

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 21620111152503

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

外源氮施加对红树林湿地土壤一氧化氮释放的影响

Effects of Exogenous Nitrogen Addition on Nitric Oxide
Emission from Mangrove Wetland Soils

朱春权

指导教师姓名: 郑海雷 教授

专业名称: 植物学

论文提交日期: 2012年04月

论文答辩时间: 2012年05月

学位授予日期: 2012年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2014年05月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(环境植物学与植物分子生物学)课题(组)的研究成果,获得(国家自然科学基金(30930076, 30770192, 30670317, 30271065, 39970438) 教育部博士点基金(20070384033), 中国博士后基金(2012M521278))课题(组)经费或实验室的资助,在(郑海雷 教授)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
第一章 前言.....	1
1.1 土壤一氧化氮 (NO) 释放研究进展.....	2
1.2 土壤产生 NO 的影响因素.....	2
1.3 红树林湿地 NO 释放研究进展.....	4
1.4 硝化及反硝化微生物研究进展.....	5
1.4.1 硝化细菌及关键调节酶.....	5
1.4.2 反硝化细菌及关键调节酶.....	6
1.5 NO 的测定方法.....	7
1.5.1 化学发光法.....	8
1.5.2 电化学法.....	8
1.5.3 荧光探针法.....	9
1.5.4 电子顺磁共振波谱法 (EPR).....	10
1.6 立题依据及科学意义.....	10
第二章 材料与方法.....	12
2.1 研究样地概况.....	12
2.2 实验设计.....	13
2.3 仪器药品.....	14
2.3.1 主要仪器设备.....	14
2.3.2 主要试剂.....	14
2.4 土壤基本理化性质.....	14
2.4.1 土壤 pH.....	14
2.4.2 土壤含水量.....	15
2.4.3 土壤盐度.....	15
2.4.4 土壤无机氮(N)含量测定.....	15
2.4.5 土壤酶活性测定.....	16

2.4.6 土壤 NO 释放速率测定	18
2.5 土壤微生物丰度分析	18
2.5.1 土壤总 DNA 的提取	18
2.5.2 土壤微生物相关基因的实时荧光定量 PCR	19
2.6 数据处理与作图	25
第三章 结果与分析	26
3.1 不同红树林湿地土壤 NO 释放差异研究	26
3.1.1 白骨壤和秋茄样地土壤的 NO 释放差异	26
3.1.2 白骨壤和秋茄样地的土壤理化性质	26
3.1.3 白骨壤和秋茄样地土壤蔗糖酶和脲酶的活性	28
3.1.4 白骨壤和秋茄样地土壤 N 代谢相关微生物的丰度	29
3.2 外源 N 施加对红树林湿地土壤 NO 释放的影响	30
3.2.1 加 N 后白骨壤和秋茄样地土壤的 NO 释放变化	30
3.2.2 加 N 对白骨壤和秋茄样地土壤 pH 和 N 利用率的影响	31
3.2.3 加 N 后白骨壤和秋茄样地土壤蔗糖酶和脲酶活性的变化	32
3.2.4 加 N 对白骨壤和秋茄样地土壤微生物丰度的影响	33
3.3 硝化反应抑制剂对红树林湿地土壤 NO 释放的影响	34
3.3.1 未施加外源 N 时白骨壤和秋茄样地土壤硝化反应抑制实验	34
3.3.2 施加外源 N 后白骨壤和秋茄样地土壤硝化反应抑制剂实验	35
第四章 讨论	36
4.1 白骨壤和秋茄样地土壤 NO 释放差异	36
4.2 白骨壤和秋茄样地土壤 NO 释放对外源 N 施加的不同响应	38
4.3 硝化反应对白骨壤和秋茄样地土壤 NO 产生中的贡献	41
第五章 结论与展望	42
参考文献	44
致谢	54

Content

Chinese Abstract	I
English Abstract	III
1 Introduction.....	1
1.1 Research progress of soil nitric oxide (NO) emission	2
1.2 Soil NO emission and its influencing factors	2
1.3 Research progress of mangrove wetland NO emission.....	4
1.4 Research progress of nitrifying and denitrifying bacteria	5
1.4.1 Nitrifying bacteria and key regulatory enzyme	5
1.4.2 Denitrifying bacteria and key regulatory enzyme	6
1.5 Determination methods of NO.....	7
1.4.1 Chemiluminescence method.....	8
1.4.1 Electrochemical method	8
1.4.1 Fluorescent probe method.....	9
1.4.1 Electron paramagnetic resonance (EPR) spectrum method.....	9
1.6 Basis and significance of this research	10
2 Materials and methods	12
2.1 Experimental sites.....	12
2.2 Experimental design	13
2.3 Main reagents instruments and equipments	14
2.3.1 Main instruments and equipments.....	14
2.3.2 Main reagents	14
2.4 Soil physical and chemical properties	14
2.4.1 Soil pH	14
2.4.2 Soil water content	15
2.4.3 Soil salinity	15
2.4.4 Soil inorganic nitrogen measurement	15
2.4.5 Soil enzyme activity measurement	16

2.4.6 Chemiluminescent detection of NO.....	17
2.5 Analysis of soil bacteria abundance	18
2.5.1 Soil total DNA extraction	18
2.5.2 Soil bacteria gene expression analysis by quantitative real-time PCR	19
2.6 Statistical analysis	25
3 Results and analysis.....	26
3.1 Research of different NO emission from mangrove wetland	26
3.1.1 Difference of NO emission between <i>Avicennia marina</i> and <i>Kandelia obovata</i> wetland soils.....	26
3.1.2 Soil physical and chemical properties of <i>A. marina</i> and <i>K. obovata</i> soils	26
3.1.3 Activities of soil invertase and urease in <i>A. marina</i> and <i>K. obovata</i> soils	28
3.1.4 Abundances of <i>16S rRNA</i> , <i>amoA</i> , <i>nirK</i> , <i>nirS</i> and <i>nosZ</i> genes in <i>A. marina</i> and <i>K. obovata</i> soils	29
3.2 Effect of exogenous N addition on NO emission from mangrove wetland	30
3.2.1 Changes of NO emission from <i>A. marina</i> and <i>K. obovata</i> soils with N addition	30
3.2.2 Changes of soil pH, NH_4^+ and NO_3^- use efficiency in <i>A. marina</i> and <i>K. obovata</i> soils with N addition.....	31
3.2.3 Changes of soil invertase and urease activity in <i>A. marina</i> and <i>K. obovata</i> soils with N addition.....	32
3.2.4 Changes of <i>16S rRNA</i> , <i>amoA</i> , <i>nirK</i> , <i>nirS</i> and <i>nosZ</i> genes abundance in <i>A. marina</i> and <i>K. obovata</i> soils with N addition	33
3.3 Effect of nitrifying inhibitor dicyandiamide on NO emission from <i>A. marina</i> and <i>K. obovata</i> soils	34
3.3.1 Experiment of nitrifying inhibition from <i>A. marina</i> and <i>K. obovata</i>	

soils without N addition.....	34
3.3.2 Experiment of nitrifying inhibition from <i>A. marina</i> and <i>K. obovata</i>	
soils with N addition	35
4 Discussion.....	36
4.1 Differences of NO emission between <i>A. marina</i> and <i>K. obovata</i> soils	36
4.2 Differential responses of soil NO emission to exogenous N addition between <i>A. marina</i> and <i>K. obovata</i> soils	38
4.3 Contribution of nitrification to NO emission in <i>A. marina</i> and <i>K. obovata</i> soils	41
5 Conclusions and prospects	42
References.....	44
Acknowledgements.....	54

缩略词

AOB	ammonia oxidizing bacteria	氨氧化细菌
AMO	ammonia monooxygenase	氨单加氧酶
AMP	ampicillin	氨苄青霉素
DCD	dicyandiamide	双氰胺
HAO	Hydroxylamine oxidoreductase	羟氨氧化还原酶
NAP	periplasmic nitrate reductase	膜外/周质硝酸还原酶
NAR	membrane-bound nitrate reductase	膜内硝酸还原酶
NIR	nitrite reductase	亚硝酸还原酶
NOR	nitric oxide reductase	一氧化氮还原酶
NOS	nitrous oxide reductase	一氧化二氮还原酶
NR	nitrate reductase	硝酸还原酶
NXR	nitrite oxidoreductase	亚硝酸盐氧化还原酶

摘要

一氧化氮(nitric oxide, NO)是大气污染物的主要成分之一,也是氮(nitrogen, N)生物地球化学循环中的重要组成部分。由于河口湿地具有高水平的 N 输入,导致红树林湿地具有较高的 NO 释放潜力。为了探究外源 N 输入对红树林湿地土壤 NO 释放的影响,本研究运用化学发光分析法测定了白骨壤和秋茄样地土壤的 NO 释放速率及其对补 N 的不同响应,并通过分析土壤无机 N 含量、净硝化速率、土壤酶活性及微生物丰度等,比较研究两样地 NO 释放差异的原因,结果表明:

1、白骨壤样地土壤的 NO 释放速率显著高于秋茄样地土壤,两样地土壤 NO 释放量速率分别是 $90.01 \text{ nmol Kg}^{-1} \text{ FW h}^{-1}$ 和 $20.67 \text{ nmol Kg}^{-1} \text{ FW h}^{-1}$ 。

2、与秋茄样地土壤相比,白骨壤样地土壤具有有较高的无机 N 含量 (NH_4^+ 和 NO_3^-)、更高的 N 利用率及净硝化速率。此外,白骨壤样地土壤的 *16S rRNA*, *amoA* 和 *nirK* 基因的拷贝数也显著高于秋茄样地土壤,表明白骨壤样地土壤中硝化及反硝化细菌的丰度较高。

3、外源 N 施加结果表明,与 0 天相比,白骨壤和秋茄样地土壤的 NO 释放速率在补 N 处理 15 天和 45 天后显著增加,并且白骨壤样地土壤的 NO 释放速率仍显著高于秋茄土壤。

4、在施加外源 N 后,白骨壤样地土壤可以保持稳定的 pH 值,秋茄土壤的 pH 值则显著下降;且白骨壤样地土壤对 NH_4^+ 的利用率显著高于秋茄样地土壤,但对 NO_3^- 的利用率却显著低于秋茄样地土壤;同时,白骨壤样地土壤中的蔗糖酶和脲酶活性对外源 N 的响应较迅速,且显著高于秋茄样地土壤;白骨壤土壤的 *16S rRNA*, *amoA* 和 *nirK* 及 *nirS* 基因的拷贝数均显著高于秋茄样地土壤,而 *nosZ* 基因的拷贝数却显著小于秋茄样地土壤,暗示外源 N 施加显著刺激了白骨壤样地土壤微生物的丰度和活动,同时降低了 NO 消耗,最终产生较高的 NO 释放速率。

5、硝化作用抑制实验表明,在未施加外源 N 时,白骨壤样地土壤产生 NO 的主要方式是硝化反应,而秋茄样地土壤产生 NO 的主要方式却是除了硝化反应外的其他反应;在外源 N 施加后,白骨壤样地土壤中,由硝化反应产生 NO 的

比例增加了，而秋茄样地土壤产生 NO 的主要方式，则可能由原来的非硝化反应转变为硝化反应。

关键词：红树林湿地；NO 释放；外源 N；土壤酶；微生物丰度

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

Nitric oxide (NO) is one of the major components of air pollutants as well as an important part of nitrogen (N) biogeochemical cycle. Because of the high level of N input, mangrove wetland have high potentials of NO emission. In order to explore the effect of exogenous N addition on NO emission in mangrove wetland, we analyzed the NO emission fluxes from *Avicenna marina* and *Kandelia obovata* mangrove wetland soil with a chemiluminescent analyzer for NO and investigated their differential responses to exogenous N addition. Besides, soil inorganic N concentration, soil enzyme activities and bacteria abundance were also assayed. The results were showed as follows:

1. *A. marina* soil samples had much higher NO emission flux than *K. obovata* soil samples, the values were $90.01 \text{ nmol Kg}^{-1} \text{ FW h}^{-1}$ and $20.67 \text{ nmol Kg}^{-1} \text{ FW h}^{-1}$, respectively.

2. *A. marina* soil samples had remarkably higher inorganic N (NH_4^+ and NO_3^-) concentration, N use efficiency and net nitrification rate than those in *K. obovata* soil samples. In addition, the copy numbers of *16S rRNA*, *amoA* and *nirK* in *A. marina* soil samples were also higher than those in *K. obovata* soil samples, indicating that *A. marina* soil have higher abundance of total bacteria, nitrifying bacteria and denitrifying bacteria.

3. The results from N addition experiment showed that NO emission fluxes of both *A. marina* and *K. obovata* soil samples had a dramatical increase at 15 and 45 d than that at 0 d. Meanwhile, the NO emission flux of *A. marina* soil samples was still higher than *K. obovata* soil samples.

4. After exogenous N addition, *A. marina* soil samples kept a stable pH, while the pH in *K. obovata* soil had a drastic drop. Besides, *A. marina* soil samples had higher NH_4^+ use efficiency and lower NO_3^- use efficiency than *K. obovata* soil samples. Meanwhile, invertase and urease in *A. marina* soil samples responded to exogenous N much more rapidly and showed higher activity than those in *K. obovata*

soil samples. The copy numbers of *16S rRNA*, *amoA*, *nirK* and *nirS* genes in *A. marina* soil samples were significantly higher than those in *K. obovata* soil samples, while the copy numbers of *nosZ* gene had an opposite tendency. These data indicated that more NO emission from *A. marina* soil samples was observed, meanwhile increased abundance and activity of stimulated bacteria and reduced NO consumption ability were measured under the exogenous N addition.

5. The results from nitrification inhibition experiment showed that nitrification was a main pathway to produce NO in *A. marina* soil samples, however, there existed some other pathways except nitrification in *K. obovata* soil samples. After exogenous N addition, the proportion of nitrification-produced NO in *A. marina* soil samples increased, while in *K. obovata* soil samples, the main pathway of NO production have shifted from other pathways to nitrification.

Keywords: *mangrove wetland; NO emission; exogenous N; soil enzyme; bacteria abundance*

第一章 前言

由于大气中温室气体浓度的不断增加,气候变化已经成为现今全球性的环境问题。其中氮氧化物(Nitrogen Oxide, NO_x)是重要的温室气体(Groffman 等 2000, Galloway 等 2003),它包含如氧化亚氮(N_2O),一氧化氮(NO)和二氧化氮(NO_2)等在内的多种化合物。 NO_x 对环境已经造成明显的负面影响(Venterea 等 2003)。 NO_x 具有很强的化学活性,在大气中发生一系列的光化学反应,特别是在对流层臭氧(O_3)和羟自由基的光化学反应过程中发挥关键作用(Ludwig 等 2001)。 NO_x 参与一氧化碳、甲烷和非甲烷碳氢化合物的催化氧化过程,导致大气中 O_3 浓度升高。在 NO_x 污染严重的地区,硝酸作为 NO_x 的氧化产物可形成酸雨降落到地面,引起土壤或水体酸化、富营养化(Rabalais 2002)、生态系统N饱和等危害(Venterea 等 2003, Vitousek 等 1997, Galloway 等 2003)。此外, NO_x 可通过形成 NH_4NO_3 气溶胶降低大气能见度及辐射强度,进而影响植物生长(IPCC 2007)。

大气中的 NO_x 的来源主要包括自然过程和一些人类活动。目前已知的 NO_x 自然来源主要有闪电、土壤、氨氧化、平流层光化学反应和海洋中物质的光解等(Williams 等 1992)。人类活动引起的 NO_x 排放主要来自能源产生和粮食生产过程。自工业革命以来,由于肥料的使用,作物固氮,动物养殖以及大气沉降,环境中的N含量急剧上升(Puckett 1995, Galloway 等 2003)。由于工业化过程,化石燃料的燃烧已经成为全球最重要的 NO_x 排放源(IPCC 2001)。IPCC (2001)估算2000年全球化石燃料燃烧过程排放的 NO_x ,其排放总量高达33.0 Tg N yr⁻¹。在主要农业区及热带偏远地区,大气 NO_x 主要来源于土壤N生物地球化学作用(Lee 等 1997)。全球土壤 NO_x 释放总量为42-47 Tg N yr⁻¹,其中NO释放量占土壤 NO_x 释放总量的90%以上(IPCC 2007)。

NO有三种存在形式,即NO自由基(NO^\bullet)、亚硝基阳离子(NO^+)、硝基阴离子(NO^-),它们是通过得到或失去电子进行相互转化而形成的,NO的这三种不同的存在方式具有不同的化学活性(Stamler 等 1992)。NO具有非常活泼的化学性质,它能催化对流层臭氧的合成,并通过影响臭氧层的再生过程而间接产生温室效应(Holland 和 Lamerque 1997, Crutzen 1995)。NO在大气中的存在

方式并不稳定，它容易通过转变为 NO_2 进而对植被的生长产生极大危害 (Venterea 等 2004)。此外，NO 还是大气中酸雨和酸云的重要间接来源，因为它是 HNO_2 的主要生成前体 (Logan 1983)。

1.1 土壤一氧化氮 (NO) 释放研究进展

1982 年，Galbally 和 Roy 首次对草地土壤的 NO 释放进行观测，后来的研究表明，土壤是生态系统 NO 产生的重要来源 (Williams 等 1992)。在全球土壤 NO 释放总量中，农田所占比例最高，约 40%，其次是热带草原和热带雨林土壤，分别占 35% 和 16% (Logan 1983, Potter 等 1996, Wang 等 2005)。此外，人们陆续对多种陆地生态系统（如农田、沙漠、森林等）土壤 NO 的释放特点及影响因素进行了大量研究 (Zheng 等 2003, Wang 等 2005, Li 和 Wang 2008, Nishina 等 2009)。

农业活动过程中产生的 NO 主要来源于化肥及有机肥施加、生物固 N、秸秆燃烧等。Zheng 等 (2002) 对亚洲农田排放的 NO_x 进行了估算，1961 年仅为 0.8 Tg N yr^{-1} ，2000 年增加至 2.2 Tg N yr^{-1} ，而预测在 2030 年将高达 3.1 Tg N yr^{-1} ，其中施肥是导致 NO 释放急剧增加的主要原因。南北美洲 (Matson 等 1996)、欧洲 (Jambert 等 1997)、澳大利亚 (Galbally 和 Johansson 1989) 和中国 (Zheng 等 2003) 施肥农田土壤 NO 释放通量的观测范围为 $1\text{-}566 \text{ ng N m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ，不施肥农田为 $0.3\text{-}21.7 \text{ ng N m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ，水稻田为 $0.2 \text{ ng N m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ，可见土壤 NO 释放具有极大的时空变异性 (Li 和 Wang 2008)。而对森林土壤 NO 释放的研究大多在欧洲、南北美洲和非洲的热带地区开展 (Williams 等 1992)。Li 等 (2007) 对我国南亚热带典型森林土壤 NO 释放及季节动态进行了研究，估算出该区域阔叶林全年 NO 释放量为 $6.1\text{-}6.9 \text{ Kg N ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ ，而马尾松林为 $4.0\text{-}4.4 \text{ Kg N ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ 。尽管人们已对部分地区的 NO 释放量进行了粗略估算，但由于一些条件的限制，目前对土壤 NO 产生的过程和规律仍然缺乏足够的了解，许多典型区域数据的缺乏增加了对区域及全球尺度土壤 NO 释放估算的准确性。

1.2 土壤产生 NO 的影响因素

影响土壤产生 NO 的因素可以分为生物因素或非生物因素。土壤中非生物因

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

廈門大學博碩士論文摘要庫