

参与土壤氮素循环的微生物功能基因 多样性研究进展*

张晶^{1,2} 林先贵^{1,2} 尹睿^{1,2}

(1. 中国科学院南京土壤研究所土壤与农业可持续发展国家重点实验室 南京 210008;
2. 中国科学院南京土壤研究所-香港浸会大学土壤与环境联合开放实验室 南京 210008)

摘要 土壤氮素循环是生物地球化学循环的重要组成部分,不但影响着土壤生产力和可持续发展,还影响着全球环境变化。土壤微生物在土壤氮循环中发挥着不可替代的作用,参与了包括固氮作用、氨化作用、硝化作用和反硝化作用等重要生态过程。近十年中,分子生物学技术的发展为从功能基因角度研究与土壤氮循环密切相关的微生物功能群结构、组成和丰度的变化提供了新的契机。本文综述了参与土壤氮循环的微生物功能基因多样性研究进展,并展望了未来发展方向。

关键词 土壤氮循环 微生物 功能基因 分子生物学 全球环境变化

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-3990(2009)05-1029-06

Advances in functional gene diversity of microorganism in relation to soil nitrogen cycling

ZHANG Jing^{1,2}, LIN Xian-Gui^{1,2}, YIN Rui^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2. Joint Open Laboratory of Soil and the Environment, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences and Hongkong Baptist University, Nanjing 210008, China)

Abstract Soil nitrogen cycling is an important part of biogeochemical cycling. Not only does it influence soil productivity and durative development, but also influences global environmental changes. Terrestrial microorganisms play a vital role in soil nitrogen cycling. They participate in important ecological processes such as nitrogen fixation, ammonification, nitrification and denitrification. With the development of molecular biological technology in recent decades, it is possible to study microbial functional community composition, structure and abundance in relation to soil nitrogen cycling from the point of functional gene. In this paper, advances in functional gene diversity in relation to soil nitrogen cycling are reviewed and future areas of improvement identified.

Key words Soil nitrogen cycling, Microorganism, Functional gene, Molecular biology, Global environmental change

(Received Oct. 21, 2008; accepted Feb. 20, 2009)

土壤氮素生物地球化学循环是土壤物质循环的重要组成部分,不仅影响土壤质量以及农田等生态系统的生产力和可持续性,还会影响全球环境变化。所谓氮循环就是指 N_2 、无机氮化合物、有机氮化合物在自然界中相互转化过程的总称,包括氨化作用、硝化作用、反硝化作用、固氮作用等。土壤微生物在陆地生态系统中大量存在,广泛分布,在土壤氮循环中起着不可替代的作用,其中一些种类

将生物圈中以 N_2 形式存在的氮通过固定生成氨氮,并进一步将其同化成有机氮或转化成硝态氮,又通过反硝化作用将硝态氮转化为 N_2 或 NO 。近十年来,随着分子生物学技术的发展,应用先进的分子系统学、微阵列技术和功能基因组学技术发掘基因组进化和功能信息^[1,2],进而探索微生物功能基因多样性与土壤氮素循环之间的关系,成为重新评价土壤质量与功能的新切入点。

* 国家自然科学基金项目(40801091, 40771202)资助

张晶(1979~),女,助理研究员,主要从事土壤微生物分子生态学研究。E-mail: zhangjing79847984@hotmail.com

收稿日期: 2008-10-21 接受日期: 2009-02-20

1 土壤氮循环过程中的微生物功能群和功能基因

1.1 固氮作用中的微生物功能群和功能基因

固氮细菌种类丰富,包括固氮菌属(*Azotobacter*)、固氮螺菌(*Azospirillum*)、拜叶林克氏菌属(*Beijerinckia*)、着色菌属(*Chromotium*)、*Chstridium*、脱硫弧菌(*Desulfovibrio*)、克氏杆菌(*Klebsiella*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、红假单胞菌属(*Rhodopseudomonas*)、红螺菌属(*Rhodospirillum*)和硫杆菌属(*Thiobacillus*)。蓝细菌和放线菌中一些种类也可以固氮。固氮酶由两个多亚基的金属蛋白酶组成,成份包括 N_2 还原活性位置,由 250 k Da 蛋白构成,由 *nifD*, *nifK* 基因编码。成份是大约 70 k Da 的蛋白,将 ATP 水解与电子转移偶联,由 *nifH* 基因编码。Fe-S 中心在成份和亚基之间交错存在。*nifHDK* 操纵子的转录是固氮条件的良好指示物,它非组成型表达,由控制固氮的各因子调控表达。固氮酶多样性研究主要基于 *nifH* 基因的系统进化分析,这主要由于 *nifD*、*nifK* 基因序列相对较少,可能大大限制了系统进化比较分析的范围。目前, *nifH* 基因数据库快速扩增至 1 500 多个序列,其中很多来自环境样品,为发展 RT-PCR、DNA 微阵列和定量 PCR 提供了资源^[3]。

1.2 硝化作用中的微生物功能群和功能基因

硝化作用是地球氮循环的重要过程,造成生态系统的氮素流失、水体富营养化和大气活跃痕量气体的产生。参与硝化过程的微生物主要有氨氧化细菌(AOB)或古菌(AOA)及亚硝酸盐氧化菌(NO_B)。

AOB 是土壤氮循环的重要驱动者,主要包括亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)、亚硝化球菌属(*Nitrosococcus*)、亚硝化螺菌属(*Nitrospira*)、亚硝酸盐菌属(*Nitrosolobus*)和 *Nitrosovicia* 等。陆地生态系统中,已知的所有自养氨氧化细菌分别属于亚硝化单胞菌属和亚硝化球菌属,形成了 α -变形菌亚纲单源进化簇。由于氨氧化细菌很难分离培养,目前研究多基于微生物分子生态学的方法,通过靶定 16 S rRNA 或氨单加氧酶编码基因 *amoA* 探讨其在生态系统中的分布和丰度等^[4, 5]。最近发现土壤氨氧化细菌优势种群主要是亚硝化螺菌,而不是亚硝化单胞菌^[6]。氨单加氧酶(AMO)是氨氧化细菌的一个膜靠多亚基的酶类,负责将氨转化为羟胺, *amo* 操纵子主要包含 *amoC*、*amoA* 和 *amoB* 3 个基因。其中 *AmoA* 亚基 27~30 k Da, 被公认为酶的活性中心; *AmoB* 和 *AmoC* 亚基分别为 38~43 k Da 和 31.2~31.4 k Da。

已知的 NO_B 包括硝化杆菌属(*Nitrobacter*)、硝

化球菌属(*Nitrococcus*)、硝化刺菌属(*Nitrospina*)和硝化螺菌属(*Nitrospira*)。其中硝化杆菌是一个系统发生比较晚的类群,其基因组在该种属中比较保守,包括 *Nitrobacter hamburgensis*、*Nitrobacter vulgaris*、*Nitrobacter winogradskyi*、*Nitrobacter alkalicus* 等,这些菌株具有多个 *nxrA* 基因拷贝,且拷贝数和相似性有差异。硝化杆菌的亚硝酸盐氧化作用由亚硝酸盐氧化还原酶(NXR)介导。以具有催化活性的 *Nitrobacter hamburgensis* X14^T 为例,其 NXR 酶包括编码 *nxrA* 和 *nxrB* 两个亚基。*nxrX* 基因编码肽基 cis-trans 异构酶,可能协助 NXR 酶的折叠,位于 *nxrA* 和 *nxrB* 基因之间,即命名为 *nxrAXB* 基因簇^[7, 8]。

1.3 反硝化作用中的微生物功能群和功能基因

反硝化作用呼吸还原硝酸盐为气态产物,是土壤氮循环的重要组成部分。具体过程为: $NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$, 要求 4 个酶连续反应,包括硝酸盐还原酶、亚硝酸盐还原酶、NO 还原酶和 N_2O 还原酶^[9]。硝酸盐还原作用或被膜靠硝酸盐还原酶(NarG)催化,或被可溶性细胞质硝酸盐还原酶(NapA)催化。NarG 由 3 个亚基构成,即由 *narG* 基因编码的 α 亚基,由 *narH* 基因编码的可溶性 β 亚基,由 *narI* 基因编码的 γ 亚基。*narGHJI* 操纵子由两个结构域构成, α 和 β 亚基组成细胞质域, γ 亚基构成细胞膜域。NapA 由 *napA* 和 *napB* 基因编码的异源二聚体组成,包含亚钼嘌呤辅助因子和 4 个 Fe-S 簇具有催化活性的大亚基。一些细菌同时表达以上两种酶,从而拥有不同的生理作用^[10]。亚硝酸盐还原作用被含铜离子的亚硝酸盐还原酶(NirK)或含细胞色素 cd1 亚硝酸盐还原酶(NirS)所催化。从某种意义上说,反硝化作用是一个组合,细菌一般仅拥有其中的一部分路径^[9, 11]。

表 1 土壤氮循环中主要功能基因列表

Tab.1 Main functional genes in soil nitrogen cycling

基因名称 Gene appellation	编码蛋白质 Protein coded by gene	催化途径 Catalyse ap- proach	在氮循环中作用 Function in ni- trogen cycling
<i>nifH</i>	固氮酶铁蛋白	$N_2 \rightarrow NH_4^+$	固氮作用
<i>amoA</i>	氨单加氧酶	$NH_4^+ \rightarrow NO_2^-$	硝化作用
<i>nxrA</i>	亚硝酸盐氧化酶	$NO_2^- \rightarrow NO_3^-$	硝化作用
<i>narG</i>	膜靠硝酸盐还原酶	$NO_3^- \rightarrow NO_2^-$	反硝化作用
<i>napA</i>	可溶性细胞质硝酸盐还原酶	$NO_3^- \rightarrow NO_2^-$	反硝化作用
<i>nirK</i>	含铜离子的亚硝酸盐还原酶	$NO_2^- \rightarrow NO$	反硝化作用
<i>nirS</i>	含细胞色素 cd1 亚硝酸盐还原酶	$NO_2^- \rightarrow NO$	反硝化作用
<i>norB</i>	NO 还原酶	$NO \rightarrow N_2O$	反硝化作用
<i>nosZ</i>	N_2O 还原酶	$N_2O \rightarrow N_2$	反硝化作用

2 与氮循环相关的土壤微生物功能基因多样性研究进展

2.1 农田生态系统

农田生态系统中, 氮素输入途径主要包括大气氮沉降、化肥施用、生物固氮和秸秆还田等, 氮素输出途径为淋失、氨挥发以及农作物的输出和硝化反硝化作用中氮的损失。与传统的土壤化学法对氨态氮、硝态氮、氧化亚氮含量的研究相比, 现代分子生态学方法以微生物功能群数量和结构为指示, 靶定功能基因, 深入探讨氮素输入输出过程对土壤中参与氮循环的微生物功能群的影响。

施肥是农业管理的最重要措施之一, 也是氮源输入的主要方式。随着农田施肥量不断增加, 土壤氮素富集, 造成环境污染和土壤生物群落结构改变^[12]。在密集性农田土壤中, 短期铵肥施用初期可显著提高硝化作用活性, 刺激氨氧化细菌群落数量增加, 在后期群落数量趋于稳定, 这种效应不受 NH_4^+ 浓度差异的影响。而长期铵肥施用过程中, 氨氧化细菌群落数量也随着肥料的施用显著上升, 群落结构未发生显著变化。中等和高 NH_4^+ 浓度增加了土壤 N_2O 的释放速率, 促进土壤反硝化群落发生转换, 这可能是由于硝化作用增加了氧化态氮的供应所致^[13-16]。Coelho等^[17]发现, 氮肥水平是影响高粱根际土壤固氮细菌群落结构的重要环境因子, *Azohydromonas*、*Ideonella*、*Rhizobium etli*、*Bradyrhizobium* 在高、低氮水平土壤中都可检测到, 而*Delftia tsuruhatensis* 仅在高氮水平土壤根际存在, *Methylocystis* 则为低氮水平土壤根际的特征类群。不仅氮肥用量, 氮肥种类也一定程度影响土壤硝化和反硝化细菌种群结构和数量。与不同无机肥组合相比, 有机肥显著刺激了土壤氨氧化细菌数量的增加和群落组成的改变^[18,19]。Enwall等^[20]发现施有机肥土壤的反硝化速率高于施无机肥的反硝化速率, 但反硝化细菌群落组成无明显差异性。而Wolsing等^[21]基于*nirK*基因研究发现施有机肥和无机肥土壤反硝化细菌群落结构显著不同。Shen等^[22]发现长期施用不同氮肥组合增加了土壤硝化速率, 显著影响土壤氨氧化细菌的种群结构和丰度, 而对氨氧化古细菌影响较小。作物根茬以及还田秸秆归还的氮也是土壤有机质的重要来源, 提高了土壤*nifH*基因和*napA*基因丰度^[23]。而其他元素的添加(例如硼和氯化钠)也会间接影响土壤氮循环, 对土壤硝化作用无显著影响, 但提高了土壤固氮细菌丰度^[24]。同时, 植物类型也是影响土壤氮循环一个不可忽视的因子^[25-29]。

土壤杀虫处理在农田生态系统被广泛应用, 其对土传病原细菌、真菌、线虫性寄生虫以及杂草和昆虫等都有良好的杀灭效果。但高强度施用改变土壤环境的同时, 也很大程度上影响了土壤微生物功能群^[30]。研究表明, 施用初期, 甲基溴等蒸汽式杀虫剂会诱导群落活动和数量的显著降低, 改变群落结构, 其中对硝化细菌影响最大; 施用15~60 d后, 与对照相比, 硝化和反硝化细菌基因丰度略有提高, 但土壤微生物群落结构发生很大变化; 施用62 d后, 土壤底物诱导呼吸和反硝化活性并未完全恢复, 几乎检测不到硝化活性^[31]。

丛枝菌根真菌在农田土壤养分循环中具有潜在的重要性, 它增加了植物获取有机和无机氮的能力, 而氨氧化细菌和丛枝菌根真菌的相互作用在土壤氮循环中可能起到意想不到的效果, 氨氧化细菌控制着从 NH_4^+ 到 NO_2^- 硝化作用的速率, 丛枝菌根真菌通过降低根区pH值增加氮的矿化速率, 一定程度改变了植物根区的氨氧化细菌种群组成, 亚硝酸螺旋菌*Nitrosolobus tenuis*和*Nitrosolobus tenuis*是其优势类群^[32]。

2.2 林地生态系统

林地生态系统的氮循环受植被类型^[33]、小气候^[34]、温度^[35,36]、氮沉降、凋落物归还和干扰(火灾)等诸多因素限制。欧洲氮饱和项目认为其森林氮饱和和临界负荷的最小值为 $10 \text{ kg(N)} \cdot \text{hm}^{-2} \cdot \text{a}^{-1}$, 但目前中欧森林大气氮输入为 $25\sim 60 \text{ kg(N)} \cdot \text{hm}^{-2} \cdot \text{a}^{-1}$, 大大超过了森林的年需要量。在北美, 某些森林地区大气氮沉降量也达到 $40 \text{ kg(N)} \cdot \text{hm}^{-2} \cdot \text{a}^{-1}$ 。过剩的氮沉降增加 NH_4^+ 和 NO_3^- 的淋失, 加速了土壤酸化。酸性土壤属于氮饱和类型, 不同程度改变了氮矿化、硝化和硝酸盐淋失的速率。高氮负荷造成土壤硝化速率增加, 自养氨氧化细菌群落代谢活性降低^[37]。Mergel等^[38]靶定*nifH*、*narG*、*nirK*和*nosZ*基因, 研究了德国科隆附近酸性林地土壤固氮和反硝化细菌种群, 发现微生物功能群数量在0~5 cm土层最高, 并随深度增加而降低, 且各土层硝酸盐浓度较高, 但对土壤中固氮和反硝化细菌的分布无影响。在挪威云杉林酸性土壤也有类似发现, 微生物功能群呈现季节性波动, 秋冬春季数量最高, 夏季数量较低, 施铵肥并不引起以上微生物功能群结构的改变^[39]。Rösch等^[40]发现橡树和铁树混交林酸性土壤固氮细菌丰度较低, 而反硝化细菌多样性较丰富。

Yeager等^[41]发现, 混交针叶林土壤固氮细菌和氨氧化细菌受燃烧影响较大, 野火后土壤微生物生物量和以上两种微生物数量占土壤微生物总数的比例降低, 固氮细菌优势种群的数量在火烧后有所增加,

其中梭菌(*Clostridium*)和类芽孢杆菌(*Paenibacillus*)在火烧土壤中丰度较高。亚硝化螺菌属类群进化簇 1,2,4 在未火烧土壤氨氧化细菌中占有绝对优势(80%~90%), 而亚硝化螺菌属进化簇 3a 在火烧土壤氨氧化细菌中占有一定优势(65%~95%)。

地点和植被转换也一定程度影响林地土壤氮循环过程。在美国俄勒冈州, 红桉木和道格拉斯冷杉是当地的主要树种, Boyle 等^[42]基于安德鲁斯林地的氮矿化量和总硝化率较低, 塞勒姆林地的较高进行了一系列试验, 发现红桉木的硝化潜能显著高于道格拉斯冷杉, 而从地点来看, 塞勒姆林地土壤的硝化潜能显著大于安德鲁斯林地, 氨氧化细菌的 *amoA* 在两地均有发现, 而古细菌 *amoA* 仅能在塞勒姆林地检测到, 氨氧化细菌序列与亚硝化螺菌属进化簇 1,2,4 密切相关。在安德鲁斯林地到草地的过渡带, 草地的硝化和反硝化潜能显著大于林地, 硝化和反硝化细菌群落发生转换, 亚硝化螺菌进化簇 4 是土壤硝化细菌的优势类群, 根瘤菌是该地反硝化细菌的优势类群^[43-45]。

2.3 草地生态系统

草地生态系统中, 土壤中氮绝大部分为有机结合态(99.5%), 无机形态氮仅占全氮的 0.5%左右, 维持在很低水平。在植物生长过程中, 有机氮化合物在土壤微生物作用下, 分解释放出植物可吸收利用的多种形态氮素(硝态氮、铵态氮和各种氨基酸等), 食草动物通过采食植物和向土壤归还有效性高的营养物质(粪和尿)。因此, 氮肥施加、放牧收割以及水热因子等是影响草地生态系统氮循环正常运转的主要原因。

高水平的氮输入对草地生态系统的植物多样性有负面影响, 在降低植物种群多样性分布的同时, 也间接影响了土壤微生物对氮素的周转^[46]。研究发现, 硝酸盐浓度的短期波动对硝酸盐还原菌结构未造成剧烈变化, 暗示该功能群对硝酸盐具有较高抗性, 硝酸盐浓度下降和 pH 值上升说明硝酸盐还原菌代谢活跃^[47]。施氮肥降低了 β -变形菌亚纲氨氧化细菌的异质性和多样性。其中, 未施加氮肥处理中氨氧化细菌多样性更丰富, 优势种群为亚硝化螺菌进化簇 1,3 和亚硝化单胞菌进化簇 7, 而施加氮肥处理则为亚硝化螺菌进化簇 3 和亚硝化单胞菌进化簇 7^[48]。

放牧和收割等管理措施也影响了土壤氮的矿化-固定过程, 增加了土壤氮的矿化速率和植物的吸氮量。过度放牧则会导致草场大面积退化, 典型草原被野草类植物所代替, 一定程度上影响着草地土壤微生物群落。Patra 等^[49]发现这些管理措施显著影

响着土壤真细菌、固氮细菌、硝酸盐还原细菌和氨氧化细菌 4 个种群的种群结构, 其中植物种类显著影响硝酸盐还原细菌种群结构, 而对土壤真细菌、氨氧化细菌有较弱或中等程度影响, 对固氮细菌种群遗传结构无明显影响。

温度也是影响草地硝化作用的重要环境因子之一。Avrahami 等^[50]通过 *amoA* 基因的变性凝胶梯度电泳指纹图谱分析, 发现酸性草地土壤在 30 以下可检测到亚硝化螺菌进化簇 1, 且 25 时亚硝化螺菌进化簇 4 为优势类群, 30 时亚硝化螺菌进化簇 3a、3b 和 9 为优势类群。而碱性草地土壤仅在亚硝化螺菌进化簇 3a 内发生群落结构演替。Sharma 等^[51]发现冬、夏季土壤反复冻融造成 N_2O 排放载荷每年增加 20%~70%, N_2O 在土壤融化第 5 d 达到峰值, 土壤细菌和真菌群落结构发生了显著转换, 与反硝化过程密切相关的 *napA* 和 *nirS* 基因在融化初期表达水平增加, 随后表达水平逐渐降低。cDNA-DGGE 指纹图谱显示反硝化细菌存在明显的群落演替现象。

3 展望

与土壤其他元素循环相比, 氮素循环更受到各国研究者的广泛关注。其原因主要在于: 首先, 氮既是植物必需的营养元素, 又是造成环境污染的重要元素。其次, 对参与氮循环各重要生态过程的微生物功能类群的了解比较清晰, 而编码特定功能酶的功能基因不断成功破译, 极大地促进了与氮循环密切相关的微生物生态学领域向纵深发展。

目前, 对氮循环特定关键过程功能基因受环境因子影响的研究较多, 而全面系统研究环境因子如何连锁性影响氮循环不同代谢过程的微生物种群的研究很少, 例如, 我们不仅关注不同类型肥料施加对土壤硝化作用中 *amoA* 基因型和丰度的变化, 还关注其对土壤反硝化作用中 *nirS*、*nirK* 和 *nosZ* 等基因类型和丰度的变化。气候等环境变化对土壤氮循环的影响逐渐受到关注。在下个世纪, 北极圈大气温度升高效应越来越显著, 这种生态效应一方面通过改变植物群落组成方式提高了植物群落的生产力, 另一方面也间接影响了土壤养分循环, 微生物功能基因数据与土壤养分数据结合, 将大大促进这一过程更深层次阐述^[52]。

总之, 在生物化学和生物信息学发展基础上, 解析参与氮循环不同代谢过程的功能酶与功能基因, 完善相应引物设计, 有助于从微生物功能基因多样性角度深入研究土壤氮循环过程及其影响机制。

参考文献

- [1] Yergeau E., Kang S., He Z. L., *et al.* Functional microarray analysis of nitrogen and carbon cycling genes across an Antarctic latitudinal transect[J]. *The ISME Journal*, 2007, 1: 163–179
- [2] Philippot L., Germon J. C. Contribution of bacteria to initial input and cycling of nitrogen in soils[M]. *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*. Berlin: Springer-Verlag, 2005: 159–172
- [3] Zehr J. P., Jenkins B. D., Short S. M., *et al.* Nitrogenase gene diversity and microbial community structure a cross-system comparison[J]. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(7): 539–554
- [4] Kowalchuk G. A., Stienstra A. W., Heilig G. H., *et al.* Molecular analysis of ammonia-oxidising bacteria in soil of successional grasslands of the Drentsche (The Netherlands) [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, 31: 207–215
- [5] Norton J. M., Alzerreca J. J., Suwa Y. C., *et al.* Diversity of ammonia monooxygenase operon in autotrophic ammonia-oxidizing bacteria[J]. *Arch. Microbiol.*, 2002, 177: 139–149
- [6] Bartosch S., Hartwig C., Spieck E., *et al.* Immunological detection of Nitrospira-like bacteria in various soils[J]. *Microbial Ecology*, 2002, 43: 26–33
- [7] Wertz S., Poly F., Roux X. L., *et al.* Development and application of a PCR-denaturing gradient gel electrophoresis tool to study the diversity of *Nitrobacter*-like *nxrA* sequences in soil[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 63 (2): 261–271
- [8] Poly F., Wertz S., Brothier E., *et al.* First exploration of *Nitrobacter* diversity in soils by a PCR cloning-sequencing approach targeting functional gene *nxrA*[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 63: 132–140
- [9] Philippot L. Denitrifying genes in bacterial and archaeal genomes[J]. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, 1577: 355–376
- [10] Richardson D. J., Berks B. C., Russell D. A., *et al.* Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases[J]. *Cell Mol. Life Sci.*, 2002, 58: 165–178
- [11] Gregory L. G., Bond P. L., Richardson D. J., *et al.* Characterization of a nitrate-respiring bacterial community using the nitrate reductase gene (*narG*) as a functional marker[J]. *Microbiology*, 2003, 149: 229–237
- [12] Rich J. J., Myrold D. D. Community composition and activities of denitrifying bacteria from adjacent agricultural soil, riparian soil, and creek sediment in Oregon, USA[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2004, 36: 1431–1441
- [13] Avrahami S., Conrad R., Braker G. Effect of soil ammonium concentration on N₂O release and on the community structure of ammonia oxidizers and denitrifiers [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 68(11): 5685–5692
- [14] Okano Y., Hristova K. R., Leutenegger C. M., *et al.* Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, 70(2): 1008–1016
- [15] Oved T., Shaviv A., Goldrath T., *et al.* Influence of effluent irrigation on community composition and function of ammonia-oxidizing bacteria in soil[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67(8): 3426–3433
- [16] Cavagnano T. R., Jackson L. E., Hristova K., *et al.* Short-term population dynamics of ammonia oxidizing bacteria in an agricultural soil[J]. *Applied Soil Ecology*, 2008, 40(1): 13–18
- [17] Coelho M. R., de Vos M., Carneiro N. P., *et al.* Diversity of *nifH* gene pools in the rhizosphere of two cultivars of sorghum (*Sorghum bicolor*) treated with contrasting levels of nitrogen fertilizer[J]. *FEMS Microbiology Letter*, 2008, 279(1): 15–22
- [18] Chu H. Y., Fujii T., Morimoto S., *et al.* Population size and specific nitrification potential of soil ammonia-oxidizing bacteria under long-term fertilizer management[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2008, 40(7): 1960–1963
- [19] Chu H. Y., Fujii T., Morimoto S., *et al.* Community structure of ammonia-oxidizing bacteria under long-term application of mineral fertilizer and organic manure in a sandy loam soil[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, 73: 485–491
- [20] Enwall K., Philippot L., Hallin S. Activity and composition of the denitrifying bacterial community respond differently to long-term fertilization[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, 71(12): 8335–8343
- [21] Wolsing M., Prieme A. Observation of high seasonal variation in community structure of denitrifying bacteria in arable soil receiving artificial fertilizer and cattle manure by determining T-RFLP of *nir* gene fragments[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 48: 261–271
- [22] Shen J. P., Zhang L. M., Zhu Y. G., *et al.* Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(6): 1601–1611
- [23] Wakelin S. A., Colloff M. J., Harvey P. R., *et al.* The effects of stubble retention and nitrogen application on soil microbial community structure and functional gene abundance under irrigated maize[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 59: 661–670
- [24] Nelson D. R., Mele P. M. Subtle changes in rhizosphere microbial community structure in response to increased boron and sodium chloride concentrations[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2007, 39: 340–351
- [25] Mounier E., Hallet S., Cheneby D., *et al.* Influence of maize mucilage on the diversity and activity of the denitrifying community[J]. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(3): 301–312
- [26] Philippot L., Piutti S., Martin-Laurent M., *et al.* Molecular analysis of nitrate reducing community from unplanted and maize-planted soils[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 68(12): 6121–6128
- [27] Roesch L. F. W., Olivares F. L., Passaglia L. M. P., *et al.* Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: Effect of plant genotype onto geny and nitrogen supply[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2006, 22: 967–974

- [28] Bremer C., Braker G., Matthies D., *et al.* Impact of plant functional group, plant species, and sampling time on the composition of *nirK*-type denitrifier communities in soil[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, 73(21): 6876–6884
- [29] Tan Z. Y., Hurek T., Reinhold-Hurek B. Effect of N- fertilization, plant genotype and environmental conditions on *nifH* gene pools in roots of rice[J]. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(10): 1009–1015
- [30] Colloff M. J., Wakelin S. A., Gomez D., *et al.* Detection of nitrogen cycle genes in soils for measuring the effects of changes in land use and management[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2008, 40: 1637–1645
- [31] Roux-Michollet D., Czarnes S., Adam B., *et al.* Effects of steam disinfection on community structure abundance and activity of heterotrophic denitrifying and nitrifying bacteria in an organic farming soil[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2008, 40: 1836–1845
- [32] Cavagnaro T. R., Jackson L. E., Scow K. M., *et al.* Effect of arbuscular mycorrhizas on ammonia oxidizing bacteria in an organic farm soil[J]. *Microbial. Ecology*, 2007, 54: 618–626
- [33] Nugroho R. A., Roling W. F. M., Laverman A. M., *et al.* Presence of *Nitrosospira* cluster 2 bacteria corresponds to N transformation rates in nine acid Scots pine forest soil[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 53: 473–481
- [34] Mintie A. T., Heichen R. S., Cromack K., *et al.* Ammonia-oxidizing bacteria along meadow-to-forest transects in the Oregon cascade mountains[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69(6): 3129–3136
- [35] Avrahami S., Conrad R. Cold-temperature climate: A factor for selection of ammonia oxidizers in upland soil? [J]. *Can. J. Microbiol.*, 2005, 51: 709–714
- [36] Avrahami S., Liesack W., Conrad R. Effects of temperature and fertilizer on activity and community structure of soil ammonia oxidizers[J]. *Environmental Microbiology*, 2003, 5: 691–705
- [37] Jordan F. L., Cantera J. L., Fenn M. E., *et al.* Autotrophic ammonia-oxidizing bacteria contribute minimally to nitrification in a nitrogen-impacted forested ecosystem[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, 71(1): 197–206
- [38] 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: 33–42
- [39] Mergel A., Kloos K., Bothe H. Seasonal fluctuations in the population of denitrifying and N₂-fixing bacteria in an acid soil of a Norway spruce forest[J]. *Plant and Soil*, 2001, 230: 145–160
- [40] Rösch C., Mergel A., Bothe H. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 68(8): 3818–3829
- [41] Yeager C. M., Northup D. E., Grow C. C., *et al.* Changes in nitrogen-fixing and ammonia-oxidizing bacterial communities in soil of a mixed conifer forest after wildfire[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, 71(5): 2713–2722
- [42] Boyle S. A., Bottomley P. J., Myrold D. D. Community composition of ammonia oxidizing bacteria and archaea in soils under stands of red alder and Douglas fir in Oregon[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11): 2956–2965
- [43] Boyle S. A., Rich J. J., Bottomley P. J., *et al.* Reciprocal transfer effects on denitrifying community composition and activity at forest and meadow sites in the Cascade mountains of Oregon[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2006, 38: 870–878
- [44] Bottomley P. J., Taylor A. E., Boyle S. A., *et al.* Responses of nitrification and ammonia-oxidizing bacteria to reciprocal transfers of soil between adjacent coniferous forest and meadow vegetation in the Cascade mountains of Oregon[J]. *Microbial Ecology*, 2004, 48: 500–508
- [45] Rich Heichen R. S., Bottomley P. J. Community composition and functioning of denitrifying bacteria from adjacent meadow and forest soils[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69(10): 5974–5982
- [46] Wang G., Skipper H. D. Identification of denitrifying rhizobacteria from bentgrass and bermudagrass golf greens[J]. *Journal Applied Microbiology*, 2004, 97: 827–837
- [47] Deiglmayr K., Philippot L., Kandeler E. Functional stability of the nitrate-reducing community in grassland soils towards high nitrate supply[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2006, 38: 2980–2984
- [48] Webster G., Embley T. M., Prosser J. I. Grassland management regimens reduce small-scale heterogeneity and species diversity of β -proteobacterial ammonia oxidizer populations[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 68(1): 20–30
- [49] Patra A. K., Abbadie L., Clays-Josserand A., *et al.* Effects of management regime and plant species on the enzyme activity and genetic structure of N-fixing, denitrifying and nitrifying bacterial communities in grassland soils[J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(6): 1005–1016
- [50] Avrahami S., Conrad R. Patterns of community changes among ammonia oxidizing in meadow soils upon long-term incubation[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69(10): 6152–6164
- [51] 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]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, 72(3): 2148–2154
- [52] Walker J. K., Egger K. N., Henry G. H. Long-term experimental warming alters nitrogen cycling communities but site factors remain the primary drivers of community structure in high arctic tundra soils[J]. *ISME J.*, 2008, 2(9): 982–995