

DOI: 10.11766/trxb202109270525

李承霖, 魏志军, 吴敏, 单军, 颜晓元. Robot 系统测定旱地 N₂ 排放的方法优化及其与其他方法的对比研究[J]. 土壤学报, 2023, 60(3): 694–704.

LI Chenglin, WEI Zhijun, WU Min, SHAN Jun, YAN Xiaoyuan. Optimization of Robot System on Determining Upland Soil N₂ Emission as Compared to Other Methods[J]. Acta Pedologica Sinica, 2023, 60(3): 694–704.

Robot 系统测定旱地 N₂ 排放的方法优化及其与其他方法的对比研究*

李承霖^{1, 2, 3}, 魏志军^{1, 2, 3}, 吴敏^{1, 2, 3}, 单军^{1, 3†}, 颜晓元^{1, 3}

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

摘要: 反硝化是生态系统氮循环的最后一环同时也是活性氮转化为惰性氮(N₂)的最主要过程。由于空气中背景 N₂ 浓度高达 78%, 在如此高的背景浓度 N₂ 环境中直接和准确测定反硝化过程产生的微量 N₂, 一直是个巨大的挑战。Robot 系统(Robotized incubation and analyzing system)是基于无 N₂ 背景(氮环境)的用以研究纯菌或土壤体系 N₂ 排放速率的方法, 该系统平台搭建简单且测定效率高, 目前应用比较广泛。但该系统在运行过程中需要频繁利用微量注射器进行取样和测定, 极易造成外界 N₂ 的渗漏。为解决这一问题, 通过使用预先置于氮环境的橡胶隔垫、采用充氮后的蒸馏水配制溶液及实施破坏性取样的处理, 对 Robot 系统测定旱地 N₂ 排放速率的方法进行优化, 同时与乙炔抑制法和 RoFlow 系统(Robotized continuous flow incubation system)的测定结果进行对比。研究表明, 通过方法优化, 可以大幅降低 Robot 系统的 N₂ 渗漏率, 方法优化后系统的渗漏率在 0~0.78 μL·L⁻¹·h⁻¹ 之间。优化后的 Robot 系统对碳源和氮源添加后 N₂ 排放速率差异的响应较好, 并且对旱地土壤 N₂ 排放速率的测定误差最小(0.003~0.045 mg·kg⁻¹·d⁻¹), 显著优于乙炔抑制法(0.34~3.29 mg·kg⁻¹·d⁻¹)和 RoFlow 系统(0.41~1.02 mg·kg⁻¹·d⁻¹)。综上, 优化后的 Robot 系统在测定旱地 N₂ 排放速率时具有 N₂ 渗漏率低, 对外源底物添加响应好及测定结果精确度高的特点, 未来在研究旱地土壤背景 N₂ 排放及相关机理方面有较好的应用前景。

关键词: N₂ 排放; 乙炔抑制法; Robot 系统(Robotized incubation and analyzing system); RoFlow 系统(Robotized continuous flow incubation system)

中图分类号: S153.6; S511 文献标志码: A

Optimization of Robot System on Determining Upland Soil N₂ Emission as Compared to Other Methods

LI Chenglin^{1, 2, 3}, WEI Zhijun^{1, 2, 3}, WU Min^{1, 2, 3}, SHAN Jun^{1, 3†}, YAN Xiaoyuan^{1, 3}

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

* 国家自然科学基金项目(U20A20113, 42177303)和中国科学院科研仪器设备研制项目(YJKYYQ20170058)共同资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. U20A20113, 42177303) and the Scientific Instrument and Equipment Development Project of CAS (No. YJKYYQ20170058)

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

作者简介: 李承霖(1994—), 男, 辽宁葫芦岛人, 博士研究生, 主要从事农田氮素循环过程及其环境效应的研究。E-mail: clli@issas.ac.cn

收稿日期: 2021-09-27; 收到修改稿日期: 2022-03-03; 网络首发日期(www.cnki.net): 2022-05-09

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

Abstract: 【Objective】 The massive application of nitrogen fertilizer to agricultural soils plays an important role in ensuring the world's food supply. However, it also leads to a large amount of reactive nitrogen (N) entering the environment, which strongly interferes with the biogeochemical cycle of N and causes a series of ecological and environmental problems. As the last step of N cycling, denitrification is the predominant pathway, converting reactive N into inert N (i.e., N₂). However, measuring soil N₂ production from denitrification is a major challenge in terrestrial ecosystems because of the high atmospheric background N₂ concentration. Recently, direct methods for measuring N₂ emission rates have been developed. Among them, robotized incubation and analyzing system (Robot system) which is based on N₂ free headspace (i.e., helium environment) have been widely used for measuring N₂ emission in pure denitrifying culture or soil, due to its advantage on platform construction and high throughput for N₂ determination. Nevertheless, frequent sampling with the small-diameter steel needle is required during the operation and determination of the Robot system, which inevitably causes leakage of N₂. This seriously interferes with the determination of low N₂ emission rates (i.e., background N₂ flux in upland soil). Therefore, to enable the Robot system to measure background N₂ emission rate in upland soil without exogenous substrate, the leakage rate of the system must be further reduced. 【Method】 In this study, helium-washed rubber septa, solutions prepared by helium-washed distilled water and destructive sampling treatments were explored to optimize the Robot system aiming at reducing the N₂ leakage therein. Additionally, results of soil N₂ emission determined by the optimized Robot system were compared with those of acetylene inhibition technique (AIT) and Robotized continuous flow incubation system (RoFlow system). 【Result】 Our results showed that the N₂ leakage rate of the Robot system could be remarkably reduced by optimizing with helium-washed septa, solutions prepared by helium-washed distilled water and destructive sampling treatments. The N₂ leakage rate was reduced to 0–0.78 μL·L⁻¹·h⁻¹ by the aforementioned treatments. Under similar treatments, the N₂ emission rate measured by the acetylene inhibition method was highest, followed by the RoFlow system, and the Robot system had the lowest results. Furthermore, the optimized Robot system was capable of determining upland soil N₂ emissions in response to carbon and N addition, which also had the smallest standard error (0.003–0.045 mg·kg⁻¹·d⁻¹) compared with the AIT method (0.34–3.29 mg·kg⁻¹·d⁻¹) and RoFlow system (0.41–1.02 mg·kg⁻¹·d⁻¹). 【Conclusion】 Overall, the optimized Robot system is characterized by low N₂ leakage, effective response to substrate addition and good consistency in determining soil N₂ emission. In the future, it will have a favorable application in investigating background N₂ emissions and the associated mechanism of upland soil.

Key words: N₂ emission rate; Acetylene inhibition method (AIT); Robotized incubation and analyzing system (Robot); Robotized continuous flow incubation system (RoFlow)

农业氮肥的大量施用导致大量活性氮进入环境^[1], 引发一系列生态环境问题^[2]。在自然界氮循环过程中, 反硝化过程是使活性氮以惰性氮(N₂)的形式离开土壤和水体返回大气的最主要途径^[3], 土壤和水体中的活性氮也只有转化为 N₂ 后对生态环境的不利影响才能够被消除。此外, 反硝化过程的中间产物 N₂O 是一种强温室气体^[4-5], 对全球气候变化有重要影响。有研究表明农田生态系统的 N₂O 排放量贡献了全球排放量的 50%以上^[6], 因此, 在农田生态系统中开展有关反硝化过程的相关研究具有非常重要的意义。

空气中极高的背景 N₂ 浓度(78%)导致反硝化过程终产物 N₂ 的直接测定一直是个世界性难题^[7]。虽然目前有关反硝化的研究已取得较大的进展, 如可通过膜进样质谱仪结合 N₂/Ar 法对河流湖泊沉积物以及水田反硝化产生的 N₂ 进行直接定量^[8-10]。但迄今仍没有一种令人满意的方法来实现对旱地 N₂ 排放速率的量化^[11], 这是因为淹水体系上覆水的存在能一定程度阻滞气体交换, 水体溶解性 N₂ 浓度受大气背景 N₂ 影响有限^[12-13], 而在旱地则很难克服大气背景 N₂ 的影响。因此, 目前对于旱地 N₂ 排放速率的测定多采用间接方法也即乙炔抑制法^[14-15]。尽

管存在一定的缺陷,但受限于旱地 N_2 直接测定的困难,该方法在旱地 N_2 排放速率的研究中仍被广泛应用^[16-20]。

近年来,有学者在前人旱地 N_2 直接测定系统之上进行改进,研制了更适用于旱地 N_2 排放速率测定的氦(He)环境-密闭培养及 He 环境-气体同步测定系统^[21-22]。目前最为常用的 He 环境-密闭培养系统是 Robot 系统^[22],该系统是通过人为营造一个密闭的环境并使用 He 或一定比例的 He/O₂ 混合气,对该密闭环境的顶空进行置换,使密闭环境内的气体全都被 He (He/O₂ 混合气)所取代,随后以一定的时间间隔采集密闭环境中的顶空气体进行测定。由于所营造的密闭环境内 N_2 浓度极低,因此可通过测定顶空气体中 N_2 浓度的变化来直接定量土壤 N_2 的排放速率。除 Robot 系统外, RoFlow 系统也是近年来旱地 N_2 排放速率直接测定应用较多的方法^[23],尽管系统构造不同,但原理上均属于 He 环境-密闭培养系统。其中, Robot 系统主要针对纯菌培养或泥浆样品,测定结果可反映体系内 N_2 的累积排放量,测定周期一般小于 5 d^[24];而 RoFlow 系统主要针对近似原状土柱样品,测定结果可反映土壤 N_2 排放速率的动态变化,测定周期一般 20 d 左右,测定效率较低^[25]。由于 Robot 系统平台搭建简单且测定效率高,因此其相比于 RoFlow 系统使用更为广泛。但是该系统最初研制时主要针对纯菌培养体系,目的是测定反硝化细菌在培养基中的 N_2 排放速率,在这种条件下 N_2 排放速率一般较高,即使体系出现微量的 N_2 渗漏也不会显著影响测定结果,因此以往研究对 Robot 系统测定过程中控制气体渗漏的限制条件关注较少,使用 Robot 系统对土壤 N_2 排放速率进行研究时也多采用土壤提取液^[26]、泥浆或添加外源底物的土壤体系^[27]。而 Robot 系统在运行过程中需要频繁利用微量注射器进行取样和测定,极易造成外界 N_2 的渗漏,进而严重干扰其对低 N_2 排放速率的测定。所以如要将 Robot 系统用于低 N_2 排放速率研究如旱地土壤背景 N_2 排放速率测定时,必须进一步降低系统的渗漏率。

针对上述问题,本研究通过使用预先置于 He 环境的橡胶隔垫、采用充 He 后的蒸馏水配制相关溶液并结合实施破坏性取样技术对 Robot 系统测定旱地 N_2 排放速率的方法进行优化,利用优化后的 Robot 系统测定旱地土壤背景 N_2 排放速率及添加碳

源和氮源后的 N_2 排放速率,并与乙炔抑制法和 RoFlow 系统测定结果进行对比,以期验证方法优化后的 Robot 系统在测定旱地土壤背景 N_2 排放速率上的优势。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试土壤采自中国科学院常熟生态实验站附近试验地(31°33'16" N, 120°43'17" E),试验地土壤为由湖泊沉积物发育而成的水耕人为土。该区域属于亚热带季风气候,年平均降水量 990 mm,约 60%~70%降水发生在 6 至 9 月间,年平均气温 16.1 °C^[28]。采集表层土壤(0~20 cm)风干,用于后续培养实验及土壤基本理化性质测定。供试土壤 pH 为 5.82,全碳含量 14.20 g·kg⁻¹,全氮含量 1.35 g·kg⁻¹,溶解性有机碳含量 70.50 mg·kg⁻¹,NO₃⁻-N 含量 57.83 mg·kg⁻¹,NH₄⁺-N 含量 3.41 mg·kg⁻¹。

1.2 试验设计

培养实验采用同一份风干土样,共设置 5 个不同碳氮底物浓度的添加处理,分别为:(1)仅添加蒸馏水的对照;(2)添加 60 mg·kg⁻¹(以 N 计,下同)硝酸钾(KNO₃)溶液;(3)添加 150 mg·kg⁻¹ KNO₃ 溶液;(4)添加 60 mg·kg⁻¹(以 C 计,下同)葡萄糖(C₆H₁₂O₆)溶液;(5)添加 60 mg·kg⁻¹ C₆H₁₂O₆ 和 60 mg·kg⁻¹ KNO₃ 混合溶液。每个处理设置 3 个重复,在室温(25 °C)和无氧条件下,分别采用三种不同方法/系统(Robot 系统、乙炔抑制法和 RoFlow 系统)测定土壤 N_2 排放速率。

1.3 Robot 系统 N_2 排放速率的测定

Robot 系统主要包括三个组成模块:气体监测模块、自动进样模块和恒温水浴模块^[22]。气体监测模块为气相色谱仪(7890B, Agilent, USA),配有热导检测器和电子捕获检测器分别分析 N_2 和 N_2O 的浓度^[17]。自动进样模块由自动进样器(PAL 3, CTC Analytics AG, Switzerland)与蠕动泵(Minipuls 3, Gilson, USA)两部分组成。恒温水浴模块为恒温水浴箱(0~40 °C)。该系统使用 He/O₂ 混合气置换血清瓶内的顶空气体,然后在一定的时间间隔内直接测定瓶内顶空 N_2 的浓度变化来确定其排放量。实验步骤如下:向 120 mL 血清瓶中加入 30 g 风干

土(质量含水量 8%)和 3 mL 蒸馏水预培养 24 h, 预培养结束后添加 5 种不同浓度的碳氮底物溶液(5 mL), 底物添加后土壤质量含水量增至 38%, 随后使用橡胶隔垫及铝盖密封。加入底物溶液后, 首先对瓶内顶空气体进行置换: 先抽真空 300 s, 然后用 He(纯度 99.999%, 下同)充满, 重复操作 6 次, 最后使用 10 mL 无活塞注射器(含有 2 mL 蒸馏水, 水层密封隔绝大气交换)插入瓶内平衡压力。随后对瓶内 N₂ 和 N₂O 浓度进行在线监测(在 0、16、22 h 进行采样测定), 根据瓶内 N₂ 和 N₂O 浓度随时间变化的线性关系计算 N₂ 和 N₂O 的排放速率(均以 N 计)^[26]。

1.4 Robot 系统测定 N₂ 排放速率方法的优化

前期预实验表明, 空气与橡胶隔垫之间的气体渗漏、吸附在橡胶隔垫中气体的扩散、溶解在底物溶液中的气体扩散和吸附在土壤颗粒上的气体扩散作用均会向血清瓶中带入 N₂(将这几个过程统称为气体渗漏), 并对实验过程中 N₂ 测定产生影响。因此需要对以上可能的气体渗漏环节进行优化以提高实验的精度。

针对空气与橡胶隔垫之间的气体渗漏采用如下方式控制: (1) 由于隔垫是阻拦空气向血清瓶中扩散的唯一介质, 而多次对其穿刺取样将产生较大的创口使渗漏量不断增加, 采用破坏性取样的方式进行取样即将每组处理设置更多的平行, 所有血清瓶只取样测定一次, 可降低该环节导致的气体泄漏。(2) 在样品培养期间, 由于空气与橡胶隔垫的扩散主要是由外界空气引起, 因此在培养期间将血清瓶放入厌氧箱中(厌氧箱使用 He 作为气源, 在箱体内部营造低 N₂ 环境)降低外界 N₂ 的扩散作用, 并在橡胶隔垫外涂上一层硅橡胶可进一步阻隔外界空气的渗漏。

针对吸附在橡胶隔垫中气体的扩散采用如下方式控制: 考虑到气体是吸附在橡胶隔垫中因此采用 He 置换的方式处理橡胶隔垫, 使橡胶隔垫预先置于 He 环境, 将吸附在橡胶隔垫中的气体置换出来。具体步骤为: 向体积为 120 mL 的柱形瓶(svg100, Nichiden-rika, Japan)中放入 20 个橡胶隔垫并密封, 接着对柱形瓶进行 He 置换(先抽真空处理 300 s 后用 He 充满, 反复进行该过程 6 次), 放置 24 h 后再进行一次 He 置换后备用。在对空气与橡胶隔垫之

间的气体渗漏采取控制措施后, 为验证这两种措施的组合处理效果, 设计如下试验: 向空血清瓶上安放预先置于 He 环境的橡胶隔垫以及未预先置于 He 环境的橡胶隔垫, 随后对这两种处理的空血清瓶进行 He 置换, 并采用破坏性取样方式分别在试验开始的 36、48、60 h 对血清瓶内顶空 N₂ 进行测定。通过比较上述两种处理之间的差异, 确定破坏性取样和使用预先置于 He 环境橡胶隔垫处理的组合效果。预实验结果表明, 使用未预先置于 He 环境的橡胶隔垫, 血清瓶中顶空 N₂ 会在 36 h 后趋于稳定, 因此将实验测定的初始时间设定为 36 h。

在对空气与橡胶隔垫之间的气体渗漏及吸附在橡胶隔垫中气体的扩散采取控制措施后, 针对溶解在蒸馏水与底物溶液中的气体扩散, 采用如下方式控制: 对实验用的蒸馏水进行充 He 处理 3 h, 并利用充 He 后的蒸馏水配制相关溶液, 设计如下两种实验处理以验证溶解性气体扩散的平衡时间: 分别向血清瓶中放入 8 mL 充 He 后的蒸馏水(充 He 水)和 8 mL 未充 He 的蒸馏水(非充 He 水), 随后在 36、48、60 h 使用 Robot 系统对两种处理的瓶内顶空气体进行监测。而针对吸附在土壤颗粒上的气体扩散, 由于实验中会向土壤中加入蒸馏水或底物溶液进行培养, 因此对于该扩散作用仅考虑血清瓶中土壤加入蒸馏水或底物溶液后的 N₂ 扩散平衡时间, 使用该平衡时间作为正式实验的测定起始点, 用以消除溶解在底物溶液中和吸附在土壤颗粒上的气体扩散作用。设计如下两种处理: 血清瓶中加入 30 g 风干后的灭菌土(高压蒸汽灭菌, 121℃, 2.50 h)并加入 8 mL 充 He 水和血清瓶中加入 30 g 风干后的灭菌土并加入 8 mL 非充 He 水处理, 分别在 36、48、60 h 使用 Robot 系统对血清瓶的顶空气体进行监测, 以确定吸附与溶解性 N₂ 的平衡时间。

1.5 乙炔抑制法测定 N₂ 排放速率

乙炔抑制法测定 N₂ 排放速率的具体操作如下^[15,29]: 在 120 mL 的血清瓶中加入 30 g 风干土(质量含水量 8%)和 3 mL 蒸馏水预培养 24 h, 添加 5 种不同浓度的碳氮底物溶液(5 mL)并补充蒸馏水使水土比达 1:1, 然后将血清瓶密封并使用 He 置换瓶内顶空气体使其达到厌氧条件。将样品分为两组, 一组用注射器从瓶中取出一定体积的顶空气体并向其中注入等体积的高纯乙炔, 使顶空的乙炔浓

度达到 10% (体积百分比), 另一组不加乙炔气体作为对照。所有血清瓶置于摇床震荡 (25°C, 220 r·min⁻¹), 在 1、2、4、6 h 采集瓶中顶空气体使用配有电子捕获检测器的气相色谱 (7890A, Agilent, USA) 测定 N₂O 浓度。根据瓶内 N₂O 浓度随时间变化的线性关系计算 N₂O 排放速率。

实验中 N₂O 的排放速率由不加乙炔的处理确定, 而 N₂ 的排放速率由加乙炔与不加乙炔处理之间排放速率的差值计算而来:

$$F_{N_2} = F_{\text{乙炔}N_2O} - F_{\text{无乙炔}N_2O} \quad (1)$$

式中, F_{N_2} 为 N₂ 排放速率 (mg·kg⁻¹·d⁻¹) (以 N 计); $F_{\text{乙炔}N_2O}$ 和 $F_{\text{无乙炔}N_2O}$ 分别为添加和不添加乙炔处理中 N₂O 的排放速率 (mg·kg⁻¹·d⁻¹) (以 N 计)。

1.6 RoFlow 系统测定 N₂ 排放速率

本研究所用的 RoFlow 系统主要由密封罐、中央控制器以及气相色谱仪 (7890B, Agilent, USA) 三部分组成^[23, 28]。该系统采用负压置换的气体置换方式将密封罐内的顶空气体置换为 He (或一定比例的 He/O₂ 混合气), 然后通入一定流速的 He (或一定比例的 He/O₂ 混合气) 吹扫罐内顶部空间, 随后以一定的时间间隔取样直接测定密封罐内顶部空间 N₂ 和 N₂O 实时浓度。具体流程如下: 向密封罐中加入 500 g 风干土 (质量含水量 8%) 和 50 mL 蒸馏水预培养 24 h, 补充加入 83 mL 的 5 种不同浓度的碳氮底物溶液 (每个处理 3 个重复), 底物添加后土壤含水量增加至 38% 质量含水量, 随后对体系内 N₂ 和 N₂O 浓度进行在线监测 (测定频率为 3.36 h 一次, 观测时间为 20.50 d)。计算 N₂ 和 N₂O 排放速率:

$$F = \frac{c \times f \times 60 \times 24 \times \rho}{m} \times 10^6 \quad (2)$$

式中, F 为 N₂ 和 N₂O 的排放通量 (mg·kg⁻¹·d⁻¹) (以 N 计); c 为测定的 N₂ 浓度 (μL·L⁻¹); f 为吹扫气体流速 (mL·min⁻¹); m 为培养罐内干土质量 (kg); 常数 60、24 为分转小时、小时转天的转换系数; ρ 为常温常压下 N₂ 和 N₂O 的密度 (g·L⁻¹) (以 N 计); 常数 10⁶ 为换算系数。

1.7 数据处理

采用 SPSS 18.0 对数据进行统计分析, 数据以平均值±标准差 ($n=3$) 表示。使用单因素方差分析

(ANOVA) 并基于 LSD 法进行数据均值显著性检验, 文中所有图件均采用 Origin 2021 绘制。

2 结果

2.1 Robot 系统反硝化潜势测定方法的优化

对比预先置于 He 环境橡胶隔垫与未预先置于 He 环境橡胶隔垫处理组 N₂ 排放的差异 (图 1), 可以看出使用预先置于 He 环境橡胶隔垫的血清瓶在 36 h 后 N₂ 含量基本不变, 始终维持在较低的浓度; 而使用未预先置于 He 环境橡胶隔垫的血清瓶在 36 h 后 N₂ 含量仍呈现出上升的趋势, N₂ 含量由 36 h 的 (44.47±4.58) μL·L⁻¹ 上升至 60 h 的 (56.95±2.30) μL·L⁻¹。此外通过对比整个培养周期内两种处理血清瓶中的 N₂ 含量可以看出, 使用预先置于 He 环境处理橡胶隔垫的血清瓶中 N₂ 含量最高为 (6.67±0.20) μL·L⁻¹, 显著低于使用未置于 He 环境橡胶隔垫的血清瓶中 N₂ 含量最低值 (44.47±4.58) μL·L⁻¹ ($P<0.05$)。

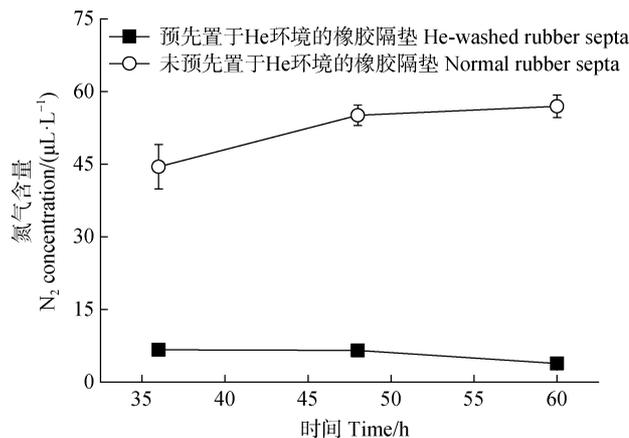


图 1 使用预先置于 He 环境或未预先置于 He 环境橡胶隔垫血清瓶中 N₂ 含量变化

Fig. 1 Concentration of N₂ in serum bottles using He-washed rubber septa or normal rubber septa

进一步对比装有充 He 水和非充 He 水血清瓶中的 N₂ 含量变化差异 (图 2)。在培养期间装有充 He 水的血清瓶中 N₂ 含量基本没有变化, 维持在 (35.37±4.10~39.1±6.30) μL·L⁻¹ 之间, 并且该数值低于装有非充 He 水的血清瓶中 N₂ 浓度 (最低浓度为 48 h 时的测定值 (47.68±13.61) μL·L⁻¹)。而装有非充 He 水的血清瓶中的 N₂ 含量在整个培养期间存

在较大的波动,即使在 47 h 后仍有上升的趋势, N₂ 含量从 47 h 时的 (47.68±13.61) μL·L⁻¹ 上升至 60 h 时的 (54.03±8.95) μL·L⁻¹。

监测装有 30 g 灭菌风干土并加入 8 mL 充 He 水或非充 He 水血清瓶中 N₂ 含量的变化,结果见图 3。培养期间两种处理下血清瓶中 N₂ 含量均基本保持不变,从 36 h 开始至结束,两组处理瓶内 N₂ 含量均无显著变化,表明无论是加入充 He 水还是加入非充 He 水的风干土均能在 36 h 后使吸附于土壤颗粒及溶解于水中的 N₂ 与血清瓶的顶空气体达到平衡。但是从 36 h 测定起始点可以看出,向灭菌风干土加入非充 He 水的处理 N₂ 含量为 (34.9±4.58) μL·L⁻¹,高于加入充 He 水处理中的 N₂ 含量 (26.27±5.75) μL·L⁻¹。

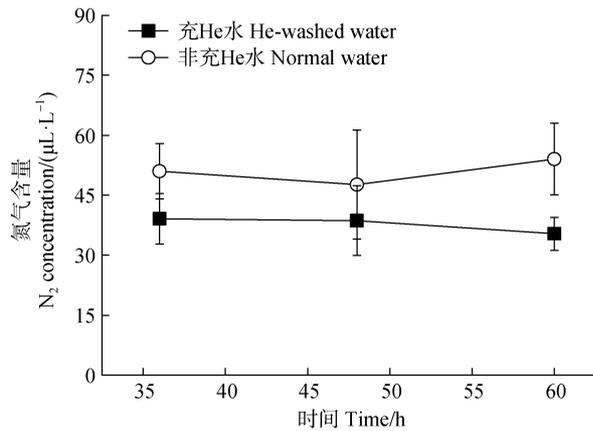


图 2 装有充 He 水或非充 He 水的水清瓶中 N₂ 含量变化
Fig. 2 Concentration of N₂ in serum bottles with He-washed water or normal water

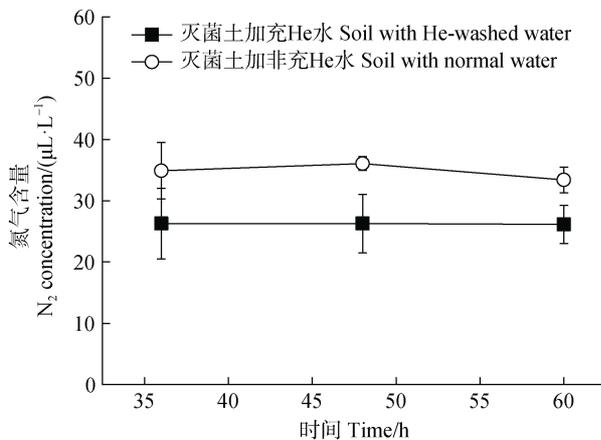


图 3 装有灭菌风干土并加入充 He 水或非充 He 水的水清瓶中 N₂ 含量变化

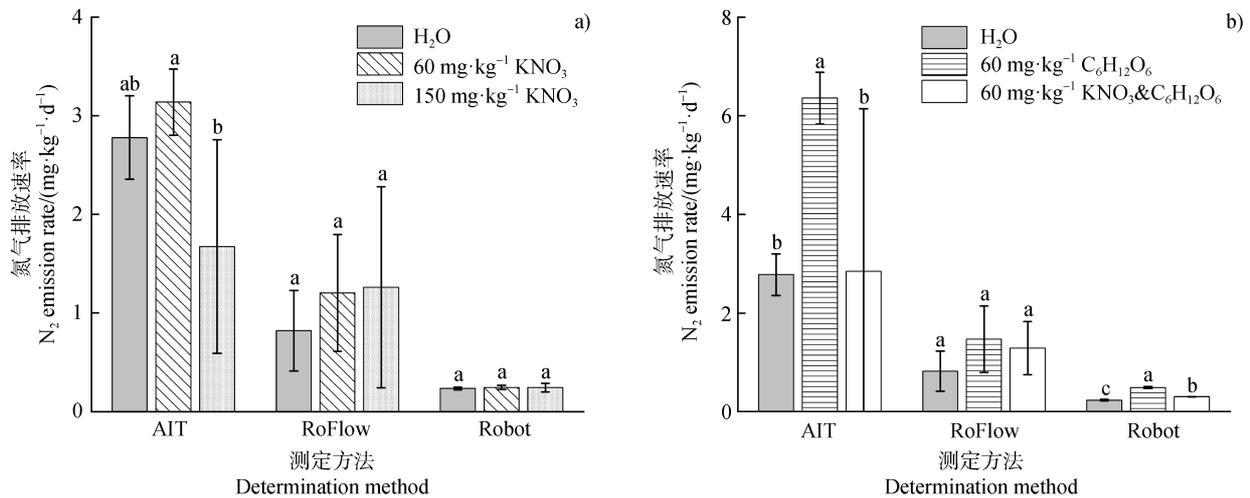
Fig. 3 Concentration of N₂ in serum bottles with soil and He-washed water or with soil and normal water

2.2 三种旱地土壤 N₂ 排放速率测定方法比较

整体而言,旱地土壤 N₂ 排放速率以乙炔抑制法测定的结果最高, RoFlow 系统次之,而 Robot 系统测定结果最低(图 4)。同一种处理使用不同方法测定的结果不尽一致。RoFlow 系统测定的 N₂ 排放速率随外源硝酸盐添加量增加而升高,添加 150 mg·kg⁻¹ KNO₃ 处理最高,为 (1.26±1.02) mg·kg⁻¹·d⁻¹。乙炔抑制法和 Robot 系统测定的 N₂ 排放速率在添加 60 mg·kg⁻¹ KNO₃ 处理最高,分别为 (3.14±0.34) 和 (0.25±0.02) mg·kg⁻¹·d⁻¹。添加 150 mg·kg⁻¹ KNO₃ 处理 N₂ 排放速率在乙炔抑制法测定结果中显著低于 60 mg·kg⁻¹ KNO₃ 处理 (P<0.05),而在 Robot 系统测定的结果中无显著差异(图 4a)。

而对于添加了 C₆H₁₂O₆ 的处理,无论使用何种测定方法测定, N₂ 排放速率均比仅添加蒸馏水的处理有所升高。相对于仅添加 60 mg·kg⁻¹ C₆H₁₂O₆ 的处理而言,同时加入 60 mg·kg⁻¹ C₆H₁₂O₆ 和 KNO₃ 的处理中 N₂ 排放速率低于前者(图 4b)。在所有的处理中,无论使用何种方法测定, N₂ 排放速率最高的均为仅添加 60 mg·kg⁻¹ C₆H₁₂O₆ 的处理,而不同测定方法中,使用乙炔抑制法测得的 N₂ 排放速率最高,为 (6.36±0.52) mg·kg⁻¹·d⁻¹(图 4b)。总体上就三种测定方法测定结果的误差而言, Robot 系统的测定误差最小,不同处理之间的误差范围在 0.003 ~ 0.045 mg·kg⁻¹·d⁻¹(图 4)。

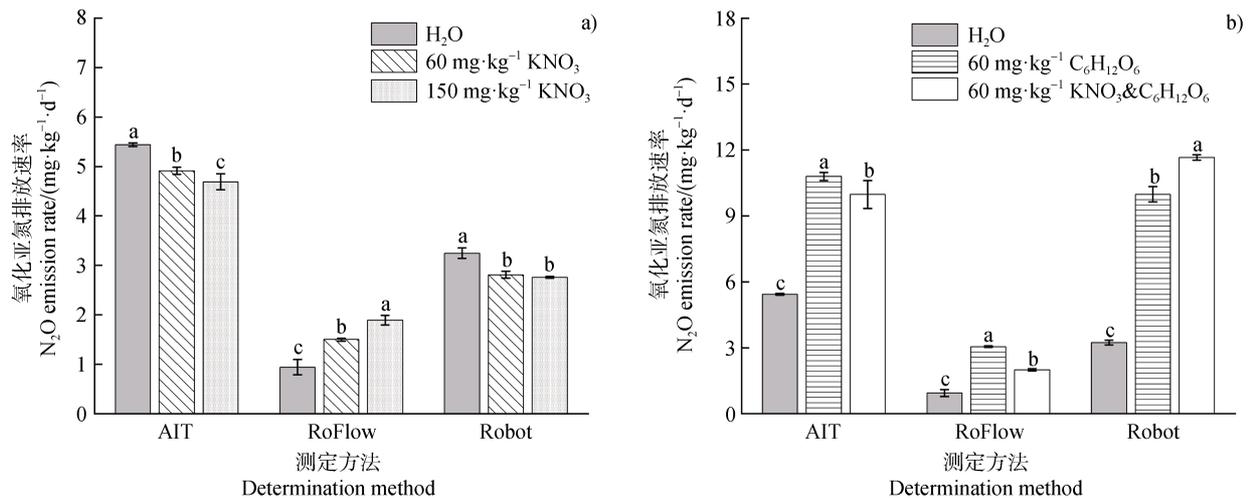
与 N₂ 排放速率类似,同一种处理使用不同测定方法测得的旱地土壤 N₂O 排放速率也并不一致(图 5)。相对于仅添加蒸馏水的处理来说,使用 RoFlow 系统测定的 N₂O 排放速率随着外源硝酸盐添加量增加而升高,在外源添加 150 mg·kg⁻¹ KNO₃ 处理中检出了最高的 N₂O 排放速率,为 (1.89±0.01) mg·kg⁻¹·d⁻¹(图 5a)。而使用乙炔抑制法和 Robot 系统测定的 N₂O 排放速率则随着外源硝酸盐添加量增加而降低,在仅添加蒸馏水的处理中检出了最高的 N₂O 排放速率,分别为 (5.44±0.04) 和 (3.25±0.11) mg·kg⁻¹·d⁻¹(图 5a)。而对于添加了 C₆H₁₂O₆ 的处理,无论使用何种测定方法测定, N₂O 排放速率均比仅添加蒸馏水的处理显著升高 (P<0.05)(图 5b)。使用乙炔抑制法和 RoFlow 系统测定的仅添加 60 mg·kg⁻¹ C₆H₁₂O₆ 处理的 N₂O 排放速率显著高于同时加入 60 mg·kg⁻¹ C₆H₁₂O₆ 和 KNO₃ 的处理 (P<0.05),排放速率分别为 (10.80±0.18) 和 (3.05±



注: AIT: 乙炔抑制法; RoFlow: RoFlow 测定系统; Robot: Robot 测定系统。不同小写字母代表同一测定方法下不同处理之间差异显著, $P < 0.05$ 。Note: In the legend, AIT, RoFlow, and Robot represent the Acetylene inhibition method, Robotized continuous flow incubation system, and Robotized incubation and analyzing system, respectively. Within the same method, different lowercase letters above the bars indicate significant differences ($P < 0.05$) among different treatments.

图 4 不同处理及测定方法下 N₂ 排放速率

Fig. 4 N₂ emission rates under different treatments as determined by three methods



注: AIT: 乙炔抑制法; RoFlow: RoFlow 测定系统; Robot: Robot 测定系统。不同小写字母代表同一测定方法下不同处理之间差异显著, $P < 0.05$ 。Note: In the legend, AIT, RoFlow, and Robot represent the Acetylene inhibition method, Robotized continuous flow incubation system, and Robotized incubation and analyzing system, respectively. Within the same method, different lowercase letters above the bars indicate significant differences ($P < 0.05$) among different treatments.

图 5 不同处理及测定方法下 N₂O 排放速率

Fig. 5 N₂O emission rates under different treatments as determined by three methods

0.03) mg·kg⁻¹·d⁻¹ (图 5b)。而使用 Robot 系统测定的 N₂O 排放速率, 在同时加入 60 mg·kg⁻¹ C₆H₁₂O₆ 和 KNO₃ 的处理中最高, 排放速率为 (11.66±0.12) mg·kg⁻¹·d⁻¹ (图 5b)。

对不同处理中三种测定方法的测定结果进行相关性分析(图 6), 发现乙炔抑制法测定结果与 Robot 系统测定结果存在显著的正相关关系 ($P < 0.05$), 而乙炔抑制法测定结果与 RoFlow 系统测定结果之间

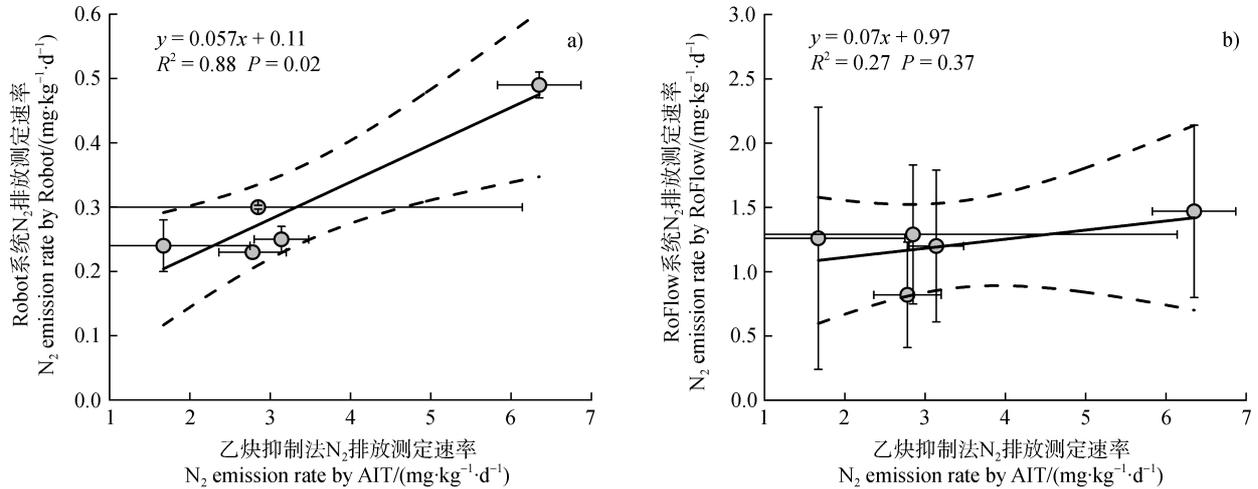


图 6 三种 N₂ 排放速率测定方法测定结果的相关性分析

Fig. 6 Correlation analysis among the results from the three methods

不存在显著的相关关系 ($P > 0.05$)。此外 Robot 系统的测定结果与 RoFlow 系统的测定结果之间也不存在显著的正相关关系 ($P > 0.05$)。

3 讨论

3.1 Robot 系统测定 N₂ 排放速率方法的优化

在利用 Robot 系统测定血清瓶中 N₂ 排放速率时, Robot 系统的研发者 Molstad 等^[22]指出橡胶隔垫中所吸附的气体可能是血清瓶中 N₂ 渗漏的一个重要来源, 本研究结果印证了该推测。使用预先置于 He 环境橡胶隔垫, 血清瓶中初始顶空 N₂ 浓度显著降低 ($P < 0.05$) (图 1)。同时, 本研究结果也表明橡胶隔垫中所吸附 N₂ 的释放是一个缓慢的过程, 48 h 后使用未预先置于 He 环境橡胶隔垫的血清瓶中 N₂ 仍在升高, 而使用预先置于 He 环境橡胶隔垫的血清瓶, 从 36 h 测定开始, 瓶中的 N₂ 浓度就始终维持在一个较低水平。要实现血清瓶中 N₂ 的准确测定, 对橡胶隔垫进行抽真空 He 置换处理并将其预先置于 He 环境是有效且必要的。

此外, 由于室温下水中溶解有一定浓度的 N₂, 使得培养实验中在向血清瓶中加入蒸馏水以调节土壤含水量时, 会向培养体系中引入外界 N₂。特别是当对血清瓶进行 He 置换处理后, 由于瓶中顶空气体 N₂ 含量极低, 此时溶解于水中的 N₂ 就会逐步扩散出来。本研究发现, 装有充 He 水的血清瓶中顶空气体在整个培养期间内均保持在一个相对稳定的

N₂ 浓度, 可见血清瓶中加入经过充 He 的水后, 水中溶解的 N₂ 可以更快与瓶中顶空气体达到交换平衡且具有更好的平行性, 可有效降低水中溶解性 N₂ 的渗漏 (图 2)。需要指出的是, 本研究结果显示, 装有非充 He 水的血清瓶在整个培养周期内的 N₂ 扩散速率不稳定, 瓶内 N₂ 含量虽然在 36 h 至 48 h 内较为稳定, 但在 60 h 时又有明显上升 (图 2)。本实验采取的是破坏性取样, 每个时间点的血清瓶测定结果与上个时间点的血清瓶并不产生关联, 因此在 60 h 时装有非充 He 水血清瓶内 N₂ 浓度的上升应该是由溶解于水中的 N₂ 向顶空扩散速度的差异导致。

最后, 从装有灭菌风干土并加入充 He 水与非充 He 水的血清瓶中 N₂ 含量变化中可以发现, 无论使用充 He 水还是非充 He 水, 在经过 36 h 培养后瓶内 N₂ 含量均始终保持稳定 (图 3)。说明在血清瓶体系完成 He 置换后, 继续培养 36 h 可以实现对吸附于土壤颗粒和溶解于蒸馏水中的气体渗漏的良好控制。但是从瓶内 36 h 初始 N₂ 浓度来看, 使用灭菌风干土加入非充 He 水的瓶内初始 N₂ 浓度高于灭菌风干土加入充 He 水处理 (图 3), 说明加入非充 He 水的处理在气体平衡之前会释放出更多 N₂, 因此最优的处理应该是向血清瓶体系中加入充 He 水或经充 He 水配制的相关溶液。此外, 虽然装有灭菌风干土并加入充 He 水的血清瓶处理中在 36 h 后瓶中的 N₂ 浓度即可保持稳定, 但是考虑到不同土壤之间的差异 (如土壤质地、有机质含量及团聚体结构等), 为了尽可能在实验开始测定之前使整个血清

瓶体系内 N_2 浓度保持稳定, 在血清瓶体系完成 He 置换后, 继续培养 48 h 后再开始测定是一个相对合适的起始点。王睿^[21]的研究表明, 在连续吹扫的条件下去除密闭容器内土壤颗粒吸附的 N_2 需要 24 h 左右的置换时间, 较本实验设定的 48 h 的时长短, 由于本实验是在密闭无连续吹扫环境进行的培养, 因此体系所需的平衡时间可能有所延长。

综合以上对 Robot 系统可能存在 N_2 渗漏环节的优化, 通过向装有土样的血清瓶中加入充 He 水配置的底物溶液, 使用预先置于 He 环境的橡胶隔垫和在培养周期内采用破坏性取样的方式进行测定, 并在整个培养周期内将样品瓶置于以 He 作为气源的厌氧培养箱中, 可大幅降低 Robot 系统的 N_2 渗漏率。Qin 等^[18]的研究表明 Robot 系统的渗漏率为 $5.15 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, 而经多次实验验证, 使用本文优化后的方法进行培养测定, Robot 系统的渗漏率在 $0\sim 0.78 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 之间, 大幅降低了渗漏率。

3.2 三种旱地 N_2 排放速率测定方法的比较

在三种测定方法测得的所有处理 N_2 排放速率中, 乙炔抑制法的测定结果最高, 主要原因是乙炔抑制法在测定过程中将水土比设定为了 1:1 并在摇床中震荡培养, 该过程可以使反硝化微生物跟反应底物在整个培养体系内充分接触, 有利于反硝化微生物对反应底物的高效利用, 所以相对于 RoFlow 和 Robot 系统, 乙炔抑制法测定的 N_2 排放速率更高。对 RoFlow 系统而言, 由于测定周期更长 (20 d) 且体系内土柱能更好地反映野外情况下土壤的 N_2 动态排放过程, 也能够更好地捕获 N_2 排放的峰值, 因此相比于 Robot 系统, 其测定的 N_2 排放速率更高; 相对于 RoFlow 系统, Robot 系统测定周期短、体系内土壤质量小, 只能反映短时间内土壤反硝化过程产生 N_2 的累积排放量^[30], 在短时间的测定周期内可能并不能较好地捕获 N_2 的排放峰值, 因此测定的 N_2 排放速率结果低于 RoFlow 系统。对比三种测定方法的测定结果, 由于乙炔抑制法在测定时其条件更加有利于土壤反硝化的发生, 所以其测定结果理论上应该是三种方法测定 N_2 排放速率的上限 (即最高速率), 这与我们的结果一致, 表现为乙炔抑制法的测定结果高于 RoFlow 和 Robot 系统的测定结果, 这也从侧面证明了乙炔抑制法的测定结果代表性不如 RoFlow 和 Robot 系统测定结果。而对于不同外源底物添加的处理来说, 不同测定方法测得的 N_2

排放速率响应不同。在添加外源氮的处理中, 使用 RoFlow 系统和 Robot 系统测得的不同处理间的 N_2 排放速率差异不显著 (图 4a), 这可能是受土壤背景硝酸盐含量影响导致。在本研究中供试土壤背景硝酸盐含量较高 ($57.83 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 此时土壤反硝化过程可能并不受限于硝酸盐浓度, 反硝化过程对于外源硝酸盐的添加响应并不敏感, 因此并没有检出显著的处理差异。在添加外源碳的处理中, Robot 系统测定结果能够反映各处理的差异, 仅添加 $60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 处理的 N_2 排放速率显著高于同时加入 $60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 和 KNO_3 的处理 ($P<0.05$), 而同时加入 $60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 和 KNO_3 处理的 N_2 排放速率显著高于仅添加蒸馏水的处理 ($P<0.05$) (图 4b)。RoFlow 系统的测定结果则无法反映外源碳处理间的差异, 因此我们认为, 相对于 RoFlow 系统, Robot 系统对于外源底物的添加有更好的响应。此外, 在所有处理中, $N_2\text{O}$ 的排放速率均高于 N_2 的排放速率, 反硝化的产物以 $N_2\text{O}$ 为主。这可能是由于供试土壤的低 pH 和高硝酸盐含量导致, 较低的土壤 pH 或高硝酸盐含量会抑制反硝化过程中 $N_2\text{O}$ 还原为 N_2 ^[28, 31], 进而造成了反硝化产物以 $N_2\text{O}$ 为主, 这也一定程度上解释了为何在部分处理的 N_2 排放速率比较中, 三种测定方法均未测定出处理之间的显著差异。

虽然乙炔抑制法采用的土水比 (1:1) 与 Robot 系统测定所采用的近似田间原位含水量有所差别, 但乙炔抑制法与 Robot 系统均是在含 30 g 土壤的 120 mL 血清瓶体系中完成测定, 无论是从反应体系还是测定周期上二者都相近, 因此两种方法之间的测定结果有显著的正相关关系 (图 6a)。但是对于乙炔抑制法与 RoFlow 系统, 二者无论是反应体系还是培养条件上均差别较大, RoFlow 系统测定结果可以更好地反映野外情况下的土壤 N_2 动态排放过程, 与乙炔抑制法测定结果之间并没有显著的相关关系 (图 6b)。虽然 Robot 系统与 RoFlow 系统, 二者都是直接测定系统, 但反应体系的不一致导致了二者的测定结果差异较大也没有显著的相关关系。

尽管 Robot 系统无法良好地反映田间真实的 N_2 排放情况, 但是优化后的 Robot 系统相比于乙炔抑制法和 RoFlow 系统具有一定优势。相对于乙炔抑制法, Robot 系统既可以实现体系内 N_2 的直接测定又能够还原一定的田间条件; 相对于 RoFlow 系统,

Robot 系统对于外源底物的添加有更好的响应且测定效率高, 虽然 Robot 系统测定结果低于 RoFlow 系统测定结果 3 倍~5 倍, 但二者还处于同一数量级上, 因此 Robot 系统在机理的研究上会有更好的应用效果。

综合评估以上三种旱地 N₂ 排放速率测定方法, 我们认为优化后的 Robot 系统测定结果合理, 测定效率高, 对外源底物添加的响应较好, 未来在研究旱地土壤背景 N₂ 排放及相关机理方面有较好的应用前景。但是需要特别指出的是, 在使用优化后的 Robot 系统进行反硝化速率研究时, 为了更好地反映田间实际情况, 最好采用原状土模拟田间水分情况下进行测定。

4 结 论

通过使用预先置于 He 环境的橡胶隔垫、采用充 He 后的蒸馏水配制溶液和实施破坏性取样的处理, 可以大幅降低 Robot 系统的 N₂ 渗漏率, 优化后的系统渗漏率在 0~0.78 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 之间。旱地 N₂ 排放速率测定中, 不同实验处理之间使用乙炔抑制法测定的 N₂ 排放速率最高, RoFlow 系统次之, Robot 系统最低。三种测定方法之间误差最小的为 Robot 系统, 不同实验处理之间误差范围在 0.003~0.045 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。整体上, 相对于乙炔抑制法, 优化后的 Robot 系统优势体现在可以实现 N₂ 的直接定量并能还原一定的田间条件。其次, 相对于 RoFlow 系统而言, 优化后的 Robot 系统对外源底物添加的响应较好, 具有更高的精确度并且测定周期短。综上, 经过优化的 Robot 系统在测定旱地 N₂ 排放速率时具有 N₂ 渗漏率低, 测定结果精确度高及对外源底物添加响应较好的特点, 未来在研究旱地土壤背景 N₂ 排放及相关机理的方面有较好的应用前景。

参考文献 (References)

- [1] Castaldelli G, Colombani N, Soana E, et al. Reactive nitrogen losses via denitrification assessed in saturated agricultural soils[J]. *Geoderma*, 2019, 337: 91—98.
- [2] Reis S, Bekunda M, Howard C M, et al. Synthesis and review: Tackling the nitrogen management challenge: From global to local scales[J]. *Environmental Research Letters*, 2016, 11 (12): 120205.
- [3] Malique F, Ke P P, Boettcher J, et al. Plant and soil effects on denitrification potential in agricultural soils[J]. *Plant and Soil*, 2019, 439 (1/2): 459—474.
- [4] Harter J, Weigold P, El-Hadidi M, et al. Soil biochar amendment shapes the composition of N₂O-reducing microbial communities[J]. *Science of the Total Environment*, 2016, 562: 379—390.
- [5] Song X T, Liu M, Ju X T, et al. Nitrous oxide emissions increase exponentially when optimum nitrogen fertilizer rates are exceeded in the North China plain[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52 (21): 12504—12513.
- [6] 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.
- [7] Zhang Z J, Qin S P, Yuan H J, et al. Advance in soil dinitrogen emission[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2018, 26 (2): 182—189. [张志君, 秦树平, 袁海静, 等. 土壤氮气排放研究进展[J]. *中国生态农业学报*, 2018, 26 (2): 182—189.]
- [8] Kuntz T M, Sullivan M B, Cornwell J C, et al. Denitrification in estuarine sediments determined by membrane inlet mass spectrometry[J]. *Limnology and Oceanography*, 1998, 43 (2): 334—339.
- [9] Li J F, Chai Y C, Chen S T, et al. Measurement of denitrification, Anammox, DNRA rates, and net N₂ flux in paddy soil using a membrane inlet mass spectrometer[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2019, 38 (7): 1541—1549. [李进芳, 柴延超, 陈顺涛, 等. 利用膜进样质谱仪测定水稻土几种厌氧氮转化速率[J]. *农业环境科学学报*, 2019, 38 (7): 1541—1549.]
- [10] Li X B, Xia Y Q, Lang M, et al. N₂: Ar technique for direct determination of denitrification rate of aquatic ecosystems using membrane inlet mass spectrometry[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2013, 32 (6): 1284—1288. [李晓波, 夏永秋, 郎漫, 等. N₂: Ar 法直接测定淹水环境反硝化产物 N₂ 的产生速率[J]. *农业环境科学学报*, 2013, 32 (6): 1284—1288.]
- [11] 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 of London Series B, Biological Sciences*, 2013, 368(1621): 20130122.
- [12] Groffman P M, Altabet M A, Böhlke J K, et al. Methods for measuring denitrification: Diverse approaches to a difficult problem[J]. *Ecological Applications*, 2006, 16 (6): 2091—2122.
- [13] Yan X Y, Zhou W. Groundwater nitrate removal through denitrification under farmland in Yangtze River Delta[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2019, 56 (2): 350—362. [颜晓元, 周伟. 长江三角洲农田地下水反硝化对硝酸盐的

- 去除作用[J]. 土壤学报, 2019, 56 (2): 350—362.]
- [14] Wang J Y, Yan X Y. Denitrification in upland of China: Magnitude and influencing factors[J]. Journal of Geophysical Research: Biogeosciences, 2016, 121 (12): 3060—3071.
- [15] Qin S P, Yuan H J, Dong W X, et al. Relationship between soil properties and the bias of N₂O reduction by acetylene inhibition technique for analyzing soil denitrification potential[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2013, 66: 182—187.
- [16] Bowen H, Maul J E, Cavigelli M A, et al. Denitrifier abundance and community composition linked to denitrification activity in an agricultural and wetland soil[J]. Applied Soil Ecology, 2020, 151: 103521.
- [17] Yuan H J, Qin S P, Dong W X, et al. Denitrification rate and controlling factors for accumulated nitrate in the deep subsoil of intensive farmlands: A case study in the North China Plain[J]. Pedosphere, 2019, 29 (4): 516—526.
- [18] Qin S P, Hu C S, Oenema O. Quantifying the underestimation of soil denitrification potential as determined by the acetylene inhibition method[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2012, 47: 14—17.
- [19] Hao Y X. Effects of long-term fertilization on N₂O emissions and denitrification potential in agricultural soils in Guanzhong Plain[D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A & F University, 2017. [郝耀旭. 关中平原长期定位施肥农田土壤 N₂O 排放和反硝化潜势的观测研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2017.]
- [20] Malghani S, Kim J, Lee S H, et al. Application of two contrasting rice-residue-based biochars triggered gaseous loss of nitrogen under denitrification-favoring conditions: A short-term study based on acetylene inhibition technique[J]. Applied Soil Ecology, 2018, 127: 112—119.
- [21] Wang R. Measurement of N₂, N₂O, NO and CO₂ emissions from soil with the gas-flow-soil-core technique[D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2012. [王睿. 直接测定 N₂法与土壤 N₂、N₂O、NO 和 CO₂ 排放研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2012.]
- [22] Molstad L, Dörsch 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.
- [23] Senbayram M, Well R, Bol R, et al. Interaction of straw amendment and soil NO₃⁻ content controls fungal denitrification and denitrification product stoichiometry in a sandy soil[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2018, 126: 204—212.
- [24] Gao Y, Mania D, Mousavi S A, et al. Competition for electrons favours N₂O reduction in denitrifying *Bradyrhizobium* isolates[J]. Environmental Microbiology, 2021, 23 (4): 2244—2259.
- [25] Wu D, Wei Z J, Well R, et al. Straw amendment with nitrate-N decreased N₂O/(N₂O+N₂) ratio but increased soil N₂O emission: A case study of direct soil-born N₂ measurements[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2018, 127: 301—304.
- [26] Qin S P, Pang Y X, Clough T, et al. N₂ production via aerobic pathways may play a significant role in nitrogen cycling in upland soils[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2017, 108: 36—40.
- [27] Yuan H J, Zhang Z J, Li M Y, et al. Biochar's role as an electron shuttle for mediating soil N₂O emissions[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2019, 133: 94—96.
- [28] Wei Z J, Shan J, Chai Y C, et al. Regulation of the product stoichiometry of denitrification in intensively managed soils[J]. Food and Energy Security, 2020, 9 (4): e251.
- [29] Smith M S, Tiedje J M. Phases of denitrification following oxygen depletion in soil[J]. Soil Biology & Biochemistry, 1979, 11 (3): 261—267.
- [30] Senbayram M, Budai A, Bol R, et al. Soil NO₃⁻ level and O₂ availability are key factors in controlling N₂O reduction to N₂ following long-term liming of an acidic sandy soil[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2019, 132: 165—173.
- [31] Giles M, Morley N, Baggs E M, et al. Soil nitrate reducing processes - drivers, mechanisms for spatial variation, and significance for nitrous oxide production[J]. Frontiers in Microbiology, 2012, 3: 407.

(责任编辑: 卢萍)