



申卫收<sup>1</sup> 杨思琪<sup>1</sup> 张欢欢<sup>2</sup> 李庆<sup>1</sup> 王铭科<sup>1</sup> 潘钰璟<sup>1</sup> 徐德红<sup>1</sup> 高南<sup>2</sup>

## 四株植物根际促生菌对农田土壤 N<sub>2</sub>O 排放的影响

### 摘要

农田土壤是温室气体氧化亚氮(N<sub>2</sub>O)最重要的人为排放源之一。本文以四株植物根际促生菌:白色芽孢杆菌 *Bacillus albus* Lv5A、枯草芽孢杆菌枯草亚种 *Bacillus subtilis* sp. *subtilis* NRCB002、施氏假单胞菌 *Pseudomonas stutzeri* NRCB010 和暹罗芽孢杆菌 *Bacillus siamensis* NRCB026 为研究对象,采用温室盆栽试验、土壤微宇宙试验及田间原位试验等方法,探究接种植物根际促生菌对农田土壤 N<sub>2</sub>O 排放的影响。结果表明,在温室盆栽条件下,接种四株植物根际促生菌的土壤 N<sub>2</sub>O 累积排放量从高到低依次为 NRCB002 > Lv5A > NRCB026 > NRCB010,与未接种的对照相比分别减少了 2.3%、33.1%、34.2%和 40.0%。选择 NRCB010 和 NRCB026 菌株进一步开展土壤微宇宙试验和田间原位试验。与未接种的对照相比,在土壤微宇宙条件下接种 NRCB010 和 NRCB026 的土壤 N<sub>2</sub>O 累积排放量分别减少了 21%和 48%;在田间原位条件下,接种 NRCB010 和 NRCB026 的土壤 N<sub>2</sub>O 累积排放量分别减少了 44%和 73%。总之,接种植物根际促生菌 NRCB010 和 NRCB026 能有效减少农田土壤 N<sub>2</sub>O 的排放。研究结果将为减少农田土壤 N<sub>2</sub>O 排放提供重要科学依据,也将为发展具有促生和减排效应的生物肥料提供实际指导。

### 关键词

农业碳中和;氧化亚氮(N<sub>2</sub>O);植物根际促生菌;温室气体减排

中图分类号 X511

文献标志码 A

收稿日期 2022-01-09

资助项目 国家自然科学基金(31972503,41771291);江苏省大学生创新创业训练计划(XJDC202110300203)

### 作者简介

申卫收,男,博士,教授,研究方向为土壤氮循环关键微生物过程、农牧业氨气与氧化亚氮排放控制机理、农牧废弃物资源化。wssh@nuist.edu.cn

高南(通信作者),女,博士,副教授,研究方向为新型肥料。ngao@njtech.edu.cn

### 0 引言

氧化亚氮(N<sub>2</sub>O)是一种重要的温室气体,它在大气中滞留时间较长,不但会产生温室效应,还会破坏臭氧层<sup>[1-3]</sup>。虽然 N<sub>2</sub>O 在大气中以痕量浓度存在,但是其在 100 年尺度上的增温潜势约为 CO<sub>2</sub> 的 265 倍<sup>[4]</sup>。在过去的 100 年中,N<sub>2</sub>O 对温室效应的贡献已经超过 5%,全球的 N<sub>2</sub>O 排放速率约为 11 Tg·a<sup>-1</sup><sup>[4]</sup>。农田土壤是全球人为活动产生 N<sub>2</sub>O 的最主要排放源,其排放占全球 N<sub>2</sub>O 排放总量的 25%~39%<sup>[5-7]</sup>。我国作为一个农业大国,农田土壤生态系统中 N<sub>2</sub>O 的排放问题不容忽视。

土壤微生物是影响农田土壤 N<sub>2</sub>O 产生和消耗的关键生物因素。土壤中 N<sub>2</sub>O 的产生途径较为复杂多样,包括土壤硝化、反硝化、硝态氮异化还原成铵(DNRA)作用以及硝化微生物的反硝化过程等,其中硝化作用与反硝化作用是农田土壤 N<sub>2</sub>O 产生的主要途径<sup>[8-10]</sup>。硝化作用是在好氧环境中微生物将氨氧化成 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>或 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>或者氧化态氮的过程<sup>[11]</sup>。常见的反硝化作用是一种 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>异化还原过程或 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>呼吸作用,是在缺氧条件下,微生物将 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>或 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>还原为气态的 NO、N<sub>2</sub>O 或者 N<sub>2</sub>,是活性氮以 N<sub>2</sub> 的形态循环、返回到大气的主要生物过程<sup>[12-14]</sup>。诸多因素影响农田土壤微生物硝化和反硝化过程,进而改变气体生成速率,并通过影响土壤中 N<sub>2</sub>O 扩散与还原速率而改变土壤 N<sub>2</sub>O 向大气中的排放量。

目前,减排农田土壤 N<sub>2</sub>O 的方法主要有施肥管理(含施肥时间与方式、施肥量、施肥类型等)、使用硝化抑制剂、科学耕作、添加生物炭、接种具有 N<sub>2</sub>O 减排效应的微生物等<sup>[15-16]</sup>。其中,接种具有 N<sub>2</sub>O 减排效应微生物的 N<sub>2</sub>O 减排技术刚刚兴起。植物根际促生菌,又称 PGPR,能有效提高作物的抗逆性,抑制病原菌、降低染病率、改善作物的营养状况,从而提高作物的产量<sup>[17]</sup>。具有 N<sub>2</sub>O 减排效应的植物根际促生菌在减排农田土壤 N<sub>2</sub>O 的同时,还可以增加作物产量,对减少化学氮肥用量及氮的环境负效应具有重要实际意义<sup>[18]</sup>。例如,Itakura 等<sup>[19]</sup>研究发现,在纯培养体系和大豆蛭石盆栽试验体系中,接种含有 *nosZ* 的大豆根瘤菌(*Bradyrhizobium*)可以有效减少土壤 N<sub>2</sub>O 的排放;

1 南京信息工程大学 环境科学与工程学院/江苏省大气环境监测与污染控制高新技术重点实验室/大气环境与装备技术协同创新中心,南京,210044

2 南京工业大学 生物与制药工程学院/国家生化工程技术研究中心,南京,211816

Gao 等<sup>[16]</sup>通过温室盆栽试验和土壤微宇宙培养试验发现,接种具有 N<sub>2</sub>O 还原功能的固氮螺菌属 (*Azospirillum sp.*) 和草螺菌属 (*Herbaspirillum sp.*) 的微生物到牧草地土壤,不仅可以减少土壤 N<sub>2</sub>O 的排放,同时还能促进红花苜蓿和梯牧草的生长。

本研究以四株植物根际促生菌为研究对象,采用温室盆栽试验、土壤微宇宙试验及田间原位试验等方法,探究接种植物根际促生菌对农田土壤 N<sub>2</sub>O 排放的影响,为农田土壤温室气体减排和农业碳中和提供实际指导。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试菌株

供试用的植物根际促生菌菌株分离自广东省惠州市和江苏省无锡市宜兴市淹水水稻土,这些菌株对多种农作物具有促生效应,保藏在中国普通微生物菌种保藏中心(表 1)。开展盆栽试验和土壤微宇宙试验时,将菌株接种到改良的营养肉汤培养基(牛肉浸粉 3.0 g/L、多聚蛋白胨 5.0 g·L<sup>-1</sup>、硝酸钠 0.3 mmol·L<sup>-1</sup>和琥珀酸钠 4.4 mmol·L<sup>-1</sup>,溶剂为蒸馏水,简称 NBNS 培养基)中,置于 28 °C 摇床中在 180 r·min<sup>-1</sup>振荡培养约 24 h,用无菌的 NBNS 液体培养基调节菌液浓度至 OD<sub>600 nm</sub> 约为 1.0 备用。进行田间原位试验时,按照上述菌剂制备方法提前准备菌剂,施肥当天在每个试验小区中将菌液和水充分稀释后均匀施入田间。

### 1.2 温室盆栽试验

温室盆栽试验供试土壤采自江苏省无锡市宜兴市蔬菜地耕作层,土壤类型为黏质砂壤土,前茬作物

为青菜。宜兴市地处江苏省西南端、太湖东岸,位于长三角中心地带,气候为亚热带湿润季风气候,四季分明、雨热同季。蔬菜地主要种植菠菜、青菜、番茄、黄瓜等。土壤采集后,自然风干,过 2 mm 筛,室温保存待用。供试土壤的理化性质如表 2 所示。

培养钵装土量(风干土)为 750 g/盆,有机肥施用量为 0.4 g·kg<sup>-1</sup>,化肥(N、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>和 K<sub>2</sub>O)的质量比为 15:15:15)施用量为 0.12 g·kg<sup>-1</sup>。番茄种子用无菌水浸泡 10 min,接着用 2% 次氯酸钠溶液表面消毒 5 min,然后用无菌水连续冲洗 8~10 次,再用无菌水浸泡 30 min,然后再次用无菌水冲洗 2~3 次,最后用无菌滤纸吸去番茄种子表面水分。将种子播撒到土壤表面,随后将 30 mL OD<sub>600 nm</sub> 约为 1.0 的细菌悬浮液(10<sup>7</sup>~10<sup>8</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>)接种于盆栽土壤中,未接种的对照浇灌等量的细菌液体培养基。每个处理重复 4 次。水肥管理按照常规管理进行。试验处理和所用植物根际促生菌的信息如表 1 所示。

### 1.3 土壤微宇宙试验

土壤微宇宙试验供试土壤采自江苏省南京市六合区水稻田耕作层土壤,土壤类型为马肝土或水耕人为土(Stagnic Anthrosols),种植制度为稻麦轮作,前茬作物为水稻。江苏省南京市六合区位于滁河支流皂河上游。该地区属于亚热带湿润季风气候,气候温和、四季分明,土壤类型以马肝土、岗黄土、黄白土为主。土壤采集后,自然风干,过 2 mm 筛,室温保存待用。供试土壤的理化性质见表 2。

土壤微宇宙试验不栽培任何植物,其他步骤同 1.2。试验所用植物根际促生菌的信息如表 1 所示。

表 1 供试用植物根际促生菌菌株

Table 1 Candidate strains of plant rhizosphere growth-promoting bacteria tested in this study

| 菌株名称缩写  | 供试菌株   | CGMCC 登记编号 | 菌株来源    | 盆栽试验 | 土壤微宇宙试验/田间试验 |
|---------|--|------------|---------|------|--------------|
| Lv5A    | 白色芽孢杆菌 <i>Bacillus albus</i> Lv5A                        | 21616      | 江苏宜兴水稻土 | 有    | 无            |
| NRCB002 | 枯草芽孢杆菌枯草亚种 <i>Bacillus subtilis sp. subtilis</i> NRCB002 | 17213      | 江苏宜兴水稻土 | 有    | 无            |
| NRCB010 | 施氏假单胞菌 <i>Pseudomonas stutzeri</i> NRCB010               | 19067      | 江苏宜兴水稻土 | 有    | 有            |
| NRCB026 | 暹罗芽孢杆菌 <i>Bacillus siamensis</i> NRCB026                 | 22841      | 广东惠州水稻土 | 有    | 有            |

表 2 供试土壤理化性质

Table 2 Physicochemical properties of the tested soils

| 土壤来源 | pH<br>(水土比 1:2.5) | 电导率/<br>(μs·cm <sup>-1</sup> ) | 全 N/<br>(g·kg <sup>-1</sup> ) | 全 C/<br>(g·kg <sup>-1</sup> ) | 碳氮比  | 有效磷/<br>(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 速效钾/<br>(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 用途             |
|------|-------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------|--------------------------------|--------------------------------|----------------|
| 江苏宜兴 | 7.7               | 140.5                          | 0.87                          | 38.0                          | 43.6 | 68.2                           | 271.2                          | 温室盆栽试验         |
| 江苏六合 | 5.9               | 114.9                          | 1.68                          | 25.4                          | 15.1 | 32.0                           | 108.0                          | 土壤微宇宙试验、田间原位试验 |

#### 1.4 田间原位试验

试验地位于江苏省南京市六合区(32°34'27"N, 118°41'23"E),为土壤微宇宙试验的土壤样品采集地点.土壤类型为马肝土,耕作制度为稻麦轮作,前茬作物为水稻,土壤理化性质如表2所示.

田间原位试验为无作物的小区试验,于2020年12月—2021年1月进行.田间原位试验处理的分布为随机区组设计,共3个处理,每个处理3个小区,每个小区4 m<sup>2</sup>,共9个小区.处理1(CK):施用复合肥(N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O 15-15-15)3 kg/亩+NBNS液体培养基;处理2(NRCB010):施用复合肥(N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O 15-15-15)3 kg/亩+NRCB010菌液;处理3(NRCB026):施用复合肥(N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O 15-15-15)3 kg/亩+NRCB026菌液.菌液制备见1.1,每个小区菌液用量350 mL,用水稀释至2 000 mL后,均匀地喷施在土壤表面.

#### 1.5 样品采集与分析

采用“静态箱-气相色谱法”进行气体样品采集与分析测定工作.采集温室盆栽试验和土壤微宇宙试验的气体样品时,将培养钵放置在气样采集容器内,于0、15和30 min时各采集1次气体样品;在每次取样时测量气体采集容器内部的温度.在温室盆栽试验播种后的2、4、5、6、7、9、11、13、16、19、23 d采集气样,测定N<sub>2</sub>O通量;在土壤微宇宙试验接种后的2、5、7、9、12、15、18 d采集气样,测定N<sub>2</sub>O通量.田间原位试验的采气箱由不透光的PVC材质制成,箱体尺寸为50 cm×50 cm×60 cm.箱体顶部安装温度计用于测定箱体内部的空气温度,侧面设置采样口,并做密闭处理.底座尺寸为60 cm×60 cm×30 cm,采样前将底座下部埋入土中,保持水平,底座上部有凹槽.采样时,将采样箱放置在底座上,在底座与采气箱的交接处加水实现液封,使水没过交接处的缝隙,以保证采气环境整体的密闭性.在采气箱放置完成后的第0、15、30 min进行气体样品采集,并记录对应采气时的箱体温度.

采集的气体样品使用带有电子捕获检测器的气相色谱仪(Agilent 7890B)进行测量.气相色谱仪的相关参数:前检测器为火焰离子化检测器(FID),可测定CH<sub>4</sub>含量,工作温度250℃,高纯H<sub>2</sub>流量为60 mL·min<sup>-1</sup>,高纯空气流量为400 mL·min<sup>-1</sup>;后检测器为微池电子捕获检测器(ECD),可测定N<sub>2</sub>O含量,工作温度为300℃,含5%甲烷的氩气流量为2 mL·min<sup>-1</sup>.测量完成后,通过计算3个时间点N<sub>2</sub>O浓度的

斜率,得到温室盆栽试验和土壤微宇宙试验的N<sub>2</sub>O通量;进一步计算N<sub>2</sub>O累积排放量.利用以下公式<sup>[20]</sup>计算田间原位试验的土壤N<sub>2</sub>O排放通量:

$$F = \rho \times h \times \frac{\Delta c}{\Delta t} \times \frac{273}{273 + T}$$

其中: $F$ 为N<sub>2</sub>O排放通量( $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ); $\rho$ 为N<sub>2</sub>O标准状态下的密度; $h$ 为取样箱高度(m); $\frac{\Delta c}{\Delta t}$ 表示N<sub>2</sub>O的排放速率( $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ); $T$ 为采样箱内温度(℃).

温室盆栽试验在播种12 d和24 d测量番茄的株高和茎粗,采集番茄地上部样品,称量植株鲜重和干重.

#### 1.6 数据分析

所有试验数据用Excel 2010和Origin 2021软件进行处理和绘图,采用IBM SPSS Statistics软件对不同试验处理进行单因素方差分析和LSD显著性检验,不同处理间统计差异显著性( $P < 0.05$ )用不同的小写字母表示.

## 2 结果与分析

### 2.1 植物根际促生菌对番茄幼苗生长的影响

在温室盆栽条件下,接种四株植物根际促生菌相对于未接种对照均不同程度地促进了番茄的生长(图1).例如,在处理12 d时,与不接种植物根际促生菌的对照相比,接种菌株Lv5A、NRCB002、NRCB010和NRCB026对番茄幼苗的株高、茎粗、叶长和地上部干重均无显著影响.然而,在处理24 d时,与不接种植物根际促生菌的对照相比,接种Lv5A显著增加番茄幼苗的茎粗,茎粗增加了250%;显著减少番茄幼苗的叶长.接种NRCB002显著增加番茄幼苗的茎粗,增加了132%;显著增加了番茄幼苗地上部干重,增加了105%.接种NRCB010显著增加了番茄幼苗地上部干重,增加了31%.NRCB026对番茄幼苗的株高、茎粗、叶长和地上部干重均无显著影响.

### 2.2 温室盆栽条件下,植物根际促生菌对土壤N<sub>2</sub>O排放特征的影响

在温室盆栽条件下,接种四株植物根际促生菌相对于未接种对照土壤N<sub>2</sub>O排放特征各不相同(图2).在温室盆栽试验中,一共监测到2次主要的土壤N<sub>2</sub>O排放峰.第1次土壤N<sub>2</sub>O排放峰出现在施肥后2 d时,未接种对照处理的土壤N<sub>2</sub>O排放达到最大峰值为0.83  $\mu\text{g}(\text{N})\cdot\text{kg}(\text{土})^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ,之后所有处理的

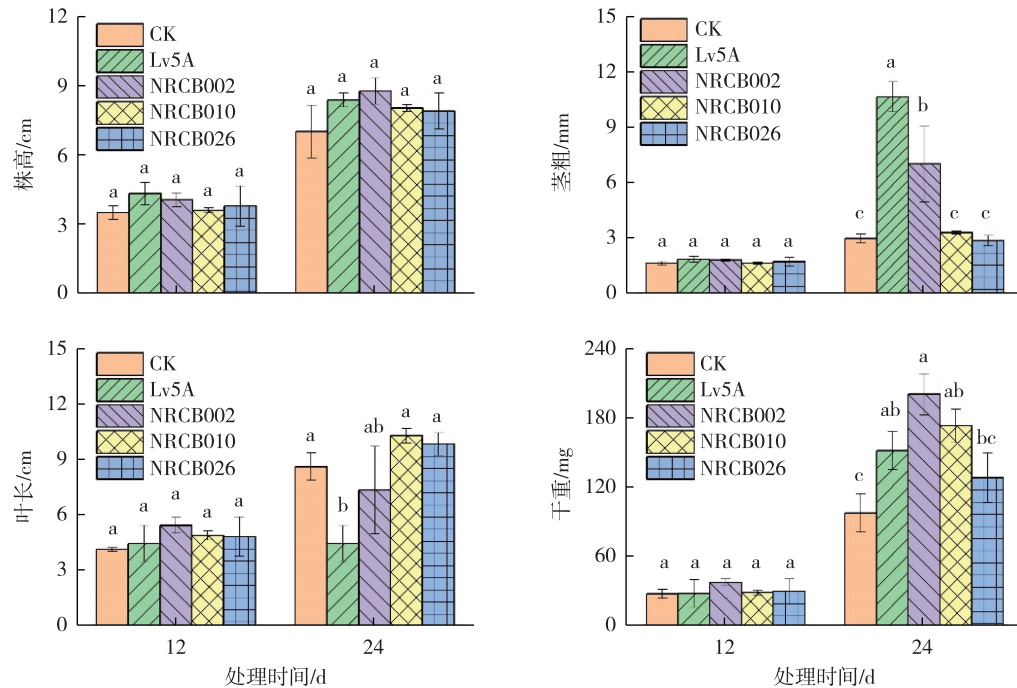


图1 植物根际促生菌对番茄幼苗生长的影响

Fig. 1 Effects of plant rhizosphere-promoting bacteria on the growth of tomato seedling

$N_2O$  排放量呈现一定的下降趋势;在施肥 9 d 后,土壤  $N_2O$  排放量逐渐上升,至第 11 d 达到第 2 次峰值.与未接种对照处理相比,在达到第 2 次峰值时,NRCB010 和 NRCB026 处理的土壤  $N_2O$  排放量明显降低,其中 NRCB026 处理的  $N_2O$  排放量峰值最低,为  $0.11 \mu g(N) \cdot kg(\text{土})^{-1} \cdot h^{-1}$ ;而 Lv5A 和 NRCB002 处理的土壤  $N_2O$  排放量增多,其中 NRCB002 处理的土壤  $N_2O$  排放量峰值最高,为  $0.69 \mu g(N) \cdot kg$

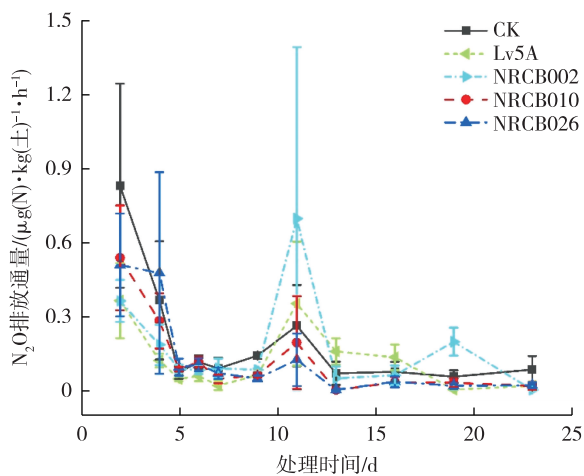


图2 植物根际促生菌对温室盆栽试验土壤  $N_2O$  排放通量的影响

Fig. 2 Effects of plant rhizosphere-promoting bacteria on soil  $N_2O$  flux in greenhouse pots

$(\text{土})^{-1} \cdot h^{-1}$ . 试验处理 13 d 后,所有处理的  $N_2O$  排放通量趋于平稳.

温室盆栽试验的番茄土壤  $N_2O$  累积排放量如表 3 所示.各处理的土壤  $N_2O$  累积排放量从高到低依次为  $CK > NRCB002 > Lv5A > NRCB026 > NRCB010$ .其中,Lv5A、NRCB010 和 NRCB026 处理的土壤  $N_2O$  累积排放量比未接种对照减少了 30% 以上.选取土壤  $N_2O$  减排效应较为明显的菌株 NRCB010 和 NRCB026 用于土壤微宇宙试验和田间原位试验.

### 2.3 土壤微宇宙条件下,植物根际促生菌对土壤 $N_2O$ 排放特征的影响

在土壤微宇宙条件下,接种 NRCB010 和 NRCB026 均减少了土壤  $N_2O$  排放通量(图 3).土壤  $N_2O$  排放峰出现在施肥后 9 d 时,未接种对照处理的土壤  $N_2O$  排放达到最大峰值为  $21.66 \mu g(N) \cdot kg(\text{土})^{-1} \cdot h^{-1}$ ,NRCB010 和 NRCB026 处理的土壤  $N_2O$  排放峰值呈现下降趋势,其中 NRCB026 处理的土壤  $N_2O$  排放峰值下降尤为明显. $N_2O$  峰值出现后,所有处理的土壤  $N_2O$  排放通量趋于平稳,接近背景浓度.

在土壤微宇宙条件下,接种 NRCB010 和 NRCB026 均减少了土壤  $N_2O$  累积排放量(表 3).各个处理的土壤  $N_2O$  累积排放量从高到低依次为  $CK > NRCB010 > NRCB026$ .NRCB026 和 NRCB010 处理

表 3 植物根际促生菌对土壤 N<sub>2</sub>O 累积排放量的影响Table 3 Effects of plant rhizosphere-promoting bacteria on cumulative N<sub>2</sub>O emissions from soils in greenhouse pots, soil microcosms, and field plots

| 处理      | 温室盆栽试验   |             | 土壤微宇宙试验  |             | 田间原位试验  |             |
|---------|--|-------------|--|-------------|---|-------------|
|         | 累积排放量/<br>( $\mu\text{g}(\text{N}) \cdot \text{kg}(\text{土})^{-1}$ ) | 变化百分比/<br>% | 累积排放量/<br>( $\mu\text{g}(\text{N}) \cdot \text{kg}(\text{土})^{-1}$ ) | 变化百分比/<br>% | 累积排放量/<br>( $\text{g}(\text{N}) \cdot \text{hm}^{-2}$ ) | 变化百分比/<br>% |
| CK      | 83.53±27.07 <sup>a</sup>   |             | 2 805±1 067 <sup>a</sup>   |             | 79.45±66.94 <sup>a</sup>                                |             |
| Lv5A    | 55.90±13.88 <sup>a</sup>   | -33         |  |             |   |             |
| NRCB002 | 81.62±42.29 <sup>a</sup>   | -2          |  |             |   |             |
| NRCB010 | 50.25±19.65 <sup>a</sup>   | -40         | 2 217±463 <sup>a</sup>   | -21         | 44.67±32.52 <sup>ab</sup>                               | -44         |
| NRCB026 | 54.99±28.09 <sup>a</sup>   | -34         | 1 453±331 <sup>a</sup>   | -48         | 21.76±12.96 <sup>b</sup>                                | -73         |

注:同一列标注不同字母表示处理间差异显著( $P < 0.05$ ).

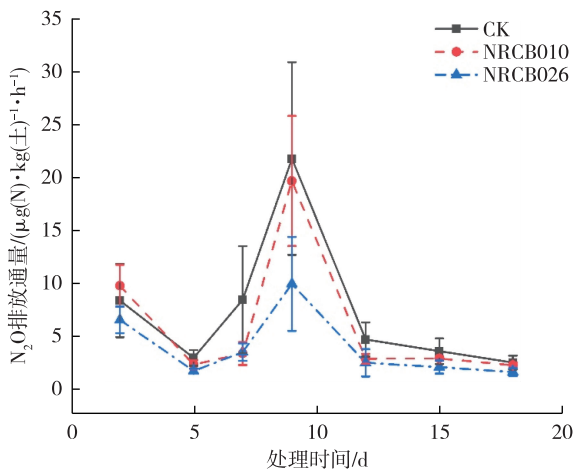


图 3 植物根际促生菌对微宇宙试验土壤 N<sub>2</sub>O 排放通量的影响

Fig. 3 Effects of plant rhizosphere-promoting bacteria on soil N<sub>2</sub>O flux in soil microcosms

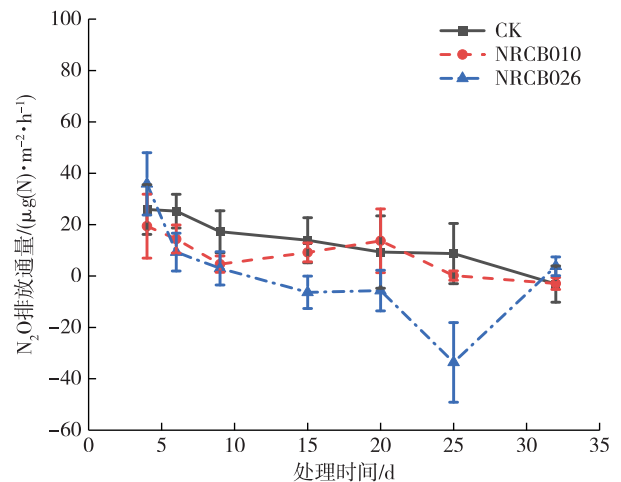


图 4 植物根际促生菌对田间小区试验土壤 N<sub>2</sub>O 排放通量的影响

Fig. 4 Effects of plant rhizosphere-promoting bacteria on soil N<sub>2</sub>O flux in field plots

的土壤 N<sub>2</sub>O 累积排放量比未接种对照分别减少了 21% 和 48%.

#### 2.4 田间原位条件下,植物根际促生菌对土壤 N<sub>2</sub>O 排放特征的影响

在田间原位条件下, NRCB026 和 NRCB010 处理的土壤 N<sub>2</sub>O 排放通量下降,以 NRCB026 更为明显(图 4).在观测期内,所有处理的土壤 N<sub>2</sub>O 排放通量均比较平稳,未观测到明显的土壤 N<sub>2</sub>O 脉冲峰. NRCB026 处理在施肥后第 20 d 的 N<sub>2</sub>O 排放通量下降为负值.

NRCB026 和 NRCB010 处理的土壤 N<sub>2</sub>O 累积排放量也明显降低(表 3).各个处理的土壤 N<sub>2</sub>O 累积排放量从高到低依次为 CK > NRCB010 > NRCB026. NRCB026 和 NRCB010 处理的土壤 N<sub>2</sub>O 累积排放量比未接种对照分别减少了 44% 和 73%.与未接种对

照相比, NRCB026 处理的土壤 N<sub>2</sub>O 累积减排量达到显著水平( $P < 0.05$ ).

### 3 讨论

农田土壤是温室气体 N<sub>2</sub>O 的重要排放源,目前关于农田 N<sub>2</sub>O 的减排措施多数是通过改进肥料的用量、类型以及农业管理措施等实现<sup>[21-29]</sup>.最新的研究表明,在土壤、肥料或者植物根际接种具有 N<sub>2</sub>O 减排效应的微生物可以减少 N<sub>2</sub>O 的排放<sup>[30-32]</sup>.例如,在大豆根部接种根瘤菌可以通过 N<sub>2</sub>O 还原酶(N<sub>2</sub>OR)将 N<sub>2</sub>O 还原为 N<sub>2</sub>,从而减少大豆田土壤的 N<sub>2</sub>O 排放<sup>[19]</sup>.通过接种具有 N<sub>2</sub>O 还原功能的固氮细菌到牧草地土壤,在减少土壤 N<sub>2</sub>O 排放的同时还能促进红花苜蓿和梯牧草的生长<sup>[16]</sup>.本研究采用温室盆栽试验、土壤微宇宙试验及田间原位试验等方法,发现接

种植物根际促生菌 NRCB010 和 NRCB026 能有效减少农田土壤  $N_2O$  的排放(图 2、3、4,表 3)。

农田土壤  $N_2O$  排放受  $N_2O$  产生过程和还原过程综合作用的影响,由多样的微生物群落通过硝化、反硝化和异化硝酸盐还原为铵等多种途径共同决定.利用微生物减少  $N_2O$  排放主要分为直接途径和间接途径.直接途径是指接种具有编码  $N_2OR$  的 *nosZ* 基因的  $N_2O$  还原微生物,进而直接增加  $N_2O$  还原微生物的丰度,从而促进  $N_2O$  还原成  $N_2$ ,减少土壤  $N_2O$  的排放.在本研究中,菌株 NRCB010 和 Lv5A 均含有 *nosZ* 基因,它们均有较好的农田土壤  $N_2O$  减排的效果(图 2,表 3),其中 NRCB010 的减排效果略优于 Lv5A.间接途径是指使用的植物根际促生菌并没有 *nosZ* 基因,即菌株不具备直接还原  $N_2O$  的能力,但却能间接通过改变  $N_2O$  还原微生物的群落丰度和组成,实现  $N_2O$  减排的效果<sup>[33]</sup>.在本研究中,NRCB002 和 NRCB026 均不含有 *nosZ* 基因,NRCB026 具有较好的农田土壤  $N_2O$  减排的效果,而未检测到 NRCB002 减少农田土壤  $N_2O$  排放的效应(图 2、3、4,表 3).这些结果意味着不同菌种对农田土壤  $N_2O$  减排潜力明显不同,也为筛选高效菌株、发展具有促生和减排效应的生物肥料指明了方向。

农田土壤  $N_2O$  排放还受土壤类型、作物和温度等因素影响.在本研究中,以江苏宜兴的蔬菜土为供试土壤的番茄温室盆栽试验中,减排效果最好的菌株为 NRCB010(表 3),而在土壤微宇宙和田间原位试验中的供试土壤为江苏六合的水稻田土壤,减排效果最好的菌株为 NRCB026.这些结果说明应用植物根际促生菌减少农田土壤  $N_2O$  排放同样可能受到供试土壤类型及作物的影响.在土壤微宇宙和田间原位试验中的供试土壤同为江苏六合的水稻土,但是在土壤微宇宙试验时培养温度恒定,而在田间原位试验中的温度为自然温度,NRCB026 和 NRCB010 对同种土壤的  $N_2O$  累积排放量的削减程度也不同(表 3).这些结果也说明应用植物根际促生菌减少农田土壤  $N_2O$  排放同样可能受到温度条件的影响.在实际田间应用时,应充分考虑土壤类型、作物种类和环境条件等因素,选用的具有促生和减排效应的微生物须与土壤-作物-环境相适宜,最大程度地发挥促生减排效应、提升菌剂或生物肥料的农学和生态环境效益。

## 4 结论

采用温室盆栽试验、土壤微宇宙试验及田间原

位试验等方法,探究植物根际促生菌对农田土壤  $N_2O$  排放的影响.在温室盆栽条件下,接种四株植物根际促生菌的土壤  $N_2O$  累积排放量从高到低依次为枯草芽孢杆菌枯草亚种 NRCB002、白色芽孢杆菌 Lv5A、暹罗芽孢杆菌 NRCB026、施氏假单胞菌 NRCB010,与未接种对照相比分别减少了 2.3%、33.1%、34.2% 和 40.0%.在微宇宙条件下,接种 NRCB010 和 NRCB026 相对于未接种对照土壤  $N_2O$  累积排放量分别减少了 21% 和 48%.在田间原位条件下,接种 NRCB010 和 NRCB026 相对于未接种对照土壤  $N_2O$  累积排放量分别减少了 44% 和 73%.总之,NRCB010 和 NRCB026 能有效减少农田土壤  $N_2O$  的排放,研究结果将为减少农田土壤  $N_2O$  排放提供重要科学依据,也将为发展具有促生和减排效应的生物肥料提供实际指导.NRCB010 和 NRCB026 减少农田土壤  $N_2O$  排放的机制还需要进一步研究。

## 参考文献

### References

- [ 1 ] Ravishankara A R, Daniel J S, Portmann R W. Nitrous oxide ( $N_2O$ ): the dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century [ J ]. Science, 2009, 326 ( 5949 ): 123-125
- [ 2 ] Volk C M, Elkins J W, Fahey D W, et al. Evaluation of source gas lifetimes from stratospheric observations [ J ]. Journal of Geophysical Research: Atmospheres, 1997, 102 ( D21 ): 25543-25564
- [ 3 ] Prather M J, Hsu J, DeLuca N M, et al. Measuring and modeling the lifetime of nitrous oxide including its variability [ J ]. Journal of Geophysical Research: Atmospheres, 2015, 120 ( 11 ): 5693-5705
- [ 4 ] Flato G, Marotzke J, Abiodun B, et al. Evaluation of climate models [ R ] // IPCC. Climate change 2013: the physical science basis. Cambridge, UK, and New York, USA: Cambridge University Press, 2013
- [ 5 ] Alexandratos N, Bruinsma J. World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision [ R ]. ESA Working Papers 288998, 2012
- [ 6 ] Tilman D, Balzer C, Befort H. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture [ J ]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108 ( 50 ): 20260-20264
- [ 7 ] Kanter D, Alcamo J, Sutton M, et al. Drawing down  $N_2O$  to protect climate and the ozone layer: a UNEP synthesis report [ R ]. United Nations Environment Programme ( UNEP ), 2013
- [ 8 ] Sullivan M J, Gates A J, Appia-Ayme C, et al. Copper control of bacterial nitrous oxide emission and its impact on vitamin B12-dependent metabolism [ J ]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110 ( 49 ): 19926-19931

- [ 9 ] Butterbach-Bahl K, Baggs E M, Dannenmann M, et al. Nitrous oxide emissions from soils: how well do we understand the processes and their controls? [ J ]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences, 2013, 368 ( 1621 ): 20130122
- [ 10 ] Baggs E M. Soil microbial sources of nitrous oxide: recent advances in knowledge, emerging challenges and future direction [ J ]. Current Opinion in Environmental Sustainability, 2011, 3 ( 5 ): 321-327
- [ 11 ] 蔡延江, 丁维新, 项剑. 土壤 N<sub>2</sub>O 和 NO 产生机制研究进展 [ J ]. 土壤, 2012, 44 ( 5 ): 712-718  
 CAI Yanjiang, DING Weixin, XIANG Jian. Mechanisms of nitrous oxide and nitric oxide production in soils [ J ]. Soils, 2012, 44 ( 5 ): 712-718
- [ 12 ] Groffman P M, Tedjje J M, Robertson G P, et al. Denitrification at different temporal and geographical scales: proximal and distal controls [ M ] // Wilson J R. Advances in Nitrogen Cycling in Agriculture Ecosystems. Wallingford, UK: CAB International, 1988: 174-192
- [ 13 ] 邹国元, 张福锁. 根际反硝化作用与 N<sub>2</sub>O 释放 [ J ]. 中国农业大学学报, 2002, 7 ( 1 ): 77-82  
 ZOU Guoyuan, ZHANG Fusuo. Rhizosphere denitrification and N<sub>2</sub>O release [ J ]. Journal of China Agricultural University, 2002, 7 ( 1 ): 77-82
- [ 14 ] Nicholas M, Baggs E M, Peter D, et al. Production of NO, N<sub>2</sub>O and N<sub>2</sub> by extracted soil bacteria, regulation by NO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> concentrations [ J ]. FEMS Microbiology Ecology, 2008, 65 ( 1 ): 102-112
- [ 15 ] Wang S W, Shan J, Xia Y Q, et al. Different effects of biochar and a nitrification inhibitor application on paddy soil denitrification: a field experiment over two consecutive rice-growing seasons [ J ]. Science of the Total Environment, 2017, 593/594: 347-356
- [ 16 ] Gao N, Shen W S, Kakuta H, et al. Inoculation with nitrous oxide (N<sub>2</sub>O)-reducing denitrifier strains simultaneously mitigates N<sub>2</sub>O emission from pasture soil and promotes growth of pasture plants [ J ]. Soil Biology and Biochemistry, 2016, 97: 83-91
- [ 17 ] 黄文茂, 詹永发, 王欢, 等. PGPR 菌剂对辣椒的促生效应及根际土壤细菌的响应研究 [ J ]. 中国土壤与肥料, 2020 ( 5 ): 152-160  
 HUANG Wenmao, ZHAN Yongfa, WANG Huan, et al. Study on the growth promotion effect of PGPR microbial agent on pepper and the response of rhizosphere soil bacteria [ J ]. Soils and Fertilizer Sciences in China, 2020 ( 5 ): 152-160
- [ 18 ] Wu S H, Zhuang G Q, Bai Z H, et al. Mitigation of nitrous oxide emissions from acidic soils by *Bacillus amyloliquefaciens*, a plant growth - promoting bacterium [ J ]. Global Change Biology, 2018, 24 ( 6 ): 2352-2365
- [ 19 ] Itakura M, Uchida Y, Akiyama H, et al. Mitigation of nitrous oxide emissions from soils by *Bradyrhizobium japonicum* inoculation [ J ]. Nature Climate Change, 2013, 3 ( 3 ): 208-212
- [ 20 ] Ding W X, Yu H Y, Cai Z C. Impact of urease and nitrification inhibitors on nitrous oxide emissions from fluvo-aquic soil in the North China Plain [ J ]. Biology and Fertility of Soils, 2011, 47 ( 1 ): 91-99
- [ 21 ] Hou H J, Peng S Z, Xu J Z, et al. Seasonal variations of CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O emissions in response to water management of paddy fields located in Southeast China [ J ]. Chemosphere, 2012, 89 ( 7 ): 884-892
- [ 22 ] 姚志生, 郑循华, 周再兴, 等. 太湖地区冬小麦田与蔬菜地 N<sub>2</sub>O 排放对比观测研究 [ J ]. 气候与环境研究, 2006, 11 ( 6 ): 691-701  
 YAO Zhisheng, ZHENG Xunhua, ZHOU Zaixing, et al. Comparative observation of N<sub>2</sub>O emissions from winter wheat fields and vegetable fields in Taihu Lake region [ J ]. Climate and Environmental Research, 2006, 11 ( 6 ): 691-701
- [ 23 ] 王保君, 顾泽海, 陈兵林, 等. 稻秆还田方式对稻麦轮作农田 CH<sub>4</sub> 和 N<sub>2</sub>O 排放的影响 [ J ]. 南京农业大学学报, 2017, 40 ( 3 ): 367-375  
 WANG Baojun, GU Zehai, CHEN Binglin, et al. Effects of rice straw returning methods on CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O emissions from rice-wheat rotation farmland [ J ]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2017, 40 ( 3 ): 367-375
- [ 24 ] Hu N J, Wang B J, Gu Z H, et al. Effects of different straw returning modes on greenhouse gas emissions and crop yields in a rice-wheat rotation system [ J ]. Agriculture Ecosystems & Environment, 2016, 223: 115-122
- [ 25 ] 赵颖, 张金波, 蔡祖聪. 添加硝化抑制剂、秸秆及生物炭对亚热带农田土壤 N<sub>2</sub>O 排放的影响 [ J ]. 农业环境科学学报, 2018, 37 ( 5 ): 1023-1034  
 ZHAO Ying, ZHANG Jinbo, CAI Zucong. Effects of adding nitrification inhibitor, straw and biochar on N<sub>2</sub>O emission from subtropical farmland soil [ J ]. Journal of Agro-Environment Science, 2018, 37 ( 5 ): 1023-1034
- [ 26 ] 张岳芳, 陈留根, 王子臣, 等. 耕作方式对太湖地区冬小麦生长季 N<sub>2</sub>O 排放的影响 [ J ]. 生态环境学报, 2011, 20 ( 8 ): 1326-1331  
 ZHANG Yuefang, CHEN Liugen, WANG Zichen, et al. Effects of farming methods on N<sub>2</sub>O emissions in winter wheat growing season in Taihu Lake region [ J ]. Ecology and Environmental Sciences, 2011, 20 ( 8 ): 1326-1331
- [ 27 ] 徐华, 邢光熹, 蔡祖聪, 等. 土壤水分状况和质地对稻田 N<sub>2</sub>O 排放的影响 [ J ]. 土壤学报, 2000, 37 ( 4 ): 499-505  
 XU Hua, XING Guangxi, CAI Zucong, et al. Effect of soil water regime and soil texture on N<sub>2</sub>O emission from rice paddy field [ J ]. Acta Pedologica Sinica, 2000, 37 ( 4 ): 499-505
- [ 28 ] 王改玲, 陈德立, 李勇. 土壤温度、水分和 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 浓度对土壤硝化反应速度及 N<sub>2</sub>O 排放的影响 [ J ]. 中国生态农业学报, 2010, 18 ( 1 ): 1-6  
 WANG Gailing, CHEN Deli, LI Yong. The influence of soil temperature, moisture and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N concentration on soil nitrification reaction rate and N<sub>2</sub>O emission [ J ]. Journal of Eco-Agriculture in China, 2010, 18 ( 1 ): 1-6
- [ 29 ] 焦燕, 黄耀, 宗良纲, 等. 氮肥水平对不同土壤 N<sub>2</sub>O 排放的影响 [ J ]. 环境科学, 2008, 29 ( 8 ): 2094-2098  
 JIAO Yan, HUANG Yao, ZONG Lianggang, et al. Effects of nitrogen fertilizer levels on N<sub>2</sub>O emissions from different soils [ J ]. Chinese Journal of Environmental Science, 2008, 29 ( 8 ): 2094-2098

- [30] Shahab S,Ahmed N,Khan N S.Indole acetic acid production and enhanced plant growth promotion by indigenous PSBs [ J ]. African Journal of Agricultural Research, 2009,4(11):1312-1316
- [31] Govindarajan M,Balandreau J,Kwon S W, et al.Effects of inoculation of burkholderia wietnamensis and related endophytic diazotrophic bacteria on grain yield of rice [ J ]. Microbial Ecology,2008,55(1):21-37
- [32] Nishizawa T,Quan A H,Kai A, et al.Inoculation with  $N_2$ -generating denitrifier strains mitigates  $N_2O$  emission from agricultural soil fertilized with poultry manure [ J ]. Biology & Fertility of Soils,2014,50(6):1001-1007
- [33] Xu S J,Feng S G,Sun H S, et al.Linking  $N_2O$  emissions from biofertilizer-amended soil of tea plantations to the abundance and structure of  $N_2O$ -reducing microbial communities [ J ]. Environmental Science and Technology, 2018,52(19):11338-11345

## Effects of four plant growth-promoting rhizo bacteria on $N_2O$ emission from farmland soil

SHEN Weishou<sup>1</sup> YANG Siqu<sup>1</sup> ZHANG Huanhuan<sup>2</sup> LI Qing<sup>1</sup>

WANG Mingke<sup>1</sup> PAN Yujing<sup>1</sup> XU Dehong<sup>1</sup> GAO Nan<sup>2</sup>

1 School of Environmental Science and Engineering/Jiangsu Key Laboratory of Atmospheric Environment Monitoring & Pollution Control/Collaborative Innovation Center of Atmospheric Environment and Equipment Technology,Nanjing University of Information Science & Technology,Nanjing 210044

2 College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering/National Engineering Research Center for Biotechnology,Nanjing Tech University,Nanjing 211816

**Abstract** Farmland soil is one of the most important anthropogenic sources of nitrous oxide ( $N_2O$ ). In this paper, four plant growth-promoting rhizo bacteria were used as the candidate strains, namely *Bacillus albus* Lv5A, *Bacillus subtilis sp. subtilis* NRCB002, *Pseudomonas stutzeri* NRCB010, and *Bacillus siamensis* NRCB026. The greenhouse pot experiment, soil microcosm experiment, and field plot experiment were established to explore the effect of these growth-promoting rhizo bacteria on  $N_2O$  emission from farmland soil. The results showed that cumulative  $N_2O$  emissions from tested soils were  $NRCB002 > Lv5A > NRCB026 > NRCB010$  after the inoculation with these four growth-promoting rhizo bacteria in the greenhouse pot experiment. The cumulative  $N_2O$  emissions were decreased by 2.3%, 33.1%, 34.2% and 40% after the inoculation with these four strains compared with that from the non-inoculated control. Then two strains of NRCB010 and NRCB026 were chosen for further soil microcosm experiment and field experiment. The inoculation with NRCB010 decreased the cumulative  $N_2O$  emissions by 21% and 44% in soil microcosm and field plot experiment, respectively; while the inoculation with NRCB026 decreased the cumulative  $N_2O$  emissions by 48% and 73% in soil microcosm and field plot experiments, respectively. In conclusion, plant growth-promoting rhizo bacteria NRCB010 and NRCB026 can effectively mitigate  $N_2O$  emission from farmland soil. Our results provides critical scientific basis for  $N_2O$  mitigation in farmland soil and important practical guidance for development of novel biofertilizer with both plant growth-promoting and greenhouse gas mitigating effects.

**Key words** carbon neutrality in agriculture; nitrous oxide ( $N_2O$ ); plant rhizosphere growth-promoting bacteria; greenhouse gas mitigation