

设施菜田不同碳氮管理对反硝化菌结构和功能的影响

宋贺¹ 王敬国^{2*} 陈清² 曹文超² 王进闯²

(1. 安徽农业大学 农学院 安徽 合肥 230036)

(2. 中国农业大学 资源与环境学院 北京 100193)

摘要:【目的】通过 6 年长期定位试验, 比较设施菜田不同碳氮管理下反硝化菌结构和功能的差异。【方法】采用末端限制性片段多态性(T-RFLP)和变性梯度凝胶电泳(DGGE)方法分别分析 *nirK/nirS* 和 *nosZ* 型反硝化菌群结构特征, 利用自动连续在线培养监测体系(Robot 系统)测定分析 $\text{NO}/(\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-)$ 和 $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O} + \text{N}_2)$ 产物比, 并通过乙炔抑制法测定反硝化酶活性。【结果】传统施肥处理(CN)显著改变了 *nirK* 和 *nosZ* 型反硝化菌的结构, 增加了 $\text{NO}/(\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-)$ 和 $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O} + \text{N}_2)$ 产物比。*nirS* 型菌受碳氮管理影响较小。减氮(RN)和添加秸秆处理(RN+S)的 *nirK* 和 *nosZ* 型反硝化菌结构与 CN 处理的差异性显著, 且会显著降低 $\text{NO}/(\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-)$ 和 $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O} + \text{N}_2)$ 产物比; 与 CN 和 RN 相比, RN+S 显著增加反硝化酶活性。【结论】设施菜田长期传统施肥措施改变了反硝化菌的结构和功能, 增加土壤自身的 NO 产生能力并减弱了 N_2O 还原 N_2 的能力。减氮和添加秸秆管理能形成自身的反硝化菌群结构, 并降低 NO 和 N_2O 排放风险; 秸秆的添加会促进反硝化潜在速率, 降低菜田 NO_3^- 淋洗风险。

关键词: 日光温室, 痕量气体, 多样性, 反硝化菌, 产物比

Impacts of different carbon and nitrogen managements on the structure and function of denitrifier community in a greenhouse vegetable cropping system

SONG He¹ WANG Jing-Guo^{2*} CHEN Qing² CAO Wen-Chao² WANG Jin-Chuang²

(1. College of Agronomy, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China)

(2. College of Resources and Environmental Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: [Objective] Based on a 6-years greenhouse cropping field, the objective of the present study was to find out the differences of the structure and function of denitrifier community under different carbon and nitrogen managements. [Methods] We used terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) methods to analyze the structure of microbial communities containing *nirK/nirS* and *nosZ*, respectively, a robotized incubation system to measure $\text{NO}/(\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-)$ and $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O} + \text{N}_2)$ product ratio and an acetylene inhibition method to determine denitrification enzyme activity. [Results] Conventional N

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 41230856, 41301258); 安徽省自然科学基金项目(No. 1408085QC68)

*通讯作者: Tel: 86-10-62732198; ✉: wangjg@cau.edu.cn

收稿日期: 2014-03-04; 接受日期: 2014-05-08; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-05-21

management (CN) significantly changed the structure of denitrifier communities containing *nirK* and *nosZ* and increased the $\text{NO}/(\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-)$ and $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O} + \text{N}_2)$ product ratio. *nirS*-denitrifiers were less affected by carbon and nitrogen managements. Reduced N (RN) and reduced N plus straw (RN+S) management had significant changed the denitrifier communities containing *nirK* and *nosZ* and reduced $\text{NO}/(\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-)$ and $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O} + \text{N}_2)$ product ratio compared with CN treatment. In contrast to CN and RN treatments, RN+S significantly increased denitrification enzyme activity. **[Conclusion]** Conventional N management significantly changed the structure and function of denitrifier community, and promoted the formation of NO and N_2O . RN and RN+S managements could form new denitrifier community structure and reduced the risk of NO and N_2O emissions. In addition, straw application promoted potential denitrification rates and reduced the risk of NO_3^- leaching in greenhouses.

Keywords: Solar greenhouse, Trace gases, Diversity, Denitrifier, Product ratio

在中国众多农业生产系统中,设施蔬菜生产系统通常被认为是水肥投入最多的农业生产系统。我国大部分设施菜田化学氮肥的年投入量在每公顷 1 200 kg 以上^[1-2],是粮田的 2-4 倍^[3]。以我国最大的设施蔬菜生产基地——山东寿光为例,仅化学氮肥的年投入量就高达每公顷 1 272 kg^[4]。除肥料过量投入外,设施菜田灌溉水投入量也很高。比如,设施番茄每年水分投入量在 1 100 mm 以上^[5]。过量水肥投入为土壤氮素反硝化过程提供了底物和条件,定会对该过程产生深刻影响。反硝化过程是土壤最重要的氮素转化过程之一。首先,作为氮素一条损失途径,它与氮素利用效率紧密相连。其次,在高湿高肥土壤中,反硝化过程也是 NO 和 N_2O 等重要痕量气体主要生物排放源^[6]。

反硝化过程主要包括 $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ 等四步还原过程,每一步都在不同种类酶的催化下还原^[7],其中亚硝酸还原酶(Nitrite reductase, Nir)和氧化亚氮还原酶(Nitrous oxide reductase, Nos)的研究备受关注。因为 Nir 首次将离子态的氮化合物转变成气态,而 Nos 的功能则可将 N_2O 催化还原为无害的 N_2 ,完成了反硝化过程的最后一步^[8]。Nir 有两种类型,分别是 cd1 型还原酶和铜型还原酶,由 *nirS* 和 *nirK* 结构基因编码^[9]。Nos 则由 *nosZ* 结构基因进行编码^[8]。目前发现约 1/3 有能力进行反硝化过程的微生物,缺少 *nosZ*,这将会影响 N_2O 还原成 N_2 ,产生较高的 $\text{N}_2\text{O}/\text{N}_2$ ^[10]。

水肥投入一方面通过为反硝化菌提供条件和底物影响着反硝化的进行;另一方面也会通过改变反硝化菌落结构影响反硝化过程。通过 DGGE 方法,一个长期定位试验显示,不同种类有机或无机肥料会显著改变 *nosZ* 型反硝化菌的结构^[8]。然而,目前尚缺乏随着反硝化菌结构的改变,其功能也发生改变的研究^[11]。此外,设施菜田长期的高氮投入会降低 C/N 比^[2],导致碳氮比例失调,因此通过添加高碳氮比的秸秆,希望可以调节土壤的碳氮平衡,促进 N 的固定。然而,这一过程是否会改变反硝化菌的结构和功能,目前尚不清楚。本研究目的希望通过长期定位试验,了解设施菜田不同碳氮管理对反硝化菌(含 *nirS*、*nirK* 和 *nosZ*)的结构和功能的影响,为设施菜田合理的碳氮管理提供理论支撑。

1 材料与方 法

1.1 试验点概况

试验点位于山东省寿光市罗家行政村(36°55'N, 118°45'E)。该地区年平均降雨和温度分别为 558 mm 和 12.4 °C。试验温室是我国北方传统冬温式型,即由高 3.5 m 的后墙和两侧依次降低到 1 m 的侧墙组成。水泥柱和上层竹架构成棚架,上面覆盖乙烯-醋酸乙烯复合膜。试验点土地面积为 655 m² (长 7.8 m×宽 84 m)。该试验是一个长期定位试验,始于 2004 年 2 月,每年种植两季番茄。试验初期的土壤表层容重 1.44 g/cm³,全氮为 1.37 g/kg,

NO_3^- -N 为 $112 \mu\text{g/g}$, 有机碳含量为 10.6 g/kg , 速效钾和速效磷均为 $299 \mu\text{g/g}$ 。有关试验点的更多细节可参考 Ren 等研究^[12]。

1.2 主要仪器和试剂

FastPrep[®] 核酸快速提取仪, 美国 BIO 101[®] System 公司; Dcode 基因突变检测系统检测, 美国 Bio-Rad 公司; ABI 3130 自动测序仪, 美国 ABI 公司; 碳氮分析仪, vario MACRO CN; 连续流动分析仪, TRACCS2000, 德国 SEAL 公司; 气相色谱, 美国 Agilent, GC-6820; 自动连续在线培养监测体系, Robot 系统, 挪威生命科学大学研发^[13]。土壤 DNA 提取试剂盒 Fast DNA SPIN Kit for Soil, 美国 Q-BIO gene 公司; DNA 凝胶回收试剂盒, 北京蓝翌公司; 灌胶使用 TH-300 梯度混合器, 上海沪西分析器厂有限公司; 抽真空-充氮气系统, 北京帅恩科技公司。

葡萄糖、硝酸钾、氯霉素、氯化钾、乙酸钠、氯化镁、乙醇等均为分析纯, 购自西陇化工; 去离子甲酰胺(99.5%), 购自美国 Sigma 公司; Taq DNA 聚合酶, 购自 TaKaRa 公司。

1.3 试验布置与样品采集

试验主要包括以下 4 个处理: (1) 空白处理(CK), 不施用有机肥和化学氮肥; (2) 农民传统施肥处理(CN), 在冬春季和秋冬季番茄移栽前, 分别施用风干鸡粪 8 t/hm^2 和 10 t/hm^2 (约含 146 kg N/hm^2 和 211 kg N/hm^2) 作为基肥。尿素作为追肥随灌溉水施用, 每次用量 120 kg N/hm^2 , 冬春季共 6 次, 秋冬季共 5 次; (3) 减氮处理(RN), 有机肥施用和传统处理相同。追肥时期和次数和传统一致, 但每

次用量为 50 kg N/hm^2 ; (4) 减氮加秸秆处理(RN+S), 有机肥和尿素的施用和减氮处理一致, 但在每季番茄移栽前, 4 t/hm^2 粉碎成 5–10 cm 的小麦秸秆(每季节约含 30 kg N/hm^2) 被翻耕到土壤中。每次灌溉量约为 50 mm, 每个处理的磷肥和钾肥施用量分别为 $180 \text{ kg P}_2\text{O}_5/\text{hm}^2$ 和 $460 \text{ kg K}_2\text{O}/\text{hm}^2$ 。每个小区尺寸为 $7.8 \text{ m} \times 5.6 \text{ m}$, 每个处理 3 次重复。

在 2010 年 5 月 9 日取各小区表层 0–20 cm 土壤 300 g 左右, 过 2 mm 筛后, 放入封口袋于 4°C 和 -20°C 储藏。经过 6 年的长期定位试验, 各处理的基本理化性质发生一定的改变, 见表 1。

1.4 土壤微生物的提取和功能基因的 PCR 扩增

土壤微生物总 DNA 利用土壤 DNA 提取试剂盒, 按照试剂盒步骤提取, 随后将洗脱液放入 -20°C 储藏。

nirK 的扩增引物对为 *nirK1F* 和 *nirK5R*, 其中 *nirK5R* 的 5'端用 6-羧基荧光素标记, 扩增片段大小约为 515 bp; *nirS* 扩增引物对为 *nirS1F* 和 *nirS6R*, 其中 *nirS1F* 的 5'端用 6-羧基荧光素标记, 扩增片段大小约为 890 bp^[15]。50 μL 体系(TaKaRa 公司)包括 5 μL 10 \times PCR 缓冲液, 4 μL dNTPs (2.5 mmol/L), 2 μL MgCl_2 (15 mmol/L), 2.5 U Taq DNA 聚合酶, 引物各 1 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), 提取的 DNA 模板 0.5 μL , 其余的用灭菌高纯水补齐。*nirK* 的 PCR 反应程序为: 94°C 4 min; 94°C 45 s, 53°C 45 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 10 min。*nirS* 扩增程序为 94°C 4 min; 94°C 1 min, 54°C 1 min, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 7 min。

表 1 不同处理 0–20 cm 土层土壤的基本化学性质

Table 1 Soil characteristics of 0–20 cm soil layer under different treatments

处理 Treatment	有机碳 Organic C (g/kg)	有机氮 Organic N (g/kg)	铵态氮含量 NH_4^+ -N content ($\mu\text{g/g}$)	硝态氮含量 NO_3^- -N content ($\mu\text{g/g}$)	pH
CK	8.9 \pm 0.5	1.2 \pm 0.0	6.1 \pm 0.3	22.3 \pm 1.3	7.56 \pm 0.2
RN	11.1 \pm 0.5	1.6 \pm 0.1	7.1 \pm 0.9	70.6 \pm 13.5	7.52 \pm 0.0
RN+S	12.3 \pm 0.5	1.7 \pm 0.2	5.8 \pm 0.2	57.6 \pm 9.1	7.52 \pm 0.1
CN	12.2 \pm 0.3	1.7 \pm 0.1	5.7 \pm 0.9	107.0 \pm 15.5	6.93 \pm 0.2

注: CK 和 CN 处理的基本化学性质来自宋贺等^[14]。

Note: Data of the soil characteristics under CK and CN treatments from Song et al^[14].

nosZ 的扩增引物对为 *nosZ-F* 和 *nosZ1622R*, *nosZ1622R* 的 5'端处夹一个 33 bp 的 GC 夹: 5'-GGCGGCGCGCCCGCCCGCCCGCCCGCGTCGCCC-3', 扩增片段约为 453 bp^[16-17]。50 μ L 体系与 *nirK* 和 *nirS* 扩增体系基本相同。PCR 扩增程序采用降落式: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 59 $^{\circ}$ C 40 s (每个循环减少 0.5 $^{\circ}$ C), 72 $^{\circ}$ C 1 min, 10 个循环; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 54 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.5 种群结构的末端限制性片段多态性(T-RFLP)分析

nirK 和 *nirS* 的 PCR 产物选用 DNA 凝胶回收试剂盒, 按试剂盒步骤切胶回收纯化。选用限制性内切酶 *Hha* I 和 *Hae* III 分别对 *nirS* 和 *nirK* 的 PCR 纯化产物进行酶切。酶切体系: 17 μ L PCR 纯化产物, 2 μ L 10 \times Loading buffer, 1 μ L 内切酶。在 37 $^{\circ}$ C 条件下 *nirS* 酶切 5 h, *nirK* 酶切 3 h。

PCR 酶切产物加入 2 μ L 乙酸钠溶液(pH 5.2) 和 40 μ L 无水乙醇, 在 -20 $^{\circ}$ C 过夜。14 000 \times g 离心 15 min, 弃上清后加入 70 μ L 70%的冰乙醇, 14 000 \times g 离心 8 min, 风干 10 min。取 1 μ L PCR 酶切纯化产物加入含 8.8 μ L 去离子甲酰胺和 0.2 μ L ROX 1000 内标混合液中, 随后上机测定酶切片段大小(美国 ABI 公司)。

1.6 包含 *nosZ* 微生物的变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析

DGGE 分析利用 Dcode 基因突变检测系统检测。配置浓度为 7.0%, 变性梯度为 36%–60%的聚丙烯酰胺凝胶。在灌胶前加入催化剂 APS 30 μ L 和 15 μ L TEMED, 充分混匀后, 使用 TH-300 梯度混合器灌胶。室温条件下聚合 2 h 左右, 待胶板凝固后放入 60 $^{\circ}$ C 的电泳缓冲液中, 每个处理随机取两个重复进行点样, 在 200 V 电压下, 电泳 5 h 后, 用 SYBR Green I 染色 3 次。

1.7 反硝化酶的活性测定

采用乙炔抑制法测定土壤反硝化酶的活性^[18]。取 25 g 鲜土放入 250 mL 的培养瓶中, 加入 25 mL

包含浓度为 1 mmol/L 葡萄糖、1 mmol/L 硝酸钾和 1 g/L 的氯霉素^[19]。用橡胶塞密封, 氮气反复冲洗 3 次后(真空-洗气系统, 北京帅恩科技公司), 注入 12 mL 的乙炔气体。分别在 30 min 和 60 min 后抽取气体 15 mL, 用气相色谱测量 N₂O 浓度并计算反硝化酶活性。

1.8 NO/(NO₃⁻+NO₂⁻)和 N₂O/(N₂O+N₂)的产物比

取 12 g 土样放入 120 mL 培养瓶中, 加一个磁力搅拌子, 注入 25 mL 去离子水。随后用含橡胶塞的铝盖密封, 用抽真空-充氮气系统反复冲洗 3 次, 放入 18 $^{\circ}$ C 恒温水浴中培养, 搅拌子每次搅拌 30 s, 停顿 10 s。每个培养瓶注入 1 mL 浓度为 140 mmol/L NO₃⁻-N, 随后用自动连续在线培养监测体系 24 h 后自动进样测定培养瓶中 N₂O、O₂、NO 和 N₂ 等气体的浓度^[14], 随后计算 NO/(NO₃⁻+NO₂⁻)和 N₂O/(N₂O+N₂)的产物比。

1.9 土壤有机碳氮、无机氮含量和 pH 值的测定

土壤有机碳氮含量由碳氮分析仪 (vario MACRO CN) 测定。土壤样品经 1 mol/L KCl 浸提后用连续流动分析仪测定其中 NH₄⁺和 NO₃⁻的含量。pH 值测定的水土比为 5:1, 摇匀静置 1 h 后, 用 pH 计测定。

1.10 数据统计与分析

作图采用 Excel 2007 软件, 数据由 SPSS 11.5 数据分析软件进行单因素方差分析(显著水平为 0.05)。T-RFLP 的图谱用分析软件 Genemaper 4.0 完成。利用 Canoco for Windows 4.5 的主成分分析 (PCA) 方法分析反硝化菌的样品分布, 并用典范对应分析 (CCA) 分析结构变化与土壤理化耦合。用 Quantity One 软件 (Bio-Rad) 对 DGGE 产物条带进行分析。多样性指数 (H') 的计算公式如下:

$$H' = -\sum P_i \ln P_i$$

其中, P_i 是各样品中单一条带的强度占有条带总强度的比率 (DGGE) 或单个 T-RFs 峰高占总 T-RFs 峰高的比率 (T-RFLP)。图表中显示的数据为各处理的平均值 \pm 标准误。

2 结果与分析

2.1 反硝化功能基因 *nirK* PCR 扩增产物的 T-RFLP 分析

从图 1 可以看出,设施菜田土壤中,*nirK* 型反硝化菌优势种群数量较为丰富,为 7–10 种,其中 154 bp T-RFs 丰度最高,在 43%–58%之间。不同碳氮处理对 *nirK* 型反硝化菌的种群结构的影响不尽相同。与空白相比,施肥处理显著降低了 154 bp T-RFs 的相对丰度,传统处理下降最大,其相对丰度为 43%,添加秸秆处理和减氮处理没有显著差异。与 154 bp T-RFs 的相对丰度变化相反,随着施氮量的增多 62 bp T-RFs 的相对丰度呈现增加趋势。与不施肥的空白和减氮处理相比较,传统施肥处理土壤有 133、214 和 249 bp T-RFs 新的优势种群出现,这可能说明随着氮肥投入的增加,*nirK* 型反硝化菌的优势种群多样性有增加的趋势。此外,与减氮处理相比,添加秸秆后,133 bp T-RFs 的优势种群开始出现。

2.2 反硝化功能基因 *nirS* PCR 扩增产物的 T-RFLP 分析

与 *nirK* 型反硝化菌优势种群数量相比,设施菜田土壤中 *nirS* 型反硝化菌优势种数略低,为 6

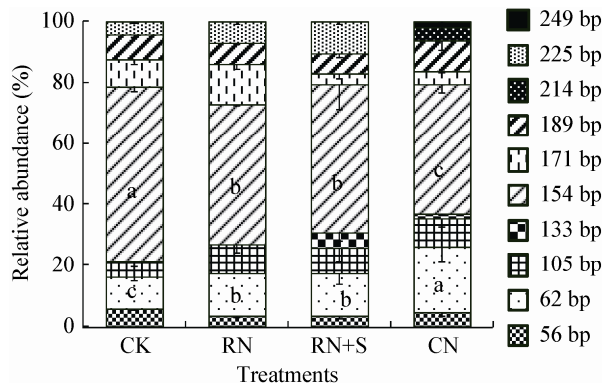


图 1 不同碳氮处理下 *nirK* 型反硝化细菌种群 T-RFLP 图谱

Figure 1 T-RFLP analyses targeting the functional gene *nirK* of denitrifiers under different C and N treatments

注:图中每个优势种上不同字母表示在处理之间差异显著 ($P < 0.05$).

Note: Different small letters for a dominant species are significantly different at the 0.05 level.

种,其中 97 bp T-RFs 丰度最高,占 50%–59% (图 2)。在所有处理中,各优势种群之间没有显著性的差异,也没有新的优势种群出现,由此说明与 *nirK* 型反硝化菌相比,*nirS* 型反硝化菌受施肥的影响较小。

2.3 反硝化功能基因 *nosZ* PCR 扩增产物的 DGGE 分析

利用引物对 *nosZ-F* 和 *nosZ1622R* 扩增功能基因 *nosZ* 后进行变性梯度凝胶电泳分离,结果见图 3。图 3 中显示长期不同碳氮管理条件下的 *nosZ*

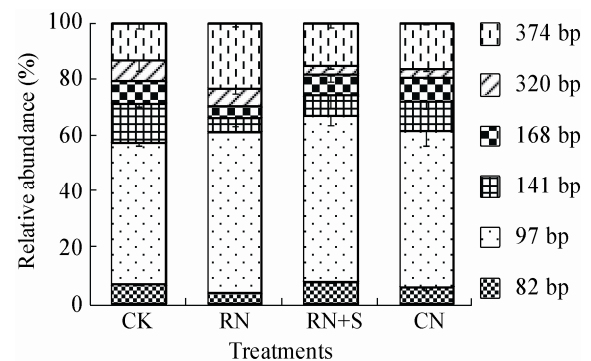


图 2 不同碳氮处理下 *nirS* 型反硝化细菌种群 T-RFLP 图谱

Figure 2 T-RFLP analyses targeting the functional gene *nirS* of denitrifiers under different C and N treatments

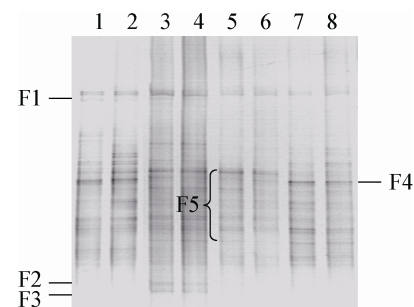


图 3 不同碳氮处理下 *nosZ* 型反硝化细菌种群 DGGE 图谱

Figure 3 DGGE analyses targeting the functional gene *nosZ* for denitrifiers under different C and N treatments

注:1、2:空白对照;3、4:减氮处理;5、6:传统处理;7、8:减氮加秸秆处理。

Note: 1, 2: Control; 3, 4: Reduced N treatment; 5, 6: Conventional N treatment; 7, 8: Reduced N plus straw (RN+S) treatment.

表 2 不同碳氮处理对反硝化菌多样性的影响

Table 2 Effects of different C and N treatments on the Shannon-Weaver of denitrifier community

处理 Treatment	<i>nirS</i> 型反硝化细菌多样性 Shannon-Weaver diversity indices of <i>nirS</i> -denitrifiers	<i>nirK</i> 型反硝化细菌多样性 Shannon-Weaver diversity indices of <i>nirK</i> -denitrifiers	<i>nosZ</i> 型反硝化细菌多样性 Shannon-Weaver diversity indices of <i>nosZ</i> -denitrifiers
CK	1.41±0.18a	1.41±0.02b	2.72±0.01b
RN	1.20±0.54a	1.60±0.01ab	2.92±0.00a
RN+S	1.25±0.06a	1.60±0.14ab	2.62±0.01b
CN	1.30±0.58a	1.68±0.01a	2.44±0.01c

注：表上不同字母表示在处理之间差异显著($P<0.05$)。

Note: Different small letters are significantly different at the 0.05 level.

型反硝化细菌种群结构产生了一定的差异,一些有新的优势种群出现,比如空白处理 F1 条带,减氮施肥的 F2、F3 条带以及减氮加秸秆的 F4 条带。此外,与空白处理相比,减氮处理的 *nosZ* 型反硝化细菌的优势种群数量较高,但是随着施肥量的增加,传统处理条件下, *nosZ* 型反硝化细菌优势种群数量有减少的趋势,主要集中在 F5 区,而添加秸秆后数量有增加趋势。

2.4 反硝化微生物群落多样性分析

从表 2 可以看出,不同的碳氮管理对 3 种不同类型反硝化菌优势种群多样性的影响不尽相同。*nirS* 型反硝化菌的优势种群多样性较为稳定,受碳氮投入影响较小。与不施肥的空白相比,传统处理会显著增加 *nirK* 型反硝化菌优势种群的多样性。与前两种反硝化菌相比, *nosZ* 型反硝化细菌多样性受碳氮管理的影响较大。与空白相比,减氮处理会增加 *nosZ* 型反硝化菌优势种群的多样性,但施氮量更大的传统处理的多样性却显著下降。添加小麦秸秆处理的 *nosZ* 型反硝化菌多样性与减氮或传统处理相比差异显著。

2.5 反硝化酶的活性分析

从图 4 可知,长期不同碳氮管理对反硝化酶活性造成了一定的差异。空白处理的反硝化酶活性最低,显著低于施肥处理的,这可能与长期不施用有机肥有关。添加小麦秸秆处理的反硝化酶活性最高。传统处理的反硝化酶活性和减氮处理没有显著差别,说明施用无机氮肥可能不会显著改变土壤反

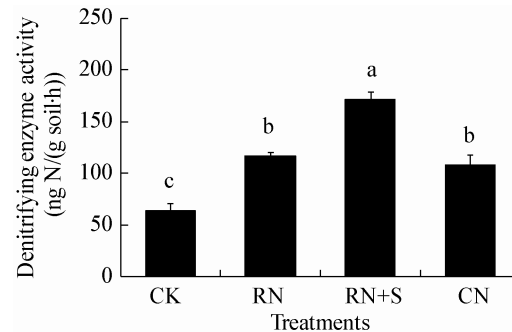


图 4 不同碳氮处理对土壤反硝化酶活性的影响

Figure 4 Effects of different C and N treatments on denitrification enzyme activities

注：表上不同字母表示在处理之间差异显著($P<0.05$)。

Note: Different small letters are significantly different at the 0.05 level.

硝化酶的活性。

2.6 $N_2O/(N_2O+N_2)$ 和 $NO/(NO_3^-+NO_2^-)$ 产物比测定

$N_2O/(N_2O+N_2)$ 和 $NO/(NO_3^-+NO_2^-)$ 的产物比在一定程度上反映 Nos 和 Nir 活性的强弱。从图 5 可知,传统施肥处理 $N_2O/(N_2O+N_2)$ 的比率最高,显著高于其他 3 个处理。减氮处理次之,添加秸秆后 $N_2O/(N_2O+N_2)$ 的比率显著性下降,下降水平和不施肥的空白处理相当。而 $NO/(NO_3^-+NO_2^-)$ 产物比的分析中,传统处理显著高于其它几个处理,而其它处理之间差异不显著。

2.7 *nirK* 和 *nosZ* 反硝化菌群主成分分析和典型对应分析

从图 6 可以看出,不同处理间反硝化菌群结构

存在显著差异:首先对于 *nirK* 型菌群(图 6A)来说,传统处理聚在第 1、4 象限,而其他几个处理主要聚在第 2、3 象限;对于 *nosZ* 型菌群(图 6B)来说减氮处理聚在第 3 象限,空白聚在第 1、4 象限,而传统和添加秸秆处理主要聚在第 2 象限。对 *nirK* (图 7A)和 *nosZ* (图 7B)反硝化菌群组成与土壤因子的 CCA 分析结果表明,土壤理化性质显著影响反硝化菌的优势种群的结构,其中有机碳氮和 NO_3^- 对反硝化菌的影响表现出较强一致性,而 pH 的影响较为专一, NH_4^+ 的影响较小。

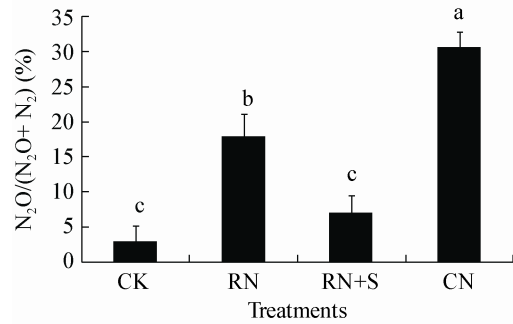


图 5 不同碳氮处理对 $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2)$ 产物比的影响
Figure 5 Effects of different C and N treatments on $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2)$ ratios

注: 表上不同字母表示在处理之间差异显著 ($P < 0.05$).

Note: Different small letters are significantly different at the 0.05 level.

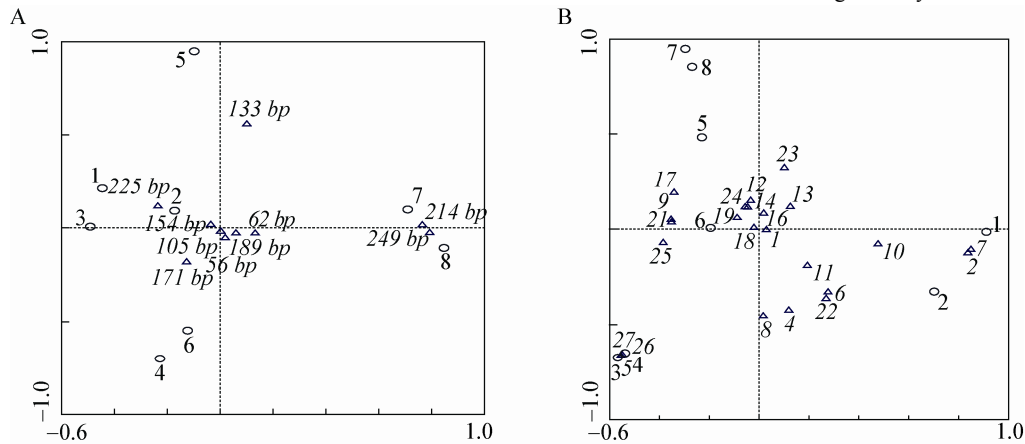


图 6 *nirK* (A)和 *nosZ* (B)反硝化菌群主成分分析

Figure 6 Principal component analysis of communities of *nirK* (A) and *nosZ* (B) denitrifiers

注: ○: 1、2: 空白对照; 3、4: 减氮处理; 5、6: 减氮加秸秆处理; 7、8: 传统处理. △1-25: *nosZ*-反硝化菌条带.

Note: ○: 1, 2: Control; 3, 4: Reduced N treatment; 5, 6: Reduced N plus straw treatment; 7, 8: Conventional N treatment. △1-25: Bands of *nosZ*-denitrifiers.

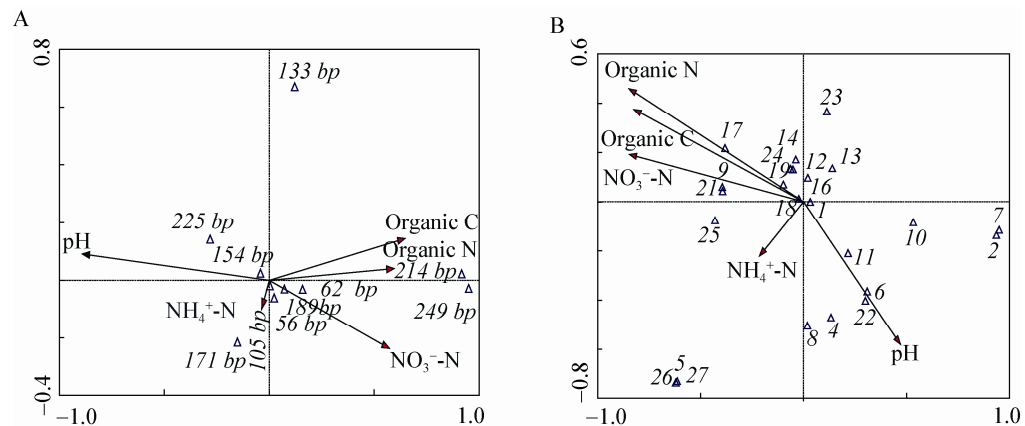


图 7 *nirK* (A)和 *nosZ* (B)反硝化菌群组成与土壤因子的 CCA 分析

Figure 7 Canonical correspondence analysis for communities of *nirK* (A), *nosZ* (B) denitrifiers and soil factors

注: ○: 1、2: 空白对照; 3、4: 减氮处理; 5、6: 减氮加秸秆处理; 7、8: 传统处理. △1-25: *nosZ*-反硝化菌条带.

Note: ○: 1, 2: Control; 3, 4: Reduced N treatment; 5, 6: Reduced N plus straw treatment; 7, 8: Conventional N treatment. △1-25: Bands of *nosZ*-denitrifiers.

3 讨论

我国设施蔬菜种植面积已高达 334.7 万 hm^2 , 其产值占整个蔬菜总产值的 51%, 逐步成为蔬菜生产的主导产业^[20-21]。但设施菜田普遍过量的水肥投入, 威胁了周边环境和土壤质量安全^[22]。合理的碳氮管理显得尤为重要, 但目前尚不知土壤功能微生物在结构和功能方面对碳氮管理是如何响应的。本研究发现不同的碳氮管理对反硝化菌结构和功能产生一定的影响(图 7)。对含亚硝酸盐还原酶的反硝化菌来说, 农民长期的传统施肥管理影响了 *nirK* 型反硝化菌的结构和优势种群多样性(图 6A 和表 2), 显著降低了丰度最大的 154 bp T-RFs 菌种的丰度(图 1)。研究表明, 并非所有的 *nir* 型反硝化菌都对反硝化过程起作用, 起主要作用的取决于丰度最大的反硝化菌^[23]。154 bp T-RFs 菌群丰度的显著下降可能会影响亚硝酸盐还原酶活性。与 *nirK* 型反硝化菌相比, *nirS* 型反硝化菌结构和多样性的变化较小(图 2 和表 2), 这与 Yoshida 等^[24]的研究类似, 其结果发现尽管这两类反硝化菌功能相近, 但与 *nirK* 型反硝化菌相比, *nirS* 型菌群结构相对稳定, 受环境影响较小。在功能上, 我们发现农民传统施肥处理下 $\text{NO}/(\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-)$ 产物比显著高于其它 3 个处理(图 8), 而该产物比一定程度上反映亚硝酸盐还原酶活性强弱, 这可能与 *nirK* 型菌群落结构改变有关。与传统施肥处理相比, 减氮处理和添加秸秆处理可以显著降低肥料投入对 154 bp T-RFs *nirK* 型菌种丰度的影响(图 1), 并降低 $\text{NO}/(\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-)$ 产物比(图 8), 这将对调控反硝化进程, 降低 NO 排放风险起到至关重要的作用。

为研究含氧化亚氮还原酶的反硝化菌, 我们选用高效引物对 *nosZ-F* 和 *nosZ1622R* 对其功能基因 *nosZ* 进行扩增, 该引物对已被证明可在多种环境中把 28 种反硝化菌种的 25 种特异地扩增出来^[16]。从图 3 和图 6B 可以看出, 不同的碳氮投入对 *nosZ* 型反硝化细菌的优势菌群和功能也产生了一定的影响。农民传统施肥处理可以显著降低 *nosZ* 型反硝化菌的多样性(图 3 和表 2), 并导致最高的

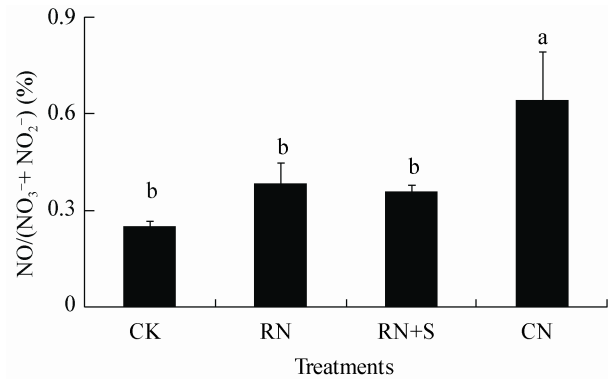


图 8 不同碳氮处理对 $\text{NO}/(\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-)$ 产物比的影响
Figure 8 Effects of different C and N treatments on $\text{NO}/(\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-)$ ratios

注: 表上不同字母表示在处理之间差异显著($P < 0.05$)。

Note: Different small letters are significantly different at the 0.05 level.

$\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O} + \text{N}_2)$ 产物比(图 5)。由此说明设施菜田的长期过量氮肥投入, 不但可以通过提供过量底物增加 N_2O 排放量, 更会通过改变 *nosZ* 型反硝化菌结构和提高土壤本身固有的 $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O} + \text{N}_2)$ 比例来增加 N_2O 排放, 这将会导致设施菜田有着惊人的 N_2O 排放量。事实上, 我们研究发现设施菜田农民传统施肥下 N_2O 的年排放高达 $19.9 \text{ kg N}/\text{hm}^2$ (未发表数据), 是粮田的 5 倍以上^[25-26]。但目前尚不清楚 *nosZ* 型反硝化菌结构和功能的改变是由长期过量施用氮肥直接影响的, 还是通过因过量施氮造成的土壤酸化间接影响的, 因为 Dambreville 等^[27]研究表明土壤 pH 下降后, *nosZ* 型菌的多样性会明显降低, 这需要更加深入的研究。

与传统处理相比, 减氮处理可以显著增加 *nosZ* 型反硝化菌的多样性(图 3 和表 2), 并降低 $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O} + \text{N}_2)$ 产物比(图 5), 但减氮处理并没有显著改变反硝化酶的活性(图 4), 由于反硝化酶的活性代表着潜在的反硝化速率, 由此说明, 减氮处理不会影响氮素反硝化转化效率, 但可以降低 N_2O 在反硝化终产物中的比例。在高氮投入的设施菜田, 碳氮比会严重失调^[2], 高碳氮比的小麦秸秆投入可能会对土壤氮素的转化产生一定的影响。本研究发现, 与减氮和传统处理相比, 添加小麦秸秆处

理的 *nosZ* 型反硝化菌结构和多样性发生了显著性的变化(表 2、图 3 和图 6B), 并会显著降低 $N_2O/(N_2O+N_2)$ 产物比(图 5)。目前认为秸秆降低 $N_2O/(N_2O+N_2)$ 产物比, 主要是因为一方面秸秆分解过程会增加无机态氮的微生物固持, 进而降低了硝态氮含量, 减少 N_2O 排放^[28], 另一方面碳源的添加为反硝化菌提供了更多的能量把 N_2O 还原成 N_2 ^[29]。但事实上, 反硝化微生物群落结构的改变也应该成为一个重要的影响因素予以考虑。此外, 添加秸秆处理会显著提高反硝化酶的活性(图 4), 可以推测, 菜田中添加高碳氮比的小麦秸秆会降低 $N_2O/(N_2O+N_2)$ 产物比, 同时也会提高反硝化氮素转化效率, 降低 NO_3^- 淋洗风险。

综上所述, 设施菜田传统的施肥管理会改变反硝化菌的结构和功能, 增加土壤自身的 NO 排放能力, 而减弱了 N_2O 还原为 N_2 的能力, 此外该管理下土壤中 NO_3^- 严重过量, 将进一步提高 NO 和 N_2O 排放风险。减氮处理和添加秸秆处理下反硝化菌的结构与传统施肥相比差异显著, 并会显著降低 NO 和 N_2O 排放风险。秸秆的添加还会促进反硝化潜在速率, 降低菜田 NO_3^- 淋洗风险。

参 考 文 献

- [1] Zhu JH, Li XL, Christie P, et al. Environmental implications of low nitrogen use efficiency in excessively fertilized hot pepper (*Capsicum frutescens* L.) cropping systems[J]. Agriculture, Ecosystems and Environment, 2005, 111(1): 70-80.
- [2] 王敬国. 设施菜田退化土壤修复与资源高效利用[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2011: 1-18.
- [3] Guo JH, Liu XJ, Zhang Y, et al. Significant acidification in major Chinese croplands[J]. Science, 2010, 327(5968): 1008-1010.
- [4] 刘兆辉, 江丽华, 张文君, 等. 山东省设施蔬菜施肥量演变及土壤养分变化规律[J]. 土壤学报, 2008, 45(2): 296-302.
- [5] Song H, Guo JH, Ren T, et al. Increase of soil pH in a solar greenhouse vegetable production system[J]. Soil Science Society of America Journal, 2012, 76(6): 2074-2082.
- [6] He FF, Jiang RF, Chen Q, et al. Nitrous oxide emissions from an intensively managed greenhouse vegetable cropping system in Northern China[J]. Environmental Pollution, 2009, 157(5): 1666-1672.
- [7] Schepers JS, Raun W. Nitrogen in agricultural systems[M]. Madison: ASA-CSSA-SSSA, 2008: 197-249.
- [8] Philippot L, Hallin S, Schlote M. Ecology of denitrifying prokaryotes in agricultural soil[J]. Advances in Agronomy, 2007, 96: 250-287.
- [9] Bothe H, Ferguson SJ, Binaldo S, et al. Biology of the nitrogen cycle[M]. Newton: Elsevier, 2007: 37-55.
- [10] Philippot L, Andert J, Jones CM, 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.
- [11] Enwall K, Philippot L, Hallin S. Activity and composition of the denitrifying bacterial community respond differently to long-term fertilization[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(6): 8335-8343.
- [12] Ren T, Christie P, Wang JG, et al. Root zone soil nitrogen management to maintain high tomato yields and minimum nitrogen losses to the environment[J]. Scientia Horticulturae, 2010, 125(1): 22-33.
- [13] Molstad L, Dörsch P, Bakken LR. Robotized incubation system for monitoring gases (O_2 , NO , N_2O , N_2) in denitrifying cultures[J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 71(3): 202-211.
- [14] 宋贺, 徐新超, 王敬国, 等. 设施菜田土壤剖面中的反硝化特征[J]. 植物营养与肥料学报, 2012, 18(4): 860-867.
- [15] Braker G, Fesefeldt A, Witzel KP. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(10): 3769-3775.
- [16] Kloos K, Mergel A, Rosch C, et al. Denitrification within the genus *Azospirillum* and other associative bacteria[J]. Australian Journal of Plant Physiology, 2001, 28(9): 991-998.
- [17] Throbäck IN, Enwall K, Jarvis A, et al. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 49(3): 401-417.
- [18] Page AL, Miller RH, Keeney DR. Methods of soil analyses. part 2. Chemical and Microbiological Properties[M]. Madison: American Society of Agronomy, 1982: 1011-1026.
- [19] Šimek M, Cooper JE, Pícek T, et al. Denitrification in arable soils in relation to their physico-chemical properties and fertilization practice[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2000, 32(1): 101-110.
- [20] 张真和. 我国蔬菜产业发展中的问题与对策[J]. 中国农业科技导报, 2001, 3(4): 57-60.
- [21] 张真和, 陈青云, 高丽红, 等. 我国设施蔬菜产业发展对策研究(上)[J]. 蔬菜, 2010, 5: 1-4.
- [22] 董章杭. 山东省寿光市集约化蔬菜种植区农用化学品使用及其对环境的影响的研究[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2006.
- [23] Wertz S, Dandie CE, 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.

- [24] Yoshida M, Ishii S, Otsuka S, et al. *nirK*-harboring denitrifiers are more responsive to denitrification-inducing conditions in rice paddy soil than *nirS*-harboring bacteria[J]. *Microbes and Environments*, 2010, 25(1): 45-48.
- [25] Cui F, Yan GX, Zhou ZX, et al. Annual emissions of nitrous oxide and nitric oxide from a wheat-maize cropping system on a silt loam calcareous soil in the North China Plain[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2012, 48(3): 10-19.
- [26] Ding WX, Cai Y, Cai ZC, et al. Nitrous oxide emissions from an intensively cultivated maize-wheat rotation soil in the North China Plain[J]. *Science of the Total Environment*, 2007, 373(2/3): 501-511.
- [27] Dambreville C, Hallet S, Nguyen C, et al. Structure and activity of denitrify community in a maize-cropped field fertilized with composted pig manure or ammonium nitrate[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2006, 56(1): 119-131.
- [28] Paul EA. *Soil microbiology, ecology, and biochemistry*[M]. Oxford: Academic Press, 2007: 341-361.
- [29] Mathieu O, L  veque J, H  nault C, et al. Emissions and spatial variability of N₂O, N₂ and nitrous oxide mole fraction at the field scale, revealed with ¹⁵N isotopic techniques[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2006, 38(5): 941-951.

科技信息摘录

微生物的导电功能再获力证

十年前,马萨诸塞大学阿姆赫斯特分校的微生物学家德里克·莱吾利和他的同事曾提出,一种名为“地杆菌属(*Geobacter*)”的微生物能够产生细微的电流导线(即微生物纳米导线),但这一科学假设长期以来陷入争论和质疑之中。现在,新的成像技术为该假设提供了比以往任何时候都强的证据。

莱吾利团队在最新一期的《自然—纳米科技》杂志上报告称,他们用静电驱动显微镜(EFM)证明,电荷确实会沿着微生物的纳米导线蔓延,正如电子能在高导电性人工材料碳纳米管中流动一样。

EFM 是用来展示电子如何在材料中运动的。马塞诸塞大学物理学家尼克希尔·马尔万科、斯贝尔·爱贝瑞·耀歆和马克·托米尼与莱吾利合作得出了这一发现。“当我们将电子注入到微生物纳米线的一个点,整个灯丝被点燃了,因为电子沿着纳米导线在传播和蔓延。”马尔万科说。

现在在太平洋西北国家实验室工作的耀歆补充说:“这种现象与你在碳纳米管或者其他高导电性纳米合成材料中看到的相同,连电荷的密度都可以与之媲美。这是 EFM 成像技术第一次应用在生物蛋白质学科上。”

据介绍,地杆菌属纳米导线是一种蛋白质丝状物,它能够像金属状复合物导线一样传递电子,但这个假设始终受到质疑。“这种物质的导电性在不同的温度和酸碱度的变化中都能被清晰地看到,但是仍然有很多生物学家对此表示质疑。”据物理学家组织网 10 月 20 日(北京时间)报道,为了增加对假设的支持,莱吾利的实验室调整了纳米导线的结构,移除了芳香族氨基酸,反而受到了更多的质疑。但是 EFM 最终不负众望,提供了关键证据。

莱吾利说:“纳米导线能让地杆菌属在土地中的钢铁或其他材料中生存,能极大地改变土壤的化学组成,在环境净化中扮演非常重要的角色。纳米导线是地杆菌属微生物的关键组成部分,这种微生物在适应微生物传感器和生物计算机设备中,具有与众不同的能力。”

托米尼说:“这个发现为蛋白质层面的纳米电子学提供了全新的发展机会。”

莱吾利和同事的微生物纳米导线,是一种潜在的绿色电子部件,用全新的无毒材料制成。目前正在开发的一个应用是,将地杆菌属微生物放到电导体中来探测环境污染物;另一个则是研发基于这种微生物的微生物计算机。

——摘自《科学网》2014-10-25

<http://news.sciencenet.cn/htmlpaper/2014102210473114634795.shtm>