

DOI: 10.11766/trxb202107190370

陈吉吉, 荆红卫, 曹文超, 陶蕾, 王敬国. 亚硝酸盐添加对土壤硝化和反硝化基因转录活性及 N₂O 排放的影响[J]. 土壤学报, 2023, 60 (3): 726–737.

CHEN Jiji, JING Hongwei, CAO Wenchao, TAO Lei, WANG Jingguo. Effects of Nitrite Addition on Transcription Activity of Nitrification and Denitrification Functional Genes and N₂O Emission in Soil [J]. Acta Pedologica Sinica, 2023, 60 (3): 726–737.

亚硝酸盐添加对土壤硝化和反硝化基因转录活性及 N₂O 排放的影响*

陈吉吉^{1, 2}, 荆红卫¹, 曹文超³, 陶蕾¹, 王敬国^{2†}

(1. 北京市生态环境监测中心, 北京 100048; 2. 中国农业大学资源与环境学院, 北京 100193; 3. 潍坊科技学院贾思勰农学院, 山东寿光 262700)

摘要: 设施菜田土壤氧化亚氮 (N₂O) 脉冲式排放期间通常伴随着亚硝酸盐 (NO₂⁻) 的大量积累, 为揭示 NO₂⁻ 对设施菜田土壤 N₂O 排放的影响机制, 以两种典型蔬菜种植区土壤 (碱性土壤/酸性土壤) 为研究对象, 通过室内培养试验, 对比厌氧和好氧培养条件下添加 NO₂⁻ 后两种土壤无机氮转化与 N₂O、氮气 (N₂) 和二氧化碳 (CO₂) 等气体排放, 以及氨氧化单加氧酶 α 亚基调控基因 (*amoA*)、亚硝酸盐还原酶调控基因 (*nirK* 和 *nirS*, 统称 *nir*) 和 N₂O 还原酶调控基因 (*nosZ*) 的丰度和转录情况。结果显示: 受 pH 等环境因素影响, 土壤中 NO₂⁻ 含量并不一定与 N₂O 排放之间存在相关性, 但添加 NO₂⁻ 的处理显著增加了两种土壤的 N₂O 排放量和 N₂O/(N₂O+N₂) 指数 (*I*_{N₂O}) (*P*<0.05)。碱性土壤中, 60 mg·kg⁻¹ 外源 NO₂⁻ 对土壤 CO₂ 排放无明显抑制作用, 厌氧培养条件下 *nirK* 基因、好氧培养条件下 *amoA* 和 *nirS* 基因均出现了添加 NO₂⁻ 后转录拷贝数显著高于空白处理的现象, 而 *nosZ* 基因无此现象。酸性土壤中, *amoA* 转录活性整体较低, 好氧空白处理时 *nirS* 基因转录拷贝数随培养时间的延长而增加 (*P*<0.05); 60 mg·kg⁻¹ 外源 NO₂⁻ 明显降低了酸性土壤的 CO₂ 排放量、相关基因的丰度及转录拷贝数。上述结果显示, 土壤中积累的 NO₂⁻ 会通过诱导 *nir* 基因转录与 N₂O 还原酶竞争电子和抑制 N₂O 还原酶活性等途径, 增加土壤的 *I*_{N₂O}, 影响有氧条件下 N₂O 的排放途径, 研究结果将为探索设施菜田土壤氮素高效利用和 N₂O 减排提供科学依据。

关键词: NO₂⁻; N₂O; N₂O/(N₂O+N₂) 指数; 硝化和反硝化功能基因转录; pH; 异养反硝化

中图分类号: X511 **文献标志码:** A

Effects of Nitrite Addition on Transcription Activity of Nitrification and Denitrification Functional Genes and N₂O Emission in Soil

CHEN Jiji^{1, 2}, JING Hongwei¹, CAO Wenchao³, TAO Lei¹, WANG Jingguo^{2†}

(1. Beijing Municipal Ecological and Environmental Monitoring Center, Beijing 100048, China; 2. College of Resource and Environment, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 3. Jia-Sixie College of Agriculture, Weifang University of Science and Technology,

* 国家自然科学基金项目 (41230856) 和北京市科技重大专项项目 (Z181100005518009) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 41230856) and the Major Science and Technology Projects of Beijing, China (No. Z181100005518009)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: wangjg@cau.edu.cn

作者简介: 陈吉吉 (1989—), 女, 陕西商洛人, 博士, 主要研究方向为土壤氮素转化过程中微生物作用机制。E-mail: cateapple@163.com

收稿日期: 2021-07-19; 收到修改稿日期: 2022-07-25; 网络首发日期 (www.cnki.net): 2022-09-27

Shouguang, Shandong 262700, China)

Abstract: 【Objective】 Studies relating soil N availability to N₂O emissions commonly focus on NO₃⁻ and in some cases NH₄⁺. Thus, less effort has been devoted to measuring soil NO₂⁻ despite its role as a central substrate in N₂O production. 【Method】 In this study, two typical greenhouse vegetable soils (alkaline vs. acid soil) were selected to explore the influencing mechanism of NO₂⁻ on N₂O emission. Also, its association with the inorganic nitrogen transformation processes, gaseous emission (N₂O, N₂, CO₂), and the abundances and transcription copies of functional genes (*amoA*, *nirK*, *nirS* and *nosZ*) under anaerobic (0% O₂) and aerobic (21% O₂) conditions through in-lab incubation and real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR). 【Result】 The natural accumulation and tolerance of NO₂⁻ were higher in alkaline soil than in acidic soil. With respect to pH, the relative concentration of NO₂⁻ in soil did not correlate with N₂O emissions. However, the addition of NO₂⁻ significantly increased the N₂O emission and N₂O/(N₂O+N₂) index (*I*_{N₂O}) of the two soils (*P*<0.05), and decreased the N₂ emission in both soils under anaerobic conditions (50.9% and 94.2% in alkaline and acidic soils, respectively). In the alkaline soil, exogenous NO₂⁻ at 60 mg·kg⁻¹ had no significant inhibition effect on soil CO₂ emission, and the transcription copies of *nirK* gene at 16 h under anaerobic incubation, *amoA* gene at 16 h and *nirS* gene at 84 h under aerobic incubation were significantly higher than that of control check (N0), but *nosZ* gene had no such phenomenon. In acid soil, the overall gene and transcription activity of *amoA* was low, and the transcription copies of the *nirS* gene increased with the increase of incubation time in aerobic N0 treatment (*P*<0.05). Exogenous NO₂⁻ at 60 mg·kg⁻¹ significantly reduced the CO₂ emission, and the abundance and transcription copies of related genes in the acid soil. Oxygen significantly reduced the transcription copies of denitrification functional genes in both soils, and *nirK* was more sensitive. Compared with the N0 treatment under anaerobic incubation, the transcription copies of *nirK*, *nirS* and *nosZ* in alkaline soil were reduced by 97.3%, 74.5% and 89.0%, respectively, at 16 h under aerobic incubation. The variation trend of the denitrification genes transcription copies in both soils under aerobic conditions was different. In the alkaline soil, the transcription copies of denitrification functional genes were significantly decreased with the increase in incubation time (*P*<0.05). In the acidic soil, only *nirK* transcription copies decreased significantly with the increase of incubation time (*P*<0.05) in N0 treatment under aerobic conditions, while *nirS* and *nosZ* transcription copies increased, or decreased first and then increased, respectively. 【Conclusion】 The accumulation of NO₂⁻ in soils will increase soil *I*_{N₂O} and affect the N₂O emission pathway by inducing *nir* gene transcription to compete for electrons with N₂O reductase and inhibiting N₂O reductase activity. These results provide a scientific basis for exploring the efficient utilization of soil nitrogen and N₂O reduction in greenhouse vegetable soils. **Key words:** Nitrite (NO₂⁻); Nitrous oxide (N₂O); N₂O/(N₂O+N₂) index (*I*_{N₂O}); Nitrification and denitrification genes transcription; pH; Heterotrophic denitrification (HD)

N₂O 是重要的温室气体, 由于其极强的温室效应和臭氧层破坏潜势, 以及长达 120 年的生命周期, 一直是全球关注和研究的热点^[1-2]。农业是重要的 N₂O 排放源, 农田土壤 N₂O 排放量占人为排放源的 66%, 且主要发生在施肥和灌水后的脉冲式排放^[3], 而 N₂O 脉冲式排放期间通常伴随着 NO₂⁻ 的大量积累^[4]。Maharjan 和 Venterea^[5] 研究结果显示, NO₂⁻ 解释了大约 44% 的全年 N₂O 排放, Ma 等^[6] 研究结果显示, 由于添加的 NH₄⁺ 或尿素抑制了 NO₂⁻ 向 NO₃⁻ 的转化, 导致土壤出现 NO₂⁻ 积累, 进而导致施肥后土壤 N₂O 出现排放峰值。因此, 了解 NO₂⁻ 对土壤 N₂O 脉冲式排放的影响机制, 可为土壤 N₂O 减排措

施的制定提供理论依据。

NO₂⁻ 引起的 N₂O 积累, 一方面来自 NO₂⁻ 还原酶 (NIR) 与 N₂O 还原酶 (N₂OR) 对电子的竞争, 电子竞争的加剧会导致 NIR 的电子通量高于 N₂OR 的电子通量, 造成 N₂O 积累^[7]; 另一方面则来自 NO₂⁻ 对 N₂OR 活性的抑制^[8-9]。此外, NO₂⁻ 会通过诱导相关基因的表达改变 N₂O 的排放途径, 部分研究认为, 出于解毒机制, NO₂⁻ 会诱导含有 *nirK* 基因的氨氧化细菌 (ammonia-oxidizing bacteria, AOB) ^[10], 利用氨氧化产生的电子还原 NO₂⁻, 并最终 N₂O 作为终产物, 发生硝化细菌的反硝化 (nitrifier denitrification, ND) 作用, 该途径被认为是有氧条

件下土壤氮素的主要损失途径^[1-2, 11]; 也有研究认为 NO₂⁻ 积累会促进土壤 NO 排放, 高浓度的 NO 会通过激活转录因子 (NNR) 蛋白的活性而促进 *nirS* 基因的表达^[12], 进而发生异养反硝化 (heterotrophic denitrification, HD) 作用。但是, 以上研究主要是基于水体或单菌株的研究成果, 很少有研究从转录层面系统地分析土壤中 NO₂⁻ 积累与功能基因转录、N₂O 排放间的关系。

本研究选取两种典型蔬菜种植区土壤, 模拟菜田土壤灌溉 (厌氧培养) 和正常持水条件下 (有氧培养) 出现 NO₂⁻ 积累后无机氮转化、气体排放 (N₂O、N₂ 和 CO₂) 和功能基因 (*amoA*, *nirK*, *nirS* 和 *nosZ*) 的丰度和转录情况, 分析不同氧分压下菜田土壤中 NO₂⁻ 的转化规律、NO₂⁻ 添加与功能基因转录、N₂O 和 N₂ 排放间的关系, 以期揭示 NO₂⁻ 对设施菜田土壤 N₂O 排放的影响机制, 为识别土壤 N₂O 排放途径、制定有效的 N₂O 减排措施提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 采样地点及土壤样品采集

本试验所用的土壤样品采自于华北平原东部两个定位试验。一份取自山东省寿光市中国农业大学蔬菜研究院示范基地日光温室长期定位试验点 (简称 VRS, 36°85'N, 118°87'E), 温室建于 2007 年, 试验设置 4 个处理, 分别为传统漫灌+过度施肥 (CFF)、传统漫灌+过度施肥+小麦秸秆 (CFF+S)、滴灌+优化施肥 (DIF)、滴灌+优化施肥+小麦秸秆 (DIF+S), 试验点的更多细节可参考 Fan 等^[13]的研究。另一份供试土壤采集于山东省寿光市古城镇罗

家村日光温室长期定位试验点 (简称 LJ, 36°85'N, 118°45'E), 温室修建于 1999 年, 试验设置了 4 个处理, 分别为对照 (CK)、有机肥处理 (MN)、优化氮肥处理 (RN) 和传统氮素处理 (CN), 试验点的更多细节可参考 Ren 等^[14]的研究。

本次试验选取的 VRS 和 LJ 两个长期定位试验点土壤样品均为农户习惯施肥处理, 分别为 CFF 和 CN 处理, 种植系统为一年两季番茄。VRS 的施肥措施为在冬春季和秋冬季番茄移栽前, 每季施用风干鸡粪 8 t·hm⁻² (146 kg·hm⁻² 氮) 作为基肥, 追肥时间根据作物的生长发育情况由农户决定, 尿素作为追肥随灌溉水施用, 化学氮肥平均投入量为每季 895 kg·hm⁻² (以 N 计, 下同)。LJ 施肥措施与 VRS 相同, 但其施肥量普遍高于 VRS 土壤, 其中风干鸡粪投入量为每季 10 t·hm⁻² (211 kg·hm⁻² 氮), 化学氮肥平均氮投入量为每季 1 049 kg·hm⁻²。两个长期定位试验点土壤样品均在冬春季拉秧期 (2014 年 07 月) 采样, 采集土层为 0~20 cm 的耕层土壤, 选 15 个采样点土壤混合为一个样品, 土样过 2 mm 筛后风干备用。

两个长期试验点土壤的基础理化性质差异明显 (表 1)。VRS 土壤 pH 为 8.02 (碱性土壤), 显著高于 LJ 土壤 (pH 为 6.59, 酸性土壤), 但酸性土壤中有有机碳、全氮、NH₄⁺ 和 NO₃⁻ 含量均显著高于碱性土壤。

1.2 试验设计与方法

前期研究结果显示, 不同氮肥投入量下碱性土壤中 NO₂⁻-N 的最高累积量为 60 mg·kg⁻¹ 左右, 为了保证两种土壤外源底物投入量一致, 培养开始时对碱性和酸性土壤同时添加 60 mg·kg⁻¹ 的 NO₂⁻-N 作为

表 1 表层土壤基础理化性质

Table 1 Soil physical and chemical properties

地点 Location	土壤类型 Soil type	pH	有机碳 Organic carbon/ (g·kg ⁻¹)	全氮 Total N/ (g·kg ⁻¹)	铵态氮 NH ₄ ⁺ -N/ (mg·kg ⁻¹)	硝态氮 NO ₃ ⁻ -N/ (mg·kg ⁻¹)
VRS	黏壤土 ^①	8.02a	11.7b	1.20b	3.37b	94.2b
LJ	砂土 ^②	6.59b	15.2a	1.75a	21.6a	168a

注: VRS 表示蔬菜研究院示范基地日光温室长期定位试验点土壤; LJ 表示罗家村日光温室长期定位试验点土壤。同列不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), pH 测定的水土比为 2.5: 1。Note: VRS is the soil from the solar greenhouse in the demonstration base of the vegetable research station. LJ is the soil from the long-term location test site of LuoJia village solar greenhouse. Different lowercase letters indicate significant differences in each row ($P < 0.05$); pH at 2.5: 1 of water: soil (v/w). ①Clay loam; ②Sandy soil.

底物。称取相当于 10.0 g 烘干土的预培养土样于 120 mL 血清瓶，设置四个处理，分别为：(1) 厌氧不添加底物 (N0 (0%)); (2) 厌氧 + 60 mg·kg⁻¹ NaNO₂ (N60 (0%)); (3) 21% O₂ 不添加底物 (N0 (21%)); (4) 21% O₂ + 60 mg·kg⁻¹ NaNO₂ (N60 (21%))。模拟分析菜田土壤灌溉 (厌氧培养) 和田间正常持水条件下 (有氧培养) 施肥后出现 NO₂⁻-N 积累时土壤氮素转化、气体排放和功能基因转录情况，下文中 N0 和 N60 分别代表不添加底物和添加 60 mg·kg⁻¹ NaNO₂ 的处理。

具体的试验操作为：将灭菌水或含有亚硝酸盐的混合液依次用注射器均匀喷洒在血清瓶内的土壤中，并用灭菌水调节土壤的含水量为 250 g·kg⁻¹。所有血清瓶用铝盖密封后，根据试验设置利用抽真空-洗气系统 (北京帅恩科技有限公司) 直接用 0% 或 21% 的 O₂/He 混合气体洗气 3 次后，充气 3 min 并平衡血清瓶内气压，随后将所有血清瓶置于 20℃ 恒温水浴槽中培养，利用 Robot 系统每间隔 4 h 测定一次培养瓶顶空气体 (O₂、N₂O、N₂、CO₂) 的动态变化，具体操作可见曹文超^[4]的描述。根据气体监测结果，分别于 0、16、84 h 对相同培养条件下的静态培养试验进行破坏性采样，用于土壤 RNA 样品的提取，土壤 DNA 的提取频率与无机氮相同，仅在培养开始 (0 h) 和培养结束 (84 h) 时进行，总培养时间为 84 h，每处理 3 个重复。

1.3 气体动态监测及土壤化学分析

恒温培养槽内的样品连接 Robot 自动培养系统，实时在线监测 O₂、N₂O、N₂、CO₂ 的动态变化。该系统由恒温培养系统、自动进样系统和气体分析模块三部分组成，实现了培养、采样、分析过程的全部自动化操作，系统的运行和采样详见 Molstad 等^[15]。

土壤理化性质分析方法参考《土壤农化分析》^[16]。破坏性采样完成后，立即称取 10.0 g 土壤样品于 200 mL 的聚乙烯瓶中，加入 50 mL 的氯化钾溶液 (1 mol·L⁻¹)，20±2℃ 恒温振荡提取 20 min 后，转移大约 40 mL 提取液于 50 mL 聚乙烯离心管中，在 3 000 r·min⁻¹ 条件下离心分离 5 min，取 10 mL 上清液 -20℃ 保存，随后用连续流动分析仪 (TRACCS2000，德国) 测定 NH₄⁺ 和 NO₃⁻ 的含量；同时取一定量上清液于 25 mL 比色管中，按要求逐

步加入乙二醇四乙酸溶液、对氨基苯磺酰胺、盐酸萘乙二胺，稀释定容至比色管刻度线后立即混匀，放置 20 min 后通过紫外可见分光光度法进行比色，测定土样 NO₂⁻ 含量。土壤 pH 采用酸度计测定，水土比为 2.5 : 1；土壤全氮含量利用碳氮分析仪测定 (Thermo Scientific Flash 2000 NC Analyzer，美国)；有机碳含量采用重铬酸钾-硫酸溶液氧化滴定法测定。

1.4 土壤核酸提取

土壤细菌 DNA 使用试剂盒 MP FastPrep1-24 (MP Biomedicals，美国) 进行提取，根据制造商要求进行操作。土壤 RNA 提取参考 Ma 等^[17]的方法并根据提取土样的实际理化性质进行优化，粗提的 RNA 使用 RNase-Free DNase 试剂盒 (Promega，美国) 去除其中 DNA 后，取 2 μL 消化后产物以 27f/907r 为引物进行 16S rRNA 扩增，验证粗提 RNA 中 DNA 是否被消化完全；使用 RNeasy® Mini 试剂盒 (Qiagen，德国) 进行 RNA 纯化。使用 NanoDrop 分光光度计 (ND 1000，Thermo Scientific，美国) 测量试剂盒提取的 DNA 以及纯化后的 RNA 样品的纯度及浓度。纯化后的 RNA 样品采用随机引物以及 Prime Script Reverse Transcriptase 试剂盒 (Promega，美国) 进行反转录，DNA 及合成的 cDNA 样品置于 -20℃ 冰箱保存备用。

1.5 定量 PCR

使用 Bio-Rad iQ5 (Bio-Rad Laboratories，Mississauga，加拿大) 对硝化 (*amoA*) 和反硝化 (*nirK*、*nirS* 和 *nosZ*) 功能基因丰度及其转录拷贝数进行定量 PCR 扩增。20 μL 反应体系包括：10 mL 的荧光定量 PCR 预混液 (Promega，美国)，引物各 0.5 μmol·L⁻¹，2 μL 的 cDNA 模板或经过 10 倍稀释的 DNA 模板，用灭菌高纯水补足 20 μL。定量 PCR 标线采用含有 *amoA*、*nirK*、*nirS* 和 *nosZ* 基因的克隆进行制备，首先进行目的基因扩增，扩增条件如表 2 所示，将含有目的基因的克隆在 Luria-Bertani 培养液中过夜培养，提取质粒纯化并测定质粒浓度，根据摩尔常数计算目标基因的拷贝数，按照 10 倍浓度梯度进行稀释制作标准曲线 (10⁻¹~10⁻⁸)。每个 96 孔板中包含标准物质、样品和阴性对照，每个样品、标准物质和阴性对照 3 个重复，将得到的结果以标准质粒拷贝数的对数值为横坐标，以对应的循环阈值为纵坐标建立标准曲线，根

据标准曲线计算样品基因丰度,循环结束后进行溶解曲线分析以检测 PCR 扩增的特异性。本研究中,扩增效

率大于等于 80%,溶解曲线为单峰且阴性对照无产物被认为是有效的 PCR 扩增。

表 2 定量 PCR 的引物及扩增条件

Table 2 Primers and conditions used in the real-time qPCR analysis

目的基因 Target gene	引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	扩增条件 Thermal conditions	参考文献 References
<i>amoA</i>	amoA1F	5'-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3'	95℃ 5 min, 1 个循环; 95℃ 30 s, 56℃	[18]
	amoA2R	5'-CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3'	30 s, 72℃ 60 s, 40 个循环	
<i>nirK</i>	FlaCu	5'-ATCATGGTCTGCGCG-3'	94℃ 3 min, 1 个循环; 94℃ 30 s, 63℃	[19]
	R3Cu	5'-GCCTCGATCAGRTTGTGGT-3'	30 s, 72℃ 60 s, 40 个循环	
<i>nirS</i>	cd3aF	5'-G TSAACG TSAAGGARACSGG-3'	94℃ 3 min, 1 个循环; 94℃ 30 s, 58℃	[20]
	R3cd	5'-GASTTCGGRTGSGTCTTGA-3'	45 s, 72℃ 60 s, 40 个循环	
<i>nosZ</i>	2F	5'-CGCRACGGCAASAAGGTSMSST-3'	95℃ 3 min, 1 个循环; 95℃ 30 s, 62℃	[21]
	2R	5'-CAKRTGCAKSGCRTGGCAGAA-3'	30 s, 72℃ 60 s, 40 个循环	

1.6 数据处理

根据在线监测的血清瓶中气体数值和标气浓度,计算气体产生量和产生速率^[22]。不同处理条件下 $N_2O/(N_2O+N_2)$ 指数 (I_{N_2O}) 计算公式如下^[22]:

$$I_{N_2O} = \int_0^T N_2O(t)dt / \int_0^T [N_2O(t) + N_2(t)]dt \quad (1)$$

式中, $N_2O(t)$ 、 $N_2(t)$ 为培养时间 t 下气体的累积产生量, T 为培养时间。

数据利用 SPSS 20.0 进行相关性和显著性分析,采用 SigmaPlot 12.5 作图,文中涉及的 NH_4^+ 、 NO_2^- 、 NO_3^- 、 N_2O 、 N_2 、无机氮投入等,均以 N 计。

2 结果

2.1 培养前后土壤无机氮含量的变化

由表 3 可见,培养结束时 N0 (0%) 处理的碱性土壤和酸性土壤 NO_3^- 的减少量分别为 37.6 和 21.6 $mg \cdot kg^{-1}$,且碱性土壤中观察到少量 NO_2^- 积累现象;N60 (0%) 处理时碱性土壤 NO_3^- 和 NO_2^- 的含量同时降低,分别减少了 27.8 和 10.2 $mg \cdot kg^{-1}$,而酸性土壤仅 NO_2^- 含量降低了 25.5 $mg \cdot kg^{-1}$ 。培养前后 N60 (21%) 处理的碱性土壤中 NO_2^- 的减少量与 NO_3^- 的增加量基本持平,分别为 26.3 和 25.3 $mg \cdot kg^{-1}$,但是整个培养过程中酸性土壤 NO_3^- 和 NO_2^- 的含量

无明显变化。

2.2 土壤 N_2O 、 N_2 和 CO_2 的排放

图 1 为 84 h 的培养过程中土壤 N_2O 、 N_2 和 CO_2 的动态变化。培养结束时碱性土壤 N0 (0%) 和 N60 (0%) 处理的 N_2O 排放量分别为 11.6 和 12.5 $mg \cdot kg^{-1}$, N_2 排放量分别为 7.88 和 3.88 $mg \cdot kg^{-1}$;酸性土壤 N0 (0%) 和 N60 (0%) 处理的 N_2O 排放量分别为 9.15 和 11.8 $mg \cdot kg^{-1}$, N_2 排放量分别为 13.2 和 0.78 $mg \cdot kg^{-1}$ 。厌氧条件下添加 NO_2^- 后碱性土壤和酸性土壤 N_2 排放量分别减少了 50.9% 和 94.2%, NO_2^- 的添加显著降低了两种土壤的 N_2O 还原率 ($P < 0.01$)。

好氧条件下土壤 N_2O 和 N_2 排放量较低, N0 处理时碱性土壤和酸性土壤 N_2O+N_2 排放量分别仅为厌氧培养的 1.59% 和 1.97%, 该条件下 N60 处理时两种土壤 N_2O 和 N_2 排放量同时增加,培养结束时碱性土壤 N0 (21%) 和 N60 (21%) 处理的 N_2O+N_2 排放量分别为 0.31 和 0.46 $mg \cdot kg^{-1}$,酸性土壤 N0 (21%) 和 N60 (21%) 处理的 N_2O+N_2 排放量分别为 0.44 和 2.02 $mg \cdot kg^{-1}$ 。

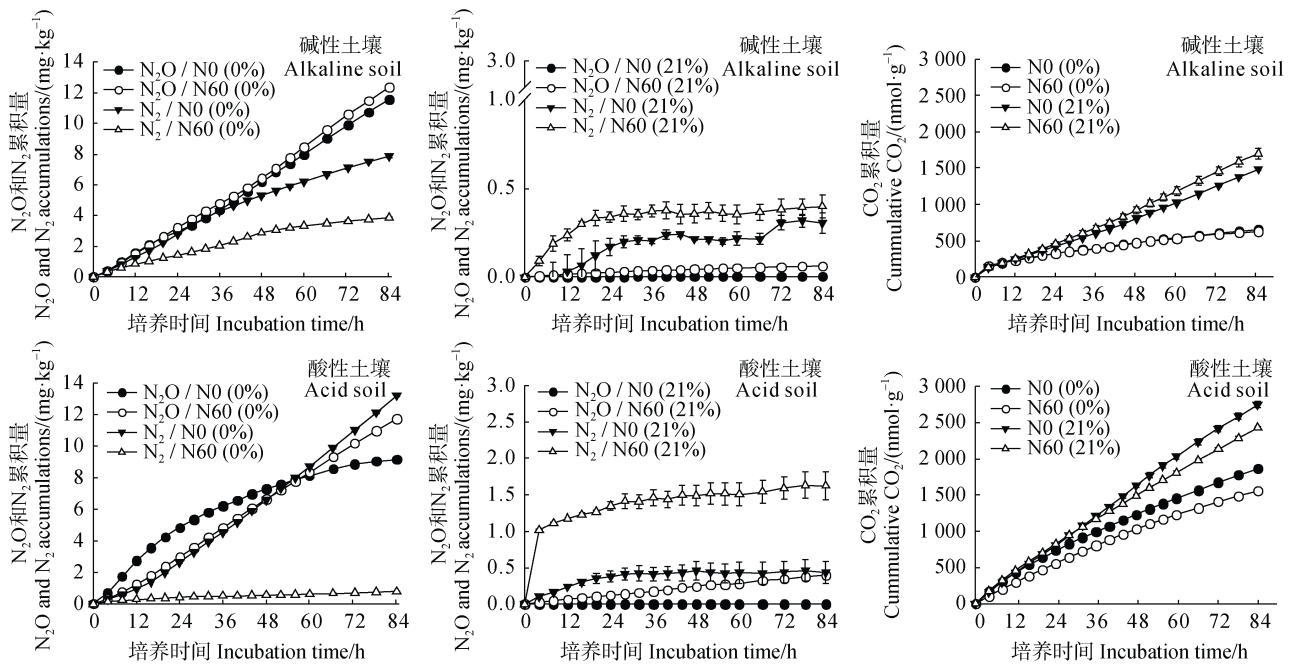
对于碱性土壤, N60 (0%) 处理 CO_2 排放量与 N0 (0%) 处理无显著差异,但 N60 (21%) 处理 CO_2 排放量显著高于 N0 (21%) 处理。对于酸性土壤, N60 (0%) 和 N60 (21%) 处理显著降低了土壤 CO_2 排放量 ($P < 0.05$)。

表 3 0 和 21% 氧分压下培养前后土壤无机氮含量

Table 3 Soil mineral N content before and after the incubation at 0 and 21% of O₂ levels

培养条件 Culture conditions	施氮量 N input/ (mg·kg ⁻¹)	培养时间 Incubation time/h	NH ₄ ⁺ -N/ (mg·kg ⁻¹)		NO ₂ ⁻ -N/ (mg·kg ⁻¹)		NO ₃ ⁻ -N/ (mg·kg ⁻¹)	
			碱性土壤 Alkaline soil	酸性土壤 Acid soil	碱性土壤 Alkaline soil	酸性土壤 Acid soil	碱性土壤 Alkaline soil	酸性土壤 Acid soil
厌氧 (0 O ₂) Anaerobic	0	0	4.32 (0.37) b	36.9 (0.38) b	1.16 (0.00) b	0.23 (0.08) a	80.0 (4.73) a	148 (2.40) a
		84	10.3 (0.22) a	39.9 (0.81) a	3.40 (0.22) a	0.20 (0.00) a	42.4 (0.56) b	127 (8.96) a
	60	0	4.92 (0.30) b	36.1 (0.46) b	59.0 (0.29) a	60.8 (0.96) a	102 (7.43) a	147 (5.92) a
		84	10.5 (0.05) a	41.3 (0.37) a	48.1 (1.65) b	35.4 (0.54) b	74.5 (1.67) b	159 (1.27) a
好氧 (21% O ₂) Aerobic	0	0	3.94 (0.78) a	36.8 (2.22) a	0.99 (0.02)	0.45 (0.06)	75.3 (3.01) a	141 (10.9) a
		84	6.27 (0.10) a	40.8 (0.33) a	NT	NT	73.2 (0.32) a	154 (4.69) a
	60	0	3.05 (0.07) b	35.6 (0.16) b	45.1 (0.19) a	50.2 (0.56) a	95.2 (8.10) a	165 (6.17) a
		84	5.63 (0.23) a	40.9 (0.69) a	18.8 (1.21) b	50.2 (0.26) a	120 (1.15) a	168 (4.70) a

注：括号中的数据表示标准误差。同列不同小写字母表示培养前后无机氮 (NH₄⁺、NO₂⁻、NO₃⁻) 含量差异显著 (P<0.05)。NT 表示未检出。Note: Data in the blanket stand for standard errors. Lowercase letters indicate a significant difference in inorganic nitrogen content (P<0.05) between 0 h and 84 h. NT means not detected.



注：N0 (0%) 和 N60 (0%) 分别表示厌氧培养条件下，不添加底物和添加 60 mg·kg⁻¹ NaNO₂ 的处理；N0 (21%) 和 N60 (21%) 分别表示好氧培养条件下，不添加底物和添加 60 mg·kg⁻¹ NaNO₂ 的处理，下同。Note: N0 (0%) and N60 (0%) represent the treatment without or with NO₂⁻ (60 mg·kg⁻¹) addition under anaerobic culture conditions, respectively. N0 (21%) and N60 (21%) represent the treatments without or with NO₂⁻ (60 mg·kg⁻¹) addition under aerobic culture conditions, respectively. The same as below.

图 1 0%和 21% 氧分压下两种土壤 N₂O、N₂ 和 CO₂ 的动态变化Fig. 1 Dynamics of N₂O, N₂ and CO₂ production following the application of NO₂⁻-N in alkaline soil and acid soil at 0% and 21% of O₂ levels

不同处理条件下两种土壤的 N₂O/(N₂O+N₂) 指数 (I_{N₂O}) 见表 4。N0 处理条件下酸性土壤 I_{N₂O} 低

于碱性土壤，添加 NO₂⁻ 的处理则相反，N60 处理显著增加了两种土壤的 I_{N₂O} (P<0.01)。

表 4 不同处理条件下两种土壤的 $N_2O/(N_2O+N_2)$ 指数 (I_{N_2O})Table 4 The $N_2O/(N_2O+N_2)$ ratio following the application of NO_2^- -N in both soil at 0 and 21% of O_2 levels

施氮量 N input/ ($mg \cdot kg^{-1}$)	0 O_2		21% O_2	
	碱性土壤	酸性土壤	碱性土壤	酸性土壤
	Alkaline soil	Acid soil	Alkaline soil	Acid soil
0	0.59 (0.00) b	0.41 (0.00) b	0.015 (0.00) b	0.0059 (0.00) b
60	0.76 (0.00) a	0.94 (0.00) a	0.12 (0.03) a	0.20 (0.018) a

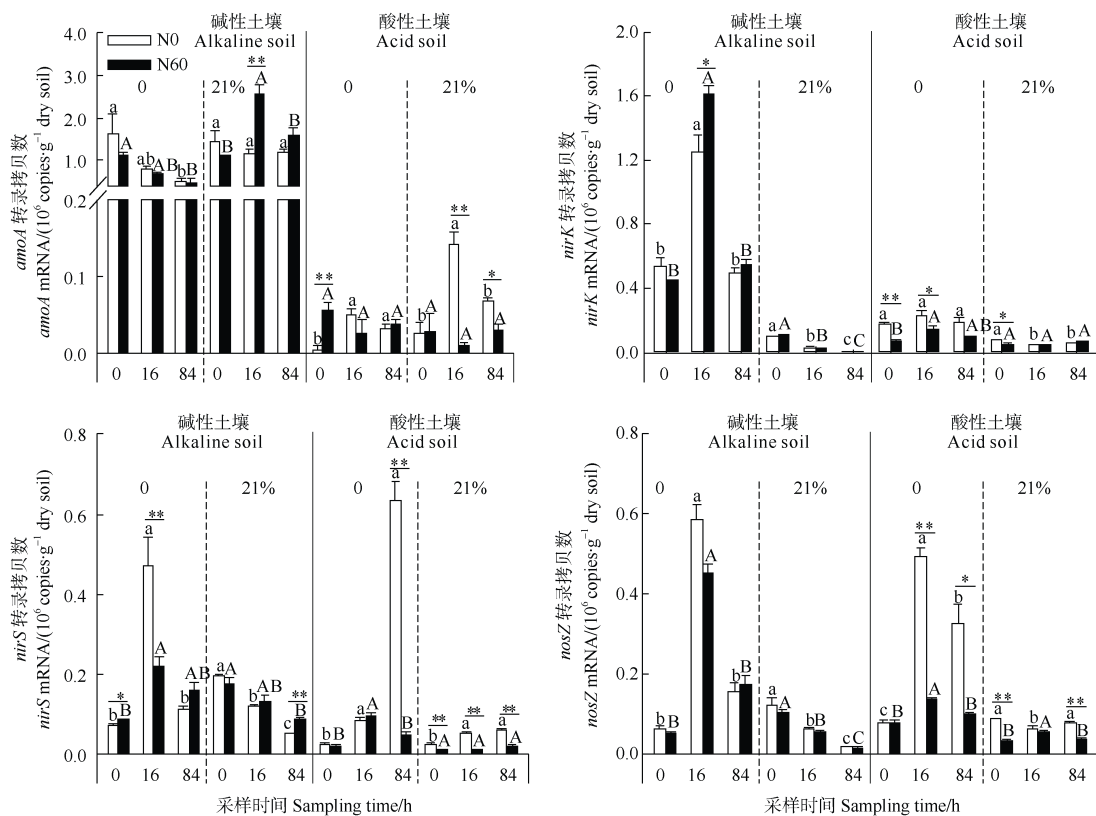
注: 同列不同的小写字母表示 N0 和 N60 处理 I_{N_2O} 差异显著 ($P < 0.01$)。Note: Lowercase letters indicate a significant difference in I_{N_2O} without or with NO_2^- ($60 mg \cdot kg^{-1}$) addition in each column ($P < 0.01$).

2.3 土壤硝化、反硝化功能基因的转录拷贝数动态变化

如图 2 所示, 对于硝化功能基因, 厌氧条件下两种土壤 *amoA* 转录拷贝数整体呈降低的趋势; 有

氧条件下, N60 (21%) 处理显著增加了碱性土壤转录峰值 (16 h) 时 *amoA* 的转录拷贝数 ($P < 0.01$), 但酸性土壤无此现象。

对于反硝化功能基因, 与 N0 (0) 相比, 碱



注: 不同的小写字母表示 N0 处理培养前后差异显著 ($P < 0.05$), 不同的大写字母表示 N60 的处理培养前后差异显著 ($P < 0.05$), *、*和 * 表示 N0 和 N60 处理在 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$ 水平上差异显著。下同。Note: Different lowercase letters indicate a significant difference in N0 treatment, and uppercase letters indicate a significant difference in N60 treatment. Values are the mean of three replicates, and bars represent the mean standard error. *、*, $P < 0.01$; *、*, $P < 0.05$. The same as below.

图 2 0 和 21%氧分压下培养过程中硝化 (*amoA*) 和反硝化 (*nirS*、*nirK* 和 *nosZ*) 功能基因转录拷贝数Fig. 2 Quantitatively analyses the transcription copies of nitrification (*amoA*) and denitrification (*nirS*, *nirK* and *nosZ*) genes during incubation at 0 and 21% of O_2 levels

性土壤 N60 (0) 处理降低了 16 h 时 *nirS* 和 *nosZ* 的转录拷贝数, 尤其是 *nirS*, 表现出极显著差异 ($P < 0.01$), 但显著增加了 *nirK* 基因的转录拷贝数 ($P < 0.05$)。与 N0 (21%) 相比, N60 (21%) 处理对碱性土壤反硝化功能基因的转录整体无显著影响, 仅 *nirS* 基因在培养结束时转录拷贝数显著高于 N0 (21%) 处理 ($P < 0.01$)。酸性土壤中 NO₂⁻ 的添加对硝化和反硝化功能基因的转录表现出明显的抑制作用。

氧气显著降低了反硝化功能基因的转录拷贝数 (图 2), 与 N0 (0) 处理相比, 转录峰值时 (16 h) 碱性土壤 N0 (21%) 处理 *nirK*、*nirS* 和 *nosZ* 转录拷贝数分别降低了 97.3%、74.5% 和 89.0%。有氧条件下 84 h 的培养过程中, 碱性土壤反硝化功能基因的转录拷贝数呈显著降低的趋势 ($P < 0.05$); 酸性土壤中不同反硝化功能基因的转录对氧气的响应不同, 与 N0 (0) 处理相比, 酸性土壤 N0 (21%)

处理培养过程中仅 *nirK* 转录拷贝数显著降低 ($P < 0.05$), *nirS* 和 *nosZ* 转录拷贝数则分别表现出升高或先降低后升高的趋势。

2.4 培养前后土壤硝化、反硝化功能基因拷贝数的变化

如图 3 所示, 碱性土壤中 AOB 的 *amoA* 基因拷贝数高出酸性土壤 1~2 个数量级。对于碱性土壤, 除 N0 (21%) 处理的 *amoA* 基因拷贝数培养结束时显著降低 ($P < 0.05$) 外, 其余硝化、反硝化功能基因培养结束时拷贝数与培养初期无显著差异。

对于酸性土壤, 培养结束时不同处理条件下 *amoA* 基因拷贝数均无显著变化; N0 (0) 处理培养结束时 *nir* 基因拷贝数显著增加 ($P < 0.05$), N0 (21%) 处理培养结束时 *nir* 和 *nosZ* 均呈显著增加的趋势 ($P < 0.05$)。添加 NO₂⁻ 的处理整体降低了酸性土壤反硝化微生物的增殖速度。

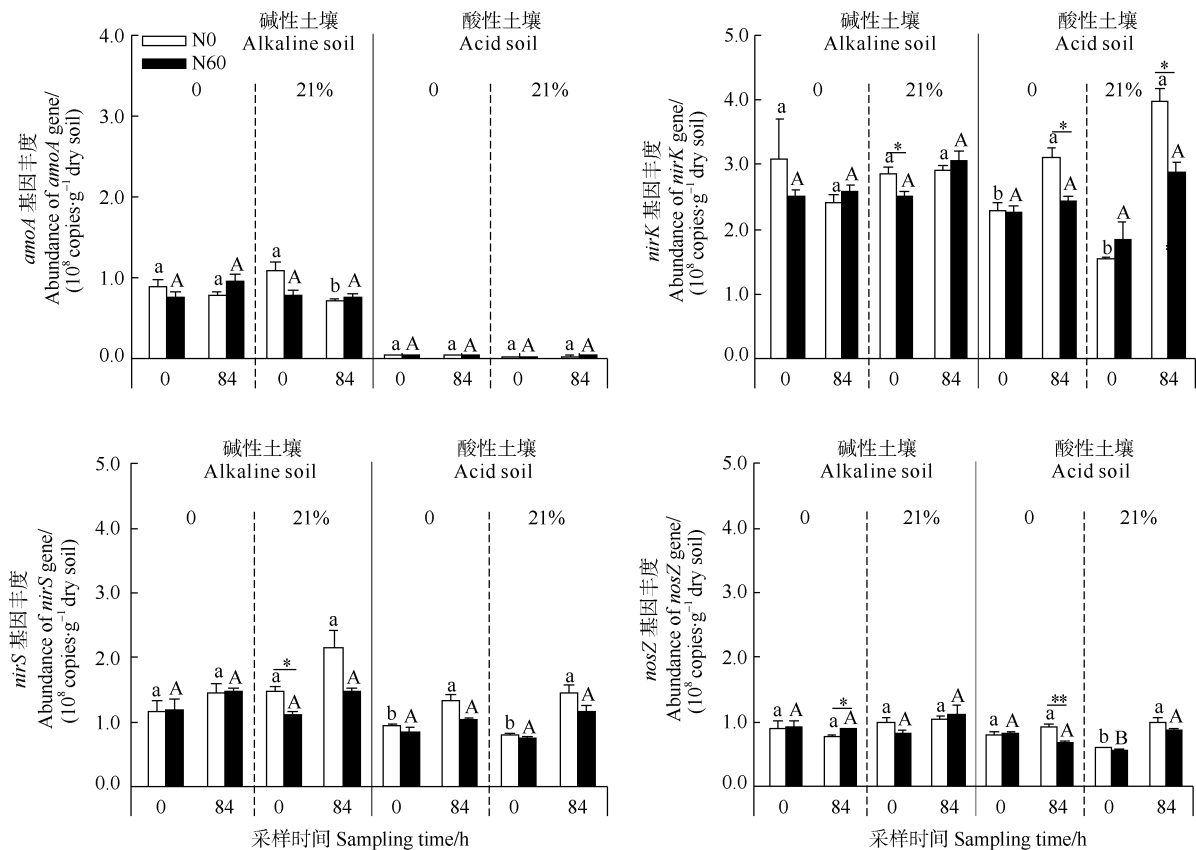


图 3 0 和 21% 氧分压下培养前后硝化 (*amoA*) 和反硝化 (*nirS*、*nirK* 和 *nosZ*) 功能基因丰度

Fig. 3 The abundances of nitrification (*amoA*) and denitrification (*nirS*, *nirK* and *nosZ*) genes before and after the incubation at 0 and 21% of O₂ levels

3 讨论

3.1 土壤中 NO_2^- 的累积规律

本次研究中两种土壤 NO_2^- 累积规律及对 NO_2^- 耐受性明显不同, 碱性土壤中 NO_2^- 的自然积累量及对 NO_2^- 的耐受性更高 (表 3 和图 1), pH 的差异可能是造成两种供试土壤 NO_2^- 累积规律明显不同的原因。土壤中 NO_2^- 的积累量随着 pH 的升高而升高, 高 pH 环境下 NO_2^- 相对稳定, 而低 pH 条件下土壤中 NO_2^- 与 H^+ 结合形成的 HNO_2 可穿透细胞膜, 导致其毒性随着 pH 降低显著增加^[23]。同时, 与 Hu 等^[24] 研究结果一致, 文中碱性土壤 *amoA* 基因丰度及转录活性显著高于酸性土壤 ($P < 0.05$), pH 可能会通过改变土壤菌群结构影响土壤中氮素转化过程^[25]。

3.2 NO_2^- 积累对土壤 N_2O 排放和 $I_{\text{N}_2\text{O}}$ 的影响

添加 NO_2^- 的处理显著增加了两种土壤的 $I_{\text{N}_2\text{O}}$ (表 4)。在 N_2O 大量排放的厌氧条件下, N60 处理时两种土壤 N_2O 排放量增加、 N_2 排放量显著降低 ($P < 0.01$); 好氧条件下 N60 处理时两种土壤 N_2O 和 N_2 排放量同时增加, 且 N_2O 排放量增加比例高于 N_2 。

碱性土壤中, NO_2^- 在厌氧培养条件下诱导土壤 *nirK* 转录, 在好氧条件下诱导土壤 *nirS* 转录, 而对 *nosZ* 基因无明显诱导效应 (图 2), 推测在此类土壤中, NO_2^- 主要是通过诱导 *nir* 转录促进 NIR 的合成, 与 N_2OR 竞争电子, 降低 N_2O 还原效率、增加土壤的 $I_{\text{N}_2\text{O}}$ ^[7, 9]。酸性土壤中 N0 处理几乎未检测到 NO_2^- 的自然积累, 但其 $\text{N}_2\text{O} + \text{N}_2$ 排放量高于碱性土壤, 表明土壤中 NO_2^- 相对含量并不一定与 N_2O 或 N_2 排放之间存在相关性。由图 2 可见, 酸性土壤 N60 (0%) 的处理与 N0 (0%) 处理相比 *nosZ* 转录拷贝数降低, 但仍存在一定量的 *nosZ* 转录, 然而与后者相比, 前者 N_2 排放量减少 94.2%, 土壤几乎未发生 N_2O 还原, 这与 Liu 等^[26] 研究结果一致, 其认为在低 pH 土壤中, 酶活性而不是基因转录活性降低, 是导致低 pH 土壤中 $I_{\text{N}_2\text{O}}$ 增加的主要原因。低 pH 会干扰细胞质中的翻译或细胞周质内蛋白的转运和合成过程^[27-28], 尽管 N_2OR 不是组装和功能依赖于周质条件的唯一还原酶, 然而, 它可能是受低 pH 影响最严重的一种, 反硝化的其他功能酶也位于细胞周质^[28], 这也解释了酸性土壤添加 NO_2^- 后基因转录与气体

排放之间无明显对应关系的原因。此外, NO_2^- 对 N_2OR 活性的抑制也可能是引起 N_2O 积累的重要因素^[8-9], 本次研究中外源 NO_2^- 的添加量为 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($17.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 满足 Baumann 等^[8] 提出的 NO_2^- (17 和 $35 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 大量累积进而对反硝化产生抑制作用的浓度水平。

值得注意的是, 好氧条件下观察到的 N_2 排放量增加现象或许不能简单归结为 N_2OR 活性的增加, 受试验条件的限制, 试验期间洗气、采样过程中不可避免地存在空气中 N_2 入渗, 导致 N_2 测量值可能存在较大的误差, 该现象在 N_2 排放量极低的好氧条件下尤为明显。但是, N_2O 测量值是准确的, 因此认为有氧条件下产物比计算结果仍有一定的参考价值。

3.3 土壤 NO_2^- 积累对 N_2O 产生途径的影响

除厌氧处理外, HD 可能同样是本次研究中碱性土壤好氧条件下 N_2O 排放的重要途径。文中碱性土壤在 N60 (21%) 处理时, 外源 NO_2^- 诱导了 *nirS* 基因表达 (图 2), 且与 Liu 等^[29] 研究结果一致, 与 *nirS* 基因相比, *nirK* 基因转录对氧气更敏感。前人研究^[12] 认为, 外源 NO_2^- 的添加为 NO 的产生创造了条件, 而后者会通过激活转录因子 NNR 的活性而促进 *nirS* 基因的表达, 进而发生了 HD 过程, 结合碱性土壤在有氧条件下快速发生的 NO_2^- 氧化过程 (表 3), 推测 NO_2^- 氧化形成的厌氧“热点”为碱性土壤有氧条件下 HD 过程的发生创造了条件。尽管试验过程中未观察到符合 ND 途径的、添加 NO_2^- 后 *amoA* 和 *nirK* 基因转录拷贝数同时增加的现象, 但添加 NO_2^- 后有氧条件下 *amoA* 基因转录拷贝数显著增加 ($P < 0.01$, 图 2), 这可能由于外源 NO_2^- 的添加诱导了含有 *nirK* 基因的 AOB 的 *amoA* 基因转录, 然而由于本次研究中碱性土壤的 NH_4^+ 始终维持在较低水平, NH_4^+ 氧化产生的电子不足以进行 NO_2^- 的还原、进而发生 ND 过程, 后续可通过分析有氧条件下不同来源 NO_2^- 与 *nirS* 和 *nirK* 基因转录的响应关系, 进一步揭示有氧条件下 N_2O 的产生机制。

HD 过程是酸性土壤中 N_2O 排放的主要途径^[1]。与碱性土壤不同, 酸性土壤中 NO_2^- 的自然积累量、*amoA* 转录活性整体较低, 且其在 N0 (21%) 处理时 *nirS* 基因转录拷贝数随着培养时间的延长而增加 ($P < 0.05$), 培养结束时 *nirS* 转录量高于 *nirK*, 推测

nirS 型反硝化菌是酸性土壤 NO₂⁻ 还原的主导菌，其也被认为是 HD 过程 NO₂⁻ 还原的主导菌^[30]。相对较高的有机碳含量可能是酸性土壤有氧条件下 *nirS* 转录拷贝数增加的主要原因，Guo 等^[31] 研究结果显示有机质与 *nirS*-型反硝化菌而不是 *nirK*-型反硝化菌的丰度显著正相关。真菌反硝化^[1]、非生物途径的 NO₂⁻ 化学分解^[23] 等可能同样对酸性土壤的 N₂O 或 N₂ 排放有一定贡献，但 Chen 等^[32] 发现，真菌在 pH 为 4.0 时较其他 pH 更丰富，Lim 等^[23] 认为，在研究 pH ≤ 5 的土壤中生物氮氧化还原转化时，需要考虑非生物亚硝酸盐动力学，而本次研究中酸性土壤的 pH 为 6.59，因此真菌反硝化、非生物途径的 NO₂⁻ 化学分解对土壤 N₂O 或 N₂ 的贡献量可能有限。

此外，本次研究中 RNA 和 DNA 层面功能基因拷贝数的变化情况也表明，仅从 DNA 水平出发研究功能基因丰度与 N₂O 排放之间的关系有一定局限性^[33]。大多数反硝化细菌为兼性好氧有机营养生物且偏好好氧生长条件，Nanang 等^[34] 研究结果显示，反硝化功能基因 (*nirS*、*nirK* 和 *nosZ*) 丰度与土壤 CO₂ 累积排放量 (表征易矿化碳) 显著正相关。本次研究亦观察到 CO₂ 累积排放量偏高的酸性土壤中 NO₂⁻ (21%) 处理培养结束时反硝化功能基因拷贝数均显著增加 ($P < 0.05$)、而 CO₂ 累积排放量较低的碱性土壤中无此现象 (图 3)。因此，仅根据 DNA 层面功能基因拷贝数的变化情况显然不能有效解释本次研究中土壤 N₂O 的排放机制，RNA 和 DNA 层面的研究结果相结合可信度更高。

4 结 论

土壤中 NO₂⁻ 相对含量并不一定与氮氧化物排放之间存在相关性，但过多的 NO₂⁻ 积累会显著增加土壤的 I_{N₂O}。除 NO₂⁻ 对 N₂OR 活性的抑制外，在碱性土壤中，土壤微生物对 NO₂⁻ 的耐性较高，NO₂⁻ 主要是通过诱导 *nir* 转录与 N₂OR 竞争电子，降低 N₂O 还原效率，增加土壤的 I_{N₂O}；酸性土壤中微生物对 NO₂⁻ 的耐性较低，尽管外源 NO₂⁻ 添加后土壤中仍存在一定量的 *nosZ* 转录，但几乎不会发生 N₂O 还原，此类土壤中 H⁺ 通过干扰 N₂OR 的合成等途径，增加土壤的 I_{N₂O}。本次研究中 HD 过程是酸性土中 N₂O 排放的主要途径，*nir* 的转录情况显示碱性土壤中除

厌氧处理外，HD 可能同样是其好氧条件下 N₂O 排放的重要途径。综上所述，在保证作物产量的前提下，精准施肥避免土壤中 NO₂⁻ 积累、降低 NIR 和 N₂OR 对电子的竞争，适当提高土壤 pH、降低其对 N₂OR 酶合成的影响等，对降低菜田土壤 N₂O 排放有重要意义。

参考文献 (References)

- [1] Shi X, Hu H W, Zhu-Barker X, et al. Nitrifier-induced denitrification is an important source of soil nitrous oxide and can be inhibited by a nitrification inhibitor 3, 4-dimethylpyrazole phosphate[J]. *Environmental Microbiology*, 2017, 19 (12): 4851—4865.
- [2] Theodorakopoulos N, Lognoul M, Degrune F, et al. Increased expression of bacterial amoA during an N₂O emission peak in an agricultural field[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2017, 236: 212—220.
- [3] Diao T, Xie L, Guo L, et al. Measurements of N₂O emissions from different vegetable fields on the North China Plain[J]. *Atmospheric Environment*, 2013, 72 (2): 70—76.
- [4] Cao W C. Contributions of nitrification and denitrification to N₂O production as affected by C and O₂ availability in greenhouse vegetable soils[D]. Beijing: China Agricultural University, 2017: 79—86. [曹文超. 设施菜田土壤硝化、反硝化 N₂O 产生特征及影响因素[D]. 北京: 中国农业大学, 2017: 79—86.]
- [5] Maharjan B, Venterea R T. Nitrite intensity explains N management effects on N₂O emissions in maize[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 66: 229—238.
- [6] Ma L, Shan J, Yan X Y. Nitrite behavior accounts for the nitrous oxide peaks following fertilization in a fluvo-aquic soil[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2015, 51 (5): 563—572.
- [7] Pan Y T, Ni B J, Bond P L, et al. Electron competition among nitrogen oxides reduction during methanol-utilizing denitrification in wastewater treatment[J]. *Water Research*, 2013, 47 (10): 3273—3281.
- [8] Baumann B, van der Meer J R, Snozzi M, et al. Inhibition of denitrification activity but not of mRNA induction in *Paracoccus denitrificans* by nitrite at a suboptimal pH[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1997, 72 (3): 183—189.
- [9] Zhou C, Pan Y T, Liu M, et al. Advance of mechanism on N₂O emissions from biological denitrification[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2017, 36 (8): 3074—3084. [周晨, 潘玉婷, 刘敏, 等. 反硝化过程中氧化亚氮释放机理研究进展[J]. *化工进展*, 2017, 36 (8): 3074—3084.]
- [10] Beaumont H J E, Lens S I, Reijnders W N M, et al. Expression of nitrite reductase in *Nitrosomonas europaea*

- involves NsrR, a novel nitrite-sensitive transcription repressor[J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 54 (1): 148—158.
- [11] Shen X Y, Xia W W, Cirenlamu, et al. Effect of allylthiourea on soil nitrification and the underlying microbial mechanism in short-term laboratory microcosms[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2021, 58 (6): 1552—1563. [沈晓忆, 夏围围, 次仁拉姆, 等. 短期培养下抑制剂烯丙基硫脲对土壤硝化作用及微生物的影响[J]. *土壤学报*, 2021, 58 (6): 1552—1563.]
- [12] Hassan J, Qu Z, Bergaust L L, et al. Transient accumulation of NO₂⁻ and N₂O during denitrification explained by assuming cell diversification by stochastic transcription of denitrification genes[J]. *PLoS Computational Biology*, 2016, 12 (1): e1004621.
- [13] Fan Z B, Lin S, Zhang X M, et al. Conventional flooding irrigation causes an overuse of nitrogen fertilizer and low nitrogen use efficiency in intensively used solar greenhouse vegetable production[J]. *Agricultural Water Management*, 2014, 144: 11—19.
- [14] Ren T, Christie P, Wang J G. Root zone soil nitrogen management to maintain high tomato yields and minimum nitrogen losses to the environment [J]. *Scientia Horticulturae*, 2010, 125: 22—33.
- [15] Molstad L, Dorsch P, Bakken L R. Robotized incubation system for monitoring gases (O₂, NO, N₂O, N₂) in denitrifying cultures[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 71 (3): 202—211.
- [16] Bao S D. Soil and agrochemistry analysis [M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 1999: 25—111. [鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 1999: 25—111.]
- [17] Ma K, Conrad R, Lu Y H. Responses of methanogen mcrA genes and their transcripts to an alternate dry/wet cycle of paddy field soil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78 (2): 445—454.
- [18] Rotthauwe J H, Witzel K P, Liesack W. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63 (12): 4704—4712.
- [19] Hallin S, Lindgren P E. PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65 (4): 1652—1657.
- [20] Ligi T, Truu M, Truu J, et al. Effects of soil chemical characteristics and water regime on denitrification genes (*nirS*, *nirK*, and *nosZ*) abundances in a created riverine wetland complex[J]. *Ecological Engineering*, 2014, 72: 47—55.
- [21] Henry S, Bru D, Stres B, et al. Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72 (8): 5181—5189.
- [22] Chen J J, Wang Y R, Cao W C, et al. Effects of oxygen levels and carbon inputs on N₂O emission in greenhouse vegetable soil[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2019, 56 (1): 114—123. [陈吉吉, 王乙然, 曹文超, 等. 碳源和氧对设施菜田土壤 N₂O 排放的影响[J]. *土壤学报*, 2019, 56 (1): 114—123.]
- [23] Lim Natalie Y N, Åsa Frostegård, Lars R. Bakken. Nitrite kinetics during anoxia: The role of abiotic reactions versus microbial reduction[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2018, 119: 203—209.
- [24] Hu H W, Zhang L M, Dai Y, et al. pH-dependent distribution of soil ammonia oxidizers across a large geographical scale as revealed by high-throughput pyrosequencing[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2013, 13 (8): 1439—1449.
- [25] Ji M M, Tian H, Wu X G, et al. Enhanced N₂O emission rate in field soil undergoing conventional intensive fertilization is attributed to the shifts of denitrifying guilds[J]. *Pedosphere*, 2021, 31 (1): 145—156.
- [26] Liu B B, Mørkved P T, Frostegård Å, et al. Denitrification gene pools, transcription and kinetics of NO, N₂O and N₂ production as affected by soil pH[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 72 (3): 407—417.
- [27] Bergaust L, Mao Y J, Bakken L R, et al. Denitrification response patterns during the transition to anoxic respiration and posttranscriptional effects of suboptimal pH on nitrouxide reductase in *Paracoccus denitrificans*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76 (19): 6387—6396.
- [28] Liu B B, Frostegård A, Bakken L R. Impaired reduction of N₂O to N₂ in acid soils is due to a posttranscriptional interference with the expression of *nosZ*[J]. *Mbio*, 2014, 5 (3): e01383—14.
- [29] Liu R R, Tian Y, Zhou E M, et al. Distinct expression of the two NO-forming nitrite reductases in *Thermus antranikianii* DSM 12462^T improved environmental adaptability[J]. *Microbial Ecology*, 2020, 80 (3): 614—626.
- [30] Bent E, Németh D, Wagner-Riddle C, et al. Residue management leading to higher field-scale N₂O flux is associated with different soil bacterial nitrifier and denitrifier gene community structures[J]. *Applied Soil Ecology*, 2016, 108: 288—299.
- [31] Guo G X, Deng H, Qiao M, et al. Effect of long-term wastewater irrigation on potential denitrification and denitrifying communities in soils at the watershed scale[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47 (7): 3105—3113.

- [32] Chen H H, Mothapo N V, Shi W. Soil moisture and pH control relative contributions of fungi and bacteria to N₂O production[J]. *Microbial Ecology*, 2015, 69 (1): 180—191.
- [33] Wen H Y, Jiao Y, Yang M D, et al. The response rule of functional gene abundance of *amoA* and *narG* on nitrous oxide emissions in saline-alkali soils[J]. *Soils*, 2019, 51 (4): 724—731. [温慧洋, 焦燕, 杨铭德, 等. 盐碱土壤 N₂O 排放与 *amoA* 和 *narG* 功能基因丰度的响应规律[J]. *土壤*, 2019, 51 (4): 724—731.]
- [34] Nanang Z, Cheng Y, Zhang J B. Denitrification potential and gas emission in red soils under different land use types[J]. *Soils*, 2020, 52 (2): 348—355.[Nanang Zulkarnaen, 程谊, 张金波. 不同利用方式红壤反硝化势和气的产物排放特征[J]. *土壤*, 2020, 52 (2): 348—355.]

(责任编辑：陈荣府)