

# 土壤 N<sub>2</sub>O 和 NO 产生机制研究进展<sup>①</sup>

蔡延江<sup>1,2</sup>, 丁维新<sup>1\*</sup>, 项 剑<sup>1</sup>

(1 土壤与农业可持续发展国家重点实验室 (中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008;

2 山地表生过程与生态调控重点实验室 (中国科学院水利部成都山地灾害与环境研究所), 成都 610041)

**摘 要:** N<sub>2</sub>O 和 NO 是大气中两种重要的活性氮气体, 强烈影响着全球变化和生态环境。土壤是 N<sub>2</sub>O 和 NO 的重要排放源, 生物和非生物途径均可产生 N<sub>2</sub>O 和 NO。本文详细论述了自养硝化、异养硝化、生物反硝化、化学反硝化、硝化细菌反硝化和硝态氮异化还原成铵作用产生 N<sub>2</sub>O 和 (或) NO 的机制, 并对研究中存在的一些问题进行了探讨。

**关键词:** 氧化亚氮; 一氧化氮; 硝化作用; 反硝化作用; 温室气体

**中图分类号:** X142; X131.3

氧化亚氮 (N<sub>2</sub>O) 不仅是一种重要的温室气体, 而且还对平流层臭氧具有破坏作用, 从而使到达地球表面的紫外线辐射量增加, 因此其浓度变化及影响备受关注。大气 N<sub>2</sub>O 浓度已从工业革命前的 11 Tg/yr (N) 增加到了现今的 17.7 Tg/yr, 增幅达 61%, 而且仍以年均 0.26% 的速度增长<sup>[1]</sup>。氮氧化物 (NO<sub>x</sub>, 包括 NO 和 NO<sub>2</sub>, 以 NO 为主) 在对流层 O<sub>3</sub> 和 OH 自由基的光化学反应过程中起着决定性作用, 此外, 它还是酸沉降中 HNO<sub>3</sub> 的生成源<sup>[2]</sup>。大气中 NO<sub>x</sub> 的分布具有较大的时空变异性, 其浓度很难被精确地测定, 从全球 NO<sub>x</sub> 排放总量来看, 已从工业革命前的 12 Tg/yr 增加到 2000 年的 42 ~ 47 Tg/yr, 并也呈不断升高的态势<sup>[1]</sup>。大气 N<sub>2</sub>O 和 NO<sub>x</sub> 浓度的变化是各种自然因素和人为因素共同作用的结果, 减少或者有效控制其排放对缓解全球变化、改善生态环境具有重大意义, 而要想做到切实可行的减排, 了解其产生机制则是不可或缺的。

土壤是 N<sub>2</sub>O 和 NO 的重要排放源, 硝化作用 (自养硝化和异养硝化)、反硝化作用 (生物反硝化和化学反硝化)、硝化细菌反硝化以及硝态氮异化还原成铵作用等都能产生 N<sub>2</sub>O 和 (或) NO<sup>[3-6]</sup>。不过, 长期以来, 硝化 (主要指自养硝化) 和反硝化 (主要指细菌异养反硝化) 一直被认为是土壤 N<sub>2</sub>O 和 NO 产生的主要过程, 而对其他产生过程的了解相对较少。本文综述了现有已知的 N<sub>2</sub>O 和 NO 产生过程及其产生机制, 并指

出了以往研究中存在的问题以及未来研究中需要加强研究的内容, 旨在为相关科研工作者提供有价值的理论参考和研究思路。

## 1 硝化作用

硝化作用是指微生物将铵 (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)、氨 (NH<sub>3</sub>) 或者有机氮 (RNH<sub>2</sub>) 等还原态氮转化为亚硝酸根 (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) 或者硝酸根 (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) 等氧化态氮的过程。硝化作用可分为自养硝化和异养硝化, 但传统意义上的硝化作用即是指自养硝化。N<sub>2</sub>O 和 NO 是在硝化微生物驱动下将还原态氮氧化为氧化态氮过程中形成的副产物。

### 1.1 自养硝化

自养硝化菌以 CO<sub>2</sub> 为碳源, 从 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (或 NH<sub>3</sub>) 的氧化过程中获得能量。自养硝化作用主要包括两个阶段<sup>[7]</sup>: 第一步是在氨单加氧酶 (Ammonia monooxygenase, AMO) 和羟胺氧化还原酶 (Hydroxylamine oxidoreductase, HAO) 的催化下, 将 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (或 NH<sub>3</sub>) 氧化成 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NH<sub>2</sub>OH (NOH) 是其中间产物; 第二步是在亚硝酸盐氧化还原酶 (Nitrite oxidoreductase, NOR) 的催化下, 将 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 进一步氧化成 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (图 1)。一般认为, 这两步分别由氨氧化细菌 (Ammonia-oxidizing bacteria, AOB) 和亚硝酸盐氧化菌 (Nitrite-oxidizing bacteria, NOB) 两类微生物驱动完成。现今土壤中唯一分离出的 NOB 为硝化菌属 (*Nitrobacter*), 主要包含两个种 (*winogradskyi* 和 *agilis*)<sup>[8]</sup>。

①基金项目: 国家自然科学基金项目 (40971134) 和中国科学院知识创新重要方向性项目 (KZCX2-YW-439) 资助。

\* 通讯作者 (wxding@issas.ac.cn)

作者简介: 蔡延江 (1983—), 男, 江苏泗阳人, 博士研究生, 主要从事农田土壤碳氮循环的研究。E-mail: yanjiangcai@163.com

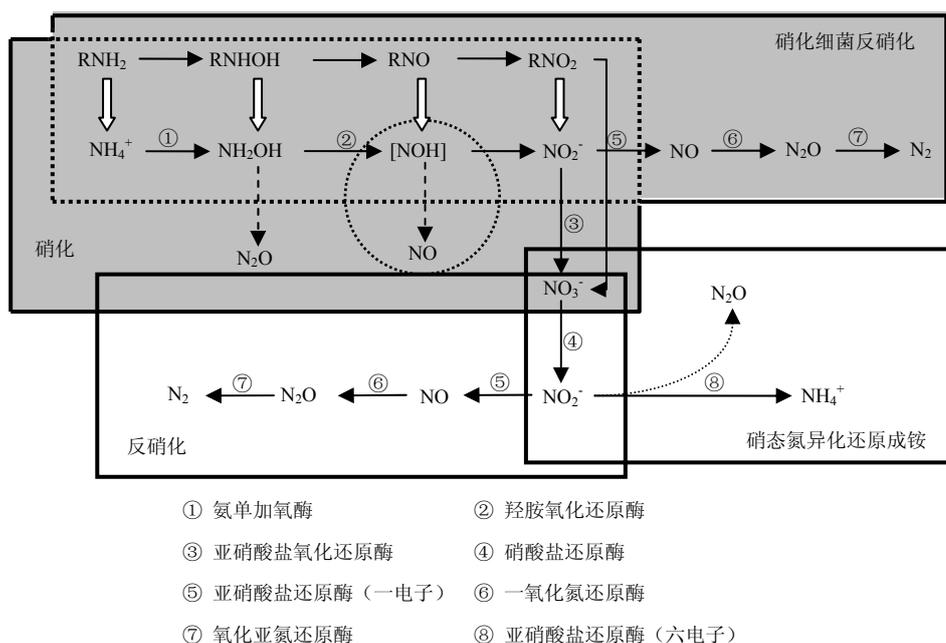


图 1 硝化、硝化细菌反硝化、反硝化和硝态氮异化还原成铵作用的途径及相关的酶（灰色部分表示硝化微生物的作用过程）<sup>[3-7]</sup>  
 Fig. 1 Nitrification, nitrifier denitrification, denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium: outline of the pathway and enzymes involved

由于氨氧化作用是硝化过程的限速步骤，因而在氮生物地球化学循环的微生物学研究中氨氧化过程比亚硝酸盐氧化过程更受关注。长期以来，典型的氨氧化过程被普遍认为是变形菌纲中氨氧化细菌进行的专性好氧的化能自养过程<sup>[7]</sup>。在厌氧氨氧化细菌（Anammox bacteria）<sup>[9]</sup>和氨氧化古菌（Ammonia-oxidizing archaea, AOA）<sup>[10]</sup>被发现之后，人们才意识到对氨氧化微生物认知的广度和深度还远远不够。AOA 是一类以重碳酸盐为碳源并独立于 AOB 进化分支外的进化类群（*amoA* 基因在进化树上分歧成不同的分支），属于泉古菌门（*Crenarchaeota*）<sup>[11]</sup>。土壤中可分离出包括亚硝化单胞菌属（*Nitrosomonas*）、亚硝化螺菌属（*Nitrospira*）、亚硝化叶菌属（*Nitrosolobus*）、亚硝化球菌属（*Nitrosococcus*）和亚硝化弧菌属（*Nitrosovibrio*）等 AOB 菌属<sup>[12]</sup>，不过，陆地生态系统中的 AOB 主要集中于变形菌纲 β 亚群的 *Nitrosomonas* 和 *Nitrospira* 两个属<sup>[8]</sup>。

AMO 的 3 个结构基因 *amoA*、*amoB* 和 *amoC* 在 AOA 与 AOB 之间有一定的差异<sup>[13]</sup>。*amoA* 常被用作分子标记来反映环境中氨氧化微生物的种类、数量和活性，再者还可以用来分析氨氧化微生物的分布、群落结构差异和进化关系<sup>[11]</sup>。AOA 广泛分布于农业旱地土壤<sup>[14]</sup>、稻田土壤<sup>[15]</sup>、草地土壤<sup>[14, 16]</sup>和森林土壤<sup>[17]</sup>等陆地生态系统中。总体而言，陆地生态系统 AOA 的 *amoA* 基因数量比 AOB 高出约 2 ~ 3 个数量级<sup>[11]</sup>。不

过在农田土壤中，虽然 AOA 在数量上占绝对优势，但氨氧化过程却仍由 AOB 主导<sup>[18]</sup>。AOB 更多存在于表层土壤中，AOA 则相反，而且表层土壤的硝化速率明显高于较深层次土壤<sup>[16]</sup>。多种烃类化合物都被证明能被 AMO 作为底物而利用，这些物质可通过竞争或共价结合 AMO 的活性点位而抑制 AMO 对氨的氧化<sup>[19]</sup>，与 AOB 不同，AOA 在添加乙炔和硝化抑制剂的情况下仍可对土壤硝化作用产生贡献<sup>[16, 20]</sup>。因而在以往使用硝化抑制剂或者乙炔来区分 N<sub>2</sub>O 和 NO 不同产生过程的研究中，由于未能完全抑制氨氧化作用，进而可能导致对氨氧化过程以及硝化作用贡献量的低估。

### 1.2 异养硝化

异养硝化作用即是指异养硝化微生物在以有机碳作为碳源和能源的情况下，将还原态氮转化为氧化态氮的过程。与自养硝化作用不同，异养硝化作用的底物既可以是无机氮也可以是有机氮（图 1）。异养硝化现象早在 19 世纪末、20 世纪初就被发现，但由于人们对自然界硝化作用的理解长期禁锢在自养硝化过程，以及异养硝化过程的众多未知性，导致这方面的报道一直很少。直到 20 世纪中期分离获得具有产生 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 能力的异养菌株，异养硝化过程才重新引起研究者的关注<sup>[21]</sup>。现已证实有多种细菌，如脱氮副球菌（*Paracoccus denitrificans*，更名前为 *Thiosphaera pantotropha*），粪产碱杆菌（*Alcaligenes faecalis*）和恶臭假单胞菌（*Pseudomonas putida*）等以及部分真菌，

如柱孢犁头霉菌 (*Absidia cylindrospora*) 等微生物可进行异养硝化作用<sup>[8, 22]</sup>。在好氧条件下, 单个异养硝化菌产生 NO 的量与自养硝化菌产生量相当, 但其产生 N<sub>2</sub>O 的能力却远高于自养硝化菌<sup>[23]</sup>。不过, 通常情况下, 异养硝化产生的 N<sub>2</sub>O 仅占土壤 N<sub>2</sub>O 总排放量的一小部分, 在特定的环境下 (如低 pH、高 O<sub>2</sub> 含量和高有机碳有效性等), 异养硝化菌才能产生大量的 N<sub>2</sub>O<sup>[4, 23]</sup>。与自养硝化细菌不同的是, 异养硝化菌不仅 AMO 活性不受低浓度 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 的抑制<sup>[21]</sup>, 而且某些异养硝化细菌还可同时进行好氧反硝化作用, 并且在 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 或 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 还原为 N<sub>2</sub> 的过程中产生 N<sub>2</sub>O 和 NO。*Thiosphaera pantotropha* 就兼有异养硝化和好氧反硝化两种功能<sup>[8]</sup>, 另外一种异养硝化菌 (*Alcaligenes faecalis*, 同时也是一种反硝化细菌) 也可在溶解 O<sub>2</sub> 浓度小于 50% 空气饱和度的培养体系中进行好氧反硝化<sup>[24]</sup>。然而, 关于异养硝化耦合好氧反硝化的反应机制及其在氮循环体系中的作用和生态系统中的地位仍不甚明确。不过, 异养硝化耦合好氧反硝化过程与后述内容中的硝化细菌反硝化有两点不同, 一是可能伴有 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的生成, 二是发生的环境条件 (O<sub>2</sub> 含量、作用酶等) 不同<sup>[4, 25]</sup>。

虽然耐酸的自养生物也可以在酸性条件下进行硝化作用<sup>[26]</sup>, 但通常认为酸性土壤 (特别是酸性森林土壤) 中硝化作用的主要承担者是异养硝化微生物 (一般认为以真菌为主), 自养硝化细菌则主导着农业土壤中的硝化作用<sup>[3]</sup>。在常规的农田生态系统中, 异养硝化作用较弱, 而一旦农耕土壤的生态环境与酸性森林土壤相似时, 异养硝化的重要性开始凸现。在长期施用氮肥的黑土上, Cai 等<sup>[27]</sup>研究发现, 在 70% WHC 和 25°C 的培养条件下, 自养硝化、异养硝化、反硝化和硝化细菌反硝化对土壤 N<sub>2</sub>O 排放的贡献量分别为 19%、38%、28% 和 15%, 并认为长期施用氮肥导致土壤 pH 下降以及较高的土壤有机碳含量是异养硝化占主导作用的主要原因。长期施肥导致中国农田土壤酸化已是一个不争的事实<sup>[28]</sup>, 农田土壤固碳、地力提升已是当今研究的热点, 在这种情势下, 农田土壤的异养硝化能力是否会增加还有待进一步研究。

## 2 反硝化作用

广义上的反硝化作用是指在厌氧条件下, 反硝化微生物将 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 或 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 还原转化为气态 NO、N<sub>2</sub>O 和 N<sub>2</sub> 的过程。土壤反硝化可分为生物反硝化和化学反硝化, 其中生物反硝化过程更为重要。反硝化作用是氮素循环的最后一步, 即活性氮回归惰性氮的过程, 因而反硝化过程对维持大气中氮素平衡和调节生态系统

活性氮库具有重要意义。

### 2.1 生物反硝化

生物反硝化即指在微生物的作用下, 将 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 或 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 还原为分子态氮的过程。在以往的很长一段时间内, 生物反硝化一直被认为是一个原核表达过程, 且仅由反硝化细菌操作完成, 这种观点在真菌和古菌反硝化被发现后才得以改变<sup>[25]</sup>。大多数反硝化微生物是异养型的兼性厌氧细菌, 异养反硝化细菌 (假单胞菌属 *Pseudomonas*, 产碱杆菌属 *Alcaligenes*, 芽孢杆菌属 *Bacillus* 等) 在有氧条件下, 进行有氧呼吸, 以氧为最终电子受体, 不发生反硝化作用, 但在厌氧条件下, 异养反硝化细菌以氮氧化物为最终电子受体, 有机碳为电子供体, 进行电子传递氧化磷酸化作用<sup>[4]</sup>。参与反硝化作用的酶包括硝酸盐还原酶 (Nitrate reductase, NaR)、亚硝酸盐还原酶 (Nitrite reductase, NiR)、一氧化氮还原酶 (Nitric oxide reductase, NOR) 和氧化亚氮还原酶 (Nitrous oxide reductase, N<sub>2</sub>OR) (图 1)。乙炔、一氧化碳、叠氮化物、氰化物以及硫化物均可抑制 N<sub>2</sub>O 还原酶活性<sup>[29]</sup>。由于乙炔抑制技术的简单性和有效性, 高浓度乙炔 (>10 kPa) 常被用于抑制 N<sub>2</sub>O 还原为 N<sub>2</sub> 的过程来评估土壤反硝化。

真菌反硝化最早被 Bollag 和 Tung<sup>[30]</sup>报道于 1972 年, 他们研究发现镰刀菌属 (*Fusarium*) 的两种丝状真菌可以在低 O<sub>2</sub> 浓度条件下将 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 还原并同时释放 N<sub>2</sub>O。随后又有研究者发现丝状真菌的其他菌属 (如 *Cylindrocarpon*, *Gibberella*, *Trichosporon*, *Aspergillus* 等) 发生反硝化的现象<sup>[31]</sup>。新近, Prendergast-Miller 等<sup>[32]</sup>在森林土壤中研究发现外生菌根真菌 (*Paxillus involutus* 和 *Tylospora fibrillosa*) 也可将 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 还原为 N<sub>2</sub>O。与反硝化细菌相比, 反硝化真菌对 O<sub>2</sub> 浓度的适应范围更大, 不过, 过量 O<sub>2</sub> 都会抑制其发生反硝化<sup>[33]</sup>。虽有部分真菌 (如 *Fusarium oxysporum* 和 *Gibberella fujikuroi* 等) 可以将 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 或 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 还原生成 N<sub>2</sub>O, 但大部分反硝化真菌只能将 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 还原, 这表明 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 可以作为更有效的底物而被反硝化真菌利用<sup>[31]</sup>。近期有研究指出, 反硝化真菌对土壤反硝化潜力有一定的贡献, 且不论在有氧还是无氧的情况下, 真菌反硝化都可在一定程度上影响土壤 N<sub>2</sub>O 排放<sup>[25]</sup>。古菌反硝化的发现要晚于真菌反硝化, Cabello 等<sup>[34]</sup>发现超嗜热菌 (*Pyrobaculum aerophilum*) 和好盐菌 (*Haloferax denitrificans*) 等古菌可发生反硝化作用。与反硝化细菌一样, 反硝化古菌也可通过异化还原作用将 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 相继转化为 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>、NO、N<sub>2</sub>O, 并最终产生 N<sub>2</sub>。不过生化分析和基因组序列分析数据表明, 这些古菌和细菌

的反硝化酶基因及其结构和调控机理有一定差异<sup>[34]</sup>。然而，关于反硝化古菌方面的研究多限于纯培养体系，对土壤等自然生态系统中古菌反硝化的研究报道几乎没有<sup>[25]</sup>。明确反硝化真菌和古菌的生态学特征及其反硝化对土壤反硝化总量的贡献，将会进一步拓宽人们对土壤异养反硝化体系的认知。

生物反硝化不仅包括以有机碳为能源的异养反硝化，还包括能源来源为其他化学物质的自养反硝化，自养反硝化即是指自养反硝化微生物将 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 还原为 N<sub>2</sub> 或者 N<sub>2</sub>O 的过程<sup>[35]</sup>。最常见的自养反硝化菌为脱氮硫杆菌 (*Thiobacillus denitrificans*) 和反硝化硫微螺菌 (*Thiomicrospira denitrificans*，现已更名为 *Sulfurimonas denitrificans*)<sup>[35-36]</sup>。自养反硝化菌可以在 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 存在下将还原态的硫化物 (如 S<sup>2-</sup>、S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> 和 SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> 等) 氧化而产生 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 以及 N<sub>2</sub><sup>[37]</sup>。部分还原态金属化合物或金属元素的存在也可促使自养反硝化的发生<sup>[36]</sup>。虽然自养反硝化广泛分布于陆地生态系统的土壤、蓄水层以及沉积物等环境中，但是对其生态学特征及意义还缺乏较为系统的研究<sup>[35]</sup>。低有机碳含量的厌氧环境下，NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 与还原态铁离子 (元素)、硫等物质共存时有利于自养反硝化的发生，因而以往的研究主要偏向于海岸/海底沉积物、咸水湖泊、碱湖以及城市给排水处理系统等自养反硝化易于发生或可适当调控的领域<sup>[35, 38]</sup>，对土壤中自养反硝化的研究关注较少。不过有研究发现，稻田土壤中也存在着 Fe<sup>2+</sup> 与 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 间的自养反硝化过程<sup>[39]</sup>。土壤硝化过程形成的 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 极易淋溶进入深层土壤或者地下水层，这种情况下是否会出现自养反硝化现象？如果在铁、硫矿产区，由于还原态铁、硫化合物的存在，是否会加剧深层土壤或地下水层的自养反硝化？这些应该在未来研究中多加以考虑。

## 2.2 化学反硝化

化学反硝化是指 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 自身的化学分解或 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 与其他物质的化学反应作用，其产物主要为 NO<sub>x</sub>，N<sub>2</sub>O 和 N<sub>2</sub><sup>[12]</sup>。在 pH < 5.5 时，NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 的自身化学分解反应会产生 NO 和 NO<sub>2</sub>，此外，NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 还可与还原态金属离子 (如 Fe<sup>2+</sup>、Cu<sup>+</sup> 等) 发生化学反应生成 NO 以及少量的 N<sub>2</sub>O 和 N<sub>2</sub><sup>[40]</sup>。NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 也可与 NH<sub>2</sub>OH 反应而生成 N<sub>2</sub>O，但产生量也较少<sup>[41]</sup>。NH<sub>2</sub>OH 与 MnO 反应生成的 N<sub>2</sub>O 量远高于 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 分解产生的 N<sub>2</sub>O 量<sup>[12]</sup>。除此之外，NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 与某些有机物质 (如酚类化合物、腐殖质等) 反应先形成易分解的中间产物 (如 -N=O 等) 并最终产生 NO、N<sub>2</sub>O 和 N<sub>2</sub><sup>[42]</sup>。

NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 可以在碱性土壤中进行短暂积累，在酸性或

弱酸性土壤中则更容易被迅速分解掉，因而通常认为 pH 是调控土壤中化学反硝化的一个主要因素<sup>[40]</sup>。化学反硝化通常只有在低 pH 时才被作为 N<sub>2</sub>O 的一个产生源而加以考虑，不过该过程产生的 N<sub>2</sub>O 量比 NO 或 N<sub>2</sub> 少，也远小于硝化或反硝化过程产生的 N<sub>2</sub>O 量<sup>[12]</sup>。Nägele 和 Conrad<sup>[43]</sup> 研究发现，在 pH = 4 时，土浆产生的 N<sub>2</sub>O 和 NO 分别有 6% 和 71% 来自于化学反硝化。Ding 等<sup>[44]</sup> 在砂壤土上研究发现，灭菌土壤完全抑制了 N<sub>2</sub>O 的排放，而化学反硝化对不同施肥处理土壤 NO 排放的贡献为 6.7% ~ 12.7%。综上分析，化学反硝化的强弱主要受 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 的积累、土壤 pH、有机质以及还原态金属离子等因素的影响。虽然化学反硝化对土壤 N<sub>2</sub>O 排放的贡献量非常小，但是在酸性或酸化土壤中发生化学反硝化的可能性及其对 NO 排放的贡献却是不容忽视的。

## 3 硝化细菌反硝化

硝化细菌反硝化即是指硝化细菌驱动下的 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 还原过程，该过程的第一阶段是将 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (NH<sub>3</sub>) 氧化成 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>，第二阶段是将 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 还原成 NO、N<sub>2</sub>O 和 N<sub>2</sub>，这两个阶段可分别归属于硝化和反硝化过程 (图 1)。与同步硝化反硝化不同，硝化细菌反硝化整个过程没有 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的生成而且仅由氢氧化细菌这一类微生物参与，同步硝化反硝化则会有 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的生成并且分别由硝化和反硝化菌两类微生物参与完成<sup>[4]</sup>。陆地生态系统中常见的两种 AOB 菌属 (*Nitrosomonas* 和 *Nitrospira*) 均可以发生硝化细菌反硝化作用<sup>[45]</sup>。即使纯培养体系中硝化细菌反硝化是一种普遍现象，但在土壤中实际发生的情况及其对土壤氮素转化的重要性还知之甚少，而且由于研究方法的局限性，对于硝化细菌反硝化的研究存在着很大的不确定性<sup>[46]</sup>。气体抑制法 (O<sub>2</sub>、C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 等) 具有经济性和易操作性，以往有很多研究者采用此法研究了硝化细菌反硝化对土壤 N<sub>2</sub>O 和 NO 排放的贡献<sup>[6, 27, 47]</sup>，但抑制的不完全性可能导致对硝化细菌反硝化贡献量的低估。<sup>15</sup>N 同位素示踪技术虽然常被用来区分硝化和反硝化对土壤 N<sub>2</sub>O 排放的贡献，但却无法区分硝化细菌反硝化过程。随着研究的深入，<sup>18</sup>O-<sup>15</sup>N 双同位素标记法的建立以及随后的改进方法能更为精确地区分硝化细菌反硝化、硝化、反硝化以及同步硝化反硝化对土壤 N<sub>2</sub>O 的贡献<sup>[46-47]</sup>，但由于其昂贵性以及对操作要求的精确性，该方法未能得到广泛应用。在对两种方法的评估实验中，Wrage 等<sup>[47]</sup> 发现 <sup>18</sup>O-<sup>15</sup>N 双同位素标记法和气体抑制法测得的硝化细菌反硝化对土壤 N<sub>2</sub>O 排放的贡献分别为 44% 和 40%，

表明虽然气体抑制法存在着低估效应,但两种方法之间仍具有一定的可比性。

在高的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  (或  $\text{NH}_3$ ) 含量、低有机碳和氧气含量以及低 pH 环境下有利于硝化细菌反硝化的进行<sup>[4]</sup>。在以往的研究中,硝化细菌反硝化对  $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{NO}$  排放的贡献或被计入硝化,也或被计入反硝化,使得硝化或者反硝化的贡献被高估或低估,也使得人们对土壤  $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{NO}$  产生机制的理解出现偏颇。迄今关于农田生态系统土壤硝化细菌反硝化的研究还相对较少,但硝化细菌反硝化也应作为农田土壤  $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{NO}$  排放的一个重要产生过程而多加关注<sup>[46]</sup>,在未来的研究中需要对硝化细菌反硝化的发生条件以及贡献作更深入的研究。

#### 4 硝态氮异化还原成铵作用

$\text{NO}_3^-$  异化还原过程不仅包括以气态氮化物为主要产物的反硝化过程,还有另外一类以  $\text{NH}_4^+$  为主要产物的硝态氮异化还原成铵过程<sup>[6]</sup>。土壤有机氮矿化和 DNRA 都可以产生  $\text{NH}_4^+$ ,但 DNRA 过程除了生成  $\text{NH}_4^+$  外,还常伴有  $\text{NO}_2^-$  的短暂积累和  $\text{N}_2\text{O}$  的排放。DNRA 过程主要分为两个阶段,首先在硝酸盐还原酶 (NaR) 的催化下,将  $\text{NO}_3^-$  还原成  $\text{NO}_2^-$ ,其次在亚硝酸还原酶 (与反硝化的 NiR 不同, DNRA 的 NiR 可进行六电子传递作用) 存在时将  $\text{NO}_2^-$  转化为  $\text{NH}_4^+$  (图 1)。专性厌氧菌 (如 *Clostridium* spp. 等)、兼性厌氧菌 (如 *Enterobacter* 等) 和好氧菌 (如 *Bacillus* spp. 等) 均可进行 DNRA 作用<sup>[48]</sup>。一般认为,反硝化是土壤中  $\text{NO}_3^-$  异化还原的主要过程,而 DNRA 则是海水和淡水沉积物中的重要过程,但在某些特定的条件下 (如高 pH、高  $\text{C}/\text{NO}_3^-$  比以及厌氧环境), DNRA 也可能在土壤氮素转化过程中起着重要的作用<sup>[49-51]</sup>。土壤中 DNRA 的发现多在于有机碳含量较高的草地、森林等自然土壤中<sup>[19, 51-52]</sup>,关于农田土壤 DNRA 过程的研究则较少<sup>[48]</sup>。在没有添加外源碳的澳大利亚和中国稻田土壤中,分别仅有 14.9% 和 5% 的  $\text{NO}_3^-$ -N 被 DNRA 过程利用<sup>[48]</sup>,表明反硝化仍是农田土壤 (尤其是旱地土壤) 中  $\text{NO}_3^-$  异化还原的主要过程。DNRA 过程能产生一定量的  $\text{N}_2\text{O}$ ,但能否产生  $\text{NO}$  还鲜有报道。由于反硝化和 DNRA 过程对底物  $\text{NO}_3^-$  存在着竞争利用,因而 DNRA 作用的增强,不仅可以减少土壤氮素损失,还可以降低土壤反硝化  $\text{N}_2\text{O}$  的排放。

#### 5 结语

生物途径 (硝化、反硝化和硝化细菌反硝化等)

对土壤  $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{NO}$  排放的贡献相对较大,而非生物途径如化学反硝化产生的  $\text{N}_2\text{O}$  量则很少,但非生物途径对土壤 (尤其是酸性土壤)  $\text{NO}$  排放的贡献却是不容忽视的。尽管有关土壤中  $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{NO}$  的众多产生过程已取得了重要的进展,但由于不同过程之间是相互联系的,而且土壤是一个不均匀体,好氧和厌氧区域镶嵌组成一个有机整体,土壤中产生  $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{NO}$  的各种过程可在土壤的不同微域内同时进行,目前尚无完善的分析方法来严格区分不同的产生过程,基于过程抑制剂以及同位素示踪手段来区分不同产生过程的方法仍存在着很大的不确定性。随着关于  $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{NO}$  产生相关的新微生物种类的不断发现,迫切需要进一步加大力度研究相关微生物的生理生化条件与  $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{NO}$  产生机制以及相关的酶学机理。运用分子生物学技术与同位素示踪技术有效地将微生物与  $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{NO}$  排放相结合,可能更好地阐释土壤  $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{NO}$  的产生机制,对此还需作进一步的深入研究。

#### 参考文献:

- [1] IPCC. Changes in atmospheric constituents and in radiative forcing // Solomon S, Qin D, Manning M. Climate Change 2007: the Physical Science Basis, Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge, United Kingdom/New York, NY, USA: Cambridge University Press, 2007
- [2] 徐文彬.  $\text{NO}_x$  大气化学概论及全球  $\text{NO}_x$  释放源综述. 地质地球化学, 1999, 27(3): 86-93
- [3] Killham K. Nitrification in coniferous forest soils. Plant and Soil, 1990, 128(1): 31-44
- [4] Wrage N, Velthof GL, van Beusichem ML, Oenema O. Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. Soil Biology and Biochemistry, 2001, 33(12/13): 1723-1732
- [5] Klotz MG, Stein LY. Nitrifier genomics and evolution of the nitrogen cycle. FEMS Microbiology Letters, 2008, 278(2): 146-156
- [6] Baggs EM. A review of stable isotope techniques for  $\text{N}_2\text{O}$  source partitioning in soils: Recent progress, remaining challenges and future considerations. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2008, 22(11): 1664-1672
- [7] Kowalchuk GA, Stephen JR. Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. Annual Review of Microbiology, 2001, 55: 485-529
- [8] De Boer W, Kowalchuk GA. Nitrification in acid soils: Microorganisms and mechanisms. Soil Biology and Biochemistry,

- 2001, 33(7/8): 853-866
- [9] Strous M, Fuerst JA, Kramer EHM, Logemann S, Muyzer G, van de Pas-Schoonen KT, Webb R, Kuenen JG, Jetten MSM. Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature*, 1999, 400 (6 743): 446-449
- [10] Konneke M, Bernhard AE, de la Torre JR, Walker CB, Waterbury JB, Stahl DA. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 2005, 437(7 058): 543-546
- [11] 刘晶静, 吴伟祥, 丁颖, 石德智, 陈英旭. 氨氧化古菌及其在氮循环中的重要作用. *应用生态学报*, 2010, 21(8): 2 154-2 160
- [12] Bremner J. Sources of nitrous oxide in soils. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 1997, 49(1): 7-16
- [13] Nicol GW, Schleper C. Ammonia-oxidising Crenarchaeota: Important players in the nitrogen cycle? *Trends in Microbiology*, 2006, 14(5): 207-212
- [14] Leininger S, Urich T, Schloter M, Schwark L, Qi J, Nicol GW, Prosser JI, Schuster SC, Schleper C. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 2006, 442 (7 104): 806-809
- [15] Chen XP, Zhu YG, Xia Y, Shen JP, He JZ. Ammonia-oxidizing archaea: Important players in paddy rhizosphere soil? *Environmental Microbiology*, 2008, 10(8): 1 978-1 987
- [16] Di HJ, Cameron KC, Shen JP, Winefield CS, O'Callaghan M, Bowatte S, He JZ. Ammonia-oxidizing bacteria and archaea grow under contrasting soil nitrogen conditions. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 72(3): 386-394
- [17] Boyle-Yarwood SA, Bottomley PJ, Myrold DD. Community composition of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in soils under stands of red alder and Douglas fir in Oregon. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11): 2 956-2 965
- [18] Jia ZJ, Conrad R. Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(7): 1 658-1 671
- [19] McCarty GW. Modes of action of nitrification inhibitors. *Biology and Fertility of Soils*, 1999, 29(1): 1-9
- [20] Offre P, Prosser JI, Nicol GW. Growth of ammonia-oxidizing archaea in soil microcosms is inhibited by acetylene. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, 70(1): 99-108
- [21] 王一明, 彭光浩. 异养硝化微生物的分子生物学研究进展. *土壤*, 2003, 35(5): 378-386
- [22] Stroo HF, Klein TM, Alexander M. Heterotrophic nitrification in an acid forest soil and by an acid-tolerant fungus. *Applied and Environmental Microbiology*, 1986, 52(5): 1 107-1 111
- [23] Anderson IC, Poth M, Homstead J, Burdige D. A comparison of NO and N<sub>2</sub>O production by the autotrophic nitrifier *Nitrosomonas europaea* and the heterotrophic nitrifier *Alcaligenes faecalis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(11): 3 525-3 533
- [24] Kuenen JG, Robertson LA. Combined nitrification-denitrification processes. *FEMS Microbiology Reviews*, 1994, 15(2/3): 109-117
- [25] Hayatsu M, Tago K, Saito M. Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2008, 54(1): 33-45
- [26] Burton SAQ, Prosser JI. Autotrophic ammonia oxidation at low pH through urea hydrolysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(7): 2 952-2 957
- [27] Cai YJ, Ding WX, Zhang XL, Yu HY, Wang LF. Contribution of heterotrophic nitrification to nitrous oxide production in a long-term N-fertilized arable black Soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 2010, 41(19): 2 264-2 278
- [28] Guo JH, Liu XJ, Zhang Y, Shen JL, Han WX, Zhang WF, Christie P, Goulding KWT, Vitousek PM, Zhang FS. Significant acidification in major Chinese croplands. *Science*, 2010, 327 (5 968): 1 008-1 010
- [29] Hochstein LI, Tomlinson GA. The enzymes associated with denitrification. *Annual Review of Microbiology*, 1988, 42: 231-261
- [30] Bollag JM, Tung G. Nitrous oxide release by soil fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 1972, 4(3): 271-276
- [31] Shoun H, Kim DH, Uchiyama H, Sugiyama J. Denitrification by fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 1992, 94(3): 277-281
- [32] Prendergast-Miller MT, Baggs EM, Johnson D. Nitrous oxide production by the ectomycorrhizal fungi *Paxillus involutus* and *Tylospora fibrillosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 2011, 316(1): 31-35
- [33] Zhou ZM, Takaya N, Sakairi MAC, Shoun H. Oxygen requirement for denitrification by the fungus *Fusarium oxysporum*. *Archives of Microbiology*, 2001, 175(1): 19-25
- [34] Cabello P, Roldan MD, Moreno-Vivian C. Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea. *Microbiology-SGM*, 2004, 150: 3 527-3 546
- [35] Shao MF, Zhang T, Fang HHP. Sulfur-driven autotrophic denitrification: Diversity, biochemistry, and engineering applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 88(5): 1 027-1 042
- [36] Shao MF, Zhang T, Fang HHP. Autotrophic denitrification and its effect on metal speciation during marine sediment remediation. *Water Research*, 2009, 43(12): 2 961-2 968
- [37] Cardoso RB, Sierra-Alvarez R, Rowlette P, Flores ER, Gomez J,

- Field JA. Sulfide oxidation under chemolithoautotrophic denitrifying conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 95(6): 1 148-1 157
- [38] Kleerebezem R, Mendez R. Autotrophic denitrification for combined hydrogen sulfide removal from biogas and post-denitrification. *Water Science and Technology*, 2002, 45(10): 349-356
- [39] Ratering S, Schnell S. Nitrate-dependent iron(II) oxidation in paddy soil. *Environmental Microbiology*, 2001, 3(2): 100-109
- [40] Van Cleemput O, Baert L. Nitrite: A key compound in N loss processes under acid conditions? *Plant and Soil*, 1984, 76(1/3): 233-241
- [41] Bremner JM, Blackmer AM, Waring SA. Formation of nitrous oxide and dinitrogen by chemical decomposition of hydroxylamine in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 1980, 12(3): 263-269
- [42] Thorn KA, Mikita MA. Nitrite fixation by humic substances: Nitrogen-15 nuclear magnetic resonance evidence for potential intermediates in chemodenitrification. *Soil Science Society of America Journal*, 2000, 64(2): 568-582
- [43] Nägele W, Conrad R. Influence of pH on the release of NO and N<sub>2</sub>O from fertilized and unfertilized soil. *Biology and Fertility of Soils*, 1990, 10(2): 139-144
- [44] Ding WX, Yagi K, Cai ZC, Han FX. Impact of long-term application of fertilizers on N<sub>2</sub>O and NO production potential in an intensively cultivated sandy loam soil. *Water Air and Soil Pollution*, 2010, 212(1/4): 141-153
- [45] Shaw LJ, Nicol GW, Smith Z, Fear J, Prosser JI, Baggs EM. *Nitrosospora* spp. can produce nitrous oxide via a nitrifier denitrification pathway. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(2): 214-222
- [46] Kool DM, Wrage N, Zechmeister-Boltenstern S, Pfeffer M, Brus D, Oenema O, Van Groenigen JW. Nitrifier denitrification can be a source of N<sub>2</sub>O from soil: A revised approach to the dual-isotope labelling method. *European Journal of Soil Science*, 2010, 61(5): 759-772
- [47] Wrage N, van Groenigen JW, Oenema O, Baggs EM. A novel dual-isotope labelling method for distinguishing between soil sources of N<sub>2</sub>O. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2005, 19(22): 3 298-3 306
- [48] Yin SX, Chen D, Chen LM, Edis R. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium and responsible microorganisms in two Chinese and Australian paddy soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 2002, 34(8): 1 131-1 137
- [49] Pett-Ridge J, Silver WL, Firestone MK. Redox fluctuations frame microbial community impacts on N-cycling rates in a humid tropical forest soil. *Biogeochemistry*, 2006, 81(1): 95-110
- [50] Huygens D, Ruetting T, Boeckx P, Van Cleemput O, Godoy R, Mueller C. Soil nitrogen conservation mechanisms in a pristine south Chilean Nothofagus forest ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39(10): 2 448-2 458
- [51] Morley N, Baggs EM. Carbon and oxygen controls on N<sub>2</sub>O and N<sub>2</sub> production during nitrate reduction. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, 42(10): 1 864-1 871
- [52] Rutting T, Huygens D, Muller C, Cleemput O, Godoy R, Boeckx P. Functional role of DNRA and nitrite reduction in a pristine south Chilean Nothofagus forest. *Biogeochemistry*, 2008, 90(3): 243-258

## Mechanisms of Nitrous Oxide and Nitric Oxide Production in Soils: A Review

CAI Yan-jiang<sup>1,2</sup>, DING Wei-xin<sup>1</sup>, XIANG Jian<sup>1</sup>

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

2 Key Laboratory of Mountain Surface Processes and Ecological Regulation, Institute of Mountain Hazards and Environment, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

**Abstract:** N<sub>2</sub>O and NO are two important reactive nitrogen gases in the atmosphere, which have a strong influence on the global change and ecological environment. Soil is a significant source of N<sub>2</sub>O and NO and their production in soils involving both biotic and abiotic processes. This paper summarized six main mechanisms of N<sub>2</sub>O and/or NO production in soils, including autotrophic nitrification, heterotrophic nitrification, microbial denitrification, chemodenitrification, nitrifier denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. Some of the previous research results were also discussed and the perspectives for further study were put forward.

**Key words:** N<sub>2</sub>O, NO, Nitrification, Denitrification, Greenhouse gas