

研究报告

硝酸盐对牛粪梭菌甲酸脱氢酶缺失型 Wood-Ljungdahl 途径固碳的影响

关紫微¹, 符波^{*1,2}, 钱庆庆¹, 张衍^{1,2}, 刘宏波^{1,2}, 刘和^{1,2}

1 江南大学环境与土木工程学院 江苏省厌氧生物技术重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江苏高校水处理技术与材料协同创新中心 苏州科技大学, 江苏 苏州 215009

关紫微, 符波, 钱庆庆, 张衍, 刘宏波, 刘和. 硝酸盐对牛粪梭菌甲酸脱氢酶缺失型 Wood-Ljungdahl 途径固碳的影响[J]. 微生物学通报, 2023, 50(4): 1396-1406.

GUAN Ziwei, FU Bo, QIAN Qingqing, ZHANG Yan, LIU Hongbo, LIU He. Nitrate affects carbon fixation by formate dehydrogenase-lacking Wood-Ljungdahl pathway in *Clostridium bovisfaecis*[J]. Microbiology China, 2023, 50(4): 1396-1406.

摘要:【背景】异于同型产乙酸菌通常利用 Wood-Ljungdahl 途径将 2 分子 CO₂ 还原为 1 分子乙酰辅酶 A, *Clostridium bovisfaecis* 缺失 Wood-Ljungdahl 途径甲基支路第 1 步将 CO₂ 还原为甲酸的甲酸脱氢酶, 需甲酸存在时将 1 分子甲酸和 1 分子 CO₂ 还原为乙酰辅酶 A 发生葡萄糖的同型产乙酸型发酵。已有报道显示, 硝酸盐也可作为同型产乙酸菌的电子受体, 而且对不同同型产乙酸菌的代谢影响有所不同, 然而硝酸盐对这种独特的甲酸脱氢酶缺失型 Wood-Ljungdahl 途径固碳的影响尚不清楚。【目的】探究硝酸盐对 *C. bovisfaecis* 甲酸脱氢酶缺失型 Wood-Ljungdahl 途径固碳的影响。【方法】硝酸盐浓度分别为 10 mmol/L 和 30 mmol/L 时, 以未添加硝酸盐为对照实验, 研究 *C. bovisfaecis* 在葡萄糖+甲酸+CO₂ 为基质条件下的细菌生长、底物消耗和产物生成情况。【结果】10 mmol/L 和 30 mmol/L 硝酸盐存在时, 主要产物乙醇浓度分别为 5.80 mmol/L 和 1.66 mmol/L, 明显低于对照组的乙醇浓度(7.13 mmol/L), 葡萄糖消耗量也明显减少。甲酸盐消耗量随着硝酸盐浓度的升高而降低, 硝酸盐浓度为 30 mmol/L 时甲酸盐无明显消耗。【结论】30 mmol/L 的硝酸盐抑制了 *C. bovisfaecis* 甲酸脱氢酶缺失型 Wood-Ljungdahl 途径的固碳作用, 10 mmol/L 硝酸盐降低了 *C. bovisfaecis* 葡萄糖的糖酵解作用。

关键词: 硝酸盐; 甲酸; 同型产乙酸作用; Wood-Ljungdahl 途径; 糖酵解

资助项目: 江苏省自然科学基金(BK20181344); 江苏高校水处理技术与材料协同创新中心(XTCXSZ2022-15)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20181344) and the Jiangsu Collaborative Innovation Center of Technology and Material of Water Treatment (XTCXSZ2022-15).

*Corresponding author. E-mail: fubo@jiangnan.edu.cn

Received: 2022-08-22; Accepted: 2022-11-27; Published online: 2023-01-03

Nitrate affects carbon fixation by formate dehydrogenase-lacking Wood-Ljungdahl pathway in *Clostridium bovifaecis*

GUAN Ziwei¹, FU Bo^{*1,2}, QIAN Qingqing¹, ZHANG Yan^{1,2}, LIU Hongbo^{1,2}, LIU He^{1,2}

1 Jiangsu Key Laboratory of Anaerobic Biotechnology, School of Environment and Civil Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Suzhou University of Science and Technology, Jiangsu Collaborative Innovation Center of Technology and Material of Water Treatment, Suzhou 215009, Jiangsu, China

Abstract: [Background] Unlike general acetogenic bacteria which usually reduce two molecules of CO₂ into one molecule of acetyl-CoA via Wood-Ljungdahl pathway, the formate dehydrogenase-lacking acetogen *Clostridium bovifaecis* reduces one molecule of formate and one molecule of CO₂ into acetyl-CoA and conducts acetogenic utilization of glucose only in the presence of formate. Nitrate is the preferred electron acceptor for acetogens which vary in their ability to utilize this alternative electron acceptor. However, the effect of nitrate on the carbon fixation by formate dehydrogenase-lacking Wood-Ljungdahl pathway remains unclear. [Objective] To investigate the effect of nitrate on the carbon fixation by formate-dependent acetogenesis in *C. bovifaecis*. [Methods] We measured the growth, substrate consumption, and product yield of *C. bovifaecis* cultured in the medium containing 10 mmol/L or 30 mmol/L nitrate and using glucose + formate + CO₂ as substrates. The medium without nitrate was taken as the control. [Results] The main product was ethanol with the concentrations of 5.80 mmol/L and 1.66 mmol/L, respectively, in the media with 10 mmol/L and 30 mmol/L nitrate, which were significantly lower than that (7.13 mmol/L) of the control. In addition, the glucose consumption significantly decreased in the presence of nitrate. Formate consumption decreased with the increase in nitrate concentration and became zero at the nitrate concentration of 30 mmol/L. [Conclusion] Nitrate of 30 mmol/L inhibited carbon fixation by formate-dependent acetogenesis, and that of 10 mmol/L decreased the glycolysis in *C. bovifaecis*.

Keywords: nitrate; formate; acetogenesis; Wood-Ljungdahl pathway; glycolysis

同型产乙酸菌是一类利用乙酰辅酶 A 途径 (也称 Wood-Ljungdahl 途径) 还原 2 分子 CO₂ 为 1 分子乙酰辅酶 A, 并作为终端电子受体储存能量和合成细胞物质的厌氧微生物(图 1)^[1]。H₂ 为电子供体时称为自养同型产乙酸作用(2CO₂+4H₂→CH₃COOH+2H₂O), 有机物为电子供体时称为异养同型产乙酸作用, Wood-Ljungdahl 途径可以将葡萄糖普通发酵释放的 2 分子 CO₂ 固定再产生 1 分子乙酸(C₆H₁₂O₆→3CH₃COOH)。Wood-Ljungdahl 途径被认为是地球上最古老的

CO₂ 生物固定途径, 也是最高效的非光合固碳作用, 在全球乙酸的生物合成中发挥着重要作用^[2]。同时, Wood-Ljungdahl 途径合成的乙酰辅酶 A 在细菌体内可以进一步转化为乙酸、乙醇^[3]、丁酸^[4]、丁醇^[5]和 2,3-丁二醇^[6]等多种产物。因此, 乙酸虽然是同型产乙酸菌的常见产物, 但并不是唯一产物, 几乎所有已知的同型产乙酸菌可生成除乙酸之外的其他产物^[1], 这些产物均可作为化学品或生物燃料。因此, 同型产乙酸菌也是一类极具技术应用潜力的微生物。

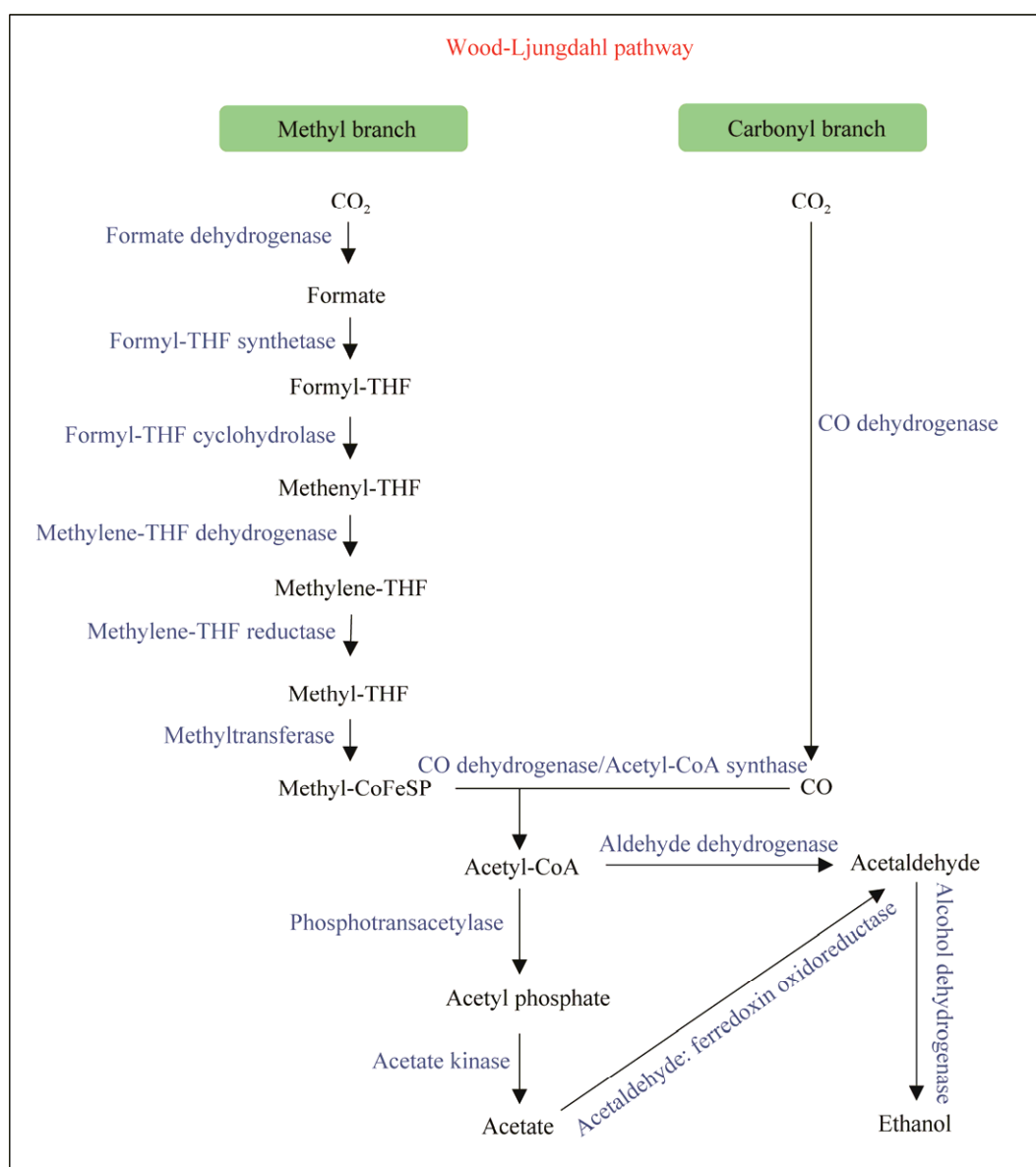


图 1 同型产乙酸菌中 Wood-Ljungdahl 途径

Figure 1 Wood-Ljungdahl pathway of acetogens.

本实验室从牛粪中分离得到一株新型同型产乙酸菌 *Clostridium bovisfaecis* 菌株 BXX^[7], 并报道了该菌株缺失 Wood-Ljungdahl 途径甲基支路的第 1 步——甲酸脱氢酶, 需在甲酸存在时将 1 分子甲酸和 1 分子 CO₂ 还原为乙酰辅酶 A 发生葡萄糖的同型产乙酸型发酵(称为甲酸依赖型

同型产乙酸作用)^[8]。这种独特的代谢特性为同型产乙酸菌代谢机制和生态作用提供了新发现。虽然 Wood-Ljungdahl 途径作为终端电子受体是同型产乙酸菌的典型特征, 但几乎所有已知同型产乙酸菌可利用富马酸^[9]、硝酸盐^[10]等其他终端电子受体。有研究报道显示硝酸盐的存在抑制了

Moorella thermoacetica (原名 *Clostridium thermoacetica*) 中 Wood-Ljungdahl 途径相关酶和电子传递相关蛋白编码基因的表达^[10]; 但又有报道显示添加硝酸盐可增强 *Clostridium ljungdahlii* 的自养生长和 CO₂ 的固定^[11]。可见, 硝酸盐对不同同型产乙酸菌代谢的影响有所差异, 然而硝酸盐对甲酸脱氢酶缺失型 Wood-Ljungdahl 途径固碳的影响尚不清楚。

本研究以 *C. bovifaecis* 菌株 BXX 为研究对象, 研究不同硝酸盐浓度条件下菌株 BXX 的细菌生长、葡萄糖、甲酸和 CO₂ 底物代谢和产物生成情况, 揭示硝酸盐对 *C. bovifaecis* 甲酸脱氢酶缺失型 Wood-Ljungdahl 途径固碳的影响, 以期对探究同型产乙酸菌的生理生化特性和生态作用具有学术价值并丰富厌氧微生物学理论。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究中使用的 *C. bovifaecis* 菌株 BXX 为本实验室分离和纯化^[12], 现已保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心与日本微生物保藏中心, 编号分别为 CGMCC 1.5228 和 JCM 32382。CO₂ 标准品, 无锡鑫锡仪科技有限公司; 其余试剂均为国产分析纯。紫外可见光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; 高效液相色谱仪, 赛默飞世

尔科技公司; 气相色谱仪, 浙江福立分析仪器股份有限公司。

基础培养基的成分如表 1 所示, 其中亚硒钨酸盐溶液成分参见德国微生物菌种保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ) 提供的 Medium 385, 维生素溶液参见 DSMZ 提供的 Medium 141, 微量元素溶液参见 DSMZ 提供的 Medium 320。2.39 g/L 二水合甲酸钠、葡萄糖、二水磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、维生素溶液、L-半胱氨酸·HCl·H₂O、Na₂S·9H₂O 及微量元素溶液均通过 0.22 μm 水系滤膜过滤除菌, 其余培养基成分通过高压蒸汽灭菌锅进行灭菌, 温度为 121 °C, 时间为 20 min。培养基的初始 pH 将用 1 mol/L HCl 或 NaOH 溶液调整至 7.00^[12]。

1.2 培养实验

培养实验在含有 50 mL 液体培养基的 120 mL 厌氧血清瓶中进行, 设置 2 种硝酸盐浓度分别是 10 mmol/L 和 30 mmol/L, 以未添加硝酸盐设置为对照组。血清瓶顶空充入 N₂-CO₂ (80:20, 体积比) 加压至 0.05 MPa, 保持厌氧条件, 将 *C. bovifaecis* 菌株 BXX 在未添加硝酸盐的培养基中培养至对数生长期 (*OD*₆₀₀ 值为 0.23), 然后用无菌注射器取 1 mL 加入各厌氧血清瓶中, 接种量为 2%, 放入恒温培养箱中, 培养温度为 30 °C, 实验组与对照组均设置 3 组平行。

表 1 基础培养基成分表

Table 1 Base medium ingredients

Ingredient	Content (g/L)	Ingredient	Content (g/L)	Ingredient	Content (mL/L)
Glucose	3.60	KH ₂ PO ₄	0.23	Selenite-tungstate solution	0.10
NH ₄ Cl	0.50	K ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0.46	FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.00
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.50	L-cysteine·HCl·H ₂ O	0.30	Na-resazurin solution (0.1%, W/V)	0.50
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.25	Na ₂ S·9H ₂ O	0.30	Vitamin solution	1.00
Yeast extract	0.50	NaCl	10.00	Trace element solution	0.10

1.3 分析测试方法

细菌浓度利用分光光度计进行测定,以 OD_{600} 值来代表细菌浓度。pH 值通过 pH 计进行测定。葡萄糖浓度测定方法采用苯酚-硫酸法进行测定^[13],分别取 0、10、20、40、80、120 和 160 μL 浓度为 1 g/L 的葡萄糖标准溶液于试管中,定容至 2 mL,依次向上述试管中加入 1 mL 5% 苯酚溶液和 5 mL 浓硫酸溶液并用涡旋仪混匀,放置 30 min 后于波长 490 nm 处测量吸光度值,根据葡萄糖浓度和 OD_{490} 值绘制标准曲线。将样品 8 000 r/min 离心 10 min 后取上清液,依次向试管中加入 1 mL 5% 苯酚溶液和 5 mL 浓硫酸溶液并用涡旋器混匀,放置 30 min 后于波长 490 nm 处测量吸光度值。根据已得到的葡萄糖标准曲线,对照测定的吸光光度值计算出对应的葡萄糖浓度。

甲酸浓度的测定采用液相色谱法。分别取浓度为 0、100、200、400、600、800 和 1 000 mg/L 的甲酸标准溶液 1 mL 注入色谱进样瓶中,使用高效液相色谱仪测定各甲酸浓度下的出峰时间和出峰面积。20 μL 的样品在 Thermo Scientific C_{18} 柱(4.6 mm \times 250 mm)上进行分离,流动相采用浓度为 0.01 mol/L 的 KH_2PO_4 和甲醇(95:5,体积比)的混合溶液。液相色谱仪分析条件为:流速为 1.00 mL/min,检测波长为 206 nm,温度为 30 $^{\circ}\text{C}$ 。根据出峰面积和甲酸标准溶液浓度绘制标准曲线。将各条件下取得的样品通过 0.22 μm 水系滤膜过滤去除沉淀。将稀释后的滤液注入色谱进样瓶中,分析条件相同。根据已得到的甲酸标准曲线,对照峰面积计算出对应样品中的甲酸浓度^[8]。乙酸和乙醇浓度的测定采用气相色谱法。将各条件下取得的样品通过 0.22 μm 水系滤膜过滤后与浓度为 3 mmol/L 的磷酸(酸化剂)以 1:1 的体积比混合后加入进样瓶中,使用气相色谱仪测定样品中的挥发性脂肪酸浓度。气相色谱仪参数

为:自动进样器(AOC-20i)、毛细管柱(PEG-20M, 30 m \times 0.32 mm \times 0.5 μm)、氢焰离子化检测器检测限为 3 pgC/s,高纯 N_2 作为载气,柱箱温度 210 $^{\circ}\text{C}$,进样口和检测器温度均设置为 250 $^{\circ}\text{C}$ ^[14]。

气体组分浓度使用气相色谱仪进行测定。气相色谱仪参数为:热导检测器、不锈钢填充柱(AE.TDX-01, 2 m \times 3 mm)和高纯氩气作为载气。分析条件为:柱温设置为 100 $^{\circ}\text{C}$ 、检测器温度和进样口温度均设置为 150 $^{\circ}\text{C}$ 。以标准气体(主要成分包括 CO_2 、 CH_4 和 H_2 等)为标样,对样品中的 CO_2 组分进行分析时检测器的电流调节为 80 mA^[8]。利用进样器(2.5 mL)手动进样检测分析。

硝酸盐浓度采用分光光度法测量,其原理与水质中硝态氮测定方法类似,由于硝酸盐在 220 nm 波长下具有紫外吸收的性质,而在 275 nm 波长不具有紫外吸收的性质,所以分别在 220 nm 和 275 nm 波长下测定其吸光度^[15]。根据硝酸盐浓度和校正后的吸光度值绘制标准曲线,对照样品测定的吸光光度值计算出对应的硝酸盐浓度。

2 结果与分析

2.1 不同硝酸盐浓度下 *Clostridium bovipaeris* 菌株 BXX 的 OD_{600} 和 pH 变化

不同硝酸盐浓度时 *C. bovipaeris* 菌株 BXX 生长情况如图 2A 所示,未添加硝酸盐的对照组菌体在 1–3 d 生长速率最快,第 8 天时 OD_{600} 值达到最大值 0.12。10 mmol/L 硝酸盐条件下 OD_{600} 值在 3–8 d 增长速率较快,达到最高值为 0.12,与未添加硝酸盐时接近。30 mmol/L 硝酸盐条件下 OD_{600} 值大约为 0.10,明显低于其他 2 组,说明较高浓度的硝酸盐影响了细菌生长,降低了细胞浓度。pH 变化如图 2B 所示,由于培养时血清瓶需顶空充入 CO_2 ,所以初始 pH 值略有下降,此时测定培养基的 pH 为 6.23。12 d 后,各组的

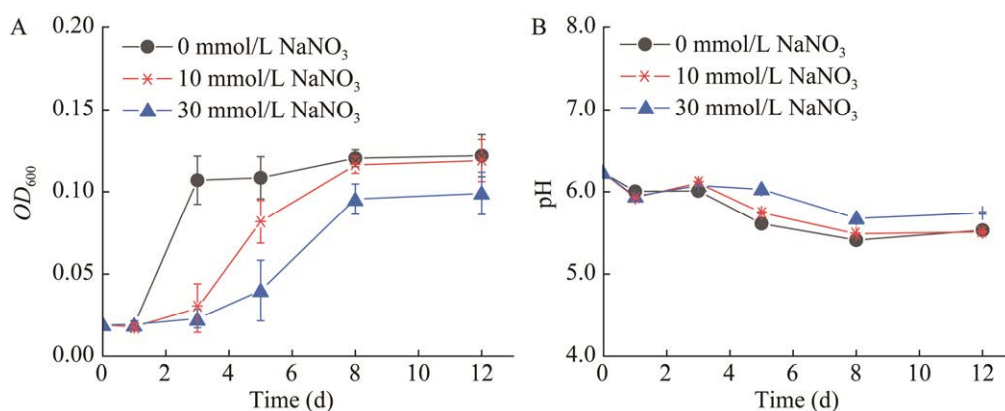


图2 10 mmol/L 和 30 mmol/L 硝酸盐浓度存在时葡萄糖+甲酸+CO₂为基质条件下 *Clostridium bovifaecis* 菌株 BXX 的 OD₆₀₀ (A)和 pH (B)的变化情况

Figure 2 OD₆₀₀ (A) and pH (B) of *Clostridium bovifaecis* strain BXX with glucose, formate and CO₂ as substrates at 10 mmol/L and 30 mmol/L of nitrate.

pH 逐渐下降到 5.51–5.74, 这与乙酸产物的积累有关。Seifritz 等^[16]发现虽然硝酸盐会抑制 *M. thermoacetica* 的同型产乙酸作用, 但添加硝酸盐仍能支持细菌的生长。

2.2 不同硝酸盐浓度下 *Clostridium bovifaecis* 菌株 BXX 的底物消耗情况

在葡萄糖消耗方面, 未添加硝酸盐的对照组 (3.48 mmol/L) 显著高于添加硝酸盐的实验组。初始葡萄糖浓度为 (20.03±0.77) mmol/L, 10 mmol/L 和 30 mmol/L 硝酸盐实验组葡萄糖消耗量分别为 2.70 mmol/L 和 1.05 mmol/L (图 3A)。对照组和实验组的 CO₂ 浓度均有所升高, 对照组、10 mmol/L 和 30 mmol/L 硝酸盐实验组的 CO₂ 产生量分别为 2.41、2.52 和 2.07 mmol/L (图 3B), 这主要来源于糖酵解产物丙酮酸脱羧过程会释放出 CO₂。当未添加硝酸盐时, 甲酸盐的消耗量为 4.11 mmol/L, 随着硝酸盐浓度的升高, 甲酸盐的消耗量减少, 甚至当硝酸盐浓度为 30 mmol/L 时甲酸盐无明显消耗 (图 3C)。硝酸盐浓度在培养过程中保持不变, 说明硝酸盐很少或基本无消耗 (图 3D)。

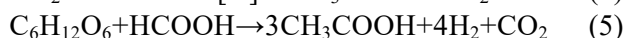
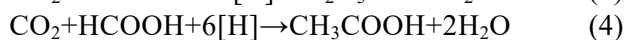
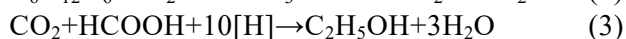
2.3 不同硝酸盐浓度下 *Clostridium bovifaecis* 菌株 BXX 的产物生成情况

如图 4 所示, 对照组和实验组乙酸的生成量为 0.25–1.20 mmol/L。随着硝酸盐浓度的升高,

乙酸生成量逐渐降低 (图 4A)。当未添加硝酸盐时, 主要产物为乙醇, 其生成量为 7.13 mmol/L; 当硝酸盐浓度为 10 mmol/L 和 30 mmol/L 时, 乙醇生成量分别为 5.80 mmol/L 和 1.66 mmol/L, 明显低于对照组 (图 4B), 而且乙醇生成量随着硝酸盐浓度升高逐渐降低。

2.4 不同硝酸盐浓度下 *Clostridium bovifaecis* 菌株 BXX 的化学物料平衡

我们之前的研究显示, 新型同型产乙酸菌 *C. bovifaecis* 菌株 BXX 缺失乙酰辅酶 A 途径甲基支路的第 1 步——甲酸脱氢酶基因, 须甲酸和 CO₂ 同时存在时才能进行葡萄糖的同型产乙酸型发酵^[8]。理论上, 糖酵解过程将 1 mol 葡萄糖转化为 2 mol 乙醇或乙酸 [分别如方程式 (1) 和 (2) 所示], 甲酸和 CO₂ 则通过 Wood-Ljungdahl 途径再合成 1 mol 的乙醇和乙酸 [分别如方程式 (3) 和 (4) 所示]^[1]。因此, *C. bovifaecis* 以葡萄糖+甲酸+CO₂ 为基质时, 葡萄糖消耗量:乙醇和乙酸积累量摩尔比的理论值为 1:3 [如方程式 (5) 所示], 甲酸消耗量和 CO₂ 消耗量的摩尔比理论值为 1:1。



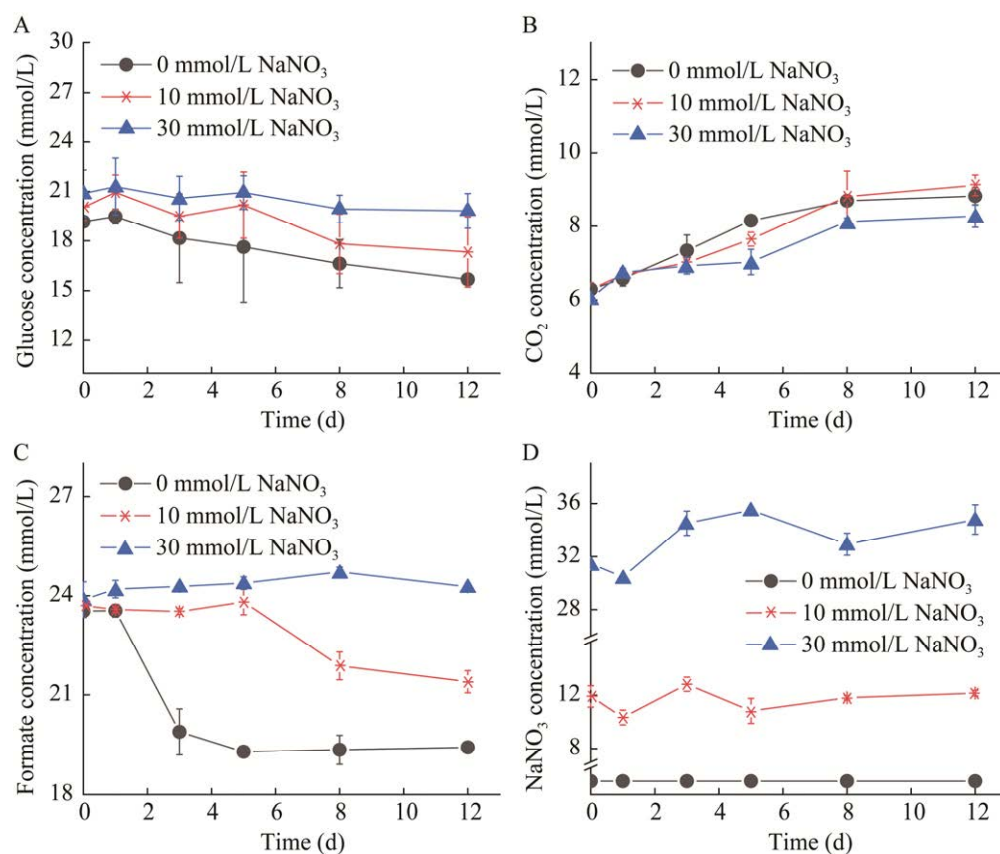


图3 10 mmol/L 和 30 mmol/L 硝酸盐浓度存在时葡萄糖+甲酸+CO₂为基质条件下 *Clostridium bovisfaecis* 菌株 BXX 的葡萄糖(A)、CO₂ (B)、甲酸盐(C)和硝酸盐(D)浓度的变化情况

Figure 3 Changes in glucose (A), CO₂ (B), formate (C) and sodium nitrate (D) concentration of *Clostridium bovisfaecis* with glucose, formate and CO₂ as substrates at 10 mmol/L and 30 mmol/L of nitrate.

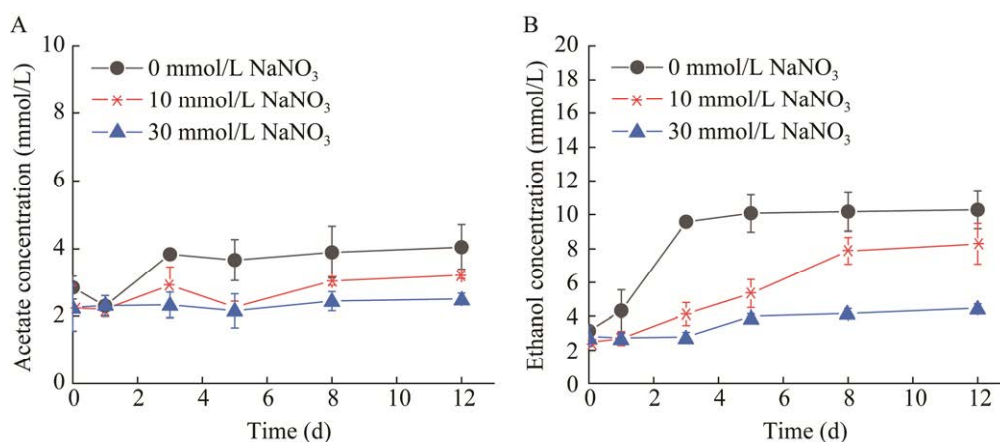


图4 10 mmol/L 和 30 mmol/L 硝酸盐浓度存在时葡萄糖+甲酸+CO₂为基质条件下 *Clostridium bovisfaecis* 菌株 BXX 生成乙酸(A)和乙醇(B)的浓度变化情况

Figure 4 Changes in acetate (A) and ethanol (B) production of *Clostridium bovisfaecis* with glucose, formate and CO₂ as substrates at 10 mmol/L and 30 mmol/L of nitrate.

如表 2 所示,未添加硝酸盐的对照组中葡萄糖消耗量为 3.48 mmol/L,根据方程式(1)和(2),CO₂积累量的理论值应为 6.96 mmol/L,然而 CO₂积累量的实际值为 2.41 mmol/L,所以 CO₂消耗量的实际值为 4.55 mmol/L,同时甲酸盐消耗量的实际值为 4.11 mmol/L,因此甲酸和 CO₂消耗量的摩尔比为 1:1.1。乙醇的积累量为 7.13 mmol/L 时,葡萄糖消耗量与乙醇/乙酸积累量的摩尔比约为 1.0:2.4,符合同型产乙酸作用的葡萄糖/产物比率理论值 1:3 [方程式(3)和(4)]。10 mmol/L 浓度的硝酸盐存在时,葡萄糖与产物的摩尔比也与理论值 1:3 接近。然而,30 mmol/L 的硝酸盐条件下,葡萄糖消耗量和乙醇/乙酸产生量的摩尔比约为 1.0:1.8,这符合葡萄糖的糖酵解发酵的化学计量比 1:2,表明该硝酸盐浓度条件下葡萄糖仅发生经典的糖酵解反应,未发生同型产乙酸型发酵。

3 讨论与结论

Fröstl 等^[10]的研究表明,硝酸盐存在时细胞膜会缺乏细胞色素 b,改变电子传递方向,阻碍甲基支路和羧基支路中 CO₂ 的还原,从而抑制 Wood-Ljungdahl 途径的发生。同时,*Clostridium thermoaceticum* 会将硝酸盐作为首选的电子受体,抑制 Wood-Ljungdahl 途径相关酶和电子传递蛋白编码基因的表达,并激活硝酸盐呼吸蛋白的转录,使得乙酸产生量相较于未添加硝酸盐减少了 1/3^[16]。另外,Seifritz 等^[17]却发现硝酸盐存在下,依赖草酸生长的 *M. thermoacetica* 优先利

用 CO₂ 作为电子受体,可避免 Wood-Ljungdahl 途径的硝酸盐抑制,而乙醛酸为基质时则优先利用硝酸盐作为电子受体,从而阻断乙酰辅酶 A 途径进行能量存储。Drake^[18]发现当 CO₂ 为电子受体时, *M. thermoacetica* 不易利用短链醇,但加入硝酸盐后,流向 CO₂ 的电子可以分流到硝酸盐,从而使得乙醇和丙醇更容易被利用。此外,Klask 等^[19]发现硝酸盐作为唯一的氮源时可使 *C. ljungdahlii* 的生长速度提高 62%,乙醇产量提高 200%–300%。

与硝酸盐能够促进 *Clostridium thermoautotrophicum* 和 *C. thermoaceticum* 氧化底物的能力不同,硝酸盐不仅会抑制 *C. bovisfaecis* 的葡萄糖糖酵解作用,降低葡萄糖利用率从而减少乙酸/乙醇产物的生成,而且硝酸盐浓度为 30 mmol/L 还会抑制甲酸脱氢酶缺失型 Wood-Ljungdahl 途径,进一步减少乙酸/乙醇的生成。许尚华^[20]发现,当 NaNO₃ 存在时,地衣芽孢杆菌 WX-02 在 12 h 后葡萄糖消耗量与对照组相比更少,转录组结果表明参与糖酵解的 α -磷酸葡萄糖变位酶编码基因 *PgcA*、磷酸甘油酸激酶编码基因 *Pgk*、甘油醛-3-磷酸脱氢酶编码基因 *GapA*、二磷酸果糖醛缩酶编码基因 *FbaA* 的表达量明显低于对照组。硝酸盐的存在减弱了 *C. bovisfaecis* 葡萄糖的糖酵解作用,可能与其抑制参与糖酵解过程的 α -磷酸葡萄糖变位酶、磷酸甘油酸激酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶和二磷酸果糖醛缩酶的酶活性有关。

表 2 10 mmol/L 和 30 mmol/L 硝酸盐浓度存在时葡萄糖+甲酸+CO₂ 为基质条件下 *Clostridium bovisfaecis* 菌株 BXX 底物消耗与产物积累的情况

Table 2 Accumulated or consumed metabolites of *Clostridium bovisfaecis* strain XBB with glucose, formate and CO₂ as substrates at 10 mmol/L and 30 mmol/L of nitrate

Group	Consumed (mmol/L)		Accumulated (mmol/L)		
	Glucose	Formate	CO ₂	Ethanol	Acetate
0 mmol/L NaNO ₃	3.48	4.11	2.41	7.13	1.20
10 mmol/L NaNO ₃	2.70	2.30	2.52	5.80	0.97
30 mmol/L NaNO ₃	1.06	0.00	2.07	1.66	0.25

糖酵解作用是 *C. bovis* 主要的碳代谢途径，也是葡萄糖+甲酸+CO₂ 基质条件下为 Wood-Ljungdahl 途径提供电子的来源。当硝酸盐浓度为 30 mmol/L 时，糖酵解水平下降，还原当量 Fd²⁻ 和 NADH 及通过底物水平磷酸化(substrate level phosphorylation, SLP)产生 ATP 也随之减少，而对于 Wood-Ljungdahl 途径中的亚甲基四氢叶酸脱氢酶、亚甲基四氢叶酸还原酶和一氧化碳脱氢酶来说，这些还原当量被认为起关键性作用。硝酸盐浓度为 10 mmol/L 时，葡萄糖的糖酵解作

用受到影响，同型产乙酸作用却未受到影响，这可能是由于硝酸盐浓度为 10 mmol/L 时对葡萄糖糖酵解作用影响较小，糖酵解途径仍可为 Wood-Ljungdahl 途径提供还原当量；而硝酸盐浓度为 30 mmol/L 时糖酵解水平降低，其产生的还原当量不足以支持 Wood-Ljungdahl 途径的发生，因此硝酸盐浓度为 30 mmol/L 会抑制 *C. bovis* 的 Wood-Ljungdahl 途径固碳。综上所述，硝酸盐抑制 *C. bovis* 甲酸脱氢酶缺失型 Wood-Ljungdahl 途径中碳流的示意图总结如图 5 所示。

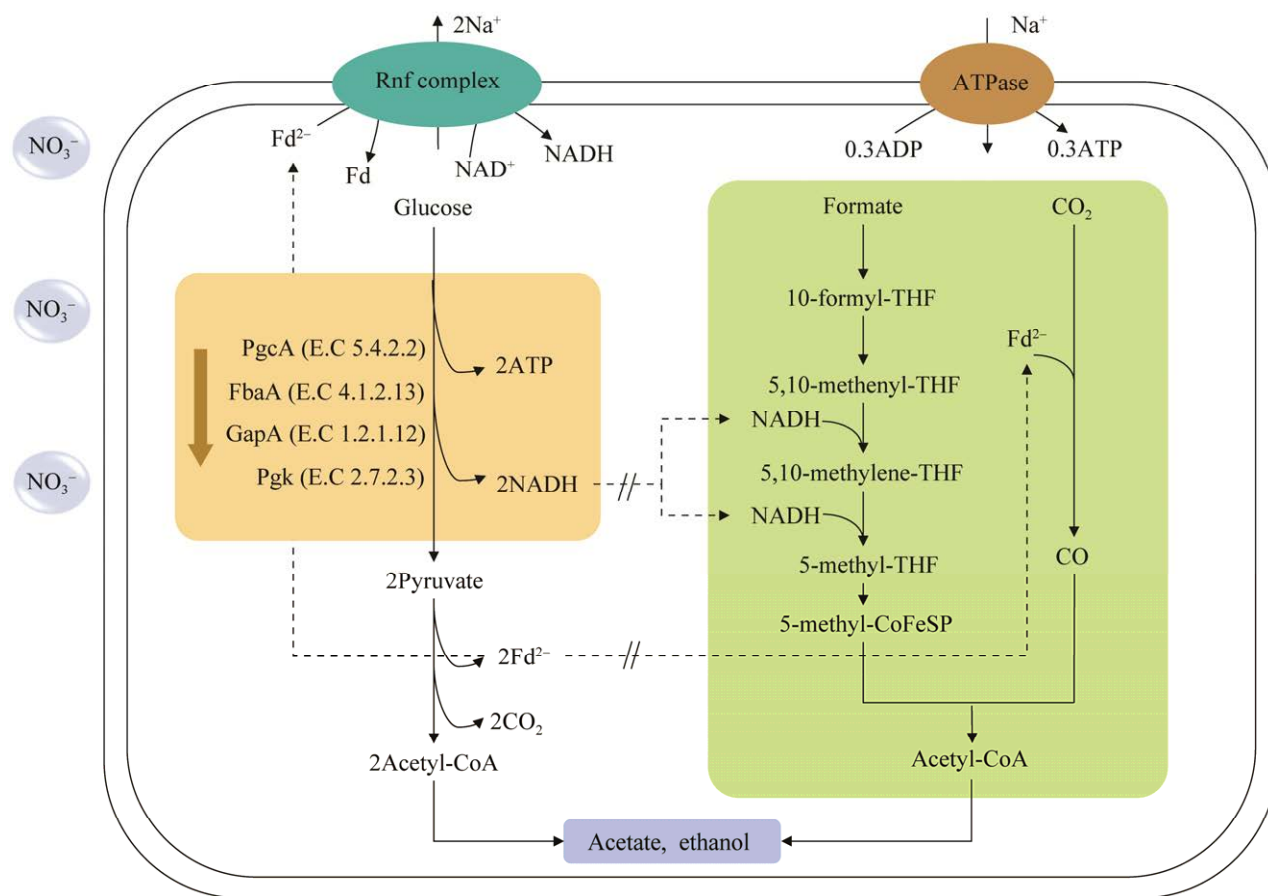


图5 硝酸盐抑制 *Clostridium bovis* 甲酸脱氢酶缺失型 Wood-Ljungdahl 途径中碳流的示意图 Fd: 铁氧还蛋白; THF: 四氢叶酸; ATPase: ATP 合酶; Rnf complex: Rnf 复合物; PgcA: α -磷酸葡萄糖变位酶; FbaA: 二磷酸果糖醛缩酶; GapA: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; Pgl: 磷酸甘油酸激酶

Figure 5 Model for carbon flow in the acetyl-CoA pathway of *Clostridium bovis* inhibited by nitrate. The level of glycolysis is reduced and the acetyl-CoA pathway is blocked. Fd: Ferredoxin; THF: Tetrahydrofolate; ATPase: ATP synthase; PgcA: Alpha-phosphoglucose mutase; FbaA: Fructose diphosphate aldolase; GapA: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Pgl: Phosphoglycerate kinase.

研究报道显示同型产乙酸菌能将硝酸盐作为电子受体, 往往优先发生硝酸盐异化从而与 CO_2 竞争电子^[21], 最终使 Wood-Ljungdahl 途径的代谢受到抑制。*C. bovisfaecis* 天然缺失催化 Wood-Ljungdahl 途径甲基支路的第一步将 CO_2 还原为甲酸的甲酸脱氢酶, 因此与常见同型产乙酸菌的 CO_2 呼吸不同, 发生甲酸+ CO_2 的联合呼吸。本文显示 10 mmol/L 硝酸盐未对 *C. bovisfaecis* 中 Wood-Ljungdahl 途径的固碳作用产生影响, 30 mmol/L 的硝酸盐则出现了抑制现象。结果表明硝酸盐抑制 *C. bovisfaecis* 甲酸+ CO_2 联合呼吸可能与硝酸盐和 CO_2 竞争电子的影响机制不同, 其影响可能主要是由于硝酸盐抑制了 *C. bovisfaecis* 的糖酵解作用, 从而使得为其 Wood-Ljungdahl 途径提供的电子减少。研究结果为硝酸盐影响同型产乙酸菌 Wood-Ljungdahl 途径固碳提供了新的机理假设, 可在未来研究中进一步开展实验进行证实。

氮肥的过量使用会造成大量硝酸盐和亚硝酸盐进入土壤或存留于甜菜、萝卜、油菜、小白菜等饲料, 这些含有高浓度硝酸盐的饲料会通过喂食进入到牛、羊等反刍动物的瘤胃^[22]。Muirhead^[23]发现反刍动物瘤胃中的硝酸盐浓度过高会引起牲畜中毒甚至死亡, 轻度硝酸盐中毒则会减缓其生长。反刍动物瘤胃微生物中富含同型产乙酸菌^[24], 甲酸脱氢酶缺失型同型产乙酸菌也主要分布于此生境^[25-26], 它们的碳水化合物代谢合成短链脂肪酸为宿主提供了大量的营养来源^[27]。因此, 本文的研究结果引出了一个值得思考的问题: 硝酸盐对反刍动物生长的负面影响是否与其抑制了瘤胃同型产乙酸菌的糖酵解及 Wood-Ljungdahl 途径固碳有关? 这为硝酸盐对反刍动物营养健康的影响提供了新思路, 有待于进一步探究。

REFERENCES

- [1] DRAKE HL, GÖßNER AS, DANIEL SL. Old acetogens, new light[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2008, 1125(1): 100-128.
- [2] WOOD HG, RAGSDALE SW, PEZACKA E. The acetyl-CoA pathway of autotrophic growth[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1986, 39(4): 345-362.
- [3] BUSCHHORN H, DÜRRE P, GOTTSCHALK G. Production and utilization of ethanol by the homoacetogen *Acetobacterium woodii*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1989, 55(7): 1835-1840.
- [4] LYND LH, ZEIKUS JG. Metabolism of H_2 - CO_2 , methanol, and glucose by *Butyrivibrio methylotrophicus*[J]. Journal of Bacteriology, 1983, 153(3): 1415-1423.
- [5] EICHLER B, SCHINK B. Oxidation of primary aliphatic alcohols by *Acetobacterium carbinolicum* sp. nov., a homoacetogenic anaerobe[J]. Archives of Microbiology, 1984, 140(2): 147-152.
- [6] SHARAK GENTHNER BR, BRYANT MP. Additional characteristics of one-carbon-compound utilization by *Eubacterium limosum* and *Acetobacterium woodii*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1987, 53(3): 471-476.
- [7] ZHU H, FU B, LU SL, LIU HB, LIU H. *Clostridium bovisfaecis* sp. nov., a novel acetogenic bacterium isolated from cow manure[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2018, 68(9): 2956-2959.
- [8] YAO Y, FU B, HAN DF, ZHANG Y, LIU H. Formate-dependent acetogenic utilization of glucose by the fecal acetogen *Clostridium bovisfaecis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 86(23): e01870-20.
- [9] DORN M, ANDRESEN JR, GOTTSCHALK G. Fermentation of fumarate and L-malate by *Clostridium formicoaceticum*[J]. Journal of Bacteriology, 1978, 133(1): 26-32.
- [10] FRÖSTL JM, SEIFRITZ C, DRAKE HL. Effect of nitrate on the autotrophic metabolism of the acetogens *Clostridium thermoautotrophicum* and *Clostridium thermoaceticum*[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(15): 4597-4603.
- [11] EMERSON DF, WOOLSTON BM, LIU N, DONNELLY M, CURRIE DH, STEPHANOPOULOS G. Enhancing hydrogen-dependent growth of and carbon dioxide fixation by *Clostridium ljungdahlii* through nitrate supplementation[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2019, 116(2): 294-306.

- [12] 朱慧, 符波, 鲁帅领, 刘宏波, 刘和. 一株新型同型产乙酸菌 *Clostridium* sp. 的自养和异养生长特性[J]. 微生物学通报, 2018, 45(11): 2320-2330.
ZHU H, FU B, LU SL, LIU HB, LIU H. Autotrophic and heterotrophic characteristics of a novel acetogenic *Clostridium* sp.[J]. Microbiology China, 2018, 45(11): 2320-2330 (in Chinese).
- [13] NIELSEN SS. Phenol-Sulfuric Acid Method for Total Carbohydrates[M]//Food Analysis Laboratory Manual. Boston, MA: Springer US, 2009: 47-53.
- [14] LIU H, HAN P, LIU HB, ZHOU GJ, FU B, ZHENG ZY. Full-scale production of VFAs from sewage sludge by anaerobic alkaline fermentation to improve biological nutrients removal in domestic wastewater[J]. Bioresource Technology, 2018, 260: 105-114.
- [15] 张长寿. 紫外分光光度法测定水中硝酸盐氮含量的实践和体会[J]. 环境科学导刊, 2015, 34(6): 110-113.
ZHANG CS. Practice and summary of testing nitrite nitrogen in water using UV spectrometry[J]. Environmental Science Survey, 2015, 34(6): 110-113 (in Chinese).
- [16] SEIFRITZ C, FRÖSTL JM, DRAKE HL, DANIEL SL. Influence of nitrate on oxalate- and glyoxylate-dependent growth and acetogenesis by *Moorella thermoacetica*[J]. Archives of Microbiology, 2002, 178(6): 457-464.
- [17] SEIFRITZ C, DANIEL SL, GÖSSNER A, DRAKE HL. Nitrate as a preferred electron sink for the acetogen *Clostridium thermoaceticum*[J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175(24): 8008-8013.
- [18] DRAKE HL. Physiology of the thermophilic acetogen *Moorella thermoacetica*[J]. Research in Microbiology, 2004, 155(6): 422-436.
- [19] KLASK CM, KLIEM-KUSTER N, MOLITOR B, ANGENENT LT. Nitrate feed improves growth and ethanol production of *Clostridium ljungdahlii* with CO₂ and H₂, but results in stochastic inhibition events[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 724.
- [20] 许尚华. 硝酸钠促地衣芽胞杆菌 WX-02 高产聚 γ -谷氨酸的蛋白质组学研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2013.
XU SH. Comparative proteomic study of effect of sodium nitrate on poly-gamma-glutamic acid biosynthesis by *Bacillus licheniformis* WX-02[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2013 (in Chinese).
- [21] SCHUCHMANN K, MÜLLER V. Autotrophy at the thermodynamic limit of life: a model for energy conservation in acetogenic bacteria[J]. Nature Reviews Microbiology, 2014, 12(12): 809-821.
- [22] 王春林. 饲料中硝酸盐及亚硝酸盐中毒问题[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2000(9): 19-20.
WANG CL. Nitrate and nitrite poisoning in feed[J]. Heilongjiang Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 2000(9): 19-20 (in Chinese).
- [23] MUIRHEAD S. Propionibacterium appears capable of reducing nitrate, nitrite toxicities[J]. Feedstuffs, 1992, 64(40): 12-13.
- [24] 杨春蕾. 产乙酸菌在草食动物消化道内的分布及其对甲烷排放的调节作用[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2016.
YANG CL. Acetogen communities in the gut of herbivores and its role in methane emission[D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2016 (in Chinese).
- [25] WOLIN MJ, MILLER TL, COLLINS MD, LAWSON PA. Formate-dependent growth and homoacetogenic fermentation by a bacterium from human feces: description of *Bryantella formatexigens* gen. nov., sp. nov.[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(10): 6321-6326.
- [26] DORÉ J, BRYANT MP. Metabolism of one-carbon compounds by the ruminal acetogen *Syntrophococcus sucromutans*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1990, 56(4): 984-989.
- [27] den BESTEN G, LANGE K, HAVINGA R, van DIJK TH, GERDING A, van EUNEN K, MÜLLER M, GROEN AK, HOOVELD GJ, BAKKER BM, REIJNGOUD DJ. Gut-derived short-chain fatty acids are vividly assimilated into host carbohydrates and lipids[J]. American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology, 2013, 305(12): G900-G910.