

# 好氧异养硝化菌 *Acinetobacter* sp. YY-5 的 分离鉴定及脱氮机理\*

金敏 王景峰 孔庆鑫 赵祖国 王新为 谌志强 陈照立 邱志刚 李君文\*\*

(军事医学科学院卫生学环境医学研究所环境卫生研究室 天津 300050)

**摘要** 通过异养硝化培养基获得一株高效脱氮细菌, 并通过形态学特征、生理生化反应及16S rDNA同源性比较对筛得菌株进行了鉴定; 分别以 $\text{NO}_3^-$ -N和 $\text{NO}_2^-$ -N为唯一氮源, 通过对脱氮过程中各种含氮代谢物的定量及对脱氮相关基因氨单加氧酶基因(*amoA*)、羟胺氧化酶基因(*hao*)、周质硝酸盐还原酶亚基基因(*napA*)的扩增及测序比较, 对该菌株的生理途径及脱氮机理进行了研究. 结果表明, 高效脱氮细菌YY-5不能发生好氧反硝化, 但能在3 d内将氨氮由95.23 mg/L降解至1.29 mg/L, 降解率达到98.6%, 同时未发现亚硝酸盐氮、硝酸盐氮积累; 对该菌主要代谢气体产物进行检测, 发现 $\text{CO}_2$ 和 $\text{N}_2$ 明显增多, 无 $\text{N}_2\text{O}$ 生成; 经鉴定, 初步判定该菌为不动杆菌属, 命名为*Acinetobacter* sp. YY-5; 从该菌基因组中均能扩增出*amoA*、*hao*、*napA*等基因, 其中*napA*与*hao*基因与已报道的*napA*与*hao*基因进行Blast比较, 发现具有较大差别. 图6 表3 参15

**关键词** 好氧异养硝化菌; *Acinetobacter* sp. YY-5; 机理; 脱氮

CLC X172

## Isolation and Denitrification Mechanism of an Aerobic Heterotrophic Bacterium *Acinetobacter* sp. YY-5\*

JIN Min, WANG Jingfeng, KONG Qingxin, ZHAO Zuguo, WANG Xinwei, SHEN Zhiqiang,

CHEN Zhaoli, QIU Zhigang & LI Junwen\*\*

(Institute of Hygiene and Environmental Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Tianjin 300050, China)

**Abstract** An aerobic heterotrophic bacterium YY-5, which could degrade  $\text{NH}_4^+$ -N from 95.23 mg/L to 1.29 mg/L in 3 days, was studied to reveal its denitrification mechanism at the level of product characteristics and several denitrification enzymes encoding genes. The results demonstrated the bacteria produced large quantities of  $\text{CO}_2$  and  $\text{N}_2$ , but small nitrite and nitrate accumulations. Furthermore, strain YY-5 had ammonia monooxygenase encoding gene (*amoA*) which encodes the enzyme to oxidize ammonia to hydroxylamine. Also, the strain had a new hydroxylamine oxidoreductase encoding gene (*hao*) whose sequence was distinct not only to that of autotrophic bacteria but also to that of heterotrophic bacteria. Its *napA* gene was also great different with the reported genes from the known aerobic heterotrophic bacteria by Blast comparison. The strain was identified as *Acinetobacter* sp. YY-5 according to its morphological, physiological and biochemical characters, as well as 16S rDNA sequence homology comparison. Fig 6, Tab 3, Ref 15

**Keywords** aerobic heterotrophic bacterium; *Acinetobacter* sp. YY-5; mechanism; denitrification

CLC X172

氮素是我国目前造成水体污染的主要原因之一, 据国家环保总局2007年《中国环境状况公报》报道, 我国主要湖泊氨氮污染较重, 富营养化问题依然突出. 因此, 水体中氮素的去除, 对于保护环境、发展经济和保障健康都具有重要的意义. 目前, 水处理中氮素的传统生物脱除主要是通过硝化和反硝化两个过程来完成, 即氨氮由自养的硝化细菌在好氧条件下转化为硝态氮, 然后再通过异养的反硝化细菌在缺氧条件下将硝态氮还原为氮气, 排出水体. 近几年来, 随着厌氧氨

氧化细菌、异养硝化细菌、好氧反硝化细菌等不同脱氮机理细菌的发现, 生物脱氮研究的领域也不断拓宽<sup>[1-3]</sup>, 但人们对这些新型微生物的了解还不够深入, 对其生理特性、代谢途径以及处理工艺等方面的研究还比较缺乏. 本文对好氧异养硝化细菌进行了筛选和鉴定, 并从生理特性及分子生物学角度对其代谢机理和途径进行了研究.

## 1 材料与方法

### 1.1 培养基

1.1.1 异养硝化培养基  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5 g, 琥珀酸钠 2.17 g, 维氏盐溶液 50 mL, 加水溶解, 补充蒸馏水至1 000 mL (若需固体培养基, 则加入2%琼脂). 维氏盐溶液:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  5.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.5 g,  $\text{NaCl}$  2.5 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 g,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.05 g, 溶解后加水定容至1 000 mL.

1.1.2 亚硝酸盐培养基 将异养硝化培养基的氮源换成

收稿日期: 2008-09-05 接受日期: 2008-12-05

\*国家自然科学基金项目(No. 30600487), 国家“863”项目(No. 2006AA06Z334)和天津市应用基础研究计划项目(No. 07JCYBJC07000)资助. Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30600487), the National High-tech Research and Development Program of China (No. 2006AA06Z334) and the Applied Basic Research Program of Tianjin, China (No. 07JCYBJC07000)

\*\*通讯作者 Corresponding author (E-mail: junwen9999@hotmail.com)

KNO<sub>2</sub>, 其它同异养硝化培养基。

1.1.3 硝酸盐培养基 将异养硝化培养基的氮源换成 KNO<sub>3</sub>, 其它同异养硝化培养基。

## 1.2 好氧异养硝化菌的筛选

1.2.1 采样与富集 样品采自天津西青开发区、纪庄子污水处理厂、丰华肥料厂等地。利用异养硝化培养基曝气培养富集2~3 wk, 其间适时补充新鲜培养基。

1.2.2 细菌的初筛与复筛 从样品富集液中吸取1 mL培养液, 加入新鲜液体异养硝化培养基中30 ℃、120 r/min摇床培养3 d。检测氨氮量, 将氨氮降低的样品重复以上操作两次。然后将氨氮降低较明显的样品稀释10<sup>7</sup>倍, 将稀释液移入新鲜培养基中, 30 ℃、120 r/min摇床培养3 d。检测氨氮降低量, 选取氨氮降低最多的样品划线接种在异养硝化固体培养基表面, 30 ℃培养3 d, 挑取单菌落, 作为初筛菌。

将初筛菌接种于新鲜液体培养基中, 30 ℃、120 r/min摇床培养3 d, 进行复筛。将氨氮降低最明显的菌落划线接种在异养硝化固体培养基表面, 挑单菌落纯化两次, 即得到所筛选菌株。

1.2.3 菌株脱氮活性的测定<sup>[3-5]</sup> 硝酸盐测定: 酚二磺酸紫外分光光度法; 亚硝酸盐测定: N-(1-萘基)-乙二胺光度法; 氨氮的测定: 纳氏试剂光度法; 总氮的测定: 过硫酸钾氧化-紫外分光光度法; CO<sub>2</sub>、N<sub>2</sub>及O<sub>2</sub>定量测定: GC/TCD检测; N<sub>2</sub>O定量测定: 利用GC/ECD检测。

## 1.3 菌株的鉴定

1.3.1 形态学鉴定 将菌株进行革兰染色和芽孢染色, 然后光镜观察菌体形态; 同时, 将菌体进行JEOL-JSM25S扫描电子显微镜观察并摄像。

1.3.2 生理生化鉴定 依据《伯杰细菌分类手册》进行鉴定。

1.3.3 VITEK微生物分析仪鉴定 由天津医科大学附属医院鉴定。

1.3.4 16S rDNA同源性比较 利用DNA提取试剂盒提取细菌模板, PCR反应引物见表1。反应体系的组成为: DNA模板2 μL; dNTP混合物4 μL; TaqDNA聚合酶1 μL; 引物各1 μL; Taq DNA聚合酶的10×反应缓冲液5 μL; 加双蒸水至终体积为50 μL。PCR反应条件<sup>[6]</sup>: 94 ℃预变性10 min; 94 ℃, 1 min;

52 ℃, 1 min; 72 ℃, 3 min, 进行30个循环; 最后72 ℃延伸7 min。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳, 选择目的DNA片段并切下, 采用上海生工生物技术有限公司柱式DNA凝胶回收试剂盒进行纯化回收。测序由大连宝生物公司完成, 测序结果提交GenBank进行blast分析。

1.3.5 氨单加氧酶基因(*amoA*)的扩增 参照文献[7], 同时选取引物AMO1F/AMO2R作为内部引物进行套式PCR, 引物扩增的区间及扩增片段的长度见表1。菌株煮沸裂解法提取模板, 反应体系为: 10×反应缓冲液5 μL, dNTP (2.5 mmol/L) 4 μL, 上游引物 (10 μmol/L) 1 μL, 下游引物 (10 μmol/L) 1 μL, 模板2 μL, Taq酶 (2.5 U/μL) 1.25 μL, 水35.75 μL。PCR反应条件: 94 ℃变性5 min; 然后进行30个循环: 94 ℃, 40 s; 40 ℃, 40 s; 72 ℃, 40 s; 最后72 ℃延伸7 min。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳并纯化回收后, 测序由大连宝生物公司完成, 测序结果提交GenBank进行blast分析。

1.3.6 羟胺氧化酶(*hao*)基因的扩增 根据已报道的*hao*基因序列, 进行同源性比较, 利用Oligo 6.0进行引物设计, 选择在保守区的引物对HAO1/HAO2, 同时选取引物HAO11/HAO12作为内部引物进行套式PCR (表1)。

菌株煮沸裂解法提取模板, PCR反应体系为: 10×反应缓冲液5 μL, dNTP 4 μL, 上游引物HAO1 (50 μmol/L) 1 μL, 下游引物HAO2 (50 μmol/L) 1 μL, 模板2 μL, Taq酶 (2.5 U/μL) 1 μL, 水35 μL; PCR反应条件: 94 ℃变性5 min; 然后进行30个循环: 94 ℃, 30 s; 52 ℃, 30 s; 72 ℃, 60 s; 最后72 ℃延伸7 min。将该PCR产物为模板进行套式PCR, 反应体系组成为: 10×反应缓冲液5 μL, dNTP (2.5 mmol/L) 4 μL, HAO11 (50 μmol/L) 1 μL, HAO12 (50 μmol/L) 1 μL, PCR产物0.5 μL, Taq酶 (2.5 U/μL) 1.25 μL, 水37.25 μL; PCR反应条件: 94 ℃变性5 min; 然后进行20个循环: 94 ℃, 20 s, 40 (42, 45, 47, 50, 52) ℃, 20 s, 72 ℃ 20 s; 最后72 ℃延伸7 min。测定纯化后的HAO1/HAO2扩增产物序列, 由大连宝生物公司完成, 测序结果提交GenBank进行Blast分析。

1.3.7 周质硝酸盐还原酶亚基基因(*napA*)的扩增 参照文献<sup>[8]</sup>。PCR扩增引物见表1。反应体系为: DNA模板, 1 μL; dNTP混合物, 4 μL; TaqDNA聚合酶, 1 μL; 引物各2 μL; TaqDNA聚合酶的10×反应缓冲液5 μL; 加双蒸水至终体积为

表1 实验所用引物  
Table 1 Primers used in this study

扩增目的基因 Target gene for amplification	引物 Primer	区间 Region	序列 (5'-3') Sequence	PCR产物大小 (bp) Product size
16S rDNA	P1	8-27	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1500
	P3	1492-1507	TACCTTGTTACGACTT	
氨加氧酶基因 ( <i>amoA</i> ) Ammonia monooxygenase A	AMOB	249-267	CATTTTATTGATCCCTC	833
	AMOE	1059-1081	AGCTTGTGAGTATATTTAGAACG	491
	AMO1F	332-349	GGGGTTTCTACTGGTGGT	
	AMO2R	802-822	CCCCCKGSAAGCCTTCTTC	
羟胺氧化酶基因 ( <i>hao</i> ) Hydroxylamine oxidoreductase	HAO1	989-1011	CATGGTCTGGCCGAACGGACAAT	462
	HAO2	1431-1450	TTCTCTGGAATGCCCGGAAC	327
	HAO11	1065-1086	AACGTGAAGTTGCCGAAGGTT	
HAO12	1373-1391	GCGAG TCTTG CGGGT GAT		
周质硝酸盐还原酶亚基基因 ( <i>napA</i> ) Periplasmic nitrate reductase A	NAP1	1188-1212	TCTGGACCATGGGCTTCAACCA	877
	NAP2	2064-2048	ACGACGACCGCCAGCGCAG	

50  $\mu\text{L}$ . PCR反应条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s; 59  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s; 72  $^{\circ}\text{C}$ , 1 min, 进行20个循环; 最后72  $^{\circ}\text{C}$  延伸7 min. PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳并纯化回收后, 由宝生物技术(大连)公司进行测序, 测序结果提交GenBank进行blast分析.

## 2 结果与讨论

### 2.1 脱氮细菌的筛选

通过初筛和复筛, 筛选出多株有效菌. 将分离有效菌接种于液体异养硝化培养基(为缩短实验时间, 氨氮浓度减半), 30  $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min摇床培养24 h后检测氨氮浓度变化, 其中部分有效菌降解效果见表2. 从表2可以看出, 分离的菌株中, YY-5脱氮效果最好, 培养24 h培养液中的氨氮几乎全部脱除. 因此选定YY-5为研究的出发菌株.

表2 筛得不同菌株降解氨氮效果比较  
Table 2 Comparison of denitrifying abilities of the screened bacteria

Strain	$\rho(\text{NH}_4^+-\text{N})/\text{mg L}^{-1}$
Control	58.49
YY-1	11.96
YY-2	3.58
YY-3	6.12
YY-4	13.11
YY-5	-0.063
YY-6	14.17

### 2.2 菌株YY-5脱氮时间曲线测定

将菌株接种于液体培养基, 30  $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min摇床培养3 d, 每隔一定时间对培养基的氨氮、硝态氮、亚硝态氮进行测定, 同时将YY-5于30  $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min摇床培养3 d后, 抽取顶气, 检测 $\text{N}_2$ 、 $\text{O}_2$ 及 $\text{N}_2\text{O}$ .

结果表明, YY-5在3 d内将氨氮由95.23 mg/L降解至1.29 mg/L, 降解率达到98.6%, 同时未发现亚硝酸盐氮、硝酸盐氮积累; 对YY-5主要代谢气体产物进行检测, 发现 $\text{CO}_2$ 和 $\text{N}_2$ 明显增多, 但无 $\text{N}_2\text{O}$ 生成, 这与已报道的大多数脱氮细菌的性状都不同.

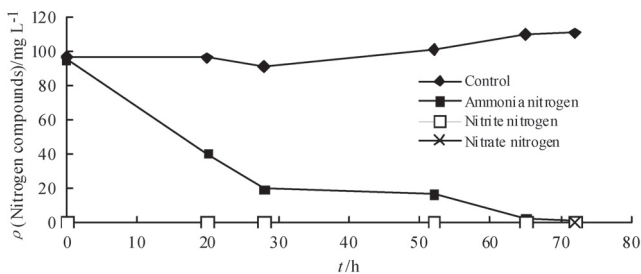


图1 菌株YY-5脱氮时间曲线  
Fig. 1 Variation in nitrogen compound products during the ammonia oxidation by strain YY-5

### 2.3 YY-5菌株的鉴定

2.3.1 形态学鉴定 YY-5为革兰氏阴性, 球状或短杆状, 直径0.4~0.48  $\mu\text{m}$ , 长度0.6~1.1  $\mu\text{m}$  (图2), 胞外有较厚的粘液层, 很难洗去, 故在电镜照片中残留的粘液层形成爪状物质, 不产芽孢.

2.3.2 生理生化鉴定 YY-5不能进行葡萄糖发酵, 不能进行乙醇发酵, 接触酶阳性, 氧化酶阳性, 异养, 专性好氧, 不具运

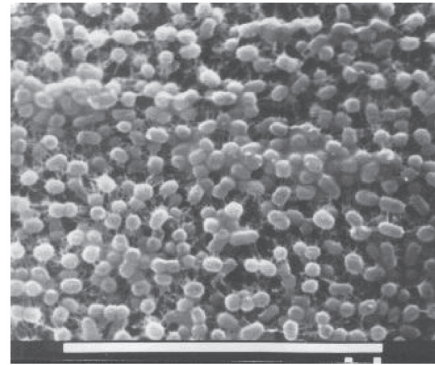


图2 菌株YY-5扫描电镜照片( $\times 7000$ )  
Fig. 2 Scanning electron micrograph of strain YY-5 ( $\times 7000$ )

动性. 依据《伯杰细菌分类手册》初步判定该菌为不动杆菌属(*Acinetobacter*).

2.3.3 VITEK微生物分析仪鉴定 YY-5经VITEK微生物分析仪鉴定为鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*).

2.3.4 16S rRNA的同源性比较 利用引物P1、P3对分离得到的YY-5菌株的DNA样品进行扩增并将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 结果显示可在1 500 bp处出现16S rDNA片段特异性条带, 对其进行测序并将该序列结果提交GenBank (gi: AY639376). 该序列Blast同源性检索结果表明, YY-5与*A. haemolyticus*同源性最高, 为99%. 用DNAMAN将其与不动杆菌属以及16S rRNA同源性相近属的基因进行同源性分析可知, YY-5与不动杆菌属同源性较高, 而与其他几个不动杆菌近源的属同源性相差较大(图3).

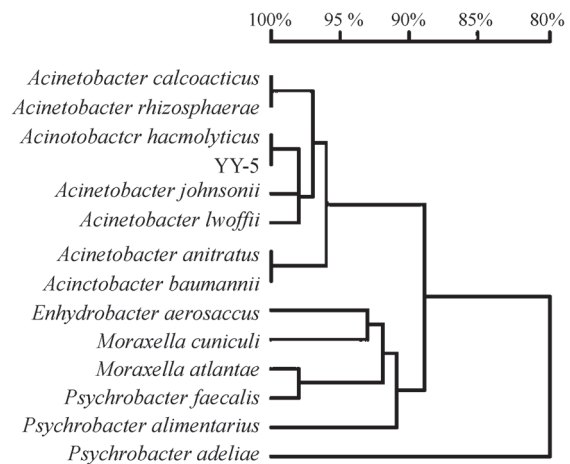


图3 菌株YY-5 16S rRNA基因同源进化树  
Fig. 3 Phylogenetic tree of YY-5 based on 16S rRNA sequences homology

综合以上结果, 可以认为菌株YY-5属于不动杆菌属, 将其命名为*Acinetobacter* sp. YY-5, 其中“YY”代表“异养硝化功能”.

### 2.4 *Acinetobacter* sp. YY-5的其它氮源代谢

2.4.1  $\text{NO}_3^-$ -N为唯一氮源代谢过程 *Acinetobacter* sp. YY-5在硝酸盐培养基中, 30  $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min摇床培养72 h后, 菌体大量生长. 硝酸盐氮, 亚硝酸盐氮, 氨氮和总氮的含量变化见表3.

由表3可见, 与对照组1相比, 加菌组1在72 h内硝酸盐氮

表3 硝酸盐和亚硝酸盐培养基中主要含氮物质浓度变化  
( $\rho/\text{mg L}^{-1}$ ,  $\bar{x}\pm s$ , N=3)

Table 3 Variations of nitrogen compound concentrations in nitrate and nitrite media ( $\rho/\text{mg L}^{-1}$ ,  $\bar{x}\pm s$ , N=3)

组别 Group	含氮化合物种类 Nitrogen compounds	浓度 Concentration		浓度变化 Concentration variation
		0 h	72 h	
Control 1	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	134.89±4.12	141.32±1.57	6.43
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N	3.68±0.29	4.61±0.12	0.93
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	nd	nd	nd
	TN	137.26±12.45	147.81±3.18	10.55
Control 2	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	nd	nd	nd
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N	124.35±4.54	146.47±1.16	22.12
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	nd	nd	nd
	TN	123.15±0.466	147.88±1.44	24.73
YY-5 1	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	135.47±3.61	105.79±3.59	-29.68
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N	3.91±0.04	4.16±0.13	0.25
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	nd	nd	nd
	TN	137.29±2.07	147.63±2.44	10.34
YY-5 2	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	nd	nd	nd
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N	122.92±1.32	103.14±0.943	-19.78
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	nd	nd	nd
	TN	122.16±0.221	147.38±2.02	25.22

nd: 未检出 Not detected

降低25.14%, 亚硝酸盐积累不明显, 无氨氮积累, 总氮变化量不显著. 因此可以认为, 少量降解的硝酸盐被菌体同化, 并未发生好氧反硝化.

2.4.2 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 为唯一氮源代谢过程 *Acinetobacter* sp. YY-5 在亚硝酸盐培养基中, 30 °C、120 r/min摇床培养72 h后, 菌体大量生长. 硝酸盐氮, 亚硝酸盐氮, 氨氮和总氮的含量变化见表3.

由表3可见, 与对照组2相比, 加菌组2在72h内亚硝酸盐氮降低了29.58%, 无氨氮、硝酸盐积累, 总氮量变化不显著. 因此可以认为, 降解的亚硝酸盐基本上用于菌体同化, 未发生好氧反硝化.

### 2.5 相关基因扩增

2.5.1 氨单加氧酶基因 (*amoA*) 的扩增 分别用试剂盒及煮沸裂解法提取菌株DNA模板, 利用引物对AMOB/AMOE进行PCR均扩增到了目的片段 (833 bp), 且效果差别不大 (图4-A), 故以后的实验中均采取煮沸裂解法提取模板.

利用引物AMO1F/AMO2R进行套式PCR, 结果显示样品均能扩增到预期长度DNA片段 (图4-B).

2.5.2 羟胺氧化酶基因 (*hao*) 的扩增 利用引物HAO1/HAO2经PCR反应扩增得到约461 bp目的片段 (图4-C), 表明 *Acinetobacter* sp. YY-5内含有 *hao* 基因; 而利用HAO1I/HAO12进行套式PCR扩增, 经多次调整各种实验条件, 均未扩增出目的片段.

对纯化后的HAO1/HAO2 PCR扩增产物进行纯化测序, 序列长度通过Blast在GenBank中进行核酸比对, 结果显示,

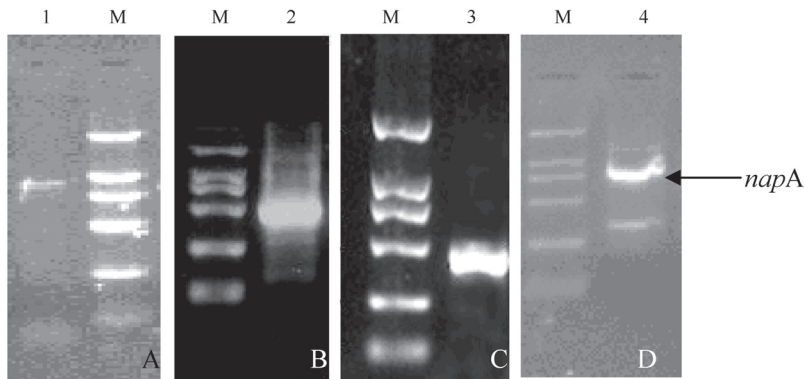


图4 *Acinetobacter* sp. YY-5 的相关基因PCR扩增电泳图

Fig. 4 Electrophoretogram of the related genes of *Acinetobacter* sp. YY-5 by PCR

M: DL2000; 1: *amoA* first PCR products; 2: *amoA* nested PCR products; 3: *hao*; 4: *napA*

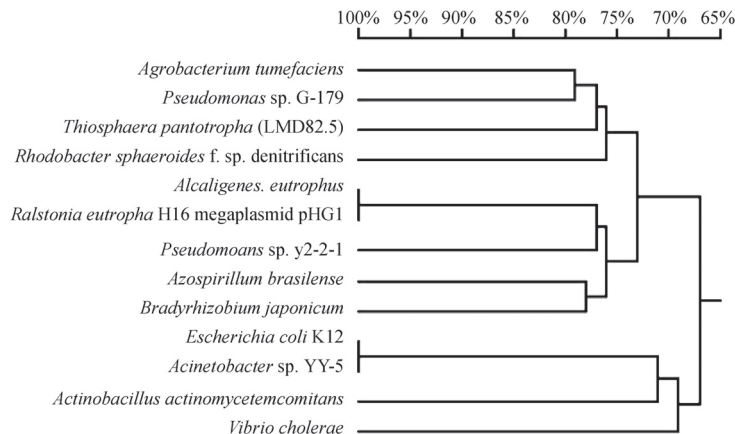


图5 *Acinetobacter* sp. YY-5 *napA* 与其它菌株 *napA* 基因同源树

Fig. 5 Phylogenetic tree of *Acinetobacter* sp. YY-5 based on *napA* sequences homology

*Acinetobacter* sp. YY-5的hao基因与现已报道的hao基因序列有非常大的差别,导致利用引物对HAOI1/HAOI2不能扩增出目的片段.将作为引物的两端保守序列区去掉,仅在1 299~1 318 bp处与*Nitrosomonas europaea* ATCC 19718中某跨膜蛋白基因序列完全相同.为证实这一现象并非由于PCR非特异扩增所致,重复上述实验,两次结果完全相同.因此,*Acinetobacter* sp. YY-5的hao基因与现有的hao基因具有较大的差别,可能是一个新的基因.

2.5.3 周质硝酸盐还原酶亚基基因(*napA*)的扩增 图4-D表明,*Acinetobacter* sp. YY-5能扩增出877 bp的特异条带,对该条带进行纯化测序并提交GenBank(gi: AY639377).通过Blast在GenBank中进行核酸比对,结果显示,*Acinetobacter* sp. YY-5的*napA*基因与*Escherichia coli* K12的*napA*基因同源性最高,达到100%.利用DNAMAN软件对*Acinetobacter* sp. YY-5与其它相关菌株进行同源性分析并作系统发育树,结果见图5.

由图5可以看出,*Acinetobacter* sp. YY-5的*napA*基因与已报道的好氧反硝化菌如*Agrobacterium tumefaciens*、*T. pantotropha*等的*napA*基因同源性并不高,仅分别为68.6%及67.2%.

## 4 讨论

1998年, Richardson等经过对异养硝化菌脱氮相关酶的深入研究,提出了较为详细的脱氮假象途径<sup>[9]</sup>,见图6.他认为,异养硝化菌可利用氨单加氧酶(AMO)将氨氮氧化为羟胺,羟胺可在一类异养硝化菌特有的不含血红素的羟胺氧化酶(HAO)的作用下转化为亚硝酸盐或N<sub>2</sub>O.在好氧情况下,异养的HAO可将羟胺转化为亚硝酸盐及少量N<sub>2</sub>O;在厌氧或微好氧情况下将羟胺转化为N<sub>2</sub>O.即:

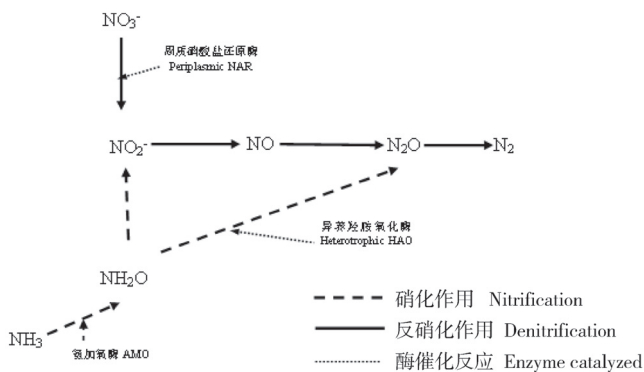
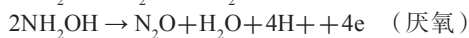
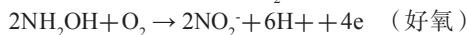


图6 Richardson提出的异养硝化假想途径<sup>[10]</sup>

Fig. 6 A scheme for heterotrophic nitrification passway proposed by Richardson<sup>[10]</sup>

同时,异养硝化细菌还可进行好氧反硝化.首先硝酸盐在周质硝酸盐还原酶(NAP)作用下还原为亚硝酸盐.即:



亚硝酸盐又可通过一系列好氧反硝化酶反应最终转化为N<sub>2</sub>.

为验证*Acinetobacter* sp. YY-5是否也是通过这种途径

进行脱氮的,我们分别以硝酸盐和亚硝酸盐为唯一氮源对*Acinetobacter* sp. YY-5进行了培养.结果表明,*Acinetobacter* sp. YY-5在以硝酸盐和亚硝酸盐为唯一氮源的培养基中,可以大量繁殖,但硝酸盐氮和亚硝酸盐仅有少量降低,而且它们各自的总氮含量变化不显著.降解的硝酸盐氮基本上被用于自身合成,而没有经好氧反硝化转化为含氮气体.因此,*Acinetobacter* sp. YY-5并不能通过Richardson等推测的代谢途径将氨氮转化为氮气,即在好氧条件下先被异养的HAO催化氧化成亚硝酸盐,然后经好氧反硝化反应转化为氮气.并且在脱氮过程中,也未测得N<sub>2</sub>O的产生(数据本文未提供),这也与Richardson等报道的异养的HAO的作用不同.故*Acinetobacter* sp. YY-5的氨氮代谢可能并非通过已报道的途径来完成的.

为进一步研究*Acinetobacter* sp. YY-5的脱氮机理,我们对*Acinetobacter* sp. YY-5可能存在的一些脱氮相关基因进行了扩增,希望从基因水平上为*Acinetobacter* sp. YY-5的代谢途径提供线索.

*amoA*是编码氨单加氧酶(AMO)的基因,AMO可将氨氮氧化为羟胺,是微生物催化铵盐氧化第一步反应的酶.*hao*基因是编码羟胺氧化酶(HAO)的基因,该酶在硝化过程中起重要作用,也是在异养硝化和自养硝化细菌中区别较大的一个酶,在自养的亚硝化细菌中,HAO含铁红蛋白,无论在好氧还是缺氧条件下羟胺氧化产物均是NO<sub>2</sub><sup>-</sup>;而异养的硝化细菌HAO不含铁红蛋白,在好氧时其氧化羟胺的产物主要为NO<sub>2</sub><sup>-</sup>;同时也有少量N<sub>2</sub>O产生;在厌氧或微氧条件下氧化羟胺的产物主要为N<sub>2</sub>O<sup>[10-11]</sup>.PCR结果表明,*Acinetobacter* sp. YY-5基因组内均能扩增到特异的*amoA*基因和*hao*基因,因此推测氨氮可能是受AMO催化转化为羟胺,同时,对扩增出的部分*hao*基因进行序列测定和GenBank Blast后发现,*Acinetobacter* sp. YY-5的*hao*基因序列与已报道的相关基因序列不同(在进一步的实验中也验证了这一点),仅1 299~1 318 bp处的基因序列与*Nitrosomonas europaea* ATCC 19718中某跨膜蛋白基因序列完全相同,因此,*Acinetobacter* sp. YY-5的*hao*基因可能是一个新的基因.我们将在接下来的实验中对这一推测进一步验证.

*napA*基因表达产物是周质硝酸盐还原酶(NAP)的一个亚基.硝酸盐还原酶(NAR)可将硝酸盐还原为亚硝酸盐,它具有两种不同的形式:一种是膜NAR,在厌氧环境中具有活性,对氧分子抑制敏感;还有一种为周质NAR,其表达与活性对氧分子的抑制不敏感,可能与好氧反硝化有关,NapA是周质NAR中最大的一个亚基<sup>[12-13]</sup>.*Acinetobacter* sp. YY-5在好氧条件下能够利用硝酸盐合成自身菌体,应该具有一种在好氧条件下仍有活性的硝酸盐还原系统,而硝酸盐还原酶是该系统中的第一个酶,推测这个酶可能是周质硝酸盐还原酶,因此对它的大亚基因*napA*进行了扩增和测序,希望通过它的存在来证明存在有推测的硝酸盐还原系统.利用自行设计的引物NAP1/NAP2,通过PCR扩增,获得了*napA*的特异片段,测序结果表明它与已报道的好氧反硝化菌,如*Agrobacterium tumefaciens*、*T. pantotropha*等的*napA*基因同源性并不高,但与可利用硝酸盐生长不能进行好氧反硝化

的 *Escherichia coli* K12 等<sup>[14-15]</sup> 的 *napA* 基因有非常高的同源性 (100%)。这提示 *Acinetobacter* sp. YY-5 存在周质硝酸盐还原酶, 推测 *Acinetobacter* sp. YY-5 中具有可在好氧环境中还原硝酸盐的系统, 这一系统最终不是将硝酸盐或亚硝酸盐转化为  $N_2$ , 而是还原为菌体同化可利用的产物。

### References

- 1 Van de Graaf AA, Mulder A, de Bruijn P, Jetten MS, Roberson LA, Kuenen JG. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61** (4): 1246-1251
- 2 Mével G, Prieur D. Heterotrophic nitrification by a thermophilic *Bacillus* species as influenced by different culture conditions. *Can J Microbiol*, 2000, **46** (5): 465-473
- 3 Su JJ, Liu BY, Liu CY. Comparison of aerobic denitrification under high oxygen atmosphere by *Thiosphaera pantotropha* ATCC 35512 and *Pseudomonas stutzeri* SU2 newly isolated from the activated sludge of a piggery wastewater treatment system. *J Appl Microbiol*, 2001, **90** (3): 457-462
- 4 Editorial Committee of Monitor and Analysis Method of Water and Wastewater of Station Environment Protection Administration of China. Monitor and Analysis Method of Water and Wastewater. 4<sup>th</sup> ed. Beijing, China (北京): China Environment Science Press, 2002
- 5 Otte S, Grobden NG, Robertson LA, Jetten MS, Kuenen JG. Nitrous oxide production by *Alcaligenes faecalis* under transient and dynamic aerobic and anaerobic conditions. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62** (7): 2421-2426
- 6 Dong XZ (东秀珠), Cai MY (蔡妙英). Identical Manual of Common Systematic Bacteriology. Beijing, China (北京): Science Press, 2001
- 7 Li JW (李君文), Zhou J (周娟), Wang XW (王新为), Zhen GL (郑金来), Gu CQ (古长庆), Song N (宋农), Jin M (金敏), Chao FH (晁福寰). Cloning, sequencing and expression of *amoA* gene of nitrosobacteria. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2004, **10** (3): 345-348
- 8 Kong QX (孔庆鑫), Li JW (李君文), Wang XW (王新为), Jin M (金敏), Gu CQ (古长庆). A new screening method for aerobic denitrification bacteria and isolation of a novel strain. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2005, **11** (2): 222-225
- 9 Richardson DJ, Wehrfritz JM, Keech A, Crossman LC, Roldan MD, Sears HJ, Butler CS, Reilly A, Moir JW, Berks BC, Ferguson SJ, Thomson AJ, Spiro S. The diversity of redox proteins involved in bacterial heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. *Biochem Soc Trans*, 1998, **26** (3): 401-408
- 10 Otte S, Schalk J, Kuenen JG, Jetten MS. Hydroxylamine oxidation and subsequent nitrous oxide production by the heterotrophic ammonia oxidizer *Alcaligenes faecalis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **51** (2): 255-261
- 11 Arp DJ, Stein LY. Metabolism of inorganic N compounds by ammonia-oxidizing bacteria. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2003, **38** (6): 471-495
- 12 Bell LC, Richardson DJ, Ferguson SJ. Periplasmic and membrane-bound respiratory nitrate reductases in *Thiosphaera pantotropha*. The periplasmic enzyme catalyzes the first step in aerobic denitrification. *FEBS Lett*, 1990, **265** (1-2): 85-87
- 13 Bell LC, Page MD, Berks BC, Richardson DJ, Ferguson SJ. Insertion of transposon Tn5 into a structural gene of the membrane-bound nitrate reductase of *Thiosphaera pantotropha* results in anaerobic overexpression of periplasmic nitrate reductase activity. *J Gen Microbiol*, 1993, **139** (Pt12): 3205-3214
- 14 Denis KS, Dias FM, Rowe JJ. Oxygen regulation of nitrate transport by diversion of electron flow in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1990, **265**: 18095-18097
- 15 Brons HJ, Zehnder AJ. Aerobic nitrate and nitrite reduction in continuous cultures of *Escherichia coli* E4. *Arch Microbiol*, 1990, **153** (6): 531-536