

引用格式:

姚东良, 彭德元, 王振华, 秦红灵, 刘毅, 张俊忠. 氧气对水稻土 N_2O 排放和 *narG* 型反硝化微生物的短期影响[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2023, 49(3): 335–343.

YAO D L, PENG D Y, WANG Z H, QING H L, LIU Y, ZHANG J Z. Short-term effects of the oxygen on N_2O emissions and *narG* type denitrifying microbes in paddy soils[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2023, 49(3): 335–343.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



氧气对水稻土 N_2O 排放和 *narG* 型反硝化微生物的短期影响

姚东良¹, 彭德元², 王振华², 秦红灵³, 刘毅³, 张俊忠^{1,4*}

(1.西南林业大学生物多样性保护学院, 云南 昆明 650224; 2.湖南省烟草公司张家界市公司, 湖南 张家界 427099; 3.中国科学院亚热带农业生态研究所亚热带农业生态过程重点实验室, 湖南 长沙 410125; 4.云南省森林灾害预警与控制重点实验室, 云南 昆明 650224)

摘要: 选取第四纪红土发育水稻土, 在 0%(厌氧)、10%(兼性厌氧)和 21%(好氧)等 3 个 O_2 体积分数及 40%和 60% 2 种土壤含水量条件下进行室内培养, 探讨 O_2 含量对土壤 N_2O 排放及 *narG* 型反硝化微生物种群丰度和群落组成的影响。结果表明: 40%和 60% 2 种土壤含水量条件下, 厌氧处理的 N_2O 排放通量均最高, 且 60%土壤含水量处理下的 N_2O 排放通量略高于 40%土壤含水量处理的; 方差分析表明, 相比于土壤含水量, O_2 含量是制约土壤中 N_2O 排放更关键的因子; 微生物 *narG* 基因丰度与 O_2 含量呈极显著($P<0.01$)负相关, 与 N_2O 排放通量和土壤 NO_3^-N 消耗质量分数呈极显著($P<0.01$)正相关, 与土壤含水量呈正相关, 但不显著; O_2 含量和含水量均会造成土壤 *narG* 型反硝化微生物群落组成差异, 40%土壤含水量处理, OTU1882(*Pseudolabrys*)、OTU1510(分枝杆菌属)的占比较大, 60%土壤含水量处理, OTU1593(地杆菌属)的占比较大, 当土壤含水量一定时, 同一培养时间厌氧处理的优势 OTU1882 和 OTU1510 相对丰度偏低, 且变化幅度较大, 其相对丰度与 N_2O 排放通量呈负相关, 其中 OTU1882 的影响显著($P<0.05$)。可见, 土壤 O_2 含量通过调控土壤微生物的 *narG* 基因丰度和群落组成而调控 N_2O 的排放。

关键词: 水稻土; *narG* 型反硝化微生物; 氧气; 土壤含水量; N_2O 排放

中图分类号: S154.1

文献标志码: A

文章编号: 1007–1032(2023)03–0335–09

Short-term effects of the oxygen on N_2O emissions and *narG* type denitrifying microbes in paddy soils

YAO Dongliang¹, PENG Deyuan², WANG Zhenhua², QING Hongling³, LIU Yi³, ZHANG Junzhong^{1,4*}

(1.College of Biodiversity Conservation, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224, China; 2.Zhangjiajie City Company, Hunan Tobacco Company, Zhangjiajie, Hunan 427099, China; 3.Key Laboratory of Agro-ecological Processes in Subtropical Region, Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha, Hunan 410125, China; 4.Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control in Yunnan Province, Kunming, Yunnan 650224, China)

Abstract: To investigate the effect of soil O_2 concentration on soil N_2O emission and the abundance and composition of

收稿日期: 2022–06–02

修回日期: 2023–05–25

基金项目: 湖南省自然科学基金面上项目(2022JJ30647、2020JJ4654); 湖南创新型省份建设专项经费(2021NK2028); 云南省教育厅科学研究基金项目(2022J0512); 湖南省烟草公司张家界市公司项目(202103)

作者简介: 姚东良(1993—), 男, 河南郑州人, 硕士研究生, 主要从事农业资源利用研究, 352526715@qq.com; *通信作者, 张俊忠, 博士, 副教授, 主要从事土壤微生物研究, zhangjunzhong@foxmail.com

narG type denitrifying microbes in paddy soils, the quaternary red clay was incubated under three O₂ concentrations of 0% (anaerobic), 10%, and 21%, and two soil water contents of 40% and 60%. The results showed that under both 40% and 60% soil moisture conditions, anaerobic treatment had the highest N₂O emission flux, and the N₂O emission flux under 60% soil moisture treatment was slightly higher than that under 40% soil moisture treatment. The analysis of variance indicated compared with soil water content, O₂ was more important factor restricting N₂O emissions in the soil. The abundance of *narG* gene of soil microbes was negatively correlated with O₂ content ($P < 0.01$), positively correlated with N₂O emission flux and soil NO₃⁻-N consumption mass fraction ($P < 0.01$), and positively correlated with soil moisture content, but not significantly. Both O₂ content and soil moisture content could cause the difference in composition of *narG* type denitrifying microbial community. In the 40% soil moisture treatment, OTU1882 (*Pseudolabs*) and OTU1510 (*Mycobacterium*) accounted for a larger proportion, while in the 60% soil moisture treatment, OTU1593 (*Geobacter*) accounted for a larger proportion. When the soil moisture content was constant, the relative abundances of advantages OTU1882 and OTU1510 in anaerobic treatment at the same time were relatively low, and the variation amplitude were large, which were negatively correlated with N₂O emission flux with a significant ($P < 0.05$) effect for OTU1882. In summary, soil O₂ content could regulate N₂O emissions by regulating the abundance of *narG* gene and community composition of soil microbe.

Keywords: paddy soil; *narG* type denitrifying microbe; oxygen; soil water content; N₂O emission

氧化亚氮(N₂O)是三大温室气体之一^[1],在百年时间尺度上,N₂O的全球增温潜势是二氧化碳(CO₂)的298倍^[2-3]。农田土壤的N₂O排放量约占人类活动N₂O排放总量的50%以上^[4]。中国水稻种植面积占世界水稻种植总面积的27%^[5],研究中国稻田的N₂O排放具有重要的科学意义。

水稻土的N₂O排放受到土壤理化性质^[6]和环境条件^[7]的影响。氧气(O₂)浓度是水稻土N₂O排放的核心调控因子之一^[8],控制着N₂O排放量^[9]。研究^[8]表明,水稻土在60%最大持水量条件下,当O₂体积分数从200 mL/L降低到20 mL/L时,N₂O排放量显著增加。在恒定的土壤含水量条件下,完全厌氧状态下N₂O的排放量最高^[10]。

水稻土的N₂O排放主要由微生物通过反硝化作用驱动^[11]。水稻土反硝化作用仅在低氧或厌氧环境下发生,O₂主要通过影响反硝化微生物相关酶的活性来影响反硝化速率,从而影响N₂O排放^[12]。研究^[13]表明,当土壤中的氧气体积分数降低到5 mL/L以下时,反硝化微生物的活性增强。但也有研究^[14]表明,反硝化微生物可在完全厌氧至好氧的O₂含量范围内产生N₂O。*narG*基因编码的硝酸还原酶在NO₃⁻转化为NO₂⁻的过程中起着关键作用,*narG*基因丰度与N₂O排放通量之间存在显著相关性^[15]。研究^[16]表明,*narG*型反硝化微生物对氧气比较敏感,主要在厌氧条件下驱动NO₃⁻的转化,但反硝化微生物也能够适应不同的土壤O₂含量。

间歇灌溉是水稻生长期主要的水管理方式,引起稻田土壤O₂含量在空间和时间上存在很大差异。大田试验结果表明,稻田N₂O排放的季节性变化取决于土壤水分的改变^[17]。当土壤含水量小于105%时,N₂O排放量随土壤含水量的增加呈指数增加^[18]。

为探讨不同土壤水分条件下O₂含量对稻田土壤N₂O排放及*narG*型反硝化微生物的短期影响,笔者通过设置控氧土壤培养试验,选择稻田土壤淹水落干过程中2个典型的土壤含水量状态,在3个不同的O₂含量下,采用实时定量PCR与高通量测序等技术,系统监测土壤N₂O排放特征,分析土壤微生物*narG*基因丰度和群落组成的演替规律,以期减少稻田N₂O排放提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

以湖南省长沙县黄兴镇(28°08'N、113°06'E)第四纪红土发育水稻土作为供试土壤。随机多点采集0~20 cm土层土壤,风干处理后过孔径2.0 mm筛,去除植物残留物和石块,充分混匀,备用。测得土壤的基本理化性质:有机质、全氮质量分数为27.0、1.7 g/kg, NH₄⁺-N、NO₃⁻-N质量分数为5.98、5.20 mg/kg, pH 5.34。土样培养盒为自制装置,材料为高强度透明塑料板,长、宽、高均为15 cm,上端开口处设置三通阀,各接口处均使用南大704硅橡胶密封。

1.2 试验设计

在土壤含水量为 40%、60% 水平下,各设定 0%、10% 和 21% 等 3 个氧气含量水平,分别表示厌氧、兼性厌氧和好氧条件,共 6 个试验处理。40% 土壤含水量的厌氧、兼性厌氧和好氧处理分别记为 T1、T2、T3,60% 土壤含水量的分别记为 T4、T5、T6。每个处理设 3 组平行试验。每个处理各有 21 个土样培养盒,用于 7 个时间点的样品采集,共计 126 个土样培养盒。取 200 g 土样装入培养盒中,所有培养盒随机排列,于 25 °C 恒温室内预培养 10 d(活化土壤微生物);随后,于土样中加入 10 mg KNO₃ 并充分混匀,再分别将土壤含水量调节至 40% 和 60%,同时密封培养盒;对培养盒反复 3 次快速抽真空处理后,迅速充入 O₂ 体积分数分别为 0%、10%、21% 的混合气体(3 组混合气体中除 O₂ 外,均含有 3% 的 CO₂,其余为 He),于 25 °C 恒温室内培养 14 d。

1.3 样品采集

在培养 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 d 时采集气体样品和土壤样品(破坏性采样)。分别于 0、60 min 时采集气体样品,每次 5 mL,用于测定 N₂O 排放通量。培养 2、8、14 d 时采集的土壤样品(编号在处理编号后分别加“-2”“-8”“-14”,如 T1 处理的分别记为 T1-2、T1-8、T1-14)迅速混匀后分成 2 部分:一半用自封袋封装,于 4 °C 冰箱保存,用于硝态氮含量测定;另一半用锡箔纸包裹,液氮速冻后保存于 -80 °C 冰箱,用于分子生物学试验分析。其他时间采集的土壤样品用自封袋封装,于 4 °C 冰箱保存,只用于硝态氮含量测定。

1.4 测定方法

参照卢静等^[19]的方法,测定土壤 N₂O 排放通量和硝态氮含量。

采用 MP 试剂盒(MagBeads FastDNA Kit for Soil, USA)提取土壤 DNA,用 1% 琼脂糖凝胶电泳和 UV-Vis 分光光度计(ND-1000, NanoDrop, GER)检测提取的土壤 DNA 质量和浓度。采用罗氏荧光定量 PCR 仪(Roche LightCycler480, GER)进行实时荧光定量 PCR,其反应体系为 5 μL SYBR GREEN (Takara), 1 μL 正/反向引物, 1 μL 质量浓度为 5 ng/μL 的 DNA 模板,加水补至 10 μL。每样 3 重复。*narG*

基因引物对为 *narG*-571F(CCGATYCCGGCVATGTC SAT)和 *narG*-773R(GGNACGTTNGADCCCCA)^[20]。反应条件:95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 10 s, 共 40 个循环。

运用 Illumina 测序分析含有目的基因的微生物群落结构多样性。扩增 *narG* 基因片段的引物对为 *narG*-145F(ACSCAYGGSGTDAACTGYAC)和 *narG*-773R^[20],由上海美吉生物医药科技有限公司合成。扩增条件:95 °C 预变性 4 min; 95 °C 变性 45 s, 60 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环;最后 72 °C 延伸 5 min。将扩增得到的 PCR 产物进行 Illumina 测序,每个样品至少获得 3 万条有效序列,并运用美吉生信云分析工具进行数据分析聚类。将优势可操作分类单元(OTU)(丰度>2%)序列在 NCBI 比对后上传 GenBank,登录号为 ON159441 至 ON159474。

1.5 数据处理与统计分析

运用 Excel 2010 对试验原始数据进行记录整理;运用 SPSS 25.0 对 N₂O 排放通量与 O₂ 含量和土壤含水量进行双因素方差(two-way ANOVA)分析,对 *narG* 丰度进行单因素方差分析(one-way ANOVA, LSD)和对 *narG* 种群丰度变化与 N₂O 排放通量、NO₃⁻-N 含量等因素进行皮尔森相关性分析。运用 Rstudio(v4.1.2)中 Function 函数命令筛选优势 OTUs(丰度>2%)。分别运用 OriginPro 2022 和 MEGA-X 绘制图形和系统发育树。

2 结果与分析

2.1 不同处理土壤 N₂O 排放的动态变化

表 1 显示,在 40% 土壤含水量条件下,厌氧处理中 N₂O 的排放通量从 2 d 时的 7.8 mmol/(m² h)逐渐上升至 8 d 时的 182.2 mmol/(m² h),达到峰值,随后逐渐下降,在 24 d 时排放通量降至约 63.8 mmol/(m² h);兼性厌氧和好氧处理中 N₂O 的排放通量在 0~10 d 呈上升趋势,峰值时间较厌氧处理的延后了 2 d,且峰值大小也比厌氧处理的低 100 mmol/(m² h)以上,随后 10~12 d 又下降,好氧和兼性厌氧处理的最终 N₂O 排放通量下降至 11.0、17.1 mmol/(m² h)。在 60% 土壤含水量条件下,3 种不同氧气含量处理中 N₂O 排放速率与 40% 土壤含水量条件下对应处理的变化趋势基本类似,但有 2 个主要不同点:厌氧和兼性厌氧处理中 N₂O 的排放通量

峰值出现的时间相比好氧处理条件下的提前了2 d; 厌氧处理中 N_2O 排放通量的高峰值相比兼性厌氧和好氧处理的高 200 $mmol/(m^2 h)$ 以上。将 N_2O 排放通量与 O_2 体积分数、土壤含水量进行双因素方

差分析(表 2)发现, O_2 体积分数和土壤含水量因素的交互作用与土壤含水量对 N_2O 排放通量没有显著影响, 而 O_2 体积分数对 N_2O 排放通量有极显著 ($P=0.001$)影响。

表 1 不同含水量和 O_2 含量处理的土壤 N_2O 排放通量

Table 1 The N_2O emission flux from soil treated with different water contents and O_2 contents

| 处理 | N_2O 排放通量/ $(mmol m^{-2} h^{-1})$ | | | | | | |
|----|-------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | 2 d | 4 d | 6 d | 8 d | 10 d | 12 d | 14 d |
| T1 | (7.8±1.0)Be | (62.9±6.8)Bd | (160.3±13.3)Bb | (182.2±17.7)Ba | (146.7±22.5)Bb | (93.7±14.6)Bc | (63.7±21.8)Bd |
| T2 | (1.3±0.2)De | (9.4±0.7)Cd | (25.1±4.6)Dc | (49.6±5.1)Db | (81.6±14.4)Ca | (44.7±3.3)Db | (17.1±3.3)Dc |
| T3 | (3.8±1.9)Ce | (7.2±0.9)Cd | (19.5±1.6)Dc | (38.6±3.1)Eb | (55.4±10.2)Da | (50.0±8.9)Da | (11.0±3.4)Ed |
| T4 | (40.6±1.0)Ae | (108.1±17.7)Ad | (203.5±25.5)Ac | (311.4±18.0)Aa | (239.1±19.1)Ab | (209.7±17.9)Ac | (108.9±16.7)Ad |
| T5 | (2.7±0.6)Ce | (9.2±0.3)Cd | (65.8±10.2)Cc | (99.7±11.3)Ca | (75.2±2.4)Cb | (66.9±5.9)Cc | (16.6±4.9)Dd |
| T6 | (3.4±0.5)Cd | (6.2±0.5)Cd | (24.1±6.1)Dc | (45.5±2.8)Db | (82.8±9.6)Ca | (42.3±3.4)Db | (25.8±2.2)Cc |

同列不同大写字母示处理间的差异有统计学意义($P<0.05$); 同行不同小写字母示同一处理不同时间点的差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 2 N_2O 排放通量与 O_2 含量和土壤含水量的双因素方差分析结果

Table 2 The two-way ANOVA of soil N_2O emission rate and O_2 concentration and soil water content

| 变量 | F | 显著性 |
|------------------|--------|-------|
| O_2 体积分数 | 13.263 | 0.001 |
| 土壤含水量 | 1.934 | 0.190 |
| O_2 体积分数×土壤含水量 | 0.623 | 0.553 |

2.2 不同处理土壤 NO_3^- -N 质量分数的动态变化

从表 3 可知, 在土壤含水量为 40% 的处理中, 厌氧处理中的 NO_3^- -N 迅速被消耗, 前 8 d 急剧下

降至 2.33 mg/kg , 8 d 后开始保持稳定; 兼性厌氧处理中的 NO_3^- -N 在 6 d 后才被快速消耗, 10 d 后基本趋于动态稳定; 好氧处理中的 NO_3^- -N 被消耗的最慢, 4~14 d 时, 好氧处理中的 NO_3^- -N 质量分数比厌氧和兼性厌氧处理约高 1.1~4.2 mg/kg 。相比 40% 土壤含水量, 在土壤含水量为 60% 的同一氧气含量条件下 NO_3^- -N 质量分数的变化趋势基本类似, 但在培养过程中 NO_3^- -N 的消耗速度更快, 厌氧、兼性厌氧和好氧处理中 NO_3^- -N 质量分数分别在 6、8、10 d 时趋于动态稳定。

表 3 不同含水量和 O_2 含量处理的土壤 NO_3^- -N 质量分数

Table 3 The NO_3^- -N mass fraction of soil treated with different water contents and O_2 contents

| 处理 | NO_3^- -N 质量分数/ $(g kg^{-1})$ | | | | | | |
|----|---------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | 2 d | 4 d | 6 d | 8 d | 10 d | 12 d | 14 d |
| T1 | (5.56±0.10)Ca | (4.45±1.18)Db | (3.02±0.99)Dc | (2.33±0.51)Dd | (2.66±0.43)Dd | (2.72±0.53)Dd | (2.51±0.53)Cd |
| T2 | (6.53±0.28)Aa | (6.27±0.12)Ba | (6.41±0.64)Ba | (4.86±0.11)Bb | (3.65±0.34)Bc | (3.74±0.29)Bc | (3.66±0.45)Bc |
| T3 | (6.37±0.21)Ab | (7.91±0.75)Aa | (7.25±0.68)Aa | (6.16±0.28)Ab | (5.89±0.55)Ab | (4.61±0.68)Ac | (4.60±0.26)Ac |
| T4 | (5.47±0.07)Ca | (3.84±0.29)Eb | (1.84±0.13)Ec | (1.97±0.14)Ec | (1.98±0.12)Ec | (2.10±0.25)Ec | (1.93±0.16)Dc |
| T5 | (6.44±0.14)Aa | (4.56±0.30)Db | (3.73±0.68)Dc | (2.37±0.23)Dd | (2.43±0.10)Dd | (2.40±0.17)Dd | (2.41±0.10)Cd |
| T6 | (5.96±0.26)Ba | (5.53±0.17)Ca | (4.89±0.4)Cb | (3.38±0.58)Cc | (3.07±0.82)Cd | (3.41±0.32)Cc | (3.40±0.51)Bc |

同列不同大写字母示处理间的差异有统计学意义($P<0.05$); 同行不同小写字母示同一处理不同时间点的差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 不同处理土壤 $narG$ 基因丰度的动态变化

从表 4 可知, 各处理中 $narG$ 基因丰度均随培养时间的增加而增加。8、14 d 时的土壤含水量 40% 的厌氧处理中的 $lg(narG$ 基因拷贝数)比 2 d 时的显著 ($P<0.05$)增加 0.7%、0.8%; 8、14 d 时的土壤含

水量 60% 的厌氧处理中的 $lg(narG$ 基因拷贝数)比 2 d 时的显著 ($P<0.05$)增加 1.0% 和 1.2%; 同一氧气处理和百分点, 土壤含水量 60% 处理中的 $lg(narG$ 基因拷贝数)等于或高于土壤含水量 40% 处理的; 在 2 种土壤含水量条件下, 厌氧处理中的 $lg(narG$ 基因拷贝数)均等于或高于兼性厌氧和好氧处理的。对

narG 基因丰度与 N₂O 排放通量、土壤 NO₃⁻-N 被消耗量、含水量和 O₂ 含量进行皮尔森相关性分析,发现 narG 基因丰度与 N₂O 排放通量和土壤 NO₃⁻-N 消耗质量分数呈极显著 ($P < 0.01$) 正相关关系,相关系数分别为 0.916、0.693; 与 O₂ 含量呈极显著 ($P < 0.01$) 负相关关系,相关系数为 -0.518; 与土壤含水量呈正相关关系,相关系数为 0.211,但相关性不显著。

表 4 不同含水量和 O₂ 含量处理的土壤微生物 narG 基因丰度

Table 4 The narG gene abundance of microbes in soil treated with different water contents and O₂ contents

| 处理 | lg(narG 基因拷贝数)/(g ⁻¹) | | |
|----|-----------------------------------|--------------|---------------|
| | 2 d | 8 d | 14 d |
| T1 | (8.93±0.03)b | (8.99±0.04)a | (9.00±0.01)Ba |
| T2 | 8.93±0.02 | 8.95±0.05 | (8.96±0.04)B |
| T3 | 8.93±0.01 | 8.95±0.01 | (8.96±0.01)B |
| T4 | (8.93±0.05)b | (9.02±0.06)a | (9.04±0.06)Aa |
| T5 | 8.93±0.02 | 8.97±0.02 | (8.97±0.03)B |
| T6 | 8.93±0.02 | 8.95±0.02 | (8.96±0.03)B |

同列不同大写字母示处理间的差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 同行不同小写字母示同一处理不同时间点的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 不同处理土壤 narG 群落组成的动态变化

从图 1 可知,各处理的优势 OTU 组成有差异,其中变化较大的优势 OTU 有 OTU1882、OTU1510、OTU1593、OTU1596。结合 narG 基因系统发育树(图 2)分析发现,OTU1882 与 *Pseudolabrys* 相近,OTU1510 与分枝杆菌属(*Mycobacterium*)相近,OTU1596 与慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)相近,OTU1593 与地杆菌属(*Geobacter*)的距离较近,此外,还有一些优势 OTU 与固氮根瘤菌属(*Azorhizobium*)、红游动菌属(*Rhodoplanes*)相近。在 40% 土壤含水量条件下,与 2 d 时相比,14 d 时各处理中的 OTU1882、OTU1510 和 OTU1596 相对丰度均降低,但厌氧处理的变化较其他处理更明显,且厌氧处理的 OTU1593 相对丰度增加较多;在 60% 土壤含水量条件下,从 2 d 到 14 d,同氧气体积分分数处理的 OTU1882、OTU1510 相对丰度都呈现下降的趋势,特别是 14 d 时厌氧处理中的 OTU1510 接近消失。此外,在此 2 种土壤含水量条件下的 OTU 组成的差异较大,变化最明显的是 OTU1593 的相对丰度,在 60% 土壤含水量条件下其占比最

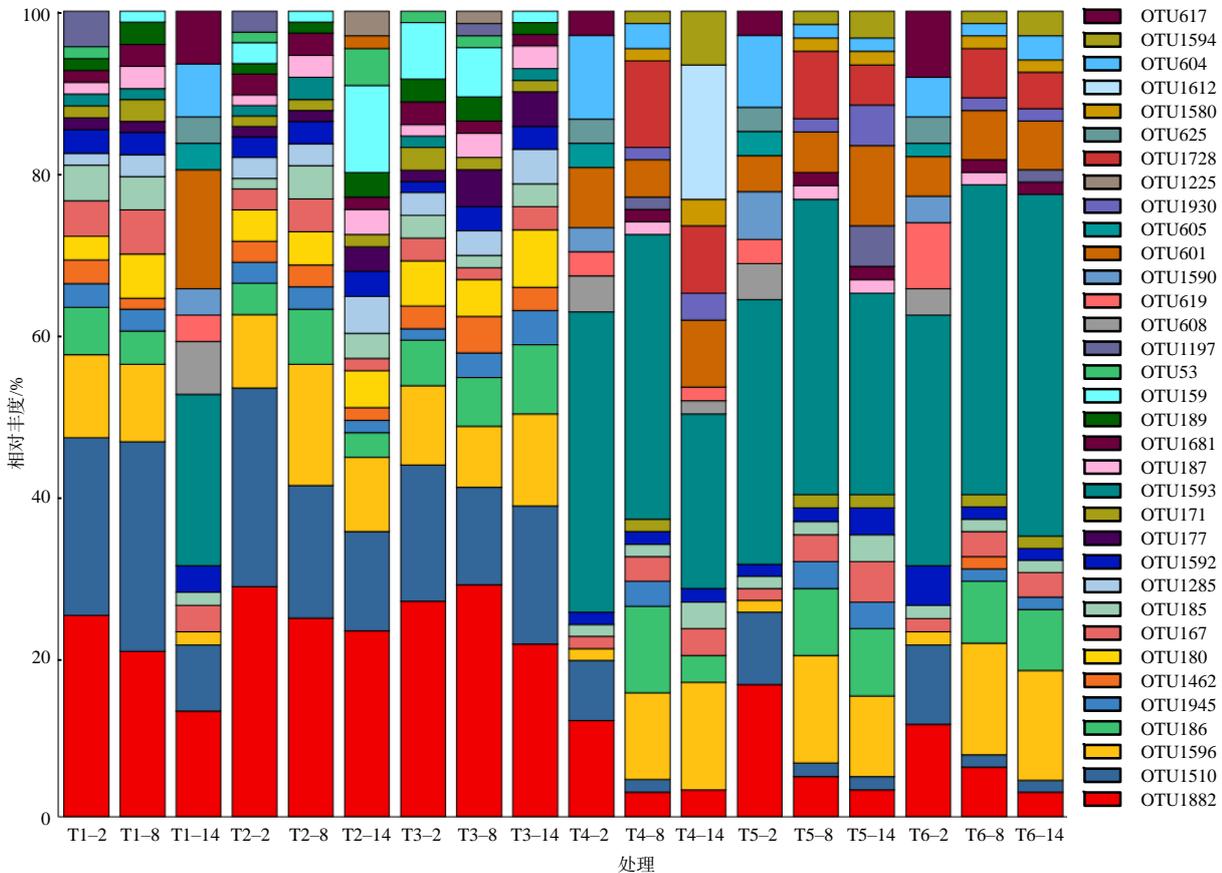
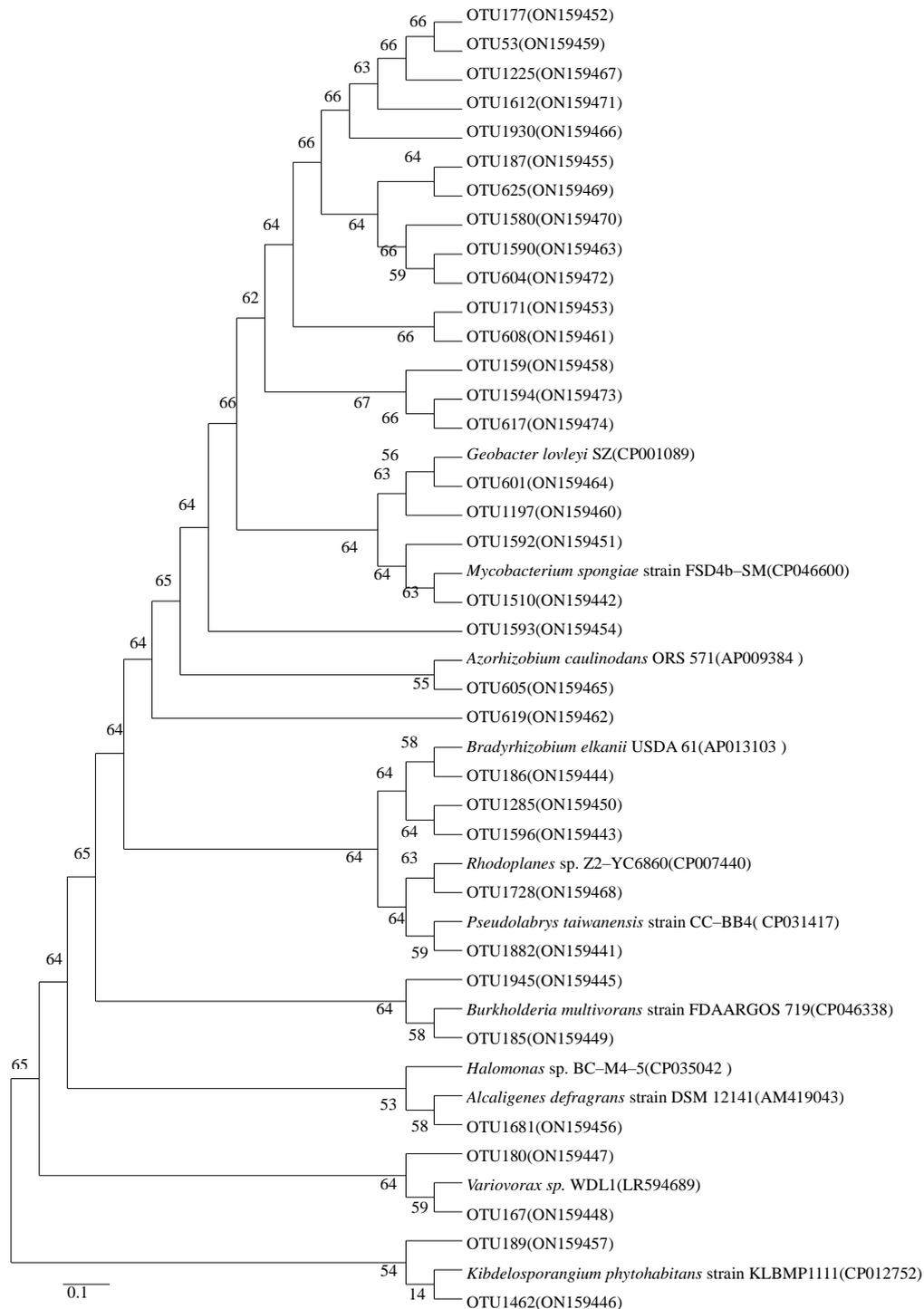


图 1 不同含水量和 O₂ 含量处理的土壤 narG 群落组成

Fig.1 The composition of narG type microbes in soil treated with different water contents and O₂ contents

图2 *narG* 基因的系统发育树Fig.2 Phylogenetic tree of *narG* gene

大，而在 40%土壤含水量条件下，OTU1882 和 OTU1510 的占比较大，除 14 d 时的厌氧处理外，均未检测到 OTU1593。厌氧处理中的 OTU1596 的相对丰度在 40%土壤含水量条件下随培养时间增加呈现降低的趋势，而当土壤含水量增加至 60% 时，OTU1596 的相对丰度反而随培养时间增加呈增

加的趋势。将相对丰度前 5 种优势 OTU 的组成丰度与 N_2O 排放通量进行皮尔森相关性分析，发现 OTU1882 的相对丰度与 N_2O 排放通量呈显著 ($P < 0.05$) 负相关，相关系数为 -0.487；OTU1510 和 OTU1596 的相对丰度也与 N_2O 排放通量呈负相关，相关系数分别为 -0.324 和 -0.004，但相关性不显著。

3 结论与讨论

本研究中,当土壤含水量一定时,厌氧处理中的 N₂O 排放通量最高,排放峰值出现最早;当 O₂ 含量一定时,60%水分处理下的 N₂O 排放通量比 40%水分处理的高;但 O₂ 含量和土壤含水量对 N₂O 排放通量的交互作用不显著,仅 O₂ 含量对 N₂O 排放通量有显著影响,说明 O₂ 含量是影响和制约土壤中 N₂O 排放更关键的因子。有研究^[10]指出,在恒定的土壤含水量条件下,在完全厌氧的状态下主要发生反硝化作用,此时 N₂O 的排放量最高。而关于土壤水分含量高低对 N₂O 排放多少的影响说法不一。有研究^[21]表明,土壤水分含量低时,较好的土壤通气性有利于 N₂O 气体在土壤中快速传输,而土壤含水量高时容易阻止 N₂O 由土壤向大气中扩散。但也有研究^[22-23]指出,N₂O 排放与土壤含水量呈正相关关系,当土壤田间持水量达到 95%左右、充水孔隙度为 78%~85.1%时,稻田 N₂O 排放通量达到最大,这可能是由于土壤含水率上升造成 O₂ 含量下降^[24],形成更为厌氧的环境,并且土壤水分含量影响土壤中的氧化还原电位(Eh)^[25],在水分含量较高的土壤,Eh 值会随着时间的延长显著增加,促进反硝化作用,增加 N₂O 排放通量^[26]。本研究中,较高土壤含水量未能延缓 N₂O 往大气中传输,其原因还有可能为培养时间较短,N₂O 在土壤滞留过程中未能被 *nosZ* 基因型反硝化微生物进一步转化为 N₂,另外受培养装置中土柱厚度及采气口位置的影响,N₂O 易扩散抽取。

本研究对不同处理土壤的 NO₃⁻-N 质量分数监测发现,当土壤含水量一定时,厌氧处理中的 NO₃⁻-N 消耗速度最快;当 O₂ 含量一定时,60%水分处理下的 NO₃⁻-N 消耗速度比 40%水分处理的快。谢婉玉等^[27]研究指出,N₂O 排放量与土壤 NO₃⁻-N 含量呈显著负相关。本研究的结果也是如此,NO₃⁻-N 消耗快的处理,N₂O 排放量也高,且速率快,这可能是由于土壤在缺氧环境下,NO₃⁻ 还原酶可以迅速合成,而 N₂O 还原酶的合成明显滞后于 NO₃⁻ 还原酶^[28],使得 N₂O 向 N₂ 转化过程被抑制,从而导致 60%含水量条件下厌氧处理中的 NO₃⁻-N 消耗速度最快,N₂O 排放通量最高,且排放峰值出现最早。

narG 基因编码的硝酸还原酶催化硝酸根还原为亚硝酸根是反硝化作用的第一步^[29]。本研究中,*narG* 基因丰度随时间增加逐渐增多,且与 N₂O 排放通量的变化趋势一致,说明 *narG* 基因丰度的变化在短期内对 N₂O 的排放具有重要的驱动作用。WANG 等^[30]在稻田淹水-落干过程试验中也指出,在水稻根系 *narG* 基因数量增多,导致根际区域 N₂O 排放速率显著增强。同时,本研究发现,在水分条件相同情况下,厌氧处理中的 *narG* 基因丰度等于或高于兼性厌氧和好氧处理的,说明氧气含量影响 *narG* 基因丰度,厌氧环境有利于 *narG* 基因型反硝化微生物的生长和繁殖,这个结果与 RICHARDSON 等^[31]得出的 *narG* 在厌氧条件下更容易富集结论一致。另外,在 60%土壤含水量处理中 *narG* 基因丰度要比 40%含水量相对应处理中的高或相近,说明土壤水分也是影响其丰度变化的重要因子。许多稻田淹水-落干过程试验^[15,19,30]结果表明,土壤水分对 *narG* 基因丰度具有显著影响,在稻田落干过程中,*narG* 基因丰度显著增加,土壤水分与之呈现负相关关系。出现这一差异的原因可能是由于本研究一开始就固定了土壤含水量、氧气含量和底物 NO₃⁻-N 含量,而稻田淹水-落干过程试验是从淹水状态下开始,尽管是落干状态,但不可能处于完全干燥状态,土壤水分含量甚至会高于红壤水稻土的田间持水量^[32],并且在这个过程中稻田孔隙中氧含量增加可能导致硝化作用增强,其过程产生的 NO₃⁻-N 为含 *narG* 基因的反硝化微生物生长提供能量^[33-34],从而导致 *narG* 基因丰度最高值出现在 NO₃⁻-N 消耗速率最快时期。

本研究中,将优势 OTU 序列在 NCBI 比对后发现多与 *Pseudolabrys*、分枝杆菌属、慢生根瘤菌属、地杆菌属等属相近。在 40%含水量条件下,以 *Pseudolabrys* 和分枝杆菌属的优势 OTUs 为主,其相对丰度与 N₂O 排放通量呈负相关;厌氧处理的 *Pseudolabrys*、分枝杆菌属的优势 OTUs 相对丰度随时间的变化幅度均较兼性厌氧和好氧处理的要明显,说明不同氧气含量对 *narG* 基因型反硝化微生物的群落组成的影响程度不同。氧气含量越低,对 *narG* 基因型反硝化微生物的群落组成影响越大。当氧气含量一定时,60%土壤含水量处理 *narG* 基因型反硝化微生物的群落组成与 40%土壤含水量处

理的有较大差异,最明显的变化是60%土壤含水量处理的 *Pseudolabrys* 和分枝杆菌属的 OTUs 减少,慢生根瘤菌属和地杆菌属的优势 OTUs 增多,说明 *narG* 功能种群类型较多^[35],土壤含水量对 *narG* 基因型反硝化微生物的群落组成也有影响,这与 LIU 等^[15]的研究结果一致。

SZUKICS 等^[36]发现,反硝化细菌群落结构受水分含量的影响很大,在潮湿的环境中反硝化细菌丰度快速上升,直至 NO_3^- -N 限制的出现,说明反硝化细菌群落结构还受 NO_3^- -N 含量的影响。刘杰云等^[37]研究发现, NO_3^- -N 是影响休闲季反硝化微生物群落结构的主要因子,通过改变 NO_3^- -N 来增加休闲季稻田 *narG* 基因丰度,并改变 *narG* 基因型反硝化微生物的群落组成,会导致 N_2O 排放增多。本研究中,在 *narG* 基因型反硝化微生物的群落组成变化大的处理中, NO_3^- -N 消耗速率最快,此结果与 SZUKICS 等^[36]和刘杰云等^[37]的一致,同时,该处理下 *narG* 基因丰度最高, N_2O 排放通量最高。

参考文献:

- [1] PRATHER M J, HSU J, DELUCA N M, et al. Measuring and modeling the lifetime of nitrous oxide including its variability[J]. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 2015, 120(11): 5693–5705.
- [2] RAVISHANKARA A R, DANIEL J S, PORTMANN R W. Nitrous oxide(N_2O): the dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century[J]. *Science*, 2009, 326: 123–125.
- [3] HUANG S, PANT H K, LU J. Effects of water regimes on nitrous oxide emission from soils[J]. *Ecological Engineering*, 2007, 31(1): 9–15.
- [4] TIAN H Q, XU R T, CANADELL J G, et al. A comprehensive quantification of global nitrous oxide sources and sinks[J]. *Nature*, 2020, 586: 248–256.
- [5] ZHANG S M, ZHANG J M, LEE J R, et al. The difference between starch chain length distribution and main quality characteristics of high resistant starch lines of japonica rice[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42(6): 2237–2243.
- [6] WRAGE N, VELTHOF G, VAN BEUSICHEM M, et al. Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2001, 33(12): 1723–1732.
- [7] 郑循华, 王明星, 王跃思, 等. 温度对农田 N_2O 产生与排放的影响[J]. *环境科学*, 1997, 18(5): 1–5.
- [8] 杨艳菊, 蔡祖聪, 张金波. 氧气浓度对水稻土 N_2O 排放的影响[J]. *土壤*, 2016, 48(3): 539–545.
- [9] BURGIN A J, GROFFMAN P M. Soil O_2 controls denitrification rates and N_2O yield in a riparian wetland[J]. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 2012, 117(G1): G01010.
- [10] KHALIL K, MARY B, RENAULT P. Nitrous oxide production by nitrification and denitrification in soil aggregates as affected by O_2 concentration[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, 36(4): 687–699.
- [11] OTTAIANO L, DI MOLA I, DI TOMMASI P, et al. Effects of irrigation on N_2O emissions in maize crop grown on different soil types in two contrasting seasons [J]. *Agriculture*, 2020, 10(12): 623.
- [12] TIEDJE J M. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium[M]//ZEHNDER A J B. *Environmental Microbiology of Anaerobic*. New York: John Wiley and Sons, 1988: 179–244.
- [13] YE R W, AVERILL B A, TIEDJE J M. Denitrification: production and consumption of nitric oxide[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(4): 1053–1058.
- [14] ZHU X, BURGER M, DOANE T A, et al. Ammonia oxidation pathways and nitrifier denitrification are significant sources of N_2O and NO under low oxygen availability[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(16): 6328–6333.
- [15] LIU J B, HOU H J, SHENG R, et al. Denitrifying communities differentially respond to flooding drying cycles in paddy soils[J]. *Applied Soil Ecology*, 2012, 62: 155–162.
- [16] 康鹏亮, 陈胜男, 黄廷林, 等. 好/厌氧条件下反硝化细菌脱氮特性与功能基因[J]. *环境科学*, 2018, 39(8): 3789–3796.
- [17] 蒋静艳, 黄耀, 宗良纲. 环境因素和作物生长对稻田 CH_4 和 N_2O 排放的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2003, 22(6): 711–714.
- [18] ZHENG X H, WANG M X, WANG Y S, et al. Impacts of soil moisture on nitrous oxide emission from croplands: a case study on the rice-based agro-ecosystem in Southeast China[J]. *Chemosphere: Global Change Science*, 2000, 2(2): 207–224.
- [19] 卢静, 刘金波, 盛荣, 等. 短期落干对水稻土反硝化微生物丰度和 N_2O 释放的影响[J]. *应用生态学报*, 2014, 25(10): 2879–2884.
- [20] CHEN Z, LIU J B, WU M N, et al. Differentiated response of denitrifying communities to fertilization regime in paddy soil[J]. *Microbial Ecology*, 2012, 63(2): 446–459.
- [21] SEITZINGER S, HARRISON J A, BOHLKE J K, et al.

- Denitrification across landscapes and waterscapes: a synthesis[J]. *Ecological Applications*, 2006, 16(6): 2064–2090.
- [22] 彭世彰, 侯会静, 徐俊增, 等. 稻田 CH₄ 和 N₂O 综合排放对控制灌溉的响应[J]. *农业工程学报*, 2012, 28(13): 121–126.
- [23] 郑循华, 王明星, 王跃思, 等. 华东稻田 CH₄ 和 N₂O 排放[J]. *大气科学*, 1997, 21(2): 231–237.
- [24] 李靳, 康荣华, 于浩明, 等. 土壤水分对土壤产生气态氮的厌氧微生物过程的影响[J]. *应用生态学报*, 2021, 32(6): 1989–1997.
- [25] 赵苗苗, 张文忠, 裴瑶, 等. 农田温室气体 N₂O 排放研究进展[J]. *作物杂志*, 2013(4): 25–31.
- [26] 刘若萱, 贺纪正, 张丽梅. 稻田土壤不同水分条件下硝化/反硝化作用及其功能微生物的变化特征[J]. *环境科学*, 2014, 35(11): 4275–4283.
- [27] 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.
- [28] LETEY J, VALORAS N, HADAS A, et al. Effect of air-filled porosity, nitrate concentration, and time on the ratio of N₂O/N₂ evolution during denitrification[J]. *Journal of Environmental Quality*, 1980, 9(2): 227–231.
- [29] GREGORY L G. Characterization of a nitrate-respiring bacterial community using the nitrate reductase gene (*narG*) as a functional marker[J]. *Microbiology*, 2003, 149(1): 229–237.
- [30] 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.
- [31] RICHARDSON D J, BERKS B C, RUSSELL D A, et al. Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2001, 58(2): 165–178.
- [32] 高嵩涓, 曹卫东, 白金顺, 等. 湘南红壤稻田 AOA-*amoA*、*narG*、*nosZ* 基因丰度及其环境影响因子[J]. *中国土壤与肥料*, 2017(1): 21–27.
- [33] WOOD N J, ALIZADEH T, BENNETT S, et al. Maximal expression of membrane-bound nitrate reductase in *Paracoccus* is induced by nitrate via a third FNR-like regulator named NarR[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(12): 3606–3613.
- [34] TAVARES P, PEREIRA A S, MOURA J, et al. Metalloenzymes of the denitrification pathway[J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2006, 100(12): 2087–2100.
- [35] 秦红灵, 陈安磊, 盛荣, 等. 稻田生态系统氧化亚氮 (N₂O) 排放微生物调控机制研究进展及展望[J]. *农业现代化研究*, 2018, 39(6): 922–929.
- [36] SZUKICS U, ABELL, G C J, HÖDL V, et al. Nitrifiers and denitrifiers respond rapidly to changed moisture and increasing temperature in a pristine forest soil[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 72(3): 395–406.
- [37] 刘杰云, 邱虎森, 王聪, 等. 生物质炭对双季稻田土壤反硝化功能微生物的影响[J]. *环境科学*, 2019, 40(5): 2394–2403.

责任编辑: 邹慧玲
英文编辑: 柳正