

## 氮肥对小麦田土壤 *nirS* 型反硝化细菌多样性的影响

莫旭华<sup>1,2</sup>, 麻威<sup>1,3</sup>, 史荣久<sup>1</sup>, 王元芬<sup>1,2</sup>, 郑佳<sup>1,4</sup>, 徐慧<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国科学院沈阳应用生态研究所, 中国科学院陆地生态过程重点实验室, 沈阳 110016)

(<sup>2</sup> 中国科学院研究生院, 北京 100049)

(沈阳农业大学, <sup>3</sup> 生物科学与技术学院, <sup>4</sup> 土地与环境学院, 沈阳 110161)

**摘要** 【目的】研究施用无机氮肥对小麦田土壤 *nirS* 型反硝化细菌多样性的影响。【方法】通过构建反硝化细菌亚硝酸盐还原酶 *nirS* 基因克隆文库, 采用限制性片段长度多态性(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)技术分析了施氮肥处理和不施氮肥处理土壤中 *nirS* 型反硝化细菌的多样性。【结果】两种处理各自分别得到了 27 个可操作分类单元(Operational Taxa Units, OTUs), 其中有 9 个 OTUs 在两个处理中相同。虽然两种处理中 *nirS* 反硝化细菌的香农-威纳指数, Simpson 指数, 丰富度指数, 均匀度指数相近, 但是土壤的 OTU 类型发生了很大变化。通过对施氮肥处理 *nirS* 文库中 11 个代表性 *nirS* 克隆子的序列分析, 有 10 个克隆子与数据库中的 *nirS* 序列的相似度在 73%~95% 之间, 有 1 个序列在数据库中找不到相似序列。【结论】施氮肥在短期内显著改变了土壤中 *nirS* 型反硝化细菌群落结构的构成。

**关键词**: 反硝化细菌; *nirS* 克隆文库; RFLP 分析; 小麦土壤

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)09-1203-06

反硝化作用是某些细菌在无氧或微氧条件下以  $\text{NO}_3^-$  或  $\text{NO}_2^-$  作为电子受体进行呼吸代谢获得能量, 同时将  $\text{NO}_3^-$  或  $\text{NO}_2^-$  还原为  $\text{N}_2\text{O}$  或  $\text{N}_2$  的过程<sup>[1]</sup>。反硝化作用既是土壤氮肥损失的途径之一, 又是温室气体  $\text{N}_2\text{O}$  的主要来源。土壤的反硝化作用主要是由反硝化细菌引起的, 反硝化细菌是一个生理类群, 在分类上主要分布于 *Pseudomonaceae*、*Neisseriaceae*、*Nitrobacteraceae*、*Rhodospirillaceae*、*Bacillaceae*、*Cytophagaceae*、*Spirileaceae*、*Rhizobiaceae*、*Halobacteriaceae* 等科<sup>[2]</sup>。由于反硝化细菌类群的多样性, 用传统的培养方法和 16S rDNA 的方法不能够很好地研究土壤中的反硝化细菌的结构和多样性。功能基因如亚硝酸还原酶基因 *nir* 已开始应用于多种生境下反硝化细菌群落结构的研究<sup>[3-4]</sup>。亚硝酸

盐还原酶是反硝化过程中一个重要酶, 在反硝化细菌中, 存在着两种编码亚硝酸盐还原酶的基因: *nirK* 和 *nirS*<sup>[5]</sup>。这两种基因在土壤反硝化细菌中广泛存在<sup>[6-7]</sup>。

土壤中的氮含量是影响土壤反硝化作用的一个因素, 无机氮肥的施入能够在短期内改变土壤中速效氮( $\text{NH}_4^+$  和  $\text{NO}_3^-$ )的含量, 引起土壤中反硝化作用的变化<sup>[8-9]</sup>。目前国内主要用实验室培养法和 MPN 法来研究土壤中反硝化细菌数量和反硝化活性的变化<sup>[10-12]</sup>, 对于土壤中的反硝化细菌的分子群落结构的研究还未有报道。本实验选用特异引物扩增土壤反硝化细菌 *nirS* 基因, 实验采用 *nirS*-PCR-RFLP 方法, 研究了施用无机氮肥对土壤中 *nirS* 型反硝化细菌多样性的影响。

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目(Kzcx2-yw-204); 国家自然科学基金(30670390)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-24-83970369; E-mail: xuhui@iae.ac.cn

作者简介: 莫旭华(1984-), 男, 湖南邵阳人, 硕士生, 从事氮循环微生物生态学研究。E-mail: shiricao2003@yahoo.com.cn.

收稿日期: 2009-03-09; 修回日期: 2009-05-15

# 1 材料和方法

## 1.1 研究区概况

采样地点位于山西省运城市董村农场中澳国际合作项目的实验田(34°00'N, 110°17'E)。该区属黄河中游、汾河下游,海拔349 m,1997~2007年的平均年降水量623.7 mm,大约80%的年降水集中在夏、秋两季,日照2350 h,年平均气温13.1℃,无霜期220 d。供试土壤为潮褐土,土壤质地为粉砂质粘土,其中粘粒(<0.002 mm)为37.34%,粉粒(0.02 mm~0.002 mm)为46.04%,砂粒(2 mm~0.02 mm)为16.62%。土壤的灌溉方式为喷灌。实验设立两个处理,分别为土壤施氮肥处理(B-UN)和土壤不施氮肥处理(B-NN),施氮肥量为260.87 kg/ha。施肥时间为2008年3月20日。

## 1.2 土壤样品

土壤样品采样时间为2008年3月29日。在每个实验处理中采集12个土柱,采集深度为0 cm~20 cm,所有采集土柱混合均匀后,一部分风干过2 mm筛,置于-20℃冰箱冻存,另一部分用于土壤速效氮含量分析。

## 1.3 土壤中NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N和NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N的测定

参照鲁如坤实验方法<sup>[13]</sup>,具体步骤为:取40 g土壤加入100 mL 2 mol/L KCl,在30℃、180 r/min下浸提1 h;用定性滤纸过滤,取10 mL滤液,用MgO-代氏合金蒸馏法测定土壤中硝态氮(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N)与铵态氮(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N)。

## 1.4 土壤总DNA的提取与检测

采用直接法提取土壤总DNA,方法主要参照周集中的SDS裂解法<sup>[14]</sup>。DNA粗提物用0.8%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粗提液,用DNA纯化试剂盒纯化。纯化试剂盒购自Axygene生物技术(杭州)有限公司(Axygene Biotechnology(Hangzhou) Co. Ltd.)。

## 1.5 nirS克隆文库建立与分析

采用nirS基因引物Cd3aF(GT(C/G)AACGT(C/G)AAGGA(A/G)AC(C/G)GG)和R3cd GA(C/G)TTCG(A/G)TG(C/G)GTCTTGA扩增土壤中的nirS基因<sup>[7]</sup>。扩增反应体系:纯化后DNA 2 μL, 10 ×

Buffer 2.5 μL, dNTPs(10 mmol/L) 0.5 μL, 上游引物和下游引物各0.5 μL(20 mmol/L), Taq 酶(5 U/μL) 0.125 μL, 补去离子水至25 μL。PCR扩增条件:94℃预变性4 min, 94℃变性45 sec, 57℃退火1 min, 72℃延伸1 min, 10个循环, 开始10个循环每个循环退火温度降低1℃, 后25个循环的退火温度为52℃, 最后72℃延伸6 min。每个样品DNA做3个重复, 然后混合所有的PCR样品, 以消除DNA提取的偏差和PCR扩增的偏差。扩增产物用1.5%的琼脂糖凝胶电泳回收, 用纯化试剂盒纯化。通过TA克隆技术将扩增的nirS片段转化到E. coli DH5α中, 蓝白斑筛选分别挑取100个白色克隆, 建立nirS克隆文库, 克隆文库通过Amp<sup>r</sup>平板保藏。大肠杆菌(Escherichia coli) DH5α为本实验室保存菌种; pMD19-T simple Vector 购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa Biotechnology(Dalian) Co. Ltd.); PCR引物由上海捷瑞生物技术公司合成。

## 1.6 群落结构计算方法和系统学分析

酶切图谱分析方法:丰富度: $d = (S - 1) / \ln N$ ; S:nirS酶切产生的总类型数; N:总克隆数。香农-威纳指数: $H = - \sum_{i=1}^s P_i \times \ln P_i$ ; P<sub>i</sub>:第i种酶切类型出现的频率,  $P_i = N_i / N$ ; N<sub>i</sub>:为第i种酶切类型所包含的克隆数。均匀度: $E = H / H_{\max}$ , H<sub>max</sub>为最大多样性。文库的库容的计算公式为: $C = 1 - nl / N$ , N代表nirS文库总克隆数, nl代表在文库中仅出现一次的OTU的数量。

## 1.7 序列比对和核酸序列注册登陆号

部分nirS克隆子经测序后,测得序列输入GenBank后,用BLAST进行序列比对。序列登录号为FJ655195-FJ655199; FJ655200-FJ655205。

# 2 结果和分析

## 2.1 土壤速效氮含量分析

施肥土壤和不施肥土壤的NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N和NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N浓度有明显差异(表1)。在施氮肥处理中, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N浓度比不施氮肥处理高99.7%, NO<sub>3</sub>-N浓度比不施氮肥处理高335.6%。

表1 不同施肥处理土壤基本性质

Table 1 Basic property of soil in different treatment

soil sample	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N concentration/ (mg/kg dry soil)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N concentration/ (mg/kg dry soil)	water content/%	pH value
With nitrogen treatment (B-UN)	15.65 ± 1.05	50.86 ± 2.08	13.8	8.36
Without nitrogen treatment(B-NN)	7.84 ± 1.25	11.73 ± 2.50	13.3	8.32

## 2.2 *nirS* 基因的 PCR 结果

反硝化细菌 *nirS* 基因的扩增片段长度在 425 bp 左右, 在施氮肥土壤和不施氮肥土壤中都能够得到 *nirS* 基因目的条带。

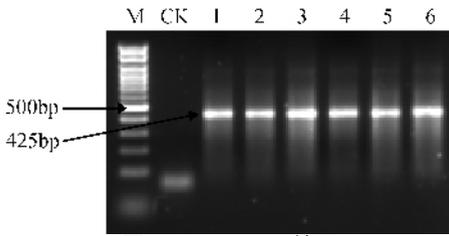


图 1 *nirS* PCR 结果

Fig.1 The *nirS* PCR result. M: Marker; CK: control; 1-3: B-UN; 4-6: B-NN.

## 2.3 *nirS* 基因的 RFLP 分析

**2.3.1 *nirS* 文库中克隆子的分布** :在不施氮肥处理中的 75 个阳性克隆子中, 通过 *Msp* I 和 *Afa* I 双酶切分型, 一共得到了 27 个 OTUs(图 2-A), 其中有 7 个 OTUs 只含有一个克隆子, 有 7 个 OTUs 含有 5 个以上的克隆子, 其余的 13 个 OTUs 的克隆子数目为 2 个或者 3 个。在施氮肥处理的克隆文库中, 得到了 62 个阳性克隆子, 通过 *Msp* I 和 *Afa* I 双酶切分型, 得到了 27 个 OTUs(图 2-B)。其中有 11 个 OTUs 只有一个克隆, 5 个 OTUs 含有 2 个克隆子, 有 11 个 OTUs 有 3-5 个克隆子。在两个处理中, 一共有 9 个 OTUs 相同(表 2), 其在施肥处理克隆文库中所占比率为 43.8%, 在不施肥处理克隆文库中所占比率为 51.7%。在两个处理中, 有 5 个 OTUs( D1、D5、D10、D23、D2) 的比率发生了比较大的变化(表 2)。

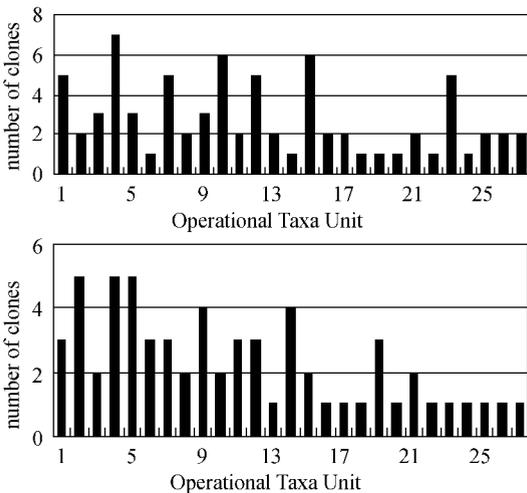


图 2 不施氮肥(A)和施氮肥(B)处理 *nirS* 克隆文库中各克隆子的分布

Fig.2 The distribution of clones in *nirS* clone library in treatment without nitrogen fertilizer (A) and with nitrogen fertilizer (B).

**2.3.2 *nirS* 型反硝化细菌多样性估计** :为了判断所分析的克隆子数目是否真正代表了克隆文库中 *nirS* 型反硝化细菌基因的多样性, 将酶切分析过程中所累积的 OTU 数目作为已分析 *nirS* 克隆子数目的函数并作图, 通过分析发现, 不施氮肥处理土壤 *nirS*

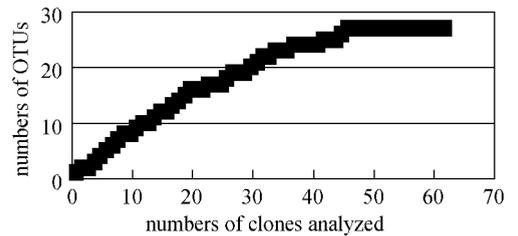
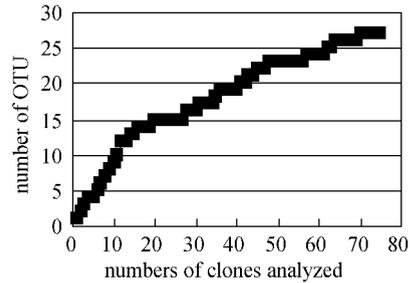


图 3 不施肥处理(A)和施肥处理(B) *nirS* 细菌群落结构及其多样性估计

Fig.3 Estimation of diversity in *nirS* bacteria clone library in treatment without nitrogen (A) and with nitrogen (B)

克隆文库在完成 70 个克隆检测以后, 再检测到新的 OTU 的几率就下降到了一个较低的水平(图 3-A)。施氮肥土壤 *nirS* 克隆文库在完成 60 个克隆以后, 再检测到新的 OTU 的水平就下降到了较低的水平了(图 3-B)。这说明, 本文采用的酶切分析强度已可以用来检测文库中的优势 OTU。

## 2.4 部分克隆子的测序与分析

为了解施肥土壤中 *nirS* 型反硝化细菌的详细信息, 从施肥处理中出现频率高和出现频率低的 OTU 里面挑选代表性克隆子(包括两个处理中所有相同的 OTUs), 对其中插入的 *nirS* 基因进行测序, 所得测序结果输入 GenBank 数据库中进行序列比对(表 2), 结果显示, 除 1 个文库在数据库找不到相似的序列, 其余序列与数据库中序列的相似性为 73%~95%, 绝大部分相似克隆子来源于土壤环境样品中。

## 3 讨论

反硝化细菌中有两种类型的亚硝酸还原酶: *nirS* 基因编码的以细胞色素 *cd1* 为辅基的亚硝酸还原酶, *nirK* 基因编码的以铜为辅基的亚硝酸还原酶<sup>[5]</sup>。虽然有研究表明, 在土壤环境中更容易检测

表 2 与测序克隆 *nirS* 序列最相似的 NCBI 基因库中微生物种类Table 2 Species of bacteria with *nirS* sequences in the NCBI GenBank database most similar to the clones of soil sample

OTU	Size of clone	ratio of clone/%		Nearest relative, Similarity/%
		B-UN	B-NN	
D1	444	3.2	8.0	Unculture soil <i>nirS</i> clone 87
D4	411	8.1	9.3	Unculture soil <i>nirS</i> clone 87
D5	414	8.1	4.0	Unculture activated sludge <i>nirS</i> clone 85
D7	411	4.8	4.8	Unculture soil <i>nirS</i> clone 85
D10	411	3.2	8.1	Unculture soil <i>nirS</i> clone 85
D11	411	4.0	6.5	Unculture soil <i>nirS</i> clone 85
D12	414	2.7	1.6	Unculture soil <i>nirS</i> clone 90
D23	408	1.6	6.7	<i>Paracoccus denitrificans</i> PD1222 73
D2	421	8.1	2.7	Not defined
D19	411	6.5	0	Unculture marine sediment <i>nirS</i> clone 83
D21	411	3.2	0	Unculture groundwater <i>nirS</i> clone 86

到 *nirK* 基因<sup>[15]</sup>, 但本实验采用 *nirK* 基因引物对 F1aCu :R3Cu 和 nirK-1F :nirK-5R 并未扩增出 *nirK* 基因, Throbäck 等<sup>[7]</sup>使用这两对引物从多种土壤样品中成功的扩增出了 *nirK* 基因, 这是否是引物偏好性造成的还不确定。Rösch 等<sup>[16]</sup>用了多种引物没能从酸性森林土壤中扩增到 *nirK* 基因, 认为酸性 pH 对于 *nirK* 型反硝化细菌有选择性。本实验土壤是 pH8.4 左右的盐碱土, 可能高 pH 值也对 *nirK* 型反硝化细菌有选择作用, 不适合 *nirK* 型反硝化细菌的生长。

尿素施入土壤后, 尿素在土壤脲酶的作用下, 经由氨基甲酸水解成  $\text{NH}_3$ , 再经质子化转变为  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NH}_4^+$  经过硝化作用转变为  $\text{NO}_3^-$ , 土壤中  $\text{NO}_3^-$  含量增高, 能够增加土壤中反硝化作用<sup>[8, 9, 15, 17]</sup>。土壤中反硝化细菌的分布与土壤环境中  $\text{NO}_3^-$ -N 浓度密切相关<sup>[18-19]</sup>, 土壤反硝化作用是由反硝化细菌引起的, 反硝化作用的增强, 表示土壤中反硝化细菌的活性发生了改变或者反硝化细菌的群落结构发生了改变。虽然在两种处理下只有 9 个 OTUs 相同, 但其比率占据了各个克隆文库的一半左右。在共同的

OTUs 中, D1、D10、D23、D5、D2 发生了比较大的变化, 施氮肥后 D1、D10、D23 有所降低, D5、D2 则有所升高, D5、D2 等 OTUs 代表的反硝化细菌类群可能更适合在高  $\text{NH}_4^+$ -N 和高  $\text{NO}_3^-$ -N 的环境中生长。Falk 等<sup>[20]</sup>认为在海洋沉积岩和海水中的 *nirS* 反硝化细菌与环境条件( $\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{S}^{2-}$ )有很大关系, 反硝化细菌具有位点特异性, 如果环境条件相同则 *nirS* 反硝化细菌会有重叠。在本研究中, 除了氮肥的使用以外, 两种土壤的所有处理均完全相同, 无机氮肥的使用增加了土壤中的速效氮( $\text{NH}_4^+$ -N、 $\text{NO}_3^-$ -N)含量, 这可能导致土壤局部环境的改变, 影响了土壤 *nirS* 型反硝化细菌的群落结构。虽然两种处理下土壤 *nirS* 型反硝化细菌发生了很大的变化, 但两种处理下土壤反硝化细菌的一些生态学指数如 Shannon-Wiener 指数、Simpson 指数、均匀度指数、丰富度指数在不同的 *nirS* 克隆文库中并没有明显的差别(表 3)。这表明, 施氮肥处理虽然改变了土壤中 *nirS* 型反硝化细菌的群落结构, 但未改变 *nirS* 型反硝化细菌的多样性, 不同类型的反硝化细菌对无机氮肥的反应不同而导致了 *nirS* 反硝化细菌群落结构改变。

表 3 *nirS* 基因生态学多样性指数Table 3 Ecological indexes of *nirS* gene

Sample No.	OTU	Clone coverage/%	Shannon-Wiener index	Simpson index	Evenness	Richness
B-NN	27	90.7	3.13	0.95	0.95	6.02
B-UN	27	82.25	3.07	0.93	0.93	6.29

*nirS* 测序结果表明, 这种土壤中的 *nirS* 基因与数据库中现存的序列相似性不高, 且绝大部分序列与从土壤环境中得到的 *nirS* 序列有较高的相似性。Priemé 等<sup>[6]</sup>研究了两种不同的森林土壤后发现, *nirS* 基因片段与数据库中已知的反硝化细菌 *nirS* 基因的序列相似性低于 80%, 这种情况的出现可能有以下原因: 1. 数据库中土壤环境样品中的反硝化细菌 *nirS* 序列较少, 以往的研究认为, *nirS* 型反硝化细菌

主要存在于海洋环境中<sup>[4, 7, 15]</sup>, 大量的研究工作集中于海洋生态系统中 *nirS* 型反硝化细菌的研究, 这就使数据库中来自土壤环境的 *nirS* 序列较少。2. *nirS* 基因的分布与样品所处的环境类型有关, 不同的环境类型其 *nirS* 基因序列存在着非常大的差异, 即使在相同的土壤环境中, *nirS* 基因的序列也存在很大的不同<sup>[6]</sup>。3. 土壤中的反硝化细菌的种类很多, 且绝大部分还是不可培养的, 现在的纯培养的方法

法还不能够培养土壤中的绝大部分反硝化细菌, Braker 等<sup>[4]</sup>通过富集培养后发现, 富集后的 *nirS* 型反硝化细菌类群与海洋环境样品中的 *nirS* 反硝化类群有很大的差别, 新培养方法的应用对于新的反硝化细菌的鉴定非常重要。在本实验中, 所有测序的结果只有 1 个 OTU 与可培养的 *Paracoccus denitrificans* 有 73% 的相似性, 这就说明, 此种土壤中绝大部分 *nirS* 反硝化细菌是不可培养的。

## 4 结论

通过 PCR-RFLP 方法研究了无机氮肥对于土壤 *nirS* 反硝化细菌群落多样性的影响, 无机氮肥对土壤中 *nirS* 型反硝化细菌群落结构有很大影响, 但是对 *nirS* 型反硝化细菌丰富度没有影响。两种处理中都存在着丰富的 *nirS* 型反硝化细菌, 但 *nirS* 基因测序结果显示其序列与数据库中 *nirS* 序列相似性低。在这种土壤中, 存在着的绝大部分 *nirS* 反硝化细菌还是不可培养的。

## 参考文献

- [ 1 ] 孙建光, 高俊莲, 马晓彤, 等. 反硝化微生物分子生态学技术及相关研究进展. 中国土壤与肥料( *Soil and Fertilizer Sciences in China* ) 2007, ( 2 ): 7 - 12.
- [ 2 ] 郑平. 环境微生物学. 杭州: 浙江人民出版社, 2002.
- [ 3 ] Braker G, Fesefeldt A, Witze KP. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes ( *nirK* and *nirS* ) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64( 10 ): 3769 - 3775.
- [ 4 ] 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66( 5 ): 2096 - 2104.
- [ 5 ] Peter M, Mark AA, Bohlke JK, et al. Methods for measuring denitrification: diverse approaches to a difficult problem. *Ecological Applications*, 2006, 16( 6 ): 2091 - 2122.
- [ 6 ] Priemé A, Braker G, Tiedje M. James. Diversity of nitrite reductase ( *nirK* and *nirS* ) gene fragments in forested upland and wetland soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68( 4 ): 1893 - 1900.
- [ 7 ] Throbäck IN, Enwall K, Jarvis A, et al. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 49: 401 - 417.
- [ 8 ] Weier KL, MacRae IC, Myers RJK. Denitrification in a clay soil under Pasture and annual crop: estimation of potential loss using intact soil cores. *Soil Biology and Biochemistry*, 1993, 25: 991 - 997.
- [ 9 ] Hermann B, Stuart JF, William EN. Biology of the nitrogen cycle. ed. Amsterdam: Elsevier, 2007: 336 - 337.
- [ 10 ] 张光亚, 陈美慈, 闵航, 等. 设施栽培土壤氧化亚氮释放及硝化、反硝化细菌数量的研究. 植物营养与肥料学报( *Plant Nutrition and Fertilizer Science* ), 2002, 8( 2 ): 239 - 243.
- [ 11 ] 闵航, 陈中云, 吴伟祥, 等.  $\text{Cr}^{3+}$  污染对稻田土壤的反硝化细菌种群数量及其活性影响的研究. 植物营养与肥料学报( *Plant Nutrition and Fertilizer Science* ) 2003, 9( 2 ): 248 - 252.
- [ 12 ] 陈中云, 闵航, 吴伟祥, 等. 农药污染对水稻田土壤反硝化细菌种群数量及其活性的影响. 应用生态学报( *Chinese Journal of Applied Ecology* ), 2003, 14( 10 ): 1765 - 1769.
- [ 13 ] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
- [ 14 ] Zhou J, Bruns AM, Tiedje MJ. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62( 2 ): 316 - 322.
- [ 15 ] Sharon A, Ralf C, Gesche B. Effect of soil ammonium concentration on  $\text{N}_2\text{O}$  release and on the community structure of ammonia oxidizers and denitrifiers. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68( 11 ): 5685 - 5692.
- [ 16 ] Rösch CAM, Bothe H. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68: 3818 - 3829.
- [ 17 ] Holtan-Hartwig L, Dörsch P, Bakken LR. Comparison of denitrifying communities in organic soils: kinetics of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{N}_2\text{O}$  reduction. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32: 833 - 843.
- [ 18 ] Cavigelli M, Robertson GP. The functional significance of denitrifier community composition in a terrestrial ecosystem. *Ecology*, 2000, 81: 1402 - 1414.
- [ 19 ] Alyson ES, Alexandria BB, Christopher AF. Denitrifier community composition along a nitrate and salinity gradient in a coastal aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72( 3 ): 2102 - 2109.
- [ 20 ] Falk S, Hannig M, Braker G, et al. *NirS*-containing denitrifier communities in the water column and sediment of the Baltic Sea. *Biogeosciences Discussions*, 2006, 3: 697 - 727.

# Diversity of *nirS*-type denitrifying bacteria under different nitrogen fertilizer management in wheat soil

Xuhua Mo<sup>1,2</sup>, Wei Ma<sup>1,3</sup>, Rongjiu Shi<sup>1</sup>, Yuanfen Wang<sup>1,2</sup>, Jia Zheng<sup>1,4</sup>, Hui Xu<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> Key Laboratory of Terrestrial Ecological Processes, Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China)

(<sup>2</sup> Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 110039, China)

(<sup>3</sup> Biological Science and Technology College, Shenyang Agriculture University, Shenyang, 110161, China)

(<sup>4</sup> Soil and Environment College, Shenyang Agriculture University, Shenyang 1100161, China)

**Abstract** [ Objective ] To study the effect of inorganic nitrogen fertilizer on *nirS*-type denitrifiers' community in the wheat soil. [ Methods ] We constructed *nirS* gene libraries of two different treatments of soil: soil fertilized with inorganic nitrogen fertilizer (B-UN) and without nitrogen fertilizer (B-NN). And we used restriction fragment length polymorphism (RFLP) method to analyze the *nirS*-type denitrifiers' diversity. [ Results ] There were 27 operational taxa units (OTUs) in each treatment after *Msp* I and *Afa* I digestion and only nine OTUs existed in both treatments. The ecological indexes such as *Shannon-Wiener* index, *Simpon* index, richness index and evenness index of two different soils were nearly equivalent. However, significant difference was found between the OTU clusters from clone libraries of different treatments. Eleven representative clones were sequenced. The similarities of ten sequences were from 73% to 95% to the sequences of the database. There was one sequence which had no similar nucleotide identities in database. [ Conclusion ] The application of inorganic nitrogen fertilizer altered significantly the *nirS*-type denitrifiers' community in the wheat soil.

**Keywords**: denitrifiers; *nirS* gene library; RFLP analyze; wheat soil

( 本文责编 : 王晋芳 )

Supported by the Knowledge Innovation Project of the Chinese Academy of Sciences (Kzcx2-yw-204) and the National Natural Science Foundation of China (30670390).

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-24-83970369; E-mail: xuhui@iae.ac.cn

Received: 9 March 2009/Revised: 15 May 2009

## 1953 年创刊以来所有文章全文上网

2008 年 1 月中旬,《微生物学报》自 1953 年创刊以来的文章全文上网啦! 欢迎广大读者登陆本刊主页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>) 浏览、查询、免费下载全文!

建立全文数据库的工作是从 2007 年初开始的, 经过多方人员的共同努力, 历经半年多时间成功完成。由于《微生物学报》历史悠久, 其间经历了期刊的变化, 变化情况统计如下, 以供读者查阅参考。

### 《微生物学报》刊、期统计表

2009 年 9 月统计

时间	刊期	卷号	期号
1953 ~ 1956	半年刊	1 ~ 4	1 ~ 2
1957 ~ 1958	季刊	5 ~ 6	1 ~ 4
1959	季刊	7	1 ~ 2
1959 ~ 1962	停刊 3 年		
1962	季刊	8	3 ~ 4
1963 ~ 1965	季刊	9 ~ 11	1 ~ 4
1966	季刊	12	1 ~ 2
1966 ~ 1972	停刊 6 年半		
1973 ~ 1988	季刊	13 ~ 28	1 ~ 4
1989 ~ 2007	双月刊	29 ~ 47	1 ~ 6
2008	月刊	48	1 ~ 12
2009	月刊	49	1 ~ 9