

Advances in nirK and nirS Type Denitrifying Microbes of Agricultural Soils

Mingming Zhao^{1*}, Xinmeng Zhao^{1*}, Xininigen^{2#}, Jingli Yu^{1,3#}

¹School of Ecology and Environment, Inner Mongolia University, Hohhot Inner Mongolia

²College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot Inner Mongolia

³Inner Mongolia Key Laboratory of Environmental Pollution Control & Waste Resource Reuse, Hohhot Inner Mongolia

Email: #hot-yjl@163.com, nndxng@163.com

Received: May 23rd, 2018; accepted: Jun. 6th, 2018; published: Jun. 13th, 2018

Abstract

Denitrification is an important way of soil nitrogen loss and also an important process of N₂O emission from greenhouse gases, which is driven by denitrifying microorganisms (microbes). nirK and nirS genes are important biomarkers for denitrifying microorganisms. The role of denitrifying microbial functional genes was briefly described. The importance of nirK and nirS type denitrifying microorganisms in farmland soil and their response to nitrogen fertilizer application and research techniques were emphasized. It pointed out that nitrogen application in farmland soil could significantly increase the abundance of nirK and nirS genes and obviously changed the nirK type denitrifying microbial community. The application of nitrogen fertilizer in the paddy field promoted the increase of the diversity of nirS type denitrifying microorganisms in the soil, while nitrogen fertilizer in the dry-land could significantly affect its community structure. In future, research on nir type denitrifying microorganisms should pay more attention to the combination of molecular ecological technology and a variety of technologies. Thus, nirK and nirS type denitrifying microorganisms can be more deeply understood.

Keywords

Agricultural Soils, Nitrogen Fertilizer, Denitrifying Microbes, nirK and nirS Genes, Techniques

农田土壤nirK和nirS型反硝化微生物的研究进展

赵明明^{1*}, 赵鑫盟^{1*}, 希尼尼根^{2#}, 于景丽^{1,3#}

*共同第一作者。

#通讯作者。

¹内蒙古大学生态与环境学院, 内蒙古 呼和浩特

²内蒙古农业大学兽医学院, 内蒙古 呼和浩特

³内蒙古自治区环境污染控制与废物资源化重点实验室, 内蒙古 呼和浩特

Email: #hot-yjl@163.com, nndxng@163.com

收稿日期: 2018年5月23日; 录用日期: 2018年6月6日; 发布日期: 2018年6月13日

摘要

反硝化作用是土壤氮逸失的重要途径, 也是引起温室气体 N_2O 释放的重要过程, 由反硝化微生物驱动完成。**nirK**和**nirS**基因是反硝化微生物的重要生物标志(biomarker)。本文简述了反硝化微生物功能基因的作用, 重点阐述了农田土壤**nirK**和**nirS**型反硝化微生物的重要性及其对施氮肥的响应和研究技术等, 指出了农田土壤施氮肥可显著提高**nirK**和**nirS**基因的丰度, 并且明显改变**nirK**型反硝化微生物群落结构组成; 在水田中施氮肥促进了土壤中**nirS**型反硝化微生物多样性的增加, 而在旱田中氮肥却可以显著影响其群落结构。今后关于**nir**型反硝化微生物的研究应更加注重分子生态技术与多种技术相结合, 以便对**nirK**和**nirS**型反硝化微生物进行更深入的研究。

关键词

农田土壤, 氮肥, 反硝化微生物, **nirK**和**nirS**基因, 主流技术

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

1.1. 反硝化作用与反硝化微生物功能基因简介

反硝化作用是微生物在无氧或微氧条件下以 NO_3^- 或 NO_2^- 作为电子受体进行呼吸代谢获得能量, 同时将 NO_3^- 或 NO_2^- 还原为 N_2O 或 N_2 的过程。反硝化作用既是土壤氮肥损失的途径之一, 也是产生温室气体 N_2O 的主要途径。土壤的反硝化作用主要是由土壤微生物引起的, 包括异化反硝化细菌、非反硝化发酵性细菌和真菌、自养型硝化细菌等。反硝化作用是一个由四步反应构成的生物地球化学过程, 包括硝酸盐还原, 亚硝酸盐还原, 一氧化氮 NO 还原和氧化亚氮还原 N_2O 。其中, 每一步都由相应的酶来催化, 分别为硝酸还原酶(Nitrate reductase, Nar)、亚硝酸还原酶(Nitrite reductase, Nir)、一氧化氮还原酶(Nitric oxide reductase, Nor)和一氧化二氮还原酶(Nitrous oxide reductase, Nos) [1] [2], 如图 1 所示。

由亚硝酸盐还原为 NO 的过程是反硝化作用区别于其他硝酸盐代谢的标志性反应, 也是反硝化过程中最重要的限速步骤, 亚硝酸盐还原酶(Nir)是执行该步骤的限速酶。因此, **nir**基因也成为反硝化细菌研究最多的功能基因。Nir酶包括进化关系不相关结构不同的两种酶: Cu型亚硝酸盐还原酶(**nirK**)和细胞色素cd1型亚硝酸盐还原酶(**nirS**) [3]。**nirK**型亚硝酸盐还原酶是由三个相同亚基组成的三聚体蛋白, 每个亚基都含有两种类型的铜原子活性中心, 即类型I (T1Cu)和类型II (T2Cu); **nirS**型亚硝酸盐还原酶是可溶的同株异核生殖蛋白, 是一个包含两个相同亚基的二聚体, 每个亚基都包含一个细胞色素c和一个细胞色素d1 [4]。这两种亚硝酸盐还原酶在功能上没有显著差异, 但二者催化位点不同, 且不能共存于同种

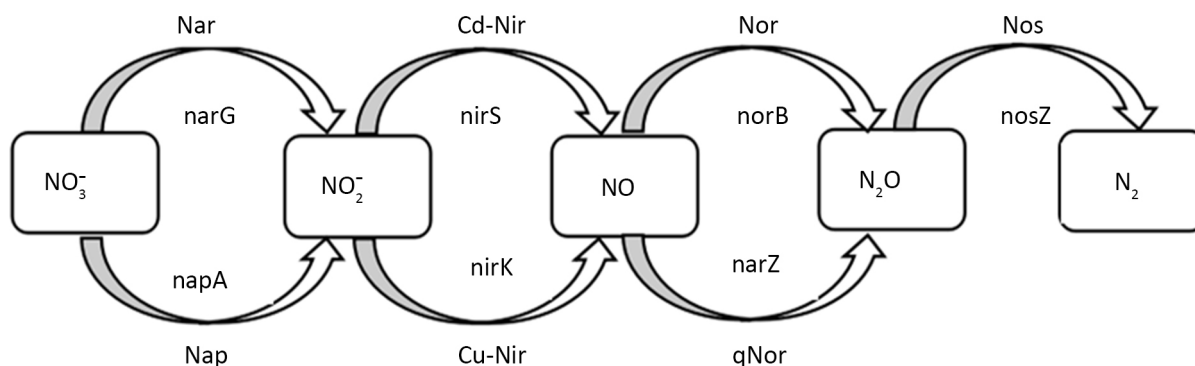


Figure 1. Denitrification enzymes and denitrifying functional genes [1]

图 1. 反硝化功能酶和功能基因[1]

细胞中[5]。很多研究将 *nirK* 和 *nirS* 基因作为环境样品中反硝化微生物的分子标识物,为研究同一生理类群微生物的群落结构提供了方法和模式,极大地促进了现代分子生态学的发展。

1.2. 研究氮肥对 *nirK* 和 *nirS* 基因影响的重要性

施肥是影响土壤质量及其可持续利用的重要农业措施之一,对土壤结构、生物肥力和生产力产生了重要的影响。近年来投入到农田的化肥量有明显的递增趋势,其中氮肥的过量投入使硝酸盐在蔬菜等植物体内超标积累,污染了地下水,造成了湖泊水体富营养化,以及产生了各种含氮气体(包括 N_2O)加剧了温室效应,既对人体健康造成了一定损害,又带来了严重的环境污染。亚硝酸盐还原酶在氮素循环中起着重要的作用,因此研究施氮肥对亚硝酸还原酶 *nir* 基因的影响,可为探讨施氮肥对土壤氮素循环利用机制及反硝化作用提供有利的依据,具有提高氮肥利用率以及开展温室气体减排研究的双重意义。

2. 农田土壤 *nirK* 和 *nirS* 型反硝化微生物影响的研究进展

2.1. 研究土壤 *nirK* 和 *nirS* 型反硝化微生物的技术方法

土壤 *nirK*、*nirS* 型反硝化细菌的研究方法有很多,从国内外目前采用的方法来看,大致包括以下几类:1) 传统的微生物平板纯培养方法;2) Biolog 微平板分析方法;3) PLFA 谱图分析方法;4) 分子生物学分析方法;5) 其他方法,如土壤酶活性分析方法、同位素示踪法,以及荧光标记蛋白、荧光染色和荧光原位杂交等(图 2)[6]。

下面对几种主要的实验研究方法加以介绍和评述。

2.1.1. 传统的微生物平板纯培养方法

微生物平板培养法是一种传统的实验方法,这种方法主要是根据目标微生物选择相应的培养基,将微生物分离培养,然后通过各种微生物的生理生化特征以及外观形态等方面进行分析和鉴定。但该分析方法只能分离 0.1%~0.5% 的土壤微生物[7],很难得到微生物在土壤生态系统中的生活特征和生态功能的信息,具有很大的局限性。因此,在土壤微生物群落多样性的研究中,需要结合现代分子生态技术来了解更详细的土壤微生物信息。

2.1.2. Biolog 微平板方法

Biolog 微平板法是通过测定土壤微生物对 95 种碳源利用能力的不同来表征土壤微生物代谢功能多样性或结构多样性的一种方法。这种方法在土壤微生物群落功能多样性的评价中得到了广泛应用。其具体做法是利用 Biolog 微平板系统,将土壤溶液接种到每一个微平板孔中,由于不同微生物利用不同的碳源

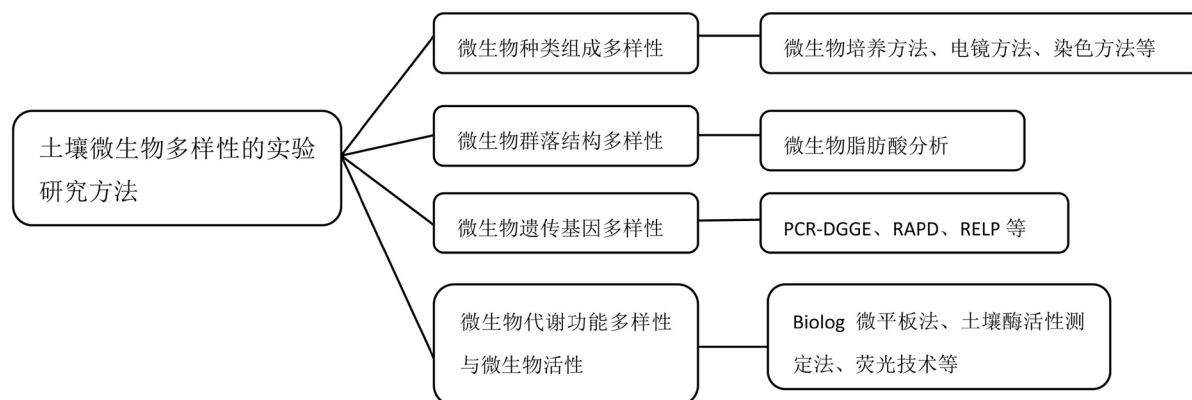


Figure 2. Research methods of soil microbial diversity at laboratory scale [6]

图 2. 实验室尺度下土壤微生物多样性的研究方法[6]

进行代谢反应，最终通过利用碳源的种类和强度差异使得每一个孔中的溶液呈现出不同的颜色，通过酶标仪将颜色变化测定和记录下来，即可得到土壤微生物特有的“代谢指纹” (Metabolic Fingerprint) [6]。根据土壤微生物的代谢指纹图谱，结合有关的计算机分析软件和已有的菌种库资料，便可以对某些微生物进行分类鉴定。Biolog 微平板法对一般细菌的鉴定可以精确到种，但目前数据库中菌种资料不完善，有些只能得到相似的类群。因此，对于微生物的分类鉴定，仅靠 Biolog 系统的方法是远远不够的，还需结合其他方法如微生物生理生化方法和表型分析等方法来进行。

2.1.3. PLFA 谱图分析方法

磷脂脂肪酸(Phospholipid Fatty Acid, PLFA)谱图分析方法主要应用于研究复杂群落中的微生物多样性[8] [9]。磷脂类化合物只存在于生物的细胞膜中，且不同微生物体内的磷脂脂肪酸的含量和组成不同。一旦微生物体死亡，其中的磷脂化合物便会马上消失。因此，磷脂脂肪酸分析法十分适合于土壤微生物群落的动态监测。PLFA 的提取和分析是该方法的关键步骤，提取方法主要分为简单提取、扩展提取和商用微生物鉴定系统(MIDI)等[8]。简单提取方法和 MIDI 方法提取土壤 PLFA 所得到的脂肪酸谱图相似[10] [11]，一般可以提取到 20~40 种脂肪酸，采用扩展提取方法检测到的 PLFA 数量介于 190 至 360 种之间[12] [13]。PLFA 方法是一种快速、可靠且可重现的分析土壤微生物群落结构的方法，最适合用于总微生物群落分析，但不适合单一的微生物种类研究。因此，该方法并不适合于 nirK、nirS 型反硝化细菌的研究。另外，该方法一个明显的缺陷是实验条件要求高，成本高，因而在实际研究工作中会受到一定的限制。

2.1.4. 分子生物学方法

最近 20~30 年间，以核酸分析技术为主的分子生物学技术(如 PCR、DGGE、RFLP、RAPD、AFLP 等)的广泛应用[14]，开拓了分子生物学与生态学的交叉领域，分子生物学技术也逐渐被应用到土壤微生物多样性的研究中[15] [16] [17] [18]。PCR 技术即聚合酶链式反应，是一种体外扩增核酸序列从而获得多个核酸拷贝的技术，可用于土壤微生物 DNA 的扩增和定性分析，还通过定量 PCR 技术对 DNA 的丰度进行检测；DGGE 即变性梯度凝胶电泳，是根据 PCR 扩增产物中不同的 rDNA 片段在电泳胶中形成不同的 rDNA 指纹剖面，来直接反映土壤微生物 rDNA 多态性的方法。例如 Sharma 等首先采用 RT-PCR 的方法反转录 nirS 和 nirK 基因，之后用 DGGE 研究了不同作物根际土壤中有活性的反硝化微生物的群落结构，发现了不同作物的根际有不同活性的 nirK 基因[19]；RFLP 方法是利用 PCR 扩增产物，用限制性内切酶进行切割，通过 DNA 转印及分子杂交方法进行检测。例如 Falk 等采用 T-RFLP 方法，研究了海洋水体和沉积物中 nirS 基因的群落多样性，发现 nirS 基因的群落结构可能与环境条件密切相关[20]；RAPD

是以单一的序列随机的寡核苷酸为引物，由于不同样本的基因组序列不同，以致与引物互补退火结合的 DNA 片段可能增加或减少，导致扩增产物数目的变化；AFLP 则是为了发现各样本基因组间差异的，有选择的扩增经酶切后的部分 DNA 片段。分子生物学技术在土壤微生物多样性研究中的应用如图 3 所示。

2.2. 施氮肥对 nirK 和 nirS 型反硝化微生物影响的研究成果

2.2.1. 施氮肥对 nirK 和 nirS 基因丰度的影响

大量研究表明，农田土壤中施加氮肥可以显著提高 nirK 和 nirS 基因的丰度。陈晨等[21]采用室内培养试验和实时荧光定量 PCR 技术研究了施加有机肥对菜地土壤反硝化微生物功能基因丰度的影响，结果表明氮肥处理显著增加了 nirK 和 nirS 基因的丰度($P < 0.05$)；在常规施氮肥的基础上，添加有机肥也可以显著提高 nirK 和 nirS 型反硝化基因的丰度($P < 0.05$) [21]。杨柳青等发现长期使用尿素能增加土壤中 nirK、nirS 基因的丰度[22]，这与陈晨等人[21]的研究结果一致。张星等利用田间取样和室内分析相结合的方法，探讨了在小麦 - 玉米轮作周期内，秸秆还田对土壤反硝化微生物功能基因的影响，实验结果证明秸秆还田显著提高了 nirK、nirS 和 nosZ 基因的丰度以及 nirK/nirS 与(nirK + nirS)/nosZ 的比例[23]。罗希茜等在不同施肥处理对水稻土亚硝酸还原酶基因多样性的影响研究中指出，平衡施化肥(氮、磷、钾及微量元素比例适宜)明显提高了 nirK 基因的多样性，单施氮肥使 nirS 基因多样性达到最高，其他施肥处理对 nir 基因多样性的影响并不显著[24]。

2.2.2. 施氮肥对 nirK 和 nirS 型反硝化微生物多样性和群落结构的影响

土壤中的氮含量是影响土壤中反硝化微生物的一个重要因素，而向农田土壤中施加氮肥对 nirK 和 nirS 型反硝化微生物的影响却不一致。土壤反硝化微生物多样性和群落组成的研究在近几年来不断取得新的进展，部分研究成果见表 1。氮肥的施用会明显改变 nirK 型反硝化微生物群落结构的组成，但对其多样性的影响并不显著，并且土层深度对 nirK 型反硝化微生物多样性的影响大于施肥。由此可见，nirK 型反硝化微生物对土壤 pH 值、有机质和硝酸盐含量具有一定的敏感性[32]。

根据表 1 中的研究，nirS 型反硝化微生物对施肥的响应存在一定的矛盾。但不难发现，nirS 型反硝化微生物群落结构对氮肥处理不敏感的研究都是以水稻土为研究对象，而在以小麦和玉米等为主的旱田中，施氮肥却可以显著改变 nirS 型反硝化微生物群落结构。由此可以得出：土壤含水量较高时，施氮肥促进了土壤中 nirS 型反硝化微生物多样性的增加，但对其群落结构影响不大；而在含水量相对较低的土壤中，nirS 型反硝化微生物群落结构受氮肥影响显著，然而其多样性却没有显著变化。因此推测研究结果的不同可能与土壤条件(温度、水分、pH、含氧量等)、作物种类以及施肥方式有关[33]。

3. nirK 和 nirS 型反硝化微生物研究展望

3.1. 当前技术的局限性及其发展趋势

3.1.1. 功能基因引物的选择

目前对土壤反硝化微生物丰度、群落结构的研究多以催化反硝化过程关键酶的基因作为分子标识物

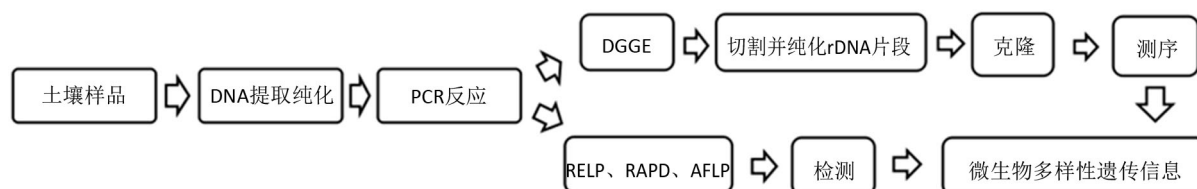


Figure 3. Framework map about molecular ecological techniques studying soil microbial diversity [6]

图 3. 分子生态技术在土壤微生物多样性研究中的应用图解[6]

Table 1. Research Progress on soil denitrifying microorganisms**表 1.** 土壤反硝化微生物的研究进展

序号 NO.	研究结果 Research results	技术方法 Technology/methods	功能基因 Functional genes	文献来源 Literatures
1	施氮肥显著改变了 nirK 型反硝化细菌群落结构组成, 土层深度对 nirK 型反硝化细菌丰度的影响大于施肥	T-RFLP 分析和实时荧光定量 PCR 技术	nirK	[3]
2	氮肥的施用对 nirK 型土壤反硝化微生物多样性影响不显著, 但明显改变其群落结构组成	PCR 扩增、克隆测序	nirK	[24]
3	不同类型氮肥 nirK 型土壤反硝化微生物多样性指数上没有差异, 并未引起其群落多样性改变	T-RFLP 分析、构建基因克隆文库	nirK	[25]
4	水稻土中 nirS 型反硝微生物对环境变化不敏感	PCR 扩增、构建基因克隆文库	nirS	[26]
5	水稻土中 nirS 型反硝化微生物的群落结构对施加无机肥和有机肥处理均没有显著的响应	PCR 扩增、T-RFLP 分析	nirS	[27]
6	施用氮肥能够显著提高稻田土壤 nirS 型反硝化微生物的丰度	PCR-DGGE、荧光定量 PCR 技术	nirS	[28]
7	水稻土 nirS 型反硝化细菌群落结构对氮肥施加不敏感	PCR 扩增、克隆测序	nirS	[29]
8	不同类型的反硝化细菌对无机氮肥的反应不同而导致 nirS 型反硝化细菌群落结构改变, 但未改变 nirS 型反硝化细菌的多样性	RFLP 分析、构建基因克隆文库	nirS	[30]
9	黑土中 nirS 型反硝化菌种群的群落结构和丰度对长期施用有机肥有显著的响应	T-RFLP 分析、实时荧光定量 PCR 技术	nirS	[31]

(例如 nir 基因)。虽然基于这些功能基因有效地克服了 16S rRNA 基因研究反硝化微生物群落组成中的不足[34], 但基因数据库中的反硝化基因序列尚不是很多, 例如研究最多的 nirK、nirS 基因, 其引物的设计主要针对变形杆菌门的几个属。对于其他反硝化微生物来说, nir 基因可以被扩增到什么程度还是未知, 且不同的 nir 基因可能只对特定生境的反硝化菌 nir 基因扩增有效。因此, 研究有关反硝化功能微生物的当务之急是设计出更具有针对性的引物, 如专门针对反硝化微生物功能基因的引物。

3.1.2. 分子生物学技术的缺陷性及展望

现代分子生物学很大程度上加快了反硝化微生物的研究, 但 DGGE、RELP 的技术都是建立在 DNA 提取以及 PCR 的基础上, 不同的 DNA 技术会提取出不同长度、质量、纯度的 DNA, 直接影响其他分子生物学技术的准确性[35]。PCR 也会不可避免的造成 DNA 的差异性扩增, 以及目标 DNA 在菌种间拷贝的差异, 导致分析结果难以准确反映自然微生物群落的多样性以及物种间的相对丰度信息[36]。

总而言之, 研究 nirK、nirS 型反硝化微生物的每种技术和方法都有其优势以及局限性, 多种技术结合势必会成为主流, 也更有利于环境样品微生物群落结构多样性的分析。而且若以多种功能基因同时作为标记物也一定能提高实验的准确性。在今后的发展中应该更注重反硝化功能基因的研究, 为研发新技术、提供新方法打下基础。采用各种技术相结合的手段, 提高检测的灵敏度, 尽可能避免环境因素对反硝化功能基因的影响, 才能对 nirK、nirS 型反硝化微生物有更深入的了解[5]。

3.2. 施氮肥造成的环境问题及其研究方向

长期施肥尤其是氮肥的大量投入会促进反硝化作用, 提高了 N₂O 的排放量。研究农田土壤施氮肥对反硝化微生物群落结构和多样性的影响, 有利于为农田可持续性发展提供重要的理论依据。要深入探讨农田反硝化功能基因丰度及多样性与含氮气体排放的关系, 还需要明确上述反硝化基因的丰度和表达特征。分离和鉴定土壤中的优势反硝化功能菌为进一步开展节氮减排研究打下坚实的基础。目前的研究多局限于研究细菌的反硝化作用, 而古细菌和真菌也具有反硝化能力。因此, 将来也可对古细菌和真菌开展研究。由于土壤细

菌体内的反硝化功能基因不一定都表达。因此,可提取和纯化细菌的RNA,通过反转录将RNA转化成cDNA,利用相关分子生态技术研究土壤中能表达反硝化基因的微生物种类和数量,探讨反硝化基因的表达与施肥的内在联系及耦合机制,这样才能更深入地了解施氮肥造成的环境问题,从而进行有效的治理。

基金项目

感谢国内外优秀学者提供的文献资料,感谢国家自然科学基金项目(No. 41361053, No. 31660724)、内蒙古自然科学基金项目(No. 2016MS0331, No. 2015MS0306)的支持。

参考文献

- [1] 梁丽华, 左剑悉. 反硝化功能基因——检测反硝化菌种群结构的分子标记[J]. 微生物学通报, 2009, 36(4): 627-633.
- [2] Braker, G., Zhou, J., Wu, L., Devol, A.H. and Tiedje, J.M. (2000) 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*, **66**, 2096-2014. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.2096-2104.2000>
- [3] 曾希柏, 王亚男, 王玉忠, 等. 施肥对设施菜地 *nirK* 型反硝化细菌群落结构和丰度的影响[J]. 应用生态学报, 2014, 25(2): 505-514.
- [4] 胡朝松, 李春强, 廖文彬, 等. 铜型亚硝酸还原酶的电子传递模式及催化机理研究进展[J]. 微生物学通报, 2008, 35(7): 1136-1142.
- [5] 郭丽芸, 时飞, 杨柳燕. 反硝化菌功能基因及其分子生态学研究进展[J]. 微生物学通报, 2011, 38(4): 583-590.
- [6] 章家恩, 蔡燕飞, 高爱霞, 等. 土壤微生物多样性实验研究方法概述[J]. 土壤, 2004, 36(4): 346-350.
- [7] 李阜棣, 胡正嘉. 微生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2010: 4-301.
- [8] Zelles, L. (1999) Fatty Acid Patterns of Phospholipids and Lipopolysaccharides in the Characterization of Microbial Communities in Soil. *Biology & Fertility of Soils*, **29**, 111-129. <https://doi.org/10.1007/s003740050533>
- [9] Fjr, P. and Tadros, M. (2002) Phospholipid Fatty Acids in Forest Soil Four Years after Organic Matter Removal and Soil Compaction. *Applied Soil Ecology*, **19**, 173-182. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(01\)00182-2](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(01)00182-2)
- [10] Cavigelli, M.A., Robertson, G.P. and Klug, M.J. (1995) Fatty Acid Methyl Ester (FAME) Profiles as Measures of Soil Microbial Community Structure. *Plant & Soil*, **170**, 99-113. <https://doi.org/10.1007/BF02183058>
- [11] Frostegard, A., Batte, E. and Tunlid, A. (1993) Shifts in the Structure of Soil Microbial Communities in Limed Forests as Revealed by Phospholipid Fatty Acid Analysis. *Soil Biology & Biochemistry*, **25**, 723-730. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(93\)90113-P](https://doi.org/10.1016/0038-0717(93)90113-P)
- [12] Zelles, L., Palojarvi, A., Kandeler, E., *et al.* (1997) Changes in Soil Microbial Properties and Phospholipid Fatty Acid Fractions after Chloroform Fumigation. *Soil Biology & Biochemistry*, **29**, 1325-1336. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(97\)00062-X](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00062-X)
- [13] Steinberger, Y., Zelles, L., Bai, Q.Y., Lützw, M.V. and Munch, J.C. (1999) Phospholipid Fatty Acid Profiles as Indicators for Microbial Community Structure and Biodiversity in Soils along a Climatic Transect in the Judean Desert. *Biology & Fertility of Soils*, **28**, 292-300. <https://doi.org/10.1007/s003740050496>
- [14] 王海涛, 郑天凌, 杨小茹. 土壤反硝化的分子生态学研究进展及其影响因素[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(10): 1915-1924.
- [15] 马万里. 土壤微生物多样性研究的新方法[J]. 土壤学报, 2004, 41(1): 103-107.
- [16] Ogram, A. (2000) Soil Molecular Microbial Ecology at Age 20: Methodological Challenges for the Future. *Soil Biology & Biochemistry*, **32**, 1499-1504. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00088-2](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00088-2)
- [17] Torsvik, V.L. (1980) Isolation of Bacterial DNA from Soil. *Soil Biology & Biochemistry*, **12**, 15-21. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(80\)90097-8](https://doi.org/10.1016/0038-0717(80)90097-8)
- [18] Torsvik, V.L., Goksoyr, J. and Daae, F.L. (1990) High Diversity in DNA of Soil Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**, 782-787.
- [19] Sharma, S., Aneja, M.K., Mayer, J., Munch, J.C. and Schloter, M. (2005) Diversity of Transcripts of Nitrite Reductase Genes (*nirK* and *nirS*) in Rhizospheres of Grain Legumes. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 2001-2007. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.2001-2007.2005>
- [20] Falk, S., Hannig, M. and Braker, G. (2006) *nirS*-Containing Denitrifier Communities in the Water Column and Sediment of the Baltic Sea. *Biogeosciences Discussions*, **3**, 697-727. <https://doi.org/10.5194/bgd-3-697-2006>

- [21] 陈晨, 许欣, 毕智超, 等. 生物炭和有机肥对菜地土壤 N_2O 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.
- [22] 杨柳青. 石灰性潮土 N_2O 产生过程及相关功能基因丰度和表达[D]: [博士学位论文]. 北京: 中国农业大学, 2017.
- [23] 张星. 生物炭和秸秆还田对华北农田 N_2O 排放的影响及机理研究[D]: [硕士学位论文]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2016.
- [24] 罗希茜. 长期施肥对水稻土亚硝酸还原酶基因(nirK、nirS)多样性的影响[D]: [硕士学位论文]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
- [25] 王婷, 刘丽丽, 张克强, 等. 牛场肥水灌溉对土壤 nirK、nirS 型反硝化微生物群落结构的影响[J]. 生态学报, 2017, 37(11): 3655-3664.
- [26] Yoshida, M., Ishii, S., Otsuka, S. and Senoo, K. (2010) nirK-Harboring Denitrifiers Are More Responsive to Denitrification-Inducing Conditions in Rice Paddy Soil than nirS-Harboring Bacteria. *Microbes and Environments*, **25**, 45-48. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME09160>
- [27] Yin, C., Fan, F., Song, A., Li, Z., Yu, W. and Liang, Y. (2014) Different Denitrification Potential of Aquic Brown Soil in Northeast China under Inorganic and Organic Fertilization Accompanied by Distinct Changes of nirS-and nirK-Denitrifying Bacterial Community. *European Journal of Soil Biology*, **65**, 47-56. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2014.09.003>
- [28] 宋亚娜, 林智敏, 林艳. 氮肥对稻田土壤反硝化细菌群落结构和丰度的影响[J]. 中国生态农业学报, 2012, 20(1): 7-12.
- [29] 罗希茜, 陈哲, 胡荣桂, 等. 长期施用氮肥对水稻土亚硝酸还原酶基因多样性的影响[J]. 环境科学学报, 2010, 31(2): 423-430.
- [30] 莫旭华, 麻威, 史荣久, 等. 氮肥对小麦田土壤 nirS 型反硝化细菌多样性的影响[J]. 微生物学报, 2009, 49(9): 1203-1208.
- [31] 尹昌, 范分良, 李兆君, 等. 长期施用有机和无机肥对黑 nirS 型反硝化菌种群结构和丰度的影响[J]. 环境科学, 2012, 33(11): 3967-3975.
- [32] 保琼莉, 巨晓棠. 夏玉米根系密集区与行间 N_2O 浓度及与氨氧化细菌和反硝化细菌数量的关系[J]. 植物营养与肥料学报, 2011, 17(5): 1156-1165.
- [33] 刘秋丽, 马娟娟, 孙西欢, 等. 土壤的硝化-反硝化作用因素研究进展[J]. 农业工程, 2011, 1(4): 79-83.
- [34] 周志峰, 王明霞. 土壤反硝化微生物研究进展[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(11): 6474-6477.
- [35] Tang, X.M., Gao, G. and Zhu, L.P. (2009) DNA Extraction Procedure Affects Organic-Aggregate-Attached Bacterial Community Profiles from a Shallow Eutrophic Lake. *Canadian Journal of Microbiology*, **55**, 776-782. <https://doi.org/10.1139/W09-026>
- [36] 余素林, 吴晓磊, 钱易. 环境微生物群落分析的 T-RFLP 技术及其优化措施[J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(6): 861-868.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2327-0810, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: amb@hanspub.org