设施菜田土壤 pH 和初始 C/NO₃⁻ 对反硝化产物比的影响

曹文超¹, 郭景恒¹, 宋 贺², 刘 骕¹, 陈吉吉¹, 王敬国¹* (1中国农业大学资源与环境学院, 北京 100193; 2 安徽农业大学农学院, 安徽合肥 230036)

摘要:【目的】设施菜田土壤反硝化作用是 N,O 排放和氮素损失的重要途径。本研究通过室内厌氧培养试验, 在不同 pH 和初始 C/NO,「条件下,比较设施菜田土壤反硝化氮素气体排放及产物比的变化特征。【方法】以设 施菜田土壤为研究对象,通过添加一定量低浓度的酸碱溶液调节土壤 pH 分别为酸性、中性和碱性条件,调节 后的实测 pH 分别为 5.63、6.65 和 7.83;同时以谷氨酸钠作为有效性碳,除未添加有效性碳作为对照处理 (CK) 外, 其他有效性碳与硝酸盐 (C/NO₃) 的比值分别调节为 5:1、15:1 和 30:1, 三种 pH 条件下均设置 4 个 C/NO₃⁻水平,每个水平3次重复。利用自动连续在线培养系统(Robot系统),在厌氧条件下监测不同处理土壤 产生的 N₂O、NO、N₂和 CO₂浓度的动态变化,通过计算 N₂O/(N₂O + NO + N₂)指数估算反硝化过程 N₂O 的产物 比。【结果】增加土壤的 pH 能显著减少设施菜田土壤 N₂O 和 NO 的产生量,酸性 (pH 5.63) 土壤的 N₂O、 NO产生量峰值在不同初始 C/NO,⁻比下均显著高于中性 (pH 6.65) 和碱性 (pH 7.83) 土壤 (P < 0.05)。中性和碱性 土壤在高 C/NO,⁻下有利于减少反硝化过程 N,O 的产生, 而酸性土壤条件下差异并不显著。中性土壤条件下增 加有机碳含量会降低 NO 产生量,而在酸性和碱性土壤上有机碳的添加对 NO 产生量没有显著影响。土壤 pH 和 初始 C/NO3⁻比对土壤 N2O 的产生有极显著的交互效应 (P < 0.001)。酸性和中性土壤上添加有机碳能够显著增加 土壤 N,的产生速率 (P < 0.05), 且与对照相比,不同 pH 的土壤添加有机碳后均显著促进反硝化过程中 N,O 向 N₂的转化。在不同初始 C/NO₃⁻下碱性土壤的 CO₂产生量显著高于酸性和中性土壤,同时与对照相比,添加有机 碳显著增加了土壤的 CO2产生量 (P < 0.05)。酸性土壤的 N2O 产物比在不同初始 C/NO3-下均极显著高于碱性土 壤 (P < 0.01), 且不同初始 C/NO3⁻下的土壤 N2O 产物比随 pH 的增加显著下降, 二者呈极显著线性负相关关系 (P < 0.01)。【结论】土壤 pH 降低是设施菜田土壤 N,O 和 NO 排放量较高的重要原因。而且,增加初始土壤有 效碳含量促进了土壤的反硝化损失,并在中性和碱性土壤中 N₂O 的产生量减少。土壤 pH 升高和初始 C/NO₃⁻增 加均降低了产物比,但增加了土壤反硝化作用速率。在利用 N₂O 排放通量和产物比估算土壤反硝化氮素损失 时,土壤 pH 和有效碳含量是必须考虑的两个重要因素。

关键词:反硝化; pH; C/NO₃⁻; N₂O; 日光温室

Effects of pH and initial labile C/NO₃⁻ ratio on denitrification in a solar greenhouse vegetable soil

CAO Wen-chao¹, GUO Jing-heng¹, SONG He², LIU Su¹, CHEN Ji-ji¹, WANG Jing-guo^{1*} (*1 College of Resource and Environment, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 2 College of Agronomy, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China*)

Abstract: (Objectives) Denitrification is one of predominant process for N_2O emission from solar greenhouse vegetable soils. An anoxic incubation experiment was conducted to explore effects of soil pH and initial labile C/NO_3^- ratio on nitrogen gaseous emissions (i.e. N_2O , NO and N_2) and the N_2O product during the denitrification in a solar greenhouse vegetable soil. **(Methods)** A typical greenhouse vegetable soil in Shouguang City was selected for the study, and soil pH was adjusted to acidic, neutral and alkaline by adding a certain amount of low

作者简介:曹文超(1986—),男,山东郓城人,博士研究生,主要从事土壤氮素转化及其环境效应方面的研究。 E-mail: caochaoqun66@163.com。*通信作者 E-mail: wangjg@cau.edu.cn

收稿日期: 2017-02-27 接受日期: 2017-04-04

基金项目:国家自然科学基金项目(41230856,41301258)资助。

concentration of acid (0.1 mol/L HCl) or alkaline (0.1 mol/L NaOH) solution. The final soil pH values were 5.63, 6.65 and 7.83 (adjusted), respectively. Sodium glutamate ($C_5H_8NO_4Na$) was added as a labile organic carbon source, and the ratios of initial labile C to NO_3^- were adjusted to 5:1, 15:1 and 30:1 by adding different amounts of sodium glutamate and no sodium glutamate addition in the control (CK). Four levels of initial labile C/NO_3^{-} ratios were set up in the three soils with different pH, and there were three replicates in each level. A robotized incubation system was used to monitor the kinetics of gaseous products (N_2O , NO, N_2 , and CO_2) of denitrification under anoxic conditions and to estimate the N₂O product ratio of denitrification by calculating Index $N_2O/(N_2O + NO + N_2)$. [Results] The increase in soil pH significantly reduced N_2O and NO production in the soil, and the peak values of N₂O and NO production in the acidic soil were significantly higher than those of the alkaline and neutral soils with different initial C/NO₃⁻ ratios (P < 0.05). With the increase of initial labile C, the production of N₂O was reduced in the neutral and alkaline soils, but kept unchanged in the acidic soil. The addition of sodium glutamate reduced NO emission in the neutral soil. However, there were no differences in NO production in other pH levels. A significant interaction on N₂O production was observed between soil pH and initial labile C/NO₃⁻ ratio (P < 0.001). The N₂ production rate significantly increased with sodium glutamate addition in the acidic and neutral soils (P < 0.05). The addition of sodium glutamate could promote the reduction of N_2O to N_2 in denitrification process at different soil pH. The CO₂ production was significantly higher in the alkaline soil than those in the acidic and neutral soils. As compared with CK, the CO₂ production increased significantly with the sodium glutamate addition at different soil pH (P < 0.05). The N₂O product ratio in the acidic soil was significantly higher than that in the alkaline soil under different initial labile C/NO₃⁻ (P < 0.01), the N₂O product ratio was significantly decreased with the increase of soil pH, and a significant linear negative correlation relationship was observed between soil pH and the Index N_2O (P < 0.01). [Conclusions] High N_2O and NO emissions were usually found in greenhouse vegetable soils, primarily due to the decline of soil pH. Furthermore, increase in labile C availability promoted the N loss of denitrification, and decreased N₂O production in neutral and alkaline soils. With the increase of both soil pH and labile C/NO₃, the N₂O product ratio reduced, but the denitrification activity increased. Both soil pH and carbon availability were crucial factors for estimation of N loss of denitrification by multiplying N₂O flux and N₂O product ratio.

Key words: denitrification; pH; C/NO₃⁻; nitrous oxide; solar greenhouse

反硝化过程是土壤氮损失的主要途径之一,而 且该过程产生的 N₂O 和 NO 会给环境带来危害。其 中,N₂O 是重要的温室气体,与全球气候变暖和臭 氧层破坏密切相关^[1-2];而 NO 是一种具有高度活性 且有毒的化合物,会损耗臭氧^[3]和污染空气^[4],同 时,NO 经光化学氧化和水合作用生成 HNO₂和 HNO₃, 对土壤和水体系统酸化产生影响^[5]。农业活动占全球 人为活动排放 N₂O 和 NO 总量比例分别约为 60% 和 10%^[6]。以我国农田土壤为例,其 N₂O 直接排放量为 4.74×10⁵ t,占全国 N₂O 排放的 55.8%^[7]。大量研究 表明 N₂O 和 NO 的排放与氮肥的施用密切相关,施 用氮肥后增加土壤 N₂O 和 NO 的排放量^[8-11]。

我国设施蔬菜种植系统中,农户为了追求高产, 过量施用化学氮肥。大部分地区设施菜田每季化肥 氮素投入量通常会超过1200 kg/hm²⁰,约为小麦、玉 米田的 2~7倍^[10-12]。除了大量施用化学氮肥外,有 机肥料的投入量也很大。以寿光设施菜田为例,有 机肥年均施用量高达 177 t/hm^{2[13]}。此外,该地区设 施菜田全年灌溉水总量在 748~1957 nm 之间,平均 灌溉量高达 1307 nm^[14]。这些都为土壤反硝化微生物 提供了大量的底物和适宜的环境条件,进而促进反 硝化作用的发生和 N₂O 的大量排放。据估计,我国 设施菜田反硝化年损失量可达 N 45.8 kg/hm^{2[15]},反 硝化过程对 N₂O 排放总量的贡献率可达 22.5%~ 57.7%^[16]。由于方法原因,土壤反硝化氮损失的直接 定量测定比较困难。已有研究表明,利用反硝化产 物比和大量的 N₂O 田间观测数据,可以估算土壤反 硝化损失^[17-18]。

众所周知, 土壤中每1 mol 的 NH₃-N 氧化为 NO₃--N 即可释放1 mol 质子,在没有生物利用的情

况下,成为导致土壤酸化的重要原因之一。同时, 在土壤根际微域环境中,根系对阳离子的吸收超过 阴离子时产生的酸性分泌物也会造成土壤局部酸 化。已有研究表明,设施菜田每年仅由施肥产生的 土壤酸化潜势就超过 H⁺ 220 kmol/hm^{2[19]},相同区域 设施菜田土壤 pH 值比粮田土壤低 0.5 个单位^[20]。土 壤 pH 值的降低会显著影响反硝化的损失量^[21-22]和气 态产物比的变化^[23]。而且,设施菜田表层土壤的可溶 性有机碳含量显著高于农田土壤^[24],这有利于其形成 土壤微域厌氧环境。设施菜田通常底施大量的有机 肥和大水漫灌,在生长季初期(1到2周内)也会产 生较大范围的厌氧环境。有证据表明,施用有机肥 后提高土壤水分含量,反硝化作用对 N₂O 的贡献可 在 64%~77%之间^[25]。

综上所述, 土壤 pH 和有机碳是影响反硝化过程 与 N₂O 排放的重要环境因子, 它们之间存在着交互 作用, 但目前相关的研究较少、亟待深入。本研究 选择 pH 下降明显、有机肥施用量很高的设施蔬菜集 中种植区代表性土壤, 通过在线连续监测的自动培 养系统,研究外源碳加入和 pH 对反硝化产物比的影 响, 从而为探讨通过降低产物比以实现 N₂O 减排的 措施提供理论依据。对土壤反硝化产物比及其影响 因素的深入了解, 又可为利用 N₂O 的田间观测数据 准确估算土壤反硝化氮损失提供参考。

1 材料与方法

1.1 采样点概况及土壤样品采集

供试土壤采自中国农业大学山东省寿光市罗家村 (36°55′N, 118°35′E) 设施菜田长期定位试验点。 该地区年平均温度和降雨分别为 12.4℃和 558 mm。 试验始于 2004 年 2 月,每年种植两季番茄,即每年 2~6 月为冬春季,8 月至次年 1 月为秋冬季,7 月份 休闲。试验初始 0—10 cm 土层土壤理化性质为全氮 1.37 g/kg,有机质 18.3 g/kg,pH 5.7 (0.05 mol/L CaCl₂),有效磷和速效钾含量均为 299 mg/kg,有关 试验点的更多信息可参见 He 等^[26]的研究。

在冬春季和秋冬季番茄移栽前,分别基施风干 鸡粪 8 t/hm²和 10 t/hm² (约为 N 146 kg/hm²和 211 kg/hm²),尿素作为追肥随灌溉水施用,每次用量为 N 120 kg/hm²,冬春季为 6次,秋冬季共 5次。本试 验以农户习惯施肥土壤作为供试样品,为避免鸡粪 施用的影响,于 2015 年 6 月番茄最后收获期采集 0—20 cm 土壤样品,充分混合后用冰盒运回实验 室,在 4℃ 下保存备用。

1.2 试验设计与方法

原土壤硝酸盐的背景值过高,为比较初始 C/NO₅-比下土壤反硝化的产物比特征,同时也避免土壤高 浓度硝酸盐造成 NO 测定出现超标的现象,本研究 通过利用去离子水将土壤反复清洗4次,使土壤硝 酸盐含量控制在 50 mg/kg 以下。待土壤水分自然蒸 发至质量含水量10%~15%时,过2mm筛,混匀 后置于4℃下储存备用。称取一定质量的该土壤 3份,将0.1 mol/L的HCl和NaOH溶液均匀喷洒至 过筛后的土壤中,每千克干土溶液添加量约为20~ 60 mmol^[27],使调节的土壤 pH 分别在 5.5、6.5、7.5 左右。充分混匀后,将酸碱调节后的土壤置于 20℃ 恒温培养箱中培养30d左右,以保持土壤调节pH 后的稳定性。培养结束后,测定各处理土壤实际 pH 和无机氮含量,土壤主要理化性质见表1。相同 pH 处理土壤,根据实际测定的硝酸盐含量添加一定质 量的 KNO₃以使土壤硝酸盐总量为 N 50 mg/kg。同 时,以谷氨酸钠 (C,H,NO,Na·H,O) 作为碳源,其添 加量分别为C214、643和1286 mg/kg, 使添加的碳 与土壤硝酸盐的比例 (C/NO,) 分别为 5:1、15:1、 30:1, 未添加谷氨酸钠的处理作为对照处理(CK)。

分别称取相当于 10.0 g 烘干土重的新鲜土样于 120 mL 血清瓶中,根据已知的土壤硝酸盐含量和谷 氨酸钠添加量配置一定浓度的溶液,将溶液用注射 器加入至土壤中后,调节土壤质量含水量为 25%。 用橡胶塞和铝盖密封,并利用抽真空-充氦气系统 (北京帅恩科技有限公司)反复用 He (99.999%)气冲 洗血清瓶 3 次,最后充上 He 气。将所有血清瓶置 于 20℃ 恒温水浴槽中培养,平衡血清瓶内气压后, 利用 Robot 自动培养系统每间隔 8 h 在线连续监测血 清瓶内 N₂O、NO、N₂和 CO₂的浓度变化。每个处理 均重复 3 次。

Robot 自动培养系统包括自动进样和气体分析模块。其中自动进样模块包括双向旋转的蠕动泵 (Gilson Model 222, Gilson,法国)和顶空自动采样器

	表1	不同土壤 pH 下初始理化性质			
Table 1	Initi	al soil physical and chemical properties			
with different soil pH					

рН	全碳 (g/kg) Total C	全氮 (g/kg) Total N	铵态氮 (mg/kg) NH ₄ +-N	硝态氮 (mg/kg) NO₃ ⁻ -N
5.63 ± 0.01	12.9	1.64	0	35.6±2.7
6.65 ± 0.01	12.7	1.63	0	50.2 ± 1.6
7.83 ± 0.01	15.5	1.58	0	53.7 ± 5.0

器,能够监测 N₂O (ECD、TCD), N₂ (TCD), CO₂ (TCD)和 O₂ (TCD) 气体浓度的变化。氮氧化物分析 仪用来定量监测 NO 气体浓度。有关 Robot 自动培养 系统的运行模块细节可参见 Molstad 等^[28]和 McMillan 等^[29]的研究。

1.3 土壤基础参数测定

土壤样品中 NH4⁺和 NO3⁻ 的含量用 1 mol/L KCl 溶液浸提后用连续流动分析仪 (TRACCS2000,德国) 测定。土壤 pH 值测定的水土比为 2.5:1,用 pH 计 测定。土壤全氮、全碳含量利用碳氮分析仪测定 (Thermo Scientific Flash 2000 NC Analyzer,美国)。

1.4 数据处理

气体数据计算根据在线监测的血清瓶中气体数 值和已知标准气体浓度,计算相应气体每克干土的 产生量。研究厌氧培养下反硝化产物比 N₂O/(N₂O + NO + N₂)的变化,以计算 N₂O 的产生量指数 *I*_{N₂O}, 计算公式如下:

$$I_{N_{2}O} = \int_{0}^{T} N_{2}O(t) dt / \int_{0}^{T} [N_{2}O(t) + NO(t) + N_{2}(t)] dt$$
(1)

其中: N₂O(t)、N₂(t)、NO(t) 均为培养时间 t 下的累 积产生量。时间 t 的选择依据是以 N₂O 产生速率为 正值或 N₂O 产生量达最大值时作为终止时间基准, 即利用从初始培养至达到 N₂O 最大累积产生量时的 反硝化产物比均值进行比较。

试验数据采用 SigmaPlot 12.5 作图,利用 SPSS 20.0 分析软件进行单、双因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 pH 和初始 C/NO₃⁻ 对反硝化 N₂O 和 NO 产生 量的影响

由图 1 整体来看,连续培养过程中土壤反硝化 N₂O 产生量变化明显,且随土壤 pH 的增加 N₂O 产生 量显著减少。除未添加谷氨酸钠的对照处理 (CK) 外,其它 3 个不同初始 C/NO₃⁻处理中 N₂O 产生量的 动态变化过程相类似,均呈现先增加达到峰值后再 减少的趋势。在 pH 5.63 条件下,初始 C/NO₃⁻比为 5:1、15:1 和 30:1 的处理中, N₂O 产生量分别在 144、120 和 128 h 时达到峰值,且三者均差异不显



图 1 不同 pH 和初始 C/NO₃⁻下土壤 N₂O 和 NO 产生量的动态变化 Fig. 1 Dynamics of N₂O and NO production during the anaerobic incubation from soil under different pH (acidic, neutral and alkaline) and C/NO₃⁻ levels

著 (图 1)。在中性条件下 (pH 6.65),初始 C/NO₃⁻比 为 5:1、15:1和 30:1的处理中,N₂O 产生量分别 在 72、48和 40h时达到峰值,分别为 N 1.05、 0.71和 0.43 μ mol/g,三者差异极显著 (P < 0.01)。单 从峰值来看,在土壤 pH 为 7.83时,添加谷氨酸钠 的 3个处理均在连续培养 32h时达到峰值,且初始 C/NO₃⁻为 30:1的处理显著降低了 N₂O 的排放 (P < 0.05)。可见,中性和碱性土壤中添加有效性碳有利 于减少反硝化过程 N₂O 的产生,而酸性条件下添加 有效性碳并不能降低 N₂O 产生量。

与 N₂O 类似, 土壤反硝化 NO 的产生量也随土 壤 pH 的增加而减少。在酸性条件下 (pH 5.63), 添加 谷氨酸钠的处理均在培养 96 h 后达到峰值, 且差异 不显著 (图 1)。未添加谷氨酸酸钠的处理 (CK), NO 的产生量较少且下降缓慢,导致其累积排放时间 较长,这可能与土壤中可利用性碳不足导致缺乏电 子供体有关。在 pH 为 6.65 的中性土壤条件下,初 始 C/NO₃⁻ 为 5 : 1 的处理在培养 64 h 时 NO 产生量 达到峰值,为 N 0.81 μmol/g,分别是初始 C/NO₃⁻ 为 15 : 1 和 30 : 1 处理峰值的 1.74 和 1.55 倍 (图 1)。而 在 pH 为 7.83 的碱性土壤中, NO 的产生量均在培养 24 h 时达到峰值,且初始 C/NO₃⁻ 为 5 : 1、15 : 1 和 30:1 的处理间 NO 产生量差异不显著。可见,酸性和碱性土壤中有机碳的添加对 NO 产生量不会产生显著影响,而在中性条件下有机碳含量会降低 NO 产生量。

2.2 pH 和初始 C/NO₃⁻ 对反硝化 N₂和 CO₂产生量 的影响

由图 2 可知,随着培养时间的延长不同土壤 pH下各处理的 N₂产生量均呈上升趋势,且添加谷氨 酸钠后 N₂产生量均达到稳定状态。由其平衡的时间 来看,随着土壤 pH 的增加 N₂O 还原为 N₂的速率显 著加快。除 pH 值为 7.83 的碱性土壤外, N₂产生速 率在 pH 为 5.63 的酸性土壤和 pH 为 6.65 的中性土壤 中均随初始土壤 C/NO₃⁻ 的增加而增大。可见,在一 定程度上增加土壤 pH 值并同时向土壤中添加可利用 性碳可促进反硝化过程中 N₂O 向 N₂的转化,有利于 减少温室气体 N₂O 的排放。

碳源为反硝化微生物提供反应所需的电子供体和能源,CO₂的产生量可间接反映微生物的活性。由图 2 可知,各 pH 土壤在添加有效性碳后,CO₂产生量均显著高于对照处理 (CK),且在相同培养时间和初始 C/NO₃⁻下,CO₂产生量随土壤 pH 的增加而显著增大 (P < 0.01)。酸性土壤中,连续培养 256 h



图 2 不同 pH 和初始 C/NO₃⁻下土壤 N₂和 CO₂产生量的动态变化 Fig. 2 Dynamics of N₂ and CO₂ production from three pH soils (acidic, neutral and alkaline) during the anaerobic incubation with different C/NO₃⁻ levels

5期

后对照处理 CO₂产生量为 2.14 μ mol/g,初始 C/NO₃⁻为 5:1、15:1和 30:1处理的 CO₂产生量分别是对 照处理的 3.55、3.93和 3.92 倍 (图 2)。在土壤 pH 为 6.65 条件下,连续培养 136 h 后,初始 C/NO₃⁻为 5:1处理的 CO₂产生量为 5.69 μ mol/g (图 2),且与初 始 C/NO₃⁻为 15:1和 30:1 的处理均差异极显著 (*P* < 0.01)。碱性土壤中,在土壤连续培养 112 h 后,CO₂产生量在添加有效性碳的不同处理间差异显 著 (*P* < 0.05)。此外,随着 pH 增加,土壤的平均呼 吸速率也明显增加。

2.3 不同初始 C/NO₃⁻ 下土壤 pH 与反硝化产物比的关系

由图 3 整体来看,反硝化产物比 (I_{N_2O}) 随土壤 pH 的增加呈极显著下降趋势 (P < 0.01)。初始培养至 达到 N₂O 最大累积产生量时,反硝化产物比均值与 不同初始 C/NO₃⁻下的土壤 pH 整体拟合线性方程为 $I_{N_2O} = -0.1132$ pH + 1.1018 ($R^2 = 0.5711$, P < 0.01)。 而且,在相同初始 C/NO₃⁻下,反硝化产物比随土壤 pH 的增加而下降,在初始 C/NO₃⁻比为 5 : 1 和 15 : 1 时产物比差异尤为显著 (表 2, P < 0.01)。与对 照相比 (CK),相同土壤 pH 下添加不同比例的谷氨 酸钠后产物比也出现显著的降低 (表 2, P < 0.05)。

由表 3 可知,当 N₂O 达最大累积产生量时,土 壤 pH 和 C/NO₃⁻ 分别对 N₂O 产生量有极显著作用 (P < 0.001),且二者交互效应极显著 (P < 0.001)。同 时,整体来看,在不同初始 C/NO₃⁻ 下各土壤 pH 对 N₂O 累积产生量影响显著 (P < 0.05)。而对于不同初 始 C/NO₃⁻ 来说,与对照处理 (CK)相比,添加有效 性碳后,显著增加了土壤 N₂O 的产生,但高 C/NO₃⁻ 比值 (30:1)的 N₂O 最大累积量显著低于其他两个水 平处理 (P < 0.05)。





表 2 不同 pH 和初始 C/NO₃⁻ 下厌氧培养土壤反硝化 产物比 I_{N,0} 比较分析

Table 2 Compared analysis for the product ratio of denitrification I_{N_2O} in soils under the anaerobic incubation with different pH and initial C/NO₃⁻ levels

pH -	C/NO ₃ -					
	СК	5:1	15 : 1	30 : 1		
5.63	$0.58 \pm 0.06 \text{ aA}$	$0.41 \pm 0.05 \text{ bA}$	$0.41 \pm 0.05 \text{ bA}$	$0.42 \pm 0.06 \text{ bA}$		
6.65	$0.55\pm0.07\;aA$	$0.34\pm0.05\;bB$	$0.31 \pm 0.02 \text{ bcB}$	$0.26\pm0.007~cB$		
7.83	$0.34\pm0.01\ aB$	$0.17 \pm 0.01 \text{ bC}$	$0.17 \pm 0.01 \text{ bC}$	$0.16 \pm 0.004 \text{ bB}$		
	注 (Note),同	司行数据后不同	小写字母表示(7/NO - 间美显显		

注 (Note): 同行剱据后不同小与字母表示 C/NO₅" 间差异显 著 (P < 0.05), 同列数据后不同大写字母表示 pH 间差异极显著 (P < 0.01); 表中数值为平均值 ± 标准差 (n = 3)。 Values followed by different lowercase letters in a row indicate significant differences (P < 0.05) among different C/NO₃⁻ ratios and capital letters in a column indicate significant differences (P < 0.01) among different pH; Values are mean ± SD (n = 3).

表 3 土壤 pH 和初始 C/NO₃⁻ 对 N₂O 产生量的因子分析 Table 3 Multivariate analysis of variance for the effects of pH and initial C/NO₃⁻ on the N₂O production

因子 Factor	自由度 df	均方 Mean square	F值 F value	P值 P value
pН	2	24.6	15960	< 0.001
C/NO ₃ -	3	1.53	992	< 0.001
$pH \times (C/NO_3)$	6	0.743	482	< 0.001

3 讨论

土壤 pH 值是影响反硝化作用特征的重要因素。 在低 pH 值条件下 (pH 5.63), 对照处理 (CK) 的氮素 气态产物以 N₂O 和 NO 为主,这是由于低 pH 阻碍 了 N₂O 还原酶的形成^[30]。同时,基于在 Paracoccus denitrificans 上研究的结果,低 pH 也会干扰周质空 间下的蛋白组装[31]。本研究发现,不同初始 C/NO3-下土壤 N₂O 产生量指数 I_{N2O} 随 pH 的增加显著下 降, 且二者呈极显著线性负相关关系 (图 3), 这与 Liu 等[32]和 Qu 等[23]的研究结果类似。同时,在碱性 土壤和中性土壤中添加有效碳后,反硝化作用 N₂O 产物比值 (0.16~0.34) 均低于 Schlesinger 等[21]汇总的 农田土壤反硝化产物比结果(0.37), 而在酸性土壤中 有无添加有效性碳 N₂O 产物比均较高 (0.41~0.58)。 由于土壤 pH 对反硝化 N₂O 产物比的影响不可忽 视,因而,对不同 pH 的土壤仅用单一的产物比并结 合 N₂O 排放通量估算土壤反硝化的总损失量存在较 大的误差。

NO 是反硝化作用过程的中间产物,同时也是编码亚硝酸盐还原酶 (NIR) 和一氧化氮还原酶 (NOR) 转录的诱导因子^[33]。Bergaust 等 ^[33]发现,在模式菌株 *P. denitrificans* 上 NO 还可以诱导 *nos*Z 基因的转录。本研究结果表明,NO 的最大累积量在低 pH 土壤 (pH 5.63) 中显著高于其他 pH 处理 (图 1),且在土壤溶液中 NO 浓度的最大值为 6.2 µmol/L (数据未显示)。这是由于 NO 在低 pH 条件下的产生速率大于其消耗速率,还可能与低 pH 下的微生物会优先将硝酸盐完全还原为亚硝酸盐,而不是还原亚硝酸盐有关。此外,在低 pH 土壤条件下,尤其在土壤亚硝态氮出现累积时,化学分解反应等非生物因素对 NO 的排放贡献也不容忽视^[34],还需进一步探究。

与对照相比 (CK),各 pH 土壤在添加谷氨酸钠 后均显著增加了反硝化速率,且土壤反硝化速率的 最大值也随有效性碳含量的增加而增大,这与 Jahangir 等^[35]的研究结果相一致。原因可能是有效性 碳增加了土壤 nir 和 nosZ 的基因拷贝浓度^[36],促进 了反硝化微生物酶的活性^[37]。同时,可利用性碳源的 添加也会增加细胞的呼吸作用,显著促进 CO₂的排 放,且随土壤 pH 值的增加呈上升趋势 (图 2)。在同 一初始 C/NO₃-比土壤下,土壤 pH 的调节对 N₂O 和 CO₂两种温室气体的排放存在某种程度上的"此消彼 长"效应 (trade-off effect)。增加土壤 pH 后, N₂O 产 生量明显减少的同时 CO₂的产生量也会显著增加, 这可能与提高土壤 pH 后促进了土壤碳、氮的矿化有 关^[38]。

土壤 pH 和初始 C/NO3⁻ 均对设施菜田土壤反硝 化作用和 N₂O 产生显著影响,且二者有显著的交互 效应(表3)。室内培养研究结果表明,任何影响土壤 中碳矿化速率的因素,如温度、施用有机和无机肥 料以及添加秸秆等都会影响土壤反硝化潜势。宋贺 等阿发现在设施菜田土壤中添加小麦秸秆可显著降低 追肥和灌溉后产生的 N₂O 排放通量,这主要是由于 增加了微生物可利用的碳源,从而促进了反硝化过 程中 N₂O 的还原;同时,可利用性碳源也影响反硝 化作用酶的活性和微生物的群落组成^[40]。而 Obia 等啊研究发现,酸性土壤中添加生物炭能够抑制反硝 化过程 N₂O 和 NO 产生量,原因可能是添加生物炭 增加了土壤的 pH。此外,由于在不同土壤 pH 下反 硝化潜势的差异,造成其培养终止时间有所不同, 但根据相同 pH 土壤培养前后的铵态氮变化 (表 1 和 表 4), 对照处理土壤铵态氮含量升高可能来源于厌 氧条件下土壤矿化作用和硝酸盐的异化还原 (DNRA) 过程。

虽然在低 pH 条件下,有效碳的添加对反硝化 N₂O 的产物比没有影响,但在中性和石灰性土壤上, 碳的有效性显著影响该产物比。因此,在利用 N₂O

рН	培养时间 (h) Incubation time	C/NO ₃ ⁻	NO3 ⁻ -N (mg/kg)	NH4 ⁺ -N (mg/kg)	气态氮损失总量 (mg/kg) Total gaseous loss
5.63	256	СК	28.9 ± 1.6 a	$11.4 \pm 1.0 \text{ d}$	27.4 ± 0.36 c
		5 : 1	0 b	28.2 ± 12 c	57.5 ± 0.36 a
		15 : 1	0 b	$47.7 \pm 0.7 \text{ b}$	56.5 ± 0.71 ab
		30 : 1	0 b	110 ± 8.3 a	55.9 ± 0.43 b
6.65	136	СК	34.0 ± 1.4 a	$6.0 \pm 0.6 \text{ d}$	13.4 ± 0.53 b
		5 : 1	0 b	20.1 ± 3.6 c	49.3 ± 0.52 a
		15 : 1	0 b	$94.8 \pm 2.6 \text{ b}$	48.9 ± 0.54 a
		30 : 1	0 b	157 ± 1.0 a	49.4 ± 0.43 a
7.83	184	СК	20.5 ± 7.6 a	$3.4 \pm 0.8 \text{ d}$	$18.0\pm0.19\ b$
		5 : 1	0 b	17.2 ± 3.6 c	60.0 ± 0.86 a
		15 : 1	0 b	106 ± 7.8 b	60.2 ± 0.86 a
		30:1	0 b	235 ± 8.1 a	58.6 ± 0.13 a

表 4 培养结束后不同 pH 和初始 C/NO₃⁻ 下铵态氮及硝态氮含量及气态氮素损失总量 Table 4 Concentrations of ammonium and nitrate and the total N gaseous loss in the end of the incubation

注(Note): 同列数据后不同小写字母表示相同 pH 值不同 C/NO₃-间差异显著 (P < 0.05) Values followed by different lowercase letters in a column indicate significant differences (P < 0.05) among different C/NO₃- ratios; 表中数值为平均值 ± 标准差 (n = 3) Values are mean ± SD (n = 3).

综上所述,设施菜田土壤通过增加土壤 pH 和初始 C/NO₃-比可以增加反硝化速率,减少 N₂O 排放。 在田间条件下,通过施用石灰或者生物炭等改良土 壤 pH 以及施用秸秆等增加土壤中可利用性碳含量是 减少土壤 N₂O 温室气体排放的重要措施。而且,在 利用产物比并结合 N₂O 排放通量观测数据来估算反 硝化氮素损失量时,土壤 pH 和碳的有效性是必须引 起重视的两个因素。

参考文献:

- [1] 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]. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology, 2008, 65: 102–112.
- [2] Wan S, Ward T L, Altosaar I. Strategy and tactics of disarming GHG at the source: N₂O reductase crops[J]. Trends in Biotechnology, 2012, 30(8): 410–415.
- [3] Thomson A J, Giannopoulos G, Pretty J, *et al.* Biological sources and sinks of nitrous oxide and strategies to mitigate emissions[J]. Philosphical Transactions of the Royal Society Biological Sciences, 2012, 367: 1157–1168.
- [4] Kartal B, Tan N C G, Van de Biezen E, et al. Effect of nitric oxide on anammox bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(18): 6304–6306.
- [5] Bergaust L, Bakken L R, Frostegård Å. Denitrification regulatory phenotype, a new term for the characterization of denitrifying bacteria[J]. Biochemical Society Transactions, 2011, 39: 207–212.
- [6] Zhang Y, Lin F, Jin Y, et al. Response of nitric and nitrous oxide fluxes to N fertilizer application in greenhouse vegetable cropping systems in southeast China[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 20700.
- [7] 董红敏, 李玉娥, 陶秀萍,等. 中国农业源温室气体排放与减排技术 对策[J]. 农业工程学报, 2008, 24(10): 269–273.
 Dong H M, Li Y E, Tao X P, *et al.* China greenhouse gas emissions from agricultural activities and its mitigation strategy[J]. Transactions of the CSAE, 2008, 24(10): 269–273.
- [8] Bouwman A F, Boumans L J M, Batjes N H. Emissions of N₂O and NO from fertilized fields: Summary of available measurement data[J]. Global Biogeochemical Cycles, 2002, 16(4): 1–13.
- [9] Zhu J H, Li X L, Christie P, et al. Environmental implications of low nitrogen use efficiency in excessively fertilized hot pepper (*Capsicum frutescens* L.) cropping systems[J]. Agriculture, Ecosystems and Environment, 2005, 111(1): 70–80.
- [10] Cui F, Yan G X, Zhou Z X, 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[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2012, 48: 10–19.
- [11] Ding W X, Cai Y, Cai Z C, et al. Nitrous oxide emissions from an intensively cultivated maize-wheat rotation soil in the North China Plain[J]. Science of the Total Environment, 2007, 373(2): 501–511.

- [12] Pang X B, Mu Y J, Lee X, *et al.* Nitric oxides and nitrous oxide fluxes from typical vegetables cropland in China: Effects of canopy, soil properties and field management[J]. Atmospheric Environment, 2009, 43(16): 2571–2578.
- [13] 余海英,李廷轩,张锡洲. 温室栽培系统的养分平衡及土壤养分变 化特征[J]. 中国农业科学, 2010, 43(3): 514–522.
 Yu H Y, Li T X, Zhang X Z. Nutrient budget and soil nutrient status in greenhouse system[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2010, 43(3): 514–522.
- [14] 宋效宗. 保护地生产中硝酸盐的淋洗及其对地下水的影响[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2007.
 Song X Z. Nitrate leaching and its effects on groundwater in intensive vegetable cropping systems in Northern China [D]. Beijing: PhD Dissertation of China Agricultural University, 2007.
- [15] Cao B, He F Y, Xu Q M, et al. Denitrification losses and N₂O emissions from nitrogen fertilizer applied to a vegetable field[J]. Pedosphere, 2006, 16(3): 390–397.
- [16] Zhu T, Zhang J, Cai Z. The contribution of nitrogen transformation processes to total N₂O emissions from soils used for intensive vegetable cultivation[J]. Plant and Soil, 2011, 343(1–2): 313–327.
- [17] Cui S H, Shi Y L, Groffman P M, et al. Centennial-scale analysis of the creation and fate of reactive nitrogen in China (1910—2010)[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013, 110: 2052–2057.
- [18] Schlesinger W H. On the fate of anthropogenic nitrogen[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009, 106: 203–206.
- [19] Guo J H, Liu X J, Zhang Y, et al. Significant acidification in major Chinese croplands[J]. Science, 2010, 327(5968): 1008–1010.
- [20] 王敬国. 设施菜田退化土壤修复与资源高效利用[C]. 北京: 中国农业大学出版社, 2011.
 Wang J G. Management of degraded vegetable soils in greenhouses
 [C]. Beijng: China Agricultural University Press, 2011.
- [21] Čuhel J, Šimek M. Proximal and distal control by pH of denitrification rate in a pasture soil[J]. Agriculture, Ecosystems and Environment, 2011, 141(1): 230–233.
- [22] Šimek M, Cooper J E. The influence of soil pH on denitrification: progress towards the understanding of this interaction over the last 50 years[J]. European Journal of Soil Science, 2002, 53(3): 345–354.
- [23] Qu Z, Wang J, Almøy T, et al. Excessive use of nitrogen in Chinese agriculture results in high N₂O/(N₂O+N₂) product ratio of denitrification, primarily due to acidification of the soils[J]. Global Change Biology, 2014, 20(5): 1685–1698.
- [24] 田静, 郭景恒, 陈海清, 等. 土地利用方式对土壤溶解性有机碳组成的影响[J]. 土壤学报, 2011, 48(2): 338–346.
 Tian J, Guo J H, Chen H Q, *et al.* Effect of land use on composition of soil dissolved organic carbon[J]. Acta Pedologica Sinica, 2011, 48(2): 338–346.
- [25] Baral K R, Arthur E, Olesen J E, et al. Predicting nitrous oxide emissions from manure properties and soil moisture: An incubation experiment[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2016, 97: 112–120.
- [26] He F F, Jiang R F, Chen Q, *et al.* Nitrous oxide emissions from an intensively managed greenhouse vegetable cropping system in

Northern China[J]. Environmental Pollution, 2009, 157(5): 1666–1672.

- [27] 张瑜. 中国农田土壤酸化现状、原因与敏感性的初步研究[D]. 北京: 中国农业大学硕士学位论文, 2009. Zhang Y. Preliminary study on acidification in Chinese agricultural soils: current status, potential reason and sensitivity [D]. Beijing: MS Thesis of China Agricultural University, 2009.
- [28] Molstad L, Dörsch P, Bakken L R. Robotized incubation system for monitoring gases (O₂, NO, N₂O, N₂) in denitrifying cultures[J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 71(3): 202–211.
- [29] McMillan A, Phillips R, Berben P, et al. Automated N₂O/N₂ analysis—a new tool for studying denitrification dynamics and testing mitigation strategies[A]. Flrc Worshop. Nutrient Management for the Farm, Catchment and Community[C]. 2014: 92.
- [30] Liu B, Frostegård Å, Bakken L R. Impaired reduction of N_2O to N_2 in acid soils is due to a posttranscriptional interference with the expression of *nosZ*[J]. Mbio, 2014, 5(3): e01383–14.
- [31] Bergaust L, Mao Y, Bakken L R, et al. Denitrification response patterns during the transition to anoxic respiration and posttranscriptional effects of suboptimal pH on nitrogen oxide reductase in *Paracoccus denitrificans*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(19): 6387–6396.
- [32] Liu B, Mørkved P T, Frostegård Å, et al. Denitrification gene pools, transcription and kinetics of NO, N₂O and N₂ production as affected by soil pH[J]. Fems Microbiology Ecology, 2010, 72(3): 407–417.
- [33] Bergaust L, van Spanning R R J M, Frostegård Å, et al. Expression of nitrous oxide reductase in *Paracoccus denitrificans* is regulated by oxygen and nitric oxide through FnrP and NNR[J]. Microbiology, 2012, 158: 826–834.
- [34] Van Cleemput O, Samater A H. Nitrite in soils: accumulation and role in the formation of gaseous N compounds[J]. Fertilizer Research,

1995, 45(1): 81-89.

- [35] Jahangir M M R, Khalil M I, Johnston P, et al. Denitrification potential in subsoils: a mechanism to reduce nitrate leaching to groundwater[J]. Agriculture, Ecosystems and Environment, 2012, 147: 13–23.
- [36] Barrett M, Khalil M I, Jahangir M M R, et al. Carbon amendment and soil depth affect the distribution and abundance of denitrifiers in agricultural soils[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2016, 23(8): 7899–7910.
- [37] Shannon K E M, Saleh–Lakha S, Burton D L, et al. Effect of nitrate and glucose addition on denitrification and nitric oxide reductase (cnorB) gene abundance and mRNA levels in Pseudomonas mandelii inoculated into anoxic soil[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2011, 100(2): 183–195.
- [38] Baggs E M, Smales C L, Bateman E J. Changing pH shifts the microbial source as well as the magnitude of N₂O emission from soil[J]. Biology and Fertility of Soils, 2010, 46(8): 793–805.
- [39] 宋贺, 王成雨, 陈清, 等. 长期秸秆还田对设施菜田土壤反硝化特征和 N₂O 排放的影响[J]. 中国农业气象, 2014, 35(6): 628-634.
 Song H, Wang C Y, Chen Q, *et al.* Effects of long-term amendment of residue on denitrification characteristics and N₂O emissions in greenhouse soil[J]. Chinese Journal of Agrometeorology, 2014, 35(6): 628-634.
- [40] Saggar S, Jha N, Deslippe J, et al. Denitrification and N₂O:N₂ production in temperate grasslands: processes, measurements, modelling and mitigating negative impacts[J]. Science of the Total Environment, 2013, 465: 173–195.
- [41] Obia A, Cornelissen G, Mulder J, et al. Effect of soil pH increase by biochar on NO, N₂O and N₂ production during denitrification in acid soils[J]. PloS One, 2015, 10(9): e0138781.