



研究报告

一株光合细菌的分离鉴定及该菌对氨氮和亚硝态氮的去除作用

王艺雅 张其中*

暨南大学水生生物研究所 广东省高校水体富营养化与赤潮防治重点实验室 广东 广州 510632

摘要:【背景】中国是水产养殖大国,氨氮、亚硝态氮是水体中主要的氮源污染物。水体氨氮超标不仅会损伤水生动物的神经系统和肝肾系统,还会导致体表及内脏充血。亚硝态氮过高会阻碍血液运载氧气能力,导致鱼虾缺氧、免疫力下降,从而引发肠炎、烂鳃,甚至窒息死亡。部分光合细菌有去除水体氨氮、亚硝态氮的能力,且对环境友好无二次污染。【目的】从广东养殖水体分离、纯化、筛选出生物活性好的光合细菌(编号 SP3)进行种属鉴定,优化培养条件,检测其去除水体氨氮和亚硝态氮的能力,为养殖水体去除氨氮和亚硝态氮提供目标菌株。【方法】用双层平板法从混合菌液中分离得到光合细菌,通过革兰氏染色、碳源利用试验、对无机电子供体的利用试验以及 16S rRNA 基因序列分析对目标菌株进行种属鉴定;测定菌株 SP3 在不同 pH、不同浓度 NaCl 条件下的 OD_{600} ,优化培养条件;通过测定 7 d 内 SP3 菌株在不同浓度氨氮(氯化铵配制)和亚硝态氮(亚硝酸钠配制)中 OD_{600} 的变化趋势,确定该菌株对不同氮源的利用情况;用纳氏比色法、分光光度法测定 SP3 菌株降解水体氨氮和亚硝态氮的能力。Genome walking 扩增获得亚硝酸盐还原酶基因(*nirS*),通过荧光定量 PCR 研究 *nirS* 在氨氮、亚硝态氮去除过程中的表达动态。【结果】筛选出的菌株 SP3 为革兰氏阴性菌,短杆状;能以醋酸盐、丙酮酸盐、丙酸盐、丁酸盐、乳酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、苹果酸、果糖、葡萄糖作为碳源,不能以乙醇和丙酮作为碳源;能利用硫化钠、硫代硫酸钠、亚硫酸钠作为无机电子供体;16S rRNA 基因序列分析表明其与沙氏外硫红螺菌(*Ectothiorhodospira shaposhnikovii*)序列相似度为 99%;菌株 SP3 适宜 pH 为 6.0–8.5,适宜盐度为 0–3%;菌株 SP3 以铵盐作为氮源时生长状态明显优于亚硝酸盐;以初始菌液浓度 8.6×10^9 CFU/mL、起始氨氮量 84.15 ± 0.58 mg/L 的条件培养 7 d,水体氨氮累计去除量为 79.45 ± 0.29 mg/L,氨氮累计去除率达到 94.42%;在同样菌浓度和 2 mg/L 亚硝酸钠的条件下培养 5 d,水体亚硝态氮含量低于检测限 0.003 mg/L。在菌株 SP3 去除氨氮、亚硝态氮过程中 *nirS* 相对表达量上调。【结论】菌株 SP3 为沙氏外硫红螺菌(*E. shaposhnikovii*),能有效去除水中氨氮和亚硝态氮,具有净化水质作用,在水产养殖和污水处理中有广阔应用前景。

关键词: 光合细菌, 分离鉴定, 培养条件优化, 氨氮去除, 亚硝态氮去除

Foundation item: Industry-University Research Project of Guangdong Province (2016B090918029)

*Corresponding author: E-mail: zhangqzdr@126.com

Received: 30-10-2018; Accepted: 14-03-2019; Published online: 23-04-2019

基金项目: 广东省产学研项目(2016B090918029)

*通信作者: E-mail: zhangqzdr@126.com

收稿日期: 2018-10-30; 接受日期: 2019-03-14; 网络首发日期: 2019-04-23

Isolation and identification of a photosynthetic bacterium strain and removal of ammonia nitrogen and nitrite by the bacterium species in water

WANG Yi-Ya ZHANG Qi-Zhong*

Key Laboratory of Eutrophication and Red Tide Prevention of Guangdong Higher Education Institutes, Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China

Abstract: **[Background]** China is a large aquaculture country. Ammonia nitrogen and nitrite are the main nitrogen source pollutants in water. Excessive ammonia nitrogen in water can damage the nervous system, liver and kidney system, body surface and internal organs filled with blood of aquatic animals. Excessive nitrite reduces the ability of carrying oxygen by red blood cells, and immune power of fish and shrimps, results in various diseases, and even suffocation. Some photosynthetic bacteria with the function of removal of ammonia nitrogen and nitrite in water are environmental friendly. **[Objective]** The photosynthetic bacterium strain (No. SP3) isolated from the mixed bacteria samples from aquaculture ponds in Guangdong province will be identified for its scientific species and removal ability of ammonia nitrogen and nitrite in water so as to provide the target bacterial strain for the biological removal of the water body. **[Methods]** The photosynthetic bacterium strain (SP3) was isolated from mixed bacteria samples from aquaculture ponds in Guangdong province using double-layer plate method. The strain SP3 was identified by 16S rRNA gene sequence analysis, gram staining, carbon source utilization and inorganic electron donor utilization experiments. The optimal culture conditions of strain SP3 were determined by detection of OD_{600} in different pH and various NaCl concentrations. The utilization of strain SP3 for different nitrogen sources (ammonium chloride, sodium nitrite) could be confirmed by measuring the change trends of OD_{600} in different concentrations of the two nitrogen sources during the period of 7 days. The ability of strain SP3 to get rid of ammonia nitrogen and nitrite in water were determined by Nessler's reagent colorimetric method and spectrophotometry. The nitrite reductase gene (*nirS*) was cloned by means of Genome Walking method, and the expression dynamics of *nirS* in the removal process of ammonia nitrogen and nitrite nitrogen were studied by RT-PCR. **[Results]** The isolated strain SP3 is Gram-negative, short rod-shaped, and can utilize acetate, pyruvate, pyruvate, propionate, butyrate, lactate, fumarate, succinic acid, malate, fructose and glucose as carbon sources, but can not use ethanol and propanol as carbon sources. It can employ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ and Na_2SO_3 as inorganic electron donors. The strain SP3 is closely similar to *Ectothiorhodospira shaposhnikovii* (99% similarity) based on the 16S rRNA gene sequence analysis. The suitable pH is 6.0–8.5, and the suitable salinity is 0–3% for SP3. The growth status of strain SP3 using ammonia nitrogen chloride as a single nitrogen source was significantly better than that using sodium nitrite as a single nitrogen source. Under the condition of an initial bacterial concentration of 8.6×10^9 CFU/mL, the ammonia nitrogen at an initial concentration of 84.15 ± 0.58 mg/L was removed in water for 7 days was 79.45 ± 0.29 mg/L, and the removal percentage reached 94.42%, meanwhile, the sodium nitrite at an initial concentration of 2 mg/L degraded in water for 5 days was lower than the detection limit (0.003 mg/L). The relative mRNA expression level of *nirS* in the strain SP3 was upregulated during the period of removal of ammonia nitrogen and nitrite. **[Conclusion]** The strain SP3 was identified as *E. shaposhnikovii*, and had the strong ability of removing ammonia nitrogen and nitrite. Therefore, it is a promising photosynthetic bacterium strain in application of aquaculture water and wastewater treatment.

Keywords: Photosynthetic bacterium strain, Isolation and identification, Optimization of culture conditions, Ammonia nitrogen removal, Nitrite removal

中国是水产养殖大国,自 1991 年起,我国食用鱼类养殖产量高于全球其余国家和地区的合计产量;自 2002 年起,我国一直是世界上鱼和鱼产品最大的出口国^[1]。2016 年,我国水产养殖产量高达 5 142.39 万 t,占全国水产品总产量的 74.51%,水产养殖产值为 8 953.57 亿元^[2]。我国多采用集约化高密度养殖方式饲养,致使大量残饵和水产动物排泄物进入水体,成为养殖池塘水体中氮的主要来源。养殖水体的氮污染问题已经成为制约我国水产养殖业发展的重要因素之一。

氨氮(NH₄⁺-N)是水体氮污染中最常见的污染物,主要以离子态(NH₄⁺)和分子态(NH₃)两种形式存在,水体中有毒性作用的主要是分子氨^[3]。我国渔业用水水质标准规定分子氨浓度不得超过 0.02 mg/L^[4]。氨氮可使动物肝肾受损、体表及内脏充血^[5],也能致使水生动物鳃组织受损、鳃小片弯曲、粘连或融合^[6]。因此去除养殖水体氨氮是保障水产动物健康养殖的关键。目前,去除水体氨氮的方法主要分为物化法和生物脱氮^[7]两大类,其中物化法由于投入大量化学药剂易造成养殖水体的二次污染^[8],而生物脱氮是目前应用最为广泛的环境友好无污染技术,其原理是利用微生物的硝化作用将水体的含氮污染物转化成为分子态氮气离开水体,从而达到水体脱氮目的。

亚硝态氮是硝化作用和反硝化作用的中间产物,也是养殖水体常见污染物之一。亚硝态氮进入鱼体内与血红蛋白结合,将二价铁(Fe²⁺)氧化为高铁(Fe³⁺),让血红蛋白失去载氧能力^[9],使鱼体缺氧,免疫力下降,从而引发疾病,甚至窒息死亡^[10]。去除亚硝态氮主要有两种途径,一种是通过硝化作用将亚硝态氮转化为无毒害作用的硝态氮,另一种是通过反硝化作用转化为氮气离开养殖水体进入大气^[11]。一般条件下,水产养殖水体中亚硝态氮(以氮计)浓度宜控制在 0.1 mg/L 以下^[12]。

亚硝酸盐还原酶(Nitrite reductase)是氮循环反硝化过程中的关键限速酶^[13]。目前发现亚硝酸盐还原酶常见的有 5 种类型, *nirK* 基因编码的含铜

型亚硝酸盐还原酶(Cu-Type nitrite reductase)^[14]、*nirS* 基因编码的细胞色素 cd1 亚硝酸盐还原酶(Cytochrome cd1 nitrite reductase)^[15]、*nasB* 基因编码的 NADH 依赖性亚硝酸盐还原酶(NADH dependent nitrite reductase)^[16]、*nrfA* 基因编码的细胞色素 c 亚硝酸盐还原酶(Cytochrome c nitrite reductase)^[17]和 *niiI* 基因编码的铁氧化还原蛋白依赖性亚硝酸盐还原酶(Ferredoxin-dependent nitrite reductase)^[18]。含铜型亚硝酸盐还原酶和细胞色素 cd1 亚硝酸盐还原酶在结构上存在差异,但功能相同^[19],催化亚硝酸盐还原成一氧化氮。编码亚硝酸盐还原酶的 *nirS* 基因和 *nirK* 基因是研究反硝化细菌的分子标记^[20]。

光合细菌是地球上最早出现的具有原始光能合成体系的原核生物^[21],能充分利用光能以及各种有机物进行不放氧的光合作用^[22],广泛存在于海洋、湖泊、水田、污泥以及某些极端生境中^[23]。20 世纪 60 年代,日本学者小林正泰发现光合细菌能有效净化有机废水,开创了用光合细菌法处理污水的先河^[24]。随后一系列研究显示,光合细菌不仅可用于各种污水脱氮^[25-29],还能去除养殖水体中氨氮和亚硝态氮^[30-34]。

目前发现多种光合细菌具有降解氨氮的能力,如粪红假单胞菌(*Rhodospirillum rubrum*)可使自然水体中初始氨氮浓度从 1.753 mg/L 下降到 0.711 mg/L^[35];浑球红假单胞菌(*R. sphaeroides*)对鱼池水的氨氮去除率高达 99%^[36];海洋紫色硫细菌(*Marichromatium gracile*) YL28 对水体氨氮最大去除量为 9.64 mmol/L,对氨氮含量低于 3.21 mmol/L 的水体氨氮去除率可达 97.61%以上^[37];纤丝红螺菌(*Rhodospirillum rubrum*) GH1、球形红假单胞菌(*R. sphaeroides*) GH2 和 GH3、沼泽红假单胞菌(*R. palustris*) GH4 四株混合菌在微氧具光照条件下对养殖水体的氨氮去除率为 89.2%^[38];研究还发现部分光合细菌能降解亚硝态氮,如球形红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*) P₄ 以苹果酸作为碳源时,对起始亚硝酸盐浓度为 1 mmol/L 的亚硝态氮去除率为

99.8%^[39]; 胶质红假单胞菌(*R. gelatinosa*) H1 对亚硝态氮浓度为 2.9 mg/L 的彭泽鲫养殖水体亚硝态氮去除率为 99.79%, 球形红假单胞菌(*R. sphaeroides*) PSB-3 对该水质亚硝态氮去除率为 86.21%, 沼泽红假单胞菌(*R. palustris*) H₁₀ 对该水质亚硝态氮去除率为 93.79%^[40]。可见自然界确实存在不少能有效去除水体中氨氮和亚硝态氮的光合细菌, 但是它们的降解效率各不相同, 因此, 有必要从自然水体中筛选出高效降解氨氮或亚硝态氮的光合细菌, 以满足改善养殖水质、保障水产养殖业健康发展的需要。

本研究旨在鉴定分离自养殖水体中一株能去除水体氨氮和亚硝态氮的光合细菌的菌种, 明确其去除氨氮和亚硝态氮能力, 为养殖水体生物脱氮提供备选菌株。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试菌株

标准菌株沙氏外硫红螺菌(*Ectothiorhodospira shaposhnikovii*) 购于美国典型培养物保藏中心(ATCC), 产品编号: 43036; SP3 菌株分离自广东省养殖水体。

1.1.2 培养基

RCVBN 培养基的配制参照文献[41], van Niel 培养基的配制参照文献[42]。

1.1.3 主要试剂和仪器

亚硝酸钠、氯化铵, 天津大茂公司; 苹果酸, 上海试剂三厂; 生物素, Sigma 公司。水平核酸电泳仪、荧光定量 PCR 仪、凝胶成像分析系统, Bio-Rad 公司; 低温高速离心机, Sigma 公司; 全波长酶标仪, BioTek 公司; 自动蒸汽灭菌锅, 北京发恩科贸有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 光合细菌的富集、分离和保存

将广东养殖水体采集水样带回实验室后立即进行富集试验。取 50 mL 养殖水体水样接种到装有 200 mL van Niel 培养基的锥形瓶中, 再加入一定量的液体石蜡以隔绝空气, 在 30 °C 和光照 2 000 lx

条件下富集静置培养 10–15 d, 直至培养液呈红色。取 10 mL 红色富集培养液加到含新灭菌的 90 mL van Niel 培养基的锥形瓶中, 再加入一定量的液体石蜡(高于培养液 1 cm 左右)在 30 °C 和光照 2 000 lx 条件下静置培养至培养液变红, 以上步骤重复富集 3 次。

取富集培养液 1 mL, 用 0.9% 的生理盐水进行 10 倍稀释, 终浓度分别为原始菌浓度的 10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸ 和 10⁻⁹ 倍, 用双层培养基(双层均为含 2% 琼脂的 RCVBN 固体培养基)平板法分离单菌落, 用接种环蘸取稀释后的富集培养菌液在固体培养基上划线接种, 然后再倒一层已灭菌的 2% 琼脂的 RCVBN 培养基, 冷却凝固后在 30 °C 和光照 2 000 lx 条件下倒置培养 7 d。待红色菌落长出后, 挑单菌落于相同固体培养基平板上划线接种再分离纯化培养 7 d, 获得单一菌种的单菌落, 并在 RCVBN 液体培养基中于 30 °C 和光照 2 000 lx 条件下进行扩大培养, 得到菌液 SP3。

保种方法: (1) 取 500 μL SP3 纯培养菌液加入 500 μL 浓度为 40% 的甘油中, -80 °C 保存。(2) 取 SP3 菌液 100 mL, 在 5 000 r/min、4 °C 下离心 10 min, 倒掉上清液并用已灭菌的 0.9% 生理盐水离心洗涤, 重复 3 次。去上清, 将离心后的 SP3 菌体接种到 500 mL 已灭菌的 RCVBN 液体培养基中, 并加入一定量的液体石蜡, 在 30 °C 和光照 2 000 lx 条件下培养 7 d 后室温保存, 每 20–30 d 按上述步骤转接培养, 以保持菌种生长活力。

1.2.2 光合细菌 SP3 的菌种鉴定

(1) 分子生物学鉴定: 提取 SP3 菌株 DNA, 用通用引物^[43] (27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCT CAG-3'; 1492R: 5'-TA CGGTTACCTTGTTACGAC TT-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(25 μL): 10×KOD buffer 2.5 μL, 2.5 mmol/L dNTP mix 2.5 μL, 25 mmol/L MgSO₄ 1.5 μL, F 和 R 引物(20 μmol/L) 各 1 μL, 模板 DNA 1 μL, KOD-plus-neo 酶 0.5 μL, 以及 ddH₂O 15 μL。PCR 反应条件: 94 °C 4 min; 98 °C 30 s, 56 °C 30 s, 68 °C 1 min, 30 个循环;

68 °C 7 min。PCR 产物经纯化后通过加尾、T/A 克隆到 pMD18-T 载体,再转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中,经蓝白斑筛选鉴定为阳性克隆。菌液送华大基因科技有限公司测序。将 16S rRNA 基因序列用软件 MEGA 6.0 通过邻接法(Neighbor-Joining, N-J 法)构建系统发育进化树,自举分析(1 000 次)进行置信度检测,初步确定菌株 SP3 可能的属和种。

(2) 形态学观察:观察菌落的典型特征,挑取分离纯化所得的 SP3 菌体,通过革兰氏染色在光学显微镜下观察该菌株的形态。

(3) 生理生化实验:参照《常见细菌系统鉴定手册》^[44]。

1.2.3 菌株 SP3 生长条件优化

(1) 最适 pH 试验:将 RCVBN 液体培养基的 pH 分别调至 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0,分别设 3 个平行。接种培养方式同 1.2.1 节保种方法(2)。每间隔 24 h 测定 OD_{600} ^[45]。

(2) 最适盐度试验:将 RCVBN 液体培养基里加入 NaCl,浓度分别为 0%、0.5%、1%、1.5%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10% (质量体积比),分别设 3 个平行。接种方式同上。每间隔 24 h 测定 OD_{600} 。

1.2.4 不同氮源对 SP3 生长的影响

(1) 不同浓度氯化铵对 SP3 生长的影响:将 RCVBN 液体培养基中的氮源去除,以氯化铵作为氮源,分别配制含 0.25、0.5、1.0、1.5 g/L 氯化铵的培养基,以不含氮源的 RCVBN 液体培养基作为对照,分别设 3 个平行。接种方式同上,在 30 °C 和光照 2 000 lx 条件下培养 7 d,每间隔 24 h 测定 OD_{600} 。

(2) 不同浓度亚硝酸钠对 SP3 生长的影响:将 RCVBN 液体培养基中的氮源去除,以亚硝酸钠作为氮源,分别配制含 0.5、1.0、2.0、4.0 mg/L 的低浓度亚硝酸钠培养基和 0.25、0.5、1.0、1.5 g/L 的高浓度亚硝酸钠培养基,以不含氮源的 RCVBN 液体培养基作为对照,分别设 3 个平行。接种培养方

式同上,每间隔 24 h 测定 OD_{600} 。

(3) SP3 去除氨氮能力:将 RCVBN 液体培养基中的氮源去除,以 0.25 g/L 氯化铵作为氮源配制培养基,接种培养方式同上,以不加 SP3 菌液的培养基对照组,分别设 3 个平行。每间隔 24 h 取 100 mL 菌液,5 000 r/min 离心 10 min,离心后菌体立即冻存于液氮罐中,采用纳氏比色法^[46]测定上清中氨氮的含量。氨氮累计去除量 $c=(A_0-A_t)-(K_0-K_t)$,氨氮累计去除率 $C=c/A_0\times 100\%$,式中 A_0 表示实验组起始(第 0 天)氨氮含量(3 次重复的平均值), A_t 表示实验组当天氨氮含量, K_0 表示对照组起始(第 0 天)氨氮含量(3 次重复的平均值), K_t 表示对照组当天氨氮含量(3 次重复的平均值)。

取实验组菌液 1 mL,用 0.9% 生理盐水将其稀释至 10^{-7} 。取 0.1 mL 稀释的光合细菌菌液均匀涂布于底层琼脂浓度为 2% 的 RCVBN 培养基,分别设 3 个平行组,烘干水分后,加入琼脂浓度为 2% 的 RCVBN 培养基,将平板置于 30 °C 和光照 2 000 lx 倒置培养 7 d 后,测定菌落数。

1.2.5 SP3 去除亚硝态氮能力

将 RCVBN 液体培养基中的氮源去除,以 2 mg/L 亚硝酸钠作为氮源配制培养基,接种培养方式同上,3 个平行组。对照组不加 SP3 菌液,3 个平行组。每间隔 24 h 于超净工作台中取 100 mL 培养中的菌液,5 000 r/min 离心 10 min,离心后菌体立即冻存于液氮罐中,采用分光光度法^[47]测定上清中亚硝态氮的含量。

亚硝态氮累计去除量 $r=(N_0-N_t)-(M_0-M_t)$ 和亚硝态氮累计去除率 $R=r/N_0\times 100\%$,式中 N_0 表示实验组起始(第 0 天)亚硝态氮含量(3 次重复的平均值), N_t 表示实验组当天亚硝态氮含量, M_0 表示对照组起始(第 0 天)亚硝态氮含量(3 次重复的平均值), M_t 表示对照组当天亚硝态氮含量(3 次重复的平均值)。

1.2.6 SP3 菌株的亚硝酸盐还原酶基因及其在去除氨氮和亚硝态氮中的表达水平动态

(1) SP3 菌株亚硝酸盐还原酶基因的确定:以

菌株 SP3 的 DNA 为模板, 用文献资料中已报道的编码亚硝酸盐还原酶基因保守序列的引物 (*NirS-F*, *NirS-R*, *NirK-F*, *NirK-R*) 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系参照本文 1.2.2, 扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳有单一明显条带后, 切胶回收产物进行 TA 克隆, 再转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 蓝白斑筛选阳性克隆, 菌液 PCR 验证成功后将该菌液送至华大基因有限公司测序。测序结果在 NCBI 数据库中比对。

(2) Genome walking 获得 SP3 菌株 *nirS* 基因全序列及生物信息学分析: 根据测序获得亚硝酸盐还原酶基因序列, 分别设计 3 条退火温度较高的特异性引物 (SP1, SP2, SP3), 依据 TaKaRa Genome Walking Kit 的说明书对菌株 SP3 的 DNA 进行 3 次巢式 PCR 获得已知亚硝酸盐还原酶的侧翼序列, PCR 产物回收纯化后经克隆连接转化, 筛选阳性克隆进行菌落 PCR 后送华大基因有限公司测序。将新获得的序列和已经得到的 *nirS* 基因序列拼接得到 *nirS* 基因全序列。利用 <http://emboss.bioinformatics.nl/> 网站得到序列展示图, 通过 Protparam 服务器 (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>) 预测 *nirS* 蛋白质的基本理化性质。PROST 服务器 (<https://psort.hgc.jp/form.html>) 预测 *nirS* 蛋白质亚细胞定位。在 <http://swissmodel.expasy.org/> 里模拟并预测 *nirS* 的三维结构, 在 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 网站预测 SP3 菌株 *nirS* 蛋白功能域。

引物设计: 根据 SP3 菌株 *nirS* 基因全序列, 设计一对近 3' 端特异性引物 RT-*NirS-F*/RT-*NirS-R* (表 1) 用于荧光定量 PCR, 扩增片段长度为 157 bp。以已确立的 *hrdB* 作为内参基因^[50]。引物由华大基因科技有限公司合成。

1.2.7 检测 *nirS* 表达水平的荧光定量 PCR 方法的建立

目的基因引物扩增效率和特异性的确定: 取 2 mg/L 亚硝酸钠培养 3 d 的 SP3 菌体, 提取总 RNA 逆转录获得 cDNA, 并 10 倍梯度稀释作为模板, 3 个重复。用 RT-*NirS-F*/RT-*NirS-R* 引物, 荧光定量 PCR 反应体系: SYBR Green Realtime PCR Master Mix 10 μ L, RT-*NirS-R* (10 μ mol/L) 0.4 μ L, RT-*NirS-F* (10 μ mol/L) 0.4 μ L, cDNA 1 μ L 以及 ddH₂O 8.2 μ L。荧光定量 PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C

表 1 扩增引物

Table 1 Primers in this study

引物名称 Primer name	核酸序列 Nucleotide sequence (5'→3')	目的基因 Target gene	来源或参考文献 Sources or reference
<i>NirS-F</i>	CCTAYTGCCGCCRCART	<i>nirS</i>	[48]
<i>NirS-R</i>	CGTTGAACTTRCCGGT	<i>nirS</i>	[48]
<i>NirK-F</i>	GGMATGGTKCCSTGGCA	<i>nirK</i>	[49]
<i>NirK-R</i>	GCCTCGATCAGRT	<i>nirK</i>	[49]
SP1	GATGAGCGCCACCGAATCGT	1st Genome walking of <i>nirS</i>	This study
SP2	GGTGATCGCCGCCAGCTTGC	2nd Genome walking of <i>nirS</i>	This study
SP3	GGTATAGTCGACCAGCTGGATCT	3rd Genome walking of <i>nirS</i>	This study
RT- <i>NirS-F</i>	CCTGTGTGATTTCGCCCTGC	RT-PCR of <i>nirS</i>	This study
RT- <i>NirS-R</i>	AACCCCGAAACCGACATCTC	RT-PCR of <i>nirS</i>	This study
RT- <i>hrdB-F</i>	AGGACGGCGACAGCGAGTTC	RT-PCR of <i>hrdB</i>	[50]
RT- <i>hrdB-R</i>	CCGAAGCGCATGGAGACG	RT-PCR of <i>hrdB</i>	[50]

1 min; 95 °C 15 s, 59 °C 20 s, 75 °C 1 min, 40 个循环。熔解曲线分析: 起始温度 65 °C, 每 10 s 升温 0.5 °C, 80 个循环。根据标准曲线确定引物扩增效率, 熔解曲线确定引物特异性。

1.2.8 SP3 菌株 *nirS* 在去除氨氮和亚硝态氮过程中的表达水平动态

模板制备: Trizol 法提取冻存于液氮罐中 0.25 g/L 氯化铵培养的菌株 SP3 菌体样品、2 mg/L 亚硝酸钠培养的 SP3 菌体实验组样品和不加氮源培养的菌株 SP3 菌体对照组样本的总 RNA, 琼脂糖凝胶核酸电泳检验 RNA 提取质量。选取高质量的 RNA, 用酶标仪检测 RNA 的纯度 (OD_{260}/OD_{280})。参照 Promega 公司 M-MLV Reverse Transcriptase 的说明书将高质量的 RNA 逆转录成 cDNA。

荧光定量 PCR: 在 mRNA 水平检测菌株 SP3 的 *nirS* 在去除氨氮和亚硝态过程中的表达动态, 以 *hrdB* 作为内参基因, 同一批样品同时对 2 个基因进行荧光定量 PCR, 3 个重复, 收集荧光信号获得 C_t 值。依据相对荧光定量计算公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行数

据分析处理。

1.3 数据的统计分析

用 IBM SPSS Statistics 22.0 软件进行数据统计分析, 采用 OriginPro 8.0 软件进行数据作图。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定

2.1.1 16S rRNA 基因序列

测序得到 1 438 bp 的 16S rRNA 基因序列 (GenBank 登录号为 MH325212.1)。将菌株 SP3 的 16S rRNA 基因序列在 NCBI 数据库进行 BLAST 比对。比对结果表明菌株 SP3 的 16S rRNA 基因序列与外硫红螺菌属 (*Ectothiorhodospira*) 相似度高达 99%。采用邻接法构建系统发育进化树, 菌株 SP3 与外硫红螺菌属的沙氏外硫红螺菌 (*Ectothiorhodospira shaposhnikovii*) 聚为一支, 置信度为 99% (图 1)。

2.1.2 形态及革兰氏染色结果

SP3 菌株的菌落形态为深红色小圆球状, 边缘整齐光滑; 菌液呈红色。该菌为革兰氏阴性菌, 短杆状。

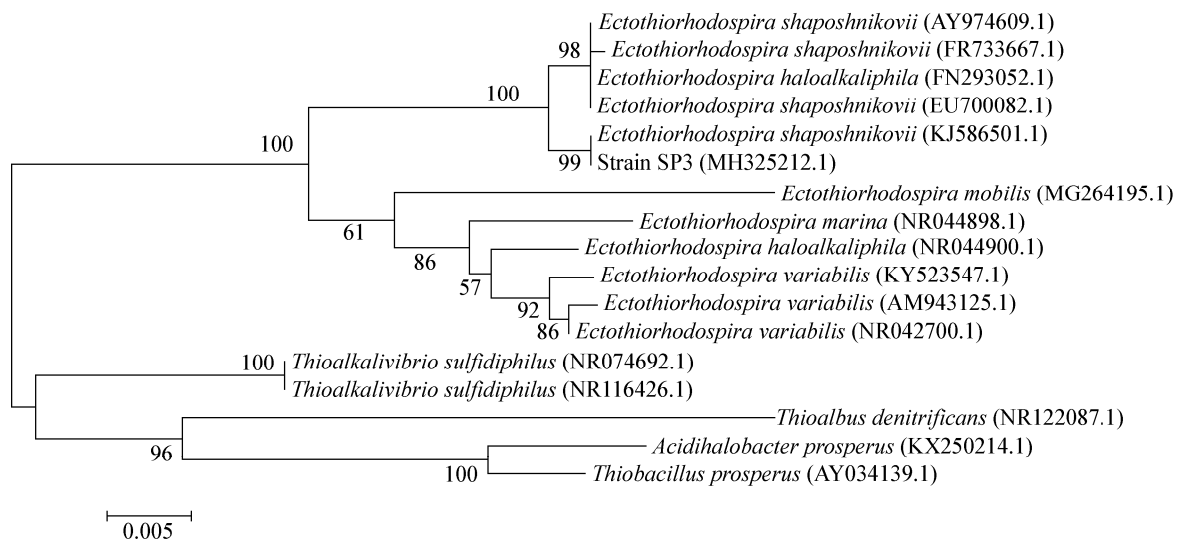


图 1 基于菌株 SP3 的 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Figure 1 The phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence

注: 分支点上的数字表示构建系统树时 1 000 次计算时形成该节点的百分比; 括号内为菌株的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中的登录号。

Note: Numbers at the branch nodes are bootstrap values, expressed as percentages of 1 000 replicates; Numbers in parentheses represent the accession numbers in GenBank for the 16S rRNA gene sequences of those type strains.

2.1.3 碳源利用结果

如表 2 所示, SP3 菌株和标准菌株沙氏外硫红螺菌对不同碳源的利用情况一致, 可以利用醋酸盐、丙酮酸盐、丙酸盐、丁酸盐、乳酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、苹果酸、果糖、葡萄糖作为碳源, 不能利用乙醇和丙醇。

2.1.4 无机电子供体的利用

菌株 SP3 和标准菌株均能以 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 、 Na_2SO_3 作为无机电子供体(表 3)。这一结果同样符合《伯杰氏细菌鉴定手册》(8 版)中 *E. shaposhnikovii* 对硫化合物的利用。

表 2 碳源利用情况

Table 2 Utilization of carbon sources

碳源 Carbon source	<i>Ectothiorhodospira shaposhnikovii</i>	SP3
醋酸盐 Acetate	+	+
丙酮酸盐 Pyruvate	+	+
丙酸盐 Propionate	+	+
丁酸盐 Butyrate	+	+
乳酸盐 Lactate	+	+
富马酸盐 Fumarate	+	+
琥珀酸盐 Succinate	+	+
苹果酸 Malate	+	+
果糖 Fructose	+	+
葡萄糖 Glucose	+	+
乙醇 Ethanol	-	-
丙醇 Propanol	-	-

注: 有机酸以钠盐的形式提供。+: 阳性反应; -: 阴性反应。

Note: Organic acids are provided in the form of sodium salt. +: Positive reaction; -: Negative reaction.

表 3 不同类型电子供体对光合细菌生长影响

Table 3 Effect of different electron donors on the growth of photosynthetic bacteria

电子供体 Electron donor	<i>Ectothiorhodospira shaposhnikovii</i>	SP3
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	+	+
$\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	+	+
Na_2SO_3	+	+

2.2 菌株 SP3 培养条件的优化

2.2.1 初始培养基 pH 对菌株 SP3 生长的影响

在不同 pH 的培养条件下, SP3 菌株生长状态不同。当 pH 7.5 时, OD_{600} 为 2.100 ± 0.015 , OD_{600} 达到最大值。当 $\text{pH} > 9.5$ 时, OD_{600} 低于 0.680 ± 0.001 。由图 2 可知, SP3 菌株适宜生长的 pH 范围为 6.0–8.5。

2.2.2 初始培养基盐度对菌株 SP3 生长的影响

在不同盐度下, SP3 菌株生长状态不同。当 NaCl (质量体积比) 浓度为 0.5% 时, OD_{600} 为 2.970 ± 0.013 , OD_{600} 达到最大值。当 NaCl (质量体积比) 浓度为 4% 时, OD_{600} 为 0.232 ± 0.012 。由图 3 可知 SP3 菌株适宜生长的盐度为 0–3%。

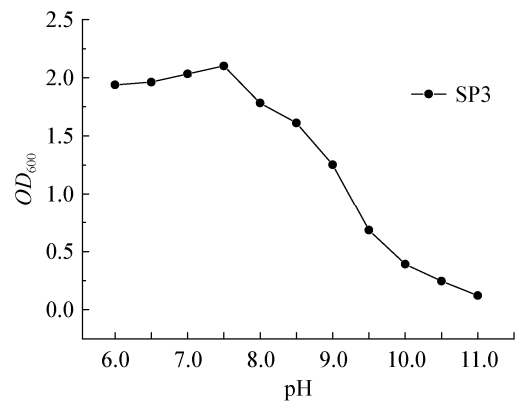


图 2 不同 pH 对 SP3 生长影响

Figure 2 Effects of different pH values on growth of SP3

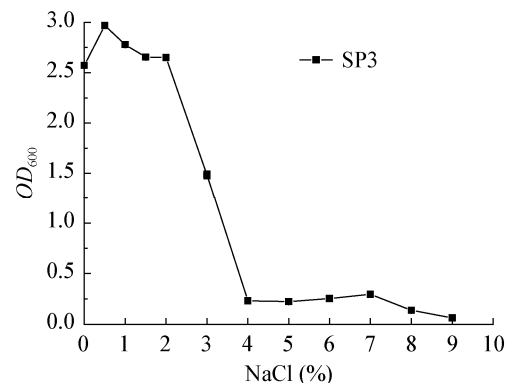


图 3 不同浓度 NaCl 对 SP3 生长的影响

Figure 3 Effects of different concentrations of NaCl on growth of SP3

2.3 单一氮源对菌株 SP3 生长的影响

2.3.1 氯化铵为唯一氮源时对菌株 SP3 生长的影响

如图 4 所示,以不加氮源(0 g/L)的培养基为对照组,菌株 SP3 以氯化铵为唯一氮源时, OD_{600} 由高到低依次是氯化铵浓度为 0.25、0.125、0.5、1.0、1.5 g/L。菌株 SP3 在氯化铵浓度为 0.25 g/L 的培养基中生长状态最佳, OD_{600} 在 6 d 达到最高,为 2.812 ± 0.001 。菌株 SP3 在氯化铵浓度为 1.5 g/L 的培养基中生长状态相对最差, OD_{600} 在 6 d 达到最高,为 2.435 ± 0.004 。

2.3.2 亚硝酸钠为唯一氮源时对菌株 SP3 生长的影响

以不加氮源的培养基作为对照组,当亚硝酸钠作为唯一氮源时,培养基中亚硝酸钠浓度大于 0.25 g/L 会抑制 SP3 菌株生长(图 5),而以低浓度

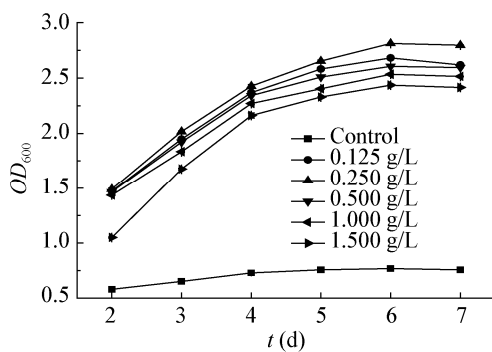


图 4 不同浓度 NH_4Cl 对菌株 SP3 生长的影响
Figure 4 Effects of different concentrations of NH_4Cl on growth of strain SP3

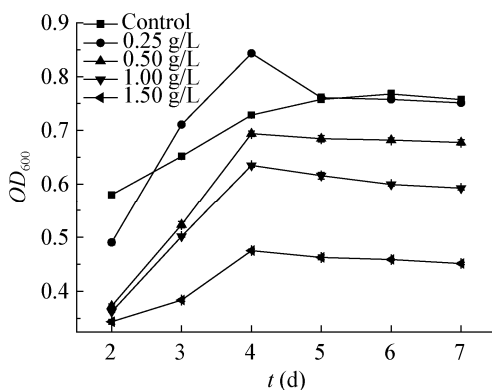


图 5 高浓度 NaNO_2 对菌株 SP3 生长的影响
Figure 5 Effect of high concentration of NaNO_2 on growth of strain SP3

的亚硝酸钠作为氮源,菌液呈粉红色, OD_{600} 由高到低依次是培养基中亚硝酸钠浓度为 2.0、1.0、0.5、4.0 mg/L (图 6)。SP3 菌株在亚硝酸钠浓度为 2.0 mg/L 的培养基中生长状态最佳, OD_{600} 在 6 d 达到最高,为 2.266 ± 0.004 。SP3 菌株在亚硝酸钠浓度为 4.0 mg/L 的培养基中生长状态相对最差, OD_{600} 在 6 d 达到最高,为 0.837 ± 0.003 。

2.4 菌株 SP3 对氨氮的去除

光合细菌初始浓度为 8.6×10^9 CFU/mL (双层平板计数的菌落平均值)。接种前(0 天),培养液中的氨氮含量为 $84.15 \text{ mg/L} \pm 0.58 \text{ mg/L}$ 。单因素方差分析结果表明,接种后第 1 天到第 4 天氨氮去除效果最显著,4 d 相互间氨氮累计去除量和累计去除率差异显著 ($P < 0.05$),接种第 1 天氨氮去除量最大,为 $50.13 \pm 1.89 \text{ mg/L}$,氨氮去除率为 $65.52\% \pm 0.02\%$ 。接种后第 5 天到第 7 天氨氮累计去除量和累计去除率相互间差异不显著;接种后第 7 天,氨氮累计去除量为 $79.45 \pm 0.29 \text{ mg/L}$,氨氮累计去除率为 $94.42\% \pm 0.00\%$ (表 4)。

2.5 菌株 SP3 对亚硝态氮的去除

在同种光合细菌初始浓度条件下,接种前(0 天)培养液中的亚硝态氮含量为 $1.31 \pm 0.00 \text{ mg/L}$ 。单因素方差分析结果表明,接种后第 1 天到第 3 天亚硝态氮去除效果最显著,这 3 天相互间亚硝态氮累计去除量和累计去除率差异显著 ($P < 0.05$),接种第 1 天,亚硝态氮去除量最大,为 $1.00 \pm 0.75 \text{ mg/L}$,

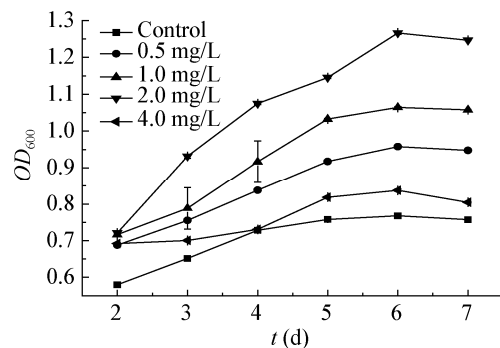


图 6 低浓度 NaNO_2 对菌株 SP3 生长的影响
Figure 6 Effects of low concentration of NaNO_2 on the growth of strain SP3

表 4 菌株 SP3 对氨氮的去除情况

Table 4 Removal of ammonia nitrogen by strain SP3

时间 Time (d)	氨氮含量		累计去除量 <i>c</i> Cumulative removal (mg/L)	累计去除率 <i>C</i> Cumulative removal percentage (%)
	Ammonia nitrogen content (mg/L)			
	对照组 Control group	实验组 Test group		
0	84.15±0.58	84.15±0.58		
1	83.65±0.29	28.52±1.89	50.13±1.89 a	65.52±0.02 a
2	82.65±1.04	18.41±2.04	64.24±2.04 b	76.35±0.03 b
3	81.91±1.75	10.42±1.44	71.48±1.44 c	84.95±0.02 c
4	81.57±1.32	6.27±1.32	75.30±1.32 d	89.49±0.02 d
5	81.32±1.32	2.95±0.76	78.37±0.76 e	93.13±0.01 e
6	80.66±1.25	1.29±0.50	79.37±0.50 e	94.32±0.01 e
7	80.08±1.32	0.63±0.29	79.45±0.29 e	94.42±0.00 e

注: 数据后不同小写字母分别表示存在显著性差异($P<0.05$)。

Note: Different lowercase letters are significantly at 0.05 probability level.

亚硝态氮去除率最高, 为 76.44%±0.06%。接种后第 3 天和第 4 天相互间的亚硝态氮累计去除量和累计去除率差异不显著; 接种后第 4 天, 氨氮累计去除量为 1.25±0.00 mg/L, 累计去除率为 95.20%±0.00%。接种后第 5 天, 培养液亚硝氮浓度低于最低检测限 0.003 mg/L (表 5)。

2.6 亚硝酸盐还原酶基因的克隆

以菌株 SP3 基因组 DNA 为模板, 先用针对两种亚硝酸盐还原酶基因 *nirS* 和 *nirK* 序列的引物扩增获得 PCR 产物, 克隆和测序获得 889 bp 的片段。以此为基础, 采用 Genome Walking 三重巢式 PCR 扩增获得的目标片段克隆测序, 通过与已知的 889 bp 中的重叠部分比对, 将新克隆测序片段与已知片段拼接在一起, 获得 1 404 bp 的序列(图 7A),

通过 BLAST 比对发现该序列与 *nirS* 基因的相似度最高, 属于亚硝酸盐还原酶基因 *nirS*。针对基因 *nirK* 的引物没有扩增出目标条带。*nirS* 基因开放阅读框为 1 299 bp, 编码 432 个氨基酸(图 7A), 其功能结构域的三维结构如图 7B, 预测 *nirS* 蛋白质相对分子质量为 46.99 kD, 理论等电点(PI)为 9.56, 该蛋白是一种胞浆蛋白。

2.7 *nirS* 荧光定量 PCR 引物扩增效率和特异性确定

标准曲线方程 $Y=-3.574X+2.328$, 相关系数(r)为 0.999, 且扩增效率为 90.4%, 满足要求($r>0.99$, $110%>Eff>90%$) (图 8)。*nirS* 引物扩增目的片段在温度为 94 °C 处出现单一的特异性峰, 无杂峰, 说明无非特异性扩增及引物二聚体出现(图 9)。

表 5 菌株 SP3 对亚硝氮的去除情况

Table 5 Removal of nitrite by strain SP3

时间 Time (d)	亚硝态氮含量		累计去除量 <i>r</i> Cumulative removal (mg/L)	累计去除率 <i>R</i> Cumulative removal percentage (%)
	Nitrogen content (mg/L)			
	对照组 Control group	实验组 Test group		
0	1.31±0.00	1.31±0.00		
1	1.30±0.01	0.30±0.08	1.00±0.75 a	76.44±0.06 a
2	1.30±0.01	0.17±0.03	1.14±0.03 b	86.57±0.02 b
3	1.29±0.00	0.05±0.02	1.24±0.02 c	94.75±0.01 c
4	1.29±0.00	0.04±0.01	1.25±0.00 c	95.20±0.00 c
5	1.29±0.00	低于检测限		

注: 数据后不同小写字母分别表示存在水平显著性差异($P<0.05$)。

Note: Different lowercase letters are significantly at 0.05 probability level.

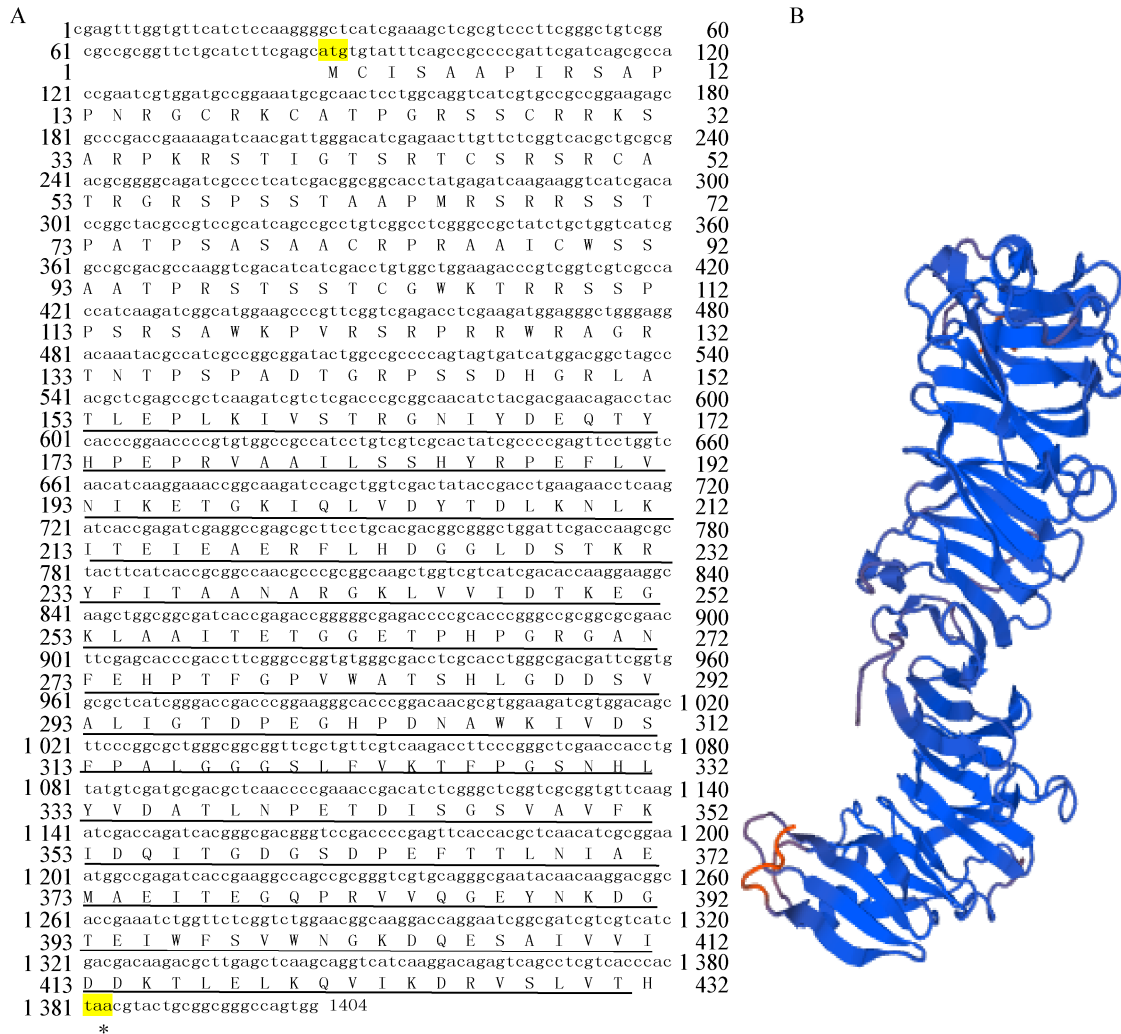


图 7 菌株 SP3 *nirS* 基因及其编码的氨基酸序列(A)和功能结构域三维结构(B)

Figure 7 The strain SP3 *nirS* gene sequence and deduced amino acid sequence (A) as well as the deduced three dimensional structure (B) of the functional domain encoded by *nirS* gene

注：A 中黄色 atg 编码起始密码子，黄色 taa 编码终止密码子；翻译终止密码子用星号(*)表示；下划线编码 B 中功能结构域。

Note: In A, the yellow atg is the initiation codon, the yellow taa encodes the terminator; The translation stop codon is represented by an asterisk (*); The underline encodes the functional domain of B.

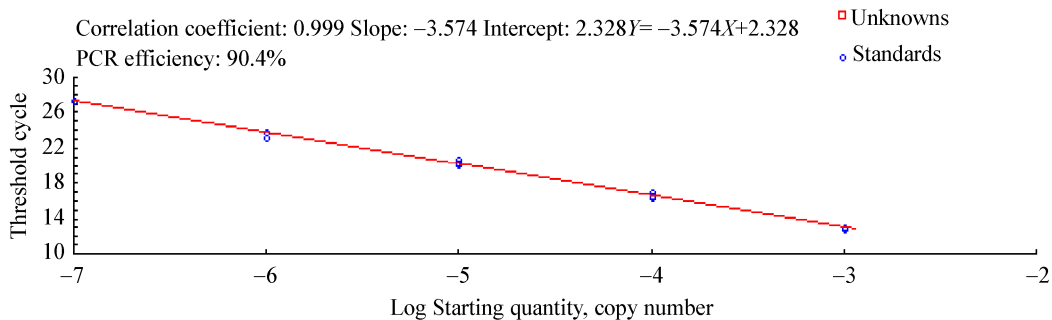
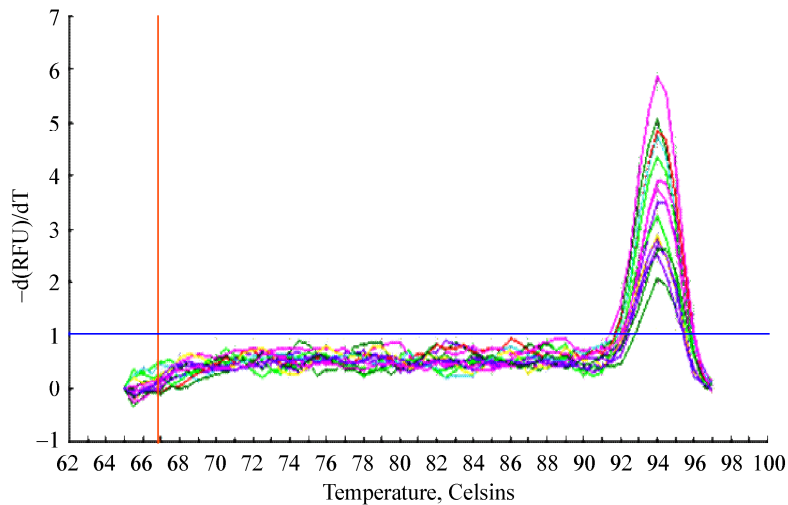


图 8 *nirS* 引物扩增标准曲线

Figure 8 The standard curve of amplification with *nirS* primers

图9 *nirS* 引物扩增熔链曲线Figure 9 The melt curve of products amplified with *nirS* primers

2.8 *nirS* 在 SP3 菌株去除氨氮、亚硝态氮过程中的表达动态

2.8.1 *nirS* 在 SP3 菌株去除氨氮过程中的表达动态

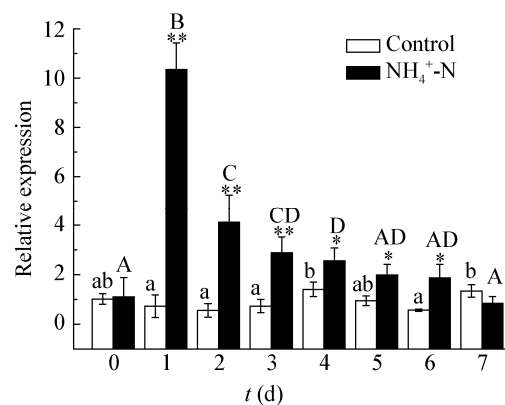
在 SP3 菌株去除氨氮过程中, *nirS* 表达水平呈先迅速升高达峰值, 再降到对照水平这样的模式, 接种后第 1 天到第 3 天 *nirS* 表达量极显著高于对照组 ($P < 0.01$), 接种后第 4 天到第 6 天, *nirS* 表达量显著高于对照 ($P < 0.05$) (图 10), 至第 7 天 *nirS* 表达量与对照间无显著差异。

2.8.2 *nirS* 在 SP3 菌株去除亚硝态氮过程中的表达动态

在 SP3 菌株去除亚硝态氮的过程中, *nirS* 表达水平也是先迅速升高达峰值, 再降到对照水平, 接种后第 1 天到第 3 天 *nirS* 表达量极显著高于对照组 ($P < 0.01$), 接种后第 4 天 *nirS* 表达量显著高于对照 ($P < 0.05$), 至第 5 天 *nirS* 表达量与对照间无异 (图 11)。

3 讨论与结论

由美国微生物学会发起编写的伯杰氏分类系统是目前国际上普遍接受采用的细菌分类系统。《伯杰氏细菌鉴定手册》最初主要根据细菌的形态学和一系列生理生化指标进行系统分类, 在后续再版发行的过程中, 逐步增加了 16S rRNA 基因序列

图 10 受氨氮处理和未处理(对照)的 SP3 菌株 *nirS* 的 mRNA 表达水平Figure 10 The mRNA expression levels of *nirS* in strain SP3 treated with ammonia nitrogen in comparison with those of the SP3 untreated in the control group

注: 白色柱: 对照组, 即不加氮源; 黑色柱: 氨氮处理组; 所有数值均以平均值±标准偏差(n=3)表示; 星号: 该值与其对照值显著或极显著不同(*: $P < 0.05$ 和 **: $P < 0.01$). 不同大(小)写字母代表实验组(对照组)值具有显著差异, 相同字母表示无显著差异。

Note: The white column represents the control group, i.e., no nitrogen source, and the black column represents the ammonia nitrogen treatment group; All values are expressed as mean ± standard deviation (n=3); An asterisk indicates that the value is significantly (*: $P < 0.05$) or very significantly (**: $P < 0.01$) different from its control value. Different capital (lowercase) letters represent significant differences among the experimental group (control group) values, and the same letters indicate no significant difference.

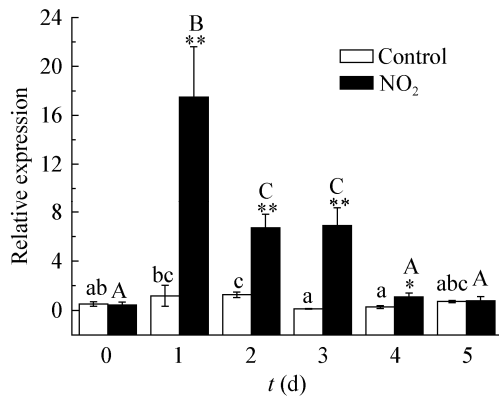


图 11 受亚硝态氮处理和未处理(对照)的 SP3 菌株 *nirS* 的 mRNA 表达水平

Figure 11 The mRNA expression levels of *nirS* in strain SP3 treated with nitrite in comparison with those of the SP3 untreated in the control group

注: 白色柱: 对照组, 即不加氮源; 黑色柱表示亚硝氮处理组; 所有数值均以平均值±标准偏差(n=3)表示; 星号: 该值与其对照值显著或极显著不同(*: $P<0.05$ 和 **: $P<0.01$). 不同大(小)写字母代表实验组(对照组)值具有显著差异, 相同字母表示无显著差异。

Note: The white column represents the control group, i.e., no nitrogen source, and the black column represents the nitrite treatment group; All values are expressed as mean ± standard deviation (n=3); An asterisk indicates that the value is significantly (* $P<0.05$) or very significantly (** $P<0.01$) different from its control value. Different capital (lowercase) letters represent significant differences among the experimental group (control group) values, and the same letters indicate no significant difference.

分析、富集和分离方法、DNA 中(G+C)mol%等遗传信息、化学分类、生态学、分类学评论以及关键特征鉴定表等更多信息^[51]。16S rDNA 是细菌遗传物质中编码 16S rRNA 基因的一段 DNA 序列, 序列保守性较高, 已广泛用于细菌属种鉴定^[52]。本研究采用伯杰氏分类鉴定方法结合 16S rRNA 基因序列聚类分析对光合细菌 SP3 进行种属鉴定。

菌株 SP3 的 16S rRNA 基因序列系统发育树分析结果显示其与沙氏外硫红螺菌(*E. shaposhnikovii*, GenBank 登录号 KJ566501.1)聚为一支, 置信度为 99%, 由此可推断 SP3 菌株属于外硫红螺菌属。本次生理生化特性鉴定结果显示, SP3 菌株与标准菌株沙氏外硫红螺菌对不同碳源和无机电子受体利

用情况一致, 也与《伯杰氏细菌鉴定手册》中对沙氏外硫红螺菌记录的生理生化指标、形态学描述和革兰氏染色结果一致。综合形态、生理生化指标和 16S rRNA 基因序列鉴定结果, 确定菌株 SP3 为沙氏外硫红螺菌(*E. shaposhnikovii*)。

沙氏外硫红螺菌(*E. shaposhnikovii*)在分类学上隶属于变形菌门(*Proteobacteria*) γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)着色菌目(*Chromatiales*)外硫红螺菌科(*Ectothiorhodospiraceae*)外硫红螺菌属(*Ectothiorhodospira*)^[53]。外硫红螺菌能在缺氧有光照的条件下, 以还原的硫化物作为电子供体, 或者以有机化合物为光异养体进行光合自养生长, 硫化物被氧化成为硫酸盐作为一种中间产物和单质硫一起沉积在细胞外^[53]。外硫红螺菌科分为外硫红螺菌属(*Ectothiorhodospira*)、红硫杆菌属(*Thiorhodospira*)和盐红螺菌属(*Halorhodospira*)三个能将硫粒沉积在细胞外部的光合营养细菌属^[54]。外硫红螺菌属中不同种对盐度的耐受范围不同, *H. halophila*, *H. halochloris* 和 *H. abdelmalekii* 由于极度嗜盐($\geq 10\%$)被移出外硫红螺菌属, 归为盐红螺菌属(*Halorhodospira*)^[55]。活动外硫红螺菌(*E. mobilis*)的适宜盐度范围为 2%–3%^[56], 菌株 SP3 最适盐度为 0.5%, 适宜盐度范围为 0%–3%。可见菌株 SP3 耐盐范围广, 能适应绝大多数淡水和海水养殖水体的盐度条件。

pH 是水产养殖用水的重要水质指标之一, 养殖水体的 pH<5.0 或者 pH>9.0 都会使养殖鱼类血液 pH 异常, 血液缓冲系统失衡, 影响呼吸甚至引起死亡^[57]。我国渔业水质标准规定, 养殖用淡水的适宜 pH 值范围是 6.5–8.5, 海水 pH 为 7.0–8.5^[4]。李瑞萍等调查的湖北宜东平原 34 个分散鱼塘养殖水体 pH 范围为 7.26–8.96, 水体酸碱度差异较小且均为弱碱性水体^[58]。而养殖水体中的 pH 不受光合细菌影响^[59], 并且绝大多数的光合细菌偏好弱碱性环境^[60–62]。菌株 SP3 的适宜生长 pH 范围是 6.0–9.0, 与养殖用水的 pH 范围基本一致, 菌株

SP3 适合在养殖水体中使用。

尽管发现有少数细菌同时具有亚硝酸盐还原酶基因 *nirS* 和 *nirK*, 如慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium nitroreducens*)^[63]和假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)^[64], 但是多数微生物只含有 *nirS* 或 *nirK*。本研究表明沙氏外硫红螺菌 SP3 只含有一种编码亚硝酸盐还原酶基因 *nirS*。在沙氏外硫红螺菌 SP3 去除氨氮或亚硝态氮过程中, *nirS* 的表达水平的变化模式与氨氮或亚硝态氮的累计去除量的变化模式相一致, 即都是第一天迅速上升, 然后快速下降, 最后与对照无显著区别, 这说明 *nirS* 在氨氮或亚硝态氮去除过程中发挥了重要作用。该研究结果与 Wittorf 等的发现一致, 即单胞菌(*P. stutzeri*)去除硝态氮时, 其 *nirS* 的表达量上调^[64]。其原因可能是氨氮可通过氨单加氧酶和羟基氧化还原酶的作用产生亚硝态氮; 同时, 硝态氮在硝酸还原酶作用下产生亚硝态氮, 不同来源的亚硝态氮能被亚硝酸盐还原酶(*nirS*)降解产生一氧化氮, 该分子再经氧化氮还原酶、氧化亚氮还原酶转化为氮气进入空气中, 起到脱氮作用, 在这里亚硝酸盐还原酶具有限速作用, 是整个脱氮过程的关键酶。

有研究表明, 在虾苗的培育过程中加入沙氏外硫红螺菌有利于改善水质^[65]。沙氏外硫红螺菌对 Na_2S 有较高的耐受度, 在 Na_2S 初始浓度为 227.6 mg/L 的培养基中培养 6 d, Na_2S 转化率达到 66.9%^[66]。沙氏外硫红螺菌形成的胞外生物聚合物对水体重金属具有很强吸附力, 在铜、锌离子初始浓度分别为 2 000 mg/L 的两种水溶液中, 铜离子的去除率达到 96.5%, 锌离子的去除率达到 95%^[67]。林启存等分离获得的沙氏外硫红螺菌株对养殖水体中的 COD、总氮、氨氮、亚硝酸氮去除率分别为 57.38%、45.34%、48.63%和 27.91%^[68]。本研究发现菌株 SP3 能以氯化铵、亚硝酸钠为氮源, 并且在铵盐中能够生长良好, 同时也可以高效去除水体中的氨氮和亚硝态氮, SP3 经过 7 d 对水体氨氮去除率达到 94.42%, 经过 5 d 将培养基中 2 mg/L

的亚硝酸钠去除到检测限(0.003 mg/L)以下, 表明菌株 SP3 有极好的去除水体氮源的潜能。SP3 菌株去除氮源的能力较林启存等^[68]分离的外硫红螺菌强, 这说明 SP3 是一株良好的可用于净化养殖水环境的沙氏外硫红螺菌。

菌株 SP3 具有广泛的盐度和 pH 适应范围, 能用于淡水和海水养殖环境有效去除氨氮和亚硝态氮, 在养殖水环境净化中有广阔应用前景。

REFERENCES

- [1] Food and Agriculture Organization of the United Nations. State of World Fisheries and Aquaculture[M]. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2018: 26-54 (in Chinese)
联合国粮食及农业组织. 世界渔业和水产养殖状况[M]. 罗马: 联合国粮食及农业组织, 2018: 26-54
- [2] Preparation by the Ministry of Agriculture, Fisheries and Fisheries. 2017 China Fishery Statistical Yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2017: 1-15 (in Chinese)
农业部渔业渔政管理局. 2017 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2017: 1-15
- [3] Emerson K, Russo RC, Lund RE, et al. Aqueous ammonia equilibrium calculations: effect of pH and temperature[J]. Journal of the Fisheries Board of Canada, 1975, 32(12): 2379-2383
- [4] Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. GB 11607-1989 Water quality standard for fisheries[S]. Beijing: Standards Press of China, 1989 (in Chinese)
农业部. GB 11607-1989 渔业水质标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 1989
- [5] Qiao SF, Liu HY, Jin XY, et al. Ammonia accumulation hazards and bioavailability in aquaculture waters[J]. Hebei Fisheries, 2006(1): 20-22 (in Chinese)
乔顺风, 刘恒义, 靳秀云, 等. 养殖水体氨氮积累危害与生物利用[J]. 河北渔业, 2006(1): 20-22
- [6] Zhang JF, Li RW, Liu JF, et al. Accumulation of ammonia nitrogen: Harm and biological control[J]. Hebei Fisheries, 2009(6): 41-44 (in Chinese)
张进凤, 李瑞伟, 刘杰凤, 等. 淡水养殖水体氨氮积累危害及生物控制的研究现状[J]. 河北渔业, 2009(6): 41-44
- [7] Peng L, Ngo HH, Guo WS, et al. A novel mechanistic model for nitrogen removal in algal-bacterial photo sequencing batch reactors[J]. Bioresource Technology, 2018, 267: 502-509
- [8] Luo LH. Research process on the now existing denitrogenation of highly concentrated ammonium-nitrogen wastewater[J]. Sichuan Chemical Industry, 2011, 14(6): 38-42 (in Chinese)
罗龙海. 高浓度氨氮废水处理技术研究进展[J]. 四川化工, 2011, 14(6): 38-42

- [9] Dong YB, Dai YY. Research survey of toxic effects of nitrite to aquatic animals[J]. Journal of Aquaculture, 2011, 32(4): 28-32 (in Chinese)
董玉波, 戴媛媛. 亚硝酸盐氮对水产经济动物毒性影响的研究概况[J]. 水产养殖, 2011, 32(4): 28-32
- [10] Wang SQ, Wang FZ, Wang S. Talking about the toxicity of nitrite and its control measures[J]. Fishery Guide to be Rich, 2007(20): 59 (in Chinese)
王圣强, 王甫珍, 王苏. 浅谈亚硝酸盐的毒性及防治措施[J]. 渔业致富指南, 2007(20): 59
- [11] Chen H, Zhang DM, Wang LG, et al. Biological characteristics and phylogenetic analysis of a denitrifying photosynthetic bacterium[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(2): 249-255 (in Chinese)
陈慧, 张德民, 王龙刚, 等. 一株反硝化光合细菌的生物学特性及系统发育分析[J]. 微生物学报, 2011, 51(2): 249-255
- [12] Gao MH, Ma LB, Ge LA, et al. Nitrite uptake mechanism and the influencing factors of accumulation in aquatic animals[J]. South China Fisheries Science, 2008, 4(4): 73-79 (in Chinese)
高明辉, 马立保, 葛立安, 等. 亚硝酸盐在水生动物体内的吸收机制及蓄积的影响因素[J]. 南方水产, 2008, 4(4): 73-79
- [13] Jones CM, Stres B, Rosenquist M, et al. Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification[J]. Molecular Biology and Evolution, 2008, 25(9): 1955-1966
- [14] Yakimov MM, La Cono V, Smedile F, et al. Contribution of crenarchaeal autotrophic ammonia oxidizers to the dark primary production in Tyrrhenian deep waters (Central Mediterranean Sea)[J]. The ISME Journal, 2011, 5(6): 945-961
- [15] Theerachai M, Virunanon C, Chulalaksananukul S, et al. *NirK* and *nirS* nitrite reductase genes from non-agricultural forest soil bacteria in Thailand[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 27(4): 999-1003
- [16] Olmo-Mira MF, Cabello P, Pino C, et al. Expression and characterization of the assimilatory NADH-nitrite reductase from the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1[J]. Archives of Microbiology, 2006, 186(4): 339-344
- [17] Einsle O, Messerschmidt A, Stach P, et al. Structure of cytochrome *c* nitrite reductase[J]. Nature, 1999, 400(6743): 476-480
- [18] Hirasawa M, Tripathy JN, Sommer F, et al. Enzymatic properties of the ferredoxin-dependent nitrite reductase from *Chlamydomonas reinhardtii*. Evidence for hydroxylamine as a late intermediate in ammonia production[J]. Photosynthesis Research, 2010, 103(2): 67-77
- [19] Sharma S, Aneja MK, Mayer J, et al. Diversity of transcripts of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) in rhizospheres of grain legumes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(4): 2001-2007
- [20] Braker G, Zhou JZ, Wu LY, et al. Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific Northwest marine sediment communities[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(5): 2096-2104
- [21] Xi YF, Zhang MJ, Huang XS, et al. Isolation and identification of a photosynthetic bacteria strain and its ability of denitrification[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(27): 14847-14849, 14875 (in Chinese)
席寅峰, 张孟婧, 黄小帅, 等. 1株光合细菌的分离鉴定及其脱氮能力研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(27): 14847-14849, 14875
- [22] Hu ZY. Isolation and identification of marine photosynthetic bacteria and their application in the ornamental fish[D]. Qingdao: Master's Thesis of Ocean University of China, 2007 (in Chinese)
胡宗云. 海洋光合细菌分离鉴定及其在观赏鱼中的应用[D]. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2007
- [23] Ji HP, Li J. The application of photosynthetic bacteria[J]. Progress in Biotechnology, 1997, 17(4): 46-50 (in Chinese)
吉海平, 李君. 光合细菌应用动态[J]. 生物工程进展, 1997, 17(4): 46-50
- [24] He CH. Research on separation, identification, growth conditions of photosynthetic bacteria and application pretest[D]. Harbin: Master's Thesis of Harbin Institute of Technology, 2009 (in Chinese)
何春华. 光合细菌的分离鉴定和生长条件优化及应用初探[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学硕士学位论文, 2009
- [25] Meng F, Zhang GM, Yang AQ, et al. Bioconversion of wastewater by photosynthetic bacteria: nitrogen source range, fundamental kinetics of nitrogen removal, and biomass accumulation[J]. Bioresource Technology Reports, 2018, 4: 9-15
- [26] Huang XF, Li CJ, Zhang FJ. Characteristics of photosynthetic bacteria and its application in wastewater treatment[J]. China Biogas, 2005, 23(1): 29-35 (in Chinese)
黄翔峰, 李春鞠, 章非娟. 光合细菌的特性及其在废水处理中的应用[J]. 中国沼气, 2005, 23(1): 29-35
- [27] Wang S. Degradation of aniline by photosynthetic bacteria[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University of Technology, 2011 (in Chinese)
王帅. 光合细菌降解苯胺废水的研究[D]. 杭州: 浙江工业大学硕士学位论文, 2011
- [28] Lu YF. Experimental study of food processing wastewater treatment by photosynthetic bacteria[D]. Harbin: Master's Thesis of Harbin Institute of Technology, 2012 (in Chinese)
卢玉凤. 光合细菌处理食品加工废水试验研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学硕士学位论文, 2012
- [29] Sun T, Li LS. Removal of nitrogen and phosphorus in wastewater using photosynthetic bacteria immobilized on activated carbon[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2006, 25(S1): 211-213 (in Chinese)
孙涛, 李兰生. 活性炭固定化对光合细菌去除废水中氮磷的研究[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(S1): 211-213
- [30] Liu HL, Zhang ZF, Li CL, et al. Effect of photosynthetic bacteria on tilapia based on water quality and disease resistance[J]. Fishery Modernization, 2009, 36(2): 47-51 (in Chinese)
刘慧玲, 张战锋, 李长玲, 等. 光合细菌对罗非鱼鱼苗养殖水质及抗病力的影响[J]. 渔业现代化, 2009, 36(2): 47-51

- [31] Fang WD, Tang X, He JL, et al. The isolation of PSB strain FP04 and its effect on culture water quality and harvest of *Trionyx sinensis*[J]. Journal of Aquaculture, 2012, 33(4): 12-16 (in Chinese)
方卫东, 唐旭, 何建林, 等. 光合细菌 FP04 的筛选及对中华鳖养殖水质和生产效益的影响[J]. 水产养殖, 2012, 33(4): 12-16
- [32] Ding AZ, Chen FZ, Lei JQ, et al. Water quality for aquiculture improved by photosynthetic bacteria[J]. Agro-Environmental Protection, 2000, 19(6): 339-341,344 (in Chinese)
丁爱中, 陈繁忠, 雷剑泉, 等. 光合细菌调控水产养殖业水质的研究[J]. 农业环境保护, 2000, 19(6): 339-341,344
- [33] Feng YL. The basic research on application of marine photosynthetic bacteria in aquaculture[D]. Harbin: Master's Thesis of Harbin Institute of Technology, 2017 (in Chinese)
冯亚利. 海洋光合细菌在水产养殖中的应用基础研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学硕士学位论文, 2017
- [34] Wang H, Wang JW, Du G. Preliminary study on microbial autotrophic nitrogen removal in aquaculture water[J]. Journal of Fisheries Science, 2010, 29(5): 295-298 (in Chinese)
王华, 王京伟, 杜刚. 养殖水体中微生物全程自养脱氮初步研究[J]. 水产科学, 2010, 29(5): 295-298
- [35] Liu M. Nitrogen and phosphate assimilation capacity of a photosynthetic strain[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2011 (in Chinese)
刘敏. 一株光合细菌氮磷同化能力的研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2011
- [36] Yu PF, Wang LH, Zhan PR. Separation, characterization and immobilization of photobacteria in PVA vectors and application of it in cleaning water of fish pool[J]. Biotechnology, 1995, 5(3): 35-36,44 (in Chinese)
于沛芬, 王丽华, 战培荣. 光合细菌的分离、鉴定和固定化及其在净化鱼池水质中的应用研究[J]. 生物技术, 1995, 5(3): 35-36,44
- [37] Jiang P, Zhao CG, Jia YQ, et al. Inorganic nitrogen removal by a marine purple sulfur bacterium capable of growth on nitrite as sole nitrogen source[J]. Microbiology China, 2014, 41(5): 824-831 (in Chinese)
蒋鹏, 赵春贵, 贾雅琼, 等. 以亚硝氮为唯一氮源生长的海洋紫色硫细菌去除无机三态氮[J]. 微生物学通报, 2014, 41(5): 824-831
- [38] Wang L, Liao LH. Separation and identification of photosynthetic bacteria (PSB) and purifying effection aquiculture water[J]. Journal of Microbiology, 2004, 24(2): 7-9,37 (in Chinese)
王兰, 廖丽华. 光合细菌的分离鉴定及对养殖水的净化研究[J]. 微生物学杂志, 2004, 24(2): 7-9,37
- [39] Yu JA, Zhang CK, Chen F, et al. Denitration of photosynthetic bacteria P₄ strain[J]. Journal of Shanghai Jiaotong University, 2000, 34(11): 1579-1582,1597 (in Chinese)
俞吉安, 张承康, 陈峰, 等. 光合细菌 P₄ 株的反硝化作用[J]. 上海交通大学学报, 2000, 34(11): 1579-1582,1597
- [40] Xu SN, Qiu HD, Lin J, et al. On the isolation, identification and function of purple nonsulfur photosynthetic bacteria[J]. Journal of Fuzhou University (Natural Science), 2004, 32(2): 246-251 (in Chinese)
徐姗楠, 邱宏端, 林娟, 等. 紫色非硫光合细菌的分离鉴定及其功能研究[J]. 福州大学学报: 自然科学版, 2004, 32(2): 246-251
- [41] Li X, Wang YH, Zhang SL, et al. Enhancement of phototrophic hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* ZX-5 using a novel strategy — shaking and extra-light supplementation approach[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2009, 34(24): 9677-9685
- [42] Carlozzi P, Pushparaj B, Degl'Innocenti A, et al. Growth characteristics of *Rhodospseudomonas palustris*, cultured outdoors, in an underwater tubular photobioreactor, and investigation on photosynthetic efficiency[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 73(4): 789-795
- [43] Jiang HC, Dong HL, Zhang GX, et al. Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(6): 3832-3845
- [44] Dong XZ, Cai MY. Handbook of Identification of Common Bacterial Systems[M]. Beijing: Science Press, 2001: 19-398 (in Chinese)
东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 19-398
- [45] Liu Y, Wang YJ, Cao F, et al. Research on photosynthetic bacteria culture[J]. Journal of Dalian Institute of Light Industry, 1993, 12(2): 37-41 (in Chinese)
刘茵, 王运吉, 曹方, 等. 光合细菌培养研究[J]. 大连轻工业学院学报, 1993, 12(2): 37-41
- [46] National Environmental Protection Agency. GB/T 7479-1987. Water quality — Determination of ammonium — Nessler's reagent colorimetric method[S]. Beijing: Standards Press of China, 1987 (in Chinese)
国家环境保护局. GB/T 7479-1987 水质 铵的测定 纳氏试剂比色法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1987
- [47] State Environmental Protection Administration. GB/T 7493-1987, Water quality—Determination of nitrogen (nitrite); Spectrophotometric method[S]. Beijing: Standards Press of China, 1987 (in Chinese)
国家环境保护总局. GB/T 7493-1987, 水质 亚硝酸盐氮的测定 分光光度法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1987
- [48] Sarkar J, Kazy SK, Gupta A, et al. Biostimulation of indigenous microbial community for bioremediation of petroleum refinery sludge[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1407
- [49] Zhang X, He LM, Zhang FL, et al. The different potential of sponge bacterial symbionts in N₂ release indicated by the phylogenetic diversity and abundance analyses of denitrification genes, *nirK* and *nosZ*[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e65142

- [50] Yan L, Zhang QZ, Virolle MJ, et al. In conditions of over-expression, WblI, a WhiB-like transcriptional regulator, has a positive impact on the weak antibiotic production of *Streptomyces lividans* TK24[J]. PLoS One, 2017, 12(3): e0174781
- [51] Yang SP, Lin ZH, Cui XH, et al. Current taxonomy of anoxygenic phototrophic bacteria — a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(11): 1562-1566 (in Chinese)
杨素萍, 林志华, 崔小华, 等. 不产氧光合细菌的分类学进展[J]. 微生物学报, 2008, 48(11): 1562-1566
- [52] Muyzer G, Teske A, Wirsén CO, et al. Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments[J]. Archives of Microbiology, 1995, 164(3): 165-172
- [53] Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, et al. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. Vol.2. Part B[M]. 2nd ed. New York: Springer, 2005: 41-48
- [54] Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, et al. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. Vol.2. Part A[M]. 2nd ed. New York: Springer, 2005: 131
- [55] Imhoff JF, Süling J. The phylogenetic relationship among *Ectothiorhodospiraceae*: a reevaluation of their taxonomy on the basis of 16S rDNA analyses[J]. Archives of Microbiology, 1996, 165(2): 106-113
- [56] Trüper HG. *Ectothiorhodospira mobilis* Pelsh, a photosynthetic sulfur bacterium depositing sulfur outside the cells[J]. Journal of Bacteriology, 1968, 95(5): 1910-1920
- [57] Deng XH. The fishery produces the pH value function and adjustment[J]. Hebei Fisheries, 2008(2): 4-6 (in Chinese)
邓希海. 养殖水体中 pH 值的作用及调节[J]. 河北渔业, 2008(2): 4-6
- [58] Li RP, Zhang XX, Liu Z, et al. Distribution characteristics and relationships of pH, nutrients, chlorophyll a and three sulfonamides in pond aquaculture water[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2015, 9(6): 2582-2588 (in Chinese)
李瑞萍, 张欣欣, 刘卓, 等. 池塘养殖水体 pH、营养盐、叶绿素 a 及 3 种磺胺类抗生素分布特征及其相关性分析[J]. 环境工程学报, 2015, 9(6): 2582-2588
- [59] Wei YL. The culture and application of the photosynthetic bacteria (PSB)[J]. Life Science Instruments, 2007, 5(3): 27-30 (in Chinese)
魏玉利. 光合细菌的培养及应用[J]. 生命科学仪器, 2007, 5(3): 27-30
- [60] Zhang FF, Zhou K, Zhao YJ, et al. Study on culture condition of photosynthetic bacteria[J]. Tianjin Agricultural Sciences, 2009, 15(2): 9-11 (in Chinese)
张峰峰, 周可, 赵玉洁, 等. 光合细菌培养条件的研究[J]. 天津农业科学, 2009, 15(2): 9-11
- [61] Xie HG, Wang SF, Chu R. Experimental cultivation of photosynthetic bacteria for wastewater treatment[J]. Environmental Science & Technology, 2007, 30(5): 19-20 (in Chinese)
谢红刚, 王三反, 褚润. 光合细菌培养条件的研究[J]. 环境科学与技术, 2007, 30(5): 19-20
- [62] Wang XJ, Wang QY. Study on culture condition and application of photosynthetic bacteria[J]. Journal of Xinyang Teachers College (Natural Science Edition), 1994, 7(2): 208-211 (in Chinese)
王小君, 王清义. 光合细菌培养条件及其应用的研究[J]. 信阳师范学院学报: 自然科学版, 1994, 7(2): 208-211
- [63] Jang J, Ashida N, Kai A, et al. Presence of Cu-type (*NirK*) and *cdI*-type (*NirS*) nitrite reductase genes in the denitrifying bacterium *Bradyrhizobium nitroreducens* sp. nov.[J]. Microbes and Environments, 2018, 33(3): 326-331
- [64] Wittorf L, Jones CM, Bonilla-Rosso G, et al. Expression of *nirK* and *nirS* genes in two strains of *Pseudomonas stutzeri* harbouring both types of NO-forming nitrite reductases[J]. Research in Microbiology, 2018, 169(6): 343-347
- [65] Wen CQ, Xue M, Liang HF, et al. Beneficial effects of *Ectothiorhodospira shaposhnikovii* WF on larval cultivation of *Litopenaeus vannamei*[J]. Beneficial Microbes, 2015, 6(4): 529-533
- [66] Liu JF, Huang Y, Liu ZH, et al. Isolation, identification and characterization of a *Ectothiorhodospira* sp. from mangrove[J]. Environmental Science & Technology, 2018, 41(2): 8-12 (in Chinese)
刘杰凤, 黄瑶, 刘正辉, 等. 1 株红树林外硫红螺菌的分离鉴定及其特性[J]. 环境科学与技术, 2018, 41(2): 8-12
- [67] Tian JM. Using the biopolymer of microorganism *Ectothiorhodospira shaposhnikovii* to remove of heavy metals from waste waters[J]. Journal of Taiyuan University of Technology, 1999, 30(2): 175-178 (in Chinese)
田建民. 用微生物外红硫螺菌属形成的生物聚合物去除废水中的重金属[J]. 太原理工大学学报, 1999, 30(2): 175-178
- [68] Lin QC, Zhu LM, Shen XH, et al. Isolation and identification of a photosynthetic bacterium[J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2017, 58(8): 1444-1446 (in Chinese)
林启存, 朱丽敏, 沈小红, 等. 一株光合细菌的分离与鉴定[J]. 浙江农业科学, 2017, 58(8): 1444-1446