

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (1) :73 - 79; 4 January 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140168

溴甲烷熏蒸对土壤反硝化作用及 *nosZ* 型反硝化微生物群落结构的影响

燕平梅^{1,2}, 乔宏萍¹, 赵文婧¹, 陈燕飞¹, 单树花¹, 曹坳程^{2*}

¹太原师范学院生物系, 山西 太原 030012

²中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100193

摘要: 【目的】探究溴甲烷熏蒸对土壤反硝化作用的影响及机制。【方法】本研究采用 *nosZ*-PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism) 方法、*nosZ*-MPN-PCR (Most-Probable-Number-PCR) 计数法和土壤硝酸根的消灭率方法研究溴甲烷熏蒸对土壤 *nosZ* 型反硝化细菌群落结构、数量及反硝化活性的影响。【结果】实验结果说明溴甲烷熏蒸剂熏蒸土壤 100 d 土壤的反硝化作用与对照无显著差异 ($P > 0.05$)。溴甲烷熏蒸土壤和对照土样 *nosZ* 型反硝化细菌群落的 Margalef 指数, Shannon-Wiener 和 Evenness 指数无显著差异 ($P > 0.05$)。溴甲烷熏蒸土壤和对照土壤中存在 *Uncultured bacterium partial rhodopsendomonas*、*pseudomonas fluorescens*、*Herbacspirillum*、*Mesorhizobium* 和 *Bradyrhizobium*, 并且此 6 种微生物均是试验土样和对照土样的优势种群; 对照土壤中检测到 *Azospirillum*、*Rhizobium melibei* 和 *Nitrosospira multififormis*, 在溴甲烷熏蒸土壤中未检测到; 而溴甲烷熏蒸土壤中检测到 *Uncultured Azospirillum*, *Mesorhizobium* 在对照土壤中未检测到。通过 *nosZ*-MPN-PCR 计数法得出反硝化细菌数量比对照低 1.4 倍。【结论】说明溴甲烷熏蒸 100d 土壤的 *nosZ* 型反硝化微生物群落组成和反硝化细菌数量发生变化, 而土壤的反硝化作用与对照无显著差异。

关键词: 溴甲烷, 熏蒸, 反硝化细菌, *nosZ* 基因, 群落结构

中图分类号: X172 文章编号: 0001-6209 (2015) 01-0073-07

随着保护地高附加值经济作物的连年栽培, 土传病害问题愈发突出, 土壤熏蒸可以有效控制农业生产中的病虫害, 尤其是连作条件下的保护地土壤^[1]。但是, 由于熏蒸剂的广谱性, 熏蒸处理在抑制杀死有害生物的同时, 土壤熏蒸不可避免地会对土壤中的非目标微生物的组成及活性产生影响^[2-4], 进而改变整个土壤生态系统的结构和功能,

特别是养分转化过程^[5]。熏蒸显著降低土壤 N 的矿化^[6], 抑制铵态氮的硝化作用^[6-8], 改变土壤中 S、P 的矿化^[9]。土壤微生物是土壤生态系统的重要组成部分, 其中土壤反硝化细菌在保持土壤肥力等过程中发挥关键的作用^[10]。利用细菌 16S rDNA 基因分析反硝化细菌群落有明显缺陷, 因为反硝化细菌不是分类学上的特定类群, 而是广泛分布在众多

基金项目: 农业部财政专项 (2110402); 国家自然科学基金项目 (40871131, 31240009)

* 通信作者。Tel: +86-40-62815940; E-mail: caoac@vip.sina.com

作者简介: 燕平梅 (1968 -), 女, 山西太原人, 教授, 博士, 主要从事微生物生态学研究。E-mail: yanpingmei@sohu.com

收稿日期: 2014-04-03; 修回日期: 2014-09-30

种属之中的复杂体系^[11]。因此,借助编码反硝化过程的关键功能基因对反硝化细菌菌群进行研究。微生物的 *nosZ* 基因编码的氧化二氮还原酶基因是反硝化细菌的重要酶^[6],目前已有不少研究者通过研究 *nosZ* 基因的多样性来探究反硝化细菌的群落结构和多样性,主要技术有 PCR 扩增、基因探针杂交、PCR-RFLP、T-RFLP 等,这些研究对不同环境中的 *nosZ* 基因进行了分析,例如森林土壤、草地、海底沉积物、耕地等^[7-8],研究发现反硝化细菌具有明显的多样性。本实验以溴甲烷熏蒸土壤中提取总基因 DNA,选用特异引物扩增反硝化细菌 *nosZ* 基因,采用 *nosZ*-PCR-RFLP 方法,研究了溴甲烷熏蒸对土壤中 *nosZ* 型反硝化细菌群落结构及活性的影响。试图探讨土壤熏蒸措施对土壤氮素循环的影响,为熏蒸土壤的合理施肥提供技术指导。

1 材料和方法

1.1 土壤处理及土壤样品

供试土壤为北京市通州区黄瓜大棚轮作 3 年以上土壤。土壤为沙壤土,其理化性质为:有机质 33.55 g/kg,铵态氮 73.01 mg/kg,硝态氮 249.46 mg/kg,速效钾 443.45 mg/kg,有效磷 657.66 mg/kg,pH 6.86。试验地前茬为番茄,于 2011 年 8 月 2 日分别在 3 个温室大棚以溴甲烷 50g/m² 的浓度采用覆膜熏蒸法熏蒸,25 d 揭取 PE 膜,定值黄瓜苗。土壤样品采样时间为 2011 年 11 月 22 日,采用对角线取样法取 3 个大棚 5 cm - 15 cm 土壤样品,混合后保存于 -20℃ 和 -4℃ 各一份备用。

1.2 土壤总 DNA 的提取与检测

土壤总 DNA 的提取按照 MO BIO 公司生产的土壤 DNA 提取试剂盒步骤提取。DNA 提取物用 2% 胶浓度的琼脂糖凝胶电泳检测。每个处理样品 3 个重复,然后混合 DNA 提取液,保存于 -20℃ 冰箱中备用。

1.3 *nosZ* 基因序列分析

1.3.1 *nosZ* 基因的 PCR 扩增:采用引物 *nosZ*-1211 F: 5'-CG (C/T) TGTTT (A/C) TCGACAGCCA-3' 和 *nosZ*-1917 R: 5'-CATGTGCAG (A/C/G/T) GC (A/G) TGGCAGAA-3' 扩增土壤 *nosZ* 基因^[12]。扩增体系 PCR 反应在 0.2 mL PCR 管中进行,反应混合物为:10 × PCR 缓冲溶液 [500 mmol/L Tris_HCl

(pH8.0), 25 mmol/L MgCl₂], 1.25U *Taq* DNA 聚合酶,引物浓度为 0.5 μm,脱氧核糖核酸浓度为 0.25 mmol/L,用无菌的双蒸水补加到 50 μL。PCR 反应的循环条件为:95℃ 5 min;95℃ 1 min,55℃ 30 s,72℃ 1 min,30 次循环;72℃ 7 min。PCR 扩增产物为 706 bp。

1.3.2 *nosZ* 基因克隆文库的构建:PCR 扩增产物用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收,与 TA-克隆体系的 T-Vector 载体连接形成重组质粒,用重组质粒转化感受态细胞 (*E. coli* TOP10),用蓝白斑表型特征方法筛选插入 706 bp *nosZ* 基因的阳性克隆转化菌,挑取阳性克隆转化菌培养在含氨苄青霉素 50 μg/mL 的 LB 培养基中过夜,加 30% 的甘油保藏在 -70℃ 条件。

1.3.3 *nosZ* 基因序列的分析和测定:将阳性克隆的 *nosZ* 基因片段用内切酶 *MspI* 和 *RsaI* 切割,用 2% 的琼脂糖凝胶电泳方法检测切割后的结果,对克隆菌作初步分析,挑选有差异的克隆,从每种类型中选一代表克隆菌测序,以此阳性菌的质粒为模板,通用 T7/SP6 序列为引物测定所有的序列反应。测序由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.3.4 *nosZ* 基因序列的鉴别和系统发育分析:测定每个阳性转化克隆菌 *nosZ* 基因序列。将所测的序列用 DNAMAN (Version4.0) 软件去除两端的载体序列,得到了约 706 bp 的 16S rDNA 序列,用 CHECK CHEMERA 程序检测人工嵌合序列并剔除。不同的序列用 BLAST 程序在 GenBank 中搜索相似序列,将相关序列用 DNAMAN (Version4.0) 进行比对,进行系统发育分析。

1.3.5 群落结构计算和系统学分析:采用 Shannon 多样性指数: $H = -\sum (P_i) (\ln P_i)$, P_i 表示第 i 种酶切类型出现的频率, $P_i = N_i/N$, N_i 为第 i 种酶切类型所包含的克隆数, N 为总克隆数。丰富度指数 (Margalef) $d = S - 1/\ln N$, S 为酶切产生的总类型。均匀度指数 (Evenness): $Evenness = H/H_{max}$ (其中 $H_{max} = \ln S$)^[10, 13]。

1.4 基于 *nosZ* 基因的反硝化细菌定量检测 MPN-PCR 法

对抽提的总 DNA 溶液进行 10 倍梯度稀释,选取不同稀释度的样品分别做 4 个平行的 PCR 反应,根据扩增产物的电泳结果来计数各样品的阳性反应数,确定数量指标。数量指标由 3 位数字组成,分别

表示 3 个连续的稀释度 PCR 反应阳性的样品数. 数量指标的第一位数字为 4 个平行反应都为阳性的最大稀释度. 根据确定的数量指标从 MPN 表中查出相应的细菌的近似值, 然后推算每克土样中反硝化细菌的数量. 计算方法: 每克土干土菌数 = (近似值 \times 数量指标第一位的稀释倍数) / 干土所占百分比^[14].

1.5 微生物生物量氮的测定方法

根据熏蒸土壤与未熏蒸土壤测定有机氮量 ($\text{NH}_4\text{-N}$) 的差值及转换系数, 计算土壤微生物生物量氮, 提取液中的氮采用茚三酮比色法测定^[15].

1.6 反硝化活性的测定和计算

土壤中加入一定量的硝酸盐, 经厌氧培养后, 由土壤硝酸根的消灭率, 代替测定反硝化作用发生的含氮气体, 用以表示土壤的反硝化活性的强度^[15]. 具体方法称取过 2 mm 筛的土壤 10–20 g, 置于 25 (或 50) mL 三角瓶中, 加入 10% 的 KNO_3 (土壤中 C/N 须小于 7), 用 5 mL 蒸馏水溶解, 使土表有薄的淹水层. 将三角瓶置真空干燥器中, 抽真空, 灌入氮气, 如此反复多次, 使干燥器内无氧. 干燥器底部还可放若干毫升碱性焦性没食子酸, 吸收残余的氧, 以美蓝作还原指示剂. 将干燥器置恒温温室培养, 于 0 d、3 d、取出土样, 用比色法测样品中剩余的硝态氮. 硝态氮的测定采用连续流动分析仪法 (INTEGRAL Futura ALLIANCE INSTRUMENTS).

2 结果和分析

2.1 熏蒸剂对土壤反硝化作用和微生物生物量氮的影响

溴甲烷熏蒸剂对土壤反硝化作用的影响如图 1 所示, 溴甲烷熏蒸剂对土壤反硝化作用的影响与对照土壤差异不显著 ($P > 0.05$). 实验结果说明溴甲烷熏蒸剂熏蒸土壤 100 d 后土壤的反硝化作用恢复到与对照同样的水平.

溴甲烷熏蒸剂对土壤微生物生物量氮的影响如图 2 所示, 溴甲烷熏蒸剂对土壤微生物生物量氮的影响与对照土壤差异不显著. 实验结果说明溴甲烷熏蒸剂熏蒸土壤 100 d 后土壤的土壤微生物生物量氮与对照无显著差异 ($P > 0.05$).

2.2 *nosZ* 基因的 RFLP 分析

2.2.1 *nosZ* 基因的 PCR 结果: 通过磁珠法从溴甲

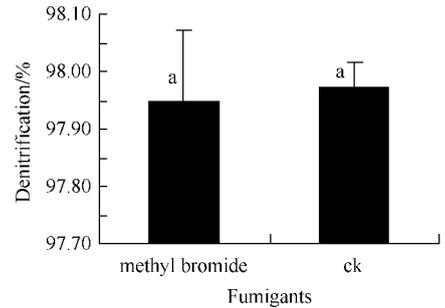


图 1. 熏蒸剂对土壤反硝化作用的影响

Figure 1. Effects of soil fumigants on the soil denitrification.

“Different small letters in the same column indicated significant difference at 0.05 level. The same below.

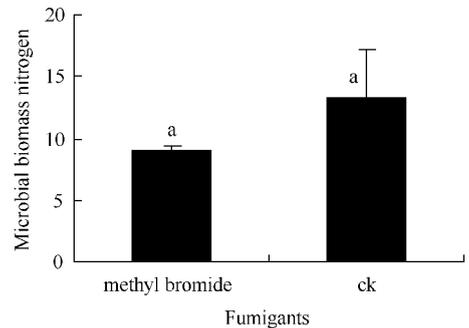


图 2. 熏蒸剂对土壤微生物生物量氮的影响

Figure 2. Effect of fumigants on soil microbial biomass nitrogen.

烷熏蒸土壤和对照土壤中提取微生物总 DNA, DNA 产量较多, 从土壤中提取量约为 10 $\mu\text{g/g}$ 干土. 以土壤 DNA 为模板, 扩增反硝化细菌 *nosZ* 基因, 扩增片段长度在 706 bp 左右, 用溴甲烷熏蒸土壤和未熏蒸土壤 (对照实验) 中均能扩增 *nosZ* 基因.

2.2.2 *nosZ* 基因文库中克隆子的分布: *nosZ* 基因阳性克隆的 PCR 产物采用内切酶 *MspI* 和 *RsaI* 酶切分析 (图 3), 克隆子的酶切指纹图谱相同者认为它们是相同的基因型, 每一特有的谱带类型代表一个 OTU (Operational taxonomic unit, OTU). 用溴甲烷熏蒸处理中得到 120 个阳性克隆子, 通过内切酶切割分型得到 8 个 OTU, 其中有 2 个 OTU 只含有一个克隆子 (占总克隆的 0.8%), 经过测序分析与 GenBank 库对比结果为 *Uncultured Azospirillum*, *Mesorhizobium*, 相似性 91%、92%。有 42 个克隆子为一个 OUT 单位 (占总克隆的 35.0%), 测序比对结果为 *Uncultured bacterium partial* 相似性 99%。有 28 个克隆子为一个 OUT 单位 (占总克隆的 23.3%), 测序比对结果为 *Rhodospseudomonas* 相似性

96%。有 16 个克隆子为一个 OTU 单位(占总克隆的 13.3%),测序比对结果为 *Mesorhizobium* 相似性 96%。有 15 个克隆子为一个 OTU 单位(占总克隆的 12.5%),测序比对结果为 *pseudomonas fluorescens* 相似性 99%。有 11 个克隆子为一个 OTU 单位(占总克隆的 9.2%),测序比对结果为 *Bradyrhizobium*。相似性 91%。有 8 个克隆子为一个 OTU 单位(占总克隆的 6.7%),测序比对结果为 *Herbacspirillum* 相似性 97%。

未用溴甲烷熏蒸处理中得到 120 个阳性克隆子(对照样品),通过内切酶 *MspI* 和 *RsaI* 切割分型得到 9 个 OTU,其中有 28 个克隆子为一个 OTU 单位(占总克隆的 23.3%),经过测序分析与 GenBank 库对比结果为 *Uncultured bacterium partial* 相似性 99%。有 18 个克隆子为一个 OTU 单位(占总克隆的 15.0%),测序比对结果为 *Rhodopsendomonas* 相似性 96%。有 17 个克隆子为一个 OTU 单位(占总克隆的 14.2%),测序比对结果为 *Azospirillum* 相似性 99%。有 14 个克隆子为一个 OTU 单位(占总克隆的 11.7%),测序比对结果为 *Mesorhizobium* 相似性 96%。有 14 个克隆子为一个 OTU 单位(占总克隆的 11.7%),测序比对结果为 *Bradyrhizobium* 相似性 91%。有 13 个克隆子为一个 OTU 单位(占总克隆的 10.8%),测序比对结果为 *pseudomonas fluorescens* 相似性 99%。有 7 个克隆子为一个 OTU 单位(占总克隆的 5.8%),测序比对结果为 *Herbacspirillum* 相似性 97%。有 5 个克隆子为一个 OTU 单位(占总克隆的 4.2%),测序比对结果为 *Nitrosospivamultiformis* 相似性 95%。有 4 个克隆子为一个 OTU 单位(占总克隆的 3.3%),测序比对结果为 *Rhizobium melibei* 相似性 99%。

溴甲烷熏蒸土壤和对照土壤中均存在 *Uncultured bacterium partial*、*Rhodopsendomonas*、*pseudomonas fluorescens*、*Herbacspirillum*、*Mesorhizobium* 和 *Bradyrhizobium*。溴甲烷熏蒸土样非培养菌占总克隆的比率高于对照土样。试验土样和对照土样中非培养菌克隆比例均最高。说明土壤中的反硝化细菌大多数为非培养型。对照土壤中检测到 *Azospirillum*、*Rhizobium melibei* 和 *Nitrosospivamultiformis*。在溴甲烷熏蒸土壤中未检测到。*Azospirillum* 占总克隆的 14.2%,高于另两种克隆菌(3.3%、4.2%)在总克隆中所占的比例。而溴甲烷熏蒸土壤中检测到 *Uncultured*

Azospirillum、*Mesorhizobium* 在对照土壤中未检测到,两者占总克隆的 0.8%。

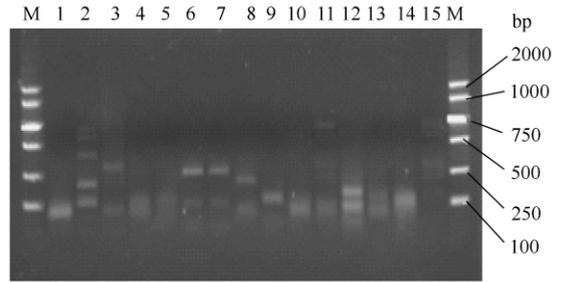


图 3. 克隆菌 16S rDNA 基因 RFLP 分析的电泳图谱

Figure 3. RFLP of clones of the 16S rDNA. Lane 1 -15: clones of the 16S rDNA. M: DNA. Marker.

2.2.3 nosZ 型反硝化细菌多样性估计:细菌群落结构多样性通过多样性指数进行评价(表 1), *Shannon-Wiener* 指数是群落中的物种及其个体数和分布均匀程度的综合指标。*Margalef* 指数反映了群落中最常见的物种丰富度。*Evenness* 指数表示物种在环境中分布状况,各物种数目愈接近,数值愈高。溴甲烷熏蒸土壤和对照土样 *Margalef* 指数, *Shannon-Wiener* 和 *Evenness* 指数无显著差异($P > 0.05$),说明溴甲烷熏蒸土壤群落结构较对照土样群落结构无差异($P > 0.05$)。

表 1. nosZ 基因生态学多样性指数

Table 1. Ecological indexes of nosZ gene

Sample	OTU	<i>Shannon-Wiener</i> index	<i>Margalef</i> index	<i>Evenness</i>
Methyl bromide	8	2.81 a	8.56 a	0.58 a
Ck	9	3.03 a	8.90 a	0.61 a

*Different small letters in the same column indicated significant difference at 0.05 level. The same below.

2.3 MPN-PCR 法对土壤反硝化细菌的定量分析结果

实验样品的 MPN-PCR 产物的电泳结果见图 4, 溴甲烷熏蒸土样、DNA 的 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} 稀释度的 4 个平行样品能扩增出 DNA 条带的分别为 4、0、0、0 和 0(图 4-A),按 MPN-PCR 法的原理,该扩增的数量指标为 400,查 MPN 表得 10 稀释度的每 L DNA 溶液相对应的反硝化细菌个数为 2.5。对照样品的 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} 稀释度的 4 个平行样品能扩增出 DNA 条带的分别为 4、2、0、0 和 0(图 4-B),按 MPN-PCR 法的原理,该扩增的数量指标为 420,查 MPN 表得 10 稀释度的每 L

DNA 溶液相对应的反硝化细菌个数为 6.0。由计算结果可知, 未熏蒸土壤(对照)反硝化细菌数量为甲基溴熏蒸土壤 30 天的 2.4 倍。

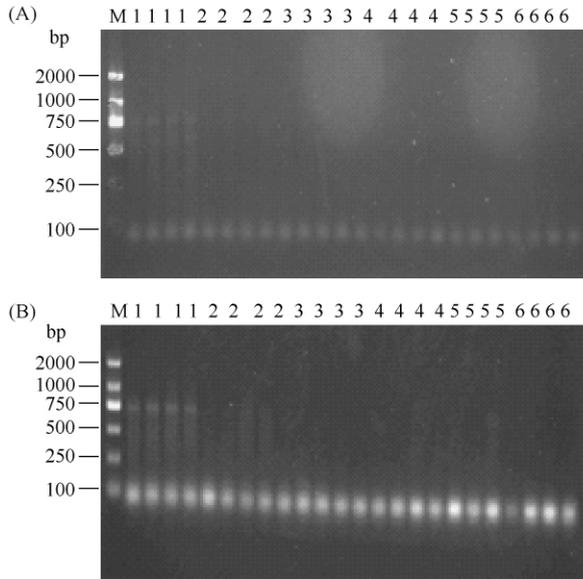


图 4. 土壤样品 MPN - PCR 产物 1.2% 琼脂糖凝胶电泳图谱

Figure 4. Soil sample MPN - PCR products 1.2% agarose gel electrophoresis. A: the methyl bromide soil fumigation; B: the control soil.

3 讨论

生物反硝化作用由反硝化细菌引起。土壤中存在大量的反硝化细菌^[10], 用熏蒸剂熏蒸土壤后不仅目标微生物被抑制, 非目标微生物、尤其细菌类受到强烈的抑制, 也抑制反硝化细菌的生长^[16], 导致反硝化细菌数量减少^[17]。由本试验结果可知溴甲烷熏蒸土壤 100 天反硝化细菌数量比对照低了 1.4 倍。与前人研究结果一致。Roux-michollet 等^[4] 研究者的报道溴甲烷熏蒸土壤 (15 - 62 d) 反硝化活性显著低于对照土壤。本试验结果得出溴甲烷熏蒸剂熏蒸土壤 (100 d) 反硝化活性与对照土壤无显著差异 ($P > 0.05$), 与前人关于溴甲烷熏蒸对土壤反硝化作用研究的矛盾是由于熏蒸剂熏蒸土壤后测定反硝化作用的时间不同, 熏蒸剂熏蒸土壤 100 d 后, 与反硝化相关的微生物恢复了功能活性, 土壤微生物生物量氮含量与对照无显著差异的结果得到证实。本实验的反硝化细菌数量是以 *nosZ* 基因作为计数的靶基因, 引起土壤反硝化作用的因素很多, 所以

nosZ 基因型反硝化细菌数量的减少未引起反硝化作用的变化。

利用 *nosZ-PCR-RFLP* 方法研究土壤熏蒸剂对土壤中非目标微生物 (反硝化细菌) 群落结构的影响, 溴甲烷熏蒸对土壤 *nosZ* 型反硝化细菌群落结构影响与对照无显著差异, 对微生物种类有影响, 测定了克隆基因的序列, 所测的结果与 GenBank 数据库中进行序列对比, 结果说明溴甲烷熏蒸土壤和对照土壤中均存在 *Rhodospirillum rubrum*、*Pseudomonas fluorescens*、*Herbaspirillum*、*Uncultured bacterium partial*、*Mesorhizobium* 和 *Bradyrhizobium*。溴甲烷熏蒸土壤非培养菌占总克隆的比率高于对照土样。两种处理土壤中非培养菌克隆比例均最高。说明土壤中的反硝化细菌大多数为非培养型。对照土壤中检测到 *Azospirillum*、*Rhizobium melibei* 和 *Nitrosospiromultiformis*, 在溴甲烷熏蒸土壤中未检测到。溴甲烷熏蒸土壤中检测到 *Uncultured Azospirillum*、*Mesorhizobium*, 在对照土壤中未检测到。*Azospirillum* 和 *Rhizobium melibei* 是两种不同的固氮微生物, 前者与谷类、禾本科植物是联合固氮 (association fixing nitrogen), 两者只是共处同一微生境, 在营养或某些其他方面互相支持与利用, 后者与豆科植物共生。两者的功能均是将大气的氮固定, 为植物生长的营养需要。*Nitrosospiromultiformis* 是氨氧化菌, 负责将铵氧化为亚硝酸盐, 实现亚硝化过程, 是硝化过程必不可少的步骤。溴甲烷熏蒸土壤中未检测到此种, 说明溴甲烷熏蒸土壤中硝化作用受到影响。Stromberger^[2] 用溴甲烷及其替代品熏蒸土壤后, 硝化速率与对照相比减少 55% 以上, 且一直持续到熏后 37 周还未恢复。在实验土壤中也发现对照土壤中不存在的微生物如 *Uncultured Azospirillum* 和 *Mesorhizobium*, 其中 *Mesorhizobium* 是根瘤菌属, 其功能与 *Azospirillum*、*Rhizobium melibei* 一样。说明溴甲烷熏蒸抑制了某一类固氮的微生物, 而使得另一类固氮微生物的固氮基因表达, 从而使本来就存在于土壤中但由于数量太少和其他各种原因在熏蒸前并没有检测到的微生物检测到了。溴甲烷熏蒸未影响土壤的反硝化作用, 是否和溴甲烷熏蒸可能诱导新的反硝化型细菌的基因的表达, 有待于进一步的研究。

参考文献

- [1] Minuto A, Gullino ML, Lamberti F, Addabbo TD, Tescari E, Ajwa H, Garibaldi A. Application of an emulsifiable mixture of 1, 3-dichloropropene and chloropicrin against root knot nematodes and soilborne fungi for greenhouse tomatoes in Italy. *Crop Protection*, 2006, 25:1244-1252.
- [2] Stromberger ME, Klose S, Ajwa H. Microbial populations and enzyme activities in soils fumigated with methyl bromide alternatives. *Soil Science Society of America Journal*, 2005, 69 (6) : 1987-1999.
- [3] Tanaka S, Kobayashi T, Iwasaki K, Yamane S, Maeda K, Sakurai K. Properties and metabolic diversity of microbial communities in soils treated with steam sterilization compared with methyl bromide and chloropicrin fumigations. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2003, 49:603-610.
- [4] Roux-Michollet D, Czarnes S, Adam B. Effects of steam disinfection on community structure, abundance and activity of heterotrophic, denitrifying and nitrifying bacteria in an organic farming soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40 (7) :1836-1845.
- [5] Ibekwe AM. Effects of Fumigants on Non-Target Organisms in Soils. *Advances in Agronomy*, 2004, 83:11-35.
- [6] Neve DS, Csitari G, Salomez J. Quantification of the effect of fumigation on short-and long-term nitrogen mineralization and nitrification in different soils. *Journal of Environmental Quality*, 2004, 33:1647-1652.
- [7] Chen Y, Cao Z, Yu Y. Impact of alternative methyl bromide technology on soil nutrient and microbial biomass carbon in tomato greenhouse. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2007, 15 (5) :42-45. (in Chinese)
陈云峰, 曹志平, 于永莉. 甲基溴替代技术对番茄温室土壤养分及微生物量碳的影响. *中国生态农业学报*, 2007, 15 (5) : 42-45.
- [8] Cheng X, Yang J. Effect of soil fumigation on soil microbe and nitrification. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2007, 15 (6) :51-53. (in Chinese)
程新胜, 杨建卿. 熏蒸处理对土壤微生物及硝化作用的影响. *中国生态学报*, 2007, 15 (6) : 51-53.
- [9] Klose S, Acosta-Martínez V, Ajwa HA. Microbial community composition and enzyme activities in a sandy loam soil after fumigation with methyl bromide or alternative biocides. *Soil Biology & Biochemistry*, 2006, 38:1243-1254.
- [10] Mo X, Ma W, Shi R, Wang Y, Zhen J, Xu H. Diversity of nirS-type denitrifying bacteria under different nitrogen fertilizer management in wheat soil. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49 (9) :1203-1208. (in Chinese)
莫旭华, 麻威, 史荣久, 王元芬, 郑佳, 徐慧. 氮肥对小麦田土壤型反硝化细菌多样性的影响. *微生物学报*, 2009, 49 (9) :1203-1208.
- [11] Mounier E, Hallet S, Cheneby D, Benizri E, Gruet Y, Nguyen C, Piutti S, Robin C, Slezaack-Deschaumes S, Martin-Laurent F. Influence of maize mucilage on the diversity and activity of the denitrifying community. *Environmental Microbiology*, 2004, 6:301-312.
- [12] Scala DJ, Kerkhof LJ. Nitrous oxide reductase (*nosZ*) gene-specific PCR primers for detection of denitrifiers and three *nosZ* genes from marine sediments. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, 162: 61-68.
- [13] Ma Y, Chen Z. Effects of enrofloxacin on molecular diversity of nitrous oxide reductase genes (*nosZ*). *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30 (4) : 1011-1017. (in Chinese)
马驿, 陈杖榴. 恩诺沙星残留对土壤中反硝化细菌氧化二氮还原酶基因 (*nosZ*) 多样性的影响. *生态学报*, 2010, 30 (4) :1011-1017.
- [14] Line F, Flemming E, Carsten SJ, Kaare J. Development and application of a Most-Probable-Number-PCR assay to quantify flagellate populations in soil samples. *Applied Environment Microbiology*, 2001, 67 (4) :1613-1618.
- [15] 李振高, 骆永明, 滕应. 土壤与环境微生物研究法. 北京: 科学出版社, 2008.
- [16] Sun J, Zhao C, Qu B. Effects of chloropicrin suffocating on soil microorganisms. *Soil China*, 2005, 12, :51-53. (in Chinese)
孙军德, 赵春燕, 曲宝成. 氯化苦熏蒸土壤对微生物种群数量的影响. *土壤通报*, 2005, 12:51-53.
- [17] Tanaka S, Kobayashi T, Iwasaki K, Yamane S, Maeda K, Sakurai K. Properties and metabolic diversity of microbial communities in soils treated with steam sterilization compared with methyl bromide and chloropicrin fumigations. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2003, 49: 603-610.

Effects of methyl bromide fumigation on community structure of denitrifying bacteria with nitrous oxide reductase gene (*nosZ*) in soil

Pingmei Yan^{1,2}, Hongping Qiao¹, Wenjing Zhao¹, Yanfei Chen¹, Shuhua Shan¹, Aocheng Cao^{2*}

¹ Department of Biology, Taiyuan Normal University, Taiyuan 030012, Shanxi Province, China

² Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

Abstract: [Objective] We studied the effect of methyl bromide fumigation on soil edaphic denitrification. [Methods] We adopted *nosZ*-PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) method, *nosZ*-MPN-PCR (Most-Probable-Number-PCR) counting method and soil nitrate elimination rate method, to explore the effect of methyl bromide fumigation on community structure, quantity and activity of denitrifying bacteria in soil. [Result] After methyl bromide fumigating soil for 100 d, soil denitrification did not change obviously ($P > 0.05$). Margalef index, Shannon-wiener index and Evenness index had no significant difference ($P > 0.05$) in *nosZ* denitrifying bacterial communities between fumigated soil and the control. There were *Rhodospirillum rubrum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Herbacspirillum*, *uncultured bacterium partial* in both of them. However, *Azospirillum*, *Rhizobium melibei*, *Nitrosospora multififormis* were exclusively found in the control, and *Uncultured Azospirillum sp*, *Mesorhizobium sp* were in fumigated one. Moreover, the number of denitrifying bacteria in the control resolved by *nosZ*-MPN-PCR (Most-Probable-Number-PCR) was 1.4 times higher than that of the fumigated one. [Conclusion] After 100 d fumigating soil, the composition of *nosZ* denitrifying microbial community and the population of denitrifying bacteria changed. Furthermore, there was no difference in denitrification between the fumigated soil and the control.

Keywords: methyl bromide fumigation, denitrifying bacteria, *nosZ* gene, community structure

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Projects of Ministry of Agricultural (2110402) and by the National Natural Science Foundation of China (40871131, 31240009)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-62815940; E-mail: caoac@vip.sina.com

Received: 3 April 2014/Revised: 30 September 2014