

# 高氮和 $\text{NO}_2^-$ 对中亚热带森林土壤 $\text{N}_2\text{O}$ 和 $\text{NO}$ 产生的影响\*

陈仕东<sup>1,2</sup> 马红亮<sup>1,2</sup> 高人<sup>1,2†</sup> 闫聪微<sup>1,2</sup> 尹云峰<sup>1,2</sup> 杨玉盛<sup>1,2</sup>

(1 湿润亚热带生态地理过程省部共建教育部重点实验室,福州 350007)

(2 福建师范大学地理科学学院,福州 350007)

**摘要** 利用<sup>15</sup>N 同位素标记方法,研究在两种水分条件即 60% 和 90% WHC 下,添加硝酸盐( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , N 300 mg kg<sup>-1</sup>)和亚硝酸盐( $\text{NaNO}_2$ , N 1 mg kg<sup>-1</sup>)对中亚热带天然森林土壤  $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{NO}$  产生过程及途径的影响。结果表明,在含水量为 60% WHC 的情况下,高氮输入显著抑制了  $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{NO}$  的产生( $p < 0.01$ );但当含水量增为 90% WHC 后,实验 9h 内抑制  $\text{N}_2\text{O}$  产生,之后转为促进。所有未灭菌处理在添加  $\text{NO}_2^-$  后高氮抑制均立即解除并大量产生  $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{NO}$ ,与对照成显著差异( $p < 0.01$ ),在 60% WHC 条件下,这种情况维持时间较短(21 h),但如果含水量高(90% WHC)这种情况会持续很长时间(2 周以上),说明水分有效性的提高和外源  $\text{NO}_2^-$  在高氮抑制解除中起到重要作用。本实验中  $\text{N}_2\text{O}$  主要来源于土壤反硝化过程,而且加入未标记  $\text{NO}_2^-$  后导致杂合的  $\text{N}_2\text{O}$ (<sup>14</sup>N<sup>15</sup>NO)分子在实验 21 h 内迅速增加,表明这种森林土壤的反硝化过程可能主要是通过真菌的“共脱氮”来实现,其贡献率可多达 80% 以上。Spearman 秩相关分析表明未灭菌土壤  $\text{NO}$  的产生速率与  $\text{N}_2\text{O}$  产生速率成显著正相关性( $p < 0.05$ ),土壤含水量越低二者相关性越高。灭菌土壤添加  $\text{NO}_2^-$  能较未灭菌土壤产生更多的  $\text{NO}$ ,但却几乎不产生  $\text{N}_2\text{O}$ ,表明酸性土壤的化学反硝化对  $\text{NO}$  的贡献要大于  $\text{N}_2\text{O}$ 。

**关键词**  $\text{N}_2\text{O}$ ;  $\text{NO}$ ; <sup>15</sup>N; 氮沉降; 真菌; 共脱氮

**中图分类号** S154.1 **文献标识码** A

很多年以来,土壤中的一些专性原核细菌的硝化和反硝化过程被认为是大气氧化亚氮( $\text{N}_2\text{O}$ )和一氧化氮( $\text{NO}$ )的主要来源<sup>[1-2]</sup>。反硝化细菌(如 *Pseudomonas* sp.)能在厌氧或兼性厌氧的条件下还原  $\text{NO}_2^-$  或  $\text{NO}_3^-$  为  $\text{N}_2$ ,  $\text{NO}$  和  $\text{N}_2\text{O}$  是该过程的中间产物<sup>[3]</sup>;硝化细菌(如 *Nitrosomonas* sp.)能在好氧的条件下氧化羟胺( $\text{NH}_2\text{OH}$ )为  $\text{NO}_2^-$ ,该反应生成的中间产物  $\text{HNO}$  很不稳定,能继续分解产生  $\text{NO}$  和  $\text{N}_2\text{O}$ <sup>[4]</sup>。然而最近的研究表明,实际过程远比想像中的复杂,除了原核微生物外还发现真核微生物(如真菌)和古菌均能参与土壤的硝化和反硝化过程<sup>[5]</sup>。此外很多新奇的氮循环比如硝化细菌反硝化<sup>[6]</sup>、厌氧氨氧化<sup>[7]</sup>、异养硝化<sup>[8]</sup>、好氧细菌反硝化<sup>[9]</sup>、真菌共脱氮<sup>[10]</sup>、氨发酵<sup>[11]</sup>等都陆续被证实,而且这些微生物氮循环能利用的底物除了熟知的无机氮外还可能是一些有机氮化合物,比如小分子氨基酸、苯胺、水杨酰异羟肟酸等<sup>[12]</sup>。许多典型的

菌类和催化酶已经被成功分离、提纯出来,表明这些微生物过程并不是特例,分布也比想象中要广得多<sup>[5, 13]</sup>。这些新的发现可能导致原来通过研究原核细菌的硝化和反硝化过程得出的  $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{NO}$  产生的机理、模型、源汇估算出现很大问题,采取的减缓  $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{NO}$  产生的措施的效果可能需要重新评估。因为真核微生物和古菌的代谢过程与原核微生物是很不同的,外部的影响因素(比如温度、 $\text{O}_2$  分压、含水量、pH)也非常不同<sup>[14]</sup>。

亚热带森林土壤往往高度风化、脱硅、富铁铝,呈现出很强的酸性<sup>[15-16]</sup>。目前这种特殊条件下的土壤微生物过程及其影响的土壤  $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{NO}$  产生的研究很少<sup>[17]</sup>。日益增加的大气氮沉降使这个地区的土壤趋于“氮饱和”<sup>[18]</sup>,但是高氮输入对土壤  $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{NO}$  产生的影响是很复杂的。Brierley 等<sup>[19]</sup>的实验表明,在酸性土壤中添加过量  $\text{NH}_4^+$  会抑制土壤微生物活性,进而减少  $\text{N}_2\text{O}$  的产生,但添加醋酸盐可

\* 国家自然科学基金项目(40901115、31070548、31170578)和福建省基金项目(2009J01207)资助

† 通讯作者, E-mail: ren.gao@fjnu.edu.cn

作者简介:陈仕东(1981—),男,硕士研究生,主要研究方向为森林氮素循环。E-mail: caini\_038@163.com

收稿日期:2011-12-29;收到修改稿日期:2012-03-17

以使抑制作用消失。李英臣等<sup>[20]</sup>认为高氮输入会对  $N_2O$  的产生速率和反硝化损失速率产生抑制作用,且随着氮输入梯度增大而加强。Matson 等<sup>[21]</sup>提出氮输入将导致氮饱和的热带雨林土壤  $N_2O$  产生量升高。Bremner 等<sup>[22]</sup>认为高氮输入导致土壤 pH 降低,使得化学还原作用增强,有利于 NO 的生成,而  $N_2O$  的产生受到限制。此外,高氮输入还有可能导土壤  $NO_2^-$  的短时间累积<sup>[23]</sup>,但因为森林土壤  $NO_2^-$  含量很低且代谢非常快<sup>[24]</sup>,其在土壤  $N_2O$  和 NO 产生过程中的作用仍缺乏足够的报道。Cho 等<sup>[25]</sup>认为当  $NO_2^-$  大量累积时氨氧化细菌(AOB)为了保护自身细胞免受毒害,通过硝化细菌反硝化过程将之还原为  $N_2$ ,  $N_2O$  是这个过程的中间产物。Mørkved 等<sup>[26]</sup>的研究表明即使添加少量的  $NO_2^-$  也会显著诱导好氧条件下的微生物反硝化过程,进而产生大量  $N_2O$  和 NO,比  $NO_2^-$  化学反硝化释放量多几个数量级。而 Wrage 等<sup>[23]</sup>则认为氮输入导致的高浓度  $NO_2^-$  会通过化学分解和硝化细菌反硝化产生大量  $N_2O$ 。鉴于土壤氮循环的复杂性,在高氮输入、 $NO_2^-$  累积共同作用下酸性亚热带森林土壤  $N_2O$  和 NO 的产生规律是什么?可能参与的主要氮循环过程有哪些呢?为此本研究设计两种水分条件(分别是 60% WHC 和 90% WHC)分别代表好氧和厌氧两种土壤环境,结合<sup>15</sup>N 示踪实验来研究这种条件下土壤  $N_2O$  和 NO 的产生规律并探讨可能的产生途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试土壤

供试土壤采自福建省建瓯市万木林自然保护区(27°03'N, 118°09'E)浙江桂天然林,属花岗岩上发育的普通山地红壤。所在区域属典型中亚热带季风气候;海拔 234 ~ 556 m;年均温为 18.8℃,7 月均温 28.6℃;无霜期 277 d;年降水量 1 673 mm,4 月至 6 月降水占全年的 50%。样地坡向 330°,坡度 20°,海拔 390 m,郁闭度为 0.8。乔木层中浙江桂(*Cinnamomum chekiangense*)占绝对优势,假蚊母树(*Distyliopsis dunnii*)次之。再次有少叶黄杞(*Engelhardtia fenzelii*)、桂北木姜子(*Litsea subcoriace*)及猴欢喜(*Sloanea sinensis*)等。灌木层较稀疏,主要有薄叶山矾(*Symplocos anomala*)、杜茎山(*Maesa japonica*)、野含笑(*Michelia skinneriana*)、沿海紫金牛(*Ardisia punctata*)、黄瑞木(*Adinandra millettii*)等种类。草本层不发达,有狗脊蕨(*Woodwardia japoni-*

*ca*)、草珊瑚(*Sarcandra glabra*)、飞扬草(*Euphorbia hirta*)等。实验地附近 1 km 内没有农业活动,没有人造的氮输入。多点选取表层(0 ~ 15cm)土壤,使用聚乙烯塑料袋封装带回实验室,彻底混匀,手工挑除肉眼可见的碎石、凋落物、根系等杂物,过 2 mm 的尼龙筛,然后保存在 4℃ 冰箱中直至实验开始。土壤基本性质为:pH  $4.79 \pm 0.18$ ,全氮  $2.0 \pm 0.5$  ( $g\ kg^{-1}$ ),氨氮  $42 \pm 1.5$  ( $mg\ kg^{-1}$ ),硝氮  $16 \pm 1.2$  ( $mg\ kg^{-1}$ ),亚硝氮  $0.21 \pm 0.1$  ( $mg\ kg^{-1}$ ),全碳  $27.2 \pm 7.7$  ( $g\ kg^{-1}$ ),C/N 13.5。

### 1.2 实验处理

a 组,设计 6 个处理,分别为对照(CK)、高温灭菌加  $NaNO_2$  (MY)、加<sup>15</sup> $NH_4NO_3$  (A)、加  $NH_4^{15}NO_3$  (X)、加<sup>15</sup> $NH_4NO_3$  和  $NaNO_2$  (AY)、加  $NH_4^{15}NO_3$  和  $NaNO_2$  (XY),其中<sup>15</sup> $NH_4NO_3$  和  $NH_4^{15}NO_3$  的<sup>15</sup>N atom% 均为 20%,加入量为  $N\ 300\ mg\ kg^{-1}$ ;  $NaNO_2$  的加入量为  $N\ 1\ mg\ kg^{-1}$ 。具体步骤为:首先取下一次性注射器(最大刻度为 60 ml,实际容积 80 ml 左右)的活塞,置入相当于风干土重 5 g 的鲜土。然后塞入活塞并倒置针管(针头端向上),调节活塞位置使得土壤的顶部空间为 60 ml。将不同处理的溶液从针头端逐滴加入土壤,对照组也加入等量去离子水,调节土壤含水量为 60% WHC。滴加溶液时不断旋转针管使液滴均匀分布,再用医用三通阀密封针头端,横置于 30℃ 恒温摇床( $200\ r\ min^{-1}$ )中避光培养 57 h。b 组,设计 4 个处理,只标记硝态氮,处理如下:对照(CK)、高温灭菌加  $NaNO_2$  (MY)、加  $NH_4^{15}NO_3$  (X)、加  $NH_4^{15}NO_3$  和  $NaNO_2$  (XY),其他操作步骤和参数与 a 组实验相同,土壤含水量控制在 90% WHC。a 组和 b 组每个处理均做三个重复。

实验 a 组和 b 组,分别于加入溶液后的 2 h、5 h、9 h、21 h、33 h、57 h 随机选取各个处理的三个针管,把土壤顶部空间的 60 ml 气体推入铝膜气袋(100 ml,大连德霖)中保存。每次取样前 2 h 先推动活塞排出针管中的原有气体,然后吸入 60 ml 新鲜空气,继续放置于恒温摇床培养 2 h。分别于实验刚开始(0 h)和每次气体取样后立即用  $2\ mol\ L^{-1}$  KCl(土水质量比为 1:10)溶液浸提土壤,用于可溶性氮的分析。

### 1.3 测定分析

土壤 pH 通过玻璃电极 pH 计测定,土水比 1:2.5 (v/v)。土壤有机碳(SOC)通过使用  $H_2SO_4-K_2Cr_2O_7$  湿法消解测定。总氮通过半微量凯氏定氮测定。土壤中的  $NH_4^+-N$  和  $NO_3^- -N$  使用  $2\ mol\ L^{-1}$

KCl 溶液(土水比 1:6 v/v)浸提,使用连续流动分析仪(SKALAR SAN<sup>++</sup>, 荷兰)测定。气体样品中的  $\text{N}_2\text{O}$  通过气相色谱仪(Shimadzu GCv2014, 日本)测定,作为载气为 95%  $\text{Ar}-\text{CH}_4$ ,流速  $30 \text{ ml min}^{-1}$ ,检测器为 ECD,检测器温度  $320^\circ\text{C}$ ,使用 3m 长的 Porapak Q (80/100 目)分离柱,柱温  $70^\circ\text{C}$ 。气样中的  $\text{NO}$  使用化学发光  $\text{NO}_x$  检测器(Thermo 42i, 美国)测定,分析时抽取 40 ml 气样,使用高纯氮气稀释至 2 L 进行测定。 $\text{N}_2\text{O}$  中的  $^{15}\text{N}$  同位素比值通过带全自动预 GC 浓缩接口(PreCon)的同位素质谱计(Thermo Finnigan MAT253, 德国)测定。

#### 1.4 计算方法及数据处理

$\text{N}_2\text{O}$  的  $^{15}\text{N}$   $\delta$  值通过 Mariotti<sup>[27]</sup> 提供的方法计算:

$\delta^{15}\text{N} = [(R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}}) - 1] \times 1000$ , 式中,  $R$  为  $\text{N}_2\text{O}$  中  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  的比值。

$\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{NO}$  产生速率的计算方法为:  $F = k \cdot \frac{V}{m} \cdot \frac{\Delta c}{\Delta t} \cdot \frac{273}{273 + T}$

式中,  $F$  表示气体产生速率( $\mu\text{g kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ );  $k$  为常数,  $\text{N}_2\text{O}$  取值  $1.964 (\text{kg m}^{-3})$ ,  $\text{NO}$  取值  $1.34 (\text{kg m}^{-3})$ ;  $\Delta c/\Delta t$  为气体在观测时间内浓度随时间变化的直线斜率( $\mu\text{g h}^{-1}$ );  $V$  为培养容器体积( $\text{m}^3$ );  $m$  为土重( $\text{kg}$ );  $T$  为培养温度( $^\circ\text{C}$ )。

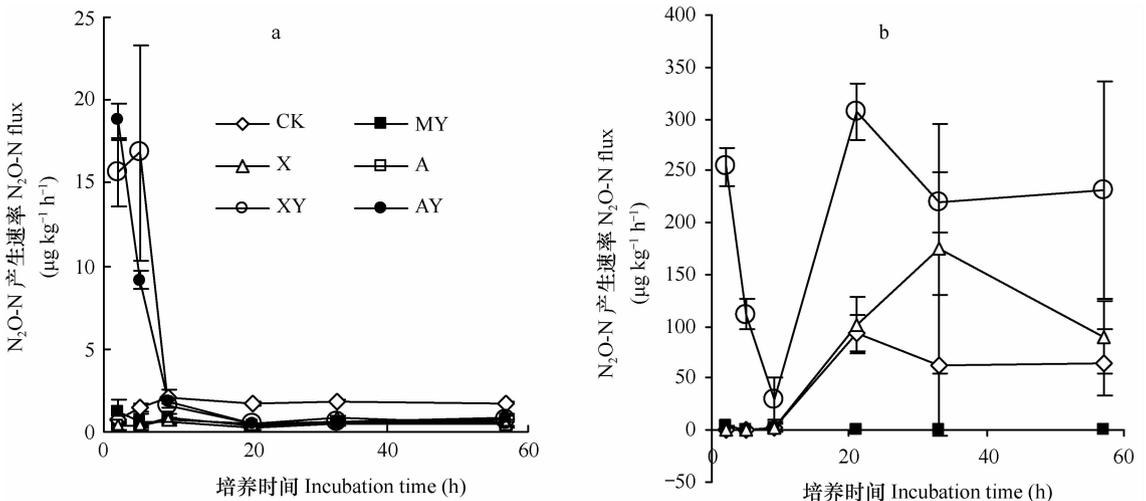
$\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{NO}$  的累积产生量采用相邻两次产生速

率的平均值乘以间隔的时间而得。每个样品测定值的三个重复求平均值,并计算标准差。采用 SPSS 17.0 的 ANOVA 检验各处理间的显著性差异, Spearman 秩相关来分析相同条件下土壤产生  $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{NO}$  之间的相关性, Excel2003 拟合  $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{NO}$  产生速率的线性回归方程。

## 2 结果与分析

### 2.1 高氮和 $\text{NO}_2^-$ 对土壤 $\text{N}_2\text{O}$ 和 $\text{NO}$ 产生的影响

**2.1.1 对  $\text{N}_2\text{O}$  产生的影响** 由图 1 可见,土壤含水量为 60% WHC 时,在实验开始 9 h 之内,AY 和 XY 处理迅速大量产生  $\text{N}_2\text{O}$ ,产生速率显著大于其他处理( $p < 0.01$ ),在 2 h 处 AY 的  $\text{N}_2\text{O}$  产生速率为  $18.79 \mu\text{g kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ ,为 CK 处理的 24 倍,MY 处理的 16 倍,X 和 A 处理的 48 倍。5 h 时 XY 的  $\text{N}_2\text{O}$  产生速率为  $16.81 \mu\text{g kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ ,为 CK 处理的 11 倍,MY 处理的 28 倍,X 处理的 48 倍,A 处理的 41 倍,但随时间增加这种趋势迅速降低。在实验开始 9 h 时 AY 和 XY 处理  $\text{N}_2\text{O}$  产生速率降为与 CK 无显著性差异。21 h 后 CK 的  $\text{N}_2\text{O}$  产生速率极显著( $p < 0.001$ )大于其他各处理。此外,整个实验过程 X 和 A 处理产生的  $\text{N}_2\text{O}$  量非常少,与 MY 处理无显著差别。实验开始 9 h 以后 X 和 A 处理与 CK 存在显著性差异( $p < 0.01$ )。



注: 图例中, CK: 对照; MY: 高温灭菌和  $\text{NO}_2^-$  处理; X:  $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  处理; XY:  $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  和  $\text{NO}_2^-$  处理; A:  $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$  处理; AY:  $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$  和  $\text{NO}_2^-$  处理。所有的值均是平均值 $\pm$ 标准偏差( $n=3$ )

Note: In the legend, CK: control; MY: sterilization and  $\text{NO}_2^-$  application; X:  $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  application; XY:  $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  and  $\text{NO}_2^-$  application; A:  $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$  application; AY:  $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$  and  $\text{NO}_2^-$  application. All values are mean $\pm$ SD ( $n=3$ )

图 1 不同水分条件下高氮和  $\text{NO}_2^-$  处理土壤的  $\text{N}_2\text{O}$  产生速率(a, 60% WHC; b, 90% WHC)

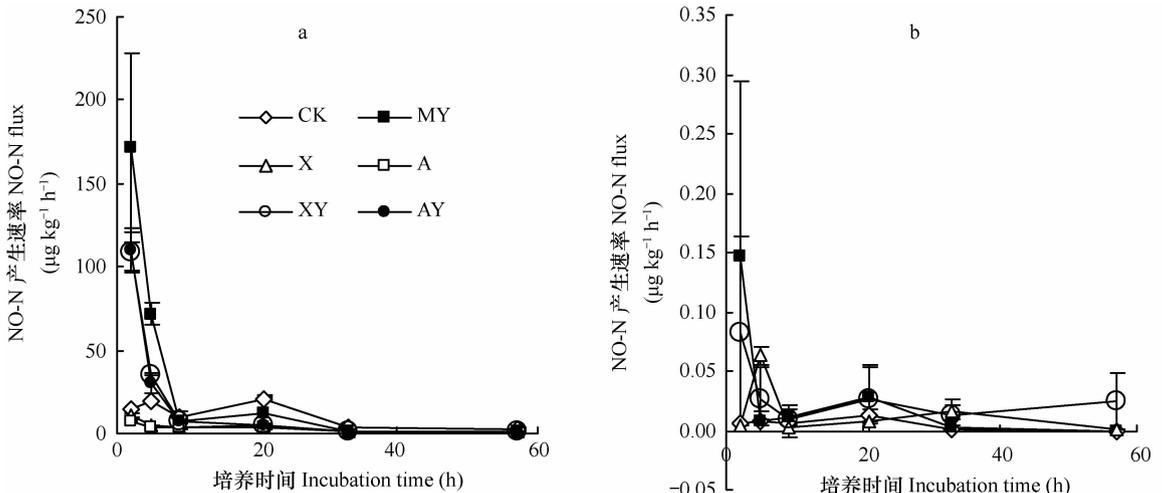
Fig. 1  $\text{N}_2\text{O}$  generation rate in soils high in nitrogen and nitrite content as affected by soil moisture content.

当土壤含水量增至 90% WHC 时,未灭菌各处理产生的  $N_2O$  较含水量 60% WHC 时均有大量增加。在实验开始 2 h 时,XY 处理迅速大量产生  $N_2O$ ,与其他处理差异显著( $p < 0.05$ )。但实验开始 9 h 内,XY 处理的  $N_2O$  产生速率迅速降低,21 h 后又迅速升高并保持在高位,57 h 内累积  $N_2O$  产生量达  $12.84 \text{ mg kg}^{-1}$ ,为 60% WHC 情况下 XY 累积产生量的 98 倍。X 和 CK 处理的  $N_2O$  产生速率开始很低,9h 后开始升高,在 21 h 处 X 处理超过 CK,并持续至实验结束,表明土壤含水量提高以后,高氮处理在实验后期(21h 后)不会抑制土壤  $N_2O$  的产生。XY 处理较 X 处理增加了  $N \text{ 1 mg kg}^{-1}$  的  $NO_2^-$  能迅速激活土壤微生物大量产生  $N_2O$ ,在实验开始 2 h,XY 的  $N_2O$  产生速率为 X 的 363 倍;5 h 时为 X 的 258 倍。但整个实验过程 MY 处理的  $N_2O$  产生速率非常低,表明在没有微生物活动的情况下即使添加  $NO_2^-$  也不能大量产生  $N_2O$ 。

**2.1.2 对  $NO$  产生的影响** 如图 2 所示,土壤含水量为 60% WHC 条件下,实验刚开始 2 h,添加  $NO_2^-$  的处理(MY、AY、XY)与未加  $NO_2^-$  处理(X、A、

CK)的  $NO$  产生速率呈显著差异( $p < 0.05$ ),MY 处理的  $NO$  产生速率值为  $171.24 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}\text{h}^{-1}$ ,为 A 处理的 22.53 倍,X 处理的 15.64 倍,CK 处理的 11.94 倍。5 h 时,MY 处理的  $NO$  产生速率为 AY 的 2.39 倍,XY 的 2.05 倍,与 AY 和 XY 处理有显著性差异( $p < 0.05$ )。9 h 后 CK 处理的  $NO$  产生速率开始超过其他处理,并一直延续至实验结束。21 h 时 CK 处理与未灭菌处理(A、X、AY、XY)的  $NO$  产生速率有显著性差异( $p < 0.05$ );33 h 后 CK 与其他处理的  $NO$  产生速率有极显著差异( $p < 0.001$ )。此外,X 和 A 处理在 5 h、21 h、33 h 和 57 h 处与 CK 呈极显著差异( $p < 0.001$ )。

当土壤含水量增为 90% WHC 时,土壤产生  $NO$  的规律与 60% WHC 时的大有不同,各处理  $NO$  产生速率与 60% WHC 时的比较减小了 2~3 个数量级,处理间的差异也不明显。57 h 培养结束后,CK、MY、X、XY 处理的  $NO$  累积产生量分别只有 60% WHC 时累积量的 2%、4%、18%、10%。表明随着含水量的增加,土壤释放的  $NO$  大量减少。



注:图例中,CK,对照;MY,高温灭菌和 $NO_2^-$ 处理;X, $NH_4^{15}NO_3$ 处理;XY, $NH_4^{15}NO_3$ 和 $NO_2^-$ 处理;A, $^{15}NH_4NO_3$ 处理;AY, $^{15}NH_4NO_3$ 和 $NO_2^-$ 处理。所有的值均是平均值 $\pm$ 标准偏差( $n=3$ )

Note: In the legend, CK: control; MY: sterilization and  $NO_2^-$  application; X:  $NH_4^{15}NO_3$  application; XY:  $NH_4^{15}NO_3$  and  $NO_2^-$  application; A:  $^{15}NH_4NO_3$  application; AY:  $^{15}NH_4NO_3$  and  $NO_2^-$  application. All values are mean $\pm$ SD ( $n=3$ )

图 2 不同水分条件下高氮和  $NO_2^-$  处理土壤的  $NO$  产生速率(a,60% WHC;b,90% WHC)

Fig. 2  $NO$  generation rate in soils high in nitrogen and nitrite content as affected by soil moisture content

## 2.2 $N_2O$ 来源分析

从图 3 可以看出,含水量为 60% WHC 时,X 和 XY 处理的  $N_2O$  的  $^{15}N$   $\delta$  值在实验的整个过程都显著大于 A 和 AY 处理( $p < 0.05$ ),其中 XY 处理释放的  $N_2O$  的  $^{15}N$   $\delta$  值最高达 13867,为 AY 处理最高值

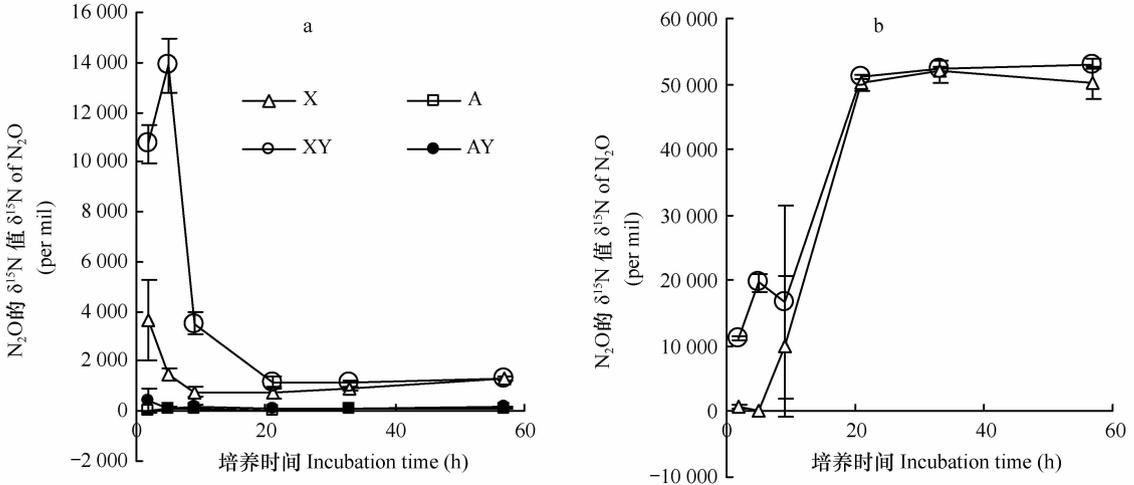
的 71 倍。XY 处理在实验开始的 33h 内  $N_2O$  的  $^{15}N$   $\delta$  值均极显著高于 X 处理( $p < 0.01$ ),但最高值出现的时间较 X 延后一点,直至实验 57h 才与 X 没有显著性差异。表明在这种水分条件下,产生的  $N_2O$  绝大部分来源于  $NO_3^-$  库,加入未标记的  $NO_2^-$  能极大

地促进带 $^{15}\text{N}$ 标记的  $\text{N}_2\text{O}$  产生。

当含水量为 90% WHC 时,有更多来自  $\text{NO}_3^-$  库的  $\text{N}_2\text{O}$  产生,加入未标记的  $\text{NO}_2^-$  也极大地促进带 $^{15}\text{N}$ 标记的  $\text{N}_2\text{O}$  产生。在实验开始 2 h 时,XY 处理的  $\text{N}_2\text{O}$  的  $^{15}\text{N}$   $\delta$  值为 X 处理的 15 倍;5 h 时为 235 倍;21 h 后  $\text{NO}_2^-$  的这种影响消失,这与 60% WHC 时的

情况类似。不同之处在于 90% WHC 时  $\text{N}_2\text{O}$  的  $^{15}\text{N}$   $\delta$  值在培养过程中不断增加,而 60% WHC 时的在培养过程中降低。

另外,从表 1 可以看出这种主要来源于  $\text{NO}_3^-$  库的  $\text{N}_2\text{O}$  由两种类型的分子组成,即纯合的( $^{46}[\text{N}_2\text{O}]$ )和杂合的( $^{45}[\text{N}_2\text{O}]$ )。在加入未标记的  $\text{NO}_2^-$ ,杂合



注: 图例中, X,  $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  处理; XY,  $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  和  $\text{NO}_2^-$  处理; A,  $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$  处理; AY,  $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$  和  $\text{NO}_2^-$  处理。数值为平均值 $\pm$ 标准偏差( $n=3$ )。

Note: In the legend, X:  $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  application; XY:  $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  and  $\text{NO}_2^-$  application; A:  $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$  application; AY:  $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$  and  $\text{NO}_2^-$  application. All values represent mean $\pm$ SD ( $n=3$ )

图 3 不同水分条件下高氮和  $\text{NO}_2^-$  处理土壤的  $\text{N}_2\text{O}$   $^{15}\text{N}$   $\delta$  值(a, 60% WHC; b, 90% WHC)

Fig. 3  $^{15}\text{N}$   $\delta$  value of  $\text{N}_2\text{O}$  emitted from soils high in nitrogen and nitrite content as affected by soil moisture content

表 1 不同土壤含水量下两种类型  $\text{N}_2\text{O}$  分子比率

Table 1 Ratio of two types of  $\text{N}_2\text{O}$  molecules as affected by soil moisture content

培养时间 Time (h)	处理 Treatments	60% 土壤饱和含水量 (60% WHC) 60% soil moisture content (60% WHC)		90% 土壤饱和含水量 (90% WHC) 90% soil moisture content (90% WHC)	
		$^{46}[\text{N}_2\text{O}]/^{44}[\text{N}_2\text{O}]$	$^{45}[\text{N}_2\text{O}]/^{44}[\text{N}_2\text{O}]$	$^{46}[\text{N}_2\text{O}]/^{44}[\text{N}_2\text{O}]$	$^{45}[\text{N}_2\text{O}]/^{44}[\text{N}_2\text{O}]$
2	X	1.54 $\pm$ 0.41	3.50 $\pm$ 1.22	0.81 $\pm$ 0.02	1.35 $\pm$ 0.18
	XY	1.80 $\pm$ 0.08	8.74 $\pm$ 0.56	1.76 $\pm$ 0.04	9.15 $\pm$ 0.19
5	X	0.90 $\pm$ 0.04	1.87 $\pm$ 0.19	0.74 $\pm$ 0.01	0.84 $\pm$ 0.03
	XY	2.54 $\pm$ 0.16	11.06 $\pm$ 0.83	3.58 $\pm$ 0.34	15.36 $\pm$ 1.11
9	X	1.03 $\pm$ 0.35	1.36 $\pm$ 0.16	3.17 $\pm$ 2.84	8.13 $\pm$ 7.94
	XY	1.20 $\pm$ 0.08	3.39 $\pm$ 0.34	4.05 $\pm$ 2.94	13.17 $\pm$ 10.97
21	X	0.82 $\pm$ 0.04	1.34 $\pm$ 0.18	13.54 $\pm$ 0.43	37.94 $\pm$ 0.94
	XY	0.88 $\pm$ 0.04	1.64 $\pm$ 0.20	13.63 $\pm$ 0.14	38.68 $\pm$ 0.30
33	X	0.83 $\pm$ 0.02	1.45 $\pm$ 0.04	13.93 $\pm$ 0.55	39.25 $\pm$ 1.35
	XY	0.87 $\pm$ 0.00	1.65 $\pm$ 0.02	14.09 $\pm$ 0.10	39.71 $\pm$ 0.21
57	X	0.89 $\pm$ 0.00	1.75 $\pm$ 0.05	13.65 $\pm$ 0.68	37.89 $\pm$ 1.84
	XY	0.90 $\pm$ 0.02	1.75 $\pm$ 0.06	14.38 $\pm$ 0.29	40.09 $\pm$ 0.52

注: X, 加入  $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  处理; XY, 加入  $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  和  $\text{NaNO}_2$  处理; 所有的值均是平均值  $\pm$  标准偏差 ( $n=3$ )

Note: X:  $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  application XY:  $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  and  $\text{NaNO}_2$  application; All values are mean  $\pm$  SD ( $n=3$ )

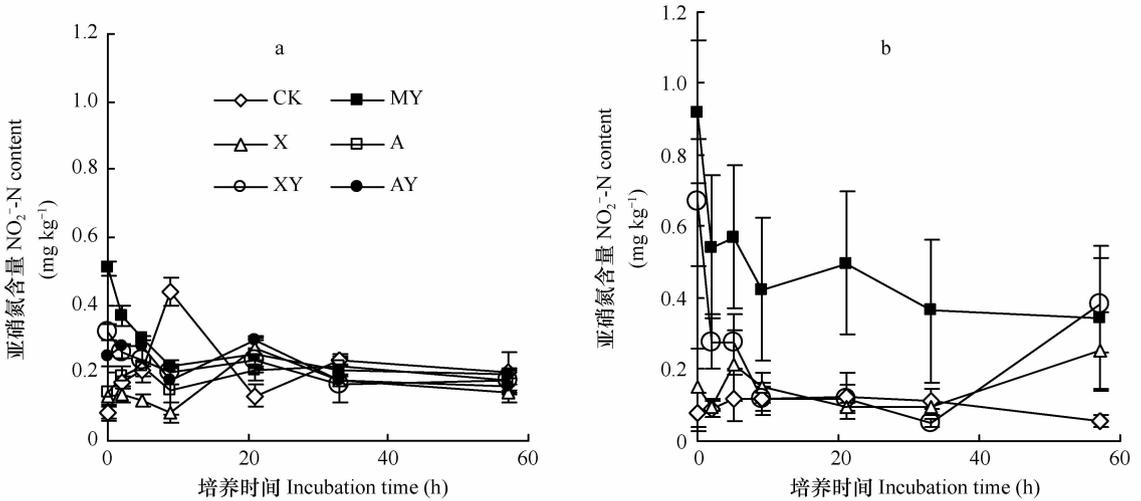
的  $N_2O$  分子比重均迅速增加,而且含水量越高比重越大,最多可占到带 $^{15}N$ 标记  $N_2O$  总数的 84% (90% WHC,XY 处理,2h 处)。在实验开始时杂合分子比例高,随着实验的进行这个比例逐渐降低,最后维持在一定水平,这是一个值得关注的现象。

### 2.3 土壤 $NO_2^-$ 含量的变化

如图 4 所示,由于 XY、AY 和 MY 处理加了  $N\ 1\ mg\ kg^{-1}$  的  $NO_2^-$ ,使其开始时的  $NO_2^-$  初始浓度高于 CK、X、A 处理,但这种差异从实验开始即有波动减小的趋势。实验开始(0h),土壤含水量为 60% WHC 时,XY 处理土壤的  $NO_2^-$  较 MY 的降低 57.76% ( $p < 0.01$ ),AY 的较 MY 的降低 55.32% ( $p < 0.01$ )。但在 90% WHC 时,XY 的只较 MY 的降低 31.74% ( $p >$

0.05),说明在刚开始实验时土壤中的  $NO_2^-$  降解已经迅速进行,未灭菌土壤  $NO_2^-$  降低的幅度更大,且因含水量不同降解规律存在很大的差异。

当含水量为 60% WHC 时,在实验开始 5 h 后,XY 和 AY 处理土壤中的  $NO_2^-$  浓度下降至几乎与 CK 处理相当;而当含水量升高为 90% WHC 时,这种情况延迟至实验开始 9 h。在 60% WHC 时,MY 处理土壤的  $NO_2^-$  浓度在实验开始 9 h 后与其他处理没有显著性差异,而在 90% WHC 时,实验开始 5 h 至 33 h,MY 处理土壤的  $NO_2^-$  浓度均与其他处理存在极显著性差异( $p < 0.001$ )。表明高含水量会导致土壤  $NO_2^-$  降解的速率更慢,并可能对土壤微生物过程起到更大的影响。



注: 图例中, CK, 对照; MY, 高温灭菌和  $NO_2^-$  处理; X,  $NH_4^{15}NO_3$  处理; XY,  $NH_4^{15}NO_3$  和  $NO_2^-$  处理; A,  $^{15}NH_4NO_3$  处理; AY,  $^{15}NH_4NO_3$  和  $NO_2^-$  处理。数值为平均值 $\pm$ 标准偏差( $n=3$ )

Note: In the legend, CK: control; MY: sterilization and  $NO_2^-$  application; X:  $NH_4^{15}NO_3$  application; XY:  $NH_4^{15}NO_3$  and  $NO_2^-$  application; A:  $^{15}NH_4NO_3$  application; AY:  $^{15}NH_4NO_3$  and  $NO_2^-$  application. All values are mean $\pm$ SD ( $n=3$ )

图 4 不同水分条件下高氮和外源  $NO_2^-$  处理土壤的  $NO_2^-$  含量 (a, 60% WHC; b, 90% WHC)

Fig. 4  $NO_2^-$  contents in soils high in nitrogen applied with extraneous nitrite as affected by soil moisture content

## 3 讨论

### 3.1 高氮和 $NO_2^-$ 对土壤 $N_2O$ 和 NO 产生的影响

本研究表明高氮 ( $NH_4NO_3$ ,  $N\ 300\ mg\ kg^{-1}$ ) 处理在 60% WHC 时显著抑制了中亚热带森林土壤  $N_2O$  的产生,但当含水量提高到 90% WHC,实验开始 9 h 内表现为抑制,至 21 h 这种抑制效应消失,并大量产生  $N_2O$  (图 1)。李香兰等<sup>[28]</sup>认为当土壤含水量处于饱和和含水量以下时  $N_2O$  排放量与水分含量是呈正相关,与本研究结论一致。90% WHC 时发生的从抑制转为促进的原因可能与底物浓度和水的

有效性有关。因为从 $^{15}N$ 示踪实验可知,这种酸性森林土壤的  $N_2O$  产生绝大多数来自反硝化过程,而反硝化是个酶促反应<sup>[29]</sup>,由米门公式可知:酶促反应速度受酶浓度和底物浓度的影响,当酶浓度足够高,随底物浓度的升高,酶促反应速度并没有因此增加,甚至受到抑制。因为高浓度底物降低了水的有效浓度,降低了分子扩散性,从而降低了酶促反应速度<sup>[30]</sup>。随着水分含量的增加,水的有效性提高,避免了过量的底物聚集在酶分子上,释放了酶分子,才能提高反应速度。

此外,未灭菌土壤添加少量的  $NO_2^-$  ( $N\ 1\ mg\ kg^{-1}$ ),在两种土壤含水量条件下均能立即解除高氮抑制,

并大量产生  $\text{N}_2\text{O}$ , 且在高含水量条件下, 这种情况甚至一直持续至实验结束(图 1)。可能的机制为高浓度的  $\text{NO}_2^-$  或者其分解产物( $\text{NO}$ )对土壤微生物是有毒性的<sup>[31-32]</sup>。黄灿等<sup>[33]</sup>认为反硝化菌胞内的一氧化氮还原酶(*nor*)很可能通过使用  $\text{NADH}$  和  $\text{NADPH}$  作为直接的电子供体, 把  $\text{NO}$  还原成  $\text{N}_2\text{O}$  脱毒<sup>[33]</sup>, 继而产生大量的  $\text{N}_2\text{O}$ 。从土壤的  $\text{NO}_2^-$  浓度来看, 土壤微生物似乎倾向于维持一个恒定的  $\text{NO}_2^-$  浓度, 新增加的  $\text{NO}_2^-$  很快便被降解, 直至与对照没有显著性差异, 但在高含水量情况下,  $\text{N}_2\text{O}$  的大量产生并未因  $\text{NO}_2^-$  浓度的恢复而停止, 事实上在实验结束 2 周后, 这种产生依然继续(数据未给出)。虽然后来  $\text{NO}_2^-$  的浓度降为正常值, 但其触发的生物机制并不会立即消失, 微生物产生的胞内和胞外酶可能继续存在活性, 从而使  $\text{N}_2\text{O}$  的大量产生持续一段时间。值得注意的是在低含水量(60% WHC)条件下  $\text{NO}_2^-$  诱导的  $\text{N}_2\text{O}$  大量产生持续时间很短, 大约在实验开始 9h 后就开始减少, 由于微生物的反硝化酶的活性和相关基因的表达会受到  $\text{O}_2$  的严格

抑制<sup>[34]</sup>, 好氧的土壤条件可能抑制了微生物反硝化的活性。

在本实验中, 未灭菌土壤的  $\text{NO}$  与  $\text{N}_2\text{O}$  的产生速率有很强的线性关系, 在低含水量(60% WHC)条件下二者的线性回归  $R^2$  达 0.79(图 5)。两种含水量条件下未灭菌土壤的  $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{NO}$  产生速率的 Spearman 等级相关均达显著性水平( $p < 0.05$ ), 这与 Zhang 等<sup>[35]</sup>的研究结果相一致。表明微生物存在的情况下, 高氮和外源  $\text{NO}_2^-$  同样对土壤  $\text{NO}$  产生造成显著影响。不同的是在低含水量条件下  $\text{NO}$  产生量比  $\text{N}_2\text{O}$  产生量大, 而高含水量条件下却比  $\text{N}_2\text{O}$  产生量少两个数量级, 这种情况也与已有的研究类似<sup>[36-37]</sup>, 表明土壤含水量对未灭菌土壤  $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{NO}$  的产生影响很大。土壤经高温灭菌处理后再加入  $\text{NO}_2^-$  (MY) 虽然产生大量的  $\text{NO}$ , 但产生的  $\text{N}_2\text{O}$  量却很低, 说明在没有微生物参与的情况下土壤依然可以大量产生  $\text{NO}$ , 即化学反硝化更倾向于产生  $\text{NO}$ , 但把  $\text{NO}$  继续还原成  $\text{N}_2\text{O}$  可能需要更复杂的微生物过程和酶的参与。

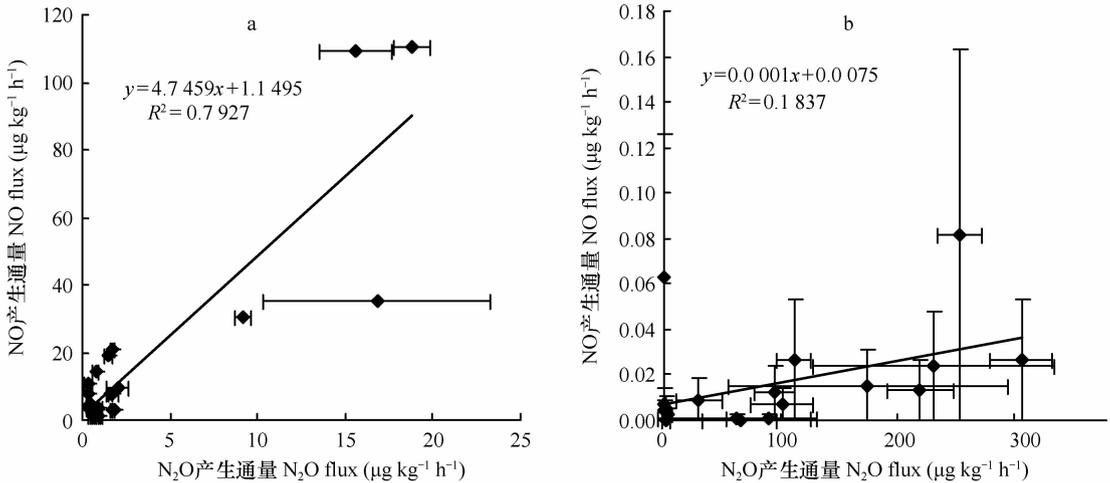


图 5 未灭菌土壤  $\text{N}_2\text{O}$  与  $\text{NO}$  产生速率之间的线性回归(a, 60% WHC; b, 90% WHC)。数值为平均值  $\pm$  标准偏差,  $n = 3$ )

Fig. 5 Linear regression of the generation rate of  $\text{N}_2\text{O}$  with that of  $\text{NO}$  from an unsterilized soil (a, 60% WHC; b, 90% WHC. All values represent mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ )

### 3.2 $\text{N}_2\text{O}$ 和 $\text{NO}$ 产生途径

Wolf and Brumme<sup>[38]</sup>研究表明酸性森林土壤(pH 3.8)主要通过反硝化过程产生  $\text{N}_2\text{O}$ , 低 pH 的土壤  $\text{NO}_3^-$  反硝化的最终产物是  $\text{N}_2\text{O}$ , 而高 pH 土壤的最终产物可能是  $\text{N}_2$ 。Ambus 等<sup>[39]</sup>认为  $\text{NO}_3^-$  是  $\text{N}_2\text{O}$  产生的主要基质, 贡献率在 50%~62% 之间, 虽然  $\text{N}_2\text{O}$  主要产生于反硝化过程, 但受到硝化过程活

性的驱动。直至目前为止, 仍然只有很少的研究有涉及酸性森林土壤  $\text{N}_2\text{O}$  的具体产生途径<sup>[40]</sup>。本研究利用  $^{15}\text{N}$  示踪表明, 这种酸性森林土壤产生的绝大多数的  $\text{N}_2\text{O}$  来源于  $^{15}\text{NO}_3^-$  库即反硝化过程, 实验还发现土壤产生的带  $^{15}\text{N}$  标记的  $\text{N}_2\text{O}$  中混有大量杂合  $\text{N}_2\text{O}$  分子即  $^{45}[\text{N}_2\text{O}]$ , 而且这种杂合的  $\text{N}_2\text{O}$  分子占  $^{15}\text{N}$  标记  $\text{N}_2\text{O}$  分子比重最多可达 84%, 随含水量

的增加其所占的比例也增高。此外,实验加入少量的未标记  $\text{NO}_2^-$  能显著激发源于  $^{15}\text{NO}_3^-$  库的杂合  $\text{N}_2\text{O}$  分子产生。如果说这种杂合的  $\text{N}_2\text{O}$  是因为土壤微生物对  $^{14}\text{N}$  和  $^{15}\text{N}$  的利用没有分馏作用形成的,那添加未标记的  $\text{NO}_2^-$  应该增加  $^{44}[\text{N}_2\text{O}]$  分子的比重,但从表 1 可以看出添加未标记的  $\text{NO}_2^-$  后  $^{46}[\text{N}_2\text{O}]$  和  $^{45}[\text{N}_2\text{O}]$  分子比重都迅速增加,  $^{45}[\text{N}_2\text{O}]$  增幅更大,直至实验开始的 21h 这个差异才减少,土壤含水量越高增幅也越大。Su 等<sup>[34]</sup>认为这种杂合的  $\text{N}_2\text{O}$  分子可能是反硝化过程形成的,其中一个 N 原子来自  $\text{NO}_2^-$  或  $\text{NO}_3^-$  而另外一个 N 原子是来自“共基质”(氨基酸、苯胺、叠氮化物、水杨基羟肟酸和氨等)。在反硝化过程中利用有机物作为共基质(术语是共脱氮)在最近十年内才引起人们的注意<sup>[5, 12]</sup>。Baggs<sup>[12]</sup>认为共脱氮将导致一个巨大的以往未知的  $\text{N}_2\text{O}$  估算,因为传统的反硝化两个  $\text{NO}_3^-$  只能产生一个  $\text{N}_2\text{O}$ ,共脱氮两个  $\text{NO}_3^-$  可以产生两个  $\text{N}_2\text{O}$ 。一般认为真菌是产生这种杂合  $\text{N}_2\text{O}$  的主要微生物,这种反应受  $\text{NO}_2^-$  或  $\text{NO}_3^-$  的诱导<sup>[41]</sup>。真菌和原核细菌共脱氮的区别在于,细菌的终产物为  $\text{NO}_2^-$ ,而真菌的产物为  $\text{N}_2\text{O}$  或  $\text{N}_2$ ,其中  $\text{N}_2\text{O}$  中的两个 N 原子则是  $^{14}\text{N}^{14}\text{NO}$  和  $^{15}\text{N}^{14}\text{NO}$  的混合物,可以通过  $^{15}\text{N}$  标记实验来区分<sup>[42]</sup>。位于真菌线粒体中的 P450nor 起主要作用,该酶催化 NO 为  $\text{N}_2\text{O}$ ,同时偶联线粒体中 ATP 的合成<sup>[43]</sup>。本实验中,当含水量提高到 90% 时,土壤产生了更多比率的杂合  $\text{N}_2\text{O}$ ,这也符合真菌“共脱氮”的特征,因为真菌的反硝化只需要少量的  $\text{O}_2$ , $\text{O}_2$  含量过高或过低都会抑制其活性<sup>[13]</sup>。有趣的是加入少量的  $\text{NO}_2^-$  ( $\text{N } 1 \text{ mg kg}^{-1}$ ),似乎能同时激活硝化和反硝化过程(图 3),其中最明显的就是这种杂合  $\text{N}_2\text{O}$  在好氧条件下大量增加,也就是说真菌似乎在氧气含量高的胁迫状态下也能短期内被激活。Hayatsu 等<sup>[13]</sup>认为真菌可以通过三个能量产生途径进行代谢,即氧气呼吸(高  $\text{O}_2$  浓度), $\text{NO}_3^-$  呼吸(低  $\text{O}_2$  浓度),氨发酵(完全厌氧)从而能在各种  $\text{O}_2$  供应条件下生存。好氧条件下,真菌反硝化和好氧呼吸使用相同的线粒体呼吸链,能较细菌的反硝化作用产生更多的跨膜质子势;低氧条件下,过多的电子也能分流给 NO,被 NO 还原酶催化脱毒还原成  $\text{N}_2\text{O}$ <sup>[33-44]</sup>。由于亚热带森林土壤的真菌群落发达<sup>[45]</sup>,真菌参与亚热带酸性森林土壤产生  $\text{N}_2\text{O}$  可能是一个独特的过程。

一般认为土壤中的  $\text{NO}_3^-$  的反硝化是土壤  $\text{N}_2\text{O}$

和 NO 的主要来源<sup>[1]</sup>,但 Russow 等<sup>[46]</sup>认为  $\text{N}_2\text{O}$  只有在严格厌氧( $0 \sim 0.2\% \text{O}_2$ )的条件下才绝大多数来源于 NO。奇怪的是本研究中在 90% WHC 下的 NO 与  $\text{N}_2\text{O}$  产生速率的相关性更低,鉴于 Russow 等<sup>[46]</sup>的实验是在扩散良好(低温  $15^\circ\text{C}$  培养、薄土层、加强对流)的情况下进行,可能“扩散限制”是造成这种差异的原因。低含水量的土壤生成的 NO 能迅速扩散到空气中,避免被进一步还原,而高含水量限制 NO 从反硝化菌胞内扩散到土壤空气中,并限制了其在土壤中的扩散。此外,NO 还可能来源于非生物过程即  $\text{NO}_2^-$  的化学分解,有研究表明  $\text{NO}_2^-$  的化学分解可以发生在  $\text{pH} < 5.5$  的情况,在这么低的 pH 下, $\text{NO}_2^-$  和  $\text{HNO}_2$  会处于一种平衡中,而  $\text{HNO}_2$  不稳定,特别是在  $\text{Fe}^{2+}$  和适合的有机物存在下容易会分解为 NO、 $\text{HNO}_3$  和  $\text{H}_2\text{O}$ <sup>[47]</sup>。所以高温灭菌处理(MY)的 NO 累积产生量是最高的,但其  $\text{N}_2\text{O}$  的产生量却是最少的,因为  $\text{N}_2\text{O}$  需要 NO 通过一氧化氮还原酶(Nor)继续还原才能形成<sup>[48]</sup>。还有许多实验室和野外的实验表明土壤释放 NO 可能主要通过  $\text{NH}_4^+$  的硝化过程<sup>[49-50]</sup>。目前对亚热带森林土壤 NO 释放的认识还非常有限<sup>[17]</sup>。所以在以后的研究中应该参考 Russow 等<sup>[46]</sup>使用的防止“扩散限制”的方法来继续深入探讨 NO 的产生途径。

## 参 考 文 献

- [1] Conrad R. Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases ( $\text{H}_2$ , CO,  $\text{CH}_4$ , OCS,  $\text{N}_2\text{O}$ , and NO). *Microbiol Rev*, 1996, 60:609—640
- [2] Yokoyama K, Ohama T. Effect of inorganic N composition of fertilizers on nitrous oxide emission associated with nitrification and denitrification. *Soil Sci Plant Nutr*, 2005, 51:967—972
- [3] Zumft W G. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol R*, 1997, 61:533—616
- [4] Hooper A B, Terry K R. Hydroxylamine reductase of *Nitrosomonas* production of nitric oxide from hydroxylamine. *Biochim Biophys Acta*, 1979, 571:12—20
- [5] Spott O, Russow R, Stange C F, et al. Formation of hybrid  $\text{N}_2\text{O}$  and hybrid  $\text{N}_2$  due to codenitrification: First review of a barely considered process of microbially mediated N-nitrosation. *Soil Biol Biochem*, 2011, 43:1 995—2 011
- [6] Mulder A, van de G A, et al. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol Ecol*, 1995, 16:177—184
- [7] Wrage N, Velthof G L. Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biol Biochem*, 2001, 33:1 723—1 732
- [8] Matsuzaka E, Nomura N, et al. Participation of nitrite reductase

- in conversion of to in a heterotrophic nitrifier, *Burkholderia cepacia* NH-17, with denitrification activity. *Microbes Environ*, 2003, 18:203—209
- [ 9 ] Chen F, Xia Q, Ju L K. Aerobic denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* monitored by online NAD(P)H fluorescence. *Appl Environ Microb*, 2003, 69:6 715—6 722
- [ 10 ] Shoun H. Denitrification and anaerobic energy producing mechanisms by fungi. *Protein Nucl Acid Enzyme*, 2006, 51:419—429
- [ 11 ] Takasaki K, Shoun H, et al. Fungal ammonia fermentation, a novel metabolic mechanism that couples the dissimilatory and assimilatory pathways of both nitrate and ethanol role of acetyl CoA synthetase in anaerobic ATP synthesis. *J Biol Chem*, 2004, 279: 12 414—12 420
- [ 12 ] Elizabeth M B. Soil microbial sources of nitrous oxide: Recent advances in knowledge, emerging challenges and future direction. *Curr Opin Env Sust*, 2011, 3:321—327
- [ 13 ] Hayatsu M, Tago K, Saito M. Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Sci Plant Nutr*, 2008, 54:33—45
- [ 14 ] 路福平. 微生物学. 北京:中国轻工业出版社, 2005, 116—175. Lu F P. Microbiology (In Chinese). Beijing: China Light Industry Press, 2005:116—175
- [ 15 ] Qafoku N P, Van R, Noble A, et al. Variable charge soils: their mineralogy, chemistry and management. *Adv Agron*, 2004, 84: 159—215
- [ 16 ] 蔡祖聪, 赵维. 土地利用方式对湿润亚热带土壤硝化作用的影响. *土壤学报*, 2009, 45:795—801. Cai Z C, Zhao W. Effects of land use types on nitrification in humid subtropical soils of China(In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2009, 46(5): 795—801
- [ 17 ] Li D J, Wang X M. Nitric oxide emission following wetting of dry soils in subtropical humid forests. *Pedosphere*, 2009, 19: 692—699
- [ 18 ] 莫江明, 方运霆, 林而达, 等. 鼎湖山主要森林土壤  $\text{N}_2\text{O}$  排放及其对模拟 N 沉降的响应. *植物生态学报*, 2006, 30: 901—910. Mo J M, Fang Y T, Lin E D, et al. Soil  $\text{N}_2\text{O}$  emission and its response to simulated n deposition in the main forests of dinghushan in subtropical China(In Chinese). *J Plant Ecology*, 2006, 30:901—910
- [ 19 ] Brierley E D R, Wood M. Heterotrophic nitrification in an acid forest soil: isolation and characterisation of a nitrifying bacterium. *Soil Biol Biochem*, 2001, 33:1 403—1 409
- [ 20 ] 李英臣, 宋长春, 刘德燕, 等. 不同氮输入梯度下草甸沼泽土反硝化损失和  $\text{N}_2\text{O}$  排放. *环境科学研究*, 2009, 22: 1 103—1 107. Li Y C, Song C C, Liu D Y, et al. Denitrification loss and  $\text{N}_2\text{O}$  emissions from different nitrogen inputs in meadow marsh soil (In Chinese). *Res Environ Sci*, 2009, 22: 1 103—1 107
- [ 21 ] Matson P A, McDowell W H, Townsend A R. The globalization of N deposition ecosystem consequences in tropical environments. *Biogeochemistry*. 1999, 46:67—83
- [ 22 ] Bremner J M. Sources of nitrous oxide in soils. *Nutr Cycl Agr*, 1997, 49:7—16
- [ 23 ] Wrage N, Velthof G L, Laanbroek H J, et al. Nitrous oxide production in grassland soils: assessing the contribution of nitrifier denitrification. *Soil Biol Biochem*, 2004, 36:229—236
- [ 24 ] Burns L C, Stevens R J, Laughlin R J. Production of nitrite in soil by simultaneous nitrification and denitrification. *Soil Biol Biochem*, 1996, 28:609—616
- [ 25 ] Cho C M, Yan T, Liu X, et al. Transcriptome of a *Nitrosomonas europaea* mutant with a disrupted nitrite reductase gene (*nirK*). *Appl Environ Microb*, 2006, 72:4 450—4 454
- [ 26 ] Mørkved P T, Dorsch P, Bakken L R, et al. The  $\text{N}_2\text{O}$  product ratio of nitrification and its dependence on long-term changes in soil pH. *Soil Biol Biochem*, 2007, 39:2 048—2 057
- [ 27 ] Mariotti A. Atmospheric nitrogen is a reliable standard for natural  $^{15}\text{N}$  abundance measurements. *Nature*, 1983, 303:6 687
- [ 28 ] 李香兰, 徐华, 蔡祖聪. 水分管理影响稻田氧化亚氮排放研究进展. *土壤*, 2009, 41:1—7. Li X L, Xu H, Cai Z C. Effect of water management on nitrous oxide emission from rice paddy field (In Chinese). *Soils*, 2009, 41:1—7
- [ 29 ] 史奕, 黄国宏. 土壤中反硝化酶活性变化与  $\text{N}_2\text{O}$  产生的关系. *应用生态学报*, 1999, 10:329—331. Shi Y, Huang G H. Relationship between soil denitrifying enzyme activities and  $\text{N}_2\text{O}$  emission (In Chinese). *Chin J Appl Ecol*, 1999, 10:329—331
- [ 30 ] 周群英, 王士芬. 环境工程微生物学. 北京:高等教育出版社, 2008, 115—116. Zhou Q Y, Wang S F. Environment engineering microbiology (In Chinese). Beijing: Higher Education Press, 2008:115—116
- [ 31 ] Poole R K. Nitric oxide and nitrosative stress tolerance in bacteria. *Biochem Soc T*, 2005, 33:176—180
- [ 32 ] 韩瑞宏, 卢欣石. 苗期紫花苜蓿对干旱胁迫的适应机制. *草地学报*, 2006, 14:393—394. Han R H, Lu X S. Studies on adaptive mechanism of alfalfa in drought stress at seedling stage (In Chinese). *Acta Agrestia Sinica*, 2006, 14:393—394
- [ 33 ] 黄灿, 何清明, 邹红东等. 真菌异化硝酸盐还原机理的研究进展. *微生物学通报*, 2009, 36:1 052—1 057. Huang C, He Q M, Wu H D, et al. Study progress on the mechanism of dissimilatory nitrate reduction in fungi (In Chinese). *Microbiology*, 2009, 36:1 052—1 057
- [ 34 ] Su F, Takaya N, Shoun H, et al. Nitrous oxide-forming codenitrification catalyzed by cytochrome P450nor. *Biosci Biotech Bioch*, 2004, 68:473—475
- [ 35 ] Zhang J B, Cai Z C, Cheng Y, et al. Denitrification and total nitrogen gas production from forest soils of eastern china. *Soil Biol Biochem*, 2009, 41:2 551—2 557
- [ 36 ] Goldberg S D, Gebauer G.  $\text{N}_2\text{O}$  and  $\text{NO}$  fluxes between a Norway spruce forest soil and atmosphere as affected by prolonged summer drought. *Soil Biol Biochem*, 2009, 41:1 986—1 995
- [ 37 ] Horv th L, F hrer E, Lajtha K. Nitric oxide and nitrous oxide emission from Hungarian forest soils; linked with atmospheric N-deposition. *Atmos Environ*, 2006, 40:7 786—7 795
- [ 38 ] Wolf I, Brumme R. Dinitrogen and nitrous oxide formation in beech forest floor and mineral soils. *Soil Sci Soc Am J*, 2003, 67:1 862—1 868
- [ 39 ] Ambus P, Zechmeister-Boltenstern S, Butterbach-Bahl K, et al.

- Sources of nitrous oxide emitted from European forest soils. *Biogeosci*, 2006, 3:135—145
- [40] Zhang J B, Cai Z C, Zhu T B, et al.  $N_2O$  production pathways in the subtropical acid forest soils in China. *Environ Res*, 2011, 111:643—649
- [41] Shoun H, Kim D H, Uchiyama H, et al. Denitrification by fungi. *FEMS Microbiol Lett*, 1992, 94(3):277—281
- [42] Tanimoto T, Hatano K, Kim D, et al. Co-denitrification by the denitrifying system of the fungus *Fusarium oxysporum*. *FEMS Microbiol Lett*, 1992, 93(2):177—180
- [43] Daiber A, Nauser T, Takaya N, et al. Isotope effects and intermediates in the reduction of  $NO$  by P450(NOR). *J Inorg Biochem*, 2002, 88:343—352
- [44] Morozkina E V, Kurakov A V, Nosikov A N, et al. Properties of nitrate reductase from *Fusarium oxysporum* 11dn1' fungi grown under aerobic and anaerobic conditions. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 2005, 41:292—297
- [45] Wu Y, Ma B, Zhou L, et al. Changes in the soil microbial community structure with latitude in eastern China, based on phospholipid fatty acid analysis. *Appl Soil Ecol*, 2009, 43:234—240
- [46] Russowa R, Stange C F. Role of nitrite and nitric oxide in the processes of nitrification and denitrification in soil: Results from  $^{15}N$  tracer experiments. *Soil Biol Biochem*, 2009, 41:785—795
- [47] Cleemput V, Samater O. Nitrite in soils: Accumulation and role in the formation of gaseous N compounds. *Fert Res*, 1996, 45:81—89
- [48] Kudo T, Takaya N, Park S Y, et al. A positively charged cluster formed in the heme-distal pocket of cytochrome P450nor is essential for interaction with NADH. *J Biol Chem*, 2001, 276:5 020—5 026
- [49] Götde M, Conrad R. Simultaneous measurement of nitric oxide production and consumption in soil using a simple static incubation system, and the effect of soil water content on the contribution of nitrification. *Soil Biol Biochem*, 1998, 30:433—442
- [50] Götde M, Conrad R. Influence of soil properties on the turnover of nitric oxide and nitrous oxide by nitrification and denitrification at constant temperature and moisture. *Biol Fert Soils*, 2000, 32:120—128

## GENERATION OF $N_2O$ AND $NO$ IN MID-SUBTROPICAL FOREST SOIL AS AFFECTED BY HIGH N AND $NO_2^-$ CONTENTS

Chen Shidong<sup>1,2</sup> Ma Hongliang<sup>1,2</sup> Gao Ren<sup>1,2†</sup> Yan Congwei<sup>1,2</sup> Yin Yunfeng<sup>1,2</sup> Yang Yusheng<sup>1,2</sup>

(1 Key Laboratory of Humid Subtropical Eco-geographical Process of the Ministry of Education, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China)

(2 School of Geographical Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China)

**Abstract** An experiment using the  $^{15}N$ -labeling method was carried out to investigate effects of application of ammonium nitrate ( $NH_4NO_3$ , N 300mg  $kg^{-1}$ ) and nitrite ( $NaNO_2$ , N 1mg  $kg^{-1}$ ) on generation of  $N_2O$  and  $NO$  in mid-subtropical forest soils, different in water regime (60% and 90% of WHC), in Southeast China. Results show that in soils 60% of WHC in soil water content, generation of  $N_2O$  and  $NO$  was significantly inhibited by high nitrogen input ( $p < 0.01$ ); while in soils 90% WHC in soil water content, a similar phenomenon was observed with the generation of  $N_2O$  within the first 9 hours of incubation, but afterwards the trend turned reversely; When  $NO_2^-$  added the inhibitions of high nitrogen input were lifted for all unsterilized soils, addition of  $NO_2^-$  immediately offset the inhibitive effect of high soil N content and triggered off generation of a large amount of  $N_2O$  and  $NO$ , forming a sharp contrast to CK ( $p < 0.01$ ). Such a phenomenon did not last long (for 21 h only) in soils 60% of WHC; but it did quite a long time (over 2 weeks) in soils 90% of WHC, which suggests that high water availability and exogenous  $NO_2^-$  played an important role in offsetting the inhibitive effect of high soil N content. In this experiment,  $N_2O$  was generated mainly in denitrification process of the soil, and what is more, the addition of unlabeled  $NO_2^-$  led to rapid increase of hybrid  $N_2O(^{14}N^{15}NO)$  molecules within the first 21 hours of the experiment, demonstrating that denitrification in the forest soil may probably proceed mainly through codenitrification by fungi, which may explain over 80% of the denitrification. Spearman rank correlation analysis indicates that there is a significantly positive correlation between the  $NO$  and  $N_2O$  production rates ( $p < 0.05$ ) in non-sterilized soils, and the lower the soil water content, the higher the correlation between the two. After addition of  $NO_2^-$ , sterilized soil produced more  $NO$  than unsterilized soil, but almost no  $N_2O$ , which indicates that in acid soils chemical denitrification contributes more to  $NO$  than to  $N_2O$ .

**Key words**  $N_2O$ ;  $NO$ ;  $^{15}N$ ; Nitrogen deposition; Fungi; Codenitrification