

DOI:10.11829/j.issn.1001-0629.2015-0751

呼和,陈先江,程云湘.撂荒地亚硝酸还原酶基因 *nirK* 和 *nirS* 丰度动态.草业科学,2016,33(7):1253-1259.

Huhe, Chen X J, Cheng Y X. The dynamics for abundance of nitrite reductase genes *nirK* and *nirS* in abandoned land. Pratacultural Science, 2016, 33(7): 1253-1259.

## 撂荒地亚硝酸还原酶基因 *nirK* 和 *nirS* 丰度动态

呼和<sup>1</sup>, 陈先江<sup>2</sup>, 程云湘<sup>2</sup>

(1. 甘肃省农业科学院土壤肥料与节水农业研究所, 甘肃 兰州 730070;

2. 草地农业生态系统国家重点实验室 兰州大学草地农业科技学院, 甘肃 兰州 730020)

**摘要:** 使用荧光定量 PCR 法测定亚硝酸还原酶基因(*nirK* 和 *nirS*) 遗传特异性片段, 研究了草原撂荒地土壤反硝化微生物丰度随着撂荒时间的变化。结果表明, 轻度放牧草原和 3 种不同撂荒时间地的土壤中 *nirK* 基因型反硝化微生物丰度都显著高于 *nirS* 基因型反硝化微生物丰度( $P < 0.05$ )。土壤 *nirK* 及 *nirS* 基因型反硝化微生物丰度撂荒地和轻度放牧地之间均有显著差异( $P < 0.05$ ), 但 3 种撂荒地均未发生显著变化( $P > 0.05$ )。此外, 这两种基因型反硝化微生物丰度之间有极显著线性负相关关系( $P < 0.001$ )。以上结果说明, *nirK* 和 *nirS* 基因型反硝化微生物对环境因子的响应有差异。

**关键词:** 反硝化微生物; *nirK* 基因; *nirS* 基因; 撂荒地; 轻度放牧草原

**中图分类号:** S812.29      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1001-0629(2016)7-1253-07\*

### The dynamics for abundance of nitrite reductase genes *nirK* and *nirS* in abandoned land

Huhe<sup>1</sup>, Chen Xian-Jiang<sup>2</sup>, Cheng Yun-Xiang<sup>2</sup>

(1. Institute of Soil and Fertilizer and Save Water Agricultural, Gansu Academy of  
Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, China;

2. State Key Laboratory of Grassland Agro-ecosystems, College of Pastoral Agriculture Science and  
Technology, Lanzhou University, Lanzhou 730020, China)

**Abstract:** Determination of nitrite reductase gene (*nirK* and *nirS*) specific fragment by real-time quantitative PCR method, we studied the dynamics of denitrification microbial abundance in abandoned land soil with different abandoned years. The results showed that the *nirK* genotype denitrifier abundance were significantly higher than *nirS* genotype denitrifier abundance in 3 kinds of abandoned land for 1, 5, and 25 years and light grazing grassland. Both of genotypes denitrifier abundance were significant difference between the light grazing grassland and the three abandoned land soils ( $P < 0.05$ ), but there was no significant change among the 3 kinds of abandoned land soil. Moreover, there were extremely significantly negative linear relationship between the two genes abundance in the investigation soils ( $P < 0.001$ ), indicating that the *nirK* and *nirS* show different response to the environmental factors on their growth.

\* 收稿日期: 2015-12-31      接受日期: 2016-03-20

基金项目: 草地农业生态系统国家重点实验室(兰州大学)开放基金项目(SKLGAE201407); 国家自然科学基金项目(31460029、31402118); 甘肃省农业科学院农业科技创新专项(2013GAAS04-04)

第一作者: 呼和(1976-), 男(蒙古族), 内蒙古通辽人, 副研究员, 博士, 主要从事环境污染的微生物修复、农牧业固体废弃物循环利用和微生物生态研究。E-mail: huhecyxw@yahoo.co.jp

通信作者: 程云湘(1977-), 女, 山东菏泽人, 副教授, 博士, 主要从事草地生态、草地温室气体排放研究。E-mail: chengyx@lzu.edu.cn

**Key words:** denitrifier; *nirK* gene; *nirS* gene; abandoned land; light-grazing grassland

**Corresponding author:** Cheng Yun-xiang E-mail: chengyx@lzu.edu.cn

由于人口迅速增长,我国对粮食及经济作物的需求量日益增大,因此,需要多种途径扩大耕地面积,如开垦荒地、围海造田、围湖造田等,这就造成了草地退化等现象,如开垦已成为呼伦贝尔草原沙化、退化的主要原因之一<sup>[1]</sup>。近年来,国家开始实施退耕还林、还草等工程,以改善生态环境<sup>[2]</sup>。目前,国内外关于退耕地的研究主要集中于植被群落的演替<sup>[3]</sup>、土壤理化性质的变化<sup>[4]</sup>以及种植植物的影响<sup>[5-6]</sup>等方面,但随着退耕时间的延长,土壤微生物群落如何变化,尤其是关于微生物氮循环重要环节之一——反硝化基因丰度变化及其相互关系的研究鲜见报道。生物反硝化作用是氮循环的主要环节之一,反硝化作用在土壤中普遍存在,其主要是通过微生物逐步地还原氮氧化合物,释放出一氧化氮(NO)、氧化亚氮(N<sub>2</sub>O)和氮(N<sub>2</sub>)等,从而导致土壤中氮元素的减少,而且,N<sub>2</sub>O和NO的释放可能导致全球变暖<sup>[7]</sup>。反硝化微生物广泛分布于细菌和古菌中,在几种真菌的线粒体中也发现了反硝化作用<sup>[8]</sup>。反硝化作用主要指在硝酸还原酶(Nar)、亚硝酸还原酶(Nir)、氧化亚氮还原酶(Nor)和一氧化二氮还原酶(Nos)等的作用下将硝酸盐(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)中的氮通过一系列中间产物(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>、NO、N<sub>2</sub>O)还原为氮气(N<sub>2</sub>)的生物化学过程。其中,亚硝酸盐向NO的还原酶和其它反硝化酶不同。首先,与其它反硝化反应相比,亚硝酸还原酶把亚硝酸盐还原为NO的反应是将亚硝酸盐还原成气体的最初阶段。其次,这个反应由两种不同类型的亚硝酸盐还原酶(Nir)催化,这两种酶存在于不同的细胞内且结构不同<sup>[8]</sup>。一种是*nirS*编码的含细胞色素 $cd_1$ 的酶,一种是由*nirK*编码的含铜的酶。据报道<sup>[9-10]</sup>,两种亚硝酸盐还原酶功能上没有显著差异,但是,如果土壤理化特性不同(如,氧、碳含量等),有可能观察到不同的反硝化微生物<sup>[11-12]</sup>或不同反硝化微生物群落<sup>[13-14]</sup>。然而,目前针对*nirS*和*nirK*基因丰度在不同特性土壤中的变化及其之间相互关系的研究较少。因此,本研究使用实时荧光定量PCR法初步探讨在撂荒时间不同的耕地土壤中的*nirS*和*nirK*基因丰度的变化规律,以利于更好地理解撂荒地土壤反硝化作用,从而为管

理撂荒地提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究区概况

研究区域位于内蒙古自治区东北部的呼伦贝尔草原新巴尔虎右旗境内(116°40′18″—117°01′56″E, 48°32′00″—48°38′50″N),为半干旱草原。试验共设4个处理,3个撂荒农田和1个轻度放牧草地。3个撂荒农田的撂荒时间分别为1、5和25年(Y<sub>1</sub>、Y<sub>5</sub>和Y<sub>25</sub>),轻度放牧草地(LG)设为对照,放牧率为1.4只羊·hm<sup>-2</sup>。在Y<sub>1</sub>、Y<sub>5</sub>和Y<sub>25</sub>样点,玉米(*Zea mays*)、向日葵(*Helianthus annuus*)、圆柱披碱草(*Elymus cylindricus*)无规律轮作约40年,各样地之间距离<10 km,且各样点地势相似,均为平地。各样地2000—2009年平均温度和降水量分别为1.6℃和213 mm,海拔在545~568 m,均为沙质土壤。

### 1.2 调查取样及分析

在每个样点随机设5个1 m×1 m的样方,于2010年8月进行植被调查和土壤取样。记录每个样方内的植物物种组成,测定样方的盖度、高度和密度,并计算Shannon-Wiener多样性指数。剪取植物地上部分,按物种分类,60℃下干燥48 h,称重,测定地上植物干重。土壤湿度用TRIME-FM(Ettlingen, Germany)测定。另外,在每个样方随机选择5个点收集0—10 cm土样,混合为一个样品,并移去表面有机质和细根。把每个混合样品分为两部分,一部分过2 mm筛后密封于15 mL离心管中,放在液氮罐里运回实验室,储存于-80℃冰箱中待用于微生物试验,另一部储存于4℃下,用于测定土壤理化特性。土壤KCl浸提物中的NO<sub>3</sub>-N和NH<sub>4</sub>-N分别用锌还原—萘乙二胺法<sup>[15]</sup>和靛酚蓝比色法<sup>[16]</sup>测定,土壤磷含量用Truog法测定<sup>[17]</sup>,有机碳和总氮使用NC分析仪(Sumigraph NC-900; Sumika Chemical Analysis Service, Tokyo, Japan)采用干燃烧法测定<sup>[18]</sup>。土壤pH采用电位法测定。

### 1.3 土壤DNA提取

每个土样分别称取3份,每份0.5 g,采用FastDNA Spin Kit(MP Biomedicals, Illkirch, France)提取土壤DNA,实验步骤按照说明书进行。采用Smart-

Spec Plus spectrophotometer (Bio-Rad Laboratories, United States)测定 DNA 的纯度及浓度。样品保存于一20 ℃冰箱中备用。

1.4 荧光实时定量 PCR(qPCR)

采用实时定量 PCR (Applied Biosystems StepOne Plus 96-well, 美国)与预混液 (Applied Biosystems Power SYBR Green, 美国)相对定量 *nirK* 和 *nirS* 基因片段,各反应的引物、qPCR 反应条件、扩增片段大小、标准微生物及混合体系组成如表 1 和表 2 所示。qPCR 反应开始前先在 95 ℃下进行 10 min 的酶活化。扩增产物的特异性通过观察熔解曲线上的单一溶解峰和溴化乙锭染色的 2%琼脂糖凝胶上特异条带的出现来检测。连续稀释( $10\sim10^7$  拷贝数 $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )标准细菌对应基因 PCR 扩增产物制作各基因的标准曲线,使用  $Eff=[10^{(-1/slope)}-1]$ 公式计算 *nirK* 和 *nirS* 基因扩增效率(*Eff*),分别为 92.0%和 98.2%。每个反应 3 个重复,平均拷贝数转换为每克干土样中的基因拷贝数。

1.5 数据分析

qPCR 数据和环境因子特征采用 SPSS 19.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, 美国)进行方差分析(ANOVA)。ANOVA 分析采用了 Tukey's test 检验。如

果每组数据不是正态分布,在分析前将数据进行对数变换。采用 SIMCA-P 11.5 (Umetrics AB, Umea, 瑞典)分析软件,偏最小二乘法(PLS)分析 *nirS* 和 *nirK* 基因拷贝数与环境因子之间的回归系数和变量投影重要性(VIP)。

2 结果与分析

2.1 *nirK* 和 *nirS* 基因丰度

开垦耕种活动显著影响了 *nirK* 和 *nirS* 基因丰度比例(图 1)。撂荒地 *nirK* 基因的丰度是 *nirS* 基因的 1 000 倍左右,然而,在 LG 土壤中, *nirK* 基因丰度是 *nirS* 基因 10 倍左右。随着撂荒时间的延长,这两种基因丰度都没有显著变化( $P>0.05$ ),但是,3 个撂荒地的 *nirK* 基因的丰度均显著高于 LG 的( $P<0.05$ )。另外,4 个样地亚硝酸还原酶基因 *nirK* 的拷贝数和 *nirS* 基因的拷贝数存在极显著线性关系(图 2),回归方程为  $nirS = -0.696(nirK) + 9.6507$  ( $R^2 = 0.5977, P<0.001$ )。

2.2 环境因子与亚硝酸还原酶基因的相互作用

两种亚硝酸还原酶基因(*nirK* 和 *nirS*)都与  $\text{NH}_4\text{-N}$ 、有机碳、总氮、植物多样性和地上生物量显著

表 1 *nirK* 和 *nirS* 基因的 qPCR 条件及引物  
Table 1 qPCR Condition of *nirK* and *nirS* gene and primer

| 基因<br>Gene  | 引物<br>Primer         | 参考文献<br>Reference | 扩增子大小<br>Amplicon size/bp | 标准源<br>Source of standard          | 热循环条件<br>Thermal cycling profile | 循环数<br>Number of cycles |
|-------------|----------------------|-------------------|---------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-------------------------|
| <i>nirK</i> | nirK876C<br>nirK1040 | [33]              | 164                       | <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021 | 95 ℃/30 s,                       |                         |
|             |                      |                   |                           |                                    | 63 ℃—58 ℃/30 s,                  | 6*                      |
|             |                      |                   |                           |                                    | 72 ℃/30 s, 95 ℃/15 s,            | 40                      |
| <i>nirS</i> | cd3af<br>R3cd        | [34]<br>[35]      | 413                       | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 | 58 ℃/30 s, 72 ℃/30 s             |                         |
|             |                      |                   |                           |                                    | 94 ℃/60 s, 57 ℃/60 s,            | 40                      |
|             |                      |                   |                           |                                    | 72 ℃/60 s                        |                         |

注: \* 表示降落。  
Note: \* means "touch down".

表 2 *nirK* 和 *nirS* 基因的 qPCR 反应体系  
Table 2 qPCR reaction system of *nirK* and *nirS* gene

| 靶基因<br>Target gene | PCR 反应体系 PCR reaction system/ $\mu\text{L}$ |        |                                           |            |                             |                                       |                    |
|--------------------|---------------------------------------------|--------|-------------------------------------------|------------|-----------------------------|---------------------------------------|--------------------|
|                    | 2 $\times$ Power<br>SYBR green              | 3% BSA | 引物 Primer/10 pmol $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ |            | 二甲基亚砷<br>Dimethyl sulfoxide | 1—5<br>ng $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ DNA | PCR 水<br>PCR water |
|                    |                                             |        | 正向 Forward                                | 反向 Reverse |                             |                                       |                    |
| <i>nirK</i>        | 12.5                                        | 0.5    | 0.50                                      | 0.50       | 0.625                       | 2                                     | 8.375              |
| <i>nirS</i>        | 12.5                                        | 0.5    | 0.50                                      | 0.50       | 0.625                       | 2                                     | 8.375              |

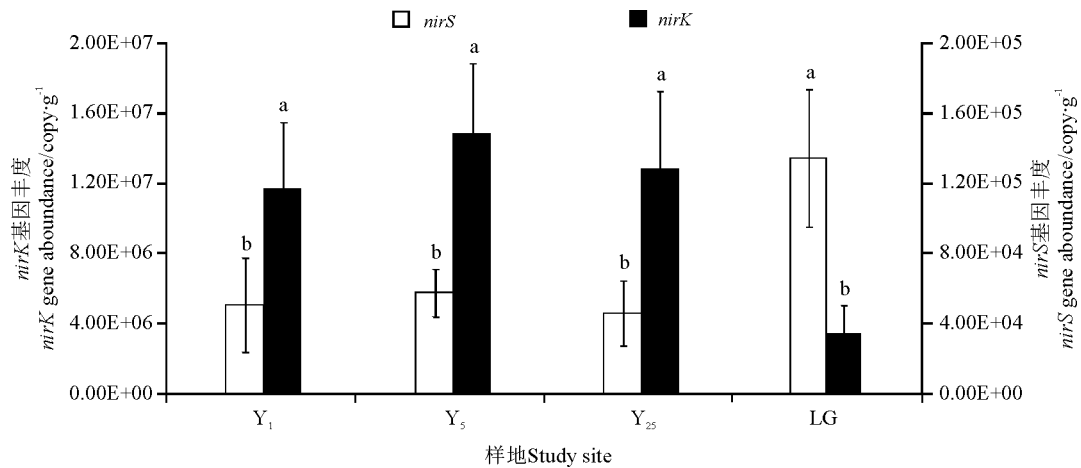


图 1 撂荒地和轻度放牧草原土壤 *nirK* 和 *nirS* 基因丰度

Fig.1 Abundance of *nirK* and *nirS* gene of soil of abandoned land and light-grazing steppe grassland

注: Y<sub>1</sub> 撂荒 1 年; Y<sub>5</sub> 撂荒 5 年; Y<sub>25</sub> 撂荒年 25 年; LG 轻度放牧地。不同小写字母表示 *nirS* 和 *nirK* 基因丰度在不同样地间差异显著 ( $P < 0.05$ )。  
Note: Y<sub>1</sub>, abandoned land with 1 year; Y<sub>5</sub>, abandoned land with 5 years; Y<sub>25</sub>, abandoned land with 25 years; LG, litght grazing grassland. Different lower case letters indicate significant difference of the same gene abundance among different plots at 0.05 level.

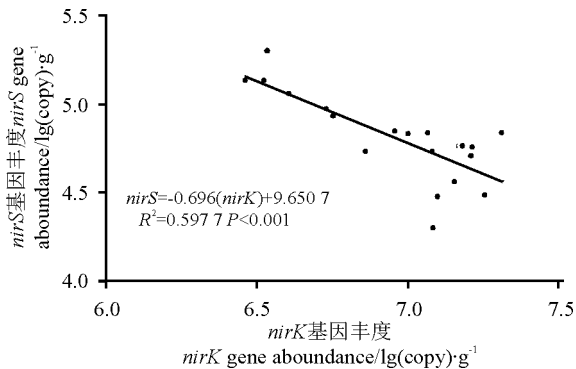


图 2 *nirK* 和 *nirS* 基因丰度之间关系

Fig.2 Relation between abundances of *nirK* and *nirS* gene

相关, VIP 值均大于 1 (图 3)。由回归系数值可知, *nirK* 基因拷贝数与  $\text{NH}_4\text{-N}$ 、有机碳、总氮和地上生物量呈负相关, 与植物多样性呈正相关, 而 *nirS* 基因的拷贝数与 *nirK* 基因的相关性分析结果正好相反。此外, pH、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、有效磷和  $\text{H}_2\text{O}$  等环境因子对 *nirK* 和 *nirS* 基因的拷贝数无显著影响, VIP 值都小于 1。

3 讨论与结论

土壤氮循环主要依赖于微生物的氮循环作用, 即固氮、亚硝化、硝化及反硝化等作用把不同类型的氮素化合物改变为亚硝酸根、硝酸根、 $\text{NO}$  及  $\text{N}_2\text{O}$  的形式。其中, 具有亚硝酸还原酶基因的微生物能把亚硝酸盐还原为  $\text{NO}$ , 是生物氮循环这一过程的重要影响环节之一, 与其它参与生物氮循环基因相同, 亚硝酸还原酶基因也是研究者关注的重要反硝化功能基因。因此,

本研究以 *nirK* 和 *nirS* 基因作为研究对象, 采用实时荧光 PCR 法探讨了不同类型亚硝酸还原酶基因丰度在呼伦贝尔草原不同撂荒时间耕地土壤中的动态变化以及其与环境因子之间的关系。

研究发现, 撂荒地和轻度放牧草原的土壤理化特征及植被状况差异较大<sup>[19]</sup>。3 个撂荒地的地上生物量有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 但铵态氮、有效磷、有机碳和植物多样性无显著差异 ( $P > 0.05$ )<sup>[19]</sup>。此外, Y<sub>5</sub> 样地的土壤 pH 和硝酸盐氮 ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ) 显著高于 Y<sub>1</sub> 和 Y<sub>25</sub>, Y<sub>1</sub> 和 Y<sub>25</sub> 之间无显著差异。Y<sub>5</sub> 的总氮显著高于 Y<sub>1</sub> 的 ( $P < 0.05$ ), 但 Y<sub>25</sub> 的与 Y<sub>1</sub> 和 Y<sub>5</sub> 的均无显著差异。Y<sub>25</sub> 的土壤水分含量 ( $\text{H}_2\text{O}$ ) 显著高于 Y<sub>1</sub> 的, Y<sub>5</sub> 的与 Y<sub>1</sub>、Y<sub>25</sub> 的均无显著差异<sup>[19]</sup>。

在 3 个不同撂荒时间的撂荒地土壤中, *nirK* 基因丰度显著高于 *nirS* 基因, 前者均约为后者的  $10^3$  倍, 而在轻度放牧草原土壤中, 前者约为后者的 10 倍, 这说明该研究地土壤中具有 *nirK* 基因的微生物是主要的亚硝酸还原微生物。在森林土壤 (壤土和粉壤土)<sup>[20]</sup> 和稻田土壤<sup>[21]</sup> 中也得到了相同的结果, 即 *nirK* 基因丰度高于 *nirS* 基因丰度。此外, 在撂荒地土壤中 *nirK* 和 *nirS* 基因丰度分别显著高于和低于轻度放牧草原。根据 PLS 分析的结果, 植物多样性和 *nirK* 基因丰度之间有显著正相关 ( $\text{VIP} = 1.05$ ), 表明 *nirK* 类型反硝化微生物有可能很容易受不同组成和数量的根系分泌物的影响, 在沙壤土中, 随着植被多样性的变化其土壤微生物群落结构也变化<sup>[22]</sup>, Bremer 等<sup>[23]</sup> 使用

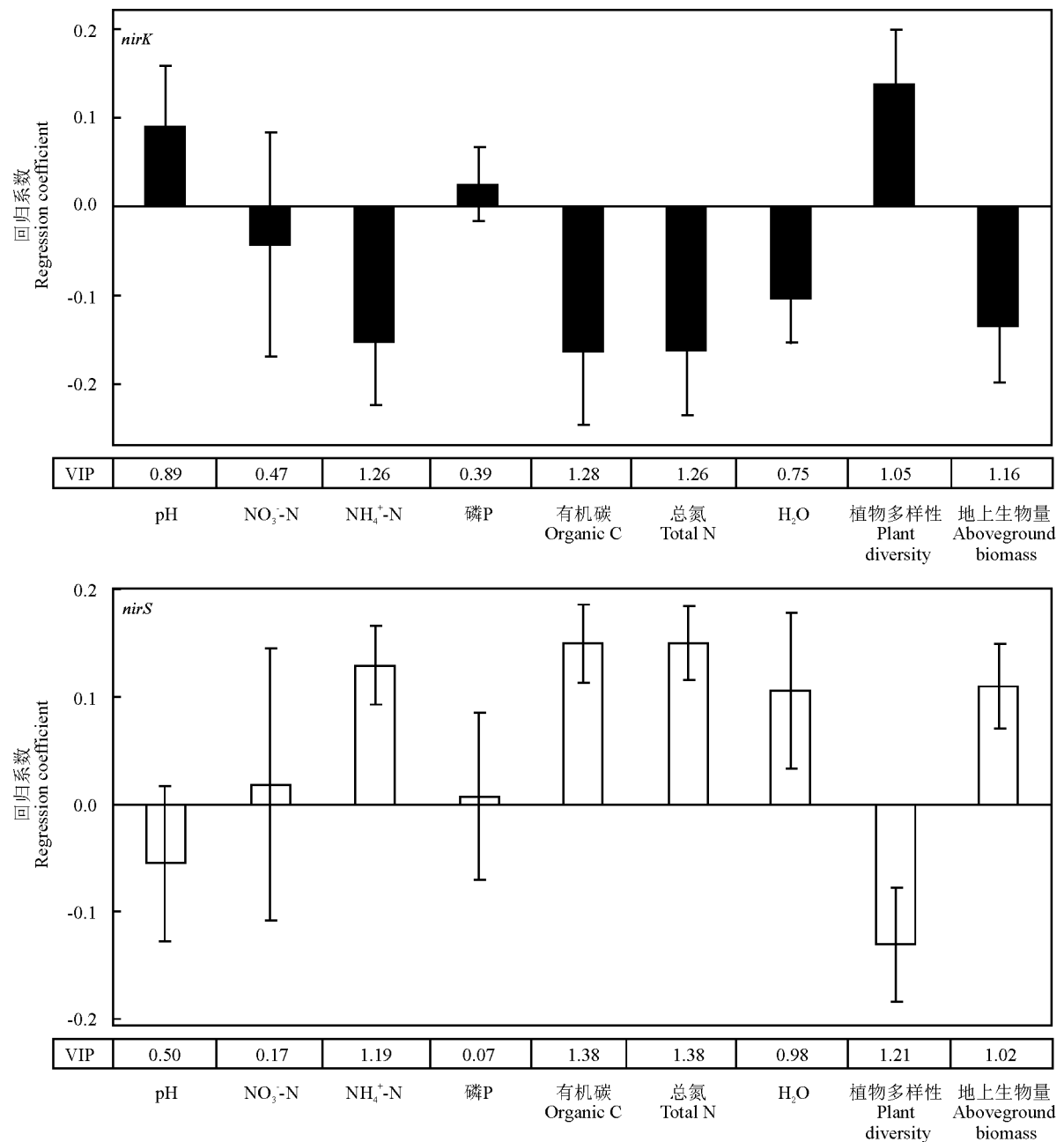


图 3 各环境因子和 *nirK*, *nirS* 基因丰度之间的回归系数及 VIP 值

Fig.3 Regression coefficient between each environmental factors and abundance of *nirK* and *nirS*, and VIP value

狐尾草 (*Alopecurus pratensis*)、黄花茅 (*Anthoxanthum odoratum*)、燕麦草 (*Arrhenatherum elatius*)、绒毛草 (*Holcus lanatus*)、老鹳草 (*Geranium pratense*)、车前 (*Plantago lanceolata*)、毛茛 (*Ranunculus acris*) 和蒲公英 (*Taraxacum officinale*) 的微宇宙试验中发现,不同植物微宇宙土壤有不同的 *nirK* 群落结构。Baneras 等<sup>[24]</sup> 也指出植被类型的改变对 *nirK* 类型反硝化微生物群落具有显著影响。除此之外,  $\text{NH}_4\text{-N}$ 、有机碳、总氮和地上生物量对于 *nirK* 和 *nirS* 基因丰

度分别呈显著负相关和正相关关系 ( $\text{VIP} > 1$ ) (图 3),说明亚硝酸还原细菌的丰度变化受到土壤不同理化性质的共同影响,导致两种类型亚硝酸还原细菌丰度呈此消彼长的趋势, *nirK* 和 *nirS* 基因丰度之间呈极显著线性关系 ( $P < 0.001$ ) (图 2)。许多研究<sup>[25-27]</sup> 表明,土壤微生物的分布、活动、多样性以及丰度与土壤理化性质密切相关。Maag 和 Vinther<sup>[28]</sup> 在森林土壤中发现,反硝化速率受多个环境因子联合调控。尽管 *nirK* 和 *nirS* 基因与  $\text{NO}_3\text{-N}$  的含量密切相关,而本研究未



发现 *nirK* 和 *nirS* 基因丰度与  $\text{NO}_3\text{-N}$  含量具有显著相关性,这有可能是在自然环境土壤中不同环境因子共同影响亚硝酸还原微生物的结果。许多研究者也在不同环境的土壤中发现了反硝化细菌群落与  $\text{NO}_3\text{-N}$  含量具有很弱的相关性<sup>[29-31]</sup>。此外,Kong 等<sup>[32]</sup>认为,在亚硝酸还原微生物生存的微生境中,其变化有可能与  $\text{NO}_3\text{-N}$  含量变化无关。

总之,在本研究区的撂荒地,*nirK* 和 *nirS* 基因型反硝化微生物丰度随着撂荒时间无有显著变化,然而

它们之间有显著线性关系,两种基因型反硝化微生物随着环境因子的变化,有可能互补调节亚硝酸盐还原为  $\text{NO}$  的作用。但本研究只分析了 DNA 水平上的反硝化微生物丰度,其活性及表达的规律还有待 RNA 样品来分析说明。另外,尚需开展 *nirK* 和 *nirS* 基因型反硝化微生物群落结构和分布,以便了解随着撂荒时间的延长反硝化微生物群落的演替规律,更科学地通过调节反硝化作用管理撂荒地。

### 参考文献 References:

- [1] 张德平.呼伦贝尔会消失吗——对草原区耕地保护的反思.中国土地,2009(4):44-46.
- [2] Li J H, Fang X W, Jia J J, Wang G. Effect of legume species introduction to early abandoned field on vegetation development. Plant Ecology, 2007, 191: 1-9.
- [3] Cheng Y X, Nakamura T. Phytosociological study of steppe vegetation in east Kazakhstan. Grassland Science, 2007, 53: 172-180.
- [4] 李强, 刘国彬, 许明祥, 张正, 孙会. 黄土丘陵区撂荒地土壤抗冲性及相关理化性质. 农业工程学报, 2013, 29(10): 153-159.  
Li Q, Liu G B, Xu M X, Zhang Z, Sun H. Soil anti-scourability and its related physical properties on abandoned land in the Hilly Loess Plateau. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2013, 29(10): 153-159. (in Chinese)
- [5] Van der Putten W H, Mortimer S R, Hedlund K, Van Dijk C, Brown V K, Lepš J, Rodriguez-Barrueco C, Roy J, Diaz Len T A, Gormsen D, Korthals G W, Lavorel S, Santa Regina I, Smilauer P. Plant species diversity as a driver of early succession in abandoned fields: A multi-site approach. Oecologia, 2000, 124: 91-99.
- [6] 薛智德, 侯庆春, 韩蕊莲, 王胜琪. 黄土丘陵沟壑区白刺花促进生态恢复的研究. 西北林学院学报, 2002, 17(3): 26-29.  
Xue Z D, Hou Q C, Han R L, Wang S Q. Trails and research on ecological restoration by *Sophora viciifolia* in Gullied Rolling Loess Region. Journal of Northwest Forestry University, 2002, 17(3): 26-29. (in Chinese)
- [7] Houghton J T, Callander B A, Varney S K. Climate Change 1992: The Supplementary Report to the IPCC Scientific Assessment. New York: Cambridge University Press, 1992.
- [8] Zumft W G. Cell biology and molecular basis of denitrification. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1997, 61: 533-616.
- [9] Priemé 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.
- [10] Ruiz-Rueda O, Trias R, Garcia-Gil T J, Bañeras L. Diversity of the nitrite reductase gene *nirS* in the sediment of a free-water surface constructed wetland. International Microbiology, 2007, 10: 253-260.
- [11] Abou-Seada M N I, Ottow J C G. Einfluß chemischer bodeneigenschaften auf ausmaß und zusammensetzung der denitrifikationsverluste drei verschiedener bakterien. Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde, 1988, 151: 109-115.
- [12] Tiedje J M. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In: Zehnder A J B. (ed). Biology of Anaerobic Microorganisms. New York: John Wiley & Sons, 1988: 179-244.
- [13] Cavigelli M, Robertson G P. The functional significance of denitrifier community composition in a terrestrial ecosystem. Ecology, 2000, 81: 1402-1414.
- [14] Holtan-Hartwig L, Dörsch P, Bakken L R. Comparison of denitrifying communities in organic soils: Kinetics of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{N}_2\text{O}$  reduction. Soil Biology and Biochemistry, 2000, 32: 833-843.
- [15] Leonardo M. Development and validation of a method for determination of residual nitrite/nitrate in foodstuffs and water after zinc reduction. Food Analytical Methods, 2009, 2: 212-220.
- [16] Motsara M R, Roy R N. Guide to laboratory establishment for plant nutrient analysis. FAO Fertilizer and Plant Nutrition Bulletin No. 19. Rome: FAO, 2008: 17-76.

- [17] Truog E, Meyer A H. Improvements in the deniges colorimetric method for phosphorus and arsenic. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, 1929, 1(3): 136-139.
- [18] Ueno T, Osono T, Kanda H. Inter- and intraspecific variations of the chemical properties of high-Arctic mosses along water-regime gradients. *Polar Science*, 2009, 3(2): 134-138.
- [19] Huhe, Borjigin S, Cheng Y X, Nomura N, Nakajima T, Nakamura T, Uchiyama H. Effect of abandonment on diversity and abundance of free-living nitrogen-fixing bacteria and total bacteria in the cropland soils of Hulun Buir, Inner Mongolia. *PLoS One*, 2014, 9(9): e106714.
- [20] Levy-Booth D J, Winder R S. Quantification of nitrogen reductase and nitrite reductase genes in soil of thinned and clear-cut Douglas-fir stands by using real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76: 7116-7125.
- [21] Bannert A, Kleineidam K, Wissing L, Mueller-Niggemann C, Vogelsang V, Welzl G, Cao Z, Schloter M. Changes in diversity and functional gene abundances of microbial communities involved in nitrogen fixation, nitrification, and denitrification in a tidal wetland versus paddy soils cultivated for different time periods. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77: 6109-6116.
- [22] Kowalchuk G A, Buma D S, De Boer W, Klinkhamer P G L, van Veen H. Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2002, 81(1-4): 509-520.
- [23] 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: 6876-6884.
- [24] Bañeras L, Ruiz-Rueda O, López-Flores R, Quintana X D, Hallin S. The role of plant type and salinity in the selection for the denitrifying community structure in the rhizosphere of wetland vegetation. *International Microbiology*, 2012, 15: 89-99.
- [25] Marschner P, Yang C H, Lieberei R, Crowley D E. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33: 1437-1445.
- [26] Pengthamkeerati P, Motavalli P, Kremer R. Soil microbial activity and functional diversity changed by compaction, poultry litter and cropping in a claypan soil. *Applied Soil Ecology*, 2011, 48: 71-80.
- [27] Cruz-Martínez K, Rosling A, Zhang Y, Song M, Andersen G L, Banfield J F. Effect of rainfall-induced soil geochemistry dynamics on grassland soil microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78: 7587-7595.
- [28] Maag M, Vinther F P. Nitrous oxide emission by nitrification and denitrification in different soil types and at different soil moisture contents and temperatures. *Applied Soil Ecology*, 1996, 4(1): 5-14.
- [29] Mergel A, Schmitz O, Mallman 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.
- [30] Chen Y N, Zhou W, Li Y P, Zhang J C, Zeng G M, Huang A Z, Huang J X. Nitrite reductase genes as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria during agricultural waste composting. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98: 4233-4243.
- [31] Smith C J, Nedwell D B, Dong L F, Osborn A M. Diversity and abundance of nitrate reductase genes (*narG* and *napA*), nitrite reductase genes (*nirS* and *nirK*), and their transcripts in estuarine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73: 3612-3622.
- [32] Kong A, Hristova K, Scow K, Six J. Impacts of different N management regimes on nitrifier and denitrifier communities and N cycling in soil microenvironments. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, 42: 1523-1533.

(责任编辑 武艳培)