

设施菜田与棚外粮田土壤菌群和反硝化气体产生的比较分析

田浩¹ 杨柳青² 曹文超² 王芸¹ 朱莹¹ 陈冠舟¹ 赵立平¹ 王敬国² 张晓君^{1*}

(1. 上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 上海 200240)

(2. 中国农业大学 资源与环境学院 北京 100193)

摘要: 【目的】对比设施菜田与棚外粮田土壤菌群以及 N₂O 产生模式的差异。【方法】采用变性梯度凝胶电泳(DGGE)和反硝化功能基因(*nirS*, *nosZ*)方法分别比较两种土壤细菌群落以及功能基因类群丰度的差异, 利用自动连续在线培养监测体系(Robot 系统)测定两种土壤在好氧、厌氧阶段 N₂O 等反硝化相关气态产物产生模式, 分析 N₂O/(N₂+N₂O+NO)产物比。【结果】设施菜田与棚外粮田具有不同的土壤细菌群落结构, 并且土壤细菌总量得到了显著的提升, 然而两种反硝化功能基因(*nirS*, *nosZ*)丰度并没有显著变化。与设施菜田相比, 棚外粮田有相对低的 N₂O 积累量以及产物比, 并且在厌氧初期气体产生模式有所不同。培养后铵态氮和亚硝态氮含量上升。【结论】设施菜田长期有别于棚外粮田的管理方式造成了土壤细菌群落的显著改变, 增大了活跃微生物总量, 造成土壤酸化, 并导致 N₂O 在气态产物中的比例升高。设施菜田土壤微生物进行了与棚外粮田不同的硝酸盐呼吸过程, 异化硝酸盐还原成铵(DNRA)过程有可能贡献了两种土壤的部分厌氧 N₂O 产生量。

关键词: 日光温室, 反硝化菌, 细菌群落, 氧化亚氮, 异化硝酸盐还原成铵

Comparison of microbial communities and denitrifying gases emissions between the soils from a greenhouse and nearby farmland

TIAN Hao¹ YANG Liu-Qing² CAO Wen-Chao² WANG Yun¹ ZHU Ying¹
CHEN Guan-Zhou¹ ZHAO Li-Ping¹ WANG Jing-Guo² ZHANG Xiao-Jun^{1*}

(1. State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences & Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

(2. School of Resource and Environment, Chinese Agriculture University, Beijing 100193, China)

Abstract: [Objective] The soil microbial communities and N₂O emissions were compared between soil samples from a vegetable greenhouse and outside farmland. [Methods] Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and quantitative PCR were used to investigate the difference of soil microbial

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 41230856, 21177086)

*通讯作者: Tel: 86-21-34204878; 信箱: xjzhang68@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2014-12-21; 接受日期: 2015-02-05; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-03-11

communities and functional gene abundance, respectively. A robotized incubation system was employed to analyze the gaseous products of denitrification and calculate the ratio of $N_2O/(N_2+N_2O+NO)$. **[Results]** Significant differences were observed in soil bacterial communities between the two soils. The total number of bacteria in the greenhouse soil was higher than that of farmland. However, relative abundance of functional genes (*nirS* and *nosZ*) of the two types of soil was no significant difference. There were lower N_2O accumulation and $N_2O/(N_2+N_2O+NO)$ ratio in the farmland soil compared to the greenhouse soil. In addition, the patterns of gas emissions in the two soils were significantly different in the early stage of anaerobic incubation. DNRA might lead to the increase of ammonium nitrogen content after the anaerobic incubation. **[Conclusion]** The higher strength of fertilization in greenhouse soil resulted in significant changes in soil bacterial communities and higher active soil microbial mass, N_2O accumulation and $N_2O/(N_2+N_2O+NO)$ ratio. The soils from a greenhouse and a farmland, of which the greenhouse soil came from, have distinct nitrate respiration property. DNRA may be responsible for certain amounts of N_2O emissions in both soils.

Keywords: Solar greenhouse, Denitrifier, Microbial community, Nitrous oxide, DNRA

为了满足日益增长的蔬菜市场需求,各地建设了大批的设施蔬菜生产基地,而这类生产方式因其高水肥投入的特点,造成了土壤质量衰退、氮素投入大量损失和以 N_2O 为代表的土壤温室气体排放量增加等环境问题^[1]。粮田土壤在改造成为设施菜田之后,土壤理化水文特性均有深刻的改变。雷宝坤等调查发现设施菜田中土壤碳、氮含量相对附近粮田有所增加,但同时碳氮比和土壤 pH 下降,氮磷钾养分富集、有盐渍化趋势^[2]。Zhou 等利用稀释涂布法、Biolog 系统以及脂肪酸分析研究了不同来源的未耕作土及 6 种菜田的土壤微生物群落多样性,发现番茄菜田的微生物群落特征与其他土地有显著的不同,不同农田系统中的土壤微生物群落与土壤地球化学元素、湿度和有机质等显著相关^[3]。Lin 等研究了土壤由水稻-小麦轮作体系转为设施菜田后的土壤微生物特征,发现随着土壤酸化以及盐分积累,微生物活性显著降低,微生物量和磷脂总量也有了大幅下降^[4]。这些研究加深了人们对设施菜田土壤退化问题的担忧。

另一方面,很多研究已报道了高投入的设施菜田土壤具有氧化亚氮气体排放量高的特征^[5-6]。氧化亚氮(N_2O)是一种强有力的温室气体,它的温室效应是同分子 CO_2 的约 300 倍。在过去一百年间,随着工农业的发展排放量急剧升高,它对全球气候变化的影响不容忽视。据估计平均每年土壤过程贡献了

56%–70% 的全球 N_2O 排放($10.3-12.8 \text{ Tg N/a}$)^[7]。 N_2O 的来源与微生物代谢过程密不可分。设施菜田的施肥管理方式对土壤微生物及其功能具有显著的影响。宋贺等对寿光设施菜棚的定位实验指出,减氮(RN)以及添加秸秆处理(RN+S)相对传统施肥处理(CN)显著改变了两类反硝化基因的结构,并且降低了 NO 以及 N_2O 在反硝化产物中的比例^[5]。Min 等对比了江苏宜兴设施菜田与当地同源小麦-大米轮作粮田的年度 N_2O 排放量,发现传统施肥管理的设施菜田 N_2O 排放量(8.1 kg/hm^2)是同源粮田(1.13 kg/hm^2)的 7 倍以上^[8]。然而,粮田改变用途为设施菜棚后,其土壤的菌群结构与微生物功能会发生怎样的变化,相关的对比研究报道较少,尤其是这种改造如何影响土壤的反硝化能力及 N_2O 产生模式还未见报道。因此,本研究对一个新改造的设施菜棚的土壤与棚外粮田同源土壤细菌数量和结构进行了比较,还测定了两种土壤分别在厌氧和好氧条件下培养时产生的气体动力学特征,以及在该培养过程中土壤氮的转化。本研究揭示了两种不同管理模式对土壤的菌群反硝化能力的影响,探讨了设施菜田 N_2O 排放的机制。

1 材料与方法

1.1 试验点概况

本实验的样品采集地点在山东省寿光市古城街道罗庄村($36^{\circ}55'N$, $118^{\circ}45'E$)。2004 年建成第一

代蔬菜大棚, 2012年翻新升级为第二代蔬菜大棚。该棚每年种植两季番茄。棚内的土壤来自该棚周围种植小麦的粮田。棚内土壤和棚外粮田的土壤理化性质见表1。

1.2 主要仪器

DGGE电泳使用Dcode电泳系统, 美国Bio-Rad公司; Light cyclor 96定量PCR仪, 瑞士Roche公司; 气相色谱, 美国Agilent公司(GC-7890A); 自动连续在线培养检测体系, Robot系统, 挪威生命大学研发^[9]。真空氮气清洗系统, 上海金城公司。

1.3 试验田土壤管理方式及土壤样本采集

设施菜田传统施肥处理(CN)的土壤管理方式: 在每季番茄移栽前, 投入风干鸡粪作为有机肥, 施用量分别为秋冬季 146 kg N/hm²、冬春季 211 kg N/hm²。随后进行翻耕。追肥时间根据作物的生长发育情况决定, 每次施用尿素量约 120 kg N/hm², 每次灌溉量约为 50 mm, 磷、钾肥施用量分别是 180 kg P₂O₅/hm² 和 460 kg K₂O/hm²。小区面积为 7.8 m×5.6 m, 3次田间重复。

棚外粮田(FM)土壤管理方式: 在播种前, 施入 375 kg/hm² 磷酸氢二铵作为底肥, 相当于 80 kg N/hm²。追肥时间根据作物的生长发育情况决定, 每次施用尿素量约为 70 kg N/hm², 每次灌溉量约为 30 mm。

土壤采集于2013年3月14日进行, 此时菜田已施用鸡粪, 处在第一次灌溉后与第二次灌溉之间, 是全年N₂O排放高峰期^[10]。使用五点混合法取传统施肥各小区和棚外粮田表层0-20 cm土壤100 g左右, 过2 mm筛, 用于DGGE分析的土样储存于-80℃。用于土壤培养的土样避光储存于4℃。

1.4 土壤DNA提取以及PCR扩增

土壤总DNA提取采用Griffiths等^[11]的方法, DNA样本经过琼脂糖凝胶电泳验证片段长度, 微量紫外分光光度计(Biodrop)检测DNA纯度及总量。

土壤总菌16S rRNA基因V3区特异性扩增引物为: 上游引物P3 (5'-CGCCCCGCCGCGCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGAGGCAGCAG-3')和下游引物P2 (5'-AATACCGDGGCTGDTGG-3')^[12], 其中P3引物包括序列为5'-CGCCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCGGGGGCACGGGGGG-3'的40 bp GC夹。具体体系以及程序参考Huang等^[13]研究。

土壤总菌特异性扩增引物为: Uni331F (5'-TCC TACGGGAGGCAGCAGT-3')和Uni797R (5'-GGAC TACCAGGGTATCTAATCCTGTT-3')^[14], 目的片段长度约466 bp。20 μL定量PCR扩增反应体系: 模板DNA 20 ng, 2×Mix (含Taq酶) 10 μL, 引物各0.5 μmol/L, 用无菌水补齐体积。扩增反应程序: 95℃ 3 min; 95℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 60 s, 80℃读板收集荧光信号, 共40个循环; 95℃ 5 s, 随后从65℃以每循环0.5℃递增到95℃。

反硝化细菌nirS基因特异性扩增引物为: nirS-cd3A (5'-AACGYSAAGGARACSGG-3')和nirS-R3Cd (5'-GASTTCGGRTGSGTCTTSAYGAA-3')^[15], 目的片段长度约为473 bp。20 μL定量PCR扩增反应体系: DNA 20 ng, 2×Mix (含Taq酶) 10 μL, 引物各0.5 μmol/L, 用无菌水补齐体积。扩增反应程序: 95℃ 3 min; 95℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 30 s, 80℃读板收集荧光信号, 共40个循环; 95℃ 5 s, 随后从65℃以每循环0.5℃递增到95℃。

表1 设施菜田与棚外粮田0-20 cm土壤的基本理化性质

Table 1 Characteristics of soils from greenhouse soil and farmland in 0-20 cm layer

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 (mg/kg)	硝态氮含量 NO ₃ ⁻ -N (mg/kg)	亚硝态氮含量 NO ₂ ⁻ -N (mg/kg)	pH
CN	14.0±0.3	1.70±0.10	0.63±0.10	86.6±4.9	2.68±0.20	6.15±0.00
FM	13.2±0.1	0.86±0.30	0.48±0.00	32.0±2.5	2.21±0.40	7.77±0.10

反硝化细菌 *nosZ* 基因特异性扩增引物为：*nosZ-2f* (5'-CGCRACGGCAASAAGGTSMSSGT-3') 和 *nosZ-2r* (5'-CAKRTGCAKSGCRTGGCAGAA-3')^[16]，目的片段长度约为 267 bp。20 μ L 定量 PCR 扩增反应体系：DNA 20 ng，2×Mix (含 *Taq* 酶) 10 μ L，引物各 0.5 μ mol/L，用无菌水补齐体积。扩增反应程序：95 $^{\circ}$ C 3 min；95 $^{\circ}$ C 30 s，58 $^{\circ}$ C 30 s，72 $^{\circ}$ C 60 s，80 $^{\circ}$ C 读板收集荧光信号，共 40 个循环；95 $^{\circ}$ C 5 s，随后从 65 $^{\circ}$ C 以每循环 0.5 $^{\circ}$ C 递增到 95 $^{\circ}$ C。

用细菌 16S rRNA 基因(27F/1492R)^[17]和反硝化细菌 *nirS* 基因(*nirS-cd3A/nirS-R3Cd*)、*nosZ* 基因(*nosZ-2f/nosZ-2r*)引物对土壤总 DNA 进行 PCR 扩增^[18]，将对应的扩增产物割胶纯化回收。纯化产物采用 pGEM-T Easy vector (Promega)连接后，转化到 DH5 α 感受态细胞(北京全式金生物技术有限公司)中，以含 Amp 抗生素(50 mg/L)以及表面涂布有 100 μ L 0.1 mol/L IPTG 和 25 μ L 0.05 g/mL X-Gal 的 LB 平板 37 $^{\circ}$ C 培养后，挑选阳性克隆。提取阳性克隆质粒，送英潍捷基公司测序验证后，测定质粒 DNA 的浓度并制备定量 PCR 标准曲线。

1.5 土壤细菌 16S rRNA 基因 V3 区变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析

取 300 ng PCR 产物于变性剂梯度范围为 33%–54%，浓度为 8%的聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳，电泳条件为：恒温 60 $^{\circ}$ C，1×TAE 缓冲液，电压 200 V，时间 240 min。结束后用 SYBR green I 染色，凝胶成像系统拍照。

1.6 土壤培养实验设计

取两种土样各 10 g 放入 120 mL 血清瓶中，每组 3 个重复，随后在瓶口加上橡胶塞和铝盖进行密封。放入 20 $^{\circ}$ C 恒温水浴中培养，使用 ROBOT 系统^[9]自动采集分析各瓶中气体浓度。培养 80 h 后，取出血清瓶，利用真空氮气清洗系统将瓶内气体置换为氮气，随后立即放回 ROBOT 系统继续测定，其中厌氧阶段的最初 1 h，采气间隔为 18 min；1 h 后采气间隔约为 4.5 h。整个培养采样持续时间

为 300 h。

1.7 土壤无机氮含量和 pH 值测定

土壤硝态氮、铵态氮的测定方法参考《土壤农化分析》^[19]；土壤亚硝态氮测定方法按照国标 HJ634-2012 方法，简要操作步骤如下：称取过筛的土壤 10.00 g 于 200 mL 的聚乙烯瓶中，加入 50 mL 氯化钾溶液(2 mol/L)，调节 pH 值至 8.0。20 \pm 2 $^{\circ}$ C 恒温振荡提取 20 min。转移大约 40 mL 提取液于 50 mL 聚乙烯离心管中，在 3 000 r/min 条件下进行离心分离 5 min。然后将上清液转移至 50 mL 三角瓶中待用。同时做空白实验，以亚硝酸盐标准液建立标准曲线，也可参考文献[20]。pH 值测定的水土比为 5:1，摇匀静置 1 h 后，用 pH 计测定。

1.8 土壤反硝化气体释放测定

采集的顶空气体通过蠕动泵导入到气相色谱仪进行气体组分分析。气相色谱检测条件为：载气流量 He (99.999%) 4.110 mL/min，柱温 50 $^{\circ}$ C，CO₂ 和 N₂ 经 Haysep Q 柱预分离后分别进入 PLOT 和 Molsieve 柱后采用热传导检测器(250 $^{\circ}$ C)检测，N₂O 经 Haysep Q 和 PLOT 柱后采用电子捕获检测器(330 $^{\circ}$ C)检测。同时在 NO Analyzer 中得到 NO 浓度数据。随后将气体浓度数据换算成每瓶内气体体积累量，再计算两种土样 N₂O/(NO+N₂O+N₂)的产物比。

1.9 数据统计与分析

利用 Quantity one 进行 DGGE 胶的数字化，数据采用 SPSS 21.0 进行单因素方差分析(显著水平为 0.05)以及土壤菌群主成分(PCA)分析。作图采用 OriginPro 8.5，图表中数据格式为：平均值 \pm 标准误。

2 结果与分析

2.1 细菌群落的 DGGE 指纹图谱比较

细菌 16S rRNA 基因 V3 区的特异性引物 DGGE 电泳图谱结果如图 1A 所示。棚内传统施肥的土壤与棚外粮田土壤图谱带型有显著区别，除了部分主要条带丰度与棚外粮田接近外，菜田土壤出现了多条新的主要条带。同一种土壤的细菌群落测定重复性较好。主成分分析(图 1B)结果表明，棚外粮

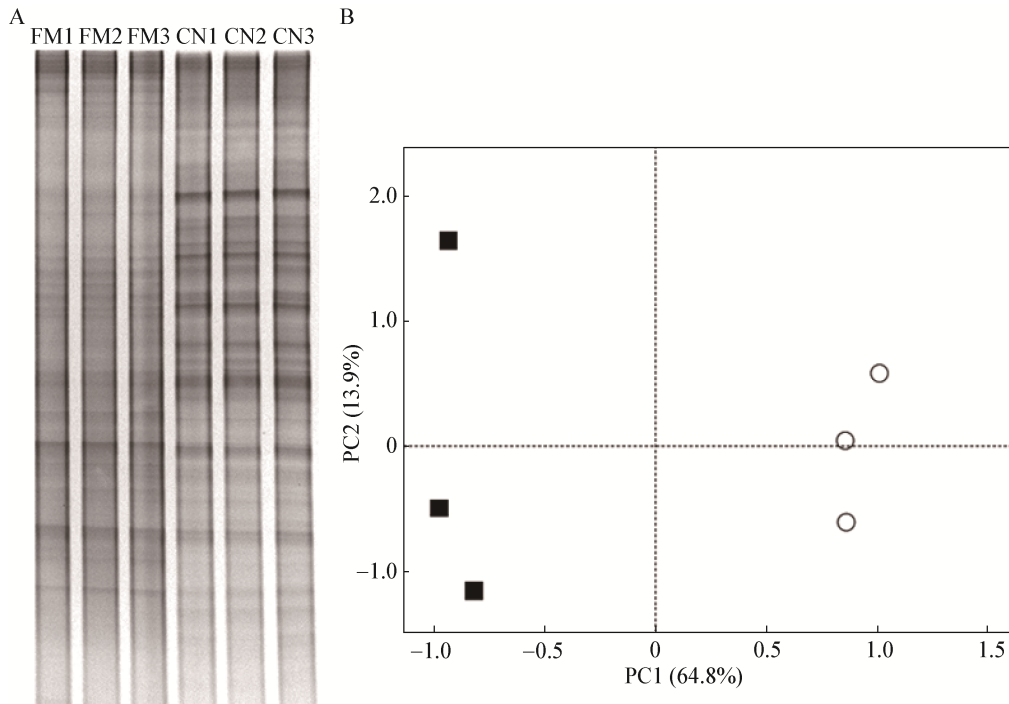


图1 棚外粮田与设施菜田 16S rRNA 基因 DGGE 指纹图谱(A); 棚外粮田与棚内菜田细菌群落 DGGE 指纹图谱带型的主成分分析(B)

Figure 1 DGGE gel profile for 16S rRNA gene of farmland and greenhouse soil (A), denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns of soil bacterial communities in different soil origin (B)

注: FM1, FM2, FM3: 棚外粮田(FM); CN1, CN2, CN3: 传统施肥组(CN). ○: 棚外粮田土壤样品(FM); ■: 棚内菜田土壤样品(CN).

Note: FM1, FM2, FM3: Farmland (FM); CN1, CN2, CN3: Conventional N treatment (CN). ○: Farmland (FM); ■: Greenhouse (CN).

田样品与棚内菜田样品在 PC1 方向分成两簇, 而棚内菜田样品在 PC2 方向上有所分开, 但并不显著。结果表明土地利用方式的改变, 使得土壤细菌群落的组成发生了变化。

2.2 细菌总量和功能基因定量分析结果

2.2.1 两种土壤细菌总量分析: 细菌 16S rRNA 基因的定量 PCR 分析结果如表 2 所示。标准曲线的 $R^2=0.994$, 扩增效率为 98%。棚内菜田土壤细菌总量显著高于棚外粮田土壤, 这表示高强度水肥投入和适宜且恒定的温度促进了棚内土壤细菌的生长。

同时还测定了两种土壤样品在好氧条件下和厌氧条件下微生物呼吸形成的 CO_2 积累量, 结果如图 2A 所示, 无论是好氧还是厌氧状态, 棚内菜田土壤的 CO_2 积累量均高于棚外粮田土壤。此结

果从另外一个侧面反映了两种土壤微生物数量的差异。

2.2.2 *nirS*/16S rRNA、*nosZ*/16S rRNA 比值分析: 利用定量 PCR 的方法测定了反硝化基因 *nirS* 和 *nosZ* 的基因拷贝数, 并利用这两种功能基因与总菌数量的比值表示细菌群落中反硝化基因的相对丰度。反硝化细菌 *nirS* 荧光定量 PCR 的标准曲线的 $R^2=0.999$, 扩增效率为 93%; *nosZ* 基因荧光定量 PCR 的标准曲线的 $R^2=0.998$, 扩增效率为 88%。如表 2 所示, 棚外粮田 *nirS* 和 *nosZ* 基因相对丰度与棚内菜田相比并没有显著差异。从粮田改为菜田后, *nirS* 和 *nosZ* 基因相对丰度并未受到土地利用方式的显著影响。另外, *nirS* 在整体菌群中占有较高比例 (10%以上) 而 *nosZ* 比例较低 (不足 3%)。

表 2 棚外粮田与棚内菜田土壤细菌数量与两种反硝化基因相对丰度的比较
Table 2 Quantity of bacteria and relative abundance of *nirS* and *nosZ* gene in two types of soil

土样 Soil samples	细菌总数($\times 10^9$ 拷贝/克干土) Total amount of bacterial ($\times 10^9$ copies/g dry soil)	<i>nirS</i> 基因相对丰度(<i>nirS</i> /16S rRNA) Relative abundance of <i>nirS</i> gene (<i>nirS</i> /16S rRNA)	<i>nosZ</i> 基因相对丰度 $\times 10$ (<i>nosZ</i> /16S rRNA) Relative abundance of <i>nosZ</i> gene $\times 10^{-1}$ (<i>nosZ</i> /16S rRNA)
FM	6.00 \pm 0.84 a	0.16 \pm 0.04 a	0.24 \pm 0.03 a
CN	42.30 \pm 9.98 b	0.24 \pm 0.03 a	0.25 \pm 0.05 a

注: 不同字母 a、b 表示在处理之间差异显著($P < 0.05$)。

Note: Different small letters (a or b) represent significantly difference at the P value of 0.05 level.

2.3 培养过程中 CO_2 和反硝化气体的生成

为了了解两种土壤在有氧和无氧条件及其条件转变过程中的呼吸与反硝化气体的形成特征, 对两种土壤进行了培养实验。前 80 h 为有氧条件, 之后转变为厌氧条件。培养过程中气体浓度的测定结果表明, 棚内菜田的 CO_2 产生量较大(图 2A); 棚外粮田土壤在好氧阶段 CO_2 产生速率和产生量均较小, 但在厌氧阶段的前 5 h, CO_2 产生速率远高于棚内菜田土壤, 而随后产生速率趋小, 约 24 h 后 CO_2 总积累量小于棚内菜田土壤(图 2B)。

N_2O 浓度的测定结果如图 3A 所示。好氧阶段均未检测到 N_2O 产生, 转入厌氧阶段后, 棚内菜田土壤以较快的速度产生了最多的 N_2O 气体; 棚外粮田土壤的 N_2O 产生速率和总量明显较低。棚内菜田土壤的产生速率约为棚外粮田土壤产生速率的 10 倍。这表明棚内菜田土壤 N_2O 产生能力相对于棚外粮田有了显著的提升。棚外粮田土壤在整个厌氧阶段瓶内 NO 浓度持续上升, 而棚内菜田土壤瓶内 NO 浓度在达到高点后有所下降(图 3B)。棚外农田土壤

在厌氧培养阶段 N_2 积累量高于棚内菜田土壤(图 3C)。两种土壤在厌氧阶段 $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2+\text{N}_2\text{O}+\text{NO})$ 产物比结果(图 3D)显示棚外粮田土壤 $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2+\text{N}_2\text{O}+\text{NO})$ 产物比在整个培养过程中仍显著低于棚内菜田土壤, 说明经过土地利用方式的改变, 菜棚土壤 N_2O 产生能力显著增加。

在厌氧初期, 棚外粮田与棚内菜田的氮素气体排放模式也有很大的区别(图 4)。在前 1 h 内棚外粮田 N_2 排放速率和总量高于棚内菜田(图 4A), 而 N_2O 、 NO 却几乎没有产生(图 4B、C); 相对的, 棚内菜田迅速排放了 N_2O 、 NO 等气体(图 4B、C), 因此 $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2+\text{N}_2\text{O}+\text{NO})$ 产物比也高于棚外粮田(图 4D)。

2.4 土壤无机氮素含量和 pH 变化

两种土壤在培养后亚硝态氮均有显著的提升(表 3), 尤其是棚外粮田土壤在培养结束后亚硝态氮含量达到 30.39 ± 2.01 mg/kg 干土, 是培养前的 14 倍以上。两种土壤的铵态氮含量在培养后均有显著增加(表 3), 特别是棚内菜田铵态氮含量增加较多。

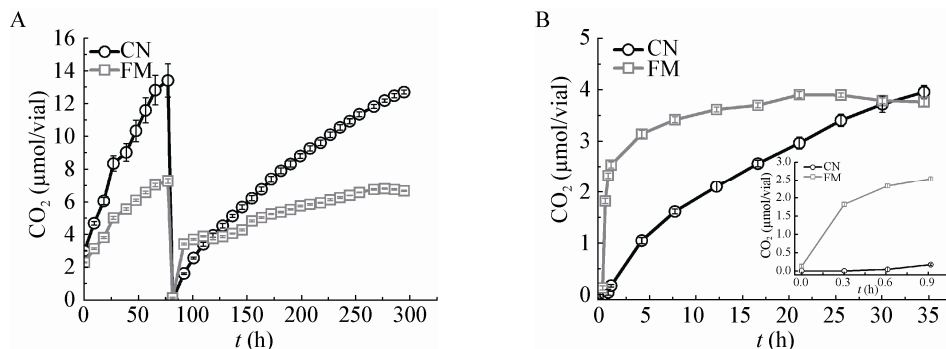


图 2 粮田与菜田土壤培养过程中的 CO_2 排放(A)及厌氧阶段前 35 h 内 CO_2 排放(B)

Figure 2 CO_2 revolution of two types of soil during the incubation process (A) and first 35 hours of anaerobic incubation (B)

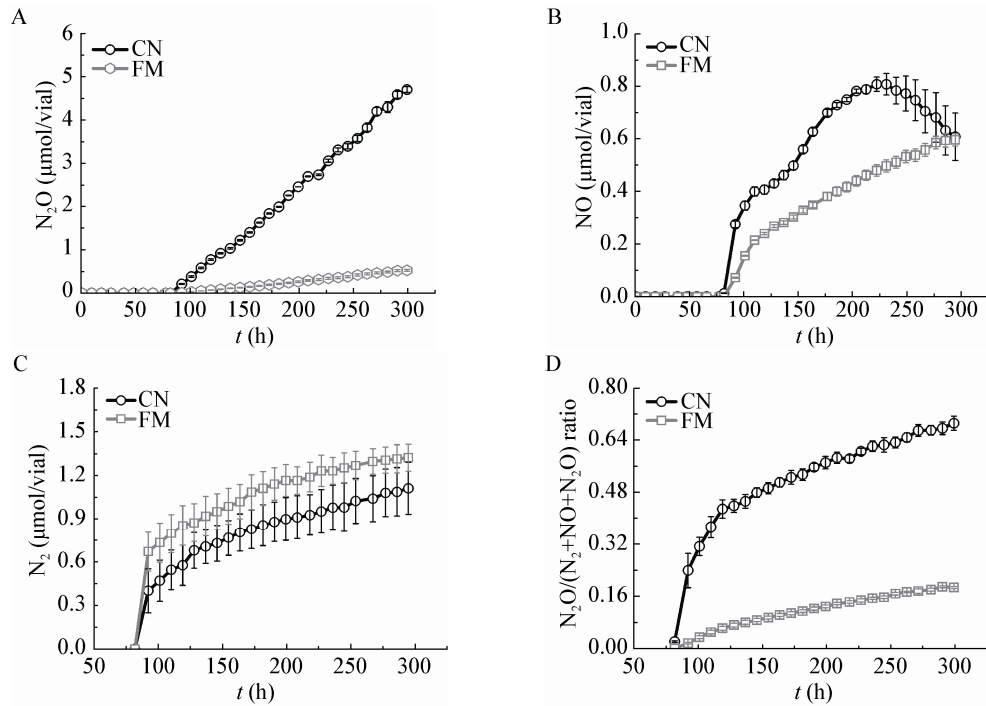


图3 土壤培养过程中反硝化气体的产生

Figure 3 Gas evolution of two types of soil during the incubation

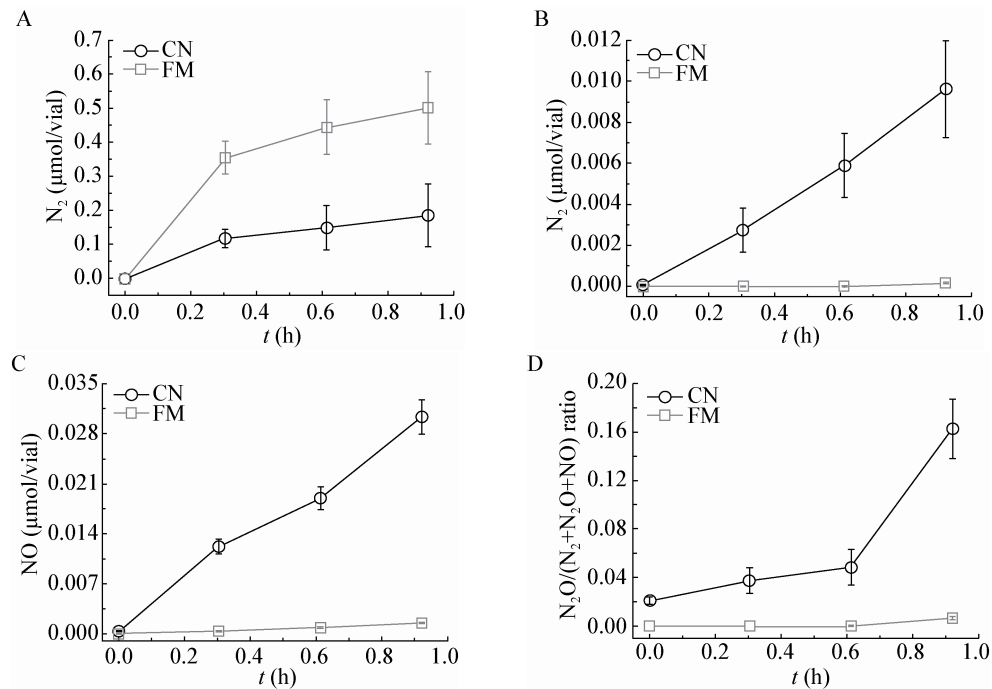
Note: A: N_2O ; B: NO ; C: N_2 ; D: $N_2O/(N_2+N_2O+NO)$.

图4 厌氧培养阶段前1 h反硝化气体的产生

Figure 4 Gas evolution of two types of soil during the first 1 hour of anaerobic incubation including N_2 (A), N_2O (B), NO (C) and $N_2O/(N_2+N_2O+NO)$ ratio (D)

表3 培养前后各土壤亚硝态氮、铵态氮以及 pH 值的变化
Table 3 Changes of NO_2^- -N, NH_4^+ -N content and pH value before and after the incubation

土样 Soil samples	亚硝态氮含量 NO_2^- -N content (g/kg)		铵态氮含量 NH_4^+ -N content (g/kg)		pH 值 pH value	
	培养前	培养后	培养前	培养后	培养前	培养后
	Before incubation	After incubation	Before incubation	After incubation	Before incubation	After incubation
CN	2.68±0.23 a	4.03±0.29 b	0.63±0.07 a	4.87±0.05 b	6.15±0.01 a	6.46±0.03 b
FM	2.21±0.42 a	30.39±2.01 b	0.48±0.04 a	2.70±0.29 b	7.77±0.11 a	7.68±0.03 a

注: 不同字母 a、b 表示在相同处理培养前后之间差异显著($P < 0.05$)。

Note: Different small letters (a or b) represent significantly difference at the P value of 0.05 level.

棚外粮田初始 pH 为 7.77 (表 3), 属于微碱性土壤, 培养结束后略有降低。棚内菜田土壤 pH 在培养前为 6.15, 培养实验结束后, 菜棚土壤 pH 有了显著的提升, 接近中性。

3 讨论

寿光菜田土壤日益衰退, 大量硝酸盐淋洗入地下水, 严重威胁着生态环境的稳定和食物供给的可持续发展^[21]。土壤的持续酸化也加快了温室气体如 N_2O 的排放趋势^[22], 为了缓解其衍生的一系列生态问题, 许多研究聚焦于田间碳氮管理。宋贺等对本研究所用的同一实验田研究表明, 通过降低氮素投入和施用秸秆, N_2O 排放和硝酸盐淋洗问题得到了改善^[5]。然而土壤管理影响土壤微生物活性的机制尚缺乏深入研究。

与棚外粮田相比, 菜田土壤细菌群落组成显著不同、细菌总量较高; 尽管这种差异并未影响 *nirS* 和 *nosZ* 基因在两种土壤整体群落中的相对丰度, 但反硝化基因的表达量可能不同, 如 Uchida 等对长期干旱土壤淹水带来的脉冲式 N_2O 排放的研究发现, 这种 N_2O 排放仅在 RNA 水平上与反硝化功能基因 (*nirK*、*nirS* 以及 *nosZ*) 的丰度显著相关^[23]。

土壤 CO_2 产生反映了土壤有机质的降解的速度^[24]。本研究结果发现, 虽然两种土壤有机碳含量差别不大, 棚内菜田土壤的 CO_2 产生显著大于棚外粮田土壤的产生, 表明了该土壤较高的微生物活性。棚内适宜微生物生长的气温、高施肥量以及频繁的土壤干湿交替, 相应改变了土壤微生物主导的

地球化学元素循环过程^[25]。如棚外粮田亚硝态氮含量显著增高、棚外粮田与棚内菜田土壤的气体产生模式有很大的区别。特别地, 我们发现在有氧条件转变为厌氧条件的早期, 棚外粮田土壤的 CO_2 和 N_2 产生速率和总量与棚内菜田土壤有显著不同的模式。菜田土壤微生物可以主动适应突发的厌氧胁迫, 其反硝化酶系能在外界氧化还原态改变的同时迅速激活, 利用好氧呼吸时积累的大量 NADH 维持反硝化过程的进行, 以确保自身厌氧呼吸的正常进行^[26], 然而硝酸盐呼吸过程相关的碳代谢酶系的从头合成使得 CO_2 排放推迟。对在醋酸盐含量有限的连续培养系统中生长的 *Alcaligenes faecalis* 的研究表明, 自好氧转入厌氧状态, N_2O 排放也同时开始, 并且在一定时间保持稳定速率, 然而 CO_2 产量以及菌体含量却下降^[27]; 相对地, 粮田土壤微生物对突发厌氧胁迫响应是被动的, 由于 Nir 以及 Nor 等反硝化下游酶系激活迟缓^[28], 为了维持正常的厌氧呼吸, 绝大多数土壤微生物不得利用产能效率较差, 但激活较早的 Nar 还原酶将土壤硝态氮还原为亚硝态氮^[26]。这种策略造成了较大的 NADH 缺口, 此时微生物可以通过快速矿化土壤碳素以保证足够的 NADH 进入硝酸盐呼吸链产生质子梯度^[29], 因此粮田土壤在厌氧初期表现为快速的 CO_2 排放及 NO 、 N_2O 的零排放和土壤亚硝态氮的大量累积。两种土壤的响应模式的不同可能与它们的细菌群落结构差异密切相关。

另一方面, $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2+\text{N}_2\text{O}+\text{NO})$ 产物比表明, 棚

内菜田微生物在厌氧条件下产生了更高比例的 N_2O 气体, 这暗示经过高水肥投入, 棚内土壤在厌氧条件下 N_2O 还原能力有所下降, 这可能与大棚菜田有较低的 pH 有关。例如, Qin 等的研究表明土壤的酸化能够导致氧化亚氮还原酶的活性降低^[30]; Bergaust 等发现 *Paracoccus denitrificans* 细菌的氧化亚氮还原酶在较低 pH 下酶的组装困难, 因而导致酶活性的低下^[31]。

此外, 铵态氮数据表明, 棚内菜田土壤可能进行了更高水平的异化硝酸盐还原成铵过程 (DNRA), 而这个过程由于不能将 N_2O 进一步还原为 N_2 , 因此也导致 N_2O 积累^[32], 但 DNRA 在我们所研究的土壤 N_2O 生成中的贡献率还需要进一步确认。

综上所述, 设施菜田长期有别于棚外粮田的管理方式造成了两者土壤细菌群落的显著差异, 提升了土壤细菌总量, 并且导致土壤 pH 的改变, 因而有了更高的厌氧 N_2O 排放和 N_2O 比例。设施菜田土壤微生物进行了与棚外粮田不同的硝酸盐呼吸过程, 同时 DNRA 过程的存在也可能是 N_2O 产生量差异的主要原因之一。

致谢: 感谢挪威生命科学大学的 Lars Bakken 和 Asa Frostegard 教授及 Lars Molstad 先生协助构建 ROBOT 系统。

参 考 文 献

- [1] Shi CY, Zhang FD, Zhang JQ, et al. Change of soil nutrients under greenhouses under long-term fertilization condition[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2006, 9(4): 437-441 (in Chinese)
史春余, 张夫道, 张俊清, 等. 长期施肥条件下设施蔬菜土壤养分变化研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2006, 9(4): 437-441
- [2] Lei BK, Chen Q, Fan MS, et al. Changes of soil carbon and nitrogen in Shouguang intensive vegetable production fields and their impacts on soil properties[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2008, 14(5): 914-922 (in Chinese)
雷宝坤, 陈清, 范明生, 等. 寿光设施菜田碳、氮演变及其对土壤性质的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2008, 14(5): 914-922
- [3] Zhou J, Wang RQ, Guo WH, et al. Soil microbial community diversity and its relationships with geochemical elements under different farmlands in Shouguang, China[J]. Communications in

- Soil Science and Plant Analysis, 2011, 42(9): 1008-1026
- [4] Lin XG, Yin R, Zhang HY, et al. Changes of soil microbiological properties caused by land use changing from rice-wheat rotation to vegetable cultivation[J]. Environmental Geochemistry and Health, 2004, 26(2): 119-128
- [5] Song H, Wang JG, Chen Q. Impacts of different carbon and nitrogen managements on the structure and function of denitrifier community in a greenhouse vegetable cropping system[J]. Microbiology China, 2014, 41(11): 2283-2292 (in Chinese)
宋贺, 王敬国, 陈清, 等. 设施菜田不同碳氮管理对反硝化菌结构和功能的影响[J]. 微生物学通报, 2014, 41(11): 2283-2292
- [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] Butterbach-Bahl K, Baggs EM, Dannenmann M, et al. Nitrous oxide emissions from soils: how well do we understand the processes and their controls?[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2013, 368(1621): 20130122
- [8] Min J, Zhao X, Shi WM, et al. Nitrogen balance and loss in a greenhouse vegetable system in southeastern China[J]. Pedosphere, 2011, 21(4): 464-472
- [9] 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
- [10] Song H. Studies on denitrification process and its environmental implications in a greenhouse vegetable cropping system[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China Agriculture University, 2012 (in Chinese)
宋贺. 设施蔬菜生产体系中反硝化过程及环境效应研究[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2012
- [11] Griffiths RI, Whiteley AS, O'Donnell AG, et al. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA-and rRNA-based microbial community composition[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(12): 5488-5491
- [12] Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3): 695-700
- [13] Huang F, Ge L, Zhang B, et al. A fullerene colloidal suspension stimulates the growth and denitrification ability of wastewater treatment sludge-derived bacteria[J]. Chemosphere, 2014, 108: 411-417
- [14] Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, et al. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set[J]. Microbiology, 2002, 148(1): 257-266
- [15] Kandler E, Deiglmayr K, Tschirko 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
- [16] 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
- [17] Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing[A]//Stackebrandt E, Goodfellow M. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics[M]. New York: John Wiley and Sons Ltd., 2011: 115-147
- [18] Eulogio JB, David CG, German T. Determination of denitrification genes abundance in environmental samples[J]. Metagenomics, 2013(2): 1-14
- [19] Bao SD. Agrochemical Soil Analysis[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000: 50-56 (in Chinese)
鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 50-56
- [20] Lu RK. Soil Agricultural Chemical Analysis Method[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 1999: 156-157 (in Chinese)
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, 1999: 156-157
- [21] Tian YQ, Wang JG, Gao LH. Research progress on vegetable soil microbial obstacles in protected cropping systems[J]. China Vegetables, 2013(20): 1-9 (in Chinese)
田永强, 王敬国, 高丽红. 设施菜田土壤微生物学障碍研究进展[J]. 中国蔬菜, 2013(20): 1-9
- [22] Qu Z, Wang J, Almøy T, et al. Excessive use of nitrogen in Chinese agriculture results in high $N_2O/(N_2O+N_2)$ product ratio of denitrification, primarily due to acidification of the soils[J]. Global Change Biology, 2014, 20(5): 1685-1698
- [23] Uchida Y, Wang Y, Akiyama H, et al. Expression of denitrification genes in response to a waterlogging event in a Fluvisol and its relationship with large nitrous oxide pulses[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2014, 88(2): 407-423
- [24] Creamer RE, Schulte RPO, Stone D, et al. Measuring basal soil respiration across Europe: do incubation temperature and incubation period matter?[J]. Ecological Indicators, 2014, 36: 409-418
- [25] Saggat S, Jha N, Deslippe J, et al. Denitrification and $N_2O:N_2$ production in temperate grasslands: processes, measurements, modelling and mitigating negative impacts[J]. Science of the Total Environment, 2013, 465: 173-195
- [26] Bueno E, Mesa S, Bedmar EJ, et al. Bacterial adaptation of respiration from oxic to microoxic and anoxic conditions: redox control[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2012, 16(8): 819-852
- [27] Otte S, Grobden NG, Robertson LA, et al. Nitrous oxide production by *Alcaligenes faecalis* under transient and dynamic aerobic and anaerobic conditions[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(7): 2421-2426
- [28] Holtan-Hartwig L, Dörsch P, Bakken LR. Comparison of denitrifying communities in organic soils: kinetics of NO_3^- and N_2O reduction[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2000, 32(6): 833-843
- [29] Haddock BA, Jones CW. Bacterial respiration[J]. Bacteriological Reviews, 1977, 41(1): 47
- [30] Qin SP, Yuan HJ, Hu CS. et al. Determination of potential N_2O -reductase activity in soil[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2014, 70: 205-210
- [31] Bergaust L, Mao Y, Bakken LR, et al. Denitrification response patterns during the transition to anoxic respiration and posttranscriptional effects of suboptimal pH on nitrogen oxide reductase in *Paracoccus denitrificans*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(19): 6387-6396
- [32] Rütting T, Boeckx P, Müller C, et al. Assessment of the importance of dissimilatory nitrate reduction to ammonium for the terrestrial nitrogen cycle[J]. Biogeosciences, 2011, 8(7): 1779-1791