

李娜,徐慧芳,黄国勤. 稻田不同轮作休耕模式下土壤反硝化功能基因群落结构[J]. 华中农业大学学报, 2022, 41(6): 42-50.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2022.06.005

稻田不同轮作休耕模式下土壤反硝化 功能基因群落结构

李娜,徐慧芳,黄国勤

江西农业大学生态科学研究中心,南昌 330045

摘要 为了探索不同轮作休耕种植模式下稻田土壤氮素及相关微生物群落结构的变化,采用乙炔抑制法测定土壤反硝化潜势,利用高通量测序手段分析反硝化微生物群落多样性和组成,以传统种植模式紫云英-早稻-晚稻(A)为对照,比较分析4种轮作休耕种植模式:紫云英-早稻-玉米||甘薯(B)、油菜-甘蔗||春大豆(C)、紫云英-春大豆-秋大豆(D)和休耕(E)的土壤理化性状、土壤反硝化潜势及相关微生物组成变化。结果显示:4种轮作休耕模式的土壤反硝化潜势显著低于传统轮作模式,有效减少了土壤氮素气态损失;4种轮作休耕模式的 *nirK* 和 *nirS* 功能基因群落结构存在显著差异,其中 *nirK* 基因群落结构受轮作休耕模式的影响小于 *nirS* 功能基因;与传统种植模式相比,休耕模式更有利于 *nirS* 功能基因 α 多样性的积累;从 *nirS* 和 *nirK* 基因群落物种相对丰度来看,轮作休耕模式的优势物种丰度高于传统轮作模式,其中紫云英-早稻-玉米||甘薯(B)和休耕(E)的菌属丰度相对较高。并且影响反硝化潜势的关键菌属是大豆根瘤菌 *Bradyrhizobium* ($r^2 = 0.85, P < 0.05$) 和 unclassified_p_*Proteobacteria* ($r^2 = 0.88, P < 0.05$);相关性分析及冗余分析发现,pH、有效磷、速效钾、硝态氮($\text{NO}_3^- - \text{N}$)与反硝化潜势呈显著相关,而影响 *nirK* 和 *nirS* 功能基因群落结构的重要影响因子是含水率。结果表明:稻田适当采用水旱、旱旱轮作及休耕模式,会改变土壤的淹水环境,影响反硝化功能基因群落结构,有助于抑制土壤氮素的气态流失,促进土壤肥力提高及土壤结构改良,其中“紫云英-早稻-玉米||甘薯”和“休耕”种植模式效果最佳。

关键词 轮作休耕;氮流失;反硝化潜势;反硝化功能基因群落结构;氮素利用效率;微生物种群

中图分类号 S344.1; S154.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2022)06-0042-09

水稻是世界三大粮食作物之一。2019年,我国水稻收获面积为6 092.19万 hm^2 ,居世界首位,约占全球水稻收获面积的1/3 (<http://www.fao.org/home/en/>)。稻田土壤长期处于淹水厌氧状态,反硝化作用强烈,导致稻田氮素气态损失严重,氮肥利用率低下,约为30%~40%^[1]。反硝化产物氧化亚氮(N_2O)是一类重要的温室气体^[2]。因此,稻田反硝化作用过程成为人们关注的热点问题。

水稻田属于典型的人工湿地生态系统^[3],土壤生境长期处于淹水厌氧条件下,其中 N_2O 的产生和稻田的氮素转化受到反硝化作用影响。稻田氮素的积累、迁移和流失等循环转化过程会导致施入稻田中氮肥的流失、氮肥利用率下降,直接或间接地影响稻田生态系统健康和土壤可持续发展等问题。近年

来,国内外针对稻田反硝化过程的研究主要在稻田的不同施肥配比^[4]、稻田水分调控^[5]、稻田根际土壤^[6]、反硝化抑制剂^[7]、稻虾共作^[8]、秸秆还田^[9]及种植绿肥作物^[10]等方面,但对不同轮作休耕模式下稻田的特殊生境研究较少。稻田长期大量化肥的投入及土壤高强度连作种植,在短期内会增加粮食的产量,但从长期来看,会产生很多对生态环境的不利影响^[11]。连作和单一作物种植导致根系分泌的有机酸和酚酸积累、土壤养分枯竭、病原微生物滋生和生物多样性降低等^[12],最终影响作物生产及土壤环境的可持续性发展。与连作或单一种植模式相比,轮作休耕是改善土壤环境质量和提高作物生产力的替代模式,在增加作物多样性的同时储蓄了土壤养分^[13]。因此,轮作休耕农业管理制度在世界许多国家越来越受欢

收稿日期: 2022-04-11

基金项目:国家重点研发计划项目(2016YFD0300208);国家自然科学基金项目(41661070);中国工程院咨询研究项目(2017-XY-28);国家自然科学基金项目(31901476);江西省自然科学基金重点项目(20202ACBL215002)

李娜, E-mail: 1125694062@qq.com

通信作者: 黄国勤, E-mail: hgqjxes@sina.com

迎,轮作休耕对稻田土壤反硝化过程的影响值得探索。

本试验通过研究不同轮作休耕模式下土壤理化性质、土壤反硝化潜势及土壤反硝化功能基因 *nirS* 和 *nirK* 群落结构的变化,分析土壤反硝化功能微生物种群的丰度和群落组成,并明确其变化的重要影响因子及关键菌属,旨在为提高农田生态系统氮素利用效率提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

于2020年10月至2021年11月在江西省鹰潭市余江区农业科学研究所试验田(28°14'8"N, 116°51'22"E)进行,该试验地属亚热带气候,周年总太阳辐射量为4 542.7 kJ/m²,周年平均日照时长1 852.4 h;周年平均气温17.7℃,极端最高温40.5℃,极端最低温5.1℃;周年平均降雨量1 796.8 mm;试验地为泥沙淤土,土质肥沃,偏微酸性。种植前的土壤理化性质为pH 4.28;碱解氮159.6 mg/kg,有效磷31.98 mg/kg,速效钾26.67 mg/kg,全氮1.86%,有机质36.19 g/kg, NH₄⁺-N 3.73 mg/kg, NO₃⁻-N 8.79 mg/kg,容重2.23 mg/kg,含水率22.56%。

1.2 试验设计

本研究5种植植模式,A(CK)为传统轮作模式,B、C、D为3个多种作物轮作模式,E处理为休耕模式(表1)。每个处理3次重复,每个小区面积为66.7 m²,随机区组排列,小区周边设置同步种植同品种的水稻保护区。小区间的田埂、保护行和环沟的宽度分别为0.5、1.0和0.5 m。试验作物品种:紫云英(余江大叶籽),油菜(华赣油1号),早稻(中早33),晚稻(黄华占),春大豆(沪鲜豆6号),秋大豆(奎鲜二号),玉米(赣1号),甘蔗(赣紫皮果蔗),甘薯(赣南瓜红薯)。紫云英播种量约为22.5 kg/hm²,播种时间2020年10月,2021年4月紫云英在盛花期直接翻压还田;油菜种植密度约为11.1万株/hm²,移栽时间在2020年12月,收获时间2021年5月;早稻播种量约为45 kg/hm²,移栽时间在2021年4月,收获时间在2021年7月;晚稻播种量约为42 kg/hm²,移栽时间在2021年7月,收获时间在2021年11月;大豆种植密度约为6.7万株/hm²,春大豆移栽时间在2021年4月,收获期在6月,秋大豆移栽时间在2021年6月,收获时间在2021年11月;玉米播种量为6.7万株/hm²,播种时期在2021年7月,收获时间2021年10月;甘

蔗种植密度约为8 230株/hm²,移栽时间在2021年5月,收获时间在2021年12月;甘薯种植密度约为5.6万株/hm²,移栽时间在2021年7月,收获时间在2021年10月。作物施肥量采用当地习惯施肥量,土壤取样时间为试验收获后进行取样。

表1 试验设计

Table 1 Test design

处理 Treatment	种植模式 Cropping pattern	类型 Planting type
A(CK)	紫云英-早稻-晚稻 Chinese milk vetch-early rice-late rice	传统轮作 Traditional crop rotation
B	紫云英-早稻-玉米 甘薯 Chinese milk vetch - early rice - maize batatas	水旱轮作 Water and drought rotation
C	油菜-甘蔗 春大豆 Rapeseed-sugarcane spring soybeans	旱旱轮作 Drought and dry crop rotation
D	紫云英-春大豆-秋大豆 Chinese milk vetch - spring soybeans - autumn soybeans	旱旱轮作 Drought and dry crop rotation
E	休耕 Annual fallow	休耕 Fallow

注:“-”代表接茬,“||”代表间作。Note:“-” represents connection and “||” represents interworking.

1.3 土壤理化性质分析

用5点取样法分别取每小区0~20 cm耕层土,混合土样,带回实验室自然风干后分析土壤理化性质。用pH计测定土壤pH,采用重铬酸钾法-浓硫酸外加热法测定有机质, NH₄OAc浸提-火焰光度法测定土壤速效钾含量, NaHCO₃浸提-钼锑抗比色法测定土壤有效磷含量,半微量凯氏法测定土壤全氮, KCl浸提-靛酚蓝比色法测定铵态氮,紫外分光光度法测定硝态氮,碱解扩散法测定土壤碱解氮,环刀法测定土壤容重和土壤含水率。

1.4 土壤反硝化潜势测定

采用乙炔抑制法测定土壤反硝化潜势,参照Pell等^[14]的方法进行。

1.5 土壤反硝化功能基因测定

从每个小区随机挑选5株作物,用无菌勺子刮取其根系表面土壤,装入50 mL无菌离心管中,加入液氮,用干冰将土壤样品运到实验室于-80℃冰箱储存。再将取好的土样委托上海美吉生物医药科技有限公司扩增测序。根据biowest agArose (biowest, E. S.)说明书进行土壤微生物群落总DNA抽提。*nirS*基因采用的引物为:cd3aF_R3cdR(5'-GTSAAC-

G TSAAGGARACSGG - 3', 5'- AGTTCTGS-GTRGGCTTSAG - 3'), *nirK* 基因引物为: FlaCu_R3 Cu (5' - TTAGCATGGAATAATRRAATAGGA - 3', 5' - TCTGGACCTGGTGAGTTTCC - 3')^[15]。扩增条件 (PCR 仪: ABI GeneAmp® 9700 型) 为: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 27 个循环; 然后在 72 °C 延伸 10 min; 最后于 4 °C 保存。PCR 反应体系为: 5× TransStart Fast*Pfu* 缓冲液 4 μL, 2.5 mol/L dNTPs 2 μL, 上游引物 (5 μmol/L) 0.8 μL, 下游引物 (5 μmol/L) 0.8 μL, TransStart Fast*Pfu* DNA 聚合酶 0.4 μL, 模板 DNA 10 ng, ddH₂O 补足至 20 μL, 每个样本 3 个重复。利用 Illumina 公司的 Illumina Miseq PE300 平台 (上海美吉生物医药科技有限公司) 进行测序。

1.6 数据分析

根据条形码的精确匹配, 对不同样品进行 *nirS*、*nirK* 基因配对端读码解复, 与条形码序列出现 1 个或多个错配, 或至少出现 2 个与引物序列错配的读数被丢弃^[16]。然后利用 FLASH (fast length adjusting of short reads) 将得到的读数进行合并, 合并后的读数至少有 10 bp 的重叠区域^[17]。删除长度超出预期 200~500 bp 的序列或含有任何模糊碱基的序列, 获得的干净读取数分别为: 421 362 和 232 177。经过筛选和嵌合体去除后, 使用 UCLUST 以 97% 的序列同源性进行 de novo 操作分类单元 (OTU) 的筛选^[18]。最后, 分别获得 *nirS* 和 *nirK* 基因 OTUs 1 642 和 1 653。

采用 Microsoft Excel 2019 处理数据; 采用 SPSS 软件 (version 18.0, Chicago, Illinois, USA) 对土壤理化性质进行方差分析 (ANOVA), Duncan's 法进行

多重比较 ($\alpha=0.05$)。采用 QIIME (Version 1.9.0) 软件估算 *nirS*、*nirK* 基因的 α -多样性, 采用未加权的 UniFrac 距离来计算多样性^[19]。采用非度量多维度尺度分析 (NMDS) 可视化样本间群落结构的差异^[20]。相似性分析 (ANOSIM) 被用来评估群落结构的相似性和差异性^[21]。用群落 barplot 分析图来表示不同样品间 *nirS*、*nirK* 基因的组成^[22]。利用 Canoco 5.0 (Microcomputer Power, Ithaca, NY, USA), 采用基于 Bray-Curtis 距离的冗余分析 (RDA) 来解释环境因子对反硝化群落的影响。

2 结果与分析

2.1 不同轮作休耕模式下土壤理化性质

如表 2 所示, 土壤 pH、碱解氮、速效磷、速效钾、NO₃⁻-N 均为 A (CK) 处理最低 ($P < 0.05$), 且均为 B、C 处理的养分指数较高。而全氮、有机质、NH₄⁺-N 含量中, A (CK)、B 和 E 处理显著高于其他处理 ($P < 0.05$)。土壤化学性质均为 B、C 处理更有利于土壤肥力的增加, 利于土壤氮含量的积累。在土壤物理性质中, A (CK) 处理的土壤容重显著高于其他处理 ($P < 0.05$), 分别高出 0.81%、0.76%、0.86%、0.90%。E 处理的土壤含水率显著高于其他处理, 其次是 A 处理, E 处理显著高出了 32.14%、101.86%、83.58%、780.87%。E 处理能有效降低土壤容重, 改善土壤团粒结构, 且保水性较好。结果表明, 不同轮作休耕模式均能改善土壤肥力和土壤结构, 并抑制了土壤氮含量的流失, 其中 B (紫云英-早稻-玉米||甘薯)、C (油菜-甘蔗||春大豆) 和 E (休耕) 处理效果较好。

表 2 不同轮作休耕模式下土壤理化性质

Table 2 Soil physicochemical properties

处理 Treatment	pH	AN/ (mg/kg)	AP/ (mg/kg)	AK/ (mg/kg)	TN/ %	SOM/ (g/kg)	NH ₄ ⁺ -N/ (mg/kg)	NO ₃ ⁻ -N/ (mg/kg)	SBD/ (mg/kg)	SWC/ %
A(CK)	4.78c	177.01b	41.58c	31.33d	2.00a	33.08a	14.32a	8.80b	2.01a	32.08b
B	5.73b	189.63a	74.34ab	61.67bc	1.92b	30.92a	15.56a	36.75a	1.11b	20.99c
C	6.28a	187.33a	80.98a	76.00a	1.95b	26.80b	9.19b	33.14a	1.14b	23.08c
D	6.11a	189.43a	74.02ab	70.00ab	1.93b	31.86a	9.49b	28.85a	1.08b	4.81d
E	6.14a	188.55a	70.01b	52.33c	1.96ab	33.22a	9.45b	29.56a	1.06b	42.37a

注: 数据为 3 个重复的平均值, 同列不同小写字母分别表示在 5% 水平的显著差异 ($P < 0.05$)。SOM: 有机质, AP: 有效磷, AK: 速效钾, AN: 碱解氮, TN: 全氮, NH₄⁺-N: 铵态氮, NO₃⁻-N: 硝态氮, SWC: 土壤含水率, SBD: 土壤容重。下同。Note: Data are the average of 3 replicates, and different lowercase letters in the same column represent significant differences at the 5% level ($P < 0.05$). SOM: Soil organic matter, AP: Soil available phosphorus, AK: Soil available potassium, AN: Soil alkaline hydrolyzable nitrogen, TN: Soil total nitrogen, NH₄⁺-N: Soil ammonium nitrogen, NO₃⁻-N: Soil nitrate-nitrogen, SWC: soil water content, SBD: Soil bulk density. The same as follows.

2.2 不同轮作休耕模式下土壤反硝化潜势

由图 1 可见, 各处理的土壤反硝化潜势中 A

(CK) 处理最高, 其次是 E 处理, C 处理最低。各处
理分别低于 A (CK) 处理 82.49%、93.23%、

89.43%、70.08%。通过 Pearson 相关性分析(表3),可知土壤反硝化潜势与 pH 呈极显著负相关($r^2 = -0.935, P < 0.01$),而与 AP、AK 和 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 呈现显著负相关,相关系数分别为 $r^2 = -0.992$ 、 $r^2 = -0.938$ 和 $r^2 = -0.944 (P < 0.05)$ 。上述结果表明,除传统轮作模式 A(CK, 紫云英-早稻-晚稻)以外,其他轮作休耕模式均减少了氮素的气态损失, pH、AP、AK、 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 与土壤反硝化潜势呈显著性相关。

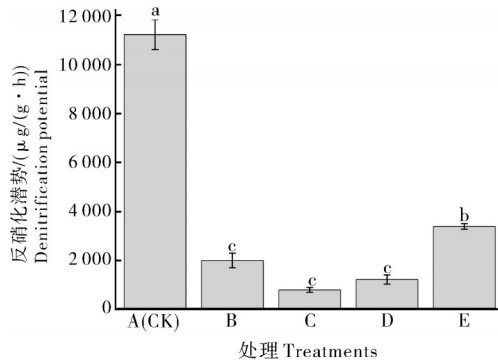


图1 不同轮作休耕模式对土壤反硝化潜势的影响

Fig.1 Effects of different crop rotation-fallow patterns on denitrification potential

2.3 不同轮作休耕模式下土壤 *nirS* 和 *nirK* 基因型微生物的多样性

由表4可知,土壤反硝化功能基因的 α -多样性指数受轮作休耕模式影响存在显著差异($P < 0.05$)。 *nirS* 基因除 Simpson 指数是 B 处理最高(0.110 2)以外,其他指数均为 E 处理最高,分别高出 A(CK)处理 11.73%、64.50%、43.52%。 *nirK* 基因 α -多样性指数各处理间无显著性差异。

由图2可以看出,在 β -多样性指数方面, *nirS* 基

表3 土壤反硝化潜势与理化性质相关性分析
Table 3 Correlation analysis between soil denitrification potential and physical chemical properties

指标 Indicator	r^2	P
pH	-0.935**	0.001
SOM	0.555	0.332
AP	-0.992*	0.020
AK	-0.938*	0.018
AN	-0.190	0.759
TN	0.878	0.050
$\text{NH}_4^+ \text{-N}$	0.501	0.398
$\text{NO}_3^- \text{-N}$	-0.944*	0.016
SBD	-0.519	0.371
SWC	0.459	0.437

注 Note: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

因除 B、C 和 D 处理有部分重叠以外,其他处理间无重叠,通过 ANOSIM 相似性检验 β -多样性指数, P 值为 0.013,表明各处理间有显著差异($P < 0.05$)。 *nirK* 基因中除 A(CK)和 E 处理没有与其他处理间有重叠以外,各处理均有重叠,进一步进行 ANOSIM 相似性检验, P 值为 0.015,表明各处理间有显著性差异($P < 0.05$)。

结果表明,不同轮作休耕模式的反硝化功能基因的多样性指数有显著性差异($P < 0.05$),且 *nirS* 基因的多样性指数及群落结构受影响程度大于 *nirK* 基因, E 处理(休耕)更有利于土壤 *nirS* 基因 α -多样性指数的提高, B、C、D 处理的 *nirS* 和 *nirK* 基因群落结构相似。

表4 土壤反硝化功能基因 α -多样性

Table 4 Study on soil denitrification function gene α -diversity

基因类型 Gene type	处理 Treatment	香农指数 Shannon index	辛普森指数 Simpson index	ACE 指数 ACE index	Chao 1 指数 Chao 1 index
<i>nirS</i>	A(CK)	3.92±0.19a	0.056 3±0.012 1b	576.03±32.28b	526.29±14.99b
	B	3.28±0.53b	0.110 2±0.061 6a	525.11±96.48b	449.50±60.37b
	C	3.94±0.19a	0.046 5±0.013 2b	554.19±64.31b	510.18±17.61b
	D	4.20±0.15a	0.036 3±0.007 0b	448.82±47.39b	442.00±50.68b
	E	4.38±0.02a	0.032 3±0.005 3b	947.56±162.87a	755.31±52.10a
<i>nirK</i>	A(CK)	3.85±0.26a	0.071 9±0.018 0a	633.00±148.16a	552.34±157.07a
	B	3.82±0.42a	0.088 4±0.050 2a	478.29±36.78a	446.62±58.90a
	C	4.20±0.52a	0.059 0±0.033 1a	622.97±271.20a	538.64±154.09a
	D	4.27±0.04a	0.035 4±0.003 2a	646.90±76.89a	565.38±55.03a
	E	3.65±0.19a	0.091 8±0.019 8a	554.03±45.49a	489.34±38.43a

注:数据为3个重复的平均值和标准误差,同列不同小写字母表示在5%水平有显著差异($P < 0.05$)。 Note: The data are the mean and standard error of three replicates, and different lowercase letters in the same column indicate significant differences at the 5% level ($P < 0.05$).

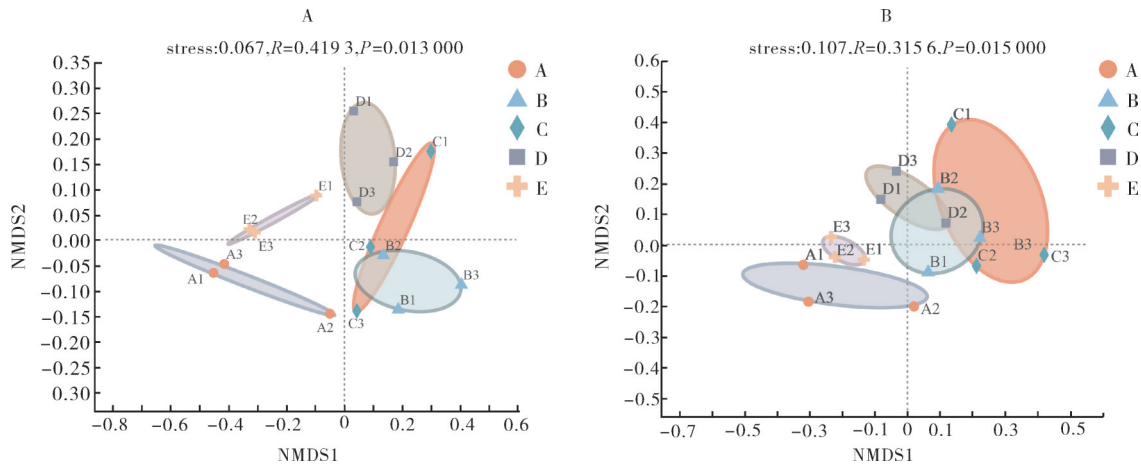


图2 土壤反硝化功能基因 *nirS*(A)和 *nirK*(B)的 β -多样性指数

Fig.2 Study on β -diversity of soil denitrification function gene *nirS*(A)and *nirK*(B)

2.4 稻田不同轮作休耕模式下土壤 *nirS*和 *nirK* 基因菌属相对丰度

属水平下,各处理的反硝化功能基因的相对丰度具有显著性差异($P < 0.05$)。由图3可见,不同轮作休耕模式的土壤反硝化基因菌属具有一致性,但不同处理下菌属相对丰度不同。*nirS*基因的优势菌属有 unclassified_k_norank_d、unclassified_p_Proteobacteria、红杆菌属 *Rhodanobacter*。其中B处理(72.27%)在 unclassified_K_norank_d 菌属相对丰度最高,C(20.21%)和E处理(21.76%)在 unclassified_p_Proteobacteria 相对丰度高于其他处理,而D处理(12.70%)在红杆菌属 *Rhodanobacter* 丰度最高。*nirK*基因优势菌属

有 unclassified_k_norank_d_Bacteria、norank_d_Bacteria、大豆根瘤菌 *Bradythizobium*、unclassified_p_Proteobacteria、亚硝化螺菌属 *Nitrosospira*。D(24.26%, 14.70%)和E处理(18.48%, 14.97%)中 norank_d_Bacteria 和大豆根瘤菌 *Bradythizobium* 的相对丰度高于其他处理,B处理(15.46%, 12.12%)的 unclassified_p_Proteobacteria 和亚硝化螺菌属 *Nitrosospira* 相对丰度高于其他处理。A处理(55.97%)仅有 unclassified_k_norank_d_Bacteria 的相对丰度高于其他处理。综上,不同轮作方式下 *nirS*、*nirK* 基因在属水平的相对丰度存在差异($P < 0.05$),其中B、D、E处理的菌属相对丰度高于其他处理。

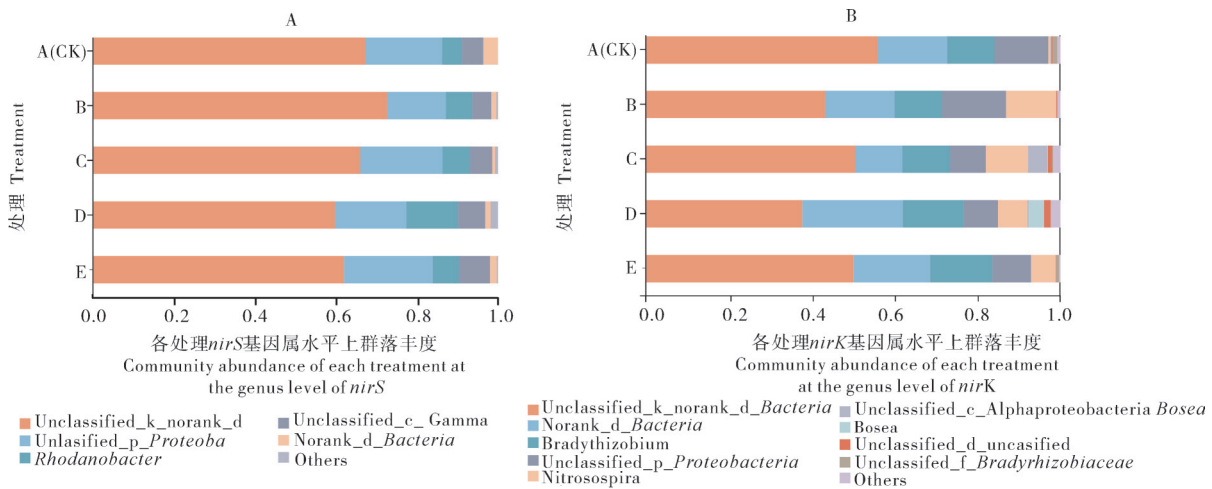


图3 *nirS*基因(A)和 *nirK*基因(B)群落组成相对丰度

Fig.3 *nirS* gene(A) and *nirK* gene (B) community composition abundance

2.5 *nirS*和 *nirK*反硝化功能基因的优势菌属与土壤反硝化潜能的相关性

由表5可知,通过Pearson相关性分析发现,*nirS*基因的优势菌属与土壤反硝化潜能无显著相关性

($P > 0.05$)。*nirK*基因的大豆根瘤菌 *Bradythizobium* 和 unclassified_p_Proteobacteria 是影响土壤反硝化潜能的关键菌属($P < 0.05$),其中大豆根瘤菌 *Bradythizobium* 与土壤反硝化潜能呈现负相关性($r^2 =$

-0.85, $P < 0.05$), unclassified_p_Proteobacteria 与土壤反硝化潜势呈现正相关性, ($r^2 = 0.88, P < 0.05$)。

表 5 土壤反硝化潜势与优势菌属相关性分析

Table 5 Correlation analysis of soil denitrification potential and dominant bacterial genus

基因类型 Gene type	优势菌属 Dominant genera	r^2	P
	Unclassified_k_norank_d	1.00	0.00
nirS	Unclassified_p_Proteoba	-0.60	0.14
	Rhodanobacter	-0.64	0.12
	Unclassified_k_norank_d_Bacteria	0.23	0.35
	Norank_d_Bacteria	-0.56	0.16
nirK	Bradythizobium	-0.85*	0.03
	Unclassified_p_Proteobacteria	0.88*	0.02
	Nitrosospira	0.33	0.29

2.6 nirS 和 nirK 反硝化功能基因细菌群落结构与土壤理化性质的相关性

基于 RDA 分析, 采用 Bray-Curtis 距离冗余度分析对群落组成排序的环境变量进行分析(图 4), 结果显示, 反硝化功能基因的群落结构与土壤理化性质

之间有显著相关性($P < 0.05$), SWC 是影响 nirS、nirK 基因群落结构的重要影响因子, 相较于其他土壤理化性质, SWC 的贡献度较高, 显著性影响较大。不同轮作休耕模式下, SWC 是土壤反硝化功能基因群落结构的重要关键因子, 水田转旱作的种植模式改变了稻田土壤的含水率, 从而影响了土壤反硝化功能基因群落结构。

3 讨论

本研究探讨了不同轮作休耕模式下土壤反硝化潜势和反硝化功能微生物(nirS/nirK)群落的多样性和组成, 结果表明, 不同轮作休耕处理改变了土壤肥力及土壤结构, 土壤反硝化潜势及反硝化功能基因群落结构均受到显著性影响。传统轮作模式 A(CK) (紫云英-早稻-晚稻) 对土壤综合肥力及土壤结构的改善较为缓慢, 土壤反硝化潜势也较大, 使得土壤氮素气态损失严重。稻田适当采用水旱轮作和休耕模式可以通过不同作物相互作用及土壤生境的改变, 增加 nirK 和 nirS 功能基因的物种多样性及菌属的相对丰度, 不仅有利于土壤环境质量的提高, 还促进了稻田土壤氮素循环的可持续发展。

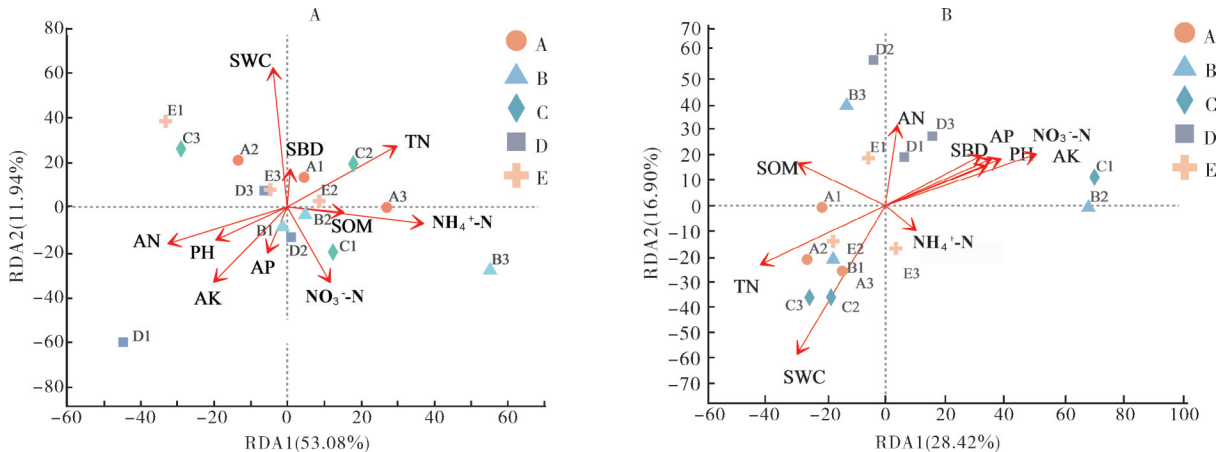


图 4 土壤反硝化基因 nirS(A)、nirK(B) 群落与土壤环境因子的相关性

Fig.4 Correlation analysis of soil denitrification gene nirS(A), nirK(B) communities with soil environmental factors

3.1 稻田不同种植模式下土壤反硝化潜势及土壤理化性质相关性

5 种稻田轮作模式下土壤反硝化潜势存在显著差异, pH、AP、AK 和 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 是影响土壤反硝化潜势的关键因子。含水量较高的 A(CK) (紫云英-早稻-晚稻) 处理反硝化潜势较强, 可能由于长期淹水条件导致土壤容易酸化, 土壤结构不良, 加快了土壤氮的流失。研究表明, 稻田土壤淹水上层(氧化层)中的氮在硝化细菌的作用下转化为硝态氮, 而 $\text{NO}_3^- \text{-N}$

不能被土壤胶粒所吸附, 随水渗漏于下边的土壤层, 逐渐在反硝化细菌作用下还原成水稻难以吸收利用的气体逸失于大气中, 土壤反硝化潜势增强^[23]。其他轮作休耕模式的反硝化潜势较低, 原因可能是土壤环境由厌氧变成好氧, 改善了土壤结构, 有利于土壤养分的吸收, 有效阻止土壤次生潜育化和酸化。Shcherbak 等^[24]研究发现, 土壤 pH 增加有效抑制了 N_2O 的排放, 降低了反硝化潜势。陈盟^[25]研究表明, 当土壤含水量稍高时, 形成低氧或厌氧条件, 土壤中

N_2O 的排放主要是受土壤的反硝化过程所主导。C处理(油菜-甘蔗||春大豆)的 N_2O 释放量和反硝化潜势最低,原因可能是大豆作为养地作物有效减少了甘蔗施肥量,从而减少蔗田土壤 N_2O 的释放量和反硝化潜势。这与龙鹏宇等^[26]的研究结果相似,他们认为合理的滴灌施肥措施能有效提高甘蔗产量且减少土壤 N_2O 的排放。邢肖毅等^[27]也发现pH是影响土壤反硝化作用的最重要因素,认为较低的pH会限制土壤反硝化微生物的生长。综上,稻田长期淹水下 NO_3^- -N不容易被土壤胶粒所吸附,并还原成水稻难以吸收的气体,导致 N_2O 大量排放、土壤结构遭到破坏、土壤养分降低、土壤酸化,加快了土壤反硝化的作用。

3.2 不同稻田种植模式下土壤 *nirS* 和 *nirK* 基因群落结构

本试验中稻田不同轮作休耕模式对 *nirS* 基因群落结构的影响大于 *nirK* 基因,可能是试验年限较短, *nirK* 基因不敏感,不容易受短时间环境的改变所影响。朱杰等^[8]发现由于稻虾种植年限较短, *nirK* 基因微生物多样性指数无显著性差异。尽管 *nirK* 和 *nirS* 行使的功能相同,但 *nirK* 的丰度与磷或钾的供应量有关,而 *nirS* 的丰度由氮的供应量决定^[28]。谢婉玉等^[29]研究表明秸秆还田处理提供了提供氮底物,对 *nirS* 基因丰度有显著影响,对 *nirK* 基因丰度没有显著影响。本研究除 E 处理(休耕)外均种植豆科作物,豆科作物可固氮,所以 *nirS* 基因的物种多样性出现显著性差异。试验中 E 处理更有利于土壤 *nirS* 基因 α -多样性指数的提高,其原因可能是休耕处理的土壤容重较低,保水性较好,土壤养分不易流失。在本研究中,种植豆科绿肥作物及施肥处理 *nirS*、*nirK* 功能基因丰度均有显著性差异。本研究中 unclassified_p_Proteoba 是 *nirS* 和 *nirK* 型反硝化细菌的共同优势菌属,这与 Snaird 等^[30]对土壤反硝化微生物的研究结果吻合。*nirS*、*nirK* 功能基因中的各菌属丰度均为 B 处理(紫云英-早稻-玉米||甘薯)较高,主要是 unclassified_k_norank_d、unclassified_p_Proteobacteria、亚硝化螺菌属 *Nitrosospira* 菌属的丰度较高,可能由于该处理作物类型多且采用了水旱轮作模式,使得根系分泌物及作物的凋落物增加,相应增加了细菌相对丰度。D 处理(紫云英-春大豆-秋大豆)和 E 处理(休耕)红杆菌属 *Rhodanobacter* 和大豆根瘤菌 *Bradythizobium* 相对丰度较高,且只有 D 处理中有博斯氏菌属(*Bosea*),可能由于该模式有养地作用(种植

豆科作物和休耕),所以增加了有益菌属的丰度。袁炜华等^[31]研究也表明,红杆菌喜光合好氧细菌,所以,红杆菌属 *Rhodanobacter* 在旱地种植模式中相对丰度较高。

通过 Pearson 相关性分析发现,大豆根瘤菌 *Bradythizobium* 和 unclassified_p_Proteobacteria 是影响土壤反硝化潜势的关键菌属($P < 0.05$),其中大豆根瘤菌 *Bradythizobium* 与土壤反硝化潜势呈现负相关,unclassified_p_Proteobacteria 与土壤反硝化潜势呈正相关,原因可能是大豆根瘤菌 *Bradythizobium* 能够固氮,可以减少土壤中的氮素损失。程玉柱等^[32]研究表明禾本科作物可以利用豆科作物所固定的氮素,促进对氮素的吸收。unclassified_p_Proteobacteria 属于变形菌纲,有研究表明反硝化菌主要为原核生物,大量存在于在 α -、 β -和 γ -变形菌纲中^[23]。冗余度分析表明,影响土壤反硝化功能基因群落结构的重要关键因子是土壤含水率,水田转旱作或者休耕的种植模式改变了稻田土壤生境,土壤水分减少,对土壤反硝化功能基因群落结产生了影响,周维^[33]研究也证实土壤水分对反硝化微生物群落组成的影响最大且最敏感。

参考文献 References

- [1] 董文军,来永才,孟英,等.稻田生态系统温室气体排放影响因素的研究进展[J].黑龙江农业科学,2015(5):145-148.DONG W J, LAI Y C, MENG Y, et al. Research progress of greenhouse gases emission in paddy field ecosystems [J]. Heilongjiang agricultural sciences, 2015 (5): 145-148 (in Chinese with English abstract).
- [2] 颜晓元,周伟.长江三角洲农田地下水反硝化对硝酸盐的去除作用[J].土壤学报,2019,56(2):350-362.YAN X Y, ZHOU W. Groundwater nitrate removal through denitrification under farmland in Yangtze River Delta [J]. Acta pedologica sinica, 2019, 56 (2): 350-362 (in Chinese with English abstract).
- [3] CHAPAGAIN T, YAMAJI E. The effects of irrigation method, age of seedling and spacing on crop performance, productivity and water-wise rice production in Japan [J]. Paddy and water environment, 2010, 8(1): 81-90.
- [4] 郭俊杰,朱晨,刘文波,等.不同施肥模式对土壤氮循环功能微生物的影响[J].植物营养与肥料学报,2021,27(5):751-759. GUO J J, ZHU W, LIU W B, et al. Effects of different fertilization managements on functional microorganisms involved in nitrogen cycle [J]. Journal of plant nutrition and fertilizers, 2021, 27 (5): 751-759 (in Chinese with English abstract).
- [5] 陈志刚,刘龙梅,陈蕾,等.水分调控对水稻根际土壤反硝化作用的影响[J].水土保持研究,2015,22(5):133-137. CHEN Z G, LIU L M, CHEN L, et al. Effects of three different irrigation cultivated modes on soil denitrification of rice rhizosphere [J]. Re-

- search of soil and water conservation, 2015, 22(5): 133-137 (in Chinese with English abstract).
- [6] 李振高, 万焕楣, 吴留松, 等. 水稻根际反硝化细菌生态分布的研究[J]. 土壤学报, 1987, 24(2): 120-126. LI Z G, WAN H M, WU L S, et al. Studies on the ecological distribution of denitrifying bacteria in rhizosphere of rice [J]. Acta pedologica sinica, 1987, 24(2): 120-126 (in Chinese with English abstract).
- [7] 张文学, 王少先, 夏文建, 等. 脲酶抑制剂与硝化抑制剂对稻田土壤硝化、反硝化功能菌的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2019, 25(6): 897-909. ZHANG W X, WANG S X, XIA W J, et al. Effects of urease inhibitor and nitrification inhibitor on functional nitrifier and denitrifier in paddy soil [J]. Journal of plant nutrition and fertilizers, 2019, 25(6): 897-909 (in Chinese with English abstract).
- [8] 朱杰, 刘海, 吴邦魁, 等. 稻虾共作对稻田土壤 *nirK* 反硝化微生物群落结构和多样性的影响[J]. 中国生态农业学报, 2018, 26(9): 1324-1332. ZHU J, LIU H, WU B K, et al. Effects of integrated rice crayfish farming system on community structure and diversity of *nirK* denitrification microbe in paddy soils [J]. Chinese journal of eco-agriculture, 2018, 26(9): 1324-1332 (in Chinese with English abstract).
- [9] 朱旭. 秸秆还田与投食对稻虾共作系统土壤硝化作用及微生物的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2020. ZHU X. Effects of straw returning and feeding on soil nitrification and microorganism in rice-crayfish ecosystem [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020 (in Chinese with English abstract).
- [10] 高嵩涓. 冬绿肥—水稻模式下的土壤微生物特征及硝化作用调控机制[D]. 北京: 中国农业大学, 2018. GAO G J. Soil microbial community and the regulation mechanisms of nitrification in winter green man ure-rice cropping system [D]. Beijing: China Agricultural University, 2018 (in Chinese with English abstract).
- [11] 钱晨晨, 黄国勤, 赵其国. 中国轮作休耕制度的应用进展[J]. 农学学报, 2017, 7(3): 37-41. QIAN C C, HUANG G Q, ZHAO Q G. Application advance of rotation fallow system in china [J]. Journal of agriculture, 2017, 7(3): 37-41 (in Chinese with English abstract).
- [12] WITTEW R A, DORN B, JOSSI W, et al. Cover crops support ecological intensification of arable cropping systems [J]. Scientific reports, 2017, 7(1): 1-12.
- [13] MORARU P I, RUSU T. Soil tillage conservation and its effect on soil organic matter, water management and carbon sequestration [J]. Journal of food, agriculture and environment, 2010, 8(3/4): 309-312.
- [14] PELL M, STENBERG B, STENSTROM J, et al. Potential denitrification activity assay in soil-: with or without chloramphenicol [J]. Soil biology and biochemistry, 1996, 28(3): 393-398.
- [15] PALMER K, BIASI C, HORN M A. Contrasting denitrifier communities relate to contrasting N₂O emission patterns from acidic peat soils in arctic tundra [J]. ISME J, 2012, 6(5): 1058-1077.
- [16] QUINCE C, LANZEN A, DAVENPORT R J, et al. Removing noise from pyrosequenced amplicons [J]. BMC bioinformatics, 2011, 12(1): 1-18.
- [17] MAGOC T, SALZBERG S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [18] EDGAR R C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. Nat. methods, 2013, 10: 996-998.
- [19] LOZUPONE C, KNIGHT R. UNIFRAC: A new phylogenetic method for comparing microbial communities [J]. Applied and environmental microbiology, 2005, 71: 8228-8235.
- [20] ABDI H, WILLIAMS L J. Principal component analysis [J]. Wiley interdisciplinary reviews: computational statistics, 2010, 2: 433-459.
- [21] GU Z, GU L, EILS R, et al. Circlize implements and enhances circular visualization in R [J]. Bioinformatics, 2014, 30: 2811-2812.
- [22] CLARKE K R. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure [J]. Australian journal of ecology, 1993, 18: 117-143.
- [23] 闵航. 微生物学 [M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2011. MIN H. Microbiology [M]. Hangzhou: Zhejiang University Press, 2011 (in Chinese).
- [24] SHCHERBAK I, MILLAR N, ROBERTSON G P. Global metaanalysis of the nonlinear response of soil nitrous oxide (N₂O) emissions to fertilizer nitrogen [J]. PNAS, 2014, 111(25): 9199-9204.
- [25] 陈盟. 设施菜田温室气体浓度分布特征及 N₂O 排放监测方法比较研究 [D]. 保定: 河北农业大学, 2019. CHEN M. Research on greenhouse gas concentration distribution characteristics and comparison of N₂O emission monitoring methods in facility vegetable field [D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2019 (in Chinese with English abstract).
- [26] 龙鹏宇, 农梦玲, 白雪, 等. 滴灌施肥蔗田土壤氧化亚氮排放与反硝化酶活性的关系 [J]. 土壤通报, 2020, 51(1): 122-129. LONG P Y, NONG M L, BAI X, et al. Relationship between nitrous oxide emission and denitrifying enzyme activities in sugarcane field soil under drip fertigation [J]. Chinese journal of soil science, 2020, 51(1): 122-129 (in Chinese with English abstract).
- [27] 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. 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 (in Chinese with English abstract).
- [28] 陈哲. 长期施肥对水稻土反硝化作用和反硝化功能微生物的影响机理 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2010. CHEN Z. Influence mechanism of long-term fertilization on denitrification and denitrification functional microorganisms in paddy soil [D]. Beijing: Chinese Academy of Sciences University, 2010 (in Chinese with English abstract).
- [29] 谢婉玉, 王永明, 纪红梅, 等. 秸秆还田种类对稻田 N₂O 排放及硝化反硝化微生物的影响 [J]. 土壤, 2022, 54(4): 769-778. XIE W Y, WANG Y M, JI H M, et al. Effects of returned straw type on N₂O emission, nitrification and denitrification microorganisms from paddy field [J]. Soils, 2022, 54(4): 769-778 (in Chinese with English abstract).
- [30] SNAIDR J, AMANN R, HUBER I, et al. Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge [J]. Ap-

- plied and environmental microbiology, 1997, 63(7): 2884-2896.
- [31] 袁炜华, 朱笔通, 赵春贵, 等. 固氮红细菌 (*Rhodobacter azotoformans*) YLK20 去除无机氮的影响因素[J]. 微生物学通报, 2019(9): 2146-2156. ZHONG W H, ZHU B T, ZHAO C G, et al. Factors affecting nitrogen removal from aquaculture wastewater by *Rhodobacter azotoformans* YLK20[J]. Microbiology China, 2019(9): 2146-2156 (in Chinese with English abstract).
- [32] 程玉柱, 李龙, 周琴, 等. 玉米/大豆不同配置下的玉米生长和产量形成研究[J]. 南京农业大学学报, 2016, 39(1): 34-39. CHEN Y Z, LI L, ZHOU Q, et al. Growth and yield formation of maize under different maize/soybean intercropping patterns[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2016, 39(1): 34-39 (in Chinese with English abstract).
- [33] 周维. 水-旱转换中 N₂O 排放特征及其相关功能基因研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2018. ZHOU W. N₂O emission characteristics and relative functional genes under flooding-drying conversion [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2018 (in Chinese with English abstract).

Community structure of gene with denitrification function in soil under different rotation and fallow patterns in paddy fields

LI Na, XU Huifang, HUANG Guoqin

Center for Ecological Sciences, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China

Abstract The physicochemical properties, denitrification differences and related microbial composition in soil under four rotation and fallow patterns including B (Chinese milk vetch - early rice- maize || batatas), C (rapeseed - sugarcane || spring soybeans), D (Chinese milk vetch - spring soybeans - autumn soybeans) and E (annual fallow) were compared and analyzed using the traditional cropping pattern A (Chinese milk vetch-early rice-late rice) as the control to study the effects of different rotation and fallow patterns on the nitrogen loss, the denitrification potential and related microbial community structure in soil of paddy fields. The acetylene inhibition method was used to determine the denitrification rate. The high-throughput sequencing was used to analyze the diversity and composition of denitrifying microbial communities. The results showed that the denitrification potential in soil under four rotation and fallow patterns was significantly lower than that under the control, which effectively reduced the gaseous loss of nitrogen in soil. There were significant differences in the community structure of functional genes *nirK* and *nirS* under different rotation and fallow patterns, among which the community structure of gene *nirK* was less affected by the rotation and fallow patterns than that of gene *nirS*. Compared with the control, the E pattern was more conducive to the accumulation of α -diversity of gene *nirS*. In terms of the relative species abundance of *nirS* and *nirK* gene communities, the abundance of dominant species under four rotation and fallow patterns was higher than that under the control, and the abundance of fungal genera in the pattern B and pattern E was relatively higher. The key genera affecting denitrification potential were *Bradythizobium* ($r^2 = 0.85, P < 0.05$) and unclassified_p, *Proteobacteria* ($r^2 = 0.88, P < 0.05$). The results of correlation and redundancy analyses showed that pH, the available phosphorus (AP), available potassium (AK) and nitrate-nitrogen (NO₃⁻-N) in soil was significantly correlated with the denitrification potential in soil, while the important factor affecting the community structure of gene *nirK* and *nirS* was the content of water in soil (SWC). It is indicated that the rotation and fallow patterns of appropriate water-drought and dry-drought crop in paddy fields can change the flooding environment in soil, affect the community structure of gene with denitrification function, help inhibit the gaseous loss of nitrogen in soil, and promote the improvement of the fertility and structure in soil, among which the pattern B and pattern E is the best.

Keywords rotation and fallow; loss of nitrogen; denitrification potential; the community structure of gene; nitrogen use efficiency; microbial population

(责任编辑: 张志钰)