

DOI: 10.11766/trxb202106170315

申卫收, 熊若男, 张欢欢, 杨思琪, 高南. 微生物介导的农业土壤氧化亚氮减排研究进展[J]. 土壤学报, 2023, 60(2): 332–344.

SHEN Weishou, XIONG Ruonan, ZHANG Huanhuan, YANG Siqi, GAO Nan. Research Progress on Microbial-Mediated Mitigation of Nitrous Oxide Emissions from Agricultural Soils[J]. Acta Pedologica Sinica, 2023, 60(2): 332–344.

微生物介导的农业土壤氧化亚氮减排研究进展*

申卫收¹, 熊若男¹, 张欢欢², 杨思琪¹, 高南^{2†}

(1. 南京信息工程大学环境科学与工程/江苏省大气环境监测与污染控制高新技术研究重点实验室/江苏省大气环境与装备技术协同创新中心, 南京 210044; 2. 南京工业大学生物与制药工程学院/国家生化工程技术研究中心, 南京 211816)

摘要: 氧化亚氮 (N_2O) 是一种在大气存留时间长且破坏臭氧层的重要温室气体。农业土壤源 N_2O 是其重要来源, 具有产生路径广、影响因素多、调控复杂等特点。减少农业土壤 N_2O 排放一直是研究的热点。含有 N_2O 还原酶的 N_2O 还原细菌能将 N_2O 还原为氮气 (N_2), 这是目前已知的微生物还原 N_2O 唯一的汇。直接应用微生物减少农业土壤 N_2O 排放是一种新兴的减排技术。本文详细阐述了农业土壤 N_2O 的生物源与汇, 重点论述了 N_2O 减排微生物的筛选及应用策略。综述了微生物介导的农业土壤 N_2O 减排的两种微生物生态学机制: 一种是利用含有 *nosZ* 基因的 N_2O 还原细菌直接减少 N_2O 排放, 另一种是利用能改变 N_2O 还原细菌群落组成和丰度及其活性的植物根际促生菌间接减少 N_2O 排放。最后, 讨论了影响微生物介导的农业土壤 N_2O 减排的环境因素及可能存在的问题, 并对该技术在减少农业土壤 N_2O 排放中的应用进行展望。本文可为我国实现农业碳中和的战略目标提供重要技术参考。

关键词: 氧化亚氮; *nosZ* 基因; 氧化亚氮还原细菌; 植物根际促生菌; 农业土壤

中图分类号: S154.3 文献标志码: A

Research Progress on Microbial-Mediated Mitigation of Nitrous Oxide Emissions from Agricultural Soils

SHEN Weishou¹, XIONG Ruonan¹, ZHANG Huanhuan², YANG Siqi¹, GAO Nan^{2†}

(1. School of Environmental Science and Engineering, Nanjing University of Information Science and Technology / Key Laboratory of High Technology Research on Atmospheric Environment Monitoring and Pollution Control in Jiangsu Province / Jiangsu Atmospheric Environment and Equipment Technology Collaborative Innovation Center, Nanjing 210044, China; 2. School of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University / National Engineering Research Center for Biotechnology, Nanjing 211816, China)

Abstract: Nitrous oxide (N_2O), an important greenhouse gas, has a global warming potential of 265 times higher than that of an equivalent concentration of carbon dioxide. The N_2O has a long atmospheric lifetime and does deplete the ozone layer in the stratosphere. Agricultural soil is an important source of N_2O , which has a characteristic of diverse generation paths, multiple impact factors, and complicated regulation processes. Mitigation of N_2O emissions from agricultural soils has long been the

* 国家自然科学基金项目(41771291, 31972503)和江苏省大学生创新创业训练计划项目(202010291176Y)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 41771291 and 31972503) and the Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students of Jiangsu Province, China (No. 202010291176Y)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: ngao@njtech.edu.cn

作者简介: 申卫收 (1979—), 男, 陕西杨凌人, 博士, 教授, 从事土壤微生物研究。E-mail: wsshenn@nuist.edu.cn

收稿日期: 2021-06-17; 收到修改稿日期: 2022-01-13; 网络首发日期 (www.cnki.net): 2022-03-05

hotspot of research in this field. N_2O -reducing bacteria harboring N_2O reductase can reduce N_2O to dinitrogen (N_2), which is the only known sink of N_2O consumption as a primary substrate in the biosphere. The direct use of microorganisms to decrease N_2O emissions from agricultural soils is an emerging technology. We elaborated on the biological sources and sinks of N_2O emissions from agricultural soils in detail, paying special emphasis on the screening and application strategies of microorganisms that can mitigate N_2O emissions. There are three strategies for the direct use of microorganisms to decrease N_2O emissions from agricultural soils: (1) application of the prepared microbial inoculum directly to the agricultural soil; (2) combination of the prepared microbial inoculum with fertilizers or other carriers before being applied to the soil; (3) construction of the microbial community with N_2O mitigation effect, and then direct application to the soil or in combination with a carrier before being applied to the soil. We summarized two ecological mechanisms of microbial-mediated mitigation of N_2O emissions from agricultural soils. One mechanism involved employing N_2O -reducing bacteria containing *nosZ* gene to directly convert N_2O to N_2 in order to mitigate N_2O emissions from agricultural soils. The other mechanism utilizes plant growth-promoting rhizobacteria to alter the community composition, abundance and activity of the N_2O -reducing bacteria and indirectly mitigate N_2O emissions from agricultural soils. We also discussed the environmental factors that affect the reduction of N_2O to N_2 by directly using microorganisms and the potential challenges. The biological process of reducing N_2O to N_2 is affected by many environmental factors, including the availability of NO_3^- and carbon sources, oxygen concentration, moisture content, temperature, pH and copper concentration. Among them, Cu availability and pH are some of the most important factors that determine the activity of N_2OR . Several issues need to be addressed in future studies. For example, there are only a limited number of strains that have been screened with N_2O mitigating effects. It remains unknown whether the inoculum colonizes roots or survive in the environment after the inoculation. The microbial ecological mechanisms are poorly understood; such as, how the inoculum achieve their beneficial effects in environments. Moreover, we lack effective technical means to regulate the inoculum to fully exploit their beneficial effects. Further, the methods to evaluate N_2O mitigating effects also need to be improved. Finally, prospects on the application of microbial-mediated mitigation of N_2O emissions from agricultural soils were suggested. The review provides an important technical reference for achieving the agricultural carbon neutrality strategic goal in China.

Key words: Nitrous oxide; *nosZ* gene; N_2O -reducing bacteria; Plant growth-promoting rhizobacteria; Agricultural soils

氧化亚氮 (N_2O) 在大气中存留时间长且破坏臭氧层, 是仅次于二氧化碳 (CO_2) 和甲烷 (CH_4) 的第三大温室气体。尽管大气中 N_2O 的浓度较 CO_2 低约 1 000 倍, 但是相同浓度的 N_2O 的增温潜势约为 CO_2 的 298 倍, 对全球总辐射强度的贡献约占 6%^[1]。 N_2O 在大气存留的时间为 $116 \pm 9 \text{ a}$ ^[2], 且能消耗大气层中的臭氧, 对高空平流层的臭氧层造成损害^[3]。2018 年大气中 N_2O 浓度与 1750 年的 N_2O 浓度相比增长超过 20%, 且在过去五年里大气中 N_2O 排放量增长率最高^[4]。2000 年以来, 全球 N_2O 的实际排放量超过了联合国政府间气候变化专门委员会 (IPCC) 的第五次评估报告中最高的典型浓度路径^[5], 也高于第六阶段耦合模式比较计划 (CMIP6) 中的所有共享社会经济路径^[6], 超出预期的 N_2O 排放对于实现《巴黎气候协定》的目标带来了更大的挑战^[7]。2007—2016 年全球 N_2O 总排放速率为 $17.0 \text{ Tg}\cdot\text{a}^{-1}$ (以 N 计, 下同), N_2O 大气化学汇

为 $13.5 \text{ Tg}\cdot\text{a}^{-1}$, 源与汇间的不平衡造成大气 N_2O 浓度不断增加。 N_2O 的来源分为自然来源与人为源。自然源 N_2O 排放主要来自土壤和海洋^[7], 土壤 N_2O 排放占全球 N_2O 总排放的 56%~70%^[8]。人为源的 N_2O 主要来自农田施肥、畜牧业生产、化石燃料和工业排放。其中农业排放的 N_2O 约占全球人为排放 N_2O 的 52%, 是大气中 N_2O 浓度升高的主要驱动力^[7]。随着全球人口不断增长和土地利用集约化, 氮肥用量不断增加。大量施入氮肥的农业土壤 N_2O 排放量占全球陆地排放的 30%^[8]。因此, 农业土壤源 N_2O 是其重要来源, 减少农业土壤 N_2O 排放的需求十分迫切。

目前, 已经有一些农业土壤 N_2O 减排的措施和技术的相关研究, 主要集中在氮肥类型、氮肥用量、添加农业化学品以及改进农业管理措施等^[9-12]。这些减排措施和技术的成功取决于对 N_2O 产生和还原微生物特别是参与硝化和反硝化过程的微生物的深

入了解,以及在此基础上对关键微生物过程的调控。最新研究表明,直接应用 N_2O 还原微生物可减少农业土壤 N_2O 的排放^[13-16]。本综述主要总结农业土壤 N_2O 的生物源与汇、应用微生物减少农业土壤 N_2O 排放的方法、机制及调控等。

1 农业土壤 N_2O 的生物源与汇

土壤 N_2O 的产生和消耗涉及复杂的微生物过程^[17]。产生 N_2O 的主要微生物过程包括氨氧化和硝化细菌反硝化、亚硝酸氧化、异养反硝化、厌氧氨氧化和硝酸盐异化还原成铵等途径^[18-19]。不同过程对 N_2O 净排放的相对贡献变化受微生物群落和环境条件的影响。土壤微生物参与的硝化过程和反硝化过程产生副产物 N_2O , 是农业土壤 N_2O 排放最为重要的来源^[18-20]。硝化过程包括两个阶段: (1) 氨氧化细菌 (AOB) 和氨氧化古菌 (AOA) 将氨 (NH_3) 氧化为亚硝酸盐 (NO_2^-), 其中间产物包括羟胺和一氧化氮 (NO); (2) 亚硝酸盐氧化菌 (NOB) 将 NO_2^- 氧化为硝酸盐 (NO_3^-)^[21]。AOB 和 AOA 对全球 N_2O 排放具有很大的贡献, 但它们产生 N_2O 的机制有所不同^[22]。AOB 在低氧状态下可进行硝化反硝化, 通过酶促反应将 NO_2^- 通过 NO 还原为 N_2O , 或者将羟胺厌氧氧化为 N_2O ^[21, 23]。AOB 和 AOA 可通过代谢中间产物 (羟胺、NO 和 NO_2^-) 的非生物反应产生“杂化”的 N_2O ^[24-25]。AOA 还可通过酶促反应将 NO 还原为 N_2O , 但是该反应的发生需要相对极端的环境条件^[26]。近些年, 有研究发现一种能将 NH_3 完全氧化为 NO_3^- 的完全氨氧化菌 (comammox), 可通过其中间产物羟胺的非生物反应产生 N_2O ^[27]。完全反硝化过程包括四个反应过程^[28]: (1) 周质的硝酸还原酶 (NAP) 或者膜结合硝酸还原酶 (NAR) 催化 NO_3^- 还原为 NO_2^- ; (2) NO_2^- 被 *nirS/K* 编码的亚硝酸还原酶 (NIR) 催化还原为气体 NO; (3) 一氧化氮还原酶 (NOR) 催化 NO 还原为 N_2O ; (4) *nosZ* 基因编码的 N_2O 还原酶 (N_2OR) 催化 N_2O 还原为 N_2 。约有三分之一含有 *nirS/K* 的反硝化微生物缺少 *nosZ* 基因^[29], 故而无将 N_2O 还原为 N_2 的能力, 因此生成副产物 N_2O 。如反硝化细菌根瘤农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* C58 含有 *nap*、*nir* 和 *nor* 基因, 但缺少 *nosZ* 基因, 在反硝化条件下产生

N_2O ^[30]。此外, 产生 N_2O 的过程还包括生物与非生物耦合的化学反硝化过程 (chemodenitrification)。例如, 铁还原细菌将三价铁离子 (Fe^{3+}) 还原成亚铁离子 (Fe^{2+}), 亚铁离子再与亚硝酸盐发生化学反应生成 N_2O ^[31]。

具有 *nosZ* 基因的反硝化细菌 (即 N_2O 还原细菌) 将 N_2O 还原为 N_2 , 是目前已知唯一的汇^[18-19]。 N_2O 还原细菌具有编码 N_2OR 的 *nosZ* 基因, 产生的 N_2OR 将 N_2O 还原为 N_2 。不同的反硝化细菌还原 N_2O 的速率不同^[32]。因此, 反硝化细菌群落的组成会影响 N_2O 的净排放速率。 N_2O 还原细菌有两种不同的类群, 分别为典型的反硝化细菌 (Clade I) 和非典型的反硝化细菌 (Clade II)。典型的反硝化细菌主要分布于 α -、 β -和 γ -变形菌门 (Proteobacteria)。非典型的反硝化细菌种类更为丰富多样, 其中大多仅含有 *nosZ* 基因, 不含其他反硝化基因; 无产生 N_2O 的能力, 仅消耗 N_2O , 为 N_2O 重要的汇^[33-34]。在多数环境下非典型的反硝化细菌 *nosZ* II 基因丰度大于典型的反硝化细菌 *nosZ* I 基因丰度^[35-36]。随着已测序的微生物基因组种类和数目的增加, Jones 等^[35]研究发现这两类 N_2O 还原微生物的多样性较先前预期的要大。每个类群的丰度或多样性不同, 可能会对土壤 N_2O 排放产生重要影响^[37]。土壤 N_2O 汇的能力主要由含有 *nosZ* II 基因的微生物决定, 这些非典型的反硝化细菌 *nosZ* II 基因多样性或丰度增加, 可能会强化 N_2O 消耗或降低 N_2O 净排放量^[30]。Clade I 和 Clade II 型 N_2O 还原细菌分布受土壤生物因子和非生物因子影响^[37]。含有 *nosZ* I 基因的细菌在植物根部占主导地位, 而含有 *nosZ* II 基因的细菌在土壤中占主导地位^[38]。分离、筛选和获得 N_2O 还原细菌对实现微生物介导的农业土壤 N_2O 减排具有重要意义。

2 N_2O 减排微生物的筛选及应用策略

N_2O 减排微生物是指具有减少土壤 N_2O 排放功能的一类微生物: 可以是微生物本身具有合成活性 N_2OR 的 *nosZ* 基因的 N_2O 还原细菌, 也可以是具有土壤 N_2O 减排效应但不含 *nosZ* 基因的植物根际促生菌, 或可以是其他具有土壤 N_2O 减排效应的微生物; 可以是细菌, 也可以是真菌。现有的 N_2O 还原细菌一般为反硝化细菌。最近, Ashida 等^[39]已通过

功能性单细胞分离方法从水稻田中分离出数千株典型的反硝化菌株，其中许多是 N_2O 还原细菌^[40]。Ishii 等^[40]从日本水稻土中分离获得含有 *nirS* 和 *nosZ* 基因的 N_2O 还原细菌 *Burkholderia* sp. TSO47-3，其还原 NO_3^- 和 NO_2^- 的反硝化活性极低，但具有很强的 N_2O 还原活性。Tago 等^[41]从日本不同水稻土和水稻-大豆轮作土壤中分离获得的反硝化细菌 *Azoarcus* sp. KS11B 和 *Niastella* sp. KS31B 的反硝化终产物仅有 N_2 ，它们还具有还原外源 N_2O 的能力。Gao 等^[42-43]进一步从日本不同地区水稻土中分离获得的 N_2O 还原细菌中，筛选获得具有良好促生特性的植物根际促生菌固氮螺菌属菌株 *Azospirillum* sp. TSA2S、*A.* sp. TSH100 和新草螺菌属菌株 *Novoherbaspirillum* sp. UKPF54。大豆慢生根瘤菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 是与大豆共生的固氮菌，含有 *napDABCDE*、*nirK*、*norECBQD* 和 *nosRZDFYLX* 基因，其反硝化终产物仅有 N_2 ^[44]。Itakura 等^[15]在纯培养条件下发现了较 *B. japonicum* USDA110 具有更高 N_2OR 活性的 *B. japonicum* 5M09 自然突变菌株和 *B. japonicum* PRNOS 基因工程突变菌。刘春梅等^[45]从水稻土中分离筛选出一株兼性 N_2O 还原菌，含有 *narG*、*nirS*、*cnorB* 和 *nosZ* 基因，其在厌氧条件下还原外源 N_2O 速率高达 $0.0219 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ ，表现出较强的还原能力。Domeignoz-Horta 等^[46]发现含有 *nosZ* II 基因的非典型反硝化细菌发酵成对杆菌 *Dyadobacter fermentans* NS114^T，该菌株在纯培养条件下仅还原 N_2O ，不能以其他形式的氮氧化物为电子受体。近些年，具有还原 N_2O 能力的微生物相继被发现分离，增强它们在土壤中的丰度和活性是减少土壤 N_2O 排放的关键^[47]。

直接应用微生物减排土壤 N_2O 的策略分为三种。第一种策略是将制备的微生物菌剂直接施用到土壤。Domeignoz-Horta 等^[46]在土壤微宇宙条件下将 *D. fermentans* NS114^T 扩繁后接种至 11 种不同类型的土壤中，超过 1/3 的土壤反硝化终产物比值 $r_{N_2O}/r(N_2O+N_2)$ 显著降低；接种较高浓度的 *D. fermentans* NS114^T 在有些土壤上具有更强的 N_2O 减排效果。Itakura 等^[15]在盆栽试验条件下将含有 *nosZ* 基因的 *B. japonicum* USDA110 接种至种植大豆幼苗的土壤中，接种 30 d 后移除大豆幼苗地上部，测定大豆根际系统的 N_2O 排放，发现 USDA110 菌株显著减少了大豆根际系统中 N_2O 的排放；在接种具有

更高 N_2OR 活性的 *B. japonicum* 5M09 自然突变菌株时具有更好的 N_2O 减排效果。将 *B. japonicum* 5M09 和含有 *nosZ* 基因的 *B. japonicum* Tsu125 接种至种植有大豆种子的育苗土壤中，再移栽至田间土壤，发现菌株 5M09 和 Tsu125 极大减少了 N_2O 累积排放量^[15]。Gao 等^[14]在温室盆栽试验条件下向种植红花苜蓿和梯牧草的土壤分别接种 7 株具有植物促生效应的 N_2O 还原细菌，大部分菌株可促进牧草植物氮磷养分的吸收，同时具有减排牧草土壤 N_2O 和促进牧草植物生长的双重效应。除了接种 N_2O 还原细菌，极个别具有植物促生效应的非 N_2O 还原微生物也可减少农业土壤 N_2O 的排放^[48-49]。Calvo 等^[50]在温室盆栽试验中将四种植物根际促生菌 *Bacillus* spp. 混合培养后接种至施肥后的土壤中，减少了土壤 N_2O 排放以及促进玉米的生长和氮素吸收。Wu 等^[48]在温室盆栽试验条件下将植物根际促生菌解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* EBL11 接种至施肥后的酸性土壤，在明显促进了油菜生长的同时，减少了酸性茶园土壤 N_2O 排放。Xu 等^[49]在温室盆栽试验中将植物促生真菌 *Trichoderma viride* EBL13 接种至施肥后的茶园土壤，使得茶园土壤 N_2O 的排放减少了 67.6%。

第二种策略是将制备的微生物菌剂与肥料或其他载体等结合后施入土壤。Nishizawa 等^[16]在微宇宙条件下，将 *Azoarcus* sp. KS11B、*Niastella* sp. KS31B 和 *Burkholderia* sp. TSO47-3 等三株 N_2O 还原细菌与颗粒有机肥混合后施入土壤中，与施加颗粒有机肥但未接种处理相比，均显著减少了土壤 N_2O 累积排放量，分别降低了 63.0%、61.3%和 43.8%。Gao 等^[13]在田间原位条件下，向火山灰土和冲积土中施入分别接种 N_2O 还原细菌 *Azospirillum* sp. TSH100 和 *Novoherbaspirillum* sp. UKPF54 的颗粒有机肥，均有效减少了这两种农田土壤的 N_2O 累积排放量。Xu 等^[51]利用甘薯淀粉废水将绿色木霉菌 *Trichoderma viride* EBL13 大量扩繁后，以秸秆为载体经固态发酵生产生物肥料，施入田间原位的茶园土壤，与施用等氮量的化学肥料相比，生物肥料处理增加了茶园茶叶产量，同时茶园土壤 N_2O 排放量显著减少了 33.3%~71.8%；与施用含氮量高一倍的化学肥料处理相比，生物肥料处理未减少茶叶产量且 N_2O 排放量显著降低了 71.6%；表明该生物肥料不仅可保持作物产量，还可提高氮肥的利用率以及减少氮肥用量。

第三种策略是构建具有 N₂O 减排效应的微生物菌群，然后制备成菌剂直接施入土壤或与肥料等载体结合后再施入土壤。为了增强在田间原位条件下接种微生物的减排效应及与土著微生物的竞争力，Akiyama 等^[52]筛选了 63 种含有 *nosZ* 基因的土著 *B. diazoefficiens* 菌株，将它们混合培养后接种至田间大豆根际土壤。结果表明，与未接种处理相比，接种 *B. diazoefficiens* 菌群在未影响根瘤数量的情况下显著增加了含有 *nosZ* 基因的根瘤比例，而且根瘤分解时期的 N₂O 排放量显著降低。

除直接应用微生物减排土壤 N₂O 之外，还可通过改变农业管理措施（耕作制度、灌溉方式和作物轮作系统等）和添加农业化学品（生石灰、生物质炭和硝化抑制剂等），也可以刺激 N₂O 还原菌生长。

Grave 等^[53]发现在施入氮肥的情况下，与常规耕作相比免耕会增加农田土壤 N₂O 的排放。Vázquez 等^[54]使用实时荧光定量 PCR 方法研究耕作制度对地中海土壤微生物群落的影响，发现常规耕作与免耕相比增加了 *nosZ* 基因丰度。Harter 等^[55]证明生物质炭可通过增加 *nosZ* 基因的丰度和转录水平来增强 N₂O 的还原，从而减少土壤 N₂O 的排放。

由此可见，应用微生物减排农业土壤 N₂O 的技术切实可行。应用具有 N₂O 减排效应的植物根际促生菌不仅能够减少农业土壤 N₂O 排放，还能够减肥增效、促进作物生长（表 1）。明确应用微生物减少农业土壤 N₂O 排放的微生物生态学机制，将有助于定向调控农业土壤 N₂O 排放，构建基于微生物的新型 N₂O 减排技术。

表 1 N₂O 减排微生物对农业土壤 N₂O 排放和作物产量的影响

Table 1 Generalized overview of the effects of microorganisms on N₂O emission reduction and crop yield

菌株 Microbial strain	<i>nosZ</i> 基因 <i>nosZ</i> gene	来源 Source	供试体系 Test system	N ₂ O 减排 ¹⁾ N ₂ O emission reduction /%	土壤特征 Soil feature	作物 ²⁾ Crop	参考文献 References
N ₂ O 还原细菌 N ₂ O-reducing bacteria							
<i>Azoarcus</i> sp. KS11B	有	水稻土	微宇宙试验	63 [#]	冲积土	无	[16]
<i>Niastella</i> sp. KS31B	有	水稻土	微宇宙试验	61 [#]	冲积土	无	[16]
<i>Burkholderia</i> sp. TSO47-3	有	水稻土	微宇宙试验	44 [#]	冲积土	无	[16]
<i>Dyadobacter fermentans</i> NS114 ^T	有	表面灭菌 的玉米茎	微宇宙试验	51 [^]	耕地和牧 草地	无	[46]
<i>Azospirillum</i> sp. TSH100	有	水稻土	盆栽试验 田间试验	76 [#] 37 [#]	冲积土 冲积土	红花苜蓿 ⁺ 无	[14] [13]
<i>Novoherbaspirillum</i> sp. UKPF54	有	水稻土	盆栽试验 田间试验	83 [#] 23 [#]	冲积土 火山灰土	红花苜蓿 ⁺ 无	[14] [13]
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA110	有	大豆根瘤	盆栽试验	83 [#]	火山灰土	大豆	[15]
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> 5M09	有	自然突变	盆栽试验 田间试验	89 [#] 56 [#]	火山灰土 火山灰土	大豆 大豆	[15] [15]
非 N ₂ O 还原细菌 Non-N ₂ O-reducing bacteria							
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> EBL11	无	水稻根际	盆栽试验	43 [*]	红壤	油菜 ⁺	[48]
<i>Trichoderma viride</i> EBL13	无	土壤	盆栽试验 田间试验	68 [*] 33-72 [*]	红壤 红壤	蔬菜 ⁺ 茶树 ⁺	[49] [51]

注：¹⁾ N₂O 减排（#）累积排放量，（^）N₂O 产生潜势，（*）N₂O 排放通量。²⁾ 作物情况：（+）表示作物生物量或产量增加。
Note: ¹⁾ N₂O emission reduction: (#) cumulative N₂O emission, (^) potential N₂O production rate, (*) N₂O emission. ²⁾ Crop situation: (+) indicates crop biomass or crop production increased.

3 微生物介导的农业土壤 N_2O 减排的微生物生态学机制

3.1 直接机制

应用微生物减排 N_2O 的直接机制是指人为向土壤中接种的微生物本身具有还原 N_2O 的功能，能合成有活性的 N_2OR ，并将 N_2O 还原为 N_2 ，从而促使农业土壤 N_2O 的减排（图 1a）。具有直接减排 N_2O 功能的微生物通常是指具有 *nosZ* 基因的 N_2O 还原细菌。 N_2O 还原细菌减少 N_2O 排放的作用机制有两种：一种是接种的 N_2O 还原细菌在与土著反硝化微生物竞争电子供体（有机化合物）和电子受体（ NO_3^- 和 NO_2^- ）中占主导地位，使得土著反硝化微生物的反硝化活性降低；另一种是接种的 N_2O 还原细菌不影响土著反硝化微生物产生 N_2O 的过程，而合成大量有活性的 N_2OR 将 N_2O 还原为 N_2 ；也可能二种机制同时存在。Akiyama 等^[52]利用实时荧光定量 PCR 技术证明在田间试验条件下向大豆根际土壤中接种含有 *nosZ* 基因的 *B. diazoefficiens* 菌群显著增加了 *nosZ* 基因的表达，*nirK* 基因的表达无显著变化但略有下降。这种现象说明 *B. diazoefficiens* 菌群还原 N_2O 的两种作用机制。Domeignoz-Horta 等^[46]在微宇宙试验中向瑞典耕作土壤中接种含有 *nosZ* II 基因的 *D. fermentans* NS114^T，同时显著减少了 N_2O 产生

潜势和 N_2O 排放潜力，而且其反硝化潜势无显著变化，表明接种的 *D. fermentans* NS114^T 可消耗土壤中其他微生物产生的 N_2O ，说明了 N_2O 还原细菌减少 N_2O 排放的第二种作用机制。

3.2 间接机制

接种微生物减排 N_2O 的间接机制是指人为向土壤接种非 N_2O 还原细菌，通过改变土著 N_2O 还原细菌群落的组成和丰度以及代谢活性，促使农业土壤 N_2O 的减排（图 1b）。非 N_2O 还原细菌虽然无编码 N_2OR 的 *nosZ* 基因，但仍具有减排 N_2O 的能力^[48-49, 56]，其可能的减排机制是非 N_2O 还原细菌改变了土壤微生物的群落组成。例如，*Bacillus* spp. 是广泛使用的植物根际促生菌，可产生多种抗病毒、抗细菌和抗真菌化合物来抑制病原微生物，但也对土壤中其他微生物产生影响^[57]。Wu 等^[48]将典型的植物根际促生菌 *Bacillus amyloliquefaciens* EBL11 接种至施肥后的酸性土壤，通过 qPCR 技术对功能基因 *amoA*（AOA 和 AOB）、*nirK*、*nirS* 和 *nosZ* 进行定量分析，结果表明接种 *B. amyloliquefaciens* EBL11 后 AOB 丰度降低，同时显著增加了 *nosZ* 基因丰度。基于 16S rDNA 测序结果预测土壤中微生物功能基因组成和丰度的变化，发现接种 *B. amyloliquefaciens* EBL11 后氨氧化过程中的功能基因丰度减少，而 N_2O 还原过程中的功能基因丰度增加。上述研究结果表明 *B. amyloliquefaciens* EBL11

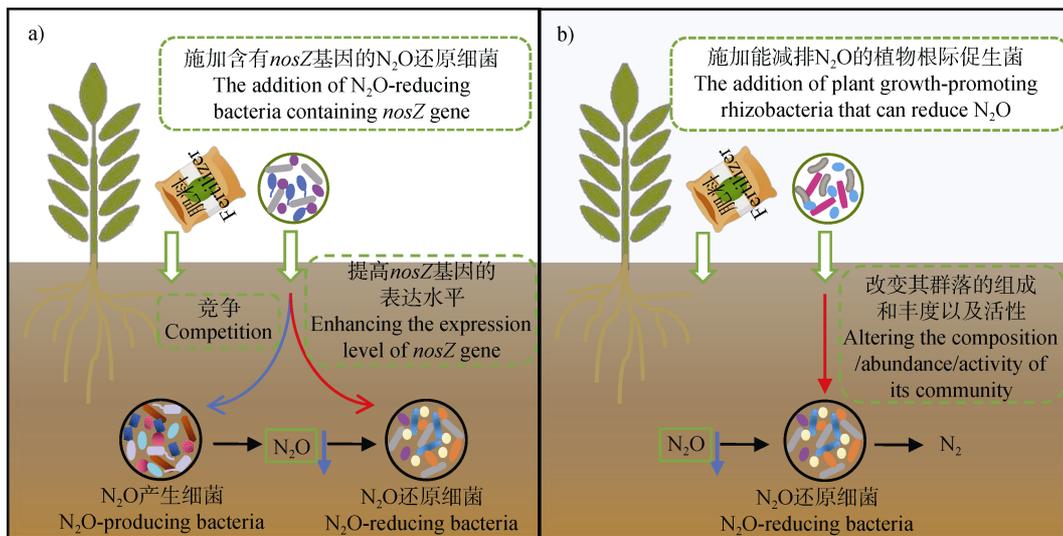


图 1 微生物介导的农业土壤 N_2O 减排的微生物生态学机制（a. 直接机制；b. 间接机制）

Fig. 1 Two microbial ecological mechanisms of using microorganisms mediated N_2O mitigation from agricultural soils (a. direct mechanism; b. indirect mechanism)

减少土壤 N_2O 排放的机制可能有两种：一种是通过减少土壤中 AOB 的数量来减少硝化作用下 N_2O 的产生；另一种是通过增加 N_2O 还原细菌数量或活性来增强 N_2O 还原过程；也可能二种机制同时存在。即 *B. amyloliquefaciens* EBL11 改变了土壤中氨氧化微生物和 N_2O 还原细菌群落的组成和丰度以及代谢活性。另一研究^[58]在温室条件下向施肥后的茶园土壤接种 *T. viride* EBL13，与未接种处理相比 N_2O 排放减少了 67.6%，然后通过 qPCR 定量和功能基因 *nosZ* 高通量测序研究 *T. viride* EBL13 与 N_2O 还原之间的潜在机制：*T. viride* EBL13 可以提高植物的抗病性及抗胁迫能力，且定殖根部后可改变植物的基因表达；接种 *T. viride* EBL13 处理与未接种处理相比 *nosZ* 基因丰度和 α 多样性增加，表明 *T. viride* EBL13 增加了土著的 N_2O 还原细菌群落的丰度和多样性。这种差异可能是接种 *T. viride* EBL13 显著减少土壤 N_2O 排放的原因。

4 应用微生物减排农业土壤 N_2O 的环境调控因子

N_2O 还原为 N_2 的生物过程受诸多环境因子的影响，主要包括 NO_3^- 和碳源的可利用性、氧气 (O_2) 的浓度、水分含量、温度、pH 和铜 (Cu^{2+}) 浓度，其中 pH 和 Cu^{2+} 浓度是影响 N_2OR 活性的两个最为关键的因素^[19, 59]。近年来，硫化物对 N_2O 还原过程的影响逐渐受到关注，有研究发现硫化钠的添加显著抑制 N_2O 还原^[60]。

4.1 NO_3^- 的可利用性

NO_3^- 通常会抑制或延缓 N_2O 的还原，导致 N_2O 的排放增加^[61]。Senbayram 等^[62]在微宇宙条件下发现在一定浓度下反硝化过程中 $N_2O/(N_2O+N_2)$ 的比值随着 NO_3^- 浓度的增加而升高，直至 NO_3^- 浓度为 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时达到最大，表明在 NO_3^- 浓度较高时反硝化细菌的 N_2O 还原过程受到抑制。Highton 等^[63]同样发现 N_2O 还原活性对 $NO_3^- + NO_2^-$ 浓度很敏感，在其浓度高时 N_2 产生速率较低。

4.2 碳源的可利用性

碳源通过增强土壤异养微生物的呼吸（营造厌氧条件）和为反硝化细菌提供电子而促进反硝化过

程，是反硝化过程的主要限制因素。反硝化过程中 N_2O 的积累可能是不同的 N-还原酶之间的电子竞争引起的。有研究^[64]表明在废水处理中，浓度低的可利用碳源导致 N_2O 与上游 N-还原酶之间的电子竞争，从而导致 N_2O 的瞬时积累。添加碳源通常可降低反硝化过程中 $N_2O/(N_2O+N_2)$ 的比值，但是会受到 NO_3^- 浓度和碳源种类的影响^[62-65]。

4.3 O_2 浓度

在纯培养和土壤微宇宙条件下，*nosZ* 基因的表达受到 O_2 的抑制，与其他反硝化基因的表达（如 *nirS*、*nirK*、*cnorB* 和 *narG*）相比，*nosZ* 基因的表达对 O_2 更敏感^[66]。Morley 等^[67]的研究证明 N_2OR 突然暴露于 O_2 时会暂时被抑制，但反硝化过程中其他的还原酶仍可发挥作用，结果导致 N_2O 的积累。

4.4 水分含量

土壤水分含量是土壤 N_2O 排放的主要驱动力之一。土壤水分含量不仅决定了 O_2 的有效性，同时影响养分在土壤基质中的扩散和运输以及微生物细胞的代谢活性^[68]。当土壤水分含量达到饱和或含量较高时， O_2 浓度相对较低， N_2O 的扩散速率也相对较低，为完全反硝化过程提供了有利的环境条件；而土壤水分含量较低时， O_2 浓度较高，不完全厌氧条件不仅使得反硝化微生物优先利用 NO_3^- 和 NO_2^- ，还抑制了 N_2OR 的活性^[63]。

4.5 温度

温度对土壤 N_2O 排放同时表现出直接作用和间接作用。直接作用表现为：在一定温度范围内，随着温度的升高，土壤微生物活性和 N_2O 产生与还原过程中的酶活性增加，对土壤 N_2O 排放具有倍增效应^[18]。间接作用表现为：温度升高引起的土壤呼吸增加导致土壤 O_2 浓度降低，为反硝化细菌创造了厌氧条件。

4.6 pH

土壤 pH 是控制 N_2O 排放的重要因素。低 pH 影响细胞周质中 N_2OR 的组装或折叠，使其不能正确装配从而活性很低甚至无活性。在土壤 pH5~8 范围内， $N_2O/(N_2+N_2O)$ 的比值与土壤 pH 呈显著负相关^[69]。向酸性土壤中施加生石灰可以中和土壤酸性，从而通过减少土壤中 NO_2^- 积累和促进完全反硝化过程来减少 N_2O 的排放^[54]。土壤 pH 的管理可能是未来减少农田土壤 N_2O 排放的重要策略，特别

是对于过度施肥导致土壤酸化的地区。

4.7 Cu 浓度

Cu 的生物可利用性是决定 N_2OR 活性的重要因素。依赖 Cu^{2+} 的 N_2OR 由两个亚基组成，每个亚基包含一个双核 Cu_A 中心（电子传递结构域）和一个独特的四核 Cu_Z 中心（催化结构域）^[70]。典型的反硝化细菌在纯培养条件下，缺少 Cu^{2+} 会导致 *nosZ* 基因表达水平降低^[71]或者 N_2OR 的合成受阻^[59]，进而 N_2O 不能被还原，导致大量 N_2O 产生。在土壤生态系统中，施入添加 Cu^{2+} 的颗粒有机肥增强了反硝化细菌将 N_2O 还原为 N_2 的能力，减少了土壤 N_2O 的排放^[72]。因此， N_2OR 的合成依赖 N_2O 还原细菌的生存环境中有足够的可利用性 Cu。

5 应用微生物减排农业土壤 N_2O 的难点与问题

尽管利用微生物减少农业土壤 N_2O 排放取得了一定的进展，但是该生物减排方法仍然有以下难点与问题，制约着微生物介导的土壤 N_2O 减排技术的高效设计和应用。

5.1 筛选获得的具有 N_2O 减排效应的菌株数量有限

目前仅分离获得少量 N_2O 减排微生物。 N_2O 还原细菌种类丰富多样，很难将信息从有限的生理学研究推广至整个 N_2O 还原细菌群落，也很难将实验室研究结果类推至土壤生态系统。此外，在实验室条件下单个模型菌株的行为与其在自然环境中的行为也可能不尽相同。因此，尽管有些 N_2O 还原细菌在纯培养条件下具有高效减排 N_2O 的能力，但将它们接种至一个新环境后其还原 N_2O 的能力可能发生改变，阻碍在生态系统水平上精确预测或调控 *nosZ* 基因的表达和 N_2OR 活性。例如：Gao 等^[13]从纯培养条件下筛选出 38 株具有较高 N_2O 还原活性的反硝化细菌，经过接种到有机肥和土壤微宇宙土壤进一步筛选，最终获得两株在田间原位条件下有效减少农业土壤 N_2O 排放的高效 N_2O 还原细菌。

5.2 接种微生物在自然环境中存活和定殖等情况不够明确

自然界中的微生物群落是复杂且动态变化的，它们具有高度互联的代谢和生态互作网络^[73]。将微

生物接种至存在生存竞争的土壤环境中，接种的微生物在与土著微生物的竞争中能否存活与定殖对其执行减少土壤 N_2O 排放功能起着决定性作用。例如：由于接种的根瘤菌与土著根瘤菌之间存在竞争，在土壤中存在土著根瘤菌的情况下，通常接种的高效根瘤菌无法发挥作用^[74]。因此选择接种的微生物时，菌株的竞争力已被认为是需要考虑的关键特征^[75]。

5.3 接种微生物功能发挥的微生物生态学机制不够清晰

自然环境中复杂的微生物群落很难在实验室条件下再现^[73]。因此，在实验室条件下难以准确预测接种的微生物在自然环境中基因表达调控和功能的变化，以及对土著微生物群落组成和生态功能的影响。植物根际促生菌可分泌多种化合物，有些化合物可以调控植物基因的表达；此外，这些化合物也对土壤中其他微生物产生一定的影响。例如，Wu 等^[48]通过高通量测序发现向土壤中施用含有 *B. amyloliquefaciens* EBL11 的生物肥料相对于施用化肥显著改变了土著的氨氧化微生物和反硝化细菌的群落组成和丰度，对其他关键土著微生物群落组成和生态功能的影响尚有待进一步探究。

5.4 有效调控接种微生物功能发挥的技术手段缺乏

接种的微生物减少 N_2O 排放功能的发挥通常受到多个因素的限制，除存在竞争性的土著微生物，还包括环境条件、农业管理措施、接种微生物本身以及接种方法等因素。 N_2O 还原为 N_2 的生物过程本身受诸多环境因子的影响，pH 和 Cu^{2+} 浓度是决定 N_2OR 活性的两个关键因素^[76]。例如，Shen 等^[72]发现与未接种且未添加 Cu^{2+} 的土壤相比，在火山灰土和灰色低地土中施入添加适宜浓度 $CuSO_4$ 的颗粒有机肥后，再接种 *Azospirillum* sp. UNPF1 会显著降低两种土壤的 N_2O 累积排放量。即：向土壤中添加 Cu^{2+} 后优化了接种 N_2O 还原细菌的环境条件。然而，采用 Cu^{2+} 调控 N_2OR 活性措施在 Cu^{2+} 缺乏的土壤中可能起到较好的效果，在 Cu^{2+} 富集的土壤背景条件下，高浓度 Cu^{2+} 可能抑制 N_2O 生成的微生物活性进而表现为减少 N_2O 的排放^[72]。此外，长期向土壤中添加 Cu^{2+} 可能引起铜的累积量超过环境标准，导致土壤污染，同时危害植物、动物和人类健康^[72]。在施用动物源的有机肥和/或在 Cu^{2+} 浓度较高的土壤中，特别需要注意这一点。分别采用土壤接种和有机肥接种时，*Burkholderia* sp. TSO47-3 对土壤 N_2O

的减排效应有显著区别^[16]。Akiyama 等^[52]改进发芽和接种方法后含有 *nosZ* 基因的根瘤比例大大提高。由此可见,优化的接种模式可能是调控微生物菌减排功能发挥的有效措施。

5.5 评估 N₂O 减排效果的方法有待改进

合适的定量模型可最终明确生态系统中微生物群落潜在的生态相互作用及其宏观效应^[73]。土壤 N₂O 产生和消耗的微生物生态学机制可能会在模型中得到实际体现,可将接种的微生物作为因子参数化来评估减排效果。但是要在广泛的气候条件、农业管理措施和土地利用类型中建立一套“微生物 N₂O 排放因子”,将大大增加参数的数量和模型的复杂性,非常具有挑战性^[19]。

6 结论与展望

本综述主要总结了基于微生物的新型 N₂O 减排方法。增强微生物作为 N₂O 汇的功能对于减少农业土壤 N₂O 排放至关重要。利用 N₂O 还原细菌或者具有 N₂O 减排功能的植物根际促菌可高效减少土壤 N₂O 排放,但涉及的微生物生态学机制有所不同。利用 N₂O 还原细菌减少农业土壤 N₂O 排放的主要机制是其本身含有 *nosZ* 基因,而利用植物根际促生菌减少土壤 N₂O 排放的机制则是由于其改变了 N₂O 还原细菌群落的组成和丰度以及代谢活性。在 NO₃⁻ 和碳源的可利用性、O₂ 的浓度、水分含量、温度、pH 和 Cu²⁺ 浓度等环境因素中,pH 和 Cu²⁺ 浓度是影响 N₂O 活性的两个最为关键的因素。微生物介导的土壤 N₂O 减排存在以下难点与问题:筛选获得的具有 N₂O 减排效应的菌株数量有限,接种微生物在自然环境中存活和定殖等情况不够明确,其功能发挥的微生物生态学机制不够清晰,有效调控影响其功能发挥的技术手段缺乏,以及评估其减排效果的方法尚有待改进等。

将来需要在以下几个方面开展相关研究。首先,进一步筛选获得高效的具有 N₂O 减排效应的 N₂O 减排微生物。从自然环境中筛选具有 N₂O 还原能力的新菌株或挖掘现有菌株的新功能,特别是筛选近些年发现的具有 *nosZ* II 基因的非典型反硝化细菌;采用功能性宏基因组学、转录组和转座子测序等方法鉴定单个微生物在特定代谢位中其基因水平适应性的决定因素^[77-78]等将有助于推进农田 N₂O 减排技术

的发展。其次,增强接种微生物在自然环境中存活和定殖等研究。例如通过创新方式克服在田间条件下接种微生物难以存活和定殖的困难,最大化提高接种微生物在农业土壤中的成活率;通过添加化学物质(如外源性物质)和载体(如有机肥、沼液、沼渣)为接种微生物创造适宜的生存环境;接种人工的微生物群落有可能增强接种微生物的生存能力和竞争能力;采用长时间内连续接种的缓释系统(如将其压缩至富营养基的开放式硅胶管)^[79]等。再次,进一步明确接种微生物功能发挥的微生物生态学机制。通过深入的遗传和生物化学研究确定微生物群落成员,接种人工微生物群落以发挥其复杂集合体的功能^[73]。然后,尝试调控影响其功能发挥的技术手段。如探究接种的 N₂O 还原细菌在特定代谢位中其 *nosZ* 基因表达水平的变化以及决定因素,结合测定结果通过添加特异的外源性物质精确地调节土著微生物群落,开展基于 N₂O 还原细菌的种属特异性调控。原位微生物组工程是通过工程化载体直接修饰自然微生物群落的宏基因组,可以更大范围和更高特异性地改变复杂微生物群落功能。原位微生物组工程或许可以为农业土壤 N₂O 减排提供关键技术^[73]。最后,改进评估 N₂O 减排效果的方法。建立合适的定量模型需要微生物生态学家、生物地球化学家、农学家、土壤学家和建模者进行紧密的跨学科合作。通过密切合作,将土壤微生物信息纳入相关模型,明确接种微生物在田间尺度或区域尺度对 N₂O 减排的贡献。总之,利用微生物减少农业土壤 N₂O 排放是一种低成本、高效益和切实可行的方法,可为我国实现农业碳中和战略目标提供重要技术参考。

参考文献 (References)

- [1] Montzka S A, Dlugokencky E J, Butler J H. Non-CO₂ greenhouse gases and climate change[J]. *Nature*, 2011, 476 (7358): 43—50.
- [2] Prather M J, Hsu J, DeLuca N M, et al. Measuring and modeling the lifetime of nitrous oxide including its variability[J]. *Journal of Geophysical Research Atmospheres*, 2015, 120 (11): 5693—5705.
- [3] Ravishankara A R, Daniel J S, Portmann R W. Nitrous oxide (N₂O): The dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century[J]. *Science*, 2009, 326 (5949): 123—125.
- [4] Prinn R G, Weiss R F, Arduini J, et al. History of

- chemically and radiatively important atmospheric gases from the Advanced Global Atmospheric Gases Experiment (AGAGE) [J]. *Earth System Science Data*, 2018, 10 (2): 985—1018.
- [5] Davidson E A. Representative concentration pathways and mitigation scenarios for nitrous oxide[J]. *Environmental Research Letters*, 2012, 7 (2): 024005.
- [6] Gidden M J, Riahi K, Smith S J, et al. Global emissions pathways under different socioeconomic scenarios for use in CMIP6: A dataset of harmonized emissions trajectories through the end of the century[J]. *Geoscientific Model Development*, 2019, 12 (4): 1443—1475.
- [7] Tian H, Xu R, Canadell J G, et al. A comprehensive quantification of global nitrous oxide sources and sinks[J]. *Nature*, 2020, 586 (7828): 248—256.
- [8] Syakila A, Kroeze C. The global nitrous oxide budget revisited[J]. *Greenhouse Gas Measurement and Management*, 2011, 1 (1): 17—26.
- [9] Chen H, Li B, Xiong Z Q. Effects of N reduction and nitrification inhibitor on N₂O emissions in intensive vegetable field[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2017, 54(4): 938—947. [陈浩, 李博, 熊正琴. 减氮及硝化抑制剂对菜地氧化亚氮排放的影响[J]. *土壤学报*, 2017, 54(4): 938—947.]
- [10] Ji Y L, Suo L, Xie Y, et al. Effects of different biochars on Hainan latosol properties and N₂O emission[J]. *Soils*, 2017, 49 (6): 1172—1178. [季雅岚, 索龙, 解钰, 等. 不同生物质炭对海南砖红壤性质及 N₂O 排放的影响[J]. *土壤*, 2017, 49 (6): 1172—1178.]
- [11] Mao X W, Cheng M, Xu Q F, et al. Effects of nitrification inhibitors on soil N₂O emission and community structure and abundance of ammonia oxidation microorganism in soil under extensively managed *Phyllostachys edulis* stands[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2016, 53 (6): 1528—1540. [毛新伟, 程敏, 徐秋芳, 等. 硝化抑制剂对毛竹林土壤 N₂O 排放和氨氧化微生物的影响[J]. *土壤学报*, 2016, 53 (6): 1528—1540.]
- [12] Wu Y, Hong M, Lin L L, et al. Influence of different fertilization measures on NH₃ volatilization and N₂O emission in salined flava-aquic soil of Hetao irrigation area[J]. *Soils*, 2017, 49 (4): 745—752. [武岩, 红梅, 林立龙, 等. 不同施肥措施对河套灌区盐化潮土氨挥发及氧化亚氮排放的影响[J]. *土壤*, 2017, 49 (4): 745—752.]
- [13] Gao N, Shen W S, Camargo E, et al. Nitrous oxide (N₂O)-reducing denitrifier-inoculated organic fertilizer mitigates N₂O emissions from agricultural soils[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2017, 53 (8): 885—898.
- [14] Gao N, Shen W, Kakuta H, et al. Inoculation with nitrous oxide (N₂O)-reducing denitrifier strains simultaneously mitigates N₂O emission from pasture soil and promotes growth of pasture plants[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 97: 83—91.
- [15] Itakura M, Uchida Y, Akiyama H, et al. Mitigation of nitrous oxide emissions from soils by *Bradyrhizobium japonicum* inoculation[J]. *Nature Climate Change*, 2013, 3 (3): 208—212.
- [16] Nishizawa T, Quan A H, Kai A, et al. Inoculation with N₂-generating denitrifier strains mitigates N₂O emission from agricultural soil fertilized with poultry manure[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2014, 50(6): 1001—1007.
- [17] Regan K, Stempfhuber B, Schloter M, et al. Spatial and temporal dynamics of nitrogen fixing, nitrifying and denitrifying microbes in an unfertilized grassland soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 109: 214—226.
- [18] Butterbach-Bahl K, Baggs E M, Dannenmann M, et al. Nitrous oxide emissions from soils: how well do we understand the processes and their controls?[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 2013, 368 (1621): 20130122.
- [19] Hu H W, Chen D L, He J Z. Microbial regulation of terrestrial nitrous oxide formation: Understanding the biological pathways for prediction of emission rates[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2015, 39(5): 729—749.
- [20] Paustian K, Lehmann J, Ogle S, et al. Climate-smart soils[J]. *Nature*, 2016, 532 (7597): 49—57.
- [21] Stein L Y. Insights into the physiology of ammonia-oxidizing microorganisms[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2019, 49: 9—15.
- [22] Stein L Y. The long-term relationship between microbial metabolism and greenhouse gases[J]. *Trends in Microbiology*, 2020, 28 (6): 500—511.
- [23] Caranto J D, Vilbert A C, Lancaster K M. *Nitrosomonas europaea* cytochrome P460 is a direct link between nitrification and nitrous oxide emission[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113 (51): 14704—14709.
- [24] Kozłowski J A, Stieglmeier M, Schleper C, et al. Pathways and key intermediates required for obligate aerobic ammonia-dependent chemolithotrophy in bacteria and Thaumarchaeota[J]. *The ISME Journal*, 2016, 10(8): 1836—1845.
- [25] Stieglmeier M, Mooshammer M, Kitzler B, et al. Aerobic nitrous oxide production through N-nitrosating hybrid formation in ammonia-oxidizing archaea[J]. *The ISME Journal*, 2014, 8 (5): 1135—1146.
- [26] Jung M Y, Gwak J H, Rohe L, et al. Indications for enzymatic denitrification to N₂O at low pH in an ammonia-oxidizing archaeon[J]. *The ISME Journal*, 2019, 13 (10): 2633—2638.

- [27] Han P, Wu D, Sun D, et al. N₂O and NO_y production by the comammox bacterium *Nitrospira inopinata* in comparison with canonical ammonia oxidizers[J]. *Water Research*, 2021, 190: 116728.
- [28] Zumft W G. Cell biology and molecular basis of denitrification[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1997, 61 (4): 533—616.
- [29] Philippot L, Andert J, Jones C M, et al. Importance of denitrifiers lacking the genes encoding the nitrous oxide reductase for N₂O emissions from soil[J]. *Global Change Biology*, 2011, 17 (3): 1497—1504.
- [30] Jones C M, Spor A, Brennan F P, et al. Recently identified microbial guild mediates soil N₂O sink capacity[J]. *Nature Climate Change*, 2014, 4 (9): 801—805.
- [31] Coby A J, Picardal F W. Inhibition of NO₃⁻ and NO₂⁻ reduction by microbial Fe (III) reduction: Evidence of a reaction between NO₂⁻ and cell surface-bound Fe²⁺[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (9): 5267—5274.
- [32] Cavigelli M A, Robertson G P. Role of denitrifier diversity in rates of nitrous oxide consumption in a terrestrial ecosystem[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33 (3): 297—310.
- [33] Graf D R, Jones C M, Hallin S. Intergenomic comparisons highlight modularity of the denitrification pathway and underpin the importance of community structure for N₂O emissions[J]. *PLoS One*, 2014, 9 (12): e114118.
- [34] Hallin S, Philippot L, Löffler F E, et al. Genomics and ecology of novel N₂O-reducing microorganisms[J]. *Trends in Microbiology*, 2018, 26 (1): 43—55.
- [35] Jones C M, Graf D R H, Bru D, et al. The unaccounted yet abundant nitrous oxide-reducing microbial community: A potential nitrous oxide sink[J]. *The ISME Journal*, 2013, 7 (2): 417—426.
- [36] Shan J, Sanford R A, Chee-Sanford J, et al. Beyond denitrification: The role of microbial diversity in controlling nitrous oxide reduction and soil nitrous oxide emissions[J]. *Global Change Biology*, 2021, 27 (12): 2669—2683.
- [37] Juhanson J, Hallin S, Söderström M, et al. Spatial and phylogeographical analyses of *nosZ* genes underscore niche differentiation amongst terrestrial N₂O reducing communities[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 115: 82—91.
- [38] Graf D R H, Zhao M, Jones C M, et al. Soil type overrides plant effect on genetic and enzymatic N₂O production potential in arable soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 100: 125—128.
- [39] Ashida N, Ishii S, Hayano S, et al. Isolation of functional single cells from environments using a micromanipulator: Application to study denitrifying bacteria[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85 (4): 1211—1217.
- [40] Ishii S, Ohno H, Tsuboi M, et al. Identification and isolation of active N₂O reducers in rice paddy soil[J]. *The ISME Journal*, 2011, 5 (12): 1936—1945.
- [41] Tago K, Ishii S, Nishizawa T, et al. Phylogenetic and functional diversity of denitrifying bacteria isolated from various rice paddy and rice-soybean rotation fields[J]. *Microbes and Environments*, 2011, 26 (1): 30—35.
- [42] Gao N, Shen W, Nishizawa T, et al. Genome sequences of two *Azospirillum* sp. Strains, TSA2S and TSH100, plant growth-promoting rhizobacteria with N₂O mitigation abilities[J]. *Microbiology Resource Announcements*, 2019, 8 (32): e00459—00419.
- [43] Gao N, Zhou C, Shen W, et al. Genome sequence of *Novoherbaspirillum* sp. UKPF54, a plant growth-promoting rhizobacterial strain with N₂O-mitigating abilities, isolated from paddy soil[J]. *Microbiology Resource Announcements*, 2020, 9 (3): e00999—00919.
- [44] Sameshima-Saito R, Chiba K, Minamisawa K. Correlation of denitrifying capability with the existence of *nap*, *nir*, *nor* and *nos* genes in diverse strains of soybean bradyrhizobia[J]. *Microbes and Environments*, 2006, 21 (3): 174—184.
- [45] Liu C M, Sheng R, Liu Y, et al. Capability of N₂O reduction of a facultative N₂O reducer[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58 (8): 1431—1438. [刘春梅, 盛荣, 刘毅, 等. 一株兼性氧化亚氮还原菌的还原 N₂O 能力[J]. *微生物学报*, 2018, 58 (8): 1431—1438.]
- [46] Domeignoz-Horta L A, Putz M, Spor A, et al. Non-denitrifying nitrous oxide-reducing bacteria - An effective N₂O sink in soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 103: 376—379.
- [47] Bakken L R, Frostegård Å. Emerging options for mitigating N₂O emissions from food production by manipulating the soil microbiota[J]. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 2020, 47: 89—94.
- [48] Wu S, Zhuang G, Bai Z, et al. Mitigation of nitrous oxide emissions from acidic soils by *Bacillus amyloliquefaciens*, a plant growth-promoting bacterium[J]. *Global Change Biology*, 2018, 24 (6): 2352—2365.
- [49] Xu S, Feng S, Sun H, et al. Linking N₂O emissions from biofertilizer-amended soil of tea plantations to the abundance and structure of N₂O-reducing microbial communities[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52 (19): 11338—11345.
- [50] Calvo P, Watts D B, Kloepper J W, et al. The influence

- of microbial-based inoculants on N_2O emissions from soil planted with corn (*Zea mays* L.) under greenhouse conditions with different nitrogen fertilizer regimens[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2016, 62 (12): 1041—1056.
- [51] Xu S, Fu X, Ma S, et al. Mitigating nitrous oxide emissions from tea field soil using bioaugmentation with a *Trichoderma viride* biofertilizer[J]. The Scientific World Journal, 2014, 2014: 793752.
- [52] Akiyama H, Hoshino Y T, Itakura M, et al. Mitigation of soil N_2O emission by inoculation with a mixed culture of indigenous *Bradyrhizobium diazoefficiens*[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 32869.
- [53] Grave R A, Nicoloso R d S, Cassol P C, et al. Determining the effects of tillage and nitrogen sources on soil N_2O emission[J]. Soil and Tillage Research, 2018, 175: 1—12.
- [54] Vázquez E, Teutschero N, Pastorelli R, et al. Liming reduces N_2O emissions from Mediterranean soil after-rewetting and affects the size, structure and transcription of microbial communities[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2020, 147: 107839.
- [55] Harter J, Krause H M, Schuettler S, et al. Linking N_2O emissions from biochar-amended soil to the structure and function of the N-cycling microbial community[J]. The ISME Journal, 2014, 8 (3): 660—674.
- [56] Calvo P, Watts D B, Ames R N, et al. Microbial-based inoculants impact nitrous oxide emissions from an incubated soil medium containing urea fertilizers[J]. Journal of Environmental Quality, 2013, 42 (3): 704—712.
- [57] Chaabouni I, Guesmi A, Cherif A. Secondary metabolites of *Bacillus*: Potentials in biotechnology // Sansinenea E. *Bacillus thuringiensis* biotechnology[M]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012: 347—366.
- [58] Alfano G, Ivey M L, Cakir C, et al. Systemic modulation of gene expression in tomato by *Trichoderma hamatum* 382[J]. Phytopathology, 2007, 97 (4): 429—437.
- [59] Felgate H, Giannopoulos G, Sullivan M J, et al. The impact of copper, nitrate and carbon status on the emission of nitrous oxide by two species of bacteria with biochemically distinct denitrification pathways[J]. Environmental Microbiology, 2012, 14(7): 1788—1800.
- [60] Sui W K, Li J, Wu X G, et al. Microbial mechanism of sulfide inhibiting N_2O reduction during denitrification in fluvo-aquic soil[J]. Microbiology China, 2020, 47 (10): 3114—3125. [隋维康, 李冀, 吴晓刚, 等. 硫化物抑制潮土反硝化过程中氧化亚氮还原的菌群机制[J]. 微生物学通报, 2020, 47 (10): 3114—3125.]
- [61] Cleemput O V. Subsoils: chemo-and biological denitrification, N_2O and N_2 emissions[J]. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 1998, 52: 187—194.
- [62] Senbayram M, Chen R, Budai A, et al. N_2O emission and the $N_2O/(N_2O+N_2)$ product ratio of denitrification as controlled by available carbon substrates and nitrate concentrations[J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2012, 147: 4—12.
- [63] Highton M P, Bakken L R, Dörsch P, et al. Soil N_2O emission potential falls along a denitrification phenotype gradient linked to differences in microbiome, rainfall and carbon availability[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2020, 150: 108004.
- [64] Pan Y, 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.
- [65] Xu Z, Dai X, Chai X. Effect of different carbon sources on denitrification performance, microbial community structure and denitrification genes[J]. The Science of the Total Environment, 2018, 634: 195—204.
- [66] Chapuis-Lardy L, Wrage N, Metay A, et al. Soils, a sink for N_2O ? A review[J]. Global Change Biology, 2007, 13 (1): 1—17.
- [67] Morley N, Bagges E M, Dörsch P, et al. Production of NO , N_2O and N_2 by extracted soil bacteria, regulation by NO_2^- and O_2 concentrations[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2008, 65 (1): 102—112.
- [68] Hu H W, Macdonald C A, Trivedi P, et al. Water addition regulates the metabolic activity of ammonia oxidizers responding to environmental perturbations in dry subhumid ecosystems[J]. Environmental Microbiology, 2015, 17 (2): 444—461.
- [69] Bakken L R, Bergaust L, Liu B, et al. Regulation of denitrification at the cellular level: a clue to the understanding of N_2O emissions from soils[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 2012, 367 (1593): 1226—1234.
- [70] Pomowski A, Zumft W G, Kroneck P M, et al. N_2O binding at a[4Cu: 2S]copper-sulphur cluster in nitrous oxide reductase[J]. Nature, 2011, 477(7363): 234—237.
- [71] Sullivan M J, Gates A J, Appia-Ayme C, et al. Copper control of bacterial nitrous oxide emission and its impact on vitamin B₁₂-dependent metabolism[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110 (49): 19926—19931.
- [72] Shen W S, Xue H W, Gao N, et al. Effects of copper on nitrous oxide (N_2O) reduction in denitrifiers and N_2O emissions from agricultural soils[J]. Biology and Fertility of Soils, 2020, 56 (1): 39—51.
- [73] Sheth R U, Cabral V, Chen S P, et al. Manipulating bacterial

- communities by *in situ* microbiome engineering[J]. Trends in Genetics, 2016, 32 (4): 189—200.
- [74] Bogino P, Banchio E, Bonfiglio C, et al. Competitiveness of a *Bradyrhizobium* sp. strain in soils containing indigenous rhizobia[J]. Current Microbiology, 2008, 56 (1): 66—72.
- [75] Schumpp O, Deakin W J. How inefficient rhizobia prolong their existence within nodules[J]. Trends in Plant Science, 2010, 15 (4): 189—195.
- [76] Thomson A J, Giannopoulos G, Pretty J, et al. Biological sources and sinks of nitrous oxide and strategies to mitigate emissions[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 2012, 367 (1593): 1157—1168.
- [77] van Opijnen T, Camilli A. Transposon insertion sequencing: A new tool for systems-level analysis of microorganisms[J]. Nature Reviews Microbiology, 2013, 11 (7): 435—442.
- [78] Yaung S J, Deng L, Li N, et al. Improving microbial fitness in the mammalian gut by *in vivo* temporal functional metagenomics[J]. Molecular Systems Biology, 2015, 11 (3): 788.
- [79] Boon N, De Gelder L, Lievens H, et al. Bioaugmenting bioreactors for the continuous removal of 3-chloroaniline by a slow release approach[J]. Environmental Science & Technology, 2002, 36 (21): 4698—4704.

(责任编辑: 陈荣府)