

土壤反硝化的分子生态学研究进展及其影响因素

王海涛^{1,2}, 郑天凌², 杨小茹^{1*}

(1.中国科学院城市环境研究所 城市环境与健康重点实验室, 厦门 361021; 2.厦门大学生命科学学院 滨海湿地生态系统教育部重点实验室, 厦门 361102)

摘要:反硝化作用是在微生物参与下的土壤氮循环中的一个重要过程,反硝化作用强弱直接影响着氮素的利用。反硝化微生物是一大生理类群,广泛分布于细菌、真菌和古菌中,经典的 16S rRNA 方法不适合反硝化细菌的生态学研究。利用功能基因,结合现代分子生物学技术,已成为反硝化研究的常用方法。主要介绍了变性梯度凝胶电泳、末端标记限制性片段长度多态性技术、实时荧光定量 PCR、反转录 PCR 以及最近发展起来的高通量测序技术和功能单细胞分离技术在反硝化生态研究中的应用,并综述了土壤反硝化作用的研究进展及其影响因素,对反硝化未来的研究技术和方向进行了展望。

关键词:土壤;反硝化;作用机理;影响因素;分子生态学

中图分类号:S154.36 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2013)10-1915-10 doi:10.11654/jaes.2013.10.003

Molecular Ecology Research Progress for Soil Denitrification and Research Status for Its Influencing Factors

WANG Hai-tao^{1,2}, ZHENG Tian-ling², YANG Xiao-ru^{1*}

(1.Key Laboratory of Urban Environment and Health, Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen 361021, China; 2.Key Laboratory of Ministry of Education for the Coastal and Wetland Ecosystems, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

Abstract: Denitrification, a microbial redox process in which nitrogen oxides are reduced stepwise to gaseous products, is an important step in nitrogen cycling, especially in the soil environments. Denitrifying microbes possess a series of enzymes encoded by various functional denitrifying genes. The classic 16S rRNA molecular method is not suitable for the study of diversity and abundance of denitrifying bacteria, since denitrifying microorganisms are a large physiological group of microbes widely distributed in bacteria, fungi and archaea. It is easier to distinguish microbes with different ecological functions by investigating specific functional genes. The application of modern molecular techniques, including denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), terminal restriction fragment length patterns (T-RFLP), real-time fluorescent quantitative PCR (qPCR), and reverse transcription-PCR (RT-PCR) techniques, as well as the newly developed high-throughput sequencing technique and functional single-cell (FSC) isolation method in denitrification ecological research are reviewed in this paper. Compared with the traditional methods, high-throughput sequencing technique could provide more reliable results to directly understand the denitrifying communities, and would contribute to the identification of new denitrification pathways when combined with FSC isolation method. The progress of molecular ecology research on soil denitrification mechanism and its influencing factors are also reviewed. In addition, the main influencing factors including temperature, pH, carbon and nitrogen sources and dissolved oxygen are discussed in relation to the denitrification activity. Finally, some new directions in the denitrification research are proposed in this paper.

Keywords: soil; denitrification; function mechanism; influencing factors; molecular ecology

收稿日期:2013-02-05

基金项目:国家自然科学基金(31000254);福建省自然科学基金(2012J05070);中国科学院知识创新工程重要方向项目(KZCX2-YW-Q02-04);科技部国际科技合作专项(2011DFB91710)

作者简介:王海涛(1988—),男,四川成都人,博士研究生,主要从事环境微生物研究。E-mail:wanght_xmu@126.com

*通信作者:杨小茹 E-mail:xryang@iue.ac.cn

反硝化作用是氮循环里的一个重要环节,和硝化作用以及生物固氮等作用共同驱动了自然界中氮素的循环。反硝化作用又称脱氮作用,是指反硝化微生物在一定条件下,将硝酸盐亚硝酸盐逐步还原,最终将氮以一氧化氮(NO)、氧化亚氮(N_2O)或分子态氮(N_2)的形式释放出来的过程。因此,反硝化作用和人类的生活息息相关,反硝化作用既可以将水体(如江河湖口、污水、工业废水)脱氮去除富营养化,又可以使农田生态系统中的氮肥流失,造成严重的经济损失。同时,反硝化作用产生的温室气体 N_2O 也会对环境造成危害。根据 IPCC 的报告,以 100 年影响尺度计, N_2O 的增温效应是 CO_2 的 300 倍^[1-2]。此外, N_2O 还会破坏臭氧层^[3],增加皮肤癌的患病机率。虽然硝化和反硝化作用都可以产生 N_2O ,但是大气中 N_2O 的主要来源是反硝化作用^[4]。反硝化作用微生物主要分布于水体、沉积物和土壤中,由于土壤的环境更适合微生物的生存^[5],所以反硝化作用主要发生于土壤中。因此,深入研究土壤反硝化的作用及其影响因素,减少反硝化损失,对提高氮肥利用率具有重要意义,也可以为我们减少 N_2O 的排放找到新途径,对于保护地球生态非常重要。

反硝化作用是由微生物驱动的,传统的微生物分离培养技术具有明显的局限性,不能满足反硝化研究的需要。目前,基于 DNA 或 RNA 的分子生物技术已被广泛应用于环境微生物各领域研究。近 10 年来,环境中细菌的群落多样性研究集中在它们的系统多样性上,但是基于 16S rRNA 的种类组成分析只能提供群落和某种具特定功能种群的一些边缘信息^[6]。目前分子生物学的一个重要方向是微生物生态功能的多样性研究。功能多样性和它们的生理动态变化研究有助于我们了解不同环境中的微生物生态和生物地球化学循环^[6]。但是这一研究的前提必须有一个适合的分子标记基因。功能基因和 16S rRNA 相比具有更多的变化的序列,因此它们通常可以用作区分那些亲缘关系很近但具生态功能差异的种群的生物标记^[7]。此外,有些具重要生态功能的微生物的分布非常广,反硝化微生物正是属于这种情况,它们在 70 多个属中均有分布^[8]。因此 16S rRNA 并不适用于反硝化细菌系统发生的研究,现在更多的研究是运用功能基因来表征反硝化微生物群落多样性。反硝化过程中功能基因的发现,以及变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)、末端限制性片段长度多态性(Terminal restriction fragment length patterns, T-RFLP)、实

时荧光定量 PCR (Real-time fluorescent quantitative PCR, qPCR)、反转录 PCR (Reverse transcription-PCR, RT-PCR) 和高通量测序等分子生物技术的发展,为我们研究反硝化微生物提供了广阔的平台和前景。本文以分子生态学技术为基础,就土壤反硝化作用的研究进展及其影响因素作一综述。

1 反硝化关键酶及反硝化微生物

反硝化作用是微生物以氮氧化物作为电子受体产生能量的过程^[9],其反应步骤为 $NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$ 。该过程的每一步都有特异的酶参与反应,每一种酶都有特异的基因编码,这些基因被称为反硝化的功能基因。这些酶分别是硝酸盐还原酶(Nitrate reductase, Nar)、亚硝酸盐还原酶(Nitrite reductase, Nir)、一氧化氮还原酶(Nitric oxide reductase, Nor)以及氧化亚氮还原酶(Nitrous oxide reductase, Nos),而这些酶又由特异的基因编码。Nar 又分为膜结合硝酸盐还原酶(Membrane-bound nitrate reductase, Nar)和周质硝酸盐还原酶(Periplasmic-bound nitrate reductase, Nap),后者可在好氧的条件下表达。亚硝酸盐还原酶又分为可溶性含铜酶和细胞色素酶,分别由 *nirK* 和 *nirS* 基因编码,是催化反硝化过程中最关键的一步反应,是反硝化作用中的限速步骤^[10],它可以将亚硝酸盐转化为气体形式的 NO,因此它是反硝化微生物最为重要的功能基因。Nor 对细胞也具有特殊的生理意义,它对 NO 具有很高的亲和力^[11],可使 NO 浓度维持在极低的水平,从而消除 NO 对细胞的毒害作用。Nos 也起着很重要的作用,它可以将温室气体 N_2O 转化为无害的 N_2 ,决定了反硝化作用的最终产物。但 Philippot 等^[3]研究发现土壤中缺少编码 *nos* 基因的微生物量的变化并不明显影响 N_2O 的产生量,这和 Čuhel 等^[12]发现的 *nosZ* 丰度对 $N_2O/(N_2O+N_2)$ 比值无明显影响是一致的。所以对 *nos* 的研究还需要更加深入。目前,编码反硝化作用酶系的功能基因(*narG/napA*, *nirK/nirS*, *norB* 和 *nosZ*)已被广泛应用于反硝化作用的分子生态学研究。

反硝化微生物是一个大的生理类群,广泛分布于细菌、真菌和古菌中^[13-15]。反硝化作用最初在细菌中发现,包括假单胞菌(*Pseudomonaceae*)、芽孢杆菌(*Bacillaceae*)、根瘤菌(*Rhizobiaceae*)、红螺菌(*Rhodospirillaceae*)、噬纤维菌(*Cytophagaceae*)、脱氮副球菌(*Paracoccus denitrificans*)、盐杆菌(*Halobacteriaceae*)等^[16-17]。后来在真菌、放线菌、酵母菌中均发现反硝化

现象^[1]。虽然传统的观点认为反硝化作用是一个厌氧的过程,但是由于周质硝酸盐还原酶(Nap)可以在好氧条件下表达,所以部分反硝化细菌也可以在好氧条件下进行反硝化作用,称为好氧反硝化作用。随着好氧反硝化作用逐渐被认识,好氧反硝化微生物也逐渐成为研究热点,一部分国内学者也分离获得了一些好氧反硝化菌株^[18-20]。目前已报道的好氧反硝化细菌有副球菌属(*Paracoccus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、克雷伯菌属(*Klebsiella*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)等^[18,21]。

近年来,虽然对反硝化作用功能基因以及它们的调控机制的研究取得了重大进展,但是只是针对极少数的反硝化微生物,如施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)和脱氮副球菌(*Paracoccus denitrificans*)等^[22]。所以,新的分子生物学方法需要不断地发展,并用于反硝化微生物环境生态学的研究中,以便让我们更好地了解反硝化过程。

2 土壤反硝化作用的分子生物学研究技术

在现阶段的微生物反硝化研究中,应用最广泛的技术分别是 DGGE、T-RFLP、qPCR 以及 RT-PCR 等,而一些新的技术如高通量测序和功能单细胞分离技术(Functional single-cell isolation method)也逐渐被应用到反硝化生态学研究。下面将逐一进行阐述。

2.1 DGGE

DGGE 技术的原理就是根据不同 DNA 分子在不同浓度变性剂中解链行为的不同,使不同片段的 DNA 分子由于变性导致空间构型的变化,从而导致电泳速率急剧下降,使其停留在相应的变性梯度位置。该技术可以将大小相同或相近的 DNA 片段分离,理论上可以将单一碱基差异的不同片段分离开来,因此已广泛用于微生物多样性调查,遗传多样性检测及基因突变检测等领域^[23-25]。土壤中具有丰富的微生物资源,大部分处于未可培养状态^[9],利用反硝化功能基因和 DGGE 技术可以对土壤中反硝化微生物多样性进行研究,发掘新资源,也可以对反硝化群落结构进行研究,揭示土壤中的反硝化作用机理。为了找到 *nirS*、*nirK* 和 *nosZ* 最合适的引物用于 PCR 和 DGGE, Throback 等^[6]对这 3 个基因多对引物进行重新设计和组合,并对这些引物进行了评价——后来这些引物被国内外学者广泛地引用。Ruiz-Rueda 等^[26]研究了人工湿地中植被对硝化和反硝化微生物群落结构和功能

的影响,通过对 *nosZ* 的 PCR-DGGE 研究,发现植被可以影响微生物群落结构和功能,并揭示了植被存在可以促进微生物的硝化和反硝化作用。Wertz 等^[27]研究了马铃薯农田中 *nirK* 微生物的分布,通过 PCR-DGGE 和反转录 PCR-DGGE 分别研究了 DNA 和 RNA 水平上 *nirK* 基因的多样性,以期找到反硝化作用最活跃的微生物,结果发现不同土壤样品中反硝化作用最活跃的是那些丰度高和分布广的常见 *nirK* 微生物,与环境因子和反硝化能力大小无关。Enwall 等^[28]采用了核糖体基因间序列分析 RISA(Ribosomal intergenic spacer region analysis)来分析全部根际微生物,结合 DGGE 和 RFLP(Restriction fragment length polymorphism)技术,研究了长期施用有机和无机肥料对土壤 *nosZ* 和 *narG* 基因多样性的影响,发现反硝化能力和反硝化微生物组成并不相关。DGGE 具有重复性好,分辨率较高等特点,曾经一度被广泛应用。然而 DGGE 也具有较大的局限性,它不适合分离大于 500 bp 的核酸片段,只能对土壤中数量大于 1% 的优势种群进行分析^[29]。同时 DGGE 对实验条件也要求较高,不同样品间条件差异较大、操作复杂、费时。由于这些局限的存在,目前 DGGE 在反硝化研究中的应用也渐渐变少。

2.2 T-RFLP

T-RFLP 是一种发明于上个世纪末的指纹图谱技术,可以分析环境样品中某一类微生物的群落结构。其基本原理是用 5'端具有荧光标记的引物从环境样品总 DNA 中扩增一段具有系统进化特征的 DNA 片段,用合适的限制性内切酶消化后,由于在不同细菌的扩增片段内存在核苷酸序列的差异,酶切位点就会存在差异,酶切后就会产生许多不同长度的限制性片段。在自动分析仪上检测和分析末端带有荧光标记的片段(称为末端限制性片段,T-RFs)的长度和含量。不同长度的 T-RFs 代表不同的微生物,同一个 T-RFs 至少代表一种微生物,通过这种方式检测群落中某类微生物的物种组成和含量或者动态变化。与其他方法相比,T-RFLP 具有分辨率高、操作简便、易于实现自动化等特点^[30],现已被广泛应用于土壤反硝化微生物的研究中。湿地是 N₂O 重要的源、汇和转换器^[31],Bañeras 等^[32]利用 T-RFLP 技术对西班牙滨海湿地的 *nirS*、*nirK* 和 *nosZ* 反硝化群落进行了分析,发现盐度、植被类型以及其他环境因子都能明显影响反硝化群落,其中植被类型对 *nirK* 反硝化群落影响更明显,而碳含量则主要影响 *nosZ* 菌群。Enwall 等^[33]则比较了 DGGE 和

T-RFLP 技术对土壤中 *nosZ* 反硝化群落的结果,发现 DGGE 的分辨率要高于 T-RFLP 技术。美国 Rutgers 大学的研究者^[34]曾经也利用 T-RFLP 技术对新泽西州 Tuckerton 地区大陆架沉淀物中反硝化细菌 *nosZ* 基因多样性进行了分析,并得到了其随时空变化的规律。此外,T-RFLP 技术也被 Castro-González 等^[35]用于水体反硝化群体的分析,发现 O_2 、 NO_3^- 、 NO_2^- 以及深度是影响 *nirS* 基因多样性和反硝化菌群结构的主要因素。作为一种技术,T-RFLP 自身也具有一定缺陷,例如酶切后片段过大,造成检测分辨率下降。又如 PCR 的差异化扩增也容易降低分析结果的准确性。但是相对于 DGGE,T-RFLP 技术依然具有明显的优势,也是目前应用最为广泛的微生物群落分析技术之一。

2.3 qPCR

qPCR 是近年来发展起来的一种重要的对基因进行定量分析的技术,其原理是在 PCR 过程中加入荧光基团,随着反应的进行,双链 DNA 分子越来越多,荧光基团嵌合在上面,可以通过荧光信号的检测来实时监控整个 PCR 的反应动态过程。可以通过对荧光强度的检测,设定阈值,实现对 PCR 模板的定量分析。和传统的梯度稀释培养计数法相比,该技术快速、高效、操作简便,具有很高的敏感性和特异性^[36-37],可以准确地对基因进行定量分析。通过 qPCR 技术对反硝化过程中的功能基因进行定量研究,可以了解反硝化对不同因素的响应机制,为找到控制该过程中氮氧化物的排放措施提供了可能。在对水稻田的研究中,日本学者 Yoshida 等^[38]对 *nirK* 和 *nirS* 基因的定量研究显示水稻田中 *nirK* 基因的拷贝数要高于 *nirS* 的拷贝数,并且拷贝数会随着土壤条件的变化而变化。但俄罗斯学者 Palmer 等^[2]在对北极苔原永久冻土的反硝化基因定量分析发现 *nirS* 基因的拷贝数比 *nirK* 基因要高出约 1000 倍。说明不同土壤里反硝化基因的组成大不相同。Henry 等^[39]对 6 种不同土壤中的 16S rRNA、*nosZ*、*narK*、*narG* 基因定量分析发现,16S rRNA 拷贝数最高,*nosZ* 最低,而 *nirK* 和 *narG* 介于二者之间,*nosZ* 和 *nirK* 与 16S rRNA 基因拷贝数的比值介于 5%~6% 之间,说明反硝化细菌在总的细菌群落里所占的比例并不高。qPCR 主要反应的是微生物在土壤中的丰度,因此常常与 DGGE 和 T-RFLP 技术结合起来用于反硝化的研究。通过对北京农村 3 个不同灌溉制度的土壤中 *nirS*、*nirK* 和 *nosZ* 基因的定量和 DGGE 分析,发现不干净的水源灌溉可以提高

土壤硝氮的含量,并进一步改变土壤反硝化细菌的数量和群落结构^[40]。该研究也部分说明了为什么污水灌溉的地区其 N_2O 排放量更高。Chen 等^[41]以水稻田为对象,研究了不同施肥制度对反硝化微生物的影响。利用 T-RFLP 和 qPCR 技术对 *narG*、*qnorB* 和 *nosZ* 的多样性、结构组成和丰度进行了研究,发现长期施肥可明显影响反硝化微生物群落的大小和组成,但对多样性影响不明显。qPCR 技术因其显著的优越性,目前在生物学各个领域尤其是生态学方面应用十分广泛。该技术是一个定量的研究,因此对 PCR 各环节的参数都要求严格,例如扩增效率问题、阴性对照等问题。此外,重复性和特异性问题,也值得我们关注。

2.4 RT-PCR

RT-PCR 技术是以 mRNA 为模板,通过 PCR 技术,反转录合成 cDNA,再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,获得目的基因的过程,主要用于对表达信息进行检测或定量分析。在反硝化研究中,并不是所有的反硝化基因都会表达,对土壤中反硝化基因 DNA 的研究和定量分析只能检测反硝化微生物的存在,并不能揭示相应的主要作用微生物。这一问题可以通过检测反硝化基因的表达来解决,即对反硝化基因的 mRNA 进行分析,利用 mRNA 研究反硝化基因可以更直接地了解反硝化活性,找到有活性的反硝化微生物^[42]。尽管可以从土壤中提取出总的 RNA 来,但顺利地对 mRNA 进行 PCR 扩增也是一个难题^[43],目前关于反硝化基因 RNA 水平研究的报道也并不多。Baumann 等^[44]在 1997 年时就利用 RNA 探针检测了活性污泥中反硝化基因的表达。在 2002 年,Nogales 等^[45]从河口湾沉积物提取 mRNA,首次利用 RT-PCR 技术检测反硝化过程中的功能基因,并检测到了 *nirS* 和 *nosZ* 基因的表达。后来,Sharma 等^[46]从豆类根际提取出 mRNA,通过 RT-PCR 对 *nirK* 和 *nirS* 基因进行检测,结果显示所有样品的 *nirK* 基因都能被监测到,而 *nirS* 却不能。利用 DGGE 和 RFLP 进一步对 *nirK* 分析发现,植物种类能明显影响反硝化微生物种群。最近,Shannon 等^[47]研究了葡萄糖添加和硝酸盐添加对 *cnorB* 基因丰度及其 mRNA 水平的影响,利用 qPCR 和 RT-PCR 技术对 *cnorB* 进行定量分析,发现葡萄糖添加可以明显增加 *cnorB* 基因丰度及其 mRNA 的表达,并且对硝酸盐添加的响应也是受碳源影响的。意大利学者 Pastorelli 等^[48]的研究也证明反转录巢式 PCR(RT-nested PCR)可以对有活性的反硝化微生物进行检测,并可以进一步探索这些反硝化种群在土壤

中表现活性的条件。转录水平的研究最重要的步骤就是RNA的提取,由于RNA是单链结构,性质不稳定,极易发生降解,所以RNA提取问题一直是个难题。虽然目前有许多方法和试剂盒可以从土壤中提取出RNA,但是后续的纯化和反转录步骤也会造成RNA的降解和损失,不能完全准确地反映实验结果。所以反硝化的RNA水平研究一直是一个难题,同时也是一个需要加强的研究方面。

2.5 高通量测序

随着分子生物学的不断发展,DNA的测序技术应用也越来越广泛。随着基因组学的发展以及人类全基因组计划的完成,人们进入后基因组时代,传统的DNA测序技术已不能满足基因组学的需求。以高通量为显著特征的第二代测序技术目前已非常成熟,且被广泛地用于生物学的各个领域。高通量测序一次能对几十万到几百万条DNA分子进行测序^[49],使得对一个物种或一个环境样品的测序变得简单易行,主要包括罗氏454公司的GSFLX测序平台、Illumina公司的Solexa Genome Analyzer测序平台和ABI公司的SOLiD测序平台^[50]。目前大部分对环境样品的宏基因组研究都是基于细菌或古菌16S rRNA或真核微生物的18S rRNA的基础上的^[51-53],很少有对功能基因直接进行测序分析的。法国学者Philippot等^[54]在他们最新的研究中,采用了454测序平台对反硝化的*nosZ*基因进行了测序分析,发现了微生物多样性的降低会显著影响反硝化微生物多样性以及群落结构。他们提出这是首次利用高通量测序技术来更准确地分析反硝化微生物。然而,在稍早之前,也有芬兰学者在研究反硝化时利用了454高通量测序^[2],他们研究了受冻裂影响的北极苔原泥炭土反硝化微生物特征与N₂O排放的关系,对*narG*、*nirK*/*nirS*以及*nosZ*基因都进行了测序分析和定量分析,结果发现高N₂O排放量都和土壤中的一些特殊反硝化微生物有关,说明N₂O排放量的大小和土壤中反硝化组成是有对应关系的。测序技术是一种比较准确反应微生物组成的方法,因为它是直接对基因序列进行测序,结果更可靠,通过对反硝化微生物全基因组信息进行分析,也可获得更多关于反硝化的分子遗传信息。然而,现在几乎还未见有其他有关反硝化的研究采用该技术。可能是由于成本的原因,目前绝大多数的反硝化研究还在利用比较传统的方法进行研究。随着以单分子测序为基础的第三代DNA技术的出现^[49],高通量测序技术必将更加普及,届时反硝化分子生态学的研究也将更简

单易行。

2.6 FSC分离技术及其他方法

目前,反硝化的分子生态研究大多数都是从环境样品的宏基因组角度去分析的,基于反硝化微生物纯种培养的研究还比较少见。最近,有日本学者发明了一种功能单细胞的分离技术,并将它用于反硝化细菌的研究中^[55]。该方法的基本步骤^[56-57]为:首先通过添加促进细胞生长物质和细胞分裂抑制物质使具有功能的活性细胞伸长;其次,利用荧光染料对活细胞进行染色;最后在荧光显微镜下,利用显微操作器将具有活性的单细胞分离出来,并进行纯培养。该技术的关键是第一步的促进培养,Ashida等^[56]在这一步中加入了2.1 μmol的NO₃⁻和1.4 μmol的琥珀酸盐,这一条件可以显著促进反硝化微生物的生长。因此,他们在最后分离到的单细胞中有45%都为反硝化微生物,这一比例已远远高于传统的稀释培养法。Ishii等^[58]也利用该技术分离得到了一株以前只在宏基因组研究中报道过的反硝化微生物。由此可见,此方法可以高效快速分离得到纯种反硝化微生物,这对于反硝化研究来说是有重要意义的。利用得到纯种微生物,结合微生物全基因组测序技术,我们可以更好地从基因水平去了解反硝化作用,也有利于我们找到新的反硝化途径和基因,完善反硝化作用机理。

其他技术如Biolog法、磷脂脂肪酸(Phospholipid fatty acid, PLFA)法、荧光原位杂交技术(Fluorescence in situ hybridization, FISH)等也可以对土壤中微生物群落结构进行评价^[5,11],但是如前所述,反硝化是一大生理类群微生物,这些方法也不能完全满足反硝化微生物的研究需求,相对于上述提到技术具有更大的局限性。此外,稳定同位素技术(Stable isotope probing, SIP)也常用作跟踪氮素转化,监测氮素去向——了解硝化反硝化过程^[59-61]。

3 土壤反硝化作用影响因素

目前关于土壤作用因素的研究中,影响反硝化作用的因素主要有温度、pH、水分、含氧量、碳氮类型和碳氮比以及土壤质地、土壤利用和耕作方式等^[62]。这些因素基本都是直接或间接地作用于反硝化酶,任何一个因素的改变都可能影响反硝化过程,进而影响N₂O的排放量。

3.1 温度

温度是影响土壤反硝化作用的一个重要因素,反硝化作用的适宜温度范围为5~75℃^[63],温度过高或

过低都会抑制反硝化作用。在适宜温度范围内,随着温度的升高,反硝化作用速率也加强。徐亚同^[64]发现,在 pH 值和 C/N 一定的情况下,反硝化速率随温度的升高而升高。郑兰香等^[65]的实验结果也表明生物膜在 22 ℃ 下的反硝化速率要比 13 ℃ 下的大。在 15~35 ℃ 温度范围内,Stanford 等^[66]也发现反硝化速率和温度表现出协同作用。Keeney 等^[67]研究了在 7~75 ℃ 范围内反硝化速率的变化,发现在大于 15 ℃ 时,反硝化速率是随着温度升高而升高的,并在 60~67 ℃ 时达到最大值。Pfenning 等^[68]也发现当温度从 22 ℃ 降到 4 ℃, N_2O 的排放量减少了 77%,说明温度的降低导致反硝化速率的降低。

3.2 pH 值

pH 值是另一个影响反硝化作用的重要因素,最适 pH 值范围大概在中性或微碱性,这是因为在酸性环境中可以利用的有机碳和无机氮要比中性或微碱性环境中的低^[69]。在最适 pH 值范围内,反硝化速率随 pH 值的增加而增加^[12]。徐亚同^[64]以挥发性脂肪酸为碳源,在悬浮污泥系统中,发现反硝化作用适宜的 pH 值是 7.5。当 pH 偏离这一适宜值时,反硝化速率逐渐降低,亚硝酸盐出现累积。Čuhel 等^[12]研究了 pH 对反硝化过程的影响,结果显示虽然 N_2O 的通量没发生变化,但是 $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2)$ 的比值随 pH 值的降低而升高,说明 pH 在决定反硝化最终产物方面起了重要作用。

3.3 碳氮类型和碳氮比

土壤中碳源和氮源也能明显影响反硝化作用,C/N 越高反硝化速率越强^[65]。张可方等^[70]发现,C/N 在 3.3~10 时,硝化反硝化速率随 C/N 的增加而增加。C/N 对 N_2O 的积累有很大影响,当碳源充足时很少出现 N_2O 的积累,但在硝酸盐过量时,就常会出现 N_2O 的积累^[71]。Henderson 等^[72]研究了几种农作物残渣以及葡萄糖作为不同的碳源氮源对反硝化作用的影响,不同的添加物具有不同的 C/N,均能明显影响各反硝化基因的表达量以及反硝化速率。

3.4 溶解氧

反硝化作用是一个厌氧的过程,溶解氧的存在会抑制反硝化作用。溶解氧对反硝化的抑制主要是作用在反硝化还原酶上。Körner 等^[73]的研究表明,不同大小的氧分压都会不同程度地抑制反硝化还原酶的合成,其中亚硝酸还原酶对氧浓度最敏感。而 Rysgaard 等^[74]则发现在 NO_3^- 含量低的水体中,较高浓度的 O_2 会促进反硝化作用,而在 NO_3^- 含量高的水体中,情况则相反。 N_2O 的排放量是评价反硝化作用的一个指

标,Schulthess 等^[75]发现 N_2O 的积累量随溶解氧的增高而增高。这是因为过高浓度的溶解氧导致氧化亚氮还原酶的失活^[71],造成 N_2O 的排放增加。前面提到的植物对反硝化的影响,也可能是含氧量改变所致。植物根部放氧,含氧量改变,在根际形成生物膜^[26]。因此,溶解氧的存在对反硝化具有明显的影响。

3.5 水分

水分不仅直接影响着微生物的生理活性,它还能通过改变土壤的通透性和氧分压来间接作用于反硝化微生物。Weier 等^[76]通过培养实验,发现随土壤含水孔隙率(WFPS)数值增高土壤的反硝化速率显著增大。Čuhel 等^[12]在研究 pH 对反硝化的影响时,也发现含水量与反硝化能力是呈显著正相关的。颜晓元等^[77]通过室内培养试验,研究了不同水分含量下水稻土的 N_2O 排放,结果表明,当水分含量在田间持水量之上时,反硝化作用是 N_2O 的主要来源。孙志高等^[78]的研究也表明持水量高于田间持水量,其 N_2O 的产生主要以反硝化作用过程为主,低于或接近田间持水量则可能以硝化作用为主。

3.6 其他因素

NO_3^- 含量、土地利用方式等也可影响反硝化作用。反硝化是以硝酸盐和亚硝酸盐作为底物的呼吸作用,因此 NO_3^- 含量也能影响反硝化作用。李勇等^[79]的研究表明, NO_3^- 和 NH_4^+ 的含量和 N_2O 的排放量是呈正相关的,说明添加 NO_3^- 和 NH_4^+ 可以增加反硝化速率。土壤的利用方式也是影响反硝化作用的因素之一,这可能是因为不同的利用方式可以导致土壤理化性质的改变,进而影响反硝化作用^[33,41]。此外,其他的一些因素,如植被^[26]、土壤质地^[80]、冻融作用^[81]、重金属^[82]、无机盐^[83]等都能影响反硝化作用。

4 展望

氮循环一直是国内外学者关注的焦点,由于微生物的活动,土壤成为氮循环中最活跃的区域。人们研究反硝化微生物的主要目的就是了解反硝化作用机制,并掌握这些影响反硝化活性和群落结构的因素,实现对反硝化群落进行调控。但是反硝化类群分布广、结构复杂,传统的 16S rRNA 方法具有明显局限性,通过功能基因作为分子标记,结合 DGGE、T-RFLP、qPCR 以及 RT-PCR 技术是目前用来反映反硝化微生物数量、多样性和功能的主要手段。但是这些技术本身也存在一定缺陷,不能完整地反应土壤中反硝化过程。目前设计出的反硝化功能基因引物基本都

只能反映大部分反硝化细菌的信息,而像真菌的反硝化作用以及一些放线菌独特的反硝化途径还未充分被人们认识^[55]。而FSC的分离技术使我们对这些单细胞培养成为可能,再结合高通量测序技术,可以对全基因组进行解析,找到新的相关的反硝化基因。其次,影响反硝化作用最直接的因素就是反硝化酶的活性,而酶活性又极易受到环境因素的影响,因此将反硝化影响因素和反硝化分子研究结合起来是非常重要的。虽然目前国内外对反硝化作用因素也作了大量的研究,但是却很少有人提出具体控制反硝化作用的措施。

综上所述,提出以下几点建议:第一,高通量测序技术应该广泛地应用到反硝化研究中,以期获得更多关于反硝化功能基因的信息。第二,新的更好的研究方法(如FSC分离技术)还有待被发展用来更好地了解反硝化作用中各种微生物的作用及关系。第三,结合反硝化分子生态学研究技术,加强反硝化酶影响机理的研究,以及微生物在土壤中的交互作用及其微生物生态学机理的研究。第四,反硝化微生物RNA水平的研究应是以后需要加强的方面。第五,如何有效调控反硝化作用,控制反硝化作用中 N_2O 的产生,以及如何减少由反硝化作用产生的农业氮肥损失应是今后主要的一个研究方向。

参考文献:

- [1] 李长生,肖向明, Frolking S, 等. 中国农田的温室气体排放[J]. 第四纪研究, 2003, 23(5):493-503.
LI Chang-sheng, XIAO Xiang-ming, Frolking S, et al. Greenhouse gas emissions from croplands of China[J]. *Quaternary Sciences*, 2003, 23(5):493-503.
- [2] Palmer K, Biasi C, Horn M A. Contrasting denitrifier communities relate to contrasting N_2O emission patterns from acidic peat soils in arctic tundra[J]. *The ISME Journal*, 2011, 6(5):1058-1077.
- [3] Philippot L, Andert J, Jone C M, et al. Importance of denitrifiers lacking the genes encoding the nitrous oxide reductase for N_2O emissions from soil[J]. *Global Change Biology*, 2011, 17(3):1497-1504.
- [4] Bakken L R, Bergaust L, Liu B, et al. Regulation of denitrification at the cellular level: A clue to the understanding of N_2O emissions from soils[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2012, 367(1593):1226-1234.
- [5] 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.
ZHANG Rui-juan, LI Hua, LIN Qin-bao, et al. Research progress of PLFA method in the soil microbial community[J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2011, 39(9):1020-1024.
- [6] Thröback I N, Enwall K, Jarvis A, 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.
- [7] Palys T, Nakamura L, Cohan F M. Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: The role of DNA sequence data[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1997, 47(4):1145-1156.
- [8] Braker G, Tiedje J M. Nitric oxide reductase(*norB*) genes from pure cultures and environmental samples[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(6):3476-3483.
- [9] Philippot L. Denitrifying genes in bacterial and Archaeal genomes[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002:355-376.
- [10] Braker G, Zhou J, Wu L, 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(5):2096-2104.
- [11] 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.
GUO Li-yun, SHI Fei, YANG Liu-yan. Advances in functional genes and molecular ecology in denitrifiers[J]. *Microbiology*, 2011, 38(4):583-590.
- [12] Čuhel J, Šimek M, Laughlin R J, et al. Insights into the effect of soil pH on N_2O and N_2 emissions and denitrifier community size and activity[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(6):1870-1878.
- [13] Verbaendert I, De Vos P, Boon N, et al. Denitrification in Gram-positive bacteria: An underexplored trait[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2011, 39:254-258.
- [14] Zumft W G. Cell biology and molecular basis of denitrification[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1997, 61(4):533-616.
- [15] Ward B B, Devol A H, Rich J J, et al. Denitrification as the dominant nitrogen loss process in the Arabian Sea[J]. *Nature*, 2009, 461(7260):78-81.
- [16] 肖晶晶,郭 萍,霍炜洁,等. 反硝化微生物在污水脱氮中的研究及应用进展[J]. 环境科学与技术, 2009, 32(12):98-102.
XIAO Jing-jing, GUO Ping, HUO Wei-jie, et al. Application of denitrifying microbes to wastewater denitrification[J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 32(12):98-102.
- [17] 方晶晶,马传明,刘存富. 反硝化细菌研究进展[J]. 环境科学与技术, 2010, 33(6E):206-210.
FANG Jing-jing, MA Chuan-ming, LIU Cun-fu. The advance of study on denitrifying bacteria[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 33(6E):206-210.
- [18] 高喜燕,刘 鹰,郑海燕,等. 一株海洋好氧反硝化细菌的鉴定及其好氧反硝化特性[J]. 微生物学报, 2010, 50(9):1164-1171.
GAO Xi-yan, LIU Ying, ZHENG Hai-yan, et al. Identification and characteristics of a marine aerobic denitrifying bacterium[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(9):1164-1171.
- [19] 王慧荣,韦彦斐,梅荣武,等. 一株好氧反硝化菌的分离及特性研究[J]. 环境保护科学, 2012, 38(1):13-18.
WANG Hui-rong, WEI Yan-fei, MEI Rong-wu, et al. Study on isolation and characteristics of an aerobic denitrifying bacteria[J]. *Environmental Protection Science*, 2012, 38(1):13-18.

- [20] 王莹, 周巧红, 梁威, 等. 人工湿地高效好氧反硝化菌的分离鉴定及反硝化特性研究[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(6): 1193–1198.
- WANG Ying, ZHOU Qiao-hong, LIANG Wei, et al. Isolation and identification of a high-efficiency aerobic denitrifier and its denitrifying characteristic in constructed wetland[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(6): 1193–1198.
- [21] 丁炜, 朱亮, 徐京, 等. 好氧反硝化菌及其在生物处理与修复中的应用研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2011, 17(6): 923–929.
- DING Wei, ZHU Liang, XU Jing, et al. Progress of researches on aerobic denitrifiers and their application in bioremediation[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2011, 17(6): 923–929.
- [22] 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.
- ZHOU Zhi-feng, WANG Ming-xia. Research progress of soil denitrifying microorganism[J]. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 2012, 40(11): 6474–6477.
- [23] Muyzer G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 1999, 2(3): 317–322.
- [24] Muyzer G, Brinkhoff T, Nübel U, et al. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology[J]. *Molecular Microbial Ecology Manual*, 2004, 1&2 (Ed. 2): 743–769.
- [25] Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1998, 73(1): 127–141.
- [26] Ruiz-Rueda O, Hallin S, Bañeras L. Structure and function of denitrifying and nitrifying bacterial communities in relation to the plant species in a constructed wetland[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, 67(2): 308–319.
- [27] Wertz S, Dandi C E, Goyer C, et al. Diversity of *nirK* denitrifying genes and transcripts in an agricultural soil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(23): 7365–7377.
- [28] Enwall K, Philippot L, Hallin S. Activity and composition of the denitrifying bacterial community respond differently to long-term fertilization[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(12): 8335–8343.
- [29] 刘权钢, 金东淳, 刘敬爱. DGGE 技术在土壤微生物多样性分析上的研究进展[J]. 延边大学农学报, 2012, 34(2): 170–176.
- LIU Quan-gang, JIN Dong-chun, LIU Jing-ai. Research process of DGGE technique for soil microbial diversity analysis[J]. *Journal of Agricultural Science Yanbian University*, 2012, 34(2): 170–176.
- [30] 罗剑飞, 林炜铁, 任杰, 等. T-RFLP 技术及其在硝化细菌群落分析中的应用[J]. 微生物学通报, 2008, 35(3): 456–461.
- LUO Jian-fei, LIN Wei-tie, REN Jie, et al. T-RFLP technique and its application on community analysis of nitrifying bacteria[J]. *Microbiology*, 2008, 35(3): 456–461.
- [31] 牟长城, 石兰英, 孙晓新. 小兴安岭典型草丛沼泽湿地 CO₂, CH₄ 和 N₂O 的排放动态及其影响因素[J]. 植物生态学报, 2009, 33(3): 617–623.
- MU Chang-cheng, SHI Lan-ying, SUN Xiao-xin. Fluxes and controls of CO₂, CH₄ and N₂O in a marsh wetland of Xiaoxing'an mountains, Northeastern China[J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2009, 33(3): 617–623.
- [32] Bañeras L, Ruiz-Rueda O, López-Flores R, et al. The role of plant type and salinity in the selection for the denitrifying community structure in the rhizosphere of wetland vegetation[J]. *International Microbiology*, 2012, 15(2): 89–99.
- [33] Enwall K, Hallin S. Comparison of T-RFLP and DGGE techniques to assess denitrifier community composition in soil[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2008, 48(1): 145–148.
- [34] Scala D J, Kerkhof L J. Horizontal heterogeneity of denitrifying bacterial communities in marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(5): 1980–1986.
- [35] Castro-González M, Braker G, Farías L, et al. Communities of *nirS*-type denitrifiers in the water column of the oxygen minimum zone in the eastern South Pacific[J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(9): 1298–1306.
- [36] 张晶, 张惠文, 张成刚. 实时荧光定量 PCR 及其在微生物生态学中的应用[J]. 生态学报, 2005, 25(6): 1445–1450.
- ZHANG Jing, ZHANG Hui-wen, ZHANG Cheng-gang. Real-time fluorescent quantitative PCR and its application in microbial ecology[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(6): 1445–1450.
- [37] 袁亚男, 刘文忠. 实时荧光定量 PCR 技术的类型、特点与应用[J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35(3): 27–30.
- YUAN Ya-nan, LIU Wen-zhong. The types, characteristics and applications of real-time fluorescent quantitative PCR techniques[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2008, 35(3): 27–30.
- [38] Yoshida M, Ishii S, Otsuka S, et al. Temporal shifts in diversity and quantity of *nirS* and *nirK* in a rice paddy field soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41(10): 2044–2051.
- [39] Henry S, Bru D, Stres B, et al. Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(8): 5181–5189.
- [40] Zhou Z F, Zheng Y M, Shen J P, et al. Response of denitrification genes *nirS*, *nirK*, and *nosZ* to irrigation water quality in a Chinese agricultural soil[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2011, 18(9): 1644–1652.
- [41] Chen Z, Liu J B, Wu M N, et al. Differentiated response of denitrifying communities to fertilization regime in paddy soil[J]. *Microbial Ecology*, 2011, 63(2): 446–459.
- [42] Philippot L, Hallin S. Finding the missing link between diversity and activity using denitrifying bacteria as a model functional community[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2005, 8(3): 234–239.
- [43] Saleh-Lakha S, Shannon K E, Goyer C, et al. Challenges in quantifying microbial gene expression in soil using quantitative reverse transcription real-time PCR[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2011, 85(3): 239–243.
- [44] Baumann B, Snozzi M, Van Der Meer J R, et al. Development of stable

- denitrifying cultures during repeated aerobic-anaerobic transient periods[J]. *Water Research*, 1997, 31(8):1947-1954.
- [45] Nogales B, Timmis K N, Nedwell D B, et al. Detection and diversity of expressed denitrification genes in estuarine sediments after reverse transcription-PCR amplification from mRNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(10):5017-5025.
- [46] Sharma S, Aneja M K, Mayer J, et al. Diversity of transcripts of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) in rhizospheres of grain legumes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(4):2001-2007.
- [47] Shannon K E M, Saleh-Lakha S, Burton D L, et al. Effect of nitrate and glucose addition on denitrification and nitric oxide reductase (*cnorB*) gene abundance and mRNA levels in *Pseudomonas mandelii* inoculated into anoxic soil[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2011, 100(2):183-195.
- [48] Pastorelli R, Landi S, Trabelsi D, et al. Effects of soil management on structure and activity of denitrifying bacterial communities[J]. *Applied Soil Ecology*, 2011, 49:46-58.
- [49] 解增言, 林俊华, 谭 军, 等. DNA 测序技术的发展历史与最新进展[J]. 生物技术通报, 2010(8):64-70.
XIE Zeng-yan, LIN Jun-hua, TAN Jun, et al. The history and advances of DNA sequencing technology[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2010(8):64-70.
- [50] Ansorge W J. Next-generation DNA sequencing techniques[J]. *New Biotechnology*, 2009, 25(4):195-203.
- [51] Besemer K, Prter H, Logue J B, et al. Unraveling assembly of stream biofilm communities[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(8):1459-1468.
- [52] Kuffner M, Hai B, Rattei T, et al. Effects of season and experimental warming on the bacterial community in a temperate mountain forest soil assessed by 16S rRNA gene pyrosequencing[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, 82(3):551-562.
- [53] Degnan P H, Ochman H. Illumina-based analysis of microbial community diversity[J]. *The ISME Journal*, 2011, 6:183-194.
- [54] Philippot L, Spor A, Hénault C, et al. Loss in microbial diversity affects nitrogen cycling in soil[J]. *The ISME Journal*, 2013:1-11.
- [55] Ishii S, Ikeda S, Minamisawa K, et al. Nitrogen cycling in rice paddy environments: Past achievements and future challenges [J]. *Microbes and Environments*, 2011, 26(4):282-292.
- [56] Ashida N, Ishii S, Hayano S, et al. Isolation of functional single cells from environments using a micromanipulator: Application to study denitrifying bacteria [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85(4):1211-1217.
- [57] Ishii S, Tago K, Senoo K. Single-cell analysis and isolation for microbiology and biotechnology: Methods and applications[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(5):1281-1292.
- [58] Ishii S, Ashida N, Otsuka S, et al. Isolation of oligotrophic denitrifiers carrying previously uncharacterized functional gene sequences[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(1):338-342.
- [59] Beaulieu J J, Tank J L, Hamilton S K, et al. Nitrous oxide emission from denitrification in stream and river networks[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(1):214-219.
- [60] Sutka R L, Ostrom N E, Ostrom P H, et al. Distinguishing nitrous oxide production from nitrification and denitrification on the basis of isotopomer abundances[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(1):638-644.
- [61] Linzmeier W, Gutser R, Schmidhalter U. Nitrous oxide emission from soil and from a nitrogen-15-labelled fertilizer with the new nitrification inhibitor 3, 4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP)[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2001, 34(2):103-108.
- [62] 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.
LIU Qiu-li, MA Juan-juan, SUN Xi-huan, et al. Research advancement on soil nitrification-denitrification and its influencing factors[J]. *Agricultural Engineering*, 2011, 1(4):79-83.
- [63] Klemetsson L, Svensson B H, Rosswall T. Dinitrogen and nitrous oxide produced by denitrification and nitrification in soil with and without barley plants[J]. *Plant and Soil*, 1987, 99(2):303-319.
- [64] 徐亚同. pH 值、温度对反硝化的影响[J]. 中国环境科学, 1994, 14(4):308-313.
XU Ya-tong. The influence of pH values and temperature on denitrification[J]. *China Environmental Science*, 1994, 14(4):308-313.
- [65] 郑兰香, 鞠兴华. 温度和 C/N 比对生物膜反硝化速率的影响[J]. 工业安全与环保, 2006, 32(10):13-15.
ZHENG Lan-xiang, JU Xing-hua. The effect of temperature and C/N ratio on biofilm denitrification rate [J]. *Industrial Safety and Environmental Protection*, 2006, 32(10):13-15.
- [66] Stanford G, Dzienia S, Vander Pol R A. Effect of temperature on denitrification rate in soils[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1975, 39(5):867-870.
- [67] Keeney D, Fillery I, Marx G. Effect of temperature on the gaseous nitrogen products of denitrification in a silt loam soil[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1979, 43(6):1124-1128.
- [68] Pfenning K, McMahon P. Effect of nitrate, organic carbon, and temperature on potential denitrification rates in nitrate-rich riverbed sediments[J]. *Journal of Hydrology*, 1997, 187(3):283-295.
- [69] Šimek M, Cooper J. The influence of soil pH on denitrification: Progress towards the understanding of this interaction over the last 50 years[J]. *European Journal of Soil Science*, 2002, 53(3):345-354.
- [70] 张可方, 杜 馨, 张朝升, 等. DO, C/N 对同步硝化反硝化影响的试验研究[J]. 环境科学与技术, 2007, 30(6):3-5.
ZHANG Ke-fang, DU Xin, ZHANG Zhao-sheng, et al. Research for the impact of DO and C/N on simultaneous nitrification and denitrification[J]. *Environmental Science & Technology*, 2007, 30(6):3-5.
- [71] 陈庆伟, 郑 涛, 李 玲. 反硝化过程中温室气体 N₂O 产生和积累的影响因素[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(19):11667-11668.
CHEN Qing-wei, ZHENG Tao, LI Ling. Influence factors of N₂O production and accumulation during denitrification[J]. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 2011, 39(19):11667-11668.
- [72] 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.

- [73] Körner H, Zumft W G. Expression of denitrification enzymes in response to the dissolved oxygen level and respiratory substrate in continuous culture of *Pseudomonas stutzeri*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55(7):1670-1676.
- [74] Rysgaard S, Risgaard-Petersen N, Sloth N P, et al. Oxygen regulation of nitrification and denitrification in sediments[J]. *Limnology and Oceanography*, 1994, 39(7):1643-1652.
- [75] Von Schulthess R, Wild D, Gujer W. Nitric and nitrous oxides from denitrifying activated sludge at low oxygen concentration[J]. *Water Science and Technology*, 1994, 30(6):123-132.
- [76] Weier K, MacRae I, Myers R. Denitrification in a clay soil under pasture and annual crop: Estimation of potential losses using intact soil cores[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1993, 25(8):991-997.
- [77] 颜晓元, 施书莲, 杜丽娟, 等. 水分状况对水田土壤 N_2O 排放的影响[J]. 土壤学报, 2000, 37(4):482-489.
- YAN Xiao-yuan, SHI Shu-lian, DU Li-juan, et al. N_2O emission from paddy soil as affected by water regime[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2000, 37(4):482-489.
- [78] 孙志高, 刘景双, 杨继松, 等. 三江平原典型小叶章湿地土壤硝化-反硝化作用与氧化亚氮排放[J]. 应用生态学报, 2007, 18(1):185-192.
- SUN Zhi-gao, LIU Jing-shuang, YANG Ji-song, et al. Nitrification-denitrification and N_2O emission of typical *Calamagrostis angustifolia* wetland soils in Sanjiang Plain[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2007, 18(1):185-192.
- [79] 李勇, 刘敏, 陆敏, 等. 崇明东滩芦苇湿地氧化亚氮排放[J]. 环境科学学报, 2010, 32(30):2526-2533.
- LI Yong, LIU Min, LU Min, et al. *Phragmites australis* effects on N_2O emission in the Chongming eastern tidal flat[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2010, 32(30):2526-2533.
- [80] 徐华, 邢光熹, 蔡祖聪, 等. 土壤质地对小麦和棉花田 N_2O 排放的影响[J]. 农业环境保护, 2000, 19(1):1-3.
- XU Hua, XING Guang-xi, CAI Zu-cong, et al. Effect of soil texture on N_2O emissions from winter wheat and cotton fields[J]. *Agro-Environmental Protection*, 2000, 19(1):1-3.
- [81] Sharma S, Szele Z, Schilling R, et al. Influence of freeze-thaw stress on the structure and function of microbial communities and denitrifying populations in soil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(3):2148-2154.
- [82] Magalhães C M, Machado A, Matos P, et al. Impact of copper on the diversity, abundance and transcription of nitrite and nitrous oxide reductase genes in an urban European estuary[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2011, 77(2):274-284.
- [83] 李建兵, 黄冠华. NaCl 对粉壤土氨挥发及硝化、反硝化的影响[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(4):945-948.
- LI Jian-bing, HUANG Guan-hua. Effect of NaCl on ammonia volatilization, nitrification and denitrification in silt loam soil[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, 25(4):945-948.

欢迎订阅 2014 年

农业环境科学学报

《农业环境科学学报》是由农业部主管,农业部环境保护科研监测所、中国农业生态环境保护协会主办的全国性学术期刊。本刊被评为中文核心期刊、中国科技核心期刊、中国科学引文数据库核心期刊、中国精品科技期刊、中国权威学术期刊、2012 中国国际影响力优秀学术期刊。被美国《化学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》和美国《剑桥科学文摘社网站》等多家国际检索系统收录。本刊主要刊登农业生态环境科学领域具有创新性的研究成果,包括新理论、新技术和新方法。读者对象为从事农业科学、环境科学、林业科学、生态学、医学和资源保护等领域的科技人员和院校师生。

《农业环境科学学报》为月刊,每月 20 日出版,大 16 开,208 页,每本定价 75.00 元,全年定价 900.00 元。国内外公开发行,全国各地邮局征订,邮发代号 6-64。如读者在当地邮局漏订,可通过邮局汇款至本刊编辑部补订。此外,编辑部存有 2010 年以前的各卷合订本,欢迎选购。

编辑部地址:天津市南开区复康路 31 号

电话:(022)23674336

电子信箱:caep@vip.163.com

邮编:300191

传真:(022)23674336

网址: <http://www.aes.org.cn>