

Research Status of Hydrogen-Oxidizing Bacteria

Lin Wang^{1*#}, Lulu Li², Ruirui Liu², Zhiying Li²

¹Department of Medical Technology, Xi'an Medical University, Xi'an Shaanxi

²Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China Ministry of Education, Xi'an Shaanxi

Email: [#]wwwang@nwu.edu.cn

Received: May 4th, 2019; accepted: May 23rd, 2019; published: May 30th, 2019

Abstract

Hydrogen produced by leguminous plants during nitrogen fixation and hydrogen-oxidizing bacteria which are dependent on hydrogen constitutes the microbial community structure, which has an important impact on soil fertility and nutrient cycling. This paper introduces the research background and definition of hydrogen-oxidizing bacteria. At present, the research on hydrogen-oxidizing bacteria includes separation and identification, determination and analysis of 16SrRNA and design of experimental schemes in domestic and foreign laboratories.

Keywords

Hydrogen Peroxide Bacteria, Research Status, Experimental Scheme

氢氧化细菌研究现状

王琳^{1*#}, 李璐璐², 刘瑞瑞², 李志英²

¹西安医学院医学技术系, 陕西 西安

²西部生物资源与现代生物技术教育部重点实验室, 陕西 西安

Email: [#]wwwang@nwu.edu.cn

收稿日期: 2019年5月4日; 录用日期: 2019年5月23日; 发布日期: 2019年5月30日

摘要

豆科植物在固氮过程中产生的氢气与其依赖于氢气而生长的氢氧化细菌构成了豆科植物根际所特有的微

*第一作者。

#通讯作者。

生物群落结构，对土壤肥力与养分循环产生重要的影响。本文介绍了氢氧化细菌的研究背景、定义等；目前国内外实验室对氢氧化细菌的研究包括分离鉴定、16SrRNA的测定分析以及实验方案的设计。

关键词

氢氧化细菌，研究现状，实验方案

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

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

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



Open Access

1. 氢氧化细菌

1.1. 研究背景

根瘤菌可以侵入豆科植物形成共生体 - 根瘤，根瘤通过一系列的生化反应将大气中游离态氮分子还原成结合态的氨分子[1]，氨分子作为可吸收的氮元素被作物吸收利用，这样不但减少化肥的使用，还可以提高作物的产量。非豆科作物与豆科作物的增产效益被认为是土壤中残留的氮造成的，但研究表明大约 75%的增产效益不能用现有的理论解释[2]。生物每固定 1 mol N₂可释放 1.5 mol H₂，在总的固氮反应中能量消耗占到总反应的 35%。虽然固氮作用产生了大量的 H₂，但是在豆科作物根际土壤附近很少监测到有 H₂ 释放出，产生这种现象的原因：1) 有些植物根瘤中含有能氧化氢气的吸氢酶，此类作物的 H₂ 会在根瘤内部被氧化，从而回收部分损失的能量；2) 而大部分与豆科作物共生的根瘤菌并没有吸氢酶，这就会导致固氮产生的大量 H₂ 被释放到根际土壤中，此时 H₂ 的消失可能是根际周围与植物生长发育关系密切的大量的微生物的作用。Mclearn 等人对此进行了研究，将 H₂ 处理的土壤样品经高温高压灭菌后，发现氧化氢气的能力消失了，这就说明 H₂ 的氧化是由微生物造成的；土壤中加入苯来特后氧化效率没有明显降低，但是加入链霉素后氧化效率明显降低，说明根瘤附近氧化 H₂ 的是细菌[3]。董忠民等通过对豆科植物根瘤固氮过程中放氢作用的研究和根际微生物的分析，提出了不含吸氢酶根瘤菌在固氮过程中释放的 H₂ 能够促进根际氢氧化细菌的生长并进一步促进植物生长的理论，即“氢肥理论”[4]。对根际氢氧化细菌进行研究，可以丰富根际微生物的种质资源，揭示与豆科作物的轮作、间作效益的分子基础，为开拓农业可持续发展提供新思路。

1.2. 氢氧化细菌定义

氢氧化细菌是根际促生菌的一类[5]，它利用根瘤固氮过程中释放的氢气获得能量和还原力，同化大气中的二氧化碳，进行自养或兼性自养生长，合成细胞物质进行化能自养生活[1]。

1.3. 氢氧化细菌特征

在含有 H₂ 的条件下氢氧化细菌能够生长和繁殖，多分布于豆科地、沼泽，稻田。最适生长温度一般在 28℃~32℃，高于 40℃生长受到抑制；最适生长 pH 一般为 6.3~7.7。大部分氢氧化细菌属于革兰氏阴性菌，但也发现一些属于革兰氏阳性菌，如脂肪杆菌、芽孢杆菌[6]。氢氧化细菌能以 H₂ 为能量，将 CO、HCO₃⁻、CO₂ 等无机碳源转化成菌体细胞所需的碳源物质，例如胞外多糖，卵磷脂，胞内多糖等[7]。有些氢氧化细菌还可以还原 NO₂⁻、NO₃⁻，具有反硝化能力。

2. 研究现状

2.1. 氢氧化细菌的分离与培养

由于氢氧化细菌进行自养、异养或兼性异养生长,对培养基的要求比较简单。在培养时采用 MSA 培养基,铵盐、磷酸盐对氢氧化细菌的影响较大[8];微量元素对氢氧化细菌影响不大;有研究表明有些氢氧化细菌的氢化酶与微量元素镍存在特异性关系,因而它们的生长需要微量的镍[9]。对氢氧化细菌进行分离时,传统采用配气法,即在密闭容器中按照 85:5:10 的比例通入 H_2 , O_2 , CO_2 , 此方法存在一定的局限性:① 当氢气浓度 $\geq 5\%$ 时易爆炸,而配气法提供的氢气浓度较高,因此存在一定的安全风险。② 氢氧化细菌分离培养时间较长,所以当氢气耗尽后需要重新配气,操作繁琐。③ 实验室的筛选条件与自然环境有很大的差异,对于分离与研究自然状态下氢氧化菌群造成一定的影响[10][11]。针对存在的问题进行改进,将电解磷酸缓冲液产生的气体,与空气泵通入的空气进行混合,再将混合气体通入串联的并装有土壤与石英砂混合物的试管[4]。此方法操作简单,无安全隐患;分离条件与自然环境接近,便于筛选出自然条件下的氢氧化细菌,这对于研究自然状态下土壤中氢氧化细菌种群的生理生化特性具有重要的意义。研究表明,改变通入培养基的三种气体的比例,对氢氧化细菌的分离有很大的影响。

2.2. 氢氧化细菌检测与鉴定

2.2.1. 氢氧化细菌的检测

(一) 化能自养生长实验

检测菌株是否能在以 H_2 作为唯一能源的无机盐培养基上自养生长,这种方法比较可靠[12]。

(二) 菌株氧化氢能力测定

利用气相色谱法检测菌株的氧化氢能力,根据氢气的减少量确定是否有吸氢酶的存在。实验过程中要注意密封,防止氢气的泄露,否则会造成实验误差大。

(三) 氢化酶能力检测

采用氯化三苯基四氮唑法(TTC)试验来检测吸氢酶的活性[13],是常用的一种检测方法,但易出现假阳性[14]。分离出的单菌落约有 65%~90%能够降低 TTC 的合成,显示阳性结果,但只有 30%~65%的单菌显示有氧化氢气的的能力。

(四) 基因杂交实验

基因杂交检测是否含有吸氢酶基因,只可以测得一小部分的基因。可能的原因:DNA 探针仅包含了全部可能的氢化酶基因的一小部分,分离菌的基因多样化不能被 DNA 探针检测到。但对于自养生长的细菌效果较好[15]。

在对氢氧化细菌的检测过程中应将几种方法结合起来使用,以确保实验结果的可靠性。

2.2.2. 氢氧化细菌的鉴定

对检测得到的细菌进行鉴定,传统的生理生化特性测定要求测试项目多,费时费力,不适合做大量细菌的分类鉴定,可是作为细菌鉴定的经典方法仍不可忽视。高通量细菌鉴定因其具有稳定性高,成本低以及检测周期短等的优势已经成为目前的主流方法。现在的研究并未对已经发现的氢氧化细菌进行系统分类,它们分属于不同的种属,目前已知的氢氧化细菌分属于副球菌属,芽孢杆菌属,假单胞菌属,分支杆菌属,产碱菌属,诺卡氏菌属,氢噬胞菌属,棒杆菌属,黄单胞属,螺旋状菌属,勒米诺氏菌属,邻单胞菌属,脂肪杆菌属,伯克霍德菌,地杆菌属等[16][17][18][19]。

2.3. 菌株促进植物生长的机制的探讨

根际促生菌(plant growth-promoting rhizobacteria PGPR)定殖于植物根系,通常产生抗生素、ACC 脱

氨酶、铁载体和 HCN 等物质[20], 直接促生吲哚乙酸(IAA)或是抑制拮抗根际的病原菌, 调整作物根际有益微生物数量, 从而实现农作物的稳产、高产。

氢氧化细菌作为根际促生菌的一种, 合成的吲哚乙酸可以吸附在种子和根的表面被植物所利用, 同时也可以和植物内生的吲哚乙酸共同作用刺激细胞增殖和生长, 或诱导 ACC 合成酶的活性, 导致植物中 ACC 的增加[21]。植物中 ACC 是乙烯合成的前体物质, 从种子或根部渗出的 ACC 会被细菌利用, 并在 ACC 脱氨酶的作用下能将 ACC 分解成为 α -酮丁酸和氨。ACC 水平的降低导致了植物中乙烯含量的减少, 从而延缓果实的成熟、促进幼苗的生长。

微生物经过长期的进化, 可以通过分泌铁载体获取 Fe^{3+} , 或者通过其他多种机制从极低浓度环境中获得 Fe^{3+} 。铁元素常以二价或三价的形式存在于含铁的化合物中, 铁元素也是生命体的必需元素。细胞最佳的生长条件需要 $1 \mu M$ 的 Fe^{3+} , 而生物体生存的环境多是氧化环境, Fe^{2+} 极易被氧化成 Fe^{3+} 并以氧化铁或氢氧化铁不溶性的多聚体的形式存在, 因此很难被微生物利用。PGPR 通过分泌各种对 Fe^{3+} 具有较高亲和力的铁载体, 结合根周围可被利用的大多数的 Fe^{3+} , 有效阻止病原微生物在植物根际的繁殖[22] [23]。

2.4. 对分离菌株进行序列分析

rDNA 分子具有高度保守性, 在所有细胞生物中都存在, 在长期的进化中, 16SrDNA 的总碱基数有所不同, 保守的部分使不同序列很容易相互对齐进行比较。基因序列分析技术是建立系统分类的主要技术, 有人建议 DNA 相关性 $\geq 70\%$, 16SrDNA 序列差异 $\leq 1\% \sim 1.5\%$ 的细菌属于同一种, 这使细菌的种有一个稳定和统一的标准[24]。利用菌株与某种菌的同源性以及在系统发育树上的置信度对细菌进行分类。序列同源性分析法具有准确快速的优越性, 可以准确鉴定细菌到属, 但对属下种间遗传距离非常近的细菌却不能将分类地位确定到种的水平。

3. 实验方案

在微生物的研究领域中, 99%以上的微生物都是目前未(难)被纯培养的[25], 可以采用分子学方法对其进行检测。依据国内外目前研究的进展, 可进行如下方面的实验: 采集豆科植物在固氮过程中能释放氢气的根际土壤, 采样时取 0~10 cm 处的表层土在 $4^{\circ}C$ 条件下并在一周之内处理, 土壤在实验室中风干 48 小时, 并在制备土壤微生物之前通过振动筛摇床 AS 200 R 过筛(2 mm 筛目大小), 测定土壤的土质, pH, 全碳和全氮[26]。将电解磷酸缓冲液产生的气体, 与空气泵通入的空气进行混合, 再将混合气体通入装有土壤与石英砂混合物的试管, 调节产生的氢气量为 525 ppmv, 接近固氮植物释放的氢气量, 处理时间约 20 天。处理之后进行细菌的筛选培养并测量土壤的土质, pH, 全碳和全氮, 分析氢气处理后的土壤的理化性质是否有明显的变化; 之后对细菌进行分离, 纯化后的细菌进行气相色谱分析, 筛选具有明显吸氢能力的细菌。将细菌 16SrRNA 基因的 V4 区 PCR 扩增, 对筛选的细菌通过 qPCR 进行细菌的 16SrRNA 和 hhyL 基因的定量。通过测定土壤理化性质的变化与 16SrRNA 和 hhyL 基因的定量, 以此为依据判断在经过处理后土壤微生物含量是否发生变化。

或者通过改变氢气的浓度来进行实验, 从而判断不同氢气浓度对于土壤中微生物的核型的影响。并进行核糖体 DNA 扩增片段限制性内切酶分析(ARDRA), 通过部分克隆序列测定构建细菌克隆文库的系统发育树。通过实验分析在哪个氢气浓度时氢氧化细菌含量多, 从而在该氢气浓度下筛选具有较强吸氢能力的氢氧化细菌, 进行细菌对作物的促生实验。促生实验可采用盆栽的方法, 具有操作简单, 实验条件易于控制的优点。取大田土壤一份用于对照组, 一份用于试验组。试验组将筛选到的具有较强吸氢活性的细菌制备菌液添加在土壤中。每个试验设置 3 个对照, 且设置一定的浓度梯度。可以通过测量植物的根茎等生理指标来判断筛选到的细菌对植物是否有明显的促生长机制, 以便将氢氧化细菌制成菌剂,

将实验室结果应用于实际农业生产中。

或将已经筛选到的对氢气有较强氧化能力的细菌，测定此细菌的全基因组，通过一定的实验操作，合成氢氧化细菌的特异的引物，对氢气处理前后的土壤进行筛选具有较强吸氢能力的细菌。

4. 展望

将含有氧化细菌的根际豆科植物引入农业生产，不仅可以保持土壤肥力，保证现代农业的可持续发展，还可以增加效益，增加满足人类对食物的需求。然而，国内外关于氢氧化细菌特性的研究尚未进行深入的学术研究。主要原因是培养条件不能满足微生物对营养和环境条件的要求。由于氢氧化细菌的独特特性和大多数土壤细菌不能耕种土壤，氢氧化细菌的分离是困难的，到目前为止没有太多的结果。对于少数实验室来说，氢氧化细菌的分离、培养和鉴定只是世界上研究的少数几个实验室，虽然氢氧化细菌的研究尚处于起步阶段，但有充分的理由相信，氢氧化工程菌的未来通过筛选和改造将广泛应用于农业，大大提高作物的产量和质量。同时还可以从根本上解决土壤、水和食物污染，人类生存和健康问题，具有非常重要的研究价值。

基金项目

国家自然科学基金(41571243); 西安医学院配套基金项目(2017PT14); 西安医学院国家基金培育项目(2017GJFY16)。

参考文献

- [1] 赵娟. 绿豆根际氢氧化细菌的分离鉴定及促生作用研究[D]: [硕士学位论文]. 西安: 西北大学, 2012.
- [2] Hesterman, O.B., Sheaffer, C.C., Barnes, D.K., Lueschen, W.E. and Ford, J.H. (1986) Alfalfa Dry-Matter and Nitrogen-Production, and Fertilizer Nitrogen Response in Legume-Corn Rotations. *Agronomy Journal*, **78**, 19-23. <https://doi.org/10.2134/agronj1986.00021962007800010005x>
- [3] Irvine, P., Smith, M. and Dong, Z. (2004) Hydrogen Fertilizers: Bacteria or Fungi? *Acta Horticulturae*, **631**, 239-242. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2004.631.30>
- [4] Dong, Z. and Layzell, D.B. (2001) H₂ Oxidation, O₂ Uptake and CO₂ Fixation in H₂ Treated Soils. *Plant and Soil*, **229**, 1-12. <https://doi.org/10.1023/A:1004810017490>
- [5] 郑士民. 自养微生物[M]. 北京: 科学出版社, 1983.
- [6] 付博, 王卫卫, 郝莹, 等. 紫花苜蓿根际氢氧化细菌的分离与鉴定[J]. 应用与环境生物学报, 2009, 15(5): 650-654.
- [7] Bowien, B. and Schlegel, H.G. (1981) Physiology and Biochemistry of Aerobic Hydrogen-Oxidizing Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, **35**, 405-452. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.35.100181.002201>
- [8] Jauris-Heipke, S., Liegl, G., Preacmursic, V., et al. (1995) Molecular Analysis of Genes Encoding Outer Surface Protein C (OspC) of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato: Relationship to *ospA* Genotype and Evidence of Lateral Gene Exchange of *ospC*. *Journal of Clinical Microbiology*, **33**, 1860-1866.
- [9] Hayashi, N.R., Oguni, A., Yaguchi, T., et al. (1998) Different Properties of Gene Products of Three Sets Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase from a Marine Obligately Autotrophic Hydrogen-Oxidizing Bacterium, *Hydrogenovibrio marinus*, Strain MH-110. *Journal of Fermentation & Bioengineering*, **85**, 150-155. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)86759-1](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)86759-1)
- [10] Aragno, M. and Schlegel, H.G. (1981) The Hydrogen-Oxidizing Bacteria. In: Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H.G., Balows, A. and Schlegel, H.G., Eds., *The Prokaryotes*, Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-13187-9_70
- [11] Goto, E., Suzuki, K., Kodama, T. and Minoda, Y. (1977) Improvement of Initial and Exponential Growth of Hydrogen Bacteria, Strain 9-5. *Agricultural and Biological Chemistry*, **41**, 521-525. <https://doi.org/10.1080/00021369.1977.10862529>
- [12] Sofowora, E.A., Isaac-Sodeye, W.A. and Ogunkoya, L.O. (1975) Isolation and Characterisation of an Antisickling Agent from Fagara *Zanthoxyloides* Root. *Lloydia*, **38**, 169-171.

- [13] Aragno, M., Schlegel, H.G., Balows, A., *et al.* (1992) The Mesophilic Hydrogen-Oxidizing (Knallgas) Bacteria. In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.H., Eds., *The Prokaryotes*, Springer, New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2191-1_55
- [14] 蒙渊. 产铁载体和 ACC 脱氢酶的氢氧化细菌筛选及促生作用研究[D]: [硕士学位论文]. 西安: 西北大学, 2011.
- [15] 周晓伦. 蚕豆根际氢氧化细菌的分离及其对 Cr⁶⁺胁迫下白菜幼苗促生作用的研究[D]: [硕士学位论文]. 西安: 西北大学, 2015.
- [16] M.T.马迪根. 微生物生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [17] Dong, Z., Wu, L., Kettlewell, B., Caldwell, C.D. and Layzell, D.B. (2003) Hydrogen Fertilization of Soils Is This a Benefit of Legumes in Rotation? *Plant Cell & Environment*, **26**, 1875-1879. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.01103.x>
- [18] Meyer, O. and Schlegel, H.G. (1978) Reisolation of the Carbon Monoxide Utilizing Hydrogen Bacterium *Pseudomonas carboxydovorans* (Kistner) Comb. Nov. *Archives of Microbiology*, **118**, 35-43. <https://doi.org/10.1007/BF00406071>
- [19] Maimaiti, J., Zhang, Y., Yang, J., *et al.* (2007) Isolation and Characterization of Hydrogen-Oxidizing Bacteria Induced Following Exposure of Soil to Hydrogen Gas and Their Impact on Plant Growth. *Environmental Microbiology*, **9**, 435-444. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01155.x>
- [20] 夏铁骑. 植物根际促生菌及其应用研究[J]. 济源职业技术学院学报, 2008, 7(3): 7-11.
- [21] 付博, 王卫卫, 唐明, 等. 一株产 1-氨基环丙烷-1-羧酸脱氢酶的氢氧化细菌的分离鉴定及酶活力测定[J]. 微生物学报, 2009, 49(3): 395-399.
- [22] 陈双雅, 张永祥, 蔡向群. 三株拮抗细菌对水仙叶大褐斑病的拮抗机理[J]. 中国生物防治学报, 2003, 19(1): 11-15.
- [23] 陈旋, 曹福祥, 李正楠, 等. 细菌嗜铁素、DAPG 和 PCA 对板栗疫病菌的抑制作用[J]. 河北林果研究, 2006, 21(4): 404-408.
- [24] Siddikee, M.A., Glick, B.R., Chauhan, P.S., Yim, W. and Sa, T. (2011) Enhancement of Growth and Salt Tolerance of Red Pepper Seedlings (*Capsicum annuum* L.) by Regulating Stress Ethylene Synthesis with Halotolerant Bacteria Containing 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Deaminase Activity. *Plant Physiology and Biochemistry*, **49**, 427-434. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.01.015>
- [25] Woese, C.R. (1996) Phylogenetic Trees: Whither Microbiology? *Current Biology*, **6**, 1060-1063. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)70664-7](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)70664-7)
- [26] Piché-Choquette, S., Tremblay, J., Tringe, S.G. and Constant, P. (2016) H₂-Saturation of High Affinity H₂-Oxidizing Bacteria Alters the Ecological Niche of Soil Microorganisms Unevenly among Taxonomic Groups. *PeerJ*, **4**, e1782. <https://doi.org/10.7717/peerj.1782>

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2324-7967, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: ije@hanspub.org