

# *nirS*和*nirK*型反硝化细菌在水稻根中的分布

陈泽斌<sup>1</sup>, 李冰<sup>2</sup>, 林丽<sup>1</sup>, 刘佳妮<sup>1</sup>, 余磊<sup>3</sup>, 徐胜光<sup>4\*</sup>

(1. 昆明学院农学与生命科学学院, 昆明 650214; 2. 中国科学院昆明动物研究所, 昆明 650223; 3. 云南省都市特色农业工程技术研究中心, 昆明 650214; 4. 云南省高校生物炭工程研究中心, 昆明 650214)

**摘要:** 为了解 *nirS* 和 *nirK* 型反硝化细菌在水稻根中的分布, 利用 MiSeq 测序平台, 对水稻根部的 *nirS* 和 *nirK* 反硝化功能基因进行高通量测序, 并对测得序列进行生物信息学分析, 揭示 *nirS* 和 *nirK* 型反硝化细菌在水稻根中的分布特征。结果表明: *nirK* 型反硝化细菌的种类丰富度虽高于 *nirS* 型, 但种类分布的均匀度却低于 *nirS* 型。 *nirS* 和 *nirK* 型反硝化细菌隶属于 3 门 5 纲 12 目 26 属。在门水平, 变形菌门是 *nirS* 和 *nirK* 型反硝化细菌的共同优势门。在纲水平,  $\alpha$ -变形菌纲是 *nirS* 和 *nirK* 型反硝化细菌的共同优势纲。在目水平, 红螺菌目是 *nirS* 型反硝化细菌的优势目; 根瘤菌目是 *nirK* 型反硝化细菌的优势目。在属水平, 磁螺菌属是 *nirS* 型反硝化细菌的优势属; 氏菌属、红假单胞菌属、慢生根瘤菌属是 *nirK* 型反硝化细菌的优势属。 *nirS* 和 *nirK* 型反硝化细菌在水稻根中的分布特征与之前对其他地理环境的同类研究结果相一致。固氮螺菌属等 5 个类群细菌仅存在于 *nirS* 型反硝化细菌中; 氏菌属等 17 种类群细菌仅存在于 *nirK* 型反硝化细菌中, 呈现出分布特异性。

**关键词:** *nirS*; *nirK*; 反硝化细菌; 水稻; 根部

中图分类号: S511

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2021)01-0062-06

## Distribution of *nirS* and *nirK* Denitrifying Bacteria in Rice Roots

CHEN Zebin<sup>1</sup>, LI Bing<sup>2</sup>, LIN Li<sup>1</sup>, LIU Jiani<sup>1</sup>, YU Lei<sup>3</sup>, XU Shengguang<sup>4\*</sup>

(1. College of Agronomy and Life Sciences, Kunming University, Kunming 650214; 2. Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223; 3. Engineering Research Center for Characteristics Agriculture of Yunnan Province, Kunming 650214; 4. Engineering Research Center for Biochar of High Education of Yunnan Province, Kunming 650214, China)

**Abstract:** In order to understand the distribution of *nirS* and *nirK* denitrifying bacteria in rice roots. High-throughput sequencing of *nirS* and *nirK* denitrification functional genes in rice roots was carried out by using MiSeq sequencing platform. Bioinformatics analysis was carried out to reveal the distribution characteristics of *nirS* and *nirK* denitrifying bacteria in rice roots. The results showed that although the species richness of *nirK*-type denitrifying bacteria was higher than that of *nirS*-type denitrifying bacteria, the species distribution uniformity of *nirK*-type denitrifying bacteria was lower than that of *nirS*-type denitrifying bacteria. *nirS* and *nirK* denitrifying bacteria belong to 26 genera, 12 orders and 3 phyla, 5 classes. At the phylum level, proteobacteria is the common predominant phylum of *nirS* and *nirK* denitrifying bacteria. At the class level, alphaproteobacteria is the common dominant class of *nirS* and *nirK* denitrifying bacteria. Rhizobium is the dominant order of *nirS* denitrifying bacteria and Rhizobium is the dominant order of *nirK* denitrifying bacteria. At genus level, *magnetospirillum* is the dominant genus of *nirS*-type denitrifying bacteria, while *bosea*, *rhodopseudomonas*, *bradyrhizobium* are the dominant genus of *nirK*-type denitrifying bacteria. The distribution characteristics of *nirS* and *nirK* denitrifying bacteria in rice roots are consistent with the results of similar studies in other geographical environments. Five groups of bacteria such as *Azospira* existed only in *nirS* denitrifying bacteria, and 17 groups of bacteria such as *Bosea* existed only in *nirK* denitrifying bacteria, showing a special distribution.

收稿日期: 2019-02-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(42067009); 云南省地方本科高校基础研究联合专项(2017FH001-041、2017FH001-042)

作者简介: 陈泽斌(1985-), 男, 副教授, 博士, 主要从事农业微生物学的教学和科研工作。

通讯作者: 徐胜光, 男, 博士, 研究员, E-mail: sgxu2011@126.com

**Key words:** *nirS*; *nirK*; Denitrifying bacteria; Rice; Root

中国是世界上稻田面积最大的国家,约340万 $\text{hm}^2$ ,占全国耕地面积的27%左右,稻田氮素的积累、迁移和流失等生物地球化学循环过程是稻田生态系统健康和可持续发展的重要因素<sup>[1]</sup>。由反硝化微生物驱动的反硝化过程是氮素转化的关键过程。反硝化作用一方面减少了环境中的硝酸盐含量,另一方面导致硝态氮的气态挥发,这是环境中氮流失的重要途径,挥发气体中的 $\text{N}_2\text{O}$ 和 $\text{NO}$ 是一种温室气体,对臭氧层有破坏作用<sup>[2]</sup>。由于反硝化微生物在氮素利用、硝态氮淋失和温室气体排放方面发挥着极其重要的作用,因此,其群落结构和机制已成为近年来的热点问题<sup>[3-4]</sup>。随着分子生物学技术的飞速发展,反硝化微生物的研究不再局限于反硝化微生物的分离培养。许多研究人员已致力于研究未培养的微生物多样性<sup>[5]</sup>。反硝化酶编码基因*nirK*和*nirS*是反硝化微生物群落结构无培养研究中常用的分子探针<sup>[6]</sup>。许多研究者采用变性梯度凝胶电泳、末端标记限制性片段长度多态性、实时荧光定量PCR技术研究不同生境的反硝化细菌群落多样性及丰度,发现3/4的反硝化细菌为*nirK*型,且*nirK*型反硝化细菌的多样性较*nirS*型更为丰富,分布于80多个细菌属中<sup>[7]</sup>。近20年来,分子生态学领域发展迅速,出现了许多新的技术和研究方法,其中Illumina高通量测序技术是近几年兴起的一种新的测序技术,采用边合成边测序的方法,高效获取大量的测序数据<sup>[8]</sup>。目前对反硝化微生物的研究主要集中在农田、湿地、沉积物、海水、淡水及地下水生态系统中<sup>[9]</sup>,而对于水稻植株内部这一特殊生境中的同类研究还尚未见报道。为此,利用MiSeq测序平台,对水稻根部的*nirS*和*nirK*反硝化功能基因进行高通量测序,并对测得序列进行生物信息学分析,揭示*nirS*和*nirK*型反硝化细菌在水稻根中的分布特征,对控制水体富氮营养、减少农田氮素流失和温室气体排放等农业和环境问题具有重要意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 根系样品采集

水稻田位于云南省安宁市昆明学院象石村试验基地( $\text{N}24^{\circ}56'24.85''$ , $\text{E}102^{\circ}32'14.45''$ )。供试水稻品种为“滇昆优8号”。于水稻成熟期(2018年8月)进行水稻根系样品采集。在200 $\text{m}^2$ 的稻田

中,按邢树文等<sup>[10]</sup>的方法,随机选取5个点进行取样,每个点采集20~30g根系样品,而后混合均匀。为防止微生物死亡或者DNA降解,将水稻根系混合样品放入冰盒(干冰+泡沫盒)中进行低温运输,带回实验室进行处理。

### 1.2 根系的超声波清洗

参照Joseph Edwards等<sup>[11]</sup>的方法。

### 1.3 根系总DNA的提取

采用CTAB法提取混合根系总DNA<sup>[12]</sup>。

### 1.4 *nirS*和*nirK*基因的PCR扩增

*nirS*基因采用引物cd3aF(5'-GTSAACGTSAA-GGARACSGG-3')/R3cd(5'-GASTTCCGRTGS-GTCTTGA-3')进行扩增(目的片段长度约400~450bp),*nirK*基因采用引物F1aCu(5'-ATCATG-GTCCTGCCGCG-3')/R3Cu(5'-GCCTCGATCA-GATTGTGGT-3')进行扩增(目的片段长度约450~500bp),PCR反应体系为:10 $\times$ PCR Buffer 1.25 $\mu\text{L}$ ,25mM $\text{MgCl}_2$  0.75 $\mu\text{L}$ ,2.5mM dNTP 1.00 $\mu\text{L}$ ,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  BSA 1.00 $\mu\text{L}$ ,10 $\mu\text{M}$ 引物各0.25 $\mu\text{L}$ ,模板DNA 1.00 $\mu\text{L}$ ,TaqDNA聚合酶2.5U,ddH<sub>2</sub>O补充到12.5 $\mu\text{L}$ 。*nirS*基因PCR扩增程序为:94 $^{\circ}\text{C}$  5min,94 $^{\circ}\text{C}$  1min,57 $^{\circ}\text{C}$  1min,72 $^{\circ}\text{C}$  1min,35个循环,最后72 $^{\circ}\text{C}$  10min;*nirK*基因PCR扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$  5min,95 $^{\circ}\text{C}$  1min,58 $^{\circ}\text{C}$  1min,72 $^{\circ}\text{C}$  1min,35个循环,最后72 $^{\circ}\text{C}$  10min<sup>[13]</sup>。

### 1.5 *nirS*和*nirK*基因的高通量测序

委托上海微基生物科技有限公司完成。

### 1.6 下机数据的生物信息分析

按文献[14]的方法得到双末端读长序列。根据条形码序列区分测序样本,对序列质量进行质控和过滤<sup>[15]</sup>,再根据序列的重叠关系进行拼接<sup>[16]</sup>,拼接后的序列再次进行质控和过滤,最后得到优化序列。对优化序列进行OTU聚类分析和物种分类学分析,基于OTU聚类分析结果,对OTU进行 $\alpha$ 多样性指数分析以及测序深度的检测<sup>[17]</sup>;基于分类学信息,在各个分类水平上进行群落结构的统计分析,并对样本之间进行 $\beta$ 多样性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 *nirS*基因和*nirK*基因序列的数据统计

对*nirS*基因和*nirK*基因进行MiSeq测序,分别得到有效序列50975条和51665条,经质控和过滤后,最终分别得到优化序列44044条和35945

条。测得的 *nirS* 基因序列大多分布于 400 ~ 500 bp 之间(图 1);测得的 *nirK* 基因序列大多分布于 450 ~ 500 bp 之间(图 2), 均与目的片段长度吻合, 且与 Hou 等<sup>[13]</sup>的研究结果一致。

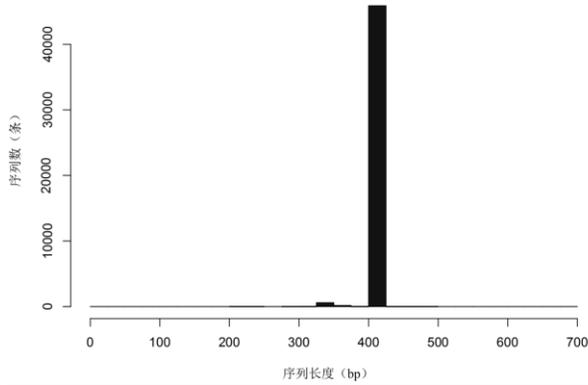


图 1 *nirS* 基因优化序列长度分布统计

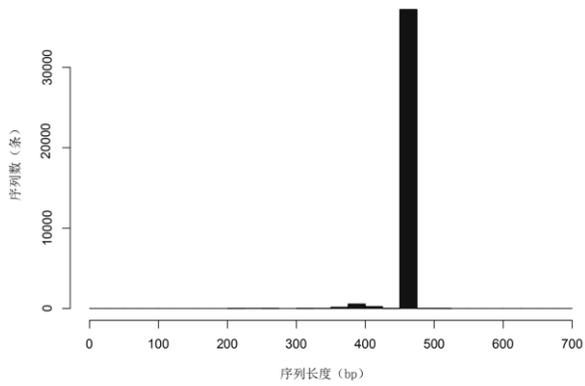


图 2 *nirK* 基因优化序列长度分布统计

### 2.2 *nirS* 和 *nirK* 型反硝化细菌的 $\alpha$ 多样性分析

由表 1 可知, 所测得的 *nirS* 基因和 *nirK* 基因序列可分别被划分为 22 个和 68 个 OTU, 说明 *nirK* 型反硝化细菌的种类明显比 *nirS* 型反硝化细菌的种类丰富。*nirK* 型反硝化细菌的 Chao 指数、Ace 指数、Shannon 指数均高于 *nirS* 型反硝化细菌, 进一步说明 *nirK* 型反硝化细菌的种类丰富度高于 *nirS* 型反硝化细菌。*nirK* 型反硝化细菌的 Simpson 指数低于 *nirS* 型反硝化细菌, 说明 *nirK* 型反硝化细菌

表 1 *nirS* 和 *nirK* 型反硝化细菌的 OTU 丰度和  $\alpha$  多样性

样品名	<i>nirS</i> 型	<i>nirK</i> 型
操作分类单元	22	68
Ace 指数	0	68
Chao 指数	22	68
覆盖度 (%)	100	100
Shannon 指数	1.79	2.72
Simpson 指数	0.26	0.13

菌的种类丰富度虽高于 *nirS* 型反硝化细菌, 但均匀度却低于 *nirS* 型反硝化细菌。*nirS* 基因和 *nirK* 基因文库的覆盖度都为 100%, 说明测序已获得 *nirS* 基因和 *nirK* 基因文库中 100% 的序列, 测序数量足够。*nirS* 和 *nirK* 基因型反硝化细菌 OTU 丰度稀释度曲线显示(图 3 和图 4), 在测序数量增加的过程中, 测序数量 < 10 000 时, 曲线均已趋于平行, 则表明随着测序数量的增加, OTU 数不再增加, 通常认为此时测序数据量合理。

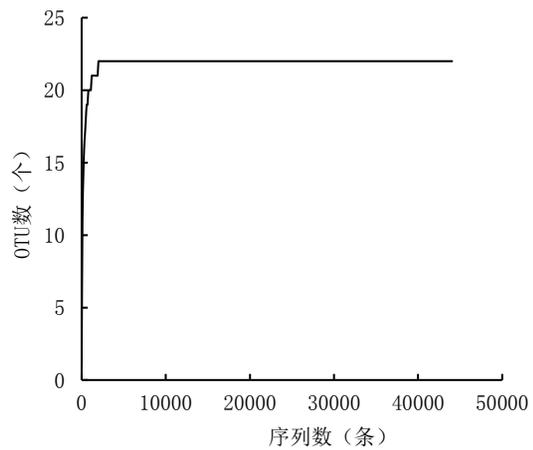


图 3 *nirS* 基因型反硝化细菌 OTU 丰度稀释度曲线

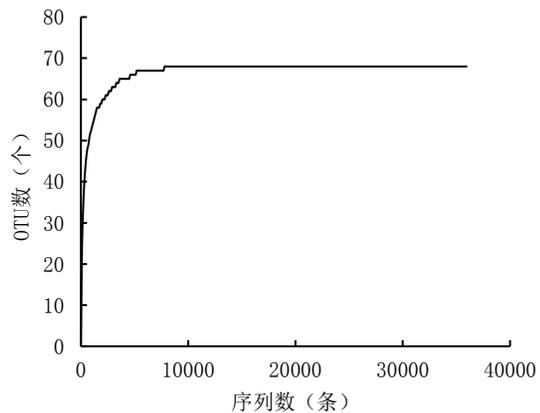


图 4 *nirK* 基因型反硝化细菌 OTU 丰度稀释度曲线

### 2.3 *nirS* 和 *nirK* 型反硝化细菌群落种类组成及丰度

分类统计表明, *nirS* 和 *nirK* 型反硝化细菌隶属于 3 门 5 纲 12 目 26 属(表 2 ~ 表 5)。在门水平(表 2), 50 975 条 *nirS* 基因有效序列分别隶属于变形菌门(28.7%)和尚未分类的门(71.3%), 说明变形菌门和尚未分类的门均是 *nirS* 型反硝化细菌的优势门, 71.3% 的 *nirS* 型反硝化细菌类群尚未被充分研究, 暂未能在门水平获得分类信息; 51 665 条 *nirK* 基因有效序列分别隶属于变形菌门(99.50%)、尚未分类的门(0.38%)和放线菌门(0.12%), 说明变

形菌门是 *nirK* 型反硝化细菌的优势门, 0.38% 的 *nirK* 型反硝化细菌暂未能在门水平获得分类信息, 0.12% 的 *nirK* 型反硝化细菌隶属于放线菌门, 而在 *nirS* 型反硝化细菌中未检测到放线菌门细菌, 推测放线菌门细菌仅存在于 *nirK* 型反硝化细菌中。

表2 门水平 *nirS* 和 *nirK* 型反硝化细菌的相对丰度 %

分类	<i>nirS</i> 型反硝化细菌相对丰度	<i>nirK</i> 型反硝化细菌相对丰度
变形菌门	28.70	99.50
尚未分类的门	71.30	0.38
放线菌门	0	0.12

在纲水平(表3), *nirS* 型反硝化细菌分别隶属于尚未分类的纲(71.3%)、 $\alpha$ -变形菌纲(17.84%)、 $\beta$ -变形菌纲(6.51%)和  $\gamma$ -变形菌纲(4.35%)。说明除了尚未分类的纲以外, 变形菌门中的  $\alpha$ -变形菌纲是 *nirS* 型反硝化细菌的优势纲; *nirK* 型反硝化细菌分别隶属于  $\alpha$ -变形菌纲(91.91%)、 $\gamma$ -变形菌纲(5.56%)、 $\beta$ -变形菌纲(2.03%)、尚未分类的纲(0.38%)和放线菌纲(0.12%)。说明变形菌门中的  $\alpha$ -变形菌纲同样是 *nirK* 型反硝化细菌的优势纲, 0.12% 的 *nirK* 型反硝化细菌隶属于放线菌纲, 而在 *nirS* 型反硝化细菌中未检测到放线菌纲细菌, 推测放线菌纲细菌仅存在于 *nirK* 型反硝化细菌中。

表3 纲水平 *nirS* 和 *nirK* 型反硝化细菌的相对丰度 %

分类	<i>nirS</i> 型反硝化细菌相对丰度	<i>nirK</i> 型反硝化细菌相对丰度
$\alpha$ -变形菌纲	17.84	91.91
$\gamma$ -变形菌纲	4.35	5.56
$\beta$ -变形菌纲	6.51	2.03
尚未分类的纲	71.3	0.38
放线菌纲	0	0.12

在目水平(表4), *nirS* 型反硝化细菌分别隶属于尚未分类的目(71.3%)、红螺菌目(16.29%)、红环菌目(6.51%)、假单胞菌目(4.35%)、根瘤菌目(1.35%)和鞘脂单胞菌目(0.2%)。说明除了尚未分类的目以外,  $\alpha$ -变形菌纲中的红螺菌目是 *nirS* 型反硝化细菌的优势目。红螺菌目和鞘脂单胞菌目2个类群细菌仅存在于 *nirS* 型反硝化细菌中, 推测这2个类群细菌是 *nirS* 型反硝化细菌所特有的。*nirK* 型反硝化细菌分别隶属于根瘤菌目(91.60%)、假单胞菌目(3.91%)、伯克氏菌目(1.66%)、黄单胞菌目(1.38%)、尚未分类的目

(0.38%)、亚硝化单胞菌目(0.37%)、肠杆菌目(0.27%)、红杆菌目(0.24%)、假诺卡氏菌目(0.12%)和红环菌目(0.07%)。说明  $\alpha$ -变形菌纲

表4 目水平 *nirS* 和 *nirK* 型反硝化细菌的相对丰度 %

分类	<i>nirS</i> 型反硝化细菌相对丰度	<i>nirK</i> 型反硝化细菌相对丰度
根瘤菌目	1.35	91.60
假单胞菌目	4.35	3.91
伯克氏菌目	0	1.66
黄单胞菌目	0	1.38
尚未分类的目	71.30	0.38
亚硝化单胞菌目	0	0.37
肠杆菌目	0	0.27
红杆菌目	0	0.24
假诺卡氏菌目	0	0.12
红环菌目	6.51	0.07
红螺菌目	16.29	0
鞘脂单胞菌目	0.2	0

表5 属水平 *nirS* 和 *nirK* 型反硝化细菌的相对丰度 %

分类	<i>nirS</i> 型反硝化细菌相对丰度	<i>nirK</i> 型反硝化细菌相对丰度
氏菌属	0	44.94
红假单胞菌属	0	17.86
慢生根瘤菌属	0	13.39
布鲁氏菌	0	8.22
假单胞菌属	4.35	3.91
根瘤菌属	1.35	2.45
无色杆菌属	0	1.58
中华根瘤菌属	0	1.49
假黄单胞菌属	0	1.38
阿菲波菌属	0	1.25
中慢生根瘤菌属	0	1.08
尚未分类的属	71.3	0.92
亚硝化单胞菌属	0	0.37
肠杆菌属	0	0.27
副球菌属	0	0.24
螯台球菌属	0	0.19
假诺卡氏菌属	0	0.12
苍白杆菌属	0	0.12
马赛菌属	0	0.08
磁螺菌属	15.09	0.07
德沃斯氏菌属	0	0.07
固氮螺菌属	2.11	0
脱氮单胞菌属	4.15	0
<i>Dechlorospirillum</i> 属	1.2	0
固氮弧菌属	0.24	0
鞘氨醇单胞菌属	0.21	0

中的根瘤菌目是 *nirK* 型反硝化细菌的优势目。其中,伯克氏菌目、黄单胞菌目、亚硝化单胞菌目、肠杆菌目、红杆菌目和假诺卡氏菌目 6 个类群细菌仅存在于 *nirK* 型反硝化细菌中,推测以上 6 种类群细菌是 *nirK* 型反硝化细菌所特有的。

在属水平(表 5), *nirS* 型反硝化细菌分别隶属于尚未分类的属(71.30%)、磁螺菌属(15.09%)、假单胞菌属(4.35%)、脱氮单胞菌属(4.15%)、固氮螺菌属(2.11%)、根瘤菌属(1.35%)、*Dechlorospirillum* 属(1.20%)、固氮弧菌属(0.24%)和鞘氨醇单胞菌属(0.21%)。说明除了尚未分类的属以外,红螺菌目中的磁螺菌属是 *nirS* 型反硝化细菌的优势属。固氮螺菌属、脱氮单胞菌属、*Dechlorospirillum* 属、固氮弧菌属和鞘氨醇单胞菌属 5 个类群细菌仅存在于 *nirS* 型反硝化细菌中,推测这 5 个类群细菌是 *nirS* 型反硝化细菌所特有的。*nirK* 型反硝化细菌分别隶属于氏菌属(44.94%)、红假单胞菌属(17.86%)等 21 个属。说明根瘤菌目中的氏菌属、红假单胞菌属、慢生根瘤菌属是 *nirK* 型反硝化细菌的优势属。氏菌属等 17 个类群细菌仅存在于 *nirK* 型反硝化细菌中,推测这 17 个类群细菌是 *nirK* 型反硝化细菌所特有的。

### 3 讨 论

目前,已有很多研究者使用 *nirK* 和 *nirS* 基因作为分子探针,讨论了农田、湿地、沉积物、海水、淡水和地下水生态系统中反硝化细菌的多样性和系统发育<sup>[18]</sup>。人们普遍认为,在大多数环境样本中, *nirK* 基因的多样性高于 *nirS* 基因的多样性<sup>[19]</sup>。但也有例外。例如,Braker 等<sup>[20]</sup>研究发现,普吉特湾沉积物中 *nirS* 基因的多样性较 *nirK* 型高。推测其原因可能是由于 *nirK* 基因容易通过 PCR 扩增,而 *nirS* 基因不容易扩增到<sup>[21-22]</sup>。本研究发现,从  $\alpha$  多样性指数来看,水稻根部 *nirK* 型反硝化细菌的种类丰富度高于 *nirS* 型反硝化细菌,这与前人对其他地理环境的同类研究结果相一致<sup>[19]</sup>。这可能与水稻植株内的生境和前人研究过的其他地理环境都属于厌氧环境有关<sup>[23]</sup>。尹昌等<sup>[24]</sup>的研究结果表明,黑土中 *nirS* 型反硝化菌由变形菌门(Proteobacteria)的 Alpha、Beta 和 Gamma 纲及一些尚未分类的细菌类群组成。这与本研究结果相似,本研究分类统计表明,在纲水平, *nirS* 型反硝化细菌也分别隶属于尚未分类的纲、 $\alpha$ -变形菌纲、 $\beta$ -变形菌纲和  $\gamma$ -变形菌纲。其中尚未分类的细菌类群丰度为 71.30%,是 *nirS* 型反硝化细菌中的最优势

类群,然而,在所有分类水平上,都无法获得该类群细菌的分类信息。由于第二代测序读取序列长度的限制,往往只能选择 500 bp 以下的扩增片段进行测序,相较于一代 Sanger 测序,分类的精确性受到一定的限制,其次,某些物种高变区也可能十分相近,能够区分它们的特异性序列片段有可能不在扩增区域内,识别过程受序列长度的限制。因此,在实际的分析过程中,并非所有的 OTU 代表序列都能获得属级或种级的分类信息,即相应的分类级别仍然是“未分类”。本研究发现,变形菌门是 *nirS* 和 *nirK* 型反硝化细菌的共同优势门。这与 Snaidr 等<sup>[25]</sup>对污泥中反硝化菌群多样性的研究结果吻合,污泥中的优势类群也为变形菌门类群。有文献报道变形菌门类群在丰度上占主要地位,是河流环境中微生物菌群结构的特征之一<sup>[26]</sup>。在纲水平,  $\alpha$ -变形菌纲是水稻根部 *nirS* 和 *nirK* 型反硝化细菌的共同优势纲,有报道认为在河口环境中  $\alpha$ -变形菌纲占比最大<sup>[27]</sup>。在目水平,红螺菌目是 *nirS* 型反硝化细菌的优势目;根瘤菌目是 *nirK* 型反硝化细菌的优势目。已有报道,稻田中的 *nirK* 型反硝化细菌多是根瘤菌目<sup>[28]</sup>,与本研究结果相符。在属水平,磁螺菌属是 *nirS* 型反硝化细菌的优势属; *nirK* 反硝化细菌的优势属为氏菌属、红假单胞菌属、慢生根瘤菌属。磁螺菌属做为一种反硝化菌群的研究鲜见报道,2012 年,薄涛<sup>[29]</sup>在趋磁细菌模式菌株 MS-1 体内鉴定出了硝酸盐还原酶和亚硝酸盐还原酶 2 种反硝化组分,证实此菌群体内有独立的反硝化系统。本研究发现部分类群细菌的分布可能具有特异性,例如,在门水平,放线菌门细菌仅存在于 *nirK* 型反硝化细菌中。在纲水平,放线菌纲细菌仅存在于 *nirK* 型反硝化细菌中。在目水平,红螺菌目和鞘脂单胞菌目 2 个类群细菌仅存在于 *nirS* 型反硝化细菌中;伯克氏菌目等 6 个类群细菌仅存在于 *nirK* 型反硝化细菌中。在属水平,固氮螺菌属等 5 个类群细菌仅存在于 *nirS* 型反硝化细菌中;氏菌属等 17 个类群细菌仅存在于 *nirK* 型反硝化细菌中。因此推测,可能是由于 *nirS* 基因以及 *nirK* 基因在不同菌株中占优势,而不同菌株对生境的应激性不一样,导致 *nirS* 型和 *nirK* 型反硝化细菌群落在水稻根中的分布呈现特异性。

### 4 结 论

从  $\alpha$  多样性指数来看, *nirK* 型反硝化细菌的种类丰富度虽高于 *nirS* 型反硝化细菌,但均匀度

却低于 *nirS* 型反硝化细菌。分类统计表明,在门水平,变形菌门是 *nirS* 和 *nirK* 型反硝化细菌的共同优势门。在纲水平, $\alpha$ -变形菌纲是 *nirS* 和 *nirK* 型反硝化细菌的共同优势纲。在目水平,红螺菌目是 *nirS* 型反硝化细菌的优势目;根瘤菌目是 *nirK* 型反硝化细菌的优势目。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 刘 琼,魏晓梦,吴小红,等.稻田土壤固碳功能微生物群落结构和数量特征[J].环境科学,2017,38(2):760-768.
- [ 2 ] Yang L, Ren Y X, Zhao S Q, et al. Isolation and characterization of three heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacteria from a sequencing batch reactor[J]. Annals of Microbiology, 2016, 66(2): 737-747.
- [ 3 ] Lv P, Luo J, Zhuang X, et al. Diversity of culturable aerobic denitrifying bacteria in the sediment, water and biofilms in Liangshui River of Beijing, China[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 10032.
- [ 4 ] Meng T, Yang H. Rapid culture, microbial community structure, and diversity of high efficiency denitrifying bacteria[J]. Environmental Science, 2017, 38(9): 3816.
- [ 5 ] 张盛博,何小娟,吴海露,等.分子生态学技术用于反硝化微生物群落研究的进展[J].环境科学与技术,2017(6):120-126.
- [ 6 ] Lee J A, Francis C A. Spatiotemporal characterization of San Francisco bay denitrifying communities: a comparison of *nirK*, and *nirS*, diversity and abundance[J]. Microbial Ecology, 2017, 73(2): 1-14.
- [ 7 ] Zhang L, Zeng G, Zhang J, et al. Response of denitrifying genes coding for nitrite (*nirK*, or *nirS*) and nitrous oxide (*nosZ*) reductases to different physico-chemical parameters during agricultural waste composting[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2015, 99(9): 4059-4070.
- [ 8 ] 周子寒,彭绍亮,伯晓晨,等.基于高通量测序技术的微生物检测数据分析方法[J].生物化学与生物物理进展,2017,44(1):58-69.
- [ 9 ] 赵明明,赵鑫盟,希尼尼根,等.农田土壤 *nirK* 和 *nirS* 型反硝化微生物的研究进展[J].微生物前沿,2018,7(2):65-72.
- [ 10 ] 邢树文,李 云,李金林,等.不同种植年限蕉柑根际土壤线虫群落及营养类群结构特征[J].果树学报,2017,34(12):1599-1609.
- [ 11 ] Edwards J, Johnson C, Santosmedellín C, et al. Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(8): E911.
- [ 12 ] 孙 卉,朴政玉,曲柏宏,等.42个苜蓿品种间亲缘关系的RAPD分析[J].东北农业科学,2017,42(5):30-35.
- [ 13 ] Hou S, Ai C, Zhou W, et al. Structure and assembly cues for rhizospheric *nirK* and *nirS* type denitrifier communities in long-term fertilized soils[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2018, 119: 32-40.
- [ 14 ] 陈泽斌,高 熹,王定斌,等.生物炭不同施用量对烟草根际土壤微生物多样性的影响[J].华北农学报,2018,33(1):224-232.
- [ 15 ] Caporaso J, Gregory L C L, Walters W A, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(S1): 4516-4522.
- [ 16 ] Hess M, Sczyrba A, Egan R, et al. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen[J]. Science, 2011, 331(6016): 463-467.
- [ 17 ] Edgar R C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. Nature methods, 2013, 10(10): 996-998.
- [ 18 ] Zumft W G. Cell biology and molecular basis of denitrification [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1997, 61(4): 533-616.
- [ 19 ] Hallin S, Lindgren P E. PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1999, 65(4): 1652-1657.
- [ 20 ] Braker G, Zhou J, Wu L, et al. Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in pacific northwest marine sediment communities [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(5): 2096-2104.
- [ 21 ] Priemé A, Braker G, Tiedje J M. Diversity of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) gene fragments in forested upland and wetland soils[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2002, 68(4): 1893-1900.
- [ 22 ] Sharma S, Aneja M K, Mayer J, et al. Diversity of transcripts of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) in rhizospheres of grain legumes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(4): 2001-2007.
- [ 23 ] Hayatsu M, Tago K, Saito M. Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification[J]. Soil Science & Plant Nutrition, 2008, 54(1): 33-45.
- [ 24 ] 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.
- [ 25 ] Snaird J, Amann R, Huber I, et al. Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(7): 2884-2896.
- [ 26 ] 岳泽滢.多泥沙河流细菌群落特征及其对环境因子的响应研究[D].西安:西安理工大学,2015.
- [ 27 ] Yoshida M, Ishii S, Otsuka S, et al. Temporal shifts in diversity and quantity of *nirS* and *nirK* in a rice paddy field soil[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2015, 41(10): 2044-2051.
- [ 28 ] 葛江丽,施汉钰,刘桂棋,等.水稻根际固氮菌分离及最适培养条件研究[J].东北农业科学,2018,43(4):53-56.
- [ 29 ] 薄 涛.趋磁细菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 反硝化代谢与DNA损伤修复体系对磁小体合成及其遗传稳定性的影响研究[D].济南:山东大学,2012.

(责任编辑:刘洪霞)