

DOI: 10.11766/trxb202007100382

吴敏, 李进芳, 魏志军, 李承霖, 夏永秋, 单军, 颜晓元. 水稻土  $\text{Fe}^{2+}$  氧化耦合硝酸根异化还原成铵 (DNRA) 及其对氧气存在和碳源添加的响应[J]. 土壤学报, 2022, 59 (1): 253–262

WU Min, LI Jinfang, WEI Zhijun, LI Chenglin, XIA Yongqiu, SHAN Jun, YAN Xiaoyuan. Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium Coupled to  $\text{Fe}^{2+}$  Oxidation in Paddy Soils as Affected by Oxygen Presence and Carbon Addition[J]. Acta Pedologica Sinica, 2022, 59 (1): 253–262.

## 水稻土 $\text{Fe}^{2+}$ 氧化耦合硝酸根异化还原成铵 (DNRA) 及其对氧气存在和碳源添加的响应\*

吴敏<sup>1, 2, 3</sup>, 李进芳<sup>1, 2</sup>, 魏志军<sup>1, 2, 3</sup>, 李承霖<sup>1, 2, 3</sup>, 夏永秋<sup>1, 3</sup>,  
单军<sup>1, 3†</sup>, 颜晓元<sup>1, 3</sup>

(1. 土壤与农业可持续发展国家重点实验室 (中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 中国科学院常熟农业生态实验站, 江苏常熟 215555)

**摘要:** 以江苏常熟和湖南桃源水稻土为研究对象, 通过室内  $^{15}\text{N}$  示踪实验研究水稻土中  $\text{Fe}^{2+}$  氧化耦合硝酸根异化还原成铵 (Dissimilatory nitrate reduction to ammonium, DNRA) 过程及其对氧气存在和碳源添加的响应。结果表明, 两种水稻土中均存在  $\text{Fe}^{2+}$  氧化耦合 DNRA 过程, 常熟和桃源水稻土中 DNRA 的速率分别为  $0.38 \pm 0.15$  和  $0.36 \pm 0.21 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (以 N 计), 当体系中  $\text{Fe}^{2+}$  浓度为  $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, DNRA 速率有所提升但并不显著, 当  $\text{Fe}^{2+}$  浓度为  $800 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, DNRA 速率提升显著 ( $P < 0.05$ ), 分别提升至  $2.35 \pm 0.30$  和  $0.81 \pm 0.22 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。在  $800 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Fe}^{2+}$  浓度下, 常熟水稻土中  $\text{Fe}^{2+}$  氧化耦合 DNRA 的速率显著 ( $P < 0.05$ ) 高于桃源水稻土, 与两种水稻土中 *nrfA* 功能基因丰度的高低一致。在氧气存在和碳源添加的响应实验中, 单一氧气处理、单一乳酸处理及氧气乳酸联合处理均显著 ( $P < 0.05$ ) 促进桃源水稻土  $\text{Fe}^{2+}$  氧化耦合 DNRA 过程速率, 而在常熟水稻土中,  $800 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Fe}^{2+}$  浓度下, 单一乳酸及乳酸氧气联合处理显著 ( $P < 0.05$ ) 抑制  $\text{Fe}^{2+}$  氧化耦合 DNRA 过程速率。以上研究表明, 两种水稻土中均存在  $\text{Fe}^{2+}$  氧化耦合 DNRA 过程, 氧气和乳酸的单独、联合作用可以影响  $\text{Fe}^{2+}$  耦合 DNRA 过程, 但具体影响因土壤而异。未来研究还应纳入更多土壤样本, 综合考虑环境因子和土壤性质对  $\text{Fe}^{2+}$  氧化耦合 DNRA 过程的影响。

**关键词:** 硝酸根异化还原; 亚铁氧化; 碳源; 氧气;  $^{15}\text{N}$  同位素示踪

中图分类号: S19 文献标志码: A

## Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium Coupled to $\text{Fe}^{2+}$ Oxidation in Paddy Soils as Affected by Oxygen Presence and Carbon Addition

WU Min<sup>1, 2, 3</sup>, LI Jinfang<sup>1, 2</sup>, WEI Zhijun<sup>1, 2, 3</sup>, LI Chenglin<sup>1, 2, 3</sup>, XIA Yongqiu<sup>1, 3</sup>, SHAN Jun<sup>1, 3†</sup>, YAN Xiaoyuan<sup>1, 3</sup>

(1. State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China;

\* 国家自然科学基金项目 (41571289) 和国家重点研发计划项目 (2017YFD0200101) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 41571289) and the National Key Research and Development Plan of China (No. 2017YFD0200101)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: shanjun@issas.ac.cn

作者简介: 吴敏 (1996—), 女, 江苏常州人, 硕士研究生, 主要从事农田氮素循环关键过程的研究。E-mail: wumin@issas.ac.cn

收稿日期: 2020-07-10; 收到修改稿日期: 2020-09-10; 网络首发日期 (www.cnki.net): 2020-11-11

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Changshu Agro-ecological Experimental Station, Chinese Academy of Sciences, Changshu, Jiangsu 215555, China)

**Abstract:** 【 Objective 】 Dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA), a biological pathway converting  $\text{NO}_3^-$  to  $\text{NH}_4^+$ , provides ammonium for rice uptake and microbial immobilization, resulting in N retention in paddy soils. Recently, the coupling between DNRA and  $\text{Fe}^{2+}$  oxidation has been reported occurring in freshwater lake or estuary sediments. However, so far little has been reported on this process in paddy soil, and its potential key factors are practically unknown. 【 Method 】 Using  $^{15}\text{N}$ -tracing technique in combination with membrane inlet mass spectrometer (MIMS), an in-lab incubation experiment was performed to investigate the process of DNRA coupled to  $\text{Fe}^{2+}$  oxidation as affected by oxygen presence and carbon addition in two types of paddy soils (CS and TY). 【 Result 】 Results showed that the process of DNRA coupled to  $\text{Fe}^{2+}$  oxidation was found in both paddy soils, where the potential rate of DNRA increased from N 0.36-0.38 to 0.81-2.35  $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  with  $\text{Fe}^{2+}$  addition rising from 0 to 800  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . At the concentration of 800  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Fe}^{2+}$ , potential rate of DNRA was significantly higher in CS soil than that in TY soil, which was in consistence with differences between the two tested soils in *nrfA* gene abundance. Effect of oxygen presence and/or lactic acid addition on the process of DNRA coupled to  $\text{Fe}^{2+}$  oxidation varied in the two tested paddy soils. In TY soil, regardless of singly or in combination applied, oxygen presence and lactic acid addition significantly promoted potential rate of DNRA at varying  $\text{Fe}^{2+}$  concentrations. In CS soil, single oxygen presence or lactic acid addition significantly increased potential rate of DNRA at the concentration of 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Fe}^{2+}$ , whereas, at the concentration of 800  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Fe}^{2+}$ , either lactic acid singly applied or in combination with oxygen significantly decreased potential rate of DNRA. 【 Conclusion 】 Findings of this study suggest that the process of DNRA coupled to  $\text{Fe}^{2+}$  oxidation occurs in paddy soils and may be affected by presence of oxygen and carbon addition. Further studies are needed to deepen understanding of this process by including more types of soil and comprehensively evaluating the effects of environmental parameters and soil properties on the process.

**Key words:** Dissimilatory nitrate reduction processes;  $\text{Fe}^{2+}$  oxidation; Carbon source; Oxygen;  $^{15}\text{N}$ -tracing technique

硝酸根异化还原成铵 (Dissimilatory nitrate reduction to ammonium, DNRA) 是微生物在厌氧环境中将硝态氮 ( $\text{NO}_3^-$ -N) 还原为铵态氮 ( $\text{NH}_4^+$ -N) 的过程<sup>[1]</sup>, 可将易流失的  $\text{NO}_3^-$ -N 转化为水稻易利用的  $\text{NH}_4^+$ -N, 有利于氮素在土壤中的固持。DNRA 是除反硝化、厌氧氨氧化以外厌氧状态下氮素转化的重要途径, 该过程可以存在于土壤、沉积物和活性污泥中, 目前对 DNRA 研究主要集中在海洋、湖泊、河流等水体沉积物中, 对稻田 DNRA 的研究相对较少<sup>[2-3]</sup>。长期处于淹水条件的稻田, 为 DNRA 过程的发生提供了适宜的条件, 研究显示, 在常规施肥的稻田土壤中, DNRA 对  $\text{NO}_3^-$  还原过程的贡献率最高可达 17.63%<sup>[4]</sup>, 长期低氮施肥稻田土壤中 DNRA 发生速率显著高于长期高氮施肥稻田土壤<sup>[5]</sup>。铁作为水稻土中重要的氧化还原物质之一, 对水稻土中氮的转化具有重要调节作用, 以针铁矿和水合氧化铁形式存在的三价铁极易在淹水的水稻土中发生铁解, 进而被部分还原为亚铁 ( $\text{Fe}^{2+}$ ), 而  $\text{Fe}^{2+}$  可被微生物氧化或被化学氧化, 与  $\text{NO}_3^-$  还原过程耦合从而

影响稻田  $\text{NO}_3^-$  还原路径和产物。尽管目前还未分离到能够将  $\text{NO}_3^-$  还原成  $\text{NH}_4^+$  的  $\text{Fe}^{2+}$  氧化纯菌株, 但  $\text{NO}_3^-$  依赖的  $\text{Fe}^{2+}$  氧化微生物群落可以耦合  $\text{NO}_3^-$  还原成  $\text{NH}_4^+$  的过程已被证实。如 Weber 等<sup>[6]</sup> 研究发现湿地环境中的 *Geobacter* 和 *Dechloromonas* 属在  $\text{NO}_3^-$  存在的厌氧体系  $\text{Fe}^{2+}$  氧化过程中会伴随  $\text{NH}_4^+$  的产生。Coby 等<sup>[7]</sup> 的研究也发现在含有铁还原微生物的体系中,  $\text{NO}_3^-$  的还原和醋酸盐的消耗导致了  $\text{Fe}^{2+}$  的快速氧化和  $\text{NH}_4^+$  的积累。Robertson 等<sup>[8]</sup> 在河口底泥沉积物中的研究显示, 增加  $\text{Fe}^{2+}$  浓度可促进  $\text{NO}_3^-$  还原成  $\text{NH}_4^+$ , 并伴随着反硝化速率的降低。陈鹏程等<sup>[9]</sup> 在水稻土的富集培养实验中发现, 只有  $\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{NO}_3^-$  同时存在的培养体系中,  $\text{Fe}^{2+}$  才能发生氧化, 并伴随着  $\text{NH}_4^+$  的生成。Wang 等<sup>[10]</sup> 对淹水水稻土的研究发现  $\text{NO}_3^-$  减少过程伴随着亚硝酸根的累积、氧化亚氮 ( $\text{N}_2\text{O}$ ) 的排放以及  $\text{NH}_4^+$  的生成。李进芳等<sup>[11]</sup> 在水稻土中的研究也发现, 土壤  $\text{Fe}^{2+}$  含量是影响水稻土 DNRA 过程速率的关键因子之一。因此有理由推测, 稻田土壤中存在  $\text{Fe}^{2+}$  氧化耦合 DNRA 过

程，根据前人对河口沉积物的研究结果，该过程的具体反应方程式<sup>[12]</sup>如下：



在稻田生态系统，除 Fe<sup>2+</sup>外，微生物还可以利用有机碳为电子供体，为 DNRA 过程的发生捐赠电子，从而影响 DNRA 过程的发生速率<sup>[13]</sup>。研究发现不同种类的碳源对 DNRA 过程的影响不同，乳酸等发酵型碳源可以直接被部分 DNRA 功能微生物利用，或经微生物发酵后以醋酸的形式为其他 DNRA 功能微生物利用<sup>[14]</sup>。此外，目前对 DNRA 的研究主要集中在厌氧条件下，一般认为 DNRA 细菌多为专性厌氧菌和兼性厌氧菌<sup>[15]</sup>，但也有学者发现氧气存在对 DNRA 具有促进作用<sup>[16]</sup>。对周期性低氧河口底泥的研究发现，在自然存在 Fe<sup>2+</sup>的环境中，当氧气状态由缺氧转为氧饱和后，NO<sub>3</sub><sup>-</sup>还原过程中 DNRA 的占比从小于 1% 上升为 18%<sup>[12]</sup>。目前对有氧下 Fe<sup>2+</sup>氧化耦合 DNRA 过程的研究较少，而氧气存在和碳源添加对 Fe<sup>2+</sup>氧化耦合 DNRA 过程的影响还不清楚。

本研究以常熟和桃源水稻土为研究对象，结合 <sup>15</sup>N 同位素示踪技术和膜进样质谱仪，研究水稻土中 Fe<sup>2+</sup>氧化耦合 DNRA 的发生情况，并探究氧气存在和碳源添加对该过程的影响，以期加深对稻田生态系统 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>还原过程的认识，为提高氮肥利用率和合理制定农田土壤氮素管理措施提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

供试水稻土分别采自江苏常熟（31°55'N，120°70'E）和湖南桃源（28°55'N，111°49'E），其中，常熟水稻土是湖基母质风化发育而成的水稻土，桃源水稻土是第四纪红土母质发育而成的水稻土。采土时用土钻采集表层 0~20 cm 土壤，置于配有冰袋的保温箱中尽快带回实验室。新鲜土样略风干后过 10 目筛混匀分成两份，一份置于 4℃ 冰箱短暂保存，随后用于 Fe<sup>2+</sup>氧化耦合 DNRA 过程实验；另一份自然风干，用于土壤基本理化性质测定。供试水稻土基本理化性质见表 1。

表 1 两种水稻土的基本理化性质

Table 1 Basic physico-chemical properties of the two tested paddy soils

采样点 Sample site	pH	全氮 TN (g·kg <sup>-1</sup> )	全碳 TC (g·kg <sup>-1</sup> )	硝态氮 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg·kg <sup>-1</sup> )	铵态氮 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg·kg <sup>-1</sup> )	亚铁 Fe <sup>2+</sup> (mg·kg <sup>-1</sup> )	阳离子交换 量 CEC (cmol·kg <sup>-1</sup> )	黏粒 Clay /%	粉粒 Silt /%	砂粒 Sand /%
CS	6.82a	2.15a	19.70b	4.77b	3.94b	74.99a	20.75a	32.03b	57.97a	10.00a
TY	5.38b	2.16a	19.96a	6.33a	23.73a	57.12b	9.40b	39.57a	50.36b	10.06a

注：CS：常熟；TY：桃源。下同。同列不同小写字母代表两种水稻土间差异显著， $P < 0.05$ 。Note: CS and TY represent Changshu and Taoyuan paddy soils, respectively. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between two paddy soils.

### 1.2 实验处理及 DNRA 速率的测定

采用 <sup>15</sup>N 示踪实验测定水稻土中 DNRA 及 Fe<sup>2+</sup> 耦合 DNRA 过程的速率，具体实验操作参考 Yin 等<sup>[17]</sup>的方法。每种水稻土取 2.5 g 过筛土样于 12 mL 顶空瓶中，注入冲氮纯水并混匀，保证每个瓶中无气泡存在，将顶空瓶置于 8 r·min<sup>-1</sup> 旋转培养器内预培养一周以消耗背景 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 和 O<sub>2</sub>。预培养结束后将样品分为三组，分别对应 0、500、800 μmol·L<sup>-1</sup> 三个 Fe<sup>2+</sup> 浓度水平（根据参与 DNRA 反应中 Fe<sup>2+</sup> 与 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 化学计量比设定），每个浓度水平下分别有四个处

理，分别是无添加的对照处理、单一氧气处理（溶解氧为 8.47 mg·L<sup>-1</sup>）、单一乳酸处理（乳酸与 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 摩尔比为 2.97）以及氧气乳酸联合处理，每个处理重复三次；除了上述处理外，为了进一步探究两种水稻土中微生物对 Fe<sup>2+</sup> 氧化耦合 DNRA 过程的贡献，每种土壤也分别增加一组 800 μmol·L<sup>-1</sup> Fe<sup>2+</sup> 浓度下灭菌实验处理。土壤具体灭菌过程为：将每种土壤放于 121℃ 高压灭菌锅中，灭菌 1 h，反复 3 次。上述所有实验处理中土壤样品的分装及 Fe<sup>2+</sup> 的添加操作均在厌氧环境中进行。所有样品在培养前均加

入  $K^{15}NO_3$  ( $^{15}N$  丰度 99%) 进行标记, 使得最终样品中  $^{15}N$  浓度在  $100 \mu mol \cdot L^{-1}$  左右。在 0、3、6 h 时间点取样并用微量进样针加入  $200 \mu L 7 mol \cdot L^{-1} ZnCl_2$  溶液终止反应。终止后的样品按不同处理分别倒入  $100 mL$  广口瓶中进行充氮半小时以上, 排出样品中反硝化、厌氧氨氧化等过程产生的  $^{28}N_2$ 、 $^{29}N_2$  和  $^{30}N_2$  后分装至干净的  $12 mL$  顶空瓶中, 用微量进样针加入  $200 \mu L$  氧化剂次溴酸钠碘溶液, 充分摇匀使得样品氧化完全。用离心机以  $2000 r \cdot min^{-1}$  的转速离心  $5 min$  后将样品取出置于  $25^\circ C$  水浴培养箱待测, 利用膜进样质谱仪 (Membrane Inlet Mass Spectrometer, MIMS) 测定水中  $^{15}N$  ( $^{29}N_2 + 2 \times ^{30}N_2$ ) 信号强度。DNRA 速率计算需要先绘制标准曲线: 制备  $0、0.5、2、4、8、10、20 \mu mol \cdot L^{-1}$  的  $^{15}NH_4Cl$  溶液分装于  $12 mL$  顶空瓶中, 用微量进样针往每个顶空瓶中加入  $200 \mu L$  氧化剂将  $^{15}NH_4^+$  氧化为  $N_2$  ( $^{29}N_2$  和  $^{30}N_2$ ), 利用 MIMS 测定水中  $^{15}N$  信号强度, 得到  $^{15}N$  信号强度与  $^{15}NH_4Cl$  浓度之间的对应曲线, 每个浓度设置三个重复。DNRA 速率的计算公式如下:

$$R = \frac{slope_{[^{15}NH_4^+]} \times V}{W}$$

式中,  $R$  表示 DNRA 速率,  $N nmol \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ ;  $slope_{[^{15}NH_4^+]}$  为  $^{15}NH_4^+$  浓度与培养时间回归得到的斜率, 表示产  $NH_4^+$  速率,  $\mu mol \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ ;  $V$  表示顶空瓶容积,  $mL$ ;  $W$  表示干土重,  $g$ 。

### 1.3 DNA 提取与实时荧光定量 PCR

采用 FastDNA SPIN Kit for soil (MP Biomedicals, 美国) 试剂盒提取各处理实验终止时刻 (即培养 6 h 后) 土壤样本的 DNA。称取  $0.3 g$  冻干土样, 按照试剂盒说明进行土壤 DNA 提取操作, 提取完毕的 DNA 于  $-20^\circ C$  冰箱保存。针对不同的功能基因选择特定的引物进行实时荧光定量 PCR (Quantitative real-time PCR, qPCR) 操作, *narG* 采用引物 narG1960m2f 和 narG2050m2r; *napA* 采用引物 napA-3F 和 napA-3FR; *nrfA* 采用引物 nrfAF2aw 和 nrfAR1。上述功能基因分别以 10 倍梯度稀释标准质粒得到各自标准曲线。采用宝生物工程 (大连) 有限公司的 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒于 QuantStudio 3 系统上分析。本实验采用  $20 \mu L$  反应体系, 包括  $1 \mu L$  DNA 样本,  $10 \mu L$  SYBR Premix Ex Taq,  $0.08 \mu L$  ROX Reference Dye II、前后引物各  $0.5 \mu L$  和  $7.92 \mu L$  灭菌水。相关引物序列和循环条件见表 2。

表 2 qPCR 扩增引物及反应条件

Table 2 Primers and qPCR conditions used in this study

基因 Gene	引物序列 (5'-3') Primer sequence	qPCR 反应程序 Thermal profile for qPCR
<i>narG</i>	narG1960m2f : TAYGTSGGGCAGGARAAACTG	95°C 预变性 10 min, 95°C 变性 10 s, 56°C 退火 30 s, 72°C 延伸 20 s, 35 个循环
	narG2050m2r : CGTAGAAGAAGCTGGTGCTGTT	10 min at 95°C, followed 35 cycles of 10 s at 95°C, 30 s at 56°C, 20 s at 72°C
<i>napA</i>	napA-3F : CCAATGCTCGCCACTG	95°C 预变性 10 min, 95°C 变性 15 s, 60°C 退火 60 s, 72°C 延伸 60 s, 40 个循环
	napA-3R : CATGTTKAGACCCACAG	10 min at 95°C, followed 40 cycles of 15 s at 95°C, 60 s at 60°C, 60 s at 72°C
<i>nrfA</i>	nrfAF2aw : CARTGYCAYGTBGARTA	94°C 预变性 10 min, 94°C 变性 15 s, 52°C 退火 45 s, 72°C 延伸 20 s, 80°C 延伸 35 s, 50 个循环
	nrfAR1 : TWNGGCATRTGRCARTC	10 min at 94°C, followed 50 cycles of 15 s at 94°C, 45 s at 52°C, 20 s at 72°C, 35 s at 80°C

## 1.4 数据处理

采用独立样本 t 检验对两种水稻土的土壤性质、功能基因丰度、灭菌前后土样的 DNRA 速率进行差异比较。利用单因素方差分析 (ANOVA) 的 LSD 法, 对两种水稻土不同 Fe<sup>2+</sup>浓度下 DNRA 速率及氧气存在和碳源添加处理下 Fe<sup>2+</sup>氧化耦合 DNRA 速率进行显著性分析。采用 IBM SPSS Statistics 24 软件进行数据分析, 利用 Origin2018 软件进行制图。

## 2 结 果

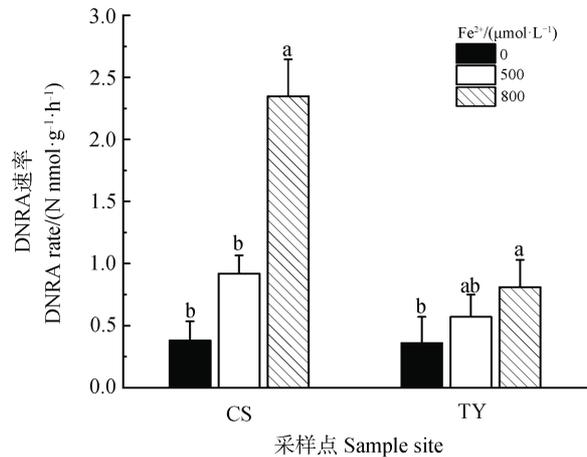
### 2.1 水稻土 Fe<sup>2+</sup>氧化耦合 DNRA 的速率

在 0、500、800 μmol·L<sup>-1</sup> Fe<sup>2+</sup>浓度处理下, 常熟和桃源水稻土的 DNRA 速率变化趋势一致, 总体上当 Fe<sup>2+</sup>浓度的增加时, 水稻土 DNRA 速率随之增加 (图 1)。两种水稻土的 DNRA 速率在 500 μmol·L<sup>-1</sup> Fe<sup>2+</sup>浓度处理下较对照组略有提高, 在 800 μmol·L<sup>-1</sup> Fe<sup>2+</sup>浓度处理下与对照组差异显著 ( $P < 0.05$ )。以上结果表明, 两种水稻土均存在 Fe<sup>2+</sup>氧化耦合 DNRA 过程。此外, 尽管两种水稻土对照组 DNRA 速率相当 (常熟 0.38 nmol·g<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>; 桃源 0.36 nmol·g<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>), 但是在 800 μmol·L<sup>-1</sup> Fe<sup>2+</sup>浓度处理下, 常熟水稻土的 DNRA 速率 (2.35 nmol·g<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>) 显著高于桃源水稻土 (0.81 nmol·g<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>,  $P < 0.05$ ), 是同处理下桃源水稻土的 2.90 倍, 表明常熟水稻土具有较大的 Fe<sup>2+</sup>氧化耦合 DNRA 潜势。

### 2.2 水稻土 DNRA 相关功能基因丰度

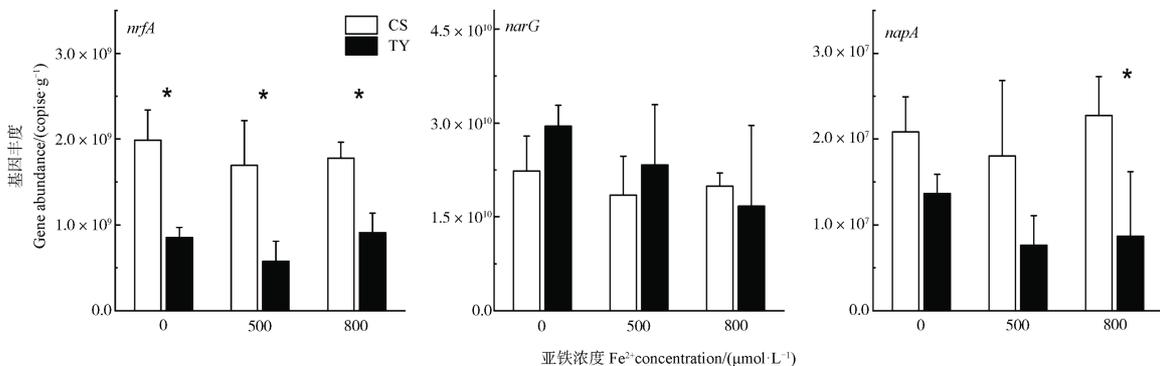
两种水稻土 DNRA 相关功能基因丰度结果显

示, 常熟水稻土中 *nrfA* 基因丰度显著高于 ( $P < 0.05$ ) 桃源水稻土 (图 2), *napA* 基因仅在 800 μmol·L<sup>-1</sup> Fe<sup>2+</sup>浓度情况下差异显著 ( $P < 0.05$ ), 而两种水稻土 *narG* 基因丰度之间无显著差异。在不同浓度 Fe<sup>2+</sup>添加情况下, 各功能基因丰度变化趋势与 DNRA 速率所呈现的趋势并不相同。两种水稻土的 DNRA 速率随 Fe<sup>2+</sup>浓度的增加而增加, 在上述趋势与相关功能基因丰度变化趋势并不一致, 两种水稻土在不同 Fe<sup>2+</sup>浓度下相关功能基因丰度变化并不显著。



注: CS: 常熟; TY: 桃源。下同。不同小写字母代表不同浓度 Fe<sup>2+</sup>处理之间差异显著,  $P < 0.05$ 。Note: S and TY represent Changshu and Taoyuan paddy soils, respectively. In each soil, different lowercase letters above bars indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) among treatment different in Fe<sup>2+</sup> concentration.

图 1 不同 Fe<sup>2+</sup>浓度对两种水稻土 DNRA 速率的影响  
Fig. 1 Effects of different Fe<sup>2+</sup> concentrations on potential rate of DNRA in two paddy soils



注: \*表示两种水稻土功能基因丰度差异显著,  $P < 0.05$ 。Note: \* indicates significant differences ( $P < 0.05$ ) between the two paddy soils.

图 2 不同 Fe<sup>2+</sup>浓度下两种水稻土中 *nrfA*、*narG*、*napA* 基因丰度

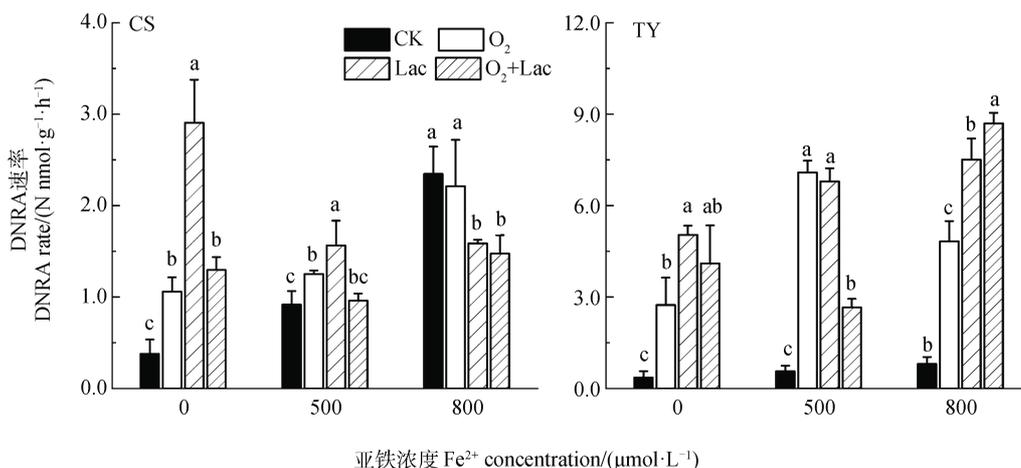
Fig. 2 Abundance of *nrfA*, *narG* and *napA* genes in the two paddy soils under different Fe<sup>2+</sup> concentrations

### 2.3 氧气存在和碳源添加下两种水稻土的 DNRA 速率

在单一氧气处理、单一乳酸处理以及氧气乳酸联合处理下, 常熟和桃源两种水稻土 DNRA 速率均表现为显著的增加 ( $P < 0.05$ ), DNRA 速率的最大值均出现在单一乳酸处理组, 分别为  $2.91 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  和  $5.04 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , 其次为氧气乳酸联合处理组和单一氧气处理组。

在氧气存在和乳酸添加处理下, 常熟和桃源两种水稻土  $\text{Fe}^{2+}$  氧化耦合 DNRA 速率表现出不同的趋势 (图 3), 桃源水稻土  $\text{Fe}^{2+}$  氧化耦合 DNRA 速率的提升高于常熟水稻土。在常熟水稻土中, 当  $\text{Fe}^{2+}$  浓度为  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 单一氧气处理、单一乳酸处理以及氧气乳酸联合处理都能促进  $\text{Fe}^{2+}$  氧化耦合 DNRA 的速率, 其中单一氧气处理和单一乳酸处理

对  $\text{Fe}^{2+}$  氧化耦合 DNRA 的促进作用均达到显著水平 ( $P < 0.05$ )。当  $\text{Fe}^{2+}$  浓度为  $800 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 三个处理下  $\text{Fe}^{2+}$  氧化耦合 DNRA 的速率均受到抑制, 且单一乳酸处理和氧气乳酸联合处理对  $\text{Fe}^{2+}$  氧化耦合 DNRA 过程表现为显著的抑制作用 ( $P < 0.05$ )。在桃源水稻土中, 单一氧气处理、单一乳酸处理以及氧气乳酸联合处理均显著提升了水稻土  $\text{Fe}^{2+}$  氧化耦合 DNRA 速率 ( $P < 0.05$ )。在  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Fe}^{2+}$  浓度下, 氧气乳酸联合处理对水稻土  $\text{Fe}^{2+}$  氧化耦合 DNRA 速率提升效率低于其他两种处理, 这一点与常熟水稻土结果一致。在  $800 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Fe}^{2+}$  浓度下, 单一氧气处理、单一乳酸处理以及氧气乳酸联合处理的水稻土  $\text{Fe}^{2+}$  氧化耦合 DNRA 的速率显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 这与常熟水稻土在  $\text{Fe}^{2+}$  浓度为  $800 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时  $\text{Fe}^{2+}$  氧化耦合 DNRA 速率受到抑制的情况不同。



注: CK: 对照组; O<sub>2</sub>: 单一氧气处理; Lac: 单一乳酸处理; O<sub>2</sub>+Lac: 氧气乳酸联合处理。不同小写字母代表不同处理之间差异显著,  $P < 0.05$ 。Note: CK: control; O<sub>2</sub>: single oxygen presence; Lac: single lactic acid addition; O<sub>2</sub>+Lac: oxygen presence combined with lactic acid addition. Different lowercase letters above the bars indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) among different treatments.

图 3 氧气存在和乳酸添加处理对两种水稻土不同  $\text{Fe}^{2+}$  浓度下 DNRA 速率的影响

Fig. 3 Potential rate of DNRA under varying  $\text{Fe}^{2+}$  concentrations in the two paddy soils as affected by oxygen presence and lactic acid addition

## 3 讨论

### 3.1 水稻土 $\text{Fe}^{2+}$ 氧化耦合 DNRA 过程

本研究中两种水稻土均存在  $\text{Fe}^{2+}$  氧化耦合 DNRA 过程, DNRA 速率随  $\text{Fe}^{2+}$  浓度增加而增加, 介于  $0.57 \sim 2.35 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  之间。以往研究表明,  $\text{Fe}^{2+}$  浓度是影响  $\text{NO}_3^-$  还原过程的重要因素, 且  $\text{NO}_3^-$  还原过程的产物很大程度上取决于  $\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{NO}_3^-$  的化学计量比。当  $\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{NO}_3^-$  化学计量比为 5 时,  $\text{NO}_3^-$

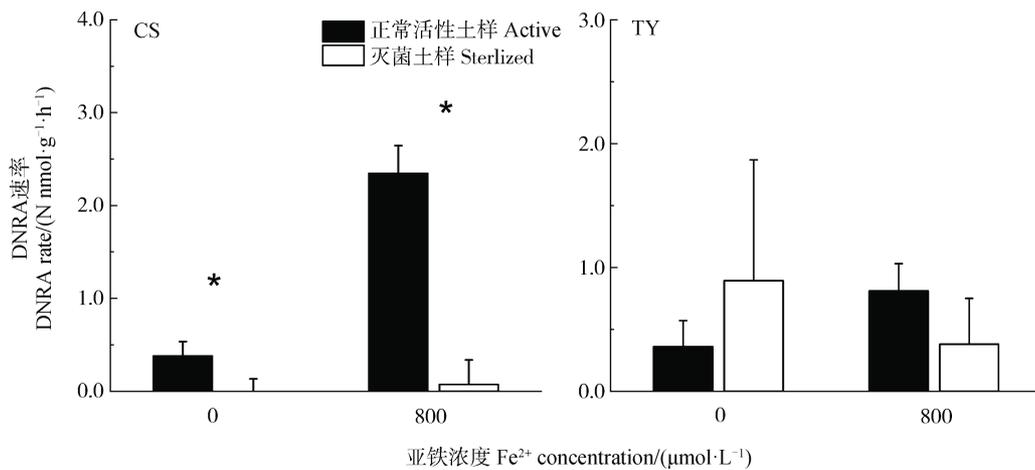
还原过程产物以  $\text{N}_2$  为主<sup>[18]</sup>, 当  $\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{NO}_3^-$  化学计量比为 8 时,  $\text{NO}_3^-$  还原过程产物以  $\text{NH}_4^+$  为主。本实验中, 当  $\text{Fe}^{2+}$  浓度为  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时,  $\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{NO}_3^-$  化学计量比为 5, 两种水稻土的 DNRA 速率较对照组略有提高, 但不构成显著差异; 当  $\text{Fe}^{2+}$  添加量为  $800 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 体系中  $\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{NO}_3^-$  的化学计量比为 8, 反应更倾向于生成  $\text{NH}_4^+$ , DNRA 速率与对照相比也差异显著 ( $P < 0.05$ ), 与上述研究结果一致。

此外, 两种水稻土的 pH 差异也可能是影响两

种水稻土 Fe<sup>2+</sup>氧化耦合 DNRA 速率的重要因素, 前人对活性污泥的研究发现, pH=8 时 Fe<sup>2+</sup>依赖型 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>还原过程的速率接近 pH=6 时的 4 倍<sup>[18]</sup>, 当 pH 高于 9 或低于 6 时反应活性极小。本研究中常熟水稻土 pH 为 6.82±0.02, 桃源水稻土 pH 为 5.38±0.01, 而 800 μmol·L<sup>-1</sup> Fe<sup>2+</sup>浓度下常熟 Fe<sup>2+</sup>氧化耦合 DNRA 速率显著高于桃源土, 与上述研究结果一致。土壤 pH 还可以通过调控其他土壤氮转化过程 (如反硝化、硝化) 从而影响 DNRA 过程。有研究表明反硝化过程在低 pH 环境下更有利, 而提高 pH 更有利于 DNRA 过程的进行<sup>[19]</sup>, 主要原因在于反硝化过程的关键酶铜依赖型亚硝酸盐还原酶 (CuNir) 和 DNRA 过程的关键酶产铵亚硝酸还原酶 (NrfA) 对环境 pH 的响应不同<sup>[20]</sup>, CuNir 活性在 pH 小于 7.0 时较高, pH 为 5.2 时活性最大, 当 pH 大于 7.5 时活性极低; 而 NrfA 活性的最适 pH 在 7.5 以上<sup>[21-22]</sup>。在有氧情况下, 硝化过程也可能为 DNRA 提供反应所需底物, 在适宜 pH 下可促进 DNRA 的发生。如 Zhang 等<sup>[23]</sup>对不同水稻土氮转化过程的研究发现, DNRA 和硝化

过程速率均在中性和碱性水稻土中较高, 在酸性水稻土中较低, 且 DNRA 随硝化速率的增加呈线性增加。

DNRA 是微生物主导的异化还原过程, 土壤的电子供应能力很大程度上决定了 DNRA 的发生潜势<sup>[24]</sup>。除了微生物驱动的 DNRA 过程外, 在厌氧条件下, 涉及表面催化的非生物过程也可以实现 Fe<sup>2+</sup>氧化并产 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>的过程<sup>[25-26]</sup>。为区分两者的产 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>量差别, 将两种水稻土灭菌后的土样与正常活性土样进行对比, 结果表明, 常熟水稻土灭菌前后的 DNRA 速率差异显著 ( $P < 0.05$ , 图 4), 这表明常熟水稻土中 DNRA 过程主要由微生物主导; 同时, 800 μmol·L<sup>-1</sup> Fe<sup>2+</sup>处理组灭菌前后水稻土的 DNRA 速率差异也显著 ( $P < 0.05$ ), 这表明常熟水稻土中由 Fe<sup>2+</sup>和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>参与的化学反应产 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>非常有限<sup>[27]</sup>。然而, 在桃源水稻土中, 对照组与 800 μmol·L<sup>-1</sup> Fe<sup>2+</sup>处理组灭菌前后的 DNRA 速率差异均不显著, 表明桃源土壤中非生物过程对 DNRA 及 Fe<sup>2+</sup>氧化耦合 DNRA 的贡献也不可忽视, 但具体机制还有待进一步研究。



注: \*表示灭菌土样 DNRA 速率与正常活性土样相比差异显著,  $P < 0.05$ 。Note: \* indicates significant differences ( $P < 0.05$ ) between sterilized and active soils.

图 4 正常活性与灭菌土样中 DNRA 速率

Fig. 4 Potential rate of DNRA in active or sterilized soils

### 3.2 功能基因丰度与 DNRA 速率的相关性

土壤氮循环高度依赖于微生物过程, 细菌群落对 DNRA 过程的调控具有重要意义。在不同的 Fe<sup>2+</sup>浓度下, 常熟和桃源两种水稻土 DNRA 速率表现出较大差异, 常熟水稻土表现出更强的氮素留存能力, 这可能与两种水稻土 DNRA 相关微生物的群落组成

差异有关。DNRA 过程中涉及的功能基因有 *narG*、*napA* 和 *nrfA*, *narG* 和 *napA* 基因参与编码硝酸根还原酶 (NaR) 调控 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>→NO<sub>2</sub><sup>-</sup>过程, 间接影响 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>的形成, 而 *nrfA* 基因参与编码亚硝酸根还原酶 (NiR) 调控 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>→NH<sub>4</sub><sup>+</sup>的反应过程, 直接调控 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>的形成。部分针对河口湿地 DNRA 过程的研究已证

明 DNRA 速率与 *nrfA* 基因数量密切相关<sup>[28-29]</sup>。此外, 也有研究发现  $\text{Fe}^{2+}$  氧化过程与 DNRA 过程的  $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$  和  $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_4^+$  的转化过程均存在联系<sup>[8]</sup>。本实验中, 在不同  $\text{Fe}^{2+}$  浓度下, 常熟水稻土较桃源水稻土展现出较高的 DNRA 速率, 常熟水稻土中 *nrfA* 基因丰度 ( $1.69 \times 10^9 \sim 1.78 \times 10^9 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 也高于桃源水稻土 ( $5.76 \times 10^8 \sim 9.08 \times 10^8 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$ ), 两种水稻土之间 *nrfA* 基因丰度与 DNRA 速率成正相关。然而, 在一种水稻土的不同浓度  $\text{Fe}^{2+}$  处理之间,  $\text{Fe}^{2+}$  浓度的增加显著提高了水稻土 DNRA 的速率, 但是水稻土 *narG*、*napA*、*nrfA* 基因丰度并无显著变化, 基因丰度变化与 DNRA 速率并不呈正相关, 其可能原因是短时间 (6 h) 内环境因子变动不足以改变主要 DNRA 功能微生物的遗传结构, 而是通过调节细胞生理活性来影响反应速率。此外, 也有研究显示相较于 DNA 分子水平的功能基因丰度, 基于 mRNA 水平的功能基因丰度更能反映 DNRA 活性的变化<sup>[30]</sup>。

### 3.3 氧气存在和碳源添加对 $\text{Fe}^{2+}$ 氧化耦合 DNRA 过程的影响

传统观点认为 DNRA 过程主要发生在厌氧环境中, 近来有学者在有氧下亦检测到 DNRA 过程的发生<sup>[31-32]</sup>, 认为就 DNRA 过程而言, 其对氧气分压的敏感性可能低于反硝化过程<sup>[33]</sup>。本实验中, 单一氧气处理显著提升了水稻土 DNRA 速率, 对于  $\text{Fe}^{2+}$  氧化耦合 DNRA 过程而言, 在  $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Fe}^{2+}$  浓度, 单一氧气处理下, 在桃源和常熟水稻土上表现为促进作用。对周期性厌氧的河口 DNRA 的研究也有类似发现, DNRA 仅在同时满足  $\text{Fe}^{2+}$  和氧气条件的情况下表现较大速率, 据此研究人员推测在厌氧下  $\text{Fe}^{2+}$  与硫化物 ( $\text{S}^{2-}$ ) 结合形成 FeS, 降低了环境中游离  $\text{Fe}^{2+}$  离子浓度, 使得  $\text{Fe}^{2+}$  氧化耦合 DNRA 过程减缓<sup>[12]</sup>。在  $800 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Fe}^{2+}$  浓度, 单一氧气处理下, 常熟水稻土中  $\text{Fe}^{2+}$  氧化耦合 DNRA 的过程表现为受抑制, 与桃源水稻土现象不一致, 这可能与两种土壤理化性质有关。推测当两种水稻土外源添加的  $\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{NO}_3^-$  的化学计量比为 8 时, 常熟水稻土中 DNRA 过程的电子需求先于桃源水稻土达到饱和, DNRA 过程的限制因素可能由电子供体转为  $\text{NO}_3^-$ <sup>[34]</sup>。此外, 在有氧情况下, 硝化作用会与  $\text{NO}_3^-$  还原过程发生耦合<sup>[35-36]</sup>, 硝化作用在有氧下产生的

$\text{NO}_3^-$ -N, 在厌氧下会成为  $\text{NO}_3^-$  还原过程的底物。桃源水稻土  $\text{NH}_4^+$ -N ( $23.73 \pm 11.08 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 含量显著高于常熟水稻土 ( $\text{NH}_4^+$ -N:  $3.94 \pm 3.81 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 这可能是导致单一氧气处理下的  $\text{Fe}^{2+}$  氧化耦合 DNRA 速率高于常熟水稻土的原因, 有关水稻土电子供应与  $\text{NO}_3^-$  还原途径关系的具体机制尚待进一步研究。除此以外,  $\text{NO}_3^-$  还原过程也可能会受环境中游离  $\text{S}^{2-}$  浓度影响, 水生生态系统大量研究显示高浓度的游离  $\text{S}^{2-}$  会抑制反硝化最终产生  $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{N}_2$  的过程, 进而促进以  $\text{NH}_4^+$  为主要产物的  $\text{NO}_3^-$  还原过程<sup>[37]</sup>。Murphy 等<sup>[38]</sup>对盐碱地沉积物的研究发现, 高浓度的  $\text{S}^{2-}$  添加促进 DNRA 速率并抑制反硝化速率, 也证实了以上猜想。但是, 本研究并未涉及土样  $\text{S}^{2-}$  含量的测定, 稻田中  $\text{S}^{2-}$  与  $\text{NO}_3^-$  还原过程的影响还有待研究。

碳源是土壤中 DNRA 过程的能量来源和电子供体, 在本研究中, 乳酸和  $\text{NO}_3^-$  的摩尔比值 ( $\text{Lac}/\text{NO}_3^-$ ) 设定为 2.97, 研究表明, 在该比值下 DNRA 过程较反硝化过程更具优势<sup>[13]</sup>。结果显示, 单一乳酸处理作用与氧气类似, 对桃源水稻土都表现为显著的促进作用, 对常熟水稻土 DNRA 过程在  $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Fe}^{2+}$  添加情况下也表现为促进作用, 而在  $800 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Fe}^{2+}$  添加情况下表现为显著的抑制作用。其机理可能与单一氧气处理类似, 因为电子需求饱和使得 DNRA 的主要限制因素转为  $\text{NO}_3^-$ 。

在常熟水稻土中, 氧气和乳酸联合处理对  $\text{Fe}^{2+}$  氧化耦合 DNRA 过程表现为抑制作用, 而桃源水稻土中, 氧气乳酸的联合处理对  $\text{Fe}^{2+}$  氧化耦合 DNRA 的过程均表现为显著的促进作用。推测产生该现象的原因有两方面。一方面, 在高  $\text{Fe}^{2+}$  浓度下, 氧气存在和乳酸添加的处理使常熟水稻土中的电子需求达到饱和, DNRA 过程受限因素转为  $\text{NO}_3^-$ 。另一方面, 由于桃源水稻土具有较高的  $\text{NH}_4^+$ -N, 氧气促进了环境中硝化过程的进行, 在硝化细菌的作用下, 土壤中的  $\text{NH}_4^+$ -N 逐渐转为  $\text{NO}_3^-$ -N, 使得桃源水稻土中  $\text{NO}_3^-$  浓度进一步提升, 因而表现为较高的电子需求, 电子供体仍是桃源水稻土中 DNRA 过程的主要限制因素。综上所述,  $\text{Fe}^{2+}$  氧化过程为 DNRA 过程提供了电子, 氧气存在和碳源添加通过提高电子供应的方式促进  $\text{Fe}^{2+}$  氧化耦合 DNRA 过程, 但是当该过程中电子供应饱和时, 氮源 ( $\text{NO}_3^-$ -N 和  $\text{NH}_4^+$ -N) 仍是调节  $\text{Fe}^{2+}$  氧化耦合 DNRA 过程的重要因素。

## 4 结 论

常熟和桃源两种水稻土中存在 Fe<sup>2+</sup>氧化耦合 DNRA 过程。氧气和乳酸的单独、联合处理均起到促进 DNRA 过程的作用, 但对 Fe<sup>2+</sup>氧化耦合 DNRA 过程的作用在不同水稻土之间不一致。在桃源水稻土中, 各处理均促进了 Fe<sup>2+</sup>氧化耦合 DNRA 过程; 而在常熟水稻土中, 800 μmol·L<sup>-1</sup> Fe<sup>2+</sup>浓度下, 单一乳酸及氧气乳酸联合处理对 Fe<sup>2+</sup>氧化耦合 DNRA 过程起到显著抑制作用。因此, 未来研究水稻土 Fe<sup>2+</sup>氧化耦合 DNRA 过程时, 还应纳入更多土壤样本, 综合考察环境因子和土壤性质对该过程的影响。

**致 谢** 感谢中国科学院南京土壤研究所柴延超、陈顺涛等同学在样品测试与分析中给予的帮助!

### 参考文献 (References)

- [ 1 ] Yin S X. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium in submerged soils[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2000.[殷士学. 淹水土壤中硝态氮异化还原成铵过程的研究[D].南京: 南京农业大学, 2000.]
- [ 2 ] Yin S X, Chen D, Chen L M, et al. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium and responsible microorganisms in two Chinese and Australian paddy soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2002, 34 ( 8 ): 1131—1137.
- [ 3 ] Lu W W, Shi W M. Potential of dissimilatory nitrate reduction to ammonium in paddy soils in paddy soils in the Taihu Lake region as affected by irrigation with tail water from pig rearing[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2012, 49 ( 6 ): 1120—1127.[卢伟伟, 施卫明. 养猪场处理尾水灌溉对太湖地区水稻土硝酸根异化还原为铵的影响[J]. *土壤学报*, 2012, 49 ( 6 ): 1120—1127.]
- [ 4 ] Shan J, Zhao X, Sheng R, et al. Dissimilatory nitrate reduction processes in typical Chinese paddy soils: Rates, relative contributions, and influencing factors[J]. *Environmental Science and Technology*, 2016, 50 ( 18 ): 9972—9980.
- [ 5 ] Pandey A, Suter H, He J Z, et al. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium dominates nitrate reduction in long-term low nitrogen fertilized rice paddies[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2019, 131 ( 4 ): 149—156.
- [ 6 ] Weber K A, Urrutia M M, Churchill P F, et al. Anaerobic redox cycling of iron by freshwater sediment microorganisms[J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8 ( 1 ): 100—113.
- [ 7 ] Coby A J, Picardal F, Shelobolina E, et al. Repeated anaerobic microbial redox cycling of iron[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77 ( 17 ): 6036—6042.
- [ 8 ] Robertson E K, Roberts K L, Burdorf L D W, et al. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium coupled to Fe ( II ) oxidation in sediments of a periodically hypoxic estuary[J]. *Limnology and Oceanography*, 2016, 61 ( 1 ): 365—381.
- [ 9 ] Chen P C, Li X M, Li F B. Shifts of microbial communities during Fe ( II ) oxidation coupled to nitrate reduction in paddy soil[J]. *China Environmental Science*, 2017, 37 ( 1 ): 358—366.[陈鹏程, 李晓敏, 李芳柏. 水稻土 Fe ( II ) 氧化耦合 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>还原的微生物变化[J]. *中国环境科学*, 2017, 37 ( 1 ): 358—366.]
- [ 10 ] Wang M, Hu R, Ruser R, et al. Role of chemodenitrification for N<sub>2</sub>O emissions from nitrate reduction in rice paddy soils[J]. *ACS Earth and Space Chemistry*, 2020, 4 ( 1 ): 122—132.
- [ 11 ] Li J F, Chai Y C, Chen S T, et al. Measurement of denitrification, Anammox, DNRA rates, and net N<sub>2</sub> flux in paddy soil using a membrane inlet mass spectrometer[J]. *Journal of Agri-Environment Science*, 2019, 38 ( 7 ): 1541—1549.[李进芳, 柴延超, 陈顺涛, 等. 利用膜进样质谱仪测定水稻土几种厌氧氮转化速率. *农业环境科学学报*[J], 2019, 38 ( 7 ): 1541—1549.]
- [ 12 ] Roberts K L, Kessler A J, Grace M R, et al. Increased rates of dissimilatory nitrate reduction to ammonium ( DNRA ) under oxic conditions in a periodically hypoxic estuary[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2014, 133 ( 3 ): 313—324.
- [ 13 ] Yin G Y, Hou L J, Liu M, et al. DNRA in intertidal sediments of the Yangtze Estuary[J]. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 2017, 122 ( 8 ): 1988—1998.
- [ 14 ] van den Berg E M, Elisrio M P, Kuenen J G, et al. Fermentative bacteria influence the competition between denitrifiers and DNRA bacteria[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1684.
- [ 15 ] Tao Y L, Wen D H. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium: the potential and impacts in estuarine regions[J]. *Microbiology China*, 2016, 43 ( 1 ): 172—181.[陶怡乐, 温东辉. 细菌硝酸盐异化还原成铵过程及其在河口生态系统中的潜在地位与影响[J]. *微生物学通报*, 2016, 43 ( 1 ): 172—181.]
- [ 16 ] Roberts K L, Eate V M, Eyre B D, et al. Hypoxic events stimulate nitrogen recycling in a shallow salt-wedge estuary: The Yarra River Estuary, Australia[J]. *Limnology and Oceanography*, 2012, 57 ( 5 ): 1427—1442.
- [ 17 ] Yin G Y, Hou L J, Liu M, et al. A novel membrane inlet mass spectrometer method to measure <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> for isotope-enrichment experiments in aquatic ecosystems[J]. *Environmental Science and Technology*, 2014, 48 ( 16 ): 9555—9562.
- [ 18 ] Nielsen J L, Nielsen P H. Microbial nitrate-dependent

- oxidation of ferrous iron in activated sludge[J]. Environmental Science and Technology, 1998, 32(22): 3556—3561.
- [ 19 ] Yoon S, Cruz-García C, Sanford R, et al. Denitrification versus respiratory ammonification: Environmental controls of two competing dissimilatory  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  reduction pathways in *Shewanella loihica* strain PV-4[J]. The ISME Journal, 2015, 9(5): 1093—1104.
- [ 20 ] Wilks J, Slonczewski J. pH of the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*: Rapid measurement by green fluorescent protein fluorimetry[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(15): 5601—5607.
- [ 21 ] Abraham Z H L, Smith B E, Howes B D, et al. pH-dependence for binding a single nitrite ion to each type-2 copper centre in the copper-containing nitrite reductase of *Alcaligenes xylosoxidans*[J]. Biochemical Journal, 1997, 324(2): 511—516.
- [ 22 ] Kajie S I, Anraku Y. Purification of a hexaheme cytochrome  $c_{552}$  from *Escherichia coli* K12 and its properties as a nitrite reductase[J]. European Journal of Biochemistry, 1986, 154(2): 457—463.
- [ 23 ] Zhang J B, Lan T, Muller C, et al. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) plays an important role in soil nitrogen conservation in neutral and alkaline but not acidic rice soil[J]. Journal of Soils and Sediments, 2015, 15(3): 523—531.
- [ 24 ] Rahman M M, Roberts K L, Grace M R, et al. Role of organic carbon, nitrate and ferrous iron on the partitioning between denitrification and DNRA in constructed stormwater urban wetlands[J]. Science of the Total Environment, 2019, 666(5): 608—617.
- [ 25 ] Carlson H K, Clark I C, Blazewicz S J, et al. Fe(II) oxidation is an innate capability of nitrate-reducing bacteria that involves abiotic and biotic reactions[J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(14): 3260—3268.
- [ 26 ] Hansen H C B, Koch C B, NanckeKrogh H, et al. Abiotic nitrate reduction to ammonium: Key role of green rust[J]. Environmental Science and Technology, 1996, 30(6): 2053—2056.
- [ 27 ] Weber K A, Picardal F W, Roden E E. Microbially catalyzed nitrate-dependent oxidation of biogenic solid-phase Fe(II) compounds[J]. Environmental Science and Technology, 2001, 35(8): 1644—1650.
- [ 28 ] Hou L J, Zheng Y L, Liu M, et al. Anaerobic ammonium oxidation and its contribution to nitrogen removal in China's coastal wetlands[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 15621.
- [ 29 ] Smith C J, Dong L F, Wilson J, et al. Seasonal variation in denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonia process rates and corresponding key functional genes along an estuarine nitrate gradient[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 542.
- [ 30 ] Chen Z, Wang C H, Gschwendtner S, et al. Relationships between denitrification gene expression, dissimilatory nitrate reduction to ammonium and nitrous oxide and dinitrogen production in montane grassland soils[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2015, 87(8): 67—77.
- [ 31 ] Silver W L, Thompson A W, Reich A, et al. Nitrogen cycling in tropical plantation forests: Potential controls on nitrogen retention[J]. Ecological Applications, 2005, 15(5): 1604—1614.
- [ 32 ] Yang W H, Ryals R A, Cusack D F, et al. Cross-biome assessment of gross soil nitrogen cycling in California ecosystems[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2017, 107(4): 144—155.
- [ 33 ] Fazzolari E, Nicolardot B, Germon J C. Simultaneous effects of increasing levels of glucose and oxygen partial pressures on denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium in repacked soil cores[J]. European Journal of Soil Biology, 1998, 34(1): 47—52.
- [ 34 ] Dong L F, Sobey M N, Smith C J, et al. Dissimilatory reduction of nitrate to ammonium, not denitrification or anammox, dominates benthic nitrate reduction in tropical estuaries[J]. Limnology and Oceanography, 2011, 56(1): 279—291.
- [ 35 ] Liu C, Hou L J, Liu M, et al. Coupling of denitrification and anaerobic ammonium oxidation with nitrification in sediments of the Yangtze Estuary: Importance and controlling factors[J]. Estuarine Coastal and Shelf Science, 2019, 220(5): 64—72.
- [ 36 ] Seitzinger S P. Linkages between organic matter mineralization and denitrification in eight riparian wetlands[J]. Biogeochemistry, 1994, 25(1): 19—39.
- [ 37 ] Burgin A J, Hamilton S K. Have we overemphasized the role of denitrification in aquatic ecosystems? A review of nitrate removal pathways[J]. Frontiers in Ecology and the Environment, 2007, 5(2): 89—96.
- [ 38 ] Murphy A E, Bulseco A N, Ackerman R, et al. Sulphide addition favours respiratory ammonification (DNRA) over complete denitrification and alters the active microbial community in salt marsh sediments[J]. Environmental Microbiology, 2020, 22(6): 2124—2139.

(责任编辑: 卢 萍)