



研究报告

硫化物抑制潮土反硝化过程中氧化亚氮还原的菌群机制

隋维康 李冀 吴晓刚 吴巧玉 马怡茗 张馨玉 张晓君*

上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 上海 200240

摘要:【背景】土壤中的反硝化作用形成气态产物 N_2O 和 N_2 ，会导致氮素的气态损失，并造成温室效应。硫化物对土壤的 N_2O 还原具有抑制作用，但其对菌群和功能基因的影响机制还不清楚。【目的】研究有无外加碳源情况下，硫化物对反硝化作用中间产物(NO 、 N_2O)的积累、反硝化功能基因($narG$ 、 $nirS$ 、 $nirK$ 和 $nosZ$)表达量以及菌群结构的影响。【方法】分别设置不同量葡萄糖(0 和 1 000 mg-C/kg 干重土壤)和硫化钠(0 和 150 mg-S/kg 干重土壤)添加的交叉处理，进行室内微宇宙培养实验，利用自动化培养与实时气体检测系统检测培养过程中 NO 、 N_2O 和 N_2 的积累量，通过反转录定量 PCR 测定反硝化功能基因表达量，利用 MiSeq 技术平台基于 16S rRNA 基因序列的高通量测序分析样品的菌群结构。【结果】硫化钠的添加显著抑制 N_2O 还原，但是其对于 N_2O 积累量没有显著影响，却显著降低了 NO 的积累量。硫化钠的添加短时间内在转录水平上显著抑制 N_2O 还原酶的活性，并且抑制固氮弧菌属(*Azoarcus*)、微枝形杆菌属(*Microvirga*)、剑菌属(*Ensifer*)、氮氢单胞菌属(*Azohydromonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、斯科曼氏球菌属(*Skermanella*)、申氏杆菌属(*Shinella*)和西索恩氏菌属(*Chthoniobacter*)的基因转录，降低它们的转录本丰度，结合 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)数据库的查询结果，发现硫化钠的添加抑制了不产生 N_2O 的 N_2O 还原反硝化细菌的生长。【结论】堆肥或其他原因引起的土壤硫化物增加，导致反硝化过程 N_2O 还原被抑制的原因是由于其对氧化亚氮基因转录的抑制和对不同反硝化菌的选择作用，研究结果有助于认识硫化物对氮代谢影响的微生物机制。

关键词：硫化物，反硝化，氧化亚氮还原，菌群结构，潮土

Microbial mechanism of sulfide inhibiting N_2O reduction during denitrification in fluvo-aquic soil

SUI Wei-Kang LI Ji WU Xiao-Gang WU Qiao-Yu MA Yi-Ming ZHANG Xin-Yu ZHANG Xiao-Jun*

State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: [Background] The products of denitrification are N_2O and N_2 , thus it causes nitrogen loss and increases greenhouse effect. Sulfide has a significant inhibitory effect on N_2O reduction, however, the effect of sulfide on denitrifying bacteria and functional genes of denitrification are unclear. [Objective] To

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31670105, 31971526, 31861133018)

*Corresponding author: Tel: 86-21-34204878; E-mail: xjzhang68@sjtu.edu.cn

Received: 11-04-2020; Accepted: 22-05-2020; Published online: 30-06-2020

基金项目：国家自然科学基金(31670105, 31971526, 31861133018)

*通信作者：Tel: 021-34204878; E-mail: xjzhang68@sjtu.edu.cn

收稿日期：2020-04-11; 接受日期：2020-05-22; 网络首发日期：2020-06-30

study the effect of sulfide on the accumulation of intermediate products of denitrification (NO and N₂O), transcription of functional gene of denitrification (*narG*, *nirS*, *nirK* and *nosZ*) as well as the structure of the microbial community structure in soil amended with or without carbon source. **[Methods]** Different levels of sodium sulfide (0 and 150 mg-S/kg-soil) combined different levels of glucose (0 and 1 000 mg-C/kg-soil) were set up in soil microcosms experiment. Robotized incubation system was used to monitor the amount of NO, N₂O and N₂ accumulated during the incubation, and quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) was used to quantify the transcriptions of functional gene of denitrification (*narG*, *nirS*, *nirK* and *nosZ*) as well as the MiSeq technology platform based on 16S rRNA gene high-throughput sequencing was used to analyze microbial community structure. **[Results]** The addition of sodium sulfide significant inhibited the reduction of N₂O, but it had no significant effect on the accumulated N₂O. And the addition of sodium sulfide significantly reduced the accumulated NO. Sodium sulfide addition significantly inhibited the activity of N₂O reductase at a transcription level in a short time. Sodium sulfide addition inhibited the transcription of *Azoarcus*, *Microvirga*, *Ensifer*, *Azohydromonas*, *Bacillus*, *Skermanella*, *Shinella*, and *Chthoniobacte*. According to the query results of the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database, the addition of sodium sulfide inhibited the growth of N₂O reducing denitrifying bacteria that cannot produce N₂O. **[Conclusion]** The increase of soil sulfide caused by compost or other reasons leads to the inhibition of N₂O reduction in denitrification process, which is due to the inhibition of nitrous oxide gene transcription and the selection impact of denitrifying bacteria. This study would be helpful to understand the microbial mechanism of the impact of sulfide on nitrogen metabolism.

Keywords: Sulfide, Denitrification, N₂O reduction, Microbial community structure, Fluvo-aquic soil

反硝化作用是重要的土壤氮循环途径, 其代谢途径为 NO₃⁻→NO₂⁻→NO→N₂O→N₂, 每一步的功能基因分别为 *narG/napA*、*nirS/nirK*、*norB* 和 *nosZ*^[1]。在土壤生态系统中, 反硝化的发生会导致土壤氮素的损失。不同的微生物带有部分或全部这些功能基因, 因此, 并不是所有反硝化细菌都能够进行 N₂O 还原^[2], 从而造成反硝化中间产物 N₂O 的积累。N₂O 是一种重要的温室气体, 其温室效应是 CO₂ 的 265 倍^[3], 会引起臭氧层空洞^[4], 具有较大的环境危害性。

碳氮比^[5]、pH^[6-7]、碳源^[8-9]、温度^[10-11]和硫化物^[12-14]是影响 N₂O 还原的重要因子。在这些因子中, 硫化物的影响逐渐受到关注, 硫化物是指含硫(-2 价态)化合物。有些农田会使用垃圾堆肥的方式来增加土壤肥力^[15-17], 而垃圾堆肥可能产生硫化物。Yang 等的研究表明, 废蔬菜和农作物残渣的厌氧消化可以最高产生 1.6 mg/L 的 H₂S^[18], 造纸厂、堆填区和药厂的废物废水中也检测发现有硫化物^[19-21], 某些工业废水中硫化物的浓度高达 100 mg/L^[22]。另外, 农田使用的高蛋白的绿肥,

比如紫云英、苜蓿之类^[23-25], 分解也能产生硫化物^[26-27]。硫化物可以抑制微生物活动^[28], 可能造成菌群的改变。本研究所用土壤的采集地——上庄定点实验田(39°48'N, 116°28'E)的部分地块土壤就是使用生活垃圾堆肥来提高土壤肥力^[29]。

Tam 等研究发现硫化物可以抑制反硝化中 N₂O 的还原^[30]。Brunet 等的研究表明在厌氧淡水沉积物中, 硫化物可以通过抑制 N₂O 还原进而抑制反硝化作用^[12]。Lu 等的研究表明硫化物对于硝酸盐异化还原为铵途径(dissimilatory nitrate reduction to ammonium, DNRA)有促进作用, 硫化物通过抑制 N₂O 还原进而抑制了反硝化作用, 并减少了反硝化作用与 DNRA 竞争相同底物(NO₃⁻)的能力^[31]。Caffrey 等发现丹麦罗斯基勒峡湾的反硝化细菌在暴露于短暂的硫化物之后, 反硝化作用就会受到抑制^[32]。这些研究只报道了硫化物对于反硝化代谢途径的影响, 但是关于反硝化菌群和功能基因的变化尚不清楚。另外, 垃圾堆肥可能产生的硫化物对于 N₂O 排放的影响也未被充足重视。硫氧化细菌(sulfur oxidizing bacteria, SOB)被报道可以

与反硝化细菌相互作用,影响反硝化细菌菌群结构^[33]。通过分析微生物菌群结构的变化,研究硫化物抑制菌群的 N_2O 代谢特点,从菌群角度分析硫化物对于 N_2O 还原的抑制作用。

为了揭示短期暴露于硫化物压力下的反硝化功能基因和菌群在转录水平上的响应,本研究使用上庄试验田的华北潮土为研究对象,设置两种硫化钠添加浓度(0、150 mg-S/kg 干重土壤)和两种葡萄糖添加浓度(0、1 000 mg-C/kg 干重土壤)的交叉实验组,使用自动化培养与实时气体检测系统(robotized incubation system, robot system)^[34]检测培养期间 N_2O 、NO 和 N_2 的积累量。通过反转录定量 PCR (RT-qPCR)测定不同处理下土壤反硝化功能基因(*narG*、*nirS*、*nirK* 和 *nosZ*)的表达量,并利用 MiSeq 技术平台基于 16S rRNA 基因序列的高通量测序数据对不同处理土壤的菌群结构差异进行分析,在此基础上分析硫化物抑制 N_2O 还原的微生物学机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

硫化钠($\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$),阿拉丁试剂(上海)有限公司;葡萄糖、硝酸钾、氯化铵,国药集团化学试剂有限公司;99.9%的 N_2O 气体,上海伟创标准气体分析技术有限公司;土壤总 RNA 提取试剂盒(RNeasy[®] PowerSoil[®] Total RNA Kit)、基因组 DNA 消化试剂盒(DNase Max[®] Kit)、RNA 纯化试剂盒(RNeasy[®] PowerClean[®] Pro Cleanup Kit),Qiagen 公司;RNA 反转录试剂盒(SuperScript[®] III First-Strand Synthesis System for RT-PCR Kit),Invitrogen 公司;iQ TM SYBR[®] Green SuperMix, Bio-Rad 公司;MiSeq Reagent Kit V3, Illumina 公司;引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司进行合成。

真空氮气清洗系统,上海金城公司;120 mL 顶空培养瓶,上海安谱实验科技股份有限公司;普通 PCR 仪,Applied Biosystems 公司;荧光定量

PCR 仪, Roche 公司;MiSeq 测序系统, Illumina 公司。

1.2 土壤采集

土壤采自华北平原的中国农业大学上庄长期定点试验点(39°48'N, 116°28'E),该试验田开始于 2006 年 10 月,种植模式为华北平原典型的冬小麦-夏玉米的轮作^[35]。采集土壤的施肥方式是优化施肥,优化施肥的施氮量=氮素供应目标值-土壤 NO_3^- -N 测试值^[29]。土壤样品采集于 2019 年 2 月,采用 5 点混合取样法采集 0-20 cm 土壤,采集之后 4 °C 运输至实验室,然后将土壤过 0.2 mm 网筛后避光保存在 4 °C,尽快进行培养实验。

1.3 土壤培养与气体测定

15 瓶顶空培养瓶中加入干重为 10 g 的土壤,加盖橡胶垫和铝盖封口,使用真空氮气清洗系统将培养瓶的顶空气体置换为氮气,然后在 25 °C 避光预培养 7 d。随机取 3 瓶样本保存在-80 °C,作为培养起点样本(编号为 Y)。剩余培养瓶随机分为 4 组,分别为不添加硫化钠和葡萄糖组(CK)、添加硫化钠组(S)、添加葡萄糖组(C)、同时添加硫化钠和葡萄糖组(C+S)。硫化钠和葡萄糖的添加浓度分别为 150 mg-S/kg 干重土壤和 1 000 mg-C/kg 干重土壤。首先加入 60 mg-N/kg 干重土壤的 NO_3^- 和 10 mg-N/kg 干重土壤 NH_4^+ , NH_4^+ 的加入是为了抑制反硝化底物 NO_3^- 被土壤微生物同化^[31]。再加入处理所需要的硫化钠和葡萄糖。最后加入无菌去离子水使土壤的含水量达到 70%土壤持水量(water holding capacity, WHC)。使用真空氮气清洗系统将培养瓶的顶空气体置换为氮气,之后在 25 °C 避光培养 12 h,期间通过 Robot system^[34]检测培养瓶中的 N_2O 、NO、 N_2 的含量。培养结束后的样本保存在-80 °C,用于后续菌群分析。

N_2O 指数的计算参照文献[36],其值等于 12 h 内 N_2O 变化曲线下累计面积与(N_2O 变化曲线下累计面积+NO 变化曲线下累计面积+ N_2 变化曲线下累计面积)的比值。

1.4 硫化钠对于 N₂O 还原的影响

6 瓶土壤如 1.3 所述进行预培养操作, 预培养结束后将 6 瓶土壤随机分为两组, 分别编号为 C_R 和 (C+S)_R。两组都加入 10 mg-N/kg 干重土壤的 NH₄⁺ 以及 1 000 mg-C/kg 干重土壤的葡萄糖, 之后 (C+S)_R 加入 150 mg-S/kg 干重土壤的硫化钠。之后两组都加入无菌去离子水使土壤的含水量达到 70% WHC。使用真空氮气清洗系统将培养瓶的顶空气体置换为氮气, 之后通过气密针和无菌气密三通阀向每个瓶子中加入 5 mL 99.9% 的 N₂O 气体, 然后在 25 °C 避光进行培养, 期间通过 Robot system^[34] 检测顶空瓶中的 N₂O 含量, 直至 N₂O 含量低于 Robot system 的检测下限。

1.5 土壤 RNA 的提取

分别取约 2 g Y、CK、S、C、C+S 组样本土壤以 RNeasy[®] PowerSoil[®] Total RNA Kit 进行 RNA 的提取, 提取物中 DNA 通过 DNase Max[®] Kit 消化。消化效果使用 16S rRNA 基因全长引物 27f/1492r^[37] 进行检验, 如果 PCR 扩增无可见条带, 再使用 RNeasy[®] PowerClean[®] Pro Cleanup Kit 对提取的 RNA 进行纯化去除 PCR 抑制物。PCR 反应体系和反应条件参照文献[38], 引物序列见表 1。最后使用 SuperScript[®] III First-Strand Synthesis System for RT-PCR Kit 将纯化之后的 RNA 反转录为 cDNA。

1.6 反硝化功能基因表达量的定量分析

以上述 cDNA 为模板, 通过定量 PCR 对反硝

化功能基因(*narG*、*nirS*、*nirK* 和 *nosZ*)以及 16S rRNA 基因进行定量。16S rRNA、*narG*、*nirS*、*nirK* 和 *nosZ* 基因的 PCR 扩增引物分别为 Uni331F/Uni797R^[39]、*narG*-f/r^[40]、Cd3aF/R3 cd^[41]、*nirK*1040/F1aCu^[42-43] 和 *nosZ*-2f/2r^[44], 引物序列见表 1。定量 PCR 的反应体系: iQ TM SYBR[®] Green SuperMix 10 μL, Primer F (10 μmol/L) 1 μL, Primer R (10 μmol/L) 1 μL, 模板 2 μL, 无菌水 6 μL。标准质粒的构建和定量 PCR 反应条件参照文献[35], 标准质粒浓度为 10²-10⁸ copies/μL。16S rRNA、*narG*、*nirS*、*nirK* 和 *nosZ* 的扩增效率分别为 78%、97%、81%、88%、92%, R² 均在 0.99 以上。

1.7 土壤菌群 16S rRNA 基因高通量测序分析

以上述的 cDNA 为模板构建 16S rRNA 基因 V3-V4 区的测序文库, 具体步骤参照文献[45]。构建好的测序文库在 MiSeq 测序系统使用 MiSeq Reagent Kit V3 进行高通量测序。序列比对、序列聚类 and ASV 划分具体步骤参照文献[45-46]。主成分分析(principal component analysis, PCA)和多元方差分析(multivariate analysis of variance, MANOVA)是基于 Bray-Curtis 距离。使用 LefSe (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>)挑选在不同处理中的差异 ASV (LDA=2.0)^[47], 并制作差异 ASV 的热图以及差异 ASV 与 N₂O 指数的 Spearman 相关矩阵图, 使用 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG, <https://www.kegg.jp/>)数据库查询

表 1 普通 PCR 和反转录定量 PCR 使用的引物

Table 1 Primer set of regular PCR and RT-qPCR

目标基因 Target gene	引物 Primer	引物序列 Primers sequence (5'→3')	片段长度 Size (bp)
16S rRNA	27f/1492r ^[37]	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG TACGGYTACCTTGTTACGACTT	~1 500
16S rRNA	Uni331F/Uni797R ^[39]	TCCTACGGGAGGCAGCAGT GGACTACCAGGTATCTAATCCTGTT	466
<i>narG</i>	<i>narG</i> -f/r ^[40]	TCGCCSATYCCGGCSATGTC GAGTTGTACCAGTCRGCSGAYTCSG	173
<i>nirS</i>	Cd3aF/R3 cd ^[41]	AACGYSAAGGARACSGG GASTTCGGRTGSGTCTTSAYGAA	425
<i>nirK</i>	<i>nirK</i> 1040/F1aCu ^[42-43]	GCCTCGATCAGRTTRTGGTT ATCATGGTSCTGCCGCG	473
<i>nosZ</i>	<i>nosZ</i> -2f/2r ^[44]	CGCRACGGCAASAAGGTSMSSTG CAKRTGCAKSGCRTGGCAGAA	267

与 N_2O 指数有显著关系的差异 ASV 所在属的反硝化代谢通路。

1.8 统计分析

以 One-way ANOVA 和 Fisher's LSD test (Graphpad Prism 8) 比较不同处理中 NO、 N_2O 积累量, N_2O 指数以及 16S rRNA 基因和反硝化功能基因表达量的差异。以 MANOVA 比较不同处理的菌群结构的差异显著性。以 Spearman 相关关系矩阵分析差异 ASV 与 N_2O 指数的相关关系。

2 结果与分析

2.1 硫化钠对 N_2O 指数的影响

硫化钠的添加显著降低 NO 积累量, 但是对

于 N_2O 积累量没有显著影响(图 1A 和 B)。硫化物的添加显著增加 N_2O 指数(图 1C)。葡萄糖的添加对于 N_2O 指数没有显著影响(图 1C), 但是可以显著增加 N_2O 积累量(图 1B)。在没有硫化钠添加的情况下, 葡萄糖的添加才会显著增加 NO 积累量(图 1A)。

2.2 硫化钠对 N_2O 还原的影响

在没有硫化钠添加的 C_R 组和有硫化钠添加的 $(C+S)_R$ 组土壤的培养实验中, 培养瓶顶空添加的 5 mL N_2O (约为 $300 \mu\text{mol-N/vial}$) 被还原到低于 Robot system 的检测下限, 需要的时间分别为 113 ± 12 h 和 146 ± 14 h (图 2)。

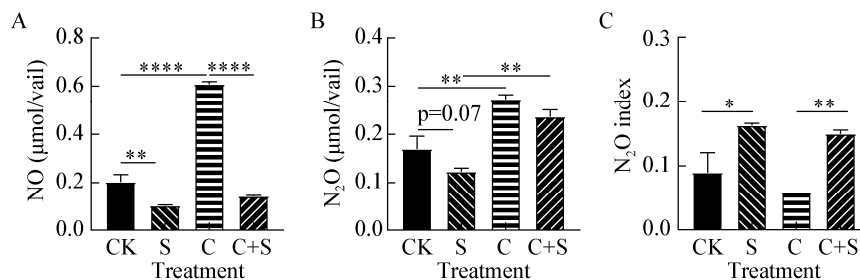


图 1 厌氧培养过程的反硝化中间气体积累量

Figure 1 Accumulation of intermediate gas products of denitrification during anaerobic cultivation

注: A: NO 积累量; B: N_2O 积累量; C: N_2O 指数。数据以平均数 \pm SEM 的形式展示。One-way ANOVA 和 Fisher LSD's post hoc test 被用来进行不同组的结果的比较。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ****: $P < 0.0001$ 。

Note: A: Accumulation of NO generated; B: Accumulation of N_2O generated; C: N_2O index. Bars represent means \pm SEM. One-way ANOVA with Fisher LSD's post hoc test was used for comparisons. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ****: $P < 0.0001$ 。

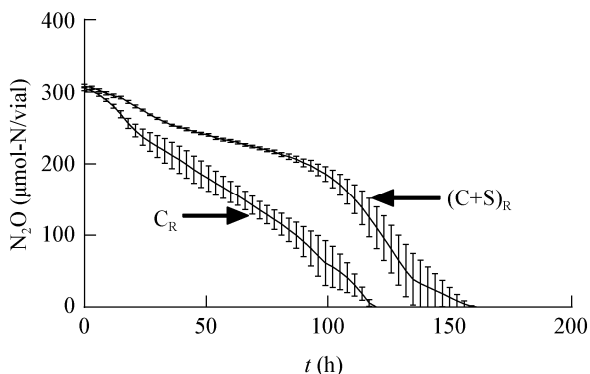


图 2 硫化钠的添加抑制 N_2O 还原

Figure 2 Sodium sulfide addition inhibited N_2O reduction

注: 数据以平均数 \pm SEM 的形式展示。

Note: Bars represent means \pm SEM.

2.3 反硝化作用功能基因定量

反硝化功能基因的表达量按照其占 16S rRNA 基因表达量的比例进行了标准化处理(图 3A-C)。不同处理组的样品经过厌氧培养后, 16S rRNA 基因表达量以及标准化的反硝化功能基因表达量均显著高于未培养样品的表达量(图 3A-D)。葡萄糖的添加显著增加 16S rRNA 基因表达量(图 3D), 但是对于标准化的反硝化功能基因表达量没有显著影响(图 3A-C)。硫化钠的添加对于 16S rRNA 基因表达量以及标准化的 *narG*、*nir* 基因表达量没有显著影响(图 3A、B、D), 但是显著降低了标准化的 *nosZ* 基因表达量(图 3C)。

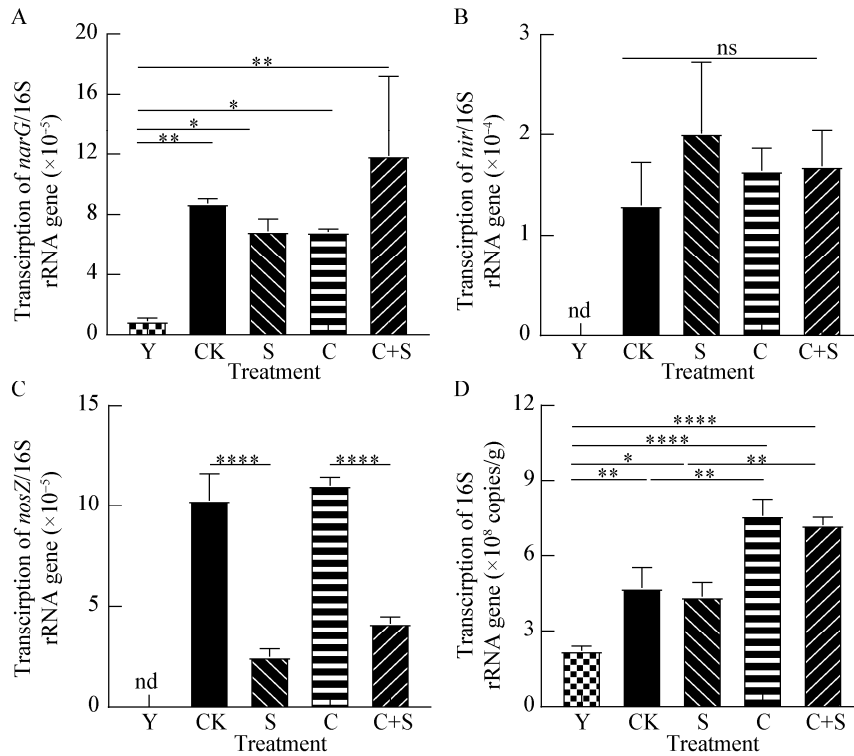


图 3 16S rRNA 基因和反硝化功能基因表达量的定量

Figure 3 Quantification of transcription of 16S rRNA gene and functional gene of denitrification

注: A: *narG* 基因表达量/16S rRNA 基因表达量; B: *nir* 基因表达量/16S rRNA 基因表达量; C: *nosZ* 基因表达量/16S rRNA 基因表达量; D: 16S rRNA 基因表达量. ns: 没有显著差异; nd: 基因表达量的检测结果为阴性. One-way ANOVA 和 Fisher LSD's post hoc test 被用来进行不同组的结果的比较. 数据以平均数±SEM 的形式展示. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.0001$.

Note: A: The ratio of transcription of *narG* to that of 16S rRNA gene; B: The ratio of transcription of *nir* to that of 16S rRNA gene; C: The ratio of transcription of *nosZ* to that of 16S rRNA gene; D: Transcription of 16S rRNA gene. ns: Not significantly different; nd: The transcription of gene was not detectable. Bars represent means±SEM. One-way ANOVA with Fisher LSD's post hoc test was used for comparisons. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.0001$.

2.4 土壤菌群结构的差异

基于 Bray-Curtis 距离的 PCA 分析可以看出, CK、C、S、C+S 和 Y 组的菌群结构两两之间可以

相互分开(图 4A); 通过 MANOVA 检验可以看出, CK、C、S、C+S 和 Y 组两两之间的菌群结构都具有显著差异(图 4B)。

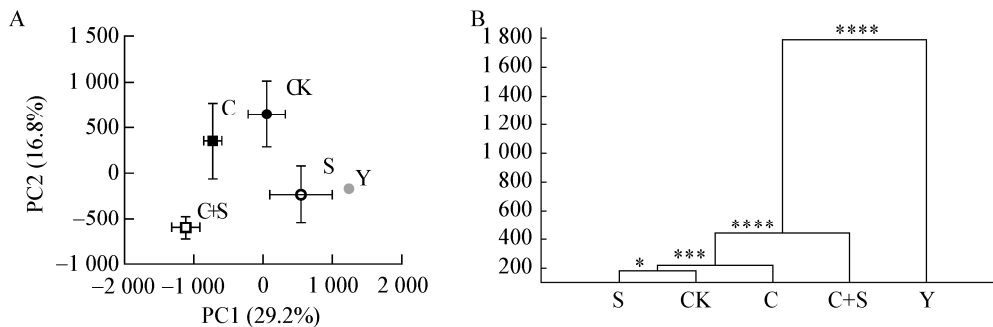


图 4 不同处理情况下的菌群结构

Figure 4 Microbial community structure under different treatments

注: A: 微生物菌群主成分分析; B: MANOVA 进行的菌群结构聚类. *: $P<0.05$; ***: $P<0.001$; ****: $P<0.0001$.

Note: A: PCA of microbial community structure; B: Clustering of microbiota calculated by MANOVA test. *: $P<0.05$; ***: $P<0.001$; ****: $P<0.0001$.

使用 LEfSe 挑选 CK、C、S 和 C+S 组中的差异 ASV (LDA=2.0), 共挑选获得 41 个差异 ASV (图 5)。通过计算差异 ASV 与 N₂O 指数的 Spearman 相关矩阵, 发现 17 个差异 ASV 与 N₂O 指数有显著关

系, 这 17 个差异 ASV 中 2 个在 CK 组中转录本相对丰度最高, 9 个在 C 组中转录本相对丰度最高, 5 个在 S 组中转录本相对丰度最高, 1 个在 C+S 组中转录本相对丰度最高(表 2)。在 CK 组和 C 组中

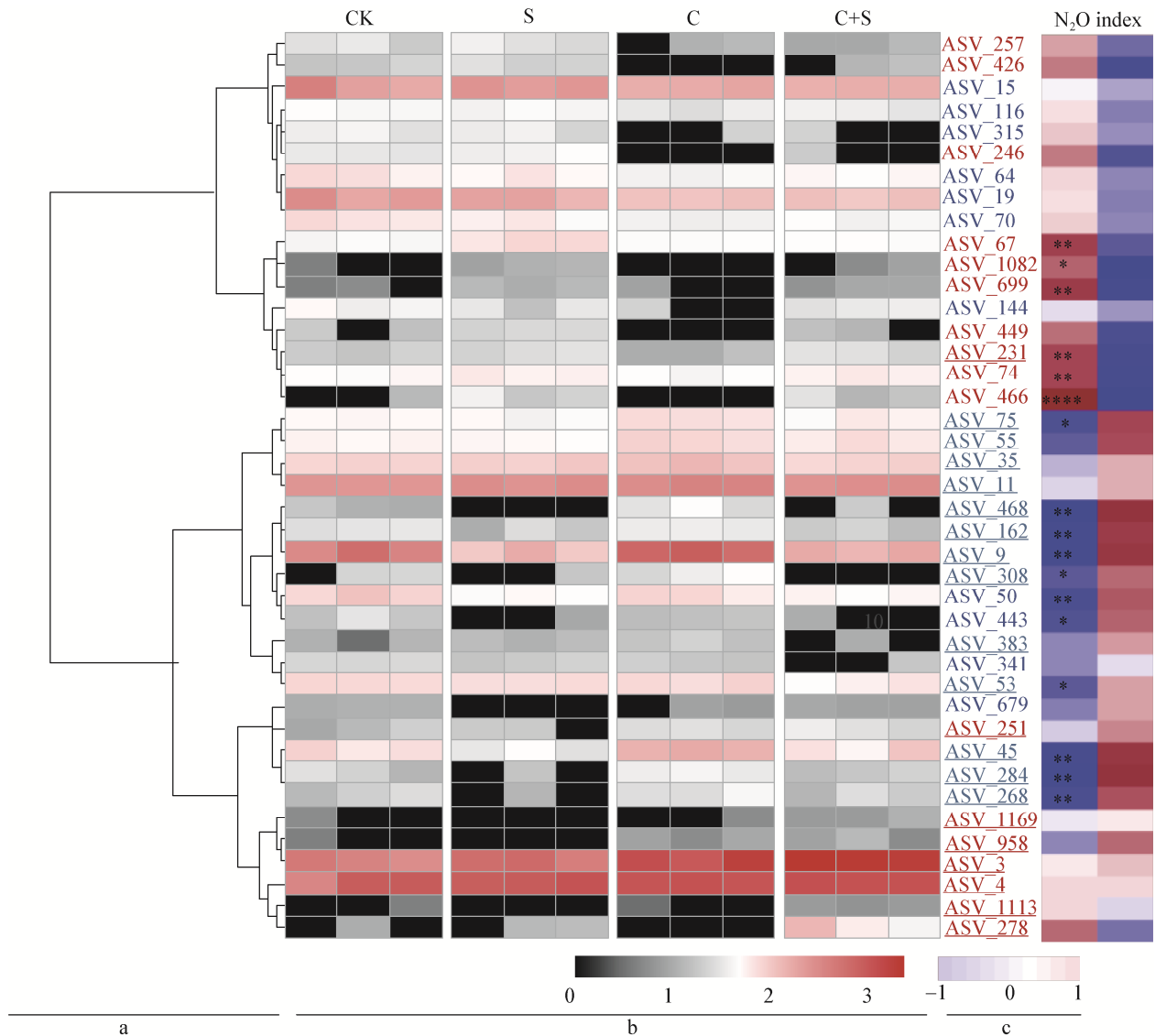


图 5 LEfSe 挑选的差异 ASV (LDA=2.0)

Figure 5 Different ASV picked out by LEfSe with LDA=2.0

注: a: 差异 ASV 按照差异 ASV 转录本相对丰度丰度的 Spearman 相关关系排列; b: 差异 ASV 丰度(使用 Log2 进行标准化)的热图; c: 差异 ASV 与 N₂O 指数的 Spearman 相关系数矩阵, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.0001$, 差异 ASV 用蓝色字体的是在 CK 组中转录本相对丰度最高的差异 ASV, 用蓝色加粗带下划线字体的是在 C 组中转录本相对丰度最高的差异 ASV, 用砖红色字体的是在 S 组中转录本相对丰度最高的差异 ASV, 用砖红色字体加粗带下划线字体的是在 C+S 组中转录本相对丰度最高的差异 ASV.
Note: a: The different ASV was organized by Spearman's correlation analysis based on relative abundances of transcription; b: The heatmap map of the different ASV, and the abundance of different ASV was normalized and log2-transformed; c: The Spearman correlation between the different ASV and N₂O index was shown on the right, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.0001$, the relative abundance of transcription of different ASV in green font were highest in CK, while in green, bold and underlined font were highest in C, the relative abundance of transcription of different ASV in firebrick font were highest in S, while in firebrick, bold and underlined font were highest in C+S.

表 2 与 N₂O 指数显著相关的差异 ASV 的分类学地位Table 2 Taxonomic status of different ASV that had significant correlation with N₂O index

差异 ASV Different ASVs	处理* Treatment	N ₂ O 指数** N ₂ O index	门 Phylum	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus
ASV_50	CK	-	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Rhodocyclaceae	Azoarcus
ASV_443	CK	-	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Rhodocyclaceae	Azoarcus
ASV_53	C	-	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	Microvirga
ASV_45	C	-	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Ensifer
ASV_284	C	-	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Burkholderiaceae	Azohydromonas
ASV_268	C	-	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus
ASV_75	C	-	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Azospirillales	Azospirillaceae	Skermanella
ASV_468	C	-	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Shinella
ASV_162	C	-	Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Chthoniobacterales	Chthoniobacteraceae	Chthoniobacter
ASV_9	C	-	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Rhodocyclaceae	Azoarcus
ASV_308	C	-	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Burkholderiaceae	
ASV_67	S	+	Actinobacteria	Thermoleophilia	Gaiellales	Gaiellaceae	Gaiella
ASV_1082S		+	Cyanobacteria	Oxyphotobacteria	Nostocales	Phormidiaceae	Phormidium
ASV_699	S	+	Actinobacteria	Acidimicrobiia	IMCC26256		
ASV_74	S	+	Entotheonellaota	Entotheonellia	Entotheonellales	Entotheonellaceae	
ASV_466	S	+	Actinobacteria	Thermoleophilia	Solirubrobacterales	67-14	
ASV_231	C+S	+	Chloroflexi	K-96			

注: *: 差异 ASV 在哪种处理中的转录本相对丰度最高; **: 差异 ASV 转录本相对丰度和 N₂O 指数的关系; +: 显著正相关; -: 显著负相关。

Note: *: The treatment in which the relative abundance of transcriptions of different ASV was highest; **: The relationship between relative abundance of transcriptions of different ASV and N₂O index; +: Significantly positive relationship; -: Significantly negative relationship.

转录本相对丰度最高的差异 ASV 与 N₂O 指数显著负相关, 在 S 组和 C+S 组中转录本相对丰度最高的差异 ASV 与 N₂O 指数显著正相关(表 2)。在 CK 组和 C 组中转录本相对丰度最高的差异 ASV 分布于厚壁菌门(*Firmicutes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)和疣微菌门(*Verrucomicrobia*), 而在 S 组和 C+S 组中转录本相对丰度最高的差异 ASV 分布于蓝藻门(*Cyanobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)和肠杆菌门(*Entotheonellaota*) (表 2)。17 个 ASV 并不都能注释到属水平, 其中在 CK 组和 C 组中转录本相对丰度最高的属包括固氮弧菌属(*Azoarcus*)、微枝形杆菌属(*Microvirga*)、剑菌属(*Ensifer*)、氮氢单胞菌(*Azohydromonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、斯科曼氏球菌属(*Skermanella*)、申氏杆菌属(*Shinella*)和西索恩氏菌(*Chthoniobacter*), 而在 S 组和 C+S 组中转录本相对丰度最高的属包括 *Gaiella* 属和席藻属(*Phormidium*) (表 2, 图 6)。使

用 KEGG 数据库查询以上属的反硝化代谢通路, 只有固氮弧菌属(*Azoarcus*)、微枝形杆菌属(*Microvirga*)、剑菌属(*Ensifer*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和申氏杆菌属(*Shinella*)的反硝化代谢通路可以被检索到(表 3)。从表 3 还可以看出: 固氮弧菌属(*Azoarcus*)和申氏杆菌属(*Shinella*)的分离菌株是具备产生 N₂O 能力的 N₂O 还原菌; 芽孢杆菌属(*Bacillus*)的分离菌株是同时不具备 N₂O 产生和还原能力的反硝化细菌; 微枝形杆菌属(*Microvirga*)中部分分离菌株(*Microvirga* sp. 17 mud 1-3 和 *Microvirga* sp. HR1)是具备产生 N₂O 能力的 N₂O 还原菌, 部分分离菌株(*Microvirga ossetica*)是同时不具备 N₂O 产生和还原能力的反硝化细菌; 剑菌属(*Ensifer*)部分分离菌株(*Ensifer adhaerens* Casida A)是具备产生 N₂O 能力的 N₂O 还原菌, 部分分离菌株(*Ensifer adhaerens* OV14 和 *Ensifer alkalisoli*)是不具备产生 N₂O 能力的 N₂O 还原菌。

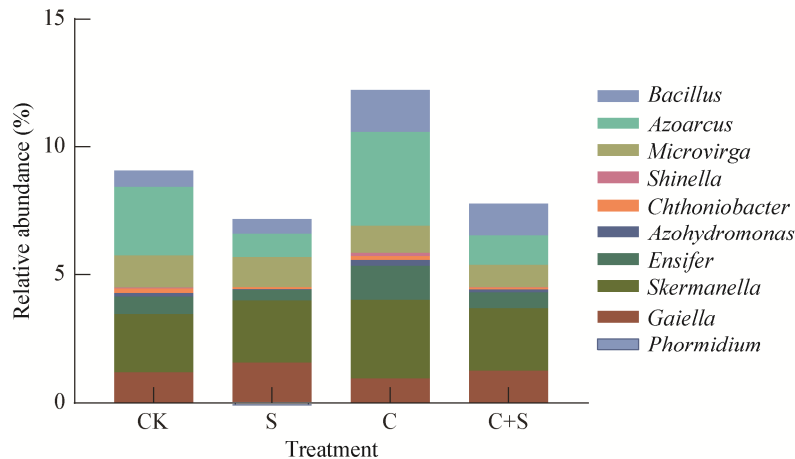


图 6 与 N_2O 指数有显著相关关系的差异 ASV 所在属的转录本相对丰度

Figure 6 The relative abundance of transcription of different ASV that had significant correlation with N_2O index at genus level

表 3 CK 组或 C 组中转录本相对丰度最高的差异 ASV 所在部分属分离菌株的反硝化通路

Table 3 Denitrification pathway of isolated strains of part of genera in which different ASV that had highest relative abundance of transcription in CK or C was distributed

属名	KEGG 数据库中记录的菌株	NO_3^- 还原	NO_2^- 还原	NO 还原	N_2O 还原
Genera	Isolated strains reported in KEGG database	NO_3^- reduction	NO_2^- reduction	NO reduction	N_2O reduction
<i>Azoarcus</i>	<i>Azoarcus</i> sp. BH72; <i>Azoarcus olearius</i> ; <i>Azoarcus</i> sp. DD4	+		+	+
	<i>Azoarcus</i> sp. KH32C; <i>Azoarcus</i> sp. CIB; <i>Azoarcus communis</i> ; <i>Azoarcus</i> sp. DN11	+	+	+	+
<i>Microvirga</i>	<i>Microvirga ossetica</i>	+			
	<i>Microvirga</i> sp. 17 mud 1-3; <i>Microvirga</i> sp. HR1		+	+	+
<i>Ensifer</i>	<i>Ensifer adhaerens</i> OV14; <i>Ensifer alkanisoli</i>	+	+		+
	<i>Ensifer adhaerens</i> Casida A	+	+	+	+
<i>Bacillus</i>		+			
<i>Shinella</i>	<i>Shinella</i> sp. HZN7	+	+	+	+

注: *Bacillus* 分离的菌株太多, 具体菌株名称不展示。+: 反硝化的某个步骤在分离的菌株中存在。

Note: The names of isolated strains of *Bacillus* were not shown in that there were so many isolations of *Bacillus*. +: A certain step of denitrification exists in the isolated strain.

3 讨论与结论

垃圾堆肥是常用的提高土壤肥力的方式, 有研究报道垃圾堆肥可能产生硫化物^[18]。农田土壤氮转化的研究具有重要的意义, 不仅因为氮转化过程影响农作物的氮吸收, 而且反硝化作用造成的 N_2O 排放与气候变化密切相关^[48]。因此, 研究垃圾堆肥可能产生的硫化物, 对于农田土壤反硝化途径中 N_2O 形成与还原的影响具有重要的生态学意义, 本实验使用的硫化钠是硫化物的一种。

我们的研究表明, 硫化钠的添加显著增

加了 N_2O 指数, 这说明硫化钠的添加显著增加了 N_2O 积累量占($NO+N_2O+N_2$)积累总量的比例。通过设置以 N_2O 作为唯一反硝化底物的实验, 进一步验证了硫化钠的添加显著增加潮土样本 N_2O 被完全还原的时间, 说明硫化钠的添加对于 N_2O 的还原具有抑制作用。Caffrey 等的研究表明罗斯基勒峡湾的反硝化细菌在短期(4.5 h)暴露于硫化物环境中时, 其反硝化代谢途径受到抑制^[32], 硫化物是通过抑制 N_2O 还原来抑制反硝化作用^[30-31]。

在设定培养时间内, 硫化钠对 16S rRNA 基因

的表达量没有显著影响, 说明硫化钠对活跃菌总量没有显著影响。因此在考虑硫化钠影响的时候, 反硝化功能基因表达量占 16S rRNA 基因表达量比例的变化趋势可以用来反映反硝化功能基因表达量的变化趋势。硫化钠的添加抑制了标准化的 *nosZ* 的表达量, 说明硫化钠从转录水平抑制了 N_2O 还原酶的活性, 进而抑制了 N_2O 还原。

在设定培养时间内, 硫化钠添加对于活跃总菌数量没有显著影响, 但导致了菌群结构的显著改变。硫化钠的添加抑制了固氮弧菌属 (*Azoarcus*)、微枝形杆菌属 (*Microvirga*)、剑菌属 (*Ensifer*)、氮氢单胞菌 (*Azohydromonas*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、斯科曼氏球菌属 (*Skermanella*)、申氏杆菌属 (*Shinella*) 和西索恩氏菌 (*Chthoniobacter*) 的转录, 降低了这些属的转录本丰度。氮氢单胞菌 (*Azohydromonas*)、斯科曼氏球菌属 (*Skermanella*) 和西索恩氏菌 (*Chthoniobacter*) 在 KEGG 数据库中暂无收录的反硝化代谢通路信息。在 KEGG 数据库中, 固氮弧菌属 (*Azoarcus*)、微枝形杆菌属 (*Microvirga*)、剑菌属 (*Ensifer*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 和申氏杆菌属 (*Shinella*) 分离的反硝化菌株的 N_2O 代谢能力可以分为三大类: (1) 不具备 N_2O 产生和还原能力的反硝化细菌, 包括芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 的分离菌株、微枝形杆菌属 (*Microvirga*) 的部分分离菌株 (*Microvirga ossetica*); (2) 具备产生 N_2O 能力的 N_2O 还原菌, 包括固氮弧菌属 (*Azoarcus*) 的分离菌株、申氏杆菌属 (*Shinella*) 的分离菌株、微枝形杆菌属 (*Microvirga*) 的部分分离菌株 (*Microvirga* sp. 17 mud 1-3 和 *Microvirga* sp. HR1)、剑菌属 (*Ensifer*) 的部分分离菌株 (*Ensifer adhaerens* Casida A); (3) 不具备产生 N_2O 能力的 N_2O 还原菌, 包括剑菌属 (*Ensifer*) 的部分分离菌株 (*Ensifer adhaerens* OV14 和 *Ensifer alkalisoli*)。之前报道过携带 N_2O 还原基因 (*nosZ*), 但无 N_2O 产生基因的反硝化细菌, 如 *Anaeromyxobacter dehalogenans* 和 *Wolinella succinogens*, 可将 N_2O 作为电子受体, 是环境中潜在活跃的 N_2O 汇^[49-52]。

结合本研究的实验结果, 硫化钠对于不具备产生 N_2O 能力的 N_2O 还原菌转录本丰度的抑制, 是硫化钠抑制 N_2O 还原的主要原因。

反硝化的中间产物 N_2O 的积累量, 取决于反硝化过程中 N_2O 产生和还原的量。虽然硫化钠的添加对于 N_2O 还原具有抑制作用, 但是硫化钠的添加未导致 N_2O 积累量的显著增加。推测可能是因为硫化钠的添加同时抑制了反硝化作用其他步骤的速率。硫化物抑制反硝化作用在淡水生态系统^[12,53]、沿海海域^[53-54]、反应器^[33]、农场土壤^[30]以及反硝化细菌^[30,55]中被报道过。

综上所述, 短时间暴露于硫化钠环境中, N_2O 还原会受到抑制。其可能的微生物学机制如下: (1) 硫化钠从转录水平抑制了 N_2O 还原酶基因的表达量; (2) 硫化钠抑制了不具备产生 N_2O 能力的 N_2O 还原菌的转录本丰度。

REFERENCES

- [1] Wang SY, Liu WY, Zhao SY, et al. Denitrification is the main microbial N loss pathway on the Qinghai-Tibet Plateau above an elevation of 5000 m[J]. Science of the Total Environment, 2019, 696: 133852
- [2] Conthe M, Wittorf L, Kuenen JG, et al. Life on N_2O : deciphering the ecophysiology of N_2O respiring bacterial communities in a continuous culture[J]. The ISME Journal, 2018, 12(4): 1142-1153
- [3] Ji MM, Wu XG, Wu XX, et al. Effect of overuse nitrogen fertilizer on bacterial community and N_2O emission from greenhouse soil[J]. Microbiology China, 2018, 45(6): 1323-1332 (in Chinese)
纪梦梦, 吴晓刚, 吴欣欣, 等. 过量施肥对设施菜田土壤菌群结构及 N_2O 产生的影响[J]. 微生物学通报, 2018, 45(6): 1323-1332
- [4] Ravishankara AR, Daniel JS, Portmann RW. Nitrous oxide (N_2O): the dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century[J]. Science, 2009, 326(5949): 123-125
- [5] Tiedje JM, Sextstone AJ, Myrold DD, et al. Denitrification: ecological niches, competition and survival[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1982, 48(6): 569-583
- [6] Schmidt CS, Richardson DJ, Baggs EM. Constraining the conditions conducive to dissimilatory nitrate reduction to ammonium in temperate arable soils[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2011, 43(7): 1607-1611
- [7] Liu Y, Wang JL. Reduction of nitrate by zero valent iron (ZVI)-based materials: a review[J]. Science of the Total Environment, 2019, 671: 388-403

- [8] Tugtás AE, Pavlostathis SG. Electron donor effect on nitrate reduction pathway and kinetics in a mixed methanogenic culture[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 98(4): 756-763
- [9] Akunna JC, Bizeau C, Moletta R. Nitrate and nitrite reductions with anaerobic sludge using various carbon sources: glucose, glycerol, acetic acid, lactic acid and methanol[J]. *Water Research*, 1993, 27(8): 1303-1312
- [10] Dong LF, Sobey MN, Smith CJ, et al. Dissimilatory reduction of nitrate to ammonium, not denitrification or anammox, dominates benthic nitrate reduction in tropical estuaries[J]. *Limnology and Oceanography*, 2011, 56(1): 279-291
- [11] Ogilvie BG, Rutter M, Nedwell DB. Selection by temperature of nitrate-reducing bacteria from estuarine sediments: species composition and competition for nitrate[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1997, 23(1): 11-22
- [12] Brunet RC, Garcia-Gil LJ. Sulfide-induced dissimilatory nitrate reduction to ammonia in anaerobic freshwater sediments[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1996, 21(2): 131-138
- [13] Mazéas L, Vigneron V, Le-Ménach K, et al. Elucidation of nitrate reduction pathways in anaerobic bioreactors using a stable isotope approach[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2008, 22(11): 1746-1750
- [14] Behrendt A, de Beer D, Stief P. Vertical activity distribution of dissimilatory nitrate reduction in coastal marine sediments[J]. *Biogeosciences*, 2013, 10(11): 7509-7523
- [15] He TT. Effects of garbage compost and its compound fertilizer on farmland CO₂ and CH₄ emissions flux[D]. Beijing: Master's Thesis of Capital Normal University, 2007 (in Chinese)
何婷婷. 垃圾堆肥及其复合肥对农田 CO₂、CH₄ 排放通量的影响[D]. 北京: 首都师范大学硕士学位论文, 2007
- [16] Li LJ. Effects of long-term compost application on soil health in Quzhou station[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2017 (in Chinese)
李丽君. 长期施用堆肥对曲周农田土壤健康影响[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2017
- [17] He TT, Hua L, Xu ZJ, et al. Influence of urban waste compost and compound fertilizer based on waste compost on flux of CO₂ and CH₄ from agricultural soils[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(3): 1153-1158 (in Chinese)
何婷婷, 华璐, 徐振剑, 等. 城市生活垃圾堆肥及其复合肥对农田 CO₂、CH₄ 排放影响的研究[J]. *农业环境科学学报*, 2007, 26(3): 1153-1158
- [18] Yang LC, Cosolini SI. A case study on converting organic farm waste vegetables to biogas using a cartridge design anaerobic digester[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2019, 189(2): 638-646
- [19] Janssen AJH, Lens PNL, Stams AJM, et al. Application of bacteria involved in the biological sulfur cycle for paper mill effluent purification[J]. *Science of the Total Environment*, 2008, 407(4): 1333-1343
- [20] Liu CS, Zhao DF, Yan LH, et al. Elemental sulfur formation and nitrogen removal from wastewaters by autotrophic denitrifiers and anammox bacteria[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 191: 332-336
- [21] Matsuto T, Zhang X, Matsuo T, et al. Onsite survey on the mechanism of passive aeration and air flow path in a semi-aerobic landfill[J]. *Waste Management*, 2015, 36: 204-212
- [22] Montalvo S, Huiliñir C, Borja R, et al. Anaerobic digestion of wastewater rich in sulfate and sulfide: effects of metallic waste addition and micro-aeration on process performance and methane production[J]. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 2019, 54(10): 1035-1043
- [23] Liang J. Disintegration dynamics of different green manures and their effects on soil nutrients[D]. Changsha: Master's Thesis of Hunan Agricultural University, 2018 (in Chinese)
梁军. 不同绿肥还田腐解动态及其对土壤养分的影响[D]. 长沙: 湖南农业大学硕士学位论文, 2018
- [24] Zhang XQ, Jing DD, Yang ZP, et al. Improvement of green manure alfalfa appropriate returned on dryland wheat yield and soil nutrient[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2019, 34(S1): 221-227 (in Chinese)
张晓琪, 景豆豆, 杨珍平, 等. 绿肥苜蓿合理还田提高旱地小麦产量及土壤养分研究[J]. *华北农学报*, 2019, 34(S1): 221-227
- [25] Qu HK, Gao YH, Han JR. Study on the reducing effect of nitrogen fertilizer in rice under returning alfalfa[J]. *Agricultural Equipment & Technology*, 2018, 44(1): 22-24 (in Chinese)
瞿怀康, 高月华, 韩九荣. 绿肥紫花苜蓿还田下水稻氮肥减量效应研究[J]. *农业装备技术*, 2018, 44(1): 22-24
- [26] Decatanzaro JB, Beauchamp EG, Drury CF. Denitrification vs dissimilatory nitrate reduction in soil with alfalfa, straw, glucose and sulfide treatments[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1987, 19(5): 583-587
- [27] Rütting T, Boeckx P, Müller C, et al. Assessment of the importance of dissimilatory nitrate reduction to ammonium for the terrestrial nitrogen cycle[J]. *Biogeosciences*, 2011, 8(7): 1779-1791
- [28] Wisniewski K, di Biase A, Munz G, et al. Kinetic characterization of hydrogen sulfide inhibition of suspended anammox biomass from a membrane bioreactor[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2019, 143: 48-57
- [29] Qiu SJ, Ju XT, Lu X, et al. Improved nitrogen management for an intensive winter wheat/summer maize double-cropping system[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2012, 76(1): 286-297
- [30] Tam TY, Knowles R. Effects of sulfide and acetylene on nitrous oxide reduction by soil and by *Pseudomonas*

- aeruginosa*[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1979, 25(10): 1133-1138
- [31] Lu WW, Zhang HL, Shi WM. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium in an anaerobic agricultural soil as affected by glucose and free sulfide[J]. European Journal of Soil Biology, 2013, 58: 98-104
- [32] Caffrey JM, Bonaglia S, Conley DJ. Short exposure to oxygen and sulfide alter nitrification, denitrification, and DNRA activity in seasonally hypoxic estuarine sediments[J]. FEMS Microbiology Letters, 2019, 366(1): fny288
- [33] Lu H, Huang HQ, Yang WM, et al. Elucidating the stimulatory and inhibitory effects of dissolved sulfide on sulfur-oxidizing bacteria (SOB) driven autotrophic denitrification[J]. Water Research, 2018, 133: 165-172
- [34] Molstad L, Dörsch P, Bakken LR. Robotized incubation system for monitoring gases (O₂, NO, N₂O, N₂) in denitrifying cultures[J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 71(3): 202-211
- [35] Yang LQ, Zhang XJ, Ju XT. Linkage between N₂O emission and functional gene abundance in an intensively managed calcareous fluvo-aquic soil[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 43283
- [36] Liu BB, Frostegård Å, Bakken LR. Impaired reduction of N₂O to N₂ in acid soils is due to a posttranscriptional interference with the expression of *nosZ*[J]. mBio, 2014, 5(3): e01383-14
- [37] Dees PM, Ghiorse WC. Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolates and extracted DNA[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2001, 35(2): 207-216
- [38] Yang LQ. N₂O production processes and the abundance and expression of relative functional genes in calcareous fluvo aquic soil[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2017 (in Chinese)
杨柳青. 石灰性潮土 N₂O 产生过程及相关功能基因丰度和表达[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2017
- [39] Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, et al. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set[J]. Microbiology, 2002, 148(1): 257-266
- [40] Bru D, Sarr A, Philippot L. Relative abundances of proteobacterial membrane-bound and periplasmic nitrate reductases in selected environments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(18): 5971-5974
- [41] Kandeler E, Deiglmayr K, Tscherko D, et al. Abundance of *narG*, *nirS*, *nirK*, and *nosZ* genes of denitrifying bacteria during primary successions of a glacier foreland[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(9): 5957-5962
- [42] Henry S, Baudoin E, López-Gutiérrez JC, et al. Quantification of denitrifying bacteria in soils by *nirK* gene targeted real-time PCR[J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 59(3): 327-335
- [43] Hallin S, Lindgren PE. PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(4): 1652-1657
- [44] Henry S, Bru D, Stres B, et al. Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(8): 5181-5189
- [45] Zhang QP, Wu YQ, Wang J, et al. Accelerated dysbiosis of gut microbiota during aggravation of DSS-induced colitis by a butyrate-producing bacterium[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 27572
- [46] Moeller AH, Suzuki TA, Phifer-Rixey M, et al. Transmission modes of the mammalian gut microbiota[J]. Science, 2018, 362(6413): 453-457
- [47] Segata N, Izard J, Waldron L, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation[J]. Genome Biology, 2011, 12(6): R60
- [48] Zhang X, Davidson EA, Mauzerall DL, et al. Managing nitrogen for sustainable development[J]. Nature, 2015, 528(7580): 51-59
- [49] Yoon S, Song B, Phillips RL, et al. Ecological and physiological implications of nitrogen oxide reduction pathways on greenhouse gas emissions in agroecosystems[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2019, 95(6): fiz066
- [50] Sanford RA, Wagner DD, Wu QZ, et al. Unexpected nondenitrifier nitrous oxide reductase gene diversity and abundance in soils[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(48): 19709-19714
- [51] Yoon S, Nissen S, Park D, et al. Nitrous oxide reduction kinetics distinguish bacteria harboring clade I *NosZ* from those harboring clade II *NosZ*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(13): 3793-3800
- [52] Hein S, Witt S, Simon J. Clade II nitrous oxide respiration of *Wolinella succinogenes* depends on the *NosG*, -C1, -C2, -H electron transport module, *NosB* and a Rieske/cytochrome *bc* complex[J]. Environmental Microbiology, 2017, 19(12): 4913-4925
- [53] Aelion CM, Warttinger U. Low sulfide concentrations affect nitrate transformations in freshwater and saline coastal retention pond sediments[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2009, 41(4): 735-741
- [54] Aelion CM, Warttinger U. Sulfide Inhibition of nitrate removal in coastal sediments[J]. Estuaries and Coasts, 2010, 33(3): 798-803
- [55] Sørensen J, Tiedje JM, Firestone RB, et al. Inhibition by sulfide of nitric and nitrous oxide reduction by denitrifying *Pseudomonas fluorescens*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1980, 39(1): 105-108