

DOI: 10.13758/j.cnki.tr.2022.04.015

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. 土壤, 2022, 54(4): 769–778.

秸秆还田种类对稻田 N₂O 排放及硝化反硝化微生物的影响^①

谢婉玉^{1,2}, 王永明¹, 纪红梅³, 黄茜^{1,2}, 徐永记¹, 纪洋^{1*}, 冯彦房⁴

(1 南京信息工程大学应用气象学院, 南京 210044; 2 南京信息工程大学长望学院, 南京 210044; 3 山东省德州市陵城区农业技术推广中心, 山东德州 253500; 4 江苏省农业科学院农业资源与环境研究所, 农业农村部长江下游平原农业环境重点实验室, 南京 210014)

摘要:以太湖流域典型单季稻田的原状土柱为研究对象, 通过设置温室土柱试验, 同步监测 3 种秸秆(水稻秸秆 RS、小麦秸秆 WS、玉米秸秆 MS)施用水稻各生长期 N₂O 排放、水稻产量和土壤理化因子, 同时定量化分析多个 N₂O 排放相关菌群及功能基因的丰度, 以阐明 N₂O 排放对不同种类秸秆施用引发的微生物响应机制, 筛选控制单季稻田 N₂O 减排增效最佳的秸秆种类。结果表明: 与对照相比, RS、WS 和 MS 处理下水稻生长期 N₂O 排放量分别增加 162.32%、107.11% 和 9.48%, 其中 RS 处理显著高于 MS 处理。水稻生育期内, 土壤氨氧化菌(AOA、AOB)和反硝化菌群落(*nirS*、*nosZ*)丰度均呈现先上升后下降的变化趋势。与对照相比, 拔节期 RS 处理显著增加 AOA、AOB、*nirS* 和 *nosZ* 拷贝数, MS 和 WS 处理对上述功能基因丰度均无显著影响。各生育期土壤 NH₄⁺-N 含量整体高于 NO₃⁻-N 含量, 二者均在水稻分蘖期达到峰值, 而后随水稻生长不断降低, 同一时期不同秸秆处理之间二者无显著性差异。相关性分析和结构方程模型(SEM)结果表明, 土壤 AOB 丰度和土壤 NH₄⁺-N 含量是直接影响稻田土壤 N₂O 排放的主要因素。综合考虑不同类型秸秆还田后土壤理化因子、水稻产量和微生物丰度变化, 玉米秸秆是减缓太湖流域单季稻田 N₂O 排放且提高产量的最优秸秆还田种类。

关键词: 秸秆种类; N₂O 排放; 土壤微生物; 结构方程模型; 稻田

中图分类号: S154.3 文献标志码: A

Effects of Returned Straw Type on N₂O Emission, Nitrification and Denitrification Microorganisms from Paddy Field

XIE Wanyu^{1,2}, WANG Yongming¹, JI Hongmei³, HUANG Xi^{1,2}, XU Yongji¹, JI Yang^{1*}, FENG Yanfang⁴

(1 College of Applied Meteorology, Nanjing University of Information Technology, Nanjing 210044, China; 2 College of Changwang, Nanjing University of Information Technology, Nanjing 210044, China; 3 Extension Center of Agricultural Technology in Lingcheng District, Dezhou, Shandong 253500, China; 4 Key Laboratory of Argo-Environment in Downstream of Yangtze Plain, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Agricultural Resources and Environment, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: The original soil columns of a typical single-cropping paddy field in the Taihu Lake Basin were used as the research object, N₂O emission, rice yield and soil physiochemical properties were monitored under the application of three straw types (rice straw-RS, wheat straw-WS and maize straw-MS), and the abundances of multiple functional genes related to N₂O emission were quantified to clarify soil microbial mechanism of N₂O emission under different straw types. The results showed that RS, WS and MS treatments increased N₂O emissions by 162.32%, 107.11% and 9.48%, respectively, in which RS was significantly higher than those from MS treatment. The abundance of ammonia oxidizing bacteria and ammonia oxidizing archaea (AOA, AOB) and denitrifiers communities (*nirS*, *nosZ*) all showed a similarly change, increasing first and then decreasing with rice growth. Compared with CK treatment (no straw), RS treatment significantly increased the abundances of AOA, AOB, *nirS* and *nosZ* by 6.14, 8.26, 4.82 and 16.96 times in the elongation stage, respectively, while no significant response was found in either MS or WS treatment. Soil NH₄⁺-N content was generally higher than NO₃⁻-N during rice growth, with an increasing pattern until the tillering stage, and then decreased with rice growth, while no significant difference was found among different straw treatments. The

①基金项目: 国家自然科学基金项目(42077043)、江苏省基础研究计划(自然科学基金)项目(BK20191400)和江苏省农业科技自主创新资金项目(CX(20)3178)资助。

* 通讯作者(jiyang@nuist.edu.cn)

作者简介: 谢婉玉(2000—), 女, 河南南阳人, 本科生, 主要研究方向为农田温室气体排放及微生物机理。E-mail: 201883310089@nuist.edu.cn

results of correlation analysis and the Structural Equation Modeling (SEM) showed that AOB abundance and soil $\text{NH}_4^+\text{-N}$ content were the main factors affecting N_2O emission in paddy field. Considering the comprehensive results of soil physiochemical properties, rice yield and soil microbial abundance, maize straw is the most appropriate for N_2O emission mitigation and yield enhancement of single-cropping paddy field in the Taihu Lake Basin.

Key words: Straw type; N_2O emission; Soil microorganisms; Structural equation modeling; Paddy field

地球大气中温室气体浓度呈现长期持续增长的趋势,对气候变化造成严重危害。自 20 世纪中期以来,全球平均表面温度上升源于 3 种主要温室气体(CO_2 、 CH_4 和 N_2O)浓度的增加^[1]。 N_2O 在大气中含量虽少,但在 100 年尺度上其相对增温潜势是 CO_2 的 298 倍^[2]。2019 年,全球 N_2O 的平均浓度已达到 $0.332 \mu\text{mol}/\text{mol}$,是 1750 年工业化前水平($0.27 \mu\text{mol}/\text{mol}$)的 123%^[3]。人类在过去 40 年内向农田施氮,使得人为 N_2O 排放量增加 30%,是造成 N_2O 负担增长的主要原因^[4]。我国稻田排放产生的 N_2O 约占农田 N_2O 排放总量的 7%~11%^[5]。因此,控制稻田 N_2O 排放是减缓温室效应的主要措施之一。

我国稻田的水分管理模式主要是以前期淹水、烤田、干湿交替和排水落干为特征的间隙灌溉^[6]。土壤微生物好氧的硝化作用过程和厌氧的反硝化作用过程是稻田土壤 N_2O 排放的重要来源^[7]。一般认为烤田期和排水落干期水分条件适宜,土壤硝化菌和反硝化菌的活性增强,是产生 N_2O 的主要阶段^[8]。硝化作用由氨氧化过程和亚硝酸氧化过程组成,其中氨氧化过程是反应的限速步骤,而氨氧化古菌(AOA)和氨氧化细菌(AOB)是催化氨氧化过程的重要菌种^[9]。反硝化作用是指在厌氧条件下,微生物将硝酸盐及亚硝酸盐还原为 NO 、 N_2O 和 N_2 的过程,其中由亚硝酸盐转变为 NO 的过程是反硝化作用的关键步骤^[10],亚硝酸盐还原酶是调控该过程的关键酶,其功能基因由 *nirK* 和 *nirS* 编码^[11]。 N_2O 还原酶是调控 N_2O 转变为 N_2 的关键酶,其功能基因由 *nosZ* 编码^[12]。通过研究与 N_2O 排放相关的土壤微生物功能基因可从分子生物学角度探寻 N_2O 的排放规律^[13]。

秸秆还田作为一项保护地耕作措施,具有培肥地力、固碳增产的作用^[14]。当前有关秸秆还田对稻田 N_2O 排放影响的报道尚未达成一致结论。有研究表明,相比秸秆不还田处理,秸秆还田处理显著增加稻田 N_2O 排放^[15];施氮促进稻田 N_2O 排放,而配施小麦秸秆则会抑制稻田 N_2O 排放^[16];添加水稻秸秆促进稻田 N_2O 排放^[17]。以上研究多从土壤理化性质角度分析秸秆还田对稻田 N_2O 排放的影响,但与其微生物学机制相关联的研究较少。一方面,秸秆还田使

微生物可利用碳源增加,增强微生物活性,加快氧气消耗从而形成厌氧环境,有利于进行反硝化作用,增加 N_2O 排放^[18];另一方面,由于秸秆碳氮比较高,加入土壤后会促进微生物对氮的固定,减少 N_2O 排放^[19]。因此,不同种类秸秆的施用对稻田 N_2O 排放的影响具有不确定性,对硝化反硝化微生物的影响有待进一步研究。

基于此,本研究以典型单季稻田的原状土柱为研究对象,设置土柱试验,同步监测 3 种秸秆施用(水稻秸秆 RS、小麦秸秆 WS、玉米秸秆 MS)下水稻各生长期 N_2O 排放通量、水稻产量、土壤理化因子,同时利用分子生物学技术,将上述因子与 N_2O 产生的微生物过程相耦合,定量化研究 5 个 N_2O 排放相关菌群及功能基因(氨氧化古菌 AOA、氨氧化细菌 AOB、反硝化菌功能基因 *nirS*、*nirK*、*nosZ*)的丰度,以阐明 N_2O 排放对不同种类秸秆施用引发的微生物响应机制,筛选单季稻田 N_2O 减排效果最佳的秸秆还田模式,为稻田温室气体排放估算与减排措施的研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 盆栽试验设计与土样采集

供试原状土样,采自江苏省宜兴市周铁镇(31.4765°N , 119.9861°E)典型单季稻田,土柱试验在江苏省农业科学院现代化温室进行,供试水稻品种南粳 46,于 2020 年 6 月 29 日移栽,同年 11 月 9 日收获。供试土壤由 0~20、20~40 和 40~60 cm 三个深度的土壤各自混合均匀后得到,称取 35 kg 依次装入半径为 15 cm、有效高度为 50 cm 的土柱内。土壤的基本理化性质为: pH 6.38($m_{\text{土壤}}:V_{\text{水}}=1:2.5$),有机质含量 29.2 g/kg,全氮含量 1.72 g/kg,有效磷含量 23.09 mg/kg,速效钾含量 159.28 mg/kg,CEC 22.61 cmol/kg。选用水稻、小麦和玉米 3 种作物秸秆作为供试秸秆,其基本性质如表 1 所示。试验采用完全随机区组设计,共设置 4 个处理:空白对照(CK)、水稻秸秆还田(RS)、小麦秸秆还田(WS)、玉米秸秆还田(MS),每个处理 3 个重复,共 12 个盆栽。本试验中水稻秸秆由江苏省农业科学院提供,小麦和玉米秸

表1 供试秸秆基本性质
Table 1 Basic properties of tested straw types

秸秆种类	TN(g/kg)	TP(g/kg)	TK(g/kg)	TC(g/kg)	C/N
RS	14.93 ± 0.78 a	2.09 ± 0.16 b	15.39 ± 1.23 b	393.00 ± 5.00 a	26.35 ± 1.12 b
WS	12.24 ± 0.81 b	0.67 ± 0.06 c	9.12 ± 0.13 c	367.00 ± 1.41 b	30.06 ± 2.10 ab
MS	10.43 ± 0.67 c	19.81 ± 0.02 a	21.11 ± 0.08 a	360.00 ± 1.41 b	34.59 ± 2.37 a

注: 同列不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$), 下同。

秆由山东省德州市陵城区农业技术推广中心提供。还田秸秆采用尼龙网袋法处理, 即将秸秆粉碎至 1~2 cm 大小后装入尺寸为 15 cm × 20 cm 的 350 目尼龙网袋中密封, 按照每盆 280 g 的施用量(0.8% 每克干土, 相当于田间施入量约 8 t/hm²)施用至盆栽内部 5~10 cm 处。

综合当地施肥管理方式, 氮肥(尿素)施用量为 N 240 kg/hm², 基肥、分蘖肥和穗肥分别在 2020 年 6 月 30 日、7 月 15 日和 8 月 13 日按 50%、25% 和 25% 比例施用; 磷肥 P₂O₅ 96 kg/hm² 和钾肥 K₂O 192 kg/hm², 作基肥一次性施用。水分管理采用间隙灌溉模式, 并将水稻生长期分为前期淹水(2020 年 6 月 30 日—7 月 29 日)、烤田(7 月 30 日—8 月 12 日, 通常土壤水分含量达到 50%~60% 田间最大持水量时结束烤田)、干湿交替(8 月 13 日—10 月 14 日)和排水落干(10 月 15 日—11 月 9 日)4 个时期。

在水稻生长的 4 个典型生育期(分蘖期、拔节期、抽穗期和成熟期)原位采集 0~10 cm 深度土壤样品。一部分烘干磨碎过筛后用于基本理化性质分析, 剩余部分在 -20 °C 条件下保存用于土壤微生物分析。4 个典型生育期采样时间分别对应前期淹水、排水烤田、干湿交替和排水落干时期。分别于施用基肥、分蘖肥和穗肥后 7 d 内每天 17:00—19:00 用 50 ml 塑料瓶采集田面水水样, 过滤后测定 NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 含量。土壤和田面水无机氮含量由荷兰 SKALAR SAN++ SYSTEM 流动分析仪测定(Skalar, the Netherlands)测定。水稻收获时计算水稻产量。

1.2 气样采集与测定

本研究采用密闭静态暗箱法^[20]采集气体, 用气相色谱仪测定 N₂O 浓度。采样箱(长 25 cm × 宽 21 cm × 高 80 cm)由 PVC 材料制成, 外覆铝膜, 具有不透光性。采样箱内置小型风扇以使采集气体更均匀、更准确, 同时配备温度计以记录采样时温度变化。采样前先倒置采样箱, 使其边缘与盆栽盆凹槽密闭连接, 然后向盆栽盆凹槽注水, 密封采样箱, 隔绝外界气体。选择上午 08:00—10:00 采集样品, 一组采样设置 4 个采集时段, 在 45 min 内完成, 即用 20 ml 注射器

每 15 min 向采样箱抽集气体。水稻生长季内水分变化剧烈的烤田及复水期每 2~3 d 采样 1 次, 其他时间每隔 4~5 d 采样 1 次, 水稻收获前 1 个月间隔 7 d 采样 1 次。

将采集的气样注入气相色谱仪(Shimadzu, GC14B), N₂O 浓度由放射源为 ⁶³Ni 的电子捕获(ECD)检测器以恒电流方式测量。对每组气样检测后的 4 个浓度值进行线性回归分析得到 N₂O 排放通量, 再通过积分求出水稻各生育期 N₂O 的累积排放量。

根据 N₂O 浓度与时间关系曲线计算排放通量:

$$F = \rho \times V / A \times dc / dt \times 273 / (273 + T) \quad (1)$$

式中: F 代表 N₂O 排放通量(N, μg/(m²·h)); ρ 为标准状态下 N₂O 密度(1.25 kg/m³); V 为采气箱内有效空间体积(m³); A 为采气箱覆盖的土壤面积(m²); dc 为气体浓度差(ml/L); dt 为时间间隔(h); T 为采样时箱温(°C)。

N₂O 排放通量用每次观测的 3 个重复的平均值及标准偏差表示。N₂O 平均排放通量是将 3 个重复的每次观测值按时间间隔加权平均后再平均。N₂O 总排放量按下式计算:

$$T = \sum [(F_{i+1} + F_i) / 2] \times (D_{i+1} - D_i) \times 24 / 1000 \quad (2)$$

式中: T 代表 N₂O 排放总量(N, g/m² 或 mg/m²); F_i 和 F_{i+1} 分别为第 i 和 $i+1$ 次采样时 N₂O 平均排放通量(N, μg/(m²·h)); D_i 和 D_{i+1} 分别为第 i 和 $i+1$ 次采样时间(d)。

1.3 土壤微生物丰度分析

称取水稻各典型生育期土样 0.5 g, 用 Fast DNA SPIN KIT 试剂盒(MP Biomedicals, Eschwege, Germany)提取总 DNA^[21]。DNA 纯度和浓度检测方法均为 NanoDrop2000, DNA 完整性检测方法为琼脂糖凝胶电泳。操作按照说明书的提取步骤进行, 将样品在冰上融化后, 充分混匀并离心, 取适量样品进行检测。将提取得到的微生物总 DNA 在电压 5 V/cm 条件下通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 检测时间为 20 min, 稀释 10 倍后进行下游实验。

使用 Lighe Cycler ST300(Roche Diagnostics, Germany)定量 PCR 仪分别对成功提取的 AOA、AOB

及反硝化菌功能基因 *nirS*、*nirK*、*nosZ* 的特定 DNA 片段进行扩增。AOA 和 AOB 的扩增引物分别为 Arch-amoAF/Arch-amoAR 和 amoA1F/amoA2R^[22]，*nirS*、*nirK* 和 *nosZ* 的扩增引物分别为 Cd3aF/R3cdR^[23]、COPPER583F/COPPER909R^[24]和 nosLb/nosRb^[25]，按照定量试剂盒说明书设置程序。

使用 CFX96C100™热循环器(Bio-Rad, Hercules, CA)进行扩增。AOA 和 AOB 的扩增程序为：95 °C 变性 3 min；然后 35 个循环为 95 °C 变性 45 s，53 °C(AOA)或 55 °C(AOB)退火 1 min，72 °C 延伸 1 min；最后 72 °C 处理 7 min^[26]。*nirS* 的扩增程序为：95 °C 变性 10 min；先进行 6 个循环：95 °C 变性 15 s，63 ~ 58 °C (-1 °C/循环)处理 30 s，72 °C 和 80 °C 分别延伸 30 s；再进行 40 个循环：95 °C 变性 15 s，58 °C 退火 30 s，72 °C 和 80 °C 分别延伸 30 s^[27]。*nirK* 的扩增程序为：94 °C 变性 5 min；先进行 5 个循环：94 °C 变性 30 s，72 ~ 67 °C (-1 °C/循环)处理 1 min，72 °C 延伸 1 min；再进行 25 个循环：94 °C 变性 30 s，67 °C 退火 1 min，72 °C 延伸 1 min；最后 72 °C 处理 7 min^[28]。*nosZ* 的扩增程序为：95 °C 变性 5 min；然后 35 个循环为 94 °C 变性 1 min，64 °C 退火 1 min，72 °C 延伸 1 min；最后 72 °C 处理 5 min^[29]。

1.4 数据处理与分析

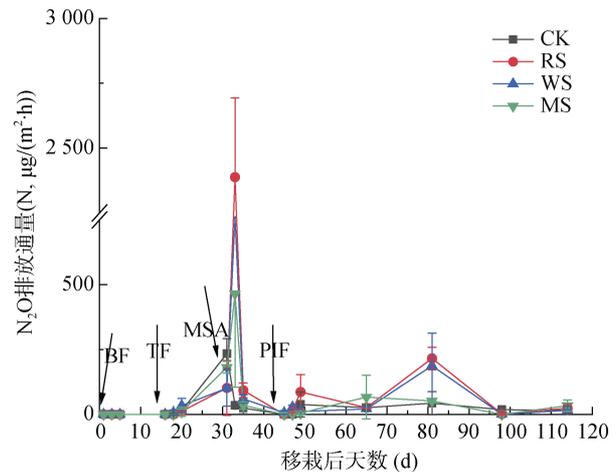
采用 Excel 2019 进行数据处理，采用 SPSS 25.0 进行单因素方差分析(one-way ANOVA)、LSD 法进行多重比较、Pearson 法进行相关性分析，采用 R-4.0.4 和 Amos 24.0 进行结构方程模型(Structural Equation Modeling)构建与分析，采用 Origin 2021 绘制图形。

2 结果与分析

2.1 N₂O 排放通量变化

图 1 表示不同处理下水稻生长期 N₂O 排放通量随水稻移栽天数的变化。各处理 N₂O 排放通量变化趋势基本相同，在水稻移栽后 20 d 内基本没有 N₂O 的产生，即尽管前期淹水时大量施用含氮的基肥和分

蘖肥，但各个处理排放量较为稳定，秸秆还田处理与 CK 基本没有差异。施用分蘖肥后 6 d 至烤田开始期间，N₂O 排放通量逐渐稳步增长。烤田期间各处理 N₂O 排放急剧增加，与 CK 相比，3 个施用秸秆的处理 N₂O 排放通量增加显著，且施用秸秆处理于移栽后 33 d 时达到峰值，之后急剧下降。其中，RS 处理 N₂O 排放通量峰值高达 N 2 387.92 μg/(m²·h)，是整个水稻生长期所有处理的最大值。随着烤田期的结束进入穗肥期，N₂O 的排放再次进入较低水平。施用穗肥后 N₂O 排放通量有小幅波动，在水稻移栽后 81 d 时 RS 与 WS 处理的排放峰值分别为 N 215.58 μg/(m²·h) 和 187.14 μg/(m²·h)，但远小于烤田期峰值，此次波动处于穗肥期结束后的常规时期(不施肥)。



(BF: 基肥, TF: 分蘖肥, PIF: 穗肥, MSA: 烤田期; 下同)

图 1 水稻生长期 N₂O 排放通量的变化

Fig. 1 Variation in N₂O emission flux during rice growing season

2.2 N₂O 排放总量与水稻产量

由表 2 可知，各处理 N₂O 排放主要集中在烤田期，烤田期 N₂O 排放量占水稻生育期总排放量的 51.52% ~ 57.21%，其次是排水落干时期，占排放量的 31.52% ~ 38.67%。与 CK 相比，RS、WS 和 MS 处理分别增加 N₂O 排放总量 6.85、4.52 和 0.40 mg/m²，增幅分别为 162.32%、107.11% 和 9.48%，其中仅

表 2 2020 年各处理不同水分管理时期 N₂O 排放量、N₂O 排放总量、水稻产量和单位产量 N₂O 排放量

Table 2 N₂O emissions in different water managements periods, total N₂O emissions, rice grain yields and N₂O emissions per unit output during rice growing season in 2020

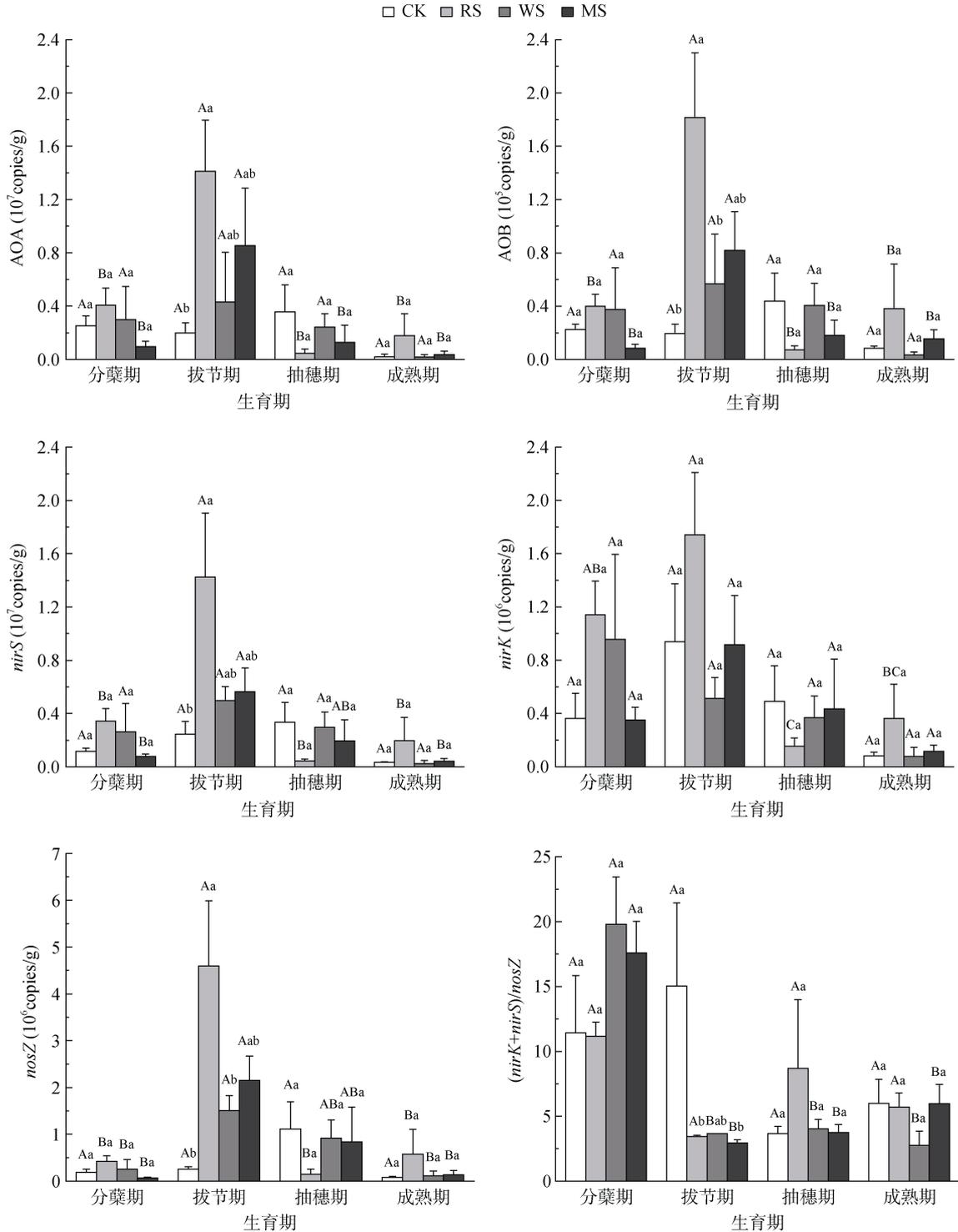
处理	N ₂ O 排放总量 (N, mg/m ²)	N ₂ O 排放量(N, mg/m ²)				水稻产量 (kg/m ²)	单位产量 N ₂ O 排放量 (N, mg/kg)
		前期淹水	烤田	干湿交替	排水落干		
CK	4.22 ± 0.98 b	0.01 ± 0.01 a	2.32 ± 0.78 b	0.55 ± 0.30 a	1.33 ± 0.32 b	1.43 ± 0.02 c	2.91 ± 0.74 b
RS	11.07 ± 0.42 a	0.01 ± 0.00 a	6.06 ± 0.81 a	1.01 ± 0.33 a	3.99 ± 0.45 a	1.80 ± 0.03 ab	6.15 ± 0.26 a
WS	8.74 ± 2.95 ab	0.04 ± 0.02 a	5.00 ± 1.78 ab	0.33 ± 0.05 a	3.38 ± 1.20 ab	1.84 ± 0.07 a	4.67 ± 1.42 ab
MS	4.62 ± 0.97 b	0.01 ± 0.01 a	2.38 ± 0.29 b	0.58 ± 0.38 a	1.66 ± 0.32 b	1.67 ± 0.04 b	2.76 ± 0.54 b

RS 处理与 CK 处理 N₂O 排放总量有显著性差异 ($P < 0.05$)。施用秸秆均能显著增加水稻产量, 与 CK 相比增产 0.24 ~ 0.41 kg/m², 增幅 16.78% ~ 28.67% ($P < 0.05$)。相比 CK, RS 处理显著增加了水稻单位产量 N₂O 排放量的 111.34% ($P < 0.05$), 而其他处

理的增加效果不显著。

2.3 土壤氨氧化菌和反硝化菌的群落丰度

荧光定量 PCR 的检测结果表明(图 2), 稻田土壤 AOA 和 AOB 数量分别介于 $1.91 \times 10^5 \sim 1.41 \times 10^7$ copies/g 和 $3.36 \times 10^3 \sim 1.81 \times 10^5$ copies/g, AOA 拷贝



(图中不同大写字母表示同一处理不同时期间差异显著 ($P < 0.05$), 不同小写字母表示同一时期不同处理间差异显著 ($P < 0.05$), 下同)

图 2 水稻生长期土壤氨氧化菌(AOA 和 AOB)和反硝化菌(*nirS/nirK/nosZ*)的群落丰度

Fig. 2 Abundances of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia oxidizing archaea (AOA and AOB) and denitrifiers (*nirS/nirK/nosZ*) during rice growing season

数比 AOB 多出 2 ~ 3 个数量级, 可知本试验中水稻土壤环境更利于 AOA 生长。*nirS*、*nirK* 和 *nosZ* 三种反硝化菌功能基因数量分别介于 $2.50 \times 10^5 \sim 1.43 \times 10^7$ 、 $7.86 \times 10^4 \sim 1.74 \times 10^6$ copies/g 和 $6.56 \times 10^4 \sim 4.60 \times 10^6$ copies/g, *nirS* 拷贝数比 *nirK* 和 *nosZ* 多 1 个数量级, 是反硝化过程中的优势功能基因。在水稻生育期内, 除 WS 处理下 *nirK* 丰度一直降低外, 其他各处理氨化菌和反硝化菌群落丰度随水稻生育期变化趋势大致相同, 均为先上升后下降。在拔节期, 相比 CK, RS 处理下 AOA、AOB、*nirS*、*nosZ* 丰度分别显著增加了 6.14 倍、8.26 倍、4.82 倍和 16.96 倍 ($P < 0.05$), MS 和 WS 处理对上述功能基因丰度均无显著影响; 不同处理均对 *nirK* 丰度没有显著影响。同一生育期不同处理(*nirK*+*nirS*)/*nosZ* 比值基本无显著性差异; CK 和 RS 处理不同生育期该比值没有显著性差异; WS 和 MS 处理分蘖期该比值显著高于其他 3 个时期 ($P < 0.05$), 而其他 3 个时期之间没有显著性差异。

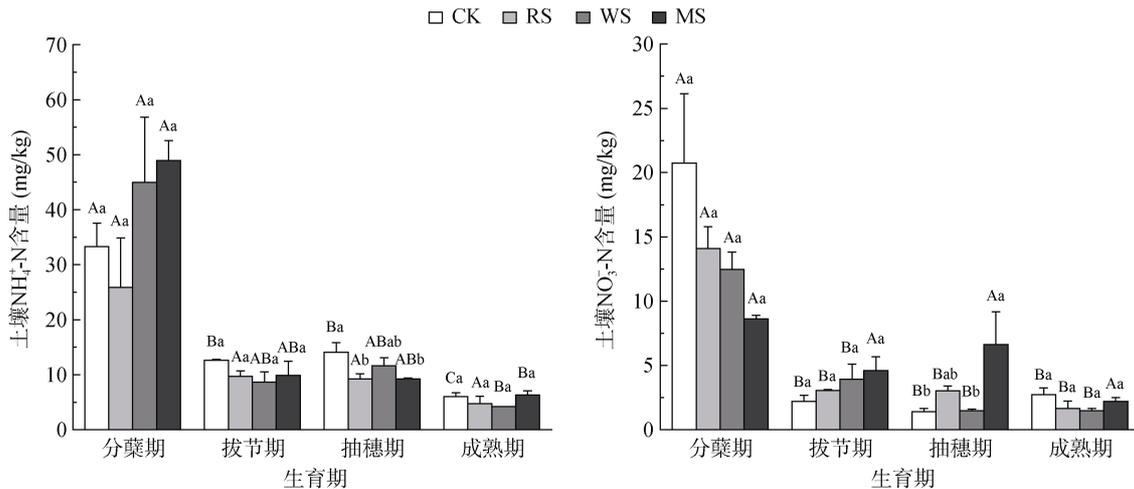


图 3 水稻生长期土壤 NH₄⁺-N、NO₃⁻-N 含量变化

Fig. 3 Variation in soil NH₄⁺-N and NO₃⁻-N contents during rice growing season

如图 4 所示, 田面水 NH₄⁺-N 浓度整体明显高于 NO₃⁻-N 浓度。各个处理 3 个肥期田面水 NH₄⁺-N 浓度变化趋势基本一致。水稻基肥期, 1 ~ 4 d 田面水 NH₄⁺-N 浓度先大幅升高后迅速下降, 且各个处理间峰值出现的时间存在差异, 4 ~ 7 d 内呈现先下降后升高趋势, 变化幅度较上个时期小。水稻蘖肥期, 田面水 NH₄⁺-N 浓度每日以不同速率急剧下降。水稻穗肥期, NH₄⁺-N 浓度总体呈现下降趋势, 变化速率先急后缓, 其中 1 ~ 4 d 下降速率较快, 4 ~ 7 d 基本保持稳定。各个处理 3 个肥期田面水 NO₃⁻-N 浓度变化趋势亦较为一致。水稻基肥期, 1 ~ 2 d 内各处理田面水

2.4 土壤和田面水无机氮含量

图 3 表明, 本研究中土壤 NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 含量均随水稻生长呈下降趋势, 且 NH₄⁺-N 含量整体高于 NO₃⁻-N 含量。CK、RS、WS、MS 处理下, 土壤 NH₄⁺-N 含量随生育期变化的极差分别为 27.26、21.11、40.75、42.60 mg/kg; 土壤 NO₃⁻-N 含量的极差分别为 19.32、12.41、11.00、6.43 mg/kg。不同生育期间比较, 各处理下土壤 NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 含量均在分蘖期达到峰值, 其中 CK 处理分蘖期土壤 NH₄⁺-N 含量显著高于其他 3 个生育期; RS 处理各生育期之间土壤 NH₄⁺-N 含量没有显著性差异; 而 WS 和 MS 处理下, 分蘖期土壤 NH₄⁺-N 含量仅显著高于成熟期; 除 MS 处理外, 其余处理分蘖期土壤 NO₃⁻-N 含量均显著高于其他 3 个生育期 ($P < 0.05$)。不同处理间比较, 抽穗期 CK 处理的土壤 NH₄⁺-N 含量显著高于 RS 和 MS 处理 ($P < 0.05$), 抽穗期 MS 处理的土壤硝态氮含量显著高于 CK 和 WS 处理 ($P < 0.05$), 其他生育期内各处理之间均无显著性差异。

NO₃⁻-N 浓度几乎没有增长, 在 2 ~ 4 d 逐渐升高到达峰值, 4 ~ 6 d 缓慢下降, 6 ~ 7 d 内 CK 处理浓度下降而其余处理浓度升高。水稻蘖肥期, 1 ~ 7 d 内田面水 NO₃⁻-N 浓度逐渐增长, 其中 CK 处理在 2 ~ 3 d 和 5 ~ 6 d 出现小幅下降。水稻穗肥期, 各处理在 1 ~ 3 d 内浓度升高后又下降, 且在 3 ~ 6 d 内呈现同样趋势, 其中 WS 处理变化幅度较大, 6 ~ 7 d 内除 RS 处理浓度缓慢升高其余处理均缓慢下降。

2.5 相关性分析和结构方程模型(SEM)

经过验证, N₂O 排放量与田面水 NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 浓度相关性不显著, 因此对除此以外的其他因素进行

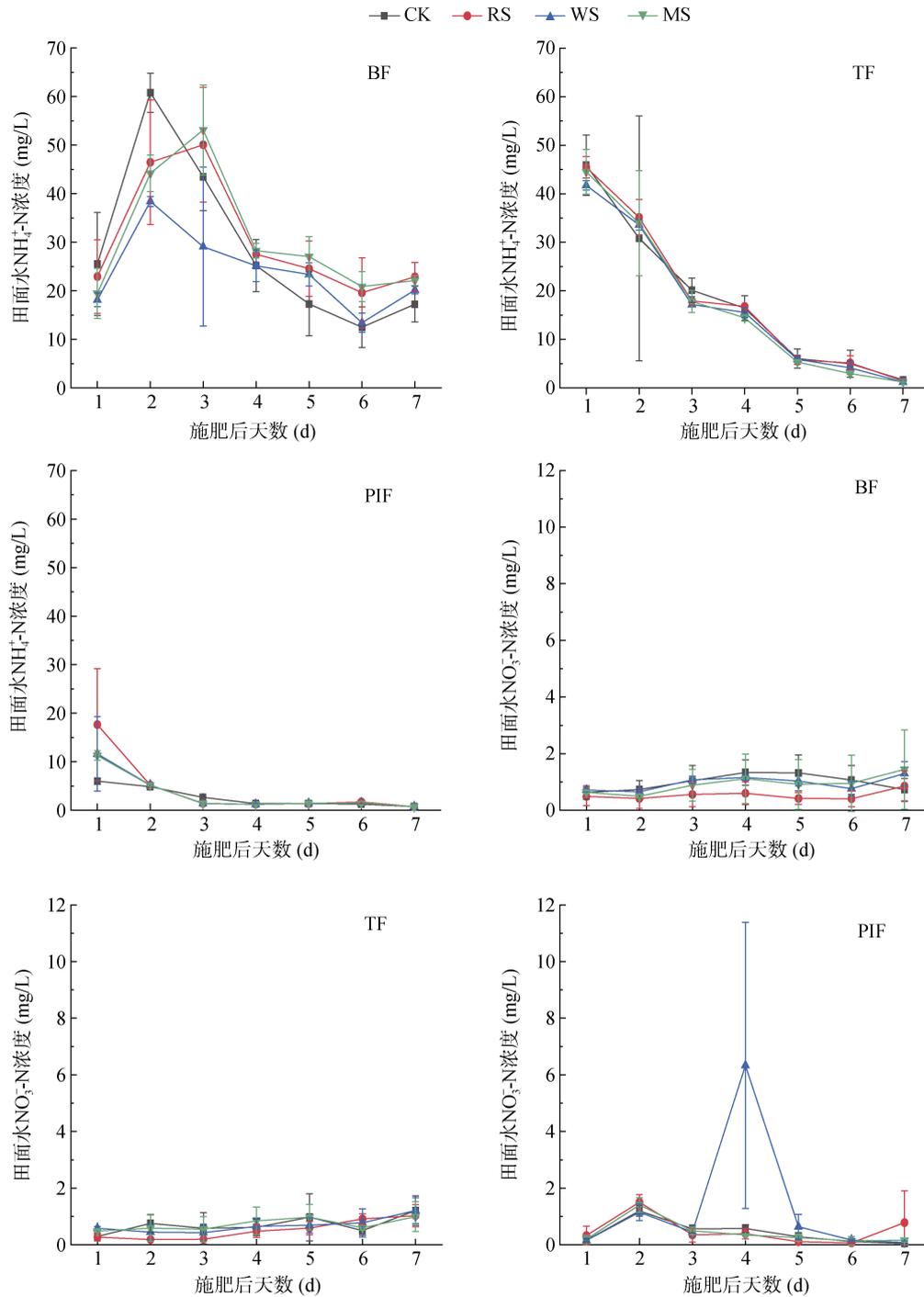


图 4 水稻生长期田面水 NH₄⁺-N、NO₃⁻-N 浓度季节变化

Fig. 4 Seasonal variations in NH₄⁺-N and NO₃⁻-N concentrations in floodwater during rice growing season

相关性分析，结果如表 3 所示。N₂O 排放量与 *nirS*、AOB、*nosZ*、AOA、*nirK* 拷贝数分别在 $P < 0.01$ 水平显著正相关(按相关性由大到小排序)；与土壤 NH₄⁺-N 含量在 $P < 0.01$ 水平显著负相关；与土壤 NO₃⁻-N 含量在 $P < 0.05$ 水平显著负相关。

以 N₂O 排放量为中心，建立路径分析模型研究各因子对 N₂O 排放量的影响，本研究中整个生育期

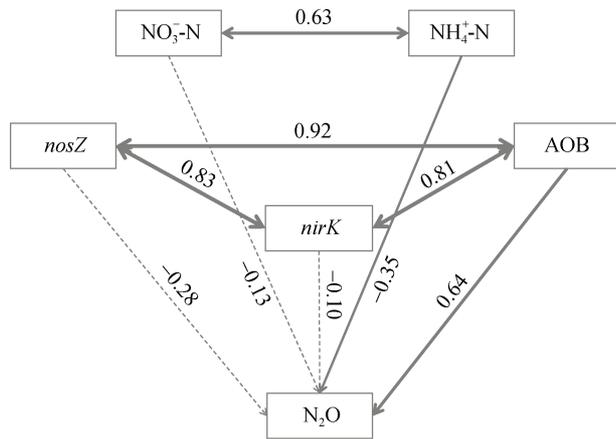
土壤理化和微生物定量数据为影响因素的结构方程模型如图 5 所示，可见，AOB 拷贝数和土壤 NH₄⁺-N 含量对 N₂O 排放量的影响起主导作用，显著性 $P < 0.05$ ，标准化路径系数分别为 0.64 和 -0.35，即 AOB 拷贝数增加一个标准差时 N₂O 排放量增加 0.64 个标准差，土壤 NH₄⁺-N 含量增加一个标准差时 N₂O 排放量减少 0.35 个标准差。*nosZ* 和 AOB、*nosZ* 和

表 3 N_2O 排放量与土壤微生物种群数量和土壤理化因子的相关性

Table 3 Correlation between N_2O emission, abundance of soil microbial communities and soil physiochemical properties

	AOA	AOB	<i>nirS</i>	<i>nirK</i>	<i>nosZ</i>	NH_4^+-N	$NO_3^- -N$
N_2O 排放量	0.537**	0.554**	0.560**	0.448**	0.554**	-0.455**	-0.390*

注: Pearson 双尾显著性检验, $n=48$; *和**分别表示在 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 水平上相关性显著。



(路径旁边显示标准化的路径系数; 实箭头和虚箭头分别表示 $P<0.05$ 和 $P>0.05$; 箭头的宽度与路径系数的程度成正比; 箭头上数值的正负分别表示正相关关系和负相关关系)

图 5 土壤理化因子和微生物丰度对 N_2O 排放影响的结构方程模型

Fig. 5 Structural Equation Model for effects of soil physiochemical properties and microbial abundance on N_2O emissions

nirK、AOB 和 *nirK* 拷贝数之间的相关系数分别为 0.92、0.83 和 0.81; 土壤 NH_4^+-N 和 $NO_3^- -N$ 含量的相关系数为 0.63。由此可见, AOB 丰度和土壤 NH_4^+-N 含量是直接影响太湖地区单季稻田 N_2O 排放的主要因素。

3 讨论

研究表明, N_2O 主要由土壤微生物参与的硝化和反硝化过程产生, 其调控过程与土壤含水量和通气性密切相关^[30]。稻田长期淹水时, O_2 供应不足, N_2O 主要通过反硝化作用产生, 产生的 N_2O 在强还原条件下进一步被还原为 N_2 ; 而烤田和排水落干期稻田处于非淹水状态, 良好的通气环境有利于硝化和反硝化作用同时进行, N_2O 排放通量大幅增加^[31]。由表 2 可知, 在前期淹水、烤田、干湿交替、排水落干 4 个阶段各处理 N_2O 平均排放通量分别为 N 1.02、3.37、0.59、2.29 $mg/(m^2 \cdot h)$, 即 N_2O 主要集中在烤田期排放, 与前人研究结论一致^[32]。

本研究中, 施用秸秆显著促进了单季稻整个生育

期 N_2O 的排放(图 1), 且增排效果 $RS>WS>MS$, 与单位产量 N_2O 排放量从大到小排序一致。这可能是由于秸秆施入土壤, 提供的易分解有机质可以促进硝化和反硝化微生物活动, 有利于 N_2O 产生。秸秆在土壤中的降解速率受其化学组成的影响, 适宜微生物分解的秸秆 C/N 比为 28 左右^[33]。本研究供试水稻、小麦和玉米秸秆的 C/N 比分别为 26.35、30.06 和 34.59。秸秆 C/N 比较高时微生物所需氮源受限, 参与硝化和反硝化作用的底物供应不足, 减缓了 N_2O 的排放^[34]。尽管秸秆在水稻生长前期腐解时固持土壤氮素导致作物缺氮, 影响早期分蘖, 但在水稻生长后期, 秸秆进一步腐解, 释放其中储存的养分, 在水稻灌浆期提高根系活力, 促进光合物质的转化, 增加水稻产量^[35]。有研究表明, 后续作物吸收利用是秸秆还田的去向之一^[36]; 秸秆分解过程中的残留物有助于维持农业土壤中微生物的多样性, 并影响碳的相关转化过程^[37]。因此, 秸秆分解不仅会发生在当季, 还会延续到后续作物及土壤微生物, 因此 N_2O 周年排放亟待进一步研究。

本研究中, 施用秸秆处理时各菌群基因丰度均在水稻拔节期达到最大(图 2)。结合以往研究分析可得, 在水稻生长前期, 氮肥分解为硝化和反硝化作用提供底物, 氨氧化菌和反硝化菌数量增多, 至拔节期水稻生长旺盛, 菌群数量达到峰值, 随着氮素的消耗, 水稻生长后期氨氧化菌和反硝化菌数量减少^[38]。施用秸秆可以培肥地力, 为相关功能微生物提供充足的营养物质、能源和底物, 促进拔节期氨氧化菌和反硝化菌的生长和繁殖, 大幅增加 N_2O 排放通量, 从而增加整个水稻生长期的 N_2O 排放总量。研究表明, 高 NH_4^+-N 的中性土壤中 AOB 主导 N_2O 产生, 而低 NH_4^+-N 的酸性土壤中 AOA 对硝化作用贡献较大^[39], 这是由于酸性条件下 AOA 对氨的亲合性较高^[40]。本试验中, 稻田土壤 pH 为 6.38, 相关性分析得到 AOB 拷贝数与 N_2O 排放量相关性显著, 表明 AOB 主导氨氧化过程, 且烤田期土壤通气性好, AOB 数量增多促进硝化作用进行, 从而产生大量 N_2O 。尽管 *nirK* 和 *nirS* 执行的功能相同, 但由于 *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^[41], 因此施用秸秆提供氮底物显著增加 *nirS* 的丰度而对 *nirK* 的丰度没有显著影响。(*nirK+nirS*)/*nosZ* 比值反映了反硝化产物 N_2O 和 N_2 的比例。本试验中拔节期各处理 *nosZ* 拷贝数增加, N_2O 排放通量却并未减少, 且秸秆处理下 N_2O 排放通量均高于 CK 处理, 而该比值则反之, 进一步说明烤田期 N_2O 主要通过硝化

作用产生。本研究中 N₂O 排放量与 *nirS* 丰度和 *nosZ* 丰度呈显著正相关, 与以往研究一致^[42-43]。

水稻生育期内不同处理土壤 NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 含量的变化趋势表明, 前期淹水期由于基肥和分蘖肥的施用, 在适宜的条件下, 尿素水解为 NH₄⁺-N, NH₄⁺-N 被氧化为 NO₃⁻-N。各处理分蘖期土壤 NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 含量分别在 25.87 ~ 48.92 mg/kg 和 8.62 ~ 20.73 mg/kg, 为各生育期最大值。进入拔节期之后, 水稻由营养生长转为生殖生长, 对氮素的需求量增加, 随着硝化作用和反硝化作用的进行, 土壤 NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 含量均呈减少趋势。分蘖期秸秆中的养分分解释放较快, 小麦和玉米秸秆处理下的土壤 NH₄⁺-N 含量高于 CK 处理, 拔节期之后 CK 处理下的土壤 NH₄⁺-N 含量整体稍高于秸秆处理, 与秸秆所含纤维素、半纤维素、木质素等成分较难矿化、水稻生育后期分解缓慢有关^[44]。分蘖期 CK 处理下的土壤 NO₃⁻-N 含量高于秸秆处理, 可能受秸秆腐解产生的有机酸抑制 NO₃⁻-N 形成的影响^[45], 也可能是秸秆还田初期稻田淹水条件下 NO₃⁻-N 易流失所致^[46]。相关性分析和 SEM 表明, N₂O 排放量与土壤 NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 含量均呈负相关, 而各生育期不同处理间反硝化作用底物 NO₃⁻-N 和硝化作用底物 NH₄⁺-N 含量基本没有显著性差异, 这表明底物含量差异对 N₂O 排放量的影响较小, 与 N₂O 排放相关的土壤微生物功能基因拷贝数的差异可能在 N₂O 排放过程中产生更为重要的作用。因此, 不同种类秸秆还田下与 N₂O 排放相关的土壤微生物群落多样性仍需进一步研究, 以明晰秸秆种类影响水稻生育期 N₂O 排放的微生物机理。

4 结论

水稻拔节期(对应烤田期), 与 CK 相比, RS 处理显著增加 AOA、AOB、*nirS*、*nosZ* 丰度($P < 0.05$), 从而增加水稻生长期 N₂O 排放量, WS 和 MS 处理对上述功能基因丰度均无显著影响, 不同处理对 *nirK* 丰度均没有显著影响。相关性分析表明, 本试验条件下稻田 N₂O 排放量与土壤中 AOA、AOB、*nirS*、*nirK* 和 *nosZ* 拷贝数呈极显著正相关关系($P < 0.01$), 与土壤 NH₄⁺-N 含量呈极显著负相关关系($P < 0.01$), 与土壤 NO₃⁻-N 含量呈显著负相关关系($P < 0.05$)。利用结构方程模型(SEM)进一步探究变量间的直接和间接作用发现, AOB 丰度直接促进 N₂O 的排放, 土壤 NH₄⁺-N 含量则对其产生直接抑制作用。由此可见, 本试验条件下 AOB 丰度和土壤 NH₄⁺-N 含量对稻田土壤 N₂O 排放起直接主导作用。综合考虑单季稻田秸秆还田后

水稻产量、土壤理化因子和微生物变化, 本试验条件下玉米秸秆还田为减少 N₂O 排放量、提高水稻产量的最优处理。

参考文献:

- [1] IPCC. Climate Change 2013: The physical science basis. contribution of working group I to the Fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change[C]. UK: Cambridge University Press, 2014.
- [2] IPCC. Climate change 2007: The physical science basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change[C]. UK: Cambridge University Press, 2007.
- [3] WMO. WMO Greenhouse Gas Bulletin: The State of Greenhouse Gases in the Atmosphere Based on Global Observations through 2019[R]. Geneva: WMO, 2020.
- [4] Tian H, Xu R, Canadell J G, et al. A comprehensive quantification of global nitrous oxide sources and sinks[J]. Nature, 2020, 586(7828): 248-256.
- [5] Zou J W, Huang Y, Zheng X H, et al. Quantifying direct N₂O emissions in paddy fields during rice growing season in mainland China: Dependence on water regime[J]. Atmospheric Environment, 2007, 41(37): 8030-8042.
- [6] Yan X Y, Yagi K, Akiyama H, et al. Statistical analysis of the major variables controlling methane emission from rice fields[J]. Global Change Biology, 2005, 11(7): 1131-1141.
- [7] 朱永官, 王晓辉, 杨小茹, 等. 农田土壤 N₂O 产生的关键微生物过程及减排措施[J]. 环境科学, 2014, 35(2): 792-800.
- [8] 徐华, 邢光熹, 蔡祖聪, 等. 土壤水分状况和氮肥施用及品种对稻田 N₂O 排放的影响[J]. 应用生态学报, 1999, 10(2): 186-188.
- [9] 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.
- [10] 郭丽芸, 时飞, 杨柳燕. 反硝化菌功能基因及其分子生态学进展[J]. 微生物学通报, 2011, 38(4): 583-590.
- [11] Liu B R, Jia G M, Chen J, et al. A review of methods for studying microbial diversity in soils[J]. Pedosphere, 2006, 16(1): 18-24.
- [12] 王培欣, 杨亚东, 王占海, 等. 施肥制度对水稻土壤 *nosZ* 型反硝化细菌群落的影响[J]. 生态学杂志, 2019, 38(7): 2072-2079.
- [13] 梁丽华, 左剑恶. 反硝化功能基因——检测反硝化菌种群结构的分子标记[J]. 微生物学通报, 2009, 36(4): 627-633.
- [14] 杨帆, 李荣, 崔勇, 等. 我国南方秸秆还田的培肥增产效应[J]. 中国土壤与肥料, 2011(1): 10-14.
- [15] 冯珺珩, 黄金凤, 刘天奇, 等. 耕作与秸秆还田方式对稻田 N₂O 排放、水稻氮吸收及产量的影响[J]. 作物学报, 2019, 45(8): 1250-1259.
- [16] Ma J, Li X L, Xu H, et al. Effects of nitrogen fertiliser and wheat straw application on CH₄ and N₂O emissions from a paddy rice field[J]. Soil Research, 2007, 45(5): 359.

- [17] Lou Y S, Ren L X, Li Z P, et al. Effect of rice residues on carbon dioxide and nitrous oxide emissions from a paddy soil of subtropical China[J]. *Water, Air, and Soil Pollution*, 2007, 178(1/2/3/4): 157–168.
- [18] Miller M N, Zebarth B J, Dandie C E, et al. Crop residue influence on denitrification, N₂O emissions and denitrifier community abundance in soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40(10): 2553–2562.
- [19] 王改玲, 郝明德, 陈德立. 秸秆还田对灌溉玉米田土壤反硝化及 N₂O 排放的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2006, 12(6): 840–844.
- [20] 张振超, 王金牛, 孙建, 等. 土壤温室气体测定方法研究进展[J]. *应用与环境生物学报*, 2019, 25(5): 1228–1243.
- [21] Kolb S, Knief C, Dunfield P F, et al. Abundance and activity of uncultured methanotrophic bacteria involved in the consumption of atmospheric methane in two forest soils[J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(8): 1150–1161.
- [22] Long X E, Chen C R, Xu Z H, et al. Abundance and community structure of ammonia-oxidizing bacteria and Archaea in a temperate forest ecosystem under ten-years elevated CO₂[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2012, 46: 163–171.
- [23] Dandie C E, Wertz S, Leclair C L, et al. Abundance, diversity and functional gene expression of denitrifier communities in adjacent riparian and agricultural zones[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2011, 77(1): 69–82.
- [24] Wertz S, Dandie C E, Goyer C, et al. Diversity of *nirK* denitrifying genes and transcripts in an agricultural soil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(23): 7365–7377.
- [25] Wang C, Lu H H, Dong D, et al. Insight into the effects of biochar on manure composting: Evidence supporting the relationship between N₂O emission and denitrifying community[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(13): 7341–7349.
- [26] Li M, Cao H L, Hong Y G, et al. Spatial distribution and abundances of ammonia-oxidizing Archaea (AOA) and ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in mangrove sediments[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 89(4): 1243–1254.
- [27] Kandeler E, Deiglmayr K, Tscherko D, et al. Abundance of *narG*, *nirS*, *nirK*, and *nosZ* genes of denitrifying bacteria during primary successions of a glacier foreland[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(9): 5957–5962.
- [28] Wertz S, Degrange V, Prosser J I, et al. Maintenance of soil functioning following erosion of microbial diversity[J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(12): 2162–2169.
- [29] Chèneby D, Hartmann A, Hénault C, et al. Diversity of denitrifying microflora and ability to reduce N₂O in two soils[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1998, 28(1): 19–26.
- [30] Oertel C, Matschullat J, Zurba K, et al. Greenhouse gas emissions from soils—A review[J]. *Geochemistry*, 2016, 76(3): 327–352.
- [31] 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.
- [32] 李彬波, 曾科, 李瑞, 等. 作物生长对土壤 N₂O 排放影响的研究进展[J]. *土壤通报*, 2015, 46(4): 1003–1010.
- [33] 王德建, 常志州, 王灿, 等. 稻麦秸秆全量还田的产量与环境效应及其调控[J]. *中国生态农业学报*, 2015, 23(9): 1073–1082.
- [34] 高焕平, 刘世亮, 赵颖, 等. 秸秆与氮肥调节 C/N 比对潮土 CH₄, CO₂ 和 N₂O 排放/吸收的影响[J]. *土壤通报*, 2019, 50(1): 157–164.
- [35] 徐国伟, 吴长付, 刘辉, 等. 麦秸还田及氮肥管理技术对水稻产量的影响[J]. *作物学报*, 2007, 33(2): 284–291.
- [36] Hubbard V C, Jordan D. Nitrogen recovery by corn from nitrogen-15 labeled wheat residues and intact roots and soil[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1996, 60(5): 1405–1410.
- [37] Ge Z, Li S Y, Bol R, et al. Differential long-term fertilization alters residue-derived labile organic carbon fractions and microbial community during straw residue decomposition[J]. *Soil and Tillage Research*, 2021, 213: 105120.
- [38] 纪洋, 于海洋, 徐华. 控释肥与尿素配合施用对稻季土壤 CH₄ 和 N₂O 排放的影响[J]. *生态环境学报*, 2017, 26(9): 1494–1500.
- [39] Hink L, Nicol G W, Prosser J I. Archaea produce lower yields of N₂O than bacteria during aerobic ammonia oxidation in soil[J]. *Environmental Microbiology*, 2017, 19(12): 4829–4837.
- [40] He J Z, Hu H W, Zhang L M. Current insights into the autotrophic thaumarchaeal ammonia oxidation in acidic soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2012, 55: 146–154.
- [41] 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: 中国科学院研究生院, 2010.
- [42] Huang R, Wang Y Y, Gao X S, et al. Nitrous oxide emission and the related denitrifier community: A short-term response to organic manure substituting chemical fertilizer[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 192: 110291.
- [43] 韩冰, 叶旭红, 张西超, 等. 不同灌溉方式设施土壤 N₂O 排放特征及其影响因素[J]. *水土保持学报*, 2016, 30(5): 310–315, 321.
- [44] 龚振平, 邓乃榛, 宋秋来, 等. 基于长期定位试验的松嫩平原还田玉米秸秆腐解特征研究[J]. *农业工程学报*, 2018, 34(8): 139–145.
- [45] Zhu J G, Liu G, Han Y, et al. Nitrate distribution and denitrification in the saturated zone of paddy field under rice/wheat rotation[J]. *Chemosphere*, 2003, 50(6): 725–732.
- [46] 崔思远, 尹小刚, 陈阜, 等. 耕作措施和秸秆还田对双季稻田土壤氮渗漏的影响[J]. *农业工程学报*, 2011, 27(10): 174–179.