

崇明东滩湿地 CH_4 与 N_2O 双消减的耦合过程研究

陈汉, 饶旭东, 滕钊军, 张耀鸿, 贾仲君

引用本文:

陈汉, 饶旭东, 滕钊军, 张耀鸿, 贾仲君. 崇明东滩湿地 CH_4 与 N_2O 双消减的耦合过程研究[J]. 农业环境科学学报, 2023, 42(11): 2604–2613.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2023-0606>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

围垦对滨海稻田土壤 N_2O 还原潜力的影响

汪方圆, 张耀鸿, 饶旭东, 谢晴, 贾仲君

农业环境科学学报. 2020, 39(11): 2668–2674 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0533>

巢湖圩区再生稻田甲烷及氧化亚氮的排放规律研究

王天宇, 樊迪, 宋开付, 张广斌, 徐华, 马静

农业环境科学学报. 2021, 40(8): 1829–1838 <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0181>

有机无机肥配施对苹果园温室气体排放的影响

马艳婷, 赵志远, 冯天宇, SOMPOUVISETThongsouk, 孔旭, 翟丙年, 赵政阳

农业环境科学学报. 2021, 40(9): 2039–2048 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-1477>

不同水分对半干旱地区砂壤土温室气体排放的短期影响

李平, 魏玮, 郎漫

农业环境科学学报. 2021, 40(5): 1124–1132 <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-1377>

稻田土壤 CH_4 排放及其关联微生物功能基因丰度对磺胺二甲嘧啶和铜污染的响应

程粟裕, 朱长俊, 李昕钰, 董宁, 周金蓉, 蒋静艳

农业环境科学学报. 2021, 40(10): 2246–2256 <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0212>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

陈汉, 饶旭东, 滕钊军, 等. 崇明东滩湿地 CH₄ 与 N₂O 双消减的耦合过程研究[J]. 农业环境科学学报, 2023, 42(11): 2604-2613.

CHEN H, RAO X D, TENG Z J, et al. Coupling process of CH₄ and N₂O double reduction in the Chongming Dongtan Wetland, China [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2023, 42(11): 2604-2613.

崇明东滩湿地 CH₄ 与 N₂O 双消减的耦合过程研究

陈汉^{1,2}, 饶旭东¹, 滕钊军^{1,2}, 张耀鸿^{1*}, 贾仲君²

(1. 南京信息工程大学应用气象学院/江苏省农业气象重点实验室, 南京 210044; 2. 中国科学院南京土壤研究所土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 南京 210008)

摘要: N₂O 还原驱动的 CH₄ 厌氧氧化作用(AOM)是湿地系统温室气体双减排的一种新途径, 而基于滨海围垦开发的稻田利用方式对该途径的影响效应尚不清楚。本研究选取长江入海口崇明东滩湿地的自然滩涂(光滩湿地和芦苇湿地)和围垦稻田(围垦稻 19 a 和 86 a)为研究对象, 设置 3 个试验处理(¹³CH₄, ¹³CH₄+N₂O, N₂O)进行室内厌氧培养。采用稳定性同位素标记结合定量 PCR 等手段, 分析不同湿地土壤的 N₂O 型 CH₄ 厌氧氧化速率及其固碳潜力, 研究其相关功能基因的数量特征。结果发现, 围垦稻田土壤中 N₂O 驱动的 AOM 速率为 6.10~7.51 ng·g⁻¹·d⁻¹, 显著高于自然滩涂湿地。供试土壤 N₂O 驱动 CH₄ 厌氧氧化的 ¹³C-SOC 固碳量为 18.1~49.4 nmol·g⁻¹, 表明该过程具有较强的固碳潜力。¹³CH₄+N₂O 添加条件下, 供试土壤中硝酸盐型和硫酸盐型 CH₄ 厌氧氧化古菌的 *mcrA* 功能基因丰度分别为 (1.08~2.29)×10⁷ copies·g⁻¹ 和 (2.55~14.30)×10⁷ copies·g⁻¹, 比只添加 ¹³CH₄ 处理分别高出 25.8%~64.1% 和 41.0%~50.1%; 相反, 亚硝酸盐型 CH₄ 厌氧氧化细菌的 *pmoA* 功能基因丰度则无明显变化。相关性分析发现 N₂O 驱动的 AOM 速率与 *nosZ* II 基因和硝酸盐型 *mcrA* 基因均呈显著正相关, 表明 *nosZ* II 型 N₂O 还原微生物和硝酸盐型 CH₄ 厌氧氧化古菌可能共同参与了 N₂O 驱动的 CH₄ 厌氧氧化过程, 而硫酸盐型 CH₄ 厌氧氧化古菌则在自然滩涂湿地中发挥着重要作用。研究表明, 围垦植稻在一定程度上促进了 N₂O 驱动的 CH₄ 厌氧氧化作用。

关键词: 滨海湿地; CH₄ 厌氧氧化; N₂O 还原; 耦合反应; *mcrA* 基因; *nosZ* II 基因

中图分类号: X144 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2023)11-2604-10 doi:10.11654/jaes.2023-0606

Coupling process of CH₄ and N₂O double reduction in the Chongming Dongtan Wetland, China

CHEN Han^{1,2}, RAO Xudong¹, TENG Zhaojun^{1,2}, ZHANG Yaohong^{1*}, JIA Zhongjun²

(1. School of Applied Meteorology/Jiangsu Provincial Key Laboratory of Agricultural Meteorology, Nanjing University of Information Science and Technology, Nanjing 210044, China; 2. State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

Abstract: Anaerobic oxidation of methane (AOM) driven by N₂O reduction is a new pathway for greenhouse gas reduction in wetland systems; however the effect on paddy field utilization after the reclamation of coastal natural wetland using this pathway is unclear. In this study, three experimental treatments (¹³CH₄, ¹³CH₄+N₂O, and N₂O) were set up for anaerobic incubation of natural coastal wetlands (bare wetlands and reed wetlands) and reclaimed rice fields (19 and 86 years of rice cultivation) in the Chongming Dongtan Natural Wetland in the Yangtze River Estuary. Stable isotope labelling combined with quantitative PCR was used to analyze AOM rates driven by N₂O reduction and its carbon sequestration potential in different wetland soils, and to study the quantitative characteristics of their related functional genes. The rates of CH₄ anaerobic oxidation driven by N₂O reduction in the reclaimed paddy fields ranged from 6.10 ng·g⁻¹·d⁻¹ to 7.51 ng·g⁻¹·d⁻¹, much higher than those in natural marsh wetlands. The sequestered organic carbon (¹³C-SOC) derived from anaerobic CH₄

收稿日期: 2023-07-30 录用日期: 2023-09-27

作者简介: 陈汉(1999—), 男, 安徽来安人, 硕士研究生, 主要从事土壤温室气体减排研究。E-mail: 202212330011@nuist.edu.cn

*通信作者: 张耀鸿 E-mail: yhzhang@nuist.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目(42377295, 42175138, 41671247)

Project supported: The National Natural Science Foundation of China(42377295, 42175138, 41671247)

oxidation driven by N₂O reduction was 18.1–49.4 nmol·g⁻¹, indicating the strong carbon sequestration potential of the process. For nitrate- and sulfate-dependent anaerobic CH₄-oxidizing archaea in the tested soils, *mcrA* numbers under ¹³CH₄+N₂O addition conditions ranged from (1.08–2.29)×10⁷ copies·g⁻¹ and (2.55–14.30)×10⁷ copies·g⁻¹, which were 25.8%–64.1% and 41.0%–50.1% higher than those under ¹³CH₄ treatment, respectively. In contrast, *pmoA* numbers of nitrite-dependent CH₄ anaerobic oxidizing bacteria did not change significantly between the two addition treatments. Correlation analysis revealed that N₂O-dependent AOM rates were significantly and positively correlated with both *nosZ* II and the nitrate-dependent *mcrA* numbers, suggesting that *nosZ* II N₂O-reducing microorganisms and nitrate-dependent anaerobic CH₄-oxidizing archaea may jointly participate in the coupling reaction of anaerobic CH₄ oxidation and N₂O reduction, whereas sulfate-dependent anaerobic CH₄-oxidizing archaea play an important role in natural coastal wetlands. In conclusion, the reclamation of coastal wetlands into paddy fields promotes the N₂O-driven anaerobic CH₄ oxidation process, which makes a remarkably positive contribution to the dual reduction of CH₄ and N₂O in coastal wetlands.

Keywords: coastal wetland; anaerobic CH₄ oxidation; N₂O reduction; coupling reaction; *mcrA*; *nosZ* II

甲烷是一种重要的温室气体,其增温潜能是等物质量CO₂的28倍,对全球温室效应的贡献率超过20%^[1]。陆地生态系统中CH₄的消减过程主要是由微生物介导的CH₄氧化作用实现的。该过程可分为两大类:一类是微生物利用O₂分子作为电子受体氧化CH₄以获取碳源和能量的甲烷好氧化作用;一类是以NO₂⁻、NO₃⁻、SO₄²⁻等为电子受体的甲烷厌氧氧化作用^[2]。目前,甲烷厌氧氧化过程在稻田、河床、滨海、湖泊、污泥、深海等环境中均有报道^[3–6],在陆地系统CH₄消减过程中发挥着重要作用。

研究发现,在滨海湿地和河床底泥中发生甲烷厌氧氧化作用的同时伴随有N₂O还原过程^[7–8],推测N₂O可能作为电子受体进行还原,耦合驱动CH₄厌氧氧化作用^[9]。这表明自然界中CH₄厌氧氧化作用能以多种物质为电子受体驱动进行,具有电子传递多样性的特征。另一方面,N₂O还原过程作为反硝化的最后一步,是控制N₂O排放通量的关键过程之一。这个还原过程由氧化亚氮还原酶(*Nos*)催化进行,该酶的编码基因*nosZ*包括以完全反硝化细菌为主的典型*nosZ* I和以非反硝化菌为主的非典型*nosZ* II,后者表现出更为鲜明的物种、代谢多样性^[10–13]。这可能为N₂O还原与CH₄厌氧氧化协同耦合反应提供了生物学基础。

滨海湿地处于海陆交错带,具有海洋性和陆地性双重特征;随着经济的发展和人口的增长,滨海湿地围垦造田成为解决土地问题的有效途径^[14–15]。崇明东滩湿地是我国长江口发育最完善的河口型滩涂湿地,先后开展了多次围垦造田工程,形成了一系列不同年限的围垦稻田^[16–17]。这种土地利用方式驱动的土壤生物地球化学过程的变化,对滨海湿地CH₄和N₂O的排放过程可能会产生深刻影响^[18]。尽管有关滨海湿地CH₄氧化过程、反硝化过程的研究已有大量报道^[19–20],但是从CH₄厌氧氧化和N₂O还原两个角度

研究滨海湿地C、N转化过程及其温室气体减排机理的研究尚未见报道。这种耦合反应是否在该区域真实发生,其相关的微生物如何变化?这些科学问题的探索对于深入了解滨海湿地生物地球化学过程及其温室气体减排机理至关重要。

本研究选取上海崇明东滩的滨海滩涂湿地和毗邻的围垦稻田为研究对象,采用¹³CH₄稳定性同位素标记结合分子生物学技术,对比研究自然湿地和不同年限围垦稻田CH₄厌氧氧化与N₂O还原作用的分异规律及其功能基因数量特征,阐明滨海湿地CH₄厌氧氧化与N₂O还原的耦合特征及机理,为深入了解人类活动影响下滨海湿地生物地球化学过程演变及缓解全球气候变化提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

试验土壤样品采自上海市崇明岛东滩湿地和围垦区稻田(31.6°N,121.8°E),所属气候为典型亚热带季风气候,年平均气温为15.3℃,年平均降水量为1 003.7 mm。选取自然保护区内光滩湿地记作GT和芦苇湿地记作LW。毗邻保护区以西为围垦稻田区。选取围垦19 a和86 a的稻田分别记作WK19和WK86。不同围垦年限样点的选择依据相关文献选取^[21]。该区域农田为稻麦轮作方式,所用水稻品种为南粳46号,小麦品种为扬麦16号。其中,稻田采用直播方式种植,6月中旬播种,11月初成熟收割。稻田水分管理采用当地传统灌溉方式:水稻分蘖期后实行淹水-烤田-湿润灌溉相结合进行。播种前施用600 kg·hm⁻²三元复合肥(N-P-K为24-8-10)作基肥,7月中旬施用225 kg·hm⁻²尿素作分蘖肥。病虫害、杂草防治等其他田间管理措施与当地高产大田一致。

选取样点的位置坐标分别为:光滩样点(31°30′

13°N, 121°59'13"E); 芦苇样点 (31°29'56"N, 121°58'44"E); 19 a 样点 (31°29'54"N, 121°56'00"E); 86 a 样点 (31°30'09"N, 121°50'31"E)。在每个样点先选取 50 m×50 m 的采样区, 选用 S 型采样法在采样区选取 6 个点, 每个点位间隔 10~15 m, 以提高样品的代表性。用土钻取 0~20 cm 鲜土, 将 6 个采样点的土壤均匀混合成 1 个样本, 重复 3 次。土样装入冰盒内迅速转移至实验室, 储存于 4 °C 冰箱备用。

1.2 理化性质测定

对采回的土壤样品进行理化性质分析。土壤总有机碳采用浓硫酸-重铬酸钾消煮法测定; 土壤全氮采用半微量凯氏定氮法测定; 土壤铵态氮和硝态氮用 2 mol·L⁻¹ KCl 溶液浸提后, 采用 AA3 流动分析仪 (德国 SEAL 公司) 测定; 土壤 pH 采用水土比为 2.5:1 提取后, 用数字酸度计 (上海雷磁) 测定; 土壤可溶性盐度 (EC) 采用电导法用 EC 计 (上海雷磁) 测定; 土壤硫酸盐采用离子色谱法 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司) 测定。

1.3 CH₄ 氧化速率与 N₂O 净还原速率的测定

每个土样设置 3 个处理: (1)¹³CH₄, (2)¹³CH₄+N₂O, (3)N₂O。具体操作为: 称取 3.000 g 鲜土放入 12 mL 的 Labco 顶空瓶后加入 3 mL 去离子水后盖紧瓶盖, 充分摇晃 60 s 成均匀泥浆, 抽真空 3 min 后充入高纯氩气 (Ar), 重复进行 3 次, 在 25 °C 培养箱中预培养 7 d。预培养结束后, 按照试验处理打入 ¹³CH₄ 200 μL 和 N₂O 800 μL, 再用 Ar 补充使每个培养瓶顶空气体体积均为 7 mL。充分摇晃形成均匀泥浆以及气体达到气液相平衡。立刻采集 100 μL 顶空气体测定 0 时刻 CO₂、CH₄、N₂O 的起始浓度以及 ¹³C-CO₂ 丰度。培养 28 d 后采集顶空气体测定其浓度及 ¹³C-CO₂ 丰度。根据培养始末顶空气中 CO₂ 气体的浓度和丰度计算得出 ¹³CO₂ 产生量, 结合培养时间和土壤质量即可计算出培养期间土壤的 CH₄ 厌氧氧化速率 (R1)。

$$R1 = (C_t \times C_i - C_0 \times 1.08) \times 100 \times V / (V_m \times m \times t)$$

式中: C_t 为培养 t 时刻后的 CO₂ 浓度, μL·L⁻¹; C_i 为培养 t 时刻后顶空气体中的 ¹³C-CO₂ 丰度, %; C_0 为零时刻顶空气体中的 CO₂ 浓度, μL·L⁻¹; V 为培养瓶顶空体积, L; V_m 为标准状态下气体摩尔体积, L·mol⁻¹; m 为土壤干土质量, g; t 为培养时间, d。

同理, 根据培养始末顶空气中 N₂O 气体的变化量计算出 N₂O 净还原速率 (R2)。

$$R2 = (C_0 - C_t) \times V / (V_m \times m \times t)$$

式中: C_0 为零时刻顶空气体中的 N₂O 浓度, μL·L⁻¹; C_t

为培养 t 时刻后的 N₂O 浓度, μL·L⁻¹。

1.4 土壤有机碳 ¹³C 丰度分析

培养结束后, 测定土壤有机碳含量及 ¹³C-SOC 丰度。先打开 Labco 瓶盖, 用注射器将上覆水抽走, 再加入 2 mol·L⁻¹ 的 HCl 溶液进行酸化处理, 盖上瓶盖摇晃后转移至 15 mL 的离心管中, 再用 5 mL HCl 溶液冲洗 Labco 瓶, 将残留泥浆全部转移至离心管中, 静置过夜以去除土壤中的无机碳。第 2 天, 将泥浆上层的 HCl 溶液排掉, 加 8 mL 纯净水盖上瓶盖剧烈摇晃, 以 3 000 r·min⁻¹ 离心 5 min。如此重复 3 次, 将土壤中的 Cl⁻ 清洗干净。将土壤进行冷冻干燥, 结束后磨碎过 2 mm 筛, 测定土壤有机碳含量, 再用同位素质谱仪 (Isoprime100) 测定该土壤有机碳的 ¹³C 丰度值。根据此有机碳含量及其 ¹³C 丰度值可计算出培养结束时土壤的 ¹³C-SOC 总增量, 再减去培养开始时土壤的 ¹³C-SOC 本底值, 即为整个培养阶段产生的 ¹³C-SOC 净增量。

1.5 荧光定量 PCR 分析

目前认为, 自然界中驱动 CH₄ 厌氧氧化过程的主要功能微生物类群包括: 介导亚硝酸盐型甲烷厌氧氧化的 *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* 细菌 (*M. oxyfera*), 介导硝酸盐型甲烷厌氧氧化的 *Candidatus Methanoperedens nitroreducens* 古菌 (*M. nitroreducens*), 和介导硫酸盐型甲烷厌氧氧化的 anaerobic methanotrophic archaea 古菌 (ANME)。本试验对这 3 种微生物 CH₄ 厌氧氧化关键酶的功能基因进行定量 PCR 分析。

将野外采集的原状鲜土冷冻干燥后, 采用 FastDNA Spin Kit for Soil 试剂盒 (MP Biomedicals, 美国) 提取土壤微生物基因组 DNA。称取 0.5 g 土样, 按照说明书的步骤提取土壤微生物总 DNA, 溶解于 100 μL 无菌 TE 缓冲液 (10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol·L⁻¹ EDTA, pH 8.0)。通过微量紫外分光光度计 (Nano-Drop ND-1000, 美国) 测定 DNA 浓度和纯度, 并利用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性, 满足条件后用于 qPCR 分析。

实时 PCR 扩增所用仪器为 CFX96 Real-Time PCR System (Bio-Rad 公司)。标准曲线分别用所测功能基因的质粒为模板, 并将其连续稀释 8 个数量级配制。定量 PCR 扩增反应体系为 20 μL, 包括: 10 μL 的 SYBR Premix Ex Taq™, 1.0 μL 土壤总 DNA 模板, 上、下游引物 (10 pmol·μL⁻¹) 各 0.5 μL, 加灭菌水至 20 μL。nosZ、pmoA、mcrA 等基因 PCR 引物及 qPCR 的循环条件见表 1。所有样品重复 3 次, 并采用灭菌双蒸水代替 DNA 作为反应模板设置阴性对照。

1.6 数据处理分析

采用SPSS 25.0软件进行数据的统计分析。CH₄氧化速率、N₂O净还原速率、基因拷贝数的差异性比较采用方差分析和最小差值法表示。CH₄氧化速率、N₂O净还原速率与功能基因丰度的相互关系采用线性回归分析拟合。图形制作采用Excel 2019和Origin 2022软件完成。

2 结果与分析

2.1 湿地土壤理化性质的演变特征

滨海湿地不同采样点间的土壤理化性质差异较大。如表2所示,芦苇湿地(LW)土壤的SOC含量显著高于光滩湿地(GT),围垦86 a稻田的SOC含量(WK86)显著高于围垦19 a稻田,也显著高于芦苇湿地土壤。LW土壤的TN含量显著高于其他3个湿地土壤,而WK86稻田的TN含量远高于WK19稻田土壤。对于NH₄⁺和NO₃⁻而言,WK86稻田土壤的含量均显著高于其他3个湿地土壤,而LW湿地的含量则显著高于GT湿地和WK19稻田。4个采样点土壤的pH值变化范围为7.25~7.86,且随着采样点远离海岸线而显著降低。EC值和SO₄²⁻含量的变化范围分别为0.74~5.07 mS·cm⁻¹和196~797 mg·kg⁻¹,两者也随着采样点远离海岸线而显著降低。从pH值、EC值和SO₄²⁻

含量的变化特征可以看出,从光滩湿地到围垦86 a稻田,其湿地土壤理化性质的陆地性特征逐渐增强,海洋性特征逐渐减弱。

2.2 CH₄厌氧氧化速率和N₂O净还原速率变化特征

2.2.1 顶空气体¹³C-CO₂丰度值变化

厌氧培养28 d后,培养瓶顶空气体¹³CO₂丰度值发生了明显变化(图1)。其¹³CO₂丰度值均远大于大气¹³CO₂自然丰度值(1.08%),说明土壤中发生了厌氧氧化过程。在只添加¹³CH₄条件下,WK86稻田的¹³CO₂丰度值为最高,达到1.41%,而LW湿地则最低,仅为1.19%。4个湿地土壤中,在添加¹³CH₄+N₂O条件下其¹³CO₂丰度值均显著高于只添加¹³CH₄处理,增幅范围达到6.4%~8.9%,这说明添加N₂O显著提高了供试土壤顶空气体CO₂的丰度值。

2.2.2 CH₄厌氧氧化速率

根据顶空气体中CO₂浓度和¹³CO₂丰度值可计算出培养土壤的CH₄厌氧氧化速率(图2a)。添加¹³CH₄处理下,WK86稻田土壤的CH₄厌氧氧化速率为15.08 ng·g⁻¹·d⁻¹,显著高于其他3个湿地土壤。而WK19稻田的CH₄厌氧氧化速率为11.01 ng·g⁻¹·d⁻¹,显著高于光滩湿地土壤,低于芦苇湿地土壤。添加¹³CH₄+N₂O处理下,4个湿地土壤CH₄厌氧氧化速率的变化特征与只添加¹³CH₄处理土壤基本一致:其中,

表1 qPCR引物及循环条件

Table 1 List of primers and thermal cycling conditions used for *pmoA*, *mcrA* and *nosZ* genes

基因 Gene	引物 Primer	循环条件 Thermal cycling condition
<i>pmoA</i>	Cmo182(5'-TCA CGT TGA CGC CGA TCC-3') Com568(5'-GCACATACTCCATCCCATC-3')	94 °C for 5 min, 30×[95 °C for 45 s, 56 °C for 50 s, 72 °C for 50 s], 72 °C for 5 min
硝酸盐型 <i>mcrA</i>	McrA159F(5'-AAA GTG CGG AGC AGC AAT CAC C-3') McrA345R(5'-TCG TCC CAT TCC TGC TGC ATT GC-3')	50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min, 40 × [95 °C for 30 s, 57 °C for 45 s, 72 °C for 50 s]
硫酸盐型 <i>mcrA</i>	(5'-GCT CTA CGA CCA GAT MTG GCT TGG-3') (5'-CCG TAG TAC GTG AAG TCA TCC AGC A-3')	95 °C for 5 min, 35×[95 °C for 1 min, 55 °C for 45 s, 72 °C for 45 s], 72 °C 10 min
<i>nosZ</i> I	1840F(5'-CGC RAC GGC AAS AAG GTS MSS GT-3') 2090R(5'-CAK RTG CAK SGC RTG GCA GAA-3')	95 °C for 5 min; 95 °C for 15 s, 65~60 °C(-1 °C /cycle) for 30 s, 60 °C for 30 s
<i>nosZ</i> II	<i>nosZ</i> II F(5'-CTI GGI CCI YTK CAY AC-3') <i>nosZ</i> II R(5'-GCI GAR CAR AAI TCB GTR C-3')	95 °C for 5 min, 95 °C for 30 s, 54 °C for 60 s, 72 °C for 60 s × 35cycles

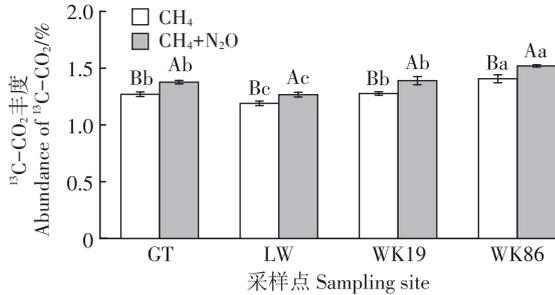
表2 湿地土壤理化性质的变化

Table 2 Changes in physicochemical properties of wetland soils

处理 treatment	有机碳 SOC/(g·kg ⁻¹)	总氮 TN/(g·kg ⁻¹)	氨态氮 NH ₄ ⁺ /(mg·kg ⁻¹)	硝态氮 NO ₃ ⁻ /(mg·kg ⁻¹)	pH	电导率 EC/(mS·cm ⁻¹)	硫酸盐 SO ₄ ²⁻ /(mg·kg ⁻¹)
GT	7.95±0.55d	0.86±0.07c	6.38±0.36c	6.39±0.32d	7.86±0.42a	5.07±0.22a	797±38a
LW	13.55±0.98b	1.20±0.09a	15.77±1.25b	10.83±0.73b	7.67±0.38b	4.80±0.21b	578±45b
WK19	9.55±0.81c	0.77±0.06d	5.46±0.35d	8.86±0.61c	7.44±0.41c	1.84±0.11c	328±26c
WK86	18.34±1.39a	1.12±0.06b	16.25±1.21a	14.11±0.91a	7.25±0.23d	0.74±0.07d	196±15d

注:同一列不同字母表示在P<0.05水平差异显著。

Note: Different letters in the same column indicate significant differences at the P<0.05 level.



不同大写字母表示同一采样点不同处理间具有显著性差异,不同小写字母表示同一处理不同采样点具有显著性差异($P < 0.05$)。下同。Different capital letters indicate significant differences between treatments at the same sampling site, and different lowercase letters indicate significant differences among sampling sites for the same treatment ($P < 0.05$). The same below.

图1 不同土壤培养瓶中顶空气体¹³C-CO₂丰度值变化
Figure 1 ¹³C-CO₂ abundance in different soils

WK86稻田土壤的CH₄厌氧氧化速率为22.59 ng·g⁻¹·d⁻¹,显著高于其他3个湿地土壤,而光滩湿地的CH₄厌氧氧化速率为13.04 ng·g⁻¹·d⁻¹,显著低于芦苇湿地和WK86稻田。通过比较两个添加处理(¹³CH₄和¹³CH₄+N₂O)下土壤CH₄厌氧氧化速率的变化量,可计算出由N₂O驱动的CH₄厌氧氧化速率(图2b)。其中,WK19和WK86的N₂O型CH₄厌氧氧化速率分别为6.10 ng·g⁻¹·d⁻¹和7.51 ng·g⁻¹·d⁻¹,显著高于自然湿地土壤,比光滩湿地分别提高了21.8%和50.0%。由此可见,滨海湿地土壤中可进行由N₂O驱动的CH₄厌氧氧化过程,其氧化速率随围垦年限增长有逐渐增大的趋势。

2.2.3 土壤N₂O净还原速率变化

根据培养期间顶空气中N₂O浓度变化量可计算出土壤N₂O净还原速率(图3)。可以看出,土壤N₂O净还原速率范围为9.02~19.05 μg·g⁻¹·d⁻¹,比其CH₄厌氧氧化速率高出3个数量级,说明培养期间土壤N₂O还原过程远比CH₄厌氧氧化过程强烈得多。其中,只添加N₂O处理下,GT和LW湿地的N₂O净还原速率分别为16.04 μg·g⁻¹·d⁻¹和19.05 μg·g⁻¹·d⁻¹,显著高于围垦稻田土壤9.02 μg·g⁻¹·d⁻¹和14.13 μg·g⁻¹·d⁻¹。

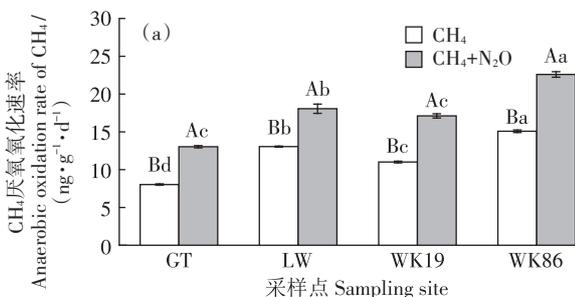


图2 不同土壤CH₄厌氧氧化速率(a)与N₂O驱动的CH₄厌氧氧化速率(b)

Figure 2 CH₄ anaerobic oxidation rates of different soils(a) and N₂O-driven CH₄ anaerobic oxidation rates(b)

d⁻¹。围垦稻田土壤中,WK86稻田的N₂O净还原速率显著高于WK19稻田。与添加N₂O处理相比,添加CH₄+N₂O处理下LW、WK19、WK86三个湿地土壤的N₂O还原速率均无显著变化,说明添加CH₄气体对这些土壤N₂O还原速率无明显影响,以土壤本底的活性有机碳为电子供体的N₂O还原过程可能占主导地位。

2.3 土壤有机碳的¹³C丰度变化

由土壤的¹³C-SOC丰度和SOC浓度计算得出其¹³C-SOC净增量(图4)。添加¹³CH₄处理下,围垦稻田的土壤¹³C-SOC净增量显著低于自然湿地。添加¹³CH₄+N₂O处理下,各湿地土壤¹³C-SOC净增量的变化特征与添加¹³CH₄处理土壤一致,自然湿地土壤显著高于围垦稻田。与只添加¹³CH₄处理相比,添加¹³CH₄+N₂O处理的GT、LW、WK19和WK86显著增加了湿地土壤的¹³C-SOC净增量,分别提高了107%、131%、91%和83%。

2.4 功能基因qPCR分析

2.4.1 CH₄厌氧氧化相关功能基因

本试验对*M. oxyfera*细菌、*M. nitroreducens*古菌和ANME古菌的3种微生物CH₄厌氧氧化关键酶的功能基因进行了定量PCR分析(图5)。从图5a可以看出,添加¹³CH₄处理下,光滩和芦苇湿地土壤的*M. oxyfera*细菌甲烷厌氧氧化酶的*pmoA*功能基因拷贝数分别为

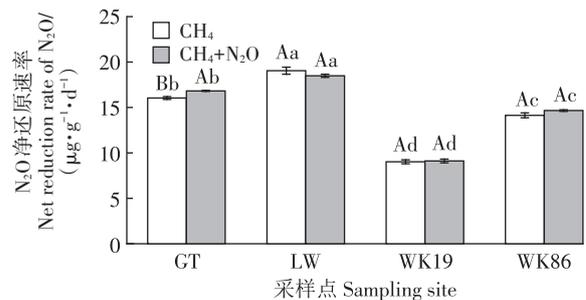
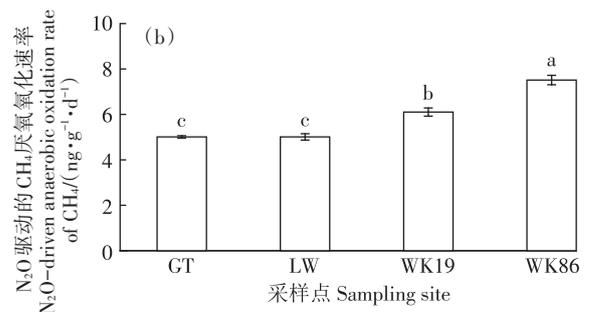
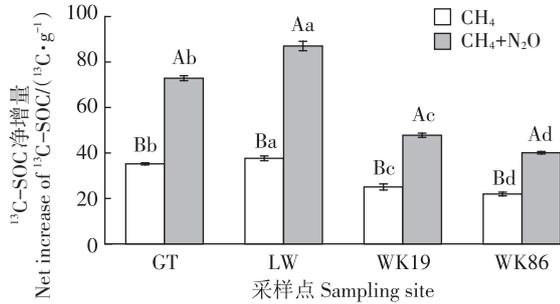


图3 土壤N₂O净还原速率变化

Figure 3 Variation of net N₂O reduction rates in different soils



图4 不同土壤¹³C-SOC净增量Figure 4 Net increase of ¹³C-SOC in different soils

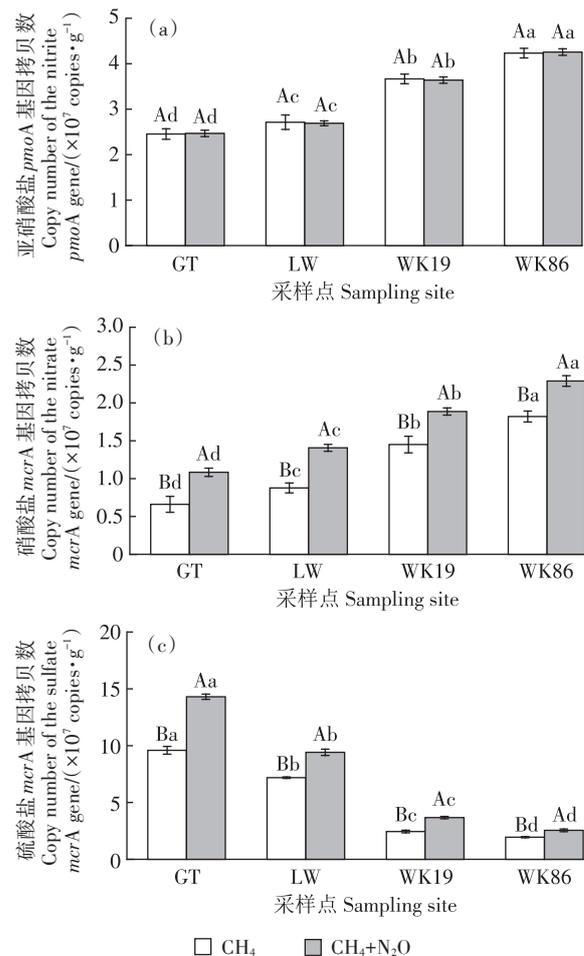
2.45×10⁷ copies·g⁻¹和2.71×10⁷ copies·g⁻¹,显著低于围垦稻田土壤的基因拷贝数3.67×10⁷ copies·g⁻¹和4.23×10⁷ copies·g⁻¹;4个土壤的*pmoA*基因拷贝数表现为从低滩位光滩到高滩位围垦稻田呈陆向性方向递增趋势。与添加¹³CH₄处理相比,添加¹³CH₄+N₂O处理对4个湿地土壤的*pmoA*功能基因拷贝数无明显影响,表明添加N₂O底物对*M. oxyfera*细菌数量及其酶活性没有显著影响效应。从图5b可以看出,光滩和芦苇湿地土壤的*M. nitroreducens*古菌甲烷厌氧氧化酶的*mcrA*功能基因拷贝数分别为0.66×10⁷ copies·g⁻¹和0.88×10⁷ copies·g⁻¹,显著低于围垦稻田土壤的基因拷贝数1.45×10⁷ copies·g⁻¹和1.82×10⁷ copies·g⁻¹。与土壤*pmoA*功能基因拷贝数变化趋势一致,4个土壤的*mcrA*基因拷贝数表现为从低滩位光滩到高滩位围垦稻田呈陆向性方向递增趋势。比较2个试验处理发现,添加N₂O气体显著提高了土壤*M. nitroreducens*古菌的数量,其*mcrA*基因拷贝数分别增加了26%、30%、61%和61%,说明N₂O气体对土壤*M. nitroreducens*古菌介导的硝酸盐型甲烷厌氧氧化过程具有显著的促进作用。由图5c可知,添加¹³CH₄处理下,围垦稻田土壤的ANME古菌甲烷厌氧氧化酶的*mcrA*功能基因拷贝数分别为1.95×10⁷ copies·g⁻¹和2.45×10⁷ copies·g⁻¹,显著低于自然湿地土壤的基因拷贝数7.19×10⁷ copies·g⁻¹和9.59×10⁷ copies·g⁻¹,表现为从低滩位湿地到高滩位稻田呈陆向性递减趋势,与*pmoA*基因和硝酸盐型*mcrA*基因拷贝数的变化趋势正好相反。比较2个试验处理发现,添加N₂O气体显著提高了土壤ANME古菌的数量,其硫酸盐型*mcrA*基因拷贝数分别增加了49%、31%、50%和31%,说明添加N₂O对湿地土壤ANME古菌介导的硫酸盐型甲烷厌氧氧化过程具有显著的促进效应。

2.4.2 N₂O还原相关功能基因

目前认为,土壤中N₂O的唯一生物消减途径是携

带有N₂O还原酶的微生物将其转化为N₂,这些微生物可分为具有*nosZ* I基因和*nosZ* II基因两种类型。由图6a可知,只添加N₂O处理下,光滩湿地和芦苇湿地土壤的*nosZ* I基因拷贝数分别为3.27×10⁷ copies·g⁻¹和3.56×10⁷ copies·g⁻¹,显著高于围垦稻田土壤2.56×10⁷ copies·g⁻¹和2.85×10⁷ copies·g⁻¹。在添加¹³CH₄+N₂O处理下,芦苇湿地土壤的*nosZ* I基因拷贝数高达17.78×10⁷ copies·g⁻¹,显著高于其他3个湿地土壤;WK86稻田土壤的*nosZ* I基因拷贝数为8.11×10⁷ copies·g⁻¹,显著高于WK19稻田的5.66×10⁷ copies·g⁻¹,而低于光滩湿地11.02×10⁷ copies·g⁻¹。与添加N₂O处理相比,添加¹³CH₄+N₂O处理显著提高了土壤*nosZ* I基因的拷贝数,分别增加了237%、400%、121%和184%。

由图6b可知,只添加N₂O处理下,围垦稻田土壤的*nosZ* II基因拷贝数分别为4.78×10⁷ copies·g⁻¹和5.01×10⁷ copies·g⁻¹,显著高于GT湿地土壤3.41×10⁷

图5 不同土壤CH₄厌氧氧化关键酶功能基因拷贝数变化Figure 5 Changes in the copy number of functional genes of key enzymes for CH₄ anaerobic oxidation

copies · g⁻¹, 而LW湿地与WK19稻田之间无显著差异。在添加¹³CH₄+N₂O处理下, 围垦稻田土壤的 *nosZ* II 基因拷贝数分别为 19.23 × 10⁷ copies · g⁻¹ 和 29.82 × 10⁷ copies · g⁻¹, 显著高于GT湿地土壤 8.83 × 10⁷ copies · g⁻¹ 和LW湿地土壤 13.26 × 10⁷ copies · g⁻¹, 表现为从低滩位光滩到高滩位围垦稻田呈陆向性递增趋势。与添加N₂O处理相比, 添加¹³CH₄+N₂O处理显著提高了土壤 *nosZ* II 基因的拷贝数, 分别增加了159%、192%、302%和496%, 说明添加¹³CH₄对土壤 *nosZ* II 型N₂O还原酶的数量特征具有明显的促进作用。

2.5 回归性分析

2.5.1 *mcrA* 功能基因与CH₄厌氧氧化速率的回归分析

对N₂O驱动的CH₄氧化速率与硝酸盐型 *mcrA* 基因和硫酸盐型 *mcrA* 基因拷贝数分别进行了回归分析, 结果(图7)发现, N₂O型CH₄氧化速率与硝酸盐型 *mcrA* 基因拷贝数的回归方程达到显著水平 ($P < 0.05$), 其斜率值为2.09, 说明硝酸盐型CH₄厌氧氧化古菌可能是N₂O型CH₄氧化速率变化的重要贡献者之一。N₂O型CH₄氧化速率与硫酸盐型 *mcrA* 基因拷贝数的回归方程也达到了显著水平 ($P < 0.05$), 但其斜率为负值-0.19, 说明硫酸盐型CH₄厌氧氧化古菌是引起N₂O型CH₄氧化速率变化的重要影响因素之一, 在N₂O型CH₄氧化速率较低的低滩位滨海湿地中可能发挥着重要的作用。

2.5.2 *nosZ* 功能基因与N₂O净还原速率、CH₄氧化速率的回归分析

对N₂O净还原速率和N₂O型CH₄氧化速率与 *nosZ* I、*nosZ* II 基因拷贝数分别进行了回归分析, 结果(图8)发现, 湿地土壤N₂O净还原速率与 *nosZ* I 基因拷贝数的回归方程达到显著水平 ($P < 0.05$), 其斜率值为0.67, 说明 *nosZ* I 型N₂O还原微生物可能是引起4个所试湿地土壤N₂O净还原速率变化的主要贡献者。N₂O驱动的CH₄氧化速率与 *nosZ* II 功能基因拷贝数的回归方程达到显著水平 ($P < 0.05$), 这表明 *nosZ* II 型N₂O还原微生物参与了N₂O驱动的CH₄厌氧氧化过程, 是试验土壤N₂O型CH₄氧化速率变化的主要贡献者。

3 讨论

3.1 湿地CH₄厌氧氧化特征

本试验表明滨海湿地土壤中发生了CH₄厌氧氧化过程。运用99%丰度的¹³CH₄底物进行厌氧培养, 可以更为真实地反映CH₄厌氧氧化过程。在喂养¹³CH₄条件下, 培养瓶内顶空¹³CO₂气体的丰度值均

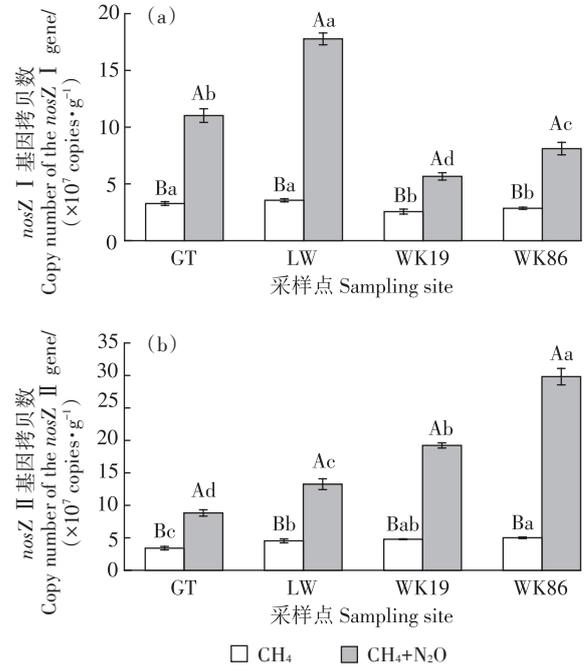


图6 不同土壤N₂O还原相关功能基因拷贝数变化
Figure 6 Copy number variation of functional genes related to N₂O reduction in different soils

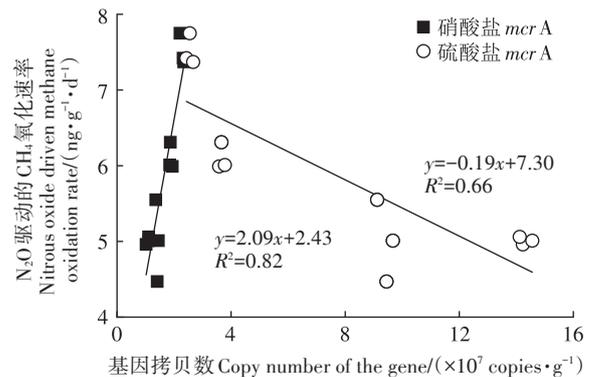
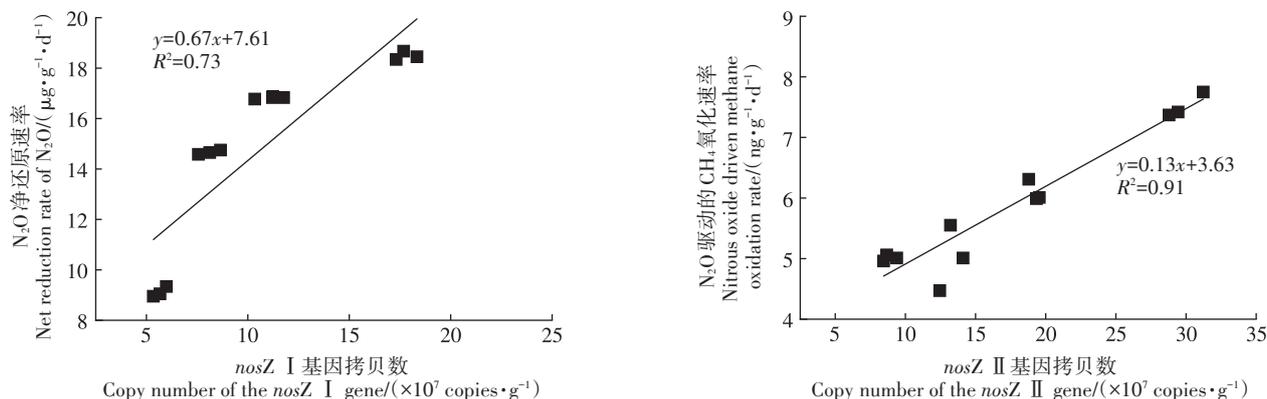


图7 N₂O驱动的CH₄氧化速率与 *mcrA* 功能基因回归分析
Figure 7 Regression analysis of N₂O-driven CH₄ oxidation rate and *mcrA* functional genes

显著高于大气CO₂气体的自然丰度1.08%。这表明试验湿地土壤发生了CH₄厌氧氧化作用, 与之前的报道一致^[22]。有不少研究发现, 在长江入海口湿地、杭州湾湿地和珠江入海口湿地中均发生了CH₄厌氧氧化过程^[5, 23-24]。不仅如此, 在添加¹³CH₄和N₂O条件下, 顶空¹³CO₂气体的丰度值均显著高于只添加¹³CH₄处理的土壤, 表明N₂O促进了CH₄厌氧氧化过程。由此计算出N₂O驱动的CH₄厌氧氧化速率范围为5.01~7.51 ng · g⁻¹ · d⁻¹, 与我们之前的结果基本一致^[25]。Cheng等^[26]发现, 在山东梅河沉积物中CH₄厌氧氧化与N₂O还原可以耦合进行, 其N₂O驱动的CH₄厌氧氧化速率

图8 *nosZ*基因与N₂O净还原速率和CH₄氧化速率的回归分析Figure 8 Regression analysis of N₂O reduction rate and CH₄ oxidation rate with *nosZ* gene

为 $3.41 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,高于本试验的结果。Valenzuela等^[27]采集墨西哥Sisal滨海湿地沉积物进行富集培养,发现富集培养物CH₄厌氧氧化产生的电子可被N₂O还原过程所利用,二者耦合进行,驱动的CH₄厌氧氧化速率高达 $1.3 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。综上结果表明,N₂O作为电子受体可促进CH₄厌氧氧化过程,其驱动的CH₄厌氧氧化速率大小各异,可能与不同湿地类型、不同培养时间有关。

以往研究表明,NO₂⁻、NO₃⁻和SO₄²⁻等可作为电子受体,在相关微生物催化作用下完成甲烷厌氧氧化过程。介导亚硝酸盐型甲烷厌氧氧化的*M.oxofer*细菌,可把CH₄厌氧氧化过程产生的电子传递给电子受体NO₂⁻,将其还原为N₂^[7-8]。目前认为这种细菌只能以NO₂⁻为电子受体催化CH₄分子的厌氧氧化。本试验发现,添加N₂O对所有湿地土壤*M.oxofer*细菌CH₄厌氧氧化的功能基因*pmoA*拷贝数没有影响,说明该类细菌不能还原N₂O这种电子受体,可能不参与N₂O驱动的CH₄厌氧氧化过程。介导硝酸盐型甲烷厌氧氧化的*M.nitroreducens*古菌,可把CH₄厌氧氧化过程产生的电子传递给电子受体NO₃⁻,将其还原为NO₂⁻^[9]。研究发现这类古菌还能以SO₄²⁻、Fe³⁺、AQDS以及腐植酸等为电子受体驱动CH₄厌氧氧化,表现出明显的电子受体底物多样性特征^[28]。本试验中添加N₂O条件下湿地土壤*M.nitroreducens*古菌CH₄厌氧氧化的功能基因*mcrA*拷贝数增加了26%~64%,而且4个湿地土壤的*mcrA*拷贝数与N₂O驱动的CH₄厌氧氧化速率之间呈显著正相关,这表明*M.nitroreducens*古菌可能会以N₂O为电子受体耦合CH₄分子的厌氧氧化。本试验还发现,4个滨海土壤的*M.oxofer*细菌*pmoA*基因拷贝数和*M.nitroreducens*古菌*mcrA*基因拷贝数随着内陆方向而显著增加,与Li等^[5]的报道结果一致;他们认

为盐度是长江河口和沿海环境中影响CH₄厌氧氧化微生物活性的关键因素。介导硫酸盐型甲烷厌氧氧化的ANME古菌是滨海和海洋生境中最为重要的CH₄厌氧氧化微生物,包含有ANME-1、ANME-2、ANME-3等不同亚群;其中ANME-2型亚群古菌与硫酸盐还原细菌结合形成共生关系,前者氧化产生的电子传递给后者用于其SO₄²⁻还原。近期发现,AQDS可替代硫酸盐还原细菌,驱动ANME-2型亚群古菌完成CH₄厌氧氧化过程,该古菌表现出较强的电子受体底物多样性特点。本试验发现,4个滨海土壤的ANME-2古菌硫酸盐型*mcrA*基因拷贝数随着内陆方向而显著降低,且与土壤的EC值和SO₄²⁻浓度呈显著正相关,说明在近海区自然湿地中ANME-2古菌对CH₄厌氧氧化过程发挥着重要作用。添加N₂O条件下湿地土壤ANME-2古菌功能基因*mcrA*拷贝数增加了31%~50%,说明该古菌可能也参与了N₂O驱动的CH₄厌氧氧化过程。值得注意的是,Valenzuela等^[27]运用高通量测序的方法,发现墨西哥Sisal滨海湿地中许多种类的微生物参与了CH₄厌氧氧化与N₂O还原的耦合过程。因此,本研究也需要进一步采用DNA-SIP结合高通量测序的方法,深入阐释滨海湿地N₂O型CH₄厌氧氧化作用的更多关键功能微生物物种特征及其催化活性。

本试验表明,CH₄厌氧氧化过程具有较强的固碳特性。厌氧条件下土壤微生物将¹³CH₄的一部分异化呼吸转变为¹³CO₂,以获取代谢能量;另一部分¹³CH₄则被微生物同化代谢,合成胞内有机物或胞外分泌物,成为土壤有机碳的重要组分。本试验中滨海自然湿地的¹³C-SOC净增量显著高于围垦稻田土壤,可能在低滩位临海湿地中ANME-2、ANME-3等种类多样的硫酸盐型CH₄厌氧氧化古菌对CH₄氧化及固碳发挥着重要的作用^[29-30]。此外,这也可能与近海滩涂沉积

物中黏粒含量高有关,新输入的有机碳易被土壤黏粒吸附,形成有机无机交联体^[31],有利于土壤有机碳的固持。与只添加¹³CH₄处理相比,添加¹³CH₄+N₂O处理下湿地土壤的¹³C-SOC净增量提高了83%~131%,这表明添加N₂O促进了湿地土壤CH₄厌氧氧化的固碳量。相对于围垦稻田来说,芦苇和光滩湿地中N₂O驱动的CH₄厌氧氧化过程,将更高比例的¹³C-CH₄同化进入到土壤有机碳中,这可能与土壤质地性质、功能微生物种类等因素有关,需要进一步分析土壤团聚体特征、微生物宏基因组,阐明其固碳机理及其关键影响因素。

3.2 湿地N₂O还原特征

N₂O还原过程是土壤反硝化作用的最后一步,一般认为,土壤异养反硝化作用占主导地位,其电子供体主要来自于低分子量活性有机物,可维持较高的反硝化速率(包括N₂O还原速率)^[32]。本试验中所试土壤的N₂O净还原速率为9.02~19.05 μg·g⁻¹·d⁻¹,表明培养土壤中发生了强烈的N₂O还原过程。与只添加N₂O处理相比,在供应¹³CH₄+N₂O条件下,湿地土壤的N₂O净还原速率虽略有增加,但并未达到显著水平。这表明与土壤本底有机物相比,CH₄分子对N₂O净还原速率的促进效应极其微弱。从热力学角度来看,异养反硝化微生物(包括N₂O还原菌)需要消耗很高的能量才能活化CH₄惰性分子,获得其电子^[33];所以这些微生物从环境中摄取电子时,优先选择活性有机物如甲酸、甲醇等。而且,按照耦合反应式的化学计量关系来看,N₂O还原速率与CH₄厌氧氧化速率的比值应为4:1,在同一个数量级水平。本试验中湿地土壤的CH₄厌氧氧化速率范围为13~23 ng·g⁻¹·d⁻¹,推算出CH₄驱动的N₂O还原速率应为52~92 ng·g⁻¹·d⁻¹,该理论值远低于本试验中测出的N₂O净还原速率。这说明本试验湿地土壤的N₂O还原过程主要以土壤本底活性有机物提供电子的异养反硝化为主,而以CH₄厌氧氧化提供电子驱动的N₂O耦合还原过程可能对N₂O净还原速率的贡献甚微。

本试验发现,与只添加N₂O处理相比,在供应¹³CH₄+N₂O条件下,氧化亚氮还原酶的编码基因*nosZ* I和*nosZ* II的拷贝数均显著增加;回归分析发现*nosZ* I基因拷贝数与所试土壤的N₂O净还原速率呈显著正相关。这表明*nosZ* I型氧化亚氮还原酶对N₂O还原过程的贡献可能高于*nosZ* II型,这与之前的报道一致^[34]。围垦稻田土壤的*nosZ* I基因拷贝数显著低于自然湿地土壤,而*nosZ* II基因则随围垦种植年限增

加呈显著上升趋势。回归分析发现N₂O驱动的CH₄厌氧氧化速率与*nosZ* II基因拷贝数呈显著正相关,这暗示了与CH₄厌氧氧化过程耦合进行的N₂O还原过程可能主要由*nosZ* II型微生物驱动。有报道认为,含有*nosZ* II基因的微生物物种更为多样化,它们大多数为非完全反硝化微生物,体内缺少*nirS*、*nirK*基因,无法完成NO₂⁻→NO的转化过程^[35],但可以将N₂O还原为N₂,对土壤环境中N₂O的消减作用具有重要意义。由此可见,*nosZ* II型N₂O还原微生物在滨海湿地土壤CH₄厌氧氧化与N₂O还原的耦合过程中发挥着重要作用,对湿地土壤的CH₄和N₂O双减排具有重要意义。

4 结论

(1)崇明东滩湿地土壤可进行N₂O驱动的CH₄氧化过程,且土壤¹³C-SOC净增量显著增加了83%~131%,提升了滨海湿地土壤的固碳量。

(2)围垦植稻促进了N₂O驱动的CH₄厌氧氧化过程。硝酸盐型古菌*M.nitroreducens*可能直接参与了该过程,而硫酸盐型古菌ANME则在滨海自然湿地中发挥重要作用。此外,滨海湿地N₂O还原过程主要由*nosZ* I型细菌驱动,而*nosZ* II型微生物是CH₄厌氧氧化和N₂O还原耦合过程的重要参与者。

参考文献:

- [1] SU J, HU C, YAN X, et al. Expression of barley SUSIBA2 transcription factor yields high-starch low-methane rice[J]. *Nature*, 2015, 523(7562):602-606.
- [2] HINRICHS K U, HAYES J M, SYLVA S P, et al. Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments[J]. *Nature*, 1999, 398(6730):802-805.
- [3] FAN L, DIPPOLD M A, GE T, et al. Anaerobic oxidation of methane in paddy soil: role of electron acceptors and fertilization in mitigating CH₄ fluxes[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2020, 141:107685.
- [4] KNITTEL K, BOETIUS A. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2009, 63:311-334.
- [5] LI X, GAO D, LIU M. Composition, diversity and abundance of *Candidatus M. oxyfera*-like bacteria in response to the estuary salinity gradient[J]. *Biogeochemistry*, 2019, 143(1):1-14.
- [6] SANCHEZ G A P, MAYER B, WUNDERLICH A, et al. Analysing seasonal variations of methane oxidation processes coupled with denitrification in a stratified lake using stable isotopes and numerical modeling [J]. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 2022, 323:242-257.
- [7] ETTWIG K F, BUTLER M K, LE PASLIER D, et al. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria[J]. *Nature*, 2010, 464(7288):543-548.

- [8] RAGHOEBARSING A A, POL A, VAN DE PAS-SCHOONEN K T, et al. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification[J]. *Nature*, 2006, 440(7086):918-921.
- [9] HAROON M F, HU S, SHI Y, et al. Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage[J]. *Nature*, 2013, 500(7464):567-570.
- [10] SANFORD R A, WAGNER D D, WU Q, et al. Unexpected nondenitrifier nitrous oxide reductase gene diversity and abundance in soils[J]. *PNAS*, 2012, 109(48):19709-19714.
- [11] JONES C M, GRAF D R, BRU D, et al. The unaccounted yet abundant nitrous oxide-reducing microbial community: a potential nitrous oxide sink[J]. *ISME J*, 2013, 7(2):417-426.
- [12] 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.
- [13] 刘春梅, 魏文学, 盛荣, 等. 氧化亚氮还原酶基因 *nosZ* II 及与环境的关系研究进展[J]. *应用与环境生物学报*, 2018, 24(3):651-656. LIU C M, WEI W X, SHENG R, et al. Progress in the study of the nitrous oxide reductase gene *nosZ* II and its relationship with the environment[J]. *Journal of Applied and Environmental Biology*, 2018, 24(3):651-656.
- [14] XIE X, PU L, WANG Q, et al. Response of soil physicochemical properties and enzyme activities to long-term reclamation of coastal saline soil, Eastern China[J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 607:1419-1427.
- [15] 侯颖, 李红, 赵敏, 等. 从湿地到农田: 围垦对生态系统碳排放的影响[J]. *生态学报*, 2017, 28(8):2517-2526. HOU Y, LI H, ZHAO M, et al. From wetlands to farmland: the impact of polder on ecosystem carbon emissions[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2017, 28(8):2517-2526.
- [16] 李建国, 濮励杰, 徐彩瑶, 等. 1977—2014年江苏中部滨海湿地演化与围垦空间演变趋势[J]. *地理学报*, 2015, 70(1):17-28. LI J G, PU L J, XU C Y, et al. Spatial evolutionary trends of coastal wetland evolution and polder in central Jiangsu from 1977—2014[J]. *Acta Geographica Sinica*, 2015, 70(1):17-28.
- [17] 徐彩瑶, 濮励杰, 朱明. 沿海滩涂围垦对生态环境的影响研究进展[J]. *生态学报*, 2018, 38(3):1148-1162. XU C Y, PU L J, ZHU M. Research progress on the ecological impact of coastal mudflat reclamation[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2018, 38(3):1148-1162.
- [18] 赵新新, 金晓斌, 杜心栋, 等. 沿海滩涂垦殖对土壤氮总转化速率的影响分析[J]. *长江流域资源与环境*, 2015, 24(9):1552-1559. ZHAO X X, JIN X B, DU X D, et al. Analysis of the effect of coastal mudflat reclamation on total soil nitrogen conversion rate[J]. *Yangtze River Basin Resources and Environment*, 2015, 24(9):1552-1559.
- [19] GAUTHIER M, BRADLEY R L, SIMEK M. More evidence that anaerobic oxidation of methane is prevalent in soils: is it time to upgrade our biogeochemical models? [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2015, 80:167-174.
- [20] WANG Z, LI K, SHEN X, et al. Soil nitrogen substances and denitrifying communities regulate the anaerobic oxidation of methane in wetlands of Yellow River Delta, China[J]. *Science of the Total Environment*, 2023, 857:159439.
- [21] CUI J, LIU C, LI Z, et al. Long-term changes in topsoil chemical properties under centuries of cultivation after reclamation of coastal wetlands in the Yangtze Estuary, China[J]. *Soil & Tillage Research*, 2012, 123:50-60.
- [22] ZHANG Y H, WANG F Y, JIA Z J. Electron shuttles facilitate anaerobic methane oxidation coupled to nitrous oxide reduction in paddy soil [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2021, 153.
- [23] WANG J, CAI C, LI Y, et al. Denitrifying anaerobic methane oxidation: a previously overlooked methane sink in intertidal zone[J]. *Environ Sci Technol*, 2019, 53(1):203-212.
- [24] SHEN L D, HU B L, LIU S, et al. Anaerobic methane oxidation coupled to nitrite reduction can be a potential methane sink in coastal environments[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(16):7171-7180.
- [25] ZHANG Y, WANG F, XIA W, et al. Anaerobic methane oxidation sustains soil organic carbon accumulation[J]. *Applied Soil Ecology*, 2021, 167:108096.
- [26] CHENG C, SHEN X, XIE H, et al. Coupled methane and nitrous oxide biotransformation in freshwater wetland sediment microcosms[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 648:916-922.
- [27] VALENZUELA E I, PADILLA-LOMA C, GOMEZ-HERNANDEZ N, et al. Humic substances mediate anaerobic methane oxidation linked to nitrous oxide reduction in wetland sediments[J]. *Front Microbiol*, 2020, 11:587.
- [28] ARANDA-TAMAURA C, ESTRADA-ALVARADO M I, TEXIER A C, et al. Effects of different quinoid redox mediators on the removal of sulphide and nitrate via denitrification[J]. *Chemosphere*, 2007, 69(11):1722-1727.
- [29] BHATTARAI S, CASSARINI C, GONZALEZ-GIL, et al. Anaerobic methane-oxidizing microbial community in a coastal marine sediment: anaerobic methanotrophy dominated by ANME-3[J]. *Microbiological Ecology*, 2017, 74:608-622.
- [30] ZHANG Y H, ZHANG X L, WANG F Y, et al. Exogenous nitrogen addition inhibits sulfate-mediated anaerobic oxidation of methane in estuarine coastal sediments[J]. *Ecological Engineering*, 2020, 158:106021.
- [31] DAVIDSON E A, JANSSENS I A. Temperature sensitivity of soil carbon decomposition and feedbacks to climate change[J]. *Nature*, 2006, 440(7081):165-173.
- [32] DI CAPUA F, PIROZZI F, LENS P N L, et al. Electron donors for autotrophic denitrification[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2019, 362:922-937.
- [33] PANG Y, WANG J. Various electron donors for biological nitrate removal: a review[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 794:148699.
- [34] 汪方圆, 张耀鸿, 饶旭东, 等. 围垦对滨海稻田土壤 N₂O 还原潜力的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2020, 39(11):2668-2674. WANG F Y, ZHANG Y H, RAO X D, et al. Effect of polder on N₂O reduction potential of coastal rice fields[J]. *Journal of Agro-environment Sciences*, 2020, 39(11):2668-2674.
- [35] 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.

(责任编辑:叶飞)