

双季稻田土壤 DNRA 菌群落丰度与结构对不同施氮的响应

张 艺¹, 孙 梅², 龙泽东², 聂三安¹, 田 昌¹, 黄 晶³, 姚 莉⁴, 孙 耿^{2*}

(1. 湖南农业大学资源学院, 湖南 长沙 410128; 2. 湖南省土壤肥料研究所, 湖南 长沙 410125;
3. 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 北京 100081;
4. 咸宁市防汛抗旱服务中心, 湖北 咸宁 437000)

摘 要:硝酸盐异化还原成铵(DNRA)过程有利于氮素在土壤中的固持。研究长期(2013—2022年)不同施氮措施对水稻土DNRA过程微生物丰度和群落结构的影响,可为稻田合理施肥提供科学依据。试验设不施氮肥(CK)、常规化肥(NPK)、控释氮肥(CRU1)、控释氮肥减氮30%(CRU2)4个处理,对稻田土壤pH、有机质、全氮、无机氮、碱解氮、全硫和二价铁等土壤理化指标进行测定,采用荧光定量PCR和高通量测序对水稻土DNRA菌丰度和群落结构进行分析。结果表明,施氮肥对DNRA菌有一定的抑制作用,*nrfA*基因丰度表现为CK>CRU2>CRU1>NPK,且NPK处理与CK差异显著($P<0.05$)。水稻土中DNRA菌优势菌门为变形菌门、疣微菌门和浮霉菌门等,施氮肥下,浮霉菌门相对丰度提高,变形菌门则降低,CRU1处理变形菌门相对丰度最低,浮霉菌门则最高。冗余分析表明,变形菌门与土壤pH和全硫呈正相关,与有机质、全氮、硝态氮和铵态氮呈负相关,浮霉菌门与有机质、全氮和碱解氮呈正相关,与土壤pH、全硫和亚铁呈负相关。多样性指数Shannon和Simpson均以CRU1处理最高。因此,施用控释氮肥改善了水稻土DNRA过程的微生物群落和结构,有利于农田生态系统的氮固持。

关键词:长期不同施氮;控释氮肥;DNRA群落丰度与结构

我国水稻耕作面积占据了全国耕地总面积的近1/4,水稻产量几乎占全国粮食总量的一半^[1-3]。水稻土对于我国粮食生产系统的稳定性和国家安全至关重要,确保其生产力持续高效,乃是我国保障粮食供给、维护国家粮食安全的核心要务^[4]。稻田通过施肥等管理措施满足水稻生长的需求,其中氮肥施用是增加产量的关键,但过度施用会引发氮损失和环境污染。研究显示,有20%~50%的氮通过径流、淋溶、氨挥发和温室气体的形式流失,这些损失会引发严重的环境问题,如土壤退化、酸雨及水体富营养化^[5-7]。稻田土壤中的氮循环复杂多样,硝酸盐异化还原过程主要分为反硝化和硝醇盐异化还原成铵(DNRA)两种途径^[8]。硝酸盐经微生物催化可发生反硝化作用将NO₃⁻还原成N₂,不仅造成氮损失,还会产生具有温室效应的中间产物

N₂O。DNRA过程是由*nrfA*基因编码的硝酸还原酶Nrf将硝态氮或亚硝态氮还原为铵态氮的过程,该过程中产生的NH₄⁺一部分与NO₂⁻进行厌氧氨氧化反应,另一部分在硝化微生物作用下重新生成NO₂⁻和NO₃⁻,新生成的NO₂⁻和NO₃⁻又再次参加反硝化、DNRA和厌氧氨氧化反应,生成NO₂⁻和NH₄⁺,有助于减少氮损失,促进氮在稻田内的有效循环和作物吸收利用^[9-11]。反硝化和DNRA二者因其反应底物及所需环境条件类同而形成了协同竞争的关系。合理调控这两种过程对于稻田氮素保持 and 环境保护意义重大。

传统观点认为,异养反硝化是稻田土壤硝酸盐还原的最主要途径^[12],最近的研究表明,厌氧氨氧化与DNRA也参与其中,对硝酸盐的还原贡献可达5%~27%^[13],并且研究发现,在稻田土壤中也存在DNRA过程^[12-16]。以往的研究大多集中于沉积物、自然湿地和活性污泥的DNRA,稻田土壤中DNRA细菌的分布特征亦有所探究^[10, 17-18],但关于长期不同氮肥管理对稻田土壤DNRA菌的群落结构产生何种影响还有待探索。氮肥的合理施用能促进作物生产,但长期大量施氮对生态环境及人类

收稿日期: 2024-09-23; 录用日期: 2024-10-27

基金项目: 湖南省教育厅重点项目(23A0185); 长沙市基金(kq2208129); 湖南省农业创新资金项目(2024CX38)。

作者简介: 张艺(1999-), 硕士研究生, 研究方向为土壤微生物。
E-mail: 1336129053@qq.com。

通讯作者: 孙耿, E-mail: sungeng@hunaas.cn。



健康的潜在风险不可忽视。农田施氮肥是土壤中铵态氮 (NH_4^+) 的主要来源,但由于其不合理施用,加剧了环境压力。氮肥的施用深刻影响土壤有机质与养分水平,进而间接调控硝酸盐异化还原微生物群落结构特征,而这些微生物是反映土壤质量的敏感性指标^[19]。例如,在温带森林土壤中,尿素施用可提高土壤的总硝化作用、 NO_3^- 固定和 DNRA 作用^[20],表明氮肥直接调控 DNRA 的关键过程。不同施肥策略对 DNRA 微生物群落有显著影响。在低氮管理的稻田中, DNRA 在土壤固氮方面的作用一直被忽视,经研究发现,连续施加低水平氮肥的稻田中,微生物借助 DNRA 过程保留了大部分易流失的 NO_3^- ,并且转化为土壤、植物可利用的 NH_4^+ ,使反硝化损失达到最小。相反,在长期高量施氮的稻田土壤中, DNRA 作用并不明显,表明硝酸盐的去向受土壤氮管理措施的强烈影响^[21]。尽管以上研究揭示了氮肥施用对 DNRA 以及土壤氮素的影响,但是,针对 DNRA 菌群落丰度与结构对不同施氮的响应还有待进一步探究。

双季稻作为我国南方重要的稻田种植模式,通过大量施用尿素提高水稻产量^[22]。然而,普通尿素的低热稳定性和高溶解度导致其施用到土壤后快速水解,从而影响后期植物对土壤的氮供应,氮肥利用率低。近年来,控释氮肥和减氮施肥在双季稻施肥中应用比较普遍,是提高双季稻产量和氮的持续可用性的重要措施。研究表明,与普通尿素相比,施用控释尿素肥料可使水稻产量增加 13.6% ~ 26.5%^[23]。由于长期定位试验在研究稻田土壤微生物对施肥响应上的优势,本研究以长期不同施氮处理的定位试验为研究对象,对 DNRA 功能基因 *nrfA* 进行定量,并进行高通量测序,研究不同施氮处理对稻田 DNRA 微生物数量和群落结构的影响,以期对稻田合理施氮提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验于 2013 年开始,位于湖南省浏阳市原种场沿溪镇花园村 (113°49'E, 28°19'N),该区域属于亚热带季风性湿润气候,年平均气温 24℃,年均日照时间 1594.8 h,全年降水集中在 6—9 月,年均降水量为 1551.3 mm。供试土壤为河流冲积物发育的潮沙泥田,土壤质地为壤土。种植制

度为双季稻,试验开始前土壤 (0 ~ 20 cm 土层) 基本理化性质为 pH 5.61、有机质 16.62 g/kg、全氮 1.21 g/kg、全磷 0.54 g/kg、全钾 11.51 g/kg、碱解氮 105.09 mg/kg、有效磷 21.25 mg/kg、速效钾 155.68 mg/kg。

1.2 试验设计

采用田间小区试验,设 4 个处理:①不施氮肥 (CK);②常规化肥 (NPK);③控释氮肥 (CRU1);④控释氮肥减氮 (CRU2)。随机区组排列,3 次重复,小区面积为 20 m² (4 m × 5 m)。小区间用水泥田埂 (宽 20 cm,高 20 ~ 25 cm) 隔开,以防串水串肥。从 2013 年开始,供试水稻品种早稻为中早 39、晚稻为金优华占 (水稻品种未更改),株行距分别为 16.7 cm × 20.0 cm 和 20.0 cm × 20.0 cm,每穴 2 苗。供试氮肥为普通尿素 (N 46%) 和控释尿素 (山东金正大生态工程股份有限公司生产的树脂包膜肥, N 42%,控释期 3 个月);磷肥为过磷酸钙 (P_2O_5 12%);钾肥为氯化钾 (K_2O 60%)。CK、NPK、CRU1 和 CRU2 处理田中,每季施 N 量分别为 0、150、150 和 105 kg/hm², P_2O_5 和 K_2O 施用量均分别为 72 和 90 kg/hm²,其中,磷肥全部作基肥一次性施入。氮肥和钾肥 60% 作基肥,40% 作分蘖肥。试验过程中,每年早稻移栽和收获时间分别在 4 月中旬和 7 月上旬;晚稻移栽和收获时间分别在 7 月下旬和 10 月下旬。

1.3 样品采集与分析

2022 年 10 月于水稻收获期采用五点取样法采集 0 ~ 20 cm 表层土壤。土样去除砾石和植物残体等杂质物后,充分混匀,分为两部分,一部分样品保存于冰箱 (-20℃) 中,用于土壤总 DNA 的提取与后续分子生物分析,另一部分样品自然风干后,过直径 2 mm 筛,用于土壤理化性质的测定。

1.3.1 土壤理化性质测定

土壤理化性质的测定方法参考《土壤农业化学分析方法》^[24]。土壤含水率采用烘干法测定,于 105℃ 烘干至恒重;土壤 pH 采用 pH 计测定 (水土比 2.5:1);土壤有机质含量采用重铬酸钾-浓硫酸氧化法测定;土壤总氮含量采用凯氏定氮消煮法测定;土壤总硫含量采用燃烧碘量法测定;二价铁含量采用邻菲罗啉比色法测定;土壤硝态氮和铵态氮含量采用 KCl (2 mol/L) 浸提,连续流动分析仪 (FIAQC8500, Lachat) 分析;土壤碱解氮采用碱解扩散法 (1 mol/L NaOH) 测定。



1.3.2 荧光定量聚合酶链式反应 (PCR) 与高通量测序

首先按照试剂盒 (Omega M5635-02, USA) 流程方法提取土壤总 DNA, 用超微量紫外风光光度计 (ND-2000, Thermo) 对 DNA 浓度和纯度进行检测。质量检测合格后, 选用特异性引物 *nrfA*-F (5'-CARTGYCAYGTBGARTA-3') 和 *nrfA*-R (5'-TWNGGCATRTGRCARTC-3') 对样品 DNA 进行 PCR 扩增, 扩增产物由 2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。定量 PCR 反应体系如下: 2×SYBR real-time PCR premixture 10 mL, 10 μmol/L 的 *nrfA*-F 和 10 μmol/L 的 *nrfA*-R 各 0.4 mL, 稀释 30 倍的模板 DNA 1 mL。使用 MA-6000 实时荧光定量 PCR 仪 (雅睿生物技术有限公司, 苏州) 进行荧光定量 PCR 反应。定量 PCR 的程序为 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 15 s, 60℃ 退火 30 s, 40 个循环, 按 10 倍浓度梯度的稀释质粒设置 8 个梯度, 3 个平行。根据梯度曲线扩增得的 Ct 值 (阈值循环: PCR 扩增过程中, 扩增产物的荧光信号达到设定的阈值时所经过的扩增循环次数) 和拷贝数绘制标准曲线。每个样品设有 3 个平行样。用 6000 SDS System 配套软件进行分析计算 DNRA 细菌丰度值。

对 DNRA 的功能基因进行扩增子测序, 测序由上海派森诺生物科技股份有限公司完成, 运用 Illumina MiSeq 测序平台进行测序。测序样品数据下机后, 根据 barcode 标签序列和前引物序列筛选出有效序列, 去除接头和 barcode 序列, 利用 FLASH 对通过质量初筛的双端序列根据重叠碱基进行配对连接, 同时利用 Vsearch 检查并剔除嵌合体序列, 从而获得高质量有效序列。使用 QIIME 调用 Vsearch 序列比对工具, 按照 97% 的序列相似度进行操作分类单元 (OTU) 划分和归并, 并选

取丰度最高的序列作为该 OTU 的代表序列。利用 QIIME 将 OTU 的代表序列与功能基因数据库 (Fun-Gene) 进行比对, 获取每个 OTU 对应的分类学信息。

1.4 数据分析

采用 Excel 2013 处理数据, 应用 SPSS 26.0 进行单因素 ANOVA 分析, 采用 Duncan 法检验差异显著性 ($P<0.05$)。利用 Origin 2021 作图。高通量测序多样性指数等在派森诺基因云平台运行。利用 CANOCO 5.0 对土壤 DNRA 菌与化学性质进行冗余分析 (RDA)。利用 QIIME2 (2019.4) 以及自编 perl 脚本获得水稻土 DNRA 菌群落组成信息, Alpha 多样性指数 (Chao1 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数) 和物种丰度图等分析在派森诺基因云平台运行, 数据均为平均值 ± 标准差。

2 结果与分析

2.1 稻田土壤理化性质

不同处理下, 稻田土壤各理化性质发生了一定程度的变化 (表 1), 不同施氮改变了土壤不同形态的氮含量。总体上, 与 CK 相比, 施氮肥处理均显著增加了土壤有机质、硝态氮和铵态氮的含量, CRU1 和 CRU2 处理均显著增加了土壤全氮、硝态氮、铵态氮和碱解氮的含量 ($P<0.05$), 显著降低了二价铁含量 ($P<0.05$), 但 NPK 处理的全氮和碱解氮含量与 CK 差异不显著。不同施氮肥处理间, CRU1 和 CRU2 处理的土壤有机质、全氮、硝态氮、铵态氮和碱解氮含量均高于 NPK 处理, 尤其是 CRU1 处理达到显著水平 ($P<0.05$)。此外, CRU1 处理的土壤有机质、全氮和碱解氮含量与 CRU2 处理无显著差异, 各处理间土壤 pH 和全硫含量无显著差异, 说明控释氮肥更有利于土壤有机质和氮素的提高。

表 1 不同施氮处理下土壤理化性质

处理	pH (2.5:1)	有机质 (g/kg)	全氮 (g/kg)	全硫 (g/kg)	二价铁 (mg/kg)	硝态氮 (mg/kg)	铵态氮 (mg/kg)	碱解氮 (mg/kg)
CK	5.70 ± 0.05a	22.50 ± 1.45c	1.55 ± 0.02c	0.25 ± 0.01a	45.53 ± 2.92a	4.21 ± 0.07d	1.34 ± 0.02d	153.00 ± 2.31c
NPK	5.62 ± 0.02a	26.06 ± 0.44b	1.65 ± 0.02bc	0.26 ± 0.02a	40.77 ± 2.43ab	4.89 ± 0.07c	4.11 ± 0.71c	164.00 ± 4.16bc
CRU1	5.83 ± 0.07a	28.64 ± 0.50a	1.85 ± 0.05a	0.26 ± 0.05a	36.00 ± 1.78b	6.31 ± 0.23a	12.85 ± 1.10a	182.33 ± 5.81a
CRU2	5.66 ± 0.09a	26.96 ± 0.83ab	1.72 ± 0.06ab	0.25 ± 0.00a	34.90 ± 1.80b	5.89 ± 0.01b	8.27 ± 1.50b	172.67 ± 7.36ab

注: 数据为均值 ± 标准差 (n=3); 不同小写字母表示处理之间在 $P<0.05$ 水平差异显著。下同。

2.2 DNRA 菌的功能基因丰度

对 DNRA 过程的功能基因 *nrfA* 进行荧光定量 PCR, 基因丰度如图 1 所示, 各处理 DNRA 过程的功能基因 *nrfA* 丰度范围在 $(2.45 \pm 0.24) \times 10^7 \sim (3.58 \pm 0.08) \times 10^7$ 拷贝 /g。与 CK 相比, 氮肥的施入降低了 *nrfA* 基因丰度, 其中 NPK 处理 $(2.45 \times 10^7$ 拷贝 /g) 降低 31.6%, 达显著水平 ($P<0.05$)。CRU2 处理 *nrfA* 基因丰度 $(3.49 \times 10^7$ 拷贝 /g) 高于 NPK 和 CRU1 处理, 且与 NPK 处理差异达到显著水平 ($P<0.05$), 但与 CRU1 处理无显著差异 $(3.06 \times 10^7$ 拷贝 /g), CRU1 与 NPK 处理之间无显著差异。可见, 施氮肥降低了 *nrfA* 基因的绝对丰度, 控释氮肥则降低了氮肥施用对 *nrfA* 基因丰度的抑制。

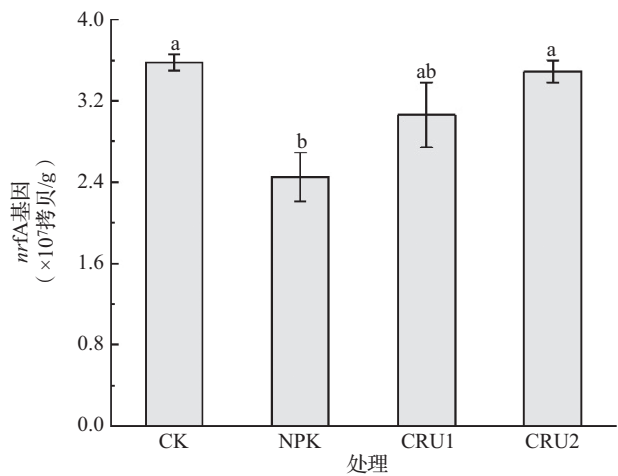


图 1 不同施肥处理下 DNRA 菌功能基因的绝对丰度

注: 不同小写字母表示处理之间在 $P<0.05$ 水平具有显著性差异。

2.3 不同处理对稻田土壤 DNRA 菌群落结构的影响

2.3.1 稻田土壤 DNRA 菌的群落组成

根据土壤样品 OTU 中代表序列的物种注释结果, 选取相对丰度大于 1% 的门水平物种生成柱状图 (图 2), 将相对丰度 $<1\%$ 类群归类为其他, 共定义到 5 个菌门, 主要菌群为变形菌

门 (Proteobacteria, 47.21% ~ 49.87%)、疣微菌门 (Verrucomicrobia, 27.18% ~ 29.21%) 和浮霉菌门 (Planctomycetes, 13.26% ~ 16.67%), 累计相对丰度超过 90%; 另外, 还有相对丰度较低的绿弯菌门 (Chloroflexi, 2.60% ~ 3.16%) 和酸杆菌门 (Acidobacteria, 2.32% ~ 2.60%)。整体上, 与 CK 相比, NPK、CRU1、CRU2 处理提高了浮霉菌门的相对丰度, 但降低了变形菌门的相对丰度; 与 NPK 处理相比, CRU1 处理增加了浮霉菌门、绿弯菌门和酸杆菌门的相对丰度, 降低了变形菌门和疣微菌门的相对丰度。CRU2 处理增加了变形菌门和酸杆菌门的相对丰度, 降低了疣微菌门、浮霉菌门和绿弯菌门的相对丰度。其中 CRU1 处理的浮霉菌门、绿弯菌门和酸杆菌门的相对丰度在 4 个施肥处理中最高, 分别为 16.67%、3.16% 和 2.60%, 而变形菌门和疣微菌门的相对丰度在 4 个施肥处理中最低, 分别为 46.84% 和 27.18%。综上, 施氮改变了水稻土 DNRA 菌的群落组成, 各细菌群落对氮素的响应不同。

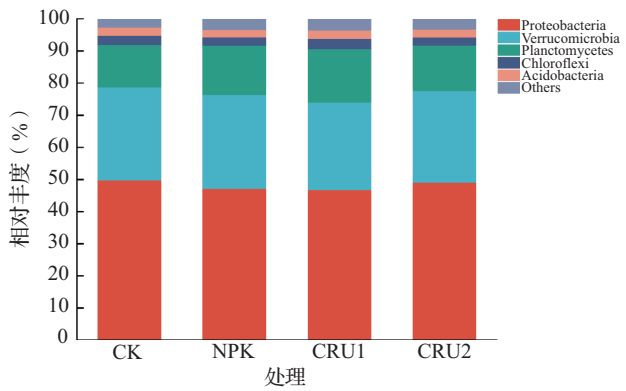


图 2 不同施肥处理下稻田土壤 DNRA 菌群落门水平相对丰度

2.3.2 稻田土壤 DNRA 菌 OTU 丰度及多样性

对稻田土壤样品进行 α 多样性分析, OTU 数目、丰富度指数 (Chao1)、优势度指数 (Simpson) 和多样性指数 (Shannon) 如表 2 所示, 在 97% 序列相似度水平下有 1008411 个 OTU, 样品的 OTU 数量为

表 2 不同施肥处理水稻土 DNRA 菌 α 多样性指数

处理	OTU 数目	α 多样性指数		
		Chao1	Simpson	Shannon
CK	5561 $\pm$ 224b	7449.42 $\pm$ 142.38b	0.992 $\pm$ 0.001b	9.16 $\pm$ 0.07b
NPK	6118 $\pm$ 62a	8257.80 $\pm$ 114.31a	0.994 $\pm$ 0.000ab	9.48 $\pm$ 0.05a
CRU1	6051 $\pm$ 181ab	8000.12 $\pm$ 166.60a	0.995 $\pm$ 0.000a	9.56 $\pm$ 0.09a
CRU2	5928 $\pm$ 85ab	7986.93 $\pm$ 90.78a	0.993 $\pm$ 0.001ab	9.35 $\pm$ 0.13ab

5561 ~ 6118 个。比较不同施肥处理土壤 DNRA 菌的 α 多样性指数发现, NPK、CRU1、CRU2 处理的 OTU 数目、Chao1、Shannon 和 Simpson 指数均高于 CK, 且 Chao1 指数具有显著差异 ($P<0.05$), NPK 处理的 OTU 数目和 Shannon 指数显著高于 CK 处理 ($P<0.05$), CRU1 处理的 Simpson 指数和 Shannon 指数与 CK 处理达到显著性水平 ($P<0.05$)。NPK、CRU1、CRU2 处理之间的 Chao1 指数、Simpson 指数和 Shannon 指数均无显著性差异 ($P>0.05$)。可见, 施氮增加了 DNRA 菌的 α 多样性, 但各施氮处理之间无显著性差异。

2.3.3 DNRA 菌群落的 RDA 分析

为进一步分析不同土壤理化因子对稻田土壤 DNRA 菌群落结构的影响, 选取土壤门水平下所有菌群为物种变量, 土壤理化性质为环境变量进行冗余分析 (图 3)。门水平下, 第一排序轴 (RDA1) 和第二排序轴 (RDA2) 分别解释 66.57% 和 6.90% 的变异, 前两轴共解释了 DNRA 菌群落总变异的 73.47%。变形菌门与土壤 pH、全氮和碱解氮呈正相关, 与土壤有机质、硝态氮和铵态氮呈负相关; 疣微菌门与土壤 pH、碱解氮、全氮、有机质、硝态氮和铵态氮呈负相关; 浮霉菌门与土壤有机质、全氮、硝态氮和铵态氮呈正相关, 与土壤 pH、碱解氮、全硫和二价铁呈负相关; 酸杆菌门与土壤 pH、碱解氮、全氮、有机质、硝态氮和铵态氮呈正相关。

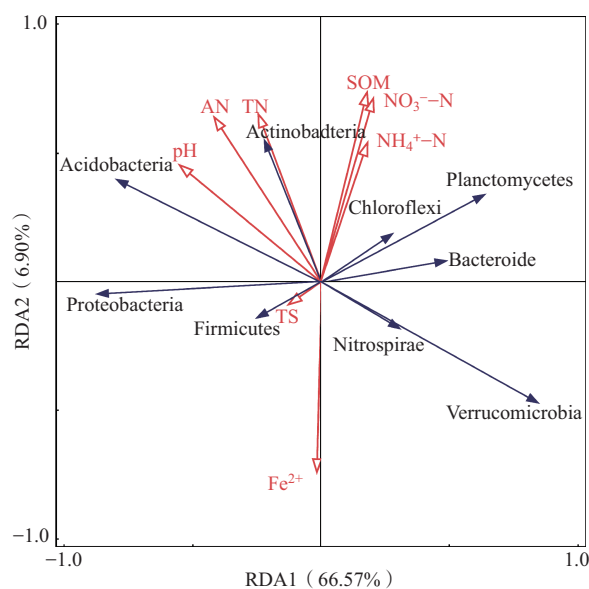


图 3 稻田土壤 DNRA 菌群落结构门水平与土壤理化性质间的冗余分析

注: SOM 为有机质, TN 为总氮, TS 为总硫, Fe^{2+} 为二价铁, NO_3^--N 为硝态氮, NH_4^+-N 为铵态氮, AN 为碱解氮。

3 讨论

3.1 不同施氮对稻田土壤 DNRA 菌功能基因丰度的影响

长期施肥可以改变土壤理化性质, 也是影响土壤微生物多样性和生长的重要因素^[25-26]。DNRA 是由 *nrfA* 基因编码的亚硝酸盐还原酶将硝态氮向铵态氮转化的过程, 这一转化不仅促进了植物可直接吸收利用的铵态氮生成, 也增强了土壤体系中氮素的保留能力^[27]。本研究结果显示, NPK、CRU1、CRU2 处理较 CK 处理有降低 *nrfA* 基因丰度的趋势, 说明施氮肥对 DNRA 菌具有一定的抑制作用。这可能是因为 DNRA 途径主要通过有机质发酵调控, 长期施用铵态氮肥会导致土壤 pH 下降, 造成土壤酸化, 不利于依赖有机物质发酵的 DNRA 微生物生存, 从而抑制了土壤微生物的存活^[11, 28-29]。功能基因丰度可以在一定程度上反映其介导的物质循环过程发生的潜力, 例如, *nrfA* 基因丰度越高, DNRA 作用越强^[30-32]。本研究在不同施氮处理的对比中发现, NPK 处理的 *nrfA* 基因丰度显著低于 CK, 但 CRU1 和 CRU2 处理则与 CK 无显著差异, 这表明, 相较于传统的化学施肥, 控释氮肥的施用可能有效缓解氮肥对 *nrfA* 基因丰度的抑制作用, 从而更有利于维持土壤中 DNRA 过程的潜在活性。Li 等^[33]的研究结果同样显示, NPK 处理会削弱稻田土壤氮素的保留。控释氮肥对 *nrfA* 基因丰度的抑制作用可能与其养分释放缓慢有关, 并且以往研究显示在氮素受限的条件下有利于 DNRA 菌的生长, 如前人^[15, 34-35]在利用 qPCR 技术研究稻田土壤 DNRA 基因 (*nrfA*) 丰度变化的试验中发现, 施氮显著降低了 DNRA 速率, 且 DNRA 在低氮条件下有助于保留氮素, 这表明, 传统速效氮肥的快速释放可能抑制 DNRA 菌的活性, 导致反硝化作用成为主要的氮素损失途径。相比之下, 控释氮肥的缓释特性可能模拟了低氮胁迫环境, 为 DNRA 菌提供了竞争性生长优势, 进而增强土壤对铵态氮的固持能力。因此, 在稻田土壤生态系统中通过优化施氮管理, 可提升 *nrfA* 基因丰度, 减少氮素以气态形式损失, 同时增加土壤铵态氮库的稳定性, 为作物氮素高效利用和农业可持续发展提供理论依据。

3.2 不同施氮对稻田土壤 DNRA 菌群落组成的影响

高通量测序结果显示, 水稻土 DNRA 菌在

门水平下的主要优势菌门为变形菌门、疣微菌门、浮霉菌门、绿弯菌门和酸杆菌门,这与王元涛等^[36]、周利等^[37]对旱地土壤和人工湿地的研究结果相似,说明这些菌在土壤硝酸盐异化还原成铵过程中发挥重要作用。本研究表明,NPK、CRU1、CRU2处理较CK处理提高了浮霉菌门的相对丰度,降低了变形菌门的相对丰度,可能是施氮肥处理提高了土壤有机碳含量,而较高有机碳含量提高了某些微生物与变形菌门的竞争,从而不利于变形菌门的生长和繁殖^[38-39]。CRU1处理浮霉菌门的相对丰度最高,可能与土壤氮素含量相关,因为浮霉菌偏好于高氮环境^[40],本研究也表明,浮霉菌门与土壤全氮、硝态氮和铵态氮呈正相关关系(图3)。酸杆菌群具有喜酸的特点^[41],与NPK处理相比,CRU1和CRU2处理增加了酸杆菌门的相对丰度,且CRU1处理酸杆菌门的相对丰度在施氮肥处理中最高,可能是因为控释氮肥提高了土壤pH,有利于嗜酸菌的生长与繁殖。大多数绿弯菌门的微生物是严格厌氧菌,能够将糖和多糖发酵成有机酸和氢,从而加快稻田土壤中有机的分解^[42]。本研究结果显示,NPK、CRU1、CRU2处理均显著增加了土壤有机质,且在CRU1处理中土壤有机质含量最大,这可能是CRU1处理绿弯菌门的相对丰度在4个施肥处理中最高的主要原因。可见,控释氮肥优化了水稻土DNRA菌群落组成。

3.3 不同施氮对水稻土DNRA细菌多样性的影响

微生物群落的多样性指数(如Chao1、Shannon和Simpson指数)是衡量细菌群落组成复杂性的关键指标,多样性指数越高表明细菌群落的多样性和丰富度越高^[35],细菌多样性受土壤理化性质、养分供应及管理措施等多种因素的影响^[43-44]。本研究中,不同氮肥处理之间DNRA菌的 α 多样性均发生不同程度的变化,但总体上施氮肥处理提高了细菌的 α 多样性。可能原因是控释氮肥通过缓慢释放氮素,模拟了低氮胁迫环境,从而激活了DNRA菌的竞争优势。DNRA菌可将硝酸盐(NO_3^-)转化为铵(NH_4^+),减少氮素以气态形式流失,从而增强土壤氮素固持能力^[45-46]。这一过程与有机肥的作用类似:有机肥料通过提供碳源和养分,促进适应富营养环境的微生物参与有机化合物的分解,能增加土壤细菌的多样性,不同的施肥方式还会影响对植物有益微生物和有害微生物群体的相对丰富程度,进一步维持土壤细菌的多样性^[47]。本

研究中NPK、CRU1、CRU2处理较CK处理明显增加了DNRA菌的OTU数目、Chao1指数、Shannon指数和Simpson指数,且Chao1指数达到显著性水平(表2),CRU1处理的Simpson指数与CK处理达到显著性水平。因此,不同施氮处理对水稻土DNRA菌群落多样性的影响不同,控释氮肥提高了DNRA菌群落的多样性。在稻田土壤中可通过缓控释氮肥对DNRA的影响进而调控氮素固持。另外,常规施肥(NPK处理)降低了DNRA菌的丰度(图1),但群落组成并未发生明显变化(图2), α 多样性与缓控释肥无显著性差异(表2),这可能与速效氮的快速释放抑制了DNRA菌活性,导致反硝化作用占主导有关^[48-49]。本研究中缓控释肥全部为包膜尿素,考虑到控释氮肥的成本较高,后续研究可以分析缓控释氮肥与常规氮肥配施对DNRA过程的影响。

4 结论

本研究通过高通量测序和荧光定量PCR技术对不同施肥处理下DNRA菌的数量和群落多样性进行分析。主要有以下结论:

(1) 长期不同施氮处理改变了DNRA细菌的数量,常规氮肥处理降低了DNRA菌功能基因的丰度,对DNRA过程的发生具有抑制作用,控释氮肥降低了氮肥对DNRA过程功能基因丰度的抑制作用;

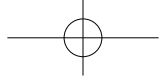
(2) 长期施肥水稻土中DNRA菌优势种群为变形菌门、疣微菌门、浮霉菌门、绿弯菌门和酸杆菌门,控释氮肥处理增加了浮霉菌门、酸杆菌门和绿弯菌门的相对丰度,但降低了变形菌门和疣微菌门的相对丰度;

(3) DNRA细菌的多样性及群落组成对不同施肥的响应不同,控释氮肥增加了DNRA细菌的Simpson指数和Shannon指数。

下一步可探索DNRA微生物对不同施氮措施,尤其是缓控释氮肥与常规氮肥配施过程的响应,从而进一步确认DNRA在稻田氮循环中的作用,深入理解其对稻田生态系统氮素转化和固持的影响。

参考文献:

- [1] 方福平,程式华.论中国水稻生产能力[J].中国水稻科学,2009,23(6):559-566.
- [2] Cui S, Shi Y, Groffman P M, et al. Centennial-scale analysis of the creation and fate of reactive nitrogen in China (1910-2010) [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the



- United States of America, 2013, 110(6): 2052–2057.
- [3] Ding L J, An X L, Li S, et al. Nitrogen loss through anaerobic ammonium oxidation coupled to iron reduction from paddy soils in a chronosequence [J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48 (18): 10641–10647.
- [4] 吴金水, 葛体达, 胡亚军. 稻田土壤关键元素的生物地球化学耦合过程及其微生物调控机制 [J]. *生态学报*, 2015, 35 (20): 6626–6634.
- [5] 易博. 稻田土壤厌氧氨氧化协同铁还原为途径的气态氮素损失过程及其机理的研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2019.
- [6] 覃云斌. 农业氮污染迁移过程中铁氨氧化脱氮机理与应用研究 [D]. 南京: 南京大学, 2020.
- [7] Xing G X, Zhu Z L. An assessment of N loss from agricultural fields to the environment in China [J]. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 2000, 57: 67–73.
- [8] Kraft B, Strous M, Tegetmeyer H E. Microbial nitrate respiration—genes, enzymes and environmental distribution [J]. *Journal of Biotechnology*, 2011, 155 (1): 104–117.
- [9] 冯佳胤, 朱敏, 何艳. 土壤主要还原转化过程中微生物功能基因多样性研究进展 [J]. *浙江大学学报 (农业与生命科学版)*, 2017, 43 (6): 663–675.
- [10] Lun J, Zhou W, Sun M, et al. Meta-analysis: Global patterns and drivers of denitrification, anammox and DNRA rates in wetland and marine ecosystems [J]. *Science of the Total Environment*, 2024, 954: 176694.
- [11] 万雨轩, 王鑫. 废水处理中异化硝酸盐还原为铵的研究进展 [J]. *土木与环境工程学报 (中英文)*, 2021, 43 (6): 134–144.
- [12] Shan J, Zhao X, Sheng R, et al. Dissimilatory nitrate reduction processes in typical Chinese paddy soils: rates, relative contributions, and influencing factors [J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50 (18): 9972–9980.
- [13] Wang S, Pi Y, Song Y, et al. Hotspot of dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) process in freshwater sediments of riparian zones [J]. *Water Research*, 2020, 173: 115539.
- [14] Yin S X, Chen D, Chen L M, et al. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium and responsible microorganisms in two Chinese and Australian paddy soils [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2002, 34 (8): 1131–1137.
- [15] Pandey C B, Kumar U, Kaviraj M, et al. DNRA: a short-circuit in biological N-cycling to conserve nitrogen in terrestrial ecosystems [J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 738: 139710.
- [16] Friedl J, De Rosa D, Rowlings D W, et al. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA), not denitrification dominates nitrate reduction in subtropical pasture soils upon rewetting [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, 125: 340–349.
- [17] Yuan H, Jia B, Zeng Q, et al. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) potentially facilitates the accumulation of phosphorus in lake water from sediment [J]. *Chemosphere*, 2022, 303: 134664.
- [18] Yin G, Hou L, Liu M, et al. DNRA in intertidal sediments of the Yangtze Estuary [J]. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 2017, 122 (8): 1988–1998.
- [19] 陈奇, 丁雪丽, 张彬, 等. 外源氮添加对土壤微生物残体积累动态的影响——基于 Meta 分析 [J]. *土壤通报*, 2021, 52 (6): 1460–1472.
- [20] Bai R, Fang Y T, Mo L Y, et al. Greater promotion of DNRA rates and nrfA gene transcriptional activity by straw incorporation in alkaline than in acidic paddy soils [J]. *Soil Ecology Letters*, 2020, 2: 255–267.
- [21] Pandey A, Suter H, He J Z, et al. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium dominates nitrate reduction in long-term low nitrogen fertilized rice paddies [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2019, 131: 149–156.
- [22] 何浩, 伍龙梅, 黄庆, 等. 南方双季稻区水稻不同种植模式碳足迹和经济效益比较研究 [J]. *广东农业科学*, 2021, 48 (11): 8–17.
- [23] 杜君, 孙克刚, 张运红, 等. 控释尿素对水稻生理特性、氮肥利用率及土壤硝态氮含量的影响 [J]. *农业资源与环境学报*, 2016(2): 134–141.
- [24] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法 [M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
- [25] 周利, 宋以萍, 周杰民, 等. 稻田硝酸盐异化还原成铵细菌群落结构的垂向分布特性 [J]. *环境科学学报*, 2020, 40 (3): 1029–1039.
- [26] Deng C, Teng X, Peng X, et al. Effects of simulated puddling intensity and pre-drying on shrinkage capacity of a paddy soil under long-term fertilization [J]. *Soil and Tillage Research*, 2014, 140: 135–143.
- [27] Kaviraj M, Kumar U, Chatterjee S N, et al. Uncovering microbial drivers and regulatory edaphic factors for DNRA–nitrogen recovery under diverse rice agro-ecosystems [J]. *Plant and Soil*, 2025: 1–28.
- [28] Zhao Y, Li Q, Cui Q, et al. Nitrogen recovery through fermentative dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA): carbon source comparison and metabolic pathway [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 441: 135938.
- [29] Guan P, Wang R, Nkoh J N, et al. Enriching organic carbon bioavailability can mitigate soil acidification induced by nitrogen fertilization in croplands through microbial nitrogen immobilization [J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2022, 86 (3): 579–592.
- [30] Li X, Gao D, Hou L, et al. Soil substrates rather than gene abundance dominate DNRA capacity in the *Spartina alterniflora* ecotones of estuarine and intertidal wetlands [J]. *Plant and Soil*, 2019, 436: 123–140.
- [31] 林伟, 李玉中, 李昱佳, 等. 氮循环过程的微生物驱动机制研究进展 [J]. *植物营养与肥料学报*, 2020, 26 (6): 1146–1155.
- [32] Cusack D F, Silver W L, Torn M S, et al. Changes in microbial community characteristics and soil organic matter with nitrogen additions in two tropical forests [J]. *Ecology*, 2011, 92 (3): 621–632.
- [33] Li C, Wei Z, Wang X, et al. Long-term fertilization regulates dissimilatory nitrate reduction processes by altering paddy soil

- organic carbon components [J]. Soil Use and Management, 2024, 40 (1): e12994.
- [34] Pandey A, Suter H, He J Z, et al. Nitrogen addition decreases dissimilatory nitrate reduction to ammonium in rice paddies [J]. Applied and environmental microbiology, 2018, 84 (17): e00870.
- [35] Rahman M M, Nahar K, Ali M M, et al. Effect of long-term pesticides and chemical fertilizers application on the microbial community specifically anammox and denitrifying bacteria in rice field soil of Jhenaidah and Kushtia District, Bangladesh [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2020, 104: 828–833.
- [36] 王元涛, 王晓玲, 刘时光, 等. 人工湿地沟壕系统中硝酸盐异化还原成铵细菌群落特征研究 [J]. 环境科学学报, 2020 (6): 2175–2185.
- [37] 周利, 王晓侠, 周立光, 等. 旱地作物根际和非根际土壤硝酸盐异化还原成铵细菌群落组成的研究 [J]. 环境科学学报, 2019 (2): 527–536.
- [38] Giblin A E, Tobias C R, Song B, et al. The importance of dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) in the nitrogen cycle of coastal ecosystems [J]. Oceanography, 2013, 26 (3): 124–131.
- [39] 刘家璇. 有机肥配施氮肥对设施菜田硝酸盐异化还原成铵菌群多样性的影响 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2021.
- [40] Podosokorskaya O A, Bonch-Osmolovskaya E A, Novikov A A, et al. Ornatilinea apprima gen. nov., sp. nov., a cellulolytic representative of the class Anaerolineae [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63 (Pt_1): 86–92.
- [41] Conradie T A, Jacobs K. Distribution patterns of Acidobacteriota in different fynbos soils [J]. PLoS One, 2021, 16 (3): e0248913.
- [42] 理鹏, 吴建强, 沙晨燕, 等. 粪肥和有机肥施用对稻田土壤微生物群落多样性影响 [J]. 环境科学, 2020 (9): 4262–4272.
- [43] 吴希慧, 王蕊, 高长青, 等. 土地利用驱动的土壤性状变化影响微生物群落结构和功能 [J]. 生态学报, 2021, 41 (20): 7989–8002.
- [44] Feranchuk S, Belkova N, Potapova U, et al. Evaluating the use of diversity indices to distinguish between microbial communities with different traits [J]. Research in Microbiology, 2018, 169 (4–5): 254–261.
- [45] 耿计彪, 杨修一, 聂素杰, 等. 控释氮肥在我国小麦–玉米轮作体系的应用研究进展 [J]. 土壤通报, 2021, 52 (3): 722–727.
- [46] Liao Y, He T, Wang C, et al. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium has a competitive advantage over denitrification under nitrate-limited conditions [J]. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 2025, 24: 97–144.
- [47] 刘纪爱, 束爱萍, 刘光荣, 等. 施肥影响土壤性状和微生物组的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2019, 35 (9): 21–28.
- [48] 蔡祖聪. 尿素和 KNO_3 对水稻土无机氮转化过程和产物的影响 II. N_2O 生成过程 [J]. 土壤学报, 2003 (3): 414–419.
- [49] 杨杉, 吴胜军, 蔡延江, 等. 硝态氮异化还原机制及其主导因素研究进展 [J]. 生态学报, 2016, 36 (5): 1224–1232.

Response of DNRA bacterial abundance and community to different nitrogen applications in paddy soils

ZHANG Yi¹, SUN Mei², LONG Ze-dong², NIE San-an¹, TIAN Chang¹, HUANG Jing³, YAO Li⁴, SUN Geng^{2*}

(1. College of Resources, Hunan Agricultural University, Changsha Hunan 410128; 2. Hunan Soil Fertiliser Research Institute, Changsha Hunan 410125; 3. Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; 4. Xianning Flood Control and Drought Relief Service Center, Xianning Hubei 437000)

Abstract: Nitrate isomerization and reduction to ammonium (DNRA) is conducive to nitrogen fixation in the soil. The effects of long-term different nitrogen application on microbial abundance and community structure of DNRA process in paddy soil were studied to provide scientific basis for rational fertilization in paddy fields. Four treatments of no nitrogen fertilizer (CK), conventional urea (NPK), controlled-release urea (CRU1) and controlled-release urea with 30% nitrogen reduction (CRU2) were set up, and the abundance and community structure of DNRA bacteria in rice soil were analyzed by fluorescence quantitative PCR and high-throughput sequencing. The results showed that nitrogen fertilization had a certain inhibitory effect on DNRA bacteria, the *nrfA* gene abundance showed as CK>CRU2>CRU1>NPK, and NPK treatment was significantly different from CK ($P<0.05$). The dominant phylum of DNRA bacteria in rice soil were Proteobacteria, Verrucomicrobia and Planctomycetes and so on. The relative abundance of Planctomycetes was increased under nitrogen fertilization, while the relative abundance of Proteobacteria was decreased. The relative abundance of Proteobacteria in CRU1 treatment was the lowest but that of Planctomycetes was the highest. RDA analysis showed that Proteobacteria was positively correlated with soil pH and total sulfur, negatively correlated with organic matter, total nitrogen, nitrate nitrogen and ammonium nitrogen, and Planctomycetes was positively correlated with organic matter, total nitrogen and hydrolyzable nitrogen, negatively correlated with soil pH, total sulfur and ferrous iron. The Shannon and Simpson diversity indices were the highest in CRU1 treatment. Therefore, the application of controlled-release nitrogen fertilizer improved the microbial community and structure of the DNRA process in paddy soil, which was beneficial to the nitrogen retention in the field ecosystem.

Key words: long-term different nitrogen application; controlled-release nitrogen fertilizer; DNRA community abundance and structure