

盐碱地中 1 株硝化细菌的分离、鉴定及其硝化能力的分析

陆洪省, 赵晓舒, 王亚舒, 张如玉, 刘月月

(山东科技大学化学与环境工程学院, 青岛 266590)

摘要: 从黄河三角洲盐碱地土壤中分离到一株异养高效硝化细菌, 对该菌株外部形态、生理生化性质、16S rDNA 序列、硝化能力等方面进行分析。结果表明, 该菌株为革兰氏阴性菌、杆状、能以葡萄糖、蔗糖等为碳源生长, 最适生长 pH 为 9; 16S rDNA 基因序列分析表明, 该菌株与 *Pseudomonas putida* (D85992) 的同源性达 99%。根据上述结果, 该菌株可鉴定为恶臭假单胞菌, 并命名为 *Pseudomonas* SKDP-1。以氨氮 ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) 为惟一氮源, 分别以柠檬酸钠、葡萄糖和蔗糖为碳源条件下, 其氨氮转化率分别为 49.5%、34%和 32.8%, 表明菌株 *Pseudomonas* sp. SKDP-1 在盐碱地土壤中对氮的循环方面具有良好的应用前景。

关键词: 黄河三角洲盐碱地; 硝化细菌; 恶臭假单胞菌; 氨氮转化率

中图分类号: S154.381

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2014)01-0164-05

Isolation and identification of a heterotrophic nitrifying strain from saline-alkali soil and analysis of its nitrification abilities

LU Hongsheng, ZHAO Xiaoshu, WANG Yashu, ZHANG Ruyun, LIU Yueyue

(School of Chemistry and Environmental Engineering, Shandong University of Science and Technology, Qingdao 266590)

Abstract: A heterotrophic nitrifying strain was isolated from Yellow River Delta saline-alkali soil, and its morphology, physiochemical properties, 16S rDNA sequence, and ammonia nitrogen degradation ability were examined. The results showed that this bacteria is rod, gram-negative, can use glucose, sucrose as carbon source for growth, and its optimum pH is 9. Its 16S rDNA sequence indicated 99% similarity with *Pseudomonas putida* (D85992). Based on the above results, this strain was believed to be a member of genus *Pseudomonas* and named *Pseudomonas* sp. SKDP-1. This strain showed high ammonia nitrogen degrading abilities of 49.5%, 34% and 32.8% with sodium citrate, glucose and sucrose as its carbon sources, respectively, and suggesting SKDP-1 has a good application prospect for nitrogen cycle in saline-alkali soil.

Key words: Yellow River Delta saline-alkali soil; nitrobacteria; *Pseudomonas putida*; ammonia nitrogen degradation

氮素循环包括氨化、硝化和反硝化 3 个环节, 其中硝化作用是整个氮转化过程中的限制性步骤^[1-2]。有关硝化细菌的研究表明, 硝化菌主要有两大生理群组成: 氧化氨氮为亚硝态氮的亚硝化细菌和氧化亚硝态氮为硝态氮的硝化细菌, 这两大菌群协同作用, 共同将氨氮转化为硝态氮。

国外对盐碱地土壤微生物的研究主要集中在耐盐碱微生物的分离^[3-4]及盐碱极端微生物的生态特征^[5]等方面。国内有关盐碱地中微生物的群体构造解析的研究很多, 如黄明勇等^[6]对天津滨海盐碱土

地区城市绿地土壤微生物的研究中发现, 在细菌、放线菌和真菌三大类群中, 细菌占绝对优势, 其次是放线菌和真菌; 郑贺云等^[7]对新疆阿克苏地区盐碱地细菌类群多样性及优势菌群进行了分析; 周帧^[8]对新疆城地区盐矿山嗜盐微生物多样性及其系统演化进行了研究; 关统伟等^[9]对新疆塔里木盆地和新疆青海中度嗜盐放线菌生物多样性进行了研究; 康贻军等^[10]、孙佳杰等^[11]报道了电导率上升到 $5 \text{ ms}\cdot\text{cm}^{-1}$ 以上时, 微生物活性会受到强烈抑制。另有报道, 细菌、放线菌数量与土壤全盐含量呈显

著负相关, 并且细菌的数量与土壤有机质含量呈极显著相关, 土壤盐害程度越高, 微生物数量越少, 而对盐碱地中硝化细菌的研究非常少。另外, 一般认为异养型硝化细菌较自养型硝化细菌分布更为广泛, 且生长速率更快、要求溶解氧更低等特点。本课题以黄河三角洲盐碱地土壤中为研究对象, 从中分离、纯化得到 1 株异养硝化细菌, 对其生理生化性状、系统发育分类学位置及其硝化能力进行了分析, 为盐碱地土壤中氮素循环以及土壤生物改良提供一定的理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

实验所用土样取自黄河三角洲盐碱地 (东经 $118^{\circ}10'$, 北纬 $37^{\circ}12'$), 取样自表层 5 cm 以下土壤。

1.2 培养基^[12]

硝化富集培养基 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): 葡萄糖 5.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0, NaCl 2.0, $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4, K_2HPO_4 1.0, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, 水 1000 mL, pH 7.2; 分离培养基: 是在富集培养基中加入 2%琼脂, 其他成分不变; 牛肉膏蛋白胨液体培养基用作细菌活化培养基, 组成及含量 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): 牛肉膏 3, 蛋白胨 10, NaCl 5, 水 1000 mL, pH 7.5; 筛选培养基 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): 葡萄糖 5.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.25, NaCl 1.0, K_2HPO_4 0.5, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25, 水 1000 mL, pH 7.2, 以上培养基均在 121°C 条件下灭菌 20 min。

1.3 硝化细菌的富集及筛选

1.3.1 富集 称量 5 g 土样放入盛有 45 mL 无菌水的烧杯中, 用超声波破碎仪中将土壤颗粒破碎, 使细菌从土壤中溶出到无菌水中, 静置, 取 5 mL 上层液加入到盛有 150 mL 灭菌的硝化细菌富集液体培养基中, 30°C , $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡条件下培养 5 d, 取 5 mL 培养液转接到新鲜的富集培养基中, 连续取样转接 3 次, 培养条件同上, 得到硝化细菌富集培养液。

1.3.2 筛选 取 0.2 mL 1.3.1 中的富集培养液平板划线培养, 所用固体培养基为分离培养基, 30°C 静置培养 5 d, 挑取单菌落, 并连续平板划线培养 3 次, 确认纯菌并保存到半固体分离培养基中, 命名为 SKDP-1, 待用。

1.4 菌株 SKDP-1 形态及生理生化性质测定

生理生化测定包括革兰氏染色、糖发酵实验、M.R 实验、V.P 实验、淀粉水解实验、明胶水解实验、 H_2O_2 酶测定, 操作方法见参考文献^[13-14]。

1.5 菌株 SKDP-1 最佳生长 pH 的确定

按 5%的接种量将菌株 SKDP-1 的培养液接种

到 pH 值分别为 7、9 及 11 的硝化富集培养基中, 30°C , $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡条件下培养, 定时测定培养液在 560 nm 处的吸光度 (OD_{560})。

1.6 不同碳源条件下菌株 SKDP-1 硝化过程中 pH 的变化

将菌株 SKDP-1 培养液以 5%的接种量接种到分别含有葡萄糖、蔗糖和柠檬酸钠为碳源 (含量)、其他成分及含量不变的硝化细菌富集培养基中, 30°C , $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 恒温摇床中培养, 定时测定培养液中 pH 值。

1.7 菌株 SKDP-1 在不同碳源条件下的氨氮转化率测定

用蔗糖和柠檬酸钠作为碳源, 分别替代硝化富集培养基中葡萄糖, 其含量与葡萄糖相同。将菌株 SKDP-1 以 5%的接种量接种到上述含有不同碳源的硝化细菌富集培养基中, 30°C , $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 恒温摇床中培养, 定时测定培养液中氨氮含量, 氨氮含量测定采用纳氏试剂光度法^[15]。

1.8 菌株 SKDP-1 16S rDNA 序列测定及系统发育树创建

采用 UNIQ-10 柱式细菌 DNA 抽提试剂盒按其说明书操作步骤对菌株 SKDP-1 进行 DNA 提取。

对提取的 DNA 序列进行 PCR 扩增: 所用正向引物 7F: $5'$ -CAGAGTTTGATCCTGGCT- $3'$; 反向引物 1540R: $5'$ -AGGAGGTGATCCAGCCGCA- $3'$ 。PCR 反应体系 (25 μL): 2.5 μL 5 \times Buffer (with Mg^{2+}), 0.5 μL 模板 DNA, 各 0.5 μL 7F (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 1540R (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 1 μL dNTP (各 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 超纯水定容至 25 μL 。PCR 反应条件: 98°C 预变性 3 min; 98°C 变性 25 s, 55°C 退火 25 s, 72°C 延伸 1 min, 30 个循环, 再 72°C 延伸 10 min。PCR 扩增产物测序由上海生工生物工程公司完成。

将测得的 16S rDNA 序列发送到 DDBJ (DNA Data Bank of Japan, <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) 数据库中的 Blast 中进行相似性比对, 选取相似性高的序列用 CustalX2.1 和 Mega5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 软件创建系统树, 系统进化距离矩阵根据 Kimura 模型估算^[16], 创建方法为邻接法 (Neighbor-Joining) ^[17-19]。该菌株的登录序号为 AB826004。

2 结果与分析

2.1 菌株分离纯化及生理生化性质测定

经过富集培养, 挑选一表面光滑, 圆形大的菌落, 进行多次平板划线、纯化分离到 1 株菌株, 命

名为 SKDP-1, 此菌株呈球状, 革兰氏染色阴性, 菌落呈现乳白色, 边缘整齐, 表面光滑, 菌株的生理生化性质测定如表 1 所示。

表 1 菌株 SKDP-1 生理生化性质

Table 1 Bio-chemical characteristics of strain SKDP-1

鉴定指标 Item	菌株 SKDP-1 Strain SKDP-1
甲基红实验 (MR) Methyl-red test	-
乙酰甲基甲醇 (V.P.) 实验 Voges-Proskauer test	-
柠檬酸盐 Utilization of sodium citrate	+
明胶实验 Gelaune liquefaction	-
淀粉实验 Starch test	-
硝酸盐还原 Nitrates reduced to nitrites	-
葡萄糖 Glucose	+
蔗糖 Sugar	+
麦芽糖 Maltose	+
产氨 NH ₃ producing	+
H ₂ S 产生 H ₂ S producing	-
接触酶 Catalase	+
氧化酶 Oxidase	+

注: “+” 为阳性; “-” 为阴性

Note: “+”, positive; “-”, negative.

2.2 不同 pH 条件下菌株 SKDP-1 的生长测定

以葡萄糖为碳源配制硝化细菌富集培养基, 调整培养基 pH 分别为 7、9 和 11, 恒温摇床培养, 每隔 24 h 测定吸光度 (OD₅₆₀), 结果如图 1 所示。

从图 1 可以看出, 菌株 SKDP-1 在 3 种 pH 的培养基中生长时, 停滞期均较短, 而对数增长期均较长, 呈现出相似的生长变化趋势。从菌体密度来看, 菌株 SKDP-1 在 pH 为 9 的培养条件下, 其 OD₅₆₀ 值明显高于在 pH 为 7、pH 为 11 的培养条件下的 OD₅₆₀, 因此, 菌株 SKDP-1 应更宜在偏碱性环境中生长。

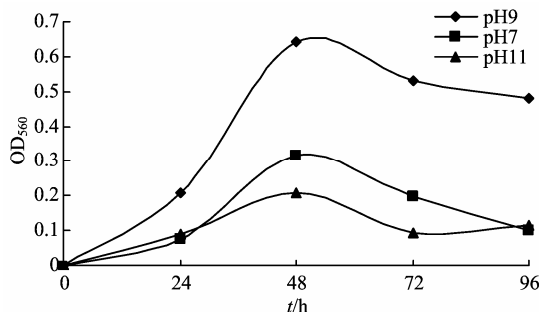


图 1 菌株 SKDP-1 在不同 pH 条件下的生长

Figure 1 Growth curves of strain SKDP-1 under different pH values in medium

2.3 不同碳源条件下培养液中 pH 变化测定

将菌株 SKDP-1 分别在以柠檬酸、葡萄糖和蔗糖为碳源的培养基中培养, 硝化的同时伴随着 pH 的变化, 结果如图 2 所示。从图 2 可以看出, 在以柠檬酸为碳源的培养基中生长时, 培养液中 pH 缓慢上升, 约由 8.5 上升至 9.4, 这种硝化过程中 pH 值升高的情况与传统的自养硝化细菌不同, 而与已经报道的菌株 *Arthrobacter* B_D 在以葡萄糖为碳源, 蛋白胨或醋酸胺为氮源的培养基中培养时相似, pH 值从最初的 3.7 升高到 8.0~9.5^[20]。菌株 SKDP-1 在分别以葡萄糖和蔗糖为碳源生长时, pH 值出现明显下降, 约从 8.1 下降到 5.5, 这说明菌株 SKDP-1 在硝化过程中产生酸而导致 pH 值下降。

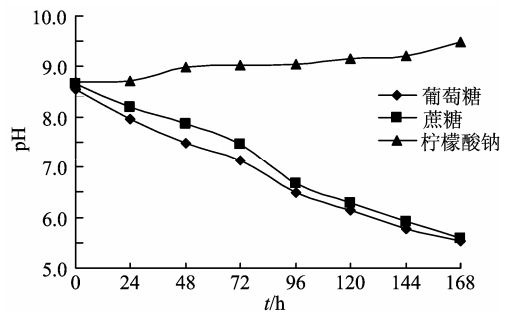


图 2 不同碳源条件下培养液中 pH 的变化曲线

Figure 2 Changes of pH values in the cultures with different carbon sources in medium

2.4 不同碳源条件下菌株 SKDP-1 的硝化效率测定

碳源是微生物生长过程中大量需要的营养成分, 主要作用是构成微生物细胞碳骨架和供给微生物生长繁殖所需要的能量。即使同一菌株对不同碳源的利用也有可能不同, 如异养硝化菌 *Alcaligenes faecalis* No.4 只能利用有机酸进行硝化反应^[21]。菌株 *Alcaligenes faecalis* 只有在醋酸钠或者乙醇作碳源的情况下, 才能充分去除硝酸^[22]。另外, Wehrfritz 等^[23]认为异养硝化细菌在利用氨氮加氧酶氧化氨生成亚硝酸的过程中, 存在着对氨氮的去除和对外加有机碳源去除的耦联作用。

本研究分别选取蔗糖、柠檬酸钠和葡萄糖为碳源来配制硝化富集培养基, 并将培养基配制 pH 调为 9 (根据 2.2 结果), 对菌株 SKDP-1 进行摇床恒温培养, 每隔 24 h 取培养液测定氨氮浓度, 确定菌株 SKDP-1 对不同碳源条件下的硝化能力, 结果如图 3 所示。

从图 3 可以看出, 菌株 SKDP-1 以柠檬酸钠为碳源时氨氮浓度从约 0.333 g·L⁻¹ 下降到 0.168 g·L⁻¹,

转化率为 49.5%; 以葡萄糖为碳源时, 氨氮浓度也从大约 $0.335 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 开始下降到 $0.221 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 降解率为 34%; 以蔗糖为碳源时, 氨氮浓度也从大约 $0.326 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 开始下降到 $0.219 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 降解率为 32.8%。因此, 菌株 SKDP-1 对柠檬酸钠的利用效率明显高于对葡萄糖和蔗糖的利用, 而对葡萄糖和蔗糖的利用效率非常相近。

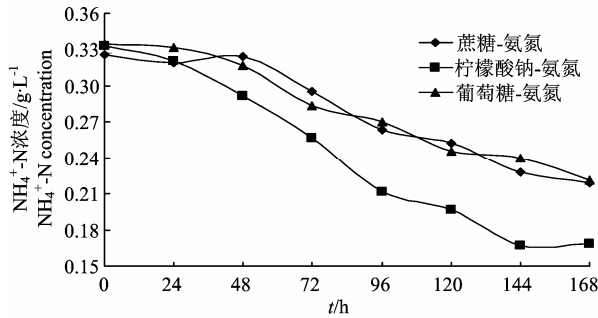


图 3 不同碳源条件下培养液中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度的变化曲线
Figure 3 Changes of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ concentration in the cultures with different carbon sources in medium

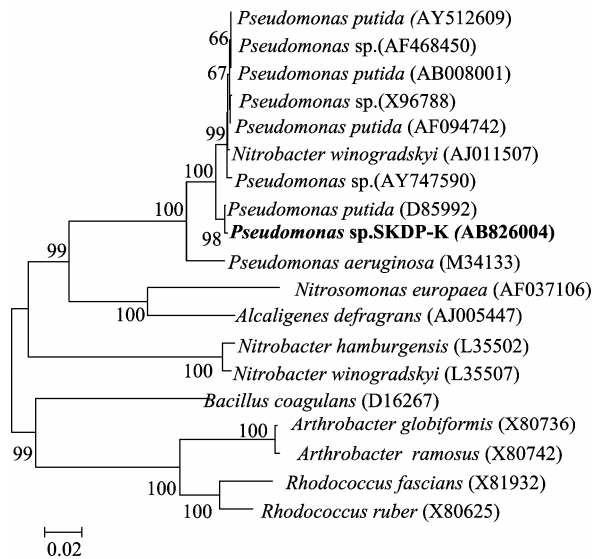


图 4 菌株 SKDP-1 基于 16S rDNA 序列 NJ 法系统发育树
Figure 4 The neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence of strain SKDP-1

2.5 菌株 SKDP-1 16S rDNA 序列测定及系统发育树创建

菌株 SKDP-1 DNA 经 PCR 扩增、16S rDNA 测序, 将测的序列 (1440 bp) 通过 BLAST 进行同源性比对, 利用 clustalx1.8.3 和 Mega5 软件, 以 Neighbor-Joining 法绘制 16S rDNA 系统发育树, 如图 4 所示。从图 4 可见, 菌株 SKDP-1 与 *Pseudomonas putida* (D85992) 的 16S rDNA 序列相似性最高

(99%), 结合菌株的生理生化性质, 可基本确定菌株 SKDP-1 为假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.)。

3 结论

根据菌株 SKDP-1 的外部形态、理化性质测定结果以及 16S rDNA 序列的相似性分析, 初步鉴定该菌株为假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.), 命名为 *Pseudomonas* sp. SKDP-1。

利用硝化细菌富集培养基从黄河三角洲盐碱地土壤中分离到异养硝化细菌 SKDNH-1, 该菌以柠檬酸钠为碳源、经过 7 d 培养后, 氨氮转化率达 49.5%, 较以葡萄糖和蔗糖为碳源, 氨氮降解率都高。

研究了不同碳源条件下, 菌株 SKDP-1 在硝化过程中 pH 的变化, 结果表明柠檬酸钠为最适碳源, 并且以柠檬酸钠为碳源培养过程中, pH 有稍微升高的现象, 而用葡萄糖和蔗糖为碳源时, pH 均有明显的下降。

参考文献:

- [1] Regan J M, Harrington G W, Noguera D R. Ammonia- and nitrite-oxidizing bacterial communities in a pilot-scale chloraminated drinking water distribution System[J]. Appl & Environ Microbiol, 2002, 68(1): 73-81.
- [2] Egli K, Langer C, Siegrist H R, et al. Community analysis of ammonia and nitrite oxidizers during start up of nitrification reactors[J]. Appl & Environ Microbiol, 2003, 69(6): 3213-3222.
- [3] Nagai K, Suzuki K, Okada G. Studies on the distribution of alkaliphilic and alkali-tolerant soil fungi II: Fungal flora in two limestone caves in Japan[J]. Mycoscience, 1998, 39(3): 293-298.
- [4] Vargas V A, Delgado O D, Hatti-Kaul R, et al. Lipase-producing microorganisms from a Kenyan alkaline soda lake [J]. Biotechnology Letters, 2004, 26(2): 81-86.
- [5] Matsuda Y, Sugiyama F, Nakanishi K, et al. Effects of sodium chloride on growth of ectomycorrhizal fungal isolates in culture[J]. Mycoscience, 2006, 47(4): 212-217.
- [6] 黄明勇, 杨剑芳, 王怀锋, 等. 天津滨海盐碱地城市绿地土壤微生物特性研究[J]. 土壤通报, 2007, 38(6): 1131-1135.
- [7] 郑贺云, 黎志坤, 李超, 等. 新疆阿克苏地区盐碱地细菌类群多样性及优势菌群分析[J]. 微生物学通报, 2012, 39(7): 1031-1043.
- [8] 周帆. 新疆拜城地区盐矿山嗜盐微生物多样性及其系统演化研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2007.
- [9] 关统伟, 吴晋元, 张利莉, 等. 新疆塔里木盆地可培养嗜盐放线菌系统发育多样性[J]. 微生物学通报, 2008, 35(11): 1698-1702.
- [10] 康贻军, 胡健, 董必慧. 滩涂盐碱土壤微生物生态特征的研究[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(S1): 181-183.
- [11] 孙佳杰, 尹建道, 解玉红, 等. 天津滨海盐碱地土壤微生物生态特性研究[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版,

- 2010, 34(3): 57-61.
- [12] 王娟, 戴习林, 宋增福, 等. 一株氨化细菌的分离、鉴定及氨氮降解能力的初步分析[J]. 水生生物学报, 2010, 34(6): 1198-1201.
- [13] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [14] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 中国科学院微生物研究所《伯杰氏细菌鉴定手册》[M]. 8版. 北京: 科学出版社, 1984: 622-651.
- [15] 国家环保局. 水和废水监测分析方法[M]. 3版. 北京: 中国环境科学出版社, 1989.
- [16] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. Journal of Molecular Evolution, 1980, 16: 111-120.
- [17] Person W R and Lipman D J. Improved tools for biological sequence comparison [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1988, 85: 2444-2448.
- [18] Saitou N and Nei M. The neighbor-joining method: a new method of reconstructing phylogenetic trees [J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4: 406-425.
- [19] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap[J]. Evolution, 1985, 39: 783-791.
- [20] Brierley E D R, Wood M. Heterotrophic nitrification in an acid forest soil: isolation and characterization of nitrifying bacterium[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2001, 33(10): 1403-1409.
- [21] Joo H S, Hirai M, Shoda M. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* No. 4[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005, 100(2): 184-191.
- [22] Otani Y, Hasegawa K, Hanaki K. Comparison of aerobic denitrifying activity among three cultural species with various carbon sources[J]. Water Science and Technology, 2004, 50(8): 15-22.
- [23] Wehrfritz J M, Reilly A, Spiro S, et al. Purification of hydroxylamine oxidase from *Thiosphaera pantotropha*, identification of electron acceptors that couple heterotrophic nitrification to aerobic denitrification [J]. FEBS Letters, 1993, 335(2): 246-250.