

研究报告

固氮施氏假单胞菌亚硝酸盐还原酶基因 *nirS* 转录特性及功能鉴定弓湃^Δ 王丽英^Δ 尚立国 战崙华 平淑珍 燕永亮* 林敏

(中国农业科学院生物技术研究所 北京 100081)

摘要:【目的】研究固氮施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*) A1501 亚硝酸盐还原酶结构基因 *nirS* 的转录调控机制及其在反硝化过程中的功能。【方法】构建 *nirS-lacZ* 融合载体, 利用三亲本结合法将其导入野生型 A1501, 通过 β -半乳糖苷酶活性的测定, 分析不同供氧状况、不同浓度的硝酸盐、亚硝酸盐对 *nirS* 基因表达的影响; 同时将该载体导入 *rpoN* 突变株中, 研究氮代谢调控因子 RpoN 对 *nirS* 基因转录影响。通过同源重组方法构建 *nirS* 突变株, 通过生化表型测定明确 *nirS* 在反硝化过程中的功能。【结果】启动子活性测定表明, *nirS* 基因厌氧条件下高水平表达, 是好氧条件下表达水平的 4 倍; *nirS* 的表达受硝酸盐诱导, 但不受亚硝酸盐的诱导; RpoN 突变株中, *nirS* 的表达活性为野生型的 1/4, *nirS* 启动子未发现 RpoN 的保守结合位点, 表明 *nirS* 的表达受 RpoN 间接调控。表型测定显示以硝酸盐为电子受体时 $\Delta nirS$ 的反硝化能力降低了约 20%; 以亚硝酸盐为电子受体时 $\Delta nirS$ 仅有微弱的反硝化能力, 并且 *nirS* 的突变使得菌体在反硝化条件下利用亚硝酸盐的能力显著减弱。*nirS* 突变提高了菌体在亚硝酸为电子受体的反硝化条件下的固氮酶活。【结论】A1501 中 *nirS* 基因的转录受外界氧及硝酸盐的影响, 同时受氮代谢 Sigma 因子 RpoN 的调控。*nirS* 在 A1501 菌反硝化过程中起关键作用, 参与了亚硝酸盐的转化。

关键词: 固氮施氏假单胞菌 A1501, 反硝化, *nirS*

The transcriptional regulation and functional identification of nitrite reductase *nirS* in *Pseudomonas stutzeri* A1501GONG Pai^Δ WANG Li-Ying^Δ SHANG Li-Guo ZHAN Yu-Hua PING Shu-Zhen
YAN Yong-Liang* LIN Min

(Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: [Objective] To study the transcriptional regulation of *nirS* encoding nitrite reductase and the function of *nirS* involved in the denitrification process of *Pseudomonas stutzeri* A1501. [Methods] The

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31230004, 31170081, 31070084); 中央科研院所基本科研业务费-农业微生物研究项目; 广东省引进创新创业团队计划项目(No. 2013S033)

*通讯作者: Tel: 86-10-82109868; ✉: yanyongliang@caas.cn

^Δ共同第一作者

收稿日期: 2014-04-11; 接受日期: 2014-05-22; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-05-30

nirS-lacZ fusion vector was constructed and transformed to A1501 and *rpoN* mutant strains by triparental conjugation. The β -galactosidase activity was detected to analyze the expression of the *nirS* gene in A1501 under different concentrations of oxygen, nitrate and nitrite. The fusion vector was also transformed to the *rpoN* mutant to investigate the effect of RpoN on the transcription of the *nirS* gene through β -galactosidase activity analysis. Furthermore, we constructed the *nirS* mutant strain by homologous recombination and investigated the function of *nirS* as it is involved in the denitrification process. **[Results]** Expressional activity of the A1501 *nirS* promoter under anaerobic conditions was four-fold higher than that under aerobic conditions. Nitrate significantly induced the expression of *nirS*, while nitrite showed only slight induction of the *nirS* promoter. Compared to the wild type, one fourth of the *nirS* expression was observed in the *rpoN* mutant. No conserved RpoN binding sites were found in the *nirS* promoter region, suggesting that RpoN regulates *nirS* expression through an indirect pattern. The denitrification capability of Δ *nirS* was reduced by about 20% compared to the wild type when nitrate was used as the sole electron receptor, while the Δ *nirS* had little denitrification with nitrite as the sole electron receptor, thus the utilization of nitrite was apparently decreased in Δ *nirS*. Compared to the wild type, the nitrogenase activity of Δ *nirS* was increased under anaerobic conditions with nitrite. **[Conclusion]** The transcription of *nirS* in A1501 was influenced not only by anaerobic conditions and nitrate, but also under the control of RpoN. The *nirS* played a key role in the denitrification process of A1501, which is involved in nitrite metabolism.

Keywords: *Pseudomonas stutzeri* A1501, Denitrification, *nirS*

反硝化作用是微生物将化合态氮(硝酸盐、亚硝酸盐)转化为游离态氮(氮气)的过程^[1],该反应是细菌在无氧条件下的一种呼吸方式,为细胞生存提供能量。反硝化过程包括四步反应: $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$,需要硝酸盐还原酶类(*nar*)、亚硝酸盐还原酶类(*nir*)、一氧化氮还原酶类(*nor*)和一氧化二氮还原酶类(*nos*)四套酶依次进行催化,约50个酶共同参与^[2]。这些基因以基因簇方式在多种反硝化细菌中均有发现并且表达受严格调控,其表达水平与氧气浓度成反比,并且还原酶的表达需要硝酸盐或者其还原产物的存在^[3-5]。 NO_2^- 还原为NO的过程是反硝化作用区别于其他硝酸盐代谢的标志性反应,该反应由*nir*编码的亚硝酸盐还原酶类催化,包括亚硝酸盐还原酶结构基因和亚硝酸盐还原酶发挥催化功能所需的一系列组件^[1]。在反硝化细菌中有两种类型:*nirS*基因编码的细胞色素cd1-*nir*型和由*nirK*基因编码的Cu-*nir*型,二者不能共存于同种细菌中^[6],其中由*nirS*基因编码的亚硝酸还原酶在不同细菌中分子大小相似,形态结构相对保守^[7]。

施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*) A1501是

假单胞菌属鲜有的一株联合固氮菌^[8],可附着、侵入禾本科作物水稻根际。在低铵、微好氧条件下具有良好的固氮活性,为水稻提供氮源;在绝对厌氧条件下,具有反硝化能力^[9]。基因组分析发现施氏假单胞菌A1501基因组中存在40个反硝化相关基因^[10]。其中,*nir*基因簇编码16个ORFs(开放阅读框),序列比对发现A1501中的亚硝酸还原酶属于细胞色素cd1型,由*nirS*基因编码亚硝酸盐还原酶^[5]。

为研究A1501菌中*nirS*基因的转录调控模式,本研究将*nirS*基因启动子与pGD926载体上的*lacZ*相连,构建融合启动子,通过测定 β -半乳糖苷酶活性研究在不同供氧条件、不同浓度的硝酸盐和亚硝酸盐诱导条件下*nirS*基因的表达水平,同时比较野生型A1501及RpoN突变株中*nirS*基因的表达差异,探索细菌氮代谢调控因子RpoN对*nirS*基因表达的影响;此外,为研究*nirS*基因在反硝化途径中的功能,通过同源重组方法构建了*nirS*的突变株,通过生理生化试验分析其功能,为进一步利用和改造反硝化途径,解决固氮过程中氮素流失提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒：施氏假单胞菌 A1501 为本实验室分离鉴定；高频转化宿主菌大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109、*E. coli* DH5 α ^[11] 为本实验室保存；pGD926^[12] 是一个 *lacZ* 融合广宿主载体(本实验室保存)，具有 Tc 抗性，用于构建 *nirS* 启动子载体；pRK2013^[13] (本实验室保存) 为穿梭质粒，用于辅助供体菌中的质粒向受体菌的传递，具有 Km 抗性；*rpoN* 突变株(本实验室保存) 为 A1501 的衍生菌株，其编码 *rpoN* 基因内部被插入 Tn5 而导致基因突变，具有 Km 抗性。pSUP202 质粒(本实验室保存) 为自杀性质粒，具有 Tc、Cm、Amp 抗性，可以通过结合转移方式进入宿主内并与宿主 DNA 发生同源交换。pKOK5 质粒(本实验室保存)，具有 Km 抗性，为构建 *nirS* 插入突变提供 *Km+lacZ* 片段。

1.1.2 主要试剂：限制性内切酶、T4 DNA 连接酶，购自 Promega 公司；PCR 相关试剂，购自 TaKaRa 公司。PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成。细菌基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒、DNA 纯化试剂盒、胶回收纯化试剂盒，购自天根公司；实验试剂均使用分析纯。

1.1.3 培养基：*E. coli* JM109、*E. coli* DH5 α 于 LB 培养基 37 °C 培养，野生型 A1501、 $\Delta nirS$ 及 $\Delta rpoN$ 于 A15 限制性培养基^[14] 30 °C 培养。抗生素在培养基中的终浓度：四环素(Tetracycline, Tc) 10 mg/L、氯霉素(Chloromycetin, Cm) 30 mg/L、卡那霉素(Kanamycin, Km) 50 mg/L、氨苄青霉素(Ampicillin, Amp) 100 mg/L。

1.2 方法

1.2.1 *nirS* 基因启动子区片段的克隆及 *nirS-lacZ* 重组质粒的构建：根据 A1501 基因组亚硝酸盐还原酶结构基因 *nirS* 的启动子片段设计引物^[15]：上游引物 Pnirs-F：5'-GAAATAACCAACCGCTGTCGTG-3'；下游引物 Pnirs-R：5'-GTCGGTAAACCTATTCTGGATC CC-3' (下划线为 *Bam*HI 酶切位点)。以 A1501 总 DNA

为模板进行 PCR 扩增 获得目的片段(大小为 360 bp)。50 μ L 体系(TaKaRa 公司)：Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L) 0.25 μ L，10 \times Buffer 5 μ L，dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μ L，模板 DNA 100 ng，引物(20 μ mol/L)各 1 μ L，用灭菌高纯水补齐至 50 μ L。PCR 条件为：95 °C 5 min；95 °C 30 s，55 °C 30 s，72 °C 1 min，30 个循环；72 °C 10 min。

将纯化后的 *nirS* 启动子区片段与 pGEM-T Easy 载体连接，构建 pTeasy-*nirS* 质粒，转化感受态细胞 *E. coli* JM109，蓝白斑筛选并将阳性克隆质粒测序。提取测序正确的 pTeasy-*nirS* 质粒，用 *Hind* III 和 *Bam*HI 酶切，切胶回收 *nirS* 启动子区片段，同时将其与经过 *Hind* III 和 *Bam*HI 完全酶切的 pGD926 载体连接，连接产物采用电击法转化入 *E. coli* DH5 α ，经蓝白斑和 Tc 抗性筛选阳性克隆，将重组质粒进行 PCR 及酶切验证，获得带有距 *nirS* 基因翻译起始位点上游 260 bp 并与 *lacZ* 融合的重组质粒，命名为 pGDP。

1.2.2 *nirS-lacZ* 重组质粒转入 A1501 和 $\Delta rpoN$ 中：将验证正确的含有 pGDP 质粒的大肠杆菌作为供体菌 野生型 A1501 和 $\Delta rpoN$ 突变株分别作为受体菌，在穿梭质粒 pKR2013 的辅助作用下，进行三亲本结合实验。由于 A1501 和 $\Delta rpoN$ 没有 Tc 抗性，大肠杆菌在 A15 培养基上不能生长，因此分别将两组亲本混合菌体于含 Tc 和 X-gal 的 A15 培养基固体平板上筛选含 pGDP 质粒的 A1501 菌株，于含 Km、Tc 及 X-gal 的 A15 培养基固体平板上筛选含 pGDP 质粒的 $\Delta rpoN$ 突变株。将筛选到的菌经 3 次单菌落纯化，提取质粒 PCR 及酶切验证，得到目的菌株并分别命名为 pGDP-A1501 和 pGDP- $\Delta rpoN$ 。将得到的目的菌株提取质粒，PCR 检测。如果得到 286 bp 的 *nirS* 启动子片段，说明已将含 *nirS* 基因启动子区的表达质粒成功转入 A1501 和 $\Delta rpoN$ 中。

1.2.3 *nirS* 基因片段的克隆及重组载体 pSUP202-TCK 的构建：根据 A1501 亚硝酸盐还原酶结构基因 *nirS* 基因序列设计引物克隆该基因内部部分序列^[15]：上游引物 nirS-F：5'-CTGGGCACCAA

GCGCCTGGA-3';下游引物 nirS-R:5'-TTAGTACA CGTCGTCATGG-3'。以 A1501 总 DNA 为模板进行 PCR 扩增,获得目的片段。PCR 体系与条件同 1.2.1。将目的片段克隆到 pGEM-T Easy 载体并转到感受态细胞 *E. coli* JM109, 筛选阳性克隆, 将验证正确的重组质粒命名为 pNIRS。

将 pNIRS 用 *Pst* I 酶切获得 1.39 kb 的 *nirS* 基因内部片段纯化回收, 并与经过 *Pst* I 酶切处理的 pSUP202 质粒连接转化入 *E. coli* JM109。通过抗性筛选酶切验证, 得到重组质粒 pSUP202-III。将 pSUP202-III 质粒用 *Sma* I 酶切(从 *nirS* 内部中间切开), 使重组载体变为线性的平末端载体; 同时用 *Pst* I 酶处理 pKOK5 质粒, 切下一段含 *Km+lacZ* 盒的 4.6 kb 片段, 将此片段用 Klenow 酶补平粘性末端; 随后将经 *Sma* I 处理后的线性 pSUP202-III 质粒与粘性末端被补平的 *Km+lacZ* 连接并转化到 *E. coli* JM109, 经 Tc、Cm 及 Km 抗性筛选并酶切验证得到自杀性重组质粒 pSUP202-TCK。

1.2.4 *nirS* 突变株的构建: 利用三亲本结合方法将自杀性重组质粒 pSUP202-TCK 转入 A1501 中, 通过同源重组方法将 *Km+lacZ* 片段插入 A1501 基因组 *nirS* 基因内部以阻断 *nirS* 基因转录, 经 Tc、Cm 及 Km 抗性筛选得到 *nirS* 插入突变株命名为 $\Delta nirS$ 。

1.2.5 不同供氧条件处理: 厌氧条件处理: 本实验使用自动真空抽气装置, 将装有菌液的青霉素小瓶于该装置下抽真空 6 min 后取出, 再向小瓶中注入氩气, 重复以上操作 3 次, 最后将灭过菌的针管插在小瓶塞上以保持常压。有氧条件处理: 将装有菌液的青霉素小瓶用氩气排气 6 min, 之后按小瓶体积的 0.5% 注入氧气。反硝化条件: 在厌氧条件下向 LB 培养基中加入 10 mmol/L NO_3^- 或者 5 mmol/L NO_2^- , 此浓度是实验室摸索出的测定 A1501 反硝化能力电子受体的最佳浓度。

1.2.6 固氮酶活的测定: 本实验固氮酶活的测定采用乙炔还原法, 具体方法见参考文献[9]。

1.2.7 β -半乳糖苷酶活性的测定: 本方法基于

Miller 法略有改动^[16]。将待测菌株接种于 A15 液体培养基(含相应抗生素), 待 OD_{600} 值达到 0.5–0.8 时, 记录 OD_{600} 值。取 1 mL 菌液 5 000 r/min、4 °C 离心 5 min, 弃去上清并用无菌水洗 2 次后按需要重新悬浮菌体; 将菌悬液与 Buffer Z 混合, 使总体积为 1 mL, 加入 3 滴氯仿, 混匀, 开盖于 37 °C 保温 40 min; 转入 30 °C 保温 5 min 之后加入 200 μL (4.0 g/L) 的邻硝基苯-C-D-苷(ONPG)混匀, 30 °C 继续保温, 此时立即记录下反应起始时间; 观察样品若出现黄色, 加入 500 μL 浓度为 1 mol/L 的 Na_2CO_3 以终止反应, 记下反应终止时间, 并将样品放于冰上待测 OD 值; 使用紫外分光光度仪测定 OD_{420} 、 OD_{550} 的值。按照下列公式计算 β -半乳糖苷酶的活性: 一单位 β -半乳糖苷酶的活性为单位细胞每 min 催化 ONPG 分解的量。

$$\text{Units} = 1\,000 \times \frac{OD_{420} - 1.75 \times OD_{550}}{T \times V \times OD_{600}}$$

其中 T 代表反应时间(min), V 代表反应中菌体体积。

1.2.8 亚硝酸盐浓度的测定: 本实验亚硝酸盐的测定采用 Nicholas 法^[17]。

2 结果与分析

2.1 亚硝酸盐还原酶结构基因 *nirS* 的系统进化分析

A1501 菌的 NirS 与反硝化模式菌株 *Pseudomonas stutzeri* Zobell 的亚硝酸还原酶同源性较高, 达 91.25%。将 A1501 中亚硝酸还原酶结构基因的氨基酸序列与其他反硝化细菌的亚硝酸还原酶同源物进行进化分析, 结果表明, A1501 亚硝酸盐还原酶与大多数假单胞菌中 cd1 型 NirS 属于一个分支, 而与包括绿针假单胞菌(*Pseudomonas chlororaphis*) 和生脂固氮螺菌(*Azospirillum lipoferum* 4B)在内的 Cu 型 NirK 不在一个分支(图 1)。此外, 结构域分析发现 A1501 亚硝酸盐还原酶蛋白中含有与 cd1 型血红素结合的结构域, 因此推断 A1501 中的亚硝酸还原酶属于 cd1 型 NirS。

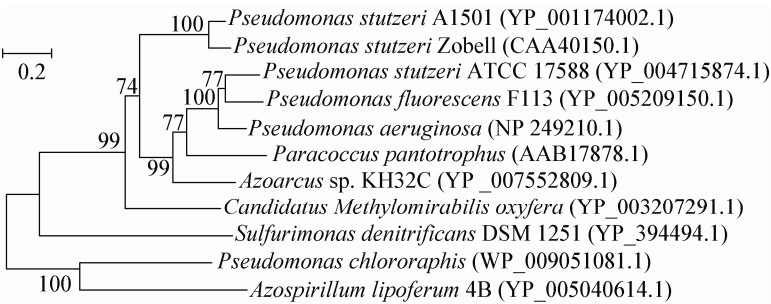


图 1 NirS 系统进化分析

Figure 1 Phylogenetic tree of NirS from *Pseudomonas stutzeri* A1501 and related strains

2.2 不同供氧状况对 *nirS* 基因表达的影响

将 pGDP-A1501 菌株在 A15 培养基中进行有氧 (0.5%)和厌氧培养。经 4 h 的诱导后，取出培养物，测定 β-半乳糖苷酶活性。结果如图 2 所示，*nirS* 的表达受氧气的抑制，其在厌氧条件下的表达活性显著高于有氧条件。

2.3 硝酸盐、亚硝酸盐浓度对 *nirS* 基因表达的影响

将 pGDP-A1501 菌株在加有不同浓度的亚硝酸盐和硝酸盐的 A15 培养基中分别有氧和厌氧条件下诱导 4 h，测定 β-半乳糖苷酶活性(分别做 5 个重复)。结果如表 1、2 所示，不论在厌氧还是有氧条件下，*nirS* 的表达几乎不受亚硝酸盐的诱导，

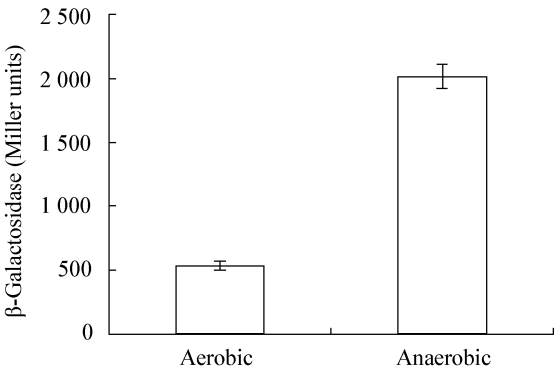


图 2 有氧与厌氧条件下 *nirS-lacZ* 在 A1501 中的表达

Figure 2 β-Galactosidase activities were measured in wild-type strain A1501 carrying *nirS-lacZ* transcriptional fusions on pGDP under anaerobic and aerobic conditions in A15 medium

表 1 亚硝酸盐诱导下的 β-半乳糖苷酶活					
Table 1 The activity of β-galactosidase under the conditions of A15 medium with different nitrite concentrations					
培养条件 Culture conditions	亚硝酸盐浓度 Concentration of NO ₂ ⁻ (mmol/L)				
	0	0.5	1.0	5.0	10.0
Aerobic	530±30	648±12	680±24	678±30	660±48
Anaerobic	2 015±91	2 575±102	2 399±73	2 404±54	2 336±89

表 2 硝酸盐诱导下的 β-半乳糖苷酶活					
Table 2 The acrivty of β-galactosidase under the conditions of A15 medium with different nitrate concentrations					
培养条件 Culture conditions	硝酸盐浓度 Concentration of NO ₃ ⁻ (mmol/L)				
	0	0.5	1.0	5.0	10.0
Aerobic	530±30	1 307±50	1 165±25	1 613±48	1 299±10
Anaerobic	2 015±91	5 974±125	12 900±214	6 443±117	4 470±131

不同浓度亚酸盐的加入几乎没有引起 *nirS* 基因表达的变化；而 *nirS* 的表达受硝酸盐的明显诱导，尤其在厌氧条件下，不同浓度的硝酸盐对 *nirS* 表达的诱导明显高于不加硝酸盐的对照组。在厌氧条件下当硝酸盐浓度为 1 mmol/L 时，*nirS* 的表达最高，呈现的 β -半乳糖苷酶活性为 12 900 Units，远高于对照组的 2 015 Units。

2.4 RpoN 对 *nirS* 基因表达的影响

RpoN 是细菌 RNA 聚合酶组成成分 Sigma 因子的类型之一，在细菌中主要负责氮代谢有关基因的转录^[18]。将含有 *nirS-lacZ* 融合片段的载体 pGDP 分别转化入 A1501 和 $\Delta rpoN$ 中，在浓度为 1 mmol/L 硝酸盐的厌氧条件下，比较 *nirS* 在 A1501 和 $\Delta rpoN$ 突变株中的表达量，研究 *nirS* 的表达是否受细菌氮代谢调控因子 RpoN 的调控。实验结果如图 3 所示，以硝酸盐为电子受体的厌氧条件下，*nirS* 在 *rpoN* 突变株中的表达约为野生型的 1/4，远远低于在野生型的表达活性，表明 A1501 中 *nirS* 基因的启动有可能依赖 RpoN，但是分析 *nirS* 启动子没有发现 RpoN 保守的识别位点，RpoN 突变对 *nirS* 启动的影响可能是通过间接的方式。

2.5 *nirS* 突变对施氏假单胞菌 A1501 反硝化生长的影响

在厌氧条件下分别以含有 10 mmol/L 硝酸盐、5 mmol/L 亚硝酸盐的 LB 培养条件下测定 A1501 和 $\Delta nirS$ 的生长曲线。结果如图 4 所示，厌氧条件

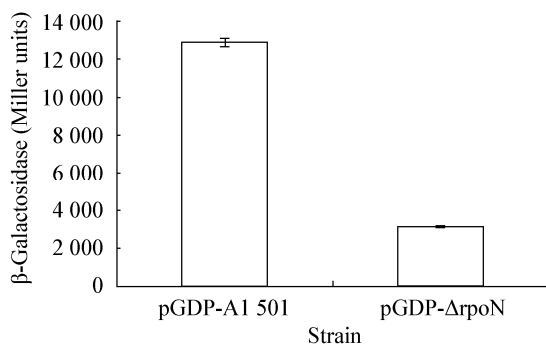


图 3 *nirS-lacZ* 在 A1501 和 $\Delta rpoN$ 突变株中的表达

Figure 3 β -Galactosidase activities were measured in wild-type strain A1501 and $\Delta rpoN$ carrying *nirS-lacZ* transcriptional fusion on pGDP under anaerobic conditions with 1 mmol/L nitrate in A15 medium

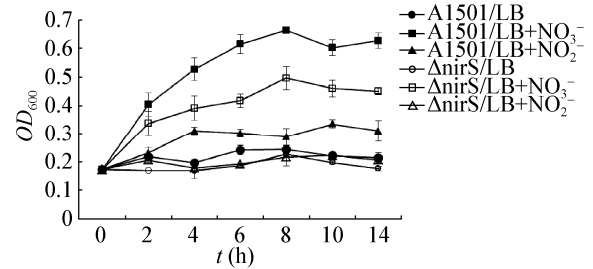


图 4 厌氧条件下 A1501 与 $\Delta nirS$ 在含硝酸盐/亚硝酸盐的 LB 培养基中生长曲线

Figure 4 Growth of A1501 and $\Delta nirS$ under anaerobic conditions with 10 mmol/L nitrate or 5 mmol/L nitrite in LB medium

下，A1501 野生型在 LB 培养基中不能生长，当加入硝酸盐或者亚硝酸盐时可以生长，并且在硝酸盐中的生长能力显著高于亚硝酸盐；同野生型一样，*nirS* 突变株在 LB 厌氧培养条件下依然不能生长，但是在含有硝酸盐的培养基中， $\Delta nirS$ 的生长能力相比野生型下降了约 30%；而当以亚硝酸盐为电子受体时， $\Delta nirS$ 几乎不能生长。分析原因，在 LB 厌氧条件下，菌体的呼吸链由于缺乏电子受体无法进行呼吸作用，因此没有能量供应，菌株也无法生长。当加入一定量的硝酸盐或者亚硝酸盐时，这两者均可代替氧气作为呼吸链末端的电子受体，菌体可以通过厌氧呼吸产生能量，因此 A1501 可以在含硝酸盐或者亚硝酸盐的培养基中生长。当 *nirS* 突变后，反硝化过程中的亚硝酸盐还原酶无法合成，因此电子在传递过程中受到阻断，菌体利用硝酸盐为电子受体，仅有第一步可以产生少量能量，表现为反硝化能力明显降低；而亚硝酸盐为电子受体时，菌体进行反硝化第一步亚硝酸盐还原为 NO 的过程即受阻，由于没有能量提供菌株无法生长。

2.6 *nirS* 突变株对亚硝酸盐的利用

在亚硝酸盐为电子受体时， $\Delta nirS$ 几乎不能生长，由此推测 *nirS* 参与了亚硝酸盐的代谢。为了验证推测，将 A1501 与 $\Delta nirS$ 分别在含 5 mmol/L 亚硝酸盐的 LB 培养基中厌氧培养，不同时间点取样测定培养基中亚硝酸盐的剩余量。测定结果如表 3 所示，亚硝酸盐为电子受体时，A1501 在 10 h 内将培养基中一定量的亚硝酸盐完全消耗，而

表 3 A1501 与 $\Delta nirS$ 在厌氧条件下对亚硝酸盐的利用				
Table 3 Nitrite utilization of A1501 and $\Delta nirS$ under anaerobic conditions (mg/L)				
菌株 Strains	时间 Time (h)			
	0	4	6	10
A1501	0.385±0.007	0.201±0.003	0.050±0.002	0
$\Delta nirS$	0.385±0.005	0.341±0.003	0.312±0.005	0.29±0.003

ΔnirS 仅有微弱的下降。这个结果表明在厌氧条件下 A1501 中 NirS 参与亚硝酸盐的代谢。亚硝酸盐为电子受体时，*ΔnirS* 几乎不能生长的原因：在厌氧条件下 *nirS* 突变后亚硝酸盐无法被代谢，因此反硝化作用无法进行，电子呼吸链不能运作，导致细菌无法生长。

2.7 *nirS* 突变对施氏假单胞菌 A1501 固氮酶活的影响

在厌氧条件下向 A15 无氮培养基中分别添加不同浓度的硝酸盐和亚硝酸盐，测定 A1501 与 *ΔnirS* 在此条件下的固氮酶活。结果如表 4 所示，在含有 0.5 mmol/L 硝酸盐的培养基中，A1501 的固氮酶活性高于无氮培养基中的固氮酶活性，随着硝酸盐浓度的提高，A1501 的固氮酶活性逐渐丧失；而加入微量的亚硝酸盐则使得 A1501 的固氮酶活性几乎完全丧失。这个现象与之前的研究报道相一致^[9]。在 *nirS* 突变株中，硝酸盐的添加可对固氮酶活产生与野生型中一致的影响趋势，但是亚硝酸盐的添加对固氮酶活的影响与野生型中的情况差别较大。如表 4 所示，野生型中 0.5 mmol/L 亚硝酸的加入可造成固氮酶活的极度下降，而突变株在浓度为 0.5 和 1.0 mmol/L 亚硝酸盐的反硝化条件下表现出较高的

固氮酶活。产生这个现象的原因可能是在野生型 A1501 菌中，抑制固氮酶活的除了亚硝酸盐本身，还包括亚硝酸盐作为反应底物产生的代谢产物，*nirS* 基因突变后，亚硝酸盐的代谢产物不再产生，所以抑制能力降低。

3 讨论

A1501 菌在厌氧条件下有需硝酸盐而不需亚硝酸盐的固氮酶活性，硝酸盐在反硝化条件下既可以充当电子受体进行反硝化作用为细胞供能，同时也可以充当氮源，低浓度的氮源促进固氮酶活，高浓度氮源抑制固氮酶活：在 0.5 mmol/L 硝酸盐的厌氧条件下，硝酸盐浓度低于固氮酶活受限制时氮源的浓度阈值，A1501 固氮酶活较高，当硝酸盐浓度达到 1 mmol/L 时，硝酸盐浓度超过阈值，A1501 的固氮能力受到抑制，固氮酶活急剧下降。之前的研究表明 A1501 中亚硝酸盐抑制反硝化条件下的固氮酶活性，但是本研究发现当加入 0.5 mmol/L 的亚硝酸盐时，几乎测不到野生型的酶活，而 *ΔnirS* 在此条件下出现了明显的固氮酶活，这表明抑制 A1501 在反硝化条件下固氮酶活性的可能不止亚硝酸本身。研究共生根瘤菌反硝化与固氮调控发现共生根瘤菌中反硝化途径中间产物和终产物都是固氮作用的抑制剂，其中亚硝酸盐是固氮酶的竞争性抑制剂，能使有活性的亚铁型的加氧血红蛋白自动氧化为无活性的高铁型；氮的氧化物是活细胞的毒物，也是固氮酶的抑制剂，亚硝酸盐的产物 NO 对共生固氮细菌酶活的抑制起直接作用^[19]。因此推测抑制 A1501 固氮酶活性的并不仅是亚硝酸盐，很可能是亚硝酸盐还原产物 NO 或者是反硝化作用途径中亚硝酸还

表 4 厌氧条件下 A1501 与 $\Delta nirS$ 在添加不同浓度的硝酸盐和亚硝酸盐后的固氮酶活测定								
Table 4 Nitrogenase activity of A1501 and $\Delta nirS$ under anaerobic conditions with different concentrations of nitrate and nitrite								
菌株 Strains	硝酸盐浓度 Nitrate concentration (mmol/L)				亚硝酸盐浓度 Nitrite concentration (mmol/L)			
	0	0.5	1.0	5.0	0	0.5	1.0	5.0
$\Delta nirS$	485.3±43.0	556.0±32.0	178.0±15.0	16.0±3.0	485.3±43.0	386.0±24.0	28.0±5.0	0
A1501	651±67	690±59	98±2	0	651±67	19±6	0	0

原酶之后产生的还原产物如 N_2O 。反硝化产物对 A1501 固氮酶活的抑制机理还需进一步研究。

生物固氮与反硝化是自然界氮循环过程中两个相反的生理反应。当稻田浸水氧分压极低的条件下,水稻根际联合固氮微生物 A1501 兼具有固氮与反硝化功能,并且反硝化是此条件下氮素流失的主要因素,为了提高固氮效率同时避免氮素流失,研究其反硝化过程中的基因调控机制以及与固氮酶活的关系显得尤为重要,本研究为揭示 A1501 反硝化与固氮调控机理提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] Zumft WG. Cell biology and molecular basis of denitrification[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1997, 61(4): 533-616
- [2] Zumft WG. Nitric oxide signaling and NO dependent transcriptional control in bacterial denitrification by members of the FNR-CRP regulator family[J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2002, 4(3): 277-286
- [3] Van Spanning RJM, de Boer APN, Reijnders WNM, et al. Regulation of oxidative phosphorylation: The flexible respiratory network of *Paracoccus denitrificans*[J]. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 1995, 27(5): 499-512
- [4] Körner H, Zumft WG. Expression of denitrification enzymes in response to the dissolved oxygen level and respiratory substrate in continuous culture of *Pseudomonas stutzeri*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1989, 55(7): 1670-1676
- [5] Van Spanning RJM, Houben E, Reijnders WNM, et al. Nitric oxide is a signal for NNR-mediated transcription activation in *Paracoccus denitrificans*[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(13): 4129-4132
- [6] Braker G, Fesefeldt A, Witzel KP. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(10): 3769-3775
- [7] Song YN, Wu MJ, Lin Y. Response of the denitrifying bacterial *nirS* gene community to nitrogen fertilizer in paddy field[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2013, 46(9): 1818-1826 (in Chinese)
宋亚娜, 吴明基, 林艳. 稻田土壤 *nirS* 型反硝化细菌群落对氮肥水平的响应[J]. 中国农业科学, 2013, 46(9): 1818-1826
- [8] Vermeiren H, Willems A, Schoofs G, et al. The rice inoculant strain *Alcaligenes faecalis* A15 is a nitrogen-fixing *Pseudomonas stutzeri*[J]. Systematic and Applied Microbiology, 1999, 22(2): 215-224
- [9] Lin M, You CB. Denitrification and nitrogen fixation by *Alcaligenes faecalis*[J]. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 1987, 1(1): 3-10 (in Chinese)
林敏, 尤崇杓. 粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis*)的反硝化及固氮作用[J]. 核农学报, 1987, 1(1): 3-10
- [10] Yan YL, Yang J, Chen LH, et al. Structural and functional analysis of denitrification genes in *Pseudomonas stutzeri* A1501[J]. Science in China (Series C: Life Sciences), 2005, 35(3): 246-253 (in Chinese)
燕永亮, 杨剑, 陈立宏, 等. 斯氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*) A1501反硝化相关基因结构及功能分析[J]. 中国科学: C 辑, 2005, 35(3): 246-253
- [11] Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors[J]. Gene, 1985, 33(1): 103-119
- [12] Ditta G, Schmidhauser T, Yakobson E, et al. Plasmids related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression[J]. Plasmid, 1985, 13(2): 149-153
- [13] Staskawicz B, Dahlbeck D, Keen N, et al. Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. glycinea[J]. Journal of Bacteriology, 1987, 169(12): 5789-5794
- [14] Galimand M, Perroud B, Delorme F, et al. Identification of DNA regions homologous to nitrogen fixation genes *nifE*, *nifUS* and *fixABC* in *Azospirillum brasilense* Sp7[J]. Journal of General Microbiology, 1989, 135(5): 1047-1059
- [15] Yan Y, Yang J, Dou Y, et al. Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008, 105(21): 7564-7569
- [16] Xie Z, Dou Y, Ping S, et al. Interaction between NifL and NifA in the nitrogen-fixing *Pseudomonas stutzeri* A1501[J]. Microbiology, 2006, 152(12): 3535-3542
- [17] Riet JVT, Stouthamer AH, Planta RJ. Regulation of nitrate assimilation and nitrate respiration in *Aerobacter aerogenes*[J]. Journal of Bacteriology, 1968, 96(5): 1455-1464
- [18] Reitzer L, Schneider BL. Metabolic context and possible physiological themes of sigma(54)-dependent genes in *Escherichia coli*[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2001, 65(3): 422-444
- [19] Trinchant JC, Rigaud J. Nitrite and nitric oxide as inhibitors of nitrogenase from soybean bacteroids[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1982, 44(6): 1385-1388