

一株高耐氧反硝化细菌的筛选及其反硝化产物确定

何芳 康贻军 单君 胡健 殷士学*

(扬州大学环境科学与工程学院 扬州 225009)

摘要: 利用浅层振荡培养和连续通气培养方法, 获得一株高耐氧反硝化细菌 H1。分别利用 NO 报告克隆 *nnrS-gfp* 和乙炔抑制-气相色谱测得菌株 H1 能够在反硝化条件下产生 NO 和 N₂O, 不能产生 N₂, 因此其反硝化途径为 NO₃⁻→NO₂⁻→NO→N₂O。在初始 O₂ 浓度为 0%~21% 范围内, 该菌株能将 98% 以上的 NO₃⁻ 还原为气态氮化物。在 150 mL 的培养液中, 连续以 2 L/min 的速率通气, H1 依然能够反硝化, 但是更高的通气速率则反硝化停止。16S rDNA 序列分析表明, 菌株 H1 与 *Ralstonia taiwanensis* 相似性达 98%。

关键词: 反硝化菌, 反硝化产物, 筛选, 耐氧

An Oxygen-tolerant Denitrifying Strain and Its Denitrifying Processes

HE Fan KANG Yi-Jun SHAN Jun HU Jian YIN Shi-Xue*

(College of Environmental Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225009)

Abstract: An oxygen-tolerant denitrifying strain designated as H1 was screened by the procedures of shallow shaking and continuous aeration cultures. With the aid of an *nnrS-gfp* fusion responsive to nitric oxide (NO) and acetylene inhibition-GC procedure, it was shown that strain H1 was able to produce NO and N₂O but not N₂ under denitrifying conditions. Denitrifying processes were thus determined as NO₃⁻→NO₂⁻→NO→N₂O, with N₂O as the end product. Strain H1 could denitrify under shallow shaking conditions as well as in the initial atmospheric oxygen concentration ranging from 0~21%. Denitrification processed normally under continuous aeration at the rate of 2 L air per min in a 150 mL medium, but stopped under high aeration rate as 5 L air per min. 16S rRNA gene sequence revealed that strain H1 shared 98% similarity to its closet relative *Ralstonia taiwanensis*, the genus where denitrifying bacteria are frequently found.

Keywords: Denitrifying bacteria, Denitrifying products, Screen, Oxygen-tolerant

反硝化指硝态氮以气态氮化物(包括 NO、N₂O、N₂)形态损失的生物学过程。参与反硝化过程的细菌

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.30470060 和 No.40471072)

* 通讯作者: Tel: 0514-7961126; ✉: sxyin@yzu.edu.cn

收稿日期: 2007-04-06; 接受日期: 2007-08-14

主要是兼厌氧和微嗜氧菌,几乎没有专性厌氧菌,缺氧或少氧是反硝化的必要条件^[1]。近年来,国内外有不少“好气反硝化细菌”的报道^[2]。因为好气反硝化细菌在污水处理系统中意味着在节省能源的同时清除氮素污染物,因此研究好气反硝化细菌有潜在实用意义。此外,一般认为反硝化细菌是在缺氧或少氧条件下把 $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 作为替代 O_2 的末端电子受体完成呼吸作用。如果反硝化菌株能够忍受较高 O_2 浓度,这就意味着 $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 是菌株优先电子受体而不是缺氧时替代性末端电子受体,这与传统反硝化概念有所不同。因此,能够忍受较高 O_2 浓度的菌株是研究反硝化细菌生命机理(例如 O_2 对反硝化基因表达的调节作用)的重要材料。本研究目的是筛选能够忍耐较高 O_2 浓度的反硝化菌株。现将筛选到的菌株 H1 的反硝化特点报告如下。

1 材料与方法

1.1 菌株分离

以扬州大学江阳路南校区的花园土为材料,用 BTB 培养基用于反硝化菌的初筛。主要成分有: 1% L-天门冬胺, 0.1% KNO_3 , 0.1% KH_2PO_4 , 0.005% $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.2% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mL 1% 的溴百里酚蓝(pH 指示剂), 2% 琼脂, pH 7.0~7.3。取 0.5 mL 0.1% 的土壤悬浊液涂抹于 BTB 培养基表面, 30℃ 条件下培养, 不断观察并及时挑取蓝色菌落进行分离纯化。

将纯化后的培养物接种到装有 50 mL 加有 10 mmol/L LB 培养基的 500 mL 三角瓶中(浅层; 静置时液体厚度 0.5 cm; 浅层振荡培养是微生物学中常用的好气培养方法), 在 120 r/min 的转速下 30℃ 恒温振荡器培养。3 天后测定 $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 剩余量, 将 $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 去除率在 50% 以上的菌株作进一步筛选。

1.2 反硝化产物测定

NO_3^- 和 NO_2^- 用紫外分光光度计在 220 nm 和 275 nm 波长下测定; NO_2^- 用 Griess-Ilosvay 试剂显色测定。 N_2O 用气相色谱(HP 5890 Series II)法测定, 具体条件: 炉温 35℃, 电子捕获检测器温度 250℃, 进样口温度 40℃, Poropak Q 分离柱。

NO 用本实验室构建的 *nnrS-gfp* 克隆定性测定。具体构建方法在文献^[3]中有详细描述, 这里只作简要介绍。绿色荧光蛋白基因(*gfp*)来自质粒 pTB93F; 从 *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3 DNA 中扩增出 926 bp 片段, 其中包含 *nnrS* (表达产物为含血色素和铜的膜蛋白)启动子、NnrR 结合位点上游 174 bp 和 *nnrS*

转录起始位点下游 607 bp。酶切质粒 pTB93F 和 926 bp 片段, 连接, 将同时包含 *nnrS* 启动子和 *gfp* 的质粒分离出来, 命名为 pMF3, 转化到 *E. coli* S17-1 中, 然后结合到 *R. sphaeroides* 11.10 菌株中, 成为 11.10/pMF3。 *R. sphaeroides* 11.10 是一株 *nirK* 缺失突变株, 其余反硝化基因与 2.4.3 相同^[4]。当细胞周围有 NO 时, *nnrR* 开始转录, 同时激活 *nor* 和 *gfp* 转录, 这样 11.10/pMF3 就成了 *nor* 转录的指示器, 也是 NO 检测器。2.4.3/pMF3 为阳性对照, 11.10 或 2.4.3 或非反硝化条件下的 11.10/pMF3 都可为阴性对照。

nnrS-gfp 克隆检测 NO 时, 预先分别将待测菌和报告菌单独培养至对数生长期, 然后以不同比例混合接种到含有 NO_3^- (或 NO_2^- , 因待测菌株而异) 的新鲜培养基中, 在反硝化条件下培养 3~6 h。本研究目的是筛选高耐氧反硝化细菌, 所以这里的反硝化条件是指浅层振荡培养(参考 1.1)。培养 3 h 后取出少量培养物样品, 置于显微镜下观察并拍摄荧光照片。设置相应的对照。显微镜为 Olympus BX61, 配有 100× UplanApo NA = 1.35 的物镜和 GFP 滤色片。

1.3 pH 和 O_2 浓度对菌株 H1 反硝化作用的影响

浅层振荡培养条件下, 将培养基起始 pH 设置在 4.5~9.5 范围内培养 H1, 测定培养基中 NO_3^- 和 NO_2^- 含量动态变化。

在 25 mL 的可密封瓶中装入 10 mL 含有 NO_3^- 的液体培养基, 接种 H1 菌株。抽真空, 注入不同量的纯 O_2 气, 用氩气平衡, 得到起始 O_2 浓度分别为 0%, 5%, 10%, 15% 和 21% 有 5 个处理。在 120 r/min、30℃ 条件下振荡培养, 测定培养基中 NO_3^- 和 NO_2^- 含量动态变化。

1.4 连续通气条件下培养基中硝酸盐变化动态

在 500 mL 培养瓶中装入含 10 mmol/L NO_3^- 的 150 mL 液体培养基, 接入 15 mL 一昼夜预培养液(对数生长期后期附近), 用气泵直接向培养基中通入经棉花柱→浓 H_2SO_4 →水→水→棉花柱过滤的空气, 30℃ 下磁力搅拌培养, 测定培养基中 NO_3^- 和 NO_2^- 含量动态变化。设置 2 L/min 和 5 L/min 通气量(空气流量计实际测定结果)。

1.5 16S rRNA 基因序列测定

将菌株 H1 培养一昼夜, 离心收集细胞, 煮沸法提取细胞 DNA, 扩增 16S rRNA 基因序列并测序。引物为 27F (5'-AGAGTTTGATCC TGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACTTGTTACG ACTT-3')。PCR 反应条件: 正反向引物各 10 pmol, 10×缓冲液 10 pmol, 2.5 mmol/L MgCl_2 , 50 mmol/L dNTPs, 0.5 μL 5 U *Taq*

酶 (Bioneer co. Ltd., Korea), 模板 DNA 20~80 ng, 94℃变性 40 s, 55℃退火 40 s, 72℃延长 1 min, 30 个循环。1%琼脂糖电泳分离, 用 PCR 纯化试剂盒 (Nucleo Gen) 纯化, 用 ABI prism 3730XL genetic analyzer 测序。序列载入 Blastn 中与已有菌株序列比对。

2 结果和讨论

2.1 菌株 H1 培养过程中培养基内 NO_3^- / NO_2^- 浓度变化

浅层振荡培养条件下, 菌株 H1 在培养 5 h 以后培养基内 NO_3^- 开始逐步下降, 大约在 20 h 以后接近消失, 到培养结束时 98% 的硝酸根回收不到 (图 1)。细胞数量增长呈正常的批培养特征。培养至 8 h 培养基中有 NO_2^- 积累, 但随着培养时间延长 NO_2^- 消失。临时性 NO_2^- 积累同时伴随 NO_3^- 减少, 表明菌株可能将 NO_3^- 还原为 NO_2^- 且进一步还原。但因为是浅层振荡培养, 不能完全排除 NO_3^- / NO_2^- 的减少是由于细胞繁殖同化氮素的结果, 因此需要进一步确认。确认方法非常简单: 如果在该条件下有 NO 产生, 表明上述 NO_3^- / NO_2^- 的减少是反硝化作用的结果。

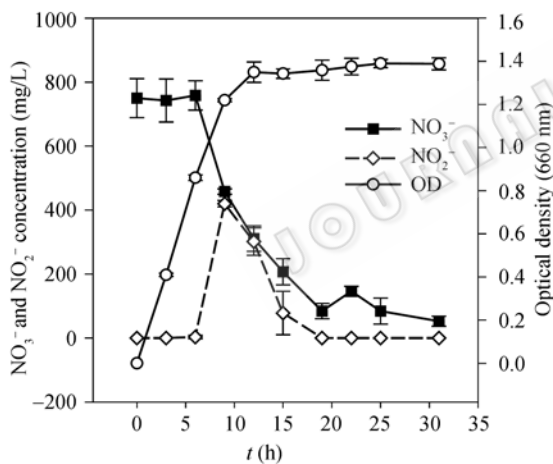


图1 H1反硝化过程中 NO_3^- 与 NO_2^- 的浓度变化
Fig. 1 Dynamic changes of NO_3^- , NO_2^- and optical density of the strain H1 under shallow shaking conditions

2.2 NO 的检测

将预先培养好的 H1 和 11.10/pMF3 按照不同细胞数比例混合, 接种到含有 NO_3^- 的 LB 培养基中浅层振荡培养条件下培养, 12 h、24 h、32 h 取细胞观察, 24 h 时得到的结果示于图 2。其它时间取样得到类似结果, 不重复展示。结果表明, 阳性对照 2.4.3/pMF3 产生强了荧光 (图 2A); 阴性对照 11.10

和 11.10/pMF3(NO 检测器本身)不产生或产生极微弱的荧光 (图 2 B); 11.10/pMF3 与已知的反硝化细菌 *Agrobacterium tumefaciens* 混合培养能产生明显的荧光 (图 2 C); 11.10/pMF3 与待检测菌 H1 混合培养能检测到极强的荧光 (图 2 D)。这表明, H1 在浅层振荡培养条件下能够产生 NO。需要指出的是: NO 产生是反硝化过程中最为关键的一步, 正是这一步将固定态氮化物转变成气态氮化物, 后面的还原反应都是气态氮化物之间的转化; 缺乏 NO 产生这一步不是严格意义上的反硝化。综合图 1 和图 2, 可以确定 H1 能够在较高氧气分压条件下完成反硝化过程。

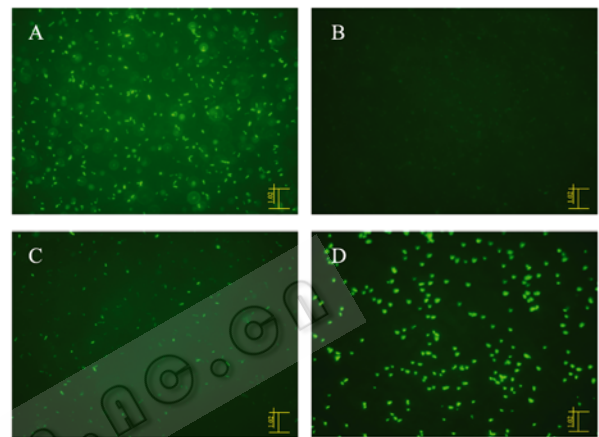


图2 用 *nrrS-gfp* 克隆检测菌株 H1 产生 NO 结果

Fig. 2 NO production by strain H1 as detected by *nrrS-gfp* fusion.
A: 2.4.3/pMF3 为阳性对照; B: 11.10 或 11.10/pMF3 为阴性对照;
C: *Agrobacterium tumefaciens* + 11.10/pMF3; D: H1 + 11.10/pMF3
A: 2.4.3/pMF3, positive control; B: 11.10 or 11.10/pMF3, negative control; C: *Agrobacterium tumefaciens* + 11.10/pMF3; D: H1 + 11.10/pMF3

2.3 菌株 H1 反硝化终产物的确定

将 H1 置于含 20 mL 有 NO_3^- 培养基的 210 mL 可密封瓶中培养, 将空间气体浓度设置成不同 O_2 浓度, 同时设加乙炔和不加乙炔处理, 测定 H1 菌株 N_2O 产出量。图 3 表明, 有 23%~30% 的 NO_3^- 被还原成 N_2O ; 加乙炔和不加乙炔 N_2O 产出量没有统计学区别。因为乙炔是 N_2O 还原酶的专性抑制剂^[5], 因此这一结果表明, H1 不能进一步将 N_2O 还原成 N_2 , 从而确定 H1 反硝化终产物为 N_2O 。图 3 同时表明, 不同起始 O_2 浓度似不影响 N_2O 产出量, 进一步表明菌株 H1 可以在较高氧分压条件下进行反硝化。

2.4 振荡与连续通气条件下 H1 的反硝化作用

进一步确认 H1 可以耐高氧分压, 改用向培养瓶中连续通气, 测定反硝化进程, 结果示于图 4。从图 4A 看出, 浅层振荡培养处理 NO_3^- 最早出现下降;

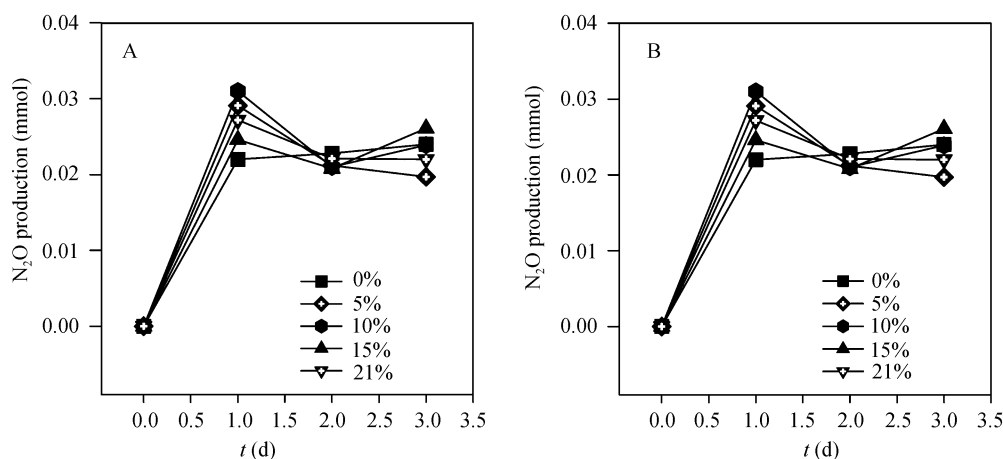


图3 H1在不同O₂浓度下N₂O生成量(氩气氛围; 培养基中起始NO₃⁻总量为0.1 mmol)

Fig. 3 N₂O production under different initial O₂ concentrations (Argon as balance gas; Initial NO₃⁻ in the medium was 0.1 mmol).

A: 加10% (V/V) C₂H₂; B: 不加C₂H₂

A: with acetylene added at final concentration of 10% (V/V); B: without acetylene

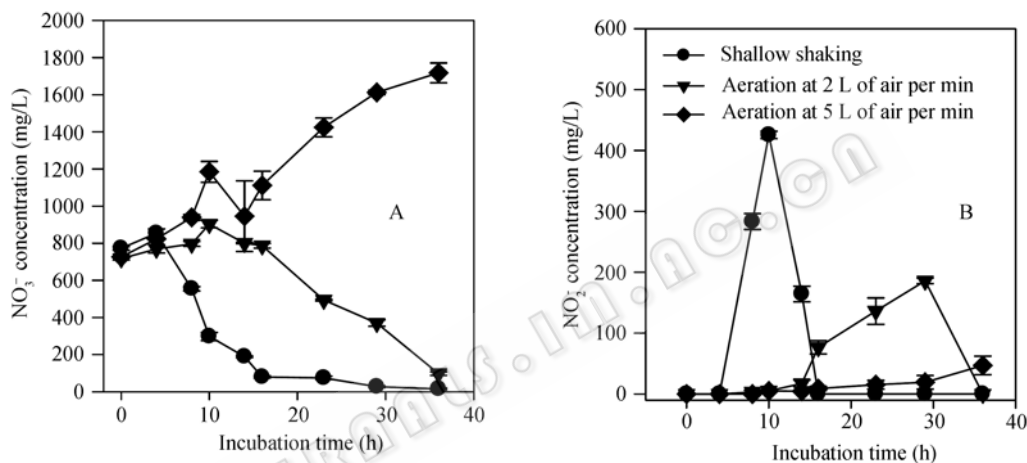


图4 不同通气条件下H1反硝化过程中NO₃⁻ (A)和NO₂⁻ (B)的浓度变化(在150 mL的培养液)

Fig. 4 Changes of NO₃⁻ (A) and NO₂⁻ (B) as strain H1 was incubated under continuous aeration 150 mL medium.

连续通气 2 L/min 稍推迟下降; 连续通气 5 L/min NO₃⁻不但下降还有不少上升。从图 4B 可以看出, 浅层振荡培养和连续通气 2 L/min 两个处理都有临时性 NO₂⁻ 积累, 但是连续通气 5 L/min 则仅仅在后期有少量 NO₂⁻ 积累。NO₃⁻ 下降和临时性 NO₂⁻ 积累表明 H1 菌株可以在该条件下反硝化。连续通气 5 L/min NO₃⁻ 含量上升, 推测 H1 菌株同时兼有硝化功能。虽然本研究尚无直接证据, 但是既能硝化也能反硝化的菌株并不少见^[6]。

2.5 16S rDNA 序列分析

16S rDNA 序列分析表明, H1 与 *Ralstonia taiwanensis* 有 98% 的相似。 *Ralstonia* 是一个重新命名的属, 过去属名为 *Alcaligenes* 的菌株都被归并于其中^[7]。 *Alcaligenes* 中不少种如 *A. eutrophus*、*A. faecalis* 等都是典型的反硝化细菌^[8], 但是未见到

关于 *Ralstonia taiwanensis* 反硝化功能的报道。 *R. taiwanensis* 是一株含羞草根瘤菌^[9], 具备降解苯酚和三氯乙烯能力^[10]。根瘤菌中有不少能够反硝化的菌株^[6], 反硝化菌株中有不少可以降解酚类化合物^[11]。本研究没有进一步鉴定 H1 菌株, 但是上述信息能反映 H1 菌株与其他菌株已知特点的关联性。

3 讨论

nnrS-gfp 克隆是一个检测和筛选 NO 产生菌有效工具, 适宜于大量样品筛选, 批量越大效率越高。可靠程度极高, 从 2002 年构建成功以后一直在本实验室使用, 筛选或检测过很多包括细菌和放线菌在内的菌株, 无一例误判。其最大特点是低成本地直接检测 NO 存在与否。常用的 NO 检测需要一台 NO 分析仪, 同时需要用标准 NO 气体校验, 而标准 NO

气体非常昂贵。本方法的缺点是不能定量测定 NO 浓度,但是可以根据荧光亮度估计其大致范围。本文中使用了 *nnrS-gfp* 克隆,成功地确定了 H1 菌株的反硝化能力,同时确定了反硝化历程。

在平板表面能形成蓝色菌落约有 50 个菌株,其中只有 3 株通过浅层振荡培养复筛,其余不能在浅层振荡培养条件下还原硝酸盐。通过复筛的 3 株菌都能在连续通气条件下还原硝酸盐,菌株 H1 表现最好。筛选成功比例只有 6%。因此认为所采用的筛选程序可靠性很好,但是效率较低,依然很费时间。文献中尚未见到效率更高的筛选方法。

在本研究中,我们还进行了一项试验,试图进一步验证菌株 H1 的严格好气反硝化功能。将菌株 H1 在浅层振荡培养的反硝化条件下培养至对数生长期结束,离心收集细胞,重新悬浮于新鲜培养基中,形成不同细胞浓度的悬浮液,高速 vortex(充分与空气平衡)。结果表明,任何细胞浓度的悬浮液都不能还原硝酸根。通过复筛的 3 株菌表现相同。这一结果结合图 4 表明, H1 并不是严格的“好气反硝化细菌”。这种方法可以最大限度地使得细胞与 O₂ 接触,能够实现的好氧程度高于连续通气培养。文献中有不少关于“好气反硝化细菌”的报道和说法,但是作者没有见到用这种方法加以进一步验证的报道。事实上,已知的反硝化细菌都是微好氧的,尚未见到严格厌氧的反硝化细菌^[1]。举几个例子:低浓度 O₂ 对于 *Agrobacterium tumefaciens* C58 的 *nirK* 和 *nor* 表达是必须的,严格无氧条件反而不能表达^[12];从厌氧转变成好氧状态, *Paracoccus denitrificans* 中 *narH*、*nirS*、*nosZ* 的 mRNA 都能长时间维持在较高水平^[13]。 *Rhodobacter capsulatus*^[14] 和 *Rhodospirillaceae* 中的若干种^[15] 都有类似表现。一般而言, O₂ 浓度超过某一浓度,反硝化细菌会优先选择好氧呼吸;低于某一浓度进行厌氧呼吸;这种“临界 O₂ 浓度”因菌株而异。因此,从微生物学角度来看,用“高耐氧反硝化”来描述菌株 H1 比用“好气反硝化”可能更加合适些。当然,生态学角度的“好气反硝化”另当别论。

菌株 H1 虽然能够在高氧分压条件下进行反硝化,但是从反硝化终产物来看,似乎不能用于污水处理。因为 N₂O 是一种强力温室气体,将一种污染物变成另外一种污染物不是可取的。有必要继续分离终产物为 N₂ 的、同时又能在高氧分压条件下进行反硝化的菌株。菌株 H1 对于研究 O₂ 对反硝化基因表达的调节作用似乎是个较好的材料,有关工作正在进行。

参 考 文 献

- [1] Tiedje, JM. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In Zehnder A J B (ed), *Biology of Anaerobic Microorganisms*. New York: John Wiley & Sons, 1988, pp. 179–244.
- [2] Takaya N, Catalan-Sakairi MA, Sakaguchi Y, *et al.* Aerobic denitrifying bacteria that produce low levels of nitrous oxide. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**: 3152–3157.
- [3] Yin S, Fuangthong M, Laratta WP, *et al.* Use of a green fluorescent protein-based reporter fusion for detection of nitric oxide produced by denitrifiers. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**: 3938–3944.
- [4] Tosques IE, Kwiatkowski AV, Shi J, *et al.* Characterization and regulation of the gene encoding nitrite reductase in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3. *J Bacteriol*, 1997, **179**: 1090–1095.
- [5] Mei LJ, Yang LZ, Wang DJ, *et al.* Nitrous oxide production and consumption in serially diluted soil suspensions as related to in situ N₂O emission in submerged soils. *Soil Biol Biochem*, 2004, **36**: 1057–1066.
- [6] Zumft WG. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1997, **61**: 533–616.
- [7] Coenye T, Falsen E, Vancanneyt M, *et al.* Classification of *Alcaligenes faecalis*-like isolates from the environment and human clinical samples as *Ralstonia gilardii* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 1999, **49** Pt 2: 405–413.
- [8] Zumft WG. Denitrifying prokaryotes. In: Balows A, Trüper H G, Dworkin M, *et al.* (eds), *The Prokaryotes*, 2nd ed, Vol 1, New York, Springer-Verlag, 1992, pp. 554–582.
- [9] Chen W M, Laevens S, Lee TM, *et al.* *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, **51**: 1729–1735.
- [10] Chen WM, Chang JS, Wu CH, *et al.* Characterization of phenol and trichloroethene degradation by the rhizobium *Ralstonia taiwanensis*. *Res Microbiol*, 2004, **155**: 672–680.
- [11] Song B, Palleroni NJ, Häggblom MM. Isolation and characterization of diverse halobenzoate-degrading denitrifying bacteria from soils and sediments. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**: 3446–3453.
- [12] Baek S-H, Shapleigh JP. Expression of nitrite and nitric oxide reductases in free-living and plant-associated *Agrobacterium tumefaciens* C58 cells. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**: 4427–4436.
- [13] Baumann B, Snozzi M, Zehnder AJ, *et al.* Dynamics of denitrification activity of *Paracoccus denitrificans* in continuous culture during aerobic-anaerobic changes. *J Bacteriol*, 1996, **178**: 4367–4374.
- [14] Ellington MJK, Richardson DJ, Ferguson SJ. *Rhodobacter capsulatus* gains a competitive advantage from respiratory nitrate reduction during light-dark transitions. *Microbiol*, 2003, **149**: 941–948.
- [15] Ferguson SJ, Jackson JB, McEwan AG. Anaerobic respiration in the *Rhodospirillaceae*: characterisation of pathways and evaluation of roles in redox balancing during photosynthesis. *FEMS Microbiol Rev*, 1987, **46**: 117–143.