

异化硝酸盐还原为铵功能菌株的筛选及产铵能力的优化

史明子¹, 张森¹, 张警予², 张斌², 王赐卫², 满振团²,
王明道¹, 崔光周^{2*}

(1. 河南农业大学 生命科学学院, 河南 郑州 450002; 2. 河南省烟草公司信阳市公司, 河南 信阳 464000)

摘要: 针对水稻土壤硝态氮易经反硝化作用还原为气态氮, 导致氮素损失的问题。对水稻土壤中能够将硝酸盐异化还原为铵态氮, 具有氮素保留功能的微生物进行了定向筛选, 通过形态学和16S rDNA基因测序技术对菌株进行鉴定, 并结合单因素实验优化了硝酸盐异化还原为铵功能菌株的产铵能力。结果表明: 筛选出的菌株S2具有较强的硝酸盐异化还原为铵的功能, 被鉴定为阿斯布里肠杆菌(*Enterobacter asburiae*)。单因素优化实验显示, *Enterobacter asburiae* S2的最适生长碳源为柠檬酸钠, 最适生长pH值为7.0, 最适碳氮比为25, 在此条件下最大产铵量可达34.84 mg/L。

关键词: 水稻土壤; 氮素保留; 硝酸盐异化还原为铵; 功能菌株; 培养条件优化

中图分类号: Q939.96

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Screening of functional strains of dissimilatory nitrate reduction to ammonium and optimization of ammonium production capacity

SHI Mingzi¹, ZHANG Sen¹, ZHANG Jingyu², ZHANG Bin², WANG Ciwei²,
MAN Zhentuan², WANG Mingdao¹, CUI Guangzhou^{2*}

(1. College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, China;

2. Xinyang City Company of Henan Tobacco Corporation, Zhengzhou 464006, China)

Abstract: The issue of nitrogen loss in paddy soils was addressed, where nitrate nitrogen was prone to dissimilatory reduction to gaseous nitrogen. The research focused on the targeted screening of microorganisms in paddy soils that can dissimilate nitrate to ammonium, thereby retaining nitrogen. The selected strains were identified using morphological and 16S rDNA gene sequencing techniques. Further, the ammonium production capability of these strains was optimized through single factor experiments. The results indicated that strain S2, identified as *Enterobacter asburiae*, exhibited a strong ability to dissimilate nitrate to ammonium. Optimization experiments revealed that the optimal carbon source for the growth of *Enterobacter asburiae* S2 was sodium citrate, the optimal pH for growth was 7.0, the optimal carbon-to-nitrogen ratio was found to be 25, under which the maximum ammonium production increased to 34.84 mg/L.

Key words: paddy soil; nitrogen retention; dissimilatory nitrate reduction to ammonium; functional strains; culture condition optimization

收稿日期: 2024-09-13; 修回日期: 2025-03-29; * 通信联系人, E-mail: 1367483620@qq.com

基金项目: 河南省自然科学基金项目(242300420606); 河南省烟草公司信阳市公司科技创新项目(信阳优质烟土壤微生物生态调控菌剂的开发与应用, 30802153)

作者简介: 史明子(1993—), 女, 黑龙江五大连池人, 讲师, 博士, 主要从事微生物与植物互作研究; 崔光周(1977—), 男, 河南信阳人, 农艺师, 硕士, 主要从事烟叶生产科研工作。

引用格式: 史明子, 张森, 张警予, 等. 异化硝酸盐还原为铵功能菌株的筛选及产铵能力的优化[J]. 信阳师范大学学报(自然科学版), 2025, 38(3): 325-334.

SHI Mingzi, ZHANG Sen, ZHANG Jingyu, et al. Screening of functional strains of dissimilatory nitrate reduction to ammonium and optimization of ammonium production capacity[J]. Journal of Xinyang Normal University (Natural Science Edition), 2025, 38(3): 325-334.

0 引言

我国种植业普遍存在氮肥过度施用问题,导致氮素大量流失,对环境造成严重压力^[1]。据统计,2022年我国农用氮肥(折纯量)施用量高达约1.65亿吨,然而氮肥利用率不足50%^[2],大量氮素通过硝态氮淋溶、氮氧化物排放等途径流失。第一次全国污染普查数据显示,我国种植业氮素流失量占全国氮素总流失量的34%^[3],其中土壤硝态氮损失在各种形态氮损失中占比最高。农田氧化亚氮排放是温室效应加剧和大气雾霾形成的重要来源之一^[4],而土壤氮素流失和氧化亚氮排放与硝酸盐还原过程密切相关^[3,5]。当前针对氮素流失的调控主要集中于硝化抑制剂施用和反硝化过程抑制,但这些方法存在成本高、环境风险大等问题,且未能解决氮素循环中“氮素保留”这一核心矛盾。

硝酸盐还原过程主要分为同化型硝酸盐还原和异化型硝酸盐还原两大类^[6]。其中,同化型硝酸盐还原是指硝酸盐在生物体内被还原为氨,并进一步参与氨基酸等含氮有机物的合成过程^[7]。这一过程在生物体内具有重要的生理意义,主要体现在氮的同化作用上,即将无机形态的氮(如硝酸盐)转化为有机形态的氮(如氨基酸)。同化型硝酸盐还原是植物和微生物获取氮素的关键途径之一,其显著特征是在还原过程中不会向外界环境释放铵态氮,所有还原产物均被用于细胞内的氮代谢。异化型硝酸盐还原过程又分为反硝化作用(DEN)和硝酸盐异化还原为铵作用(DNRA)^[8]。反硝化作用是能够将硝酸盐(NO_3^- -N)依次还原为亚硝酸盐(NO_2^- -N)、一氧化氮(NO)、一氧化二氮(N_2O)和氮气(N_2)的过程^[9]。DEN是造成土壤氮肥大量流失的重要原因^[10]。而硝酸盐异化还原为铵作用能够将 NO_3^- -N还原为 NO_2^- -N,然后生成铵态氮(NH_4^+ -N),该途径有利于土壤氮素的保留^[11]。现有研究多聚焦于反硝化过程调控,而对DNRA关注不足。

1938年,DNRA过程就首次在自养土壤生物中被发现^[12],现已被认为是陆地和水生生态系统中全球生物地球化学氮循环的重要组成部分。2015年,荷兰的VAN DEN BERG^[13]首次使用恒化器的方法成功地富集到了DNRA菌群,并通过凝胶电泳分析,确认其功能菌类型为*Geobacter*,从

而为DNRA的实际应用提供了重要的理论支撑。韦宗敏^[14]、刘佳等^[15]通过从生物膜上提取DNRA菌株假单胞菌属*Pseudomonas alcaliphila*,并研究了它们的各种理化特征,例如碳氮比、温度和pH值等,以深入了解它们的作用。

我国学者近年来对于DNRA菌的研究主要集中在南方红树林、河口、湿地以及水稻田等生态系统,探索了DNRA过程在不同生境中的活性、对硝酸盐还原的贡献率及环境因素对其的影响^[16-17]。DNRA根据电子供体的不同分为自养型和异养型两类,大多数的DNRA菌属于异养型,需要碳源来提供电子供体^[18]。按照呼吸类型的不同又可分为微好氧菌、好氧菌、兼性厌氧菌和厌氧菌,其中DNRA菌以兼性厌氧菌最为广泛^[19-20]。另外有研究者发现在已知的厌氧氨氧化菌*Candidatus Jettenia caeni*检测到DNRA菌的功能基因*nrfA*,并且观测到*Candidatus Jettenia caeni*能够产生 NH_4^+ -N,说明*Candidatus Jettenia caeni*在特定条件下也能够进行DNRA过程^[21]。然而,目前DNRA研究仍然存在3个关键瓶颈问题:(1)已知DNRA功能菌株多分离自水生系统,对农田土壤特别是水稻土适应性差;(2)环境因子对DNRA菌株产铵效率的影响规律不明确;(3)缺乏针对淹水土壤的DNRA菌株定向筛选方法。

本研究以此为切入点,鉴于DNRA过程在厌氧或微氧环境下极易发生,而淹水水稻田是典型的农田厌氧环境,故以淹水水稻土壤为材料,致力于筛选出DNRA能力较强的功能菌株。进一步探究不同培养条件对DNRA功能菌株产铵能力的影响,期望借此提高功能菌株的氮素保留能力。本研究不仅能丰富土壤固氮菌种质资源,更为开发利用高效水稻土壤DNRA生物固氮技术奠定基础,有望为解决我国种植业氮素流失问题提供新的思路与方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 水稻土壤和菌种来源

水稻土壤取自信阳市罗山县楠杆镇淹水水稻田,并从水稻土壤中富集筛选菌群。

1.1.2 培养基

Giltay培养基:A溶液为 KNO_3 1.0 g、1% BTB乙醇溶液5.0 mL、蒸馏水500 mL;B溶液为

柠檬酸钠 8.5 g、 KH_2PO_4 1.0 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g、蒸馏水 500 mL。混合 A、B 溶液调节 pH 值为 7, 115 °C 灭菌 15 min。固体培养基加入琼脂。

Giltay 培养基基础液: KNO_3 1.0 g、 KH_2PO_4 1.0 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g、蒸馏水 1000 mL。

LB 培养基: 牛肉膏 0.5 g、酵母膏 0.5 g、蛋白胨 1.0 g、葡萄糖 0.5 g、NaCl 0.5 g、琼脂 1.5 g、蒸馏水 100 mL。115 °C 灭菌 30 min。

1.1.3 试剂

2 mol/L NaOH 溶液, 1 mol/L HCl 溶液, 10% 的硫酸锌溶液, 纳氏试剂(定性检测 NH_4^+ -N 的含量)。

称取 16 g NaOH 溶于 50 mL 水中, 完全冷却至室温。再称取 7 g KI 和 10 g HgI_2 溶于 20 ~ 40 mL 去离子水中, 边搅拌边缓慢加入 NaOH 溶液中, 用水定容至 100 mL, 贮存于瓶中备用。

酒石酸钾钠溶液: 称取 50 g 的酒石酸钾钠溶于 100 mL 水中, 用微波炉加热煮沸, 除去溶液中的氨气, 冷却至室温后定容至 100 mL, 储存在瓶中备用。

0.8% 的氨基磺酸溶液。

1.2 实验方法

1.2.1 DNRA 功能菌的富集

取 10 g 土壤溶于 90 mL 无菌水中, 30 °C, 220 r/min 振荡 30 min。无菌条件下取 10 mL 土壤悬浊液加入灭菌备用的 Giltay 培养基 150 mL, 30 °C, 140 r/min, 振荡培养 72 h, 得到蓝色培养液。在超净工作台中, 用接种环从培养液中取一环菌液, 在未添加 BTB 乙醇溶液的 Giltay 培养基琼脂平板上进行划线分离。再将平板放置于 30 °C 生化培养箱中培养 2~3 d。将该平板存放于 4 °C 冰箱中保藏, 随后平板上有大量白色结晶析出。

1.2.2 DNRA 功能菌的筛选

刮取能够析出晶体的平板菌落, 在 Giltay 培养基中进行培养, 富集得到混合菌群。用接种环将混合菌群在 Giltay 平板上进行划线分离。得到能够使培养基变蓝的细菌, 将此类细菌利用划线分离法接种于未加 BTB 乙醇溶液的 Giltay 平板上。然后将平板置于 30 °C 的恒温箱培养 2~3 d。当平板上出现菌落时, 挑选单菌落, 采用平板划线分离法划 Giltay 琼脂平板, 同样条件培养 1~2 d。挑取

单菌落, 经多次平板划线法分离纯化, 直到菌种镜检为单一菌种后制作细菌斜面、保存。

1.2.3 DNRA 功能菌能力的测定

从斜面刮取少许新鲜菌种, 接种于液体 Giltay 培养基中。培养瓶在摇床中以 28 °C、140 r/min 做序批式培养实验, 每隔 8 h 取样进行以下分析。

采用紫外分光光度计法, 测定菌液的 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 值。将所测得的一组 OD 值与相应的培养时间作图, 绘制不同培养条件下 DNRA 功能菌株的生长曲线。

采用紫外分光光度法测定 NO_3^- -N 含量^[22]。将菌悬液离心, 取 1 mL 上清液加入 50 mL 比色管中, 用去离子水定容至 50 mL。混匀后依次加入 1 mL HCl (1 mol/L)、0.1 mL (0.8%) 氨基磺酸溶液, 混匀后, 分别测定 $\text{OD}_{220\text{nm}}$ 及 $\text{OD}_{275\text{nm}}$ 值, 最终校准后吸光值 $A_{\text{校准}} = \text{OD}_{220\text{nm}} - 2 \times \text{OD}_{275\text{nm}}$ 。

NO_3^- -N 标准曲线的绘制: 分别取 0.50、1.00、2.00、3.00、4.00 mL 的硝酸盐标准储备液(优级纯硝酸钾), 并用去离子水定容至 200 mL, 其浓度分别为 0.25、0.50、1.00、1.50、2.00 mg/L 硝态氮, 分别测定 $\text{OD}_{220\text{nm}}$ 及 $\text{OD}_{275\text{nm}}$, 按照上述方法计算校准后的吸光值, 绘制标准曲线(图 1)。

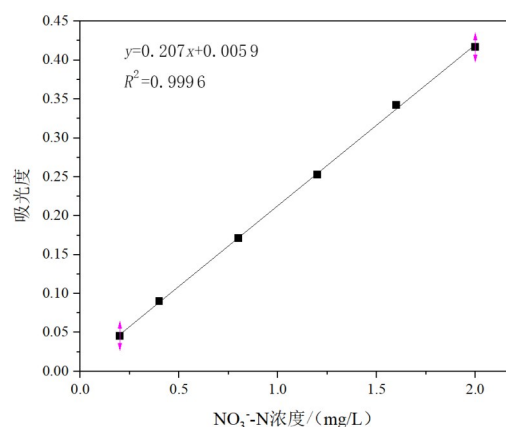
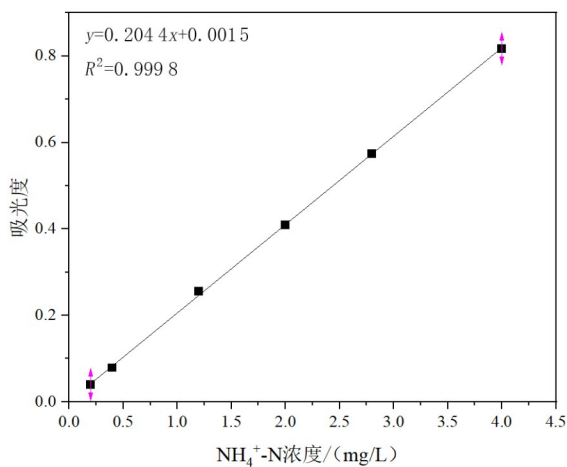


图 1 NO_3^- -N 标准曲线

Fig. 1 Standard curve of NO_3^- -N

采用纳氏试剂法测定 NH_4^+ -N 含量^[22]: 取 1 mL 上清液加入 50 mL 比色管中, 用去离子水定容至 50 mL。混匀后依次加入 1 mL 50% 酒石酸钾钠和 1.5 mL 纳氏试剂。混匀静置 10 min, 测定 $\text{OD}_{420\text{nm}}$ 。

标准曲线绘制: 用优级纯氯化铵制备标准曲线(图 2), 具体方法参照 NO_3^- -N 标准曲线的绘制。

图2 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 标准曲线Fig. 2 Standard curve of $\text{NH}_4^+\text{-N}$

1.2.4 细菌染色及形态学鉴定

在光学显微镜下观察细胞形态,并测定细胞大小,采用常规染色方法对分离菌株进行革兰氏染色和芽孢染色。

1.2.5 细菌DNA提取扩增和测序

提取功能细菌总DNA作为PCR扩增的模板。用于16S rDNA PCR扩增反应的引物为通用引物,27F(5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')和1492R(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')。反应总体系为20 μL :2 \times Taq酶12.5 μL ,引物27F和1492R各1 μL ,模板DNA 1 μL ,ddH₂O 9.5 μL 。PCR扩增程序有4步:(1)95 $^{\circ}\text{C}$,3 min;(2)95 $^{\circ}\text{C}$,30 s;55 $^{\circ}\text{C}$,30 s;72 $^{\circ}\text{C}$,3 min;(3)第二步循环35次;(4)72 $^{\circ}\text{C}$,10 min。引物的合成及PCR产物的测序由上海生工测序公司完成。

1.2.6 不同环境因子对DNRA功能菌产铵能力的影响

以硝酸盐为唯一氮源,采用单一变量法利用Giltay培养基测定菌株在不同碳源(柠檬酸钠、乙酸钠、酒石酸钾钠)、不同初始pH(5、7、10)、不同碳氮比(10.00、17.18、25.00),180 r/min振荡培养48 h的氮代谢情况,每8 h取样测定OD_{600nm}、NO₃⁻-N和NH₄⁺-N含量,探究不同的环境因子对DNRA功能菌产铵能力的影响。由于在相同碳氮比下,存在碳源与氮源浓度的差别。因此本研究在相同碳氮比情况下,分别设置了两种碳源与氮源添加的方式(根据物质分子量中碳或氮占的百分比计算添加量,表1),来探究相同碳氮比,不同碳源或氮源浓度下菌株产铵能力的强弱。

表1 不同碳氮比实验设置

Tab. 1 Experimental Settings of different carbon nitrogen ratios

碳氮比	实验组	KNO ₃ 添加量/(g/L)	柠檬酸钠添加量/(g/L)
17.18(基础)	CK	1.00	8.5
10.00	①	1.72	8.50
	②	1.00	4.95
25.00	①	0.69	8.50
	②	1.00	12.37

2 结果

2.1 混菌生长及晶体析出现象

混合菌群在Giltay琼脂平板上利用硝酸盐为氮源、柠檬酸钠为碳源进行生长,将硝酸盐还原为铵。在28 $^{\circ}\text{C}$ 培养48 h后存放在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下观察到晶体析出现象(图3)。最初,混合细菌的琼脂平板上无法观察到明显晶体析出现象;而经低温驯化后,混合菌群在琼脂平板上则析出具有三维空间的针状的晶体聚集在琼脂层中部。通过将纳氏试剂滴加在晶体上的颜色变化,判定以上晶体含有铵盐。通过长期的试验观察和多次的试验发现,只有将生长有该混合菌群的Giltay平板保存在低温条件下,才可能有铵晶体的析出,晶体出现的时间在低温培养后的3~5 d到2周不固定。

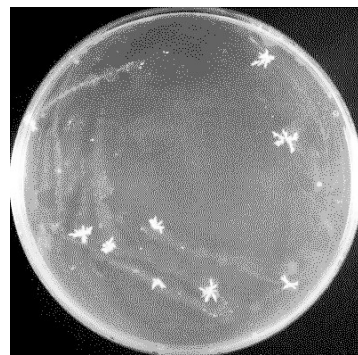


图3 混合菌群晶体析出现象

Fig. 3 The phenomenon of crystal precipitation of mixed flora

2.2 不同细菌产铵能力的比较及功能菌株的筛选

将混合菌液在固体平板(添加BTB)上进行平板划线,划线后的固体平板放置于培养箱中进行培养,筛选能使培养基变蓝的菌落,采用平板划线法从中挑选菌种,得到S1、S2、S3、S5、Y4、Y7、Y8、

Y15、Y18等9个菌株,最后甘油低温保存备用。

分别对9株菌的OD_{600nm}和产铵能力进行测定。9个菌株在生长情况良好,且均具有将硝酸盐异化还原的功能(表2、表3),其中,S2菌株对

NO₃⁻-N的利用最高且产铵能力最强(表3、表4),培养液中NH₄⁺-N的浓度可达25.95 mg/L(表4)。因此,以S2菌株作为后续研究对象。

表2 功能菌株48 h内生长情况(OD_{600nm})

Tab. 2 Growth rules of functional strains within 48 h (OD_{600nm})

菌株	0 h	8 h	16 h	24 h	32 h	40 h	48 h
S1	0.012±0.020	0.424±0.050	1.168±0.048	1.381±0.033	1.361±0.016	1.442±0.024	1.357±0.047
S2	0.018±0.016	0.250±0.017	1.429±0.067	1.567±0.100	1.724±0.160	1.735±0.020	1.520±0.056
S3	0.019±0.002	0.658±0.024	1.491±0.075	1.614±0.072	1.773±0.028	1.759±0.036	1.704±0.078
S5	0.031±0.003	0.741±0.050	1.222±0.090	1.526±0.141	1.474±0.294	1.783±0.090	1.587±0.034
Y4	0.009±0.002	0.288±0.010	1.045±0.038	1.194±0.071	1.219±0.044	1.427±0.291	1.341±0.118
Y7	0.021±0.003	0.357±0.045	1.065±0.047	1.391±0.038	1.379±0.113	1.356±0.090	1.285±0.166
Y8	0.024±0.003	0.227±0.096	1.219±0.052	1.186±0.123	1.272±0.027	1.428±0.108	1.328±0.213
Y15	0.009±0.002	0.239±0.278	1.298±0.006	1.540±0.078	1.598±0.132	1.501±0.201	1.398±0.070
Y18	0.023±0.002	0.253±0.048	1.054±0.007	1.082±0.122	1.557±0.105	1.491±0.281	0.888±0.019

表3 功能菌株48 h内NO₃⁻-N还原能力

Tab. 3 NO₃⁻-N reduction capacity of functional strain within 48 h

mg/L

菌株	0 h	8 h	16 h	24 h	32 h	40 h	48 h
S1	176.43±4.770	141.65±4.650	70.15±4.156	18.86±5.626	4.29±3.424	0.00±0.000	11.62±1.651
S2	146.03±2.202	132.66±2.691	9.87±4.892	8.00±2.691	5.84±2.202	3.01±3.307	2.74±0.122
S3	157.54±6.932	138.54±4.718	56.94±4.476	10.36±1.309	2.83±0.015	3.17±0.028	9.06±0.153
S5	146.80±1.560	109.12±2.450	94.07±1.249	17.44±7.062	17.28±0.067	1.26±0.031	4.64±0.019
Y4	167.90±2.108	152.60±4.030	50.19±0.108	11.12±1.807	15.46±0.042	14.22±0.200	7.65±0.067
Y7	175.87±3.439	104.13±8.210	12.75±1.778	15.31±3.635	17.45±6.711	7.33±0.039	8.46±0.049
Y8	172.25±1.356	151.71±8.163	6.95±0.181	21.48±0.029	12.25±0.031	6.40±0.033	4.86±0.064
Y15	159.11±1.165	153.35±3.405	16.16±0.671	8.44±1.135	11.49±1.142	11.86±1.917	4.29±0.037
Y18	169.99±2.219	134.65±9.456	17.74±1.086	15.95±0.040	9.54±0.049	8.11±0.033	12.11±0.057

表4 功能菌株48 h内产NH₄⁺-N能力

Tab. 4 NH₄⁺-N production capacity of functional strain within 48 h

mg/L

菌株	0 h	8 h	16 h	24 h	32 h	40 h	48 h
S1	6.71±0.837	6.38±0.656	6.63±0.397	8.83±0.005	8.79±0.002	10.09±0.010	9.23±0.010
S2	3.04±0.002	6.54±0.025	21.47±0.039	25.95±0.038	13.31±0.069	11.76±0.069	10.99±0.004
S3	4.99±0.027	7.32±0.036	9.11±0.058	5.81±0.039	5.97±0.044	11.44±0.103	11.07±0.117
S5	4.34±0.048	3.49±0.037	5.85±0.026	8.46±0.098	8.05±0.038	8.34±0.064	7.36±0.018
Y4	5.85±0.044	4.26±0.079	7.36±0.088	6.26±0.085	4.38±0.020	5.57±0.087	6.14±0.097
Y7	7.44±0.024	14.05±0.079	16.37±0.041	8.05±0.095	13.07±0.079	11.64±0.023	18.00±0.047
Y8	4.75±0.035	4.79±0.109	12.50±0.164	15.64±0.182	18.20±0.091	10.91±0.085	12.01±0.097
Y15	4.75±0.124	6.87±0.132	16.61±0.111	19.92±0.095	8.58±0.031	8.50±0.076	6.18±0.117
Y18	5.24±0.066	10.09±0.109	12.41±0.140	22.08±0.408	11.23±0.039	21.87±0.136	10.17±0.217

2.3 功能菌的鉴定

经富集培养、分离筛选,获得具有硝酸盐异化还原为铵的最佳的功能细菌 S2。菌株 S2 的菌落为灰白色,菌落边缘整齐,表面光滑,中间凸起,菌体呈杆状,革兰氏染色为红色,为革兰氏阴性菌(图 4)。

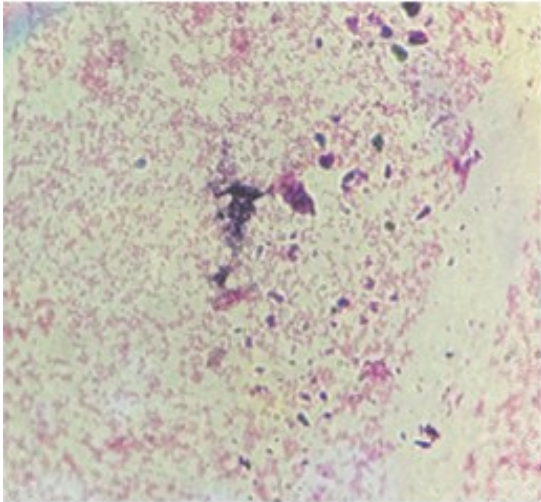


图 4 菌株 S2 革兰氏染色结果

Fig. 4 Gram staining results of strain S2

将菌株 S2 的 16S rDNA 的序列通过 NCBI GENBANK 中数据库进行对比分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)。菌株 S2 与 *Enterobacteria asburise* 的模式株的相似性高达 100%。根据上述生理生化特征、形态特征和 16S rDNA 的序列测试

比对结果,菌株 S2 被鉴定为 *Enterobacter asburiae* (图 5)。

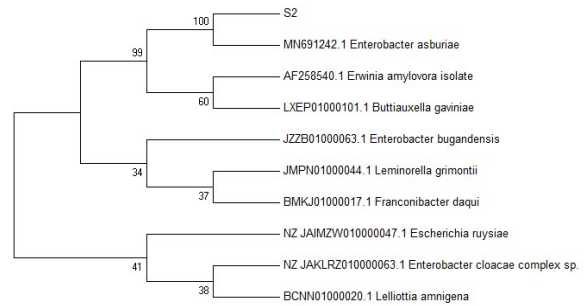


图 5 菌株 S2 系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of strain S2

2.4 培养条件对硝酸盐还原为铵功能菌产铵能力的影响

2.4.1 不同碳源条件下 *Enterobacter asburiae* S2 硝酸盐异化还原为铵的能力

如图 6 所示,当以柠檬酸钠作为碳源时, *Enterobacter asburiae* S2 能够快速生长, OD_{600} 在接种 32 h 达到最大值,并且其产铵量最高,为 25.95 mg/L,远高于其他两种碳源;而 S2 在以乙酸钠为碳源的培养基中生长速度缓慢,在 32 h 之后其 OD 值才明显升高,其硝酸盐消耗量也增加,但是铵态氮产量仅为 4 mg/L;以酒石酸钾钠为碳源时,菌株生长极慢,硝酸盐消耗少,几乎不具备产铵能力。以上结果表明, *Enterobacter asburiae* S2 最适碳源为柠檬酸钠。

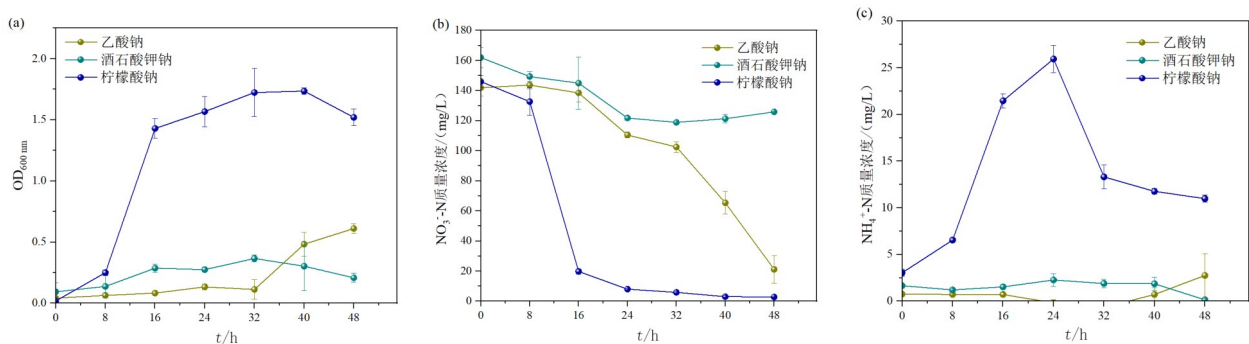


图 6 不同碳源对 *Enterobacter asburiae* S2 生长及产铵能力的影响

Fig. 6 Effect of different carbon sources on the growth and ammonium production capacity of *Enterobacter asburiae* S2

2.4.2 不同初始 pH 条件下 *Enterobacter asburiae* S2 硝酸盐异化还原为铵的能力

研究表明, pH 值对 *Enterobacter asburiae* S2 的生长有显著影响,如图 7 所示, pH=7 的环境更有利于菌株的 *Enterobacter asburiae* S2 生长。在培养 16 h 之前,菌株均呈快速增长状态,在培养

32 h 时,菌株生长浓度最大,到达平台期。

在 pH=7 的环境下, *Enterobacter asburiae* S2 的 NH_4^+-N 产量最高,最高达到 25.95 mg/L。尤其当 pH=7 时, NH_4^+-N 的产量最高,在第 8 h NH_4^+-N 开始大量积累,最大产铵量为 25.95 mg/L,而 pH=10 的环境下该菌株的产铵量很少,

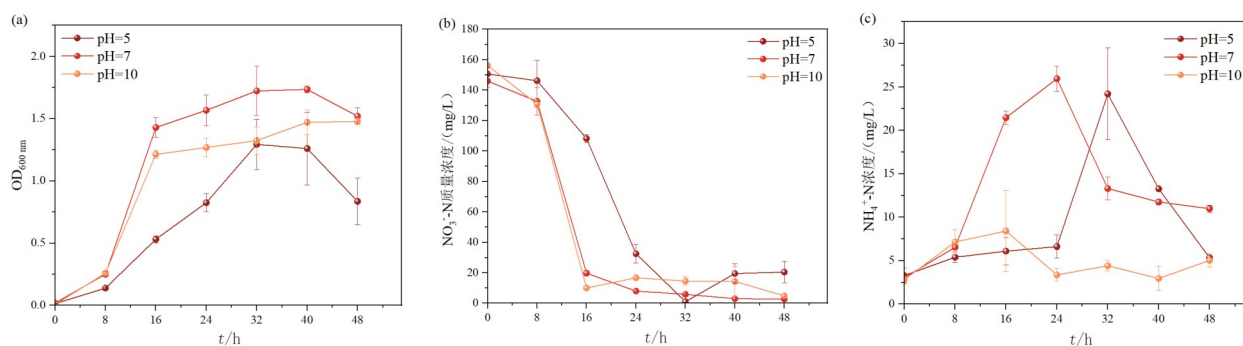


图7 不同pH值对*Enterobacter asburiae* S2生长及产铵能力的影响

Fig. 7 Effect of different pH on the growth and ammonium production ability of *Enterobacter asburiae* S2

仅为6 mg/L。

以上结果表明,在碱性环境下 *Enterobacter asburiae* S2 的 DNRA 功能被抑制,菌株 *Enterobacter asburiae* S2 在弱酸性和中性环境下的产铵率高于碱性环境。

2.4.3 不同碳氮比条件下 *Enterobacter asburiae* S2 硝酸盐异化还原为铵的能力

不同碳氮比实验结果如图8所示,结果表明在相同氮源添加量,不同碳氮比的实验处理中即:碳氮比为10②和碳氮比为25②,结果显示与低碳氮

比为10②相比高碳氮比为25②处理下细菌浓度和铵态氮产量更高;在相同碳源添加量,不同碳氮比实验处理中即:碳氮比为10①和碳氮比为25①,结果显示,与低碳氮比为10①相比,高碳氮比为25①相比,高碳氮比为25②处理下细菌浓度和铵态氮产量更高。由上可知,*Enterobacter asburiae* S2 在碳氮比为25和碳氮比为17.18的培养基中的产铵能力更强,在碳源充足,氮源减少,而维持碳氮比为25的条件下,菌株的产铵量最高,达到34.84 mg/L。

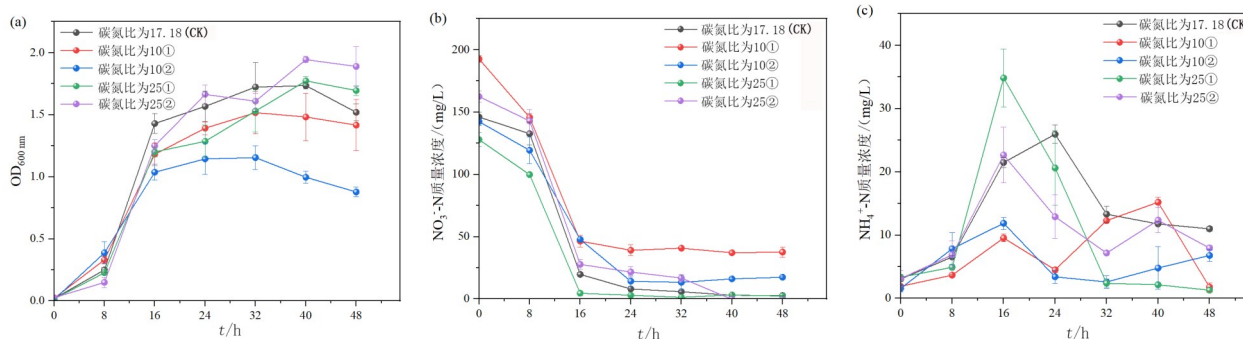


图8 不同碳氮比对*Enterobacter asburiae* S2生长及产铵能力的影响

Fig. 8 Effect of different C/N on the growth and ammonium production capacity of *Enterobacter asburiae* S2

3 结论与讨论

对水稻土壤中能够进行硝酸盐异化还原为铵的功能微生物进行探讨,采用以硝酸盐为唯一氮源的Giltay培养基进行培养,通过对水稻土壤中微生物进行筛选,得到1株产铵能力较强的功能菌,经鉴定其为阿斯布里肠杆菌 (*Enterobacter asburiae*)。

在异化硝酸盐还原的研究领域,肠杆菌属中的 *Enterobacter asburiae* 作为无芽孢杆菌,具有对环境无污染的特性,其在植物相关领域的作用已

有所研究,主要体现在促进植物生长、增强植物抗逆性以及植物病害防治方面。例如,文献[23] *Enterobacter asburiae* L3R3-1 对柑橘树脂病具备较好的防治效果, *Enterobacter asburiae* L95 能够有效防止作物细菌性软腐病^[24]。此外,肠杆菌科的其他成员已被证实具有 DNRA 功能^[25],然而,关于 *Enterobacter asburiae* 在 DNRA 这一过程的功能尚无相关研究。本研究中的 *Enterobacter asburiae* S2 菌株,系首次被证实具备 DNRA 功能。经对环境因素进行优化后,该菌株产铵能力最高可达 34.84 mg/L。与现有文献中肠杆菌科其

他具有 DNRA 功能的菌种相比, *Enterobacter asburiae* S2 的优势在于其对环境无污染的特性, 这在环境友好型农业及相关领域具有潜在应用价值。不过, 目前对于 *Enterobacter asburiae* S2 在异化硝酸盐还原过程中的作用机制研究尚不够深入, 与已知高效 DNRA 菌株相比, 其产铵能力提升空间的探索也有待加强, 这将是后续研究中需要重点关注并进一步完善之处。

具有 DNRA 功能的菌株能够利用多种有机物作为碳源, 而碳源种类差异会对 DNRA 过程产生不同的影响。在 DNRA 过程中, 碳源主要起到为代谢提供所需能量以及作为代谢过程中电子供体的关键作用^[26]。已有研究报道指出, 在以易发酵有机物作为碳源的反应体系中, DNRA 过程更易于发生^[27]; 与之相反, 反硝化过程则更倾向于利用挥发性酸及盐等不易发酵的底物^[28]。例如, 唐婧等^[29]从处理高盐废水的生物接触氧化池的活性污泥中成功分离出一株好氧反硝化假单胞菌 F10, 并证实了在以乙酸钠为碳源条件下, 该菌株的反硝化脱氮速率最快。

土壤 pH 值也是影响 DNRA 速率的一个关键因素。对污水湖进行 DNRA 相关研究时发现, DNRA 速率与 pH 值呈现出负相关关系^[23]。而 ZHANG 等^[30]在水稻土中开展不同 pH 条件对 DNRA 影响的研究时则发现, 在中性条件下, DNRA 能够较好地发挥氮保留的作用。这表明在不同的土壤环境中, pH 值对 DNRA 的影响存在明显差异。

碳氮比是影响 DNRA 过程的重要因素。SILVER 等^[31]运用 ¹⁵N 同位素标记法对热带森林土壤中 DNRA 的速率进行测定, 证实了可利用的 NO₃⁻-N 以及有机碳源是影响 DNRA 的主要因

素; RUTTIN 等^[32]通过微生物技术和 ¹⁵N 示踪技术对土壤中的 DNRA 过程展开研究, 发现碳氮比是 DNRA 过程最为关键的调控因子; LU 等^[33]在温室栽培蔬菜土壤的研究中发现, 提高土壤中有机碳与硝酸盐的比值能够有效提升 DNRA 速率。

与上述现有文献的研究结果相比, 本研究中的 *Enterobacter asburiae* S2 菌株展现出了独特的特性。*Enterobacter asburiae* S2 菌株生长的最适碳源为柠檬酸钠, 这与部分文献中提到的其他碳源情况不同, 说明 S2 菌株对碳源的偏好具有特异性。其最适 pH 值为 7.0, 处于中性范围, 与 ZHANG 等^[30]在水稻土中发现的中性条件利于 DNRA 发挥氮保留作用相契合, 但在最适 pH 值的具体数值上可能存在一定差异, 这或许与菌株自身特性以及实验环境等因素有关。此外, S2 菌株的最适碳氮比为 25(氮源限制), 在此条件下, 菌株 S2 生长速度最快, 产铵量最大, 可达 34.84 mg/L。相较于其他文献中关于 DNRA 功能菌的产铵能力描述, S2 菌株在适宜条件下的产铵能力具有一定优势, 这体现了该菌株在异化硝酸盐还原方面的潜在应用价值。然而, 菌株 *Enterobacter asburiae* S2 也存在一些不足之处。尽管其具有较好的产铵能力, 但目前对于该菌株 DNRA 的具体作用机制尚未完全明晰, 与其他已知 DNRA 功能菌的作用机制对比研究也相对缺乏。同时, 在实际应用方面, 虽然其具备较大的研发应用潜力, 但在不同复杂环境中的适应性以及大规模应用的可行性等方面仍有待进一步探索和验证。综上所述, 菌株 *Enterobacter asburiae* S2 作为 DNRA 功能菌, 具有较好的产铵能力, 具备较大的研发应用潜力, 但其 DNRA 作用机制及实际应用还有待深入探索。

参考文献:

- [1] 单立楠. 不同施肥模式下菜地氮素面源污染特征及生态拦截控制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
SHAN Linan. Nitrogen non-point source pollution of vegetable field under different fertilizer treatments and its ecological intercept control[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2015.
- [2] 张建军, 党翼, 赵刚, 等. 控释尿素掺混比例对旱地玉米产量、无机氮含量及氮肥利用率的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2023, 29(6): 1025-1036.
ZHANG Jianjun, DANG Yi, ZHAO Gang, et al. Effects of blend ratio of controlled-release urea and normal urea on yield, inorganic nitrogen content and nitrogen use efficiency of spring maize in the dryland area of eastern Gansu province [J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2023, 29(6): 1025-1036.
- [3] 《我国水稻施氮限量》编制组. 农业行业标准《我国水稻施氮限量》[EB/OL]. (2021-04-20)[2024-07-19]. <https://www.iarrp.cn/docs/2021-04/20210415154918269026.pdf>.
Compilation team of "Nitrogen Application Limits for Rice in China". Agricultural industry standard "Nitrogen

- Application Limits for Rice in China”[EB/OL]. (2021-04-20)[2024-07-19]. <https://www.iarrp.cn/docs/2021-04/20210415154918269026.pdf>.
- [4] 李玥, 巨晓棠. 农田氧化亚氮减排的关键是合理施氮[J]. 农业环境科学学报, 2020, 39(4): 842-851.
LI Yue, JU Xiaotang. Rational nitrogen application is the key to mitigate agricultural nitrous oxide emission [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2020, 39(4): 842-851.
- [5] ZHU Bo, YAO Zhiyuan, HU Dongni, et al. Effects of substitution of mineral nitrogen with organic amendments on nitrogen loss from sloping cropland of purple soil[J]. Frontiers of Agricultural Science and Engineering, 2022, 9(3): 396-406.
- [6] 单晓雨, 张萌, 郑平. Nar与Nxr: 氮素循环中微生物关键酶研究进展[J]. 科技通报, 2016, 32(7): 202-206.
SHAN Xiaoyu, ZHANG Meng, ZHENG Ping. Nar and Nxr: Key enzymes in microbiological nitrogen cycle [J]. Bulletin of Science and Technology, 2016, 32(7): 202-206.
- [7] 李子玮. 植烟土壤氮循环功能基因丰度特征研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2021.
LI Ziyi. Study on abundance characteristics of nitrogen cycle functional genes in tobacco-growing soil [D]. Henan: Henan Agricultural University, 2021.
- [8] 胡晓婷, 程吕, 林贤彪, 等. 沉积物硝酸盐异化还原过程的温度敏感性与影响因素: 以长江口青草沙水库为例[J]. 中国环境科学, 2016, 36(9): 2624-2632.
HU Xiaoting, CHENG Lv, LIN Xianbiao, et al. Temperature sensitivity and controlling factors of dissimilatory nitrate reduction processes in sediments of Qingcaosha reservoir, Yangtze Estuary [J]. China Environmental Science, 2016, 36(9): 2624-2632.
- [9] 张志君, 秦树平, 袁海静, 等. 土壤氮气排放研究进展[J]. 中国生态农业学报, 2018, 26(2): 182-189.
ZHANG Zhijun, QIN Shuping, YUAN Haijing, et al. Advance in soil dinitrogen emission [J]. Chinese Journal of Ecological Agriculture, 2018, 26(2): 182-189.
- [10] 刘佳, 李大平, 刘强, 等. 一株好氧DNRA细菌的分离鉴定及其诱导的生物矿化[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2008, 45(3): 651-655.
LIU Jia, LI Daping, LIU Qiang, et al. Identification of dissimilatory nitrate reduction to ammonium bacterium and biomineralization [J]. Journal of Sichuan University (Natural Science Edition), 2008, 45(3): 651-655.
- [11] 洪璇. 九龙江河口微生物多样性及一株异养硝化菌脱氮特性研究[D]. 泉州: 华侨大学, 2017.
HONG Xuan. Diversity of microorganisms in Jiulong river estuary and characteristics of nitrogen removal of a strain of heterotrophic nitrifying bacteria [D]. Quanzhou: Huaqiao University, 2017.
- [12] WOODS D D. The reduction of nitrate to ammonia by *Clostridium welchii* [J]. The Biochemical Journal, 1938, 32 (11): 2000-2012.
- [13] VAN DEN BERG E M, VAN DONGEN U, ABBAS B, et al. Enrichment of DNRA bacteria in a continuous culture [J]. The ISME Journal, 2015, 9(12): 2749.
- [14] 韦宗敏. 微好氧环境中硝酸盐异化还原成铵的影响研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2012.
WEI Zongmin. Preliminary research on dissimilatory nitrate reduction to ammonium in microaerobic condition [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012.
- [15] 刘佳. 微生物好氧硝酸盐还原产铵研究[D]. 成都: 四川大学, 2007.
LIU Jia. Preliminary research on aerobic and dissimilatory nitrate reduction to ammonium by bacteria [D]. Chengdu: Sichuan University, 2007.
- [16] CAO Wenzhi, YANG Jingxin, LI Ying, et al. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium conserves nitrogen in anthropogenically affected subtropical mangrove sediments in southeast China [J]. Marine Pollution Bulletin, 2016, 110 (1): 155-161.
- [17] SHAN Jun, ZHAO Xu, SHENG Rong, et al. Dissimilatory nitrate reduction processes in typical Chinese paddy soils: Rates, relative contributions, and influencing factors [J]. Environmental Science & Technology, 2016, 50(18): 9972-9980.
- [18] 卜翠娜. 异化硝酸盐还原菌(DNRA)的环境分布及富集培养研究[D]. 济南: 山东大学, 2018.
BU Cuina. Study on environmental distribution and enrichment culture of dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) bacteria [D]. Jinan: Shandong University, 2018.
- [19] 李倩霞. 异化硝酸盐还原菌(DNRA)对不同碳源的适应性及其在自然环境中的分布研究[D]. 济南: 山东大学, 2020.
LI Qianxia. Study on the adaptability of DNRA to different carbon sources and distribution in natural environment [D]. Jinan: Shandong University, 2020.

- [20] JIANG Xingyu, GAO Guang, ZHANG Lu, et al. Denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium in freshwater lakes of the Eastern Plain, China: Influences of organic carbon and algal bloom[J]. *The Science of the Total Environment*, 2020, 710: 136303.
- [21] ALI M, OSHIKI M, AWATA T, et al. Physiological characterization of anaerobic ammonium oxidizing bacterium “*Candidatus Jettenia caeni*”[J]. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(6): 2172-2189.
- [22] 国家环保局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法[M]. 3版. 北京: 中国环境科学出版社, 1989.
Editorial Committee of the National Environmental Protection Administration’s “Monitoring and Analysis Methods for Water and Wastewater”. *Analytical methods for water and wastewater monitoring* [M]. 3rd ed. Beijing: China Environmental Science Press, 1989.
- [23] 王剑峰, 董飞, 董丹, 等. 半夏内生菌 L3R3-1 鉴定及其对植物病原菌的拮抗特性[J]. *植物保护学报*, 2011, 38(6): 573-574.
WANG Jianfeng, DONG Fei, DONG Dan, et al. Identification and the characteristic of antagonism of endophytic antagonistic bacteria L3R3-1 from *Pinellia ternata*[J]. *Acta Phytophylacica Sinica*, 2011, 38(6): 573-574.
- [24] 周佳暖, 刘帆, 胡明, 等. 一株阿氏肠杆菌及其在防治植物细菌性软腐病中的应用[P]. 2022-04-02.
ZHOU Jianuan, LIU Fan, HU Ming, et al. A strain of *Enterobacter Aspergillus* and its application in the control of bacterial soft rot of plants[P]. 2022-04-02.
- [25] 周利, 宋以萍, 周杰民, 等. 稻田硝酸盐异化还原成铵细菌群落结构的垂向分布特性[J]. *环境科学学报*, 2020, 40(3): 1029-1039.
ZHOU Li, SONG Yiping, ZHOU Jiemin, et al. Vertical distribution of community composition of dissimilatory nitrate reduction to ammonium bacteria in paddy soils[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2020, 40(3): 1029-1039.
- [26] 范红叶, 郑桑鹏, 许宇虹, 等. 反硝化过程中的关键影响因素: 电子供体[J]. *自然科学*, 2022, 10(5): 885-896.
FAN Hongye, ZHENG Shenpeng, XU Yuhong, et al. The key influencing factor in denitrification process: Electron donor[J]. *Natural Science*, 2022, 10(5): 885-896.
- [27] 郝婧羽. 活性污泥硝酸盐异化还原为铵(DNRA)的影响因素及DNRA-Anammox耦合机理探究[D]. 西安: 西安科技大学, 2021.
HAO Jingyu. Factors affecting nitrate isomerization and reduction to ammonium (DNRA) in activated sludge and the coupling mechanism of DNRA-Anammox[D]. Xi’an: Xi’an University of Science and Technology, 2021.
- [28] CHOI O, CHA S J, KIM H, et al. Dynamic changes of microbiome with the utilization of volatile fatty acids as electron donors for denitrification[J]. *Water*, 2021, 13(11): 1556.
- [29] 唐婧, 肖亚男, 屈姗姗, 等. 一株耐盐好氧反硝化细菌的分离鉴定及其脱氮特性[J]. *环境工程学报*, 2014, 8(12): 5499-5506.
TANG Jing, XIAO Yanan, QU Shanshan, et al. Identification and denitrification characteristics of a strain of halophilic denitrifying bacteria[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2014, 8(12): 5499-5506.
- [30] ZHANG Jinbo, LAN Ting, MÜLLER C, et al. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) plays an important role in soil nitrogen conservation in neutral and alkaline but not acidic rice soil [J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2015, 15(3): 523-531.
- [31] SILVER W L, HERMAN D J, FIRESTONE M K. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium in upland tropical forest soils[J]. *Ecology*, 2001, 82(9): 2410-2416.
- [32] RUETTING T, BOECKX P, MÜLLER C, et al. Assessment of the importance of dissimilatory nitrate reduction to ammonium for the terrestrial nitrogen cycle[J]. *Biogeosciences*, 2011, 8(7): 1779-1791.
- [33] LU Weiwei, ZHANG Hailin, MIN Ju, et al. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium in a soil under greenhouse vegetable cultivation as affected by organic amendments[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2015, 15(5): 1169-1177.

责任编辑: 任长江