

草坪土壤异养硝化菌的分离筛选及硝化产物特征分析

白三女, 许天月, 刘 英, 王晓红, 白 龙*

(沈阳农业大学园艺学院, 沈阳 110866)

摘 要: 从早熟禾草坪土壤中分离出两株异养硝化菌, 将菌株 16S rDNA 测序结果在 GenBank 中进行同源性对比确定菌种, 用无机氮源 ($\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$) 在适宜条件下测定两个菌株的硝化能力, 分析中间产物、反硝化作用和 N_2O 排放特征。结果表明, 分离到的异养硝化菌属于假单胞杆菌属 (*Pseudomonas* sp.), 两个菌株的 16S rDNA 片段长度分别为 1 448 和 1 460 bp, 命名为 *Pseudomonas* sp. BJ 和 *Pseudomonas* sp. DJ, GenBank 登录号分别为 MF001078 和 MF001079; 两个菌株对无机氮的氧化能力很强, 培养 24 h 内 BJ 和 DJ 菌株对铵态氮的总硝化率分别为 96.61% 和 97.06%, 最大硝化速率分别为 21.97 和 18.90 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。但两个菌株的反硝化能力不强, 最大反硝化速率分别为 0.99 和 1.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; 两个菌株的代谢途径是 $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$, DJ 菌株的最终产物以 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 为主, 积累量高于 BJ 菌株 ($P < 0.05$)。BJ 菌株的 N_2O 排放量显著高于 DJ 菌株 ($P < 0.05$)。

关键词: 草坪土壤; 异养硝化菌; 硝化特性; N_2O 排放

中图分类号: S 668.4

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2018) 07-1338-09

Separation and Selection of Heterotrophic Nitrifying Bacteria from Lawn Soil and Their Nitrification Products Characteristics

BAI Sannü, XU Tianyue, LIU Ying, WANG Xiaohong, and BAI Long*

(Horticultural Institute, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: In this experiment, two heterotrophic nitrifying bacteria isolated from lawn soil were identified by comparing 16S rDNA sequence to homologous species published on the GenBank. The nitrification function of these two bacteria were detected by measuring intermediate products, denitrification process and N_2O emission characteristics under inorganic nitrogen sources ($\text{NH}_4^+\text{-N}$ and $\text{NO}_3^-\text{-N}$). The results showed that the two heterotrophic nitrifying bacteria were identified as *Pseudomonas* sp., 16S rDNA fragment length were 1 448 and 1 460 bp and named as *Pseudomonas* sp. BJ and *Pseudomonas* sp. DJ, respectively. GenBank accession number were MF001078 and MF001079 for *Pseudomonas* sp. BJ and *Pseudomonas* sp. DJ. The two strains have a strong oxidation ability with inorganic nitrogen, ammonium removal efficiencies were 96.61% and 97.06%, respectively. The maximum nitrification rate were 21.97 and 18.90 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Denitrification ability of two bacteria were not

收稿日期: 2018-02-01; 修回日期: 2018-05-02

基金项目: 辽宁省农业厅草原站基础项目 (2015LC001-5)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: bailong0124@163.com)

efficient, the maximum denitrification rate were 0.99 and 1.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, respectively. Metabolic pathways of the two strains can be simplified to a large extent as $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$. NO_3^- -N was the main intermediate products of strain DJ, and its content was much higher than that of strain BJ ($P < 0.05$). The content of N_2O produced by strain BJ was significantly higher than that of strain DJ ($P < 0.05$).

Keywords: lawn soil; heterotrophic nitrifying bacteria; nitrification characteristic; N_2O emission

异养硝化是土壤氮素转化的重要过程, 异养硝化是指异养微生物在好氧条件下将还原态氮氧化为 NO_2^- 和 NO_3^- 的过程, 由于研究起步较晚, 异养硝化的功能微生物及硝化特征、硝化产物、微生物作用机制等仍不清楚。与自养硝化相比, 异养硝化作用的底物既可以是无机态氮也可以是有机态氮, 特定环境条件下异养硝化是硝化作用的主要过程。已有研究证实, 异养硝化作用是草地、森林等原始土壤 N_2O 排放的主要贡献者, 尤其在酸性森林土壤中更为明显 (Nakajima et al., 2005; Baggs, 2011; Zhang et al., 2011; Chen et al., 2014)。本课题组研究发现, 在北方的草坪土壤中, 异养硝化作用占 N_2O 排放的 62% (白龙 等, 2016)。虽然目前仍有很多机制未得到解释, 对一些现象的解释也不尽圆满, 但异养硝化在氮素转化中的作用已是不争的事实。

迄今为止, 主要围绕污泥、水体、火山灰、土壤等不同生境中筛选出的 20 余属异养硝化菌株进行探索性研究 (Pedersen et al., 1999; de Boer & Kowalchuk, 2001; Joo, 2005; Schmidt et al., 2011; Zhang et al., 2014)。污泥中分离的 *Acinetobacter* sp. YF 菌, 对铵态氮的总硝化率达 92%, 且无 NO_2^- -N 和 NO_3^- -N 的积累, 异养硝化、反硝化能力都极强, 几乎能将 NO_3^- -N 完全去除 (辛玉峰 等, 2011)。从湿地泥中分离的 *Micrococcus* sp. HB-1 菌, 铵态氮的总硝化率仅为 49.2%, 但缺氧条件下反硝化能力相当高 (陈威 等, 2010)。在假单胞菌属、丛毛单胞菌属、副球菌属、红球菌属、节杆菌属、不动杆菌的研究中发现, 不同属、种的菌种对铵盐及硝酸盐的利用率、硝化中间产物、最终产物的研究结果并不一致, 尚存很多不确定性 (Brierley & Wood, 2001; 陈威 等, 2010; 潘学军 等, 2010; 辛玉峰 等, 2011; 王田野 等, 2017)。

异养硝化过程中被氧化的氮的去向主要有 3 个: 微生物固持、硝化中间产物和硝酸盐。中间产物含 N_2O 、 N_2 等气态产物, 但不同菌株产生气态产物的途径和量并不相同。来自海洋的嗜冷菌株 *Psychrobacter* sp. S1-1 硝化过程的主要气体产物是 N_2O (Zheng et al., 2011)。*Acinetobacter* sp. HA2 在硝化过程中未发现 N_2O 排放, 且 N_2 质量浓度稳定在 $13 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (Yao et al., 2013)。具异养硝化功能的蜡状芽孢杆菌株 (*Bacillus cereus* WXZ-8) 的 N_2O 产生量约占降解总氮的 0.6%, 被认为是排放量较低的菌株 (尹明锐 等, 2010)。由于已发现的菌株数量不多, 研究积累少, 尚不清楚造成上述现象的具体原因, 需要更深入的研究。

草坪是园林绿地、高尔夫球场的主体植被, 在减肥减药的大背景下深入研究异养硝化微生物的硝化特性, 对于掌握植物对氮素的利用途径, 提高草坪土壤氮素利用率, 控制草坪土壤温室气体排放具有重要意义。本试验中采用选择性培养基从草坪土壤中筛选分离出异养硝化细菌, 通过菌种 16S rDNA 测序结果与 GenBank 中进行同源性对比后确定菌种, 并以无机氮为氮源测定其硝化特性, 分析硝化产物及 N_2O 排放特征, 为进一步揭示异养硝化菌对不同氮源的有效利用率, 阐明硝化机理提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 供试土壤

土样采自沈阳农业大学百草园草坪试验基地(41°46'N, 123°25'E), 草坪面积为2 000 m², 2012年建植早熟禾草坪。年平均气温7.8 ~ 8.0 °C, 年降水量700 mm。草坪生长期约6个月(4月下旬至10月下旬)。草坪土壤为棕壤, 含有机质10.16 g·kg⁻¹, 全氮0.45 g·kg⁻¹, 全磷0.85 g·kg⁻¹。共设置3个小区, 每小区面积为2 m×2 m。2016年9月, 从每小区中以5点法取0~10 cm土层鲜土并混合成500 g土样, 3小区共3个土样。过筛去除杂物后用于菌种的筛选培养。

1.2 异养硝化菌的分离筛选

硝化培养基(g·L⁻¹): (NH₄)₂SO₄ 0.5, C₆H₅Na₃O₇·2H₂O 4.9, NaCl 0.12, K₂HPO₄ 1.0, MgSO₄·7H₂O 0.5, FeSO₄·7H₂O 0.03, CaCl₂ 0.3; pH 7.0~7.2。在液体培养基中加入1.5%琼脂粉, 高压灭菌后倒入平板内冷却即可得到相应的固体培养基, 用于菌种的纯化分离。

反硝化培养基(g·L⁻¹): KNO₃ 0.5, C₆H₅Na₃O₇·2H₂O 4.9, NaCl 0.12, K₂HPO₄ 1.0, MgSO₄·7H₂O 0.5, FeSO₄·7H₂O 0.03, CaCl₂ 0.3; pH 7.0~7.2。

细菌的纯化分离: 取5 g土样放入无菌水中振荡2 h后, 取2 mL上清液放入液体硝化培养基中, 30 °C、150 r·min⁻¹, 培养箱中进行活化。取活化后的菌液1 mL, 用无菌水进行梯度稀释(10¹~10⁸)后进行平板划线分离, 得到纯菌株。

1.3 菌种16S rDNA的PCR扩增和测序

用于16S rDNA PCR扩增的引物为通用引物。27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492R: 5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

PCR反应体系(50 μL): 10× Buffer(含Mg²⁺) 5.0 μL, DNTP 1.0 μL, 正向和反向引物各1.5 μL, 模板1.0 μL, Taq聚合酶缓冲液1.0 μL, ddH₂O 39.0 μL。

PCR反应程序如下: 95 °C 5 min, 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 90 s, 72 °C 7 min, 35个循环。反应完成后通过凝胶电泳检测, 确认PCR扩增片段进行测序分析。测序委托上海佩森诺公司完成。

1.4 菌种的鉴定

对筛选的菌种进行革兰氏染色, 在显微镜下观察菌种的形态和革兰氏染色情况, 并将菌种16S rDNA测序结果与GenBank中进行同源性对比后确定菌种。

1.5 菌株的异养硝化及反硝化特征测定

以2%的接种量接种于100 mL的液态硝化培养基和反硝化培养基中, 在30 °C条件下恒温摇床培养, 设定转速150 r·min⁻¹。每隔2 h检测培养液中的pH、NH₄⁺-N、NO₃⁻-N、NO₂⁻-N和菌株浓度OD₆₀₀值至NH₄⁺、NO₃⁻浓度稳定。以不接种的液体培养基作为空白对照, 根据培养基中NH₄⁺-N、NO₃⁻-N、NO₂⁻-N浓度变化绘制硝化曲线, 分析菌株的异养硝化和反硝化特征。根据OD₆₀₀值的变化绘制菌株生长曲线, 分析菌株生长特性。NH₄⁺-N采用靛酚蓝分光光度法, NO₃⁻-N采用紫外分光光度法, NO₂⁻-N采用氮1-萘基乙二胺分光光度法, 以不接种的液体培养基为空白对照, 测定菌株在600 nm的分光光度值, N₂O采用气相色谱仪测定, 总氮采用碱性过硫酸钾紫外分光光度法测定。

2 结果与分析

2.1 菌种鉴定

经过固体培养基筛选后得到两株异养硝化能力较强的细菌。两个菌株都呈革兰氏阴性, 既没有孢子也没有鞭毛, 不透明。其中一个菌株呈白色, 表面干燥, 边缘整齐, 粘; 另一个菌株呈乳白色, 表面隆起, 边缘整齐、光滑。SEM 图像表明, 两个菌株细胞呈杆状, 大小分别为 $(0.7 \sim 0.9) \mu\text{m} \times 0.5 \mu\text{m}$ 和 $(1.0 \sim 1.2) \mu\text{m} \times 0.5 \mu\text{m}$ 。

16S rDNA 片段长度分别为 1 448 和 1 460 bp, 经 GenBank 的同源性比较得知, 两个菌株都是假单胞杆菌属细菌, 分别命名为 *Pseudomonas* sp. BJ 和 *Pseudomonas* sp. DJ, 登录号为 MF001078 和 MF001079。以目的菌株 16S rDNA 基因序列为基础, 选择已知其他异养硝化菌株的 16S rDNA 基因序列, 采用 MEGA7.1 软件构建系统发育树 (图 1)。从图中看出, 相同属的不同菌株之间系统发育差异较大, 两个菌株与 *Pseudomonas* sp. CCOS 191 的相似度较高。两个菌株虽然属于同一个属, 但系统发育上有一定的距离, 可视为两个单独发育的异养硝化菌。

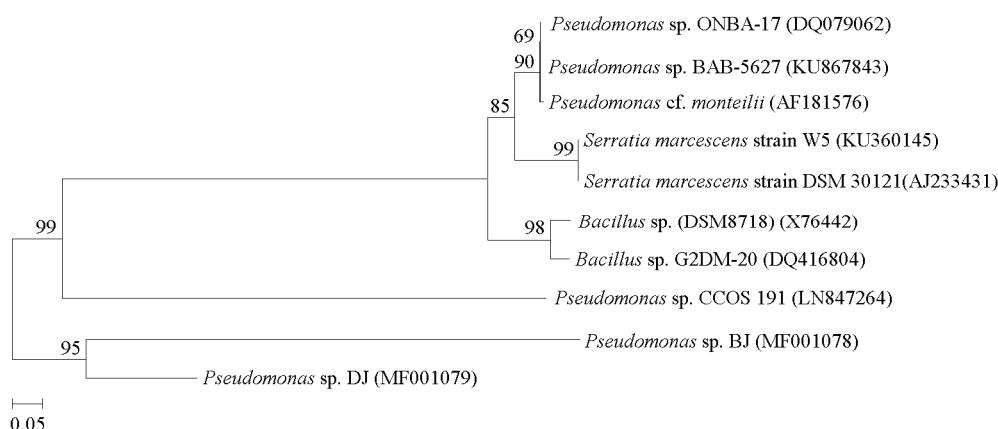


图 1 基于 16S rDNA 序列的 *Pseudomonas* sp. BJ 和 *Pseudomonas* sp. DJ 的系统发育树

Fig. 1 Neighbour-joining phylogenetic tree based on the comparison of partial 16S rRNA gene sequences showing the phylogenetic position of *Pseudomonas* sp. BJ and *Pseudomonas* sp. DJ, and other reference sequences

2.2 菌株的异养硝化特性

以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为唯一氮源、 $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 为唯一碳源的异养硝化过程中, 24 h 内液体培养基的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、总氮浓度及 OD_{600} 值变化见图 2。

可以看出, BJ 菌株的生长停滞期约 2 h, 在 14 h 内将 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 从 $103.32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 降至 $3.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的总硝化率达 96.61%, 最大硝化速率为 $21.97 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 平均为 $4.16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。DJ 菌种在 14 h 内将 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度降低至 $3.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 总硝化率达 97.06%, 最大硝化速率为 $18.90 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 平均速率为 $4.18 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。随着 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度下降菌株 BJ 和 DJ 的总氮去除率分别为 27.70% 和 25.07%。

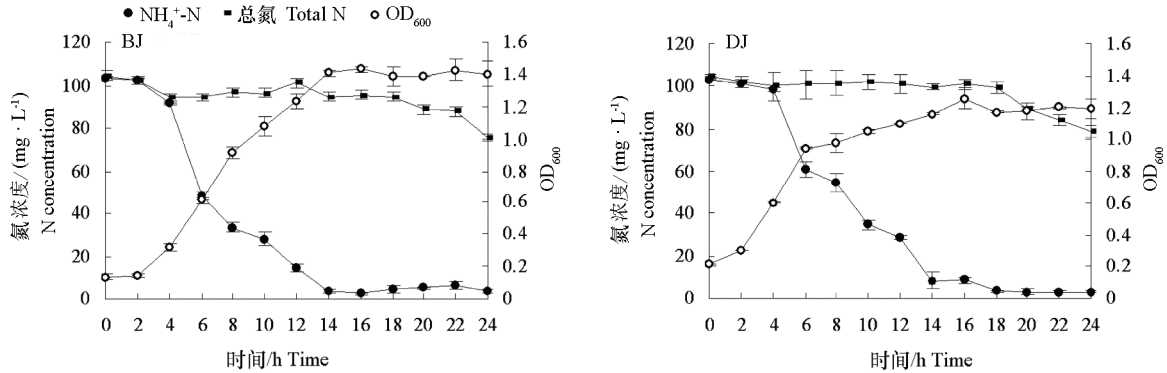


图2 以铵盐为基底的硝化过程中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、总氮浓度和 OD_{600} 值的变化
 Fig. 2 Changes in $\text{NH}_4^+\text{-N}$, total nitrogen concentration and OD_{600} in the nitrifying process with ammonium nitrogen

两个菌株的生长量 (OD_{600} 值) 随培养时间呈上升趋势。BJ 菌株的急速生长期为 2~14 h, 之后进入稳定期。DJ 菌株的急速生长期为前 6 h, 6~16 h 期间缓慢增加, 16 h 后有所减少。

在 24 h 培养期间, 为了解菌种的生长特性和 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 硝化的相关关系, 绘制 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度和菌株 OD_{600} 的拟合曲线 (图 3)。分析发现, 两个菌株对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的硝化曲线并不完全一致, BJ 菌株 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 下降与 OD_{600} 增长较同步, 而 DJ 菌株初期菌株生长较快, 后期菌株增长较慢, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的浓度变化较大。两个菌株 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度与 OD_{600} 值变化呈显著负相关。

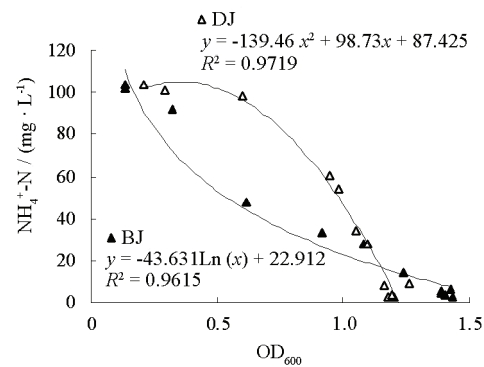


图3 菌株 BJ、DJ 的 OD_{600} 与 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度变化相关关系
 Fig. 3 Relationships between ammonia concentration and OD_{600} of strain DJ and strain BJ

两个菌株不仅对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的硝化速率有差异, 中间产物也并不相同。BJ 菌株产生的 $\text{NH}_2\text{OH-N}$ 浓度最大值为 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 而 DJ 菌株为 $4.29 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 显著高于 BJ 菌株 ($P < 0.05$, 图 4)。

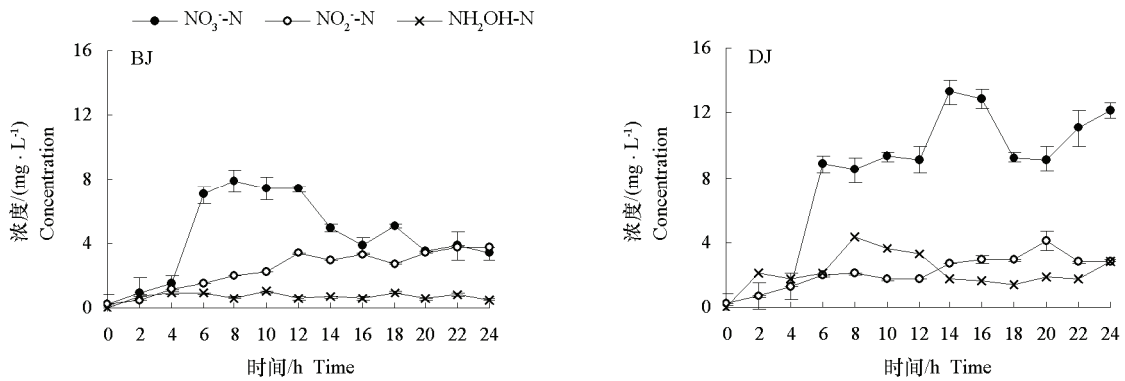


图4 硝化培养基中 $\text{NH}_2\text{OH-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度变化
 Fig. 4 The changes of $\text{NH}_2\text{OH-N}$, $\text{NO}_2^-\text{-N}$ and $\text{NO}_3^-\text{-N}$ concentration with heterotrophic nitrification medium

硝化过程中两个菌株均产生 $\text{NO}_2^- \text{-N}$, 其浓度随着培养时间呈上升趋势, BJ、DJ 菌株分别在 22 和 20 h 达到最大值 3.82 和 $4.12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 4), 二者相近。

$\text{NO}_3^- \text{-N}$ 往往是硝化过程的最终产物, BJ 和 DJ 菌株在 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 产生量上有很大区别, 两个菌株都在 6 h 内迅速积累, 然后进入缓慢积累期 (图 4)。BJ 菌株在培养 12 h 后 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 浓度开始下降, 而 DJ 菌株产生的 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 浓度随着培养时间的延长逐渐积累。培养末期, BJ 菌株硝化产生的 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 浓度为 $3.37 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 而 DJ 菌株高达 $12.15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 远高于 BJ 菌株 ($P < 0.05$)。

2.3 硝化过程中 N_2O 的排放量

两个菌株在硝化过程中均产生 N_2O , 6 h 内 DJ 菌株产生的 N_2O 浓度达到 $0.14 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 而 BJ 菌株在 10 h 内达到 $0.22 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 之后保持相对稳定 (图 5), BJ 菌株的总排放量显著高于 DJ 菌株 ($P < 0.05$)。

2.4 菌株的反硝化特征

以 KNO_3 为氮源的反硝化培养基中, 两个菌株的生长特征、 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 及总氮 (TN) 浓度变化如图 6 所示。两个菌株对 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 的降解能力基本相同, 48 h 降到最低值, 分别为 28.11 和 $30.84 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 但对 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 的利用率并不高, 最大反硝化速率分别为 0.99 和 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。两个菌株生长量 (OD_{600}) 都在 24 h 达到高峰, OD_{600} 值分别为 1.03 和 1.17 , 之后 BJ 菌株保持稳定, 而 DJ 菌株在 24~48 h 内呈下降趋势。两个菌株的生长曲线与 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 的减少并不同步, 反硝化能力有差异。整个培养过程中, $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 浓度都较低, 并且变化幅度小, 这说明两个菌株虽有反硝化能力但作用并不强。

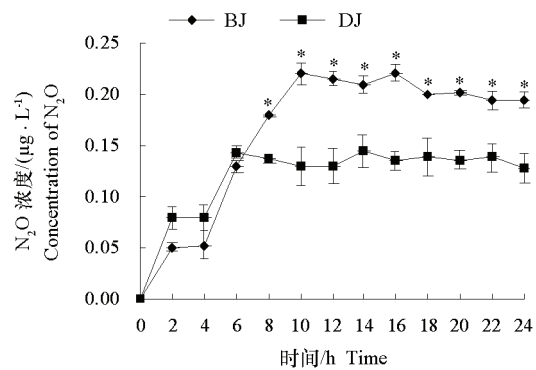


图 5 BJ 和 DJ 菌株在异养硝化过程中的 N_2O 浓度
 Fig. 5 N_2O concentration of strain BJ and strain DJ in the heterotrophic nitrification process
 * $P < 0.05$.

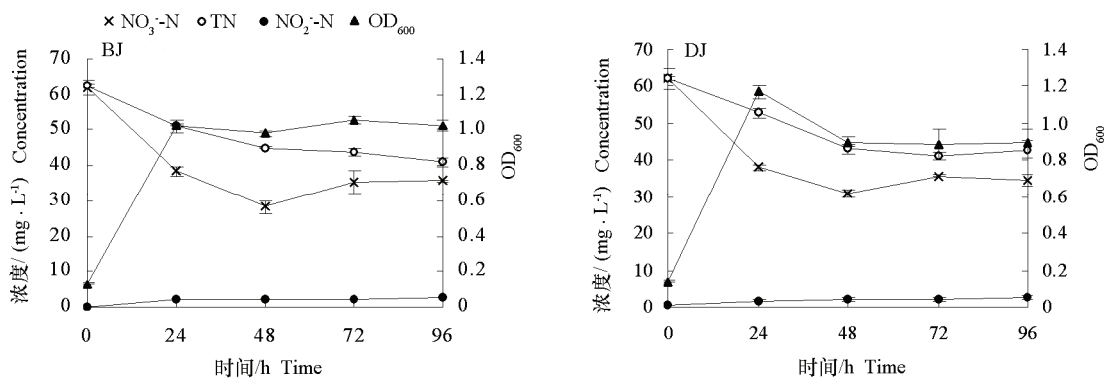


图 6 BJ 和 DJ 菌株以 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 为基底的反硝化特征
 Fig. 6 Denitrification characteristics of strain BJ and strain DJ with nitrate nitrogen

3 讨论

3.1 异养硝化菌的硝化特征及硝化产物

为了掌握异养硝化菌的硝化特征,本试验中采用选择性培养基从草坪土壤中筛选出两个异养硝化菌株 BJ 和 DJ,并以无机氮为氮源测定了其硝化能力及中间产物。两个菌株对铵态氮的最高利用率分别达到 21.97 和 18.90 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,比已发现的 *Providencia rettgeri* YL (18.70 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)、*Cupriavidus* sp. S1 (10.43 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) 以及 *Acinetobacter* sp. Y1 (10.28 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) 对铵态氮利用率 (Taylor, 2009; Liu et al., 2015; Sun et al., 2016) 都高。BJ 和 DJ 菌株对铵态氮的平均硝化速率分别达 4.16 和 4.18 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,比 *Pseudomonas* sp. AS-1 (1.15 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) 和 *Vibrio dabolicus* SF16 (2.29 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) 的硝化速率 (Su et al., 2006; Duan et al., 2014) 都高。充分证实两个菌株对铵态氮有较高的氧化能力,且在 2 h 快速增长,比 ZW5 菌株在 6 h 以及 *Acinebacter junii* YB 在 3 h 开始快速增长 (王弘宇 等, 2009; Lei et al., 2015) 都要早,这可能与菌种的特性有关。本试验中硝化作用发生在菌株生命活动最为旺盛的培养前期,与张光亚等 (2003) 报道的硝化作用可能是发生在老龄细胞中的结果不相同,说明不同菌种的硝化特征不同。培养后期菌种 OD_{600} 值保持稳定,可能是培养基中营养物质不足造成的。

本试验中,两个菌株的硝化中间产物并不一致。两个菌株都产生 NH_2OH , NH_2OH 是异养菌在硝化过程中将 NH_4^+ 转变成为 NO_2^- 的中间产物。这说明这两个菌株进行硝化时首先是将 NH_4^+ 硝化成为 NH_2OH 。在 24 h 的培养过程中,两个菌株培养基中的 NO_2^- -N 浓度总体趋势都上升,这与 *Rhodococcus* sp. CPZ24 菌 (Chen et al., 2012) 的试验结果一致,而与菌株 *Acinetobacter* sp. Y1 (Liu et al., 2015) 在培养过程中一直没有检测到 NO_2^- -N 和 NO_3^- -N 的结果并不一致。本试验中, BJ 和 DJ 菌株的代谢途径可能是: $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ 。

硝酸盐是异养硝化作用的最终产物, BJ 菌株的 NO_3^- -N 在培养 14 h 后下降, DJ 菌株在 16 h 后下降。但培养末期, DJ 菌株的 NH_2OH 和 NO_2^- 等中间产物浓度相等,而最终产物 NO_3^- -N 浓度远高于中间产物, BJ 菌株的 NO_2^- -N 和 NO_3^- -N 浓度相等。BJ 菌株的 NO_3^- -N 浓度为 4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,而 DJ 菌株高达 12 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,可能是 BJ 菌株通过反硝化作用消耗了部分硝酸盐,但两个菌株的反硝化能力并不强且无显著差异,此结果需要进一步研究。

两个菌株在氨态氮的硝化过程中,培养基中总氮浓度变化表现出相同的趋势,这说明二者很容易将 NH_4^+ -N 转变成为细胞内氮和中间产物。这与 *Pseudomonas tolaasii* Y-11 的氮固持结论 (He et al., 2016) 一致。总氮去除过程中释放 N_2O 、 N_2 等含氮气体,这可能是总氮不平衡的主要原因。本次试验只测定了 N_2O 的浓度,今后的试验中应考虑 N_2 的浓度。这样才能全面了解总氮的去向。

3.2 异养硝化过程的气态产物

硝化过程中的 N_2O 产生途径有两种解释:一种是羟胺被硝化为亚硝酸过程中产生的副产物,另一种是在亚硝酸进行好氧反硝化时产生 (Zhang et al., 2011)。有研究表明,羟胺在有氧条件下会转变成为 N_2 (Joo et al., 2005; Zhao et al., 2010, 2012)。本试验中 DJ 菌株的羟胺浓度比 BJ 菌株高,但是 N_2O 浓度比 BJ 菌株低,可能是因为 DJ 菌株生成的羟胺直接转化成为 N_2 而并没有转变成 N_2O ,导致 DJ 菌株的 N_2O 浓度低于 BJ 菌株。

在硝酸钾为唯一氮源的反硝化系统中, BJ 和 DJ 两株菌株的最大反硝化速率为 0.99 和 1.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,比 *Cupriavidus* sp. S1 和 *Klebsiella pneumoniae* CF-S9 的 8.64 和 2.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (Padhi et

al., 2013; Sun et al., 2016) 低很多。充分说明 BJ 和 DJ 菌株的反硝化能力并不强。在草坪土壤中细菌的反硝化能力相对较低, 可降低反硝化造成的氮损失, 有利于草坪土壤中氮的保存和利用。另一方面, 虽然 N_2O 产生主要来自硝化和反硝化作用, 但因本次试验中检测到这两个菌株反硝化能力较弱, 因而并未测定反硝化产生的 N_2O 。

本试验是在培养液中进行的, 具有试验周期短, 容易监测的特点, 对于快速探究异养硝化菌的硝化特性、选育优异菌种意义有重要意义。但筛选到的菌种在草坪土壤异养微生物中占多大比重, 是否为主要功能种群, 还需进一步验证。另外, 筛选的菌种在草坪土壤环境中是否仍具有高效的硝化特性, 还需要深入研究。

References

- Baggs E M. 2011. Soil microbial sources of nitrous oxide: recent advances in knowledge, emerging challenges and future direction. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 3: 321 - 327.
- Bai Long, Wang Yue-xi, Liu Ying, Wang Xiao-hong, Tan Dong-mei. 2016. Effects in responses of turf grass soil on nitrous oxide emission processes to N application. *Acta Horticulturae Sinica*, 43 (10): 1971 - 1979. (in Chinese)
- 白 龙, 王跃羲, 刘 英, 王晓红, 谭冬梅. 2016. 草坪土壤的 N_2O 产生途径及其对施氮肥的响应. *园艺学报*, 43 (10): 1971 - 1979.
- Brierley E D R, Wood M. 2001. Heterotrophic nitrification in an acid forest soil: isolation and characterisation of a nitrifying bacterium. *Soil Biology & Biochemistry*, 33: 1403 - 140
- Chen P, Li J, Li Q X, Wang Y, Li S, Ren T, Wang L. 2012. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by bacterium *Rhodococcus* sp. CPZ24. *Bioresource Technology*, 116: 266 - 270.
- Chen Wei, Wang Zhen-yu, Zhao Geng-feng, Liu Guo-sheng, Wang Hai-lei. 2010. Isolation and performance evaluation of a heterotrophic nitrobacterium *Micrococcus* sp. *Chinese Journal of Ecology*, 29 (8): 1629 - 1633. (in Chinese)
- 陈 威, 王振宇, 赵更峰, 刘国生, 王海磊. 2010. 异养硝化微球菌的分离及性能评价. *生态学杂志*, 29 (8): 1629 - 1633.
- Chen Z M, Ding W X, Xu Y H, Müller C, Yu H Y, Fan J L. 2014. Nitrous oxide emissions from cultivated black soil: a case study in Northeast China and global estimates using empirical model. *Global Biogeochemical Cycles*, 28 (11): 1311 - 1326.
- de Boer W, Kowalchuk G A. 2001. Nitrification in acid soils: micro-organisms and mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 853 - 866.
- Duan J M, Fang H M, Su B, Chen J F, Lin J M. 2015. Characterization of a halophilic heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium and its application on treatment of saline wastewater. *Bioresource Technology*, 179: 421 - 428.
- He T X, Li Z L, Sun Q, Xu Y, Ye Q. 2016. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by *Pseudomonas talaasii* Y-11 without nitrite accumulation during nitrogen conversion. *Bioresource Technology*, 200: 493 - 499.
- Joo H S, Hirai M, Shoda M. 2005. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* No.4. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100 (2): 184 - 191.
- Lei Y, Ren Y X, Liang X, Zhao S Q, Wang J P, Xia Z X. 2015. Nitrogen removal characteristics of a heterotrophic nitrifier *Acine-bacter junii* YB and its potential application for the treatment of high-strength nitrogenous wastewater. *Bioresource Technology*, 193: 227 - 233.
- Liu Y X, Hu T T, Song Y J, Chen H P, Lü Y K. 2015. Heterotrophic nitrogen removal by *Acinebacter* sp. Y1 isolated from coke plant wastewater. *Bioscience and Bioengineering*, 120 (5): 549 - 554.
- Nakajima Y, Ishizuka S, Tsuruta H, Iswandi A, Murdiyarto D. 2005. Microbial processes responsible for nitrous oxide production from acid soils in different land-use patterns in Pasir Mayang, central Sumatra. *Indonesia Nutrient Cycling in Agroecosystem*, 71: 33 - 42.
- Padhi S K, Tripathy S, Sen R, Mahapatra A S, Mohanty S, Maiti N K. 2013. Characterisation of heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying *Klebsiella pneumoniae* CF-S9 strain for bioremediation of wastewater. *Biodeterior Biodegrad*, 78: 67 - 73.
- Pan Xue-jun, Zhang Wen-e, Fan Wei-guo, Peng Gui-hua, Luo Guo-hua. 2010. Effects of sod culture and intercropping green manure on the soil nutrient, enzyme activities and microorganisms in *Bonsai citrus*. *Acta Horticulturae Sinica*, 37 (8): 1235 - 1240. (in Chinese)
- 潘学军, 张文娥, 樊卫国, 蓬桂华, 罗国华. 2010. 自然生草和间种绿肥对盆栽柑橘土壤养分、酶活性和微生物的影响. *园艺学报*, 37 (8):

- 1235 - 1240.
- Pedersen H, Dunkin K A, Firesne M. 1999. The relative importance of autotrophic heterotrophic nitrification in a conifer forest soil as measured by ^{15}N tracer and pool dilution techniques. *Biogeochemistry*, 44: 35 - 150.
- Schmidt C S, Richardso D J, Baggs E M. 2011. Constraining the conditions conducive-dissimilary nitrate reduction ammonium in temperate arable soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 43: 1607 - 1611.
- Su J J, Yeh K S, Tseng P W. 2006. A strain of *Pseudomonas* sp isolated from piggery wastewater treatment systems with heterotrophic nitrification capability in Taiwan. *Current Microbiology*, 53: 77 - 84.
- Sun Z Y, Lü Y K, Liu Y X, Ren R P. 2016. Removal of nitrogen by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a novel metal resistant bacterium *Cupriavidus* sp S1. *Bioresource Technology*, 220: 142 - 150.
- Taylor S M, He Y, Zhao B, Huang J. 2009. Heterotrophic ammonium removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying-denitrifying bacterium, *Providencia rettgeri* YL. *Environment Science*, 21: 1336 - 1341.
- Wang Hong-yu, Ma Fang, Yang Kai, Wei Li, Su Jun-feng, Zhang Xian-xu. 2009. Ammonia removal by two strains of heterotrophic nitrifying bacteria. *Environmental Science*, 29 (1): 47 - 52. (in Chinese)
王弘宇, 马放, 杨开, 魏利, 苏俊峰, 张献旭. 2009. 两株异养硝化细菌的铵态氮去除特性. *中国环境科学*, 29 (1): 47 - 52.
- Wang Tian-ye, Wei He-fen, Hu Zi-quan, Chai Hua-jian, Zhao Hai-quan. 2017. Isolation and identification of a heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying strain and its denitrification characteristics. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 37 (3): 945 - 953. (in Chinese)
王田野, 魏荷芬, 胡子全, 柴化建, 赵海泉. 2017. 一株异养硝化好氧反硝化菌的筛选鉴定及其脱氮特性. *环境科学学报*, 37 (3): 945 - 953.
- Xin Yu-feng, Qu Xiao-hua, Yuan Meng-dong, Jing Yan-de. 2011. Isolation and identification of a heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying *Acinetobacter* sp. YF14 and its denitrification activity. *Acta Microbiologica Sinica*, 51 (12): 1646 - 1654. (in Chinese)
辛玉峰, 曲晓华, 袁梦冬, 荆延德. 2011. 一株异养硝化—反硝化不动杆菌的分离鉴定及脱氮活性. *微生物学报*, 51 (12): 1646 - 1654.
- Yao S, Ni J R, Ma T, Li C. 2013. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature by a newly isolated bacterium *Acinetobacter* sp. HA2. *Bioresource Technology*, 139: 80 - 86.
- Yin Ming-rui, Wang Ping, Liao Xiao-hong, Zhang Zheng-jie, Ma Jie-feng, Yu Qun. 2010. Screening and identification of a heterotrophic nitrification - aerobic denitrification strain with N_2O emission control ability. *Research of Environmental Sciences*, 33 (8): 16 - 23. (in Chinese)
尹明锐, 汪苹, 廖小红, 张正洁, 马洁峰, 于群. 2010. 异养硝化—好氧反硝化菌 WXZ-8 的脱氮产物 N_2O 和 N_2 研究. *环境科学与技术*, 33 (8): 16 - 23.
- Zhang Guang-ya, Chen Mei-ci, Han Ru-yang. 2003. Isolation, identification and phylogenetic analysis of a heterotrophic nitrifier. *Acta Microbiology Sinica*, 43 (2): 156 - 162. (in Chinese)
张光亚, 陈美慈, 韩如吻. 2003. 一株异养硝化细菌的分离及系统发育分析. *微生物学报*, 43 (2): 156 - 162.
- Zhang J B, Cai Z C, Zhu T B. 2011. N_2O production pathways in the subtropicalacid forest soils in China. *Environmental Research*, 111: 643 - 649.
- Zhang J B, Sun W J, Zhong W H, Cai Z C. 2014. The substrate is an important factor in controlling the significance of heterotrophic nitrification in acidic forest soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 76: 143 - 148.
- Zhao B, An Q, He Y L, Guo J S. 2012. N_2O and N_2 production during heterotrophic nitrification by *Alcaligenes faecalis* strain NR. *Bioresource Technology*, 116: 379 - 385.
- Zhao B, He Y L, Hughes J, Zhang X F. 2010. Heterotrophic nitrogen removal by a newly isolated *Acinebacter calcoaceticus* HNR. *Bioresource Technology*, 101 (14): 5194 - 5200.
- Zheng H Y, Liu Y, Sun G D, Gao X Y, Zhang Q L, Liu Z P. 2011. Denitrification characteristics of a marine origin psychrophilic aerobic denitrifying bacterium. *Environmental Sciences*, 23 (11): 1888 - 1893.