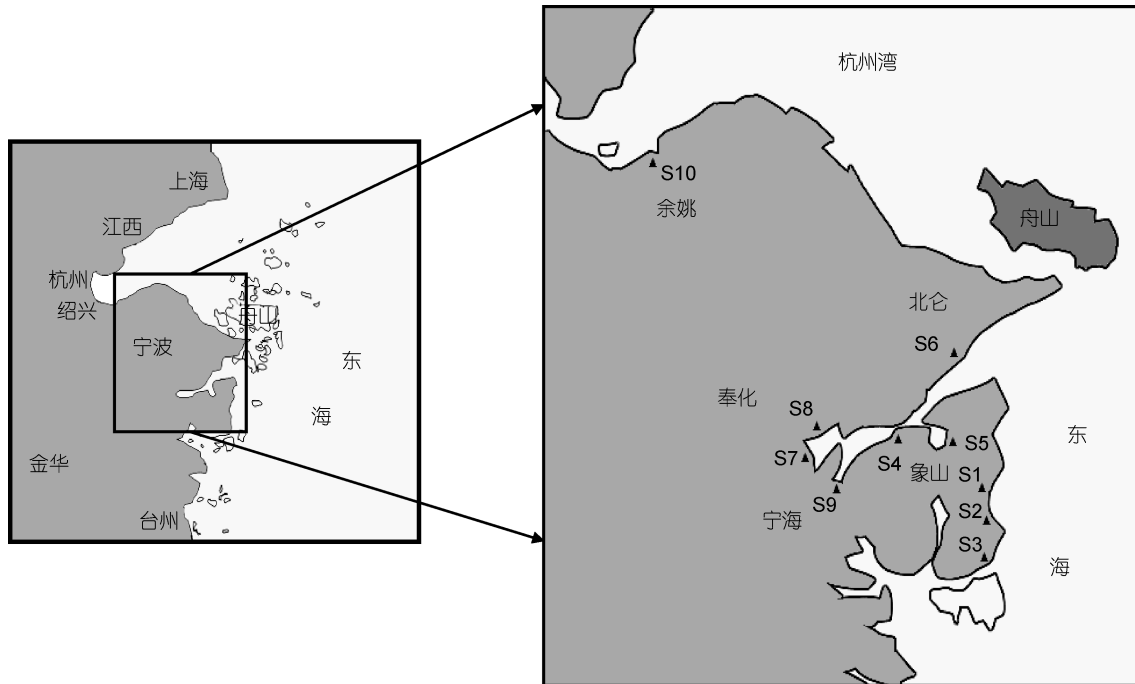


图 1 采样站位区域分布图

Fig.1 Map of sampling site

S1: 象山爵溪东塘排污口; S2: 象山水桶岱垃圾场排污口, S3: 象山石浦水产加工园区排污口, S4: 象山西周工业园区排污口, S5: 象山墙头综合排污口, S6: 北仑三山排污口, S7: 宁海西店崔家综合排污口, S8: 奉化下陈排污口, S9: 宁海颜公河入海排污口, S10: 余姚黄家埠排污口; 其中 S5 和 S9 为重点排污口, 其余为一般排污口

利用 Primer Premier 5.0 设计扩增引物: 16S F (5'-CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG ACT CAG-3')和 16S R (5'-CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TCT CAG-3')。

20 μ L 扩增反应体系: 10 \times buffer 2 μ L, 2 μ L MgCl₂, 2 μ L dNTP, 上游引物和下游引物各 25 μ L, 0.2 μ L Taq DNA 聚合酶和 1 μ L DNA 模版。PCR 扩增产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50s, 35 个循环; 最终 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min (刘兵等, 2009)。

1.2.3 测序与分析 将纯化后的 PCR 产物进行 454 焦磷酸测序 (Margulies *et al.*, 2005; 华蔚颖等, 2010), 测序结果用罗氏软件 2.5.3 进行信号处理分析。根据假单胞菌属在文库中出现的频次数量, 进一步用 R For Window 2.15.2、SPSS 等进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 排污口假单胞菌属的优势菌种分析

通过对 454 高通量测序平台结果进行比对分析, 共检出假单胞菌属中 19 个种, 分别是产碱假单胞菌

(*Pseudomonas alcaligenes*)、鳃败血假单胞菌(*P. anguilliseptica*)、巴利阿里假单胞菌(*P. balearica*)、*P. borbori*、香茅醇假单胞菌(*P. citronellolis*)、*P. cuatrocienegasensis*、莓实假单胞菌(*P. fragi*)、弯曲假单胞菌(*P. geniculata*)、韩国假单胞菌(*P. koreensis*)、门多萨假单胞菌(*P. mendocina*)、摩氏假单胞菌(*P. mosselii*)、硝基还原假单胞菌(*P. nitroreducens*)、海绵假单胞菌(*P. pachastrellae*)、*P. rhodesiae*、施氏假单胞菌(*P. stutzeri*)、阴城假单胞菌(*P. umsongensis*)、维罗纳假单胞菌(*P. veronii*)、绿黄假单胞菌(*P. viridiflava*)、*P. libanensis*, 各菌株检出频次分布如表 1 所示。

在排污口假单胞菌属的检出中, 维罗纳假单胞菌(*P. veronii*)、莓实假单胞菌(*P. fragi*)、门多萨假单胞菌(*P. mendocina*)、巴利阿里假单胞菌(*P. balearica*)、*P. libanensis*、施氏假单胞菌(*P. stutzeri*)等出现的频率最高。

2.2 假单胞菌的分布与时间的关系

在 3 月份(图 2a), S9 号站位宁海颜公河入海排污口的假单胞菌属检出频次最高(排污口 1708 次, 距排污口 50m 处 1002 次), 其中维罗纳假单胞菌(*P. veronii*)的检出次数最多占总量的 95.9%, 其次是莓实假单胞菌(*P. fragi*)占 2.69%。S4 号站位象山西周工业园区综

表 1 排污口中假单胞菌属检出情况
Tab.1 The occurrence of *Pseudomonas* in sewage outlets

检出菌种	排污口假单胞菌数量	
	检出次数	构成比(%)
产碱假单胞菌(<i>P. alcaligenes</i>)	13	0.232
鳃败血假单胞菌(<i>P. anguilliseptica</i>)	6	0.107
巴利阿里假单胞菌(<i>P. balearica</i>)	456	8.128
香茅醇假单胞菌(<i>P. citronellolis</i>)	12	0.214
莓实假单胞菌(<i>P. fragi</i>)	780	13.904
弯曲假单胞菌(<i>P. geniculata</i>)	1	0.018
韩国假单胞菌(<i>P. koreensis</i>)	81	1.444
门多萨假单胞菌(<i>P. mendocina</i>)	473	8.431
摩氏假单胞菌(<i>P. mosselii</i>)	4	0.071
硝基还原假单胞菌(<i>P. nitroreducens</i>)	13	0.232
海绵假单胞菌(<i>P. pachastrellae</i>)	13	0.232
施氏假单胞菌(<i>P. stutzeri</i>)	226	4.029
阴城假单胞菌(<i>P. umsongensis</i>)	23	0.410
维罗纳假单胞菌(<i>P. veronii</i>)	3182	56.720
绿黄假单胞菌(<i>P. viridiflava</i>)	19	0.339
<i>P. borbori</i>	4	0.071
<i>P. cuatrocienegasensis</i>	42	0.749
<i>P. libanensis</i>	257	4.581
<i>P. rhodesiae</i>	5	0.089

合排污口检出频次也较高(排污口 577 次, 距排污口 50m 处 927 次), 其中检出最多的也是维罗纳假单胞菌(*P. veronii*)和莓实假单胞菌(*P. fragi*)。

在 5 月份(图 2b), S2 号站位象山水桶沓垃圾场渗滤液排污口(排污口检出 2456 次, 距排污口 50m 处假

出 727 次)和 S10 号站位余姚黄家埠排污口的假单胞菌属检出频次较高(排污口 1228 次, 距排污口 50m 处 680 次)。

在 8 月份(图 2c), S2 号站位象山水桶沓垃圾场渗滤液排污口的假单胞菌属检出频次最多(排污口 192 次, 距排污口 50m 处 224 次), 且与其它排污口检出频次相差较多, 总体检出频次较前两个月低。10 月份各排污口假单胞菌属的检出频次较为相近(图 2d), 总体检出频次较低, 10 个站位排污口的平均检出频次仅 142 次。

3 月份和 5 月份排污口中假单胞菌属的检出次数总体明显高于 8 月份和 10 月份。8 月份东海海洋表面平均温度达到年最高值, 高温也使部分工厂停工休息, 排污量相对较少, 3 月份和 5 月份排污量较多。假单胞菌有很大一部分属于耐冷菌(杨光富等, 2011), 3 月份、5 月份气候潮湿温暖, 水文条件极易造成细菌的生长繁殖, 推测排污口中假单胞菌属的检出频次与季节性温度有关。

假单胞菌属作为一类典型的腐败细菌, 适应性强, 可广泛存在于多种水体、土壤中和水产品上极易繁殖。S2 号, S4 号-S9 号 7 个排污口站位, 所在功能海域都为养殖区, 在 3 月份和 5 月份尤其应该加强排污治理, 防治养殖区污染, 降低潜在水产品安全隐患风险。

2.3 各排污口之间的分布规律

对不同检测时间各排污口和距排污口 50m 处假

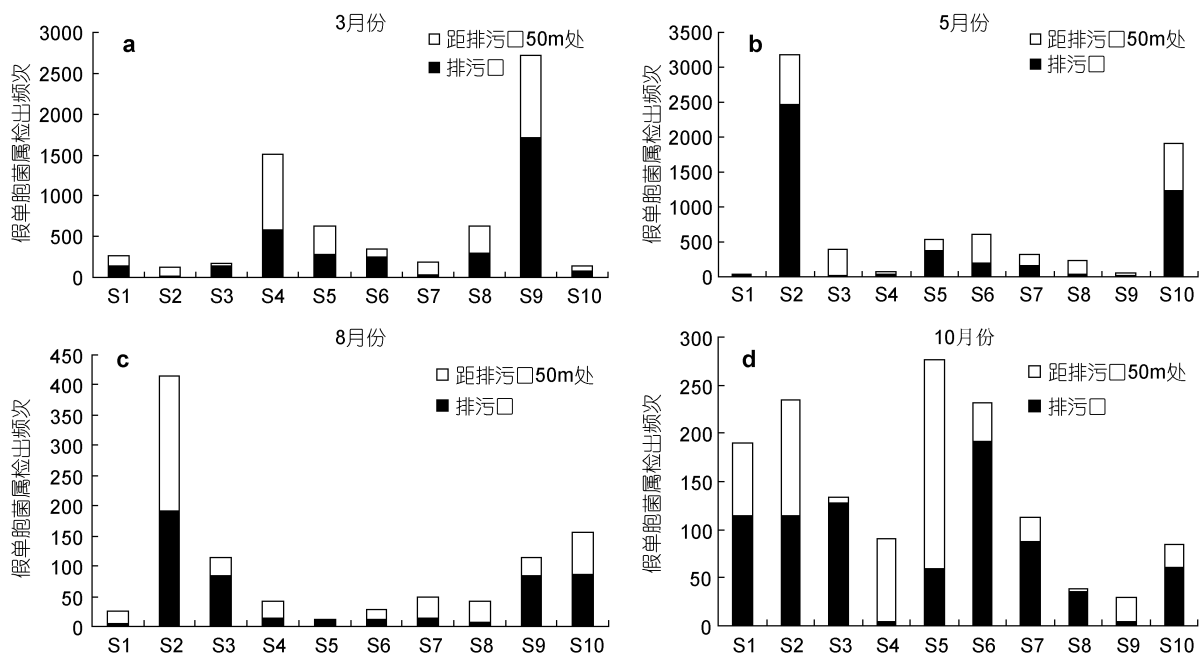


图 2 不同检测月份、不同站位排污口假单胞菌属的检出次数

Fig.2 The numbers of *Pseudomonas* in different sewage outlets and different months

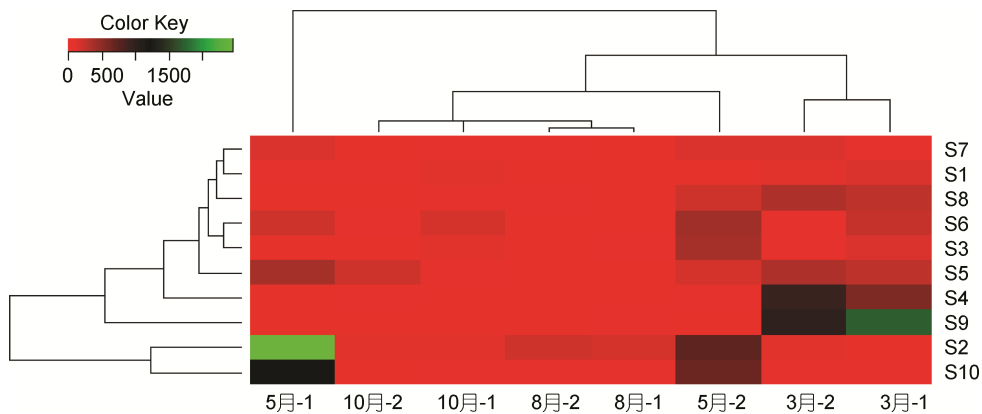


图3 不同检测月份不同排污口站位假单胞菌属数量的聚类分析

Fig.3 Cluster analysis of the number of *Pseudomonas* in different sewage outlets and different months

注:“-1”表示排污口处;“-2”表示距排污口50m处

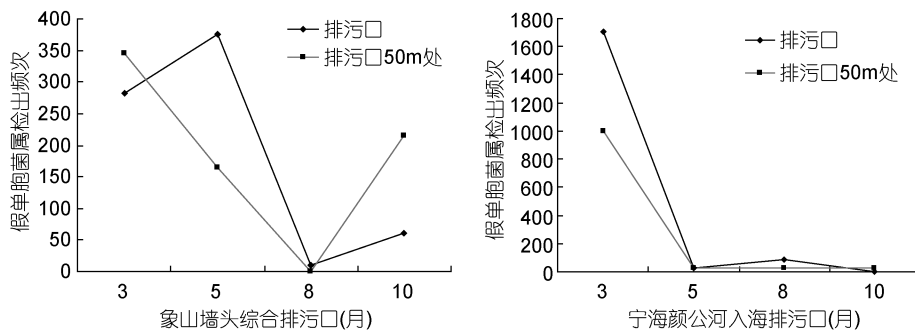


图4 重点排污口各月份假单胞菌属检出频次分布情况

Fig.4 The occurrence frequency of *Pseudomonas* in key sewage outlets of different months

单胞菌属检出频次的聚类分析结果如图3所示。根据假单胞菌属的数量不同,排污口可聚为三类: S10和S2一类, S9一类, S1、S3、S4、S5、S6、S7、S8这7个排污口为一类,其中S4站位的假单胞菌属检出次数又比同类中其它6个排污口站位多。在5月份,排污口和距排污口50m处假单胞菌属的检出数相差较大;其它检测月份检测结果区别不明显。

S2号、S4号、S9号、S10号排污口站位的检出次数较高,其海水质量比其它排污口更适合假单胞菌属的生长繁殖。S2号站位象山水桶袋垃圾场渗透水排污口和S9号站位宁海颜公河入海排污口均为A级排污口。前者的氨氮、化学需氧量和总磷含量较高;后者的主要污染物为粪大肠菌群、总磷、氨氮。假单胞菌的生长pH范围在7.0—8.5,大多数不能在pH6或6以下生长。垃圾渗透液中氨氮浓度较高(孙孝龙等,2010),给假单胞菌属提供合适的pH、丰富的有机物以及较好的代谢条件(杨光富等,2011)。同时,检出次数最低的S1号站位象山爵溪东塘排污口和S7号站位宁海西店崔家综合排污口的主要污染物中都不包

含氨氮,推测假单胞菌属的检出次数高低与氨氮存在一定关系。

假单胞菌属是分解有机质能力很强的革兰氏阴性细菌, *P. veronii*、*P. alcaligenes*、*P. stutzeri*和*P. mendocina*可降解甲苯、氯化烃等污染物(Hong *et al.*, 2004; Weissenfels *et al.*, 1990; Stoffels *et al.*, 1998; Lewis *et al.*, 2001)。有研究表明将黑曲霉和荧光假单胞菌引入到城市污水处理工艺中,可以明显提高常规工艺对重金属的吸附降解效率(李海华等,2011)。将大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)肠道的弧菌拮抗菌进行筛选与鉴定,结果显示假单胞菌为其中较强拮抗作用的菌株之一(王娟等,2010)。研究表明在缺铁的条件下假单胞

菌能产生抗菌活性,通过与致病菌竞争环境中的铁离子而抑制致病菌的生长(Gram *et al.*, 1999)。将陆源排污口中的假单胞菌属优势菌进行分离、驯化、扩大培养,将是处理养殖污水有机污染物以及活性开发利用的良好菌种。

2.4 假单胞菌属在重点排污口中的分布

象山墙头综合排污口和宁海颜公河入海排污口为宁波市两个重点沿海排污口。假单胞菌属的检出频次在不同时间具有明显差异,见图4。象山墙头综合排污口中的假单胞菌检出频次最高为5月份,最低的是8月份。宁海颜公河入海排污口的假单胞菌属检出频次最高为3月份排污口高达1708次,距排污口50m处1002次,其余三个月份的假单胞菌属平均检出次数仅33次。象山墙头综合排污口的主要污染为粪大肠菌群、苯胺、生化需氧量,宁海颜公河入海排污口的主要污染物为粪大肠菌群、总磷、氨氮。其中宁海颜公河排污口的假单胞菌属检出频次总体次数比象山墙头综合排污口多,这与之前推测假单胞菌属检出频次与氨氮含量相符合。作为宁波市重点排污口,

象山墙头综合排污口和宁海颜公河入海排污口的邻近海域均为海水增殖区,为杜绝假单胞菌属在增殖区影响水产品质量,造成食源性污染,在3月份和5月份期间尤其要注意对排污口假单胞菌属的防治处理。

排污口的假单胞菌属极易侵染海水增殖区的水产品,造成食源性致病菌污染。利用高通量454测序可以对排污口不易培养的假单胞菌属进行检测分析,大大扩展了对排污口细菌多样性的分析的认识。通过对不同排污口在不同采样检测时间的假单胞菌属检出次数的比较,3月份和5月份检出频次较多,8月份和10月份检出频次相对较少,表明宁波市陆源入海排污口的假单胞菌属的数量确实存在季节性差异,氮含量较高的排污口水质中假单胞菌属的含量更高,其中维罗纳假单胞菌(*P. veronii*)和莓实假单胞菌(*P. fragi*)的含量较多。

参 考 文 献

- 王娟,封永辉,蔡立胜等,2010.来自大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)肠道的弧菌拮抗菌的筛选与鉴定.海洋与湖沼,(05):707—713
- 华蔚颖,徐昭,张梦晖等,2010.CVTree在454高通量测序分析菌群结构中的应用.中国微生态学杂志,22(04):312—316
- 刘兵,李太武,苏秀榕等,2009.宁波北仑港冬季浮游细菌多样性研究.台湾海峡,28(2):217—222
- 许宏毅,杨淑专,苏文金,1993.厦门地区养殖对虾细菌性病害病原学调查.福建水产,03:15—17
- 孙孝龙,蒋文举,2010.国内垃圾渗滤液处理工艺现状与技术探讨.云南化工,37(2):40—43
- 李玉,冯志华,李谷祺等,2010.连云港近岸海域沉积物中重金属污染来源及生态评价.海洋与湖沼,41(6):829—833
- 李海华,白国强,付莹莹等,2011.黑曲霉、荧光假单胞菌去除污水中重金属试验研究.灌溉排水学报,30(01):57—60
- 杨光富,魏云林,2011.假单胞菌研究现状及应用前景.生物技术通报,01:37—39+49
- 林萍,周与华,李擎天等,2011.运用454焦磷酸测序技术对病原菌16S rDNA的分析.检验医学,(6):364—367
- 徐晓宇,刘和,2010.454测序法在环境微生物生态研究中的应用.生物技术通报,73—77
- Gram L, Melchiorson J, Spanggaard B *et al*, 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. Appl Environ Microbiol, 65(3): 969—973
- Hong H B, Nam I H, Murugesan K *et al*, 2004. Biodegradation of dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran, and chlorodibenzo-p-dioxins by *Pseudomonas veronii* PH-03. Biodegradation, 15(5): 303—313
- Lewis T A, Paszczyński A J, Gordon-Wylie S W *et al*, 2001. Carbon tetrachloride dechlorination by the bacterial transition metal chelator pyridine-2, 6-bis (thiocarboxylic acid). Environ Sci Technol, 35(3): 552—559
- Margulies M, Egholm M, Altman W E *et al*, 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. Nature, 437: 376—380
- Stoffels M, Amann R, Ludwig W *et al*, 1998. Bacterial community dynamics during start-up of a trickle-bed bioreactor degrading aromatic compounds. Appl Environ Microbiol, 64(3): 930—939
- Weissenfels W D, Beyer M, Klein J, 1990. Degradation of phenanthrene, fluorine and fluoranthene by pure bacterial cultures. Appl Microbiol Biotechnol, 32(4): 479—484

DISTRIBUTION CHARACTERISTICS OF *PSEUDOMONAS* IN NINGBO COASTAL SEWAGE OUTLETS

CHEN Li-Ping¹, HOU Fu-Jing², ZHANG Di-Jun¹, HE Wei-Na¹, ZHOU Jun¹, ZHANG Chun-Dan¹, TONG Qian-Qian¹, WANG Zhong-Hua¹, LI Tai-Wu³, SU Xiu-Rong¹

(1. School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo, 315211; 2. Ningbo Green-Health Pharmaceutical Co., Ltd., Ningbo, 315505; 3. Ningbo City College of Vocational Technology, Ningbo, 315100)

Abstract Water samples were collected at 20 sites spread across 10 sewage outlets, two key sewage outlets, and eight general sewage outlets in Ningbo City during March, May, August, and October of 2011. Samples were analyzed using high-throughput 454 pyrophosphate sequencing to determine the distribution of *Pseudomonas*. The results show *Pseudomonas* was present in sewage off the coast. *Pseudomonas veronii* and *Pseudomonas fragi* were the most common species, accounting for 56.72% and 13.90%, respectively, of all detectable *Pseudomonas*. The numbers of *Pseudomonas* showed seasonal differences, more in March and May, and less in August and October, indicating seasonal alternation in temperature. The numbers of *Pseudomonas* were associate with the main pollutant in the outlets, and higher levels of ammonia nitrogen corresponding to more *Pseudomonas*.

Key words *Pseudomonas*; high-throughput 454 pyrophosphate sequencing; sewage outlet; cluster analysis