

太湖地区水稻土优势反硝化细菌的数量、组成与酶活性

李振高 潘映华 伍期途 李良谟

(中国科学院南京土壤研究所)

摘 要

本研究结果表明太湖地区主要水稻土中反硝化细菌常在百万/克干土以上,占细菌总数的50—80%。同一类型土壤中,肥力高者含菌数多于肥力低者。各类土壤中反硝化细菌数与细菌总数呈显著正相关。其优势种中,以巨大芽孢杆菌、荧光假单胞菌和施氏假单胞菌等出现的机率最高,占反硝化细菌的10—50%;地衣芽孢杆菌及坚强芽孢杆菌等出现的机率较少。具有使 NO_3^- 还原为 N_2O 的菌株和使 N_2O 还原为 N_2 的菌株,分别占供试菌株的67%和56%;使 $^{15}\text{NO}_3^-$ 异化还原为 $^{15}\text{NH}_4^+$ 的菌株占供试菌株的92%,其中以蜡质芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌的这种能力特别强。

由反硝化作用引起的土壤中肥料氮素的损失问题,因其涉及浪费能源和环境污染,为国内外研究者广泛重视。有人在施用硝态肥料的田间直接测定释放的 N_2O 和 N_2 ,其损失的氮量占加入氮素的1—73%^[9]。我国对稻田表施 ^{15}N 标记硫酸铵的氮素平衡的测定结果表明,平衡帐中的亏缺部分可达施入 ^{15}N 肥料氮素的35%左右,推测主要是反硝化损失的结果^[10]。朱兆良等应用氮素平衡帐扣除 NH_3 挥发量的方法,间接测定氮素的反硝化损失量。在太湖地区酸性粘质水稻土上,测得碳铵、尿素作水稻基肥与土混施时的硝化-反硝化损失分别达39%和37%^[12],这是十分值得注意的问题。在该地区土壤中究竟有哪些微生物造成如此大量的反硝化损失?其量多少?酶活性怎样?几乎未见此类报道。为了防止氮素损失和因大量施用氮肥(或因工厂含氮排污水)带来的氮素污染问题,研究引起反硝化作用的微生物种类、数量及其酶活性是有实际意义的。

一、材料和方法

(一) 供试土壤 采自太湖地区的乌栅土、青紫泥、乌沙土、黄泥土、板浆白土和小粉白土。每种土壤采集高肥和低肥的成对样品,并以相应类型的旱地土壤(从未种过水稻)作比较研究。

(二) 细菌分离和测数 细菌总数采用稀释平板法,培养基为肉膏蛋白胨琼脂。反硝化细菌数量的测定是以分离细菌时选择稀释度高的培养皿,挑取其中出现的菌落,接种于含 KNO_3 的肉膏蛋白胨培养液中,定期用格里斯试剂及二苯胺试剂检测培养液中形成的 NO_2^- ,或原有 NO_3^- 是否消失,以判别菌株有无还原硝酸盐的能力,据此进行计数,换算成每克干土的反硝化细菌数。

(三) 细菌鉴定 按细菌鉴定专著^[13]进行。

(四) 培育试验 1. 研究菌株使 NO_3^- 还原为 N_2O 的酶活性: 以含 0.2% KNO_3 的肉膏蛋白胨培养液做培养基。作法是取 10 毫升培养液分装于 50 毫升血清瓶中, 塞上棉塞, 常规灭菌。再将供试菌株分别接入血清瓶, 换上经酒精消毒的双重橡皮塞, 将瓶抽真空, 再充入高纯 N_2 , 至 1 大气压, 最后注入 1% (V/V) 乙炔, 血清瓶置恒温 (28°C, 下同) 下培养, 定期分析瓶内气相中的 N_2O , 出现 N_2O 者示菌株具有使 NO_3^- 还原为 N_2O 的酶活性。2. 研究菌株的 N_2O 还原酶活性: 取普通肉膏蛋白胨培养液做培养基。作法基本同培育试验 1, 唯不加 KNO_3 , 亦不注入乙炔, 而注入标准 N_2O 作为电子受体, 浓度为 1% (V/V)。接菌的当天和培养 5 天后, 分别测定瓶内气相中的 N_2O 。并设不接菌的空白对照。由培养前后 N_2O 峰高之差, 判断菌株有无具备 N_2O 还原酶, 如果注入的 N_2O 还原为 N_2 , 则原 N_2O 峰高下降。3. 研究菌株使 NO_3^- 异化还原为 NH_4^+ 的酶活性: 培养基是由葡萄糖 0.5%, 牛肉膏 0.3%, 蛋白胨 0.5%, K^{15}NO_3 0.2%, 蒸馏水 100 毫升组成, pH7.2—7.4。作法是将上述培养液分装于 25 毫升三角瓶中, 每瓶盛液 10 毫升, 塞上棉塞, 于 10 磅灭菌 20 分钟。冷却后接入供试菌株。三角瓶置真空干燥器内(器内还盛有若干毫升碱性焦性没食子酸, 以吸收残余氧。美蓝作指示剂), 将其抽真空, 再充入高纯 N_2 , 至 1 大气压。恒温培养 4 和 20 小时, 分别取出三角瓶, 分析培养液中 NH_4^+-N 及其 $^{15}\text{NH}_4^+-\text{N}\%$ 。并设不接菌为空白对照。

(五) 分析方法 (1) NH_4^+-N : 用常规蒸馏法分析; (2) $^{15}\text{NH}_4^+-\text{N}\%$: 用 ZHT-130 型质谱计测定; (3) N_2O : 用 SP-501 型气相色谱仪测定, 色谱条件: 电子捕获鉴定器, 检温 175°C, 柱温 65°C, Porapak Q 柱, 载气为高纯 N_2 , 流速为每分钟 80 毫升。

二、结果和讨论

(一) 土壤中细菌和反硝化细菌的数量

表 1 结果表明, 太湖地区主要类型水稻土中的细菌总数为 200—6000 万/克干土, 反硝化细菌数为 100—5000 万/克干土。通常, 反硝化细菌数占细菌总数的 50—80%。由

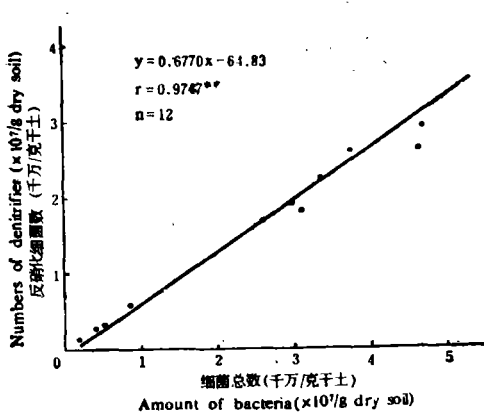


图 1 水稻土中反硝化细菌数与细菌总数的相关性

Fig. 1 Relationship between numbers of denitrifiers and bacteria in paddy soil

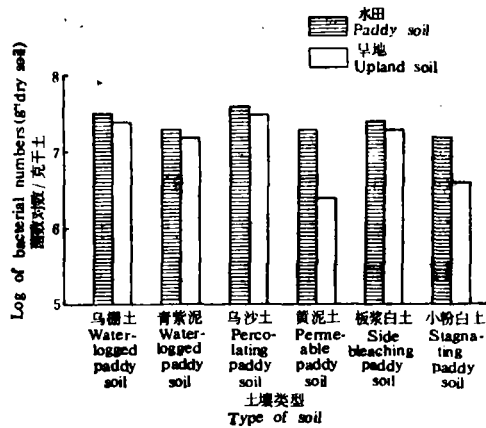


图 2 水田土壤与旱地土壤中反硝化细菌的数量

Fig. 2 Numbers of denitrifiers in paddy soils and in upland soils

1) ^{15}N 丰度为 29.88%

表 1 主要类型水稻土中细菌总数及反硝化细菌数量

Table 1 Numbers of bacteria and denitrifiers in different types of paddy soil

土壤 Soil	肥力水平 Fertility	数 量 Numbers of		反硝化细菌占细菌总数% Denitrifier % of bacteria
		细 菌 Bacteria ($\times 10^6 \text{g}^{-1}$ dry soil)	反硝化细菌 Denitrifier	
乌 栅 土	高	4720.8	2925.5	62.0
	低*	3352.0	1676.0	50.0
青 紫 泥	高	3787.5	1907.4	50.4
	低	512.8	284.9	55.6
乌 沙 土	高	5305.0	4244.0	80.0
	低	873.0	634.9	72.7
黄 泥 土	高	3038.7	2210.0	72.7
	低	2630.1	2602.7	99.0
板 浆 白 土	高	4645.2	2580.7	55.6
	低	410.8	308.1	75.0
小 粉 白 土	高	3149.6	1837.3	58.3
	低	211.4	105.7	50.0

* 系采自连续三年不施肥的试验区。

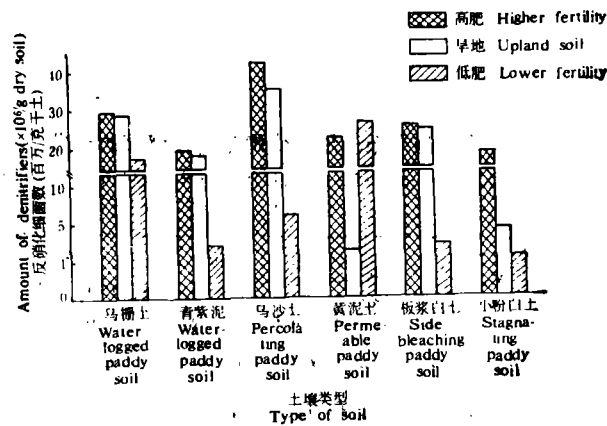


图 3 肥力水平不同的水稻土与旱地土壤中反硝化细菌的分布

Fig. 3 Distribution of denitrifiers in paddy soils with different fertility, and in upland fields

表 1 还可看出,无论哪种类型水稻土,凡肥力水平高者,其细菌和反硝化细菌的数量高于肥力水平低者,其中尤以乌沙土、白土和青紫泥的高低肥土壤含菌量差异最为显著,相差 6—16 倍。由此看来利用微生物作为土壤肥力指标之一,并非没有科学意义。

在本试验中所获得的反硝化细菌,系来源于测细菌总数的培养基上出现的菌落,凡具有还原 NO_3^- 为 NO_2^- 的细菌统算做反硝化细菌(即广义的,但不都是还原 NO_3^- 为 N_2O 或 N_2 的细菌)。所以,经相关分析,在太湖地区各类型水稻土中,反硝化细菌数量与细菌总数呈正相关($p < 0.01$, 图 1)。表明该生理群在土壤中是广泛存在的;而且是兼厌气性—异养型细菌,在有氧时进行有氧呼吸,一般地亦为氨化细菌;无氧时才利用 NO_3^- 和 NO_2^-

为呼吸作用的最终电子受体,将其还原为 N_2O 和 N_2 , 导致肥料氮素损失。

在旱地与水田土壤反硝化细菌数量的对比分析中,发现水稻土中反硝化菌数量高于旱地土壤(图2),可能由于水稻土较多时间处于渍水状态,有较多的可利用态有机质和矿质养分以及充足的水分条件。但是,3年不施肥的水稻土(除黄泥土外),其含菌量反低于旱地土壤(图3),说明除了水分状况外,土壤养分含量等其他因素对反硝化菌的数量亦有影响。

(二) 优势反硝化细菌的组成

反硝化活性是由反硝化细菌引起的,土壤中能进行反硝化作用的微生物数量大、种类多,广泛分布于多种细菌属中^[3]。太湖地区的主要类型土壤中反硝化细菌的组成分析表明(表2),本地区各土壤中均以芽孢杆菌属(*Bacillus*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)等种类占优势。其中巨大芽孢杆菌(*Bac. megaterium*),荧光假单胞菌(*Ps. fluorescens*)及施氏假单胞菌(*Ps. stutzeri*)在各主要类型土壤中均有出现,占反硝化细菌总数的10%—50%。地衣芽孢杆菌(*Bac. licheniformis*)和铜绿假单胞菌(*Ps. aeruginosa*)只出现在黄泥土和小粉白土的水田中,而枯草芽孢杆菌(*Bac. subtilis*)多分布在各旱地土壤中。坚强芽孢杆菌(*Bac. firmus*)只在乌栅土的水田中出现,球形芽孢杆菌(*Bac. sphaericus*)则又只出现在乌栅土的旱地土壤中。环状芽孢杆菌(*Bac. circulans*)是黄泥土水田中唯一出现的种。关于这些在不同土壤中出现的特有的种与土壤性质的关系,尚有待进一步研究。

表2 水田和旱地土壤中优势反硝化细菌的组成(%)

Table 2 Composition of denitrifiers in paddy soil and in upland fields
(% of isolates)

优势种 Predominant species	乌栅土 Waterlogged paddy soil		青紫泥 Waterlogged paddy soil		乌沙土 Percolating paddy soil		黄泥土 Permeable paddy soil		板浆白土 Side bleaching paddy soil		小粉白土 Stagnating paddy soil	
	水田	旱地	水田	旱地	水田	旱地	水田	旱地	水田	旱地	水田	旱地
	<i>Bac. megaterium</i>	14.3	37.5	36.4	33.3	21.4	16.7	15.8	12.5	31.6	12.5	20.0
<i>Bac. subtilis</i>	—	25.0	—	—	—	16.7	5.3	12.5	—	—	—	—
<i>Bac. cereus</i>	—	—	18.2	16.7	—	—	15.8	25.0	—	25.0	6.7	18.2
<i>Bac. licheniformis</i>	—	—	—	—	—	—	15.8	—	—	—	13.3	—
<i>Bac. mycoides</i>	—	—	—	—	3.6	8.3	—	—	—	—	6.7	9.1
<i>Bac. firmus</i>	21.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Bac. circulans</i>	—	—	—	—	—	—	10.5	—	—	—	—	—
<i>Bac. sphaericus</i>	—	12.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Bac. sp.</i>	7.1	—	9.1	16.7	—	8.3	—	—	—	—	—	9.1
<i>Ps. fluorescens</i>	14.3	—	9.1	—	28.6	16.7	5.3	25.0	47.4	25.0	26.7	—
<i>Ps. aeruginosa</i>	—	—	—	—	—	—	10.5	—	—	—	13.3	—
<i>Ps. stutzeri</i>	14.3	—	9.1	16.7	17.9	16.7	10.5	12.5	5.3	—	6.7	—
<i>Ps. mendocina</i>	28.6	—	—	—	21.4	—	—	12.5	—	25.0	—	45.5
<i>Pseudomonas sp.</i>	—	—	—	—	—	16.7	—	—	10.5	—	—	—
Others	—	25.0	18.2	16.7	7.1	—	10.5	—	5.3	12.5	6.7	—

(三) 反硝化细菌的酶活性

以上提到所分离的菌株系指凡能还原 NO_3^- 为 NO_2^- 的广义反硝化菌, 在这些菌株中究竟有多少具有还原 NO_3^- 为 N_2O 和还原 N_2O 为 N_2 的能力? 以及这些菌株能否将 NO_3^- 异化还原为 NH_4^+ ? 这对利用所获菌株于防止脱氮或净化含氮污水的研究, 有着实际意义。反硝化细菌具有复杂的酶体系, 我们仅就以下三种酶活性进行了研究。

1. 菌株使 NO_3^- 还原为 N_2O 的酶活性: 将 108 株优势反硝化细菌作酶活性测定, 其中有 72 株能将 NO_3^- 还原为 N_2O , 占供试菌株的 67%。从表 3 可以看出具有这种酶活性的菌株, 有的酶活性较强, 如菌号 33、264 和 265 等, 有的酶活性较弱, 如菌号 1748 等, 但都造成氮素气态损失。如果这些菌株不再具备 N_2O 还原酶, 则 N_2O 为其还原的最终产物。当土壤中这种菌占优势时, 对大气污染会带来严重威胁。

表 3 太湖地区土壤中菌株的 NO_3^- 还原酶活性

Table 3 Denitrifying nitrate reductase ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2\text{O}$) activity of strains isolated from soils in Taihu Lake region

菌 株 Strains	N_2O 峰高 (mm/10 μl) Relative output of peak (N_2O) in mm (10 μl)	NO_3^- 还原酶活性* Enzyme activity ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2\text{O}$)
<i>Ps. fluorescens</i> 33*	89.6	+++
<i>Ps. fluorescens</i> 264*	114.0	+++
<i>Ps. fluorescens</i> 265*	90.4	+++
<i>Ps. fluorescens</i> 144*	18.2	++
<i>Bac. megaterium</i> 205*	60.5	++
<i>Bac. licheniformis</i> 2389*	35.4	++
<i>Bac. megaterium</i> 202*	0.25	+
<i>Ps. aeruginosa</i> 1748*	0.82	+
<i>Bac. megaterium</i> 123*	0.0	-
<i>Bac. megaterium</i> 178*	0.0	-

* NO_3^- 还原酶活性: +++ 强, ++ 中, + 弱, - 无。

2. 菌株使 N_2O 还原为 N_2 的酶活性: 不仅土壤中的反硝化细菌是多种多样的, 而且就单一菌株来说, 其酶体系有的也很复杂。在测试的 50 株菌株中, 具有 N_2O 还原酶活性的有 28 株, 占供试菌株的 56% (表 4)。将表 3 和表 4 结合来看, 菌株 33 号既有较强的 NO_3^- 还原酶活性, 又有较强的 N_2O 还原酶活性; 2389 号菌株的 NO_3^- 还原酶活性中等, 但是, 其 N_2O 还原酶活性较强; NO_3^- 还原酶活性中等的 144 号菌株, 却没有 N_2O 还原酶活性。还要提出的是菌株 33 号和 144 号都称为荧光假单胞菌, 前者具有 N_2O 还原酶, 后者则否; 205 号和 123 号菌株都称为巨大芽孢杆菌, 前者具有使 NO_3^- 还原为 N_2O 的能力, 后者则不能, 说明同一种菌的不同菌株在酶系统上还有较大差异。具有 N_2O 还原酶的菌株, 使 N_2O 进一步还原为 N_2 , 再参与氮循环, 这对环境保护来说, 消除 N_2O 对大气的污染倒是有益的。利用硝化-反硝化体系净化含氮污水, 已有成功的实例^[5,6]。这方面的工作对乡镇企业发达的和氮肥用量大的太湖地区来说急待开展。

3. 菌株使 NO_3^- 异化还原为 NH_4^+ 的酶活性: 有资料证明, 有的细菌在无氧条件下能使 NO_3^- 异化还原为 NH_4^+ , 这一特性在农业生态系氮素平衡中引起人们的关注^[6,7]。我

表 4 太湖地区土壤中菌株的 N_2O 还原酶活性
Table 4 Nitrous oxide reductase activity of strains isolated from soils in Taihu Lake region

菌 株 Strains	峰高 (mm/20 μ l) Relative output of peak (N_2O) in mm after		N_2O 还原酶活性* Enzyme activity ($N_2O \rightarrow N_2$)
	0 天 0 day	5 天 5 days	
CK	49.8	47.3	
<i>Ps. fluorescens</i> 33*	179.0	0.25	+++
<i>Bac. licheniformis</i> 2389*	174.0	0.50	+++
CK	153.0	160.0	
<i>Ps. fluorescens</i> 140*	159.0	0.0	+++
<i>Ps. stutzeri</i> 176*	155.0	95.9	++
<i>Ps. fluorescens</i> 144*	152.0	154.0	-
CK	133.0	122.0	
<i>Bacillus</i> sp. 617*	137.0	80.0	++
<i>Ps. fluorescens</i> 211*	131.0	122.0	-
<i>Bac. cereus</i> 2718*	132.0	128.0	-

* N_2O 还原酶活性: +++ 强, ++ 中, - 无。

表 5 太湖地区土壤中菌株异化还原 $^{15}NO_3^-$ 为 $^{15}NH_4^+$ 的能力
Table 5 The dissimilatory reduction of $^{15}NO_3^-$ to $^{15}NH_4^+$ by strains isolated from soils in Taihu Lake region

菌 株 Strains	($^{15}NH_4^+$ -N%) $^{15}NH_4^+$ abundance in medium* after	
	4 小时 4 hours	20 小时 20 hours
CK	0.385	0.380
<i>Bac. subtilis</i> 003*	0.407	0.540
<i>Ps. fluorescens</i> 33*	0.382	0.387
<i>Bac. megaterium</i> 247*	0.385	0.433
<i>Bac. licheniformis</i> 934*	0.392	4.69
<i>Bac. licheniformis</i> 1880*	0.380	2.82
<i>Bac. cereus</i> 115*	0.385	0.448
<i>Bac. cereus</i> 2281*	0.635	9.62
<i>Bac. cereus</i> 2718*	0.892	5.30
CK	0.377	0.386
<i>Ps. fluorescens</i> 26*	0.398	0.401
<i>Bac. megaterium</i> 275*	0.689	3.44
<i>Bac. licheniformis</i> 813*	0.393	1.47

* 培养液中 $K^{15}NO_3$ 的 ^{15}N 丰度为 29.8%。

们用 ^{15}N 示踪法对太湖地区水稻土的部分优势菌株进行了研究, 结果表明, 具有这种能力的菌株占供试菌株的 91.7%。并发现培养 20 小时所形成的 $^{15}NH_4^+$ -N% 高于只培养 4 小时的, 而且在供试菌株中以地衣芽孢杆菌和蜡质芽孢杆菌的这种异化还原能力比较强,

个别菌株(2281号)培养20小时,使 ^{15}N 丰度为29.8%的 K^{15}NO_3 异化形成的 $^{15}\text{NH}_4\text{-N}$ %可达9.62%(表5)。设想在渍水水稻土中,在富含可利用有机质的条件下,如能使 NO_3^- 异化还原为 NH_4^+ 的能力强的菌株在土壤中占绝对优势,则对保蓄土壤中氮素和消除 N_2O 的污染,将起重要作用。这方面的工作值得进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 朱兆良、蔡贵信、俞金洲, 1977: 稻田中 ^{15}N 标记硫酸铵的氮素平衡的研究初报。科学通报, 第11期, 303页。
- [2] 蔡贵信、朱兆良、朱宗武, 1985: 水稻田中碳铵和尿素的氮素损失的研究。土壤, 第5期, 225—229页。
- [3] Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E., 1974: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Eighth edition. The Williams & Wilkins Company. Baltimore.
- [4] Caskey, M. H., Tiedje, J. M., 1979: Evidence for clostridia as agents of dissimilatory reduction of NO_3^- to NH_4^+ in soils. *Soil Sci. Soc. Amer. J.*, 43: 931—936.
- [5] Debusk, T. A., Williams, C. D., and Ryther, J. H., 1983: Removal of nitrogen and phosphorus from waste water in a waterhyacinth-based treatment system. *J. Environ. Qual.*, 12: 257—262.
- [6] Magdalena Przylocka-Jusiak, Mieczyslaw Blaszczyk, Elzbieta Kosinska and Aleksandra Bisz-Konarzewska, 1984: Removal of nitrogen from industrial waste-water with the use of algal rotating disks and denitrification packed bed reactor. *Water Res.*, 18: 1077—1082.
- [7] McCready, R. G. L., Gould, W. D., and Brøndregt, R. W., 1983: Nitrogen isotope fractionation during the reduction of NO_3^- to NH_4^+ by *Desulfovibrio* sp. *Can. J. Microbiol.*, 29: 231—234.
- [8] Payne, W. J., 1973: Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. *Bacteriologic Reviews*, 37: 409—452.
- [9] Rolston, D. E., 1978: Field measurement of denitrification: I. Flux of N_2 and N_2O . *Soil Sci. Soc. Amer. J.*, 42: 863—869.

NUMBERS, COMPOSITIONS AND ENZYME ACTIVITIES OF DENITRIFIERS IN PADDY SOILS OF TAIHU LAKE DISTRICT

Li Zhengao, Pan Yinghua, Wu Qitu and Li Liangmo

(*Institute of Soil Science, Academia Sinica, Nanjing*)

Summary

This article deals with numbers, compositions and enzyme activities of denitrifiers in paddy soil in Taihu Lake district. The results obtained are as follows.

1. The amount of denitrifiers was rather numerous in paddy soil in this region, generally, more than million per gram of dry soil. Numbers of denitrifiers in soil with higher fertility were larger than that with lower fertility. In all the paddy soils, there was significant positive correlation between numbers of denitrifiers and bacteria.

2. The species in genus *Bacillus* and *Pseudomonas* were the predominant denitrifying bacteria in paddy soils in Taihu Lake district. The highest occurrence frequency of *Bac. megatherium* and *Pseu. fluorescens* has been found in these soils, they even constituted 10—50% of the total denitrifiers, while the frequencies of *Bac. licheniformis* and *Bac. firmus* were much lower than the former.

3. The enzyme activities of denitrifiers have been determined by means of GC-technique. The amount of the strains reducing NO_3^- to N_2O and those reducing N_2O to N_2 constituted 67% and 56% of the strains tested, respectively. The amount of denitrifiers being able to reduce $^{15}\text{NO}_3^-$ to $^{15}\text{NH}_4^+$ through dissimilatory reduction pathway constituted 92% of the strains tested. The dissimilatory reduction ability of *Bac. cereus* and *Bac. licheniformis* were vigorous.