

## 亚硝氮对海洋着色菌亚硝氮和氨氮去除以及 光合色素合成的影响

蒋鹏 赵春贵\* 贾雅琼 杨素萍\*

(华侨大学 生物工程与技术系 福建 厦门 361021)

**摘要:**【目的】在以亚硝氮为唯一氮源和亚硝氮-氨氮共存体系中, 考察和分析海洋着色菌 (*Marichromatium gracile*) YL28 菌株对水体亚硝氮的环境适应能力。【方法】采用分光光度法分析亚硝氮、氨氮去除效率以及亚硝氮对菌体生物量和色素含量的影响, 采用薄层层析法分析亚硝氮对菌体光合色素组成的影响。【结果】YL28 菌株能以亚硝氮为唯一氮源生长, 主要积累 2 种细菌叶绿素 (BChl) 组分 (BChl  $a_{\text{THGG}}$  和 BChl  $a_p$ )、1 种细菌脱镁叶绿素 (Bphe) 和玫红品 (Rhodopin)、螺菌黄质 (Spirilloxanthin)、脱水紫菌红醇 (Anhydro rhodovibrin)、番茄红素 (Lycopene) 4 种类胡萝卜素 (Car); YL28 生物量和对亚硝氮的去除效率随亚硝氮浓度升高而降低, 完全去除亚硝氮的浓度可达 200 mg/L 以上; 当亚硝氮浓度高于 25 mg/L, 单位质量菌体 BChl  $a$  和 Car 总量降低, BChl  $a$  和 Car 合成的末端产物 (BChl  $a_p$  和 Spirilloxanthin) 以及 Bphe 相对含量升高, 其它 4 种色素组分相对含量则降低, 但 Car 与 BChl  $a$  相对含量的比值未见明显变化。当亚硝氮-氨氮共存时, YL28 菌株对亚硝氮的耐受能力和去除能力明显提高, 完全去除亚硝氮的浓度可达 300 mg/L 以上; 氨氮减缓了亚硝氮对光合色素合成的抑制作用, 提高了菌体色素合成总量, 各色素组分相对含量的变化与亚硝氮为唯一氮源时的变化规律一致。【结论】YL28 菌株能高效去除亚硝氮, 亚硝氮对菌株生长和光合色素的合成有抑制作用, 但氨氮能明显提高 YL28 菌株对亚硝氮的适应能力。这为进一步开发高效脱除亚硝氮的 APB 水质调节剂奠定了基础。

**关键词:** 亚硝氮, 海洋着色菌, 光合色素

## Effects of nitrite on ammonia-nitrogen removal and nitrite-nitrogen as well as photopigment biosynthesis of *Marichromatium gracile* YL28

JIANG Peng ZHAO Chun-Gui\* JIA Ya-Qiong YANG Su-Ping\*

(Department of Bioengineering and Biotechnology, Huaqiao University, Xiamen, Fujian 361021, China)

**Abstract:** [Objective] To understand the adaptability of *Marichromatium gracile* YL28 to nitrite

基金项目: 国家自然科学基金项目(No.31070054, 31270106); 国家海洋公益性行业科研专项项目(No.201505026); 福建省自然科学基金项目(No. 2012J01136)

\*通讯作者: Tel: 86-592-6166178

✉: 赵春贵: chungui@hqu.edu.cn; 杨素萍: yangsuping@hqu.edu.cn

收稿日期: 2014-09-22; 接受日期: 2014-10-30; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-12-15

environment. **[Methods]** When YL28 was grown with nitrite as the sole nitrogen source or with nitrite-ammonium as coexisting nitrogen sources, the removal efficiency of ammonium-nitrogen and nitrite-nitrogen, the effect of nitrite on bacterial growth and total amounts of photopigments including carotenoids and bacterio chlorophylls were studied by spectrophotometry. The effect of nitrite on compositions of carotenoid and bacteriochlorophyll was investigated by thin layer chromatography. **[Results]** Strain YL28 was capable of growing with nitrite as the sole nitrogen sources; mainly accumulated two BChl *a* intermediates (BChl *a*<sub>THGG</sub> and BChl *a*<sub>p</sub>), bacterio pheophytin (BPhe) and four carotenoids (rhodopin, spirilloxanthin, anhydro rhodovibrin and lycopene). Bacterial growth and nitrite removal efficiency were decreased with increasing nitrite concentration, more than 200 mg/L of nitrite could be completely removed by strain YL28. When nitrite concentration reached to 25 mg/L, the total amounts of carotenoid and bacteriochlorophyll were decreased dramatically, whereas the relative contents of BChl *a*<sub>p</sub> (end product of BChl *a* biosynthesis), spirilloxanthin (end product of carotenoids biosynthesis) and Bphe increased. When YL28 was grown with nitrite-ammonium as coexisting nitrogen source, the tolerance of YL28 to nitrite and removal efficiency of nitrite by YL28 were significantly enhanced compared with nitrite as the sole nitrogen source, more than 300 mg/L of nitrite was completely eliminated by strain YL28. The inhibitory of nitrite on photopigment biosynthesis was alleviated, the total amounts of carotenoid and bacteriochlorophyll were enhanced, the changes in photopigment compositions were similar to those with nitrate as the sole nitrogen sources. **[Conclusion]** YL28 could remove nitrite. High concentration nitrite inhibited bacterial growth and photopigment biosynthesis, but the presence of ammonium together with nitrite could promote the tolerance of strain YL28 to nitrite. This work should be helpful to develop novel marine water cleaner for high efficient removal of nitrite.

**Keywords:** Nitrite, *Marichromatium gracile*, Photopigment

亚硝酸盐是氮循环中硝化作用和反硝化作用的一种中间产物<sup>[1]</sup>。通常情况下,在健康的生物系统的水体中,亚硝酸盐保持在很低水平<sup>[2]</sup>。目前,由于工农业生产和人类活动以及沉积物硝酸盐还原和铵盐氧化作用,使水体亚硝酸盐积累量明显增加,一些养殖水体中亚硝氮含量甚至高达 15 mg/L<sup>[3-4]</sup>。高浓度亚硝酸盐对水生动物有严重的毒害作用,例如能使水生动物高铁血红蛋白含量升高、损伤心脏和肝脏等器官<sup>[5-8]</sup>,对植物也有严重破坏作用,例如破坏植物的叶绿素,增加细胞内氧自由基含量,抑制光合作用等<sup>[9-12]</sup>。此外,由于亚硝酸盐在动植物体内的残留,也会导致食品安全和人类健康问题<sup>[13]</sup>。因此,尽快去除环境水体中的亚硝酸盐是解决这些问题的关键。微生物修复技术在环境氮素污染治理和调控方面发挥着重要作用,具有独特优势,已在污水处理和水产养殖业等领域广泛研究和应用。但不容忽视的是,目前应用于海水环境的微生物制剂菌种多源自淡水种或陆源种,对盐的耐受程度较低。这些淡水种或陆源种在海洋环境中

的存活性或有效性如何,目前尚无明确定论。因此,深入挖掘海洋微生物资源,了解它们的生理特性和环境适应性,进一步开发适应性强、针对性强的海洋微生物产品和制剂备受关注。

不产氧光合细菌(APB)含有丰富的光合色素,代谢方式灵活多样,可在有光或黑暗、厌氧或有氧环境中能够以有机物(糖、酸、醇等)、还原性硫化物(H<sub>2</sub>S 等)及氨等进行光能自养或异养、化能自养或异养代谢,不但能净化水质,还可作为水产动物的开口饵料或饲料添加剂,很多 APB 菌株还具有反硝化作用。因此,多年来,APB 一直广泛应用于水产养殖等领域<sup>[14]</sup>,成为水产动物高效养殖和健康养殖的一个重要保障。研究表明:铵盐是 APB 生长的良好氮源,少数 APB 菌株如 *Rhodospseudomonas palustris* HaA2、*Rhodobacter capsulatus* E1F1 也能以硝酸盐为唯一氮源,但生长速率缓慢。能以亚硝氮为唯一氮源生长的 APB 菌株鲜有报道<sup>[14-15]</sup>。目前报道的 APB 菌株对亚硝氮的去除作用是在氨氮-亚硝氮共存体系中完成的,例如 *Rhodobacter*

*sphaeroides* 和 *Rhodopseudomonas* sp. wps 等在氨氮存在时,对水体中亚硝氮和硝氮具有良好去除能力<sup>[16-17]</sup>; *Thiocapsa* sp. KS1 和 *Rhodopseudomonas* sp. LQ17 能通过亚硝酸盐厌氧氧化作用将亚硝氮转化为硝氮<sup>[18]</sup>;低浓度亚硝氮能促进 *Rhodobacter* sp. S 菌株的生长,高浓度则抑制其生长<sup>[19]</sup>;黑暗条件下,亚硝氮明显抑制 *Rhodobacter capsulatus* N22DNAR<sup>+</sup> 菌株生长<sup>[20]</sup>。目前,关于亚硝氮对 APB 光合色素合成的影响报道较少<sup>[19-20]</sup>,尚未见到以亚硝氮为唯一氮源时,亚硝氮对 APB 生长、光合色素合成量及代谢途径中各色素组分影响的报道。

本课题组从福建泉州洛阳桥红树林分离获得一株海洋着色菌 *Marichromatium gracile* YL28 菌株,该菌株拥有螺菌黄质系 Car 合成途径和 BChl *a* 合成途径<sup>[21-22]</sup>,能以亚硝氮为唯一氮源生长,很好地去除水体中高浓度无机三态氮,对亚硝氮也具有很高耐受能力和去除能力<sup>[23]</sup>。本文系统地比较了在以亚硝氮为唯一氮源以及亚硝氮-氨氮共存体系中,亚硝氮对 YL28 菌株亚硝氮去除、生长以及光合色素合成代谢的影响,为进一步开发高效脱氮,尤其是脱除亚硝氮的 APB 水质调节剂提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种:** 海洋着色菌 *Marichromatium gracile* YL28 菌株,16S rRNA 基因 GenBank 登录号为 JF719917,本室分离鉴定<sup>[21]</sup>。

**1.1.2 主要仪器和试剂:** UV-3200PCS 紫外可见分光光度计,MAPADA;5417R 台式高速离心机,Eppendorf;硅胶 G 薄板,规格 30 mm×100 mm,青岛海洋化工厂。甲醇、丙酮为色谱纯试剂。氯化铵、亚硝酸钠和硝酸钾为国产优级纯试剂;氯化汞、氢氧化钾、酒石酸钾钠、盐酸萘乙二胺等为国产分析纯试剂。

### 1.2 方法

**1.2.1 菌体的培养和菌种悬液的制备:** 采用 Pfennig 培养基<sup>[21]</sup>,添加 24.3 mmol/L 无水乙酸钠,以 0.75 mmol/L Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 取代 1.5 mmol/L Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O,

配制改良 Pfennig 培养基 pH 7.0。接种量为 5% (体积比),接种后用无菌培养基充满培养瓶,厌氧光照培养,培养条件为 28 °C、3 000 lx,培养 5 d,8 000×g 离心 8 min 收集菌体,用无菌生理盐水洗涤菌体 3 次,制备成 OD<sub>660</sub> 为 2.5 的菌种悬液。

**1.2.2 实验体系的设置:** 将改良 Pfennig 培养基中去除 NH<sub>4</sub>Cl 制备成无氮培养基。在无氮培养基中添加亚硝酸钠,配制不同终浓度亚硝氮为唯一氮源的培养基;无氮培养基中添加氯化铵和亚硝酸钠,配制氨氮与不同浓度亚硝氮共存的培养基,氨氮浓度为 28.26 mg/L,氮素含量以测定值为准。培养容器为规格 250 mL 的玻璃瓶,接种量为 3% (体积比),用无氮培养基充满培养瓶后,总容积为 310 mL,旋紧瓶盖,28 °C、3 000 lx 厌氧光照培养。培养过程中取样测定生物量、氨氮和亚硝氮含量、细菌叶绿素和类胡萝卜素含量,分析色素组成。

**1.2.3 生物量和无机氮的测定:** 采用比浊法测定生物量。取样置于光程为 1 cm 的石英比色杯内,于 UV-3200PCS 紫外可见分光光度计(MAPADA)上测波长为 660 nm 处光密度(OD<sub>660</sub>),以 OD<sub>660</sub> 表示菌体的生物量,通过 OD<sub>660</sub> 与湿菌体质量的关系,计算湿菌体质量。分别采用钠氏试剂光度法和 N-(1-萘基)-乙二胺光度法测定 NH<sub>3</sub>-N 和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 的含量<sup>[24]</sup>。按公式  $R=(1-C_t/C_0) \times 100\%$  计算氨氮和亚硝氮的去除率(R),式中 C<sub>0</sub> 和 C<sub>t</sub> 分别表示氨氮或亚硝氮的初始浓度和 t 时间的浓度。氨氮和亚硝氮均以氮素含量计算,重复测定 3 次。氮含量测定所用的玻璃器皿均在 5% 盐酸中浸泡 12 h,用二次水冲洗干净备用。

**1.2.4 光合色素含量的测定:** 采用超声波辅助丙酮甲醇法制备色素提取液<sup>[22]</sup>,色素提取、Car 和 BChl 光合色素含量测定按文献[22]方法进行。

**1.2.5 色素组成分析:** 采用 TLC 法分析色素组成。色素提取液室温减压浓缩干燥,再用乙醚溶解,于硅胶 G 板上进行展层。展层剂为石油醚:正己烷:异丙醇:丙酮:甲醇(8:0.75:0.2:0.8:0.25,体积比)。展层结束时,立即拍照,得到 TLC 色素指纹图谱,图像

经 Gel-Pro analyzer 软件分析,以各色素条带的相对灰度(Intensity)表示其相对含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 亚硝氮对 YL28 菌株生长和亚硝氮去除的影响

在以亚硝氮为唯一氮源体系中,亚硝氮对菌体生长和亚硝氮去除过程的影响如图 1 所示。随着处理时间的延长,菌体生物量和亚硝氮的去除率逐渐升高;随亚硝氮浓度升高,菌体生长速率和亚硝氮的去除速率降低。不同亚硝氮浓度对菌株生长和亚硝氮去除的影响如图 2A 所示,培养 5.8 d,5.0 mg/L 亚硝氮体系中生物量最高,随着亚硝氮浓度的升高,菌体生物量则逐渐降低,亚硝氮达 200.06 mg/L 时,菌体生物量虽然很低,但培养体系中的亚硝氮仍能被完全去除。与亚硝氮为唯一氮源相比,当亚

硝氮和氨氮共存时,体系中菌体生物量、生长速率和亚硝氮的去除速率明显升高;随亚硝氮浓度的升高,菌体对亚硝氮的去除速率降低,低浓度亚硝氮时,菌体生物量和生长速率以及氨氮的去除速率略有升高,但高浓度时则有明显的抑制作用(图 2B 和图 3) 培养 5.8 d,当水体中亚硝氮浓度达 300.12 mg/L 时,虽然菌体生物量很低,但亚硝氮也能被完全去除(图 2B)。目前,文献报道的 APB 菌株对亚硝氮的去除作用是在氨氮-亚硝氮共存体系中完成的,对亚硝氮的最高耐受浓度达 20 mmol/L<sup>[9]</sup>,测试的亚硝氮浓度一般在 0.1–5.0 mmol/L 范围内<sup>[13,19]</sup>,为了避免亚硝氮对菌体的毒性,有学者在培养体系中多次少量添加亚硝氮<sup>[18]</sup>。由此可知,YL28 菌株不但能以亚硝氮为唯一氮源而生长,而且是目前对亚硝氮耐受和去除能力最高的 APB 菌株之一。

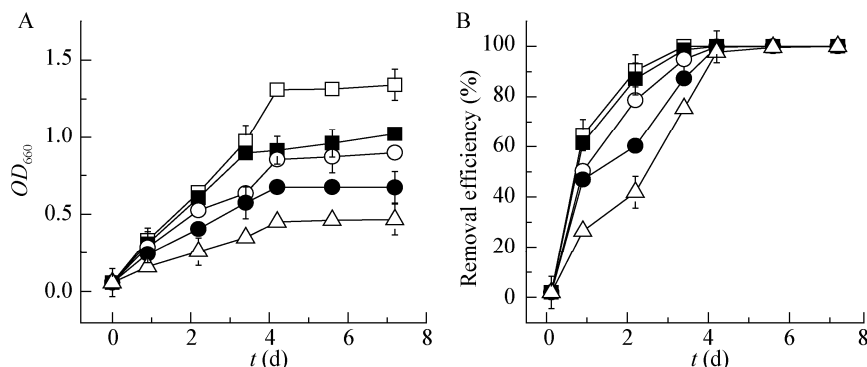


图 1 以亚硝氮为唯一氮源时,亚硝氮对菌体生长(A)和亚硝氮去除(B)过程的影响

Figure 1 The effects of nitrite concentrations on bacterial growth (A) and the removal efficiency of nitrite-nitrogen (B) when used nitrite as the sole nitrogen source

Note: Initial  $c(\text{NO}_2^--\text{N})$ :  $\square$ : 5.03 mg/L;  $\blacksquare$ : 10.10 mg/L;  $\circ$ : 25.05 mg/L;  $\bullet$ : 50.04 mg/L;  $\triangle$ : 100.08 mg/L.

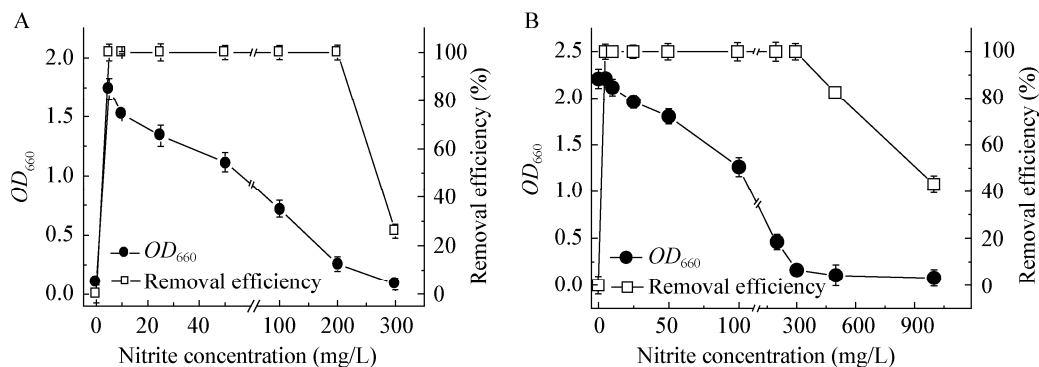


图 2 以亚硝氮为唯一氮源(A)和亚硝氮-氨氮共存(B)时亚硝氮浓度对菌株生长和亚硝氮去除的影响

Figure 2 The effects of nitrite concentrations on the removal efficiency of nitrite-nitrogen and bacterial growth in the absence of ammonium (A) or presence of ammonium (B)

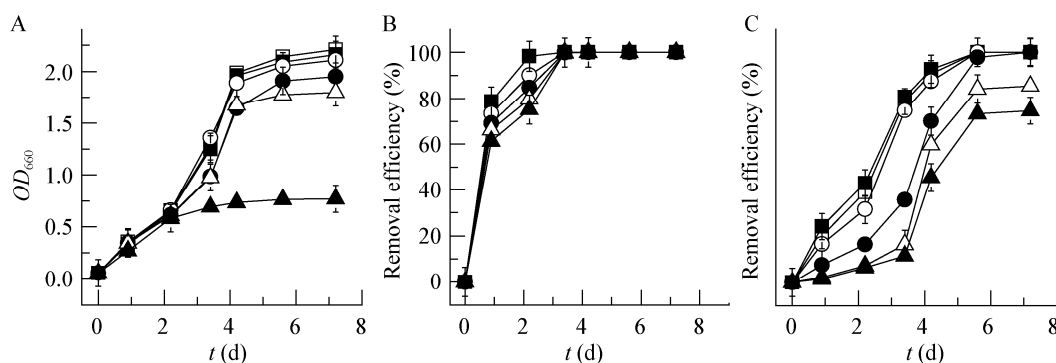


图3 亚硝氮-氨氮共存时亚硝氮对菌体生长(A)、亚硝氮去除(B)和氨氮去除(C)过程的影响

Figure 3 The effects of nitrite concentrations on bacterial growth (A), the removal of nitrite-nitrogen (B) and ammonia-nitrogen (C) in the presence of ammonium

Note: Initial  $c(\text{NO}_2^- - \text{N})$ :  $\square$ : 0.01 mg/L;  $\blacksquare$ : 5.04 mg/L;  $\circ$ : 10.08 mg/L;  $\bullet$ : 25.03 mg/L;  $\triangle$ : 50.08 mg/L;  $\blacktriangle$ : 100.11 mg/L.

## 2.2 亚硝氮对 YL28 菌株光合色素合成的影响

光合色素(细菌叶绿素 BChl 和类胡萝卜素 Car)是 APB 进行光合生长的核心功能成分。亚硝氮除了影响细菌生长外,是否影响光合色素的合成?为此进一步考察了亚硝氮对菌体光合色素合成的影响。图 4 所示为菌体培养 5.8 d 时,亚硝氮对 BChl 和 Car 合成量的影响。结果显示,无论体系中是否存在氨氮,亚硝氮对菌体光合色素含量的影响规律基本一致,即亚硝氮低于 25.05 mg/L 时,单位菌体积累的 BChl 和 Car 含量未见明显变化,当亚硝氮浓度继续升高时,BChl 和 Car 含量则明显降低。但氨氮的存在,可显著减缓亚硝氮对光合色素合成的抑制作用,BChl 和 Car 合成量明显升高。

图 5 所示为亚硝氮对菌体光合色素组成的影响。

TLC 色素指纹图谱显示:YL28 主要积累 7 种色素组分,从原点到前沿依次编号为 T1-T7。本课题组曾系统地鉴定过 YL28 色素组成<sup>[21-22]</sup>,与文献比对可知,T1 和 T2 为 BChl  $a_{\text{THGG}}$  和 BChl  $a_p$ , T3 为细菌脱镁叶绿素(Bphe),T4-T7 为 4 种 Car 组分,依次为玫红品(Rhodopin)、螺菌黄质(Spirilloxanthin)、脱水紫菌红醇(Anhydrorhodovibrin)和番茄红素(Lycopene)。使用 Gel-Pro analyzer 软件对 TLC 色素指纹图谱中各色带进行灰度分析(图 5A 和 5B),以各色素条带灰度的相对面积表示各色带的相对含量(图 6)。结果显示,无论体系中是否存在氨氮,亚硝氮对菌体积累的光合色素组分的影响规律基本一致,即随着亚硝氮浓度升高:(1) T4 和 T5 是优势 Car 组分,T2 是优势 BChl 组分;(2) T2、

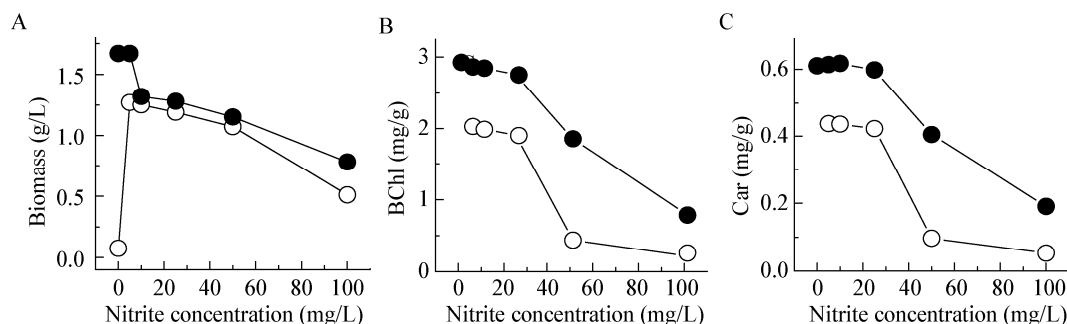


图4 亚硝氮对菌体生物量(A)、BChl 含量(B)和 Car 含量(C)的影响

Figure 4 The effects of nitrite on biomass (A), the total amounts of BChl (B) and Car (C)

Note:  $\circ$ : Nitrite as sole nitrogen source;  $\bullet$ : Nitrite plus ammonium as coexisting nitrogen sources.

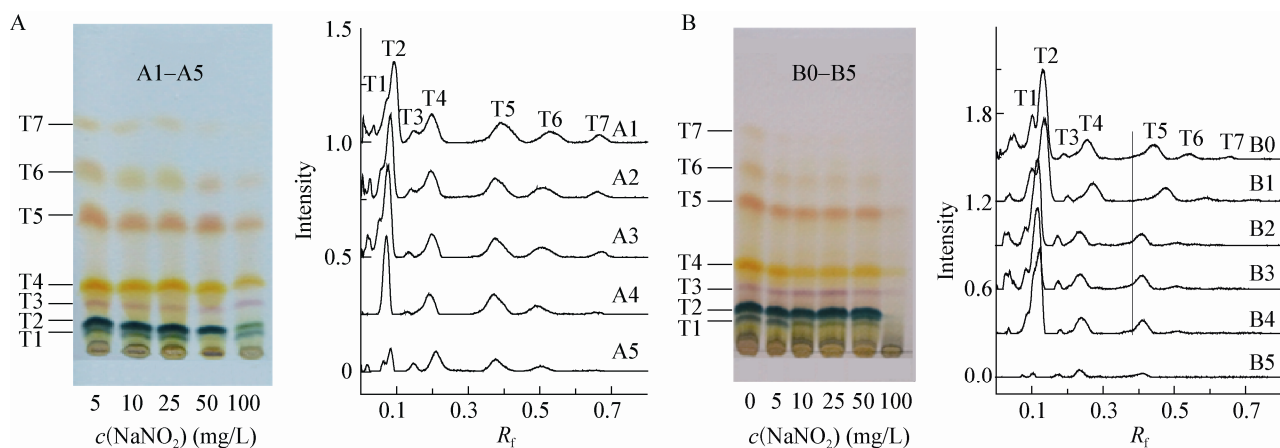


图5 YL28 光合色素的 TLC 色素指纹图谱及其图像灰度分析曲线

Figure 5 TLC photopigment fingerprintings and their corresponding gray image intensity analysis

Note: A1–A5: Nitrite as sole nitrogen source; B0–B5: Nitrite plus ammonium as coexisting nitrogen sources. Initial  $c(\text{NO}_2^--\text{N})$ : A1–A5: 5.03, 10.10, 25.05, 50.04, 100.08 mg/L; B0–B5: 0.01, 5.04, 10.08, 25.03, 50.08, 100.11 mg/L.

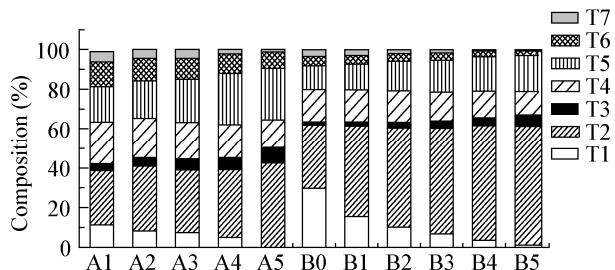


图6 无氨氮和有氨氮时亚硝氮对光合色素组成的影响

Figure 6 The effects of nitrite on photopigments compositions in the presence of ammonium or absence of ammonium

Note: A1–A5: Nitrite as sole nitrogen source. B0–B5: Nitrite plus ammonium as coexisting nitrogen sources. Initial  $c(\text{NO}_2^--\text{N})$ : A1–A5: 5.03, 10.10, 25.05, 50.04, 100.07 mg/L; B0–B5: 0.01, 5.04, 10.08, 25.03, 50.08, 100.11 mg/L.

T3 和 T5 组分相对含量逐渐增加, 而 T1、T4、T6 和 T7 组分相对含量则逐渐降低; (3) Car 和 BChl 合成途径中的末端积累产物 T5 (螺菌黄质) 和 T2 (BChl  $a_p$ ) 相对含量升高; (4) T1–T2 和 T4–T7 相对含量之和未见明显变化, 即 BChl 和 Car 相对含量的比值未见明显变化。

### 3 讨论

#### 3.1 氮代谢机制探讨

随着微生物氮循环研究的发展, 不但加深了人

们对陆地和海洋等生态系统中氮循环的认识, 而且也推动着生物脱氮技术的高效发展。目前认为 APB 具有固氮作用、氨同化作用、氨化作用、反硝化作用、同化硝酸盐还原和亚硝酸盐厌氧氧化作用等多种氮代谢机制。APB 主要通过 3 种代谢方式转化亚硝氮: (1) 呼吸性硝酸盐还原 (也称反硝化作用), 该过程将硝酸盐还原为亚硝氮, 再进一步转化最终生成氮气<sup>[1]</sup>; (2) 同化硝酸盐还原, 即将硝酸盐转化为亚硝氮, 再进一步转化为  $\text{NH}_4^+$ <sup>[14-15]</sup>; (3) 亚硝酸盐厌氧氧化作用, 即在厌氧条件下将亚硝酸盐氧化为硝酸盐的过程<sup>[18]</sup>。另外, 一些厌氧氨氧化菌具有厌氧氨氧化作用 (Anammox), 能在厌氧环境中以  $\text{NO}_2^-$  作为电子受体将  $\text{NH}_4^+$  转化为氮气, 使环境中的氨氮和亚硝氮同时高效去除, 但至今尚未在 APB 中发现这一过程。本研究显示: YL28 菌株能以亚硝氮为唯一氮源生长并高效去除体系中的亚硝氮, 亚硝氮对菌体生长有明显抑制作用, 但菌体受到严重抑制时仍能高效去除亚硝氮; 另外, 氨氮能明显提高该菌株对亚硝氮毒性的适应性, 使菌体生长和亚硝氮的去除能力提高, 氨氮去除速率在低浓度亚硝氮时虽有升高的现象, 但并不明显。由此表明, YL28 菌株能够通过同化硝酸盐还原和反硝化过程清除亚硝氮, 氨同化作用是氨氮脱除的主要方式, 该菌

是否具有厌氧氨氧化作用并不明确,是否具有硝化和亚硝酸盐厌氧氧化等作用,仍需进一步研究。

### 3.2 亚硝氮对菌体生长和光合色素合成的影响规律

亚硝氮是微生物氮代谢过程中产生的一种有毒中间产物,在环境中积累时对生物具有明显的毒害作用。APB 富含的光合色素是光合作用的功能分子,YL28 隶属于 APB,也含有丰富的光合色素,了解其对亚硝氮的去除特性,进一步了解亚硝氮对菌体生长与光合色素合成的影响具有重要的生物学意义。目前关于亚硝氮对 APB 生长及光合色素合成影响也有一些报道,由于选择的菌株不能以亚硝氮为唯一氮源生长,其研究体系中都含有氨氮,例如 Michalski 等<sup>[9]</sup>研究表明亚硝氮能够抑制 *Rhodospseudomonas sphaeroides* f. sp. denitrificans strain IL106 的光合生长和球形烯 Car 的合成;刘双江等<sup>[19]</sup>分离到一株 *Rhodobacter* sp. S,培养基中添加低浓度(0.5 mmol/L)亚硝氮,对该菌株生长具有一定的促进作用,浓度升高则表现出细胞毒性;通过活细胞吸收光谱观察到亚硝氮对光合色素的合成也有明显的抑制作用。本研究表明:在氨氮存在时,低浓度亚硝氮也有促进菌体生长的现象,浓度升高,明显抑制菌体的生长和光合色素(BChl 和 Car)的合成,这与上述文献报道结果基本一致。但与文献报道明显不同之处是:(1)除了亚硝氮-氨氮共存体系,本文还在亚硝氮为唯一氮源的体系中研究了亚硝氮对菌体生长和光合色素合成的影响,表明该菌株能以亚硝氮为唯一氮源良好生长,随着浓度升高,菌体生长和色素合成受到明显抑制;亚硝氮-氨氮共存时,氨氮能缓解亚硝氮的毒性,使菌体生长和色素含量明显升高。(2) Michalski 等<sup>[9]</sup>报道 IL 106 菌株拥有球形烯系 Car 合成途径,亚硝氮抑制了该途径下游产物球形烯的合成,而积累上游 Car 中间产物;YL28 菌株拥有螺菌黄质系 Car 合成途径,随亚硝氮浓度升高,Car 合成末端产物 Spirilloxanthin 相对含量增加,而中间产物相对含量降低。由此可见,亚硝氮不仅抑制色素的合成,色

素组分也呈规律性变化,但变化规律因菌种(株)而异。菌体积累的光合色素组分是环境适应性的综合体现,但目前关于各色素组分在细胞内功能的差异尚不清楚。

### 3.3 光合色素合成与氮代谢的关系

光合色素是光合生物进行光合作用的核心功能分子,光合色素含量明显降低,势必使光合速率降低,从而影响菌体的生长代谢。本课题组前期研究表明,黑暗环境中 YL28 菌株在改良 Pfennig 培养基中不生长,光强适宜时才能良好生长(数据未发表),表明该菌利用光能和乙酸钠和  $\text{NH}_4\text{Cl}$  等合成细胞物质,这也包括氮代谢相关酶系,由此可见,YL28 氨同化过程需要耗能。本研究也表明,无论氨氮是否存在,亚硝氮影响菌体生长和色素合成,低浓度亚硝氮时,菌体生长良好,单位菌体光合色素含量也较高,随亚硝氮浓度增加,菌体生物量和光合色素含量明显降低,亚硝氮去除速率也有所降低,但菌体仍保持良好的亚硝氮去除能力,由此可见,亚硝氮抑制了菌体光合色素的合成,进而抑制了菌体的光合生长,但细胞中已合成的氮代谢酶系仍然存在。由于氨同化需要能量,亚硝氮浓度升高,抑制了光合色素的合成,光合速率降低,因此氨同化作用也降低,表现出氨氮的清除率降低。由于反硝化是产能过程,虽然高浓度亚硝氮抑制了菌体生长,但细胞合成的反硝化酶系仍能高效代谢亚硝氮。因此,APB 光合色素合成与菌体的生长代谢(包括氮代谢)密切相关,亚硝氮通过抑制 APB 光合作用抑制了菌体光合生长与物质代谢。

综上所述:YL28 菌株能高效去除亚硝氮,是目前报道去除能力最高的 APB 菌株之一。亚硝氮对菌株生长和光合色素的合成有抑制作用,但氨氮能明显提高 YL28 菌株对亚硝氮的适应能力。无论氨氮是否存在,色素组分的变化规律基本一致,即随着亚硝氮浓度升高,Car 和 BChl 合成途径中末端产物 Spirilloxanthin 和 BChl  $a_p$  相对含量升高,中间色素组分相对含量降低,色素组分规律性变化的生物学意义尚不清楚,仍需要进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Thamdrup B. New pathways and processes in the global nitrogen cycle[J]. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 2012, 43: 407-428
- [2] Corey P, Kim JK, Duston J, et al. Bioremediation potential of *Palmaria palmata* and *Chondrus crispus* (Basin Head): effect of nitrate and ammonium ratio as nitrogen source on nutrient removal[J]. Journal of Applied Phycology, 2013, 25(5): 1349-1358
- [3] Harris J, Maguire GB, Edwards SJ, et al. Effect of nitrite on growth and oxygen consumption for juvenile greenlip abalone, *Haliotis laevigata* Donovan[J]. Journal of Shellfish Research, 1997, 16(2): 395-401
- [4] Shinn C, Marco A, Serrano L. Influence of low levels of water salinity on toxicity of nitrite to anuran larvae[J]. Chemosphere, 2013, 92(9): 1154-1160
- [5] Dolomatov S, Zukow W, Hagner-Derengowska M, et al. Toxic and physiological aspects of metabolism of nitrites and nitrates in the fish organism[J]. Journal of Health Sciences, 2013, 3(2): 68-91
- [6] Jensen FB. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2003, 135(1): 9-24
- [7] Jiang Q, Dilixiati A, Zhang W, et al. Effect of nitrite exposure on metabolic response in the freshwater prawn *Macrobrachium nipponense*[J]. Central European Journal of Biology, 2014, 9(1): 86-91
- [8] Romano N, Zeng C. Toxic effects of ammonia, nitrite, and nitrate to decapod crustaceans: a review on factors influencing their toxicity, physiological consequences, and coping mechanisms[J]. Reviews in Fisheries Science, 2013, 21(1): 1-21
- [9] Michalski WP, Nicholas D, Whatley F. Effects of nitrate, nitrite and diphenylamine on the photosynthetic apparatus of *Rhodospseudomonas sphaeroides* f. sp. *denitrificans*[J]. Journal of General Microbiology, 1985, 131(8): 1951-1961
- [10] Sahay A, Jajoo A, Singh P, et al. Nitrite regulates distribution of excitation energy between the two photosystems by causing state transition[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2006, 44(1): 7-12
- [11] Singh P, Jajoo A, Sahay A, et al. Relation between the mode of binding of nitrite and the energy distribution between the two photosystems[J]. Physiologia Plantarum, 2007, 129(2): 447-454
- [12] Zhou Y, Ganda L, Lim M, et al. Free nitrous acid (FNA) inhibition on denitrifying poly-phosphate accumulating organisms (DPAOs)[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 88(1): 359-369
- [13] Camargo JA, Alonso A. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment[J]. Environment International, 2006, 32(6): 831-849
- [14] Madigan MT, Jung DO. An overview of purple bacteria: systematics, physiology, and habitats[A]//The Purple Phototrophic Bacteria[M]. Berlin: Springer Netherlands, 2009, 28: 1-15
- [15] Pino C, Olmo-Mira F, Cabello P, et al. The assimilatory nitrate reduction system of the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1[J]. Biochemical Society Transactions, 2006, 34(1): 127-129
- [16] Kerber NL, Cárdenas J. Nitrate reductase from *Rhodospseudomonas sphaeroides*[J]. Journal of Bacteriology, 1982, 150(3): 1091-1097
- [17] Chen H, Zhang DM, Wang LG, et al. Biological characteristics and phylogenetic analysis of a denitrifying photosynthetic bacterium[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(2): 249-255 (in Chinese)
- 陈慧, 张德民, 王龙刚, 等. 一株反硝化光合细菌的生物学特性及系统发育分析[J]. 微生物学报, 2011, 51(2): 249-255
- [18] Schott J, Griffin BM, Schink B. Anaerobic phototrophic nitrite oxidation by *Thiocapsa* sp. strain KS1 and *Rhodospseudomonas* sp. strain LQ17[J]. Microbiology, 2010, 156(8): 2428-2437
- [19] Liu SJ, Sun Y, Cen YH, et al. Biological control of nitrite in fish farming ponds by photosynthetic nonsulfur bacteria[J]. Environmental Science, 1995, 16(6): 21-23 (in Chinese)
- 刘双江, 孙燕, 岑运华, 等. 采用光合细菌控制水体中亚硝酸盐的研究[J]. 环境科学, 1995, 16(6): 21-23
- [20] Ellington MJ, Richardson DJ, Ferguson SJ. *Rhodobacter capsulatus* gains a competitive advantage from respiratory nitrate reduction during light-dark transitions[J]. Microbiology, 2003, 149(4): 941-948
- [21] Zhao JY, Fu YN, Zhao CG, et al. Identification and properties of a purple sulfur bacterium with rhodopin as predominant carotenoid from mangrove[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(10): 1318-1325 (in Chinese)
- 赵江艳, 傅英楠, 赵春贵, 等. 一株高含玫红品的红树林海洋紫色硫细菌分离鉴定及特性[J]. 微生物学报, 2011, 51(10): 1318-1325
- [22] Zhuo MQ, Zhao CG, Cheng QR, et al. Fingerprinting analysis of photopigments in purple bacteria[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(6): 760-768 (in Chinese)
- 卓民权, 赵春贵, 程茜茹, 等. 紫细菌光合色素指纹图谱的建立与色素分析[J]. 微生物学报, 2012, 52(6): 760-768
- [23] Jiang P, Zhao CG, Jia YQ. Inorganic nitrogen removal by a marine purple sulfur bacterium capable of growth on nitrite as sole nitrogen source[J]. Microbiology China, 2014, 41(5): 824-831 (in Chinese)
- 蒋鹏, 赵春贵, 贾雅琼, 等. 以亚硝氮为唯一氮源生长的海洋紫色硫细菌去除无机三态氮[J]. 微生物学通报, 2014, 41(5): 824-831
- [24] APHA, AWWA, WEF. Standard methods for the examination of water and wastewater[S]. Washington DC: American Public Health Association, 1998