

盐碱土壤 N₂O 排放与 *amoA* 和 *narG* 功能基因丰度的响应规律^①

温慧洋, 焦燕*, 杨铭德, 谷鹏, 白曙光, 杨洁

(内蒙古师范大学化学与环境科学学院, 呼和浩特 010022)

摘要:为揭示盐碱土壤中参与氨氧化过程和硝酸盐还原过程的 *amoA* 和 *narG* 基因丰度与 N₂O 排放的响应规律, 本研究选取内蒙古河套灌区 3 种不同盐碱程度土壤(轻度盐土 S_A、强度盐土 S_B 和盐土 S_C), 通过控制室内温度和土壤质量含水量进行室内培养试验, 并运用荧光定量 PCR(real-time PCR)技术研究了盐碱土壤中 N₂O 排放速率、氨氧化细菌和 *narG*(膜结合型硝酸还原酶)型反硝化细菌丰度与土壤环境因子之间的偶联关系。结果表明: S_A、S_B 和 S_C 3 种盐碱土壤中, N₂O 平均排放速率随着土壤盐碱程度的升高而升高, 值分别为 16.9、30.8、69.6 μg/(kg·d); 氨氧化细菌和 *narG* 型反硝化细菌丰度分别为 0.415×10⁴、6.91×10⁴、9.44×10⁴ copies 和 2.61×10⁴、5.36×10⁴、13.5×10⁴ copies, 表明在一定盐分条件下, 土壤中的盐分能够促进氨氧化细菌和 *narG* 型反硝化细菌丰度。RDA 分析结果显示, N₂O 平均排放速率与氨氧化细菌和 *narG* 型反硝化细菌丰度具有显著的正相关($r = 0.863$ 、 0.975 , $P < 0.01$); 土壤 pH、EC、速效钾和有机碳是盐碱土壤中影响 N₂O 排放速率的主要环境因子, 其中, 土壤 pH、EC、速效钾和 N₂O 排放速率存在显著正相关($r = 0.968$ 、 0.983 、 0.987 , $P < 0.01$), 土壤有机碳和 N₂O 排放速率存在负相关($r = -0.800$, $P < 0.05$), 土壤有效磷和总氮与 N₂O 排放速率的相关性未达到显著水平($P > 0.05$)。

关键词: 盐碱土壤; 氧化亚氮; 硝化; 反硝化

中图分类号: X144 文献标识码: A

全球变暖和土壤盐碱化是目前国际关注的重要环境问题。N₂O 作为一种重要的温室气体, 具有辐射活性强、增温潜势(GWP)高、破坏臭氧层等特点^[1-2]。盐碱土壤中高浓度的可溶性盐分由于渗透压和特异性离子对微生物细胞的毒性作用对土壤酶活性和微生物过程有重要影响^[3]。农田土壤是大气中 N₂O 的最重要排放源, 而土壤中参与氮循环的微生物过程是 N₂O 排放的主要驱动机制, 其中起主导作用的过程为硝化作用和反硝化作用^[4-5]。硝化作用包含两个过程: 分别为氨氧化过程和亚硝酸盐氧化过程, 而参与氨氧化过程的主要微生物为含有氨单加氧酶基因(*amoA*)的氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)或氨氧化古菌(ammonia-oxidizing archaea, AOA), 参与亚硝酸盐氧化过程的微生物则以硝酸细菌属(*Nitrobacter*)为主^[6], 其中氨氧化过程作为整个硝化作用的限速步骤, 该过程的中间产物(NO₂⁻-N)部分会发生化学分解进而产生 N₂O^[7-10]。2006 年 Costa 等^[11]根据新陈代谢途径的动力学理论推测, 环境中应存在

单步硝化作用和全程氨氧化微生物(complete ammonia oxidizer, Comammox), 即由一种微生物独立地完全氧化 NH₃ 为 NO₂⁻-N 的过程。2015 年 Kessel 等^[12]和 Daims 等^[13]分别研究发现 3 种经过纯培养的不同细菌(*Candidatus Nitrospira nitrosa*、*Candidatus Nitrospira nitrificans* 和 *Candidatus Nitrospira inopinata*), Pinto 等^[14]团队发现一种未经过纯培养的细菌(类 *Nitrospira*) 均具备独立将 NH₃ 氧化为 NO₂⁻-N 的能力。赵伟焯等^[15]在研究石灰性紫色土硝化作用及硝化微生物对不同氮源的响应时发现, 亚硝酸盐氧化细菌占总微生物的比例高于氨氧化细菌和古菌, 意味着石灰性紫色土中可能存在全程氨氧化微生物。因此, 由全程氨氧化微生物驱动的单步硝化作用将成为微生物氮循环的重要组成部分, 这对进一步了解环境中的硝化作用有重要意义。反硝化作用是在多种微生物的参与下, 通过硝酸还原酶(nitrate reductase, Nar)、亚硝酸盐还原酶(nitrite reductase, Nir)、一氧化氮还原酶(nitric oxide reductase, Nor)和氧化亚氮还原酶(nitrous

基金项目: 国家自然科学基金项目(41565009, 41765010)资助。

* 通讯作者(jiaoyan@imnu.edu.cn)

作者简介: 温慧洋(1990—), 男, 河南驻马店人, 硕士研究生, 主要从事盐碱土壤温室气体排放的研究。E-mail: 1102853450@qq.com

oxide reductase, Nos)的 4 步催化作用, 最终将硝酸盐还原为 N₂, 并在中间过程释放 N₂O^[16]。

本研究分别选取 AOB 和含有 *Nar* 基因的硝酸盐还原菌作为硝化和反硝化过程中的研究对象, 原因在于, 在碱性土壤中, AOB 比 AOA 活性更强, 且 AOB 是土壤硝化作用的主要驱动者^[17]。如 Shen 等^[18]研究发现, 在 pH 为 8.3~8.7 范围内的碱性砂质壤土中, AOB 丰度与土壤 pH 和潜在硝化速率显著相关。而对于反硝化过程中功能基因微生物的选择则是考虑到目前国内外多选择含有亚硝酸盐还原酶基因 (*nirK/nirS*) 的亚硝酸盐还原菌为研究对象, 而对于含有 *Nar* 基因的硝酸盐还原菌研究较少。

Zheng 等^[19]在河口沉积物中研究发现, β -AOB 群落结构组成和沉积物中水溶性盐离子显著相关, 而 AOA 群落结构组成与硝酸根浓度有关。Mosier 和 Santoro 等^[20-21]均研究发现, 在河口沉积物中 β -AOB 中的 *amoA* 基因丰度超过 AOA, 且在 0~33 实用盐度单位 (practical salinity unit, psu) 范围内, 随着盐度水平的增加而增加。含有 *Nar* 基因的硝酸还原菌是反硝化作用中 NO₃⁻-N 向 NO₂⁻-N 转化的主要驱动者, 与 N₂O 的排放有密切关系。而盐分含量作为土壤中重要的环境因子, 对 *narG* 型反硝化细菌的丰度和多样性有重要影响。Yang 等^[22]研究发现, 由盐水侵蚀导致的次生盐渍化显著改变了反硝化微生物的丰度和群落组成, 其中 *narG* 型反硝化细菌的群落大小受到最大抑制。Wang 等^[23]在稻田土壤中通过室内培养试验并运用 TRFLP 和荧光定量 PCR 技术研究发现, 外源高浓度硝酸盐的添加显著促进 N₂O 排放速率, 且该效应和 *narG* 型反硝化细菌丰度的增加密切相关。Yang 等^[24]在石灰性潮土中研究也发现 N₂O 排放量和 *narG* 型反硝化细菌丰度显著相关。

内蒙古河套灌区位于我国西北黄河上中游地区的内蒙古段北岸的冲积平原, 地势平坦, 当地农业发展依赖引黄灌溉, 其中引黄控制面积约 116.2 万 hm², 有效灌溉面积 57.4 万 hm², 面积居中国 3 个特大型灌区之首, 长期过度灌溉导致灌区土壤次生盐渍化形势严峻^[25-26]。内蒙古河套灌区地处半干旱地区, 迄今

该区仍有盐碱地 34.53 万 hm², 盐荒地 27.50 万 hm², 土壤盐碱化不仅制约着内蒙古河套灌区的农业发展, 也对本地区的粮食安全构成了严重威胁^[27-28]。

盐碱土壤较普通农田土壤中的环境条件更为复杂, 其盐分含量和土壤 pH 对土壤中的微生物群落结构、丰度和多样性等有重要影响^[29-31]。而盐碱土壤中 N₂O 排放于硝化及反硝化微生物驱动下的响应规律研究较少。因此, 本研究选取内蒙古河套灌区 3 种不同盐碱程度土壤通过室内培养试验并利用分子生物学技术探究硝化和反硝化微生物丰度与 N₂O 排放之间的响应规律, 以期对盐碱土壤中 N₂O 排放的微生物驱动机制的探究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

土壤样品采集于内蒙古自治区巴彦淖尔市乌拉特前旗 (40°28'~41°16'N, 108°11'~109°54'E), 该地区属于典型的温带大陆性气候, 该地处于我国西北黄河上中游地区, 夏季高温干旱、冬季严寒少雪, 年均气温 7.7 °C, 年均降水量 213.5 mm, 降水量最大值集中在 8 月, 年均日照 3 212.5 h, 无霜期 167 d, 对于内蒙古河套灌区的生态环境、气候特征具有广泛的代表性。该地区主要种植作物为小麦、玉米和向日葵。

1.2 样品采集

土壤样品采集时间为 2015 年 6 月中旬, 选取该地区 3 种典型不同盐碱程度农田土壤, 并测定其盐分含量 (表 1), 测定方法参考《土壤农业化学分析》^[32] 中的质量法。按照土壤盐化分级标准 (表 2), 将样地 (10 m×10 m) 分别命名为轻度盐土 (S_A)、强度盐土 (S_B)、盐土 (S_C), 按照邻近原则采用“S”型布点法布置样点, 每块样地布设 3 个样点, 每个样点用土钻采集作物根区 0~20 cm 表层土壤, 重复取样 3 次。混合新鲜土样去除碎石、秸秆及动植物残体无菌聚乙烯自封袋带回实验室, 将土样分为两份, 其中一份风干土样磨碎过 2 mm 筛用于土壤理化性质的测定及室内培养试验, 另一份土样放入 4 °C 冰盒内保存, 于实验室内装于若干无菌离心管中 -20 °C 保存用于土壤总 DNA 的提取。

表 1 采样点信息
Table 1 Information of sample plots

| 样地 | 地理位置 | 当季作物 | 种植年限及管理状况 | 盐分总量 (g/kg) |
|----------------|----------------------------|------|--|-------------|
| S _A | 40°50'6"N, 108°39'29"E | 向日葵 | 葵花种植历史超过 20 a, 主要施用复合肥、尿素及少量磷肥, 葵花长势较好, 近一个月无施肥、农药管理 | 1.2 |
| S _B | 40°50'10"N, 108°39'24"E | 向日葵 | 葵花种植历史超过 20 a, 主要施用复合肥、尿素及少量磷肥, 葵花长势较差, 近一个月无施肥、农药管理 | 8.3 |
| S _C | 40°50'18"N, 108°38'13"E | 向日葵 | 葵花种植历史超过 20 a, 近年来, 由于土壤盐碱程度增加, 不适宜农作物生长, 无葵花种植 | 16.9 |

表 2 土壤盐化分级标准^[33]
Table 2 Soil salinization classification

| 盐分类系适用地区 | 土壤含盐量(%) | | | | | 盐渍土类型 |
|-----------------|----------|--------------|--------------|-------------------|------------|---|
| | 非盐化 | 轻度 | 中度 | 强度 | 盐土 | |
| 滨海, 半湿润、半干旱、干旱区 | <0.1 | 0.1~0.2 | 0.2~0.4 | 0.4~0.6(1.0) | >0.6(1.0) | HCO ₃ ⁻ +CO ₃ ²⁻ 、Cl ⁻ 、Cl ⁻ -SO ₄ ²⁻ 、SO ₄ ²⁻ -Cl ⁻ |
| 半荒漠区及荒漠区 | <0.2 | 0.2~0.3(0.4) | 0.3~0.5(0.6) | (0.6)0.5~1.0(2.0) | >1.10(2.0) | SO ₄ ²⁻ 、SO ₄ ²⁻ -Cl ⁻ 、Cl ⁻ -SO ₄ ²⁻ |

注: 括号中数值指有的地区土壤质量含盐量标准采用该值; “+”代表两种盐含量都高;“-”代表一种盐含量高,另一种盐含量低。

1.3 样品分析

1.3.1 土壤理化性质的测定 土壤 pH 和 EC 值分别以 1:2.5 和 1:1 土水比,用土壤 pH 计和土壤便携式电导仪测定;紫外分光光度计法测定土壤 NO₃-N 含量;凯氏定氮法测定土壤总氮(TN)含量;重铬酸钾容量法-外加热法测定土壤有机碳(SOC)含量;流动分析仪测定土壤有效磷(AP)和速效钾(AK)含量。

1.3.2 土壤总 DNA 的提取及 PCR 的扩增 称取 0.5 g 土壤样品,采用 CTAB/SDS 方法提取土壤总 DNA,DNA 样品于 -20 °C 冰箱保存待用。功能基因的定量分析采用 SYBR-GREEN 法,反硝化细菌的特有功能基因 *narG* 的定量分析引物为 *narG-F*(TCGC CSATYCCGGCSATGTC)和 *narG-R*(GAGTTGTACC AGTCRGCSGAYTCSG)^[34], 氨氧化细菌的特有功能基因 *amoA* 的定量分析引物为 *amoA-1F*(GGGGTTTC TACTGGTGGT)和 *amoA-2R*(CCCCTCKGSAAAGCC TTCTTC)^[35]。

PCR 扩增体系(25 μl): 10×PCR buffer 2.5 μl, dNTP(2.5 mmol/L) 3.2 μl, Primer F/R(5 μmol/L) 1 μl, Taq(5 U/μl) 0.125 μl, 补 ddH₂O 至 25 μl;模板 DNA: 2 μl。PCR 扩增程序: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 15 s, 55 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 20 s, 40 个循环,最终 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物采用 AXYGEN 公司 DNA Gel Extraction Kit 进行纯化。纯化连接到 pEASY-T 载体上,并转化至 DH5α 感受态细胞中,筛选阳性克隆,对插入的细菌 DNA 片段进行序列测定。采用 M13F 测序引物对阳性克隆进行测序验证,依据测序结果验证标准品是否构建合格。PCR 仪为美国 AB 公司 7 500 fast,凝胶成像仪为 Bio-Rad 公司的 Gel-Doc2000 凝胶成像系统。

1.3.3 标准曲线的建立 利用核算定量仪测定质粒质量浓度得到氨氧化细菌 *amoA* 基因片段质量浓度为 356 ng/μl,反硝化细菌 *narG* 基因片段质量浓度为 110 ng/μl。将制备好的质粒标准品按照 10⁴~10¹⁰ 进行 10 倍系列稀释得到 4 个浓度梯度的标准模板,各取 2 μl 稀释标准品,每个稀释模板质量浓度取 3 个

平行样,记录结果并取平均值,绘制熔点曲线,以不同模板拷贝数的对数值为纵坐标,以 qPCR 反应的循环数(Ct)为横坐标,绘制标准曲线。其中氨氧化细菌标准曲线为: $y(\lg \text{ 浓度值}) = -0.4257 Ct + 5.2802$, 相关系数 $R^2 = 0.9837$; 反硝化细菌标准曲线为: $y(\lg \text{ 浓度值}) = -0.3656 Ct + 4.5104$, 相关系数 $R^2 = 0.9978$ 。同时将各样本基因组 10 倍稀释后取 2 μl 作模板,均用目的基因引物进行扩增,同时在 60~95 °C 进行熔点曲线分析。

1.3.4 土壤 N₂O 排放速率的测定 称取 S_{A-1}~S_{C-3} 共 9 份土壤样品 100 g 于 310 ml 培养瓶中,预培养实验:将 5 ml 灭菌去离子水分别加入 9 个培养瓶中,于(25±1)°C 下培养 7 d 以激活土壤微生物。培养实验:用去离子水调节土壤质量含水量为 25%,并用 T 型硅胶塞封口,于(25±1)°C 下恒温培养箱避光培养 21 d,取样时间分别为第 1、2、3、4、7、10、13、16、21 天,用连接三通阀的注射器抽取气体样品,并用 Agilent6820 型气相色谱仪测定气体样品的 N₂O 质量浓度,取样结束后敞口通气 2 h,重新加盖培养,同时利用称重法每隔 2~3 d 补充土壤水分以保证土壤含水量一致。

1.4 数据分析方法

$$N_2O \text{ 排放速率: } F = \frac{\Delta C \times V \times M \times \frac{273}{273+T}}{d \times m \times 22.4 \times 1000} \quad (1)$$

式中: F 代表 N₂O 排放速率(μg/(kg·d)); V 为培养瓶中气体有效体积(ml); ΔC 单位时间内气体浓度变化值(nl/(L·d)); M 为 N₂O 的摩尔质量(44); T 为培养箱的温度(K); d 为培养的天数(d); m 为培养瓶内的干土重(100 g); 22.4 为 273 K(绝对零度)时 N₂O 的摩尔体积(L/mol)。

$$\text{微生物丰度: } MA = \frac{V \times n \times c}{N \times M} \quad (2)$$

式中: MA 为微生物丰度(copies); V 为 DNA 总体积(μl); n 为 DNA 的物质的量(个/mol); c 为样品中检测目标的质量浓度:依据标准曲线,PCR 反应的 Ct 值可通过换算得到样品片段的质量浓度(ng/μl); N 为

pEASY-T 碱基数为载体构建的标准品碱基对的数量(个); M 为脱氧核糖核苷酸平均分子量(607.4 g/mol)。

本研究采用 Microsoft Excel 2010 处理试验数据。采用 SPSS 22.0 软件对各数据组间的显著差异进行单因素方差分析(AVNOA)。采用 Microsoft Excel 2010 以及 Origin pro 9.0 软件作图,利用 CANOCO 4.5 for windows 软件进行除趋势对应分析(detrended correspondence, DCA),采用线性拟合模型对 N₂O 排放速率、*amoA* 及 *narG* 功能基因丰度和环境因子进行冗余分析(RDA)。

2 结果与分析

2.1 土壤理化性质的多重比较

对 3 种不同盐碱程度土壤 pH、EC、铵态氮、硝态氮、总氮、有机碳、有效磷和速效钾进行多重比较,结果如表 3 所示。土壤铵态氮和有效磷含量无显著性差异($P>0.05$);土壤 pH、硝态氮、总氮和有机质呈显著性差异($P<0.05$);土壤 EC 和速效钾呈极显著差异($P<0.01$),二者均表现为轻度盐土<强度盐土<盐土。

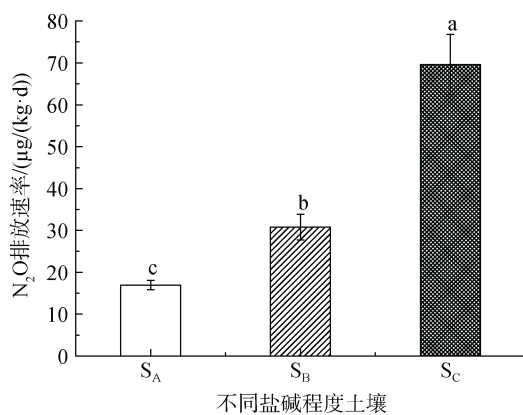
表 3 供试土壤理化性质
Table 3 Physical and chemical properties of soil samples

| 供试土壤 | pH | 电导率 (mS/cm) | 铵态氮 (mg/kg) | 硝态氮 (mg/kg) | 总氮 (g/kg) | 有机质 (g/kg) | 有效磷 (mg/kg) | 速效钾 (mg/kg) | 土壤质地 | |
|----------------|---------------|----------------|----------------|----------------|---------------|---------------|----------------|----------------|--------------|--------------|
| | | | | | | | | | 砂粒 (g/kg) | 黏粒 (g/kg) |
| S _A | 8.46 ± 0.02 b | 0.46 ± 0.01 c | 0.20 ± 0.08 a | 2.37 ± 0.05 a | 2.22 ± 0.09 b | 14.1 ± 1.43 a | 0.614 ± 0.41 a | 5.91 ± 0.12 c | 511 | 203 |
| S _B | 8.48 ± 0.03 b | 0.90 ± 0.01 b | 0.27 ± 0.02 a | 2.76 ± 0.03 a | 2.44 ± 0.08 a | 15.4 ± 0.86 a | 0.133 ± 0.01 a | 16.05 ± 0.13 b | 562 | 263 |
| S _C | 8.67 ± 0.01 a | 2.92 ± 0.03 a | 0.24 ± 0.02 a | 0.64 ± 0.16 b | 2.09 ± 0.02 b | 10.3 ± 0.30 b | 0.100 ± 0.02 a | 41.59 ± 0.26 a | 633 | 320 |

注:同列数据小写字母不同表示不同盐碱土壤间差异显著($P<0.05$)。

2.2 不同盐碱程度土壤中 N₂O 排放速率

由单因素 ANOVA 方差分析可知,不同盐碱程度土壤之间 N₂O 平均排放速率具有明显差异性($F=107, P<0.01$, 图 1),3 种不同盐碱土壤(S_A、S_B、S_C)N₂O 平均排放速率分别为:16.9、30.8、69.6 μg/(kg·d),即 S_A<S_B<S_C,结果表明,随着土壤盐碱程度的增加,N₂O 平均排放速率呈增加趋势。



(图中小写字母不同表示不同盐碱土壤间差异显著($P<0.01$),下同)

图 1 不同盐碱程度土壤中 N₂O 排放速率

Fig. 1 N₂O emission rates from different salinization soils

2.3 不同盐碱程度土壤中硝化及反硝化微生物功能基因丰度

由单因素 ANOVA 方差分析可知,3 种不同盐碱程度土壤之间 AOB 和 *narG* 型反硝化细菌丰度具有明显差异性($F=158, P<0.01$; $F=352, P<0.01$, 图 2)。

不同盐碱程度土壤之间(S_A、S_B、S_C)AOB 丰度分别为: 0.415×10^4 、 6.91×10^4 、 9.44×10^4 copies, 表现为: S_A<S_B<S_C; *narG* 型反硝化细菌丰度表现为: S_A<S_B<S_C, 值分别为: 2.61×10^4 、 5.36×10^4 、 13.4×10^4 copies。

2.4 土壤理化性质与微生物基因丰度及 N₂O 排放速率的相关性分析

利用 CANOCO 软件 RDA 分析方法分析土壤理化性质对微生物基因丰度及 N₂O 排放速率的影响,结果如图 3 所示,其中第一主成分轴(94.5%)和第二主成分轴(5.2%)共解释环境变量的 99.7%。由 Monte Carlo 法检验可知,土壤 N₂O 平均排放速率与 AOB 和 *narG* 型反硝化细菌丰度具有显著的相关性($r = 0.863, P<0.01$; $r = 0.975, P<0.01$)。土壤 N₂O 平均排放速率分别与 pH、EC、速效钾呈显著正相关($r = 0.968, 0.983, 0.987, P<0.01$),土壤 N₂O 排放速率与土壤有机碳(SOC)呈负相关($r = -0.800, P<0.05$),土壤 N₂O 平均排放速率与总氮和有效磷无明显相关性($P>0.05$)。

3 讨论

本研究通过控制培养试验的室内温度和土壤质量含水量探究不同盐碱程度土壤 N₂O 排放特征,研究发现,N₂O 排放速率随土壤盐碱程度升高而升高,即 S_A<S_B<S_C。该研究结果与 Ruiz-Romero 等^[36]研究发现一致,N₂O 排放量随着电导率的升高而升高;而

且,土壤电导率(EC)为 56 mS/cm 时, N_2O 累积排放量显著高于电导率为 12 mS/cm 的土壤。Marton 等人^[37]研

究发现高的盐分含量抑制反硝化过程中的 N_2O 还原酶活性, 导致在厌氧条件下 N_2O 累积排放量升高。

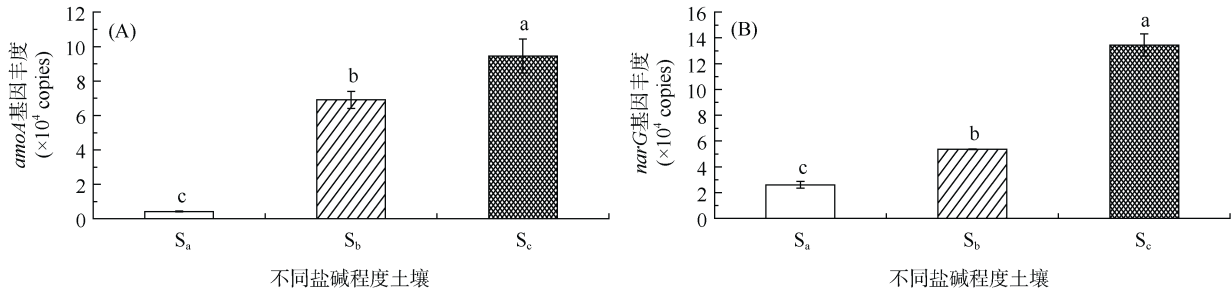
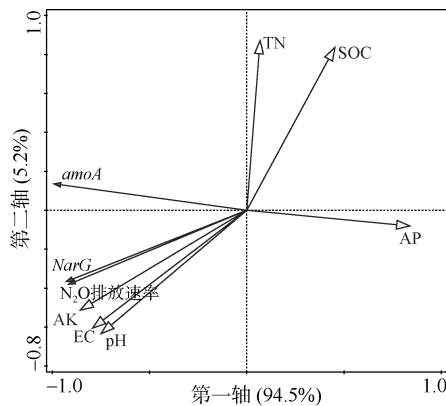


图 2 不同盐碱程度土壤 *amoA* 和 *narG* 基因丰度

Fig. 2 The abundance of *amoA* and *narG* genes from different salinization soils



(SOC: 土壤有机碳, TN: 总氮, AK: 速效钾, AP: 有效磷)

图 3 N_2O 排放速率与硝化及反硝化微生物丰度以及环境因子的冗余分析图

Fig. 3 Redundancy analysis of the correlation among N_2O emission rates, the abundance of microorganisms and the soil properties

N_2O 是在微生物驱动下硝化过程和反硝化过程的中间产物,其中硝化过程中的氨氧化过程作为硝化作用中重要的限速步骤,其所涉及的主要微生物 AOB 在土壤氮素生物地球化学循环中具有重要作用,而反硝化过程中的 NO_3^- -N 还原为 NO_2^- -N 的过程是区分硝酸盐的异化作用和呼吸作用的关键步骤。因此,氨氧化过程对应的主要微生物 AOB 和反硝化过程中硝酸还原菌丰度对盐分的响应规律具有重要的研究意义。

本研究发现,3 种不同盐碱土壤中,盐土中 *amoA* 和 *narG* 基因丰度最高。表明,在一定的盐分条件下,土壤中的盐分对硝化作用和驱动该过程的 AOB 丰度有促进作用。这一变化关系与 Mosier 和 Francis^[20]以及 Santoro 等^[21]的研究结果相同。WANG 等^[38]利用膜生物反应器处理高盐高铵废水中研究发现,1% ~ 4% 的盐度(NaCl)范围对硝化过程中 NH_4^+ -N 向 NO_2^- -N 转化几乎没有影响,高通量测序显示,高的含盐量对 AOB 群落结构有选择效应,耐盐氨氧化微生物的生

存导致微生物丰富度和多样性升高。Cortés-Lorenzo 等^[39]在水下固定床生物反应器中研究也发现,废水中的 NaCl 质量浓度低于 3.7 g/L (EC = 12 mS/cm) 时硝化过程不会被抑制。Sorokin 等^[40]在蒙古苏打盐湖中研究发现, AOB 在 0.1 ~ 1.0 mol/L 总 Na^+ 盐度范围内能够生存,且最适宜盐度为 0.3 mol/L。本研究所选 3 种不同盐碱程度土壤盐分分别为 1.2、8.3 和 16.9 g/kg, 其对应电导率分别为 0.45、0.90 和 2.92 mS/cm, 盐度范围均低于以上研究结果。因此,在适度盐度范围内,盐分的增加对 AOB 会产生选择效应进而导致该微生物丰度发生变化。盐分对 *narG* 型反硝化细菌丰度的影响主要是通过硝酸还原过程对应酶活性的影响发挥作用。李小平等^[41]通过对东湖沉积物中异化硝酸还原酶活性(*dNaR*)与硝酸还原菌数量关系发现,硝酸还原菌数量与 *dNaR* 活性呈显著正相关 ($P < 0.01$)。刘浩荣等^[42]利用土壤培养试验研究发现,喷施 KCl 可以增强小白菜叶片内硝酸还原酶活性。程玉静等^[43]采用营养液栽培试验研究发现,外源 $Ca(NO_3)_2$ 通过提高黄瓜幼苗体内 NO_3^- -N 含量,进而诱导硝酸还原酶(NR)活性升高。因此,在一定盐分条件下,土壤中的盐分通过增强硝酸还原酶活性进而增加硝酸还原菌的丰度。

RDA 分析结果显示, N_2O 排放速率分别与 AOB 的 *amoA* 基因拷贝数及反硝化细菌的 *narG* 基因拷贝数呈显著正相关 ($r = 0.863, P < 0.01$; $r = 0.975, P < 0.01$),即在盐碱土壤中, N_2O 排放速率随 *amoA* 和 *narG* 基因丰度的升高而升高。陈晨等^[44]研究发现,菜地土壤通过施加生物炭增加 *amoA* 基因丰度进而间接促进 N_2O 排放。本研究发现硝酸还原菌中的 *narG* 基因丰度与 N_2O 排放存在显著正相关,该研究结果与郑燕等^[45]研究结果相似。卢静等^[46]在研究水稻土短期落干过程对 N_2O 排放通量和反硝化微生物丰度

的影响时也发现, N₂O 排放通量与 *narG* 基因丰度呈极显著相关($P < 0.01$)。虽然本研究结果有据可循,但是从 DNA 水平出发,研究 *amoA* 基因和 *narG* 基因丰度与 N₂O 排放之间的关系有一定局限性。原因在于微生物功能基因丰度仅能反映该类微生物的多寡,另外,靶标基因可能并不全部参与表达,微生物功能基因丰度仅仅代表其潜在生理功能,并不能代表该类微生物活性^[45]。而信使 RNA(mRNA)作为生命活动重要承担者,在微生物活性的研究中常用于表征某一特定代谢过程的活跃程度^[47],因此需进一步从 mRNA 水平系统研究 *amoA* 基因和 *narG* 基因丰度与 N₂O 排放之间的关系。土壤有机碳(SOC)对土壤的氮循环过程有重要影响进而间接影响 N₂O 的排放。杨艳菊等^[48]通过室内模拟试验,在 25 °C 和 60% 田间持水量条件下研究 SOC 含量对水稻土 N₂O 排放的影响发现,土壤 N₂O 累积排放量与 SOC 含量呈正相关。兰宇等^[49]通过田间试验,利用静态箱-气相色谱法研究秸秆还田方式对 N₂O 排放和土壤理化性质的影响时发现,SOC 促进土壤中的反硝化作用。SOC 间接增加 *nosZ* 基因丰度进而促进 N₂O 还原为 N₂ 释放到大气中,减少土壤 N₂O 排放^[50]。本课题组前期研究发现^[51],反硝化过程是盐碱土壤中 N₂O 排放的主要途径,该过程 N₂O 排放贡献率为 60.35%~72.46%。而 pH 对土壤的反硝化过程有重要影响,Feng 等^[52]在酸性矿质土壤中研究发现,反硝化过程中 N₂O 排放量随土壤 pH 的增加而显著增加。目前,关于土壤速效钾含量对 N₂O 排放的影响还未见直接报道,但速效钾作为土壤中重要的环境因子,其对 SOC 含量有重要影响。王霖娇等^[53]研究发现,喀斯特石漠化生态系统土壤中 SOC 与速效钾存在极显著正相关($P < 0.001$)。贡璐等^[54]在研究塔里木盆地南缘典型绿洲土壤有机碳与环境因子的相关性时也发现,速效钾对 SOC 含量有显著影响($P < 0.05$)。因此,土壤速效钾可以通过影响土壤 SOC 的含量间接影响 N₂O 排放。

本研究运用荧光定量 PCR 技术定量不同盐碱程度土壤中参与氨氧化过程和硝酸盐的还原过程的 AOB 的 *amoA* 基因丰度和反硝化细菌的 *narG* 基因丰度,进而探究 AOB 和 *narG* 型反硝化细菌丰度与土壤中 N₂O 排放之间的关系。该研究结果对从 DNA 水平揭示盐碱土壤 N₂O 排放的微生物学机理具有一定意义,还需进一步通过与 N₂O 排放实时相关的能反映氨氧化过程和硝酸盐的还原过程微生物活性的 mRNA 水平进行深入研究。

4 结论

1) 不同盐碱程度土壤 N₂O 平均排放速率表现为:轻度盐化土壤<强度盐化土壤<盐化土壤,随着盐碱程度的增加,N₂O 平均排放速率呈增加趋势。

2) 不同盐碱程度土壤中氨氧化细菌和 *narG* 型反硝化细菌丰度与 N₂O 平均排放速率呈显著正相关($P < 0.01$),且随着盐碱程度(EC)的增加而增加。

3) 盐碱土壤 N₂O 排放速率与土壤环境因子的冗余分析结果显示,土壤 pH、EC、速效钾和 N₂O 排放速率存在显著正相关关系($P < 0.01$),土壤有机碳和 N₂O 排放速率存在负相关关系($P < 0.05$),土壤有效磷和总氮对 N₂O 排放速率影响较小,未达到显著水平($P > 0.05$)。

参考文献:

- [1] Stocker T F. Climate change 2013: The physical science basis: Working group I contribution to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change[J]. Computational Geometry, 2013, 18(2): 95-123
- [2] Delgado J A, Mosier A R. Mitigation alternatives to decrease nitrous oxides emissions and urea-nitrogen loss and their effect on methane flux[J]. Journal of Environmental Quality, 1999, 25(6): 1105-1111
- [3] Thapa, Chatter A, Abbey W, et al. Carbon dioxide and nitrous oxide emissions from naturally occurring sulfate-based saline soils at different moisture contents[J]. Pedosphere, 2017, 27(5): 868-876
- [4] Baggs E M. A review of stable isotope techniques for N₂O source partitioning in soils: Recent progress, remaining challenges and future considerations[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2008, 22(11): 1664-1672
- [5] Wrage N, Velthof G L, VAN Beusichem M L, et al. Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide[J]. Soil biology and Biochemistry, 2001, 33(12): 1723-1732
- [6] 侯海军, 秦红灵, 陈春兰, 等. 土壤氮循环微生物过程的分子生态学研究进展[J]. 农业现代化研究, 2014, 35(5): 588-594
- [7] Prosser J I. Autotrophic nitrification in bacteria[J]. Advances in Microbial Physiology, 1990, 30: 125-181
- [8] Frame C H, Casciotti K L. Biogeochemical controls and isotopic signatures of nitrous oxide production by a marine ammonia oxidizing bacterium[J]. Biogeosciences, 2010, 7(9): 2695-2709
- [9] Wrage N, Van Groenigen J W, Oenema O, et al. A novel dual-isotopelabelling method for distinguishing between soil sources of N₂O[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2005, 19(22): 3298-3306
- [10] Kowalchuk G A, Stienstra A W, Heilig G H, et al. Molecular analysis of ammonia-oxidising bacteria in soil of successional grasslands of the Drentsche A (The

- Netherlands)[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, 31(3): 207-215
- [11] Costa E, Pérez J, Kreft J U. Why is metabolic labour divided in nitrification?[J]. *Trends in Microbiology*, 2006, 14(5): 213-219
- [12] Kessel M A H J V, Speth D R, Albertsen M, et al. Complete nitrification by a single microorganism[J]. *Nature*, 2015, 528(7583): 555-559
- [13] Daims H, Lebedeva E V, Pjevac P, et al. Complete nitrification by *Nitospira* bacteria[J]. *Nature*, 2015, 528(7583): 504
- [14] Pinto A J, Marcus D N, Ijaz U Z, et al. Metagenomic evidence for the presence of comammox nitrospira-like bacteria in a drinking water system[J]. *Mosphere*, 2016, 1(1): 1-8
- [15] 赵伟焯, 王智慧, 曹彦强, 等. 石灰性紫色土硝化作用及硝化微生物对不同氮源的响应[J]. *土壤学报*, 2018, 55(2): 479-489
- [16] Morley N, Baggs E M, Dörsch P, et al. Production of NO, N₂O and N₂ by extracted soil bacteria, regulation by NO₂⁻ and O₂ concentrations[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 65(1): 102-112
- [17] Xia W, Zhang C, Zeng X, et al. Autotrophic growth of nitrifying community in an agricultural soil[J]. *The ISME Journal*, 2011, 5(7): 1226-1236
- [18] Shen J P, Zhang L M, Zhu Y G, et al. Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(6): 1601-1611
- [19] Zheng Y, Hou L, Liu M, et al. Diversity, abundance, and activity of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in Chongming eastern intertidal sediments[J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2013, 97(18): 8351-8363
- [20] Mosier A C, Francis C A. Relative abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the San Francisco Bay estuary[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11): 3002-3016
- [21] Santoro A E, Francis C A, De Sieyes N R, et al. Shifts in the relative abundance of ammonia-oxidizing bacteria and archaea across physicochemical gradients in a subterranean estuary[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(4): 1068-1079
- [22] Yang C, Jing Y, Wang Y, et al. Rhizospheric denitrification potential and related microbial characteristics affected by secondary salinization in a riparian soil[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2015, 32(7): 624-634
- [23] Wang L, Sheng R, Yang H, et al. Stimulatory effect of exogenous nitrate on soil denitrifiers and denitrifying activities in submerged paddy soil[J]. *Geoderma*, 2017, 286: 64-72
- [24] Yang L, Zhang X, Ju X. Linkage between N₂O emission and functional gene abundance in an intensively managed calcareous fluvo-aquic soil[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 43283
- [25] 李亮, 史海滨, 贾锦凤, 等. 内蒙古河套灌区荒地水盐运移规律模拟[J]. *农业工程学报*, 2010, 26(1): 31-35
- [26] 刘霞, 王丽萍, 张圣微, 等. 内蒙古河套灌区灌排水离子组成及淋洗盐分用水量评价[J]. *中国生态农业学报*, 2011, 19(3): 500-505
- [27] 李凤霞, 郭永忠, 许兴. 盐碱地土壤微生物生态特征研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(23): 14065-14067
- [28] 侯玉明, 王刚, 王二英, 等. 河套灌区盐碱土成因、类型及有效的治理改良措施[J]. *现代农业*, 2011(1): 92-93
- [29] 李新, 焦燕, 代钢, 等. 内蒙古河套灌区不同盐碱程度的土壤细菌群落多样性[J]. *中国环境科学*, 2016, 36(1): 249-260
- [30] Keshri J, Mishra A, Jha B. Microbial population index and community structure in saline-alkaline soil using gene targeted metagenomics[J]. *Microbiological Research*, 2013, 168(3): 165-173
- [31] Wu Y J, Whang L M, Fukushima T, et al. Responses of ammonia-oxidizing archaeal and betaproteobacterial populations to wastewater salinity in a full-scale municipal wastewater treatment plant[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2013, 115(4): 424-432
- [32] 鲁如坤. 土壤农业化学分析[M]. 北京: 中国农业科学出版社, 1999
- [33] 王遵亲, 祝寿泉, 俞仁培. 中国盐渍土[M]. 北京: 科学出版社, 1993
- [34] Underwood J C, Harvey R W, Metge D W, et al. Effects of the antimicrobial sulfamethoxazole on groundwater bacterial enrichment[J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(7): 3096-3101
- [35] Rotthauwe J H, Witzel K P, Liesack W. The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(12): 4704-4712
- [36] Ruizromero E, Alcántarahernández R, Cruzmondragon C, et al. Denitrification in extreme alkaline-saline soils of the former lake Texcoco[J]. *Plant and Soil*, 2009, 319(1/2): 247-257
- [37] Marton J M, Herbert E R, Craft C B. Effects of salinity on denitrification and greenhouse gas production from laboratory-incubated tidal forest soils[J]. *Wetlands*, 2012, 32(2): 347-357
- [38] Wang Z, Luo G, Li J, et al. Response of performance and ammonia oxidizing bacteria community to high salinity stress in membrane bioreactor with elevated ammonia loading[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 216: 714-721
- [39] Cortés-Lorenzo C, Rodríguez-Díaz M, Sipkema D, et al. Effect of salinity on nitrification efficiency and structure of ammonia-oxidizing bacterial communities in a submerged fixed bed bioreactor[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2015, 266: 233-240
- [40] Sorokin D, Tourova T, Schmid M C, et al. Isolation and properties of obligately chemolithoautotrophic and extremely alkali-tolerant ammonia-oxidizing bacteria from Mongolian soda lakes[J]. *Archives of Microbiology*, 2001, 176(3): 170-177

- [41] 李小平, 方涛, 敖鸿毅, 等. 东湖沉积物中 dNaR 活性和硝酸盐还原菌的垂向分布[J]. 中国环境科学, 2010, 30(2): 228-232
- [42] 刘浩荣, 宋海星, 刘强, 等. 喷施氯化钾对小白菜体内硝酸盐累积的影响[J]. 土壤, 2008, 40(2): 222-225
- [43] 程玉静, 郭世荣, 孙锦, 等. 外源硝酸钙对盐胁迫下黄瓜幼苗氮化合物含量和硝酸还原酶活性的影响[J]. 西北农业学报, 2010, 19(4): 188-191
- [44] 陈晨, 许欣, 毕智超, 等. 生物炭和有机肥对菜地土壤 N₂O 排放及硝化、反硝化微生物功能基因丰度的影响[J]. 环境科学学报, 2017, 37(5): 1912-1920
- [45] 郑燕, 侯海军, 秦红灵, 等. 施氮对水稻土 N₂O 释放及反硝化功能基因(*narG/nosZ*)丰度的影响[J]. 生态学报, 2012, 32(11): 3386-3393
- [46] 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 N₂O 释放的影响[J]. 应用生态学报, 2014, 25(10): 2879-2884
- [47] 车荣晓, 王芳, 王艳芬, 等. 土壤微生物总活性研究方法进展[J]. 生态学报, 2016, 36(8): 2103-2112
- [48] 杨艳菊, 蔡祖聪, 张金波. 氧气浓度对水稻土 N₂O 排放的影响[J]. 土壤, 2016, 48(3): 539-545
- [49] 兰宇, 孟军, 杨旭, 等. 秸秆不同还田方式对棕壤 N₂O 排放和土壤理化性质的影响[J]. 生态学杂志, 2015, 34(3): 790-796
- [50] Thomson A J, Giannopoulos G, Pretty J, et al. Biological sources and sinks of nitrous oxide and strategies to mitigate emissions[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 2012, 367(1593): 1157-1168
- [51] 温慧洋, 焦燕, 杨铭德, 等. 不同盐碱程度土壤氧化亚氮(N₂O)排放途径的研究[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(10): 2026-2033
- [52] Feng K, Yan, Hutsch B W, et al. Nitrous oxide emission as affected by liming an acidic mineral soil used for arable agriculture[J]. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 2003, 67(3): 283-292
- [53] 王霖娇, 李瑞, 盛茂银. 典型喀斯特石漠化生态系统土壤有机碳时空分布格局及其与环境相关性[J]. 生态学报, 2017, 37(5): 1367-1378
- [54] 贡璐, 朱美玲, 刘曾媛, 等. 塔里木盆地南缘典型绿洲土壤有机碳、无机碳与环境因子的相关[J]. 环境科学, 2016, 37(4): 1516-1522

The Response Rule of Functional Gene Abundance of *amoA* and *narG* on Nitrous Oxide Emissions in Saline-alkali Soils

WEN Huiyang, JIAO Yan*, YANG Mingde, GU Peng, BAI Shuguang, YANG Jie
(College of Chemistry & Environmental Science, Inner Mongolia Normal University, Hohhot 010022, China)

Abstract: To reveal the response of N₂O emission to the abundances of ammonia-oxidizing bacteria (*amoA*) and *narG* (membrane-bound nitrate reductase) genes, a culture experiment was conducted with light saline soil (S_A), heavy saline soil (S_B) and saline soil (S_C) under controlled temperature and moisture to study the effects of soil environmental factors on N₂O emission rates and the abundances of *amoA* and *narG* genes by real-time PCR. Average N₂O emission rates were 16.9, 30.8 and 69.6 μg/(kg·d) for S_A, S_B and S_C, respectively, significantly increased with the degree of salinization. The abundances of AOB were 0.415×10⁴ copies (S_A), 6.91×10⁴ copies (S_B) and 9.44×10⁴ copies (S_C), while the abundances of *narG* were 2.61×10⁴ copies (S_A), 5.36×10⁴ copies (S_B) and 13.4×10⁴ copies (S_C), respectively, indicating that the salinity stimulates the abundances of AOB and *narG*-type denitrifying bacteria. The RDA analysis showed that the average N₂O emission rate positively correlated with the abundances of AOB ($r = 0.863, P < 0.01$) and *narG* ($r = 0.975, P < 0.01$). pH, conductivity, available potassium and soil organic carbon are the main environmental factors affecting N₂O emission rate, they significantly correlated with N₂O emission rate with the coefficients of 0.968, 0.983, 0.987 ($P < 0.01$) and -0.800 ($P < 0.05$), respectively. The correlations between N₂O emission rate and soil available phosphorus and total nitrogen contents were not significant ($P > 0.05$).

Key words: Saline-alkali soils; N₂O; Nitrification; Denitrification