

DOI: 10.11766/trxb201810150520

曹林桦, 刘彩霞, 刘茗, 方伟, 梁辰飞, 秦华, 陈俊辉, 徐秋芳. 集约经营对毛竹林土壤反硝化细菌丰度的影响[J]. 土壤学报, 2020, 57(3): 710–720.

CAO Linhua, LIU Caixia, LIU Ming, FANG Wei, LIANG Chenfei, QIN Hua, CHEN Junhui, XU Qiufang. Effects of Intensive Management Practice on Functional Gene Abundance of Denitrifying Bacteria in the Soil of Moso Bamboo (*Phyllostachys heterocycla*) Plantation[J]. Acta Pedologica Sinica, 2020, 57(3): 710–720.

集约经营对毛竹林土壤反硝化细菌丰度的影响*

曹林桦^{1,2}, 刘彩霞^{1,2}, 刘茗^{1,2}, 方伟^{1,2}, 梁辰飞^{1,2}, 秦华^{1,2}, 陈俊辉^{1,2},
徐秋芳^{1,2†}

(1. 浙江省森林生态系统碳循环与固碳减排重点实验室, 浙江农林大学, 浙江临安 311300; 2. 浙江农林大学环境与资源学院, 浙江临安 311300)

摘 要: 为探究集约经营过程中反硝化细菌丰度的变化情况, 采用实时荧光定量 PCR (real-time PCR) 方法, 对集约经营 0 (CK)、10、15、20、25 a 毛竹林表层 (0~20 cm) 和亚表层 (20~40 cm) 三种反硝化细菌 *nirK*、*nirS*、*nosZ* 丰度进行分析。结果表明: 毛竹林土壤反硝化细菌基因丰度 ($1.45 \times 10^6 \sim 3.03 \times 10^8$ copies·g⁻¹ 干土) 高于其他生态系统。随着集约经营时间的增加, 两层土壤的三种功能基因丰度在集约经营 10 年时表现增加或不变的一致规律。除表层土壤 *nirS* 基因外, 三种功能基因在集约经营过程的某一阶段 (15 或 20 a) 出现不同程度的下降; 但集约经营持续 25 a 时, 除表层土壤 *nosZ* 基因丰度仍低于对照外, 其他基因丰度均恢复甚至超过对照水平, 说明土壤反硝化细菌表现出对集约经营干扰的抵抗和恢复反应。表层 *nirS* 和 *nosZ* 土壤基因丰度显著高于亚表层土壤, 但 *nirK* 基因丰度出现相反现象。土壤性质与基因丰度的相关性分析和冗余分析表明, 集约经营措施对土壤反硝化细菌影响明显, 主要通过土壤氮和有机碳变化综合影响反硝化细菌的活动和功能。毛竹林集约经营土壤的反硝化细菌功能基因丰度较高, 积极参与氮循环过程, 可加剧 N₂O 温室气体的排放

关键词: 反硝化细菌; 集约经营; 毛竹林; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: S714.3 文献标志码: A

Effects of Intensive Management Practice on Functional Gene Abundance of Denitrifying Bacteria in the Soil of Moso Bamboo (*Phyllostachys heterocycla*) Plantation

CAO Linhua^{1,2}, LIU Caixia^{1,2}, LIU Ming^{1,2}, FANG Wei^{1,2}, LIANG Chenfei^{1,2}, QIN Hua^{1,2}, CHEN Junhui^{1,2}, XU Qiufang^{1,2†}

(1. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Carbon Cycling in Forest Ecosystems and Carbon Sequestration, Lin'an, Zhejiang 311300, China; 2. School of Environmental and Resources, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an, Zhejiang 311300, China)

* 国家自然科学基金项目 (No. 31570602) 和浙江省自然科学基金重点项目 (LZ16C160002) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31570602) and the Key Projects of Zhejiang Natural Science Foundation (No. LZ16C160002)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: xuqiufang@zafu.edu.cn

作者简介: 曹林桦 (1994—), 男, 浙江舟山人, 硕士研究生, 主要从事土壤生物与生物化学研究。E-mail: caolinhua2017@163.com

收稿日期: 2018-10-15; 收到修改稿日期: 2019-01-15; 优先数字出版日期 (www.cnki.net): 2019-04-18

Abstract: 【Objective】 Moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla*) is an important non-timber forest resource in subtropical China. Intensive bamboo forest management, beginning in the 1980s, has enormously increased the area of moso bamboo plantations and economic return for farmers. However, these long-term management practices, such as removal of understories and excessive application of nitrogen fertilizers combined with tillage, have already brought about some negative impacts, such as significantly altering soil microbial communities and increasing N_2O emission, of which the latter possibly reflects changes in the population of denitrifying bacteria. To explore this possibility, investigations were made of abundance of denitrifying bacteria in moso bamboo plantations under long-term intensive management. 【Method】 Soil samples were collected from the surface (0–20 cm) and subsurface (20–40 cm) soil layers of moso bamboo plantations receiving 0 (CK), 10, 15, 20 and 25 years of intensive management, for analysis of abundances of denitrifying communities (*nirK*-, *nirS*- and *nosZ*-denitrifiers). In addition with the aid of real-time quantitative PCR, and for analysis of soil physicochemical properties in an attempt to determine major factors that contribute the most to alteration of denitrifying bacteria in abundance. 【Result】 It was found that the abundances of soil denitrifying bacteria in the moso bamboo plantations ($1.45 \times 10^6 \sim 3.03 \times 10^8$ copies·g⁻¹ dry soil) were generally higher than those reported for other ecosystems, except in the case of *nirS* in farmland. Abundances of the three functional genes in both soil layers increased or remained unchanged during the first 10 years of intensive management. With the exception of *nirS* in the surface soil, all three functional genes then decreased somewhat after either 15 or 20 years of intensive management. Eventually however, and with the exception of *nosZ* in the surface soil, abundances of the other genes recovered or even exceeded the level in control after 25 years of intensive management, indicating a resistance of denitrifying bacteria to disturbance caused by intensive management practices. The abundances of *nirS* and *nosZ* in the surface soil samples were significantly higher than those in the subsurface soil samples, but *nirK* showed an a reverse trend. This phenomenon possibly reflects the observed decreases in pH and dissolved organic carbon excreted by bamboo root in the subsurface soil. Correlation analysis between soil physicochemical properties and functional genes reveals that the denitrifying genes, *nirK*, *nirS*, and *nosZ*, were positively related to total N, available P, and organic carbon in the surface soils. Additionally, *nosZ* was also positively related to C/N. However, in the subsurface soils, all the three denitrification genes as a group were significantly and positively related to organic carbon. Redundancy analysis demonstrates that the impacts of intensive management significantly on denitrifying bacteria were main reflected in the comprehensive effects of soil nitrogen and organic carbon on activities and functioning of the bacteria. 【Conclusion】 In summary, all the findings in this study indicate that long-term intensive management substantially alters both soil physicochemical properties and associated denitrifying bacterial communities. But the effect varies with soil layer, which means that depth of the soil is also a key factor affecting composition of the denitrifying bacterial community. Compared to some other ecosystems, the intensively managed moso bamboo plantations are relatively higher in abundance of denitrifying bacterial functional genes. Active participation of these bacteria in nitrogen recycling leads to increased emission of N_2O . Therefore, it is suggested that growers should use slow-release N fertilizers to reduce the concentration of ammonium nitrogen in the soil solution, thus encourage plant to absorb ammonium before it is nitrified. This strategy is believed to be able to decrease production of nitrate and hence denitrification and N_2O emissions.

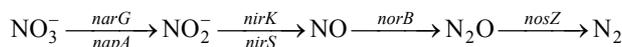
Key words: Denitrifying bacteria; Intensive management; *Phyllostachys heterocycla*; Real-time quantitative PCR

反硝化作用是土壤氮素循环过程中的重要一环,是指反硝化微生物在厌氧的条件下,通过一系列的酶催化还原反应,先将 NO_3^- 转化为 NO_2^- ,然后再进一步转化为气态氮 (NO , N_2O , N_2) 的过程^[1]。反硝化作用不仅会导致氮肥损失,造成严重的经济危害。同时反硝化作用过程释放的 N_2O 是三大温室气体之一,其产生的温室效应约是 CO_2 的 300 倍^[2]。

此外, N_2O 还会对臭氧层造成极大的破坏,增加皮肤癌的患病概率^[3]。虽然硝化和反硝化过程均能产生 N_2O 。但与硝化过程不同的是, N_2O 是反硝化过程中的必要产物,甚至是终产物^[4],而且有大量研究表明亚热带酸性森林土壤中由反硝化作用产生的 N_2O 大于硝化作用^[5]。虽然反硝化微生物主要分布在水体、沉积物和土壤等环境^[6],但由于土壤的环

境更适合微生物生存, 微生物多样性更为丰富, 而且土壤中氮含量普遍较水体、沉积物高, 因此, 研究土壤微生物反硝化作用对于减少氮肥损失, 降低 N_2O 排放均有着重要的意义。

反硝化作用是一个由四步反应所构成的生物地球化学过程, 包括 NO_3^- 还原、 NO_2^- 还原、 NO 还原和 N_2O 还原。其每个步骤均由相应细菌的代谢合成酶催化完成。



其中, 亚硝酸盐 (NO_2^-) 还原为 NO 的过程是反硝化过程中产生气体的关键步骤, 这一步骤由两种不同类型的亚硝酸还原酶 (Nir) 催化, 分别由 *nirK* 和 *nirS* 两种功能基因编码, 两种基因功能相似, 但分别属于不同的细菌菌株^[7]。反硝化过程的最后一步则是 *nosZ* 基因编码的 N_2O 还原酶将有害的 N_2O 气体还原成无害的 N_2 , 在反硝化过程中具有重要意义。因此, 许多研究者选择 *nirK*、*nirS* 以及 *nosZ* 编码基因作为研究反硝化过程的目标基因。

毛竹林土壤属于旱地土壤, 虽然总体为好氧环境, 但土壤中存在大小不等的孔隙, 微小孔隙的局部环境也可能是厌氧的。故在此种土壤环境中也会有相应的反硝化过程存在。然而已有的大多数研究均围绕着不同树种森林^[8]、沙漠^[9]、草原^[10]等其他生态系统展开。有关毛竹林反硝化过程微生物的变化情况少见报道。

毛竹是我国重要的经济和生态竹种, 具有生长周期短、产量高、经济价值高等特点。为追求更高的经济效益, 人们对原来以粗放经营为主的毛竹林进行了集约化经营。集约经营的主要措施有施肥、去除林下植被、翻耕等。这种集约经营模式虽然提高了毛竹的产量, 但人为耕作导致水土流失加剧, 使土壤出现不同程度的退化^[11]。与此同时, 长期集约经营降低了土壤微生物的活性^[12], 这也促使人们加大了对集约经营过程中土壤微生物相关生态变化的关注^[13-15]。然而, 与碳氮循环密切相关的反硝化微生物的研究少见报道。许多研究证明氮肥施用后因硝化作用产生大量 N_2O ^[16], 集约经营毛竹林土壤是否存在反硝化微生物? 是否也会导致排放 N_2O 等问题值得探索。本文以 *nirK*、*nirS* 和 *nosZ* 3 个基因

为研究对象, 运用定量 PCR 的方法初步探究集约经营过程中毛竹林土壤 3 种功能基因丰度的变化, 研究结果对毛竹林经营管理具有重要指导意义。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

研究区遂昌县位于浙江省西南部 (28°13'—18°49'N, 118°41'—119°30'E)。属中亚热带季风类型, 全年平均气温 16.8 °C, 年降水量 1 510 mm, 降水天数 172 d, 年无霜期 251 d。土壤母岩为由花岗岩变质而成的片麻岩石, 土层厚度大于 1 m, 坡度为 20°~25°。毛竹密度约为 1 800 株·hm⁻², 1989 年之前为竹林开发阶段, 仅开垦、劈山, 不施肥。该阶段毛竹林下主要有 9 种植被, 其中狗脊蕨 (*Woodwardia japonica*) 和兔儿伞 (*Syneilesis aconitifolia*) 盖度为 90%。1989—2000 年施肥方法为: 大年 (留养新竹年) 6 月在每株毛竹的上方开环形沟, 施用尿素 (或碳铵) 450 kg·hm⁻²; 2000—2010 年施用配方肥, 每年用量为尿素 450 kg·hm⁻²、过磷酸钙 380 kg·hm⁻²、氯化钾 75 kg·hm⁻²; 2010 年之后每年施用毛竹专用肥 (福建中化生产) 750 kg·hm⁻² 和尿素 450 kg·hm⁻²。集约经营过程毛竹林下基本无灌木杂草, 毛竹平均密度约 3 250 株·hm⁻²。

1.2 样品采集与处理

于 2013 年 9 月按照生态控制原则, 选择生长历史一致但集约经营时间不同的毛竹林, 采用随机取样法采集不同经营年限毛竹林表层 (0~20 cm) 和亚表层 (20~40 cm) 的土壤样品。该毛竹林地均位于同一山头, 并由同一农户经营, 采取的施肥管理措施也均一致。集约经营的时间分别为: 0 a (对照组)、10 a、15 a、20 a 和 25 a。每个年份分别选择 3 个样地, 即 3 个重复, 每个样地采用 S 型取样法选取 5 个样品点就地混合为一个样品, 分别采集表层 (0~20 cm)、亚表层 (20~40 cm) 的土样, 过筛 (2 mm) 后装入密封袋, 将样品放入冰盒带回实验室。样品共分为 2 份, 1 份放入 -70 °C 冰箱, 经冷冻干燥后, 提取土壤细菌总 DNA, 用于分子生物学分析; 另一份于室内自然风干, 充分研磨过筛后用于土壤基本理化性质的测定。

1.3 分析方法

土壤理化性质分析: 土壤理化性质分析方法参

考《土壤农化分析》^[17]。土壤 pH 采用酸度计测定, 土水比为 2.5 : 1; 有机碳含量采用重铬酸钾-浓硫酸油浴外加热法测定; 土壤全氮含量采用半微量凯式滴定法测定; 碱解氮含量采用碱解扩散法测定; 有效磷含量采用盐酸-氟化铵溶液浸提, 钼锑抗比色法测定; 速效钾含量采用醋酸铵提取, 火焰光度计测定; 硝态氮含量采用氯化钾浸提, 紫外分光光度计测定; 铵态氮含量采用氯化钾浸提, 靛酚蓝比色法测定。

土壤总 DNA 提取: 采用 Power Soil DNA Isolation Kit 试剂盒提取土壤总 DNA。称取 0.50 g 保存于 -70 °C 冰箱, 经冷冻干燥后, 按试剂盒说明书进行提取。DNA 提取成功后经 1% (m/v) 的琼脂糖凝

胶电泳检测 DNA 片段大小, 并用微量分光光度计检测其浓度和纯度。提取后的 DNA 样品保存于 -40 °C。

土壤反硝化细菌质粒制备: 以土壤样品 DNA 为模板分别对 *nirK*、*nirS*、*nosZ* 三种功能基因进行 PCR 扩增, 扩增条件如表 1 所示。PCR 产物用纯化试剂盒 (Takara) 纯化后与 PEASY-T3 Vector (全式金生物技术公司, 北京) 连接, 然后将连接产物转化到 Trans1-T1 感受态细胞中, 并涂在含有 X-gal、IPTG 和 Amp 的 LB 琼脂平板上进行蓝白斑筛选, 用菌落 PCR 方法检测阳性克隆子。对阳性克隆子用 LB 液体培养基继续培养, 最后用质粒抽提试剂盒提取质粒。

表 1 聚合酶链式反应中的引物及反应条件

Table 1 Primers and PCR condition used for the PCR amplification

目标基因 Target gene	引物 Primer	序列 Sequences	参考文献 Reference
<i>nirK</i>	<i>nirK</i> FlaCu	ATC ATG GTS CTG CCG CG	[18]
	<i>nirK</i> R3Cu	GCC TCG ATC AGR TTG TGG TT	
<i>nirS</i>	<i>nirS</i> Cd3aF	GTS AAC GTS AAG GAR ACS GG	[19]
	<i>nirS</i> R3cd	GAS TTC GGR TGS GTC TTG A	
<i>nosZ</i>	<i>nosZ</i> Lb	CCC GCT GCA CAC CRC CTT CGA	[20]
	<i>nosZ</i> Rb	CGT CGC CSG AGA TGT CGA TCA	

土壤反硝化细菌相关功能基因荧光定量 PCR: 采用引物 FlaCu: R3Cu、Cd3aF: R3cd、Lb: Rb 分别对 *nirK*、*nirS*、*nosZ* 三种功能基因进行基因片段扩增, 定量 PCR 在荧光实时定量 PCR 仪 (Bio-Red, USA) 上进行。反应体系为 20 μ L, 反应体系如下: 2 \times Premix Ex Taq 10 μ L, 50 μ mol \cdot L⁻¹ 上游和下游引物各 0.2 μ L, 模板 DNA 1.0 μ L, 无菌双蒸水 8.6 μ L。三种功能基因荧光定量 PCR 条件相同, 均为: 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 变性 10 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 20 s, 35 个循环, 溶解曲线过程 (65 °C 至 95 °C, 0.5 °C \cdot s⁻¹)。标准曲线制作: 三种功能基因质粒 DNA 经 Nanodrop[®]ND-1000 测定, *nirK*、*nirS* 和 *nosZ* 基因重组质粒浓度分别为 105.6、102.5、135.2 ng \cdot μ L⁻¹, 计算其拷贝数分别为 2.74 \times 10¹⁰、2.70 \times 10¹⁰、3.74 \times 10¹⁰ copies \cdot μ L⁻¹, 以 10 倍梯度对重组质粒进行梯度稀释 (10⁻³~10⁻⁸), 每个梯度 3 次重复, *nirK*、*nirS* 和 *nosZ* 决定系数 (R^2) 分别为 0.995、0.998 和 0.999。

1.4 数据处理

采用 Microsoft Excel 2016 软件对数据进行处理, 采用 Origin 7.5 软件作图, 采用 SPSS 21.0 软件对数据进行分析, 采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 和最小显著差数 (LSD) 法进行显著性和多重比较 ($\alpha=0.05$), 采用皮尔逊 (Pearson) 法进行相关性分析。通过 Canoco 4.5 结合环境因子分析微生物功能基因丰度的变化。

2 结果

2.1 集约经营毛竹林土壤理化性质

有关毛竹集约经营土壤理化性质变化已有报道^[15]。简要概括: 毛竹集约经营过程中土壤理化性质变化, 表层土壤 pH 呈下降趋势; 有机碳、全氮含量于经营 10 a 达到最大 ($P<0.05$), 其余年份无显著差异; 碱解氮呈现先上升再下降后又上升的波动变化规律; 碳氮比经营初期缓慢上升, 15 a 时达到

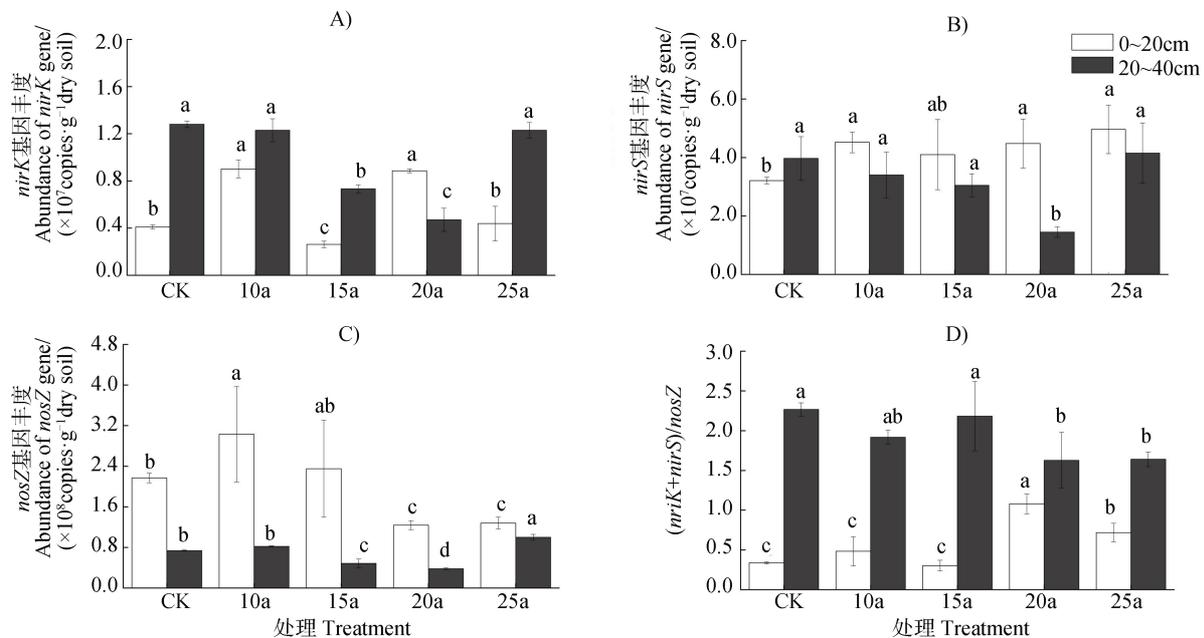
最大, 20 a 显著下降 ($P<0.05$); 有效磷和速效钾总体呈上升趋势; 硝态氮出现先减少后增加的变化规律, 而铵态氮在整个经营过程中变化不大。

与表层土壤不同的是, 集约经营前期亚表层毛竹土壤 pH 没有发生明显变化, 而在第 25 年时显著下降 0.42 个 pH 单位 ($P<0.05$); 全氮和碱解氮均在经营 25 a 之后显著增加 ($P<0.05$); 有机碳含量在经营 10 a 和 25 a 显著增加 ($P<0.05$), 而在经营 20 a 显著下降 ($P<0.05$)。其余理化因子变化与表层相同。

2.2 集约经营对毛竹林土壤反硝化细菌功能基因丰度的影响

采用荧光实时定量 PCR 分析集约经营毛竹林土壤反硝化细菌丰度结果表明, *nirK* 基因数量在 $2.62\times 10^7\sim 1.28\times 10^8$ copies·g⁻¹ 干土之间, 随着集约经营时间的持续, 表层土壤 *nirK* 基因数量呈现周期性波动态势(图 1A), 上升过程发生在集约经营 10 a 和 20 a 的 2 个时间, 其基因丰度显著大于其他年份 ($P<0.05$), 集约经营 15 年时丰度达到最低值, 显著小于其他年份 ($P<0.05$), 第 25 年时的基因丰度与对照组无显著性差异。而亚表层土壤的 *nirK* 丰度变化呈 V 字型, 集约经营 15 a 时才开始下降、20 a 时

达到低谷, 土壤 *nirK* 基因数量在 15 a 和 20 a 分别较对照下降 43% 和 63% ($P<0.05$), 25 a 时又恢复至对照水平, 集约经营 10 a 和 25 a 与对照无显著性差异。*nirS* 基因数量在 $1.45\times 10^6\sim 4.96\times 10^7$ copies·g⁻¹ 干土之间, 总体低于 *nirK* 基因。表层土壤基因数量在集约经营 10 a 显著上升 41% ($P<0.05$), 之后一直保持较高的水平(图 1B), 说明集约经营促进表层土壤中携带 *nirS* 基因微生物的繁殖。土壤亚表层 *nirS* 基因数量则在前 20 a 的集约经营过程中呈下降趋势, 第 20 年最大下降幅度为 63%, 而第 25 年则恢复到对照水平。*nosZ* 基因数量在 $3.81\times 10^7\sim 3.03\times 10^8$ copies·g⁻¹ 干土之间。表层土壤基因丰度在集约经营 10 a 明显增加, 第 15 年时开始下降, 集约经营 20 a 较对照低 70%, 之后则变化不大 ($P>0.05$)。亚表层土壤 *nosZ* 基因丰度前 10 年变化不大(图 1C), 第 15 年和 20 年分别降低 34% 和 48%, 显著低于对照和 10 a 土壤 ($P<0.05$), 第 25 年时 *nosZ* 基因丰度恢复、且数量显著高于对照(增加 35%, $P<0.05$)。集约经营过程中表层土壤的 (*nirK*+*nirS*)/*nosZ* 比率为 0.34~1.08, 在亚表层为 1.63~2.27。表层 (*nirK*+*nirS*)/*nosZ* 的比率在集约经营 20 a 显著增加, 而亚表层中显著降低。



注: 不同字母表示同一土层不同处理间差异显著。Note: Surface soil and subsurface soils are marked separately for significance level.

图 1 长期集约经营毛竹林土壤反硝化细菌 *nirK*、*nirS*、*nosZ* 功能基因丰度

Fig. 1 Abundance of *nirK*, *nirS*, *nosZ* genes in the soils of the moso bamboo plantations under long-term intensive management

2.3 土壤理化性质对反硝化细菌功能基因丰度的影响

集约经营主要通过土壤性质的改变来影响土壤微生物。为揭示土壤性质对反硝化细菌丰度的影响, 将表层与亚表层土壤的三个功能基因的丰度分别与对应的土壤理化性质进行相关性分析, 结果如表 2 所示。在表层土壤中, *nirK* 基因数量与全氮呈显著正相关 ($P<0.05$), *nirS* 基因与有效磷呈显著正相关 ($P<0.05$), 而 *nosZ* 基因则与有机碳和碳氮比呈显著

正相关 ($P<0.05$)、与速效钾和硝态氮含量呈显著负相关 ($P<0.05$), 说明影响表层土壤三个功能基因丰度的主要因素并不一致。作为 N_2O 排放量指标^[21] 的 (*nirK+nirS*)/*nosZ* 比值与碳氮比呈显著负相关 ($P<0.05$)、与速效钾和硝态氮呈显著正相关 ($P<0.05$)。在亚表层土壤中, 三种功能基因均与有机碳呈显著正相关 ($P<0.05$), *nosZ* 基因还与全氮和碱解氮含量呈显著正相关 ($P<0.05$)。(*nirK+nirS*)/*nosZ* 的比值与硝态氮呈显著负相关 ($P<0.05$)。

表 2 毛竹林土壤反硝化功能基因与环境参数之间的皮尔逊相关系数

Table 2 Pearson's correlations(r) between denitrifying functional gene abundance and environmental parameters in the moso bamboo plantation

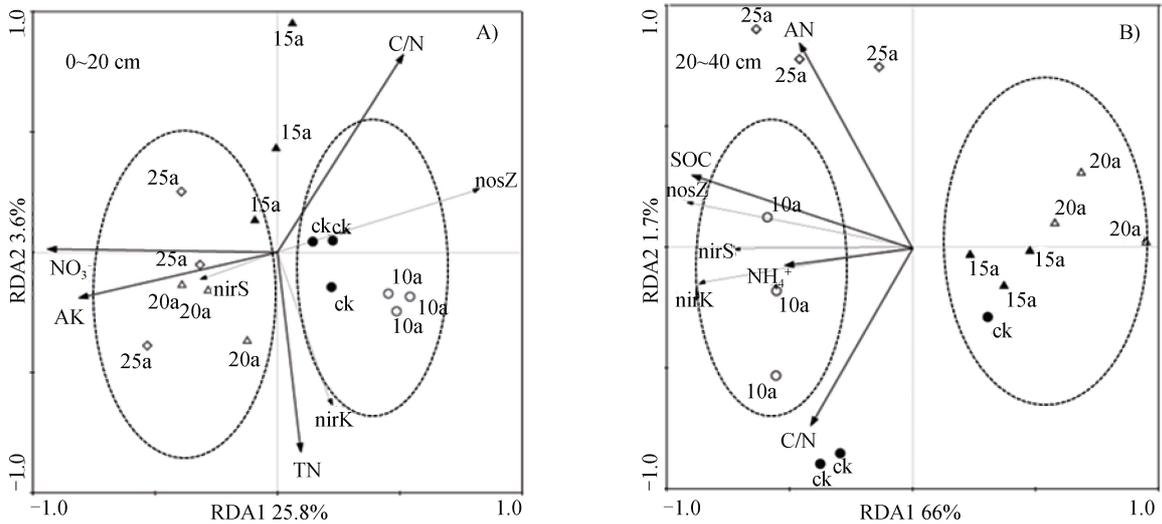
土层 Soil layer/cm	功能基因 Functional genes	pH	有机碳 Organic carbon/ ($g \cdot kg^{-1}$)	全氮 Total N/ ($g \cdot kg^{-1}$)	碳氮比 C/N	碱解氮 Alkalytic N/ ($mg \cdot kg^{-1}$)	有效磷 Available P/ ($mg \cdot kg^{-1}$)	速效钾 Available K/ ($mg \cdot kg^{-1}$)	硝态氮 $NO_3^- - N/(mg \cdot kg^{-1})$	铵态氮 $NH_4^+ - N/(mg \cdot kg^{-1})$
0~20	<i>nirK</i>	-0.035	0.271	0.531*	-0.369	0.346	-0.017	-0.057	-0.209	-0.221
	<i>nirS</i>	-0.461	0.154	0.268	-0.132	0.306	0.700**	0.396	0.411	0.301
	<i>nosZ</i>	0.371	0.516*	-0.113	0.637*	0.410	-0.372	-0.689**	-0.741**	-0.300
	(<i>nirK+nirS</i>) / <i>nosZ</i>	-0.374	-0.288	0.353	-0.704**	-0.170	0.443	0.523*	0.534*	0.192
20~40	<i>nirK</i>	-0.182	0.726**	0.233	0.436	0.261	0.023	-0.262	-0.131	0.447
	<i>nirS</i>	-0.022	0.596*	0.246	0.336	0.326	0.209	-0.092	-0.019	0.365
	<i>nosZ</i>	-0.360	0.867**	0.515*	0.220	0.559*	0.239	-0.043	0.143	0.450
	(<i>nirK+nirS</i>) / <i>nosZ</i>	0.307	-0.226	-0.511	0.455	-0.511	-0.348	-0.378	-0.515*	0.067

*, $P<0.05$; **, $P<0.01$.

为了进一步揭示集约经营过程中土壤性质对反硝化功能基因丰度变化的影响, 将表层以及亚表层土壤的反硝化功能基因丰度分别与对应土层的理化性质作为两组变量进行冗余分析(RDA, Redundancy analysis)。根据蒙特卡洛检验, 选取影响较大的 4 个环境因子分析结果表明, 表层土壤中第一排序轴和第二排序轴分别解释了 25.8%和 23.6%的变异(图 2A), 第一排序轴将 CK 和 10 年样品与 20 年和 25 年样品很好地区分开来, 而 15 年样品则在第二坐标轴附近, 说明集约经营过程中土壤反硝化功能基因丰度变化分为三个阶段。第一排序轴与碳氮比呈正相关、与硝态氮和速效钾呈负相关, 第二排序

轴与全氮呈负相关。土壤硝态氮 ($F=3.855$, $P=0.024$)、碳氮比 ($F=3.832$, $P=0.022$)、速效钾 ($F=2.844$, $P=0.050$) 对土壤反硝化细菌功能基因丰度的影响均达显著水平, 而全氮 ($F=2.646$, $P=0.054$) 则接近显著水平。进一步分析可得, 硝态氮和速效钾对 20 年和 25 年样地反硝化细菌影响最大。*nirK* 与全氮呈显著正相关, *nosZ* 与硝态氮和速效钾呈显著负相关, 这与相关性分析结果相同。

根据蒙特卡洛检验, 选取亚表层土壤中影响较大的 4 个环境因子分析结果表明, 第一排序轴和第二排序轴分别解释了 66%和 1.7%的变异, 第一排序轴上三个功能基因与有机碳相关性很强(图 2B)。



注: AK: 速效钾; TN: 全氮; AN: 碱解氮; SOC: 土壤有机碳。Note: AK: Available K; TN: Total N; AN: Alkalytic N; SOC: Soil organic carbon.

图 2 集约经营毛竹林土壤反硝化功能基因丰度与环境参数的冗余分析

Fig. 2 Redundancy analysis of abundance of denitrifying functional genes and environmental parameters in soils of the moso bamboo plantation under intensive management

不同集约经营时间的土壤均聚焦在一起（一个对照重复外），但分组情况与表层土壤不同，15 年和 20 年聚在一组、位于第一排序轴正值区，其他 3 个年份组位于第一排序轴的负值区，且 25 年又与 CK 和 10 年在第二排序轴分开。说明集约经营时间对 3 个反硝化功能基因影响显著，其中影响最大是有机碳和铵态氮，与第一排序轴呈负相关，有机碳 ($F=14.717$, $P=0.002$) 达到显著水平，而铵态氮 ($F=2.795$, $P=0.092$) 则没有；其次为碱解氮和碳氮比，分别与第二排序轴呈正相关和负相关，但均未达到显著水平（碱解氮 $F=2.315$, $P=0.114$ 、碳氮比 $F=1.811$, $P=0.181$ ）。进一步分析发现，碱解氮对集约经营 25 年样地有积极影响，有机质与 3 种功能基因均呈显著正相关，全氮和碱解氮与 *nosZ* 功能基因呈正相关。

3 讨论

前人的研究结果证明，影响土壤反硝化作用的因素比较多，而且各因素之间互为影响，主要影响因素包括速效氮、有机碳、土壤水分、温度、pH 以及土壤质地等^[22]。理论推测以及研究证明，单因素速效氮^[23]、有机碳^[24]、土壤水分^[23]、温度^[25]、pH^[26]

与反硝化作用均有正相关关系，而自然或人为耕作土壤的土壤性质变化不一致（不同步），因此，实际测量得到的反硝化基因丰度变化是多个因素综合作用的结果。由于不同因素的作用强度不同，正反作用可能会抵消、或者作用强的因子将弱的因子掩盖掉。

3.1 集约经营对毛竹林表层和亚表层反硝化基因的总影响

毛竹林土壤的反硝化基因 *nirK*、*nirS* 和 *nosZ* 丰度总体较报道的结果高（图 1），除旱地农田 *nirS* 外，水稻田、杉木林和旱地农田中的三种功能基因丰度均显著低于毛竹林或与毛竹林持平^[27-29]。这表明毛竹林土壤含有更高的反硝化基因丰度，因此相比其他土地利用方式可能 N_2O 排放量较高。集约经营措施主要措施有施肥、去除林下植被、翻耕等。由此，集约经营过程中土壤速效养分水平提高，土壤通气性增加，pH 下降，有机碳含量不断波动。其中 pH 下降的原因在于集约经营过程中大量氮肥的施用，而有机碳含量不断变化的原因一方面在于集约经营初期施肥结合翻耕促进土壤中地下根鞭的分解，另一方面施肥促进毛竹生长，增加毛竹根系分泌物量，从而提高了土壤的有机质含量。而 10 年后不断翻耕施肥导致有机碳含量下降。25 年有机质又有小幅回

升，这可能与毛竹生产量提高后，枯落物和根系分泌物的增加有关。随着集约经营时间的增加，三种反硝化基因的变化表现出一定的规律性，无论是表层还是亚表层土壤，三种功能基因丰度在集约经营 10 年时增加或保持不变，说明在前 10 年期间毛竹林集约经营措施对反硝化细菌没有产生不良影响，有的还有促进作用。尽管有研究表明酸性范围内土壤 pH 越低，反硝化细菌丰度也会随之降低^[26]。而在本研究中有机碳、全氮和碱解氮明显增加对反硝化作用的正作用抵消了 pH 下降的负面影响，从而掩盖了 pH 下降带来的不利影响。土壤硝态氮下降是反硝化作用增强导致底物减少的结果（表 1）。这与斐自伟等^[30]的研究结果相似。除表层土壤 *nirS* 基因外，三种功能基因在集约经营过程的某一阶段出现不同程度的下降，但集约经营持续 25 年时，除了 *nosZ* 表层功能基因外，其他反硝化功能基因丰度均恢复到对照甚至超过对照的水平（图 1）。10 年之后土壤有机碳及 pH 明显低于对照和 10 年土壤，这可能是导致反硝化基因丰度下降的主要原因。而在 25 年反硝化基因丰度回升可能是由于有机碳含量的上升。由于土壤因子变化较复杂，将土壤性质与基因丰度进行相关性和冗余分析以揭示内在规律，相关分析表明，*nirK* 和 *nirS* 基因丰度与不同土层土壤性质的相关性没有一致的规律，而 *nosZ* 基因丰度在表层和亚表层均与有机碳显著相关。表层和亚表层土壤 pH 和铵态氮与所有基因均没有显著相关性（表 2），其他指标则分别或同时与某一土层的某个基因表现出显著相关性，其中单因子有机碳、全氮以及它们的比值（C/N）与反硝化基因相关的频率最高。冗余分析表明，表层土壤的硝态氮、C/N、速效钾以及全氮含量等 4 个因子对 3 个反硝化基因影响的显著水平依次递减，而对亚表层影响较大的 4 个因子依次为：有机碳、铵态氮、碱解氮以及 C/N，不同土层驱动基因丰度变化的主要土壤性质不同，而 C/N 同时影响两个土层，且两个土层分别同时出现 2 个含氮指标，说明集约经营措施主要通过土壤氮和有机碳综合影响反硝化微生物的活动和功能。由于所有土壤的质地相同，集约经营措施是每年去除林下植被、翻耕，故不同集约经营时间的土壤疏松度差别不大，因此，土壤化学性质变化是影响基因丰度的主要因素。

3.2 集约经营过程中表层和亚表层反硝化基因的差异

为弄清土层深度对不同反硝化基因的影响，我们对不同土层之间各种基因丰度差异情况展开讨论。表层 *nirS* 和 *nosZ* 土壤基因丰度显著高于亚表层土壤，但 *nirK* 基因丰度出现相反现象。大部分研究报告表层土壤反硝化基因丰度高于亚表层土壤，*nirK*、*nirS* 和 *nosZ* 丰度在不同类型土壤如耕地^[31]、草地^[32]和森林^[33]中均随着深度的增加而降低。虽然亚表层土壤的氧化还原电位通常较表层低，有利于反硝化作用，但表层土壤有机碳高于亚表层，可能对反硝化作用的影响更大。为什么亚表层土壤的 *nirK* 基因丰度反而高于表层的异常现象？从前面分析得知，毛竹林集约经营土壤反硝化细菌丰度变化受到氮素水平和有机碳的影响最大，而亚表层土壤的氮素水平和有机碳均低于正常表层，从土壤性质解释不通。推测可能是分布在 30 cm 亚表层的毛竹竹鞭分泌大量可溶性有机碳，对携带 *nirK* 基因的微生物促进效果较 *nirS* 和 *nosZ* 基因微生物更加显著。李振高等^[34]也发现在小麦生长过程中随着根系分泌物的增加反硝化细菌数量不仅显著增加，同时根系分泌物还刺激了反硝化细菌的代谢活动。此外，研究证明 pH 与 *nirK* 反硝化基因丰度呈显著正相关^[26]，而在本研究中表层 pH 显著低于亚表层，因此 pH 也可能是导致 *nirK* 表层和亚表层丰度出现异常的原因之一。

3.3 集约经营过程中不同反硝化基因之间的差异

本研究中，反硝化基因 *nirK*、*nirS* 和 *nosZ* 等随着集约经营时间的变化规律不同。尽管表层土壤中 *nirK* 和 *nirS* 两种功能基因共同编码亚硝酸还原酶，且丰度上有着相同的数量级，但毛竹集约经营过程中两种 *nir* 基因变化趋势不同，且分别受不同的土壤理化因子的控制。关于这两种基因的同步^[35]和反向^[36]变化规律的结果均有报道。由于土壤中携带反硝化 *nirK* 和 *nirS* 的微生物属于不同的种^[7]，在环境中各有各的生态位^[27]，对同一环境因子的响应可能不同。有时可能存在竞争关系^[36]、有时候存在正相关关系^[35]，有时则互不影响^[26]，三种关系均有可能发生。毛竹林表层土壤中 *nirK* 和 *nirS* 无显著相关性，属于互不影响的关系，这可能是由于 *nirK* 丰度在整个集约过程中的波动远大于 *nirS*。研究表明

nirK 对环境的敏感程度要远大于 *nirS*^[37]。而集约经营过程中由于施肥、毛竹凋落物、翻耕等抗干扰活动导致微生物的生境不断变化,可以很好地解释 *nirK* 基因丰度波动大于 *nirS* 的结果。与 *nirK* 和 *nirS* 变化规律不同,集约经营过程中表层和亚表层土壤的 *nosZ* 基因丰度均表现为先增加后减少的一致规律,且与有机碳含量呈显著正相关;表层土壤 *nosZ* 丰度与速效钾和硝态氮含量呈显著负相关、而亚表层土壤 *nosZ* 丰度则与碳氮比呈显著正相关,说明有机碳是影响 *nosZ* 丰度的共性因子,研究表明^[38]随着氮肥施用量增加,土壤碳氮比降低,土壤中反硝化微生物 *nosZ* 的丰度显著降低。毛竹林在集约经营初期由于施肥促进有机质分解以及促进毛竹生长使毛竹分泌根系分泌物增加,因而,土壤有机质含量明显增加,虽然施肥增加土壤氮水平,但增幅小于有机碳,因此,土壤碳氮比总体升高有利于携带 *nosZ* 基因的微生物活动。而长期集约经营碳氮比显著低于对照, *nosZ* 基因丰度同碳氮比一样呈现同步变化的趋势。

3.4 集约经营过程中 (*nirK+nirS*) /*nosZ* 比值变化

研究发现 (*nirK+nirS*) /*nosZ* 比值可预测 N₂O 排放的变化,相同基因丰度水平情况下比值越高产生的 N₂O 越多^[21]。表层土壤 (*nirK+nirS*) /*nosZ* 比值在集约经营初期变幅不大,而在集约经营后期显著上升(图 1D),说明随着集约经营时间可能会增加 N₂O 排放。表层后期 *nosZ* 基因降幅较大(图 1C)而 *nirS* 基因则没有下降(图 1B),因此造成 (*nirK+nirS*) /*nosZ* 比值明显增加。集约经营后期硝态氮明显积累,为反硝化作用提供丰富的底物,反硝过程可以保持在较高水平,而 *nosZ* 基因数量显著减少使硝化过程不能彻底还原为 N₂,导致 N₂O 排放量增加。*nosZ* 基因数量减少主要受到与硝态氮积累有关,研究表明^[23]高浓度的硝态氮会抑制 N₂O 还原酶 (*nosZ*) 的活性,使 N₂O 转化为 N₂ 速率减慢。亚表层土壤由于 *nirK* 明显高于表层、而 *nosZ* 则明显低于表层,导致 (*nirK+nirS*) /*nosZ* 比值显著高于表层(图 1D),但随着集约经营时间呈缓慢下降趋势。从 3 个基因丰度变化情况看,亚表层土壤对 *nosZ* 基因的影响大于 (*nirK+nirS*),说明亚表层土壤反硝化步骤主要为 NO₂⁻还原形成 NO,因而产生较多的 N₂O。然而,亚表层土壤 (*nirK+nirS*) /*nosZ* 的比值在集约经营后期显著降低,这正好与表层的变化规

律相反、呈显著负相关。亚表层土壤 (*nirK+nirS*) /*nosZ* 与硝态氮浓度呈显著负相关,这可能是由于土壤亚表层相比表层硝态氮浓度更低,故在集约经营后期并未抑制 N₂O 还原酶活性。以上结果推测,整个集约经营过程亚表层土壤反硝化产生的 N₂O 均高于表层,表层土壤集约经营后期 N₂O 排放量增加。

4 结 论

反硝化作用是竹林土壤氮循环的重要一环。随着集约经营时间的增加,两层土壤的三种功能基因丰度在集约经营 10 年时表现增加或不变的一致规律。除表层土壤 *nirS* 基因外,三种功能基因在集约经营过程的某一阶段(15 或 20 年)出现不同程度的下降,集约经营持续 25 年时,除 *nosZ* 表层土壤基因丰度仍低于对照,其他不同土层土壤基因丰度均恢复甚至超过对照水平,说明土壤反硝化细菌表现出对集约经营干扰的抵抗和恢复反应。集约经营措施主要通过土壤氮和有机碳变化综合影响反硝化细菌的活动和功能。毛竹林集约经营土壤的反硝化细菌积极参与氮循环过程,加剧 N₂O 温室气体的排放。建议在集约经营过程中,通过施用缓释肥料以减少反硝化细菌的底物硝酸根。

参考文献 (References)

- [1] Maeda K, Hanajima D, Toyoda S, et al. Microbiology of nitrogen cycle in animal manure compost[J]. Microbial Biotechnology, 2011, 4 (6): 700—709.
- [2] Conrad R. Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO) [J]. Microbiological Reviews, 1996, 60 (4): 609—640.
- [3] Kim S W, Miyahara M, Fushinobu S, et al. Nitrous oxide emission from nitrifying activated sludge dependent on denitrification by ammonia-oxidizing bacteria[J]. Bioresource Technology, 2010, 101 (11): 3958—3963.
- [4] Anderson I C, Levine J S. Relative rates of nitric oxide and nitrous oxide production by nitrifiers, denitrifiers, and nitrate respirers[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1986, 51 (5): 938—945.
- [5] Zhang J B, Cai Z C, Cheng Y, et al. Denitrification and total nitrogen gas production from forest soils of Eastern China[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2009, 41 (12): 2551—2557.
- [6] Zhang R J, Li H, Lin Q B, et al. Research progress of PLFA method in the soil microbial community[J]. Journal

- of Shanxi Agricultural Sciences, 2011, 39 (9): 1020—1024. [张瑞娟, 李华, 林勤保, 等. 土壤微生物群落表征中磷脂脂肪酸 (PLFA) 方法研究进展[J]. 山西农业科学, 2011, 39 (9): 1020—1024.]
- [7] Zumft W G, Körner H. Enzyme diversity and mosaic gene organization in denitrification[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1997, 71 (1/2): 43—58.
- [8] Jung J, Yeom J, Han J, et al. Seasonal changes in nitrogen-cycle gene abundances and in bacterial communities in acidic forest soils[J]. Journal of Microbiology, 2012, 50 (3): 365—373.
- [9] Li G, Xiu W M, Wang J, et al. Community structure and diversity of soil denitrifying bacteria of the *nirK* gene type under different vegetation restoration patterns in the Hulunbeier Sandy Land, Inner Mongolia[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2015, 24 (1): 115—123. [李刚, 修伟明, 王杰, 等. 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[J]. 草业学报, 2015, 24 (1): 115—123.]
- [10] Sun Y F, Shen J P, Zhang C J, et al. Responses of soil ammonia oxidizers and denitrifiers to different grazing intensities[J]. Acta Ecologica Sinica, 2018, 38 (8): 2874—2883. [孙翼飞, 沈菊培, 张翠景, 等. 不同放牧强度下土壤氨氧化和反硝化微生物的变化特征[J]. 生态学报, 2018, 38 (8): 2874—2883.]
- [11] Liang B C, MacKenzie A F, Schnitzer M, et al. Management-induced change in labile soil organic matter under continuous corn in eastern Canadian soils[J]. Biology and Fertility of Soils, 1997, 26 (2): 88—94.
- [12] Qin H, Xu Q F, Cao Z H. Soil microbial biomass in long-term and intensively managed *Phyllostachys praecox* stands[J]. Journal of Zhejiang A & F University, 2010, 27 (1): 1—7. [秦华, 徐秋芳, 曹志洪. 长期集约经营条件下雷竹林土壤微生物量的变化[J]. 浙江农林学院学报, 2010, 27 (1): 1—7.]
- [13] He D H, Chen J H, Xu Q F, et al. Effects of intensive management on abundance and composition of soil N₂-fixing bacteria in *Phyllostachys heterocyclus* stands[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2015, 26 (10): 2961—2968. [何冬华, 陈俊辉, 徐秋芳, 等. 集约经营对毛竹林土壤固氮细菌群落结构和丰度的影响[J]. 应用生态学报, 2015, 26 (10): 2961—2968.]
- [14] Zhao T X. Effects of management models on abundance and structure of soil bacterial and fungal community in Mao bamboo (*Phyllostachys edulis*) forest[D]. Hangzhou: Zhejiang A & F University, 2017. [赵天心. 经营模式对毛竹林土壤细菌、真菌群落结构和丰度的影响[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2017.]
- [15] Liu C X, Zhou Y, Xu Q F, et al. Effects of intensive management on the community structure and diversity of CO₂-assimilating bacteria in a *Phyllostachys pubescens* stand[J]. Acta Ecologica Sinica, 2018, 38 (21): 7819—7829. [刘彩霞, 周燕, 徐秋芳, 等. 毛竹林集约经营对土壤固碳细菌群落结构和多样性的影响[J]. 生态学报, 2018, 38 (21): 7819—7829.]
- [16] Chen H, Li B, Xiong Z Q. Effects of N reduction and nitrification inhibitor on N₂O emissions in intensive vegetable field[J]. Acta Pedologica Sinica, 2017, 54 (4): 938—947. [陈浩, 李博, 熊正琴. 减氮及硝化抑制剂对菜地氧化亚氮排放的影响[J]. 土壤学报, 2017, 54 (4): 938—947.]
- [17] Bao S D. Soil and agricultural chemistry analysis[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000. [鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.]
- [18] Hallin S, Lindgren P E. PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65 (4): 1652—1657.
- [19] Throbäck I N, Enwall K, Jarvis Å, et al. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 49 (3): 401—417.
- [20] Chèneby D, Hartmann A, Hénault C, et al. Diversity of denitrifying microflora and ability to reduce N₂O in two soils[J]. Biology and Fertility of Soils, 1998, 28 (1): 19—26.
- [21] Szukics U, Hackl E, Zechmeister-Boltenstern S, et al. Contrasting response of two forest soils to nitrogen input: Rapidly altered NO and N₂O emissions and *nirK* abundance[J]. Biology and Fertility of Soils, 2009, 45 (8): 855—863.
- [22] Bolan N S, Saggar S, Luo J F, et al. Gaseous emissions of nitrogen from grazed pastures: Processes, measurements and modelling, environmental implications, and mitigation. Advances in Agronomy, 2004, 84: 37—120.
- [23] Weier K L, Doran J W, Power J F, et al. Denitrification and the dinitrogen/nitrous oxide ratio as affected by soil water, available carbon, and nitrate[J]. Soil Science Society of America Journal, 1993, 57 (1): 66—72.
- [24] Chen C, Xu X, Bi Z C, et al. Effects of biochar and organic manure on N₂O emissions and the functional gene abundance of nitrification and denitrification microbes under intensive vegetable production[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2017, 37 (5): 1912—1920. [陈晨, 许欣, 毕智超, 等. 生物炭和有机肥对菜地土壤 N₂O 排放及硝化、反硝化微生物功能基因丰度的影响[J]. 环境科学学报, 2017, 37 (5): 1912—1920.]
- [25] Schaufler G, Kitzler B, Schindlbacher A, et al. Greenhouse gas emissions from European soils under different land use: Effects of soil moisture and temperature[J]. European Journal of Soil Science, 2010, 61 (5): 683—696.
- [26] Wang X H, Guo G X, Zheng R L, et al. Effect of biochar

- on abundance of n-related functional microbial communities in degraded greenhouse soil[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2013, 50 (3): 624—631. [王晓辉, 郭光霞, 郑瑞伦, 等. 生物炭对设施退化土壤氮相关功能微生物群落丰度的影响[J]. *土壤学报*, 2013, 50(3): 624—631.]
- [27] Tang Y Q, Zhang X Y, Li D D, et al. Impacts of nitrogen and phosphorus additions on the abundance and community structure of ammonia oxidizers and denitrifying bacteria in Chinese fir plantations[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2016, 103: 284—293.
- [28] Yin C. Responses of N₂O emission and reduction as well as associated microbes to temperature and different fertilization regimes in arable soils[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2017. [尹昌. 农田土壤 N₂O 产生和还原及相关功能微生物对温度及施肥的响应[D]. 北京: 中国农业科学院, 2017.]
- [29] Hallin S, Jones C M, Schloter M, et al. Relationship between N-cycling communities and ecosystem functioning in a 50-year-old fertilization experiment[J]. *The ISME Journal*, 2009, 3 (5): 597—605.
- [30] Pei Z W, Chen Y C, Li F S, et al. The relationship between N₂O emission flux from paddy fields and nitrifying-denitrifying bacteria under different irrigation methods and nitrogen treatments[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2017, 36(12): 2561—2568. [裴自伟, 陈意超, 李伏生, 等. 不同灌水模式和施氮处理下稻田 N₂O 排放通量及其与硝化-反硝化细菌数量的关系[J]. *农业环境科学学报*, 2017, 36 (12): 2561—2568.]
- [31] Fierer N, Schimel J P, Holden P A. Variations in microbial community composition through two soil depth profiles[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2003, 35 (1): 167—176.
- [32] Regan K, Kammann C, Hartung K, et al. Can differences in microbial abundances help explain enhanced N₂O emissions in a permanent grassland under elevated atmospheric CO₂?[J]. *Global Change Biology*, 2011, 17 (10): 3176—3186.
- [33] Mergel A, Schmitz O, Mallmann T, et al. Relative abundance of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in layers of a forest soil[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 36 (1): 33—42.
- [34] Li Z G, Pan Y H, Li L M. Dynamics of bacteria and their enzyme activity]in rhizosphere of wheat of different genotypes[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 1993, 30(1): 1—8. [李振高, 潘映华, 李良谟. 不同基因型小麦根际细菌及酶活性的动态研究[J]. *土壤学报*, 1993, 30 (1): 1—8.]
- [35] Wang C, Lu H H, Dong D, et al. Insight into the effects of biochar on manure composting: Evidence supporting the relationship between N₂O emission and denitrifying community[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47 (13): 7341—7349.
- [36] Huhe, Chen X J, Cheng Y X. The dynamics for abundance of nitrite reductase genes *nirK* and *nirS* in abandoned land[J]. *Pratacultural Science*, 2016, 33 (7): 1253—1259. [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[J]. *草业科学*, 2016, 33 (7): 1253—1259.]
- [37] Yin C, Fan F L, Song A L, et al. Different denitrification potential of aquatic brown soil in Northeast China under inorganic and organic fertilization accompanied by distinct changes of *nirS*- and *nirK*-denitrifying bacterial community[J]. *European Journal of Soil Biology*, 2014, 65: 47—56.
- [38] Yang C, Hamel C, Gan Y T. Incongruous variation of denitrifying bacterial communities as soil N level rises in Canadian canola fields[J]. *Applied Soil Ecology*, 2015, 89: 93—101.

(责任编辑: 卢 萍)