

基于 KEGG 的碳固定和氮代谢通路土壤微生物组筛选

王小利 王淑兰

(西北农林科技大学农学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 利用宏基因组测序技术,以 KEGG 数据库的碳固定、氮代谢途径为工具,以陕西渭北旱塬小麦连作粮田长期定位 3 种施肥方式的土壤为研究对象,对影响该地区农田生态系统中碳固定和氮代谢通路的主要微生物物种及功能基因进行分析。结果表明:3 个施肥水平下土壤微生物在 KEGG 数据库代谢通路的基因 PcoA 分析显示,常规施肥土壤功能基因丰度与平衡施肥处理的关系密切,而与低量施肥处理关系较远。施肥明显改变了碳固定、氮代谢的功能基因丰度,常规施肥和平衡施肥的主要功能基因相对丰度均大于低量施肥;在碳固定途径中常规施肥主要功能基因相对丰度大于平衡施肥,在氮代谢途径中平衡施肥主要功能基因相对丰度大于常规施肥。*Sorangium*、*Spiribacter*、*Lentzea*、*Rhodovibrio*、*Pseudomonas*、*Flaviumibacter*、*Streptomyces*、*Nitrososphaera*、*Rubrobacter*、*Dyadobacter*、*Novosphingobium*、*Pedospaera*、*Thermogemmatispora* 为该地区小麦连作土壤碳固定途径标记性微生物种群;E4. 2. 1. 2A. fumA. fumB、E2. 3. 1. 9. atoB、mdh、ACSS. acs、korB. oorB. oforB、pps. ppsA、ppdK、sdhA. frdA、K18594、K18604、E4. 2. 1. 2B. fumC、folD、ppc、accA 为施肥水平产生明显响应的碳固定功能基因。*Sphingopyxis*、*Alcanivorax*、*Nitrosospira*、*Aeromicrobium*、*Roseiflexus*、*Devosia*、*Altererythrobacter* 为该地区小麦连作土壤氮代谢的主要物种;nirB、nasA、nasB、nrtP. nak. nrtP. nasA、GDH2 为施肥水平产生明显响应的氮代谢主要功能基因。平衡施肥更有益于节肥减排和土壤的可持续利用,是适合该地区小麦连作粮田的施肥方式。

关键词: 土壤微生物; 施肥; KEGG; 碳固定途径; 氮代谢途径

中图分类号: S154. 36 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2020)08-0303-08 OSID: 

Soil Microbiome Screening for Carbon Fixation and Nitrogen Metabolism Pathways Based on KEGG Database

WANG Xiaoli WANG Shulan

(College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling, Shannxi 712100, China)

Abstract: Using metagenome sequencing technology and fixed carbon and nitrogen metabolism in KEGG database as a research tool, taking wheat continuous cropping grain long-term positioning of three methods for fertilizing soil in Shaanxi Weihe Hanyuan as the research object, the influence of microbes in the farmland ecosystem in the region of fixed carbon and nitrogen metabolism pathway of main microbial species and functional genes were analyzed, and the results were as follows: PcoA analysis of metabolic pathways of soil microorganisms at KEGG database Level 3 at three fertilization levels showed that the abundance of functional genes in soil under conventional fertilization was closely related to the balanced fertilization treatment, but it was far from that under low fertilization. Fertilization significantly changed the functional gene abundance of carbon fixation and nitrogen metabolism, and the main functional genes of conventional fertilization and balanced fertilization were larger than that of low-dose fertilization. In the carbon fixation pathway, the abundance of main functional genes in the conventional fertilization was greater than that in the balanced fertilization, and in the nitrogen metabolism pathway, the abundance of the main functional genes in the balanced fertilization was greater than that in the conventional fertilization. *Sorangium*, *Spiribacter*, *Lentzea*, *Rhodovibrio*, *Pseudomonas*, *Flaviumibacter*, *Streptomyces*, *Nitrososphaera*, *Rubrobacter*, *Dyadobacter*, *Novosphingobium*, *Pedospaera*, *Thermogemmatispora* were population of soil carbon fixation pathway marker microorganisms in this

region. E4. 2. 1. 2A. fumA. fumB, E2. 3. 1. 9. atoB, mdh, ACSS. acs, korB. oorB. oforB, pps. ppsA, ppdK, sdhA. frdA, K18594, K18604, E4. 2. 1. 2 B. fumC, folD, ppc and accA produced significant responses to carbon fixation function genes for fertilization level. *Sphingopyxis*, *Alcanivorax*, *Nitrosospira*, *Aeromicrobium*, *Roseiflexus*, *Devosia*, *Altererythrobacter* were major species of nitrogen metabolism. nirB, nasA, nasB, nrt. nak. nrtP. nasA and GDH2 were the main functional genes of nitrogen metabolism in this region. Balanced fertilization was more beneficial to fertilizer saving and emission reduction and sustainable use of soil, which was the fertilization level suitable for continuous wheat field in this region.

Key words: soil microorganism; fertilization; KEGG; carbon fixation pathway; nitrogen metabolism pathway

0 引言

施肥、耕作和秸秆还田是影响土壤微生物数量、群落结构及其功能的主要农业措施,也是实现农田可持续生产的有效措施^[1-3]。渭北旱塬地处我国北方半湿润易旱和偏旱气候区,耕地面积 75% 以上为旱作粮田,长期实行“小麦-夏闲”耕作制。根据陕西省农业厅对旱作冬小麦和春玉米平衡施肥推荐方案与渭北旱作高产冬小麦和春玉米常规施肥调查结果,从 2007 年开始本课题组在渭北旱塬开展了秸秆还田条件下小麦连作粮田的长期定位施肥试验,设立了常规施肥(SC)、平衡施肥(SB)和低量施肥(SL)3 种施肥方式,改进和完善了旱作粮田作物栽培和土壤耕作机制,在蓄水保墒、水土保持、抗旱增产、有机碳积累、微生物多样性等方面进行了一系列研究^[4-7]。但针对长期秸秆还田条件下旱地小麦连作粮田在不同施肥水平下土壤微生物功能的响应机制研究还处于起步阶段。碳固定、氮代谢是农田生态系统中微生物最活跃的 2 个能量代谢途径,研究表明,化肥会影响秸秆的分解及土壤碳和氮的转化过程^[8-10]。因此,利用长期定位试验注释小麦连作粮田土壤碳、氮代谢微生物的功能基因对长期施肥的响应,对探究碳固定、氮代谢通路的分子机制和旱地粮田固碳减排机理具有重要意义。

微生物宏基因组学是由大规模海量测序转向功能导向的微生物组学研究,基于大规模宏基因组鸟枪法测序和宏基因组序列拼接,并通过与已知基因序列数据库相似性的比对进行微生物分类和功能的注释^[11-12]。在 KEGG 数据库,将行使相同功能的基因聚在一起,称为 KEGG ortholog groups (KO),每个 KO 包含多个基因信息,并在一至多个代谢通路中发挥作用,能够大幅减小测序数据量以及数据分析的工作量,且可用来直接鉴定农田生态系统的特定代谢途径微生物群落的基因数量^[13-15]。本文利用宏基因组测序技术,以 KEGG 数据库碳固定、氮代谢 2 个能量代谢途径 (map00720, map00910) 为研究工具,以陕西渭北旱塬小麦连作粮田深松和秸秆还

田的长期定位试验为基础,以常规施肥(SC)、平衡施肥(SB)和低量施肥(SL)3 种施肥土壤为研究对象,对影响其农田生态系统中碳固定、氮代谢相关的物种及功能基因进行筛选,分析微生物物种与功能的关系及其对长期施肥的响应,为探讨该地区小麦粮田土壤微生物的碳固定、氮代谢机理及区域粮田可持续发展提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验设计

陕西省合阳县甘井镇西北农林科技大学旱农试验站(35°19′54.45″N, 110°5′58.35″E)位于渭北旱塬东部,海拔 877 m,属典型的黄土高原沟壑区,暖温带半干旱型大陆性季风气候,多年平均降雨量为 536.6 mm,主要集中在 7—9 月。土壤为黑垆土。

长期定位施肥和耕作试验于 2007 年 9 月—2016 年 6 月实施,品种为长旱 58。试验小区有 3 个,每个小区面积 110 m² (22 m × 5 m)。前茬小麦收获时秸秆高留茬 20 ~ 30 cm 覆盖地表,每间隔 40 ~ 60 cm 宽度留茬深松 35 ~ 40 cm,夏闲期喷施除草剂防除杂草。在休闲期满后作物播种时,采用 3 种施肥方式:①平衡施肥(SB):N 施肥量 150 kg/hm², P₂O₅施肥量 120 kg/hm², K₂O 施肥量 90 kg/hm²。②常规施肥(SC):N 施肥量 255 kg/hm², P₂O₅施肥量 90 kg/hm²。③低量施肥(SL):N 施肥量 75 kg/hm², P₂O₅施肥量 60 kg/hm², K₂O 施肥量 45 kg/hm²。氮、磷、钾肥分别以尿素、磷酸二铵和硫酸钾的形式定位施入。田间管理按照本地高产田措施进行良好管理。在 2016 年 6 月小麦收获后采集 10 ~ 20 cm 表层土壤样品,每个小区 3 个重复,每个重复选 3 个点采样混合过筛,于田间放入液氮罐中,到室内保存于 -80℃ 超低温冰箱中,用于土壤微生物宏基因组测序。2007—2016 年各处理平均小麦产量:低量施肥为 3 405.7 kg/hm²,常规施肥为 3 953.2 kg/hm²,平衡施肥 4 194.7 kg/hm²。2016 年 6 月小麦收获后 10 ~ 20 cm 土层养分情况如表 1 所示。

表 1 10 ~ 20 cm 土层养分情况

Tab. 1 Nutrient status of 10 ~ 20 cm soil layer

施肥 方式	有机质质量比/ (g·kg ⁻¹)	总氮质量比/ (g·kg ⁻¹)	有效氮质量比/ (mg·kg ⁻¹)	总磷质量比/ (g·kg ⁻¹)	有效磷质量比/ (mg·kg ⁻¹)	总钾质量比/ (g·kg ⁻¹)	有效钾质量比/ (mg·kg ⁻¹)
SB	15.66	0.89	13.66	0.77	13.840	10.73	234.90
SL	13.22	0.70	7.97	0.67	9.627	11.13	210.10
SC	15.66	0.90	22.91	0.81	22.640	11.15	218.11

1.2 DNA 提取、文库构建及测序

采用 CTAB 法对样本的基因组 DNA 进行提取，琼脂糖凝胶电泳分析 DNA 的纯度和完整性；检测合格的 DNA 样品用超声波破碎仪随机打断成长度约为 350 bp 的片段，经末端修复、加 A 尾、加测序接头、纯化、PCR（聚合酶链式反应）扩增等步骤完成整个文库制备。库检合格后，把不同文库按照有效浓度混合后进行 Illumina HiSeq 测序^[16-19]。

1.3 信息分析

1.3.1 数据质控

首先对原始数据进行质控及宿主过滤，然后进行宏基因组（metagenome）组装，并采用 MetaGeneMark 软件进行基因预测，构建基因目录，获得各样品中的丰度信息^[16-17]。

1.3.2 物种及功能基因注释

从基因目录出发，与 MicroNR 库进行比对，获得每个基因的物种注释信息，并结合基因丰度，获得不同分类层级的物种丰度；从基因目录出发，进行碳固定、氮代谢通路（map00720、map00910）的功能注释和丰度分析^[18-19]。

1.3.3 代谢通路分析

基于功能丰度，进行丰度聚类分析，对代谢通路进行比较分析，分析处理之间的功能组成差异及其与物种的相关性^[20-23]。

2 结果与分析

2.1 土壤微生物功能基因比较分析

质控后总测序数据量为 124 651.25 Mbp，组装得到 4 250 132 693 bp 的 Scaffolds，预测得到 7 682 452 条 ORFs，经去冗余后得到 4 588 922 条 ORFs。其中有 1 344 013（29.29%）个基因能够比对上 KEGG 数据库，有 706 049（15.39%）个基因能够比对上数据库中的 5 734 个 KEGG KO。对 3 个施肥水平土壤微生物 KEGG 数据库第 3 水平的所有代谢通路的功能基因进行 PcoA 分析（主坐标分析），基于功能基因丰度表得到 Bray - Curtis 距离矩阵，样品距离越接近，表示功能基因组组成越相似，功能基因结构相似度高的样品倾向于聚集在一起，功能基因差异大的样品则会远远分开。从图 1 可以看出施

肥对 KEGG 数据库检测到的代谢通路有明显的影
响，表现为 SC 与 SB 的土壤功能基因组相似度高，而与 SL 相似度较低。

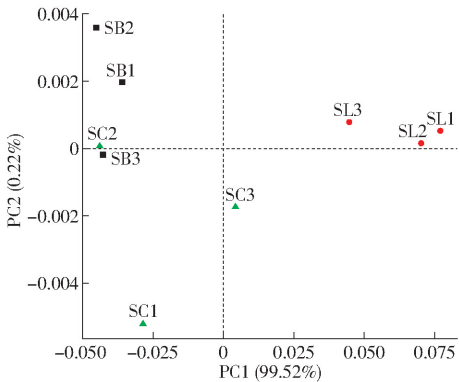


图 1 KEGG 第 3 水平的 PcoA 分析

Fig. 1 PcoA analysis at Level 3

2.2 碳固定途径功能基因分析

2.2.1 施肥方式对碳固定途径功能基因的影响

通过与 KEGG 途径中的碳固定通路比对，发现检测到功能基因 48 个，而且 3 种施肥方式土壤检测到的功能基因相同（图 2 红色框内表示 3 种施肥方式检测到的基因）。

通过 3 种施肥方式的碳固定途径的主要功能基因（丰度排名前十）比较（图 3）发现，SC（相对丰度累加值为 1.65×10^{-3} ）的主要功能基因相对丰度累加大于 SB（ 1.55×10^{-3} ），SB 的主要功能基因相对丰度累加大于 SL（ 1.10×10^{-3} ），说明施肥明显改变了碳固定的主要功能基因丰度。

2.2.2 碳固定途径物种与功能基因相关分析

通过基因目录与 MicroNR 库比对，利用属水平的物种与碳固定途径的主要基因进行相关分析，选择相关系数大于 0.8 和小于 -0.8 的物种 33 个属，发现有 24 个属与碳固定的基因有 0.05 水平显著相关关系（图 4）。进一步研究发现其中 13 个物种（*Sorangium*、*Spiribacter*、*Lentzea*、*Rhodovibrio*、*Pseudomonas*、*Flavihumibacter*、*Streptomyces*、*Nitrososphaera*、*Rubrobacter*、*Dyadobacter*、*Novosphingobium*、*Pedosphaera*、*Thermogemmatispora*）与 28 个功能基因有 0.01 水平的极显著差异。这 13 个物种是这一地区小麦连作土壤微生物碳固定途径的标记性微生物种群。在这 28 个基因中，与 5

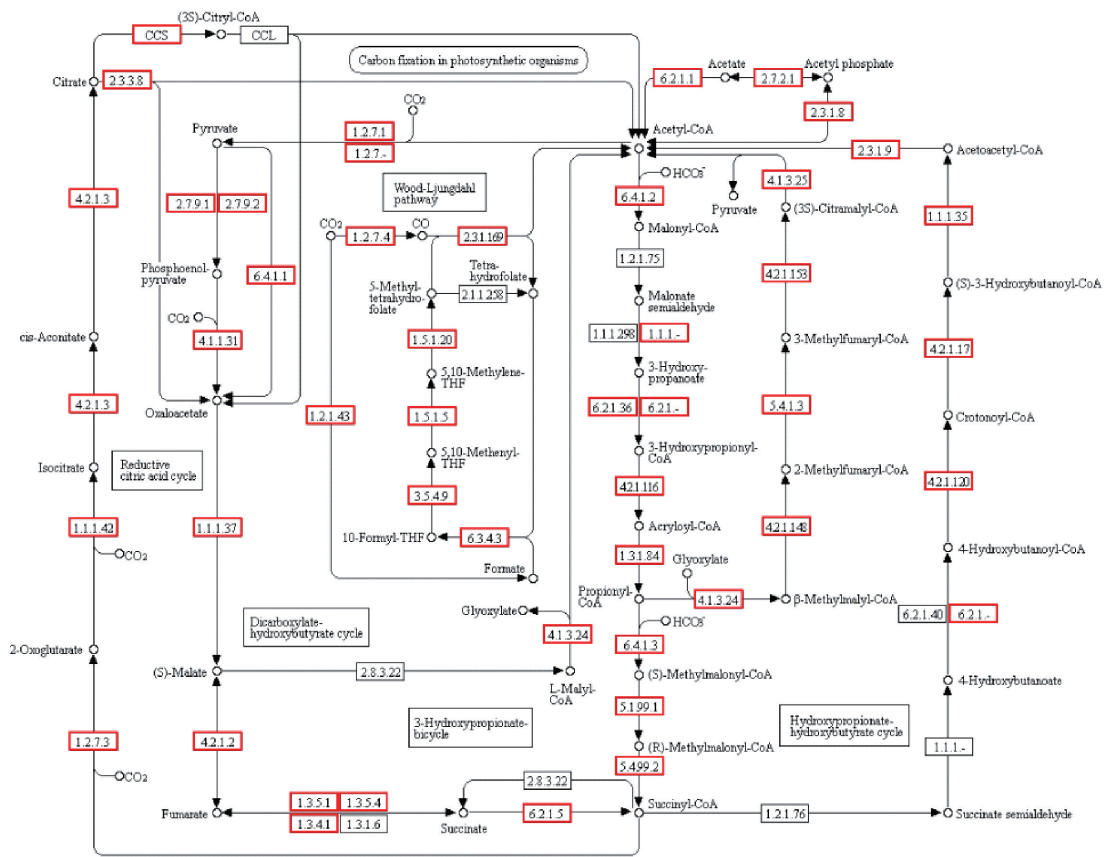


图 2 3 种施肥方式的碳固定途径检测到的基因

Fig. 2 Gene detected by carbon fixation pathway of three fertilization methods

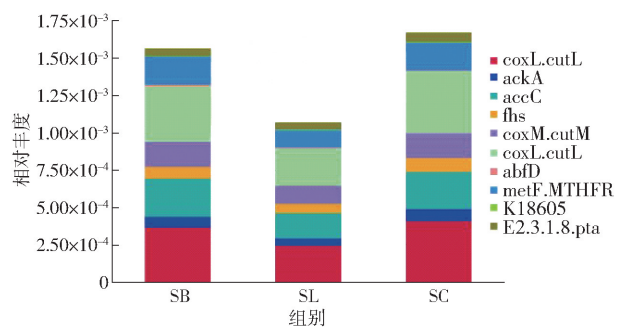


图 3 碳固定途径的主要功能基因比较
Fig. 3 Comparison of major functional genes
in carbon fixation pathway

个以上属有极显著性差异的基因有 14 个: E4. 2. 1. 2A. fumA, fumB、E2. 3. 1. 9. atoB、mdh、ACSS. acs、korB. oorB. oforB、pps. ppsA、ppdK、sdhA. frdA、K18594、K18604、E4. 2. 1. 2B. fumC、folD、ppc、accA, 为小麦连作粮田土壤微生物碳固定途径的标记性基因。

2.3 氮代谢途径功能基因分析

2.3.1 施肥方式对氮代谢途径功能基因的影响

通过与 KEGG 途径中的氮代谢通路比对,发现检测到基因 46 个,且检测到的 3 种施肥方式基因数目相同(图 5 红色框内表示 3 种施肥方式检测到的基因)。

通过 3 种施肥方式的氮代谢途径的主要功能基

因(丰度排名前十)比较发现(图 6),SB(相对丰度累加值为 1.10×10^{-3})的主要功能基因相对丰度累加大于 SC(1.00×10^{-3}),SC 的主要功能基因相对丰度累加明显大于 SL(6.50×10^{-4}),说明施肥明显改变了氮代谢的主要功能基因丰度。

2.3.2 氮代谢途径物种与功能基因相关分析

通过基因目录与 MicroNR 库比对,利用物种与氮代谢途径基因进行相关分析,选择相关系数大于 0.8 和小于 -0.8 的 13 个属的物种,与氮代谢途径的主要基因进行相关分析(图 7),筛选出代表性的物种和基因。具有 0.01 极显著相关的物种有 7 个: *Sphingopyxis*、*Alcanivorax*、*Nitrosospora*、*Aeromicrobium*、*Roseiflexus*、*Devosia*、*Altererythrobacter*。具有极显著的基因有 12 个,其中与 4 个以上物种显著相关的功能基因有 5 个: nirB、nasA、nasB、nrt. nak. nrtP. nasA、GDH2。

3 讨论

3.1 碳固定和氮代谢途径功能微生物筛选

本研究发现旱地麦田在深松 + 秸秆还田的条件下,施用化肥明显改变了土壤碳固定和氮代谢途径的物种及功能基因丰度。常规施肥和平衡施肥的主要功能基因丰度均大于低量施肥;在碳固定途径中

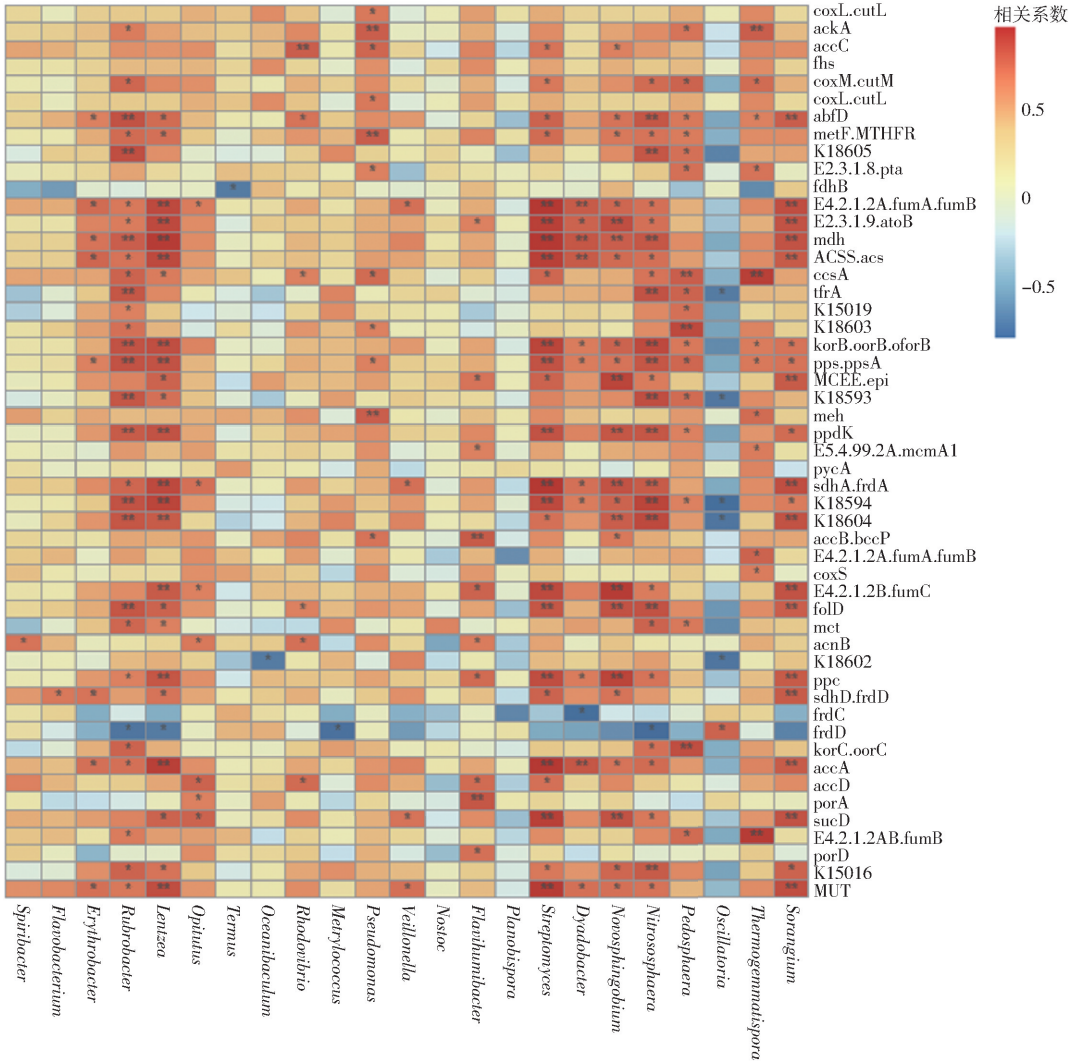


图 4 碳固定途径的物种(属)与基因相关分析

Fig. 4 Analysis of species (genus) and gene correlation of carbon fixation pathway

常规施肥主要功能基因丰度大于平衡施肥,在氮代谢途径中平衡施肥主要功能基因丰度均大于常规施肥。这说明常规施肥对碳固定的作用更大一些,平衡施肥则更利于氮代谢。同时通过功能微生物的筛选,没有筛选到碳固定和氮代谢协同的微生物,说明在秸秆还田和深松的小麦连作农田生态系统中微生物物种是分工协作的,碳固定和氮代谢分别有各自特有的主要物种。因此可以利用筛选到的物种进行土壤微生物多样性研究的标记物种;也可以通过功能基因作标记来检测渭北旱塬农田土壤微生物基因丰度及其对环境因子的响应,为进一步研究这一地区的土壤微生物组提供了便利条件。

3.2 施肥对土壤微生物碳固定的影响

本文是在深松 + 秸秆还田的保护性耕作情况下进行不同施肥水平试验,土壤微生物固碳途径物种和功能基因丰度的变化是耕作、施肥和秸秆还田共同作用的结果。秸秆还田为微生物的生长繁殖提供

了大量的碳源和能源,小麦根系分泌物也会影响微生物的组成及数量,进而影响土壤碳固定活性;化肥的施用能够直接改变土壤中有机碳的结构与含量,显著增加或抑制土壤微生物的增殖。化肥的合理施用能够改变土壤中有机碳的含量,增加固碳微生物的繁殖;在贫瘠的土壤施用化肥,土壤中有机碳含量受限会促进微生物分泌更多的胞外酶,从而加速土壤有机质的分解,增加土壤碳固定;反之,肥沃的土壤不合理地大量施肥,微生物活性降低、数量减少,同时小麦产生胞外酶也减少,抑制有机碳的分解,反而降低土壤碳固定活性^[24-26]。所以氮肥优化管理措施可以通过提高作物产量,增加作物根系分泌物量及秸秆产量,促进土壤碳库积累。本研究发现在秸秆还田和深松耕作条件下,碳固定途径中平衡施肥和常规施肥都增加了基因丰度,而且常规施肥的碳固定功能基因响应略大于平衡施肥,说明常规施肥在当地小麦生产中有一定的利用价值,还没有达到抑制碳固定的程度,在秸秆还田下化肥使用量对

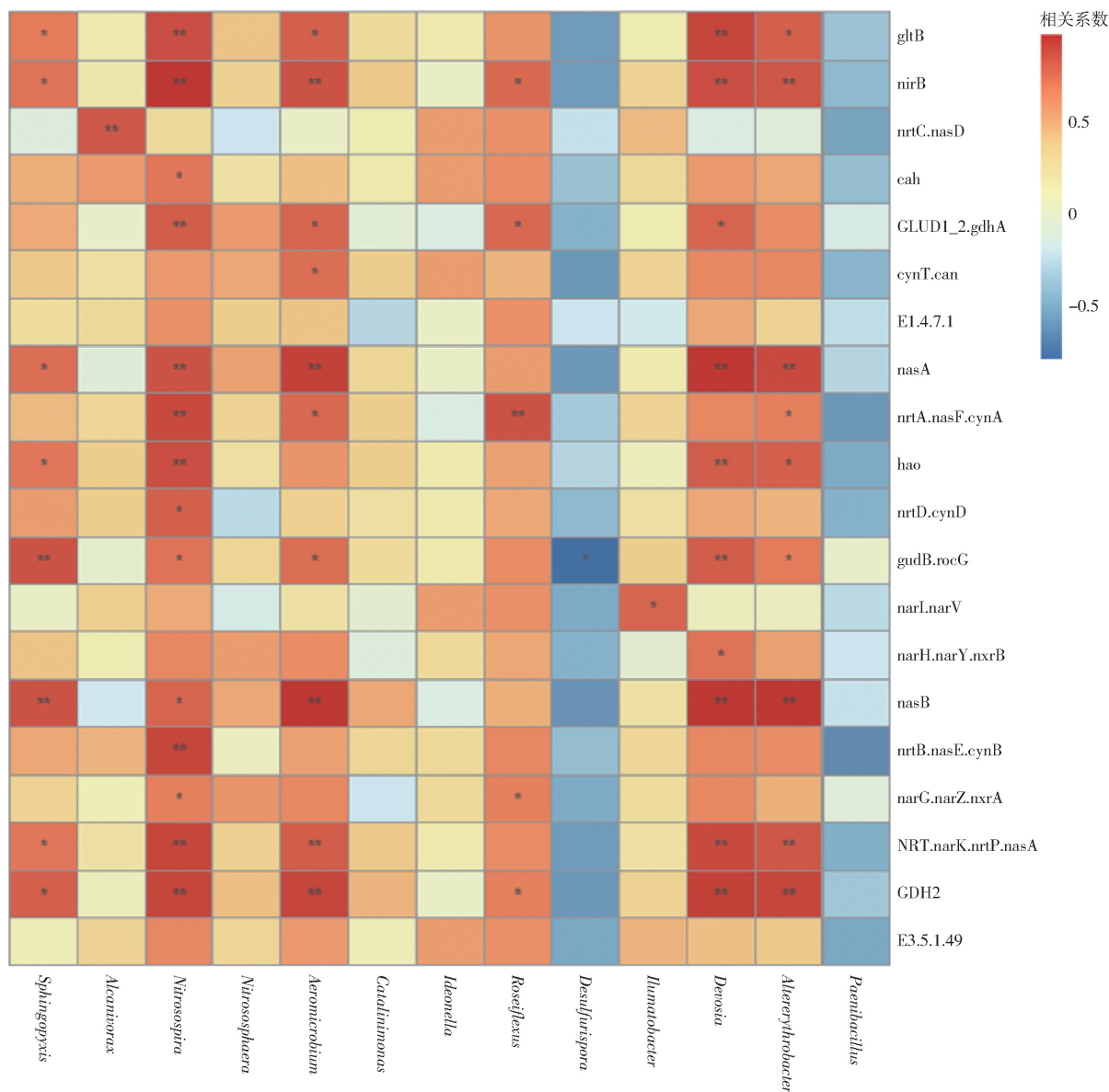


图 7 氮代谢途径的响应物种与基因相关分析

Fig. 7 Correlation analysis of species and genes in response to nitrogen metabolism pathway

筛选得到氮代谢途径微生物 7 个属,与之紧密相关的功能基因 5 个。平衡施肥更有益于节肥减排和土壤的可持续利用,是适合该地区小麦连作粮田的施肥方式。

参 考 文 献

[1] LIU Liang, SHEN Guoqing, SUN Mingxing, et al. Effect of biochar on nitrous oxide emission and its potential mechanisms[J]. Journal of the Air & Waste Management Association,2014,64(8): 894 – 902.

[2] CONG Jing, LIU Xueduan, LU Hui, et al. Analyses of the influencing factors of soil microbial functional gene diversity in tropical rainforest based on GeoChip 5.0[J]. Genomics Data, 2015, 5: 397 – 398.

[3] BARDGETT R D, FREEMAN C, OSTLE N J. Microbial contributions to climate change through carbon cycle feedbacks[J]. The ISME Journal, 2008, 2(8): 805 – 814.

[4] WANG Hao, WANG Shulan, ZHANG Yujiao, et al. Tillage system change affects soil organic carbon storage and benefits land restoration in loess soil in North China[J]. Land Degradation and Development,2018,29(9):2880 – 2887.

[5] SUN Lei, WANG Shulan, ZHANG Yujiao, et al. Conservation agriculture based on crop rotation and tillage in the semi-arid Loess Plateau, China: effects on crop yield and soil water use[J]. Agriculture Ecosystems and Environment, 2018,251:67 – 77.

[6] SUN Lei, WANG Rui, LI Jun, et al. Reasonable fertilization improves the conservation tillage benefit for soil water use and yield of rain-fed winter wheat: a case study from the Loess Plateau, China[J]. Field Crops Research,2019,242:107589.

[7] WANG Hao, WANG Shulan, YU Qi. No tillage increases soil organic carbon storage and decreases carbon dioxide emission in the crop residue-retained farming system[J]. Journal of Environmental Management, 2020,261:110261.

- [8] LIU S W, ZHANG Y J, ZONG Y J, et al. Response of soil arbondioxide fluxes, soil organic carbon and microbial biomass carbon to biochar amendment: a meta-analysis[J]. GCB Bioenergy, 2016, 8(2): 392406.
- [9] XIA L L, LMA S K, CHEN D L, et al. Can knowledge-based N management produce more staple grain with lower greenhouse gase mission and reactive nitrogen pollution? A meta-analysis[J]. Global Change Biology, 2017, 23(5): 1917 – 1925.
- [10] FANG H, WANG H, CAI L, et al. Prevalence of antibiotic resistance genes and bacterial pathogens in long-term manured greenhouse soils as revealed by metagenomic survey [J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49(2): 1095 – 1104.
- [11] 邓晔, 冯凯, 魏子艳, 等. 宏基因组学在环境工程领域的应用及研究进展[J]. 环境工程学报, 2016, 10(7): 3373 – 3382.
DENG Ye, FENG Kai, WEI Ziyang, et al. Recent studies and applications of metagenomics in environmental engineering[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2016, 10(7): 3373 – 3382. (in Chinese)
- [12] STREIT W R, SCHMITZ R A. Metagenomics—the key to the uncultured microbes[J]. Current Opinion in Microbiology, 2004, 7(5): 492 – 498.
- [13] TSENG C H, TANG S L. Marine microbial metagenomics: from individual to the environment[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(5): 8878 – 8892.
- [14] RAVIN N V, MARDANOV A V, SKRYABIN K G. Metagenomics as a tool for the investigation of uncultured microorganisms [J]. Russian Journal of Genetics, 2015, 51(5): 431 – 439.
- [15] SEGATA N, IZARD J, WALDRON L, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation[J]. Genome Biology, 2011, 12(6): 1 – 18.
- [16] ZHU Wenhan, LOMSADZE A, BORODOVSKY M. *Ab initio* gene identification in metagenomic sequences[J]. Nucleic Acids Research, 2010, 38(12): e132.
- [17] FU L, NIU B, ZHU Z, et al. CD – HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data[J]. Bioinformatics, 2012, 28(23): 3150 – 3152.
- [18] ONDOV B D, BERGMAN N H, PHILLIPPY A M. Interactive metagenomic visualization in a Web browser[J]. BMC Bioinformatics, 2011, 12(1): 385 – 394.
- [19] WHITE J R, NAGARAJAN N, POP M. Statistical methods for detecting differentially abundant features in clinical metagenomic samples[J]. PLoS Comput. Biol., 2009, 5(4): e1000352.
- [20] KANEHISE M, GOTO S, SATO Y, et al. Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG[J]. Nucleic Acids. Res., 2014, 42(D1): 199 – 205.
- [21] 魏子艳, 金德才, 邓晔. 环境微生物宏基因组学研究中的生物信息学方法[J]. 微生物学通报, 2015, 42(5): 890 – 901.
WEI Ziyang, JIN Decai, DENG Ye. Bioinformatics tools and applications in the study of environmental microbial metagenomics [J]. Microbiology China, 2015, 42(5): 890 – 901. (in Chinese)
- [22] SUNAGAWA S, COELHO L P, CHAFFRON S, et al. Structure and function of the global ocean microbiome[J]. Science, 2015, 348(6237): 1261359.
- [23] YAN Xun, LU Xuegang, ZHAO Min. Metagenomic analysis of microbial community in uranium-contaminated soil[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2016, 100: 299 – 310.
- [24] LU F, WANG X, HAN B, et al. Soil carbon sequestrations by nitrogen fertilizer application, straw return and no-tillage in China's cropland [J]. Global Change Biology, 2009, 15(2): 281 – 305.
- [25] BERG I A. Ecological aspects of the distribution of different autotrophic CO₂ fixation pathways[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(6): 1925 – 1936.
- [26] MBADINGA S, SUN X B. Microbial communities responsible for fixation of CO₂ revealed by using *mcrA*, *cbbM*, *cbbL*, *fthfs*, *fefe*-hydrogenase genes as molecular biomarkers in petroleum reservoirs of different temperatures [J]. Biogeosciences Discussions, 2015, 12(2): 1875 – 1906.
- [27] CHRISTOPHER R, ALEXANDER M, HERMANN B. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(8): 3818 – 3829.
- [28] FEANLIEBBER A J, HONS F M, ZUBERER D A. Long-term changes in soil carbon and nitrogen pools in wheat management systems[J]. Soil Science Society of America Journal, 1994, 58(6): 1639 – 1645.
- [29] 侯贤清, 李荣, 吴鹏年, 等. 秸秆还田配施氮肥对土壤碳氮含量与玉米生长的影响[J/OL]. 农业机械学报, 2018, 49(9): 238 – 246.
HOU Xianqing, LI Rong, WU Pengnian, et al. Effects of straw returning with nitrogen application on soil carbon, nitrogen content and maize growth[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2018, 49(9): 238 – 246. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?flag=1&file_no=20180928&journal_id=jesam. DOI: 10.6041/j.issn.1000-1298.2018.09.028. (in Chinese)