

冯琪, 王睿, 郑循华, 等. 2013. 厌氧条件下土壤反硝化气体 (N_2 、 N_2O 、 NO) 和 CO_2 排放——氦环境培养—气体同步直接测定法的应用初探 [J]. 气候与环境研究, 18 (3): 297–310, doi:10.3878/j.issn.1006-9585.2013.11014. Feng Qi, Wang Rui, Zheng Xunhua, et al. 2013. Direct measurements of denitrification gas (N_2 , N_2O , NO) and CO_2 emissions using the gas-flow-soil-core technique with helium environment incubation [J]. Climatic and Environmental Research (in Chinese), 18 (3): 297–310.

厌氧条件下土壤反硝化气体 (N_2 、 N_2O 、 NO) 和 CO_2 排放——氦环境培养—气体同步直接测定法的应用初探

冯琪^{1,2} 王睿² 郑循华² 张伟² 邹建文¹

¹ 南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095

² 中国科学院大气物理研究所大气边界层物理和大气化学国家重点实验室, 北京 100029

摘要 反硝化过程是维系闭合氮循环所必需的氮素形态转化环节。土壤反硝化过程速率及产物比的直接测定是研究氮循环过程机理的基础, 但却是一个难题。为解决此难题, 德国卡尔斯鲁厄技术研究所与中国科学院大气物理研究所最近合作新建了一套通过氦环境培养—气体同步直接测定土壤反硝化气体——氮气 (N_2)、氧化亚氮 (N_2O)、一氧化氮 (NO) 和二氧化碳 (CO_2) 排放的系统 and 与之配套的三阶段培养方法。为检验该新建系统和配套方法测定土壤反硝化过程的准确性和可靠性, 以华北地区广泛分布的盐碱地农田土壤 (采自山西运城) 为研究对象开展实验室培养试验, 在初始可溶性有机碳 (DOC) 供应比较充足约 300 mgC kg^{-1} 干土 (d.s.) 的条件下, 测试了不同初始土壤硝态氮含量水平 (10、100 mgN kg^{-1} d.s. 左右, 分别表示为 10N 和 100N) 的反硝化气体和 CO_2 排放过程。结果显示: 100N 的反硝化速率 (定义为 N_2 、 N_2O 和 NO 排放速率之和) 显著高于 10N 处理 (统计检验显著水平 $p < 0.01$); 两个处理的反硝化产物均以 N_2 为主 (质量比分别占 77% 和 75%), 产物的 NO/N_2O 摩尔比分别为 1.2 和 1.5, N_2O/N_2 摩尔比均为 0.19; 土壤反硝化气体动态排放速率及相关指标的测定结果表明, 培养土壤中消失的硝态氮被回收 81%~87%, 培养前后的氮平衡率达 92%~95%。因此, 该新建方法测定土壤反硝化速率和产物比的结果具有很好的可靠性, 为定量研究土壤反硝化过程提供了有效的直接测定手段。研究中检测到的土壤反硝化产物 NO/N_2O 摩尔比大于 1, 不同于以往用液体培养基培养反硝化细菌得出的 NO/N_2O 摩尔比远小于 1 的结论。这意味着, 不能用 NO/N_2O 摩尔比小于 1 与否来推断土壤排放的 N_2O 和 NO 是主要来源于反硝化作用还是硝化作用。

关键词 氦环境培养—气体同步直接测定法 反硝化作用 N_2 、 N_2O 、 NO 和 CO_2 排放 NO/N_2O 比 N_2O/N_2 比 回收率
文章编号 1006-9585 (2013) 03-0297-14 **中图分类号** X51 **文献标识码** A
doi:10.3878/j.issn.1006-9585.2013.11014

Direct Measurements of Denitrification Gas (N_2 , N_2O , NO) and CO_2 Emissions Using the Gas-Flow-Soil-Core Technique with Helium Environment Incubation

FENG Qi^{1,2}, WANG Rui², ZHENG Xunhua², ZHANG Wei², and ZOU Jianwen¹

¹ College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095

² State Key Laboratory of Atmospheric Boundary Layer Physics and Atmospheric Chemistry, Institute of Atmospheric Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100029

Abstract Denitrification is the key process of nitrogen transformation to close the global nitrogen cycle. Quantification

收稿日期 2011-01-27 收到, 2013-02-25 收到修定稿

资助项目 公益性行业 (农业) 科研专项项目 200803036, 国家自然科学基金国际合作项目 40711130636

作者简介 冯琪, 女, 1986 年出生, 硕士研究生, 主要从事土壤温室气体方面的研究。E-mail: fengqi@mail.iap.ac.cn

通讯作者 王睿, E-mail: wangrui@mail.iap.ac.cn

of microbial denitrification rate and its ratios of products is the key step for obtaining insights into nitrogen cycling processes, though it is very difficult. To enable precise quantification of the rates of the entire process, as well as individual products, a system of gas-flow-soil-core technique with helium-environment incubation was recently established and a three-period incubation method was set up by the Karlsruhe Institute of Technology and the Institute of Atmospheric Physics, Chinese Academy of Sciences. Using this system, dynamic emission rates of dinitrogen (N_2), nitrous oxide (N_2O), nitric oxide (NO) and carbon dioxide (CO_2), which are the gaseous products of microbial denitrification, can be simultaneously and directly measured. In this study, we conducted the first soil incubation experiment to test the reliability of the measurements by this system in association with the newly proposed incubation method. Our experiment included two levels of initial soil nitrate (NO_3^-) content, which were around 10 and 100 mgN kg^{-1} d.s. (dry soil), respectively (hereinafter referred to as 10N and 100N). For either nitrate level, sufficient dissolved organic carbon (DOC) was initially supplied (glucose was added to establish an initial DOC content of around 300 mgC kg^{-1} d.s.). The incubated fresh soil was a silty clay loam of the northern China. It was sampled from a typical cropland rotationally cultivated with a double cropping system of summer maize and winter wheat and a single cropping system of cotton. Our results show that the microbial denitrification rate was significantly higher for the 100N than 10N treatments ($p < 0.01$), and N_2 was the main product in both treatments (with mass fractions of 77% and 75%, respectively). The molar ratios were 1.2 (10N) to 1.5 (100N) for NO/ N_2O and were 0.19 (both treatments) for N_2O/N_2 . The measurements of individual denitrification gases recovered 81%–87% of disappeared nitrate during incubation. The direct dynamic detection of individual denitrification gases and the measurements of DOC, ammonium, nitrate, microbial biomass carbon, and microbial biomass nitrogen at the beginning and end of incubation gave mass balance rates of 92%–95% for nitrogen. These results suggest that the tested system, in association with the proposed incubation method, could precisely determine the dynamical rate of microbial denitrification. The molar ratios of NO/ N_2O given by our data were greater than 1. This differs from previous knowledge of much lower ratios yielded by denitrifiers. This difference implicates that the NO/ N_2O ratio of 1 may not be used as the threshold to indicate nitrification or denitrification processes.

Keywords Gas-flow-soil-core technique with helium-environment incubation, Denitrification, Dynamics of N_2 , N_2O , NO, and CO_2 emissions, NO/ N_2O , N_2O/N_2 , Recovery rate

1 引言

反硝化过程使氮素从硝态氮 (NO_3^-) 转化为氮气 (N_2), 这是维系闭合全球氮循环所必需的氮素形态转化环节, 土壤微生物反硝化过程是该环节的重要组成。在土壤微生物反硝化过程中, 微生物(包括细菌和真菌)利用碳底物的氧化提供电子, 将硝态氮逐步还原成一氧化氮(NO)、氧化亚氮(N_2O)和 N_2 。 N_2 本身不具有化学和生物活性, 而大气 N_2O 却是一种重要的温室气体, 并可参与破坏平流层臭氧, 大气 NO 是臭氧 (O_3) 形成的前提物, 也是形成酸雨的主要物质, 因而它们的土壤排放, 尤其是人为活动影响(如施氮肥等)下的土壤排放很受关注(IPCC, 2007)。初始硝态氮向这 3 种气体的转化率总和, 定义为总反硝化速率。对反硝化速率及其各气体产物所占比例的直接测定是研究氮循环过程机理和认识 N_2O 和 NO 排放规律的基础, 但却又是一个难题, 这主要是因为大气背景中的高 N_2 浓度(78%)使反硝化 N_2 排放速率的直接测定极其困难(Davidson and Seitzinger, 2006;

Groffman et al., 2006)。

目前测定土壤反硝化速率的方法主要有:(1)乙炔(C_2H_2)抑制法(Yoshinari and Knowles, 1976); (2) ^{15}N 示踪法(Nömmik, 1956); (3) 直接测定 N_2 法(Swerts et al., 1995; Scholefield et al., 1997a; Butterbach-Bahl et al., 2002)。

乙炔抑制法因其操作简便并可适用于大田而得到了广泛的应用, 但它也有不可忽视的缺点:(1)高浓度 C_2H_2 可以同时抑制硝化和反硝化作用(Klemetsson et al., 1990), 造成在有氧条件下对反硝化速率的低估;(2) C_2H_2 难以均匀扩散到被检测的整个土体中, 抑制效果欠佳(Jordan et al., 1998); (3) 土壤 NO_3^- 浓度较低时, C_2H_2 对 N_2O 还原酶抑制不完全(Simarmata et al., 1993); (4) 当氧气(O_2)和较高浓度 C_2H_2 存在时, NO 会被 C_2H_2 催化氧化成二氧化氮, 造成对反硝化速率的低估(Bollmann et al., 1997); (5) 可测定总反硝化速率, 但不能测定单个反硝化产物速率。

^{15}N 同位素示踪法需要向土壤中引入标记物, 此过程会对土壤造成较大扰动, 也会刺激微生物氮

转化过程 (Butterbach-Bahl et al., 2002), 从而给测定结果造成较大误差。更大的问题是, 该方法检测 N_2 的灵敏度不高, 只能检测 $>500 \text{ gN}_2\text{-N ha}^{-1} \text{ d}^{-1}$ [或 $>50 \text{ }\mu\text{gN}_2\text{-N h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ 干土 (d.s.)] 的排放速率 (Butterbach-Bahl et al., 2002)。此外, 该方法测定过程比较复杂、成本也较高 (Butterbach-Bahl et al., 2002; Groffman et al., 2006)。

直接测定 N_2 法由 Stefanson and Greenlan (1970) 发明, 后经 Swerts et al. (1995)、Scholefield et al. (1997a)、Butterbach-Bahl et al. (2002)、Cárdenas et al. (2003) 和 Molstad et al. (2007) 等人的改进而进一步发展。该方法的基本原理是, 用高纯氦 (He) 或 He- O_2 混合气体 [O_2 可设定为 $\leq 20\%$ (自由大气浓度)] 置换去除土壤孔隙和密闭培养容器气室中高 N_2 含量的空气, 从而实现土壤排放的 N_2 的直接测定。和 C_2H_2 与 ^{15}N 同位素示踪法相比, 直接测定 N_2 法具有如下优点: (1) 不用向土壤中引入标记物, 这对于研究半自然和自然环境条件下的 N_2 排放非常重要; (2) 不用添加 C_2H_2 抑制剂, 避免了 C_2H_2 可能引起的不良影响; (3) 具有比 ^{15}N 示踪法高得多的检测灵敏度 ($2.4 \text{ gN}_2\text{-N ha}^{-1} \text{ d}^{-1}$ 或 $0.3 \text{ }\mu\text{gN}_2\text{-N h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ d.s.) (Butterbach-Bahl et al., 2002)。正因为这些优点, 直接测定 N_2 法的发展和近来越来越受关注 (Groffman et al., 2006), 并根据不同研究目的具体需求不同, 国际上发展出了四类略有不同的氮环境培养—气体同步直接测定系统, 分别以 Swerts et al. (1995)、Scholefield et al. (1997a)、Butterbach-Bahl et al. (2002) 以及 Molstad et al. (2007) 报道的测定系统为代表。对于土壤反硝化 N_2 排放的直接测定, 以 Butterbach-Bahl et al. (2002) 系统最为灵敏。

尽管直接测定 N_2 法得到很大的发展, 但目前仍存在一些问题: (1) 很难同步检测反硝化过程中多种 (中间) 产物产生速率, 不利于有效地刻画陆地生态系统中反硝化关键过程及其驱动机制; (2) 测定数据难以实现培养前后的碳和氮平衡 (Scholefield et al., 1997a, 1997b; Cárdenas et al., 2003), 从而难以做到对反硝化过程进行准确定量。这预示着, 当前的直接测定 N_2 法仍需进一步改进。为此, 德国卡尔斯鲁厄技术研究所与中国科学院大气物理研究所最近对 Butterbach-Bahl et al. (2002) 系统做了一些改进, 设计了一套新的氮环境培养—气体同步直接测定系统 (Wang et al., 2011)。该系

统的主要改进是: 简化了培养容器的气路设计; 改进了置换方式 (由吹扫式改为负压式), 大大缩短了置换时间; 将检测 N_2 的非放射性脉冲放电氦离子化检测器 (PDHID) 改成了通用型的热导检测器 (TCD); 实现对反硝化气体 (N_2 、 N_2O 和 NO) 和 CO_2 排放的同步测定; 建立了三阶段培养法 (低温有氧置换阶段—低温无氧置换阶段—常温厌氧测定阶段), 目的是为了减少气体置换过程对气体排放的影响 (Wang et al., 2011)。

为检验该新建测定系统是否可以实现培养前后的氮平衡, 并了解其测定土壤反硝化速率和反硝化产物比的准确性, 本文用采自华北地区盐碱地的农田土壤, 测试了该系统对两个初始硝态氮含量水平的反硝化过程测定效果。

2 材料与方 法

2.1 氮环境培养—气体同步直接测定系统简介

该测定系统由培养容器、气路系统和分析检测系统三部分组成 (图 1)。培养容器是 3 个完全相同的不锈钢圆柱形容器 (内径 13.9~14.5 cm, 外径 18.9 cm, 高 5.6 cm), 每个容器可放置 4 个环刀土柱 (放入土柱后, 培养容器所剩空间约为 408 mL, 称为气室)。培养容器置于恒温水箱 (130×73×84 cm^3) 中, 以控制土壤培养温度。培养容器内部空间与系统的其他部分通过不锈钢管 (内径 2 mm, 外径 3 mm) 路连通。气路系统由气源 [高纯 He (99.9997%)、高纯 O_2 (99.999%) 和 N_2 标气 (20 $\mu\text{mol mol}^{-1} N_2$, He 为底气)]、质量流量计、电磁阀、控制模块、真空泵等组成。分析检测系统由带有 TCD 的气相色谱仪 (美国安捷伦科技有限公司出品的 Agilent micro-GC 3000, 用于测定 N_2)、带有电子捕获检测器 (ECD) 和氢火焰离子化检测器 (FID) 的气相色谱仪 (美国惠普公司出品的 HP 5890, 用于测定 N_2O 和 CO_2) 和化学发光氮氧化物分析仪 (美国赛默飞世尔科技公司出品的 Thermo 42i, 用于测定 NO) 组成。关于该系统的更详细介绍, 见 Wang et al. (2011)。

整个系统由数据采集系统计算机程序软件 IDAS (IFU Data Acquisition System) 控制。系统运行时, 计算机程序软件通过各控制模块发出指令, 设置和调节气路流量, 执行电磁阀的开关动作, 从而改变管线中气体流速和方向, 以达到气体置

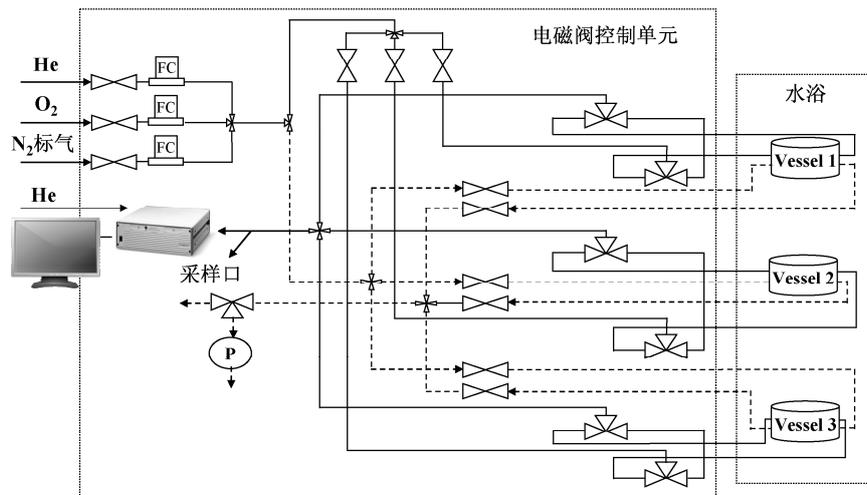


图1 氦环境培养—气体同步直接测定系统构造图 (P: 泵; FC: 质量流量计; \times \times : 电磁阀)

Fig. 1 Schematic diagram of the gas-flow-soil-core system (P: pump; FC: flow controller; \times \times : magnetic valves)

换、平衡和采样分析的目的。置换、平衡和采样分析步骤具体如下：

(1) 气体置换。用 80%高纯 He 和 20%高纯 O₂ 构成的混合气体（以下简称置换气）置换培养容器内土壤孔隙中和气室内含高浓度 N₂ 的空气，直至其全部为置换气所取代。置换过程采用负压式置换，即首先将培养容器内含有高浓度 N₂ 的气体抽出，使其到达负压状态，然后注入置换气以平衡压力。这样的过程在 3 个培养容器间反复交替进行，直至气体置换完成（如图 1 虚线气路所示）。完成置换的时间需要 20~40 h 不等，依土壤质地、含水量而异。置换气的构成和置换温度等条件由试验目的确定。气体置换时间的确定方法：首先将供试土壤进行灭菌，灭菌后的土壤放入培养容器内，用置换气去置换培养容器内的高浓度 N₂ 的空气，每置换土壤空气一段时间（3~5 h），测定一次培养容器顶部空间 N₂ 浓度的变化，直到测定的顶部空间 N₂ 浓度的变化恒定时，认为气体置换过程完成，而这个恒定的 N₂ 浓度变化率即为外界 N₂ 的渗漏率，而这期间每次气体置换时间之和即为该类型土壤在该湿度下的气体置换时间。

(2) 建立气体流动平衡。为模拟野外自然条件下土壤表层空气不断流动的状态，同时也为避免气室内气体的过度累积对测定结果的影响，在气体置换结束后的排放速率测定间隙，需要使土柱上方气室始终处于气体流动的平衡状态。用 N₂ 浓度为 20 μmol mol⁻¹ 的标气（底气为高纯 He）以 20 mL min⁻¹ 的流速吹扫培养容器的气室，以在土壤内部建立自

然的气体浓度梯度，同时也平衡气室的压力（如图 1 实线气路所示）。在所有气体排放速率测定间隙，培养容器中始终保持这种气体流动平衡状态。

(3) 气体采样分析。气体置换结束后，以 8~24 h 的时间间隔测定培养容器气室中气体（N₂、N₂O、NO 和 CO₂）的排放速率，直到氮素气体排放速率降低到检测限附近为止。每次排放速率测定均分别以 45 和 15 min 间隔测定 5 次 N₂ 和其他气体（N₂O、NO 和 CO₂）的浓度，根据 5 次浓度的变化率计算 N₂、N₂O、NO 和 CO₂ 的排放速率。

(4) 系统渗漏率测定。在空的培养容器内进行，不放置供试土壤样品，采用高纯 He 置换培养容器中的空气，使其全部为 He 所取代，然后以一定时间间隔测定培养容器空间的气体浓度变化，即为系统渗漏率，该方法可作为检验系统气密性的日常测定方法。

2.2 供试土壤

供试土壤采自山西省永济市董村农场（34°56'N，110°43'E）典型冬小麦—夏玉米轮作农田（李明等，2009），供试土壤的理化性质见表 1。采回的鲜土经风干至质量含水量为 18%左右，过 2 mm 筛、除杂、混匀，置于 4 °C 冷藏箱内干燥保存。每次试验开始前 2 周，加水（去离子水）调节土壤湿度为 25%（质量含水量，约 44%土壤充水孔隙度，缩写 WFPS），将土壤在低温条件下（4 °C）进行预培养，预培养期间，每天加水保持土壤湿度 25%，并且每天开冷藏箱门通气 2~3 次，以防止培养箱内供试土壤因 O₂ 缺乏而发生反硝化作用消耗底物。

表 1 供试土壤理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of soil samples

土壤类型	土层深度 (cm)	不同粒径土粒质量分数			容重 (g cm ⁻³)	总孔隙度	pH 值	有机碳 (g kg ⁻¹)	全氮 (g kg ⁻¹)
		<0.002 mm	0.002~0.02 mm	0.02~2 mm					
潮褐土	0~15	37.4%	46.0%	16.6%	1.23	54%	8.5	9.6	1.09

2.3 试验设计

本试验设置两个初始 NO₃⁻-N 浓度水平[用硝酸钾 (KNO₃) 调节], 分别为大约 10 和 100 mgN kg⁻¹d.s. (以下简称 10N 和 100N)。每个 NO₃⁻-N 水平的土壤初始可溶性有机碳(DOC)含量均维持在大约 300 mgC kg⁻¹d.s. (用葡萄糖调节)。在完全厌氧条件下培养和测定反硝化气体(N₂、N₂O 和 NO)和 CO₂ 排放速率动态, 以研究初始 NO₃⁻-N 含量变化对 25 °C 条件下土壤反硝化气体 (N₂、N₂O 和 NO) 和 CO₂ 排放的影响。

对于每个 NO₃⁻-N 浓度水平处理, 用不锈钢环刀 (内径 5.6 cm, 外径 6 cm, 高 4 cm) 取 12 个土柱, 每个土柱湿重 130 g 左右, 随机分成 3 组, 分别置于 3 个培养容器内, 每个培养容器放置 4 个环刀土柱。在取环刀土柱之前, 先取土壤样品测定其中的铵态氮 (NH₄⁺-N)、NO₃⁻-N 和 DOC 含量, 作为调节培养土柱初始矿质氮和 DOC 含量的参考依据。在取环刀土柱的同时, 再取土壤样品测定其中的 NH₄⁺-N、NO₃⁻-N、DOC、微生物碳 (SMBC)、微生物氮 (SMBN) 含量和含水量, 作为准确确定培养土柱的初始碳、氮、水含量的依据。在密闭培养容器以进行气体置换之前, 向每个环刀土柱中均匀添加 5 mL KNO₃ 和葡萄糖的混合溶液, 使其达到土壤初始 NO₃⁻-N 和 DOC 含量设定值。加入溶液后,

土壤湿度由 25% 增加至 30% (约 53% WFPS)。气体排放速率测定结束后, 立即测定土壤样品中的 NH₄⁺-N、NO₃⁻-N、DOC、SMBC、SMBN 和含水量, 以定量这些变量在培养测定过程中的变化。

2.4 培养方法

本研究采用低温置换, 即在整个置换过程中使土柱温度维持在 2 °C 左右。低温条件可以避免置换过程发生氧化反应而消耗初始 NH₄⁺ 和 DOC 等。在低温条件下首先采用上述 He-O₂ 混合气体进行置换, 以防止置换过程中发生反硝化作用而消耗底物 NO₃⁻。为了测定反硝化速率, 在低温置换后期, 需将 O₂ 源切断, 使土柱内形成完全厌氧状态。置换结束后, 将土壤温度迅速调节至 25 °C, 进行反硝化气体和 CO₂ 排放速率动态的测定。培养容器中环刀土柱的上述培养过程可用图 2 所示的三阶段表示, 分别是低温有氧置换阶段 (P1)、低温厌氧置换阶段 (P2) 和常温厌氧培养测定阶段 (P3)。

2.5 气体样品检测

在 P1 阶段, 用 80% He 和 20% O₂ 构成的混合气体, 以 250 mL min⁻¹ 的流速每置换土壤空气一段时间 (先后分别为 5、10、8 h), 测定一次 N₂O、NO 和 CO₂ 的排放速率。测定时首先将置换停止, 并平衡 30 min 左右, 然后进行测定, 测定时间为 60 min, 测定期间每间隔 15 min 测定一次气室内的

培养时间 (h)	0	25	50	75	100	125	150	175	200	225	250
培养阶段	P1		P2		P3						
培养温度	2 °C		2 °C		25 °C						
置换气吹扫气	20% O ₂ + 80% He (250 mL min ⁻¹)		100% He (200 mL min ⁻¹)		100% He (20 mL min ⁻¹)						
操作	置换和排放速率测定 (N ₂ O、NO、CO ₂)		置换和排放速率测定 (N ₂ 、N ₂ O、NO、CO ₂)		吹扫和排放速率测定 (N ₂ 、N ₂ O、NO、CO ₂)						

图 2 培养期间各阶段的条件设置和测定排放速率的气体种类

Fig. 2 Setting conditions and gas species to measure in each incubation period

N₂O、NO 和 CO₂ 浓度，共测定 5 次用于排放速率的计算。P1 阶段有氧置换（大约 30 h）结束后至 P2 阶段厌氧置换前，先后测定两次低温有氧条件下的 N₂ 排放速率，测定时间为 3 h，测定期间每间隔 45 min 测定一次气室内的 N₂ 浓度，共测定 5 次用于排放速率的计算。

在 P2 阶段，继续保持低温，但切断了 O₂ 源，进行两次纯 He 置换（置换气体流速为 200 mL min⁻¹），每次置换 2 h。每次置换结束后都测定一次四种气体的排放速率，每次测定之前平衡大约 30 min。之后继续保持低温，持续间歇性地测定 4 次 4 种气体的排放速率，每次排放速率测定持续 5 h 左右，每两次测定之间平衡 2 h 左右。

在 P3 阶段，首先在流动气体平衡条件下将水浴快速升温至 25 °C，然后每间隔 8 h 测定一次 4 种气体的排放速率，到气体排放高峰过去后降为每间隔 12 h 或 24 h 测定一次，直至各氮素气体排放速率接近检测限为止。在所有气体排放速率测定间隙，培养容器顶部空间始终有 20 mL min⁻¹ 的平衡气流过。

所有样品的测定均于采样后 1 h 内完成。

气室内气体的 N₂ 浓度由安捷伦 micro GC 3000 微型气相色谱在线采样分析。对于每个气体样品测定，微型气相色谱的内置真空泵以 2 mL min⁻¹ 的流速抽取吹扫土柱上方气室流出的气体，使其连续流过微型气相色谱的气体样品定量管 20 s，然后进样分析，用 TCD 检测器检测 N₂ 信号，并用几乎同步分析的 N₂ 标气（20 μmol mol⁻¹，底气为高纯 He）进行浓度标定。微型气相色谱的配置条件如下：分子筛色谱柱（14 m×320 μm×12 μm）；柱温 80 °C；检测器温度 50 °C；进样口温度 80 °C；载气高纯 He（99.9997%，流速 20 mL min⁻¹）；出峰时间 1.8 min。

分析 N₂O、NO 和 CO₂ 的样气从系统采气口用 60 mL 注射器以 20 mL min⁻¹ 的速度（与采样时系统的进气速度一致）采样 3 min，所采集的 60 mL 样气，20 mL 用于测定 N₂O 和 CO₂（视浓度高低决定是否需要稀释），余下 40 mL 注入充有 1.8 L 高纯 N₂（99.999%）的气袋（大连普莱特气体包装有限公司出品），用于测定 NO。检测 N₂O 和 CO₂ 的色谱配置条件如下：载气高纯 N₂，流速 30 mL min⁻¹；检测器 ECD 温度 350 °C，FID 温度 220 °C；色谱柱 PorapakQ，柱温 55 °C；导入 ECD 的高 CO₂ 缓冲气

体（CO₂/N₂=10/90，流速约 3 mL min⁻¹）。详细的色谱配置条件请参看 Zheng et al. (2008) 和 Wang et al. (2011)。

N₂O 采用外标工作曲线来标定。CO₂ 和 N₂ 采用单点标定，其标气浓度分别为 354 μmol mol⁻¹ CO₂（高纯 N₂ 为底气）和 20 μmol mol⁻¹ N₂（高纯 He 为底气）。测定 NO 的氮氧化物分析仪每次试验之前标定一次。所有标准气体均由北京氦普北分气体工业有限公司提供。

测定系统检测 N₂、N₂O、NO 和 CO₂ 浓度的分析精度分别为 0.2、0.005、0.045 和 1.3 μmol mol⁻¹。

2.6 排放速率计算

N₂ 标气（20 μmol mol⁻¹ N₂）以一定流速（20 mL min⁻¹）吹扫土柱顶部气室，并携带培养容器内的样气通过尾气放空口流出，这种采样方式对气室内的气体造成了稀释，使测得的流出气体 N₂、N₂O、NO 和 CO₂ 浓度不能直接代表土壤排放气体的真实浓度。因此，在用于计算排放速率之前需对其进行矫正。矫正公式（Butterbach-Bahl et al., 2002）如下：

$$C_i = C_i^m + \frac{V_m}{V_H} \left(\sum_{i=1}^5 C_i^m - i C_{in} \right), \quad (1)$$

其中， C_i^m 为第 i 次采样测定的出气口处 N₂、N₂O、NO 或 CO₂ 浓度（单位：μmol mol⁻¹）（ i 取 1、2、3、4、5）， C_i 为稀释矫正后的土壤顶部空间气体浓度，用于参与排放速率计算（单位：μmol mol⁻¹）， C_{in} 为流入培养容器气室的气体 N₂、N₂O、NO 或 CO₂ 浓度（N₂ 浓度为 20 μmol mol⁻¹，N₂O、NO 和 CO₂ 浓度均为 0 μmol mol⁻¹）， V_{in} 为流入培养容器气室的气体体积（单位：mL）， V_H 为培养容器气室体积（ $V_H=408$ mL）。

采用矫正后的气体浓度值 C_i 和以下公式（Wang et al., 2011）可计算上述气体的排放速率：

$$F = \frac{\Delta m}{\Delta t \times m_{ds}} = \frac{V_H \times (\Delta C_i - \Delta C_L) \times M \times 273.15}{m_{ds} \times \Delta t \times V_M \times (273.15 + T)}, \quad (2)$$

其中， F 为培养土壤排放 N₂、N₂O、NO 或 CO₂ 的速率（单位：μgN h⁻¹ kg⁻¹d.s. 或 μgC h⁻¹ kg⁻¹d.s.）， Δt 为排放速率测定的时间，即培养容器密闭的时间（单位：h）， m_{ds} 为培养土壤样品的干重（单位：g）， Δm 为 Δt 时刻培养容器内的 m_{ds} 质量的土壤 N₂、N₂O、NO 和 CO₂ 的排放质量（单位：μgN 或 μgC）， V_H 为培养容器内的气室体积（ $V_H=408$ mL）， ΔC_i

为稀释校正后的培养容器气室内气体浓度变化 (单位: $\mu\text{mol mol}^{-1}$), ΔC_L 为培养容器的气体渗漏量 (N₂ 渗漏量为 $0.3 \mu\text{mol mol}^{-1}$, N₂O、NO 和 CO₂ 渗漏量接近系统检测限, 默认为 $0 \mu\text{mol mol}^{-1}$), M 为被测气体纯 C 或者纯 N 的摩尔质量 (单位: g mol^{-1}), V_M 为标况下气体的摩尔体积 (单位: L mol^{-1}), T 为培养温度 (单位: $^{\circ}\text{C}$)。

由上述气体浓度检测精度、浓度测定时间间隔、培养容器气室体积及测定土壤样品干重, 可得 N₂、N₂O、NO 和 CO₂ 的排放速率检测限依次为 0.23 、 0.02 、 $0.08 \mu\text{gN h}^{-1} \text{kg}^{-1} \text{d.s.}$ 和 $1.9 \mu\text{gC h}^{-1} \text{kg}^{-1} \text{d.s.}$ 。

2.7 土壤辅助参数测定

土壤质量含水量 (SWC) 的测定采用烘干称重法; NH₄⁺-N 的测定采用 2 M KCl 浸提 (水土比 5:1) 一靛酚蓝比色法; NO₃⁻-N 和 DOC 的测定采用无 CO₂ 去离子水浸提 (水土比 5:1) 浸提液用 $0.45 \mu\text{m}$ 聚醚砜膜过滤, 用离子色谱仪 (瑞士万通中国有限公司出品的 790 通用型) 测定 NO₃⁻-N, 用碳氮分析仪 (德国耶拿公司出品的 Multi N/C 3000 型) 测定 DOC (引自《土壤农化分析第三版》)(鲍士旦, 2000)。SMBC 和 SMBN 的测定采用氯仿熏蒸法 (Sparling and West, 1988), 用碳氮分析仪测定浸提液的总有机碳 (TOC) 和总氮 (TN) 含量, 并用熏蒸和未熏蒸土壤样品的 TOC 和 TN 之差分别表示

SMBC 和 SMBN 含量。

2.8 统计分析方法

统计检验采用 Excel 数据分析工具中的双样本等方差假设分析, 统计显著水平由 t 检验给出。

3 结果

3.1 反硝化气体 (N₂、N₂O 和 NO) 与 CO₂ 的排放速率动态

10N 和 100N 两处理反硝化气体 (N₂、N₂O 和 NO) 和 CO₂ 的排放动态如图 3 所示。

P1 阶段: 随着温度逐渐降低, 土壤呼吸作用减弱, 两处理 CO₂ 的排放速率均逐渐降低至 100 (10N) ~ 130 (100N) $\mu\text{gC h}^{-1} \text{kg}^{-1} \text{d.s.}$ 。两处理的初始 CO₂ 排放速率高是因为土壤样品的温度一开始高于此阶段的设定值 (2°C 左右), 后来逐渐降低并稳定是因为土壤温度逐渐降低到设定值, 呼吸作用也逐渐减弱, 并达到稳定状态。置换气中的高 O₂ 含量抑制了反硝化作用, 低温抑制了硝化作用, 因而此阶段测得的 N₂O 和 NO 排放速率都很低, 接近系统检测限。此阶段后期测得的 10N 处理的 N₂ 排放速率为 $0.5 \mu\text{gN h}^{-1} \text{kg}^{-1} \text{d.s.}$, 100N 为 $0.8 \mu\text{gN h}^{-1} \text{kg}^{-1} \text{d.s.}$, 100N 显著高于 10N (统计检验显著水平 $p < 0.05$), 且两处理 N₂ 排放速率均显著高于 N₂O 和 NO 排放速率之和 ($p < 0.01$)。

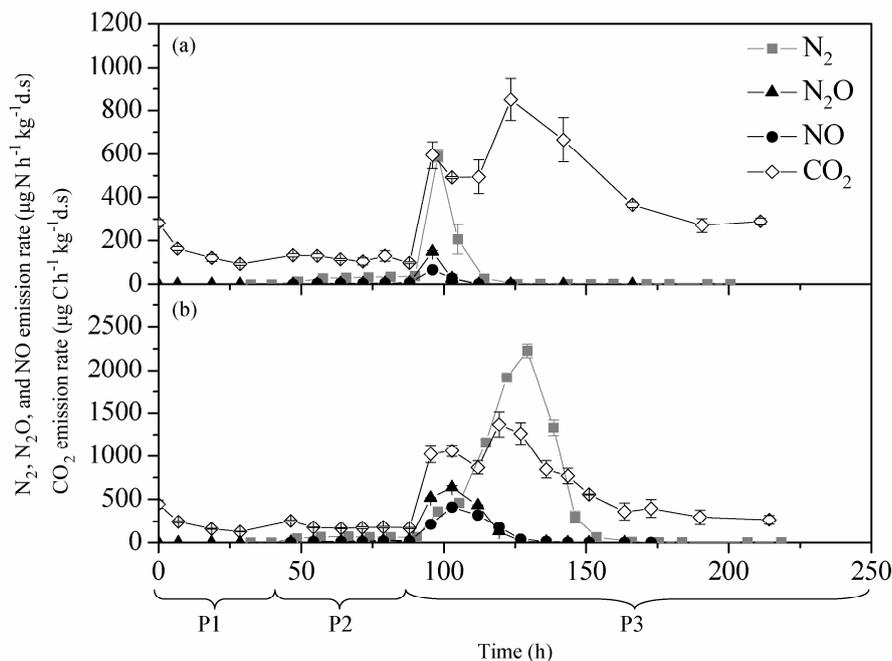


图 3 反硝化气体 (N₂、N₂O、NO) 和 CO₂ 的排放动态: (a) 10N 处理; (b) 100N 处理

Fig. 3 Emission dynamics of denitrification gases (N₂, N₂O, and NO) and CO₂ from incubated soils: (a) 10N; (b) 100N

P2 阶段: 置换气切换为纯 He 后, 虽然培养温度仍然为 2 °C 左右, 但反硝化作用还是因缺 O₂ 而明显增强, 致使 N₂、N₂O 和 NO 排放速率均比 P1 阶段明显增加 ($p < 0.01$)。至该阶段后期, 10N 处理的 N₂、N₂O 和 NO 排放速率分别增加到 37、6 和 6 $\mu\text{gN h}^{-1} \text{kg}^{-1} \text{d.s.}$, 100N 处理分别增加到 61、26 和 17 $\mu\text{gN h}^{-1} \text{kg}^{-1} \text{d.s.}$, 后一处理 3 种气体的排放速率依次比前一处理高大约 1 倍 ($p < 0.01$)、4 倍 ($p < 0.01$) 和 3 倍 ($p < 0.01$)。尽管此阶段的置换气无 O₂, 但两处理的 CO₂ 排放速率较上一阶段并未受显著影响, 始终维持在 120 (10N) ~ 170 (100N) $\mu\text{gC h}^{-1} \text{kg}^{-1} \text{d.s.}$ 左右。该阶段 CO₂ 排放来自于微生物无氧呼吸, 而 P1 阶段的 CO₂ 排放来自于微生物有氧呼吸, 尽管 P2 阶段 CO₂ 排放速率较 P1 阶段末的 CO₂ 排放无显著差异, 但 CO₂ 其实来自于不同的微生物呼吸过程。

P3 阶段: 在无 O₂ 条件下将培养温度升至 25 °C 后, 反硝化作用剧烈发生, N₂、N₂O、NO 和 CO₂ 排放速率均比 P2 阶段迅速增加, 此阶段 4 种气体的第一次测定值分别比上一阶段最后一次测定值高 300~552 $\mu\text{gN h}^{-1} \text{kg}^{-1} \text{d.s.}$ ($p < 0.01$)、143~492 $\mu\text{gN h}^{-1} \text{kg}^{-1} \text{d.s.}$ ($p < 0.01$)、60~195 $\mu\text{gN h}^{-1} \text{kg}^{-1} \text{d.s.}$ ($p < 0.01$) 和 495~855 $\mu\text{gC h}^{-1} \text{kg}^{-1} \text{d.s.}$ ($p < 0.01$), 除 N₂ 的排放速率增加幅度是 10N 大于 100N 外, 其他 3 种气体均是 100N 大于 10N 处理。10N 处理的 N₂O 和 NO 排放速率在升温后 2 h 左右同时达到最大值 (分别为 149 ± 5 和 $67 \pm 5 \mu\text{gN h}^{-1} \text{kg}^{-1} \text{d.s.}$), 100N 处理的 N₂O 和 NO 排放速率在升温后 9 h 左右才同时达到最大值 (分别为 637 ± 20 和 $412 \pm 11 \mu\text{gN h}^{-1} \text{kg}^{-1} \text{d.s.}$), 并且分别比 10N 最大值高 3 倍 ($p < 0.01$) 和 5 倍 ($p < 0.01$)。10N 处理的 N₂ 排放速率峰值 ($590 \pm 27 \mu\text{gN h}^{-1} \text{kg}^{-1} \text{d.s.}$) 与 N₂O 和 NO 几乎同步, 但分别比 N₂O 和 NO 排放速率峰值高 4 倍 ($p < 0.01$) 和 8 倍 ($p < 0.01$)。100N 处理的 N₂ 排放速率峰值 ($2226 \pm 77 \mu\text{gN h}^{-1} \text{kg}^{-1} \text{d.s.}$) 要比 N₂O 和 NO 峰值滞后大约 26 h, 且分别比 N₂O 和 NO 速率峰值高 3 倍 ($p < 0.01$) 和 5 倍 ($p < 0.01$)。之后两处理的 N₂、N₂O 和 NO 排放速率均逐渐降低, 10N 处理 3 种气体依次在升温后 107、30 和 30 h 左右降到检测限附近, 100N 处理则依次在升温后 124、70 和 70 h 左右降到检测限。此阶段两处理的 CO₂ 排放速率动态均呈现双峰型, 第一次峰值出现时间均与 N₂O 和 NO 一致, 且峰值

表 2 培养阶段的全部反硝化氮素气体 (N_T=N₂+N₂O+NO)、单种反硝化氮素气体 (N₂、N₂O、NO) 和 CO₂ 的累积排放量

Table 2 Cumulative emissions of all nitrogen gases (N_T=N₂+N₂O+NO), individual nitrogen gases (N₂, N₂O, NO) and CO₂ in each incubation period

培养阶段		处理	10N	100N	
P1	NO		0	0	
	N ₂ O		0.0006±0.0003 ^a	0.0016±0.0002 ^a	
	N ₂		0.0030±0.0009 ^a	0.0062±0.0015 ^a	
	N _T		0.0036±0.0011 ^a	0.0078±0.0017 ^a	
	CO ₂		4.4±0.06 ^A	6.2±0.2 ^B	
	N ₂ O/N ₂ 摩尔比		0.2±0.01 ^a	0.3±0.02 ^b	
	CO ₂ -C/N _T -N 摩尔比		1420±357 ^a	922±161 ^a	
	P2	NO		0.16±0.003 ^A	0.4±0.1 ^B
		N ₂ O		0.16±0.004 ^A	0.6±0.1 ^B
		N ₂		1.3±0.05 ^A	2.9±0.03 ^B
N _T			1.6±0.1 ^A	4.0±0.1 ^B	
CO ₂			7.0±0.2 ^A	10.4±0.1 ^B	
NO/N ₂ O 摩尔比			2.0±0.1 ^A	1.3±0.1 ^B	
N ₂ O/N ₂ 摩尔比			0.12±0.002 ^A	0.21±0.01 ^B	
CO ₂ -C/N _T -N 摩尔比			5.0±0.4 ^a	3.1±0.1 ^b	
P3		NO		0.8±0.15 ^A	9.3±0.23 ^B
		N ₂ O		1.4±0.17 ^A	12.0±1.9 ^B
	N ₂		6.6±0.5 ^A	62.9±0.9 ^B	
	N _T		8.8±0.9 ^A	84.3±1.0 ^B	
	CO ₂		59.1±5.0 ^a	81.6±6.0 ^a	
	NO/N ₂ O 摩尔比		1.11±0.09 ^a	1.55±0.02 ^b	
	N ₂ O/N ₂ 摩尔比		0.20±0.01 ^a	0.19±0.01 ^a	
	CO ₂ -C/N _T -N 摩尔比		7.9±1.2 ^A	1.1±0.1 ^B	
	反硝化阶段 CO ₂ -C/N _T -N 摩尔比		1.6±0.1 ^A	0.8±0.1 ^B	
	非反硝化阶段 CO ₂ -C/N _T -N 摩尔比		311±75 ^a	58±17 ^a	
Pt	NO [#]		0.9±0.2 (8%) ^A	9.7±0.3 (11%) ^B	
	N ₂ O [#]		1.5±0.2 (15%) ^A	12.6±1.9 (14%) ^B	
	N ₂ [#]		8.0±0.5 (77%) ^A	65.9±0.9 (75%) ^B	
	N _T		10.4±0.6 ^A	88.3±2.2 ^B	
	CO ₂		70.6±5.3 ^a	98.2±6.0 ^b	
	NO/N ₂ O 摩尔比		1.2±0.08 ^a	1.5±0.03 ^a	
	N ₂ O/N ₂ 摩尔比		0.19±0.01 ^a	0.19±0.01 ^a	
	CO ₂ -C/N _T -N 摩尔比		7.9±1.2 ^A	1.1±0.1 ^B	

注: 10N 和 100N 分别表示两个不同初始硝态氮含量水平的处理, 其他培养和测定条件完全相同; 表中数据为 3 个重复的平均值±标准误差; P1、P2 和 P3 表示 3 个培养阶段 (见图 2), Pt 表示 3 个阶段的总和; 表中氮素气体和 CO₂ 均为累积排放量, 单位分别为 $\text{mgN kg}^{-1} \text{d.s.}$ 和 $\text{mgC kg}^{-1} \text{d.s.}$; # 括号中的百分数指示单种气体占 3 种氮素气体累积排放总质量的比例; 同一行内不同大写字母表示两个处理间存在极显著差异 ($p < 0.01$), 不同小写字母表示两个处理间存在显著差异 ($p < 0.05$), 相同字母表示两个处理间没有显著性差异, 下同。

排放速率分别为 594 和 1060 $\mu\text{gC h}^{-1} \text{kg}^{-1} \text{d.s.}$, 第二次峰值排放速率分别为 850 和 1368 $\mu\text{gC h}^{-1} \text{kg}^{-1} \text{d.s.}$, 出现时间比 N₂O 和 NO 分别滞后 28 h (10N) 和 24 h (100N)。100N 处理的 CO₂ 排放显著高于 10N

处理, 反硝化微生物利用 DOC 作为呼吸的电子供体, 当底物 DOC 充足时, 高的反硝化速率对应更多的电子传递, 消耗更多的 DOC, 产生的更多的 CO_2 (Swerts et al., 1996a)。

3.2 不同培养阶段的 N_2 、 N_2O 、 NO 和 CO_2 排放总量与比值

反硝化氮素气体排放总量定义为 N_2 、 N_2O 和 NO 累积排放量之和 (即 $N_t-N=N_2-N+N_2O-N+NO-N$, 均以纯 N 计算)。 CO_2-C/N_t-N 摩尔比对于验证反硝化过程基本理论有指示意义 (Swerts et al., 1996a)。有研究表明, 当微生物利用葡萄糖作为电子供体和能源时, 反硝化产物以 $NO-N$ 、 N_2O-N 或 N_2-N 为主时, CO_2-C/N_t-N 排放摩尔比分别为 0.75、1.0 和 1.25 (Reddy and DeLaune 2008; Swerts et al., 1996a, 1996b)。当 CO_2-C/N_t-N 摩尔比大于 1.25 时, 认为 CO_2 来自于其他过程, 非反硝化过程, 并不伴随着含氮气体的排放; 当 CO_2-C/N_t-N 摩尔比小于 0.75 时, 认为反硝化微生物利用其他的碳源, 如丁酸, 而非葡萄糖作为电子传递的供体和能量 (Swerts et al., 1996a)。

在 P1 阶段, 两处理的 N_2 、 N_2O 和 NO 累积排放总量均较低, 可证明低温有氧的气体置换过程可很好的抑制微生物硝化及反硝化过程, 保存底物氮。该阶段有氧, 我们关注的是反硝化过程, 所以不对该阶段的气体排放摩尔比进行讨论。

在 P2 阶段, 两处理的 N_2 、 N_2O 、 NO 和 CO_2 累积排放总量均呈极显著差异 ($p < 0.001$), 100N 比 10N 依次分别高 2.2、3.8、2.5 和 1.5 倍 (表 2)。10N 和 100N 的 NO/N_2O 摩尔比分别约为 2.0 和 1.3, 差异极显著 ($p < 0.01$); N_2O/N_2 摩尔比分别约为 0.12 和 0.21, 差异也极显著 ($p < 0.01$); CO_2-C/N_t-N 摩尔比分别约为 5.0 和 3.1, 两者差异显著 ($p < 0.05$)。

在 P3 阶段, 两处理的 N_2 、 N_2O 、 NO 排放总量差异与初始氮底物供应量差异相当, 即 100N 的三种气体排放总量分别比 10N 高 9.5、8.6 和 12.3 倍 ($p < 0.0001$), 但 CO_2 排放总量的差异却不显著 (表 2)。10N 和 100N 在此阶段的 NO/N_2O 摩尔比分别约为 1.11 和 1.55, N_2O/N_2 摩尔比分别约为 0.20 和 0.19, 两个处理间的差异都不显著。对于整个 P3 阶段, 10N 和 100N 的 CO_2-C/N_t-N 摩尔比分别约为 7.9 和 1.1, 两处理间差异极显著 ($p < 0.01$)。从图 3 可见, 在 P3 阶段的前期, 反硝化氮

素气体排放明显发生, 我们将这一反应阶段称为反硝化阶段; 随后, 反硝化氮素气体排放不再明显, 但 CO_2 排放依然比较强, 我们将这一反应阶段称为非反硝化阶段 (Swerts et al., 1996a)。尽管初始 NO_3^- 含量水平相差 9 倍之多, 但如表 2 所示, 两个处理在反硝化阶段的 CO_2-C/N_t-N 摩尔比却在数值上比较接近, 10N 约为 1.6, 100N 约为 0.8, 不过两个处理间的差异仍然极显著 ($p < 0.01$)。在之后的非反硝化阶段, 两个处理的 CO_2-C/N_t-N 摩尔比分别大幅度增加到大约 311 和 58, 且两者差异显著 ($p < 0.05$)。

10 N 和 100 N 两处理的反硝化气体排放均主要发生在 P3 的反硝化阶段, 两处理在此阶段的全部反硝化氮素气体总量 N_t 分别占三个阶段总和的 85% 和 92%。10N 处理在整个培养过程中的 CO_2 排放总量有 16% 和 68% 分别发生在反硝化阶段和其后的非反硝化阶段, 100N 处理 CO_2 排放总量有 60% 和 21% 分别发生在反硝化阶段和非反硝化阶段, 由此可见, 两个处理的 CO_2 排放总量在这两个反应阶段的分配比例呈相反趋势 (图 3)。

就整个培养过程而言, 10N 和 100N 两处理的反硝化氮素气体均以 N_2 为主, 累积排放量分别为 10 ± 1 和 $88 \pm 2 \text{ mgN kg}^{-1} \text{ d.s.}$, 各占氮素气体排放总量的 77% 和 75%, 其中 10N 显著高于 100N ($p < 0.05$)。初始 NO_3^- 水平对 N_2O 累积量占氮素气体排放总量比值的影响不显著, 10N 为 15%, 100N 为 14%。 NO 排放占氮素气体排放总量的比重是 10N 低 100N 高 ($p < 0.05$), 分别为 8% 和 11%。整个培养过程的 CO_2-C/N_t-N 摩尔比在两个处理之间差异极显著 ($p < 0.01$), 10N 为 7.9, 100N 为 1.1 (表 2)。

3.3 整个培养过程前后的碳、氮平衡

整个培养过程前后的碳平衡用培养结束时的土壤 DOC、SMBC 含量与 CO_2 累积排放量之和与培养刚开始时的土壤 DOC、SMBC 含量之和的百分比来表征。类似地, 整个培养过程前后的氮平衡用培养结束时的土壤 NH_4^+-N 、 $NO_3^- -N$ 、SMBN 含量与氮素气体排放总量 N_t 之和与培养刚开始时的土壤 NH_4^+-N 、 $NO_3^- -N$ 、SMBN 含量之和的百分比来表征。培养过程中, 土壤 C 素回收率用 CO_2 累积排放量与培养前后土壤碳含量 (DOC 与 SMBC 含量之和) 变化量的百分比来表示; 土壤 N 素回收率用氮素气体累积排放总量 ($N_t=N_2+N_2O+NO$) 与培养

表 3 培养前后土壤碳和氮素的平衡状况

Table 3 Carbon and nitrogen balance before and after the incubation

处理	培养前的土壤碳氮含量 (mgC kg ⁻¹ d.s. 或 mgN kg ⁻¹ d.s.)					培养后的土壤碳氮含量 (mgC kg ⁻¹ d.s. 或 mgN kg ⁻¹ d.s.)					气体累积排放量 (mgC kg ⁻¹ d.s. 或 mgN kg ⁻¹ d.s.)		培养前后的 碳氮平衡		气体排放对土 壤碳氮变化的 回收率	
	DOC	SMBC	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	SMBN	DOC	SMBC	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	SMBN	N _t	CO ₂	C [^]	N ^{&}	C [*]	N [§]
10N	303±3	184±5	12.9±0.6	0.2±0.1	31±1	131±1	196±6	0.1±0.1	5.2±0.3	26±1	10.4±0.6 ^A	70.6±5.3 ^a	82±2%	95±4%	44±4%	81±7%
100N	293±4	256±13	103±0.5	0.6±0.1	48±2	110±5	290±37	0.2±0.1	6.4±0.4	45±3	88.3±2.2 ^B	98.2±6.0 ^b	91±7%	92±3%	66±19%	87±2%

注: SMBC 和 SMBN 分别表示土壤微生物碳和氮; 表中所给数据为 3 个重复的平均值 ± 标准误差; ^ 表示培养结束时的土壤 DOC、SMBC 含量与 CO₂ 累积排放量之和与培养刚开始时的土壤 DOC、SMBC 含量之和的百分比; & 表示培养结束时的土壤 NH₄⁺-N、NO₃⁻-N、SMBN 含量与氮素气体排放总量 N_t之和与培养刚开始时的土壤 NH₄⁺-N、NO₃⁻-N、SMBN 含量之和的百分比; * 表示碳素回收率为 CO₂ 累积排放量占培养前后土壤碳含量 (DOC 与 SMBC 含量之和) 变化量的百分比; § 表示氮素回收率为氮素气体累积排放总量 (N_t) 占培养前后土壤 NO₃⁻-N 变化量的百分比。

前后土壤 NO₃⁻-N 变化量的百分比。培养前后的土壤 DOC、NH₄⁺-N、NO₃⁻-N、SMBN、SMBC 含量和整个培养过程中的 CO₂ 和氮素气体排放总量如表 3 所示。其中初始的 DOC 和 NO₃⁻-N 含量均为土壤自身含量与加入量之和。

对于 10N 处理, 培养后 DOC 含量极显著地下降到 131 mgC kg⁻¹d.s. ($p < 0.0001$), SMBC 含量有所增加 (197 mgC kg⁻¹d.s.), 但不显著, SMBN 和 NO₃⁻-N 分别减少到 26 mgN kg⁻¹d.s. ($p = 0.05$) 和 0.1 mgN kg⁻¹d.s. ($p < 0.0001$), NH₄⁺-N 显著增加到 5.2 mgN kg⁻¹d.s. ($p < 0.001$)。100N 处理, 培养后的 DOC 含量显著降低到 111 mgC kg⁻¹d.s. ($p < 0.0001$), SMBC 含量略有增加 (290 mgC kg⁻¹d.s.), SMBN 略有减少 (45 mgN kg⁻¹d.s.), 两者变化都不显著, NO₃⁻-N 含量极显著地降低到 0.2 mgN kg⁻¹d.s. ($p < 0.0001$), NH₄⁺-N 含量极显著地增加到 6.4 mgN kg⁻¹d.s. ($p < 0.001$)。

从表 3 可见, 10N 处理培养前后的碳、氮平衡分别为 82% 和 95%, 100N 处理分别为 91% 和 92%; 10N 和 100N 处理在整个培养过程中的 CO₂ 累积排放量测定值对培养前后土壤碳含量 (DOC 与 SMBC 含量之和) 变化的回收率分别为 44% 和 66%, 氮素气体排放总量测定值对培养前后土壤 NO₃⁻-N 含量变化的回收率分别为 81% 和 87%。

4 讨论

4.1 测定系统与方法的有效性

从以上结果可见, 培养前后测定的土壤碳素、氮素的平衡结果较好 (82%~95%); 通过测定反硝化氮素气体排放可以回收培养前后的土壤 NO₃⁻-N 含量变化 81%~87%; 整个培养过程中的土壤反硝

化氮素气体和 CO₂ 排放速率动态可很好地验证反硝化过程基本理论。这三点可说明该氮环境培养—气体同步直接测定法能够比较准确地定量土壤反硝化气体排放速率及其产物比。

4.2 培养过程中发生的反硝化及其他伴随过程

该测定系统和方法在整个培养过程中检测的氮素气体 (N₂、N₂O 和 NO) 和 CO₂ 排放速率动态与反硝化过程基本理论比较吻合。

低温抑制微生物活性, 有氧抑制反硝化作用 (Knowles, 1982), 这从 P1 阶段测得的非常低的 N₂O、NO 和 CO₂ 排放速率得到了很好的体现。在这一阶段, 初始碳底物 (DOC) 被气体排放消耗 1%~3%, 而初始氮底物 (NO₃⁻-N) 的消耗率不到 1/1000, 这表明完全达到了设计低温有 O₂ 置换条件的目的, 即有效阻止置换过程中呼吸作用、硝化作用等氧化过程及反硝化作用造成底物消耗。

为了测定反硝化过程, 必须将土壤从有氧培养环境转换为无氧培养环境, 因而, 测定系统设计了 P2 阶段, 在 P2 阶段, 土壤空气中的 O₂ 含量迅速减少 (完全清除 O₂ 大约需 5 h 左右), 反硝化作用增强, 使测得的 N₂、N₂O 和 NO 排放速率较上阶段明显增加, 但由于受温度 (2 °C) 的限制, 这些气体的排放速率较低。这一阶段的气体排放导致了 2%~4% 的初始碳底物和 4% (100N)~12% (10N) 的初始氮底物被消耗。该氮消耗率表明, 控制这一阶段反硝化作用强度的不是底物有效性, 而是温度。

如果培养土壤处于低初始 N 水平和高初始 DOC-C/NO₃⁻-N 质量比条件下 (例如 10N, 初始 N 水平为 13.6 mgN kg⁻¹d.s., DOC-C/NO₃⁻-N 质量比为 22), 则在 P3 的反硝化阶段, 三种氮素气体排放速率峰值几乎同时出现, 此时也出现第一个 CO₂ 排放速率峰值, 第二个 CO₂ 排放速率峰值明显滞后于

N_2 约 26 h, 而且发生在非反硝化阶段 (图 3a), 这与 Swerts et al. (1996a) 的研究结果相一致, 造成两者一致的原因可能跟土壤初始 DOC-C/ NO_3^- -N 质量比较一致有关 [本研究 10N 处理的土壤初始 DOC-C/ NO_3^- -N 质量比约为 22, Swerts et al. (1996a) 的约为 10]。10N 处理在反硝化阶段的 CO_2 -C/ N_t -N 摩尔比为 1.6, CO_2 -C/ N_t -N 摩尔比大于 1.25 表明培养过程中排放的 CO_2 可能来源于其他微生物过程 (并不伴随着含 N 气体的排放), 如微生物参与的 Fe^{3+} 和 SO_4^{2-} 还原 (Yao et al., 1999), 或者厌氧发酵过程 (Swerts et al., 1996a), 或者厌氧矿化过程 (Bridgham et al., 1998)。其他微生物过程贡献 CO_2 排放可从 10N 处理含 N 气体和 CO_2 排放动态中得到证实, 即 CO_2 排放峰再次出现而此时含 N 气体的排放已接近系统检测线了。随着土壤中 NO_3^- 在反硝化过程中被耗尽, 培养土壤进入非反硝化阶段, 这时, 剩余的 DOC 及死亡微生物的发酵反应促成了第二个 CO_2 排放峰。之后, 随着土壤中的 DOC 逐渐被消耗, 发酵作用逐渐减弱, CO_2 排放也随之逐渐减少, 并最终稳定在一定水平 (图 3a), 这个稳定水平在很大程度上可能由微生物维持呼吸强度所决定。

如果培养土壤处于高初始 N 水平和低初始 DOC-C/ NO_3^- -N 质量比条件下 (例如 100N, 初始 N 水平为 $103 \text{ mgN kg}^{-1} \text{ d.s.}$, DOC-C/ NO_3^- -N 质量比为 2.8), 则在 P3 的反硝化阶段, N_2O 与 NO 排放峰值和第一个 CO_2 排放峰值同时出现, N_2 排放峰值明显滞后, 但却与第二个 CO_2 排放峰值同步 (图 3b)。在 100N 处理的 N_2O 和 NO 排放达到峰值之前, 反硝化中间产物与最终产物的质量比 N_2O/N_2 和 $(N_2O+NO)/N_2$ 分别为 1.2 和 1.9。这证实了有关反硝化理论阐述: 在 NO_3^- -N 供应比较充足的情况下, 反硝化会优先利用 NO_3^- -N 作为电子受体, 将其还原为 N_2O 和 NO 等中间产物, 从而造成 N_2O 和 NO 的积累 (Nömmik, 1956; Swerts et al., 1996c)。此反硝化阶段的 CO_2 -C/ N_t -N 摩尔比为 0.8, 与反硝化反应的理论比值范围 0.80~1.25 的下限比较一致。随着 NO_3^- 逐渐被耗尽, N_2O 和 NO 代替 NO_3^- 成为反硝化的电子受体, 并最终被还原为 N_2 , 从而形成 N_2 排放峰, 与此同时, 反硝化过程产生的 CO_2 也导致其第二个排放峰值。之后, 随着氮底物被逐渐耗尽, 反硝化作用逐渐停止, 氮素气体排放速率降低到检测限附近。

4.3 培养前后的氮平衡

本研究的测试结果显示, 无论初始 NO_3^- -N 含量处于低水平还是高水平, 反硝化气体累积排放量可回收培养前后土壤 NO_3^- -N 库变化的 81%~87%, N 素回收率计算涉及 4 个变量, 考虑每一个变量均存在测定误差, 该回收率结果比较令人满意。反硝化过程的消耗使培养结束时的 NO_3^- -N 含量降低到检测限附近, 而 NH_4^+ -N 含量培养结束后则由最初的 $<1 \text{ mgN kg}^{-1} \text{ d.s.}$ 增加到 $6 \text{ mgN kg}^{-1} \text{ d.s.}$ 左右。培养过程中 NH_4^+ -N 含量增加可能有四条途径: 一是 NO_3^- 异化还原为 NH_4^+ (DNRA)。有资料证明, 有的细菌在无氧条件下能使 NO_3^- 异化还原为 NH_4^+ (Caskey and Tiedje, 1979; McCready et al., 1983; Tiedje, 1988; 李振高等, 1989); 二是厌氧条件下的土壤有机氮矿化 (Bridgham et al., 1998)。旱地土壤中存在大量的硫酸盐和氧化态的铁和锰, 当土壤空气中的 O_2 被置换清除后, 这些氧化态的物质有可能成为有机质降解的主要电子受体, 使其厌氧矿化产生 NH_4^+ ; 三是死亡微生物细胞溶解释放; 四是厌氧条件下的非共生固氮 (Rice and Paul, 1972; Swerts et al., 1996a, 1996b)。

此外, 100N 处理中的 SMBN 变化量比 NH_4^+ -N 增加量少, 也不能排除是测定误差所致。本研究给出 SMBN 含量时, 没有对 SMBN 测定结果进行提取率校正, 因为不同土壤的提取率通常存在差异, 而目前我们尚不能确定测定土壤的准确提取率。由此可能使给出的数据比实际值偏小, SMBN 含量越高, 偏差量可能越大。

4.4 反硝化产物摩尔比 [NO/N_2O 、 $NO/(N_2O+N_2)$ 和 N_2O/N_2]

NO/N_2O 摩尔比是否大于 1, 一直作为土壤的排放 NO 和 N_2O 来自于硝化作用还是反硝化作用的判据。一般认为, 如果 NO/N_2O 摩尔比 <1 , 是反硝化作用占主导 (Anderson and Levine, 1986)。本研究中, 10N 和 100N 两处理在整个培养过程中反硝化中间产物排放总量的 NO/N_2O 摩尔比分别为 1.2 和 1.5, 两者无显著差异, 但却都显著高于 1.0 ($p < 0.001$), 这与以往对于反硝化中间产物比的认识不一致。基于厌氧条件下液体培养基培养反硝化细菌和硝化细菌的试验结果, Anderson and Levine (1986) 发现, 硝化细菌作用下形成的 NO/N_2O 摩尔比大于 1, 而反硝化细菌作用下形成的 NO/N_2O 摩尔比却远小于 1。本研究结果表明, 对于置于氮

环境中培养的水分含量约为 53% WFPS 的土壤,其反硝化产物的 $\text{NO}/\text{N}_2\text{O}$ 摩尔比要高于水分饱和的基质(如液体培养基)中的反硝化 $\text{NO}/\text{N}_2\text{O}$ 摩尔比。导致如此差异的原因可能是,在水分不饱的情况下(如本研究培养土壤的情形),反硝化产生的 NO 扩散离开培养基质的过程要比水分饱和条件下(如液体培养基和淹水的情形)快得多,因而被反硝化细菌捕捉并进一步还原为 N_2O (Robertson and Groffman, 2007) 的机会就会小得多,从而导致高于 1.0 的 $\text{NO}/\text{N}_2\text{O}$ 摩尔比。这意味着,不能用 $\text{NO}/\text{N}_2\text{O}$ 摩尔比大于 1 与否来作为土壤排放的 N_2O 和 NO 是主要来源于硝化作用还是反硝化作用的判定依据。

在无 O_2 条件下采用乙炔抑制法测定水分不饱土壤的反硝化速率时,所测得的 N_2O 排放量实际上是反硝化排放的 N_2O 和 N_2 之和。本研究中,10N 和 100N 两处理在整个培养过程中排放气体的 $\text{NO}/(\text{N}_2\text{O} + \text{N}_2)$ 质量比分别为 0.09 和 0.12,后者显著高于前者 ($p < 0.05$)。这意味着,如果像绝大多数研究一样不同时检测 NO 排放,则无 O_2 条件下水分不饱土壤的反硝化速率可能会被乙炔抑制法低估 9%~12%,低估程度因土壤初始 NO_3^- 含量多少而异。

对 $\text{N}_2\text{O}/\text{N}_2$ 摩尔比的测定是估算土壤 N_2 排放的重要指标 (Groffman et al., 2006)。有研究指出,反硝化产物的 $\text{N}_2\text{O}/\text{N}_2$ 摩尔比随土壤初始 NO_3^- 含量的增加而增大 (Focht, 1985; Sahrawat and Keeney, 1986; 范晓晖和朱兆良, 2002)。反硝化的 $\text{N}_2\text{O}/\text{N}_2$ 比大小很大程度上取决于氧化剂 (NO_3^-) 和还原剂 (有效碳) 的相对有效性。当氧化剂 NO_3^- 供应超过反硝化对还原剂有效碳的需求时,反硝化就会因缺少电子而进行不彻底,生成较多中间产物 NO 和 N_2O , 从而导致 $\text{N}_2\text{O}/\text{N}_2$ 比增加;反之,反硝化过程则进行得很彻底,生成较多的终产物 N_2 , 导致 $\text{N}_2\text{O}/\text{N}_2$ 比下降 (Hutchinson and Davidson, 1993)。本研究中 10N 和 100N 两处理的 $\text{N}_2\text{O}/\text{N}_2$ 摩尔比均为 0.19,两者无差异。尽管 100N 处理的 NO_3^- 含量显著高于 10N 处理,但两处理的 $\text{DOC-C}/\text{NO}_3^- \text{N}$ 的摩尔比均 > 1.25 ,反硝化过程的底物碳供应充足,反硝化过程进行彻底,产物以 N_2 为主。除底物 NO_3^- 和 DOC 外,其他环境因子(如土壤氧气状况、温度和湿度、pH 值、质地等)也会影响反硝化产物的 $\text{N}_2\text{O}/\text{N}_2$ 比 (Weier et al., 1993; Dannenmann et al., 2008; Cuhel et al., 2010),导致不同情况下的 $\text{N}_2\text{O}/\text{N}_2$

比值差异较大,如 Scheer et al. (2009) 观测到的 $\text{N}_2\text{O}/\text{N}_2$ 比值可在 0.005~0.2 之间变化。

5 结论

本研究的测试结果表明:通过测定反硝化氮素气体——氮气、氧化亚氮和一氧化氮的排放速率动态, Wang et al. (2011) 新建的氮环境培养-气体同步直接测定系统和方法回收培养土壤中消失的 NO_3^- 的 81%~87%;结合土壤无机氮和微生物氮含量测定,该方法可使培养前后的氮平衡率达 92%~95%;在氮底物比较充分时,反硝化阶段排放的二氧化碳与反硝化氮素气体总量的摩尔比与反硝化反应的理论值具有较好的一致性。这些充分显示,该新建系统和测定方法对土壤反硝化过程的测定具有很好的可靠性,为定量研究土壤反硝化过程提供了有效的直接测定手段。

致谢 对本研究提供技术支持和帮助的有中国科学院大气物理研究所的刘广仁、张文、王迎红、廖婷婷、李宝江、罗献宝等,谨此致谢!

参考文献 (References)

- Anderson I C, Levine J S. 1986. Relative rates of nitric oxide and nitrous oxide production by nitrifiers, denitrifiers, and nitrate respirers [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 51 (5): 938-945.
- 鲍士旦. 2000. 土壤农化分析 [M]. 北京: 中国农业出版社, 49-56. Bao Shidan. 2000. *Soil Agricultural Chemistry Analysis (in Chinese)* [M]. Beijing: China Agriculture Press, 49-56.
- Bollmann A, Conrad R. 1997. Acetylene blockage technique leads to underestimation of denitrification rates in oxic soils due to scavenging of intermediate nitric oxide [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 29 (7): 1067-1077.
- Bridgman S D, Updegraff K, Pastor J. 1998. Carbon, nitrogen, and phosphorus mineralization in northern wetlands[J]. *Ecology*, 79 (5): 1545-1561.
- Butterbach-Bahl K, Willibald G, Papen H. 2002. Soil core method for direct simultaneous determination of N_2 and N_2O emissions from forest soils [J]. *Plant and Soil*, 240 (1): 105-116.
- Cárdenas L M, Hawkins J M B, Chadwick D, et al. 2003. Biogenic gas emissions from soils measured using a new automated laboratory incubation system [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 35 (6): 867-870.
- Caskey M H, Tiedje J M. 1979. Evidence for clostridia as agents of dissimilatory reduction of NO_3^- to NH_4^+ in soils [J]. *Soil Science Society of America Journal*, 43 (5): 931-936.
- Cuhel J, Simek M, Laughlin R J, et al. 2010. Insights into the effect of soil pH on N_2O and N_2 emissions and denitrifier community size and activity

- [J]. Applied and Environmental Microbiology, 76 (6): 1870–1878.
- Dannenmann M, Butterbach-Bahl K, Gasche R, et al. 2008. Dinitrogen emissions and the N₂: N₂O emission ratio of a Rendzic Leptosol as influenced by pH and forest thinning [J]. Soil Biology and Biochemistry, 40 (9): 2317–2323.
- Davidson E A, Seitzinger S. 2006. The enigma of progress in denitrification research [J]. Ecological Applications, 16 (6): 2057–2063.
- 范晓晖, 朱兆良. 2002. 旱地土壤中的硝化—反硝化作用 [J]. 土壤通报, 33 (5): 385–391. Fan Xiaohui, Zhu Zhaoliang. 2002. Nitrification and denitrification in upland soils [J]. Chinese Journal of Soil Science (in Chinese), 33 (5): 385–391.
- Focht D D. 1985. Differences in nitrogen-15 enrichments of evolved nitrous oxide and dinitrogen and the question of a uniform nitrate-15 pool [J]. Soil Science Society of America Journal, 49 (3): 786–790.
- Groffman P M, Altabet M A, Bohlke J K, et al. 2006. Methods for measuring denitrification: diverse approaches to a difficult problem [J]. Ecological Applications, 16 (6): 2091–2122.
- Hutchinson G L, Davidson E A. 1993. Processes for production and consumption of gaseous nitrogen oxides in soil [M] // Harper L A, Mosier A R, Duxbury J M, et al. Agricultural Ecosystem Effects on Trace Gases and Global Climate Change. Madison, WI: ASA Special Publication, 79–93.
- IPCC. 2007. Climate Change 2007: The Physical Scientific Basis [M] // Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Solomon S, Qin D, Manning M, et al., Eds. Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA: Cambridge University Press, 996.
- Jordan T E, Weller D E, Correll D L. 1998. Denitrification in surface soils of a riparian forest: Effects of water, nitrate, and sucrose [J]. Soil Biology and Biochemistry, 30 (7): 833–843.
- Klemmedtsson L, Hansson G, Mosier A. 1990. The use of acetylene for the quantification of N₂ production from biological processes in soil [M] // Revsbech J P, Sorensen J. Denitrification in Soil and Sediment. New York: Plenum Press, 167–180.
- Knowles R. 1982. Denitrification [J]. Microbiological Reviews, 46 (1): 43–70.
- 李明, 梁旺国, 郑循华, 等. 2009. 晋南地区典型盐碱地棉田的 NO 排放特征 [J]. 气候与环境研究, 14 (3): 318–328. Li Ming, Liang Wangguo, Zheng Xunhua, et al. 2009. Characteristics of NO emission from typical saline soil of southern Shanxi cotton land [J]. Climatic and Environmental Research (in Chinese), 14 (3): 318–328.
- 李振高, 潘映华, 伍期途, 等. 1989. 太湖地区水稻土优势反硝化细菌的数量、组成与酶活性 [J]. 土壤学报, 26 (1): 79–86. Li Zhengao, Pan Yinghua, Wu Qitu, et al. 1989. Numbers, compositions and enzyme activities of denitrifiers in paddy soils of Taihu Lake district [J]. Acta Pedologica Sinica (in Chinese), 26 (1): 79–86.
- McCready R G L, Gould W D, Brendregt R W. 1983. Nitrogen isotope fractionation during the reduction of NO₃⁻ to NH₄⁺ by Desulfovibrio sp. [J]. Canadian Journal of Microbiology, 29 (2): 231–234.
- Molstad L, Dörsch P, Bakken L R. 2007. Robotized incubation system for monitoring gases (O₂, NO, N₂O, N₂) in denitrifying cultures [J]. Journal Microbiological Methods, 71 (3): 202–211.
- Nömmik H. 1956. Investigations on denitrification in soil [J]. Acta Agriculturae Scandinavica, 6 (2): 195–228.
- Reddy K R, DeLaune R D. 2008. Biogeochemistry of Wetlands: Science and Applications [M]. CRC Press: Boca Raton: 136–151.
- Rice W A, Paul E A. 1972. The organisms and biological processes involved in asymbiotic nitrogen fixation in waterlogged soil amended with straw [J]. Canadian Journal of Microbiology, 18 (6): 715–723.
- Robertson G P, Groffman P M. 2007. Nitrogen Transformations [M] // Paul E A. Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry. 3rd ed. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo: Elsevier, 341–364.
- Sahrawat K L, Keeney D R. 1986. Nitrous oxide emission from soils [J]. Advance in Soil Science, 4: 103–148.
- Scheer C, Wassmann R, Butterbach-Bahl K, et al. 2009. The relationship between N₂O, NO, and N₂ fluxes from fertilized and irrigated dryland soils of the Aral Sea Basin, Uzbekistan [J]. Plant Soil, 314 (1–2): 273–283.
- Scholefield D, Hawkins J M B, Jackson S M. 1997a. Development of a Helium atmosphere soil incubation technique for direct measurement of nitrous oxide and dinitrogen fluxes during denitrification [J]. Soil Biology and Biochemistry, 29 (9–10): 1345–1352.
- Scholefield D, Hawkins J M B, Jackson S M. 1997b. Use of a flowing helium atmosphere incubation technique to measure the effects of denitrification controls applied to intact cores of a clay soil [J]. Soil Biology and Biochemistry, 29 (9–10): 1337–1344.
- Simarmata T, Benkiser G, Ottow J C G. 1993. Effect of an increasing carbon: nitrate-N ratio on the reliability of acetylene in blocking the N₂O-reductase activity of denitrifying bacteria in soil [J]. Biology and Fertility of Soils, 15 (2): 107–112.
- Stefanson R C, Greenlan D J. 1970. Measurement of nitrogen and nitrous oxide evolution from soil-plant systems using sealed growth chambers [J]. Soil Science, 109 (3): 203–206.
- Swerts M, Uytterhoeven G, Merckx R, et al. 1995. Semicontinuous measurement of soil atmosphere gases with gas-flow soil core method [J]. Soil Science Society of America Journal, 59 (5): 1336–1342.
- Swerts M, Merckx R, Vlassak K. 1996a. Denitrification, N₂-fixation and fermentation during anaerobic incubation of soils amended with glucose and nitrate [J]. Biology and Fertility of Soils, 23 (3): 229–235.
- Swerts M, Merckx R, Vlassak K. 1996b. Denitrification followed by N₂ fixation during anaerobic incubation [J]. Soil Biology and Biochemistry, 28 (1): 127–129.
- Swerts M, Merckx R, Vlassak K. 1996c. Influence of carbon availability on the production of NO, N₂O, N₂, CO₂ by soil cores during anaerobic incubation [J]. Plant and Soil, 181 (1): 145–151.
- Sparling G P, West A W. 1988. Modifications to the fumigation-extraction technique to permit simultaneous extraction and estimation of soil microbial-C and microbial-N [J]. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 19 (3): 327–344.
- Tiedje J M. 1988. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium [M] // Zehnder A J B. Biology of Anaerobic Microorganisms. New York: Wiley.
- Wang R, Willibald G, Feng Q, et al. 2011. Measurements of N₂, N₂O, NO

- and CO₂ emissions from soils with the gas-flow-soil-core technique [J]. *Environmental Science and Technology*, 45 (14): 6066–6072.
- Weier K L, Doran J W, Power J F, et al. 1993. Denitrification and the dinitrogen/nitrous oxide ratio as affected by soil water, available carbon, and nitrate [J]. *Soil Science Society of America Journal*, 57 (1): 66–72.
- Yao H, Conrad R, Wassmann R, et al. 1999. Effect of soil characteristics on sequential reduction and methane production in sixteen rice paddy soils from China, the Philippines, and Italy [J]. *Biogeochemistry*, 47 (3): 269–295.
- Yoshinari T, Knowles R. 1976. Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction by denitrifying bacteria [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 69 (3): 705–710.
- Zheng X H, Mei B L, Wang Y H, et al. 2008. Quantification of N₂O fluxes from soil-plant systems may be biased by the applied gas chromatograph methodology [J]. *Plant and Soil*, 311 (1–2): 211–234.