

碳源和氧对设施菜田土壤 N₂O 排放的影响*

陈吉吉^{1,2} 王乙然¹ 曹文超¹ 宋贺³ 王敬国^{1†}

(1 中国农业大学资源与环境学院, 北京 100193)

(2 北京市环境保护监测中心, 北京 100048)

(3 安徽农业大学农学院, 合肥 230036)

摘要 利用在线自动监测培养系统 (Robot 系统), 研究不同氧分压、碳源投入以及不同氧分压和碳源投入组合下, 添加硝化抑制剂双氰胺 (DCD) 对设施菜田土壤 N₂O 排放的影响。结果表明: 随着土壤氧分压的升高, N₂O 排放量呈指数下降 ($P < 0.001$), 土壤氧分压大于等于 3% O₂ 后, N₂O 排放量不足于无氧和微量氧 (1% 氧) 处理的 30%。添加碳源降低了有氧条件下土壤 N₂O 和 N₂ 产生量, 显著增加了微量氧下异养反硝化途径对 N₂O 的贡献量 ($P < 0.01$)。在微量氧和 3% O₂ 下, 与未添加 DCD 的处理相比, 无碳源添加且施用 DCD 后, N₂O 的排放分别降低了 64.4% 和 88.8%, 同时 N₂ 排放分别降低了 23.4% 和 18.6%。从微量氧至 3% O₂, 虽然无碳源添加的处理硝化细菌反硝化作用对 N₂O 排放的贡献从 17.2% 增加至 42.6%, 但由于排放总量的急剧下降, 硝化细菌反硝化作用对设施菜田土壤 N₂O 排放的贡献较小。本研究所用土壤 pH 较高, 且添加 DCD 的处理培养前后硝酸盐基本平衡, 异养的反硝化-反硝化过程可能很弱。总之, 设施菜田土壤 N₂O 排放主要发生在无氧和微量氧条件下。异养反硝化菌对土壤 N₂O 排放的直接贡献最大, 尤其是在碳源较为充足的条件下。

关键词 氧分压; 碳源; N₂O; 与硝化相耦合的反硝化; 异养反硝化; 硝化细菌反硝化

中图分类号 X511 **文献标识码** A

土壤 N₂O 的产生途径包括氨氧化、硝化诱导的反硝化 (包括硝化细菌反硝化 (Nitrifier denitrification, ND) 和与硝化相耦合的反硝化 (Nitrification-coupled denitrification, NCD))、异养硝化和异养反硝化过程 (Heterotrophic denitrification, HD)^[1], 贡献了全球 70% 以上的 N₂O 排放^[2]。其中, 反硝化过程, 主要是异养反硝化微生物利用 NO₃⁻ 作为电子受体被逐步还原为 NO₂⁻、NO、N₂O 最终为 N₂ 的过程, 被普遍认为是土壤 N₂O 产生的主要途径。但是, 近年来大量研究表明, 含有 *nirK* 基因的氨氧化细菌 (Ammonia-oxidizing bacteria, AOB) 利用 NH₄⁺ 氧化产生电子, 还原 NO₂⁻ 为 N₂O 的 ND 过程, 同样对土壤 N₂O 排放具有重要贡献^[3], 在有些培养条件下, ND 过程对土壤 N₂O 的贡献量甚至超过异养反硝化过程^[4]。同时, 异养反硝化微生物以硝化过程产生的 NO₂⁻ 为电子受体发生反硝化反应, 称之为与硝化相耦合的反硝化过程 (NCD), 同样对 N₂O 排放有重要贡献^[1]。此外, 在高氧、碳源充足的酸性土壤和污水处理系统中^[5], 相当数量的异养细菌和真菌可将 NH₃ 或有机形态的氨基氧化为 NO₃⁻, 发生异养硝化作用, 许多异养硝化菌同时可以进行好氧反硝化产生 N₂O, 称为同步硝化-反硝化过程 (Simultaneous nitrification-denitrification, SND)^[6]。

* 国家自然科学基金项目(41230856) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 41230856)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: wangjg@cau.edu.cn

作者简介: 陈吉吉 (1989—), 女, 陕西商洛人, 博士研究生, 主要研究方向为土壤氮素转化过程中微生物作用机制。
E-mail: cateapple@163.com

收稿日期: 2018-03-12; 收到修改稿日期: 2018-08-10; 优先数字出版日期 (www.cnki.net):

氧分压是影响土壤 N_2O 排放的重要参数。一般认为, 厌氧条件下 HD 是土壤 N_2O 排放的主要途径; 氨氧化是高氧分压下土壤 N_2O 的主要来源^[7]; ND 和 HD 对 N_2O 的贡献量随着土壤氧分压的升高而降低, 且 ND 途径对土壤氧分压的耐性高于 HD 途径^[8]。由于土壤具有高度异质性的特点, 低氧条件下各种 N_2O 产生途径可在不同的微域空间同时发生, 被认为是促使土壤 N_2O 排放最有利的环境^[5], 但是, 受各种环境因素的影响, 低氧条件下各途径对 N_2O 排放的相对贡献存在争议。

为促进作物生长、增加土壤微生物活性以及改善土壤结构, 我国设施蔬菜种植体系普遍会投入大量的有机肥^[9], 这会显著增加土壤碳源的有效性。土壤中充足的碳源有助于发生完全反硝化作用^[10], 降低土壤 N_2O 排放; 但也有研究认为, 氧分压而不是碳源的有效性决定了 N_2O 的还原^[5,11]。反之, 碳源不足会导致中间产物 NO_2^- 的累积^[12], NO_2^- 作为硝化和反硝化过程的中间产物, 与土壤 N_2O 排放正相关^[13]。碳源和氧浓度均会显著影响土壤 N_2O 排放, 但二者交互作用对 N_2O 排放的影响缺乏系统研究。

本研究选择典型蔬菜种植区土壤, 设置不同的氧分压和有效性碳投入, 研究二者对土壤 N_2O 排放的影响; 同时设置添加双氰胺(Dicyandiamide, DCD)的处理, 分析不同氧分压(0%、1%、3%、10%和 21%)和碳源投入下硝化和反硝化途径对土壤 N_2O 排放的相对贡献, 以期为设施菜田土壤 N_2O 减排措施的制定提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 采样地点及土壤样品

供试土壤采自于中国农业大学山东寿光蔬菜研究院(36°85'N, 118°87'E)的一个日光温室定位试验, 该试验设置于 2007 年, 种植系统为一年两季番茄。试验为裂区设计, 主处理为滴灌和漫灌, 副处理为不添加秸秆、添加小麦秸秆和添加玉米秸秆。本研究选取的土壤样品来自于滴灌和玉米秸秆处理, 该处理每个作物生长季平均滴灌量为 309 mm, 施肥处理 N、 P_2O_5 、 K_2O 投入量分别为 204 kg hm^{-2} 、229 kg hm^{-2} 和 526 kg hm^{-2} ; 玉米秸秆投入量为 8 t hm^{-2} (相当于 109 kg hm^{-2} 氮以及 3 406 kg hm^{-2} 碳); 商品鸡粪作为基肥, 平均施用量相当于 210 kg hm^{-2} 氮和 1 984 kg hm^{-2} 碳。2014 年 7 月番茄收获后采集 0~20 cm 土壤样品, 充分混匀后过 2 mm 筛风干备用。该土壤样品 NH_4^+-N 、 $NO_3^- -N$ 含量分别为 4.35、75.24 mg kg^{-1} , 全氮 1.31 g kg^{-1} , 全碳 17.9 g kg^{-1} , 有机碳 12.40 g kg^{-1} , 有效磷 150 mg kg^{-1} , 速效钾 483 mg kg^{-1} , pH 8.02。有关试验点的更多信息可参见 Fan 等^[14]的研究。

1.2 试验设计与方法

为缓解土壤中硝态氮(NO_3^-)背景值含量过高而铵态氮(NH_4^+)过低的现象, 试验开始前用去离子水清洗试验用土以保持 $NO_3^- -N$ 含量低于 20 mg kg^{-1} , 待水分自然蒸发至质量含水量为 100~150 g kg^{-1} 之间时, 过 2 mm 筛, 随后将过筛土置于 4℃冰箱储存备用。洗土后土壤 NH_4^+-N 、 $NO_3^- -N$ 含量分别为 3.37 mg kg^{-1} 和 8.03 mg kg^{-1} , 全氮 1.10 g kg^{-1} , 全碳 15.80 g kg^{-1} , 有机碳 10.81 g kg^{-1} , 有效磷 117 mg kg^{-1} , 速效钾 416 mg kg^{-1} , pH 8.01。

以水洗后的菜田土壤为研究对象, 30 mg kg^{-1} (以 N 计, 下同) NH_4NO_3 为氮源, 谷氨酸钠($C_5H_8NO_4Na \cdot H_2O$)为碳源, 设置未添加谷氨酸钠的对照处理(T1)和添加 184.8 mg kg^{-1} (以 C 计, 下同)谷氨酸钠的处理(T2), 两种处理土壤同时设置不添加/添加 DCD(50 mg kg^{-1})的处理, 研究 DCD 在 0%、1%、3%、10%和 21%氧分压(O_2/He 混合气体, 下同)下对设施菜田土壤 N_2O 的减排效果。为了进一步解释 T1 土壤有氧条件下 N_2O 产生的原因, 根据气体监测结果, 选取 9 个气体产生关键点, 同步设置平行试验测定无碳源添加土壤培养过程中 NO_2^- 、 NO_3^- 和 NH_4^+ 的动态变化。总培养时间为 108 h, 每个处理 3 个重复。

具体的试验操作为：称取相当于 10.0 g 烘干土重的预处理土样于 120 mL 血清瓶中，用注射器分别将去离子水或含有添加物（ NH_4NO_3 、 $\text{C}_5\text{H}_8\text{NO}_4\text{Na} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 或 DCD）的溶液均匀喷洒至土壤表面，调节土壤质量含水量为 250 g kg^{-1} 。所有血清瓶用铝盖密封后按处理分别用 0%、1%、3%、10%、21% 的氧气和氦气（ O_2/He ）的混合气（体积比）通过抽真空-洗气系统（帅恩科技有限公司，北京）洗气 4 次，最后一次抽真空后充入对应浓度的 O_2/He 混合气体，平衡血清瓶内气压后将所有血清瓶置于 20°C 恒温水浴槽中进行培养，利用 Robot 自动培养系统每间隔 6 h 在线连续监测血清瓶内 N_2O 、 N_2 和 CO_2 的浓度变化。培养过程中根据气体监测结果，使用密闭注射器定期向血清瓶中补充纯氧（99.9%，v/v），维持血清瓶中恒定的氧含量。

1.3 土壤气体及相关参数测定

恒温培养槽内的样品连接 Robot 自动培养系统，实时在线监测 O_2 、 N_2O 、 N_2 、 CO_2 的动态变化。该系统由恒温培养系统、自动进样系统和气体分析模块三部分组成，实现了培养、采样、分析过程的全部自动化操作。恒温培养系统主要包括恒温水浴锅（ $0\sim 40^\circ\text{C}$ ）、血清瓶、以及固定血清瓶位置的铁架构成（可放置 44 个 120 mL 的血清瓶）；自动进样系统由自动进样器（Gilson Model 222, Gilson, 法国）和蠕动泵（Gilson Minipuls 3, Gilson, 法国）构成，通过 Python 编程语言控制自动采样功能；气体分析模块由包含热导检测器（TCD）、电子捕获检测器（ECD）和火焰离子化检测器（FID）的气相色谱（Agilent 7890A, 美国）组成，能够监测 N_2O （ECD、TCD）、 N_2 （TCD）、 CO_2 （TCD）和 O_2 （TCD）的含量。该系统最大的优势是能够准确检测 N_2 的变化且采样过程中 N_2 的渗气率较低。相关 Robot 自动培养系统的运行模块细节可参见 Molstad 等^[15]的描述。

土壤样品中 NH_4^+ 和 NO_3^- 的含量用 1 mol L^{-1} KCl 溶液浸提后用连续流动分析仪（TRACCS2000, 德国）测定。土壤亚硝态氮、全氮、全碳、有机碳、有效磷、速效钾、pH 测定参照文献[16]。

1.4 数据处理

每批测量试验开始时，放置 3 个已知浓度的标气瓶，根据在线监测的血清瓶中气体数值和标气浓度，利用挪威生命科学大学 NMBU 研究小组的计算方法 (<https://www.nmbu.no/en/research/groups/nitrogen/approaches-and-infrastructure>) 计算上述气体产生量，计算过程中同时考虑了采样过程中由于回注等量 He 气造成的稀释效应、 N_2 和 O_2 的漏气影响、气体在各温度和 pH 下的溶解度以及在气液两相之间的扩散率，具体请参见 Molstad 等^[15]的研究。

不同氧分压下气态产物的产物比用 $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2)$ 指数 ($I_{\text{N}_2\text{O}}$) 计算求出，其计算公式如下^[17]：

$$I_{\text{N}_2\text{O}} = \int_0^T \text{N}_2\text{O}(t) dt / \int_0^T [\text{N}_2\text{O}(t) + \text{N}_2(t)] dt \quad (1)$$

式中，无氧处理的 $\text{N}_2\text{O}(t)$ 、 $\text{N}_2(t)$ 为 N_2O 测量值达到高峰时间(t)下的累积产生量， mg kg^{-1} ；有氧处理的时间节点是培养结束时。

质量平衡是指培养结束时土壤无机氮（ NH_4^+ 、 NO_3^- ）与气体产生量（ N_2O 、 N_2 ）之和与培养开始时土壤无机氮（ NH_4^+ 、 NO_3^- ）与气体产生量（ N_2O 、 N_2 ）之和两者间的差值。数据利用 SPSS 20.0 进行单因素、多因素方差分析。采用 SigmaPlot 12.5 作图，图表中数据均为：平均值±标准误差。文中所有涉及的 NO_3^- 、 NO_2^- 、 NH_4^+ 、 N_2O 、 N_2 、无机氮投入等均以 N 计。

2 结果

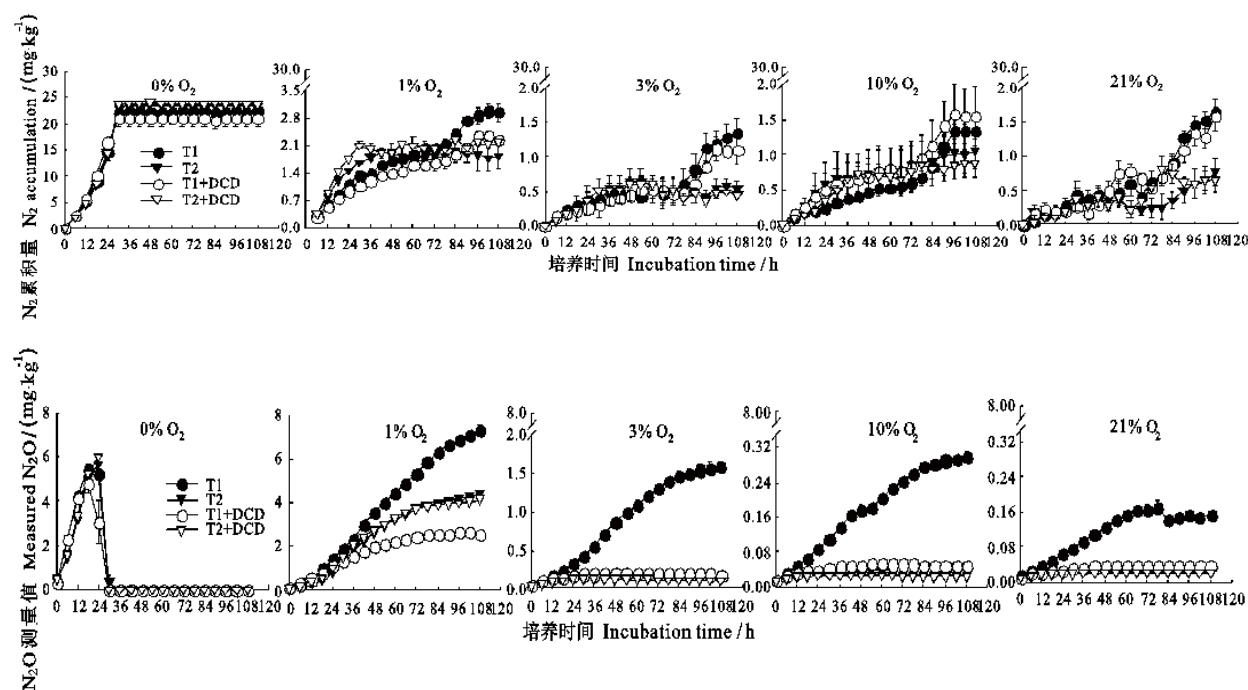
2.1 不同氧分压下碳源添加对设施菜田土壤 N₂O、N₂ 产生量的影响

由图 1 可见, 在厌氧条件下, 未添加和添加碳源土壤 N₂O 的排放量分别于在线培养后的 18 h、24 h 达到 5.42 mg kg⁻¹ 和 6.02 mg kg⁻¹ 的排放峰值, 并于 30 h 全部转化为 N₂, 且硝化抑制剂是否添加对 N₂O 产生量无显著影响。

随着土壤氧分压的升高, N₂O 排放量呈指数下降(图 2)。1% 氧分压下未添加硝化抑制剂和碳源的处理 N₂O 累积排放量显著高于厌氧处理 N₂O 的排放量 ($P < 0.01$)。在氧分压大于等于 1% 的条件下, 未添加碳源土壤 N₂O 排放量均高于添加碳源的处理, 但是在 1% 氧分压同时添加 DCD 和碳源条件下, 土壤 N₂O 排放量显著高于仅添加 DCD 的土壤 ($P < 0.01$), 分别为 4.21 mg kg⁻¹ 和 2.61 mg kg⁻¹。DCD 的添加显著降低了有氧条件下未添加碳源土壤 N₂O 和 N₂ 产生量, 在 1%、3%、10% 和 21% 氧分压下, 与未添加 DCD 的处理相比, 添加 DCD 后未添加碳源的处理 N₂O 产生量分别降低了 64.4%、88.8%、83.5% 和 76.3%; 添加 DCD 同时导致 1% 和 3% 氧分压下 N₂ 累积产生量分别降低了 23.4%、18.6%。DCD 的添加对添加碳源处理的 N₂O 和 N₂ 产生量均无显著影响。

厌氧条件下 N₂O 和 N₂ 排放量显著高于有氧处理 ($P < 0.01$), 最高达到 23.5 mg kg⁻¹。随着氧分压的增加, 土壤 N₂O 和 N₂ 排放量迅速下降。从 1% 氧分压时的 10.3 mg kg⁻¹ (未添加碳源处理) 和 6.74 mg kg⁻¹ (添加碳源处理), 分别下降至 3% 氧分压时的 2.94 mg kg⁻¹ 和 0.68 mg kg⁻¹。同时, 培养瓶顶空氧分压高于 3% 后, 添加碳源土壤的 N₂O 和 N₂ 排放峰值显著低于未添加碳源的土壤 ($P < 0.01$)。

当氧分压高于 3% 以后, 土壤 N₂ 排放量很低且可能存在较大的误差, 因此, 仅计算了前三个氧分压处理的 N₂O/(N₂O+N₂) (I_{N2O}) 值(表 1)。1% 氧分压下全部处理, 以及未添加 DCD 和碳源的 3% 氧分压处理的 I_{N2O} 普遍高于其余各氧分压处理, 其中, 未添加碳源土壤在 3% 与 1% 氧分压下 I_{N2O} 无显著差异, 均显著高于厌氧处理。碳源的添加显著降低了土壤的 I_{N2O}, 而 DCD 的添加则仅显著降低了未添加碳源土壤的 I_{N2O}。添加碳源和 DCD 的处理 I_{N2O} 对氧分压的响应类似, 即在 1% 氧分压下 I_{N2O} 最高, 0% 氧次之。



注: T1、T2、T1+DCD、T2+DCD 分别表示无碳源添加的处理、添加碳源的处理、无碳源添加但添加 DCD 的处理、添加碳源和 DCD 的处理, 下同 Note: T1, T2, T1+DCD and T2+DCD stands for treatment without

carbon added, treatment with carbon added, treatment with DCD, but no carbon added, treatment with both DCD and carbon added, respectively. The same below

图 1 不同氧分压下不同处理土壤培养过程中 N_2O 和 N_2 浓度的动态变化

Fig. 1 Dynamics of the concentrations of N_2O and N_2 in the soil under incubation relative to treatment and oxygen partial pressure (OPP)

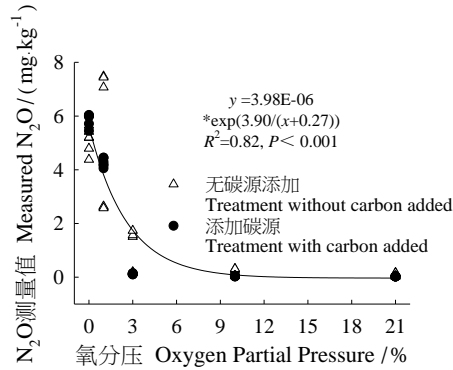


图 2 氧分压与 N_2O 排放量间的相关性 ($n=60$)

Fig. 2 Relationship between oxygen partial pressure and N_2O emission ($n=60$)

表 1 不同氧分压以下 $N_2O/(N_2O+N_2)$ (I_{N_2O}) 指数表示的产物比

Table 1 Gaseous product ratio [$N_2O/(N_2O+N_2)$ index (I_{N_2O})] relative to oxygen partial pressure (OPP)

| 氧分压 OPP | T1 | T2 | T1+DCD | T2+DCD |
|---------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 0% | 0.42 (0.00) aA | 0.35 (0.01) aB | 0.39 (0.01) bA | 0.36 (0.00) aA |
| 1% | 0.69 (0.01) aA | 0.59 (0.02) aB | 0.57 (0.00) bA | 0.57 (0.00) aA |
| 3% | 0.61 (0.05) aA | 0.23 (0.03) aB | 0.26 (0.02) bA | 0.32 (0.16) aA |

注：不同小写字母表示同一氧分压、同一碳投入水平下不同 DCD 处理间差异显著 ($P<0.05$)；不同大写字母表示同一氧分压、添加或不添加 DCD 处理条件下，不同碳投入处理间差异显著 ($P<0.01$)。括号内数据表示标准误差 Note: Different lowercase letters indicate significant differences between DCD treatments ($P<0.05$) the same in OPP and carbon input. Different uppercase letters indicate significant differences between treatments different in carbon input, but the same in OPP ($P<0.01$). Data in the blanket stand for standard error

质量平衡计算结果显示，在有氧和无氧条件下均有氮的净矿化，而且厌氧条件下两种处理中土壤的矿化量显著低于有氧处理 ($P<0.01$)，最高达到 17.0 mg kg^{-1} 。DCD 有效抑制了土壤的氨氧化，未添加碳源处理的土壤尤为显著 ($P<0.01$)。同时，在不同氧分压下，添加碳源的处理培养前后 NH_4^+ 含量无显著降低现象，即使在 21% 氧分压下，培养结束时不添加/添加 DCD 的处理 NH_4^+-N 含量分别为 50.0 mg kg^{-1} 和 55.2 mg kg^{-1} (谷氨酸钠添加带入了 43.12 mg kg^{-1} 的氮)。

2.2 不同氧分压下无碳源添加处理培养过程中无机氮动态

未添加碳源土壤培养过程中无机氮动态监测的结果 (图 3) 显示，厌氧条件下 NO_2^- 也会发生短暂的积累，累积量在 12 h 达到峰值，为 18.9 mg kg^{-1} 。在 1%、3% 和 10% 氧分压下，未添加 DCD 处理 NO_2^- 的累积时间、累积量显著高于厌氧和 21% 氧分压处理，三种氧分压下最高的 NO_2^- 累积量出现在培养开始后 72 h，分别为 25.7、30.6 和 31.5 mg kg^{-1} (图 3a)。

由图 3c 可见，培养开始后，厌氧条件下 NO_3^- 含量显著降低 ($P<0.01$)，90 h 时 NO_3^- 含量低于检测限。有氧条件下，培养结束时 NO_3^- 含量显著增加 ($P<0.05$)。在 1% 浓度下， NO_3^- 含量呈现先降低后增加的趋势，培养结束时 NO_3^- 的增加量显著低于 10% 和 21% 氧分压下的处理 ($P<0.01$)。

厌氧条件下 NH_4^+ 含量呈增加趋势, 培养结束时 NH_4^+ 增加了 16.6 mg kg^{-1} 。有氧条件下 NH_4^+ 整体呈下降趋势, 且 1% 氧分压下 NH_4^+ 的降低速率显著低于其他有氧处理 ($P < 0.01$)。

DCD 的添加对厌氧条件下 NO_2^- 、 NO_3^- 、 NH_4^+ 的变化无影响, 但其显著降低了有氧条件下 NH_4^+ 的氧化速率, 导致整个培养过程中土壤 NH_4^+ 、 NO_3^- 含量无显著变化(图 3d 和图 3f))。 NH_4^+ 氧化速率的降低同时显著降低了 1%、3% 和 10% 氧分压下中间产物 NO_2^- 的累积量(图 3b), 而在 1% 氧分压下添加 DCD 的处理 NO_2^- 累积量显著高于其他有氧处理 ($P < 0.01$)。

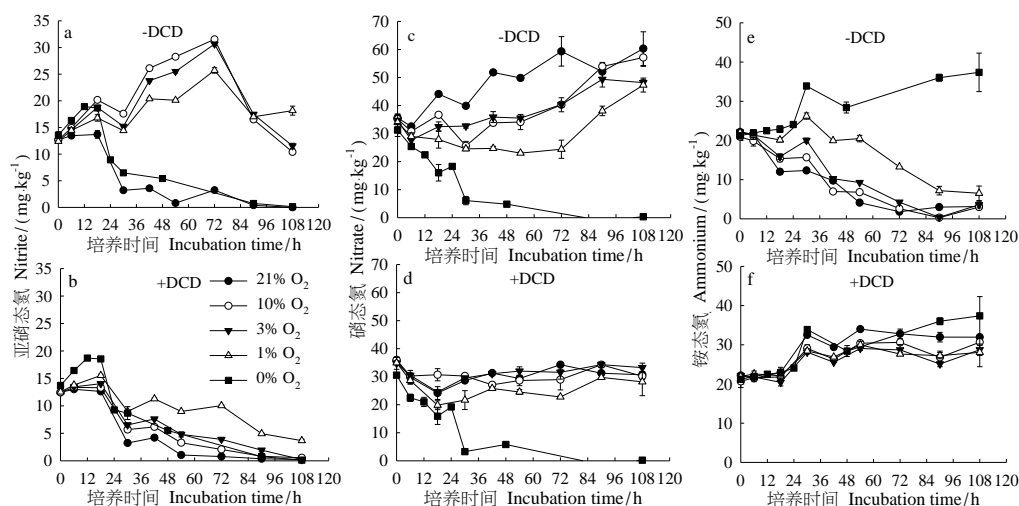


图 3 无碳源添加处理培养过程中无机氮的动态变化

Fig. 3 Dynamics of inorganic nitrogen in the soil under incubation without available carbon added

3 讨论

随着土壤氧分压的升高, N_2O 排放量呈指数下降, 土壤 N_2O 排放主要发生在厌氧和 1% 氧分压下(图 2)。厌氧条件下土壤 N_2O 主要来自 HD 过程, 且在本试验条件下, 厌氧处理土壤 N_2O 的排放量被明显低估, 这是因为在封闭培养体系中, 大量的 N_2O 很快会被进一步还原为 N_2 , 而在田间实际条件下, 大部分 N_2O 将被释放进入大气, 这也是室内培养试验普遍存在的问题^[18], 大量 N_2O 被还原导致本研究中无碳源和 DCD 添加的处理在微量氧(1% O_2) 下 N_2O 累积产生量显著高于厌氧处理 ($P < 0.01$)。在持续微量氧供应条件下, 各处理土壤中 N_2O 排放量以较高的速率不断增加; 当土壤氧分压增加至 3% O_2 后, 仅在未添加碳源的处理中表现出 N_2O 的持续排放, 与相同处理条件下的 1% 氧分压处理相比, N_2O 和 N_2O 加 N_2 排放量仍分别降低了 78.2% 和 71.3%, 表明土壤氧分压高于 3% 后, 即使是在碳源充足的条件下, N_2O 排放量、氮素气态损失显著降低^[19]。农田土壤 N_2O 排放主要发生在施肥和灌水后的脉冲式排放, 特别是设施菜田土壤, 在全年 17.5% 的时间内排放了约 78.8% 的 N_2O ^[20]。由此可见, 田间状态下, 土壤 N_2O 排放量中的绝大部分来自于厌氧和低氧的微域环境, 当土壤空气中的氧分压普遍高于 3% 后, 以氨氧化及其相关过程等途径来源的 N_2O 表现为脉冲式排放后的土壤 N_2O 背景排放。氨氧化过程中 N_2O 排放主要源于中间产物 NH_2OH 氧化, 但是土壤中几乎无 NH_2OH 累积, 且仅有 1/3 的 NH_2OH 氧化酶活性位点可能会将 NH_2OH 氧化为 N_2O ^[21], 导致该过程 N_2O 产生量很低, 一般不超过氨氧化量的 1%~2%^[22]。 NH_2OH 或 NO_2^- 的化学分解也会造成 N_2O 排放, 但该途径主要发生在低 pH 土壤中^[23]。

在碳源较为充足的条件下, HD 过程对设施菜田土壤 N_2O 排放的贡献量更大, 只是随着氧分压的升高, 其贡献的比例显著降低。添加碳源的处理中, DCD 对土壤 N_2O 、 N_2 产生量和 I_{N_2O} 均无显著影响, 且在添加 DCD 的 1% 氧分压下, 添加碳源的处理 N_2O 排放量显著高于无碳源添加的处理 ($P < 0.01$) (图 1)。此外, 与无碳源添加的土壤相比, 氨氧化量显著降低, 即使在 21% 氧分压下, 也无显著的氨氧化现象发生。由此可见, 碳源的添加可能会造成有氧条件下异养菌对自养菌生长产生竞争优势^[24], 导致有氧条件下 N_2O 可能主要来自 HD 过程。添加碳源后可能会有部分 N_2O 来自异养硝化-反硝化过程 (SND), 因为有利且碳源充足的条件有利于异养硝化作用的发生^[25], 但本研究所用土壤 pH 较高, 且添加 DCD 的处理培养前后硝酸盐基本平衡, 异养的不同步硝化-反硝化过程或许很弱。

在低氧 (1%~3% O_2) 且无碳源添加的土壤中, 异养反硝化菌可能会通过 HD 或 NCD 途径对土壤 N_2O 排放产生重要贡献。DCD 的添加显著降低了无碳源添加处理土壤 N_2O 排放量 ($P < 0.01$), 这与田间通量观测结果一致^[26-28], 且大量研究结果也表明, 低氧且低碳源环境会显著增加 ND 途径对 N_2O 的贡献量^[29], 但不能以此推测 ND 途径是微量氧条件下 N_2O 排放的主导途径。例如, 在微量氧 1% O_2 分压下, 无 DCD 添加的处理产物比 I_{N_2O} 指数为 0.69, 添加 DCD 后 I_{N_2O} 为 0.57, 根据产物比下降的幅度, 可以推算出在微量氧供应情况下, 约有 82.6% 的 N_2O 来自 HD 和 NCD 过程, 17.8% N_2O 来自于 ND 等过程。即在微量氧供应条件下, N_2O 排放中的绝大部分来自于分别以 NO_3^- 和 NO_2^- 为底物的异养反硝化过程。以同样方式计算, 在 3% O_2 分压下 HD 和 NCD 过程对 N_2O 排放的贡献量为 57.4%, 42.6% 的 N_2O 主要来自 ND 过程。硝化抑制剂同样会降低广义的 HD 途径氮素损失, 主要原因可能是 DCD 添加后 NCD 过程的底物 NO_2^- 含量降低^[30]。NCD 过程在本质上仍然是 HD 过程^[31], 在氧扩散受阻的情况下好氧微生物对土壤孔隙氧的消耗会导致微域土壤产生厌氧微位点, 造成氨氧化过程产生的 NO_2^- 通过异养反硝化途径损失。Petersen 等^[32] 研究结果表明, 有氧-厌氧的土壤环境会导致 70% 的硝化产物通过反硝化途径损失, Lee 等^[30] 也观察到土壤中硝化与反硝化潜势呈正相关。由此可见, 与自养的氨氧化微生物相比, 在微量氧和低氧且无碳源添加的土壤中, 异养菌可能对土壤 N_2O 排放和氮素气态损失更为重要。对比 1% 和 3% 氧分压下 N_2O 排放量也可以看出, 尽管氨氧化和 ND 过程在 3% 氧分压下对 N_2O 贡献量显著增加, 但 N_2O 的排放量较 1% 氧分压时下降了 78.2%, 因而, 总体上 ND 过程对设施菜田土壤 N_2O 排放的贡献不大。

有些条件下, 土壤中 ND 途径对 N_2O 的贡献量有可能被高估。例如, 本研究表明, 在 1%、3% 和 10% 氧分压下, 均存在 NO_2^- 较长时间的过渡性积累 (图 3a), 但仅在 1% 氧分压下出现大量的 N_2O 排放。通常认为, 硝化微生物进行 ND 的目的是解除 NO_2^- 对其细胞的毒害作用^[8]。由此可以推论, 当土壤中出现 NO_2^- 大量积累时, 就有可能伴随着通过 ND 途径排放大量 N_2O 的现象。这一假设显然与本研究的结果不符。认为有氧条件下 ND 过程是土壤 N_2O 排放主导途径之一的结论, 主要来自于在低氧条件下利用同位素标记方法进行的试验^[3-4]。然而, 利用双同位素技术计算排放途径的前提, 是假定氨氧化产生的 NO_2^- 仅能被氨氧化菌所利用, 进行反硝化过程并释放出 N_2O ^[33]。这种假设或许存在下列不足: 首先, 土壤中有许多异养反硝化菌对 NO_3^- 和 NO_2^- 有相同的异养还原能力; 其次, 部分异养菌由于缺少 NO_3^- 还原基因仅能以 NO_2^- 为底物进行反硝化作用, 因此, 利用双同位素标记法得到的结果可能会高估 ND 途径对 N_2O 排放的贡献^[1,34]。

4 结论

随着土壤氧分压的升高, N_2O 排放量呈指数下降, 土壤 N_2O 排放主要发生在厌氧和微量氧 (1% O_2) 情况下, 氧分压大于等于 3% 后, 土壤 N_2O 排放量、氮素气态损失显著降低。在低氧条件下 (0%~3% O_2), 总体上异养反硝化菌对设施菜田土壤 N_2O 排放更为重要, 特别是在碳源较为充足的条件下。田间实际条件下, 在保证作物产量的前提下, 适当的碳源投入、通过水分管理控制土壤空气中氧分压以及减少低氧与厌氧的“热点”, 并结合施用硝化抑制剂, 对降低菜田土壤 N_2O 排放有重要意义。

参考文献

- [1] Shi X Z, Hu H W, Xia Z, et al. Nitrifier-induced denitrification is an important source of soil nitrous oxide and can be inhibited by a nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate. *Environmental Microbiology*, 2017, 19(12): 4851-4865
- [2] Butterbach-Bahl K, Baggs E M, Dannenmann M, et al. Nitrous oxide emissions from soils: how well do we understand the processes and their controls? *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 2013, 368(1621): 20130122
- [3] Kool D M, Dolfing J, Wrage N, et al. Nitrifier denitrification as a distinct and significant source of nitrous oxide from soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 2011, 43(1): 174-178
- [4] Zhu X, Burger M, Doane T A, et al. Ammonia oxidation pathways and nitrifier denitrification are significant sources of N_2O and NO under low oxygen availability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110(16): 6328-6333
- [5] Ju X T, Lu X, Gao Z, et al. Processes and factors controlling N_2O production in an intensively managed low carbon calcareous soil under sub-humid monsoon conditions. *Environmental Pollution*, 2011, 159(4): 1007-1016
- [6] Cui F, Yan G, Zhou Z, et al. Annual emissions of nitrous oxide and nitric oxide from a wheat-maize cropping system on a silt loam calcareous soil in the North China Plain. *Soil Biology and Biochemistry*, 2012, 48(4): 10-19
- [7] Sutka R L, Ostrom N E, Ostrom P H, et al. Distinguishing nitrous oxide production from nitrification and denitrification on the basis of isotopomer abundances. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(1): 638-644
- [8] Hu H W, Chen D, He J Z. Microbial regulation of terrestrial nitrous oxide formation: understanding the biological pathways for prediction of emission rates. *FEMS Microbiology Reviews*, 2015, 39(5): 729-749
- [9] Yan Z, Chen S, Li J, et al. Manure and nitrogen application enhances soil phosphorus mobility in calcareous soil in greenhouses. *Journal of Environmental Management*, 2016, 181: 26-35
- [10] Saito T, Ishii S, Otsuka S, et al. Identification of novel *Betaproteobacteria* in a succinate-assimilating population in denitrifying rice paddy soil by using stable isotope probing. *Microbes & Environments*, 2008, 23(3): 192-200
- [11] Morley N, Baggs E M. Carbon and oxygen controls on N_2O and N_2 production during nitrate reduction. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, 42: 1864-1871
- [12] Yang X, Wang S, Zhou L. Effect of carbon source, C/N ratio, nitrate and dissolved oxygen concentration on nitrite and ammonium production from denitrification process by *Pseudomonas stutzeri* D6. *Bioresource Technology*, 2012, 104(1): 65-72
- [13] Maharjan B, Venterea R T. Nitrite intensity explains N management effects on N_2O emissions in maize. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 66(11): 229-238

- [14] Fan Z B, Lin S, Zhang X M, et al. Conventional flooding irrigation causes an overuse of nitrogen fertilizer and low nitrogen use efficiency in intensively used solar greenhouse vegetable reduction. *Agricultural Water Management*, 2014, 144(2): 11-19
- [15] Molstad L, Dorsch P, Bakken L R. Robotized incubation system for monitoring gases (O_2 , NO , N_2O , N_2) in denitrifying cultures. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 71(3): 202-211
- [16] 鲍士旦. 土壤农化分析. 3版. 北京: 中国农业出版社, 1999: 25-111
Bao S D. Soil agrochemical analysis (In Chinese). 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 1999: 25-111
- [17] Qu Z, Wang J G, Almøy T, et al. Excessive use of nitrogen in Chinese agriculture results in high $N_2O/(N_2O+N_2)$ product ratio of denitrification, primarily due to acidification of the soils. *Global Change Biology*, 2014, 20(5): 1685-1698
- [18] Wu D, Dong W, Oenema O, et al. N_2O consumption by low-nitrogen soil and its regulation by water and oxygen. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 60(1):165-172
- [19] 杨艳菊, 蔡祖聪, 张金波. 氧气浓度对水稻土 N_2O 排放的影响. *土壤*, 2016, 48(3): 539-545
Yang Y J, Cai Z C, Zhang J B. Effect of oxygen concentration on N_2O emission from paddy soil (In Chinese). *Soils*, 2016, 48(3): 539-545
- [20] Diao T, Xie L, Guo L, et al. Measurements of N_2O emissions from different vegetable fields on the North China Plain. *Atmospheric Environment*, 2013, 72(2): 70-76
- [21] Yamazaki T, Hozuki T, Arai K, et al. Isotopomeric characterization of nitrous oxide produced by reaction of enzymes extracted from nitrifying and denitrifying bacteria. *Biogeosciences*, 2014, 11(10): 2679-2689
- [22] Morkved P T, Dorsch P, Bakken L R. The N_2O product ratio of nitrification and its dependence on long-term changes in soil pH. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39(8): 2048-2057
- [23] Lim N Y N, Frostegård Å, Bakken L R. Nitrite kinetics during anoxia: The role of abiotic reactions versus microbial reduction. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, 119: 203-209
- [24] Third K A, Burnett N, Cord-Ruwisch R. Simultaneous nitrification and denitrification using stored substrate (PHB) as the electron donor in an SBR. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, 83(6): 706-720
- [25] Zhang J, Müller C, Cai Z. Heterotrophic nitrification of organic N and its contribution to nitrous oxide emissions in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 84: 199-209
- [26] 毛新伟, 程敏, 徐秋芳, 等. 硝化抑制剂对毛竹林土壤 N_2O 排放和氨氧化微生物的影响. *土壤学报*, 2016, 53(6): 1528-1540
Mao X W, Cheng M, Xu Q F, et al. Effects of nitrification inhibitors on soil N_2O emission and community structure and abundance of ammonia oxidation microorganism in soil under extensively managed *Phyllostachys edulis* stands (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2016, 53(6): 1528-1540
- [27] 陈浩, 李博, 熊正琴. 减氮及硝化抑制剂对菜地氧化亚氮排放的影响. *土壤学报*, 2017, 54(4): 938-947
Chen H, Li B, Qiong Z Q. Effects of N reduction and nitrification inhibitor on N_2O emissions in intensive vegetable field (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2017, 54(4): 938-947
- [28] 孙海军, 闵炬, 施卫明, 等. 硝化抑制剂影响小麦产量、 N_2O 与 NH_3 排放的研究. *土壤*, 2017, 49(5): 876-881
Sun H J, Min J, Shi W M, et al. Effects of nitrification inhibitor application on wheat grain yield, N_2O emission and NH_3 volatilization (In Chinese). *Soils*, 2017, 49(5): 876-881
- [29] Wrage N, Velthof G L, van Beusichem M L, et al. Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33 (12/13): 1723-1732
- [30] Lee A, Winther M, Priemé A, et al. Hot spots of N_2O emission move with the seasonally mobile oxic-anoxic interface in drained organic soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 115: 178-186

- [31] Bergstrom D W, Tenuta M, Beauchamp E G. Increase in nitrous oxide production in soil induced by ammonium and organic carbon. *Biology & Fertility of Soils*, 1994, 18(1): 1-6
- [32] Peterson S O, Henriksen K, Blackburn T H. Coupled nitrification-denitrification associated with liquid manure in a gel-stabilized model system. *Biology & Fertility of Soils*, 1991, 12(1): 19-27
- [33] Kool D M, van Groenigen J W, Wrage N. Source determination of nitrous oxide based on nitrogen and oxygen isotope tracing dealing with oxygen exchange. *Methods in Enzymology*, 2011, 496(16): 139-160
- [34] Bakken L R, Frostegård Å. Sources and sinks for N₂O, can microbiologist help to mitigate N₂O emissions? *Environmental Microbiology*, 2017, 19(12): 4801-4805

Effects of Oxygen Levels and Carbon Inputs on N₂O Emission in Greenhouse Vegetable Soil

CHEN Jiji^{1,2} WANG Yiran¹ CAO Wenchao¹ SONG He³ WANG Jingguo^{1†}

(1 College of Resource and Environment, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

(2 Beijing Municipal Environmental Monitoring Center, Beijing 100048, China)

(3 College of Agronomy, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract 【Objective】 In order to explore effects of oxygen level (0%, 1%, 3%, 10% and 21%) and carbon input on major sources of N₂O emission in greenhouse vegetable soil, an on-line robotized monitoring and incubation system was used to automatically monitor real-time dynamics of O₂, N₂O and N₂ in greenhouse vegetable soil after a crop of tomato was harvested. In addition, dicyandiamide (DCD), a kind of nitrification inhibitor, was added to investigate contribution of nitrification to N₂O emission from the soil relative to carbon source and oxygen level. 【Method】 A certain amount of soil sample collected from a vegetable field under greenhouse after a crop of tomato was harvested, was washed with deionized water and divided into two groups, labeled as T1 and T2, separately. T2 was spiked with glutamate, whereas T1 was not. NH₄NO₃ was added as nitrogen source for both groups. Then the pretreated soil samples were put into 120 mL vials, 10.0 g in dry soil weight in each. Deionized water or solution containing NH₄NO₃, C₅H₈NO₄Na H₂O or DCD was sprayed onto the soil surface to adjust moisture content of the soil up to 250 g kg⁻¹ in line with the requirement of the treatment, T1 or T2. Then the soils in the sealed vials were placed in a thermostatic (20 °C) waterbath trough for incubation. Concentrations of O₂, N₂O, N₂ and CO₂ in the headspace of a vial were monitored online at intervals of 6 h, and pure O₂ was supplemented with a hermetic syringe in the light of the monitoring results of the gases in the headspace to maintain an approximately constant oxygen concentration (1%, 3%, 10% or 21% (v/v)) in the sealed vials. 【Result】 Results show that N₂O emission declined exponentially with rising soil oxygen partial pressure (OPP) ($R^2=0.82$, $P<0.001$). It peaked when OPP was 0% or 1%, and fell below 30% of the peak when OPP got equal to or higher than 3%. Addition of available carbon into the vial reduced N₂O and N₂ production in the soil under aerobic conditions, while significantly increasing the contribution of the process of heterotrophic denitrification in the soil to N₂O emission under near-anaerobic conditions ($P<0.01$), which suggests that this kind of soil is highly capable of triggering heterotrophic denitrification, and anaerobicity and near-anaerobicity is more favorable to N₂O emission. Compared with Group T1, Group T2 was 64.4%

and 88.8% lower in N₂O emission, 23.4% and 18.6% lower in N₂ emission, and 14.5% and 62.3% lower in N₂O/(N₂O+N₂) index (I_{N₂O}), respectively, when OPP was 1% and 3% and no carbon supplemented. However, when carbon was supplemented, the two groups did not vary much in N₂O and N₂ emissions and I_{N₂O}, which suggests that strong nitrification occurs in the soil with no carbon supplemented and N₂O comes mainly from heterotrophic denitrification process (HD) under aerobic conditions in the soil with sufficient carbon supply. DCD would lower the accumulation of NO₂⁻, a substrate of nitrification-coupled denitrification (NCD), which is considered to be an important contributor to N₂O emission under aerobic conditions; nevertheless, the process of NCD is still a heterotrophic one in nature. That is to say, DCD would reduce N₂O emission from nitrification processes, and from heterotrophic denitrification processes, too. With OPP rising from 1% to 3%, N₂O emission from nitrifier-induced denitrification (ND) increased from 17.2% to 42.6%, however, the contribution of ND to N₂O emission in the vegetable soil was still quite low due to the drastic reduction in total N₂O emission. Moreover, the commonly used dual isotopic labeling method would lead to overestimation of the contribution of ND to N₂O emission because this method may rule partial NCD or HD processes into ND. As the soil in this study was quite high in pH and remained almost unchanged in nitrate content after the treatment with DCD, simultaneous heterotrophic nitrification-denitrification processes might be very weak. 【Conclusion】 Soil N₂O emission mainly occurs under anaerobic and near-anaerobic conditions (OPP=1%). Heterotrophic denitrifiers make the biggest direct contribution to soil N₂O emissions, especially when carbon sources are abundant. NO₂⁻ is an important substrate of the process of nitrification-coupled denitrification.

Key words Oxygen partial pressure (OPP); Carbon source; Nitrous oxide (N₂O); Nitrification-coupled denitrification (NCD); Heterotrophic denitrification (HD); Nitrifier-denitrification (ND)

(责任编辑: 陈荣府)