

DOI: 10.5846/stxb201407181464

杨杉, 吴胜军, 蔡延江, 周文佐, 朱同彬, 王雨, 黄平. 硝态氮异化还原机制及其主导因素研究进展. 生态学报, 2016, 36(5): - .
YANG S, WU S j, CAI Y j, ZHOU W z, ZHU T b, WANG Y, HUANG P. The synergetic and competitive mechanism and the dominant factors of dissimilatory nitrate reduction processes: a review. Acta Ecologica Sinica, 2016, 36(5): - .

硝态氮异化还原机制及其主导因素研究进展

杨 杉^{1,2}, 吴胜军¹, 蔡延江³, 周文佐², 朱同彬⁴, 王 雨¹, 黄 平^{1,*}

1 中国科学院水库水环境重点实验室, 中国科学院重庆绿色智能技术研究院, 重庆 400714

2 西南大学地理科学学院, 重庆 400715

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

4 南京师范大学地理科学学院, 南京 210046

摘要: 硝态氮(NO_3^-)异化还原过程通常包含反硝化和异化还原为铵(DNRA)两个方面, 是土壤氮素转化的重要途径, 其强度大小直接影响着硝态氮的利用和环境效应(如淋溶和氮氧化物气体排放)。不过, 反硝化和 DNRA 过程在反应条件、产物和影响因素等方面常会呈现出协同与竞争的交互作用机制。本文综述了反硝化和 DNRA 过程的研究进展及其二者协同竞争的作用机理, 并阐述了在 NO_3^- 、pH、有效 C、氧化还原电位(Eh)等环境条件和土壤微生物对其发生强度和产物的影响, 提出今后应在产生理、土壤环境因素、微生物学过程以及与其他氮素转化过程耦联作用等方面亟需进一步深入研究, 以期增进对氮素循环过程的认识以及为加强氮素管理利用提供依据。

关键词: 硝态氮异化还原; 反硝化; 硝态氮异化还原成铵(DNRA); N_2O ; 协同竞争机制

The synergetic and competitive mechanism and the dominant factors of dissimilatory nitrate reduction processes: a review

YANG Shan^{1,2}, WU Shengjun¹, CAI Yanjiang³, ZHOU Wenzuo², ZHU Tongbin⁴, WANG Yu¹, HUANG Ping^{1,*}

1 Key Laboratory of Reservoir Aquatic Environment, Chongqing Institute of Green and Intelligent Technology, Chinese Academy of Science, Chongqing 400714, China

2 School of Geography Science, Southwest University, Chongqing 400715, China

3 Institute of Mountain Hazards and Environment, Chinese Academy of Sciences and Ministry of Water Resources; Key Laboratory of Mountain Environment Evolution and Regulation, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China

4 College of Geography Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China

Abstract: The nitrate ion (NO_3^-), an important form of inorganic soil nitrogen, is susceptible to reduction under anaerobic conditions, and its reduction consists of both assimilatory and dissimilatory processes. The dissimilatory nitrate reduction process—of great significance in nitrogen transformation—includes denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA). Such reduction processes can directly affect the transformation of nitrates and the environmental consequences (such as NO_3^- leaching and N_2O emission). During the processes of denitrification and DNRA, NO_3^- is utilized as a substrate, while N_2O is generated synchronously. Nonetheless, there are significant differences between denitrification and DNRA, such as metabolic processes, the transformation mechanism, reductases, and the final products. For DNRA, the final product is ammonium (NH_4^+), which can continue to participate in other soil nitrogen transformation processes,

基金项目: 中国科学院西部行动计划项目(KZCX2-XB3-14); 重庆市基础与前沿研究项目(cstc2013jcyjA0302); 中国科学院水库水环境重点实验室开放基金(RAE2014BA06B)

收稿日期: 2014-07-18; 网络出版日期: 2015- -

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: huangping@cigit.ac.cn

such as crop uptake and nitrification. In agroecosystems, DNRA can consume 3.9—25.4% of NO_3^- ; this process can decrease NO_3^- leaching and N_2O emissions in comparison with denitrification. Both reducing pathways show a synergistic and competitive mechanism among the reaction conditions, products, and dominant regulators. The synergistic mechanism of denitrification and DNRA manifests itself as the similar suitable environmental conditions, the shared nitrate reductase (*Nar*), and an intermediate product (N_2O), along with the similar soil parameters. Thus, according to the synergistic effect, the dissimilatory nitrate reduction process can be greatly enhanced without limiting factors such as the soil water regimen, temperature, and soil substrates. As for the competitive mechanism, it mainly involves competition for a substrate and energy supplies between denitrification and DNRA. In contrast, the direct competition for NO_3^- exists ubiquitously between denitrification and DNRA. Nevertheless, regulation of soil parameters (such as available C, oxidation–reduction potential (Eh)) changes the concentration of NO_3^- accordingly; thus, the competition for NO_3^- between denitrification and DNRA should be rebalanced subsequently. Moreover, soil microorganisms that are related to denitrification and DNRA can compete for a carbon source for their growth and proliferation. The dissimilatory nitrate reduction process is influenced by a great number of factors, mainly environmental conditions and microorganisms. Sufficient soil NO_3^- and available carbon can significantly enhance the dissimilatory nitrate reduction process, whereas soil pH and Eh have their own suitable ranges for different dissimilatory nitrate reduction processes. The competition between denitrification and DNRA is regulated by these factors. With the changes in available carbon, soil pH, and Eh, the two pathways show different levels of activity. Bacteria can exist in the form of an advantageous microbial population during the dissimilatory nitrate reduction process. Nevertheless, different populations and genes are involved in denitrification and DNRA, and the diversity of soil microorganisms is in turn influenced by soil environmental factors. This review summarizes the synergistic and competitive mechanisms and the factors influencing denitrification and DNRA, for example, soil environmental conditions (soil NO_3^- , soil pH, available carbon, and Eh) and microorganisms (population, diversity, and genes). The mechanism of formation, soil environmental factors, microbiological processes, and the correlation with other nitrogen transformation processes urgently need further research on dissimilatory nitrate reduction processes. In DNRA, the mechanism of formation and analysis of N_2O emissions, populations, diversity, and genes of a microorganism have not been established yet. In addition, the interactions of nitrogen transformation processes in soils—e.g., between denitrification and DNRA or between anaerobic ammonium oxidation and denitrification—should be investigated holistically. The knowledge about synergistic and competitive mechanisms and the factors influencing denitrification and DNRA should improve the understanding of the regulation of nitrogen transformation in soils; this knowledge is also necessary for the development of effective countermeasures and policies on soil nitrogen management.

Key Words: dissimilatory nitrate reduction process; denitrification; dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA); N_2O ; synergetic and competitive mechanism

硝态氮(NO_3^-)是土壤氮素的重要赋存形态,在厌氧环境下极易被还原^[1]。由于微生物种类以及氧(O_2)条件的差异, NO_3^- 还原主要可区分为同化还原和异化还原途径^[2]。同化还原的目的是利用 NO_3^- 合成细胞物质,整个过程中既没有 NO_2^- 的积累,也没有 NH_4^+ 的产生。然而,与之不同的是,异化还原过程则可根据产物的不同再分为两种途径,一种途径以 N_2O 、 N_2 为产物,称为反硝化(Denitrification);另一种途径以 NH_4^+ 为产物,称为硝态氮异化还原成铵(Dissimilatory nitrate reduction to ammonium, DNRA)^[1-4]。

传统观念认为,嫌气或低氧条件下,土壤中的 NO_3^- 易发生反硝化作用^[3, 5-6], NO_3^- 经反硝化气态损失掉^[7],损失率为0.1%—52%^[8]。与反硝化造成的氮损失相反,在某些特定条件下, DNRA过程可为作物提供其可直接吸收利用和淋溶性较小的 NH_4^+ 。DNRA过程早在1938年即被发现^[1, 9],但受研究方法和技术手段的限制,该过程的研究曾一度被忽视^[10-11]。不过近年来分离培养技术的不断更新^[1, 3]以及 ^{15}N 示踪方法和测

定技术^[11-12]的发展都为 DNRA 过程的研究提供了可能。新近研究发现,DNRA 过程在土壤氮素循环中起着重要作用,可转化农田生态系统中 3.9%—25.4% 的 NO_3^- ^[12-13];在森林生态系统中,DNRA 过程甚至超越反硝化过程^[14],占到 NO_3^- 总消耗量的 98.4%—99%^[15-16]。此外,某些环境条件下 DNRA 过程产生的 NH_4^+ 甚至远远高于土壤矿化生成量^[15]。相较于 NO_3^- , NH_4^+ 能够继续参与到土壤其他氮素转化过程中,会在一定程度上起到减少 NO_3^- 淋失,降低反硝化率和 N_2O 排放量的效果^[15, 17]。反硝化和 DNRA 过程是硝态氮异化还原过程的重要环节,两者在底物和发生环境等方面较为相似,在土壤环境条件及微生物的影响下^[18],呈现出协同竞争的关系。因此,开展硝态氮异化还原协同竞争机制及其影响因素的研究,对于加深氮素转化规律认知,制定有效的土壤氮素管理措施等方面有着重要意义。

本文综述了反硝化和 DNRA 过程协同与竞争的交互作用机理,并对二者在土壤环境条件(NO_3^- 、pH、Eh、有效 C)和微生物等因素影响下的协同竞争关系进行了比较分析,旨在明确反硝化和 DNRA 的发生强度和影响因素,合理调控主导因素,使反硝化和 DNRA 过程优势共存、合理竞争,并为提高氮素经济利用,降低生态环境负荷提供科学依据。

1 硝态氮异化还原的机理过程

反硝化和 DNRA 过程均属于硝态氮异化还原过程,易在嫌气或低氧状态下发生,以 NO_3^- 为还原底物,过程中均有 N_2O 生成^[6, 12, 15, 19],但二者在产生过程、转化机理、最终产物等均有明显差异。

(1)代谢过程不同。生物反硝化通常是土壤反硝化的主导过程^[7, 20],它是由兼性好氧异养微生物利用同一个呼吸电子传递系统,以 NO_3^- 为电子受体,还原 NO_3^- 的呼吸过程^[7]。DNRA 则是指将 NO_3^- 还原为 NH_4^+ 的过程,该过程可分为发酵型和呼吸型两种^[2, 13],前者的本质是发酵型能量代谢,以 C 为电子供体,而后者则以硫化物(H_2S 、 S^{2-})为电子供体^[13]。代谢过程的不同决定了微生物竞争 C 源的能力^[1]。

(2)还原酶和产物不同。反硝化过程中, NO_3^- 依次通过硝态氮盐还原酶(Nitrate reductase, *Nar*)、亚硝态氮盐还原酶(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, *Nos*)四步还原反应,中间过程释放 NO 和 N_2O ,最终还原成 N_2 ^[4, 7]。其还原酶分别由各自对应的功能基因(*narG/napA*, *nirK/nirS*, *norC/norB*, *nosZ/nosR/nosD-FYL*)所编码(图 1)^[1, 21]。DNRA 过程主要分为两个阶段,首先在 *Nar* 催化下, NO_3^- 还原成 NO_2^- ;其次再由 *Nir* 将 NO_2^- 最终还原为 NH_4^+ ^[22-23]。其还原酶分别由各自对应的功能基因(*narG/napA*, *nirB/nirC/cysG*)所编码(图 1)^[1, 3]。两过程具有相同的 *Nar*,但 *Nir* 有显著区别,反硝化的 *Nir* 分为含铜的(*Cu-dNir*)以及含 c-型和 d-型细胞色素的(*cd₁-dNir*);DNRA 过程的 *Nir* 则分为溶解性酶和胞围酶两类^[1, 3]。

(3)传递电子数量不同。DNRA 过程还原至 NH_4^+ 的自由能,比反硝化还原为 N_2O 和 N_2 的自由能要高^[1]。在无有效 C 限制的情况下,就还原 1mol 的 NO_3^- 而言,DNRA 过程能接受 8mol 电子,反硝化只接受 5mol^[22]。

(4)时间进程不同。在条件适宜的情况下,土壤反硝化速度较快,1—2 d 就可全部完成;DNRA 过程一般要在 2—5 d 之后才发生^[1, 24]。但为何出现 DNRA 过程相对滞后的现象,其机制目前尚不清楚^[1]。

(5) N_2O 的生成状况不同。反硝化和 DNRA 过程均能生成 N_2O ^[23, 24-26]。一般认为,反硝化中 N_2O 的生成是由于土壤中某些微生物缺失 *Nos* 或土壤条件抑制了土壤中 N_2O 的进一步还原;大部分反硝化微生物能将 NO_3^- 还原为 NO_2^- ,但能还原 N_2O 的微生物数量则相对较少,导致反硝化过程中释放了 N_2O ^[27-28]。而现阶段,DNRA 过程产生 N_2O 的机理仍不清楚,有研究认为可能是 NO_2^- 还原为 NH_4^+ 的过程中,缺乏 *Nir* 的中间产物所致^[10, 29]。反硝化 N_2O 排放量的范围变化值比 DNRA 过程的大,分别占施氮量的 0.1%—15.5%^[8],1%—8%^[3, 6, 15]。

总体来说,反硝化和 DNRA 过程最大的不同在于,因参与的还原酶的差异,各自产生机理过程有着本质差别,导致反硝化过程的最终产物为 N_2 ,而 DNRA 过程的最终产物为 NH_4^+ ^[1, 3]。

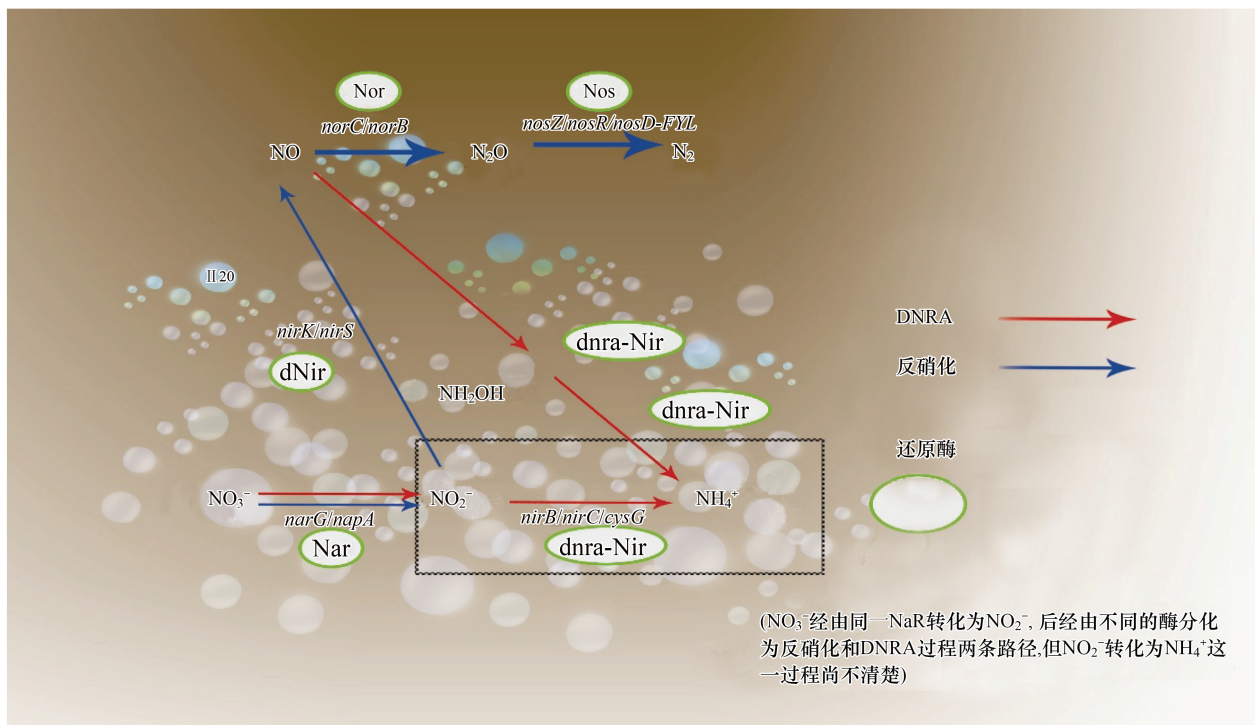


图 1 硝态氮异化还原过程及其主要机理

Fig. 1 The scheme of dissimilatory nitrate reduction process and its main mechanisms

(*Nar*, *Nor*, *Nos*, *dNir*, *dnra-Nir* 表示参与硝态氮异化还原过程的还原酶; *narG* / *napA*, *nirB* / *nirC* / *cysG*, *nirK* / *nirS*, *norC* / *norB*, *nosZ* / *nosR* / *nosD-FYL* 表示参与硝态氮异化还原过程的还原酶所对应的功能基因)

(*Nar*, *Nor*, *Nos*, *dNir*, *dnra-Nir* represent reductase involved in dissimilatory nitrate reduction process; *narG* / *napA*, *nirB* / *nirC* / *cysG*, *nirK* / *nirS*, *norC* / *norB*, *nosZ* / *nosR* / *nosD-FYL* denote corresponding functional genes related to the aforementioned reductase)

2 硝态氮异化还原的协同竞争机制

反硝化和 DNRA 过程既存在整体性相似又存在个体性差异。整体性表现为同属于硝态氮异化还原过程,且相同的反应环境条件、*Nar*、中间产物(N_2O)和土壤环境因子等对二者均有协同促进作用。增加土壤 NO_3^- 含量,较其他氮素转化过程,整个硝态氮异化还原过程的强度趋于加强^[30]。个体差异性表现为竞争,即仅就硝态氮异化还原过程范围内,反硝化或 DNRA 过程对底物(NO_3^-)的直接竞争,或通过土壤环境因子(有效 C、Eh)来限制对 NO_3^- 的间接竞争,或土壤微生物对 N 源和 C 源的竞争等,两个过程呈现出此消彼长的趋势。在有效 C 含量高而 NO_3^- 浓度低的还原性条件下, NO_3^- 发生 DNRA 过程的几率高于反硝化过程^[19, 31]。这就是硝态氮异化还原的协同竞争机制,通过这种机制,两个过程相互联系、相互依存、相互转化。

3 硝态氮异化还原过程主导因素及其对协同与竞争的调节机制

硝态氮异化还原过程的协同竞争机制与研究区域的土壤类型、施肥状况、土地利用类型等有关^[5, 32-33]。pH 较高的土壤易进行硝态氮异化还原过程,研究表明,相对于酸性较强的红壤,经 DNRA 过程,黄泥土中 NH_4^+ 生成量占总 NO_3^- 加入量的 7.8%,而红壤仅为 0.7%^[5]。氮肥类型对硝态氮异化还原过程的协同竞争机制也具有调节作用,施用有机肥能明显增强硝态氮异化还原过程的强度^[32];施用尿素使土壤 pH 提高,增强了 DNRA 过程对 NO_3^- 的竞争力,但反硝化过程仍占绝对优势^[5]。

可见,硝态氮异化还原过程是多种因素综合作用的结果,但在不同研究区域中主导因素又有较大差异。硝态氮异化还原过程的影响因子,主要可以分为土壤环境条件和土壤微生物两大类。土壤环境条件包括土壤

NO_3^- 含量、pH、有效 C、Eh 等,而土壤微生物则包括种类、数量、活性等。

3.1 土壤环境条件

3.1.1 硝态氮(NO_3^-)

在厌氧状态下,反硝化和 DNRA 过程可能同时发生在同一土壤中,共同以 NO_3^- 为基质^[23]。在适宜的条件下,通过施用氮肥,增加基质浓度,会促进硝态氮异化还原过程^[30, 34]。研究表明,在 18 个土样中连续两年施入 71—132 $\mu\text{mol/L}$ 的 NO_3^- ,反硝化和 DNRA 过程在原有的基础上分别提高了 11—16 倍、6 倍^[30, 35]。

从另一角度来讲,反硝化和 DNRA 过程对 NO_3^- 的竞争也会限制两者的相对强度。若 DNRA 过程竞争到的 NO_3^- 相对含量多,DNRA 过程的强度就得以增强,反硝化过程则会相对削弱。对美国波多黎各区域的森林土壤研究发现,75%的 NO_3^- 经 DNRA 过程转化为 NH_4^+ 后,减少了反硝化过程可利用的 NO_3^- ,导致反硝化率比 DNRA 率低 3 倍^[36]。因此,可以通过调控硝态氮异化还原过程以利于 DNRA 进行,从而去除 NO_3^- ,以降低 NO_3^- 的损失^[12],但 DNRA 过程产生的 NH_4^+ 在碱性条件下易挥发。所以应根据实地土壤环境条件,通过调控关键影响要素,定向培育硝态氮异化还原过程,提高氮素利用效率,减少氮素损失和环境活性氮负荷。

3.1.2 氧化还原电位(Eh)

氧化还原电位(Eh)能间接地反映土壤的含氧状态,从而影响硝态氮异化还原过程,其主要取决于土壤中的氧分压或溶解态氧的浓度^[17]。Eh 通过氧分压来调控硝态氮异化还原过程,氧化和还原条件,均能进行反硝化作用^[34, 37],但相较于还原条件,在氧化原条件下反硝化速率明显降低^[37];而强还原性会更有利于 DNRA 过程的发生^[1, 18, 38]。Eh<300 mV 的厌氧条件是反硝化进行的必要条件;若 Eh 较高,氧分压就会成为反硝化作用的主要限制因子^[1, 37]。也有研究表明,还原性较弱的环境中也能进行 DNRA 过程^[12, 39],*Pseudomonas putrefaciens* 在 Eh 为 0mv 时能进行 DNRA 过程,而 Eh 为 -100mV 时受到极大抑制^[1]。此外,Eh 还能决定硝态氮异化还原的途径^[34],通过对两个过程产生条件的比较,DNRA 过程对氧分压变化较不敏感^[39-40]。当氧分压从 0 升高到 2%的过程中,反硝化均呈现降低的趋势。但 DNRA 过程则呈现不同的趋势,当氧分压为 0—0.5% 时,DNRA 过程显著增加;为 0.5%—1% 时,DNRA 过程没有变化;继续上升到 1%—2% 时,DNRA 的强度减小^[40]。这些研究结果为通过调控氧化还原状况有效管理氮素转化与利用提供了重要依据。

3.1.3 土壤 pH

土壤 pH 是影响硝态氮异化还原过程的主要因素^[41]。在自然条件下,进行反硝化和 DNRA 过程的微生物通常生活在同一环境中,最适 pH 范围较接近,反硝化为 6—8,而 DNRA 过程为 5—9^[1, 23, 24, 41];但 pH 通过对 Nir 活性的影响(二者微生物中所含的 Nir 不同),导致二者的机理过程产生很大的差别^[1]。低 pH 值会明显地降低反硝化速率^[14],抑制反硝化过程,当 pH<6 时,由于 Nor 或 Nos 受到抑制,或酸性土壤中耐酸的反硝化细菌数量少或活性低,导致反硝化速率随 pH 的下降而降低;而高 pH 值能加强 DNRA 过程对反硝化基质(NO_3^-)的竞争,DNRA 过程相对增强的同时,反硝化强度会削弱^[5, 23, 25]。

3.1.4 有效 C

有效 C 为硝态氮异化还原过程提供了能源和电子供体,同时有机物分解消耗了土壤中的 O_2 ,促进了厌氧环境的形成,增加了硝态氮异化还原过程发生的概率。与不添加额外 C 源的情况相比,添加少量易被微生物利用的葡萄糖能显著提高土壤硝态氮异化还原过程的强度,土壤反硝化速率和发酵型 DNRA 过程的强度分别提高了 2—20 倍^[3, 42-43]和 17%—50.2%^[1, 13]。自然环境下,通过秸秆覆盖^[3, 11]和施用有机肥^[22, 25]等一系列土壤管理措施,可增加有效 C 源,促进反硝化和 DNRA 过程的发生。长期覆盖秸秆的土壤,反硝化速率提高了 0.5%^[2],高达 14.4%—39.5%的 NO_3^- 经 DNRA 过程还原成了 NH_4^+ ^[1]。

相关研究发现,厌氧环境下,有效 C 还能调节反硝化和 DNRA 过程对土壤中 NO_3^- 的竞争^[1, 22, 38, 40],表现出竞争的关系,这主要与不同还原路径接收到的以有效 C 作为电子供体的比率不同有关^[6, 14]。仅有效 C 作为限制因子时,反硝化过程比 DNRA 过程更具有竞争性。当 C/N 为 2.0—2.5 时,更有利于发生反硝化作

用^[40];而当 C/N 为 4.0—12.0 时, DNRA 过程会明显增强, NH_4^- 的最大净增加量能达到原有 NO_3^- 的 30%^[1, 40]。

3.2 土壤微生物

土壤微生物在其新陈代谢过程中能对有机质进行分解、转化,是硝态氮异化还原过程的参与者。

3.2.1 硝态氮异化还原过程土壤微生物

土壤微生物的种类、数量、种群结构与时空动态变化等都会对硝态氮异化还原过程有一定的影响。硝态氮异化还原微生物是一个大的生理类群,而反硝化和 DNRA 过程存在着不同的微生物类型(表 1)。

表 1 硝态氮异化还原过程的微生物类型

Table 1 Types of the microorganisms of dissimilatory nitrate reduction process

生物类型 Biological types	反硝化 Denitrification	DNRA
严格厌氧 Strictly anaerobic		<i>Clostridium</i> spp., <i>Veillonella</i> spp., <i>Wolinella</i> spp. ^[41]
兼性厌氧 Facultative anaerobic	<i>Chromobacterium</i> ^[41]	<i>Escherichia coli</i> , <i>Citrobacter</i> spp., <i>Salmonella typhimurium</i> ^[1]
好氧 Aerobic	<i>Pseudomonas</i> spp., <i>Bacillus</i> spp., <i>Alcaligenes</i> ^[3]	<i>Pseudomonas</i> spp., <i>Bacillus</i> spp., <i>Neisseria subflava</i> ^[35]
微好氧 Micro-aerobic	<i>Spirillaceae</i> ^[42]	<i>Campylobacter sputorum</i> ^[1]
真核生物 Eukaryotes	真菌, 原生动物, 底栖有孔虫, <i>Gromiida</i> ^[4] Fungi, Protozoa, Benthic Foraminifera	真菌 ^[27] Fungi

细菌被认为是进行硝态氮异化还原过程时的微生物优势种群^[21],且反硝化菌与 DNRA 菌可以共存于一个环境中,共同利用土壤环境中的 N 源和 C 源^[3],均以兼性厌氧菌最为普遍,但二者存在着不同的主导区系。而在稻田土壤中,自养反硝化菌(*Thiobacillus denitrificans*, *Thiomicrospira denitrificans*, *Sulfurimonas denitrificans* 等)可以在 NO_3^- 存在下将还原态的硫化物(S^{2-} 、 SO_3^{2-} 等)或铁离子(元素)氧化,最终生成 SO_4^{2-} 、 Fe^{3+} 及 N_2 ^[20]。硝态氮异化还原过程发生程度不同的土壤,其细菌的组成存在很大差异,但与土壤的还原能力相吻合,即 DNRA 能力强的土壤中 DNRA 细菌所占比例较高^[3]。土壤中还存在极少数既具有 DNRA 菌特征,又具有反硝化菌特征的特殊菌株^[1, 3]。决定两者细菌数量的因素不是 NO_3^- 的有无或多少,而是 DNRA 细菌与反硝化细菌竞争 C 源的能力^[37]。由于反硝化菌属呼吸过程,从产能角度讲, DNRA 发酵代谢的能量产出远不及反硝化菌的呼吸代谢。这样,与发酵性 DNRA 细菌相比,反硝化菌具有高产能的生存优势^[1]。

细菌功能基因是影响硝态氮异化还原过程动态变化及产物组成的关键因子,故借助编码硝态氮异化还原过程关键基因的菌群是研究硝态氮异化还原过程微生物的重要方法。研究表明,土壤反硝化菌中, *nosZ* 基因最为稳定,不易受到环境影响; *nirK* 基因对环境因子的响应比 *nirS* 基因敏感^[33]。分别施用有机肥和无机氮肥,土壤 *narG* 基因的优势种群有明显差异(无机肥处理含优势种群 EU873052,有机肥处理则没有)^[32]。

3.2.2 影响硝态氮异化还原过程土壤微生物多样性的因素

硝态氮异化还原过程是不同种类微生物共同作用的结果,不同微生物种群,其动态过程不同,产物也有差异^[21]。硝态氮异化还原微生物种群具有多样性^[23]其形成受土壤环境条件(有效 C、土壤 NO_3^- 含量、pH 等)^[23, 32]、土地利用方式^[33]、农业措施^[32]等多种因素综合影响。土壤环境条件方面,土壤氧分压对农田土壤中反硝化微生物种群的抑制作用更明显;而自然土壤中的反硝化微生物种群对 pH 变化更为敏感^[23]。耕作会促使硝态氮异化还原过程微生物种群多样性增加,相对于自然土壤,农田土壤中反硝化微生物酶(*Nar*、*Nir*、*Nor*)的数量、*nosZ* 的多样性及数量更具优势^[23]。施用不同类型的氮肥对硝态氮异化还原过程的影响不同。长期使用尿素能增加土壤反硝化微生物中 *nirK*、*nirS* 基因的丰度;而施入有机肥,反硝化菌的多样性和丰度增加,各施肥处理的 *narG* Shannon 指数显示:有机肥(2.65) > 不施肥(2.35) > 无机肥(2.10)^[32]。但目前对 DNRA 过程的认识中,微生物种群多样性与潜在影响因素的相关性尚不明确。

硝态氮异化还原过程的影响因素较多,且影响作用并不是单一的,而是交互联系作用的。除以上几种主导因素外,土壤质地^[35]、土壤含水量^[35]和土壤温度^[7, 44]等土壤环境的其他因素也会对硝态氮异化还原过程产生影响。在对不同土壤质地与硝态氮异化还原关系的研究中,与粘土相比,砂土的 DNRA 过程速率低, N_2O 的排放量少^[35]。这主要是由于粘土所含的土壤水分多,厌氧环境较适宜硝态氮异化还原过程的发生^[35]。

4 研究展望

以往对硝态氮异化还原过程的研究主要集中于反硝化,但由于 DNRA 过程生成了有效性高且淋溶性较差的铵态氮,进而增强土壤氮的可利用性,近年来关于 DNRA 过程的研究逐渐受到了充分重视。目前, DNRA 过程的研究对象多为海水或淡水沉积物^[10, 18],而对陆地土壤研究较少,已有的研究也主要集中于森林和农田等土壤,且多为室内培养结果^[15, 25],自然生境中的硝态氮异化还原状况还未知。在全球变化的背景下,有必要对不同气候、土壤和耕作施肥制度下的硝态氮异化还原强度深入研究。鉴于硝态氮异化还原过程研究中存在影响因素多、时空变异大、测定难度大等限制条件,今后应亟需加强以下几个方面的研究。

(1) 加强对硝态氮异化还原机理过程的研究。对硝态氮异化还原机理过程的认识是制订土壤氮素管理措施的前提。目前,对土壤反硝化机理的认识已较为深入,而 DNRA 过程中, N_2O 的排放量、产生机理及其相关功能微生物等方面尚不清楚^[12, 45]。其次,研究方法的不完善也是致使硝态氮异化还原机理过程不明确的重要原因。仅靠 ^{15}N 标记法,不能从严格意义上来区分反硝化和 DNRA 过程对 N_2O 生成的相对贡献率^[22, 26]及 NO_3^- 的相对消耗量^[16],这直接影响到对两者强度的估算。因此,需要进一步探讨 N_2O 的测定方法,揭示硝态氮异化还原过程的贡献率及与反硝化和 DNRA 过程的联系。此外,硝态氮异化还原过程中还涉及到多种酶的参与,反硝化与 DNRA 过程中 *Nir* 的差异是否导致了二者对 O_2 的敏感度不同^[40]? 还有待进一步从土壤酶的角度进行探讨,加强氮循环调节的酶学机制研究。

(2) 加强土壤环境因素对硝态氮异化还原过程反馈机制的研究。硝态氮异化还原过程的研究多数局限在对单一土壤环境因素的控制或模拟,而主导硝态氮异化还原过程的土壤环境因素有很多,存在复杂的交互作用,且不同生境下各因子的影响强度差异较大。如不同海拔高度、不同立地条件,土壤水热条件和有机 C 库有所不同,势必影响到硝态氮异化还原的强度。决定土壤中反硝化和 DNRA 过程平衡的环境因素亦未见报道。此外,在硝态氮异化还原过程对环境因子的响应研究中,探讨如何选择并调节土壤环境因子参数。同时,考虑在土壤环境因子复合影响下,土壤氮素和其他土壤元素之间的综合效应,明确土壤氮素阈值,提高氮肥利用率的同时,确保土壤的其他养分的固持。诸如,若 $Eh < 200$ mv,土壤中的铁锰化合物会被还原为不同价态的锰、硫、铁,土壤出现潜育化,导致 O_2 分压减小,影响土壤中的氮素形态及供应情况^[17];硝态氮异化还原过程能在此范围内发生,如何协调各土壤养分固持与供给平衡,以获得最高产量或最大收益时最佳氮素投入量,保持土壤优良性状,利于作物生长。

(3) 加强硝态氮异化还原过程的微生物学过程的研究。当前,参与硝态氮还原的微生物中,反硝化菌的数量、区系组成及其活性报道较多^[3],而对于 DNRA 菌组成和数量等的研究较少,但已越来越受到研究者的关注。土壤环境和农业措施,能够影响土壤中微生物的活性、丰度及群落组成。研究不同生态系统土壤微生物量及活性对反硝化和 DNRA 两个过程的影响,对于完善土壤氮素内循环机制,提高土壤肥力,具有十分重要的作用。对于满足反硝化和 DNRA 双重性质的细菌,今后可在同一个细胞中开展反硝化与 DNRA 竞争机理的研究^[3]。同时,考虑厌氧氨氧化细菌对硝态氮异化还原过程的影响。研究表明,厌氧氨氧化菌能同时表现出反硝化和厌氧氨氧化的能力,两个反应可在同一种微生物体内进行^[46-47]。

(4) 加强对硝态氮异化还原过程与其他氮素转化过程耦联作用的研究。目前的研究多只针对反硝化或 DNRA 单个过程,可能造成反硝化强度被高估的现象(由于反硝化和 DNRA 均能生成 N_2O ,反硝化强度往往通过 N_2O 排放量计算)^[18]。其次,忽视了同一土壤体系中,氮素转化各过程(如矿化、硝化、厌氧氨氧化作用)的相互影响。例如,厌氧氨氧化(Anaerobic ammonium oxidation, Anammox)与反硝化作用具有相近的生理特征和

环境,厌氧氨氧化产生的 NO_3^- 可被反硝化菌利用,为反硝化提供电子受体^[47-48],且二者共同的环境因子为有效 C、 NO_3^- 浓度、pH 值^[49];研究表明,在有效 C 的环境中,厌氧氨氧化与反硝化能相互促进反应^[47]。其次,这种耦合关系对微生物与土壤环境因素的响应,亦不清楚。对硝态氮异化还原过程及其他氮素转化过程耦联作用的研究,有助于明晰土壤氮素转化和迁移规律,探讨提升土壤氮素利用率的综合策略,加强 DNRA 等氮素蓄持过程,减少反硝化等过程造成氮素损失和环境氮负荷,在实践中提高氮肥利用率。

参考文献 (References):

- [1] 殷士学. 淹水土壤中硝态氮异化还原成铵过程的研究[D].江苏:南京农业大学,2000.
- [2] 殷士学,沈其荣. 缺氧土壤中硝态氮还原菌的生理生化特征. 土壤学报,2003,40(4):624-630.
- [3] 陈丽敏. 淹水土壤中反硝化菌和硝酸还原菌数量、生理类群及其还原特点的研究[D].江苏:扬州大学,2001.
- [4] Canfield D E, Glazer A N, Falkowski P G. The evolution and future of earth's nitrogen cycle. Science, 2010, 330(6001):192-196.
- [5] 蔡祖聪. 尿素和 KNO_3 对水稻土无机氮转化过程和产物的影响无机氮转化过程. 土壤学报,2003,40(2):239-245.
- [6] Tiedje J M, Sextstone A J, Myrold D D, Robinson J A. Denitrification: ecological niches, competition and survival. Antonie Van Leeuwenhoek, 1982, 48(6):569-583.
- [7] 朱兆良,文启孝. 中国土壤氮素. 南京:江苏科学技术出版社,1992.
- [8] 张玉树,丁洪,秦胜金. 农业生态系统中氮素反硝化作用与 N_2O 排放研究进展. 中国农学通报,2010,26(6):253-259.
- [9] Woods D D. The reduction of nitrate to ammonia by *Clostridium welchii*. Biochemical Journal, 1938, 32(11):2000-2012.
- [10] Giblin A E, Tobias C R, Song B, Weston N, Banta G T, RiveraMonroy V H. The importance of dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) in the nitrogen cycle of coastal ecosystems. Oceanography, 2013, 26(3):124-131.
- [11] Chen D L, Chalk P M, Freney J R. Distribution of reduced products of ^{15}N labelled nitrate in anaerobic soils. Soil Biology & Biochemistry, 1995, 27(12):1539-1545.
- [12] Yin S X, Chen D, Chen L M, Edis R. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium and responsible microorganisms in two Chinese and Australian paddy soils. Soil Biology & Biochemistry, 2002, 34(8):1131-1137.
- [13] Lu W W, Zhang H L, Shi W M. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium in an anaerobic agricultural soil as affected by glucose and free sulfide. European Journal of Soil Biology, 2013, 58:98-104.
- [14] Bengtsson G, Bergwall C. Fate of ^{15}N labelled nitrate and ammonium in a fertilized forest soil. Soil Biology & Biochemistry, 2000, 32(4):545-557.
- [15] Rütting T, Huygens D, Müller C, Van 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.
- [16] Huygens D, Rütting T, Boeckx P, Van Cleemput O, Godoy R, Müller C. Soil nitrogen conservation mechanisms in a pristine south Chilean *Nothofagus* forest ecosystem. Soil Biology & Biochemistry, 2007, 39(10):2448-2458.
- [17] 黄昌勇. 土壤学. 北京:中国农业出版社,2000.
- [18] Ma H B, Aelion C M. Ammonium production during microbial nitrate removal in soil microcosms from a developing marsh estuary. Soil Biology & Biochemistry, 2005, 37(10):1869-1878.
- [19] Burgin A J, Hamilton S K. Have we overemphasized the role of denitrification in aquatic ecosystems? A review of nitrate removal pathways. Frontiers in Ecology and the Environment, 2007, 5(2):89-96.
- [20] 蔡延江,丁维新,项剑. 土壤 N_2O 和 NO 产生机制研究进展. 土壤,2012,44(5):712-718.
- [21] 王莹,胡春胜. 环境中的反硝化微生物种群结构和功能研究进展. 中国生态农业学报,2010,18(6):1378-1384.
- [22] Stevens R J, Laughlin R J. Measurement of nitrous oxide and di-nitrogen emissions from agricultural soils. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 1998, 52(2/3):131-139.
- [23] Stevens R J, Laughlin R J, Malone J P. Soil pH affects the processes reducing nitrate to nitrous oxide and di-nitrogen. Soil Biology & Biochemistry, 1998, 30(8-9):1119-1126.
- [24] Schmidt C S, Richardson D J, Baggs E M. Constraining the conditions conducive to dissimilatory nitrate reduction to ammonium in temperate arable soils. Soil Biology & Biochemistry, 2011, 43(7):1607-1611.
- [25] Fernandes S O, Bonin P C, Michotey V D, Garcia N, LokaBharathi P A. Nitrogen-limited mangrove ecosystems conserve N through dissimilatory nitrate reduction to ammonium. Scientific Reports, 2012, 2:419.
- [26] Hansen M, Clough T J, Elberling B. Flooding-induced N_2O emission bursts controlled by pH and nitrate in agricultural soils. Soil Biology &

- Biochemistry, 2014, 69: 17-24.
- [27] 贺纪正, 张丽梅. 土壤氮素转化的关键微生物过程及机制. 微生物学通报, 2013, 40(1): 98-108.
- [28] 邹国元, 张福锁. 根际反硝化作用与 N_2O 释放. 中国农业大学学报, 2002, 7(1): 77-82.
- [29] Hom S S M, Hennecke H, Shanmugam K T. Regulation of nitrogenase biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* effect of nitrate. Journal of General Microbiology, 1980, 117: 169-179.
- [30] Koop-Jakobsen K, Giblin A E. The effect of increased nitrate loading on nitrate reduction via denitrification and DNRA in salt marsh sediments. Limnology and Oceanography, 2010, 55(2): 789-802.
- [31] Davis J H, Griffith S M, Horwath W R, Steiner J J, Myrold D D. Denitrification and nitrate consumption in an herbaceous riparian area and perennial ryegrass seed cropping system. Soil Science Society of America Journal, 2008, 72(5): 1299-1310.
- [32] 陈哲, 袁红朝, 吴金水, 魏文学. 长期施肥制度对稻田土壤反硝化细菌群落活性和结构的影响. 生态学报, 2009, 29(11): 5923-5929.
- [33] 于涌杰. 土地利用方式对中国东南部红壤微生物特性及氮转化作用的影响[D].江苏: 南京师范大学, 2012.
- [34] Matheson F E, Nguyen M L, Cooper A B, Burt T P, Bull D C. Fate of ^{15}N nitrate in unplanted, planted and harvested riparian wetland soil microcosms. Ecological Engineering, 2002, 19(4): 249-264.
- [35] Sotta E D, Corre M D, Veldkamp E. Differing N status and N retention processes of soils under old-growth lowland forest in Eastern Amazonia, Caxiuanã, Brazil. Soil Biology & Biochemistry, 2008, 40(3): 740-750.
- [36] Silver W L, Herman D J, Firestone M K. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium in upland tropical forest soils. Ecology, 2001, 82(9): 2410-2416.
- [37] 倪吾钟, 沈仁芳, 朱兆良. 不同氧化还原电位条件下稻田土壤中 ^{15}N 标记硝态氮的反硝化作用. 中国环境科学, 2000, 20(6): 519-523.
- [38] Rütting T, Boeckx P, Müller C, Klemetsson L. Assessment of the importance of dissimilatory nitrate reduction to ammonium for the terrestrial nitrogen cycle. Biogeosciences, 2011, 8(7): 1779-1791.
- [39] Pett-Ridge J, Silver W L, Firestone M K. Redox fluctuations frame microbial community impacts on N-cycling rates in a humid tropical forest soil. Biogeochemistry, 2006, 81(1): 95-110.
- [40] Fazzolari É, Nicolardot B, Germon J C. Simultaneous effects of increasing levels of glucose and oxygen partial pressures on denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium in repacked soil cores. European Journal of Soil Biology, 1998, 34(1): 47-52.
- [41] Šimek M, Cooper J E. The influence of soil pH on denitrification: progress towards the understanding of this interaction over the last 50 years. European Journal of Soil Science, 2002, 53(3): 345-354.
- [42] 方芳, 高红涛, 张曾宇, 孙志伟, 李哲, 郭劲松. 三峡库区消落带土壤 N_2O 排放和反硝化影响因子分析. 重庆大学学报, 2013, 36(11): 93-100.
- [43] Azam F, Müller C, Weiske A, Benckiser G, Ottow J. Nitrification and denitrification as sources of atmospheric nitrous oxide - role of oxidizable carbon and applied nitrogen. Biology and Fertility of Soils, 2002, 35(1): 54-61.
- [44] Kelly-Gerrey B A, Trimmer M, Hydes D J. A diagenetic model discriminating denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium in a temperate estuarine sediment. Marine Ecology Progress Series, 2001, 220: 33-46.
- [45] Baggs E M. Soil microbial sources of nitrous oxide: recent advances in knowledge, emerging challenges and future direction. Current Opinion in Environmental Sustainability, 2011, 3(5): 321-327.
- [46] Kartal B, Kuypers M M M, Lavik G, Schalk J, den Camp H J M O, Jetten M S M, Strous M. Anammox bacteria disguised as denitrifiers: nitrate reduction to dinitrogen gas via nitrite and ammonium. Environmental Microbiology, 2007, 9(3): 635-642.
- [47] 黄孝肖, 陈重军, 张蕊, 陈英旭, 吴伟祥. 厌氧氨氧化与反硝化耦合反应研究进展. 应用生态学报, 2012, 23(3): 849-856.
- [48] 周少奇. 厌氧氨氧化与反硝化协同作用化学计量学分析. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2006, 34(5): 1-4.
- [49] 沈李东, 郑平, 胡宝兰. 自然生态系统中的厌氧氨氧化. 生态学报, 2011, 31(15): 4447-4454.