

一株兼性厌氧反硝化细菌的分离与鉴定

余安祺, 张 博

北京大学生命科学学院, 北京
Email: 1800012114@pku.edu.cn, bzhang@pku.edu.cn

收稿日期: 2021年8月26日; 录用日期: 2021年9月15日; 发布日期: 2021年9月28日

摘 要

本项目从水产养殖的实际需求出发, 尝试对具有水质净化作用的硝化细菌及其群落中其它菌种进行分离和鉴定。本实验中利用硝化细菌可氧化铵根获得能量的营养特性, 采用四种简单的无机盐(包括 NH_4Cl 、 NaHCO_3 、 Na_2HPO_4 、 NaCl)及琼脂糖配置了分离硝化细菌群落的简易培养基。在饲养热带观赏鱼采用的 28°C 、潮湿条件下, 经过10天培养后, 长出了两种不同的菌落。经16S rRNA测序和核酸序列比对, 可知其中一种菌落为硝化细菌*Alcaligenes faecalis*, 另一种为兼性厌氧菌*Dysgonomonas*的新种。该新种的16S rRNA序列与其系统发生树上最接近的已命名物种*Dysgonomonas oryzae* (CBA7536品系, 序列号MN646999.1)有93.29%相似度。其系统发生树由TreeView X软件构建。在以上描述的生长条件下, 该种经推断为反硝化细菌, 通过还原*Alcaligenes faecalis*的硝化产物获得能量。

关键词

反硝化细菌, 硝化细菌, 选择培养基, 系统发生树构建

Isolation and Identification of a Facultative Anaerobic Denitrifying Bacteria

Anqi Yu, Bo Zhang

School of Life Sciences, Peking University, Beijing
Email: 1800012114@pku.edu.cn, bzhang@pku.edu.cn

Received: Aug. 26th, 2021; accepted: Sep. 15th, 2021; published: Sep. 28th, 2021

Abstract

Nitrifying bacteria have been playing an important role in aquaculture because of their ability to purify water by oxidizing ammonium salt. Using this special feature, a series of selective culture

media for them and other bacteria in their community have been designed. The culture media contain agarose, NaCl, Na_2HPO_4 and different amounts of NH_4Cl and NaHCO_3 . After 10-day culture under 28°C , two different colonies are distinguished and isolated. Through 16S rRNA sequencing and alignment, the species forming the larger one of the colonies is recognized to be *Alcaligenes faecalis*, a kind of nitrifying bacteria; and the other species is identified as a new species of *Dysgonomonas*, a genus of facultative anaerobic bacteria. The 16S rRNA sequence of the new species shows 93.29% similarity with *Dysgonomonas oryzae* strain CBA7536 (MN646999.1), which is currently its phylogenetically closest species that has been named. The phylogenetic tree of the new species is constructed by TreeView X. Under the culture conditions described above, the novel *Dysgonomonas* strain acts as denitrifying bacteria which reduces the nitrification products of *Alcaligenes faecalis* to produce energy.

Keywords

Denitrifying Bacteria, Nitrifying Bacteria, Selective Culture Medium, Phylogenetic Tree Construction

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

硝化细菌是一类细菌的总称,它们广泛分布在自然界中的土壤和水源中,是氮循环的重要组成部分。由细菌进行的硝化作用主要分为两个部分,一个是由氨或铵根离子氧化到亚硝酸盐,由 *Nitrosomonas* 等属的细菌完成;另一个是由亚硝酸盐氧化到硝酸盐,由 *Nitrobacter*、*Nitrospira* 等属的细菌完成[1] [2] [3]。此外,也存在可完成这两个反应、有多种硝化产物的细菌,如 *Alcaligenes* 属的一些物种。在含有硝化细菌的水体中可能会出现自发形成的反硝化细菌菌群,它们可以通过还原硝化细菌产生的硝酸盐获得能量,终产物大部分为氮气,少部分为铵根离子。硝化细菌在水质净化过程中起重要作用,在水产养殖业中应用广泛,而反硝化菌群可达到防止水体中硝酸盐过多积累的效果,因此均有很大培养价值。目前商品化的“硝化细菌”菌种往往混有多种杂菌(其中部分菌种在生产过程中混入了杂菌;部分菌种因培养基适合异养菌生长而在后期处理过程中混入了杂菌),这可能对其应用产生影响。大部分硝化细菌因不属于含抗性基因的品系而无法用抗生素富集培养,一般的培养基则不能抑制杂菌生长繁殖。

2. 方法

2.1. 硝化细菌与反硝化细菌的培养

未经基因改造的硝化细菌没有抗生素抗性基因,无法通过含抗生素的培养基筛选。本研究利用它能氧化铵根获得能量的特性,利用四种简单的无机盐配制了三组成分配比不同,但都不含有机氮源的培养基(表 1)。经查阅资料和前期预实验得知,在其它成分相同情况下,加入适量磷元素有利于硝化细菌生长[4]。因此,我们也引入了少量的 Na_2HPO_4 , 每组用量相同。

三组培养基中 NaCl 和 Na_2HPO_4 的用量不变; NH_4Cl (氮源及能量来源)和 NaHCO_3 (碳源)的总质量也不变,二者的比例分别为 2:1, 1:1 和 1:2 (见表 1)。该配比的变化会导致 pH 的变化,但三组的 pH 值均落在适宜硝化细菌生长的区间之内。每组培养基配置了 3 个培养皿(直径为 100 mm),接种材料为市场上常见的硝化细菌混合菌液(样本来自北京广源工艺品市场)。接种后放置于 28°C 培养箱(斑马鱼饲养最适温度

和湿度)中静置培养, 3~10 日连续观察、记录菌落形态和生长状况。取菌落生长状况较好的一组, 按其配比重新配置培养基并接种, 进行重复实验。

Table 1. Components ratio of each culture media

表 1. 各组培养基的分配比

组别	1	2	3
NH ₄ Cl g/100mL	1.00	0.75	0.50
NaHCO ₃ g/100mL	0.50	0.75	1.00
Na ₂ HPO ₄ g/100mL	0.10	0.10	0.10
NaCl g/100mL	1.00	1.00	1.00
琼脂糖 g/100mL	1.50	1.50	1.50

2.2. 菌落的测序与定种

长出较密集菌落后, 观察菌落形态, 用 2 mL 移液枪枪头小心挑出样本: 取大、小菌落各 2 个得混合样本 1; 取大菌落 4 个得样本 2; 取小菌落 4 个得样本 3。将 3 份样本分别转移到装有 1 mL 液体培养基 (NH₄Cl 1.00 g/100mL, NaHCO₃ 0.50 g/100mL, Na₂HPO₄ 0.10 g/100mL, NaCl 1.00 g/100mL) 的 1.5 mL 离心管中, 在 28℃ 培养箱放置过夜, 提取核糖体 16S rRNA 并进行 16S rRNA 测序以鉴定菌种。

获得 16S rRNA 序列后, 采用 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 网站上的 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, 2.11.0+) 工具找出与每个样本特征最接近的前 100 个 16S rRNA 序列, 应用 TreeView X (5.0 版本) 软件构建系谱树, 分析其与已知样本的亲缘关系。

3. 结果

3.1. 菌落生长状况

经过 10 天的培养, 三组培养皿中均长出了菌落。在生长时间相同的条件下, 第 2 组菌落覆盖面积最少, 第 1 组平均覆盖面积比第 3 组稍多, 但差别并不明显。第二次接种培养基及液体培养基采用第 1 组的配方。

肉眼可见两种形态明显不同的菌落(见图 1): 一种较大, 边缘模糊且不规则, 颜色更黯淡, 命名为菌落 A; 另一种较小, 边缘清晰且更有光泽, 常伴生在菌落 A 的周围, 命名为菌落 B (见图 2)。样本 1 的测序结果显示为双峰, 表明确实有两种细菌。样本 2 与样本 3 均为单峰。3 个组的培养皿中均存在菌落 A、B 且形态相同。

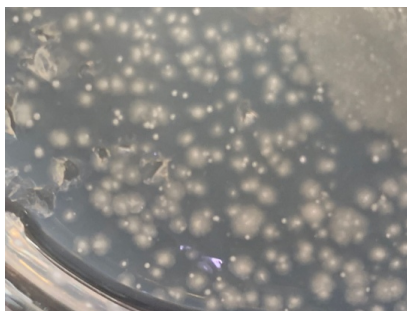


Figure 1. Two different kinds of colonies on the culture medium

图 1. 培养基上两种形态不同的菌落

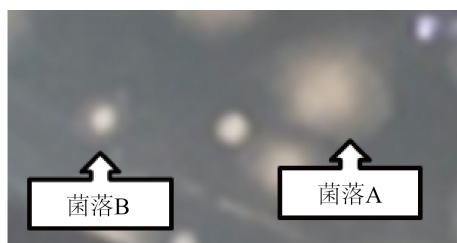


Figure 2. Shapes of Type A and B colonies
图 2. 菌落 A、B 形状示意图

3.2. 序列比对结果及系统发生树构建

16S rRNA BLAST 比对结果表明, 菌落 A 属于 *Alcaligenes faecalis*, 与其最接近的该种序列相似度为 98.87% (见图 3、图 4); 而菌落 B 属于 *Dysgonomonas* 属的一种细菌(比对结果最接近者为 95.58%, 有明确种的最接近序列为 93.29%, 见图 5), 这种细菌很可能为新种。

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Alcaligenes faecalis strain WZ-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Alcaligenes faecalis	1576	1576	99%	0.0	98.87%	1442	MG828834.1
<input checked="" type="checkbox"/> Alcaligenes faecalis strain B17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Alcaligenes faecalis	1572	1572	99%	0.0	98.87%	1443	MG234449.1
<input checked="" type="checkbox"/> Alcaligenes faecalis strain GX28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Alcaligenes faecalis	1572	1572	99%	0.0	98.76%	1441	KU937391.1
<input checked="" type="checkbox"/> Alcaligenes faecalis strain LZU-52 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Alcaligenes faecalis	1572	1572	99%	0.0	98.87%	1405	KT262984.1
<input checked="" type="checkbox"/> Alcaligenes sp. strain 12# 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Alcaligenes sp.	1570	1570	99%	0.0	98.87%	1433	MF093616.1
<input checked="" type="checkbox"/> Alcaligenes faecalis strain PSD10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Alcaligenes faecalis	1570	1570	99%	0.0	98.76%	1451	KP835577.1
<input checked="" type="checkbox"/> Alcaligenes faecalis strain VJ6 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	Alcaligenes faecalis	1568	1568	99%	0.0	98.87%	1442	KX530451.1
<input checked="" type="checkbox"/> Alcaligenes faecalis strain B17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Alcaligenes faecalis	1568	1568	99%	0.0	98.87%	1443	KF641851.1
<input checked="" type="checkbox"/> Alcaligenes faecalis strain Ba55 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Alcaligenes faecalis	1568	1568	99%	0.0	98.87%	1416	MZ365016.1
<input checked="" type="checkbox"/> Alcaligenes sp. IARI-NIAW1-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Alcaligenes sp. IARI-NIAW1-8	1568	1568	99%	0.0	98.76%	1439	KF054929.1
<input checked="" type="checkbox"/> Alcaligenes sp. JAS1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Alcaligenes sp. JAS1	1568	1568	99%	0.0	98.76%	1441	JQ514558.1
<input checked="" type="checkbox"/> Alcaligenes sp. JF3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Alcaligenes sp. JF3	1568	1568	99%	0.0	98.87%	1417	FJ999731.1
<input checked="" type="checkbox"/> Alcaligenes faecalis strain Y5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Alcaligenes faecalis	1567	1567	99%	0.0	98.76%	1440	KF925435.1
<input checked="" type="checkbox"/> Alcaligenes faecalis strain B26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Alcaligenes faecalis	1567	1567	99%	0.0	98.76%	1444	KF641855.1

Figure 3. 16S rRNA sequence alignment results of Type A colonies
图 3. 菌落 A 16S rRNA 序列比对结果

Alcaligenes faecalis strain ISJ128 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [MK968769.1](#) Length: 1462 Number of Matches: 1

Range 1: 14 to 894 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1561 bits(845)	0.0	880/894(98%)	14/894(1%)	Plus/Plus
Query 9	GGGATGCTTTA-ACATGCAAGTCGAACGGCAGCGAGAGAGCTTGCTCTCTTGGCGGCG	67		
Sbjct 14	GGGATGCTTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCGAGAGAGCTTGCTCTCTTGGCGGCG	73		
Query 68	AGTGGCGGACGGGTGAGTAATATATCGGAACGTGCCAGTAGCGGGGATAACTACTCGA	127		
Sbjct 74	AGTGGCGGACGGGTGAGTAATATATCGGAACGTGCCAGTAGCGGGGATAACTACTCGA	133		
Query 128	AAGAGTGGCTAATACCGCATACGCCCTACGGGGAAAAGGGGGATCGCAAGACCTCTCA	187		
Sbjct 134	AAGAGTGGCTAATACCGCATACGCCCTACGGGGAAAAGGGGGATCGCAAGACCTCTCA	193		
Query 188	CTATTGGAGCGCCGATATCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTACCAAGGCAAC	247		
Sbjct 194	CTATTGGAGCGCCGATATCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTACCAAGGCAAC	253		
Query 248	GATCCGTAGCTGGTTGAGAGGACGACCAAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACT	307		
Sbjct 254	GATCCGTAGCTGGTTGAGAGGACGACCAAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACT	313		
Query 308	CCTACGGGAGGACGAGTGGGGAAATTTGGACAATGGGGAAACCTGATCCAGCCATCC	367		
Sbjct 314	CCTACGGGAGGACGAGTGGGGAAATTTGGACAATGGGGAAACCTGATCCAGCCATCC	373		


```

Query 368 CGCGTGTATGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTTGGCAGAGAAGAAAAGGTATC 427
Sbjct 374 CGCGTGTATGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTTGGCAGAGAAGAAAAGGTATC 433
Query 428 CCCTAATACGGGATACTGCTGACGGTATCTGCAGAATAAGCACGGCTAACTACGTGCCA 487
Sbjct 434 CCCTAATACGGGATACTGCTGACGGTATCTGCAGAATAAGCACGGCTAACTACGTGCCA 493
Query 488 GCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGT 547
Sbjct 494 GCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGT 553
Query 548 GTAGGCGGTTTCGAAAGAAAGATGTGAAATCCCAGGGCTCAACCTTGGAACGCATTTTT 607
Sbjct 554 GTAGGCGGTTTCGAAAGAAAGATGTGAAATCCCAGGGCTCAACCTTGGAACGCATTTTT 613
Query 608 AACTGCCGAGCTAGAGTATGTGAGAGGGGGTAGAATTCACAGTGTAGCAGTGAAATGCG 667
Sbjct 614 AACTGCCGAGCTAGAGTATGTGAGAGGGGGTAGAATTCACAGTGTAGCAGTGAAATGCG 673
Query 668 TAGATATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCTGGGATAATACTGACGCTCAG 727
Sbjct 674 TAGATATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCTGGGATAATACTGACGCTCAG 733
Query 728 ACACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGA 787
Sbjct 734 ACACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG-CCCTAAACGA 792
Query 788 TGTCAACTAGCTGTTGGGGCCGTTAGGGCCTTAGTAGCGCAGCTAACGCGTGAAAGTTG 847
Sbjct 793 TGTCAACTAGCTGTTGGGG-CCGTTA-GGCCTTAGTAGCGCAGCTAACGCGTGAA-GTTG 849
Query 848 ACCGCCCTGGGGAGTACGGGTCGCCAAGGATTAACCTCAAAAGGGAATTG 901
Sbjct 850 ACCGCC-TGGGG-AGTACGG-TCGC-AAG-ATTAAAA-C-TCAAA-GG-AATTG 894
    
```

Figure 4. Sequence alignment result of Type A colonies and *Alcaligenes faecalis*
图 4. 菌落 A 与 *Alcaligenes faecalis* 的序列比对结果

除序列比对结果外, 菌落 A 也在形态特征上与 *Alcaligenes faecalis* 的菌落基本吻合, 为较大的白色菌落, 且边界较模糊, 形状偏离正圆形[5]。

图中 *Dysgonomonas oryzae* 序列并不是 BLAST 结果中最接近样本的序列, 但它是与样本最接近的有明确定种的序列。通过构建样本的系统发生树, 可确定与新种序列较为接近的已知序列(见图 6)。

除 *Dysgonomonas oryzae* 外, 系统发生树上的 CFB 菌群指由 *Cytophaga*, *Fusobacterium* 和 *Bacteroides* 三个属的细菌组成的菌群。它们在系谱上有差异, 但在一些 DNA 序列上显示出相似性。它们都是适应无氧环境的杆状细菌[6]。其中 *Bacteroides* 与 *Dysgonomonas* 同属 Bacteroidetes 门。

Dysgonomonas 属的一种细菌 *Dysgonomonas capnocytophagoides* 的菌落特征和本实验中的菌落 B 的

Dysgonomonas oryzae strain CBA7536 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [MN646999.1](#) Length: 1448 Number of Matches: 1

Range 1: 11 to 827 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Pr

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1210 bits(655)	0.0	778/834(93%)	22/834(2%)	Plus/Plus
Query 6	GCGA-AAGCCT-AC-CGTGC-AGTCGAGGGGAGCATAATGAGTAGCAATTTTGGTGGC	61		
Sbjct 11	GCGATAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGGGGAGCATA-GAGTAGCAATACTTTGGTGGC	69		
Query 62	GACCGCGCGGGGTGAGTGACACGTATGCAACCTACCTACATCAGGGGAATAACCCGGA	121		
Sbjct 70	GACCGCGCACGGGTGAGTAACACGTATGCAACCTACCTACATCAGGGGAATAACCCGGA	129		
Query 122	GAAATTCAGACTAATACCGCCTAATACAGGGATGCCGATGGGAATATTTGTTAAAGATT	181		
Sbjct 130	GAAATTCGACTAATACCGCATAATACAGGGATGCCGATGGGAATATTTGTTAAAGATT	189		
Query 182	TTTCGGATGTAGATGGGCATGCGTTCATTAGCTGGTGGTGGGTAACGGCTACCAAG	241		
Sbjct 190	TATCGGATGTAGATGGGCATGCGTTCATTAGCTGGTGGTGGGTAACGGCTACCAAG	249		
Query 242	GCAACGATGGATAGGGGAAGTGGAGGTTGTCACCCACACTGGAACTGACACACGGACC	301		
Sbjct 250	GCAACGATGGATAGGGGAAGTGGAGGTTGTCACCCACACTGGAACTGAGACACGGACC	309		
Query 302	AAACTCTACGGGAGGAGCAGTGAGGAATTTGGTCAATGGACGACAGTCTGAACAGC	361		
Sbjct 310	AGACTCTACGGGAGGAGCAGTGAGGAATTTGGTCAATGGACGAGAGTCTGAACAGC	369		

```

Query 362 CAAATCGCGTGAAGGAAAACAGCCCTACGGGTGTAACCTCTTTTGTACAGGAATAAAA 421
Sbjct 370 CAAATCGCGTGAAGGAAAGACTGCCTACGGGTGTAACCTCTTTTGTACAGGAATAAAA 429

Query 422 GACATTACGTGTAATGTATTGCATGTACTGTACGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCG 481
Sbjct 430 GACATTACGTGTAATGTATTGCATGTACTGTACGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCA 489

Query 482 GCAGCCGCGGTAATACTGAGGATGCGAGCGTTATCCGGATTATTGGGGTTAAAGGGTGC 541
Sbjct 490 GCAGCCGCGGTAATACTGAGGATGCGAGCGTTATCCGGATTATTGGGGTTAAAGGGTGC 549

Query 542 TCAGGCGGGATTTAAGTCAGCGGTGAAATTTTCAGGCTCAACCTGAACACTGCCGTTGA 601
Sbjct 550 GCAGGCGGGATTTAAGTCAGCGGTGAAATTTTCAGGCTCAACCTGAACACTGCCGTTGA 609

Query 602 AACTGGGATCTTGAA-ATGGATGAAGTAGCGGAATTCGTTGTGTAGCGGTGACATGCT 660
Sbjct 610 AACTGGGATCTTGAGTATGGATGAAGTAGCGGAATTCGTTGTGTAGCGGTGACATGCT 669

Query 661 TAAATATAACGAGGAACCTCTATTGCGTAAGCGGTTACTAATCCATAACTGACGCTCAA 720
Sbjct 670 TAGATATAACGAGGAACCTCGATTGCGTAGGCAGCTTACTAAGCCATAACTGACGCTCAA 729

Query 721 GCACGAAAAGCGTGGGGATCAAACAGACATCATAACACCTGCGTAGTCCCCGCCCGGTA 780
Sbjct 730 GCACG-AAAGCGTGGGGATCAAACAGG-ATTAGATAC-CCTG-GTAGTCCAC-GCC-GTA 783

Query 781 TACGATGAATTACATACTTTGCTTTTGTGTATATACCGTCAAGATGAACTAAG 834
Sbjct 784 AACGATGA-TTAC-TAGTT-G-TTT-GCG-ATATACC-GT-AAG-TGA-CTAAG 827

```

Figure 5. Sequence alignment result of Colony B and *Dysgonomonas oryzae*
图 5. 菌落 B 与 *Dysgonomonas oryzae* 的序列比对结果

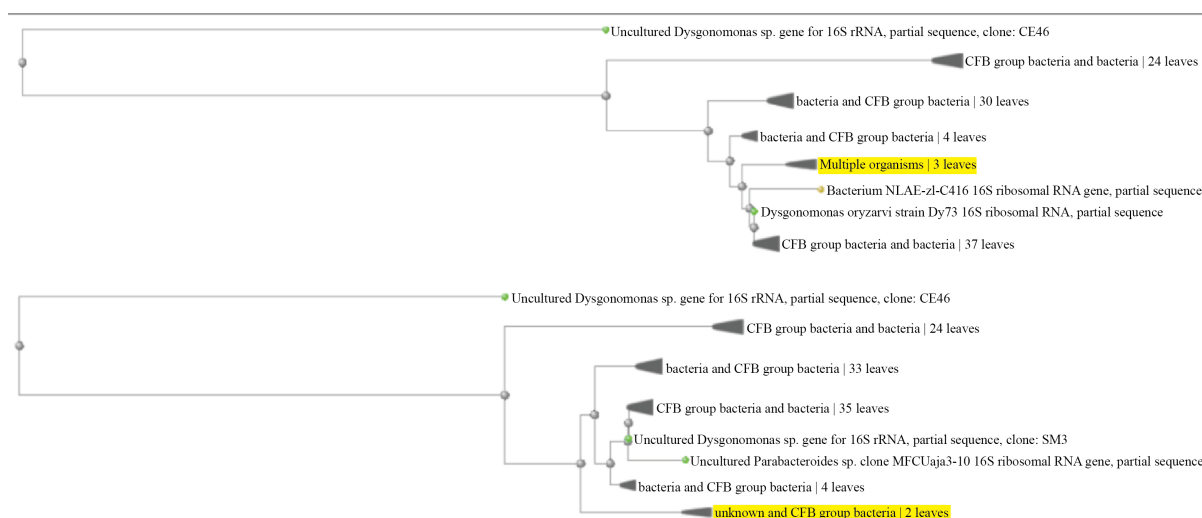


Figure 6. Phylogenetic tree of the *Dysgonomonas* species constructed respectively with Neighbor Joining and Fast Minimum Evolution

图 6. Neighbor Joining 和 Fast Minimum Evolution 两种方法构建的 *Dysgonomonas* 系统发生树

特征相似，二者均为较小的灰白色的完整圆形菌落[7]，且进化树上距离样本最远和最近的分支都含 *Dysgonomonas* 属的细菌，据此基本可以确定菌落 B 属于该属。

3.3. 菌种代谢特征分析

Alcaligenes faecalis 是一种硝化细菌，可氧化铵根至不同氧化态，产物为亚硝酸根、硝酸根、一氧化氮、一氧化二氮和羟胺等[8] [9] [10] [11] [12]。相比 *Nitrosomonas*、*Nitrosococcus* 等其他利用铵根的硝化细菌，*Alcaligenes faecalis* 的特殊之处在于在有氧气和铵根存在的情况下，还可以进行反硝化作用，还原亚硝酸根和硝酸根，产生一氧化二氮和少量氮气。反硝化作用往往在开始培养 24 h 内开始进行；在本实验超过 240 h 的观察周期内，基本可以肯定有还原产物一氧化二氮和氮气产生[13] [14]。

Alcaligenes 属的另一些细菌也具有这种性质, 如 *Alcaligenes* sp. TB 可先将铵根氧化为羟胺, 再氧化为亚硝酸盐, 最后到硝酸盐; 也可还原硝酸盐到亚硝酸盐, 再到一氧化氮(或一氧化二氮), 最后到氮气[15]。

Dysgonomonas 属的细菌是兼性厌氧菌, 可寄生在动物体内, 代谢淀粉、纤维素等多糖, 在污水、腐烂的食物中也有发现。该属没有作为硝化细菌的记录, 反而在文献中常出现在还原性菌群里, 并与 *Pseudomonas* 和 *Bacillus* 等反硝化菌并列; 该属的一些物种在微生物燃料电池(microbial fuel cell)的菌群中被发现[16][17][18]。

结合其往往生长在 *Alcaligenes faecalis* 周围的现象, 它在本实验的培养环境下有可能是作为反硝化细菌出现的, 直接利用了 *Alcaligenes faecalis* 生成的硝化产物(说明 *Alcaligenes faecalis* 的反硝化作用并没有将其硝化产物的浓度降到太低的水平)。虽然它也可以通过用氧气氧化分解糖类的方式生存, 但培养基上并没有发现其它采用这种能量供给方式的杂菌, 说明 *Alcaligenes faecalis* 本身产生的糖类并不足以支撑一般的好氧异养菌消费, 因此 *Dysgonomonas* 采用反硝化作用提供能量的可能性更大。

4. 讨论

4.1. 硝化细菌培养方法的比较

目前已报道了多种硝化细菌培养基配方。除必要的铵根离子外, 培养基配方常会采用不同的碳源, 包括乙酸钠、碳酸氢钠、琥珀酸盐、二水合柠檬酸钠等。此外, 它们往往会包含不同的金属盐, 如镁盐、锰盐、铜盐、铁盐等。

例如一个模拟废水的配方包括: 氮元素 1 g/L, 以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的形式添加; 磷元素 0.07 g/L, 以 KH_2PO_4 的形式添加; NaHCO_3 3 g/L; 微量元素混合溶液 2 mL/L。微量元素混合溶液包含: EDTA, 5.0 g/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.2 g/L; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1.6 g; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 5.1 g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1.6 g; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1.1 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5.5 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5.0 g。pH 约为 7.9 [19]。另一个富集硝化细菌的配方含有相同的元素, 但其含量不同[20]。

一个用于富集一种 *Nitrospira* 属的细菌的培养基配方包括: NH_4Cl , 0.5 mM/L; KH_2PO_4 , 50 mg/L; KCl , 75 mg/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mg/L; NaCl , 584 mg/L; CaCO_3 , 4 g/L (微溶); TES (specific trace element solution), 1 mL/L; SWS (selenium-wolfram solution), 1 mL/L。TES 包含: $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 34.4 mg/L; H_3BO_3 , 50 mg/L; ZnCl_2 , 70 mg/L; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 72.6 mg/L; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 mg/L; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 24 mg/L; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 80 mg/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L。SWS 包含: NaOH , 0.5 g/L; $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 3 mg/L; $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4 mg。富集过程中, CaCO_3 缓冲系统使得 pH 保持在 7.8 左右[21]。

一个简单的 *Alcaligenes faecalis* 培养基包括: 柠檬酸钠 9.5×10^{-3} mol/L, NH_4Cl 9.35×10^{-3} mol/L, KH_2PO_4 1.47×10^{-3} mol/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.62×10^{-4} mol/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.36×10^{-7} mol/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (EDTA 合) 3.6×10^{-5} mol/L, pH 由碳酸钠或氢氧化钠调至 6.5 [12]。

一个由 PYGV 培养基改进、培养纯净的 *Dysgonomonas oryzae* sp. nov. 的培养基包括: 每升中 K_2HPO_4 0.45 g, KH_2PO_4 0.45 g, NH_4Cl 0.36 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.075 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.09 g, NaCl 0.9 g, BBL 1 g, 酵母提取物 0.5 g, 葡萄糖 1 g, L-半胱氨酸-HCl·H₂O 0.3 g, 8% (w/v) Na_2CO_3 2.5 mL, 维生素混合物 2 mL, pH 为 7.3 [18][22]。由于 *Dysgonomonas* 属的物种不能氧化铵盐获得能量, 其单独培养的培养基中应包含有机碳源和氮源。

相比之下, 本论文的配方仅保留了必要的碳源和氮源, 以及调节渗透压的氯化钠, 并添加了少量促进生长的磷酸氢盐。所有的成分(除琼脂糖)都是简单易得的无机物。本论文的 3 组培养基中, 第 2 组生长状况最差, 而第 1 组和第 3 组的生长状况更为接近, 其中的原因尚不清楚, 可能与培养基的 pH 值或代谢中消耗的碳氮比例有关。然而如果主要影响因素为 pH 值, 三组的菌落覆盖面积应为递增或递减或中

间高两边低的状况。

4.2. 群落状况分析

硝化细菌和反硝化细菌出现在同一菌群中的现象并不罕见, 并且目前已有 *Alcaligenes* 属和 *Dysgonomonas* 属细菌出现在同一群落中的报道。在被汽油污染的土壤中, 生长出了可利用其中碳氢化合物的菌群, 其中包括这两个属的细菌[23]。在甘蔗生成的酒糟中, 也发现了包括 *Alcaligenes* 属和 *Dysgonomonas* 属细菌在内的菌群[24]。已有多篇将硝化细菌和反硝化细菌共同培养的报道; 其目的是在移除水体中铵根的同时不使硝酸盐含量增加[25] [26]。然而在本研究进行过程中, 未找到仅将 *Alcaligenes* 属和 *Dysgonomonas* 属细菌共同培养的报道。

目前未能查明混合菌液中是否含有其它种类的反硝化细菌。若有, 则可能由于其环境最适合 *Dysgonomonas* 生长, 导致其在竞争中完全压过了其它反硝化菌。我们将在后续实验中调整培养基的成分配比及培养温度, 探究是否会有其它反硝化菌落长出。

5. 结论

本项目通过 16S rRNA 测序和进化树构建, 为不含有有机氮源的选择培养基中分离出的两种菌落进行了定种。其一为硝化细菌 *Alcaligenes faecalis*; 其伴生菌落为兼性厌氧菌 *Dysgonomonas* 属的新种, 通过反硝化代谢获得能量。该实验结果对水产养殖相关菌群的进一步分析和利用具有一定意义。

参考文献

- [1] Kuypers, M., Marchant, H.K. and Kartal, B. (2018) The Microbial Nitrogen-Cycling Network. *Nature Reviews Microbiology*, **16**, 263-276. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.9>
- [2] Schaechter, M. (2009) Encyclopedia of Microbiology. AP, Amsterdam.
- [3] Gerardi, M.H. (2003) Nitrification and Denitrification in the Activated Sludge Process. John Wiley & Sons, Hoboken.
- [4] de Vet, W.W., van Loosdrecht, M.C.M. and Rietveld, L.C. (2012) Phosphorus Limitation in Nitrifying Groundwater Filters. *Water Research*, **46**, 1061-1069. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.075>
- [5] Veetil, A., et al. (2012) Characterization of *Alcaligenes faecalis* GPA-1 Producing Thermostable Extracellular α -Amylase. *Research in Biotechnology*, **3**, 19-27.
- [6] Parker, N., et al. (2016) Microbiology. OpenStax, Houston.
- [7] Hironaga, M., et al. (2008) Characterization and Antimicrobial Susceptibility of *Dysgonomonas capnocytophagoides* Isolated from Human Blood Sample. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, **61**, 212-213.
- [8] Yang, J.X., et al. (2018) Bioaugmentation with *A. faecalis* Strain NR for Achieving Simultaneous Nitrogen and Organic Carbon Removal in a Biofilm Reactor. *Bioresource Technology*, **247**, 871-880. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.189>
- [9] Zhao, B., An, Q., He, Y.L. and Guo, J.S. (2012) N₂O and N₂ Production during Heterotrophic Nitrification by *Alcaligenes Faecalis* Strain NR. *Bioresource Technology*, **116**, 379-385. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.113>
- [10] Zhao, B., et al. (2019) N₂O Production from Hydroxylamine Oxidation and Corresponding Hydroxylamine Oxidoreductase Involved in a Heterotrophic Nitrifier *A. faecalis* Strain NR. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **42**, 1983-1992. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02191-w>
- [11] Shoda, M. and Ishikawa, Y. (2014) Heterotrophic Nitrification and Aerobic Denitrification of High-Strength Ammonium in Anaerobically Digested Sludge by *Alcaligenes Faecalis* Strain No. 4. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **117**, 737-741.
- [12] Papen, H., et al. (1989) Heterotrophic Nitrification by *Alcaligenes faecalis*: NO₂⁻, NO₃⁻, N₂O and NO Production in Exponentially Growing Cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, **55**, 2068-2072.
- [13] Joo, H.S., Hirai, M. and Shoda, M. (2005) Nitrification and Denitrification in High-Strength Ammonium by *Alcaligenes faecalis*. *Biotechnology Letters*, **27**, 773-778.
- [14] Huang, Y.S., An, Q., Zhao, B., Lv, Q.H. and Guo, J.S. (2018) Potential for Aerobic NO₂⁻ Reduction and Corres-

- ponding Key Enzyme Genes Involved in *Alcaligenes faecalis* Strain NR. *Archives of Microbiology*, **200**, 147-158.
- [15] Chen, J., Gu, S.Y., Hao, H.H. and Chen, J.M. (2016) Characteristics and Metabolic Pathway of *Alcaligenes* sp. TB for Simultaneous Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **100**, 9787-9794.
- [16] Li, P., *et al.* (2017) Nitrogen Removal and N₂O Accumulation during Hydrogenotrophic Denitrification: Influence of Environmental Factors and Microbial Community Characteristics. *Environmental Science & Technology*, **51**, 870-879.
- [17] Zhang, Q.H., Zhang, Y.Y. and Li, D.P. (2017) Cometabolic Degradation of Chloramphenicol via a Meta-Cleavage Pathway in a Microbial Fuel Cell and Its Microbial Community. *Bioresource Technology*, **229**, 104-110.
- [18] Kodama, Y., Shimoyama, T. and Watanabe, K. (2012) *Dysgonomonas oryzaevi* sp. nov., Isolated from a Microbial Fuel Cell. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **62**, 3055-3059.
- [19] Kuai, L. and Verstraete, W. (1998) Ammonium Removal by the Oxygen-Limited Autotrophic Nitrification-Denitrification System. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 4500-4506.
- [20] Xu, Y., Yuan, Z. and Ni, B.J. (2017) Biotransformation of Acyclovir by an Enriched Nitrifying Culture. *Chemosphere*, **170**, 25-32.
- [21] Daims, H., Lebedeva, E.V., Pjevec, P., *et al.* (2015) Complete Nitrification by Nitrospira Bacteria. *Nature*, **528**, 504-509.
- [22] Kodama, Y. and Watanabe, K. (2008) An Electricity-Generating Prosthecate Bacterium Strain Mfc52 Isolated from a Microbial Fuel Cell. *FEMS Microbiology Letters*, **288**, 55-61.
- [23] Li, X.J., *et al.* (2018) Surfactants Selectivity Reallocated the Bacterial Distribution in Soil Bioelectrochemical Remediation of Petroleum Hydrocarbons. *Journal of Hazardous Materials*, **344**, 23-32.
- [24] Cassman, N.A., *et al.* (2018) Genome-Resolved Metagenomics of Sugarcane Vinasse Bacteria. *Biotechnology for Biofuels*, **11**, Article No. 48.
- [25] Sakairi, M., *et al.* (1996) Nitrogen Removal in Seawater Using Nitrifying and Denitrifying Bacteria Immobilized in Porous Cellulose Carrier. *Water Science and Technology*, **34**, 267-274.
- [26] Du, G., *et al.* (2003) Mixed Culture of Nitrifying Bacteria and Denitrifying Bacteria for Simultaneous Nitrification and Denitrification. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **19**, 433-437.