

氮循环过程的微生物驱动机制研究进展

林伟^{1,2}, 李玉中³, 李昱佳¹, 周晚来¹, 张冬冬¹, 戚智勇^{1*}

(1 中国农业科学院都市农业研究所, 四川成都 610213; 2 农业农村部都市农业重点实验室, 上海 200240;
3 中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所/农业农村部旱地节水农业重点实验室/中国农业科学院
环境稳定同位素实验室, 北京 100081)

摘要: 氮循环在生物地球化学中具有重要地位, 与人类生活密切相关。氮循环在很大程度上依赖微生物驱动的氮素转化, 而在转化过程中必然会造成不同形式氮的同位素效应。为更好地了解和溯源氮循环过程, 本文从氮循环的物质通量、微生物作用及氮同位素效应等角度进行系统地论述, 并对氧化亚氮 (N_2O) 分子内的特异同位素值区分微生物过程做了详细介绍。结果表明, 人为固氮是环境中活性氮增加的主要原因, 也进一步促进了氮素转化的各个环节。通过解析氮素循环中微生物过程的形成机理和评估每个过程的同位素效应, 为进一步探索微生物的功能基因和氮素同位素效应的内在联系提供依据, 对阐明氮循环过程中微生物驱动分子机制具有重要意义, 而两者的结合也为解决自然条件下氮素转化各过程的溯源难题指明了方向, 也将成为今后研究的热点, 并在揭示氮素转化机制中发挥越来越大的作用。

关键词: 全球氮通量; 微生物作用; 编码基因; ^{15}N 同位素; SP 值

Advances in the mechanism of microbe-driven nitrogen cycling

LIN Wei^{1,2}, LI Yu-zhong³, LI Yu-jia¹, ZHOU Wan-lai¹, ZHANG Dong-dong¹, QI Zhi-yong^{1*}

(1 Institute of Urban Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610213, China; 2 Key Laboratory of Urban Agriculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 200240, China; 3 Institute of Environment and Sustainable Development in Agriculture, CAAS/Key Laboratory of Dryland Agriculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Environmental Stable Isotope Laboratory of CAAS, Beijing 100081, China)

Abstract: Nitrogen cycle plays an important role in the discipline of biogeochemistry and is closely related to human life. Nitrogen cycle is largely dependent on microbe-driven nitrogen transformation, which inevitably results in isotopic effects of different forms of nitrogen. In order to better understand and trace the nitrogen cycle, this paper made a comprehensive summary from the material flux of nitrogen cycle, the microbial processes and the nitrogen isotope effects of nitrogen transformation processes, and the specificity of nitrous oxide (N_2O) molecule on distinguishing microbial processes. The results show that artificial nitrogen fixation is the main reason for the increase of active nitrogen in the environment, and also promoted the various links of nitrogen conversion. By analyzing the formation mechanisms of microbial processes in the nitrogen cycle and assessing the isotope effect of each process, it provides a basis for further exploring the internal connection between the functional genes and nitrogen isotope effects. It is important to elucidate the molecular mechanism of microbe-driven nitrogen cycle. The combination of the two methods also points out the direction for solving the source problem of nitrogen conversion processes under natural conditions, which is bound to become the focus of future research and plays an increasingly important role in revealing the mechanism of nitrogen conversion.

Key words: global nitrogen budget; microbial action; encoding gene; $\delta^{15}N$; SP value

收稿日期: 2020-03-27 接受日期: 2020-04-22

基金项目: 国家自然科学基金 (41473004); 中国农业科学院科技创新工程; 国家成都农业科技中心地方财政专项 (NASC2020AR09); 农业农村部都市农业重点实验室开放基金 (UA201913)。

联系方式: 林伟 E-mail: linwei01@caas.cn; * 通信作者 戚智勇 E-mail: qizhiyong@caas.cn

氮素是 DNA、蛋白质、酶等有机分子最基本的组成元素, 也是所有生命体最基本的营养物质, 在生物组织的所有化学元素中排在氧、碳、氢之后。大气中的氮气 (N_2) 是最大的可自由获取的氮库, 但仅有少量的固氮细菌或真菌可以直接将其利用, 其他生命体则需要依靠活性更强的氧化态氮和还原态氮 (统称为活性氮; Nr, reactive nitrogen)。氧化态氮主要有一氧化氮 (NO)、二氧化氮 (NO_2)、氧化亚氮 (N_2O)、硝酸盐 (NO_3^-) 和亚硝酸盐 (NO_2^-)。还原态氮主要有氨气 (NH_3)、铵盐 (NH_4^+)、有机合成氮 (如最简单形式的尿素) 和氮衍生品 (如蛋白质中的有机氮)。目前活性氮来源是固氮作用将大气中氮气固定, 包括在闪电作用下的自然固氮、陆地或水生系统中的生物固氮 (BNF) 和 Haber-Bosch 人工合成固氮 (N_2 转化成 NH_3/NH_4^+)^[1]。不管哪种固氮作用都需要经微生物作用促进氮素的转化并为生物吸收。人工合成氮对人类生活产生了深远的影响, 其中合成化肥的生产满足了世界上 50% 人口对粮食的需求^[2], 然而大量施肥也造成严重的环境问题, 如 NO_3^- 淋失对地下水的污染^[3] 和 N_2O 的排放造成温室效应^[4] 等。因此了解氮素的转化机制对合理施肥和减少污染具有重要意义。

微生物作用是控制氮素转化的主要因素, 并可以通过以下过程进行有序的循环。首先将一分子 N_2 固定到氨上 (nitrogen fixation), 氨被同化为有机氮 (assimilation), 有机氮通过降解和氨化生成铵盐 (ammonification), 随后经硝化作用氧化成硝酸盐 (nitrification), 再通过反硝化作用转化为 N_2O 或 N_2 (denitrification), 或者硝酸盐异化还原为氨 (DNRA), 或者厌氧氨氧化转化为 N_2 (ANAMMOX)。氮素转化过程同样伴随着氮的同位素分馏, 而植物、土壤、水和空气中氮化合物的同位素组成能够为主要过程提供信息, 因此被认为是一种重要的整合措施。不同微生物过程在氮素转化中同位素分馏的差异构成了同位素手段分析微生物来源的基础^[5], 而分析氮素循环过程中同位素效应为评估全球氮素水平和主要转化过程提供了依据。另外, N_2O 中 ^{15}N 位嗜值 SP (site preference, 在 N_2O 分子中间位和末端位 ^{15}N 的差值) 的发现为探索不同微生物过程提供了新的方法, 在硝化和反硝化作用上具有明显的差异值, 进而能够有效地区分相应过程, 它的补充进一步增强了同位素分析在物质组成和生物鉴定上的应用^[6]。

氮循环过程中的氮素转化与微生物作用和同位素效应有着密切的关系, 科学地认识其内在规律是

扩展我们在生物地球化学领域研究的重要基石。目前相关的报道缺乏全面的总结和彼此的联系, 本文在此背景下从氮素流通量、微生物作用及同位素效应、SP 值在区分微生物的应用 3 个角度综述文献中关于氮素转化研究的进展情况, 进一步明确氮循环中的关键过程及控制因子。同时, 分析和评估了氮素主要转化过程的编码基因和同位素效应值, 以期为分子生物学手段和稳定同位素技术在氮素循环领域的应用提供技术参考。

1 氮循环总量

氮循环是通过固氮作用将大气中大量天然 N_2 转化为 Nr 流入陆地和海洋生态系统, 再经过土壤、海水或人为活动等一系列作用后以分子氮的形式返回到大气中^[7]。因此, 氮循环中氮素总量估测主要从 Nr 来源和排放两方面进行评估 (表 1)。

1.1 活性氮素来源

大气中的 N_2 为地球上最广泛存在的氮素, 是转化为 Nr 最主要的来源。主要包括 3 个方面的固氮作用: 自然固氮、生物固氮和人工固氮。

自然固氮主要指 N_2 和 O_2 在自然界中的闪电作用下生成氮氧化物 (NO_x) 并将 Nr 引入远离对流层区域的过程。该过程中闪电活动可以通过卫星遥感监测并直接测量。由于直接测量存在较大的不确定性, 很难扩大直接测量的范围, 因此全球 NO_x 产量主要通过现有数据和模型进行估测。Brasseur 等^[8] 还考虑了气候变化可能对闪电产生 NO_x 的影响, 结果表明全球温度每增加 $8^\circ C$, NO_x 的产量就增加 3%~12%^[8]。全球每年自然固氮量估计在 $N\ 2\sim 10\ Tg$, 平均接近 $N\ 6.6\ Tg$ ^[8]。

生物固氮 (BNF) 是非人为制造 Nr 的主要来源。它的形成过程于 19 世纪末被发现, 此后便成为生态学研究热点。在陆地生态系统中, 土壤中存在的可利用 Nr 能够显著降低 BNF 的能力。因此, Nr 在农田和半自然土地上的广泛应用可能会大大降低非农业的 BNF, 针对这一问题目前并没有很好地解释。Vitousek 等^[9] 研究表明, 陆地生态系统中每年的 BNF 量为 $N\ 40\sim 100\ Tg$, 平均为 $N\ 58\ Tg$ 。在海洋生态系统中, BNF 和反硝化作用是氮循环中仅有的两种氮素转化过程且基本维持转化平衡^[7], 但是其大规模转化机制还不清晰, 评估全球每年海洋生态系统的 BNF 量为 $N\ 60\sim 200\ Tg$, 平均为 $N\ 140\ Tg$ ^[10]。

人为固氮虽然也有一定的不确定性, 但由于受到相关部门的监管和审查, 其评估相比自然固氮更

表 1 全球氮通量
Table 1 Global nitrogen budget

类别 Category	氮循环路径 Nitrogen cycle path	排放量 Emission (N Tg/year)	参考文献 Reference
氮固定 N fixation (N ₂)	闪电固氮 N ₂ fixation by lightning	5	[8]
	人为固氮—工业运输 N ₂ fixation by industrial transport	30	[1]
	人为固氮—生物质燃烧 N ₂ fixation by biomass burning	60	[1]
	人为固氮—肥料生产 N ₂ fixation by industrial production	120	[1]
	生物固氮—陆地 N ₂ fixation by land	58	[9]
	生物固氮—海洋 N ₂ fixation by oceans	140	[10]
氮转化 N transformation (Nr)	NH ₃ 陆地排放 Emissions from land	60	[11]
	NH ₃ 海洋排放 Emissions from oceans	9	[12]
	N ₂ O 陆地排放 Emissions from land	13	[13]
	N ₂ O 海洋排放 Emissions from oceans	5.5	[12]
	NO 陆地排放 Emissions from land	5	[13]
	NO _x 陆地燃烧排放 Emissions from burning in land	40	[14]
	Nr 陆地沉降 Deposition to land	70	[15]
	Nr 海洋沉降 Deposition to oceans	30	[15]
	Nr 海洋埋葬 Burial in oceans	20	[12]
	N ₂ 海洋反硝化作用 Denitrification to N ₂ in oceans	100~280	[12]

加准确。人为固氮主要有 3 个方面，包括工业运输过程中将 N₂ 转化为 NO 和 NO₂、生物质燃烧和 Haber-Bosch 过程将 N₂ 合成为 NH₃，三者每年的固氮量分别为 N 10~40、30~90 和 110~130 Tg，平均值分别为 N 30、60 和 120 Tg^[1]。其中，农业上施用的氮素主要来自 Haber-Bosch 过程中人为固定的大气中的 N₂^[18]。

1.2 活性氮的转化

大气中 N₂ 在天然过程或人为活动中发生反应生成 Nr，其中很大一部分还要在陆地和海洋生态系统中经微生物和植物的生物化学作用进一步转化，产生一系列的有机和无机化合物。Nr 循环量在陆地生态系统中为 N 240 Tg，海洋生态系统中为 N 230 Tg 和空气中为 N 100 Tg，而这些忽略了进出大气的 N₂ 储存通量^[1]。Nr 在空气中比在海洋和陆地中存留时间要短，而陆地土壤中 Nr 平均寿命也仅有几十年（除了泥炭土壤可能是 102~103 年）。陆地和海洋生态系统中通过生物固氮生成的 Nr 经植物代谢和微生物处理后转化为植物和微生物蛋白。在农业生产中与作物结合的 Nr 要么直接作为人类的食物，要么喂给牲畜，然后转化为供人类食用的蛋白质，但效率相当低。从最初的 N₂ 固定到食物链的转化和转移都

有可能导致其在地下水或大气中损失。土壤中容易获取的无机氮如果不被植物吸收则会经硝化作用和反硝化作用转化为气态形式的 NO 和 N₂O₃ (N₂ 没有考虑) 排放，通量分别为 N 5 和 13 Tg^[13]。而陆地生态系统中 NH₃ 和 NO_x 的排放则主要来自 Nr 的燃烧，通量分别为 N 60^[11] 和 40 Tg^[14]。这些气体在空气中的传导和反应会生成次级污染物，包括臭氧 (O₃)、其他光化学氧化剂和气溶胶，其中硝酸铵 (NH₄NO₃) 和硫酸铵 [(NH₄)₂SO₄] 会随雨水等氮沉降方式向陆地和海洋输入，通量分别约 N 70 和 30 Tg^[15]。另外土壤中硝酸盐浸出后通过水流进入海洋约 N 40~70 Tg，能使海洋 Nr 量增加近一倍^[19]。在海洋生态系统中反硝化作用产生的 N₂O 为 N 5.5 Tg 和 N₂ 为 N 100~280 Tg，海洋排放的 NH₃ 为 N 9 Tg，而海洋埋葬的 Nr 为 N 20 Tg^[12]。

综上所述，可以看出 Nr 的主要来源为生物固氮和人为固氮，其中人为固氮是近年来 Nr 通量不断增加的最主要原因，也必然造成氮素在不同 Nr 之间转化量的不同。对主要形式的氮素气体通量进行分析，我们发现 NO、N₂O 和 N₂ 更多的来自于微生物的硝化作用和反硝化作用，其中 N₂O 是一种重要的温室气体，然而目前我们还无法确定增加的 Nr 如何

影响它们的形成过程。因此, 必须要明确氮素的具体转化机制, 以制定有效的管控措施使氮循环朝着有益于人类的方向发展。

2 氮素转化的微生物作用及同位素效应

氮素转化其实是氮在-3价和+5价之间的一系列氧化还原反应, 绝大多数的氮素转化过程都有微生物的参与, 其转化过程也较为复杂。微生物代谢过程产生的酶是控制转化过程的关键, 然而不同类别微生物(细菌、真菌和古菌)可能执行一个或多个过程, 其代谢途径也是多种多样。为了更好地对氮素转化进行分类, 我们根据氮素转化类型将其分成6个经典过程, 分别为: 氮固定作用、硝化作用(细菌/古菌硝化作用和硝化细菌反硝化作用)、反硝化作用(细菌反硝化作用和真菌反硝化作用)、同化作用、异化作用和氨化作用(图1)。随着分子技术的发展, 控制这些微生物过程的酶(编码基因)已基本明确, 但是具体的代谢过程仍需结合其他方法进行分析。而稳定同位素技术被认为是一种非常有效的方法, 并已广泛应用于揭示复杂环境中微生物生理生态过程的代谢机制。目前, 针对微生物驱动的大多

数氮素转化同位素效应愈趋明朗, 但是在不同研究中其结果不尽相同。为此, 本文通过汇总前人文献中关于土壤培养、地下水检测和纯培养等研究中氮循环过程的同位素效应^[20-22], 并结合微生物催化反应原理, 整合并评估了相应微生物驱动氮素转化过程中的催化机制和同位素效应, 进一步明确彼此之间的联系(图1)。

2.1 固氮作用

由微生物参与的固氮作用被称为生物固氮(BNF), 是微生物携带的固氮酶将大气中的 N_2 固定为 NH_3 的过程。固氮酶主要有3种类型: 钼-铁(MoFe)、钒-铁(VFe)和铁-铁(FeFe), 它们主要存在于细菌和古菌中。固氮酶中的金属离子主要起催化作用, 铁、钒和钼等催化成分的编码基因分别为 $anfDGK$ 、 $vnfDGK$ 和 $nifDK$ ^[25]。另外, $nifH$ 、 $anfH$ 和 $vnfH$ 基因可以编码含铁的电子转运蛋白, 其中 $nifH$ 基因可以用来检测固氮微生物^[26]。值得注意的是固氮酶不能暴露在空气中, 遇到 O_2 会失活。

生物固氮(BNF)过程同位素效应值主要来自纯培养实验对固氮菌和其他单一的自由活细菌评估, 大部分介于-2.5‰到-1.4‰之间^[27]。BNF的同位素效应不会随温度升高和不同的培养条件而发生太大改

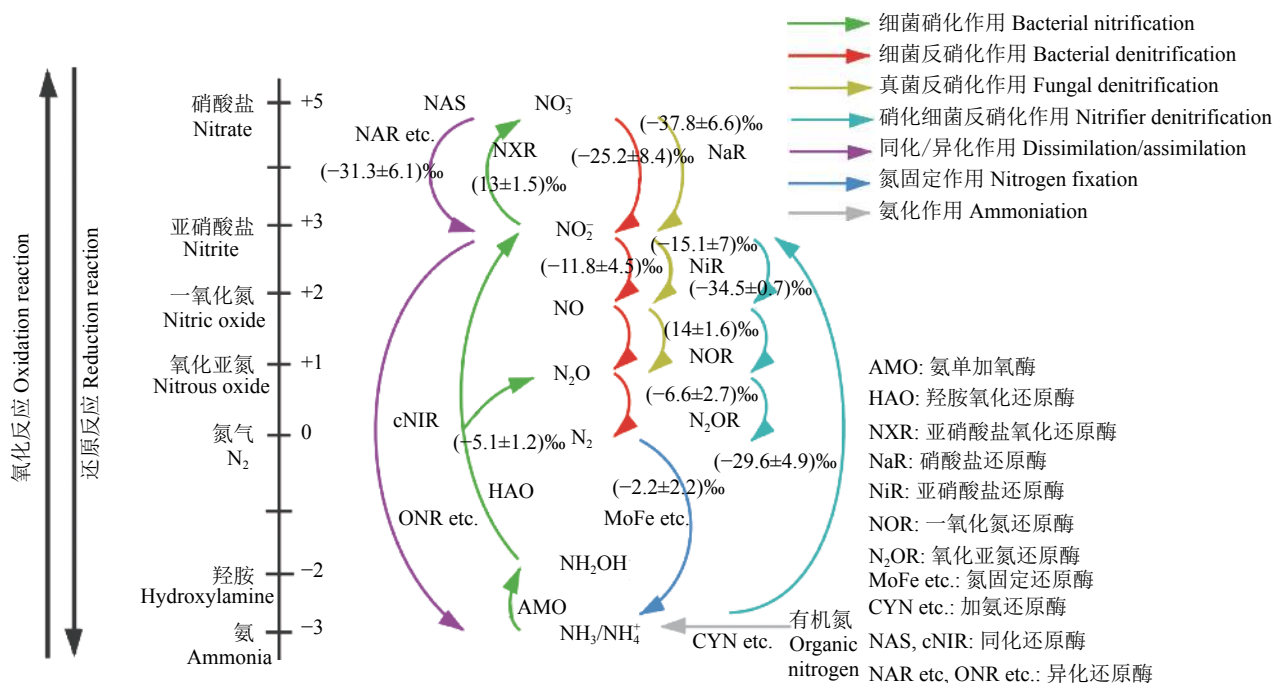


图1 氮素转化的微生物过程及同位素效应^[23-24]

Fig. 1 Microbial controlled nitrogen transformation processes and isotope effects

[注 (Note): 未压线的同位素效应值是不同的氮素之间转化的平均值, 压线的同位素效应值为微生物过程涉及的同位素效应 The isotope effect values above the line are the mean value converted between different nitrogen, and the isotope effect values the next to line are the isotope effects involved in microbial processes.]

变,除了在非经典固氮酶实验中表现较强同位素效应为 -8.0% ^[28]。共生植物固氮同位素效应与BNF不同,其中在刺槐的叶和树干中分别为 $(-0.7 \pm 0.3)\%$ 和 $(1.1 \pm 0.3)\%$,红三叶草中为 $(1.8 \pm 0.3)\%$ 和羽叶满江红中为 $(1.9 \pm 0.3)\%$ ^[29]。大多数生态系统都有BNF和共生植物固氮,评估其固氮作用的同位素效应平均值为 $(-2.0 \pm 2.2)\%$ 。

2.2 硝化作用

硝化作用是在需氧条件下 NH_3 或 NH_4^+ 向 NO_3^- 转化的一系列氧化过程,主要涉及3个氮素转化阶段($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$)。

在前两个氮素转化过程中, NH_3 或 NH_4^+ 向羟胺(NH_2OH)转化过程主要由氨氧化细菌(AOB)或古菌(AOA)代谢产生的氨单加氧酶(AMO, *amoA*基因编码)催化^[30]; NH_2OH 向 NO_2^- 转化过程由氨氧化细菌代谢的羟胺还原酶(HAO, *hao*基因编码)控制(氨氧化古菌不能代谢此酶)^[31]。大多数氨化细菌属于 β -变形菌和 γ -变形菌两类,它们是能将 NH_4^+ 氧化成 NO_2^- 的化能自养生物^[30]。在同位素检测时这两个过程主要涉及亚硝化单胞菌,其中在纯培养实验中,欧洲亚硝化单胞菌株(*Nitrosomonas europaea*)的氮同位素效应在 -38.2% 和 -24.0% 之间;而其他亚硝化单胞菌株(*Nitrosomonas eutropha*, *Nitrosomonas marina C-113a*, *Nitrosospira tenuis*)则有更大的范围,同位素效应在 -38.2% 和 -14.2% 之间^[32-33]。因此,在物种水平对其评估的同位素效应平均值约为 $(-29.6 \pm 4.9)\%$ 。

NO_2^- 向 NO_3^- 的转化则由亚硝酸盐氧化细菌、光能利用菌(不产生氧的菌属)和厌氧氨氧化细菌代谢的亚硝酸盐氧化还原酶(NXR)完成^[34]。NXR可由好氧的亚硝化-氧化细菌(α -变形杆菌纲、 β -变形杆菌纲、 γ -变形杆菌纲、绿弯菌门、硝化螺旋菌门)^[35]、无氧的光能利用菌(例如荚硫菌属KS1和红假单胞菌属LQ17)^[36-37]和厌氧氨氧化细菌^[38]代谢分泌而来,其编码基因为*nxrAB*。该过程仅Casciotti等^[39]做了同位素效应研究,利用移动硝基球菌做了3个纯培养实验,得到的平均值为 $(13.0 \pm 1.5)\%$ 。农业生产中氨基类化肥在氨氧化和亚硝酸盐微生物的协同作用下转变为 NO_3^- ,是植物吸收和水体污染的重要来源。

另外, NH_4^+ 向 NO_3^- 转化过程中也会有副产物 N_2O 产生,虽然参与催化作用的酶相同,但不同产物的同位素效应存在差异。在 NH_4^+ 到 N_2O 过程中有更强的同位素效应,其值从 -64.0% 到 -46.9% ^[40, 41],

而在热带土壤的培养实验中更是达到了 -112% 到 -102% ^[42],不过在硝化作用中 NH_4^+ 到 N_2O 过程更常用同位素效应均值 $(-56.6 \pm 7.3)\%$ 。而 NH_2OH 到 N_2O 过程在纯培养实验中的同位素效应在 -26.3% 和 5.7% 之间^[41, 43];在后来的研究中,将 NO_2^- 和 NH_2OH 1:1混合作为反应底物,其同位素效应变弱为从 -17.8% 到 0.8% ,而 NH_4^+ 到 N_2O 过程的同位素效应表现得 weaker,表明这些氧化过程会使同位素效应减弱。因此,我们选取仅以 NH_2OH 作为底物进行反应的值进行估算,其同位素效应均值为 $(-5.1 \pm 12.0)\%$ 。

2.3 反硝化作用

反硝化作用是在缺氧条件下 NO_3^- 还原为 N_2O 或 N_2 的一系列还原反应,主要包含4个氮素转化阶段($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$)。该过程以细菌和真菌参与为主,又称细菌反硝化作用和真菌反硝化作用,其中部分真菌因不能代谢 N_2O 还原酶(NOS)而不能进行 N_2O 还原过程。

NO_3^- 向 NO_2^- 的转化主要受细胞质中膜结合硝酸还原酶(NAR, *narG*基因编码)或细胞外的周质硝酸还原酶(NAP, *napA*基因编码)催化^[44],一般发生在富含 NO_3^- 的缺氧环境且多数生物都同时含有这两种酶^[45]。该过程的同位素效应值在纯培养、土壤和地下水中均有研究,真菌纯培养实验中同位素效应最强,在 -25.6% 和 -30.9% 之间^[46];然后是土壤培育实验,在 -52.8% 和 -10% 之间^[42, 47-48];次之是纯细菌培养实验,在 -36.7% 和 -10% 之间^[41, 49];最弱是水样在 -38% 和 -2.6% 之间^[50]。综合纯培养及土壤和水体的结果进行估测,该过程同位素效应的平均值为 $(-31.3 \pm 6.1)\%$ 。

NO_2^- 向 NO 转化由外周质细胞内的两种不相关的亚硝酸盐还原酶(NIR)催化,包括*nirS*基因编码的cd1-NIR和*nirK*编码的Cu-NIR,这两种酶普遍存在于细菌和古菌中^[51]。该过程的同位素效应研究多为纯培养实验,它们的同位素效应均较弱。反硝化细菌从 -15.8% 到 -6.9% ^[41];反硝化真菌从 -29.3% 到 -6.0% ^[46];而硝化细菌反硝化作用的 NO_2^- 还原同位素效应值较强且变化较小,在 -35.1% 和 -33.7% 之间^[52]。目前该过程以细菌反硝化作用和真菌反硝化作用为主,因此我们估测其平均值为 $(-19.8 \pm 7.6)\%$ 。

NO 向 N_2O 转化由一氧化氮还原酶(NOR, *narB*基因编码)催化^[53],广泛存在于各种环境中。然而迄今为止,该过程的同位素效应只在纯化的

P450nor 酶催化的真菌反硝化作用下进行了测量, 其同位素值为 $(14.0 \pm 1.6)\%$ ^[54]。

N_2O 向 N_2 的转化则受氧化亚氮还原酶 (NOS, *nosZ* 基因编码) 的催化, 在多种细菌 (变形菌门、拟杆菌门和绿菌门) 和古菌 (泉古菌门和嗜盐菌门) 中均有发现^[55]。Ostrom 等^[56]在纯培养实验的研究结果表明, N_2O 还原为 N_2 过程的同位素效应值最低为 -12.9% , 最高为 -1.8% , 平均值为 $(-4.1 \pm 6.8)\%$, 但该过程中同时存在正反两种同位素效应。在不考虑反向同位素效应时, 其同位素值在 -9.1% 和 -2.5% 之间^[47], 平均值为 $(-6.6 \pm 2.7)\%$ 。

2.4 同化/异化作用

同化/异化作用主要指 NO_3^- 还原为 NH_4^+ 的过程 ($NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NH_4^+$)。 NO_3^- 同化吸收还原为 NO_2^- 的过程由同化硝酸盐还原酶 (NAS, *nasA* 和 *nirA* 基因编码) 催化^[57], 尽管该过程的催化酶与反硝化有所不同, 但相同过程的同位素效应基本相同 (同反硝化作用该过程值)。 NO_2^- 同化吸收还原为 NH_4^+ 的过程由同化亚硝酸盐还原酶 (cNIR, *nasB* 和 *nirB* 基因编码) 催化^[23], 目前还没有该过程的相关同位素效应值报道。

异化过程也称硝酸盐异化还原成铵 (DNRA), 其中 NO_3^- 还原为 NO_2^- 的过程由膜结合硝酸还原酶 (NAR, *narG* 基因编码) 或周质硝酸还原酶 (NAP, *napA* 基因编码) 催化^[44], 该过程的同位素效应值同上。亚硝酸盐还原为铵盐是 DNRA 中的关键反应, 大部分由热球菌属家族的细菌代谢产生的细胞色素 c 亚硝酸盐还原酶 (ccNIR, *nrfA* 基因编码)、八面体血红素亚硝酸盐还原酶 (ONR) 和八面体血红素连四硫酸盐还原酶 (OTR) 来催化^[58], 同位素效应值未知。

2.5 其他作用

硝化细菌反硝化作用可看作是硝化作用的一种途径, 在硝化细菌进行硝化作用时并不产生 NO_3^- 而是直接经由 NO_2^- 氧化成 N_2O 和 N_2 的过程 ($NH_3 \rightarrow NH_2OH \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$)。该步骤涉及的酶和编码基因与硝化作用和反硝化作用中参与相应步骤的酶和基因相同, 因此该过程的同位素效应值可参考硝化作用和反硝化作用的相应过程。

氨化作用是有机氮转化为 NH_4^+ 的过程 (organic N $\rightarrow NH_4^+$), 由角质酶 (CYN, *cynS* 基因编码) 和脲酶 (URE, *ureABC* 基因编码) 催化^[23]。氨化作用的同位素效应研究相对较少, 这里只找到一项明确致力于氨化过程的同位素效应的研究。Mobius 等^[59]研究发现在富含有机质的深海沉积物中, 土壤有机氮矿化

过程的同位素效应值在 -2.3% 到 -1.4% 之间, 平均值约为 -1.7% ^[59]。无论如何, 氨化过程难以被广泛研究的原因可能与其分离过程的难度大、矿化的时间尺度长、有机化合物形成的种类多有关。

联氨合成及脱氢作用是在厌氧条件下 NO 还原为 NH_2OH 后在联氨合成酶 (HZS, *hzsA* 基因和 *hzsB* 基因编码) 催化下与 NH_4^+ 发生归中反应生成联氨 (H_2NNH_2)^[60], 再经联氨脱氢酶 (HDH, *hdh* 基因编码) 催化生成氮气 ($NO \rightarrow NH_2OH + NH_4^+ \rightarrow H_2NNH_2 \rightarrow N_2$)^[61], 该过程有待进一步研究。

微生物代谢分泌的酶催化的氮素一系列氧化还原反应是氮素循环的主要驱动者, 而编码酶的基因是控制微生物过程的关键, 也是分子生物学的分析基础。另外通过总结评估, 不同氮素转化过程的同位素效应也已知晓。因此, 通过分子生物学和稳定同位素结合进行氮素溯源能够为我们提供更多探索空间。

3 N_2O 中 SP 值在区分微生物过程中的应用

氮素循环的同位素效应值虽已被进一步总结和评估, 但是氮素转化不同过程的同位素效应值差异并不明显, 这为我们区分氮素来源带来了一定的困难。而随着稳定同位素技术的发展, 人们发现 N_2O 分子中的特异同位素值 (SP) 可以用于区分参与 N_2O 产生和消耗的主要微生物过程^[62]。 N_2O 是不对称分子 (N^a-N^b-O), 中间和末端氮原子不同。SP 值 ($SP = \delta^{15}N^a - \delta^{15}N^b$) 的形成独立于 N_2O 前体物质同位素组成, 也不依赖于 N 同位素分馏。 N_2O 分子中 α 位和 β 位 ^{15}N 丰度是基于同位素质谱仪对 N_2O 中分子 (N_2O^+) 和片段 (NO^+) 的质谱分析。 N_2O 分子中较轻原子间的键优先断裂决定了 SP 值大小, 而不同微生物或酶对这一过程的响应差异构成了其分析微生物发生过程的基础。国内相关研究还比较少, 主要利用简便形式加以区分细菌硝化作用和细菌反硝化作用^[63-64], 其 SP 值分别为 33% 和 0 ^[41]。随着对真菌和古菌的深入研究发现, 不同微生物在同一过程中存在着显著差异, 已知微生物过程的 SP 值基本上都呈两极分化趋势^[65], 可分为较高 SP 值和较低 SP 值微生物过程 (表 2)。

3.1 高 SP 值的微生物过程

具有较高 SP 值的微生物过程主要有细菌硝化作用、古菌硝化作用和真菌反硝化作用。细菌硝化作

表 2 不同微生物过程中 SP 平均值
Table 2 SP average value in different microbial processes

组 Group	微生物过程 Microbial process	氮素转化途径 N transformation path	SP 平均值 (%) SP average value	参考文献 Reference
高 SP High SP	细菌硝化作用 Bacteria nitrification	$\text{NH}_3 \rightarrow \text{N}_2\text{O}$	31.4 ± 4.2	[39]
		$\text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$	33 ± 4	[66]
	古菌硝化作用 Archaea nitrification	$\text{NH}_3 \rightarrow \text{N}_2\text{O}$	25 ± 2.3	[67]
	真菌反硝化作用 Fungal denitrification	$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2\text{O}$	35.3 ± 2	[44]
$\text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2\text{O}$		35.4 ± 1.7	[44, 68]	
低 SP Low SP	细菌反硝化作用 Bacteria denitrification	$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2\text{O}$	-2 ± 1.4	[39]
		$\text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2\text{O}$	-0.5 ± 2	[39]
		$\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$	6 ± 1	[54]
	硝化细菌反硝化作用 Nitrifier denitrification	$\text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2\text{O}$	-3.8 ± 3.5	[69]

用中 NH_3 到 N_2O 过程 (*Nitrosomonas europaea*) 的 SP 值在 27.2% 和 35.6% 之间, 平均值为 $(31.4 \pm 4.2)\%$ ^[41]; NH_2OH 到 N_2O 过程 (*Methylosinus trichosporium*、*Mthylcococcus capsulatus Bath*、*Nitrosomonas marina C-113a*、*Nitrosomonas europaea*、*Nitrosospira multiformis* 和 *Nitrosomonas oceani*) 的 SP 值在 24.9% 和 40.0% 之间, 平均值为 $(33 \pm 4)\%$ ^[66]。古菌硝化作用 (海洋和土壤中的 AOA) 的 SP 值在 18.0% 和 30.4% 之间, 平均值为 $(25.0 \pm 2.3)\%$ ^[67]。真菌反硝化作用中 NO_3^- 到 N_2O 过程 (*Cylindrocarpon lichnenicola*、*Fusarium decemcellulare*、*Fusarium solani fsp. pisi*、*Fusarium oxysporum* 和 *Trichoderma hamatum*) 的 SP 值在 32.5% 和 38.9% 之间, 平均值为 $(35.3 \pm 2.0)\%$ ^[51]; NO_2^- 到 N_2O 过程 (*Cylindrocarpon tonkinense*、*Cylindrocarpon lichnenicola*、*Fusarium oxysporum*、*Fusarium decemcellulare*、*Fusarium solani fsp. pisi* 和 *Trichoderma hamatum*) 的 SP 值在 32.0% 和 39.7% 之间, 平均值为 $(35.4 \pm 1.7)\%$ ^[46, 68]。

3.2 低 SP 值的微生物过程

具有较低 SP 值的微生物过程主要有细菌反硝化作用、硝化细菌反硝化作用。细菌反硝化作用中 NO_3^- 到 N_2O 过程 (*Paracoccus denitrificans*、*Pseudomonas aureofaciens* 和 *Pseudomonas chlororaphis*) 的 SP 值在 -6.9% 和 1.4% 之间, 平均值为 $(-2.0 \pm 1.4)\%$ ^[41]; NO_2^- 到 N_2O 过程 (*Pseudomonas aureofaciens* 和 *Pseudomonas chlororaphis*) 的 SP 值在 -2.5% 和 1.4% 之间, 平均值为 $(-0.5 \pm 2.0)\%$ ^[41]。硝化细菌反硝化作用中 NO_2^- 到 N_2O 过程 (*Nitrosomonas*

marina C-113a、*Nitrosomonas europaea* 和 *Nitrosospira multiformis*) 的 SP 值在 -13.6% 和 5.0% 之间, 平均值为 $(-3.8 \pm 3.5)\%$ ^[69]。

另外, N_2O 还原为 N_2 也会使 SP 值升高。Ostrom 等^[56]研究表明 *Pseudomonas denitrificans* 和 *Pseudomonas stutzeri* 两种细菌在 N_2O 还原期间 SP 值分别为 -6.8% 和 -5.0%, 平均值为 $(6 \pm 1)\%$ 。因此, 如果不将 N_2O 还原导致的 SP 值升高考虑在内, 则可能过低估计反硝化作用的贡献。

总之, 同位素技术手段为揭示微生物控制的氮素转化过程提供一种有效的方法, 通过大量研究也进一步明确了主要微生物过程的同位素效应, 对于区分主要微生物过程和建立氮素效应数据库具有重要的意义。

4 小结

在生态系统赖以维持的关键生物地球化学循环中, 全球氮循环因人类活动受到极大地改变, 是地球上最令人担忧的物质循环过程。目前, 全球氮预算的许多组成部分都已经被量化, 已知海洋和陆地与大气之间的 Nr 循环也都存在大幅度的增加, 主要源于人类为满足粮食需求, 在农业上施用大量的合成氮肥。我们获取的数据显示人工合成氮的投入使得进入氮循环系统的 Nr 总量增加了两倍左右, 这些氮素如果得不到有效的管控, 就会导致大量的氮素经一系列转化泄露到淡水和大气中, 例如硝化作用的最终产物 NO_3^- 和中间产物 N_2O 及反硝化作用的部分终产物 N_2O 的泄露, 在一定程度上对人类健康、生物多样性和气候产生严重影响。不同的氮素转化

过程其最终产物是不同的, 因此在严格控制总氮投入情况下, 适当的调节氮素形态和微生物过程能够减缓 Nr 有害部分的流通, 例如完全的反硝化作用促进 NO_3^- 向 N_2 的转化, 既能减少水体 NO_3^- 含量, 又能减缓 N_2O 的排放。已知绝大部分的氮素转化过程是由微生物驱动的, 其转化机制逐步形成 6 种经典的氮循环过程, 然而微生物为了生存也在不断地进化和革新, 进而突破本身固有界限, 可能导致更多的微生物作用发生。另外, 人类干扰和自然条件的变化都会影响自然界原有的氮素转化模式, 因此微生物驱动的氮素转化机制探索依旧曲折而又漫长^[23]。

利用分子生物学手段和稳定同位素技术探索微生物在氮素转化过程中扮演的角色已得到一定应用。基于对 *amoA* 和 *hao* 等硝化基因和 *nirS*、*nirK*、*narB* 和 *nosZ* 等反硝化基因测定的 qPCR 技术和高通量测序, 对查明硝化作用和反硝化作用相关基因丰度和物种多样性提供可能, 但是在自然条件下区分

硝化和反硝化作用对氮素转化的贡献仍然十分困难。为此, 已有研究利用不同氮素转化过程中氮同位素效应的差异, 及主要微生物过程中 SP 值的差异构建出同位素模型, 通过分析自然丰度的同位素值准确地定量了主要微生物过程贡献份额, 进而解决了自然条件下区分微生物过程的难题^[21]。在我们的研究中充分地利用了稳定同位素技术与分子技术的结合, 并关联基本土壤指标和 N_2O 通量进行相关分析, 进一步阐明了 N_2O 产生过程的微生物响应机制(图 2)。因此, 联合参与微生物过程功能基因和氮素转化的同位素效应, 对未来探明多种氮素转化过程的微生物驱动机制具有重要指导意义。本文也基于此对参与氮素转化的微生物功能基因及转化过程的氮同位素效应进行了系统的分析, 明确了部分氮循环中微生物作用和同位素效应的内在联系(图 1)。希望在探索生物地球化学的氮循环过程中, 这些内容能为相关研究提供一些借鉴和帮助。

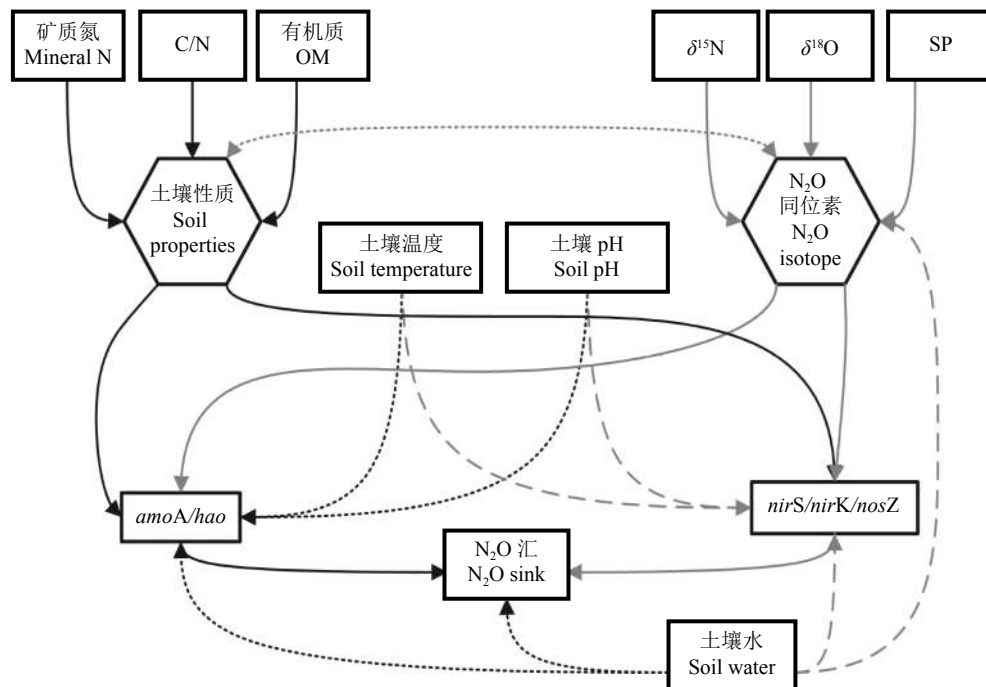


图 2 N_2O 产生关系网络分析图

Fig. 2 Diagram of nitrous oxide production by relationship network

参 考 文 献:

- [1] Fowler D, Coyle M, Skiba U, *et al.* The global nitrogen cycle in the twenty-first century[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 2013, 368: 20130164.
- [2] Erismann J W, Sutton M A, Galloway J, *et al.* How a century of ammonia synthesis changed the world[J]. *Nature Geoscience*, 2008, 1(10): 636-639.
- [3] 马洪斌, 李晓欣, 胡春胜. 中国地下水硝态氮污染现状研究[J]. *土壤通报*, 2012, 43(6): 1532-1536.
- [4] Ma H B, Li X X, Hu C S. Status of nitrate nitrogen contamination of groundwater in China[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2012, 43(6): 1532-1536.
- [5] Smeets E M W, Bouwman L F, Stehfest E, *et al.* Contribution of N_2O to the greenhouse gas balance of first-generation biofuels[J]. *Global Change Biology*, 2009, 15(1): 1-23.
- [6] Hattori S, Palma Y N, Itoh Y, *et al.* Isotopic evidence for seasonality

- of microbial internal nitrogen cycles in a temperate forested catchment with heavy snowfall[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 690: 290–299.
- [6] 林伟, 房福力, 张薇, 等. 稳定同位素技术在土壤 N₂O 溯源研究中的应用[J]. *应用生态学报*, 2017, 28(7): 2344–2352.
- Lin W, Fang F L, Zhang W, *et al.* A review on development of stable isotope technique in the studies of N₂O formation mechanism[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2017, 28(7): 2344–2352.
- [7] Stein L Y, Klotz M G. The nitrogen cycle[J]. *Current Biology*, 2016, 26(3): R94–R98.
- [8] Gordillo-Vázquez F J, Pérez-Invernón F J, Huntrieser H, *et al.* Global chemical influence of lightning with CAM5: Comparison of lightning schemes with observations[A]. EGU. Geophysical Research Abstracts[C]. 2019.
- [9] Vitousek P M, Menge D N L, Reed S C, *et al.* Biological nitrogen fixation: rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B–Biological Sciences*, 2013, 368: 20130119.
- [10] Canfield D E, Glazer A N, Falkowski P G. The evolution and future of earth's nitrogen cycle[J]. *Science*, 2010, 330(6001): 192–196.
- [11] Sutton M A, Reis S, Riddick S N, *et al.* Towards a climate-dependent paradigm of ammonia emission and deposition[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B–Biological Sciences*, 2013, 368:20130166.
- [12] Voss M, Bange H W, Dippner J W, *et al.* The marine nitrogen cycle: recent discoveries, uncertainties and the potential relevance of climate change[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B–Biological Sciences*, 2013, 368: 20130121.
- [13] Ganzeveld L N, Lelieveld J, Dentener F J, *et al.* Global soil-biogenic NO_x emissions and the role of canopy processes[J]. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 2002, 107(D16): 1–9.
- [14] Van V D P, Bouwman L F, Smith S J, *et al.* Global projections for anthropogenic reactive nitrogen emissions to the atmosphere: an assessment of scenarios in the scientific literature[J]. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 2011, 3(5): 359–369.
- [15] Stevenson D S, Dentener F J, Schultz M G, *et al.* Multimodel ensemble simulations of present-day and near-future tropospheric ozone[J]. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 2006: 111: D08301.
- [16] Brasseur G P, Schultz M, Granier C, *et al.* Impact of climate change on the future chemical composition of the global troposphere[J]. *Journal of Climate*, 2006, 19(16): 3932–3951.
- [17] Gruber N, Galloway J N. An earth-system perspective of the global nitrogen cycle[J]. *Nature*, 2008, 451(7176): 293–296.
- [18] Sarkadi L S. Effects of fertilizer on food supply [A]. Chemistry's role in food production and sustainability: past and present[M]. American Chemical Society, 2019.127–143.
- [19] Duce R A, LaRoche J, Altieri K, *et al.* Impacts of atmospheric anthropogenic nitrogen on the open ocean[J]. *Science*, 2008, 320(5878): 893–897.
- [20] Toyoda S, Yoshida N, Koba K. Isotopocule analysis of biologically produced nitrous oxide in various environments[J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2017, 36: 135–160.
- [21] Ibraim E, Wolf B, Harris E, *et al.* Attribution of N₂O sources in a grassland soil with laser spectroscopy based isotopocule analysis[J]. *Biogeosciences*, 2019, 16: 3247–3266.
- [22] Maeda K, Toyoda S, Philippot L, *et al.* Relative contribution of nirK- and nirS-bacterial denitrifiers as well as fungal denitrifiers to nitrous oxide production from dairy manure compost[J]. *Environmental Science Technology*, 2017, 51: 14083–14091.
- [23] Kuypers M M, Marchant H K, Kartal B. The microbial nitrogen-cycling network[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(5): 263–276.
- [24] Denk T R A, Mohn J, Decock C, *et al.* The nitrogen cycle: A review of isotope effects and isotope modeling approaches[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 105: 121–137.
- [25] McRose D L, Zhang X, Kraepiel A M L, *et al.* Diversity and activity of alternative nitrogenases in sequenced genomes and coastal environments[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 267.
- [26] Zehr J P, Jenkins B D, Short S M, *et al.* Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross - system comparison[J]. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(7): 539–554.
- [27] Bauersachs T, Schouten S, Compaoré J, *et al.* Nitrogen isotopic fractionation associated with growth on dinitrogen gas and nitrate by cyanobacteria[J]. *Limnology and Oceanography*, 2009, 54(4): 1403–1411.
- [28] Zhang X N, Sigman D M, Morel F M, *et al.* Nitrogen isotope fractionation by alternative nitrogenases and past ocean anoxia[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111(13): 4782–4787.
- [29] Minagawa M, Wada E. Nitrogen isotope ratios of red tide organisms in the east China Sea: a characterization of biological nitrogen fixation[J]. *Marine Chemistry*, 1986, 19(3): 245–259.
- [30] Pjevac P, Schauburger C, Poghosyan L, *et al.* AmoA-targeted polymerase chain reaction primers for the specific detection and quantification of comammox *Nitrospira* in the environment[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1–11.
- [31] Simon J, Klotz M G. Diversity and evolution of bioenergetic systems involved in microbial nitrogen compound transformations[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–Bioenergetics*, 2013, 1827(2): 114–135.
- [32] Arp D J, Stein L Y. Metabolism of inorganic N compounds by ammonia-oxidizing bacteria[J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 38: 471–495.
- [33] Kobayashi K, Makabe A, Yano M, *et al.* Dual nitrogen and oxygen isotope fractionation during anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria[J]. *The ISME Journal*, 2019, 13(10): 2426–2436.
- [34] Schweiger P F. Nitrogen isotope fractionation during N uptake via arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal fungi into grey alder[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2016, 205: 84–92.
- [35] Daims H, Lüscher S, Michael W. A new perspective on microbes formerly known as nitrite-oxidizing bacteria[J]. *Trends in Microbiology*, 2016, 24(9): 699–712.
- [36] Griffin B M, Schott J, Schink B. Nitrite, an electron donor for anoxygenic photosynthesis[J]. *Science*, 2007, 316: 1870.
- [37] Schott J, Griffin B M, Schink B. Anaerobic phototrophic nitrite oxidation by *Thiocapsa* sp. strain KS1 and *Rhodospseudomonas* sp. strain LQ17[J]. *Microbiology*, 2010, 156: 2428–2437.
- [38] Strous M, Pelletier E, Manganot S, *et al.* Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community

- genome[J]. *Nature*, 2006, 440(7085): 790–794.
- [39] Casciotti K L. Inverse kinetic isotope fractionation during bacterial nitrite oxidation[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2009, 73(7): 2061–2076.
- [40] Mandernack K W, Mills C T, Johnson C A, *et al.* The $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{18}\text{O}$ values of N_2O produced during the co-oxidation of ammonia by methanotrophic bacteria[J]. *Chemical Geology*, 2009, 267(1–2): 96–107.
- [41] Sutka R L, Ostrom N E, Ostrom P H, *et al.* Distinguishing nitrous oxide production from nitrification and denitrification on the basis of isotopomer abundances[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(1): 638–644.
- [42] Pérez T, Garcia-Montiel D, Trumbore S, *et al.* Nitrous oxide nitrification and denitrification ^{15}N enrichment factors from Amazon forest soils[J]. *Ecological Applications*, 2006, 16(6): 2153–2167.
- [43] Heil J, Wolf B, Brüggemann N, *et al.* Site-specific ^{15}N isotopic signatures of abiotically produced N_2O [J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2014, 139: 72–82.
- [44] Butala N S, Falkinham J O. Nitrate and nitrite reductase activities of *Mycobacterium avium*[J]. *International Journal of Mycobacteriology*, 2018, 7(4): 328–331.
- [45] Philippot L, Hallin S, Schloter M. Ecology of denitrifying prokaryotes in agricultural soil[J]. *Advances in Agronomy*, 2007, 96: 249–305.
- [46] Rohe L. Nitrous oxide from fungal denitrification—pure culture and soil studies using stable isotope and microbial inhibitor approaches [D]. Göttingen: PhD Dissertation of Georg August Universität Göttingen, 2014.
- [47] Lewicka Szczebak D, Well R, Bol R, *et al.* Isotope fractionation factors controlling isotopocule signatures of soil-emitted N_2O produced by denitrification processes of various rates[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2015, 29(3): 269–282.
- [48] Phillips R, Grelet G, McMillan A, *et al.* Fungal denitrification: *Bipolaris sorokiniana* exclusively denitrifies inorganic nitrogen in the presence and absence of oxygen[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2016, 363(4): fnw007.
- [49] Toyoda S, Mutobe H, Yamagishi H, *et al.* Fractionation of N_2O isotopomers during production by denitrifier[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2005, 37(8): 1535–1545.
- [50] Well R, Eschenbach W, Flessa H, *et al.* Are dual isotope and isotopomer ratios of N_2O useful indicators for N_2O turnover during denitrification in nitrate-contaminated aquifers?[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2012, 90: 265–282.
- [51] Graf D R H, Jones C M, Hallin S. Intergenomic comparisons highlight modularity of the denitrification pathway and underpin the importance of community structure for N_2O emissions[J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(12): e114118.
- [52] Sutka R L, Ostrom N E, Ostrom P H, *et al.* Nitrogen isotopomer site preference of N_2O produced by *Nitrosomonas europaea* and *Methylococcus capsulatus* Bath[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2003, 17(7): 738–745.
- [53] Saraiva L M, Vicente J B, Teixeira M. The role of the flavodiiron proteins in microbial nitric oxide detoxification[J]. *Advances in Microbial Physiology*, 2004, 49: 77–129.
- [54] Yang H, Gandhi H, Ostrom N E, *et al.* Isotopic fractionation by a fungal P450 nitric oxide reductase during the production of N_2O [J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(18): 10707–10715.
- [55] Zumft W G, Kroneck P M H. Respiratory transformation of nitrous oxide (N_2O) to dinitrogen by Bacteria and Archaea[J]. *Advances in Microbial Physiology*, 2006, 52: 107–227.
- [56] Ostrom N E, Pitt A, Sutka R, *et al.* Isotopologue effects during N_2O reduction in soils and in pure cultures of denitrifiers[J]. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 2007, 112: G02005.
- [57] Maia L B, Moura J J G. How biology handles nitrite[J]. *Chemical Reviews*, 2014, 114(10): 5273–5357.
- [58] Einsle O, Messerschmidt A, Stach P, *et al.* Structure of cytochrome c nitrite reductase[J]. *Nature*, 1999, 400(6743): 476–480.
- [59] Mobius J. Isotope fractionation during nitrogen remineralization (ammonification): implications for nitrogen isotope biogeochemistry [J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2013, 105: 422–432.
- [60] Kartal B, Keltjens J T. Anammox biochemistry: a tale of heme c proteins[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2016, 41(12): 998–1011.
- [61] Maalcke W J, Reimann J, De V S, *et al.* Characterization of anammox hydrazine dehydrogenase, a key N_2 -producing enzyme in the global nitrogen cycle[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(33): 17077–17092.
- [62] Wu D, Köster J R, Cárdenas L M, *et al.* N_2O source partitioning in soils using ^{15}N site preference values corrected for the N_2O reduction effect[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2016, 30(5): 620–626.
- [63] 林伟, 丁军军, 李玉中, 等. 有机肥和无机肥对菜地土壤 N_2O 排放及其来源的影响[J]. *应用生态学报*, 2018, 29(5): 1470–1478.
Lin W, Ding J J, Li Y Z, *et al.* Effects of organic and inorganic fertilizers on emission and sources of N_2O in vegetable soils[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2018, 29(5): 1470–1478.
- [64] 林伟, 张薇, 李玉中, 等. 有机肥与无机肥施对菜地土壤 N_2O 排放及其来源的影响[J]. *农业工程学报*, 2016, 32(19): 148–153.
Lin W, Zhang W, Li Y Z, *et al.* Effects of combined application of manure and inorganic fertilizer on nitrous oxide emissions and sources in vegetable soils[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2016, 32(19): 148–153.
- [65] Lin W, Ding J J, Li Y Z, *et al.* Partitioning of sources of N_2O from soil treated with different types of fertilizers by the acetylene inhibition method and stable isotope analysis[J]. *European Journal of Soil Science*, 2019, 70(5): 1037–1048.
- [66] Toyoda S, Yano M, Nishimura S I, *et al.* Characterization and production and consumption processes of N_2O emitted from temperate agricultural soils determined via isotopomer ratio analysis[J]. *Global Biogeochemical Cycles*, 2011, 25: GB2008.
- [67] Jung M Y, Well R, Min D, *et al.* Isotopic signatures of N_2O produced by ammonia-oxidizing archaea from soils[J]. *The ISME Journal*, 2014, 8(5): 1115–1125.
- [68] Rohe L, Anderson T H, Braker G, *et al.* Dual isotope and isotopomer signatures of nitrous oxide from fungal denitrification—a pure culture study[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2014, 28(17): 1893–1903.
- [69] Frame C H, Casciotti K L. Biogeochemical controls and isotopic signatures of nitrous oxide production by a marine ammonia-oxidizing bacterium[J]. *Biogeochemistry*, 2010, 7: 2695–2709.