

威百亩熏蒸对土壤硝化作用及 *amoA* 型硝化细菌群落结构的影响

燕平梅* 李 娜 赵文婧 陈燕飞 乔宏萍

(太原师范学院生物系, 土壤消毒活化绿色产业技术创新战略联盟, 太原 030619)

摘要: 为探究威百亩对土壤硝化作用的影响及作用机制, 通过理化分析和变性梯度凝胶电泳方法研究浓度为 20、100 和 500 mg/kg 威百亩熏蒸处理对土壤硝化作用及 *amoA* 型硝化细菌群落结构的影响。结果表明, 威百亩熏蒸处理 0、14、28 d 后, 3 种浓度处理的土壤硝化率与对照差异不显著; 处理 56 d 后, 20、100 和 500 mg/kg 浓度处理的土壤硝化率分别为 81.15%、76.66% 和 94.08%, 前两者与对照差异不显著, 后者与对照差异显著; 而处理 84 d 后, 3 种浓度处理的土壤硝化率与对照差异均不显著。与对照相比, 3 个浓度威百亩熏蒸处理不同时间后土壤 *amoA* 型硝化细菌群落的均匀度指数差异不显著。熏蒸处理 14 d 后, 浓度 20、100 mg/kg 威百亩处理的土壤 *amoA* 型硝化细菌群落的香农多样性指数和丰富度指数分别为 1.00、10.97 和 0.84、7.79, 与对照的 0.92 和 9.78 均无显著差异; 而浓度 500 mg/kg 威百亩处理的香农多样性指数和丰富度指数分别为 0.59、5.77, 显著低于对照。表明威百亩对土壤硝化强度的影响较 *amoA* 型硝化细菌群落延迟, 说明土壤中硝化作用的强弱并非完全决定于土壤 *amoA* 型硝化细菌的作用。

关键词: 威百亩; 土壤熏蒸剂; 硝化作用; 氨单加氧酶; 变性梯度凝胶电泳

Effects of metham sodium fumigation on soil nitrification and the community structure of *amoA* nitrification bacteria

Yan Pingmei* Li Na Zhao Wenjing Chen Yanfei Qiao Hongping

(Green Industry Technology Innovation Strategic Alliance of Soil Disinfestation and Activation, Department of Biology, Taiyuan Normal University, Taiyuan 030619, Shanxi Province, China)

Abstract: To explore the effect and mechanism of metham on soil nitrification, physicochemical analysis and denaturing gradient gel electrophoresis were used to analyze the effects of 20, 100 and 500 mg/kg of fumigant on soil nitrification and *amoA* type denitrifying bacteria community structure. The results showed that after 0, 14 and 28 days of fumigation treatment, the soil nitrification rates of 20, 100 and 500 mg/kg treatments were not significantly different from those of the control. After 56 days of treatment, the soil nitrification rate of the 20, 100 and 500 mg/kg treatments were 81.15%, 76.66% and 94.08%, respectively. There was no significant difference between the two treatments and that of the control, but the significant difference appeared later. After 84 days of treatment, there was no significant difference in soil nitrification between 20, 100 and 500 mg/kg treatments and the control group. Compared with the control group, there was no significant difference in evenness index of *amoA* type nitrifying bacteria community after 0, 14, 28, 56 and 84 days of fumigation with three concentrations of metham.

After 14 days of fumigation treatment, the diversity index and richness index of *amoA*-type nitrifying bacteria community in soil treated with 20, 100 mg/kg concentrations were 1.00, 10.97 and 0.84, 7.79, respectively, which had no significant with those of control (0.92 and 9.78); the diversity index and richness index of treatment with 500 mg/kg concentration were 0.59 and 5.77, were remarkable lower than those of control. The effect of metham on soil nitrification intensity was delayed compared with that of *amoA* type nitrifying bacteria community structure, which indicated that the strength of nitrification in soil does not depend entirely on the number of nitrifying bacteria in the soil.

Key words: metham; soil fumigant; nitrification; *amoA*; denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

土壤熏蒸是防治作物土传性病害的一项技术,利用化学、物理、生物防治技术以及耕作措施抑制土壤病原体的生长繁殖及其对作物的侵染,减轻土壤中病原体对农作物的危害,能有效地防止土传病害的传播蔓延,很好地解决高附加值作物的重茬问题,并显著提高作物的产量和品质。随着保护地高附加值经济作物的连年栽培,土传病害问题愈发突出。土壤熏蒸技术成为普遍使用并且能有效控制农业生产中土传病害的重要措施(程新胜和杨建卿,2007)。

溴甲烷曾是一种优良的土壤熏蒸剂,由于其显著消耗臭氧层物质,目前溴甲烷替代品如威百亩、氯化苦、二甲基二硫等不断被研究开发用于防治土传病害(Hutchinson et al., 2000; Gilreath et al., 2005; Minuto et al., 2006)。有关溴甲烷替代品的研究主要是考察其对病虫害及杂草的防治效果,或熏蒸剂的环境行为等方面(Gilreath & Santos, 2004; Klose et al., 2007; Hanson et al., 2011)。土壤熏蒸剂对土壤中氮转化相关功能的微生物及其功能的影响一直是研究热点问题,已有试验证明熏蒸处理会抑制土壤硝化作用,如Stromberger et al.(2005)认为用溴甲烷熏蒸土壤后,硝化速率与对照相比减少55%以上,且一直持续到熏蒸后37周还未恢复;程新胜和杨建卿(2007)发现溴甲烷和威百亩熏蒸后,土壤硝化作用受到明显抑制。硝化作用分为2个阶段,即氨氧化和亚硝酸盐氧化,分别由2类化能自养微生物完成:一类是氨氧化微生物的氨单加氧酶(ammonia monooxygenase, *amoA*)完成氨(NH_3)的氧化过程;另一类是硝化细菌完成亚硝酸氧化过程。氨氧化微生物是执行硝化作用速率限制性步骤的关键微生物(Phillips et al., 2000),同时也是普遍存在于土壤中的硝化微生物(Schlepr et al., 2005; Treusch et al., 2005),常永凯(2016)以氨氧化微生物的功能基因氨单加氧酶(*amoA*)基因研究辽

河口沉积物的硝化作用,揭示了辽河口沉积物中氨氧化微生物的多样性特征及硝化作用;杨扬等(2012)基于氨氧化微生物的*amoA*基因研究了硝化抑制剂对蔬菜土硝化和反硝化细菌的影响,阐述了硝化抑制剂的抑制机理。

威百亩熏蒸剂对病虫害及杂草的防治效果能够替代溴甲烷,但其是否为优良的熏蒸剂目前尚未见报道。本研究以实验室熏蒸土壤为材料,以威百亩熏蒸土壤中提取的总基因DNA作模板,采用PCR技术和变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)方法鉴定土壤中的*amoA*型硝化微生物,分析威百亩熏蒸对土壤中*amoA*型硝化微生物群落结构及硝化作用的影响,探究威百亩熏蒸影响土壤硝化作用机制,以期能为土壤熏蒸剂的选择提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

供试土壤:本试验所选土壤为北京市通州区黄瓜大棚轮作3年以上土壤。土壤为砂壤土,其理化性质为:有机质 33.55 g/kg, 铵态氮 73.01 mg/kg, 硝态氮 249.46 mg/kg, 速效钾 443.45 mg/kg, 有效磷 657.66 mg/kg, pH 6.86。

药剂、试剂及仪器:42%威百亩(metham-sodium)水剂,大连染料化工有限公司。*Taq*酶、dNTPs等,生工生物工程(上海)股份有限公司;琼脂糖、RNase、去离子甲酰胺、聚丙烯酰胺,上海鼎国生物技术有限公司;DNA Ladder,北京天为时代科技有限公司;土壤DNA提取试剂盒、SYBR Green,美国MO-Bio Laboratories公司;其它常规试剂均为国产分析纯。TC-96/G/H(b)B PCR基因扩增仪、Centrifuge 5415D离心机,德国Eppendorf公司;D-Code TM DGGE电泳仪、DGGE指纹图谱用凝胶成像系统,美国Bio-Rad公司;Futura连续流动分析仪,法国

Alliance 公司。

1.2 方法

1.2.1 土壤熏蒸试验

土壤熏蒸试验于2012年在北京市通州区黄瓜大棚内进行,大棚面积约2 000 m²,采用对角线五点法取土样,将其过2 mm筛后混匀,加水将土壤湿度调为15%,称取1 kg土壤置于1.5 L干燥器中。对土壤分别进行不同熏蒸处理,即20、100和500 mg/kg三个浓度的威百亩熏蒸处理,以无熏蒸剂处理作对照,共4个处理,每个处理3次重复。干燥器在加入药剂后立即密封,在温度为25℃条件下密闭熏蒸7 d后敞气,然后置于温度为25℃条件下恒温避光培养,每隔2 d调节土壤含水量至熏蒸前水平,分别于熏蒸后0、14、28、56、84 d采用五点法取样,每个样点取1 g土壤,每个处理共取5 g,用于测定各参数。

1.2.2 土壤硝化作用的测定

通过土壤培养法测定1.2.1中所处理土壤的硝化率,用连续流动分析仪测定土壤中的酸态氮(NO₃⁻-N)或硝酸态和亚硝酸态的氮(NO₃⁻+NO₂⁻-N),根据其在土样中转化为硝酸态的氮(NO₃⁻-N)或硝酸态和亚硝酸态的氮(NO₃⁻+NO₂⁻-N)占总矿态氮的百分率计算硝化率,分析各处理土壤中硝化作用的强度(孙军德等,2005)。

1.2.3 *amoA* 基因的PCR扩增及基因序列的鉴定

土壤总DNA的提取与检测:土壤总DNA的提取按照土壤DNA提取试剂盒步骤提取。DNA提取物用2%琼脂糖凝胶电泳检测。每个处理样品3个重复,然后混合DNA提取液,于-20℃保存。

amoA 基因的PCR扩增:采用*amoA*-F(5'-CTGGGAYTTCTGGMTKGACTG-3')和*amoA*-R(5'-AGTARASYTTKCCRARRTACCACCA-3')引物扩增土壤*amoA*基因(陈哲等,2009),引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。扩增体系:PCR Master Mix 12.5 μL、10 pmol/μL上下游引物各1 μL、DNA 1.5 μL,加ddH₂O至终体积25 μL。反应程序:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,48.8℃退火30 s,72℃延伸45 s,35个循环;72℃再延伸8 min,于4℃保存。扩增目的片段大小约为576 bp。

PCR产物的变性梯度凝胶电泳及差异泳带的回收:取PCR产物20 μL进行变性梯度凝胶电泳分析,细菌的变性剂梯度范围为35%~50%,聚丙烯酰胺凝胶浓度为8%(100%的变性剂为7 mol/L尿素

和40%的去离子甲酰胺)。在1×TAE缓冲液中,于200 V、60℃下电泳4 h。电泳后采用SYBR Green试剂对凝胶进行染色,观察到有荧光条带。变性梯度凝胶电泳图谱胶切下目的条带,通过变性梯度凝胶电泳指纹图谱用凝胶成像系统分析电泳条带,并送至由华大基因技术服务有限公司进行测序,将测序所得序列用DNAMAN 4.0软件去除载体序列,用BLAST程序在GenBank中搜索相似序列,相关序列用DNAMAN 4.0进行比对,进行系统发育分析,鉴定获得*amoA*型硝化细菌。

1.2.4 *amoA* 型硝化细菌群落结构分析

采用香农多样性指数对获得的土壤硝化细菌群落结构进行分析。用香农多样性指数 H' 、均匀度指数 E 和丰富度指数 R 表示反硝化细菌群落的结构水平及生态学特征(李晔等,2010),香农多样性指数 $H'=-\sum(n_i/N)\ln(n_i/N)$,式中 n_i 表示变性梯度凝胶电泳中单一条带的峰面积, N 为所有电泳条带峰的面积,峰面积从仪器的结果中获得;丰富度指数 $R=S-1/\ln N$,式中 S 为某一泳道的总带数;均匀度指数 $E=H'/H_{\max}$, $H_{\max}=\ln S$ (李晔等,2010),通过3个指标反映细菌群落类型、结构差异及群落演替的动态变化。

1.3 数据分析

采用SPSS 13.0软件对试验数据进行处理,以最小显著差数(LSD)法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 威百亩熏蒸对土壤硝化作用的影响

威百亩熏蒸处理后,随着敞气时间的延长,对土壤硝化作用的影响不同。处理后0 d,对照的土壤硝化率为74.02%,20、100和500 mg/kg浓度威百亩熏蒸土壤硝化率分别为74.85%、77.87%和83.91%,与对照差异不显著。处理后14~28 d,不同处理与对照间仍差异不显著。处理后56 d,对照土壤的硝化率为81.45%,20、100和500 mg/kg浓度处理的土壤硝化率分别为81.15%、76.66%和94.08%,前两者与对照差异不显著,后者与对照差异显著($P<0.05$)。处理后84 d,对照的土壤硝化率为81.98%,20、100和500 mg/kg浓度处理的土壤硝化率分别为80.13%、76.53%和74.34%,与对照差异不显著($P>0.05$)。说明威百亩熏蒸剂对土壤硝化作用的影响表现为高浓度(500 mg/kg)在培养后期(56 d)抑制土壤硝化作用,而84 d硝化作用与对照无显著差异。

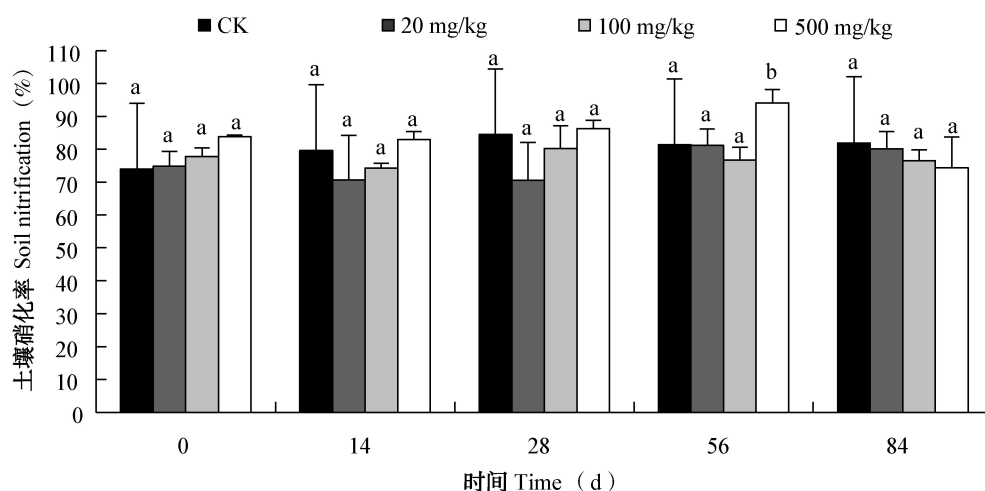


图1 不同浓度威百亩熏蒸对土壤硝化作用的影响

Fig.1 Effects on soil nitrification with different concentration of metam-sodium fumigation

图中数据为平均数±标准差。相同时间下不同处理间的小写字母表示经LSD法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters among different treatments at the same time indicate significant difference at $P<0.05$ level by LSD test.

2.2 *amoA*型硝化型细菌的变性梯度凝胶电泳分析

不同浓度威百亩熏蒸处理不同时间后的土壤及对照的土壤微生物 *amoA* 基因 PCR 扩增产物的变性梯度凝胶电泳图谱不同,20 mg/kg 浓度威百亩熏蒸土壤和对照土壤的电泳中出现 100 mg/kg 和 500 mg/kg 浓度威百亩熏蒸土样没有的电泳条带,经回收此条带(条带a)测序分析为车菊哈氏菌 *Ha-hella chejuensis*。不同泳道上有一些共同的DNA条带,其中有1条带(条带b)在不同样品中迁移率一致、且信号强度高,预示着不同浓度威百亩熏蒸剂处

理之间以及和对照土壤之间存在着共同的优势硝化细菌类群,经回收鉴定为未培养氨氧化菌,但DNA条带信号强度又不相同。100 mg/kg 和 500 mg/kg 浓度威百亩熏蒸土壤和对照土壤的电泳中出现了20 mg/kg 浓度处理土壤没有的电泳条带,经回收此条带(条带c),测序分析为未培养氨氧化菌。在对照土壤中出现威百亩熏蒸土样没有的电泳条带d,经回收条带测序分析此泳带为施氏假单胞菌 *Pseudomonas stutzeri*(图2、表1)。表明土壤中 *amoA* 型硝化型细菌的优势菌为未培养氨氧化菌。

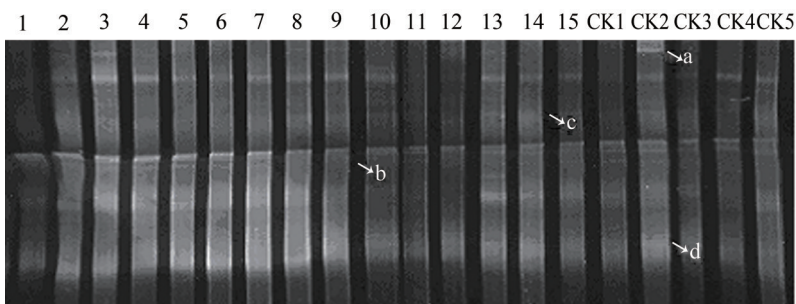


图2 威百亩熏蒸土壤 *amoA* 型硝化细菌的变性梯度凝胶电泳结果

Fig. 2 The results of denaturing gradient gel electrophoresis of *amoA* type of nitrification bacteria in soil fumigated with metam

图中a、b、c、d是从变性梯度凝胶电泳图谱中回收的电泳带。1~5: 20 mg/kg 威百亩熏蒸0、14、28、56、84 d后的样品; 6~10: 100 mg/kg 威百亩熏蒸0、14、28、56、84 d后的样品; 11~15: 500 mg/kg 威百亩熏蒸0、14、28、56、84 d后的样品; CK1、CK2、CK3、CK4、CK5: 无熏蒸剂处理0、14、28、56、84 d后的样品。Electrophoresis patterns a, b, c, d are electrophoretic bands recovered from denaturing gradient gel electrophoresis patterns. 1~5: samples at 0, 14, 28, 56, 84 d after fumigation with 20 mg/kg metham-sodium; 6~10: samples at 0, 14, 28, 56, 84 d after fumigation with 100 mg/kg metham-sodium; 11~15: samples at 0, 14, 28, 56, 84 d after fumigation with 500 mg/kg metham-sodium; CK1, CK2, CK3, CK4, CK5: samples at 0, 14, 28, 56, 84 d after treatment with no fumigant.

表1 威百亩熏蒸土壤中 *amoA* 的PCR-变性梯度凝胶电泳片段测序分析结果

Table 1 The results of *amoA*-PCR-DGGE sequence analysis (of the soil samples fumigated with metam-sodium)

测序条带	登录号	与NCBI中已发表相关序列同源性比较	同源率 (%)
Sequenced band	Accession number	The strain or clones which have the highest identity from NCBI	Homology rate
a	CP000155.1	车菊哈氏菌 <i>Hahella chejuensis</i>	97
b	HQ267731.1	未培养氨氧化菌 Uncultured ammonia-oxidizing bacterium	96
c	FN394212.1	未培养氨氧化菌 Uncultured ammonia-oxidizing bacterium	98
d	CP002881.1	施氏假单胞菌 <i>Pseudomonas stutzeri</i>	99

2.3 熏蒸后土壤中 *amoA* 型硝化细菌群落的生态指数

浓度为 20 mg/kg 和 500 mg/kg 威百亩熏蒸处理后 0 d, 土壤 *amoA* 型硝化细菌群落的香农多样性指数为 0.81 和 0.88, 显著高于对照的 0.73 ($P<0.05$)。浓度为 20 mg/kg 和 100 mg/kg 威百亩熏蒸处理后 14 d, 土壤 *amoA* 型硝化细菌群落的香农多样性指数 1.00 和 0.84, 与对照无显著差异, 而 500 mg/kg 浓度处理的香农多样性指数 (0.59) 显著低于对照 ($P<0.05$)。3 种浓度威百亩熏蒸处理 28 d, 土壤 *amoA* 型硝化细菌

群落的多样性指数与对照均无显著差异。浓度为 100 mg/kg 和 500 mg/kg 威百亩熏蒸处理后 56 d, 土壤 *amoA* 型硝化细菌群落的多样性指数分别为 0.80 和 0.99, 显著高于对照的 0.76 ($P<0.05$)。浓度为 20 mg/kg 和 100 mg/kg 威百亩熏蒸处理后 84 d, 土壤 *amoA* 型硝化细菌群落的香农多样性指数为 0.84 和 1.09, 显著高于对照 ($P<0.05$) (表 2)。3 种浓度威百亩熏蒸处理不同时间, 土壤 *amoA* 型硝化细菌群落的均匀度指数与对照均无显著差异。

表2 威百亩熏蒸土壤中 *amoA* 型硝化细菌群落的生态指数

Table 2 The ecological index of nitrifying bacteria in the soil fumigated with metam-sodium

处理时间	浓度 (mg/kg)	香农多样性指数	均匀度指数	丰富度指数
Time (d)	Concentration	Shannon diversity index	Evenness index	Richness index
0	20	0.81±0.11 a	0.95±0.41 a	6.79±1.11 b
	100	0.73±0.21 b	0.86±0.21 a	6.79±1.12 b
	500	0.88±0.15 a	0.87±0.01 a	9.79±2.01 a
	CK	0.73±0.28 b	0.93±0.21 a	6.77±1.15 b
14	20	1.00±0.01 a	0.96±0.23 a	10.79±1.31 a
	100	0.84±0.31 a	0.93±0.31 a	7.79±1.13 a
	500	0.59±0.12 b	0.75±0.09 a	5.77±0.11 b
	CK	0.92±0.38 a	0.92±0.11 a	9.78±2.11 a
28	20	0.89±0.22 a	0.94±0.31 a	8.79±1.10 a
	100	0.79±0.17 a	0.94±0.33 a	6.77±0.10 b
	500	0.95±0.41 a	0.99±0.41 a	8.75±1.13 a
	CK	0.83±0.27 a	0.92±0.31 a	7.78±1.14 a
56	20	0.68±0.13 b	0.87±0.32 a	5.78±0.99 b
	100	0.80±0.16 a	0.89±0.22 a	7.78±1.01 a
	500	0.99±0.38 a	0.99±0.11 a	9.76±1.18 a
	CK	0.76±0.19 b	0.89±0.11 a	6.77±1.04 a
84	20	0.84±0.23 a	0.93±0.21 a	7.78±1.10 b
	100	1.09±0.18 a	0.95±0.11 a	13.79±2.11 a
	500	0.57±0.16 b	0.94±0.01 a	3.74±0.17 c
	CK	0.48±0.13 b	0.90±0.21 a	2.72±0.17 c

表中数据为平均数±标准差。同列不同小写字母表示经 LSD 法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by LSD test.

浓度为 500 mg/kg 威百亩熏蒸处理后 0 d, 土壤 *amoA* 型硝化细菌群落的丰富度指数为 9.79, 显著高于对照的 6.77 ($P<0.05$); 而其它 2 种浓度处理与对照间均无显著差异。浓度 20、100 和 500 mg/kg 威百

亩熏蒸处理后 14 d, 土壤 *amoA* 型硝化细菌群落的丰富度指数分别为 10.79、7.79 和 5.77, 其中 500 mg/kg 处理显著低于对照的 9.78 ($P < 0.05$); 而其它 2 种浓度处理与对照间均无显著差异。浓度 20 mg/kg 和 500 mg/kg 威百亩熏蒸处理后 28 d, 丰富度指数为 8.79 和 8.75, 与对照的 7.78 无显著差异; 浓度 100 mg/kg 熏蒸处理的丰富度指数显著低于对照 ($P < 0.05$)。浓度 20 mg/kg 威百亩熏蒸处理后 56 d, 土壤 *amoA* 型硝化细菌群落的丰富度指数为 5.78, 显著低于对照的 6.77 ($P < 0.05$)。浓度 20 mg/kg 和 100 mg/kg 威百亩熏蒸处理后 84 d, 土壤 *amoA* 型硝化细菌群落的丰富度指数为 7.78 和 13.79, 显著高于对照 2.72 ($P < 0.05$)。说明不同浓度威百亩熏蒸对土壤 *amoA* 型硝化细菌群落均匀度无显著影响, 而对其多样性和丰富度表现为初期 (14 d) 影响较明显; 浓度 100 mg/kg 和 500 mg/kg 处理对土壤 *amoA* 型硝化细菌群落具有抑制作用, 但到 28 d 后可自然恢复。

3 讨论

硝化作用是土壤氮转化中的一个重要过程, 通过微生物作用将 NH_4^+ 氧化成 NO_3^- 。土壤熏蒸处理对硝化作用有着明显的抑制作用, 使土壤中可摄取的 NH_4^+-N 库保持较高水平, 保证了作物对铵态氮的需要, 提供了作物对土壤氮素的利用需求 (颜冬冬等, 2010)。因此, 选择溴甲烷替代熏蒸剂, 既要考虑替代熏蒸剂对土传病害的作用, 也需考虑熏蒸剂对硝化作用的影响。本研究也获得类似结果, 高浓度 500 mg/kg 威百亩熏蒸土壤后 56 d 会抑制土壤硝化作用。颜冬冬等 (2010) 研究报道溴甲烷替代熏蒸剂氯化苦熏蒸土壤后的前 11 周硝化作用过程受到明显抑制, 11 周后硝化作用逐渐恢复, 硝化作用受抑制程度减弱; 燕平梅等 (2014) 试验结果表明, 溴甲烷熏蒸土壤 100 d 后明显降低了土壤硝化强度。以上研究表明熏蒸剂熏蒸土壤可以抑制其硝化作用, 但不同熏蒸剂对土壤硝化作用抑制时间不一样。

本试验研究了威百亩熏蒸对土壤 *amoA* 型硝化细菌群落多样性指数和丰富度指数的影响, 结果表明熏蒸处理后 14 d, 浓度 500 mg/kg 处理后香农多样性指数和丰富度指数显著低于对照, 说明威百亩熏蒸处理后 14 d, *amoA* 型硝化细菌的就可以受到抑制, 虽然熏蒸处理 56 d 也可抑制土壤硝化作用, 但后者晚于前者 42 d, 这与燕平梅等 (2014) 的研究结论存在差异, 后者发现溴甲烷对土壤硝化作用的抑制主要发生在氨氧化微生物 *amoA* 催化的氨的氧化过

程, 溴甲烷熏蒸抑制 *amoA* 型硝化细菌的多样性。说明不同土壤熏蒸剂对土壤硝化作用的抑制机理不同。

李君 (2017) 发现威百亩熏蒸土壤后可能引起短暂抑制硝化过程或者加速土壤矿化, 考察涉及到硝化和反硝化的基因表达量, 被威百亩抑制的亚硝化过程也主要反映 *amoA* 基因表达量的变化, 但是 *amoA* 的下降并没有达到显著水平; Feld et al. (2015) 研究棉隆熏蒸对土壤硝化作用的影响, 表明棉隆刺激土壤硝化活性, 同时抑制细菌和古菌 *amoA* 基因的表达。而本研究中未观察到威百亩熏蒸土壤对 *amoA* 型硝化细菌硝化作用的刺激效应; 燕平梅等 (2019) 研究了威百亩熏蒸对土壤反硝化作用及 *nirS* 型反硝化微生物群落结构的影响, 发现威百亩对土壤反硝化影响与反硝化微生物无关。综上所述, 威百亩熏蒸对土壤硝化作用的影响并非完全决定于土壤 *amoA* 型硝化细菌的作用, 有待于以后进一步研究。

参考文献 (References)

- Chang YK. 2016. Diversity of ammonia oxidizing microorganisms and nitrification in Liaohu Estuary sediments. Master Thesis. Dalian: Dalian Ocean University (in Chinese) [常永凯. 2016. 辽河口沉积物中氨氧化微生物多样性和硝化作用研究. 硕士学位论文. 大连: 大连海洋大学]
- Chen Z, Chen CL, Qin HL, Wang X, Wu MN, Wei WX. 2009. Impact of chemical fertilizers on paddy soil bacterial diversity and nitrification, denitrification functional bacteria composition. *Acta Ecologica Sinica*, 29(11): 6142–6147 (in Chinese) [陈哲, 陈春兰, 秦红灵, 王霞, 吴敏娜, 魏文学. 2009. 化肥对稻田土壤细菌多样性及硝化、反硝化功能菌组成的影响. *生态学报*, 29(11): 6142–6147]
- Cheng XS, Yang JQ. 2007. Effect of soil fumigation on soil microbe and nitrification. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 15(6): 51–53 (in Chinese) [程新胜, 杨建卿. 2007. 熏蒸处理对土壤微生物及硝化作用的影响. *中国生态农业学报*, 15(6): 51–53]
- Feld L, Hjelmsø MH, Nielsen MS, Jacobsen AD, Rønn R, Ekelund F, Krogh PH, Strobel BW, Jacobsen CS. 2015. Pesticide side effects in an agricultural soil ecosystem as measured by *amoA* expression quantification and bacterial diversity changes. *PLoS ONE*, 10(5): e126080
- Gilreath JP, Motis TN, Santos BM, Mirusso JM, Gilreath PR, Noling JW, Jones JP. 2005. Influence of supplementary in-bed chloropicrin application on soilborne pest control in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Crop Protection*, 24(9): 779–784
- Gilreath JP, Santos BM. 2004. Herbicide dose and incorporation depth Herbicide dose and incorporation depth in combination with 1, 3-dichloropropene plus chloropicrin for *Cyperus rotundus* control in tomato and pepper. *Crop Protection*, 23(3): 205–210
- Hanson BD, Gao S, Gerik JS, Shrestha A, Qin R, McDonald JA. 2011.

- Effects of emission reduction surface seal treatments on pest control with shank-injected 1, 3-dichloropropene and chloropicrin. *Crop Protection*, 30(2): 203–207
- Hutchinson CM, McGiften ME, Ohr HD, Sims JJ, Becker JO. 2000. Efficacy of methyl iodide and synergy with chloropicrin for control of fungi. *Pest Management Science*, 9(56): 413–418
- Klose S, Ajwa HA, Fennimore S. 2007. Dose response of weed seeds and soilborne pathogens to 1, 3-D and chloropicdn. *Crop Protection*, (26): 535–542
- Li J. 2017. Effects of two fumigants on soil microbial diversity and community structure. Ph. D Thesis. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences (in Chinese) [李君. 2017. 两种熏蒸剂对土壤微生物多样性和群落结构的影响. 博士学位论文. 北京: 中国农业科学院]
- Li Y, Sun LN, Yang JS, Yang XB, Qu YJ. 2010. Microbial communities in heavy metal polluted soils by PCR-DGGE fingerprint. *Ecology and Environmental Sciences*, 19(9): 2204–2208 (in Chinese) [李晔, 孙丽娜, 杨继松, 杨晓波, 曲亚军. 2010. 基于PCR-DGGE的重金属污染土壤微生物种群指纹分析. 生态环境学报, 19(9): 2204–2208]
- Minuto A, Gullino ML, Lamberti F, Addabbo TD, Tescari E, Ajwa H, Garibaldi A. 2006. Application of an emulsifiable mixture of 1, 3-dichloropropene and chloropicrin against root knot nematodes and soilborne fungi for greenhouse tomatoes in Italy. *Crop Protection*, 25(12): 1244–1252
- Phillips CJ, Harris D, Dollhopf SL. 2000. Effects of agronomic treatments on structure and function of ammonia-oxidizing communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 5410–5418
- Schlepr C, Jurgens G, Jonscheie M. 2005. Genomic studies of uncultivated archaea. *Nature Review of Microbiology*, 3: 479–488
- Stromberger ME, Klose S, Ajwa H. 2005. Microbial populations and enzyme activities in soils fumigated with methyl bromide alternatives. *Soil Science Society of America Journal*, 69(6): 1987–1999
- Sun JD, Zhao CY, Qu BC, Li SC. 2005. Effects of chloropicrin suffocating on soil microorganisms. *Chinese Journal of Soil Science*, (2): 283–285 (in Chinese) [孙军德, 赵春燕, 曲宝成, 李飒铖. 2005. 氯化苦熏蒸土壤对微生物种群数量的影响. 土壤通报, (2): 283–285]
- Treusch AH, Leininger S, Kletzin A. 2005. Novel genes for nitrite reductase and amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environmental Microbiology*, 7: 1985–1995
- Yan DD, Wang QX, Guo MX, Wang FY, Cao AC. 2010. Effect of chloropicrin on soil nitrogen mineralization and nitrification. *Hubei Agricultural Sciences*, 49(2): 323–326 (in Chinese) [颜冬冬, 王秋霞, 郭美霞, 王方艳, 曹勘程. 2010. 氯化苦熏蒸处理对土壤氮矿化和硝化作用的影响. 湖北农业科学, 49(2): 323–326]
- Yan PM, Gao GX, Cao AC, Zhang T, Li Y, Wang QX, Guo MX. 2014. Effects of soil fumigants on soil nitrification and denitrification. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 22(4): 401–407 (in Chinese) [燕平梅, 高贵喜, 曹勘程, 张腾, 李园, 王秋霞, 郭美霞. 2014. 土壤熏蒸剂对土壤硝化、反硝化作用的影响. 中国生态农业学报, 22(4): 401–407]
- Yan PM, Wei AL, Qiao HP, Zhao WJ, Cao AC, Li Y. 2019. Influence of metham-sodium fumigated on soil denitrification and *nirS* denitrifying gentrifying bacterial community structure. *Journal of Plant Protection*, 46(2): 393–400 (in Chinese) [燕平梅, 魏爱丽, 乔宏萍, 赵文婧, 曹勘程, 李园. 2019. 威百亩熏蒸对土壤反硝化作用及 *nirS* 型反硝化细菌群落结构的影响. 植物保护学报, 46(2): 393–400]
- Yang Y, Meng DL, Qin HL, Wu MN, Zhu YJ, Wei XW. 2012. Mechanism of nitrification inhibitor on nitrogen-transformation bacteria in vegetable soil. *Acta Ecologica Sinica*, 32(21): 6803–6809 (in Chinese) [杨扬, 孟德龙, 秦红灵, 吴敏娜, 朱亦君, 魏学文. 2012. 硝化抑制剂对蔬菜土硝化和反硝化细菌的影响. 生态学报, 32(21): 6803–6809]

(责任编辑:王璇)