

土壤中“接力反硝化”机制的部分证据*

梅丽娟¹ 毛 健¹ 杨林章² 王德建² 尹 斌² 胡 健¹
朴 哲¹ 殷士学^{1†}

(1 扬州大学环境科学与工程学院, 江苏扬州 225009)

(2 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008)

摘 要 设想土壤中存在不同类型的不完全反硝化细菌; 这些细菌可以彼此配合, 此菌产物作为彼菌的底物, 共同完成完整的反硝化过程。该机制称之为“接力反硝化”机制, 有别于传统的反硝化机制。本文为“接力反硝化”机制的存在提供部分证据。以土壤浸提液为培养基, N_2O 为电子受体富集土壤微生物, 获得了 1 株仅完成 $NO_3^- \rightarrow NO_2^-$ 反应的细菌(原始编号 21-6-9-2)、1 株仅完成 $NO_2^- \rightarrow N_2O$ 反应的细菌(原始编号 1-9-5-3)、1 株仅完成 $NO_2^- \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$ 反应的细菌(原始编号 21-6-3-6)。把菌株 21-6-9-2 和 1-9-5-3 两菌株以适当的数量比例混合于灭菌的土壤中, 不添外来碳源, 仅添加 NO_3^- , 厌气培养 1 周后, 测得土壤中剩余的 NO_3^- 仅为原添加量的 39.4%~53.0%, 与此同时有 5.2%~13.9% 的 NO_3^- 被还原成 NO_2^- , 有 28.6%~30.8% 以 N_2O 形态被回收, 总回收率为 75.4%~95.5%, 说明两者可以相互配合, 菌株 21-6-9-2 的硝酸根还原产物可以被菌株 1-9-5-3 用作底物, 共同完成反硝化过程, 从而支持我们设想的“接力反硝化”机制。

关键词 反硝化; 不完全反硝化细菌; 土壤氮素转化

中图分类号 S 154.34 文献标识码 A

厌气条件下, 土壤中的硝酸根 90% 以上被还原成气态氮化物($N_2 + N_2O$), 只有少量的硝酸根被还原成铵^[1], 说明只要提供厌气条件和硝酸根, 反硝化过程总是占主导地位。因为典型反硝化菌能将 NO_3^- 几乎 100% 地还原成($N_2 + N_2O$)^[2], 因此人们一般认为土壤中典型反硝化细菌是还原硝酸根的主导微生物区系。但是, 已有报告表明, 在所有能够还原硝酸根的细菌中, 典型反硝化细菌往往不是数量最多的类群。Gamble 等^[3] 分析世界不同地区 23 个土壤中反硝化细菌的数量和种群, 共得到 1 500 个能够还原硝酸根的菌株, 其中属于典型反硝化细菌的有 146 个, 仅占总数的 9.7%。另外几篇可供比较的报告所得到的相应比例为 4%~38% 不等^[1, 3~6]。既然典型反硝化菌不是土壤中参与硝态氮还原的优势种群, 那么为何土壤中反硝化过程总是占主导地位?

根据本实验室过去积累的菌株及相关文献, 我

们设想一种新的反硝化机制, 即土壤中存在一些细菌, 本身不能完成反硝化过程的全部, 但可以完成反硝化全过程中某一步或几步反应; 严格意义上来说, 这些细菌都不是反硝化菌, 但是这些细菌之间彼此配合, 此菌的产物作为彼菌的底物, 共同完成反硝化过程。因为该机制类似于接力赛中运动员之间的相互配合, 故称为“接力反硝化”机制。该机制表现效果与反硝化菌反硝化相同, 但是机制不同, 它是由多种非反硝化菌联合完成。如果“接力反硝化”机制成立, 那么就很容易解释土壤中反硝化菌不是主导区系但反硝化过程却总是占主导地位这一矛盾现象。

证明“接力反硝化”机制成立, 最重要的根据是土壤中确实有这类菌株存在, 分离出这些菌株是关键。本文通过适当的富集方法, 成功地从土壤中分离到具有参与“接力反硝化”特性的菌株, 并在灭菌土壤中重现该机制。主要结果报告如下。

* 国家自然科学基金项目(30170029)、中国科学院知识创新工程项目(KZCX2-413-3-1)、中国科学院土壤圈物质循环开放实验室基金课题资助

† 通讯作者

作者简介: 梅丽娟(1980-), 女, 硕士研究生, 主要从事反硝化微生物学方面的研究工作

收稿日期: 2003-08-11; 收到修改稿日期: 2003-12-03

1 材料和方法

1.1 微生物富集和分离

土壤取自中国科学院南京土壤研究所常熟农业生态试验站。土壤 pH 7.3, 有机质含量 35.0 g kg^{-1} , 全氮 2.09 g kg^{-1} , CEC $17.7 \text{ cmol kg}^{-1}$ 。按照 1: 3 的土水比例加入自来水, 搅拌后煮沸 30 min, 静置过夜, 取上清液过滤得土壤浸提液, 灭菌后 4°C 下保存待用。

将 100 g 新鲜土置于 500 ml 三角瓶中, 加入 200 mL 土壤浸提液, 橡胶塞密封。反复抽真空充纯氩气 3 次(厌氧条件), 最后一次抽真空后充入纯 N_2O 气(作为电子受体), 30°C 下培养, 间歇摇动。待泥浆中有大量气泡产出(指示有 N_2 形成)时, 取出 50 ml 置于新的 150 ml 的土壤浸提液中, 继续抽真空、充纯 N_2O 气体、培养。如此反复富集 10 次。

取适当稀释后的富集物 0.5 ml, 涂布于 1/10 浓度(0.8 g L^{-1})的 NB-琼脂培养基(Nutrient broth, Merck)表面, 分别在厌气、好气 2 种条件下培养 4 周。厌气培养中按 3 种处理提供电子受体: 1) NB 中添加 10 mmol L^{-1} 的 NO_3^- 、氩气环境; 2) NB 中添加 5 mmol L^{-1} 的 NO_2^- 、氩气环境; 3) NB 中仅添加约 30 mL L^{-1} 的 N_2O 环境。好气培养处理不添加任何氮氧化物。从这些处理的平板中选取菌落密度适宜的平板, 挑取全部菌落, 反复划线纯化, 并以形态特征和染色反应等来核对菌株纯度。菌株的鉴定仍在进行之中。

1.2 菌株还原氮氧化物特性研究

用 NB 培养基, 分别以 NO_3^- 、 NO_2^- 、 N_2O 为唯一电子受体, 分别设加 C_2H_2 和不加 C_2H_2 , 厌气培养(氩气环境)1 周后测定培养基中 NO_3^- 、 NO_2^- 、 N_2O 含量变化。依此选出具备“接力反硝化”特性的不同菌株(目的菌株)。以 N_2O 为唯一电子受体的处理, 主要目的是再次确认菌株是否能将 N_2O 还原至 N_2 。

将目的菌株按一定比例接种到灭菌的土壤中, 分别加入适宜的氮氧化物, 厌气培养, 测定土壤中剩余的氮氧化物以及产生的 N_2O 。

参考菌株为 *Agrobacterium tumefaciens* C58 和 *Paraccoccus denitrificans* (康奈尔大学 James P. Shapleigh 博士赠送)。这两个菌株都是已知的典型反硝化菌, 很多文献都有描述。

所有试验均设 3 次重复, 分别测定, 结果表示成平均数和标准误(Standard error)。

1.3 测定方法

NO_3^- 用紫外分光光度法(220 nm 和 275 nm 之间差值)、 NO_2^- 用 Griess-Ilosvay 试剂分光光度法测定。液体培养基中 NO_3^- 、 NO_2^- 直接取样测定; 土壤中的 NO_3^- 、 NO_2^- 用 1 mol L^{-1} KCl 浸提后测定。 N_2O 用气相色谱(HP 5890 Series II)测定, 测定条件是: 电子捕获检测器, 200°C ; Poropak Q 分离柱, 40°C ; 载气为 N_2 (99.99%)。先用 N_2O 标准气体($5.8 \times 10^{-6} \text{ mol mol}^{-1}$ 、 $15.1 \times 10^{-6} \text{ mol mol}^{-1}$ 和 $30.7 \times 10^{-6} \text{ mol mol}^{-1}$); 购于南京特种气体厂)制作标准曲线(以峰面积计), 待测样品的 N_2O 浓度根据其峰面积和标准曲线计得。 N_2O 浓度过高的待测样品经稀释后测定。培养瓶的容积预先测定; 瓶内气压用 Pressure transducer (Loktronic, Dargaville, New Zealand) 测定。 N_2O 产出量根据(1)式计算^[7]:

$$\text{N}_2\text{O} = C_g \times (V_g \cdot P_b + V_l \cdot \alpha) \quad (1)$$

其中 C_g 为气相 N_2O 浓度; V_g 为气相体积; P_b 为瓶内压力; V_l 为液相体积; α 为 Bunsen 吸收系数^[8]。

上述培养方法和测定方法主要参考文献[7]及该书的其它卷有关内容。

2 结果和讨论

2.1 研究方法

通常分离或富集土壤反硝化菌的方法一般是在牛肉膏蛋白胨培养基中加入 $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 后厌气培养, 这种方法较难满足本研究要求。本研究首先需要获得具备“接力反硝化”特点的细菌, 而这些细菌有些不能利用 $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 但能利用其它形态的氮氧化物为电子受体, 因此, 常规方法可能分离/富集不到目标微生物。此外, 牛肉膏蛋白胨培养基营养丰富, 而土壤相对于微生物而言一般都是营养贫乏的基质^[9], 因此用营养丰富的培养基来分离/富集土壤微生物, 得到的区系组成可能与土壤中实际区系组成有很大区别。考虑到上述 2 个因素, 采用以土壤浸提液为培养基、以 N_2O 为电子受体来富集微生物。此外, 使用先富集后分离的方法, 目的是尽可能多的得到候选菌株。候选菌株越多, 得到目的菌株的可能性越大。

2.2 菌株还原氮氧化物的特性

已知反硝化菌 *Agrobacterium tumefaciens* C58 在 NB 培养基中(图 1)几乎 100% 地将 NO_3^- 还原成 N_2O 。加乙炔和不加乙炔对 N_2O 产出量没有影响, 说明该菌

株不能进一步将 N_2O 还原成 N_2 。以 N_2O 为唯一电子受体进一步确认了这一特点。尽管如此, 该菌仍然是反硝化菌, 因为 1) N_2O 的回收率很高(这是判断反硝化菌的重要指标之一); 2) 该菌具有将 N_2O 还原成 N_2 的基因^[10], 只是不知什么原因不能正常表达。 N_2O 还原酶的基因存在但不能表达的现象在反硝化菌中比较常见, 另一个已知反硝化菌 *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3 (ATCC 17025) 同样如此(结果未示)。有些反硝化菌在刚分离出时具有 N_2O 还原酶活性, 但在实验室内几次转接后该酶活性消失^[3]。 *Paracoccus denitrificans* 在加乙炔时同样可以将 NO_3^- 几乎 100% 地还原成 N_2O (图 1), 但是不加乙炔时仅有 0.02% ~ 0.05% 的氮以 N_2O 形态被回收(注意纵坐标分段), 显然该菌可以从 NO_3^- 一直还原到 N_2 。两个已知反硝化菌同样能将 NO_2^- 定量地还原成气态氮化物, 因结果与 NO_3^- 还原相同而未示。

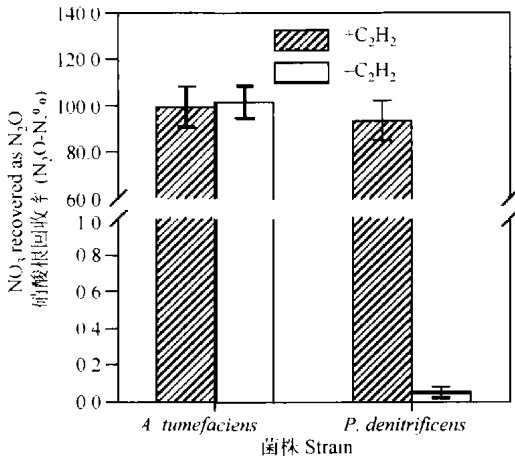


图 1 已知反硝化菌在 NB 中还原 NO_3^- 的产物及其回收
Fig. 1 NO_3^- reduction to N_2O by know denitrifiers

未知菌株 21-6-9-2 在 NB 培养基中将 NO_3^- 几乎 100% 地还原成 NO_2^- (图 2); 添加的 NO_2^- 亦几乎 100% 地保留在培养基中; 两种情况下均能产生 $10 \mu L L^{-1}$ 左右浓度的 N_2O , 但是计算出的 N_2O -N 总量仅占 NO_3^- 还原量的 $0.59\% \pm 0.09\%$ (未示于图 1 中)。这一结果说明, 该菌是亚硝酸积累菌, 仅能完成 $NO_3^- \rightarrow NO_2^-$ 反应。土壤中这类菌株很多, 在硝酸 NB 培养基上出现频率大约在 20% 以上, 无需富集就可以分离到。

未知菌株 21-6-3-6 在 NB 培养基中不能还原 NO_3^- (图 3), 因为添加的 NO_3^- 几乎 100% 地保留在培养基中。但是如果添加 NO_2^- , 加乙炔处理有 22.7% 以 N_2O 形态被回收, 培养基中没有 NO_2^- 剩

余; 不加乙炔处理则检测不到 N_2O , 培养基中同样没有 NO_2^- 剩余, 说明该菌能还原 NO_2^- , 且能将 N_2O 进

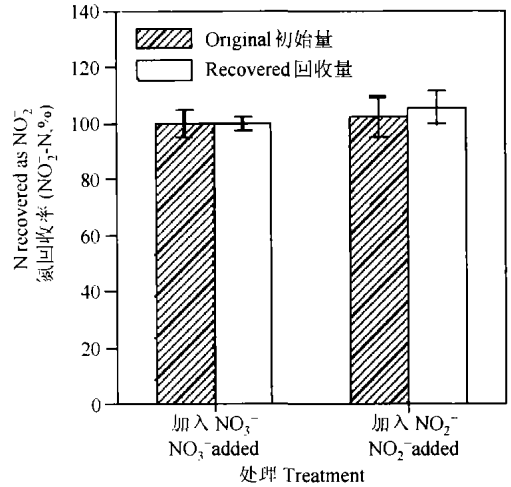


图 2 菌株 21-6-9-2 在 NB 中还原 NO_3^-/NO_2^- 的特性
Fig. 2 NO_3^-/NO_2^- reduction by strain 21-6-9-2 in NB

一步还原为 N_2 。在以 N_2O 为唯一电子受体条件下, 该菌能 100% 地消耗完加入的 N_2O , 进一步证明该菌能将 N_2O 进一步还原成 N_2 (结果未示)。该菌完成的反应为 $NO_2^- \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$ 。在本试验条件下该菌的出现频率大约为 1/200。

未知菌 1-9-5-3 在添加 NO_3^- 的 NB 培养基中(图 4), 绝大部分 NO_3^- 仍然以 NO_3^- 形式保留, 只有 1.2% ~ 1.3% 的 NO_3^- 以 N_2O 形态产出(注意纵坐标分段), 没有 NO_2^- 积累于培养基中。但是, 添加的 NO_2^- 则有 68% ~ 76% 以 N_2O 形态被回收, 此时培养基中没有任何 NO_2^- 剩余。根据上述结果, 该菌虽然能还原少量的 NO_3^- , 但是与其还原 NO_2^- 能力相比甚微。还原 NO_2^- 时, N_2O 回收率高达 68% ~ 76% (尚有 24% ~ 32% 未能回收, 其原因不明)。加乙炔和 不加乙炔几乎不影响该菌 N_2O 产出量, 说明该菌不能将 N_2O 还原为 N_2 , 因此不可能因为产生 N_2 而回收不到。 NO_2^- 还原成铵的可能性也不大, 一是因为 NB 培养基不适合 NO_2^- 异化还原成铵过程^[11]; 二是至今尚未发现能将 NO_2^- 异化还原成铵并有如此高 N_2O 产出量的菌株(N_2O 产出量在 10% 以下的菌株是有的^[4])。以 N_2O 为唯一电子受体时, 该菌不能消耗所加的 N_2O , 进一步证明 N_2O 是该菌的终产物(结果未示)。因此, 可以将该菌视为仅仅完成 $NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O$ 反应的菌株。在本试验条件下该菌的出现频率大约为 1/200。

我们将上述已知和未知菌分别接种到灭菌土壤

中,考察其 $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 还原特性,结果与在 NB 中的情况类似,故有关结果从略。

分离到上述未知菌,说明土壤中确有这些菌。需要进一步考察这些菌是否可以在土壤中彼此配合,联合完成反硝化过程。

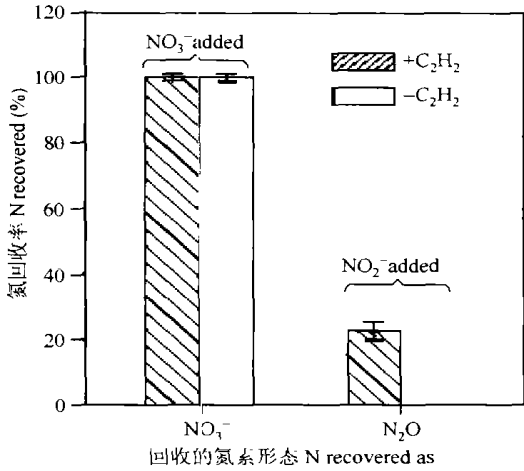


图3 菌株 21-6-3-6 在 NB 中还原 $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 的特性

Fig. 3 $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ reduction by strain 21-6-3-6 in NB

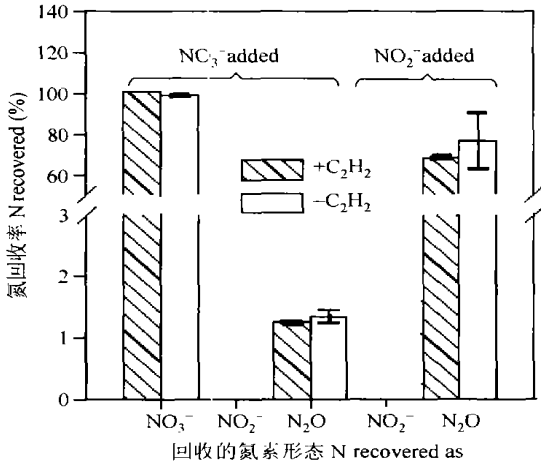


图4 菌株 1-9-5-3 在 NB 中还原 NO_3^- 或 NO_2^- 的特性

Fig. 4 Reduction of NO_3^- or NO_2^- by strain 1-9-5-3 in NB

2.3 “接力反硝化”机制

将菌株 21-6-9-2 和菌株 1-9-5-3 以适当的数量比例(本试验中大约为 3:1)混合于灭菌的土壤中,不添加任何外来碳源,仅添加 NO_3^- , 厌氧培养 1 周后,测得土壤中剩余的 NO_3^- 仅为原添加量的 39.4%~53.0% (图 5; 因加乙炔和不加乙炔处理而异),与此同时有 5.2%~13.9% 的 NO_3^- 被还原成 NO_2^- , 有 28.6%~30.8% 以 N_2O 形态被回收,总回收

为 75.4%~95.5%。菌株 21-6-9-2 单独培养时只能将 NO_3^- 还原到 NO_2^- (图 2); 菌株 1-9-5-3 单独培养时几乎不还原 NO_3^- (图 4), 但是混合培养时则能够顺利地由 NO_3^- 还原到 N_2O (图 5), 说明两者可以相互配合, 共同完成反硝化过程, 从而支持我们设想的“接力反硝化”机制。因为培养时未加入任何外来碳源, 所以土壤中原有碳源可以作为“接力反硝化”的电子供体(反硝化条件之一)。在该试验条件下, 土壤中有 NO_2^- 积累, 说明电子供体不足, 间接证明土壤相对于微生物而言是贫营养状态^[9]。

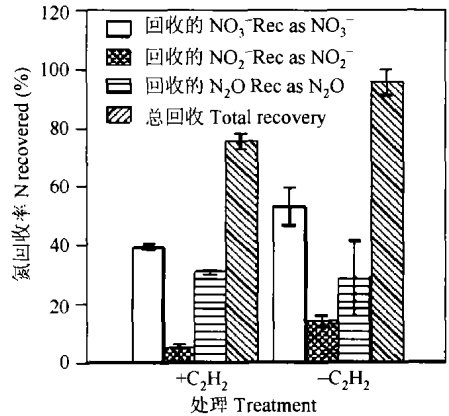


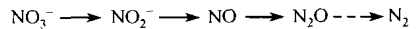
图5 菌株 21-6-9-2 与菌株 1-9-5-3 在灭菌土壤中联合反硝化作用

Fig. 5 Denitrification performed jointly by strains of 21-6-9-2 and 1-9-5-3 in sterile soil

菌株 21-6-3-6 与其它菌之间的“接力反硝化”尚在研究中。

关于“接力反硝化”机制, 曾经在一篇综述文献^[11] 中进行过简单描述。图 6 中实弧线表示完成该过程的细菌已经获得, 虚弧线表示的是尚未得到但设想是存在的那些细菌。这些设想的菌株最终是否能被找到尚不知晓。

典型反硝化菌反硝化:



“接力反硝化”:

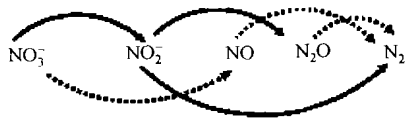


图6 典型反硝化菌反硝化与“接力反硝化”比较示意图
Fig. 6 Comparison between “Successive Denitrification” and normal denitrification

不同微生物之间的相互作用是自然界一种普遍现象。仅就参与氮素转化的微生物而言,土壤自养硝化细菌与异养硝化细菌之间^[12]、硝化细菌与反硝化细菌之间^[13,14]的联合作用都已得到证实。因此“接力反硝化”机制可能只是普遍现象中的一例,只是实际土壤中的相互作用远比实验室能够展现的要复杂得多。

参考文献

- [1] Yin S X, Chen D, Chen L M, *et al.* Dissimilatory nitrate reduction to ammonium and responsible microorganisms in two Chinese and Australian paddy soils. *Soil Biol. Biochem.*, 2002, 34: 1 131~ 1 137
- [2] Mahne I, Tiedje J M. Criteria and methodology for identifying respiratory denitrifiers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, 61: 1 110~ 1 115
- [3] Gamble T N, Betlach M R, Tiedje J M. Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1977, 33: 926~ 939
- [4] Smith M C, Zimmernan K. Nitrous oxide production by nondenitrifying soil nitrate reducers. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 1981, 45: 865~ 871
- [5] Fazzolari E, Mariotti A, Gemmon J C. Nitrate reduction to ammonium: a dissimilatory process in *Enterobacter amnigenus*. *Can. J. Microbiol.*, 1990, 36: 779~ 785
- [6] Chénepy D, Hartmann A, Henault C, *et al.* Diversity of denitrifying microflora and ability to reduce N_2O in two soils. *Biol. Fertil. Soils*, 1998, 28: 19~ 26
- [7] Tiedje J M. Denitrifiers. In: Weaver R W, *et al.* eds. *Methods of Soil Analysis. Part 2. Microbiological and Biochemical Properties.* Soil Science Society of America, Madison, 1994. 245~ 267
- [8] Wilhelm E, Battino R, Wilcock R J. Low-pressure solubility of gases in liquid water. *Chem. Rev.*, 1977, 77: 219~ 262
- [9] Aldén L, Demoling F, Bååth E. Rapid method of determining factors limiting bacterial growth in soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67: 1 830~ 1 838
- [10] Wood D W, Stubal J C, Kaul R, *et al.* The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science*, 2001, 294: 2 317~ 2 323
- [11] 殷士学, 陈丽敏. 土壤中硝化反硝化微生物的研究进展. *土壤学报*, 2002, 39(增刊): 116~ 128. Yin S X, Chen L M. Advances in soil nitrifying and denitrifying microorganisms (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2002, 39(Suppl.): 116~ 128
- [12] van Niel E W J, Arts P A W, Wesseling B J, *et al.* Competition between heterotrophic and autotrophic nitrifiers for ammonium in chemostat culture. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1993, 102: 109~ 118
- [13] Kuenen J G, Robertson L A. Combined nitrification-denitrification processes. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1994, 15: 109~ 117
- [14] 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

SUCCESSIVE DENITRIFICATION BY NON-TYPICAL DENITRIFIERS IN SOIL

Mei Lijuan¹ Mao Jian¹ Yang Linzhang² Wang Dejian² Yin Bin² Hu Jian¹ Piao Zhe¹ Yin Shixue[†]

(¹ College of Environmental Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

(² State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture (Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences), Nanjing 210008, China)

Abstract Purpose of the present work is to show evidence supporting the hypothesis that nitrate reduction products produced by one type of partial denitrifiers could be used as electron acceptor by other type of partial denitrifiers. This mechanism of soil denitrification, here referred to as successive denitrification, differed from the commonly accepted mechanism in that the former was conducted by different types of partial denitrifiers while the later was done by complete denitrifiers. Soils sampled from the Changshu Agroecosystem Experimental Station, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences were enriched with soil extract plus N_2O as the sole electron acceptor. Bacteria in the enriched materials were isolated using 1/10 diluted nutrient broth under anaerobic condition. The isolates were characterized by reduction of nitrogen oxides. Partial denitrifying strains were obtained. The strain coded as 21-6-9-2 was able to reduce NO_3^- to NO_2^- only, the strain coded as 1-9-5-3 able to reduce NO_2^- to N_2O only and the strain coded as 21-6-3-6 able to reduce NO_2^- to N_2 only. When strain 21-6-9-2 and strain 1-9-5-3 were mixed with proper ratio into sterile soil, without adding any additional carbon substrate, NO_3^- was reduced to N_2O , demonstrating that the partial denitrifiers could cooperate in use of the substrate and play a similar role to that typical denitrifiers do.

Key words Denitrification; Partial denitrifiers; Soil nitrogen transformation