



酸性旱地红壤无机氮同化菌株筛选及其全基因组分析

刘冉¹, 姜允斌^{1,2}, 邓欢^{2,3}, 张银萍⁴, 韩成^{1,2*}, 钟文辉^{1,2}

- 1 南京师范大学地理科学学院, 江苏 南京 210023
- 2 江苏省物质循环与污染控制重点实验室, 江苏 南京 210023
- 3 南京师范大学环境学院, 江苏 南京 210023
- 4 南京师范大学分析测试中心, 江苏 南京 210023

刘冉, 姜允斌, 邓欢, 张银萍, 韩成, 钟文辉. 酸性旱地红壤无机氮同化菌株筛选及其全基因组分析[J]. 微生物学报, 2023, 63(8): 3157-3172.

LIU Ran, JIANG Yunbin, DENG Huan, ZHANG Yinping, HAN Cheng, ZHONG Wenhui. Isolation and whole genome analysis of bacterial strains assimilating inorganic nitrogen in acidic dryland red soils[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(8): 3157-3172.

摘要: 微生物执行的无机氮同化作用可固定施入土壤后未被作物直接吸收的化学氮肥, 有效减少化学氮肥损失、降低环境氮素污染风险。土壤无机氮同化作用不是由大量冗余微生物共同执行的, 而是由一小部分功能微生物优先执行。【目的】对酸性旱地红壤中的优势无机氮同化细菌进行富集、菌株分离鉴定及全基因组测序, 并明确菌株在土壤中的氮同化能力, 为酸性土壤化学氮肥应用及其转化过程研究提供菌株资源和理论依据。【方法】在酸性旱地红壤中添加 KNO_3 或 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为无机氮源, 以葡萄糖作为碳源, 在好氧条件下进行富集预培养, 采用稀释分离法筛选出优势无机氮同化细菌菌株; 将菌株回接至土壤中从而验证其无机氮同化能力, 并通过全基因组测序分析菌株的氮素代谢途径及相关功能基因。【结果】酸性旱地红壤经富集预培养一周后, 优势无机氮同化微生物的 16S rRNA 基因相对丰度从 0.20%–0.94% 增长至 20.2%–30.2%; 分离筛选后得到的 3 株优势无机氮同化细菌菌株, 鉴定为伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia* sp.) M6-3、索状芽孢杆菌(*Bacillus funiculus*) M2-4 和节杆菌(*Arthrobacter* sp.) M7-15。灭菌土壤中菌株 M6-3、M2-4 和 M7-15 的无机氮同化速率分别为 (1.28 ± 0.61) 、 (0.17 ± 0.07) 和 (0.16 ± 0.02) $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 。氮素代谢通路分析显示, 菌株 M6-3 具备更高效的氮同化代谢通路, 其氮同化相关功能基因数量显著高于其

资助项目: 国家自然科学基金(42077033, 42277287, 41730753)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (42077033, 42277287, 41730753).

*Corresponding author. Tel: +86-25-85891352, E-mail: chenghan@njnu.edu.cn

Received: 2022-12-02; Accepted: 2023-02-17; Published online: 2023-02-22

他2株细菌。氮素代谢通路与功能活性结果均显示菌株 *Burkholderia* sp. M6-3 在酸性旱地红壤无机氮同化过程中占据优势。【结论】本研究证实在酸性旱地红壤无机氮同化过程中低丰度微生物类群发挥重要功能，并从菌株基因组水平上揭示了其无机氮同化代谢过程。上述结果可为酸性旱地红壤农业利用过程中化学氮肥应用及其转化过程研究提供菌株资源和理论依据。

关键词：土壤氮素同化；化学氮肥；酸性旱地红壤；全基因组测序；伯克霍尔德氏菌属

Isolation and whole genome analysis of bacterial strains assimilating inorganic nitrogen in acidic dryland red soils

LIU Ran¹, JIANG Yunbin^{1,2}, DENG Huan^{2,3}, ZHANG Yinping⁴, HAN Cheng^{1,2*}, ZHONG Wenhui^{1,2}

1 School of Geography, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, Jiangsu, China

2 Key Laboratory of Material Cycle and Pollution Control of Jiangsu Province, Nanjing 210023, Jiangsu, China

3 School of Environment, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, Jiangsu, China

4 Center for Analysis and Testing, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, Jiangsu, China

Abstract: Inorganic nitrogen assimilation performed by microorganisms can immobilize chemical fertilizer nitrogen that is not directly absorbed by crops after application to the soil, which can reduce the losses of chemical nitrogen fertilizer and the risk of environmental nitrogen pollution. Soil inorganic nitrogen assimilation is performed by functional microbial populations rather than a large number of redundant microorganisms. **[Objective]** The enrichment, isolation, identification, and whole genome sequencing of dominant inorganic nitrogen-assimilating bacteria in acidic dryland red soil and clarification of the nitrogen assimilation capacity of the strains in soil can provide strain resources and a theoretical basis for the application of chemical nitrogen fertilizer in acidic soil and the research on the nitrogen transformation process. **[Methods]** We added KNO_3 or $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ as the inorganic nitrogen source and glucose as the carbon source into the acidic dryland red soil. Then, we performed strain enrichment under aerobic conditions and screened the dominant bacterial strains assimilating inorganic nitrogen by the gradient dilution isolation method. We verified the inorganic nitrogen assimilation ability of the strains by soil recolonization experiments, and employed whole genome sequencing to analyze the nitrogen metabolic pathways of different strains. **[Results]** The relative abundance of 16S rRNA genes of dominant inorganic nitrogen-assimilating microorganisms in acidic dryland red soils increased from 0.20%–0.94% to 20.2%–30.2% after one week of enrichment. We isolated three dominant inorganic nitrogen-assimilating strains, which were identified as *Burkholderia* sp. M6-3, *Bacillus funiculus* M2-4, and *Arthrobacter* sp. M7-15. The inorganic nitrogen assimilation rates of strains M6-3, M2-4, and M7-15 in sterilized soil were (1.28 ± 0.61) , (0.17 ± 0.07) , and (0.16 ± 0.02) mg/(kg·d), respectively. M6-3 possessed a more complete metabolic pathway and more functional genes related to nitrogen assimilation than the other two strains. In terms of

nitrogen metabolic pathways and functional activity, *Burkholderia* sp. M6-3 was dominant in the assimilation of inorganic nitrogen in acidic dryland red soils. **[Conclusion]** This study confirmed that low-abundance microbial taxa play a dominant role in the inorganic nitrogen assimilation of acidic dryland red soil, and revealed the metabolic process of inorganic nitrogen assimilation at the genomic level of the strains. The above results provide strain resources and a theoretical basis for the study of chemical nitrogen fertilizer application and transformation process in the acidic dryland red soil.

Keywords: soil nitrogen assimilation; chemical nitrogen fertilizer; acidic dryland red soil; whole genome sequencing; *Burkholderia* sp.

氮素是农业生产中保证作物产量的重要养分, 然而施用化学氮肥后释放的无机氮移动性强且极易在土壤中损失(经 NO_3^- 的淋溶或 NH_3 挥发等途径)^[1-2]。土壤中的铵态氮(NH_4^+ -N)和硝态氮(NO_3^- -N)被微生物吸收利用成为生物体有机组成部分, 称为无机氮的微生物固持(microbial immobilization), 又称微生物同化作用(microbial assimilation)^[3], 微生物利用铵态氮或硝态氮作为氮源并转化为微生物生物量氮(microbial biomass nitrogen, MBN), MBN 短期储存后经再矿化释放无机氮, 该过程可以减少无机氮损失、增加土壤有效态氮含量^[4]。因此, 微生物对无机氮的同化是保持土壤中氮的重要生化过程, 会显著影响土壤中氮肥的利用效率, 减少环境中的氮素损失^[5-6]。现有研究已经证明了这一点, 例如在南方酸性土壤中, 较强的无机氮同化作用增加了易流失无机氮在土壤中的固持, 提高了土壤中有效态氮的含量^[7]; 另有研究认为氮素被微生物同化固定后, 可以在种植后期再矿化为可利用态的无机氮, 供长季节作物或下一季作物使用, 从而有效增强土壤中无机氮的可持续利用^[8]。因此, 对土壤无机氮同化作用及相关微生物的研究具有重要科学价值和实践意义。

所有微生物的生长都需要氮源, 长期以来研究者们认为土壤中几乎所有微生物类群都会

参与氮素同化与固定^[9], 然而近年来研究者发现主导无机氮同化作用的微生物并不是由大量冗余的类群组成, 而是由一些在土壤总微生物类群中占比较低的低丰度微生物优先执行。Morrissey 等^[10]利用稳定性同位素核酸探针技术(stable isotope nucleic acid probe technology, SIP)对混合针叶林草甸土中微生物同化 ^{15}N 的研究发现, 主导 ^{15}N 同化作用的原核生物大部分(82%–88%)都集中在少数几个低丰度微生物类群中, 包括放线菌目(*Actinomycetales*)、黄色单胞菌目(*Xanthomonadales*)和伯克霍尔德氏菌目(*Burkholderiales*); Wawrik 等^[11]通过 ^{15}N 稳定同位素探测法对西佛罗里达大陆架异养细菌的无机氮同化进行研究, 发现交替单胞菌(*Alteromonadales*)和 α -变形杆菌纲(*Alphaproteobacteria*)的塔拉索布氏菌(*Thalassobacter*)等少数类群表现出对硝酸盐同化利用的优势。可见, 土壤中的低丰度微生物类群主导了无机氮同化过程, 它们在无机氮同化作用发生过程中大量繁殖并发挥主导作用^[8], 对土壤氮素同化微生物的研究具有重要科学价值和实践意义。利用具有无机氮同化优势的微生物在提高农业生产效率或减少化肥施用等方面的研究早有报道。2020 年有研究者^[12]发现含有枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的生物肥料可以显著减少农田土壤中的氮素尤其是硝态氮的淋失从而提高土壤氮素固持和肥力水

平; Wang 等^[13]向土壤中添加伯克霍尔德氏菌株 (*Burkholderia* sp. Y4) 后发现其定殖后会显著抑制土壤中铵态氮向硝酸盐氮的转化, 从而减少硝酸盐的淋溶损失, 并能够促进作物对必需养分的吸收。

由于微生物在氮代谢中的作用与能力由其功能基因调控^[14-15], 细胞通过 *NrT/NrTA* 调控的转运蛋白将硝酸盐或亚硝酸盐运输到细胞质中^[16-17], 通过 *nasAB* 编码的同化硝酸盐还原酶和 *nirBD* 编码的亚硝酸盐还原酶依次将硝酸盐、亚硝酸盐还原为 NH_4^+ ^[18]; 铵则通过谷氨酸脱氢酶途径 (glutamate dehydrogenase, GDH, 由 *gdhA/GDH2* 等编码) 或谷氨酰胺合成酶-谷氨酸合成酶途径 (GS-GOGAT, 分别由 *glnA* 和 *gltBD* 编码) 被纳入碳骨架进入生物分子^[19-21], 因此对菌株氮素代谢相关功能基因的注释与分析可以在基因水平挖掘菌株的氮代谢功能潜力, 并为进一步研究其在土壤中的作用提供理论依据。全基因组序列测序是了解菌株代谢途径和功能潜力的重要手段^[22], 针对菌株的深入研究对于进一步探索这类具有无机氮同化优势的低丰度微生物在土壤中的氮同化能力具有重要意义。因此, 获得在酸性旱地土壤中具有无机氮同化优势的菌株可以为化学氮肥减量施用、提高化肥利用效率和作物产量等多种农业应用提供菌株资源和氮肥高效利用途径。然而, 目前为止, 关于酸性旱地红壤中无机氮同化微生物菌株及其代谢功能基因的研究尚不清楚。

本研究通过添加无机氮对酸性旱地红壤进行富集预培养, 采用稀释分离法筛选出优势无机氮同化细菌菌株, 通过土壤回接实验验证这些菌株的无机氮同化能力, 并采用全基因组测序明确菌株的氮素代谢途径与相关功能基因。研究结果可为酸性土壤化学氮肥应用及其转化过程研究提供菌株资源和理论依据。

1 材料与方 法

1.1 土壤来源及优势微生物富集

供试土壤于 2021 年 3 月采集自江西省红壤研究所长期施肥试验点 (28°15'30"N, 116°20'24"E), 该实验站建立于 1986 年; 该地区属亚热带季风气候, 年平均降雨量为 1 537 mm, 年平均温度 17.5 °C, 采样地土壤母质为第四纪红黏土, 种植制度为春玉米-秋玉米-冬闲制^[23]。选取不施肥处理, 使用五点采样法采集 0-20 cm 表层土壤, 挑去肉眼可见的植物根系, 混匀并过 2 mm 筛后于 4 °C 保存。土壤基本性质参考文献^[24]的方法测定, 其 pH 值为 4.9, 土壤饱和持水量 (water holding capacity, WHC) 为 50.3%, 总氮含量为 0.92 g/kg, 总有机碳含量为 7.14 g/kg。

1.2 土壤富集预培养及 HiSeq 高通量测序

称取相当于 15 g 风干土重的新鲜土壤置于三角瓶中, 将含水量调节至 40% WHC 后, 25 °C 避光通气培养 3 d 以恢复微生物活性。取 3 个无添加处理进行破坏性取样作为 0 d 样品, 然后向土壤中添加葡萄糖 (glucose) 作为碳源 (500 mg C/kg), 分别添加 KNO_3 或 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为氮源 (4 $\mu\text{mol N/g}$), 即设置 KNO_3 +glucose 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ +glucose 2 个处理, 调节土壤含水量至 60% WHC, 采用通气膜进行封口, 25 °C 避光通气培养 7 d, 每个处理设置 3 个重复。培养结束后, 进行破坏性取样, 将样品分别置于 4 °C 和 -80 °C 保存。

土壤微生物 DNA 使用 FastDNA SPIN Kit for Soil 试剂盒 (MP Biomedicals) 提取, 严格按照试剂盒操作说明进行。最终得到的土壤微生物基因组 DNA 样品一部分使用 NanoDrop ND-1000 UV-Vis spectrophotometer (NanoDrop Technologies) 测定 DNA 浓度和纯度, 另一部分于 -80 °C 保存。使用引物 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3')

和 926R (5'-CCGYCAATTCHTTTRAGTT-3')对土壤 DNA 中的 16S rRNA 基因 V4-V5 区进行 PCR 扩增^[25]。委托广东美格基因生物技术有限公司使用 Illumina HiSeq 2500 高通量测序平台进行测序。测序数据进行过滤和拼接, 对拼接序列进行质量过滤, 最终得到有效拼接片段(clean tags)。利用 Usearch 软件(V10, <http://www.drive5.com/usearch/>)对 clean tags 进行聚类, 相似度 $\geq 97\%$ 的序列视为同一分类操作单元(operational taxonomic units, OTU)。一个 OTU 被认为可能代表一个物种。提取出现频率最高的序列作为每个 OTU 的代表序列, 并对其进行筛选, 以便进一步注释^[26]。使用 Silva 数据库(<https://www.arb-silva.de/>)注释分类信息, 置信阈值大于 0.5^[27]。高通量测序产生的 16S rRNA 基因序列已上传 NCBI 数据库, 登录号为 PRJNA694002。

1.3 菌株筛选与鉴定

1.3.1 培养基

营养琼脂培养基(nutrient agar, NA 培养基)^[28]: 蛋白胨 10 g, 牛肉膏 3 g, 氯化钠 5 g, 溶于 1 000 mL 水中, 调节 pH 为 7.3, 添加 15 g/L 琼脂, 121 °C 灭菌 20 min。

无氮培养基(nitrogen-free medium, NF 培养基)^[29-30]: 葡萄糖 20 g, K₂HPO₄ 0.2 g, MgSO₄ 0.2 g, NaCl 0.2 g, K₂SO₄ 0.1 g, CaCO₃ 5.0 g, 调节 pH 为 7.3, 添加 15 g/L 琼脂, 121 °C 灭菌 20 min。

1.3.2 土壤悬浊液的制备及菌株的分离筛选

取 10 g 上述经富集预培养后的新鲜土壤置于 250 mL 三角瓶中, 加入 90 mL 无菌水, 180 r/min、25 °C 恒温振荡 0.5 h, 将土壤悬浊液转移至 2 mL 无菌离心管中, 备用。

芽孢杆菌(*Bacillus*)的筛选: 使用无菌水将土壤悬浊液进行梯度稀释(10^{-4} – 10^{-8})后分装于 2 mL 无菌离心管中, 80 °C 水浴 15 min 以杀死

非芽孢菌体^[31], 冷却, 静置后取上清液涂布在无氮固体培养基(NF 培养基)上, 在 30 °C 培养箱中培养至出现明显单菌落。挑取单菌落, 多次划线纯化, 在显微镜下初步鉴定形态。

伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia*)和节杆菌(*Arthrobacter*)的筛选: 将土壤悬浊液进行梯度稀释(10^{-4} – 10^{-8}), 静置后取上清液涂布在无氮固体培养基(NF 培养基)上, 在 30 °C 培养箱中培养至出现明显单菌落。挑取单菌落, 多次划线纯化, 在显微镜下初步鉴定形态。

1.3.3 菌株 16S rRNA 基因测序及其同源性分析

在 2 mL 无菌离心管中加入 100 μ L 无菌水, 用接种环挑取经过纯化培养的菌株置于水中, 100 °C 水浴 5 min, 置于冰上 5 min, 剧烈涡旋后短暂离心, 取上清液进行 PCR 扩增(94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 90 s, 35 个循环; 72 °C 7 min), 使用 25 μ L PCR 反应体系[南京诺唯赞(vazyme)生物科技股份有限公司 SYBR Green qPCR Master Mix 12.5 μ L, 引物 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTAYGACTT-3', 5 μ mol/L) 0.5 μ L, 27F (5'-AGAGTTTGATCCTG GCTCAG-3', 5 μ mol/L) 0.5 μ L^[32], ddH₂O 10.5 μ L, DNA 模板 1 μ L]。通过凝胶电泳检测数量及质量, 回收条带进行纯化, 纯化产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行 16S rRNA 基因测序。将获得的基因序列在 NCBI 数据库 BLAST (basic local alignment search tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)中进行比对分析。

筛菌试验共获得菌株 154 株, 经镜检后送样测序的样品共 115 个, 经测序鉴定后得到芽孢杆菌 15 株, 节杆菌 58 株, 伯克霍尔德氏菌 6 株。经过序列比对后, 挑选其中最接近富集培养实验测序结果的菌株, 最终获得 3 株细菌, 分别是 *Burkholderia* sp. M6-3、*Bacillus funiculus*

M2-4 和 *Arthrobacter* sp. M7-15。

1.3.4 菌株显微形态学观察

在液体培养基中接种 M6-3、M2-4、M7-15 三个菌株，在 180 r/min、30 °C 培养至剧烈增殖期时转移至无菌离心管中，6 000 r/min 离心 5 min 收集菌体。加入 2.5%戊二醛 10 mL，摇匀后静置 24 h。加入无菌水清洗 3 次，离心后分别依次使用 30%、50%、70%、85%、90%、95%、100% (第 1 次)、100% (第 2 次)的乙醇对菌体进行梯度脱水，每次静置 30 min，离心去除上清液。放置于冷冻干燥机中干燥 24 h，使用高分辨扫描电镜(scanning electron microscopy, SEM, Apreo 2S, Thermo Fisher Scientific Company)摄制扫描照片。

1.4 菌株全基因组测序

配制 NA 液体培养基，将 3 株细菌 M6-3、M2-4 和 M7-15 分别接种到培养基中，在 180 r/min 摇床中 30 °C 培养至剧烈增殖期，6 000 r/min 离心 5 min，收集菌体后使用液氮速冻，委托广东美格基因生物技术有限公司使用 Illumina HiSeq 1500 高通量测序平台对 3 株细菌基因组进行测序。测序数据经过滤后进行组装^[33]，纯三代数据用 SMRT Link v5.1.0 组装(<https://www.pacb.com/support/software-downloads/>)^[34]，同时含有二代和三代数据选择 Unicycler 进行组装(<https://github.com/rrwick/Unicycler>)^[35]。使用直系同源蛋白质组簇(clusters of orthologous groups of proteins, COG)^[36]和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)^[37]等数据库对 3 株细菌的基因组数据进行注释，对上述数据库进行全基因组 BLAST 搜索(E-value<1⁻¹⁰，最小排列长度百分比>40%)^[38]。基于细菌基因组组装与编码基因预测结果，结合非编码 RNA、COG 注释等分析结果，使用 Circos 软件进行可视化展示，得到 3 株细菌的

全基因组图谱。基于 KEGG 注释到的功能基因及 KEGG 氮代谢通路，绘制 3 株细菌氮代谢通路图，并标注细菌基因组在氮代谢途径中注释到的功能基因。测序原始数据已上传至 NCBI 数据库，登录号为 PRJNA891540。

1.5 菌株无机氮同化能力测定(¹⁵N 标记法)

1.5.1 土壤灭菌

土壤经 121 °C、20 min 高温高压灭菌后，在 25 °C 避光通气培养 2 d，重复上述操作 3 次。在超净台中称取 0.5 g 土壤并制备为土壤悬液，将其涂布于 NA 培养基上。将培养基置于 30 °C 避光通气培养 2 d 后，观察发现无菌落产生，即为土壤灭菌完成。

1.5.2 样品处理

在超净台中称取相当于 15 g 风干土重的灭菌土壤置于灭菌后的 120 mL 血清瓶中，添加葡萄糖(glucose)作为碳源(500 mg C/kg)，分别添加 K¹⁵NO₃ 或(¹⁵NH₄)₂SO₄ 作为氮源(4 μmol N/g)，将相当于其自然丰度(0.20%–0.94%)的上述菌株 M6-3、M2-4 和 M7-15 均匀添加入土壤中。设置无氮源添加对照(control)。调节土壤含水量至 60% WHC，25 °C 避光通气培养 7 d，每个处理设置 3 个重复。在进行添加处理后的 30 min 和 7 d 后进行破坏性取样，将样品分别置于 4 °C 和–80 °C 保存。

1.5.3 样品测定

土壤有机氮(organic-¹⁵N)测定使用文献[8,39]中的方法，土壤经 2 mol/L KCl 溶液多次清洗后于 40 °C 烘干，磨成细粉后锡纸包样，使用同位素质谱仪(Europa Scientific Integra Crewe)测定。去除无机氮后的总氮测定方法与 1.1 相同。

1.6 数据处理

利用 Excel 2021 和 SPSS 13.0 软件对数据进行分析，用 Duncan's test 分析处理间平均数在 P<0.05 和 P<0.01 水平的差异显著性，数据

使用 Origin (ver. 2019b)和 Adobe Illustrator (CS6)绘图。

2 结果与分析

2.1 土壤富集预培养及优势无机氮同化细菌富集

富集预培养前, 酸性旱地红壤中伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和微球菌科(*Micrococcaceae*) 3类微生物的 16S rRNA 基因相对丰度为 0.20%–0.94%。经富集后这些微生物迅速增长, 在土壤微生物群落中占据显著优势, 培养 1 周后, *Burkholderia*、*Bacillus* 和 *Micrococcaceae* 的 16S rRNA 基因相对丰度分别增长至 20.2%、30.2%和 29.5%, 其总相对丰度在富集预培养土壤中达到 58.9%–68.1% (表 1)。

2.2 优势无机氮同化菌株的分离、筛选与鉴定

2.2.1 菌株 16S rRNA 基因序列同源性分析

本研究共获得 3 株优势无机氮同化菌株,

分别是 M6-3、M2-4 和 M7-15。16S rRNA 基因序列 BLAST 比对结果显示, 菌株 M6-3 与 *Burkholderia* sp. HC1.1bh 和 *Burkholderia* sp. WK1.1d 同源关系较近, 相似度分别为 95.4%和 95.5%; M2-4 和 *Bacillus funiculus* strain PK16 等菌株同源关系较近, 序列相似度均不低于 98.9%; M7-15 和 *Arthrobacter ramosus* isolate PSB49 等菌株同源关系较近, 序列相似性约为 96.3% (表 2)。因此 3 株优势无机氮同化菌株分别鉴定为 *Burkholderia* sp. M6-3、*Bacillus funiculus* M2-4 和 *Arthrobacter* sp. M7-15。在分类学上, *Burkholderia* sp. M6-3 属于变形菌门 (*Proteobacteria*)、 β -变形菌纲 (*Betaproteobacteria*)、伯克霍尔德氏菌目 (*Burkholderiales*)、伯克霍尔德氏菌科 (*Burkholderiaceae*)、伯克霍尔德氏菌属 (*Burkholderia*); *Bacillus funiculus* M2-4 属于厚壁菌门 (*Firmicutes*)、芽孢杆菌纲 (*Bacilli*)、芽孢杆菌目 (*Bacillales*)、芽孢杆菌科 (*Bacillaceae*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*), 而 *Arthrobacter* sp. M7-15

表 1 富集预培养后土壤优势无机氮同化细菌类群 16S rRNA 基因相对丰度

Table 1 Relative abundance of dominant N assimilating microorganisms based on 16S rRNA gene after the pre-enrichment culture

Dominant bacterial taxa	0 d	7 d	
		NO ₃ ⁻ +glucose	NH ₄ ⁺ +glucose
<i>Burkholderia</i>	0.20%±0.04%	20.15%±0.12%	7.40%±2.27%
<i>Bacillus</i>	0.82%±0.04%	30.19%±3.87%	21.97%±5.23%
<i>Micrococcaceae</i>	0.94%±0.43%	17.74%±2.28%	29.50%±1.80%

表 2 三株细菌的基因序列 BLAST 结果

Table 2 Gene sequence BLAST results of three bacterial strains

Strain	Similar strain	Sequence ID	Query cover (%)	Percent identity (%)
M6-3	<i>Burkholderia</i> sp. HC1.1bh	HF674717.1	93	95.4
	<i>Burkholderia</i> sp. DS21	AB982950.1	94	95.5
M2-4	<i>Bacillus funiculus</i> strain PK16	MK519226.1	87	98.9
	<i>Ectobacillus funiculus</i> strain D5	OK161085.1	89	98.9
	<i>Bacillus funiculus</i> strain NK20.3	AY169820.1	79	98.8
M7-15	<i>Arthrobacter ramosus</i> isolate PSB49	HQ242762.1	95	96.3
	<i>Arthrobacter</i> sp. S3SP505	KT183561.1	95	96.3

属于放线菌门 (*Actinobacteria*)、放线菌纲 (*Actinobacteria*)、微球菌目 (*Micrococcales*)、微球菌科 (*Micrococcaceae*)、节杆菌属 (*Arthrobacter*)。

2.2.2 菌株形态特征

将 M6-3、M2-4 和 M7-15 接种于 NA 培养基平板上 30 °C 培养 24–36 h 后，均形成白色、边缘整齐、湿润、中间凸起的圆形菌落。在显微镜下

观察，菌株 M6-3 呈现长杆状菌体，大小约为 $0.6\text{--}0.7\ \mu\text{m}\times 1.0\text{--}2.2\ \mu\text{m}$ ，单个菌落直径约为 1.0 mm；菌株 M2-4 呈现长杆状相连接后的绳索状，大小约为 $1.0\text{--}1.2\ \mu\text{m}\times 20\text{--}30\ \mu\text{m}$ ，其生长后期产生大量芽孢，单个菌落直径约为 3.0 mm；菌株 M7-15 呈现短杆状，大小约为 $0.4\text{--}0.5\ \mu\text{m}\times 0.8\text{--}1.2\ \mu\text{m}$ ，单个菌落直径约为 1.0 mm (图 1)。

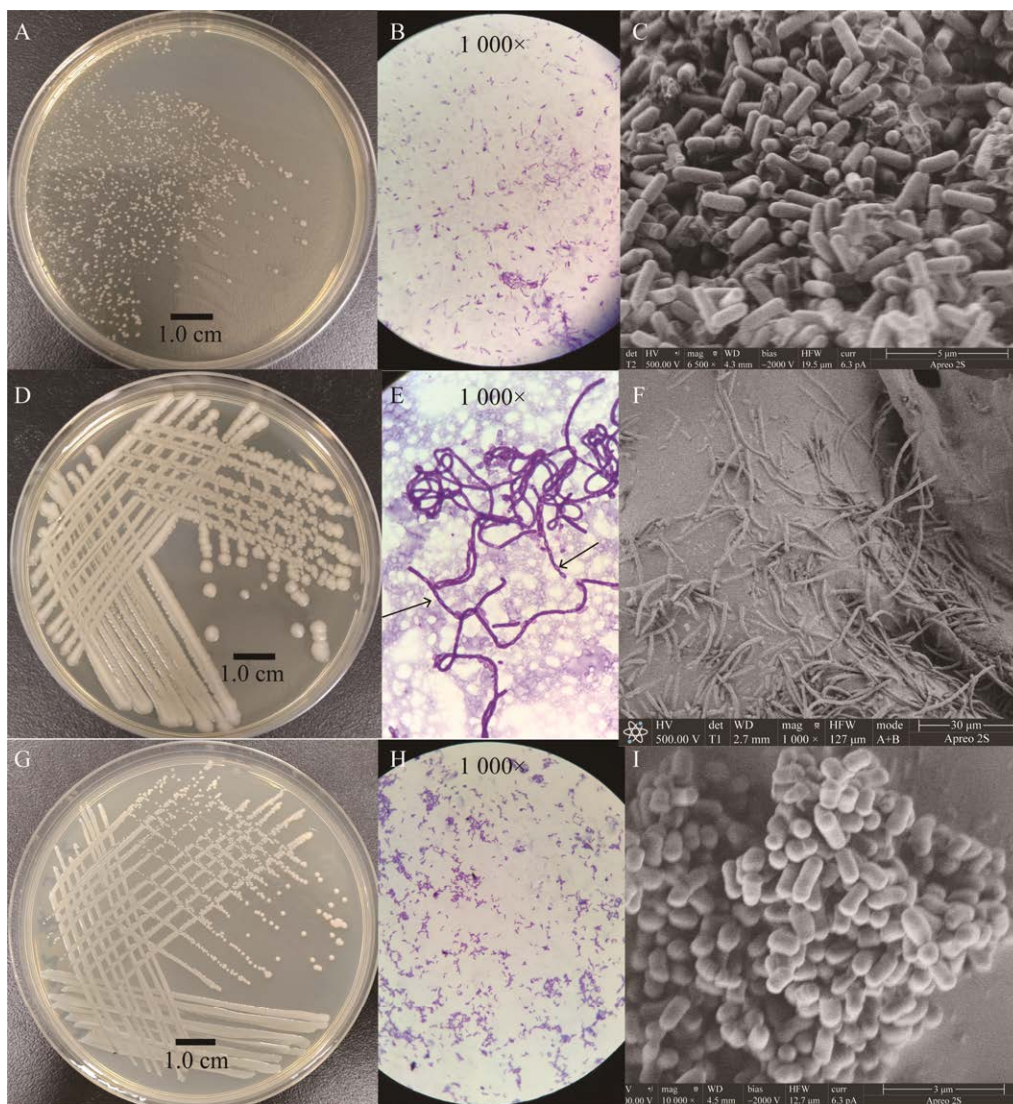


图 1 三株优势无机氮同化菌株的菌落及显微形态特征

Figure 1 Colony and microscopic morphological characteristics of three dominant inorganic nitrogen assimilating strains. A–C, D–F and G–I indicated the colony morphology of strains *Burkholderia* sp. M6-3, *Bacillus funiculus* M2-4, and *Arthrobacter* sp. M7-15 on NA solid medium, the cell morphology characteristics under optical microscope and scanning electron microscope, respectively.

2.3 菌株无机氮同化能力

在灭菌土壤中添加菌株 M6-3, $^{15}\text{NO}_3^-$ 处理下土壤有机氮 ^{15}N 丰度在培养 7 d 后从自然丰度 0.36%–0.37% 增加到 0.99%±0.05%, 增加量为 0.61%±0.05%; 而 $^{15}\text{NH}_4^+$ 处理下有机氮 ^{15}N 丰度在培养 7 d 后增加至 2.17%±0.07%, 增加量为 1.79%±0.07%。添加菌株 M2-4 后, $^{15}\text{NO}_3^-$ 处理下土壤有机氮 ^{15}N 丰度在培养 7 d 后从自然丰度 0.36%–0.37% 增加至 0.49%±0.01%, $^{15}\text{NH}_4^+$ 处理下有机氮 ^{15}N 丰度在培养 7 d 后增加至 0.50%±0.004%。添加菌株 M7-15 后, $^{15}\text{NO}_3^-$ 处理下土壤有机氮 ^{15}N 丰度在培养 7 d 后从自然丰度 0.36%–0.37% 增加至 0.52%±0.12%, $^{15}\text{NH}_4^+$ 处理下有机氮 ^{15}N 丰度在培养 7 d 后增加至 0.59%±0.03% (图 2A)。添加 M6-3 的灭菌土壤 1 周培养期内净氮同化速率(使用 ^{15}N 标记的有机氮增加量计算)为 (0.24±0.03) mg/(kg·d) ($^{15}\text{NO}_3^-$ 处理) 和 (1.28±0.61) mg/(kg·d) ($^{15}\text{NH}_4^+$ 处

理); 添加 M2-4 的灭菌土壤 1 周培养期内净氮同化速率为 (0.17±0.07) mg/(kg·d); 添加 M7-15 的灭菌土壤 1 周培养期内净氮同化速率为 (0.13±0.03)–(0.16±0.02) mg/(kg·d) (图 2B)。可见, 菌株 M6-3 在灭菌酸性红壤中无机氮同化能力较强。

2.4 菌株全基因组序列分析

2.4.1 菌株基因组特征

菌株 M6-3、M2-4 和 M7-15 基因组组装与编码基因预测结果显示, 菌株 M6-3 基因序列全长 8 155 157 bp, GC 含量为 61.6%, 菌株含有 2 个染色体, 2 个质粒; 其基因组包含编码区域和用于实现转录调控、翻译调控、表观遗传等功能的非编码区域; 编码基因个数为 7 989 个, 编码区总长度占基因组的比例为 83.53% (表 3); 非编码 RNA 则包括 63 个 tRNA、18 个 rRNA 和 5 个 sRNA。菌株 M2-4 基因序列全长 6 575 618 bp, GC 含量为 40.2%, 菌株含有 3 个染色体, 7 个

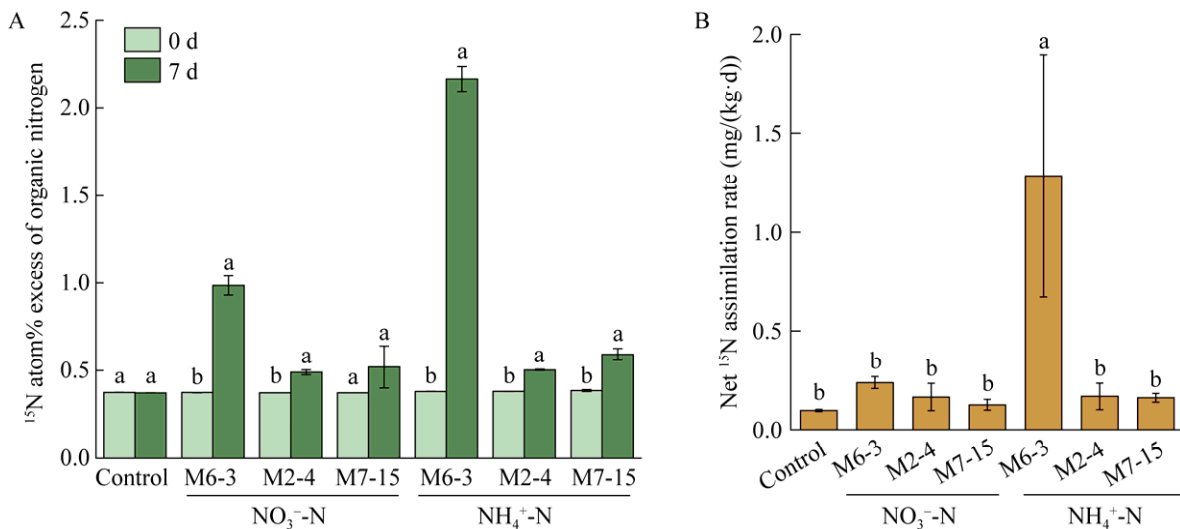


图 2 三株细菌的无机氮同化能力

Figure 2 Inorganic nitrogen assimilation capacity of three bacterial strains. A: The change in organic ^{15}N abundance in the sterilized soil with the added strain. B: The net ^{15}N assimilation rate during the incubation period. The data and errors on the bar represent the mean and standard error, respectively ($n=3$, $P<0.05$).

表3 三株细菌基因组编码基因预测结果

Table 3 Prediction of genes encoding the genomes of three strains

Strain	Genome size (bp)	Gene number	Gene total length (bp)	Gene average length (bp)	Gene length/Genome (%)	Gene density (per kb)
M6-3	8 155 157	7 989	6 812 310	852.71	83.53	0.98
M2-4	6 575 618	6 438	5 138 523	798.16	78.15	0.98
M7-15	4 155 715	4 092	3 655 056	893.22	87.95	0.98

质粒；编码基因个数为 6 438 个，编码区总长度占基因组的比例为 78.15%，非编码 RNA 包括 182 个 tRNA、60 个 rRNA 和 4 个 sRNA。菌株 M7-15 基因序列全长 4 155 715 bp，GC 含量为 63.31%，菌株含有 1 个染色体，无质粒；编码基因个数为 4 092 个，编码区总长度占基因组的比例为 87.95%，非编码 RNA 包括 57 个 tRNA 和 15 个 rRNA (图 3)。

2.4.2 代谢途径及氮转化功能基因注释

菌株 M6-3 经 KEGG 共注释到 6 929 个基因，M2-4 注释到 5 418 个基因，M7-15 注释到 3 616 个基因。3 株细菌基因组注释到的基因数量最多的途径为碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)，其次是氨基酸代谢(amino acid metabolism)和膜运输(membrane transport)，菌株具有丰富的碳水化合物代谢和氮代谢功能。在大部分途径中，菌株 M6-3 都比另外 2 株细菌注释到更多的相关基因，表明其在代谢途径多样性及功能基因多样性上具备优势(图 4)。3 株细菌都注释到了完整的氮同化-矿化途径，包括编码硝酸盐/亚硝酸盐运输系统底物结合蛋白的 *Nrt* 基因，编码同化硝酸盐还原酶的 *nasAB* 基因和编码亚硝酸盐还原酶的 *nirB/nirD* 基因；编码谷氨酸脱氢酶的 *gdhA/GDH2/gudB* 基因、编码谷氨酰胺合成酶和谷氨酸合成酶的 *glnA* 和 *gltB/gltD* 基因等。其中菌株 M6-3 氮代谢相关功能基因最为丰富，菌株 2-4 在铵固定途径中注释到 *gdhA* 和 *gudB*，M7-15 在该途径中则只注释到 *GDH2* (图 5)。

3 讨论

土壤中氮素固定-释放的平衡驱动着土壤中有效态氮的固存与转化^[40]，而微生物对无机氮的吸收-贮存-释放是保证土壤中氮素长期保持可利用性的核心^[7]，其中微生物驱动的无机氮同化作用意义重大^[5]。2010 年有研究表示无机氮同化作用或许是被一组相对已经经过选择的微生物所执行和驱动，而不是由大量看似冗余的微生物类群来执行^[41]；2018 年 Morrissey 等^[10]发现在混合针叶林草甸土壤原始微生物类群中占比较小的低丰度微生物类群在添加外源无机氮后主导了无机氮同化过程；另有研究也发现放线菌和腐生真菌等微生物占据氮素同化微生物类群的大部分，放线菌在氮被大量固定的土壤中变得更丰富^[42-44]；本研究通过向无施肥处理的酸性旱地红壤添加外源无机氮和易利用态碳源以刺激无机氮同化微生物的增殖，从而在短期内富集优势无机氮同化微生物类群，经过一周的富集预培养后优势氮同化微生物从自然丰度的 1.96%左右增长到 58.9%–68.1%，在微生物类群中占据显著优势，然而这些微生物的 OTUs 仅占据土壤总 OTUs 的约 2.06%。酸性旱地红壤中低丰度微生物类群在无机氮同化过程中发挥了主导作用。

为进一步探索这些优势氮同化微生物的无机氮同化能力，本研究筛选得到 3 株优势无机氮同化菌株。菌株被回接至灭菌土壤后，在 7 d 富集预培养期内进行了剧烈的无机氮同化作

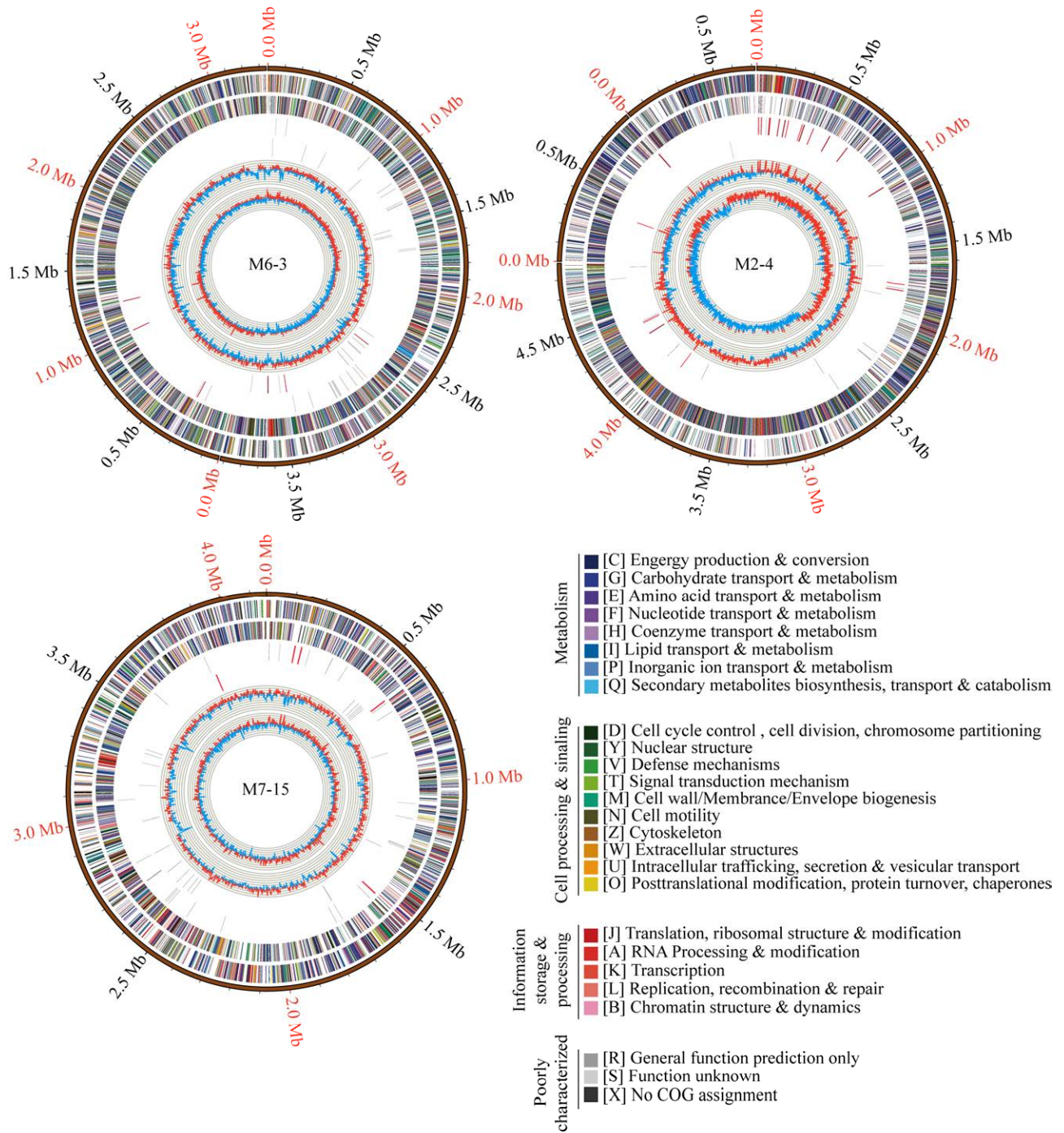


图 3 三株细菌全基因组图谱

Figure 3 Genomic maps of the three strains. Rings from the outermost to the center: Scale marks of the genome; Protein-coding genes on the forward strand; Protein-coding genes on the reverse strand; tRNA (black) and rRNA (red) genes on the forward strand; tRNA (black) and rRNA (red) genes on the reverse strand; GC content; GC skew. Protein-coding genes are color coded according to their COG categories.

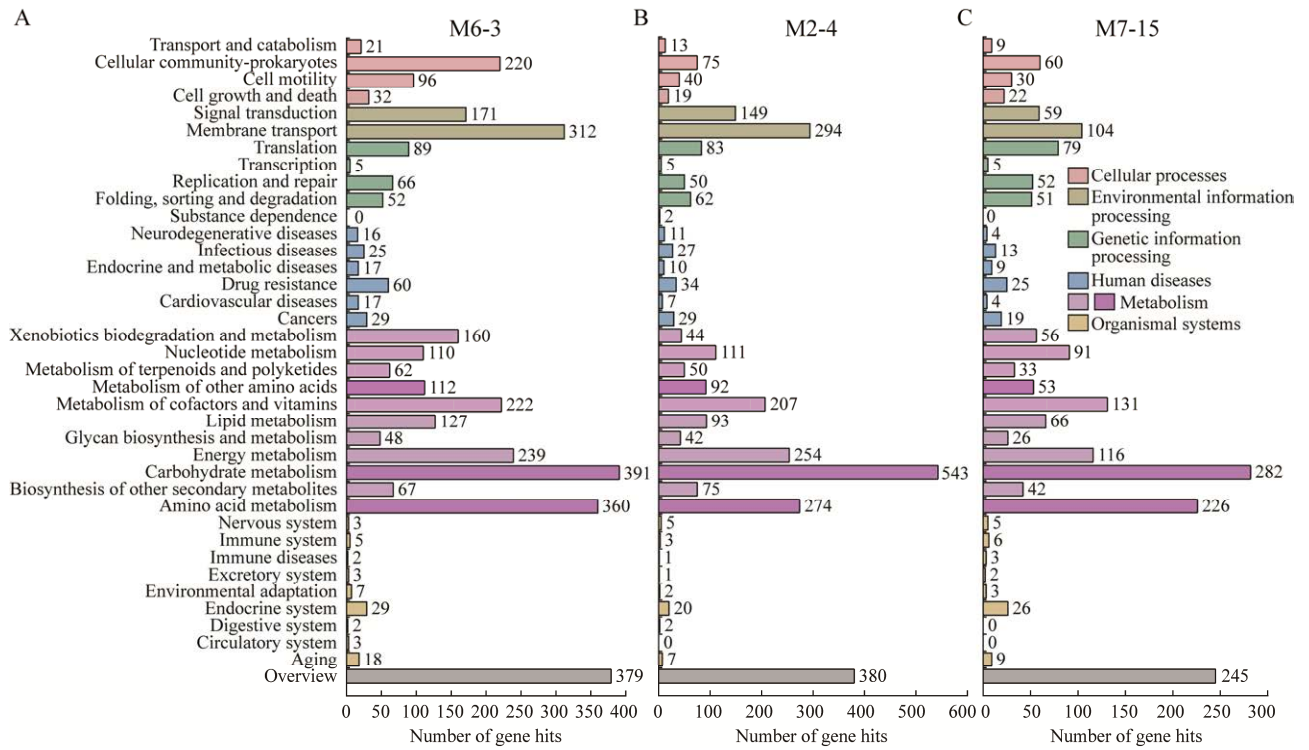


图 4 三株细菌基因组 KEGG 注释分类
Figure 4 The KEGG annotation classification of three bacterial genomes.

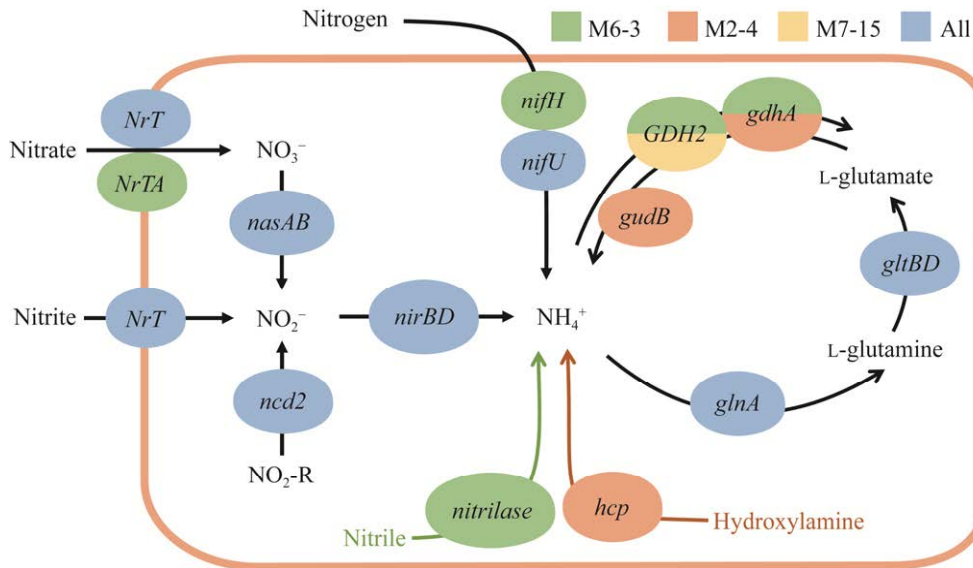


图 5 基于 KEGG 的三株细菌氮代谢途径及相关功能基因
Figure 5 KEGG nitrogen metabolism pathway and related functional genes of three strains. The green indicates genes specific to M6-3, orange indicates genes specific to M2-4, and blue indicates genes common to all three bacterial strains.

用, 该菌株对铵态氮的同化量显著高于对硝态氮的同化量, 以往有关土壤氮转化研究经常发现 NH_4^+ 比 NO_3^- 更优先被微生物固定^[39-40], 菌株 M6-3 表现出相似的特性。灭菌土壤中添加单一菌株 M6-3 后, 其净氮同化速率(使用有机氮 ^{15}N 增加量计算)可以达到 $(1.28 \pm 0.61) \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 。2021 年研究者发现一株具有强硝酸盐去除能力的巨大芽孢杆菌, 在灭菌土壤中的净氮同化速率为 $0.058 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, 在未灭菌土壤中的净氮同化速率为 $0.42 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ^[45]; 其他研究者发现在 C/N 为 27 的酸性土壤中, 土壤微生物群落对 NH_4^+-N 的同化速率约为 $4.6\text{--}146.0 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$; 在 C/N 为 15 的酸性土壤中, 微生物群落对 NH_4^+-N 的同化速率约为 $1.4\text{--}24.7 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ^[46]; 在橡树林地砂壤土中, 微生物群落的氮同化速率仅为 $0.5\text{--}1.7 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ^[47]。可见, 菌株 M6-3 在土壤中具备较强的氮同化能力。

细菌基因组信息显示, 菌株 M6-3 的基因组最大、M2-4 次之、M7-15 最小; 相应的, 菌株 M6-3 基因组中也包含最多的功能基因。经 KEGG 注释后发现菌株 M6-3 注释到最多的氨基酸代谢功能基因, 菌株可能在氮代谢能力上具有优势; 菌株 M2-4 注释到最多的碳水化合物代谢功能基因, 该菌株可能在碳代谢上具有优势。3 株细菌在信号传导、膜运输等途径也注释到大量基因, 这些基因有助于菌株在氮代谢途径中将胞外无机氮转运到细胞内并进行氮转化与利用^[48], 其中菌株 M6-3 有约 1 167 个与 ABC 转运相关的编码蛋白被注释, 包括糖 ABC 转运、氨基酸 ABC 转运、组氨酸/赖氨酸/精氨酸/鸟氨酸 ABC 转运等多种 ABC 转运蛋白, ABC 蛋白发挥着影响细胞分裂、低分子量的溶质输入和运输的功能^[49-50], 这对于菌株 M6-3 在土壤中同化无机元素与矿化有机养分有重要意义。菌株 M6-3 在铵固定途径中注释到编码

谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, GDH)的 *gdhA* 和 *GDH2* 基因, 其介导 GDH 调控的铵同化过程($\text{glutamate} + \text{NH}_4^+ + \text{ATP} = \text{glutamine} + \text{ADP} + \text{P}_i + \text{H}_2\text{O}$)是可逆过程^[51-52], 因此 GDH 在氮同化与矿化过程中都发挥作用, 这些为菌株进行无机氮同化或矿化提供了功能基础。基因 *gdhA* 编码的 NADP(H)-GDH 在铵态氮同化中发挥重要作用^[53], 基因 *GDH2* 则编码 NAD(+)端依赖的 GDH, 催化谷氨酸降解形成铵和 α -酮戊二酸酯^[54]。菌株 M2-4 在 GDH 途径注释到 *gdhA* 和 *gudB* 基因, *gudB* 仅介导谷氨酸分解为铵的过程却不能介导谷氨酸合成^[55-56]。而 M7-15 在该途径中只注释到 *GDH2* 基因, 但细胞内铵态氮的增加会导致 *GDH2* 的表达量减少进而减弱 M7-15 在该途径的功能^[54]。土壤回接培养实验与全基因组分析都证明本研究发现的菌株 M6-3 可在酸性旱地红壤无机氮同化过程乃至化学氮肥固定过程中发挥重要作用。

4 结论

(1) 本研究从酸性旱地红壤中分离到 3 株优势无机氮同化细菌菌株, 分别是 *Burkholderia* sp. M6-3、*Bacillus funiculus* M2-4 和 *Arthrobacter* sp. M7-15。3 株细菌在土壤中属于低丰度类群, 其 16S rRNA 基因丰度仅占有所有细菌的 0.20%–0.94%; 而施用无机氮素一周后, 土壤好氧培养实验证明, 3 菌株所属细菌群落 16S rRNA 基因相对丰度增长至 58.9%–68.1%, 证实其无机氮同化生长能力。

(2) ^{15}N 标记实验发现, 在灭菌酸性旱地红壤中接种菌株 M6-3、M2-4 和 M7-15, 其无机氮同化速率分别达到 (1.28 ± 0.61) 、 (0.17 ± 0.07) 和 $(0.16 \pm 0.02) \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, 其中菌株 M6-3 的无机氮同化能力最强。

(3) 全基因组测序结果显示, 3 株细菌均注释到完整的氮同化-矿化代谢途径。菌株 M6-3

基因组最大(8 155 157 bp), 编码基因数量最多(7 989 个), 其在代谢途径多样性及氮代谢功能基因多样性上具备优势, 因此表现出更强的无机氮同化潜力。

(4) 本研究证实在土壤无机氮同化过程中低丰度微生物发挥重要功能, 并从菌株基因组水平上揭示了无机氮同化代谢过程。上述结果可为酸性旱地红壤农业利用过程中化学氮肥应用及其转化过程研究提供菌株资源和理论依据。

参考文献

- [1] CUI SH, SHI YL, GROFFMAN PM, SCHLESINGER WH, ZHU YG. Centennial-scale analysis of the creation and fate of reactive nitrogen in China (1910–2010)[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(6): 2052-2057.
- [2] GREAVER TL, CLARK CM, COMPTON JE, VALLANO D, TALHELM AF, WEAVER CP, BAND LE, BARON JS, DAVIDSON EA, TAGUE CL, FELKER-QUINN E, LYNCH JA, HERRICK JD, LIU L, GOODALE CL, NOVAK KJ, HAEUBER RA. Key ecological responses to nitrogen are altered by climate change[J]. *Nature Climate Change*, 2016, 6(9): 836-843.
- [3] 程谊, 张金波, 蔡祖聪. 土壤中无机氮的微生物同化和非生物固定作用研究进展[J]. *土壤学报*, 2012, 49(5): 1030-1036.
CHENG Y, ZHANG JB, CAI ZC. A research progress on biotic and abiotic inorganic nitrogen immobilization in soils[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2012, 49(5): 1030-1036 (in Chinese).
- [4] 程谊, 黄蓉, 余云飞, 王慎强. 应重视硝态氮同化过程在降低土壤硝酸盐浓度中的作用[J]. *土壤学报*, 2017, 54(6): 1326-1331.
CHENG Y, HUANG R, YU YF, WANG SQ. Role of microbial assimilation of soil NO₃⁻ in reducing soil NO₃⁻ concentration[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2017, 54(6): 1326-1331 (in Chinese).
- [5] TAHOVSKÁ K, KAŇA J, BÁRTA J, OULEHLE F, RICHTER A, ŠANTRŮČKOVÁ H. Microbial N immobilization is of great importance in acidified mountain spruce forest soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 59: 58-71.
- [6] VINTEN AJ, WHITMORE A, BLOEM J, HOWARD R, WRIGHT F. Factors affecting N immobilisation/mineralisation kinetics for cellulose-, glucose- and straw-amended sandy soils[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2002, 36(3): 190-199.
- [7] ZHANG JB, CAI ZC, ZHU TB, YANG WY, MÜLLER C. Mechanisms for the retention of inorganic N in acidic forest soils of southern China[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3(1): 2342.
- [8] ROMERO CM, ENGEL R, CHEN CC, WALLANDER R. Microbial immobilization of nitrogen-15 labelled ammonium and nitrate in an agricultural soil[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2015, 79(2): 595-602.
- [9] SCHIMMEL J. Ecosystem consequences of microbial diversity and community structure[M]//*Ecological Studies*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1995: 239-254.
- [10] MORRISSEY EM, MAU RL, SCHWARTZ E, KOCH BJ, HAYER M, HUNGATE BA. Taxonomic patterns in the nitrogen assimilation of soil prokaryotes[J]. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(3): 1112-1119.
- [11] WAWRIK B, BOLING WB, van NOSTRAND JD, XIE JP, ZHOU JZ, BRONK DA. Assimilatory nitrate utilization by bacteria on the West Florida Shelf as determined by stable isotope probing and functional microarray analysis[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, 79(2): 400-411.
- [12] SUN B, GU LK, BAO LJ, ZHANG SW, WEI YX, BAI ZH, ZHUANG GQ, ZHUANG XL. Application of biofertilizer containing *Bacillus subtilis* reduced the nitrogen loss in agricultural soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2020, 148: 107911.
- [13] WANG CR, HUANG YC, YANG XR, XUE WJ, ZHANG X, ZHANG YH, PANG J, LIU YM, LIU ZQ. *Burkholderia* sp. Y4 inhibits cadmium accumulation in rice by increasing essential nutrient uptake and preferentially absorbing cadmium[J]. *Chemosphere*, 2020, 252: 126603.
- [14] TU QC, LIN L, CHENG L, DENG Y, HE ZL. NCycDB: a curated integrative database for fast and accurate metagenomic profiling of nitrogen cycling genes[J]. *Bioinformatics*, 2019, 35(6): 1040-1048.
- [15] TU QC, HE ZL, WU LY, XUE K, XIE G, CHAIN P, REICH PB, HOBBIE SE, ZHOU JZ. Metagenomic reconstruction of nitrogen cycling pathways in a CO₂-enriched grassland ecosystem[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 106: 99-108.
- [16] RICHARDSON DJ, BERKS BC, RUSSELL DA, SPIRO S, TAYLOR CJ. Functional, biochemical and

- genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases[J]. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 2001, 58(2): 165-178.
- [17] MORENO-VIVIÁN C, CABELLO P, MARTÍNEZ-LUQUE M, BLASCO R, CASTILLO F. Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(21): 6573-6584.
- [18] ZHANG JB, LAN T, MÜLLER C, CAI ZC. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) plays an important role in soil nitrogen conservation in neutral and alkaline but not acidic rice soil[J]. Journal of Soils and Sediments, 2015, 15(3): 523-531.
- [19] FERRER J, PÉREZ-POMARES F, BONETE MJ. NADP-glutamate dehydrogenase from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranea*. Enzyme purification, N-terminal sequence and stability[J]. FEMS Microbiology Letters, 1996, 141(1): 59-63.
- [20] IKEDA PT, SHAUGER AE, KUSTU S. *Salmonella typhimurium* apparently perceives external nitrogen limitation as internal glutamine limitation[J]. Journal of Molecular Biology, 1996, 259(4): 589-607.
- [21] HELLING RB. Pathway choice in glutamate synthesis in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(17): 4571-4575.
- [22] 赵焕帅, 王健鑫, 黄嘉茂, 马云程, 陈云飞, 陶晨智, 王定全, 廖智, 石戈, 刘雪珠, 曲武. 金黄杆菌 ZHDP1 菌株基因组分析及其蛋白酶活性特征与产酶优化[J]. 微生物学通报, 2022, 49(8): 3324-3334.
- ZHAO HS, WANG JX, HUANG JM, MA YC, CHEN YF, TAO CZ, WANG DQ, LIAO Z, SHI G, LIU XZ, QU W. Genome analysis, protease characterization, and enzyme production optimization of *Chryseobacterium* sp. ZHDP1[J]. Microbiology China, 2022, 49(8): 3324-3334 (in Chinese).
- [23] SHEN WS, XU TT, LIU JJ, HUANG QR, GU GY, ZHONG WH. Long-term application of organic manure changes abundance and composition of ammonia-oxidizing archaea in an acidic red soil[J]. Soil Science and Plant Nutrition, 2015, 61(4): 620-628.
- [24] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- BAO SD. Soil and Agricultural Chemistry Analysis[M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2000 (in Chinese).
- [25] WALTERS W, HYDE ER, BERG-LYONS D, ACKERMANN G, HUMPHREY G, PARADA A, GILBERT JA, JANSSON JK, CAPORASO JG, FUHRMAN JA, APPRILL A, KNIGHT R. Improved bacterial 16S rRNA gene (V4 and V4-5) and fungal internal transcribed spacer marker gene primers for microbial community surveys[J]. mSystems, 2015, 1(1): e00009-e00015.
- [26] CAPORASO JG, LAUBER CL, WALTERS WA, BERG-LYONS D, HUNTLEY J, FIERER N, OWENS SM, BETLEY J, FRASER L, BAUER M, GORMLEY N, GILBERT JA, SMITH G, KNIGHT R. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms[J]. The International Society for Microbial Ecology Journal, 2012, 6(8): 1621-1624.
- [27] QUAST C, PRUESSE E, YILMAZ P, GERKEN J, SCHWEER T, YARZA P, PEPLIES J, GLÖCKNER FO. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(D1): D590-D596.
- [28] MISHRA M. Growing and Handling of Bacterial Cultures[M]. Rijeka: IntechOpen, 2019.
- [29] PATIL SV, MOHITE BV, PATIL CD, KOLI SH, BORASE HP, PATIL VS. *Azotobacter*[M]//Beneficial Microbes in Agro-Ecology. Amsterdam: Elsevier, 2020: 397-426.
- [30] 李振高, 骆永明, 滕应. 土壤与环境微生物研究法[M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- LI ZG, LUO YM, TENG Y. Research Method of Soil and Environmental Microorganisms[M]. Beijing: Science Press, 2008 (in Chinese).
- [31] 伍楚妍, 黄晓冰, 刘少君, 李洋, 谢为天, 徐春厚. 海洋源芽孢杆菌的分离鉴定及其消化酶代谢产物的测定[J]. 广东农业科学, 2021, 48(7): 137-144.
- WU CY, HUANG XB, LIU SJ, LI Y, XIE WT, XU CH. Isolation and identification of marine *Bacillus* and determination of its digestive enzyme metabolites[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2021, 48(7): 137-144 (in Chinese).
- [32] HAAS BJ, GEVERS D, EARL AM, FELDGARDEN M, WARD DV, GIANNOUKOS G, CIULLA D, TABBAA D, HIGHLANDER SK, SODERGREN E, METHÉ B, DESANTIS TZ, CONSORTIUM HM, PETROSINO JF, KNIGHT R, BIRREN BW. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons[J]. Genome Research, 2011, 21(3): 494-504.
- [33] METZKER ML. Sequencing technologies—the next generation[J]. Nature Reviews Genetics, 2010, 11(1): 31-46.
- [34] JAYAKUMAR V, SAKAKIBARA Y. Comprehensive evaluation of non-hybrid genome assembly tools for third-generation PacBio long-read sequence data[J].

- Briefings in Bioinformatics, 2019, 20(3): 866-876.
- [35] WICK RR, JUDD LM, GORRIE CL, HOLT KE. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads[J]. *PLoS Computational Biology*, 2017, 13(6): e1005595.
- [36] TATUSOV RL, KOONIN EV, LIPMAN DJ. A genomic perspective on protein families[J]. *Science*, 1997, 278(5338): 631-637.
- [37] KANEHISA M, GOTO S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(1): 27-30.
- [38] PAN JH, SUN Y, YAO WW, MAO HY, ZHANG YJ, ZHU MY. Complete genome sequence of the *Vibrio vulnificus* strain VV2014DJH, a human-pathogenic bacterium isolated from a death case in China[J]. *Gut Pathogens*, 2017, 9: 67.
- [39] CHRISTIE P, WASSON EA. Short-term immobilization of ammonium and nitrate added to a grassland soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33(9): 1277-1278.
- [40] RECOUS S, MARY B, FAURIE G. Microbial immobilization of ammonium and nitrate in cultivated soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1990, 22(7): 913-922.
- [41] MCGUIRE KL, TRESEDER KK. Microbial communities and their relevance for ecosystem models: decomposition as a case study[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, 42(4): 529-535.
- [42] BALSER TC, FIRESTONE MK. Linking microbial community composition and soil processes in a California annual grassland and mixed-conifer forest[J]. *Biogeochemistry*, 2005, 73(2): 395-415.
- [43] SMITHWICK EAH, TURNER MG, METZGER KL, BALSER TC. Variation in NH_4^+ mineralization and microbial communities with stand age in lodgepole pine (*Pinus contorta*) forests, Yellowstone National Park (USA)[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2005, 37(8): 1546-1559.
- [44] HEIJBOER A, ten BERGE HFM, de RUITER PC, JØRGENSEN HB, KOWALCHUK GA, BLOEM J. Plant biomass, soil microbial community structure and nitrogen cycling under different organic amendment regimes; a ^{15}N tracer-based approach[J]. *Applied Soil Ecology*, 2016, 107: 251-260.
- [45] YOU YM, CHU SH, CHI YW, CHEN XF, WANG JC, HAYAT K, YANG XJ, MÜLLER C, ZHANG D, ZHOU P. How bacteria remediate soil nitrate for sustainable crop production[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2021, 328: 129600.
- [46] BENGTSSON G, BENGTSON P, MÅNSSON KF. Gross nitrogen mineralization-, immobilization-, and nitrification rates as a function of soil C/N ratio and microbial activity[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, 35(1): 143-154.
- [47] PURI G, ASHMAN MR. Microbial immobilization of ^{15}N -labelled ammonium and nitrate in a temperate woodland soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, 31(6): 929-931.
- [48] LIU YY, LI HX, LI JY, ZHOU Y, ZHOU ZM, WANG P, ZHOU SM. Characterization of the promoter of the nitrate transporter-encoding gene *nrtA* in *Aspergillus nidulans*[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2020, 295(5): 1269-1279.
- [49] FATH MJ, KOLTER R. ABC transporters: bacterial exporters[J]. *Microbiological Reviews*, 1993, 57(4): 995-1017.
- [50] REES DC, JOHNSON E, LEWINSON O. ABC transporters: the power to change[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, 10(3): 218-227.
- [51] ABIKO T, WAKAYAMA M, KAWAKAMI A, OBARA M, KISAKA H, MIWA T, AOKI N, OHSUGI R. Changes in nitrogen assimilation, metabolism, and growth in transgenic rice plants expressing a fungal NADP(H)-dependent glutamate dehydrogenase (*gdhA*)[J]. *Planta*, 2010, 232(2): 299-311.
- [52] WOOTTON JC. Re-assessment of ammonium-ion affinities of NADP-specific glutamate dehydrogenases. Activation of the *Neurospora crassa* enzyme by ammonium and rubidium ions[J]. *The Biochemical Journal*, 1983, 209(2): 527-531.
- [53] KINGHORN JR, PATEMAN JA. NAD and NADP L-glutamate dehydrogenase activity and ammonium regulation in *Aspergillus nidulans*[J]. *Journal of General Microbiology*, 1973, 78(1): 39-46.
- [54] DELUNA A, AVENDAÑO A, RIEGO L, GONZÁLEZ A. NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*: purification, kinetic properties, and physiological roles[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(47): 43775-43783.
- [55] GUNKA K, STANNEK L, CARE RA, COMMICHAU FM. Selection-driven accumulation of suppressor mutants in *Bacillus subtilis*: the apparent high mutation frequency of the cryptic *gudB* gene and the rapid clonal expansion of *gudB*⁺ suppressors are due to growth under selection[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e66120.
- [56] BELITSKY BR, SONENSHEIN AL. Role and regulation of *Bacillus subtilis* glutamate dehydrogenase genes[J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(23): 6298-6305.