

# 长期施肥对塿土 *nirS* 型反硝化细菌的影响及其与 $N_2O$ 排放的关系

刘耕苑<sup>1</sup>, 肖杰<sup>1</sup>, 高明霞<sup>2</sup>, 孙本华<sup>1,4</sup>, 张树兰<sup>1</sup>, 杨学云<sup>1</sup>, 冯浩<sup>2,3,4</sup>, 张彤勋<sup>1</sup>

(1.西北农林科技大学 资源环境学院/农业部西北植物营养与农业环境重点实验室,

陕西 杨凌 712100; 2.西北农林科技大学 水利与建筑工程学院, 陕西 杨凌 712100;

3.西北农林科技大学 水土保持研究所, 陕西 杨凌 712100; 4.中国旱区节水农业研究院, 陕西 杨凌 712100)

**摘 要:**土壤反硝化作用是土壤  $N_2O$  产生的重要过程,亚硝酸盐还原酶(NIR)催化的亚硝态氮( $NO_2^-$ )还原为一氧化氮(NO)是反硝化作用的关键环节,研究长期施肥对反硝化微生物的影响及其与  $N_2O$  排放的关系对于全面理解土壤反硝化过程具有重要意义。基于 28 年的旱作雨养长期施肥试验,通过常规监测、定量 PCR 和高通量测序等探讨了长期不同施肥(不施肥 CK、偏施肥的单施氮肥 N 和氮钾配施 NK、以及氮磷钾平衡施肥 NPK)下塿土  $N_2O$  排放和 *nirS* 反硝化细菌群落特征及两者之间的关系。结果表明:长期化肥施用(N,NK 和 NPK)均显著提高了  $N_2O$  累积排放量,其中平衡施肥(NPK)最高。长期化肥施用对 *nirS* 基因丰度和 *nirS* 型反硝化细菌的  $\alpha$ -多样性无显著影响,但长期平衡施用化肥提高了 *uncultured\_bacterium\_2303* 和 *Rhodanobacter\_sp.\_D206a* 的相对丰度,降低了 *unclassified\_k\_norank\_d\_Bacteria* 和 *unclassified\_p\_Proteobacteria* 的相对丰度,从而改变了 *nirS* 型反硝化细菌的群落结构组成。雨养旱作条件下,土壤有机碳(SOC)、全氮(TN)、有效磷(AP)和 pH 等土壤性质是塿土 *nirS* 型反硝化细菌群落结构组成变化的主要影响因素。塿土 *nirS* 型反硝化细菌群落结构组成对土壤  $N_2O$  排放具有显著影响,而 *nirS* 基因丰度和 *nirS* 型反硝化细菌多样性并没有显著影响。

**关键词:**长期施肥; *nirS* 型反硝化细菌; 氧化亚氮; 实时定量 PCR; 高通量测序

中图分类号:X144; X172

文献标识码:A

文章编号:1005-3409(2022)02-0099-07

## Effect of Long-Term Fertilization on *nirS*-Type Denitrifier and Its Relationship with $N_2O$ Emission in Eum-Orthic Anthrosols

LIU Gengyuan<sup>1</sup>, XIAO Jie<sup>1</sup>, GAO Mingxia<sup>2</sup>, SUN Benhua<sup>1,4</sup>, ZHANG Shulan<sup>1</sup>,

YANG Xueyun<sup>1</sup>, FENG Hao<sup>2,3,4</sup>, ZHANG Tongxun<sup>1</sup>

(1.College of Natural Resources and Environment, Northwest A&F University/Key Laboratory of Plant Nutrition and Agro-Environment, Ministry of Agriculture, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2.College of Water Resources and Architectural Engineering, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 3.Institute of Soil and Water Conservation, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 4.Institute of Water Saving Agriculture in Arid Region of China, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** Soil denitrification is an important process for the production of soil  $N_2O$ , and that Nitrite reductase (NIR) catalyzes the reduction of nitrite nitrogen ( $NO_2^-$ ) to nitric oxide (NO) is the key step of denitrification. The study on the impact of long-term fertilization on denitrifying microorganisms and its relationship with soil  $N_2O$  emissions is of great significance for a comprehensive understanding of the soil denitrification process. Based on 28 years of long-term fertilization experiments in rain-fed dry farming system, the characteristics of soil *nirS*-type denitrifying bacterial communities and  $N_2O$  emission and their relationship were investigated under different types of long-term fertilization (No fertilization of CK, only N fertilization and NK combined fertilization of partial fertilizations, and balanced fertilization of NPK) by conventional monito-

收稿日期:2021-02-04

修回日期:2021-03-30

资助项目:国家高技术研究发展计划(2013AA102904);陕西省自然科学基金研究计划项目(2018JM4007);高等学校学科创新引智计划资助(B12007)

第一作者:刘耕苑(1995—),男,山西临汾人,硕士研究生,研究方向为土壤化学和土壤生态。E-mail:lgyhao0@163.com

通信作者:孙本华(1972—),男,江苏淮安人,教授,主要从事土壤化学和土壤生态研究。E-mail:sunbenhua@nwafu.edu.cn

ring, quantitative PCR and high-throughput sequencing. The results showed that all types of long-term fertilization (N, NK and NPK) significantly increased the cumulative  $\text{N}_2\text{O}$  emission ( $\text{EN}_2\text{O}$ ), in which balanced fertilization (NPK) caused the the highest cumulative  $\text{N}_2\text{O}$  emission; long-term fertilization had no significant effect on *nirS* gene abundance and the  $\alpha$ -diversity of *nirS*-type denitrifying bacteria, while long-term balanced fertilization increased the relative abundance of *uncultured\_bacterium\_2303* and *Rhodanobacter\_sp.\_D206a*, and reduced the relative abundance of *unclassified\_k\_norank\_d\_Bacteria* and *unclassified\_p\_Proteobacteria*, thereby changed the community structure of *nirS*-type denitrifying bacteria. Soil properties such as soil organic carbon, total nitrogen, available phosphorus and pH are the main factors influencing the *nirS*-type denitrifying bacterial community structure that has a significant effect on soil  $\text{N}_2\text{O}$  emission, while the abundance of *nirS* gene abundance and the diversity of *nirS*-type denitrifying bacteria have no significant effects in Eum-Orthic Anthrosols under rain-fed dry farming system.

**Keywords:** long-term fertilization; *nirS*-type denitrifier; nitrous oxide; quantitative real-time PCR; high-throughput sequencing

氧化亚氮( $\text{N}_2\text{O}$ )是导致气候变化最重要的温室气体之一,其全球变暖潜力是  $\text{CO}_2$  的 298 倍,在大气中滞留时间长,而且还会导致臭氧层损耗<sup>[1]</sup>。自工业革命以来,全球大气中的  $\text{N}_2\text{O}$  浓度增长了约 16%,其主要原因是人类活动干扰了自然氮循环<sup>[2]</sup>。许多研究表明,土壤  $\text{N}_2\text{O}$  主要来自土壤反硝化作用<sup>[1,3]</sup>。土壤反硝化作用主要由反硝化微生物参与,其中亚硝酸盐( $\text{NO}_2^-$ )还原为一氧化氮( $\text{NO}$ )是反硝化作用的关键环节,由亚硝酸盐还原酶(NIR)来催化<sup>[4]</sup>。编码 NIR 的基因(主要为 *nirK* 和 *nirS*)经常被用作分析反硝化菌群落功能的标记物<sup>[5]</sup>,其中,*nirS* 在系统发育分析应用更为广泛<sup>[6]</sup>。通过 *nirS* 反硝化功能基因的定量分析(qPCR)和高通量测序分析可以评估全面衡量 *nirS* 基因丰度、*nirS* 型反硝化细菌的  $\alpha$ -多样性以及群落结构组成<sup>[7]</sup>。

不同生态系统中, $\text{N}_2\text{O}$  排放与土壤性质和 *nirS* 反硝化细菌之间的关系已有不少报道<sup>[8-9]</sup>。土壤性质会影响  $\text{N}_2\text{O}$  排放<sup>[10]</sup>, $\text{N}_2\text{O}$  排放量与土壤有机碳和土壤硝态氮含量正相关,与土壤 pH 负相关<sup>[5,11-12]</sup>。有研究表明, $\text{N}_2\text{O}$  排放量与 *nirS* 反硝化细菌丰度和群落结构无关<sup>[7]</sup>;但也有研究发现, $\text{N}_2\text{O}$  排放量与 *nirS* 基因丰度密切相关<sup>[13]</sup>。这些不同可能主要是由于土壤类型和性质以及施肥方式不同造成的,研究和明确不同土壤类型和土壤性质下 *nirS* 反硝化细菌丰度、多样性和群落结构特征及其与  $\text{N}_2\text{O}$  排放之间的关系,对于全面理解土壤反硝化过程具有重要意义。

全球 60% 的  $\text{N}_2\text{O}$  排放量来自于农业土壤<sup>[14]</sup>,其中施肥是影响土壤  $\text{N}_2\text{O}$  排放的关键因素。许多研究表明,长期不同施肥方式可引起土壤性质的改变并导致 *nirS* 细菌丰度、多样性和群落结构产生显著差异<sup>[15-16]</sup>。瘠土是人为长期土粪堆垫而形成的典型土

壤,是关中地区主要土壤类型<sup>[17]</sup>,长期施肥对土壤理化性质产生了巨大影响<sup>[18]</sup>,并且对农田  $\text{N}_2\text{O}$  的排放产生影响<sup>[19]</sup>,但其  $\text{N}_2\text{O}$  排放产生差异的原因和微生物机制尚不明确。本研究以 20 世纪 90 年代初建立的旱作雨养农田长期施肥定位试验为基础<sup>[19]</sup>,通过分析长期不同施肥对旱作雨养农田土壤理化性质、 $\text{N}_2\text{O}$  排放和 *nirS* 型反硝化细菌丰度和群落结构的影响及其相互关系,以期对旱作雨养农田制定合理的肥料管理措施来减缓农田  $\text{N}_2\text{O}$  排放提供理论和实践依据<sup>[20]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验地点和基本情况

长期肥料定位试验位于中国陕西杨凌农业高新技术产业示范区(北纬  $34^{\circ}17'$ 、东经  $108^{\circ}00'$ )的“国家黄土肥力和肥料效益监测基地”内。气候类型为暖温带大陆性季风气候,年平均气温为  $12.9^{\circ}\text{C}$ ,年平均降水量为 550~600 mm,主要集中在 7—9 月,蒸发量为 993 mm,无霜期 184~216 d,没有明显的年变化。土壤类型为瘠土(土垫旱耕人为土),黄土母质<sup>[21]</sup>。

### 1.2 试验设计

长期试验始于 1990 年秋,种植体系为冬小麦—夏休闲。长期肥料试验共 7 个处理,本研究选取其中不施肥(CK)、单施氮肥(N)、施氮钾肥(NK)和施氮磷钾肥(NPK)共 4 个处理,小区面积为  $399\text{ m}^2$  ( $19\text{ m} \times 21\text{ m}$ )<sup>[21]</sup>。氮肥用量为  $135\text{ kg/hm}^2$ ,磷肥用量为  $108\text{ kg/hm}^2$ ,钾肥用量为  $67.5\text{ kg/hm}^2$ 。氮、磷和钾肥分别采用尿素、过磷酸钙和硫酸钾。所有肥料均在小麦播前一次性全部施入。

### 1.3 气体样品采集和测定

气体样品采用静态箱法采集,每个处理随机设置 3 个静态箱底座,于 2017 年 6 月至 2018 年 6 月,每

隔 7 d 采集气体样品一次,采用气相色谱法测定 N<sub>2</sub>O 浓度,并计算获得年度 N<sub>2</sub>O 排放量<sup>[19]</sup>。

1.4 土壤样品采集

2018 年 6 月小麦收获后采集 0—20 cm 耕层混合土样,每静态箱附近随机采集 9 个点组成一个混合样品,样品装入塑封袋并置于冰盒中运回实验室。新鲜样品剔除动植物残体,过 2 mm 筛后分成三部分<sup>[21]</sup>。一部分样品风干并保存于室温下用于土壤理化性质分析;一部分保存在<5℃冰箱冷藏并于一周内测定土壤硝态氮;一部分土壤样品保存在-80℃超低温冰箱里用于土壤 *nirS* 基因丰度、*nirS* 型反硝化细菌的多样性和群落结构的测定。

1.5 土壤理化性质测定

土壤基本理化性质的测定方法参照土壤农化分析<sup>[22]</sup>。土壤 pH 测定采用电极法(水:土=1:1);土壤有机碳采用重铬酸钾容量法;全氮采用硫酸消煮-凯氏定氮法;土壤硝态氮采用 KCl 浸提-流动注射分析仪测定;土壤有效磷采用 NaHCO<sub>3</sub> 浸提-分光光度法;土壤速效钾采用 NH<sub>4</sub>OAC 浸提-原子吸收光谱法。

1.6 土壤 DNA 的提取、qPCR 和高通量测序

称取相当于 0.5 g 干土的鲜土,使用 E.Z.N.A.© soil 分离试剂盒(Omega Bio-tek,Norcross,GA,U.S.)进行土壤 DNA 的提取,使用百分之一的琼脂糖凝胶电泳检测<sup>[23]</sup>。使用 *nirS*-cd3aF(5'-GTSAACGTSAAGGARAC-SGG-3')和 *nirS*-R3cd(5'-GASTTCGGRTGSGTCTTGA-3')引物通过 ABI GeneAmp © 9700 型 PCR 仪进行扩增<sup>[24-25]</sup>。*nirS* 基因丰度利用 QuantiFluor™-ST (Promega,USA)进行检测定量<sup>[26]</sup>。利用 Illumina 公司的 MiseqPE300 平台进行测序<sup>[23]</sup>。共获得了 118,932 条有效序列,在 97% 相似度下聚类得到 864 个 OTU。所有处理覆盖率均为 99%,说明样品被检出的概率很高。

1.7 数据分析和统计

使用 QIIME 管道分析原始的焦磷酸测序读数,以去除低质量的读数,并从序列读数中去除接头,条形码和引物。对每个样品分别进行反硝化细菌序列的分类学分类(OTU)。使用 UPARSE 软件(version7.1, <http://drive5.com/uparse/>),根据 97%的相

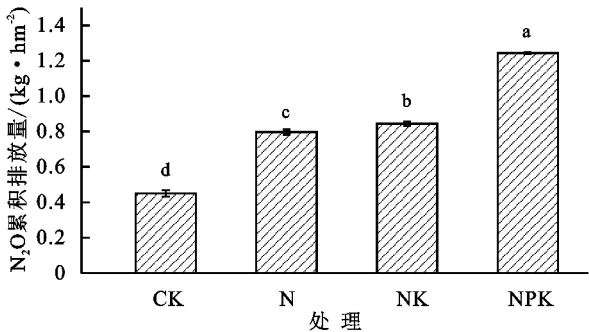
似度下进行 OTU 聚类<sup>[23]</sup>。使用 RDP classifier(<http://rdp.cme.msu.edu/>)注释每个 OTU 的代表性序列。比对 Silva(Release115, <http://www.arb-silva.de>)数据库,设置比对阈值为 70%<sup>[27]</sup>。

利用美吉的 I-Sanger 生信云平台(<https://www.i-sanger.com/>)进行 α-多样分析(包括 Shannon,Chao1 和 OTUs 等指数)、Heatmap 分析和冗余分析<sup>[23]</sup>。使用 SPSS 21 软件进行单因素方差分析(LSD 法,  $p < 0.05$ )和 Pearson 相关性分析。使用 Origin Pro 9.0 软件进行作图。图表中数据为 3 个重复的平均值±标准差。

2 结果与分析

2.1 长期施肥对土壤 N<sub>2</sub>O 累积排放量和土壤性质的影响

长期施肥显著改变了土壤 N<sub>2</sub>O 累积排放量(图 1)。所有施肥处理(N,NK 和 NPK)的 N<sub>2</sub>O 累积排放量(EN<sub>2</sub>O)均显著高于不施肥处理(CK),并且不同施肥处理间存在显著差异,其大小顺序为 NPK>NK>N。长期不同施肥方式下土壤性质产生了显著差异(表 1)。与 CK 处理相比,NK 处理和 NPK 处理显著降低了土壤 pH,以 NPK 处理为最低(pH=8.2)。所有施肥处理均显著提高了 SOC 和 TN 含量,其中 NPK 处理提高最大,分别提高了 31.50%和 21.35%。所有施肥处理均显著提高了土壤 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 含量,增幅达 3.3~3.6 倍,但施肥处理间无显著差异。施磷处理(NPK)显著提高了土壤 AP 含量,施钾处理(NK 和 NPK)显著提高了土壤速效钾(AK)含量。



注:不同字母表示 5%水平上差异显著( $p < 0.05$ )。

图 1 不同施肥处理土壤 N<sub>2</sub>O 累积排放量

表 1 不同施肥处理土壤性质

| 处理  | pH     | 土壤有机碳/<br>(g·kg <sup>-1</sup> ) | 全氮/<br>(g·kg <sup>-1</sup> ) | 硝态氮/<br>(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 有效磷/<br>(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 速效钾/<br>(mg·kg <sup>-1</sup> ) |
|-----|--------|---------------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| CK  | 8.32a  | 7.84d                           | 0.89c                        | 1.99b                          | 3.6b                           | 197b                           |
| N   | 8.31ab | 8.38c                           | 0.98b                        | 8.75a                          | 3.1b                           | 197b                           |
| NK  | 8.29b  | 8.76b                           | 1.03ab                       | 8.58a                          | 4.0b                           | 345a                           |
| NPK | 8.20c  | 10.31a                          | 1.08a                        | 9.11a                          | 26.6a                          | 306a                           |

注:同列数值后不同小写字母表示处理间差异显著( $p < 0.05$ )。下表同。

## 2.2 长期施肥对土壤 *nirS* 基因丰度、*nirS* 型反硝化细菌的 $\alpha$ -多样性和群落结构的影响

每克干土的 *nirS* 基因丰度为  $7.28 \times 10^6 \sim 11.79 \times 10^6$  个。与 CK 相比,所有施肥处理的 *nirS* 基因丰度无显著变化。所有施肥处理的 *nirS* 型反硝化细菌群落的

表 2 不同施肥处理土壤的 *nirS* 基因丰度和细菌  $\alpha$ -多样性

| 处理  | <i>nirS</i> 基因丰度/<br>( $\times 10^6$ copies $\cdot$ g $^{-1}$ ) | Shannon<br>指数     | Chao1<br>指数        | OUTs           | 物种数         |
|-----|-----------------------------------------------------------------|-------------------|--------------------|----------------|-------------|
| CK  | 7.28 $\pm$ 1.99a                                                | 4.12 $\pm$ 0.19ab | 428.9 $\pm$ 14.3b  | 352 $\pm$ 13b  | 16 $\pm$ 1a |
| N   | 11.49 $\pm$ 4.16a                                               | 4.09 $\pm$ 0.14ab | 452.8 $\pm$ 53.4ab | 359 $\pm$ 29ab | 16 $\pm$ 2a |
| NK  | 11.79 $\pm$ 2.46a                                               | 4.28 $\pm$ 0.10a  | 527.9 $\pm$ 77.2a  | 420 $\pm$ 50a  | 16 $\pm$ 3a |
| NPK | 7.70 $\pm$ 1.29a                                                | 3.97 $\pm$ 0.15b  | 466.7 $\pm$ 28.9ab | 351 $\pm$ 36b  | 15 $\pm$ 1a |

不同施肥处理土壤 *nirS* 型反硝化细菌种水平的分布比例(将相对丰度 $<1\%$ 的部分合并为 others)见图 2,丰富度最高的 4 个优势种为 *unclassified\_k\_norank\_d\_Bacteria*, *Uncultured\_bacterium\_2303*, *unclassified\_p\_Proteobacteria* 和 *Rhodanobacter\_sp.\_D206a*。*unclassified\_k\_norank\_d\_Bacteria* 的相对丰度,CK,N 和 NK 差异不显著,但均显著高于 NPK 处理。*unclassified\_p\_Proteobacteria* 的相对丰度,CK,N 和 NK 差异不显著,其中 CK 和 N 显著高于 NPK。*uncultured\_bacterium\_2303* 的相对丰度 NPK 最高,显著高于 CK 和 N。*Rhodanobacter\_sp.\_D206a* 的相对丰度,CK,N 和 NK 差异不显著,但均显著低于 NPK。CK 和 N 的 *nirS* 型反硝化细菌群落结构组成最接近,其次是 NK,而与 NPK 差别较大(图 2)。

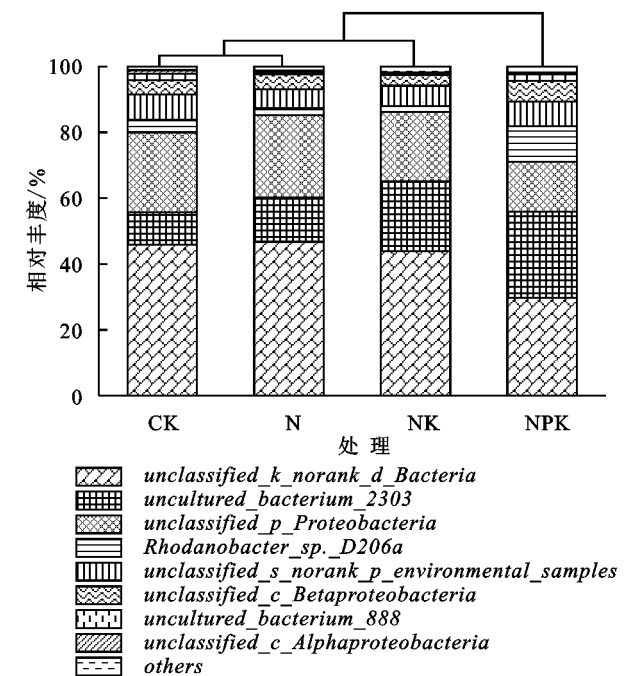


图 2 不同施肥处理土壤 *nirS* 型反硝化细菌种水平相对丰度和聚类分析结果

Shannon 指数与 CK 均无显著差异,但 NK 显著高于 NPK。相比 CK,NK 显著提高了 Chao1 指数,而其他处理间没有显著差异。NK 测得的 OUT 数量最高达 420 个,且显著高于 CK 和 NPK。所有处理土壤 *nirS* 型反硝化细菌物种数(species)无显著差异(表 2)。

## 2.3 N<sub>2</sub>O 累积排放量、*nirS* 型反硝化细菌群落和土壤性质之间的关系

冗余分析(RDA)可反映环境因子与 *nirS* 型反硝化细菌群落结构组成之间的关联,RDA1 和 RDA2 共解释了 *nirS* 型反硝化细菌群落结构总变化的 81.92%(图 3),能够反映群落结构和土壤理化性质的绝大部分信息。土壤 *nirS* 型反硝化细菌群落结构组成与 EN<sub>2</sub>O 显著相关,其中,EN<sub>2</sub>O 与 *uncultured\_bacterium\_2303* 的相对丰度极显著正相关,与 *Rhodanobacter\_sp.\_D206a* 的相对丰度显著正相关,与 *unclassified\_p\_Proteobacteria* 和 *unclassified\_k\_norank\_d\_Bacteria* 的相对丰度显著负相关(图 3)。RDA 分析表明,N<sub>2</sub>O 累积排放量(EN<sub>2</sub>O)与土壤 pH 极显著负相关,与土壤 SOC,TN,AP 和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 含量极显著正相关,与 AK 显著正相关(图 3)。

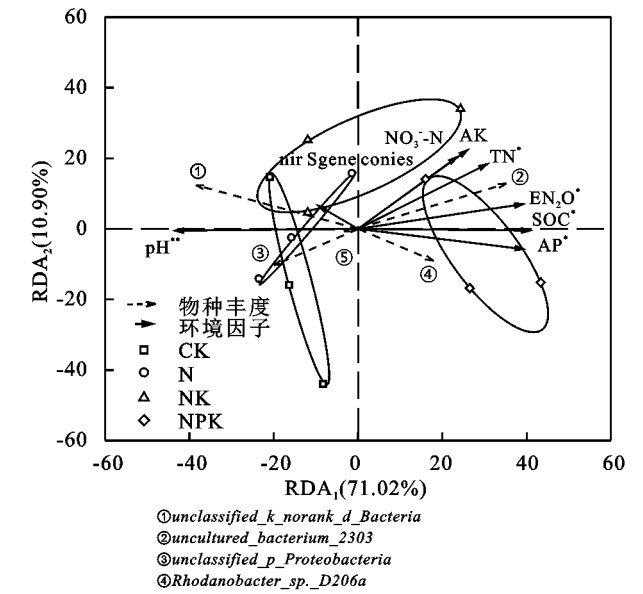
SOC,AP 和 TN 含量对土壤 *nirS* 型反硝化细菌群落结构组成具有显著影响( $p<0.05$ ),而土壤 pH 具有极显著影响( $p<0.01$ )。*uncultured\_bacterium\_2303* 和 *Rhodanobacter\_sp.\_D206a* 的相对丰度与 SOC,AP 和 TN 含量极显著正相关,而 *unclassified\_p\_Proteobacteria* 和 *unclassified\_k\_norank\_d\_Bacteria* 呈显著负相关。*uncultured\_bacterium\_2303* 和 *uncultured\_bacterium\_888* 的相对丰度与土壤 pH 值极显著负相关,而 *unclassified\_p\_Proteobacteria* 和 *unclassified\_k\_norank\_d\_Bacteria* 呈极显著正相关(图 3)。

## 3 讨论

土壤 N<sub>2</sub>O 主要来自土壤反硝化作用<sup>[1,3]</sup>,许多研究表明,土壤 N<sub>2</sub>O 排放与反硝化微生物(*nirS* 型反硝化细菌群落)和反硝化底物(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N)有关<sup>[28-29]</sup>。作为反硝化作用的最直接底物,NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 含量的高低会直接影响



$N_2O$  排放量<sup>[30]</sup>。本研究结果,长期施用化肥均显著提高了矮土旱作雨养农田的  $N_2O$  排放量(图 1),其中平衡施用化肥(NPK)显著高于非平衡施肥(N 和 NK),这表明长期不同施肥确实会造成土壤  $N_2O$  排放的显著差异。从反硝化作用的底物  $NO_3^-$ -N 含量来看,施肥处理均显著高于不施肥处理,但不同施肥处理间并没有显著差异(表 1),这表明长期不同施肥土壤  $N_2O$  排放差异并非是底物含量差异造成的,故这种土壤  $N_2O$  排放的差异应来源于土壤微生物的差异。



注:所有的排序轴由蒙特卡罗算法检验,\*代表环境因子与群落结构在 0.05 水平上显著相关,\*\*代表在 0.01 水平上极显著相关。

图 3 土壤理化性质、 $N_2O$  累积排放量和 *nirS* 细菌群落结构的冗余分析

许多研究表明, $N_2O$  排放量与 *nirS* 基因丰度(多度)呈正相关<sup>[13,31]</sup>。本研究中,Pearson 相关分析表明, $EN_2O$  与 *nirS* 基因丰度之间的相关系数为 0.057,相关性不显著。这表明长期不同化肥施用下矮土 *nirS* 基因丰度对土壤  $N_2O$  排放并没有显著影响。*nirS* 基因丰度仅代表 *nirS* 型反硝化细菌的数量,而不能代表 *nirS* 基因的表达以及亚硝酸盐还原酶的活性,并且极易受外界环境的影响而发生变化。本研究中,长期施用化肥对矮土 *nirS* 型反硝化细菌丰度并没有显著影响(表 2),黑土、灌淤土和黑垆土上进行的长期施肥试验结果也同样表明,长期施氮磷钾化肥对土壤 *nirS* 基因丰度没有显著影响<sup>[5,16,32]</sup>。可见,旱作雨养条件下,长期施肥后矮土  $N_2O$  累积排放量的变化并不能通过 *nirS* 型反硝化细菌丰度的变化来解释。

对比不施肥处理,长期施肥对土壤 *nirS* 型反硝化细菌  $\alpha$ -多样性无显著影响,但是长期施 NK 肥显著高于长期施 NPK 肥(表 2)。相较于 NK 处理,NPK

处理的 *nirS* 型反硝化细菌的群落结构发生改变,部分优势种(*uncultured\_bacterium\_2303* 和 *Rhodanobacter\_sp.\_D206a*)的相对丰度显著提高,未找到分类信息细菌(*unclassified\_p\_Proteobacteria* 和 *unclassified\_k\_norank\_d\_Bacteria*)的相对丰度显著降低,这可能导致了 *nirS* 细菌群落  $\alpha$ -多样性的降低(图 2 和表 2)。此外,NPK 处理的 OTUs 指数和物种数量(species)较 NK 少也说明了这一点(表 2)。长期施肥对土壤 *nirS* 型反硝化细菌  $\alpha$ -多样性的影响可能与施用磷肥有关。有研究表明,土壤磷含量较高会降低土壤微生物的  $\alpha$ -多样性<sup>[33]</sup>。由于长期施用磷肥,NPK 的土壤有效磷含量达到了 26.6 mg/kg,显著高于不施肥处理和不施磷处理(表 1)。本研究中,通过 Pearson 相关分析表明, $EN_2O$  与反映 *nirS* 型反硝化细菌  $\alpha$ -多样性的 Shannon 指数、Chao1 指数、OTUs 指数和物种数之间的相关系数分别为 -0.299, 0.248, -0.004 和 -0.069,均没有显著相关性。这表明长期不同化肥施用下矮土 *nirS* 型反硝化细菌多样性对土壤  $N_2O$  排放也没有显著影响。因此,*nirS* 型反硝化细菌群落  $\alpha$ -多样性亦不是影响长期施肥后矮土  $N_2O$  累积排放量的关键因素。

越来越多的研究表明,对  $N_2O$  排放起关键作用的是 *nirS* 型反硝化细菌中的某些优势菌,比如 *Rhodanobacter*, *Azospirillum*, *Bradyrhizobium* 和 *Paracoccus* 等<sup>[3,34]</sup>。雨养旱作条件下,矮土 *nirS* 型反硝化细菌的主要优势种为 *uncultured\_bacterium\_2303*, *Rhodanobacter\_sp.\_D206a*, *unclassified\_p\_Proteobacteria* 和 *unclassified\_k\_norank\_d\_Bacteria*(图 2)。长期不同化肥施用导致矮土的 *nirS* 型反硝化细菌群落结构组成产生了显著差异,其中长期平衡施用化肥提高了 *uncultured\_bacterium\_2303* 和 *Rhodanobacter\_sp.\_D206a* 的相对丰度,降低了 *unclassified\_p\_Proteobacteria* 和 *unclassified\_k\_norank\_d\_Bacteria* 的相对丰度;而长期非平衡施肥(N 和 NK)对 *unclassified\_p\_Proteobacteria*, *unclassified\_k\_norank\_d\_Bacteria* 和 *Rhodanobacter\_sp.\_D206a* 的相对丰度没有显著影响(图 2)。冗余分析进一步表明,*nirS* 型反硝化细菌群落结构组成对  $N_2O$  排放的影响与关键优势种的相对丰度有关。 $EN_2O$  与 *uncultured\_bacterium\_2303* 和 *Rhodanobacter\_sp.\_D206a* 相对丰度显著正相关,而与 *unclassified\_p\_Proteobacteria* 和 *unclassified\_k\_norank\_d\_Bacteria* 的相对丰度显著负相关(图 3)。

因此,雨养旱作条件下,长期施肥改变了**矮土** *nirS* 型反硝化细菌的群落结构组成,从而影响了  $\text{N}_2\text{O}$  排放。

土壤 SOC 能够通过矿化作用间接为反硝化细菌提供电子供体,从而可以促进反硝化作用;土壤 pH 值会影响 *nirS* 型反硝化细菌的生长环境,而 AP 提高可以为 *nirS* 型细菌生长代谢提供所需要的磷素营养<sup>[35]</sup>。许多研究表明,长期不同施肥方式导致 *nirS* 型细菌群落结构组成发生改变的主要原因是长期施肥导致的 SOC, TN, 全磷和 pH 值等土壤因子的改变<sup>[36-37]</sup>。本研究中,长期非平衡施肥与不施肥处理土壤性质较接近,而长期平衡施用化肥显著提高了 SOC, TN 和 AP, 并降低了土壤 pH 值(表 1)。相较于其他处理,长期平衡施用 NPK 化肥后土壤 *nirS* 型细菌优势种中的 *uncultured\_bacterium\_2303* 和 *Rhodanobacter\_sp.\_D206a* 的相对丰度显著增加,而 *unclassified\_k\_norank\_d\_Bacteria* 和 *unclassified\_p\_Proteobacteria* 的相对丰度显著下降(图 2)。冗余分析也表明, SOC, AP, TN 和 pH 值等土壤性质是影响 *nirS* 型细菌群落结构组成的主要环境因素(图 3)。

## 4 结论

雨养旱作条件下,长期施用化肥能够显著提高**矮土**  $\text{N}_2\text{O}$  排放量。长期化肥施用对 *nirS* 基因丰度和 *nirS* 型反硝化细菌的  $\alpha$ -多样性均没有显著影响。长期平衡施用化肥提高了 *nirS* 型反硝化细菌优势种 *uncultured\_bacterium\_2303* 和 *Rhodanobacter\_sp.\_D206a* 的相对丰度并降低了 *unclassified\_p\_Proteobacteria* 和 *unclassified\_k\_norank\_d\_Bacteria* 的相对丰度,改变了 *nirS* 型反硝化细菌群落结构组成。旱作雨养条件下,长期施用化肥通过改变**矮土** SOC, TN, AP 含量和土壤 pH 等土壤性质而影响了 *nirS* 型反硝化细菌群落结构组成。*nirS* 型反硝化细菌群落结构组成变化,而不是 *nirS* 基因丰度和 *nirS* 型反硝化细菌多样性的变化导致不同施肥土壤  $\text{N}_2\text{O}$  排放产生差异。

### 参考文献:

- [1] Butterbach-Bahl K, Baggs E M, Dannenmann M, et al. Nitrous oxide emissions from soils: how well do we understand the processes and their controls [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2013, 368(1621). DOI: 10.1098/rstb.2013.0122.
- [2] Syakila A, Kroeze C. The global nitrous oxide budget revisited[J]. Greenhouse Gas Measurement and Management, 2011, 1(1): 17-26.
- [3] Shi Y L, Liu X R, Zhang Q W. Effects of combined biochar and organic fertilizer on nitrous oxide fluxes and the related nitrifier and denitrifier communities in a saline-alkali soil[J]. Science of the Total Environment, 2019, 686: 199-211.
- [4] Zhou S, Huang T, Zhang C, et al. Illumina MiSeq sequencing reveals the community composition of *NirS*-Type and *NirK*-Type denitrifiers in Zhoucun reservoir: A large shallow eutrophic reservoir in northern China[J]. Rsc. Advances, 2016, 6(94): 91517-91528.
- [5] Tao R, Wakelin S A, Liang Y, et al. Nitrous oxide emission and denitrifier communities in drip-irrigated calcareous soil as affected by chemical and organic fertilizers[J]. Science of the Total Environment, 2018, 612: 739-749.
- [6] Heylen K, Gevers D, Vanparys B, et al. The incidence of *nirS* and *nirK* and their genetic heterogeneity in cultivated denitrifiers [J]. Environmental Microbiology, 2006, 8(11): 2012-2021.
- [7] Dandie C E, Sophie W, Leclair C L, et al. Abundance, diversity and functional gene expression of denitrifier communities in adjacent riparian and agricultural zones [J]. FEMS Microbiol Ecol., 2011, 77(1): 69-82.
- [8] Palmer K, Biasi C, Horn M A. Contrasting denitrifier communities relate to contrasting  $\text{N}_2\text{O}$  emission patterns from acidic peat soils in arctic tundra [J]. The Isme Journal, 2012, 6(5): 1058-1077.
- [9] Braker G, Conrad R. Diversity, structure, and size of  $\text{N}_2\text{O}$ -producing microbial communities in soils: what matters for their functioning[J]. Adv. Appl. Microbiol., 2011, 75: 33-70.
- [10] Liu X, Chen C R, Wang W J, et al. Soil environmental factors rather than denitrification gene abundance control  $\text{N}_2\text{O}$  fluxes in a wet sclerophyll forest with different burning frequency[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2013, 57: 292-300.
- [11] Barrett M, Khalil M I, Jahangir M M R, et al. Carbon amendment and soil depth affect the distribution and abundance of denitrifiers in agricultural soils[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2016, 23(8): 7899-7910.
- [12] 程效义, 刘晓琳, 孟军, 等. 生物炭对棕壤  $\text{NH}_3$  挥发、 $\text{N}_2\text{O}$  排放及氮肥利用效率的影响[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(4): 801-807.
- [13] Huang R, Wang Y, Gao X, et al. Nitrous oxide emission and the related denitrifier community: A short-term response to organic manure substituting chemical fertilizer[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2016, 128: 1-10.

- 2020,192.DOI:10.1016/j.ecoenv.2020.110291.
- [14] Wang Q, Liu Y R, Zhang C, et al. Responses of soil nitrous oxide production and abundances and composition of associated microbial communities to nitrogen and water amendment[J]. *Biology and Fertility of Soils*,2017,53(6):601-611.
- [15] Hu X, Liu J, Wei D, et al. Chronic effects of different fertilization regimes on *nirS*-type denitrifier communities across the black soil region of Northeast China[J]. *Pedosphere*, 2020,30(1):73-86.
- [16] Sun R, Guo X, Wang D, 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.
- [17] Yang X Y, Li P R, Zhang S L, et al. Long-term-fertilization effects on soil organic carbon, physical properties, and wheat yield of a loess soil[J]. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2011,174(5):775-784.
- [18] 吴娟,齐雁冰,常庆瑞,等.关中地区**塍**土系统分类归属及代表土系建立[J].*土壤学报*,2021,58(2):357-371.
- [19] 肖杰,刘平静,孙本华,等.长期施用化肥对旱作雨养农田  $\text{N}_2\text{O}$  排放特征的影响[J].*西北农林科技大学学报:自然科学版*,2020,48(5):108-114,122.
- [20] 郭慧楠,马丽娟,黄志杰,等.咸水滴灌对棉田土壤  $\text{N}_2\text{O}$  排放和反硝化细菌群落结构的影响[J].*环境科学*, 2020,41(5):2455-2467.
- [21] 郭芸,孙本华,王颖,等.长期施用不同肥料土 PLFA 指纹特征[J].*中国农业科学*,2017,50(1):94-103.
- [22] 鲍士旦.土壤农化分析[M].3 版.北京:中国农业出版社,2000.
- [23] 刘平静,肖杰,孙本华,等.长期不同施肥措施下**塍**土菌群落结构变化及其主要影响因素[J].*植物营养与肥料学报*,2020,26(2):307-315.
- [24] Michotey V, Méjean V, Bonin P. Comparison of methods for quantification of cytochrome *cd1*-denitrifying bacteria in environmental marine samples[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000,66(4):1564-1571.
- [25] 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 Microbiol Ecol*, 2004,49(3):401-417.
- [26] Huse S M, Huber J A, Morrison H G, et al. Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing[J]. *Genome Biology*, 2007,8(7):1-9.
- [27] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project:Improved data processing and web-based tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 41:590-596.
- [28] Fracetto F J C, Fracetto G G M, Bertini S C B, et al. Effect of agricultural management on  $\text{N}_2\text{O}$  emissions in the Brazilian sugarcane yield[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017,109:205-213.
- [29] Morales S E, Jha N, Saggar S. Biogeography and biophysicochemical traits link  $\text{N}_2\text{O}$  emissions,  $\text{N}_2\text{O}$  emission potential and microbial communities across New Zealand pasture soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015,82:87-98.
- [30] Francis C, O'Mullan G, Cornwell J, et al. Transitions in *nirS*-type denitrifier diversity, community composition, and biogeochemical activity along the Chesapeake Bay estuary[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4. DOI:10.3389/fmicb.2013.00237.
- [31] Bian R X, Sun Y J, Li W H, et al. Co-composting of municipal solid waste mixed with matured sewage sludge: The relationship between  $\text{N}_2\text{O}$  emissions and denitrifying gene abundance[J]. *Chemosphere*, 2017, 189:581-589.
- [32] Cui P Y, Fan F L, Yin C, et al. Long-term organic and inorganic fertilization alters temperature sensitivity of potential  $\text{N}_2\text{O}$  emissions and associated microbes[J]. *Soil Biology and Biochemistry*,2016,93:131-141.
- [33] Liu C X, Zhao X R, Lin Q M, et al. Decrease in diversity and shift in composition of the soil bacterial community were closely related to high available phosphorus in agricultural Fluvisols of North China[J]. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B: Soil and Plant Science*,2019,69(7):618-630.
- [34] Fang S, Nan H, Lv D Q, et al. Effects of sulfoxaflor on greenhouse vegetable soil  $\text{N}_2\text{O}$  emissions and its microbial driving mechanism[J]. *Chemosphere*, 2021, 267.DOI:10.1016/j.chemosphere.2020.129248.
- [35] 曹文超,宋贺,王娅静,等.农田土壤  $\text{N}_2\text{O}$  排放的关键过程及影响因素[J].*植物营养与肥料学报*,2019,25(10):1781-1798.
- [36] 胡晓婧,刘俊杰,于镇华,等.东北黑土 *nirS* 型反硝化细菌群落和网络结构对长期施用化肥的响应[J].*植物营养与肥料学报*,2020,26(1):1-9.
- [37] Yin C, Fan F, Song A, et al. Denitrification potential under different fertilization regimes is closely coupled with changes in the denitrifying community in a black soil[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015,99(13):5719-5729.