

王蓉, 龚世飞, 金涛, 等. 稻虾共作对稻田土壤反硝化细菌 *nosZ* 基因数量、多样性及群落结构的影响[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(4): 246–251. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.04.056

# 稻虾共作对稻田土壤反硝化细菌 *nosZ* 基因数量、多样性及群落结构的影响

王蓉<sup>1</sup>, 龚世飞<sup>2</sup>, 金涛<sup>1</sup>, 刘章勇<sup>1</sup>

(1. 长江大学农学院, 湖北荆州 434025; 2. 湖北省十堰市农业科学院, 湖北十堰 442000)

**摘要:** 对稻虾共作模式下水稻土壤反硝化细菌群落进行研究, 以期揭示稻虾复合种养模式下土壤反硝化细菌丰度、群落多样性及组成, 为科学研究稻虾共作模式的土壤微生物多样性, 维持土壤地力提供理论依据。依托长江大学农学院基地设置常规中稻种植模式(MR)、稻虾共作模式(CR)等2种模式, 利用荧光定量PCR和高通量测序平台比较2种模式下水稻土壤反硝化细菌 *nosZ* 基因的数量、群落多样性及群落组成。结果表明, 稻虾共作显著提高水稻土壤硝态氮、全碳、全氮含量, 对碱解氮含量、pH值、碳氮比及铵态氮含量无显著影响。*nosZ* 基因在MR、CR处理中的基因丰度分别为1 g干土  $1.51 \times 10^6$ 、 $2.23 \times 10^6$  拷贝数, CR处理中 *nosZ* 基因丰度是MR的1.48倍。CR处理显著提高了土壤 *nosZ* 基因的丰度。通过对  $\alpha$  群落多样性指数进行方差分析可知, CR处理与MR处理间微生物群落多样性差异不显著。经韦恩(Venn)分析, 在目和科水平上, MR处理与CR处理的微生物群落组成显示出较高的相似度, 在属与种水平上, 2个处理下的土壤微生物群落结构存在差异性, CR处理下的土壤缺失沼泽红假单胞菌。经冗余分析, 土壤总碳(TC)含量对 *nosZ* 基因群落结构的影响最为显著, 其次是pH值、碱解氮含量、硝态氮含量与铵态氮含量。综合分析, 稻虾共作可显著提高水稻土壤 *nosZ* 基因丰度, 稻虾轮作对群落多样性的影响较小, 其在种水平上缺失了沼泽红假单胞菌。常规中稻种植模式与稻虾共作模式下的土壤微生物群落结构虽保有一定的相似度, 但仍存在差异, 土壤总碳含量是影响群落结构差异的主要原因。

**关键词:** 稻虾共作; 反硝化作用; 荧光定量; 高通量测序技术;  $\alpha$  群落多样性; *nosZ* 基因

**中图分类号:** S154.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)04-0246-06

反硝化作用作为土壤氮循环的组成部分, 在土壤氮素转化中占据重要地位<sup>[1-2]</sup>。反硝化过程在厌氧的条件下由微生物驱动, 可产生氧化亚氮( $N_2O$ ), 被认为是土壤释放  $N_2O$  的主要过程<sup>[3-7]</sup>, 主要指硝化作用产生的硝酸根( $NO_3^-$ )最终被还原成氮气( $N_2$ )的过程, 中间过程会产生一氧化碳(CO)和  $N_2O$  等气体, 造成氮素损失, 并引起一系列环境问题<sup>[8-10]</sup>。反硝化过程分为4个部分<sup>[11]</sup>: 第1步是在由 *nar* 或 *narp* 基因编码的硝酸盐还原酶的催化作用下, 将硝酸盐( $NO_3^-$ )还原成亚硝酸盐( $NO_2^-$ ); 第2步反应是在由 *nirK* 基因或 *nirS* 基因编码的亚硝酸盐还原酶的催化作用下, 将亚硝酸盐还原成NO; 第3步反应是在由 *norB* 基因编码的一氧化氮还原酶的催化作用下, 将NO还原为  $N_2O$ , 此步可将氮素以气态的形式排放; 第4步是在由 *nosZ* 基因编码的氧化亚氮还原酶的催化作用下, 将  $N_2O$  还原为  $N_2$ 。由于氧化亚氮还原酶是控制  $N_2O$  排放的主要调节因子, 是完全脱氮途径最后一步的重要催化剂, 因此 *nosZ* 基因通常被用作研究反硝化群落的遗传标记。稻田是重要的农业用地, 其中约70%位于亚热带和热带地

区, 同时也是  $N_2O$  的主要来源<sup>[12]</sup>。与旱地土壤不同, 常年淹水的稻田土壤提供的厌氧条件有利于反硝化作用的发生<sup>[13]</sup>。稻虾种养是将水稻种植与克氏螯虾养殖相结合组成的互利共生复合生态农业系统, 是稻田综合种养模式之一。该模式实现了一水两用、一田双收, 在节约稻田水土资源的同时带来可观的经济效益<sup>[14]</sup>。当前, 我国农业正面临着资源与环境约束加剧和农民增收难度加大的难题, 稻虾生态种养高效模式的兴起, 被农业部誉为“现代农业的一次革命”, 很快在长江中下游地区获得大面积的推广种植。截至2016年, 稻虾种养模式在江汉平原推广面积已经达到20万  $hm^2$  以上<sup>[15]</sup>。统计显示, 全国适合稻虾种养模式的稻田面积高达450万  $hm^2$ <sup>[16]</sup>。稻虾种养模式面积逐年扩大, 但国内外关于稻虾种养模式下参与稻田土壤反硝化反应微生物的研究较少。通过研究微生物种群数量和群落结构, 可以明确稻虾土壤反硝化过程的作用机制及影响因素。本试验以江汉平原典型稻虾种养区湖北省荆州市为研究对象, 研究该模式下土壤反硝化微生物的变化特征, 以期揭示稻虾种养模式土壤微生物群落结构和多样性的变化规律, 丰富稻虾种养模式反硝化微生物理论, 同时为该地区土地利用改良、农业结构战略性调整以及发展稻虾种养高产高效生态友好型农业提供理论依据。

## 1 材料与与方法

### 1.1 试验设计

试验地位于湖北省荆州市长江大学农学院基地(地理位

收稿日期: 2018-09-12

基金项目: 国家重点研发计划(编号: 2017YFD0301400、2017YFD0800102)。

作者简介: 王蓉(1994—), 女, 湖北宜昌人, 硕士研究生, 主要从事农业生态研究。E-mail: WRchangda@163.com。

通信作者: 金涛, 博士, 讲师, 主要从事土壤碳氮循环研究。E-mail: jintao165@126.com。

置 30°6' N, 111°54' E)。该地区处于江汉平原地带, 具有四季分明、雨热同季、年降水量充沛等特点, 冬季受极地大陆气团影响, 气温偏低, 降水量少; 夏季受热带海洋气团影响, 高温多雨, 水分季节分配不均, 属于亚热带季风气候区, 年均降水量在 1 100 mm 左右, 无霜期 200 d。土壤类型为潮土, 土壤母质为河流冲积物。供试土壤全氮、全磷、速效钾含量分别为 0.75 g/kg、0.54 g/kg、17.09 mg/kg, 有机质含量为 38.8 g/kg, pH 值为 7.5。

试验设置常规中稻种植模式 (MR) 与稻虾共作模式 (CR), 本研究自 2015 年开始, 连续开展 2 年, 于中稻抽穗期采集土壤样品作为研究对象。试验小区由长 12 m、宽 5 m 的田埂围成, 每个处理 3 次重复, 为防止小龙虾逃出, 田埂加高加固并在田埂周围铺设塑料膜。水稻品种为隆两优华占, 小龙虾品种为克氏原螯虾, 施肥量采用当地习惯用量, 年均施肥量为氮肥 180 kg/hm<sup>2</sup>、磷肥 75 kg/hm<sup>2</sup>、钾肥 105 kg/hm<sup>2</sup>, 以尿素 (含 N 46%)、过磷酸钙 (含 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 12%)、氯化钾 (含 K<sub>2</sub>O 60%) 的形式施用。氮肥按基肥: 蘖肥: 穗肥 = 5 : 2 : 3 施用, 磷肥用作底肥 1 次基施, 钾肥按照 50% 基肥、50% 追肥的方式施肥。2 种模式水稻期间田间水分管理为前期灌水、中期晒田、后期干湿交替的模式。虾田于每年水稻收获后覆水泡田, 随即投放虾苗, 投放密度约为 20 万只/hm<sup>2</sup>, 来年 4 月至 6 月上旬捕捞成虾, 捕捞完成后开始整体准备中稻的移栽, 等待水稻收获后进行下一轮的小龙虾养殖。

## 1.2 土壤样品采集

土壤样品在水稻抽穗期采集, 用于基本理化性质分析与土壤微生物测定。采用不锈钢土钻按照 5 点采样法采集用于测定土壤基本理化性质的土样, 重复 3 次, 将土样带回实验室剔除石子、根系等杂物, 存放在阴凉处混匀风干, 待土样风干磨碎后分别过 20 目与 100 目筛用于室内分析。用谷物采样器采集用于测定水稻土壤微生物的样品, 每个处理重复 3 次, 样品采集后剔除石子与根系, 然后立即放入锡箔纸中包裹, 存放在液氮罐中, 并带回实验室存放于 -80 °C 冰箱备用。

## 1.3 土壤基本理化性质测定

土壤基本理化性质分析参考鲍士旦的方法<sup>[17]</sup>。土壤全氮、全碳含量采用 ECS4024 元素分析仪 (意大利 Costech 公司) 测定; 土壤碱解氮含量测定采用碱解扩散法; 土壤硝态氮含量采用 2 mol/L KCl 溶液浸提并在 203、270 nm 下测定; 铵态氮含量测定采用靛酚蓝比色法; pH 值测定采用电位法 (水与土质量比为 2.5 : 1)。

## 1.4 土壤总 DNA 提取

取 0.25 g 低温保存的土壤样品, 用 PowerSoil® DNA Isolation Kit (美国 Mobio 公司) DNA 试剂盒提取土壤总 DNA。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 DNA, 并用 NanoDrop ND-1000Uvis 分光光度计 (美国赛默飞世尔科技公司) 检测提取的 DNA 浓度与纯度。

表 1 稻虾共作模式对稻田土壤理化性质的影响

| 模式     | pH 值         | 碱解氮含量<br>(mg/kg) | 硝态氮含量<br>(mg/kg) | 铵态氮含量<br>(mg/kg) | 全碳含量<br>(mg/kg) | 全氮含量<br>(mg/kg) | 碳氮比          |
|--------|--------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|--------------|
| 常规中稻种植 | 7.47 ± 0.07a | 136.17 ± 8.19a   | 0.31 ± 0.03b     | 13.61 ± 3.41a    | 18.16 ± 0.18b   | 1.86 ± 0.01b    | 9.78 ± 0.12a |
| 稻虾共作   | 7.41 ± 0.15a | 141.28 ± 3.59a   | 0.40 ± 0.01a     | 19.84 ± 4.01a    | 18.59 ± 0.14a   | 1.94 ± 0.02a    | 9.58 ± 0.10a |

注: 表中所有数据为平均值 ± 标准误; 同列数字后不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

## 1.5 反硝化微生物 *nosZ* 基因扩增与荧光定量 PCR 分析

用引物对<sup>[18]</sup> *nosZF* (CGYTGTTCMTTCGACAGCCAG) 和 *nosZ*-1622R (CGSACCTTSTTGCCSTYGC) 扩增 *nosZ* 基因。PCR 反应体系总体积为 20 μL, 包括: 10 μL 2 × syberMIX, 0.2 μL 的 2 种上、下游引物 (10 μmol/L), 1 μL 稀释 8 倍后的样品, 最后用无 RNA 酶的 ddH<sub>2</sub>O 补足至 20 μL。PCR 扩增程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 55 s, 32 个循环; 72 °C 终延伸 10 min, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

标准曲线的制备: 将 PCR 产物纯化回收后, 选取荧光假单胞菌的 *nosZ* 基因阳性克隆转接过夜培养, 质粒浓度经分光光度计测定后, 按照 10 倍梯度逐渐将质粒稀释至 10<sup>3</sup> ~ 10<sup>8</sup> 拷贝数, -80 °C 低温保存。

荧光定量 PCR 反应在 ABI7500 荧光定量 PCR 仪 (美国应用生物系统公司) 上进行, 引物序列前文已标出, 反应体系总体积为 25 μL, 包括 2 × SYBER Green 12.5 μL, 上下游引物各 0.8 μL, ROX 0.4 μL, DNA 模板 2.0 μL, 用 ddH<sub>2</sub>O 补足至 25 μL, 试验试剂购宝生物工程 (大连) 有限公司。

## 1.6 高通量测序

扩增产物经切胶纯化后连接至 pUC-T 载体上, 转至大肠杆菌 DH5α 中进行培养, 选用阳性克隆进行测序, 序列提交至 NCBI 数据库进行比对, 并将同源性大于等于 97% 的序列进行可操作分类单元 (operational taxonomic units, 简称 OTU) 聚类。

## 1.7 数据处理与作图

利用 SPSS 22.0 对土壤基本理化性质数据进行方差分析; 采用 CANOCO 5.0 软件对土壤基本理化性质与反硝化微生物 *nosZ* 基因群落结构进行冗余分析 (redundancy analysis, 简称 RDA), 使用 Mothur1.30.1 在同源性达 97% 上进行群落多样性指数分析, *nosZ* 基因数量采用 Excel 软件作图, R 语言绘制曲线与相关热图。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同处理下土壤基本理化性质

稻虾共作处理显著影响了部分土壤基本理化性质 (表 1)。方差分析结果表明, 除土壤碱解氮含量、pH 值、铵态氮含量及碳氮比 (C/N) 无显著变化外, 稻虾共作显著增加了土壤硝态氮、全碳、全氮的含量。相比常规中稻种植模式, 硝态氮含量提升了 29.03%, 全碳含量增加了 2.37%, 全氮含量提升了 4.30%, 对土壤 pH 值、碱解氮含量、铵态氮含量及 C/N 无显著影响。

### 2.2 测序结果及多样性指数

采用 Miseq 技术对微生物 *nosZ* 基因进行测序分析, 数据经过优化筛选后, 6 个样品共测得原始序列 218 108 条, 序列平均长度为 407.74 bp, 共测得碱基 88 937 543 个, 所有样品

的序列长度在 218 ~ 552 bp 之间(表 2)。按 97% 的相似度对非重复序列进行 OTU 分析,共得到 344 个 OTUs。对各样本序列采用随机抽样方法进行抽样,以抽到的序列数与它们对应的物种多样性指数,构建稀释曲线。由图 1 可知,样本覆盖度(coverage)指数为 0.998 2 ~ 0.999 2,稀释性曲线均趋于平坦饱和,表明此测序深度获得的序列数数据量可以反映土壤样品 *nosZ* 基因微生物信息。

表 2 不同样品测序结果

| 样品  | 序列数(条)  | 碱基数(个)     | 平均长度(bp) | 最短序列长度(bp) | 最长序列长度(bp) |
|-----|---------|------------|----------|------------|------------|
| CR1 | 41 956  | 17 115 019 | 407.93   | 242        | 544        |
| CR2 | 36 432  | 14 878 295 | 408.39   | 246        | 550        |
| CR3 | 30 995  | 12 618 132 | 407.10   | 233        | 550        |
| MR1 | 34 654  | 14 130 129 | 407.75   | 244        | 552        |
| MR2 | 37 963  | 15 497 787 | 408.23   | 233        | 544        |
| MR3 | 36 108  | 14 698 181 | 407.06   | 218        | 550        |
| 合计  | 218 108 | 88 937 543 | 2 446.46 | 1 416      | 3 290      |

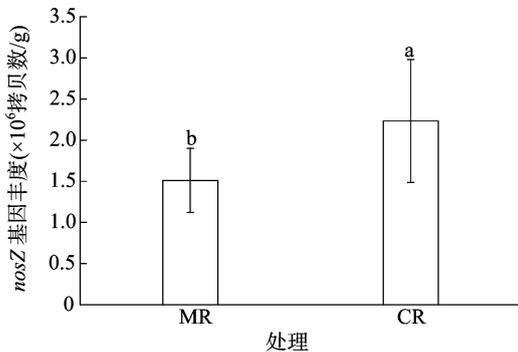
对  $\alpha$  多样性指数进行单因素方差分析,结果(表 3)显示,

表 3 不同处理的多样性指数

| 处理 | Ace 指数          | Chao 指数         | Shannon 指数   | Simpson 指数   | Sobs 指数         |
|----|-----------------|-----------------|--------------|--------------|-----------------|
| MR | 278.32 ± 12.9a  | 280.96 ± 8.62a  | 3.58 ± 0.09a | 0.05 ± 0.00a | 245.33 ± 20.13a |
| CR | 269.64 ± 17.74a | 273.82 ± 14.22a | 3.31 ± 0.34a | 0.07 ± 0.03a | 240.33 ± 20.55a |

### 2.3 稻虾种养对土壤 *nosZ* 基因丰度的影响

利用荧光定量技术对氧化亚氮还原酶 *nosZ* 基因进行定量分析,结果(图 2)表明,CR 处理 *nosZ* 基因丰度显著高于 MR 处理。其中 CR 处理中 *nosZ* 基因丰度为 1 g 干土  $2.23 \times 10^6$  拷贝数,MR 处理中 *nosZ* 基因丰度为 1 g 干土  $1.51 \times 10^6$  拷贝数,CR 处理 *nosZ* 基因丰度是 MR 处理基因丰度的 1.48 倍。与常规中稻种植模式相比,稻虾种养模式可以显著提升稻田土壤 *nosZ* 基因丰度。

图 2 不同土壤样品 *nosZ* 基因丰度

### 2.4 稻虾种养对土壤中 *nosZ* 基因物种组成的影响

在水稻抽穗期,对 CR 处理和 MR 处理 *nosZ* 基因微生物进行目、科、属、种的物种分类学水平韦恩(Venn)分析,结果见图 3。在目和科水平上,CR 处理和 MR 处理具有相同的 10 个目(图 3-a)和 12 个科(图 3-b),在目和科水平的群落组成上表现出极大的相似性;在属水平上,CR 处理和 MR 处理有 17 个相同的属,MR 处理独有红假单胞菌属(图 3-c);在种水平上,CR 处理和 MR 处理有 19 个相同的种,MR 处理独有沼泽红假单胞菌(图 3-d)。分析表明,在科水平以上,稻虾种养模式(CR) *nosZ* 基因微生物群落组成与常规稻田表现

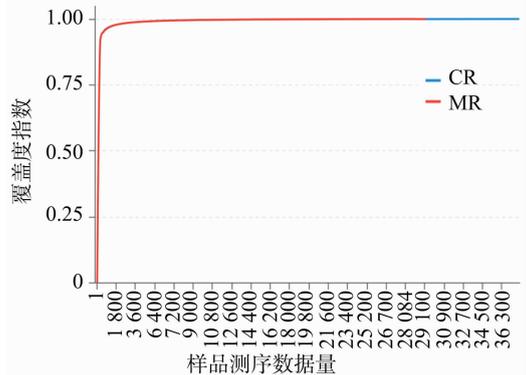
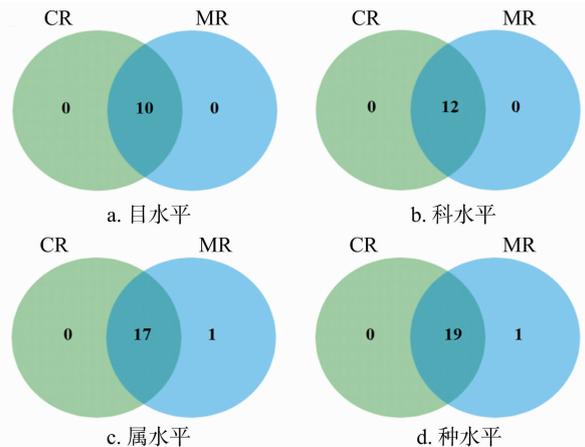


图 1 不同土壤样品 OUT 水平覆盖度指数稀释性曲线

2 个处理间多样性指数差异不显著( $P < 0.05$ )。MR 处理的 Ace 指数、Chao 指数、香浓(Shannon)指数、Sobs 指数均高于 CR 处理,差异不显著;MR 处理的辛普森(Simpson)指数低于 CR 处理,差异不显著。多样性分析结果表明,稻虾种养模式(CR)没有显著改变 *nosZ* 基因微生物群落丰富度及群落多样性。

出极大的相似性,在属和种水平上,2 个处理之间的微生物群落组成存在差异,稻虾种养模式(CR)缺失红假单胞菌属下的沼泽红假单胞菌。

图 3 不同处理土壤样品 *nosZ* 基因微生物物种分类学组成

### 2.5 稻虾种养模式对 *nosZ* 基因物种目水平相对丰度的影响

样品获得的 *nosZ* 基因微生物物种分类在 2 个域、2 个界、4 个门、6 个纲、10 个目、12 个科、18 个属和 20 个种。将无法分类的序列定义为无法归类,样品获得的 *nosZ* 基因 OTUs 在分类学界、门、纲、目、科、属、种水平上可归类比例为 95.0%、95.0%、90.0%、85.0%、75.0%、50.0%、35.0%。

在目水平上,未分类 c\_β-变形菌目、未分类\_p-变形菌目、嗜氢菌目、红环菌目、未分类\_k\_norank\_d\_细菌目、根瘤菌目是 2 个处理平均相对丰度同时大于 1% 的 6 个优势菌目(图 4),CR 处理 3 次重复平均相对丰度分别为 52.45%、29.49%、6.72%、5.57%、2.91%、1.82%;MR 处理 3 次重复平均相对丰度分别为 58.43%、15.57%、8.85%、9.77%、

2.98%、2.40%。对 *nosZ* 目水平上相对丰度大于 >0.1% 的群落物种进行显著性分析,结果(表4)显示,红环菌目在 CR 处理中的相对丰度显著低于 MR 处理 ( $P < 0.05$ ), *norank\_p\_environmental\_samples* 在 CR 处理中的相对丰度显著高于 MR 处理 ( $P < 0.05$ )。稻虾种养模式显著降低了红环菌目的相对丰度,增加了 *norank\_p\_environmental\_samples* 的相对丰度,改变了 *nosZ* 基因微生物目水平相对丰度的组成。

## 2.6 *nosZ* 型反硝化细菌群落结构与土壤理化性质的相关性

对 97% 相似水平上的 OTU 代表序列进行决策曲线分析法 (decision curve analysis, 简称 DCA) 进行分析,看分析结果中 lengths of gradient 的第一轴的大小,如果大于 4.0,就应该选典型关联分析 (canonical correlation analysis, 简称 CCA),如果介于 3.0~4.0 之间,选 RDA 和 CCA 分析均可,如果小于 3.0, RDA 分析优于 CCA 分析。分析结果中 lengths of gradient

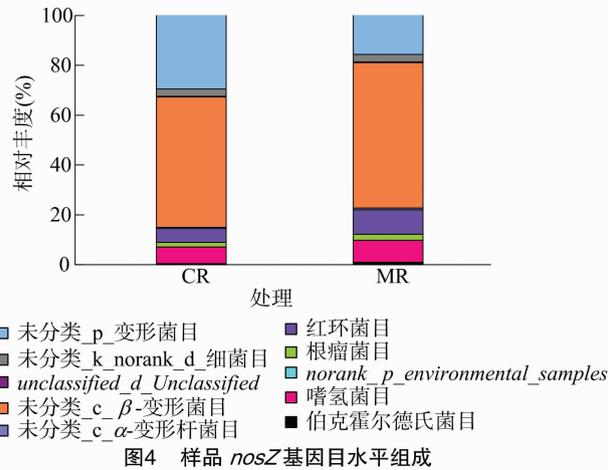


表4 稻虾共作模式和常规中稻模式下土壤 *nosZ* 目水平群落组成显著性分析

| 处理 | <i>nosZ</i> 群落目水平组成 |                    |                                       |                  |                    |
|----|---------------------|--------------------|---------------------------------------|------------------|--------------------|
|    | 伯克霍尔德氏菌目            | 嗜氢菌目               | <i>norank_p_environmental_samples</i> | 根瘤菌目             | 红环菌目               |
| CR | 118.33 ± 37.38a     | 2 035 ± 142.22a    | 5.33 ± 1.45a                          | 552.33 ± 123.86a | 1 687.33 ± 89.91b  |
| MR | 272 ± 95.06a        | 2 489.33 ± 136.85a | 0.67 ± 0.33b                          | 675.33 ± 116.25a | 2 747.33 ± 296.72a |

| 处理 | <i>nosZ</i> 群落目水平组成 |                     |                             |                    |                      |
|----|---------------------|---------------------|-----------------------------|--------------------|----------------------|
|    | 未分类_c_α-变形杆菌目       | 未分类_c_β-变形菌目        | unclassified_d_Unclassified | 未分类_k_norank_d_细菌目 | 未分类_p_变形菌目           |
| CR | 124.33 ± 10.41a     | 15 887 ± 559.17a    | 68.67 ± 10.17a              | 882 ± 98.02a       | 8 932.33 ± 3 796.16a |
| MR | 204 ± 29.01a        | 16 430.67 ± 513.74a | 82.67 ± 14.24a              | 839 ± 195.86a      | 4 378 ± 257.11a      |

注:同列不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。

第一轴的大小为 0.553,因此选用 RDA 分析环境因子、样本、菌群三者间的关系。

对 *nosZ* 群落结构与土壤理化性质进行冗余分析,结果(图5)表明,2个排序轴共解释了 98.35% 的变化,第一排序轴 (RDA1) 解释了 95.56% 的群落变化,第二排序轴 (RDA2) 解释了 2.79% 的变化。第一排序轴与土壤全碳 (TC) 含量、pH 值、硝态氮 ( $\text{NO}_3^- - \text{N}$ ) 含量的关系最为密切,第二排序轴与土壤碱解氮 (AN) 含量的关系最为密切。总体而言,土壤全碳 (TC) 含量对群落结构的影响最为显著 ( $R^2 = 0.4828$ ),影响顺序依次是土壤总碳含量 > pH 值 > 碱解氮含量 > 硝态氮含量 > 铵态氮含量。沿第一排序轴看,稻虾种养的 3 个样本全部分布在常规中稻处理左侧,其中 CR2、CR3 分别与常规中稻的 MR1、MR2、MR3 样本距离较近,而 CR1 处理与其他样本距离较远。表明 2 个处理群落结构存在差异,但稻虾种养模式与常规稻田模式在群落结构上仍保留着一定的相似性,土壤总碳含量是影响 2 种模式群落结构的主因子。

## 3 讨论与结论

但国涵等研究表明,长期稻虾轮作显著提高水稻土 0~40 cm 耕层有机碳、全钾、碱解氮含量,0~30 cm 耕层的土壤全氮含量及 0~10 cm 土壤速效钾、全磷含量在稻虾轮作下也显著提高,该模式可改善土壤结构增加土壤养分<sup>[19]</sup>。金乃康研究结果显示,稻虾种养模式下虾子的粪便可增强土壤肥力,减少化肥使用量,在降低生产投入的情况下又可提高农田利用效率与经济效益<sup>[20]</sup>。本研究的结果与前人研究基本一致,

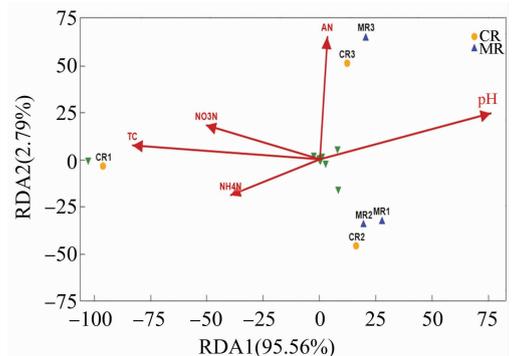


图5 不同处理土壤化学性质与细菌群落(属水平)的冗余分析

与常规中稻种植模式相比,稻虾轮作模式显著提高了土壤全氮、全碳、硝态氮含量。目前,稻虾稻田种养复合模式的研究多数集中在土壤物理化学性质、稻田温室气体以及稻虾种养技术等方面,对于稻虾土壤反硝化微生物方面的研究较少。研究结果表明,稻田养虾对 *nosZ* 基因微生物群落丰富度及群落多样性的影响均不显著。稻虾种养模式与常规中稻种植模式 *nosZ* 基因微生物群落结构存在差异,但二者在群落结构上仍保留着一定的相似性。该结果与之前的研究发现一致,在不同的土地利用方式、不同环境条件下, *nosZ* 基因的微生物群落组成变化不大, *nosZ* 基因微生物群落在土壤中相对比较稳定,受到环境条件影响的变化不大<sup>[21-22]</sup>。在中稻抽穗期,稻虾种养模式 *nosZ* 基因丰度是常规中稻种植模式的 1.48 倍,显著提升了稻田土壤中 *nosZ* 基因的丰度。稻虾种养模式

显著提升了土壤中硝态氮含量,而  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  是反硝化反应第 1 步硝酸还原反应的底物,反应生成的  $\text{N}_2\text{O}$  是 *nosZ* 基因编码的  $\text{N}_2\text{O}$  还原酶的原料,能够促进 *nosZ* 的增长。所以,硝态氮间接地为 *nosZ* 基因微生物提供了原料,促进了 *nosZ* 基因丰度的增加<sup>[9]</sup>。沼泽红假单胞菌是一种菌体富含蛋白质、维生素、类胡萝卜素等营养物质,被广泛应用于渔业的光合细菌,作为饲料添加剂可以有效地提高饲料效率,促进鱼虾生长<sup>[23]</sup>。沼泽红假单胞菌和红螺菌同属红螺菌科,二者生存条件相似,均是在光照和厌氧条件下适宜生长<sup>[24]</sup>。稻虾种养模式缺失沼泽红假单胞菌可能与缺失红螺菌的原因相似,一方面是抽穗期株高较高,遮光效应不利于沼泽红假单胞菌的生长;另一方面可能在浅水状态下,克氏螯虾的扰动带入了水体氧气,打破了厌氧环境,不利于沼泽红假单胞菌的生长<sup>[25]</sup>。Miller 等在研究短期内(72 h)碳源对小麦反硝化基因丰度的影响发现,碳含量较高是氮施入可以提高反硝化微生物丰度的前提<sup>[26]</sup>。自然界中多种环境因素,如土壤 pH 值<sup>[27]</sup>、土壤含氧量<sup>[28-29]</sup>、土壤温度<sup>[30]</sup>、土壤含水量<sup>[31]</sup>、土壤中的养分供应状况<sup>[32]</sup>以及植物种类<sup>[33-34]</sup>等均能够影响反硝化细菌群落的结构。续勇波等认为,凡是能促进土壤碳、氮积累和厌氧微生物活性的土地利用方式和耕作管理措施均会促进反硝化作用进行,可见碳、氮是影响反硝化活性的主要因子<sup>[35]</sup>。本研究结果显示,土壤总碳是影响 2 种模式 *nosZ* 基因微生物群落结构的主效因子,与前人的研究结果基本一致。此外,由于稻虾田土壤的环境较为复杂,须经历干湿交替阶段,且受水稻植株根系分泌物的影响,因此对于稻虾土壤反硝化细菌群落的研究也就更为复杂,须要更加深入系统的研究。

本研究结论如下:(1)相比常规中稻种植模式,稻虾共作显著增加了水稻土壤硝态氮、全碳、全氮含量,对土壤 pH 值、碱解氮含量及土壤碳氮比无显著影响。(2)本研究借助荧光定量 PCR 对常规中稻种植模式与稻虾共作模式下的土壤反硝化细菌 *nosZ* 基因数量进行研究,结果表明,稻虾共作模式中 *nosZ* 基因丰度显著高于常规中稻种植模式。(3)与常规中稻种植模式相比,稻虾种养模式没有显著改变 *nosZ* 基因微生物群落丰富度及群落多样性。在目和科水平以上,稻虾种养模式 *nosZ* 基因微生物群落组成与常规稻田表现出极大的相似性;在属和种水平,2 个处理微生物群落组成存在差异,稻虾种养模式缺失红假单胞菌属下的沼泽红假单胞菌。2 种植模式群落结构存在差异,但稻虾种养模式与常规稻田种植模式在群落结构上仍保留着一定的相似性。与常规中稻种植模式相比,稻虾种养模式显著降低了红环菌目的相对丰度,改变了 *nosZ* 基因微生物目水平相对丰度的组成。此外,土壤 pH 值、碱解氮含量、硝态氮含量、铵态氮含量与群落结构存在显著相关关系,而土壤总碳含量是影响 2 种植模式 *nosZ* 基因微生物群落结构的主效因子。

#### 参考文献:

- [1] 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.
- [2] 郑燕,侯海军,秦红灵,等. 施氮对水稻土  $\text{N}_2\text{O}$  释放及反硝化功能基因(*narG/nosZ*)丰度的影响[J]. 生态学报,2012,32(11):3386-3393.
- [3] Saeki Y, Nakamura M, Mason L T M, et al. Effect of flooding and the *nosZ* gene in *Bradyrhizobia* on *Bradyrhizobial* community structure in the soil[J]. Microbes & Environments, 2017, 32(2):154-163.
- [4] Zhu X, Burger M, Doane T A, et al. Ammonia oxidation pathways and nitrifier denitrification are significant sources of  $\text{N}_2\text{O}$  and NO under low oxygen availability[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013, 110(16):6328-6333.
- [5] Wang Y Y, Lu S E, Xiang Q J, et al. Responses of  $\text{N}_2\text{O}$  reductase gene (*nosZ*) - denitrifier communities to long-term fertilization follow a depth pattern in calcareous purplish paddy soil[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2017, 16(11):2597-2611.
- [6] Juhanson J, Hallin S, Stenberg M, et al. Spatial and phylogeographical analyses of *nosZ* genes underscore niche differentiation amongst terrestrial  $\text{N}_2\text{O}$  reducing communities [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2017, 115:82-91.
- [7] Yang Y D, Yang J Z, Ying J, et al. Response of bacteria harboring *nirS* and *nirK* genes to different N fertilization rates in an alkaline northern Chinese soil[J]. European Journal of Soil Biology, 2017, 82:1-9.
- [8] Jin Z J, Li L Q, Liu X Y, et al. Impact of long-term fertilization on community structure of ammonia oxidizing and denitrifying bacteria based on *amoA* and *nirK* genes in a rice paddy from Tai Lake region, China[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2014, 13(10):2286-2298.
- [9] 胡春晓,陈耀宇,张嘉超,等. 农业废物好氧堆肥中环境因子对 *nirK*, *nirS* 和 *nosZ* 数量的影响[J]. 环境科学, 2013, 34(3):1196-1203.
- [10] 刘若萱,贺纪正,张丽梅. 稻田土壤不同水分条件下硝化/反硝化作用及其功能微生物的变化特征[J]. 环境科学, 2014, 35(11):4275-4283.
- [11] 高嵩涓,曹卫东,白金顺,等. 湘南红壤稻田 AOA - *amoA*, *narG*, *nosZ* 基因丰度及其环境影响因子[J]. 中国土壤与肥料, 2017(1):21-27.
- [12] Domeignoz - Horta L A, Philippot L, Peyrard C, et al. Peaks of in situ  $\text{N}_2\text{O}$  emissions are influenced by  $\text{N}_2\text{O}$  - producing and reducing microbial communities across arable soils [J]. Global Change Biology, 2017, 24(1):360-370.
- [13] Chen Z, Hou H J, Zheng Y, et al. Influence of fertilisation regimes on a *nosZ* - containing denitrifying community in a rice paddy soil [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2012, 92(5):1064-1072.
- [14] 李成芳,曹涛贵,汪金平,等. 稻鸭、稻鱼共作对稻田 P 素动态变化的影响[J]. 长江流域资源与环境, 2009, 18(2):126-131.
- [15] 徐祥玉,张敏敏,彭成林,等. 稻虾共作对秸秆还田后稻田温室气体排放的影响[J]. 中国生态农业学报, 2017, 25(11):1591-1603.
- [16] 曹涛贵,江洋,汪金平,等. 稻虾共作模式的“双刃性”及可持续发展策略[J]. 中国生态农业学报, 2017, 25(9):1245-1253.
- [17] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3版. 北京:中国农业出版社, 2000:42-58.
- [18] Throbäck I N, Enwall k, Jarvis A, et al. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE[J]. Fems Microbiology Ecology, 2010, 49(3):401-417.
- [19] 佘国涵,彭成林,徐祥玉,等. 稻虾共作模式对涝渍稻田土壤理

- 化性状的影响[J]. 中国生态农业学报,2017,25(1):61-68.
- [20] 金乃康,尉士南,张友平,等. 稻虾轮作种养模式研究[J]. 水生生态杂志,2009,30(4):151-152.
- [21] Rich J J, Heichen R S, Bottomley P J, et al. Community Composition and Functioning of Denitrifying Bacteria from Adjacent Meadow and Forest Soils[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2003, 69(10):5974-82.
- [22] Rich J J, Myrold D D. Community composition and activities of denitrifying bacteria from adjacent agricultural soil, riparian soil, and creek sediment in Oregon, USA[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2004, 36(9):1431-1441.
- [23] 刘如林. 光合细菌及其应用[M]. 北京:中国农业科技出版社, 1991:95.
- [24] 陈燕红,杨紫红,喻国辉,等. 光照、氧气、pH和盐度对沼泽红假单胞菌2-8菌株生长和亚硝酸盐消除的影响[J]. 南方水产科学,2010,6(4):1-5.
- [25] 尤希凤,张全国,杨群发,等. 天然混合产氢红螺菌培养条件[J]. 太阳能学报,2006,27(4):331-334.
- [26] Miller M N, Zebarth B J, Dandie C E, et al. Crop residue influence on denitrification, N<sub>2</sub>O emissions and denitrifier community abundance in soil[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2008, 40(10):2553-2562.
- [27] 马宁宁,李天来,武春成,等. 长期施肥对设施菜田土壤酶活性及土壤理化性状的影响[J]. 应用生态学报,2010,21(7):1766-1771.
- [28] Nicolaisen M H, Risgaardpetersen N, Revsbech N P, et al. Nitrification - denitrification dynamics and community structure of ammonia oxidizing bacteria in a high yield irrigated Philippine rice field[J]. Fems Microbiology Ecology, 2004, 49(3):359-369.
- [29] Briones A M, Okabe S, Umemiya Y, et al. Influence of different cultivars on populations of ammonia - oxidizing bacteria in the root environment of rice[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2002, 68(6):3067.
- [30] Braker G, Schwarz J, Conrad R. Influence of temperature on the composition and activity of denitrifying soil communities[J]. Fems Microbiology Ecology, 2010, 73(1):134-148.
- [31] Szukics U, Abell G C, Hödl V, et al. Nitrifiers and denitrifiers respond rapidly to changed moisture and increasing temperature in a pristine forest soil[J]. Fems Microbiology Ecology, 2010, 72(3):395-406.
- [32] Nicolaisen M H, Risgaardpetersen N, Revsbech N P, et al. Nitrification - denitrification dynamics and community structure of ammonia oxidizing bacteria in a high yield irrigated Philippine rice field[J]. Fems Microbiology Ecology, 2010, 49(3):359-369.
- [33] Bremer C, Braker G, Matthies D, et al. Impact of plant functional group, plant species, and sampling time on the composition of *nirK*-type denitrifier communities in soil[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(21):6876-6884.
- [34] Briones A M, Okabe S, Umemiya Y. Influence of different cultivars on populations of ammonia - oxidizing bacteria in the root environment of rice[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2002, 68(6):3067.
- [35] 续勇波, Xu Z H, 蔡祖聪. 热带亚热带土壤氮素反硝化研究进展[J]. 生态环境学报, 2014, 23(9):1557-1566.
- (上接第245页)
- stoichiometry in forests worldwide: implications of terrestrial red field - type ratio[J]. Ecology, 2004, 85(9):2390-2401.
- [15] 王其兵,李凌浩,刘兴华,等. 内蒙古锡林河流域草原土壤有机碳及氮素的空间异质性分析[J]. 植物生态学报,1998,22(5):409-414.
- [16] Templer P H, Findlay S, Lovett G. Soil microbial biomass and nitrogen transformations among five tree species of the Catskill Mountains, New York, USA[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2003, 35(4):607-613.
- [17] Grenon F, Bradley R L, Titus B D. Temperature sensitivity of mineral N transformation rates, and heterotrophic nitrification: possible factors controlling the post - disturbance mineral N flush in forest floors[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2004, 36(9):1465-1474.
- [18] 苏永中,赵哈林. 土壤有机碳储量、影响因素及其环境效应的研究进展[J]. 中国沙漠,2002,22(3):220-228.
- [19] Liu C J, Westman C J, Berg B, et al. Variation in litterfall - climate relationships between coniferous and broadleaf forests in Eurasia[J]. Global Ecology and Biogeography, 2004, 13(2):105-114.
- [20] Reich P B, Oleksyn J, Modrzynski J, et al. Linking litter calcium, earthworms and soil properties: a common garden test with 14 tree species[J]. Ecology Letters, 2005, 8(8):811-818.
- [21] Ayres E, Steltzer H, Berg S, et al. Tree species traits influence soil physical, chemical, and biological properties in high elevation forests[J]. PLoS One, 2009, 4(6):e5964.
- [22] Díaz - Pinés E, Schindlbacher A, Godino M A, et al. Effects of tree species composition on the CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O efflux of a Mediterranean mountain forest soil[J]. Plant Soil, 2014, 384(1/2):243-257.
- [23] 荣文卓. 密云水源涵养林造林措施对土壤性质影响的研究[D]. 北京:北京林业大学,2010.
- [24] 张杨. 黄土高原人工林草被恢复过程中的土壤理化性质及生态效应研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2010.
- [25] 艾鹏. 苏北沿海防护林造林地土壤理化特性研究[D]. 南京:南京林业大学,2012.
- [26] 单贵莲,徐柱,宁发,等. 围封年限对典型草原植被与土壤特征的影响[J]. 草业学报,2009,18(2):3-10.
- [27] 孔玉华,姚风军,鹏爽,等. 不同利用方式下草地土壤碳积累及汇/源功能转换特征研究[J]. 草业科学,2010,27(4):40-45.
- [28] 刘凤娟,李红丽,董智,等. 封育对退化草原植被恢复及土壤理化性质影响的研究进展[J]. 中国水土保持科学,2012,10(5):116-122.
- [29] Lhm B S, Lee J S, Kim J W, et al. Coastal plant and soil relationships along the southwestern coast of South Korea[J]. Journal of Plant Biology, 2007, 50(3):331-335.
- [30] 林宇,胡欢甜,邱岭军,等. 滨海沙地3种人工林表层土壤微生物量及其影响因素[J]. 东北林业大学学报,2017,45(5):85-90.
- [31] 邱岭军,何宗明,胡欢甜,等. 滨海沙地不同树种碳氮磷化学计量特征[J]. 应用与环境生物学报,2017,23(3):555-559.