

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2022.04.036

生物有机肥对马铃薯产量与土壤氮循环作用机制研究

赵健宇¹ 王凤新¹ 孟潮彪^{1,2} 金松³ 彭敏⁴

(1. 中国农业大学水利与土木工程学院, 北京 100083; 2. 浙江大学水土资源与环境研究所, 杭州 310058;
3. 怀俄明大学工业与民用建筑工程系, 拉勒米 WY 82071; 4. 元泰丰(包头)生物科技有限公司, 包头 014199)

摘要: 为探讨煤基生物有机肥对滴灌条件下马铃薯产量和土壤理化特性及氮循环相关功能微生物丰度的影响, 揭示煤基生物有机肥对作物产量和土壤氮循环的作用机制, 在施用相同化肥基础上, 分别增施 0、1 500、3 000、4 500 kg/hm² (CF、BF1、BF2、BF3 处理) 煤基生物有机肥开展田间试验。结果表明: 与 CF 相比, 增施煤基生物有机肥显著增加了植株和块茎干物质积累量, 显著提高块茎总产量 5.30% ~ 9.49%, 且随增施量的增加而增加; 显著降低了土壤 pH 值, 增加了有机碳含量。随有机肥增施量的增加, 土壤细菌和真菌丰度呈现减少趋势, 但均高于 CF。增施煤基生物有机肥显著提高了亚硝酸盐还原酶基因 (*nirS*) 丰度, 对固氮酶基因 (*nifH*) 和氨氧化细菌 (AOB) 的氨单加氧酶基因 (*amoA*) 丰度提高不显著。土壤有机碳是驱动 *nirS* 型反硝化菌丰度的重要环境因子。适宜增施煤基生物有机肥可以调控土壤细菌和真菌占比, 调节土壤氮循环过程, 与其他功能基因相比, *nirS* 基因丰度变化对煤基生物有机肥的添加更为敏感。增施煤基生物有机肥有助于提升马铃薯田生产力, 以增施 4 500 kg/hm² 煤基生物有机肥最佳。

关键词: 生物有机肥; 氮循环; 功能微生物; 马铃薯; 产量

中图分类号: S154.3; S532 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2022)04-0343-09 **OSID:** 

Mechanism of Bio-organic Fertilizer on Potato Yield and Soil Nitrogen-cycling

ZHAO Jianyu¹ WANG Fengxin¹ MENG Chaobiao^{1,2} JIN Song³ PENG Min⁴

(1. College of Water Resources and Civil Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China
2. Institute of Soil and Water Resources and Environmental Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China
3. Department of Civil and Architectural Engineering, University of Wyoming, Laramie WY 82071, USA
4. Yuan Taifeng (Baotou) Biotechnology Co., Ltd., Baotou 014199, China)

Abstract: The effects of coal-based bio-organic fertilizer on potato yield, soil physical and chemical properties and abundance of nitrogen-cycling microbes under drip irrigation were studied, aiming to reveal the mechanism of the fertilizer on crop yield and soil nitrogen cycle. A field experiment was conducted from May to September in 2019, located in Guyang County, Inner Mongolia. Totally 1 500 kg/hm² (BF1), 3 000 kg/hm² (BF2), 4 500 kg/hm² (BF3) of coal-based bio-organic fertilizer and no organic fertilizer (CF) were applied respectively on the same levels of chemical fertilizations. The chemical fertilizers were 210 kg/hm² of nitrogen (N), 150 kg/hm² of phosphorus (P₂O₅) and 180 kg/hm² of potassium (K₂O). The field experiment included four treatments and each treatment was repeated three times. Plant dry matter accumulation and tuber yield were quantified at potato maturity and harvest periods, respectively. Samples were collected from 0 ~ 20 cm layer for analysis of physicochemical properties of soil and abundances of nitrogen cycling microbes before tuber harvesting. The abundances of bacteria (16S rRNA), fungi (ITS) and nitrogen cycle functional genes (*nirS*, ammonia-oxidizing bacteria *amoA*, *nifH*) were quantified by quantitative real-time PCR techniques. Compared with CF, increasing the coal-based bio-organic fertilizer ratio could significantly increase the dry matter accumulation of plant and tuber. The total tuber yield was increased by 5.30% ~ 9.49% with the organic

收稿日期: 2021-05-19 修回日期: 2021-09-17
基金项目: 国家自然科学基金项目(51579240)
作者简介: 赵健宇(1997—),男,博士生,主要从事农业水土工程研究,E-mail: jyu_zhao@163.com
通信作者: 王凤新(1973—),男,教授,博士生导师,主要从事滴灌理论及作物生长环境调控研究,E-mail: fxinwang@cau.edu.cn

fertilizer increasing. The soil pH value of organic fertilizer treatments was significantly lower but organic carbon content was higher than that of CF. The abundance of soil bacteria and fungi was decreased with the increase of organic fertilizer application, but it was higher than that of CF. The abundance of microbial genes related to soil nitrogen-cycling responded positively to the addition of organic fertilizer. Furthermore, the gene abundance of nitrite reductase (*nirS*) was significant, while nitrogenase (*nifH*) and ammonia monooxygenase (*amoA*) of ammonia-oxidizing bacteria (AOB) were not significant. The content of soil organic carbon appeared to be the key factor influencing the abundance of *nirS*-type denitrifying bacteria. Overall, these results indicated that the proportion of soil bacteria and fungi could be regulated through proper application of the coal-based bio-organic fertilizer. Soil nitrogen cycle would be affected by the coal-based bio-organic fertilizer. The abundance of *nirS* gene was more sensitive to the addition of organic fertilizer than that of other functional genes. The coal-based bio-organic fertilizer would help to improve the productivity of potato fields, and the application of 4 500 kg/hm² had a better performance.

Key words: bio-organic fertilizer; nitrogen-cycling; function microorganism; potato; yield

0 引言

土壤氮循环是土壤生态系统中重要的循环之一,与其密切相关的氨氧化细菌(Ammonia-oxidizing bacteria, AOB)、氨氧化古菌(Ammonia-oxidizing archaea, AOA)、反硝化细菌和固氮菌是参与硝化、反硝化和固氮作用的重要功能微生物,其群落丰度和结构等因素直接调节氮素在土壤中的转化,影响作物对氮素的吸收利用^[1]。

研究发现,施肥会导致土壤微生物的丰度和结构发生变化。有机和无机肥料配合施用已被证明是提高土壤肥力和维持农作物产量的有效施肥方式^[2]。施用粪肥、作物秸秆作为有机肥料还田能显著增加固氮菌、反硝化菌和 AOB 丰度^[3-6]。然而,也有研究发现施用粪肥对反硝化菌丰度无影响,无机肥与粪肥配施减少固氮菌丰度,而无机肥与秸秆还田配合对固氮菌丰度无明显影响^[4,7-9]。有机肥料对氮循环相关微生物的丰度产生不同程度的影响,与土壤理化特性的变化有关。有机肥料的施入直接为反硝化菌等异养微生物生长提供碳源,促进土壤微生物生长^[10]。不同有机肥和无机肥配施量对氮素形态(铵态氮和硝态氮)的影响直接关系到硝化作用和反硝化作用底物的浓度,进而对相关微生物的丰度和功能产生影响^[11-12]。当土壤中可利用的氮能充分满足固氮微生物的需求时,固氮微生物的活性将会降低,生物固氮作用受到抑制^[13]。此外,施肥造成的土壤 pH 值变化也是影响微生物变化的主要因素之一^[3,14-15]。因此,氮循环过程相互关联,受到土壤环境因子驱动,不同的肥料类型及施用量会对氮循环相关微生物的活性和丰度产生重要影响,从而影响土壤养分循环。

褐煤具有多孔性和较大的比表面积,具有较高的有机质和腐殖酸含量,对各种土壤化合物的吸附

作用较强^[16],有助于增加土壤有机碳含量、碳氮比和阳离子交换能力,是有机肥料的基础^[17]。褐煤中的腐殖酸可以提高马铃薯对含氮化合物的吸收,促进马铃薯生长和块茎形成。与粪肥等有机肥料相比,褐煤稳定性较强,有机质矿化速率有限,短期内可能对土壤微生物群落丰度和结构影响较小^[18]。土壤养分的供应离不开微生物的参与。随着生物技术的发展,出现以褐煤为原料进行微生物发酵生产的煤基生物有机肥^[19-20]。煤基生物有机肥与无机肥料混施,能否促进肥料本身和土壤养分的缓慢释放,从而提高肥料利用效率;煤基生物有机肥能否改善土壤的理化特性和调节土壤氮循环功能微生物,进而促进马铃薯对氮素的吸收利用,实现产量提升,值得研究。

目前的研究很少关注生物有机肥联合化肥施用对作物生长及土壤氮循环微生物的影响。本研究拟通过大田试验,利用分子微生物学方法标记相关功能基因,研究增施煤基生物有机肥对滴灌马铃薯产量和土壤理化特性以及氮循环相关功能微生物丰度的影响,揭示煤基生物有机肥对作物产量和土壤氮循环的作用机制,为土壤科学管理和提高氮素利用率及制定合理施肥制度提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验区概况

试验于2019年5月11日—9月10日在内蒙古自治区包头市固阳县旧城村(41°1'N, 110°3'E,海拔1 356 m),该地区属于温带大陆性气候,年平均气温为4℃,年平均降雨量为300 mm,多年平均20 cm蒸发皿蒸发量为2 270 mm左右,年日照总时数为3 130 h,无霜期为95~110 d。该试验地土壤质地为砂壤土,0~80 cm处土层平均干容重为1.35 g/cm³,

平均田间持水率约为 21.67% (体积含水率)。前茬作物为马铃薯,耕作层(0~40 cm)土壤 pH 值 8.10,有机碳质量比 3.71 g/kg,全氮质量比 0.39 g/kg,全磷质量比 0.61 g/kg,硝态氮质量比 12.0 mg/kg,速效钾质量比 141.0 mg/kg。

1.2 试验设计

试验共计 4 个处理:单施化肥(CF)、化肥增施 1 500 kg/hm²煤基生物有机肥(BF1)、化肥增施 3 000 kg/hm²煤基生物有机肥(BF2)、化肥增施 4 500 kg/hm²煤基生物有机肥(BF3),每个处理重复 3 次,共计 12 个小区,随机布置。所用化肥为尿素(含 N 46%)、磷酸二铵(含 N 16%,P₂O₅ 44%)、硫酸钾(含 K₂O 50%),施用量为 210、150、180 kg/hm²。煤基生物有机肥由元泰丰(包头)生物科技有限公司生产,主要原料为褐煤,其 pH 值为 8.48,有机质质量比为 976 g/kg,全氮质量比为 30.9 g/kg,全碳质量比为 366 g/kg,碳氮比为 11.9。

1.3 农艺措施

试验所用马铃薯品种为克新一号,每个小区种植 7 垄,垄长 6.00 m,垄底宽 0.80 m,垄高 0.30 m,一垄单行,株距约为 0.25 m,播种深度为 0.15 m,种植密度为 52 500 株/hm²,所有处理小区均采用黑色地膜(宽约 0.70 m,厚约 0.008 mm)覆盖。马铃薯于 2019 年 5 月 11 日播种,9 月 10 日收获。采用滴灌灌溉,垄的中央、滴头的正下方埋设负压计,陶土头埋深为 20 cm,土壤水势低于 -25 kPa 时开始灌水,每次灌水量取 5 mm^[21]。马铃薯全生育期共灌水 56 次,灌水总量为 280 mm,各生育期(除 A 外)灌水量如图 1(图中 A~E 分别表示芽条生长期、幼苗期、块茎形成期、块茎膨大期、成熟期)所示。有机肥和全部磷肥、30%氮肥和 30%钾肥在旋耕起垄前人工撒施,剩余氮肥和钾肥平均分成 2 份分别在块茎形成期(6 月 24 日)和块茎膨大期(7 月 20 日)随水追施。

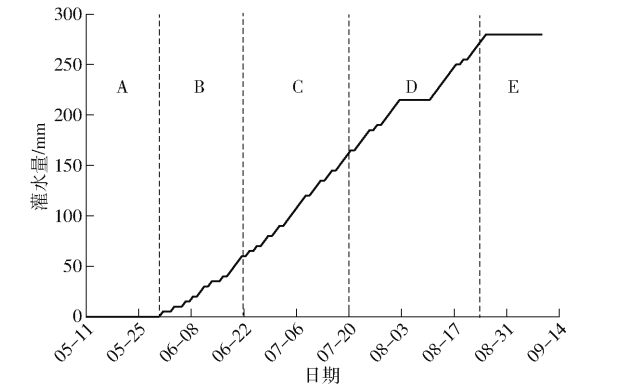


图 1 全生育期累计灌水量

1.4 测定项目及方法

1.4.1 作物干物质量及块茎产量

干物质量:块茎成熟期从每个小区随机选取 10 株马铃薯,将植株茎、叶、根和块茎分离并称鲜质量,植株的茎、叶、根和块茎置于 105℃干燥箱中杀青 30 min,然后 80℃恒温干燥至质量恒定,再冷却至室温(20℃),分别称量得茎、叶、根和块茎的干物质量。

块茎产量及分级:收获时每个小区随机取 10 株马铃薯,用电子天平(精度为 0.01 g)称量单株块茎质量和商品薯质量(≥75 g);每个小区选取中间 3 垄称取鲜质量,计算单位面积上块茎总产量。

1.4.2 土壤样品采集

块茎成熟收获前,各小区选取 3 个代表样点采集 0~20 cm 深度土样,混合均匀后分成 2 份装入无菌袋低温保存带回实验室。一份鲜土 4℃保存,用于测定土壤理化性质;另一份鲜土 -20℃保存,用于提取土壤 DNA。

1.4.3 土壤理化性质测定

土壤理化性质的测定参照《土壤农业化学分析方法》^[22]中的相关方法进行。土壤 pH 值用土壤 pH 计测定,水土质量比为 5:1;土壤含水率采用干燥法测定;有机碳含量采用重铬酸钾容量法测定;全氮、全磷和全钾含量分别采用凯氏定氮法、氢氧化钠熔融-钼锑抗比色法和氢氧化钠熔融-火焰光度法测定;2 mol/L 氯化钾溶液浸提土壤后用连续流动分析仪测定硝态氮和铵态氮含量。

1.4.4 土壤微生物 DNA 提取和功能基因荧光定量分析

从土样中取 0.5 g,通过 PowerSoil DNA 提取试剂盒(MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, 美国)按操作步骤提取土壤总 DNA。提取的 DNA 保存在 -20℃下备用。通过琼脂糖凝胶电泳((Bio-Rad, Hercules, CA, 美国)和 ND-2000 型分光光度计(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, 美国)检测所提 DNA 片段大小和质量。PCR 反应体系为 20 μL,其中包含 4 μL 的 5×FastPfu 缓冲液,2 μL dNTPs(2.5 mmol/L),上下游引物(5 μmol/L)各 0.8 μL,0.4 μL 的 FastPfu 聚合酶(Promega, Fitchburg, WI, 美国)和 10 ng 的 DNA 模板,最后用双蒸水补齐至 20 μL。16S rRNA、ITS、nirS、AOB-amoA 和 nifH 基因荧光实时定量 PCR 分析所用的引物及反应条件见表 1。质粒及标准曲线的制备参考文献^[23]。

1.5 数据分析

采用 Microsoft Excel 2010 对试验数据进行计

Fig. 1 Accumulated irrigation amount in growth period

表1 PCR 扩增引物及反应条件

Tab.1 Primers and reaction conditions of PCR analysis

基因	引物	引物序列	反应程序	文献序号
16S rRNA	1369F	5'-CGGTGAATACGTTTCYCGG-3'	95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 15 s,55℃ 退火 20 s, 72℃ 延伸 30 s,40 个循环;72℃ 延伸 10 min	[24]
	1492R	5'-GGWTACCTTGTTACGACTT-3'		
ITS	ITS1F	5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'	95℃ 预变性 3 min;95℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 30 个循环	[25]
	ITS2R	5'-GCTGCGTTCCTCATCGATGC-3'		
<i>nirS</i>	cd3a-F	5'-GTSAACTSAAGGARACSGG-3'	95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 45 s, 55℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 40 个循环	[26]
	R3cd-R	5'-GASTTCGGRGTSGTCTTGA-3'		
AOB	<i>amoA</i> 1F	5'-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3'	95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 60 s, 60℃ 退火 60 s, 72℃ 延伸 60 s, 40 个循环	[27]
	<i>amoA</i> 2R	5'-CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3'		
<i>nifH</i>	<i>nifH</i> -F	5'-AAAGGYGGWATCGGYAARTCCACCAC-3'	95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 45 s, 55℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 40 个循环	[28]
	<i>nifH</i> -R	5'-TTGTTSGCGSCTACATSGCCATCAT-3'		

算,Origin 2017 进行绘图,SPSS 20 统计软件进行统计分析,采用单因素方差分析和 LSD 法分析处理间显著性差异 ($P < 0.05$),相关性分析采用 Pearson 法。

2 结果与分析

2.1 煤基生物有机肥对马铃薯成熟期干物质质量和块茎产量的影响

由图 2(图中不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$),下同)可知,BF3 处理马铃薯植株干物质积累总量最大,比 CF 处理多 27.11%。在块茎成熟期时,干物质积累量主要集中于块茎,占干物质积累总量的 62.21% ~ 71.65%;其次是茎,占干物质积累总量的 17.56% ~ 25.76%;根和叶干物质积累量分别占总量的 2.31% ~ 2.98%、8.30% ~ 9.73%。煤基生物有机肥对块茎干物质积累量具有极显著影响($P < 0.01$),BF3 和 BF2 处理块茎干物质质量分别比 CF 处理多 10.37%、9.32%,BF1 较 CF 处理多 6.05%;BF2 与 BF3 间无显著性差异($P > 0.05$)。

由图 3 可知,增施煤基生物有机肥处理的产量均高于单施化肥处理且差异显著($P < 0.05$),随着煤基生物有机肥量的增加,单株薯质量、商品薯质量

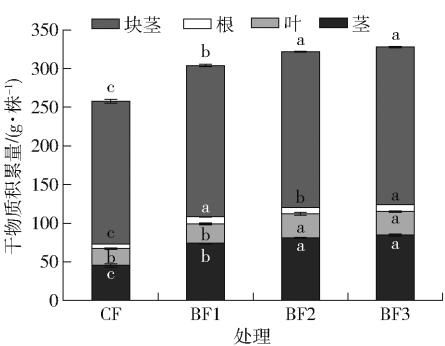


图2 马铃薯成熟期干物质积累量

Fig.2 Dry matter accumulation at potato maturation stage

和块茎总产量均有不同程度增加。与 CF 处理相比,BF3 处理显著提高了单株薯质量、商品薯质量和块茎总产量,分别增加了 22.62%、17.73% 和 9.49%。就块茎总产量来说,增施 1 500 ~ 4 500 kg/hm² 的煤基生物有机肥,较单施化肥增产幅度为 5.30% ~ 9.49%。

2.2 煤基生物有机肥对土壤基本理化性质的影响

不同煤基生物有机肥增施量对 0 ~ 20 cm 土壤 pH 值和有机碳、全氮、全磷、全钾、硝态氮、铵态氮含量的影响,如表 2 所示。与 CF 处理相比,BF1、BF2 和 BF3 显著降低了土壤 pH 值,显著增加了有机碳含量。增施煤基生物有机肥对土壤全氮、全钾、硝态氮和铵态氮含量变化没有产生显著差异,但随着增

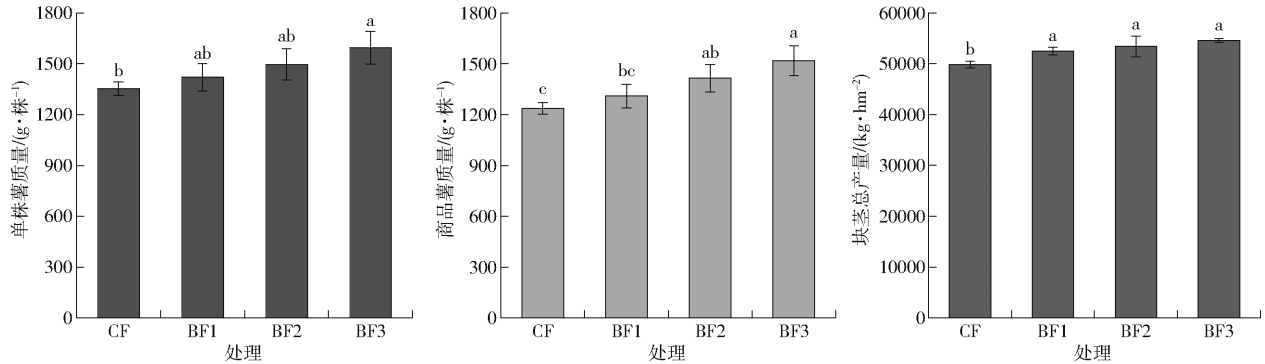


图3 不同处理对马铃薯单株薯质量、商品薯质量和块茎总产量的影响

Fig.3 Tuber weight per plant, commodity potato weight and yield in responding to different treatments

表 2 不同处理的土壤基本理化性质

Tab. 2 Physical and chemical properties of soils under different treatments

处理	含水率	pH 值	有机碳质量比/ (g·kg ⁻¹)	全氮质量比/ (g·kg ⁻¹)	全磷质量比/ (g·kg ⁻¹)	全钾质量比/ (g·kg ⁻¹)	硝态氮质量比/ (mg·kg ⁻¹)	铵态氮质量比/ (mg·kg ⁻¹)
CF	(0.078 ± 0.01) ^a	(8.17 ± 0.06) ^a	(5.88 ± 0.22) ^b	(0.58 ± 0.08) ^a	(0.99 ± 0.13) ^a	(14.83 ± 0.24) ^a	(14.86 ± 1.28) ^a	(3.95 ± 1.30) ^a
BF1	(0.079 ± 0.01) ^a	(8.07 ± 0.06) ^b	(6.16 ± 0.21) ^a	(0.57 ± 0.07) ^a	(0.74 ± 0.09) ^b	(14.32 ± 0.72) ^a	(15.76 ± 2.70) ^a	(3.39 ± 0.49) ^a
BF2	(0.079 ± 0.01) ^a	(8.00 ± 0.01) ^b	(6.96 ± 0.39) ^a	(0.60 ± 0.06) ^a	(1.10 ± 0.12) ^a	(14.40 ± 0.45) ^a	(15.99 ± 1.69) ^a	(3.92 ± 0.70) ^a
BF3	(0.081 ± 0.01) ^a	(8.07 ± 0.05) ^b	(6.18 ± 0.30) ^a	(0.63 ± 0.07) ^a	(0.60 ± 0.11) ^b	(14.73 ± 0.03) ^a	(15.57 ± 1.31) ^a	(3.77 ± 0.71) ^a

注：同列数字后不同小写字母表示差异显著(P < 0.05)。

施量的增加,呈现出土壤全氮、硝态氮和铵态氮递增趋势。

2.3 煤基生物有机肥对土壤微生物丰度的影响

与单施化肥相比,增施煤基生物有机肥可以使0~20 cm 深度土壤细菌和真菌总量增加 26% ~ 97%,其中细菌丰度增加 33% ~ 104%,真菌丰度增加 11% ~ 80% (图 4),但无显著差异(P > 0.05)。而随着煤基生物有机肥增施量的增加,土壤细菌和真菌丰度均呈现减少趋势,但均高于 CF 处理。各处理中土壤细菌/真菌丰度比为 2.4 ~ 3.3,随生物有机肥增施量的增加呈现出先降后升的趋势;BF3 处理较 BF2 处理真菌丰度减少 26%,细菌丰度几乎不变,致使 BF3 处理土壤细菌/真菌丰度比提高;而 BF2 处理比 BF1 处理真菌丰度减少 17%,细菌丰度减少 31%,造成 BF2 处理土壤细菌/真菌丰度比大为降低,甚至低于 CF 处理。说明适量增施煤基生物有机肥可以增加土壤细菌和真菌的丰度,进一步增施会导致其丰度减少;由于微生物丰度减少的比例不同,细菌/真菌丰度比发生变化。

2.4 煤基生物有机肥对土壤氮循环相关微生物功能基因丰度的影响

由亚硝酸盐还原酶基因(*nirS*)、氨氧化细菌(AOB)的氨单加氧酶基因(*amoA*)和固氮酶基因(*nifH*)丰度测定表明(图 5),试验土壤中 *nifH* 基因和 AOB-*amoA* 基因拷贝数高出 *nirS* 基因拷贝数 1 个数量级,与 CF 处理相比,增施煤基生物有机肥的 0~20 cm 深度土壤中上述 3 种与氮循环相关的功能基因丰度均有所提高,但 *nifH* 基因和 AOB-*amoA*

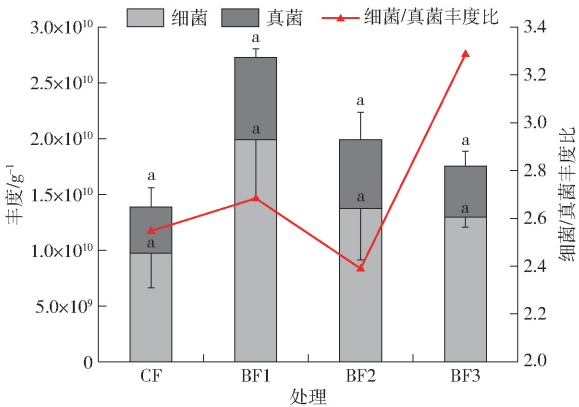


图 4 不同处理土壤中细菌和真菌丰度及细菌/真菌丰度比
Fig. 4 Abundance and ratio of bacteria and fungi in soil under different treatments

基因在统计学上无显著差异(P > 0.05)。与 CF 处理相比,对于 *nifH* 基因和 AOB-*amoA* 基因丰度,以 BF3 处理提高幅度最大,分别达 74% 和 77%,BF2 处理提高幅度最小,为 29% 和 40%;对于 *nirS* 基因丰度,以 BF2 处理提高幅度最大,为 90%,BF3 处理提高幅度最小,为 33%。随着煤基生物有机肥增施量的增加,*nifH* 基因和 AOB-*amoA* 基因丰度呈现先减后增,*nirS* 基因丰度呈现先增后减的趋势。

2.5 土壤理化性质与氮循环相关微生物功能基因的相关分析

土壤微生物丰度与土壤基本理化性质的相关分析(表 3)表明,细菌 16S rRNA、真菌 ITS 和 *nifH* 基因丰度与土壤含水率、pH 值、有机碳含量、全氮含量、硝态氮含量、铵态氮含量均无显著相关性。除 *nirS* 基因丰度与有机碳含量呈显著正相关,AOB-

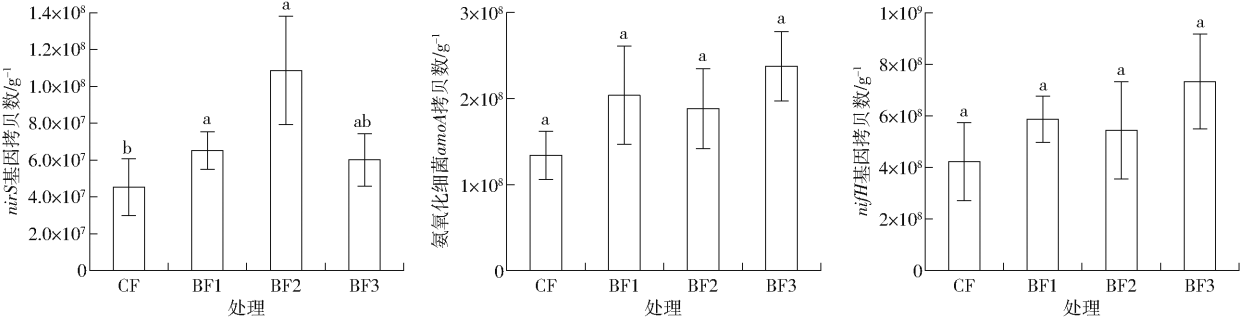


图 5 不同处理土壤中 *nirS*、AOB-*amoA* 和 *nifH* 基因拷贝数

Fig. 5 Copies of *nirS*, AOB-*amoA* and *nifH* genes in soil under different treatments

amoA 基因丰度与全氮含量呈显著正相关外,*nirS*、*AOB-amoA* 基因丰度与其他土壤理化性质无显著相关性。

表 3 土壤微生物丰度与土壤基本理化性质的相关系数
Tab. 3 Correlation coefficients between soil microbial abundances and physical and chemical properties of soil

项目	细菌	真菌	<i>nifH</i>	<i>nirS</i>	<i>AOB-amoA</i>
含水率	0.258	-0.433	0.174	0.507	0.187
pH 值	-0.084	-0.266	-0.224	-0.256	-0.328
有机碳含量	0.424	-0.043	0.454	0.682 *	0.476
全氮含量	0.241	-0.034	0.389	0.360	0.706 *
硝态氮含量	0.415	-0.141	0.416	0.443	0.478
铵态氮含量	-0.267	0.245	-0.063	-0.229	-0.164

注: * 表示差异显著 ($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 煤基生物有机肥对马铃薯干物质积累和产量的影响

有机肥含有丰富的有机质和多种营养元素,生物有机肥还含有特定功能的微生物,可以活化土壤中矿物固定的养分^[29]。许多研究表明无机肥有机肥合理配施可以培肥土壤,提高肥料的利用率,促进植株生长,增加作物产量^[30-32]。干物质积累量是马铃薯产量形成的基础,块茎膨大期大量物质由叶、茎向块茎转移,才能获得高产^[33]。本研究结果表明,增施煤基生物有机肥对马铃薯成熟期干物质积累量具有显著影响。与单施化肥相比,增施煤基生物有机肥马铃薯成熟期植株干物质积累总量多 17.94% ~ 27.11%,块茎干物质质量多 6.05% ~ 10.37%,均表现为 4 500 kg/hm²生物有机肥处理最多;就单株薯质量、商品薯质量和产量而言,增施 4 500 kg/hm²生物有机肥最优,分别比单施化肥处理增加 22.62%、17.73% 和 9.49%。这是由于研究所用生物有机肥是由褐煤经过微生物技术生产而来,其本身有机质丰富,施入土壤后直接增加了土壤有机质含量,同时生物有机肥中微生物产生的有机酸可以释放土壤所固定的养分,为作物生长和产量提高提供了物质基础。此外,褐煤对 NH₄⁺ 具有吸附作用,可能导致其在根区滞留时间更长,从而提高马铃薯对氮素的吸收,促进产量增加^[34]。

3.2 煤基生物有机肥对土壤微生物丰度的影响

土壤微生物在一定程度上能反映土壤肥力水平,土壤细菌丰度高,表明土壤性质和水肥条件好,可以作为评价土壤健康的指标^[35]。倪雷^[36]研究发现,作物生育时期是影响土壤细菌丰度变化的首要因素,施加有机肥后增加了细菌丰度,而自小麦拔节

期后丰度递减且无显著差异。本研究结果与之相似,增施煤基生物有机肥较单施化肥不同程度增加了土壤细菌和真菌丰度,但无显著差异。一方面由于施加有机肥带入了有机质和碳源,促进了土壤团粒结构形成,进而促进微生物生命活动和生长繁殖,细菌和真菌丰度增加^[37];另一方面可能是作物生育期内气候变化和产生的根系分泌物导致成熟期各处理土壤细菌和真菌丰度无显著差异。随着煤基生物有机肥施用量的增加,土壤中细菌和真菌丰度均呈现减少趋势,这可能是由于煤基生物有机肥本身含有大量腐殖酸、大中小分子系列有机物和有益活性菌,这些组分均可加剧微生物活动,造成微生物间相互争夺养分,优势群体逐渐占主导地位,抑制其他种群繁殖,并充当关键物种(Keystone species),起到稳定微生物生态平衡的作用^[38]。其次,褐煤在碱性土壤中可能释放出一些化合物,如酚类、邻苯二甲酸盐、多芳香烃、苯类和脂肪族化合物等,其中一些对细胞代谢有毒害作用^[18]。这也是随着煤基生物有机肥施用量增加,微生物生长受到抑制的原因之一。

本研究中,增施 4 500 kg/hm² 和 1 500 kg/hm²煤基生物有机肥土壤细菌/真菌丰度比高于单施化肥,而增施 3 000 kg/hm²煤基生物有机肥土壤细菌/真菌丰度比低于单施化肥,说明土壤微生物区系可以通过施用生物有机肥进行调控,适宜的有机肥施用量对细菌/真菌丰度比有增加趋势。然而增施该种煤基生物有机肥对土壤微生物区系的调控规律仍需进一步研究。

3.3 煤基生物有机肥对土壤理化性质和氮循环功能基因的影响

增施煤基生物有机肥对土壤 pH 值和有机碳含量影响显著。增施煤基生物有机肥后土壤有机碳含量增加了 4.8% ~ 18.4%,这与肥料本身碳含量丰富密切相关;土壤 pH 值降低了 0.10 ~ 0.17,这可能是由于在有机肥分解过程中有机酸和 CO₂ 释放到土壤中所致^[39]。

本研究利用 PCR 技术定量检测了 *nirS*、*AOB-amoA* 和 *nifH* 3 个关键氮循环功能基因,以研究增施煤基生物有机肥对参与反硝化作用、硝化作用和固氮作用微生物的影响。土壤 pH 值、有机碳含量、氮含量等理化性质是影响氮循环的重要环境因子。先前的研究表明 pH 值是决定土壤微生物丰度与群落的最主要因素^[3,14,40],而本研究中土壤 pH 值与氮循环相关微生物丰度无显著相关关系,说明增施煤基生物有机肥虽然显著降低了土壤 pH 值,但未能改变土壤酸碱度对微生物丰度变化产生影响。

本研究结果表明,与单施化肥相比,增施有机肥

显著提高了 *nirS* 型反硝化菌丰度,这与大多数研究结果一致^[41-42]。相关分析发现,*nirS* 基因拷贝数与土壤有机碳含量显著正相关,说明有机碳是影响反硝化菌丰度的一个重要因素。本研究中煤基生物有机肥促进反硝化菌生长,可能原因是:①增施煤基生物有机肥显著提高土壤有机碳含量,为异养的反硝化菌生长提供了丰富的碳源^[10]。②增施生物有机肥带来了大量微生物,微生物活性较高,耗氧量增加可能导致某些土壤区域产生缺氧,为反硝化菌生长创造了合适的环境条件。而 BF3 处理较 BF2 和 BF1 处理 *nirS* 基因拷贝数有所减少,这可能是由于 BF3 处理根系生长旺盛,植物氮素吸收量增加,土壤中可供反硝化作用的底物减少,限制了反硝化菌的丰度^[43]。此外,NO₃⁻-N 作为反硝化过程的电子受体和反硝化菌生长的底物,是影响反硝化菌丰度的重要因素之一^[11]。YANG 等^[44]研究发现在碱性土壤中 *nirS* 基因拷贝数与全氮含量和 NO₃⁻-N 含量呈正相关,而在本研究未发现存在显著相关关系,可能的原因是增施煤基生物有机肥并未对土壤氮含量产生显著影响。本研究中,土壤有机碳含量是引起 *nirS* 型反硝化菌丰度变化的主要原因。

作为氨氧化作用的主要承担者,AOB 在土壤氮循环中起到重要作用。先前有研究表明,肥料类型显著影响 AOB 丰度^[45],而本研究结果表明,增施煤基生物有机肥对 AOB - *amoA* 基因拷贝数增加不显著。AOB 是一类化能自养型微生物,一般不以有机碳为能源生长。因此,本研究中土壤有机碳含量增加没有导致 AOB 丰度显著提高。据报道,氨氧化作用的底物——氨的可利用性是氨氧化微生物生长的重要原因,无机氮作为能源物质,AOB 的生长易受到其影响^[12,40]。本研究中,AOB - *amoA* 基因拷贝数与土壤全氮含量呈显著正相关,则进一步说明了氮素对 AOB 生长的重要性。

研究表明大多数土壤都具有固氮能力^[46-47],本研究中土壤的 *nifH* 基因丰度与倪雷^[36]、ZHAO 等^[32]报道的结果相近。自生固氮菌适合生活在低氮土壤中,而较高水平的氮会使固氮能力降低,*nifH* 基因丰度会随施氮量增加而降低^[48-49]。另有研究表明,NH₄⁺ 的存在通常会抑制固氮酶表达^[14]。大多数参与固氮作用的固氮菌是异养或兼养型微生物,*nifH* 基因丰度与土壤有机碳含量呈正相关,可以通过提高土壤碳氮比或增加外源有机物质来促进固氮微生物活性^[15]。而本研究在相同化肥施用量上

增施煤基生物有机肥发现,*nifH* 基因拷贝数没有显著增加,这与 SUN 等^[2]无机肥添加粪肥的试验结果不一致。这可能是由于本试验中氮肥输入量较高致使土壤 NH₄⁺ 增加,对固氮菌的抑制作用抵消了有机碳的促进作用。

3.4 土壤氮循环特征与马铃薯增产机制

本试验表明,短期内增施煤基生物有机肥对土壤微生物及氮循环功能基因丰度影响有限,但在一定程度上可以提高马铃薯产量。与单施化肥相比,增施煤基生物有机肥通过显著增加土壤有机碳含量,促进 *nirS* 基因丰度增长,增强反硝化作用强度,而硝化作用和固氮作用几乎不受影响。在不同增施梯度下,BF2 处理 *nirS* 基因丰度最高,AOB - *amoA* 基因丰度最低,反硝化作用有所增强,可能产生更多的土壤氮损失。煤基生物有机肥增施量不同诱导土壤性质变化,导致土壤硝化和反硝化细菌基因丰度变化,最终影响产量。与单施化肥相比,增施煤基生物有机肥不同程度地提高 *nirS* 和 AOB - *amoA* 基因表达量,进而协调硝化和反硝化过程,使土壤 NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 维持在一定比例,以满足马铃薯生长需求,这可能是造成产量增加的原因之一。其次,褐煤中含有多种活性官能团,使其具备一定的阳离子交换能力,对 NH₄⁺ 吸附作用强,从而提高马铃薯对根区土壤氮素的利用,促进产量增加^[34]。

4 结论

(1)增施煤基生物有机肥可以调节土壤氮循环过程,增加土壤有机质和有效养分,显著提高马铃薯成熟期干物质积累量,显著提高单株薯质量、商品薯质量和块茎总产量,以增施 4 500 kg/hm² 煤基生物有机肥最佳。

(2)增施煤基生物有机肥较单施化肥不同程度增加了土壤细菌和真菌丰度,而随增施量增加,土壤细菌和真菌丰度均呈现出减少趋势,但无显著差异;适宜的生物有机肥增施量对细菌/真菌丰度比有增加趋势。

(3)增施煤基生物有机肥能显著降低土壤 pH 值,提高有机碳含量和 *nirS* 型反硝化菌丰度,而对 AOB 和固氮菌丰度影响不显著。相关性分析表明,*nirS* 基因拷贝数与土壤有机碳含量显著正相关,AOB - *amoA* 基因拷贝数与土壤全氮含量显著正相关,土壤有机碳是驱动 *nirS* 型反硝化菌丰度的重要环境因子。

参 考 文 献

[1] GRUBER N, GALLOWAY J N. An earth-system perspective of the global nitrogen cycle[J]. Nature, 2008,451(7176):293-296.

- [2] SUN Ruibo, GUO Xisheng, WANG Daozhong, et al. Effects of long-term application of chemical and organic fertilizers on the abundance of microbial communities involved in the nitrogen cycle[J]. *Applied Soil Ecology*, 2015,95(4):171–178.
- [3] TAO Rui, WAKELIN S A, LIANG Yongchao, et al. Nitrous oxide emission and denitrifier communities in drip-irrigated calcareous soil as affected by chemical and organic fertilizers[J]. *Science of the Total Environment*, 2018,612:739–749.
- [4] HAI B, DIALLO N H, SALL S, et al. Quantification of key genes steering the microbial nitrogen cycle in the rhizosphere of sorghum cultivars in tropical agroecosystems[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009,75(15):4993–5000.
- [5] WAKELIN S A, COLLOFF M J, HARVEY P R, et al. The effects of stubble retention and nitrogen application on soil microbial community structure and functional gene abundance under irrigated maize[J]. *FEMS Microbiol Ecology*, 2007,59(3):661–670.
- [6] FAN Fenliang, YANG Qianbao, LI Zhaojun, et al. Impacts of organic and inorganic fertilizers on nitrification in a cold climate soil are linked to the bacterial ammonia oxidizer community[J]. *Microbial Ecology*, 2011,62(4):982–990.
- [7] YIN Chang, FAN Fenliang, SONG Alin, et al. Different denitrification potential of aquatic brown soil in Northeast China under inorganic and organic fertilization accompanied by distinct changes of *nirS*- and *nirK*-denitrifying bacterial community[J]. *European Journal of Soil Biology*, 2014,65(4):47–56.
- [8] HU Xiaojing, LIU Junjie, ZHU Ping, et al. Long-term manure addition reduces diversity and changes community structure of diazotrophs in a neutral black soil of Northeast China[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2018,18(5):2053–2062.
- [9] LIN Yongxin, YE Guiping, LIU Deyan, et al. Long-term application of lime or pig manure rather than plant residues suppressed diazotroph abundance and diversity and altered community structure in an acidic ultisol[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018,123(3–4):218–228.
- [10] 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 Microbiol Ecology*, 2006,56(1):119–131.
- [11] LIU Xueduan, TIQUIA S M, HOLGUIN G, et al. Molecular diversity of denitrifying genes in continental margin sediments within the oxygen-deficient zone off the pacific coast of Mexico[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003,69(6):3549–3560.
- [12] ERGUDER T H, BOON N, WITTEBOLLE L, et al. Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia-oxidizing archaea[J]. *FEMS Microbiol Reviews*, 2009,33(5):855–869.
- [13] 王磊, 王静, 张爱君, 等. 小麦-甘薯轮作长期增施有机肥对碱性土壤固氮菌群落结构及多样性的影响[J]. *生态学报*, 2020,40(16):5771–5782.
- WANG Lei, WANG Jing, ZHANG Aijun, et al. Effects of long-term organic fertilization on soil diazotrophic community structure and diversity under wheat-sweet potato rotation system[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2020,40(16):5771–5782. (in Chinese)
- [14] PEREIRA E S M C, SEMENOV A V, ELSAS J D, et al. Seasonal variations in the diversity and abundance of diazotrophic communities across soils[J]. *FEMS Microbiol Ecology*, 2011,77(1):57–68.
- [15] YANG Lu, BAI Jinshun, ZENG Naohua, et al. Diazotroph abundance and community structure are reshaped by straw return and mineral fertilizer in rice-rice-green manure rotation[J]. *Applied Soil Ecology*, 2019,136:11–20.
- [16] AMOAH-ANTWI C, KWIATKOWSKA-MALINA J, FENTON O, et al. Holistic assessment of biochar and brown coal waste as organic amendments in sustainable environmental and agricultural applications[J]. *Water, Air, Soil Pollution*, 2021,232(3):106.
- [17] CIARKOWSKA K, SOLEK-PODWIKA K, FILIPEK-MAZUR B, et al. Comparative effects of lignite-derived humic acids and FYM on soil properties and vegetable yield[J]. *Geoderma*, 2017, 303: 85–92.
- [18] KIM T T C, ROSE M T, CAVAGNARO T R, et al. Lignite amendment has limited impacts on soil microbial communities and mineral nitrogen availability[J]. *Applied Soil Ecology*, 2015, 95(4): 140–150.
- [19] FALLGREN P H, ZENG Cuiping, REN Zhiyong, et al. Feasibility of microbial production of new natural gas from non-gas-producing lignite[J]. *International Journal of Coal Geology*, 2013,115:79–84.
- [20] 金松, 付格林, 彭敏, 等. 一种煤基生物天然气、有机肥和生物有机肥的联产系统:CN206089607U[P]. 2017-04-12.
- [21] WANG F, WU X, SHOCK C C, et al. Effects of drip irrigation regimes on potato tuber yield and quality under plastic mulch in arid Northwestern China[J]. *Field Crops Research*, 2011, 122(1): 78–84.
- [22] 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.
- [23] GUAN X, GAO X, AVELLAN A, et al. CuO nanoparticles alter the rhizospheric bacterial community and local nitrogen cycling for wheat grown in a calcareous soil[J]. *Environmental Science Technology*, 2020,54(14):8699–8709.
- [24] DANDIE C E, MILLER M N, BURTON D L, et al. Nitric oxide reductase-targeted real-time PCR quantification of denitrifier populations in soil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007,73(13):4250–4258.
- [25] BOKULICH N A, MILLS D A. Improved selection of internal transcribed spacer-specific primers enables quantitative, ultra-high-throughput profiling of fungal communities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013,79(8):2519–2526.
- [26] HARTER J, KRAUSE H M, SCHUETTLER S, et al. Linking N₂O emissions from biochar-amended soil to the structure and function of the N-cycling microbial community[J]. *The ISME Journal*, 2014,8(3):660–674.
- [27] ROTTHAUWE J H, WITZEL K P, LIESACK W. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(12):4704–4712.
- [28] ROSCH C, MERGEL A, BOTHE H. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002,68(8):3818–3829.
- [29] 张雪艳, 田蕾, 高艳明, 等. 生物有机肥对黄瓜幼苗生长、基质环境以及幼苗根系特征的影响[J]. *农业工程学报*, 2013,29(1):117–125.

- ZHANG Xueyan, TIAN Lei, GAO Yanming, et al. Effects of bioorganic fertilizer on cucumber seedling growth, substrate nutrient content and seedling root characteristics[J]. Transactions of the CSAE, 2013,29(1):117–125. (in Chinese)
- [30] 邢素丽, 韩宝文, 刘孟朝, 等. 有机无机配施对土壤养分环境及小麦增产稳定性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2010,29(增刊1):135–140.
- XING Suli, HAN Baowen, LIU Mengchao, et al. The effect of NPK fertilizer combined with soil organic manure on soil nutrition and wheat yield increasing[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2010,29(Supp.1):135–140. (in Chinese)
- [31] 周慧, 史海滨, 张文聪, 等. 有机无机氮配施对玉米产量和硝态氮淋失的影响[J]. 农业机械学报, 2021,52(9):291–301,249.
- ZHOU Hui, SHI Haibin, ZHANG Wencong, et al. Evaluation of organic-inorganic nitrogen application on maize yield and nitrogen leaching by DNDC model[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2021,52(9):291–301,249. (in Chinese)
- [32] ZHAO Jun, NI Tian, LI Jing, et al. Effects of organic-inorganic compound fertilizer with reduced chemical fertilizer application on crop yields, soil biological activity and bacterial community structure in a rice-wheat cropping system[J]. Applied Soil Ecology, 2016,99(5):1–12.
- [33] 高聚林, 刘克礼, 张宝林, 等. 马铃薯干物质积累与分配规律的研究[J]. 中国马铃薯, 2003,17(4):209–212.
- GAO Julin, LIU Keli, ZHANG Baolin, et al. Accumulation and distribution of dry matter in potato[J]. Chinese Potato Journal, 2003,17(4):209–212. (in Chinese)
- [34] PARAMASHIVAM D, CLOUGH T J, CARLTON A, et al. The effect of lignite on nitrogen mobility in a low-fertility soil amended with biosolids and urea[J]. Science of the Total Environment, 2016, 543(14): 601–608.
- [35] 屈忠义, 孙慧慧, 杨博, 等. 不同改良剂对盐碱地土壤微生物与加工番茄产量的影响[J]. 农业机械学报, 2021,52(4):311–318,350.
- QU Zhongyi, SUN Huihui, YANG Bo, et al. Effects of different amendments on soil microorganisms and yield of processing tomato in saline alkali soil[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2021,52(4):311–318,350. (in Chinese)
- [36] 倪雷. 施用有机肥料对水旱轮作系统小麦土壤微生物区系的影响[D]. 南京:南京农业大学, 2018.
- NI Lei. The effects of application of organic fertilizer on the flora of wheat soil bacteria in wheat-rice rotation system[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2018. (in Chinese)
- [37] 侯毛毛, 陈竞楠, 林志远, 等. 滴灌和微生物有机肥对设施土壤呼吸的耦合作用及机制[J]. 农业工程学报, 2019,35(24):104–112.
- HOU Maomao, CHEN Jingnan, LIN Zhiyuan, et al. Coupling effect and mechanism of drip irrigation and microbial organic fertilization on soil respiration in greenhouse[J]. Transactions of the CSAE, 2019,35(24):104–112. (in Chinese)
- [38] 王若楠, 邱小倩, 刘亮, 等. 施用腐植酸对植物根际和内生微生物的影响[J]. 腐植酸, 2019(4):16–20.
- WANG Ruonan, QIU Xiaoqian, LIU Liang, et al. Effects of humic acid application on plant rhizosphere microbes and endophytes[J]. Humic Acid, 2019(4):16–20. (in Chinese)
- [39] WEI Xiaorong, HAO Mingde, SHAO Migan, et al. Changes in soil properties and the availability of soil micronutrients after 18 years of cropping and fertilization[J]. Soil and Tillage Research, 2006,91(1–2):120–130.
- [40] SHEN Jupei, ZHANG Limei, ZHU Yongguan, et al. Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam[J]. Environmental Microbiology, 2008,10(6):1601–1611.
- [41] CUI Peiyuan, FAN Fenliang, YIN Chang, et al. Long-term organic and inorganic fertilization alters temperature sensitivity of potential N_2O emissions and associated microbes[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2016,93:131–141.
- [42] TATTI E, GOYER C, ZEBARTH B J, et al. Short-term effects of mineral and organic fertilizer on denitrifiers, nitrous oxide emissions and denitrification in long-term amended vineyard soils[J]. Soil Science Society of America Journal, 2013,77(1):113–122.
- [43] 王芬, 刘会, 冯敬涛, 等. 牛粪和生物炭对苹果根系生长、土壤特性和氮素利用的影响[J]. 中国生态农业学报, 2018,26(12):1795–1801.
- WANG Fen, LIU Hui, FENG Jingtao, et al. Effects of cow dung and biochar on root growth, soil properties and nitrogen utilization of apple[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2018,26(12):1795–1801. (in Chinese)
- [44] YANG Yadong, ZHAO Jie, JIANG Ying, et al. Response of bacteria harboring *nirS* and *nirK* genes to different N fertilization rates in an alkaline northern Chinese soil[J]. European Journal of Soil Biology, 2017,82:1–9.
- [45] YANG Yadong, REN Yongfeng, WANG Xiquan, et al. Ammonia-oxidizing archaea and bacteria responding differently to fertilizer type and irrigation frequency as revealed by Illumina Miseq sequencing[J]. Journal of Soils and Sediments, 2018,18(3):1029–1040.
- [46] IZQUIERDO J A, NUSSLEIN K. Distribution of extensive *nifH* gene diversity across physical soil microenvironments[J]. Microbial Ecology, 2006,51(4):441–452.
- [47] POLY F, RANJARD L, NAZARET S, et al. Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001,67(5):2255–2262.
- [48] COELHO M R R, MARRIEL I E, JENKINS S N, et al. Molecular detection and quantification of *nifH* gene sequences in the rhizosphere of sorghum (*Sorghum bicolor*) sown with two levels of nitrogen fertilizer[J]. Applied Soil Ecology, 2009,42(1):48–53.
- [49] 郑棉海, 陈浩, 朱晓敏, 等. 矿质养分输入对森林生物固氮的影响[J]. 生态学报, 2015,35(24):7941–7954.
- ZHENG Mianhai, CHEN Hao, ZHU Xiaomin, et al. Effects of the addition of mineral nutrients on biological nitrogen fixation in forest ecosystems[J]. Acta Ecologica Sinica, 2015,35(24):7941–7954. (in Chinese)