

# 高寒草甸生态系统土壤微生物反硝化作用引起氮素损失的研究

杜伊光 李家藻 师治贤 杨涛

(中国科学院西北高原生物研究所)

## 摘 要

本文采用气相色谱法研究了高寒草甸生态系统中3种不同植被类型土壤的反硝化作用引起氮素损失的季节性变化和不同土壤层次间的差异。结果表明：矮嵩草草甸土壤反硝化作用的最高值为 $155.69\text{ng N}_2\text{O}-\text{N}/(\text{天}\cdot\text{克干土})$ ；杂类草草甸土壤的最高值为 $545.75\text{ng N}_2\text{O}-\text{N}/(\text{天}\cdot\text{克干土})$ ，金露梅灌丛土壤为 $180.17\text{ng N}_2\text{O}-\text{N}/(\text{天}\cdot\text{克干土})$ 。同时还测定了土壤中的 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 、 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 、 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 含量及其与土壤反硝化作用的关系。

**关键词：**气相色谱法；反硝化作用；土壤微生物

高寒草甸生态系统中的土壤微生物反硝化作用研究国内外尚未见报道。因此进行此项研究不仅是因为反硝化作用引起氮素损失是该生态系统中的一个重要参数，同时它与土壤肥力及畜牧业发展有着密切的关系。本文采用自制的土柱气体循环系统可使土壤结构保持不变，还可以模拟自然条件中的反硝化作用动态变化（刘晓达等，1992）。选择该生态系统中具有代表性的矮嵩草（*Kobresia humilis*）草甸、金露梅灌丛（*Potentilla fruticosa*）及退化的垂穗披碱草（*Elymus nutans*）人工草场为植被的3种土壤进行了反硝化作用引起氮素损失的季节性动态研究。

## 材料与方 法

### 1. 取 样

1989年4—10月，每月中旬取样于中国科学院海北高寒草甸生态系统定位站附近的草场。用土柱取样器在3种不同植被类型的土壤中按0—15厘米、15—30厘米、30—45厘米3个土层重复取样。取样后加塞密闭带回实验室处理。同时测定土样中的 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$ 含量。

## 2. 样品的反硝化强度的测定

将土柱进行抽气换气,以高纯氮气置换出土柱中的空气。采用乙炔阻断法 (Balderston, 等, 1976) 注入2%乙炔气体阻断土壤中的  $N_2O$  还原酶活性。37℃ 恒温培养24小时分析  $N_2O$  的释放量。同时选用混合风干土样加水,使水分达36%进行  $N_2O$  释放量的测定。 $N_2O$  释放量用气相色谱法测定。

## 3. 色谱分析条件

气相色谱仪用 Pye104 (英国、Pye-Unican 公司); 色谱柱为不锈钢柱, 2米×2毫米; 固定相 GDX-102; 载气, 高纯  $N_2$ , 流速60毫升/分; 气体定量管, 500微升; 检测器, 电子捕获检测器 (ECD); 温度, 350℃; 标准气体,  $N_2O$  含量99.5% (北京分析仪器厂); B-1蠕动泵 (上海环球物化仪器厂)。

## 4. 土壤中 $NH_4^+$ 、 $NO_3^-$ 和 $NO_2^-$ 含量测定

将土风干过筛, 采用氧化镁-代氏合金法 (布伦纳, 1981) 直接测定土壤中的  $NH_4^+-N$ ,  $NO_3^- - N$  和  $NO_2^- - N$  含量, 其蒸馏系统为瑞士产 BÜCHI 321。

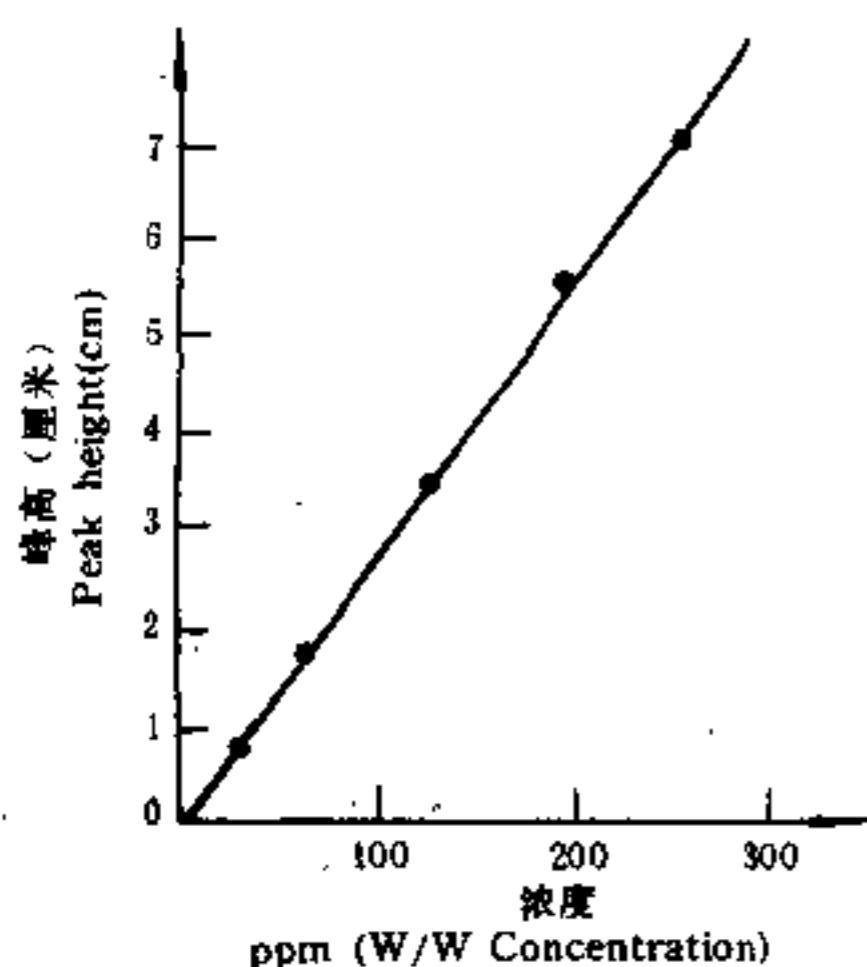


图1  $N_2O$  的标准曲线

Fig. 1 The standard Concentration Curve of  $N_2O$

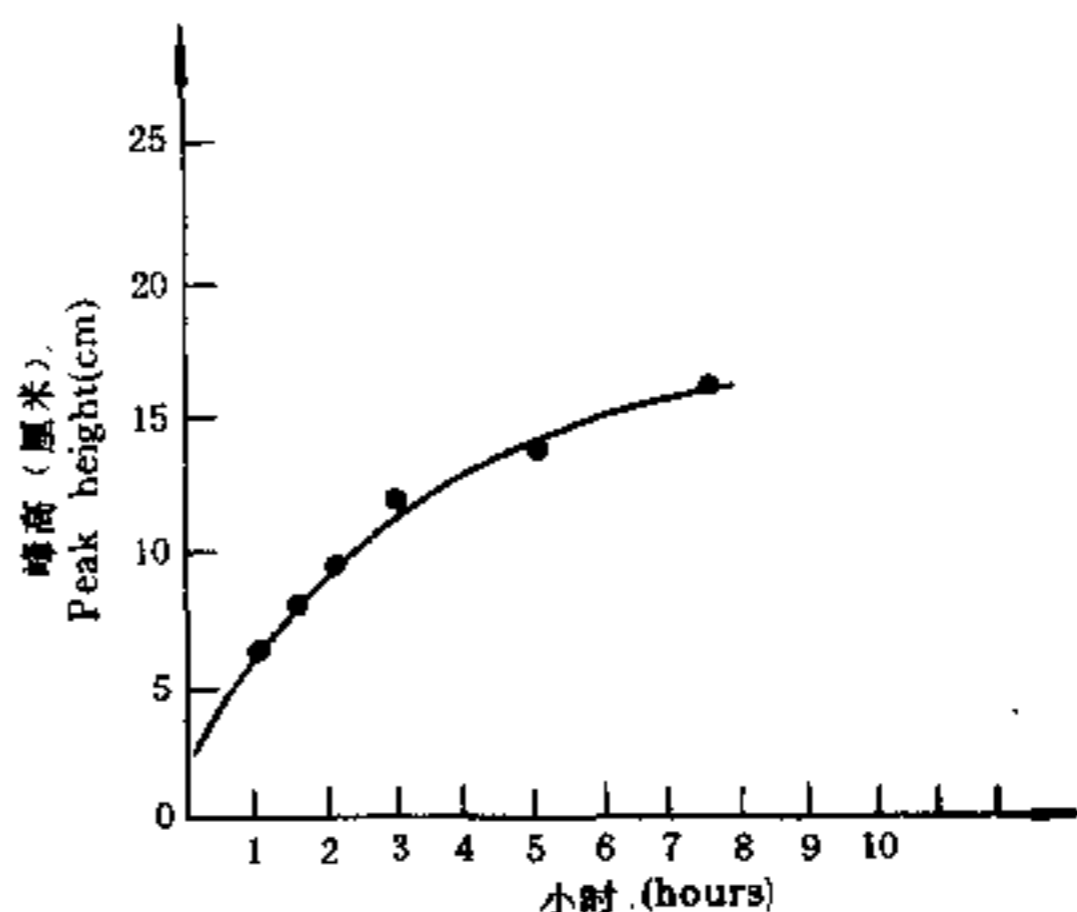


图2 恒温培养过程中的  $N_2O$  的释放

Fig. 2  $N_2O$  emissions from soil denitrification incubated at 37°C

## 5. 标准曲线的制作及反硝化作用强度计算

用外标法测定, 控制气体压力及注射一定量标准气体配制不同浓度的  $N_2O$  气体, 用  $N_2O$  的浓度与峰高绘制标准曲线如图1。

从标准曲线上的峰高 ( $H$ ) 对  $N_2O$  浓度 ( $C$ ) 得到的回归方程为

$$H = 0.02672C + 0.0127$$

$$C = \frac{H - 0.0127}{0.02672} \quad (1)$$

设土柱中  $N_2O$  产生的总量为  $M$

$$\text{即 } M = N_2O \text{ 浓度 } (C) \times \frac{V_{\text{总(土柱气体体积)}}}{22.4} \times M_w N_2 \quad (2)$$

$$N_2O - N \text{ 总量}(m) = M \times \frac{2N}{N_2O} \quad (3)$$

由 (1)、(2)、(3) 式得反硝化强度  $A = m/G$  (土壤干重)

$$\text{即 } A = 29.75 (H - 0.0127) V_{\text{总}}/G$$

## 结果与讨论

### 1. 恒温培养中土壤 $N_2O$ 释放速度

在培养过程中分别在不同时间取样测定  $N_2O$  绘图2。从图2中明显可看出培养初期  $N_2O$  释放速度较快,而在3小时后速度逐渐减慢,土壤中  $NO_3^-$  含量相对较高。但随反硝化作用中  $N_2O$  的不断产生,反硝化作用底物  $NO_3^-$  含量减少,速度又减慢,到24小时后曲线上升平稳。Smith 等(1979)认为土壤反硝化作用存在两个过程。厌氧培养1—3小时到达过程 I, 4—8小时到达过程 II。过程 I 中由于酶系统合成稳定,这样不受酶合成抑制剂氯霉素的影响,而过程 II 则受此影响。图2中过程 I, II 是否也存在这种现象还得进一步研究。Limmer (1982) 认为  $N_2O$  的释放速率在培养开始1—8小时内是直线上升,8小时后呈指数上升。与 Smith 等(1979)测定的结果也有差别。

### 2. 不同植被类型土壤 $N_2O$ 损失的季节性变化

从图3中看出,3种不同植被类型的土壤反硝化作用季节性变化各不相同,但均以土层15—30厘米最高,其次为30—45厘米和0—15厘米。除退化的垂穗披碱草人工草场外,4月下旬表层土壤的反硝化作用强度最高,9月下旬最低。虽然0—15厘米土壤中的微生物数量有机质含量较高,通气性较好,但通过同样抽换气处理后的氧气分压仍比15—30厘米和30—45厘米的土层高,表明0—15厘米土层中的反硝化作用底物  $NO_3^-$ 、 $NO_2^-$  及  $NH_4^+$  的含量与其反硝化作用无显著相关,氧气分压应是该层土壤反硝化作用的限制因子。由于高寒草甸寒冷季节较长,有机质分解缓慢,土壤养分消耗较少。经过冬季长时间的养分积累,4月份土壤中的  $NO_3^-$  含量相对高于其它月份。5月份月上旬牧草开始返青,植物根系不断吸收养分供生长发育而使土壤中的  $NO_3^-$  含量降低。因此恒温培养后,4月份出现反硝化作用强度同样比其它月份高。波动性的变化曲线主要受自然环境多种因素影响,特别是受植物生长的影响。Ryden (1983) 对草地土壤中反硝化作用强度的季节性测定也有类似的波动性变化曲线,土壤中的反硝化作用在夏季较低。Christensen (1985)、Klemedtsson 等(1987)、Beck 等(1987) 对此也有报道。

退化的垂穗披碱草人工草场由于杂类草大量入侵,土壤变得十分疏松,造成土壤肥

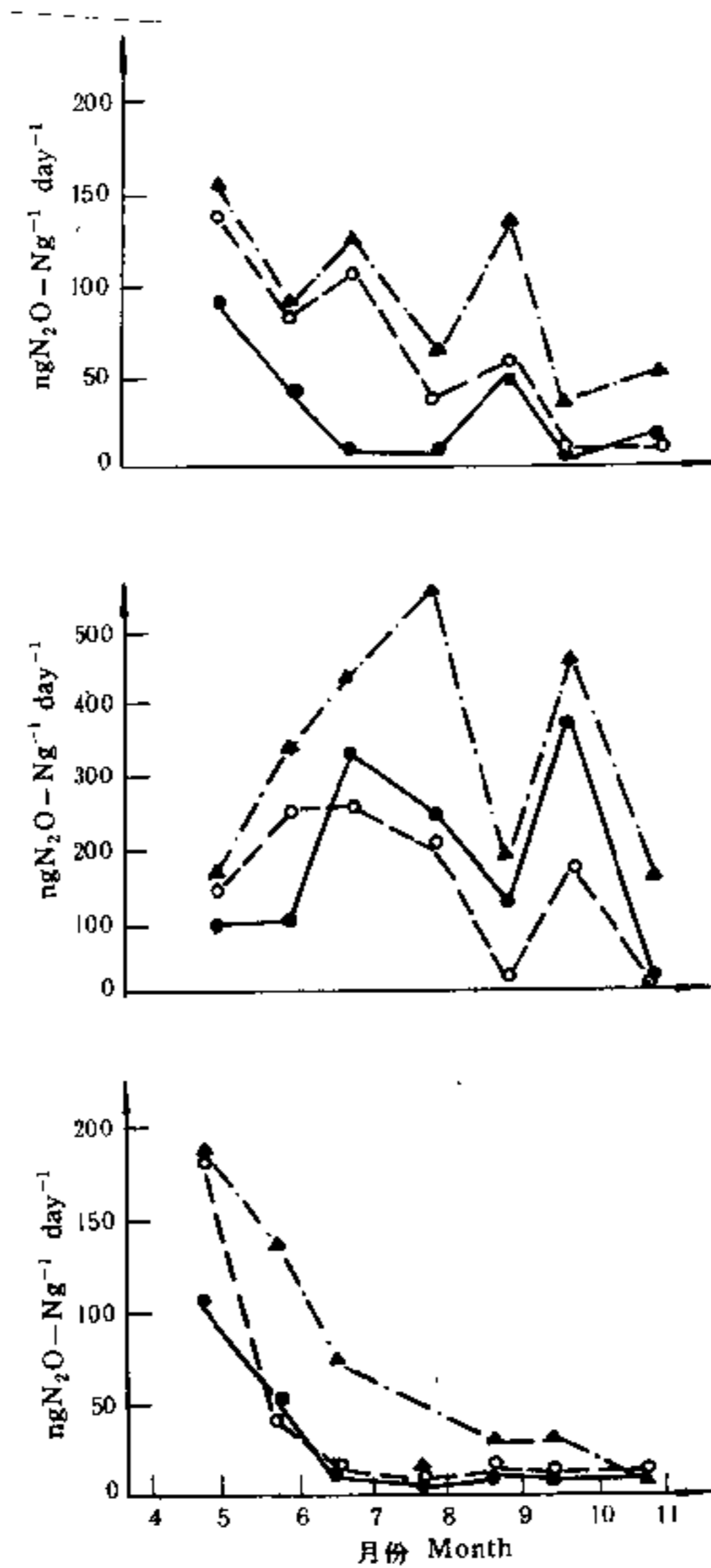


图3 海北高寒草甸不同植被土壤反硝化作用强度的季节性变化

Fig. 3 The seasonal variation of different vegetation soil denitrification activities in Haibei Alpine Meadow

力下降。入侵杂草主要为细叶亚菊 (*Ajania tenuifolia*), 它所产生的挥发油对垂穗披碱草的生长有抑制作用 (张宝琛等, 1989)。同时用挥发油及其组份中的樟脑精对土壤处理, 对照培养发现对土壤反硝化作用有明显促进作用, 经  $t$  检验差异极显著 ( $P < 0.001$ ,  $n = 6 - 1$ )。在生态系统土壤中产生的一些有毒物质对硝化菌、反硝化菌及  $N_2O$  的产生有着明

显的影响, 因此讨论该草场土壤的反硝化作用季节性变化动态时, 就不能忽略细叶亚菊分泌出挥发油的作用。从图3中可看出, 4月份开始, 土壤反硝化作用逐渐增强的过程也是气温逐渐升高, 植物从萌发幼苗生长到旺盛期的过程。当然细叶亚菊的分泌物——挥发油也随之增加, 从而影响土壤的反硝化作用。

### 3. 土壤中 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$ 和 $\text{NO}_2^-$ 含量与土壤 $\text{N}_2\text{O}$ 释放量的关系

用土壤中的  $\text{NH}_4^+-\text{N}$ 、 $\text{NO}_3^--\text{N}$  及  $\text{NO}_2^--\text{N}$  含量分别对应地与3种不同植被土壤中的反硝化作用强度进行简单线性与非线性回归分析, 见表1、表2。3种不同植被类型土壤中的  $\text{NH}_4^+-\text{N}$ 、 $\text{NO}_3^--\text{N}$  和  $\text{NO}_2^--\text{N}$  含量与0—15厘米土层的反硝化作用强度相关性不明显。因此, 氧分压应是一个反硝化作用的限制因子, 杂类草草甸土壤中的细叶亚菊植物就是一个主要影响因素。

表1  $\text{NH}_4^+-\text{N}$  含量与土壤反硝化作用回归分析

Table 1 The regression analysis concerning the content of  $\text{NH}_4^+-\text{N}$  in soil vs. denitrification

植被类型 Vegetation types	土壤层次(cm) Soil depth	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coeffic.	显著性检验 Significance test
矮蒿草草甸 <i>Kobresia humilis</i> meadow	30—45	$\hat{Y} = 74.0211x - 5.32$	0.8792	非常显著相关(n=7) Very significant correlation ( $r = 0.879 > r_{0.01} = 0.834$ )
金露梅灌丛 <i>Potentilla fruticosa</i> shrub	15—30	$\hat{Y} = 32.17x - 56.36$	0.9619	非常显著相关(n=6) Very significant correlation ( $r = 0.962 > r_{0.01} = 0.875$ )
	30—45	$\hat{Y} = 3.615e^{0.51x}$	0.9373	非常显著相关(n=6) Very significant correlation ( $r = 0.937 > r_{0.01} = 0.875$ )

在高寒草甸生态系统中, 影响土壤反硝化作用强度主要包括, 土壤  $\text{NO}_3^-$  含量, 土壤通气状况、pH 值、氧化还原电位等因素。由于恒温培养处理、气温对反硝化作用影响并不明显。但与降雨量等因素综合地对植物生长产生作用, 进而影响土壤的营养状况, 间接地作用于土壤微生物。Powlson 等(1988)研究了澳大利亚热带土壤及英国温带土壤中, 温度对反硝化作用的影响。发现英国温带土壤在10℃培养7天, 92%的  $\text{NO}_3^-$  被反硝化作用所消耗。而澳大利亚热带土壤同样被进行培养, 则91%的  $\text{NO}_3^-$  仍保留在土壤中, 在20℃以上才能进行反硝化作用。这说明不同类型土壤的反硝化细菌的生态适应性不同, 而高寒地区的反硝化细菌也是有适应性的生理特点。

表2 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 含量与土壤反硝化作用回归分析

Table 2 The regression analysis concerning the content of NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N and NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N vs. denitrification

植被类型 Vegetation types	土壤层次 (厘米) Soil depth (cm)	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coeffic.	显著性检验 Significance test
矮嵩草草甸 <i>Kobresia humilis</i> meadow	15—30	$\hat{Y}=40.71x+25.46$	0.8241	显著相关 (n=5) Significance correlation ( $r=0.829>r_{0.05}=0.8111$ )
	30—45	$\hat{Y}=76.88x-0.546$	0.8860	显著相关 (n=5) Significance correlation ( $r=0.886>r_{0.05}=0.8111$ )
杂类草草甸 Forbs meadow	30—45	$\frac{1}{\hat{Y}}=0.014/x$ -0.011	0.8494	显著相关 (n=5) Significance correlation ( $r=0.879>r_{0.05}=0.834$ )
金露梅灌丛 <i>Potentilla fruticosa</i> shrub	30—45	$\hat{Y}=0.5675e^{0.95x}$	0.9208	非常显著相关 (n=6) Very significant correlation ( $r=0.921>r_{0.01}=0.874$ )

### 参 考 文 献

- 刘晓达, 杜伊光, 师治贤, 1992, 海北高寒草甸土壤微生物反硝化气体损失的分析及应用. 高原生物学集刊, 第11集, 105—111. 科学出版社.
- 张宝琛, 白雪芳, 顾立华, 甄润德, 1989, 生化他感作用与高寒草甸人工草场自然退化现象的研究. 生态学报, 9 (2), 115—120.
- 布伦纳 (曹亚澄等译), 1981, 土壤氮素分析法, 36—94, 农业出版社.
- Balderston W L, Sherr B, Payne W J, 1976, Blockage by acetylene of nitrous oxide reduction in *Pseudomonas perfectomarinus* *Applied and Environmental Microbiology* 31: 504—508.
- Beck H, Christensen S, 1987, The effect of grass maturing and root decay on nitrous oxide production in soil *Plant and Soil* 103: 269—273.
- Christensen S, 1985, Denitrification in an acid soil: effects of slurry and potassium nitrate on the evolution of nitrous oxide and on nitrate-reducing bacteria *Soil Biol. Biochem.* 17 (6): 757—764.
- Klemedtsson L, Svensson B H, Rasswall T, 1987, Dinitrogen and nitrous produced by denitrification and nitrification in soil with and without barley plants *Plant and Soil* 99: 303—319.
- Limmer A W, Steele K W, Wilson A T, 1982, Direct field measurement of nitrogen and nitrogen oxide evolution from soil *J. Soil Sci.* 33: 499—507.
- Powilson D S, Saffigna P G, Monigue K C, 1985, Denitrification at Sub-optimal temperatures in soils from different climatic zones *Soil Biol. Biochem.* 20 (5): 719—723.
- Ryden J C, 1983, Denitrification loss from a grassland soil in the field receiving different rates of nitrogen as ammonium nitrate *J. Soil Sci.* 34 (2): 355—365.
- Smith M S, Tiedje J M, 1979, Phases of denitrification following oxygen depletion in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 11 (3): 261—267.

# STUDIES ON THE DENITRIFICATION OF SOIL MICROORGANISM CAUSED THE NITROGEN LOSS IN ALPINE MEADOW ECOSYSTEM

Du Yiguang Li Jiazao Shi Zhixian Yang Tao

(Northwest Plateau Institute of Biology, The Chinese Academy of Sciences)

## Abstract

The seasonal variation of the nitrogen loss caused the denitrification activities of soil microorganisms in three kinds different vegetation soil and the difference of different soil layers were determined by gas chromatography from April to October in 1989.

The result showed that the highest soil denitrification activities was 155.69 ng  $N_2O-N/g \cdot dry \cdot soil$  day in 15–30cm soil depth of *Kobresia humilis* meadow. It was 180.17ng  $N_2O-N/g \cdot dry \cdot soil \cdot day$  in 15–30cm soil depth of *Potentilla fruticosa* shrub and 545.75ng  $N_2O-N/g \cdot dry \cdot soil \cdot day$  in 15–30cm soil depth of degenerated artificial *Elymus nutans* grassland.

At the same time, the relation of the content of  $NO_3^-$ ,  $NH_4^+$ ,  $NO_2^-$  and it's denitrification activities of soil were also determined and discussed.

**Key words:** Gas chromatography; Denitrification activities; Soil microorganism

