

# 环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第35卷 第11期

Vol.35 No.11

**2014**

中国科学院生态环境研究中心 主办

科学出版社 出版



目次

南京北郊夏季近地层臭氧及其前体物体积分数变化特征 ..... 邵平, 安俊琳, 杨辉, 林旭, 吉东生 (4031)

亚青会期间南京污染气体与气溶胶中水溶性离子的分布特征 ..... 邹嘉南, 安俊琳, 王红磊, 邵平, 段卿, 薛国强, 庞博 (4044)

亚青会期间南京地区气溶胶浓度变化及其与能见度的关系 ..... 袁亮, 银燕, 李琦, 肖辉, 李力 (4052)

2013年10月长株潭城市群一次持续性空气污染过程特征分析 ..... 廖志恒, 范绍佳, 黄娟, 孙家仁 (4061)

在线单颗粒气溶胶质谱 SPAMS 对细颗粒物中主要组分提取方法的研究 ..... 付怀于, 闫才青, 郑玫, 蔡靖, 李小滢, 张延君, 周振, 傅忠, 李梅, 李磊, 张远航 (4070)

PM<sub>10</sub>可替代源成分谱的建立方法及其应用 ..... 陈强, 景毅, 吴焕波, 王芳 (4078)

夏季东海和南黄海一氧化碳的浓度分布、海-气通量和微生物消耗研究 ..... 王敬, 陆小兰, 杨桂朋, 徐冠球 (4085)

三峡库区典型农田小流域水体汞的时空分布特征 ..... 王娅, 赵铮, 木志坚, 王定勇 (4095)

浑太水水体中不同粒径有机胶体荧光光谱特性 ..... 刘娜娜, 李斌, 刘瑞霞, 宋永会, 吴畏 (4103)

深圳湾流域 TN 和 TP 入海年通量变化规律研究 ..... 赵晨辰, 张世彦, 毛献忠 (4111)

滇池沉积物有机磷垂直分布特征及其生物有效性 ..... 熊强, 焦立新, 王圣瑞, 彭希琰 (4118)

金山湖闸坝型水体表层沉积物重金属分布特征及生态风险评价 ..... 周晓红, 刘龙梅, 陈曦, 陈志刚, 张金萍, 李义敏, 刘彪 (4127)

西藏普莫雍错湖芯沉积物中重金属的垂向分布特征及生态风险评估 ..... 谢婷, 罗东霞, 杨瑞强 (4135)

西安市雨水径流中重金属季节性污染特征及分析 ..... 袁宏林, 李星宇, 王晓昌 (4143)

城市不同下垫面降雨径流多环芳烃(PAHs)分布及源解析 ..... 武子澜, 杨毅, 刘敏, 陆敏, 于英鹏, 汪青, 郑鑫 (4148)

粗放型绿色屋面填料的介质组成对出水水质的影响 ..... 陈昱霖, 李田, 顾俊青 (4157)

饮用水处理中不同来源生物活性炭微生物群落多样性和结构研究 ..... 杜尔登, 郑璐, 冯欣欣, 高乃云 (4163)

压力强化混凝除藻工艺中藻毒素安全性研究 ..... 蒋新跃, 栾清, 丛海兵, 徐思涛, 刘玉娇, 朱学源 (4171)

基于膜特征参数变化的蛋白质超滤过程膜污染研究 ..... 王旭东, 张银辉, 王磊, 张慧慧, 夏四清 (4176)

臭氧氧化水溶液中对乙酰氨基酚的机制研究 ..... 曹飞, 袁守军, 张梦涛, 王伟, 胡真虎 (4185)

电辅助微生物反应器降解苯并噻唑效能的研究 ..... 刘春苗, 丁杰, 刘先树, 程旺斌 (4192)

铁镧复合氧化物纳米吸附剂的制备、表征及 As(III)吸附性能研究 ..... 张伟, 陈静, 张高生 (4198)

重金属铬胁迫下水蚯蚓的生理响应研究 ..... 楼菊青, 杨东叶, 曹永青, 孙培德, 郑平 (4205)

光质对蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)生长特征及生化组成的影响研究 ..... 唐青青, 方治国, 嵇雯雯, 夏会龙 (4212)

常温低基质下碱度和溶解氧对厌氧氨氧化的影响 ..... 任玉辉, 王科, 李相昆, 马凯丽, 张杰 (4218)

Fe<sup>2+</sup>和 Fe<sup>3+</sup>对厌氧氨氧化污泥活性的影响 ..... 李祥, 黄勇, 巫川, 王孟可, 袁怡 (4224)

CSTR 中亚硝化颗粒污泥的变化过程研究 ..... 阴方芳, 刘文如, 王建芳, 吴鹏, 沈耀良 (4230)

盐度对好氧颗粒污泥硝化过程中 N<sub>2</sub>O 产生量的影响 ..... 王珊珊, 梁红, 高大文 (4237)

硫酸盐还原反应器污泥驯化过程中微生物群落变化分析 ..... 曾国驱, 贾晓珊, 郑小红, 杨丽平, 孙国萍 (4244)

利用铅同位素方法量化不同端元源对南京土壤和长江下游悬浮物铅富集的影响 ..... 王成, 夏学齐, 张义, 廖启林, 杨忠芳, 季峻峰 (4251)

北京东南郊土壤剖面氟喹诺酮类抗生素分布特征 ..... 苏思慧, 何江涛, 杨蕾, 乔肖翠, 崔亚丰 (4257)

环境因素对土壤中几种典型四环素抗性基因形成的影响 ..... 张俊, 罗方园, 熊浩徽, 焦少俊, 叶波平 (4267)

稻田土壤不同水分条件下硝化/反硝化作用及其功能微生物的变化特征 ..... 刘若萱, 贺纪正, 张丽梅 (4275)

典型岩溶土壤微生物丰度与多样性及其对碳循环的指示意义 ..... 靳振江, 汤华峰, 李敏, 黄炳富, 李强, 张家喻, 黎桂文 (4284)

变温环境对典型石灰土有机碳矿化的影响 ..... 王莲阁, 高若红, 丁长欢, 慈恩, 谢德体 (4291)

铁氧化物与电子供体基质交互作用对红壤性水稻土中 DDT 还原脱氯影响 ..... 刘翠英, 徐向华, 王壮, 姚童言 (4298)

植物套种及化学强化对重金属污染土壤的持续修复效果研究 ..... 卫泽斌, 郭晓方, 吴启堂, 龙新宪 (4305)

不同取样尺度下亚高山草甸土壤呼吸的空间变异特征 ..... 李洪建, 高玉凤, 严俊霞, 李君剑 (4313)

不同开垦年限黑土温室气体排放规律研究 ..... 李平, 郎漫, 徐向华, 李煜姗, 朱淑娟 (4321)

转 Cry1Ac 基因抗虫棉与其亲本棉花根际真菌多样性的比较 ..... 潘建刚, 焦海华, 白志辉, 齐鸿雁, 马安周, 庄国强, 张洪勋 (4329)

天津污灌区内气态汞的污染特征及在叶菜类蔬菜中的富集 ..... 郑顺安, 韩允垒, 郑向群 (4338)

1-硝基萘和 1,2-萘醌的联合细胞毒性和致 DNA 损伤 ..... 尚羽, 蒋玉婷, 张玲, 李怡 (4345)

鸡粪堆肥有机物演化对重金属生物有效性影响研究 ..... 卜贵军, 于静, 邱慧慧, 罗世家, 周大寨, 肖强 (4352)

污泥预植重金属 Cu 炭化及炭中重金属的稳定性研究 ..... 窦晓敏, 陈德珍, 戴晓虎 (4359)

上层曝气式生物反应器填埋工艺特性的研究 ..... 田颖, 王坤, 徐期勇 (4365)

硝酸盐连续回灌对生物反应器填埋场 N<sub>2</sub>O 产生的影响 ..... 卞荣星, 孙英杰, 李晶晶, 张欢欢 (4371)

中国碳强度下降和碳排放增长的行业贡献分解研究 ..... 蒋晶晶, 叶斌, 计军平, 马晓明 (4378)

泛长三角地区工业污染重心演变路径及其驱动机制研究 ..... 赵海霞, 蒋晓威, 崔建鑫 (4387)

基于污染防治技术模拟的造纸行业环境管理方法研究 ..... 张雪莹, 温宗国 (4395)

大气棕色碳的研究进展与方向 ..... 闫才青, 郑玫, 张远航 (4404)

《环境科学》征稿简则(4094) 《环境科学》征订启事(4126) 信息(4243, 4266, 4274, 4328)

# 稻田土壤不同水分条件下硝化/反硝化作用及其功能微生物的变化特征

刘若萱<sup>1,2</sup>, 贺纪正<sup>1</sup>, 张丽梅<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:** 以湖南桃源县一长期种植水稻的酸性土壤为研究对象, 在微宇宙培养条件下设置了 4 个水分梯度处理, 分别为田间持水量 (water holding capacity, WHC) 的 30%、60%、90% 和淹水 2 cm 深. 考察了水分条件变化对硝化和反硝化作用影响, 并结合定量 PCR 和限制性末端片段长度多态性 (T-RFLP) 技术研究了硝化-反硝化微生物的响应特征. 结果表明, 30% WHC 处理土壤无明显的硝化和反硝化作用发生, 硝化作用主要发生于 60% WHC 和 90% WHC 处理土壤, 90% WHC 处理土壤硝化作用明显强于 60% WHC, 并检测到明显的  $N_2O$  释放, 表明该水分条件可能发生了硝化-反硝化耦合作用. 淹水处理土壤氧化还原势 Eh 显著低于非淹水处理土壤, 无明显的硝化作用发生, 但能检测到  $N_2O$  释放且释放量小于 90% WHC 处理土壤. 除培养初期 (7 d) 外, 反硝化功能基因 *nirS* 和 *nirK*, 以及氨氧化细菌 (AOB) *amoA* 基因的丰度先随着水分增加而增加, 并在淹水处理中小幅下降, 三者之间呈明显的正相关关系, 且 AOB *amoA*、*nirS* 和 *nirK* 基因丰度均在 90% WHC 处理中最高, 与该处理中硝化和反硝化活性最高相一致. T-RFLP 结果表明, 培养 2 周后, *nirS* 基因为代表的反硝化微生物群落组成对水分梯度变化产生明显响应, Eh 和含水率  $C_w$  是影响其群落组成的主要因子.

**关键词:** 水稻土; 水分;  $N_2O$  释放; 反硝化作用; 反硝化微生物

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2014)11-4275-09 DOI: 10.13227/j.hjxx.2014.11.033

## Response of Nitrification/Denitrification and Their Associated Microbes to Soil Moisture Change in Paddy Soil

LIU Ruo-xuan<sup>1,2</sup>, HE Ji-zheng<sup>1</sup>, ZHANG Li-mei<sup>1</sup>

(1. Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** To investigate the effect of moisture change on nitrification and denitrification and their corresponding functional microbes, an acidic paddy soil from Taoyuan, Hunan Province was selected as the study object, and soil microcosm experiment containing 4 different water holding capacity (WHC) levels (30% WHC, 60% WHC, 90% WHC, and waterlog) was set up in this study. Results showed that no active nitrification and denitrification occurred in 30% WHC treatment as there were no obvious ammonia consumption and nitrate accumulation, while nitrification was active in 60% WHC and 90% WHC treatments as indicated by the obvious accumulation of nitrate in those two treatments. Meanwhile, significant ammonia consumption and  $N_2O$  emission were only observed in 90% WHC treatment, implying that a much stronger nitrification in 90% WHC treatment than in 60% WHC treatment and the co-occurrence of nitrification and denitrification in 90% WHC treatment. In waterlog treatment, relatively lower  $N_2O$  emission was detected and no obvious nitrification was detected, corresponding to a significant lower soil Eh in this treatment than in the other three non-waterlog treatments. Except the early stage of incubation (7 d), the abundance of *nirS*, *nirK* and ammonia-oxidizing bacteria (AOB) *amoA* genes showed similar responses to soil moisture change over time. Except the slight decrease in waterlog treatment, the abundances of the three genes increased significantly as the soil moisture increased, and the highest abundances of *nirS*, *nirK*, and *amoA* gene were observed in 90% WHC treatment in which the highest nitrification and denitrification activity was detected. T-RFLP analysis showed that the community composition of *nirS* gene-containing denitrifiers changed significantly in response to soil moisture change after two weeks, and soil Eh and  $C_w$  were the main factors affecting the community composition of denitrifiers.

**Key words:** paddy soil; moisture;  $N_2O$  emission; denitrification; denitrifier

稻田生态系统在农业生产和全球氮循环过程中起着举足轻重的作用, 由于水稻特殊的种植制度, 稻田土壤长期处于淹水状态且干湿交替频繁发生, 使得水稻土本身具有较强的氧化还原活性, 反硝化作用活跃. 反硝化作用是微生物在嫌气条件下进行的硝酸盐还原过程, 在多种微生物的参与下, 在硝酸盐

还原酶 (Nar)、亚硝酸盐还原酶 (Nir)、一氧化氮还原酶 (Nor) 以及一氧化二氮还原酶 (Nos) 的作用下,

收稿日期: 2014-04-24; 修订日期: 2014-05-26

基金项目: 国家自然科学基金项目 (41090281, 41322007)

作者简介: 刘若萱 (1988 ~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为土壤分子生态学, E-mail: liuruoxuan11@mails.gucas.ac.cn

\* 通讯联系人, E-mail: zhanglm@rcees.ac.cn

硝酸盐经四步还原反应,即  $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ , 依次被还原,最终转化成氮气释放,并在中间过程释放强效应的温室气体  $\text{N}_2\text{O}$ ,因此反硝化作用一直受到广泛的关注。

基于通量观测和反硝化活性测定,国内外学者对于影响反硝化作用的物理化学因素、不同土壤系统中反硝化作用发生的强度及其对  $\text{N}_2\text{O}$  气体排放的贡献等已有大量研究<sup>[1, 2]</sup>。众多研究表明,土壤的反硝化作用受到 pH、有机质含量、 $\text{CO}_2$ 、温度、氮素、水分含量和剖面深度等因素的影响。由于反硝化相关的酶多是在低氧条件下才能被诱导合成并具有活性,因而水分和  $\text{O}_2$  含量是影响反硝化作用的重要因素,二者通过影响土壤氧化还原电位间接对反硝化过程产生影响。一般认为,土壤反硝化作用随着水分的增加而增加<sup>[3, 4]</sup>,但也有研究发现,在临界饱和水及干湿交替条件下土壤  $\text{N}_2\text{O}$  排放量最大<sup>[5-7]</sup>。但由于反硝化过程复杂,参与反硝化作用的微生物种类非常多,已发现有 80 多个属的细菌和部分古菌、真菌和放线菌都可能参与反硝化作用的全部或部分反应步骤<sup>[8]</sup>,且多种功能基因(如 *narG*、*napA*、*nirK*、*nirS*、*norB*、*NosZ* 等)参与其中的反应过程,因此对反硝化微生物的研究相对困难<sup>[9-12]</sup>。且目前多数研究主要集中于各种理化因素对反硝化作用的影响和对  $\text{N}_2\text{O}$  释放的相对贡献,对于反硝化过程发生的微生物学机制的研究较少。

此外,反硝化作用通常伴随着硝化作用发生,硝化-反硝化耦合作用是土壤氮肥损失最主要的途径,可达投入氮肥量的 40%<sup>[13, 14]</sup>。许多研究发现,氮肥的施入对  $\text{N}_2\text{O}$  的释放和反硝化作用有明显的促进效应,尤其是当土壤水分含量很高时<sup>[7, 15, 16]</sup>。但目前对反硝化作用的研究多只针对反硝化这一过程进行。因此,本研究在室内微宇宙培养条件下,通过设置不同水分梯度条件来考察硝化和反硝化作用对水分梯度变化的响应,并结合运用定量 PCR 和限制性末端片段长度多态性(T-RFLP)技术等研究硝化-反硝化微生物的响应特征,揭示不同水分条件下稻田土壤硝化-反硝化作用特征以及二者的耦合作用及其微生物学机制,以期为认识稻田土壤氮循环过程和为稻田土壤水分和氮肥管理提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 土壤样品与实验处理

供试水稻土采自湖南省桃源县一长期植稻农田(东经  $111^\circ 26' 39''$ ,北纬  $28^\circ 55' 51''$ ),取样深度为 0

~30 cm。该土壤为第四季红壤发育而形成的水稻土,土壤为弱酸性,pH = 5.9,EC = 0.07  $\text{dS} \cdot \text{m}^{-1}$ ,热水可溶性有机碳(HWC)为 415  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,取样时土壤含水量约 25%,田间持水量(WHC)为 50.95%。土壤运回实验室后,过 2.0 mm 筛存放于温室备用。为方便土壤 Eh 测定,微宇宙培养实验采用 250 mL 玻璃广口瓶进行,实验设置 4 个水分梯度:即田间持水量(WHC)的 30%、60%、90% 及淹水状态(waterlog),分别在第 7、15、30、60 d 进行破坏性取样,每个处理设置 4 个重复。微宇宙培养实验过程如下:分别向每个广口瓶装入 50 g 土壤,通过向土壤中均匀地添加不同量的无菌水,调节土壤含水率至田间持水量(WHC)的 30%、60%、90% 以及淹水约 2 cm 深,并在调节水分梯度的同时加入终含量为 10  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的  $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ (氯化铵)。此后将 Eh 计的 Pt 电极插入土壤,以铝箔纸盖住瓶口,置于 28℃ 培养。培养过程中通过每周补加水保持恒重,培养开始后每隔 7 d 再次加入 10  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的  $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ (与调节含水量同时进行),如遇当天或第 2 d 取样的处理则加等量无菌水替代氯化铵溶液,以保证每次取样均在加氯化铵后 7 d 进行。每次于采样前一天把广口瓶用涂有真空硅脂的橡胶塞密封,继续培养 24 h 后用注射器抽取 50 mL 气体置于气袋中待测,然后把广口瓶中的土样混匀后分为两份,一份经冷冻干燥后保存于 -80℃ 冰箱用于 DNA 的提取,其余保存在 4℃ 冰箱用于基本理化性质的测定。

### 1.2 土壤 Eh、 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 的测定

土壤 Eh 值测定采用 PRN-41 便携式土壤 Eh 计(DKK, TOA, Tokyo, Japan)进行,该 Eh 计由测定电极和参比电极组成,培养过程中 Pt 电极一直插于土壤中,测量时将参比电极尽量靠近 Pt 电极插入土壤深度约为 2 cm,待数值稳定 1 min 不动时进行读数,每次测定时通过在不同方位移动参比电极读取 3~4 个读数取其平均值作为 Eh 读数。

土壤  $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^- \text{-N}$  含量的测定以 1  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  KCl 溶液(土水比 1:5)在 200  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  下振荡浸提 1 h,离心,过滤,用连续流动分析仪(SAN++, Skalar, Holland)测定。

### 1.3 $\text{N}_2\text{O}$ 和 $\text{CO}_2$ 的测定

$\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{CO}_2$  测定分别以带有 ECD 电子捕获检测器和 FID 氢火焰检测器的气相色谱仪(Agilent GC 7890A)进行。

### 1.4 土壤 DNA 提取

土壤总 DNA 提取采用 PowerSoil™ Total DNA

Isolation 试剂盒进行 (MO BIO laboratories, CA, USA), 称取 0.25 g 经过冷冻干燥后的土样, 按试剂盒提供的操作步骤进行, 以 FastPrep<sup>®</sup> 细胞破碎仪 (Qiogene Inc., USA) 进行细胞破碎处理, 速度  $5.0 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ , 时间 45 s. 提取的 DNA 在 1% 的琼脂糖胶中进行电泳检测.

### 1.5 定量 PCR 分析

功能基因的定量分析采用 SYBR GREEN 法, 亚硝酸盐还原酶基因 *nirK*、*nirS*、氨氧化细菌 (AOB) 和氨氧化古菌 (AOA) 的 *amoA* 基因的定量分析引物分别为 F1aCu/R3Cu、cd3aF/R3cd<sup>[17]</sup>、amoA1F/amoA2R<sup>[3]</sup>、CrenamoA23f/CrenamoA616r<sup>[18]</sup>. 25  $\mu\text{L}$  定量 PCR 反应体系中包括  $2 \times \text{SYBR Premix Ex Taq}^{\text{TM}}$  (TaKaRa, Japan) 12.5  $\mu\text{L}$ , 引物 (浓度为  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 各 0.5  $\mu\text{L}$  以及 10 倍稀释的模板 DNA 2  $\mu\text{L}$ . Real-time PCR 反应在 Bio-rad iQ5 机器上运行. 其中 *nirK*、*nirS* 基因均采用 touchdown 程序, *nirK* 的扩增程序为:  $95^{\circ}\text{C}$  2 min;  $95^{\circ}\text{C}$  30 s,  $63^{\circ}\text{C}$  30 s ( $-1^{\circ}\text{C}/\text{cycle}$ ),  $72^{\circ}\text{C}$  30 s (5 个循环);  $95^{\circ}\text{C}$  30 s,  $58^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  30 s (30 个循环). *nirS* 的扩增程序为:  $95^{\circ}\text{C}$  2 min;  $94^{\circ}\text{C}$  30 s,  $58^{\circ}\text{C}$  60 s ( $-1^{\circ}\text{C}/\text{cycle}$ ),  $72^{\circ}\text{C}$  30 s (5 个循环);  $94^{\circ}\text{C}$  30 s,  $53^{\circ}\text{C}$  60 s,  $72^{\circ}\text{C}$  30 s (30 个循环). AOB 和 AOA *amoA* 的退火温度均为  $55^{\circ}\text{C}$ , 扩增分别采用 35 和 40 个循环. 以上 4 个基因均在  $83^{\circ}\text{C}$  收集反应荧光信号, 数据分析采用 iCycler 软件.

### 1.6 T-RFLP 方法

反硝化微生物的群落结构组成以 T-RFLP 方法进行, *nirS* 基因的 PCR 扩增引物与定量 PCR 所用引物 (cd3aF/R3cd) 相同, 前引物 5' 端以荧光染料 6-carboxyfluorescein (6-FAM) 标记. 50  $\mu\text{L}$  的反应体系中包括  $2 \times \text{Premix Ex Taq}^{\text{TM}}$  (TaKaRa, Japan) 25  $\mu\text{L}$ , 引物 (浓度为  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 各 1  $\mu\text{L}$  以及 10 倍稀释的模板 DNA 4  $\mu\text{L}$ . 扩增采用 touchdown 程序, 反应条件为:  $95^{\circ}\text{C}$  5 min;  $95^{\circ}\text{C}$  45 s,  $63^{\circ}\text{C}$  30 s ( $-1^{\circ}\text{C}/\text{cycle}$ ),  $72^{\circ}\text{C}$  30 s (5 个循环);  $95^{\circ}\text{C}$  45 s,  $58^{\circ}\text{C}$  30 s,

$72^{\circ}\text{C}$  45 s (30 个循环);  $72^{\circ}\text{C}$  6 min. 被标记的 PCR 产物使用 Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA) 试剂盒进行纯化, 具体步骤按照说明书进行. 纯化的 PCR 产物以限制性内切酶 *Msp* I (Takara, Japan) 进行酶切. 20  $\mu\text{L}$  的酶切反应体系包括纯化后的 PCR 产物 6  $\mu\text{L}$ , 限制性内切酶 (*Msp* I) 1  $\mu\text{L}$ ,  $10 \times \text{T Buffer}$  和 0.1% BSA 各 2  $\mu\text{L}$ , 其余以无菌水补足. 在  $37^{\circ}\text{C}$  条件下反应 3 h, 然后把以上酶切产物送至测序公司进行纯化、电泳和测序. T-RFLP 图谱分析使用 GeneMapper (Applied Biosystems) 软件进行分析, 根据标准样品 ROX-500 的检测范围, 选取长度小于 500 bp 的片段进行分析. 把片段长度之差小于 1 bp 的片段进行合并, 计算出每个检测峰的峰高占所有检测峰中最大峰高的百分比, 其中百分比小于 0.5% 的检测峰作为噪声值被剔除.

### 1.7 数据处理

实验中的数据作图分析在 Origin8 中完成, 统计分析在 SPSS 16.0 软件中进行, 其中, 差异显著性检测采用单因素方差分析 (S-N-K 检验,  $P < 0.05$ ), 相关性用直线相关分析 (Bivariate 过程), 采用 Spearman 相关系数计算, 双尾显著性检验. 对 T-RFLP 的结果采用典型对应分析 (canonical correspondence analysis, CCA) 来研究样品间群落组成的差异及其与环境变量的关系, 在 CANOCO 4.5 软件中完成.

## 2 结果与分析

### 2.1 不同水分梯度下土壤 Eh 的变化

淹水处理后, 土壤 Eh 迅速降低, 整个培养过程中淹水处理土壤 Eh 在 107 ~ 245 mV 之间, 显著低于非淹水处理 (444 ~ 640 mV). 各处理中, 除 30% WHC 处理土壤 Eh (521 ~ 560 mV) 随培养时间延长无显著变化外, 其余处理土壤 Eh 在培养后期显著增加 (表 1). 60% WHC 处理土壤 Eh 除在 60 d 时 (约 621 mV) 显著高于 30% WHC (约 555 mV) 处理

表 1 培养过程中土壤 Eh 的变化<sup>1)</sup>/mV

Table 1 Dynamics of soil Eh during microcosm incubation/mV

持水量	7 d	15 d	30 d	60 d
30% WHC	520.8 ± 12.15a	550.2 ± 7.54a*	560.1 ± 3.91b'	555 ± 8.76b''
60% WHC	556 ± 6.45a	558.8 ± 4.68a*	573.9 ± 5.10b'	621.1 ± 7.26a''
90% WHC	443.8 ± 1.88b	496.6 ± 10.21b*	619.4 ± 1.87a'	639.8 ± 2.82a''
waterlog	112.7 ± 2.46c	107.1 ± 7.03c*	131.1 ± 5.95c'	245.2 ± 44.48c''

1) 表中数值为平均值 ± 标准误 ( $n = 4$ ); 表中分别对各个取样时间单独进行 ANOVA 分析, 并添加“\* ' ' ”等符号相互区别; 同一列数据显著性差异以不同字母表示 (“a”为最大值,  $P < 0.05$ )

外,其余时间点土壤 Eh 与 30% WHC 无明显区别. 90% WHC 处理土壤 Eh 在培养前期(7 d 时)较低(444 mV),之后逐渐增加至约 640 mV. 淹水处理土壤 Eh 在培养前 30 d 无明显变化(107 ~ 131 mV),培养至 60 d 时增加至 245 mV. 总体来说,Eh 与土壤含水量呈显著负相关关系( $r = -0.506, P < 0.05$ , 表 2).

## 2.2 不同水分梯度下土壤 $\text{NH}_4^+$ -N、 $\text{NO}_3^-$ -N 的变化和 $\text{N}_2\text{O}$ 、 $\text{CO}_2$ 的释放

供试水稻土的  $\text{NH}_4^+$ -N 和  $\text{NO}_3^-$ -N 本底值分别为

$56.96 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  和  $1.76 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . 培养过程中每 7 d 向土壤中加入  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$   $\text{NH}_4^+$ -N, 培养过程中  $\text{NH}_4^+$ -N 和  $\text{NO}_3^-$ -N 的含量变化如图 1、2 所示. 除 90% WHC 处理土壤外,其余各处理土壤中  $\text{NH}_4^+$ -N 均呈现出不同程度的累积现象. 其中,30% WHC 处理土壤铵态氮明显累积,培养 7 ~ 60 d 时  $\text{NH}_4^+$ -N 从  $51.07 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  明显增加至  $149.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 而  $\text{NO}_3^-$ -N 没有明显累积,在  $0 \sim 45.87 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  之间波动. 60% WHC 处理土壤  $\text{NH}_4^+$ -N 在 7 ~ 60 d 的培养过程中从  $61.26 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  明显增加至  $121.7 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,

表 2 土壤理化指标及基因丰度等的相关分析<sup>1)</sup>

Table 2 Correlations among soil physiochemical properties and gene abundances

	Eh	$\text{NH}_4^+$ -N	$\text{NO}_3^-$ -N	$C_w$	$\text{N}_2\text{O}$	<i>nirS</i>	<i>nirK</i>	AOA <i>amoA</i>
$\text{NH}_4^+$ -N	-0.003							
$\text{NO}_3^-$ -N	<b>0.829</b>	-0.252						
$C_w$	<b>-0.506</b>	-0.226	-0.180					
$\text{N}_2\text{O}$	-0.262	-0.374	-0.037	<b>0.600</b>				
<i>nirS</i>	0.038	0.038	0.112	0.238	0.179			
<i>nirK</i>	0.026	-0.232	0.337	0.491	0.474	<b>0.826</b>		
AOA <i>amoA</i>	0.115	0.321	0.007	-0.194	0.079	<b>-0.559</b>	-0.394	
AOB <i>amoA</i>	0.206	-0.126	0.394	0.388	0.438	<b>0.624</b>	<b>0.729</b>	-0.215

1) 粗体表示相关显著或极显著

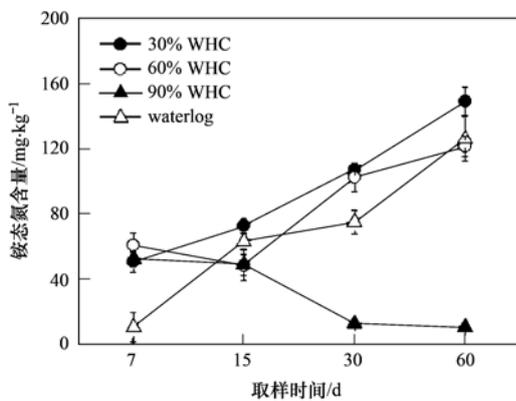


图 1 土壤  $\text{NH}_4^+$ -N 浓度

Fig. 1 Concentration of soil  $\text{NH}_4^+$ -N

但土壤  $\text{NO}_3^-$ -N 含量在培养前 30 d ( $67.52 \sim 70.57 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 显著高于其它所有处理(除了 30 d 时与 90% WHC 处理无显著差异外),且在 30 d 后增至  $92.72 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . 90% WHC 处理土壤  $\text{NH}_4^+$ -N 浓度在第 7 d 和第 15 d 时较高,分别为  $52.85 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  和  $49.22 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,但在培养至 30 d 后显著降低至  $13.13 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  以下;  $\text{NO}_3^-$ -N 浓度则相反,在培养初期较低( $3.89 \sim 19.16 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),但在培养 30 d 后,显著增高至  $133.4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . 这些结果表明 60%

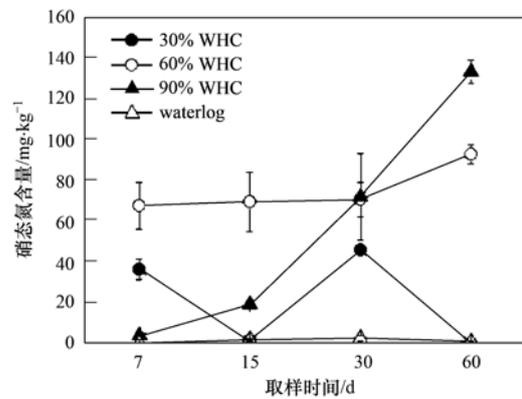


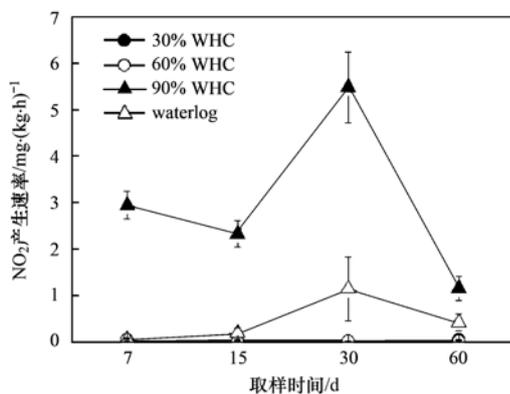
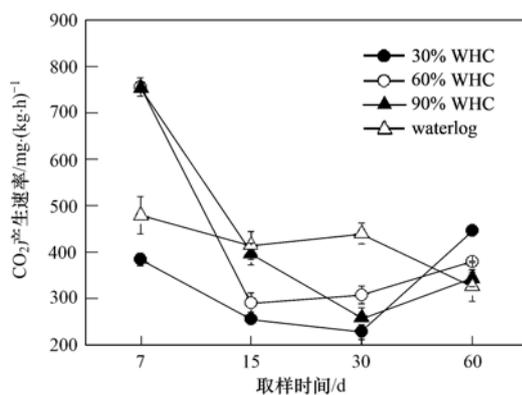
图 2 土壤  $\text{NO}_3^-$ -N 浓度

Fig. 2 Concentration of soil  $\text{NO}_3^-$ -N

WHC 和 90% WHC 处理土壤在培养过程中,发生了明显的硝化作用. 淹水处理(waterlog)土壤随培养时间延长,  $\text{NH}_4^+$ -N 浓度一直增加,而  $\text{NO}_3^-$ -N 浓度在整个培养过程中均低于  $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . 总体来说,土壤  $\text{NO}_3^-$ -N 含量与土壤 Eh 呈极显著正相关关系( $r = 0.829, P < 0.05$ ),而与土壤含水率的相关关系不显著.

在每次取样前 24 h,培养瓶以密闭胶塞密闭后继续培养 24 h,收集气体分析  $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{CO}_2$  产生速率,结果表明,在不同取样时间下,30% 和 60% WHC 处

理土壤均检测不到 $N_2O$ 的产生,而90%和淹水处理土壤中能检测到明显的 $N_2O$ 的释放,且 $N_2O$ 的产生速率(以干土计,下同)在30 d时 $N_2O$ 最高(图3),分别为 $5.49 \text{ mg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{h})^{-1}$ 和 $1.15 \text{ mg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{h})^{-1}$ ,表明90% WHC和淹水处理土壤中有反硝化作用发生。 $CO_2$ 分析结果显示其变化范围(以干土计,下同)为 $229 \sim 756 \text{ mg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{h})^{-1}$ ,所有处理中,60% WHC和90% WHC处理培养7 d时 $CO_2$ 的产生速率最高,分别为 $756 \text{ mg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{h})^{-1}$ 和 $754 \text{ mg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{h})^{-1}$ ,且显著高于30% WHC [ $385 \text{ mg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{h})^{-1}$ ]和淹水处理 [ $480 \text{ mg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{h})^{-1}$ ](图4)。7 d后,除淹水处理土壤的 $CO_2$ 产生速率在培养过程中一直下降外,其他3个非淹水处理均表现出先降低后小幅增加的趋势(图4)。结合该水稻土热水可溶性有机碳HWC含量较高,达 $415 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,表明在培养前期发生了强烈的有机碳矿化作用,尤其是在60%和90% WHC处理的土壤中,适宜的水分含量显著促进了微生物的呼吸和有机碳的矿化作用,对 $NO_3^-$ -N的积累产生一定贡献。

图3 土壤 $N_2O$ 释放量Fig. 3 Flux of soil  $N_2O$  emission图4 土壤 $CO_2$ 释放量Fig. 4 Flux of soil  $CO_2$  emission

### 2.3 不同水分梯度下土壤硝化/反硝化微生物群落丰度的变化

各处理土壤中反硝化微生物相关的 *nirS* 和 *nirK*, 以及氨氧化细菌和古菌 *amoA* 基因的定量分析结果如图5所示。所有处理中, *nirS* 基因的丰度(以干土计,下同,  $8.19E+06 \sim 5.30E+08 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$ )均显著高于 *nirK* 基因 ( $2.99E+05 \sim 7.28E+07 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$ ), 见图5(a)和图5(b)。 *nirS* 基因在淹水处理7 d时丰度最低 ( $8.19E+06 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$ ), 在90% WHC处理15 d和30 d时较高 ( $5.30E+08 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $4.65E+08 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$ )。而在其它取样时间下,不同处理间 *nirS* 基因的丰度无显著差异。同样, *nirK* 基因的最低丰度 ( $2.99E+05 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$ )也出现在淹水处理的第7 d, 在90% WHC处理30 d时最高 ( $7.28E+07 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$ )。60% WHC、90% WHC和淹水处理中 *nirK* 基因丰度均明显高于30% WHC处理。总体来说, *nirK* 基因丰度呈现随水分梯度和培养时间先增加后降低的趋势, 即90% WHC处理高于其它处理, 除30% WHC中 *nirK* 基因丰度随培养时间延长无显著变化外, 其余处理在培养中期(15 d或30 d)最高。由此可见, 土壤中 *nirK* 基因的丰度对水分变化的响应比 *nirS* 基因灵敏。

各处理中 AOB *amoA* 基因的丰度在培养7 d时无差异, 7 d后 AOB *amoA* 基因的丰度也呈随水分梯度增加先增加后下降的趋势, 在90% WHC和淹水处理中显著高于30%和60% WHC处理土壤[图5(c)]。各处理间 AOA *amoA* 的丰度在各取样时间点均无明显差异, 只是15 d时的丰度显著低于其他培养时间[图5(d)]。

### 2.4 不同水分梯度下土壤反硝化微生物群落结构的变化

由于部分样品 *nirK* 基因丰度较低, 不能得到足够的PCR产物用于T-RFLP分析, 因此仅对 *nirS* 基因的群落结构组成进行了分析。T-RFLP分析结果显示, 限制性内切酶 *Msp* I 共获得11个 *nirS* 基因末端片段, 分别为70 bp、108 bp、112 bp、115 bp、175 bp、203 bp、219 bp、223 bp、258 bp、261 bp、271 bp T-RFs(图6)。

培养前期(7 d时), *nirS* 基因代表的反硝化微生物群落组成在各处理间无明显差异, 219 bp和112 bp T-RFs为优势片段, 分别占43%~56%和20%~44%。7 d后, 219 bp和112 bp T-RFs的相对丰度降低, 而223 bp T-RF的比例显著增加, 其相对

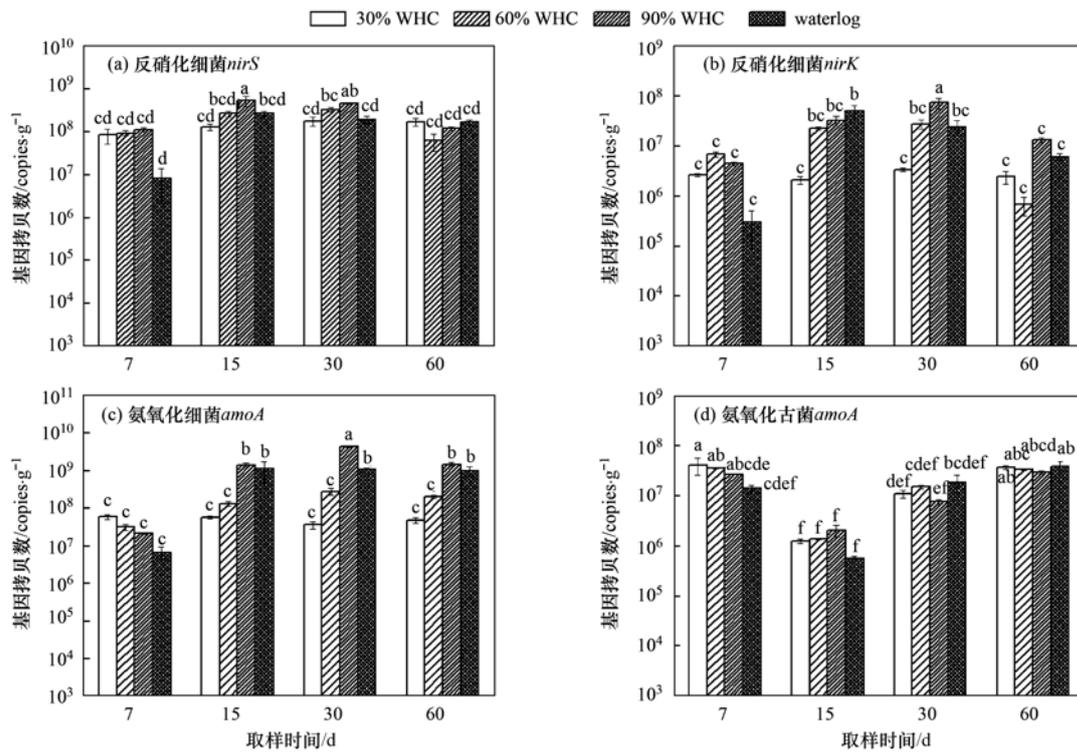


图 5 反硝化/氨氧化微生物功能基因丰度

Fig. 5 Abundance of functional genes of denitrifiers and ammonia-oxidizing microbes

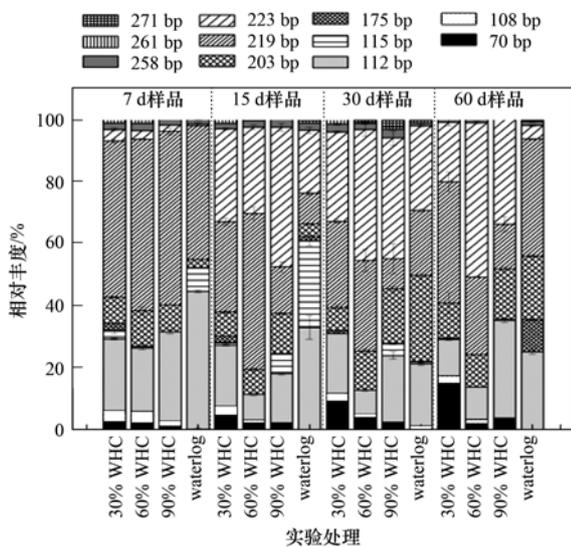


图 6 不同水分梯度处理下反硝化微生物 (*nirS* 基因) 群落组成的变化

Fig. 6 Change of denitrifiers (*nirS* gene) community composition under different moisture gradients

丰度从 7 d 时的 0.4% ~ 4% 增加至 60 d 时的 4% ~ 50%, 但淹水处理中的该片段在各取样时间下均最低. 219 bp 和 70 bp T-RFs 的相对丰度总体随着水分梯度增加而降低, 并且在淹水处理中检测不到 70 bp T-RF; 而 203 bp 和 112 bp T-RFs 总体随水分梯

度增加而增加, 在培养 30 d 和 60 d 时最高, 203 bp T-RF 在 90% WHC 和淹水处理中所占比例达 17% ~ 28% (30 d) 和 16% ~ 21% (60 d), 均明显高于其他取样时间和其他水分处理. 这些结果表明 *nirS* 型反硝化微生物组成对土壤水分含量变化响应灵敏, 水分含量的增加一方面抑制了 70 bp T-RF 等类群的生长, 同时刺激了 203 bp 和 112 bp T-RFs 等反硝化微生物的生长 (图 6).

对 *nirS* 基因所代表的反硝化微生物群落结构组成与环境变量进行的典型对应分析 (CCA) 结果 (图 7) 表明, 淹水与非淹水处理沿 X 轴被明显分离, 90% WHC 和 30% WHC 处理沿 Y 轴分离, X 轴和 Y 轴分别解释了 56% 和 30.5% 的变异. 在所考察的 4 个环境变量 Eh、含水率  $C_w$ 、 $\text{NO}_3^-$ -N 和  $\text{NH}_4^+$ -N 中, Eh 和含水率  $C_w$  对 *nirS* 基因的多样性组成具有显著影响, 表明水分含量对该土壤 *nirS* 反硝化微生物的群落结构产生明显影响.

### 3 讨论

#### 3.1 土壤水分对硝化/反硝化作用和 Eh 的影响

硝化作用是微生物的好氧化过程, 多数研究显示, 在田间持水量的 50% ~ 60% 时, 土壤硝化作

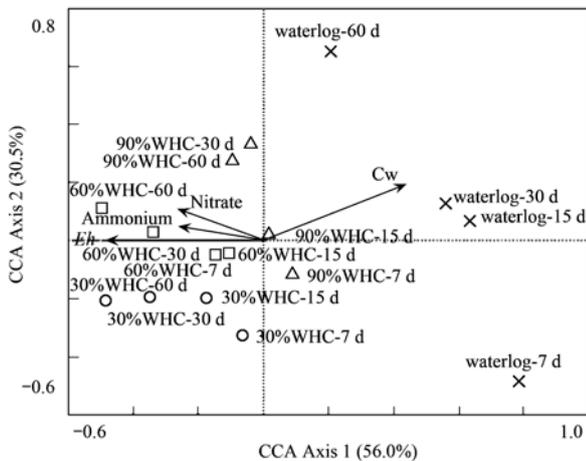


图7 *nirS* 基因 T-RFLP 和环境变量的 CCA 分析

Fig. 7 Canonical correspondence analysis (CCA) of *nirS* gene T-RFLP relative abundance and environment parameters

用最为活跃,这个水分范围既满足了微生物代谢活动的最佳水分条件,也满足了氧气扩散的条件<sup>[19,20]</sup>。反硝化作用是微生物在嫌气条件下进行的硝酸盐还原过程,受土壤水分和通气状况的影响,主要发生于水分含量较高的还原条件下。本研究对不同水分梯度培养下土壤 $\text{NH}_4^+$ -N、 $\text{NO}_3^-$ -N和 $\text{N}_2\text{O}$ 的监测结果显示,30% WHC 处理土壤在整个培养过程中无明显 $\text{NH}_4^+$ -N消耗和 $\text{NO}_3^-$ -N累积,也无 $\text{N}_2\text{O}$ 释放,表明无明显的硝化和反硝化作用发生;60% WHC 处理土壤在培养7 d 取样时, $\text{NO}_3^-$ -N浓度明显高于其他处理和背景值, $\text{CO}_2$ 产生速率此时最高,之后明显下降,而在培养后期 $\text{NO}_3^-$ -N明显累积,表明培养初期 $\text{NO}_3^-$ -N主要来自于矿化作用,后期则主要来自于硝化作用; $\text{N}_2\text{O}$ 释放仅在90% WHC 和淹水处理中检测到,表明反硝化作用只在这两个水分含量较高的处理中发生。这些结果与之前对硝化和反硝化作用的认识一致。但较为意外的是,90% WHC 处理虽然在培养初期土壤 $\text{NO}_3^-$ -N含量低于60% WHC 处理,但在培养后期显著高于60% WHC 处理土壤,而且整个培养过程中 $\text{NH}_4^+$ -N显著下降,表明90% WHC 处理土壤硝化作用较60% WHC 处理更强烈。同时,90% WHC 处理还发生了强烈的反硝化作用。

Masscheleyn 等<sup>[21]</sup>研究发现,当土壤 Eh 小于200 mV 时,反硝化作用显著,而当土壤 Eh 大于400 mV 时,土壤中硝化作用占优势,反硝化作用相对较弱。本研究对 Eh 监测的结果显示淹水处理显著降低土壤 Eh,整个培养过程中淹水处理土壤 Eh 在107~245 mV 之间,而60% WHC 和90% WHC 处理土壤 Eh 在444~640 mV 之间,保证了硝化作用发

生所需的氧化条件,同时,90% WHC 处理中,硝化作用可能通过为反硝化作用提供底物而促进了反硝化作用发生。倪吾钟等<sup>[22]</sup>通过 $^{15}\text{N}$  标记实验也发现稻田土壤在氧化 (Eh, 290~330 mV) 和还原 (Eh, -114~42 mV) 条件下均能进行硝态氮的反硝化作用。Zhou 等<sup>[23]</sup>的研究也发现,当土壤中起始 $\text{NO}_3^-$ -N 很低时,加入 $\text{NH}_4^+$ -N 后会发生硝化-反硝化耦合作用,最终促进反硝化作用的发生。但从本研究结果来看,这种硝化和反硝化之间耦合作用仅发生在特定的水分(90% WHC) 和 Eh 条件下,随含水量进一步增加,即淹水处理土壤硝化作用减弱,反硝化作用也减弱。而且笔者也发现土壤中硝态氮含量与 Eh 呈极显著正相关,与含水量的相关性不显著,而 $\text{N}_2\text{O}$  释放量则与土壤含水量呈显著正相关而与 Eh 的相关性不显著。Khalil 等<sup>[24]</sup>运用 $^{15}\text{N}$  同位素进行的研究也表明在75% 土壤孔隙水 (water filled pore space, WFPS) 时土壤 $\text{N}_2\text{O}$  排放最大,且主要来自反硝化作用,表明反硝化作用不一定只发生在还原状态,氧化状态下硝化-反硝化作用耦合也可产生 $\text{N}_2\text{O}$ 。这些结果与有关干湿交替、好氧厌氧条件经常变化的环境能提供最优的反硝化条件<sup>[25]</sup> 等的研究结论一致。

然而,值得注意的是,近来越来越多的证据表明硝化作用过程也是 $\text{N}_2\text{O}$  释放的一个主要源头<sup>[26,27]</sup>。硝化作用产生 $\text{N}_2\text{O}$  有两种可能的途径,一是氨氧化微生物氧化 $\text{NH}_3$  为 $\text{NH}_2\text{OH}$  的过程中, $\text{N}_2\text{O}$  作为副产物释放;另一个途径是在低氧条件下,氨氧化微生物参与了 $\text{NO}_2^-$  还原为 $\text{N}_2\text{O}$  的过程,即发生了硝化微生物的反硝化作用 (nitrifier denitrification)。因此不能排除本研究中硝化作用过程对90% WHC 处理中检测到的 $\text{N}_2\text{O}$  释放是否有贡献。下一步研究需要借助 $^{15}\text{N}$  和 $^{18}\text{O}$  同位素双标记技术进行研究以阐明此水分条件下 $\text{N}_2\text{O}$  产生的微观机制。

除90% WHC 处理外,淹水处理在整个培养过程中也检测到 $\text{N}_2\text{O}$  的释放,但其总量明显小于90% WHC 处理。Cai 等<sup>[7]</sup>对水稻田进行的长期监测结果也表明,水稻田在淹水期间释放的 $\text{N}_2\text{O}$  非常少,而在落干季节的排放量最大。在过度还原的条件下可促进完全反硝化过程的发生,即反硝化作用终产物以 $\text{N}_2$  为主,而不是 $\text{N}_2\text{O}$ <sup>[28,29]</sup>。对于淹水条件下 $\text{N}_2\text{O}$  的释放量减少是由于反硝化作用发生完全释放 $\text{N}_2$  还是由于硝化-反硝化耦合作用受阻导致反硝化作用减弱所致还需进一步研究。

此外,培养过程中各个水分处理土壤 Eh 均有

随时间延长而增高的趋势(30% WHC 除外),尤其是 90% WHC 和淹水处理,土壤 Eh 值随培养时间显著增加,可能由于培养瓶在长时间静置后,导致空气中的氧气进一步溶解扩散,以及还原性物质被氧化所致. 另外,整个过程中 Eh 的测定也可能存在一定的误差,水分含量较高的处理土壤在培养过程中,土壤聚集成团,使得氧气随空隙扩散,进而导致 Eh 测量值比理论值偏高. 但这些实验及测量误差并不影响硝化和反硝化作用对不同水分梯度响应的总体趋势.

### 3.2 土壤水分对反硝化微生物群落的影响

参与反硝化作用过程的功能基因有多个,由于亚硝酸盐转化为一氧化氮的过程是反硝化作用有别于其他硝酸盐代谢的标志性反应,是反硝化过程中的重要限速步骤,其相应的亚硝酸盐还原酶基因(*nir* 基因)包括 *nirK* (*Cu-nitrite reductase gene*) 和 *nirS* (*cd<sub>1</sub>-nitrite reductase gene*) 常被作为反硝化微生物的代表性分子标记用于其群落结构研究. 有研究表明 *nirK* 基因对外界环境因子的响应更灵敏<sup>[30]</sup>,在土壤反硝化中可能起着比 *nirS* 更为重要的作用<sup>[31]</sup>,因此反硝化细菌 *nirK* 基因丰度常被用来表征和预测 N<sub>2</sub>O 的释放<sup>[30, 32]</sup>. 本研究结果显示,受土壤水分条件的影响,反硝化微生物数量和群落结构发生明显变化. 在所有处理中,*nirS* 基因丰度显著地高于 *nirK*,培养过程中 *nirK* 和 *nirS* 基因丰度整体随着水分的增加而增加,这一现象在 Szukics 等的研究中也存在<sup>[3]</sup>,尤其 *nirK* 基因反应更为灵敏.

此外,AOB *amoA* 的丰度与 *nirS* 和 *nirK* 基因表现出相似的趋势,三者之间呈极显著的正相关. 而 AOA *amoA* 的基因丰度除了在 15 d 时显著低于其他培养时间外,在其他取样时间和水分梯度处理间无明显变化. 表明该土壤中氨氧化细菌对水分条件变化的响应比氨氧化古菌灵敏,且在高水分处理土壤的氨氧化过程中起了重要作用. 除 7 d 取样外,其余各个取样时间点 AOB *amoA*、*nirS* 和 *nirK* 基因的丰度均在 90% WHC 处理土壤中最高,而在淹水处理土壤中又有所下降,表明 90% WHC 条件最适宜土壤氨氧化细菌和反硝化细菌的生长,有利于硝化及反硝化作用共同发生. 随水分含量的进一步增加,硝化及反硝化微生物的丰度均下降,硝化、反硝化作用的强度也减弱. 这可能是由于淹水导致的过度还原条件抑制了硝化微生物的活性,进而限制了反硝化作用底物的浓度,最终抑制了反硝化微生物的活性.

此外,对 *nirS* 基因的 T-RFLP 分析结果表明,水分增加抑制了 219 bp 和 70 bp T-RFs 等反硝化微生物类群的生长,但同时刺激了 203 bp 和 112 bp T-RFs 等类群的生长. 可见,203 bp 和 112 bp T-RFs 对应的反硝化微生物类群可能在高水分处理土壤的反硝化作用中起了重要作用. CCA 分析结果进一步揭示了在本研究所模拟的底物为非限制性因子的条件下,含水率  $C_w$  和氧化还原电位 Eh 是影响土壤反硝化微生物群落结构的两个重要因素.

## 4 结论

(1) 硝化作用主要发生于 60% WHC 和 90% WHC 处理土壤中,且 90% WHC 处理最强,并检测到明显的 N<sub>2</sub>O 释放,表明该水分条件可能发生了硝化-反硝化耦合作用;淹水处理土壤 Eh 显著低于非淹水处理土壤,无明显的硝化作用发生,但能检测到少量 N<sub>2</sub>O 的释放.

(2) 定量 PCR 分析结果表明,*nirS*、*nirK* 及 AOB *amoA* 的丰度均随着水分增加而增加,且在 90% WHC 处理中最高,与该处理中硝化和反硝化活性最高一致,表明这些基因在土壤硝化和反硝化过程中起了重要作用.

(3) *nirS* 基因为代表的反硝化微生物群落组成随土壤水分条件变化发生明显变化,含水率  $C_w$  和氧化还原电位 Eh 是影响其群落结构组成重要因素,一些类群仅在高水分处理土壤中出现,可能在这些处理土壤的反硝化作用中起了重要作用.

### 参考文献:

- [1] 孙志强,郝庆菊,江长胜,等. 农田土壤 N<sub>2</sub>O 的产生机制及其影响因素研究进展[J]. 土壤通报, 2010, 41(6): 1524-1530.
- [2] 张玉树,丁洪,秦胜金. 农业生态系统中氮素反硝化作用与 N<sub>2</sub>O 排放研究进展[J]. 中国农学通报, 2010, 26(6): 253-259.
- [3] Szukics U, Abell G C J, Hödl V, et al. Nitrifiers and denitrifiers respond rapidly to changed moisture and increasing temperature in a pristine forest soil[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2010, 72(3): 395-406.
- [4] Hwang S, Hanaki K. Effects of oxygen concentration and moisture content of refuse on nitrification, denitrification and nitrous oxide production[J]. Bioresource Technology, 2000, 71(2): 159-165.
- [5] 李勇先,田光明. 不同水分管理模式下水稻土氮素形态转化与 N<sub>2</sub>O 释放的关系[J]. 生态环境, 2003, 12(2): 157-159.
- [6] Liu J B, Hou H J, Sheng R, et al. Denitrifying communities differentially respond to flooding drying cycles in paddy soils[J]. Applied Soil Ecology, 2012, 62: 155-162.

- [ 7 ] Cai Z C, Xing G X, Yan X Y, *et al.* Methane and nitrous oxide emissions from rice paddy fields as affected by nitrogen fertilisers and water management[J]. *Plant and Soil*, 1997, **196**(1): 7-14.
- [ 8 ] Bender S F, Plantenga F, Neftel A, *et al.* Symbiotic relationships between soil fungi and plants reduce N<sub>2</sub>O emissions from soil[J]. *The ISME Journal*, 2014, **8**(6): 1336-1345.
- [ 9 ] 贺纪正, 张丽梅. 土壤氮素转化的关键微生物过程及机制[J]. *微生物学通报*, 2013, **40**(1): 98-108.
- [ 10 ] Chen Z, Luo X Q, Hu R G, *et al.* Impact of long-term fertilization on the composition of denitrifier communities based on nitrite reductase analyses in a paddy soil[J]. *Microbial Ecology*, 2010, **60**(4): 850-861.
- [ 11 ] Ju X T, Lu X, Gao Z L, *et al.* Processes and factors controlling N<sub>2</sub>O production in an intensively managed low carbon calcareous soil under sub-humid monsoon conditions [J]. *Environmental Pollution*, 2011, **159**(4): 1007-1016.
- [ 12 ] Bao Q L, Ju X T, Gao B, *et al.* Response of nitrous oxide and corresponding bacteria to managements in an agricultural soil[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2012, **76**(1): 130-141.
- [ 13 ] Galbally I E, Freney J R, Muirhead W A, *et al.* Emission of nitrogen oxides (NO<sub>x</sub>) from a flooded soil fertilized with urea: Relation to other nitrogen loss processes [J]. *Journal of Atmospheric Chemistry*, 1987, **5**(3): 343-365.
- [ 14 ] Buresh R J, de Datta S K, Samson M I, *et al.* Dinitrogen and nitrous oxide flux from urea basally applied to puddled rice soils [J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1991, **55**(1): 268-273.
- [ 15 ] Henderson S L, Dandie C E, Patten C L, *et al.* Changes in denitrifier abundance, denitrification gene mRNA levels, Nitrous oxide emissions, and denitrification in anoxic soil microcosms amended with glucose and plant residues [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, **76**(7): 2155-2164.
- [ 16 ] Senbayram M, Chen R R, Mühling K H, *et al.* Contribution of nitrification and denitrification to nitrous oxide emissions from soils after application of biogas waste and other fertilizers[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2009, **23**(16): 2489-2498.
- [ 17 ] Throbäck I N, Enwall K, Jarvis Å, *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 ] Bustamante M, Verdejo V, Zúñiga C, *et al.* Comparison of water availability effect on ammonia-oxidizing bacteria and archaea in microcosms of a Chilean semiarid soil [J]. *Frontier in Microbiology*, 2012, **3**: 282.
- [ 19 ] Linn D M, Doran J W. Effect of water-filled pore space on carbon dioxide and nitrous oxide production in tilled and nontilled soils[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1984, **48**(6): 1267-1272.
- [ 20 ] Skopp J, Jawson M D, Doran J W. Steady-state aerobic microbial activity as a function of soil water content [J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1990, **54**(6): 1619-1625.
- [ 21 ] Masscheleyn P H, Delaune R D, Patrick W H. Methane and nitrous oxide emissions from laboratory measurements of rice soil suspension: Effect of soil oxidation-reduction status [J]. *Chemosphere*, 1993, **26**(1-4): 251-260.
- [ 22 ] 倪吾钟, 沈仁芳, 朱兆良. 不同氧化还原电位条件下稻田土壤中<sup>15</sup>N 标记硝态氮的反硝化作用[J]. *中国环境科学*, 2000, **20**(6): 519-523.
- [ 23 ] Zhou S, Sakiyama Y, Riya S, *et al.* Assessing nitrification and denitrification in a paddy soil with different water dynamics and applied liquid cattle waste using the <sup>15</sup>N isotopic technique[J]. *Science of the Total Environment*, 2012, **430**: 93-100.
- [ 24 ] Khalil M I, Baggs E M. CH<sub>4</sub> oxidation and N<sub>2</sub>O emissions at varied soil water-filled pore spaces and headspace CH<sub>4</sub> concentrations[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2005, **37**(10): 1785-1794.
- [ 25 ] 万晓红, 周怀东, 刘玲花. 湿地反硝化作用研究进展[J]. *中国水利*, 2007, (9): 38-40.
- [ 26 ] Opdyke M R, Ostrom N E, Ostrom P H. Evidence for the predominance of denitrification as a source of N<sub>2</sub>O in temperate agricultural soils based on isotopologue measurements[J]. *Global Biogeochemical Cycles*, 2009, **23**(4), doi: 10.1029/2009GB003523.
- [ 27 ] Kool D M, Dolfing J, Wrage N, *et al.* Nitrifier denitrification as a distinct and significant source of nitrous oxide from soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2011, **43**(1): 174-178.
- [ 28 ] Wang L F, Cai Z C, Yan H. Nitrous oxide emission and reduction in a laboratory-incubated paddy soil response to pretreatment of water regime [J]. *Journal of Environmental Sciences-China*, 2004, **16**(3): 353-357.
- [ 29 ] 颜晓元, 施书莲, 杜丽娟, 等. 水分状况对水田土壤N<sub>2</sub>O排放的影响[J]. *土壤学报*, 2000, **37**(4): 482-489.
- [ 30 ] Szukics U, Hackl E, Zechmeister-Boltenstern S, *et al.* Contrasting response of two forest soils to nitrogen input: rapidly altered NO and N<sub>2</sub>O emissions and nirK abundance[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2009, **45**(8): 855-863.
- [ 31 ] 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 Environments*, 2010, **25**(1): 45-48.
- [ 32 ] Morales S E, Cosart T, Holben W E. Bacterial gene abundances as indicators of greenhouse gas emission in soils[J]. *The ISME Journal*, 2010, **4**(6): 799-808.

## CONTENTS

Variation Characteristics of Surface Ozone and Its Precursors During Summertime in Nanjing Northern Suburb .....	SHAO Ping, AN Jun-lin, YANG Hui, <i>et al.</i> (4031)
Distribution Characteristics of Pollution Gases and Water Soluble Ion in Aerosol During the Asian Youth Games of Nanjing, China .....	ZOU Jia-nan, AN Jun-lin, WANG Hong-lei, <i>et al.</i> (4044)
Aerosol Concentration Variation in Nanjing During Asian Youth Games and the Relationship Between Aerosol Concentration and Visibility .....	YUAN Liang, YIN Yan, LI Qi, <i>et al.</i> (4052)
Characteristic Analysis of a Multi-day Pollution Event in Chang-Zhu-Tan Metropolitan Area During October 2013 .....	LIAO Zhi-heng, FAN Shao-jia, HUANG Juan, <i>et al.</i> (4061)
Application of On-line Single Particle Aerosol Mass Spectrometry (SPAMS) for Studying Major Components in Fine Particulate Matter .....	FU Huai-yu, YAN Cai-qing, ZHENG Mei, <i>et al.</i> (4070)
Establishment and Application of Replaceable Source Profiles of PM <sub>10</sub> .....	CHEN Qiang, JING Yi, WU Huan-bo, <i>et al.</i> (4078)
Distribution, Flux and Biological Consumption of Carbon Monoxide in the East China Sea and the South Yellow Sea in Summer .....	WANG Jing, LU Xiao-lan, YANG Gui-peng, <i>et al.</i> (4085)
Spatial and Temporal Distribution of Mercury in Water of a Small Typical Agricultural Watershed in the Three Gorges Reservoir Region .....	WANG Ya, ZHAO Zheng, MU Zhi-jian, <i>et al.</i> (4095)
Fluorescence Characteristics of Fractionated Colloidal Organic Matter in Freshwater from Hunhe and Taizihe Watersheds .....	LIU Na-na, LI Bin, LIU Rui-xia, <i>et al.</i> (4103)
Variations of Annual Load of TN and TP in the Deep Bay Watershed, Shenzhen .....	ZHAO Chen-chen, ZHANG Shi-yan, MAO Xian-zhong (4111)
Characteristics and Bioavailability of Organic Phosphorus from Different Sources of Sediments in Dianchi Lake .....	XIONG Qiang, JIAO Li-xing, WANG Sheng-rui, <i>et al.</i> (4118)
Heavy Metals Distribution Characteristics and Ecological Risk Evaluation in Surface Sediments of Dammed Jinshan Lake .....	ZHOU Xiao-hong, LIU Long-mei, CHEN Xi, <i>et al.</i> (4127)
Vertical Distribution Pattern and Ecological Risk Assessment of Heavy Metals in a Sediment Core from Pumoyum Co, Tibet .....	XIE Ting, LUO Dong-xia, YANG Rui-qiang (4135)
Heavy Metals Pollution and Analysis of Seasonal Variation Runoff in Xi'an .....	YUAN Hong-lin, LI Xing-yu, WANG Xiao-chang (4143)
Distribution and Source Apportionment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Urban Rainfall Runoff .....	WU Zi-lan, YANG Yi, LIU Min, <i>et al.</i> (4148)
Influence of the Substrate Composition in Extensive Green Roof on the Effluent Quality .....	CHEN Yu-lin, LI Tian, GU Jun-qing (4157)
Investigation of the Microbial Diversity and Structure of Biological Activated Carbon from Different Sources in Drinking Water Treatment Process .....	DU Er-deng, ZHENG Lu, FENG Xin-xin, <i>et al.</i> (4163)
Microcystin Safety Study During <i>Cyanobacteria</i> Removal by Pressure Enhanced Coagulation Process .....	JIANG Xin-yue, LUAN Qing, CONG Hai-bing, <i>et al.</i> (4171)
Membrane Fouling Based on Change of Membrane Characteristic Parameters During Ultrafiltration of Protein .....	WANG Xu-dong, ZHANG Yin-hui, WANG Lei, <i>et al.</i> (4176)
Impact Factors and Degradation Mechanism for the Ozonation of Acetaminophen in Aqueous Solution .....	CAO Fei, YUAN Shou-jun, ZHANG Meng-tao, <i>et al.</i> (4185)
Degradation of Benzothiazole in Electro-Assisted Microbial Reactor .....	LIU Chun-miao, DING Jie, LIU Xian-shu, <i>et al.</i> (4192)
Preparation and Evaluation of Fe-La Composite Oxide Nanoadsorbent for As(III) Removal from Aqueous Solutions .....	ZHANG Wei, CHEN Jing, ZHANG Gao-sheng (4198)
Physiological Responses of Tubificidae to Heavy Metal Chromium Stress .....	LOU Ju-qing, YANG Dong-ye, CAO Yong-qing, <i>et al.</i> (4205)
Effects of Light Quality on the Growth Characteristics and Biochemical Component of <i>Chlorella pyrenoidosa</i> .....	TANG Qing-qing, FANG Zhi-guo, JI Wen-wen, <i>et al.</i> (4212)
Influence of Alkalinity and DO on ANAMMOX Bioreactor at Normal Temperature and Low Substrate Concentration .....	REN Yu-hui, WANG Ke, LI Xiang-kun, <i>et al.</i> (4218)
Effect of Fe <sup>2+</sup> and Fe <sup>3+</sup> on the Activity of ANAMMOX .....	LI Xiang, HUANG Yong, WU Chuan, <i>et al.</i> (4224)
Research on Change Process of Nitrosation Granular Sludge in Continuous Stirred-Tank Reactor .....	YIN Fang-fang, LIU Wen-ru, WANG Jian-fang, <i>et al.</i> (4230)
Effects of Salinity on N <sub>2</sub> O Production During Nitrification Using Aerobic Granular Sludge .....	WANG Shan-shan, LIANG Hong, GAO Da-wen (4237)
Analysis of Microbial Community Variation in the Domestication Process of Sludge in a Sulfate-reducing Reactor .....	ZENG Guo-qu, JIA Xiao-shan, ZHENG Xiao-hong, <i>et al.</i> (4244)
Quantifying the Influence of Different Matrices on Pb Accumulation in the Soil from Nanjing and Suspended Matter from the Lower of the Yangtze River with Pb Isotopic Technique .....	WANG Cheng, XIA Xue-qi, ZHANG Yi, <i>et al.</i> (4251)
Contamination Characteristics of Fluoroquinolones in Different Kinds of Soil Profiles in Southeast Suburb of Beijing .....	SU Si-hui, HE Jiang-tao, YANG Lei, <i>et al.</i> (4257)
Effect of Environmental Factors on the Formation of Several Typical Tetracycline Resistance Genes in Soil .....	ZHANG Jun, LUO Fang-yuan, XIONG Hao-hui, <i>et al.</i> (4267)
Response of Nitrification/Denitrification and Their Associated Microbes to Soil Moisture Change in Paddy Soil .....	LIU Ruo-xuan, HE Ji-zheng, ZHANG Li-mei (4275)
Microbial Community Abundance and Diversity in Typical Karst Ecosystem to Indicate Soil Carbon Cycle .....	JIN Zhen-jiang, TANG Hua-feng, LI Min, <i>et al.</i> (4284)
Effects of Variable Temperature on Organic Carbon Mineralization in Typical Limestone Soils .....	WANG Lian-ge, GAO Yan-hong, DING Chang-huan, <i>et al.</i> (4291)
Influence of the Interaction Between Iron Oxide and Electron Donor Substances on 1,1,1-Trichloro-2,2-bis( <i>p</i> -chlorophenyl)ethane (DDT) Reductive Dechlorination in Hydragic Acrisols .....	LIU Cui-ying, XU Xiang-hua, WANG Zhuang, <i>et al.</i> (4298)
Continuous Remediation of Heavy Metal Contaminated Soil by Co-Cropping System Enhanced with Chelator .....	WEI Ze-bin, GUO Xiao-fang, WU Qi-tang, <i>et al.</i> (4305)
Spatial Heterogeneity of Soil Respiration in a Subalpine Meadow at Different Sampling Scales .....	LI Hong-jian, GAO Yu-feng, YAN Jun-xia, <i>et al.</i> (4313)
Study on Regularity of Greenhouse Gas Emissions from Black Soil with Different Reclamation Years .....	LI Ping, LANG Man, XU Xiang-hua, <i>et al.</i> (4321)
Comparison Between Transgenic Insect-Resistant Cotton Expressing CryI <sub>Ac</sub> Protein and Its Parental Variety in Rhizospheric Fungal Diversity .....	PAN Jian-gang, JIAO Hai-hua, BAI Zhi-hui, <i>et al.</i> (4329)
Concentrations of Mercury in Ambient Air in Wastewater Irrigated Area of Tianjin City and Its Accumulation in Leafy Vegetables .....	ZHENG Shun-an, HAN Yun-lei, ZHENG Xiang-qun (4338)
Combined Effects of 1-Nitropyrene and 1,2-Naphthoquinone on Cytotoxicity and DNA Damage in A549 Cells .....	SHANG Yu, JIANG Yu-ting, ZHANG Ling, <i>et al.</i> (4345)
Influence of Organic Matter Evolution During Composting on the Bioavailability of Heavy Metals .....	BU Gui-jun, YU Jing, DI Hui-hui, <i>et al.</i> (4352)
Carbonization of Heavy Metal Cu Implanted Sewage Sludge and Stability of Heavy Metal in the Resulting Char .....	DOU Xiao-min, CHEN De-zhen, DAI Xiao-hu (4359)
Technological Characteristics of Bioreactor Landfill with Aeration in the Upper Layer .....	TIAN Ying, WANG Shen, XU Qi-yong (4365)
Impact of Nitrate Continuous Injection on N <sub>2</sub> O Releases from Bioreactor Landfill .....	BIAN Rong-xing, SUN Ying-jie, LI Jing-jing, <i>et al.</i> (4371)
Research on Contribution Decomposition by Industry to China's Carbon Intensity Reduction and Carbon Emission Growth .....	JIANG Jing-jing, YE Bin, JI Jun-ping, <i>et al.</i> (4378)
Shifting Path of Industrial Pollution Gravity Centers and Its Driving Mechanism in Pan-Yangtze River Delta .....	ZHAO Hai-xia, JIANG Xiao-wei, CUI Jian-xin (4387)
Method for Environmental Management in Paper Industry Based on Pollution Control Technology Simulation .....	ZHANG Xue-ying, WEN Zong-guo (4395)
Research Progress and Direction of Atmospheric Brown Carbon .....	YAN Cai-qing, ZHENG Mei, ZHANG Yuan-hang (4404)

# 《环境科学》第6届编辑委员会

主 编: 欧阳自远

副主编: 赵景柱 郝吉明 田 刚

编 委: (按姓氏笔画排序)

万国江 王华聪 王凯军 王绪绪 田 刚 田 静 史培军  
朱永官 刘志培 汤鸿霄 陈吉宁 孟 伟 周宗灿 林金明  
欧阳自远 赵景柱 姜 林 郝郑平 郝吉明 聂永丰 黄 霞  
黄 耀 鲍 强 潘 纲 潘 涛 魏复盛

环 境 科 学

(HUANJING KEXUE)

(月刊 1976年8月创刊)

2014年11月15日 第35卷 第11期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

(Monthly Started in 1976)

Vol. 35 No. 11 Nov. 15, 2014

主 管	中国科学院	Superintended	by	Chinese Academy of Sciences
主 办	中国科学院生态环境研究中心	Sponsored	by	Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences
协 办	(以参加先后为序) 北京市环境保护科学研究院 清华大学环境学院	Co-Sponsored	by	Beijing Municipal Research Institute of Environmental Protection School of Environment, Tsinghua University
主 编	欧阳自远	Editor-in -Chief		OUYANG Zi-yuan
编 辑	《环境科学》编辑委员会 北京市2871信箱(海淀区双清路 18号, 邮政编码:100085) 电话:010-62941102, 010-62849343 传真:010-62849343 E-mail: hjkx@rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn	Edited	by	The Editorial Board of Environmental Science ( HUANJING KEXUE) P. O. Box 2871, Beijing 100085, China Tel:010-62941102, 010-62849343; Fax:010-62849343 E-mail: hjkx@rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn
出 版	科 学 出 版 社 北京东黄城根北街16号 邮政编码:100717	Published	by	Science Press 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
印 刷 装 订	北京北林印刷厂	Printed	by	Beijing Bei Lin Printing House
发 行	科 学 出 版 社 电话:010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencep. com	Distributed	by	Science Press Tel:010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencep. com
订 购 处	全国各地邮电局	Domestic		All Local Post Offices in China
国外总发行	中国国际图书贸易总公司 (北京399信箱)	Foreign		China International Book Trading Corporation (Guoji Shudian), P. O. Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号: ISSN 0250-3301  
CN 11-1895/X

国内邮发代号: 2-821

国内定价: 90.00元

国外发行代号: M 205

国内外公开发行