

## 研究报告

过量施肥对设施菜田土壤菌群结构及 N<sub>2</sub>O 产生的影响

纪梦梦 吴晓刚 吴欣欣 吴巧玉 李冀 秦先超 张晓君\*

(上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 上海 200240)

**摘要:**【背景】N<sub>2</sub>O 是一种很强的温室气体,其温室效应强度大约是 CO<sub>2</sub> 的 265 倍。土壤氮肥施加量是影响 N<sub>2</sub>O 排放的重要因素,而厌氧条件下微生物反硝化则是 N<sub>2</sub>O 产生的重要途径。【目的】研究过量施肥条件下蔬菜大棚土壤菌群结构变化及其对 N<sub>2</sub>O 气体排放的影响。【方法】利用自动化培养与实时气体检测系统(Robot)监测土壤厌氧培养过程中 N<sub>2</sub>O 和 N<sub>2</sub> 排放通量,比较过量施肥和减氮施肥模式下土壤 N<sub>2</sub>O 排放模式的差异。通过 Illumina 二代测序平台对这 2 种不同施肥处理的土壤微生物群落进行高通量测序,研究不同施肥量对土壤菌群组成的影响。【结果】过量施肥土壤中硝酸盐的含量大约是减氮施肥土壤的 2 倍,通过添加硝酸盐使 2 种土壤的硝酸盐含量均为 60 mg/kg 或为 200 mg/kg 时,过量施肥土壤在厌氧培养前期 N<sub>2</sub>O 气体的产生量及产生速度都明显高于减氮施肥土壤。另外,过量施肥导致土壤菌群结构发生显著改变,并且降低了土壤微生物的多样性。相对于减氮施肥,过量施肥方式富集了 *Rhodanobacter* 属的微生物。PICRUST 预测结果显示,传统施肥没有显著改变反硝化功能基因相对丰度。【结论】长期过量氮肥施用显著增加了土壤 N<sub>2</sub>O 的排放,可能原因是施肥改变了包括氮转化相关微生物在内的土壤菌群组成,从而影响了土壤 N<sub>2</sub>O 气体的形成与还原过程。

**关键词:** 氮肥, N<sub>2</sub>O, 菌群, 硝酸盐, 反硝化

## Effect of overuse nitrogen fertilizer on bacterial community and N<sub>2</sub>O emission from greenhouse soil

JI Meng-Meng WU Xiao-Gang WU Xin-Xin WU Qiao-Yu LI Ji  
QIN Xian-Chao ZHANG Xiao-Jun\*

(State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences & Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

**Abstract:** [Background] N<sub>2</sub>O is a powerful greenhouse gas with a 265-fold stronger warming potential than CO<sub>2</sub>. Fertilization plays an important role in affecting N<sub>2</sub>O emission from soils driven by bacterial community, and denitrification is the major source of N<sub>2</sub>O under anaerobic conditions. [Objective] To investigate N<sub>2</sub>O emission and greenhouse soil bacterial community response to the overuse of nitrogen fertilizer. [Methods] Robot system was used to monitor the denitrifying gas

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (31670105, 41230856)

\*Corresponding author: Tel: 86-21-34204878; E-mail: xjzhang68@sjtu.edu.cn

Received: November 16, 2017; Accepted: March 19, 2018; Published online (www.cnki.net): April 11, 2018  
基金项目: 国家自然科学基金(31670105, 41230856)

\*通信作者: Tel: 86-21-34204878; E-mail: xjzhang68@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2017-11-16; 接受日期: 2018-03-19; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-04-11

(N<sub>2</sub>O and N<sub>2</sub>) kinetics of soils during anaerobic incubation, and compare the difference of N<sub>2</sub>O emissions between traditional fertilization and reduced nitrogen fertilization. The soil microbial community structure was analyzed by sequencing the 16S rRNA gene V3–V4 region using Illumina MiSeq. **[Results]** The nitrate concentration in conventional nitrogen fertilization soil (CNS) was about two folds higher than that in reduced nitrogen fertilization soil (RNS). CNS showed higher N<sub>2</sub>O accumulation and emission rate during earlier anaerobic-incubation stage although the nitrate content was adjusted to the same level in both types of soil. Traditional fertilization significantly changed the bacterial community structure, and decreased the microbial diversity. Although *Rhodanobacter* was the most abundant genus both in CNS and RNS, it was enriched by traditional fertilization. However, relative abundance of denitrifying functional genes (*narG*, *nirK*, *norB*, *nosZ*) had little response to the overuse of fertilizer. **[Conclusion]** Traditional fertilization reshaped the bacterial community in soil. Overuse nitrogen fertilizer influenced N<sub>2</sub>O emission from soil via changing the microbial community including the microbiota related with nitrogen transformations.

**Keywords:** Nitrogen fertilizer, N<sub>2</sub>O, Bacterial community, Nitrate, Denitrification

N<sub>2</sub>O 是一种很强的温室气体,并且能造成臭氧层的消耗。虽然 N<sub>2</sub>O 气体只占温室气体总量的 0.03%, 但是其温室作用强度大约是二氧化碳的 265 倍<sup>[1]</sup>。近几年, 大气层中 N<sub>2</sub>O 气体的浓度呈现出快速增长的趋势<sup>[2]</sup>。土壤生态系统是 N<sub>2</sub>O 气体最大的来源, 人类从事的农业生产每年会造成 6.7 Tg N-N<sub>2</sub>O 的排放, 大约占全年 N<sub>2</sub>O 排放总量的 60%<sup>[3-4]</sup>。Zhang 等研究表明与氮肥相关的 N<sub>2</sub>O 排放大约占整个中国温室气体排放总量的 7%<sup>[5]</sup>, 并且当氮肥的施加量超过作物生长所需的量时, N<sub>2</sub>O 排放量随着氮含量的增加呈指数型增长<sup>[6]</sup>。在 2030 年之前, 随氮肥投入量增加, 全球 N<sub>2</sub>O 的排放会呈现持续增加的趋势<sup>[7]</sup>。

目前的研究发现, 土壤中 N<sub>2</sub>O 的排放主要来源于微生物的硝化及反硝化过程<sup>[8]</sup>, 其中反硝化是 N<sub>2</sub>O 最大的来源<sup>[5]</sup>。反硝化一般是微生物通过呼吸作用还原土壤中可溶性的硝酸盐, 经过一系列的还原反应, 最终生成 N<sub>2</sub> 或者 N<sub>2</sub>O。土壤中硝酸盐含量及土壤微生物是影响反硝化过程的 2 个重要因素。

土壤微生物在调节土壤 N<sub>2</sub>O 排放方面发挥着重要作用<sup>[9-10]</sup>。外界环境因子影响土壤 N<sub>2</sub>O 排放的主要驱动因子是土壤微生物<sup>[11]</sup>。目前有关氮肥对土壤 N<sub>2</sub>O 排放影响的研究主要集中于不同施肥管理对土壤理化因素的改变, 进而研究土壤理化因素对

N<sub>2</sub>O 排放的影响。研究表明过量氮肥使用可能会造成土壤酸化和硝酸盐沉积, 进而导致土壤 N<sub>2</sub>O 排放增加<sup>[12-14]</sup>。但是, 将微生物菌群特征与 N<sub>2</sub>O 排放相关联的研究比较少<sup>[15]</sup>。研究土壤菌群结构与 N<sub>2</sub>O 排放的关系, 对进一步揭示过量氮肥影响 N<sub>2</sub>O 释放机制具有重要意义。

为了探究过量氮肥对土壤菌群结构及 N<sub>2</sub>O 排放的影响, 本研究以位于山东省寿光市 2 种不同施肥处理的实验田土壤为对象, 利用高通量测序的方法探究 2 种土壤菌群结构的差异。并利用 Robot 系统监测厌氧培养过程中 N<sub>2</sub>O 排放的情况<sup>[16]</sup>。研究结果发现, 过量氮肥施加显著改变了土壤菌群的结构, 不同类型细菌丰度的改变导致了 N<sub>2</sub>O 排放量的变化。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验点概况及样品采集

试验点是山东省寿光市罗家村(36°55'N, 118°45'E)长期进行施肥处理的蔬菜大棚试验田。罗家村试验田于 2004 年开始进行水肥管理, 2012 年翻新建成第二代蔬菜大棚。包括传统施肥加秸秆处理的试验田(Conventional nitrogen fertilization soil, CNS)及减氮施肥加秸秆处理的试验田(Reduced nitrogen fertilization soil, RNS)。土壤样品采集时间为 2017 年 3 月 29 日, 采用 5 点混合取样法取 CNS 和 RNS 表层 0–20 cm 土壤。

CNS 管理情况: 每季番茄栽种前投入风干的鸡粪作为有机肥, 并投入 32 kg N/hm<sup>2</sup> 的小麦秸秆。随后进行翻耕尿素追肥, 每次 120 kg N/hm<sup>2</sup>。冬春季追肥 6 次, 秋冬季共追肥 5 次。

RNS 管理情况: 有机肥及小麦秸秆投入量与 CNS 相同。尿素追肥的次数不变, 但每次追肥量减少为 50 kg N/hm<sup>2</sup>。

## 1.2 土壤氮素含量测定及 pH 值

土壤硝态氮测定方法参考《土壤农化分析》<sup>[17]</sup>, 简单操作方法如下: 取 10.0 g 土壤加入 50 mL 硫酸钙饱和液浸提。取过滤后的浸提液于 20.0 mL 蒸发皿中, 加入 0.03 g 碳酸钙, 水浴蒸干后加入 2 mL 酚二磺酸试剂。冷却后将溶液完全转移到 50 mL 三角烧瓶中, 加入 1:1 氨水至溶液呈黄色, 并且保证氨水过量, 将溶液转入 100 mL 容量瓶中, 加蒸馏水定容。以全波长酶标仪在 420 nm 进行比色, 每个样本重复测 2 次。同时设立空白对照, 以硝酸盐标准液制作标准曲线。土壤亚硝态氮、铵态氮含量测定使用国标 HJ634-2012 方法。pH 值测定的水土比为 5:1, 摇匀静置 1 h 后用 pH 计测定。

## 1.3 土壤样品培养及气体检测

### 1.3.1 土壤培养实验设计

土壤在培养之前避光保存于 4 °C。第一个培养实验的设计方案: 取 12 g 土壤样品转移到 120 mL 血清瓶中, 加入 25 mL 灭菌的双蒸水, RNS 土壤中加入 140 mmol/L 硝酸钾溶液至与 CNS 土壤中硝态氮含量相同, 均为 60 mg/kg。第二个培养实验的设计方案同第一个实验设计, 但 CNS 和 RNS 同时加入 140 mmol/L 硝酸钾溶液使各自的 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 浓度均达到 200 mg/kg。

### 1.3.2 气体监测

将加有转子的血清瓶加上橡胶塞和铝盖密封。每种土壤样品设置 3 个重复。利用真空氮气清洗系统将瓶内气体置换为氮气, 随后放入 20 °C 水浴中培养, 并用 Robot 系统实时监测瓶内土壤 N<sub>2</sub>O 释放情况。整个厌氧培养产气实验持续 40–80 h。

## 1.4 土壤微生物 DNA 的提取

土壤微生物总 DNA 的提取方法在 Griffiths<sup>[18]</sup> 方法的基础上稍加修改, 具体的操作方法: 称取 0.3 g 土壤样品, 加入 0.3 g 0.1 mm 玻璃珠及一颗大玻璃珠; 加入 0.5 mL 苯酚-氯仿-异戊醇(25:24:1) 及 0.5 mL CTAB; 在高通量组织研磨仪中以 27 Hz/s 击打 5 min, 中间将样品放置冰上 1 min, 继续击打 5 min; 4 °C 离心后转移上层清液 400 μL, 加入等体积氯仿-异戊醇(24:1)以移除苯酚; 4 °C 离心后转移水相, 加入 30% PEG, 放置于冰上 2 h; 4 °C 条件下 16 000×g 离心 20 min, 倒掉上清后, 用 70% 乙醇(-18 °C)清洗; 乙醇挥发后, 用 100 μL 双蒸水重悬 DNA。

## 1.5 土壤菌群 16S rRNA 基因高通量测序分析

以 CNS 和 RNS 土壤样本微生物总 DNA 进行 16S rRNA 基因 V3–V4 区测序建库, 步骤参照文献[19]。利用 Illumina MiSeq 测序获得了 139 912 条高质量序列, 用 USEARCH (V8.0.1623\_i86linux32) 根据 97% 的相似度将这些高质量序列划分到 2 079 个操作分类单元(OTU)中。另外, 将每个 OTU 的代表序列利用 Fast Tree 插入到系统进化树中, 并提交到 RDP (V2.10) 中鉴定 OTU 的系统发育进化地位(置信度设为 80%)。根据 OTU 代表序列的系统发育进化地位和相对丰度计算出 Weighted UniFrac 距离, 基于 Weighted UniFrac 距离进行主坐标分析<sup>[20]</sup>。所有的这些分析都在 QIIME 平台上进行(v1.8)。

PICRUSt (Phylogenetic investigation of the communities by reconstruction of the unobserved states) 是一种利用 16S rRNA 基因序列预测元基因组功能的方法<sup>[21]</sup>。利用 PICRUSt 预测反硝化功能基因的相对丰度, 方法按照 Galaxy 网站(<http://galaxy.morganlangille.com/>) 中的流程进行。

## 1.6 统计学分析

利用 Mann-Whitney 的方法对 CNS 和 RNS 中硝态氮含量及微生物物种多样性进行差异分析, 使用的软件为 PRISM。利用 MATLAB 2013a, 采用多元方差分析(MANOVA)比较 CNS 和 RNS 菌群结构

的差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 土壤样品氮素含量及 pH

CNS 和 RNS 土壤中硝态氮的含量分别为 60.48 mg/kg 及 32.83 mg/kg, CNS 土壤经过长期过量的施肥处理, 土壤中硝态氮含量相比于 RNS 土壤明显增加。CNS 和 RNS 土壤中亚硝态氮的含量都较低, 但减氮施肥的土壤中亚硝态氮的含量高于传统施肥土壤。2 种不同施肥处理土壤中铵态氮的含量相似, CNS 土壤的 pH 低于 RNS 土壤(表 1)。我们的结果说明长期施肥处理可能会导致土壤硝态氮含量的升高, 并导致土壤 pH 降低。

### 2.2 培养过程中反硝化气体的产生

为了探究土壤中硝酸盐含量对土壤  $N_2O$  气体排放的影响, 设计了 2 个培养实验。第一个厌氧培养实验  $N_2O$  累积量分析结果(图 1A)显示: 培养前 15 h CNS 土壤  $N_2O$  的排放急剧增加, 培养 15 h 后顶空气体中的  $N_2O$  浓度出现下降的趋势, 46 h 后浓度基本为 0; 相比于 CNS 土壤, RNS 土壤在培养过程中  $N_2O$  的产生量较低, 前 15 h  $N_2O$  的产生缓慢

表 1 传统施肥及减氮施肥 0–20 cm 土壤无机氮素含量及 pH

Table 1 Inorganic N content and pH of traditional fertilization and reduced fertilization in 0–20 cm layer

处理 Treatment	硝态氮 NO <sub>3</sub> -N (mg/kg)	亚硝态氮 NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N (mg/kg)	铵态氮 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg/kg)	pH
CNS	60.48±0.53	0.08±0.03	1.02±0.12	6.08±0.01
RNS	32.83±0.41	0.45±0.04	0.91±0.16	6.61±0.00

增加, 20–30 h 也呈现出缓慢增加的趋势。另外, CNS 和 RNS 土壤在培养过程中  $N_2$  的产生都呈增加趋势, CNS 土壤  $N_2$  的产生量略高于 RNS (图 1B)。但培养 46 h 后 RNS 土壤  $N_2$  的产生量基本上达到平台期, CNS 土壤  $N_2$  产生量还在缓慢增加。

第二个培养实验  $N_2O$  和  $N_2$  产生情况如图 1C、D 所示,  $N_2O$  在 CNS 和 RNS 土壤中的产生情况与第一个培养实验相似, 但是  $N_2O$  在培养 15 h 后的产生量大约是第一批培养实验产生量的 10 倍。在培养的前 50 h, RNS 土壤  $N_2$  的产生量略高于 CNS 土壤(图 1D)。RNS 土壤培养 47 h 后,  $N_2$  的产生进入平台期, 而 CNS 土壤  $N_2$  的产生仍呈缓慢增加的趋势。

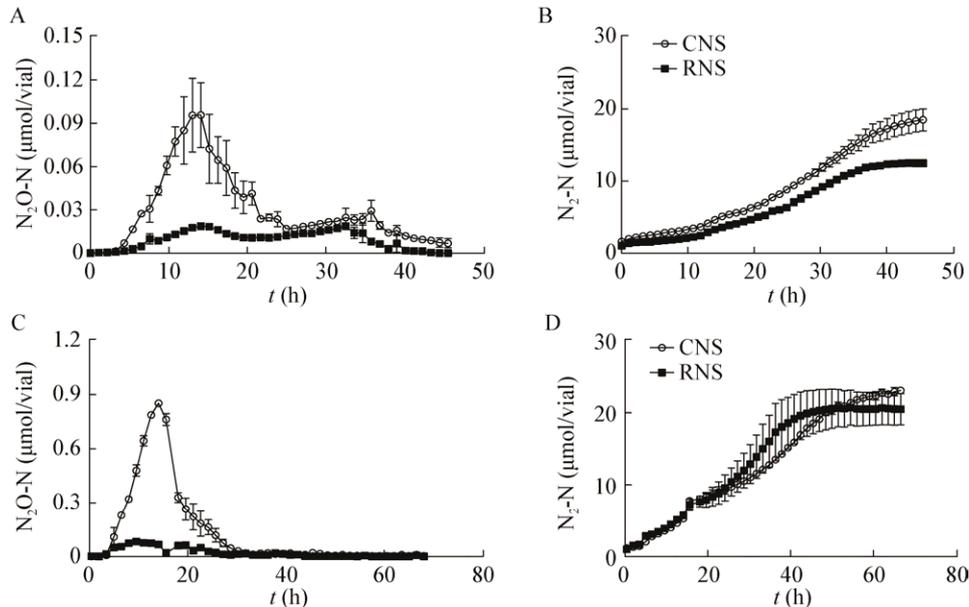


图 1 土壤厌氧培养过程中反硝化气体的产生

Figure 1 Denitrifying gas ( $N_2O$  and  $N_2$ ) kinetics during anaerobic incubation

Note: A, B: Results with 60 mg/kg nitrate in the incubation; C, D: Results with 200 mg/kg nitrate in the incubation.

第一个培养实验中,在封闭的环境 CNS 和 RNS 土壤硝态氮最终全部转化为 N<sub>2</sub> (151.5%, 102.6%)。而在第二个培养实验中,CNS 和 RNS 分别将 64.1% 和 56.4%的硝态氮转化为 N<sub>2</sub>。

这 2 个培养实验反硝化气体(N<sub>2</sub>O 和 N<sub>2</sub>)的产生情况说明, CNS 和 RNS 的 N<sub>2</sub>O 产生能力存在着较大差异,长期进行过量施肥的土壤释放 N<sub>2</sub>O 的能力更强。

### 2.3 过量施肥对土壤菌群的影响

#### 2.3.1 过量施肥显著改变土壤菌群结构

利用 MiSeq 对 CNS 和 RNS 土壤微生物 16S rRNA 基因扩增样本进行高通量测序,平均测序量为 23 318.7,详细信息见表 2。基于 Weighted UniFrac 距离的主坐标分析(PCoA)发现 CNS 和 RNS 的菌群在 PC2 上存在较大差异(图 2A),多元方差分析发现 CNS 和 RNS 菌群结构存在显著性差异( $P=0.018$ )。这说明过量施肥显著改变了土壤的菌群结构。CNS 的香农指数小于 RNS (Mann-Whitney,  $P=0.1$ ),而其它表征样本物种多样性的指数,如 Chao1 指数也显示传统施肥土壤的物种多样性低于减氮施肥土壤,说明过量氮肥施加可能有降低土壤微生物物种多样性的趋势(图 2B, 表 2)。

#### 2.3.2 土壤菌群组成的差异

CNS 和 RNS 中相对丰度最高的属是 *Rhodanobacter*, 其平均相对丰度在 CNS 和 RNS 中分别为 11.4% 和 5.9%, 其次为 *Aeromicrobium*、*Bacillus*。另外, CNS 和 RNS 中其它主要的属为: *Nocardioideis*、*Gp16*、*Gaiella*、*Gp6*、*Streptomyces*

和 *Gemmatimonas*。CNS 土壤富集了 *Rhodanobacter* 和 *Gaiella* 属的菌(图 2C)。

在门水平上, CNS 和 RNS 中变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、酸杆菌门(Acidobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)及浮霉菌门(Planctomycetes)在总菌中的相对丰度大于 1% (图 2D)。2 种土壤均以变形菌门的微生物为主,其相对丰度在 CNS 和 RNS 中分别为 38.0% 及 31.5%。过量施肥处理使土壤中变形菌门的相对丰度升高,并使酸杆菌门的相对丰度降低。

CNS 及 RNS 中微生物的组成在属水平及门水平上均存在差异,说明过量施肥改变了土壤微生物的组成。

#### 2.3.3 导致土壤菌群差异的关键 OTU 分析

利用随机森林的方法共挑选出 86 个导致 CNS 和 RNS 菌群出现显著性差异的关键 OTU,从形成的热图中(图 3)发现过量施肥富集了 42 个关键 OTU,分别属于 *Nocardioideis* (n=4)、*Gaiella* (n=3)、*Gemmatimonas* (n=2)、*Sphaerobacter* (n=2)及 *Gp16*、*Rhodococcus*、*Nitrospira*、*Rhodanobacter*、*Gp6*、*Parvibaculum*、*Taibaiella*、*Conexibacter*、*Castellaniella*、*Arenibacter*、*Acidothermus* 和 *Phenylobacterium* (n=1)。

传统过量施肥共降低了 44 个关键 OTU 的相对丰度,这些 OTU 分别属于 *Gp6* (n=3)、*Gp4* (n=2),及 *Agromyces*、*Rhizobium*、*Pseudonocardia*、

表 2 各样品高通量测序情况及物种多样性比较

Table 2 The detail of the high-throughput sequencing and alpha-diversity in samples

样本 Samples	高质量序列数 High-quality sequence number	OTU 数量 OTU number	Chao1 指数 Chao1 index	香农指数 Shannon index	辛普森指数 Simpson index
RNS-1	14 236	1 053	1 350	8.52	0.99
RNS-2	27 680	1 586	1 586	8.15	0.99
RNS-3	25 645	1 551	1 551	8.18	0.99
CNS-1	23 513	1 431	1 431	8.00	0.99
CNS-2	24 238	1 425	1 425	7.91	0.98
CNS-3	24 600	1 445	1 445	7.94	0.99

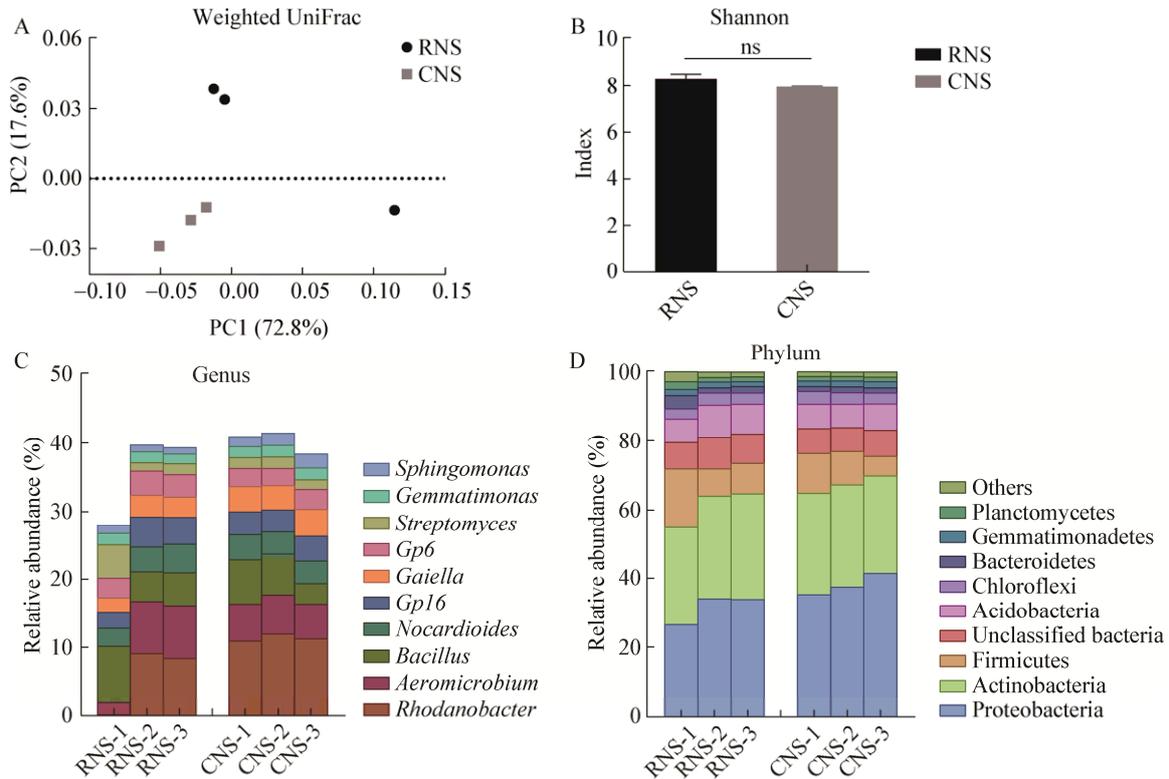


图2 CNS和RNS土壤细菌菌群的比较

Figure 2 Comparison of bacterial community for CNS and RNS

注: A: 基于 Weighted UniFrac 距离的主成分分析; B: 物种香农多样性指数; C: 属水平菌群组成; D: 门水平菌群组成。

Note: A: Beta-diversity analysis based on Weighted UniFrac distance; B: Shannon index; C, D: Microbial community composition in RNS and CNS. The genus and phylum which the relative abundance greater than 1% are shown.

*Mucilaginibacter*、*Gaiella*、*Vitellibacter*、*Aridibacter*、*Hydrogenophaga*、*Gp5*、*Gp17*、*Ilumatobacter*、*Hyphomicrobium*、*Phaselicystis*、*Chitinophaga*、*Steroidobacter*、*Luteimonas*、*Sphingomonas* (n=1)。

#### 2.4 反硝化功能基因预测结果分析

PICRUSt 预测结果表明, CNS 土壤中 *narG*、*nirK*、*norB* 的相对丰度高于 RNS 土壤, 但是两者没有显著差异(图 4)。*nosZ* 基因编码的氧化亚氮还原酶是反硝化过程中消耗  $N_2O$  唯一的酶, *nosZ* 基因在 CNS 中的相对丰度低于 RNS, 说明 CNS 土壤消耗  $N_2O$  的能力可能低于 RNS 土壤。

### 3 讨论与结论

土壤中  $N_2O$  气体的主要来源是反硝化过程, 而硝酸盐是反硝化过程的底物。大量研究表明土壤中

过量氮肥施加会造成土壤中的氮沉积, 因此会导致  $N_2O$  气体的排放量显著增加<sup>[14,22]</sup>, 我们之前的研究也表明集中水肥管理会促进  $N_2O$  的产生<sup>[23]</sup>。因此土壤中硝酸盐含量是影响土壤  $N_2O$  排放的重要因素。过量施肥会导致土壤中硝酸盐含量增加(表 1), 但在相同硝酸盐浓度下过量施肥土壤与减氮施肥土壤在厌氧培养过程中  $N_2O$  气体的排放仍有不同, 过量施肥土壤在培养前期  $N_2O$  的释放量及速度明显高于减氮施肥的土壤(图 1A, 1C)。这个结果说明, 过量施肥造成的土壤硝态氮沉积可能并不是导致土壤  $N_2O$  释放量增加的直接因素。

PICRUSt 预测反硝化功能基因的结果显示, *narG*、*nirK*、*norB* 及 *nosZ* 基因在 CNS 和 RNS 土壤中的相对丰度没有显著性差异(图 4)。有研究表明反硝化功能基因不是在 DNA 水平上而是在 RNA 水

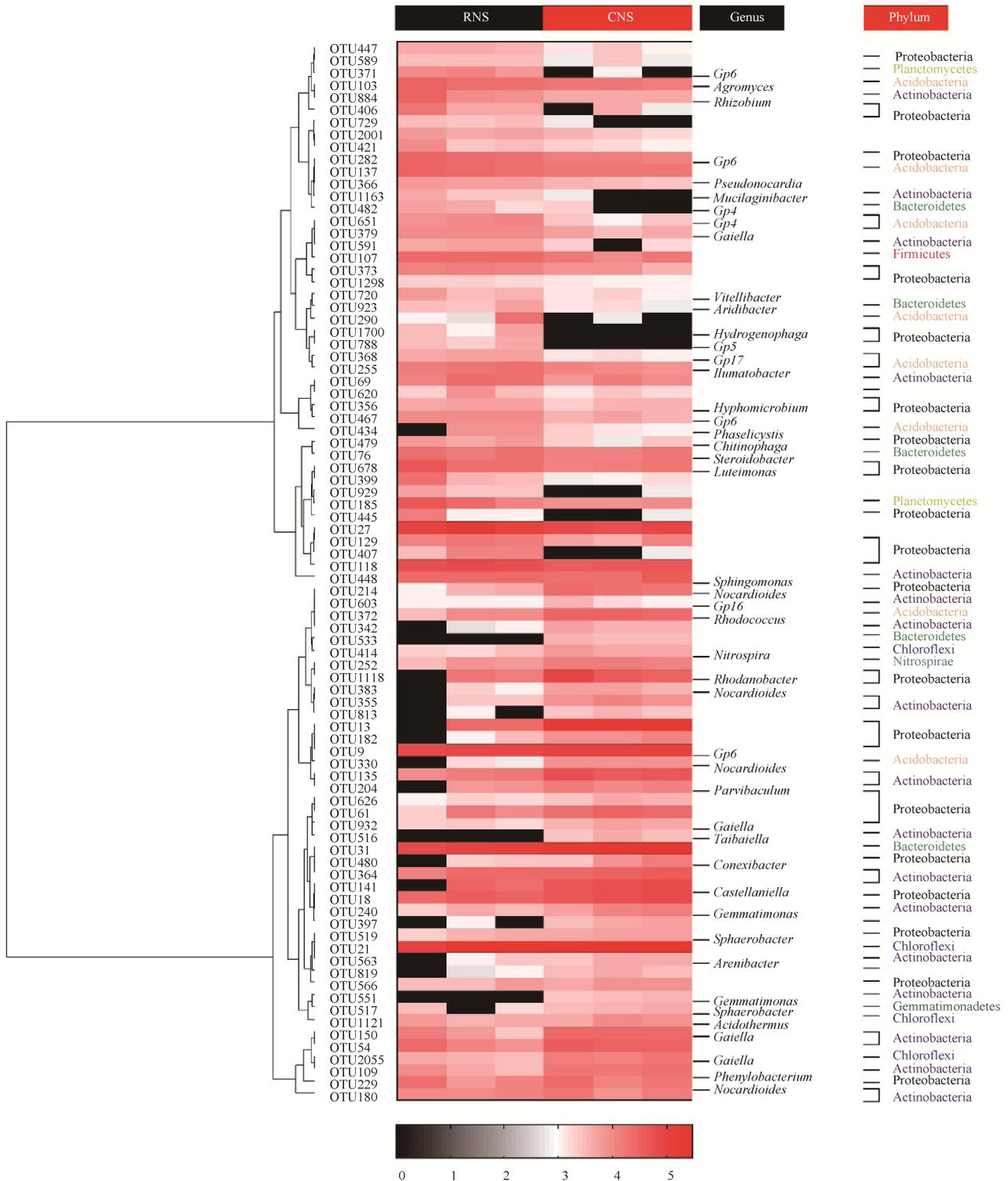


图 3 导致 CNS 和 RNS 土壤菌群出现显著性差异的关键 OTU

Figure 3 Heat map of key OTU selected with random forest responding to different fertilization

注: 左侧是根据各 OTU 的相对丰度利用 Spearman 相关性进行聚类的结果, 右侧是 RDP 鉴定的 OTU 系统发育地位。

Note: The OTUs are clustered by spearman's correlation analysis based on their relative abundance. Right panel shows the phylogenetic position identified with RDP.

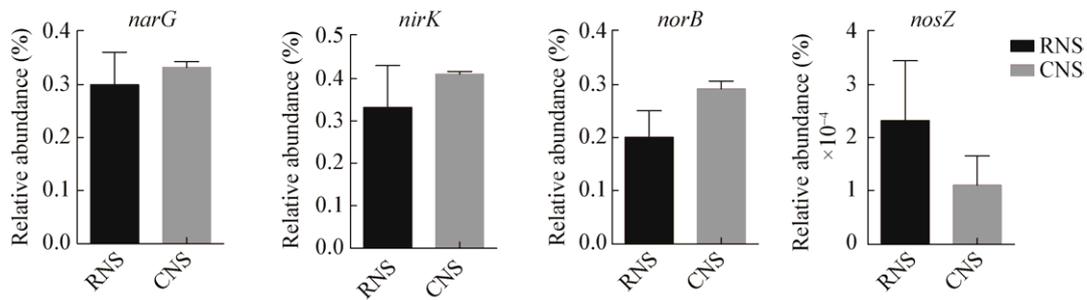


图4 反硝化基因的相对丰度

Figure 4 Relative abundance of denitrifying functional genes in CNS and RNS

平上与  $N_2O$  排放相关<sup>[24]</sup>，我们的研究也表明土壤反硝化功能基因含量可能不是影响  $N_2O$  排放的因素，需要继续探究反硝化功能基因在 RNA 水平上的变化。

过量氮肥施加不仅显著改变了土壤的菌群结构(图 2)，还降低了土壤微生物菌群的多样性(表 2)。在我们研究的 2 种土壤中，传统过量施肥土壤尿素的投入量大约是减氮施肥土壤的 2 倍，而 2 种土壤中有机肥及秸秆的投入量是相同的。土壤中的主要碳源为有机肥及秸秆，秸秆的主要成分是纤维素，有研究发现较高的氮肥投入量会提高土壤中纤维素酶的活性，从而促进纤维素降解为小分子物质<sup>[25-26]</sup>。而土壤中的某些特定微生物可能能够利用这些小分子物质为自身的生命活动提供能量，加快其生长速率<sup>[27]</sup>，例如：CNS 土壤富集了变形菌门的微生物，而许多属于变形菌门的微生物被鉴定为富营养的分类群，倾向于在营养丰富的环境中生长<sup>[28]</sup>。因此，传统过量施肥可能通过改变土壤碳源利用率，从而改变了土壤菌群的结构，进而影响土壤反硝化过程。

之前的研究揭示长期环境因子作用是通过改变微生物菌群组成控制  $N_2O$  释放的<sup>[29]</sup>，本文的结果也说明氮肥施用重塑了土壤菌群的组成，进而影响  $N_2O$  气体排放，但是目前在属水平及 OTU 水平分析氮肥对微生物菌群组成影响的研究比较少。本文从菌群属水平及 OTU 水平上探索菌群组成的改变，研究菌群影响  $N_2O$  气体排放的机制。Green 等发现

在酸性及硝酸盐丰富的环境中，*Rhodanobacter* 属菌株展现了很高的相对丰度及活性，并且都具有完整的反硝化能力<sup>[30]</sup>，这说明 *Rhodanobacter* 属的菌株可能会利用高浓度的硝酸盐维持自身的生长。但也有研究表明不同的 *Rhodanobacter* 菌株在遗传学水平上具有不同的反硝化能力<sup>[31]</sup>。我们研究发现 *Rhodanobacter* 是 CNS 和 RNS 土壤中相对丰度最高的属，并且过量施肥进一步增加了该属的相对丰度(图 2C)，如：属于 *Rhodanobacter* 属的关键 OTU1118 被传统施肥处理富集。这说明 *Rhodanobacter* 属的菌株可能在调节 CNS 和 RNS 土壤  $N_2O$  排放方面发挥重要作用，其还原  $N_2O$  的能力可能比较弱。

在 OTU 水平上，通过随机森林法共挑选出 86 个导致传统施肥土壤和减氮施肥土壤菌群结构发生分歧的关键 OTU (图 3)。其中减氮施肥富集了 *Agromyces* 属的 OTU，有研究表明该属的部分菌株有去除硝酸盐的能力<sup>[32-33]</sup>，但是目前对其反硝化能力的研究比较少。被 RNS 土壤富集的 OTU884 属于 *Rhizobium* 属，属于根瘤固氮菌，该属的一些菌株能执行完整的反硝化将  $N_2O$  还原为  $N_2$ <sup>[34]</sup>，但是也有研究表明 *Rhizobium* 属不同菌株的反硝化能力存在很大差异<sup>[35]</sup>。被传统施肥增加的 OTU204 和 OTU372 分别属于 *Parvibaculum* 属和 *Rhodococcus* 属。*Parvibaculum* 类似株缺乏合成氧化亚氮还原酶 ( $N_2OR$ ) 的 *nos* 基因<sup>[36]</sup>。而目前  $N_2OR$  被认为是反硝化过程中还原  $N_2O$  唯一的酶，因此 *Parvibaculum* 的部分菌株只能产生  $N_2O$ 。*Rhodococcus* 属菌株虽

然具有完整的反硝化能力, 但是其 N<sub>2</sub>O 的产生能力很强<sup>[37]</sup>。我们的结果说明, 过量施肥可能富集了土壤中 N<sub>2</sub>O 产生能力比较强或者 N<sub>2</sub>O 还原能力比较弱的菌株, 导致土壤 N<sub>2</sub>O 的释放量明显增加。从微生物菌株水平研究其反硝化能力, 将是探究土壤菌群与 N<sub>2</sub>O 排放关系的重要一步。

综上所述, 长期过量施肥会导致土壤硝态氮的沉积增加, 并且提高土壤 N<sub>2</sub>O 的释放量, 但是硝态氮含量增加不是造成土壤反硝化过程 N<sub>2</sub>O 排放量增加的直接原因, 可能是过量施加氮肥的管理模式重新塑造了土壤菌群, 造成对氮肥响应模式不同的细菌的富集, 进而影响 N<sub>2</sub>O 气体排放。

## REFERENCES

- [1] Stocker FS, Qin DH, Plattner GK, et al. Climate change 2013: The physical science basis[A]//Working Group I Contribution to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change[C]. Cambridge: Cambridge University Press, 2013
- [2] Solomon S, Qin D, Manning M, et al. Climate change 2007: The physical science basis[A]//Working Group I Contribution to the Fourth Assessment Report of the IPCC[C]. Cambridge, UK and New York, NY, USA: Cambridge University Press, 2007
- [3] Smith KA, Mosier AR, Crutzen PJ, et al. The role of N<sub>2</sub>O derived from crop-based biofuels, and from agriculture in general, in Earth's climate[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2012, 367(1593): 1169-1174
- [4] Smith P, Martino D, Cai Z, et al. Greenhouse gas mitigation in agriculture[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2008, 363(1492): 789-813
- [5] Zhang WF, Dou ZX, He P, et al. New technologies reduce greenhouse gas emissions from nitrogenous fertilizer in China[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(21): 8375-8380
- [6] Shcherbak I, Millar N, Robertson GP. Global metaanalysis of the nonlinear response of soil nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) emissions to fertilizer nitrogen[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(25): 9199-9204
- [7] Bruinsma J. World Agriculture: Towards 2015/2030: An FAO Perspective[M]. FAO, 2003
- [8] Firestone MK, Davidson EA. Microbiological basis of NO and N<sub>2</sub>O production and consumption in soil[A]//Andreae MO, Schimel DS. Exchange of Trace Gases between Terrestrial Ecosystems and the Atmosphere[M]. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd., 1989: 7-21
- [9] Li SQ, Song L, Jin YG, et al. Linking N<sub>2</sub>O emission from biochar-amended composting process to the abundance of denitrify (*nirK* and *nosZ*) bacteria community[J]. AMB Express, 2016, 6(1): 37
- [10] Samad MDS, Biswas A, Bakken LR, et al. Phylogenetic and functional potential links pH and N<sub>2</sub>O emissions in pasture soils[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 35990
- [11] Wallenstein MD, Peterjohn WT, Schlesinger WH. N fertilization effects on denitrification and N cycling in an aggrading forest[J]. Ecological Applications, 2006, 16(6): 2168-2176
- [12] Qu Z, Wang JG, Almøy T, et al. Excessive use of nitrogen in Chinese agriculture results in high N<sub>2</sub>O/(N<sub>2</sub>O+N<sub>2</sub>) product ratio of denitrification, primarily due to acidification of the soils[J]. Global Change Biology, 2014, 20(5): 1685-1698
- [13] Allen DE, Kingston G, Rennenberg H, et al. Effect of nitrogen fertilizer management and waterlogging on nitrous oxide emission from subtropical sugarcane soils[J]. Agriculture, Ecosystems and Environment, 2010, 136(3/4): 209-217
- [14] Mohn J, Schürmann A, Hagedorn F, et al. Increased rates of denitrification in nitrogen-treated forest soils[J]. Forest Ecology & Management, 2000, 137(1/3): 113-119
- [15] Hu HW, Chen DL, He JZ. 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
- [16] Molstad L, Dörsch P, Bakken LR. Robotized incubation system for monitoring gases (O<sub>2</sub>, NO, N<sub>2</sub>O N<sub>2</sub>) in denitrifying cultures[J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 71(3): 202-211
- [17] Bao SD. Soil and Agricultural Chemistry Analysis[M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2000: 50-56 (in Chinese)  
鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2000: 50-56
- [18] Griffiths RI, Whiteley AS, O'donnell AG, et al. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(12): 5488-5491
- [19] Zhang QP, Wu YQ, Wang J, et al. Accelerated dysbiosis of gut microbiota during aggravation of DSS-induced colitis by a butyrate-producing bacterium[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 27572
- [20] Lozupone C, Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(12): 8228-8253
- [21] Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(9): 814-821
- [22] Gundersen P. Nitrogen deposition and the forest nitrogen cycle: role of denitrification[J]. Forest Ecology and Management, 1991, 44(1): 15-28
- [23] Tian H, Yang LQ, Cao WC, et al. Comparison of microbial communities and denitrifying gases emissions between the soils from a greenhouse and nearby farmland[J]. Microbiology China, 2015, 42(5): 835-844 (in Chinese)  
田浩, 杨柳青, 曹文超, 等. 设施菜田与棚外粮田土壤菌群和反硝化气体产生的比较分析[J]. 微生物学通报, 2015,

- 42(5): 835-844
- [24] Uchida Y, Wang Y, Akiyama H, et al. Expression of denitrification genes in response to a waterlogging event in a Fluvisol and its relationship with large nitrous oxide pulses[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2014, 88(2): 407-423
- [25] Yuan YH. Effects of nitrogen deposition on soil microbial biomass, microbial functional diversity and enzyme activities in fir plantations of subtropical China[J]. Advanced Materials Research, 2012, 610/613: 323-330
- [26] Waldrop MP, Zak DR, Sinsabaugh RL, et al. Nitrogen deposition modifies soil carbon storage through changes in microbial enzymatic activity[J]. Ecological Applications, 2004, 14(4): 1172-1177
- [27] Tomme P, Warren RAJ, Gilkes NR. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi[J]. Advances in Microbial Physiology, 1995, 37: 1-81
- [28] Choo YF, Lee J, Chang IS, et al. Bacteria communities in microbial fuel cells enriched with high concentrations of glucose and glutamate[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2006, 16(9): 1481-1484
- [29] Dambreville C, Hallet S, Nguyen C, et al. Structure and activity of the denitrifying community in a maize-cropped field fertilized with composted pig manure or ammonium nitrate[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2006, 56(1): 119-131
- [30] Green SJ, Prakash O, Jasrotia P, et al. Denitrifying bacteria from the genus *Rhodanobacter* dominate bacterial communities in the highly contaminated subsurface of a nuclear legacy waste site[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(4): 1039-1047
- [31] Hemme CL, Green SJ, Rishishwar L, et al. Lateral gene transfer in a heavy metal-contaminated-groundwater microbial community[J]. mBio, 2016, 7(2): e02234-15
- [32] Rivas R, Trujillo ME, Mateos PF, et al. *Agromyces ulmi* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from *Ulmus nigra* in Spain[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54(6): 1987-1990
- [33] Dastager SG, Qiang ZL, Damare S, et al. *Agromyces indicus* sp. nov., isolated from mangroves sediment in Chorao Island, Goa, India[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2012, 102(2): 345-352
- [34] O'Hara GW, Daniel RM. Rhizobial denitrification: a review[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1985, 17(1): 1-9
- [35] Rosén A, Lindgren PE, Ljunggren H. Denitrification by *Rhizobium meliloti* 1: Studies of free-living cells and nodulated plants[J]. Swedish Journal of Agricultural Research, 1996, 26(3): 105-113
- [36] Takeuchi M, Yamagishi T, Kamagata Y, et al. *Tepidicaulis marinus* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium that reduces nitrate to nitrous oxide under strictly microaerobic conditions[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(6): 1749-1754
- [37] Takeda H, Takahashi N, Hatano R, et al. Active N<sub>2</sub>O emission from bacterial microbiota of Andisol farmland and characterization of some N<sub>2</sub>O emitters[J]. Journal of Basic Microbiology, 2012, 52(4): 477-486