ISSN 0564-3929

Acta Pedologica Sinica 土壤学报

Turang Xuebao









中国土壤学会 主办
科学出版社 出版

2015
第52卷 第5期
Vol.52 No.5

土 壤 学 报

（Turang Xuebao）

第 52 卷 第 5 期 2015 年 9 月

目 次

综述与评论

基于文献计量分析的近30年国内外土壤科学发展过程解析 …… 宋长青 谭文峰（957）

土壤生态系统服务的概念、量化及其对城市化的响应…… 吴绍华 虞燕娜 朱 江等（970）

研究论文

基于土壤系统分类的河南省土壤有机质时空变异…… 李 玲 张少凯 吴克宁等（979）

皖南第四纪红土伊利石结晶度值与风化强度的关系…… 刘莉红 胡雪峰 叶 玮等（991）

青海民和官亭盆地喇家遗址古耕作土壤层微形态研究…… 张玉柱 黄春长 庞奖励等（1002）

基于成像光谱技术预测氮素在土壤剖面中的垂直分布…… 李 硕 汪善勤 史 舟（1014）

基于探地雷达的典型喀斯特坡地土层厚度估测…… 王 升 陈洪松 付智勇等（1024）

淮河流域地表干湿变化的时空分布特征…… 曹永强 徐 丹 曹 阳（1031）

神府矿区弃土弃渣体侵蚀特征及预测…… 郭明明 王文龙 李建明等（1044）

砂石条形覆盖下土壤水分蒸发动态研究…… 赵 丹 李 毅 冯 浩（1058）

pH和三种阴离子对紫色土亚硒酸盐吸附-解吸的影响 …… 周鑫斌 于淑慧 谢德体（1069）

土壤非交换性钾释放动力学特征及其生物有效性…… 李 婷 王火焰 陈小琴等（1078）

生物质灰对红壤酸度的改良效果…… 时仁勇 李九玉 徐仁扣等（1088）

小麦秸秆生物炭对高氯代苯的吸附过程与机制研究…… 李 洋 宋 洋 王 芳等（1096）

不同温度玉米秸秆生物炭对萘的吸附动力学特征与机理…… 张 默 贾明云 卞永荣等（1106）

十溴联苯醚对秀丽隐杆线虫毒性研究…… 王赢利 陈建松 阳宇翔等（1116）

稻草和三叶草分解对微型土壤动物群落的影响…… 王 慧 桂 娟 刘满强等（1124）

沿海区土壤线虫对海水入侵土壤盐渍化的响应…… 王诚楠 张伟东 王雪峰等（1135）

土壤团聚体N_2O释放与反硝化微生物丰度和组成的关系 …… 周汉昌 张文钊 刘 毅等（1144）

基于产量、氮效率和经济效益的春玉米控释氮肥掺混比例…… 王 寅 冯国忠 张天山等（1153）

问题讨论

中国土壤系统分类基层单元土族建设现状与命名上存在的问题…… 易 晨 马渝欣 杨金玲等（1166）

研究简报

干旱与重吸水对人工藻结皮光合特性的影响…… 吴 丽 杨 红 兰书斌等（1173）

咸水灌溉对沙漠防护林植物根系分布及风沙土演变的影响…… 李从娟 唐俊妍 高 培等（1180）

不同$NaNO_3$浓度下可变电荷土壤铜离子解吸率的分配及影响因素 … 张政勤 罗文贱 陈 勇等（1188）

封面图片：不同浓度十溴联苯醚对秀丽隐杆线虫的毒性（由王赢利提供）

DOI：10.11766/trxb201410280545

土壤团聚体N_2O释放与反硝化微生物丰度和组成的关系*

周汉昌[1, 2] 张文钊[1] 刘 毅[1] 盛 荣[1] 秦红灵[1] 魏文学[1†]

（1 中国科学院亚热带农业生态研究所，长沙 410125）

（2 中国科学院大学，北京 100049）

摘 要 不同粒径团聚体的物理化学和生物学特性差异可能影响N_2O的产生与释放，但目前有关团聚体N_2O释放的微生物学机制少有研究。本研究从菜地土壤中分筛出粒径为<1 mm、2～4 mm和4～8 mm的团聚体并开展培养试验，通过实时荧光定量PCR（Quantitative Polymerase Chain Reaction，qPCR）与末端限制性片段长度多态性分析（Terminal-Restricted Fragment Length Polymorphism，T-RFLP）技术的结合，研究了不同粒径团聚体反硝化微生物群落数量与组成的变化规律及其与N_2O释放的相互关系。结果表明，不同粒径团聚体N_2O释放速率表现为：粒径小于1 mm团聚体>2～4 mm团聚体 > 4～8 mm团聚体；硝酸还原酶基因（*narG*）和氧化亚氮还原酶基因（*nosZ*）的丰度也表现为小粒径团聚体最高，随团聚体粒径增加而显著下降。然而，不同粒径团聚体间含*narG*和*nosZ*基因的群落组成并没表现出显著差异。因此，不同粒径团聚体N_2O释放速率差异与反硝化功能微生物丰度密切相关，而与它们的组成没有显著相关性。

关键词 土壤团聚体；*narG*基因；*nosZ*基因；N_2O；质量含水量

中图分类号 S154.36 **文献标识码** A

氧化亚氮（N_2O）是《京都议定书》规定的三种重要温室气体之一，因其较高的增温潜势和对平流层臭氧层的破坏力而受到越来越广泛的关注[1]。土壤是N_2O的重要来源之一，据IPCC统计，农业土壤排放的N_2O约占总来源的13.5%[2]。其中旱地分布广，面积大，并具有土壤结构复杂、施肥和灌溉频繁等特点，导致旱地土壤具有较高的N_2O释放潜力[3]。

旱地土壤N_2O的释放主要来自硝化过程与反硝化过程[4]。Bateman和Baggs[5]通过土壤水分梯度培养试验发现，反硝化作用释放的N_2O占主要比重，当土壤孔隙充水度（Water-Filled Pore Space，WFPS）上升至70% 以上时N_2O的释放完全来自反硝化作用。 Wang和Cai[6]也报道了当土壤持水量（Water Holding Capacity，WHC）达到100%时土壤N_2O主要来自于反硝化作用。反硝化作用主要发生在厌氧环境中，土壤物理结构影响水分在土壤中的分布进而影响厌氧微域的形成和分布，从而与土壤N_2O的释放密切相关[7]。然而，有关旱地土壤中N_2O产生微域的微生物学作用机制研究鲜见报道。

土壤团聚体是土壤物理结构的重要单元，团聚体的分布和组合对土壤性质具有重要影响，而不同粒径团聚体间也存在物理化学性质和生物学特性差异。如Jastrow[8]发现大团聚体有机质更能耐受微生物的分解，而小团聚体内有机质结构简单，易被微生物快速利用而被消耗。不仅如此，不同粒径团聚体除C、N、P物质总含量不同外，有机物种类与分布状态以及三种元素的比例均存在差异[9]。除养分差异外，不同粒径团聚体的水分分布、透气性和厌氧状况也存在差异，大团聚体更容易保持较高的水分含量并降低O_2的通透性从而形成厌氧内核，而小团聚体只有当水分趋近饱和状态才可能形成厌氧内核[10]。在微生物方面，Gupta和Germida[11]

* 国家自然科学基金项目（41401295）和中国科学院战略性先导专项（XDB15020200）资助

† 通讯作者，E-mail：wenxuewei@isa.ac.cn

作者简介：周汉昌（1990—），硕士研究生，主要研究方向为土壤氮素循环过程微生物作用机理

收稿日期：2014-10-28；收到修改稿日期：2014-12-19

的研究表明，大团聚体和小团聚体的生物丰度与组成明显不同，但耕作会减弱团聚体之间微生物丰度的差异，这种差异可能来自于耕作管理对土壤团聚体结构的影响[12]。因此，不同粒径团聚体的物理化学性质和生物学特性差异可能导致反硝化微生物群落组成与丰度和功能上的差异。

然而，近年来关于团聚体N_2O释放与团聚体粒径的关系并不十分清楚。Diba等[13]认为施用粪肥后的火山灰土大团聚体N_2O释放显著高于小团聚体。Khalil等[14]也提出大团聚体通气性低于小团聚体，因而产生更多的N_2O。与之相反，Uchida等[15]的研究表明，在没有受到应力挤压的情况下施用尿素的小团聚体N_2O释放速率远高于大团聚体。但是，Robinson等[16]用黏土进行培养试验得出N_2O的累积释放量不受土壤团聚体大小影响的结论。尽管不同研究的结论存在一定的分歧，不同粒径团聚体N_2O的产生与释放却均存在明显的差异，而对于这一现象的微生物作用机制仍有待深入了解。

本研究选取南方典型河流冲积物发育的菜地土，分离不同粒径的土壤团聚体并进行培养试验，以*narG*和*nosZ*基因为对象研究不同粒径团聚体反硝化微生物群落的组成和丰度与N_2O释放的耦合机制。

1　材料与方法

1.1　供试材料

供试土壤采集自湖南农业大学实验基地的蔬菜地（0～15 cm），为冲积母质发育的土壤（美国制土壤质地分类，砂粒23.88%、粉粒48.24%、黏粒27.88%），采集时间为2013年8月，当季作物为草莓。参照Drury等[17]的方法筛分团聚体，筛分出的团聚体中4～8 mm、2～4 mm和<1 mm分别占土重的16.69%、7.52%和6.11%。供试土壤有机质含量21.11 g kg^{-1}，全氮 1.95 g kg^{-1}，全磷1.46 g kg^{-1}，全钾 5.96 g kg^{-1}，pH 5.34，土壤容重1.32 g cm^{-3}。

1.2　培养试验与样品采集

供试各粒径团聚体通过喷施0.125 mol L^{-1} NH_4NO_3溶液，使土壤质量含水量达到35%的同时施入N 700 μg g^{-1} 干土，其中铵态氮和硝态氮各350 μg g^{-1} 干土。称取67.5 g处理好的团聚体装入500 ml 的广口瓶中，每个粒径团聚体分别分装至20个广口瓶中，其中5个用于气体样品的采集，15个用于土壤样品采集。每个瓶口用具有若干小孔的保鲜膜封盖，减缓培养过程中水分的散失。将装有团聚体的广口瓶置于30 ℃ 下培养。

分别在培养过程的12、24、36、48、60、72、84和96 h采集气体。每次采气前使瓶内外气体充分交换后，用连接有三通阀的橡胶塞密封瓶口，将三通阀调至密闭状态，继续培养2 h后用注射器采集30 ml瓶内气样，同时采集5个培养室空气作为本底样品。采用气相色谱仪（Agilent 7890A，USA）检测N_2O浓度。分别在培养0、24、48、72和96 h采集土壤团聚体样品，每个时间点随机取3瓶作为重复。取样前将广口瓶盖好，混匀，开盖后用无菌取样器取约5 g团聚体样品用锡箔纸包好后迅速用液氮速冻，–80 ℃保存。瓶内剩余团聚体装入密封袋，4 ℃保存用于NH_4^+–N和NO_3^-–N含量的测定（连续流动分析仪 Flastar 5000 Analyze）。

1.3　反硝化群落结构分析与功能基因丰度测定

土壤团聚体DNA提取方法参考陈哲[18]的研究，使用Nanodrop ND–1000核酸分析仪测定DNA浓度和纯度，置于–20 ℃保存。

*narG*基因PCR程序为：95 ℃5 min变性；95 ℃30 s、63 ℃45 s、72 ℃1 min，2个循环；95 ℃30 s、60 ℃45 s、72 ℃1 min，2个循环；95 ℃30 s、58 ℃45 s、72 ℃1 min，30个循环；72 ℃延伸7 min。上下游引物分别为*narG*–145F和*narG*–773R，扩增片段长度为629bp[18]。*nosZ*基因PCR程序为：95 ℃3 min变性；95 ℃30 s、60 ℃30 s、72 ℃40 s，40个循环；72 ℃延伸7 min。上下游引物分别为*nosZ*–2002F和*nosZ*–2002R，扩增片段长度为707bp[19]。其中*narG*–145F和*nosZ*–2002F的5’端被羧基荧光素FAM标记。*narG*与*nosZ*的PCR反应体系为：上下游引物各0.5 μl，PCRmix 25 μl，DNA模板100 ng，用ddH_2O补至50 μl；PCR仪为Eppendorf–6321。经1.0%的琼脂糖凝胶电泳分离PCR产物后，通过DNA凝胶纯化试剂盒（天根）回收纯化目的片段，*narG*和*nosZ*基因分别选用*HhaI*和*CfoI*进行酶切，酶切产物由上海桑尼生物科技有限公司进行T–RFLP分析，测序仪器为ABI Prism3100 Genetic Analyzer。

*narG*基因qPCR程序为：95 ℃30 s预变性；95 ℃15 s、63 ℃20 s、72 ℃20 s，2个循环；95 ℃15 s、60 ℃20 s、72 ℃20 s，2个循环；95 ℃15 s、58 ℃20 s、72 ℃20 s，30个循环。上下游引物分

别为*narG*-571F和*narG*-773R，扩增片段长度为256bp[18]。*nosZ*基因qPCR程序为：95 ℃30 s预变性；95 ℃15 s、60 ℃20 s、72 ℃20 s，40个循环。上下游引物分别为*nosZ*-1126F和*nosZ*-1381R，扩增片段长度为203bp[19]。*narG*与*nosZ*的qPCR反应体系为：上下游引物各0.2 μl，SYBR-Green（Takara）5 μl，Rox 0.2 μl，DNA模板5 ng，用ddH_2O补至10 μl。采用的仪器为ABI 7900TH。

1.4 数据处理析

采用SAS 8.0统计软件对数据进行单因素方差分析（ANOVA），差异显著性通过最小显著差数法（LSD）进行检验，相关关系采用偏相关法分析。

2 结 果

2.1 不同粒径团聚体铵态氮与硝态氮含量变化

培养初始（0 h）时<1 mm、2～4 mm和4～8 mm的团聚体铵态氮含量分别为444.2、428.2和442.2 μg g^{-1}，彼此间不存在显著差异（图1）。培养开始后各粒径团聚体的铵态氮含量均逐渐下降并在48 h降至最低，<1mm、2～4 mm和4～8 mm团聚体分别较0 h 降低了42.45%、29.70%和20.45%，呈现出与粒径正相关的趋势。培养48 h后各粒径团聚体铵态氮含量开始回升，可能与矿化作用有关。

培养过程中硝态氮含量变化趋势与铵态氮含量基本一致。培养初始各粒径团聚体的硝态氮含量平均为643.8 μg g^{-1}，团聚体间没有较大差异。培养开始后，各粒径团聚体硝态氮含量均迅速下降，其中<1 mm团聚体下降幅度最大，48 h时其硝态氮含量较初始时降低47.40 %，其次为2～4 mm团聚体，而4～8 mm团聚体的硝态氮含量相对稳定，降低幅度为29.86 %。在48 h后不同粒径团聚体硝态氮含量有所回升，其中<1 mm团聚体的回升幅度相对较大，96 h较48 h增加了47.66 %，而4～8 mm团聚体仅增加13.09 %。

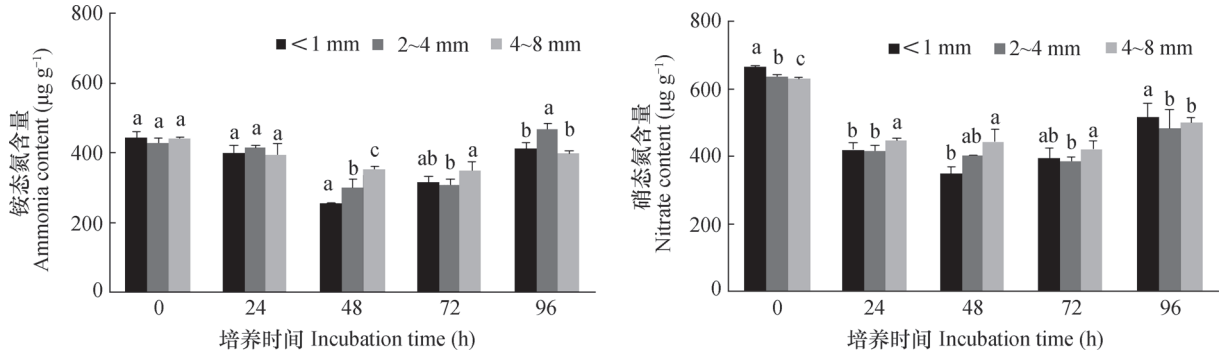


图1 不同粒径团聚体铵态氮、硝态氮含量变化

Fig.1 Ammonia and nitrate contents in soil aggregates relative to particle size

2.2 不同粒径团聚体N_2O释放速率

由图2可见，培养12 h时，各粒径团聚体的N_2O释放速率均已达到高峰，但不同粒径团聚体间存在显著差异，其中<1 mm团聚体的释放速率最高（7.637 μg g^{-1} h^{-1}），较2～4 mm团聚体的排放速率（5.607 μg g^{-1} h^{-1}）高36.19 %；4～8 mm团聚体的N_2O排放速率最低（1.965 μg g^{-1} h^{-1}），较<1 mm团聚体和2～4 mm团聚体分别低288.6 %和185.4 %；培养24 h时各粒径团聚体N_2O释放速率与12 h相似，只有4～8 mm团聚体约下降14.68 %。随着培养时间的延长，各团聚体的N_2O释放速率均缓慢下降，<1 mm团聚体每12 h N_2O释放速率约减小0.7651 μg g^{-1} h^{-1}，分别是2～4 mm团聚体和4～8

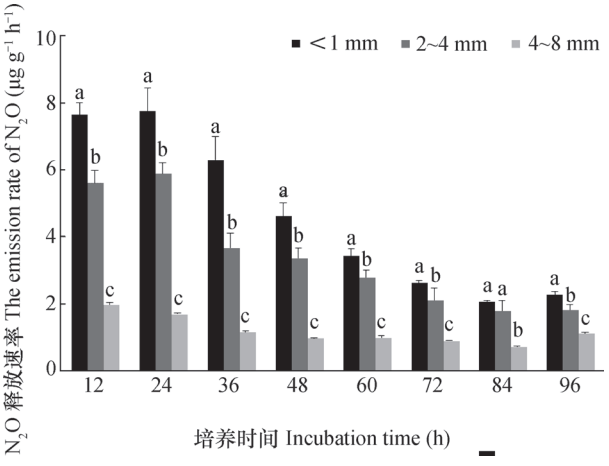


图2 不同粒径团聚体N_2O释放速率

Fig.2 Emission rate of N_2O of soil aggregates relative to particle size

mm团聚体单位时间N_2O释放速率减小量的1.4倍和6.3倍；N_2O排放速率与团聚体粒径大小呈负相关关系的趋势在整个培养过程中保持不变，但各粒径团聚体间的差异明显缩小，培养84 h后其排放速率达到最低水平，且各粒径团聚体间N_2O排放速率差异分别为：2～4 mm团聚体较<1 mm团聚体低13.88 %，4～8 mm团聚体较2～4 mm团聚体低 60.16 %。

2.3　反硝化功能基因丰度变化

硝酸还原酶基因（*narG*）的丰度在不同粒径团聚体中的分布特征表明（图3），不同培养时间点*narG*基因丰度均在<1 mm团聚体中最高，显著高于其他团聚体，且在培养48 h时达到最高值，为$3.799 \times 109\ g^{-1}$，分别为2～4 mm和4～8 mm团聚体的3.4倍和5.5倍。在培养过程中*narG*基因的拷贝数在2～4 mm团聚体中保持相对稳定，维持在$1.118 \times 10^9\ g^{-1}$至$8.826 \times 10^8\ g^{-1}$间。在4～8 mm团聚体中，*narG*丰度在24 h 和48 h维持较低水平，分别为$6.287 \times 10^8\ g^{-1}$和$6.860 \times 10^8\ g^{-1}$，形成了从<1 mm团聚体到4～8 mm团聚体间的明显丰度梯度，与N_2O排放速率呈显著正相关；在培养72 h和96 h时，4～8 mm团聚体中*narG*基因拷贝数的增加至与2～4 mm团聚体相接近，4～8 mm团聚体与2～4 mm团聚体之间差异性逐渐消失，但<1 mm团聚体*narG*基因拷贝数仍显著高于4～8 mm团聚体与2～4 mm团聚体，在72 h和96 h时分别高出约0.5倍和1.0倍。

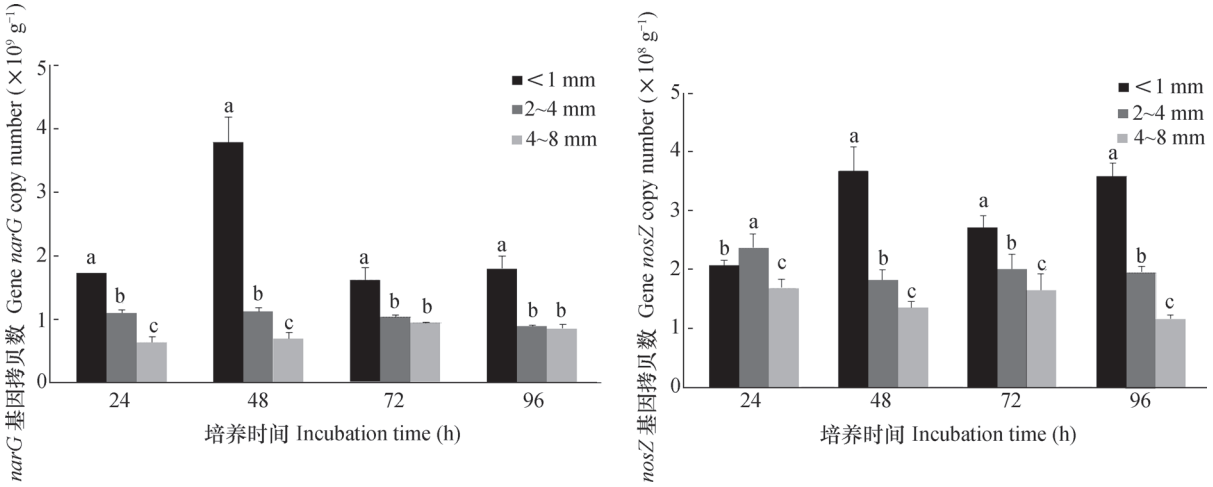


图3　不同粒径团聚体*narG*基因与*nosZ*基因丰度

Fig.3　Abundance of *narG* and *nosZ* in soil aggregates relative to particle size

各团聚体中氧化亚氮还原酶基因（*nosZ*）丰度的分布趋势在24 h以外的时间点均和团聚体粒径呈负相关。在24 h时，2～4 mm团聚体的丰度为$2.365 \times 10^8\ g^{-1}$，较4～8 mm团聚体高出约39.96 %，但与 <1 mm团聚体并不存在显著差异。在48 h时 <1 mm团聚体的*nosZ*基因拷贝数增长将近1倍，但2～4 mm和4～8 mm团聚体的丰度却在24 h～96 h间保持相对恒定，这使得 <1 mm团聚体在96 h丰度是2～4 mm团聚体的近2倍、4～8 mm团聚体的3倍。

团聚体的N_2O释放速率在整个培养过程中始终随团聚粒径增大而减小，并与*narG*和*nosZ*基因丰度均呈现出极显著正相关，相关系数分别为0.520**和0.676**。

*nosZ/narG*值是与反硝化作用终产物形态密切相关的一个指标，基因组丰度*nosZ/narG*值与土壤反硝化N_2O释放速率以及N_2/N_2O生成比之间均存在相关性[20]。由图4可见，在48 h前，*nosZ/narG*值

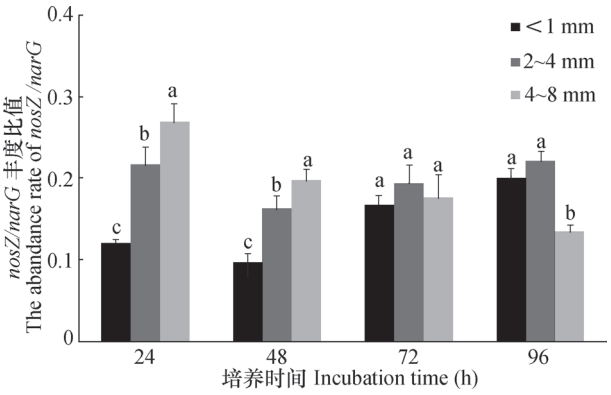


图4　不同粒径团聚体*nosZ/narG*丰度比值

Fig.4　Abundance rate of *nosZ/narG* in soil aggregates relative to particle size

均为<1 mm团聚体中数量最少，随团聚体粒径增大*nosZ/narG*值显著增加。24 h是不同团聚体间*nosZ/narG*值差异最大时期，2～4 mm团聚体较<1 mm团聚体高96.72%，而4～8 mm团聚体较2～4 mm团聚体高24.13%。在培养后期由于4～8 mm团聚体中*nosZ/narG*值大幅减少，使得72 h时<1 mm团聚体和4～8 mm团聚体的*nosZ/narG*值相当，而2～4 mm团聚体含反硝化微生物群落*nosZ/narG*值最高。而96 h时4～8 mm 粒径团聚体的*nosZ/narG*值显著低于<1 mm团聚体。在培养过程中不同粒径团聚体*nosZ/narG*值的变化各有特点，其中<1 mm团聚体*nosZ/narG*值48 h前维持在较低水平，约0.12，随后呈增加趋势，到96 h时达最大值，为0.20；与之不同的是，4～8 mm团聚体中*nosZ/narG*丰度在24 h即达到最大值0.26，随培养时间的推移呈递减趋势；然而，*nosZ/narG*值在2～4 mm团聚体中保持相对稳定。

2.4 反硝化功能基因组成变化

不同粒径团聚体中的反硝化基因*narG*和*nosZ*的T-RFs（Terminal-Restricted Fragments）相对丰度并无显著差异，表明其组成结构明显差异（图5），虽然<1 mm团聚体中的*narG*和*nosZ*的组成结构与2～4 mm和4～8 mm团聚体有一定差别，但总体上不同粒径团聚体间具有相似的优势种群结构。而且经培养后在N_2O释放高峰期（24 h），三种粒径团聚体中的*narG*和*nosZ*基因的组成结构趋于一致，没有明显的差异，这种现象在其他培养时间的样品中表现一致（结果省略）。

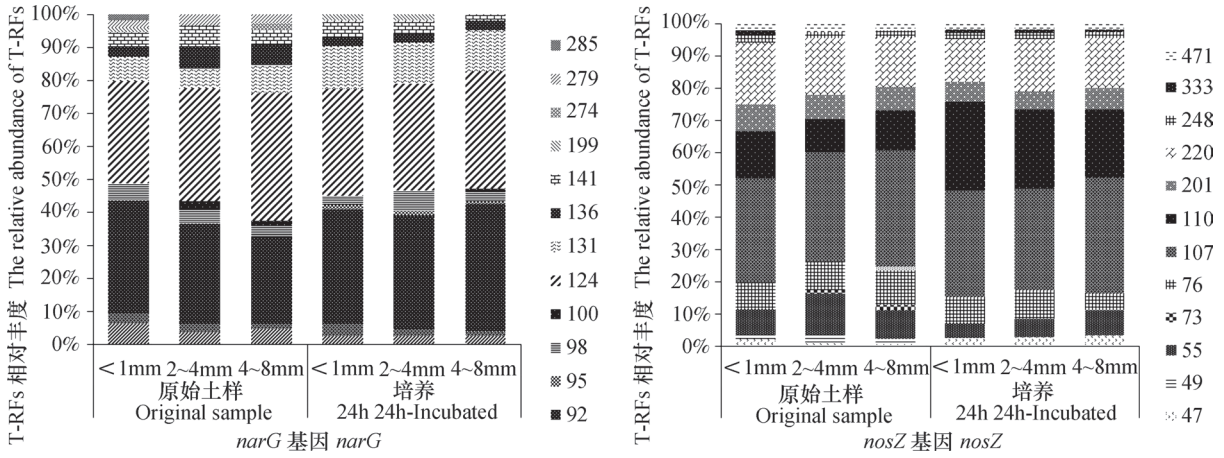


图5 *narG*和*nosZ*基因T-RFs相对丰度

Fig.5 T-RFs relative abundance of *narG* and *nosZ*

3 讨 论

本研究发现N_2O的释放速率随团聚体粒径增大而减小，Uchida等[15]也获得类似的结果，然而将不同粒径团聚体培养物压实至统一容重后培养则大团聚体N_2O释放速率更高。说明团聚体的结构与N_2O的产生和释放存在密切关系，小团聚体相比大团聚体保有更低的团粒间孔隙度与透气性，更利于形成整体的厌氧环境[21]，从而更有利于N_2O生成和排放。

在土壤团聚体培养的前24 h中，各粒径团聚体中硝态氮含量下降幅度明显大于铵态氮，而且小粒径团聚体的硝态氮含量的降幅又明显大于大粒径团聚体，表明反硝化作用更为强烈，其中<1 mm团聚体表现尤为突出。而这一期间是N_2O释放高峰期，说明反硝化微生物可能是N_2O排放的主要贡献者。随着培养时间延长，N_2O释放速率递减，而铵态氮和硝态氮含量反而回升，一方面可能与小分子有机物矿化作用有关，另一方面可能与培养过程中水分损失导致硝化作用增强有关。

不同大小团聚体所表现出的N_2O排放速率的差异可能意味着相关功能微生物种群也存在明显差异，但目前该方面缺乏相关研究。本项研究表明，反硝化过程的硝酸还原酶基因（*narG*）和氧化亚氮还原酶基因（*nosZ*）丰度均随着团聚体粒径减小而增大，<1 mm团聚体的反硝化微生物数量显著高于4～8 mm粒径团聚体，如在48 h时<1 mm团聚体*narG*和*nosZ*丰度分别是4～8 mm团聚体的近5倍和3倍；而在团聚体中微生物大部分分布在团聚体表面[8]，小团聚体比表面积更大，可能是反硝化微

生物数量更多的重要原因。此外，不同大小团聚体的有机物质组成、数量和空间分布差异也可能是导致微生物数量不同的重要因素；虽然小团聚体的有机质相比大团聚体更加稳定，但大团聚体的有机质与微生物之间存在一定的空间隔离使其短时间内更难被反硝化微生物利用，这是导致短期培养试验小团聚体反硝化微生物丰度高于大团聚体的又一重要原因[22-23]。此外，团聚体粒径也是硝态氮等反硝化底物向反硝化“热点”扩散的重要限制因素，本研究中0～48 h 内反硝化底物硝态氮的减少量随团聚体粒径的增加而下降，表明小团聚体对硝态氮的利用量高于大团聚体，这可能是因为大团聚体中底物需要更长时间才能扩散抵达至微生物可利用的区域进而导致其利用率低于小团聚体，也使得大团聚体反硝化微生物群落的丰度低于小团聚体[24]。由此可见，团聚体的粒径对反硝化微生物丰度具有多方面的影响，使得反硝化微生物丰度与粒径呈负相关。值得注意的是，0～48 h内铵态氮的减少量也与粒径呈负相关，这表明粒径对硝化微生物也可能存在类似的影响。虽然功能微生物数量大小并不能完全反映其活性，但功能微生物丰度与活性间存在显著正相关关系[25-26]。本试验结果显示，不同粒径团聚体中*narG*和*nosZ*基因丰度均与N_2O释放速率成显著正相关关系，说明团聚体中反硝化微生物丰度可能直接影响N_2O的释放。

与此同时，不同粒径团聚体内部的O_2浓度也可能是影响N_2O释放的另一个重要因素。由于含*nosZ*微生物受O_2的抑制高于含*narG*微生物[27]，本研究释放高峰的24 h *nosZ/narG*丰度比值与团聚体粒径呈反相关，意味着有厌氧内核的大团聚体可能更利于含*nosZ*基因微生物繁殖。由于含*narG*基因微生物将硝酸盐还原为亚硝酸盐，进而控制N_2O的生成；含*nosZ*基因微生物则将N_2O还原成N_2，同时具有消耗N_2O的能力，*nosZ/narG*丰度比值可成为反映N_2O产生与消耗平衡关系的指标[20]。大粒径团聚体中具有更高的*nosZ/narG*丰度比值，可能意味着有更多的N_2O被转化成N_2，而小粒径团聚体中的*nosZ/narG*丰度比值显著低于大团聚体，可能预示着其产生N_2O能力强而消耗N_2O能力弱，导致更多的N_2O释放。因此这也是<1 mm 团聚体较4～8 mm 团聚体N_2O释放速率更高的原因之一。

除了微生物的丰度外，微生物的群落组成差异也是影响群落活性的重要参数。本研究发现，*narG*基因和*nosZ*基因的群落组成结构在不同团聚体间没有显著差异，说明在不同粒径团聚体间的N_2O释放速率差异与反硝化功能微生物的组成没有明显关联，其主要原因可能是因为连年耕作，表层土壤经反复干扰，土壤团聚体也不断更新[28]，从而导致含*narG*和*nosZ*微生物组成在不同粒径团聚体间无显著差异。

4　结　论

菜地土壤团聚体N_2O释放速率随着粒径的增加而减小。团聚体粒径大小会直接影响有机碳、硝态氮、O_2等环境因子与反硝化微生物的接触，使得小粒径团聚体具有更高的反硝化微生物丰度和更低的*nosZ/narG*比值；从而导致小团聚体的反硝化速率不仅更高，其反硝化气体终产物中N_2O的比例也越高，进而使得N_2O的释放速率呈现随粒径增大而减小的关系。然而不同粒径团聚体间反硝化微生物群落组成不存在显著差异，表明反硝化微生物的组成并不是影响团聚体N_2O释放速率差异的因素。

参 考 文 献

[1] Waibel A E, Peter T, Carslaw K S, et al. Arctic ozone loss due to denitrification. Science, 1999, 283(5410): 2064—2069

[2] Smith P, Martino D, Cai Z, et al. Greenhouse gas mitigation in agriculture. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2008, 363(1492): 789—813

[3] 李良谟, 朱兆良, 文启孝. 中国土壤氮素. 南京: 江苏科学技术出版社, 1992. Li L M, Zhu Z L, Wen Q X. Chinese soil nitrogen (In Chinese). Nanjing: Jiangsu Science and Technology Press, 1992

[4] Conrad R. Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H_2, CO, CH_4, OCS, N_2O, and NO). Microbiological Reviews, 1996, 60(4): 609—640

[5] Bateman E J, Baggs E M. Contributions of nitrification and denitrification to N_2O emissions from soils at different water-filled pore space. Biology and Fertility of Soils, 2005, 41(6): 379—388

[6] Wang L, Cai Z. Nitrous oxide production at different soil moisture contents in an arable soil in China. Soil Science and Plant Nutrition, 2008, 54(5): 786—793

[7] Sexstone A J, Parkin T B, Tiedje J M. Denitrification

response to soil wetting in aggregated and unaggregated soil. Soil Biology & Biochemistry, 1988, 20(5): 767—769

[8] Jastrow J D. Soil aggregate formation and the accrual of particulate and mineral-associated organic matter. Soil Biology and Biochemistry, 1996, 28(4): 665—676

[9] Elliott E T. Aggregate structure and carbon, nitrogen, and phosphorus in native and cultivated soils. Soil Science Society of America Journal, 1986, 50(3): 627—633

[10] Leffelaar P A. Water movement, oxygen supply and biological processes on the aggregate scale. Geoderma, 1993, 57(1): 143—165

[11] Gupta V, Germida J J. Distribution of microbial biomass and its activity in different soil aggregate size classes as affected by cultivation. Soil Biology & Biochemistry, 1988, 20(6): 777—786

[12] Miller M N, Zebarth B J, Dandie C E, et al. Denitrifier community dynamics in soil aggregates under permanent grassland and arable cropping systems. Soil Science Society of America Journal, 2009, 73(6): 1843—1851

[13] Diba F, Shimizu M, Hatano R. Effects of soil aggregate size, moisture content and fertilizer management on nitrous oxide production in a volcanic ash soil. Soil Science and Plant Nutrition, 2011, 57(5): 733—747

[14] Khalil K, Renault P, Mary B. Effects of transient anaerobic conditions in the presence of acetylene on subsequent aerobic respiration and N_2O emission by soil aggregates. Soil Biology & Biochemistry, 2005, 37(7): 1333—1342

[15] Uchida Y, Clough T J, Kelliher F M, et al. Effects of aggregate size, soil compaction, and bovine urine on N_2O emissions from a pasture soil. Soil Biology & Biochemistry, 2008, 40(4): 924—931

[16] Robinson A, Di H J, Cameron K C, et al. Effect of soil aggregate size and dicyandiamide on N_2O emissions and ammonia oxidizer abundance in a grazed pasture soil. Soil Use and Management, 2014, 30(2): 231—240

[17] Drury C F, Yang X M, Reynolds W D, et al. Influence of crop rotation and aggregate size on carbon dioxide production and denitrification. Soil and Tillage Research, 2004, 79(1): 87—100

[18] 陈哲. 长期施肥对水稻土反硝化作用和反硝化功能微生物的影响机理. 长沙: 中国科学院亚热带农业生态研究所, 2010. Chen Z. Effect of long-term fertilization on denitrification and denitrifying microbial community (In Chinese). Changsha: Institution of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, 2010

[19] Rösch C, Mergel A, Bothe H. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(8): 3818—3829

[20] Chon K, Chang J S, Lee E, et al. Abundance of denitrifying genes coding for nitrate (*narG*), nitrite (*nirS*), and nitrous oxide (*nosZ*) reductases in estuarine versus wastewater effluent-fed constructed wetlands. Ecological Engineering, 2011, 37(1): 64—69

[21] Greenwood D J. Measurement of soil aeration//Soil physical conditions and crop production. HMSO London, 1975: 261—272

[22] Semenov V M, Ivannikova L A, Semenova N A, et al. Organic matter mineralization in different soil aggregate fractions. Eurasian Soil Science, 2010, 43(2): 141—148

[23] David C G, Germán T, David B, et al. Spatial distribution of N-cycling microbial communities showed complex patterns in constructed wetland sediments. FEMS Microbiology Ecology, 2013, 83(2): 340—351

[24] Kremen A, Bear J, Shavit U, et al. Model demonstrating the potential for coupled nitrification denitrification in soil aggregates. Environmental Science & Technology, 2005, 39(11): 4180—4188

[25] Baudoin E, Philippot L, Cheneby D, et al. Direct seeding mulch-based cropping increases both the activity and the abundance of denitrifier communities in a tropical soil. Soil Biology & Biochemistry, 2009, 41(8): 1703—1709

[26] Davinic M, Fultz L M, Acosta-Martinez V, et al. Pyrosequencing and mid-infrared spectroscopy reveal distinct aggregate stratification of soil bacterial communities and organic matter composition. Soil Biology and Biochemistry, 2012, 46(1): 63—72

[27] Bollmann A, Conrad R. Influence of O_2 availability on NO and N_2O release by nitrification and denitrification in soils. Global Change Biology, 1998, 4(4): 387—396

[28] Bronick C J, Lal R. Soil structure and management: A review. Geoderma, 2005, 124(1): 3—22

RELATIONSHIPS OF N_2O EMISSION WITH ABUNDANCE AND COMPOSITION OF DENITRIFYING MICROORGANISMS IN SOIL AGGREGATES

Zhou Hanchang[1, 2]　Zhang Wenzhao[1]　Liu Yi[1]　Sheng Rong[1]　Qin Hongling[1]　Wei Wenxue[1†]

(1 *Institution of Subtropical Agriculture*, *Chinese Academy of Sciences*, *Changsha* 410125, *China*)

(2 *University of Chinese Academy of Sciences*, *Beijing* 100049, *China*)

Abstract　Nitrous oxide (N_2O) is a major greenhouse gas, which is not only an important contributor to global warming, but also a damager of the stratospheric ozone layer. Upland is an important source of N_2O, of which the emission activity has been widely reported to be related to soil structure, and denitrification is a major pathway of N_2O production in upland soil. Soil aggregates are an important component in soil structure and a factor affecting soil N_2O emission. However, little has been reported on mechanisms of soil microbes explaining differences in N_2O emission rate between different fractions of soil aggregate. In this study, soil aggregates, <1 mm, 2 ~ 4 mm, and 4 ~ 8 mm in diameter, separated from the soil of a vegetable field, over 15 years in cultivation history, were sprayed with NH_4NO_3 solution to add N 700 μg g^{-1} soil and regulate soil water content up to 35%. Afterwards, 50 g of aggregates on a dry weight basis was taken from each fraction and transferred into a 500 ml jar for soil incubation under 30 ℃ for a 96 h, and each had 3 replicates. Gas samples were collected once every 12 h after during the incubation and N_2O concentrations in the samples were determined with a Gas-chromatograph. Soil samples for molecular analysis were collected once every 24 h and quick-frozen in liquid nitrogen, and stored at −80 ℃. Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) and Terminal-Restricted Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) were used to determine changes in abundance and composition of denitrifying genes, *narG* and *nosZ*. Results show that N_2O emission rate was closely related to abundance of *narG*- and *nosZ*-containing soil microbes, while the fraction of <1 mm aggregates was significantly higher in N_2O emission rate than the fractions of 2 ~ 4 mm and 4 ~ 8 mm, and the fraction of 4 ~ 8 mm was the lowest. N_2O emission peaked at 12 h and 24 h of incubation. At 12 h, N_2O emission rate of <1mm aggregates reached 7.637 μg g^{-1} h^{-1}, about 36% higher than that of 2 ~ 4 mm aggregates, while the N_2O emission rate of 2 ~ 4 mm aggregates was about 2 times higher than that of 4 ~ 8 mm aggregates, reaching 1.965 μg g^{-1} h^{-1}. The differences between the fractions of aggregates were gradually narrowed with the incubation going on, and to the least after 96 h of incubation. Interestingly, the relationships between abundances of *narG* and particle size of soil aggregates were very similar to those between N_2O emission rates and particle size of soil aggregates. The fraction of <1 mm aggregates was the highest in abundance of *narG*-containing bacteria, much higher than the fraction of 2 ~ 4 mm aggregates, while the latter was much higher than the fraction of 4 ~ 8 mm aggregates in all the soil samples. The abundance of *nosZ* in soil aggregates demonstrated a similar trend that the fraction smallest in particle size was the highest in copy numbers of *nosZ* after 48 h of incubation, while the fraction the largest in particle size the lowest. The 2 ~ 4 mm and 4 ~ 8 mm fractions of aggregates were relatively stable in *nosZ* abundance, lingering around 2.5×10^8 g^{-1} and 1.6×10^8 g^{-1} during the whole incubation process, while the <1 mm fraction of aggregates leveled off around 3.6×10^8 g^{-1} after 48 h of incubation. N_2O emission rates of the three fractions of aggregates were significantly and positively related to *narG* gene abundance and to *nosZ* gene abundance as well at 48 h, 72 h and 96 h of the incubation. However, T-RFLP shows that at most of the time points during the incubation, the fractions

differed in number of strips low in content of *narG* and *nosZ*, but did not in number of major strips containing *narG* and *nosZ*. When *narG* and *nosZ* were used as biomarkers characterizing structure and composition of the soil microbial community, no difference was found in structure of soil microbial community between the fractions of soil aggregates, and moreover, the main tendency won't change with the incubation going on. To sum up, soil aggregates different in diameter vary in N_2O emission rate, displaying a negative relationship between N_2O emission rate and particle size of the aggregates, and the difference in N_2O emission rate is attributed mainly to the difference in abundance of denitrifying microorganisms, rather than in composition of their community.

Key words Soil aggregate; *narG*; *nosZ*; N_2O; Water content

（责任编辑：卢 萍）

ACTA PEDOLOGICA SINICA Vol. 52 No. 5 Sep., 2015

CONTENTS

Reviews and Comments
The historical venation of soil science in the past 30 years—Based on the bibliometric analysis ····· Song Changqing, Tan Wenfeng (968)
Soil ecosystem services: Concept, quantification and response to urbanization ····· Wu Shaohua, Yu Yanna, Zhu Jiang, et al. (977)
Research Articles
Analysis on spatial-temporal variability of soil organic matter in Henan Province based on Soil Taxonomy ··· Li Ling, Zhang Shaokai, Wu Kening, et al. (989)
Relationship between illite crystallinity (IC) value and weathering degree of Quaternary Red Clay in southern Anhui Province, Southeast China ····· Liu Lihong, Hu Xuefeng, Ye Wei, et al. (1000)
Micromorphology of ancient plow layer of paleosol in the Lajia Ruins in the Guanting Basin, Minhe County, Qinghai Province ····· Zhang Yuzhu, Huang Chunchang, Pang Jiangli, et al. (1013)
Prediction of vertical distribution of soil nitrogen content in soil profile using spectral imaging technique ··· Li Shuo, Wang Shanqin, Shi Zhou (1022)
Estimation of thickness of soil layer on typical karst hillslopes using a ground penetrating radar ····· Wang Sheng, Chen Hongsong, Fu Zhiyong, et al. (1030)
Spatio-temporal distribution of dry-wet alteration in surface soil layer of the Huaihe River Basin ····· Cao Yongqiang, Xu Dan, Cao Yang (1042)
Erosion on dunes of overburden and waste slag in Shenfu coalfield and prediction ····· Guo Mingming, Wang Wenlong, Li Jianming, et al. (1056)
Dynamics of soil water evaporation from soil mulched with sand-gravels in stripe ····· Zhao Dan, Li Yi, Feng Hao (1067)
Effect of pH and three kinds of anions on selenium absorption and desorption in purple soil ····· Zhou Xinbin, Yu Shuhui, Xie Deti (1076)
Release kinetics and bioavailability of nonexchangeable potassium in soil ····· Li Ting, Wang Huoyan, Chen Xiaoqin, et al. (1086)
Effects of bio-ash ameliorating red soil in acidity ····· Shi Renyong, Li Jiuyu, Xu Renkou, et al. (1095)
Effect of wheat straw biochar on high chlorinated benzene sorption process and mechanism ····· Li Yang, Song Yang, Wang Fang, et al. (1104)
Sorption kinetics and mechanism of naphthalene on corn-stalk-derived biochar with different pyrolysis temperature ····· Zhang Mo, Jia Mingyun, Bian Yongrong, et al. (1114)
Toxicity of deca-brominated diphenyl ether to *Caenorhabditis elegans* ····· Wang Yingli, Chen Jiansong, Yang Yuxiang, et al. (1122)
Effects of clover and straw decomposition on soil microfaunal community ····· Wang Hui, Gui Juan, Liu Manqiang, et al. (1133)
Response of soil nematodes to soil salinization induced by seawater intrusion in coastal areas ····· Wang Chengnan, Zhang Weidong, Wang Xuefeng, et al. (1142)
Relationships of N_2O emission with abundance and composition of denitrifying microorganisms in soil aggregates ····· Zhou Hanchang, Zhang Wenzhao, Liu Yi, et al. (1151)
Optimizing blending ratio of controlled release N fertilizer for spring maize based on grain yield, N efficiency, and economic benefit ····· Wang Yin, Feng Guozhong, Zhang Tianshan, et al. (1164)
Communications and Comments
Status quo and problems in setting-up and naming of basic taxon-Soil family in Chinese Soil Taxonomy ····· Yi Chen, Ma Yuxin, Yang Jinling, et al. (1172)
Research Notes
Effects of drought and rehydration on photosynthetic characteristics of artificial algal crusts ····· Wu Li, Yang Hong, Lan Shubin, et al. (1179)
Effect of irrigation with saline water on plant root distribution and evolution of aeolian sandy soil in shelterbelts along desert highways ····· Li Congjuan, Tang Junyan, Gao Pei, et al. (1186)
Distribution of Cu (II) desorption rate in variable charge soils relative to concentrations of $NaNO_3$ and its affecting factors ····· Zhang Zhengqin, Luo Wenjian, Chen Yong, et al. (1194)
Cover Picture: Toxicity of deca-brominated diphenyl ether (BDE-209) to *Caenorhabditis elegans* (by Wang Yingli)

《土壤学报》编辑委员会

主　　编： 史学正

执行编委：（按姓氏笔画为序）

丁维新	巨晓棠	王敬国	王朝辉	史　舟	宇万太	朱永官
李永涛	李芳柏	李保国	李　航	吴金水	沈其荣	张玉龙
张甘霖	张福锁	陈德明	邵明安	杨劲松	杨明义	杨林章
林先贵	依艳丽	周东美	周健民	金继运	逄焕成	胡　锋
施卫明	骆永明	赵小敏	贾仲君	徐国华	徐明岗	徐建明
崔中利	常志州	黄巧云	章明奎	蒋　新	彭新华	雷　梅
窦　森	廖宗文	蔡祖聪	蔡崇法	潘根兴	魏朝富	

编辑部主任： 陈德明

责任编辑： 汪枞生　　卢　萍　　檀满枝

土　壤　学　报

Turang Xuebao

（双月刊，1948年创刊）

第 52 卷　第 5 期　2015 年 9 月

ACTA PEDOLOGICA SINICA

（Bimonthly，Started in 1948）

Vol. 52　No. 5　Sep.，2015

编　　辑	《土壤学报》编辑委员会 地址：南京市北京东路 71 号　邮政编码：210008 电话：025－86881237 E-mail：actapedo@issas.ac.cn	Edited by	Editorial Board of Acta Pedologica Sinica Add：71 East Beijing Road，Nanjing 210008，China Tel：025－86881237 E-mail：actapedo@issas.ac.cn
主　　编	史学正	Editor-in-Chief	Shi Xuezheng
主　　管	中国科学院	Superintended by	Chinese Academy of Sciences
主　　办	中国土壤学会	Sponsored by	Soil Science Society of China
承　　办	中国科学院南京土壤研究所	Undertaken by	Institute of Soil Science， Chinese Academy of Sciences
出　　版	科学出版社 地址：北京东黄城根北街 16 号 邮政编码：100717	Published by	Science Press Add：16 Donghuangchenggen North Street， Beijing 100717，China
印刷装订	北京中科印刷有限公司	Printed by	Beijing Zhongke Printing Limited Company
总 发 行	科学出版社 地址：北京东黄城根北街 16 号 邮政编码：100717 电话：010－64017032 E-mail：journal@mail.sciencep.com	Distributed by	Science Press Add：16 Donghuangchenggen North Street， Beijing 100717，China Tel：010－64017032 E-mail：journal@mail.sciencep.com
国外发行	中国国际图书贸易总公司 地址：北京 399 信箱　邮政编码：100044	Foreign	China International Book Trading Corporation Add：P. O. Box 399，Beijing 100044，China

国内统一刊号：CN 32-1119/P　　国内邮发代号：2-560　　国外发行代号：BM45　　定价：60.00 元

国　内　外　公　开　发　行

ISSN 0564-3929