

DOI: 10.11766/trxb202009250539

王海翠, 刘兆东, 李丹丹, 柳开楼, 黄庆海, 赵炳梓, 张佳宝. 种植模式影响施肥导致的土壤反硝化势变化及其微生物机制[J]. 土壤学报, 2022, 59(1): 242–252.

WANG Haicui, LIU Zhaodong, LI Dandan, LIU Kailou, HUANG Qinghai, ZHAO Bingzi, ZHANG Jiabao. Effect of Planting System on Fertilization-induced Variation of Soil Denitrification Potential and Its Microbial Mechanism[J]. Acta Pedologica Sinica, 2022, 59(1): 242–252.

种植模式影响施肥导致的土壤反硝化势变化及其微生物机制*

王海翠^{1, 2}, 刘兆东³, 李丹丹^{1, 2}, 柳开楼⁴, 黄庆海⁴, 赵炳梓^{1†},
张佳宝¹

(1. 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 农业农村部黄淮海平原农业环境重点实验室/山东省环保肥料工程技术研究中心, 山东省农业科学院农业资源与环境研究所, 济南 250100; 4. 国家红壤改良工程技术研究中心, 江西省红壤研究所, 南昌 330046)

摘要: 水田土壤反硝化势 (Soil denitrification potential, SDP) 往往高于旱地土壤, 但施肥对水田和旱地 SDP 的影响差异往往基于不同气候条件下的不同土壤类型获取, 其准确性可能受外界条件干扰。以发育自同一母质的相邻水田和旱地长期试验为平台, 比较不同施肥模式下水田和旱地 SDP 的变化及其与功能基因 (*narG*、*nirS*、*nirK* 和 *nosZ*) 丰度及 *nirS*-型反硝化细菌群落组成之间关系的异同。结果表明, 在水田中, 与常规氮磷钾平衡施肥 (NPK 处理) 相比, 缺钾 (NP 处理) 和缺氮 (PK 处理) 的 SDP 分别提高 33.01% 和 23.57%, 而缺磷 (NK 处理) 则降低 35.76%, 其中 NP 和 NK 处理的 SDP 变化与 *nirS* 基因丰度显著相关。这可能与施肥导致的土壤有效磷和氮/磷变化有关, 而 PK 处理的 SDP 变化与 *nirS*-型反硝化细菌 *Azospira* sp. NC3H-14 丰度的显著升高有关。在旱地中, 与 NPK 处理相比, NP、NK 和缺氮钾的 P 处理 SDP 分别提高 13.94%、26.51% 和 25.41%, NK 和 P 处理的 SDP 变化既与 *narG* 基因丰度显著增加相关, 也与不同的 *nirS*-型反硝化细菌丰度增加有关, 其中 NK 处理与 *Azospira* sp. NC3H-14 和 *Ideonella* sp. NC3L-43b 丰度增加有关, P 处理与 *Azospira* sp. NC3H-14、*Rhodanobacter* sp. D206a 和 *Rubrivivax gelatinosus* 丰度增加有关; 而土壤无定形氧化铁含量的变化可能是影响 *narG* 基因丰度的主要因素。直接比较相同环境条件下的水田和旱地结果可以发现, 水田中施肥导致的 SDP 变化主要与反硝化微生物群落组成变化有关, 而旱地中则可能同时受制于功能基因和反硝化微生物群落组成的变化。

关键词: 水田; 旱地; 反硝化势; 功能基因; *nirS*-型反硝化细菌群落

中图分类号: X17 **文献标志码:** A

Effect of Planting System on Fertilization-induced Variation of Soil Denitrification Potential and Its Microbial Mechanism

* 国家自然科学基金项目 (41977102) 和江西省自然科学基金项目 (20192BAB203022) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 41977102) and the Natural Science Foundation of Jiangxi Province (No. 20192BAB203022)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: bzhao@issas.ac.cn

作者简介: 王海翠 (1986—), 女, 山东临沂人, 博士研究生, 主要从事土壤生态、氮循环研究。E-mail: hcwang@issas.ac.cn

收稿日期: 2020-09-25; 收到修改稿日期: 2020-11-30; 网络首发日期 (www.cnki.net): 2021-02-09

WANG Haicui^{1,2}, LIU Zhaodong³, LI Dandan^{1,2}, LIU Kailou⁴, HUANG Qinghai⁴, ZHAO Bingzi^{1†}, ZHANG Jiabao¹

(1. State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Key Laboratory of Agro-Environment of Huang-Huai-Hai Plain, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Shandong Environmental Fertilizer Engineering Technology Research Center, Institute of Agricultural Resources and Environment, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China; 4. Jiangxi Institute of Red Soil, National Engineering and Technology Research Center for Red Soil Improvement, Nanchang 330046, China)

Abstract: 【 Objective 】Soil denitrification potential (SDP) is generally higher in paddy field than in upland field. However, as the effect of fertilization on SDP in paddy field and upland field varies with climatic and soil type, accuracy of its assessment is often affected by external conditions. 【 Method 】 In this study, two adjacent fields, one paddy field and one upland field, both derived from the same parent material of Quaternary red clay, in a long-term field experiment were selected for exploration of effect of fertilization regime on SDP and its association with abundances of functional genes (*narG*, *nirS*, *nirK*, and *nosZ*) and community composition of *nirS*-type denitrifiers with the aid of in-lab incubation, real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR), and high-throughput sequencing technology. 【 Result 】 In the paddy field, compared with Treatment NPK, Treatment NP and PK was significantly or 33.01% and 23.57%, respectively, higher in SDP, while Treatment NK was 35.76% lower in SDP. The effects of Treatments NP and NK were related to the abundance of *nirS* gene, and the changes in content of soil available P (AP) and N : P ratio, while that of Treatment PK was associated with the community composition of *nirS*-type denitrifiers (*Azospira* sp. NC3H-14). In the upland field, compared with Treatment NPK, Treatment NP, NK and P was 13.94%, 26.51%, and 25.41%, respectively, higher in SDP. The effects of Treatments NK and P were significantly related to the abundance of *narG* gene and of *nirS*-type denitrifiers (*Azospira* sp. NC3H-14 and *Ideonella* sp. NC3L-43b for NK treatment; *Azospira* sp. NC3H-14, *Rhodanobacter* sp. D206a, *Rubrivivax gelatinosus* for P treatment). The content of amorphous iron oxide (Feo) was probably the main factor affecting the abundance of *narG* gene. 【 Conclusion 】 The above listed findings indicate that planting system affects the effect of fertilization on SDP. The variation of SDP in paddy field is mainly attributed to *nirS*-type denitrifiers, while that in upland field primarily to the abundance of functional gene and the community composition of *nirS*-type denitrifiers.

Key words: Paddy field; Upland field; Soil denitrification potential; Functional genes; Community composition of *nirS*-type denitrifiers

土壤反硝化是土壤氮循环的重要过程，是温室气体氧化亚氮（ N_2O ）的重要排放源^[1]。土壤潜在反硝化作用的大小可用土壤反硝化潜势（Soil denitrification potential, SDP）来表示，常用的测定方法中，乙炔抑制厌氧培养法由于经济且易操作性应用最广泛。土壤反硝化包括生物反硝化和化学反硝化，其中以生物反硝化为主^[2]。生物反硝化是指异养微生物在厌氧条件下将 NO_3^- 逐步还原为 N_2 的硝酸盐异化过程^[3]。反硝化细菌群落是一个复杂的生物体系，广泛分布于复杂的属种中，而不是一个特定的分类群。因此 16rRNA 并不适用于反硝化微生物的系统发生研究，而功能基因经常被用来表征反硝化微生物，如 *narG*、*nirS*、*nirK* 和 *nosZ* 基因经常被广泛用于反硝化细菌群落的丰度和结构的检测^[4-5]。传统的微生物鉴定技术并不适用于反硝化微生物的鉴定^[6]。高通量测序技术一次可以对几十万到几百万条 DNA 分子进行测序^[7]，与其他分子生物鉴定技术

相比具有通量高、节省成本和时间的优点，因此，越来越多的被应用于反硝化微生物的鉴定。由 NO_2^- 到 NO 的反应被认为是区分反硝化过程与其他硝酸盐代谢的关键步骤，也被认为是反硝化过程的限速步骤^[8-9]。*nirS/nirK* 基因是控制此过程的编码基因^[10]，但 *nirS* 型微生物较 *nirK* 型微生物在环境中分布更广泛，因此 *nirS* 基因常被用于反硝化微生物的检测^[11]。自 1970 年以来，大气中的 N_2O 浓度一直以每年约 $0.75 \mu g \cdot L^{-1}$ 的速度增加^[12]，且全球 1/2 以上的 N_2O 来自于农田生态系统^[1]。因此，系统研究农田土壤的反硝化及其影响机制对调控农田土壤氮循环具有重要的参考意义。

农田土壤往往种植水稻和旱地作物，不同施肥模式下的水田 SDP 往往高于旱地土壤^[13-14]，并且影响水田和旱地的微生物机制也可能不同。针对水田土壤，施氮可以明显改变反硝化微生物的群落组成，从而提高水田的 SDP^[15-16]。已有研究表明，有效磷

的缺乏会限制反硝化微生物活性^[17-18]。Wei 等^[19]向缺 P 水稻土中施入 P 肥之后,发现通过改变土壤的 N/P 比,显著降低了 *amoA* 基因丰度,增加了反硝化功能基因丰度 (*narG*、*nirS*、*nirK* 及 *nosZ*)。因此,施 P 可以通过改变土壤中 P 的有效性^[17-20]和 N/P 比^[21],对土壤反硝化过程产生显著影响。而针对旱地土壤,施氮在短期内也显著改变了旱地土壤中 *nirS*-型反硝化细菌^[22]和 SDP^[23]。Mori 等^[20]在旱地土壤中加入 P 之后,发现土壤的硝化及反硝化速率均显著提高。施用 K 肥能够引起根际土壤中有效钾含量的变化,从而能够影响微生物分泌的酶,改善土壤微域环境,进而调控微生物代谢的一些功能^[24-25]。Xue 等^[26]研究表明:速效钾是影响旱地土壤 *nirK*-型反硝化细菌群落的重要因子。以上研究结果显示,不同种植模式下施肥对土壤反硝化过程的影响机制存在显著差异^[27],但是,上述施肥模式对水田和旱地土壤 SDP 的影响效应及其微生物机制均基于不同地点的水田和旱地获取,不同研究地点存在的土壤母质^[28]和气候条件^[29]差异可能会影响水田和旱地之间结果的可比性。

本研究选择位于江西进贤的相邻水田和旱地长期定位施肥试验为研究平台,辅以内室培养实验,基于实时荧光定量 PCR (qPCR) 及高通量测序,开展不同种植模式下施肥对 SDP 及其与功能基因和微生物群落组成关系的影响研究,主要研究目的包括:(1)明确施肥模式对水田和旱地土壤 SDP 的不同影响效应;(2)剖析施肥模式对水田和旱地反硝化功能基因 *narG*、*nirS*、*nirK* 和 *nosZ* 丰度,及 *nirS*-型反硝化细菌群落组成影响;(3)评估水田和旱地土壤 SDP 与功能基因及 *nirS*-型反硝化细菌群落组成之间的潜在关系。以期探索种植模式与施肥措施对土壤反硝化微生物学机制的双重影响提供参考,为优化农田温室气体减排方案提供依据。

1 材料与方 法

1.1 长期试验概况

试验地点位于江西省进贤县的红壤研究所 (116°20'24"N, 28°15'30"E)。水田、旱地均采用随机区组设计,每个处理均 3 个重复。水田选取 4 个施肥处理:常规平衡施肥 (NPK)、缺钾 (NP)、缺磷 (NK) 和缺氮 (PK) 处理。旱地的 4 个施肥处

理是:常规平衡施肥 (NPK) 处理、缺钾 (NP)、缺磷 (NK) 和缺氮钾 (P) 处理。

1.2 样品采集与处理

在 2015 年 12 月冬季完成样品采集,每个小区随机选取 5 点,采集 0~20 cm 耕层土混匀。取约 100 g 新鲜土样-80℃保存,用于土壤反硝化微生物的测定;取约 50 g 新鲜土在 4℃条件下贮存,用于铵态氮 ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) 和硝态氮 ($\text{NO}_3^-\text{-N}$) 的测定;剩余土样在室温下风干,移除肉眼可见的落叶、植物根系及石块,过 2 mm 筛,用于后期土壤理化性质的测定。

1.3 土壤理化性质的测定

土壤 pH 按土水比 1:5 充分混合后用 pH 计测定;土壤有机碳 (SOC) 用重铬酸钾氧化外加加热法测定^[30]。全氮 (TN) 用凯氏法测定^[30]。 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 和 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 用 2 mol·L⁻¹ KCl 提取后用流动注射自动分析仪测定^[30]。有效磷 (AP) 用 0.5 mol·L⁻¹ NaHCO₃ 提取,钼蓝法测定^[30]。土壤速效钾 (AK) 用 CH₃COONH₄ 提取^[30],火焰光度计测定,检测限为 0.004 mmol·L⁻¹。采用草酸铵酸性法提取非晶态氧化铁 (Feo) 和非晶态氧化铝 (Al_o)^[31],利用 ICP-MS 测定提取液中的铁和铝。

1.4 厌氧培养试验

乙炔抑制厌氧培养的具体过程如下:风干土含水量调节至 40% WFPS, 25℃黑暗条件中预激活 1 周。取相当于 6 g 干土的预激活土至 120 mL 血清培养瓶中,加入 8.658 mg 硝酸钾 (N 200 μg·g⁻¹ 干土) 和 20.508 mg 乙酸钠 (C 1 mg·g⁻¹ 干土),调节含水量至 70% WFPS。血清培养瓶用黑色橡胶塞和铝盖密封,用真空泵抽真空 2 min,注入 120 mL 纯 Ar (99.999%),再进行抽真空处理,此过程重复 3 次。最后向培养瓶内分别注入 108 mL Ar 和 12 mL C₂H₂ (10% v/v)。25℃条件下,以 180 r·min⁻¹ 振荡 15 min,然后在 25℃的培养箱中避光培养 6 h。用注射器从培养瓶顶部采集气体并储存在 20 mL 采气瓶中。之后培养瓶抽真空,重新注入 Ar,此过程重复 3 次,以确保培养瓶的厌氧条件,培养瓶再次注入 12 mL C₂H₂ 和 108 mL Ar,进行下一阶段的 6 h 厌氧培养。培养总共进行 24 h。培养期间,N₂O-N 的平均排放速率代表 SDP。

1.5 土壤反硝化势 (N₂O-N) 的测定

气体样品采用安捷伦气相色谱仪 (GC, Agilent 7980, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)

测定。代表 SDP 的 N_2O 的排放量计算：

$$F = \frac{dc}{dt} \frac{M}{Vm} V \frac{273}{273+T} \frac{1}{M} \quad (1)$$

式中， F 表示 N_2O -N 的排放速率 ($N \mu g \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$)， dc/dt 表示单位时间内气体浓度的变化量 ($mg \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)， M 表示 N_2O 的摩尔质量 ($28 g \cdot mol^{-1}$, N_2O -N)， Vm 表示摩尔体积 ($22.4 L \cdot mol^{-1}$)， V 表示培养瓶的有效体积 ($0.12 L$)， T 表示培养温度 ($25^\circ C$)， M 表示培养土干重 (kg)。

1.6 实时荧光定量 PCR (qPCR) 和测序分析

土壤 DNA 提取采用 Fast DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) 试剂盒。每个土样连续提取 3 次，混匀，降低 DNA 提取偏差。提取的 DNA 在 $-80^\circ C$ 条件下保存。采用 SYBR Premix Ex TaqTM 试剂盒于 CFX96 Optical Real-Time PCR System 扩增仪 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 上进行 qPCR 分析。*narG*、*nirS*、*nirK* 及 *nosZ* 基因的扩增体系、引物信息及扩增条件参照 Wang 等^[13]。标准曲线用各基因的代表性质粒进行 10 倍梯度稀释获得，共 5 个梯度，ddH₂O 为阴性对照。*narG*、*nirS*、*nirK* 和 *nosZ* 基因的扩增效率分别为 90.4%~93.1%、84.1%~92.8%、86.0%~87.8% 和 89.8%~89.0%。

利用 Illumina MiSeq 测序平台 (Illumina, San Diego, CA, USA) 对 *nirS* 基因的 PCR 扩增产物进行了测序，引物为 cd3aF/R3cd。

1.7 数据分析

利用 SPSS 20.0 (Chicago, USA) 和 R 3.6.1 进行数据分析。

2 结果

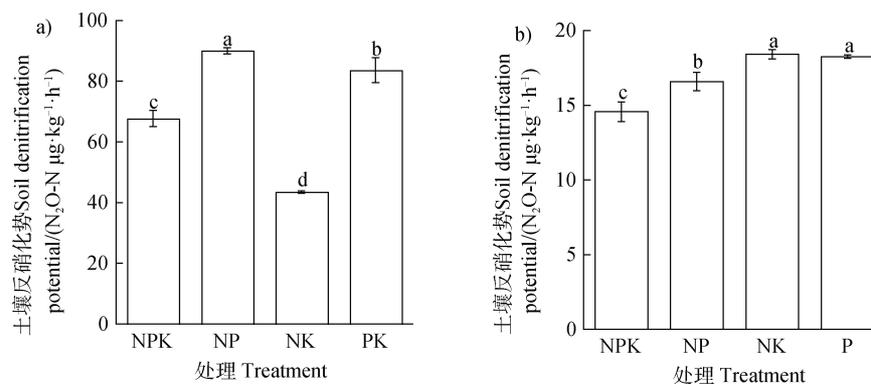
2.1 土壤理化性质

表 1 结果表明，不同施肥模式对水田 pH、SOC、TN、 NH_4^+ -N 和 Alo 没有显著影响；与 NPK 相比，NP 处理的 NO_3^- -N、C/N 和 N/P 分别降低 86.75%、3.51% 和 96.84%，而 AP 和 Feo 含量明显提高 346.7% 和 13.11%；NK 处理的 AP 含量显著降低 48.15%，而 AK 含量和 N/P 明显提高 25.08%、107.37%；PK 处理的 NO_3^- -N、C/N 和 N/P 分别下降 83.43%、5.15% 和 96.84%。

长期不同施肥模式对旱地 TN、 NH_4^+ -N 及 C/N 没有显著影响；与平衡施肥 NPK 相比，NP 处理显著提高土壤 pH 和 AP 含量，分别提高 4.88% 和 11.36%，而 SOC、 NO_3^- -N、AK 和 N/P 分别降低 9.97%、75.14%、74.43% 和 78.05%；NK 处理的土壤 pH、 NO_3^- -N、AP、Feo 和 N/P 分别降低 4.21%、59.53%、55.79%、8.11% 和 8.54%，Alo 含量显著提高；单施 P 处理，土壤 pH 和 AP 显著提高 16.35% 和 43.31%，但 SOC、 NO_3^- -N、AK、Feo、Alo 和 N/P 显著降低 11.03%、88.34%、56.49%、9.96%、23.63% 和 91.46%。

2.2 土壤反硝化势

不同施肥模式显著影响水田和旱地的 SDP，但影响规律不同。在水田中，NP 处理的 SDP 最高，其次为 PK、NPK，NK 处理的 SDP 最低；与 NPK 相比，NP 和 PK 处理的 SDP 分别提高 33.01% 和 23.57%，而 NK 处理则降低 35.76% (图 1a)。



注：图中不同小写字母表示不同施肥模式下差异显著，(Duncan 多重比较， $P < 0.05$) 下同。Note: Different lowercase letters mean significant difference between different fertilization regimes (Duncan's multiple range test, $P < 0.05$). The same below.

图 1 长期不同施肥模式对水田 (a) 和旱地 (b) 反硝化势的影响

Fig. 1 Soil denitrification potential in the paddy field (a) and upland (b) relative to fertilization regime

表 1 长期不同施肥模式对水田和旱地土壤基本性质的影响

Table 1 Soil chemical properties of the paddy field and upland relative to fertilization regime

利用方式 Land use type	处理 Treatment	pH	SOC/ (g·kg ⁻¹)	TN/ (g·kg ⁻¹)	NO ₃ ⁻ -N/ (mg·kg ⁻¹)	NH ₄ ⁺ -N/ (mg·kg ⁻¹)	AP/ (mg·kg ⁻¹)	AK/ (mg·kg ⁻¹)	Feo/ (g·kg ⁻¹)	Alo/ (g·kg ⁻¹)	C/N	N/P
水田 Paddy field	NPK	5.39±0.05a	19.88±1.19a	2.05±0.14a	3.32±0.13a	17.82±2.25a	3.51±0.04c	46.66±7.04b	0.61±0.03c	1.34±0.17a	9.70±0.15a	0.95±0.08b
	NP	5.27±0.06a	19.76±0.59a	2.11±0.09a	0.44±0.11b	15.23±5.94a	15.68±0.53b	48.68±5.34ab	0.69±0.10b	1.53±0.06a	9.36±0.15b	0.03±0.00c
	NK	5.24±0.35a	19.89±0.50a	2.03±0.06a	3.50±0.46a	17.99±4.91a	1.82±0.22d	58.36±7.05a	0.63±0.06c	1.52±0.04a	9.77±0.20a	1.97±0.08a
旱地 Upland	PK	5.28±0.00a	19.51±0.27a	2.12±0.04a	0.55±0.11b	14.19±2.36a	19.65±0.27a	54.85±0.23ab	0.92±0.02a	1.40±0.10a	9.20±0.02b	0.03±0.01c
	NPK	4.71±0.06c	9.43±0.61a	1.03±0.03a	7.24±0.64a	2.40±0.07a	8.89±0.27c	202.17±10.86a	7.03±0.37a	1.82±0.11b	9.11±0.36a	0.82±0.11a
Upland field	NP	4.94±0.11b	8.49±0.52b	0.99±0.03a	1.80±0.26c	2.44±0.06a	9.90±0.69b	51.70±2.59b	7.01±0.19a	1.94±0.24b	8.59±0.33a	0.18±0.03b
	NK	4.52±0.09d	9.47±0.66a	1.02±0.05a	2.93±0.11b	2.86±0.12a	3.93±0.15d	236.34±21.23a	6.46±0.14b	2.34±0.30a	9.30±0.15a	0.75±0.01a
	P	5.48±0.05a	8.39±0.55b	0.98±0.08a	0.84±0.13c	2.75±0.39a	12.74±0.51a	87.96±16.93b	6.33±0.08b	1.39±0.07c	8.60±0.87a	0.07±0.01c

注: SOC 表示土壤有机碳, TN 表示土壤全氮, AP 表示土壤有效磷, AK 表示土壤速效钾, Feo 表示土壤无定形氧化铁, Alo 表示土壤无定形氧化铝, C/N 表示土壤有机碳与土壤全氮的比, N/P 表示土壤硝态氮与有效磷的比。表中数据均为平均值±标准差 (n=3), 同一列数据后不同字母表示同一土壤类型不同施肥处理之间显著性差异 (Duncan 多重比较, P<0.05)。

Note: SOC: Soil organic carbon, TN: Total N, AP: Available P, AK: Available K, Feo: amorphous iron oxide, Alo: amorphous aluminum oxide, C/N: Ratio of soil organic carbon to total nitrogen, N/P: Ratio of NO₃⁻-N to Available P. Different letters within the same column indicate significant difference between treatment (Duncan's multiple range test, P<0.05).

旱地 NK 和 P 处理 SDP 最高，并且 NK 和 P 处理间没有显著差异，其次为 NP 处理，而 NPK 处理最低；相对于 NPK 处理，NK、P 和 NP 处理的 SDP 分别显著提高 26.51%、25.41% 和 13.94% (图 1b)。

2.3 土壤反硝化功能基因及与 SDP 之间关系

除了水田的 *narG* 基因，本研究采用的施肥模式均显著影响 *nirS*、*nirK* 和 *nosZ* 基因的丰度 (图 2)。图 2 表明，在水田中，与 NPK 处理相比，NP 处理显著提高 *nirS* 基因丰度，提高 22.94%，而 NK 和 PK 处理则显著降低 24.07% 和 19.80%；NK 处理的 *nirK* 基因丰度显著降低 26.08%，NP 和 PK 处理没有显著变化；NP 和 NK 处理的 *nosZ* 基因丰度分别显著提高 22.45% 和 17.98%。Spearman 相关性分析表

明，水田 SDP 变化与 *nirS* 基因丰度显著正相关 ($r = 0.783^{**}$)，与 *narG*、*nirK* 和 *nosZ* 基因丰度没有显著相关性 (表 2)。

在旱地中 (图 2)，与 NPK 处理相比，NP 处理的 *narG* 基因丰度显著降低 12.97%，而 NK 和 P 处理显著提高 46.90% 和 46.94%；NK 处理对 *nirS* 基因丰度没有显著影响，NP 和 P 处理显著提高 80.36% 和 468.19%；*nirK* 基因丰度不受 NP 和 NK 处理影响，单施 P 肥显著降低 38.40%；NP 和 P 处理显著提高 *nosZ* 基因丰度，分别提高 8035% 和 116.5%。Spearman 相关性分析表明，旱地 SDP 变化与 *nirG* 基因丰度显著正相关 ($r = 0.783^{**}$)，与 *nirS*、*nirK* 和 *nosZ* 基因丰度没有显著相关性 (表 2)。

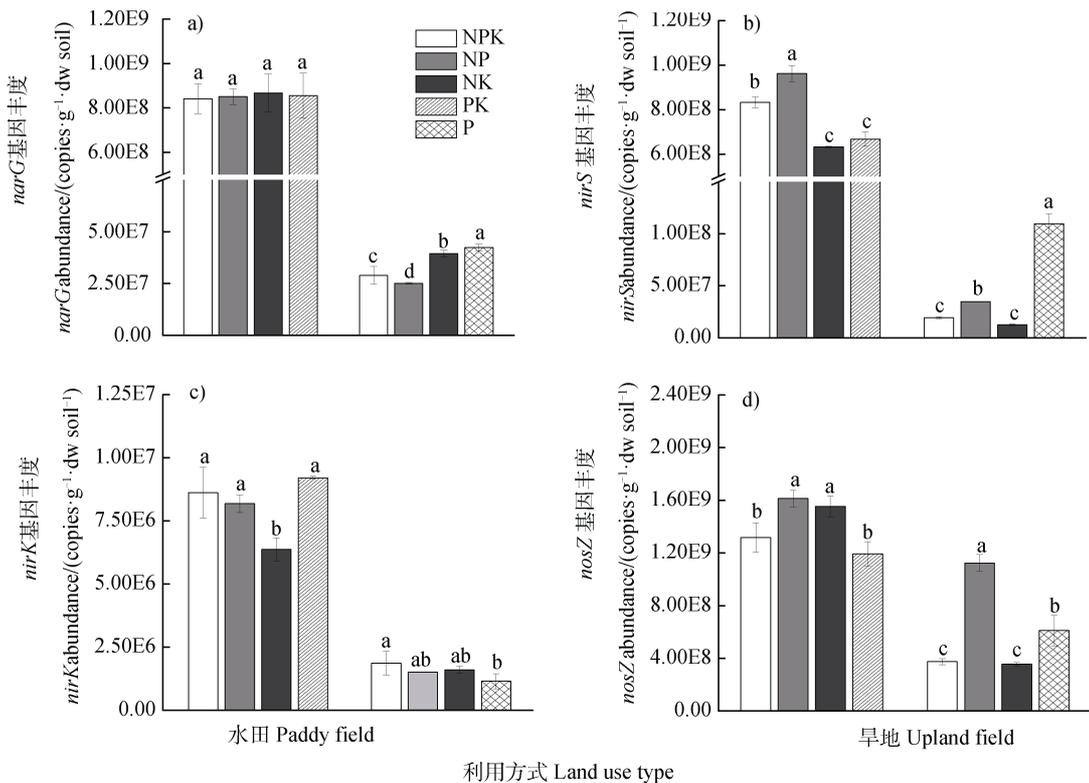


图 2 长期不同施肥模式对水田、旱地反硝化功能基因丰度的影响

Fig. 2 Abundances of *narG*, *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes in the paddy field and upland field relative to fertilization regime

表 2 水田、旱地反硝化势与功能基因的 Spearman 相关分析

Table 2 Spearman's correlations analysis of SDPs of the paddy field and upland field with functional genes

项目 Item	水田 Paddy field				旱地 Upland field			
	<i>narG</i>	<i>nirS</i>	<i>nirK</i>	<i>nosZ</i>	<i>narG</i>	<i>nirS</i>	<i>nirK</i>	<i>nosZ</i>
SDP	0.252	0.783 ^{**}	0.531	0.217	0.592 [*]	-0.035	-0.524	-0.049

2.4 *nirS*-型反硝化细菌群落组成

水田和旱地 24 个土壤样品测序总共获得 415 848 条高质量序列, 在 97% 相似度聚类下得到 4 727 个 OTUs。从门水平分析, 水田样品的 *nirS*-型反硝化细菌有 97.49% 来自 Proteobacteria, 包括 Betaproteobacteria (62.39%)、Alphaproteobacteria (30.16%) 和 Gammaproteobacteria (4.93%); 旱地样品中有 99.28% 来自 Proteobacteria, 包括 Betaproteobacteria (74.85%)、Gammaproteobacteria (19.29%) 和 Alphaproteobacteria (5.14%)。

置换多元方差分析结果表明, 水田 *nirS*-型反硝化细菌群落组成只有 PK 处理与 NPK 处理存在显著差异 ($P < 0.05$), 而 NP 和 NK 处理与 NPK 处理间均不存在显著差异 (表 3); 而对旱地而言, 仅 NP 处理的 *nirS*-型反硝化细菌群落组成与 NPK 处理间无显著差异, NK 和 P 处理与 NPK 处理间均存在显著差异 ($P < 0.05$)。

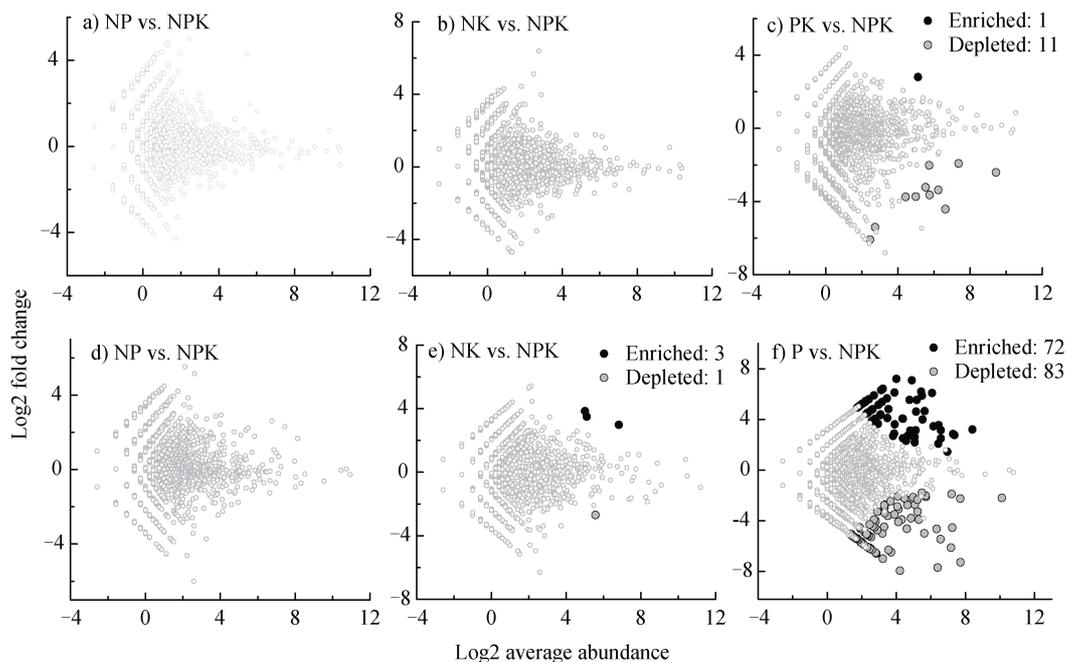
进一步采用火山灰图分析不同施肥处理间 *nirS*-型反硝化细菌的差异, 结果表明, 在水田中,

NK 和 NP 与 NPK 处理无显著差异的 OTUs (图 3a, 图 3b), 这与表 3 结果一致; 而 PK 处理与 NPK 处理之间微生物差异主要表现为 PK 处理中的 1 个 OTU (*Azospira* sp. NC3H-14) 丰度显著增加, 而 11 个 OTUs 丰度显著降低 (图 3c)。在旱地中, NK 与 NPK 处理之间的差异主要表现为 NK 处理具有更高丰度的 3 个 OTUs, 它们归类为 *Azospira* sp. NC3H-14 和 *Ideonella* sp. NC3L-43b (图 3e)。而 P 与 NPK 处

表 3 水田和旱地 *nirS*-型反硝化细菌群落组成的置换多元方差分析

Table 3 PERMANOVA analysis of community composition of *nirS*-type denitrifier in the paddy field and upland

处理	水田 Paddy field		旱地 Upland field	
	F	P	F	P
NPK vs. NP	1.77	0.846	3.70	0.270
NPK vs. NK	1.66	1.000	6.98	0.018
NPK vs. PK	6.92	0.018	—	—
NPK vs. P	—	—	17.70	0.018



注: 黑点代表丰富型物种, 灰点代表消弭型物种, 空心点代表稳定型物种。(a)、(b)、(c) 分别是红壤水田 NP、NK、PK 与 NPK 对比, (d)、(e)、(f) 分别是红壤旱地 NP、NK、P 与 NPK 对比。Note: Black point represents OTUs enriched, gray point represents OTUs depleted, and the hollow point represents the stable OTUs. (a), (b), and (c) stands for NP vs. NPK, NK vs. NPK, and PK vs. NPK in the paddy field, respectively. (d), (e), and (f) are NP vs. NPK, NK vs. NPK, and P vs. NPK in the upland field, respectively.

图 3 长期不同施肥模式下水田和旱地 OTU 水平 *nirS*-型反硝化细菌差异物种

Fig. 3 Volcano plots showing enrichment (black) and depletion (gray) of *nirS*-type denitrifiers at the OTU level in the paddy field and upland relative to treatment

理间的主要差异表现为 P 处理中具有更高丰度的 72 个 OTUs, 它们主要归类为 *Azospira* sp. NC3H-14、*Rhodanobacter* sp. D206a 和 *Rubrivivax gelatinosus* (图 3f)。

3 讨 论

3.1 水田和旱地 SDP 与功能基因的关系

反硝化功能基因丰度对 SDP 的影响一直以来存在不确定性。有研究认为反硝化功能基因丰度与 SDP 没有直接的关系^[32], 也有研究指出反硝化功能基因丰度变化能显著影响 SDP^[6, 33]。本研究通过 Spearman 相关分析研究发现水田 SDP 变化与 *nirS* 基因丰度显著正相关 ($r=0.783^{**}$), 而与 *narG*、*nirK* 和 *nosZ* 基因丰度没有显著相关性 (表 2), 这与罗希茜等^[34]的研究结果一致, 其研究结果表明施肥导致的水田 SDP 变化与 *nirS* 基因丰度有关。与 NPK 处理相比, NP 处理同时提高了 *nirS* 基因丰度和 SDP, 而 NK 处理同时降低了 *nirS* 基因丰度和 SDP。上述结果表明, 与 NPK 处理相比, NP 处理和 NK 处理的 SDP 差异与 *nirS* 基因丰度的变化有关。土壤微生物生物量通常较土壤和植物具有更低的 N/P, 微生物更容易受到磷的限制^[35]。Mori 等^[20]及 Hartman 和 Richardson^[36]通过对缺磷土壤反硝化的研究发现, 土壤 AP 含量的提高可以促进土壤氮循环及反硝化微生物的生长, 从而提高土壤反硝化速率。Wei 等^[19]研究也发现, 通过改变土壤的 C/P 和 N/P, 可以显著提高反硝化功能基因丰度。因此推断 NP 处理中较高的 AP 含量以及较低的 N/P 可能会引起 *nirS* 基因丰度的增加, 使其 SDP 显著高于平衡施肥 NPK。而 NK 处理中较低的 AP 含量以及较高的 N/P 可能降低了 *nirS* 基因丰度, 从而可能与 NK 处理较低的 SDP 有关 (图 1)。

与水田不同, 不同施肥模式下, 旱地 SDP 变化与 *narG* 基因丰度显著正相关 ($r=0.592^*$) (表 2), 这与 Dong 等^[37]的研究结果非常相似, 其研究发现 *narG* 基因丰度显著影响玉米-小麦生态系统中 N_2O 的排放。与 NPK 处理相比, P 和 NK 处理同时提高了 *narG* 基因丰度和 SDP, 表明 *narG* 基因丰度的变化与 P 和 NK 处理的 SDP 差异有关。不同施肥模式

下, NPK 和 NP 处理的 Feo 含量明显高于 NK 和 P 处理。Feo 胶体对阴阳离子的吸附性限制反应基质的有效性, 例如 SOC 的有效性, 从而降低 *narG* 基因丰度^[38]。因此, NK 和 P 处理中较低的 Feo 可能引起 *narG* 基因丰度显著高于 NPK 处理, 从而使 P 和 NK 处理具有较高的 SDP。

3.2 水田和旱地影响 SDP 与 *nirS*-型反硝化细菌群落组成的关系

在水田中, *Azospira* sp. NC3H-14 是 PK 和 NPK 处理间具有显著差异的反硝化微生物, 而 NP 和 NK 处理与 NPK 处理间反硝化细菌群落组成间没有差异 (图 3c)。*Azospira* 菌属不能利用碳水化合物, 但可利用有机酸、氨基酸等为碳源, 氧或硝酸盐作为末端电子受体^[39]。Li 等^[40]研究发现, 与 NPK 相比, 不平衡施肥改变土壤有机碳结构, 且养分有效性较养分含量对微生物的影响更大^[41]。因此, PK 施肥可能改变了土壤有机碳结构使其更容易被 *Azospira* NC3H-14 利用, 而提高了 *Azospira* sp. NC3H-14 的丰度, 并提高了 PK 施肥处理的 SDP。

在旱地中, 与 NPK 处理相比, NK 处理的 *Azospira* sp. NC3H-14 和 *Ideonella* sp. NC3L-43b 丰度更高, 而 P 处理的 *Azospira* sp. NC3H-14、*Rhodanobacter* sp. D206a 和 *Rubrivivax gelatinosus* 具有更高的丰度 (图 3)。有研究表明, 在厌氧条件下, *Rubrivivax gelatinosus* 可以通过将亚硝酸盐还原为 N_2 来提高 SDP^[42-43]。上述反硝化细菌丰度的增加与 NK 及 P 处理显著改变 *nirS*-型反硝化细菌群落组成有关 (表 3), 进而提高 NK 和 P 处理的 SDP。旱地 NP 处理 SDP 的变化与本研究测定的功能基因丰度和 *nirS*-型反硝化细菌组成均无关, 这可能与其他本研究未测定的参数变化有关。比如, 反硝化酶活性也是调控 SDP 变化的重要因素^[44-45]。此外, Chee-Sanford 等^[46]研究发现, 非特异性 *nosZ* 基因 (Clade II *nosZ*) 较特异性扩增的 *nosZ* 基因微生物在生态系统中 (特别是土壤中) 更具有优势。因此, 非特异性 *nosZ* 基因在水田、旱地不同种植模式下可能会对 SDP 有不同的影响。而本研究中的 *nosZ* 基因扩增引物无法反应非特异性 *nosZ* 基因代表的微生物。因此, 影响水田和旱地间 SDP 变化的机理值得进一步深入研究。

4 结论

通过直接比较相同土壤母质和气候条件下的水田和旱地 SDP 变化发现, 与常规平衡施肥 NPK 相比, 水田 NP 和 PK 处理的 SDP 显著提高, 而 NK 处理显著降低, 其中 NP 和 NK 的 SDP 变化主要与 *nirS* 基因丰度变化有关, 而 PK 处理较高的 SDP 与反硝化细菌 *Azospira* sp. NC3H-14 的丰度增加有关; 而在旱地中, NP、NK、P 处理的 SDP 均显著提高, 其中 NK 和 P 处理的 SDP 变化与 *narG* 基因丰度显著正相关, 同时与 NK 处理中反硝化细菌 *Azospira* sp. NC3H-14 和 *Ideonella* sp. NC3L-43b 丰度显著增加, P 处理中 *Azospira* sp. NC3H-14、*Rhodanobacter* sp. D206a 和 *Rubrivivax gelatinosus* 丰度显著增加有关。

参考文献 (References)

- [1] Hu H W, Chen D L, He J Z. Microbial regulation of terrestrial nitrous oxide formation: Understanding the biological pathways for prediction of emission rates[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2015, 39 (5): 729—749.
- [2] Wrage N, Velthof G L, van Beusichem M L, et al. Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2001, 33 (12/13): 1723—1732.
- [3] Philippot L, Hallin S, Schloter M. Ecology of denitrifying prokaryotes in agricultural soil[J]. Advances in Agronomy, 2007, 96: 249—305.
- [4] Sun R B, Guo X S, Wang D Z, et al. Effects of long-term application of chemical and organic fertilizers on the abundance of microbial communities involved in the nitrogen cycle[J]. Applied Soil Ecology, 2015, 95: 171—178.
- [5] Wolsing M, Priemé 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 (2): 261—271.
- [6] Chen Z, Hou H J, Zheng Y, et al. Influence of fertilisation regimes on a *nosZ*-containing denitrifying community in a rice paddy soil[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2012, 92 (5): 1064—1072.
- [7] Buermans H P J, den Dunnen J T. Next generation sequencing technology: Advances and applications[J]. Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Basis of Disease, 2014, 1842 (10): 1932—1941.
- [8] Cutruzzola F, Brown K, Wilson E K, et al. The nitrite reductase from *Pseudomonas aeruginosa*: Essential role of two active-site histidines in the catalytic and structural properties[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98 (5): 2232—2237.
- [9] Zumft W G. Cell biology and molecular basis of denitrification[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1997, 61 (4): 533—616.
- [10] Throbäck I N, Enwall K, Jarvis Å, 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.
- [11] Braker G, Fesefeldt A, Witzel K P. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64 (10): 3769—3775.
- [12] IPCC. Climate change 2014: Mitigation of climate change, summary for policymakers[M]//Contribution of working group III to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge: Cambridge University Press, 2014.
- [13] Wang H C, Liu Z D, Ma L, et al. Denitrification potential of paddy and upland soils derived from the same parent material respond differently to long-term fertilization[J]. Frontiers in Environmental Science, 2020, 8: 105. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.00105>.
- [14] Xu Y B, Cai Z C. Denitrification characteristics of subtropical soils in China affected by soil parent material and land use[J]. European Journal of Soil Science, 2007, 58 (6): 1293—1303.
- [15] Wang L, Sheng R, Yang H C, et al. Stimulatory effect of exogenous nitrate on soil denitrifiers and denitrifying activities in submerged paddy soil[J]. Geoderma, 2017, 286: 64—72.
- [16] Wang J, Cheng Y, Cai Z C, et al. Effects of long-term fertilization on key processes of soil nitrogen cycling in agricultural soil: A review[J]. Acta Pedologica Sinica, 2016, 53 (2): 292—304. [王敬, 程谊, 蔡祖聪, 等. 长期施肥对农田土壤氮素关键转化过程的影响[J]. 土壤学报, 2016, 53 (2): 292—304.]
- [17] He M Z, Dijkstra F A. Phosphorus addition enhances loss of nitrogen in a phosphorus-poor soil[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2015, 82: 99—106.
- [18] Sheng R, Meng D L, Wu M N, et al. Effect of agricultural land use change on community composition of bacteria and ammonia oxidizers[J]. Journal of Soils and Sediments, 2013, 13 (7): 1246—1256.
- [19] Wei X M, Hu Y J, Peng P Q, et al. Effect of P stoichiometry on the abundance of nitrogen-cycle genes in phosphorus-limited paddy soil[J]. Biology and Fertility of Soils, 2017, 53 (7): 767—776.
- [20] Mori T, Ohta S, Ishizuka S, et al. Effects of phosphorus

- addition on N₂O and NO emissions from soils of an *Acacia mangium* plantation[J]. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2010, 56 (5): 782—788.
- [21] Zhang Y, Song C L, Ji L, et al. Cause and effect of N/P ratio decline with eutrophication aggravation in shallow lakes[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 627: 1294—1302.
- [22] Mo X H, Ma W, Shi R J, et al. Diversity of *nirS*-type denitrifying bacteria under different nitrogen fertilizer management in wheat soil[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49 (9): 1203—1208. [莫旭华, 麻威, 史荣久, 等. 氮肥对小麦田土壤 *nirS* 型反硝化细菌多样性的影响[J]. *微生物学报*, 2009, 49 (9): 1203—1208.]
- [23] Wang J, Yan X. Denitrification in upland of China: Magnitude and influencing factors[J]. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 2016, 121(12): 3060—3071.
- [24] Tian Y Y. Effects of long-term potassium deficiency on tomato root exudates and rhizosphere microecology[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2018. [田悦悦. 长期缺钾对设施番茄根系分泌物及根际微生物的影响[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2018.]
- [25] Wang Y Y, Lu S E, Chen X M, et al. Analyzing the nitrate reductase gene (*nirK*) community in the peat soil of the Zoige Wetland of the Tibetan Plateau[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2017, 37 (19): 6607—6615. [王莹燕, 卢圣鄂, 陈小敏, 等. 若尔盖高原湿地泥炭沼泽土亚硝酸盐还原酶 (*nirK*) 反硝化细菌群落结构分析[J]. *生态学报*, 2017, 37 (19): 6607—6615.]
- [26] Xue K, Wu L Y, Deng Y, et al. Functional gene differences in soil microbial communities from conventional, low-input, and organic farmlands[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79 (4): 1284—1292.
- [27] Zulkarnaen N, Cheng Y, Zhang J B. Denitrification potential and gas emission in red soils under different land use types[J]. *Soils*, 2020, 52 (2): 348—355. [Nanang Zulkarnaen, 程谊, 张金波. 不同利用方式红壤反硝化势和气体产物排放特征[J]. *土壤*, 2020, 52 (2): 348—355.]
- [28] Xing X Y, Sheng R, Xu H F, et al. Denitrification characteristics of dryland soils derived from different parent materials[J]. *Soils*, 2019, 51 (5): 949—954. [邢肖毅, 盛荣, 徐慧芳, 等. 不同母质发育旱地土壤反硝化功能差异及其关键影响因素[J]. *土壤*, 2019, 51 (5): 949—954.]
- [29] Wang J Y, Chadwick D R, Cheng Y, et al. Global analysis of agricultural soil denitrification in response to fertilizer nitrogen[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 616/617: 908—917.
- [30] Page A L, Miller R H, Keeney D R. Methods of soil analysis: Chemical and microbiological properties[M]. Madison, Wisconsin: Soil Science Society of America, 1982.
- [31] Pansu M, Gautheryrou J. Handbook of soil analysis: Mineralogical, organic and inorganic methods groenekennis[M]. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 2006.
- [32] Liu Y, Shen K, Wu Y C, et al. Abundance and structure composition of *nirK* and *nosZ* genes as well as denitrifying activity in heavy metal-polluted paddy soils[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2018, 35 (2): 100—107.
- [33] Cui P Y, Fan F L, Yin C, et al. Long-term organic and inorganic fertilization alters temperature sensitivity of potential N₂O emissions and associated microbes[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2016, 93: 131—141.
- [34] Luo X Q, Chen Z, Hu R G, et al. Effect of long-term fertilization on the diversity of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) in paddy soil[J]. *Environmental Science*, 2010, 31 (2): 423—430. [罗希茜, 陈哲, 胡荣桂, 等. 长期施用氮肥对水稻土亚硝酸还原酶基因多样性的影响[J]. *环境科学*, 2010, 31 (2): 423—430.]
- [35] Cleveland C C, Liptzin D. C: N: P stoichiometry in soil: Is there a “Redfield ratio” for the microbial biomass?[J]. *Biogeochemistry*, 2007, 85 (3): 235—252.
- [36] Hartman W H, Richardson C J. Differential nutrient limitation of soil microbial biomass and metabolic quotients (*qCO₂*): Is there a biological stoichiometry of soil microbes?[J]. *PLoS One*, 2013, 8 (3): e57127.
- [37] Dong Z X, Zhu B, Jiang Y, et al. Seasonal N₂O emissions respond differently to environmental and microbial factors after fertilization in wheat-maize agroecosystem[J]. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 2018, 112 (2): 215—229.
- [38] Turner S, Mikutta R, Guggenberger G, et al. Distinct pattern of nitrogen functional gene abundances in top- and subsoils along a 120, 000-year ecosystem development gradient[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2019, 132: 111—119.
- [39] Reinhold-Hurek B, Hurek T. The genera *Azoarcus*, *Azovibrio*, *Azospira* and *Azonexus*[M]//The Prokaryotes. New York: Springer, 2006: 873—891.
- [40] Li D D, Chen L, Xu J S, et al. Chemical nature of soil organic carbon under different long-term fertilization regimes is coupled with changes in the bacterial community composition in a Calcaric Fluvisol[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2018, 54 (8): 999—1012.
- [41] Briar S S, Fonte S J, Park I, et al. The distribution of nematodes and soil microbial communities across soil aggregate fractions and farm management systems[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2011, 43 (5): 905—914.
- [42] Magoč T, Salzberg S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J].

- Bioinformatics, 2011, 27 (21): 2957—2963.
- [43] Edwards J, Johnson C, Santos-Medellín C, et al. Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112 (8): E911-E920.
- [44] Shi Y, Huang G H. Relationship between soil denitrifying enzyme activities and N₂O emission[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 1999, 10 (3): 329—331. [史奕, 黄国宏. 土壤中反硝化酶活性变化与 N₂O 排放的关系[J]. 应用生态学报, 1999, 10 (3): 329—331.]
- [45] Wang L F, Cai Z C. Effects of temperature and water regime on nitrification and denitrification activity of upland red soils[J]. Soils, 2004, 36 (5): 543—546, 560. [王连峰, 蔡祖聪. 水分和温度对旱地红壤硝化活力和反硝化活力的影响[J]. 土壤, 2004, 36 (5): 543—546, 560.]
- [46] Chee-Sanford J C, Connor L, Krichels A, et al. Hierarchical detection of diverse Clade II (atypical) nosZ genes using new primer sets for classical- and multiplex PCR array applications[J]. Journal of Microbiological Methods, 2020, 172: 105908.

(责任编辑: 卢 萍)