

# 一株氨氧化链霉菌的分类鉴定及其氨氧化特性的研究

胡宝兰 郑 平\* 武小鹰 尹 亮

(浙江大学环境工程系 杭州 310029)

**摘 要** :从硝化反应器中分离获得一株链霉菌。根据其形态特征、培养特征、生理生化特性 (G+C)mol% 含量以及 16S rDNA 序列和 DNA 杂交结果,将其归入链霉菌属中的比基尼链霉菌 (*Streptomyces bikiniensis*)。该菌株既能在 YD 培养基上异养生长,也能在无机培养基上自养生长。异养生长速率 ( $V_{\max}$  为 0.39mg/L·d)明显高于自养生长速率 ( $V_{\max}$  为 0.22mg/L·d)。异养生长时,氨氮主要用于合成细胞物质;自养生长时,部分氨氮用于合成细胞物质,部分氨氮转化成亚硝酸盐。在无机培养基上自养生长时,最适氨浓度为 118mgN/L。最适生长 pH 值为 9.36,最适氨氧化 pH 值为 9.29。最适生长温度为 31℃,最适氨氧化温度为 40.6℃。提高溶解氧浓度有利于该菌株生长和氨氧化,菌体生长对溶解氧浓度的敏感性高于氨氧化。

**关键词** :比基尼链霉菌 鉴定 生长 氨氧化代谢

中图分类号 :Q939 文献标识码 :A 文章编号 :1001-6209 (2005) 03-0321-04

为了研发新型生物脱氮技术,作者启动运行了硝化反应器。为了探明其中优势菌群与硝化效能的关系。作者测定分析了氨氧化菌的数量与活性。从硝化反应器中分离氨氧化菌时,意外地获得了一株具有好氧氨氧化活性的链霉菌(编号 A2 菌株)。迄今为止,文献报道的氨氧化菌大多是化能自养型细菌(亚硝化细菌)<sup>[1~3]</sup>,少数是异养型细菌<sup>[4,5]</sup>,放线菌报道甚少。鉴于此,对该菌株进行了鉴定,并对其生长特性和氨氧化特性进行了研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和培养基** :放线菌 A2 菌株,从硝化反应器中分离获得。异养生长研究采用 YD 培养基<sup>[6]</sup>,自养生长研究采用基本无机盐培养基<sup>[6]</sup>。

**1.1.2 主要试剂和仪器** :DNA 抽提试剂盒、PCR 试剂盒、DNA Marker、琼脂糖等均购自 Sangon 公司。(G+C)mol% 的测定采用岛津 UV-2401PC 紫外分光光度计,菌株形态观察采用德国 Leica 研究显微镜 (DMLB+QCOLite)和 KYKY-100B 扫描电镜;

### 1.2 菌株的鉴定

**1.2.1 形态特征** :在 28℃ 下,采用玻璃纸透析培养法,以高氏 1 号琼脂培养基培养 7d<sup>[7]</sup>,用研究显微镜及扫描电镜观察供试菌株的菌体形态。

**1.2.2 培养特征** :在 28℃,以 8 种常用的链霉菌培

养基(表 1)培养 7~15d,观察菌丝体的表现特征。

**1.2.3 生理生化特征** :参照文献[6],测定 A2 菌株的生理生化特征。

**1.2.4 细胞壁类型分析** :参考 Hasegawa<sup>[8]</sup>和王平改进的快速薄层层析法(Thinlayerchromatography, TLC)<sup>[9]</sup>进行全细胞氨基酸及全细胞水解液糖型的分析。

**1.2.5 (G+C)mol% 的测定** :采用热变性法<sup>[10]</sup>。

**1.2.6 16S rDNA 序列测定**<sup>[10]</sup> :以微波法快速提取供试菌株基因组 DNA<sup>[11]</sup>,采用通用 27F/1495r 引物(正向引物 Pf :5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';反向引物 Pf :5'-ACGGCTACCTTGTACGACT-3')进行 16S rDNA 的 PCR 扩增。PCR 反应体系(100μL) :DNA 模板(1.0μmol/L)5μL, dNTP 混合物(终浓度 100μmol)2μL, Taq DNA 聚合酶 2.5U,正、反向引物 Pf (50pmol)各 2μL,缓冲液 10μL,水 78μL。PCR 反应条件 :94℃ 1min ;52℃ 1min ,72℃ 3min ,30 个循环。PCR 产物经纯化后测序。

**1.2.7 DNA-DNA 杂交** :参照 Ezaki 等<sup>[12]</sup>的方法进行 DNA 杂交,由中国科学院微生物研究所完成。

### 1.3 供试菌株的生长特性和氨氧化特性

**1.3.1 供试菌株的异养生长和自养生长** :异养生长研究采用 YD 培养基,自养生长研究采用基本无机盐培养基。在 250mL 三角瓶中装入 100mL 培养液,  $\text{NH}_4^+$ -N 浓度依次设定为 0、4、8、12、16、20mmol/L,添加磷酸盐缓冲液,使初始 pH 值调控至 8.0,在 30℃

基金项目 :国家自然科学基金(30070017)

\* 通讯作者。Tel 86-571-86971709 ;E-mail :pzheng@zju.edu.cn

作者简介 :胡宝兰(1972-)女,浙江东阳人,讲师,在职博士生,主要从事环境微生物学的教学和研究工作。E-mail :blhu@zju.edu.cn

收稿日期 :2004-10-17,修回日期 :2005-03-07

下以 120r/min 振荡培养 ,通过测定培养液中  $\text{NH}_4^+ -\text{N}$  浓度和蛋白浓度的变化来判断菌体的生长情况。

**1.3.2 供试菌株的最适生长 pH 值和最适代谢 pH :** 最适生长 pH 试验采用 YD 培养液 ,最适代谢 pH 试验采用基本无机盐培养基。在 250mL 三角瓶中装入 100mL 培养液 , $\text{NH}_4^+ -\text{N}$  浓度设定为 8mmol/L ,添加磷酸盐缓冲液 ,初始 pH 值依次调控至为 5、6、7、8、9、10 ,在 30℃下以 120r/min 摇床振荡培养 ,通过测定培养液中  $\text{NH}_4^+ -\text{N}$  浓度和蛋白浓度的变化来判断菌体的生长和代谢情况。

**1.3.3 供试菌株的最适生长温度和最适代谢温度 :** 试验设计同 1.3.2 ,温度依次设定为 20℃、30℃、37℃、50℃。

**1.3.4 供试菌株的最适生长需氧量和最适代谢需氧量 :** 试验设计同 1.3.2 ,在 500mL 三角瓶中分别装液 50mL、100mL、150mL、200mL、250mL、350mL。

1.4 测定方法

**1.4.1  $\text{NH}_4^+ -\text{N}$  的测定 :**采用水杨酸-次氯酸盐光度法<sup>[14]</sup>测定。

**1.4.2  $\text{NO}_2^- -\text{N}$  的测定 :**采用 N-(1-萘基)-乙二胺光度法<sup>[14]</sup>测定。

**1.4.3 菌体蛋白浓度的测定 :**采用双缩脲法<sup>[15]</sup>。

2 结果和讨论

2.1 A2 菌株的分类鉴定

**2.1.1 形态特征 :**采用玻璃纸琼脂平板透析法观察 ,接种后的第 3 天可观察到基内菌丝生长 ,接种后的第 5 天可观察到基内菌丝和气生菌丝生长 ,接种后的第 7 天可观察到孢子链(图 1-A)。采用环境扫描观察 ,基内菌丝无横隔、不断裂 ,孢子丝直链状 ,孢子椭圆形 ,表面光滑(图 1-B)。

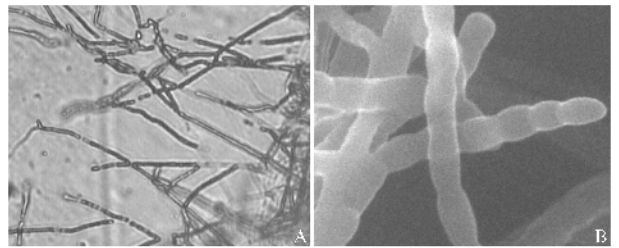


图 1 (A) A2 菌株菌丝体和孢子丝(1000×)(B) A2 菌株的孢子链和孢子表面特征(10000×)

Fig.1 (A) The morphology of mycelium and straight spore-bearing filaments of strain A2 (1000×) (B) The spore-bearing filaments and smooth spores of strain A2 (10000×)

2.1.2 培养特征和生理生化特征 :在不同培养基

中 ,A2 菌株的培养特征见表 1。A2 菌株的生理生化实验结果表明 ,菌株 A2 能够以多种物质为唯一碳源生长如葡萄糖、木糖、果糖、蔗糖 ,但不能利用阿拉伯糖、甘露醇和棉子糖。不能液化明胶 ,不产硫化氢、不形成黑色素 ,但具有牛奶凝固、牛奶胨化和淀粉消解的特性。

表 1 A2 菌株的培养特征

Table 1 The cultural characteristics of strain A2 on eight media

Media	Aerial mycelium	Substrate mycelium
Gauze No.1 agars	Offwhite	Red
Inorganic salts agars	Bright white	Lacteus
Oat agars	Offwhite	Yellow red
Glucose yeast extract agars	Offwhite	Nacarat
Czapek sucrose agars	Offwhite	Black
Glucose asparagine agars	gray	Red
Nutrition agars	Offwhite	Yellow , red , black
Casein agars	Transparency around the lawn	Wine
Emerson agars	Offwhite	Wine
Produce melanin	Offwhite	Lacteus
Spores forming	Offwhite	Black

**2.1.3 细胞壁类型 :**菌株 A2 的细胞壁化学组分为 :氨基酸 I 型 ,含 LL-DAP ,糖型 C ,无特性糖。符合链霉菌属(*Streptomyces*)的化学分类特性。

**2.1.4 (G + C)mol% 含量测定 :**测得的(G + C)mol% 为 72% ,其含量位于链霉属的 69% ~ 76% 的范围内。

**2.1.5 16S rDNA 序列 :**A2 菌株 16S rDNA 序列有 1382 个碱基 ,GenBank 注册号为 AY946043。菌株和比基尼链霉菌(*Streptomyces bikiniensis*)的相似性为 99.2% ,据此可以把它定为 *S. bikiniensis* 菌。

**2.1.6 DNA-DNA 杂交 :**为了验证 A2 菌株到底是不是 *Streptomyces bikiniensis* 菌 ,将 A2 菌株和 *S. bikiniensis*(AS 4.569)进行了杂交 ,其杂交结果显示 DNA-DNA 同源性为 87.48% ,根据 DNA 同源性的判断结果表明 A2 菌株和 *S. bikiniensis* 菌是同种。

从 A2 菌株的形态特征(孢子表面光滑 ,孢子丝直 ,孢子丝短 ,只有 10-20 个孢子 ,不产黑色素)培养特征(气丝呈灰色至褐灰色)及(G + C)mol% ,可将它归入链霉菌属灰类群中的比基尼链霉菌。经 16S rDNA 序列对比以及 DNA-DNA 同源性杂交结果验证它是 *S. bikiniensis*。

2.2 A2 菌株的生长和代谢特性

**2.2.1 A2 菌株的异养生长和自养生长 :**为了考察

A2 菌株的异养生长和自养生长特性 ,分别采用 YD 培养基和基本无机盐培养基 ,进行了添加不同浓度氨氮的培养试验。5d 的培养结果(图 2)表明 ,A2 菌株既能在 YD 培养基上异养生长 ,也能在无机培养基上自养生长。对图 2 进行非线性拟合 ,异养生长时  $V_{max} = 0.39\text{mg}(\text{L} \cdot \text{d})$  , $K_s = 36.5\text{mgN}(\text{L} \cdot \text{d})$  ;自养生长时 , $V_{max} = 0.22\text{mg}(\text{L} \cdot \text{d})$  , $K_s = 21.8\text{mgN}(\text{L} \cdot \text{d})$  ,异养生长速率明显高于自养生长 ,但异养生长时对氨氮的亲和力明显低于自养生长。

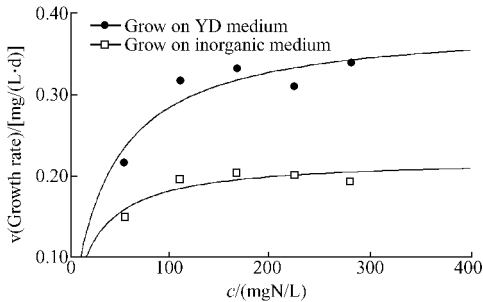


图 2 A2 菌株在 YD 培养基和无机培养基上的生长

Fig.2 Relationship between growth rate of strain A2 on YD medium and inorganic medium

虽然 A2 菌株在 YD 培养基上的生长量大于在无机培养基上的生长量 ,但它在 YD 培养基上的氨氮消耗量却明显小于在无机培养基上氨氮消耗量 ;在 YD 培养基中 ,不能测到亚硝酸盐 ,而在无机培养基中 ,则可测到大量的亚硝酸盐。由此推断 ,在 YD 培养基中 A2 菌株主要将氨氮用于合成细胞物质 ;而在无机培养基中 A2 菌株不仅将部分氨氮用于合成细胞物质 ,也将部分氨氮转化成亚硝酸盐。

若以亚硝酸盐生成速率来表征 A2 菌株的氨氧化活性 ,在无机培养基上测得的 A2 菌株的氨氧化活性(图略)可知 ,氨浓度对 A2 菌株的氨氧化速率有显著影响。当氨氮浓度由 0 升高至  $118\text{mgN/L}$  时 ,氧化速率增大并达到峰值 ;氨氮浓度超过  $118\text{mgN/L}$  后 ,氧化速率降低 ,显现基质抑制效应。

2.2.2 A2 菌株的最适生长 pH 及最适代谢 pH :起始 pH 对 A2 菌株生长速率和氨氧化速率的影响试验(图 3)发现 ,pH 对 A2 菌株生长和氨氧化的影响基本一致 ,当 pH 从 5.0 升至 9.0 时 ,A2 菌株的生长速率和氨氧化速率逐渐提高 ;但当 pH 继续升至 10.0 时 ,A2 菌株的生长速率和氨氧化速率都不断下降。对图 3 结果进行非线性拟合 ,可得 A2 菌株的最适生长 pH 为 9.36 ,最适氨氧化 pH 为 9.29 二者基本一致。

2.2.3 A2 菌株的最适生长温度和最适代谢温度 :从图 4 可以看出 ,温度对 A2 菌株的生长和氨氧化代

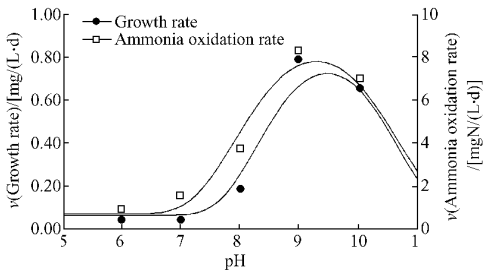


图 3 pH 对 A2 菌株生长速率和氨氧化速率的影响

Fig.3 Effect of pH value on growth rate and ammonia oxidation rate of strain A2

谢均有明显影响 ,温度对生长的影响不同于对氨氧化的影响。当温度从  $20^{\circ}\text{C}$  升到  $30^{\circ}\text{C}$  时 ,菌体的生长速率逐渐增大 ;温度继续升高后 ,菌体生长速率降低。菌体的最适氨氧化温度高于最适生长温度。对图 4 结果进行非线性拟合 ,可得菌株的最适生长温度为  $31^{\circ}\text{C}$  ,最适氨氧化温度为  $40.6^{\circ}\text{C}$ 。

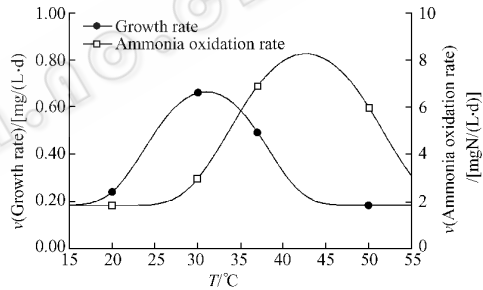


图 4 温度对 A2 菌株生长速率和氨氧化速率的影响

Fig.4 Effect of temperature on growth rate and ammonia oxidation rate of strain A2

2.2.4 A2 菌株的最适生长溶解氧浓度和最适代谢溶解氧浓度 :链霉菌为好氧菌 ,溶解氧(装液量)对 A2 菌株的生长和氨氧化有很大的影响。装液量为 50mL 时 ,A2 菌株的生长速率和氨氧化速率最大。装液量从 50mL 增加到 350mL ,A2 菌株的生长速率同比下降 92.3% ,氨氧化速率同比下降 62.1% ;其中装液量从 50mL 增加到 100mL 装液量时 ,菌株生长速率下降 52% ,但氨氧化速率只下降 16.8% ,这个结果表明 ,菌株生长对溶解氧浓度的敏感性高于氨氧化。

### 3 结论

(1)根据形态特征、培养特征、生理生化特征、(G+C)mol% 含量以及 16S rDNA 比对和 DNA-DNA 同源性杂交结果 ,将 A2 菌株归于链霉菌属的比基尼链霉菌。

(2) A2 菌株既能在 YD 培养基上异养生长,也能在无机培养基上自养生长。异养生长速率( $V_{\max}$  为  $0.39\text{mg}(\text{L}\cdot\text{d})$ )明显高于自养生长速率( $0.22\text{mg}(\text{L}\cdot\text{d})$ )。异养生长时,氨氮主要用于合成细胞物质;自养生长时,部分氨氮用于合成细胞物质,部分氨氮转化成亚硝酸盐。

(3) 测定了 A2 菌株生长和氨氧化的最适条件。在无机培养基上自养生长时,最适氨浓度为  $118\text{mgN/L}$ 。最适生长 pH 为 9.36,最适氨氧化 pH 为 9.29。最适生长温度为  $31^\circ\text{C}$ ,最适氨氧化温度为  $40.6^\circ\text{C}$ 。提高溶解氧浓度有利于 A2 菌株生长和氨氧化,菌体生长对溶解氧浓度的敏感性高于氨氧化。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Staley J T, Bryant M P, Pfennig N, *et al.* Bergey's manual of systematic bacteriology ( Vol. 3 ). Baltimore: The Williams and Wilkins Co. ,1989 ,1807 - 1835.
- [ 2 ] Purkhold U, Pommerening-Röser A, Juretschko S, *et al.* Phylogeny of All Recognized Species of Ammonia Oxidizers Based on Comparative 16S rRNA and *amoA* Sequence Analysis: Implications for Molecular Diversity Surveys. *Appl Environ Microbiol* , 2000 , **66** :5368 - 5382.
- [ 3 ] Koops H P, Möller U C. The lithotrophic ammonia-oxidizing bacteria. In: Balows A, *et al.* ed. The Prokaryotes: An Evolving Electronic Database for the Microbiological Community, New York: Springer-Verlag New York, 2001.
- [ 4 ] Robertson L A, Kuenen J G. Combined heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Thiosphaera pantotropha* and other bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* ,1990 , **57** :139 - 152.
- [ 5 ] Krummel A and Harms H. Effect of organic matter on growth and cell yield of ammonia-oxidizing bacteria. *Arch Microbiol* , 1982 , **135** :50 - 54.
- [ 6 ] 阎遵初.放线菌的分类和鉴定.北京:科学出版社,1992, 268 - 1048.
- [ 7 ] 赵 斌, 何绍江.微生物学实验.北京:科学出版社,2002, 49 - 50.
- [ 8 ] Hasegawa T, Takizawa M, Tanida S. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic Actinomycetes. *J Gen Appl Microbiol* ,1983 **29** : 319-322.
- [ 9 ] 王 平.测定放线菌菌体中氨基酸和单糖的快速方法——薄层层析法.微生物学通报,1986, **13**(5):228 - 231.
- [ 10 ] 东秀珠, 蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册.北京:科学出版社,1999 410 - 412.
- [ 11 ] 徐 平, 李文均, 徐丽华, 等.微波法快速提取放线菌基因组 DNA. 微生物学通报, 2003, **30**(4):82 - 85.
- [ 12 ] Ezaki T, Hashimoto Y, Yabuuchi E. Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int J Syst Bacteriol* ,1989 **39** :224 - 229.
- [ 13 ] Christensen H, Angen O, Mutters R, *et al.* DNA-DNA hybridization determined in micro-wells using covalent attachment of DNA. *Int j Syst Evol Bacteriol* ,2000 **50** :1095 - 1102.
- [ 14 ] 魏复盛主编.水和废水监测分析方法.第四版.北京:中国环境科学出版社,1997.
- [ 15 ] Stickland H L. The determination of small quantities of bacteria by means of the biuret reaction. *J Gen Microbio* , 1951 , **5** :698 - 703.

## Identification of ammonia oxidation Streptomyces strain A2 and study of its autotrophic ammonium oxidation characteristics

HU Bao-lan ZHENG Ping\* Wu Xiao-ying YIN Liang

( Department of Environmental Engineering , Zhejiang University , Hangzhou 310029 , China )

**Abstract** : Streptomyces strain A2 was isolated from a nitrification reactor. According to the characteristics of morphology , cultivation , physiology , ( G + C )mol% content , 16S rDNA sequence and DNA-DNA hybridization . it was identified as *Streptomyces bikiniensis* . Strain A2 could heterotrophically grow on YD medium and could also autotrophically grow on inorganic medium. The heterotrophical growth rate (  $0.39\text{mg/L}\cdot\text{d}$  ) was higher than the autotrophical growth rate (  $0.22\text{mg/L}\cdot\text{d}$  ). During heterotrophical growth ammonia was mainly assimilated. During autotrophical growth , however , one part of ammonia was assimilated and other part of ammonia was converted into nitrite. When grown on the inorganic medium , the maximum ammonium oxidation rate reached at ammonium concentration of  $118\text{mgN/L}$ . The optimal pH for growth and ammonia oxidation was 9.36 and 9.29 , respectively. The optimal temperature for growth and ammonia oxidation was  $31^\circ\text{C}$  and  $40.6^\circ\text{C}$  , respectively. A high concentration of dissolved oxygen was good for growth and ammonia oxidation , and growth was more sensitive to dissolved oxygen change than to ammonia oxidation.

**Key words** : *Streptomyces bikiniensis* , Identification , Growth , Ammonium oxidation