

一株海洋来源水质污染降解光合细菌的筛选及初步鉴定

姜红辛 娄绍悦 陈宴希 叶佳龙 兰兴泽 曾小英 廖艳娟*

广西民族大学 海洋与生物技术学院, 广西 南宁 530005

[摘要] 水质污染已成为全球生态环境和人类健康的重要威胁, 尤其是在海洋环境中, 急需探索有效的生物修复策略。本论文旨在筛选和鉴定一种来自红树林根际土壤的光合细菌, 以评估其在氨氮和亚硝酸盐去除方面的能力。我们通过土壤样品采集、富集培养、分离纯化及分子生物学鉴定等方法, 成功分离获得了 1 株具有显著降解能力的菌株 *Rhs.2024*。形态学特征显示该菌株在培养基上呈现圆形凸起, 且通过 PCR 扩增与测序确认其与红螺菌属相似度高达 99%。功能评估结果表明, *Rhs.2024* 在接种后 7 天内氨氮去除率达到 99.4%, 亚硝酸盐去除率达到 98.52%。这些结果表明 *Rhs.2024* 具备显著的水质净化潜力, 可能为水污染治理提供新的生物修复策略。然而, 本研究的局限性在于样本量较小及缺乏长期现场验证数据。未来的研究应进一步探索该菌株的基因功能及其在不同环境条件下的表现, 以推动微生物技术在水污染治理中的应用发展。整体来看, 本研究为海洋来源光合细菌在水质修复中的应用奠定了基础, 具有重要的生态和社会意义。

[关键词] 光合细菌; 水质净化; 分离鉴定

DOI: 10.33142/nsr.v1i3.14911

中图分类号: X172

文献标识码: A

Screening and Preliminary Identification of a Photosynthetic Bacterium for Water Pollution Degradation from Marine Sources

JING Hongxin, LOU Shaoyue, CHEN Yanxi, YE Jialong, LAN Xingze, ZENG Xiaoying, LIAO Yanjuan*

College of Marine and Biotechnology, Guangxi Minzu University, Nanning, Guangxi, 530005, China

Abstract: Water pollution has become an important threat to the global ecological environment and human health, especially in the marine environment, and there is an urgent need to explore effective bioremediation strategies. This paper aims to screen and identify a photosynthetic bacterium from mangrove rhizosphere soil to evaluate its ability in removing ammonia nitrogen and nitrite. We successfully isolated and obtained a strain *Rhs.2024* with significant degradation ability through soil sample collection, enrichment culture, separation and purification, and molecular biology identification methods. The morphological features show that the strain presents circular protrusions on the culture medium, and its similarity to the genus *Rhodospirillum* is confirmed to be as high as 99% through PCR amplification and sequencing. The functional evaluation results showed that within 7 days after inoculation, the ammonia nitrogen removal rate of *Rhs.2024* reached 99.4%, and the nitrite removal rate reached 98.52%. These results indicate that *Rhs.2024* has significant potential for water purification and may provide new bioremediation strategies for water pollution control. However, the limitations of this study lie in the small sample size and lack of long-term on-site validation data. Future research should further explore the genetic function of this strain and its performance under different environmental conditions, in order to promote the application and development of microbial technology in water pollution control. Overall, this study lays the foundation for the application of marine derived photosynthetic bacteria in water quality remediation, and has important ecological and social significance.

Keywords: photosynthetic bacteria; water purification; separation and identification

引言

水质污染不仅影响水体生态系统的健康, 也对人类的饮水安全和生物多样性造成严重威胁。随着全球工业化进程的加快, 水体污染问题日益严重, 尤其是在沿海地区, 污染源多样且复杂^[1]。尽管已有研究针对水质污染的影响开展了一定的探讨, 但对水质污染降解微生物的系统研究仍显不足, 尤其是在特定海洋环境中, 这一领域尚存较大的研究空白^[2]。

本研究关注海洋来源的水质污染及其降解微生物的筛选与鉴定, 这一问题在生物学和生态学领域具有重要性。关于水质污染和水体自净能力的研究已有一些进展,

许多研究集中在微生物的生态功能及其在水质修复中的潜力上。先前的研究表明, 某些微生物群体具备有效去除水中氮污染物的能力, 这为水质改善提供了新的视角^[3]。然而, 针对特定海洋环境中微生物群落的研究相对较少, 而这些微生物可能具备独特的代谢功能, 能够提升水质。因此, 探讨海洋环境中微生物的潜力, 对水质修复具有重要意义。

本研究以来自红树林根际土壤的光合细菌为研究对象。尽管已有研究在水质污染微生物的降解能力方面取得了一定成果, 但针对特定海洋环境中光合细菌的研究仍显不足。光合细菌的独特代谢特性, 使其在污水处理和水质

改善中展现出广阔的应用前景^[4]。通过挖掘这些微生物的潜力,本研究旨在为水质改善提供新的思路和解决方案。

本研究采用的研究方法包括土壤样品采集、富集培养、分离纯化及分子生物学鉴定等。这些方法的优势在于能够有效筛选和鉴定出具有降解能力的微生物,为后续的功能研究提供基础^[5]。具体目的在于筛选出一种新型光合细菌,并评估其在氨氮和亚硝酸盐去除方面的能力,以期为水质污染治理提供科学依据^[6]。通过这些方法的结合,研究不仅能够揭示光合细菌在水质净化中的潜力,还能为未来的生物修复技术提供有力支持。

综上所述,为应对水质污染提供新的解决方案,并推动微生物技术在环境治理中的应用发展。尽管已有研究探讨了光合细菌在水质净化中的作用,但对其特定菌株的筛选及其氨氮、亚硝酸盐去除能力的系统性研究仍显不足。因此,本研究旨在通过系统性的方法探索海洋环境中光合细菌的降解能力,采用高灵敏度的分子生物学技术,对分离获得的光合细菌进行分子鉴定,以确保所选菌株的准确性和可靠性。具体方法包括 PCR 扩增和基因测序,这些技术的应用将有助于建立系统发育树,揭示不同菌株之间的亲缘关系。通过这些方法,我们将能够筛选出具有良好氨氮及亚硝酸盐去除能力的光合细菌菌株,为水体富营养化的治理提供新的解决方案。通过这一研究,我们期望增强对水体富营养化治理的理解,为未来的生物治理提供新的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 供试土样

实验材料均采集自中国广西壮族自治区北海红树林保护区的红树林根际土壤表层 5~15cm 处沉积物。在低潮期时利用无菌铲在 5 个相距约 15m 的不同区域集中采集沉积物备样,并用聚乙烯无菌袋带回实验室,放置于 4 °C 冰箱保存。

1.2 培养基

(1) 富集培养 取已经灭菌的 200ml 光合细菌液体富集培养基,加入少许玻璃珠,同时接入泥土样品 10g,震荡摇匀,造成厌氧环境。在 28 °C、光照 5000lx 的生化培养箱中培养至培养液呈红棕色,并且在瓶底淤泥表面有深红色沉积物,使欲要分离的光合细菌成为优势种。

(2) 多次富集 取适量经初步富集的菌液于试管液体富集培养基中,再次富集,重复两次,使光合细菌进一步繁殖增多,成为绝对优势种。

(3) 光合细菌的分离,先在无菌培养皿上倒一层培养基,然后涂布和划线菌液,再在其表面到一层培养基,形成无氧环境。继续培养至单菌落。待单菌落长出后,用穿刺法继续纯化目的菌,即用接种针在平板中挑取菌落为红色和绿色的菌落,插入培养基底部,继续培养后进行菌种鉴定。

1.3 光合细菌的初步鉴定

首先观察分离平板上生长的菌落形态及特征,对不同菌落进行革兰氏染色,显微镜下观察菌体形态特征。

1.4 分子生物学鉴定

以基因组 DNA 为模板,使用引物扩增 16S rDNA 基因片段,所得序列提交 Ez Bio Cloud,和 Ez Bio Cloud 数据库进行同源性比对,用 MEGA 6.0 软件比对分析,采用 Neighbor-Joining 算法构建系统发育树。

PCR 扩增反应体系: 16S rDNA 扩增参考文献, PCR 产物提交至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。目的条带大约 1500bp 左右。反应结束后,进行琼脂糖凝胶电泳,以检测是否有目的条带。

引物是: F:5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';

R:5' -GG TTACCTGTACGACTT-3'。

PCR 反应条件: 95 °C 5min; 95 °C 15s, 59 °C 20s, 75 °C 1min, 25 个循环。

1.5 系统发育树的构建

测序完成后进行序列比对,然后构建系统发育进化树。所得序列提交 Ez Bio Cloud,并与 Ez Bio Cloud 数据库中的序列进行同源关联比对,最后利用 MEGA 6.0 软件进行 16S rDNA 序列的比对分析,采用 Neighbor-Joining 算法计算,构建系统进化树。

1.6 菌株 *Rhs.2024* 氨氮清除能力的评估

将液体培养基中的氮源去除,以 0.25g/L 氯化铵作为氮源配制培养基,接种培养方式同上,以不加待测菌液的培养基对照组,分别设 3 个平行。每间隔 24 h 取 100mL 菌液,5000r/min 离心 10min,离心后菌体立即冻存于液氮罐中,采用纳氏比色法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 1mL,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 2000lx 倒置培养 7d 后,测定菌落数。

1.7 菌株 *Rhs.2024* 亚硝酸盐清除能力的评估

将液体培养基中的氮源去除,以 2mg/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。对照组不加待测菌液,3 个平行组。每间隔 24h 于超净工作台取 100mL 培养中的菌液,5000r/min 离心 10min,离心后菌体立即冻存于液氮罐中,采用分光光度法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)。

2 结果与分析

2.1 光合细菌的分离纯化

经多次富集培养分离筛选待测菌中，分离获得了 1 株菌株编号为 *Rhs.2024*。菌株形态特征见图 1。在富集双层培养基上呈圆形凸起，外缘光滑，表面湿润层菌落。在穿刺培养基中层鲜红色，有明显向外生长痕迹，呈动力阳性，其在无氧环境下生长活跃。革兰氏染色显紫红，与大肠杆菌染色颜色一致，呈革兰氏阴性，菌体呈杆状，两端钝圆。

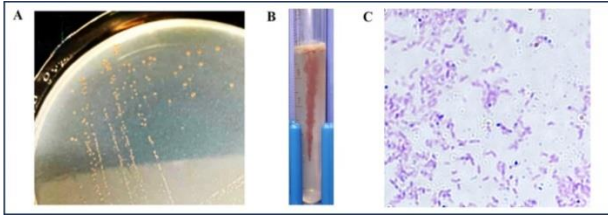


图 1 菌株 *Rhs.2024* 特性

A 菌落特征; B 穿刺生长特征; C 革兰氏染色特征

2.2 分子鉴定

以菌株 DNA 为模板，利用细菌 16S rDNA 基因引物进行 PCR 扩增，测序由上海生物工程有限公司完成。凝胶电泳结果见图 2，通过 16S rDNA 引物 PCR 扩增，得到长度约为 1500bp 的产物，在凝胶成像系统下观察。泳道 Marker 为 2000bp，之后的三个泳道均为菌株 DNA 条带，条带单一，无杂带。

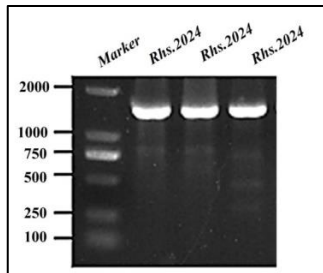


图 2 菌株 *Rhs.2024* 16srDNA 检测

将菌株 *Rhs.2024* 的 16S rDNA 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 rDNA 基因序列与红螺菌属 (*Rhodobacter*) 相似度高达 99%。采用邻接法构建系统发育进化树，菌株 *Rhs.2024* 与红螺菌属球形红菌外硫红螺菌属的沙氏外硫红螺菌 (*Rhodobacter sphaeroide*) 聚为一支，置信度为 99% (图 3)。

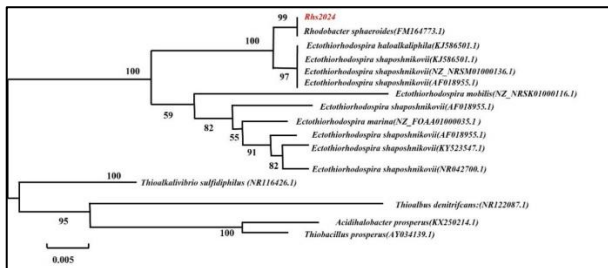


图 3 菌株 *Rhs.2024* 系统发育进化树

2.3 菌株 *Rhs.2024* 氨氮清除能力的评估

光合细菌初始浓度为 7.9×10^{12} cell/mL (血球计数法)。接种前 (天)，培养液中的氨氮含量为 $84.24 \text{ mg/L} \pm 0.22 \text{ mg/L}$ 。接种后第 1 天到第 4 天氨氮去除效果最显著，4d 相互间氨氮累计去除量和累计去除率差异显著 ($P < 0.001$)，接种第 1 天氨氮去除量最大，为 $55.70 \pm 0.89 \text{ mg/L}$ ，氨氮去除率为 $66.31\% \pm 0.87\%$ 。7 天后菌株总氨氮含量为 $0.456 \pm 0.13 \text{ mg/L}$ ，总体氨氮去除率为 99.4%，见图 4。

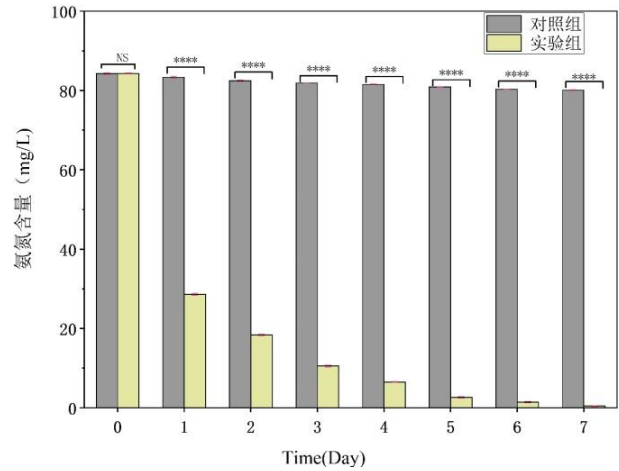


图 4 菌株 *Rhs.2024* 对氨氮消除情况图

2.4 菌株 *Rhs.2024* 亚硝酸盐清除能力的评估

在同种光合细菌初始浓度条件下，接种前 (天) 培养液中的亚硝酸盐含量为 $1.33 \pm 0.018 \text{ mg/L}$ 。接种后第 1 天到第 3 天亚硝酸盐去除效果最显著，这 3 天相互间亚硝酸盐累计去除量和累计去除率差异极显著 ($P < 0.001$)，接种第 1 天，亚硝酸盐去除量最大，为 $1.00 \pm 0.154 \text{ mg/L}$ ，亚硝酸盐去除率最高，为 $76.92\% \pm 0.87\%$ 。接种后第 3 天和第 4 天相互间的亚硝酸盐累计去除量和累计去除率差异不显著；接种后第 7 天，亚硝酸盐累计去除量为 $1.304 \pm 0.34 \text{ mg/L}$ ，累计去除率为 $98.52\% \pm 0.45\%$ ，见图 5。

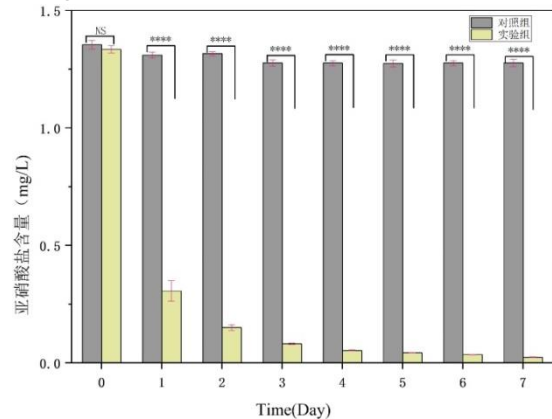


图 5 菌株 *Rhs.2024* 对亚硝酸盐消除情况图

3 讨论

在全球范围内，水质污染已成为一个日益严重的问题，

严重影响了生态系统的健康和人类的饮水安全。水污染主要源于工业废水、农业径流和城市污水的排放,导致水体中氮、磷等营养物质的过量积累,进而引发水华和生态失衡。这些污染物不仅影响了水体的生物多样性,还可能对人类健康构成潜在威胁,例如通过饮用水传播的病原体和有毒物质^[7-8]。因此,寻找有效的水质修复方法具有重要的科学和社会意义,尤其是在海洋环境中,水质污染的影响更加显著。

本研究专注于筛选和鉴定来自红树林根际土壤的光合细菌,探索其在水质污染治理中的应用潜力。通过土壤样品采集、富集培养以及分子生物学鉴定等方法,我们成功分离出一株具有优异氨氮和亚硝酸盐去除能力的光合细菌 *Rhs.2024*。研究表明,该菌株在氨氮去除率方面达到 99.4%,亚硝酸盐去除率达到 98.52%。这些发现不仅为水质污染治理提供了新的生物修复策略,也为海洋微生物的生态功能研究奠定了基础^[9-10]。

本研究的结果揭示了 *Rhs.2024* 这一新发现的光合细菌在水质污染治理方面的显著潜力,尤其在氨氮和亚硝酸盐的去除能力上表现突出。通过 PCR 扩增和测序,我们确认了该菌株的 16S rRNA 基因序列与红螺菌属的相似度高达 99%,为理解光合细菌的种类及其生态功能提供了重要的分子基础^[3]。这一结果不仅增强了我们对光合细菌在水质改善中潜在作用的认识,还为微生物分类学提供了新的见解。红螺菌属在水质净化过程中可能通过特定的生理机制发挥重要作用,例如通过代谢途径有效去除水中氮污染物,从而促进生态系统的健康^[6]。

进一步分析表明, *Rhs.2024* 在氨氮和亚硝酸盐去除能力方面的表现与其生长状态密切相关,尤其是培养条件和初始氨氮浓度的变化对去除效果有显著影响。这一发现提示我们,在实际应用中,有必要优化培养条件,以最大限度地提高光合细菌的降解能力^[4]。此外,研究还表明,不同光合细菌在氮污染去除中的作用机制存在差异,未来的研究可以集中于探讨这些机制,以便更好地应用于水质治理^[5]。

综上所述, *Rhs.2024* 作为一种新型光合细菌,展示了其在水质污染治理中的广泛应用前景。其高效的氨氮和亚硝酸盐去除能力为生物修复技术的发展提供了新的思路。未来的研究应进一步探讨影响光合细菌基因表达的环境因素,以及基因功能的研究如何指导改良菌株的开发,以实现更为有效的水质治理策略^[11]。

本研究的局限性主要体现在样本量的不足及环境因子的多样性考量方面。尽管我们成功筛选出光合细菌 *Rhs.2024* 并评估了其在特定水质条件下的降解能力,但研究仅基于单一环境样本,未能涵盖不同水体条件下微生物的适应性和降解效率。此外,缺乏长期现场验证数据限制了结果的普适性,这意味着在不同生态环境中应用该菌株

的效果尚需进一步探讨。因此,未来研究应考虑扩大样本范围并进行多样化环境因子的系统分析,以获得更全面的结论。

综上所述,本研究成功鉴定了一株具有优异去氨氮和去亚硝酸盐能力的光合细菌 *Rhs.2024*,展示了其在水质污染治理中的潜在应用价值。通过结合现代分子生物学技术与传统微生物学方法的研究策略,我们为水体生态修复提供了新的思路与方向。未来的研究将集中于深入探索该菌株的基因功能及其在多种环境条件下的表现,以进一步推动微生物技术在水污染治理中的实际应用。

基金资助:2023 年国家级大学生创新创业训练计划项目(项目编号:S202310608051);广西民族大学教改项目:广西民族大学创新创业教育金课,项目编号:民大发(2023)237号。

[参考文献]

- [1] Yu C, Huang X, Chen H, et al. Managing nitrogen to restore water quality in China[J]. Nature, 2019, 567(7749): 516-520.
- [2] Shi X, Wang L, Chen A, et al. Enhancing water quality and ecosystems of reclaimed water-replenished river: A case study of Dongsha River, Beijing, China[J]. Sci Total Environ, 2024(926): 172-173.
- [3] Pan D, Huang Q, Chen W. Screening and identification of two heterotrophic nitrifying bacteria and characterization of their capacity for nitrogen removal[J]. Wei Sheng Wu Xue Bao, 2011, 51(10): 1382-9.
- [4] De Guardia A, Mallard P, Teglia C, et al. Comparison of five organic wastes regarding their behaviour during composting: part 2, nitrogen dynamic[J]. Waste Manag, 2010, 30(3): 415-25.
- [5] Yang X, Liu L, Wu B, Liu S, Chen F. Screening and ammoxidation characteristics of an ammonium oxidizing bacteria group[J]. Wei Sheng Wu Xue Bao, 2015, 55(12): 1608-18.
- [6] Cui L, Zhu B, Zhang X, et al. Influences of organic nitrogen on the removal of inorganic nitrogen from complicated marine aquaculture water by *Marichromatium gracile* YL28[J]. J Biosci Bioeng, 2020, 130(2): 179-186.
- [7] Li H, Gao X, Gu Y, et al. Comprehensive large-scale investigation and assessment of trace metal in the coastal sediments of Bohai Sea[J]. Mar Pollut Bull, 2018, 129(1): 126-134.
- [8] Kucherenko M, Kovalchuk L, Strus O, et al.

Biosafety of marine vessels: current trends and prospects[J]. *Int Marit Health*, 2023, 74(2):98-104.

[9] Wu G, Li J, Luo W. Spatial distribution, source apportionment, and assessment of marine water quality parameters in the Bohai Sea, China[J]. *Mar Pollut Bull*, 2024(195):115526.

[10] Jung JM, Kim CJ, Chung CS, et al. Applying new regional background concentration criteria to

assess heavy metal contamination in deep-sea sediments at an ocean dumping site[J]. Republic of Korea. *Mar Pollut Bull*, 2021(200):116065.

[11] Xue S, Zhang X, Ngo HH, et al. Food waste based biochars for ammonia nitrogen removal from aqueous solutions[J]. *Bioresour Technol*, 2022(292):121927.

作者简介: 廖艳娟, 女, 壮族, 广西, 博士, 讲师, 广西民族大学海洋与生物技术学院。