海岸带地区的固氮、氨化、硝化与反硝化特征

徐继荣¹,王友绍¹,孙 松²

(1. 中国科学院南海海洋研究所,广州 510301;2. 中国科学院海洋所,青岛 266071)

摘要:海岸带是海洋环境中受人类活动影响最大、生物地球化学循环最为活跃的地区。这一地区氮的生物地球化学循环包括:生物固氮、有机氮的氨化、氮的硝化、反硝化等4个主要过程。概括性地介绍了有关这四个过程的发生机制、环境影响因素及研究 方法等方面的研究动态、进展、存在的科学问题与今后的研究方向。

过去十几年来,固氮主要集中在对束毛藻属的研究上,其间有两个重要发现,一是生物固氮在海洋氮循环中的作用远比人 们以前的想象要重要得多;二是蓝细菌已经在海洋中存在了 20 亿年,它们有可能调节大气中的 CO₂,进而影响全球气候。由于 有机物的结构千差万别,含氮有机物的氨化过程可能是一个简单的矿化反应,也有可能是一系列复杂的代谢过程,在水解酶的 作用下含氮有机物降解为下一级化合物。硝化过程分两步进行,氨的硝化为反硝化细菌提供了重要的硝酸盐来源,通常采用同 位素方法来研究硝化过程。发生在沉积物中的反硝化过程是氮循环的关键步骤,反硝化过程一方面减少了海水中初级生产者可

利用的氮,另一方面产生了终结产物 N₂ 和 N₂O, 而 N₂O 是一种温室气体, 可能影响全球气候变化。 关键词: 海岸带; 固氮; 氨化; 硝化; 反硝化; 生物地球化学

The characteristics of nitrogen fixation, ammonification, nitrification and denitrification in coastal zones

XU Ji-Rong¹, WANG You-Shao¹, SUN Song² (1. South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China; 2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China). Acta Ecologica Sinica, 2004, 24 (12):2907~2914.

Abstract: The biogeochemical cycling of nitrogen is a significant factor influencing global climatic change. It is a complex process involving interactions between the atmosphere, seawater, sediments, and microorganisms. Nitrogen cycling is particularly active in estuarine and coastal zones, regions where human activities can impact on the natural process. There are four major processes in biogeochemical cycling: nitrification fixation; organic nitrogen ammonification; nitrification, and denitrification.

The mechanisms and physico-chemical factors regulating the four major processes will be reviewed, along with an outline of the active research directions in this field.

Recent research on nitrogen fixation has highlighted the role of Trichodesmium. Biological nitrogen fixation is a more important process than previously understood and may have an influence on the capacity of the oceans to sequester carbon. The nitrogen fixation rates of cyanobacterial mats can range from 0.8 to 76 g N /(m \cdot a). Usually, the contribution of cyanobacterial nitrogen fixation in estuaries is relatively small, but in tropical coastal marine lagoons, it may account for a significant proportion of the total annual nitrogen inputs. This research suggests that available organic carbon is probably the main factor limiting the nitrogen fixing potential in oligotrophic marine environments. The addition of carbon compounds such as glucose, polysaccharides, xylan or alginate can stimulate nitrogen fixation activity.

基金项目:中国科学院知识创新工程重要方向资助项目(KZCX3-SW-214);广东省自然科学基金资助项目(032622);中国科学院南海海洋研究 所知识创新工程前沿领域资助项目(LYQY200303)

收稿日期:2003-09-10;修订日期:2004-06-10

作者简介:徐继荣(1955~),男,安徽人,副教授,主要从事海洋环境化学、海洋生物地球化学研究。E-mail: Jirongxu@sina.com.cn

Foundation item: The Knowledge Innovation Project of CAS (No. KZCX3-SW-214); Natural Science Foundation of Guangdong Provinece (No.

032622); The Knowledge Innovation Project of SCS10(No. LYQY200303)

Received date:2003-09-10; Accepted date: 2004-06-10

Biography: XU Ji-Rong, Associate professor, mainly engaged in marine environmental chemistry & marine biogeochemistry.

Depending on the structural complexity of the organic matter, ammonification can be either a simple mineralization reaction or a complex series of metabolic steps involving a number of hydrolytic enzymes during which N-containing polymers. are broken down to their soluble sub-units. The ammonification rates for coastal sediments reported is ranged from 7 to 644 mg N/(m² • d), and is controlled by temperature, oxygen penetration into the sediment, the nature and concentration of organic matter and the physiological characteristics of microbial communities.

It is now recognised that the oxidation of ammonium plays a pivotal role in generating a source of nitrate for denitrifying bacteria. Ammonia oxidation to nitrate is a two-stage process, and a number of different methods have been developed to estimate nitrification rates in marine sediments. One of the most widely used is the ¹⁵N-NO₃⁻ isotope dilution technique. Many physico-chemical and biological factors are important in regulating nitrifying activity in coastal marine sediments including temperature, ammonium concentration, oxygen tension, pH, CO2 concentration, salinity, presence of inhibitory compounds, light, and macrofaunal activity.

Denitrification is a key process in the sediment nitrogen cycle since it decreases the amount of nitrogen available to the primary producers, as the gaseous end-products N₂O and N₂ diffuse into the atmosphere. In coastal marine systems that receive large quantities of nitrogen from anthropogenic sources, it also provides a mechanism to remove excess nitrogen and helps to control the rate of eutrophication in these environments. On the other hand, N₂O is a greenhouse gas that plays a key role in

both the stratospheric ozone and tropospheric heat budget. A number of methods have been employed to estimate denitrification rates in coastal marine sediment, such as mass balance, acetylene inhibition and the use of ¹⁵N as an isotopic tracer. Denitrification rates are regulated by a number of physico-chemical and biological factors including nitrate concentration, available carbon, temperature, oxygen depth penetration, Eh, pH, concentration of inhibitory compounds, salinity, light, and macrofaunal activity.

Key words: coastal zone; biological nitrogen fixation; ammonification; nitrification; denitrification; biogeochemistry **文章编号:**1000-0933(2004)12-2907-08 中图分类号:Q938.1,X142 文献标识码:A

氦是海洋中最为重要的生源要素之一。海洋中氮循环的研究始于 20 世纪 60 年代初, Menzel 等^[1]率先研究了百慕大外边 的马尾藻海域氦循环的年变化;此后,国际上许多学者致力于这方面的研究^[2~69]。20世纪80年代,以探索全球变化为目标的国 际前沿研究如:"国际地圈-生物圈计划(IGBP)","全球海洋通量联合研究(JGOFS)"等都将氮等生源要素的生物地球化学循环 列为研究重点。

海岸带的氦循环是一个涉及化学、生物、物理等多种要素的多相的复杂的生物地球化学过程,与陆地和开阔大洋相比其复 杂性更胜一筹。为了形象地描述这一过程,许多学者尝试用模型进行概括,如影响广泛的 Valiela 模型^[2]。在 George 的著作《海 岸带生态学》(The Ecology of Seashores)中给出了一个更为详尽的海岸带氮生物地球化学模型^[3]。

海岸带地区氮的生物地球化学循环主要包括以微生物为媒介的:生物固氮、有机氮的氨化、硝化、反硝化等过程。本文拟概 括性介绍这几个方面的研究进展和今后的趋势。

微生物固氮研究 1

微生物的固氮作用在海岸带十分活跃,尤其是在海草草场、岩礁区和红树林地区的沉积物中。许多学者认为微生物固氮是 控制海岸带环境初级生产力的重要因素[4.5]。

1.1 固氮微生物及固氮速率

固氮微生物属于原核生物(Procaryotes),分自养型和异养型。海洋中异养固氮菌的种群比较复杂,多数集中于沉积物中,水 相较少161。它们包括:好氧细菌、微需氧细菌、兼性厌氧菌、专性厌氧菌及古菌。近十几年来,海洋固氮主要集中束毛藻属 (Trichodesmium)的研究。其间有两个重大发现,一是生物固氮在海洋氮循环中的作用远比我们以前的想象要重要得多;二是蓝 细菌已经在海洋中存在了 20 亿年,它们有可能调节大气中的 CO_2 ,进而影响全球气候变化^[7]。 分子生物学为人们认识固氮转换过程的速率与生物群落的结构式之间的联系提供了强有力的工具^[8]。Jonathan 等根据固

氦基因的系统发育,对海洋中已发现的主要固氮微生物进行了基因聚类分析,描绘了固氮基因系统发育进化树,包括蓝细菌固 氦基因、α-protebacteria *nif* H 基因、β-protebacteria *nif* H 基因^[9]。

通常测定微生物固氮速率的方法有乙炔还原法、N混合法和同位素对法。近些年发展起来的高精度的同位素对质谱法实现 了直接测定净固氮量。

不同地区微生物固氮量相差很大(见表 1),通常在热带地 区观测到的固氮速率最高,夏威夷 Kaneohe 湾蓝细菌的固氮 量高达 76g-N/(m² · a)^[10]。对于人类活动输入氮量很高的河 口等海岸带地区微生物固氮所占的比例较低。Nixon 等估算在 Narragansett 湾沉积物固氮量只占总氮输入量的 4%^[13]。而对 于营养贫乏的热带海岸带固氮可能是氮输入的主要来源,这 一点已被近几年来对束毛藻属固氮研究所证实^[14]。根据 Smith 等人计算,澳大利亚鲨鱼湾及太平洋两个珊瑚岛海域,生物固 氮量占总输入氮量 56%~99%^[15]。

1.2 影响微生物固氮的因素

目前,国际上一般公认的生物固氮化学计量式为[16]:

 $N_2 + 8H^+ + 8e + 16MgATP \rightarrow 2NH_3$

 $+ H_2 + 16MgADP + 16Pi$

表 1 河口、海岸带固氮速率

Table 1 Nitrogen fixation rate in estuarine and coastal zone

生态系统	固氮速率(mg N/(m ² ・d))参考文献
Ecosystem	Nitrogen fixation rate	Reference
盐沼 Salt marsh	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
蓝绿细菌 Blue-green bacteria	$5 \sim 45$	[10]
沉积物细菌 Sediment bacteria	80	[10]
海草 Sea grass		
海龟草(真菌)Thalassia (Epiph	(a) $4 \sim 150$	[10]
海龟草(沉积物细菌)	20~80	[10]
Thalassia (Sediment bacteria)	0.5~10	[10]
河口沉积物 Estuary sediment	固氮速率(g N/(1	m ² • a))
夏威夷 Kaneohe 湾	0.60	[10]
日本 Vostok 湾	0.002	[11]
英国 Lune 河口	0.13	[12]

每固定一个分子氮至少需要约 16 个 ATP,因此,微生物固氮需要足够的能量;固氮微生物在海洋中主要利用可用性的有机碳作为固氮的能源^[17]。

据估计,在热带海草草场生态系统中微生物固氮可满足植物群落生长所需氮的 50%^[18]。这是由于海草植物碎屑和在代谢 过程中根系可分泌一些有机质,产生较多的可用有机碳。Woitch 等^[19]研究了非洲东部(肯尼亚)海岸带红树林的落叶在沉积物 表面分解对固氮作用的影响,结果表明在雨季树叶分解作用加强时固氮速率可达 380 nmolN/(h・g)(干重),而在旱季分解作 用减弱时仅有 78 nmol/(h・g)(干重)。大型植物根组织中的乳酸盐是一个重要的有机碳贮存库,固氮菌从植物根部得到有机 碳,而植物从固氮菌那儿得到氮作为回报,形成一种共生现象^[20]。

往沉积物中加入有机碳(如葡萄糖等)可以促进微生物固氮。Tibble 等^[21]将木聚糖和藻元酸加入泻湖沉积物中,固氮活性提高了 5~18 倍;如果加入海带多糖和糖元,固氮速率可提高到 19~92 倍;说明可用性有机碳是微生物固氮的主要限制因素。

温度、光照、pH、DO、无机氮和磷的含量和形态、盐度以及微量元素等也都会对微生物的固氮作用产生影响。对于光合细菌 光照显然是重要能源。有关微量元素的限制作用研究最多的是铁。固氮微生物对铁的需求量比非固氮微生物要高很多,因为它 们需要铁来合成固氮酶的催化活性中心^[16, 22]。

2 有机氮的氨化过程研究

氨化是指海洋生物的遗骸在微生物的作用下细胞降解,氨从含氮的大分子中释放出来。

2.1 氨化的基本过程

目前有关这方面的研究较少,一般认为在这些代谢过程中有大量的水解酶的参与,它们首先将含氮的聚合体分子分解成可 溶性的低分子量的含氮有机物如,氨基酸、多聚肽、胺、核酸和尿素等。氨基酸、嘌呤、嘧啶和尿素等在水和沉积物中很快被细菌 降解。

蛋白酶 肽酶 脱氮作用 蛋白质 → 肽 → 氨基酸 → 有机酸 + NH₄+

能产生活性蛋白酶的不同系列的微生物广泛地存在于海岸带沉积物中,包括:假单胞菌(Pseudomonas)、弧菌(Vibrio)、变形杆菌(Proteus)、沙雷氏菌(Serratia)、杆菌(Bacillus)、梭菌(Clostridium)、以及多种放射菌和真菌。Donnelly等^[23]指出春季在北亚得尼亚海,在浮游植物水华出现之后,氨化细菌数量迅速增

长到 4.7×109 个/ml 沉积物,与水解蛋白酶活性显著增强相
关。到目前为止有关蛋白质的矿化过程的研究还很少。
Therkildsen 的研究表明 RNA 在富氧和缺氧条件下都能够产
生尿素,而尿素是再生氮的一个重要来源,因为尿素可以迅速
水解产生氨[24]。
2.2 氨化速率和影响因素
由于缺乏测定含氮有机物矿化的专门方法,只能采用产
生氨的总量作为有机物矿化的速率。这些方法包括简单的沉
积物培养实验,测定实验过程中氨随时间的积累情况;水-沉积

表 2 河口、海岸带沉积物氨化速率

Table 2	Ammonification	rate in estuarine and coastal	sediments
	区域 Zone	氨化速率(mg N/(m ² ・d)) Ammonification (mg N/(m ² ・d))	参考文献 Reference
Patuxent 泙	「口(美国)	157	[26]
Chesapeake	e Bay(美国)	$120 \sim 430$	[27]
Aarhus 湾(丹麦)	7	[28]
Mangoku-U	Jra 湾(日本)	644	[29]
Moreton 湾	(澳大利亚)	50~490	[30]
Southern N 部)	lorth Sea(北海南	$11 \sim 74$	[31]

位素稀释技术,往未受扰动的沉积物芯样或泥样中加入 ¹⁵ N-NH4,这一方法可以同时计算出矿化总量和净矿化量 ^[25] 。
目前对影响海岸带氨化速率的主要因素还不十分清楚,比较肯定的影响因素包括:温度、沉积物中溶解氧的穿透深度、有机
物的含量与性质、微生物群落的生理特性以及浮游生物的组成和生物量。Florence Vocuvé 等用同位素稀释法研究了法国
Marennes-Oléron 湾潮间带氨化作用与温度的关系 ^[32] 。他们将沉积物最上面的两层 0~2cm,2~4cm 分别在 10、20、30℃下培养
不同的时间,结果表明,随着温度的升高氨化速率从 0 上升到 17μgNH₄-N/g • d (千重)。López 等 ^[33] 通过给海草沉积物增加营
养物质,发现营养物质能提高细菌活性,氨化速率提高了1倍。沉降到海底的有机物的性质对氨化速率的影响也很明显。Fernex
等 ^[34] 研究了地中海西北面的 Villenfrache 湾氨化速率与浮游生物组成和生物量的关系。该海湾的桡足类和樽海鞘(Salpa)的生
物量在每年的 5 月底达到最高, 而最大的氨化速率出现在春季出现樽海鞘水华之后。表层沉积物(0~2 cm) 最高氨化速率达
0.1μmol/(ml•d),这似乎意味着樽海鞘的排泄物能增强表层沉积物中的微生物活性,提高氨化速率。

3 硝化过程研究

氨在需氧环境中被硝化细菌最终氧化为硝酸盐的过程称为硝化。在这一过程中细菌利用氨作为能源同化二氧化碳。这一过程分两步:第一步,氨在细菌媒介的作用下被氧化为亚硝酸盐;第二步,在亚硝酸盐氧化酶的催化作用下氧化为硝酸盐。 3.1 硝化细菌及其分类

硝化细菌分为两个属:氨氧化属和亚硝化属。氨氧化属包括:亚硝化单胞菌属(Nitrosomonas)、亚硝化球菌属 (Nitrosococcus)、亚硝化螺菌属(Nitrosopira)、亚硝化叶菌属(Nitrosolobus)、和亚硝化弧菌属(Nitrosovibio)均为革兰氏阴性菌, 它们能从氨氧化到亚硝酸盐的反应中获得能量并将 CO₂ 同化为细胞碳。亚硝酸盐氧化菌包括:硝化细菌属(Nitrobacter)、硝化 刺菌属(Nitrospina)、亚硝化球菌属(Nitrosococcus)和亚硝化螺菌属(Nitrosopira)。根据 16S rRNA 的序列同源性种系分析证 明^[35],氨的氧化细菌可以分为两类,第一个类包括亚硝化球菌属,并构成 γ-protebacterias 的一个下级分枝。第二类为亚硝化螺 菌属在 β-protebacteriask 中构成一个紧密的簇,可以被再分为两个相应的进化枝——亚硝化单胞菌属和亚硝化螺菌属。由于亚 硝化叶菌属、亚硝化弧菌属与亚硝化螺菌属有很高的 16S rRNA 基因序列同源性,现在都归类于亚硝化螺菌属^[36]。尽管有证据 证明海洋亚硝化螺菌属的存在,但在浅水的河口和海岸带地区与两个硝化步骤有关的主要微生物分别是亚硝化单胞菌属和硝

3.2 硝化速率及测定方法

通常在海岸带地区水相的硝化速率比较低,有时近乎可以忽略;而在沉积物的表层(氧化层)硝化速率比水相高得多。由于 自然条件的差异和人类活动的冲击,不同地区的水相和沉积硝化速率有时差距甚大(请见表 3)。

研究海洋中的硝化速率的方法有抑制法和同位素法。抑制法通过使用抑制剂抑制硝化细菌的单加氧酶 (monooxygenase)活性,阻断氨氧化为羟氨的路径,通过测定 有无抑制剂时氨的积累量差值来计算硝化速率^[42]。最常用的 抑制剂是乙炔,此外还有氯啶(Nitrapyrin)又称 N-Sevsr、烯丙 基硫脲(allylthiourea)、一氟甲烷、氯酸盐等。Gaffreg等比较了 乙炔和一氟甲烷的抑制作用,认为后者略优一些^[43]。

同位素稀释法是往沉积物样品中加入一定量的¹⁵N-NH⁺, 通过测定¹⁵N-NH⁺ 的消耗量来计算硝化速率。这种方法的优 点是可以同时测定硝化与反硝化速率,缺点是人为加入¹⁵N-

表 3 河口、海岸带地区硝化速率

Table 3 Nitrification	n rate	in estuari	ne and	coastal	zones
-----------------------	--------	------------	--------	---------	-------

生态系统 Ecosystem	硝化速率(gN/(m ² ・a)) Nitrification rate (gN/(m ² ・a))	参考文献 Reference
盐沼 Salt marsh	60	[4]
海草场 Sea grass	20-1200-500010-115	[4]
河口水相 Estuarine water		[4]
河口沉积物 Estuarine sedim	ents	$\begin{bmatrix} 4 \end{bmatrix}$
	$mgN/(m^2 \cdot d)$	
Ochlocknee 湾(美国)	84	[37]
Chesapeake 湾(美国)	$14 \sim 23$	[38]
Kysing Fjord 湾(丹麦)	$23 \sim 27$	[39]

NH4 可能影响沉积初中的浓度梯度,广生偏差

3.3 影响硝化过程的因素

Normsinde Fjord 湾(丹麦)	112	[40]
Odawa 湾(日本)	38~42	[41]

影响海岸带硝化过程的因素很多,其中主要有温度、NH4

的浓度、溶解氧(DO)含量、pH、溶解的二氧化碳浓度、盐度、抑制化合物、光、底栖微动物区系的活性以及大型植物等。

有关研究表明,硝化细菌生长的适宜温度范围是 25~35℃,低于 15℃生长速率急剧下降。因此,硝化速率有明显的日变化 和季节性变化,尤其是在浅水区和潮间带。Hansen 的研究发现,丹麦海岸带沉积物中的硝化速率从春季 2℃时到秋季 22℃时上 升了 5 倍^[45]。根据 Macfarlane 和 Herbert 的报道在苏格兰的 Tay 河口最高的硝化速率出现在夏季,当温度在 19~21℃之间的 时候^[46]。实际上温度对硝化作用的影响有两重性,一方面随着温度升高硝化细菌的活性增强,另一方面温度升高也会影响其它 因素如溶解氧的浓度降低,导致硝化速率下降。O₂ 与夏季底层的呼吸作用相关联,氧气向下扩散一般局限于沉积物表层的 1~ 2cm。因此,在有机物含量丰富的沉积物中,氧的浓度对硝化作用的影响比温度产生的影响更为重要。夏季美国 Chesapeake 湾 沉积物硝化率出现最低值的原因就在于此。

低氧浓度下(<10µmol/L)氨的氧化过程中不仅产生硝酸盐,还同时产生 N2O^[47]。但是氧浓度过高似乎对硝化也不利,根据 Henriksen 等^[48]报道当溶解氧浓度达到饱和值的 2~2.6 倍时,河口沉积物稀泥中的硝化速率下降 15%~25%,是何原因目前 仍不清楚。

生物活动对硝化作用的影响也是明显的。例如,维管植物群集的沉积物中,光合作用释放出的氧进入根围区可能促进硝化 作用。底栖大型动物的活动如排泄和筑洞等会影响 O2 与 NH⁺ 的垂直分布,从而影响硝化作用^[49]。

4 反硝化过程研究

与硝化作用相反,异养细菌在呼吸作用中利用硝酸盐为电子接受体,将其还原为气态的 N₂ 和 N₂O(脱氮)或氨(硝酸盐氨 化)的过程称为反硝化。最常见的反硝化细菌是假单胞菌属。由于反硝化作用将无机氮转变成了气态的 N₂ 和 N₂O 扩散到大气 中,从而将沉积物、水体和大气联系起来。反硝化一方面减少了初级生产者可利用的氮,另一方面可以减轻河口、海岸带地区因 氯过多造成的富营养化,对高浓度氨起到解毒作用^[50]。所以反硝化过程是河口、海岸带氮的生物地球化学循环中的关键过程。 此外,反硝化也是沉积物中碳矿化的重要途径。由反硝化作用排放到大气中的 N₂O 是一种温室气体,能破坏平流层的臭氧。这 一点引起了越来越多的学者的关注。

4.1 反硝化速率及测定方法

海岸带地区的反硝化速率与硝化速率大致相当或略高一些。由于反硝化是一个厌氧过程,主要发生在沉积物的还原带,在 水相中发生的可能性很小。由于控制反硝化作用的因素很多,不同海区的反硝化速率存在着不小的差异,即使在同一海区,季节

性变化也很显著的。

为了测定脱氮速率学者们设计了多种方法,其中最常见 的3种是质量平衡法^[51, 52]、乙炔抑制技术和同位素法^[53, 54]。 传统的质量平衡法是根据氮的输入与输出量之估算反硝化速 率。由于在多数情况下很难取得准确的氮输入与输出量,因而 估算结果的可信度较差。乙炔抑制技术(AIT)是一个简单、灵 敏度高且费用省的方法。一定浓度的乙炔不仅能抑制氧化亚 氯还原酶的活性使反硝化过程停留在 N₂O 阶段,而且能抑制 NH_4^+ 氧化为 N₂O,从而根据可根据 N₂O 的产量来计算反硝化 速率。有报道认为这一方法存在缺陷,即当沉积物中硝酸盐浓 度较低时(<10μmol/L)时,乙炔的抑制作用不完全,此时的反 硝化速率可能被低估 30%~50%^[52, 55]。此外,沉积物中的硫 化物能反转乙炔对 N₂O 还原酶的抑制。用¹⁵N 同位素示踪技术

河口、海岸带地区的反硝化速率 表 4

Table 4 Denitrificatio	n rate in estuarine and coast	al zone
生态系统	反硝化速率(gN/(m ² ・a))	参考文献
Ecosystem	Denitrification rate	Reference
盐沼(Salt marsh)	11	[4]
每草场(Sea grass)	20~90	[4]
可口水相(Estuarine water)	0	[4]
可口沉积物(Estuarine sedim	ent) $10 \sim 300$	[4]
	$(mgN/(m^2 \cdot d))$	
Chesapeake 湾(美国)	20~739	[38]
Kysing Fjord 湾(丹麦)	3~1109	[39]
Finland 湾(芬兰)	1~9	[49]
Odawa 湾(日本)	54~111	[51]

.

测定反硝化速率似乎要更好一些。近几年发展起来的同位素对方法(IMP)是一种高效的分析技术,一个实验就能测定硝化、反 硝化(包括硝酸盐的氨化)、和氮的矿化率。这个方法的缺陷,主要是在较长时间的培养过程中容易受到玷污、溶解氧耗竭,此外 人工加入的¹⁵N 有可能混合不均匀,导致低估反硝化率^[42]。测定反硝化速率的方法除了上述 3 种以外,还有 N₂ 产量测定法^[56]、 孔隙水成岩剖面法、膜输入质谱法^[57](Membrane inlet mass spectrometry)和微电极法等。尤其是微电极法是近十几年发展起来 的新技术,显示出强劲的发展势头。

4.2 影响反硝化过程的因素

影响海岸带反硝化过程的因素主要有水体和沉积物中硝酸盐的浓度、碳的可利用性、温度、溶解氧浓度与穿透深度,还有氧

化还原电位、阻滞物(如 S ²⁻)的浓度、pH、盐度、光照以及低栖生物的犹动及植物群落的特性等 ¹³⁰ 。温带海洋环境中反明化速率
表现出明显的季节性,这主要是因为硝酸盐含量、可利用的有机碳以及温度的季节变化[59]。在全年营养盐丰富的海区,反硝化
速率与温度之间有良好的相关性。而在硝酸盐输入呈阶段性的海区,反硝化速率也显阶段性。在丹麦的 Norsminde Fjord 海区
反硝化一年中有两个季节性的最高值[60],1个在5月份,由于大型藻类死亡后沉降至海底分解使水相中硝酸盐含量升高,另1
个在深秋与输入水中的硝酸盐有关。有学者认为沿岸地下水渗入海岸带沉积物,其中携带的硝酸盐也是反硝化氮的重要来源。
溶解氧浓度直接与间接地影响着反硝化过程。因为一方面,溶解氧的浓度直接影响着反硝化细菌的活性;另一方面,沉积物
中溶解氧的浓度影响到沉积物剖面的氧化带分布、Eh值、酸溶性硫化物(AVS)的含量及烧失量(IL)有关。Kim等 ^[50] 对日本广
岛湾的沉积物的硝化、反硝化和硝酸盐氨化速率进行了一年多的研究,结果显示 8 月份水中溶解氧含量最低、Eh 值最低、AVS
值最高时即处于最高还原态时,反硝化率最高。反之,1月份处于最高氧化态时反硝化率最低。其它的研究结果与此类似。
大型植物、底栖动物和藻类的活动通过影响沉积物中的氧含量、有机碳及硝酸盐的剖面分布影响反硝化速率。盐度对反硝
化速率的影响也是明显的,随着盐度升高反硝化速率下降。紫外线对反硝化也有抑制作用[61]。

硝酸盐的反硝化作用除了脱氮以外还包括硝酸盐的氨化。异养细菌有通过呼吸作用将硝酸盐还原为氨的能力。通常在硝酸
盐浓度较高时主要发生脱氮过程,硝酸盐浓度较低时还原为氨。夏季在丹麦的 Norsmide Fjord 表层沉积物中只发生硝酸盐的。
氨化过程 ^[39] 。
4.3 硝化-反硝化耦合
硝化与反硝化耦合是研究氮的生物地球化学循环中比较深入的课题,至今仍是各国学者研究的热点。
从前面的叙述中可以看出,沉积物的反硝化是一个厌氧还原过程,其速率与沉积物和水相中的硝酸盐含量密切相关;而硝
酸盐的重要来源之一是沉积物中氨的氧化,这又是一个需氧的氧化过程,整个反硝化过程受控于两个截然相反的环境条件,即
反硝化硝酸盐依赖于沉积物缺氧带的微生物还原作用,所需的硝酸盐则依赖于沉积物氧化带中硝化细菌对氨的硝化作用。因

虽然海岸带地区在整个海洋环境中所占的比例很小,但是它是联接陆地和大洋生态系统的纽带。海岸带地区高营养盐、低 盐度、水动力强劲、水交换频繁等环境因素的影响,发生在该地区的固氮、氨化、硝化和反硝化过程有着自身的特点和规律。与陆 地水环境生态系统不同,通常研究上述4个生物地球化学循环时必须考虑到盐度、pH和水动力等海洋因素的影响。从总体上说 由于盐度的抑制和 pH 的影响,微生物的活性往往没有陆地水环境中那么强,但研究工作的复杂性却提高了。而与高盐度、低营

此,沉积物中硝化与反硝化之间有时存在着很强的耦合作用。Jenkins 等^[44]指出春季在 Patuxent 河口,硝化作用产生的硝酸盐

99%以上被反硝化。但是到了夏季这一耦合的强度降低了两个数量级。美国佛罗里达州的 Ochlockonee 湾的情况与此相似。

5 结语

养盐的大洋相比,海岸带固氮、氨化、硝化和反硝化过程要强烈得多,整个海洋中反硝化作用的 60%发生在此。此外,海岸带有 河口、泻湖、红树林、海草场、珊瑚礁等多个子生态系统,各个子系统的固氮、氨化、硝化和反硝化过程又有各自的特点和差异。

在过去的十几年里,国际上有关海岸带氮的生物地球化学循环研究取得了长足的进步。首先集中在实验方法学上,乙炔抑 制技术和同位素技术更趋完善,微电极的发展极大地改善了对水底发生的固氮、氨化、硝化和反硝化各过程及影响因素的时空 分析。运用这些技术人们已经能粗略地描述上述4个主要过程。然而。海岸带氮的生物地球化学循环的确是一个非常复杂的过 程,很多机制目前仍不清楚,有待进一步深入探索。

今后微生物固氮可能主要集中于对束毛藻类的研究和重新评价热带营养贫乏海区生物的固氮作用;铁等微量元素对生物 固氮作用的影响;进一步研究生物固氮模型、模拟生物固氮以及生物固氮对碳循环和全球气候变化产生的影响。

由于对有机物氨化过程的研究相对较少,到目前为止我们仍难以确定氨是怎么样从有机氮里释放出来,对一些含氮大分子 如 DNA、RNA 和几丁质等的降解知之甚少,设计更为灵敏的方法系统地研究这些过程将是研究有氮氨化的当务之急。

尽管有海岸带地区硝化与反硝化与硝化的研究已有 30 多年的历史,但到目前仅限于少数几个国家对为数不多的几个河口 和海湾进行过研究,且所取样品的数量很少。由于受研究方法和技术手段所限,无论从研究区域和深度上都显不足。河口、海岸 带地区硝化与反硝化与硝化究竟有多大?仍拿不出令人信服的资料。需要设计出更符合现场环境条件的实验方法,进一步积累 资料和扩大研究区域。硝化与反硝化及其耦合过程一方面可以减轻富营养化带来和危害,另一方面产生破坏臭氧层的 N₂O 是 福还是祸?仍将是今后的研究热点。从分子生物学的角度研究海洋中的硝化与反硝化细菌,寻找和培育出治理海洋环境的微生 物可能大有可为。

References:

Menzel DW, Rther, J.H. The annual cycle of primary production in the Sargasso Sea off Bermuda. Deep-Sea Research, 1960, 6: 351~ 1 367.

- [2] Shen G Y, She B Z. Marine Ecology. Beijing: Science Press, 2000. 259.
- [3] George A Knox. The ecology of seashores. Boca Raton: CRC Press LLC, 2001. 211.
- Ryther J H & Dunstan W M. Nitrogen, phosphorus and eutrophication in the coastal marine environment. Science, 1971, 171: 1008~ 1013.
- Eppley R W, Renger E H, Harrison W G. Nitrogen and phytoplankton production in southern Californian waters. Limnol. Oceanogr, 1979, **24**: 483~494.
- Bergman B, Gallon J, Rai A N. N₂ fixation by non-heterocystous cyanobateria. FEMS Microbial Rew, 1997, 19: 139~185.
- Douglas G Capone. Marine nitrogen fixation: What's the fuss? Current Opinion in Microbiology, 2001, 4: 341~348. [7]
- Jonathan P Zehr, Edward J Carpenter, Tracy A. Villareal New perspective on nitrogen-fixing microorganisms in tropical and subtropical [8] oceans. Trends in Microbiology, 2000, 8: 68~73.
- Jonathan P, Zehr Sarah Braun, Yibu Chen. Nitrogen fixation in the marine environment: relating genetic potential to nitrogenase [9] activity. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1996, 203:67~73.
- Hanson R B, Gundersen K. Relationship between nitrogen fixation (acetylene reduction) and C: N ratio in a polluted coral reef system, $\begin{bmatrix} 10 \end{bmatrix}$

Kaneohe Bay, Hawaii. Est. Coast. Mar. Sci., 1977, 5: 437~444.

- Odintsov V S. Nitrogen fixation (acetylenereduction) in the digestive tract of some echinoderms from Vostok Bay in the Sea of Japan. $\begin{bmatrix} 11 \end{bmatrix}$ Ambio Spec. Rep., 1981, 5: 15~21.
- Jens K. Nitrogen fixation in the temperate estuarine intertidal sediments of the river. Lune. Limnol. Oceanogr, 1982, 27: $455 \sim 460$. $\begin{bmatrix} 12 \end{bmatrix}$
- Nixon S W. Remineralisation and nutrient cycling in coastal marine ecosystems. In: Estuaries and Nutrients (Nielson, B. J. and Cronin, [13] L.E., Eds). New Jersey, Humanna Press, 1981. 111~138.
- Karen M Orcutt, Fredric Lipschults, Kjell Gundersen, et al. A seasonal study of the significance of N fixation by Trichodesmium spp. at $\begin{bmatrix} 14 \end{bmatrix}$ the Bermuda Atlantic Time-Series study (BATS) site. Deep-Sea Research I, 2001, 48: 1583~1608.
- Smith S V. Phosphorus versus nitrogen limitation in the marine environment. Limnol. Oceanogr., 1984, 29: 1149~1160. $\begin{bmatrix} 15 \end{bmatrix}$
- Wang Y S, Li J L. The catalytic mechanic and chemical simulation on the progress of nitrification fixing by organism, Progress in natural [16] science, 2000, 10 (6): 481~490.
- Herbert R A. Nitrogen cycling in Coastal Marine Ecosystems. FEMS Microbiol. Rev., 1999, 23: 563~590. [17]
- Moriarty D J W & O'Donohue M J. Nitrogen fixation in sea grass communities during summer in the Gulf of Carpentaria, Australia. J. [18] Mar. Freshw. Res., 1993, 44: 117~125.
- Woitchik A F, Ohowa B, Kazungu J M, et al. Nitrogen enrichment during decomposition of mangrove-leaf little in an east African coastal [19] lagoon (Kenya): Relative importance of biological nitrogen fixation. Biogeochemistry, 1997, 39: $15 \sim 35$.
- Capone D G. Benthal nitrogen fixation. In: Nitrogen Cycling in Coast Marine Sediments. New York: John Wiley and Sons, 1988. 85~ **_**20**_** 123.
- Tibbles B J, Lucas M I, Coyne V E, et al. Nitrogenase activity in marine sediments from a temperate salt marsh lagoon: Modulation by
- [21] complex polysaccharides, ammonium and oxygen. J. Exp. Mar. Biol., 1994, 184: $1 \sim 20$.
- Adam Kustka, Edward J Carpenter, Sergio A. Sanudo-wilhebmy Iron and marine nitrogen fixation: Progress and future directions, [22] Research in Microbiology., 2002, 153: 255~262.
- Donnelly A P, Herbert R A. An investigation into the role of bacteria in the remineralization of organic nitrogen in shallow coastal [23] sediments of Northern Adriatic Sea. In: Transfer Pathways and Flux of Organic Matter Related Elements in Water and Sediments of the Northern Adriatic Sea and Their Importance in Eastern Mediterranean Sea. Price, N. B., Ed, 1996, 189~197.
- Therkildsen M S, King G M, Lomstein B A. Urea production and turnover following the addition of AMO. CMP. RNA and a protein [24] mixture to a marine sediment. Aquat. Microb. Ecol., 1996, 10: 173~179.
- Blackburn T H. A method for measuring rates of NH⁺ dilution technique. Appl. Environ. Microbiol, 1979, 37: 760~765. $\begin{bmatrix} 25 \end{bmatrix}$
- Boynton W R, Kemp W M, Osborne C G, Nntrient fluxes across the sediment-water interface in the turbid zone of a coast plain estuary. [26] New York: Academic Press, 1980, 93~109.
- Caffery J M, Kemp W M. Influnce of the submersed plant, Potamogeton perfoliatus, on nitrogen cycling in estuarine sediments. Limnol. [27] Oceannogr, 1992, 37: 1483~1495.
- Jensen H M, Lomstein E, Sorensen J Benthic. NH⁺ and N₂O flux following sedimentation of a spring phytoplankton bloom in Arhus [28] Bight, Denmark. Mar. Ecol. Prog. Ser., 1990, 61: 87~96.
- Izumi H, Hattori A, McRoy C P. Ammonium regeneration and assimilation in eelgrass beds. Mar. Biol., 1982, 66: 59~65. [29]
- Boon P I, Moriarty D J W, Saffinga P G. Rates of ammonium turnover and the role of aminoacid deamination in seagrass beds of Moreton [30] Bay Austrilia. Mar. Biol., 1986, 91: 269~275.
- Billen G A. Budget nitrogen recycling in North Sea sediments off the Belgian coast. Est. Coast. Mar. Sci., 1978, 7: 127~146. $\begin{bmatrix} 31 \end{bmatrix}$
- Florence VOUVé, Gérade GulRAUD, Christine Marol, et al. NH⁺ turnover in intertidal sediments of Marinnes-Oléron Bay (France): [32] Effect of sediment temperature. Oceanological Acta, 1998, 23: 575~548.
- Nancy I López, Carlos M Duarte. Ferrán Vallespinó, et al. The effect of nutrient additions on bacterial activity in sea grass (Posidonia [33] oceanica) sediments. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1998, 224: 155~166.
- [34] Francois E Fernex, Jean Claude Braconnot, Sekge Dallot, et al. Is ammonification rate in marine sediment related to plankton composition and Abundance? A Time-series and Study in Villefrancce Bay (NW Mediterranean). Estuarine, Coastal and Shelf Science., 1996, 43: 359~371.
- Woese C R, Weisburg W G, Hahn C M, et al. The phylogeny of the purple bacteria: the gamma subdivision. Syst. Apply. Microbiol, [35] 1985, **6**: 25~33.
- Head I M, Hiorns W D, Embley M T, et al. The phylogeny of autotrophic ammonia oxidizing bacteria as determined by analysis of 36 ammonia oxidizing bacteria as determined by analysis of 16s ribosomal RNA gene sequences. J, Gen. Microbiol., 1993, 139: 1147~ 1153.
- Seitzinger S.P. Nitrogen biogeochemistry in an unpolluted estuary: the importance of benthic denitrification in marine sediments at low [37] oxygen concentrations. J. Microbiol., 1987, 30: 1073~1078.
- Henriksen K, Kemp W M. Nitrification in estuarine and coastal marine sediments. New York: John Willey and Sons, 1988. 207. [38]
- Hansen J I, Heriksen K, Blackburn TH. Seasonal distribution of nitrifying bacteria and rates of nitrification in coastal marine sediments. Microb. Ecol., 1981, 7: 297~304.

- [40] Binnerup S V, Jensen K, Revsbech N P, et al. Denitrification, dissimilatory reduction of nitrate to ammonium and nitrification in a bioturbated estuarine sediment as measured with ¹⁵N and microsensor techniques. Appl. Environ. Microbiol., 1992, **58**: 303~313.
- [41] Koike I, Hattori A. Simultaneous determination of nitrification and nitrate reductionin coastal sediments by a ¹⁵N dilution technique. Appl. Environ. Microbiol., 1978, 35: 853~857.
- [42] Hooper A B, Terry K R. Specific inhibitors of ammonia oxidation in nitrosomonas, J. Bacterial, 1973, 115: 480~485.
- [43] Caffrey J M, Miller L G. A comparison of two nitrification inhibitors used to measure nitrification rates in estuarine sediments. FEMS Microbi. Eco., 1995, 17: 213~220.
- [44] Jenkins M C, Kemp W. M. The coupling of nitrification and dinitrification in two estuarine sediments. *Limnol. Oceanogr.*, 1984, **29**: 609~619.
- [45] Herbert R A. Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems, FEMS Microbiol. Rew., 1999, 23: 563~590.
- [46] Macfarlane G T, Herbert R A. Dissimilatory nitrate reduction and nitrification estuarine sediments, J. Gen. Microbiol., 1984, 130: 2301~2308.
- [47] Yoshida N. ¹⁵N-depleted N₂O as a product of nitrification. Nature, 1988, 307: 442~444.
- [48] Henriksen K, Kemp W M. Nitrification in estuarine and coastal marine Environments. John Wiley and Sons, New York, 1988, 207~ 249.
- [49] Sloth N P, Nielsen L P, Blackburn T H. Nitrification in sediment cores measured with acetylene inhabitation. Limnol. Oceanogr., 1992, 37: 1108~1112.
- [50] Tuominen L, Heinanen A, Kuparinen, J, et al. Spatial and temporal variability of denitrification in the sediments of the Northern Baltic
- Proper. Mar. Ecol. Prog. Ser., 1998, 172: 13~24.
- [51] Do-Hee Kim, Malsuda O, Yamamoto T. Nitrification, denitrification and nitrate reduction rates in the sediment of Hiroshima Bay, Japan, J. of Oceanogr., 1997, 53: 317~324.
- [52] Seitzinger S P. Nitrogen biogeochemistry in an unpolluted estuary: the importance of benthic denitrification. Mar, Ecol. Prog. Ser., 1987, 41: 177~186.
- [53] Nielsen L P, Glud R N. Denitrification in coastal sediment measured in situ by the nitrogen isotope pairing technique applied to a benthic flux chamber. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1996, **137**: 181~186.
- [54] Middelburg J J, Soetaert K, Herman P M J. Evaluation of the nitrogen isotope paring method for measuring benthic denitrification: a simulation analysis. *Limnol. Oceanogr.*, 1996, **41**: 1838~1844.
- [55] Seitzinger S P, Nielsen L P, Caffrey J, et al. Denitrification measuring in aquatic sediments: a comparison of three method. Biogeochemistry, 1993, 23: 147~167.
- [56] Devol A H. Direct measurement of nitrogen gas fluxes from continental shelf sediments. Nature, 1991, 349: $319 \sim 321$.
- [57] Thomas K L, David Lloyd. Measurement of denitrification in estuarine sediment using memberance inlet mass spectrometry. FEMS Microbiol., 1995,16: 103~114.
- [58] Bissett W P, Walsh J J, Dieterle D A. Carbon cycling in the upper waters of the Sargasso Sea I. Numerical simulation of differential carbon and nitrogen fluxes. *Deep-Sea Res.* I, 1999, 46: 205~269.
- [59] Grguric G, Sondey C J, DuVall B M. Carbon and nitrogen fluxes in a closed seawater facility. The Science of the Total Environment, 2000, 247: 57~69.
- [60] Jorgensen K S. Annual pattern of dinitrification and nitrate ammonification in an estuarine sediment. Apply. Environ. Microbiol., 1989, 55: 1841~1847.
- [61] Mancinelli R L, White M R. Inhibition of denitrification by ultraviolet radiation. Adv. Space Res., 2000, 26: 2041~2046.

参考文献:

[2] 沈国英,施并章.海洋生态学(第二版).北京:科学出版社,2000.259.

[16] 王友绍,李季伦. 固氮酶催化机制及化学模拟生物固氮研究进展. 自然科学进展,2000,10(6):481~490.

