作物茬口对黑土农田土壤反硝化细菌数量及群落结构的影响

王 璐^{1,2}, 刘俊杰^{2*}, 刘株秀², 顾海东², 张兴义², 王光华², 刘晓冰^{2*} (1东北农业大学资源与环境学院, 黑龙江哈尔滨 150030; 2中国科学院东北地理与农业生态研究所/ 黑土区农业生态重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150081)

摘要:【目的】反硝化作用导致农田土壤氮素损失和温室气体 N₂O 的排放。研究不同作物茬口对土壤反硝化细 菌群落结构的影响,旨在揭示作物茬口影响 N₂O 排放的相关机制。【方法】定位试验位于黑龙江省海伦市前进 乡光荣村 (47°23'N,126°51'E),种植方式包括玉米连作 (CC)、大豆连作 (SS) 以及玉米--大豆轮作,每年一季。 取样时,轮作体系玉米已倒茬三次、大豆两次。采集 CC、SS 以及轮作体系中的大豆茬口 (SSC)和玉米茬口 (CSC)的表层土壤 (0—15 cm)样品,利用实时定量 PCR (qPCR)和高通量测序技术,分析土壤中的 nirS 和 nirK 型反硝化细菌丰度和群落组成。【结果】在 4 个作物茬口土壤中,CC 处理的反硝化速率最高,玉米--大豆 轮作体系中 SSC 和 CSC 处理的反硝化速率显著高于 SS 处理。轮作体系两个茬口 SSC 和 CSC 处理的 nirS 和 nirK 型反硝化细菌基因丰度多显著高于 SS 处理,而与 CC 处理多差异不显著。PCoA 结果显示,SSC 和 CSC 处 理的 nirS 型反硝化细菌群落间差异显著,而 CC 和 SS 处理的 nirK 型反硝化细菌群落间存在显著差异。RDA 分 析结果表明,NO₃-N和 C/N 分别是 nirS 和 nirK 型反硝化细菌群落分异的最主要驱动因子。SEM 分析结果显 示,nirS 型反硝化细菌群落与反硝化速率呈显著正相关 (R²=0.92),而 nirS 和 nirK 型基因丰度与土壤反硝化速率 无显著相关关系。【结论】作物茬口显著影响黑土农田土壤反硝化细菌群落和丰度组成。反硝化细菌群落组成 而非反硝化细菌丰度是反硝化速率变化的决定性因素,nirS 型反硝化细菌群剂丰度组成。反硝化细菌群落组成

Effects of crop stubbles in different cropping systems on the number and community structure of denitrifying bacteria in black soil farmland

 WANG Lu^{1,2}, LIU Jun-jie^{2*}, LIU Zhu-xiu², GU Hai-dong², ZHANG Xing-yi², WANG Guang-hua², LIU Xiao-bing^{2*}
 (1 College of Resource and Environment, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China;
 2 Northeast Institute of Geography and Agroecology, Chinese Academy of Sciences / Key Laboratory of Mollisols Agroecology, Harbin, Heiongjiang 150081, China)

Abstract: [Objectives] Denitrification is an important process in soil nitrogen loss and greenhouse gas emissions. We studied the effects of crop stubbles in different cropping systems on soil denitrifying bacterial community structures, aiming to reveal the related mechanisms of crop stubbles affecting N₂O emission. [Methods] The experiment was conducted in Hailun City, Heilongjiang Province (47°23'N, 126°51'E).

Continuous cropping of corn, soybean, and corn-soybean rotation was set up in the experiment. At sampling, the corn was three years, and the soybean was two years old. Topsoil (0-15 cm) samples were collected after harvesting maize and soybean. The abundance and community composition of the soil *nirS* and *nirK* denitrification bacteria were analyzed using real-time quantitative PCR (qPCR) and high-throughput sequencing techniques.

[**Results**] The continuous corn (CC) plot soil had the highest denitrification rate. Rotation corn (CSC) and rotation soybean (SSC) had higher soil denitrification rate (P<0.05) than continuous soybean (SS). The abundance

联系方式: 王璐 E-mail: wang_lu9108@163.com * 通信作者 刘俊杰 E-mail: liujunjie@iga.ac.cn; 刘晓冰 E-mail: liuxb@iga.ac.cn

收稿日期: 2022-01-19 接受日期: 2022-03-15

基金项目:黑土地保护与利用科技创新工程专项(XDA28070302); ANSO 世界黑土联合会项目(ANSO-PA-2020-12);国家自然科学基金(42177105)。

of *nirS* and *nirK* denitrifying bacterial genes in CSC and SSC was higher than that in SS, and there was no significant difference between CSC and CC (P>0.05). PCoA results showed variation in *nirS* denitrifying bacterial communities in SSC and CSC, while CC and SS had different *nirK* bacterial communities. RDA analysis showed that NO₃⁻-N content and C/N were the main factors regulating the *nirS* and *nirK* denitrifying bacterial communities, respectively. SEM revealed that *nirS* denitrifying bacterial communities were positively (R^2 =0.92) correlated with the denitrification rate (P<0.05), but the gene abundance of *nirS* and *nirK* did not correlate with the denitrification rate. **[Conclusions]** The abundance and community composition of denitrifying bacteria vary among the farmlands under different crops. Denitrifying bacterial community composition, rather than their abundance, plays essential roles in determining the denitrification rate, while *nirS* denitrifying bacteria contributes more to soil denitrification.

Key words: nirS genes; nirK genes; soybean stubble; corn stubble; denitrification rate

反硝化作用是硝酸盐 (NO₃⁻) 逐步被还原成亚硝酸盐 (NO₂⁻)、一氧化氮 (NO)、一氧化二氮 (N₂O)和终产物氮 (N₂)的四步还原过程^[1-2]。NO₂⁻还原为NO 是反硝化细菌区别于其他硝酸盐呼吸细菌的关键过程^[3],此步还原过程是由亚硝酸盐还原酶 (NIR) 催化的,该酶具有两种结构不同但功能相同的形式,分别为 nirS 基因编码的 cdl 细胞色素还原酶和 nirK 型基因编码的含铜还原酶^[4-5]。N₂O 是重要的温室气体,其全球变暖潜力比等摩尔量的 CO₂ 高出 300 倍^[6]。农田是温室气体的主要来源,农业土壤排放的 N₂O 约占全球人为排放 N₂O 的 60%,而土壤微生物介导的反硝化作用被认为是人为 N₂O 排放的关键因素^[7-8]。目前如何通过调控土壤反硝化作用减少 N₂O 的排放备受关注^[9]。

土壤微生物在土壤生态系统中发挥重要作用, 是评价土壤生态系统功能的重要指标[10]。土壤微生物 介导了包括固氮作用、硝化作用和反硝化作用等重 要的土壤氮素循环过程^[11]。大量研究证实,连作导致 土壤理化性质恶化、土壤生物群落失衡,不仅影响 农田生态系统的稳定性,而且显著降低作物产量, 而轮作被认为是保持土壤肥力和土壤健康的一种合 理耕作方式。周丽等[12]对四川紫色土反硝化细菌 nirS型基因丰度的研究发现,玉米-大豆轮作体系的 nirS型基因丰度显著高于连作处理。Behnke 等[13] 研究发现,与玉米-大豆轮作比,玉米连作的 nirS 型 基因丰度无显著变化,但显著增加了 nirK 型基因丰 度。Jude 等^[14]研究发现,轮作处理大豆茬口下, nirK型基因丰度显著高于轮作体系下的小麦茬口, 而不同作物茬口的 nirS 型基因丰度没有显著变化。 此外,研究结果表明,土壤类型15%、作物茬口16%和轮 作年限凹均对反硝化细菌数量和群落组成具有显著影 响。因此,以反硝化 nirS 和 nirK 型基因为标记,开 展不同作物茬口土壤反硝化微生物群落变化特征研 究,有助于进一步认知土壤微生物参与的农田生态 系统的生物地球化学循环过程。

黑龙江省农作物种植面积达 10.99 万 hm²,粮食 产量占全国的1/4,调出量占1/3,是我国粮食安全 的"压舱石"和"稳压器"。黑龙江省是我国大豆的主 产区,随着国家作物种植结构的调整和大豆产业振 兴计划的实施,加之耕地面积和经济效益的制约, 东北地区大豆连作现象有所加重,必将制约中国大 豆生产力的提高,威胁中国大豆产业的可持续发 展,是目前亟待解决的现实问题。连作则会导致土 壤肥力不均衡,降低土壤肥力,引发连作障碍,从 而导致土传病害加重, 而轮作是改善土壤肥力、减 少养分流失的有效技术措施18]。目前,基于黑土农田 土壤不同作物茬口下反硝化细菌群落的变化特征的 研究相对较少。因此,开展该地区不同作物茬口下 土壤反硝化细菌数量、多样性指数、群落组成及其 与反硝化速率间的作用关系研究,对选择适宜的种 植方式提高土壤氮素利用率和改善土壤生态功能具 有重要意义。鉴于此,本研究采用 qPCR 和高通量 测序技术对黑土区玉米连作、大豆连作和玉米--大豆 轮作体系下土壤反硝化细菌数量和群落特征进行综 合分析,旨在从微生物生态学角度,明确不同作物 茬口下反硝化细菌群落的变化特征, 阐明不同作物 茬口影响 N₂O 排放的微生物学机制,为提出减少温 室气体排放的种植方式提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验设计与土壤样品采集

利用 2013 年建立于中国科学院东北地理与农业 生态所海伦水土保持监测研究站的长期定位试验开

展研究。试验站位于黑龙江省海伦市前进乡光荣村 (47°23'N, 126°51'E),海拔高度为 210 m;是温带大 陆性季风气候,冬季干燥寒冷,夏季炎热多雨,平 均年降水量为 530 mm,年均气温 1.5℃,极端最高 温度为 37℃,极端最低温度为–39.5℃,土壤类型为 典型黑土,该地区是雨养农业区。

该定位试验 2013 年开始种植玉米,2014 年种植 大豆,由此循环。该样地采用人工播种、人工除 草、机械中耕的方法。选用定位试验中的 4 个处 理,分别为:大豆连作 (CC)、玉米连作 (SS)、玉米 -大豆轮作玉米茬口 (CSC)和玉米--大豆轮作大豆茬 口 (SSC)处理。随机区组设计,4 次重复,每小区 12 条垄,垄距为 0.7 m, 垄长为 9 m,每个小区面积 为 75.6 m²。种植的大豆和玉米品种分别为'东生 1 号'和'兴垦 5 号',种植大豆小区施用磷酸二铵 150 kg/hm²、尿素 50 kg/hm²和硫酸钾 50 kg/hm²;玉 米小区施用磷酸二胺 150 kg/hm²、尿素 70 kg/hm² 和硫酸钾 50 kg/hm²,并在玉米生长的 V6 期追施 225 kg/hm²尿素。

于 2018 年大豆成熟期和玉米蜡熟期,采集 16 个土壤样品,土样过 2 mm 筛后分为 3 份,一份于 -80℃保存,用于土壤微生物 DNA 提取;一份风 干,用于土壤理化性质测定;一份于 4℃保存,用 于反硝化速率测定。

1.2 土壤理化性质测定

土壤 pH 采用 pH 计 (PHS-3C,中国) 测定 (w_{\pm} : v_{π} 为1:5)。利用元素分析仪 (VarioELIII,德国) 测 定土壤全碳和全氮含量。土壤全磷、速效磷、铵态 氮 (NH₄⁺-N) 和硝态氮 (NO₃⁻-N) 含量用连续流动分析 仪 (SKALAR SAN⁺⁺,荷兰)测定。利用电感耦合等离 子发射光谱 (ICPS-7500,日本) 测定土壤全钾和有效 钾含量。

1.3 土壤反硝化速率

采用乙炔抑制法测定土壤的反硝化速率^[19]。取 4℃保存的土壤样品于28℃活化7天,取10g活化 后的土样放入集气瓶中,加入10mL无菌蒸馏水, 提供厌氧环境。集气瓶瓶盖插入两个针头,一个充 氮气,一个排空气,待排除瓶内空气后,抽取15mL 氮气,加乙炔15mL,震荡1h,25℃培养12h。由 于乙炔气体的存在抑制了N₂O向N₂的还原,所以 N₂O成为了反硝化作用的最终产物,最后通过气相 色谱(GC-2010,日本)测定集气瓶中N₂O的浓度, 用以表征土壤反硝化作用的强弱。

1.4 土壤总 DNA 提取、qPCR 和 Illumina MiSeq 测序

称取土壤样品 0.5 g, 采用 Fast DNA[®] Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, 美国) 试剂盒, 按照说明书提 取土壤总 DNA, 并使用 NanoDrop[®] 2000 (Thermo Scientific, USA) 检测 DNA 浓度和纯度,将提取的 DNA 放入-20℃ 冰箱中保存。

利用引物 Cd3aF (5'-GTSAACGTSAAGGARA-CSGG-3')/R3cdR (5'-GASTTCGGRTGSGTCTT-GA-3')^[20]和 F1aCu (5'-ATCATGGTSCTGCCGCG-3')/R3Cu (5'-GCCTCGATCAGRTTGTGGTT-3')^[21], 分別对反硝化细菌 *nirS* 型基因和 *nirK* 型基因进行扩 增。利用 LightCycler[®] 480 thermocycler (Roche Applied Science)进行 qPCR 反应。将拷贝数已知的 质粒 DNA,按 10 倍梯度稀释做标准曲线,每个标 准样品做 4 次重复。qPCR 反应体系包括 10 μ L SYBR[®] Premix Ex Taq (Takara,大连,中国)、1 μ L 土壤样 品 DNA、1 μ L 10 μ mol/L 正向引物、1 μ L 10 μ mol/L 反向引物和 7.0 μ L H₂O。反应条件为: 95°C 初变性 30 s,然后 95°C 变性 5 s, 60°C 退火和延伸 30 s,共 25 个循环,最后 50°C 保持 30 s。

采用上述相同的引物,对 *nirS*和 *nirK*型基因进行高通量测序分析。区别于 qPCR分析,高通量测序分析每个引物 5'端被样本特异的 barcode 所修饰,以区分土壤样本的处理来源。PCR 体系共 25 µL,包含 2.5 µL 10× PCR buffer、2 µL 2.5 mmol/L dNTPs、0.25 µL Taq 酶 (5 U/µL) (TaKaRa,大连,中国)、0.5 µL 正向和反向引物,2 µL 样品 DNA 为模板,用灭菌超纯水补足至 25 µL。PCR 反应条件:95℃ 初变性 5 min,然后 95℃ 变性 1 min, 63℃ 复性 1 min 和 72℃ 延伸 1 min,共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 5 min。每个样品做 3 次重复,PCR 产物经凝胶电泳检测,并利用胶纯化试剂盒 (TaKaRa,大连,中国)进行纯化。利用 Illumina MiSeq 平台 (上海美吉生物公司,中国)对纯化后的 PCR 产物进行测序分析。

1.5 测序数据分析

基于 Illumina PE 300 测序平台,测序结果通过 QIIME Pipeline Version 1.9.0 软件进行分析 (http:// qiime.org/tutorials/tutorial.html)。首先,将获得的反 硝化细菌 FASTQ 原始序列文件,进行序列拆分和质 量控制^[22]。利用 FLASH (fast length adjustment of short reads) 软件,对质控序列进行双端拼接,去除序列短 于 200 bp 以及平均质量得分小于 20 的序列信息^[23]。 将得到的优质序列,以 97% 相似度水平进行 OTU (operational taxonomic units)聚类。将每个 OTU 的代 表性序列翻译成氨基酸序列,然后在 NCBI 上比 对。使用 Mega 软件将代表性序列与参考序列对比, 构建系统发育树。将每个样品的序列,按最小序列 数进行抽平处理,用于后续生物信息学分析。

1.6 统计分析

基于 SPSS (Version 18.0) 软件,利用单因素方差 分析 (one-way ANOVA) 对不同处理的土壤理化性 状、反硝化速率和反硝化细菌相对丰度进行差异显 著性分析。利用 R (Version 3.3.1) 软件 (R Development CoreTeam, 2006) 的 "vegan" 包, 进行基于 Bray-Curtis 距离的主坐标分析 (principal co-ordinates analysis, PCoA) 和冗余分析 (redundancy analysis, RDA), 以 分析不同处理间反硝化细菌群落的差异及其主要驱 动因素。用R软件的"pheatmap"包进行反硝化细菌 相对丰度与反硝化速率间相关性的 Heatmap 分析。 此外,利用 SPSS AMOS 软件 (Version 24.0, Chicago, IL: Amos Development Corporation) 构建结构方程模 型 (structural equation models, SEM), 以解析土壤理 化性质、nirS 型和 nirK 型反硝化细菌基因丰度和群 落结构对反硝化速率的影响。采用方差膨胀系数 (variance inflation factor, VIF)分析,构建以土壤全 氮、C/N和NO₃⁻-N为最佳土壤理化因子的SEM结 构方程模型。

2 结果与分析

2.1 土壤理化性质变化的差异

表1显示,4个处理的土壤pH、全碳、全钾以

及速效钾含量无显著差异(P>0.05)。与连作处理 CC和SS相比,轮作处理的CSC和SSC显著提高了 土壤全氮含量,而降低了土壤C/N(P<0.05)。此外, CSC显著增加了铵态氮(NH₄⁺-N)和硝态氮(NO₃⁻⁻ N)含量,但显著降低了土壤全磷含量,SSC显著增 加了土壤速效磷含量(P<0.05)。

2.2 土壤反硝化速率及反硝化细菌丰度变化差异

4 个处理间土壤反硝化速率差异显著 (*P*<0.05) (图 1)。其中, CC 处理的土壤反硝化速率最高,达 到 21.15 μg/(g·h);其次是轮作处理 CSC 和 SSC,反 硝化速率分别为 16.93 和 16.48 μg/(g·h)。SS 处理的 土壤反硝化速率最低,为 7.00 μg/(g·h),相比于 CC、CSC 和 SSC 处理,分别降低 66.9%、58.7% 和 57.5% (*P*<0.05)。

不同处理条件下,反硝化细菌 nirK 型基因拷贝 数为 6.83×10⁶~10.31×10⁶/(g, soil), nirS 型基因拷贝 数为 2.59×10⁷~3.48×10⁷/(g, soil)(图 2)。轮作处理 SSC 和 CSC 中 nirS 和 nirK 型基因拷贝数均显著高 于 SS 处理 (P<0.05), SSC 处理的 nirK 型基因拷贝数 显著高于 CC 处理 (P<0.05), 而 SSC 和 CSC 的 nirS 型基因拷贝数与 CC 处理无显著差异 (P>0.05)。

2.3 土壤反硝化速率与反硝化细菌的相关性

本研究分别获得了 471 和 1055 个 nirS 和 nirK 型反硝化细菌 OTUs。土壤 nirS 和 nirK 型反硝化细 菌 OTUs 与反硝化速率的相关性分析结果 (图 3) 表明, nirS 型基因中, OTU225 (罗河杆菌属 Rhodanobacter)、 OTU357 (草螺菌属 Herbaspirillum) 等 30 个 OTUs 与 土壤反硝化速率呈显著负相关关系; OTU63 (噬氢 菌属 Hydrogeaophaga)、OTU472 (慢生根瘤菌属

Table 1 The effects of crop stubble in different cropping systems on soil physical and chemical properties										
处理 Treat.	рН	全碳 Total C (g/kg)	全氮 Total N (g/kg)	C/N	全磷 Total P (g/kg)	全钾 Total K (g/kg)	铵态氮 NH₄+-N (mg/kg)	硝态氮 NO₃⁻-N (mg/kg)	速效磷 Available P (mg/kg)	速效钾 Available K (mg/kg)
CC	6.39±0.12 a	21.94±2.62 a	1.57±0.16 b	13.99±0.50 a	0.56±0.029 a	15.64±0.25 a	18.83±1.37 b	30.66±5.21 b	15.98±1.62 c	231.05±14.11 a
SS	6.36±0.01 a	20.90±1.88 a	1.52±0.12 b	13.73±0.17 a	0.56±0.035 a	15.79±0.20 a	17.74±1.68 b	13.69±3.64 c	20.00±2.08 b	219.55±11.29 a
CSC	6.36±0.16 a	20.97±2.40 a	1.84±0.15 a	11.40±0.48 b	0.47±0.023 b	15.97±0.16 a	24.22±1.35 a	37.98±3.23 a	20.68±2.46 b	223.57±9.84 a
SSC	6.34±0.09 a	20.47±2.67 a	1.78±0.13 a	11.50±0.86 b	0.56±0.035 a	15.68±0.40 a	18.13±1.12 b	10.28±1.42 c	25.96±2.40 a	234.96 ±12.21 a

注:数据为平均值±SD (*n*=4);CC一玉米连作;SS一大豆连作;CSC一玉米-大豆轮作玉米茬;SSC一玉米-大豆轮作大豆茬。同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著 (*P*<0.05)。

Note: Data are mean \pm SD (n=4); CC—Continuous corn; SS—Continuous soybean; CSC—Corn in corn–soybean rotation; SSC—Soybean in corn–soybean rotation. Values followed by different small letters in the same column indicate significant difference among treatments (P < 0.05).



图 1 不同作物茬口对土壤的反硝化速率的影响

Fig. 1 Effects of crop stubble in different cropping systems on soil denitrification rate

注: CC一玉米连作; SS一大豆连作; CSC一玉米-大豆轮作玉米 茬; SSC一玉米-大豆轮作大豆茬。柱上不同小写字母表示处理间 差异显著 (P<0.05)。

Note: CC—Continuous corn; SS—Continuous soybean; CSC—Corn in corn–soybean rotation; SSC—Soybean in corn–soybean rotation. Different small letters above the bars indicate significant difference among treatments (P<0.05).

Bradyrhizobium) 等 9 个 OTUs 与土壤反硝化速率呈 显著正相关关系,其余 OTUs 与土壤反硝化速率则 无显著相关性。在 nirK 基因中,OTU346 (慢生根瘤 菌属 Bradyrhizobium)、OTU159 (中慢生根瘤菌属 Mesorhizobium) 等 24 个 OTUs 与土壤反硝化速率呈 显著正相关;而 OTU281 (根瘤菌属 Rhizobium)、 OTU258 (中慢生根瘤菌属 Mesorhizobium) 等 65 个 OTUs 与反硝化速率呈负相关,其余 966 个 OTUs 与 土壤反硝化速率无显著相关性。

2.4 nirS型和 nirK型反硝化细菌群落的变化

图 4 列出了土壤 nirS 和 nirK 型反硝化细菌中与 反硝化速率显著正相关的 8 个属 (OTUs) 在不同茬口 土壤总的相对丰度。CC 和 CSC 处理的 nirS 和 nirK 型反硝化细菌相对丰度均高于甚至显著高于 SS 处 理。除 OTU261 (慢生根瘤菌属 Bradyrhizobium) 和 OTU307 (中慢生根瘤菌属 Mesorhizobium) 的相对丰度 显著高于 CSC 处理外, CC 处理其余的 OTUs 基因丰 度与 CSC 处理的多无显著差异。nirK 型反硝化细菌中, CC 处理 OTU346 (慢生根瘤菌属 Bradyrhizobium)、 OTU376 (假单胞菌属 Pseudomonas) 和 OTU307 (中慢 生根瘤菌属 Mesorhizobium) 在 CSC 和 SSC 处理中 的相对丰度差异不显著,而 OTU261 (慢生根瘤菌属 Bradyrhizobium) 在轮作体系 SSC 处理中相对丰度显 著高于 CSC 处理, 且均明显高于 SS 处理 (P<0.05)。 nirS型反硝化细菌中,轮作体系 CSC 处理的 OTU472 (慢生根瘤菌属 Bradyrhizobium)、OTU129 (新草 螺菌属 Noviherbaspirillum) 和 OTU100 (草螺菌属 Herbaspirillum) 相对丰度均显著高于 SSC 处理, 且 OTU129 和 OTU100 的相对丰度显著高于 SS 处理 $(P < 0.05)_{\circ}$

2.5 不同茬口反硝化细菌群落结构及其驱动因素

基于 bray-curtis 距离的 PCoA 分析结果 (图 5) 表明, PCoA1 和 PCoA2 分别解释了 *nirS* 型反硝化细菌 群落结构变化的 47.72% 和 7.83%。根据 Adonis 分析, *nirS* 型反硝化细菌群落中 SSC 处理和 CSC 处理 各自单独聚类 (Adonis test, *P*=0.028), 而 CC 和





Fig. 2 The effects of crop stubble in different cropping systems on denitrification gene abundance

注: CC一玉米连作; SS一大豆连作; CSC一玉米-大豆轮作玉米茬; SSC一玉米-大豆轮作大豆茬。柱上不同小写字母表示处理间差异显著 (P<0.05)。

Note: CC—Continuous corn; SS—Continuous soybean; CSC—Corn in corn–soybean rotation; SSC—Soybean in corn–soybean rotation. Different small letters above the bars indicate significant difference among treatments (P<0.05).



图 3 土壤反硝化速率与反硝化细菌的相关性分析





图 4 不同作物茬口土壤下 nirK 和 nirS 型细菌中与反硝化速率正相关的 8 个属 (OTUs) 的基因相对丰度

Fig. 4 The relative gene abundance of the eight OTUs is positively related to the denitrifying rate of *nirK or nirS* in soils with different crop stubbles

注: CC一玉米连作; SS一大豆连作; CSC一玉米-大豆轮作玉米茬; SSC一玉米-大豆轮作大豆茬。柱上不同小写字母表示处理间差异显著 (P<0.05)。

Note: CC—Continuous corn; SS—Continuous soybean; CSC—Corn in corn–soybean rotation; SSC—Soybean in corn–soybean rotation. Different small letters above the bars indicate significant difference among treatments (*P*<0.05).

SS 处理群落相似度较大 (Adonis test, *P*=0.212)。对 于 *nirK* 型反硝化细菌而言, PCoA1 和 PCoA2 分别 解释了群落结构变异的 34.36% 和 14.46%。Adonis 分析表明, CC 处理和 SS 处理的 nirK 型反硝化细菌 群落存在显著差异 (Adonis test, P=0.036), 而 SSC 处理和 CSC 处理在 PCoA 分析图谱中聚集较为紧



图 5 不同作物茬口土壤中反硝化细菌群落结构及其驱动因素

Fig. 5 Denitrifying bacterial community structures and their driving factors in soils with different crop stubbles

注: RDA 排序描述了功能基因、环境因子、不同处理的相互关系。CC一玉米连作; SS一大豆连作; CSC一玉米-大豆轮作玉米茬; SSC-玉米-大豆轮作大豆茬; TP-全磷; TN-全氮; TK-全钾; AK-速效钾; AN-碱解氮。红色箭头表示 8 种环境因子。 Note: RDA sequencing describes the interrelationship of functional genes, environmental factors, and different treatments. CC-Continuous corn; SS-Continuous soybean; CSC-Corn in corn-soybean rotation; SSC-Soybean in corn-soybean rotation; TP-Total P; TN-Total N; TK-Total K; AK-Available K; AN-Available N. The red arrow represents the 8 environmental factors.

密,其群落相似度较高 (Adonis test, P=0.134)。此外, RDA 分析结果表明, NO_3^--N 和 C/N 分别是 *nirS* 和 *nirK* 型反硝化细菌群落分异的最主要驱动因子。

2.6 土壤理化性质、nirS和 nirK型反硝化细菌 群落结构和基因丰度对反硝化速率的影响

本研究利用结构方程模型 (SEM) 探究了土壤理 化性质、反硝化基因丰度及反硝化细菌群落结构对 土壤反硝化速率的影响 (图 6)。SEM 分析结果表 明,土壤全氮与 nirS型 (R²=-0.62) 和 nirK型 (R²= -0.66) 反硝化细菌的基因丰度呈显著负相关,与土 壤反硝化速率呈显著正相关 (R²=0.78)。土壤 C/N 和 NO₃⁻-N 均通过影响 nirS型 (R²=0.65) 和 nirK型 (R²= 0.59) 反硝化细菌群落多样性,间接影响土壤反硝化 速率。此外, nirS型反硝化细菌群落多样性与反硝 化速率呈显著正相关 (R²=0.92), nirK型反硝化细菌 群落多样性与反硝化速率呈显著负相关 (R²=-0.81), 而 nirS和 nirK型基因丰度与土壤反硝化速率无显著 相关关系。

3 讨论

3.1 作物茬口对土壤理化性质、反硝化细菌丰度和反硝化速率的影响

作物茬口显著影响着土壤的理化性质。与大豆 连作相比,玉米--大豆轮作显著增加了土壤 pH、全 氮、全碳和速效养分含量^[24-25]。本研究中,不同作物 茬口的土壤 pH 和全碳含量无显著差异,可能与本 研究的试验持续时间较短 (第5年)、轮作倒茬仅两 次有关。然而,与玉米连作和大豆连作处理相比, 玉米--大豆轮作体系处理显著增加了土壤全氮含量 (表1)。利用相同的土壤样本,Zou等^[26]研究发现, 玉米--大豆轮作导致大豆根瘤菌数量增加,大豆从空 气中固定更多的氮素,进而增加了土壤全氮含量。

在本试验中, nirS 型反硝化细菌的基因丰度远远高于 nirK 型细菌,表明短期内 nirS 型反硝化细菌可能比 nirK 型细菌在土壤反硝化中发挥更重要的作用^[27-28]。Wang 等^[29]研究发现, nirK 型反硝化细菌主要在深层土壤中富集,而本研究采集的土壤样品为



nirS 型 反硝化菌群落 反硝化菌群落 nirK denitrifying nirS denitrifying bacterial communitie bacterial communitie 0.88** $R^2 = 0.52$ $R^2 = 0.53$ 0.92* -0.81* $R^2 = 0.59$ 反硝化速率 Denitrification rate

图 6 土壤理化性质与反硝化细菌群落对反硝化速率的直接与间接影响

Fig. 6 Direct and indirect effects of soil physical and chemical properties and denitrifying bacterial communities on soil denitrification rate

注:采用结构方程模型 (SEM) 分析,红线表示正相关,蓝线表示负相关,虚线表示无显著相关关系。R²值为变量的解释比例;*--*P*<0.05; **—*P*<0.01; ***—*P*<0.001。

Note: The analysis was made using structural equation model (SEM). The red, blue and dotted lines indicate positive, negative and no significant correlation, respectively. The R^2 value was the explained proportion of a variable; *—P < 0.05; **—P < 0.01; ***—P < 0.001.

表层 (0-15 cm) 土壤,这可能是导致 *nirK* 型反硝化 细菌丰度低于 nirS 型反硝化细菌的原因。本研究同 时发现,玉米连作处理的土壤反硝化速率显著高于 其他处理,这很可能与玉米种植时高的氮肥投入量 有关。已有研究均发现,氮肥能显著增加土壤反硝 化细菌数量,进而促进土壤反硝化作用[30-31]。黄国宏 等[32]研究表明, 土壤 N₂O 排放随着种植作物的不同 而发生改变,种植玉米的土壤 N₂O 排放量比种植大 豆的土壤增加了103.7%。

3.2 作物茬口对 nirS 和 nirK 型反硝化细菌群落 组成的影响

本研究中,通过分析 nirS 和 nirK 型反硝化细菌 相对丰度与反硝化速率呈正相关的 OTUs,发现玉米 连作处理的反硝化细菌相对丰度显著高于大豆连作 处理,说明种植玉米施用的氮量可导致反硝化微生 物数量的增加,其在加速作物对养分吸收利用的同 时也加速了土壤反硝化速率[3-34]。有趣的是, Zou 等[26] 利用相同土壤样本对不同作物茬口下土壤固氮微生 物群落的研究发现, nifH 型基因丰度在种植相同茬 口的作物中,轮作处理下的基因丰度均显著高于连 作处理。然而,本研究发现, nirS和 nirK 基因丰度

未呈现与 nifH 基因丰度变化一致性规律, 尽管玉米-大豆轮作玉米茬的相对丰度多显著高于连作大豆, 仅玉米-大豆轮作大豆茬的 OTU346 (Bradyrhizobium sp.) 和 OTU261 (Bradyrhizobium sp.) 丰度高于大豆连 作,说明反硝化细菌群落组成受到氮肥施用量和作 物茬口的双重制约,且氮肥施用是反硝化细菌群落 分异的主导因素[35-37]。此外, nirS型反硝化细菌草螺 菌属 (Hydrogenophaga) 在玉米茬口下丰度显著高于 大豆茬口, Gabriela 等[38]研究证明氮肥施用量相比于 作物茬口对草螺菌属的影响更大。与 nirK 型反硝化 细菌变化特征相比, nirS 型反硝化细菌群落中玉 米-大豆轮作大豆茬口和大豆连作处理相对丰度及大 豆-玉米轮作玉米茬口和玉米连作处理相对丰度均无 显著差异。已有研究发现, nirS型反硝化细菌对于 土壤中可利用资源的竞争能力显著高于 nirK 型反硝 化细菌,致使 nirS 型反硝化细菌的环境适应能力更 强且不易受到作物茬口的影响[39-40]。

3.3 土壤理化性质和反硝化细菌群落对土壤反硝 化速率的影响

基于 PCoA 结果显示, 玉米-大豆轮作体系处理 中 nirS 型反硝化细菌群落差异显著,大豆连作和玉

TN

0.78**

-0.62**

 $R^2 = 0.45$

米连作处理群落相似度较高,而 nirK 型反硝化细菌 群落则呈现完全相反的趋势,说明不同作物茬口对 nirS 和 nirK 型反硝化细菌群落结构的影响存在分 异。Teele等[41]研究表明, nirS 型反硝化细菌群落偏 好氧浓度较高的环境,而 nirK 型反硝化细菌群落对 土壤氧气水平不敏感,为此轮作导致的土壤氧气含 量升高是导致 nirS 型反硝化细菌在轮作处理中差异 显著,而连作处理下群落相似度高的主要原因。结 合 RDA 分析和 SEM 分析结果发现,土壤全氮、土 壤 C/N 和土壤硝态氮对 nirS 和 nirK 型反硝化群落结 构存在显著影响,这与以往研究结果一致,即土壤 氮素作为反硝化作用的底物其强烈影响反硝化微生 物群落的结构^[42-43]。

已有研究发现, nirK 型反硝化细菌群落对调节 反硝化速率有显著影响^[44-45]。本研究 SEM 结构方程 分析同样发现, nirS型反硝化细菌群落与反硝化速 率显著正相关,说明东北黑土中 nirS 型反硝化细菌 群落可能对土壤反硝化作用起到更重要的作用。这 一结论与 Yin 等[46]研究结果一致,即黑土区农田土壤 中携带 nirK 型基因的反硝化细菌与反硝化速率无显 著相关关系,而 nirS 型反硝化细菌是土壤反硝化作 用的主要贡献者。本研究发现,反硝化基因丰度与 反硝化速率间不存在显著相关性 (nirS: P= 0.395; nirK: P=0.597),此外,SEM分析也发现,nirS和nirK 型基因丰度对反硝化速率变化没有显著影响,而反 硝化细菌群落组成与反硝化速率显著相关(图 6)。采 用 qPCR 技术对土壤反硝化基因丰度变化研究均发 现,土壤反硝化基因丰度与土壤反硝化速率之间不 存在显著相关性[47-49]。本研究和上述报道均证明,反 硝化基因丰度仅表征了反硝化微生物的潜在生理功 能,而反硝化细菌的多样性特征和群落组成是土壤 反硝化作用发生的决定因素。

4 结论

连作玉米茬口土壤中 nirS 和 nirK 型反硝化细菌 的相对丰度多显著高于连作大豆茬口,轮作玉米和 大豆茬口与连作大豆茬口也存在显著性差异,但未 表现出一致的规律性变化特征。轮作体系中大豆茬 口和玉米茬口 nirS 型反硝化细菌群落构成差异显 著,而连作玉米和连作大豆在 nirK 型反硝化细菌群 落构成间存在显著差异。反硝化速率与 nirS 型反硝 化细菌群落构成显著正相关,与 nirS 和 nirK 型基因 丰度无显著相关性。土壤 NO₅-N 和 C/N 含量是驱动 黑土中 nirS 型反硝化细菌群落构成的主要因素。

参考文献:

- Zumft W G. Cell biology and molecular basis of denitrification[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1997, 61: 533–616.
- [2] Jones C M, Stres B, Rosenquist M, et al. Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification[J]. Molecular Biology and Evolution, 2008, 25: 1955–1966.
- [3] Braker G, Zhou J Z, Wu L Y, *et al.* Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific northwest marine sediment communities[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66: 2096–2104.
- [4] Cutruzzola F, Brown K, Wilson E K, et al. The nitrite reductase from Pseudomonas aeruginosa: Essential role of two active-site histidines in the catalytic and structural properties[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 2001, 98: 2232–2237.
- [5] Philippot L, Hallin S, Schloter M. Ecology of denitrifying prokaryotes in agricultural soil[J]. Advances in Agronomy, 2007, 96: 249–305.
- [6] Butterbach-Bahl K, Baggs E M, Dannenmann M, et al. Nitrous oxide emissions from soils: How well do we understand the processes and their controls?[J]. Philosoohical Transactions of the Royal Society B-Biological, 2013, 368: 23713120.
- Bouwman A F, Beusen A H W, Griffioen J, et al. Global trends and uncertainties in terrestrial denitrification and N₂O emissions[J]. Philosoohical Transactions of the Royal Society B-Biological, 2013, 368: 23713114.
- [8] Syakila A, Kroeze C. The global nitrous oxide budget revisited[J]. Greenhouse Gas Meas Manage, 2011, 1: 17–26.
- [9] Ravishankara A R, Daniel J S, Portmann R W. Nitrous oxide (N₂O): The dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century
 [J]. Science, 2009, 326: 123–125.
- [10] Kasak K, Espenberg M, Anthony T L, et al. Restoring wetlands on intensive agricultural lands modifies nitrogen cycling microbial communities and reduces N₂O production potential[J]. Journal of Environmental Management, 2021, 299: 113562.
- [11] Zhang Q Q, Wu Z, Zhang X, et al. Biochar amendment mitigated N₂O emissions from paddy field during the wheat growing season[J]. Environmental Pollution, 2021, 281: 117026.
- [12] 周丽,付智丹,杜青,等.减量施氮对玉米/大豆套作系统中作物氮 素吸收及土壤氨氧化与反硝化细菌多样性的影响[J].中国农业科 学,2017,50(6):1076–1087.

Zhou L, Fu Z D, Du Q, *et al.* Effects of reduced N fertilization on crop N uptake, soil ammonia oxidation and denitrification bacteria diversity in maize/soybean relay strip intercropping system[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2017, 50(6): 1076–1087.

- [13] Behnke G D, Zabaloy M C, Riggins C W, et al. Acidification in corn monocultures favor fungi, ammonia oxidizing bacteria, and nirKdenitrifier groups[J]. Science of the Total Environment, 2020, 720: 137514.
- [14] Maul J E, Michel A C, Bryan V, *et al.* Cropping system history and crop rotation phase drive the abundance of soil denitrification genes *nirK*, *nirS* and *nosZ* in conventional and organic grain agroecosystems
 [J]. Agriculture, Ecosystems and Environment, 2019, 273: 95–106.
- [15] 徐华, 邢光熹, 蔡祖聪, 等. 土壤质地对小麦和棉花田N₂O排放的影

响[J]. 农业环境保护, 2000, 19(1): 1-3.

Xu H, Xing G X, Cai Z C, *et al*. Effect of soil texture on N₂O emissions from winter wheat and cotton fields[J]. Agro-Environmental Protection, 2000, 19(1): 1–3.

- [16] Tago K, Ishii S, Nishizawa T, et al. Phylogenetic and functional diversity of denitrifying bacteria isolated from various rice paddy and rice-soybean rotation fields[J]. Microbes and Environments, 2011, 26(1): 30–35.
- [17] 王亚男,曾希柏,王玉忠,等.设施蔬菜种植年限对氮素循环微生物 群落结构和丰度的影响[J].应用生态学报,2014,25(4):1115–1124. Wang Y N, Zeng X B, Wang Y Z, *et al.* Effects of vegetable cultivation years on microbial biodiversity and abundance of nitrogen cycling in greenhouse soils[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2014, 25(4): 1115–1124.
- [18] 吴晓玲,周宝利,侯永侠. 连作、轮作对辣椒不同品种生育和土壤 肥力、微生物种群的影响[J]. 辽宁农业科学, 2006, (2): 1–4.
 Wu X L, Zhou B L, Hou Y X. Effects of continuous cropping and rotation on growth, soil fertility and microbial population of different pepper varieties[J]. Liaoning Agricultural Sciences, 2006, (2): 1–4.
- [19] Magalh^{*}aes C M, Joye S B, Moreira R M, et al. Effect of salinity and inorganic nitrogen concentrations on nitrification and denitrification rates in intertidal sediments and rocky biofilms of the Douro River estuary, Portugal[J]. Water Research, 2005, 39(9): 1783–1794.
- [20] Throbäck I N, Enwall K, Jarvis A, Hallin S. 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.
- [21] Palmer K, Biasi C, Horn M A. Contrasting denitrifier communities relate to contrasting N₂O emission patterns from acidic peat soils in Arctic tundra[J]. The ISME Journal:Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology, 2012, 6(5): 1058–1077.
- [22] Edgar R C, Haas B J, Clemente J C, et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection[J]. Bioinformatics, 2011, 27(16): 2194–2200.
- [23] Li W Z, Godzik A. Cd-hit: A fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences[J]. Bioinformatics, 2006, 22(13): 1658–1659.
- [24] Sindhu J, Rattan L, Robert G, *et al.* Nitrogen fertilization and cropping system impacts on soil properties and their relationship to crop yield in the central corn belt, USA[J]. Soil & Tillage Research, 2007, 98(2): 120–129.
- [25] Miao S J, Qiao Y F, Huang X Z. Review of researches on obstacles of continuous cropping of soybean[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2007, 15(3): 203–206.
- [26] Zou J X, Yao Q, Liu J J, et al. Changes of diazotrophic communities in response to cropping systems in a mollisol of Northeast China[J]. PEERJ, 2020, 8: e9550.
- [27] Cui P Y, Fan F L, Yin C, et al. Long-term organic and inorganic fertilization alters temperature sensitivity of potential N₂O emissions and associated microbes[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2016, 93: 131–141.
- [28] Gastón A, Jorge M, Claudia E, et al. nirS and nirK-type denitrifier communities are differentially affected by soil type, rice cultivar and

water management[J]. European Journal of Soil Biology, 2017, 78: 20-28.

- [29] Wang H H, Li X, Li X, et al. Changes of microbial population and Ncycling function genes with depth in three Chinese paddy soils[J]. PLoS ONE, 2017, 12: e0189506.
- [30] 张中杰,朱波,项红艳.氮肥施用对西南地区紫色土冬小麦N₂O释 放和反硝化作用的影响[J].农业环境科学学报,2010,29(10): 2033-2040.

Zhang Z J, Zhu B, Xiang H Y. Effect of nitrogen fertilizer for wheat on N₂O emission and denitrification in purple soil[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2010, 29(10): 2033–2040.

- [31] 方芳, 孙志伟, 高红涛, 等. 三峡库区消落带土壤N₂O排放及反硝化研究[J]. 长江流域资源与境, 2014, 23(2): 287–293.
 Fang F, Sun Z W, Gao H T, *et al.* Soil N₂O emission and denitrification in the water-level fluctuation zone of the three gorges reservoir area[J]. Resources and Environment in the Yangtze Basin, 2014, 23(2): 287–293.
- [32] 黄国宏, 陈冠雄, 吴杰, 等. 东北典型旱作农田N₂O和CH₄排放通量 研究[J]. 应用生态学报, 1995, 6(4): 383–386.
 Huang G H, Chen G X, Wu J, *et al.* N₂O and CH₄ fluxes typical upland fields in northeast China[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 1995, 6(4): 383–386.
- [33] 柳文丽, 李锡鹏, 沈茜, 等. 施肥方式对冬小麦季紫色土N₂O排放特 征的影响[J]. 中国生态农业学报, 2014, 22(9): 1029–1037. Liu W L, Li X P, Shen X, *et al.* Effects of fertilizer application regimes on soil N₂O emissions in the croplands of purple soil in the Sichuan Basin during wheat season[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2014, 22(9): 1029–1037.
- [34] 陈霖. 土壤N₂O与CO₂排放间的关系[D]. 武汉: 华中农业大学硕士 学位论文, 2016.

Chen L. The correlation between soil N₂O and CO₂ emission[D]. Wuhan: MS Thesis of Huazhong Agricultural University, 2016.

- [35] Chen J, Gong J L, Xu M G. Implications of continuous and rotational cropping practices on soil bacterial communities in pineapple cultivation[J]. European Journal of Soil Biology, 2020, 97: 103172.
- [36] 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,2010,31(2):423-430.
 Luo X Q, Chen Z, Hu R G, *et al.* Effect of long-term fertilization on the diversity of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) in paddy soil[J]. Environment Science, 2010, 31(2): 423-430.
- [37] Chen Z, Hou H J, Zheng Y, et al. Influence of fertilisation regimes on a nosZ-containing denitrifying community in a rice paddy soil[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2012, 92(5): 1064– 1072.
- [38] Gabriela C A, Carlos L S, Jerri E Z, et al. Agronomic evaluation of Herbaspirillum seropedicae strain ZAE94 as an inoculant to improve maize yield in Brazil[J]. Pedosphere, 2021, 31(4): 583–595.
- [39] 刘若萱,贺纪正,张丽梅.稻田土壤不同水分条件下硝化/反硝化作用及其功能微生物的变化特征[J].环境科学,2014,35(11): 4275-4283.

Liu R X, He J Z, Zhang L M. Response of nitrification/denitrification and their associated microbes to soil moisture change in paddy soil[J]. Environment Science, 2014, 35(11): 4275–4283.

- [40] Asuming-Brempong S, Gantner S, Adiku S G K, et al. Changes in the biodiversity of microbial populations in tropical soils under different fallow treatments[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2008, 40(11): 2811–2818.
- [41] Ligi T, Truu M, Truu J, et al. Effects of soil chemical characteristics and water regime on denitrification genes nirS, nirK, and nosZ abundances in a created riverine wetland complex[J]. Ecological Engineering, 2014, 73: 47–55.
- [42] Tao R, Wakelin S A, Liang Y C, *et al*. Nitrous oxide emission and denitrifier communities in drip-irrigated calcareous soil as affected by chemical and advances in organic chemistry[J]. Science of the Total Environment, 2018, 612: 739–749.
- [43] Francis C A, O'Mullan G D, Cornwell J C, et al. Transitions in nirStype denitrifier diversity community composition and biogeochemical activity along the Chesapeake Bay estuary front[J]. Microbiology, 2013, 4(1): 237–249.
- [44] Fan F F, Zhang F S, Lu Y H. Linking plant identity and interspecific competition to soil nitrogen cycling through ammonia oxidizer communities[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2010, 43(1): 46–54.
- [45] Xin F, Rong B Z, Xue L G, et al. Responses of denitrification rate

and denitrifying bacterial communities carrying *nirS* and *nirK* genes to grazing in peatland[J]. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 2020, 20(3): 1249–1260.

- [46] Yin C, Fan F L, Song A, *et al.* Denitrification potential under different fertilization regimes is closely coupled with changes in the denitrifying community in a black soil[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(13): 5719–5729.
- [47] Dandie C E, Burton D L, Zebarth B J, et al. Changes in bacterial denitrifier community abundance over time in an agricultural field and their relationship with denitrification activity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(19): 5997–6005.
- [48] Henderson S L, Dandie C E, Patten C L, et al. Changes in denitrifier abundance, denitrification gene mRNA levels, nitrous oxide emissions, and denitrification in anoxic soil microcosms amended with glucose and plant residues[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(7): 2155–2164.
- [49] Smith C J, Dong L F, Wilson J, et al. Seasonal variation in denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonia process rates and corresponding key functional genes along an estuarine nitrate gradient[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 542.