

# 土样制备和保存方法对亚热带土壤反硝化的影响<sup>①</sup>

续勇波<sup>1,2</sup>, 蔡祖聪<sup>1</sup>, 雷宝坤<sup>3</sup>

(1 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008; 2 云南农业大学, 昆明 650201;

3 云南省农业科学院农业环境与资源研究所, 昆明 650205)

**摘要:** 比较了两种土样制备和保存方法对厌氧培养 1 周内土壤反硝化及矿化的动态影响。试验结果表明, 强烈风干后并经长期存放过的土样显著促进了 $\text{NO}_3^-$ -N浓度降低速率和 $\text{N}_2\text{O}$ 排放速率的提高, 其反硝化速率和矿化速率分别较稍微风干后无存放时间(即立即开始培养试验)的土样提高了 47.3% 和 31.0%。强烈风干土有机C矿化作用的增强以及易矿化有效态C含量的提高是促进反硝化作用增强的主要原因。风干程度和存放时间对反硝化的促进程度取决于其对有机质矿化影响的相对大小, 对有机质矿化的影响越大, 反硝化强度增加的幅度也越大。由试验结果可推测, 利用风干土的实验室培养方法测定得到的土壤反硝化势可能会过高估计田间原位测定的反硝化势。

**关键词:** 反硝化; 风干程度; 存放时间; 矿化; 红壤

**中图分类号:** S153

在大批量土样的反硝化培养试验中, 常常采用风干土样作为供试材料, 这是由于土样数量众多, 培养试验的完成耗时较长, 甚至需要长达半年以上的时间。如果采集新鲜土样立即培养, 则不同时期以及不同季节采集的土样由于受植物生长、土壤水分状况、施肥水平的不同而差异较大, 造成同一土壤反硝化势会因土样采集时期的不同而发生改变, 难以进行不同土样之间的相对比较。因此, 通常将所有土样在同一时期内采集完毕, 制成风干土样进行培养试验。

但是, 风干和贮存过程中土壤理化性质、微生物数量和活性会发生改变, 从而改变反硝化特性。然而关于风干土对反硝化的影响结论不一致, 如风干土某些情况下会导致反硝化酶活性(DEA)的升高<sup>[1-2]</sup>, 而Smith和Parsons<sup>[3]</sup>发现风干土中反硝化酶活性比鲜土降低了20%。风干土贮存时间长短不同, 反硝化酶活性也不同, Luo<sup>[4]</sup>等人发现贮存1周的风干土较贮存7周的风干土DEA高, 认为是风干土壤存放1周内有机C有效性的提高促进了反硝化的进行, 而1周后有机C的有效性降低以及反硝化菌数量和活性的下降, 导致反硝化酶活性下降。4℃低温保存有利于保持反硝化细菌的数量, 但显著抑制反硝化活力<sup>[5]</sup>。

文献中关于不同土样制备和保存方法对反硝化的影响主要集中在以反硝化酶活性(DEA)表征的反硝化势大小方面的影响, 该方法反映的是土壤中即存反

硝化酶(或反硝化菌)活性大小, 培养测定时间不超过5h。然而, 在以反硝化底物 $\text{NO}_3^-$ -N耗竭法表征的较长时期内的反硝化势差异如何尚鲜有报道, 为此我们比较了两种土样制备和保存方法对同样条件下培养1周土壤反硝化势的影响, 以及造成这种差异的主要原因, 为评价田间原位反硝化强度提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试土壤

供试所用的6个土样于2006年8月采自江西鹰潭, 采样地点描述和采样方法参见文献[6], 土壤理化性质见表1。

### 1.2 土样制备和保存方法

试验采用两种土样制备和保存方法:

处理1: 采集新鲜土样, 风干1~3天, 以能通过2mm筛为宜, 此时土壤平均含水量为11.8%。制备好的土样暂时于4℃保存备用, 立即开始培养试验。

处理2: 土样采集后风干7天, 过1mm筛, 此时平均土壤含水量为3.4%。制备好的土样于4℃保存备用, 8个月后开始培养试验。

### 1.3 培养试验方法

称取相当于30g烘干土重的土样装入250ml三角瓶中, 加蒸馏水30ml, 用硅橡胶塞密封瓶口, 于30℃下淹水预培养7天, 以便激活土壤微生物。预培养结

①基金项目: 国家自然科学基金项目(40471065)、中科院知识创新工程项目(CXTD-Z2005-4)和云南大学校青年基金项目(2007Q001A)资助。

作者简介: 续勇波(1974—), 女, 山西太原人, 博士, 副教授, 主要从事土壤氮素循环与温室气体排放研究。E-mail: ybxu@ynu.edu.cn

表1 土壤理化性质(表层0~20 cm)

Table 1 Physico-chemical properties of the tested soils

| 土样* | pH<br>(H <sub>2</sub> O) | 无定形 Fe<br>(g/kg) | TN<br>(g/kg) | TC<br>(g/kg) | 颗粒组成 (g/kg) |         |            | CEC<br>(cmol/kg) |
|-----|--------------------------|------------------|--------------|--------------|-------------|---------|------------|------------------|
|     |                          |                  |              |              | <2 μm       | 2~20 μm | 20~2000 μm |                  |
| SR  | 4.74                     | 2.18             | 1.30         | 13.00        | 125.0       | 341.5   | 533.5      | 6.83             |
| QR  | 4.86                     | 2.44             | 1.05         | 11.44        | 125.5       | 309.5   | 565.0      | 5.20             |
| QU  | 5.03                     | 4.82             | 0.89         | 9.96         | 153.0       | 333.0   | 514.0      | 15.45            |
| QB  | 4.85                     | 3.12             | 1.53         | 22.18        | 266.0       | 354.0   | 380.0      | 18.66            |
| GT  | 4.50                     | 2.09             | 2.32         | 29.61        | 196.0       | 306.5   | 497.5      | 13.81            |
| GF  | 4.74                     | 1.72             | 1.63         | 26.52        | 137.0       | 276.5   | 586.5      | 13.76            |

\*: S 红砂岩; Q 第四纪红土; G 花岗岩; F 林地; U 旱地; R 稻田; T 茶园; B 灌丛。

束后, 注入 10 ml (含 6 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N) KNO<sub>3</sub> 溶液 (相当于每千克土含 N 量 200 mg), 充分混合。同时设一不加 KNO<sub>3</sub> 溶液只加入相同体积去离子水的空白对照。所有处理的三角瓶用带采气口的特殊硅橡胶塞盖紧并在瓶塞周围涂抹 704 硅胶以密封瓶口。从采气口将三角瓶抽成真空, 通入 1.01×10<sup>5</sup> Pa 的高纯 N, 重复 3 次, 最后将采气口用 704 硅胶密封以保证厌氧培养环境, 置于 30℃ 下恒温培养, 所有处理均重复 3 次。分别在加入 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 后的 1、3、7 天用 20 ml 注射器反复抽提培养瓶中气体 3 次, 使其充分混合, 然后采集上部空间气体, 测定 CH<sub>4</sub> 浓度、N<sub>2</sub>O 浓度和 CO<sub>2</sub> 浓度。采集气样后, 打开瓶塞, 加入 3 mol/L KCl 溶液, 提取并测定 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 含量。在每次提取测定矿质态 N 的浸提液中取一定体积待测液, 用邻菲罗啉比色法测定 Fe<sup>2+</sup> 含量<sup>[7]</sup>。两种方法制备和保存的土样培养试验方法完全相同。

CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>O 和 CO<sub>2</sub> 浓度测定和累积排放量计算方法参见文献[6,8]。

## 2 结果和分析

### 2.1 两种方法制备和保存的土样培养期间 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 含量比较

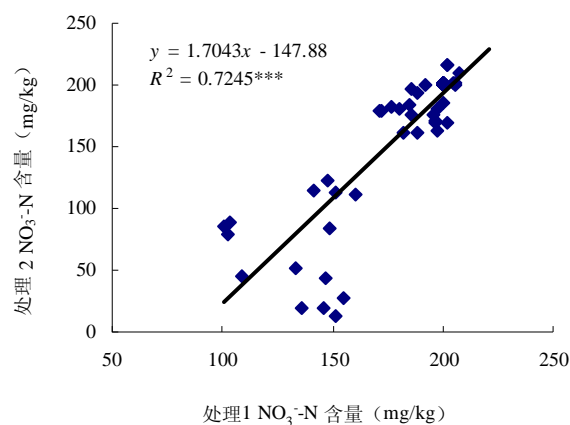
表2 7 天厌氧培养期间两种处理土样配对 T 检验的 T 值和显著水平

Table 2 T-test between the two treatments during the 7-day of anaerobic incubation

|      | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup><br>(mg/kg) | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup><br>(mg/kg) | N <sub>2</sub> O<br>(N mg/kg) | CH <sub>4</sub><br>(C μg/kg) | Fe <sup>2+</sup><br>(mg/kg) |
|------|---|---|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| 处理 1 | 178.92 ± 4.11                           | 23.37 ± 2.00                            | 5.65 ± 0.84                   | 5.56 ± 0.39                  | 166.82 ± 22.85              |
| 处理 2 | 157.05 ± 8.24                           | 62.44 ± 4.35                            | 7.46 ± 0.97                   | 8.22 ± 0.84                  | 430.06 ± 43.44              |
| T 值  | 4.201***                                | -9.802***                               | -2.603**                      | -2.911**                     | -10.24***                   |

注: \*\*, \*\*\* 分别表示 p<0.01 和 p<0.001 显著水平。

两种处理土样中 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 含量均随培养时间推移而下降, 全部 6 个土样 2 种处理方式后培养期间各次测定的土壤残留 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 含量之间存在显著相关性 (p<0.001), 如图 1 所示, R<sup>2</sup>=0.7245, 表明试验方法的重现性较好。配对 T 检验结果表明 (表 2), 所有 6 个土样 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 平均残留量处理 1 显著高于处理 2 (p<0.001)。

图1 两种处理土样培养期间 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 含量的相关性Fig.1 Relationship between NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N contents in the two kinds of soil sample treatments during the 7 day-incubation

### 2.2 两种方法制备和保存的土样NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量降低速率比较

不同土样厌氧培养 7 天内的NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量平均降低速率如图 2 所示,除旱地土壤(QU)经两种处理土样NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N降低速率间无明显差别外,其余土壤均为处理 1 低于处理 2。处理 1 和处理 2 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N平均降低速率分别为 $N(8.2 \pm 3.7) \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 和 $(16.3 \pm 8.2) \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ,配对T检验结果表明处理 2 的NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量平均降低速率显著高于处理 1 ( $p < 0.05$ )。

回归分析表明(图 3),无论是处理 1 还是处理 2,NO<sub>3</sub><sup>-</sup>降低速率和N<sub>2</sub>O排放速率间均存在显著相关性, $R^2$ 分别为 0.9424\*\* 和 0.8429\*\*。由回归方程可知,单位NO<sub>3</sub><sup>-</sup>降低速率的增加将导致处理 2 的N<sub>2</sub>O排放速率增加量较处理 1 为多,表明处理 2 由反硝化产生的N<sub>2</sub>O

排放量将较处理 1 高。

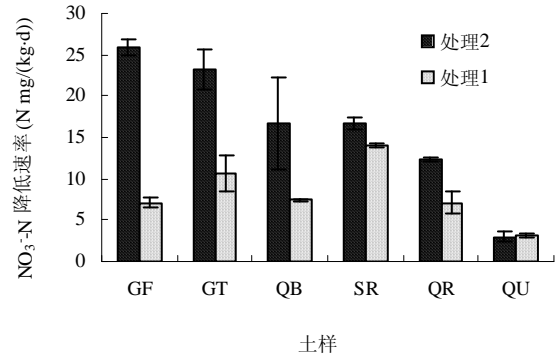


图 2 两种处理土样NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N降低速率比较

Fig. 2 Reduction rates of NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N contents in the two kinds of soil sample treatments

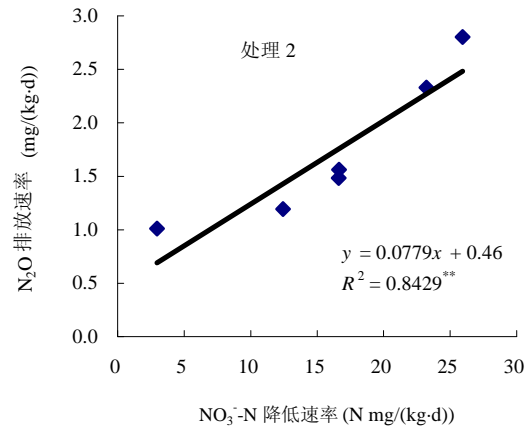
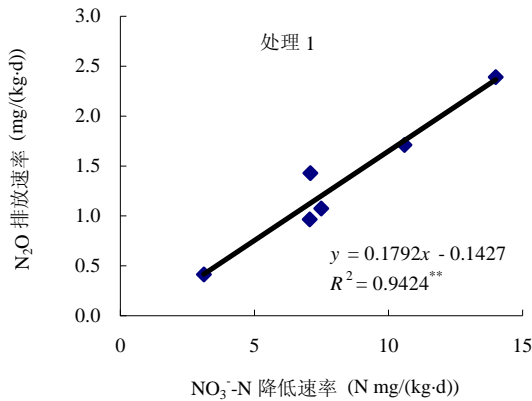


图 3 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N降低速率和N<sub>2</sub>O排放速率间的关系

Fig. 3 Relationship between the reduction rate of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> content and the emission rate of N<sub>2</sub>O

### 2.3 两种处理土样培养期间NH<sub>4</sub><sup>+</sup>含量、N<sub>2</sub>O浓度、CH<sub>4</sub>浓度和Fe<sup>2+</sup>含量比较

表 2 配对T检验结果表明,7 天厌氧培养期间测定的各指标中,处理 2 的NH<sub>4</sub><sup>+</sup>含量,N<sub>2</sub>O、CH<sub>4</sub>排放量以及Fe<sup>2+</sup>含量都显著高于处理 1 ( $p < 0.01$ )。表明处理 2 在促进反硝化底物NO<sub>3</sub><sup>-</sup>显著减少、产物N<sub>2</sub>O显著增加的同时,也伴随着与反硝化作用相关的其他指标的相应改变。

### 2.4 影响处理 2 反硝化作用增强的因素

表 3 结果表明,除QU外,不同土样处理 2 较处理 1 反硝化强度均有不同程度增加,处理 2 的NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N降低速率( $V_N$ )较处理 1 增加的百分比 $R_1 = (V_{N\text{处理}2} - V_{N\text{处理}1})/V_{N\text{处理}1} \times 100\%$ 可表示处理 2 对反硝化的促进程度,该值为 15.75% ~ 72.70%,平均为 $47.32\% \pm 9.15\%$ (表 3)。

表 3 不同土样两种处理的NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N和NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N变化速率

Table 3 Reduction rates of NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N content and the increase rates of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N content during the incubation in the two kinds of soil sample treatments

| 土样 | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N降低速率 (N mg/(kg·d)) |              |                    | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N增长速率 (N mg/(kg·d)) |             |                    |
|----|---|--------------|--------------------|---|-------------|--------------------|
|    | 处理 1  | 处理 2         | R <sub>1</sub> (%) | 处理 1  | 处理 2        | R <sub>2</sub> (%) |
| SR | 13.99 ± 0.18                                      | 16.63 ± 0.70 | 15.75 ± 3.46       | 2.62 ± 0.20                                       | 2.81 ± 0.64 | 2.32 ± 31.34       |
| QR | 7.06 ± 1.33                                       | 12.43 ± 0.22 | 43.05 ± 11.62      | 1.16 ± 0.15                                       | 2.40 ± 0.42 | 50.05 ± 15.59      |
| QU | 3.11 ± 0.30                                       | 2.96 ± 0.55  | -7.80 ± 23.13      | 1.35 ± 0.29                                       | 1.10 ± 0.07 | -24.79 ± 32.20     |
| QB | 7.50 ± 0.12                                       | 16.64 ± 5.56 | 51.28 ± 16.82      | 2.92 ± 1.05                                       | 4.13 ± 1.33 | 17.29 ± 59.35      |
| GT | 10.59 ± 2.14                                      | 23.22 ± 2.40 | 53.84 ± 11.68      | 3.14 ± 0.46                                       | 4.64 ± 0.90 | 30.31 ± 17.79      |
| GF | 7.08 ± 0.65                                       | 25.94 ± 1.00 | 72.70 ± 2.19       | 1.66 ± 0.27                                       | 3.69 ± 0.45 | 55.00 ± 6.27       |

与之相对应的是， $\text{NH}_4^+\text{-N}$  增长速率 ( $V_A$ ) 除 QU 土样的处理 1 和处理 2 之间几乎相同外，其余土样处理 2 的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  增长速率均高于处理 1 (表 3)，处理 2 的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  增长速率 ( $V_A$ ) 较处理 1 增加的百分比  $R_2 = (V_{A\text{处理}2} - V_{A\text{处理}1}) / V_{A\text{处理}2} \times 100\%$  用来表示处理 2 对有机 N 矿化的促进程度，该值为 2.32% ~ 55.00%，平均为  $30.99\% \pm 26.07\%$  (表 3)。

$R_1$  和  $R_2$  间具有显著相关性 ( $R^2=0.8028$ ,  $p<0.05$ ) (图 4)，说明风干程度和存放时间对反硝化的促进程度取决于其对有机质矿化影响的相对大小，风干程度越大，存放的时间越长，对有机质矿化的促进程度越大，反硝化强度增加的幅度也越大。

培养期间  $\text{NH}_4^+$  含量的增加和  $\text{CO}_2$  浓度的上升呈显著正相关关系，以处理 1 为例，6 个土样  $R^2$  变化在 0.6443 ~ 0.9408 (图 5)，表明  $\text{NH}_4^+$  含量的增加是来源于

有机质的矿化，有机 C 的矿化分解产生  $\text{CO}_2$ ，同时释放出有机 N 矿化产物  $\text{NH}_4^+$ ；也表明有机 C 和  $\text{NO}_3^-$  底物的增加促进了厌氧微生物的活性。

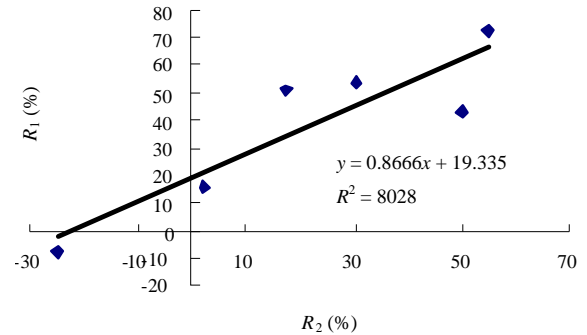


图 4  $R_1$  和  $R_2$  间的相关性  
Fig. 4 Relationship between  $R_1$  and  $R_2$

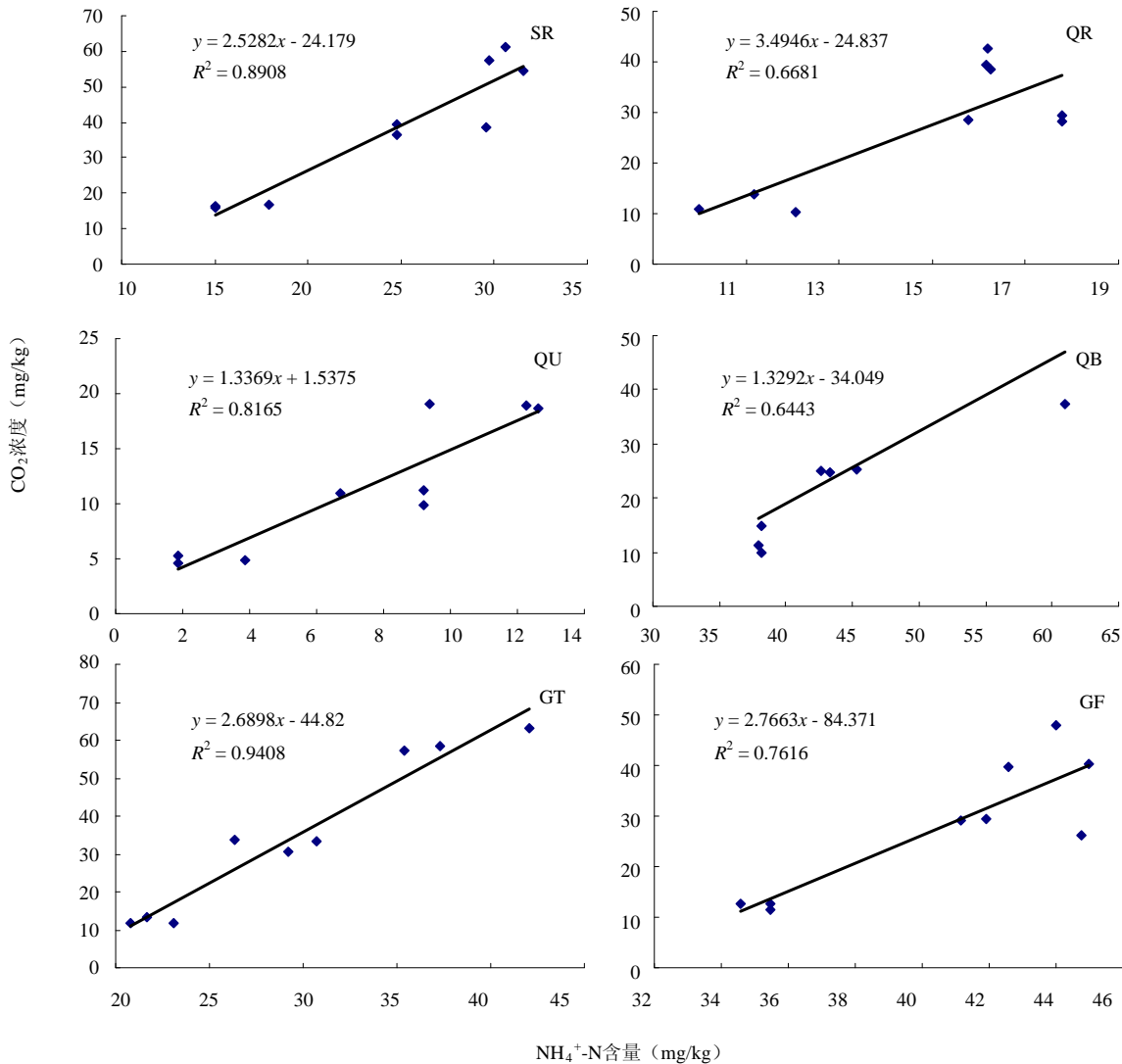


图 5  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  含量和  $\text{CO}_2$  浓度间的关系  
Fig. 5 Relationship between  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  content and  $\text{CO}_2$  concentration

### 3 讨论

以往的研究通过添加外源C和N, 比较贮存时间不同的土样在反硝化速率方面的差异, 间接证明有机C有效性的提高是造成风干较强烈的土样反硝化强于风干较弱的土样的原因<sup>[4]</sup>。本试验在只加入外源N而不加外源C的情况下, 比较风干程度和存放时间不同的土样在培养一段时间内的反硝化及矿化的动态变化, 为风干促进了土壤有机质矿化作用、提高易矿化有效态C的含量, 进而促进反硝化的进行提供了直接证据。

土壤风干显著促进反硝化势的研究结果和前人一致<sup>[1,4]</sup>。土样风干对反硝化的促进效应表现为强烈风干的土样较风干程度较弱的土样 $\text{NO}_3^-$ 含量降低速率更快, 反硝化产生和排放的 $\text{N}_2\text{O}$ 更多。造成这种促进效应的主要原因是风干促进了有机C的矿化, 其直接效果是为反硝化提供的电子供体以及为反硝化微生物提供的能源和C源增多, 从而促进了微生物的活性和反硝化作用的进行。其间接效果是矿化释放出的有机C底物的增加也促进了 $\text{CH}_4$ 的产生, 以及 $\text{NO}_3^-$ 的消耗也解除了对 $\text{CH}_4$ 产生的抑制效应, 导致 $\text{CH}_4$ 排放量增加<sup>[9]</sup>。

土样风干也可能促进了氧化铁矿物的分解和游离氧化铁和非晶质氧化铁含量的增加, 从而导致参与反硝化电子传递的 $\text{Fe}^{2+}$ 浓度的增加<sup>[9-10]</sup>。

土样经风干和粉碎过程(过1mm筛)后增大了与微生物的接触面积, 促进土壤有机质的矿化分解。同时由于风干过程和存放过程中部分微生物的死亡, 提高了土壤易矿化态有机C的含量。重新淹水厌氧培养后, 这部分有效性较高的有机C经微生物分解释放出, 这也可能是造成土样风干后促进有机质矿化分解的原因。

由试验结果可以推测, 利用风干土的实验室培养方法测定得到的土壤反硝化势可能较田间原位测定的反硝化势高, 导致对田间实际反硝化势的过高估计。但是田间可能存在的频繁干湿交替过程, 也能促进反硝化的进行, 造成反硝化总量的增加, 从而弥补对田

间原位反硝化势过低估计的不足, 这也可能是造成年度间和不同土壤间反硝化势在时间和空间上变异性大的原因之一。

### 参考文献:

- [1] Patten DK, Bremner JM, Blackmer AM. Effects of drying and air-dry storage of soil on their capacity for denitrification of nitrate. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 1980, 44: 67-70
- [2] Bijay-Singh J, Ryden C, Whitehead DC. Some relationships between denitrification potential and fractions of organic carbon in air-dried and field-moist soils. *Soil Biol. Biochem.*, 1988, 20: 737-741
- [3] Smith MS, Parsons LL. Persistence of denitrifying enzyme activity in dried soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, 49: 316-320
- [4] Luo J, White RE, Roger BP, Tillman RW. Measuring denitrification activity in soils under pasture: Optimizing conditions for the short-term denitrification enzyme assay and effects of soil storage on denitrification activity. *Soil Biol. Biochem.*, 1996, 28: 409-417
- [5] 王连峰, 蔡祖聪. 水分和温度对旱地红壤硝化活力和反硝化活力的影响. *土壤*, 2004, 36 (5): 543-546
- [6] Xu YB, Cai ZC. Denitrification characteristics of subtropical soils in China affected by soil parent material and land use. *European Journal of Soil Science*, 2007, 58: 1293-1303
- [7] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 2000: 65-71
- [8] 续勇波, 蔡祖聪. 亚热带土壤氮素反硝化过程中 $\text{N}_2\text{O}$ 的排放和还原. *环境科学学报*, 2008, 28 (4): 731-737
- [9] 续勇波. 亚热带土壤氮素反硝化及其环境效应 (博士学位论文). 南京: 中国科学院南京土壤研究所, 2007: 30-90
- [10] 李良漠, 潘映华, 吴期途, 周秀如, 李振高. 无定形氧化铁作为嫌气下 $\text{NH}_4^+$ 氧化时电子受体的研究. *土壤学报*, 1988, 23: 184-190

## Effects of Soil Samples Preparation and Conservation on Denitrification Capacity in Subtropical Soils

XU Yong-bo<sup>1,2</sup>, CAI Zu-cong<sup>1</sup>, LEI Bao-kun<sup>3</sup>

(1 *State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture (Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences), Nanjing 210008, China;*

*2 Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;*

*3 Institute of Agricultural Environment and Resources, Yunnan Academy of Agricultural Science, Kunming 650205, China)*

**Abstract:** Two soil sample treatments, which were less dramatically air-dried and immediately commenced incubation experiment (treatment 1) and more dramatically air-dried and stored for a long time (treatment 2), were used in the experiment. Effects of the two methods of soil samples on denitrification and mineralization were compared during a 7d-anaerobic-incubation. The results suggested that soil samples under treatment 2 significantly stimulated the decrease of  $\text{NO}_3^-$  content and the increase of  $\text{N}_2\text{O}$  emission rate. Denitrification rate and mineralization rate in soil samples under treatment 2 were 47.3% and 31.0% higher than those of the soils under treatment 1, respectively. Air-drying enhanced soil organic matter mineralization and increased the availability of organic carbon, which was the main reason for the higher denitrification capacity in more dramatically air-dried soils. The enhanced extent of denitrification by the air-drying degree and the storage period in air-dried soils was determined by the promoted extent of organic matter mineralization. The more organic matter mineralized, the more  $\text{NO}_3^-$  denitrified. Therefore, the results deduced from the incubation experiment with air-dried soil samples may overestimate *in situ* denitrification capacity.

**Key words:** Denitrification, Air-drying degree, Storage period, Mineralization, Red soils