中国生态农业学报(中英文)
Chinese Journal of Eco-Agriculture
中文核心期刊
中国科技核心期刊
中国精品科技期刊
百种中国杰出学术期刊
中国科学引文数据库源刊

# 华北平原农田厚包气带及含水层反硝化细菌的分离鉴定及作用机制研究

赵会成，刘梦帅，陈帅民，王新珍，王仕琴，胡春胜，刘彬彬，王凤花

引用本文:
赵会成, 刘梦帅, 陈帅民, 等. 华北平原农田厚包气带及含水层反硝化细菌的分离鉴定及作用机制研究[J]. 中国生态农业学报(中英文), 2021, 29(1): 94−101.

在线阅读 View online: https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.200519

(向下翻页，阅读全文)

**您可能感兴趣的其他文章**

Articles you may be interested in

中国北方农田氮磷淋溶损失污染与防控机制

Mitigation of nitrogen and phosphorus leaching from cropland in northern China

中国生态农业学报(中英文). 2021, 29(1): 1−10 https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.200910

北方区域尺度地下水−包气带硝酸盐分布与变化特征

Spatial distribution and changes of nitrate in the vadose zone and underground water in northern China

中国生态农业学报(中英文). 2021, 29(1): 208−216 https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.200862

白洋淀流域浅层地下水硝酸盐分布及来源的区域分异特征

Regional characteristics of nitrate sources and distributions in the shallow groundwater of the Lake Baiyangdian watershed

中国生态农业学报(中英文). 2021, 29(1): 230−240 https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.200672

再生水灌溉区农田包气带及地下水中硝酸盐分布特征及来源研究

Distribution characteristics and sources of nitrate in the unsaturated zone and groundwater of farmlands in an area irrigated with reclaimed water

中国生态农业学报(中英文). 2019, 27(11): 1725−1731 https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.190578

华北农区浅层地下水硝酸盐分布特征及其空间差异性

Spatial distribution characteristics of nitrate in shallow groundwater of the agricultural area of the North China Plain

中国生态农业学报. 2018, 26(10): 1476−1482 https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.180639

**DOI: 10.13930/j.cnki.cjea.200519**

赵会成, 刘梦帅, 陈帅民, 王新珍, 王仕琴, 胡春胜, 刘彬彬, 王凤花. 华北平原农田厚包气带及含水层反硝化细菌的分离鉴定及作用机制研究[J]. 中国生态农业学报(中英文), 2021, 29(1): 94−101

ZHAO H C, LIU M S, CHEN S M, WANG X Z, WANG S Q, HU C S, LIU B B, WANG F H. Isolation, identification, and functional characterization of denitrifiers from the deep vadose zone and aquifer in the North China Plain[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2021, 29(1): 94−101

# 华北平原农田厚包气带及含水层反硝化细菌的分离鉴定及作用机制研究*

赵会成[1,2†], 刘梦帅[1†], 陈帅民[1], 王新珍[1], 王仕琴[1], 胡春胜[1], 刘彬彬[1], 王凤花[1**]

(1. 中国科学院遗传与发育生物学研究所农业资源研究中心/中国科学院农业水资源重点实验室/河北省土壤生态学重点实验室 石家庄 050022; 2. 中国科学院大学 北京 100049)

**摘 要:** 华北平原农田由于长期过量施用氮肥, 造成了土壤硝酸盐累积, 导致地下水硝酸盐污染日趋严重。微生物的反硝化作用可将土壤中累积的硝酸盐或亚硝酸盐还原为气态产物, 是消减厚包气带土壤累积的硝酸盐的重要途径。因此筛选高效反硝化微生物资源, 对人工强化厚包气带土壤反硝化脱氮, 阻控地下水硝酸盐污染具有重要作用。基于此, 本研究采集位于华北平原的中国科学院栾城农业生态系统试验站长期施氮[施氮量为 600 kg(N)·hm$^{-2}$·a$^{-1}$]定位试验 0~150 m 农田厚包气带及含水层土壤样品, 从中筛选到 62 株细菌。16S rRNA 基因序列分析表明这 62 株菌株与变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)中的 9 个属具有较高的同源性。根据系统发育树的结果, 挑选 7 株亲缘关系较远的菌株进行反硝化潜势试验, 结果表明, 菌株 L71、L13 和 L103 具备反硝化产气能力。电镜观察结果表明, 这 3 株菌均为无鞭毛的杆状细菌, 其长度分别为 1.0 μm、1.5 μm 和 1.5 μm, 只有 L103 具有运动能力。此外, 菌株 L103 具有完全反硝化能力, 且脱氮能力受到 pH 的影响, 在本试验条件下, 菌株 L103 的反硝化速率高达 1.62~2.36 g($KNO_3$)·d$^{-1}$·L$^{-1}$, 具备实际应用潜力。本研究表明华北平原厚包气带土壤中存在完全反硝化微生物, 并可为人工强化治理厚包气带土壤硝酸盐污染提供菌种资源和理论依据。

**关键词:** 包气带土壤; 硝酸盐积累; 反硝化细菌; 反硝化能力; 16S rRNA 基因测序; 华北平原

**中图分类号:** S154 开放科学码(资源服务)标识码(OSID):

# Isolation, identification, and functional characterization of denitrifiers from the deep vadose zone and aquifer in the North China Plain*

ZHAO Huicheng[1,2†], LIU Mengshuai[1†], CHEN Shuaimin[1], WANG Xinzhen[1], WANG Shiqin[1], HU Chunsheng[1], LIU Binbin[1], WANG Fenghua[1**]

(1. Center for Agricultural Resources Research, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences / Key Laboratory of Agricultural Water Resources, Chinese Academy of Sciences / Hebei Key Laboratory of Soil Ecology, Shijiazhuang 050022, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

* 国家重点研发计划项目(2016YFD0800100)资助

** 通信作者: 王凤花, 主要研究方向为微生物分子生态学。E-mail: fhwang@sjziam.ac.cn

† 同等贡献者: 赵会成, 主要研究方向为微生物分子生态学, E-mail: hczhao@sjziam.ac.cn; 刘梦帅, 主要研究方向为微生物分子生态学, E-mail: lms9095@163.com

收稿日期: 2020-06-29 接受日期: 2020-09-01

* The study was supported by the National Key Research and Development Program of China (2016YFD0800100).

** Corresponding author, E-mail: fhwang@sjziam.ac.cn

† Equivalent contributors

Received Jun. 29, 2020; accepted Sep. 1, 2020

**Abstract:** The long-term excessive use of nitrogen (N) fertilizer in agricultural regions has increased soil nitrate and residual N accumulation and poses a threat to groundwater quality. Nitrate leaching into the vadose zone is becoming a global concern as the N stock in this habitat comprises a significant portion of N budgets. The vadose zone is also an essential channel for the conversion and reduction of nitrate. Therefore, the elimination of nitrate accumulation in the vadose zone is significant for maintaining groundwater safety. Microbial denitrification is the reduction of nitrogen nitrate ( $NO_3^-$-N ) to gaseous nitric oxide (NO), nitrous oxide ($N_2O$), or dinitrogen ($N_2$). This mechanism is essential for removing excess nitrate in the subsoil before it leaches into the groundwater and saturates deep soil zones or discharges into ground aquifers through subsurface drainage. Therefore, isolating and screening bacteria with strong denitrification abilities may strengthen the vadose zone and aquifer microbial denitrification process, preventing groundwater nitrate pollution. In this study, 62 microbial denitrifiers were isolated from the 0−150 m vadose zone in a position experiment of long-term nitrogen application in the Agricultural Ecosystem Experimental Station of Luancheng, Chinese Academy of Sciences, located the North China Plain. 16S ribosomal RNA (16S rRNA) gene sequence analysis showed that the isolated denitrifiers had high homology with nine genera, belonging to the phyla Proteobacteria, Actinobacteria, and Firmicutes. Of the 62 denitrifiers, seven strains (L37, L71, L96, L103, L104, L133, and L13) were selected for denitrification potential experiments based on the phylogenetic tree results. Gas kinetics under anoxic incubations showed that three strains (L71, L13, and L103) could reduce nitrate substrates to nitrous oxides, such as $N_2O$ and $N_2$, in anaerobic conditions. Electron microscopy showed that the denitrifying strains were 1.0 μm (L71), 1.5 μm (L13), and 1.5 μm (L103) long rod-shaped bacteria. Strain L103 had motile and complete denitrification abilities, and the denitrification rate was between 1.62 and 2.36 $g(KNO_3)\cdot d^{-1}\cdot L^{-1}$, indicating a high potential for use in agricultural practices. Furthermore, the denitrification ability of strain L103 was inhibited in acidic conditions, suggesting that pH also affects the microbial denitrification potential. Bacterial denitrifiers that reduce nitrate to $N_2$ in hypoxic/anoxic conditions exist in the deep vadose zone of the North China Plain. The denitrification potential of these strains is important for understanding how microorganisms contribute to the soil nitrate accumulation self-remediation process.

**Keywords:** Vadose zone; Nitrate accumulation; Denitrifiers; Denitrification ability; 16S rRNA gene sequence; North China Plain

在农业生产中, 合理施用氮肥在保障粮食作物稳产、增产中起着重要作用。然而, 随着集约化农业发展进程的加快, 过量施用氮肥的现象日益增加, 由此引起的土壤硝酸盐累积、地下水硝酸盐污染、温室气体排放以及土壤酸化等问题日趋严重[1]。华北平原农田区作为我国主要的粮食主产区之一, 氮肥年施用量高达 500 $kg(N)\cdot hm^{-2}\cdot a^{-1}$[2], 远超作物“最适的”氮肥需求量[286 $kg(N)\cdot hm^{-2}\cdot a^{-1}$][3]。目前, 该地区农业氮肥施用已造成 0~12 m 土壤剖面硝酸盐的大量累积, 成为潜在的污染源, 最终通过强降雨或灌溉进入地下水, 造成污染[4]。已有研究表明典型厚包气带农田区浅层地下水中硝酸盐污染超标率高达 50%, 而深层地下水中硝酸盐的污染程度也在逐年加剧[5]。因此, 如何削减厚包气带土壤硝酸盐污染是集约化农田区面临的最重要问题。

包气带是指地表到地下水之间的非饱和带, 既是土壤硝酸盐淋失的通道, 也是土壤硝酸盐累积、转化和削减的场所。其中, 土壤硝酸盐自修复作用是削减厚包气带土壤累积硝酸盐的重要途径。土壤中的反硝化微生物, 可将土壤中累积的硝酸盐或亚硝酸盐还原为气态产物($N_2O$、NO 和 $N_2$)[6], 又经土壤孔隙消散到大气中, 完成厚包气带土壤硝酸盐污染的自修复过程, 是阻控厚包气带土壤硝酸盐淋失的有效途径。研究表明, 反硝化细菌约占土壤微生物总数的 5%[7], 但并不是所有的反硝化细菌都具有完全反硝化能力, 有些反硝化细菌在反硝化过程中会产生 $N_2O$ 等中间产物。$N_2O$ 会对臭氧层造成破坏, 是导致全球变暖现象出现的主要温室气体之一[8], 它吸收热量的能力是 $CO_2$ 的 300 倍[9]。因此筛选具有完全反硝化能力的菌株, 将累积的硝酸盐最终还原为 $N_2$, 对削减包气带土壤累积的硝酸盐具有重要的应用价值。

目前, 国内外关于反硝化微生物的报道多来自于表层土壤[10-11], 例如王惠芬等[12]通过采集表层 3~5 cm 的土壤分离出 6 株具有反硝化能力菌株。陈寒玉等[13]从蔬菜大棚表层 0~20 cm 的土壤分离出 1 株反硝化细菌并进行土壤脱氮效果研究。Falk 等[14]从表层 0~10 cm 的土壤筛选出 490 株细菌, 其中 8 株菌株携带 *nirK* 功能基因。尽管包气带微生物具有提高反硝化活性的潜力, 但目前对厚包气带及含水层土壤中反硝化微生物的研究相对较少。此外, 土壤微生物的反硝化过程受土壤含水量、温度、硝酸盐浓度以及可利用碳等因素的影响, 其中土壤 pH 对微生物反硝化过程尤为重要[15]。有研究表明, 过

量施氮肥会导致土壤 pH 降低, 造成土壤 $N_2O$ 排放速度加快[15-16]。Šimek 等[17]研究表明在酸性土壤中反硝化作用生成的 $N_2O/N_2$ 的比例高于碱性土壤。

本研究依托中国科学院栾城农业生态系统试验站, 从农田包气带及含水层土壤中筛选到 62 株细菌。采用 16S rRNA 基因序列分析对菌株进行初步鉴定, 同时选取代表性菌株对其生长和反硝化特性进行初步分析, 旨在为微生物强化治理厚包气带土壤硝酸盐污染的应用提供菌种资源和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

本研究依托中国科学院栾城农业生态系统试验站, 该试验站位于河北省石家庄市栾城区(37°53′N, 114°41′E), 海拔 50.1 m, 属暖温带半湿润季风气候, 土壤类型以潮褐土为主。长期施氮肥定位试验始于 1997 年, 供试土壤采集于长期施氮量为 600 kg(N)·$hm^{-2}$·$a^{-1}$ 的处理。土壤样品采集于 2016 年 6 月, 利用 Geoprobe (Geoprobe Model 54D, 美国)土壤深层采样机钻取 0~150 m 的土壤样品, 根据土壤质地, 选取代表性土层进行微生物分离。土壤样品分为 13.3~16.0 m (L1)、16.0~20.0 m (L2)、30.2~39.0 m (L3)、44.0~50.0 m (L4)、50.0~54.0 m (L5)、65.0~70.0 m (L6)、70.0~80.0 m (L7)、81.0~91.0 m (L8)、91.0~96.0 m (L9)、107.0~110.0 m (L10)、117.0~120.0 m (L11)、120.0~126.7 m (L12)、129.0~130.3 m (L13)和 141.0~150.0 m (L14)共 14 个土层。分别将上述各土壤剖面土柱样品混匀后装入自封袋, 并置于冰上, 运回实验室进行微生物筛选工作。

### 1.2 反硝化细菌的筛选与鉴定

#### 1.2.1 培养基

固体 TSA 培养基[18]: 胰蛋白胨 15.0 g, 大豆蛋白胨 5.0 g, 氯化钠 5.0 g, 琼脂 15.0 g, 加蒸馏水至 1.0 L。

液体 TSB 培养基[18]: 胰蛋白胨 15.0 g, 大豆蛋白胨 5.0 g, 氯化钠 5.0 g, 加蒸馏水至 1.0 L。

固体 LB 培养基: 胰蛋白胨 10.0 g, 酵母粉 5.0 g, 氯化钠 5.0 g, 琼脂 15.0 g, 加蒸馏水至 1.0 L。

土壤浸提液培养基: 牛肉膏 3.0 g, 胰蛋白胨 5.0 g, 琼脂 15.0 g, 土壤浸汁 1.0 L。

所有培养基均调节 pH 至 7.2~7.4, 121 ℃、30 min 高压蒸汽灭菌。

#### 1.2.2 反硝化细菌的分离与纯化

采用平板稀释涂布法分离反硝化细菌: 称取 5.0 g 新鲜土壤加入无菌水 20 mL, 28 ℃, 180 r·$min^{-1}$ 摇床振荡 1 h 后, 取出静置。取上清液并用无菌水进行稀释, 稀释梯度为 $10^{-2}$ 和 $10^{-3}$。将稀释后的土壤上清液分别涂布在含有 $KNO_3$(2 mmol·$L^{-1}$)的 TSA 培养基、LB 培养基和土壤浸提液培养基中, 置于厌氧培养袋中于 28 ℃恒温培养箱中培养。根据菌落颜色、形态等挑选单菌落, 并经多次划线纯化后, 将纯化后的单菌落接种于液体培养基中, 过夜培养后, 采用甘油水溶液(50%)保存于−80 ℃冰箱中。

### 1.3 细菌的鉴定

#### 1.3.1 分子生物学鉴定

对于细菌 16S rRNA 基因的扩增, 选用细菌的通用引物对 27F (5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′)和 1492R (5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′)[19]。PCR 扩增体系 50 μL, 包括 2×GoldStar-Mix (康为世纪, 北京) 25 μL, 正反向引物各 0.5 μL (10 μM), DNA 模板 1 μL, 灭菌超纯水 23 μL。PCR 扩增程序如下: 95 ℃预变性 5 min; 95 ℃变性 1 min, 55 ℃退火 1 min; 72 ℃延伸 2 min, 30 个循环; 72 ℃延伸 10 min。PCR 扩增产物由生工生物工程股份有限公司测序完成, 测序结果在 NCBI 网站进行 BLAST 在线比对, 并使用 MEGA 4.0[20]软件构建系统发育树。

#### 1.3.2 反硝化功能测定

预培养阶段: 250 mL 三角瓶中加入 50 mL 1/10 TSB 液体培养基, 分别接种纯化后的菌株, 接菌量为 1 mL。置于磁力搅拌器上, 700 r·$min^{-1}$, 28 ℃恒温培养。培养 10 h 后, 采用紫外可见分光光度计(UV-6100S, 上海)测定菌液在 600 nm 处的吸光度值($OD_{600}$), 并确保该值小于 0.5。

反硝化功能测定: 120 mL 血清瓶中加入 50 mL 1/10 TSB 培养基(含 $KNO_3$ 2 mmol·$L^{-1}$), 使用丁基胶塞和中空铝盖进行密封。利用真空抽洗气装置将血清瓶内的空气置换为氦气, 并添加 1%的氧气, 加快反硝化细菌的增殖速度。按照吸光值×接种量=0.5 的原则, 将菌液接种于血清瓶内, 立即将血清瓶置于气体自动采样培养装置[21], 700 r·$min^{-1}$, 28 ℃恒温培养, 采用气相色谱仪(Agilent 7890A, 美国)测定血清瓶内的 $N_2O$ 和 $N_2$ 的浓度, 每隔 2 h 进行一次采样。

#### 1.3.3 形态特征检测

细菌电镜照片采用逐点成像的方法, 将样品图像特征按顺序成比例的转化为图像信号。具体过程为预先向培养皿中放入尺寸大小不同的盖玻片, 加入适量 TSB 液体培养基并接种目的菌种, 密封后 28 ℃恒温培养至对数生长期。移液器缓缓移除菌液,

只保留盖玻片和菌团，加入 10 mL PBS 溶液(NaCl 8 g·L$^{-1}$; KCl 0.2 g·L$^{-1}$; $Na_2HPO_4$ 1.44 g·L$^{-1}$; $KH_2PO_4$ 0.24 g·L$^{-1}$, pH 7.4)清洗菌体。加 15 mL 戊二醛溶液(2.5%)进行室温避光固定。再用乙醇脱水后，即刻用临界点干燥仪(Leika EM CPD300，德国)干燥 1.5 h。最后将干燥后的盖玻片固定在铜台，使用真空镀膜仪(Leika EM SCD050，德国)喷金处理后置于扫描电镜(Phenom ProX，荷兰)的样品台模块，按照高倍聚焦、低倍成像的顺序进行观察并拍照保存。

### 1.3.4　细菌运动性检测

采用半固体穿刺法对细菌运动性进行检测。50 mL 离心管中加入 45 mL 半固体培养基，灭菌牙签蘸取菌液后，刺入半固体培养基中，拔出牙签，过夜培养。使用透射光源目测的方式观察细菌运动性，若观察到细菌仅生长在穿刺线上，且存在明显的边缘界限，则表示细菌不具有运动特性；反之，若观察到细菌沿着穿刺线向其四周生长扩散并呈现云雾状，则表示细菌具有运动性。

### 1.4　pH 对反硝化细菌功能的影响

120 mL 血清瓶中加入 50 mL 1/10 TSB 培养基，添加 $KNO_3$ 终浓度为 2 mmol·L$^{-1}$，分别通过磷酸缓冲液调节 pH 为 5.8、6.2、6.6、7.0、7.4 和 7.8，接种具有完全反硝化能力的菌株 L103，接菌量为 1 mL，将血清瓶置于气体自动采样培养装置[21]，700 r·min$^{-1}$，28 ℃恒温培养，使用气相色谱仪(Agilent 7890A，美国)测定血清瓶内的 $N_2O$ 和 $N_2$ 的浓度，每隔 2 h 进行一次采样。

## 2　结果与分析

### 2.1　分离纯化的反硝化菌株

本试验共筛选得到 62 株潜在的反硝化菌株，16S rRNA 基因序列构建的系统发育树结果如图 1 所示，筛选到的 62 株菌株分别与变形菌门

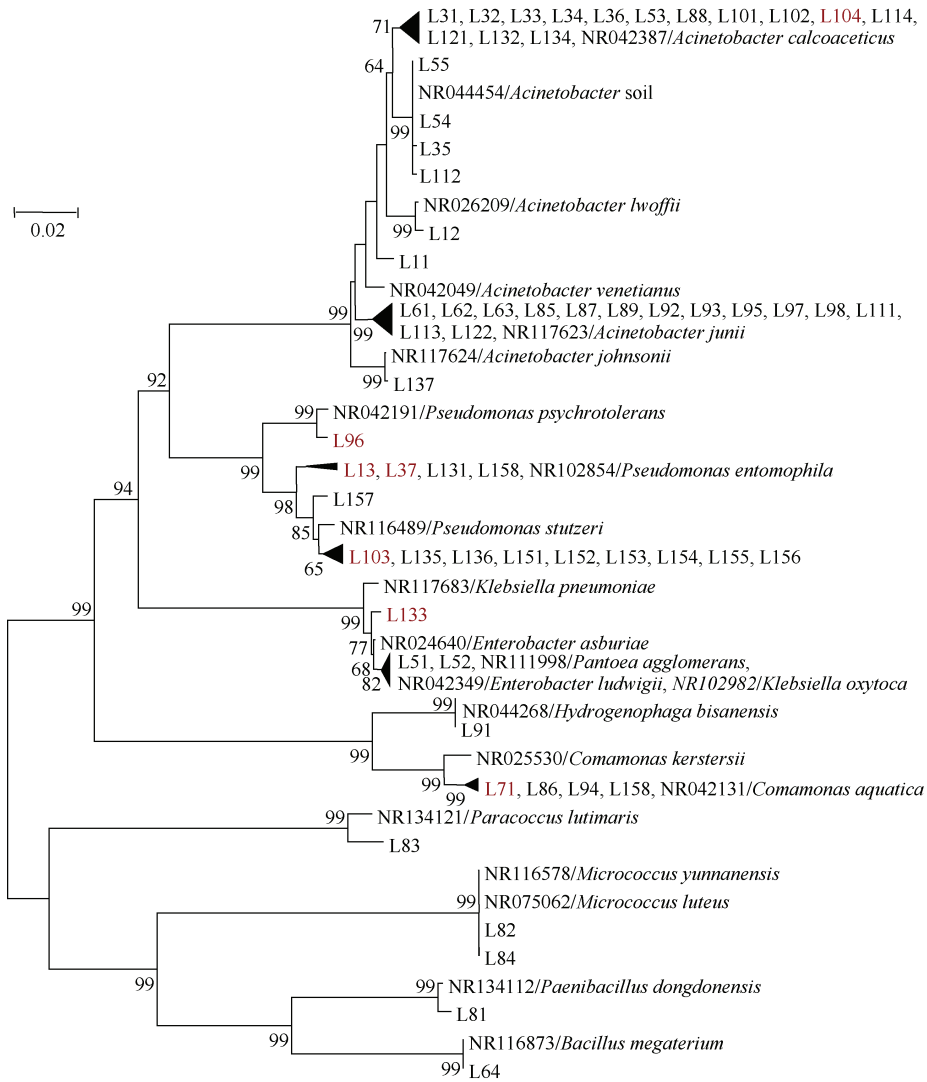


**图 1　基于 16S rRNA 基因序列的筛选得到 62 株潜在反硝化菌株的系统进化树**

Fig. 1　Phylogenetic tree of screened 62 potential denitrifying strains based on 16S rRNA gene sequences analysis

(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes)中的 9 个属，即与不动细菌属(*Acinetobacter*, 35 株)、假单胞菌属(*Pseudomonas*, 15 株)、阴沟肠杆菌属(*Enterobacter*, 3 株)、丛毛单胞菌属(*Comamonas*, 3 株)、微球菌属(*Micrococcus*, 2 株)、芽孢杆菌属(*Bacillus*, 1 株)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*, 1 株)、副球菌属(*Paracoccus*, 1 株)以及氢噬胞菌属(*Hydrogenophaga*, 1 株)具有较高的同源性。根据所构建的系统发育树的结果，挑选其中 7 株亲缘关系较远的菌株(L37、L71、L96、L103、L104、L133 和 L13)进行后续反硝化功能研究。

**2.2** 细菌反硝化功能验证

选取菌株 L37、L71、L96、L103、L104、L133 和 L13 进行反硝化功能试验。结果表明，在厌氧条件下，菌株 L37、L96、L104 和 L133 均不能产生 $N_2O$ 和 $N_2$，初步推测这些菌株不具备反硝化能力。菌株 L71、L13 和 L103 具有反硝化功能(图 2)。其中菌株 L71 在第 4 h 开始产生 $N_2O$，$N_2O$ 产生速率从第 8 h 开始匀速增长，第 18 h 反应结束。菌株 L13 在第 3 h 开始产生 $N_2O$，$N_2O$ 产生速率从第 5 h 开始匀速增长，第 8 h 反应结束。此外，菌株 L103 是唯一能够在反硝化过程中产生 $N_2$ 的反硝化细菌，从第 4 h 开始产生 $N_2O$，第 9 h 达峰值，随后 $N_2O$ 浓度迅速下降，到第 10 h $N_2O$ 浓度为 0；而 $N_2$ 在第 7 h 开始产生，第 10 h $N_2$ 产量达峰值。结果表明，菌株 L103 具备完全反硝化能力，经计算得到其反硝化速率高达 1.62~2.36 g$(KNO_3)\cdot d^{-1}\cdot L^{-1}$。

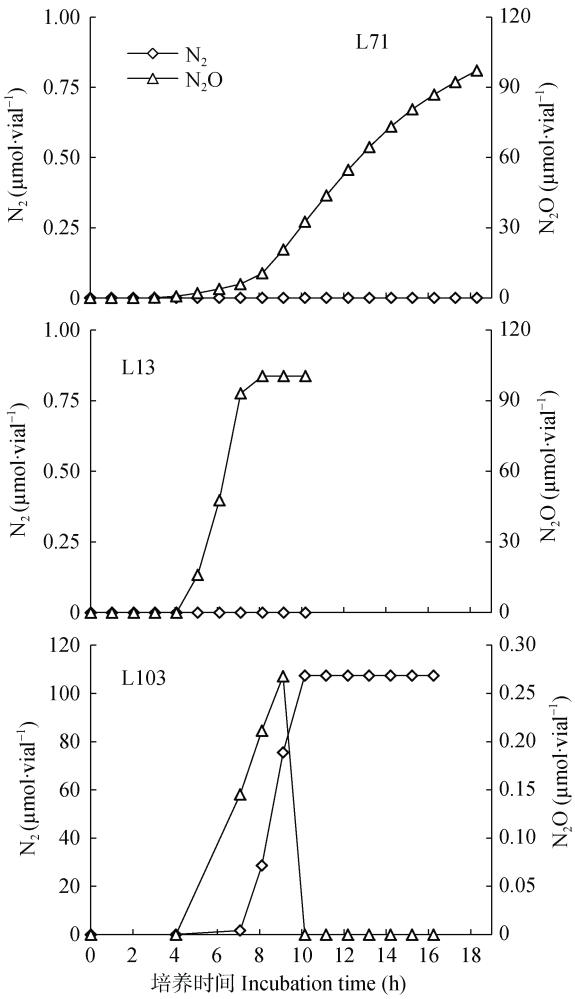


**图 2** 菌株 **L71**、**L13** 和 **L103** 的反硝化潜势

Fig. 2 Denitrification potentials of the selected strains L71, L13 and L103

**2.3** 反硝化细菌的形态特征及生物学特性

电镜观察结果表明，反硝化菌株 L71、L13 和 L103 均为杆状细菌，长度分别为 1.0 μm、1.5 μm 和 1.5 μm，且都不具有鞭毛(图 3)。菌株运动性试验结果表明(表 1)，菌株 L71 和 L13 仅在穿刺物的位置上生长，与半固体培养基存在明显界限，说明菌株 L71 和 L13 没有运动能力。而菌株 L103 则沿着穿刺物中心向其四周呈现云雾状扩散，与培养基界限不明显，表明菌株 L103 具有运动能力。

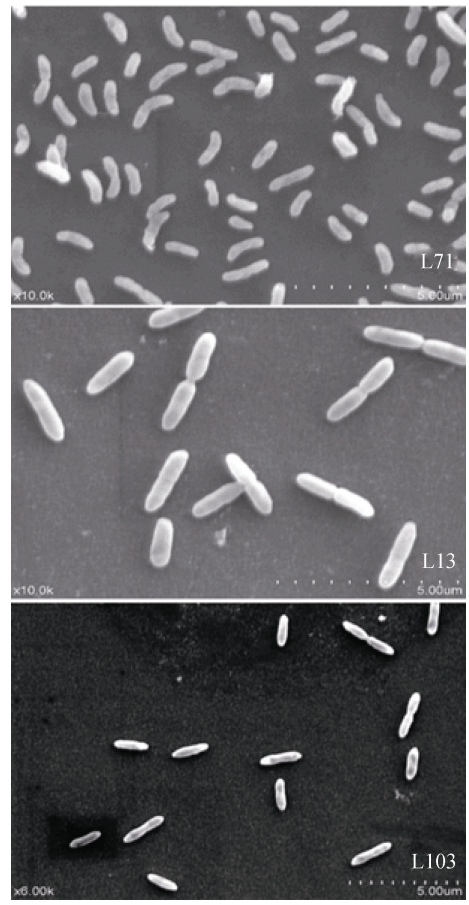


**图 3** 菌株 **L71**、**L13** 和 **L103** 的细菌形态特征

Fig. 3 Morphological characteristics of the selected strains L71, L13 and L103

表 1　菌株 L71、L13 和 L103 的生物学特性
Table 1　Biological features of the selected strains L71, L13 and L103

| 菌株 Strain | 运动性 Motile | 形状 Shape | 长度 Length (μm) | 鞭毛 Flagellum |
|---|---|---|---|---|
| L71 | 无 No | 杆状 Rod | 1.0 | 无 No |
| L13 | 无 No | 杆状 Rod | 1.5 | 无 No |
| L103 | 有 Yes | 杆状 Rod | 1.5 | 无 No |

表 2　菌株 L103 在不同 pH 下将 $KNO_3$ 还原成 $N_2$ 所需时间及最大反硝化速率
Table 2　Time consumed to reduce $KNO_3$ to $N_2$ and max denitrification rate of the strain L103 at different pH

| | 7.8 | 7.4 | 7.0 | 6.6 | 6.2 | 5.8 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 时间 Time (h) | 6 | 6 | 10 | 16 | — | — |
| 最大反硝化速率 Max denitrification rate [$g(KNO_3)\cdot d^{-1}\cdot L^{-1}$] | 2.36 | 2.02 | 1.62 | 0.77 | — | — |

“—”表示菌株 L103 不能在该 pH 条件下生长。“—” indicates strain L103 can not grow under this pH condition.

### 2.4　pH 对细菌 L103 反硝化功能的影响

菌株 L103 在 pH 5.8、6.2、6.6、7.0、7.4 和 7.8 条件下的反硝化功能结果如表 2 所示。在 pH 7.8 条件下反硝化速率最大, 最大反硝化速率随着 pH 的降低而降低。在 pH 6.2 和 pH 5.8 条件下菌株 L103 的反硝化活性受到抑制。因此挑选 pH 6.6 和 pH 7.4 条件下, 添加 1%的氧气, 进一步探究菌株 L103 在反硝化过程中 NO、$N_2O$、$N_2$ 和 $O_2$ 的变化情况(图 4)。结果表明, 在 pH 7.4 的条件下, $O_2$ 在第 12 h 时完全耗尽, 第 6 h 开始产生 NO、$N_2O$ 和 $N_2$。NO 在第 8 h 时达到峰值, 随后 NO 浓度降低, 到第 10 h, 浓度降为 0。$N_2O$ 在第 10 h 达到峰值, 之后浓度降低, 在第 12 h 时产量为 0。而 $N_2$ 在第 8 h 产生速率逐渐加快, 之后保持稳定, 直到第 12 h 时浓度不再增加。在 pH 6.6 的条件下, $O_2$ 在第 20 h 时完全耗尽, NO 的峰值出现在第 28 h。$N_2O$ 则在第 10 h 和第 45 h 出现峰值, 最大峰值出现在第 45 h, 之后浓度快速下降, 到第 55 h 时浓度为 0。$N_2$ 则是在第 28 h 时才开始产生, 并在第 58 h 时达到峰值。上述结果可以表明, 与 pH 7.4 相比, 菌株在 pH 6.6 的条件下反硝化活性受到抑制。

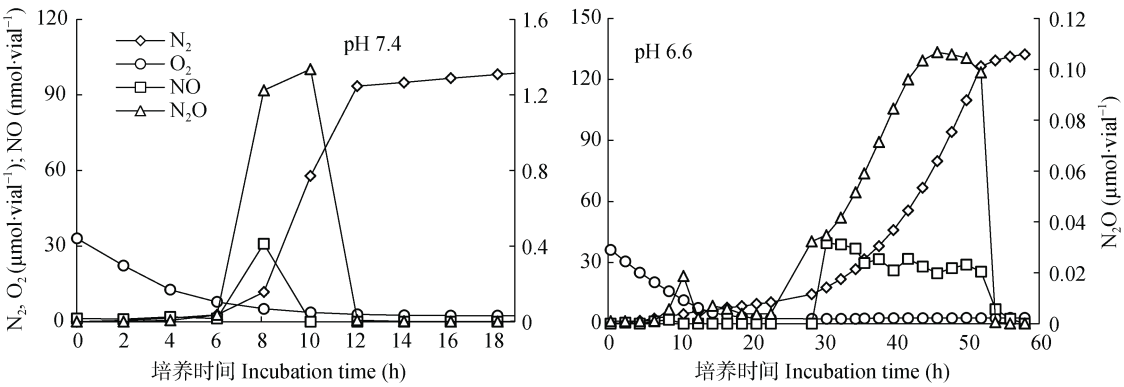


图 4　菌株 L103 在 pH 7.4 和 pH 6.6 下的反硝化潜势
Fig. 4　Denitrification potential of the strain L103 at pH 6.6 and pH 7.4

## 3　讨论和结论

本研究从华北平原长期施氮肥的农田厚包气带土壤及含水层中共筛选到 62 株潜在的反硝化细菌, 测序结果表明这 62 株菌株分别与变形菌门、放线菌门、厚壁菌门中的 9 个属具有较高的同源性。深层包气带土壤中环境因子和微生物群落结构与表层土壤存在很大差异[22]。尽管表层土壤中人为施肥、动植物残体的分解、根系分泌物的产生等因素, 使得表层土壤中富含微生物所需的有机碳等营养元素, 但由于土壤吸附、微生物分解以及作物根系吸收等, 表层土壤中富含的养分很难进入深层土壤中, 这就导致深层土壤环境变得更为贫瘠, 微生物丰度和多样性也变得很低。研究表明, 变形菌门在各种土壤环境中占主导地位, 包括养分受限的环境[22]; 厚壁菌门能够产生孢子, 可抵御恶劣的环境条件[23-24]。此外发现筛选到的这 62 株菌株中, 35 株菌株和 15 株菌株分别与不动杆菌属及假单胞菌属具有很高的同源性, 这与不动杆菌属[24]和假单胞菌属[22]在反硝化过程中起关键作用的报道一致。Chen 等[22]通过反硝化潜势的测定以及反硝化功能基因的定量试验也证实了包气带土壤中反硝化微生物的存在。

集约化农田往往依靠施加大量氮肥和灌溉来提高作物产量, 未被植物利用的氮素会在土壤中累积, 进而通过淋溶进入到地下水, 对地下水水质安全造成威胁[25]。而深层土壤中存在的反硝化微生物可通过微生物的反硝化过程, 完成土壤硝酸盐的自修复, 对削减深层包气带土壤累积的硝酸盐、保障地下水安全具有重要的作用。同时, 包气带土壤微生物的

反硝化作用受到多种因素的影响, 比如反硝化微生物的丰度及土壤有机碳、硝态氮和氧气含量等。其中, 土壤有机碳是驱动反硝化作用进行的能源物质, 决定了土壤中反硝化作用的强弱, 是限制深层土壤反硝化作用的关键因素[22]。此外, 自然界中并不是所有的反硝化细菌都具有完全反硝化能力, 土壤中存在完全和不完全反硝化细菌[26], 这些不完全反硝化细菌在反硝化过程中会产生 NO、$N_2O$ 等中间产物, 是环境中 $N_2O$ 主要的排放源[27-28]。在本研究中也发现, 菌株 L71 和 L13 是不完全反硝化菌株, 只能将硝酸盐底物还原为 $N_2O$。只有菌株 L103 能够进行完全反硝化能力, 可以将硝酸盐底物完全还原为 $N_2$, 其反硝化速率高达 1.62~2.36 g $(KNO_3)\cdot d^{-1}\cdot L^{-1}$, 具备实际应用潜力。进一步根据菌株 L103 的全基因组测序结果表明, 该菌株含有反硝化过程的 4 个步骤所必需的 4 种反硝化功能基因[29], 此结果与细菌的反硝化潜势测定结果相吻合。

与此同时, 长期施氮肥引起的土壤酸化问题也日益严重[30]。土壤酸化会加快农田土壤 $N_2O$ 的排放速度, 加剧温室气体的影响[15-17]。本试验中菌株 L103 在不同 pH 条件下反硝化潜势的结果表明, 在培养过程中菌株 L103 的反硝化过程受到 pH 的影响, 低 pH 影响反硝化速率, 尤其是 $N_2O$ 还原为 $N_2$ 的速率。有研究发现氮相关功能微生物比较适宜生存在中性或弱碱性环境中[31]。也有研究表明土壤 pH 可影响反硝化酶 Nos 的活性, 当 pH>7 时, 反硝化酶 Nos 的活性增强, 而当 pH<7 时, 反硝化酶 Nos 的活性降低, 而其他反硝化酶活性增强, 从而导致反硝化过程产生更多的 $N_2O$[32]。

综上所述, 本研究结果对理解微生物在土壤硝酸盐污染反硝化自修复过程中的作用机制、利用微生物资源增强包气带土壤硝酸盐污染的自修复过程, 从而削减农田土壤硝酸盐积累具有重要的指导意义。但目前对于反硝化细菌的实际应用还处于探索阶段, 更多的机制和高效反硝化细菌的工程应用尚待深入研究。

## 参考文献 References


[1] ERISMAN J W, GALLOWAY J N, SEITZINGER S, et al. Consequences of human modification of the global nitrogen cycle[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2013, 368(1621): 20130116

[2] 胡春胜, 张玉铭, 秦树平, 等. 华北平原农田生态系统氮素过程及其环境效应研究[J]. 中国生态农业学报, 2018, 26(10): 1501–1514
HU C S, ZHANG Y M, QIN S P, et al. Nitrogen processes and related environmental effects on agro-ecosystem in the North China Plain[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2018, 26(10): 1501–1514

[3] JU X T, XING G X, CHEN X P, et al. Reducing environmental risk by improving N management in intensive Chinese agricultural systems[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(9): 3041–3046

[4] 梁慧雅, 王仕琴, 魏守才. 华北山前平原典型厚包气带硝态氮分布累积规律[J]. 土壤, 2017, 49(6): 1179–1186
LIANG H Y, WANG S Q, WEI S C. Nitrate distribution and accumulation in deep unsaturated zone soils in piedmont of North China Plain[J]. Soils, 2017, 49(6): 1179–1186

[5] 马洪斌, 李晓欣, 胡春胜. 中国地下水硝态氮污染现状研究[J]. 土壤通报, 2012, 43(6): 1532–1536
MA H B, LI X X, HU C S. Status of nitrate nitrogen contamination of groundwater in China[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2012, 43(6): 1532–1536

[6] ZUMFT W G. Cell biology and molecular basis of denitrification[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1997, 61(4): 533–616

[7] HENRY S, BRU D, STRES B, et al. Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(8): 5181–5189

[8] CANFIELD D E, GLAZER A N, FALKOWSKI P G. The evolution and future of earth's nitrogen cycle[J]. Science, 2010, 330(6001): 192–196

[9] CICERONE R J. Analysis of sources and sinks of atmospheric nitrous oxide ($N_2O$)[J]. Journal of Geophysical Research: Atmospheres, 1989, 94(D15): 18265–18271

[10] 王海涛, 郑天凌, 杨小茹, 等. 土壤反硝化的分子生态学研究进展及其影响因素[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(10): 1915–1924
WANG H T, ZHENG T L, YANG X R, et al. Molecular ecology research progress for soil denitrification and research status for its influencing factors[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2013, 32(10): 1915–1924

[11] 方晶晶, 马传明, 刘存富. 反硝化细菌研究进展[J]. 环境科学与技术, 2010, 33(6E): 206–210
FANG J J, MA C M, LIU C F. The advance of study on denitrifying bacteria[J]. Environmental Science & Technology, 2010, 33(6E): 206–210

[12] 王惠芬, 温展, 张秋玲, 等. 土壤中反硝化细菌的分离与脱氮性能初步研究[J]. 环保科技, 2018, 24(6): 19–24
WANG H F, WEN Z, ZHANG Q L, et al. A preliminary study on the screening of denitrifiers and their denitrification performance in soil[J]. Environmental Protection and Technology, 2018, 24(6): 19–24

[13] 陈寒玉, 靳慧征, 靳慧霞. 一株好氧反硝化细菌的筛选及对土壤脱氮效果研究[J]. 中国农学通报, 2018, 34(20): 55–62
CHEN H Y, JIN H Z, JIN H X. Screening of an aerobic denitrification strain and its nitrogen removal characteristics for

soil[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2018, 34(20): 55–62

[14] FALK S, LIU B B, BRAKER G. Isolation, genetic and functional characterization of novel soil *nirK*-type denitrifiers[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2010, 33(6): 337–347

[15] LIU B B, MORKVED P T, FROSTEGÅRD Å, et al. Denitrification gene pools, transcription and kinetics of NO, $N_2O$ and $N_2$ production as affected by soil pH[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2010, 72(3): 407–417

[16] QU Z, WANG J G, ALMØY T, et al. Excessive use of nitrogen in Chinese agriculture results in high $N_2O/(N_2O+N_2)$ product ratio of denitrification, primarily due to acidification of the soils[J]. Global Change Biology, 2014, 20(5): 1685–1698

[17] ŠIMEK M, COOPER J E. The influence of soil pH on denitrification: Progress towards the understanding of this interaction over the last 50 years[J]. European Journal of Soil Science, 2010, 53(3): 345–354

[18] LYCUS P, BØTHUN L, BERGAUST L, et al. Phenotypic and genotypic richness of denitrifiers revealed by a novel isolation strategy[J]. The ISME Journal, 2017, 11(10): 2219–2232

[19] BAKER G C, SMITH J J, COWAN D A. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers[J]. Journal of Microbiological Methods, 2003, 55(3): 541–555

[20] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596–1599

[21] MOLSTAD L, DÖRSCH P, BAKKEN L R. Robotized incubation system for monitoring gases ($O_2$, NO, $N_2O$, $N_2$) in denitrifying cultures[J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 71(3): 202–211

[22] CHEN S M, WANG F H, ZHANG Y M, et al. Organic carbon availability limiting microbial denitrification in the deep vadose zone[J]. Environmental Microbiology, 2018, 20(3): 980–992

[23] ONYENWOKE R U, BRILL J A, FARAHI K, et al. Sporulation genes in members of the low G+C Gram-type-positive phylogenetic branch (*Firmicutes*)[J]. Archives of Microbiology, 2004, 182(2): 182–192

[24] STONE M M, KAN J J, PLANTE A F. Parent material and vegetation influence bacterial community structure and nitrogen functional genes along deep tropical soil profiles at the Luquillo Critical Zone Observatory[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2015, 80: 273–282

[25] 马林, 柏兆海, 胡春胜. 科技部“十三五”农业面源和重金属污染农田综合防治与修复技术研发重点专项“农田氮磷淋溶损失污染与防控机制研究”项目正式启动[J]. 中国生态农业学报, 2016, 24(11): 1575–1576
MA L, BAI Z H, HU C S. Research on mechanisms of nitrogen and phosphorus leaching loss and control of farmland[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2016, 24(11): 1575–1576

[26] SAMESHIMA-SAITO R, CHIBA K, MINAMISAWA K. Correlation of denitrifying capability with the existence of *nap*, *nir*, *nor* and *nos* genes in diverse strains of soybean bradyrhizobia[J]. Microbes and Environments, 2006, 21(3): 174–184

[27] MINAMIKAWA K, NISHIMURA S, SAWAMOTO T, et al. Annual emissions of dissolved $CO_2$, $CH_4$, and $N_2O$ in the subsurface drainage from three cropping systems[J]. Global Change Biology, 2010, 16(2): 796–809

[28] PHILIPPOT L, HALLIN S, SCHLOTER M. Ecology of denitrifying prokaryotes in agricultural soil[J]. Advances in Agronomy, 2007, 96: 249–305

[29] LIU M S, CHEN S M, WANG S Q, et al. High-quality draft genome sequence of *Pseudomonas songnenensis* L103, a denitrifier isolated from a 100-meter-deep aquifer in a heavily nitrogen-fertilized agricultural area[J]. Microbiology Resource Announcements, 2019, 8(36): e00373−19

[30] GUO J H, LIU X J, ZHANG Y, et al. Significant acidification in major Chinese croplands[J]. Science, 2010, 327(5968): 1008–1010

[31] STEVENS R J, LAUGHLIN R J, MALONE J P. Soil pH affects the processes reducing nitrate to nitrous oxide and di-nitrogen[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1998, 30(8/9): 1119–1126

[32] RICHARDSON D, FELGATE H, WATMOUGH N, et al. Mitigating release of the potent greenhouse gas $N_2O$ from the nitrogen cycle-could enzymic regulation hold the key?[J]. Trends in Biotechnology, 2009, 27(7): 388–397