

# 区分土壤中硝化与反硝化对N<sub>2</sub>O产生贡献的方法

黄树辉, 吕军

(浙江大学环境与资源学院, 杭州 310029)

**摘要:** 土壤是产生N<sub>2</sub>O的最主要来源之一。硝化和反硝化反应是产生N<sub>2</sub>O的主要机理, 由于硝化和反硝化微生物同时存在于土壤中, 因而硝化和反硝化作用能同时产生N<sub>2</sub>O。N<sub>2</sub>O的来源可通过使用选择性抑制剂, 杀菌剂以及加入的标记底物确定。通过对生成N<sub>2</sub>O反应的每一步分析, 主要从抑制反应发生的催化酶和细菌着手, 总结了测量区分硝化、反硝化和DNRA反应对N<sub>2</sub>O产生的贡献方法。并对<sup>15</sup>N标记底物法, 乙炔抑制法和环境因子抑制法作了详细介绍。

**关键词:** 土壤; 氧化亚氮; 硝化与反硝化; N<sub>2</sub>O

中图分类号: S153

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2005)ZK-0048-04

## 0 引言

N<sub>2</sub>O是近年来全球变暖备受关注的温室气体之一, 据估计其全球增温潜势值为310(CH<sub>4</sub>为21)<sup>[1]</sup>。此外, N<sub>2</sub>O在大气中具有较长的滞留时间, 并参与大气中许多光化学反应, 破坏平流层的臭氧<sup>[2]</sup>。大气中90%的N<sub>2</sub>O来自地表生物源<sup>[3]</sup>。近年研究表明, 土壤特别是农田土壤和热带地区的土壤, 是全球最主要的N<sub>2</sub>O排放源, 贡献率高达70%<sup>[4]</sup>。大气中N<sub>2</sub>O的浓度正以每年0.2%~0.3%的速度递增<sup>[5]</sup>。农田化肥量的增施, 水田干湿交替的水分管理, 水田干湿交替的水分管理等农田管理方式的改变和环境因子的影响导致了土壤排放的N<sub>2</sub>O日益增多, 由此导致的环境问题以及人们的健康问题也日益突出。人们对影响N<sub>2</sub>O产生的环境因素, 比如土壤湿度、温度、pH、氧气浓度、孔隙度、微生物数量等作了相当多的研究。此外对于影响N<sub>2</sub>O释放的管理方式如氮肥施用类型和氮肥施用量, 施肥技术和时间, 耕作方式, 其他化学肥料的使用, 作物品种, 浇灌, 作物的秸秆和残留物还田等影响也做了一些研究。同时, 还提出了一些控制N<sub>2</sub>O排放的有效措施。但由于N<sub>2</sub>O产生过程的复杂性, 各个过程的难控制性, 以及检测技术的精密性要求和方法的不成熟性, 导致对于N<sub>2</sub>O不同产生过程的贡献定量研究还很少。本文介绍了使用不同抑制剂抑制N<sub>2</sub>O产生的不同过程的方法, 及使用<sup>15</sup>N标记底物等方法, 以期通过使用这些方法能定量研究硝化反硝化反应对N<sub>2</sub>O产生的贡献。

## 1 土壤中产生N<sub>2</sub>O的途径分析

当人们首先研究土壤中产生的N<sub>2</sub>O时, 普遍认为微生物参与的反硝化过程是N<sub>2</sub>O形成的主要机制。随

着对N<sub>2</sub>O生成机理的逐渐了解, 现认为硝化过程、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>异化还原成NH<sub>4</sub><sup>+</sup>过程(DNRA)和化学反硝化过程在某种环境下也能大量产生N<sub>2</sub>O。一些发酵细菌参与DNRA反应过程, 导致N<sub>2</sub>O的生成, 但不产生N<sub>2</sub><sup>[6-8]</sup>。一些发酵细菌能使NO<sub>2</sub><sup>-</sup>还原成N<sub>2</sub>O, 硝酸盐受到限制时支持DNRA, 但是C源受到限制时支持反硝化。图1中详细介绍了产生N<sub>2</sub>O的硝化和反硝化途径及其专一性催化酶<sup>[9]</sup>。

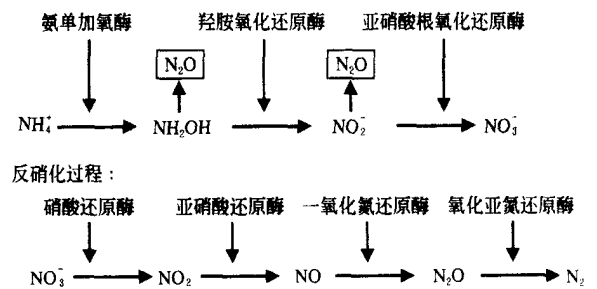


图1 硝化和反硝化反应路径及其酶

Fig 1 Outline of the pathway and enzymes involved in nitrification and denitrification

## 2 N<sub>2</sub>O的生成过程中的抑制剂

### 2.1 硝化抑制

由于硝化反应是在微生物作用下, 由专一性的酶催化反应。因此抑制参与硝化反应的细菌, 以及抑制促使硝化反应发生的每一步专一催化酶都可起到硝化抑制的作用。硝化抑制剂是用来减缓氨态氮至硝态氮的氧化, 以减少NH<sub>3</sub>挥发, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>淋溶或N<sub>2</sub>与N<sub>2</sub>O等N损失的元素或化合物。

#### 2.1.1 硝化反应中细菌的抑制

硝化作用分两步进行, 首先由NH<sub>4</sub><sup>+</sup>氧化成N<sub>2</sub>O, NH<sub>2</sub>OH是中间产物, N<sub>2</sub>O可由这一步产生。参与这一步反应的细菌称为铵氧化细菌, 亚硝化单胞菌属(nitrosomonas)为此类细菌代表。第二步反应是NO<sub>2</sub><sup>-</sup>氧化为NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 亚硝酸氧化细菌参与这一步反应, 硝化杆菌属(nitrobacter)为此类细菌的代表。这两步反应中, 只要有一步反应被抑制, 整个硝化反应就被抑制。许多硝化

收稿日期: 2003-10-13 修订日期: 2004-04-05

基金项目: 973项目(2002CB410807); 国家自然科学基金(40171047)

作者简介: 黄树辉(1977-), 女, 博士生, 主要从事污水治理和氮的迁移转化研究。杭州市凯旋路 浙江大学环境与资源学院资源科学系, 310029。Email: hshuhui@sohu.com

抑制对铵氧化细菌产生毒性, 导致NH<sub>4</sub><sup>+</sup>氧化成NO<sub>2</sub><sup>-</sup>。其中浓度1 Pa的C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>可抑制纯培养硝化细菌欧洲亚硝化单胞菌(*Nitrosomonas europaea*)的活动, 这类硝化抑制还有双氰铵(DCD), 2-氯-6(三氯甲基)吡啶(nitrapyrin), 包被碳化钙等。氰酸盐(cyanate)碘酸盐(iodate)和氯酸盐(chlorate)可抑制硝化杆菌属(*Nitrobacter*)细菌的活动, 即抑制硝化反应过程中的NO<sub>2</sub><sup>-</sup>氧化为NO<sub>3</sub><sup>-</sup>这一步<sup>[10]</sup>。

### 2.1.2 硝化反应中酶的抑制

在图1中详细介绍了催化硝化反应每一步反应的专一酶。由NH<sub>4</sub><sup>+</sup>氧化成NH<sub>2</sub>OH是由氨单加氧酶专一催化。在催化氧化反应过程中, 氨单加氧酶有一个非常广泛的底物范围。这些底物也能抑制酶的NH<sub>3</sub>氧化功能。例如, 著名的抑制剂C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>阻碍一种很强活性的不饱和环氧化物。该环氧化物通过共价捆绑抑制氨单加氧酶。C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>抑制NH<sub>3</sub>氧化物质的浓度是0.1~10 Pa<sup>[11]</sup>。氟甲烷CH<sub>3</sub>F和二甲醚(dimethyl ether)是氨单加氧酶的另外一种抑制剂<sup>[12]</sup>。胼(hydrazine)能抑制羟胺氧化还原酶。氯酸盐抑制亚硝酸根氧化还原酶。

### 2.1.3 抑制剂的选用

在硝化反应中, 每一步反应有多种细菌参与硝化反应, 如果只抑制了一种细菌, 还有另外其他的细菌参与反应。但是酶具有专一性, 如果抑制了一种酶, 由该种酶控制的该步反应就不能发生。综观图1硝化反应生成N<sub>2</sub>O的反应过程可知, 只有抑制了氨单加氧酶, 才能阻止硝化反应的进行, 和硝化反应中N<sub>2</sub>O的生成。如果考虑提高氮肥利用率时, 以上抑制剂都可选用, 特别是像DCD等可作为缓释氮肥的硝化抑制剂对提高氮肥利用率有非常好的效果。但是当考察硝化和反硝化对N<sub>2</sub>O产生的贡献时, 常用C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>和CH<sub>3</sub>F抑制剂来抑制硝化作用。CH<sub>3</sub>F与乙炔相比的优点是, 乙炔在0.1~10 kPa时抑制反硝化, 而CH<sub>3</sub>F只抑制硝化反应。硝化抑制的缺点是阻止了硝酸根的形成, 因而可能影响反硝化率。

## 2.2 反硝化抑制剂

有的硝化抑制不仅可抑制土壤的硝化过程, 而且还可以抑制土壤的反硝化过程, 如乙炔, 双氰胺和包被碳化钙等。但是由于DCD是一种缓释氮肥, 主要起着逐渐释放氮肥, 提高作物的吸氮利用率, 而不是真正意义上对反硝化反应某一过程起到抑制。而包被碳化钙是一个持续缓慢产生乙炔的过程, 其反应方程式是CaC<sub>2</sub>+2H<sub>2</sub>O→Ca(OH)<sub>2</sub>+C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>。随着乙炔的增多, 土壤中的酸碱度也将发生变化, 影响N<sub>2</sub>O的生成。故可以说, 在衡量硝化反硝化对N<sub>2</sub>O的生成贡献时, 反硝化反应中除了环境因子和C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>抑制剂外, 目前没有专门的其他抑制剂用来研究反硝化对N<sub>2</sub>O生成的贡献。C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>主要抑制N<sub>2</sub>O还原为N<sub>2</sub>这一过程。

## 2.3 杀菌剂

杀菌剂是可用来判断独立于生物因素而导致的N<sub>2</sub>O生成贡献。如化学反硝化对N<sub>2</sub>O的产生贡献。

## 3 测量硝化和反硝化产生N<sub>2</sub>O贡献的方法

### 3.1 <sup>15</sup>N标记底物法

#### 3.1.1 <sup>15</sup>N标记法测量硝化和反硝化产生N<sub>2</sub>O贡献的理论基础

土壤中N<sub>2</sub>O的产生绝大部分归因于硝化或反硝化反应。因为土壤团聚体中存在厌氧和好氧微域, 导致硝化和反硝化反应同时发生。土壤中硝化和反硝化反应对N<sub>2</sub>O生成的贡献可通过不同<sup>15</sup>N标记的NO<sub>3</sub><sup>-</sup>和NH<sub>4</sub><sup>+</sup>库来研究, 每隔一定时间测量和比较N<sub>2</sub>O、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>和NH<sub>4</sub><sup>+</sup>库的丰度, 这样两个过程的相对重要性就能被确定。该结论假设来自于硝化和反硝化库的<sup>15</sup>N原子分数在培养过程时能保持一致。反硝化库的一致性最开始是通过加入硝化抑制剂C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>来测试的, 然后检测N<sub>2</sub>O中<sup>15</sup>N分布随时间变化的积累量。当铵离子库处于自然丰度时, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>库被<sup>15</sup>N富集时, 则硝化产生的N<sub>2</sub>O的丰度也是在自然丰度, 而反硝化将产生与有NO<sub>3</sub><sup>-</sup>库参与反应的同样丰度的N<sub>2</sub>O。如果N<sub>2</sub>O中<sup>15</sup>N是随机分布的, 那么N<sub>2</sub>O来自于同一库源; 但是如果N<sub>2</sub>O中<sup>15</sup>N是不随机分布的, 那么N<sub>2</sub>O产生于一个或多个库源<sup>[13]</sup>。

#### 3.1.2 与气相分析有关的计算

N<sub>2</sub>O分子中的<sup>15</sup>N的含量可用离子流强度比<sup>45</sup>R(<sup>45</sup>I/<sup>44</sup>I)和<sup>46</sup>R(<sup>46</sup>I/<sup>44</sup>I)来计算。其中通过<sup>45</sup>R来计算N<sub>2</sub>O分子中<sup>15</sup>N的含量可用公式(1)和(3), 其中通过<sup>46</sup>R来计算N<sub>2</sub>O分子中的<sup>15</sup>N的含量可用公式(2)和(3)计算。当用<sup>45</sup>R计算的N<sub>2</sub>O丰度与用<sup>46</sup>R来计算N<sub>2</sub>O的丰度不一样时, 则N<sub>2</sub>O分子中的<sup>15</sup>N是不随机分布, 而这种不随机性分布暗示着N<sub>2</sub>O来自于两种来源的混合物。当N<sub>2</sub>O分子中的<sup>15</sup>N是不随机分布时, N<sub>2</sub>O分子中的<sup>15</sup>N的含量可用公式(4)计算。

$$^{15}R = (^{45}R - ^{17}R) / 2 \quad (1)$$

$$^{15}R = \frac{-2^{17}R \pm [4(^{17}R)^2 - 4(^{18}R - ^{46}R)]^{1/2}}{2} \quad (2)$$

$$A \text{ tom } \% ^{15}N = (100 \times ^{15}R) / (1 + ^{15}R) \quad (3)$$

$$A \text{ tom } \% ^{15}N \text{ in } N_2O = 100 \times (^{45}R + 2^{46}R - ^{17}R - 2^{18}R) / (2 + 2^{45}R + 2^{46}R) \quad (4)$$

式中 N<sub>2</sub>O中<sup>15</sup>R、<sup>17</sup>R、<sup>18</sup>R分别可用<sup>15</sup>R = <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N, <sup>17</sup>R = <sup>17</sup>O/<sup>16</sup>O, <sup>18</sup>R = <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O表示。

#### 3.1.3 区分硝化和反硝化贡献的<sup>15</sup>N标记实验技术

可以通过两种培养实验来确定硝化和反硝化对N<sub>2</sub>O产生的贡献。第一种实验的测量依据是, 只用一个标记一致的NO<sub>3</sub><sup>-</sup>库为反硝化库的标记方法, 可确定硝化反应的贡献。而第二种实验则是通过使用乙炔等硝化抑制剂抑制硝化反应, 确定反硝化的贡献。

当一种<sup>15</sup>N标记的底物加入时, 假定其与原来的土壤库完全混合而形成一个丰度一致的标记库。如果N<sub>2</sub>O进入顶部空间或者密封包围周围正常空气, 就可以简单地从浓度随时间变化的计算中获得通量。N<sub>2</sub>O产生的来源和过程的信息数据可通过测量和比较N<sub>2</sub>O, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>,

$\text{NO}_3^-$  库的丰度而获得。

$\text{N}_2\text{O}$  是从两个不同的 $^{15}\text{N}$  原子分数库中释放出来的。 $a_d$  (反硝化库, 假定是 $\text{NO}_3^-$  库) 和  $a_n$  (硝化库, 假定是铵离子库), 在开始时可以忽略大气中的 $\text{N}_2\text{O}$  含量。混合物中的 $^{15}\text{N}$  分数  $a_m$  可由(5)式计算获得

$$a_m = d \cdot a_d + (1 - d) a_n \quad (5)$$

式中  $d$  —— 从反硝化库中获得的 $\text{N}_2\text{O}$  通量分数;  $(1 - d)$  —— 从硝化库中获得的 $\text{N}_2\text{O}$  通量分数。如果两个土壤库中的 $^{15}\text{N}$  原子分数和 $\text{N}_2\text{O}$  混合物可通过测量确定, 那么  $d$  可通过(6)式计算获得

$$d = (a_m - a_n) / (a_d - a_n) \quad (6)$$

由于两个过程可同时一致发生, 当测量 $\text{N}_2\text{O}$  分子中 $^{15}\text{N}$  原子的分布时, 如果 $\text{N}_2\text{O}$  分子中的 $^{15}\text{N}$  原子既来自于自然丰度, 又来自于一个标记丰度的库源, 那么 $\text{N}_2\text{O}$  分子中 $^{15}\text{N}$  原子是不随机分布的。标记 $\text{NO}_3^-$  库与标记 $\text{NH}_4^+$  库相比获得的数据信息较容易处理, 而且更可靠。当 $\text{NH}_4^+$  库被标记时, 硝化反应将使硝酸盐丰度增加, 因此标记 $\text{NH}_4^+$  库时, $\text{N}_2\text{O}$  分子中 $^{15}\text{N}$  原子的分布是不能确定同时发生硝化和反硝化的。当 $\text{NO}_3^-$  库被标记时, $\text{N}_2\text{O}$  分子中 $^{15}\text{N}$  原子折任何一个非随机分布都可归因于同时发生的硝化和反硝化反应(见图2a), 或者仅仅从两个不同丰度库中发生的反硝化反应(见图2b)。因而当硝化反应被抑制时, 仅从一个 $\text{NO}_3^-$  库发生的反硝化反应就能被测试和确定<sup>[13]</sup>。

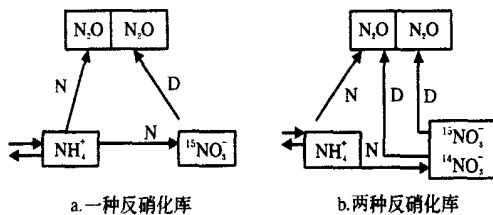


图2 标记 $^{15}\text{NO}_3^-$  时影响 $\text{N}_2\text{O}$  生成的可能的来源和路径

Fig 2 Possible sources and processes affecting the enrichment of the  $\text{N}_2\text{O}$  produced when  $^{15}\text{NO}_3^-$  is added to soil

直接用来测量土壤的 $^{15}\text{N}$  示踪技术是基于承担反硝化的 $\text{NO}_3^-$  存在一个同位素丰度一致的单一库。现实中的 $\text{NO}_3^-$  反硝化可能存在于不同 $^{15}\text{N}$  丰度的复杂库中。当使用硝化和反硝化的 $\text{N}_2\text{O}$  通量分数技术时进行测量时, 必须确保 $\text{N}_2\text{O}$  是由两个过程而不是由不同丰度的两种硝酸盐库中的反硝化。模拟的发酵和反硝化的确定需要对细菌的确认和计数, 因而反硝化和DNRA 中 $\text{N}_2\text{O}$  生成的相对贡献是不可能单单通过使用 $^{15}\text{NO}_3^-$  来确定的。使用乙炔作为硝化抑制的处理以便阻碍 $\text{N}_2\text{O}$  还原酶应该是随后实验的一部分。

### 3.2 乙炔抑制法

使用乙炔抑制技术是研究反硝化作用比较简单、有效的方法。它广泛地应用于实验室培养试验和田间试验。乙炔抑制技术具有其他方法所没有的优点: 乙炔抑制技术可克服以前方法中大气含有较高 $\text{N}_2$  浓度使试验灵敏度低的缺点; 在培养过程中不用加入培养基等

添加物, 也不用培养太长时间; 因为 $\text{C}_2\text{H}_2$  是一种可溶于水的气体, 它较容易扩散到土壤孔隙中, 使其很方便地应用于没有被干扰的系统(如土柱)之中。

Renald, A. Kesteret 用乙炔的短期曝露来区分土壤中硝化和反硝化细菌产生的 $\text{N}_2\text{O}$ 。当使用乙炔作为一种硝化抑制剂来判断不同氧气浓度下的硝化和反硝化反应的贡献时, 反硝化和化学反硝化是 $\text{N}_2\text{O}$  排放的主要来源<sup>[14]</sup>。Klemedtsson 发展了 PPM 方法(parts per million method), 即低浓度的乙炔用来调整硝化和反硝化对 $\text{N}_2\text{O}$  排放的贡献<sup>[15]</sup>。低压情况下的乙炔(1~10 Pa)用来抑制硝化。在该种情况下, 经乙炔抑制硝化作用后, 产生的 $\text{N}_2\text{O}$  来自反硝化作用。硝化作用产生的 $\text{N}_2\text{O}$  来自不加乙炔产生的 $\text{N}_2\text{O}$  和加1~10 Pa 乙炔产生的应用 $\text{N}_2\text{O}$  之差。 $\text{N}_2$  的产生来自加1~10 kPa 乙炔与加1~10 Pa 乙炔的产生量之差。

PPM 方法的主要缺点是, 反硝化细菌还原导致的 $\text{N}_2\text{O}$  也对乙炔很敏感。1~10 kPa 乙炔能普遍用于完全控制土壤中 $\text{N}_2\text{O}$  的还原。但由于1~10 Pa 的乙炔也能大量的抑制(10%~50%)土壤中硝化作用产生的 $\text{N}_2\text{O}$ 。这种发生在 $\text{N}_2\text{O}$  还原的反应的抑制能导致对硝化细菌产生的 $\text{N}_2\text{O}$  低估。这种问题在土壤拥有较高的反硝化活动时更严重, 比如大量的厌氧微域。使用 PPM 方法的缺点在一些土壤中可能被忽略, 在另外一些土壤中可能较明显。

### 3.3 环境因子抑制法

不同环境因子影响 $\text{N}_2\text{O}$  的产生, 比如pH 值低于5 时, 生物反硝化停止。pH 值低于6 时, 氮气产生受到抑制。好氧情况和厌氧情况下对 $\text{N}_2\text{O}$  的产生量的贡献有极大的差别。L effelaar(1988) 指出, 当用  $P_{\text{O}_2}$  表示土壤中氧气的压力,  $P_{\text{O}_{2,1}}$  表示土壤中氧气压力的最低域值,  $P_{\text{O}_{2,h}}$  表示土壤中氧压力的最高域值。如果土壤中  $P_{\text{O}_2} < P_{\text{O}_{2,1}}$ , 仅仅只发生反硝化反应; 如果  $P_{\text{O}_{2,1}} < P_{\text{O}_2} < P_{\text{O}_{2,h}}$ , 氧气、硝酸盐、亚硝酸盐和 $\text{N}_2\text{O}$  都是硝化反应的电子受体, 反硝化细菌和严格的好氧细菌都是积极的参与反应; 如果  $P_{\text{O}_2} > P_{\text{O}_{2,h}}$  只有氧气是硝化反应的电子受体, 反硝化细菌和严格的好氧细菌也都是积极的参与反应<sup>[16]</sup>。底物、温度、湿度等环境因子的抑制也将影响硝化和反硝化反应的贡献。只要能够完全抑制硝化和反硝化发生某一步的环境因子都有利于用来区分硝化和反硝化产生 $\text{N}_2\text{O}$  的贡献分析。

## 4 结论

$\text{N}_2\text{O}$  的来源可通过使用选择性抑制剂, 杀菌剂以及加入的标记底物确定。通过对产生 $\text{N}_2\text{O}$  的每一步反应的分析, 主要从抑制反应发生的催化酶和细菌着手, 总结了测量区分硝化、反硝化反应和DNRA 产生 $\text{N}_2\text{O}$  的贡献方法。这些方法主要是 $^{15}\text{N}$  标记底物法, 乙炔抑制法和环境因子抑制法。当前用 $^{15}\text{N}$  技术和自动气质谱仪是确定施肥土壤中 $\text{N}_2\text{O}$  来源的最好的实用方法。但由于抑制剂的加入, 会不同程度地影响其他反应生成

过程, 常常导致低估了各过程的贡献。现在人们正在研究和尝试着利用基于自然丰度的同位素组成变化和 $^{15}N$ 标记技术来区分生成 $N_2O$ 的贡献。因为用 $^{15}N$ 标记底物时, 在没有抑制剂情况下, 也可以确定 $N_2O$ 的来源<sup>[17]</sup>, 故今后用 $^{15}N$ 标记底物来评价硝化和反硝化对于 $N_2O$ 释放通量的贡献的方法是很有潜力的。探索区分 $N_2O$ 生成贡献的完善方法能合理估算土壤对大气 $N_2O$ 的排放量, 这样有利于控制农田土壤对大气排放 $N_2O$ , 减少环境风险, 保护地球自然环境。

#### [参 考 文 献]

- [1] IPCC. Climate changes 1995-the science of climate change Contribution of group I to second assessment report of the intergovernmental panel to climate change[A]. 1995: 15
- [2] Delgado J A, Mosier A R. Mitigation alternatives to decrease nitrous oxide emissions and urea-nitrogen loss and their effect on methane flux[J]. J Environ Qual, 1999, 28 (6): 1105- 1111
- [3] Dexburg J M. Contribution of agro-ecosystems to global climate change[J]. A SA special publication, 1993, 55: 1- 18
- [4] Bouwman A F. The role of soils and land use in the greenhouse effect. Background paper of the international conference soil and the greenhouse effect[M]. Wageningen, the Netherlands: Int Soil Ref and Into Cnt. 1989: 14- 18
- [5] Parry M L. Climate Change and World Agriculture[M]. London. 1990
- [6] Firestone M K. Biological denitrification. In Nitrogen in Agriculture Soils[M]. F J Stevenson American Society of Agronomy, Madison. 1982: 289- 326
- [7] Cole J A. Assimilatory and dissimilatory reduction of nitrate to ammonia. In The Nitrogen and Sulphur Cycles [A]. J A Cole and S J Ferguson Cambridge University Press, Cambridge. 1988: 281- 329
- [8] Smith M S. Dissimilatory reduction of  $NO_2^-$  to  $NH_4^+$  and  $N_2O$  by a soil *Citrobacter* sp [J]. Applied Environmental Microbiology. 1982, 43: 854- 860
- [9] Wrage N, Velthof G L, Van Beusichem M L, et al. Role of nitrifier-denitrification in the production of nitrous oxide [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2001, 33: 1723 - 1732
- [10] Lees H. Inhibitors of nitrogen fixation[A]. In Hochster, R M and Quastel H (eds) Metabolic Inhibitor: Comprehensive Treatise [M]. Academic Press New York. 1996, 32: 615- 629
- [11] Berg P, Klemedtsson L, Rosswall T. Inhibitory effect of low partial pressures of acetylene on nitrification[J]. Soil Biology & Biochemistry, 1982, 29: 505- 510
- [12] Hymen M R, Page C L, Arp D J. Oxidation of methyl fluoride and dimethyl ether by ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*[J]. Applied & Environmental Microbiology. 1994, 60: 3033- 3035
- [13] Stevens R J, Laughlin L C, Burns L C. Measuring the contribution of nitrification and denitrification to the flux of nitrous oxide from soil[J]. Soil Biol Biochem, 1997, 29 (2): 139- 151
- [14] Ronald A Kester, Wietse de Boer, Hendrikus J. Laanbroek. Short exposure to acetylene to distinguish between nitrifier and denitrifier nitrous oxide production in soil and sediment samples[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1996, 20: 111- 120
- [15] Klemedtsson L, Hansson G. The use of acetylene for a quantification of  $N_2$  and  $N_2O$  production from biological processes in soil[A]. In: Denitrification in Soil and Sediment[M]. Plenum Press, New York. 1990: 167- 180
- [16] Lefelaar P A. Dynamics of partial anaerobiosis, denitrification, and water in a soil aggregate: Simulation [J]. Soil Sci, 1998, 146: 427- 444
- [17] Speir T W, Kettles H A, More R D. Aerobic emissions of  $N_2O$  and  $N_2$  from soil cores: measurement procedures using  $^{15}N$ -labelled  $NO_3^-$  and  $NH_4^+$  [J]. Soil Biology & Biochemistry, 1995, 27: 1299- 1306

## Methods for the contributions of nitrification and denitrification to the production of nitrous oxide from soil

Huang Shuhui, L ÜJun

(College of Natural Resource and Environmental Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

**Abstract** Most of nitrous oxide produced from soil. The flux of  $N_2O$  from soil can be resulted from nitrification, denitrification or dissimilatory  $NO_3^-$  reduction to  $NH_4^+$  (DNRA), and nitrification and denitrification are the primary mechanism about  $N_2O$  forming. Since aerobic and anaerobic microsites can develop within the same soil, nitrification and denitrification could be occurring at the same time. Their contributions to nitrous oxide emission could differentiate from inhibiting catalysis enzymes and bacteria from each reaction process. Some methods such as  $^{15}N$ -labelling the substrate, acetylene inhibition and environmental factors inhibition are introduced in detail.

**Key words** soil; nitrous oxide; nitrification and denitrification;  $N_2O$