土壤中放线菌参与反硝化可能性研究*

葛　灿[1]　石竹南[2]　颜志民[3]　杨林章[4]
王德建[4]　尹　斌[4]　梅丽娟[1]　朴　哲[1]　胡　健[1]　殷士学[1†]
(1 扬州大学农学院农学系, 江苏扬州　225009)　(2 扬州大学物理科学与技术学院, 江苏扬州　225009)
(3 扬州市环境监测总站, 江苏扬州　225007)　(4 中国科学院南京土壤研究所, 南京　210008)

摘　要　对土壤中放线菌参与土壤反硝化可能性进行了初步研究。从土壤 10^{-5} 稀释液中共获得 23 个放线菌单菌落, 初步鉴定属于 10 个不同类型的菌株, 其中 9 个属于 *Streptomyces* (链霉菌属), 1 个属于 *Actinomadura* (马杜拉属)。10 个菌株在纯培养条件下都能将 NO_3^- 还原成 N_2O, 表明该土壤中具有反硝化能力的放线菌比例很高。测得其中 3 个链霉菌菌株的 N_2O 产出速率为 N 1.2~ 187.7 $\mu g\ g^{-1}\ min^{-1}$(细胞干重基数)。N_2O 形成与放线菌生物量成正比。多数链霉菌菌株的 N_2O 产出受 C_2H_2 抑制。将 3 个链霉菌菌株接种到灭菌土壤中厌气培养, 均能测到 N_2O 形成, 表明链霉菌可以利用土壤中原有碳源作为电子供体还原 NO_3^-。经历厌氧胁迫 21 d 以后, 测试的 3 株链霉菌菌株至少能保留一部分反硝化能力。

关键词　放线菌; 反硝化; 土壤微生物
中图分类号　S 154.34　　文献标识码　A

90 年代之前积累的知识表明, 反硝化菌都是细菌, 几篇著名的综述文献[1~ 4]充分反映了当时的相关知识状况。这些文献分别汇总了当时已知的反硝化菌, 其中无一例外的都是细菌, 没有一例是放线菌。

从 1997 年起, 人们相继发现在纯培养条件下许多放线菌都具有反硝化能力。Albrecht 等[5]发现链霉菌属的 2 株菌株都能在缺氧条件下将 $^{15}NO_3^-$ 还原为 $^{15}N_2O$。Shoun 等[6]测定了 40 株(16 个属) 放线菌, 发现其中 22 株(11 个属) 都能将 $^{15}NO_3^-$ 还原为 $^{15}N_2O$; 确认参与 N_2O 形成的酶为含 Cu 的亚硝酸还原酶(Cu-Nir)。Kumon 等[7]进一步证明菌株 *Streptomyces antibioticus* 可以将 $^{15}NO_3^-$ 还原为 $^{15}N_2$ 和 $^{15}N_2O$, 且 NO_3^- 的还原伴随着细胞生长, 说明 NO_3^- 还原是厌氧呼吸过程(即典型反硝化过程)。Chèneby 等[8]从 3 种土壤中分离出 138 株反硝化菌, 经16S rRNA 序列分析确认其中有 26 株为链霉菌属。Lensi 等[9]证实 *Frankia* 属中的一些种同样具有反硝化能力。虽然已有相关文献篇数不多, 但因为证据充分且有说服力, 所以微生物学家已经将属于放线菌的 13 个属增列入反硝化菌属名名录中[10]。

土壤中的放线菌是否可能参与反硝化过程, 目前尚无研究。要研究这个问题, 首先需要了解土壤中有多少放线菌能够反硝化、其反硝化能力有多强、土壤中的碳源是否可以作为其反硝化的电子供体等等信息。现有有关放线菌反硝化能力的研究都是在纯培养条件下进行的, 供试菌株均来自有关菌种保藏中心。这些研究只能说明一些放线菌菌株确能反硝化, 但是不能反映其是否可能参与土壤反硝化过程。研究自然生境下放线菌是否参与反硝化非常困难, 因为没有合适的研究方法。本文考察了几株从一种土壤中分离出来的放线菌的反硝化能力, 并测定其反硝化速率以及部分菌株在灭菌土壤中的反硝化活性, 试图初步了解放线菌参与土壤反硝化作用的可能性。

1　材料和方法

1.1　土壤及分离方法

土壤取自中国科学院南京土壤研究所常熟农业

* 国家自然科学基金项目(30170029)、中国科学院南京土壤研究所土壤圈物质循环开放实验室基金课题、中国科学院知识创新工程项目(KZCX2- 413- 3- 1)资助
† 通讯作者
作者简介: 葛　灿, 男, 学士, 本科毕业设计阶段起从事放线菌反硝化方面的研究
收稿日期: 2003- 06- 23; 收到修改稿日期: 2003- 09- 03

生态试验站秸秆还田实验小区 0~ 15 cm 耕层, 有机质含量 35.0 g kg^{-1}, 全氮 2.09 g kg^{-1}, pH 7.3。新鲜土壤经系列稀释后用高氏 1 号培养基分离放线菌。根据菌落特征挑取适当稀释度平板中所有放线菌菌落。纯化后选取菌落特征各不相同的所有放线菌, 观察其形态学特征, 并作初步鉴定。

1.2　放线菌反硝化能力测定

平板培养放线菌, 待孢子大量形成以后, 刮取孢子于无菌水中, 超声波分散后得孢子悬浮液。将孢子悬浮液定量接种到牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 振荡 6 h (好气) 使孢子萌发, 然后加灭菌橡胶塞, 反复抽真空充 Ar 气 3 次后加入 10 mmol L^{-1} KNO_3, 并设加 C_2H_2 和不加 C_2H_2 处理, 3 次重复, 28 ℃下厌气培养 2 d, 测定 N_2O 产出量和培养基中剩余 NO_3^- / NO_2^- 。

1.3　放线菌反硝化速率测定

将孢子悬浮液均匀涂抹接种到透明半透膜上, 半透膜紧贴高氏 1 号固体培养基表面, 好气培养生长菌丝。菌丝盖遍半透膜时(有少量孢子形成), 剪取固定面积的半透膜, 置于硝酸盐- 牛肉膏蛋白胨液体培养基(同上) 中, 不加乙炔, 相同条件下厌气培养。另外剪取一定面积的半透膜, 65 ℃烘干称重计算半透膜上放线菌的生物量。适当时候测定 N_2O 产出量。

1.4　放线菌在灭菌土壤中反硝化活性测定

先培养菌丝。新鲜土壤 200 g (干重基数) 置于 250 ml 三角瓶中, 加棉塞灭菌。定量接入放线菌孢子悬浮液到灭菌的土壤中, 边加边摇动混匀, 不外加任何碳源, 28 ℃好气培养 5 d, 培养过程中适当摇动尽量使放线菌在土壤中均匀生长。控制最终土壤含水量在 0.21 g g^{-1} 以保证好气条件。

至有白色菌丝长出时, 在无菌条件下称取 5 g (干重基数) 长有菌丝的土壤于事先灭菌的 15 ml 血清瓶中, 加灭菌的橡胶塞, 加灭菌 KNO_3 液体至 N 100 mg kg^{-1}, 土壤含水量控制在 1 g g^{-1}。反复抽真空充 Ar 气 3 次后设加 C_2H_2 和不加 C_2H_2 处理, 均 3 次重复, 28 ℃下培养, 隔一定时间取样测定 N_2O 产出量。以灭菌土壤加 NO_3^- 加乙炔/ 不加乙炔为对照。

1.5　经历持续厌氧以后放线菌的反硝化能力

将另一部分 1.4 中处理好的、密闭于 15 ml 血清瓶中的土样(5 g $bottle^{-1}$; 长有放线菌菌丝; 含水量 1g g^{-1}; 未外加 NO_3^-) 反复抽真空充 Ar 气后, 于 30 ℃下预培养 21 d。然后重新反复抽真空充 Ar 气(去除预培养过程中可能产生的 N_2O, 同时保证厌氧条件), 用可密封的注射针筒透过橡胶塞注入灭菌的 NO_3^- (加入量为 N 100 mg kg^{-1}) , 不加乙炔, 28 ℃下培养 24 h, 测定 N_2O 产出量。以预培养 21 d 后灭菌但其它处理相同的样品为对照。

1.6　测定方法

N_2O 用气相色谱(HP 5890 Series Ⅱ) 测定, 测定条件为: Poropak 分离柱; 柱温 40 ℃; 电子捕获检测器温度 200 ℃。培养基中剩余 NO_3^- / NO_2^- 用差值紫外分光(220 nm 和 275 nm, 见 Hitachi U- 2001 使用指南) 和 Griess-Ilosvay 比色法测定。

2　结果和讨论

2.1　具备反硝化能力的放线菌数量

在 10^{-5} 土壤稀释度下共获得 23 个放线菌单菌落, 经初步鉴定属于 10 个不同类型的菌株, 根据形态特征(孢子颜色、孢子丝形态、色素等) , 其中有 9 个为 *Streptomyces*(链霉菌属) , 其典型孢子丝形态如图 1 所示, 另一个(F9) 属于 *Actinomadura* (马杜拉属) 。

在硝酸盐- 牛肉膏蛋白胨液体培养基中厌气培养 2 d, 10 个菌株都能形成 N_2O (图 2) , 形成量为 N 2~ 170 μg $bottle^{-1}$, 占加入硝态氮量的 0.01% ~ 1.2%。此时培养基中有 NO_2^- 积累, 表明反硝化过程尚未全部完成。这一结果表明, 土壤中有很高比例放线菌能够将 NO_3^- 还原为 N_2O。

C_2H_2 处理对 7 个链霉菌菌株(F1~ F7) 的 N_2O 形成有抑制作用(图 2) 。这一现象在后来的实验中重复出现(参考图 4) , 因此认为这是由菌株本身的某些生物学特性决定的一个现象。对于反硝化细菌, 公认的事实是 C_2H_2 抑制其 N_2O 还原酶的活性, 因而乙炔抑制法已成为测定反硝化的常规手段。人们之所以肯定 C_2H_2 的抑制机理, 是因为在对反硝化细菌纯菌株的测试中尚未发现任何例外。但是, C_2H_2 的这种抑制机理是否适用于链霉菌不得而知, 至今人们还不知道链霉菌的 N_2O 还原酶在结构和作用机理方面是否与细菌的 N_2O 还原酶相同。对此作进一步研究应该是很有价值的。C_2H_2 对 F8、F9、F10 三个菌株的 N_2O 形成有促进作用, 是否表明有 N_2 形成也不得而知。

2.2　代表菌株的反硝化速率

根据上述结果, 选取 F3、F5、F6 三个菌株, 分别代表 N_2O 产出能力高低不等的链霉菌, 进一步研究其反硝化速率, 结果如图 3 所示。图 3 表明, N_2O 形

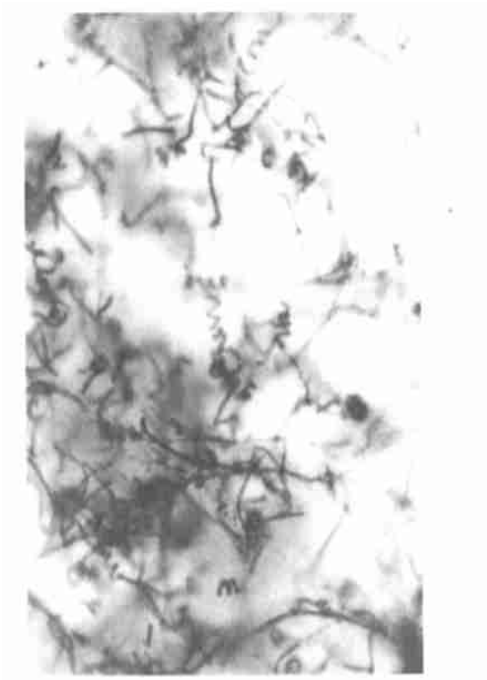
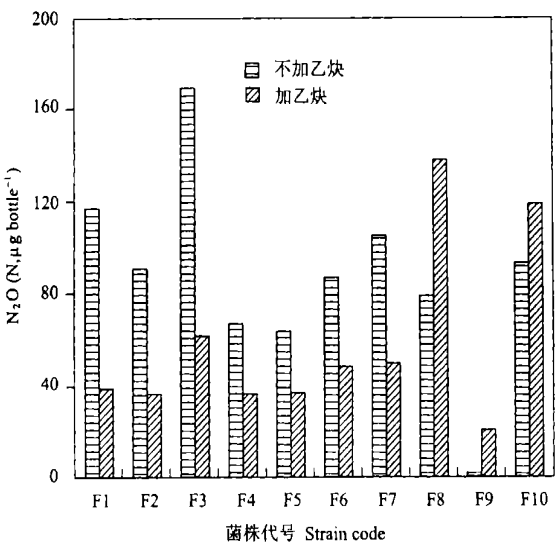


图1 代表性放线菌菌丝和孢子丝形态

Fig. 1 Micrograph of typical sporangia of *Streptomycetes* sp isolated from a soil (× 400)



不加乙炔: Untreated with C_2H_2;

加乙炔: Treated with C_2H_2

图2 放线菌菌株反硝化能力比较

Fig. 2 N_2O produced from NO_3^- by actinomycetes isolated from a soil

成量与生物量成正比。计算出F3、F5、F6的反硝化速率分别为N 187.7、3.2和1.2 μg g^{-1} min^{-1}(图3中的斜率×1 000/(18×60),其中的1000为mg换算成g的换算因子;细胞干重基数)。文献中报道的[11]反硝化细菌的反硝化速率为N_2O 9.7~133 μmol g^{-1} min^{-1}(蛋白干重基数)。因为单位不同,本文数据不能与文献报道数据直接比较,但是如果与本实验室过去测试过的典型反硝化菌株(*Agrobacterium tumefaciens* C58和*Paraccocus denitrificens*)相比(殷士学等,未发表资料),至少菌株F3的反硝化速率在典型反硝化菌范围。

2.3 代表菌株在灭菌土壤中的反硝化活性

链霉菌为好气菌。原本生活在土壤中的链霉菌在好气条件下能够利用土壤中原有有机碳生活是理所当然的,但是在厌气且有硝酸根存在的条件下能否利用有机碳生活、能利用什么有机碳生活等问题都没有研究。在厌气且有硝酸根存在的条件下利用有机碳作为还原NO_3^-的电子供体是反硝化的必备条件。因此,放线菌能否在厌气条件下利用土壤原有有机碳,是评估放线菌参与土壤反硝化可能性方面的重要参考信息。

将F3、F5、F6分别接入到灭菌的土壤中,添加NO_3^-但不添加任何碳源,厌气培养,均能测得N_2O产出,且产出量大致随培养时间延长而增加(图4),说明链霉菌能够在厌气且有硝酸根存在的条件下利用土壤原有有机碳作为还原NO_3^-的电子供体。

2.4 持续厌氧后放线菌的反硝化能力

一般而言,好氧菌可以临时忍受厌氧胁迫;如果厌氧条件很快解除,好氧菌可以恢复活性,但是长期厌氧会使好氧菌活性降低甚至死亡。放线菌是好氧菌。反硝化一般在厌气条件下才能进行。稻田的持续淹水为反硝化提供了良好条件,但是为放线菌的生存、生活提供了不利条件。因此,评估放线菌是否可能参与土壤反硝化过程,需要知道放线菌能否忍受持续厌氧条件。为此进一步测定了经历持续厌氧21 d的放线菌反硝化能力,结果示于图5。

图5表明,3个代表性菌株经历厌氧胁迫21 d后都依然显示明显的反硝化活性(图5)。因为图4和图5所用的样品相同,起始放线菌生物量相同,所不同的是图5所用的样品经历了21 d持续厌氧胁迫,而图4所用的样品没有经历厌氧胁迫。因此,比较图4和图5中相应的数据可以发现,经历厌氧胁迫以后,F3的反硝化活性明显降低,仅为原来活性的27%。但是F5和F6的活性反而有了明显提高,分别相当于原来活性的66倍和7倍。本文没有进一步研究为什么经历厌氧胁迫以后有的链霉菌活性反而升高了,但是现有数据显然可以说明,厌氧胁迫21 d以后,链霉菌至少能保留一部分反硝化能力。

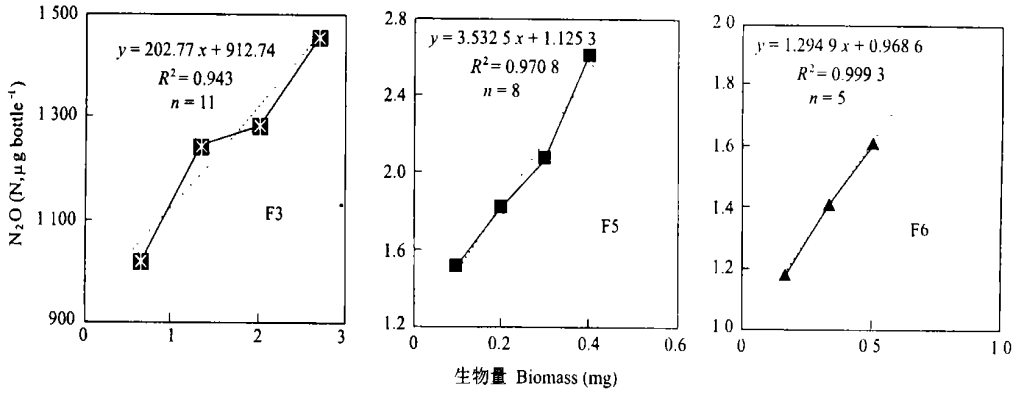
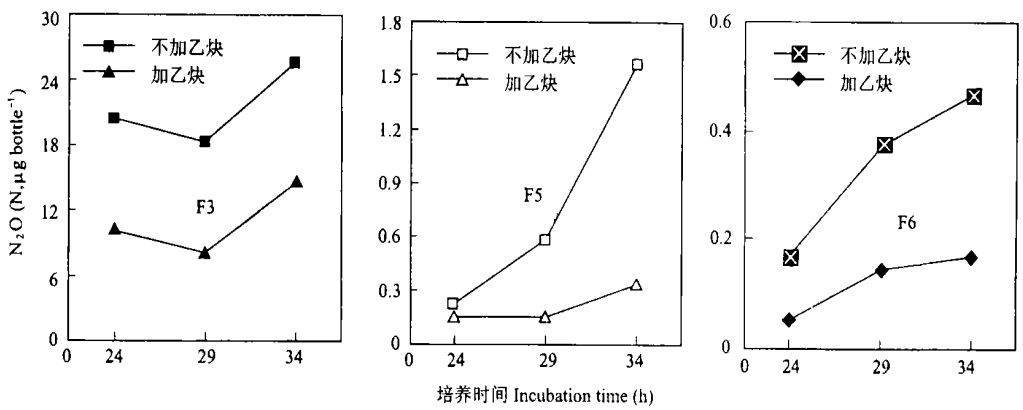


图 3　代表菌株 F3、F5、F6 反硝化速率(培养 18h)

Fig. 3　N_2O production rates of strain F3, F5 and F6(incubated for 18h)



不加乙炔: Untreated with C_2H_2; 加乙炔: Treated with C_2H_2

图 4　代表菌株 F3、F5、F6 在灭菌土壤中的反硝化活性

Fig. 4　N_2O produced from NO_3^- by strain F3, F5 and F6 in sterile soil

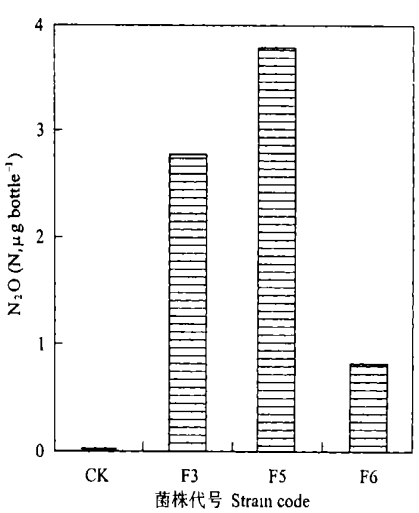


图 5　持续厌氧 21 d 后代表菌株的反硝化活性

Fig. 5　N_2O produced by strain F3, F5 and F6 anaerobically pre-incubated for 21 days

3　小　结

本研究表明, 土壤中具有反硝化能力的放线菌数量占很高比例; 在纯培养条件下代表性菌株具有较高的反硝化速率; 放线菌虽然是好气菌, 但是能够在厌气且有硝酸根存在的条件下利用土壤原有有机碳作为还原 NO_3^- 的电子供体。经历厌氧胁迫 21 d 以后, 测试的 3 株链霉菌至少能保留一部分反硝化能力。

所分离到的多数链霉菌 N_2O 产出受 C_2H_2 抑制, 其机理尚不明了, 值得进一步研究。原位条件下放线菌是否同样具有反硝化能力、放线菌对土壤反硝化的贡献有多大等等问题都有待于进一步研究。

参 考 文 献

[1]　Payne W J. Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. Bae-

teriol. Rev., 1973, 37: 409~ 452

[2] Tiedje J M. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. *In*: Zehnder A J B. ed. Biology of Anaerobic Microorganisms. New York: John Wiley & Sons, 1988. 179~ 244

[3] Zumft W G. The Denitrifying prokaryotes. *In*: Balows A, Truper H G, Dworkin M, *et al*. eds. The Prokaryotes. New York: Springer, 1992. 554~ 582

[4] 李良谟. 反硝化作用. 见: 朱兆良, 文启孝主编. 中国土壤氮素. 南京: 江苏科学技术出版社, 1992. 145~ 170. Li L M. Denitrification. *In*: Zhu Z L, Wen Q X. eds. Nitrogen in Soils of China (In Chinese). Nanjing: Jiangsu Science and Technology Publishing House, 1992. 145~ 170

[5] Albrecht A, Ottwo J C G, Benchkiser G. Incomplete denitrification (NO and N_2O) from nitrate by *Streptomyces violaceoruber* and *S. nitrosproesu* revealed by acetylene inhibition and ^{15}N gas chromatography-quadrupole mass spectrometery analysis. Naturwissenschaften, 1997, 84: 145~ 147

[6] Shoun H, Kano M, Baba I, *et al*. Denitrification by actinomycetes and purification of dissimilatory nitrite reductase and azurin from *Strpetomyces thioluteus*. J. Bacteriol., 1998, 180: 4 413~ 4 415

[7] Kumon Y, Sasaki Y, Kato I, *et al*. Codenitrification and denitrification are dual metabolic pathways through which dinitrogen evolves from nitrate in *Streptomyces antibioticus*. J. Bacteriol., 2002, 184: 2 963~ 2 968

[8] Chèneby D, Philippot L, Hartmann A, *et al*. 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. FEMS Microbiol. Ecol., 2000, 34: 121~ 128

[9] Lensi R, Beaupied H, Moiroud A. Denitrifying activity in the *Actinorhizae*. Acta Oecol., 1990, 11: 391~ 398

[10] Shapleigh J. The Denitrifying prokaryotes. *In*: Dworkin M. ed. The Prokaryotes, An Evolving Electronic Resources of Microbiological Community, 2000, web version, release 3.13 (5/12/03), subject to update on time, at http://et.springer-ny.com:8080/prokPUB/index.htm

[11] Mahne I, Tiedje J M. Criteria and methodology for identifying respiratory denitrifiers. Appl. Environ. Microbiol., 1995, 61: 1 110~ 1 115

PARTICIPANT POSSIBILITY OF ACTINOMYCETES IN SOIL DENITRIFICATION

Ge Can[1] Shi Zhunan[2] Yan Zhimin[3] Yang Linzhang[4]
Wang Dejian[4] Yin Bin[4] Mei Lijuan[1] Piao Zhe[1] Hu Jian[1] Yin Shixue[1†]

(1 Department of Agronomy, Agricultural College, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

(2 College of Physics Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

(3 General Station of Environmental Monitoring, Yangzhou, Jiangsu 225007, China)

(4 Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

Abstract Twenty three single colonies of actinomycetes were isolated from a soil sample collected from Changshu Agroecological Experimental Station, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences. Among 10 strains distinguished from each other by morphological properties, 9 were further identified as *Streptomyces* sps. All strains showed capability of reducing nitrate into N_2O under anaerobic pure culture conditions. Three strains were selected and denitrification rates were measured. Nitrous oxide production rate of these strains ranged from N 1.2 to 187.7 $\mu g\ g^{-1}\ min^{-1}$. The strains were shown not only to grow well but also to be able to reduce nitrate to N_2O in sterile soil, indicating that these strains were able to use soil organic carbon as electron donor for nitrate reduction. Acetylene showed inhibitory effect on N_2O production of most strains isolated. Stressed under continuous strict anaerobic condition, strains of *Streptomyces* sps still showed considerable denitrification capacities.

Key words Actinomycetes; Denitrification; Soil microorganisms