

DOI: 10.11766/trxb202303250115

杨钰, 赵永鉴, 宋晓桐, 张丽梅, 巨晓棠. 典型旱作农田土壤氧化亚氮排放的氨氧化微生物相对贡献[J]. 土壤学报, 2024, 61(5): 1398–1409.
YANG Yu, ZHAO Yongjian, SONG Xiaotong, ZHANG Limei, JU Xiaotang. Relative Contribution of Ammonia-oxidizing Microorganisms to Nitrous Oxide Emissions in Upland Agricultural Soils[J]. Acta Pedologica Sinica, 2024, 61(5): 1398–1409.

典型旱作农田土壤氧化亚氮排放的氨氧化微生物相对贡献*

杨钰¹, 赵永鉴¹, 宋晓桐^{2†}, 张丽梅², 巨晓棠¹

(1. 海南大学热带作物学院, 海口 570228; 2. 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085)

摘要: 氨氧化过程对氧化亚氮 (N_2O) 排放具有重要贡献。在不同土壤类型和农田管理下, 氨氧化微生物类群对 N_2O 排放的相对贡献组成规律还缺乏系统的研究。选取典型农田耕层土壤 (潮土、黑土、砖红壤和红壤), 以及有机肥改良的砖红壤剖面土壤, 采用选择性抑制法 (乙炔和辛炔) 研究氨氧化细菌 (AOB)、氨氧化古菌和全程硝化菌 (AOA + comammox) 以及异养硝化菌对土壤硝化潜势、净硝化速率及 N_2O 排放的相对贡献。结果表明, 在耕层的潮土、黑土、砖红壤和红壤中, 硝化潜势随土壤由酸性至碱性显著提高 ($P < 0.05$), 分别为 N 32.5、6.6、4.8 和 2.3 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$, AOB 主导四种土壤的硝化潜势 (58%~100%)。对耕层的潮土、黑土和砖红壤进一步分析, 表明净硝化速率和 N_2O 排放均随 pH 的增加显著提高 ($P < 0.05$), 与硝化潜势的规律一致。在潮土和砖红壤中, AOB 和 AOA + comammox 对净硝化速率贡献相当 (均在 30%~40%), 而黑土的净硝化速率由 AOB 主导 (72%)。在潮土、黑土和砖红壤中, N_2O 排放均由 AOB 主导 (58%~92%)。在有机肥改良的砖红壤剖面土壤中, 随土壤由深层至表层, pH、硝化潜势、净硝化速率及 N_2O 排放显著提高 ($P < 0.05$)。AOA + comammox 主导表层硝化潜势及净硝化速率的提高 (分别贡献 63%和 54%), AOB 主导 N_2O 排放的增加 (贡献 54%)。研究结果为制定与土壤氨氧化特性及土壤性质相匹配的 N_2O 减排措施提供了新的科学依据。

关键词: 自养氨氧化; 异养硝化; 氧化亚氮; 氨氧化微生物; 有机肥改良

中图分类号: S154 文献标志码: A

Relative Contribution of Ammonia-oxidizing Microorganisms to Nitrous Oxide Emissions in Upland Agricultural Soils

YANG Yu¹, ZHAO Yongjian¹, SONG Xiaotong^{2†}, ZHANG Limei², JU Xiaotang¹

(1. School of Tropical Crops, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

Abstract: 【Objective】Ammonia oxidizers make an important contribution to N_2O emissions. However, the composition of their

* 国家自然科学基金青年项目 (42107320)、中国博士后科学基金特别资助项目 (2022T150683) 和海南省重点研发计划项目 (ZDYF2021XDNY184) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 42107320), the China Postdoctoral Science Foundation (No. 2022T150683), and the Hainan Provincial Key Research and Development Program (No. ZDYF2021XDNY184)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: xtsong@rcees.ac.cn

作者简介: 杨钰 (1997—), 女, 江西赣州人, 硕士研究生, 研究方向为农田土壤氧化亚氮的排放机制。E-mail: 1428304136@qq.com

收稿日期: 2023-03-25; 收到修改稿日期: 2023-05-10; 网络首发日期 (www.cnki.net): 2023-06-12

relative contribution to N_2O emission in different soils and agricultural management systems has not been systematically studied. 【Method】 We studied the contributions of AOB, AOA + comammox and heterotrophic nitrifiers to the potential nitrification rate, net nitrification rate and N_2O emission in typical upland surface soils (fluvo-aquic soil, black soil, latosol, red soil), and in latosols from soil profile under organic fertilizer amendment. 【Result】 In the surface fluvo-aquic soil, black soil, latosol and red soil, potential nitrification rate significantly increased with soil pH ($P < 0.05$), and was 32.5, 6.6, 4.8 and 2.3 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$, respectively. AOB dominated the potential nitrification rate in the above surface soils, with contributions ranging 58%–100%. Further analyses of the fluvo-aquic soil, black soil and latosol indicated that net nitrification rate and N_2O emission both significantly increased with soil pH ($P < 0.05$), which were consistent with potential nitrification rate. For the net nitrification rate, AOB and AOA + comammox contributed equally (30%–40%) in the fluvo-aquic soil and latosol, while AOB dominated in the black soil (72%). N_2O emissions from the fluvo-aquic soil, black soil and latosol were all dominated by AOB (58%–92%). For soils from the organic fertilizer-amended latosol profile, pH, potential nitrification rate, net nitrification rate and N_2O emission significantly increased from the subsurface to surface layer ($P < 0.05$). The increase in potential nitrification rate and net nitrification rate was dominated by AOA + comammox (contributing 63% and 54%) and the increase in N_2O emission was dominated by AOB (contributing 54%). 【Conclusion】 This study provides new evidence for developing reduction measures of N_2O emissions that match the soil ammonia oxidation characteristics and soil properties.

Key words: Autotrophic ammonia oxidation; Heterotrophic nitrification; N_2O ; Ammonia oxidizing microorganisms; Organic fertilizer amendment

气候变化是人类发展所面临的全球挑战之一^[1]。氧化亚氮 (N_2O) 是一种长寿命强效的温室气体, 具有较二氧化碳高 273 倍的增温潜势, 可在大气中存留约 120 年, 也是臭氧层最主要的破坏物质^[2-3]。全球 N_2O 排放量自 19 世纪初的 $N 10 \sim 12 Tg \cdot a^{-1}$ 增至目前约 $N 17 Tg \cdot a^{-1}$ 。其中, 自然源 N_2O 排放一直稳定在约 $N 10 Tg \cdot a^{-1}$, 而人为源 N_2O 排放自 19 世纪以来持续增至目前的 $N 6 \sim 7 Tg \cdot a^{-1}$, 人为源排放的增加是全球 N_2O 排放增加的主要原因^[4]。施用化肥及有机肥的农田土壤是 N_2O 最大的人为排放源, 排放量 $N 3 \sim 4 Tg \cdot a^{-1}$, 约占总人为排放的 60%, 且目前仍在以每十年 $N 0.27 Tg$ 的速度增加^[4]。农田土壤中, 旱地是主要的 N_2O 排放源。近十年旱地 N_2O 排放因子约 1.1%, 而水田 N_2O 排放因子在 0.5% 左右^[5]。全球每年铵态或酰胺态氮肥使用量 (120 Tg) 占化肥氮总使用量 (170 Tg) 的 70% 左右^[6-8]。铵态氮肥的大量使用, 使氨氧化及其驱动的后续偶联过程对陆地 N_2O 排放 (直接和间接影响) 具有重要贡献。但目前对土壤氨氧化特性及其对 N_2O 排放的作用机制仍理解不清, 是 N_2O 减排和估算不确定性的主要来源之一^[8]。

氨氧化是硝化过程的第一步和限速步骤, 即在氨单加氧酶 (AMO) 和羟胺脱氢酶 (HAO) 的催化下, 将氨 (NH_3) 经羟胺 (NH_2OH) 氧化至亚硝酸

根 (NO_2^-) 的过程。氨氧化可通过 NH_2OH 的不完全氧化和反应产物 (NH_2OH 、一氧化氮 NO 、 NO_2^-) 的偶联反应直接产生 N_2O 。自养氨氧化过程由三类氨氧化微生物进行, 包括氨氧化细菌 (Ammonia oxidizing bacteria, AOB)、氨氧化古菌 (Ammonia oxidizing archaea, AOA) 和全程硝化菌 (Complete ammonia oxidizing bacteria, comammox)。三类氨氧化微生物偏好的生态位及 N_2O 产率具有显著差异^[8]。AOB 偏好碱性高 NH_3 环境, AOA 偏好酸性低 NH_3 环境^[8]。comammox 则与 AOA 更为相似, 更适应于寡营养环境^[9]。AOB 可通过硝化反硝化作用和非生物反应产生 N_2O ^[10]。目前还未发现 AOA 和 comammox 可以进行硝化反硝化作用, 因为缺少 NO 还原酶基因, 但其可以通过中间产物的非生物反应产生 N_2O ^[9]。从量级上看, AOB 的 N_2O 产率显著高于 AOA 的 N_2O 产率^[11]。纯培养研究表明, 与 AOB 和 AOA 产生的 N_2O 相比, comammox 虽是一个不可忽略的 N_2O 产生源, 但贡献很小^[12]。异养微生物也可将还原态氮 (包括有机氮) 氧化为亚硝态氮和硝态氮, 即异养硝化作用。异养硝化微生物对还原态氮的氧化能力远不如自养氨氧化微生物, 因此异养硝化作用通常被认为可以忽略。但在酸性和有机碳较高的土壤中, 其对硝化作用可能具有重要贡献^[13]。因此, 土壤中氨氧化微生物对氨氧化过程的相对贡

献,决定着土壤整体的氨氧化能力及后续 N_2O 的产生。尽管对特定氨氧化微生物类群的氨氧化和 N_2O 排放已有一定认识,目前对不同土壤类型和农田管理措施下氨氧化微生物类群对 N_2O 排放的相对贡献组成规律还缺乏系统的研究。

选择性抑制法被广泛用于研究不同种类氨氧化微生物的相对贡献。相较于稳定同位素,选择性抑制法操作简便、成本低,通过特异性抑制不同氨氧化微生物的活动,可以指示各类氨氧化微生物对氨氧化及 N_2O 排放的相对贡献。研究表明,乙炔通过破坏 AOB、AOA 和 comammox 的 AMO 酶可抑制其氨氧化过程,是一种最为常用的自养硝化菌的特异性抑制剂,可用于区分自养硝化和异养硝化过程的 N_2O 排放^[14]。由于 AOB 对长链的炔烃更加敏感,辛炔常被作为 AOB 的特异性抑制剂,对 AOA 和 comammox 几乎没有抑制作用^[15-16]。通过乙炔和辛炔的组合使用,可以区分 AOB、AOA + comammox、异养硝化菌对土壤氨氧化过程及 N_2O 排放的相对贡献。本研究通过采集我国不同 pH 和有有机碳的典型农田耕层土壤(潮土、黑土、砖红壤、红壤),以及有机肥改良的砖红壤剖面土壤,采用选择性抑制法(乙炔或辛炔)区分 AOB、AOA + comammox 以及异养硝化菌对土壤硝化潜势、净硝化速率及 N_2O 排放的相对贡献,以阐明氨氧化微生物对土壤氨氧化能力和 N_2O 排放的相对贡献,以及与土壤性质和人为管理因素的关系,为制定与土壤氨氧化特性及土壤性质相匹配的农田管理措施、有效减少 N_2O 排放提供新的科学依据。

1 材料与方 法

1.1 土壤采集与基础信息

根据 pH 差异选取潮土、黑土、砖红壤和红壤四种土壤类型,分别采自北京上庄、黑龙江哈尔滨、海南澄迈和江西鹰潭的典型传统管理农田耕层(0~20 cm)。潮土(SZ)采自北京上庄小麦-玉米轮作田块,黑土(HB)采自哈尔滨玉米-大豆轮作田块,砖红壤(XA)采自澄迈西岸村香蕉田块,红壤(YT)采自鹰潭花生-休闲田块。

在澄迈红山农场种植年限分别为 1 年(H1)和 4 年(H4)的两个菠萝田块,分别采集 0~20 cm、20~40 cm 及 40~60 cm 砖红壤剖面样品,探究人为管理

(有机肥投入)导致土壤剖面性质改变后,对土壤氨氧化能力、氨氧化微生物活动及 N_2O 排放的影响。

10 个土壤样品均在各田块以五点法随机采集,混匀后剔除根系、植物残体及杂物,过 2 mm 筛,取 1 kg 用于理化性质测定及培养试验。土壤基础理化性质见表 1。

1.2 土壤硝化潜势、氨氧化微生物相对贡献及 N_2O 排放测定

选取所有供试土壤,在反应底物充足和完全有氧的条件下,结合选择性抑制剂测定土壤硝化潜势及不同氨氧化微生物的贡献^[17](图 1),同时测定 N_2O 排放。设计 4 个处理,分别为(1)空白(N0)、(2)施氮(N140)、(3)施氮加乙炔(N140+Acetylene,自养氨氧化菌抑制剂)及(4)施氮加辛炔(N140+Octyne, AOB 抑制剂),每个处理 3 个重复。取 4 g 风干土壤至 120 mL 血清瓶,重新湿润土壤至 15% 重量含水量,25℃下预培养一周。预培养后,施氮处理加入 40 mL 浓度为 1 mmol·L⁻¹的 NH_4Cl 溶液,实现目标施氮量为 N 140 mg·kg⁻¹干土,空白处理加入 40 mL 去离子水,立即用硅胶塞和铝盖密封瓶口。乙炔和辛炔气体立即通过注射器注射进入瓶内顶空气体,添加浓度依据文献中的最适浓度确定,分别为 1%v/v^[18]和 4 μmol·L⁻¹ Caq^[14]。25℃, 175 r·min⁻¹ 连续振荡培养 72 h,期间分别于 0、12、24、48、72 h 将血清瓶从震荡机中取出,静置 15 min,用注射器吸取 1 mL 上清液离心后进行无机氮的测定,以 NO_3^- 线性增长阶段的累积速率计算硝化潜势;于 0、24、48、72 h 抽取顶空气体 16 mL 用于测定培养期间 N_2O 的累积排放量,气体抽取后补充 16 mL 氦气进入瓶中继续震荡。

1.3 土壤净硝化速率、氨氧化微生物相对贡献及 N_2O 排放测定

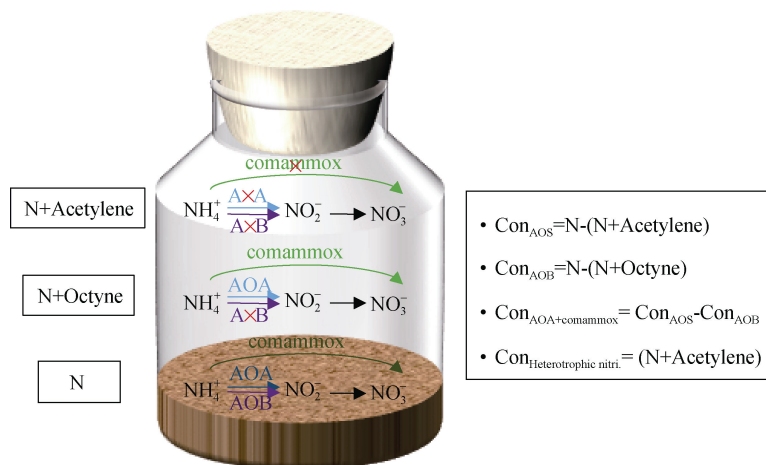
选取硝化潜势差异显著的 3 个耕层土样(SZ、HB、XA)及改良 4 年剖面的 3 个土层深度土样(H4-20、H4-40、H4-60),开展微宇宙静态培养实验,以研究土壤实际的净硝化速率、氨氧化微生物活动及 N_2O 排放。实验设置 3 个处理,分别为(1)施氮(N100)、(2)施氮加乙炔(N100+Acetylene)、(3)施氮加辛炔(N100+Octyne),每个处理 4 个重复。称取 100 g 风干土壤样品于 550 mL 玻璃广口瓶中,调节土壤的重量含水量为 15%,以 parafilm 封口膜封瓶口,在 25℃恒温培养箱中避光预培养一周。

表 1 供试土壤基础理化性质

Table 1 Chemical and physical properties of soils

土壤 Soil	土层 Layer/ cm	pH	$\text{NH}_4^+\text{-N}/$ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	$\text{NO}_3^-\text{-N}/$ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	SOC/ ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	TN/ ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	C/N	黏粒 Clay/%	粉粒 Silt/%	砂粒 Sand/%
SZ	0~20	8.0	1.88	10.21	8.90	0.85	10.5	21.4	49.4	29.2
HB	0~20	6.7	0.89	2.25	16.20	1.43	11.3	32.3	53.4	14.3
XA	0~20	5.7	1.64	47.61	16.40	1.66	9.9	61.7	8.5	29.8
YT	0~20	5.0	0.48	8.02	4.90	0.71	6.9	41.9	31.6	26.5
H1-20	0~20	4.5	1.51	2.69	14.10	1.30	10.9	59.2	26.0	14.8
H1-40	20~40	4.6	0.70	14.85	10.40	1.03	10.2	58.2	28.1	13.7
H1-60	40~60	4.5	1.15	30.39	6.70	0.73	9.2	50.8	31.5	17.7
H4-20	0~20	7.0	2.91	5.88	11.20	1.51	7.4	47.4	42.1	10.6
H4-40	20~40	5.5	1.13	5.11	11.00	1.08	10.2	58.8	29.5	11.6
H4-60	40~60	4.9	0.79	6.21	9.30	0.96	9.7	60.7	29.3	10.0

注：SZ 代表潮土，HB 代表黑土，XA 代表砖红壤，YT 代表红壤。H1-20、H1-40、H1-60 分别代表海南红山农场种植 1 年地块 0~20、20~40、40~60 cm 土层砖红壤，H4-20、H4-40、H4-60 分别代表海南红山农场种植 4 年地块 0~20、20~40、40~60 cm 土层砖红壤。下同。Note: SZ, HB, XA and YT represent fluvo-aquic soil, black soil, latosol and red soil, respectively. H1-20, H1-40 and H1-60 correspondingly represent soils at 0-20 cm, 20-40 cm and 40-60 cm layers of the latosol profile under 1-year organic fertilizer amendment. H4-20, H4-40 and H4-60 correspondingly represent soils at 0-20 cm, 20-40 cm and 40-60 cm layers of the latosol profile under 4-year organic fertilizer amendment. The same below.



注：图中蓝色、紫色及绿色箭头分别表示 AOA、AOB 及 comammox 执行的氨氧化过程。右侧计算式中的 Con 表示不同氨氧化类群的相对贡献，AOS 为自养氨氧化微生物、AOB 为氨氧化细菌、AOA 为氨氧化古菌、comammox 为全程硝化细菌、Heterotrophic nitr. 为异养硝化微生物。Note: The blue, purple and green arrows indicate ammonia oxidation performed by AOA, AOB and comammox, respectively. The Con in the right box indicates the relative contribution of different ammonia-oxidizing microorganisms, AOS, AOB, AOA, comammox and Heterotrophic nitr. represent autotrophic ammonia-oxidizing microorganisms, ammonia-oxidizing bacteria, ammonia-oxidizing archaea, complete ammonia oxidizers and heterotrophic nitrifiers.

图 1 不同抑制剂确定氨氧化微生物相对贡献的原理示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the mechanisms for calculating the relative contribution of different ammonia-oxidizing microorganisms using different inhibitors

预培养结束后均匀加入 5 mL 浓度 143 mmol·L⁻¹ NH₄Cl 溶液, 实现目标施氮量 N 100 mg·kg⁻¹ 干土, 施氮量依据田间传统施氮量设置。补充去离子水调节重量含水量至 20%, 用配有三通阀的橡胶塞密封培养瓶。乙炔和辛炔气体立即通过注射器注射进入瓶内顶空气体, 添加浓度分别为 1%v/v 和 4 μmol·L⁻¹ Caq。在培养箱中以 25℃ 条件连续培养 14 d, 0、1、3、7、14 d 对土壤样品破坏取样, 用于测定无机氮; 1、2、3、5、7、10、14 d 采集顶空气体, 采气前将橡胶塞打开, 使瓶内气体与空气充分流通混匀, 分别于 0、10、20、30 min 采集培养瓶内顶空气体, 采气时以注射器混匀瓶内气体后取 20 mL 至真空瓶内用于 N₂O 气体分析。盖上瓶塞后再次补充气体抑制剂以继续培养和下次采气。

1.4 土壤及气体指标测定

土壤无机氮测定通过 1 mol·L⁻¹ KCl 溶液浸提, 将浸提液加入 96 孔酶标板, 采用水杨酸钠-硝普钠比色法在 660 nm 波长下测定 NH₄⁺ 浓度、磺胺重氮化反应比色法在 540 nm 波长下测定 NO₂⁻ 浓度、氯化钒还原比色法测定 NO₃⁻ 浓度^[17], 使用酶标仪 (Infinite F50, Tecan Austria GmbH) 读取数据。土壤 pH 以土水比 1:2.5 浸提后用 pH 计测定 (Seven Compact, Mettler Toledo), 有机碳采用重铬酸钾氧化-分光光度法进行测定, 全氮 (TN) 采用凯氏法进行测定, 土壤质地采用比重计法进行测定^[19]。

N₂O 浓度采用气相色谱仪 (Agilent GC 8890) 进行分析, 检测器为电子捕获器 ECD, 检测温度 350℃, 柱温 55℃。

1.5 数据处理与分析

硝化潜势实验中气体累积排放量 (E) 的计算式为:

$$E = \frac{273}{273+T} \times M / 22.4 / m \times C (V_g + V_l \times \alpha) / 1000 \quad (1)$$

式中, E 为 N₂O 累积量 (N₂O-N μg·kg⁻¹), C 为顶空气体中 N₂O 的浓度 (nL·L⁻¹), V_g 为顶空气体总体积 (L), V_l 为培养体系中的液体体积 (L), α 为 N₂O 在 25℃ 时的溶解系数 (0.544)^[20], T 为培养温度 (℃), M 为 N₂O 中 N 的摩尔质量, 22.4 为 273 K 温度下气体的摩尔体积 (L·mol⁻¹), m 为瓶内烘干土重 (kg)。

静态培养实验中气体排放通量 (F) 计算式为:

$$F = \frac{273}{273+T} \times M \times 60 \times 24 \times C \times 10^{-3} \times V \times dc/dt / 22.4 / m \quad (2)$$

式中, F 为 N₂O 排放通量 (N₂O-N μg·kg⁻¹·d⁻¹), T 为培养温度 (℃), M 为 N₂O 中 N 的摩尔质量, 22.4 为 273 K 温度下气体的摩尔体积 (L·mol⁻¹), m 为瓶内烘干土重 (kg), V 为培养瓶顶空气体体积 (L), C 为气体浓度 (nL·L⁻¹), dc/dt 为培养瓶内气体浓度的时间变化率 (nL·L⁻¹·min⁻¹)。

上述数据处理采用 Microsoft Excel 2019, 各土样间硝化潜势、净硝化速率、N₂O 排放差异的显著性检验 ($P < 0.05$) 采用 IBM SPSS Statistics 26 进行, 图表绘制采用 Origin 2023。

2 结果

2.1 不同土壤类型和农田管理对土壤 pH 和有机碳的影响

四个耕层土壤中, 潮土 (SZ)、黑土 (HB)、砖红壤 (XA) 和红壤 (YT) 的酸碱度呈现北方土壤 (SZ、HB) 为碱性和中性, 南方土壤 (XA、YT) 为酸性的趋势。黑土和砖红壤的有机碳显著高于潮土和红壤。

有机肥改良的剖面土壤中, 改良 1 年的剖面样品 (H1-20~H1-60) pH 在土壤不同层次间还未显著变化 (4.5~4.6), 其有机碳由深层至表层呈现递增趋势, 这主要是该剖面刚施入的有机肥还未矿化完全导致的有机碳短暂累积。改良 4 年的剖面样品 (H4-20~H4-60) pH 和有机碳均由深层至表层呈现递增的趋势。

2.2 土壤硝化潜势、N₂O 排放及氨氧化微生物相对贡献

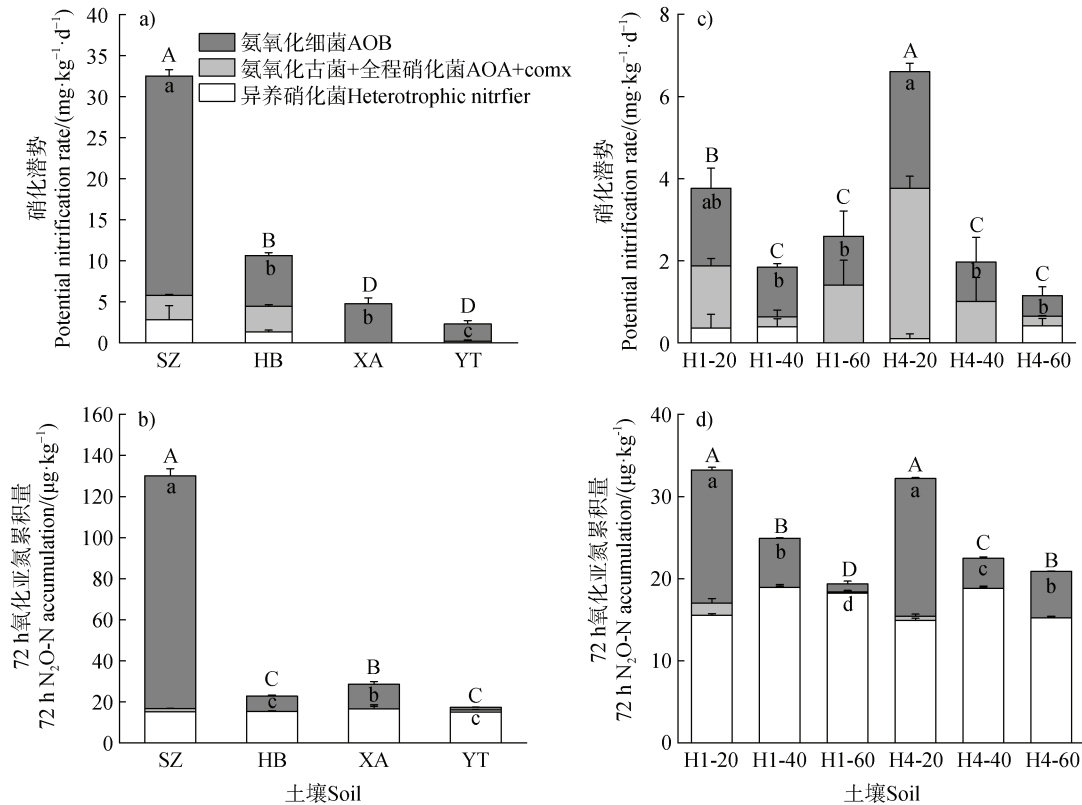
四个耕层土壤中, 潮土 (SZ)、黑土 (HB)、砖红壤 (XA) 和红壤 (YT) 的硝化潜势分别为 N 32.5、6.6、4.8、2.3 mg·kg⁻¹·d⁻¹ (图 2a)。它们在 72 h 内的 N₂O 累积排放量分别为 N 130.0、22.8、28.5、17.3 μg·kg⁻¹ (图 2b)。

上述四个耕层土壤中, 对于硝化潜势, AOB 分别贡献 82%、58%、100% 和 91%, AOA + comammox

分别贡献 9%、29%、0 和 9%，异养硝化菌分别贡献 9%、13%、0 和 0。对于 N_2O 排放，AOB 分别贡献 87%、33%、42%和 6%，AOA + comammox 分别贡献 1%、0、0 和 7%，异养硝化菌分别贡献 12%、67%、58%和 87%。因此，AOB 主导上述耕层土壤的硝化潜势。AOB 主导潮土的 N_2O 排放，而异养硝化菌主导黑土、砖红壤和红壤的 N_2O 排放。AOA + comammox 对所有供试土壤的 N_2O 排放贡献均较小。

改良 1 年的砖红壤剖面中，土壤硝化潜势在 40~60 cm (H1-60)、20~40 cm (H1-40) 和 0~20 cm (H1-20) 分别为 N 2.6、1.8 和 3.8 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ (图 2c)。改良 4 年的砖红壤剖面中，土壤硝化潜势在 40~60 cm (H4-60)、20~40 cm (H4-40) 和 0~20 cm

(H4-20) 分别为 N 1.1、2.0 和 6.6 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ ，由深层至表层呈现显著增加 (图 2c)。改良 1 年剖面中，H1-60、H1-40 和 H1-20 的 N_2O 排放分别为 N 19.4、24.9 和 33.2 $\mu g \cdot kg^{-1}$ (图 2d)。改良 4 年剖面中，H4-60、H4-40 和 H4-20 的 N_2O 排放分别为 N 20.9、22.5 和 32.2 $\mu g \cdot kg^{-1}$ 。 N_2O 排放由深层至表层均呈现显著的增加 (图 2d)。在改良 1 年的剖面中，AOA + comammox 和 AOB 对硝化潜势的贡献由深层至表层均在 50%左右。在改良 4 年的剖面中，AOA + comammox 对硝化潜势的贡献从 21% (40~60 cm) 显著增加至 55% (0~20 cm)。以上结果说明，对于同一土壤，人为管理对土壤氨氧化能力及氨氧化微生物活动均有显著影响，且这一现象随种植年限增加 (人为管理的影响增强) 而加强。



注：图中误差线为标准误差 SE ($n = 3$)，不同大写字母表示硝化潜势或 72 h N_2O 累积排放量在不同土壤间差异显著 ($P < 0.05$)；不同小写字母表示 AOB 对硝化潜势或 72 h N_2O 累积排放量的贡献在不同土壤间差异显著 ($P < 0.05$)。Note: Error bars are standard errors ($n = 3$). Different capital letters indicate that the potential nitrification rate or 72 h N_2O cumulative emissions differed significantly between soils ($P < 0.05$); different lowercase letters indicate that the contribution of AOB to potential nitrification rate or 72 h N_2O cumulative emissions differed significantly between soils ($P < 0.05$).

图 2 不同土壤硝化潜势、72 h N_2O 累积排放量及氨氧化菌相对贡献

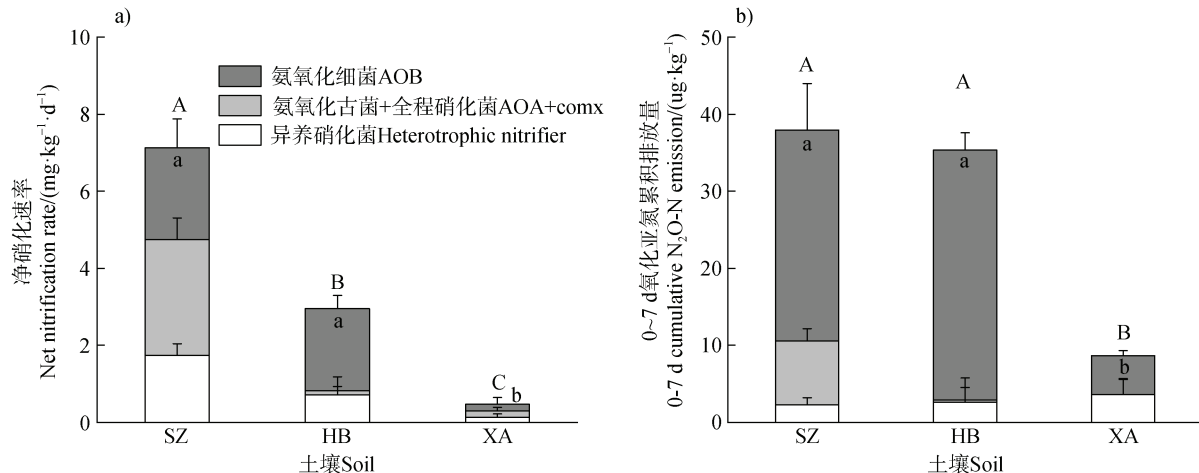
Fig. 2 Potential nitrification rate, cumulative 72 h N_2O emissions and relative contribution of ammonia-oxidizers in different soils

2.3 土壤净硝化速率、N₂O 排放及氨氧化微生物相对贡献

在微宇宙静态培养实验选取的 3 个耕层土样中, 潮土 (SZ)、黑土 (HB) 和砖红壤 (XA) 的净硝化速率分别为 N 7.1、3.0 和 0.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹ (图 3a)。它们在 7 d 内的 N₂O 累积排放量分别为 N 38.0、35.4 和 8.7 μg·kg⁻¹ (图 3b)。

上述三个耕层土壤中, 对于净硝化速率, AOB

分别贡献 33%、72%和 36%, AOA + comammox 分别贡献 42%、4%和 36%, 异养硝化菌分别贡献 24%、24%和 28%。对于 N₂O 排放, AOB 分别贡献 72%、92%和 58%, AOA + comammox 分别贡献 22%、1%和 0, 异养硝化菌分别贡献 6%、7%和 42%。AOB 和 AOA + comammox 对潮土和砖红壤的净硝化贡献相当, 而黑土的净硝化由 AOB 主导。此外, 上述三个土壤中的 N₂O 排放均由 AOB 主导。



注: 图中误差线为标准误差 SE ($n = 4$)。不同大写字母表示净硝化速率或 N₂O 累积排放量 (0~7 d) 在不同土壤间差异显著 ($P < 0.05$)。不同小写字母表示 AOB 对净硝化速率或 N₂O 累积排放量 (0~7 d) 的贡献在不同土壤间差异显著 ($P < 0.05$)。下同。Note: Error lines are standard errors ($n = 4$). Different capital letters indicate that the net nitrification rate or cumulative N₂O emissions (0~7 d) differed significantly ($P < 0.05$) among soils; different lowercase letters indicate that the contribution of AOB to the net nitrification rate or cumulative N₂O emissions (0~7 d) differed significantly ($P < 0.05$) among soils. The same below.

图 3 不同类型土壤净硝化速率、N₂O 累积排放量 (0~7 d) 及氨氧化菌相对贡献

Fig. 3 Net nitrification rate, cumulative N₂O emissions (0~7 d) and relative contribution of ammonia-oxidizers in different soils

改良 4 年砖红壤的微宇宙静态培养实验结果显示, 土壤净硝化速率在 40~60、20~40 cm 和 0~20 cm 分别为 N 0.2、0.9 和 4.1 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 由深层至表层呈现显著增加 (图 4a)。N₂O 排放由深层至表层同样呈现显著增加 (图 4b), H4-60、H4-40 和 H4-20 的 N₂O 排放分别为 N 2.8、6.5 和 16.3 μg·kg⁻¹。AOA + comammox 对净硝化速率的贡献由深层至表层保持在 60%左右, 但 AOB 的贡献从 8% (40~60 cm) 显著增至 43% (0~20 cm)。综上, 人为管理对土壤硝化、氨氧化微生物活动及 N₂O 排放潜力的影响, 均会反映在其实际反应速率上。

2.4 土壤硝化潜势与净硝化速率对 pH 响应的关系

比较土壤硝化潜势与净硝化速率对 pH 的响应表明, 硝化潜势与净硝化速率均与 pH 呈正相关关

系 (图 5a)。对于硝化速率较高的土壤 (SZ 和 HB), 其硝化潜势 (N 12~30 mg·kg⁻¹·d⁻¹) 是净硝化速率 (N 4~10 mg·kg⁻¹·d⁻¹) 的 3 倍。而对于硝化速率较低的土壤 (XA), 其硝化潜势与净硝化速率在同一量级 (图 5a)。在硝化潜势和净硝化速率测定条件下 N₂O 的排放对 pH 的响应规律并不完全一致, 主要表现为黑土在两种测定条件下 N₂O 排放量的显著差异 (图 5b)。

3 讨论

3.1 土壤性质对氨氧化微生物相对贡献的影响

本研究中耕层土壤的硝化潜势随着土壤 pH 由酸性到碱性而呈现显著的增加趋势 (图 2a)。土壤

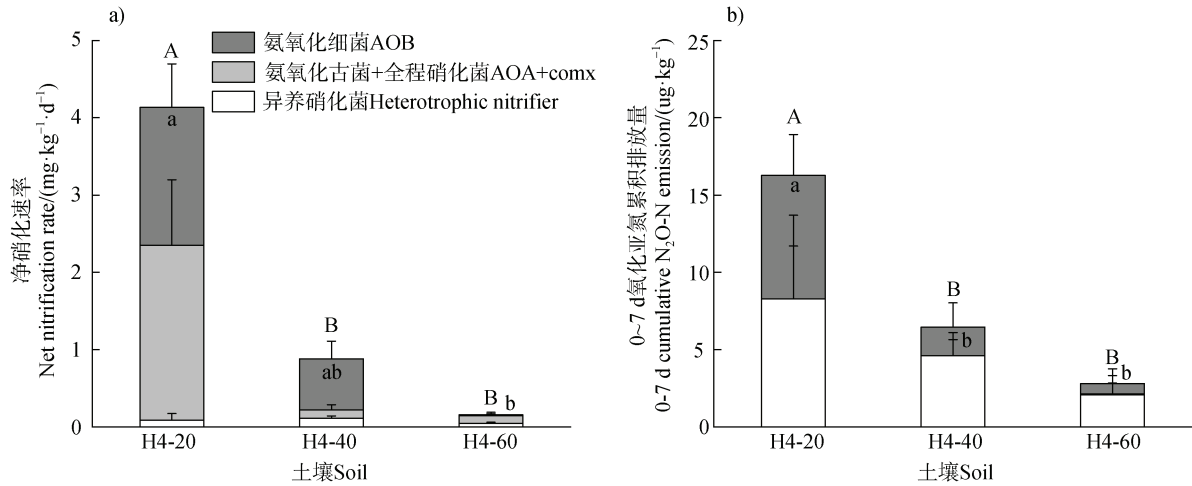
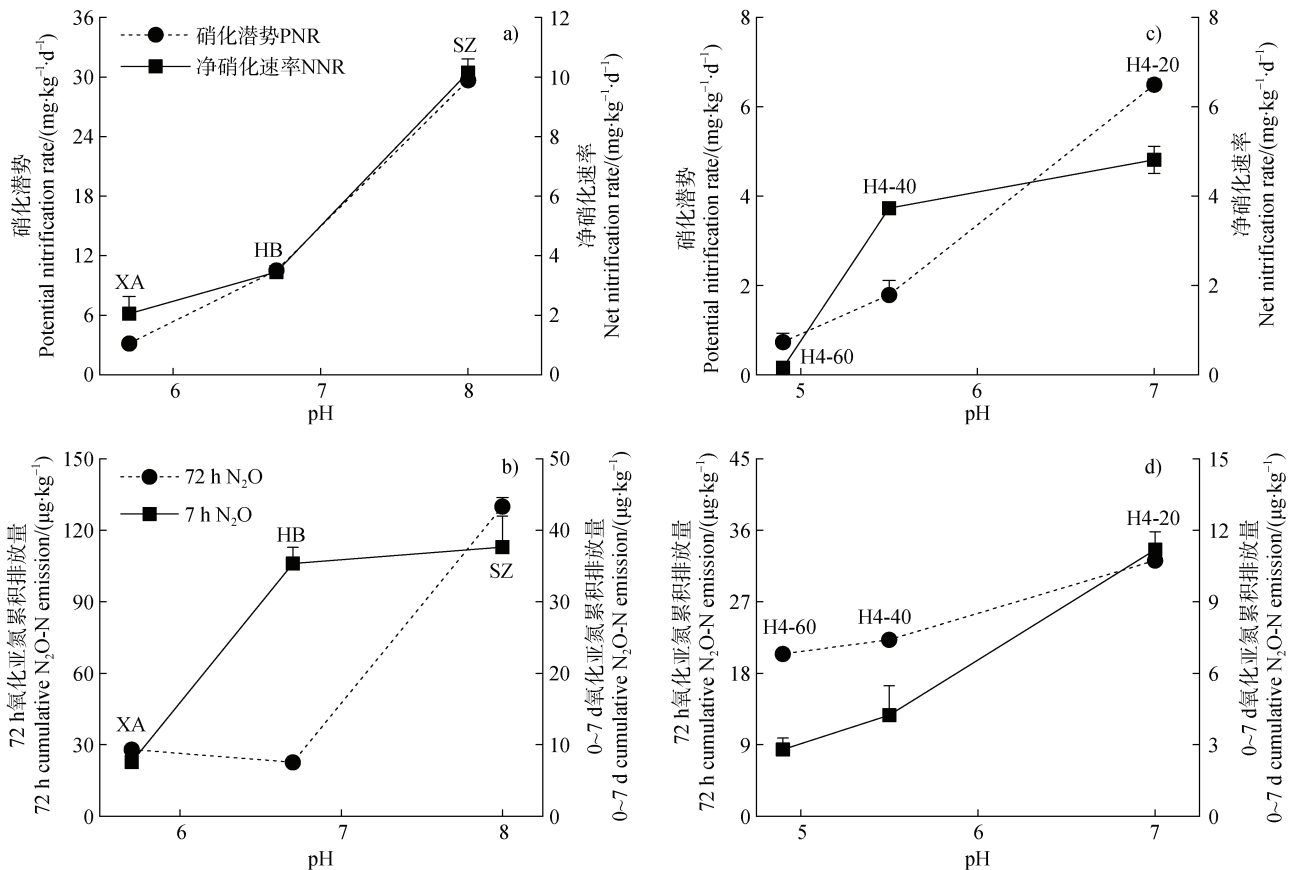


图 4 剖面土壤净硝化速率、N₂O 累积排放量 (0~7 d) 及氨氧化菌相对贡献

Fig. 4 Net nitrification rate, cumulative N₂O emissions (0-7 d) and relative contribution of ammonia-oxidizers in different profile soils



注：图中误差线为标准误差 SE (PNR $n = 3$, NNR $n = 4$)。Note: PNR and NNR represent the potential nitrification rate and net nitrification rate, respectively. The error bars are standard errors (PNR $n = 3$, NNR $n = 4$) .

图 5 硝化潜势与净硝化速率及 N₂O 排放对 pH 的响应

Fig. 5 Potential nitrification rate versus net nitrification rate and the response of N₂O production to pH during the period

硝化潜势的提升主要是由于 AOB 的贡献增强，这与先前在农田湖棕壤、钙积土和灰化土中的研究结

果^[21-26]一致。有研究表明，土壤 pH 的升高显著改变了 AOB 的群落结构和数量^[27]，从而提升了 AOB

对氨氧化的贡献。此外,本研究设置相当于田间传统施氮量的氮底物添加量,反映了田间氨氧化过程发生的主要时期(即施肥后高氨浓度阶段)中 AOB 的贡献。然而,在不施肥氨浓度较低时, AOB 的贡献会有所下降^[28]。

在改良的砖红壤剖面土壤中,随土壤 pH 与肥力由深层至表层逐渐提升, AOB 和 AOA + comammox 对硝化潜势的贡献均显著增加。这一结果与 Ouyang^[29]、王萍萍^[30] 等的结果一致。一般而言,随着有机肥管理年限的增加,土壤 pH 的改良效果逐渐显著,土壤中的有效态氮 (NH_3) 浓度呈指数级提高^[31],偏好高 pH 富营养环境的 AOB 是主要的“受益者”^[32]。此外,基于 DNA-SIP 标记、选择性抑制剂以及功能基因测序的研究结果一致表明,在农田土壤中, comammox 对氨氧化有不可忽略的贡献,且高氨浓度和高 pH 促进其分布和活动^[33-37]。有机肥的投入还可以为 AOA 和 comammox 提供偏好氮源,改变土壤理化性质^[38],促进其生长。

本研究在黑土 (HB) 中检测到了异养硝化菌对硝化的贡献,可能是由于其较高的 C/N。有研究表明,较高 C/N 的土壤可以为异养硝化菌的生长提供更多可利用碳源,增强异养硝化的贡献^[19, 39-40]。

3.2 土壤氨氧化相对贡献对 N_2O 排放的影响

氨氧化通过消耗土壤 O_2 并提供 NO_2^- 和 NO_3^- 底物引起硝化反硝化或异养反硝化是 N_2O 产生的主要途径,且该过程随 AOB 主导作用的加强而增强^[41]。本研究中,由 AOB 主导氨氧化的潮土 (SZ) 在培养 48 h 出现 NO_2^- 的累积峰,与 N_2O 的排放高峰耦合,可能的机制一是为减轻高浓度 NO_2^- 的毒害作用, AOB 发生了硝化反硝化作用;二是由于 AOB 迅速的氨氧化过程,消耗土壤 O_2 ,抑制了 NOB 的活动,引起了 NO_2^- 累积,进而导致硝化-反硝化耦合作用的发生。

尽管有研究表明,在未施肥的酸性土壤中, AOA + comammox 是氨氧化的主导微生物^[42],本研究却发现施氮后的酸性红壤和砖红壤中, AOB 对硝化潜势有较显著的贡献,且 AOB 和异养硝化菌对 N_2O 的贡献量接近 90%。这可能是因为 AOB 通过其硝化反硝化作用或驱动反硝化产生的 N_2O 远高于 AOA 和 comammox 的 N_2O 产生量。对全球农田土壤的研究结果也表明, comammox *Nitrospira* 对 N_2O

排放的贡献非常有限, N_2O 排放贡献由 AOB 主导^[43]。异养硝化菌的 N_2O 产生量也较 AOA 和 comammox 高^[44-45]。

氨氧化相关的非生物学过程也会产生 N_2O 。一方面是氨氧化过程中产生的 NH_2OH 底物,可通过 AOA 和 comammox 与 NH_2OH 氧化相关的非生物学过程产生 N_2O ^[46]。另一方面,氨氧化产物 NH_2OH 、 NO 和 NO_2^- 的化学分解也可以产生 N_2O ,此过程在三类氨氧化菌中均可发生^[47]。因此,本研究中氨氧化微生物对 N_2O 的贡献中包括了中间产物非生物过程的贡献。

3.3 氨氧化微生物相对贡献研究方法的差异

乙炔和辛炔分别是常用的自养氨氧化和 AOB 氨氧化的特异性炔烃抑制剂,被广泛应用于室内培养实验中。二者的结合使用可以比较准确地定量各类氨氧化微生物对氨氧化过程的相对贡献。然而,基于其炔烃的性质,使用过程中可能作为异养硝化菌的碳源^[48],进而刺激异养硝化的发生,从而高估培养体系中的异养硝化作用。此外,不同土壤质地会对乙炔和辛炔的扩散效果产生影响,导致对体系内氨氧化微生物相对贡献的估计误差。值得注意的是,乙炔和辛炔的化学结构特性可能将反应体系中的 NO 氧化为 NO_2^- ^[49-51],减少 N_2O 的化学排放量,从而低估 AOA + comammox 的 N_2O 排放量。但上述偏差,不会影响本研究的基本结论。总体而言,本研究使用炔烃抑制剂区分不同氨氧化能力的土壤中主导的氨氧化微生物类群,结果与前人利用 DNA 稳定同位素探测 (SIP) 技术获得的结果一致^[52]。未来可以将抑制剂法与同位素或微生物基因表达分析结合,在限制特定氨氧化微生物活性的基础上,更加清楚地明确 N_2O 的排放源^[35, 53]。由于同一类氨氧化微生物内部也存在生态位的分化,例如嗜酸 AOB TAO100^[54]、comammox clade A 和 comammox clade B 的差异^[34],因此继续开发针对氨氧化微生物,尤其是对 AOA 或 comammox 的特异性抑制剂是非常必要的,这将有助于拓展对硝化微生物的认知边界。

4 结 论

潮土、黑土、砖红壤及红壤旱地农田耕层土壤的硝化潜势随土壤由酸性到碱性而显著增加, AOB

主导四种耕层土壤的硝化潜势。在潮土、黑土及砖红壤中, 净硝化速率和 N_2O 排放均随 pH 的升高而显著提升, 与硝化潜势的规律一致。AOB 主导黑土的净硝化速率, 在潮土和砖红壤中 AOB 与 AOA + comammox 对净硝化速率的贡献相当。潮土、黑土及砖红壤的 N_2O 排放均由 AOB 主导。在有机肥改良的砖红壤剖面土壤中, pH、硝化潜势、净硝化速率和 N_2O 排放均由深层至表层而显著增加, 硝化潜势和净硝化速率的提升由 AOA + comammox 作用的显著增加主导, N_2O 排放的增加由 AOB 作用的增加主导, 且这一现象随有机肥改良年限的增加而加强。

参考文献 (References)

- [1] IPCC. Summary for policymakers[M]//Global warming of 1.5°C. Cambridge: Cambridge University Press, 2018. https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/sites/2/2022/06/SPM_version_report_LR.pdf.
- [2] 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.
- [3] Smith K A. Changing views of nitrous oxide emissions from agricultural soil: Key controlling processes and assessment at different spatial scales[J]. *European Journal of Soil Science*, 2017, 68 (2): 137—155.
- [4] Tian H Q, Xu R T, Canadell J G, et al. A comprehensive quantification of global nitrous oxide sources and sinks[J]. *Nature*, 2020, 586 (7828): 248—256.
- [5] Wang Q H, Zhou F, Shang Z Y, et al. Data-driven estimates of global nitrous oxide emissions from croplands[J]. *National Science Review*, 2020, 7 (2): 441—452.
- [6] FAO. World fertilizer trends and outlook to 2020[R]. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2017. <https://www.fao.org/3/i6895e/i6895e.pdf>.
- [7] Lehtovirta-Morley L E. Ammonia oxidation: Ecology, physiology, biochemistry and why they must all come together[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2018, 365 (9): fny058.
- [8] Prosser J I, Hink L, Gubry-Rangin C, et al. Nitrous oxide production by ammonia oxidizers: Physiological diversity, niche differentiation and potential mitigation strategies[J]. *Global Change Biology*, 2020, 26 (1): 103—118.
- [9] Kits K D, Sedlacek C J, Lebedeva E V, et al. Kinetic analysis of a complete nitrifier reveals an oligotrophic lifestyle[J]. *Nature*, 2017, 549 (7671): 269—272.
- [10] Kozłowski J A, Kits K D, Stein L Y. Comparison of nitrogen oxide metabolism among diverse ammonia-oxidizing bacteria[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1090.
- [11] Hink L, Gubry-Rangin C, Nicol G W, et al. The consequences of niche and physiological differentiation of archaeal and bacterial ammonia oxidisers for nitrous oxide emissions[J]. *The ISME Journal*, 2018, 12 (4): 1084—1093.
- [12] Han P, Wu D M, Sun D Y, et al. N_2O and NO_y production by the comammox bacterium *Nitrospira inopinata* in comparison with canonical ammonia oxidizers[J]. *Water Research*, 2021, 190: 116728.
- [13] Chen Z M, Ding W X, Xu Y H, et al. Importance of heterotrophic nitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium in a cropland soil: Evidences from a ^{15}N tracing study to literature synthesis[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2015, 91: 65—75.
- [14] Taylor A E, Vajrala N, Giguere A T, et al. Use of aliphatic *n*-alkynes to discriminate soil nitrification activities of ammonia-oxidizing thaumarchaea and bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79 (21): 6544—6551.
- [15] Hink L, Nicol G W, Prosser J I. Archaea produce lower yields of N_2O than bacteria during aerobic ammonia oxidation in soil[J]. *Environmental Microbiology*, 2017, 19 (12): 4829—4837.
- [16] Taylor A E, Giguere A T, Zobelein C M, et al. Modeling of soil nitrification responses to temperature reveals thermodynamic differences between ammonia-oxidizing activity of archaea and bacteria[J]. *The ISME Journal*, 2017, 11 (4): 896—908.
- [17] Nadeem S, Bakken L R, Frostegård Å, et al. Contingent effects of Liming on N_2O -emissions driven by autotrophic nitrification[J]. *Frontiers in Environmental Science*, 2020, 8: 598513.
- [18] Zhang J B, Sun W J, Zhong W H, et al. The substrate is an important factor in controlling the significance of heterotrophic nitrification in acidic forest soils[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2014, 76: 143—148.
- [19] Lu R K. Analytical methods for soil and agro-chemistry[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000. [鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.]
- [20] Giguere A T, Taylor A E, Suwa Y, et al. Uncoupling of ammonia oxidation from nitrite oxidation: Impact upon nitrous oxide production in non-cropped Oregon soils[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2017, 104: 30—38.
- [21] Zhao J, Meng Y Y, Drewer J, et al. Differential ecosystem function stability of ammonia-oxidizing archaea and bacteria following short-term environmental perturbation[J]. *mSystems*, 2020, 5 (3): e00309-20.
- [22] Tao R, Wakelin S A, Liang Y C, et al. Response of

- ammonia-oxidizing archaea and bacteria in calcareous soil to mineral and organic fertilizer application and their relative contribution to nitrification[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2017, 114: 20—30.
- [23] Stienstra A W, Klein Gunnewiek P, Laanbroek H J. Repression of nitrification in soils under a climax grassland vegetation[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1994, 14 (1): 45—52.
- [24] Sun R B, Guo X S, Wang D Z, et al. Effects of long-term application of chemical and organic fertilizers on the abundance of microbial communities involved in the nitrogen cycle[J]. *Applied Soil Ecology*, 2015, 95: 171—178.
- [25] Tang Y Q, Yu G R, Zhang X Y, et al. Environmental variables better explain changes in potential nitrification and denitrification activities than microbial properties in fertilized forest soils[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 647: 653-662.
- [26] Yu W T, Xu Y G, Bi M L, et al. Activity and composition of ammonia-oxidizing bacteria in an aquatic brown soil as influenced by land use and fertilization[J]. *Pedosphere*, 2010, 20 (6): 789—798.
- [27] Che J, Zhao X Q, Zhou X, et al. High pH-enhanced soil nitrification was associated with ammonia-oxidizing bacteria rather than Archaea in acidic soils[J]. *Applied Soil Ecology*, 2015, 85: 21—29.
- [28] Ouyang Y, Norton J M, Stark J M. Ammonium availability and temperature control contributions of ammonia oxidizing bacteria and archaea to nitrification in an agricultural soil[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2017, 113: 161—172.
- [29] Ouyang Y, Evans S E, Friesen M L, et al. Effect of nitrogen fertilization on the abundance of nitrogen cycling genes in agricultural soils: A meta-analysis of field studies[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2018, 127: 71—78.
- [30] Wang P P, Duan Y H, Xu M G, et al. Nitrification potential in fluvo-aquic soils different in fertility and its influencing factors[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2019, 56 (1): 124—134. [王萍萍, 段英华, 徐明岗, 等. 不同肥力潮土硝化潜势及其影响因素[J]. *土壤学报*, 2019, 56 (1): 124—134.]
- [31] Kemmitt S J, Wright D, Goulding K W T, et al. pH regulation of carbon and nitrogen dynamics in two agricultural soils[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2006, 38 (5): 898—911.
- [32] Zhong W H, Bian B Y, Gao N, et al. Nitrogen fertilization induced changes in ammonia oxidation are attributable mostly to bacteria rather than archaea in greenhouse-based high N input vegetable soil[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2016, 93: 150—159.
- [33] Li C Y, Hu H W, Chen Q L, et al. Comammox *Nitrospira* play an active role in nitrification of agricultural soils amended with nitrogen fertilizers[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2019, 138: 107609.
- [34] Li C Y, Hu H W, Chen Q L, et al. Niche differentiation of clade A comammox *Nitrospira* and canonical ammonia oxidizers in selected forest soils[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2020, 149: 107925.
- [35] Li C Y, Hu H W, Chen Q L, et al. Niche specialization of comammox *Nitrospira* clade A in terrestrial ecosystems[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2021, 156: 108231.
- [36] Li C Y, He Z Y, Hu H W, et al. Niche specialization of comammox *Nitrospira* in terrestrial ecosystems: Oligotrophic or copiotrophic?[J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2023, 53 (2): 161—176.
- [37] Zhu G B, Wang X M, Wang S Y, et al. Towards a more labor-saving way in microbial ammonium oxidation: A review on complete ammonia oxidization (comammox) [J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 829: 154590.
- [38] Li X, Han S, Wan W J, et al. Manure fertilizes alter the nitrite oxidizer and comammox community composition and increase nitrification rates[J]. *Soil and Tillage Research*, 2020, 204: 104701.
- [39] Lan T, Liu R, Suter H, et al. Stimulation of heterotrophic nitrification and N₂O production, inhibition of autotrophic nitrification in soil by adding readily degradable carbon[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2020, 20 (1): 81—90.
- [40] Zhang N, Miao S J, Qiao Y F, et al. N₂O emissions from black soils in northeast China[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2022, 59 (4): 899—909. [张楠, 苗淑杰, 乔云发, 等. 东北农田黑土 N₂O 排放研究进展[J]. *土壤学报*, 2022, 59 (4): 899—909.]
- [41] Huang T, Gao B, Hu X K, et al. Ammonia-oxidation as an engine to generate nitrous oxide in an intensively managed calcareous Fluvo-aquic soil[J]. *Scientific Reports*, 2014, 4 (1): 3950.
- [42] Bai X, Hu X J, Liu J J, et al. Ammonia oxidizing bacteria dominate soil nitrification under different fertilization regimes in black soils of northeast China[J]. *European Journal of Soil Biology*, 2022, 111: 103410.
- [43] Jiang L P, Yu J, Wang S Y, et al. Complete ammonia oxidization in agricultural soils: High ammonia fertilizer loss but low N₂O production[J]. *Global Change Biology*, 2023, 29 (7): 1984—1997.
- [44] Zhang J B, Müller C, Cai Z C. Heterotrophic nitrification of organic N and its contribution to nitrous oxide emissions in soils[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2015, 84: 199—209.
- [45] Zhu T B, Zhang J B, Cai Z C. The contribution of nitrogen transformation processes to total N₂O emissions

- from soils used for intensive vegetable cultivation[J]. *Plant and Soil*, 2011, 343 (1): 313—327.
- [46] Kits K D, Jung M Y, Vierheilig J, et al. Low yield and abiotic origin of N₂O formed by the complete nitrifier *Nitrospira inopinata*[J]. *Nature Communications*, 2019, 10 (1): 1836.
- [47] Heil J, Vereecken H, Brüggemann N. A review of chemical reactions of nitrification intermediates and their role in nitrogen cycling and nitrogen trace gas formation in soil[J]. *European Journal of Soil Science*, 2016, 67 (1): 23—39.
- [48] Nielsen T H, Nielsen L P, Revsbech N P. Nitrification and coupled nitrification-denitrification associated with a soil-manure interface[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1996, 60 (6): 1829—1840.
- [49] Bollmann A, Conrad R. Acetylene blockage technique leads to underestimation of denitrification rates in oxic soils due to scavenging of intermediate nitric oxide[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1997, 29(7): 1067—1077.
- [50] Bollmann A, Conrad R. Enhancement by acetylene of the decomposition of nitric oxide in soil[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1997, 29 (7): 1057—1066.
- [51] Caranto J D, Lancaster K M. Nitric oxide is an obligate bacterial nitrification intermediate produced by hydroxylamine oxidoreductase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114 (31): 8217—8222.
- [52] Shen J P, Zhang L M, Di H J, et al. A review of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in Chinese soils[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 296.
- [53] Decock C, Six J. How reliable is the intramolecular distribution of ¹⁵N in N₂O to source partition N₂O emitted from soil?[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2013, 65: 114—127.
- [54] Hayatsu M, Tago K, Uchiyama I, et al. An acid-tolerant ammonia-oxidizing γ -proteobacterium from soil[J]. *The ISME Journal*, 2017, 11 (5): 1130—1141.

(责任编辑：卢 萍)