

化肥对稻田土壤细菌多样性及硝化、反硝化功能菌组成的影响

陈 哲^{1,2}, 陈春兰^{1,2}, 秦红灵¹, 王 霞^{1,3}, 吴敏娜¹, 魏文学^{1,*}

(1. 中国科学院亚热带农业生态研究所, 长沙 410125; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049;

3. 华中农业大学资源与环境学院, 武汉 430070)

摘要:以中国科学院桃源农业生态试验站长期定位施肥试验为平台, 采用聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 和 DNA 序列测定技术分析研究了 3 种长期施肥制度 (对照不施肥-CK, 单施氮肥-N, 氮磷钾肥-NPK) 对土壤细菌群落以及硝化、反硝化微生物种群的影响。通过系统分析细菌 16S rDNA、细菌的硝化基因氨单加氧酶 (ammonia monooxygenase, *amoA*) 和反硝化基因氧化亚氮还原酶 (nitrous oxide reductase, *nosZ*) 等基因文库发现, 长期单施氮肥导致细菌 16S rDNA 和 *amoA* 的多样性明显低于 CK 和 NPK 处理, 而 *nosZ* 的多样性与之相反, 即单施氮肥处理明显高于 CK 和 NPK 处理。LUBSHUFF 软件统计分析显示: 16S rDNA 和 *amoA* 基因文库在 CK 与 N, CK 与 NPK, NPK 与 N 处理间均存在显著性差异。而对于 *nosZ* 基因文库, N 和 NPK 与 CK 处理相比呈现出了显著性差异, N 与 NPK 之间的差异没有达到显著水平。上述结果表明长期施用化肥对水稻土细菌的群落结构及硝化和反硝化细菌组成产生了明显的影响, 但这种影响因基因类型而异。

关键词:水稻土; 长期施肥; 细菌多样性; *amoA*; *nosZ*

文章编号: 1000-0933(2009)11-6142-06 中图分类号: Q939, Q78 文献标识码: A

Effect of fertilization on bacterial community, genetic diversity of *amoA* and *nosZ* genes in paddy soil

CHEN Zhe^{1,2}, CHEN Chun-Lan^{1,2}, QIN Hong-Ling¹, WANG Xia^{1,3}, WU Min-Na¹, WEI Wen-Xue^{1,*}

1 Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, ChangSha 410125, China

2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(11): 6142 ~ 6147.

Abstract: Polymerase Chain Reaction (PCR) and DNA sequencing techniques were applied to explore the effects of long-term fertilization on the community of bacteria and diversity of nitrifying and denitrifying bacteria in paddy soil. The analyses were based on the sequence libraries of 16S rDNA, *amoA* and *nosZ* genes. The Shannon Indices indicated that the diversity of soil bacteria and *amoA* gene of N treatment was lower than that of CK and NPK treatments, whereas the diversity of *nosZ* gene was opposite while the highest diversity occurred in N treatment. The LUBSHUFF statistical analyses demonstrated that both bacterial 16S rDNA and *amoA* gene libraries of CK, N and NPK treatments were significantly different from each other. As to the *nosZ* gene libraries, N and NPK treatments were remarkably different from CK, however, no significant difference was found between N and NPK treatments. It inferred that the application of chemical fertilizers influenced the community structure of bacteria and the functional genes of *amoA* and *nosZ*.

Key Words: paddy soil; fertilization; bacterial diversity; *amoA*; *nosZ*

基金项目:国家自然科学基金资助项目(40771115); 中国科学院百人计划资助项目(KZCX2-YW-BR-01); 国家“十一五”科技支撑计划重点资助项目(2008BADA7B07)

收稿日期: 2008-11-25; 修订日期: 2009-02-03

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: wenxuewei@isa.ac.cn

土壤中微生物数量庞大,作用复杂,在土壤生物地球化学过程研究中据有重要地位^[1,2]。由于传统的研究方法和手段的限制,对土壤微生物的认识十分有限^[3]。近年来,随着分子生物学技术在环境微生物领域的应用,促进了对微生物种群演变及其环境功能的了解^[4,5]。由于细菌的 16S rDNA 具有多个保守区段,因此被广泛用于土壤及环境样品的细菌多样性研究^[6~8]。土壤氮素循环主要受硝化和反硝化作用所调控,而硝化和反硝化是由微生物驱动的生物化学过程。*amoA* 基因控制硝化作用的第一步反应: NH_3 氧化成 NH_2OH , 是硝酸盐形成的关键反应之一。*nosZ* 基因在反硝化过程中调控着 N_2O 转化成 N_2 的关键环节,因而土壤中含有上述两个基因的功能微生物种群结构及其演变规律受到广泛关注^[9~14]。

长期以来,施肥对提高作物产量起着非常重要的作用,随着化学肥料的大量投入,其副作用也凸显出来,如引起土壤酸化、板结及养分失衡等。然而有关施肥对土壤微生物种群的影响,尤其是对功能微生物种群的了解很少。Enwall 等^[15]研究了有机和无机肥对旱地土壤反硝化基因 *nosZ* 的影响时发现,施用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和污泥的土壤 *nosZ* 基因群落结构有明显差异,而施用 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 粪肥与不施肥土壤的 *nosZ* 群落结构相似;Chu 等^[14]研究小麦施肥发现,施用氮肥的土壤 *amoA* 基因的多样性和硝化作用均高于不施氮肥的土壤。而 Ogilvie 等^[16]最近提出,施用 NH_4NO_3 和有机肥对旱地土壤细菌 16S rDNA 的群落结构没有明显影响。但施肥制度对水稻土微生物和功能基因多样性的影响很少有报道。

本研究以中国科学院桃源农业生态试验站水稻长期施肥定位试验为基础,通过分子生物学技术研究不同施肥制度对土壤的细菌群落(16S rDNA),硝化基因 *amoA* 和反硝化基因 *nosZ* 多样性的影响,探讨化学肥料对水稻土细菌多样性以及硝化和反硝化菌的影响机理。

1 材料与方法

1.1 土壤样品采集

土壤样品采自中国科学院桃源农业生态试验站施肥制度长期定位试验田,海拔高度 89m。土壤为青隔黄泥,母质为第四纪红土,从 1990 年至今每年均种植早稻和晚稻。施肥制度实施前土壤基本肥力性状为:有机 C $15.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,全 N $1.88 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,全 P $0.60 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,全 K $12.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,速效 P $16.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,速效 K $74.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,pH 5.74。本研究采集不施肥对照(CK)、氮肥(N)和氮磷钾(NPK)3 个处理土壤样品,供试化肥为尿素、过磷酸钙和氯化钾。施用量为:N $182.3 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$,P $39.3 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$,K $197.2 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 。小区面积 33 m^2 ,采用五点取样法取 0~15 cm 土壤并混匀,一部分土样(约 200g)用液氮冷冻后 -80°C 保存,供分子生物学研究,另一部分土样用做常规分析。土壤样品的理化性状见表 1。

表 1 3 种施肥处理土壤的理化性质

Table 1 The physical and chemical properties of the soil samples from the three fertilization treatments

处理 Treatments	有机质 Organic matter ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	$\text{NO}_3^- - \text{N}$ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	$\text{NH}_4^+ - \text{N}$ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	pH (H_2O)
CK	$31.26 \pm 1.96\text{ba}$	$0.16 \pm 0.02\text{c}$	$3.35 \pm 0.91\text{b}$	$5.17 \pm 0.14\text{a}$
N	$34.32 \pm 1.78\text{ab}$	$3.16 \pm 0.2\text{a}$	$6.07 \pm 1.18\text{a}$	$5.17 \pm 0.18\text{a}$
NPK	$37.21 \pm 1.47\text{a}$	$1.27 \pm 0.03\text{b}$	$3.20 \pm 0.49\text{b}$	$5.10 \pm 0.15\text{a}$

a 平均值 $\pm$ 标准偏差 ($n=3$); 相同的字母代表同一项数值差异不显著 ($P < 0.05$) mean $\pm$ SD ($n=3$); Values within the same column followed by the same letter do not differ at $P < 0.05$

1.2 DNA 提取

土壤 DNA 提取采用 SDS-GITC-PEG 方法^[17],并进行适当修改:称取 0.5g 土样放入 2mL 离心管中,SDS 裂解液,异硫氰酸胍,2 $\times$ CTAB 溶液的加入量分别改为 800 μL ,200 μL ,900 μL ,加入氯仿-异戊醇后离心速度改为 15,000g,10min。其它操作步骤不变。

1.3 目的基因的 PCR 扩增

细菌 16S rDNA, *amoA* 和 *nosZ* 基因片断扩增所用的引物见表 2。50 μL PCR 反应体系包含 10 $\times$ PCR bufer 5 μL ; 10 mmol L^{-1} dNTP 2 μL , 10 $\mu\text{mol} \text{L}^{-1}$ 的上下游引物各 2 μL ; TaqDNA 聚合酶 2U; 模板 100ng; 加灭菌双蒸馏

水至 50μL。PCR 反应条件如下:

(1) 16S rDNA:95℃,预变性 5min;40 个循环为 95℃ 30s,50℃ 45s,72℃ 1min;72℃ 终延伸 10min。扩增产物长度为 1050bp。

(2) 硝化基因 *amoA*:95℃,预变性 5min;45 个循环为 95℃ 30s,48℃ 45s,72℃ 1min;72℃ 终延伸 10min。扩增产物长度为 575bp。

(3) 反硝化基因 *nosZ*:95℃,预变性 5min;40 个降落 PCR 循环为 95℃ 30s,45~50℃ 45s,72℃ 1min,前两个循环退火温度为 60℃,接着 55℃ 5 个循环,52℃ 5 个循环,50℃ 30 个循环;72℃ 终延伸 10min。扩增产物长度为 659bp。

1.4 扩增产物的克隆和测序

1.0% 琼脂糖电泳检测 PCR 扩增产物,利用试剂盒(Wizard SV gel and PCR clean-up system, Promega)回收目标片段。pGEM-T(Promega)载体试剂盒对回收的 PCR 产物进行克隆。挑选白斑,用 M13F 和 M13R 引物对克隆产物进行 PCR 扩增,筛选含目标片段的克隆进行测序(Invitrogen 公司)。

1.5 多样性分析

采用 Shannon 多样性指数: $H = - \sum (Pi) (\ln Pi)$; Pielou 均匀度指数: $E = H/H_{\max}$ (其中 $H_{\max} = \ln S$) 以及稀疏曲线(EstimateS win7.51)进行多样性分析^[18~20]。P 代表属于某个 OTU 的个体在全部个体中的比例。

1.6 LUBSHUFF 分析处理间差异情况

利用 LUBSHUFF 软件比较不同的施肥处理下,微生物或功能基因多样性是否存在差异。此软件^①允许比较两个处理克隆文库间的差异,并设定在 95% 的值信度区间内,如果 $P < 0.05$,说明两个处理间存在显著性差异, $P > 0.05$ 则说明两个处理间没有显著性差异^[21]。

2 结果

2.1 多样性指数分析

利用上述简并引物成功扩增了细菌 16S rDNA, *amoA* 和 *nosZ* 基因,扩增产物片段大小与设计相符,电泳图上可看到清晰的目的条带。将回收产物进行连接转化和培养,筛选出含有目标片段大小的克隆进行测序,通过 Clustal W 软件比较 DNA 序列的相似性,将相似性大于 98% 的序列归为同一种可操作分类单元(OTU)^[22,23]。对于细菌 16S rDNA,3 种施肥处理 CK, N 和 NPK 均挑选 150 个克隆,测序分析后得到的 OTUs 分别为 117, 132 和 148,序列间的相似度在 60%~98% 之间。Shannon 多样性和 Pielou 均匀度指数显示, NPK 处理的细菌多样性和均匀度最高, N 处理次之, CK 处理的细菌多样性和均匀度最低(表 3)。

从 3 种施肥处理的土壤中共获得了 147 个 *amoA* 的 OTUs 和 161 个 *nosZ* 的 OTUs,序列间的相似度均在 58%~98% 之间。BLAST 搜索的结果显示,从水稻土中克隆的 *amoA* 基因序列与已知硝化细菌不具有明显的亲缘关系,主要是与不可培养的硝化细菌 *amoA* 基因有较好的同源性,同源性处于 72%~100% 之间。从水稻

表 2 用于扩增细菌 16S rDNA, *amoA* 和 *nosZ* 基因片段的引物

Table 2 Primer sequences and positions used to amplify bacterial 16S rDNA, *amoA* and *nosZ* fragments

引物 ^a Primer ^a	位点 ^b Position ^b	引物序列 ^c (5'-3') Primer sequences ^c (5'-3')
16S rDNA-F	299-318	ACAYTGGDACTGAGACACGG
16S rDNA-R	1307-1328	GATTACTAGCGATTCCRRCTTC
<i>amoA</i> -F	150-170	CTGGGAYTCTGGMTKGACTG
<i>amoA</i> -R	701-725	AGTARASYTTKCCRARRTACCACCA
<i>nosZ</i> -F	1126-1145	GGICTBGGICCRYTGCCAYAC
<i>nosZ</i> -R1	1864-1884	CATYTCSAKRTGCAKCGCRTG
<i>nosZ</i> -R2	1864-1884	CATYTCSAKRTGCAKGGCRTG

a. 上下游引物的名称分别在最后加上字母 F 和 R, *nosZ* 反向引物分成两条,有一个核苷酸不同; b. 16S rDNA, *amoA* 和 *nosZ* 引物的位置分别用以下三种菌种表示: *Flavobacterium* sp. ANU301 (EF192137), *Nitrosospora briensis* (AAB38709) 和 *Sinorhizobium meliloti* 1021 (AE007253); c. Y = C 或 T; S = C 或 G; V = A, C 或 G; R = A 或 G; B = C, G 或 T; N = A, C, T 或 G a. The forward and reverse primers are indicated by the last letters F and R, respectively. The reverse primer of *nosZ* was divided into two primers with a nucleotide different; b. Positions correspond to 16S rDNA, *amoA* and *nosZ* gene of *Flavobacterium* sp. ANU301 (EF192137), *Nitrosospora briensis* (AAB38709) and *Sinorhizobium meliloti* 1021 (AE007253) respectively; c. Y = C or T; S = C or G; V = A, C or G; R = A or G; B = C, G or T; N = A, C, T or G

① <http://LUBSHUFF.mib.uga.edu/>

土中克隆的 *nosZ* 的部分序列与已知的反硝化菌同源性相对较高,从单施氮肥处理分离出的 5 种特有的 OTUs 与已知反硝化细菌 *nosZ* 基因同源性高达 95% 以上。根据 Shannon 指数,施肥制度对硝化基因 *amoA* 和反硝化基因 *nosZ* 多样性也产生了明显的影响。其中,NPK 处理导致 *amoA* 基因多样性增加,与之相反,施用氮肥使 *amoA* 基因的多样性减少,N 处理土壤的 *amoA* 基因文库的均匀度指数最低(表 3)。施肥对反硝化基因 *nosZ* 的多样性和均匀度的影响不同于 *amoA* 基因,单施氮肥处理导致 *nosZ* 基因多样性和均匀度均高于 NPK 处理(表 3)。

表 3 细菌 16S rDNA,硝化基因 *amoA* 和反硝化基因 *nosZ* 多样性指数
Table 3 Diversity indices of bacterial 16S rDNA, *amoA* and *nosZ*

基因 Genes 处理 Treatments	16S rDNA			<i>amoA</i>			<i>nosZ</i>		
	CK	N	NPK	CK	N	NPK	CK	N	NPK
筛选克隆数目 Screened clones	150	150	150	70	70	70	78	64	75
OTUs	104	119	134	48	38	61	53	57	51
Shannon 指数 Shannon Indices	4.24	4.65	4.90	3.74	3.34	4.00	3.86	4.01	3.79
Shannon 均匀度指数 Shannon Evenness Indices	0.91	0.97	0.99	0.97	0.92	0.97	0.97	0.99	0.96

2.2 稀疏曲线

稀疏曲线的结果与多样性指数基本一致,NPK 处理中细菌 16S rDNA 和硝化细菌 *amoA* 基因的多样性高于 CK 和 N 处理,N 肥处理的 16S rDNA 多样性明显高于 CK,而 *amoA* 基因在 N 处理中的多样性低于 CK。*nosZ* 基因 N 处理的多样性明显高于 CK 和 NPK,后两者之间差别不明显。此外,对于 3 个基因,每种施肥处理的曲线都没有达到平台期,说明水稻土中细菌及含有 *AmoA* 和 *NosZ* 的细菌多样性很高(图 1)。

2.3 LUBSHUFF 比较处理间的差异

采用 LUBSHUFF 软件分析处理间序列差异的显著性。结果显示,16S rDNA 和 *amoA* 基因文库在 CK 与 N,CK 与 NPK,NPK 与 N 处理间均存在显著性差异($P<0.05$)。对于反硝化 *nosZ* 基因的克隆文库,两个施肥处理(N 和 NPK)与对照相比达到显著性差异,而 N 和 NPK 处理间差异不显著(表 4)。

表 4 细菌 16S rDNA,*amoA* 和 *nosZ* 基因文库在不同施肥处理间的差异分析

Table 4 The value of ΔC and significant differences (P) of paired comparison among different fertilization treatments of 16S rDNA, *amoA* and *nosZ* libraries based on LIBSHUFF

处理 Treatments		16S rDNA		<i>amoA</i>		<i>nosZ</i>	
		CK	N	CK	N	CK	N
N	LUBSHUFF(ΔC)	0.287	/	0.176	/	0.759	/
	P	0.002 *a	/	0.020 *	/	0.004 *	/
NPK	LUBSHUFF(ΔC)	0.722	0.615	0.33	0.425	0.250	0.399
	P	0.002 *	0.002 *	0.004 *	0.004 *	0.042 *	0.053

* 代表 $P<0.05$ 水平下的显著性差异 represent the significant differences at the statistical level of $P<0.05$

3 讨论

比较 3 种施肥处理土壤细菌的 Shannon 指数(多样性),NPK 明显高于 N 和 CK 处理,从稀疏曲线也可看出同样的趋势。由于施用 NPK 肥料能同时满足水稻对这三大营养要素的需求,作物的生长量和产量均显著高于其它处理^[24,25],其发达的根系及其分泌物可能促进了微生物的繁衍,因而维持了较高的多样性。而长期施用氮肥导致土壤养分不平衡,氮素过多而磷钾等营养元素不足,严重制约植物生长并导致土壤性质恶化,对细菌的生长也有一定的影响^[26]。然而,氮肥处理的 16S rDNA 多样性高于 CK 处理,可能是由于长期单施氮肥刺激了某些能适应这种环境的细菌的生长和繁殖^[15,27]。LUBSHUFF 结果显示 NPK 和 N 处理的 16S rDNA 文库与 CK 相比都达到了极显著性差异,进一步说明这两种施肥制度明显改变了土壤细菌的群落结构。

长期施肥对土壤功能微生物的种群也产生了一定的影响。与 16S rDNA 相似,NPK 施肥处理获得的氨氧

化细菌(含 *amoA*)的多样性明显高于 N 和 CK 处理。然而与 CK 相比,单施氮肥大幅度降低了 *amoA* 基因的多样性。虽然出现这些现象的原因还不清楚,但由于长期单施氮肥造成土壤养分的不均衡性可能是造成多样性减少的主要原因之一^[23]。此外, $\text{NH}_4\text{-N}$ 测定结果显示,虽然连续 17a 施加氮磷钾肥料,但 NPK 处理的 $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量与 CK 接近,说明该处理中可能有更多硝化细菌存在。这一结果与 He 等和 Phillips 等^[11,23]的研究基本一致。与 16S rDNA 和 *amoA* 基因的多样性结果不同,单施氮肥使 *nosZ* 基因多样性和均匀度明显高于 CK 和 NPK 处理。此外,本文克隆的与已知反硝化细菌的同源性达到 95% 以上的 5 个 OTUs 均来自 N 处理,在 CK 和 NPK 处理中均未发现,说明水稻土长期施用氮肥对反硝化细菌群落的影响独特。Enwall 等^[15]也发现施用氮肥处理诱发出不同的 *nosZ* 分支类群。通过 LUBSHUFF 软件对 *nosZ* 序列组成的统计分析显示,氮肥处理的 *nosZ* 基因文库组成与 CK 有显著性差异(表 4)。施肥处理对 *nosZ* 多样性的影响与文献报道不一致^[15,28],上述研究结果显示长期施用氮肥导致 *nosZ* 多样性降低,但他们均以旱地土壤为试验对象,认为长期施用硫酸铵导致土壤 pH 明显降低是导致反硝化细菌的多样性降低的主要原因。然而,本试验施用的氮肥为尿素,长期施用没有引起土壤 pH 降低(表 1)。以上结果表明,含 *amoA* 和 *nosZ* 基因的硝化和反硝化微生物种群对施肥制度的响应不同。

虽然本文测序的克隆数达 70~150 个,超过大多数文献报道的测序数(一般 30~70 个)^[10],但 16S rDNA, *amoA* 以及 *nosZ* 基因的稀疏曲线均未达到平台期。说明水稻土中含有的细菌,硝化及反硝化功能菌的多样性高。没有达到平台期的另一原因可能是与本文采用的筛选方法不同有关。通常采用的 DGGE、RFLP 等方法筛选差异性核苷酸序列可能排除了一些亲缘关系比较相近的克隆^[12],造成了少量的 OUT 也能到达稀疏曲线平台期的假象。本研究采用了直接测序法,避免了亲缘性相近的序列的遗漏。虽然获得的 OTU 数目增加了,但仍达不到平台期。为深入了解施肥引起的微生物群落改变与养分循环的关系,需要进一步通过 16S rDNA,硝化和反硝化功能基因研究土壤微生物的动态变化过程。

References:

- [1] Tiedje J M, Asuming-Brempong S, Nusslein K, et al. Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology*, 1999, 13, 109—122.
- [2] Girvan M S, Bullimore J, Pretty J N, et al. Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69, 1800—1809.

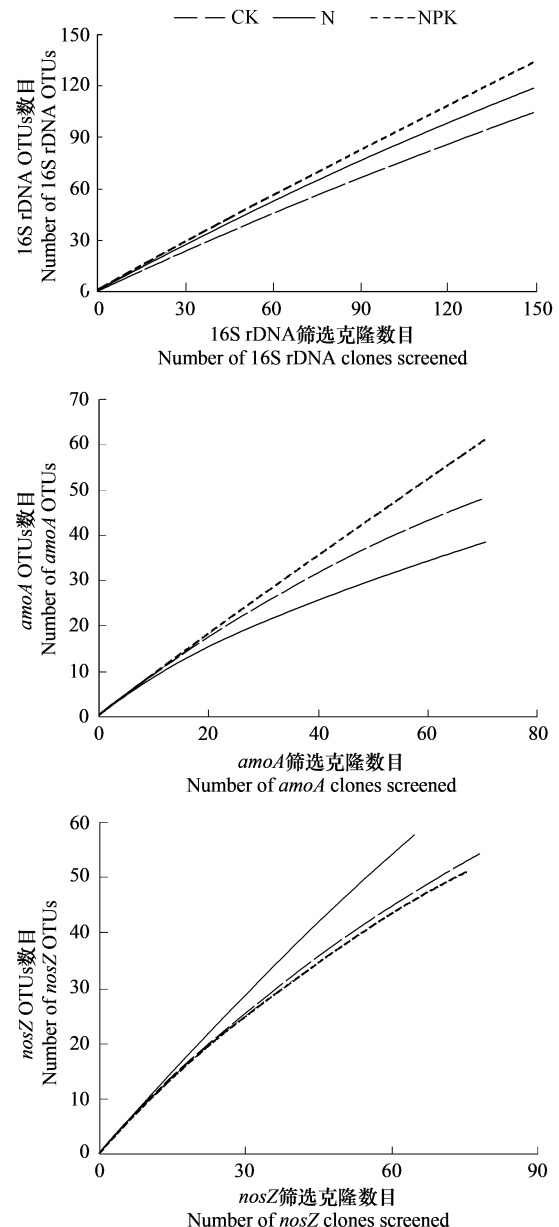


图1 细菌 16S rDNA, *amoA* 和 *nosZ* 克隆文库的稀疏曲线

Fig. 1 Rarefaction curve of clone libraries of bacterial 16S rDNA, *amoA* and *nosZ*

- [3] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic Identification and in-Situ Detection of Individual Microbial-Cells without Cultivation. *Microbiological Reviews*, 1995 59, 143 — 169.
- [4] Theron J, Cloete T E. Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. *Critical Reviews in Microbiology*, 2000, 26, 37 — 57.
- [5] Prosser J I. Molecular and functional diversity in soil micro-organisms. *Plant and Soil*, 2002, 244, 9 — 17.
- [6] Avanissaghajani E, Jones K, Chapman D, *et al.* A Molecular Technique for Identification of Bacteria Using Small-Subunit Ribosomal-Rna Sequences. *Biotechniques*, 1994, 17, 144 — 149.
- [7] Dunbar J, Ticknor L O, Kuske C R. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66, 2943 — 2950.
- [8] Dunbar J, Ticknor L O, Kuske C R. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67, 190 — 197.
- [9] Stres B, Mahne I, Avgustin G, *et al.* Nitrous oxide reductase (nosZ) gene fragments differ between native and cultivated Michigan soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70, 301 — 309.
- [10] Roesch C, Mergel A, Bothe H. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68, 3818 — 3829.
- [11] Phillips C J, Harris D, Dollhopf S L, *et al.* Effects of agronomic treatments on structure and function of ammonia-oxidizing communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66, 5410 — 5418.
- [12] Liu B, Jia G, Chen J, *et al.* A review of methods for studying microbial diversity in soils. *Pedosphere*, 2006, 16, 18 — 24.
- [13] Cavigelli M A, Robertson G P. Role of denitrifier diversity in rates of nitrous oxide consumption in a terrestrial ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33, 297 — 310.
- [14] Chu H Y, Fujii T, Morimoto S, *et al.* Community structure of ammonia-oxidizing bacteria under long-term application of mineral fertilizer and organic manure in a sandy loam soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73, 485 — 491.
- [15] Enwall K, Philippot L, Hallin S. Activity and composition of the denitrifying bacterial community respond differently to long-term fertilization. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71, 8335 — 8343.
- [16] Ogilvie L A, Hirsch P R, Johnston A W B. Bacterial diversity of the Broadbalk 'classical' winter wheat experiment in relation to long-term fertilizer inputs. *Microbial Ecology*, 2008, 56, 525 — 537.
- [17] Huang S H, Lu J. Research progress in nitrous oxide emissions from agricultural soil. *Chinese Journal of Soil Science*, 2004, 35(4), 26 — 29.
- [18] Ma K P, The methods for measuring bio-diversity (a). *Chinese Biodiversity*, 1994, 3, 162 — 168.
- [19] Ma K P, Liu Y M, The methods for measuring bio-diversity (b). *Chinese Biodiversity*, 1994, 4, 231 — 239.
- [20] Hill T C J, Walsh K A, Harris J A, *et al.* Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 43, 1 — 11.
- [21] Singleton D R, Furlong M A, Rathbun S L, *et al.* Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67, 4374 — 4376.
- [22] Prieme A, Braker G, Tiedje J M. Diversity of nitrite reductase (nirK and nirS) gene fragments in forested upland and wetland soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68, 1893 — 1900.
- [23] He J Z, Shen J P, Zhang L M, *et al.* Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. *Environmental Microbiology*, 2007, 9, 3152 — 3152.
- [24] Zhou W J, Wang K R, Zhang G Y, *et al.* Effect s of inorganic-organic fertilizer incorporation on productivity and soil fertility of rice cropping system in red soil area of China. *Scientia Agricultura Sinica*, 2002, 1109 — 1113.
- [25] Zhou W J, Wang K R, Xie X L. Research on fertilization regime and soil sustainable productivity. *Research of Agricultural Modernization*, 1998, 388 — 391.
- [26] McAndrew D W, Malhi S S. Long-Term N Fertilization of a Solonchic Soil - Effects on Chemical and Biological Properties. *Soil Biology & Biochemistry*, 1992, 24, 619 — 623.
- [27] Parkin T, Sexstone A J, Tiedje J M. Adaption of denitrifying populations to low soil pH. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, 49, 1053 — 1056.
- [28] Dambreville C, Hallet S, Nguyen C, *et al.* Structure and activity of the denitrifying community in a maize-cropped field fertilized with composted pig manure or ammonium nitrate. *Fems Microbiology Ecology*, 2006, 56, 119 — 131.

参考文献:

- [17] 杨建, 洪葵. 红树林土壤总 DNA 不同提取方法比较研究. *生物技术通报*, 2006(增刊), 366 ~ 371.
- [18] 马克平. 生物群落多样性的测度方法 I. α 多样性的测度方法(上). *生物多样性*, 1994, 3, 162 ~ 168.
- [19] 马克平, 刘玉明. 生物群落多样性的测度方法 I. α 多样性的测度方法(下). *生物多样性*, 1994, 4, 231 ~ 239.
- [24] 周卫军, 王凯荣, 张光远, 等. 有机与无机肥配合对红壤稻田系统生产力及其土壤肥力的影响. *中国农业科学*, 2002, 1109 ~ 1113.
- [25] 周卫军, 王凯荣, 谢小立. 红壤稻田施肥制度与土壤持续生产力关系的研究. *农业现代化研究*, 1998, 388 ~ 391.