

DOI: 10.5846/stxb202004170915

曹乾斌, 王邵军, 陈闽昆, 曹润, 王平, 左倩倩, 赵爽, 杨波. 不同恢复阶段热带森林土壤 *nirS* 型反硝化微生物群落结构及多样性特征. 生态学报, 2021, 41(2): 626-636.

Cao Q B, Wang S J, Chen M K, Cao R, Wang P, Zuo Q Q, Zhao S, Yang B. The structure and diversity of *nirS*-denitrifying microbial community across three restoration stages of Xishuangbanna tropical forests. Acta Ecologica Sinica, 2021, 41(2): 626-636.

不同恢复阶段热带森林土壤 *nirS* 型反硝化微生物群落结构及多样性特征

曹乾斌¹, 王邵军^{1,2,*}, 陈闽昆¹, 曹润¹, 王平¹, 左倩倩¹, 赵爽¹, 杨波¹

1 西南林业大学生态与环境学院, 昆明 650224

2 南京林业大学南方现代林业协同创新中心, 南京 210037

摘要: 探明热带森林土壤反硝化微生物群落结构及多样性, 对于理解反硝化引起的 N₂O 排放及缓解全球变暖具有重要意义。本研究以西双版纳 3 个不同恢复阶段热带森林类型[即白背桐 (*Mallotus paniculatus*, MP)、崖豆藤 (*Millettia leptobotrya*, ML) 群落、群落及高檐蒲桃 (*Syzygium oblatum*, SO) 群落]为研究对象, 揭示土壤 *nirS* 型反硝化微生物群落组成及多样性的干湿季变化, 分析热带森林恢复过程中土壤理化环境变化对 *nirS* 型反硝化细菌群落的影响。结果表明, 变形菌门 (*Proteobacteria*) 和酸杆菌门 (*Acidobacteria*) 相对丰度表现为恢复前期高于恢复后期, 而脱氯单胞菌属 (*Dechloromonas*)、嗜盐单胞菌属 (*Halomonas*) 和罗思河小杆菌属 (*Rhodanobacter*) 表现为恢复后期高于恢复前期; 绿弯菌门 (*Chloroflexi*) 和放线菌门 (*Actinobacteria*) 均随恢复年限增加而增加, 而贪铜菌属 (*Cupriavidus*) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 的相对丰度表现为随恢复年限增加而降低。9 月份各样地新检测出的属数量表现为: SO (19 种) > MP (13 种) > ML (7 种)。土壤 *nirS* 型反硝化微生物群落的 Shannon 多样性指数表现为: 高檐蒲桃群落 > 崖豆藤群落 > 白背桐群落, 且 9 月 (湿季) > 3 月 (干季)。相关分析表明, 热带森林恢复引起土壤 N 库 (全氮、NH₄⁺、NO₃⁻)、C 有效性 (微生物量碳、易氧化碳) 及微气候 (土壤含水率与温度) 的改变, 能够显著影响 *nirS* 型反硝化细菌群落的结构及多样性。主成分分析结果表明, 土壤硝态氮、微生物量碳、全氮及易氧化碳是调控不同恢复阶段热带森林土壤 *nirS* 型反硝化细菌群落结构及多样性变化的主控因子, 其次为土壤水分、温度、水解氮、pH、铵态氮、有机碳、容重及 C/N。

关键词: *nirS* 基因; 反硝化细菌; 微生物多样性; 热带森林

The structure and diversity of *nirS*-denitrifying microbial community across three restoration stages of Xishuangbanna tropical forests

CAO Qianbin¹, WANG Shaojun^{1,2,*}, CHEN Minkun¹, CAO Run¹, WANG Ping¹, ZUO Qianqian¹, ZHAO Shuang¹, YANG Bo¹

1 College of Ecology and Environment, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China

2 Co-Innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China

Abstract: Identifying the structure and diversity of denitrifying microbial community in tropical forest is of great significance for understanding N₂O emissions from soil denitrification as well as for mitigating global warming. In this study, three secondary restoration stages (i.e., *Mallotus paniculatus*, *Millettia leptobotrya*, and *Syzygium oblatum* communities) of Xishuangbanna tropical forests were selected to explore the composition and diversity of *nirS*-denitrifying microbial community in dry and wet seasons. We also examined the effects of variations in soil physicochemical properties on structure

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32060281, 31660191); 国家林业局“948”项目 (2015-4-39); 云南省全球变化生态学研究研究生导师团队建设项目; 云南省高校优势特色重点学科 (05000511311)

收稿日期: 2020-04-17; 网络出版日期: 2020-11-27

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: shaojunwang2009@163.com

and diversity of *nirS*-denitrifying bacteria community during tropical forest restoration. Our results showed that the relative abundance of *Proteobacteria* and *Acidobacteria* was higher in early recovery stage than in later stage. In contrast, the relative abundance of *Dechloromonas*, *Halomonas*, and *Rhodanobacter* was higher in later stage than in early one. The relative abundance of *Chloroflexi* and *Actinobacteria* increased along with the tropical forest restoration, while that of *Cupriavidus* and *Pseudomonas* had an opposite tendency. The genus number of *nirS*-denitrifying bacteria community in September was ranked as *S. oblatum* (19) > *M. paniculatus* (13) > *M. leptobotrya* (7). The order of Shannon diversity of *nirS*-denitrifying microbial community was *S. oblatum* > *M. leptobotrya* > *M. paniculatus*. The Shannon diversity was higher in wet season (September) than in dry season (March). Correlation analysis showed that the structure and diversity of *nirS*-denitrifying microbial community had a close association with N pool (i.e., total nitrogen, NH_4^+ , and NO_3^-), C availability (i.e., microbial biomass carbon, easily oxidized carbon), and microclimate (i.e., soil water and temperature) during tropical forest restoration. Principal component analysis (PCA) showed that nitrate nitrogen, microbial biomass carbon, total nitrogen, and easily oxidized carbon were the key factors controlling community structure and diversity of *nirS*-denitrifying microbial community across three recovery stages of tropical forests. The effect of soil water content, temperature, hydrolytic nitrogen, pH, ammonium nitrogen, organic carbon, bulk density and C/N was ranked the next.

Key Words: *nirS* gene; denitrifying bacteria; microbial diversity; tropical forests

土壤微生物的反硝化过程是 N_2O 排放的主要来源之一,由其主导的反硝化过程对全球温室效应及 N 循环具有重要贡献^[1]。土壤反硝化是硝酸盐或亚硝酸盐在土壤酶的作用下,被还原生成含氮气体(NO 、 N_2O 或 N_2)的地下微生物学过程。其中,亚硝酸盐还原酶(Nitrite reductase, Nir)具有催化 NO_2^- 还原生成 N_2O 等气体的能力,成为限制土壤反硝化速率的关键酶^[2]。研究表明,*nirK*(含铜)和 *nirS*(含细胞色素 cd1)两种基因标记物能够很好地标记 Nir 酶的催化过程,因此这两种标记物被广泛用于陆地土壤微生物的反硝化过程研究^[3]。但有研究指出,土壤 *nirS* 型反硝化细菌拷贝数是 *nirK* 型的 3 倍以上,且 *nirS* 型反硝化细菌对土壤 N_2O 排放的贡献高于 *nirK* 型^[4]。此外,Liu^[5]和 Barker^[6]等人的研究也表明,*nirS* 型反硝化细菌比 *nirK* 型分布更广泛,其丰富度、微生物活性及多样性也更高^[7]。因此,*nirS* 型反硝化细菌标记物在研究土壤反硝化过程中运用更广泛。

土壤反硝化微生物群落结构及多样性受生态系统类型及土壤环境因子的影响显著^[2,4]。研究表明,在温带农田生态系统中,土壤质地、含水量、硝态氮含量是调控反硝化过程的主控因子^[8]。而在森林生态系统中,土壤有机碳、易溶性有机碳、全氮、铵态氮及 pH 则成为调控反硝化微生物群落的重要因子^[9-11]。热带森林生态系统每年 N_2O 的排放量高达 3.0 Tg,占全球总排放量的 40%,是地球上最大的天然 N_2O 排放源^[12],因此,热带森林土壤反硝化微生物具有更高的多样性和丰富度。另外,由于热带森林具有相对较高的降雨量,年均温度变化小,植物群落多样性及异质性较高,土壤理化性质具有较大的变异性^[2],可能导致热带森林区域土壤反硝化微生物群落结构及多样性的巨大差异。目前,*nirS* 型反硝化标记基因已被广泛用于草地、河口沉积物、农田土壤、湿地、北方森林等区域土壤反硝化微生物多样性研究^[2,13],而有关热带森林中土壤 *nirS* 型反硝化细菌的群落结构及多样性的研究,却十分缺乏。因此,探明热带森林中土壤 *nirS* 型反硝化细菌群落多样性及其与土壤理化因子间相互关系,具有十分重要的科学意义。

云南西双版纳位于北回归线以南的热带湿润区,地貌复杂,小气候多样,水热条件优越,物种丰富,是我国原始热带雨林保存最为完整的地区之一。由于农业生产方式改变及人口增加等因素的影响,热带雨林遭受了刀耕火种等农业活动的严重人为破坏,形成了一系列处于不同恢复阶段的次生恢复类型^[14]。不同恢复阶段形成的森林群落结构会对土壤微生物区系组成产生重要影响,可能影响反硝化微生物群落的结构及多样性^[15-16]。因此,本研究以中国科学院西双版纳热带植物园为研究区,选择 3 种处于不同恢复阶段的热带森林群落为研究对象,以 *nirS* 型基因标记物,采用 Illumina MiSeq 高通量测序技术,对比分析不同森林群落土壤

nirS 型反硝化微生物群落结构及多样性特征,深入探讨 *nirS* 型反硝化微生物与土壤理化因子的关系,进而揭示影响热带森林土壤反硝化功能微生物的主要因子,为评估热带森林恢复过程中土壤 N_2O 排放动态及土壤 N 循环过程提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

研究样地位于云南省西双版纳州的中国科学院西双版纳热带植物园(21°55'N, 101°16'E)区内,属东南亚北热带季风气候区,自然植被类型为热带雨林和季雨林,自然恢复的次生植被主要包括白背桐群落、崖豆藤群落、高檐蒲桃群落等,人工林主要为橡胶林^[17]。全年平均气温 21.5℃。干湿季节分明,年均降水量 1557 mm,其中,全年降雨量的 87%集中在 5—10 月的雨季,为 1335 mm;而 13%则集中于 11 月至次年 4 月的干季,为 202 mm。研究区土壤类型为白垩纪砂岩发育而成的砖红壤。

1.2 样地设置

根据中国科学院西双版纳热带森林植物园建园以来的相关森林维护记录,在植物园区内选取起源于热带雨林经刀耕火种后自然恢复形成的次生热带森林(白背桐群落、崖豆藤群落及高檐蒲桃热带森林群落)为研究对象,3 个群落处于连续演替的不同恢复阶段且起源(植被与土壤类型)和立地条件(包括坡度、坡向与坡位等)基本类似^[18]。样地详情如下:

白背桐群落(*Mallotus paniculatus* community, 简称 MP),恢复年限约 12 a,海拔 600 m。植被盖度约 60%,枯枝落叶层厚 1—2 cm,平均树高 8.85 m,平均胸径 7.13 cm。样地内乔木树种为白背桐(*M. paniculatus*);下木为小乔木粉被金合欢(*Acacia pruinescens*);灌木植物包括椴叶山麻秆(*Alchornea tiliifolia*);草本层盖度约为 40%,包括野生风轮草(*Clinopodium chinensis*)、丰花草(*Borreria stricta*)等。

崖豆藤群落(*Millettia leptobotrya* community, 简称 ML),恢复年限约 42 a,海拔 568 m。植被盖度 90%左右,枯枝落叶层厚 4—5 cm,平均树高 12.25 m,平均胸径 9.93 cm。样地内乔木树种为思茅崖豆(*M. leptobotrya*);下木为小乔木钝叶金合欢(*A. megaladena*);灌木植物包括锈毛鱼藤(*Derris ferruginea*)、椴叶山麻秆(*A. tiliifolia*)、猪肚木(*Canthium horridum*)和滇南九节(*Psychotria henryi*),灌木层优势种为锈毛鱼藤;草本层盖度约为 25%,包括刚莠竹(*Microstegium ciliatum*)、银叶砂仁(*Amomum sericeum*)等。

高檐蒲桃群落(*Syzygium oblatum* community, 简称 SO),恢复年限约 53 a,海拔 619 m。植被盖度 95%左右,凋落物层厚 6—7 cm,平均树高 23.56 m,平均胸径 23.45 cm。样地内乔木树种为高檐蒲桃(*S. oblatum*);下层乔木为思茅崖豆(*M. leptobotrya*)、鸡嗉子榕(*Ficus semicordata*)、印度栲(*Castanopsis indica*)和云南黄杞(*Engelhardia spicata*);灌木植物包括黑风藤(*Fissistigma polyanthum*)、南山花(*Prismatomeris connata*);草本层盖度约为 15%,包括多型叉蕨(*Tectaria polymorpha*)、红豆蔻(*Alpinia galanga*)、子分叉露兜(*Pandanus furcatus*)等,草本层优势种为多型叉蕨。

1.3 样品采集和理化因子测定

于 2019 年 3 月、9 月中旬在 3 个处于不同恢复阶段样地内,各设置 3 个 50m×50m 样地,样地与样地间距至少 200m。每个样地内在对角线取 3 个取样点,扒开取样点上方枯枝落叶,按 0—10cm 取土,混合均匀后装入无菌自封袋,分 2 份带回实验室。其中一份用于土壤基本理化指标测定,另一份用于土壤反硝化微生物测定。

土壤温度采用便携式土壤水分温度测量仪(SIN-TN8,昆仑中大)测定;土壤含水率(%)采用烘干称量法(105℃,24h)测定;土壤容重采用环刀法测定;土壤 pH 采用电位法(土水比 1:2.5)测定;土壤有机碳采用油浴加热-重铬酸钾氧化法测定;土壤易氧化有机碳采用高锰酸钾氧化法测定;土壤全氮、铵态氮、硝态氮采用全自动流动分析仪测定;土壤水解性氮采用碱解扩散法测定;土壤微生物量碳采用氯仿水浴法测定^[19]。

1.4 土壤微生物 DNA 提取及反硝化基因测定和测序

准确称取 0.5g 鲜土,根据 E.Z.N.A.® soil 试剂盒(Omega Bio-tek, Norcross, GA, U.S.)说明书进行总

DNA 抽提,DNA 浓度和纯度利用 NanoDrop2000 进行检测,利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量;对每份土壤样品,采用 *nirS* 型反硝化细菌引物对: Cd3aF (5'-GTSAACGTSAAGGARACSGG-3') 和 R3cd (5'-GASTTCGGRTGSGTCTTGA-3'),对 V3-V4 可变区进行 PCR 扩增。扩增程序为:95℃ 预变性 3 min,27 个循环(95℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s),最后 72℃ 延伸 10 min(PCR 仪:ABI GeneAmp® 9700 型)。扩增体系为 20μL,4μL 5 * FastPfu 缓冲液,2μL 2.5mmol/L dNTPs,0.8μL 引物(5μmol/L),0.4μL FastPfu 聚合酶;10ng DNA 模板,剩余体积用双蒸水补足。每个样本均进行 3 个重复,将同一样本的 PCR 产物混合后用 2%琼脂糖凝胶电泳检测,使用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒(AXYGEN 公司)切胶回收 PCR 产物,Tris_HCl 洗脱;2%琼脂糖电泳检测。将 PCR 产物用 QuantiFluor™-ST 蓝色荧光定量系统(Promega 公司)进行检测定量,采用 Illumina PE250 平台构建系统文库并测序。对 Illumina PE250 测序得到的 PE reads,首先根据 overlap 关系进行拼接,同时对序列质量进行质控和过滤,区分样本后进行 OTU 聚类分析和物种分类学分析。使用 QIIME 软件,对 OUT 丰度矩阵中每个样本的系列数在不同深度下随机抽样,以每个深度下抽取到的系列数和对应的 OUT 数绘制稀释曲线。根据上述 OUT 划分和分类水平鉴定结果,使用 RDP classifier 贝叶斯算法对 97%相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析,并分别在各个分类水平:domain(域),kingdom(界),phylum(门),class(纲),order(目),family(科),genus(属),species(种)统计各样本的群落组成。之后在各分类水平进行 Alpha 多样性指数及物种组成分析。

1.5 数据处理

土壤数据用 Excel 进行整理,数据分析前进行正态性及方差齐性检验,采用单因素方差分析(one-way ANOVA)比较不同恢复阶段、不同月份数据之间的差异;采用双因素方差分析比较不同月份(3月、9月)及不同样地对土壤 *nirS* 型反硝化微生物 Shannon 指数的影响;使用 R 语言绘图包(ggplot2)进行数据处理及图形绘制。

2 研究结果

2.1 土壤 *nirS* 基因测序结果

在 97%的相似性水平下,对测序结果进行 OTU 划分,一共获得 1640 个 OTUs,经比对鉴定后获得 5 门 7 纲 17 目 22 科 27 属 70 种土壤 *nirS* 型反硝化菌群信息。采用随机抽样方法构建的样品稀释曲线(Rarefaction curve),结果如图 1。3 个样地 2 个月份的样品稀释曲线均趋于平坦,表明测序数据量合理,且 OUT 数目随恢复年限增加而增多。从各样地的稀释曲线在水平方向上跨度范围来看,SO 样地的 *nirS* 型反硝化菌群丰富度最高,而 MP 样地最低。此外,ML 和 SO 样地的稀释曲线平缓程度以及 OUT 数目相似,表明处于恢复后期的热带森林群落内 *nirS* 型反硝化细菌群落丰富度以及物种均匀度相似。

2.2 土壤反硝化微生物群落组成的变化

从门分类水平来看(图 2),不同恢复阶段土壤 *nirS* 型未分类反硝化细菌门变化极大(1.37% — 94.04%),在已经被注释的 *nirS* 型反硝化细菌门中,主要集中于变形菌门(*Proteobacteria*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、酸杆菌门(*Acidobacteria*)和放线菌门(*Actinobacteria*)。变形菌门成为热带森林不同恢复阶段中的优势门(32.71% — 98.63%),其相对丰度 3 月表现为 MP(98.63%)>ML

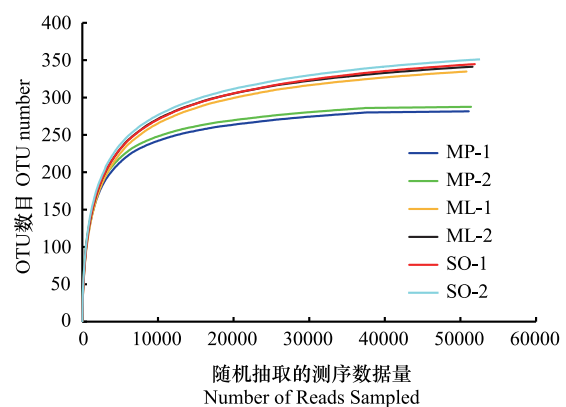


图 1 各样地不同月份土壤样品稀释曲线

Fig.1 The rarefaction curves of soil samples in different months MP-1 与 MP-2 分别代表白背桐群落(*M. paniculatus*)3月和9月的测量数据;ML-1 与 ML-2 分别代表崖豆藤群落(*M. leptobotrya*)3月和9月的测量数据;SO-1 与 SO-2 分别代表高檐蒲桃群落(*S. obtatum*)3月和9月的测量数据

(68.66%)>SO(32.71%),9月份则表现为ML(79.62%)>MP(72.35%)>SO(60.90%)。此外,绿弯菌门(0.12%—28.3%)和放线菌门(0.54%—2.31%)均沿恢复年限增加而增加,但酸杆菌门相对丰度表现为恢复初期的ML群落最高(1.09%—11.64%)。

3种不同恢复阶段热带森林群落中,土壤 *nirS* 型反硝化细菌门相对丰度在不同月份间差异显著(图2)。与3月份相比,9月份变形菌门在ML、SO群落中出现不同程度增幅(3.56%—86.18%),表现为SO(52.19倍)>ML(4.82倍)>MP(0.59倍),但MP群落降低了26.64%。此外,各样地的新检测出的反硝化细菌门差异较大,如9月份ML群落新检测出2门(放线菌门和绿弯菌门),其余样地均新检测出1门(拟杆菌门)。放线菌门(*Actinobacteria*)是3个样地内9月份的共有新增反硝化细菌门,相对丰度表现为MP(2.31%)>SO(1.91%)>ML(0.54%)。变形菌门的最高和最低相对丰度均出现在3月份,分别为MP(98.63%)和SO(32.71%)群落。

从属分类水平来看(图3),3种不同群落类型的 *nirS* 型反硝化细菌属相对丰度在不同恢复阶段表现差异较大。除未分类细菌属(0.37%—94.04%)之外,3

个样地在3月和9月共有的 *nirS* 型反硝化细菌属为:贪铜菌属(*Cupriavidus*, 2.20%—60.27%)、脱氯单胞菌属(*Dechloromonas*, 0.04%—40.67%)、嗜盐单胞菌属(*Halomonas*, 0.04%—5.17%)、假单胞菌属(*Pseudomonas*, 0.76%—21.09%)以及罗思河小杆菌属(*Rhodanobacter*, 0.02%—34.19%)。除贪铜菌属的相对丰度表现为沿恢复年限增加而降低外,其余共有反硝化细菌属在相同月份内的相对丰度变化趋势差异巨大。脱氯单胞菌属、嗜盐单胞菌属和罗思河小杆菌属在3月份表现为MP>SO>ML,假单胞菌属表现为ML>SO>MP;而在9月,脱氯单胞菌属和罗思河小杆菌属的相对丰度则表现为沿恢复年限增加而增加,嗜盐单胞菌属表现为MP>ML>SO,假单胞菌属则表现为MP>SO>ML。

与3月相比,9月份各样地的 *nirS* 型反硝化细菌属种类数差异较大。其新检测出的种类数表现为:SO(19种, 0.01%—2.17%)>MP(13种, 0.02%—2.31%)>ML(7种, 0.01%—0.59%)。在各样地共有的 *nirS* 型反硝化细菌属中,9月ML群落的罗思河小杆菌属、嗜盐单胞菌属、脱氯单胞菌属和贪铜菌属的相对丰度分别是3月的473.7、31.1、10.8和1.3倍,SO群落的罗思河小杆菌属和贪铜菌属则为16.9和7.9倍,而MP群落的假单胞菌属则为16.7倍;同一样地内的共有反硝化菌属相对丰度在9月表现出不同程度的降低,如MP群落的脱氯单胞菌属、ML群落的假单胞菌属的相对丰度仅为3月的0.04和0.27。

2.3 土壤 *nirS* 型反硝化微生物 α 多样性的样地差异

如表1所示,在相似性水平为97%下,3种不同恢复阶段热带森林中土壤反硝化微生物多样性表现为9月(湿季)高于3月(干季)。Shannon多样性指数随恢复年限增加而增加(1.65—3.93),且各样地间差异性显著($P<0.05$),9月份MP、ML、SO样地的Shannon指数分别是3月份的2.28、2.20和1.48倍;Simpson多样性指数随恢复年限增加而降低(0.04—0.28),除3月的SO样地和9月的MP样地与其它样地差异性显著外($P<0.05$),其余相同月份间差异不显著;Chao指数则表现为:3月份SO群落最低,ML群落最高,而9月份则随恢复年限增加而增加,其变化范围在25—365之间。

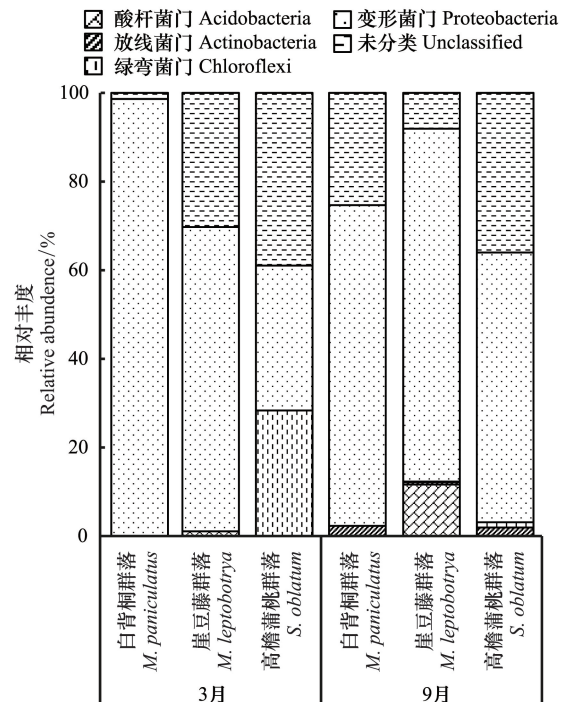


图2 不同恢复阶段、不同月份间门水平反硝化微生物相对丰度
Fig.2 Relative abundance of phylum-level denitrification microorganisms in different months across three recovery stages

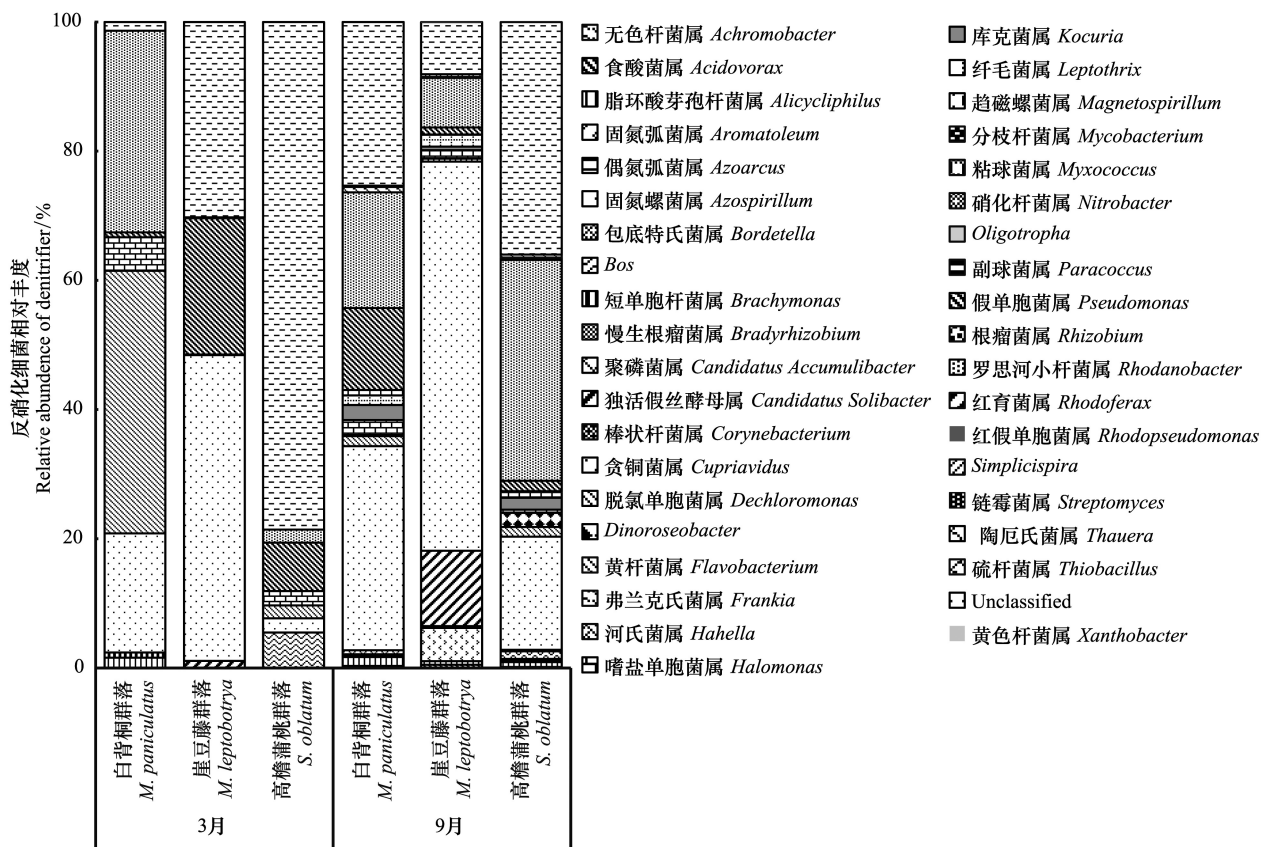


图3 不同恢复阶段、不同月份间属水平反硝化微生物相对丰度

Fig.3 Relative abundance of genus-level denitrification microorganisms in different months across three recovery stages

表1 不同恢复阶段热带森林土壤 nirS 型反硝化微生物 α 多样性指数

Table 1 Alpha diversity index of soil nirS-denitrification microorganism in three restoration stages of tropical forests

样地 Sites	3 月			9 月		
	Chao	Shannon	Simpson	Chao	Shannon	Simpson
白背桐群落 (<i>M. paniculatus</i>)	42	1.65±0.03c	0.28±0.001a	299	3.77±0.01c	0.06±0.001a
崖豆藤群落 (<i>M. leptobotrya</i>)	44	1.73±0.02b	0.26±0.004a	354	3.81±0.02b	0.05±0.002b
高檐蒲桃群落 (<i>S. oblatum</i>)	25	2.66±0.01a	0.08±0.003b	365	3.93±0.01a	0.04±0.001b

相同小写字母表示不同群落之间没有显著差异 ($P>0.05$)

热带森林不同恢复阶段和月份对土壤 nirS 型反硝化微生物的影响均达极显著水平(表 2)。由表 2 可知,恢复年限和月份变化(3 月到 9 月)均对土壤 nirS 型反硝化细菌的群落结构及多样性特征产生显著影响 ($P<0.01$),且恢复年限与月份变化也会对土壤 nirS 型反硝化细菌共同产生影响 ($P<0.01$)。

表2 恢复阶段和取样时间对土壤 nirS 型反硝化微生物 Shannon 指数影响的双因素方差分析

Table 2 Two-way ANOVAs showing the effect of recovery stage and sampling time on Shannon index of nirS-denitrifying microbial community

项目 Items	df	Mean Sq.	F	P
样地 Site	2	1.26	76.07	<0.001
月份 Month	1	14.94	1807.53	<0.001
样地×月份 Site×Month	2	0.34	41.07	<0.001

2.4 土壤理化性质与反硝化微生物的关系

3 种不同恢复阶段热带森林土壤理化指标的测定结果见表 3。由表可知,土壤含水率、全氮、水解氮、铵态

氮、硝态氮、微生物量碳及土壤有机碳随恢复年限增加而增加,且不同样地差异性显著($P<0.05$),尽管 SO 群落的 pH 值最高,但与 ML 群落差异不显著,而土壤温度表现为随恢复年限增加而降低,土壤容重表现为 ML 群落最高,MP 群落最低。

表 3 不同恢复阶段热带森林土壤理化性质特征

Table 3 Soil physicochemical properties across different recovery stages of tropical forests

样地 Site	土壤含水率 SW/%	土壤温度 ST/°C	容重 BD/ (g/cm ³)	pH	土壤有机碳 SOC/ (g/kg)	微生物 量碳 MBC/ (g/kg)	易氧化碳 ROC/ (g/kg)	全氮 TN/ (g/kg)	水解氮 HN/ (mg/kg)	铵态氮 NH ₄ ⁺ -N/ (mg/kg)	硝态氮 NO ₃ ⁻ -N/ (mg/kg)
MP	27.52±3.1b	21.38±3.74a	1.01±0.03c	3.75±0.23b	19.88±3.83c	1.46±0.38c	10.86±1.67b	0.98±0.32c	87.97±20.34b	15.04±3.24c	3.73±0.56c
ML	33.35±3.2c	20.32±4.15a	1.26±0.17a	3.96±0.06a	23.03±4.43b	1.86±0.43b	10.11±1.03b	1.47±0.09b	145.22±8.45a	17.45±3.22b	4.02±0.43b
SO	37.23±4.5a	18.42±2.25b	1.21±0.13b	4.01±0.03a	25.46±2.89a	2.21±1.01a	11.45±0.56a	1.56±0.17a	147.56±9.43a	21.34±2.13a	4.19±1.29a

SOC:土壤有机碳 Soil organic carbon;MBC:微生物量碳 Microbial biomass carbon;TN:全氮 Total nitrogen;ROC:易氧化碳 Readily oxidizable organic carbon;HN:水解氮 Hydrolyzable nitrogen;NH₄⁺-N:铵态氮 Ammonium nitrogen;NO₃⁻-N:硝态氮 Nitrate nitrogen;SW:土壤水分 Soil water;ST:土壤温度 Soil temperature;BD:容重 Bulk density;相同小写字母表示不同群落之间没有显著差异($P>0.05$)。ML、MP 和 SO 分别代表:崖豆藤群落(*M. leptobotrya*)、白背桐群落(*M. paniculatus*)和高檐蒲桃群落(*S. oblatum*)

热带森林不同恢复阶段土壤 *nirS* 型反硝化微生物群落 α 多样性指数与土壤环境因子的相关分析结果见表 4。其中,Shannon 指数与土壤含水率、温度、微生物量碳、土壤全氮、水解氮、铵态氮、硝态氮呈极显著正相关($P<0.01$),而 Simpson 指数与土壤易氧化碳、全氮、水解氮、铵态氮及硝态氮呈极显著负相关($P<0.01$)。Chao 指数与土壤微生物量碳、全氮及硝态氮呈极显著正相关($P<0.01$),与土壤 pH、有机碳、水解氮及铵态氮呈显著正相关($P<0.05$)。

表 4 土壤 *nirS* 型反硝化微生物群落 α 多样性指数与土壤理化性质间的关系Table 4 Correlation of soil physicochemical properties with alpha diversity index of *nirS*-denitrification microbial community

项目 Items	容重 BD	pH	含水率 SW	温度 ST	有机碳 SOC	微生物 量碳 MBC	易氧化碳 ROC	全氮 TN	水解氮 HN	铵态氮 NH ₄ ⁺ -N	硝态氮 NO ₃ ⁻ -N	C/N
Chao 指数	-0.11	0.68 *	0.49	0.47	0.66 *	0.78 **	0.78 **	0.71 **	0.57 *	0.62 *	0.83 **	-0.30
Shannon 指数	-0.29	0.57 *	0.67 **	0.55 *	0.59 *	0.61 **	0.95 **	0.88 **	0.86 **	0.76 **	0.94 **	-0.56 *
Simpson 指数	0.26	-0.49	-0.34	-0.32	-0.36	-0.47	-0.90 **	-0.89 **	-0.83 **	-0.70 **	-0.88 **	0.73 **

*表示显著性相关($P<0.05$),**表示极显著性相关($P<0.01$)

采用主成分分析(PCA)对影响热带森林不同恢复阶段土壤 *nirS* 型反硝化细菌 α 多样性指数的理化因子进行分析,其结果如图 4。PC1 和 PC2 的主成分累积解释量为 67.32%,Shannon 指数与各土壤理化指标的夹角排序为:土壤硝态氮<土壤微生物量碳<全氮<易氧化碳<含水率<水解氮<pH<铵态氮<土壤温度<有机碳<容重<C/N。说明土壤硝态氮、微生物量碳、全氮以及易氧化碳是调控热带森林不同恢复阶段土壤反硝化细菌群落结构及多样性特征的主控因子,其次为土壤含水率、土壤温度、水解氮、pH、铵态氮、有机碳、容重及 C/N。

3 讨论

3.1 热带森林恢复对 *nirS* 型反硝化细菌群落结构的影响

3 种不同恢复阶段的热带森林土壤 *nirS* 型反硝化细菌群落结构差异显著。变形菌门(*Proteobacteria*)、酸杆菌门(*Acidobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)和放线菌门(*Actinobacteria*)成为该热带森林区域的优势门,且变形菌门的相对丰度变化范围较宽(32.71% — 98.63%),这一结果与 Gu^[20]及 Zhao^[4]等人的研究结果相似。变形菌门在土壤生态系统中广泛存在,其拷贝数在总克隆文库中占比高达 25-40%^[21],且一些厌氧异养变形菌相对丰度会随土壤氧气浓度的周期波动出现显著变化^[2]。本研究中,变形菌门、酸杆菌门的相对丰度表现为恢复初期高于恢复后期。这可能与变形菌门和酸杆菌门属于寡营养型反硝化微生物有关,它们在养分有效

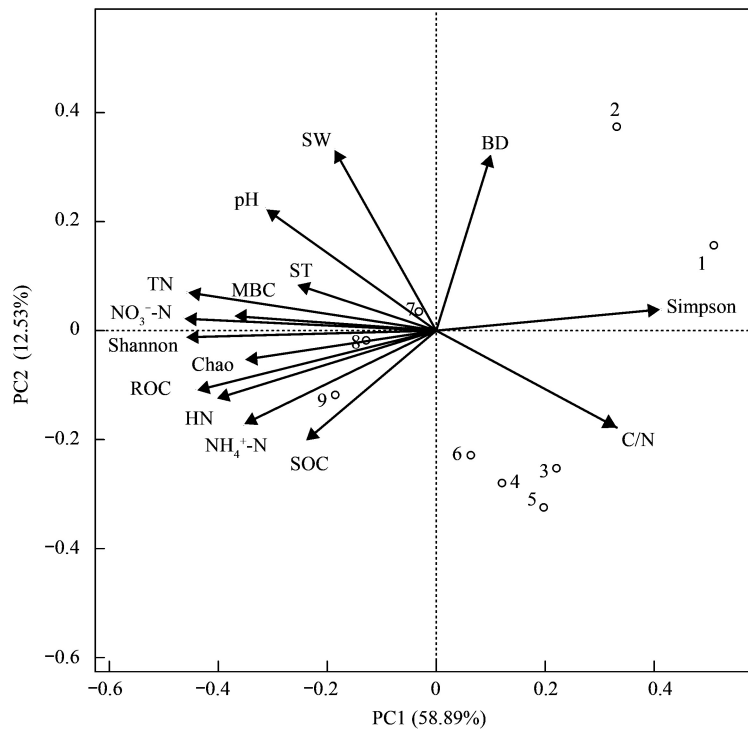


图 4 土壤反硝化微生物 α 多样性指数与土壤理化因子的主成分分析 (PCA)

Fig.4 PCA of alpha diversity index of soil denitrification microbial community with soil physicochemical properties

Shannon; Shannon 指数; Simpson; Simpson 指数; Chao; Chao 指数; SOC; 土壤有机碳 Soil organic carbon; MBC; 微生物生物量碳 Microbial biomass carbon; TN; 全氮 Total nitrogen; ROC; 易氧化碳 Readily oxidizable organic carbon; HN; 水解氮 Hydrolyzable nitrogen; NH₄⁺-N; 铵态氮 Ammonium nitrogen; NO₃⁻-N; 硝态氮 Nitrate nitrogen; SW; 土壤水分 Soil water; ST; 土壤温度 Soil temperature; BD; 容重 Bulk density; 1—9; 样方数据平均值 Average of sample plots

性较低的环境中反而具有较高的相对丰度^[22];而绿弯菌门和放线菌门可能属于富营养型反硝化细菌门,处于恢复后期的高檐蒲桃群落具有充足的有效养分,因此其在恢复后期具有较高的相对丰度。此外,本研究区在 3 月期间会出现周期性的浓雾(从夜晚持续至第二天早上),这使得研究区内的土壤相对湿度保持在一个相对稳定水平^[23],加之处于恢复初期的群落植被结构和盖度比处于恢复后期更单一,无法维持一个相对稳定的土壤含水率及养分有效性水平,使得反硝化细菌相对丰度出现激烈波动(如变形菌门)。9 月份新检测出的放线菌门表现为恢复中后期高于恢复初期,可能是因为放线菌门对水分和温度更为敏感,在水分充足的月份具有更高的丰度^[24],且处于恢复后期的土壤养分有效性更高,最终导致高温湿润的 9 月比低温干燥的 3 月检测出更多的放线菌门。

与 3 月份相比,9 月份各样地的 *nirS* 型反硝化细菌属种类数出现不同程度的增幅。贪铜菌属、脱氯单胞菌属、嗜盐单胞菌属、假单胞菌属及罗思河小杆菌属成为 3 个样地内的优势属(图 3)。这一结果与陈秀波^[15]等人的研究结果相同,但其采用的是 *nosZ* 型引物,这说明上述几种反硝化细菌属不但具有亚硝酸还原酶,同时也具有氧化亚氮还原酶(Nos 酶,一种能将 N₂O 气体还原成 N₂ 的酶)。此外,除贪铜菌属的相对丰度在 3 月、9 月表现为沿恢复年限增加而降低外,其余反硝化细菌属的相对丰度变化趋势各不相同,如 9 月的脱氯单胞菌属和罗思河小杆菌属在沿恢复年限增加而增加,3 月则表现为 MP>SO>ML;9 月新检测出的反硝化细菌种数表现为 SO(19 种)>MP(13 种)>ML(7 种),说明这些反硝化细菌属的相对丰度对样地及季节变化(干湿季)较为敏感。处于恢复初期的 ML 群落内土壤 *nirS* 型反硝化细菌相对丰度变化最大,而处于恢复后期的 SO 群落变化相对较小,说明恢复年限对 *nirS* 型反硝化细菌的群落结构造成显著影响。洪璇^[25]、Winter^[26]等人认

为, *nirS* 型反硝化细菌群落结构会随着季节及所处的生境出现显著变化, 且与生境中的含氮化合物的浓度密切相关。3 个样地内均发现的罗思河小杆菌属、假单胞菌属、脱氯单胞菌属和贪铜菌属等 *nirS* 型反硝化细菌属, 也在河口区^[25]、水稻土^[27]、湖泊底泥及森林土壤^[13] 中被发现, 说明这些 *nirS* 型反硝化细菌属的生态幅较广。因此, 热带森林区域季节的变换, 会使得土壤 *nirS* 型反硝化细菌群落的丰富度随生态类型出现显著差异。

3.2 热带森林恢复对 *nirS* 型反硝化细菌群落多样性的影响

热带森林的恢复过程对 *nirS* 型反硝化细菌群落多样性产生重要影响。随着热带森林恢复年限的增加, 土壤 *nirS* 型反硝化微生物群落多样性也逐渐增加, 9 月份 MP、ML、SO 样地的 Shannon 指数分别是 3 月份的 2.28、2.20 和 1.48 倍, 说明恢复年限越高, 其 Shannon 指数变化越小, *nirS* 型反硝化微生物群落结构就越趋于稳定。随着恢复年限增加, 植被盖度及郁闭度会逐渐增加, 凋落物数量及质量也逐年累积, 同时土壤温度及湿度等环境因子趋于稳定, 在累积大量养分的同时刺激了微生物活性^[14, 28], 使得高檐蒲桃群落的 *nirS* 型反硝化细菌的群落多样性最高, 而白背桐群落最低。此外, 处于恢复后期的崖豆藤群落和高檐蒲桃群落的稀释曲线位置及宽度接近, 说明随着恢复年限的增加, 热带森林群落土壤反硝化细菌的群落结构及多样性趋于相似。处于恢复后期的 2 个样地的土壤 pH 值及土壤有机碳、全氮及硝态氮含量相近, 这为 *nirS* 型反硝化微生物提供了较为相似土壤理化环境, 从而使得恢复后期的崖豆藤群落和高檐蒲桃群落的 *nirS* 型反硝化微生物群落结构及多样性趋于相似。但土壤有机碳、全氮及硝态氮等养分浓度仍存在差异, 最终使得恢复后期的两个群落内的反硝化微生物具有一定的差异性。土壤 pH、有机碳、全氮及硝态氮含量会刺激土壤养分有效性, 显著影响热带森林土壤 *nirS* 型反硝化细菌的群落多样性^[29-31]。因此, 热带森林恢复过程中形成不同的植物群落, 会改变群落土壤理化环境, 最终影响土壤 *nirS* 型反硝化细菌的群落多样性。

取样月份不同对不同恢复阶段的土壤 *nirS* 型反硝化细菌多样性影响显著。本研究表明, 随恢复年限增加, 9 月份各样地 Shannon 指数比 3 月份平均增加将近 2 倍, 且不同样地增加倍数差异显著, 说明月份变化也会对不同恢复阶段的土壤 *nirS* 型反硝化细菌多样性造成显著影响。研究表明, 西双版纳热带森林中干季(3 月) 的温度及降雨量显著低于湿季(9 月), 使得湿季微生物分解底物的有效性显著高于干季^[23, 32]。此外, 热带森林中土壤温度年均变化不大, 但土壤含水率会随季节出现显著变化, 这导致土壤氧分压随含水率出现周期性波动, 刺激土壤反硝化作用, 促进土壤 *nirS* 型反硝化细菌的活性^[33]。另一方面, 随着恢复年限的增加, 各种土壤碳(如微生物量碳、易氧化碳)、氮(如铵氮、硝氮) 含量会在湿季(9 月) 大量积累, 水分过多导致根系分泌物浸出也会使得土壤积累更多的含碳、氮类物质, 使得即使在干季也能保持较高的反硝化细菌多样性^[34]; 而在湿季, 适宜的温度和水分使得微生物繁殖速率加快, 最终使得 9 月的 *nirS* 型反硝化细菌多样性高于 3 月。因此, 热带森林季节变化改变了不同恢复阶段的土壤含水率的时间分配, 进而影响微生物栖息的土壤微环境, 最终对土壤 *nirS* 型反硝化细菌产生重要影响。

3.3 热带森林恢复过程中土壤理化环境变化对 *nirS* 型反硝化细菌的影响

本研究表明, 土壤含水率、全氮、水解氮、铵态氮、硝态氮、微生物量碳及土壤有机碳随恢复年限增加而增加, 且不同样地差异性显著($P < 0.05$), 这与 *nirS* 型反硝化微生物的 Shannon 指数变化趋势一致, 且与 Shannon 指数呈显著正相关, 说明热带森林不同恢复阶段土壤理化性质变化对土壤 *nirS* 型反硝化细菌群落结构及多样性产生重要影响。随着热带森林恢复年限增加, 植物枯枝落叶的输入量和积累量增加, 处于恢复后期的热带森林土壤积累了更多的活性 C、N 养分, 为反硝化细菌的生长和繁殖提供了更适宜的环境^[16, 20]。不同林型的枯落物的输入数量及质量, 会改变土壤理化性质特征, 且反硝化功能微生物与土壤理化环境因子间也存在着复杂的交互作用^[13], 最终使得处于不同恢复时长的群落土壤反硝化细菌的丰度和结构^[20, 23, 32] 出现显著差异。而处于恢复前期的热带森林群落, 植被覆盖度低, 群落内土壤温度、水分及土壤 C、N 养分波动剧烈, 最终使得土壤反硝化微生物的活性低于恢复后期的热带森林群落。

本研究表明, 土壤容重及 C/N 与 *nirS* 型反硝化微生物多样性指数呈负相关, 土壤 pH、含水率、温度、全

氮、硝态氮、铵态氮、水解氮、有机碳、微生物量碳以及易氧化碳对土壤 *nirS* 型反硝化微生物群落结构及多样性产生了重要影响。随着恢复年限增加,土壤 pH 小幅增加,土壤 *nirS* 型反硝化微生物也逐渐增加,可能是因为低 pH 对土壤反硝化微生物活性具有限制作用,而随着 pH 值增加,这种限制被逐渐抵消。研究表明,在一定范围内,土壤 pH 值增加会使得土壤反硝化酶(如 *nirS* 酶)活性增加^[13],土壤反硝化微生物大量繁殖,最终使得处于恢复后期的土壤具有更多的 *nirS* 型反硝化细菌。土壤水分与温度对土壤反硝化细菌的影响小于土壤 N 素(硝态氮、微生物量碳、全氮),且土壤水分的影响大于土壤温度,说明在水热充足的热带森林中,土壤水分和温度可能是影响反硝化细菌多样性的间接因子。特别是热带森林中土壤含水率的频繁变化,会造成土壤含氧量出现剧烈波动,导致土壤氧化还原环境不断变化^[2],同时土壤容重也发生变化,加深了土壤有氧/缺氧环境的频繁转变,均会促进土壤 Nir 酶的表达,使得土壤反硝化细菌群落不同季节和恢复阶段出现显著变化^[13,35-36]。本研究中,处于恢复后期的热带森林群落土壤铵态氮、硝态氮、有机碳、易氧化碳、微生物量碳含量均显著高于恢复前期,且 Shannon 指数随恢复年限增加而升高,说明不同恢复阶段的土壤碳、氮形态及浓度对土壤 *nirS* 型反硝化微生物群落多样性及结构影响显著。土壤 *nirS* 基因丰度对土壤中氮素的形态变化非常敏感,大量的 NH_4^+ 存在时,会显著降低 *nirS* 型土壤微生物的丰度^[37];而大量 NO_3^- 存在时,会促进 *nirS* 型反硝化细菌的生长繁殖^[30];但是当大量有机碳,特别是活性有机碳(如易氧化碳、微生物量碳)及铵氮、硝氮共同存在时,土壤 *nirS* 的基因丰度是单一养分存在时的 3 倍多^[31,33,35]。因此,热带森林的恢复阶段改变了土壤 C、N 养分浓度状况,使得土壤理化性质产生明显异质性,进而影响热带森林 *nirS* 型土壤微生物的群落结构及多样性。

4 结论

热带森林恢复过程中,季节和恢复阶段以及它们的交互作用,影响土壤理化性质的时空异质性,进而调控热带森林土壤 *nirS* 型反硝化细菌的群落结构及多样性。土壤 *nirS* 型反硝化细菌群落结构沿恢复年限在干湿季节差异显著,且其多样性随恢复年限增加而增加,说明热带森林群落不同恢复年限改变了土壤 N 形态(全氮、 NH_4^+ 、 NO_3^-)、C 有效性(微生物量碳、易氧化碳)及物理因子(土壤含水率、土壤温度),进而对土壤 *nirS* 型反硝化细菌群落结构及多样性产生显著影响。土壤硝态氮、微生物量碳、全氮及易氧化碳是调控不同恢复阶段热带森林土壤 *nirS* 型反硝化细菌群落结构及多样性变化的主控因子,其次为土壤含水率、土壤温度、水解氮、pH、铵态氮、有机碳、容重及 C/N。

参考文献 (References):

- [1] Corre M D, Sueta J P, Veldkamp E. Nitrogen-oxide emissions from tropical forest soils exposed to elevated nitrogen input strongly interact with rainfall quantity and seasonality. *Biogeochemistry*, 2014, 118(1/3): 103-120.
- [2] Pajares S, Bohannan B J M. Ecology of nitrogen fixing, nitrifying, and denitrifying microorganisms in tropical forest soils. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1045.
- [3] Zumft W G. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1997, 61(4): 533-616.
- [4] Zhao S Y, Zhou J M, Yuan D D, Wang W D, Zhou L G, Pi Y X, Zhu G B. *NirS*-type N_2O -producers and *nosZ* II-type N_2O -reducers determine the N_2O emission potential in farmland rhizosphere soils. *Journal of Soils and Sediments*, 2020, 20(1): 461-471.
- [5] Liu B B, Mørkved P T, Frostegård Å, Bakken L R. Denitrification gene pools, transcription and kinetics of NO , N_2O and N_2 production as affected by soil pH. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 72(3): 407-417.
- [6] Braker G, Zhou J Z, Wu L Y, Devol A H, Tiedje J M. Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in pacific northwest marine sediment communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(5): 2096-2104.
- [7] Mosier A C, Francis C A. Denitrifier abundance and activity across the San Francisco Bay estuary. *Environmental Microbiology Reports*, 2010, 2(5): 667-676.
- [8] Mahmood T, Ali R, Sajjad M I, Chaudhri M B, Tahir G R, Azam F. Denitrification and total fertilizer-N losses from an irrigated cotton field. *Biology and Fertility of Soils*, 2000, 31(3/4): 270-278.
- [9] Kandler E, Brune T, Enowashu E, Dörr N, Guggenberger G, Lamersdorf N, Philippot L. Response of total and nitrate-dissimilating bacteria to reduced N deposition in a spruce forest soil profile. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, 67(3): 444-454.

- [10] Bárta J, Melichová T, Vaněk D, Pícek T, Šantrůčková H. Effect of pH and dissolved organic matter on the abundance of *nirK* and *nirS* denitrifiers in spruce forest soil. *Biogeochemistry*, 2010, 101(1): 123-132.
- [11] Morales S E, Cosart T, Holben W E. Bacterial gene abundances as indicators of greenhouse gas emission in soils. *The ISME Journal*, 2010, 4(6): 799-808.
- [12] Townsend A R, Cleveland C C, Houlton B Z, Alden C B, White J W C. Multi-element regulation of the tropical forest carbon cycle. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2011, 9(1): 9-17.
- [13] Levy-Booth D J, Prescott C E, Grayston S J. Microbial functional genes involved in nitrogen fixation, nitrification and denitrification in forest ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 75: 11-25.
- [14] 王邵军, 王红, 李霁航. 热带森林不同演替阶段蚂蚁巢穴的分布特征及其影响因素. *生物多样性*, 2016, 24(8): 916-921.
- [15] 陈秀波, 朱德全, 赵晨晨, 张路路, 陈立新, 段文标. 凉水国家自然保护区不同林型红松林土壤 *nosZ* 型反硝化微生物群落组成和多样性分析. *林业科学*, 2019, 55(8): 106-117.
- [16] 朱平, 陈仁升, 宋耀选, 刘光琇, 陈拓, 张威. 祁连山不同植被类型土壤微生物群落多样性差异. *草业学报*, 2015, 24(6): 75-84.
- [17] 杨效东. 热带季节雨林凋落叶分解过程中的中小型土壤节肢动物的群落结构及动态. *生物多样性*, 2004, 12(2): 252-261.
- [18] 张哲, 王邵军, 陈闽昆, 曹润, 李少辉. 西双版纳不同演替阶段热带森林土壤 N_2O 排放的时间特征. *生态环境学报*, 2019, 28(4): 702-708.
- [19] Vance E D, Brookes P C, Jenkinson B D. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*, 1987, 19(6): 703-707.
- [20] Gu Y F, Liu T, Bai Y, Xiang Q J, Zhang X P, Chen Q. Pyrosequencing of *nirS* gene revealed spatial variation of denitrifying bacterial assemblages in response to wetland desertification at Tibet plateau. *Journal of Mountain Science*, 2019, 16(5): 1121-1132.
- [21] Spain A M, Krumholz L R, Elshahed M S. Abundance, composition, diversity and novelty of soil *Proteobacteria*. *The ISME Journal*, 2009, 3(8): 992-1000.
- [22] Fierer N, Bradford M A, Jackson R B. Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*, 2007, 88(6): 1354-1364.
- [23] Wang S J, Wang H, Li J H, Zhang Z. Ants can exert a diverse effect on soil carbon and nitrogen pools in a Xishuangbanna tropical forest. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 113: 45-52.
- [24] Warnecke F, Amann R, Pernthaler J. Actinobacterial 16S rRNA genes from freshwater habitats cluster in four distinct lineages. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(3): 242-253.
- [25] 洪璇, 洪有为, 陈仲巍, 赵春贵, 杨素萍. 九龙江河口区 *nirS* 型反硝化细菌多样性及系统发育学分析. *微生物学通报*, 2015, 42(9): 1639-1650.
- [26] Winter C, Hein T, Kavka G, Mach R L, Farnleitner A H. Longitudinal changes in the bacterial community composition of the Danube River: a whole-river approach. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(2): 421-431.
- [27] Yoshida M, Ishii S, Otsuka S, Senoo K. Temporal shifts in diversity and quantity of *nirS* and *nirK* in a rice paddy field soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41(10): 2044-2051.
- [28] 张哲, 王邵军, 李霁航, 曹润, 陈闽昆, 李少辉. 土壤易氧化有机碳对西双版纳热带森林群落演替的响应. *生态学报*, 2019, 39(17): 6257-6263.
- [29] 刘洋, 曾全超, 黄懿梅. 基于 454 高通量测序的黄土高原不同乔木林土壤细菌群落特征. *中国环境科学*, 2016, 36(11): 3487-3494.
- [30] Ligi T, Truu M, Truu J, Nõlvak H, Kaasik A, Mitsch W J, Mander Ü. Effects of soil chemical characteristics and water regime on denitrification genes (*nirS*, *nirK*, and *nosZ*) abundances in a created riverine wetland complex. *Ecological Engineering*, 2014, 72: 47-55.
- [31] 尹昌, 范分良, 李兆君, 宋阿琳, 朱平, 彭畅, 梁永超. 长期施用有机和无机肥对黑土 *nirS* 型反硝化菌种群结构和丰度的影响. *环境科学*, 2012, 33(11): 3967-3975.
- [32] 曹乾斌, 王邵军, 任玉连, 张哲, 陈闽昆, 李少辉, 曹润, 王平, 左倩倩. 蚂蚁筑巢对西双版纳热带森林土壤碳矿化动态的影响. *应用生态学报*, 2019, 30(12): 4231-4239.
- [33] Rich J J, Heichen R S, Bottomley P J, Cromack Jr K, Myrold D D. Community composition and functioning of denitrifying bacteria from adjacent meadow and forest soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(10): 5974-5982.
- [34] 方丽娜, 杨效东, 杜杰. 土地利用方式对西双版纳热带森林土壤微生物生物量碳的影响. *应用生态学报*, 2011, 22(4): 837-844.
- [35] Pett-Ridge J, Petersen D G, Nuccio E, Firestone M K. Influence of oxic/anoxic fluctuations on ammonia oxidizers and nitrification potential in a wet tropical soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 2013, 85(1): 179-194.
- [36] Morley N, Baggs E M, Dörsch P, Bakken L. Production of NO , N_2O and N_2 by extracted soil bacteria, regulation by NO_2^- and O_2 concentrations. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 65(1): 102-112.
- [37] Hallin S, Jones C M, Schloter M, Philippot L. Relationship between N-cycling communities and ecosystem functioning in a 50-year-old fertilization experiment. *The ISME Journal*, 2009, 3(5): 597-605.