

一株异养硝化细菌的分离及系统发育分析*

张光亚^{1,2} 陈美慈^{2**} 韩如旻² 闵 航²

(¹ 中国科学院南京土壤研究所土壤圈物质循环开放研究实验室 南京 210008)

(² 浙江大学生命科学院生物科学系 杭州 310029)

摘 要: 从大棚土壤中分离到一株异养型硝化细菌, 命名为菌株 HN, 分离菌株为革兰氏染色阳性, 球状或杆状。菌落颜色为橙红色。该菌株能以乙酰胺为唯一碳源和氮源进行氨化作用和硝化作用并产生亚硝酸。以硝酸钠为氮源时能进行反硝化作用。部分长度的 16S rDNA 序列分析表明, 分离菌株 HN 与 *Rhodococcus ruber* 具有 99% 相似性。并用 PHYLIPS 程序将该菌株与报道的相关硝化细菌进行系统发育进化分析。本文首次报道 *Rhodococcus* sp. HN 为异养型亚硝化细菌。

关键词: 异养硝化细菌, 16S rDNA 序列, 系统发育

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2003) 02-0156-06

氧化亚氮是重要的温室效应气体, 它对温室效应的贡献仅次于 CH_4 和 CO_2 , 居第三位。一般认为, 硝化作用和反硝化作用是生物产生氧化亚氮的主要途径, 而自养型硝化细菌在硝化作用的过程中占据主要地位。但近年来, 有关异养型硝化细菌的报道较多, 与自养型硝化细菌相比, 异养型硝化细菌在自然界的分布更为广泛, 包括真菌、放线菌和细菌, 甚至一些藻类^[1,2], 其中一些能在异养型硝化过程中产生氧化亚氮。本文经富集和分离, 获得一株能进行异养型硝化反应的细菌, 命名为菌株 HN。并根据其生理生化性状和部分长度的 16S rDNA 序列确定了分离菌株的分类学和系统发育地位。

1 材料和方法

1.1 异养型硝化细菌的分离

1.1.1 培养基组成: 乙酰胺 2g, NaOH 1.6g, KH_2PO_4 8.2g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, KCl 0.5g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5mg, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5mg, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.5mg, 用蒸馏水定容至 1L, pH7.0。

1.1.2 富集分离: 取杭州市蔬菜研究所大棚土样 1g (随机多点取样后混匀) 于 25mL 上述培养基中, 经多次富集, 在平板上划线分离, 分别挑取单菌落于液体培养基中, 检测液体中亚硝酸含量, 选取产亚硝酸较强的一株分离物进一步作下述试验。

* 浙江省自然科学基金(399214)和中国科学院南京土壤研究所土壤圈物质循环开放研究实验室基金资助项目

** 通讯作者。E-mail: hzmagr@163.com

作者简介: 张光亚(1975-), 男, 湖北黄冈人, 浙江大学硕士生, 研究方向为环境微生物学与微生物分子生态学。

E-mail: zhgyzju@eyou.com

收稿日期: 2002-07-01, 修回日期: 2002-11-15

1.2 碳源和氮源试验

碳源试验时,培养基氮源改为硫酸铵(0.2%),碳源分别为浓度0.2%的乙酸钠、甲酸钠、苹果酸、葡萄糖、衣康酸、乙酰胺、酵母膏和蛋白胨。氮源试验时,碳源改为乙酸钠,所用氮源分别为浓度0.2%的乙酰胺、硫酸铵、硝酸钠、亚硝酸钠、尿素和氨基乙酸。接种(接种量1%,下同)培养60h后,测定菌体数量和亚硝酸量。重复3次。

1.3 氨化和硝化作用试验

菌株活化后接种于液体培养基中,以乙酰胺为碳源和氮源检测了该分离物的生长量和硝化作用强度。重复3次。

1.4 分离菌株反硝化活性

硝酸钠(浓度为0.2%)为唯一的氮源,培养基煮沸5min后取20mL放入120mL的血清瓶中,菌株活化后接种于该培养基中,隔数小时测定菌体生长量和亚硝酸量。重复3次。

1.5 异养型亚硝化细菌的形态及系统发育分析

1.5.1 显微摄影 用带拍摄装置的 Olympus BH-2 型光学显微镜相差拍摄。菌落中的菌体用接种针挑取后涂抹在载玻片上,滴加1/4滴蒸馏水,加盖盖玻片,进行显微摄影。

1.5.2 16S rDNA 的 PCR 扩增和测序 从平板中直接挑取一环菌体,加入至100 μ L重蒸水中,旋涡混匀后,沸水浴7min,12 000r/min离心5min,上清液直接用于PCR扩增模板。用于16S rDNA PCR反应的引物为一对通用引物(<http://silk.uic.ac.be/primer/database.html>),正向引物BSF8/20 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';反向引物BSR1541/20 5'-AAGGAGGT-GATCCAGCCGCA-3'。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。PCR反应体系(50 μ L)为:10 \times PCR缓冲液5 μ L,MgCl₂(25mmol/L)4 μ L,dNTP 2 μ L,引物BSF8/20和引物BSR1541/20各1 μ L,模板DNA 1 μ L,Taq酶(10 000U/mL)0.5 μ L,重蒸水35.5 μ L。PCR程序如下:1. 94 $^{\circ}$ C 2min;2. 94 $^{\circ}$ C 1min,56 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 2min;3. 第2步循环29次;4. 72 $^{\circ}$ C 10min;5. 60 $^{\circ}$ C 10min。PCR产物用QIAGene公司的DNA纯化试剂盒纯化。测序由上海申友生物技术有限责任公司完成,测序用引物为引物BSF8/20。

1.5.3 系统发育分析 获得菌株部分长度16S rDNA(约602 bp)序列,将该序列通过Blast程序^[3]与GenBank中核酸数据进行对比分析(<http://ncbi.nlm.nih.gov/blast>),利用RDP II数据库Phylip Interface构建系统发育树(<http://rdp.cme.msu.edu/html/analyses.html>)。用于系统发育树构建的分离菌株和相关参比菌株的细菌名称、菌株编号和序列登录号见表1。

2 结果和讨论

2.1 菌株 HN 的形态特征

经富集和分离,获得一株异养型硝化细菌——菌株HN,菌落颜色为橙红色,菌体形态呈球状或杆状(图1),革兰氏染色阳性。

2.2 不同碳源对分离菌株生长和产亚硝酸的影响

菌株HN在以硫酸铵(0.2%)为氮源,碳源分别为浓度0.2%的甲酸钠、乙酸钠、苹果酸、葡萄糖、衣康酸、乙酰胺、琥珀酸、酵母膏和蛋白胨的培养基中生长,其生长和产亚硝酸能力各异(表2)。在酵母膏中生长量最大,在乙酰胺中产亚硝酸的量最高,而对甲酸钠和衣康酸则不能利用。

表 1 用于系统发育树构建的分离菌株和相关参比菌株的细菌名称、菌株编号和序列登录号

Table 1 Names of isolates and related strains and accession numbers

Names of bacteria	Numbers of strains	Accession numbers
<i>Alcaligenes defragrans</i>	54Pin DSM 12141 ^T	AJ005447
<i>Alcaligenes faecalis</i>	B3/I	U71008
<i>Arthrobacter globiformis</i>	168 DSM 20124 ^T	X80736
<i>Arthrobacter ramosus</i>	I Gm 25 DSM 20546 ^T	X80742
<i>Bacillus coagulans</i>	IAM 12463 ^T	D16267
<i>Nitrobacter hamburgensis</i>	Nb14 or X14 ^T	L35502
<i>Nitrobacter winogradskyi</i>	ATCC 14123	L35507
<i>Nitrosomonas europaea</i>	M103	AF037106
<i>Nitrosomonas ureae</i>	Nm10	Z46993
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NIH 18 ATCC 25330	M34133
<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC 11172	D85992
<i>Rhodococcus fascians</i>	ATCC 35014	X81932
<i>Rhodococcus</i> sp.	HN	AJ459106
<i>Rhodococcus ruber</i>	DSM 43338 ^T	X80625

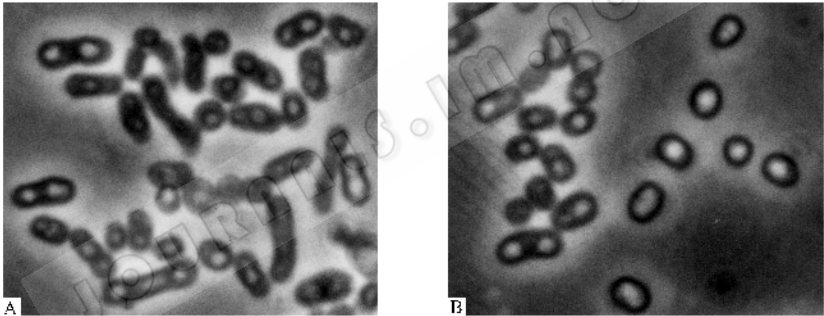


图 1 菌株 HN 的相差照片(1200 ×)

Fig.1 Phase-contrast photomicrographs of strain HN(1200 ×)

表 2 菌株 HN 在不同碳源和氮源上的生长和产亚硝酸能力

Table 2 Nitrite productivity and growth of strain HN on different carbon and nitrogen sources

Carbon sources	<i>OD</i> ₆₀₀	NO ₂ ⁻ (mmol/L)	Nitrogen sources	<i>OD</i> ₆₀₀	NO ₂ ⁻ (mmol/L)
Sodium formate	0	0	Acetamide	0.075	19.012
Sodium acetate	0.06	17.314	Ammonium sulfate	0.058	11.543
Malic acid	0.046	15.665	Sodium nitrate	0.050	47.82
Glucose	0.032	10.718	Sodium nitrite	0	0
Itaconic acid	0	0	Urea	0.060	18.963
Acetamide	0.066	18.963	Amino acetic acid	0.060	54.414
Amber acid	0.030	14.016			
Yeast extract	0.089	13.192			
Peptone	0.058	14.841			

2.3 不同氮源对菌株 HN 生长和产亚硝酸的影响

菌株 HN 在乙酸铵(浓度为 0.2%)为碳源,氮源分别为浓度 0.2%的乙酰胺、硫酸铵、

硝酸钠、亚硝酸钠、尿素和氨基乙酸的培养基中的生长和产亚硝酸各异(表 2)。在乙酰胺中的菌体生长最好,而在氨基乙酸中产亚硝酸的量最大,对亚硝酸则不能利用。

2.4 菌株 HN 的氨化作用和硝化作用

在以乙酰胺为唯一碳源和氮源的培养基上生长时,培养液中 NH_4^+ 和 NO_2^- 浓度变化如图 2 示。菌体在培养 24h 后进入对数生长期,在 48h 内达到最大生长量,随后进入衰亡期,在此过程中, NH_4^+ 浓度变化与菌体生长曲线基本一致,在对数生长期其氨化作用最强,而图中亚硝酸浓度变化情况则与菌体生长情况不一致,亚硝酸浓度的对数增加出现在菌体衰亡期,这表明硝化作用可能是在老龄细胞中发生的。这与 Verstraete^[4]等报道基本一致。

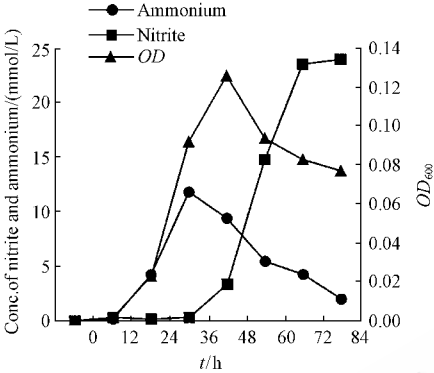


图 2 菌株 HN 的氨化和硝化作用
Fig.2 Ammonification and nitrification of strain HN

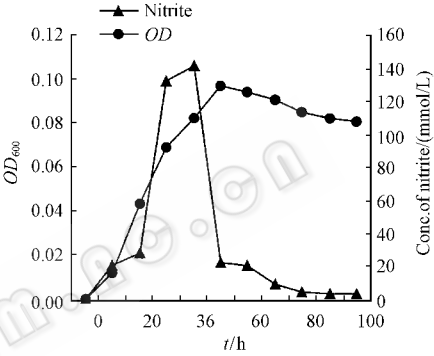


图 3 菌株 HN 的反硝化作用
Fig.3 Denitrification of strain HN

2.5 菌株 HN 的反硝化作用

菌株在以硝酸根为氮源的培养基上生长时,菌体生长曲线及溶液中亚硝酸浓度的变化曲线如图 3 示,由图可知,菌体的反硝化主要是在菌体的对数生长期发生的,而在菌体进入衰亡期后,溶液中的亚硝酸的浓度一直处于很低的水平。Lesley 等^[5]认为通过测定异养硝化细菌积累亚硝酸的量来确定该菌体的硝化强度,得出的资料往往很小,主要由于一些异养硝化细菌能同时进行反硝化作用,硝化作用与反硝化作用处于一种平衡状态,使得亚硝酸不能在溶液中积累。本文的结果与之相符,故而需要重新评估异养型硝化细菌的生态学作用。

2.6 Rhodococcus sp. 菌株 HN 的系统发育分析

测序后,得到长度为 602 bp 菌株的 16S rDNA 的序列。将获得的菌株与某些异养型硝化细菌以及一些自养型硝化细菌进行系统发育分析,得到系统进化发育树的结构如图 4。

已被正式描述的硝化细菌(包括自养和异养型)分为 3 类:一类属于 *Alcaligenes* 属,包括 *Alcaligenes defragrans*^[6]、*Alcaligenes gaecalis*^[7];一类属于 *Nitrosomonas* 属,包括 *Nitrosomonas europaea*^[8]、*Nitrosomonas ureae*^[9],第三类是属于 *Rhodococcus* 属、*Arthrobacter* 属、*Bacillus* 属、*Nitrobacter* 属和 *Pseudomonas* 属,包括 *Rhodococcus ruber*^[10]、*Rhodococcus fascians*^[11]、*Arthrobacter globiformis*^[12]、*Arthrobacter ramosus*^[12]、*Bacillus coagulans*^[13]、*Nitrobacter winograd-*

skyi^[14]、*Nitrobacter hamburgensis*^[14]、*Pseudomonas putida*^[15]、*Pseudomonas aeruginosa*^[16]。

序列对比的结果表明,分离菌株与 *Rhodococcus ruber* 16S rRNA 的相似性水平达 99%,结合菌株的形态学和生理学特性,可基本确定分离的菌株为 *Rhodococcus* sp.。命名为 *Rhodococcus* sp. strain HN。

近年来,有关土壤中异养型硝化微生物的报道较多,目前已报道的异养型硝化微生物有:*Thiosphaera pantotropha*^[5],*Alcaligenes gaecalis*^[17],*Pseudomonas putida*^[18],*Arthrobacter* sp.^[19]以及嗜热的 *Bacillus* sp.^[20]。本文报道的 *Rhodococcus* sp. 菌株 HN 为首次报道的异养型亚硝化微生物。目前的研究结果表明,分离到的这些微生物产生氧化亚氮的能力远远小于自养型硝化细菌。但是在一些特定环境中,如石楠林(heath forest)、松林(conifer forest)^[21]和内蒙古典型草原^[22],异养型硝化微生物可能占主导地位。本文报道的菌株分离自蔬菜所大棚土壤中,在所研究的大棚土壤中尚缺乏直接证据表明异养型硝化细菌在氧化亚氮释放中的贡献,需要更深入的研究。

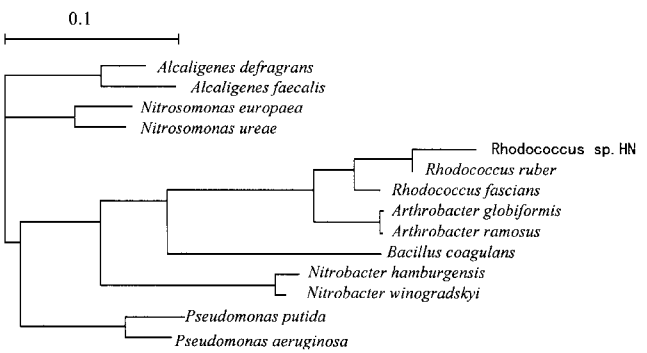


图 4 基于 16S rDNA 序列同源性的菌株 HN 和其它 13 个相关细菌的系统发育树

Fig.4 Unrooted phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence of strain HN and sequences of validly described bacteria associated.

Scale bar indicates evolutionary distance

参 考 文 献

[1] Focht D D , Verstraete W . Biochemical ecology of nitrification and denitrification . In : Alexander M ed . Advances in microbi- al ecology . Vol 1 , New York : Plenum Press , 1977 , 135 ~ 214 .

[2] Killham K . Heterotrophic nitrification . In : Prosser J J , Nitrification . Oxford : IRL Press , 1986 , 117 ~ 126 .

[3] Altschul S F , Thomas L M , Alejandro A S , et al . Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database searchprograms . Nucleic Acids Res ,1997 , 25 3389 ~ 3402 .

[4] Verstraete W , Alexander M . Hererotrophic nitrification by *Arthrobacter* sp . J Bacteriol , 1972 , 110 955 ~ 961 .

[5] Lesley A R , Van Niel E W J , Torremans R A M , et al . Simultaneous nitrification and denitrifartion in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotropha* . Appl Environ Microbiol , 1988 , 54 2812 ~ 2818 .

[6] Foss S , Heyen U , Harder J . *Alcaligenes defragrans* sp nov . , description of four strains isolated on alkenoic monoterpenes ((+)-menthene , alpha-pinene , 2-carene , and alpha-phellandrene) and nitrate . Syst Appl Microbiol , 1998 , 21 237 ~ 244 .

[7] Dicello F , Pepi M , Baldi F , et al . Molecular characterization of an n-alkane degrading bacterial community and identification of a new species , *Acinetobacter venetianus* . Res Microbiol , 1997 , 148 , 237 ~ 249 .

[8] Juretschko S , Timmermann G , Schmid M , et al . Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diver- sity in activated sludge : *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations . Appl Environ Microbiol , 1998 , 64 3042 ~ 3051 .

[9] Pommerening-Roeser A , Rath G , Koops H . Syst Phylogenetic diversity within the genus *Nitrosomonas* . Appl Microbiol , 1996 , 19 : 344 ~ 351 .

[10] Rainey F A , Burghardt J , Kroppenstedt R , et al . Polyphasic evidence for the transfer of *Rhodococcus roseus* to *Rhodococcus rhodochrous* . Int J Syst Bacteriol , 1995 , 45 :101 ~ 103 .

[11] Ruimy R , Riegel P , Boiron P , et al . Phylogeny of the genus *Corynebacterium* deduced from analyses of small-subunit riboso- mal DNA sequences . Int J Syst Bacteriol , 1995 , 45 : 740 ~ 746 .

- [12] Koch C , Rainey F A , Stackebrandt E . 16S rDNA studies on members of *Arthrobacter* and *Micrococcus* : an aid for their future taxonomic restructuring. *FEMS Microbiol Lett* , 1994 , **123** : 167 ~ 172 .
- [13] Suzuki T , Yamasato K . Phylogeny of spore-forming lactic acid bacteria based on 16S rRNA gene sequences. *FEMS Microbiol Lett* , 1994 , **115** : 13 ~ 18 .
- [14] Teske A , Alm E , Regan J M , *et al* . Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. *J Bacteriol* , 1994 , **176** : 6623 ~ 6630 .
- [15] Yamamoto S , Harayama S . Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB* , *rpoD* and 16S rRNA genes. *Int J Syst Bacteriol* , 1998 , **48** : 813 ~ 819 .
- [16] Adkins J P , Madigan M T , Mandelco L , *et al* . *Arhodomonas aquaeolei* gen. nov. , sp. nov. , an aerobic , halophilic bacterium isolated from a subterranean brine. *Int J Syst Bacteriol* , 1993 , **43** : 514 ~ 520 .
- [17] Anderson I C , Poth M , Homstead J , *et al* . A comparison of NO and N₂O production by the autotrophic *Nitrosomonas europaea* and the heterotrophic nitrifier *Alcaligenes faecalis* . *Appl Environ Microbiol* , 1993 , **59** : 3525 ~ 3533 .
- [18] Daum M , Zimmer W , Papen H , *et al* . Physiological and molecular biological characterization of ammonia oxidation of the heterotrophic nitrifier *Pseudomonas putida* . *Curr Microbiol* , 1998 , **37** : 281 ~ 288 .
- [19] Verstraete W , Alexander M . Mechanism of nitrification by *Arthrobacter* sp. *J Bacteriol* , 1972 , **110** : 962 ~ 967 .
- [20] Mevel G , Prieur D . Heterotrophic nitrification by a thermophilic *Bacillus* species as influenced by different culture conditions. *Can J Microbiol* , 2000 , **46** : 465 ~ 473 .
- [21] Papen H , Von Berg R , Hinkel I , *et al* . Heterotrophic nitrification by *Alcaligenes faecalis* : NO₂⁻ , NO₃⁻ , and NO production in exponentially growing cultures. *Appl Environ Microbiol* , 1989 , **55** : 2068 ~ 2072 .
- [22] 杜 睿 , 王庚辰 , 吕达仁 . 内蒙古典型早元土壤氧化亚氮产生机理探讨 . 中国环境科学 , 2000 , **20** (5) : 387 ~ 391 .

Isolation , Identification and Phylogenetic Analysis of a Heterotrophic Nitrifier

Zhang Guangya^{1,2} Chen Meici^{2*} Han Ruyang² Min Hang²

(¹ Laboratory of Material Cycling in Pedosphere , Institute of Soil Science , Chinese Academy of Sciences , Nanjing 210008 , China)

(² College of Life Science , Zhejiang University , Hangzhou 310029 , China)

Abstract : A heterotrophic nitrifier , named strain HN , was isolated from the greenhouse soil . The cells of isolates were Gram positive , rod or coccus . The colonies of the strain were orange-red . Strain HN could ammonize organic nitrogen compounds and nitrify ammonia itself when it grew on acetamide accompanying the formation of ammonia and nitrite . It also could denitrify nitrate accompanying the formation of nitrite . The phylogenetic analysis based on 16S rRNA suggested strain HN was the closest relative of *Rhodococcus ruber* with 99% sequence identity . The phylogenetic analysis of strain HN was performed by PHYLIPS and the phylogenetic tree of strain HN and the neighbouring nitrifiers was given . This paper first reported *Rhodococcus* sp. strain HN is a heterotrophic nitrifier .

Key words : Heterotrophic nitrifier , 16S rDNA sequence , Phylogenetic nitrifier

* Corresponding author . E-mail : hzmagr@163.com