DOI: 10.5846/stxb201809232072
王玲,李昆,宋雅琦,公勤,李兆华.浅表层水稻土N_2O消耗能力及其与N_2O还原微生物的耦合关系研究.生态学报,2019,39(20): - .
Wang L, Li K, Song Y Q, Gong Q, Li Z H.The N_2O consumption ability in the surface paddy soil layer and its coupling relationship to N_2O reducing microorganisms.Acta Ecologica Sinica,2019,39(20): - .

浅表层水稻土N_2O消耗能力及其与N_2O还原微生物的耦合关系研究

王 玲[1,2],李 昆[1,2],宋雅琦[1],公 勤[1],李兆华[1,2,*]
1 湖北大学资源环境学院,武汉 430062
2 湖北省农村安全饮用水工程技术研究中心,武汉 430062

摘要:土壤不仅能够产生、排放温室气体N_2O,还具有截留、吸收、转化N_2O的能力。土壤消耗N_2O已经成为很重要的一种降低大气N_2O浓度的途径,但目前关于土壤N_2O消耗过程及其微生物调控机制的系统研究较为缺乏。试验以浅表层水稻土柱(0—5cm)为研究对象,通过外源添加N_2O气体研究N_2O迁移通过淹水土柱的动态过程,以及N_2O消耗能力与氧化亚氮还原酶基因丰度变化和其他土壤养分含量变化的联系,揭示浅表层水稻土N_2O消纳量与N_2O还原微生物之间的耦合关系。结果显示,淹水厌氧条件下 5cm 土壤深度外源添加的N_2O迁移通过浅表层土柱后,仅有 7.17—9.80%部分逸散出土表,表明 0—5 cm 淹水水稻土层具有极强的N_2O截留能力(90%以上)而减少N_2O净排放量。排放出土表的N_2O也可被淹水土柱继续吸收消耗,且吸收转化速率随N_2O浓度增加而大幅提高,最高可达到 3896.75μg N m^{-2} h^{-1}。与此同时,土壤 DOC 含量大量消耗,含 *nosZI* 基因的反硝化微生物数量显著增长($P<0.01$),而 *nosZII* 基因丰度的无显著变化。说明高浓度N_2O添加能够促进淹水土壤N_2O吸收消耗能力,此刺激作用可能主要由含 *nosZI* 基因的N_2O还原微生物进行调控。浅表层土壤强大的N_2O吸收消耗功能可进一步深入系统研究,为实践温室气体减排提供理论基础。

关键词:水稻土;淹水厌氧;N_2O消耗;*nosZI*;*nosZII*

The N_2O consumption ability in the surface paddy soil layer and its coupling relationship to N_2O reducing microorganisms

WANG Ling[1,2], LI Kun[1,2], SONG Yaqi[1], GONG Qin[1], LI Zhaohua[1,2,*]
1 *Faculty of Resources and Environmental Science, Hubei University, Wuhan* 430062, *China*
2 *Hubei rural safe drinking water engineering technology research center, Wuhan* 430062, *China*

Abstract: Soil could produce greenhouse gas N_2O and emit it to atmosphere; however, it could be retained, absorbed, and transformed. The N_2O consumption by soil has become a very important way to reduce atmospheric N_2O concentration, but the systematic research on the N_2O consumption process in soil and its microbial regulation mechanism is scarce at present. The surface paddy soil cores (0—5 cm) were incubated under laboratory conditions, by adding exogenous N_2O into the bottom of flooded soil cores, and the dynamics of N_2O diffusion through the soil cores and after transportation were monitored. The links between N_2O consumption ability and the variation of the *nosZ* gene abundance and other soil nutrient contents were explored to reveal the coupling relationship between N_2O consumption and N_2O reducing microorganisms. The results showed that only 7.17—9.80% of the exogenous N_2O added in the 5 cm soil depth escaped the soil surface under anaerobic and submergence conditions, indicating that the flooded 0—5 cm paddy soil layer had a strong N_2O interception

基金项目:中国博士后科学基金项目(2017M622386);国家自然科学基金项目(41807043);湖北省自然基金创新群体项目(2016CFA016)
收稿日期:2018-09-23; **网络出版日期**:2019-00-00
* 通讯作者 Corresponding author.E-mail: zli@ hubu.edu.cn

capacity (over 90%) and reduced N_2O net emissions. The N_2O escaped from the soil surface could also be absorbed and transformed by the submerged soil column, and the consumption rate increased significantly as N_2O increased in the headspace, with a maximum value of 3896.75μg N m^{-2} h^{-1}. At the same time, large quantities of soil DOC were consumed and the number of denitrifying microorganisms containing the *nosZI* gene increased significantly (P <0.01), whereas the abundance of *nosZII* gene did not obviously change. This suggests that the N_2O consumption ability of surface paddy soil cores under anaerobic and flooded conditions could be promoted by high concentrations of N_2O addition, and this stimulation may be mainly regulated by N_2O reducing microorganisms containing the *nosZI* gene, not the *nosZII* gene. The strong ability of N_2O consumption of surface soil needs to be further studied to provide a theoretical basis for the practice of greenhouse gas reduction.

Key Words: paddy soil core; flooded-anaerobic condition; N_2O consumption; *nosZI*; *nosZII*

土壤是大气氧化亚氮(N_2O)排放的重要来源之一,由土壤微生物介导的硝化、反硝化作用是产生N_2O的主要过程[1,2]。然而常规静态箱法监测到的N_2O排放量仅是土壤中N_2O产生与消耗过程综合作用后的动态结果[3]。由于土壤水、土壤孔隙等非生物因素的截留作用以及土壤微生物的还原作用,土壤剖面中产生的N_2O量并不能完全迁移出土壤表面而贡献排放[4,5]。近年来水稻土研究结果显示,无论是淹水状态还是落干过程,N_2O排放可能主要来源于距离土表更近的 0—5 cm 深度的水稻土层[6-8]。但同时 Wang 等研究发现 0—5 cm 深度土层产生的N_2O气体并不能完全排放,高达 90%的N_2O产生量以不同途径消耗损失了[9],因此 0—5 cm 深度土壤N_2O消耗能力值得关注。此外,越来越多的研究监测到土壤N_2O负排放量,在温带和热带区域的自然和耕作生态系统中,N_2O净消纳率在<−1.0 μg N m^{-2} h^{-1}至−207 μg N m^{-2} h^{-1}范围波动[10,11]。全球每年通过土壤作用消耗的N_2O总量不可忽视,土壤消耗N_2O已经成为很重要的一种降低大气N_2O浓度的途径,值得深入探究。

水稻土是一种长期处于淹水缺氧状态中的人工水成土,土壤环境极有利于其反硝化脱氮和N_2O充分还原[12,13]。但目前关于水稻土壤消耗N_2O过程及其微生物调控机制的系统研究较为缺乏。为揭示 0—5 cm 深度水稻土层N_2O消纳量与N_2O还原微生物之间的耦合关系,本研究拟通过微宇宙培养方法对浅表层(0—5 cm)原状水稻土外源添加N_2O气体,测定N_2O迁移通过土柱的动态过程以及无机养分和氧化亚氮还原酶基因(*nosZ* Ⅰ 和 *nosZ* Ⅱ)丰度变化。研究结果将为水稻田温室气体减排提供重要的科学参考。

1 材料与方法

1.1 土样采集与预处理

土样采集自湖南益阳水稻丰产节水节肥试验田(29°08′N, 112°27′E),为多年种植双季稻土壤,土壤类型为河流冲积物母质发育的潮土(土壤质密,可有效防止气体从土壤裂缝泄漏)。采集时间为 2016 年 4 月(翻耕前 2 周),此时田间土壤处于休耕渍水状态。采用随机多点采样法,尽量避免残留主根区域,用自制 PVC 管(d = 17 cm, h = 8 cm)采集多个深度为 0—5 cm 的原状水稻土柱。标注方向后用保鲜膜包裹紧实,带回实验室做后续处理。同时在田间分别多点随机采集 0—5 cm 土样,混匀后带回实验室测定基础理化性质,结果见表 1。

表 1 供试土样基础理化性质

Table 1 Physicochemical properties of paddy soil

土层深度 soil depth	NH_4^+-N/ (mg/kg)	NO_3^--N/ (mg/kg)	DOC/ (mg/kg)	容重 Volume weight/ (g/cm^3)	总孔隙度 Total porosity
0—5 cm	72.19	7.19	389.29	0.73	0.71

用小 PVC 管(d=5 cm,h=7 cm)在取回的原状土柱上以环刀法采集小土柱(d=5 cm,h=5 cm),每大土柱可取 2 个小土柱。然后在底部安装相同尺寸 PVC 管(d=5 cm,h=3 cm)制的通气底座并密封边缘。通气底座上端用均匀打孔的 PVC 板覆盖后,在 PVC 板下再覆盖一层透气不透水的硅胶片并密封边缘,通气底座下端直接用 PVC 板覆盖并密封边缘。确保每个边缘密封完好后将整套装置置于培养用塑料杯(d=9 cm,h=13 cm)中,用三通阀连接通气底座与塑料杯外壁,用于外源气体的添加。培养装置如图 1 所示。

从原状土柱表面缓慢加入双水使土表水层约 1 cm 左右,放置在 25±1℃温室预培养 10 d 后待用,预培养期间注意补充水分使水层厚度保持不变。预培养结束后将安装了三通阀的塑料杯盖盖起并完全密封,用浸水法确定整体密封效果。之后用注射器连接塑料杯三通阀置换装置内气体为高纯 He 气,反复置换 5 次后保证内外气压平衡。

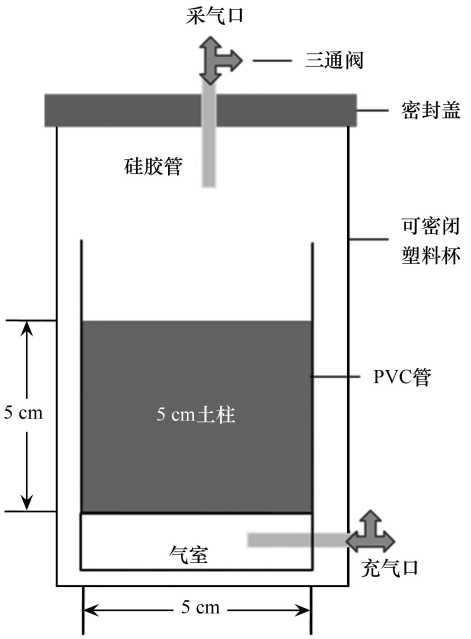

图 1　培养装置模型图

Fig.1　Schematic diagram of incubation device

2.2　试验处理

每土层均设置 3 个N_2O含量添加处理,分别为 1 ml(N1)、5 ml(N5)、10 ml(N10) 99.99%纯度N_2O/盆(相当于 880、4404、8808 μg N_2O-N/盆),每处理 3 个重复。为降低土壤异质性对后续分析的影响,每处理 0h 和 172h 土样样品分别为同一大土柱取出的 2 个小土柱。塑料杯内气体置换完成后,用注射器连接通气底座三通阀,分别抽出 1、5、10 ml 气体后通入设定量的N_2O气体,随后将整套装置置于无氧培养装置中(真空压缩袋制,抽真空后通入高纯 He 气),开始培养计时,培养时间共计 172 h。

2.3　样品采集

气体样品采集:用注射器分别在密闭培养的 0、33、82、125、172 h 采集通气底座内气体,并在 0、5、10、21、28、33、44、57、69、82、94、107、125、144、172 h 采集塑料杯内气体样品 1 ml 于 12 mL 真空血清瓶中,充入 29 ml 高纯 He 使气瓶内气体维持高压,用于N_2O含量的测定。每次采集气体样品前用注射器反复抽打空间内气体 15—20 次使空间气体混匀,气体样品采集后立即补入等量高纯 He 保证装置内各空间气压平衡。

土壤样品采集:在N_2O充入前采集土样为 0h 样品,N_2O充入后培养 172h 后采集土样为 172h 样品。倒掉自由水后充分混匀土样,取出约 20 g 土样迅速用锡箔纸包裹,经由液氮速冻,放入-80℃ 保存用于相关分子生物学分析。将剩余土样装入密封袋,放入 4℃ 保存用于 NH_4^+-N、NO_3^--N 及 DOC 含量分析,并在 72 h 内完成测定。

2.4　氧化亚氮浓度,无机氮和 DOC 测定

N_2O浓度采用温室气体气相色谱仪(GC 7890A)测定。以高纯 N_2作为色谱柱载气,气流速度 28 psi,检测器温度为 300℃,柱箱温度为 50℃,检测器为微池电子捕获器^{63}Ni-ECD。

无机氮及 DOC 含量测定采用硫酸钾共提法浸提。称取约 10 g 土样,置于 100 ml 塑料振荡瓶中,加入 50 ml 0.5 mol L^{-1} K_2SO_4溶液浸提,在振荡机上振荡 1 h 后用滤纸过滤悬浊液,澄清滤液分别采用连续流动分析仪(Flastar 5000 Analyzer) 和 C/N 分析仪测定硝态氮、铵态氮含量和 DOC 含量。

2.5　氧化亚氮还原酶基因丰度测定

土壤样品的 DNA 提取方法主要参考 Chen 等[14]的方法。提取的 DNA 由 Nanodrop ND-1000UV-Vis 分光光度计测定 DNA 浓度和质量系数,并通过 1% 凝胶电泳检测 DNA 完整度,满足条件后用于 qPCR 分析。

氧化亚氮还原酶基因 PCR 分析用引物分别为 nosZⅠ-1126F(5′-GGG CTB GGG CCR TTG CA-3′)和 nosZⅠ-1381R(5′- GAA GCG RTC CTT SGA RAA CTT G -3′),以及 nosZⅡ-F(5′-CTI GGI CCI YTK CAY AC-3′)和 nosZⅡ-R(5′- GCI GAR CAR AAI TCB GTR C -3′)。实时 PCR 扩增所用的仪器为 ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems),实现荧光检测和样品浓度测定。标准曲线用含 *nosZ* Ⅰ和 *nosZ* Ⅱ基因的质粒为模板,以 10 倍梯度稀释法配制 nosZ 基因 PCR 扩增反应体系为(10μL):上下游引物各 0.2μL, SYBRGreen (Takara) 5μL, Rox 0.2μL,DNA 模板 5ng(1μL),补水至 10μL。nosZⅠ基因 qPCR 程序为:95℃ 30s 预变性;95℃ 5s,60℃ 30s,72℃ 10s,40 个循环;95℃ 15s,60℃ 15s,95℃ 15s 校正溶解曲线。nosZⅡ基因 qPCR 程序为:95℃ 30s 预变性;95℃ 15s,54℃ 30s,72℃ 30s,45 个循环;95℃ 15s,60℃ 15s,95℃ 15s 校正溶解曲线。所有样品重复 3 次并设置阴性对照,溶解曲线分析和琼脂糖凝胶电泳鉴定产物的特异性。

2.6 数据分析处理

数据的统计分析均采用 SPSS 13.0 软件进行分析。N_2O浓度、无机养分浓度以及功能基因丰度处理间的差异性分析采用单向方差分析(One Way ANOVE,LSD 检验)。N_2O浓度与消耗速率的关系采用线性回归分析拟合。图形制作采用 Orgin Pro 9.0 和 Excel 2010 软件完成。

3 结果与分析

3.1 淹水水稻土柱N_2O消纳动态

由于 N1、N5、N10 处理实际N_2O充入量分别为 705.48、10645.77、20200.19 μg N_2O-N,与预设处理浓度稍有误差,后续以实测量为基础进行计算和分析。

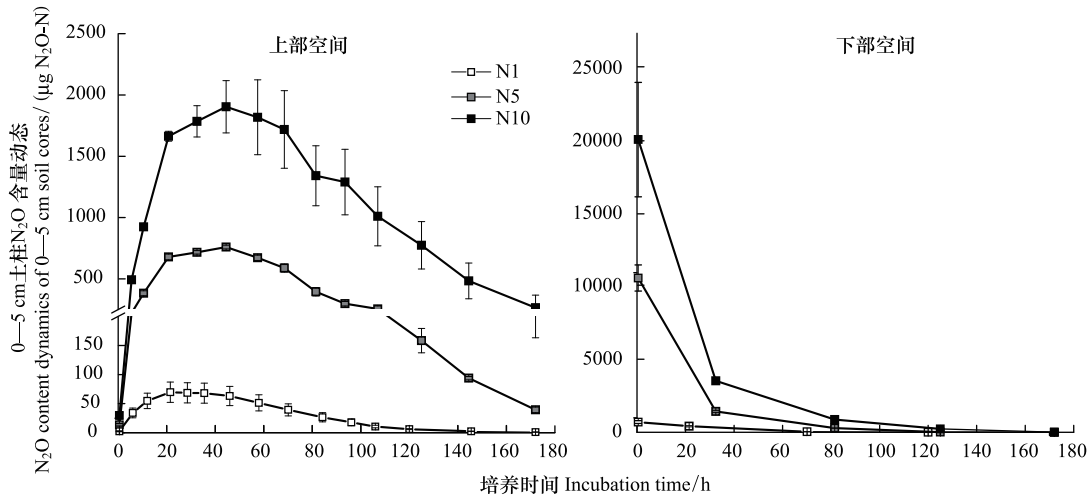

图 2 浅表层水稻土柱上部N_2O释放动态(a)与土柱底部N_2O消减动态(b)

Fig.2 Dynamics of inputting N_2O content in the headspace (a) and bottom space (b) of 0—5 cm soil layer during flooding incubation

图 2 显示,土柱底部添加的外源N_2O气体量均随培养时间延长而呈指数形式迅速降低。在培养 172h 后,所有处理中的底部N_2O含量值均接近于 0,表明外源添加的N_2O气体已全部扩散、迁移进了原状土柱。三个N_2O浓度处理上部空间N_2O量随时间的变化趋势基本一致,均呈现先增后降的动态变化,但高峰时间略有差别。N5、N10 处理的土柱上部空间N_2O气体量在培养第 45h 左右达到最高峰,分别占气体添加总量的 7.17%、9.76%,N1 处理在培养第 22 小时即达到峰值,N_2O量占气体添加总量的 9.80%,说明 5 cm 浅表层水稻土在淹水状态下对N_2O气体的截留率极高。随后上部空间逸出的N_2O量持续降低,进一步说明土体对上层空间N_2O有吸收作用,随着时间延长外源N_2O几乎可被全部吸收。

表 2　不同处理水稻土柱淹水培养期N_2O消耗量差异

Table 2　N_2O consumption of flooding paddy soil cores after different N_2O additions

处理 Treatment	培养 0h N_2O含量 N_2O contents at 0h/(μg N_2O-N)		培养 172h N_2O含量 N_2O contents at 172h/(μg N_2O-N)		N_2O消耗总量 N_2O total consumption/(μg N_2O-N)	N_2O平均消耗速率 N_2O consumption rates/(μg N_2O-N g^{-1} h^{-1})
	底部 Bottom	上部 Headspace	底部 Bottom	上部 Headspace		
N1	703.07a	2.42a	0.24a	0.97a	704.28a	0.03a
N5	10632.18b	13.59b	1.19a	39.29b	10605.29b	0.45b
N10	20170.68c	29.52c	10.84b	265.49c	19923.87c	0.86c

不同小写字母代表N_2O添加处理间差异显著($P<0.05$)

培养期内N_2O消耗总量通过培养起始点(0 h)与结束点(172 h)装置内N_2O量(上、下空间之和)的差值表示(表 2)。结果显示尽管 N1、N5、N10 处理N_2O气体添加量在培养起始点存在显著差异($P<0.05$),但经过 172 h 密闭淹水培养,三处理N_2O消耗总量占初始N_2O添加总量的 97.11—99.55%,说明浅表层土壤对N_2O的消耗能力很强,且无论外源加入N_2O量多少,均能够被土壤基本消耗完全。而 N1、N5、N10 处理N_2O平均消耗速率存在显著差异($P<0.05$)。N_2O平均消耗速率随N_2O外源添加量的增加而增加,通过线性拟合分析发现(图 3),N_2O平均消耗速率(Y)与外源N_2O添加量(X)成显著线性关系($P<0.01$),表明浅表层水稻土柱N_2O消耗能力会受到外源N_2O添加量的刺激而显著增强。

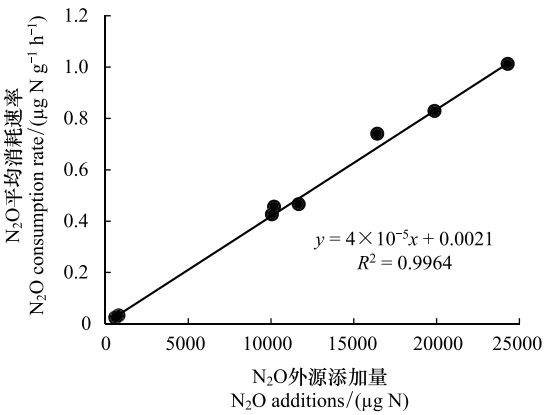

图 3　浅表层水稻土柱N_2O平均消耗速率与底部添加N_2O量的线性关系

Fig.3　Linear relationship of N_2O average consumption rate and N_2O addition of surface paddy soil layer

3.3　土壤 NH_4^+-N、NO_3^--N、DOC 含量变化

铵态氮结果(图 4a)显示,三处理培养起始点土壤 NH_4^+-N 含量均高于 60 mg/kg,但 N1 处理 NH_4^+-N 含量显著低于 N5、N10 处理($P<0.05$),可能是由田间采集原状土柱的异质性造成,因此后续分析采用培养期内的相对量变化更为科学。经过 172h 淹水密闭培养后,N1、N5、N10 处理土壤 NH_4^+-N 含量均被消耗,分别消耗了 5.29%、17.45%和 20.09%,表明高浓度N_2O添加促进了土壤 NH_4^+-N 的消耗。

硝态氮结果(图 4b)显示,培养起始点三个处理土壤 NO_3^--N 含量也存在明显差异,但浓度均低于 10 mg/kg,处于较低水平。但淹水密闭培养 172h 后,N1、N5、N10 处理土壤 NO_3^--N 含量分别降低了 4.89、1.31、1.36 mg/kg。相对于培养起始点土壤 NO_3^--N 含量,N1 处理 NO_3^--N 消耗比例达到 72.04%,显著高于 N5 和 N10 处理(消耗比例 16.87%和 15.60%),表明高浓度添加的N_2O可能抑制了浅表层土壤 NO_3^--N 的消耗还原过程。

可溶性有机碳结果(图 4c)显示表层水稻土柱中 DOC 含量在培养起始点均高于 350 mg/kg,表明可利用的碳含量较为丰富。经过淹水厌氧培养 172h 后,各处理土壤 DOC 含量均被显著消耗,N1、N5、N10 处理 DOC 消耗量分别为 126.38、134.50、212.33 mg/kg,消耗比例分别为 35.60%、29.68%、48.61%。高浓度的N_2O添加处理(N10)消耗了最多的 DOC,由于 DOC 是供给微生物活动的直接 C 源,侧面反映高浓度N_2O添加刺激了较多的微生物响应。

3.4　氧化亚氮还原酶基因丰度变化

土壤细菌氧化亚氮还原酶基因丰度结果(图 5)显示,培养起始点三处理土壤 *nosZ* Ⅰ基因拷贝数量平均为 1.20×10^9 copies/g 干土,而 *nosZ* Ⅱ基因丰度则为 *nosZ* Ⅰ基因丰度的 2 倍以上。此外,*nosZ* Ⅰ和 *nosZ* Ⅱ基因拷贝数在淹水厌氧培养 172h 后变化趋势明显不同。不同浓度外源N_2O添加均引起了 *nosZ* Ⅰ基因丰度的显著增

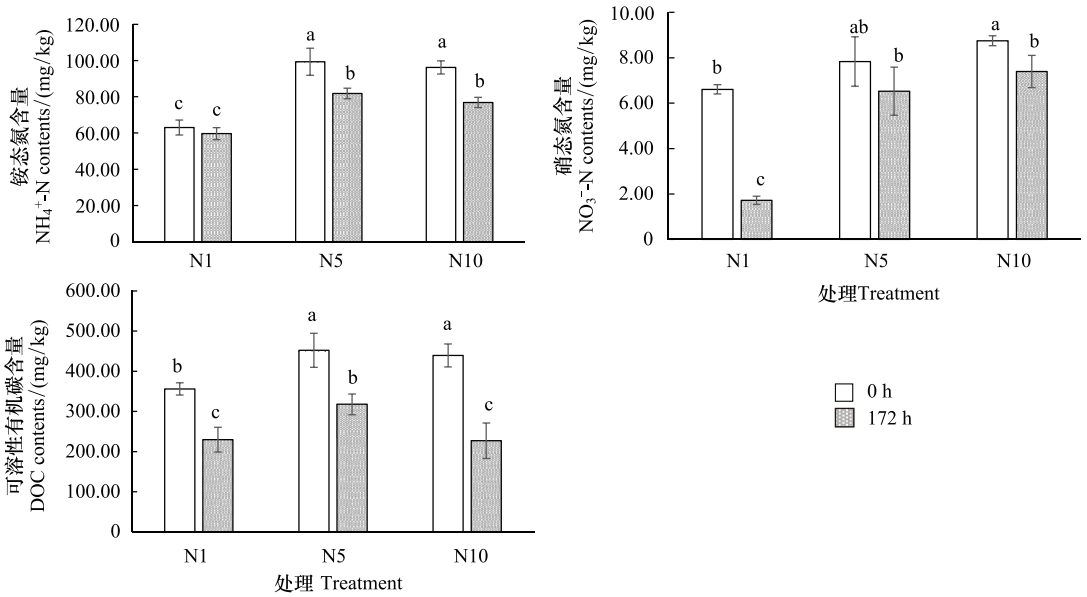

图 4 浅表层水稻土 NH_4^+-N 含量(a)，NO_3^--N 含量(b)和 DOC 含量(c)在培养期内的变化动态

Fig.4 Dynamics of NH_4^+-N concentration (a), NO_3^--N concentration (b), and DOC concentration (c) at 0h and 172h of surface paddy soil layer

不同小写字母代表处理间差异显著(P<0.05)

加，N1、N5、N10 处理 *nosZ* Ⅰ基因拷贝数分别增加了 4.46×10^8、5.91×10^8、9.91×10^8。*nosZ* Ⅰ基因拷贝数增幅基本上随N_2O添加量增加而增加，表明外源N_2O的添加刺激了含 *nosZ* Ⅰ基因微生物数量的增长。而 *nosZ* Ⅱ基因数量对不同N_2O添加浓度的响应存在差异，N1 处理低浓度N_2O添加促进了 *nosZ* Ⅱ基因拷贝数的增长(增长幅度约为 32.35%)，N5、N10 处理 *nosZ* Ⅱ基因丰度无显著变化，表明添加的高浓度N_2O对含 *nosZ* Ⅱ基因的微生物生长无明显激发作用。

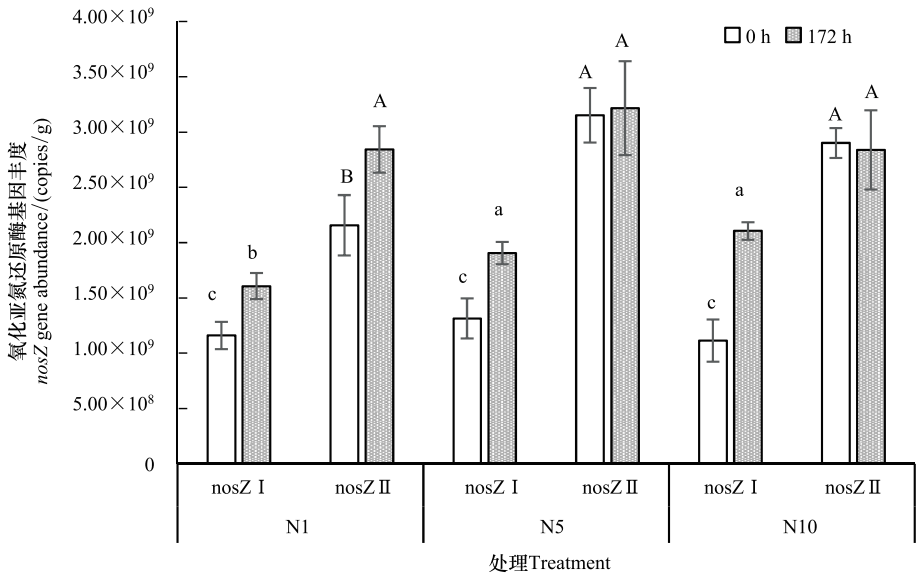

图 5 浅表层水稻土细菌 nosZ 基因丰度在培养期内的变化动态

Fig.5 Dynamics of *nosZ* gene abundance at at 0h and 172h of surface paddy soil layer

不同小写字母代表 *nosZ* Ⅰ处理间差异显著(p<0.05)，不同大写字母代表 *nosZ* Ⅱ处理间差异显著(P<0.05)

3.5　浅表层水稻土N_2O氧化亚氮消耗速率与相关土壤因子关系

相关分析结果显示,在淹水厌氧培养过程中N_2O外源添加量引起了表层水稻土柱N_2O平均消耗速率、无机养分消耗量(NH_4^+-N、NO_3^--N、DOC)和氧化亚氮还原酶基因丰度增量(*nosZ* Ⅰ 和 *nosZ* Ⅱ)的规律变化,相关性均达到了极显著水平($P < 0.01$)。其中N_2O添加量与 NO_3^--N 消耗量和 *nosZ* Ⅱ 基因丰度增量显著负相关,与N_2O平均消耗速率、NH_4^+-N 消耗量、DOC 消耗量和 *nosZ* Ⅰ 基因丰度增量显著正相关。此外,培养过程中土壤 DOC 消耗量与N_2O平均消耗速率和土壤细菌 *nosZ* Ⅰ 基因拷贝数的增加量显著正相关($P < 0.01$),但与土壤无机氮含量(NH_4^+-N、NO_3^--N)和 *nosZ* Ⅱ 基因丰度增量变化的关系不显著。

表 3　浅表层水稻土N_2O消耗速率与N_2O添加量及相关土壤因子相关系数

Table 3　Pearson′s correlation coefficients for relationships between N_2O consumption rates and N_2O addition, relative soil variables of surface paddy soil layer

	N_2O添加量 N_2O additions	N_2O平均消耗速率 N_2O consumption rates	NH_4^+-N 消耗量 NH_4^+-N consumption	NO_3^--N 消耗量 NO_3^--N consumption	DOC 消耗量 DOC consumption	*nosZ* Ⅰ 基因增加量 *nosZ* Ⅰ gene copies increment	*nosZ* Ⅱ 基因增加量 *nosZ* Ⅱ gene copies increment
N_2O添加量 N_2O additions	1.00						
N_2O平均消耗速率 N_2O consumption rates	0.98**	1.00					
NH_4^+-N 消耗量 NH_4^+-N consumption	0.83**	0.83**	1.00				
NO_3^--N 消耗量 NO_3^--N consumption	−0.82**	−0.86**	−0.91**	1.00			
DOC 消耗量 DOC consumption	0.87**	0.79*	0.50	−0.50	1.00		
nosZ Ⅰ 基因增加量 *nosZ* Ⅰ gene copies increment	0.93**	0.86**	0.68*	−0.62	0.92**	1.00	
nosZ Ⅱ 基因增加量 *nosZ* Ⅱ gene copies increment	−0.84**	−0.86**	−0.95**	0.88**	−0.53	−0.67*	1.00

**. 相关性在 0.01 水平上显著 Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed). *. 相关性在 0.05 水平上显著 Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

4　讨论

农业土壤是大气N_2O排放的重要来源之一,土壤中的N_2O主要是通过一系列土壤微生物作用驱动产生的。而后N_2O气体在土壤剖面内迁移扩散,部分被土壤反硝化微生物利用进一步转化为分子氮(N_2),部分被截留在土壤水、土壤孔隙中,剩余部分才能以N_2O形式排出土壤表面[3]。土壤体截留、消耗一部分N_2O后,土表N_2O排放量并不总是与土壤剖面中累积的N_2O产生量直接相关。Gao 等通过野外监测发现频繁淹水的河岸带土壤剖面中N_2O含量升高的同时,土表N_2O排放量并未显著变化,推测可能是在持续厌氧的淹水环境下土壤中累积的N_2O在迁移至土表前已被大量消耗[5]。本研究采用从 0—5cm 土柱底部外源添加N_2O气体的方法,模拟了累积在 5cm 土壤深度的N_2O气体迁移通过土柱后的排放动态。结果显示底部外源添加的三个浓度的N_2O气体量均迅速降低,迁移扩散进了水稻土柱,但通过土柱后排放出的N_2O量最高值也仅占添加总量的 7.17—9.80%,暗示 0—5 cm 表层水稻土在淹水厌氧状态下可截留、消耗 5cm 深度N_2O积累量的 90%以上。Wang 等通过对 0—20 cm 原状水稻土柱剖面N_2O含量和土表N_2O排放量动态耦合关系研究发现,0—5 cm 土层产生的N_2O大量损失,每天的N_2O排放量仅占总损失量的 10%左右,约 90%的N_2O以其他途径消耗损失[9]。这部分N_2O损失途径可能是被还原转化为 N_2、溶解于土壤水中或是停留在土壤孔隙中[15],因此持续淹水条件下稻田土壤N_2O排放量很低,甚至会出现N_2O负排放的现象[16,17]。

淹水或厌氧环境也有利于土壤吸收消耗大气N_2O,前人研究表明含水率较高的泥炭地、湿地、稻田等土壤生态系统中土壤N_2O吸收消耗量远远高于旱地土[10]。本试验结果显示在土柱上部空间N_2O排出量达到高峰后开始持续下降,表明在厌氧条件下淹水土壤逐渐吸收转化了上部空间的N_2O气体。结合试验中小土柱表面积计算 N1、N5、N10 处理N_2O吸收转化速率分别为 120.80、1556.11、3896.75μg N m^{-2} h^{-1},远远超过已报道的最大值记录(约 207 μg N m^{-2} h^{-1})。土壤反硝化微生物利用N_2O为电子受体,进一步将其还原为 N_2的过程,被认为是消耗N_2O的唯一有效途径[3]。尤其是在水分饱和、厌氧的环境条件下,完全反硝化作用能够被大幅激发[3,18]。有效碳源是土壤微生物活动的能量来源,高浓度的可用有机碳含量促进土壤厌氧环境的进一步加强,因此土壤 N_2产量与土壤有机碳的可利用率关系密切[19,20]。本研究中应试土壤基础的 DOC 含量较充足,为 356.20—452.29 mg kg^{-1},能够促进反硝化微生物对N_2O的吸收量。此外 NO_3^- 获得电子的能力强于N_2O,因此在 NO_3^- 含量很低的土壤环境中(<10 mg kg^{-1}),N_2O更容易被反硝化还原为 N_2而成为N_2O负排放区域[10,21,22]。本研究中土壤本底 NO_3^--N 含量水平较低,均低于 10 mg kg^{-1},利于土壤还原N_2O。因此,培养条件(厌氧、淹水)及土壤本底无机养分特征(高 DOC、低 NO_3^--N)使得表层水稻土壤的N_2O吸收消耗能力大大提高。

此外,本研究中N_2O外源添加量与N_2O总消耗量成正比,表明在实验条件下水稻土壤的N_2O消耗潜力可被N_2O底物浓度大幅提高。氧化亚氮还原酶(*nosZ* 基因编码)调控N_2O向 N_2转化的过程,*nosZ* 基因数量的变化可用来反映土壤还原N_2O过程的强度[23]。本研究结果显示高浓度N_2O添加促进了 *nosZ* Ⅰ基因丰度的增加,相关分析结果也显示N_2O添加量与 *nosZ* Ⅰ基因增加量显著正相关(P<0.01)。Deepanjan(2013)指出当N_2O成为环境中唯一的电子受体时,N_2O还原微生物的数量是影响N_2O最终浓度的唯一因素[24]。本研究中与N_2O竞争电子的 NO_3^- 含量处于较低水平,因此外源添加的高浓度N_2O气体对电子的竞争力提高,因此高浓度N_2O添加抑制了土壤 NO_3^--N 的消耗。丰富的反应底物也激发了氧化亚氮还原微生物数量的增长,从而通过 *nosZ* Ⅰ基因数量调控土壤N_2O消耗能力,使之显著增强。*nosZ* Ⅱ基因是近五年来新发现的与常规 *nosZI* 基因相关但具有进化差异的氧化亚氮还原酶编码基因[25,26]。虽然 *nosZI* 与 *nosZII* 基因都能够编码氧化亚氮还原酶,但两者在微生物种群类别分布上存在明显区别。*nosZI* 基因主要存在于古生菌、α-古变形菌、β-变形菌以及 γ-变形菌中,而 *nosZII* 基因则大部分在 ε-变形细菌、拟杆菌、产水菌以及其他一些范围的细菌中被发现[27]。这类来自包括土壤环境在内的不同环境的新型 *nosZ II* 细菌功能类群的发现,表明一个更为广泛的微生物类群贡献了N_2O的消耗,这些微生物可能在全球N_2O还原过程中发挥重要作用[27,28]。但研究发现 *nosZ II* 型氧化亚氮还原菌在旱地土中占优势,在水稻田土壤中 *nosZI* 型功能更强[25],因为大部分 *nosZ II* 型微生物缺乏亚硝酸还原酶(nir),属于非反硝化菌[29]。且 *nosZ II* 型氧化亚氮还原菌在较低的N_2O浓度下能得到很好的生长,但其对N_2O的亲和系数(*Ks*)低于 *nosZI* 型微生物[30],暗示 *nosZ II* 型微生物可能更高效的利用低浓度N_2O,但对高浓度的N_2O竞争力不如 *nosZI* 型微生物。本研究结果也显示低浓度N_2O添加处理(N1)促进了 *nosZ II* 基因数量的增加,而高浓度N_2O添加处理(N5、N10)并未显著改变 *nosZ II* 基因丰度。

5 结论

淹水厌氧培养条件下,浅表层水稻土柱(0—5 cm)能够截留 5cm 深度外源N_2O添加量的 90%以上,表明土壤中产生的N_2O大部分已被土壤主动消耗而减少了N_2O的最终排放量。水稻土壤也具有吸收还原N_2O的能力,尤其是在培养条件(厌氧、淹水)及土壤本底无机养分特征(高 DOC、低 NO_3^--N)前提下,N_2O吸收转化速率大幅提高,最高达到了 3896.75μg N m^{-2} h^{-1}。高浓度N_2O添加会促进淹水土壤N_2O消纳总量和消耗速率,此刺激作用与含 *nosZI* 基因的N_2O还原微生物数量增长关系密切,但与 *nosZII* 基因丰度的变化无显著联系。此外,N_2O添加也显著促进了土壤中 NH_4^+-N 和 DOC 含量的消耗,而抑制了 NO_3^--N 的消耗。

参考文献(References):

[1] Braker G, Conrad R. Diversity, structure, and size of N_2O-producing microbial communities in soils—what matters for their functioning? Advances in Applied Microbiology, 2011, 75: 33-70.

[2] 朱永官, 王晓辉, 杨小茹, 徐会娟, 贾炎. 农田土壤N_2O产生的关键微生物过程及减排措施. 环境科学, 2014, 35(2): 792-800.

[3] Chapuis-Lardy L, Wrage N, Metay A, Chotte J L, Bernoux M. Soils, a sink for N_2O? A review. Global Change Biology, 2007, 13(1): 1-17.

[4] Clough T J, Kelliher F M, Wang Y P, Sherlock R R. Diffusion of ^{15}N-labelled N_2O into soil columns: a promising method to examine the fate of N_2O in subsoils. Soil Biology and Biochemistry, 2006, 38(6): 1462-1468.

[5] Gao X P, Rajendran N, Tenuta M, Dunmola A, Burton D L. Greenhouse gas accumulation in the soil profile is not always related to surface emissions in a prairie pothole agricultural landscape. Soil Science Society of America Journal, 2014, 78(3): 805-817.

[6] Uchida Y, Wang Y, Akiyama H, Nakajima Y, Hayatsu M. Expression of denitrification genes in response to a waterlogging event in a Fluvisol and its relationship with large nitrous oxide pulses. FEMS Microbiology Ecology, 2014, 88(2): 407-423.

[7] 刘平丽, 张啸林, 熊正琴, 黄太庆, 丁敏, 王金阳. 不同水旱轮作体系稻田土壤剖面N_2O的分布特征. 应用生态学报, 2011, 22(9): 2363-2369.

[8] Yang H C, Sheng R, Zhang Z X, Wang L, Wang Q, Wei W X. Responses of nitrifying and denitrifying bacteria to flooding-drying cycles in flooded rice soil. Applied Soil Ecology, 2016, 103: 101-109.

[9] Wang L, Sheng R, Yang H C, Wang Q, Zhang W Z, Hou H J, Wu J S, Wei W X. Stimulatory effect of exogenous nitrate on soil denitrifiers and denitrifying activities in submerged paddy soil. Geoderma, 2017, 286: 64-72.

[10] Schlesinger W H. An estimate of the global sink for nitrous oxide in soils. Global Change Biology, 2013, 19(10): 2929-2931.

[11] 郝庆菊, 王跃思, 宋长春, 江长胜. 垦殖对沼泽湿地 CH_4和N_2O排放的影响. 生态学报, 2007, 27(8): 3417-3426.

[12] Liu B B, Mørkved P T, Frostegård Å, Bakken L R. Denitrification gene pools, transcription and kinetics of NO, N_2O and N_2 production as affected by soil pH. FEMS Microbial Ecology, 2010, 72(3): 407-417.

[13] 郑燕, 侯海军, 秦红灵, 朱亦君, 魏文学. 施氮对水稻土N_2O释放及反硝化功能基因(*narG*/*nosZ*)丰度的影响. 生态学报, 2012, 32(11): 3386-3393.

[14] Chen Z, Luo X Q, Hu R G, Wu M N, Wu J S, Wei W X. Impact of long-term fertilization on the composition of denitrifier communities based on nitrite reductase analyses in a paddy soil. Microbial Ecology, 2010, 60(4): 850-861.

[15] Clough T J, Sherlock R R, Rolston D E. A review of the movement and fate of N_2O in the subsoil. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 2005, 72(1): 3-11.

[16] Cai Z C, Xing G X, Yan X Y, Xu H, Tsuruta H, Yagi K, Minami K. Methane and nitrous oxide emissions from rice paddy fields as affected by nitrogen fertilisers and water management. Plant and Soil, 1997, 196(1): 7-14.

[17] Hansen M, Clough T J, Elberling B. Flooding-induced N_2O emission bursts controlled by pH and nitrate in agricultural soils. Soil Biology and Biochemistry, 2014, 69: 17-24.

[18] Blackmer A M, Bremner J M. Potential of soil as a sink for atmospheric nitrous oxide. Geophysical Research Letters, 1976, 3(12): 739-742.

[19] Mathieu O, Lévêque J, Hénault C, Milloux M J, Bizouard F, Andreux F. Emissions and spatial variability of N_2O, N_2 and nitrous oxide mole fraction at the field scale, revealed with ^{15}N isotopic techniques. Soil Biology and Biochemistry, 2006, 38(5): 941-951.

[20] 李彬彬, 马军花, 武兰芳. 土壤溶解性有机物对 CO_2和N_2O排放的影响. 生态学报, 2014, 34(16): 4690-4697.

[21] Wu D M, Dong W X, Oenema O, Wang Y Y, Trebs I, Hu C S. N_2O consumption by low-nitrogen soil and its regulation by water and oxygen. Soil Biology and Biochemistry, 2013, 60: 165-172.

[22] Rosenkranz P, Brüggemann N, Papen H, Xu Z, Seufert G, Butterbach-bahl K. N_2O, NO and CH_4 exchange, and microbial N turnover over a Mediterranean pine forest soil. Biogeosciences, 2005, 2(3): 673-702.

[23] 王晓君, 陈少华, 张兆基, 肖俊超. 利用氧化亚氮还原酶基因(*nosZ*)评价人工湿地系统中的反硝化菌. 环境科学, 2012, 33(4): 1306-1312.

[24] Majumdar D. Biogeochemistry of N_2O uptake and consumption in submerged soils and rice fields and implications in climate change. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2013, 43(24): 2653-2684.

[25] Jones C M, Graf D R, Bru D, Philippot L, Hallin S. The unaccounted yet abundant nitrous oxide-reducing microbial community: a potential nitrous oxide sink. The ISME Journal, 2013, 7(2): 417-426.

[26] Sanford R A, Wagner D D, Wu Q Z, Chee-Sanford J C, Thomas S H, Cruz-García C, Rodríguez G, Massol-Deyá A, Krishnani K K, Ritalahti K M, Nissen S, Konstantinidis K T, Löffler F E. Unexpected nondenitrifier nitrous oxide reductase gene diversity and abundance in soils. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(48): 19709-19714.

[27] 刘春梅, 魏文学, 盛荣, 邢肖毅, 谌星. 氧化亚氮还原酶基因 *nosZ* Ⅱ及与环境的关系研究进展. 应用与环境生物学报, 2018, 24(3): 651-656.

[28] 李冀, 朱莹, 张晓君. 非典型氧化亚氮还原酶基因 *nosZ* Ⅱ研究进展. 微生物学通报, 2017, 44(7): 1714-1719.

[29] Hallin S, Philippot L, Löffler F E, Sanford R A, Jones C M. Genomics and ecology of novel N_2O-reducing microorganisms. Trends in Microbiology, 2018, 26(1): 43-55.

[30] Conthe M, Wittorf L, Kuenen J G, Kleerebezem R, Hallin S, Van Loosdrecht M C M. Growth yield and selection of *nosZ* clade II types in a continuous enrichment culture of N_2O respiring bacteria. Environmental Microbiology Reports, 2018, 10(3): 239-244.