

朱津宏¹ 熊若男¹ 杨思琪¹ 高南² 吴永红³ 张振超⁴ 吴国平⁴ 申卫收¹

接种氧化亚氮(N_2O)还原细菌 YSQ030 对复垦土壤 N_2O 排放和氮循环关键功能基因的影响

摘要

复垦土地是重要的后备土地资源,但通常土壤结构差、有机质和养分含量低;增施有机肥是快速提升地力的关键途径,但会造成温室气体如氧化亚氮(N_2O)的大量排放。接种具有 N_2O 还原功能的植物根际促生菌(PGPR)不仅能够减少温室气体排放,还能促进作物生长。本研究以一株具有 N_2O 还原功能的 PGPR 反硝化无色杆菌(*Achromobacter denitrificans*) YSQ030 为供试菌株,明确接种 YSQ030 对施用有机肥的复垦土壤 N_2O 排放和氮循环关键功能基因的影响。通过设置施用有机无机复混肥和羊粪有机肥的土壤微宇宙试验,利用气相色谱仪分析接种 YSQ030 后土壤 N_2O 排放通量,进一步计算累积排放量;在试验结束后分析土壤 pH、EC(电导率)、硝态氮和铵态氮含量,并利用实时荧光定量 PCR 分析土壤硝化功能基因(AOA *amoA* 和 AOB *amoA*)和反硝化功能基因(*nirS*、*nirK*、*nosZ I* 和 *nosZ II*)的丰度。结果显示,施用有机无机复混肥和羊粪有机肥的土壤中接种 YSQ030 明显减少复垦土壤 N_2O 排放, N_2O 排放量最大减少分别达 90.4% 和 30.6%。施用有机无机复混肥处理的 N_2O 排放量远高于施用羊粪有机肥处理,这可能是由于施用有机无机复混肥的土壤与施用羊粪有机肥的土壤相比,土壤中编码反硝化细菌 N_2O 还原酶基因 *nosZ I* 和非典型反硝化细菌 N_2O 还原酶基因 *nosZ II* 基因丰度较低。施用有机无机复混肥均显著降低土壤硝化和反硝化功能基因丰度,而施用羊粪有机肥对土壤硝化和反硝化功能基因丰度大多没有明显影响。研究表明,接种 YSQ030 能够减少施用有机肥土壤的 N_2O 排放,将为复垦土壤地力提升和 N_2O 减排提供科学依据,也将为研发新型微生物肥料或生物有机肥提供核心菌种资源。

关键词

微生物肥料;有机肥;氧化亚氮(N_2O);植物根际促生菌;温室气体减排

中图分类号 S144

文献标志码 A

收稿日期 2023-03-13

资助项目 国家自然科学基金(31972503,41771291);江苏省重点研发计划(社会发展)项目(BE2020731)

0 引言

为了切实保护我国耕地资源,合理利用与开发复垦土地十分重要。复垦土地作为我国重要后备土地资源,存在土壤结构差、抗侵蚀能力弱、养分含量低等问题^[1],导致农作物生长发育不良、产量低下。增施有机肥可改善复垦土壤结构,快速提升地力^[2],例如施用牛粪有机肥可以增加复垦土壤有机质含量、提高作物存活率^[3]。此外,施用化学肥料也可提高复垦土壤养分含量、保证作物生长。有机肥无机肥配施可以提高土壤肥力,同时促进作物增产^[4]。然而,增施有机肥和施用化学氮肥,在提升地力的同时,也造成了大量的温室气体 N_2O 排放。 N_2O 是一种会破坏臭氧层且在大气存留时间长的温室气体^[5]。百年尺度下 N_2O 的增温潜势约为 CO_2 的 273 倍^[6-7]。截至 2018 年,全球大气中 N_2O 质量分数以每年 1.83×10^{-9} 的速度增长,目前大气中 N_2O 质量分数约为 330×10^{-9} ^[8]。农业排放的 N_2O 约占全球人为排放的 52%^[9],其中农业土壤源 N_2O 是重要来源,因此减少农业土壤 N_2O 排放十分重要。

农田土壤 N_2O 的产生包括很多复杂的微生物过程,其中硝化过程中氨氧化微生物(AOA 和 AOB)和反硝化过程中含有 *nirS/K* 基因的反硝化微生物是产生 N_2O 的主要微生物类群。微生物硝化作用的过程主要是将 NH_3 氧化为 NO_2^- ,最终生成 NO_3^- ^[10-12],该过程主要是由含有 *amoA* 基因的氨氧化古菌(AOA)和氨氧化细菌(AOB)进行。含有编码氨单加氧酶的反硝化作用过程主要是将 NO_3^- 还原为 NO_2^- 、 NO 、 N_2O ,最后还原成 N_2 的过程^[13-15]。*nirS/K* 基因编码的亚硝酸还原酶(NIR)

作者简介

朱津宏,男,硕士生,主要从事具有温室气体减排功能的新颖生物肥料研发。2632735894@qq.com

申卫收(通信作者),男,博士,教授,博士生导师,主要从事土壤氮循环关键微生物过程、农牧业氨气与氧化亚氮排放控制机理和农牧废弃物资源化研究。wsshenn@nuist.edu.cn

- 1 南京信息工程大学 环境科学与工程学院/江苏省大气环境监测与污染控制高新技术研究重点实验室/大气环境与装备技术协同创新中心,南京,210044
- 2 南京工业大学 生物与制药工程学院/国家生化工程技术研究中心,南京,211816
- 3 中国科学院南京土壤研究所 土壤与农业可持续发展国家重点实验室,南京,210008
- 4 江苏丘陵地区镇江农业科学研究所,镇江,212400

将 NO_2^- 还原为 NO , 是反硝化过程的关键酶和限速酶^[14]. 含有 *nosZ* 基因的反硝化微生物将 N_2O 还原为氮气(N_2), 这是目前已知的生物途径中 N_2O 唯一的汇^[16-18]. N_2O 还原细菌有两种不同的类群, 分别为典型的反硝化细菌(Clade I)和非典型的反硝化细菌(Clade II). 因此研究硝化功能基因(*AOA amoA* 和 *AOB amoA*)和反硝化功能基因(*nirS*、*nirK*、*nosZ I* 和 *nosZ II*) 在农田土壤中的丰度对 N_2O 产生和消耗过程至关重要.

植物根际促生菌(PGPR)指能够稳定存活在植物根际周围或土壤中并产生和分泌各种抑菌物质^[19-20], 从而直接或间接促进植物生长或防治植物病害、有效降低病原物对植物危害的一类有益微生物的总称. 利用 PGPR 制作而成的微生物肥料不仅能够提高作物的存活率、增大作物产量和修复环境污染^[21-23], 还能降低温室气体 N_2O 的排放^[24-26]. 最新研究表明直接应用 N_2O 还原微生物可减少农业土壤 N_2O 的排放^[15, 27]. Gao 等^[28] 在温室盆栽试验条件下向种植红花苜蓿和梯牧草的土壤接种具有植物促生效应的 N_2O 还原细菌, 大部分菌株同时具有减排土壤 N_2O 和促进植物生长的双重效应. 申卫收等^[25] 将四株根际促生菌接种到农田土壤, 发现部分菌株能有效减少农田土壤 N_2O 的排放. 因此, 研究具有 N_2O 减排效应的植物根际促生菌对 N_2O 减排和土壤地力提升具有重要意义.

在土壤微宇宙条件下以一株具有 N_2O 还原功能的植物根际促生菌 YSQ030 为供试菌株, 研究接种 YSQ030 对施用不同用量有机无机复混肥和羊粪有机肥的复垦土壤 N_2O 排放的影响, 并采用实时荧光定量 PCR 分析土壤中硝化功能基因(*AOA amoA* 和 *AOB amoA*)和反硝化功能基因(*nirS*、*nirK*、*nosZ I* 和 *nosZ II*) 的丰度变化, 探究接种 YSQ030 减少土壤 N_2O 排放的微生物生态机理, 为复垦土壤地力提升和固碳减排提供科学依据.

1 材料和方法

1.1 供试菌株

供试用的 N_2O 还原细菌 YSQ030 为反硝化无色杆菌(*Achromobacter denitrificans*), 前期研究表明其具有还原 N_2O 的能力^[29], 从江苏省南京市江北新区某水塘芦苇根际土中分离获得. 该菌株不仅对 N_2O 具有减排功效, 而且对农作物具有促生效应^[25]. 开展土壤微宇宙试验时, 将菌株接种到改良的营养肉汤

培养基(牛肉浸膏 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、多聚蛋白胨 $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、硝酸钠 $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和琥珀酸钠 $4.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 溶剂为蒸馏水, 简称 NBNS 培养基)中, 置于 28°C 摇床中在 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养约 24 h, 用无菌的 NBNS 液体培养基在 600 nm 紫外可见分光光度计测定下调节菌液浓度至 $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ 约为 1.0 备用.

1.2 供试土壤

土壤微宇宙试验供试土壤取自江苏省镇江市句容市白兔镇复垦土地, 土地原用于砖瓦厂的厂房地基, 于 2018 年变更为农业试验用地, 土壤为黄棕壤, 土体深厚, 质地黏重, 核状和柱状结构发育, 土壤肥力水平较低, 难以发展农业生产. 土壤采集后, 在自然条件下风干, 过 2 mm 筛, 室温条件下保存.

1.3 供试有机肥

土壤微宇宙试验所用有机肥为镇江贝思特有机活性肥料有限公司所提供的有机无机复混肥(氮、磷、钾质量分数分别为 9%、5%、6%, 有机质质量分数大于等于 20%)和江苏丘陵地区镇江农业科学研究所提供的羊粪有机肥(氮质量分数为 2.7%).

1.4 土壤微宇宙试验设计

土壤微宇宙试验共 13 个处理, 每个处理 4 个重复, 具体处理设置如表 1 所示. C1.6、C3.9、C7.8 分别表示施用 1.6、3.9 和 7.8 g 有机无机复混肥, 同时按照质量体积比 1:1 加入无菌的 NBNS 液体培养基; IC1.6、IC3.9、IC7.8 分别表示施用 1.6、3.9 和 7.8 g 有机无机复混肥, 同时按照质量体积比 1:1 接种

表 1 土壤微宇宙试验处理
Table 1 Soil microcosmic test treatments

处理	施用肥料	肥料用量/ g	施用菌液	菌液用量/ mL
C1.6	有机无机复混肥	1.6	无菌 NBNS 液体培养基	1.6
C3.9	有机无机复混肥	3.9	无菌 NBNS 液体培养基	3.9
C7.8	有机无机复混肥	7.8	无菌 NBNS 液体培养基	7.8
IC1.6	有机无机复混肥	1.6	YSQ030 菌液	1.6
IC3.9	有机无机复混肥	3.9	YSQ030 菌液	3.9
IC7.8	有机无机复混肥	7.8	YSQ030 菌液	7.8
S3.7	羊粪有机肥	3.7	无菌 NBNS 液体培养基	3.7
S13	羊粪有机肥	13.0	无菌 NBNS 液体培养基	13.0
S26	羊粪有机肥	26.0	无菌 NBNS 液体培养基	26.0
IS3.7	羊粪有机肥	3.7	YSQ030 菌液	3.7
IS13	羊粪有机肥	13.0	YSQ030 菌液	13.0
IS26	羊粪有机肥	26.0	YSQ030 菌液	26.0
CK	无	无	无	无

YSQ030 菌液;S3.7、S13、S26 分别表示施用 3.7、13 和 26 g 羊粪有机肥,同时按照质量体积比 1:1 加入无菌的 NBNS 液体培养基;IS3.7、IS13、IS26 分别表示施用 3.7、13 和 26 g 羊粪有机肥,同时按照质量体积比1:1 接种 YSQ030 菌液;CK 表示不施肥、不接种的对照.建立土壤微宇宙试验具体过程:先称取 100 g 供试土壤放入约 500 mL 的培养瓶中,加入有机肥、混合搅拌均匀;接着加入 100 g 供试土壤,将培养瓶中的土壤压实后,倒入 YSQ030 菌液或无菌的 NBNS 液体培养基;最后加入蒸馏水使得培养瓶中的土壤含水量达到最大田间持水量的 80%.将处理完的培养瓶放入生化培养箱内,置于 26 ℃ 暗培养.

1.5 气体采集与测定

采集气样时,每个培养瓶盖上密封盖,保持 1 h 后采集气体.在接种 YSQ030 菌液后的第 2 天开始采气,采样频率为 2 d 一次,共 15 次.采集后的气体采用气相色谱仪(Agilent 7890A, USA)测定 N₂O 浓度.气相色谱仪分析柱为 Poropak Q 填充柱,柱箱温度为 60 ℃,载气为 99.999%的高纯氮气;后检测器为微池电子捕获检测器(ECD),用于测定气体样品中 N₂O 的浓度,工作温度为 400 ℃,尾吹气为 5%氩甲烷标准气(99.999%),流量为 2 mL·min⁻¹,最低检测下限为 32 μg·kg⁻¹.

1.6 土壤样品采集与分析

采集培养试验结束时的土壤,每个试验样品采集 2 份:一份过 2 mm 筛并储藏于 4 ℃ 冰箱,用于分析 pH、EC(电导率),以及铵态氮、硝态氮等土壤理化性质;另一份保存到-80 ℃ 超低温冰箱用于提取

DNA.采用玻璃电极法测定土壤样品的 pH,利用电导率仪测定土壤样品的 EC,紫外分光光度法测定样品的硝态氮和铵态氮含量.

1.7 提取土壤 DNA 与实时荧光定量 PCR 分析

利用 HiPure Soil DNA Mini Kit 试剂盒(Magen, China)提取土壤样品中的 DNA,并使用超微量紫外可见分光光度计(Life Real, China)测定 DNA 浓度.提取的土壤 DNA 样品在实时荧光定量 PCR 仪(bio-rad, CFX96, China)上完成反应,每个样品 3 个重复.反应体系为 25 μL,包括 12.5 μL 的 TB Green Premix Ex Taq II、1 μL 的正反引物、5.5 μL 双蒸水以及 5 μL 的 DNA 模板.本试验设计的氮循环功能基因种类、引物序列以及反应程序如表 2 所示.所有试验结果的扩增效率均处于 90.5%~95.5%之间,溶解曲线呈单峰.

1.8 数据统计与分析

所有数据用 Origin 2022 和 Excel 2010 软件进行处理和绘图,采用 IBM SPSS Statistics 软件对不同试验处理进行方差分析、最小显著性检验(LSD)和相关性分析;不同处理间统计差异显著性($P<0.05$)用不同的小写字母表示,相关性分析中以 $P<0.01$ 表示极显著相关, $P<0.05$ 表示显著相关.

2 结果与分析

2.1 接种 YSQ030 对施用两种有机肥土壤 N₂O 排放的影响

等氮量条件下施用有机无机复混肥后土壤 N₂O 排放通量远高于施用羊粪有机肥.N₂O 排放通量在

表 2 荧光定量 PCR 扩增引物
Table 2 The amplification primers of quantitative PCR

基因名	引物名称	引物序列	荧光定量 PCR 反应程序
AOA <i>amoA</i>	Arch-amoAF	STAATGGTCTGGCTTAGACG	95 ℃, 1 min; 95 ℃, 5 s; 55 ℃, 30 s;
	Arch-amoAR	GCGGCCATCCATCTGTATGT	72 ℃, 45 s; 39×
AOB <i>amoA</i>	amoA-1F	GGGGTTTCTACTGTTGGT	95 ℃, 1 min; 95 ℃, 5 s; 55 ℃, 30 s;
	amoA-2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	72 ℃, 45 s; 39×
<i>nirS</i>	nirS-cd3aF	G TSAACG TSAAGGARACSGG	95 ℃, 1 min; 95 ℃, 5 s; 55 ℃, 30 s;
	nirS-R3cd	GASTTCGGRTGSGTCTTGA	72 ℃, 45 s; 39×
<i>nirK</i>	nirK-F1aCu	GCCTCGATCAGRTTRTGTT	95 ℃, 1 min; 95 ℃, 5 s; 55 ℃, 30 s;
	nirK-R3Cu	ATYGGCGGVCA YGGCGA	72 ℃, 1 min; 39×
<i>nosZ I</i>	nosZ2F	CGCRACGGCAASAAGTSMSSGT	95 ℃, 1 min; 95 ℃, 5 s; 55 ℃, 30 s;
	nosZ2R	CAKRTGCAKSGCRTGGCAGAA	72 ℃, 1 min; 39×
<i>nosZ II</i>	NosZ912F	CGTCCCCGGCCTCGTGTA	95 ℃, 1 min; 95 ℃, 5 s; 55 ℃, 30 s;
	NosZ1853R	GAGCAGAAGTTCGTGCAGTAGTAGGG	72 ℃, 80 s; 39×

第2天达到排放峰值,2周后出现第2个峰值,但相对于第1次峰值大幅降低(图1).除了IC1.6处理相对于C1.6处理 N_2O 排放量略微上升外,其余处理在接种YSQ030后均能有效降低 N_2O 排放量(单位时间单位质量干土所排放的 N_2O 态氮的质量).双因素方差分析结果显示,接种YSQ030效应极显著,但施用有机无机复混肥的效应不显著,两者交互作用的效应显著.施用较大量有机无机复混肥配施YSQ030的效果更加明显,IC3.9、IC7.8与对应的未接种YSQ030菌液的处理相比 N_2O 累积排放量分别减少了75.4%和91.5%(图2).接种YSQ030的效应不显著,但施用羊粪有机肥的效应显著,两者交互作用的效应不显著.施用羊粪有机肥后接种YSQ030,

减排效果从大到小依次为IS3.7>IS26>IS13.IS3.7处理与S3.7处理相比 N_2O 排放量降低了近30.9%.

2.2 接种YSQ030对施用两种有机肥土壤理化性质的影响

施用有机无机复混肥相对于不施肥对照均显著降低土壤pH值,而施用有机无机复混肥后接种YSQ030能明显提高土壤pH.施用羊粪有机肥相对于不施肥对照显著降低土壤pH,但随着施用量增加,土壤pH值也随之上升.施用有机肥与未施肥的对照相比均能够显著提升土壤的电导率,且电导率的增加随施用量的增加而呈现上升趋势.在等氮量条件下施用有机无机复混肥相对于羊粪有机肥,土壤电导率增加更快.施用有机无机复混肥和羊粪有

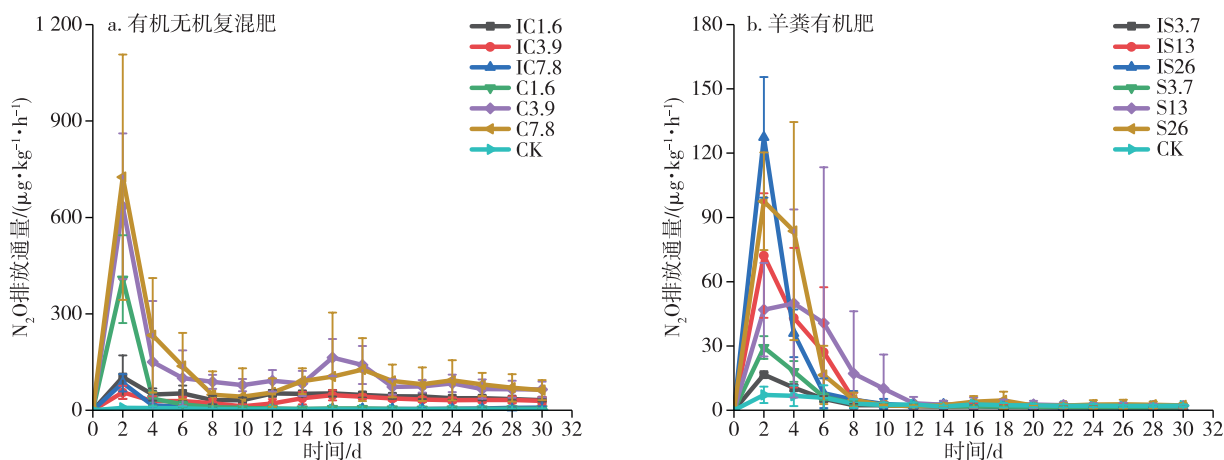
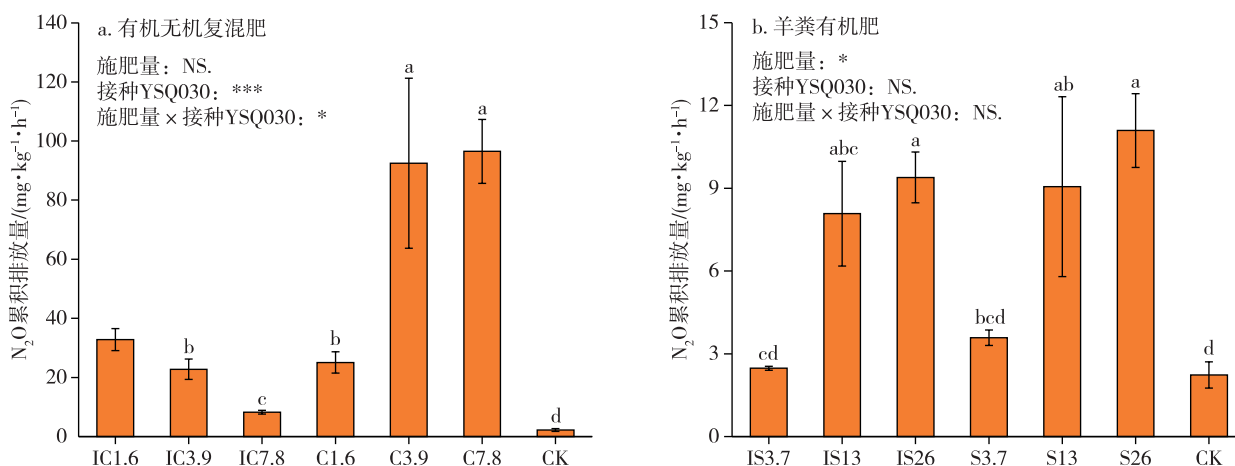


图1 施用有机无机复混肥(a)和羊粪有机肥(b)后土壤 N_2O 排放通量

Fig. 1 Soil N_2O emission fluxes after application of organic-inorganic compound fertilizer (a) or sheep manure (b)



注:运用LSD显著性检验,柱状图中标注不同字母表示处理间差异显著($P<0.05$);双因素方差分析NS.表示不显著,*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$,***表示 $P<0.001$.

图2 施用有机无机复混肥(a)和羊粪有机肥(b)后土壤 N_2O 累积排放量

Fig. 2 Cumulative soil N_2O emissions after application of organic-inorganic compound fertilizer (a) or sheep manure (b)

机肥对于土壤中的铵态氮和硝态氮提升显著,尤其是施用有机无机复混肥后,土壤中的硝态氮和铵态氮含量远远高过施羊粪有机肥.施用有机无机复混肥后接种 YSQ030,除 IC1.6 处理外,其余处理土壤中的硝态氮和铵态氮含量均有不同程度的降低,并随着肥料用量的增加而下降.施用羊粪有机肥后接种 YSQ030,土壤中的铵态氮含量则无明显变化,但硝态氮含量有所提升,并随着肥料用量的增加而增大(表 3、表 4).在施用有机无机复混肥的基础上接种 YSQ030 能够调节土壤 pH、电导率,降低土壤中的硝态氮、铵态氮含量;在施用羊粪有机肥的基础上接种 YSQ030 也能调节土壤 pH、电导率,而且还能提升土壤中的硝态氮含量,增强土壤养分含量.

2.3 接种 YSQ030 对施用两种有机肥土壤硝化和反硝化功能基因丰度的影响

2.3.1 硝化功能基因丰度

施用有机无机复混肥后接种 YSQ030 相对于不接种对照能够增加土壤中 AOA *amoA* 基因丰度(单位质量干土中基因的拷贝数),IC1.6 处理相对于 C1.6 处理土壤中的 AOA *amoA* 基因丰度增长幅度最大(图 3a);IC1.6 和 IC3.9 处理能提升土壤中

AOB *amoA* 基因丰度(图 3c).除 IS3.7 处理外,其他施用羊粪有机肥接种 YSQ030 的处理与对应未接种处理相比,土壤中的 AOA *amoA* 基因丰度无显著变化(图 3b);除 IS26 处理外,其他接种 YSQ030 的处理与对应未接种处理相比,土壤中的 AOB *amoA* 基因丰度无显著变化(图 3d).施用有机无机复混肥和羊粪有机肥均降低了土壤中 AOA *amoA* 基因丰度.施用有机无机复混肥的处理土壤 AOA *amoA* 基因丰度降低幅度从大到小依次为 C1.6、C7.8、C3.9.施用羊粪有机肥的处理土壤 AOA *amoA* 基因丰度降低幅度从大到小依次为 S26、S13、S3.7.施用有机无机复混肥后土壤中的 AOB *amoA* 基因丰度均显著降低,但随着施肥量的增加其丰度也显著增加.除 S26 处理外施用羊粪有机肥接种 YSQ030 能显著增加土壤中 AOB *amoA* 基因丰度(图 3).

2.3.2 反硝化功能基因丰度

施用有机无机复混肥后接种 YSQ030 相对于不接种处理能增加土壤 *nirS* 基因丰度(图 4a).除 IC7.8 处理外,施用有机无机复混肥后接种 YSQ030 的处理与对应未接种处理相比,土壤中的 *nirK* 基因丰度均有增加趋势(图 4c).施用羊粪有机肥后接种

表 3 施用有机无机复混肥后的土壤理化性质
Table 3 Soil physicochemical properties after application of organic-inorganic compound fertilizer

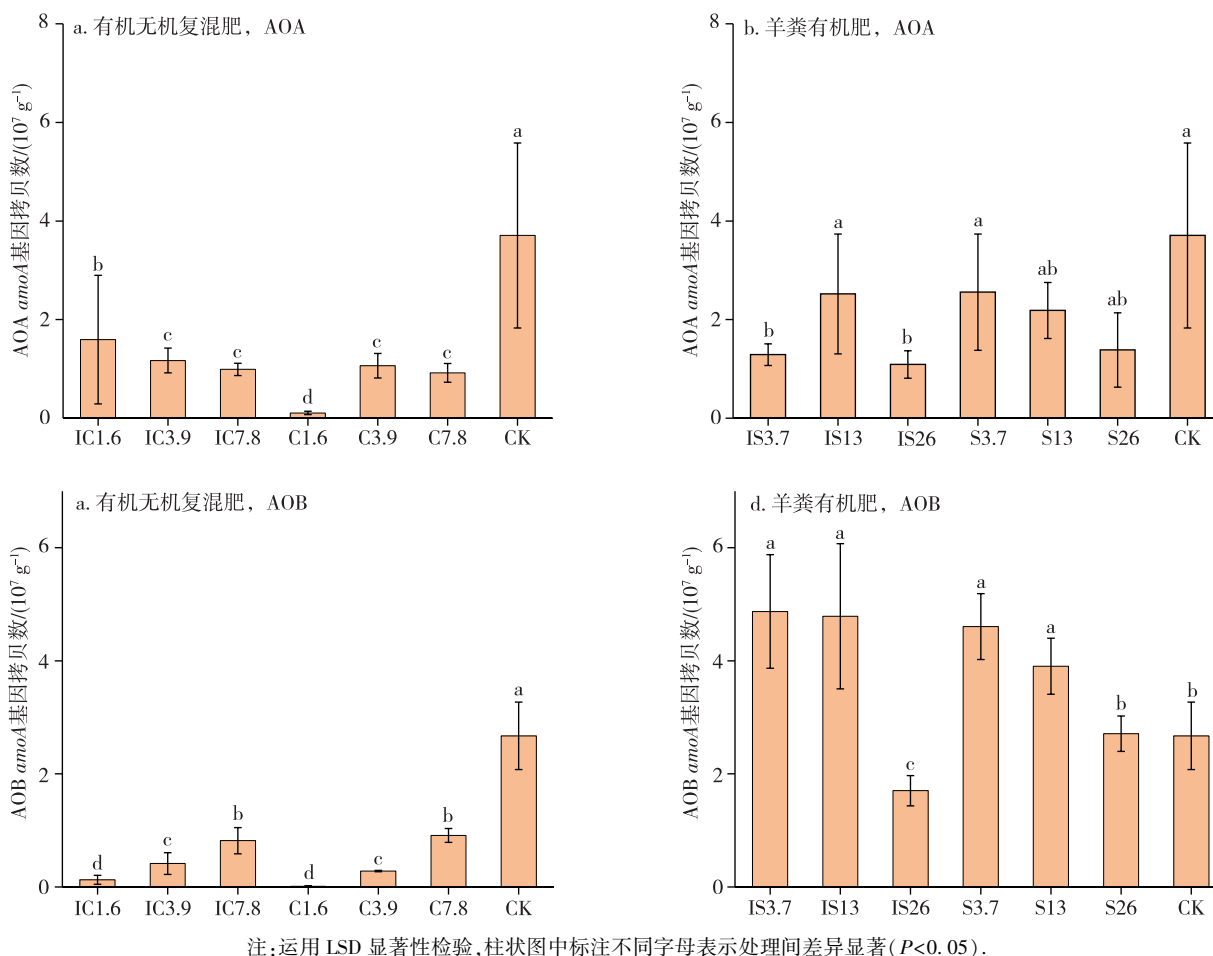
处理	pH	EC/ (ms·cm ⁻¹)	硝态氮质量分数/ (mg·kg ⁻¹)	铵态氮质量分数/ (mg·kg ⁻¹)
C1.6	5.52±0.09 bc	964.75±42.00 cd	40.34±2.58 d	11.50±1.11 d
C3.9	4.71±0.05 e	2 001.50±121.65 bc	69.54±9.20 c	29.68±1.04 b
C7.8	5.19±0.13 d	3 477.50±118.28 a	148.20±7.85 a	36.62±0.87 a
IC1.6	5.52±0.13 bc	816.25±75.12 d	32.45±4.26 d	11.75±1.15 d
IC3.9	5.52±0.10 bc	1 738.00±48.82 bc	53.07±7.36 d	25.47±0.60 c
IC7.8	5.63±0.03 b	3 362.50±186.38 ab	121.97±14.83 bc	34.74±0.77 a
CK	6.77±0.02 a	97.25±15.16 e	0.13±0.12 e	0.02±0.00 e

注:运用 LSD 显著性检验,同一列标注不同字母表示处理间差异显著(P<0.05).

表 4 施用羊粪有机肥后的土壤理化性质
Table 4 Soil physicochemical properties after application of sheep manure

处理	pH	EC/ (ms·cm ⁻¹)	硝态氮质量分数/ (mg·kg ⁻¹)	铵态氮质量分数/ (mg·kg ⁻¹)
S3.7	6.50±0.06 b	245.00±46.52 c	8.46±1.96 d	0.90±0.16 a
S13	6.42±0.08 bc	352.00±109.21 b	13.62±2.06 bcd	0.89±0.05 a
S26	6.51±0.04 b	586.50±45.23 a	17.70±2.68 ab	0.82±0.06 a
IS3.7	6.11±0.03 e	273.50±32.36 c	11.34±0.59 cd	0.81±0.06 a
IS13	6.26±0.04 d	389.50±26.71 b	15.19±3.80 bc	0.74±0.15 a
IS26	6.37±0.04 c	499.75±11.98 a	22.87±2.34 a	0.94±0.14 a
CK	6.77±0.02 a	97.25±15.16 d	0.13±0.12 e	0.02±0.00 b

注:运用 LSD 显著性检验,同一列标注不同字母表示处理间差异显著(P<0.05).



注:运用 LSD 显著性检验,柱状图中标注不同字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$).

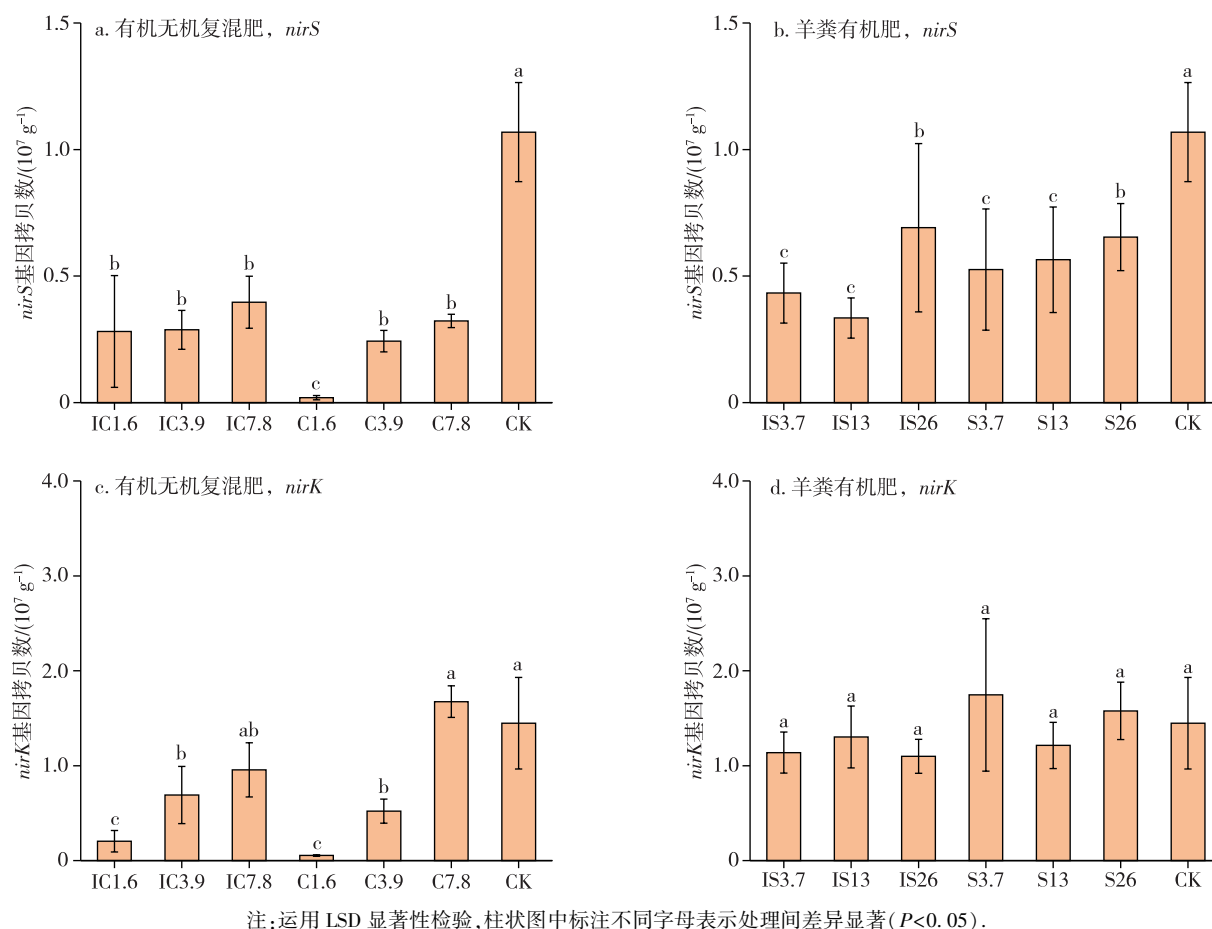
图 3 施用有机无机复混肥(a)和羊粪有机肥(b)后土壤 AOA *amoA* 基因丰度以及施用有机无机复混肥(c)和羊粪有机肥(d)后土壤 AOB *amoA* 基因丰度

Fig. 3 Soil AOA *amoA* gene abundance after application of organic-inorganic compound fertilizer (a) or sheep manure (b), and soil AOB *amoA* gene abundance after application of organic-inorganic compound fertilizer (c) or sheep manure (d)

YSQ030 处理与对应未接种菌株的处理相比,土壤中 *nirS* 和 *nirK* 基因丰度均无明显变化(图 4b 和 4d).施用有机无机复混肥和羊粪有机肥与未施肥对照相比,均显著降低了土壤 *nirS* 基因丰度.除 IC7.8 和 C7.8 处理外,施用有机无机复混肥与未施肥对照相比,显著降低了土壤中 *nirK* 的基因丰度,但随着有机无机复混肥的施用量增加,土壤中 *nirK* 基因丰度有增加的趋势.施用羊粪有机肥的所有处理与未施肥对照相比,土壤中 *nirK* 的基因丰度均无显著变化(图 4).

施用有机无机复混肥后接种 YSQ030 处理与对应未接种处理相比,土壤 *nosZ I* 和 *nosZ II* 基因丰度均呈增加趋势.其中:IC1.6 和 IC3.9 处理均显著提高土壤中 *nosZ I* 基因丰度,分别增加了 99.7% 和 75.4%;IC7.8 处理的 *nosZ II* 基因丰度显著增加

(图 5a 和 5c).施用羊粪有机肥后接种 YSQ030,土壤中 *nosZ I* 基因丰度均呈现减少趋势(图 5b).除 IS13 处理能增加土壤 5 基因丰度外,IS3.7 和 IS26 处理降低了土壤 *nosZ II* 基因丰度(图 5d).施用有机无机复混肥的所有处理与未施肥对照相比,土壤 *nosZ I* 和 *nosZ II* 基因丰度均显著降低,而且 *nosZ II* 基因丰度降低程度更大.随着有机无机复混肥的用量增加,土壤 *nosZ I* 基因丰度逐渐增大;相对于 C1.6 处理,C3.9 和 C7.8 处理土壤 *nosZ I* 基因丰度增量均为 1 倍以上(图 5a 和 5c).施用羊粪有机肥的多数处理土壤中 *nosZ II* 基因丰度与未施肥对照相比均有增加趋势,其中 S3.7 和 S26 处理显著增加了土壤中 *nosZ II* 基因丰度(图 5d).



注:运用 LSD 显著性检验,柱状图中标注不同字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$).

图4 施用有机无机复混肥(a)和羊粪有机肥(b)后土壤 *nirS* 基因丰度以及施用有机无机复混肥(c)和羊粪有机肥(d)后土壤 *nirK* 基因丰度

Fig. 4 Soil *nirS* gene abundance after application of organic-inorganic compound fertilizer (a) or sheep manure (b), and soil *nirK* gene abundance after application of organic-inorganic compound fertilizer (c) or sheep manure (d)

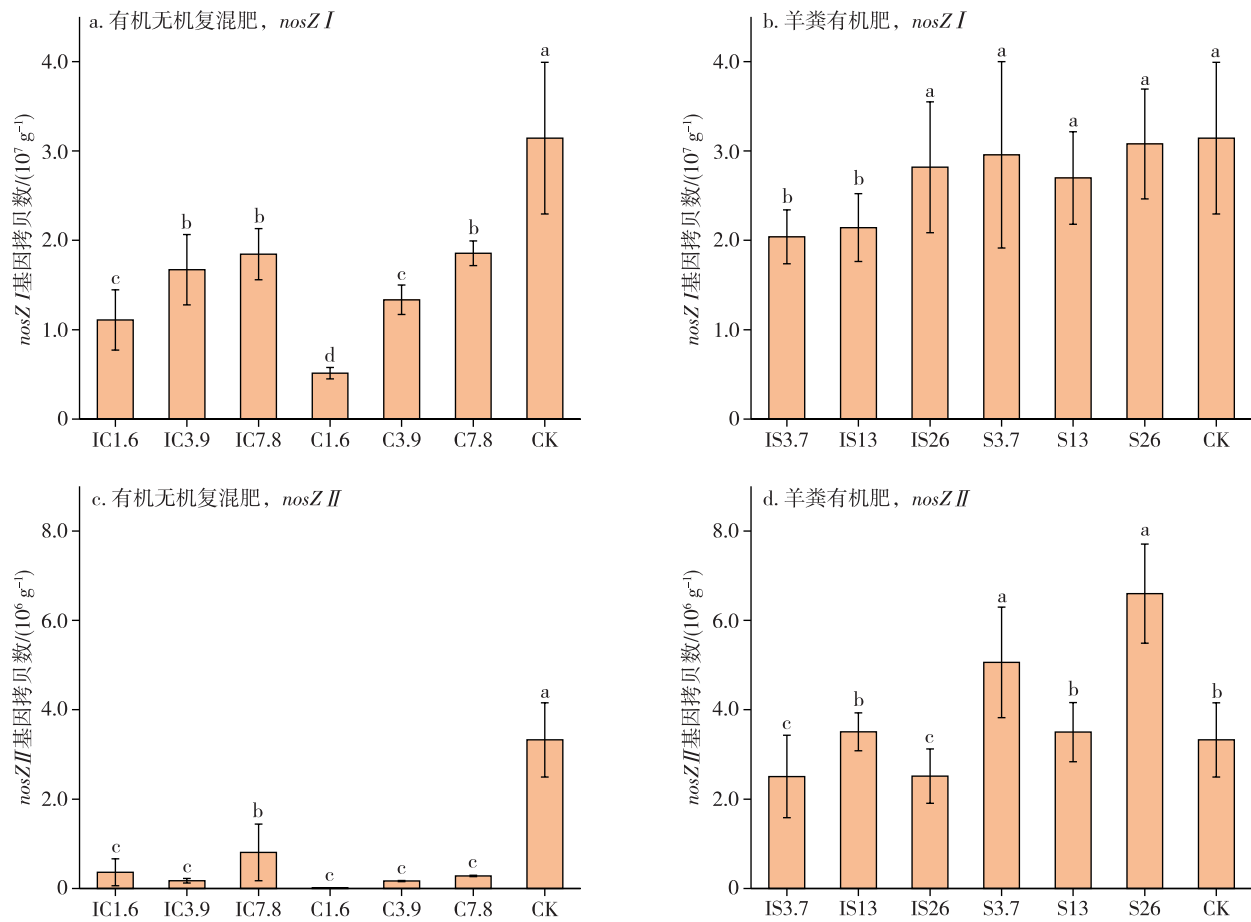
2.4 氮循环关键功能基因、土壤理化性质与 N_2O 排放量的相关性分析

土壤氮循环关键功能基因、土壤理化性质与 N_2O 排放量的相关性如表 5 所示.土壤 N_2O 排放量与 pH 和 AOA *amoA*、*nosZ II* 基因丰度呈负相关关系 ($P < 0.01$),与 EC、硝态氮、铵态氮呈现正相关关系 ($P < 0.01$).土壤 pH 与土壤中 EC、硝态氮、铵态氮呈负相关关系 ($P < 0.01$),与 AOA *amoA*、AOB *amoA*、*nirS*、*nirK*、*nosZ I*、*nosZ II* 基因丰度呈正相关关系 ($P < 0.01$).EC 与土壤中硝态氮和铵态氮呈正相关关系 ($P < 0.01$),与 AOB *amoA*、*nosZ II* 基因丰度呈负相关关系 ($P < 0.01$),与 AOA *amoA*、*nirS*、*nosZ I* 基因丰度呈负相关关系 ($P < 0.05$).硝态氮与铵态氮呈正相关关系 ($P < 0.01$),与土壤中 AOB *amoA*、*nosZ II* 基因丰度呈负相关关系 ($P < 0.01$),与 AOA *amoA* 基因丰度呈负相关关系 ($P < 0.05$).铵态氮与 AOB

amoA、*nosZ I*、*nosZ II* 基因丰度呈负相关关系 ($P < 0.01$),与 AOA *amoA*、*nirS* 基因丰度呈负相关关系 ($P < 0.05$).AOB *amoA* 基因丰度与 AOB *amoA*、*nirS*、*nirK*、*nosZ I*、*nosZ II* 基因丰度呈正相关关系 ($P < 0.01$).其余反硝化功能基因丰度之间呈正相关关系 ($P < 0.01$).

3 讨论

复垦土壤因其地力水平低、养分含量少,往往需要施用有机肥来改善土壤结构、提升肥力水平.有研究表明:将木本泥炭制作成的有机肥施到黄河三角洲地区复垦土壤,能够增加土壤有机质含量^[30];将腐殖酸施用到由黄绵土组成的复垦土壤中,使得土壤孔隙度提升,从而有利于地力快速提升和农业发展^[31];将改良的有机肥施用到露天煤矿区复垦土壤中,能够提升土壤肥力^[32].但是施用有机肥会增加土



注:运用 LSD 显著性检验,柱状图中标注不同字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$).

图5 施用有机无机复混肥(a)和羊粪有机肥(b)后土壤 *nosZ I* 基因丰度以及施用有机无机复混肥(c)和羊粪有机肥(d)后土壤 *nosZ II* 基因丰度

Fig.5 Soil *nosZ I* gene abundance after application of organic-inorganic compound fertilizer (a) or sheep manure (b), and soil *nosZ II* gene abundance after application of organic-inorganic compound fertilizer (c) or sheep manure (d)

表5 土壤理化性质、各功能基因丰度与 N_2O 排放量相关性

Table 5 Correlation between soil physicochemical properties, functional gene abundance and N_2O emission

	N_2O 排放量	pH	EC	硝态氮 质量分数	铵态氮 质量分数	AOA <i>amoA</i>	AOB <i>amoA</i>	<i>nirS</i>	<i>nirK</i>	<i>nosZ I</i>
pH	-0.653 **									
EC	0.543 **	-0.699 **								
硝态氮质量分数	0.586 **	-0.660 **	0.950 **							
铵态氮质量分数	0.612 **	-0.815 **	0.956 **	0.909 **						
AOA <i>amoA</i>	-0.181	0.405 **	-0.280 *	-0.274 *	-0.284 *					
AOB <i>amoA</i>	-0.413 **	0.654 **	-0.535 **	-0.476 **	-0.624 **	0.452 **				
<i>nirS</i>	-0.243	0.528 **	-0.281 *	-0.269	-0.339 *	0.593 **	0.384 **			
<i>nirK</i>	-0.113	0.404 **	-0.071	-0.016	-0.178	0.642 **	0.547 **	0.660 **		
<i>nosZ I</i>	-0.247	0.559 **	-0.279 *	-0.252	-0.358 **	0.651 **	0.523 **	0.879 **	0.867 **	
<i>nosZ II</i>	-0.423 **	0.741 **	-0.540 **	-0.504 **	-0.638 **	0.481 **	0.630 **	0.521 **	0.638 **	0.694 **

注: *表示 $P < 0.05$ 水平显著相关, **表示 $P < 0.01$ 水平显著相关.

壤 N_2O 的排放,而且施用有机肥对于土壤 N_2O 的排放比施用化肥更多^[33],所以在土地复垦的过程中很难兼顾地力提升和固碳减排.

PGPR 作为绝大多数微生物肥料的重要菌种来源,不仅能够影响土壤中氮素养分转化和供应,减少农田土壤 N_2O 的排放,而且还能够调节土壤理化性质,保持和提高土壤肥力.PGPR 的减排能力也成为国内外许多学者的研究热点.Gao 等^[26]将 N_2O 还原菌接种至添加畜禽粪便有机肥的土壤中,发现能够减排 N_2O ;Itakura 等^[27]在田间原位条件和蛭石盆栽试验体系中将含 *nosZ* 基因的大豆根瘤菌接种至大豆根部能够有效减少 N_2O 的排放;接种具有 N_2O 还原功能的 PGPR 到牧草地土壤,不仅可以减少土壤 N_2O 的排放,而且能够促进牧草生长^[28].反硝化无色杆菌 YSQ030 在纯培养条件下表现出非常强的 N_2O 还原能力,减排效率达 66.3%;在田间原位条件下将该菌剂接种到施用尿素的设施栽培蔬菜地,显著减少了土壤 N_2O 累积排放量,同时显著增加了作物的干重、叶面积以及叶片叶绿素含量^[25].

本研究在土壤微宇宙条件下,通过接种含有 *nosZ* 基因的 YSQ030 到施用有机无机复混肥和羊粪有机肥的丘陵地区复垦土壤,发现在施用有机无机复混肥和羊粪有机肥的土壤中接种 YSQ030 具有减少 N_2O 排放的能力,最大减排效率分别达 91.5% 和 30.9%.本试验中接种 YSQ030 后表现出很明显的 N_2O 减排效应,可能是接种的微生物本身能合成有活性的氧化亚氮还原酶(N_2OR)或通过改变土著 N_2O 还原细菌群落的组成和丰度以及代谢活性,从而实现农业土壤 N_2O 的减排.但接种微生物在环境中存活和定殖等情况尚不明确,监测其在土壤中的存活和定殖情况至关重要.Gao 等^[34]基于菌株的全基因组序列设计菌株特异性引物,定量分析菌株在培养过程中的动态变化.本试验中接种 YSQ030 菌剂后菌株的存活和定殖情况以及其他土著微生物群落组成和丰度变化,对揭示减少 N_2O 排放的微生物机理十分必要.后续将设计菌株特异性引物,并结合功能基因的高通量测序更加深入地探讨相应的土壤微生物机理.

土壤中 N_2O 的排放主要是由微生物的硝化和反硝化作用主导的, N_2O 的减排则要通过产生 N_2OR 的反硝化微生物将 N_2O 还原为 N_2 ,微生物产生 N_2OR 主要是由 *nosZ* 基因编码,因此土壤微生物种群的 N_2O 还原能力将土壤中 *nosZ* 基因丰度作为评

价指标^[35-37].这与本研究得出的结果相似,施用有机无机复混肥后接种 YSQ030 的土壤中 N_2O 排放量下降,这得益于土壤中 *nosZ* 基因丰度的增加.在减排效果较好的 IC3.9、IC7.8 处理的土壤中,功能基因 *nosZ I* 和 *nosZ II* 基因丰度都有不同程度的提升.施用有机无机复混肥后土壤中 N_2O 排放量显著增加,这可能是因为土壤中功能基因 *nosZ I* 和 *nosZ II* 基因丰度下降.在等氮量条件下施用有机无机复混肥处理的 N_2O 排放量远高于施用羊粪有机肥处理,这可能是由于施用有机无机复混肥的土壤中 *nosZ I* 和 *nosZ II* 基因丰度均低于施用羊粪有机肥的土壤,尤其是 *nosZ II* 基因丰度降低更加明显.本研究通过相关性分析发现 N_2O 排放量与 *nosZ I* 和 *nosZ II* 基因丰度均呈负相关,尤其是与 *nosZ II* 基因丰度呈极显著负相关($P < 0.01$),表明 *nosZ II* 基因在减排农田土壤 N_2O 排放中具有更加重要的作用.这也是因为非典型的反硝化细菌大多仅含有 *nosZ* 基因,不含其他反硝化基因^[38-39].

N_2O 还原为 N_2 的生物过程受诸多环境因子的影响,其中 pH 是最为关键的影响因素^[40].本研究中 pH 与 N_2O 排放量、其他环境因子以及硝化和反硝化功能基因均呈现极显著相关.施用有机无机复混肥对土壤硝化和反硝化功能基因丰度均有明显影响,而施用羊粪有机肥对土壤硝化和反硝化功能基因大多没有显著影响,这也意味着不同类型有机肥对氮循环关键功能基因丰度的影响各不相同.此外,施用不同类型有机肥后接种 YSQ030,其减少土壤 N_2O 排放的效应也各不相同,相应的土壤微生物机理值得进一步研究.

4 结论

无论施用有机无机复混肥还是羊粪有机肥都能提高土壤矿物氮含量,但也增加了土壤 N_2O 排放量.等氮量条件下,施用有机无机复混肥处理的 N_2O 排放量远高于施用羊粪有机肥,这可能是由于施用有机无机复混肥的土壤中 *nosZ I* 和 *nosZ II* 基因丰度均低于施用羊粪有机肥的土壤,尤其是 *nosZ II* 基因丰度降低更为明显.施用含氮量较高的有机无机复混肥并接种 YSQ030 能够显著降低土壤 N_2O 的排放量,最高减少 91.5%,而且与未接种的对照相比土壤中 *nosZ I* 和 *nosZ II* 基因丰度均明显增加.施用含氮量较低的羊粪有机肥并接种 YSQ030 能有效降低土壤 N_2O 的排放量,最高减少 30.9%.研究结果将

为研发具有地力提升和固碳减排协同的新型微生物肥料、生物有机肥提供核心菌种,也将为减少复垦土壤 N_2O 排放提供科学依据。

参考文献

References

- [1] 李然,徐明岗,郭磊,等.煤矿区复垦土壤中秸秆和生物炭的分解特征[J].植物营养与肥料学报,2021,27(7):1129-1140
LI Ran, XU Minggang, WU Lei, et al. Decomposition characteristics of straw and biochar in a reclaimed soil from coal mining area[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2021, 27(7): 1129-1140
- [2] Zhang X, Davidson E A, Mauzerall D L, et al. Managing nitrogen for sustainable development[J]. Nature, 2015, 528(7580): 51-59
- [3] 郭龙,李陈,刘佩诗,等.牛粪有机肥替代化肥对茶叶产量、品质及茶园土壤肥力的影响[J].水土保持学报,2021,35(6):264-269
GUO Long, LI Chen, LIU Peishi, et al. Effect of replacing chemical fertilizer with cow manure organic fertilizer on tea yield, quality, and soil fertility in tea garden[J]. Journal of Soil and Water Conservation, 2021, 35(6): 264-269
- [4] 乔莎莎,张永清,杨丽雯,等.有机肥对铅胁迫下小麦生长的影响[J].应用生态学报,2011,22(4):1094-1100
QIAO Shasha, ZHANG Yongqing, YANG Liwen, et al. Effects of organic manure on wheat growth under lead stress[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2011, 22(4): 1094-1100
- [5] Liu X, Chen C R, Wang W J, et al. Soil environmental factors rather than denitrification gene abundance control N_2O fluxes in a wet sclerophyll forest with different burning frequency[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2013, 57: 292-300
- [6] Jones C M, Spor A, Brennan F P, et al. Recently identified microbial guild mediates soil N_2O sink capacity[J]. Nature Climate Change, 2014, 4(9): 801-805
- [7] Chen Z M, Ding W X, Xu Y H, et al. Increased N_2O emissions during soil drying after waterlogging and spring thaw in a record wet year[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2016, 101: 152-164
- [8] Liu G, Ma J, Yang Y T, et al. Effects of straw incorporation methods on nitrous oxide and methane emissions from a wheat-rice rotation system[J]. Pedosphere, 2019, 29(2): 204-215
- [9] 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(7828): 248-256
- [10] 聂江文,王幼娟,吴邦魁,等.紫云英还田对早稻直播稻田温室气体排放的影响[J].农业环境科学学报,2018,37(10):2334-2341
NIE Jiangwen, WANG Youjuan, WU Bangkui, et al. Effect of Chinese milk vetch incorporation on greenhouse gas emissions from early-rice direct-seeding paddy fields[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2018, 37(10): 2334-2341
- [11] 李虎,邱建军,王立刚,等.中国农田主要温室气体排放特征与控制技术[J].生态环境学报,2012,21(1):159-165
LI Hu, QIU Jianjun, WANG Ligang, et al. The characterization of greenhouse gases fluxes from croplands of China and mitigation technologies[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2012, 21(1): 159-165
- [12] 胡玉麟,汤水荣,陶凯,等.优化施肥模式对我国热带地区水稻-豇豆轮作系统 N_2O 和 CH_4 排放的影响[J].环境科学,2019,40(11):5182-5190
HU Yulin, TANG Shuirong, TAO Kai, et al. Effects of optimizing fertilization on N_2O and CH_4 emissions in a paddy-cowpea rotation system in the tropical region of China[J]. Environmental Science, 2019, 40(11): 5182-5190
- [13] Kuypers M M M, Marchant H K, Kartal B. The microbial nitrogen-cycling network [J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, 16(5): 263-276
- [14] Prosser J I, Hink L, Gubry-Rangin C, et al. Nitrous oxide production by ammonia oxidizers: physiological diversity, niche differentiation and potential mitigation strategies[J]. Global Change Biology, 2020, 26(1): 103-118
- [15] 申卫收,熊若男,张欢欢,等.微生物介导的农业土壤氧化亚氮减排研究进展[J].土壤学报,2023,60(2):332-344
SHEN Weishou, XIONG Ruonan, ZHANG Huanhuan, et al. Research progress on microbial-mediated mitigation of nitrous oxide emissions from agricultural soils[J]. Journal of Soil Science, 2023, 60(2): 332-344
- [16] Stein L Y. The long-term relationship between microbial metabolism and greenhouse gases[J]. Trends in Microbiology, 2020, 28(6): 500-511
- [17] Philippot L, Andert J, Jones C M, et al. Importance of denitrifiers lacking the genes encoding the nitrous oxide reductase for N_2O emissions from soil[J]. Global Change Biology, 2011, 17(3): 1497-1504
- [18] 张玉铭,胡春胜,张佳宝,等.农田土壤主要温室气体(CO_2 、 CH_4 、 N_2O)的源/汇强度及其温室效应研究进展[J].中国生态农业学报,2011,19(4):966-975
ZHANG Yuming, HU Chunsheng, ZHANG Jiabao, et al. Research advances on source/sink intensities and greenhouse effects of CO_2 , CH_4 and N_2O in agricultural soils[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2011, 19(4): 966-975
- [19] Shao J H, Xu Z H, Zhang N, et al. Contribution of indole-3-acetic acid in the plant growth promotion by the rhizospheric strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9[J]. Biology and Fertility of Soils, 2014, 51: 321-330
- [20] 霍佳慧,毕少杰,于欣卉,等.植物根际促生菌作用机制研究进展[J].现代农业科技,2022(9):90-96
HUO Jiahui, BI Shaojie, YU Xinhui, et al. Research progress on the mechanism of plant growth promoting rhizobacteria[J]. Xiandai Nongye Keji, 2022(9): 90-96
- [21] 张瑞福.根际微生物:农业绿色发展中有大作为的植物第二基因组[J].生物技术通报,2020,36(9):1-2
ZHANG Ruifu. Rhizosphere microorganism: the second genome of plants with great potential in the green devel-

- opment of agriculture [J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(9): 1-2
- [22] 张艺灿,刘凤之,王海波.根际溶磷微生物促生机制研究进展[J].中国土壤与肥料,2020(2):1-9
ZHANG Yican, LIU Fengzhi, WANG Haibo. Research progress on plant-growth-promoting mechanisms of phosphate-solubilizing rhizosphere microbes [J]. Soils and Fertilizers Sciences in China, 2020(2): 1-9
- [23] 付严松,李宇聪,徐志辉,等.根际促生菌调控植物根系发育的信号与分子机制研究进展[J].生物技术通报,2020,36(9):42-48
FU Yansong, LI Yucong, XU Zhihui, et al. Research progressing in signals and molecular mechanisms of plant growth-promoting rhizobacteria to regulate plant root development [J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(9): 42-48
- [24] 孙玉,邢瑜琪,王红,等.西藏黄花草木樨根际溶磷菌筛选及其促生特性研究[J].高原农业,2020(5):510-516
SUN Yu, XING Yuqi, WANG Hong, et al. Isolation and characterization of PGPR from *Melilotus officinalis* in Renbu county of Xizang [J]. Journal of Plateau Agriculture, 2020(5): 510-516
- [25] 申卫收,杨思琪,张欢欢,等.四株植物根际促生菌对农田土壤 N_2O 排放的影响[J].南京信息工程大学学报(自然科学版),2022,14(1):32-39
SHEN Weishou, YANG Siqi, ZHANG Huanhuan, et al. Effects of four plant growth-promoting rhizo bacteria on N_2O emission from farmland soil [J]. Journal of Nanjing University of Information Science & Technology (Natural Science Edition), 2022, 14(1): 32-39
- [26] Gao N, Shen W S, Camargo E, et al. Nitrous oxide (N_2O)-reducing denitrifier-inoculated organic fertilizer mitigates N_2O emissions from agricultural soils [J]. Biology and Fertility of Soils, 2017, 53(8): 885-898
- [27] Itakura M, Uchida Y, Akiyama H, et al. Mitigation of nitrous oxide emissions from soils by *Bradyrhizobium japonicum* inoculation [J]. Nature Climate Change, 2013, 3(3): 208-212
- [28] Gao N, Shen W S, Kakuta H, et al. Inoculation with nitrous oxide (N_2O)-reducing denitrifier strains simultaneously mitigates N_2O emission from pasture soil and promotes growth of pasture plants [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2016, 97: 83-91
- [29] 杨思琪,张欢欢,申卫收,等.氧化亚氮还原细菌 YSQ030 的筛选、鉴定及植物促生特性[J].中国土壤与肥料,2024(1):210-217
YANG Siqi, ZHANG Huanhuan, SHEN Weishou, et al. Isolation, identification and plant growth-promoting characteristics of a nitrous oxide-reducing bacterium [J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2024(1): 210-217
- [30] 于彩虹,杜闫彬,鞠正山,等.不同改良材料对黄河三角洲耕层土壤理化性质及微生物多样性的影响[J].土壤通报,2019,50(6):1335-1342
YU Caihong, DU Yanbin, JU Zhengshan, et al. Effects of different modified materials on physical and chemical properties and microbial diversity of coastal saline soil in the Yellow River Delta [J]. Chinese Journal of Soil Science, 2019, 50(6): 1335-1342
- [31] 曹丽花,刘合满,赵世伟.不同改良剂对黄绵土水稳性团聚体的改良效果及其机制[J].中国水土保持科学,2011,9(5):37-41
CAO Lihua, LIU Heman, ZHAO Shiwei. Effect of soil conditioners on water stability of soil aggregates and its mechanisms in loessal soil [J]. Science of Soil and Water Conservation, 2011, 9(5): 37-41
- [32] 李华,李永青,沈成斌,等.风化煤施用对黄土高原露天煤矿区复垦土壤理化性质的影响研究[J].农业环境科学学报,2008,27(5):1752-1756
LI Hua, LI Yongqing, SHEN Chengbin, et al. Effect of weathered coal application on physical and chemical properties of reclaimed soil in open-pit coal mining area of Loess Plateau [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2008, 27(5): 1752-1756
- [33] 武星魁,姜振萃,陆志新,等.有机肥部分替代化肥氮对叶菜产量和环境效应的影响[J].中国生态农业学报,2020,28(3):349-356
WU Xingkui, JIANG Zhencui, LU Zhixin, et al. Effects of the partial replacement of chemical fertilizer with manure on the yield and nitrogen emissions in leafy vegetable production [J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2020, 28(3): 349-356
- [34] Gao N, Zhang H H, Xiong R N, et al. Different strategies for colonization and prevalence after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria revealed by a monitoring method [J]. Soil Science and Plant Nutrition, 2022, 68(4): 442-453
- [35] 秦红灵,陈安磊,盛荣,等.稻田生态系统氧化亚氮(N_2O)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
QIN Hongling, CHEN Anlei, SHENG Rong, et al. A review on the microbial regulation mechanism of N_2O production and emission of rice paddy ecosystems [J]. Research of Agricultural Modernization, 2018, 39(6): 922-929
- [36] Pauleta S R, Carepo M S P, Moura I. Source and reduction of nitrous oxide [J]. Coordination Chemistry Reviews, 2019, 387: 436-449
- [37] Henry S, Bru D, Stres B, et al. Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(8): 5181-5189
- [38] Hallin S, Philippot L, Löffler F E, et al. Genomics and ecology of novel N_2O -reducing microorganisms [J]. Trends in Microbiology, 2018, 26(1): 43-55
- [39] Jones C M, Graf D R, Bru D, et al. The unaccounted yet abundant nitrous oxide-reducing microbial community: a potential nitrous oxide sink [J]. The ISME Journal, 2013, 7(2): 417-426
- [40] Hu H W, Chen D L, He J Z. 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

Effects of inoculation with N₂ O-reducing bacteria YSQ030 on soil N₂ O emission and key functional genes involved in nitrogen cycling in reclaimed soil

ZHU Jinhong¹ XIONG Ruonan¹ YANG Siqi¹ GAO Nan² WU Yonghong³
ZHANG Zhenchao⁴ WU Guoping⁴ SHEN Weishou¹

1 School of Environmental Science and Engineering/Jiangsu Key Laboratory of Atmospheric Environment Monitoring & Pollution Control/Collaborative Innovation Center of Atmospheric Environment and Equipment Technology, Nanjing University of Information Science & Technology, Nanjing 210044, China

2 College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering/National Engineering Research Center for Biotechnology, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China

3 State Key Laboratory of Soil & Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China

4 Zhenjiang Institute of Agricultural Sciences in Hilly Area of Jiangsu Province, Zhenjiang 212400, China

Abstract Though the reclaimed land is an important reserve land resource, it usually is poor in soil structure and low in organic matter and nutrient content. Organic fertilizer can quickly improve soil productivity, yet it will cause large emissions of greenhouse gases such as Nitrous Oxide (N₂O). It has been proved that the inoculation of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) with N₂O reduction function not only reduces greenhouse gas emissions but also promotes crop growth. In this study, a PGPR denitrificans YSQ030 with N₂O reduction function was used as the test strain to clarify the effect of YSQ030 on N₂O emission and nitrogen cycling key functional genes in reclaimed soil with organic fertilizer application. Soil microcosmic experiments were set up for application of organic-inorganic compound fertilizer and sheep manure, then the soil N₂O emission fluxes after inoculation of YSQ030 were analyzed by gas chromatography. Meanwhile, soil chemical properties were analyzed at the end of the experiment, and the abundance of soil nitrification and denitrification functional genes (AOA *amoA* and AOB *amoA*; *nirS*, *nirK*, *nosZ I* and *nosZ II*) were analyzed by real-time quantitative PCR. The results showed that YSQ030 significantly reduced the N₂O emission of reclaimed soil with organic-inorganic compound fertilizer or sheep manure, with the maximum reduction of N₂O emission reaching 91.5% and 30.9%, respectively. The N₂O emissions of organic-inorganic compound fertilizer treatment were much higher than those of sheep manure treatment, which may be due to the low abundance of N₂O reductase genes of *nosZ I* and *nosZ II* in the former treatment. Furthermore, significant reduction of the abundance of nitrification and denitrification functional genes were observed only in organic-inorganic compound fertilizer treatments. This study shows that YSQ030 can reduce the N₂O emission in soil applied with organic fertilizer, which can provide a scientific basis for both soil fertility improvement and N₂O emission reduction, and also provide core strain resources for the research and development of new microbial fertilizers or bio-organic fertilizers.

Key words microbial fertilizer; organic fertilizer; nitrous oxide (N₂O); plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR); greenhouse gas mitigation