

N₂O产生机制的同位素方法研究进展

梁越¹, 肖化云², 刘小真³, 谢亚军¹

(1. 东华理工大学 江西省大气污染成因与控制重点实验室 南昌 330013; 2. 中国科学院地球化学研究所 环境地球化学国家重点实验室 贵阳 550081; 3. 南昌大学 资源环境与化工学院 鄱阳湖环境与资源利用教育部重点实验室 南昌 330047)

摘要: N₂O 是一种重要的温室气体,是由多种微生物的硝化与反硝化作用产生,但是它产生的生物地球化学机制还不十分清楚。本文结合 N₂O 产生的微生物过程,阐述了国内外利用同位素标记法、N₂O 的 δ¹⁵N 和 δ¹⁸O 双同位素法、N₂O 的 δ¹⁵N^α (¹⁴N¹⁵N¹⁶O) 和 δ¹⁵N^β (¹⁵N¹⁴N¹⁶O)、SP 值同位素异构体法以及多种同位素法相结合研究 N₂O 的产生机制及微生物过程,比较了这些方法的优缺点,尤其重点阐述了近些年来兴起的 N₂O 同位素异构体计算各过程贡献比例及其判别源与汇的理论及其应用。¹⁵N 同位素富集因子法和 SP 值法也分别应用于产生 N₂O 的微生物群落结构、数量和活性变化的研究,以从根本上达到控制 N₂O 排放量的目的。同时指出同位素方法研究 N₂O 产生机制的困难和不足。

关键词: N₂O; 机制; 同位素; 进展

中图分类号: X142 文献标识码: A 文章编号: 1672-9250(2018)06-0606-07 doi: 10.14050/j.cnki.1672-9250.2018.46.136

N₂O 在平流层形成 NO 自由基与 O₃ 发生反应而破坏臭氧层^[1],是一种重要的温室气体。单个分子 N₂O 引起全球变暖的效率是 CO₂ 的 206 倍,且对流层 N₂O 浓度每年增加约 0.26%^[2]。目前国内外对 N₂O 产生机制的研究还存在很大的不确定性^[3-4],是全球变暖重大研究领域的一个重要热点。N₂O 的来源广泛,其最大的释放源为农业和森林自然土壤环境,占 50% 以上^[2],其他的释放源包括海洋、河口、河流、地下水、湿地、草地和湖泊等水环境。地表水环境氧恢复条件好,易发生硝化反应,而缺氧条件如沉积物-水界面则易发生反硝化反应^[5],N₂O 是这些硝化和反硝化过程的中间产物,是地表氮循环的重要过程。N₂O 产生的复杂过程与地表环境中的有机氮、铵态氮、硝态氮等含氮化合物密切相关,也与氧含量、温度等环境因素密切相关^[6-7]。深入研究 N₂O 产生的硝化和反硝化作用机制,探索 N₂O 释放的源与汇,有助于了解地表环境中氮的生物地球化学过程,更加准确地评价氮循环的总体环境效应,也为控制 N₂O 的排放提供理论和技术支持。

1 产生 N₂O 的微生物过程

释放到大气中的 N₂O 有 70% 来自于微生物的硝化和反硝化作用,N₂O 是这些微生物过程中的副产物:(1) 硝化作用,N₂O 由好氧氨氧化细菌^[8-9](AOB) 和氨氧化古菌^[10](AOA) 在羟胺(NH₂OH) 氧化成 NO₂⁻ 期间产生(NH₃→NH₂OH→N₂O);(2) 硝化细菌脱氮作用,N₂O 是由厌氧氨氧化细菌将 NO₂⁻ 反硝化生成(NH₄⁺/NH₃→NO₂⁻→NO/N₂/N₂O);(3) 反硝化作用,N₂O 是异养反硝化细菌在厌氧条件下将 NO₃⁻ 转变成 N₂ 过程的中间产物(NO₃⁻→NO₂⁻→NO→N₂O→N₂)^[11];另外,硝酸盐异化还原为铵盐的同化作用过程也可能产生 N₂O。反硝化作用在厌氧条件下进行,当前被认为是主要的 N₂O 微生物源^[12]。可见,产生 N₂O 的微生物源具有多样性。但是,硝化细菌脱氮作用倾向于出现在高氮、低碳和低氧的环境中^[9];硝酸盐异化还原为铵盐的过程在淡水生态系统中则比较少见^[13]。

收稿日期: 2018-03-29; 改回日期: 2018-07-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(41563001); 国家重大研究与开发项目(2016YTA0601000); 江西省科技厅重大项目(20161ACG70011); 江西省青年科学基金项目(20171BAB214010); 东华理工大学核资源与环境国家重点实验室培育基地自主基金项目(Z1610)。

第一作者简介: 梁越(1974-),女,博士,主要研究方向为环境地球化学、大气污染成因与控制。E-mail: liangyue@ecit.cn.

2 N₂O 产生机制的研究

2.1 乙炔抑制法和同位素标记法

过去对 N₂O 释放有关硝化作用和反硝化作用机制的研究大都基于乙炔抑制法^[14]。如 Klemetsson 等^[15]发现 10 Pa 的 C₂H₂ 可用于抑制硝化作用,而 10 KPa 的 C₂H₂ 可用于硝化作用和反硝化作用过程的 N₂O 还原研究。但这种方法具有很大的不可靠性,因为:(1) C₂H₂ 分解;(2) 在 O₂ 参与下,高浓度的 C₂H₂ 催化 NO 氧化成 NO₂; (3) 如果 C 限制, C₂H₂ 就会作为基质被反硝化过程利用;(4) 硝酸盐氨化作用的抑制;(5) 在一定条件下 C₂H₂ 的扩散会受到限制^[16]。同位素标记法易受示踪剂的不完全扩散和加入标记物质本身刺激的影响。

2.2 N₂O 稳定同位素法

不同源产生的 N₂O 应该伴随有不同的同位素信号,比如农业无机肥料源产生的 N₂O 比自然森林土壤源产生的 N₂O 明显亏损¹⁵N 同位素。如果了解这些源释放到大气中的 N₂O 的同位素信号,那么就能解释对流层中观察到的 N₂O 同位素变化趋势,并估算不同来源变化的量。

2.2.1 N₂O 的双同位素法

N₂O 的双同位素(¹⁵N 和 ¹⁸O) 是一个强大的示踪 N₂O 生物地球化学过程的工具^[17-19],能有效辨别 N₂O 源(自然和人为)和 N₂O 产生的微生物过程^[20-22]。

不同源排放的 N₂O 的双同位素组成不同,如不同类型土壤中硝化和反硝化作用产生的 N₂O 相对于对流层大气 N₂O 明显亏损¹⁵N 和 ¹⁸O^[23-24],而海洋、河流等水体以及非微生物源(如生物质燃烧、化石燃料的燃烧等)排放的 N₂O 在同位素组成上很接近对流层大气 N₂O^[23,25]。N₂O 源同位素信号的不同可以用于建立这些源对对流层 N₂O 的相对贡献,对于制定减少 N₂O 释放的措施是很有价值的。N₂O 的 ¹⁸O 在一定程度上也能用来研究 N₂O 产生的微生物过程^[26-28],例如在细菌培养实验中,硝化细菌(AOB)参与 NH₄⁺ 氧化的 N₂O 的 ¹⁸O 为 23.5 ± 1.3‰,比 NH₂OH 氧化的 N₂O 的 ¹⁸O (38.8 ± 2.4‰) 偏负;硝化细菌脱氮作用产生的 N₂O 的 ¹⁸O 为 9.8 ± 1.5‰;反硝化细菌产生的 N₂O 的 ¹⁸O 为 34.9 ± 6.1‰,这些 ¹⁸O 明显的差异可以用来判别 N₂O 产生的微生物过程^[29-30]。但是在自然条件下,

需考虑水中的氧原子与 NO₂⁻ 和 NO₃⁻ 中氧原子发生交换对 ¹⁸O 的影响,比如 NH₃ → NO₂⁻ 过程的氧交换值在 1‰ ~ 25‰; NO₂⁻ → NO₃⁻ 过程的氧交换值为 3‰^[31]。硝化或反硝化过程产生的 N₂O 比它的前体物(NH₄⁺, NO₃⁻)更亏损¹⁵N 和 ¹⁸O(优先利用轻同位素),但两者同位素的分馏程度不同,从硝化到反硝化的转换能明显升高 N₂O 的 ¹⁵N 和 ¹⁸O(¹⁵N 增加 20‰~50‰, ¹⁸O 增加 10‰~25‰^[27]),也就是说反硝化作用产生的 N₂O 比硝化作用产生的 N₂O 有更高的 ¹⁵N 和 ¹⁸O^[29],结合 O₂ 的浓度,能较好地地区分硝化和反硝化作用。Xiong 等^[32]利用 N₂O 的 ¹⁵N 和 ¹⁸O 研究种植小麦的土壤,发现反硝化过程是冬季小麦土壤释放 N₂O 的主要过程。

2.2.2 同位素异构体 ¹⁵N^α 和 ¹⁵N^β 法

N₂O 同位素异构体 ¹⁵N^α(¹⁴N¹⁵N¹⁶O) 和 ¹⁵N^β(¹⁵N¹⁴N¹⁶O) 为识别 N₂O 产生的微生物过程信息提供了更好的途径。由于产生 N₂O(NH₂OH, NO, NO₂⁻)的前体只含有一个 N 原子,这个¹⁵N 即 N₂O 分子内的 α 位置(¹⁴N¹⁵N¹⁶O),而 β 位置(¹⁵N¹⁴N¹⁶O)主要由生物化学反应过程引起的 N-O 断裂决定^[33],意味着不同的微生物过程和功能群展示不同的¹⁵N 位置偏好^[34-35],可以用 SP(SP = ¹⁵N^α - ¹⁵N^β)作为 N₂O 产生的微生物过程的示踪指标^[36-37]。

据报道 SP 不受物质同位素的支配^[38],如在纯培养实验中增加前体物(NH₄⁺, NO₃⁻)的同位素,使产生的 N₂O 的 ¹⁵N^{bulk}(¹⁵N^{bulk} = (¹⁵N^α + ¹⁵N^β)/2)增加了 96‰,而 SP 仅增加了 0.003‰,几乎保持不变^[39],因此 SP 这个新示踪指标的一个优点是不需要了解前体物的氮同位素组成,就能独立的用于区分每一种氮的微生物过程。Yano 等^[40]利用 SP 研究稻田灌溉,发现 N₂O 在水淹过程排放量快速增加,且来源于反硝化过程。一般来讲,单独的硝化与反硝化过程产生 N₂O 的 SP 具有较为明显的区别^[38],而反硝化过程与硝化-反硝化过程(NO₂⁻还原成 N₂O)的 SP 均为负值且较为接近^[40]。例如,在实验室纯培养研究中硝化和反硝化作用产生的 N₂O 的 SP 有显著差异,羟胺氧化产生的 N₂O 的 SP 为 30.8 ± 5.9‰~36.3 ± 2.4‰;硝化细菌脱氮作用产生的 N₂O 的 SP 为 -10.7 ± 2.9‰~0.1 ± 1.7‰;反硝化作用产生的 N₂O 的 SP 为 -5‰~0‰^[41]。Yano 等^[40]的纯培养实验发现以羟胺氧化为主的硝化作用过程产生的 N₂O 的 SP 为 31‰。Toyoda 等^[42]在

一个生物污水处理厂的有氧槽里测得 N_2O 的 SP 值为 4.5% , 表明由羟胺氧化产生的 N_2O 贡献是不重要的。Decock 等^[43] 把 SP 分为 N_2O_N (羟胺氧化作用, $SP=32.8\pm 4.0\%$) 和 N_2O_D (硝化细菌脱氮作用和反硝化作用, $SP=-1.6\pm 3.8\%$)。SP 值的测定对于 N_2O 产生来源的识别是非常有用的工具, 如果知道硝化反应的 SP_{nit} 和反硝化反应的 SP_{denit} 就可以计算它们对 N_2O 的相对贡献 ($SP = X \times SP_{nit} + (1-X) \times SP_{denit}$, X 为贡献比例)^[3]。

N_2O 的 $\delta^{15}N^\alpha$ 和 $\delta^{15}N^\beta$ 与 $\delta^{18}O$ 的相关性也可以用来判别 N_2O 还原为 N_2 的程度或者说 N_2O 的消耗 (当反硝化进行到一定程度)。因为 N_2O 还原为 N_2 首先破坏 $N^\alpha-O$ 键 (动力学效应首先破坏轻同位素) 剩下的 N_2O 富集 ^{18}O 和 $^{15}N^\alpha$, 这就导致 $\delta^{18}O$ 和 $\delta^{15}N^\alpha$ 有正的相关性, 而 $\delta^{18}O$ 与 $\delta^{15}N^\beta$ 或者 $\delta^{15}N^{bulk}$ 则没有的相关性。Park 等^[3] 在自然雨林土壤和农业土壤的实验里证实了 N_2O 的消耗与它的同位素组成有这样的对应关系。 N_2O 还原为 N_2 的同位素分馏程度也可以用瑞利分馏模型来估算, $\delta^x - \delta_0^x = \epsilon^x \times \ln([N_2O]/[N_2O]_0)$, $\epsilon^x = ^{18}O$ 或 $^{15}N^\alpha$, ϵ^x 是分馏系数($\%$) ρ 表示起始值, $1 - ([N_2O]/[N_2O]_0)$ 就是 N_2O 消耗的分率。

2.2.3 多种同位素法

N_2O 的双同位素 ($\delta^{15}N^{bulk}$ 和 $\delta^{18}O$) 及其同位素异构体 $\delta^{15}N^\alpha$ 和 $\delta^{15}N^\beta$ 是近些年来在国际上兴起的研究 N_2O 形成机制和来源的一种有效手段^[27], 主要用于海洋^[44]、农业土壤^[45] 和细菌培养实验^[46] 等。如果以 N_2O 的 $\delta^{15}N$ 和 $\delta^{18}O$ 、SP 为主要研究手段, 结合它产生的前体物相应的氮氧同位素 $\delta^{15}N-NH_4^+$ 、 $\delta^{15}N-NO_2^-$ 和 $\delta^{18}O-NO_2^-$ 、 $\delta^{15}N-NO_3^-$ 和 $\delta^{18}O-NO_3^-$ 等来研究硝化与反硝化过程, 将很大程度地提升氮循环机制理论基础^[49]。Casciotti 等^[47] 利用 NO_3^- 和 NO_2^- 的 $\delta^{15}N$ 和 $\delta^{18}O$ 对海洋缺氧区进行研究, 发现 NO_2^- 硝化过程是 NO_2^- 的主要消耗过程, 并显著影响了 NO_3^- 的 $\delta^{15}N$ 和 $\delta^{18}O$ 。Peters 等^[48] 结合 $\delta^{15}N-NO_2^-$ 和 $\delta^{18}O-NO_2^-$ 、 $\delta^{15}N-NO_3^-$ 和 $\delta^{18}O-NO_3^-$ 、 $\delta^{15}N-N_2O$ 和 $\delta^{18}O-N_2O$ 以及 SP 对南极土壤和湖泊进行研究, 发现 Labyrinth 的 $\delta^{15}N-N_2O$ 和 $\delta^{18}O-N_2O$ 以及 SP 落在 NH_2OH 氧化和 NO_2^- 反硝化过程产生 N_2O 的值之间, 认为 Labyrinth 的 N_2O 来源于 NH_2OH 氧化和 NO_2^- 反硝化过程; Lake Vanda 的 SP 落在硝化过程与硝化-反硝化过程之间, 认为 Lake Vanda 的 N_2O

来源于硝化过程与硝化-反硝化过程。Tumendelger 等^[49] 利用 SP 的测定得出废水处理系统中 N_2O 来自于 NH_2OH 氧化的贡献小于 40% , 而来自于 NO_2^- 还原的贡献大于 60% 。因此, 多种同位素手段相结合, 将能更好地反映 N_2O 产生的不同微生物过程。稳定同位素示踪技术的研究将大大提高对 N_2O 产生和释放过程的认识和对 N_2O 源的识别。

2.3 N_2O 同位素的测定

同位素质谱仪能够测定 N_2O 的浓度和 $\delta^{15}N^{bulk}$ 、 $\delta^{18}O$ 、 $\delta^{15}N^\alpha$ 和 $\delta^{15}N^\beta$ 值, 精度好于 0.1% 。 N_2O 同位素异构体 $\delta^{15}N^\alpha$ 和 $\delta^{15}N^\beta$ 最早由日本科学家发现并在日本用同位素质谱仪测定^[21]。

最近由美国生产的 N_2O 同位素分析仪可在野外变化的环境条件下持续在线监测 N_2O 的浓度、 $\delta^{15}N^{bulk}$ 、 $\delta^{18}O$ 及同位素异构体 $\delta^{15}N^\alpha$ 和 $\delta^{15}N^\beta$ 值, N_2O 回收率 $>99\%$, 无同位素分馏或其它气体成分干扰^[45, 50], 是研究 N_2O 形成机制和来源的一种有效手段, 目前已在土壤、草地、废水等多个环境中得到应用^[50-52]。

3 应用同位素技术研究产生 N_2O 的微生物群落组成

微生物群落结构和稳定同位素都是研究环境中 N_2O 产生过程和机制的重要工具, 也都是判别 N_2O 产生的硝化与反硝化过程的重要手段, 对环境因素 (如气候、湿度、温度) 的变化都很敏感。国际上已逐步利用同位素技术研究产生 N_2O 的微生物群落组成, 试图通过监测 N_2O 同位素信号预测产生 N_2O 的微生物群落结构、数量和活性的变化, 以从根本上达到控制 N_2O 排放量的目的。

3.1 ^{15}N 同位素富集因子法

N_2O 是由不同的前体物质经过不同的微生物群落转化而来, 如硝化作用是由前体物质 NH_4^+ 经过氨氧化细菌转化成 N_2O , 反硝化作用是由前体物质 NO_3^- 经过反硝化细菌转化成 N_2O , 期间 ^{15}N 同位素富集因子 (ϵ) 能够区分这些微生物路径^[2], 就是说不同前体物质的 ^{15}N 经过不同细菌反应产生的 N_2O 的 ^{15}N 同位素不同。例如, 细菌纯培养实验表明, 氨氧化细菌作用的 ϵ 为 $-66.5 \sim -45.3$ ^[41], 比反硝化细菌作用的 ϵ ($-37 \sim -10$) 更小^[41], 厌氧氨氧化细菌作用的富集因子 ϵ 为 -35.7 ± 2.7 ^[34] (图 1)。富集因子可以较好地了解微生物群落组

成,但富集因子的测定必须依赖于前体物质的同位素测定,而且富集因子不是常数,在计算反硝化富集因子时也受 N₂O 还原为 N₂ 所引起同位素升高的影响,也就是不能准确判断反硝化微生物贡献的比例。

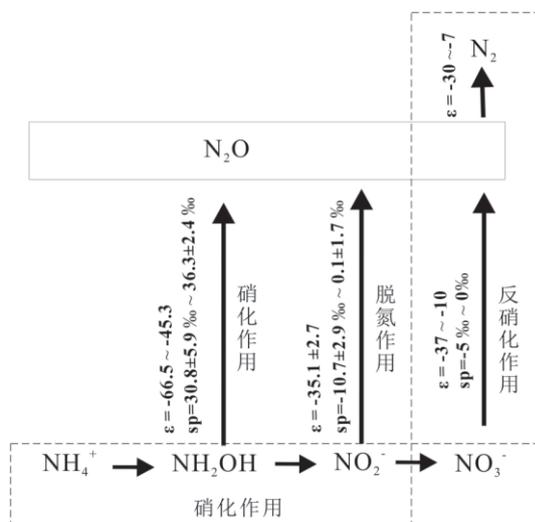


图1 不同微生物过程产生 N₂O 的 SP 值及 ¹⁵N 同位素富集因子 ε

Fig.1 Isotopic enrichment factor of ¹⁵N and SP of N₂O production by different microorganisms

3.2 同位素异构体 SP 值法

N₂O 的 SP 可用于研究产生 N₂O 的微生物群落组成(图1),在细菌纯培养实验中,氨氧化细菌产生的 N₂O 的 SP 为 30.8 ± 5.9 ‰ ~ 36.3 ± 2.4 ‰; 厌氧氨氧化细菌产生的 N₂O 的 SP 为 -10.7 ± 2.9 ‰ ~ -0.1 ± 1.7 ‰; 异养反硝化细菌产生的 N₂O 的 SP 为 -5 ‰ ~ 0 ‰^[41]。这些差异明显的 SP 可以较好地地区分不同的微生物组成^[53]。2015 年 Maeda 等^[54]在真菌培养实验中测得的 SP 为 15.8 ‰ ~ 36.7 ‰,表明真菌反硝化作用也是 N₂O 的重要来源。2016 年 Nordmann Winther 等^[55]培养海洋中不同的反硝化细菌,发现两种反硝化细菌产生的 N₂O 具有不同的 SP,表明两种反硝化细菌在反硝化过程中产生的 N₂O 机制有所差异。Maeda 等^[56]在牛堆肥产生的 N₂O 实验中,利用不同的抑制剂培养细菌、真菌和反硝化细菌,发现这些微生物产生 N₂O 的 SP 不同,认为 N₂O 主要由 *nirK* 反硝化细菌产生,然而,还需要进一步辨别反硝化细菌 SP

的不同是源于 NO 转化成 N₂O 还是共同反硝化的过程。N₂O 的 SP 在单独利用时同样存在缺点,在判别缺氧状态下的厌氧氨氧化细菌和反硝化细菌的反硝化路径时有所重叠,并不能完全区分这两个过程^[57]。

4 影响 N₂O 同位素值的主要因素

产生 N₂O 的微生物具有多样性,生物过程的微生物菌种或菌株的不同是造成 N₂O 的 SP 不同的根本原因^[22]。而环境因素的改变(如 NH₄⁺、pH、温度、O₂、含水量等)会影响微生物的生理过程、群落组成和硝化活性^[58-59],从而影响 N₂O 的释放量和产生过程(路径)^[4,60]。例如,Cardenas 等^[61]研究土壤水分的饱和度对 N₂O 同位素值的影响,发现土壤水分含量少时 N₂O 释放量变化较大,可能归因于微生物对养分的竞争,主要发生硝化作用;当土壤处于干湿交替时,N₂O 的释放量最大,反硝化作用是 N₂O 的主要来源;当土壤被水淹没时,水体和土-水界面硝化和反硝化作用都会发生。郑欠等^[62]在研究土壤含水量的影响时,发现高含水量的 N₂O 释放量最高,主要发生硝化作用;中含水量主要发生反硝化过程;低含水量前期以反硝化为主,后期以硝化作用为主。土壤水分含量的不同影响微生物不同群落的硝化与反硝化过程,是造成 N₂O 同位素值不同的主要原因。Mullungal^[63]研究最小氧含量大于 10 μm 和大于 130 μm 的两个海洋的 N₂O 释放,发现有显著不同的 N₂O 释放量和双同位素及同位素异构体信号,是不同氧条件下 N₂O 形成路径不同的结果。

5 困难和不足

N₂O 产生的机制还存在很大的不确定性,微生物纯培养实验在条件控制下完成,难以反映自然条件下 N₂O 产生的确切路径,同位素方法为 N₂O 产生机制的研究提供了良好的前景。然而,在自然状态下也难以区分单一微生物群落产生的特定的同位素值,使得实验室与野外数据存在差异,因为环境因素的变化对 N₂O 释放量的影响较大。任何单一技术都会有各自的优缺点,多种手段相结合,分子生物学技术和多种同位素技术相结合,可以相互验证 N₂O 产生的硝化与反硝化作用机制及其相对贡献,也为氮循环提供理论支持。

参 考 文 献

- [1] Ravishankara A R, Portmann, R W. Nitrous oxide (N_2O): The dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century [J]. *Science*, 2009, 326(5949): 123-125.
- [2] Solomon S, Qin D, Manning M, *et al.* (eds.). *Climate change 2007—the physical science basis: Working group I contribution to the fourth assessment report of the IPCC* [M]. Cambridge University Press, 2007.
- [3] Park S, Pérez T, Boering K A, *et al.* Can N_2O stable isotopes and isotopomers be useful tools to characterize sources and microbial pathways of N_2O production and consumption in tropical soils? [J]. *Global Biogeochemical Cycles*, 2011, 25(1): 1-16.
- [4] Wei J, Zhou M, Vereecken H, *et al.* Large variability of CO_2 and N_2O emissions and of ^{15}N site preference of N_2O from reactions of nitrite with lignin and its derivatives at different pH [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2017, 31(16): 1333-1343.
- [5] 吴敬禄, 林琳, 刘建军, 等. 太湖沉积物碳氮同位素组成特征与环境意义 [J]. *海洋地质与第四纪地质*, 2005, 25(2): 25-30.
- [6] 王仕禄, 刘丛强, 万国江, 等. 贵州百花湖分层晚期有机质降解过程与溶解 N_2O 循环 [J]. *第四纪研究*, 2004, 24(5): 569-577.
- [7] Wang S, Liu C, Yeager K M, *et al.* The spatial distribution and emission of nitrous oxide (N_2O) in a large eutrophic lake in eastern China: Anthropogenic effects [J]. *Science of the Total Environment*, 2009, 407(10): 3330-3337.
- [8] Arp D J, Chain P S G, Klotz M G. The impact of genome analyses on our understanding of ammonia-oxidizing bacteria [J]. *Annual Review of Microbiology*, 2007, 61: 503-528.
- [9] Otte S, Schalk J, Kuenen J G, *et al.* Hydroxylamine oxidation and subsequent nitrous oxide production by the heterotrophic ammonia oxidizer *Alcaligenes faecalis* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, 51(2): 255-261.
- [10] 胡安谊, 焦念志. 氨氧化古菌—环境微生物生态学研究的一个前沿热点 [J]. *自然科学进展*, 2009, 19(4): 370-379.
- [11] Bakken L R, Bergaust L, Liu B, *et al.* Regulation of denitrification at the cellular level: A clue to the understanding of N_2O emissions from soils [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 2012, 367(1593): 1226-1234.
- [12] Schreiber F, Wunderlin P, Kai M U, *et al.* Nitric oxide and nitrous oxide turnover in natural and engineered microbial communities: Biological pathways, chemical reactions, and novel technologies [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 319(4): 95-97.
- [13] Scott J T, McCarthy M J, Gardner W S, *et al.* Denitrification, dissimilatory nitrate reduction to ammonium, and nitrogen fixation along a nitrate concentration gradient in a created freshwater wetland [J]. *Biogeochemistry*, 2008, 87(1): 99-111.
- [14] 郑佳, 金兰淑, 莫旭华, 等. 乙炔抑制法在硝化与反硝化过程中的应用 [J]. *生物技术*, 2009, 19(4): 95-97.
- [15] Klemmedtsson L, Svensson B H, Rosswall T. A method of selective inhibition to distinguish between nitrification and denitrification as sources of nitrous oxide in soils [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1988, 6(2): 112-119.
- [16] Watts S H, Seitzinger S P. Denitrification rates in organic and mineral soils from riparian sites: A comparison of N_2 flux and acetylene inhibition methods [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2000, 32(10): 1383-1392.
- [17] Bernard S, Ckmann T R, Kaiser J, *et al.* Constraints on N_2O budget changes since pre-industrial time from new firm air and ice core isotope measurements [J]. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 2006, 6(2): 493-503.
- [18] Ishijima K, Sugawara S, Kawamura K, *et al.* Temporal variations of the atmospheric nitrous oxide concentration and its $\delta^{15}N$ and $\delta^{18}O$ for the latter half of the 20th century reconstructed from firm air analyses [J]. *Journal of Geophysical Research Atmospheres*, 2007, 112(D3).
- [19] Roeckmann T, Levin I. High-precision determination of the changing isotopic composition of atmospheric N_2O from 1990 to 2002 [J]. *Journal of Geophysical Research Atmospheres*, 2005, 110(D21).
- [20] Baggs E M. A review of stable isotope techniques for N_2O source partitioning in soils: Recent progress, remaining challenges and future considerations [J]. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 2010, 22(11): 1664-1672.
- [21] Toyoda S, Yoshida N. Determination of nitrogen isotopomers of nitrous oxide on a modified isotope ratio mass spectrometer [J]. *Analytical Chemistry*, 1999, 71(20): 4711-4718.
- [22] 林伟, 房福力, 张薇, 等. 稳定同位素技术在土壤 N_2O 溯源研究中的应用 [J]. *应用生态学报*, 2017, 28(7): 2344-2352.
- [23] Kim K R, Craig H. Nitrogen-15 and oxygen-18 characteristics of nitrous oxide: A global perspective [J]. *Science*, 1993, 262(5141): 1855-1857.
- [24] 朱仁斌, 刘雅淑, 徐华, 等. 上海-南极洋面大气 N_2O 的 $\delta^{15}N$ 与 $\delta^{18}O$ 时空变化特征 [J]. *中国科学(地球科学)*, 2008(9): 1156-1166.
- [25] Ogawa M, Yoshida N. Nitrous oxide emission from the burning of agricultural residue [J]. *Atmospheric Environment*, 2005, 39(19): 3421-3429.
- [26] 徐文彬. $\delta^{15}N$ 和 $\delta^{18}O$ 指标识别环境中 N_2O 生成机理 [J]. *地球与环境*, 1999, 27(2): 16-21.
- [27] Bol R, Toyoda S, Yamulki S, *et al.* Dual isotope and isotopomer ratios of N_2O emitted from a temperate grassland soil after fertiliser application [J]. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 2003, 17(22): 2550-2556.
- [28] Sutka R L, Adams G C, Ostrom N E, *et al.* Isotopologue fractionation during N_2O production by fungal denitrification [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2010, 22(24): 3989-3996.

- [29] Decock C, Six J. How reliable is the intramolecular distribution of ¹⁵N in N₂O to source partition N₂O emitted from soil? [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2013, 65: 114–127.
- [30] Kool D M, Muller C, Wrage N, et al. Oxygen exchange between nitrogen oxides and H₂O can occur during nitrifier pathways [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2009, 41: 1632–1641.
- [31] Casciotti K L. Oxygen isotopic exchange and fractionation during bacterial ammonia oxidation [J]. *Limnology & Oceanography*, 2010, 55: 753–762.
- [32] Xiong Z Q, Khalil M A K, Xing G, et al. Isotopic signatures and concentration profiles of nitrous oxide in a rice-based ecosystem during the drained crop-growing season [J]. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 2009, 114(G2) .
- [33] Popp B N, Westley M B, Toyoda S, et al. Nitrogen and oxygen isotopomeric constraints on the origins and sea-to-air flux of N₂O in the oligotrophic subtropical North Pacific gyre [J]. *Global Biogeochemical Cycles*, 2002, 16(4) : 12–1–12–4.
- [34] Sutka R L, Ostrom N E, Ostrom P H, et al. Nitrogen isotopomer site preference of N₂O produced by *Nitrosomonas europaea* and *Methylococcus capsulatus* Bath [J]. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 2010, 18(12) : 1411–1412.
- [35] Wunderlin P, Lehmann M F, Siegrist H, et al. Isotope signatures of N₂O in a mixed microbial population system: Constraints on N₂O producing pathways in wastewater treatment [J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(3) : 1339–1348.
- [36] Yoshida N, Toyoda S. Constraining the atmospheric N₂O budget from intramolecular site preference in N₂O isotopomers [J]. *Nature*, 2000, 405(6784) : 330–334.
- [37] Pérez T, Trumbore S E, Tyler S C, et al. Identifying the agricultural imprint on the global N₂O budget using stable isotopes [J]. *Journal of Geophysical Research*, 2001, 106: 9869–9878.
- [38] Toyoda S, Mutoke H, Yamagishi H, et al. Fractionation of N₂O isotopomers during production by denitrifiers [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2005, 37(8) : 1535–1545.
- [39] 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.
- [40] Yano M, Toyoda S, Tokida T, et al. Isotopomer analysis of production, consumption and soil-to-atmosphere emission processes of N₂O at the beginning of paddy field irrigation [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2014, 70(2) : 66–78.
- [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] Toyoda S, Suzuki Y, Hattori S, et al. Isotopomer analysis of production and consumption mechanisms of N₂O and CH₄ in an advanced wastewater treatment system [J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(3) , 917–922.
- [43] Decock C, Six J. How reliable is the intramolecular distribution of ¹⁵N in N₂O to source partition N₂O emitted from soil? [J], *Soil Biology & Biochemistry*, 2013, 65: 114–127.
- [44] McIlvin M R, Casciotti K L. Fully automated system for stable isotopic analyses of dissolved nitrous oxide at natural abundance levels [J]. *Limnology & Oceanography Methods*, 2010, 8(2) : 54–66.
- [45] Meijide A, Cardenas L M, Bol R, et al. Dual isotope and isotopomer measurements for the understanding of N₂O production and consumption during denitrification in an arable soil [J]. *European Journal of Soil Science*, 2010, 61: 364–374.
- [46] Yamazaki T, Hozuki T, Arai K, et al. Isotopomeric characterization of nitrous oxide produced by reaction of enzymes extracted from nitrifying and denitrifying bacteria [J]. *Biogeosciences*, 2014, 11(10) : 2679–2689.
- [47] Casciotti K L, Buchwald C, McIlvin M. Implications of nitrate and nitrite isotopic measurements for the mechanisms of nitrogen cycling in the Peru oxygen deficient zone [J]. *Deep Sea Research Part I Oceanographic Research Papers* 2013, 80(5) : 78–93.
- [48] Peters B, Casciotti K L, Samarkin V A, et al. Stable isotope analyses of NO₂⁻, NO₃⁻, and N₂O in the hypersaline ponds and soils of the McMurdo Dry Valleys, Antarctica [J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2014, 135(7) : 87–101.
- [49] Tumendelger A, Byambadorj T, Bors C, et al. Investigation of dissolved N₂O production processes during wastewater treatment system in Ulaanbaatar [J]. *Mongolian Journal of Chemistry*, 2017, 17(43) : 23–27.
- [50] Lee A, Winther M, Priemé A, et al. Hot spots of N₂O emission move with the seasonally mobile oxic-anoxic interface in drained organic soils [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2017, 115: 178–186.
- [51] Banik G D, Som S, Maity A, et al. An EC-QCL based N₂O sensor at 5.2 μm using cavity ring-down spectroscopy for environmental applications [J]. *Analytical Methods*, 2017, 9(15) : 2315–2320.
- [52] Yamazaki T, Hozuki T, Arai K, et al. Isotopomeric characterization of nitrous oxide produced by reaction of enzymes extracted from nitrifying and denitrifying bacteria [J]. *Biogeosciences*, 2014, 11(10) : 2679–2689.
- [53] Winther M, Balslev-Harder D, Christensen S, et al. Continuous measurements of nitrous oxide isotopomers during incubation experiments [J]. *Biogeosciences*, 2018, 15(3) : 767–780.
- [54] Maeda K, Spor A, Edelherrmann V, et al. N₂O production, a widespread trait in fungi [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5.
- [55] Nordmann Winther M, Blunier T, Balslevharder D, et al. Continuous measurements of Nitrous Oxide isotopomers during incubation experiments

- [J]. *Biogeosciences Discussions*, 2016, 16(3) : 1-19.
- [56] 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(24) : 14083-14091
- [57] Magyar P M. Insights into pathways of nitrous oxide generation from novel isotopologue measurements[D]. California Institute of Technology, 2017.
- [58] 杨柳燕,王楚楚,孙旭,等.淡水湖泊微生物硝化反硝化过程与影响因素研究[J].*水资源保护* 2016, 32(1) : 12-22.
- [59] 王超,单保庆.子牙河水系水和沉积物好氧氨氧化微生物分布特征[J].*环境科学学报*, 2012, 32(12) : 2943-2950.
- [60] Szukics U , Hackl E , Zechmeister-Boltenstern S , *et al.* Rapid and dissimilar response of ammonia oxidizing archaea and bacteria to nitrogen and water amendment in two temperate forest soils[J]. *Microbiological Research*, 2012, 167(2) : 103-109.
- [61] Maritza Cardenas L , Bol R , Lewickaszczyk D , *et al.* Effect of soil saturation on denitrification in a grassland soil[J]. *Biogeosciences Discussions*, 2017, 14(20) : 1-51.
- [62] 郑欠,丁军军,李玉中,等.土壤含水量对硝化和反硝化过程 N_2O 排放及同位素特征值的影响[J].*中国农业科学* 2017, 50(24) : 4747-4758.
- [63] Mullungal M N. Oceanic nitrous oxide distribution and production a stable isotopic approach[D]. University of Otago, 2017.

Research Progress on the Mechanism of N_2O Production Based on Stable Isotopic Methods

LIANG Yue¹, XIAO Huayun², LIU Xiaozhen³, XIE Yajun¹

- (1. Jiangxi Province Key Laboratory of the Causes and Control of Atmospheric Pollution, State Key Laboratory Breeding Base of Nuclear Resources and Environment, East China University of Technology, Nanchang 330013, China; 2.State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry Chinese Academy of Science, Guiyang 550081, China;
3. Key Laboratory of Poyang Lake Environment and Resource Utilization, Ministry of Education, School of Resources Environmental & Chemical Engineering, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: N_2O is one of the important greenhouse gases, however, the biogeochemical mechanism of N_2O production is still unclear. Focusing on the microorganism process of N_2O production, we summarized research progresses of nitrification and denitrification of the N_2O production based on the $\delta^{15}N$ and $\delta^{18}O$ double stable isotopes, $\delta^{15}N^{\alpha}$ ($^{14}N^{15}N^{16}O$) and $\delta^{15}N^{\beta}$ ($^{15}N^{14}N^{16}O$) and SP values, and multiple stable isotopes of N_2O production, and discussed the advantages and disadvantages of above stable isotope techniques. Particularly, we described the related theories and reviewed current applications of stable isotopes and isotope isomers of N_2O . The ^{15}N stable isotope enrichment factorization and the SP value methods were applied to decide structure, magnitude and activities of the N_2O production microbial community. In the end, we discussed the difficulty and shortage of the mechanism study on the N_2O production by using stable isotopes.

Key words: N_2O ; mechanism; stable isotope; research progress