

异养硝化/好氧反硝化菌的分离鉴定及其在不同培养条件下产 N_2O 研究

蒋静艳¹, 胡正华³, 黄耀^{1,2}

(1. 南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095; 2. 中国科学院大气物理研究所, 北京 100029; 3. 南京信息工程大学环境科学与工程学院, 南京 210044)

摘要: 以乙酰胺为唯一碳氮源分离纯化出 2 株既能异养硝化又能好氧反硝化的菌株 XM1 和 HX2, 革兰氏阴性, 分别为链状杆菌和球状菌. 在富集培养基中, 菌株 HX2 产 N_2O 量为 XM1 的 76 倍; 两菌株均能分别以葡萄糖、甘露醇、酒石酸钠为唯一碳源进行生长; 也可分别以硝酸钠和硫酸铵为唯一氮源进行硝化和反硝化作用, 但菌株 XM1 生长速率快于 HX2, 且有较多的 NO_2^- 积累. 部分长度的 16S rDNA 序列分析表明, 菌株 XM1 与 HX2 的序列与 *Pseudomonas* sp. 具有 99% 的相似性, 定为假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.). 两菌株 27 d 反接种培养实验结果表明, 在添加外源 N 的条件下, HX2 菌株更适合在 30% 的土壤水分 (WFPS) 条件下生长, N_2O 产生量为 (36.01 ± 2.48) ng/g, 为 60% WFPS 条件下 N_2O 产生量的 1.9 倍; 而菌株 HX1 则适合在 60% 的水分条件下生长, 在该条件下几乎不产生 N_2O .

关键词: 异养硝化/好氧反硝化; 分离; N_2O 产生

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)07-2105-07

Isolation of Heterotrophic Nitrifiers/Aerobic Denitrifiers and Their Roles in N_2O Production for Different Incubations

JIANG Jing-yan¹, HU Zheng-hua³, HUANG Yao^{1,2}

(1. College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Atmospheric Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100029, China; 3. College of Environmental Science and Engineering, Nanjing University of Information Sciences & Technology, Nanjing 210044, China)

Abstract: Soil microorganisms are important sources of N_2O for the atmosphere. Peak emissions of N_2O are often observed after wetting of soil. The simultaneous heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacteria with respect to N_2O emission were studied to obtain more information about the microbiological aspects of peak emissions. Using acetamide as the C and N source, two strains of nitrifying and denitrifying bacteria were isolated, coded as XM1 and HX2, respectively. XM1 strain was Gram-negative chain-like bacilli, and the HX2 was Gram-negative cocci. In enrichment culture, N_2O production of HX2 was 76 times more than XM1. Two strains could grow with glucose, mannitol or sodium tartrate as sole carbon source, respectively. They could nitrify with sodium nitrate or denitrify with ammonium sulfate as unique nitrogen source, and produce intermediate product nitrite. XM1 strain growth velocity and nitrite formation were obviously higher than HX2. The phylogentic analysis based on partial 16S rDNA showed that two isolated strains were the closest relative of *Pseudomonas* sp. 99% sequence similarity. Under different WFPS (water-filled-pore-space) conditions, the aerobic autoclaved soil incubation trial showed that, HX2 strain was suitable for growing in 30% WFPS, and N_2O production was (36.01 ± 2.48) ng/g which was 1.9 times than that in 60% WFPS. But XM1 was suitable for growing in 60% WFPS and almost had no N_2O production. To investigate the nitrifying and denitrifying mechanisms of heterotrophic nitrifiers/aerobic denitrifiers should be useful for mastering the mitigation way of soil N_2O emission in future.

Key words: heterotrophic nitrifier/aerobic denitrifier; isolate; N_2O production

N_2O 是重要的温室气体之一, 其主要源为热带土壤和农业土壤^[1]. 土壤 N_2O 的产生主要源于微生物的硝化和反硝化作用^[2]. 长期以来, 土壤 N_2O 被认为主要是自养硝化和厌氧反硝化作用 2 个过程独自产生的. 但近些年来的一些研究表明: 反硝化过程不仅发生在缺氧条件下, 而且在好氧条件下也能发生, 现已发展出有氧条件下同步硝化反硝化的污水处理脱氮工艺^[3,4], 有些条件下好氧反硝化还会产生

比厌氧反硝化时更多的中间产物 N_2O ^[5]; 且有的好氧反硝化菌还同时具有异养硝化的功能^[6~8]. Wolf 等^[9]的研究表明, 在酸性土壤(如森林土壤)中好氧反硝化菌或异养硝化菌有可能大量存在, 并是产生 N_2O 的主要微生物. 杜睿等^[10]的研究结果也证明内

收稿日期: 2008-08-28; 修订日期: 2008-11-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(40605029)

作者简介: 蒋静艳(1972~), 女, 博士研究生, 讲师, 主要研究方向为农田温室气体与全球变化, E-mail: lilacjy@njau.edu.cn

蒙古典型草原土壤 N_2O 产生是以异养硝化作用为主的微生物过程. Anderson 等^[11] 经过比较实验指出在低氧分压条件下, 异养硝化菌产碱杆菌属单个细胞产 N_2O 的能力是自养亚硝化单胞菌属的 10 倍, 并认为在有氧或近厌氧的土壤和水中, 异养硝化可能是 N_2O 主要的源. 同时, 在长达多年的稻田温室气体排放通量研究中, 观测到的 N_2O 排放高峰几乎都在氧化还原电位较高的烤田初期^[12, 13]. 虽然许多研究者认为是水分条件适宜, 土壤存在局部有氧和厌氧的微域, 从而好氧硝化和厌氧反硝化能共同作用, 使得 N_2O 产生速率最大, 但也不能排除来自于生物异养硝化和好氧反硝化作用的可能.

在全球范围内, 估计农业土壤因施用化学氮肥而直接导致的 N_2O 排放量可达 36%^[1, 14]. 大量外源氮的施入被土壤转化为 N_2O , 而对于既能异养硝化又能好氧反硝化的细菌在不同水分条件下转化土壤内外源氮为 N_2O 的作用如何尚少见报道. 因农田土壤中的异养硝化/好氧反硝化菌目前国内外都没有成熟的方法能对其进行原位计数及活性研究^[15], 为此, 本研究从土壤中分离纯化出既能异养硝化又能好氧反硝化的细菌, 分析了其在纯培养条件及在不同水分和氮源条件下的灭菌土壤中产生 N_2O 的作用, 以期为深入研究土壤 N_2O 产生机制及减排途径提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 异养硝化/好氧反硝化细菌的分离、纯化和初步鉴定

培养基组成^[16]: 乙酰胺 2.0 g; KH_2PO_4 8.2 g; NaOH 1.6 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g; KCl 0.5 g; $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 各 0.5 mg, 1 L 蒸馏水, 调 pH 至 7.0. 取不同土样于上述培养基中, 30℃, 220 r/min 条件下培养, 经多次富集, 在固体培养基平板上划线分离, 观察菌落形态. 分别挑取不同单菌落于上述液体培养基中进行培养, 用格利试剂 I、II 检测 NO_2^- 是否存在, 若溶液呈红色, 说明乙酰胺被氧化成亚硝酸盐, 该溶液中具有亚硝化作用的细菌. 如无红色出现, 则进一步加入二苯胺试剂, 培养液若呈蓝色, 则表示培养液中有硝酸盐, 溶液中有硝化细菌. 另外以酒石酸钠为碳源、以硝酸钾为唯一氮源进行培养, 同上检查硝酸盐是否被还原成亚硝酸盐, 以确定溶液中是否具有好氧反硝化作用的细菌; 用纳氏试剂检查有无 NH_4^+ 生成, 判断

该溶液中是否存在将硝酸盐部分还原成 NH_4^+ 的好氧反硝化细菌. 同时于培养的第 4 d, 用气相色谱仪 (Agilent 4890D) 检测其有无气态产物 N_2O . 对上述既能异养硝化又能好氧反硝化的两菌株进行形态和生理生化特征观测, 包括细菌的革兰氏染色, 对碳氮源的要求, 采用半固体穿刺法检测细菌的运动性^[17], 并利用 16S rDNA 测序鉴定细菌属性等.

1.2 菌株异养硝化/好氧反硝化作用验证

硝化和反硝化培养基组成: KH_2PO_4 0.68 g, CaCl_2 0.05 g, Na_2HPO_4 1.07 g, 葡萄糖 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25mg, H_2O 0.5 L, pH 7.0, 氮源分别为 0.5 g 的 KNO_3 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. 培养基灭菌后, 分别接种所分离筛选出的细菌于 30℃ 恒温下以 170 r/min 振荡培养. 每菌株做 3 个平行, 同时做不加氮源的对照. 观察细菌的生长情况, 每隔 12 h 检测 1 次培养基中的光密度值 ($\lambda = 540 \text{ nm}$) 和 NO_2^- 浓度^[18].

1.3 异养硝化/好氧反硝化菌不同培养条件下产 N_2O 的试验

1.3.1 菌株 HX2 和 XM1 在纯培养条件下产 N_2O 比较

分别吸取 1 mL 由上述 2 株菌制成的菌悬液, 接种于已灭菌的 100 mL 上述筛选富集培养液中, 用不接种的灭菌培养液作空白. 置于恒温 30℃ 的摇床中培养 7 d, 从第 3 d 开始, 定期密闭培养 2 h 后再抽取 20 mL 气样 (采样针筒和密封盖均用 75% 乙醇消毒), 在气相色谱仪上分析样品 N_2O 的浓度, 计算其与空白的差值, 换算成单位体积培养基单位培养时间内 N_2O 的释放速率. 每处理 3 重复.

1.3.2 两菌株不同水分条件下无菌土反接种培养产 N_2O 比较

供试肥料为普通尿素, 供试土壤为黄棕壤. 土壤质地为 4% 沙土, 45% 壤土和 51% 粘土, pH (H_2O) 6.7, 总有机碳和全氮分别为 13.1 和 $1.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$.

每株菌培养试验设添加外源氮和不同水分 2 种处理. 取两菌株的菌悬液各 1 mL, 接种于 50 g 灭菌风干土中 (共经 3 次湿热灭菌, 每天 1 次, 每次 40 min). 土壤外源氮为尿素, 加入量以 1% (0.5 g) 纯氮计算为 1.09 g (以代码 U30 和 U60 表示, 30 和 60 表示 30% 和 60% 的土壤充水孔隙度, 以下同). 取接种但是不加入任何氮肥的灭菌土作对照 (以代码 CK30 和 CK60 表示), 同时取不接种的灭菌土作空白 (下文图中以空 30 和空 60 表示), 于不同水分条件即

30%和60%土壤充水孔隙度下,在0.5 L培养瓶中置无菌室30℃恒温敞口培养(培养瓶口覆盖8层纱布),上述处理皆加入0.25 g葡萄糖以促进异养硝化反硝化菌的生长.每处理3次重复.土壤水分通过重量法补加无菌水调节,每3~5 d补充1次,要求无菌操作.从培养的第3 d开始,密闭培养2 h后再抽取20 mL气样(采样针筒和密封盖均用75%乙醇消毒),在经改装后的气相色谱仪(型号Agilent 4890D)上分析样品N₂O和CO₂的浓度.结合培养瓶上部空间体积,计算单位时间每g土壤N₂O和CO₂的释放量.共培养27 d,以前后2次连续测定结果的均值与该时间段的乘积作为该时间段N₂O和CO₂的累积排放量,进而计算27 d内每g干土N₂O和CO₂的累积排放总量.整个培养期间定期用牛肉膏琼脂培养基检测无菌室空气有无杂菌,并随机抽取无菌室空气20 mL作为背景,测其N₂O和CO₂的

浓度.

1.4 数据处理方法

实验结果用算术均值和标准误表示测定结果的精密度,利用Microsoft Excel 2003和SPSS软件进行数据分析与统计检验.

2 结果与讨论

2.1 两菌株生理生化特征及16S rDNA序列测定

经多次筛选分离,获得2株不同形态既能好氧反硝化又能异养硝化的菌株,分别命名XM1和HX2.两菌株菌落形态见图1,颜色均为橙红色,但色泽差别较大,其中菌株XM1的菌落表面光滑凸起,边缘规则呈圆形或椭圆形;而菌株HX2菌落表面较干燥且凹凸不平,边缘不规则.镜检结果表明,菌株XM1为链状杆菌,而菌株HX2为球状菌,革兰氏染色皆阴性.

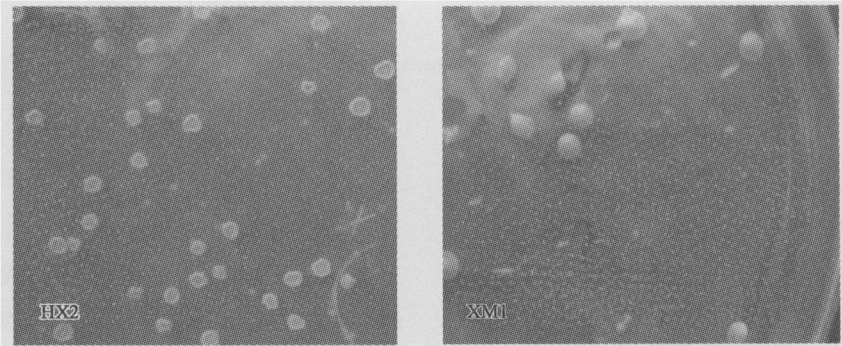


图1 两菌株菌落形态

Fig.1 Colony morphology of two strains

碳氮源实验结果表明,两菌株均能以葡萄糖、甘露醇、酒石酸钠为唯一碳源进行生长,在无碳源以及甲醇为碳源的培养基中不能生长;两菌株也能以硝酸钾、硫酸铵、乙酰胺和尿素为唯一氮源进行生长,在无氮源的培养基中不能生长.细菌的运动性实验结果表明,菌株XM1和HX2都能成雾状由培养基表面向培养基内渗透生长,其中菌株HX2比菌株XM1更为明显,两菌株都具有运动性.

提取菌株的基因组DNA,以一对通用引物[正向引物:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'(E. coli base 8 to 27),反向引物:5'-TACCTGTACGACTT-3'(E. coli base 1507 to 1492)]作PCR扩增,得到的产物经纯化再T/A克隆后,以pMD19-Vector T的通用引物为测序引物测序,测序由北京华大基因研究中心进行.测序结果用BLAST程序和GenBank中已登录的16S rDNA序列进行核苷酸同源性比较,结果发

现菌株XM1和HX2与假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)细菌的16S rDNA核苷酸序列相似性均在99%以上.

2.2 两菌株的异养硝化和好氧反硝化作用

(1)异养硝化作用 图2光密度(D)数据表明,在以硫酸铵为唯一氮源的培养基中,菌株XM1和HX2的对数生长期分别为36~72 h和60~96 h,菌株XM1生长速率较HX2快.培养期内菌株HX2 NO₂⁻的浓度变化规律与其光密度趋势基本一致,均为48 h内较低,而在60~96 h内,NO₂⁻的浓度开始呈对数增长,96 h之后,增长趋势趋于平缓.但菌株XM1则是在48 h内NO₂⁻的浓度相对较低,48~60 h内,呈较明显的对数增长,在60~108 h之间,增长趋势趋于平缓,但至108 h时又有很大的提高,NO₂⁻的快速增加出现在菌体衰亡期,是否是老龄细胞反

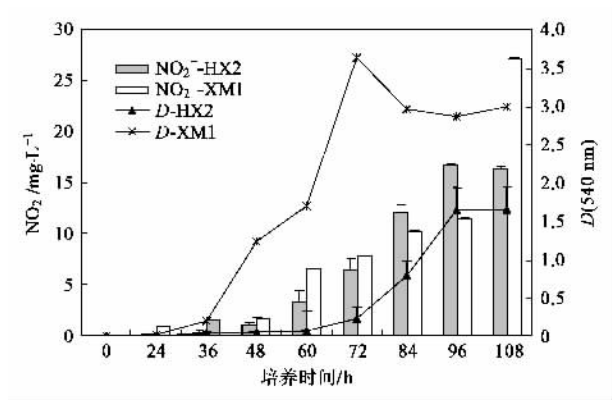


图 2 两菌株异氧硝化作用

Fig.2 Heterotrophic nitrification of two strains

硝化作用减弱导致 NO_2^- 的大量积累, 还需进一步研究.

(2)好氧反硝化作用 图 3 表明, 在以硝酸钾为唯一氮源的培养基中, 两菌生长速率也不完全一致, XM1 和 HX2 的对数生长期分别为 24 ~ 60 h 和 48 ~ 72 h, 其对数生长期均比以硫酸铵为唯一氮源的异养硝化作用提前, 表明好氧反硝化两菌生长代时加快. 在培养期内 XM1 菌株 NO_2^- 的浓度变化规律与其光密度趋势不一致, 表现为对数生长期前 NO_2^- 的浓度就已高速增长, 而到了细菌对数生长时, 其浓度基本维持不变, 这表明反硝化作用可能是在对数生长期前期发生的. 而 HX2 菌 NO_2^- 的浓度变化规律与其光密度趋势基本一致, 但在细菌对数生长期后其 NO_2^- 浓度有降低的趋势, 可能是转化为 N_2O 及其它气态产物所致. HX2 菌好氧反硝化及异养硝化过程与刘晶晶等^[19]报道的恶臭假单胞菌 WXZ-4 的硝化反硝化作用均发生在菌体的对数生长期一致, 但与之不同的是硝化过程有亚硝酸盐的积累. 此外菌株 XM1 和 HX2 好氧反硝化作用时, 无论是 D 值还

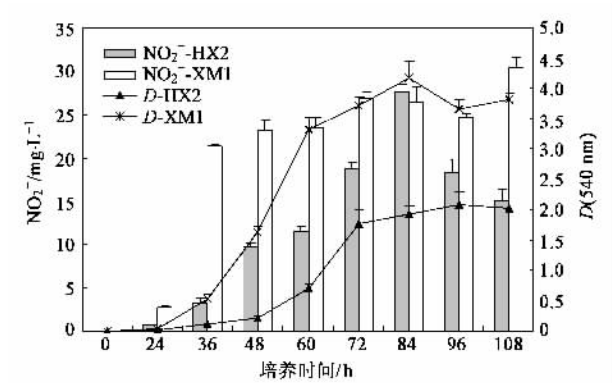


图 3 两菌株好氧反硝化作用

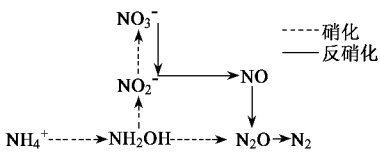
Fig.3 Aerobic denitrification of two strains

是 NO_2^- 浓度最高数值均比异养硝化时高, 是否是两菌株好氧反硝化比异养硝化生长快, 还是反硝化转化硝酸根较完全尚需进一步实验确定.

2.3 不同培养条件下两菌株产 N_2O 结果比较

2.3.1 XM1 和 HX2 菌株在纯培养条件下产 N_2O 速率比较

图 4 显示在以乙酰胺为唯一碳氮源的时菌株 XM1 和 HX2 的 N_2O 产出速率. 方差分析结果表明, 两者存在极显著差异 ($p = 0.0016$). 根据其均值水平进一步计算表明, HX2 菌平均产 N_2O 速率是菌株 XM1 的 76 倍. 在以硝酸钾为唯一氮源的纯培养液中, HX2 菌平均产 N_2O 速率也是菌株 XM1 的 1.5 倍 ($p = 0.0344$), 表明 N_2O 产出率菌株 XM1 偏低而 HX2 较高. 结合图 2 和图 3, 说明尽管两菌株同属于假单胞菌属但对氮素转化作用却不完全相同. Richardson 等^[20]曾提出异养硝化和好氧反硝化菌的脱氮假想途径如下:



因不同菌株参与异养硝化和好氧反硝化过程的关键酶及其编码基因都存在较大的差别^[21,22], 故本次筛选的两菌株如果按照 Richardson 等^[20]提出的 N 转化模式, 则在硝化过程中不应有大量的 NO_2^- 的积累, 尤其 XM1 菌株显然与之不同, 其产 N_2O 很少, 无论硝化还是反硝化作用都有大量 NO_2^- 的积累, 其原因尚需有关实验证实. 因本次纯培养实验未测培养液中的总氮, 故无法得知两菌株总脱氮率的大小, 也无法确定 N_2O 主要产生于何种微生物过程. 两菌株氮代谢的详细途径如何, 还有待进一步探索.

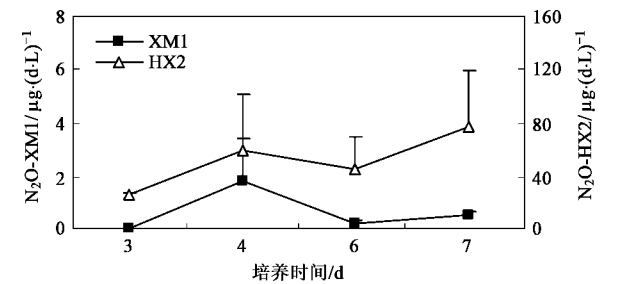


图 4 纯培养液中菌株 XM1 和 HX2 的 N_2O 产出速率

Fig.4 N_2O production of XM1 and HX2 in liquid culture

2.3.2 不同培养条件下两菌株反接种试验结果

(1)空白与背景中 CO₂ 和 N₂O 浓度比较 反接种灭菌土培养试验的关键是无菌室要长期保持无菌状态,不能被杂菌污染.为此在整个培养期间定期检测空气有无杂菌,检测结果表明牛肉膏琼脂培养基上基本无菌落生长,说明无菌室保持了高度无菌.而

空白处理土壤 CO₂ 的排放与背景值的比较,则可说明灭菌土壤是否完全无菌.图 5 为培养期内无菌室空气即背景值与 30% 和 60% WFPS 条件下的空白 CO₂ 和 N₂O 浓度变化.

从图 5 中可以看出,对于 CO₂ 来说,背景值与两

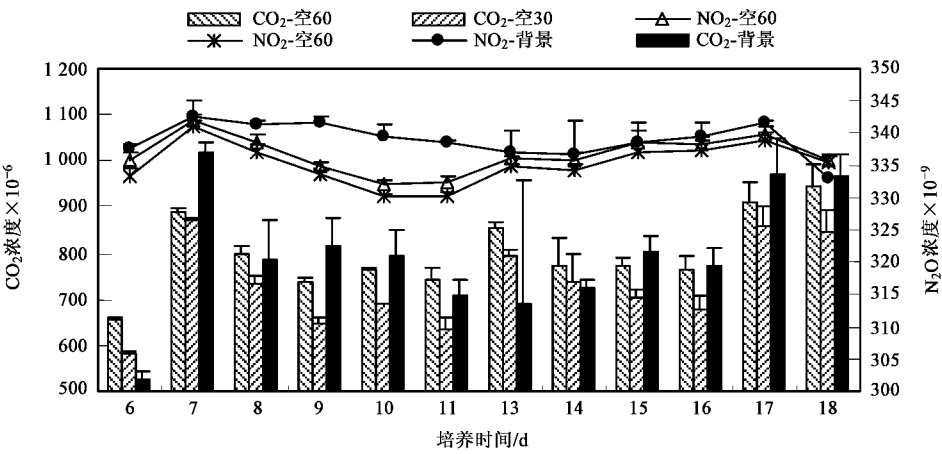


图 5 空白与背景 CO₂ 和 N₂O 浓度比较
Fig.5 Comparison of CO₂ and N₂O concentration between the blank and background

水分条件下的空白变化不大,将上述 3 组值进行方差分析,结果显示不同水分的空白处理与背景中 CO₂ 的浓度值无显著差异($p = 0.150$).这说明对于未接种的灭菌土 CO₂ 的排放不受含水量高低的影响,同时与背景值无差异也间接说明未接种的灭菌土未受外源微生物的污染.

但是在培养期的第 7~13 d,背景 N₂O 值却明显高于 2 种水分条件下的空白值($p = 0.000\ 954$),其它期间三者无明显差异($p = 0.212$),是否是已接种的土壤在敞口培养时 N₂O 释放至空气中导致背景变高,其原因有待进一步探讨.

(2)不同培养条件下两菌株的呼吸变化 呼吸释放的 CO₂ 反映了不同水分条件下微生物生长活性.表 1 为不同处理下菌株呼吸释放的 CO₂ 累积量.从中可以看出,菌株 XM1 和 HX2 在添加尿素的条件下,不同水分其生长活性不同.XM1 在 60% WFPS

条件下呼吸释放的 CO₂ 量明显高于 30% WFPS 条件,而 HX2 则正好相反.水分条件的高低反映了土壤的通气情况,上述结果间接说明 XM1 菌更适合在低氧情况下生长,而 HX2 则适合在高氧即含水量较少的土壤中存活.

(3)不同培养条件下两菌株的 N₂O 产出分析 图 6 反映了 HX2 菌株在不同水分和氮源条件下产 N₂O 的动态变化趋势.相对于不添加外源氮尿素而言,2 种水分的对照在整个培养期间,N₂O 的排放比较平缓,基本上维持较低水平 $2\text{ ng}\cdot(\text{d}\cdot\text{g})^{-1}$ 以下,到第 27 d,基本上趋于零排放.而 U 处理在不同水分条件下,其变化趋势不同,表现为 30% WFPS 条件下,前期 N₂O 排放高,峰值出现在第 7 d;而 60% WFPS 条件下为中后期排放偏高(从第 11~21 d 一直维持较高的排放水平).方差分析结果表明添加外源氮尿素处理 U 在不同水分条件下的 N₂O 排放达极显著差异($p = 0.006\ 16$).

相对于菌株 HX2,XM1 菌株在 60% 的水分条件下,添加外源 N 的处理与空白的方差分析结果表明两者无差异($p = 0.689\ 7$),故在该 WFPS 条件下,XM1 菌株几乎未产生 N₂O.图 7 也表明其在 30% 的 WFPS 条件下虽有 N₂O 排放,但其排放值较低,且重复之间变异很大.这与纯培养条件下的菌株 XM1 产 N₂O 偏低的结果是一致的.

表 1 不同培养条件下菌株呼吸释放 CO₂ 的累积量¹⁾/μg·g⁻¹

Table 1 Cumulative CO₂emissions of two strains' respiration for different treatments/μg·g⁻¹

菌株	CK30	CK60	U30	U60
XM1	—	—	421.1 ± 52.6	782.7 ± 90.2 *
HX2	581.7 ± 144.7	650.4 ± 46.1	963.4 ± 340.8	627.7 ± 130.2 **

1) * 表示不同水分处理在 0.1 水平上有差异; * * 表示在 0.05 水平上有差异,下同

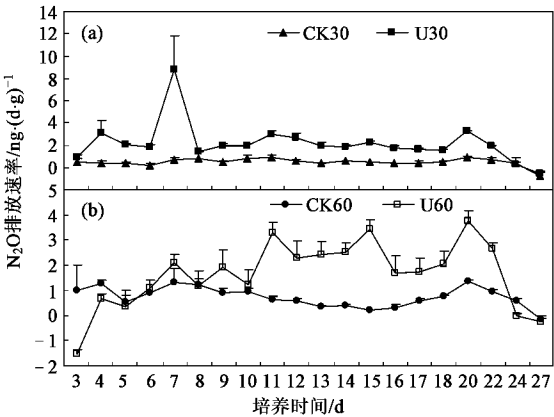


图 6 菌株 HX2 在不同培养条件下 N₂O 排放动态变化
Fig.6 N₂O dynamic variations of HX2 strain in different WFPS

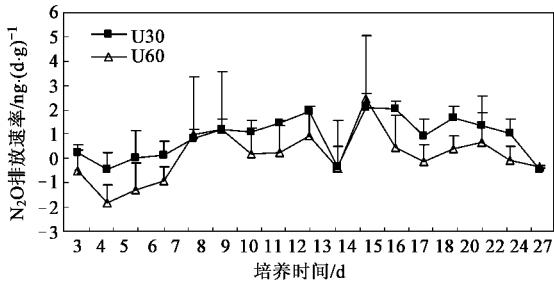


图 7 30% WFPS 水分条件下菌株 XM1 的 N₂O 排放动态变化
Fig.7 N₂O dynamic variations of XM1 in 30% WFPS

进一步计算不同培养条件下菌株产 N₂O 的累积排放量,结果见表 2。添加尿素处理减去对照反映了菌株对外源 N 转化为 N₂O 的能力。XM1 因其产 N₂O 量很少,故未做对照处理。从表 2 N₂O 累积排放量可以看出,对于 HX2 菌株在不添加外源 N 的条件

下,对照处理对土壤本身氮素转化为 N₂O 无显著差异,但添加了外源 N 后其 N₂O 排放总量在 0.01 水平有了显著差异,且表现为 30% 的水分条件下 N₂O 的释放量几乎是 60% 的水分条件下的 1.9 倍,与其呼吸释放的 CO₂ 总量趋势一致。但对于菌株 XM1 而言,也反映为低水分条件 30% WFPS 下 N₂O 排放较高,但在呼吸速率高的 60% 水分条件下其 N₂O 却几乎无排放。Takaya 等^[23] 也报道过曾分离出主要产物为 N₂,只产较低水平的 N₂O 的好氧反硝化菌,本次实验分离出的 XM1 菌是否在高活性条件下对外源 N 转化的最终产物不是 N₂O,而是其它的 N 形态,尚有待进一步研究。

分离出的两菌株在灭菌土壤 30% WFPS 水分条件下可以通过异养硝化和好氧反硝化作用将土壤内外源氮素转化为 N₂O,但转化能力不尽相同。因此尽管属于同一属的异养硝化和好氧反硝化菌,但其不同种类对农田土壤 N₂O 产生的作用各不相同,说明土壤 N₂O 产生机制极其复杂,今后应加强对该领域作进一步研究。

因本次灭菌土反接种实验未测有无中间产物亚硝酸盐,以及灭菌土壤本身理化性质与自然土壤相比有所改变,灭菌后土壤中的有效碳氮增多^[24],都可能导致灭菌土实验结果与自然条件下有所差异^[25]。另外周立祥等^[26]报道分离出同为假单胞菌属的两好氧反硝化菌株在未灭菌的土壤培养中,3 d 内能使土壤中硝态氮表观损失率高达至 56%,同时少有反硝化中间产物的积累。因此,在实际农田环境中,在好氧条件下异养硝化和反硝化作用对土壤

表 2 不同培养条件下菌株产 N₂O 累积排放量/ng·g⁻¹

Table 2 Cumulative N₂O emissions of two strains for different incubation/ng·g⁻¹

菌株	CK30	CK60	A30	A60	A30-CK30	A60-CK60
XM1	—	—	20.55 ± 10.39	0	—	—
HX2	12.31 ± 3.94	19.07 ± 0.30	49.94 ± 2.39	38.27 ± 6.19*	36.01 ± 2.48	19.20 ± 6.19**

N₂O 的产生作用究竟如何,还有待原位深入研究。

3 结论

(1)本研究以乙酰胺为唯一碳氮源筛选出的 2 株异养硝化/好氧反硝化细菌 XM1 和 HX2,革兰氏阴性,分别为链状杆菌和球状菌;在纯培养条件下, HX2 菌株产 N₂O 量为 XM1 菌株的 76 倍。两菌株均能分别以葡萄糖、甘露醇、酒石酸钠为唯一碳源进行生长;也可分别以硝酸钠和硫酸铵为唯一氮源进行

硝化和反硝化作用,并产生中间产物 NO₂⁻,但 XM1 菌株生长速率快于 HX2 菌株,且 NO₂⁻ 积累也高于 HX2 菌株。部分长度的 16S rDNA 序列分析表明,菌株 XM1 与 HX2 的序列与 *Pseudomonas* sp. 具有 99% 的相似性,定为假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.)。

(2)在添加外源 N 条件下, HX2 菌株更适合在 30% 的土壤水分(WFPS)条件下生长,其产 N₂O 几乎是 60% WFPS 条件下的 1.9 倍;而 HX1 菌则适合在 60% 的水分条件下生长,但在该条件下几乎不产生 N₂O。

致谢: 感谢南京农业大学 2003 级环境科学专业学生朱秋兰、任娟娟和朱妍艳 3 位同学在菌株筛选中付出的辛勤工作, 也感谢环境科学及微生物专业研究生孙文和曹慧同学在菌株鉴定中给予的帮助!

参考文献:

- [1] Metz B, Davidson O R, Bosch P R, *et al.* Climate Change 2007: Mitigation of Climate Change. Contribution of Working Group III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change[M]. IPCC, Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 2007.
- [2] Venterea R T, Rolston D E. Mechanisms and kinetics of nitric and nitrous oxide production during nitrification in agricultural soil[J]. Global Change Biol, 2000, **6**: 303-316.
- [3] 吕锡武. 同时硝化反硝化的理论和实践[J]. 环境化学, 2002, **21**(6): 564-570.
- [4] Morita M, Uemoto H, Watanabe A. Nitrogen-removal bioreactor capable of simultaneous nitrification and denitrification for application to industrial wastewater treatment[J]. Biochem Eng J, 2008, **41**: 59-66.
- [5] Lemaire R, Meyer R, Taske A, *et al.* Identifying causes for N_2O accumulation in a lab-scale sequencing batch reactor performing simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal[J]. J Biotechnol, 2006, **122**: 62-72.
- [6] Castignetti D, Hollocher T C. Heterotrophic Nitrification Among Denitrifiers[J]. Appl Environ Microb, 1984, **47**(4): 620-623.
- [7] Robertsow L A, Cornelisse R, De Vos P, *et al.* Aerobic denitrification in various heterotrophic nitrifiers[J]. Anton Leeuw Int J G, 1989, **56**: 289-299.
- [8] Kim J K, Park K J, Cho K S, *et al.* Aerobic nitrification denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains[J]. Bioresource Technol, 2005, **96**: 1897-1906.
- [9] Wolf I, Brumme R. Contribution of nitrification and denitrification sources for seasonal N_2O emissions in an acid German forest soil[J]. Soil Biol Biochem, 2002, **34**: 741-744.
- [10] 杜睿, 王庚辰, 吕达仁. 内蒙古典型草原土壤 N_2O 产生的机理探讨[J]. 中国环境科学, 2000, **20**(5): 387-391.
- [11] Anderson I C, Poth M, Homstead J, *et al.* A comparison of NO and N_2O production by the autotrophic nitrifier *Nitrosomonas europaea* and the heterotrophic nitrifier *Alcaligenes faecalis*[J]. Appl Environ Microb, 1993, **59**(11): 3525-3533.
- [12] Zou J W, Huang Y, Jiang J Y, *et al.* A 3-year field measurement of methane and nitrous oxide emissions from rice paddies in China: Effects of water regime, crop residue, and fertilizer application[J]. Global Biogeochem Cy, 2005, **19**, GB2021, doi: 10. 1029/2004GB002401.
- [13] Cai Z C, Xing G X, Yan X Y, *et al.* Methane and nitrous oxide emissions from rice paddy fields as affected by nitrogen fertilizers and water management [J]. Plant Soil, 1997, **196**(1): 7-14.
- [14] Mosier A, Kroeze C. Potential impact on the global atmospheric N_2O budget of the increased nitrogen input required to meet future global food demands[J]. Chemosphere-Global Change Sci, 2000, **2**: 465-473.
- [15] Papen H, Von Berg R. A Most Probable Number method (MPN) for the estimation of cell numbers of heterotrophic nitrifying bacteria in soil[J]. Plant Soil, 1998, **199**: 123-130.
- [16] Matsuzaka E, Nomura N, Nakajima-Kambe T, *et al.* A Simple Screening Procedure for Heterotrophic Nitrifying Bacteria with Oxygen-Tolerant Denitrification Activity[J]. J Biosci Bioeng, 2003, **95**(4): 409-411.
- [17] 布坎南 R E, 吉本斯 N E, 等编, 中国科学院微生物研究所译. 伯杰细菌鉴定手册[M]. (第八版). 北京: 科学出版社, 1984. 274-312.
- [18] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. (第四版). 北京: 中国环境科学出版社, 2002. 271-274.
- [19] 刘晶晶, 汪苹, 王欢. 一株异养硝化-好氧反硝化菌的脱氮性能研究[J]. 环境科学研究, 2008, **21**(3): 121-125.
- [20] Richardson D J, Watmough N J. Inorganic nitrogen metabolism in bacteria[J]. Curr Opin Chem Biol, 1999, **3**(2): 207-219.
- [21] 何霞, 吕剑, 何义亮, 等. 异养硝化机理的研究进展[J]. 微生物学报, 2006, **46**(5): 844-847.
- [22] Kester R A, Boer W D, Laanbroek H J. Production of NO and N_2O by Pure Cultures of Nitrifying and Denitrifying Bacteria during Changes in Aeration[J]. Appl Environ Microb, 1997, **63**(10): 3872-3877.
- [23] Takaya N, Antonina B M, Sakairi C, *et al.* Aerobic Denitrifying Bacteria That Produce Low Levels of Nitrous Oxide[J]. Appl Environ Microb, 2003, **69**(6): 3152-3157.
- [24] Stevenson B A, Verburg P S J. Effluxed CO_2 - ^{13}C from sterilized and unsterilized treatments of a calcareous soil[J]. Soil Biol Biochem, 2006, **38**: 1727-1733.
- [25] Moesby L, Hansen E W, Christensen J D, *et al.* Dry and moist heat sterilisation cannot inactivate pyrogenicity of Gram positive microorganisms[J]. Eur J Pharm Sci, 2005, **26**: 318-323.
- [26] 周立祥, 黄峰源, 王世梅. 好氧反硝化菌的分离及其在土壤氮素转化过程中的作用[J]. 土壤学报, 2006, **143**(13): 430-435.