

# 好氧反硝化菌的分离及其在土壤氮素转化过程中的作用\*

周立祥<sup>1</sup> 黄峰源<sup>2</sup> 王世梅<sup>3</sup>

(南京农业大学资源环境科学学院环境工程系, 南京 210095)

**摘要** 在土壤厌氧条件下发生的生物反硝化作用是影响作物对土壤氮素利用率和影响环境质量的重要氮素转化过程。本研究从土壤中分离到在好氧条件下也能进行反硝化的 3 株细菌。其中 1 株为严格好氧的异养菌, 编号为 AD26。另外 2 株为兼性菌, 分别为 AD7 和 AD60。根据其形态和生理生化特征初步鉴定为假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp1)。在好氧培养的液体培养基中 AD26 和 AD7 在 24 h 内能通过反硝化作用使硝态氮表现损失率分别达到 21% 和 18%。而在好氧的土壤培养中, 二个菌株在 3 d 内能使土壤中硝态氮表现损失率达到 56%, 同时少有反硝化中间产物的积累。因此, 在农业生产中不应忽视在好氧条件下的生物反硝化作用。

**关键词** 好氧; 反硝化细菌; 分离; 土壤; 氮形态

**中图分类号** S1541.3

**文献标识码** A

硝化与反硝化作用是土壤氮素最重要的转化过程, 既影响作物对氮的利用率<sup>[1]</sup>, 也影响水气的环境质量(如硝酸盐对地下水的污染、氮氧化物对大气的的影响等)<sup>[1,2]</sup>。研究发现, 我国每年农田氮肥的损失率达 3313%~7316%, 其中反硝化作用导致氮的损失占整个氮损失率的 15%<sup>[3]</sup>, 也是水田土壤氮素损失最重要的途径之一<sup>[4]</sup>。因为硝酸盐在水田淹水的厌氧土层中能被反硝化细菌最终转化为氮氧化物(如  $N_2O$ ,  $NO$  等)或氮气而挥发损失。因此, 长期来普遍认为生物反硝化过程是严格的厌氧过程。然而近年来, 在水处理中研究发现, 生物反硝化也可发生在有氧条件下, 并发展出在有氧条件下同步硝化反硝化的污水处理脱氮工艺<sup>[5]</sup>。分离出的好氧反硝化菌有 *Pseudomonas* sp1, *Alcaligenes faecalis*, *Thiophara pantotropha*<sup>[5]</sup> 等。虽然在水田土壤中尚未确定是否存在具有明显的反硝化作用的好氧反硝化细菌, 但近 10 年来, 人们在稻田温室气体排放通量研究中, 几乎都发现氧化亚氮排放高峰并非在氧化还原电位较低的淹水期而是在氧化还原电位较高的搁水晒田初期<sup>[6-9]</sup>。这一现象虽被许多研究者解释为晒田初期土壤中易形成较多的反硝化作用底物))) 硝态氮从而有利于形成氧化亚氮, 但也不能排除来自

于生物好氧反硝化作用的原因。为此, 我们采用纯培养单菌的方法, 研究了从土壤中分离纯化好氧反硝化菌及其在土壤中好氧反硝化作用的大小, 为深入研究土壤氮素反硝化作用机制提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 好氧反硝化菌的分离和纯化

将新鲜肥沃的菜园土 10 g 在 90 ml 无菌水中作系列稀释, 取稀释梯度  $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  的悬浊液分别在牛肉膏蛋白胨硝酸盐固体培养基(肉汁胨培养基加 1 j  $KNO_3$ , pH7.2~7.4)平板上涂布, 于 28 e, 培养 3~4 d。挑选形态各异的菌落(共 66 个)分别接种于装有 3ml 的以硝酸钾为唯一氮源的硝酸柠檬酸反硝化液体培养基(培养基组成为: 柠檬酸钠 5100 g、 $KNO_3$  2100 g、 $KH_2PO_4$  1100 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0120 g、去离子水 1000 ml、pH7.12)试管中, 于 28 e,  $180 r \min^{-1}$  下, 振荡培养 1 周。然后在各试管中加入 1~2 滴 Griess 试剂以检测是否有亚硝酸盐的存在, 如溶液马上呈粉红色、棕色等, 说明硝酸盐被还原成亚硝酸盐, 该溶液中具有好氧反硝化作用的细菌。如无红色出现, 则进一步加入二苯胺试剂, 培养液若呈蓝

\* 新世纪优秀人才支持计划(NCET-04-0505)

- 通讯作者, E-mail: kzhou@njau.edu.cn

作者简介: 周立祥(1965~), 男, 湖南衡山人, 博士, 教授。主要从事固废处理、环境化学与环境微生物方面的研究。Tel: 025-84395160

收稿日期: 2005-03-09; 收到修改稿日期: 2005-07-31

色,则表示培养液中硝酸盐未被转化,溶液中无反硝化细菌。若无色,则表示硝酸盐和新形成的亚硝酸盐都已还原成氮氧化物,该溶液中具有较强作用的好氧反硝化功能的细菌。

在上述试管中检测到有好氧反硝化细菌后,将试管中菌液接种到硝酸柠檬酸反硝化平板上采用涂布法进行细菌分离,在平板上选择分离较好的有代表性的单菌落做涂片镜检,若有不纯,则进一步挑取此菌落作划线分离,直至获得目的菌株的纯培养,并转移到硝酸柠檬酸反硝化斜面保存备用。

### 112 菌株好氧反硝化作用验证及初步鉴定

从硝酸柠檬酸反硝化斜面上取一环纯菌种回接到装有 100 ml 灭过菌的硝酸柠檬酸反硝化液体培养基的 250 ml 三角瓶中,置于 28 e, 180 r min<sup>-1</sup>下,振荡培养 5 d。每隔 24 h 从三角瓶中取 1 ml 样品,采用过硫酸钾氧化-紫外分光光度法<sup>[10]</sup>测定液体中总氮以检测硝态氮的变化,因本试验的培养基中氮完全以硝态氮形式存在,且测定的氮为溶液中总氮,包括微生物氮,因此排除了微生物同化引起溶液中硝态氮减少的可能,也不存在微生物作用下硝态氮异化成铵的途径。培养期间,采用称重法补充三角瓶中水分。

参照文献[11],重点对上述好氧反硝化作用明显的菌株进行形态和生理生化特征观测,包括对糖的发酵状况,对碳源的要求等等,鉴定到属。并分别采用深层琼脂法和半固体穿刺法检测细菌的需氧性和运动性。

### 113 好氧反硝化异养菌对土壤氮素转化的影响试验

11311 好氧反硝化菌的扩大培养 将 100 ml 硝酸柠檬酸反硝化液体培养基装于 250 ml 三角瓶中,于 121 e 下灭菌 15 min。从硝酸柠檬酸反硝化斜面培养基中接一环菌苔于培养基中,置 28 e 摇床上培养 48 h,备用。

11312 菌株在土壤中的好氧反硝化作用 供试土壤为采自江苏南通搬经镇的潮土类灰潮土亚类的高沙土(石灰淡色潮湿锥形土),土壤风干磨细后过 20 目筛。供试土壤 pH 为 8.25,有机质为 10.11 g kg<sup>-1</sup>,全氮 0.19 g kg<sup>-1</sup>,硝态氮 72.5 mg kg<sup>-1</sup>,速效磷(P) 6.10 mg kg<sup>-1</sup>,速效钾(K) 47.11 mg kg<sup>-1</sup>。分别称取 10 g 土样装于一系列 80 ml 塑料瓶中,纱布封口,加入培养至对数期的菌液 0.5 ml 和 1 ml 已灭菌浓度为 1 000 mg L<sup>-1</sup>的 KNO<sub>3</sub>溶液,使土壤起始硝态氮含量约为 150 mg kg<sup>-1</sup>,同时调整瓶中土样含水量为田间持水量的 80%,暗处静置培养。设置经 0、1、

115、2、215、3、315、4、5、7、10 d 定时取样,每个时间梯度设置 6 个重复。每次取样后,其中 3 个重复用 2 mol L<sup>-1</sup> KCl 浸提,浸提液用 AutoAnalyzer 3 型流动注射分析仪(Bran2Luebbe,德国)测定硝态氮、铵态氮和亚硝态氮的浓度,另外 3 个重复用于测定全氮的含量,采用半微量开氏法消煮后用流动注射分析仪测定。同时,设置不接菌的空白对照,即加入 0.5 ml 灭活的菌液,其他条件同上。

为消除土著微生物的可能影响,还同时设置了菌株在灭菌土壤中的好氧反硝化作用的试验。处理方法同上,只是土样预先采用高压灭菌(121 e 下灭菌 15 min)。

## 2 结果与讨论

### 211 目的菌株的形态与生态特征

结合平板上的菌落形态和镜检结果,并用 Griess 试剂和二苯胺试剂检测最终得到 3 株形态各异的反硝化菌株,分别编号为 AD7、AD26 和 AD60,其中以 AD26 作用最明显(其形态见图 1),菌液中加入 Griess 试剂和二苯胺试剂均不显色。

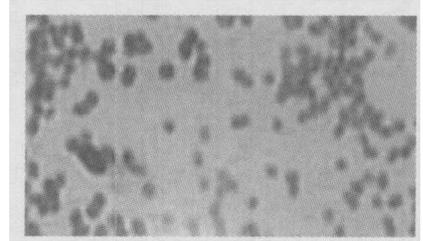


图 1 AD26 菌体形态(10@100)

Fig 1 Unicell morphology of AD26

菌株 AD7、AD26 和 AD60 的单细胞呈小短杆状,直径 110~115 nm,平板上培养 3 d 后,形成直径 3~5 mm 的菌落,AD26 和 AD60 分别为表面光滑隆起的圆形的黄色和白色菌落,AD7 形成黄色的边缘不规则菌落,并产绿色色素。革兰氏染色均为阴性。它们生长不需要 NaCl 和有机因子。采用穿刺法对其需氧性测定发现,AD7 和 AD60 菌株在整条穿刺线上均能生长,即在好氧的靠近培养基表面和受氧限制的穿刺线底部均有菌的生长。而 AD26 菌株只能生长在靠近培养基表面部分,在穿刺线底部不能生长。上述三种菌株在用甘油-凡士林密封的以硝酸柠檬酸反硝化溶液为培养基的试管中培养 5 d 后镜检进一步证实,AD7 和 AD60 菌株能在厌氧环境中生长繁殖,因为 5 d 后液体培养基因菌的增殖而变

混浊, 菌的密度比开始时明显增加。而 AD26 菌株的处理则无此现象, 镜检发现菌的密度比开始时反而降低。充分说明 AD26 为严格好氧菌, AD7 和 AD60 为兼性菌。穿刺接种还表明, 三种菌株沿穿刺线均有明显的扩散带, 只是 AD26 处理整条穿刺线

只有靠近表面的 1/3 处长菌, 说明这些菌都具有运动性。

三种菌株对糖的发酵状况, 对碳源的要求等生理生化特征见表 1。按文献[11]初步鉴定 AD7、AD26 和 AD60 为假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)。

表 1 AD7、AD26 和 AD60 的生理生化特征

Table 1 Physiological properties of AD7 AD26 and AD60

菌株编号 Bacteria code	糖发酵 Fermentation of saccharide			吲哚测定 Indole measurement	V2P 测定 V2P measurement	甲基红 Methyl red	接触酶 Touch enzyme	氧化酶 Oxidation enzyme
	葡萄糖 Glucose	乳糖 Lactose	蔗糖 Sucrose					
AD7	-	-	-	-	-	-	+	-
AD26	+	-	-	-	-	-	+	-
AD60	-	-	-	-	-	-	+	-

212 好氧反硝化作用的确证

为了验证分离得到的 AD7、AD26 和 AD60 是否具有好氧反硝化作用, 在硝酸柠檬酸反硝化液体培养基中(氮以硝态氮形态存在) 分别接种三种菌株, 在好氧条件下振荡培养, 每日取样以检测其对培养基中总氮的影响, 结果见图 2。

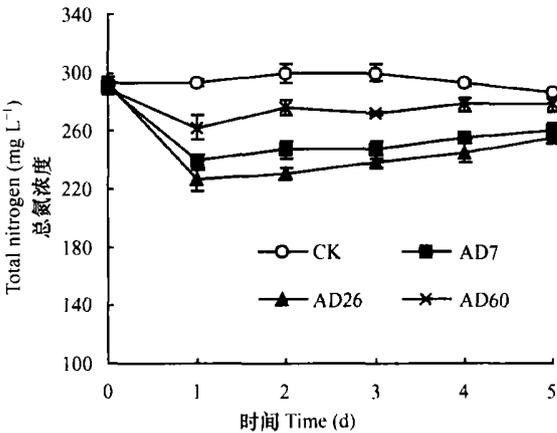


图 2 好氧培养下三种菌株对溶液中总氮浓度的影响  
Fig 2 Effect of the three denitrifying bacterial strains AD7, AD26 and AD60 on total nitrogen concentration in the solution under aerobic incubation

从图 2 中可以看出, 在 5 d 的好气培养时间内, 未接菌的对照处理(CK), 溶液中总氮几乎没有变化, 说明溶液中不存在反硝化作用。但接种了 AD7、AD26 和 AD60 后, 培养液中总氮有较大幅度的降低, 经 1 d 培养, 总氮浓度降低尤其明显, 说明这三种菌株均促进溶液中硝态氮以反硝化形式损失。但不同菌株对溶液中硝态氮的反硝化作用有较大差异, 其中 AD26 菌株作用最大, 其次为 AD7 菌株, 而 AD60 菌株的好氧反硝化作用相对较弱。在培养期

间, 它们使总氮的减少率最大分别达 2115%、1718% 和 913%。考虑到溶液的 pH 并非酸性, 且对照 CK 的总氮基本不变, 因此不存在化学反硝化。这说明在溶液中分离得到的这三种菌株均能够进行好氧反硝化作用, 是反硝化细菌。至于接种三种菌株的处理溶液中第一天总氮浓度降低尤其明显, 而第一天后总氮还略有上升, 其原因可能是在纯培养条件下, 好氧反硝化作用主要发生在指数生长期, 细胞合成所需要的能量和还原力主要在这一阶段被消耗<sup>[12]</sup>, 之后细胞生长进入平稳期和衰亡期, 细胞合成停止甚至出现衰亡<sup>[13]</sup> 导致。

213 AD7、AD26 和 AD60 在土壤中的好氧反硝化作用

为了探索 AD7、AD26 和 AD60 在土壤系统中是否具有反硝化作用, 将 AD7、AD26 和 AD60 分别接种在灭菌和不灭菌的土壤中, 定期测定硝态氮、铵态氮和亚硝态氮的浓度, 检测其对土壤氮素转化过程的影响, 实验结果列于图 3 至图 8。

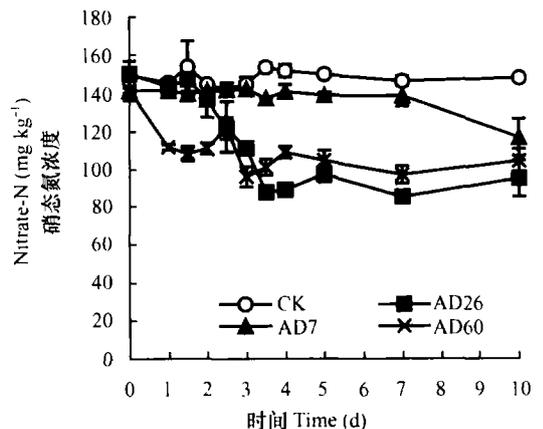


图 3 灭菌土壤在接种三种菌株后土壤硝态氮的变化  
Fig 3 Dynamics of nitrate-N in the presterilized soil inoculated with the three strains

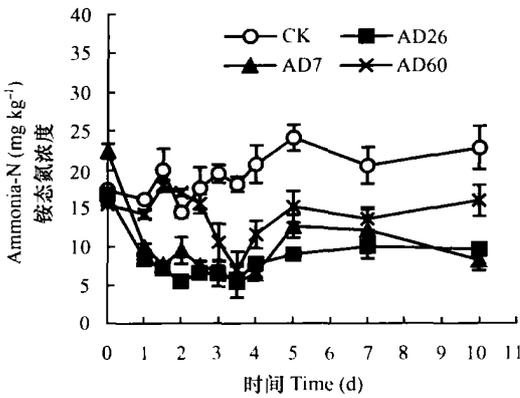


图 4 灭菌土壤在接种三种菌株后铵态氮的变化  
Fig14 Dynamics of ammoni2N in the presterilized soil inoculated with the three strains

从图 3 可以看出, 在灭菌土壤中若不接种目的菌株, 则经 10 d 的好气培养土壤硝态氮始终基本维持在  $150 \text{ mg kg}^{-1}$  左右, 硝态氮不发生形态转变。然而接种的各处理, 则整个过程硝态氮有明显变化, AD26 使硝态氮的含量从  $150 \text{ mg kg}^{-1}$  下降到  $85 \text{ mg kg}^{-1}$ , 减少率为 43.13%, AD60 使硝态氮的减少 32.14%, AD7 使硝态氮含量下降相对较少。而且接种 AD26 和 AD60 的处理在培养的前 4 d 便可使硝态氮降低到最低值。结合图 4 铵态氮在 3 个接种处理中并没有大幅升高或积累的现象, 相反都有一定的减少, 而从图 5 中进一步发现在整个过程中亚硝态氮含量一直较低, 没有积累。充分说明接种的三种目的菌株在好气培养的土壤中能明显促进土壤硝态氮的反硝化作用, 最终形成气态的氮形态而损失。在三种菌株中尤其以 AD26 菌株的反硝化作用最强。

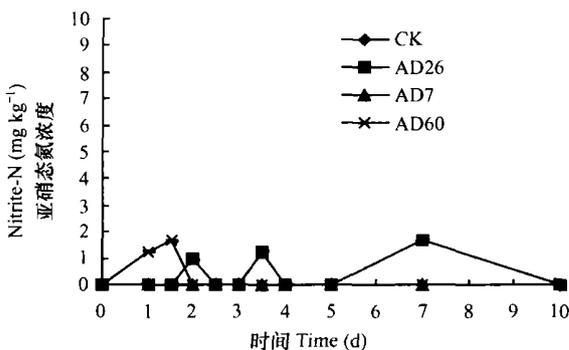


图 5 灭菌土壤在接种三种菌株后土壤亚硝态氮的变化  
Fig5 Dynamics of nitriteN in the presterilized soil inoculated with the three strains

在不灭菌的自然土壤中, AD7、AD26 和 AD60 三种菌株对土壤硝态氮的反硝化作用比灭菌土壤作用

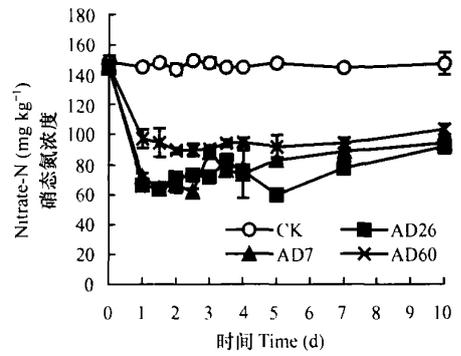


图 6 未灭菌土壤在接种三种菌株后土壤硝态氮变化  
Fig16 Dynamics of nitrateN in the unsterilized soil inoculated with the three strains

更为明显。从图 6 可以看出, 在好气培养的前 1~3 d, AD26 使硝态氮的含量从  $145 \text{ mg kg}^{-1}$  下降到最低的  $64 \text{ mg kg}^{-1}$ , 减少率达 56%, AD7 使硝态氮的含量减少 55.16%, AD60 使硝态氮的含量减少 39.10%, 此后, 各接种处理土壤硝态氮的含量不再明显下降。而不接种目的菌株的对照处理 CK, 在整个培养期间硝态氮含量几乎没有变化。图 7 和图 8 表明相应

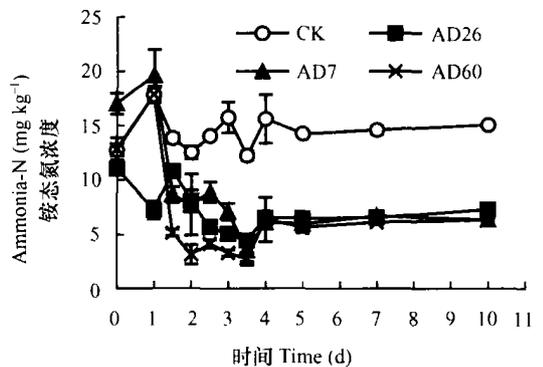


图 7 未灭菌土壤在接种三种菌株后土壤铵态氮的变化  
Fig7 Dynamics of ammoni2N in the unsterilized soil inoculated with the three strains

处理的铵态氮和亚硝态氮含量并没有积累现象。说明接种菌株后硝态氮的大幅减少并非是由于异化还原成铵或转化成亚硝酸盐的缘故, 而只能是因为硝态氮通过反硝化作用最终变成氮氧化物等气态形态而挥发损失之故, 尽管我们未采用气相色谱等方法来直接测定挥发出来的气态形态氮。对照图 3 和图 6, 进一步发现, AD7、AD26 和 AD60 三种菌株在灭菌与不灭菌的土壤中都有明显的反硝化功效, 其中尤其以严格好氧的 AD26 菌株作用最大。三种目的菌株在不灭菌的土壤中又比在灭菌的土壤中明显, 说明在该试验条件下接种的目的菌株在土壤中能有效

竞争土著微生物而成为优势菌,而土壤在高温高压条件下灭菌会对土壤性质有较大影响,不利于外源接种的微生物的生长可能是另一原因。

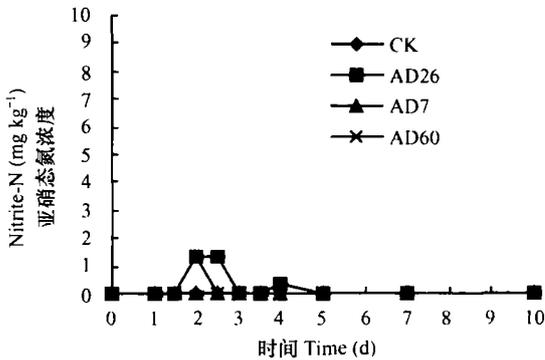


图8 未灭菌土壤亚硝态氮的变化

Fig 8 Dynamics of nitrite-N in the unsterilized soil inoculated with the three strains

从以上结果分析,分离出的三种菌株在土壤中可以通过好氧反硝化作用将硝态氮直接还原为氮气或氮氧化物,很少形成中间产物亚硝酸盐。因此,在农业生产中不应忽视在好气条件下的生物反硝化作用。至于在实际农田环境中,在好气条件下生物反硝化作用导致土壤氮素损失的幅度有多大?还有待深入研究。

### 3 结论

1) 土壤中的确存在好氧条件下能进行反硝化的细菌。本试验从土壤中分离得到三株反硝化细菌,其中一株为严格好氧的反硝化细菌,编号为AD26,另两株为兼性菌,编号为AD7和AD60,初步鉴定均为假单胞菌属(*Pseudomonas* sp1)。

2) 在好氧培养条件下,3 d时间内,分离获得的AD26和AD7菌株能使土壤中硝态氮表现反硝化损失率达到56%,同时少有反硝化中间产物的积累。因此,在农业生产中不应忽视在好气条件下的生物反硝化作用。

### 参考文献

[1] 朱兆良. 农田中氮肥的损失与对策. 土壤与环境, 2000, 9(1): 1~6. Zhu ZL. Loss of fertilizer N from plant-soil system and the

strategies and techniques for its reduction (In Chinese). Soil and Environmental Sciences, 2000, 9(1): 1~6

- [2] 曹志洪. 施肥与大气环境质量. 土壤, 2003, 35(4): 265~270. Cao ZH. Effect of fertilization on air quality (In Chinese). Soils, 2003, 35(4): 265~270
- [3] 徐谦. 我国化肥和农药非点源污染状况综述. 农业生态环境, 1996, 12(2): 39~43. Xu Q. A review on the status of nonpoint source pollution of chemical fertilizers and pesticides in China (In Chinese). Rural Environment, 1996, 12(2): 39~43
- [4] 朱兆良, 文启孝. 中国土壤氮素. 南京: 江苏科学技术出版社, 1992. 213~249. Zhu ZL, Wen QX. Nitrogen in Soils of China (In Chinese). Nanjing: Jiangsu Science and Technology Publishing House, 1992. 213~249
- [5] Lukow T, Diekmann H. Aerobic denitrification by a newly isolated heterotrophic bacterium strain TL1. Biotechnology Letters, 1997, 11(19): 1157~1159
- [6] 黄树辉, 吕军, 曾光辉. 水稻烤田期间 N<sub>2</sub>O 排放及其影响因素. 环境科学学报, 2004, 24(6): 1084~1090. Huang SH, Lu J, Zheng GH. Nitrous oxide emissions and impact factors in paddy soil drying (In Chinese). Acta Scientiae Circumstantiae, 2004, 24(6): 1084~1090
- [7] Xu H, Xing GX, Cai ZC, et al. Nitrous oxide emissions from three rice paddy fields in China. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 1997, 49: 23~28
- [8] 郑循华, 王明星, 王跃思, 等. 稻麦轮作生态系统中土壤湿度对 N<sub>2</sub>O 产生与排放的影响. 应用生态学报, 1996, 7(3): 273~279. Zheng XH, Wang MX, Wang YS, et al. Impact of soil humidity on N<sub>2</sub>O production and emission from a rice-wheat rotation ecosystem (In Chinese). Journal of Applied Ecology, 1996, 7(3): 273~279
- [9] 郑循华, 王明星, 王跃思, 等. 温度对农田 N<sub>2</sub>O 产生与排放的影响. 环境科学, 1997, 18(5): 1~6. Zheng XH, Wang MX, Wang YS, et al. Impact of temperature on N<sub>2</sub>O production and emission (In Chinese). Environmental Science, 1997, 18(5): 1~6
- [10] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科学技术出版社, 1999. 128~129. Lu YK. Methods of soil and plant analysis (In Chinese). Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 1999. 128~129
- [11] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001. Dong XZ, Cai MY. Manual of Common Systematic Determinative Bacteriology (In Chinese). Beijing: Science Press, 2001
- [12] 周丹丹, 马放, 王弘宇, 等. 关于好氧反硝化菌筛选方法的研究. 微生物学报, 2004, 44(6): 837~839. Zhou DD, Ma F, Wang HY, et al. Study on screening method of aerobic denitrifiers (In Chinese). Acta Microbiologica Sinica, 2004, 44(6): 837~839
- [13] 周德庆. 微生物学教程. 北京: 高等教育出版社, 1993. 186~190. Zhou DQ. Textbook of Microbiology (In Chinese). Beijing: Higher Education Press, 1993. 186~190

## ISOLATION OF AEROBIC DENITRIFIERS AND THEIR ROLES IN SOIL NITROGEN TRANSFORMATION

Zhou Lixiang<sup>\*</sup> Huang Fengyuan Wang Shimei

( Department of Environmental Engineering, College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China )

**Abstract** Denitrification occurring mostly in flooded soil is considered as an important process which reduces use efficiency of soil nitrogen and affects environmental quality. In this study, 3 strains of denitrifiers were isolated from soil. Of the 3 strains, one is obligate aerobic bacteria coded as AD26, the other two strains are facultative bacteria coded as AD7 and AD60. Based on the morphological, physiological, and biochemical features of the three isolated strains, they were identified as *Pseudomonas* sp. In an aerobic incubation trial, N denitrification loss in the liquid culture medium inoculated with AD26 and AD7 reached to 21% and 18%, respectively, in 24 hours. In an aerobic soil incubation trial, about 56% of the soil nitrate-N was lost in the first three days due to denitrification in the presence of AD26 or AD7. Moreover, soil nitrate was eventually transformed into nitrogen oxide or N<sub>2</sub>, leaving no nitrite left in accumulation. Therefore, the bio-denitrification in the farmland should not be overlooked.

**Key words** Aerobic incubation; Denitrifier; Isolation; Soil; N form