

氮循环是土壤生态系统元素循环的核心过程之一，主要由微生物所驱动；研究微生物驱动的氮素转化过程及其机制，可为定向调控土壤氮素转化过程，提高氮素利用效率并减少其负面效应提供科学依据。

贺纪正

## 土壤氮素转化的关键微生物过程及机制

贺纪正\* 张丽梅

(城市与区域生态国家重点实验室 中国科学院生态环境研究中心 北京 100085)

**摘要:** 微生物是驱动土壤元素生物地球化学循环的引擎。氮循环是土壤生态系统元素循环的核心之一，其四个主要过程，即生物固氮作用、氨化作用、硝化作用、反硝化作用，均由微生物所驱动。近 10 年来，随着免培养的分子生态学技术和高通量测序技术等的发展，在硝化微生物多样性及其作用机理、厌氧氨氧化过程和机理等研究方面取得了突破性进展。本文重点阐述了我国有关土壤硝化微生物方面的研究进展，在此基础上，简要介绍了反硝化微生物和厌氧氨氧化及硝酸盐异化还原成铵作用的研究进展，并对今后的研究工作提出了展望。今后土壤氮素转化微生物生态学的研究，应瞄准国际微生物生态学发展的前沿，加强新技术新方法的应用，结合我国农业可持续发展、资源环境保护和全球变化研究的重大需求，重点开展以下几方面的工作：(1) 开展大尺度上土壤硝化作用及氨氧化微生物分布的时空演变特征及驱动因子的研究；(2) 加强氮素转化关键微生物过程与机理的研究，并与相关过程的通量(如氨挥发、 $N_2O$  释放)和反应速率(如矿化速率、硝化速率)关联起来；(3) 在特定生态系统中系统研究各个氮转化过程的耦合关系，构建相关氮素转化和氮素平衡模型，为定向调控土壤氮素转化过程，提高氮素利用效率并减少其负面效应提供科学依据。

**关键词:** 氮循环，氨氧化微生物，硝化/反硝化作用，厌氧氨氧化作用，硝酸盐异化还原成铵作用，土壤生态系统

基金项目：国家自然科学基金项目(No. 41020114001, 41090281, 41025004)

\*通讯作者：Tel: 86-10-62849788; 信箱: jzhe@rcees.ac.cn

收稿日期：2012-11-12; 接受日期：2012-12-05

# Key processes and microbial mechanisms of soil nitrogen transformation

HE Ji-Zheng\* ZHANG Li-Mei

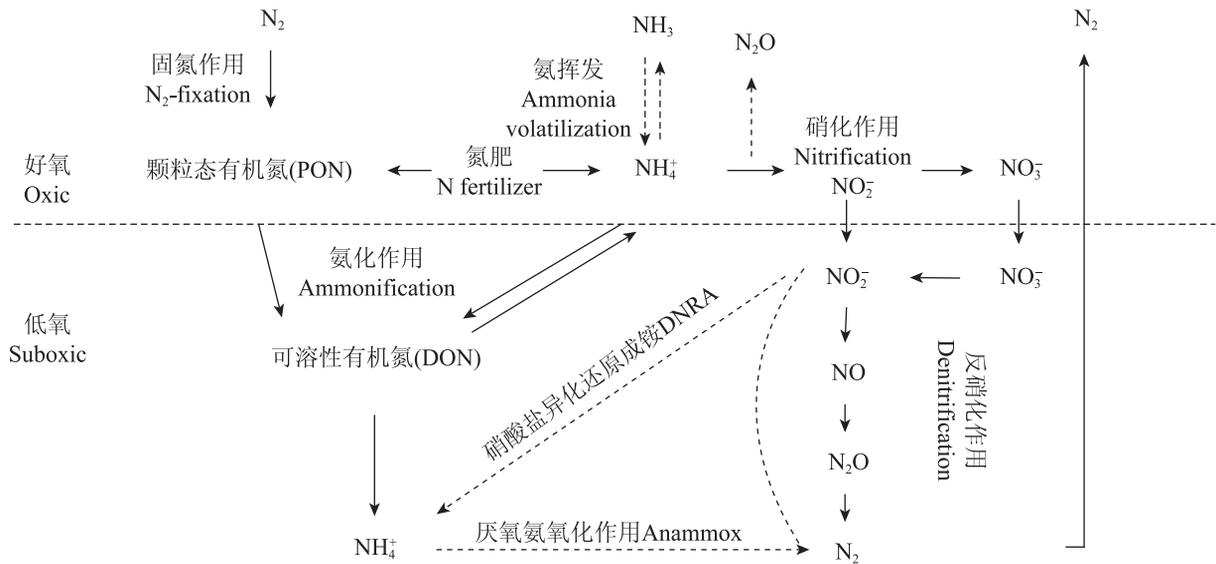
(State Key Laboratory of Urban and Regional Ecology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

**Abstract:** Microorganisms are the engines driving the biogeochemical cycles of soil elements. The nitrogen cycle is one of the central processes of terrestrial ecosystems, and contains four main steps, i.e. nitrogen fixation, ammonification, nitrification, denitrification, all of which are driven by microorganisms. In the last decade, with the rapid development of culture-independent molecular techniques and high-throughput sequencing technologies, breakthrough progress has been made on the diversity and mechanisms of nitrifying microorganisms, and anaerobic ammonia oxidation (anammox) process and mechanisms. Here we review the available knowledge concerning the research progress in ammonia oxidation studies in China, and briefly introduce the researches on denitrifying microorganisms, anammox, and dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA), and then present the future perspectives on this research field. Novel techniques and methods will be applied to the future microbial ecology studies of soil nitrogen transformation. It needs to hold the frontiers of microbial ecology, in combination with significant demands for China's sustainable agriculture, resources and environment protection, and global change research, primarily focusing on the following several areas: (1) to carry on investigations on the large-scale biogeographical patterns of soil nitrification processes and nitrifying microorganisms, and to elucidate the underlying mechanisms of spatial-temporal variations and their driving factors. (2) To explore the key microbe-mediated processes and mechanisms of nitrogen transformation, and link them to the relevant observations on gas flux (e.g. ammonia volatilization, N<sub>2</sub>O emissions) and reaction rates (e.g. the rates of mineralization and nitrification). (3) To elucidate the coupling between different nitrogen transformation processes in certain ecosystems, and to estimate the nitrogen balance and build models to predict nitrogen transformation and balance. These studies are expected to provide scientific basis for adjustment of nitrogen transformation processes, improvement of nitrogen utilization efficiency and elimination of its negative effects.

**Keywords:** N cycle, Ammonia oxidisers, Nitrification/Denitrification, Anammox, DNRA, Soil ecosystem

微生物是驱动土壤元素生物地球化学循环的引擎。氮循环是土壤生态系统元素循环的核心之一,其四个主要过程,即生物固氮作用、氨化作

用、硝化作用、反硝化作用,均由微生物所驱动(图1)。其中,硝化作用是连接固氮作用与反硝化作用的中间环节,不仅决定着植物对氮素的有效

图 1 微生物参与的氮循环过程示意图<sup>[5]</sup>Fig. 1 Schematic processes of microbial nitrogen cycle in soil ecosystems<sup>[5]</sup>

利用程度, 并与过量氮肥投入导致的土壤酸化、硝酸盐淋失及其引起的水体污染和温室气体氧化亚氮( $N_2O$ )释放等一系列生态环境问题直接相关, 构成氮循环的中心环节。硝化作用分两个阶段完成, 即氨态氮氧化为亚硝态氮的氨氧化过程(Ammonia oxidation)和亚硝态氮氧化为硝态氮的亚硝酸盐氧化过程(Nitrite oxidation)。氨氧化作用, 也称亚硝化作用, 是硝化作用的第一个反应步骤, 也是限速步骤, 是全球氮循环的中心环节<sup>[1]</sup>。

一百多年来, 人们一直认为土壤生态系统中的氨氧化作用主要是由变形菌纲中的一些化能自养细菌——氨氧化细菌(Ammonia-oxidizing bacteria, AOB)催化完成的, 直到 2004 年宏基因组学研究发现海洋古菌基因组中含有类似细菌编码氨单加氧酶的结构基因 *amoA*、*amoB* 和 *amoC*<sup>[2]</sup>, 2005 年从西雅图水族馆海水中分离培养到第一株氨氧化古菌(Ammonia-oxidizing archaea, AOA)<sup>[3]</sup>, 根本改变了学术界对氨氧化微生物的传统认识。Leininger 等<sup>[4]</sup>2006 年在“Nature”杂志

上报道土壤中氨氧化古菌的数量(以 *amoA* 基因拷贝数计量, 下同)最多是氨氧化细菌的 3 000 倍, 随后大量的研究发现氨氧化古菌广泛分布于包括海洋、湖泊和土壤等在内的多种环境中, 而且其数量通常远远高于氨氧化细菌<sup>[5-6]</sup>, 氨氧化古菌和细菌在硝化作用中的重要性 and 相对贡献也因此成为国际上近年来研究的热点问题。我国土壤资源丰富, 环境条件多样, 自 20 世纪 80 年代以来, 由于农业氮肥大量投入引起的环境问题日显突出, 对硝化作用的研究一直深受重视。近 10 年来, 随着免培养的分子生态学技术包括变性梯度凝胶电泳(DGGE)、末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)、克隆测序及实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)等技术的发展及在我国的普及应用, 在硝化微生物多样性及其作用机理研究方面也取得了重要进展, 本文将在对我国氨氧化微生物研究方面取得的主要进展进行阐述的基础上, 简要介绍反硝化微生物和厌氧氨氧化及硝酸盐异化还原成铵作用的研究进展, 并对今后的研究工作提出展望。

## 1 我国典型土壤中氨氧化微生物的多样性及分布特征

运用克隆测序、变性梯度凝胶电泳、实时荧光定量 PCR 等分子生态学技术, 结合土壤学、土壤生物化学等分析方法, 国内研究者对我国不同典型农业土壤包括酸性红壤、碱性潮土、高氮牧草地土壤和水稻土中 AOA 和 AOB 的多样性特征及其与土壤环境因子的相互关系进行了系统研究。对湖南祁阳旱地肥力及肥料效应长期定位试验点红壤(pH 3.7–5.8)的研究结果显示, 长期施用化学氮肥显著降低土壤 pH 值, 在 8 个长期不同施肥处理中, AOA 的数量均显著高于 AOB。不同施肥对土壤中总细菌数量(以 16S rRNA 基因拷贝数计量, 下同)影响不大, 但对 AOA 和 AOB 的数量有显著影响, 其中, AOA 和 AOB 的数量在施用氮磷钾肥加有机质(NPK+OM)的处理中最高, 在偏施化学氮肥的所有处理(施氮肥 N、施氮钾肥 NK、施氮磷肥 NP)中最低。在不同施肥处理间, 氨氧化细菌的群落组成没有显著差异, 但氨氧化古菌群落组成差异明显<sup>[7]</sup>。这表明氨氧化古菌的丰度和群落组成对长期施肥处理及其引起的土壤性质变化的响应比氨氧化细菌更明显。而且, 氨氧化细菌和古菌的丰度都与土壤的硝化潜势之间存在极显著的正相关关系, 预示着这些酸性土壤中氨氧化细菌和氨氧化古菌可能都对土壤硝化作用有贡献。而对河南封丘长期定位试验站碱性潮土(pH 8.3–8.7)的研究结果却表明, 尽管不同施肥处理下土壤氨氧化古菌的数量均显著高于氨氧化细菌, 但不同施肥处理引起氨氧化细菌群落结构发生变化, 而对氨氧化古菌的群落组成没有明显影响, 且只有氨氧化细菌丰度与土壤硝化潜势之间存在显著正相关关系, 表明这些碱性潮土中主要是氨氧化细菌对土壤硝化作用有贡献<sup>[8]</sup>。

植稻土壤中氨氧化古菌和氨氧化细菌的数量明显高于不种植水稻的土壤, 其微生物组成也具有明显差异, 表明氨氧化古菌是水稻土根际的优势氨氧化微生物, 且前者可能比后者更易受水稻土氧气浓度的影响<sup>[9]</sup>。这 3 个研究是国内较早开展的有关氨氧化古菌的研究, 不仅证实了 Leininger 等有关氨氧化古菌在土壤中大量存在的结果, 并首次揭示了氨氧化古菌和氨氧化细菌对酸性和碱性土壤环境条件变化的响应完全不同, 为进一步认识这两类微生物的生理生态特性及功能活性提供了重要线索。

随后开展的一系列研究结果显示, 在局域范围上, 不同土地利用和管理方式<sup>[10–11]</sup>, 氮肥添加<sup>[12–14]</sup>, 高山土壤中海拔高度<sup>[15]</sup>等都会影响氨氧化细菌和古菌的组成多样性及数量。通过对以上多个研究结果数据的汇总分析, 我们总结了我国典型土壤中这两类微生物的分布特征<sup>[16]</sup>, 发现在区域尺度上, AOA 和 AOB 的数量与土壤有机质含量呈显著正相关关系, 与土壤 pH、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  含量均无明显相关关系; 酸性土壤中氨氧化细菌的优势菌群为亚硝化螺菌(*Nitrosospira*) Cluster10、11 和 12, 中性及碱性土壤中主要为亚硝化螺菌 Cluster3a.1, 3a.2 和亚硝化单胞菌(*Nitrosomonas*) Cluster 6 和 7。氨氧化古菌主要由 Group1.1a associated 和 Group1.1b 两大类组成, 其中 Group1.1a associated 主要分布于酸性土壤, 其相对丰度随土壤 pH 升高而降低, 二者之间具有明显的负相关关系; Group1.1b 则主要分布于中性及碱性土壤, 与土壤 pH 有一定正相关关系, 表明 pH 是影响氨氧化古菌和细菌组成分布的主要驱动因子之一(图 2)。这些结果与国际上同期发表的许多重要研究结果相互印证, 为认识氨氧化微生物的全球分布模式及其关键驱动因子提供了重要补充。

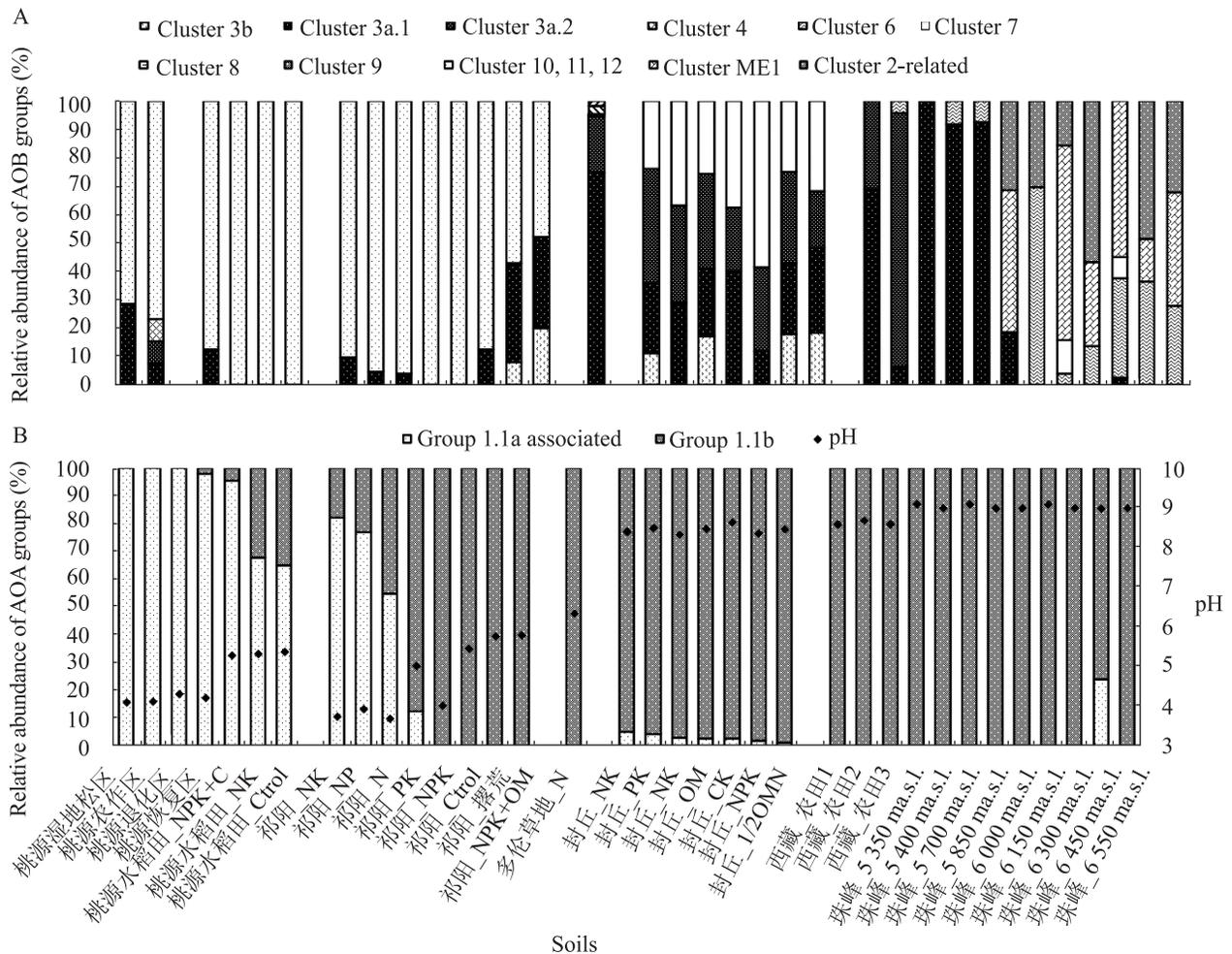


图 2 不同土壤中氨氧化细菌(A)和氨氧化古菌(B)类群的相对丰度

Fig. 2 Relative abundance of the bacterial (A) and archaeal (B) ammonia-oxidizer group in selected Chinese soils

## 2 不同土壤中氨氧化细菌和古菌的生理生态特征及功能活性

虽然以上国内及同时期国际上开展的大量研究均发现, 不同环境中都能检测到高丰度的AOA, 但对于AOA对土壤硝化作用的贡献存在较大争议, 成为国际上争论的焦点问题之一。从以上对两类氨氧化微生物的分子生态学调查结果可以看出, 不同土壤中AOA和AOB对环境条件变化的响应明显不同, 如在湖南祁阳酸性红壤中, 尽管AOA和AOB的数量均与土壤硝化潜势(PNR)呈明显正相关关系, 但仅AOA的群落组成

对长期施肥处理及其引起的土壤性质变化产生了明显响应<sup>[7]</sup>。类似地, 国际上其他一些研究发现, 在一些酸性热泉(pH 2.5–7.0)和酸性土壤(pH 4.5–6.9)中, 存在大量的AOA但却检测不到AOB<sup>[17–18]</sup>, 说明AOA可能比AOB更耐受酸性的环境。Nicol等<sup>[19]</sup>也发现在不同pH梯度(4.9–7.5)下, AOA的数量和*amoA*基因的表达活性随土壤pH增加明显降低, 其群落组成也对pH变化产生明显的响应, 这些结果暗示AOA和AOB在不同土壤环境中所起的作用可能不同, 酸性土壤中氨氧化古菌可能更为活跃。Ying等<sup>[10]</sup>和Yao等<sup>[11]</sup>对我国南方酸性土壤中氨氧化细菌和古菌群落

组成调查的研究结果也支持这一猜测,发现这些土壤的硝化潜势仅与 AOA 的数量有正相关关系,与 AOB 无关,且发现茶园土壤中 AOA 与 AOB 的比值随土壤 pH 降低而增加,一些 AOA 类群仅出现在强酸性的土壤中。应用基于 DNA 分析的稳定性同位素探测技术(DNA-SIP),我们进一步证实了氨氧化古菌是酸性土壤中起主导作用的微生物类群<sup>[20]</sup>。利用氨氧化微生物氧化氨的同时利用 CO<sub>2</sub> 为碳源进行自养生长这一原理,以 <sup>13</sup>C 标记的 CO<sub>2</sub> 为基质对土壤(pH 3.7)进行培养后,提取土壤微生物 DNA 并进行密度梯度离心,获得了 <sup>13</sup>C 标记的微生物基因组 DNA,并对其中的氨氧化微生物进行鉴定,发现氨氧化古菌同化 <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> 生长,且其 *amoA* 基因丰度的变化与活跃的氨氧化速率呈显著正相关关系,而在氨氧化细菌中未观察到此现象,表明是氨氧化古菌而不是氨氧化细菌主导了这些土壤中的硝化作用。添加硝化抑制剂双氰胺(Dicyandiamide, DCD)明显抑制氨氧化古菌的生长和土壤硝化活性,这些结果有力地证实了氨氧化古菌在酸性土壤硝化过程中的主导作用<sup>[20]</sup>。

与此相反,在中性及碱性土壤中,施肥尤其是高量氮肥的投入,明显改变氨氧化细菌的群落组成并增加其数量,但对氨氧化古菌没有明显影响<sup>[8,13]</sup>,暗示这些土壤中,氨氧化细菌可能更活跃。类似地,Di 等<sup>[21]</sup>也发现在新西兰高氮草地土壤中施氮增加 AOB 的数量和土壤硝化活性,硝化抑制剂 DCD 能明显抑制这种增加,但对 AOA 无明显影响。利用 SIP 技术, Xia 等<sup>[22]</sup>研究发现在封丘碱性潮土中,只观察到氨氧化细菌而不是氨氧化古菌参与了 <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> 固定和氨氧化过程,是该土壤硝化作用的主要驱动者。这些研究结果与酸性土壤中氨氧化古菌占主导地位的研究结果相互补充,支持了有关两类氨氧化微生物具有明显的生态位分化特征的猜测<sup>[23]</sup>,即在高氮投入的

pH 中性和碱性的环境中, AOB 是硝化作用的主要驱动者,而 AOA 主要在较苛刻的环境包括低氮、强酸性和高温的环境中发挥功能活性。近来从英国苏格兰酸性土壤中成功富集培养到的一株嗜酸氨氧化古菌 *Nitrosotalea devanatterra* (阿伯特土壤亚硝化细杆菌),其适宜的生长 pH 为 4.0–5.0,当 pH>5.5 时生长受抑制<sup>[24]</sup>,更进一步证实了以上观点。氨氧化古菌在这些酸性环境中发挥功能作用的可能机理包括<sup>[25]</sup>: (1) AOA 对 NH<sub>3</sub> 分子具有更高的亲和力<sup>[26]</sup>,因此 AOA 更适应于在低浓度 NH<sub>3</sub> 的环境中生长。酸性土壤由于较低的 pH,其中的氨多为离子态 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>存在, NH<sub>3</sub> 底物浓度较低, AOA 对 NH<sub>3</sub> 分子的高亲和力使得其更能适应酸性土壤。(2) 多数研究表明 AOA 的生长更易受有机氮而非无机氮的刺激,并主要利用土壤中有机质持续矿化所释放的低浓度 NH<sub>3</sub> 进行自养生长。因此, AOA 可能与土壤中的矿化微生物紧密结合,从而更容易获得持续的底物供给。此外, AOA 也可能进行混合营养型生长,直接利用有机碳源<sup>[27]</sup>,使得 AOA 比 AOB 更具竞争优势。(3) 与 AOB 相比, AOA 具有独特的生理生化 and 遗传特征,对几株纯培养氨氧化古菌的基因组学分析表明, AOA 的氨氧化途径可能与 AOB 显著不同,并且 AOA 的氨氧化过程和碳固定过程减少了能量的消耗,有助于其在这些不利环境下发挥作用<sup>[28]</sup>。

### 3 反硝化微生物

与硝化作用相对,反硝化作用在嫌气或低氧土壤系统中普遍存在和发生。在多种微生物的参与下,硝酸盐通过四步还原反应,在硝酸盐还原酶(Nar)、亚硝酸盐还原酶(Nir)、一氧化氮还原酶(Nor)以及一氧化二氮还原酶(Nos)的作用下,最终被还原成氮气,并在中间过程释放强效应的温室气体 N<sub>2</sub>O。传统理论上认为反硝化作用只发生

于严格厌氧的环境,但 20 世纪 80 年代发现了许多微生物具有周质型硝酸盐还原酶(Nap), Nap 位于细胞周质内,对氧分子不敏感,使得反硝化作用也能在好氧条件下发生。因此影响反硝化作用的主要因子不是氧,而是有机质和硝酸盐含量。通过为反硝化作用提供底物,硝化-反硝化作用通常耦合发生,二者作用构成土壤氮肥损失的最主要途径(可达投入氮肥量的 40%)<sup>[29-30]</sup>,其代谢中间产物  $N_2O$  是仅次于  $CO_2$  和  $CH_4$  的重要温室气体,农业源的  $N_2O$  释放可占人为  $N_2O$  总排放量的 70% 以上,且主要是微生物作用的产物。反硝化作用一直受到广泛的关注。基于通量观测和反硝化活性测定,国内外对于影响反硝化作用的物理化学因素、不同土壤系统中反硝化作用发生的强度及其对  $N_2O$  气体排放的贡献等已有大量研究<sup>[31-32]</sup>。但由于反硝化过程复杂,参与反硝化作用的微生物种类繁多,已发现有 80 多个属的细菌和部分古菌、真菌和放线菌都可能参与反硝化作用的全部或部分反应步骤,多数微生物可能同时含有一种或多种功能基因,使得对反硝化微生物的研究较为困难。近年通过免培养的分子生态学技术,对不同环境条件下参与反硝化过程的关键功能基因如 *narG*、*napA*、*nirK*、*nirS*、*norB*、*NosZ* 的多样性变化及其影响因子等也开展了一些研究<sup>[33-35]</sup>。但常规的分子生态学研究难以识别哪些功能基因真正与土壤原位反硝化活性有关,反应过程复杂,也难以利用 SIP 技术对反硝化微生物进行标记,因此对反硝化微生物的功能及活性研究相对落后,相关研究亟待加强。

#### 4 厌氧氨氧化及硝酸盐异化还原成铵作用

厌氧氨氧化(Anaerobic ammonium oxidation, Anammox)是细菌在厌氧条件下以亚硝酸盐为电子受体将氨氧化为氮气的过程,即

$NH_4^+ + NO_2^- = N_2 + 2H_2O$ , 主要由浮霉菌目(Planctomycetales)的细菌所催化完成,目前已知的厌氧氨氧化细菌有 5 个属: *Candidatus "Brocadia"*, *"Kuenenia"*, *"Scalindula"*, *"Jettenia"*, *"Anammoxoglobus"*, 均属于浮霉菌目。厌氧氨氧化作用最早于 1995 年发现于废水生物反应器中,后来发现该反应是一些海域氮素损失的主要途径,如在黑海和 Golfo Dulce 海的低氧水柱区通过厌氧氨氧化作用损失的氮达到 20%-40%,甚至可能更多<sup>[36-37]</sup>。近年来通过综合利用  $^{15}N$  示踪技术,对生物标志物 LADDERANE 脂质的分析、荧光原位杂交(FISH)及 16S rRNA 基因分析等方法,证实了厌氧氨氧化细菌在水环境如海洋、沉积物、红树林,淡水湖等中广泛分布,在这些环境的氮循环中起着重要作用。厌氧氨氧化过程的发现与氨氧化古菌的发现一起,被认为是近百年来氮循环研究中两个最重要的突破。但目前对土壤厌氧氨氧化作用的研究报道非常少,虽然有研究报道在我国一些高氮输入的水稻土中检测到厌氧氨氧化细菌及高活性的厌氧氨氧化作用<sup>[38]</sup>,但有关土壤中厌氧氨氧化过程发生的普遍性及强度还不清楚。

在厌氧条件下,硝酸盐也可在微生物作用下异化还原成铵(Dissimilatory nitrate reduction to ammonium, DNRA),也称为发酵型异化还原,许多微生物包括专性厌氧细菌、兼性厌氧细菌、好氧细菌和真菌等都能进行 DNRA。同样是以硝酸盐为底物将其还原的过程,但 DNRA 反应将  $NO_3^-$  还原至  $NH_4^+$  所需的自由能比反硝化作用将  $NO_3^-$  还原为  $N_2O$  和  $N_2$  的自由能高,多数情况下反硝化作用更容易发生<sup>[39]</sup>,加上常规分析方法难以鉴别 DNRA 的产物和活性,所以 DNRA 曾一度被忽视。与硝化和反硝化作用导致的氮损失相反, DNRA 将  $NO_3^-$  还原为可供植物利用的  $NH_4^+$ ,有利于氮素在土壤中的蓄持。在  $NO_3^-$  浓度极低和

更强的还原势下, 即高  $C:NO_3^-$  比条件下, DNRA 比反硝化作用更容易发生<sup>[39-40]</sup>。此外, 还发现一些厌氧氨氧化细菌如 *K. stuttgartiensis* 也能进行 DNRA 作用, DNRA 能够为厌氧氨氧化提供  $NH_4^+$ , 使  $NH_4^+$  最终转变为  $N_2$  而损失, DNRA 与厌氧氨氧化过程耦合作用导致的氮损失甚至更多<sup>[41]</sup>。因此, DNRA 在氮循环中的作用不可忽视。目前大多数传统的同位素示踪实验难以从反硝化作用中区分出 DNRA-Anammox 耦合反应, 需要结合利用更多更复杂的示踪方法和发展新的标靶基因评估其在生态和环境中的重要性。

## 5 展望

综上所述, 在过去几年间, 从宏基因组学分析发现自然环境中存在古菌氨单加氧酶基因, 到氨氧化古菌的成功培养, 并与免培养的分子生态学技术及同位素原位标记分析方法等的研究结果相互补充、印证, 共同揭示了参与硝化作用过程的关键微生物的多样性、生理生态特征、功能活性及作用机理, 极大地丰富了我们对于氮素循环过程和机理的认识, 并充分展示了微生物在地球化学元素转化中的重要驱动作用。面向未来的土壤微生物与氮素循环研究, 应以新技术新方法为手段, 瞄准国际微生物生态学发展的前沿和热点, 结合我国农业可持续发展、资源环境保护和全球变化研究的重大需求, 重点开展以下几方面的研究。

(1) 大尺度上土壤的硝化作用及其中氨氧化微生物分布的时空演变特征及驱动因子研究。大量分子生态学调查及微宇宙模拟研究已揭示了氨氧化细菌和氨氧化古菌的生态位分化特征及其在不同环境条件下的功能活性差异, 但这些研究多是零散地在某些特定位点上开展的。由于土壤生态系统的复杂性以及不同人为干扰程度导致土壤氮输入的差异, 难以在大尺度范围上对其

中的硝化作用及其微生物学过程进行预测。此外, 氨氧化古菌所代表的一类中温古菌因数量巨大, 种类丰富, 但系统发育、遗传和生理生态特征明显有别于广古菌门(Euryarchaeota)和泉古菌门(Crenarchaeota), 被作为古菌域的第三个主要类群, 单独划分为一个新的门—Thaumarchaeota(奇古菌门)<sup>[42-43]</sup>, 目前还不确定是否所有奇古菌均具有氨氧化能力。在一些土壤(如高氮的中性和碱性土壤)中检测到相当高数量的氨氧化古菌 *amoA* 基因, 而硝化作用主要由氨氧化细菌主导, 对于这类含 *amoA* 基因的氨氧化古菌在环境中大量存在和分布具有什么样的生理功能或生态学意义尚不清楚。因此, 除进一步加强氨氧化古菌的分离培养研究外, 利用各种免培养的方法, 包括新一代高通量测序, 并结合利用各种原位分析手段(SIP 和二次离子质谱技术)和其他地球化学研究方法, 在大尺度范围上对土壤硝化作用及其中氨氧化微生物的多样性、活性的时空演变特征开展系统性研究, 进一步认识两类微生物的生态生理学特征及其在功能活性上的分异规律和驱动因子, 评估不同氨氧化微生物类群在硝化过程中的作用和其他可能的生态功能, 进而全面认识土壤硝化作用过程及其微生物学机理, 是目前和将来一段时间内的研究重点。

(2) 加强氮素转化关键微生物过程与机理的研究, 并与相关观测及通量(如氨挥发、 $N_2O$  释放、硝酸根流失等)和反应速率(如矿化速率、硝化速率、反硝化速率、酸化速率等)研究相结合, 为氮素的有效管理及调控提供依据。除反硝化作用过程中释放的  $N_2O$  外, 近来越来越多的证据表明硝化作用可能是  $N_2O$  排放的主要源头<sup>[44-45]</sup>。硝化作用中  $N_2O$  的产生可能有两种不同的机制, 一是氨氧化微生物氧化  $NH_3$  至  $NH_2OH$  的过程中,  $N_2O$  作为副产物释放; 另一个途径是在氨氧化细菌的作用下  $NO_2^-$  被还原为  $N_2O$ , 这个过程被称为

硝化微生物的反硝化作用(Nitrifier denitrification), 主要在低氧条件下发生。硝化作用中  $N_2O$  的产生可能是  $N_2O$  产生的最主要机制, 早已在氨氧化细菌中得到证实。通过同位素双标记技术解析  $^{15}N$  异构体在  $N_2O$  分子内的分配情况, Santoro 等<sup>[46]</sup>最近也发现氨氧化古菌是海洋环境  $N_2O$  排放的主要贡献者, 但对于土壤中该途径对  $N_2O$  排放的贡献以及特征如何还不清楚。此外, 一些新发现或被长期忽视的氮转化过程如厌氧氨氧化作用(Anammox)和硝酸盐异化还原成铵(DNRA)过程在土壤, 尤其是淹水的水稻土中发生的普遍性及对氮素损失的贡献如何也不清楚, 相关的研究非常少, 迫切需要加强。对这些关键反应过程和机理的认识是制订有效氮素管理措施和发展调控方法的重要前提。

(3) 各个氮转化过程之间的关联研究。就整个氮循环过程而言, 硝化作用作为连接生物固氮、有机质矿化和反硝化作用的中间桥梁, 通过与不同氮转化过程的耦联作用, 共同决定着土壤生态系统中氮的平衡和归趋。而目前的研究多只针对某一过程独立开展, 同一体系中固氮、硝化、反硝化、厌氧氨氧化和硝酸盐异化还原成铵等过程如何交替发生以及如何影响参与这些过程转化的微生物的多样性及代谢活性, 尚不清楚。在特定生态系统(如一个土壤长期定位试验站或小流域系统)中系统研究各个氮转化过程的耦合关系, 以及这种耦合关系之下的微生物多样性与其生态功能和代谢活性的结合, 关联微生物过程与各形态氮素通量, 构建相关氮素转化和氮素平衡模型, 将成为氮素转化过程及其调控的突破口, 为最终调节氮素转化过程, 提高农业氮素利用率并降低其生态环境负效应提供科学依据。

## 参 考 文 献

[1] Prosser J. Autotrophic Nitrification in Bacteria[J].

- Advances in Microbial Physiology, 1990, 30: 125.
- [2] Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, et al. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea[J]. Science, 2004, 304(5667): 66-74.
- [3] Könneke M, Bernhard AE, de la Torre JR, et al. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon[J]. Nature, 2005, 437(7058): 543-546.
- [4] Leininger S, Urich T, Schloter M, et al. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils[J]. Nature, 2006, 442(7104): 806-809.
- [5] 贺纪正, 张丽梅. 氨氧化微生物生态学与氮循环研究进展[J]. 生态学报, 2009, 29(1): 406-415.
- [6] 沈菊培, 张丽梅, 贺纪正. 几种农田土壤中古菌、泉古菌和细菌的数量分布特征[J]. 应用生态学报, 2011, 22(11): 2996-3002.
- [7] He JZ, Shen JP, Zhang LM, et al. Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(9): 2364-2374.
- [8] Shen JP, Zhang LM, Zhu YG, et al. Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam[J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(6): 1601-1611.
- [9] Chen XP, Zhu YG, Xia Y, et al. Ammonia-oxidizing archaea: important players in paddy rhizosphere soil?[J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(8): 1978-1987.
- [10] Ying JY, Zhang LM, He JZ. Putative ammonia-oxidizing bacteria and archaea in an acidic red soil with different land utilization patterns[J]. Environmental Microbiology Reports, 2010, 2(2): 304-312.
- [11] Yao H, Gao Y, Nicol GW, et al. Links between ammonia oxidizer community structure, abundance, and nitrification potential in acidic soils[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(13): 4618-4625.
- [12] Wang YN, Ke XB, Wu LQ, et al. Community composition of ammonia-oxidizing bacteria and

- archaea in rice field soil as affected by nitrogen fertilization[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2009, 32(1): 27–36.
- [13] Shen XY, Zhang LM, Shen JP, et al. Nitrogen loading levels affect abundance and composition of soil ammonia oxidizing prokaryotes in semiarid temperate grassland[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2011, 11(7): 1243–1252.
- [14] Wu YC, Lu L, Wang BZ, et al. Long-term field fertilization significantly alters community structure of ammonia-oxidizing bacteria rather than archaea in a paddy soil[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2011, 75(4): 1431–1439.
- [15] Zhang LM, Wang M, Prosser JI, et al. Altitude ammonia-oxidizing bacteria and archaea in soils of Mount Everest[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, 70(2): 208–217.
- [16] Shen JP, Zhang LM, Di HJ, et al. A review of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in Chinese soils[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 296, doi: 10.3389/fmicb.2012.00296.
- [17] Hansel CM, Fendorf S, Jardine PM, et al. Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(5): 1620–1633.
- [18] Reigstad LJ, Richter A, Daims H, et al. Nitrification in terrestrial hot springs of Iceland and Kamchatka[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 64(2): 167–174.
- [19] Nicol GW, Leininger S, Schleper C, et al. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11): 2966–2978.
- [20] Zhang LM, Hu HW, Shen JP, et al. Ammonia-oxidizing archaea have more important role than ammonia-oxidizing bacteria in ammonia oxidation of strongly acidic soils[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(5): 1032–1045.
- [21] Di HJ, Cameron K, Shen JP, et al. Nitrification driven by bacteria and not archaea in nitrogen-rich grassland soils[J]. *Nature Geoscience*, 2009, 2(9): 621–624.
- [22] Xia WW, Zhang CX, Zeng XW, et al. Autotrophic growth of nitrifying community in an agricultural soil[J]. *The ISME Journal*, 2011, 5(7): 1226–1236.
- [23] Schleper C. Ammonia oxidation: different niches for bacteria and archaea?[J]. *The ISME Journal*, 2010, 4(9): 1092–1094.
- [24] Lehtovirta-Morley LE, Stoecker K, Vilcinskas A, et al. Cultivation of an obligate acidophilic ammonia oxidizer from a nitrifying acid soil[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(38): 15892–15897.
- [25] He JZ, Hu HW, Zhang LM. Current insights into the autotrophic thaumarchaeal ammonia oxidation in acidic soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2012, 55: 146–154.
- [26] Martens-Habbena W, Berube PM, Urakawa H, et al. Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria[J]. *Nature*, 2009, 461(7266): 976–979.
- [27] Ingalls AE, Shah SR, Hansman RL, et al. Quantifying archaeal community autotrophy in the mesopelagic ocean using natural radiocarbon[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(17): 6442–6447.
- [28] Walker CB, De La Torre JR, Klotz MG, et al. *Nitrosopumilus maritimus* genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107(19): 8818–8823.
- [29] Buresh RJ, de Datta SK, Samson MI, et al. Dinitrogen and nitrous oxide flux from urea basally applied to puddled rice soils[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1991, 55(1): 268–273.
- [30] Galbally IE, Freney JR, Muirhead WA, et al. Emission of nitrogen-oxides (NO<sub>x</sub>) from a flooded soil fertilized with urea: relation to other nitrogen loss processes[J]. *Journal of Atmospheric Chemistry*, 1987, 5(3): 343–365.
- [31] 张玉树, 丁洪, 秦胜金. 农业生态系统中氮素反硝化作用与 N<sub>2</sub>O 排放研究进展[J]. *中国农学通报*, 2010, 26(6): 253–259.
- [32] 孙志强, 郝庆菊, 江长胜, 等. 农田土壤 N<sub>2</sub>O 的

- 产生机制及其影响因素研究进展[J]. 土壤通报, 2010, 41(6): 1524–1530.
- [33] Chen Z, Luo XQ, Hu RG, et al. Impact of long-term fertilization on the composition of denitrifier communities based on nitrite reductase analyses in a paddy soil[J]. *Microbial Ecology*, 2010, 60(4): 850–861.
- [34] Ju XT, Lu X, Gao ZL, et al. Processes and factors controlling  $N_2O$  production in an intensively managed low carbon calcareous soil under sub-humid monsoon conditions[J]. *Environmental Pollution*, 2011, 159(4): 1007–1016.
- [35] Bao QL, Ju XT, Gao B, et al. Response of nitrous oxide and corresponding bacteria to managements in an agricultural soil[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2012, 76(1): 130–141.
- [36] Dalsgaard T, Canfield DE, Petersen J, et al.  $N_2$  production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica[J]. *Nature*, 2003, 422(6932): 606–608.
- [37] Kuypers MMM, Sliemers AO, Lavik G, et al. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea[J]. *Nature*, 2003, 422(6932): 608–611.
- [38] Zhu GB, Wang SY, Wang Y, et al. Anaerobic ammonia oxidation in a fertilized paddy soil[J]. *The ISME Journal*, 2011, 5(12): 1905–1912.
- [39] Tiedje JM, Sexton AJ, Myrold DD, et al. Denitrification: ecological niches, competition and survival[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1982, 48(6): 569–583.
- [40] Rütting T, Boeckx P, Müller C, et al. Assessment of the importance of dissimilatory nitrate reduction to ammonium for the terrestrial nitrogen cycle[J]. *Biogeosciences*, 2011, 8(7): 1779–1791.
- [41] Kartal B, Kuypers MMM, Lavik G, et al. Anammox bacteria disguised as denitrifiers: nitrate reduction to dinitrogen gas via nitrite and ammonium[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(3): 635–642.
- [42] Brochier-Armanet C, Boussau B, Gribaldo S, et al. Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(3): 245–252.
- [43] 张丽梅, 贺纪正. 一个新的古菌类群——奇古菌门(Thaumarchaeota)[J]. *微生物学报*, 2012, 52(4): 411–421.
- [44] Opdyke MR, Ostrom NE, Ostrom PH. Evidence for the predominance of denitrification as a source of  $N_2O$  in temperate agricultural soils based on isotopologue measurements[J]. *Global Biogeochemical Cycles*, 2009, 23: GB4018, doi: 10.1029/2009GB003523.
- [45] Kool DM, Dolfing J, Wrage N, et al. Nitrifier denitrification as a distinct and significant source of nitrous oxide from soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2011, 43(1): 174–178.
- [46] Santoro AE, Buchwald C, McIlvin MR, et al. Isotopic signature of  $N_2O$  produced by marine ammonia-oxidizing archaea[J]. *Science*, 2011, 333(6047): 1282–1285.