



## 一株兼性氧化亚氮还原菌的还原 N<sub>2</sub>O 能力

刘春梅<sup>1,2</sup>, 盛荣<sup>1</sup>, 刘毅<sup>1</sup>, 谌星<sup>1,2</sup>, 魏文学<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 中国科学院亚热带农业生态研究所亚热带农业生态过程重点实验室, 中国科学院桃源农业生态试验站, 湖南 长沙 410125

<sup>2</sup> 中国科学院大学, 北京 100049

**摘要:**【目的】从水稻土中分离筛选出一株兼性氧化亚氮还原菌, 并探索其在不同条件下还原 N<sub>2</sub>O 的能力, 为减少温室气体 N<sub>2</sub>O 的排放提供重要依据。【方法】通过微生物富集培养分离技术从水稻土中分离得到纯菌; 利用 *nosZ* 基因和 16S rRNA 的测序分析鉴定菌株; 通过测定菌株在不同条件下 N<sub>2</sub>O 的还原量, 分析该菌株还原 N<sub>2</sub>O 的能力及调控因子。【结果】经鉴定, 该菌株含有 *nosZ* 基因, 属于假单胞菌属, 在温度 30 °C、厌氧条件下还原 N<sub>2</sub>O 速率高达 0.0219 μmol/min 以上, 改变不同温度和氧气浓度后其能力相对减弱, 但仍具备较强的还原 N<sub>2</sub>O 作用。【结论】从水稻土中分离筛选得到的兼性氧化亚氮还原菌为假单胞菌, 它在不同环境条件下都具备较强的还原 N<sub>2</sub>O 能力, 该菌株可能为减少土壤 N<sub>2</sub>O 排放提供新途径, 对保障生态环境安全具有重要的应用价值。

**关键词:** 氧化亚氮还原菌, 假单胞菌, N<sub>2</sub>O 还原能力, *nosZ* 基因

全球气候变暖受到国内外的广泛关注。氧化亚氮(N<sub>2</sub>O)是大气中主要的温室气体之一, 虽然 N<sub>2</sub>O 对温室效应的贡献率只有 5%, 但其增温潜势却是 CO<sub>2</sub> 的约 300 倍<sup>[1]</sup>。此外, N<sub>2</sub>O 具有较稳定的化学性质, 排放后在大气驻留的时间长达 150 年左右, 其进入臭氧层后还不断消耗臭氧, 导致臭氧层受到破坏<sup>[2]</sup>。更严重的是, N<sub>2</sub>O 浓度仍在以每年约 0.8 ppb 的速度不断升高<sup>[3]</sup>, 对全球气候和环

境造成巨大威胁。

目前已知的 N<sub>2</sub>O 排放源主要包括: 化石燃料燃烧、化工生产过程、海洋、热带及温带森林、草地和土壤等。研究表明, 全球人为排放的 N<sub>2</sub>O 主要是来自于农田土壤<sup>[4]</sup>, 而农业土壤中 N<sub>2</sub>O 主要来源于微生物活动引起的硝化和反硝化过程<sup>[5]</sup>。目前已知的生物途径中 N<sub>2</sub>O 唯一的汇是反硝化过程, 由 *nosZ* 基因编码的氧化亚氮还原酶(nitrous

基金项目: 国家自然科学基金项目(41330856, 41501277, 41301274); 中国科学院战略性先导科技专项(XDB15020200)

\*通信作者。Tel/Fax: +86-731-84615210; E-mail: wenxuewei@isa.ac.cn

收稿日期: 2017-09-30; 修回日期: 2017-12-16; 网络出版日期: 2018-01-05

oxide reductase, N<sub>2</sub>OR)将 N<sub>2</sub>O 还原成 N<sub>2</sub><sup>[6]</sup>。

一般认为 *nosZ* 基因在厌氧条件下发挥作用<sup>[7]</sup>。但近几年,随着越来越多好氧反硝化菌被分离筛选<sup>[8]</sup>,传统的生物脱氮理论正在逐步被完善。研究表明,好氧反硝化菌在有氧或纯氧的条件下依然能起作用,将硝酸盐和亚硝酸盐还原为 N<sub>2</sub> 或 N<sub>2</sub>O 等气态产物<sup>[9-11]</sup>。另外,温度是影响微生物生长和酶活性的重要因素之一。当温度适宜时,微生物生长快,相关活性和代谢产物达到较高水平。

目前微生物生态方向的研究主要集中在环境样品的群落结构及多样性上,但对纯菌的特性研究能更直观地了解微生物相关作用机制并可更好地发挥微生物的环境应用价值。目前关于纯菌的脱氮特性研究已具备一定基础,主要包括一些异养硝化-好氧反硝化菌以及好氧反硝化菌的研究。但大部分研究都主要集中在硝酸根(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)和亚硝酸根(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)的脱氮能力上<sup>[12]</sup>,且菌株样品主要来源于海水、污水以及一些生物反应器中<sup>[13]</sup>,对来自土壤样品中的反硝化细菌且直接探索菌株还原 N<sub>2</sub>O 能力的研究相对较少。

本研究以水稻土中分离富集得到的反硝化菌为基础,从中筛选出氧化亚氮还原菌,研究 N<sub>2</sub>O 还原能力强的菌株,为通过生物途径调控土壤 N<sub>2</sub>O 的排放、有效减控温室气体提供科学基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株来源:** 本实验所用反硝化细菌从水稻土壤中(N: 30°38'21.6", E: 120°46'50.9")分离,以硝酸钾、琥珀酸为底物富集培养<sup>[14]</sup>,筛选得到的一些可高效利用硝酸盐的反硝化微生物菌群,由本实验室保存。

**1.1.2 菌株的筛选:** 对分离得到的细菌从中选择 56 株进行初步筛选,通过对这 56 株反硝化细菌进行 *nosZ* 基因的 PCR 扩增,测定菌株在反硝化培养基的生长状况(用 Bioscreener C 仪器测定菌株 OD 值),以及还原 N<sub>2</sub>O 能力测定,最终筛选出一株含 *nosZ* 基因、且在反硝化培养基中生长状况良好的氧化亚氮还原菌作为试验对象,该菌株编号为 DJ7。

**1.1.3 培养基:** (1) LB 培养基: NaCl 10 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L; (2) 反硝化培养基<sup>[15]</sup> (DM): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g/L, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.25 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g/L, KNO<sub>3</sub> 2 g/L, 柠檬酸三钠 11.35 g/L (C/N=10), pH 7.0, 微量元素母液 500 μL/L; (3) 微量元素母液: Na<sub>2</sub>EDTA 50 g/L, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 5.06 g/L, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.2 g/L, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 1.57 g/L, CaCl<sub>2</sub> 5.5 g/L, NaMoO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 1.1 g/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 5.0 g/L, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 1.61 g/L, pH 7.0-7.2。

### 1.2 菌株的鉴定

**1.2.1 菌株形态观察:** 参照《常见细菌系统鉴定手册》中介绍的方法,对菌株进行形态描述。将菌株培养后进行固定、脱水、脱乙醇等预处理,干燥后送样,使用场发射扫描电子显微镜(型号 SU8010)观察菌株在扫描电镜下的形态特征。

**1.2.2 16S rRNA 基因测序及系统发育分析:** 采用细菌全基因组试剂盒(天根细菌基因组 DNA 提取试剂盒)提取菌株 DJ7 的 DNA,以 DNA 为模板扩增 16S rRNA 基因,正向引物 8F: 5'-AGAGTTTGA TCCTGGCTCAG-3'; 反向引物 1492R: 5'-GGWTA CCTTGTTACGACT-3'。PCR 反应体系(50 μL): 上游引物(10 μmol/L) 2 μL、下游引物(10 μmol/L) 2 μL、2×PCR mix 25 μL、DNA 模板量(50-

100 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L、补 ddH<sub>2</sub>O 至 50  $\mu$ L。扩增程序为: 94 °C 预热 3 min; 94 °C 45 s, 50 °C 45 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。PCR 产物经切胶纯化后送生工生物工程(上海)股份有限公司完成基因测序分析(回收试剂盒使用天根切胶回收试剂盒)。将测序结果在 NCBI 基因库里进行比对分析, 若相似度达到 90% 以上即初步认为样品和基因库菌株为同一个属。然后在库里找到其他模式菌株的 16S rRNA 基因序列进行同源性比对, 基于 16S rRNA 序列同源性, 用软件 MEGA7 以邻接法构建菌株 DJ7 与其相近序列细菌的系统发育树。

### 1.3 *nosZ* 基因测序分析

同样以 DNA 为模板, 用特异性引物去扩增 *nosZ* 基因, 上游引物 *nosZ*-2002F: 5'-CGYGTGTTTCMTCGACAGCCAG-3', 下游引物 *nosZ*-2002R: 5'-CATGTGCAGNGCRTGGCAGAA-3'。PCR 反应体系 (50  $\mu$ L): 上游引物 (10  $\mu$ mol/L) 2  $\mu$ L、下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 2  $\mu$ L、2 $\times$ PCR mix 25  $\mu$ L、DNA 模板量 (50–100 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L、补 ddH<sub>2</sub>O 至 50  $\mu$ L。扩增程序为: 95 °C 2 min; 95 °C 30 s, 65 °C 45 s, 72 °C 45 s, 10 个循环, 每个循环退火温度降 1 °C; 30 个循环为 94 °C 30 s, 55 °C 45 s, 72 °C 45 s; 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经切胶回收纯化后送生工生物工程(上海)股份有限公司完成测序(回收试剂盒使用天根切胶回收试剂盒)。最后将测序结果在网站 NCBI 基因库里, 进行比对分析。

### 1.4 菌株 N<sub>2</sub>O 还原能力的测定

**1.4.1 菌株的培养:** 接种菌株 DJ7 于有 30 mL 反硝化培养基的锥形瓶中进行扩大培养 24 h(菌种培养条件设置:  $T=30$  °C, pH 7, C/N=10, 转速 150 r/min)。将菌液尽量摇匀, 接 1 mL 菌液于装有 30 mL 培养

基的 100 mL 培养瓶中, 立即盖好瓶塞, 用铝盖夹好封住后统一放入摇床内进行培养。

**1.4.2 样品的采集:** 培养 24 h 后, 取出培养瓶, 将菌液倒入 50 mL 离心管中, 4000 r/min 离心 10 min, 用无 KNO<sub>3</sub> 的 DM 培养基洗涤 2 次, 溶于 30 mL 无 KNO<sub>3</sub> 的 DM 培养基后倒入 100 mL 培养瓶中, 密封后加一个滤菌器, 抽真空 60 s, 充入 179.59  $\mu$ g/L 的 N<sub>2</sub>O 气体, 再放于摇床内, 培养 10 min 后, 将瓶子取出, 采集 N<sub>2</sub>O 气体 20 mL。采用气相色谱仪(Agilent 7890A, USA)测定 N<sub>2</sub>O 浓度, 即为反应后的 N<sub>2</sub>O 量。

**1.4.3 不同条件下还原能力测定:** 探索两个重要的环境因素对菌株还原能力的影响, 包括温度和氧气浓度。反应温度设置分别为 20、30 和 40 °C。氧气浓度设置条件为 0%、10% 和 21%。除了环境条件的不同, 其测定菌株还原 N<sub>2</sub>O 能力的方法与 1.4.2 中所述一致。

## 2 结果和分析

### 2.1 菌株的鉴定

**2.1.1 菌株形态:** 菌株 DJ7 在 LB 平板上生长 2 d 后形成圆形菌落, 菌落表面光滑, 颜色为白色略微带浅黄色, 无透明度, 革兰氏染色呈红色说明为革兰氏阴性菌。从扫描电镜观察显示, 菌株 DJ7 为杆菌, 无鞭毛、无芽孢, 长度约为 1.5–2.5  $\mu$ m, 直径约为 0.6–0.9  $\mu$ m (图 1)。

**2.1.2 16S rRNA 基因测序及系统发育分析:** 通过 PCR 扩增、切胶回收、测序, 获得菌株 DJ7 的 16S rRNA 基因序列已提交到 GenBank 网站(基因库登录号为 MF802245), 通过在 NCBI 数据库中比对, 发现 DJ7 与 *Pseudomonas* sp. 的多株模式菌株的 16S rRNA 基因相似性达 100%, 通过检索和 DJ7

亲缘性相近的其他模式菌株, 利用 MEGA7 软件, 以 Neighbor-joining 法绘制 16S rRNA 系统发育树(图 2)。根据发育树结果鉴定菌株 DJ7 为假单胞菌属。

## 2.2 *nosZ* 基因测序结果

通过 PCR 扩增、切胶回收和测序, 获得的菌

株 DJ7 的 *nosZ* 基因序列已提交到 GenBank 网站 (基因库登录号为 MF802247), 通过在 NCBI 数据库中比对, 发现 DJ7 与 *Pseudomonas* sp. 的多株模式菌株的 *nosZ* 基因相似性达 98% 以上, 可确定菌株 DJ7 含有 *nosZ* 基因。

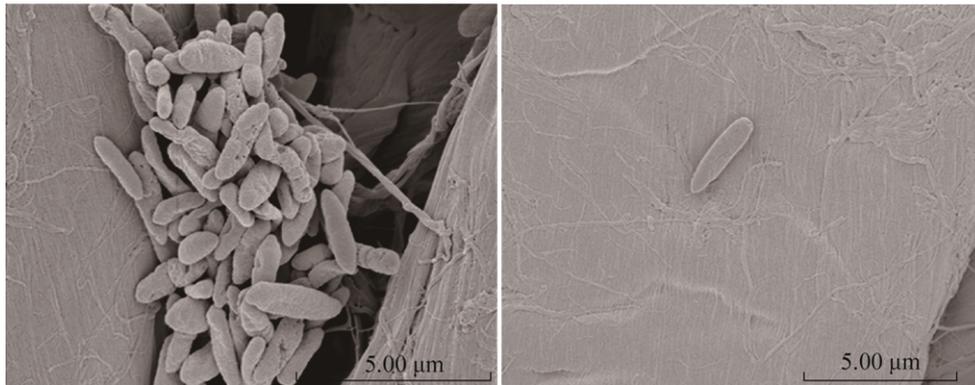


图 1. 菌株 DJ7 的扫描电镜图 (10000×)

Figure 1. Scanning electron microscopy of strain DJ7 (10000×).

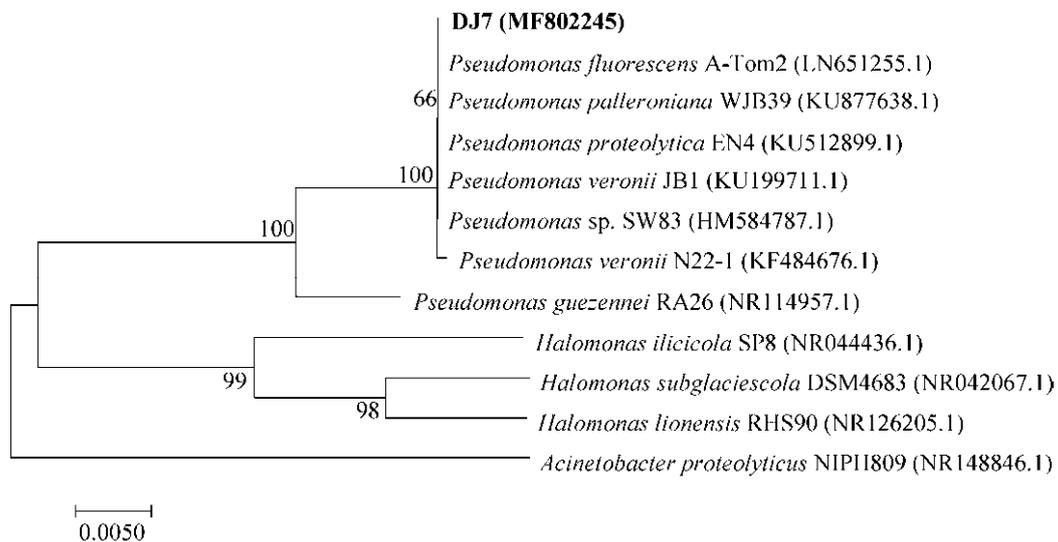


图 2. 菌株 DJ7 的 16S rRNA 系统发育树

Figure 2. Phylogenetic tree of strain DJ7 based on the sequences of 16S rRNA gene. Numbers in bracket are the sequences accession number in GenBank. Numbers at the nodes indicate the bootstrap values on Neighbor-joining analysis. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches.

### 2.3 菌株还原 N<sub>2</sub>O 能力结果

**2.3.1 菌株的还原 N<sub>2</sub>O 能力测定:** 菌株在 DM 培养基中, 30 °C、转速为 150 r/min、氧气浓度为 0% 的条件下, 充入 179.59 μg/L 的 N<sub>2</sub>O 反应 10 min 后, 实验组剩余 32.92 μg/L 的 N<sub>2</sub>O, 将 CK 组剩余 N<sub>2</sub>O 减去实验组剩余的 N<sub>2</sub>O, 即为菌株 N<sub>2</sub>O 还原量, 结果显示菌株还原 N<sub>2</sub>O 效率达 64.88% (图 3), 表现出较强的还原 N<sub>2</sub>O 能力, 其反应速率为 0.0219 μmol/min。

**2.3.2 不同温度条件下菌株还原 N<sub>2</sub>O 结果:** 温度的改变可能会影响细菌的氧化亚氮还原酶活性。在 20、30、40 °C 条件下, 根据实验组和对照组 N<sub>2</sub>O 消耗量的差值得出, 菌株实际还原 N<sub>2</sub>O 效率分别是 25.65%、64.88%、16.78% (图 4), 即以 0.3265 μmol N<sub>2</sub>O 为底物, 菌株消耗 N<sub>2</sub>O 速率分别为 0.0084、0.0212 和 0.0055 μmol/min。由此可以看出, 3 个温度中 30 °C 是该菌株还原 N<sub>2</sub>O 的最佳温度, 且该菌受温度影响较大。

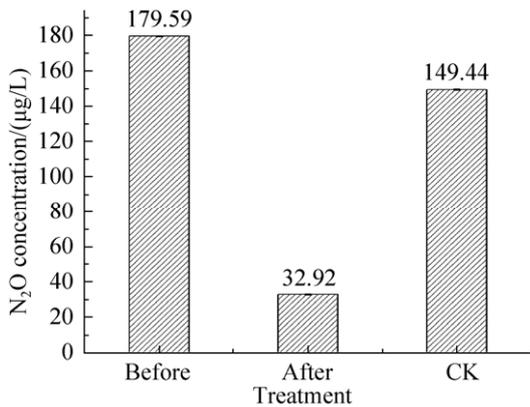


图 3. 菌株 DJ7 还原 N<sub>2</sub>O 能力结果  
Figure 3. N<sub>2</sub>O-reducing ability results of strain DJ7. Data are mean±standard error of the three replicates.

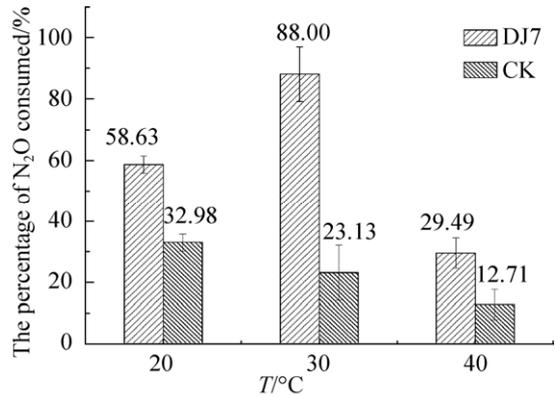


图 4. 不同温度条件下菌株还原 N<sub>2</sub>O 效率  
Figure 4. Results of reducing N<sub>2</sub>O efficiency of strain under different temperature conditions. Data are mean±standard error of the three replicates.

**2.3.3 不同氧气浓度下菌株还原 N<sub>2</sub>O 结果:** 其他条件保持一致、改变不同氧气浓度, 在 0%、10%、21% 氧气浓度条件下, 根据实验组和对照组 N<sub>2</sub>O 消耗量的差值得出, 菌株实际还原 N<sub>2</sub>O 效率分别是 62.78%、16.34%、8.89% (图 5), 以 0.3265 μmol N<sub>2</sub>O 为底物, 菌株消耗 N<sub>2</sub>O 速率分别为 0.0205、0.0053、0.0029 μmol/min。结果表明, 虽然该菌株在厌氧条件下具有最高的还原 N<sub>2</sub>O 效率, 但在兼性厌

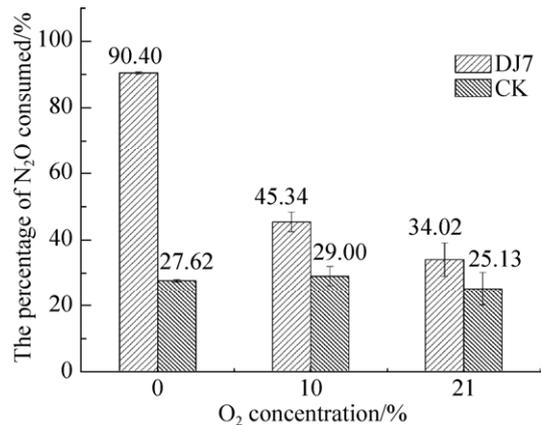


图 5. 不同氧气浓度下菌株还原 N<sub>2</sub>O 效率结果  
Figure 5. Results of reducing N<sub>2</sub>O efficiency under different oxygen concentrations. Data are mean±standard error of the three replicates.

氧和好氧条件下也仍具有较强的还原能力。

### 3 讨论

20 世纪 80 年代, Robertson 等最先发现并报道了好氧反硝化菌和好氧反硝化酶系的存在, 随着研究者对好氧反硝化菌研究的不断深入, 越来越多具有较强脱氮能力的好氧反硝化菌从不同的生态环境中被分离筛选。目前报道的好氧反硝化细菌主要种类有芽孢菌属(*Bacillus*)、产碱菌属(*Alcaligenes*)、副球菌属(*Paracoccus*)、克雷伯菌属(*Klebsiella*)、苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、生丝微菌属(*Hyphomicrobium*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)、黄杆菌属(*Eubacterium*)、丙酸杆菌属(*Propionibacterium*)、芽生杆菌属(*Blastobacter*)、盐杆菌属(*Halobacterium*)和根瘤菌属(*Rhizobium*)等<sup>[16]</sup>。通过生理生化和 16S rRNA 序列鉴定, 本文菌株 DJ7 为假单胞菌属, 属于  $\gamma$ -变形菌门。假单胞菌属也是目前研究较典型的好氧反硝化菌。Miyahara<sup>[11]</sup>等研究了 *Pseudomonas stutzeri* TR2 在污水处理过程中在有氧条件下仍表现出较强的还原 N<sub>2</sub>O 能力。Ikeda-Ohtsubo 等<sup>[13]</sup>将 *Pseudomonas stutzeri* 添加到污水处理生物反应器中同样证明了该菌的强 N<sub>2</sub>O 还原能力。有研究通过分离培养及菌种鉴定的方法发现 *Pseudomonas* 是玉米农田土壤中的优势菌种且与 N<sub>2</sub>O 的排放存在较强相关性<sup>[17]</sup>。其中, 氧化亚氮还原菌直接参与反硝化作用的最后一步, 对温室气体减排效应起着重要作用。目前直接对这一类还原菌的研究还相对较少, Gao 等<sup>[18]</sup>在农田土壤中筛选得到一些既能减少 N<sub>2</sub>O 排放又能促进作物生长的氧化亚氮还原菌, 包括 *Azospirillum* 和 *Herbaspirillum* 属。本文菌株

DJ7 是从稻田土壤中通过以硝酸钾和琥珀酸为底物在好氧条件下富集培养分离得到的兼性氧化亚氮还原菌, 且对其不同环境条件下菌株还原 N<sub>2</sub>O 能力强弱进行研究, 这对将氧化亚氮还原菌应用于 N<sub>2</sub>O 的减排效应中具有重要参考意义。

通过对该菌株的还原 N<sub>2</sub>O 特性研究发现, 菌株在 20 °C、30 °C 和 40 °C 的条件下, 还原 N<sub>2</sub>O 效率分别是 25.65%、64.88% 和 16.78%。可以看出该菌虽在 30 °C 还原效率最高, 但随温度降低或温度升高仍具有较强的还原能力, 这可能意味着该菌对温度的改变具有较强适应性。亚热带地区水稻田的土表平均温度在 6–33 °C<sup>[19]</sup>, 这代表着除了在冬季外, 该菌株可能在稻田土壤中都能保持较强的 N<sub>2</sub>O 还原能力。此外, 菌株 DJ7 在厌氧、兼性厌氧和好氧的条件下, 菌株的还原 N<sub>2</sub>O 效率分别是 62.78%、16.34% 和 8.89%, 这说明菌株在厌氧条件下还原能力最强, 但在有氧条件下同样能还原 N<sub>2</sub>O, 表明氧气浓度不会完全抑制该菌的氧化亚氮还原酶活性, 若将菌株接种到有氧的环境中仍能起到减少 N<sub>2</sub>O 的作用。目前受到认可的好氧反硝化菌的作用机理主要是反硝化还原酶理论和微环境理论<sup>[20]</sup>, 而该菌受氧气浓度的影响机理还需进一步证实。综上可以得出, 该菌株具有适应性强、生长速度快、生长条件温和及能高效还原 N<sub>2</sub>O 等特点。对该菌株的研究为在好氧条件下进行反硝化作用提供理论支撑, 为利用氧化亚氮还原菌应用于 N<sub>2</sub>O 的减排效应提供一个新思路。

除了 *nosZ* 基因的功能验证, 菌株在硝化和反硝化过程中具备何种功能特点同样值得探究。利用相关特异性引物, 通过 PCR 扩增技术对菌株 DJ7 中是否含有编码反硝化过程系列酶的基因, 如 *narG/napA*、*nirK/nirS* 和 *cnorB/qnorB* 做了初步

验证, 结果发现其具有 *narG*、*nirS* 和 *cnorB* 基因, 即该菌含有全套的反硝化过程基因, 能将  $\text{NO}_3^-$  彻底还原成  $\text{N}_2$ 。根据好氧反硝化机理, DJ7 含有 *narG* 基因而不是周质还原酶基因 *napA*, 表明该菌在好氧条件下仍能进行反硝化作用的机理可能更倾向于微环境理论。当然这只是初步结果, 该菌株的作用机理还需进一步的探索和验证。今后, 可从以下几方面对该类菌进行深入研究。(1) 对反应后菌液样品进行 *nosZ* 基因的 RNA 提取和定量分析, 从 *nosZ* 基因的表达量上来更直观地验证还原能力的强弱。(2) 以更多株不同属的菌株作为实验对象, 比较不同菌株之间还原  $\text{N}_2\text{O}$  能力的差异和对不同环境条件的响应, 对含 *nosZ* 基因的微生物进行更全面的了解。(3) 不止关注 *nosZ* 基因与还原  $\text{N}_2\text{O}$ , 还可验证菌株在反硝化过程中的其他基因, 以及与  $\text{N}_2\text{O}$  排放关系, 考虑对该菌株进行全基因组测序, 更全面地分析该菌株不同途径的相关基因与相互作用关系。(4) 虽然对纯菌的脱氮特性进行研究会比较清晰地分析相关现象和机理, 但要将菌株应用到解决生态问题中, 还需将菌株接种于土壤环境样品中后的响应进行深入研究, 这样对菌株的应用才更具参考价值。

## 参考文献

- [1] Regan K, Kammann C, Hartung K, Lenhart K, Müller C, Philippot L, Kandeler E, Marhan S. Can differences in microbial abundances help explain enhanced  $\text{N}_2\text{O}$  emissions in a permanent grassland under elevated atmospheric  $\text{CO}_2$ ? *Global Change Biology*, 2011, 17(10): 3176–3186.
- [2] Ravishankara AR, Daniel JS, Portmann RW. Nitrous oxide ( $\text{N}_2\text{O}$ ): the dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century. *Science*, 2009, 326(5949): 123–125.
- [3] Hofmann DJ, Butler JH, Dlugokencky EJ, Elkins JW, Masarie K, Montzka SA, Tans P. The role of carbon dioxide in climate forcing from 1979 to 2004: introduction of the Annual Greenhouse Gas Index. *Tellus B Chemical and Physical Meteorology*, 2006, 58(5): 614–619.
- [4] Minamikawa K, Nishimura S, Sawamoto T, Nakajima Y, Yagi K. Annual emissions of dissolved  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$ , and  $\text{N}_2\text{O}$  in the subsurface drainage from three cropping systems. *Global Change Biology*, 2010, 16(2): 796–809.
- [5] Abbasi MK, Adams WA. Gaseous N emission during simultaneous nitrification-denitrification associated with mineral N fertilization to a grassland soil under field conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32(8/9): 1251–1259.
- [6] Fernandes SO, Bharathi PAL, Bonin PC, Michotey VD. Denitrification: an important pathway for nitrous oxide production in tropical mangrove sediments (Goa, India). *Journal of Environmental Quality*, 2010, 39(4): 1507–1516.
- [7] Tallec G, Garnier J, Billen G, Gousailles M. Nitrous oxide emissions from secondary activated sludge in nitrifying conditions of urban wastewater treatment plants: effect of oxygenation level. *Water Research*, 2006, 40(15): 2972–2980.
- [8] Sun XM, Li QF, Zhang Y, Liu HD, Zhao J, Qu KM. Phylogenetic analysis and nitrogen removal characteristics of a heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacteria strain from marine environment. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(6): 687–695. (in Chinese)  
孙雪梅, 李秋芬, 张艳, 刘淮德, 赵俊, 曲克明. 一株海水异养硝化-好氧反硝化菌系统发育及脱氮特性. *微生物学报*, 2012, 52(6): 687–695.
- [9] Liu Y, Ai GM, Miao LL, Liu ZP. *Marinobacter* strain NNA5, a newly isolated and highly efficient aerobic denitrifier with zero  $\text{N}_2\text{O}$  emission. *Bioresource Technology*, 2016, 206: 9–15.
- [10] Jin RF, Liu TQ, Liu GF, Zhou JT, Huang JY, Wang AJ. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the marine origin bacterium *Pseudomonas* sp. ADN-42. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 175(4): 2000–2011.
- [11] Miyahara M, Kim SW, Fushinobu S, Takaki K, Yamada T, Watanabe A, Miyauchi K, Endo G, Wakagi T, Shoun H. Potential of aerobic denitrification by *Pseudomonas stutzeri* TR2 to reduce nitrous oxide emissions from wastewater treatment plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(14): 4619–4625.
- [12] Yang XL, Li WM, Chen Y, Cao YS. Identification and denitrification of an aerobic bacterium. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(8): 1062–1070. (in Chinese)  
杨小龙, 李文明, 陈燕, 曹郁生. 一株好氧反硝化菌的分离鉴定及其除氮特性. *微生物学报*, 2011, 51(8): 1062–1070.
- [13] Ikeda-Ohtsubo W, Miyahara M, Kim SW, Yamada T, Matsuoka M, Watanabe A, Fushinobu S, Wakagi T, Shoun H, Miyauchi K, Endo G. Bioaugmentation of a wastewater bioreactor system with the nitrous oxide-reducing denitrifier *Pseudomonas stutzeri* strain TR2. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2013, 115(1): 37–42.
- [14] Brierley EDR, Wood M. Heterotrophic nitrification in an acid forest soil: isolation and characterisation of a nitrifying bacterium. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33(10): 1403–1409.

- [15] Wen Y, Wei CH. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacterium isolated from anaerobic/anoxic/oxic treatment system. *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10(36): 6985–6990.
- [16] Fang JJ, Ma CM, Liu CF. The advance of study on denitrifying bacteria. *Environmental Science & Technology*, 2010, 33(6E): 206–210, 264. (in Chinese)  
方晶晶, 马传明, 刘存富. 反硝化细菌研究进展. *环境科学与技术*, 2010, 33(6E): 206–210, 264.
- [17] Nie YX, Li L, Isoda R, Wang MC, Hatano R, Hashidoko Y. Physiological and genotypic characteristics of nitrous oxide (N<sub>2</sub>O)-emitting *Pseudomonas* species isolated from dent corn andisol farmland in Hokkaido, Japan. *Microbes and Environments*, 2016, 31(2): 93–103.
- [18] Gao N, Shen WS, Camargo E, Shiratori Y, Nishizawa T, Isobe K, He XH, Senoo K. Nitrous oxide (N<sub>2</sub>O)-reducing denitrifier-inoculated organic fertilizer mitigates N<sub>2</sub>O emissions from agricultural soils. *Biology and Fertility of Soils*, 2017, 53(8): 885–898.
- [19] Lin S, Iqbal J, Hu RG, Ruan LL, Wu JS, Zhao JS, Wang PJ. Differences in nitrous oxide fluxes from red soil under different land uses in mid-subtropical China. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2012, 146(1): 168–178.
- [20] Li M. Research progress of aerobic denitrifying biological denitrification technique. *Guangdong Chemical Industry*, 2015, 42(13): 119–120. (in Chinese)  
李美. 好氧反硝化生物脱氮技术研究进展. *广东化工*, 2015, 42(13): 119–120.

## Capability of N<sub>2</sub>O reduction of a facultative N<sub>2</sub>O reducer

Chunmei Liu<sup>1,2</sup>, Rong Sheng<sup>1</sup>, Yi Liu<sup>1</sup>, Xing Chen<sup>1,2</sup>, Wenxue Wei<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory of Agro-ecological Processes in Subtropical Regions, Taoyuan Station of Agro-ecology Research, Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha 410125, Hunan Province, China

<sup>2</sup> University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** [Objective] A nitrous oxide reducing bacterium (DJ7) was isolated from paddy soil and its ability to reduce N<sub>2</sub>O was detected under different incubation conditions. Aiming to understand the mechanisms of N<sub>2</sub>O reduction and supply theoretical basis for regulation of N<sub>2</sub>O emission. [Methods] The strain was isolated by microbial enrichment culture and identified by homogeneous analysis of its sequences of *nosZ* and 16S rRNA gene with the database of NCBI. The abilities of N<sub>2</sub>O-reducing of DJ7 at different temperatures and O<sub>2</sub> concentrations were determined by measuring the amount of N<sub>2</sub>O reduction through GC. [Results] The strain was characterized as *Pseudomonas* and contained *nosZ* gene, its N<sub>2</sub>O reduction rate was more than 0.0219 μmol/min under anaerobic at 30 °C. Although the increase of air O<sub>2</sub> concentration and shifts of incubation temperature at either direction resulted decreases of the capability of N<sub>2</sub>O reduction, it maintained a certain ability in N<sub>2</sub>O reduction. [Conclusion] The strain is an active facultative N<sub>2</sub>O reducer belonging to *Pseudomonas* and possesses strong ability to reduce N<sub>2</sub>O, especially under anaerobic condition. This strain may provide a new idea to alleviate the N<sub>2</sub>O issue and play an active role in the ecological environment.

**Keywords:** nitrous oxide reducer, *Pseudomonas* sp., N<sub>2</sub>O-reducing ability, *nosZ* gene

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41330856, 41501277, 41301274) and by the Special Funds for Strategic Pilot Sci-tech Projects of the Chinese Academy of Sciences (XDB15020200)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-731-84615210; E-mail: wenxuewei@isa.ac.cn

Received: 30 September 2017; Revised: 16 December 2017; Published online: 5 January 2018