DOI：10.11766/trxb202109010267

孙梅，聂三安，龙泽东，李超，王华，肖小平，罗尊长，孙耿. 水稻土厌氧氨氧化对不同耕作方式与秸秆还田的响应[J]. 土壤学报，2022，59（6）：1695–1703.

SUN Mei，NIE San'an，LONG Zedong，LI Chao，WANG Hua，XIAO Xiaoping，LUO Zunchang，SUN Geng. Response of Paddy Soil Anammox Bacteria to Rice Straw Returning and Different Tillage Practices[J]. Acta Pedologica Sinica，2022，59（6）：1695–1703.

水稻土厌氧氨氧化对不同耕作方式与秸秆还田的响应*

孙　梅[1]，聂三安[2]，龙泽东[1]，李　超[1]，王　华[2]，肖小平[1]，罗尊长[1]，孙　耿[1, 2†]

（1. 湖南省土壤肥料研究所，长沙 410125；2. 湖南农业大学资源环境学院，长沙 410128）

摘　要：研究稻田土壤厌氧氨氧化微生物活性、丰度和群落结构对不同耕作方式与秸秆还田的响应，可为稻田土壤氮素管理提供科学依据。设 3 个不同耕作方式（翻耕、旋耕、免耕）+秸秆还田处理，以翻耕+秸秆不还田处理作为对照，采用 ^{15}N 示踪法、荧光定量 PCR 及 Illumina 测序分析厌氧氨氧化菌潜在活性、功能基因 *hzs*B 拷贝数及群落组成。结果表明，秸秆还田显著改变了土壤理化性质，与不还田相比，土壤有机质、全氮、容重均呈明显增加趋势，尤其是免耕还田条件下差异显著。秸秆还田条件下，厌氧氨氧化菌潜在活性表现为免耕>旋耕>翻耕（$P<0.05$），对照与旋耕+秸秆还田处理无显著性差异。各处理之间厌氧氨氧化菌功能基因（*hzs*B）拷贝数无显著性差异。Illumina 测序从属水平鉴定出 *Kuenenia* 和 *Scalindua* 两种已知的厌氧氨氧化菌及部分未鉴定属，且各处理间二者的相对丰度具呈负相关（$P<0.05$）。相关性分析结果显示，厌氧氨氧化菌活性与土壤反硝化活性显著相关，与功能基因拷贝数及群落组成无显著相关性。试验表明，免耕条件下秸秆还田显著提升了土壤容重，降低了土壤氧化势，可能是其厌氧氨化活性强的重要原因。与无机氮含量和土壤全氮等理化性质相比，水稻土氧化还原状况可能更好解释水稻土厌氧氨氧化活性，长期秸秆还田和不同耕作方式改变了厌氧氨氧化菌活性和群落组成，但其数量未发生显著变化。水稻田秸秆还田加翻耕可在一定程度提高土壤透气性，降低厌氧氨氧化活性，而秸秆还田与免耕结合则可能降低土壤通透性并导致更多的土壤氮素损失。

关键词：厌氧氨氧化；秸秆还田；翻耕；旋耕；免耕

中图分类号：S154.2　　**文献标志码：**A

Response of Paddy Soil Anammox Bacteria to Rice Straw Returning and Different Tillage Practices

SUN Mei[1], NIE San'an[2], LONG Zedong[1], LI Chao[1], WANG Hua[2], XIAO Xiaoping[1], LUO Zunchang[1], SUN Geng[1, 2†]

(1. *Hunan Soil and Fertilizer Institute*, *Changsha* 410125, *China*; 2. *College of Environment and Resources*, *Hunan Agricultural University*, *Changsha* 410128, *China*)

---

* 区域创新发展联合基金（U19A2048）、国家重点研发计划项目（2016YFD0300901-03）和国家自然科学基金项目（42177288）共同资助 Supported by the Joint Regional Innovation and Development Fund（No. U19A2048），the National Key Research and Development Program of China（No. 2016YFD0300901-03），and the National Natural Science Foundation of China（No. 42177288）

† 通讯作者 Corresponding author，E-mail：sungeng@hunaas.cn

作者简介：孙　梅（1987—），女，湖南邵阳人，硕士，主要从事农田土壤及养分循环。E-mail：suny_mei@126.com

收稿日期：2021–09–01；收到修改日期：2021–11–11；网络首发日期（www.cnki.net）：2022–02–09

Abstract: 【Objective】This study was carried out to evaluate the response of paddy soil anammox bacterial activity, abundance and community structure to rice straw returning and different tillage practices.【Method】Three different till treatments (conventional till, rotary till and no-till) + rice straw returning were set up, with conventional till and no rice straw returning as control. The potential activity, functional gene (*hzs*B) abundance and community structure of anammox bacteria were analyzed by ^{15}N tracing, fluorescent quantitative PCR and Illumina sequencing, respectively.【Result】Anammox activity showed a significant difference and the values ranked as no-till > rotary till > conventional till (P<0.05), while no significant difference was observed between control and rotary tillage+rice straw. Also, no significant difference was detected in the copy number of *hzs*B among treatments. Two known anammox bacteria (*Kuenenia* and *Scalindua*) and some unidentified genera were identified by Illumina sequencing, and the relative abundance of Kuenenia and *Scalindua* showed a negative correlation (P<0.05). Pearson correlation analysis showed that anammox activity was significantly correlated with denitrification activity, but not with *hzs*B abundance and community composition.【Conclusion】We conclude that anammox activity and community composition but not the functional gene abundance respond to long term straw returning and different tillage practices. Rice straw returning + conventional till in rice field may inhibit N loss to some extent, while rice straw returning + no-tillage increased soil N loss. This study may provide a scientific basis for nitrogen (N) management in paddy fields.

Key words: Anammox; Straw returning; Conventional till; Rotary till; No-till

微生物介导的稻田土壤氮循环对稻田生产力和生态环境产生影响。传统观点认为稻田土壤氮损失途径为氨挥发、反硝化和淋溶损失作用，但我国农业土壤仍有 13%的氮素去向未知[1]。近年来的研究表明厌氧氨氧化是稻田生态系统氮损失的重要原因[2-3]。对南方典型水稻土的研究发现每年约 2.5×10^6 Mg 氮通过厌氧氨氧化损失到大气中，占氮肥施用量的 10%[4]。Nie 等[3]认为农业土壤的厌氧氨氧化对氮气损失的贡献量为 5%～10%，表明农田土壤厌氧氨氧化与氮素损失关系密切。

环境因素是决定厌氧氨氧化菌活性与分布的主要原因。相比于海洋和淡水生态系统，土壤环境中的厌氧氨氧化菌的活性、丰度与生物多样性更高，原因是土壤环境异质性较大，而厌氧氨氧化菌本身具有代谢多样化的特点，土壤可为其提供有利生境[3]。农业土壤中可检测到各种不同的厌氧氨氧化菌，最常见的两类是 *Brocadia* 和 *Kuenenia*。农业土壤系统由于大量氮肥的投入，刺激了厌氧氨氧化菌的生长，提高了其丰度和活性，加快了土壤氮素损失[3]。目前对厌氧氨氧化的研究集中于低氧或厌氧环境。溶解氧是厌氧氨氧化过程的重要调控因子，厌氧氨氧化菌对环境中的氧具有一定的耐受力，但高氧浓度条件下具有明显抑制作用[5]。有研究表明，在氧分压<0.4%的环境中，厌氧氨氧化过程可正常进行；但在高氧浓度时发生不可逆的抑制作用[6]。淹水稻田表层土壤氧分压较高但亚表层以下土壤氧气浓度较低[7]，受不同农田管理方式的影响，如秸秆还田后微生物对有机物料的降解、不同耕作方式对土壤的扰动强度的差别，可能在不同时期造成土壤中氧分压发生差异，因此稻田厌氧氨氧化菌活性、菌群丰度和多样性对农田管理方式的响应值得探索。

秸秆还田和耕作方式影响厌氧氨氧化过程。顾超[8]的研究表明，水旱轮作系统中，秸秆还田后土壤的厌氧氨氧化反应速率明显变低，秸秆中有机碳抑制了土壤厌氧氨氧化活性；但周慧芳[9]发现稻草还田后提高了厌氧氨氧化活性和厌氧氨氧化菌数量，需深入研究秸秆还田对厌氧氨氧化过程的影响。土壤耕作使土壤中水、肥、气、热等发生改变，进而影响土壤微生物的活性与群落结构[10]。南方稻田土壤常见的耕作方式有翻耕、旋耕及少免耕等。免耕改善了土壤理化性质，可提高水稻产量[11]，而翻耕和旋耕在一定程度上破坏了土壤结构和土壤微生物生存环境[12]。本研究选择中国南方典型稻区土壤，研究经过 15 a 不同耕作措施和秸秆还田对厌氧氨氧化过程的影响，重点分析厌氧氨氧化菌的潜在活性、功能基因丰度和群落组成差异。采用 ^{15}N 示踪培养分析厌氧氨氧化速率，定量厌氧氨氧化功能基因，通过 Illumina 测序平台检测厌氧氨氧化菌群落组成，旨在探讨不同耕作方式与秸秆还田对水稻土厌氧氨氧化过程的影响，为预测稻田生态系统氮损失、合理有效氮调控提供科学依据。

1　材料与方法

1.1　试验设计

研究依托 2005 年建立于湖南省宁乡市回龙铺镇（28°07′N，112°18′E）的长期定位试验，种植制度为冬闲-早稻-晚稻，土壤类型为红壤水稻土。试验开始前耕作层（0～20 cm）土壤有机质 34.90 $g·kg^{-1}$，全氮 1.29 $g·kg^{-1}$，pH6.26，容重 1.21 $g·cm^{-3}$。设置 4 个处理：（1）秸秆不还田+翻耕（CT：conventional till）、（2）秸秆还田+翻耕（CTS：conventional till + rice straw）、（3）秸秆还田+旋耕（RTS：rotary till + rice straw）、（4）秸秆还田+免耕（NTS：no till + rice straw），每个处理 3 次重复。小区之间用水泥埂隔开，采用随机区组排列。CT 处理在种植水稻前翻地 1 次，旋耕 2 次，水稻收获后秸秆全部移出；CTS 处理耕作方式与 CT 处理一致，但秸秆全量还田；RTS 处理在水稻抛秧前旋耕 4 次，秸秆全量还田；NTS 处理免耕，秸秆全部覆盖还田。秸秆还田量多年平均值为 12 500 $kg·hm^{-2}$。抛秧前基施复合肥 391 $kg·hm^{-2}$（N 195.5 $kg·hm^{-2}$，P 34.14 $kg·hm^{-2}$，K 97.33 $kg·hm^{-2}$），返青后追施尿素 47 $kg·hm^{-2}$（N 21.62 $kg·hm^{-2}$）。晚稻抛秧前基肥施用复合肥 469 $kg·hm^{-2}$（N 234.50 $kg·hm^{-2}$，P 40.95 $kg·hm^{-2}$，K 116.75 $kg·hm^{-2}$），返青后追施尿素 39 $kg·hm^{-2}$（17.94 $kg·hm^{-2}$）。各处理其他田间管理措施保持一致。

1.2　土壤样品采集与理化性质分析

定位试验开始第 15 年，在前茬稻草全部还田且耕作未开始之前采集土壤样品，采样深度 0～15 cm，采样时间为 2019 年 3 月。采用对角线采样法，每个小区用不锈钢土钻采集 5 个土壤样品，迅速混匀，取少部分置于自封袋后密闭保存于冰盒内用于绝对定量 PCR 和高通量测序分析，其他样品带回实验室分析。土壤 pH 和电导率（盐度）分析采用多参数测定仪（SX751，中国）测定，液土比为 2.5∶1。土壤有机质分析采用重铬酸钾容量法。全氮采用凯氏消煮法，铵态氮和硝态氮采用 KCl（2 $mol·L^{-1}$）浸提，凯氏定氮仪（K9860，中国）测定。土壤容重分析采用环刀法。具体方法参考《土壤农业化学分析方法》[13]。

1.3　^{15}N 稳定同位素分析

采用稳定同位素技术分析厌氧氨氧化潜势，可同时分析反硝化潜势，分析方法参照聂三安等[14]的方法。根据厌氧氨氧化和反硝化产生氮气的原理不同，通过氮同位素标记以区分二者产生的氮气量，估算厌氧氨氧化和反硝化潜势。称取 3.50 g 鲜土至 20 mL 柱状培养管中，加满氮气饱和的去离子水，厌氧预培养至少 24 h 以消耗硝酸盐。预培养结束后，培养管加入配制好的同位素溶液至无机氮总浓度为 100 $\mu mol·L^{-1}$。每个样品分为 3 个处理添加不同同位素：处理 1 加入 99.09%的 $^{15}NH_4Cl$，在 0 h 和 24 h 加入 200 μL $ZnCl_2$（7 $mol·L^{-1}$）以终止反应，验证硝酸盐消耗彻底；处理 2 加入 99.09%的 $^{15}NH_4NO_3$，在 0 h 和 24 h 加入 $ZnCl_2$，验证是否发生厌氧氨氧化反应；处理 3 加入 99.21%的 $Na^{15}NO_3$，分别在加入同位素溶液后的 0、3、6、12 和 24 h 加入 $ZnCl_2$，通过氮气产生量对时间的线性回归方程计算厌氧氨氧化反应潜势。反应终止后，在厌氧培养箱内将 2 mL 反应液转移至新的柱状培养管中，剧烈摇晃释放氮气，产生的氮气同位素（$^{28}N_2$、$^{29}N_2$、$^{30}N_2$）由稳定同位素质谱仪连接 Gasbench 进行分析。

1.4　DNA 提取与 qPCR

采用 FastDNA® Spin Kit for Soil 试剂盒（天根生化科技（北京）有限公司）的方法提取土壤总 DNA，之后采用超微量紫外分光光度计（Nanodrop 2000）检测 DNA 纯度和浓度。采用绝对定量的方法分别检测 DNA 样品中的厌氧氨氧化功能基因 *hzs*B 和细菌总数的拷贝数。细菌 16S 引物为 341F-517R，厌氧氨氧化菌定量引物采用 396F-742R。反应体系和扩增条件如表 1，定量 PCR 检测仪器为 ABI7500。

1.5　高通量测序

采用巢式 PCR 对厌氧氨氧化菌的 16S rRNA 基因进行扩增。第一次采用引物 PLA46f-630 对浮霉菌属进行扩增，第二步以第一步 PCR 产物稀释 300 倍后作为模板，用厌氧氨氧化菌特异性引物 Amx368F-Amx820R 进行全长 PCR 扩增。反应体系和反应条件参照 Hefting 等[15]的方法。PCR 产物经电泳检测和纯化后，通过 Illumina MiSeq 平台（美吉生物医药科技有限公司，上海）进行测序。

表 1 细菌 16S rRNA 和厌氧氨氧化 *hzs*B 基因反应体系和扩增条件

Table 1 Reaction mixture and profiles used for real-time qPCR

目的基因 Target gene	反应体系 Reaction mixture	扩增条件 Thermal profile
细菌 16S rRNA Bacterial 16s rRNA	10 μL 2×Master Mix，0.5 μL 上下游引物（10 μmol·L^{-1}），2 μL DNA 模板，5 μL ddH$_2$O	95℃ 30 s，95℃ 55 s，60℃，40 s 共 40 个循环
*hzs*B	25 μL 2×Master Mix，1 μL 上下游引物（10 μmol·L^{-1}），2 μL DNA 模板，20 μL ddH$_2$O	94℃ 5 min，94℃ 30 s，55℃ 30 s，72℃ 30 s 共 30 个循环，72℃延伸 10 min

1.6 数据处理与分析

所有数据均为 3 个生物学重复，数据处理采用 Microsoft Excel 2016，图形处理采用 Sigmaplot 14.0，正态分布检验与相关性分析采用 IBM SPSS Statistics 25，方差齐性采用 Duncan 检验，方差不齐采用 Dunnett's T3 检验，在 P<0.05 水平表示显著性差异。相关性分析采用双尾检验，分别在 0.05 和 0.01 水平表示显著和极显著相关。高通量测序分析在美吉生物云平台运行。

2 结 果

2.1 不同耕作方式与秸秆还田对土壤理化性质的影响

经过 15 年的秸秆还田与耕作管理，土壤的主要理化性质发生了不同程度变化，总体上改善了水稻土肥力状况。各处理间土壤 pH 无显著差异，说明秸秆还田和不同耕作方式均对水稻土 pH 无显著性影响（表 2）。CTS、RTS 和 NTS 处理土壤有机质、全氮、盐度显著性高于 CT 处理（CTS 全氮含量大于 CT，但未达到显著性水平）。各处理土壤硝态氮含量均较低，从数量级上相比低于铵态氮含量。CTS 和 CT 处理相比 NH_4^+浓度无显著差异，但均显著性低于 RTS 和 NTS 处理，说明翻耕条件下，秸秆还田并未显著提高铵态氮浓度；但秸秆还田条件下，旋耕和免耕可显著提高土壤铵态氮浓度。NTS 处理的土壤容重显著高于其他处理，且 CT、CTS 和 RTS 处理间差异不显著，因此免耕提高了水稻土的容重。

2.2 厌氧氨氧化和反硝化活性

同位素示踪培养实验中土壤厌氧氨氧化和反硝化潜在活性见图 1。厌氧培养条件下，各处理土壤反硝化活性为 N 7.45～12.33 nmol·g^{-1}·h^{-1}，而厌氧氨氧化活性为 0.49～1.17 nmol·g^{-1}·h^{-1}，反硝化活性远大于厌氧氨氧化活性。处理间反硝化活性与厌氧氨氧化活性之间存在显著性相关关系（表 3）。CTS 的反硝化活性（7.45 ± 0.18 nmol·g^{-1}·h^{-1}）和厌氧氨氧化活性（0.49 ± 0.04 nmol·g^{-1}·h^{-1}）显著低于 CT 处理（分别为 9.21 ± 0.53 nmol·g^{-1}·h^{-1} 和 0.61 ± 0.02 nmol·g^{-1}·h^{-1}），

表 2 不同耕作方式与秸秆还田下土壤理化性质

Table 2 Effects of different tillage practices and rice straw return on soil physical-chemical properties（n=3）

处理 Treatment	pH 2.5∶1	土壤有机质 SOM /（g·kg^{-1}）	全氮 TN /（g·kg^{-1}）	盐度 Salinity /（μS·cm^{-1}）	NH_4^+-N /（mg·kg^{-1}）	NO_3^--N /（mg·kg^{-1}）	容重 Bulk density /（g·cm^{-3}）
CT	6.10±0.15a	33.93±2.08b	1.96±0.11b	109.61±12.01b	21.79±6.63c	0.97±0.04b	1.00±0.02b
CTS	6.01±0.18a	38.07±2.70a	2.18±0.10ab	144.67±12.10a	22.92±7.01c	1.19±0.14ab	1.04±0.06b
RTS	6.08±0.32a	41.10±2.44a	2.34±0.10a	150.00±21.07a	38.58±5.61a	1.80±0.41a	1.14±0.03b
NTS	6.05±0.11a	43.83±2.60a	2.46±0.10a	155.33±16.62a	27.19±7.26b	1.49±0.50a	1.23±0.04a

注：CT，秸秆不还田+翻耕；CTS，秸秆还田+翻耕；RTS，秸秆还田+旋耕；NTS，秸秆还田+免耕。同一列中不同字母表示处理间差异显著（P<0.05）。下同。Note：CT，conventional till；CTS，conventional till+rice straw；RTS，rotary till+rice straw；NTS：no till+rice straw. Different letters in the same row indicate significant difference between treatments（P<0.05）. The same below.

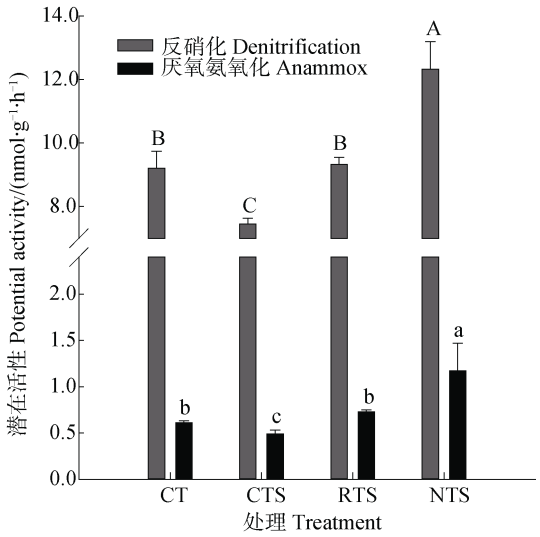

图 1　秸秆还田与不同耕作方式下水稻土反硝化和厌氧氨氧化活性

Fig. 1　Potential denitrification and anammox activity of soil under straw returning and different tillage practices

说明翻耕条件下，秸秆还田降低了水稻土反硝化和厌氧氨氧化活性。秸秆还田条件下，不同耕作方式之间厌氧氨氧化和反硝化活性表现为 NTS>RTS>CTS（$P<0.05$），因此，不同耕作方式显著改变了厌氧氨氧化和反硝化微生物活性，免耕提高了稻田土壤潜在氮素损失，而翻耕可能会减少氮损失。

2.3　厌氧氨氧化菌和总细菌拷贝数

通过对 16S rRNA 基因和 *hzs*B 功能基因定量分析土壤中总细菌与厌氧氨氧化细菌的丰度（图 2a）。各处理总细菌数量具有一定差异，NTS 处理（1.66×10^9 copies·g^{-1}）显著性高于其他处理，而 CTS 与 RTS 之间无显著性差异（分别为 8.25×10^8 copies·g^{-1} 和 1.07×10^9 copies·g^{-1}），CT 处理最低（4.93×10^8 copies·g^{-1}）。因此，尽管耕作方式不同，但秸秆还田后土壤细菌总量均显著性高于对照处理。此外，免耕处理也有利于细菌的富集。四个处理厌氧氨氧化功能基因 *hzs*B 拷贝数为 1.2×10^6～1.61×10^6 copies·g^{-1}，且处理之间无显著性差异。不同处理之间厌氧氨氧化菌占细菌的比例表现为 CT>CTS>RTS>NTS，说明秸秆还田降低了厌氧氨氧化菌的相对比例，但翻耕和旋耕提高了其在水稻土中的相对比例。以上结果表明，水稻土秸秆还田或免耕均利于土壤细菌的富集，但厌氧氨氧化菌的生长可能受土壤综合因子的调控。

2.4　厌氧氨氧化菌的群落组成

总体而言，不同处理之间厌氧氨氧化菌的组成较为相似，但相对丰度有所差异。各处理中均检测到 *Kuenenia* 和 *Scalindua*（属水平），且 *Kuenenia* 属的相对丰度含量范围 74.05%～93.03%，高于 *Scalindua*（6.11%～23.37%），此外还有少量未鉴定浮霉菌属（0.39%～1.87%）（图 2b）。与 CT 比，CTS 和 NTS 处理 *Kuenenia* 属的相对丰度无显著性差异，但 RTS 处理显著更高，说明旋耕加秸秆还田更有利于 *Kuenenia* 属厌氧氨氧化菌的积累。*Scalindua* 的相

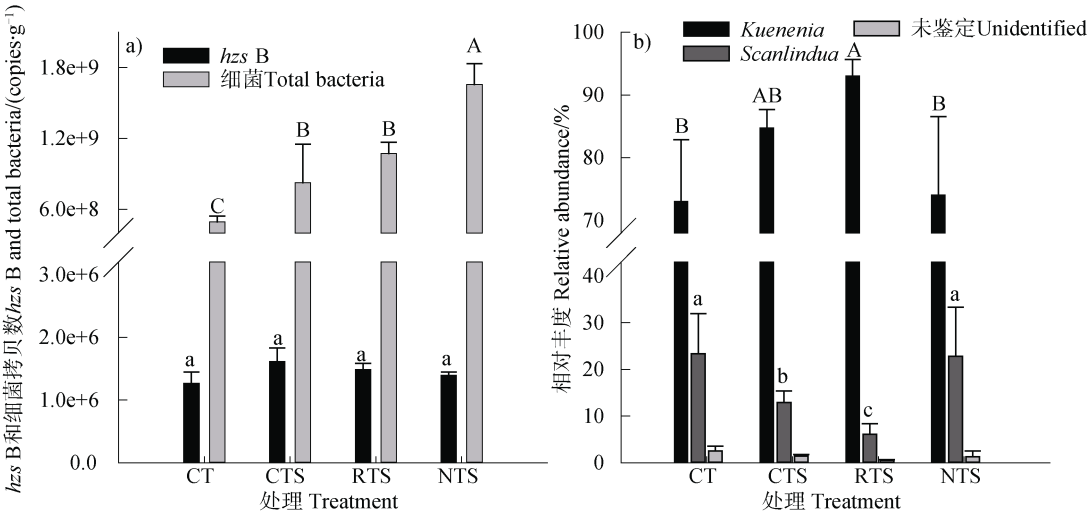

图 2　秸秆还田与不同耕作方式下土壤厌氧氨氧化菌和细菌总量丰度（a）、土壤厌氧氨氧化菌群落组成与相对丰度（b）

Fig. 2　Abundance of *hzs*B gene of anammox and total bacteria（a） and composition and relative abundance of soil anammox bacteria（b） in soil under straw returning and different tillage practices

对丰度，CTS 显著低于 CT 处理，说明翻耕条件下，秸秆还田降低了其相对丰度；不同翻耕处理之间表现为 NTS>CTS>RTS，说明旋耕不利于 *Scalindua* 的生长。因此，秸秆还田和耕作方式未改变水稻田厌氧氨氧化菌的群落组成，但改变了主要菌属的相对丰度。

2.5 相关性分析

表 3 列出了本研究中厌氧氨氧化的重要参数（潜在活性、功能基因丰度、群落相对丰度）与土壤关键因子之间的皮尔森相关性。土壤细菌总数、容重、有机质与全氮含量之间均显著相关，说明秸秆还田和不同耕作后，水稻土的碳、氮供应潜力与土壤细菌总数和容重密切相关。此外，厌氧氨氧化活性与土壤反硝化活性显著相关（$P<0.01$），而与功能基因 *hzs*B 丰度、NH_4^+和 NO_3^-浓度无显著相关性。不同处理间厌氧氨氧化功能基因 *hzs*B 丰度无显著性差异（图 2a），且与群落组成相对丰度和土壤理化因子均无显著相关性。*Kuenenia* 相对丰度与 *Scalindua* 极显著负相关（$P<0.01$），说明秸秆还田和耕作方式可能对水稻土关键厌氧氨氧化菌的影响不同。推测秸秆还田和不同耕作处理后，水稻土厌氧氨氧化过程受土壤综合因素的影响。

表 3 不同处理厌氧氨氧化活性、基因丰度、群落相对丰度与土壤理化性质的皮尔森相关性（*n*=4）

Table 3 Pearson correlations between anammox indexes and physicochemical properties in different treated paddy soils（*n*=4）

指标 Index	pH	有机质 SOC	全氮 TN	盐度 Salinity	NO_3^--N	NH_4^+-N	容重 Bulk density	16S rRNA	*hzs*B	*Kuenenia*	*Scalindua*	厌氧氨氧化活性 Anammox activity
有机质 SOC	–0.326											
全氮 TN	–0.331	0.999**										
盐度 Salinity	–0.578	0.930	0.940									
NO_3^--N	0.009	0.801	0.819	0.780								
NH_4^+-N	0.250	0.562	0.586	0.544	0.943							
容重 Bulk density	–0.123	0.966*	0.958*	0.804	0.747	0.525						
16S rRNA	–0.289	0.966*	0.955*	0.834	0.647	0.380	0.980*					
*hzs*B	–0.828	0.319	0.345	0.644	0.330	0.212	0.063	0.144				
Kuenenia	–0.175	0.235	0.274	0.465	0.667	0.750	0.050	–0.023	0.694			
Scalindua	0.189	–0.214	–0.253	–0.452	–0.645	–0.729	–0.025	0.044	–0.706	–0.999**		
厌氧氨氧化活性 Anammox activity	0.080	0.778	0.754	0.505	0.450	0.240	0.906	0.894	–0.313	–0.357	0.383	
反硝化活性 Denitrification activity	0.249	0.644	0.618	0.326	0.344	0.177	0.816	0.787	–0.496	–0.471	0.496	0.980*

注：双尾检验，*，**分别表示在 0.05 和 0.01 水平显著相关。Note：two-tailed test，*，and * * showed significant correlation at 0.05 and 0.01 levels，respectively.

3 讨　论

3.1 厌氧氨氧化活性响应不同耕作方式与秸秆还田

本研究采用稳定同位素示踪分析厌氧氨氧化活性，由于未考虑某些其他过程（如共反硝化、铁氨氧化等），结果可能高估了厌氧氨氧化的活性。厌氧培养条件下，反硝化和厌氧氨氧化的最终产物为氮气，厌氧氨氧化对氮气损失的贡献为 6.17%～8.67%，剩余由反硝化产生（图 1），且二者活性显著正相关（表 3）。该结果反映了厌氧氨氧化对稻田土壤氮损失的贡献比例，与 Nie 等[3]的结果一致。稻田土壤反硝化作用强烈，为厌氧氨氧化提供亚硝酸盐作为反应底物，对长期不同施肥水稻土的研究也发现，反硝化是决定厌氧氨氧化的关键因子[16]，二者具有潜在耦合性[3]。

土壤理化因子与厌氧氨氧化活性无显著相关性（表 3），很可能与秸秆还田后多种因素的综合影响有关。秸秆作为有机物料，还田后改善土壤物理、化学和生物学性质[17]。本研究中，翻耕加秸秆还田处理的厌氧氨氧化和反硝化活性显著低于对照，说明水稻秸秆还田可在一定程度上减少氮损失。通常水稻秸秆 C/N 比较高，分解较慢，一定程度上抑制氮矿化[18]，减缓氮损失。王改玲等[19]认为，土壤中加入高 C/N 比的秸秆后会发生生物固定，在高氮水平时，可降低反硝化速度；秸秆分解过程中还可能发生化感作用，抑制反硝化，而反硝化与厌氧氨氧化具有正相关性（表 3）。此外，秸秆还田后有机物的增加可能抑制了厌氧氨氧化菌的脱氮功能[20]，降低了其反应活性。这些因素在不同程度上影响了稻田土壤的厌氧氨氧化过程。秸秆还田后，土壤的厌氧氨氧化受土壤整体环境条件而非微观环境的综合调控，其关键的环境驱动因子有待深入研究。

不同耕作方式下土壤厌氧氨氧化活性由低至高依次为翻耕、旋耕、免耕（$P<0.05$），很可能与土壤理化性质差异有关。厌氧氨氧化菌生长较为缓慢，偏好较为稳定的环境[21]，而免耕对水稻土扰动较少，这种长期且稳定的厌氧环境有利于厌氧氨氧化菌的生长和代谢。此外，免耕条件下土壤总有机质、全氮、盐度均较高（表 1），可为厌氧氨氧化菌的代谢提供更为充足的底物。而翻耕或旋耕对土壤的扰动加快了土壤中的物质与能量交换，土壤养分总体上低于免耕处理[22]，因此，其厌氧氨氧化菌的代谢受到一定程度影响，显著低于免耕处理。稻田土壤中，耕作方式显著影响了反硝化和厌氧氨氧化，其活性受土壤环境的稳定性的影响。

3.2 厌氧氨氧化菌丰度与不同耕作方式与秸秆还田

水稻土长期淹水和氮肥投入形成的厌氧且高氮条件可为厌氧氨氧化菌的生长提供有利生境[3]。本研究中，水稻土厌氧氨氧化菌丰度为 1.20×10^6～1.61×10^6 g^{-1}，其值范围与长期施用粪肥的水稻土（2.0×10^5～2.7×10^6 g^{-1}）[23]及长期不同施肥的水稻土（1.3×10^6～3.6×10^6 g^{-1}）[24]较为相近。秸秆还田后，改善了土壤理化性质（表 1），土壤养分呈增加趋势[25]，本研究中总细菌数量处理显著高于对照也印证了这一观点（图 2a）。然而，各处理间厌氧氨氧化菌丰度无显著性差异（图 2a），推测受可利用底物的影响。一方面，各处理土壤中铵盐浓度较高但硝酸盐浓度均较低，厌氧氨氧化菌对亚硝酸盐的利用受限；另一方面，秸秆还田处理有机质含量显著高于对照（表 1），可能抑制了厌氧氨氧化菌的生长，因为较高的有机质为反硝化微生物提供了充足的氮源，其对底物的利用强于厌氧氨氧化菌，这一点在生物反应器中的研究已经得到印证[26]。因此，尽管秸秆还田和不同耕作方式改善了土壤理化性质，提高了水稻土肥力水平，但厌氧氨氧化菌的生长可能受稻田土壤综合因素的影响。同时，相关性分析表明，厌氧氨氧化菌丰度与其活性及土壤理化因子无显著相关性（表 3），很可能因本研究仅在 DNA 水平进行厌氧氨氧化微生物的丰度分析，无法准确定量活性厌氧氨氧化菌的数量。本研究仅对上层水稻土进行分析，受氧气渗透的影响，土壤表层的部分厌氧氨氧化菌可能处于休眠状态[3]。

3.3 厌氧氨氧化菌群落响应不同耕作方式与秸秆还田

稻田生态系统最常见的厌氧氨氧化菌为 *Brocadia* 和 *Kuenenia*，本研究中鉴定出 *Kuenenia* 和 *Scalindua*，很可能与母质有关。在不同水稻土中均检测到不同丰度的 *Kuenenia*[7]，说明其可适应稻田生态系统。*Scalindua* 通常与盐度密切相关，如在高

盐度的海洋中仅能检测到 *Scalindua*[27]，在河口和河流沉积物中 *Scalindua* 与盐度密切相关[28]。通常水稻土盐度与海洋或沉积物存在较大差异，因此仅在某些水稻土中能检测到一定丰度的 *Scalindua*。对黄泥田水稻土的研究发现长期有机-无机配施肥后显著提高了土壤盐度，有利于 *Scalindua* 的生长[24]。对东北地区的白浆水稻土的研究发现 *Scalindua* 是厌氧氨氧化优势菌属，很可能与其高盐基饱和度有关[29]。本研究中水稻土母质为河沙泥，其盐度含量较高（表 1），因此可检测到一定数量的 *Scalindua*。对照与免耕加秸秆还田处理 *Kuenenia* 和 *Scalindua* 相对丰度均无显著性差异，但翻耕加秸秆还田及旋耕加秸秆还田后其相对丰度发生了显著变化（图 2b），说明秸秆还田和耕作同时影响了厌氧氨氧化菌的群落组成。秸秆还田后对水稻土进行不同程度的耕作，有利于 *Kuenenia* 的生长。相关分析表明，不同耕作方式与秸秆还田处理之间 *Kuenenia* 和 *Scalindua* 相对丰度具有显著负相关性，但与活性无显著关系，很可能与其代谢差异性有关。推测 *Kuenenia* 可能对土壤耕作不敏感，而稳定的土壤条件可能更有利于 *Scalindua* 的生长。

4 结 论

稻田长期不同耕作方式与秸秆还田措施下，厌氧氨氧化活性发生不同变化，但厌氧氨氧化菌功能基因丰度无显著性差异，厌氧氨氧化菌群落种类未发生改变但相对丰度发生了变化，厌氧氨氧化过程很可能受土壤秸秆还田后综合因素的调控。以后研究可重点关注厌氧氨氧化过程对秸秆还田后的响应机理。

参考文献（References）

[1] Zhu Z L. Research on soil nitrogen in China[J]. Acta Pedologica Sinica，2008，45（5）：778—783. [朱兆良. 中国土壤氮素研究[J]. 土壤学报，2008，45（5）：778—783.]

[2] Nie S A，Li H，Yang X R，et al. Nitrogen loss by anaerobic oxidation of ammonium in rice rhizosphere[J]. The ISME Journal，2015，9（9）：2059—2067.

[3] Nie S A，Zhu G B，Singh B，et al. Anaerobic ammonium oxidation in agricultural soils-synthesis and prospective[J]. Environmental Pollution，2019，244：127—134.

[4] Yang X R，Li H，Nie S N，et al. Potential contribution of anammox to nitrogen loss from paddy soils in Southern China[J]. Applied and Environmental Microbiology，2015，81（3）：938—947.

[5] Fu B B，Liu J W，Gao M H，et al. Progress in study on response of anammox bacterial species composition to environmental factors[J]. Advances in Marine Science，2014，32（3）：427—434. [富冰冰，刘吉文，高铭鸿，等. 厌氧氨氧化细菌物种组成对环境因子响应的研究进展[J]. 海洋科学进展，2014，32（3）：427—434.]

[6] Strous M，van Gerven E，Kuenen J G，et al. Effects of aerobic and microaerobic conditions on anaerobic ammonium-oxidizing（anammox）sludge[J]. Applied and Environmental Microbiology，1997，63（6）：2446—2448.

[7] Bai R，Xi D，He J Z，et al. Activity，abundance and community structure of anammox bacteria along depth profiles in three different paddy soils[J]. Soil Biology & Biochemistry，2015，91：212—221.

[8] Gu C. Study on soil anammox process and its effect factors in paddy soils with paddy-upland rotation system[D]. Hangzhou：Zhejiang University，2017. [顾超. 水旱轮作稻田土壤厌氧氨氧化及其影响因素的研究[D]. 杭州：浙江大学，2017.]

[9] Zhou H F. Study on anammox of farmland soil and its effects on nitrogen cycling[D]. Hangzhou：Zhejiang University，2018. [周慧芳. 农田土壤厌氧氨氧化及其在氮循环中影响的研究[D]. 杭州：浙江大学，2018.]

[10] Huang M，Zou Y B，Jiang P，et al. Effect of tillage on soil and crop properties of wet-seeded flooded rice[J]. Field Crops Research，2012，129：28—38.

[11] Chen D G，Zhou X Q，Li L J，et al. Relationship between root morphological characteristics and yield components of major commercial indica rice in South China[J]. Acta Agronomica Sinica，2013，39（10）：1899—1908. [陈达刚，周新桥，李丽君，等. 华南主栽高产籼稻根系形态特征及其与产量构成的关系[J]. 作物学报，2013，39（10）：1899—1908.]

[12] Elliott L F，Stott D E. Influence of no-till cropping systems on microbial relationships[J]. Advances in Agronomy，1997，60：121—147.

[13] Lu R K. Analytical methods for soil and agrochemistry[M]. Beijing：China Agricultural Science and Technology Press，2000. [鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京：中国农业科技出版社，2000.]

[14] Nie S A，Yu C J，Li H，et al. Determination of anammox activity in paddy soils with isotope-tracing technique[J]. Research of Agricultural Modernization，2015，36（4）：680—683. [聂三安，於辰佳，李虎，等. 水稻土厌氧氨氧化活性测定的同位素示踪法方法探讨[J]. 农业现代化研究，2015，36（4）：680—683.]

[15] Hefting M，Beltman B，Karssenberg D，et al. Water quality dynamics and hydrology in nitrate loaded riparian

zones in the Netherlands[J]. Environmental Pollution，2006，139（1）：143—156.

[16] Nie S A，Lei X M，Zhao L X，et al. Response of activity，abundance，and composition of anammox bacterial community to different fertilization in a paddy soil[J]. Biology and Fertility of Soils，2018，54（8）：977—984.

[17] Lao X R，Sun W H，Wang Z，et al. Effect of matching use of straw and chemical fertilzer on soil fertility[J]. Acta Pedologica Sinica，2003，40（4）：618—623.[劳秀荣，孙伟红，王真，等. 秸秆还田与化肥配合施用对土壤肥力的影响[J]. 土壤学报，2003，40（4）：618—623.]

[18] Li F C，Wang Z H，Dai J，et al. Fate of nitrogen from green manure，straw，and fertilizer applied to wheat under different summer fallow management strategies in dryland[J]. Biology and Fertility of Soils，2015，51（7）：769—780.

[19] Wang G L，Hao M D，Chen D L. Effect of stubble incorporation and nitrogen fertilization on denitrification and nitrous oxide emission in an irrigated maize soil[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizers，2006，12（6）：840—844. [王改玲，郝明德，陈德立. 秸秆还田对灌溉玉米田土壤反硝化及 N_2O 排放的影响[J]. 植物营养与肥料学报，2006，12（6）：840—844.]

[20] Dapena-Mora A，Fernández I，Campos J L，et al. Evaluation of activity and inhibition effects on Anammox process by batch tests based on the nitrogen gas production[J]. Enzyme and Microbial Technology，2007，40（4）：859—865.

[21] Shen L D，Wu H S，Liu X，et al. Vertical distribution and activity of anaerobic ammonium-oxidising bacteria in a vegetable field[J]. Geoderma，2017，288：56—63.

[22] Wang X，Qi J Y，Liu B Y，et al. Strategic tillage effects on soil properties and agricultural productivity in the paddies of Southern China[J]. Land Degradation & Development，2020，31（10）：1277—1286.

[23] Wang Y，Zhu G B，Harhangi H R，et al. Co-occurrence and distribution of nitrite-dependent anaerobic ammonium and methane-oxidizing bacteria in a paddy soil[J]. FEMS Microbiology Letters，2012，336（2）：79—88.

[24] Nie S A，Wang Y，Wang F，et al. Response of paddy soil anammox bacteria to long-term fertilization in community structure[J]. Acta Pedologica Sinica，2018，55（3）：744—753. [聂三安，王祎，王飞，等. 稻田土壤厌氧氨氧化菌群落结构对长期不同施肥的响应[J]. 土壤学报，2018，55（3）：744—753.]

[25] Cheng C，Wang J J，Cheng H H，et al. Effects of straw returning and tillage system on crop yield and soil fertility quality in paddy field under double-cropping-rice system[J]. Acta Pedologica Sinica，2018，55（1）：247—257. [成臣，汪建军，程慧煌，等. 秸秆还田与耕作方式对双季稻产量及土壤肥力质量的影响[J]. 土壤学报，2018，55（1）：247—257.]

[26] Kraiem K，Wahab M A，Kallali H，et al. Effects of short- and long-term exposures of humic acid on the Anammox activity and microbial community[J]. Environmental Science and Pollution Research International，2019，26（19）：19012—19024.

[27] Amano T，Yoshinaga I，Okada K，et al. Detection of anammox activity and diversity of anammox bacteria-related 16S rRNA genes in coastal marine sediment in Japan[J]. Microbes and Environments，2007，22（3）：232—242.

[28] Dale O R，Tobias C R，Song B. Biogeographical distribution of diverse anaerobic ammonium oxidizing（anammox） bacteria in Cape Fear River Estuary[J]. Environmental Microbiology，2009，11（5）：1194—1207.

[29] Jia H B，Liu F，Zhao D L，et al. Research on some physical-chemical properties and improvement of planosols[J]. Acta Pedologica Sinica，1997，34（2）：130—137. [贾会彬，刘峰，赵德林，等. 白浆土某些理化特性与改良的研究[J]. 土壤学报，1997，34（2）：130—137.]

（责任编辑：卢　萍）