

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

燕平梅^{1*} 魏爱丽¹ 乔宏萍¹ 赵文婧¹ 曹塬程² 李园²

(1. 太原师范学院, 太原 030012; 2. 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100193)

摘要: 为探究威百亩对土壤反硝化作用的影响及作用机制, 采用理化分析和变性梯度凝胶电泳方法分析浓度 20、100 和 500 mg/kg 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。结果显示, 威百亩熏蒸处理 0、14 d 后, 500 mg/kg 浓度处理的土壤反硝化率为 84.64%、90.52%, 分别显著低于对照的 86.72% 和 91.87%, 100、20 mg/kg 浓度处理的土壤反硝化率与对照均无显著差异; 熏蒸处理 28、56 和 84 d 后, 4 个处理的土壤反硝化率均无显著差异。与对照相比, 3 个浓度威百亩熏蒸处理 0、14、28、56 和 84 d 后的土壤 *nirS* 型反硝化细菌群落的多样性指数和均匀度指数均差异不显著。除 56 d 外, 20 mg/kg 浓度熏蒸处理 0、14、28 和 84 d 的土壤细菌群落丰富度指数分别为 8.77、14.77、9.77 和 8.75, 均显著低于对照; 100 mg/kg 浓度熏蒸处理 0、14 和 28 d 后的土壤细菌群落丰富度指数分别为 10.76、6.77 和 10.78, 显著低于对照, 而处理 56、84 d 后, 土壤细菌群落丰富度指数与对照无显著差异。500 mg/kg 浓度威百亩熏蒸处理后, 土壤反硝化作用在熏蒸后 0~14 d 受到抑制, 28 d 后土壤反硝化作用自然恢复; 土壤细菌群落丰富度指数无论熏蒸初期或后期与均对照差异不显著。威百亩对土壤反硝化强度的影响与 *nirS* 型硝化细菌群落结构变化无关, 说明 *nirS* 型反硝化细菌在土壤反硝化作用中不起主要作用。

关键词: 威百亩; 土壤熏蒸剂; 反硝化作用; 变性梯度凝胶电泳

Influences of fumigation with metham-sodium on soil denitrification and *nirS* denitrifying bacterial community structure

Yan Pingmei^{1*} Wei Aili¹ Qiao Hongping¹ Zhao Wenjing¹ Cao Aocheng² Li Yuan²

(1. Taiyuan Normal University, Taiyuan 030012, Shanxi Province, China; 2. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: To explore the impact and mechanism of soil fumigants on soil denitrification, physicochemical analysis and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) were performed to investigate the effects of fumigant metham-sodium with different doses at 20, 100 and 500 mg/kg on soil denitrification and the structure of *nirS* bacteria community. The results showed that at 0 d and 14 d after the metham-sodium fumigation treatment, soil denitrification rate with the 500 mg/kg treatment was 84.64% and 90.52%, respectively, significantly lower than those of the control group (86.72% and 91.87%). Compared with the control group, soil denitrification rate with the 100 and 20 mg/kg treatment was not significantly different. At 28, 56, 84 d after fumigation treatment, there were no significant difference between the denitrification rates of four treatments. Compared with control group, the diversity indexes and evenness indexes of *nirS* bacteria at 0, 14, 28, 56 and 84 d after fumigation treatments with 20, 100 and

500 mg/kg were not significantly different. Except for 56 d, the bacterial community richness index at 0, 14, 28 and 84 d after 20 mg/kg fumigation were 8.77, 14.77, 9.77 and 8.75, respectively, which were significantly lower than those of the control group, the bacterial community richness index at 0, 14 and 28 d after 100 mg/kg fumigation were 10.76, 6.77 and 10.78, respectively, which were significantly lower than those of the control group, and there was no significant difference in the bacterial community richness index between the treated soil and the control group at 56 and 84 d after fumigation. The results showed that the denitrification was inhibited at 0–14 d after fumigation treatment with 500 mg/kg, and then the soil denitrification was restored at 28 d; the bacterial richness index with 500 mg/kg fumigation treatment had no significant difference in the early or the later periods from that of the control group. The metham-sodium effect on soil denitrification was independent with the changes of *nirS* bacterial community structure, and the *nirS* denitrifying bacteria did not play a major role in denitrification in soil.

Key words: metham-sodium; soil fumigant; denitrification; denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

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,土壤熏蒸是控制其危害的主要有效措施之一。溴甲烷是一种效果非常好的熏蒸剂,但由于对臭氧层有破坏作用,将被全球禁用,1,3-二氯丙烯、氯化苦、威百亩、棉隆、二甲基二硫等一些替代品不断被开发(Gilreath et al., 2005; Minuto et al., 2006)。

目前,1,3-二氯丙烯、氯化苦和二甲基二硫等溴甲烷替代熏蒸剂的研究主要集中在其对土壤反硝化作用的影响(Gilreath & Santos, 2004; Hanson et al., 2011),溴甲烷替代熏蒸剂——威百亩的研究主要集中在其对病虫害及线虫的防治效果等方面(赵云等, 2008; 卜东欣等, 2014; 王惟萍等, 2017),而关于威百亩熏蒸剂熏蒸处理土壤后非目标生物,尤其与氮循环相关的微生物是否受到明显影响的报道较少。反硝化作用是土壤氮循环的重要过程,土壤生物反硝化过程为 $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$,分别由硝酸盐还原酶(基因 *narG*)、亚硝酸盐还原酶(基因 *nirS*、*nirK*)、一氧化氮还原酶(基因 *norB*)、一氧化二氮还原酶(基因 *nosZ*)参与的催化过程。*nirS*基因编码的亚硝酸还原酶基因是反硝化细菌的重要酶(莫旭华等, 2009),并且 *nirS* 基因已用于多种生境下反硝化细菌群落结构的研究。本研究利用亚硝酸还原酶基因 *nirS* 分析土壤熏蒸剂威百亩对反硝化细菌群落结构的影响。变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)是通过聚丙烯酰胺凝胶中变性剂浓度梯度的不同将序列不同的DNA分开(Muyzer et al., 1993),自1993年Muyzer将DGGE技术引入到微生物生态学研究以来,DGGE已被广泛

应用于各种生态系统如淡水、土壤等微生物群落结构分析。由于自然界中只有极其少的微生物能够通过纯培养法培养(吕文洲, 2008),应用传统的微生物分离培养方法研究土壤中微生物种群构成会造成生物多样性丢失(赵柏霞等, 2015)。本试验采用聚合酶链反应的变性梯度凝胶电泳(polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE)技术测定土壤中反硝化细菌,以期更全面地反映熏蒸土壤中反硝化细菌的多样性。

为优选溴甲烷替代熏蒸剂,探究威百亩熏蒸对土壤反硝化细菌群落结构的影响,本研究以 *nirS* 基因为研究对象,采用PCR-DGGE技术,探究威百亩熏蒸剂对土壤反硝化细菌群落结构的影响,阐明熏蒸剂对土壤反硝化作用与反硝化细菌群落结构的关系,以期合理地选择环保型土壤熏蒸剂提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试土壤:本试验选取北京市通州区黄瓜大棚轮作3年以上的砂壤土,有机质、铵态氮、硝态氮、速效钾、有效磷含量分别为33.55、73.01、249.46、443.45和657.66 mg/kg, pH 6.86。

药剂及仪器:威百亩(metham-sodium)42%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、CTAB,北京天为时代科技有限公司;土壤DNA提取试剂盒、SYBR Green, MO Bio

Laboratories 公司;其它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 股份公司;D-Code TM DGGE 电泳仪、Gel Doc TM XR 凝胶成像系统,美国 Bio-Rad 公司;722N 分光光度计,上海精密仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 土壤熏蒸试验

2012 年在北京市通州区黄瓜大棚内进行试验,大棚面积约 2 000 m²,采用对角线五点法取土样,每点取约 10 g 土样,将其分别用 2 mm 目筛子过滤后混匀,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,共 4 个处理,即 20、100 和 500 mg/kg 三个浓度的威百亩熏蒸处理和 1 个未作任何处理(对照),每个处理重复 3 次,干燥器在加入药品后立即密封,在 25℃ 条件下密闭熏蒸 7 d 后敞气,敞气后置于 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,分别于恢复培养后 0、14、28、56、84 d 采用五点法取样,每个处理共取 5 g 土壤,每个处理重复 3 次,用于各参数的测定。

1.2.2 土壤样品中硝态氮、铵态氮的测定

铵态氮 NH₄-N、硝态氮 NO₃-N 的测定采用铵态氮和硝态氮的联合测定。用 2 mol/L KCl 浸提土壤,把吸附在土壤胶体上的 NH₄⁺ 及水溶性 NH₄⁺ 浸提出来。取一份浸出液在半微量定氮蒸馏器中加 MgO 蒸馏,MgO 是弱碱,能防止浸出液中酰胺有机氮水解。蒸出的氨用硼酸吸收,用标准酸溶液滴定,计算土壤中的 NH₄⁺-N 含量。土壤浸出液中加入 MgO 后,用 FeSO₄-Zn 将土壤浸出液中的 NO₃⁻ 和 NO₂⁻ 还原成氨气,还原出的氨气用硼酸吸收,用盐酸标准溶液滴定硼酸来测定 NO₃-N 含量(李振高等,2008)。

1.2.3 反硝化作用的测定和计算

土壤中加入一定量的硝酸盐,经厌氧培养后,用土壤 NO₃⁻ 的硝化率表示土壤的反硝化作用(李阜棣等,1996),NO₃⁻ 转化为氮素的百分率为反硝化率,反硝化率=土样培养后剩余的 NO₃-N/培养前的土壤 NO₃-N×100%。具体测定方法:称取过 2 mm 目筛的土壤 10~20 g,置于 25 或 50 mL 三角瓶中,加入 10% KNO₃ 溶液(土壤中 C/N 须小于 7),用 5 mL 蒸馏水溶解,使土表有薄的淹水层;将三角瓶置于真空干燥器中,抽真空,灌入氮气,如此反复多次,使干燥器内无氧;在干燥器底部放 100 mL 碱性焦性没食子酸用来吸收残余的氧,还原指示剂为美蓝。将干燥器置 25℃ 恒温温室培养,于 0、3 d 后取出土样,采用连续流动分析仪测定样品中剩余的 NO₃-N。

1.2.4 土壤样品中还原酶活性的测定

通过土壤反硝化反应前后 NO₃-N 含量差值得硝酸还原酶活性,土壤反硝化反应前后 NO₃-N 含量采用比色法测定(李振高等,2008)。亚硝酸还原酶活性测定采用分光光度法(孙军德等,2005)。

1.2.5 *nirS* 基因 PCR 扩增及基因序列的鉴定

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

nirS 基因 PCR 扩增:采用引物 Cd3aF-GC:5'-G-T(C/G)AACGT(C/G)AAGGA(A/G)AC(C/G)GG-3' 和 R3cd:5'-GA(C/G)TTCGG(A/G)TG(C/G)GTC-TTGA-3' 扩增土壤 *nirS* 基因(陈哲等,2009),引物均委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 反应体系:10×PCR 缓冲溶液(500 mmol/L Tris-HCl、pH 8.0、25 mmol/L MgCl₂)、1.25U *Taq* DNA 聚合酶、0.5 mmol/L 引物、0.25 mmol/L DNA,用无菌双蒸水补加到 50 μL。PCR 反应的循环条件:95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 1 min,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,30 次循环。PCR 扩增产物为 425 bp。取 20 μL PCR 产物进行 DGGE 分析,细菌变性剂梯度范围为 35%~50%,聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8%,变性剂为尿素 7 mol/L 和 40% 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 对凝胶进行染色。利用 Quantity One 软件分析样品电泳条带。

nirS 基因序列的鉴定和系统发育分析:测定每个阳性转化菌 *nirS* 基因序列,用 DNAMAN 4.0 软件去除两端的载体序列,用程序检测人工嵌合序列并剔除;用 BLAST 程序在 GenBank 中搜索相似序列,用 DNAMAN 4.0 软件进行相似序列比对,计算遗传距离并构建系统发育树。

1.2.6 *nirS* 型反硝化基因细菌群落结构分析

用香农多样性指数 H' 、均匀度指数 E 和丰富度指标 R 表示反硝化基因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 表示单一条带的峰面积, N 为所有峰的面积;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),这 3 个指标反映了群落类型、结构差异及群落演替的动态变化。

1.3 数据分析

采用 SPSS13.0 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 威百亩熏蒸剂对土壤反硝化作用的影响

威百亩熏蒸不同处理时间对土壤反硝化的影响不同。处理0 d后,对照处理土壤反硝化率为86.72%,20、100和500 mg/kg浓度威百亩处理的土壤反硝化率分别为85.23%、85.87%和84.64%,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14 d后,对照处理土壤反硝化率为91.87%,20、100和500 mg/kg浓度威百亩处理的土壤反硝化率分别为90.74%、89.76%和90.52%,后两者与对照差异显著($P < 0.05$)。熏蒸28、56、84 d后,4个处理的土壤反硝化率均无显著差异,表明500 mg/kg浓度威百亩熏蒸0~14 d后土壤反硝化作用受到抑制,28 d后土壤反硝化作用自然恢复(图1-A)。

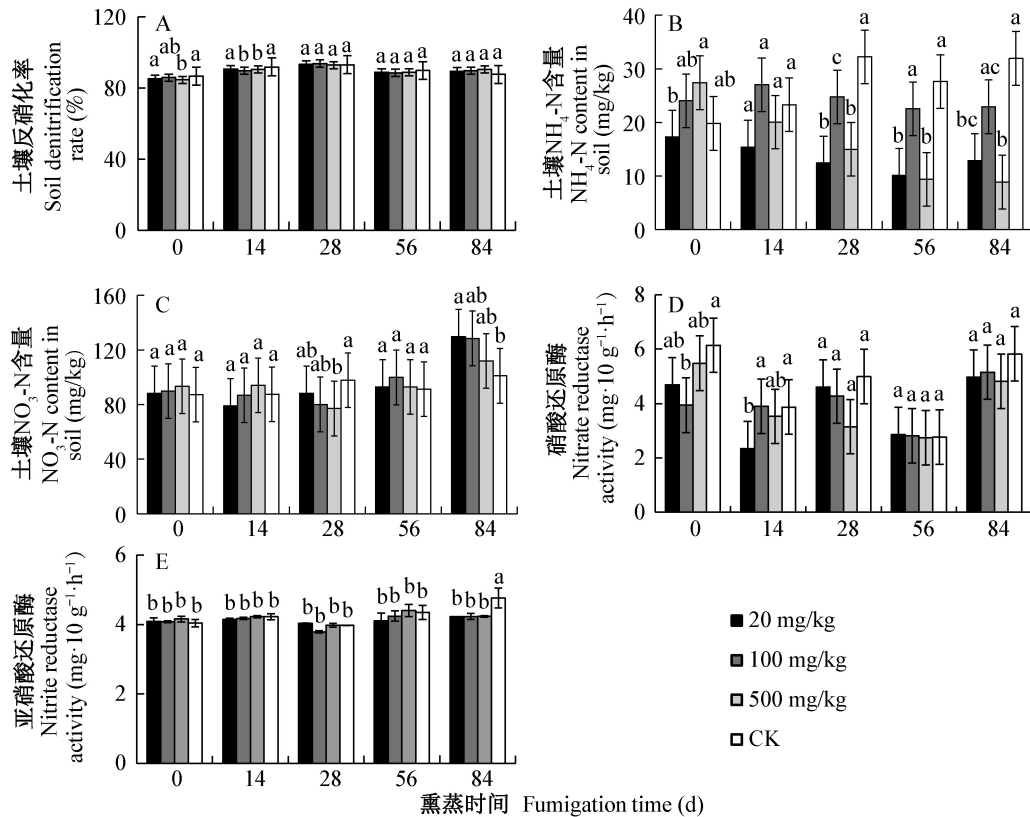


图1 不同浓度威百亩熏蒸处理对土壤反硝化作用(A)、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量(B)、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量(C)、硝酸还原酶(D)、亚硝酸还原酶(E)的影响

Fig. 1 Changes of soil denitrification (A), $\text{NH}_4\text{-N}$ (B), $\text{NO}_3\text{-N}$ (C), nitrate reductase activity (D), nitrite reductase activity (E) with different concentrations of metham-sodium fumigation

图中数据为平均数±标准差。同天不同字母表示经LSD法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters in the same day indicate significant difference at $P < 0.05$ level by LSD.

2.2 威百亩熏蒸剂对土壤 $\text{NH}_4\text{-N}/\text{NO}_3\text{-N}$ 的影响

威百亩熏蒸0 d后,500和20 mg/kg浓度处理的土壤 $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量分别为27.41、17.29 mg/kg,前者显著高于后者($P < 0.05$),100 mg/kg浓度威百亩处理的土壤 $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量为24.01 mg/kg,与对照无显著差异;熏蒸后14 d,威百亩3个浓度处理的土壤 $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量与对照无显著差异;熏蒸后28 d,100 mg/kg浓度威百亩处理的 $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量为24.74 mg/kg,显著低于对照(32.23 mg/kg, $P < 0.05$),56 d和84 d后,与对照差异不显著,熏蒸28、56、84 d后,20、500 mg/kg浓

度威百亩处理的土壤 $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量显著低于对照($P < 0.05$),而威百亩3个浓度处理在不同时间对土壤 $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量的影响表现不同。试验结果说明,威百亩熏蒸后土壤 $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量初期高于对照处理,28 d后低于对照处理且不同浓度之间影响不同(图1-B)。

熏蒸0、14、56 d后,4个处理土壤 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量之间均无显著差异;熏蒸28 d后,500、100、20 mg/kg浓度威百亩处理和对照土壤 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量分别为77.11、80.11、88.26和97.76 mg/kg,500 mg/kg浓度威百亩处理的土壤 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量显著低于对照($P < 0.05$),而

20、100 mg/kg 浓度威百亩处理的与对照差异不显著;熏蒸 84 d 后,100、500 mg/kg 浓度威百亩处理土壤 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量分别为 118.00 和 111.91 mg/kg,与对照的 101.09 mg/kg 无显著差异,而 20 mg/kg 浓度威百亩处理土壤 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量为 129.70 mg/kg,显著高于对照 ($P<0.05$)。表明威百亩熏蒸后初期土壤 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量与对照无显著差异,后期 20 mg/kg 浓度威百亩处理显著高于对照 ($P<0.05$),而 100、500 mg/kg 浓度威百亩处理与对照无显著差异(图 1-C)。

2.3 威百亩熏蒸剂对土壤还原酶活性的影响

威百亩熏蒸后,不同时间土壤硝酸还原酶的活性不同。熏蒸 0 d,500 mg/kg 浓度处理的土壤硝酸还原酶活性为 $5.48 \text{ mg} \cdot 10 \text{ g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,低于对照处理的 $6.14 \text{ mg} \cdot 10 \text{ g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$;熏蒸 14 d 后,20 mg/kg 浓度威百亩处理的土壤硝酸还原酶活性为 $2.34 \text{ mg} \cdot 10 \text{ g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,显著低于对照的 $3.86 \text{ mg} \cdot 10 \text{ g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ($P<0.05$)。熏蒸 28、56、84 d 后,4 个处理的土壤硝酸还原酶之间差异不显著。表明威百亩熏蒸后 0~14 d 土壤硝酸还原酶受到抑制,28 d 后威百亩 3 个浓度处理的土壤硝酸还原酶之间差异不显著,土壤硝酸还原酶自然恢复(图 1-D)。

威百亩熏蒸后,不同处理时间的土壤亚硝酸还原酶活性变化不大,4 个处理的土壤亚硝酸还原酶活性之间差异不显著;熏蒸 84 d 后浓度为 20、100、500 mg/kg 威百亩处理的土壤亚硝酸还原酶活性分别为 4.19 、 4.32 、 $4.22 \text{ mg} \cdot 10 \text{ g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,均显著低于对照

的 $4.76 \text{ mg} \cdot 10 \text{ g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ($P<0.05$)。表明土壤亚硝酸还原酶活性对威百亩熏蒸不敏感,熏蒸 84 d 后才对土壤亚硝酸还原酶活性表现抑制作用(图 1-E)。

2.4 *nirS* 型细菌的 DGGE 分析及系统发育树

不同泳道上有些相同的 DNA 条带,且其中有 1 条泳带在不同样品中迁移率一致,而这些共有的 DNA 条带信号强度不同。每个土壤样品的扩增产物均被明显区分为较多的 DNA 条带,不同处理之间的条带数目、迁移率差别很小(图 2)。回收不同处理的差异电泳条带,经鉴定均为 *Uncultured denitrifying bacterium*,条带 2 和条带 3 同源关系较近,条带 1 和条带 4 同源关系较近(图 3)。

2.5 土壤中 *nirS* 型反硝化细菌群落结构分析

与对照相比,3 个浓度威百亩熏蒸处理 0、14、28、56 和 84 d 后的土壤 *nirS* 型反硝化细菌群落多样性指数和均匀度指数均差异不显著,表明威百亩熏蒸不影响土壤 *nirS* 型反硝化细菌群落的均匀度和多样性。除 56 d 外,20 mg/kg 浓度威百亩熏蒸处理后 0、14、28 和 84 d 的土壤细菌群落丰富度指数分别为 8.77、14.77、9.77、8.75,均显著低于对照 ($P<0.05$),100 mg/kg 浓度威百亩熏蒸处理 0、14、28 d 后土壤细菌群落丰富度指数分别为 10.76、6.77、10.78,均显著低于对照 ($P<0.05$),处理 56 和 84 d 后与对照差异不显著。500 mg/kg 浓度威百亩熏蒸处理,无论熏蒸初期或后期的土壤细菌群落丰富度指数均与对照差异不显著(表 1)。

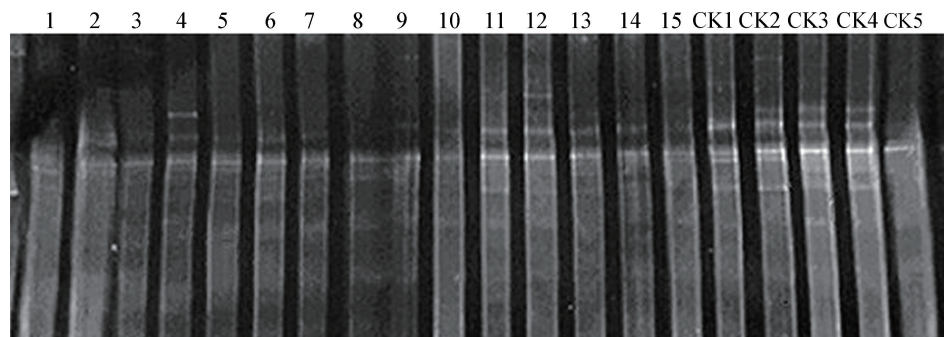


图2 威百亩熏蒸土壤中 *nirS* 型反硝化基因的 DGGE 图谱分析

Fig. 2 The results of DGGE for *nirS*-type denitrifying bacteria in the soil fumigated with metham-sodium

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~CK5: 无熏蒸剂处理 0、14、28、56、84 d 后的样品。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~CK5: samples at 0, 14, 28, 56, 84 d after treatment without fumigant.

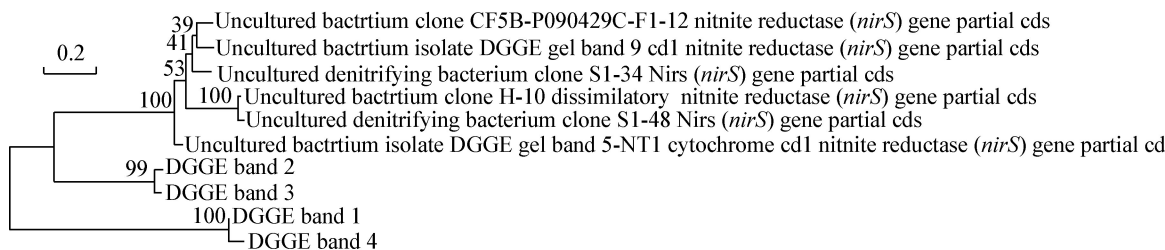


图3 基于遗传距离的威百亩熏蒸土壤中的 *nirS* 序列与其它已知 *nirS* 序列的系统发育树

Fig. 3 The phylogenetic tree of the *nirS* sequences of the soil fumigated with metham-sodium and other related *nirS* sequences based on genetic distance

DGGE band 1: 无熏蒸剂处理28 d后的样品; DGGE band 2: 20 mg/kg 威百亩熏蒸84 d后的样品; DGGE band 3: 100 mg/kg 威百亩熏蒸28 d后的样品; DGGE band 4: 100 mg/kg 威百亩熏蒸28 d后的样品。DGGE band 1: Sample at 28 d after treatment without fumigant; DGGE band 2: sample at 84 d after fumigation with 20 mg/kg metham-sodium; DGGE band 3: sample at 28 d after fumigation with 100 mg/kg metham-sodium; DGGE band 4: sample at 28 d after fumigation with 100 mg/kg metham-sodium.

表1 威百亩熏蒸土壤中 *nirS* 型反硝化细菌群落的生态指数

Table 1 The ecological indexes of *nirS*-type of denitrifying bacteria in the soil fumigated with metham-sodium

浓度 (mg/kg) Concentration	香农多样性指数 Shannon diversity index				
	0 d	14 d	28 d	56 d	84 d
20	0.89±0.02 a	1.13±0.03 a	0.83±0.01 a	1.24±0.01 a	0.94±0.02 a
100	1.02±0.71 a	0.67±0.04 a	0.92±0.12 a	1.07±0.67 a	1.02±0.54 a
500	1.22±0.83 a	1.01±0.06 a	1.01±0.05 a	0.93±0.03 a	0.99±0.08 a
对照 CK	1.14±0.33 a	1.22±0.04 a	1.03±0.04 a	0.91±0.06 a	0.90±0.26 a
浓度 (mg/kg) Concentration	均匀度指数 Evenness index				
	0 d	14 d	28 d	56 d	84 d
20	0.94±0.04 a	0.96±0.02 a	0.83±0.04 a	0.98±0.03 a	0.98±0.01 a
100	0.80±0.03 a	0.88±0.56 a	0.91±0.06 a	0.94±0.74 a	0.84±0.45 a
500	0.85±0.22 a	0.84±0.07 a	0.91±0.06 a	0.76±0.06 a	0.77±0.03 a
对照 CK	0.94±0.04 a	0.96±0.02 a	0.83±0.04 a	0.89±0.06 a	0.85±0.07 a
浓度 (mg/kg) Concentration	丰富度指数 Richness index				
	0 d	14 d	28 d	56 d	84 d
20	8.77±0.13 b	14.77±1.29 b	9.77±0.91 b	17.77±1.32 a	8.77±0.13 b
100	10.76±2.36 b	6.77±1.21 b	10.78±2.79 b	13.79±5.68 a	15.79±6.53 a
500	21.81±2.74 a	16.81±2.31 a	17.79±1.98 a	16.79±2.11 a	18.79±3.12 a
对照 CK	20.81±3.46 a	21.79±2.19 a	18.81±1.88 a	17.79±1.44 a	18.76±2.14 a

表中数据为平均数±标准差。同列不同字母表示经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.

3 讨论

关于熏蒸剂对土壤反硝化作用影响的研究报道结果不一。本研究结果表明土壤反硝化作用对威百亩熏蒸剂敏感,刚熏蒸处理后就抑制。Roux-michollet et al.(2008)报道溴甲烷熏蒸初期土壤反硝化作用被抑制,之后其慢慢恢复。颜冬冬(2013)报道氯化苦和棉隆熏蒸土壤能明显地促进土壤反硝化作用过程;而1,3-二氯丙烯、二甲基二硫与对照之间差异不显著。本研究结果显示威百亩熏蒸后期 NO_3^- -

N的含量高于对照,是因为威百亩熏蒸抑制了反硝化作用,导致反硝化过程 $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ 受阻,同时,因为威百亩抑制了硝酸还原酶和亚硝酸还原酶,土壤中 $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NH}_4^+$ 氮素转化过程也受到抑制,导致初产物 NO_3^- 的累积,进一步说明威百亩熏蒸抑制反硝化作用。Rovira & Simon(1985)采用氯化苦和溴甲烷熏蒸处理第15周后土壤中 NO_3^- -N含量较对照增加了2~7倍。Gasser & Peachey(1964)则发现溴甲烷和威百亩熏蒸处理后

能同时增加土壤 $\text{NH}_4\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3\text{-N}$ 的含量。本试验结果表明威百亩熏蒸土壤中的 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量高于对照土壤,可能是威百亩熏蒸对土壤反硝化作用抑制影响强于对硝化作用的影响,关于威百亩对土壤硝化作用的影响需要进一步深入研究。

本研究结果表明,威百亩熏蒸土壤的亚硝酸还原酶受到抑制,与威百亩抑制土壤反硝化作用时间相差大;而熏蒸对硝酸还原酶抑制作用表现在刚熏蒸,与反硝化作用受到抑制的时间一致,表明反硝化过程中硝酸还原酶的催化作用起主要作用,也就是硝酸还原酶是反硝化作用的限速酶,亚硝酸还原酶的作用次于硝酸还原酶 (Gregory et al., 2003; 颜冬冬, 2013)。本研究试图通过 *nirS* 型反硝化细菌群落多样性反应熏蒸剂影响反硝化作用的机理,而研究结果显示不同浓度威百亩熏蒸对土壤 *nirS* 型反硝化细菌群落多样性指数和均匀度指数无显著影响,说明威百亩对反硝化作用的影响与 *nirS* 型反硝化细菌群落变化无相关性,进一步说明反硝化过程中亚硝酸还原酶处于次要地位。土壤的生物反硝化过程中硝酸盐还原酶和亚硝酸盐还原酶参与土壤 $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NH}_4^+$ 的氮素转化过程。熏蒸处理能杀死土壤中大量微生物,使微生物中的酶失去活性,抑制土壤中氮素的生物转化过程,通过影响 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 转化进而引起其含量发生变化。Yamamoto et al. (2008) 研究结果表明,溴甲烷、氯化苦和蒸汽熏蒸处理后增加了土壤中 $\text{NH}_4\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量,但 Tanaka et al. (2003) 研究结果表明, $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量减少,其原因可能是作物对硝酸盐的吸收或硝酸盐的淋洗流失。此外 Rovira & Simon (1985) 采用氯化苦和溴甲烷熏蒸处理第 15 周后土壤中 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量较对照增加了 2~7 倍。Welsh et al. (1998) 在不同地块上采用溴甲烷和威百亩熏蒸处理后,其土壤中 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量存在较大差异。相反, Gasser & Peachey (1964) 研究结果显示溴甲烷和威百亩熏蒸处理能同时增加土壤中 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量。本研究结果显示威百亩熏蒸土壤中 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量高于对照土壤,可能是威百亩熏蒸对土壤反硝化作用的影响强于对硝化作用的影响,关于威百亩对土壤硝化作用的影响需要进一步深入研究。

参 考 文 献 (References)

Bu DX, Zhang C, Zhang X, Cong C, Wang JX. 2014. Effects of fumigant metham sodium on soil microbial population and enzyme activities. Chinese Agricultural Science Bulletin, 30(15): 227-

233 (in Chinese) [卜东欣, 张超, 张鑫, 丛聪, 王金信. 2014. 熏蒸剂威百亩对土壤微生物数量和酶活性的影响. 中国农学通报, 30(15): 227-233]

Chen Z, Chen CL, Qin HL, Wang X, Wu MN, Wei WX. 2009. Effect of fertilization on bacterial community, genetic diversity of *amoA* and *nosZ* genes in paddy soil. 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]

Gasser JKR, Peachey JE. 1964. A note on the effects of some soil sterilants on the mineralization and nitrification of soil nitrogen. Journal of the Science of Food and Agriculture, 15(3): 142-146

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 in combination with 1,3-dichloropropene plus chloropicrin for *Cyperus rotundus* control in tomato and pepper. Crop Protection, 23(3): 205-210

Gregory LG, Bond PL, Richardson DJ, Spiro S. 2003. Characterization of a nitrate-respiring bacterial community using the nitrate reductase gene (*narG*) as a functional marker. Microbiology, 149(1): 229-237

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

Li FL, Yu ZN, He SJ. 1996. Agricultural microbiology experiment technology. Beijing: China Agriculture Press, pp. 99-107 (in Chinese) [李阜棣, 喻子牛, 何绍江. 1996. 农业微生物学实验技术. 北京: 中国农业出版社, pp. 99-107]

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]

Li ZG, Luo YM, Teng Y. 2008. Soil and environmental microbiology research methods. Beijing: Science Press, pp. 78-89 (in Chinese) [李振高, 骆永明, 滕应. 2008. 土壤与环境微生物研究法. 北京: 科学出版社, pp. 78-89]

Lü WZ, Liu Y, Zhu JL. 2008. Analysis of yeast community in oil and wastewater treatment system by PCR-DGGE. Microbiology, 35(8): 1198-1202 (in Chinese) [吕文洲, 刘英, 朱建林. 2008. PCR-DGGE 用于油脂废水处理系统中酵母菌群落结构解析. 微生物学通报, 35(8): 1198-1202]

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

- Mo XH, Ma W, Shi RJ, Wang YF, Zhen J, Xu H. 2009. Diversity of *nirS*-type denitrifying bacteria under different nitrogen fertilizer management in wheat soil. *Acta Microbiologica Sinica*, 49(9): 1203–1208 (in Chinese) [莫旭华, 麻威, 史荣久, 王元芬, 郑佳, 徐慧. 2009. 氮肥对小麦田土壤 *nirS* 型反硝化细菌多样性的影响. *微生物学报*, 49(9): 1203–1208]
- Muyzer G, Waal EC, Utrtlinden AG. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3): 695–700
- Roux-michollet D, Czarnes S, Adam B, Berry D, Commeaux C, Guillaumaud N, Le Roux X, Clays-Josserand A. 2008. Effects of steam disinfestation on community structure, abundance and activity of heterotrophic, denitrifying and nitrifying bacteria in an organic farming soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 40(7): 1836–1845
- Rovira AD, Simon A. 1985. Growth, nutrition and yield of wheat in calcareous sandy loams of South Australia: effects of soil fumigation, fungicide, nematicide and nitrogen fertilizers. *Soil Biology and Biochemistry*, 17(3): 279–284
- 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]
- Tanaka S, Kobayashi T, Iwasaki K, Yamane S, Maeda K, Sakurai K. 2003. Properties and metabolic diversity of microbial communities in soils treated with steam sterilization compared with methyl bromide and chloropicrin fumigations. *Soil Science and Plant Nutrition*, 49(4): 603–610
- Wang WP, Shi YX, Zhao YJ, Xie XW, Chai AL, Li BJ. 2017. Effects of soil environment on the metam sodium fumigation against cucumber *Fusarium* wilt. *Journal of Plant Protection*, 44(1): 159–167 (in Chinese) [王惟萍, 石延霞, 赵一杰, 谢学文, 柴阿丽, 李宝聚. 2017. 土壤环境条件对威百亩熏蒸防治黄瓜枯萎病的影响. *植物保护学报*, 44(1): 159–167]
- Welsh CE, Guertal EA, Wood CW. 1998. Effects of soil fumigation and N source on soil inorganic N and tomato growth. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 52(1): 37–44
- Yamamoto T, Ultra VU, Tanaka S, Sakurai K, Iwasaki K. 2008. Effects of methyl bromide fumigation, chloropicrin fumigation and steam sterilization on soil nitrogen dynamics and microbial properties in a pot culture experiment. *Soil Science and Plant Nutrition*, 54(6): 886–894
- Yan DD. 2013. The impact of different fumigation on dissolved N composition and nitrous oxide emission in greenhouse soil and its microbiological mechanisms. Ph. D Thesis. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences (in Chinese) [颜冬冬. 2013. 熏蒸对设施栽培土壤中可溶性氮素和氧化亚氮的影响及其微生物学机制. 博士学位论文. 北京: 中国农业科学院]
- Zhao BX, Yan JF, Liu Q, Yu JC, Zhao XX. 2015. Analysis of bacterial community in rhizosphere soil of cucumber by 16S rDNA-PCR-DGGE. *China Vegetables*, 12: 33–37 (in Chinese) [赵柏霞, 闫建芳, 刘秋, 于基成, 赵秀香. 2015. 黄瓜根际土壤细菌群落的 16S rDNA-PCR-DGGE 分析. *中国蔬菜*, 12: 33–37]
- Zhao Y, Wang QX, Guo MX, Cao AC, Yang ML. 2008. Efficacy of killing nematodes in different temperature and combination with metam sodium. *Ecology and Environment*, 17(4): 1654–1656 (in Chinese) [赵云, 王秋霞, 郭美霞, 曹勘程, 杨美林. 2008. 不同温度与威百亩联合时对线虫的杀灭效果评价. *生态环境*, 17(4): 1654–1656]

(责任编辑:张俊芳)