

长期施肥制度对稻田土壤反硝化细菌 群落活性和结构的影响

陈 哲^{1,2}, 袁红朝^{1,2,*}, 吴金水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)

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,研究了 3 种长期施肥制度(对照不施肥-CK, 化学施肥-NPK, 化学施肥 + 有机肥-NPKOM)下土壤反硝化速率的差异。同时,以硝酸还原酶基因(*narG*)作为反硝化细菌的功能标志物,分析了施肥对反硝化细菌群落结构和多样性的影响。结果表明,长期施用有机肥的土壤反硝化速率,反硝化菌多样性都高于对照和施用化肥处理。从 3 个处理的土壤样品中共获得 35 个 *narG* 基因的可操作分类单元(OTU)主要分布在两个簇,与变形菌门(*Proteobacteria*)和放线菌门(*Actinobacteria*)的反硝化细菌有一定的亲缘关系,均为首次从土壤中克隆。Shannon 多样性指数显示,NPKOM 处理的 *narG* 基因多样性最高,CK 处理次之,NPK 处理最低。LUBSHUFF 软件对 *narG* 基因群落组成的分析显示,施有机肥后含 *narG* 基因的细菌群落组成与 CK 之间有显著性差异($P < 0.05$),而化肥(NPK)没有产生显著影响。实验结果为进一步研究亚热带地区水稻土反硝化作用及反硝化功能菌提供了重要的依据。

关键词:水稻土;施肥;反硝化速率;*narG* 基因;多样性

文章编号:1000-0933(2009)11-5923-07 中图分类号:Q939, Q78 文献标识码:A

Activity and composition of the denitrifying bacterial community respond differently to long-term fertilization

CHEN Zhe^{1,2}, YUAN Hong-Zhao^{1,2,*}, WU Jin-Shui¹, 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

Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(11): 5923 ~ 5929.

Abstract: The objective of this study was to explore the long-term effects of organic and inorganic fertilizers on activity and composition of the denitrifying communities in paddy soil. The soil samples were collected from the following treatments: CK (no fertilizer), NPK (nitrogen, phosphorus and potassium fertilizers) and NPKOM (NPK plus organic matter), which were established in 1990. The activity was measured in terms of potential denitrification rate and *narG* gene was used as the functional marker of the denitrifying community. The results showed that the potential denitrification rate was higher in plot treated with organic fertilizer than in those with mineral fertilizer and no fertilizer, and this finding was positively correlated to soil organic matter content, MBC, and MBN. Totally 35 OTUs were obtained and identified as *narG* from the three treatments. Recovered *narG* sequences were mainly grouped in two clusters and related to *narG* gene of the denitrifiers from *Proteobacteria* and *Actinobacteria*. The LUBSHUFF statistical analyses demonstrated that *narG* gene library of NPKOM treatment was significantly different from CK, while no significant difference was found between NPK and CK, NPK and NPKOM treatments. It inferred that the combined application of chemical and organic fertilizers remarkably influenced the community composition of *narG*-containing bacteria.

基金项目:中国科学院百人计划资助项目(KZCX2-YW-BR-01);国家自然科学基金资助项目(40771115);中国科学院重点方向资助项目(KZCX2-YW-423)

收稿日期:2009-01-09; 修订日期:2009-02-17

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

Key Words: paddy soil; fertilization; denitrifying enzyme activity; *narG* gene; diversity

硝化和反硝化作用是土壤 N_2O 产生的主要过程^[1],受多种因素的影响,如施肥制度,土壤理化性质,温度等^[2~6]。氮肥的施入不仅促进了反硝化细菌的活性,而且相当多的氮素通过反硝化作用损失^[7~10]。近年来,随着分子生物学技术的迅速发展和应用,使深入研究土壤微生物种群与养分循环过程的关系成为可能。然而,利用细菌 16S rDNA 分析反硝化细菌群落有明显缺陷,因为反硝化细菌不是分类学上的特定类群,而是广泛分布在众多种属之中的复杂体系^[11]。因此,需要借助编码反硝过程的关键功能基因对反硝化细菌菌群进行研究。微生物的 *narG* 基因编码的硝酸还原酶控制着反硝化过程的第一步反应,即催化 NO_3^- 还原成 NO_2^- 。因此 *narG* 基因也被许多学者用于研究反硝化细菌的作用机理。Enwall 等^[12]研究有机和无机肥对旱地土壤 *narG* 的影响时发现,施用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和污泥的土壤 *narG* 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 *narG* 群落结构相似;Dambreville 等^[13]在种植玉米的土壤中发现,施用化学肥料和混合堆肥后 *narG* 基因群落组成发生了改变;但对于水稻土,尤其是不同施肥制度对水稻土中反硝化细菌群落及基因多样性的影响很少见报道。

本文利用长期定位施肥试验,研究了稻田土壤施肥模式对土壤反硝化细菌群落结构影响。

1 材料与方法

1.1 土壤样品采集

中国科学院桃源农业生态试验站(110°72'E, 28°52'N)水稻长期施肥制度定位试验始于 1990 年,试验点的海拔高度 89m,土壤为青隔黄泥,母质为第四纪红土,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 C15.4 g·kg⁻¹,全 N1.88 g·kg⁻¹,全 P0.60 g·kg⁻¹,全 K12.8 g·kg⁻¹,速效 P16.2 g·kg⁻¹,速效钾 74.3 g·kg⁻¹,pH 5.74。本研究采集不施肥对照(CK)、氮磷钾(NPK)和氮磷钾加有机肥(NPKOM)3 个处理的土壤样品。供试化肥为尿素、过磷酸钙和氯化钾,有机肥为紫云英和稻草还田。化肥施用量为:N 182.3 kg·hm⁻²,P 39.3 kg·hm⁻²,K 197.2 kg·hm⁻²,小区面积 33 m²,重复 3 次。土壤样品采于 2007 年 3 月(土壤处于冬闲期),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℃ 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。

1.2 反硝化速率(DEA)测定

参照 Pell 等^[14]的方法:称取 25g 解冻的土样放入 250 mL 广口瓶中,室温过夜。次日加入 25 mL 底物(1mmol L⁻¹葡萄糖和 1mmol L⁻¹ KNO₃),反复用氮气填充 3 次,密封,添加 10% 左右的乙炔气体,土壤样品放入 25℃ 摇床上振荡培养 6 h(225r min⁻¹),每小时收集 1 次气体,气相色谱检测(Hewlett 5890; Packard series II),所用色谱柱为 Poraplot Q (3m×2mm)。

1.3 DNA 提取

土壤 DNA 提取采用 SDS-GITC-PEG 方法^[15],并进行适当修改,修改后的方法所用土壤样品的用量为 0.5 g,使用土壤和试剂的量均减少到原方法的 1/20,更便于实验室操作。

1.4 引物设计和 PCR 反应

narG 基因的简并引物:用于设计引物的 24 种已知的不同种属的 *narG* 基因蛋白序列来自 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),包含的基因蛋白序列号有 NP_252564, AAB50620, YP_001171435, YP_263899, YP_435153, YP_960347, AAT47523, YP_310854, NP_707133, YP_402918, NP_455739, ZP_01534411, YP_001176789, YP_741846, YP_001257334, YP_223631, YP_983978, NP_902213, YP_439445, NP_961554, AAS04937, AAY17360, NP_630616, CAA20632 等,运用 Clustal W 软件分析后做 *Alignment* 并根据保守的氨基酸片段(FYDWYA / CD 和 HYVGQEK)设计引物。*narG* 基因上游引物 5'-T(C/T) TA (C/T) GA (C/T) TGG TA (C/T) GC(A,C/T) GA -3';下游引物 5'-TT(C/T) TC(C/T) TG(A,G,C/T) CC(A,G,C/T) AC(A/G) TA(A/G) -3' (Invitrogen 公司合成)。扩增目的基因的片断长度为 1076bp。

PCR 扩增反应体系(50 μL):10 $\times$ 缓冲液 5 μL ,dNTP (10 m mol L^{-1}) 2 μL ,上游引物 (100 $\mu\text{L mol L}^{-1}$) 1 μL ,下游引物(100 $\mu\text{L mol L}^{-1}$) 1 μL , DNA 60 ~ 100 ng,Taq DNA 聚合酶 2U,补水至 50 μL 。

降落 PCR 扩增程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 S,42 $^{\circ}\text{C}$ / 41 $^{\circ}\text{C}$ /40 $^{\circ}\text{C}$ /39 $^{\circ}\text{C}$ 30 S,72 $^{\circ}\text{C}$ 45 S,1 个循环;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 S,38 $^{\circ}\text{C}$ 30 S,72 $^{\circ}\text{C}$ 45 S,40 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 扩增反应仪:Eppendorf Mastercycler。

1.5 克隆和测序及序列分析

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)回收目标片断。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,依次用 MspI, HaeIII 和 TaqI 酶切分析,挑选有差异的克隆进行测序(Invitrogen 公司)。将所得序列在 NCBI 中进行同源性比对(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>),然后利用 Clustal $\times$ 1.83 和 Mega 4.0 中的邻接法(Neighbor-Joining)建立 *narG* 基因的系统发育树。

将测序得到的序列提交 GenBank 数据库,数据库登录号为 EU873021-EU873032 和 EU873044-EU873070。

1.6 LUBSHUFF 分析处理间差异情况

利用 LUBSHUFF 软件(<http://LUBSHUFF.mib.uga.edu/>)比较不同的施肥处理下,微生物群落组成是否存在差异。此软件允许比较两个处理克隆文库间的差异,并设定在 95% 的置信度区间,如果 $P < 0.05$,说明两个处理的群落组成存在显著性差异, $P > 0.05$ 则说明两个处理间没有显著性差异^[16]。

1.7 统计分析

采用 SPSS13.0 软件对土壤理化性质和反硝化速率的测定值进行显著性分析(One-way ANOVA, LSD 检验)。

2 结果

2.1 土壤的理化性质和反硝化速率

3 种土壤样品的部分理化性质见表 1。从表 1 可以看出,施用有机肥处理的土壤有机质含量,微生物量碳和微生物量氮均显著高于 CK 和 NPK 处理,且变化趋势一致,即 NPKOM > NPK > CK。同样,长期不同施肥制度的土壤反硝化速率也发生了较大的分异,施用有机肥后土壤的反硝化速率显著高于 CK 和 NPK 处理,NPK 处理的土壤反硝化速率略高于 CK,但差异没有达到显著水平(图 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)	微生物量 C MBC ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	微生物量 N MBN ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)
CK	31.3 $\pm$ 1.96ca	0.16 $\pm$ 0.02b	3.35 $\pm$ 0.91a	5.17 $\pm$ 0.14a	893 $\pm$ 1.16c	75.1 $\pm$ 1.72b
NPK	37.2 $\pm$ 1.47b	1.27 $\pm$ 0.03a	3.20 $\pm$ 0.49a	5.10 $\pm$ 0.15a	1026 $\pm$ 2.25b	79.5 $\pm$ 1.12b
NPKOM	47.2 $\pm$ 0.97a	1.26 $\pm$ 0.06a	4.74 $\pm$ 0.33a	5.05 $\pm$ 0.38a	1233 $\pm$ 0.69a	116.1 $\pm$ 2.01a

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 $P < 0.05$

2.2 多样性和系统发育分析

利用简并引物从 3 种施肥处理的稻田土壤 DNA 样品中成功扩增了 *narG* 基因,从电泳图上可以看出 500bp 和 900bp 附近有清晰的条带(图 2),显然 900bp 符合设计片断的长度,因此将此处的条带回收后进行连接转化和培养,筛选出含有目标片断大小的克隆进行酶切。

从 CK,NPK,NPKOM 处理的土壤中分别获得了 11 个,9 个,15 个 OTUs。在 3 种施肥制度的土壤样品中,很大部分的 OTUs 都是由单个克隆产生的,处理之间交叉的 OTU 仅有 2 个,也就是说,多数克隆具有独特的 RFLP 谱带类型。说明各个处理中的 *narG* 基因具有高度的多样性。其中,CK 和 NPK 处理中有一个明显的优势种群(EU873052),这一优势种群分别占 CK 和 NPK 总克隆数的 33% 和 23%,而在 NPKOM 处理中没有克隆

到此菌种。Shannon 多样性指数显示,NPKOM 处理的细菌多样性最高,CK 处理次之,NPK 处理的细菌多样性最低。3 种施肥处理的细菌均匀度指数与多样性趋势略有差异,即 NPKOM 和 CK 的均匀度基本一致,而 NPK 仍然是最低的(表 2)。

将所有的 OTU 进行序列测定,与 GenBank 数据库中的序列进行比对,在数据库中没有找到完全相似的序列,因此这些序列可能均是以前没有报道过的基因序列。在 GenBank 中选取了部分与测定序列相似性较高的 *narG* 基因序列,通过 Mega 软件将这些序列构建系统发育树(图 3)。*narG* 基因在系统发育图上主要分为 2 个不同的簇:Cluster1 和 Cluster2,这些序列都与已知的反硝化细菌具有较远的亲缘关系,为 2 个不同的 *narG* 基因种群。Cluster1 包含 27 个 OTU,核酸序列的相似性在 67% ~ 98% 之间,与属于 *beta-Proteobacteria* 的 *Dechlorosomas agitate* 聚类在一起,但相似性较低仅有 60% 左右。3 种施肥制度所获得的 *narG* 基因克隆在 Cluster1 中的分布有差异。NPK、NPKOM 在 Cluster1 中所占的比例较大,分别为 89% 和 87%,CK 略少,占 73%。Cluster2 包含 4 个 OTU,序列之间的相似性在 63% ~ 73% 之间,与属于 *Actinobacteria* 的 *Rhodococcus equi* 聚类在一起,相似性约为 58%。由于所含的 OTU 较少,很难判定施肥造成的影响。剩余的两个 OTU 分别是来自 CK 和 NPKOM 处理,其中 EU873032 (CK) 与已知反硝化细菌的遗传距离较远;EU873070 (NPKOM) 与属于 *alpha-Proteobacteria* 的 *Hyphomonas neptunium* ATCC 聚类在一起,有 72% 的相似性。

2.3 LUBSHUFF 比较处理间的差异

LUBSHUFF 软件统计结果显示,*narG* 克隆文库仅在 CK 与 NPKOM 处理之间存在显著性差异,说明化肥和有机肥的联合施用能够对含 *narG* 基因的反硝化细菌群落组成造成显著性的影响,而其它处理之间(CK 与 NPK,NPK 与 NPKOM) *narG* 克隆文库的差异没有达到显著水平,说明与对照相比,单施化肥(NPK)不会对 *narG* 群落造成较大影响(表 3)。

3 讨论

生物的反硝化作用是由微生物体内相关的酶所调控的,反硝化速率是衡量反硝化过程酶活性的指标,同样也是反映土壤反硝化细菌群落活性的重要指标。施肥是我国稻田土壤维持高产及其可持续利用的主要农业措施之一。本研究发现与化学肥料相比,施用有机肥能够促进土壤反硝化速率,而相应的反硝化细菌群落组成及多样性也显著增加。本文 3 个处理土壤的反硝化速率顺序依次是 NPKOM > NPK > CK,其中 NPKOM 处理显著高于 CK 和 NPK 处理,这一结果与前人的研究一

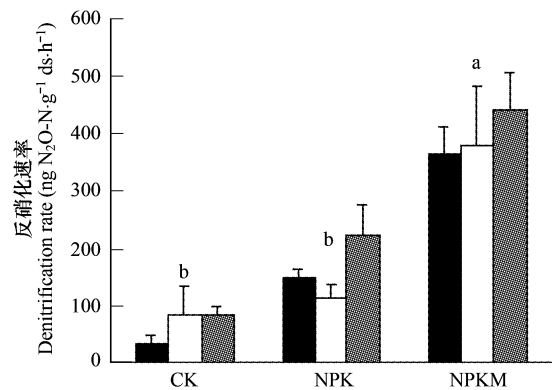


图 1 3 种施肥处理土壤样品的反硝化速率($n=3$)

Fig. 1 Potential denitrification rates of the soils from the three treatments ($n=3$)

图柱的 3 种颜色代表每个处理 3 个重复的测定值;图柱上相同的字母代表差异不显著($P < 0.05$); ds: 干土 Three colors of the column represent values of three repeats of each treatment; The same letters above the bars indicate treatments without significant differences ($P < 0.05$); ds: dry solid

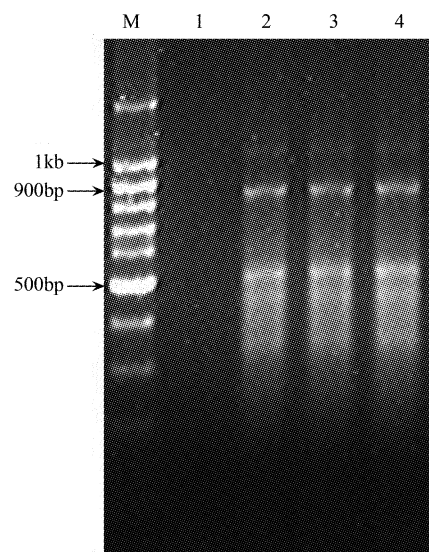
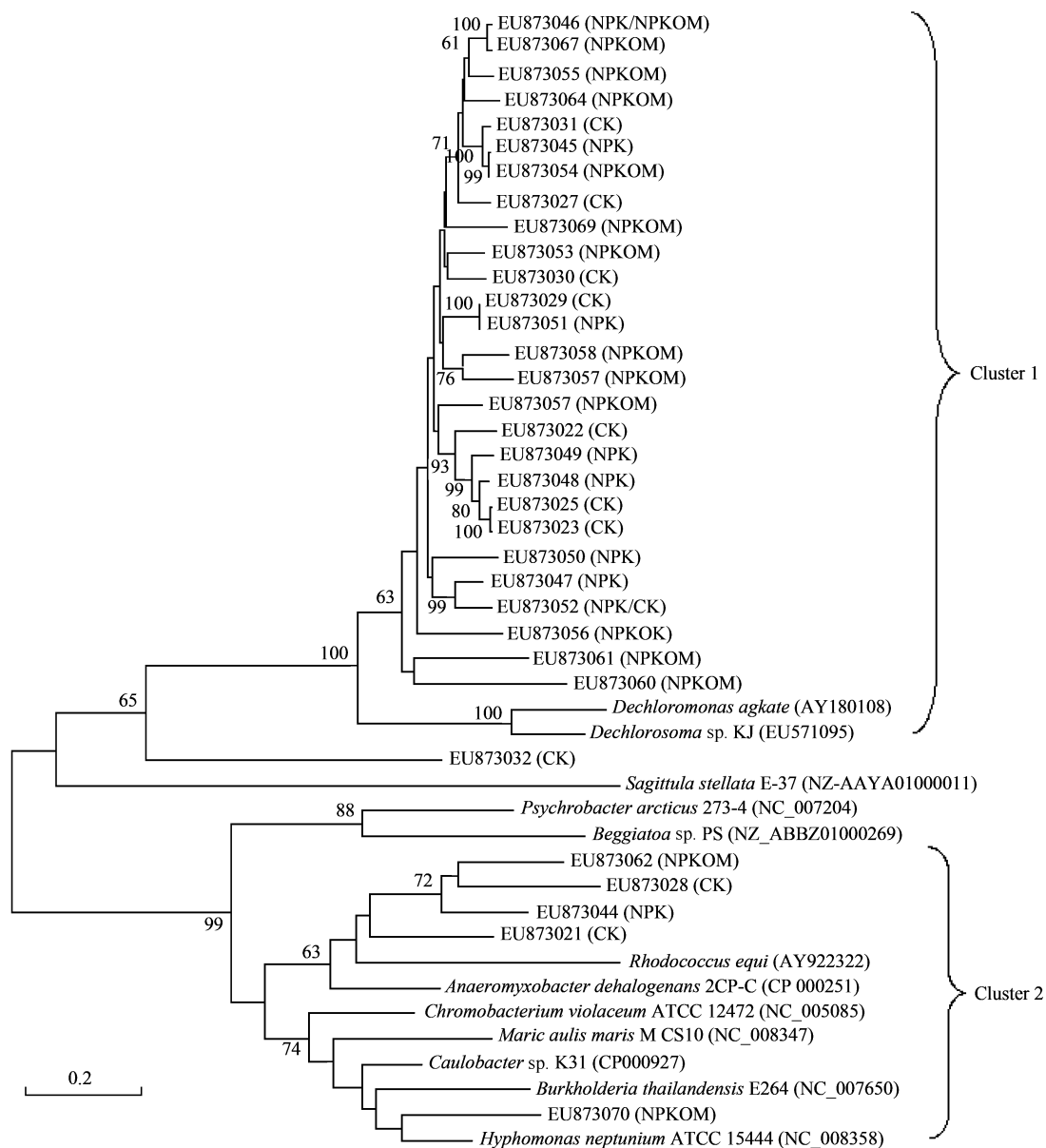


图 2 3 种施肥处理的稻田土壤 DNA 样品 *narG* 基因扩增结果

Fig. 2 Agarose gel for PCR products of *narG* gene fragments from the soil DNAs

M: 100bp DNA 分子标记; 1: 无模板对照; 2~4: 分别为 CK, NPK, NPKOM 处理的 *narG* 基因 PCR 产物 M represents DNA marker, lane 1: negative control, without template DNA; lane 2, 3, 4: PCR products of *narG* from CK, NPK, NPKOM treatments, respectively

图3 *narG* 基因系统发育树(用邻接法构建)Fig. 3 Phylogenetic tree for *narG*

各支上的数字是1000次重抽样分析的支持百分比,小于50的省略;括号前的数字为基因序列在Genbank数据库中的登录号,括号中的字母代表施肥处理的缩写。Phylogenetic distances were determined by neighbor-joining analysis; Values indicate the percentage of 1000 replicate trees supporting the branching order; values below 50 are omitted. Genbank accession number followed by treatment abbreviation in parentheses

致^[12,13,17]。有机肥对反硝化作用和反硝化细菌活性及群落结构的刺激可能是添加了可利用的有机碳^[18],导致C/N比的增加。此外,绝大多数的反硝化细菌是化能异养型的,有机质能够为反硝化细菌的细胞生长和代谢提供丰富的物质和能量来源,调控土壤反硝化细菌群落的代谢功能和结构,使反硝化细菌的多样性和丰度增加,相应地提高了反硝化作用;Fliebbach等^[19]的研究也表明向土壤中施加有机物料对土壤微生物具有诱导效应,微生物数量和多样性均有所增加。另一方面,有机质能激活微生物的呼吸作用,加快了土壤氧的消耗,加速了土壤厌氧环境的形成,间接地增加了土壤生物反硝化速率。

narG 基因多样性指数依次为 NPKOM > CK > NPK,与反硝化速率的变化趋势不完全一致。LIBSHUFF 对

narG 克隆文库的分析也显示不同施肥处理的 *narG* 群落组成的差异与反硝化速率不一致。其他学者在研究农田和湿地等的反硝化功能细菌群落结构与反硝化速率时发现类似现象^[11~13,20]。由于反硝化速率测定的是包含了细菌和真菌等多种微生物作用的总和,而 *narG* 基因多样性和群落组成的分析中只针对于细菌反硝化作用的第一步,即由硝酸根还原成亚硝酸根。另外,Chèneby 等^[23]发现农田土壤中有 35% 的 NO_3^- 还原细菌不能被扩增出来,尽管利用最近的 NCBI 更新数据库中的序列设计引物,但仍然可能会有遗漏现象。然而,Rich 等^[22]对森林和草地土壤的研究中发现两者有一定的相关性。因此,反硝化速率与反硝化功能菌群落的关系可能受多种因素的影响。

本文克隆得到的 *narG* 基因主要与 *Proteobacteria* 和 *Actinobacteria* 聚类在一起,这一结果与 Enwall^[20]等在长期施肥的谷类种植地中发现的 *narG* 基因群落类似,而 Chèneby 等^[23]在玉米种植的土壤中发现 *narG* 菌群主要为 *Firmicutes*, *Theactinomycetes* 和 *Proteobacteria*。反硝化细菌多样性研究结果的差异可能是由于研究区域的作物种植类型和土壤性质不同所致,其中土壤 pH 值的差异对反硝化细菌群落组成的影响受到广泛关注,本研究及上述 Enwall 等的供试土壤均为酸性 (pH < 6.2),而 Chèneby 等研究区域的土壤程碱性 (pH = 7.9),推测 pH 值可能是导致反硝化细菌群落组成差异的主要原因之一。

本文所有的 *narG* 序列与已知的 *narG* 序列均没有重叠,且与已知反硝化细菌的同源性不高 (< 80%),说明这些反硝化细菌是水稻土中新发现的种群,可能存在地域和环境的特异性,其他学者的研究也有相似的结论^[24~26]。克隆得到的大部分的 *narG* 都集中在第一簇中,序列比对发现,这些基因与含有钼蝶呤结合蛋白的一组多功能基因群体相似,即可能催化硝酸盐的还原,也可能催化高氯酸盐、硒酸盐等的还原。第二簇序列只与硝酸还原酶的 α 亚基具有相似性,这可能是两簇之间序列相似性低的一个原因,也进一步说明了所设计的引物对于分析 *narG* 基因的多样性是合适的。

本研究表明了长期施肥制度影响土壤反硝化细菌的活性、反硝化功能菌群落结构及多样性。施用有机肥后土壤的反硝化速率和细菌多样性显著高于对照和化肥处理的土壤。研究结果可为深入探讨施肥对水稻土反硝化作用及氮素循环利用的机理提供有力的依据。要深入了解土壤反硝化过程机理,还需要定量研究反硝化作用的系列关键基因及其表达特征等。

References:

- [1] Huang S H, Lu J. Research progress in nitrous oxide emissions from agricultural soil. *Chinese Journal of Soil Science*, 2004, 35(4), 26—29.
- [2] Xu Y B, Cai Z C. Denitrification characteristics of subtropical soils in China affected by soil parent material and land use. *European Journal of Soil Science*, 2007, 58, 1293—1303.
- [3] Bergsma T T, Robertson G P, and Ostrom N E. Influence of soil moisture and land use history on denitrification end-products. *Journal of Environmental Quality*, 2002, 31, 711—717.
- [4] Hwang S J, Hanaki K. Effects of oxygen concentration and moisture content of refuse on nitrification, denitrification and nitrous oxide production. *Bioresource Technology*, 2000, 71, 159—165.

表 2 反硝化基因 *narG* 多样性指数

Table 2 diversity indices of *narG* gene

处理 Treatments	<i>narG</i>		
	CK	NPK	NPKOM
OTUs	11	9	15
Shannon 指数 Shannon Indices	2.35	2.10	2.65
Shannon 均匀度指数 Shannon Evenness Indices	0.98	0.95	0.98

表 3 *narG* 基因文库在不同施肥处理间的差异分析

Table 3 The value of ΔC and significant differences (*P*) of paired comparison among different fertilization treatments of *narG* libraries based on LIBSHUFF

处理 Treatments	<i>narG</i>	
	CK	NPK
NPK LUBSHUFF(ΔC)	0.471	
显著性差异 Significant differences (<i>P</i>)	0.653	
NPKOM LUBSHUFF(ΔC)	2.634	1.446
显著性差异 Significant differences (<i>P</i>)	0.049 *	0.308

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

- [5] Rudaz A O, Walti E, Kyburz G, *et al.* Temporal variation in N_2O and N_2 fluxes from a permanent pasture in Switzerland in relation to management, soil water content and soil temperature. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 1999, 73, 83 — 91.
- [6] Smalla K, Oros-Sichler M, Milling A, *et al.* Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: Do the different methods provide similar results? *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 69, 470 — 479.
- [7] Kaiser E A, Kohrs K, Kucke M, *et al.* Nitrous oxide release from arable soil: Importance of N-fertilization, crops and temporal variation. *Soil Biology & Biochemistry*, 1998, 30, 1553 — 1563.
- [8] Deklein C A M, Vanlogtestijn R S P. Denitrification in the Top-Soil of Managed Grasslands in the Netherlands in Relation to Soil Type and Fertilizer Level. *Plant and Soil*, 1994, 163, 33 — 44.
- [9] Kim S, Dale B E. Effects of nitrogen fertilizer application on greenhouse gas emissions and economics of corn production. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42, 6028 — 6033.
- [10] Asing J, Saggarr S, Singh J, *et al.* Assessment of nitrogen losses from urea and an organic manure with and without nitrification inhibitor, dicyandiamide, applied to lettuce under glasshouse conditions. *Australian Journal of Soil Research*, 2008, 46, 535 — 541.
- [11] Mounier E, Hallet S, Cheneby D, *et al.* Influence of maize mucilage on the diversity and activity of the denitrifying community. *Environmental Microbiology*, 2004, 6, 301 — 312.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] Pell M, Stenberg B, Stenström J, *et al.* Potential denitrification activity assay in soil-With or without chloramphenicol? *Soil Biology and Biochemistry*, 1996, 28, 393 — 398.
- [15] Yang J, Hong K. Comparing study on different methods for DNA extraction from Mangrove Soil. *Biotechnology Bulletin*, 2006, 366 — 371.
- [16] 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.
- [17] Wolsing M, Prieme A. Observation of high seasonal variation in community structure of denitrifying bacteria in arable soil receiving artificial fertilizer and cattle manure by determining T-RFLP of nir gene fragments. *Fems Microbiology Ecology*, 2004, 48, 261 — 271.
- [18] Rochette P, van Bochove E, Prevost D, *et al.* Soil carbon and nitrogen dynamics following application of pig slurry for the 19th consecutive year: II. Nitrous oxide fluxes and mineral nitrogen. *Soil Science Society of America Journal*, 2000, 64, 1396 — 1403.
- [19] A Fliessbach, F Eyhorn, P Mäder, *et al.* Long term farming system trial: microbial biomass, activity and diversity affected the decomposition of plant residues. *CABI Publishing*, 2001, 63 — 369.
- [20] 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. *Soil Biology & Biochemistry*, 2004, 36, 1431 — 1441.
- [21] Chèneby D, Hartmann A, Hénault C, *et al.* Diversity of denitrifying microflora and ability to reduce N_2O in two soils *Biology and Fertility of Soils*, 1998, 28, 19 — 26.
- [22] Rich J J, Heichen R S, Bottomley P J, *et al.* Community composition and functioning of denitrifying bacteria from adjacent meadow and forest soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69, 5974 — 5982.
- [23] Chèneby D, Hallet S, Mondon A, *et al.* Genetic characterization of the nitrate reducing community based on narG nucleotide sequence analysis. *Microbial Ecology*, 2003, 46, 113 — 121.
- [24] Scala D J, Kerkhof L J. Diversity of nitrous oxide reductase (nosZ) genes in continental shelf sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65, 1681 — 1687.
- [25] 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.
- [26] Horn M A, Drake H L, Schramm A. Nitrous oxide reductase genes (nosZ) of denitrifying microbial populations in soil and the earthworm gut are phylogenetically similar. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72, 1019 — 1026.

参考文献:

- [1] 黄树辉, 吕军. 农田土壤 N_2O 排放研究进展. *土壤通报*, 2004, 35(4), 26 ~ 29.
- [15] 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, 366 ~ 371.