

DOI: 10.5846/stxb202011112920

周婷婷, 胡文革, 钟镇涛, 王月娥, 陈婷, 张雪. 不同季节艾比湖湿地盐角草根际 *nirS*-型与 *nirK*-型反硝化细菌群落组成分析. 生态学报, 2022, 42(13): 5314-5327.

Zhou T T, Hu W G, Zhong Z T, Wang Y E, Chen T, Zhang X. Community composition of *nirS*-type and *nirK*-type denitrifying bacteria in rhizosphere of *Salicornia europaea* in the Ebinur Lake Wetland during different seasons. Acta Ecologica Sinica, 2022, 42(13): 5314-5327.

## 不同季节艾比湖湿地盐角草根际 *nirS*-型与 *nirK*-型反硝化细菌群落组成分析

周婷婷, 胡文革\*, 钟镇涛, 王月娥, 陈婷, 张雪

石河子大学生命科学学院, 石河子 832000

**摘要:**旨在了解艾比湖湿地盐生植物盐角草根际与非根际中不同类型反硝化细菌的分布及其随季节变化情况,为温带干旱地区荒漠盐化生态系统的代表—艾比湖湿地在生态植被恢复过程中,由微生物推动的土壤氮素循环过程提供数据支撑。采集了艾比湖湿地夏、秋、春三个季节的盐角草根际和非根际土壤样本,通过高通量测序技术,比较分析了 *nirS*-型和 *nirK*-型两种类型的反硝化细菌的多样性和群落结构特点;利用 RDA (redundancy analysis) 探究了土壤理化因素对反硝化细菌多样性及群落结构的影响。艾比湖湿地盐角草根际与非根际中, *nirS*-型和 *nirK*-型反硝化细菌多样性最高的为秋季根际土壤样本;各土壤样本中的反硝化细菌多样性均呈现根际 > 非根际。盐角草各土壤样本中的 *nirS*-型反硝化细菌在门分类水平上隶属于变形菌门 (*Proteobacteria*), 厚壁菌门 (*Firmicutes*) 和放线菌门 (*Actinobacteria*), 而 *nirK*-型反硝化细菌在门水平上分类仅包括了 *Proteobacteria* 和 *Firmicutes*。 *Proteobacteria* 在各土壤样本中的占比均较高;其中 *Gamma-Proteobacteria* 的盐单胞菌属 (*Halomonas*) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 是各土壤样本所共有的 *nirS*-型反硝化菌的优势菌属,但它们在每个土壤样本中的相对丰度各有差异。 *Alpha-Proteobacteria* 的根瘤菌属 (*Rhizobium*) 是盐角草各土壤样本中较为广泛存在的 *nirK*-型反硝化细菌。艾比湖湿地盐角草各土壤样本中的反硝化细菌群落结构存在着一定的差异。RDA 结果显示含水量、有机质、全氮和铵态氮等对各土壤样本中的 *nirS*-型反硝化细菌的多样性影响较大,含水量、有机质、全氮、碱解氮等是 *nirK*-型反硝化细菌多样性的主要影响因素。土壤电导率、全磷、全钾、全氮和碱解氮协同影响 *nirS*-型反硝化细菌的群落结构,有机质、速效钾、速效磷、pH 和硝态氮是 *nirK*-型反硝化细菌群落结构组成的主要影响因素。艾比湖湿地反硝化细菌呈现季节性变化, *nirS*-型和 *nirK*-型反硝化细菌以不同的主要菌属,共同推进湿地反硝化作用。而对于湿地生态系统的保护,则需要进行长期而广泛的土壤状态评估和土壤反硝化微生物群落的动态监测。

**关键词:**艾比湖湿地;根际与非根际;*nirS*-型和 *nirK*-型反硝化细菌;群落组成

## Community composition of *nirS*-type and *nirK*-type denitrifying bacteria in rhizosphere of *Salicornia europaea* in the Ebinur Lake Wetland during different seasons

ZHOU Tingting, HU Wenge\*, ZHONG Zhentao, WANG Yuee, CHEN Ting, ZHANG Xue

College of Life Sciences, Shihezi University, Shihezi 832000, China

**Abstract:** The purpose of this study is to understand the distribution and seasonal variation of different types of denitrifying bacteria in the rhizosphere and non-rhizosphere of the saline plant *Salicornia europaea* in the Ebinur Lake Wetland, so as to provide data support for the process of soil nitrogen cycling driven by microorganisms in the process of vegetation restoration

基金项目:国家自然科学基金项目(31160026);国家自然科学基金项目(31560040)

收稿日期:2020-11-11; 网络出版日期:2022-03-18

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: hwg-t@163.com

in the Ebinur Lake Wetland, a representative of desert salinization ecosystem in temperate arid area. In this study, the rhizosphere and non-rhizosphere soil samples of *Salicornia europaea* were collected from the Ebinur Lake Wetland in summer, autumn and spring. The diversity and community structure characteristics of *nirS*-type and *nirK*-type denitrifying bacteria were compared and analyzed by high-throughput sequencing. RDA (redundancy analysis) was used to explore the effects of soil physical and chemical factors on the diversity and community structure of denitrifying bacteria. Among the soil samples of *Salicornia europaea* in the Ebinur Lake Wetland, the highest genotype diversity of denitrifying bacteria in *nirS* and *nirK* was the autumn rhizosphere, and the diversity of denitrifying bacteria in each soil sample showed rhizosphere > non-rhizosphere. The *nirS*-type denitrifiers in rhizosphere and non-rhizosphere soil samples of *Salicornia europaea* belonged to *Proteobacteria*, *Firmicutes* and *Actinobacteria*, while the classification of *nirK*-type denitrifying bacteria only includes *Proteobacteria*, *Firmicutes*. *Proteobacteria* accounted for a higher proportion in each soil sample. *Halomonas* and *Pseudomonas* of *gamma-Proteobacteria* were the dominant genera of *nirS*-type denitrifiers shared by all soil samples, but the relative abundance in each soil sample was different. *Rhizobium* of *alpha-Proteobacteria* was a kind of *nirK*-type denitrifiers widely existing in the soil samples of *Salicornia europaea*. There were certain differences in the community structure of denitrifying bacteria among the soil samples of *Salicornia europaea* in the Ebinur Lake Wetland. The results of RDA showed that water content, organic matter, total nitrogen, and ammonium nitrogen had a great influence on the diversity of *nirS*-type denitrifying bacteria in soil samples, while water content, organic matter, total nitrogen and alkali hydrolyzed nitrogen were the main factors affecting the diversity of *nirK*-type denitrifying bacteria. Soil electrical conductivity, total phosphorus, total potassium, total nitrogen and alkali-hydrolyzable nitrogen synergistically affected the community structure of *nirS*-type denitrifying bacteria, while organic matter, available potassium, available phosphorus, pH and nitrate nitrogen were the main influencing factors of the community structure of *nirK*-type denitrifying bacteria. With the change of seasons, the diversity and community structure of *nirS*-type and *nirK*-type denitrifying bacteria in rhizosphere and non-rhizosphere of *Salicornia europaea* were changed. The denitrifying bacteria of the two genotypes, with different main genus, jointly promoted the denitrification of wetland. For the protection of wetland ecosystems, long-term and extensive soil state assessment and dynamic monitoring of soil denitrifying microbial flora are required.

**Key Words:** Ebinur Lake Wetland; the rhizosphere and non-rhizosphere; *nirS*-type and *nirK*-type denitrifying bacteria; community composition

新疆艾比湖湿地国家自然保护区位于东经 82°33'—83°53', 北纬 44°37'—45°15', 总面积达到 2670.8 km<sup>2</sup>, 是国内典型的温带干旱区湿地荒漠生态系统<sup>[1]</sup>, 作为北疆地区的天然生态屏障, 对于维护区域生态平衡、调节气候和保证物种的多样性等方面都起着极为重要的作用<sup>[2]</sup>。近年来, 艾比湖湿地土壤逐年荒漠化、植被也不断退化, 加大对该地区的研究迫在眉睫。氮素作为组成地球生命的物质之一, 也是湿地恢复的限制养分之一。目前, 对于艾比湖湿地植物根际与非根际中氮素转化过程中的固氮菌<sup>[3-5]</sup>, 硝化作用中的氨氧化细菌和氨氧化古菌<sup>[6-7]</sup>的群落结构及多样性已有部分研究, 但对于反硝化过程中的反硝化细菌的多样性情况随季节性变化状况尚未明确。

反硝化作用是氮循环过程中氮素去除的重要环节<sup>[8]</sup>, 而亚硝酸盐还原过程又是其中最关键的过程及限速步骤, 该过程主要由亚硝酸盐还原酶推动, 编码该酶的基因为 *nirK* 和 *nirS* 基因。目前, 关于反硝化细菌的研究主要涉及不同的环境, 例如海湾、河口沉积物、活性污泥、人工湿地<sup>[9-12]</sup>, 但不同类型的环境中的反硝化过程存在着明显的时空差异<sup>[13-14]</sup>。*nirS* 和 *nirK* 两种基因型的反硝化细菌的分布具有一定的环境特异性, 前者的氧化还原条件较低<sup>[15]</sup>; 目前已知其存在于超过 70% 的已知反硝化细菌中, 在环境中的分布更为广泛<sup>[16]</sup>; *nirK* 基因型反硝化细菌大多不明确分类归属<sup>[17-18]</sup>。

*nirS* 和 *nirK* 两种基因型反硝化细菌群落的多样性与植被类型、土壤状况等密切相关<sup>[19]</sup>。高志强<sup>[20]</sup>等在

对于珠江口表层沉积物中发现,盐度、氮素水平(总氮、铵态氮、硝态氮、亚硝态氮)是影响 *nirS*-型反硝化细菌群落分布的重要因素。莫旭华等<sup>[21]</sup>用 RFLP 技术对小麦土壤的研究结果表明,无机氮肥含量与 *nirS*-型反硝化细菌的群落结构显著相关。张文学等<sup>[22]</sup>利用 qPCR 技术结合 DGGE 技术研究氮肥增效剂对水稻土壤中的反硝化细菌丰度及群落结构的影响,结果表明,氮肥施加与否影响着反硝化细菌的丰度和群落结构。扬扬<sup>[23]</sup>研究发现,艾比湖湿地植物根际反硝化微生物群落结构与土壤电导率、有机质、铵态氮和硝态氮等相关。此外,靳希桐等<sup>[4]</sup>对于艾比湖湿地土壤的理化性质研究发现,湿地中较为广泛存在的盐角草植物,其生长的土壤类型为碱性沙壤土,土壤中的有机质含量较高,含水量较低。

集中开展湿地生态系统中盐角草植物覆盖区各土壤理化因子对反硝化微生物多样性及群落结构的响应,对湿地生境特征及其演化的深入认识,具有非常重要的作用。本研究采集艾比湖湿地夏、秋、春 3 个季节盐角草植物覆盖区的根际与非根际样本,利用高通量测序技术,分别以 *nirS* 和 *nirK* 基因作为分子标记比较研究盐角草根际与非根际样本中的反硝化细菌的多样性状况,了解湿地中不同类型反硝化细菌的分布情况及季节性变化,旨在为湿地的土壤肥力和土壤功能改善、生态植被恢复提供及生态系统保护提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 土壤样品的采集

分别于 2017 年 7、10 月和 2018 年 4 月在艾比湖湿地盐角草群落区(82°43'46.35"E,44°51'3.59"N,海拔 193.2 m),参照文献<sup>[24]</sup>的方法,采集根际和非根际土样。随机选择 3 个 10 m×10 m 大小的植物群落样区,在每个样区中随机选择 5 个采样位点,采集与植物根部表面紧密结合的土壤,共 15 个土样,将 15 个土样混合即为根际样本。采集植物非根际样本时,在采集根际样本区域,采集无植物生长 5—20 cm 土层的土壤即为非根际样本。将采集土样装入无菌袋于 4℃ 手提式冰箱暂时保存运输回实验室,保存于-80℃ 冰箱,用于土壤总 DNA 的提取。2017 年 7、10 月和 2018 年 4 月采集的盐角草根际土样分别命名为 S7、S10、S4;采集的非根际土样分别命名为 SN7、SN10、SN4。

### 1.2 样品理化性质指标测定

土壤环境因子数据:土壤电导率(EC)、有机质(SM)、含水量(SOM)、速效氮(AN)、速效磷(AP)、速效钾(AK)、全氮(TN)、全磷(TP)、全钾(TK)、硝态氮(NO<sub>3</sub>-N)、铵态氮(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N)参照土壤常规分析方法<sup>[25]</sup>进行测定。

### 1.3 土壤总 DNA 的提取及反硝化细菌基因 PCR 扩增

土壤预处理:取适量保存于-80℃ 冰箱的湿润土壤置于无菌且预冷后的研钵中,迅速研磨至土壤颗粒完全破碎后用于提取总 DNA。用 DNeasy PowerSoil Kits 试剂盒(MoBio 公司)提取各样本总 DNA,操作步骤参照试剂盒说明书。每个土壤样品各提取 3 个总 DNA,混匀后用于反硝化细菌基因序列的扩增。

选用引物 *nirS*-cd3aF: 5'-GTSAACGTSAAAGGARACSGG- 3' 和 *nirS*-R3cd: 5'- GASTTCGGRTGSGTCTTGA-3'<sup>[26]</sup>,PCR 扩增 *nirS* 基因序列,扩增片段长度约为 425 bp。选用引物 *nirK*-F: 5'-TCATGGTGCTGCCGCGY GANGG-3'和 *nirK*-R: 5'-GAACTTGCCGCTKCCCCAGAC-3'<sup>[27]</sup>,PCR 扩增 *nirK* 基因序列,扩增片段长度约为 326 bp。*nirS* 基因扩增条件为:95℃ 3 min;95℃ 30 s,54℃ 30 s,72℃ 30 s,35 个循环;72℃ 10 min。*nirK* 基因扩增条件为:95℃ 3 min;95℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 30 s,32 个循环;72℃ 10 min。PCR 反应体系(50 μL): 2×PCR Mix 25 μL,上游、下游引物各 1 μL,DNA 模板 3 μL,ddH<sub>2</sub>O 20 μL。

分别用带有不同 barcode 的 *nirS* 基因引物和 *nirK* 基因引物对各根际和非根际土壤样品的总 DNA 进行 PCR 扩增,用 1%浓度的琼脂糖凝胶电泳检测后,将有清晰条带的 PCR 扩增产物送诺禾致源公司进行高通量测序,测序平台为 Illumina Hiseq PE250。

### 1.4 数据处理与分析

对高通量测序得到的原始数据进行拼接、过滤,质控后得到 Effective Tags,利用 Uparse 软件对获得的

Effective Tags 进行聚类分析,基于 97%的一致性划分 OTUs(operational taxonomic units,可操作性分类单元),然后对每个 OTU 中多次出现的序列进行过滤以获得代表序列,利用 Silva132 数据库进行物种注释(阈值为 0.8—1),进而确定基因序列在各分类水平上的物种信息及群落结构组成情况。利用 MUSCLE 软件进行多序列比对,并对各样本数据进行均一化处理,用于计算反硝化细菌的多样性,进而利用 Mothur 软件分析 Shannon 指数、Simpson 指数 Chao 1 指数和 ACE 指数,探究不同样本间群落结构的差异<sup>[28]</sup>。利用 Canoco4.5 软件对反硝化细菌的多样性及主要类群与环境因子进行冗余分析(RDA),得到显著影响反硝化细菌群落多样性及丰富度的环境因子。

## 2 结果与分析

### 2.1 盐角草根际与非根际样本土壤理化性质

盐角草根际与非根际样本土壤理化性质特征:土壤盐度呈现明显的季节性变化,土壤碱解氮、钾元素的含量在不同季节存在显著性差异,土壤硝态氮、速效磷的含量在根际样本和非根际样本间存在差异,土壤整体有机质含量较高,水分含量较低。

### 2.2 测序数据分析

高通量测序的所有样本中反硝化细菌 *nirS* 基因和 *nirK* 基因的有效序列数均超过 50000 条,且所有样本的覆盖率(表 1)均高于 99.0%,表明这些样本的 *nirS* 基因和 *nirK* 基因的高通量测序数据能真实地反映样本的信息。

表 1 艾比湖湿地盐角草根际与非根际土样中 *nirS*-型和 *nirK*-型反硝化细菌多样性

Table 1 Diversity of *nirS*-type and *nirK*-type denitrifying bacteria in rhizosphere and non-rhizosphere samples of *Salicornia europaea* in the Ebinur Lake Wetland

| 样本名<br>Sample name | 基因<br>Gene  | 有效序列<br>Effective sequences | 操作分类<br>单元 OTU<br>(Operational taxonomic units) | Shannon 指数<br>Shannon index | Simpson 指数<br>Simpson index | Chao1 指数<br>Chao1 | ACE 指数<br>the ACE estimator | 覆盖率<br>Goods coverage |
|--------------------|-------------|-----------------------------|---|-----------------------------|-----------------------------|-------------------|-----------------------------|-----------------------|
| S7                 | <i>nirS</i> | 94248                       | 932   | 5.093                       | 0.805                       | 1096              | 1092                        | 0.996                 |
|                    | <i>nirK</i> | 67426                       | 3383  | 9.967                       | 0.995                       | 3520              | 3556                        | 0.992                 |
| SN7                | <i>nirS</i> | 81657                       | 485   | 5.388                       | 0.935                       | 520               | 533                         | 0.999                 |
|                    | <i>nirK</i> | 67201                       | 1000  | 6.954                       | 0.978                       | 1058              | 1084                        | 0.997                 |
| S10                | <i>nirS</i> | 87558                       | 512   | 5.862                       | 0.952                       | 559               | 536                         | 0.999                 |
|                    | <i>nirK</i> | 61747                       | 3104  | 9.984                       | 0.996                       | 3202              | 3199                        | 0.994                 |
| SN10               | <i>nirS</i> | 84603                       | 463   | 3.171                       | 0.641                       | 493               | 506                         | 0.999                 |
|                    | <i>nirK</i> | 64781                       | 623   | 6.805                       | 0.973                       | 640               | 651                         | 0.999                 |
| S4                 | <i>nirS</i> | 96266                       | 444   | 5.375                       | 0.924                       | 477               | 467                         | 0.999                 |
|                    | <i>nirK</i> | 55890                       | 1239  | 7.744                       | 0.978                       | 1317              | 1296                        | 0.997                 |
| SN4                | <i>nirS</i> | 90139                       | 200   | 4.383                       | 0.880                       | 224               | 213                         | 1.000                 |
|                    | <i>nirK</i> | 60972                       | 976   | 6.428                       | 0.959                       | 1046              | 1067                        | 0.997                 |

注:S7:7月的盐角草根际样品 *Salicornia europaea* rhizosphere sample in July;S10:10月的盐角草根际样品 *Salicornia europaea* rhizosphere sample in October;S4:4月的盐角草根际样品 *Salicornia europaea* rhizosphere sample in April;SN7:7月的盐角草非根际样品 *Salicornia europaea* non-rhizosphere sample in July;SN10:10月的盐角草非根际样品 *Salicornia europaea* non-rhizosphere sample in October;SN4:4月的盐角草非根际样品 *Salicornia europaea* non-rhizosphere sample in April

### 2.3 盐角草根际与非根际样本中的反硝化细菌基因多样性

利用每个样本的 OTU 数目、覆盖率、Shannon 指数、Simpson 指数和 Chao 1 指数和 ACE 指数评估反硝化细菌基因多样性及丰富度。

由表 1 可知,在艾比湖湿地各土样中,*nirS*-型反硝化细菌 Shannon 指数、Simpson 指数均呈现出 S10>SN7>

S4>S7>SN4>SN10, *nirK*-型反硝化细菌 Shannon 指数、Simpson 指数均呈现出 S10>S7>S4>SN7>SN10>SN4; 在艾比湖湿地 3 个季节盐角草中, *nirS*-型反硝化细菌 ACE 指数和 Chao1 指数呈现出 S7>S10>SN7>SN10>S4>SN4, *nirK*-型反硝化细菌群落 ACE 指数和 Chao1 指数呈现出 S7>S10>S4>SN7>SN4>SN10。

总体而言, 盐角草根际土样中的 *nirS*-型和 *nirK*-型反硝化细菌群落多样性均普遍高于非根际土样, *nirS*-型反硝化细菌群落多样性在季节上呈现秋季>春季>夏季, *nirK*-型反硝化细菌群落多样性在季节上呈现秋季>夏季>春季, 可知两种类型反硝化细菌群落多样性最高的均为秋季的根际土样。

## 2.4 盐角草根际与非根际样本中的反硝化细菌群落结构组成

### 2.4.1 门水平上的群落结构组成

艾比湖湿地盐角草各样品中的 *nirS* 和 *nirK* 基因序列分别与数据库 Silva132 比对, 进行物种注释后分别统计其在门水平下的物种相对丰度, 结果见图 1 (Others 为未能鉴定出来的序列)。由图 1 可知, 在门分类水平上, 盐角草根际与非根际各样本中的 *nirS*-型反硝化细菌主要隶属于变形菌门 (*Proteobacteria*), 厚壁菌门 (*Firmicutes*) 和放线菌门 (*Actinobacteria*)。 *Proteobacteria* 在各样本中的相对丰度分别为 6.063%、10.692%、27.995%、5.139%、10.539%、16.388%, 表明 *Proteobacteria* 为每个样本的绝对优势菌门, *Firmicutes* 在各样本中的相对丰度分别为 0.007%、0%、0.002%、0.007%、0.019%、0%, 其普遍存在于根际各样本中, *Actinobacteria* 仅存在于夏季根际样本中, 相对丰度为 0.002%, 占比较低。各样本中的 *nirK*-型反硝化细菌仅隶属于 *Proteobacteria* 和 *Firmicutes*。 *Proteobacteria* 在各样本中的相对丰度分别为 0.295%、5.117%、0.523%、2.583%、0.400%、2.983%, 为每个样本的优势菌门, 但其在每个样本中的占比又存在着差异, *Firmicutes* 仅存在于夏季盐角草根际样本中, 相对丰度为 0.195%。

比较两种类型的反硝化细菌在门分类水平上的差异发现(表 2), 在盐角草根际与非根际两种类型的反硝化细菌所共有的门为 *Proteobacteria* 和 *Firmicutes*, 但它们在各样本中的占比存在差异。相比于 *nirK*-型反硝化细菌, *nirS*-型反硝化细菌中的这两个门的占比相对较多。

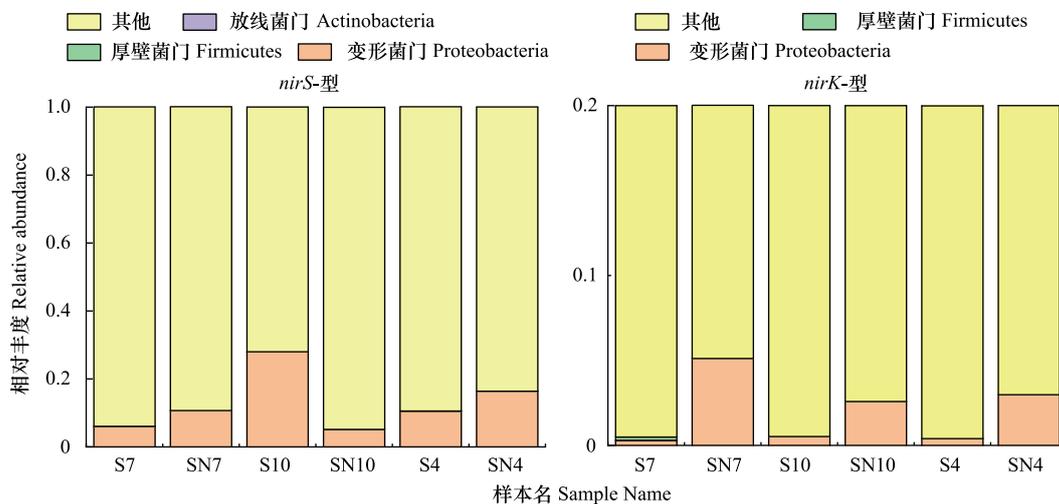


图 1 艾比湖湿地盐角草根际与非根际样本中 *nirS*-型和 *nirK*-型反硝化细菌在门分类水平上的群落结构

Fig.1 Community structure of *nirS*-type and *nirK*-type denitrifying bacteria at the level of phylum in rhizosphere and non-rhizosphere samples of *Salicornia europaea* in the Ebinur Lake Wetland

S7:7 月的盐角草根际样品 *Salicornia europaea* rhizosphere sample in July; S10:10 月的盐角草根际样品 *Salicornia europaea* rhizosphere sample in October; S4:4 月的盐角草根际样品 *Salicornia europaea* rhizosphere sample in April; SN7:7 月的盐角草非根际样品 *Salicornia europaea* non-rhizosphere sample in July; SN10:10 月的盐角草非根际样品 *Salicornia europaea* non-rhizosphere sample in October; SN4:4 月的盐角草非根际样品 *Salicornia europaea* non-rhizosphere sample in April

表 2 盐角草根际和非根际样本中 *nirS*-型与 *nirK*-型反硝化细菌在门水平上的群落结构

Table 2 Community structure of *nirS*-type and *nirK*-type denitrifying bacteria at the phylum level in rhizosphere and non-rhizosphere samples of *Salicornia europaea*

| 样本名<br>Sample name | 变形菌门<br><i>Proteobacteria</i> |             | 厚壁菌门<br><i>Firmicutes</i> |             | 放线菌门<br><i>Actinobacteria</i> |
|--------------------|-------------------------------|-------------|---------------------------|-------------|-------------------------------|
|                    | <i>nirS</i>                   | <i>nirK</i> | <i>nirS</i>               | <i>nirK</i> | <i>nirS</i>                   |
| S7                 | 6.0626%                       | 0.2952%     | 0.0074%                   | 0.1954%     | 0.0019%                       |
| SN7                | 10.6923%                      | 5.1169%     | 0                         | 0           | 0                             |
| S10                | 27.9952%                      | 0.5232%     | 0.0019%                   | 0           | 0                             |
| SN10               | 5.1388%                       | 2.5834%     | 0.0074%                   | 0           | 0                             |
| S4                 | 10.5387%                      | 0.3995%     | 0.0185%                   | 0           | 0                             |
| SN4                | 16.3884%                      | 2.9829%     | 0                         | 0           | 0                             |

2.4.2 属水平上的群落结构组成

根据物种注释结果,统计各样本在属水平上的分布情况,每个样本在属水平上丰富度排名前 10 的物种的统计结果见图 2( Others 为未能鉴定到种属的序列)。 *nirS*-型反硝化细菌在属水平上排名前 10 的物种包括链球菌属 (*Streptococcus*)、海杆菌属 (*Marinobacter*)、磁螺菌属 (*Magnetospirillum*)、副球菌属 (*Paracoccus*)、含铜菌属 (*Cupriavidus*)、固氮螺旋菌属 (*Azospirillum*)、红长命菌属 (*Rubrivivax*)、短枝单胞菌属 (*Brachymonas*)、盐单胞菌属 (*Halomonas*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)。其中, *Pseudomonas* 和 *Halomonas* 是各土壤样本中 *nirS*-型反硝化细菌所共有的绝对优势属,其余 8 个属在各样本中的占比相对较低。在样本 S7 中 *nirS*-型反硝化细菌的优势属为 *Pseudomonas* (1.13%)、*Halomonas* (2.50%)、*Rubrivivax* (0.99%) 和 *Paracoccus* (0.64%), 展现出较为丰富且分布均衡的群落结构。在样本 S10 中 *nirS*-型反硝化细菌的优势属为 *Pseudomonas* (1.33%) 和 *Halomonas*

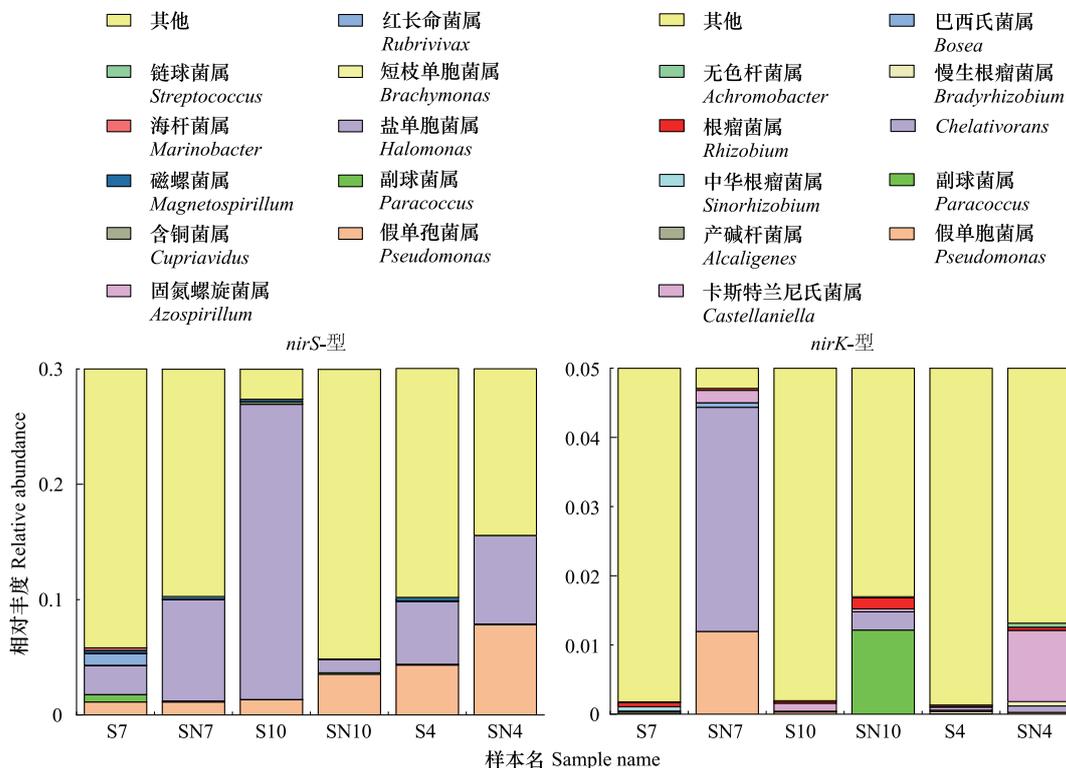


图 2 艾比湖湿地盐角草根际与非根际样本中 *nirS*-型和 *nirK*-型反硝化细菌在属分类水平上的群落结构

Fig.2 Community structure of *nirS*-type and *nirK*-type denitrifying bacteria at the level of genus in rhizosphere and non-rhizosphere samples of *Salicornia europaea* in the Ebinur Lake Wetland

(25.61%)。样本 S4 中所包含的属的种类同 S10 相似,区别在于缺少了 *Rubrivivax* 以及优势菌属的相对丰度不同。在样本 SN7 中 *nirS*-型反硝化细菌优势属为 *Pseudomonas* (1.12%)、*Halomonas* (8.78%),其他 5 个属的相对丰度均较低。在样本 SN10 中 *nirS*-型反硝化细菌的优势属为 *Pseudomonas* (3.54%) 和 *Halomonas* (1.15%),其余各属的分布较少且均匀。样本 SN4 主要包括了 *Pseudomonas* (1.13%)、*Halomonas* (2.50%)、*Azospirillum* (0.02%)、*Paracoccus* (0.08%) 和 *Magnetospirillum* (0.002%)。盐角草非根际土样中 *nirS*-型反硝化细菌的多样性相对较低。

*nirK*-型反硝化细菌在属水平上排名前 10 的物种包括 *Chelativorans*、慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*)、巴西氏菌属 (*Bosea*)、副球菌属 (*Paracoccus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、卡斯特兰尼氏菌属 (*Castellaniella*)、产碱杆菌属 (*Alcaligenes*)、中华根瘤菌属 (*Sinorhizobium*)、根瘤菌属 (*Rhizobium*)、无色杆菌属 (*Achromobacter*)。 *Castellaniella* 和 *Rhizobium* 是各土样中所共有的 *nirK*-型反硝化细菌属。根际各样本中 *nirK*-型反硝化细菌的各个属的分布较为均匀。*Pseudomonas* 和 *Chelativorans* 在样本 SN7 中的相对丰度较高,分别为 1.20% 和 3.24%; *Rhizobium* 在样本 SN10 中占比最高,为 0.16%; *Castellaniella* 在样本 SN4 中占比最高,为 1.03%,远高于在其他样本中的占比。

比较两种类型的反硝化细菌在属分类水平上的分布情况(表 3 和表 4),在所有土壤样本中共有的反硝化细菌的属为 *Pseudomonas* 和 *Paracoccus*,但二者在各样本中的相对丰度存在差异。*nirK*-型反硝化细菌中的 *Paracoccus* 仅存在于样本 SN10 中,相对丰度仅为 1.22%,较低;*nirS*-型反硝化细菌中的 *Pseudomonas* 在各样本中的相对丰度明显高于 *nirK*-型反硝化细菌。植物根际与非根际各样本中两种类型的反硝化细菌分别存在一定比例的独有属。*nirS*-型反硝化细菌中,在各样本中较为广泛存在的独有属是 *Halomonas*、*Azospirillum* 和 *Magnetospirillum*,在 *nirK*-型反硝化细菌中相对丰度较高的独有属是 *Rhizobium* 和 *Castellaniella*。

表 3 盐角草根际和非根际样本中的 *nirS*-型与 *nirK*-型反硝化细菌共有属

Table 3 Common genera of *nirS*-type and *nirK*-type denitrifying bacteria in rhizosphere and non-rhizosphere samples of *Salicornia europaea*

| 样本名<br>Sample name | 假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i> |             | 副球菌属 <i>Paracoccus</i> |             |
|--------------------|--------------------------|-------------|------------------------|-------------|
|                    | <i>nirS</i>              | <i>nirK</i> | <i>nirS</i>            | <i>nirK</i> |
| S7                 | 1.1255%                  | 0           | 0.6442%                | 0           |
| SN7                | 1.1200%                  | 1.1962%     | 0.0944%                | 0           |
| S10                | 1.3254%                  | 0.0326%     | 0.0130%                | 0           |
| SN10               | 3.5357%                  | 0           | 0.1222%                | 1.2157%     |
| S4                 | 4.3262%                  | 0.0043%     | 0.0722%                | 0           |
| SN4                | 7.8119%                  | 0.0261%     | 0.0759%                | 0           |

## 2.5 盐角草根际与非根际样本中反硝化细菌的多样性及群落结构影响因子分析

### 2.5.1 *nirS*-型反硝化细菌的多样性影响因子分析

图 3 为盐角草中 *nirS*-型反硝化细菌多样性指数与环境因子之间的 RDA 分析(RD1 和 RD2 轴的解释度分别为 93.7% 和 6.2%),样本 S7、S10 和 S4 分别位于 3 个不同的象限,且根际各样本与非根际各样本分别位于不同的象限,表明盐角草根际样本中的 *nirS*-型反硝化细菌的多样性在三个季节上存在一定的差异,且根际与非根际样本中的 *nirS*-型反硝化细菌的多样性也存在较大差异;*nirS*-型反硝化细菌的多样性指数之一 Shannon 指数与 SOM、AN 呈明显的正相关,与 SM 呈明显的负相关,而丰富度指数与 pH、EC、SOM、AP、TN 呈正相关,与 SM、TP、TK、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$  呈负相关;图 3 为盐角草各样本中的 *nirS*-型反硝化细菌属水平的 Top10 的菌属与环境因子之间的 RDA 分析(RD1 和 RD2 轴的解释度分别为 90.9% 和 8.9%),样本 S7、样本 S4 和样本 S10 在图中的位置较为分散,且根际各样本与非根际各样本也普遍分别位于不同的象限,表明三个季节盐角草各样本中的 *nirS*-型反硝化细菌群落结构发生改变,且根际与非根际的群落结构也存在着差异;*Paracoccus*、*Brachymonas*、*Rubrivivax* 和 *Marinobacter* 的相对丰度与 EC、AP 和 TN 呈正相关,与 TK、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和 TP 呈负相关;*Cupriavidus* 的相对丰度与 AN 呈正相关,而与其他理化因子之间的相关性较弱;*Azospirillum* 和 *Halomonas* 的相

对丰度与TK、AN 和 EC 呈正相关;*Magnetospirillum* 的相对丰度与 SOM、AN 呈正相关,与 TP、TK、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$  呈负相关;绝对优势属之一的 *Pseudomonas* 的相对丰度与 TP、TK 呈正相关,与 EC、TN 呈负相关。结果表明,SOM、SM、TN、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$  是影响盐角草土壤 *nirS*-型反硝化细菌多样性的主要环境因子。在属水平上,EC、TN、TK、TP 和 AN 含量变化是造成 *nirS*-型反硝化细菌群落结构差异的主要因素。

表 4 盐角草根际与非根际样本中的 *nirS*-型和 *nirK*-型反硝化细菌的独有属Table 4 Unique genera of *nirS*-type and *nirK*-type denitrifying bacteria in rhizosphere and non-rhizosphere samples of *Salicornia europaea*

| 分类 Classify                    | S7      | SN7     | S10      | SN10    | S4      | SN4     |
|--------------------------------|---------|---------|----------|---------|---------|---------|
| <i>nirS</i>                    |         |         |          |         |         |         |
| 盐单胞菌属 <i>Halomonas</i>         | 2.4954% | 8.7801% | 25.6053% | 1.1496% | 5.4628% | 7.6620% |
| 短枝单胞菌属 <i>Brachymonas</i>      | 0.0426% | 0       | 0        | 0.0093% | 0       | 0       |
| 红长命菌属 <i>Rubrivivax</i>        | 0.9922% | 0.0074% | 0.0019%  | 0.0537% | 0       | 0       |
| 固氮螺旋菌属 <i>Azospirillum</i>     | 0.0185% | 0.0093% | 0.0185%  | 0.0074% | 0.0056% | 0.0185% |
| 含铜菌属 <i>Cupriavidus</i>        | 0.0407% | 0.0185% | 0.1944%  | 0.0278% | 0.0130% | 0       |
| 磁螺菌属 <i>Magnetospirillum</i>   | 0.2332% | 0.2444% | 0.2129%  | 0.0222% | 0.2999% | 0.0019% |
| 海杆菌属 <i>Marinobacter</i>       | 0.2203% | 0       | 0        | 0.0093% | 0       | 0       |
| 链球菌属 <i>Streptococcus</i>      | 0.0074% | 0       | 0.0019%  | 0.0074% | 0.0185% | 0       |
| <i>nirK</i>                    |         |         |          |         |         |         |
| <i>Chelativorans</i>           | 0.0130% | 3.2390% | 0.0109%  | 0.2649% | 0       | 0.0934% |
| 慢生根瘤菌属 <i>Bradyrhizobium</i>   | 0.0239% | 0       | 0        | 0       | 0.0347% | 0.0630% |
| 巴西氏菌属 <i>Bosea</i>             | 0       | 0.0651% | 0        | 0       | 0.0195% | 0       |
| 卡斯特兰尼氏菌属 <i>Castellaniella</i> | 0.0022% | 0.1802% | 0.1151%  | 0.0412% | 0.0434% | 1.0290% |
| 产碱杆菌属 <i>Alcaligenes</i>       | 0.0065% | 0       | 0        | 0       | 0       | 0       |
| 中华根瘤菌属 <i>Sinorhizobium</i>    | 0.0630% | 0       | 0        | 0       | 0.0109% | 0       |
| 根瘤菌属 <i>Rhizobium</i>          | 0.0608% | 0.0282% | 0.0304%  | 0.1585% | 0.0195% | 0.0456% |
| 无色杆菌属 <i>Achromobacter</i>     | 0.0087% | 0       | 0.0065%  | 0.0174% | 0       | 0.0586% |

### 2.5.2 *nirK*-型反硝化细菌的多样性影响因子分析

图 4 为盐角草土壤中 *nirK*-型反硝化细菌多样性指数与环境因子之间的 RDA 分析(RD1 和 RD2 轴的解释度分别为 99.6%和 0.3%),样本 S4 位于第二象限,样本 S7 和样本 S10 在图中的距离较为接近,表明盐角草根际土壤中 *nirK*-型反硝化细菌的多样性在夏季与秋季差异较小,而在春季与夏季,春季与秋季之间差异较大;根际各样本与非根际各样本分别位于不同的象限,表明盐角草根际与非根际各样本中的 *nirS*-型反硝化细菌的多样性存在较大差异;*nirK*-型反硝化细菌的多样性指数均与 EC、SOM、AN、TN 呈正相关关系,与 SM、TP、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$  呈负相关;图 4 为盐角草各样本中 *nirK*-型反硝化细菌属水平的 Top10 的菌属与环境因子之间的 RDA 分析(RD1 和 RD2 轴的解释度分别为 82.4%和 11.7%),样本 S7、S10 和 S4 在图中位置较为接近,表明随着季节推移,盐角草根际各样本中的 *nirK*-型反硝化细菌群落结构变化不甚明显;而根际与非根际各样本分别普遍位于不同的象限,表明两者之间的群落结构存在较大差异;*Chelativorans* 和 *Pseudomonas* 的相对丰度与 pH、AP 呈正相关,与 TP、TK、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$  呈负相关;*Paracoccus* 的相对丰度与 SM、AP 呈正相关,与 SOM、AK 呈负相关;在属水平上,相对丰度排名前三的 *nirK*-型反硝化细菌主要受到 SM、AK、pH、AP 和  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  的影响。其余各属在图中均靠近原点,相对丰度均较低,并没有随季节变化发生明显的改变。结果表明,SM、SOM、AN、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$  是影响盐角草土壤 *nirK*-型反硝化细菌多样性的主要环境因子,而影响群落结构的主要因素有 SM、AK、pH、AP 和  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 。

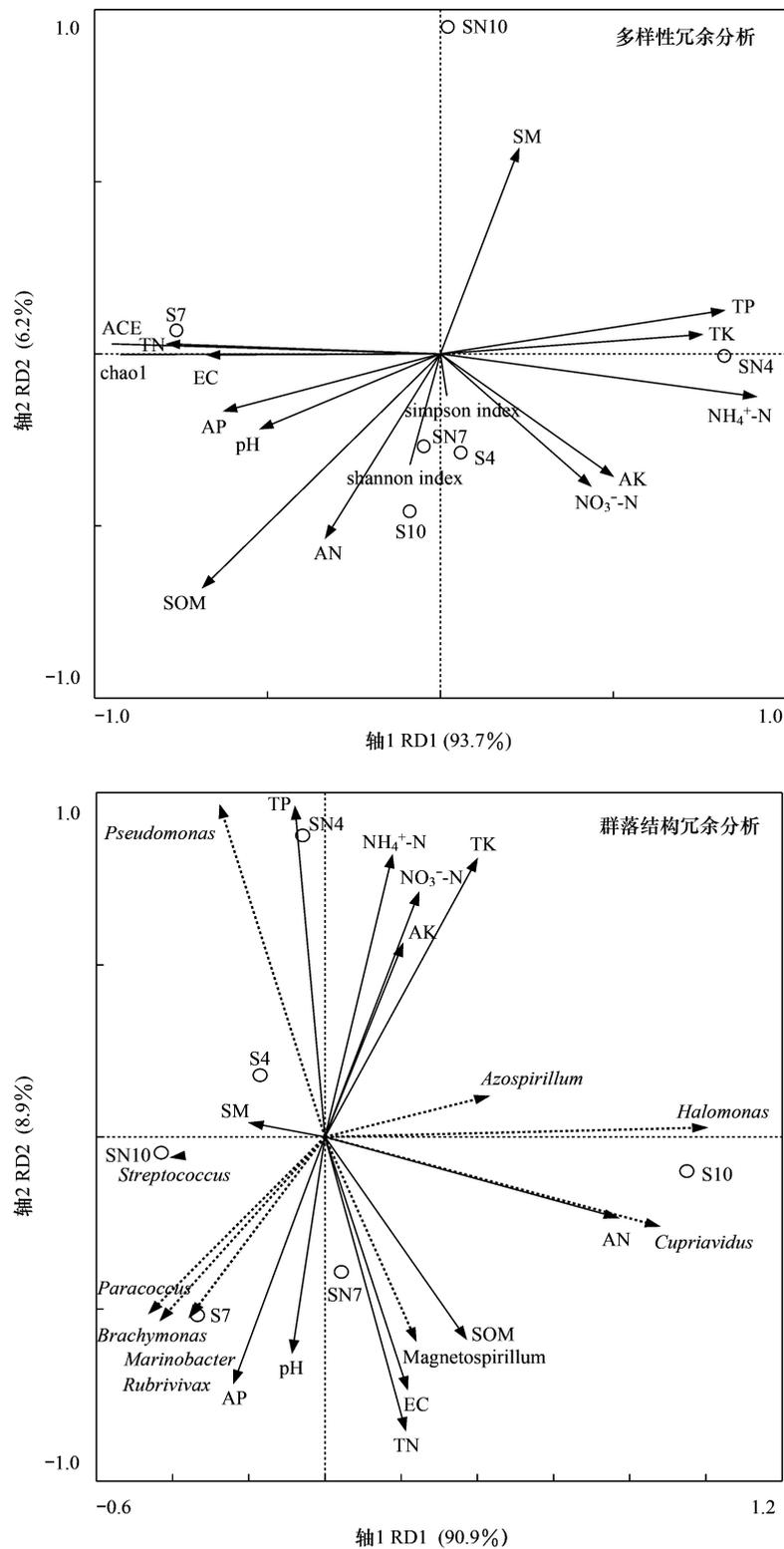


图3 不同季节盐角草根际和非根际土壤中 nirS-型反硝化细菌多样性、群落结构环境因子的冗余分析

Fig.3 RDA analysis between the diversity, community structure of nirS-type denitrifying bacteria and environmental factors in rhizosphere and non-rhizosphere soils of *Salicornia europaea* in different season

EC: 土壤电导率 Electric Conductivity; SM: 土壤有机质 Organic Matter; SOM: 土壤含水量 Soil Moisture Content; AN: 土壤速效氮 Available Nitrogen; AP: 土壤速效磷 Available Phosphorus; AK: 土壤速效钾 Available Potassium; TN: 土壤全氮 Total Nitrogen; TP: 土壤全磷 Total Phosphorus; TK: 土壤全钾 Total Potassium; NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N: 土壤硝态氮 Nitrate Nitrogen; NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N: 土壤铵态氮 Ammonium Nitrogen

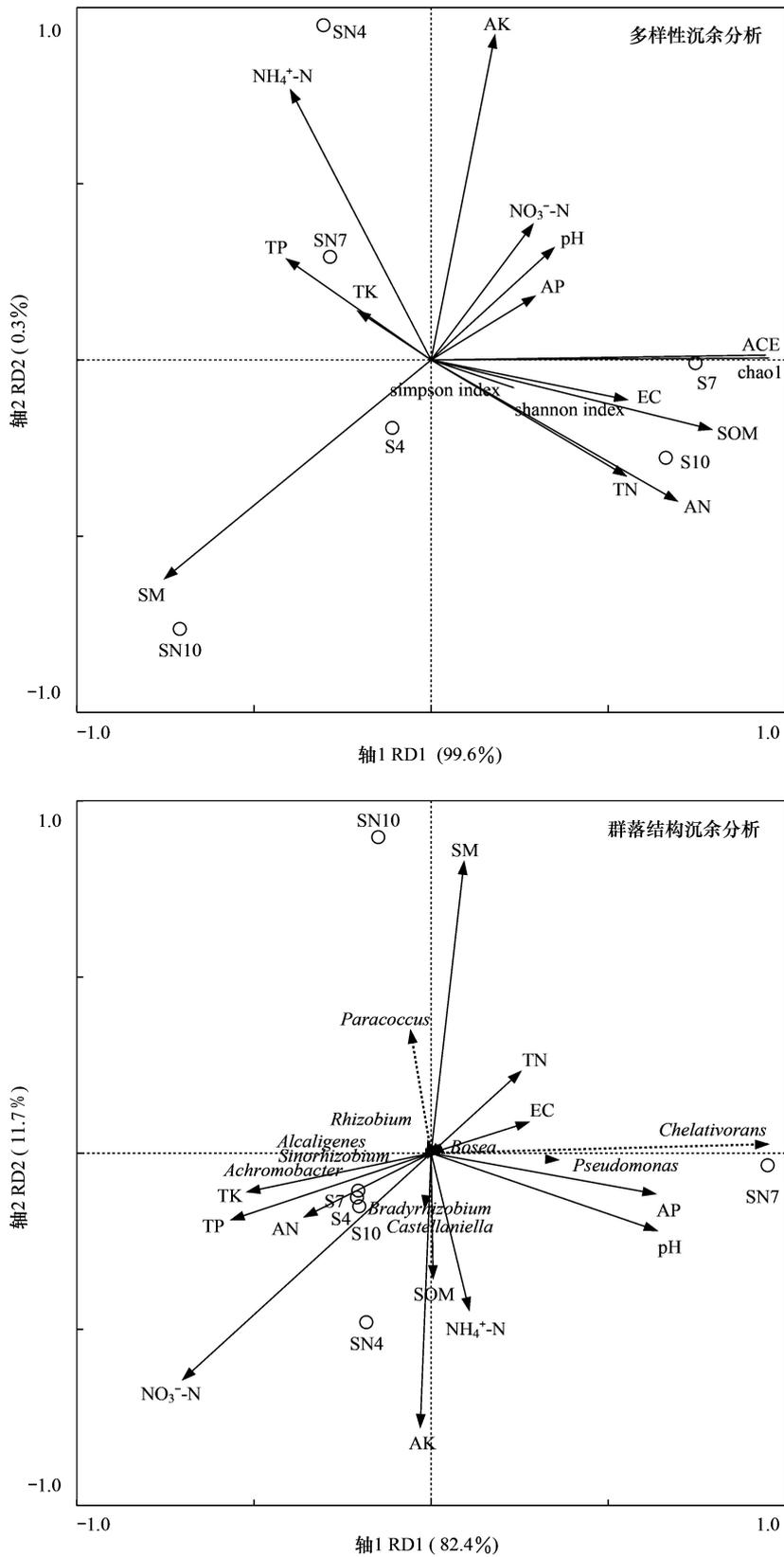


图 4 不同季节盐角草根际和非根际土壤中 nirK-型反硝化细菌多样性、群落结构与环境因子的冗余分析

Fig.4 RDA analysis between the diversity, community structure of nirK-type denitrifying bacteria and environmental factors in rhizosphere and non-rhizosphere soils of Salicornia europaea in different season

### 3 讨论

#### 3.1 盐角草根际与非根际样本中的反硝化细菌多样性及群落结构

多样性结果表明,艾比湖湿地盐角草各样品都含有较高的 *nirS* 和 *nirK* 基因多样性,且 *nirK* 基因多样性普遍高于 *nirS* 基因。秋季根际样本中的 *nirS* 和 *nirK* 基因多样性最高。盐角草根际各样本中的反硝化细菌多样性普遍高于非根际,这主要是植物的根系环境造成的,植物的根系能够产生有机酸、氨基酸、胞外酶等多种物质,这些物质在植物根际形成了植物根际效应<sup>[29]</sup>。

反硝化细菌群落结构分析表明,各样本中的 *nirS*-型反硝化细菌在门分类水平上主要包括了: *Proteobacteria*, *Firmicutes* 和 *Actinobacteria*,这与杨扬<sup>[23]</sup>的研究结果,湿地植物根际中的 *nirS* 基因序列在门水平仅有 *Proteobacteria*,其余均为 unidentified 的研究结果存在一定的差异;本研究测得各样本的 Coverage 均高于 0.995,这与她测得的 0.61 的覆盖度形成了鲜明的对比;本研究测得的多样性及丰富度指数也均高于其测定结果,这些都展现了高通量测序技术研究反硝化过程的优势。各土壤样本中的 *nirK*-型反硝化细菌在门分类水平上仅包括了 *Proteobacteria* 和 *Firmicutes*,且在各样本中存在的 others 的比例明显高于 *nirS*-型反硝化细菌,这表明盐角草各土壤样本中存在着较多的未知的 *nirK*-型反硝化细菌类群。*Proteobacteria* 作为各土壤样本中所共有的两种类型反硝化细菌优势门,是盐角草各样本中起主导作用的反硝化细菌门类。这与杨文焕等<sup>[30]</sup>对于包头市南海湖表层沉积物中的 *nirS*-型反硝化细菌的群落特征的研究结果是相符的,也与李博超<sup>[31]</sup>对辽宁河口沉积物中的反硝化细菌多样性的研究结论是较为一致的,这可能是由于 *Proteobacteria* 中包含了各种营养类型的细菌,且其在艾比湖湿地土壤中的分布较为广泛<sup>[32-34]</sup>。*Gamma-Proteobacteria* 的 *Halomonas* 和 *Pseudomonas* 作为各土壤样本中所共有的、分布较为广泛的 *nirS*-型反硝化细菌优势属,是盐角草各样本中起主导作用的 *nirS*-型反硝化细菌属,这与鲍林林等<sup>[35]</sup>在北运河沉积物中发现主要的反硝化细菌类群为 *Halomonas* 和 *Pseudomonas* 的结果是一致的,表明了这两个属在沉积物与土壤样本之间的广泛存在。*Pseudomonas* 是各土壤样本中共同存在的 *nirS*-型和 *nirK*-型反硝化细菌,主要是因为 *Pseudomonas* 具有着丰富的代谢多样性,能够适应不同的环境状况,可以普遍存在于不同的环境中。前人的研究已经证实了这一点,黄鑫等<sup>[36]</sup>在对珠江水体研究中发现 *nirK*-型和 *nosZ*-型反硝化细菌的优势属均为 *Pseudomonas*,杨文焕等<sup>[30]</sup>就在包头南海湖高原湖泊沉积物中发现 *nirS*-型反硝化细菌的优势属主要为 *Pseudomonas*。*Halomonas* 的菌株属于中度嗜盐菌,主要分布在高盐碱环境中<sup>[37]</sup>,而盐角草植物附近盐渍化的土壤环境适合该类菌株的生长。*Azospirillum* 是在各样本中少量存在的 *nirS*-型反硝化细菌,这可能与典型的反硝化菌属 *Azospirillum* 可以促进反硝化作用,加快脱氮过程相关<sup>[26]</sup>。*Alpha-Proteobacteria* 的 *Rhizobium* 为各土壤样本中所共有的、分布较为广泛的 *nirK*-型反硝化细菌优势属,是盐角草各样本中起主导作用的 *nirK*-型反硝化细菌属,部分样本中少量存在的 *Bradyrhizobium* 和 *Sinorhizobium* 的菌株,已有研究表明根瘤菌不仅可以与豆科植物共生固氮,其中的许多菌株都具有反硝化能力<sup>[38]</sup>。邹艳艳等<sup>[39]</sup>就曾研究发现了一株隶属于 *Rhizobium* 的异养硝化-好氧反硝化细菌,方芳等<sup>[40]</sup>对活性污泥反应器中的反硝化细菌进行研究,结果发现,所有样本中的大部分 *nirK*-型反硝化菌株均隶属于根瘤菌目。本研究发现 *Castellaniella* 也存在于各土壤样本中,陈寒玉等<sup>[41]</sup>从盐渍化土壤中分离获得一株高效好氧反硝化菌隶属于 *Castellaniella*,它可以高效地还原硝酸盐为一氧化氮、氮气、一氧化二氮。*Chelativorans* 是存在于盐角草根际与非根际这一盐碱环境中的 *nirK*-型反硝化细菌,戴九兰<sup>[42]</sup>等曾在黄河三角洲的盐碱农田土壤中发现了少量的 *Chelativorans* 的菌株。

#### 3.2 盐角草根际与非根际样本中的反硝化细菌多样性及群落结构对环境因子响应分析

RDA 分析结果表明,在盐角草根际与非根际中,*nirS*-型反硝化细菌的多样性及群落结构呈现季节性差异,夏秋两季中的 *nirK*-型反硝化细菌的多样性差别较小,且 *nirK*-型反硝化细菌的群落结构在各个季节上存在较小的差异。而根际与非根际各样本中的 *nirS*-型和 *nirK*-型反硝化细菌的多样性及群落结构存在着一定的差异性。

反硝化微生物的群落多样性在不同理化性质的土壤之间存在差异, 主要的原因有植被类型、植物残体和植物根系分泌物等<sup>[19]</sup>。前人研究发现盐度、氮素各水平(总氮、铵态氮、亚硝态氮)、有机质等均会影响反硝化细菌群落多样性及结构<sup>[20, 23]</sup>。杨文焕等<sup>[30]</sup>在对于包头市南海湖的表层沉积物中反硝化细菌多样性研究中发现, 反硝化菌的优势属 *Pseudomonas* 与硝态氮、亚硝态氮和总磷密切相关。本研究发现, EC、AP、TN、AN、SM、SOM 和铵态氮等对于 *nirS*-型反硝化细菌的多样性影响较大。影响 *nirK*-型反硝化细菌多样性的主要因素包括 SOM、TP、SM、TN、AN 和铵态氮。温慧洋等<sup>[43]</sup>研究了不同程度的盐碱土壤中的反硝化细菌功能基因丰度的关系, 结果发现在一定的盐分条件下, 盐度与反硝化细菌基因丰度存在正相关关系。EC 与反硝化细菌之间的相关性, 主要是 EC 会影响硝酸盐还原过程中的酶活性, 进而影响后续的反硝化过程。而艾比湖湿地土壤中硝态氮的含量并非反硝化细菌多样性的主要影响因素, 这与前人的研究结果是一致的, 李刚<sup>[44]</sup>等利用 DGGE 技术对沙地土壤中的 *nirK* 基因型的反硝化细菌进行研究, 结果表明 *nirK*-型反硝化细菌的多样性与硝态氮之间无相关关系, Alexander Mergel<sup>[45]</sup>等利用基因探针技术对酸性森林土壤中的反硝化细菌进行研究, 结果也表明了两者之间的相关性很低。对于盐角草各样本中反硝化细菌属水平的 Top10 的菌属与环境因子之间的冗余分析发现: AP、TP 和硝态氮的含量等与共有属 *Pseudomonas* 的相对丰度密切相关, 表明 *Pseudomonas* 的群落结构与磷元素之间存在较强的响应关系<sup>[46]</sup>, 这和 Wang Chun-Chin 等<sup>[47]</sup>的研究结果是一致的, 研究发现太湖流域沉积物中的优势菌属 *Pseudomonas* 的相对丰度与总磷含量相关, 而其他的优势菌属与环境因子的相关性较低。Azospirillum 的相对丰度和氮素水平密切相关, 相对丰度和碱解氮含量均是植物根际样本中较高。土壤 EC 含量整体呈现根际高于非根际, 而 *Halomonas* 的相对丰度并没有呈现此趋势, 表明, *Halomonas* 的相对丰度虽然受到 EC 的影响, 但并非仅由该因素决定。本研究中反硝化细菌中 top10 的菌属相对丰度高低并非单一土壤理化因子驱动, 两种类型的反硝化菌群落结构差异受到不同土壤理化因子影响。EC、TN、TK、TP 和 AN 在属水平协同影响 *nirS*-型反硝化细菌的生长; SM、AK、pH、AP 和硝态氮共同影响着 *nirK*-型反硝化细菌。艾比湖湿地盐角草根际与非根际中反硝化细菌的群落结构组成是由多种土壤理化因子共同起作用的, 这和 WOLSING M<sup>[48]</sup>等的研究结果具有一定的相似性。

#### 4 结论

在艾比湖湿地, 随着季节的变化, 盐角草根际与非根际中的 *nirS*-型和 *nirK*-型反硝化细菌多样性及群落结构发生着变化, 且两种基因型的反硝化细菌在多样性及群落结构方面存在着差异。盐角草根际各样本中的反硝化细菌基因多样性普遍高于非根际, 且根际与非根际中的反硝化细菌的群落结构并不相同。湿地土壤各理化因子对于两种基因型的反硝化细菌的多样性及群落结构的影响不尽相同。艾比湖湿地反硝化细菌呈现季节性变化, *nirS*-型和 *nirK*-型反硝化细菌以不同的主要菌属, 共同推进湿地反硝化作用。对于湿地生态系统的保护, 需要进行长期而广泛的土壤状态评估和土壤反硝化微生物菌群的动态监测。

#### 参考文献 (References):

- [ 1 ] Yu H Y, Zhang F, Kung H T, Johnson V C, Bane C S, Wang J, Ren Y, Zhang Y. Analysis of land cover and landscape change patterns in Ebinur Lake Wetland National Nature Reserve, China from 1972 to 2013. *Wetlands Ecology and Management*, 2017, 25(5): 619-637.
- [ 2 ] 格丽玛, 冷中笑, 何清, 潘晓玲. 新疆艾比湖湿地生态功能及其恢复的研究. *中国科技信息*, 2005(24): 84, 86.
- [ 3 ] 杨迪, 胡文革, 陈登稳, 董艳艳, 王艳萍, 韩晶. 艾比湖湿地固氮菌数量与有机碳、微生物生物量 C、N 在时空分布上的相关性研究. *西南农业学报*, 2013, 26(6): 2417-2421.
- [ 4 ] 靳希桐, 胡文革, 贺帅兵, 周婷婷, 王月娥, 钟镇涛. 不同时期艾比湖湿地盐角草群落土壤固氮微生物的多样性分析. *微生物学报*, 2019, 59(8): 1600-1611.
- [ 5 ] 兰鸿珠, 胡文革, 杨扬, 何园, 高岩. 艾比湖湿地盐节木土壤固氮微生物群落结构和丰度的环境异质性特点. *微生物学通报*, 2019, 46(7): 1597-1610.
- [ 6 ] He Y, Hu W G, Ma D C, Lan H Z, Yang Y, Gao Y. Abundance and diversity of ammonia-oxidizing Archaea and bacteria in the rhizosphere soil of three plants in the Ebinur Lake wetland. *Canadian Journal of Microbiology*, 2017, 63(7): 573-582.

- [ 7 ] 何园, 胡文革, 马得草, 杨扬, 兰鸿珠, 高岩. 艾比湖湿地盐节木根际土壤氨氧化微生物多样性和丰度及其与环境因子的相关性分析. 环境科学学报, 2017, 37(5): 1967-1975.
- [ 8 ] 梁丽华, 左剑恶. 反硝化功能基因——检测反硝化菌群结构的分子标记. 微生物学通报, 2009, 36(4): 627-633.
- [ 9 ] Jiang X L, Yao L, Guo L D, Liu G H, Liu W Z. Multi-scale factors affecting composition, diversity, and abundance of sediment denitrifying microorganisms in Yangtze lakes. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(21): 8015-8027.
- [ 10 ] Kim J O, Cho K H, Ligaray M, Jang H M, Kang S, Kim Y M. Monitoring influential environmental conditions affecting communities of denitrifying and nitrifying bacteria in a combined anoxic-oxic activated sludge system. International Biodeterioration & Biodegradation, 2015, 100: 1-6.
- [ 11 ] Marks B M, Chambers L, White J R. Effect of fluctuating salinity on potential denitrification in coastal wetland soil and sediments. Soil Science Society of America Journal, 2016, 80(2): 516-526.
- [ 12 ] Fu G P, Han J Y, Yu T, Huangshen L K, Zhao L. The structure of denitrifying microbial communities in constructed mangrove wetlands in response to fluctuating salinities. Journal of Environmental Management, 2019, 238: 1-9.
- [ 13 ] Liu X D, Tiquia S M, Holguin G, Wu L Y, Nold S C, Devol A H, Luo K, Palumbo A V, Tiedje J M, Zhou J Z. Molecular diversity of denitrifying genes in continental margin sediments within the oxygen-deficient zone off the Pacific Coast of Mexico. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(6): 3549-3560.
- [ 14 ] Wang L P, Zheng B H, Nan B X, Hu P L. Diversity of bacterial community and detection of *nirS*- and *nirK*-encoding denitrifying bacteria in sandy intertidal sediments along Laizhou Bay of Bohai Sea, China. Marine Pollution Bulletin, 2014, 88(1/2): 215-223.
- [ 15 ] Gao M H, Liu J W, Qiao Y L, Zhao M X, Zhang X H. Diversity and abundance of the denitrifying microbiota in the sediment of Eastern China marginal seas and the impact of environmental factors. Microbial Ecology, 2017, 73(3): 602-615.
- [ 16 ] Lisa J A, Jayakumar A, Ward B B, Song B. *nirS*-type denitrifying bacterial assemblages respond to environmental conditions of a shallow estuary. Environmental Microbiology Reports, 2017, 9(6): 766-778.
- [ 17 ] 常佳丽. 不同种植年限水稻土中甲烷及氮循环相关微生物群落的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2014.
- [ 18 ] Bremer C, Braker G, Matthies D, Reuter A, Engels C, Conrad R. Impact of plant functional group, plant species, and sampling time on the composition of *nirK*-type denitrifier communities in soil. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(21): 6876-6884.
- [ 19 ] López-Lozano N E, Eguarte L E, Bonilla-Rosso G, García-Oliva F, Martínez-Piedragil C, Rooks C, Souza V. Bacterial communities and the nitrogen cycle in the gypsum soils of Cuatro Ciénegas Basin, Coahuila: a Mars analogue. Astrobiology, 2012, 12(7): 699-709.
- [ 20 ] 高志强, 朱玲, 朱伟, 柳淑芳, 范艳君, 庄志猛. 珠江口表层沉积物 *nirS* 型反硝化微生物多样性. 海洋与湖沼, 2012, 43(6): 1114-1121.
- [ 21 ] 莫旭华, 麻威, 史荣久, 王元芬, 郑佳, 徐慧. 氮肥对小麦田土壤 *nirS* 型反硝化细菌多样性的影响. 微生物学报, 2009, 49(9): 1203-1208.
- [ 22 ] 张文学, 王少先, 夏文建, 孙刚, 刘增兵, 李祖章, 刘光荣. 脲酶抑制剂与硝化抑制剂对稻田土壤硝化、反硝化功能菌的影响. 植物营养与肥料学报, 2019, 25(6): 897-909.
- [ 23 ] 杨扬. 艾比湖湿地建群植物根际反硝化微生物群落结构和生态位分化特征[D]. 石河子: 石河子大学, 2018.
- [ 24 ] Li S X, Wang Z H, Stewart B A. Differences of some leguminous and nonleguminous crops in utilization of soil phosphorus and responses to phosphate fertilizers. Advances in Agronomy. Amsterdam: Elsevier, 2011: 125-249.
- [ 25 ] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
- [ 26 ] Zhou S L, Sun Y, Zhang Y R, Huang T L, Li Z X, Fang K K, Zhang C H. Variations in microbial community during nitrogen removal by *in situ* oxygen-enhanced indigenous nitrogen-removal bacteria. Water Science and Engineering, 2018, 11(4): 276-287.
- [ 27 ] 程建华, 窦智勇, 孙庆业. 铜陵市河流沉积物中硝化和反硝化微生物分布特征. 环境科学, 2016, 37(4): 1362-1370.
- [ 28 ] 邓欣昊. 基于高通量测序技术的卧龙国家级自然保护区林下土壤微生物群落研究[D]. 成都: 成都理工大学, 2019.
- [ 29 ] He S B, Tan J, Hu W G, Mo C. Diversity of Archaea and its correlation with environmental factors in the Ebinur lake wetland. Current Microbiology, 2019, 76(12): 1417-1424.
- [ 30 ] 杨文焕, 石大钧, 张元, 李卫平, 敬双怡, 于玲红. 高原湖泊沉积物中反硝化微生物的群落特征——以包头南海湖为例. 中国环境科学, 2020, 40(1): 431-438.
- [ 31 ] 李博超. 辽河口沉积物反硝化相关功能基因丰度和多样性分析[D]. 大连: 大连海洋大学, 2017.
- [ 32 ] Hu W G, Jin X T, Wang Y P, He S B. Diversity of eukaryotic micro-organisms and changes in the dominant fungal taxa composition in relationship with soil environment in the Ebinur Lake wetland. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2018, 32(2): 408-419.
- [ 33 ] 韩晶. 艾比湖湿地原核微生物群落动态演替和优势群落组成变化对环境的响应的研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2014.
- [ 34 ] 韩晶, 胡文革, 王艳萍, 武菲, 张晓红, 王翠华. 新疆艾比湖湿地博乐河入口处土壤细菌多样性分析. 微生物学通报, 2014, 41(11): 2244-2253.
- [ 35 ] 鲍林林, 王晓燕, 陈永娟, 张苓荣. 北运河沉积物中主要脱氮功能微生物的群落特征. 中国环境科学, 2016, 36(5): 1520-1529.

- [36] 黄鑫. 基于高通量的珠江水体的反硝化功能基因的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2016.
- [37] Gaboyer F, Vandenabeele-Trambouze O, Cao J W, Ciobanu M C, Jebbar M, Le Romancer M, Alain K. Physiological features of *Halomonas lionensis* sp. nov., a novel bacterium isolated from a Mediterranean Sea sediment. *Research in Microbiology*, 2014, 165(7): 490-500.
- [38] Dane RH, 郑鸿元. 根瘤菌反硝化作用的评述. *生态学进展*, 1989(2): 131-136.
- [39] 邹艳艳, 张宇, 李明智, 梅荣武, 韦彦斐, 丁林贤. 一株异养硝化-好氧反硝化细菌的分离鉴定及脱氮活性研究. *中国环境科学*, 2016, 36(3): 887-893.
- [40] 方芳, 王淑梅, 冯翠杰, 陈少华. 好氧条件下复合生物膜-活性污泥反应器中的反硝化菌群结构. *生态学杂志*, 2011, 30(3): 430-437.
- [41] 陈寒玉, 靳慧征, 靳慧霞. 一株好氧反硝化细菌的筛选及对土壤脱氮效果研究. *中国农学通报*, 2018, 34(20): 55-62.
- [42] 戴九兰, 苗永君. 黄河三角洲不同盐碱农田生态系统中氮循环功能菌群研究. *安全与环境学报*, 2019, 19(3): 1041-1048.
- [43] 温慧洋, 焦燕, 杨铭德, 谷鹏, 白曙光, 杨洁. 盐碱土壤  $N_2O$  排放与 *amoA* 和 *narG* 功能基因丰度的响应规律. *土壤*, 2019, 51(4): 724-731.
- [44] 李刚, 修伟明, 王杰, 吴元凤, 赵建宁, 宋晓龙, 杨殿林. 不同植被恢复模式下呼伦贝尔沙地土壤反硝化细菌 *nirK* 基因组成结构和多样性研究. *草业学报*, 2015, 24(1): 115-123.
- [45] Mergel A, Schmitz O, Mallmann T, Bothe H. Relative abundance of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in layers of a forest soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 36(1): 33-42.
- [46] 湛钰, 高丹丹, 盛荣, 魏文学, 秦红灵, 张文钊, 侯海军, 汤亚芳. 磷差异性调控水稻根际 *nirK/nirS* 型反硝化菌组成与丰度. *环境科学*, 2019, 40(7): 3304-3312.
- [47] Wang C C, Lee C M. Isolation of the *Epsilon*-caprolactam denitrifying bacteria from a wastewater treatment system manufactured with acrylonitrile-butadiene-styrene resin. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, 145(1/2): 136-141.
- [48] Wolsing M, Priemé 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(2): 261-271.