



稻田土-水界面降NH₃菌株的筛选与鉴定

高帅帅, 吴民熙, 尹红梅, 喻孟元, 杜东霞, 刘标, 陈薇, 王震, 许丽娟, 吴迎奔, 李咏梅, 赵信林

引用本文:

高帅帅, 吴民熙, 尹红梅, 喻孟元, 杜东霞, 刘标, 陈薇, 王震, 许丽娟, 吴迎奔, 李咏梅, 赵信林. 稻田土-水界面降NH₃菌株的筛选与鉴定[J]. *农业环境科学学报*, 2023, 42(10): 2274–2280.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2022-1279>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

同步硝化反硝化菌(*Alcaligenes faecalis* WT14)养殖污水脱氮效果研究

陈均利, 张树楠, 戴桂金, 张苗苗, 吴金水, 刘锋

农业环境科学学报. 2020, 39(8): 1811–1817 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0325>

一株草甘膦高效降解菌的筛选和表征研究

王天廓, 温玉娟, 杨悦锁, 路莹, 张茜, 曹楠, 孙东

农业环境科学学报. 2021, 40(3): 591–599 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-1404>

水生植物对不同氮磷水平养殖尾水的综合净化能力比较

冯优, 陈庆锋, 李金业, 郭贝贝, 刘婷, 李磊

农业环境科学学报. 2020, 39(10): 2397–2408 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0816>

黄腐酸改性膨润土对氮素淋失和氮肥利用率的影响

孔柏舒, 焦树英, 李永强, 沈玉文, 李烨, 张子胥, 付春雨

农业环境科学学报. 2020, 39(10): 2371–2379 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0838>

猪粪秸秆沼液短程硝化反硝化快速启动及稳定运行研究

高兴东, 陈杨武, 付世玉, 董世阳, 周后珍, 罗娅君, 谭周亮

农业环境科学学报. 2021, 40(5): 1062–1070 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-1323>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

高帅帅, 吴民熙, 尹红梅, 等. 稻田土-水界面降NH₃菌株的筛选与鉴定[J]. 农业环境科学学报, 2023, 42(10): 2274–2280.

GAO S S, WU M X, YIN H M, et al. Screening and identification of bacteria that decrease ammonia production at the soil-water interface in a paddy field[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2023, 42(10): 2274–2280.

稻田土-水界面降NH₃菌株的筛选与鉴定

高帅帅¹, 吴民熙¹, 尹红梅¹, 喻孟元¹, 杜东霞¹, 刘标¹, 陈薇¹, 王震¹, 许丽娟¹, 吴迎奔¹, 李咏梅¹, 赵信林^{2*}

(1. 湖南省微生物研究院, 长沙 410009; 2. 中国农业科学院麻类研究所, 长沙 410205)

摘要:为筛选和鉴定稻田中具有降NH₃作用的土著菌株并评估其降NH₃效果,探讨其在水稻追施尿素中减少氮肥损失的潜力,本研究首先通过降NH₃菌株选择性培养基进行富集,然后利用平板划线法对其进行分离,进而根据细菌的降NH₃效果进行复筛,对筛选出的高效降NH₃菌株通过16S rDNA测序鉴定菌属,并对目标菌株的氮利用能力、产脲酶性能和溶血性等进行测定。结果表明:通过选择性培养基从稻田土-水界面样品中筛选出3株具有降NH₃效果的菌株,分别命名为菌Ⅰ、菌Ⅱ、菌Ⅲ。利用NH₃降低率实验进行复筛,其中菌Ⅱ的NH₃降低率最高,达到88.60%,根据形态特征和16S rDNA序列分析,鉴定菌Ⅱ为污水溶杆菌(*Lysobacter defluvii*)。将菌Ⅱ接种到富氨和富硝的培养基后,培养基铵态氮浓度从25.00 mg·L⁻¹降到9.85 mg·L⁻¹,硝态氮浓度从34.00 mg·L⁻¹降到3.85 mg·L⁻¹,降低率分别为60.60%和88.68%,表明菌Ⅱ的氨氮利用和硝态氮利用能力较好。生理生化鉴定结果显示菌Ⅱ不产生脲酶,不会加速尿素产氨,溶血实验显示菌Ⅱ不具有溶血性,对人致病能力差。研究表明,本试验所筛选的稻田土著降NH₃菌株在室内条件下具有较好的降NH₃效果,对减少稻田追施尿素引起的NH₃挥发具有较大潜力,在水稻生产中具有较大的应用前景。

关键词:稻田; 土-水界面; 降NH₃菌株; 氨; 溶杆菌

中图分类号:S154.3 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2023)10-2274-07 doi:10.11654/jaes.2022-1279

Screening and identification of bacteria that decrease ammonia production at the soil-water interface in a paddy field

GAO Shuaishuai¹, WU Minxi¹, YIN Hongmei¹, YU Mengyuan¹, DU Dongxia¹, LIU Biao¹, CHEN Wei¹, WANG Zhen¹, XU Lijuan¹, WU Yingben¹, LI Yongmei¹, ZHAO Xinlin^{2*}

(1. Hunan Institute of Microbiology, Changsha 410009, China; 2. Institute of Bast Fiber Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410205, China)

Abstract: This study aimed to screen and identify indigenous bacteria that can decrease ammonia production in a paddy field, evaluate their performance in decreasing ammonia, and explore the potential of the bacteria in reducing nitrogen loss caused by urea topdressing of rice. Bacteria capable of decreasing ammonia production were enriched in a selective medium, separated by the striaing plate method, and

收稿日期:2022-12-17 录用日期:2023-04-12

作者简介:高帅帅(1991—),女,山东乳山人,博士,助理研究员,主要从事农田氮磷养分循环研究。E-mail:ssgao1991@126.com

*通信作者:赵信林 E-mail:xlzhao1990@126.com

基金项目:湖南省农业农村厅2022年农业科研计划;中国农业科学院科技创新工程项目(CAAS-ASTIP-IBFC);湖南省自然科学基金项目(2021JJ30412);湖南省农业农村厅2021年“一化四体系”农业科研计划项目(湘农20210001);湖南省微生物研究院课题(2021zy09);长沙市科技局自然科学基金项目(kq2202329,kq2208131)

Project supported: Agriculture and Rural Department of Hunan Province 2022 Agricultural Research Program; Science and Technology Innovation Project of Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS-ASTIP-IBFC); Natural Science Foundation of Hunan Province, China (2021JJ30412); Research Foundation of Department of Agriculture and Rural Affairs of Hunan Province, China (20210001); Research Foundation of Hunan Microbiology Institute(2021zy09); Natural Science Foundation of Changsha City, China(kq2202329,kq2208131)

re-screened according to the bacteria's ammonia reduction rate. Bacteria that were highly effective in reducing ammonia were identified by 16S rDNA sequencing. Nitrogen utilization, urease production, and hemolytic properties of these bacteria were determined. Three bacterial strains (bacterium I, II, and III) capable of reducing ammonia production were screened from the surface soil near the soil-water interface of the paddy field using the selective medium. Bacterium II had the highest ammonia reduction rate (maximum 88.60%) and was identified as *Lysobacter defluvii* by morphological characterization and 16S rDNA sequence analysis. After bacterium II was inoculated into an ammonia- and nitrate-rich medium, the ammonium nitrogen concentration in the medium decreased from 25.00 mg·L⁻¹ to 9.85 mg·L⁻¹ (60.60% reduction), and the nitrate nitrogen concentration decreased from 34.00 mg·L⁻¹ to 3.85 mg·L⁻¹ (88.68% reduction), indicating the efficiency of bacterium II in utilizing ammonia and nitrate. Physiological and biochemical identification results showed that bacterium II did not produce urease and did not accelerate ammonia production from urea. Additionally, it did not display hemolysis and was poorly pathogenic in humans. The collective results suggested that the indigenous bacterium screened from the rice paddy effectively decreased ammonia production at ambient conditions. Bacterium II has great potential to reduce ammonia volatilization caused by urea topdressing in rice fields, and great application prospects in rice production.

Keywords: paddy field; soil-water interface; ammonia production decreasing bacteria; ammonia; *Lysobacter*

施肥可以显著提高作物产量,据统计,化肥对主要粮食作物产量的贡献率高达40%~60%^[1-2]。氮对作物的生长和产量至关重要,施氮则成为提高粮食产量的关键手段^[3-4]。我国是世界上最大的水稻生产和消费国,需要持续增加水稻产量来满足日益增长的对粮食的需求^[5]。水稻对氮的需求量较大,且需要分次施氮才会有更好的效果^[6]。为保证产量,农民一般选择直接将尿素撒在稻田上覆水进行追氮。在尿素转化为铵态氮或进一步转化为其他形态无机氮后,除部分被作物吸收利用,还有相当部分通过NH₃挥发、径流、淋溶、硝化-反硝化等途径损失^[7],这不仅造成肥料资源的浪费,还会诱发多种环境污染问题^[8-9]。研究表明,NH₃挥发是氮素损失的主要形式之一,NH₃挥发量占施氮量的9%~40%^[4,10],NH₃挥发不仅降低了肥料利用率,还会对水体、大气带来不良影响^[11]。因此,亟待改善施肥技术或寻找其他途径减少NH₃挥发。

关于稻田NH₃挥发的研究很多,多种方法已经被证明可以有效降低NH₃挥发。例如:Chen等^[12]通过多年试验发现土壤-作物综合系统管理可以有效降低NH₃挥发并提高产量;Li等^[13]通过深度分析发现缓控释肥、硝化抑制剂、脲酶抑制剂等的使用可显著降低NH₃挥发并提高产量;有研究表明尿素深施^[14]、合理晚施^[15]等也可以提高氮肥利用率并降低NH₃挥发。尽管上述措施在一定程度上减少了NH₃挥发损失,提高了氮的利用效率,但其经济性和劳动力投入都限制了其在水稻种植系统中的广泛应用。

微生物在自然界的物质循环和能量流动中发挥着不可替代的作用,对农田生态系统中的氮循环具有重要意义^[16-17],但微生物在降低农田氮损失方面的研究报道较少。微生物同化无机氮作用是构成土壤氮

素保蓄能力的重要组成,Li等^[18-20]研究发现合理恢复退化生态系统的土壤微生物同化无机氮作用可有效提高土壤氮素保蓄能力,减少氮素损失风险。微生物在减少氮损失方面的应用还体现在堆肥中,如Guo等^[21]通过在猪粪和麦秸混合堆肥中添加5%的巨大芽孢杆菌发现NH₃和N₂O的排放量减少;Tu等^[22]发现,将由乳酸杆菌等组成的微生物菌剂与生物炭组合添加到猪粪与锯末混合的堆肥中,可以有效降低NH₃和N₂O排放量,增加堆肥中的氮素存储量。然而,目前有关利用相关微生物降低稻田氮损失的报道还不多见。

土-水界面是稻田土壤和上覆水中氮“交流”的必经之所,特殊的环境条件使其与上覆水体和耕层土壤相比,在理化、氮磷化学计量、微生物种类方面存在特殊性,土-水界面氮素迁移转化极大地影响着稻田氮素走向^[23-24]。NH₃挥发是稻田氮损失的主要途径,稻田土-水界面降NH₃工作的开展有利于降低肥料损失,而生物降NH₃^[25]具有经济、高效的特点。本研究拟利用湖南省益阳市典型稻田的土-水界面样本筛选土壤中降NH₃效果较好的菌株,并对其致病性和生化特征等进行鉴定,以期利用该菌株有效降低稻田NH₃挥发和提高氮肥利用率。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验样品

水稻插秧后,在湖南省益阳市某典型稻田(28.373 4°N, 112.339 1°E)土-水界面采集土水混合样本带回实验室用于分离降NH₃菌株。

1.1.2 培养基

氨选择性培养基^[26-27]:蔗糖50.0 g,KH₂PO₄ 2.0 g,

MgSO₄ 0.5 g, FeSO₄ 0.1 g, ZnSO₄ 0.5 g, NaCl 2.0 g, 1 000 mL H₂O, 氨水 10 mL, 自然 pH。

营养肉汤(NB)培养基:蛋白胨 10.0 g, 牛肉粉 3.0 g, NaCl 5.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0~7.4。

分离培养基:牛肉膏蛋白胨培养基、马铃薯葡萄糖培养基、高氏一号培养基。

富氨培养基:葡萄糖 5.0 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄ 0.25 g, FeSO₄ 0.01 g, (NH₄)₂SO₄ 0.47 g, NaCl 1.0 g, 1 000 mL H₂O, pH 7.0。培养基灭菌后用无菌水稀释 4 倍使用,经测定铵态氮浓度为 25 mg·L⁻¹。

富硝培养基:葡萄糖 5.0 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄ 0.25 g, FeSO₄ 0.01 g, KNO₃ 0.72 g, NaCl 1.0 g, 1 000 mL H₂O, pH 7.0。培养基灭菌后用无菌水稀释 3 倍使用,经测定硝态氮浓度为 34 mg·L⁻¹。

尿素酚红培养基:尿素 20 g, 酚红 1 g, 蛋白胨 10 g, 牛肉膏 3 g, NaCl 5.0 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 6.4。

低氨选择性培养基:100 mL 无氨选择性培养基中加入 2 mL 500 mg·L⁻¹ 的氨水。

1.2 试验方法

1.2.1 降 NH₃菌株的富集、分离纯化

称取土壤 10 g 置于装有 90 mL 无菌水的三角瓶中,室温环境下于 180 r·min⁻¹ 摆床处理 30 min, 随后静置 20 min, 吸取 10 mL 稀释液接种至装有 100 mL 氨选择性培养基的三角烧瓶中, 置于 30 °C、180 r·min⁻¹ 摆床上恒温培养 5 d 后, 观察菌液变化, 若菌液浑浊则表明菌株具有降解 NH₃能力, 如此反复连续富集 7 代。

分别在牛肉膏蛋白胨培养基、马铃薯葡萄糖培养基、高氏一号培养基中,利用梯度稀释平板涂布法分离纯化菌液中的单菌落,筛选其中长势良好的菌落,再采用划线法多次分离纯化,直至获得完全纯的单菌落,将分离出的单菌落接种至试管斜面,4 °C 低温保存待用。

1.2.2 降 NH₃菌株的复筛及 NH₃降低率的测定^[26~27]

将分离得到的单菌株接种至 10 mL 营养肉汤培养基中,35 °C、180 r·min⁻¹ 培养 24 h 后, 分别吸取细菌培养液置于无菌离心管中, 8 000 r·min⁻¹ 离心 2 min 后弃上清液, 加无菌水重新悬浮, 重复以上操作 3 次, 去除菌株生长过程中产生的氨, 最后用无菌水重悬, 制得无氨种子液。

取上述种子液 2 mL 于装有 100 mL 低氨选择性培养基的 250 mL 密封瓶中, 再向瓶中放入装有 10

mL 0.005 mol·L⁻¹ 硫酸吸收液的 20 mL 试管, 35 °C、180 r·min⁻¹ 摆床培养。对照组不加种子液, 加 2 mL 无菌水。于培养的第 1、2、3、4 天取样, 采用纳氏试剂法测定 NH₃的释放量。

$$R = (C_0 - C) / C_0 \times 100\%$$

式中: R 为 NH₃ 释放量的降低率, %; C₀ 为对照组硫酸吸收液中铵的浓度, mg·L⁻¹; C 为加菌液处理硫酸吸收液中铵的浓度, mg·L⁻¹。

1.3 菌种鉴定

将菌株接种在平板上 35 °C 培养, 待长出菌落后, 观察菌落形态特征, 并结合《微生物学实验》进行生理生化特征的鉴定^[28]。

利用细菌 DNA 提取试剂盒提取菌株的 DNA, 然后利用通用引物 27F 和 1492R 进行 PCR 扩增^[26], 扩增反应条件: 95 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 1 min, 56 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 该过程进行 30 个循环; 72 °C 保持 10 min。整个过程结束后, 仪器设置为 4 °C 终止保存。

PCR 产物检测合格后, 切割目的条带进行纯化回收, 用回收后的产物进行 Sanger 测序。Sanger 测序结果用软件 ContigExpress 进行拼接, 并去除两端不准的部分。批量对拼接序列进行 blastn(最新版本 v2.13)比对核酸数据库。其中, 核酸数据库选择最新版本的 nt 库, 通过与 nt 库进行 blastn 比对, 即可得到同源序列的 Accession Number 号及物种鉴定和注释。将测得的序列结果在 NCBI 进行 BLAST 比对, 利用 Mega7 软件中的 NJ 法构建系统发育树, 确定菌株的种属类别。

1.4 菌株对不同氮源的利用能力测定^[27]

将无氨种子液, 以 2% 的接种量, 分别接种于富氨和富硝培养基中, 35 °C、180 r·min⁻¹ 摆床培养, 分别在第 1、2、3、4 天取样, 8 000 r·min⁻¹ 离心 2 min 后测定上清液中的铵态氮和硝态氮浓度。铵态氮采用纳氏试剂法进行测定, 硝态氮参照《水和废水检测分析方法》^[29]中的紫外分光光度法进行测定。

1.5 菌株产脲酶情况

产脲酶的细菌分解尿素后产生的氨使 pH 上升, 培养基呈碱性, 以酚红为酸碱指示剂, 颜色由黄色变为红色。因此, 检验目标菌株是否产生脲酶采用尿素酚红培养基^[30]。

同时开展土柱培养试验, 设置添加目标菌株和不添加(对照)处理, 在培养的第 1、3、5 天取土-水界面泥土作为样品, 利用脲酶试剂盒测定界面处脲酶活性。

1.6 数据分析

采用Excel 2016进行试验数据的处理,运用SPSS 22.0进行方差分析,利用Origin 2019b绘图,采用Duncan法在0.05的显著水平上进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 降NH₃菌株的筛选

土壤样品经氨选择性培养基富集、分离纯化后,共获得3株长势较好的降NH₃菌株,分别命名为菌I、菌II、菌III,3株菌均为细菌。利用低氨的选择性培养基对3株菌株进行复筛,测定其NH₃降低率,结果如图1所示。在试验持续期间,菌I和菌III对NH₃的降低率随着培养时间的延长而降低,菌II在培养的前3 d的NH₃降低率比较平稳,第4天出现上升。在培养的第1、2、3、4天中,NH₃降低率均是菌II>菌I>菌III,菌II的最高NH₃降低率出现在第1天,为88.60%,显著高于其他2个菌株。

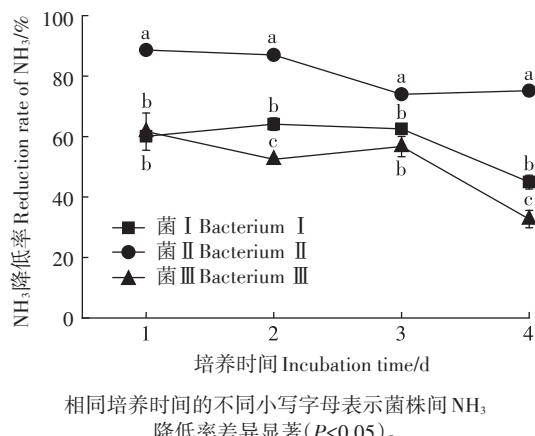


图1 不同菌株的NH₃降低率

Figure 1 NH₃ reduction rates of different bacterial strains

2.2 菌种鉴定

选择NH₃降低率最高的菌II进行菌种鉴定,将其在牛肉膏蛋白胨培养基上培养,其菌落形态和显微观察特征及革兰氏染色结果见图2。菌II的菌落呈圆形,边缘不整齐,颜色呈微黄色,不透明;革兰氏染色结果为阴性,菌体呈杆状。

扩增菌II的16S rDNA基因序列,得到一个1419 bp的PCR产物,NCBI BLAST比对结果显示菌II与污水溶杆菌 *Lysobacter defluvii* 相似性最高(99.72%以上)。16S rDNA基因序列系统发育树显示(图3),菌

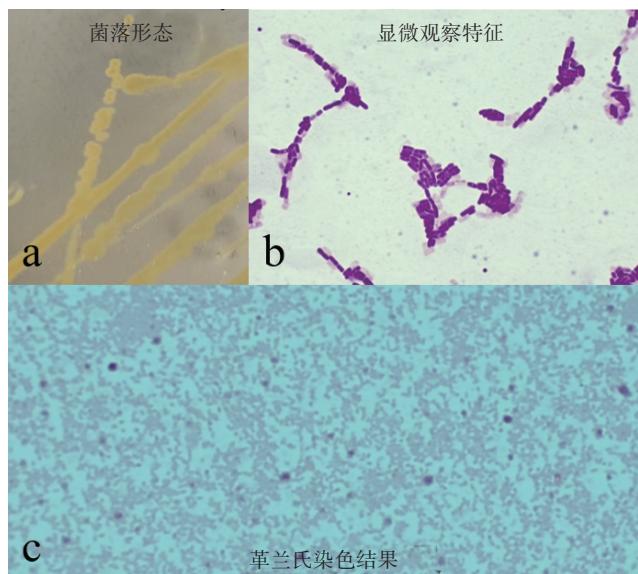


图2 菌II的形态特征及革兰氏染色情况

Figure 2 Morphological characteristics and Gram staining of bacterium II

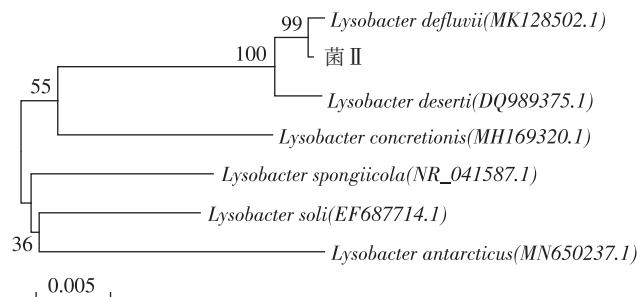


图3 菌II的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of bacterium II

II与污水溶杆菌 *Lysobacter defluvii* 聚为一支。结合形态学分析、革兰氏染色结果以及16S rDNA基因序列分析,菌II被鉴定为污水溶杆菌。

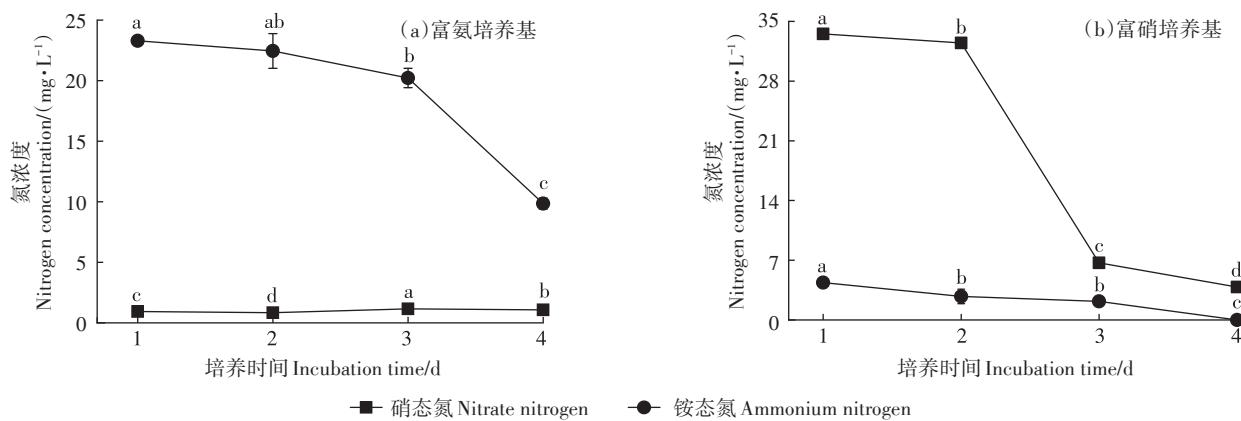
2.3 菌株对不同氮源的利用能力

菌II降NH₃效果见图4a,加菌处理4 d内铵态氮浓度从25.00 mg·L⁻¹降到9.85 mg·L⁻¹,铵态氮降低率达到60.60%,其中第4天降低率最高。在降低铵态氮的同时,培养基中的硝态氮浓度从0增加到1.08 mg·L⁻¹。

菌II降硝能力测定结果见图4b,加菌处理4 d内硝态氮浓度从34.00 mg·L⁻¹降到3.85 mg·L⁻¹,硝态氮降低率达到88.68%,其中第3天降低率最高。在降低硝态氮的同时,培养基中的铵态氮浓度从0增加到4.37 mg·L⁻¹,随后降低至0。

2.4 产脲酶性能和溶血性能

将菌II接种于尿素酚红培养基,培养48 h后“十”



相同折线上的不同小写字母表示不同培养时间下氮浓度差异显著($P<0.05$)。

Different lowercase letters on the same broken line indicate significant differences in nitrogen concentration at different incubation times ($P<0.05$)。

图4 菌Ⅱ对不同氮源的利用能力

Figure 4 Utilization ability of different nitrogen of bacterium Ⅱ

字”菌株周围未出现红圈(图5a),说明菌Ⅱ周围的尿素没有被分解,即该菌不产生脲酶。泥柱土-水界面样品的脲酶活性测定结果见图5b,接种菌Ⅱ后脲酶的活性与对照相比在第1天无显著差异,但在第3天和第5天显著降低。

溶血性是体外对相关菌株安全性测定过程中需要分析的关键指标之一。将菌Ⅱ接种于血平板,30℃培养48 h,进行溶血性实验,结果见图6,可以看出菌Ⅱ在血平板上生长良好,菌落附近没有出现溶血圈,说明菌Ⅱ不具有溶血性。

3 讨论

NH_3 挥发是稻田氮损失的重要途径,目前关于稻田 NH_3 挥发的研究主要集中在施肥方式^[15,31]、肥料用

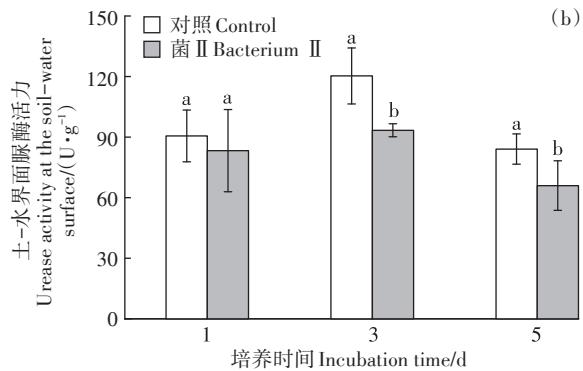
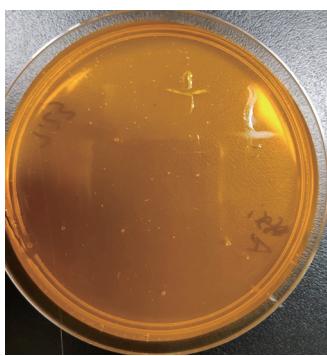


图6 菌Ⅱ在血平板培养基的溶血情况

Figure 6 Hemolysis of bacterium Ⅱ in blood plate medium

量^[32]、氮肥种类^[33-34]、土壤改良剂^[35]等,但利用微生物降低稻田 NH_3 挥发的报道较少,所以筛选土-水界面

(a) 尿素酚红培养基中菌Ⅱ产脲酶情况



同一组柱上方的不同小写字母表示不同处理下脲酶的活力差异显著($P<0.05$)。

Different lowercase letters above the same column group indicate significant differences in urease activity under different treatments ($P<0.05$)。

图5 菌Ⅱ产脲酶情况

Figure 5 Urease production status of bacterium Ⅱ

处的降NH₃菌株十分必要。本研究通过采集湖南省典型稻田土-水界面样品,进一步筛选出的菌Ⅱ降NH₃效果较好,NH₃降低率最高可达88.60%,具有一定降低稻田NH₃挥发的潜力。高通量测序所得菌株基因序列与NCBI基因序列数据库进行对比分析,证明所筛选菌株为溶杆菌属,进一步通过菌落形态、颜色以及革兰氏染色结果发现所筛选菌株与Yassin等^[36]报道的*Lysobacter defluvii*十分相似,所以判断所得菌株为污水溶杆菌。但是,目前有关污水溶杆菌的研究较少,关于污水溶杆菌的降NH₃或氮转化功能方面的研究更为缺乏。同时,由于本试验是在室内开展的培养试验,该菌株在实际田间的降NH₃效果还需要进一步验证。

与尹红梅等^[27]的实验结果相比,菌Ⅱ的硝态氮利用能力和氨氮利用能力较弱,一方面这可能是因为本研究接种率为2%,低于尹红梅实验中的5%,另一方面可能是由于该菌株大量繁殖吸收了部分的氮。富氨培养基中铵态氮下降,但是硝态氮没有显著增加,由于本试验是在非厌氧条件下进行,好养的溶杆菌不易使反硝化发生,因此,富氨培养基中铵态氮降低的一个原因很可能是所培养菌株将其利用并转化为生物量氮,试验开展期间,随着菌的生长,供试培养基逐渐变浑浊,这也在一定程度上反映了菌株确实有一定的增殖,另一方面,由于是非厌氧条件,部分氨氮也可能通过NH₃挥发损失。由于硝态氮相对稳定,同时试验在有氧条件下进行,所以富硝培养基中减少的硝态氮极有可能是被菌株增殖利用了。

脲酶是尿素分解过程中的关键酶^[37],尿素酚红培养基研究表明菌Ⅱ几乎不产生脲酶^[30],同时在土-水界面添加该菌株可能还有抑制脲酶产生的作用,这说明菌Ⅱ不会通过产生脲酶加速尿素产NH₃的过程,满足稻田土-水界面降NH₃的基本要求。溶血性是体外对相关菌株安全性测定过程中需要分析的关键指标之一,本研究发现菌Ⅱ无溶血性^[38-39],初步断定菌Ⅱ的致病性可能较低,但是还需要开展进一步试验来鉴定其是否为致病菌株,从而决定该菌是否可应用于生产实践。

4 结论

(1)通过对稻田土-水界面降NH₃菌株的筛选,获得了一株在室内试验条件下具有较好降NH₃效果的菌株——菌Ⅱ,经鉴定该菌株为污水溶杆菌。

(2)菌Ⅱ几乎不产脲酶,且不具有溶血性,具有降低稻田NH₃挥发的潜力。

(3)菌Ⅱ可能对氨氮和硝态氮具有较好的吸收和利用能力,其在稻田降低氮肥损失方面的效果需要进一步在田间验证。

参考文献:

- STEWART W M, DIBB D W, JOHNSTON A E, et al. The contribution of commercial fertilizer nutrients to food production[J]. *Agronomy Journal*, 2005, 97(1):1-6.
- 朱兆良,金继运.保障我国粮食安全的肥料问题[J].植物营养与肥料学报,2013,19(2):259-273. ZHU Z L, JIN J Y. Fertilizer use and food security in China[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2013, 19(2):259-273.
- GAO Y H, CABRERA SERRENHO A. Greenhouse gas emissions from nitrogen fertilizers could be reduced by up to one-fifth of current levels by 2050 with combined interventions[J]. *Nature Food*, 2023, 4(2):170-178.
- SUN C, CHEN L, ZHAI L M, et al. National assessment of nitrogen fertilizer fate and related environmental impacts of multiple pathways in China[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2020, 277:123519.
- ZHU C H, XIANG J, ZHANG Y P, et al. Mechanized transplanting with side deep fertilization increases yield and nitrogen use efficiency of rice in eastern China[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9:5653.
- LI G H, LIN J J, XUE L H, et al. Fate of basal N under split fertilization in rice with ¹⁵N isotope tracer[J]. *Pedosphere*, 2018, 28(1):135-143.
- CAI S Y, ZHAO X, PITTELKOW C M, et al. Optimal nitrogen rate strategy for sustainable rice production in China[J]. *Nature*, 2023, 615(7950):73-79.
- 马林,卢洁,赵浩,等.中国硝酸盐脆弱区划分与面源污染阻控[J].农业环境科学学报,2018,37(11):2387-2391. MA L, LU J, ZHAO H, et al. Nitrate vulnerable zones and strategies of non-point pollution mitigation in China[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2018, 37(11):2387-2391.
- 卫凯平,武慧君,黄莉,等.农业生产系统氮磷环境影响分析:以安徽省为例[J].农业环境科学学报,2018,37(8):1802-1810. WEI K P, WU H J, HUANG L, et al. Analysis of environmental impact derived from nitrogen and phosphorus in agricultural production systems: a case study of Anhui Province[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2018, 37(8):1802-1810.
- 俞映倞,薛利红,杨林章.太湖地区稻田不同氮肥管理模式下氨挥发特征研究[J].农业环境科学学报,2013,32(8):1682-1689. YU Y L, XUE L H, YANG L Z. Ammonia volatilization from paddy fields under different nitrogen schemes in Tai Lake region[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2013, 32(8):1682-1689.
- 李欠欠,李雨繁,高强,等.传统和优化施氮对春玉米产量、氨挥发及氮平衡的影响[J].植物营养与肥料学报,2018,21(3):571-579. LI Q Q, LI Y F, GAO Q, et al. Effect of conventional and optimized nitrogen fertilization on spring maize yield, ammonia volatilization and nitrogen balance in soil-maize system[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2018, 21(3):571-579.
- CHEM X P, CUI Z L, FAN M S, et al. Producing more grain with lower environmental costs[J]. *Nature*, 2014, 514:486-489.
- LI T Y, ZHANG W F, YIN J, et al. Enhanced-efficiency fertilizers

- are not a panacea for resolving the nitrogen problem[J]. *Global Change Biology*, 2017, 24:e511–e521.
- [14] YAO Y L, ZHANG M, TIAN Y H, et al. Urea deep placement for minimizing NH₃ loss in an intensive rice cropping system[J]. *Field Crops Research*, 2018, 218:254–266.
- [15] TIAN Y H, ZHAO X, YIN B, et al. Delaying tillering nitrogen top-dressing until the midtillering phase improves nitrogen use efficiency and reduces ammonia emission via rice canopy recapture[J]. *European Journal of Agronomy*, 2023, 142:126657.
- [16] PORAZINSKA D L, BARDGETT R D, BLAAUW M B, et al. Relationships at the aboveground–belowground interface: plants, soil biota, and soil processes[J]. *Ecological Monographs*, 2003, 73:377–395.
- [17] KUYPERS M M M, MARCHANT H K, KARTAL B. The microbial nitrogen–cycling network[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16: 263–276.
- [18] LI X B, HE H B, ZHANG X D, et al. Calculation of fungal and bacterial inorganic nitrogen immobilization rates in soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2021, 153:108114.
- [19] LI X B, LI Z A, ZHANG X D, et al. Disentangling immobilization of nitrate by fungi and bacteria in soil to plant residue amendment[J]. *Geoderm*, 2020, 374:114450.
- [20] LI X B, HE H B, ZHANG X D, et al. Distinct responses of soil fungal and bacterial nitrate immobilization to land conversion from forest to agriculture[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2019, 134:81–89.
- [21] GUO H H, GU J, WANG X J, et al. Beneficial effects of bacterial agent/bentonite on nitrogen transformation and microbial community dynamics during aerobic composting of pig manure[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 298:122384.
- [22] TU Z N, REN X N, ZHAO J C, et al. Synergistic effects of biochar/microbial inoculation on the enhancement of pig manure composting[J]. *Biochar*, 2019, 1:127–137.
- [23] YUAN Z F, GUSTAVE W, BRIDGE J, et al. Tracing the dynamic changes of element profiles by novel soil porewater samplers with ultralow disturbance to soil–water interface[J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53:5124–5132.
- [24] LIU J Z, LU H Y, WU L R, et al. Interactions between periphytic biofilms and dissolved organic matter at soil–water interface and the consequent effects on soil phosphorus fraction changes[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 801:149708.
- [25] 申彦晶, 饶力群, 任杰. 降氨除臭芽孢杆菌的筛选鉴定及其氮素迁移过程[J]. 微生物学通报, 2015, 42(7):1234–1240. SHEN Y J, RAO L Q, REN J. Identification and nitrogen migration of an ammonia-oxidizing and deodorizing *Bacillus*[J]. *Microbiology China*, 2015, 42(7):1234–1240.
- [26] 刘标, 尹红梅, 刘惠知. 病死猪堆肥降氨除臭微生物的筛选与鉴定[J]. 科学技术与工程, 2018, 18(34):248–252. LIU B, YIN H M, LIU H Z. Screening and identification of deodorant microorganism for dead-pig composting[J]. *Science Technology and Engineering*, 2018, 18(34):248–252.
- [27] 尹红梅, 刘标, 郭照辉, 等. 1株畜禽粪便堆肥脱氨除臭菌的筛选及特性[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(17):261–265. YIN H M, LIU B, GUO Z H, et al. Screening and characterization of a denitrifying and deodorizing strain from manure compost[J]. *Journal of Jiangsu Agricultural Sciences*, 2020, 48(17):261–265.
- [28] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验[M]. 二版. 北京:科学出版社, 2002: 148–149. ZHAO B, HE S J. *Experimental microbiology*[M]. 2nd Edition. Beijing:Science Press, 2002:148–149.
- [29] 魏复盛, 齐文启. 水和废水监测分析方法[M]. 四版. 北京:中国环境科学出版社, 2002: 266–268. WEI F S, QI W Q. *Methods for monitoring and analysis of water and wastewater*[M]. 4th Edition. Beijing:China Environmental Science Press, 2002:266–268.
- [30] 王晓玉, 张颖, 刘双, 等. 枯草芽孢杆菌J530菌株的分离鉴定及其对鸡粪的氨减排作用[J]. 家畜生态学报, 2022, 43(1):47–53. WANG X Y, ZHANG Y, LIU S, et al. Isolation and identification of *Bacillus* strain J530 and ammonia emission reduction effect of it on chicken manure[J]. *Acta Ecologiae Animalis Domestici*, 2022, 43(1): 47–53.
- [31] SONG H, CHEN X Q, CHENG L, et al. Negligible ammonia volatilization loss with one-time root-zone targeted application of common nitrogen, phosphorus, and potassium fertilizers in transplanted rice cultivation[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2022, 338: 108072.
- [32] ZHAO L M, WU L H, DONG C J, et al. Rice yield, nitrogen utilization and ammonia volatilization as influenced by modified rice cultivation at varying nitrogen rates[J]. *Agricultural Sciences*, 2010, 1(1):10–16.
- [33] XU J Z, PENG S Z, YANG S H, et al. Ammonia volatilization losses from a rice paddy with different irrigation and nitrogen managements [J]. *Agricultural Water Management*, 2012, 104:184–192.
- [34] KARAIVAZOGLOU N A, TSOTSOLIS N C, TSADILAS C D. Influence of liming and form of nitrogen fertilizer on nutrient uptake, growth, yield, and quality of Virginia (flue-cured) tobacco[J]. *Field Crops Research*, 2007, 100:52–60.
- [35] SUN X, ZHONG T, ZHANG L, et al. Reducing ammonia volatilization from paddy field with rice straw derived biochar[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 660:512–518.
- [36] YASSIN A F, CHEN W M, HUPFER H, et al. *Lysobacter defluvii* sp. nov., isolated from municipal solid waste[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(5):1131–1136.
- [37] 焦洪超, 张洪芳, 林海. 铝盐对鸡粪中氨气释放的影响及其机理研究[J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(4):522–527. JIAO H C, ZHANG H F, LIN H. Effect of aluminum salt on ammonia release from poultry litter[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2009, 40(4): 522–527.
- [38] 孟祥晨, 李雪, 姚蕾, 等. 两株植物乳杆菌作为潜在益生菌的体外评价[J]. 东北农业大学学报, 2015, 46(9):44–51. MENG X C, LI X, YAO L, et al. *In vitro* evaluation of two *Lactobacillus plantarum* as potential probiotics[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2015, 46(9):44–51.
- [39] 苏本宪. 乳杆菌对 *Staphylococcus aureus* 和 *Streptococcus pyogenes* 抑菌作用的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2014:47. SU B X. Study of the inhibition activity of Lactobacilli on *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2014:47.

(责任编辑:李丹)