

方知库
Eco-Environmental
Knowledge Web

环境科学

ENVIRONMENTAL SCIENCE

ISSN 0250-3301 CODEN HCKHDV
HUANJING KEXUE

- 主办 中国科学院生态环境研究中心
- 出版 科学出版社



2019

Vol.40 No.7
第40卷 第7期

目次

《大气污染防治行动计划》实施的环境健康效果评估 武卫玲, 薛文博, 王燕丽, 雷宇, 冯涛, 蔡泽林 (2961)

基于达标约束的南京市环境空气质量情景模拟 谢放尖, 史之浩, 李婧祎, 郑新梅, 胡建林, 刘春蕾, 杨峰 (2967)

郑州市 PM_{2.5} 中水溶性离子特征及来源分析 杨留明, 王申博, 郝祺, 韩士杰, 李晨, 赵庆炎, 燕启社, 张瑞芹 (2977)

能见度与 PM_{2.5} 浓度关系及其分布特征 王继康, 张恒德, 桂海林, 饶晓琴, 张碧辉 (2985)

基于扩散模式反演的橡胶轮胎制造行业 VOCs 排放特征 白红祥, 魏巍, 王雅婷, 任云婷, 臧佳欣, 程水源 (2994)

太原市环境空气中挥发性芳香烃碳同位素组成及来源 李颖慧, 闫雨龙, 李志生, 郝爱胜, 李如梅, 杨帆, 彭林 (3001)

办公楼聚集区空气中 PBDEs 谱分布与污染特征 王琳, 邓雅佳, 廖晓勇, 曹红英, 焦春春 (3008)

南北水调东线中游枢纽湖泊有色可溶性有机物来源组成特征 张柳青, 彭凯, 周蕾, 石玉, 李元鹏, 周永强, 龚志军, 张运林, 杨艳 (3018)

黄土丘陵沟壑区小流域不同水体氢氧同位素特征 张荷惠子, 于坤霞, 李占斌, 李鹏, 赵宾华, 柯浩成, 蒋凯鑫 (3030)

基于碳氮同位素的澜沧江水库 TOC 来源差异性分析 王从锋, 胡子龙, 杨正健, 丹勇, 赵萍, 郝文超, 聂小芬, 聂睿, 徐刘得, 刘德富 (3039)

李家河水库污染物来源及水体分层对水质的影响 徐进, 黄廷林, 李凯, 杨尚业, 温成成, 林子深, 李衍庆, 刘雪晴 (3049)

水库淹没带土壤有机氯农药分布特征及风险评价 王霞, 张青琢, 赵高峰, 王晓燕 (3058)

银川市湿地表层水中多环芳烃的分布、来源及生态风险评价 田大年, 党丽慧, 丁润梅, 蔡倩, 张鹏举, 汪岭, 杨慧芳 (3068)

人类活动影响下的垂直气候带岩溶泉地球化学特征对比: 以重庆金佛山水房泉、碧潭泉为例 谢国文, 杨平恒, 盛婷, 邓书金, 洪爱花 (3078)

渝江冲洪积扇地下水化学特征及控制因素分析 唐金平, 张强, 胡谦, 张宇, 聂保伟 (3089)

三峡库区蓄水期和非蓄水期附石藻类群落变化及其影响因素分析 付君珂, 刘黎, 贺新宇, 张红波, 董聪聪, 杨燕君, 施军琼, 吴忠兴 (3099)

降雨对香溪河库湾主要藻种原位生长的影响 翁传松, 刘德富, 张佳磊, 龚川, 沈旭舟 (3108)

绿狐尾藻分解及其氮磷释放特征 童雄, 罗沛, 刘锋, 黄敏, 陈哲, 肖润林, 吴金水 (3118)

微藻固定化条件优化及其污水氨氮去除潜力分析 刘祥, 王婧瑶, 吴娟娟, 鹏飞, 王凯军 (3126)

钛酸盐纳米管对水中氨氮的吸附特性 张政, 冯长生, 张晓瑞, 郑建奎, 蒋彩云, 李攀杰, 王玉萍 (3135)

基于缺陷重构的类芬顿光催化剂在降解染料废水中的应用 唐清文, 安晓强, 兰华春, 刘会娟, 李海翔 (3146)

N 原子杂化石墨烯高效活化过一硫酸盐降解 RBk5 染料废水 于永波, 黄湾, 董正玉, 吴丽颖, 张倩, 洪俊明 (3154)

Cu²⁺ 对以 NO₂⁻ 为电子受体反硝化过程的影响 买文可, 彭永臻, 吉建涛 (3162)

CANON 中试反应器启动及性能优化 孙庆花, 吴迪, 周家中, 郑志佳 (3169)

好氧段碳源浓度对同步去除和富集磷酸盐生物膜的影响 徐林建, 潘杨, 章豪, 冯鑫, 魏攀龙, 尤星怡 (3179)

有机物特性对 AAO 系统污泥沉降性能的影响 刘小博, 袁林江, 陈希, 薛欢婷 (3186)

不同污泥浓度下缺氧 FNA 对硝化菌活性的影响 吕心涛, 周桐, 田夏迪, 谷鹏超, 杨岸明, 王伟佳, 张树军 (3195)

ANAMMOX 菌铁自养反硝化工艺的稳定性 张文静, 黄勇, 毕贞, 胡羽婷, 董石语 (3201)

在线 NaClO 反洗对倒置 A²O-MBR 系统微生物群落的影响 王旭东, 高森, 王莹莹, 杨永哲, 刚家斌, 符国力, 王磊 (3208)

基于有机物释放和经济性的污泥预处理方法评价 袁悦, 谭学军, 郑舍予 (3216)

北京市清水与再生水协同利用优化模型 张田媛, 谭倩, 王淑萍 (3223)

N-亚硝胺在不同处理工艺污水处理厂中的分布及其去除 柳王荣, 赵建亮, 杨愿愿, 姚理, 刘有胜, 应光国 (3233)

北京市生活污水中曲霉和芬太尼的赋存 周子雷, 杜鹏, 白雅, 韩胜, 黄红梅, 徐泽琼, 李喜青 (3242)

贵阳市污水处理厂中典型抗生素的污染水平及生态风险 杨钊, 李江, 张圣虎, 向福亮, 唐涛涛, 杨娅男 (3249)

紫色土丘陵区畜禽养殖场土壤中抗生素抗性基因分布特征 程建华, 唐翔宇, 刘琛 (3257)

四环素对污泥蚯蚓粪中微生物种群和抗性基因的影响 陈景阳, 夏慧, 黄魁, 吴颖 (3263)

热水解污泥厌氧消化过程中肠球菌抗生素抗性基因与毒力基因的转归 李慧莉, 裴媛玫, 李姗, 何芙蓉, 杨月婷, 魏源送, 佟娟 (3270)

鸡粪与中药渣共堆肥对抗生素抗性基因的影响 武晋萍, 陈建文, 刘勇, 张红, 李君剑 (3276)

宁武亚高山湖泊细菌群落的时空格局及驱动机制 王雪, 刘晋仙, 柴宝峰, 罗正明, 赵鹏宇, 暴家兵 (3285)

石家庄市春季景观水体 nirS 型反硝化细菌群落特征分析 张艺冉, 李再兴, 孙悦, 霍然, 孟文茹, 王凌霄, 申邵恒, 杨子程, 周石磊 (3295)

磷差异性调控水稻根际 nirK/nirS 型反硝化菌组成与丰度 湛钰, 高丹丹, 盛荣, 魏文学, 秦红灵, 张文钊, 侯海军, 汤亚芳 (3304)

会仙岩溶湿地、稻田与旱地土壤细菌群落结构特征比较 贾远航, 靳振江, 袁武, 程跃扬, 邱江梅, 梁锦桃, 潘复静, 刘德深 (3313)

湘中典型稻田系统 Cd 平衡分析 蒋凯, 邓潇, 周航, 龙坚, 李欣阳, 董霞, 王树兵, 刘文辉, 侯红波, 彭佩钦, 廖柏寒 (3324)

改良剂对根际土壤-水稻系统中镉运移的影响 李义纯, 王艳红, 唐明灯, 巫彬芳, 李林峰, 艾绍英, 凌志祥 (3331)

重金属固定植物促生细菌的筛选及其阻控小麦富集重金属效应 韩辉, 王晓宇, 蔡红, 姚伦广, 蔡倩迪, 王逸雪, 陈兆进 (3339)

不同品种辣椒镉亚细胞分布和化学形态特征差异 彭秋, 李桃, 徐卫红, 焦璐琛, 邓继宝 (3347)

添加磷对水稻-油菜轮作土壤 N₂O 排放影响 孙正, 苏荣琳, 徐鹏, 吴宏涛, 胡金丽, 赵劲松, 胡荣桂 (3355)

渭北旱原土地利用方式对土壤团聚体稳定性及其有机碳的影响 刘杰, 马艳婷, 王宪玲, Sompouviset Thongsouk, 李利敏, 秦亚旭, 赵志远, 郑伟, 翟丙年 (3361)

不同土地利用类型的土壤中多环芳烃的纵向迁移特征 鲁垠涛, 向鑫鑫, 张士超, 刘明丽, 王静, 李爽, 姚宏, 孙绍斌 (3369)

西湖景区土壤中邻苯二甲酸酯污染水平、来源分析和空间分布特征 廖健, 邓超, 陈怡, 周文钊, 林春绵, 张辉 (3378)

生物炭对壤土土壤容重和团聚体的影响 李倩倩, 许晨阳, 耿增超, 张久成, 陈树兰, 王慧玲, 张妍, 俞方悦, 杨林, 董胜虎 (3388)

《环境科学》征订启事(3194) 《环境科学》征稿简则(3222) 信息(3256, 3284, 3323)

磷差异性调控水稻根际 *nirK/nirS* 型反硝化菌组成与丰度

湛钰^{1,2}, 高丹丹^{1,2}, 盛荣^{1*}, 魏文学¹, 秦红灵¹, 张文钊¹, 侯海军¹, 汤亚芳³

(1. 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, 长沙 410125; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 湖北工程学院生命科学与技术学院, 孝感 432000)

摘要: 磷作为一种重要的生命元素, 对反硝化微生物的活性和功能有重要影响. 反硝化功能基因 *nirK* 和 *nirS* 是编码亚硝酸还原酶两种同工酶基因, 但是, 磷对具有同种功能的 *nirK* 和 *nirS* 型反硝化菌的调控是否存在差异尚不清楚. 本文采集严重缺磷红壤性水稻土设置水稻盆栽试验, 通过外源添加磷肥设置对照 (CK, P: 0 mg·kg⁻¹), 低磷 (P1, P: 15 mg·kg⁻¹), 高磷 (P2, P: 30 mg·kg⁻¹) 这三个磷添加水平, 研究不同磷水平对水稻亚硝酸还原酶基因的组成与丰度的调控作用. 结果表明, 在长期缺磷土壤上施用磷肥对含亚硝酸还原酶基因 *nirK* 和 *nirS* 的细菌种群的调控作用有明显差异. 不管是根际还是非根际土, 含 *nirS* 的微生物种群均对施磷水平表现敏感, 尤其是高磷 (P2) 水平, 施磷可导致 *nirS* 丰度提高 2~3 倍, 同时显著改变 *nirS* 型反硝化微生物的组成结构. 相比之下, 施磷后含 *nirK* 基因的微生物组成结构和丰度变异较小. 与非根际土壤相比, 高磷水平条件下根际土中 *nirS* 的基因拷贝数和群落结构均发生了显著变化, 缺磷和低磷条件下水稻生长只引起根际土 *nirS* 种群组成结构发生显著变化, 但其丰度与非根际无显著差异. 但不同磷水平条件下 *nirK* 的基因丰度和组成结构在根际和非根际土之间几乎无显著变化. 综上所述, 在严重缺磷水稻土中加施磷肥会显著提高水稻根际和非根际土中 *nirK* 和 *nirS* 型反硝化菌数量, 并改变其种群组成结构, 且 *nirS* 比 *nirK* 型种群响应更敏感. 不同磷水平条件下的水稻根系生长均显著改变了根际土壤中 *nirK* 和 *nirS* 种群组成结构, 但除了在高磷水平条件下显著增加了 *nirS* 丰度外, 对 *nirK* 和 *nirS* 丰度均影响较小. 研究结果可为进一步深入探究施肥对土壤反硝化过程的影响提供理论依据.

关键词: 缺磷水稻土; 磷肥; 根际; *nirK*; *nirS*

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2019)07-3304-09 DOI: 10.13227/j.hjxx.201812061

Differential Responses of Rhizospheric *nirK*- and *nirS*-type Denitrifier Communities to Different Phosphorus Levels in Paddy Soil

ZHAN Yu^{1,2}, GAO Dan-dan^{1,2}, SHENG Rong^{1*}, WEI Wen-xue¹, QIN Hong-ling¹, ZHANG Wen-zhao¹, HOU Hai-jun¹, TANG Ya-fang³

(1. Taoyuan Agro-ecosystem Research Station, Key laboratory of Agro-ecological Processes in Subtropical Regions, Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha 410125, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. College of Life Science and Technology, Hubei Engineering University, Xiaogan 432000, China)

Abstract: Phosphorus is an essential life element, which can affect the activities and functions of denitrifiers. Both *nirK* and *nirS* genes can code nitrite reductase; however, it remains unclear whether *nirK*- and *nirS*-containing denitrifiers respond differentially to changes in the availability of phosphorus in paddy soil. In this study, P-deficient paddy soil was used to grow rice plants. Three phosphorus levels established by applying P fertilizer at a rate of 0 mg·kg⁻¹ (CK), 15 mg·kg⁻¹ (P1), and 30 mg·kg⁻¹ (P2), respectively. The abundance and community structure of *nirK*- and *nirS*-containing denitrifiers were determined using quantitative PCR and high-throughput sequencing techniques. Results indicated that *nirK*- and *nirS*-containing communities responded differentially to changes in the P levels. The *nirS*-containing communities are more sensitive to the changes in P in both rhizosphere and bulk soil samples. In addition, the abundance of *nirS* genes was 2-3 times higher in the P2 treatment than in the CK treatment. Furthermore, the *nirS* community structure is also clearly differed from the CK treatment. However, P addition only induced partial modification of the community structure and abundance of *nirK*-containing denitrifiers. Moreover, compared to the bulk soil with each phosphorus level, the *nirS* community structure in the rhizosphere soil changed significantly; however, only the P2 treatment induced significant increases in the abundance of the *nirS* gene. In contrast, no significant differences in the abundance and composition of *nirK*-containing denitrifiers were detected between rhizosphere and bulk soils under different phosphorus levels. Collectively, application of phosphate fertilizer in P-deficient paddy soil could significantly increase the abundance of *nirK*- and *nirS*-containing denitrifiers, changing their community structures, with *nirS*-type showing a greater sensitivity than *nirK*-type denitrifiers. In comparison, the denitrifying communities in the rhizosphere were more sensitive to variable P levels than that in the bulk soil. Compared to bulk soils, rice growth shifted the community structure of *nirS*- and *nirK*-containing denitrifiers in rhizosphere soils at each level of P, but failed to induce

收稿日期: 2018-12-07; 修订日期: 2019-01-30

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

作者简介: 湛钰(1994~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为土壤微生物分子生态学, E-mail: zhanyu1994@hotmail.com

* 通信作者, E-mail: shengrong@isa.ac.cn

significant changes in their abundance (except for P2) that could cause a significant increase in *nirS* abundance. These results could provide a theoretical basis for exploring the effects of fertilization on soil denitrification.

Key words: P-deficient paddy soil; phosphate fertilizer; rhizosphere; *nirK*; *nirS*

磷是地球生物生长和发育必需的营养元素, 不仅作为核酸和磷脂的结构成分, 还直接参与能量代谢和代谢中间体的活化^[1]. 虽然土壤中全磷比较丰富, 但是绝大部分以 $\text{Ca}_2\text{-P}$ 、 Fe-P 和 Al-P 等固定态的磷存在, 难以被植物或微生物吸收利用. 而能被植物或微生物直接吸收利用的有效磷较为缺乏^[1, 2]. 土壤有效磷的缺乏不仅会限制植物的生长, 还会影响土壤微生物活性和功能, 尤其是根际微生物. 根际定义为: 在植物根系表面以及可以直接受根系影响的土壤区域, 是土壤-植物-微生物相互作用的活性界面^[3]. 根际微生物作为土壤生态系统中最活跃的组分, 与土壤生态系统中的物质循环和能量流动密切相关, 对土壤氮素的转化与利用等具有重要作用^[4, 5].

反硝化作用作为土壤氮素转化的一个重要过程, 是反硝化微生物在厌氧条件下以硝酸根为电子受体进行呼吸代谢并将其转化为 N_2O 或 N_2 的过程, 是土壤中氮素损失的重要途径^[6]. 反硝化过程主要由 4 种不同的酶诱导: 硝酸还原酶、亚硝酸还原酶、一氧化氮还原酶、氧化亚氮还原酶, 其中, 亚硝酸还原酶基因被广泛用作反硝化微生物的标记基因^[7]. 编码亚硝酸还原酶有两种不同基因型的微生物: 一种是 *nirK* 基因编码的铜型亚硝酸还原酶, 另一种是 *nirS* 基因编码的含细胞色素 *cd1* 型的亚硝酸还原酶^[8]. 虽然还未明确这两种亚硝酸盐还原酶在功能上的差异, 但二者催化位点不同, 且不能共存于同种细胞中^[9]. Heylen 等^[10] 发现 *nirK* 普遍存在于 α -变形菌纲, 而 *nirS* 基因则在 β -变形菌纲中较多, 且 *nirK* 易发生水平基因转移, *nirK* 与 16S rRNA 基因系统发育不一致, 而 *nirS* 基因在科和属水平上与 16S rRNA 系统发生一致. Bárta 等^[11] 在对云杉林土壤的研究中发现, *nirK* 反硝化菌丰度与土壤有机碳含量成正比, 但是 *nirS* 反硝化菌并未发生这种现象. 由此可见, 两种具有亚硝酸还原功能的反硝化类群生理生化特性及其对环境因子的响应是有差异的.

有研究表明, 反硝化作用受多种因素, 如土壤养分状态、水分以及温度等环境因子的影响^[12-14]. Chen 等^[12] 的研究发现, 单施氮肥、均衡施氮磷钾肥和有机无机肥配施可显著提高 *nirK* 和 *nirS* 基因丰度, 同时改变其种群结构, 但 *nirK* 比 *nirS* 响应更敏感. 与施化肥相比, 有机肥的施用会显著提高

nirK 和 *nirS* 型反硝化菌丰度和多样性^[15]. 然而有关土壤磷素水平对反硝化微生物的影响, 尤其是同功能的 *nirK* 和 *nirS* 型反硝化微生物的了解较少. 已有的研究表明, 有效磷的缺乏会限制反硝化微生物活性, 磷肥施用可以刺激含 *nirK* 基因的反硝化菌生长^[16, 17]. 此外, 土壤磷素有效性还可能通过影响植物生长状况改变土壤氮素水平^[18, 19], 从而间接影响反硝化微生物的群落结构及其功能. 但是, 具有同种功能的 *nirK* 和 *nirS* 型反硝化菌对土壤磷水平变化的响应是否一致且其关键调控机制等问题均尚不明确.

因此, 本研究通过采集严重缺磷水稻土, 设置不同施磷水平, 利用水稻盆栽试验和现代微生物分子生物学技术, 探究在水稻种植条件下磷水平对亚硝酸还原酶基因组成与丰度的调控作用, 以期深入探究施肥对土壤反硝化过程的影响提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 供试土壤

土壤取自中国科学院桃源农业生态试验站第四纪红色黏土发育的水稻土, 选取长期定位试验缺磷处理土壤 (0~20 cm), 采样时间为 2016 年 1 月 20 日. 经自然风干并过 2 mm 筛, 去除石子和植物残体, 室温保存备用. 土壤基本化学性质为: 有机质 3.51%, 全氮 2.00 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 全磷 0.33 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 全钾 10.25 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 速效氮 193.20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 速效磷 3.17 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 速效钾 59.23 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, pH 5.02.

1.2 水稻盆栽试验

共设 3 个处理, 即对照 (CK): 不施磷肥; 低磷 (P1): P 添加量为 15 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ [$(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ 70 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$]; 高磷 (P2): P 添加量为 30 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ [$(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ 140 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$]. 所有处理均施加尿素 100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和钾素 100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 所用肥料为尿素和氯化钾. 将肥料与土壤充分混匀后分装到塑料桶 (直径 16 cm × 高 20 cm) 中, 每桶装土 3 kg, 设置 4 个重复. 每桶中放置了两个尼龙网袋 (孔径 50 μm , 可固定根系生长范围, 但不影响土壤水肥正常扩散), 尺寸分别为直径 8 cm × 高 15 cm 和直径 6 cm × 高 15 cm. 前者作为根袋用于水稻种植, 后者不种水稻用于非根际土壤采集, 两袋间相隔 1 cm. 袋中均填充拌肥土壤.

淹水一周后移栽水稻(苗龄 18 d)幼苗到各根袋中,每袋移栽水稻苗一兜含 5 棵幼苗.水稻品种为五山丝苗(编号为粤审稻 2009031).水稻生长至分蘖盛期(苗龄 52 d),破坏性采集根际和非根际土壤.根际土:将直径 8 cm 的根袋取出,除去尼龙网袋后取根系密集分布区域土样为根际土,分别标注为 CK-R、P1-R 和 P2-R.非根际土:将直径 6 cm 的土柱取出,去掉尼龙网和上下端各 4 cm 后用灭菌器具取土柱中心样品为非根际土,分别标注为 CK-B、P1-B 和 P2-B.采集的土壤样品一部分存放在 4℃ 用于 Olsen-P、铵态氮、硝态氮和溶解性有机碳(DOC)的检测,另一部分存放于 -80℃ 冰箱用于土壤 DNA 分析.

1.3 有效磷、硝态氮、铵态氮、DOC 测定

采用 $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ K}_2\text{SO}_4$ 溶液共提法浸提,使用连续流动注射分析仪(FIAstar 5000 Analyzer)测定土壤硝态氮和铵态氮含量,使用有机碳分析仪(TOC-VWP)测定土壤 DOC 含量^[20].采用 $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ 浸提、钼锑抗比色法,使用紫外可见分光光度计(UV-2600)测定土壤有效磷(Olsen-P)含量^[20].

1.4 土壤 DNA 提取和荧光定量 PCR

土壤微生物 DNA 的提取方法参照 SDS-GITC-PEG 方法^[12],并进行了适当修改.用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测所提 DNA 片段大小,并用核酸蛋白测定仪(Nanodrop-ND-1000 UV-vis 分光光度计)测定 DNA 的浓度及质量.

分别利用引物对 *nirK*-876F/1040R、*nirS*-cd3aF/R3cd 进行 *nirK*、*nirS* 基因片段扩增(表 1),仪器为 ABI 7900 (Massachusetts, USA).荧光定量 PCR 反应体系为 $10 \mu\text{L}$,包括上下游引物($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)各 $0.3 \mu\text{L}$,SYBR Green II (Takara) $5 \mu\text{L}$,Rox I (Takara) $0.2 \mu\text{L}$,DNA 模板 $1 \mu\text{L}$ ($5 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), ddH_2O $3.2 \mu\text{L}$.*nirK* 基因扩增程序为:95℃ 预变性 30 s;40 个循环(95℃,5 s;60℃,30 s;72℃,10 s);添加溶解曲线程序(95℃,15 s;60℃,15 s;95℃,15 s).*nirS* 基因扩增程序为:95℃ 预变性 30 s;40 个循环(95℃,5 s;60℃,30 s;72℃,30 s);添加溶解曲线程序(95℃,15 s;60℃,15 s;95℃,15 s).荧光定量 PCR 标准曲线的建立参照 Chen^[12]的方法.分别选择含有 *nirK* 和 *nirS* 目的片段的质粒,以 10 倍梯度稀释法配制定量标准曲线.标准曲线范围在 $10^2 \sim 10^8$ 之间, $R^2 > 0.99$,扩增效率在 90% ~ 110% 之间.

1.5 PCR 扩增和高通量测序

利用带有 8 个碱基序列 barcode 的 *nirK*-F1aCu/

R3Cu 和 *nirS*-cd3aF/R3cd 分别对 *nirK* 和 *nirS* 基因进行扩增(表 1),所用仪器为 Eppendorf Mastercycler (Model-5333).PCR 反应体系为 $50 \mu\text{L}$,包括上下游引物($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)各 $2 \mu\text{L}$, $2 \times \text{PCR mix}$ (Hot Start PCR Enzyme, Takara) $25 \mu\text{L}$,DNA 模板 $2 \mu\text{L}$ ($20 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), ddH_2O 补至 $50 \mu\text{L}$.*nirK* 基因扩增程序为:98℃ 预变性 2 min,30 个循环(98℃,10 s;58℃,30 s;72℃,45 s),最后 72℃ 延伸 10 min.*nirS* 基因扩增程序为:98℃ 预变性 2 min,30 个循环(98℃,10 s;54℃,30 s;72℃,45 s),最后 72℃ 延伸 10 min.

PCR 产物采用琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒(Axygen Biosciences, Union City, CA, USA)进行纯化,然后用 QuantiFluor™-ST (Promega, Wisconsin, USA)进行定量.将样品等质量混匀后建库,利用 Illumina Miseq PE300 测序平台(Illumina, San Diego, USA)进行测序分析(上海美吉生物医药科技有限公司,中国).

表 1 *nirK* 和 *nirS* 基因引物¹⁾

Table 1 Primers for <i>nirK</i> and <i>nirS</i> genes			
目的基因	引物	引物序列 (5'-3')	文献
<i>nirK</i>	<i>nirK</i> -876F	ATYGGCGGVCAYGGCGA	[21]
	<i>nirK</i> -1040R	GCYTCGATCAGRTTRTGTT	
	<i>nirK</i> -F1aCu	ATCATGGTCTGCCCGG	[22]
	<i>nirK</i> -R3Cu	GCCTCGATCAGRTTGTT	
<i>nirS</i>	<i>nirS</i> -cd3aF	G TSAACG TSAAGGARACSGG	[23]
	<i>nirS</i> -R3cd	GASTTCGGRTGSGTCTTGA	[24]

1) 上下游引物分别标注为 F 和 R; 引物序列 Y = C 或 T, R = A 或 G, S = C 或 G, V = A, C 或 G, D = A, G 或 T, B = C, G 或 T, N = A, C, T 或 G

1.6 数据分析方法

采用 Excel 2016 和 SPSS 25.0 对 Olsen-P、铵态氮、硝态氮、DOC 以及基因拷贝数进行数据统计分析,采用单因素(one-way ANOVA)和 Duncan 法进行方差分析和多重检验($\alpha = 0.05$),并用 Pearson 法对土壤养分含量和基因拷贝数进行相关性分析.在美吉生物云平台(<http://www.i-sanger.com/>)进行高通量测序数据质控,包括数据去杂和嵌合体去除,然后分别以 83% 和 82% 序列相似性进行 *nirK* 和 *nirS* 基因的 OTU 划分^[25],并进行群落 OTU 水平上的相似性分析(ANOSIM 分析).应用 QIIME 软件对得到的已划分 OTU 的去杂序列进行后续物种注释.每个 OTU 挑选一条代表序列与物种注释模板进行比对,进行物种注释,比对方法为 Blast.所用模板为 FunGene 数据库(<http://fungene.cme.msu.edu>)下载的各个功能基因的序列及物种信息.利用 Origin 9、Excel 2016 以及 Canoco 5.0 软件制图.

2 结果与分析

2.1 土壤养分含量变化

不同磷水平的土壤养分含量变化存在差异(表 2)。在非根际土壤中,与严重缺磷的 CK-B 相比,磷肥的施用显著增加了 P1-B 和 P2-B 土壤中的 Olsen-P 含量($P < 0.05$)。根际土壤也呈现出同样的趋势,表现为 P2-R > P1-R > CK-R。与非根际相比,各处理根际土壤中 Olsen-P 含量均呈现显著下降($P < 0.05$),且随着磷水平的提高,根际与非根际土壤之间的差异越来越大,表现为 CK-R 的 Olsen-P 含量比 CK-B 低 $0.37 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,而 P1-R 和 P2-R 处理的 Olsen-P 含量分别比 P1-B 和 P2-B 低 $0.45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $2.08 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

在非根际土壤中,2 个磷添加处理的 DOC 含量显著低于 CK 处理($P < 0.05$),说明施磷后,土壤

中的微生物消耗了更多的 DOC。在根际土中,仅 P2-R 的 DOC 含量显著低于 CK-R($P < 0.05$),而 P1-R 与 CK-R 无显著差异($P > 0.05$)。植物根系的生长导致各处理根际土的 DOC 含量均高于非根际,且随着磷水平的提高,其增加的幅度也显著提高,说明施磷后,水稻的种植会显著提高根际土壤 DOC 含量。

$\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 含量在非根际的 3 个处理之间没有显著差异($P > 0.05$),但在根际土中差异显著($P < 0.05$),表现为 P2-R < P1-R < CK-R。与非根际相比,不同磷水平条件下根际土壤 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 含量均显著降低,且随着磷水平的提高,其减少的幅度也越高,说明磷的添加加速了根际土壤 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 的转化。

$\text{NO}_3^- \text{-N}$ 含量在根际和非根际的 3 个磷水平处理间都没有显著性差异($P > 0.05$)。

表 2 不同磷水平处理水稻土养分含量变化¹⁾/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$

Table 2 Nutrient concentrations of three phosphorus levels in rhizosphere and bulk paddy soils/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$

项目	根际			非根际		
	CK-R	P1-R	P2-R	CK-B	P1-B	P2-B
Olsen-P	4.89 ± 0.27 e	5.99 ± 0.37 cd	7.02 ± 0.34 b	5.26 ± 0.21 de	6.44 ± 0.11 bc	9.10 ± 0.45 a
DOC	433.57 ± 16.19 a	455.20 ± 40.61 a	363.82 ± 32.79 ab	393.20 ± 67.75 a	274.17 ± 19.31 bc	216.87 ± 19.79 c
$\text{NH}_4^+ \text{-N}$	81.74 ± 7.47 b	76.97 ± 20.63 b	41.36 ± 7.71 c	190.05 ± 2.81 a	182.03 ± 0.53 a	186.78 ± 5.19 a
$\text{NO}_3^- \text{-N}$	1.49 ± 0.10 a	1.36 ± 0.31 a	1.67 ± 0.16 a	1.38 ± 0.10 a	1.45 ± 0.23 a	1.93 ± 0.50 a

1) 表中数据代表每处理 4 个重复的平均值 ± 标准误;不同字母代表差异显著($P < 0.05$)

2.2 *nirK* 和 *nirS* 基因丰度变化

非根际土中,随着磷水平的提高,水稻土中的亚硝酸还原酶基因丰度有不同程度地增加。相较于 CK,从低磷到高磷处理的 *nirK* 基因拷贝数增加幅度小,即 P2-B > P1-B > CK-B。其中 P1-B 与 CK-B 之间无显著差异($P > 0.05$),但 P2-B 处理的 *nirK* 基因拷贝数平均约为 CK-B 的 167%,达到显著水平[$P < 0.05$, 图 1(a)]. 与 CK-B 相比, P1-B 的 *nirS* 基因拷贝数也无显著变化($P > 0.05$),但是 P2-B 处理的 *nirS* 基因丰度是 CK-B 的 2 倍多[图 1(b)]. 不同磷水平的根际土相比, P2-R 的 *nirK* 丰度最高,其次是 CK-R 和 P1-R,但 P2-R 与 CK-R 以及 CK-R 和 P1-R 之间均无显著差异($P > 0.05$)。与 *nirK* 不同, P1-R 中的 *nirS* 丰度与 CK-R 无显著差异($P > 0.05$),但 P2-R 的 *nirS* 丰度是 CK-R 的 3 倍以上[$P < 0.05$, 图 1(b)]. 与其非根际相比,水稻根系的生长导致 CK 根际土具有较高的 *nirK* 丰度,但在低磷和高磷条件下,根际和非根际之间无显著差异($P > 0.05$)。与 *nirK* 不同,在低磷和 CK 处理中根 > 际和非根际 *nirS* 的丰度无显著差异($P > 0.05$),但在高磷处理中,根际土 *nirS* 基因拷贝数是非根际的 2.46 倍。上述结果说明在高磷条件下根际环境对含

nirK 和 *nirS* 基因反硝化微生物丰度的影响更大,且 *nirS* 种群响应更敏感。此外, *nirK* 和 *nirS* 基因丰度与 Olsen-P 的相关性分析显示(表 3),不管是根际还是非根际土, *nirS* 基因的丰度与 Olsen-P 的相关性均明显高于 *nirK*, *nirK* 和 *nirS* 在根际土中的相关系数分别为 0.273($P > 0.05$)和 0.519($P > 0.05$),在非根际土中的相关系数分别为 0.791($P < 0.01$)和 0.919($P < 0.001$),进一步说明 *nirS* 种群丰度对土壤磷浓度的变化响应更敏感。

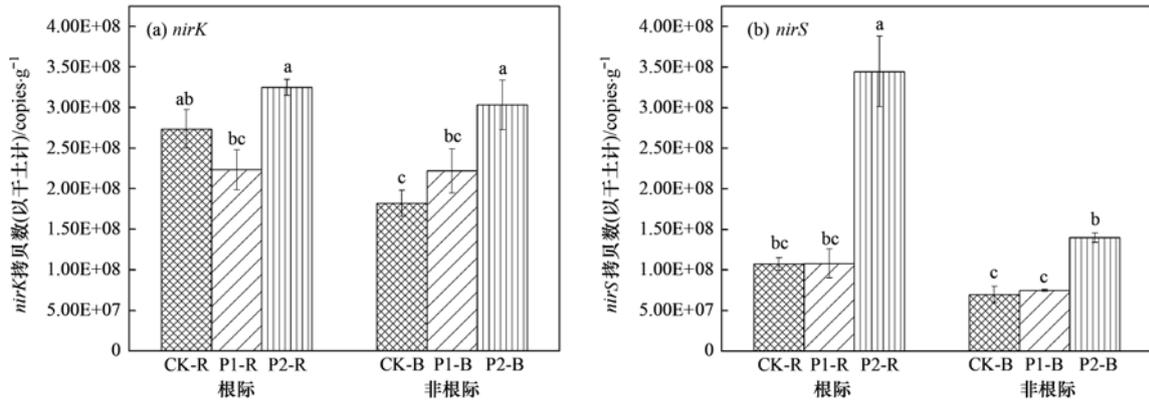
表 3 土壤养分含量与 *nirK* 和 *nirS* 基因丰度的 Pearson 相关系数¹⁾

Table 3 Pearson's correlation coefficients for the relationships between nutrient concentrations and the abundance of *nirK* and *nirS* in rhizosphere and bulk paddy soils

项目	<i>nirK</i>		<i>nirS</i>	
	根际	非根际	根际	非根际
Olsen-P	0.273	0.791 **	0.519	0.919 **
DOC	-0.591 *	-0.444	-0.650 *	-0.399
$\text{NH}_4^+ \text{-N}$	-0.571	0.113	-0.670 *	0.136
$\text{NO}_3^- \text{-N}$	0.535	0.499	0.411	0.387

1) * 表示 $P < 0.05$; ** 表示 $P < 0.01$

2.3 含 *nirK* 和含 *nirS* 反硝化细菌种群组成结构变化
nirK 和 *nirS* 有效序列分别为 894 856 和 881 424



图柱代表每处理4个重复的测定平均值,误差线代表标准误;不同字母代表差异显著($P < 0.05$)

图1 不同磷水平处理水稻土根际和非根际 *nirK*、*nirS* 基因丰度

Fig. 1 The *nirK* and *nirS* gene abundance for three phosphorus levels in rhizosphere and bulk paddy soils

条,平均每个样品37 286和36 726条(表4). 分别以83%和82%序列相似性划分 *nirK* 和 *nirS* 基因的 OTU, 获得 750 和 248 个 OTU. 通过计算各处理根

际和非根际土壤 *nirK* 和 *nirS* 多样性指数发现,各处理 *nirK* 和 *nirS* 种群的 α -多样性指数无显著差异($P > 0.05$).

表4 *nirK* 和 *nirS* 基因高通量测序有效序列数和 α -多样性指数¹⁾

Table 4 High-throughput sequencing and α -diversity index of *nirK* and *nirS* genes

项目	组别	测序结果 有效序列数	α -多样性指数			
			Sobs	Chao	Shannon	Simpson
<i>nirK</i>	CK-R	32 643 ± 2 342 b	128 ± 9 a	153.92 ± 6.01 ab	2.28 ± 0.27 ab	0.20 ± 0.07 a
	P1-R	35 274 ± 5 042 ab	139 ± 18 a	159.04 ± 18.51 ab	2.35 ± 0.18 a	0.19 ± 0.05 a
	P2-R	39 668 ± 3 777 a	141 ± 30 a	168.70 ± 41.48 ab	2.10 ± 0.16 ab	0.25 ± 0.05 a
	CK-B	38 691 ± 4 676 ab	113 ± 30 a	146.23 ± 23.81 b	2.08 ± 0.23 ab	0.25 ± 0.06 a
	P1-B	38 533 ± 5 507 ab	144 ± 19 a	188.40 ± 26.29 a	2.21 ± 0.18 ab	0.20 ± 0.04 a
	P2-B	38 906 ± 1 638 ab	125 ± 12 a	150.00 ± 13.68 ab	1.98 ± 0.10 b	0.26 ± 0.03 a
<i>nirS</i>	CK-R	37 219 ± 2 565 ab	58 ± 13 a	82.08 ± 33.56 a	1.97 ± 0.18 b	0.22 ± 0.03 b
	P1-R	36 434 ± 3 116 b	65 ± 12 a	103.43 ± 10.25 a	1.87 ± 0.25 b	0.35 ± 0.06 a
	P2-R	41 248 ± 2 145 a	87 ± 2 a	84.78 ± 23.25 a	1.99 ± 0.34 b	0.24 ± 0.11 b
	CK-B	34 862 ± 3 932 b	67 ± 7 a	83.96 ± 11.93 a	2.48 ± 0.08 a	0.12 ± 0.02 c
	P1-B	34 619 ± 3 396 b	72 ± 22 a	88.67 ± 27.47 a	2.19 ± 0.10 ab	0.19 ± 0.01 bc
	P2-B	35 975 ± 1 744 b	74 ± 6 a	105.64 ± 25.44 a	2.09 ± 0.15 b	0.20 ± 0.03 bc

1)表中数据代表每处理4个重复的平均值 ± 标准误;不同字母代表差异显著($P < 0.05$)

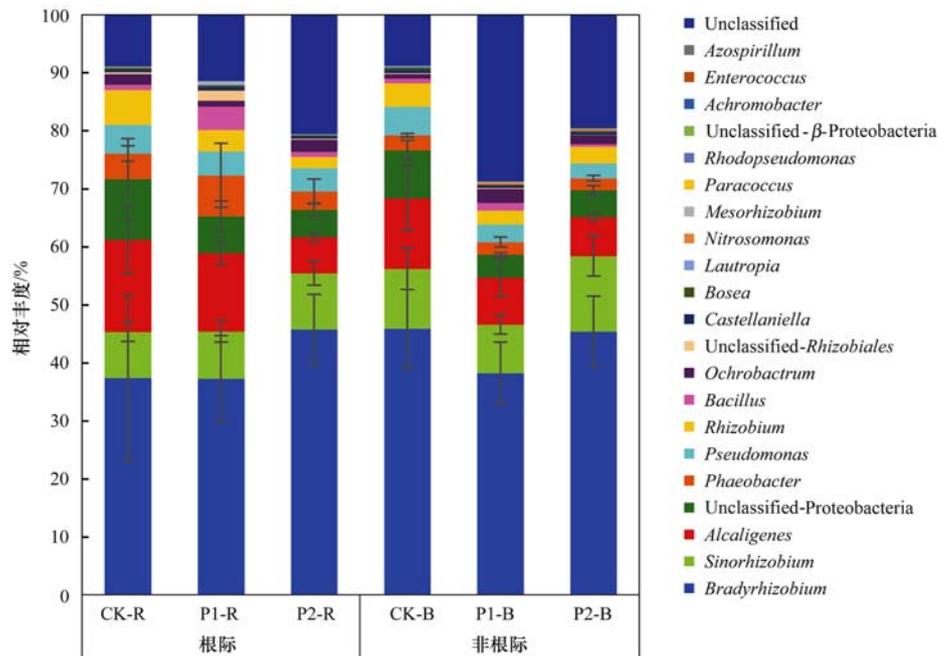
由测序结果(图2)可知, *nirK* 种群的优势属 *Bradyrhizobium*、*Sinorhizobium*、*Alcaligenes*、*Unclassified-Proteobacteria*、*Phaeobacter*、*Pseudomonas* 和 *Rhizobium* 均归属于变形菌门,占 *nirK* 型反硝化菌丰度的66.27%~88.22%。这些属在3个磷水平处理间以及根际与非根际间均存在显著差异($P < 0.05$)。在非根际土中, P1-B的 *Alcaligenes* 和 *Proteobacteria* 的相对丰度分别从占比12.16%和8.29%减少到8.07%和4.00%。与P1-B相比, P2-B的 *Bradyrhizobium* 和 *Sinorhizobium* 的相对丰度略有上升,从38.25%和8.36%增加到45.40%和13.02%。

不同磷水平条件下的根际土 *nirK* 种群组成结构也存在差异($P < 0.05$),尤其是 P2-R 处理。例如,与 CK-R 相比, P2-R 处理中的 *Bradyrhizobium*

和 *Sinorhizobium* 的相对丰度分别从37.3%和8%增加到45.75%和9.7%,而 *Alcaligenes* 从15.82%降低到6.17%。但与 CK-R 相比, P1-R 中 *nirK* 种群组成没有发生明显变化($P > 0.05$)。

在严重缺磷条件下,水稻根系生长导致根际 CK-R 中 *Bradyrhizobium* 和 *Sinorhizobium* 的相对丰度显著低于非根际土 CK-B ($P < 0.05$),而 *Alcaligenes* 和 *Rhizobium* 显著增加($P < 0.05$)。在低磷条件下,根际土 P1-R 中 *Alcaligenes*、*Rhizobium* 和 *Phaeobacter* 相对丰度均显著高于非根际 P1-B ($P < 0.05$)。但在高磷条件下,含 *nirK* 基因反硝化微生物组成结构在根际和非根际之间无显著差异($P > 0.05$)。

由 *nirS* 基因属水平上的注释结果可知(图3),磷的添加显著改变了 *nirS* 型反硝化菌的群落结构($P < 0.05$)。在非根际土中, P1-B 和 P2-B 群落组



图柱代表每处理 4 个重复的测定平均值, 误差线代表标准差

图 2 不同磷水平水稻土 *nirK* 型反硝化细菌属分类水平物种组成

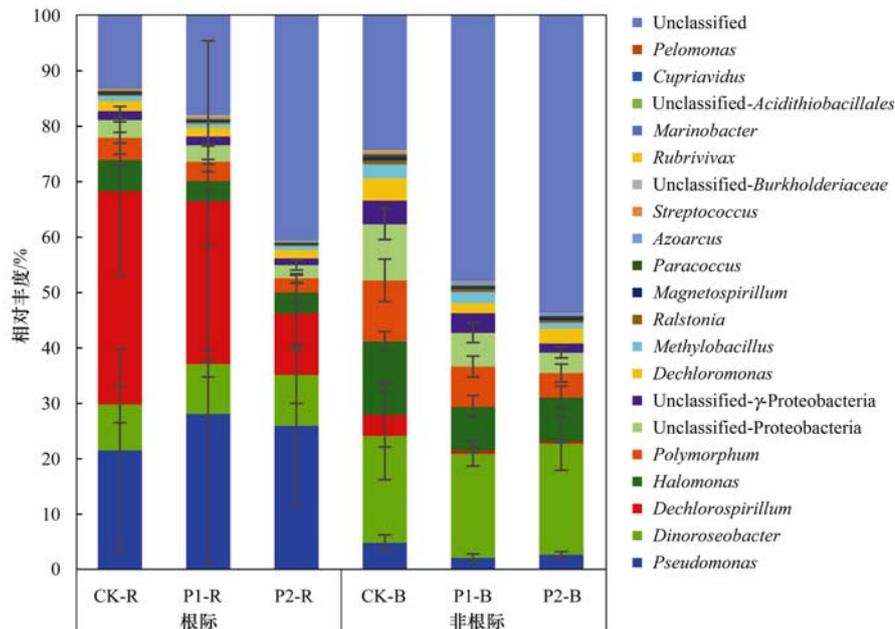
Fig. 2 Composition of *nirK*-containing bacterial genera at three phosphorus levels in rhizosphere and bulk paddy soils

成结构相似, 但与 CK-B 存在显著差异 ($P < 0.05$). 与 CK-B 相比, P2-B 高磷处理的 unclassified 组分的相对丰度从 24.19% 增加到 53.56%, 但 *Pseudomonas* 和 *Halomonas* 的相对丰度减少了将近一半, *Dechlorospirillum* 从 3.83% 减少到了 0.5% 以下. 其中, 部分菌属在高磷水平下的变化更明显, *Polymorphum* 在 CK-B 中的相对丰度为 11.02%, 而在 P1-B 和 P2-B 处理中仅占 7.25% 和 4.39%, *Unclassified-Proteobacteria* 由 CK-B 处理的 10.14% 分

别减少到 6.10% 和 3.71%.

磷的添加同样导致根际土壤中 *nirS* 种群的结构发生了显著变化 ($P < 0.05$), 尤其是高磷处理. 如与 CK-R 相比, P1-R 和 P2-R 处理中 *Dechlorospirillum* 的相对丰度分别平均减少了 9.15% 和 27.39%, 而 unclassified 组分相对丰度分别增加了 4.81% 和 27.53%.

不同磷水平条件下的水稻根系生长均导致其根际土中的 *nirS* 种群组成结构显著不同于其非根际



图柱代表每处理 4 个重复的测定平均值, 误差线代表标准差

图 3 不同磷水平水稻土 *nirS* 型反硝化细菌属分类水平物种组成

Fig. 3 Composition of *nirS*-containing denitrifiers at the genus level for three phosphorus levels in rhizosphere and bulk paddy soils

土壤 ($P < 0.05$), 主要体现在根际土中 *Pseudomonas* 和 *Dechlorospirillum* 的相对丰度大幅提高, 而 *Dinoroseobacter*、*Halomonas*、*Polymorphum* 和 *Unclassified-Proteobacteria* 等种群比例相对降低. 但是在不同磷水平条件下根际与非根际间的差异有差别. 与 CK 相比, P1 和 P2 处理根际与非根际土之间 *Pseudomonas* 相对丰度的差值变大, 而随着磷含量的增加, *Dechlorospirillum*、*Halomonas*、*Polymorphum* 和 *Unclassified-Proteobacteria* 在根际与非根际之间的差异越来越小. 如 CK-R 的 *Dechlorospirillum* 相对丰度比 CK-B 高 34.69%, 而在 P1 和 P2 处理中, 根际与非根际间仅分别相差 28.86% 和 10.78%.

通过 PCA 分析进一步探讨在严重缺磷的稻田土壤中, 磷水平对 *nirK* 和 *nirS* 型反硝化细菌种群结构的影响 (图 4). 由图 4 可知, *nirK* 基因的根际和非根际群落样本聚集在一起 [图 4(a)], 而 *nirS* 的根际与非根际样品在轴 1 上分开 [图 4(b)], 说明

水稻土含 *nirS* 基因的反硝化微生物群落结构在根际与非根际间有明显差异, 而含 *nirK* 基因的反硝化微生物根际与非根际间群落结构相似. 同时, *nirK* 基因的 P1-B、P2-B 与 CK-B 在轴 1 上分开, 但是 P1-B 与 P2-B 聚集在一起; P2-R 与 CK-R 在轴 1 上分开, 但是 P1-R 与 CK-R 聚集在一起 [图 4(a)]. 而不管是根际还是非根际, *nirS* 基因的 3 个磷水平都能在轴 2 上较好地分开, 尤其是 CK-B 与 P2-B, CK-R 与 P2-R [图 4(b)]. 说明不管是根际还是非根际, 含 *nirK* 和 *nirS* 基因微生物的群落结构对磷添加都有明显的响应, 尤其是高磷水平, 但是 *nirS* 基因对磷添加的响应比 *nirK* 更敏感. 此外, *nirK* 和 *nirS* 种群结构的相似性分析 (ANOSIM) 结果显示, 施磷后, 含 *nirK* 和 *nirS* 基因微生物的群落结构都发生了极显著的变化 ($P < 0.01$), 但是 *nirS* 基因处理间的差异 ($R = 0.6391$) 比 *nirK* ($R = 0.3291$) 更大, 进一步说明 *nirS* 种群结构对土壤磷浓度的变化响应更敏感.

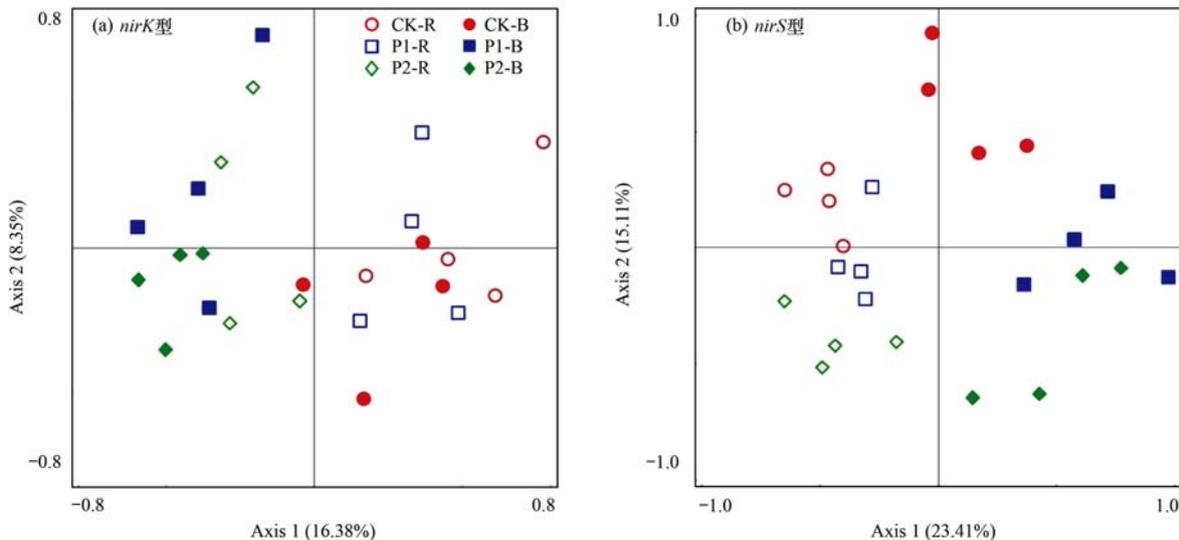


图 4 不同磷水平水稻土 *nirK* 和 *nirS* 型反硝化细菌 OTU 水平 PCA 分析

Fig. 4 Principal component analysis of *nirK*- and *nirS*- containing bacterial OTU at three phosphorus levels in rhizosphere and bulk paddy soils

3 讨论

磷是重要的生命元素, 是核苷酸和能量代谢必不可少的成分, 所以土壤磷的缺乏不仅限制植物生长^[1], 同时也影响土壤微生物繁衍和功能^[26, 27]. 但是, 对于在缺磷环境下土壤磷如何调控功能微生物种群, 尤其是具有相同功能的微生物种群缺乏清晰的认识. 本研究发现, 在严重缺磷的水稻土上施用磷肥, 土壤亚硝酸还原酶基因 *nirK* 和 *nirS* 所代表的反硝化微生物种群间存在明显的差异性响应. 不管是根际还是非根际土, 含 *nirS* 的微生物种群均对施磷水平表现敏感, 相比之下, 含 *nirK* 基因的微生物

组成结构和丰度变异较小. 以往的研究发现, 不同环境下, 共存的 *nirK* 和 *nirS* 反硝化菌群落构建规则存在差异^[28], *nirK* 和 *nirS* 在土壤生态系统中可能占据着不同的生态位^[29]. 其中, *nirK* 种群对生境的特异选择性更强, 对环境变异的响应比 *nirS* 种群更敏感^[28]. 但也有研究发现 *nirS* 对 pH 的改变比 *nirK* 敏感, 尤其是在 pH = 4.7 的阈值下, *nirS* 的转录过程受到严重抑制, 酶的数量及活性明显降低^[30, 31]. 因此, *nirK* 和 *nirS* 种群对不同生境变化的响应可能存在差异. 本研究中, 增加土壤磷含量, 尤其是高磷 (P2) 水平引起根际和非根际土中 *nirS* 基因丰度和部分种群的相对丰度成倍增加或减少, 表明这些

组分中的一个或多个物种对磷含量响应敏感, 但 *nirK* 的丰度和种群相对丰度的变化幅度明显小于 *nirS*。虽然人们无法全部了解这些对磷响应敏感的物种, 但从已注释物种, 可以推测它们受磷调控可能是因为磷的添加促进部分反硝化菌的生长繁殖, 如 *nirS* 种群中的 *Halomonas*, 在缺磷条件下严重制约其生长繁殖^[32]。Allers 等^[33] 和 Sánchez 等^[34] 的研究也表明, 在海水中, 磷添加加快浮游细菌 *Rhodobacteraceae* 的生长速率, 而本研究发现添加磷肥显著增加该细菌目中 *Dinoroseobacter* 和 *Paracoccus* 等属的丰度。此外, 本实验还发现, 根际土中 *nirS* 基因对磷的响应比 *nirK* 更敏感, 尤其是在高磷(P2-R)水平下, *nirS* 基因拷贝数甚至达到 CK-R 的 3 倍以上。Yin 等^[35] 在对潮土棕壤的研究中也发现, *nirS* 基因群落结构受到磷浓度的调控, 而 *nirK* 种群未发现这种影响。上述结果进一步说明淹水稻土中含 *nirS* 反硝化种群对土壤磷含量响应更为敏感, 尤其是高磷水平, 且在水稻根际和非根际都表现出相同的趋势。

与非根际土壤主要受磷水平影响相比, 水稻根际土壤不仅受磷的影响, 同时还受水稻植株根系分泌物制约。一般情况下, 在缺磷土壤上施用磷肥显著促进植物生长的同时也改善根际环境和增加根系分泌物, 从而影响根际微生物组成与活性^[36, 37]。本研究发现, 含 *nirS* 基因种群受到根际的显著影响, 不论是基因丰度还是群落结构, 根际与非根际之间都存在差异, 而 *nirK* 几乎没有显著变化。研究表明, *nirS* 型反硝化菌容易在好氧土壤中聚集^[38], 而水稻根系细胞的通气组织可以分泌氧气促进 *nirS* 型反硝化菌数量。但是 *nirS* 基因丰度在根际与非根际间的显著性差异只发生在高磷处理, 这可能是因为, 高磷水平下植物生长最好, 根系活性最高, 既需要从土壤中吸收更多的养分, 又产生更多的根系分泌物, 造成了根际与非根际较大的养分差异和氧化还原条件^[19]。此外, 还有研究认为, 植物根系分泌物的量会影响根际微生物的数量, 而根系分泌物的类型则会影响根际微生物的群落结构^[39]。因此, 含 *nirS* 基因的群落结构在根际与非根际间具有显著性差异可能是因为水稻根系分泌物能诱导和刺激特殊种群的微生物在根际定殖^[36], 以往的研究也发现, 根系分泌物提供的碳源和氮源能促进含 *nirS* 基因的微生物在根际生长, 如 *Pseudomonas* 和 *Dechlorospirillum*^[36, 40, 41]。因此, 含 *nirS* 反硝化菌对水稻生长的响应比 *nirK* 反硝化菌更加敏感。

4 结论

在严重缺磷水稻土中加施磷肥会显著提高反硝

化菌数量, 并改变反硝化菌种群组成结构, 且根际土响应更加敏感。与含 *nirK* 反硝化细菌相比, 含 *nirS* 反硝化细菌种群对磷水平和水稻生长的响应更加敏感。

参考文献:

- [1] Rausch C, Bucher M. Molecular mechanisms of phosphate transport in plants[J]. *Planta*, 2002, **216**(1): 23-37.
- [2] Holford I C R. Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants[J]. *Australian Journal of Soil Research*, 1997, **35**(2): 227-240.
- [3] 陆雅海, 张福锁. 根际微生物研究进展[J]. *土壤*, 2006, **38**(2): 113-121.
Lu Y H, Zhang F S. The advances in rhizosphere microbiology [J]. *Soils*, 2006, **38**(2): 113-121.
- [4] Philippot L, Hallin S, Bjerrum G, et al. Biochemical cycling in the rhizosphere having an impact on global change[J]. *Plant and Soil*, 2009, **321**(1-2): 61-81.
- [5] Dotaniya M L, Meena V D. Rhizosphere effect on nutrient availability in soil and its uptake by plants: a review [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 2015, **85**(1): 1-12.
- [6] 贺纪正, 张丽梅. 土壤氮素转化的关键微生物过程及机制[J]. *微生物学通报*, 2013, **40**(1): 98-108.
He J Z, Zhang L M. Key processes and microbial mechanisms of soil nitrogen transformation [J]. *Microbiology China*, 2013, **40**(1): 98-108.
- [7] Zhou S L, Huang T L, Zhang C H, et al. Illumina MiSeq sequencing reveals the community composition of *nirS*-type and *nirK*-type denitrifiers in Zhoucun reservoir—a large shallow eutrophic reservoir in northern China[J]. *RSC Advances*, 2016, **6**(94): 91517-91528.
- [8] Zumft W G. Cell biology and molecular basis of denitrification [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1997, **61**(4): 533-616.
- [9] 郭丽芸, 时飞, 杨柳燕. 反硝化菌功能基因及其分子生态学研究进展[J]. *微生物学通报*, 2011, **38**(4): 583-590.
- [10] Guo L Y, Shi F, Yang L Y. Advances in functional genes and molecular ecology in denitrifiers[J]. *Microbiology China*, 2011, **38**(4): 583-590.
- [11] Heylen K, Gevers D, Vanparys B, et al. The incidence of *nirS* and *nirK* and their genetic heterogeneity in cultivated denitrifiers [J]. *Environmental Microbiology*, 2006, **8**(11): 2012-2021.
- [12] Bárta J, Melichová T, Vaněk D, et al. Effect of pH and dissolved organic matter on the abundance of *nirK* and *nirS* denitrifiers in spruce forest soil[J]. *Biogeochemistry*, 2010, **101**(1-3): 123-132.
- [13] Chen Z, Luo X Q, Hu R G, et al. Impact of long-term fertilization on the composition of denitrifier communities based on nitrite reductase analyses in a paddy soil[J]. *Microbial Ecology*, 2010, **60**(4): 850-861.
- [14] Chen Z, Liu J B, Wu M N, et al. Differentiated response of denitrifying communities to fertilization regime in paddy soil[J]. *Microbial Ecology*, 2012, **63**(2): 446-459.
- [15] Liu J B, Hou H J, Sheng R, et al. Denitrifying communities differentially respond to flooding drying cycles in paddy soils[J]. *Applied Soil Ecology*, 2012, **62**: 155-162.
- [16] 尹昌, 范分良, 李兆君, 等. 长期施用有机和无机肥对黑土 *nirS* 型反硝化菌种群结构和丰度的影响[J]. *环境科学*, 2012, **33**(11): 3967-3975.

- Yin C, Fan F L, Li Z J, *et al.* Influences of long-term application of organic and inorganic fertilizers on the composition and abundance of *nirS*-type denitrifiers in black soil [J]. *Environmental Science*, 2012, **33**(11): 3967-3975.
- [16] Sheng R, Meng D L, Wu M N, *et al.* Effect of agricultural land use change on community composition of bacteria and ammonia oxidizers[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2013, **13**(7): 1246-1256.
- [17] He M Z, Dijkstra F A. Phosphorus addition enhances loss of nitrogen in a phosphorus-poor soil [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, **82**: 99-106.
- [18] Mori T, Ohta S, Ishizuka S, *et al.* Phosphorus application reduces N₂O emissions from tropical leguminous plantation soil when phosphorus uptake is occurring[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2014, **50**(1): 45-51.
- [19] Duan Y H, Shi X J, Li S L, *et al.* Nitrogen use efficiency as affected by phosphorus and potassium in long-term rice and wheat experiments[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2014, **13**(3): 588-596.
- [20] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. (第三版). 北京: 中国农业出版社, 2000. 49-56, 79-83.
- [21] Henry S, Baudoin E, López-Gutiérrez J C, *et al.* Quantification of denitrifying bacteria in soils by *nirK* gene targeted real-time PCR[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, **59**(3): 327-335.
- [22] Hallin S, Lindgren P E. PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65**(4): 1652-1657.
- [23] Michotey V, Méjean V, Bonin P. Comparison of methods for quantification of cytochrome *cd₁*-denitrifying bacteria in environmental marine samples[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**(4): 1564-1571.
- [24] Throbäck I N, Enwall K, Jarvis Å, *et al.* Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, **49**(3): 401-417.
- [25] Palmer K, Biasi C, Horn M A. Contrasting denitrifier communities relate to contrasting N₂O emission patterns from acidic peat soils in arctic tundra[J]. *The ISME Journal*, 2012, **6**(5): 1058-1077.
- [26] Cleveland C C, Townsend A R. Nutrient additions to a tropical rain forest drive substantial soil carbon dioxide losses to the atmosphere[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, **103**(27): 10316-10321.
- [27] Wei X M, Hu Y J, Peng P Q, *et al.* Effect of P stoichiometry on the abundance of nitrogen-cycle genes in phosphorus-limited paddy soil[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2017, **53**(7): 767-776.
- [28] Jones C M, Hallin S. Ecological and evolutionary factors underlying global and local assembly of denitrifier communities [J]. *The ISME Journal*, 2010, **4**(5): 633-641.
- [29] Tang Y Q, Zhang X Y, Li D D, *et al.* Impacts of nitrogen and phosphorus additions on the abundance and community structure of ammonia oxidizers and denitrifying bacteria in Chinese fir plantations[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, **103**: 284-293.
- [30] Brenzinger K, Dörsch P, Braker G. pH-driven shifts in overall and transcriptionally active denitrifiers control gaseous product stoichiometry in growth experiments with extracted bacteria from soil[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, **6**: 961.
- [31] Herold M B, Giles M E, Alexander C J, *et al.* Variable response of *nirK* and *nirS* containing denitrifier communities to long-term pH manipulation and cultivation [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2018, **365**(7), doi: 10.1093/femsle/fny035.
- [32] Sarilmiser H K, Ates O, Ozdemir G, *et al.* Effective stimulating factors for microbial levan production by *Halomonas smyrnensis* AAD6^T[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2015, **119**(4): 455-463.
- [33] Allers E, Gómez - Consarnau L, Pinhassi J, *et al.* Response of *Alteromonadaceae* and *Rhodobacteriaceae* to glucose and phosphorus manipulation in marine mesocosms [J]. *Environmental Microbiology*, 2007, **9**(10): 2417-2429.
- [34] Sánchez O, Koblížek M, Gasol J M, *et al.* Effects of grazing, phosphorus and light on the growth rates of major bacterioplankton taxa in the coastal NW Mediterranean [J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2017, **9**(3): 300-309.
- [35] Yin C, Fan F L, Song A L, *et al.* Different denitrification potential of aquatic brown soil in northeast China under inorganic and organic fertilization accompanied by distinct changes of *nirS*- and *nirK*-denitrifying bacterial community[J]. *European Journal of Soil Biology*, 2014, **65**: 47-56.
- [36] Wu H L, Wang X Z, He X J, *et al.* Effects of root exudates on denitrifier gene abundance, community structure and activity in a micro-polluted constructed wetland [J]. *Science of the Total Environment*, 2017, **598**: 697-703.
- [37] 罗永清, 赵学勇, 李美霞. 植物根系分泌物生态效应及其影响因素研究综述[J]. *应用生态学报*, 2012, **23**(12): 3496-3504.
- Luo Y Q, Zhao X Y, Li M X. Ecological effect of plant root exudates and related affecting factors; a review [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2012, **23**(12): 3496-3504.
- [38] Coyne M S, Arunakumari A, Averill B A, *et al.* Immunological identification and distribution of dissimilatory heme *cd1* and nonheme copper nitrite reductases in denitrifying bacteria [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, **55**(11): 2924-2931.
- [39] 朱丽霞, 章家恩, 刘文高. 根系分泌物与根际微生物相互作用研究综述[J]. *生态环境*, 2003, **12**(1): 102-105.
- Zhu L X, Zhang J E, Liu W G. Review of studies on interactions between root exudates and rhizospheric microorganisms [J]. *Ecology and Environment*, 2003, **12**(1): 102-105.
- [40] Rovira D A. Interactions between plant roots and soil microorganisms[J]. *Annual Review of Microbiology*, 1965, **19**: 241-266.
- [41] Phillips L A, Armstrong S A, Headley J V, *et al.* Shifts in root-associated microbial communities of *Typha latifolia* growing in naphthenic acids and relationship to plant health [J]. *International Journal of Phytoremediation*, 2010, **12**(8): 745-760.

CONTENTS

Health Benefit Evaluation for Air Pollution Prevention and Control Action Plan in China	WU Wei-ling, XUE Wen-bo, WANG Yan-li, <i>et al.</i> (2961)
Scenario Simulation Study Constrained by the Ambient Air Quality Standards in Nanjing	XIE Fang-jian, SHI Zhi-hao, LI Jing-yi, <i>et al.</i> (2967)
Characteristics and Source Analysis of Water-Soluble Ions in PM _{2.5} in Zhengzhou	YANG Liu-ming, WANG Shen-bo, HAO Qi, <i>et al.</i> (2977)
Relationship Between Atmospheric Visibility and PM _{2.5} Concentrations and Distributions	WANG Ji-kang, ZHANG Heng-de, GUI Hai-lin, <i>et al.</i> (2985)
Characteristics of VOCs Emitted from the Rubber Tire Manufacturing Industry Based on the Inverse-Dispersion Calculation Method	BAI Hong-xiang, WEI Wei, WANG Ya-ting, <i>et al.</i> (2994)
Stable Carbon Isotope Compositions and Source Apportionments of Volatile Aromatic Compounds in the Urban Atmosphere of Taiyuan, China	LI Ying-hui, YAN Yu-long, LI Zhi-sheng, <i>et al.</i> (3001)
Spectral Distribution and Pollution Characteristics of Polybrominated Diphenyl Ethers in the Air of an Office Building Clustered Area	WANG Lin, DENG Ya-jia, LIAO Xiao-yong, <i>et al.</i> (3008)
Characterizing Chromophoric Dissolved Organic Matter in Key Lakes in the Middle Reaches of the East Route of the South-North Water Diversion Project	ZHANG Liu-qing, PENG Kai, ZHOU Lei, <i>et al.</i> (3018)
Characteristics of Hydrogen and Oxygen Isotopes in Different Water Bodies in Hilly and Gully Regions of the Loess Plateau	ZHANG He-hui-zi, YU Kun-xia, LI Zhan-bin, <i>et al.</i> (3030)
Analysis of Total Organic Carbon Source Differences Between New and Old Cascade Reservoirs using Carbon and Nitrogen Isotopes	WANG Cong-feng, HU Zi-long, YANG Zheng-jian, <i>et al.</i> (3039)
Pollution Sources and the Stratification Effects on Water Quality in Lijiahe Reservoir	XU Jin, HUANG Ting-lin, LI Kai, <i>et al.</i> (3049)
Distribution and Potential Risk of Organochlorine Pesticides in the Soil of a Submerged Area Around Miyun Reservoir	WANG Xia, ZHANG Qing-zhuo, ZHAO Gao-feng, <i>et al.</i> (3058)
Distribution, Sources, and Ecological Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Surface Waters of the Yinchuan Wetlands	TIAN Da-nian, DANG Li-hui, DING Run-mei, <i>et al.</i> (3068)
Comparison of the Geochemical Characteristics of Karst Springs of a Vertically Zoned Climate Region under Human Activity: A Case of Shuifang Spring and Bitan Spring in the Jinfo Mountain Area, Chongqing	XIE Guo-wen, YANG Ping-heng, SHENG Ting, <i>et al.</i> (3078)
Groundwater Chemical Characteristics and Analysis of Their Controlling Factors in an Alluvial Fan of Jianjiang River	TANG Jin-ping, ZHANG Qiang, HU Yang, <i>et al.</i> (3089)
Dynamics of Epilithic Algae Communities and Their Relationship with Environmental Factors During Storage and Non-storage Periods in the Three Gorges Reservoir	FU Jun-ke, LIU Li, HE Xin-yu, <i>et al.</i> (3099)
Influence of Rainfall on the <i>in situ</i> Growth of Dominant Algae Species in Xiangxi River	WENG Chuan-song, LIU De-fu, ZHANG Jia-lei, <i>et al.</i> (3108)
Decomposition of <i>Myriophyllum aquaticum</i> and the Associated Release of Nitrogen and Phosphorus	TONG Xiong, LUO Pei, LIU Feng, <i>et al.</i> (3118)
Optimization of the Parameters for Microalgae Immobilization and Analysis of Its Recovery Potential for Ammonia Nitrogen in Wastewater	LIU Xiang, WANG Jing-yao, WU Juan-juan, <i>et al.</i> (3126)
Ammonium Adsorption Characteristics in Aqueous Solution by Titanate Nanotubes	ZHANG Zheng, FENG Chang-sheng, ZHANG Xiao-nui, <i>et al.</i> (3135)
Application of Fenton-like Photocatalysts Based on Defect Reconstruction in Degradation of Dye Wastewater	TANG Qing-wen, AN Xiao-qiang, LAN Hua-chun, <i>et al.</i> (3146)
Degradation of RBK5 with Peroxymonosulfate Efficiently Activated by N-Doped Graphene	YU Yong-bo, HUANG Wan, DONG Zheng-yu, <i>et al.</i> (3154)
Effect of Cu ²⁺ on Denitrification Using NO ₂ ⁻ as an Electron Acceptor	MAI Wen-ke, PENG Yong-zhen, JI Jian-tao (3162)
Start-up and Performance Optimization of a CANON Pilot Reactor	SUN Qing-hua, WU Di, ZHOU Jia-zhong, <i>et al.</i> (3169)
Effects of Aerobic Carbon Sources on Biofilm with Simultaneous Phosphate Removal and Enrichment	XU Lin-jian, PAN Yang, ZHANG Hao, <i>et al.</i> (3179)
Effect of Organic Characteristics on Sludge Settability in an AAO System	LIU Xiao-bo, YUAN Lin-jiang, CHEN Xi, <i>et al.</i> (3186)
Effect of Free Nitrous Acid on the Activity of Nitrifying Bacteria in Different Sludge Concentrations Under Anoxic Conditions	LÜ Xin-tao, ZHOU Tong, TIAN Xia-di, <i>et al.</i> (3195)
Stability of ZVI-dependent Autotrophic Denitrification by ANAMMOX Bacteria	ZHANG Wen-jing, HUANG Yong, BI Zhen, <i>et al.</i> (3201)
Effect of On-line NaClO Backwashing on Microbial Communities in an Inverted A ² O-MBR System	WANG Xu-dong, GAO Miao, WANG Ying-ying, <i>et al.</i> (3208)
Evaluation of Organic Matter Release and Economy for Various Pretreatments of Sewage Sludge	YUAN Yue, TAN Xue-jun, ZHENG She-yu (3216)
Model-based Optimization for the Coordinated Supply of Clear and Reclaimed Water in the Central Districts of Beijing, China	ZHANG Tian-yuan, TAN Qian, WANG Shu-ping (3223)
Occurrence and Removal of N-nitrosamines in the Wastewater Treatment Plants Using Different Treatment Processes	LIU Wang-rong, ZHAO Jiang-liang, YANG Yuan-yuan, <i>et al.</i> (3233)
Occurrence of Tramadol and Fentanyl Use in Domestic Wastewater in Beijing	ZHOU Zi-lei, DU Peng, BAI Ya, <i>et al.</i> (3242)
Pollution Level and Ecological Risk of Typical Antibiotics in Guiyang Wastewater Treatment Plants	YANG Zhao, LI Jiang, ZHANG Sheng-hu, <i>et al.</i> (3249)
Characteristics of Antibiotic Resistance Genes in Various Livestock Feedlot Soils of the Hilly Purple Soil Region	CHENG Jian-hua, TANG Xiang-yu, LIU Chen (3257)
Effects of Tetracycline on Microbial Communities and Antibiotic Resistance Genes of Vermicompost from Dewatered Sludge	CHEN Jing-yang, XIA Hui, HUANG Kui, <i>et al.</i> (3263)
Fate of Antibiotic Resistance Genes and Virulence Genes in Enterococci During Anaerobic Digestion Process of Thermal Hydrolyzed Sludge	LI Hui-li, PEI Yuan-mei, LI Shan, <i>et al.</i> (3270)
Effect of Co-composting of Chicken Manure with Chinese Medicinal Herbal Residues on Antibiotic Resistance Genes	WU Jin-ping, CHEN Jian-wen, LIU Yong, <i>et al.</i> (3276)
Spatio-temporal Patterns of Microbial Communities and Their Driving Mechanisms in Subalpine Lakes, Ningwu, Shanxi	WANG Xue, LIU Jin-xian, CHAI Bao-feng, <i>et al.</i> (3285)
Community Structure Characteristics of <i>nirS</i> Denitrifying Bacteria of Spring Typical Parkland Waterbodies in Shijiazhuang City	ZHANG Yi-ran, LI Zai-xing, SUN Yue, <i>et al.</i> (3295)
Differential Responses of Rhizospheric <i>nirK</i> - and <i>nirS</i> -type Denitrifier Communities to Different Phosphorus Levels in Paddy Soil	ZHAN Yu, GAO Dan-dan, SHENG Rong, <i>et al.</i> (3304)
Comparison of Soil Bacterial Community Structure Between Paddy Fields and Dry Land in the Huixian Karst Wetland, China	JIA Yuan-hang, JIN Zhen-jiang, YUAN Wu, <i>et al.</i> (3313)
Cd Balance Analysis of a Typical Rice Paddy System in Central Hunan	JIANG Kai, DENG Xiao, ZHOU Hang, <i>et al.</i> (3324)
Effects of an Amendment on Cadmium Transportation in the Rhizosphere Soil-Rice System	LI Yi-chun, WANG Yan-hong, TANG Ming-deng, <i>et al.</i> (3331)
Isolation of Heavy Metal Immobilizing and Plant Growth-Promoting Bacteria and Its Effects on Reducing Heavy Metal Accumulation in Wheat	HAN Hui, WANG Xiao-yu, CAI Hong, <i>et al.</i> (3339)
Differences in the Cadmium-Enrichment Capacity and Subcellular Distribution and Chemical Form of Cadmium in Different Varieties of Pepper	PENG Qiu, LI Tao, XU Wei-hong, <i>et al.</i> (3347)
Effect of Phosphorus Addition on N ₂ O Emissions from Rice-Rapeseed Rotation Soils	SUN Zheng, SU Rong-lin, XU Peng, <i>et al.</i> (3355)
Impact of Land Use Type on the Stability and Organic Carbon Content of Soil Aggregates in the Weibei Dryland	LIU Jie, MA Yan-ting, WANG Xian-ling, <i>et al.</i> (3361)
Vertical Distribution Characteristics of PAHs in Soils with Different Land Use Types During Rapid Urbanization	LU Yin-tao, XIANG Xin-xin, ZHANG Shi-chao, <i>et al.</i> (3369)
Pollution Levels, Sources, and Spatial Distribution of Phthalate Esters in Soils of the West Lake Scenic Area	LIAO Jian, DENG Chao, CHEN Yi, <i>et al.</i> (3378)
Impact of Biochar on Soil Bulk Density and Aggregates of Lou Soil	LI Qian-qian, XU Chen-yang, GENG Zeng-chao, <i>et al.</i> (3388)