

DOI: 10.11766/trxb201602250583

添加水铁矿对水稻土 N₂O 释放及反硝化微生物的影响*

王庆^{1,2} 杨会翠^{1,2} 王玲^{1,2} 秦红灵¹ 张文钊¹ 盛荣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 水稻土氧化还原状态的变化与 N₂O 的释放有密切关系。为揭示水稻土中 Fe 对 N₂O 释放及反硝化功能微生物的影响, 本研究选取第四纪红壤发育的水稻土, 设置 3 个水铁矿添加水平 (Fe 0, 10, 40 μmol g⁻¹ 土) 和两个土壤质量含水量 (50%, 80%) 进行土壤培养试验, 利用实时荧光定量 PCR (real time fluorescent quantification polymerase chain reaction, qPCR) 和末端限制性片段长度多态性 (terminal-restricted fragment length polymorphism, T-RFLP) 分析技术开展研究。结果表明, N₂O 排放速率升至高峰期的过程中, 外源铁处理尤其是添加高量铁 (40 μmol g⁻¹) 处理导致硝态氮含量显著高于对照, 而 N₂O 排放速率却明显低于对照; 然而, 高峰期后添加高量铁处理却维持了较对照显著高的 N₂O 排放速率; 与此同时, 添加水铁矿对硝酸还原酶基因 (*narG*) 和氧化亚氮还原酶基因 (*nosZ*) 丰度的影响表现出与 N₂O 排放相同的趋势, 即 N₂O 排放速率升至高峰期的过程中, 外源铁处理明显抑制了反硝化微生物的生长与繁殖, 而高峰期后外源铁对反硝化微生物的抑制作用不明显。因此, 水稻土中添加 Fe (III) 对 N₂O 释放影响的主要原因可能是前期抑制了反硝化功能微生物的种群数量, 从而减少了硝酸根的还原和 N₂O 的产生, 而后期由于反硝化微生物数量的恢复和 NO₃⁻ 等含氮化合物的残留, 使得外源铁处理的 N₂O 释放量明显高于对照。

关键词 水稻土; 铁; N₂O; *narG* 基因; *nosZ* 基因

中图分类号 S154.36 **文献标识码** A

氧化亚氮 (N₂O) 是《京都议定书》规定的三种主要温室气体之一, 它能吸收中心波长为 7.78、8.56 和 16.98 μm 的长波红外辐射, 导致全球气候变暖。同时, N₂O 在平流层中经太阳紫外光照射分解成 NO 后与臭氧分子反应, 导致臭氧含量降低, 从而破坏平流层中的臭氧层^[1]。近年来, 由于人类活动频繁, 导致大气中 N₂O 浓度正以每年 0.2% ~ 0.3% 的速度不断增加^[2-3], 其所带来的环境问题也日益凸显, 逐渐受到人们的广泛关注。

农业土壤是 N₂O 排放的重要源头之一, 每年因施用化学氮肥产生约 1.5 × 10⁷ t N₂O-N, 占人

类活动向大气输入 N₂O-N 量的 44%^[4]。中国是水稻生产大国, 截止 2007 年, 我国稻田面积约 2892 万 hm², 占全国作物种植面积的 18.84%^[5]。而水稻生产过程中干湿交替可显著促进土壤 N₂O 的排放^[6-8]。有研究表明, 当土壤水分含量在 60% ~ 90% 孔隙充水度 (water filled pore space, WFPS) 时, N₂O 释放量明显增加, 当含水量达到 80% ~ 90% WFPS 时, N₂O 的排放达到高峰^[9-11]。然而, 目前对水稻土干湿交替过程中影响 N₂O 产生的生物和非生物学机制的认识十分有限。

水稻土中 N₂O 主要来自反硝化过程^[12], 而该过程是由多种微生物驱动, 且受不同环境因素的

* 国家自然科学基金项目 (41501277, 41330856) 和中国科学院战略性先导科技专项 (XDB15020200) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 41501277, 41330856) and Special Funds for Strategic Pilot Sci-tech Projects of the Chinese Academy of Sciences (No. XDB15020200)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: wenxuewei@isa.ac.cn

作者简介: 王庆 (1988—), 硕士研究生, 主要从事土壤微生物分子生态方向研究

收稿日期: 2016-02-25; 收到修改稿日期: 2016-06-13; 优先数字出版日期 (www.cnki.net): 2016-07-04

影响,如温度、Eh、水分、 O_2 等^[13]。研究发现,在水稻土淹水落干过程中, N_2O 的排放与土壤Eh呈极显著正相关^[6-8]。但Eh改变与土壤中的氧化还原物质(O_2 、Fe、Mn等)的含量和形态变化可能存在密切关系。作为地壳中含量第四的铁元素,也是红壤中重要的氧化还原物质之一^[14],其地球化学丰度为5.1%^[15],铁因在土壤中能形成各种形态的矿物相而具有氧化/还原,吸附/解吸、催化等各种功能^[16]。由于铁具有较高的地球化学活性,Fe(II)和Fe(III)组成的铁循环与反硝化、厌氧氨氧化等多种氮素转化过程密切相关^[17-19]。Huang等^[20]通过向泥浆中添加水铁矿的试验发现,铁可刺激 N_2O 的产生。Zhu等^[21]的研究结果表明,铁与土壤的其他特性相比,在调控 N_2O 排放中占有重要的地位。然而,水稻土水分含量变化条件

下铁影响 N_2O 产生的微生物过程机理的研究较少。

本研究旨在通过添加水铁矿探究外源Fe(III)对水稻土 N_2O 的释放以及反硝化微生物丰度和群落结构的影响,为我国农田温室气体减排和提高氮肥利用效率提供重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试土壤

土壤样品采集于长沙市黄花镇(28°14'08" N, 113°13'05" E),为第四纪红壤发育形成的水稻土。采样时间为2013年11月。采用随机多点采样法,取0~20 cm的耕作土壤,样品自然风干后,去除石块和植物残渣,磨碎过1 mm筛,保存备用。土壤基本理化性质见表1。

表1 供试土壤基本理化性质

Table 1 Basic physical and chemical properties of the soil tested

土壤类型 Soil type	pH	有机质 Organic matter (g kg ⁻¹)	全氮 Total N (g kg ⁻¹)	有效铁 Available Fe (mg kg ⁻¹)	NH ₄ ⁺ -N (mg kg ⁻¹)	NO ₃ ⁻ -N (mg kg ⁻¹)	溶解性有机碳 DOC (mg kg ⁻¹)
水稻土 Paddy soil	4.51	27.0	1.7	43.2	11.5	5.2	16.0

1.2 水铁矿的制备

水铁矿的制备方法主要参照Schwertman和Cornell^[22],并做适当修改,其具体制作方法如下:配置0.4 mol L⁻¹的FeCl₃溶液,用1 mol L⁻¹的NaOH调至pH为7,然后用10倍体积的蒸馏水洗涤、离心(10 000 g, 10 min)5次,目的是去除盐离子,洗涤结束后,冷冻干燥并以固体形式保存在不透明的玻璃瓶中。用原子吸收分光光度法测定出水铁矿中有效铁的含量为49%。

1.3 培养试验和样品采集测定

培养试验采用的培养装置为具有密封性好的圆柱形塑料盒(体积1 L),部分塑料盒的盒盖安装三通阀后作为采气装置。土壤含水量设置为50%、80%质量含水量,在此基础上设3个外源水铁矿添加量处理,分别添加Fe 0 μmol g⁻¹(对照,CK),10 μmol g⁻¹(低铁,Fe1),40 μmol g⁻¹(高铁,Fe2)。水铁矿的添加方法为:按Fe 0 μmol g⁻¹,10 μmol g⁻¹,40 μmol g⁻¹分别添加到风干土中并充

分混匀后分装到塑料盒中,每盒装土200 g,共装102盒。将各铁处理均分成2组,分别添加0.1 mol L⁻¹的KNO₃水溶液,使质量含水量达到50%和80%的同时保证加N量为1.6 μmol g⁻¹土。每个处理5盒用于气体采集,12盒用于土壤样品采集。土壤置于28 °C下培养,采用称重法定时补充水分。

培养试验从加入KNO₃溶液后开始计时,分别于培养的第6 h、12 h、18 h和24 h采集气体,每个处理采5盒作为重复,每次采气前通风30 min使盒内气体浓度与空气中一致,密封培养1 h后,用注射器将盒内气体充分混匀并采集30 ml气体用于 N_2O 浓度的测定。采集气体的同时采集土壤样品,每个处理采3盒作为重复,土样采集方式为破坏性采样,具体方法为用直径为1.5 cm的圆孔采样器采集0~2 cm土壤样品。采集的土壤样品充分混匀,一部分用锡箔纸包好后立即用液氮速冻,存放于-80 °C冰箱用于分子生物学实验;另一部分样品存于4 °C冰箱,进行NH₄⁺-N和NO₃⁻-N含量的测定。

N_2O 浓度采用气相色谱仪 (Agilent 7890A, USA) 检测; NH_4^+-N 和 $NO_3^- -N$ 含量采用连续流动分析仪 (Flastar 5000 Analyzer) 测定。

1.4 反硝化微生物功能基因丰度测定与群落结构分析

土壤DNA提取参照SDS-GITC-PEG法^[23]。用1%的琼脂糖凝胶电泳检测所提DNA片段大小,用Nanodrop ND-1000核酸分析仪测定DNA的浓度及质量。

实时荧光定量PCR (real time fluorescent quantification polymerase chain reaction, qPCR) 分析: 实时荧光定量PCR所用仪器为ABI 7900 (Applied Biosystem), *narG*和*nosZ*的反应体系为: 5 ng DNA模板, 0.3 μ l上游引物 (*narG*-571F^[24], *nosZ*-1126F^[25]), 0.3 μ l下游引物 (*narG*-773R, *nosZ*-1381R), 5 μ l SYBR-Green II (Takara), 0.2 μ l Rox参比染料 (Takara), 补充ddH₂O至10 μ l。*narG*和*nosZ*的扩增片段长度分别为256bp^[24]、203bp^[25], 扩增程序相同: 95 $^{\circ}$ C预变性30 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 10 s, 40个循环; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s, 90 $^{\circ}$ C 15 s。

末端限制性片段长度多态性 (Terminal-Restricted Fragment Length Polymorphism, T-RFLP) 分析: *narG*基因反应体系为50 μ l: 上下游引物各2 μ l (145F, 773R)^[24], 25 μ l PCRMix, DNA模板80 ng, 补充ddH₂O至50 μ l。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C预变性5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 2个循环; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 5个循环; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 52 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 5个循环; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 52 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 25个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸10 min。*nosZ*基因反应体系为50 μ l: 上下游引物各2 μ l (2002F, 2002R)^[25], 25 μ l PCRMix, DNA模板80 ng, 补充ddH₂O至50 μ l。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 10个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 30个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸10 min。*narG*和*nosZ*的扩增片段长度分别为629bp^[24]、707bp^[25]。其中*narG*和*nosZ*上游引物的5'端均被羧基荧光素 (FAM, carboxyfluorescein-5-succinimidyl ester) 标记。所使用的PCR仪器为Eppendorf-6321。PCR产物先经1.0%的琼脂糖凝胶电泳分离, 然后通过DNA凝胶纯化试剂盒 (天根) 回收纯化目的片段, 回收的

目的片段进行酶切, 其中*narG*基因使用HhaI酶, *nosZ*基因使用CfoI酶, 酶切产物送往上海桑尼生物科技有限公司进行T-RFLP分析, 分析仪器为ABI 3100基因分析仪 (ABI Prism 3100 Genetic Analyzer)。

1.5 数据处理

采用SPSS20.0统计软件对数据进行单因素方差分析 (ANOVA), 差异显著性水平通过新复极差法 (Duncan法) 和最小显著差数法 (LSD) 进行检验, 偏相关法分析相关关系。

2 结果

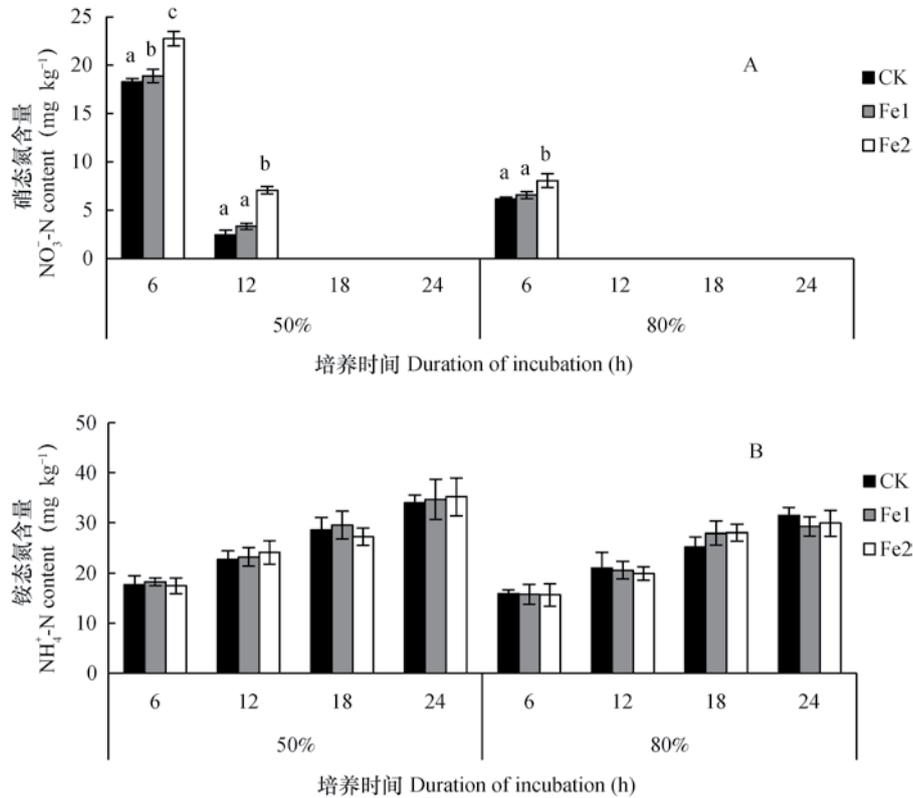
2.1 两个水分条件下外源铁处理对硝态氮和铵态氮含量的影响

硝态氮含量变化显示 (图1A), 随培养时间的延长, 两个水分含量土壤中 $NO_3^- -N$ 含量均迅速降低, 含水量为50%和80%的土壤 $NO_3^- -N$ 含量分别在培养至18 h和12 h时低于检测限, 表明高含水量土壤 $NO_3^- -N$ 转化速率更快。含水量为50%的土壤培养至6 h, 添加铁处理的硝态氮含量均明显高于对照, 低铁和高铁处理分别较对照高3.5% ($p < 0.05$) 和24.6% ($p < 0.01$)。至培养12 h时, 低铁和高铁处理的硝态氮含量分别较对照高35.5%和185.5% ($p < 0.01$)。含水量为80%的土壤在培养6 h时低水平和高水平加铁处理的 $NO_3^- -N$ 含量分别较对照高6.8%和30.84% ($p < 0.01$), 结果表明, 同样培养6 h, 加铁处理对80%含水量土壤 $NO_3^- -N$ 含量的影响大于50%含水量土壤。

然而, 在土壤培养过程中铵态氮含量呈逐渐增加趋势, 但不同处理间没有明显差异 (图1B)。在培养6 h至24 h间, 含水量50%的土壤平均 $NH_4^+ -N$ 含量由17.8 mg kg⁻¹干土增加至34.6 mg kg⁻¹干土左右, 增幅为94.6%; 在80%含水量条件下, 则由15.7 mg kg⁻¹干土增加到30.2 mg kg⁻¹干土, 增幅为92.3%。铵态氮的增加可能与有机氮的矿化有关, 而添加铁处理对铵态氮含量没有明显的影响。

2.2 两个水分条件下外源铁处理对 N_2O 释放速率的影响

培养试验中 N_2O 释放速率明显受外源铁的影响, 且两个不同水分含量的土壤表现出相同趋势 (图2)。其主要特点是, 经前6 h培养, 50%和80%含水量土壤的 N_2O 释放速率均很低, 尽管如



注：CK, Fe 0 $\mu\text{mol g}^{-1}$; Fe1, Fe 10 $\mu\text{mol g}^{-1}$; Fe2, Fe 40 $\mu\text{mol g}^{-1}$ 。不同小写字母表示各时间点三个处理间差异显著性 ($p < 0.05$)。下同 Note: CK, Fe 0 $\mu\text{mol g}^{-1}$; Fe1, Fe 10 $\mu\text{mol g}^{-1}$; Fe2, Fe 40 $\mu\text{mol g}^{-1}$. Different lowercase letters mean significant difference between treatments at each time point ($p < 0.05$). The same below

图1 两个水分条件下外源铁处理中土壤硝态氮 (A) 和铵态氮 (B) 含量变化

Fig. 1 Changes in soil $\text{NO}_3\text{-N}$ (A) and $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (B) contents in treatments spiked with extraneous iron relative to soil water content

此, 外源铁仍然改变了 N_2O 的释放, 其中高铁处理 (10 $\mu\text{mol g}^{-1}$) 的影响相对较小, 在土壤水分含量为50%和80%的条件下分别较对照减少5.2%和3.2%, 差异不显著; 而高铁处理 (40 $\mu\text{mol g}^{-1}$) 则分别较对照降低36.8% ($p < 0.01$) 和10.3% ($p < 0.01$), 达到极显著水平。当培养至12 h时, 两个水分含量土壤 N_2O 释放速率均达到高峰, 其中含水量为50%土壤的释放速率显著高于含水量为80%的土壤, 平均约1.8倍, 而添加铁处理均降低了 N_2O 释放速率, 与对照相比, 高铁处理在土壤含水量为50%和80%条件下分别降低1.4%和7.4% ($p < 0.01$), 高铁处理则导致 N_2O 释放速率分别下降20.7% ($p < 0.01$) 和24.3% ($p < 0.01$), 降幅显著大于高铁处理。随培养过程的继续进行, 对照和添加高铁处理的土壤 N_2O 释放速率迅速下降, 而高铁处理的土壤的下降幅度相对较小, 且不同水分条件差异较大。含水量为50%的土壤培养至18 h时对照和高铁处理的 N_2O 释放速率急剧下降, 由12 h

的265 $\mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$ 左右下降至4 $\mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$ 左右, 与不同的是高铁处理的降幅明显较小, 由12 h的215 $\mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$ 下降至133 $\mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$ 。至培养24 h时, 高铁处理的 N_2O 释放速率降至与其他处理相似的水平。相比之下, 含水量80%土壤 N_2O 释放速率随培养时间的延长下降明显缓慢, 至24 h时仍保持较高的 N_2O 释放速率 (平均24.0 $\mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$), 而3个处理的 N_2O 释放速率减少动态表现不尽相同, 在12~24 h间, 对照匀速下降, 平均减少11.3 $\mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$; 高铁处理在培养到18 h时较对照的降幅小, 平均减少9.7 $\mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$, 维持了较对照高的 N_2O 释放速率, 但差异不显著。至24 h时其 N_2O 释放速率与对照相似。高铁处理表现出明显不同的趋势, 在12~18h, 该处理的 N_2O 释放速率不但没有下降, 反而有所增加, 且显著高于对照和高铁处理。在18~24 h, 虽然 N_2O 释放速率快速降低, 但24 h时仍然维持28.6 $\mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$ 的释放速率, 显著高于对照和高铁处理。

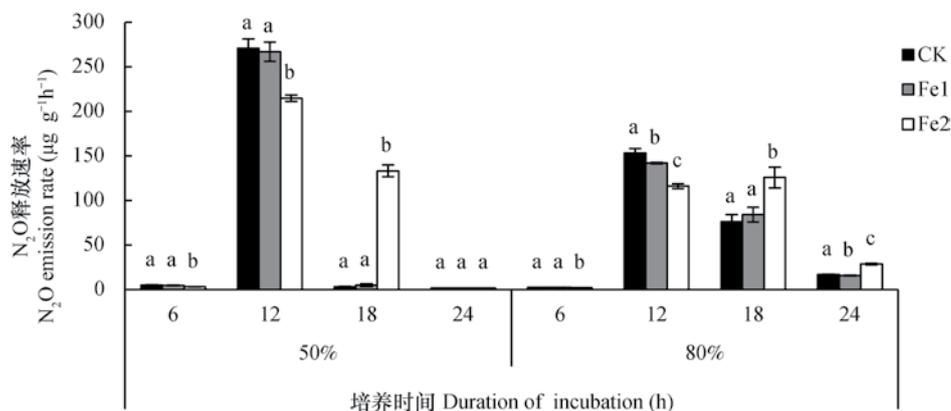


图2 两个水分条件下外源铁处理中N₂O释放速率

Fig. 2 N₂O emission rates in treatments spiked with extraneous iron relative to soil water content

2.3 反硝化基因 *narG* 和 *nosZ* 丰度变化

外源铁对硝酸还原酶基因*narG*和氧化亚氮还原酶基因*nosZ*丰度的影响有着比较相似的规律(图3),且两个含水量土壤间也存在一定差异。在土壤含水量为50%的条件下,对照处理的*narG*的丰度在整个培养过程中基本稳定,约 $1.6 \times 10^9 \sim 2.0 \times 10^9$ 之间。而添加铁处理改变了这一状态,尤其是在培养的前12 h,加铁处理明显导致*narG*丰度减少,低铁处理在培养6 h和12 h分别较对照减少1.0%和18.9% ($p < 0.05$),而高铁处理则较对照减少18.8% ($p < 0.05$)和65.5% ($p < 0.05$)。这种外源铁对含*narG*微生物数量的抑制作用至培养18 h时消除,此时两个加铁处理的*narG*丰度恢复到对照处理水平,至24 h时甚至超过了对照处理。另一反硝化基因*nosZ*的丰度变化与*narG*有同样的趋势,在12 h时添加低铁和高铁处理的*nosZ*丰度分别较对照低11.7% ($p < 0.05$)和35.6% ($p < 0.05$),至培养18 h时迅速恢复到与对照相似的水平并保持稳定。当土壤含水量为80%时,对照处理的*narG*和*nosZ*的丰度均表现为在整个培养过程中均呈下降趋势,这一现象与反硝化微生物对淹水后的土壤环境适应过程有关。添加铁处理在前12 h中显著抑制了含*narG*和*nosZ*的反硝化微生物繁殖,其中,在12 h时添加低铁和高铁处理分别导致*narG*丰度较对照处理减少24.0% ($p < 0.05$)和50.8% ($p < 0.05$),*nosZ*丰度较对照减少31.9% ($p < 0.05$)和34.0% ($p < 0.05$)。然而,有趣的是在后续培养中上述反硝化基因丰度得到恢复并保持相对稳定,至培养18 h和24 h时添加低铁和高铁处理的*narG*和*nosZ*丰度均维持在相似水平,且均显著高于同一时期的对

照处理。

2.4 反硝化基因群落结构变化

反硝化基因*narG*和*nosZ*的末端限制性片段(Terminal-Restricted Fragments, T-RFs)相对丰度变化显示(图4),在整个培养试验过程中,含*narG*和*nosZ*基因的微生物群落结构基本保持稳定,仅在一些低丰度T-RFs中有小幅度变化,如*narG*基因中T-RFs相对丰度变化主要体现在223 bp和101 bp片段上,而*nosZ*基因中变化主要体现在379 bp、321 bp及84bp片段上。但各处理中反硝化基因*narG*和*nosZ*的优势种群并未出现显著差异,说明添加外源铁对含*narG*和*nosZ*基因的微生物群落结构影响较小。其中12 h和18 h微生物群落结构与6 h相比无明显差异,结果已省略。

3 讨论

本研究设置了两个水分条件,其中50%质量含水量为适合N₂O排放的土壤水分条件,而80%质量含水量为淹水状态。在自然条件下N₂O排放很少^[26],其原因主要是受到反硝化底物含量的限制,由于硝化作用弱,NO₃⁻-N含量一般处于极低水平,因而少有N₂O释放。而当土壤含水量降低至约50%质量含水量时,土壤硝化作用加强,为反硝化作用提供底物,促进了N₂O的排放。

本研究分别在两个水分条件的土壤中添加同样量的硝酸盐,而在培养第6 h和12 h,含水量为50%土壤的NO₃⁻-N含量显著高于含水量为80%的土壤,与此同时,培养12 h时含水量50%的土壤N₂O释放速率显著高于80%含水量土壤。上述现象可能

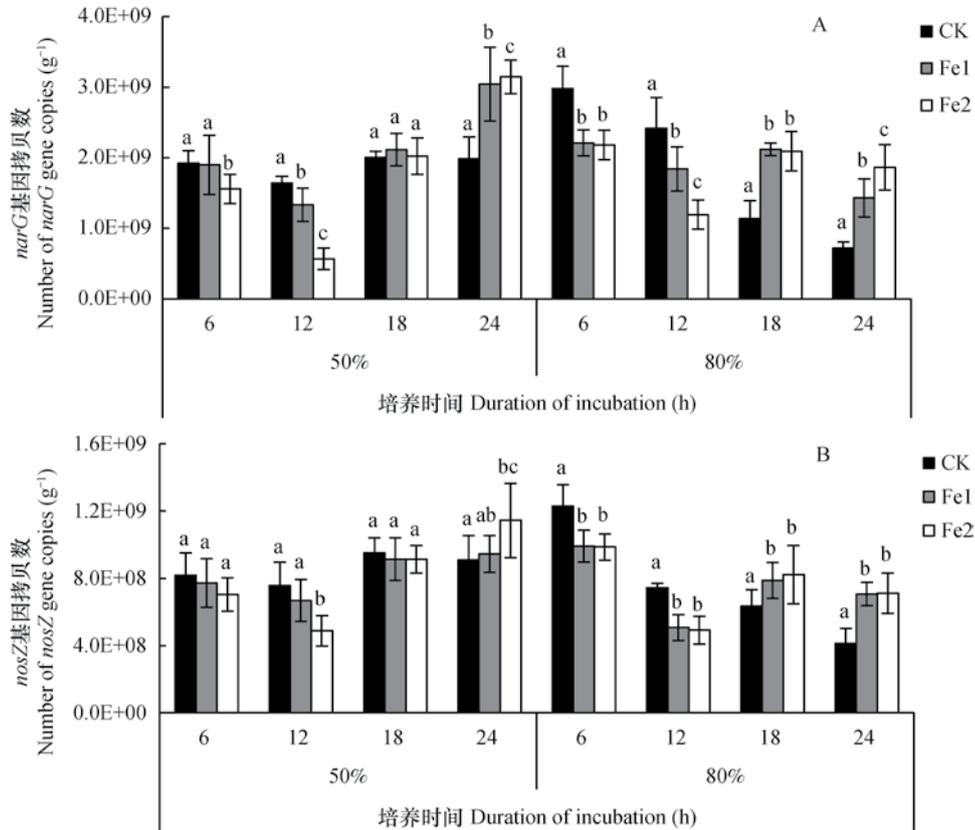


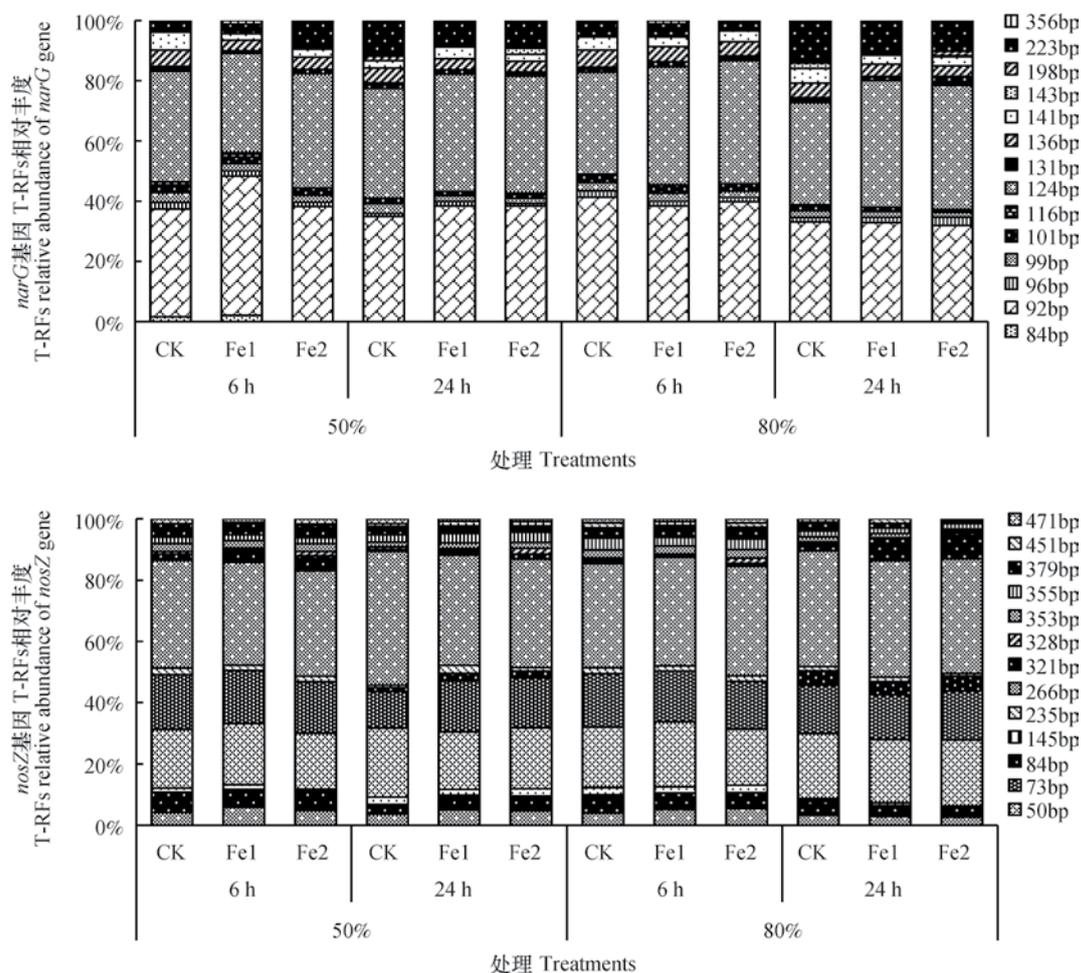
图3 两个水分条件下外源铁处理中 $narG$ (A) 和 $nosZ$ (B) 基因丰度

Fig. 3 Abundances of $narG$ (A) and $nosZ$ (B) genes in treatments spiked with extraneous iron relative to soil water content

表明, 在培养开始后的12 h内, 含水量50%较80%的土壤维持了更高的 NO_3^- -N含量, 一方面可能土壤有机氮的矿化和硝化作用增强补充部分 NO_3^- 有关^[27-28]; 另一方面, 可能因为硝酸还原相对较弱而延缓 NO_3^- 的消耗。而在80% (淹水) 条件下, 由于土壤还原性更强, 具备更强的反硝化能力, 所以 NO_3^- 消耗更快^[29]。然而, 在淹水土壤中产生的 N_2O 难以释放到大气中, 而易被进一步还原成 N_2 ^[30], 因此其 N_2O 释放速率虽然相对较低但延续的时间长。相比之下, 在含水量50%的土壤中氧化亚氮还原酶受到抑制且土壤条件有利于 N_2O 扩散, 导致 N_2O 在短时间内高强度排放^[31-32]。

本试验结果还表明, 添加不同浓度的水铁矿在两个土壤水分状态下对 NO_3^- -N含量和 N_2O 释放速率的影响趋势完全相同, 即添加Fe (III) 明显延缓硝酸根的转化和 N_2O 的释放, 而且添加高量铁较低量铁的效果更为明显。这种现象可能与下列因素有关: 首先是添加到土壤中的Fe (III) 会快速还原成Fe (II), 在这一还原过程中会与 NO_3^- 还原过程竞争电子^[33], 所以添加外源水铁矿会导致硝酸盐还

原过程减缓, 而且添加的Fe (III) 越多则效果越明显。此外, 水铁矿的加入会导致土壤中氧化还原电位 (Eh) 值升高, Eh值升高后可能会降低硝酸还原酶的活性, 从而减弱反硝化作用, 何起利等^[34]在人工湿地中已证明了此发现。除此之外, 外源铁对反硝化微生物的影响可能也是重要的原因之一。尽管到目前为止有关外源铁与土壤微生物关系的研究较少。陈娜等^[35]发现外源Fe (II) 会抑制微生物的活性, Li等^[36]发现水铁矿对地杆菌属和梭菌属的群落结构有强烈的影响。本研究发现, 在培养12 h内, 添加水铁矿使反硝化基因 $narG$ 和 $nosZ$ 的丰度明显减少, 并随培养时间的延长而加重, 而且添加高铁处理的影响更显著。然而至16 h后这种抑制效果消失, 两个反硝化基因的拷贝数迅速恢复或反弹, 而且两个添加铁处理间没有显著差异。但无论是添加高铁还是高铁处理对 $narG$ 和 $nosZ$ 的组成结构均没有产生明显影响。显然, 外源Fe (III) 的添加抑制了反硝化微生物的生长, 可能是减少 N_2O 释放的重要原因, 但对其机理的认识并不十分清楚。当Fe (III) 被添加到高含水量土壤后, 由于微生物

图4 *narG*和*nosZ*基因T-RFs相对丰度Fig. 4 T-RFs relative abundance of *narG* and *nosZ* genes

物代谢过程的电子传递链受到严重干扰，可能对微生物的生长产生抑制作用，添加高水平铁的抑制作用更为明显，而且在淹水条件下这种抑制效果更清楚，可能原因是淹水条件下的电子传递对铁的依赖性更强，在50%含水量的土壤中可能有部分电子通过微量 O_2 的调控。在含水量高的土壤中Fe(III)可以快速转化为Fe(II)，虽然并不清楚Fe(III)抑制反硝化微生物的临界浓度，但到培养16 h时*narG*和*nosZ*基因数量迅速恢复或增加说明可能与Fe(III)的减少和Fe(II)的增加有一定的关系，还需要深入研究。

4 结论

添加外源Fe(III)对水稻土 N_2O 的产生与释放过程产生了明显影响。在 N_2O 排放升至高峰期过程中，添加高铁处理显著降低了 N_2O 释放速率，其重

要原因可能是外源铁抑制了反硝化微生物的生长与繁殖，从而减少了硝酸根的还原，进而减少 N_2O 的产生；而在 N_2O 排放的高峰期后，由于反硝化功能微生物的数量逐渐恢复和残留的 NO_3^- 等含氮化合物相对较多，导致 N_2O 释放量明显高于对照。而外源铁对反硝化微生物群落结构的影响与 N_2O 释放的关系还需进一步研究。

参考文献

- [1] 王少彬. 大气中氧化亚氮的源、汇和环境效应. 环境科学, 1994(4): 23—27
Wang S B. The source, sink and environmental effects of nitrous oxide in the atmosphere (In Chinese). Environmental Science, 1994(4): 23—27
- [2] Leuenberger M, Siegenthaler U. Ice-age atmospheric concentration of nitrous oxide from an antarctic icecore. Nature, 1992, 360(6403): 449—451
- [3] Prinn R, Cunnold D, Rasmussen R, et al.

- Atmospheric emissions and trends of nitrous oxide deduced from 10 years of ale-gauge data. *Journal of Geophysical Research-Atmospheres*, 1990, 95 (D11): 18369—18385
- [4] 张玉铭, 胡春胜, 张佳宝, 等. 农田土壤主要温室气体 (CO_2 、 CH_4 、 N_2O) 的源/汇强度及其温室效应研究进展. *中国生态农业学报*, 2011, 19 (4): 966—975
Zhang Y M, Hu C S, Zhang J B, et al. Research advances on source/sink intensities and greenhouse effects of CO_2 , CH_4 and N_2O in agricultural soils (In Chinese). *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2011, 19 (4): 966—975
- [5] 中国农业年鉴编辑委员会. 中国农业年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2008
China Agriculture Yearbook Editorial Board. China agriculture yearbook (In Chinese). Beijing: China Agriculture Press, 2008
- [6] Liu J, Hou H, Sheng R, et al. Denitrifying communities differentially respond to flooding drying cycles in paddy soils. *Applied Soil Ecology*, 2012, 62: 155—162
- [7] Zou J, Huang Y, Qin Y, et al. Changes in fertilizer-induced direct N_2O emissions from paddy fields during rice-growing season in China between 1950s and 1990s. *Global Change Biology*, 2009, 15 (1): 229—242
- [8] 卢静, 刘金波, 盛荣, 等. 短期落干对水稻土反硝化微生物丰度和 N_2O 释放的影响. *应用生态学报*, 2014, 25 (10): 2879—2884.
Lu J, Liu J B, Sheng R, et al. Effect of short-time drought process on denitrifying bacteria abundance and N_2O emission in paddy soil (In Chinese). *Chinese Journal of Applied Ecology* 2014, 25 (10): 2879—2884
- [9] 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
- [10] Mathieu O, Henault C, Leveque J, et al. Quantifying the contribution of nitrification and denitrification to the nitrous oxide flux using ^{15}N tracers. *Environmental Pollution*, 2006, 144 (3): 933—940
- [11] Skiba U, Fowler D, Smith K A. Nitric oxide emissions from agricultural soils in temperate and tropical climates: Sources, controls and mitigation options. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 1997, 48 (1): 139—153
- [12] Wrage N, Lauf J, Del P A, et al. Distinguishing sources of N_2O in european grasslands by stable isotope analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2004, 18 (11): 1201—1207
- [13] Freney J R. Emission of nitrous oxide from soils used for agriculture. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 1997, 49 (1/3): 1—6
- [14] Hauck S, Benz M, Brune A, et al. Ferrous iron oxidation by denitrifying bacteria in profundal sediments of a deep lake (Lake Constance). *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 37 (2): 127—134
- [15] 赵其国. 红壤物质循环及其调控. 北京: 科学出版社, 2002
Zhao Q G. The circulation of materials and control on red soil (In Chinese). Beijing: Science Press, 2002
- [16] Borch T, Kretzschmar R, Kappler A, et al. Biogeochemical redox processes and their impact on contaminant dynamics. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44 (1): 15—23
- [17] Clement J C, Shrestha J, Ehrenfeld J G, et al. Ammonium oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron under anaerobic conditions in wetland soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 2005, 37 (12): 2323—2328
- [18] Davidson E A, Chorover J, Dail D B. A mechanism of abiotic immobilization of nitrate in forest ecosystems: The ferrous wheel hypothesis. *Global Change Biology*, 2003, 9 (2): 228—236
- [19] 胡敏, 李芳柏. 土壤微生物铁循环及其环境意义. *土壤学报*, 2014, 51 (4): 683—698
Hu M, Li F B. Soil microbe mediated iron cycling and its environmental implication (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2014, 51 (4): 683—698
- [20] Huang B, Yu K, Gambrell R P. Effects of ferric iron reduction and regeneration on nitrous oxide and methane emissions in a rice soil. *Chemosphere*, 2009, 74 (4): 481—486
- [21] Zhu X, Silva L C, Doane T A, et al. Iron: The forgotten driver of nitrous oxide production in agricultural soil. *PLoS ONE*, 2013, 8 (3), DOI: 10.1371/journal.pone.0060146
- [22] Schwertmann U, Cornell R M. Iron oxides in the laboratory preparation and characterization. Weinheim: Wiley VC H, 1991: 69—144
- [23] Chen Z, Luo X, Hu R, et al. 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
- [24] 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
- [25] 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
- [26] Yan X, Du L, Shi S, et al. Nitrous oxide emission from wetland rice soil as affected by the application of controlled-availability fertilizers and mid-season aeration. *Biology and Fertility of Soils*, 2000, 32 (1): 60—66
- [27] Breuer L, Kiese R, Butterbach-Bahl K. Temperature and moisture effects on nitrification rates in tropical rain-forest soils. *Soil Science Society of America Journal*, 2002, 66 (3): 834—844
- [28] Guntinas M E, Leiros M C, Trasar-Cepeda C, et al. Effects of moisture and temperature on net soil nitrogen mineralization: A laboratory study. *European Journal of Soil Biology*, 2012, 48 (1): 73—80
- [29] 江德爱, 唐懿达, 马益辉, 等. 不同条件对土壤反硝化作用的影响. *环境科学*, 1989 (3): 13—19
Jiang D A, Tang Y D, Ma Y H, et al. The influence of different conditions of soil denitrification (In Chinese). *Environmental Science*, 1989 (3): 13—19
- [30] Hutsch B W, Wang X Z, Feng K, et al. Nitrous oxide emission as affected by changes in soil water content and nitrogen fertilization. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 1999, 162 (6): 607—613
- [31] Weier K L, Doran J W, Power J F, et al. Denitrification and the dinitrogen nitrous-oxide ratio as affected by soil-water, available carbon, and nitrate. *Soil Science Society of America Journal*, 1993, 57 (1): 66—72
- [32] 石生伟, 李玉娥, 刘运通, 等. 中国稻田CH₄和N₂O排放及减排整合分析. *中国农业科学*, 2010, 43 (14): 2923—2936
Shi S W, Li Y E, Liu Y T, et al. CH₄ and N₂O emission from rice field and mitigation options based on field measurements in China: An integration analysis (In Chinese). *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43 (14): 2923—2936
- [33] Zhang W, Li X, Liu T, et al. Competitive reduction of nitrate and iron oxides by *Shewanella putrefaciens* 200 under anoxic conditions. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 2014, 445: 97—104
- [34] 何起利, 梁威, 贺锋, 等. 人工湿地氧化还原特征及其与微生物活性相关性. *华中农业大学学报*, 2007, 26 (6): 844—849
He Q L, Liang W, He F, et al. Correlations between the redox potential characteristics and microorganisms activities in the integrated vertical flow constructed wetland (In Chinese). *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2007, 26 (6): 844—849
- [35] 陈娜, 廖敏, 张楠, 等. Fe²⁺对水稻生长及土壤微生物活性的影响. *植物营养与肥料学报*, 2014, 20 (3): 651—660
Chen N, Liao M, Zhang N, et al. Effects of exogenous ferrous on rice growth and soil microbial activities (In Chinese). *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2014, 20 (3): 651—660
- [36] Li H J, Peng J J, Li H B. Diversity and characterization of potential H²-dependent Fe (III)-reducing bacteria in paddy soils. *Pedosphere*, 2012, 22 (5): 673—680

Effect of Amending Ferrihydrite on N₂O Emission and Denitrifying Microorganisms in Paddy Soil

WANG Qing^{1, 2} YANG Huicui^{1, 2} WANG Ling^{1, 2} QIN Hongling¹ ZHANG Wenzhao¹
SHENG Rong¹ 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 【Objective】 Nitrous oxide (N₂O) is an important greenhouse gas, which is 298 times higher than carbon dioxide in Global Warming Potential (GWP) over a time scale of one hundred years. With the widespread application of chemical fertilizers and the practice of water management of alternation of drying and wetting, paddy soil has become an important source of nitrous oxide emissions. Researches show

that the process of flooding-draining paddy fields can cause emissions of large amounts of nitrous oxide, and variation of the redox potential during the process is closely related to N_2O emission. Iron is a crucial redox element in paddy soil, but its influence on N_2O emission is not clear. The study is oriented to expose impacts of Fe on N_2O emission and denitrifying microorganisms. **【Method】** An in-lab soil incubation experiment was carried out using samples of the paddy soil derived from the quaternary red clay. The experiment was designed to have three levels of ferrihydrite amendment (Fe 0, 10 and 40 $\mu\text{mol g}^{-1}$ soil) and two levels of soil water content (50% and 80%). The soil samples were air-dried and sifted through a 1mm sieve. According to the designing of the experiment, the pretreated soil samples were fully blended with ferrihydrite, separately, put into 1-L plastic boxes, 200 g soil on a dry weight basis in each box, and then spiked with KNO_3 solution to ensure the samples 1.6 $\mu\text{mol g}^{-1}$ soil in N content and 50% or 80% in soil water content, separately. The boxes of soil samples were placed into an incubator, 28 °C in temperature and kept there for 24h. Air and the soils in the boxes were sampled once every 6 h during the incubation for analysis N_2O concentration in the air sample was determined with a Gas-chromatograph. Soil samples for physical and chemical analysis were stored at 4 °C and analyzed for $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and $\text{NO}_3^-\text{-N}$ contents with a continuous flow analyzer, while soil samples for microorganism analysis were quick-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C , and then analyzed for variations of the communities and populations of soil denitrifying microorganisms with a real time fluorescent quantification polymerase chain reaction (qPCR) and a terminal-restricted fragment length polymorphism (T-RFLP) . **【Result】** Results show that during the process of N_2O emission rate rising to a peak, denitrification was obviously disturbed. In the treatments spiked with extraneous iron, especially at high rates (40 $\mu\text{mol g}^{-1}$), nitrate concentrations were much higher than in CK, while N_2O emission rates were significantly lower than in control. However, after the peak, N_2O emission rate decreased markedly in all the treatments, but it did much more slowly in the treatments spiked with high rates of iron than in CK and consequently remained higher than that in CK. Meanwhile, during the first 12 hours of incubation, the abundance of nitrate reductase gene (*narG*) and nitrous oxide reductase gene (*nosZ*) varied significantly, demonstrating that the ferrihydrite spiked apparently inhibited the growth of *narG*- and *nosZ*-containing communities in population size, and the more ferrihydrite was added and the more obvious was the effect. However, after 12 hours, the inhibition effect was no longer so obvious. The addition of extraneous iron did not have much influence on structure of the denitrifying microorganism community. **【Conclusion】** So it is concluded that the effect of Fe (III) affecting population of the denitrifying microorganism community is the main cause of extraneous Fe (III) inhibiting N_2O emission during the early period of the incubation, and hence nitrate reduction and N_2O production. But in the late period of the incubation, the recovery of denitrifying microorganisms in abundance and the existence of nitrate-containing residues, like NO_3^- , pushes the N_2O emission rate higher in the treatments spiked with extraneous iron than in CK.

Key words Paddy soil; Iron; N_2O ; *narG*; *nosZ*

(责任编辑: 卢 萍)