

养虾池好氧反硝化细菌新菌株的分离鉴定及特征

廖绍安¹, 郑桂丽³, 王安利^{1,*}, 黄洪辉², 孙儒泳¹

(1. 华南师范大学生命科学学院, 广州 510631; 2. 农业部渔业生态环境重点开放实验室, 广州 510300;
3. 广州市疾病预防控制中心, 广州 510080)

摘要: 利用间歇曝气选择性富集并对所获菌株的好氧反硝化活性进行检测, 筛选到一株亚硝酸盐去除活性较高的好氧反硝化细菌。在溶解氧(DO)为 3.80~5.21 mg/L 的培养条件下, 该菌株 10h 内将亚硝态氮由 26.18 mg/L 降至 0; 在盐度为 0~25 之间 20h 内均可达到同样的去除效果。通过形态学特征、生理生化反应及部分长度 16S rDNA 序列分析对筛选菌株进行鉴定, 初步判定它为嗜麦芽寡养单胞菌 *Stenotrophomonas maltophilia*。亚硝酸盐还原酶基因分析结果表明, 该菌株只含亚硝酸盐还原酶 *nirS* 基因, 其序列与 *Alcaligenes faecalis* A15 (后来被重新鉴定为 *Pseudomonas stutzeri*) 的 *nirS* 基因序列相似。

关键词: 好氧反硝化细菌; 嗜麦芽寡养单胞菌; 16S rDNA; 亚硝酸盐还原酶 *nirS* 基因

文章编号: 1000-0933(2006)11-3718-07 中图分类号: Q93 文献标识码: A

Isolation and characterization of a novel aerobic denitrifier from shrimp pond

LIAO Shao-An¹, ZHENG Gui-Li³, WANG An-Li^{1,*}, HUANG Hong-Hui², SUN Ru-Yong¹ (1. College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China; 2. Key Laboratory of Fishery Ecology Environment, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510300, China; 3. Guangzhou Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 510080, China). Acta Ecologica Sinica, 2006, 26(11): 3718~3724.

Abstract: Denitrifying activity of most typical denitrifiers is usually completely suppressed when anaerobiosis is insufficient, aerobic denitrifying bacteria has a major advantage in reducing nitrate and/or nitrite to N₂ under aerobic conditions, which is critical for nitrite and nitrate removal from aerobic environment, such as aquaculture water. Aims: To isolate aerobic denitrifying bacteria to enhance nitrate and nitrite removal from aquaculture system. Methods and Results: Selective enrichment culture method under alternating oxic-anoxic conditions was used for screening bacteria that have high capability of aerobic denitrification from a shrimp pond. A novel denitrifier X0412 was isolated and purified after 2 months of incubation. It, identified as *Stenotrophomonas maltophilia* (formerly referred to as *Xanthomonas maltophilia*) based on its biochemical and morphological characters, is grouped into the Y subclass of the class Proteobacteria. Phylogenetic analysis of 16S rDNA sequences indicated that strain X0412 was most closely related to *S. maltophilia* AB021406. Analysis of the both nitrite reductase genes *nirS* and *nirK* showed that it contained *nirS* gene, which is highly homologous to *nirS* of *Pseudomonas stutzeri* (formerly referred to as *Alcaligenes faecalis* A15). When bacterial concentrations as represented by OD₆₀₀ increased from 0.044 to 0.436, the bacterium reduced the concentrations of nitrite rapidly from 26.18 mgL⁻¹ to an undetectable level within 10 h, with DO titer decreasing from 5.21 mgL⁻¹ to 3.80 mgL⁻¹. Similar result was observed within 20 h at the salinity less than 25‰. Conclusions: *Stenotrophomonas maltophilia* strain X0412 reduced nitrite rapidly and efficiently at a high DO concentration and across a wide range of salinity. Significance and Impact of the

基金项目: 广东省自然科学基金重点资助项目(021098); 国家农业部渔业生态环境重点开放实验室开放基金资助项目(2003-3)

收稿日期: 2005-12-07; 修订日期: 2006-06-20

作者简介: 廖绍安(1970~), 男, 湖北麻城人, 博士, 主要从事水产养殖生态及环境微生物研究。

*通讯作者 Corresponding author. E-mail: wanganl@scnu.edu.cn

Foundation item: The project was financially supported by The Key Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 021098), The Opening Foundation of Key Laboratory of Fishery Ecology Environment, Ministry of Agriculture (No. 2003-3)

Received date: 2005-12-07; **Accepted date:** 2006-06-20

Biography: LIAO Shao-An, Ph.D., mainly engage in aquaculture ecology and environmental microbiology.

study: Strain X0412 is highly promising for future potential application in the control of nitrite and nitrate concentration of aquaculture systems.

Key words: aerobic denitrifier; *Stenotrophomonas maltophilia*; 16S rDNA; nitrite reductase nirS gene

在水产养殖过程中,水体中的氨、硝酸盐、亚硝酸盐、磷酸盐等营养元素含量过高所造成的富营养化情况频繁出现。除了会改变水质与生物平衡外,其中氨态氮和亚硝态氮等毒性较高会对水生动物造成严重影响,特别是池塘养殖条件下亚硝态氮转化速率低、毒性大,由此造成的养殖水产动物病害加重甚至死亡现象已多见报道。

在氮的生物地球化学循环中,反硝化作用是其中重要的环节。反硝化作用是硝态氮或亚硝态氮被还原成含氮气体(NO , N_2O)及氮气的过程,硝态氮在还原成亚硝态氮后也可异化还原为氨氮而非含氮气体,即产铵异化硝酸盐还原(DNRA dissimilatory nitrate reduction to ammonia)。反硝化过程与产铵异化硝酸盐还原过程的差异不仅包括环境条件不同,参与反应的微生物也不同^[1]。

具有反硝化能力的细菌就目前所知分布于 50 多个属,约有 150 余种,绝大部分属于变形细菌纲(Proteobacteria)中的 α 和 β 簇群^[2]。反硝化细菌能将硝态氮或亚硝态氮还原成含氮气体或氮气,不过并不是所有的反硝化细菌都能进行完全的反硝化过程,编码亚硝酸盐还原酶的基因才是反硝化细菌的关键功能基因,在进行反硝化的分子生态学研究中也主要以 nirS 或 nirK 基因作为分子标记^[3~7]。

传统上认为反硝化作用只有在厌氧或缺氧条件下发生,但是在水处理过程中也观察到好氧反硝化现象。尽管有人将好氧反硝化现象的发生归因于微环境中的厌氧条件,但是目前已有相当数量的好氧反硝化细菌,如 *Microvirgula aerodenitrificans*^[8~11]、*Paracoccus denitrificans*^[12, 13]、*Pseudomonas aeruginosa*^[14, 15]、*Pseudomonas stutzeri*^[13, 16, 17]、*Alcaligenes* sp.^[18, 19]被分离并进行了深入研究,证实好氧反硝化细菌确实存在。

目前已知的反硝化细菌多是从淡水环境中分离得来,能用于海水养殖中水处理且主要针对亚硝酸盐还原能力的报道极少,而业界迫切需要缓解养殖环境中亚硝酸盐积累的技术。本文从盐度 12 的淡化养殖虾池悬浮生物膜中经富集、分离和纯化,筛选到一株在淡水及海水中均适用的亚硝酸盐还原活性较强的好氧反硝化细菌,根据其形态特征、生理生化性状和部分长度 16S rDNA 序列,确定了其分类学和系统发育地位。

1 材料与方法

1.1 好氧反硝化细菌的富集和筛选

1.1.1 培养基组成 基本培养基:醋酸钠 20 mmol/L,葡萄糖 30 mmol/L, NaNO_3 10 mmol/L, K_2HPO_4 1.4 g, KH_2PO_4 2.7 g, NaCl 2.5 g, 5ml 2% MgSO_4 溶液, FeSO_4 4mmol/L, pH 7.6, 虾池水(盐度 12) 1000ml。

富集培养基按照 2 × 基本培养基组成配制, 121 °C 灭菌 30min 备用。

1.1.2 样品来源与富集及分离 用 500ml 虾池水(盐度 12)冲洗下一直被曝气的虾池悬浮化学纤维棉上的生物膜,加入 500ml 2 × 基本培养基,用气石间歇曝气。在富集培养过程中, NaNO_3 根据消耗程度补充,富集 2 个月。

向基本培养基中加入 18g/L 琼脂粉,加热溶解后 121 °C 灭菌 20min,制作分离平板培养基。富集培养物被系列稀释后涂布平板, 32 °C 培养。根据菌落特征差异挑选单菌落再次培养。

1.1.3 好氧反硝化细菌的筛选 基本培养基按照 100ml/培养瓶(250ml)分装,盖上透气硅胶塞,灭菌,冷却后接种挑选的菌株, 32 °C 下 150 r/min 振荡培养 5d,检测 NO_3^- -N 和 NO_2^- -N 浓度。根据 NO_2^- -N 积累及去除速率,筛选其中反硝化活性最强的菌株,涂布到分离培养基平板上于 32 °C 再次培养。

1.2 分离菌株的好氧反硝化活性测定

用去离子水配制盐度 12 的人工海水配制反硝化活性测定培养基。培养基成分:醋酸钠 20 mmol/L,葡萄糖 30 mmol/L, NaNO_2 2 mmol/L, NH_4Cl 20 mmol/L, K_2HPO_4 1.4 g, KH_2PO_4 2.7 g, 5ml 2% MgSO_4 溶液, FeSO_4 4mmol/L, pH 7.6, 人工海水(盐度 12) 1000ml。

用制成备用的反硝化活性测定培养液 100ml, 无菌洗下 1.1.3 中平板培养物, 混匀。取 5ml 接种到 150ml 液体培养基中 (250ml 带硅胶塞), 32 °C 下 180r/min 振荡培养。检测溶解氧浓度、亚硝酸盐浓度和 OD_{600} 。溶解氧用电极法 (Hach, sensION156)、亚硝酸盐用盐酸萘乙二胺法、 OD_{600} 用分光光度法 (Hach, DR/4000U) 分别测定。

1.3 筛选菌株在不同盐度条件下的反硝化活性

用去离子水配制盐度分别为 0、10、15、20、25、30 的人工海水, 加入 1.2 所述培养基成分制作液体培养基, 接种和培养按照 1.2 所述。每 5h 检测 1 次亚硝酸盐, 记录亚硝酸盐完全去除所需时间。

1.4 好氧反硝化细菌的鉴定

1.4.1 形态观察 对筛选菌株进行革兰氏染色和鞭毛染色。

1.4.2 生理生化反应 参照伯杰氏手册对筛选菌株做进一步鉴定。

1.4.3 16S rDNA 序列分析 从平板上直接挑取一环单菌落菌苔, 加至 100 μ l 去离子水中, 吹打混匀, 100 °C 水浴 10min, 12,000r/min, 4 °C 离心 10min, 取上清于 4 °C 保存, 直接作为 PCR 扩增模板。16S rDNA 扩增引物为: 上游引物 BSF8/20, 5'-AGA-GTT-TGA-TCC-TGG-CTG-AG-3'; 下游引物 BSR814/21, 5'-TAG-AGG-GTG-GAG-TAC-CAG-GGT-3', 由上海生工生物工程有限公司合成。扩增体系: 2 $\times$ Premix Taq (Ex TaqTM Version, TaKaRa 公司) 25 μ l, 引物各 0.5 μ mol/L, 模板 1 μ l, 灭菌去离子水补至 50 μ l。采用 PE2400 PCR 扩增仪, 反应程序为: 94 °C 变性 10min; 94 °C 变性 40s, 56 °C 退火 50s, 72 °C 延伸 1min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10min, 4 °C 保存。PCR 产物以含 0.15 μ g/ml 溴化乙锭的 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶图像分析系统 (Bio-Rad Gel Doc 2000) 记录结果。用 Microcon-PCR Purification Kit (Millipore) 纯化扩增产物, 由 Invitrogen 公司采用 ABI 377 DNA 测序仪完成测序, 测序引物为 BSF8/20。测序结果提交 GenBank 采用 BLASTN 程序, 及 EMBL 采用 FASTA 程序进行同源性检索。利用 MEGA3 软件, 将筛选菌株与部分参考菌株基于 16S rDNA 序列的 ClustalW 多重比对结果, 采用 UPGMA 方法构建系统发育树。

1.5 亚硝酸盐还原酶基因序列分析

参照文献^[3], 选择针对亚硝酸盐还原酶结构基因 *nirS*、*nirK* 的特异引物, 分别进行 PCR 检测。引物序列分别为: *nirS*1F, 5'-CCT-A (C/T) T-GGG-CGC-C (A/G) G-A (A/G) T-3', *nirS*6R, 5'-CGT-TGA-ACT-T (A/G) G-CGG-T-3', 产物长度为 890bp; *nirK*1F, 5'-GG(A/C)-ATG GT(G/T)-CC (C/G)-TGG-CA-3', *nirK*5R, 5'-GCC-TCG-ATC-AG (A/G)-TT(A/G)-TGG-3', 产物长度为 514bp, 由上海生工生物工程有限公司合成。模板提取方法同上。扩增体系: 2 $\times$ Premix Taq (Ex TaqTM Version, TaKaRa 公司) 25 μ l, 引物各 0.5 μ mol/L, 模板 1 μ l, 灭菌去离子水补至 50 μ l。同上采用 PE2400 PCR 扩增仪, 扩增程序为: 94 °C 变性 10min; 94 °C 变性 40s, 54 °C 退火 50s, 72 °C 延伸 1min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10min, 4 °C 保存。PCR 产物同上进行电泳检测及纯化, 由 Invitrogen 公司采用 ABI 377 DNA

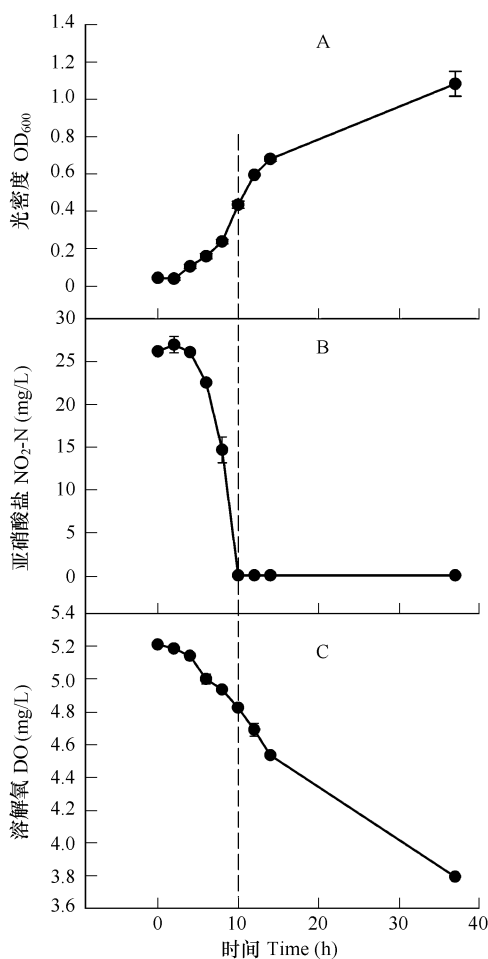


图1 菌株 X0412 反硝化中细菌生长 (A) 及亚硝酸盐 (B) 和溶解氧 (C) 浓度变化
Fig.1 Dynamics of X0412 growth (A), concentrations of nitrite (B) and dissolved oxygen (C) during denitrification

测序仪完成测序,测序引物为 nirS1F 和 nirS6R,同上进行同源性检索。

2 结果

2.1 好氧反硝化细菌的筛选及好氧反硝化活性测定

通过在典型好氧反硝化细菌富集条件下从虾池水及生物膜中分离获得 1 株高活性反硝化细菌,结合筛选过程的培养条件,初步推测该菌株具有好氧反硝化能力。实验结果表明,以氨氮为氮源时它在好氧条件下有相当高的亚硝酸盐还原活性,检测结果见图 1。结果显示,在 10h 内培养液 OD₆₀₀ 从 0.044 到 0.436 的过程中,溶解氧浓度从 5.21mg/L 缓慢下降到 3.8mg/L,而亚硝酸盐浓度从 26.18mg/L 下降至 0。亚硝酸盐被快速去除的过程中,溶解氧浓度一直维持在较高的水平。

2.2 不同盐度条件下的反硝化活性

不同盐度下筛选菌株完全还原亚硝酸盐所需时间如图 2 所示。盐度 0~25 条件下,20h 内亚硝酸盐浓度从 26.18mg/L 降为 0,随着盐度升高完全还原亚硝酸盐所需时间也相应延长,推测较高盐度对该菌株的反硝化活性有抑制作用。

2.3 菌株的鉴定

2.3.1 形态特征 菌株 G⁻,极生鞭毛,在选择性平板上菌落较大,黄色并有皱褶。

2.3.2 生化反应 该菌的主要生化反应特征表现为,氧化酶试验阴性、分解葡萄糖和麦芽糖、葡萄糖 O/F 为氧化型、并具有硝酸盐还原能力。

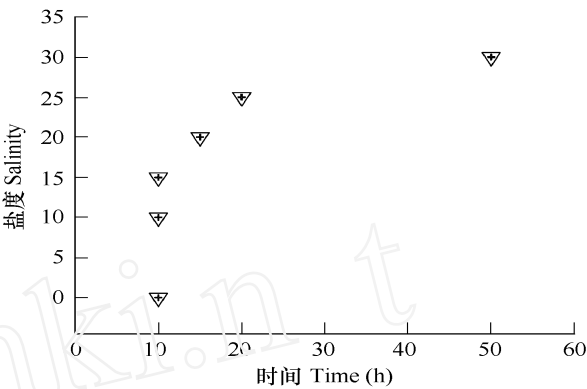


图 2 不同盐度下亚硝酸盐完全去除所需时间
Fig.2 Time needed for removal of nitrite by strain X0412 under aerobic different salinity

表 1 筛选菌株生物学特性

Table 1 Biological characteristics of the selected strain

生化反应 Test or characteristics		生化反应 Test or characteristics		生化反应 Test or characteristics	
氧化酶 Oxidase	-	葡萄糖 Glucose	+	精氨酸 Arginine	-
葡萄糖 O/F Glucose O/F	O	麦芽糖 Maltose	+	鸟氨酸 Ornithine	-
动力	+	木糖 Xylose	-	枸橼酸盐 Citrate	-
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	甘露醇 Mannitol	-	尿素酶 Urease	-
明胶液化 Gelatine hydrolysis	+	赖氨酸 Lysine	+	胆汁七叶苷 Bile aesculin	+
				HLN acid	-

“+”表示反应呈阳性 positive,“-”表示反应呈阴性 negative

2.3.3 16S rDNA 序列分析 部分长度 16S rDNA 序列在 GenBank 的登记号为 DQ359944,分析结果(见图 3)表明,筛选菌株与多株 *Stenotrophomonas maltophilia* (嗜麦芽寡养单胞菌) 菌株 16S rDNA 序列相似性均达 99 % 以上,与菌株 AB021406 同源性达 99.74 %,利用 MEGA3 软件,将筛选菌株与部分参考菌株基于 16S rDNA 序列构建系统发育树(如图 4),结合菌株形态学及生理生化特性,基本确定筛选菌株为 *Stenotrophomonas maltophilia*,命名为 *Stenotrophomonas maltophilia* strain X0412。

2.4 亚硝酸盐还原酶序列分析

菌株 *S. maltophilia* strain X0412 亚硝酸盐还原酶基因 nirS、nirK 基因扩增结果见图 5。nirS 扩增产物大小约为 900bp,与预期相符,nirK 扩增结果阴性,表明该菌株为 nirS⁺ 和 nirK⁻。nirS 片断测序后长度 903bp(见图 6),同源检索结果发现其与 *Alcaligenes faecali* A15 nirS 基因序列相似度最大,达 98.7 %。

3 讨论

由于好氧反硝化细菌在环境中本来就很少且很难成为优势菌,故采用一般筛菌方法不易将其筛选出来。对于好氧反硝化细菌而言,在好氧条件下可同时利用氧和硝酸盐或/和亚硝酸盐为电子受体,但由于有氧呼吸

1	atgcaagtcg	aacggcagca	caggagagct	tgctctctgg	gtggcgagtg	gcggacgggt
61	gaggaataca	tcggaaatcta	ctctgtctgtg	ggggataacg	tagggaaact	tacgctaata
121	ccgcatacga	cctacgggtg	aaagcagggg	atcttcggac	cttgcgcgat	tgaatgagcc
181	gatatcggat	tagctagtgtg	gcggggtaaa	ggcccaccaa	ggcgacgac	cgtagctggt
241	ctgagaggat	gatcagccac	actggaactg	agacacggtc	cagactccta	cgggaggcag
301	cagtggggaa	tattggacaa	tgggcgcaag	cctgatccag	ccataccgcg	tgggtgaaga
361	aggccttcgg	gttgtaaagc	ccctttgttg	ggaaagaaat	ccagctggct	aatacccgtt
421	tgggatgacg	gtacccaaag	aataagcacc	ggctaacttc	gtgccagcag	ccgcggtaat
481	acgaagggtg	caagcggtac	tcgggaattac	tgggcgtaaa	gcgtgcgtag	gtgggtattt
541	aagtcctgtg	tgaagccct	gggctcaacc	tgggaactgc	agtggatact	ggaatgactag
601	aatgtggtag	agggtagcgg	aattcctggt	gtagcagtga	aatgcgtaga	gacagaggag
661	aacatccatg	gcgaaggcag	ctacctggac	caacattgac	actgaggcac	gaaagcgttg
721	ggagcaaaca	gattagata	ccctggtagt	ccacgctgta	a	

图3 菌株 X0412 部分长度 16S rDNA 序列

Fig. 3 Partial 16S rDNA sequence of strain X0412

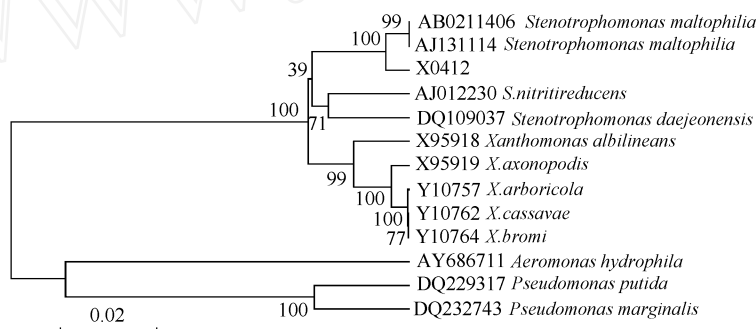
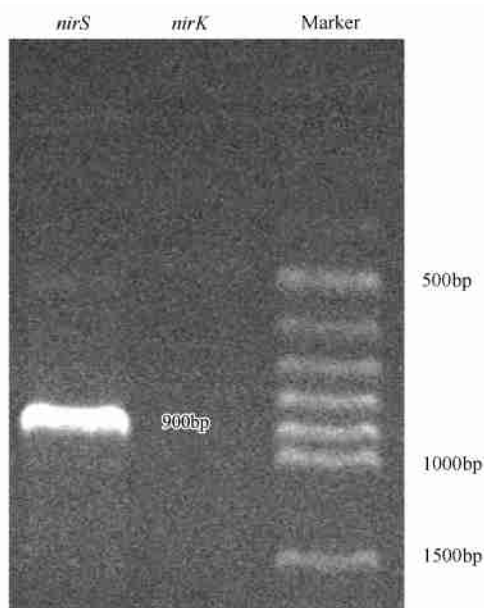


图4 菌株 X0412 与参考菌株基于 16S rDNA 序列构建的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on partial 16S rDNA sequences of strain X0412 and the references

产生的能量一般远大于利用硝酸盐或/和亚硝酸盐产生的能量,因此一般情况下有氧呼吸占优势;在厌氧条件下以硝酸盐或/和亚硝酸盐为电子受体,此时其生长速率一般又较低,故好氧反硝化细菌的筛选比较困难,在筛菌及保存过程中条件控制非常重要,稍不合适就很难获得反硝化活性强的菌株,或在应用过程中菌株反硝化活性难以长期保持。而利用间歇曝气法,由于频繁的好氧/缺氧环境转换使得完全好氧和厌氧细菌不能正常生长,增加了好氧反硝化菌成为优势菌的可能性;此外,间歇曝气一方面提供了细菌生长所需氧气,使细菌维持了一定的生长速率,另一方面间歇的厌氧条件又诱导了细菌反硝化过程酶的活性,而间歇的有氧条件并不会很快使其反硝化活性受到抑制,从而同时保证了细菌的生长和反硝化活性的表达,因此该方法目前得到许多研究者的青睐^[11]。孔庆鑫等通过该方法分离出好氧反硝化菌 *Pseudomonas* sp. Y2-1,该菌硝酸盐去除率随溶解氧升高而降低,但仍具有较强的去除能力^[20]。通过间歇曝气富集筛选,亦从虾池悬浮生物膜中分离到多个亚硝酸盐去除率较高的好氧反硝化细菌菌株,同样证实了该方法的有效性。

图5 菌株 X0412 亚硝酸盐还原酶基因 *nirS*、*nirK* 扩增结果Fig. 5 Amplification of *nirS* and *nirK* gene from strain X0412

1	acagttttat	ttggggcgccg	cgcagtactc	gatcatggac	ggcgagaccc	tggagccgat
61	caaggctcgtc	tccaccctgtg	gccagacggt	cgaaggcgaa	taccaccccg	aaccgcgtgt
121	ggcgctccatc	gtcgctctgc	acatcaagcc	ggagtgggtg	gtcaacgtga	aggagaccgg
181	acagatcacc	ctggctgact	acaccgacct	gaagaacctc	aagaccacca	ccatcgagtc
241	ggccaagttc	ctccacgacg	gtggctggga	ctactccaag	cgctacttca	tggctgcccgc
301	caacgcctcc	aacaaggctc	cggcagtcga	taccaagacc	ggcaagctgg	ccgcgctggt
361	cgaaccgcgc	aagatcccgc	acccggggcg	cggcgccaacc	tccatccacc	cgcagttcgg
421	cccggctctgg	accaccggcc	acctgggtga	cgaagtgttc	tcgtgatctt	ccaccgcacc
481	ggacgatccg	aagtacgcca	agtacaagga	gcacaactgg	aaggtggtgc	aggagctgaa
541	gatgccgggc	gccggcaacc	tgttcgtcaa	gacccatccg	aagtcgaaga	acctctgggc
601	cgaaccgcgc	atgaaccccg	agcgggaagt	cgcggaatcc	gtctacgtct	acgacctggc
661	cgaatctcagc	aaggagccca	agcggctgga	cgtcgccaag	gactccggcc	tgcgggaag
721	caaggcgatc	cgtcgtgcca	cccacccgga	gtacaacgag	gcgggtgacg	aggtgtggat
781	ctccctctgg	ggcgccaaga	ccgaccagtc	cgcgatactg	atctacgaag	acaaagacgt
841	gaagctgaag	aaggtgatca	ccgatccggc	gaicgtcacc	ccgcccgaag	attttcacac
901	gaa					

图6 菌株 X0412 *nirS* 基因扩增产物序列Fig. 6 Sequence of amplified *nirS* gene product from strain X0412

尽管 16S rDNA 序列分析在菌种鉴定上仍有不足之处,但比传统的鉴定方法能更快捷地获得更明确的鉴定结果,也可以作为种和亚种水平上鉴定的依据;虽然 16S rDNA 全序列在鉴定某些新种时是必要的,但起始的 500bp 片段对大多数菌株的鉴定已提供了足够丰富的信息^[21]。La Scola 等认为该方法比传统方法在鉴定 *Bartonella* sp. 内各菌株时更准确。尽管对鉴定到种水平的 16S rDNA 序列相似度标准还没有统一,但一般以 $\geq 99\%$ 作为种水平上的鉴定标准^[22, 23]。分离的菌株 16S rDNA 序列 FASTA 及 BLASTN 检索结果均与 *Pseudomonas beteli* AB021406 最为接近(相似性达 99.74%),*Pseudomonas beteli* AB021406 最早被归于假单胞菌属,2000 年被 Anzai 等根据 16S rDNA 基因的部分序列相似度 99.5% 及系统发育分析将其更名为嗜麦芽寡养单胞菌 *Stenotrophomonas maltophilia*^[24]。嗜麦芽寡养单胞菌广泛存在于自然界中,并在污染物降解转化中发挥重要作用。Romano 等发现 *S. maltophilia* 在市政水处理的出口水中占 G⁻ 菌的 3.8%^[25]。郭全友等对东海几个养殖场大黄鱼进行细菌多样性分析,即发现嗜麦芽寡养单胞菌是鱼体第二优势菌群,占 21.0%^[26]。Dungan 等报道了从含硒的排污塘沉积物中分离的 *S. maltophilia* 对硒酸盐和亚硒酸盐有很强的去除能力^[27],Chen 等也发现 *S. maltophilia* 是被表面活性剂 Triton X-100(曲拉通)污染土壤中的土著种并且在通氧及添加氮源和碳源条件下可以提高其数量^[28],Ivanov 等则报道了从市政污水处理厂经富集分离到 *S. maltophilia* 不仅还原 Fe³⁺ 还可以除磷^[29]。*S. maltophilia* 不仅在处理污染物上具有重要作用,而且从农作物根际中分离的 *S. maltophilia* 还具有固氮能力^[30]。

从淡化养殖虾池悬浮生物膜中分离的嗜麦芽寡养单胞菌在溶解氧浓度为 3.80~5.21 mg/L 条件下,可在 10h 内将亚硝酸盐从 26.18mg/L 还原至 0。Finkmann 等报道本属中的 *Stenotrophomonas nitritireducens* 也有反硝化能力,但是缺乏 N₂O 还原酶^[31];关于 *S. maltophilia* 的反硝化能力则未见报道。同时该菌株在盐度 0~20 之间显示有较高的反硝化活性,不过较高盐度对反硝化活性表现出抑制作用。嗜盐反硝化细菌数量较少,主要包括古细菌中的 *Haloarcula*、*Halobacterium*、*Haloferax* 及细菌中的 *Halomonas* 和 *Bacillus* 等几个属的某些种^[2]。Yoshie 等指出盐度降低了污水处理系统中亚硝酸盐还原酶基因的多样性^[32]。*Pseudomonas* 和 *Stenotrophomonas* 两个属中的反硝化细菌在不同盐度下的反硝化能力也未见报道。盐度对反硝化细菌的分布和反硝化活性可能有一定的影响,本文所分离的菌株在较高盐度下仍有一定的反硝化活性可能与来源有关,此特点使得该菌株具有了在生活污水和养殖水处理等多种场合应用的巨大潜力。

在对菌株好氧反硝化活性及盐度对反硝化活性影响评估的基础上,本文进行了亚硝酸盐还原酶基因 *nirS*/*nirK* 的 PCR 检测。*nirS*/*nirK* PCR 结果表明该菌株为 *nirS*⁺,*nirS* 为含有血红素 cd1 的亚硝酸盐还原酶(cdh1-nir)基因,目前尚未发现 *nirS* 基因和 *nirK* 基因出现在同株菌体中,但是它们对应的还原酶具有相同的功

能。菌株 X0412 *nirS* 基因序列同源分析结果证实其与 *Alcaligenes faecalis* A15 序列的相似性达 98.7%。Vermeiren 等根据表型特征、脂肪酸分析及 DNA 杂交等多种手段,认定 *Alcaligenes faecalis* A15 就是目前报道较多的反硝化细菌 *Pseudomonas stutzeri*^[33]。

尽管亚硝酸盐可以通过亚硝酸盐氧化、产铵异化还原和反硝化还原这三种生化转化途径去除,但反硝化仍然是从水环境中去除亚硝酸盐的最好途径。前两种方法分别产生的硝酸盐和铵都会滞留在水体中,而反硝化作用是将亚硝酸盐或硝酸盐还原成气体使之完全从水体中去除。本文所分离的好氧反硝化细菌 X0412 还原亚硝酸盐的特征已确定,但它在反硝化过程中是否以温室气体 N_2O 为主要产物仍需进一步研究。

References:

- [1] Maier R M. Biochemical cycling. In: Maier R M ed. Environmental Microbiology. San Diego: Academic Press, 2000. 319 ~ 346.
- [2] Zumft W G. Cell biology and molecular basis of denitrification. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 1997, 61(4): 533 ~ 616.
- [3] Braker G, Zhou J, Wu L, et al. Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific northwest marine sediment communities. Appl. Environ. Microbiol., 2000, 66(5): 2096 ~ 2104.
- [4] Braker G, Ayala-del-Rio H L, Devol A H, et al. Community structure of denitrifiers, bacteria, and archaea along redox gradients in Pacific Northwest marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of amplified nitrite reductase (*nirS*) and 16S rRNA genes. Appl. Environ. Microbiol., 2001, 67(4): 1893 ~ 1901.
- [5] Liu X, Tiquia S M, Holguin G, et al. Molecular diversity of denitrifying genes in continental margin sediments within the oxygen-deficient zone off the Pacific coast of Mexico. Appl. Environ. Microbiol., 2003, 69(6): 3549 ~ 3560.
- [6] Tarone-Oldenburg G, Griner E M, Francis C A, et al. Oligonucleotide microarray for the study of functional gene diversity in the nitrogen cycle in the environment. Appl. Environ. Microbiol., 2003, 69(2): 1159 ~ 1171.
- [7] Prieme A, Braker G, Tiedje J M, et al. Diversity of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) gene fragments in forested upland and wetland soils. Appl. Environ. Microbiol., 2002, 68(4): 1893 ~ 1900.
- [8] Patureau D, Bernet N, Delgenes J P, et al. Effect of dissolved oxygen and carbon-nitrogen loads on denitrification by an aerobic consortium. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2000, 54(4): 535 ~ 542.
- [9] Patureau D, Gdon J J, Dabert P, et al. *Microvirgula aerodenitrificans* gen. nov., sp. nov., a new gram-negative bacterium exhibiting co-respiration of oxygen and nitrogen oxides up to oxygen-saturated conditions. Int. J. Syst. Bacteriol., 1998, 48(3): 775 ~ 782.
- [10] Patureau D, Hellein E, Rustrian E, et al. Combined phosphate and nitrogen removal in a sequencing batch reactor using the aerobic denitrifier, *Microvirgula aerodenitrificans*. Water Res., 2001, 35(1): 189 ~ 197.
- [11] Patureau D, Zumstein E, Delgenes J P, et al. Aerobic Denitrifiers Isolated from Diverse Natural and Managed Ecosystems. Microb. Ecol., 2000, 39(2): 145 ~ 152.
- [12] Robertson L A, Kuenen J G. Aerobic denitrification: a controversy revived. Arch Microbiol., 1984, 139: 351 ~ 354.
- [13] Takaya N, Catala-Sakairi M A, Sakaguchi Y, et al. Aerobic denitrifying bacteria that produce low levels of nitrous oxide. Appl. Environ. Microbiol., 2003, 69(6): 3152 ~ 3157.
- [14] Ka J O, Urbance J, Ye R W, et al. Diversity of oxygen and N-oxide regulation of nitrite reductases in denitrifying bacteria. FEMS Microbiol. Lett., 1997, 156(1): 55 ~ 60.
- [15] Chen F, Xia Q, Ju L K. Aerobic denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* monitored by online NAD(P)H fluorescence. Appl. Environ. Microbiol., 2003, 69(11): 6715 ~ 6722.
- [16] Vollack K U, Hartig E, Körner H, et al. Multiple transcription factors of the FNR family in denitrifying *Pseudomonas stutzeri*: characterization of four fnr-like genes, regulatory responses and cognate metabolic processes. Mol. Microbiol., 1999, 31(6): 1681 ~ 1694.
- [17] Su J J, Liu B Y, Lin J, et al. Isolation of an aerobic denitrifying bacterial strain NS-2 from the activated sludge of piggy wastewater treatment systems in Taiwan possessing denitrification under 92% oxygen atmosphere. J. Appl. Microbiol., 2001, 91(5): 853 ~ 860.
- [18] Otani Y, Hasegawa K, Hanaki K. Comparison of aerobic denitrifying activity among three cultural species with various carbon sources. Water Sci. Technol., 2004, 50(8): 15 ~ 22.
- [19] Ozeki S, Baba I, Takaya N, et al. A novel Cl⁻-using denitrifier alcaligenes sp. STC1 and its genes for copper-containing nitrite reductase and azurin. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2001, 65(5): 1206 ~ 1210.
- [20] Kong Q X, Li J W, Wang X W, et al. A new screening method for aerobic denitrification bacteria and isolation of a novel strain. Ch. in J. Appl. Environ. Biol., 2005, 11(2): 222 ~ 225.
- [21] Clarridge J E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. Clin. Microbiol. Rev., 2004, 17(4): 840 ~ 862.
- [22] Bosshard PP, Abels S, Zbinden R, et al. Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic gram-positive rods in the clinical laboratory (an 18-month evaluation). J. Clin. Microbiol., 2003, 41(9): 4134 ~ 4140.
- [23] Drancourt M, Bollet C, Carlioz R, et al. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. J. Clin. Microbiol., 2000, 38(10): 3623 ~ 3630.
- [24] Anzai Y, Kim H, Park J Y, et al. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2000, 50(4): 1563 ~ 1589.
- [25] Romano G, Stampi S, Zanetti F, et al. Occurrence of gram-negative bacteria in drinking water undergoing softening treatment. Zentralbl. Hyg. Umweltmed., 1997, 200(2 ~ 3): 152 ~ 162.
- [26] Guo Q Y, Xu Z, Yang X S. Bacterial diversity in cultured *Pseudosciaena crocea* from the East China Sea. Marine Fisheries, 2005, 27(3): 241 ~ 245.
- [27] Dungan R S, Yates S R, Frankenberger W T Jr. Transformations of selenate and selenite by *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from a seleniferous agricultural drainage pond sediment. Environ. Microbiol., 2003, 5(4): 287 ~ 295.
- [28] Chen H J, Huang S L, Tseng D H. Aerobic biotransformation of octylphenol polyethoxylate surfactant in soil microcosms. Environ. Technol., 2004, 25(2): 201 ~ 210.
- [29] Ivanov V, Stabnikov V, Zhuang W Q, et al. Phosphate removal from the returned liquor of municipal wastewater treatment plant using iron-reducing bacteria. J. Appl. Microbiol., 2005, 98(5): 1152 ~ 1161.
- [30] Park M, Kim C, Yang J, et al. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. Microbiol. Res., 2005, 160(2): 127 ~ 133.
- [31] Finkmann W, Altendorf K, Stackebrandt E, et al. Characterization of N_2O -producing *Xanthomonas*-like isolates from biofilters as *Stenotrophomonas nitritireducens* sp. nov., *Luteimonas mephitis* gen. nov., sp. nov. and *Pseudoxanthomonas broegbernensis* gen. nov., sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2000, 50(1): 273 ~ 282.
- [32] Yoshie S, Noda N, Tsuneda S, et al. Salinity decreases nitrite reductase gene diversity in denitrifying bacteria of wastewater treatment systems. Appl. Environ. Microbiol., 2004, 70(5): 3152 ~ 3157.
- [33] Vermeiren H, Willems A, Schoofs G, et al. The rice inoculant strain *Alcaligenes faecalis* A15 is a nitrogen-fixing *Pseudomonas stutzeri*. Syst. Appl. Microbiol., 1999, 22(2): 215 ~ 224.

参考文献:

- [20] 孔庆鑫, 李君文, 王新为, 等. 一种新的好氧反硝化菌筛选方法的建立及新菌株的发现. 应用与环境生物学报, 2005, 11(2): 222 ~ 225.
- [26] 郭全友, 许钟, 杨宪时. 东海养殖大黄鱼细菌多样性分析. 海洋渔业, 2005, 27(3): 241 ~ 245.