

河流反硝化过程及其在河流氮循环与氮去除中的作用

马培^{1,3}, 李新艳², 王华新³, 王佳宁³, 晏维金^{3*}

(1.河南工程学院, 郑州 451191; 2.中国科学院南京地理与湖泊研究所, 湖泊与环境国家重点实验室, 南京 210008; 3.中国科学院地理科学与资源研究所, 北京 100101)

摘要: 全球每年通过人类活动新增的“活性”氮导致全球氮循环严重失衡, 并引起水体的富营养化、水体酸化、温室气体排放等一系列环境问题。河流作为重要的氮汇, 其氮循环对整个生态系统氮收支的影响、水体氮污染的改善和减少温室气体的排放与控制气候变化均具有重要意义。为了有助于理解反硝化过程中控制反硝化产物组成的影响因子, 以利于增加反硝化最终产物氮气的释放, 减少温室气体氧化亚氮的释放, 从而加强对河流氮输送和氧化亚氮排放的管理, 就河流反硝化的如下关键问题进行了综述: 第一, 河流反硝化作用的发生地点、时间以及其主要影响因素; 第二, 河流反硝化对河流氮负荷变化的响应机制; 第三, 河流系统的水文和地形地貌的变化对反硝化的影响, 换言之, 河流反硝化与河流水力学滞留时间及河流氮负荷的关系; 第四, 从生态系统尺度上讲, 与陆地、海洋等生态系统相比, 河流系统单位面积的反硝化率的时空变化特征, 以及河流系统总的反硝化通量所占比例; 第五, 河流反硝化研究的主要方法。

关键词: 氮; 反硝化; 氮气; 氧化亚氮; 氮同位素; 氮/氩比; 河流

中图分类号: X131.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2014)04-0623-11 **doi:** 10.11654/jaes.2014.04.002

Denitrification and Its Role in Cycling and Removal of Nitrogen in River

MA Pei^{1,3}, LI Xin-yan², WANG Hua-xin³, WANG Jia-ning³, YAN Wei-jin^{3*}

(1.Henan Institute of Engineering, Zhengzhou 451191, China; 2.Nanjing Institute of Geography and Limnology, State Key Laboratory for Lake Science and Environments, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 3.Institute of Geographical Science and Natural Resources Research, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Anthropogenic inputs of “new” active nitrogen (N) into the environment have caused water eutrophication, acidification as well as greenhouse gas emission. In this paper, the following issues were reviewed: when and where did the river denitrification occur? How does denitrification respond to N concentration and load? What were relationships between river denitrification and water residence time and N load? How did river hydrology and geomorphology influence N losses from the denitrification? What were the characteristics of river denitrification rates at ecosystem scale? In addition, methods for measuring river denitrification were discussed.

Keywords: nitrogen; denitrification; nitrogen gas; nitrous oxide; ¹⁵N isotope; N₂/Ar ratio; river

随着经济的发展和人口的膨胀, 全球每年通过人类活动新增的“活性”氮量约为 165 Tg, 大约是自然生态系统生物固氮量(每年约为 90 Tg 氮)的 2 倍, 导致全球氮循环严重失衡^[1], 氮素固定量持续增加带来的严重后果是土壤和水体的富营养化以及全球范围的酸雨和臭氧层流失的加剧。就全球范围而言, 输入河

流的总氮约有 50% 通过反硝化作用被去除, 最终约 30% 的陆地“新增”氮通过河流输送到河口、近海或内陆水生生态系统, 这均表明河流已经成为陆地系统主要的氮汇^[2-4]。研究表明, 反硝化过程是去除河流氮素、解决河流氮污染的最佳途径, 是调节区域甚至全球尺度上氮循环的关键过程^[5]。另一方面, 河流反硝化过程的一个重要副产物氧化亚氮是一种主要的温室气体, 研究如何减少河流氧化亚氮释放, 促进反硝化最终产物氮气的排放, 有助于改善大气环境质量以及加强对河流氮循环的认识和管理。

与陆地生态系统相比, 河流系统氮的反硝化问题主要体现在以下几方面: 第一, 河流系统反硝化的

收稿日期: 2013-09-13

基金项目: 国家自然科学基金(21177126, 41371454); 中国科学院地理科学与资源研究所前沿探索项目(2012QY001); 中科院南京地理与湖泊研究所青年启动项目(NIGLAS2011QD04)

作者简介: 马培(1983—), 女, 河南开封人, 博士, 研究方向为水污染控制, 水体富营养化研究。E-mail: map55912@163.com

* 通信作者: 晏维金 E-mail: yanwj@igsnr.ac.cn

基本问题是河流反硝化作用的发生地点和时间,也就是什么时间在什么地点(Hotspot)发生反硝化作用?河流反硝化作用的主要影响因素是什么?第二,河流氮负荷量的时空变化是如何影响河流反硝化的?或者反过来说,河流反硝化对河流氮负荷的响应机制是什么?第三,由于河流是连接陆地和海洋的桥梁,进入河流系统的氮负荷量受河流水文过程的驱动,而河流系统的水文和地形地貌变化是如何影响反硝化的?换言之,河流反硝化与河流水力学滞留时间及河流氮负荷的关系是什么?第四,从生态系统尺度上讲,与陆地、海洋等生态系统相比,河流系统单位面积的反硝化率的时空变化特征如何?河流系统总的反硝化通量所占比例是多少?第五,河流反硝化的微生物机制是什么?第六,河流反硝化研究的主要方法有哪些?与陆地生态系统相比,这些方法的优缺点是什么?

虽然人们对反硝化的研究由来已久,但由于仅是技术上初步满足了研究的需要^[6],且研究方法不一致使得数据积累受限,反硝化研究无疑仍处于起步阶段。目前,河流反硝化的研究大都集中在 25~60 °N 北温带的欧洲、美国的河口以及一些河段和较小的河流,流域尺度乃至全球尺度河流反硝化的系统研究仍然匮乏。因此,开展河流反硝化的研究对整个生态系统氮收支的认识、水体氮污染的改善和减少温室气体的排放与控制气候变化均具有重要意义。

1 河流氮循环过程与氮污染现状

在特定的流域内,氮以输入和输出两种途径对流域环境造成影响,见图 1 所示。氮输入方式主要有:大气沉降、化肥氮使用、生物固氮、粪便、点源污染排放等;输出方式主要包括地表径流流失、淋溶下渗、氨挥发释放、反硝化脱氮、厌氧氨氧化脱氮等方式。河流氮循环过程主要包括以各种自养或异养微生物为媒介的生物固氮、有机氮矿化、硝化、反硝化和厌氧氨氧化等氧化还原反应过程。生物固氮是河流水体初级生产力的重要过程,它可以将稳定的 N_2 经过生物体内的固氮酶催化还原为生物可利用氮;有机氮矿化是指核酸、蛋白质、聚氨基酸糖等含氮有机大分子降解为植物可直接利用的无机氮的过程,目前矿化过程的途径及其中间产物的化学特性还不完全清楚;硝化是氨氮氧化成硝氮的过程;反硝化是指在缺氧条件下,反硝化细菌把生物可利用的活性氮素(NO_3^-)转化为惰性气体 N_2 和少量 N_2O 归还到生态系统无机环境中,由于 N_2 的惰性和在大气中的丰富含量,不会因为氮素的不断输入而导致这个氮汇达到饱和^[7]。该过程是氮生物地球化学循环的关键环节,对保持岩石圈、水圈、生物圈和大气圈氮素平衡起着极其重要的作用。

氮素作为自然界中普遍存在的一种元素,是重要的生源要素。随着经济的发展和人口的膨胀,人类对化石燃料以及化学氮肥的使用量陡然增加^[8],使得生

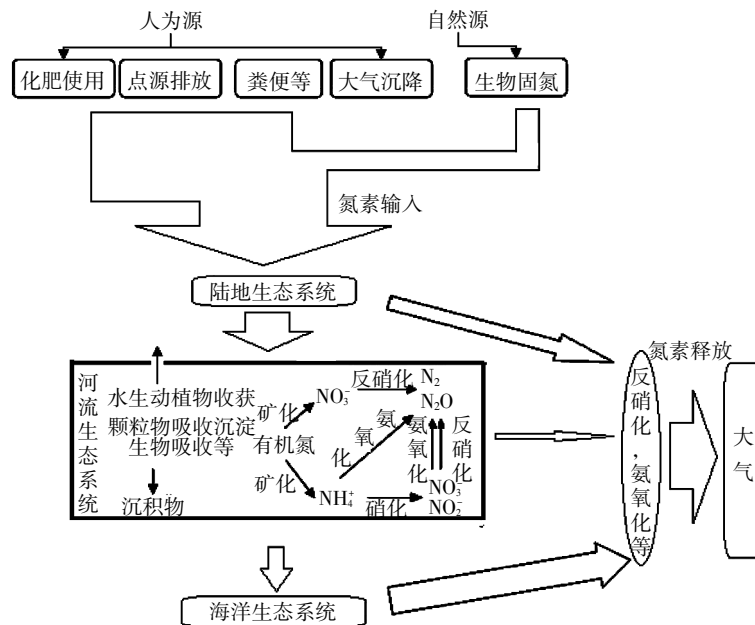


图 1 人为干扰下的河流氮循环关键过程示意图

Figure 1 Schematic diagram of key processes of nitrogen cycling related to rivers

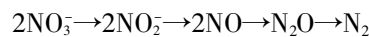
态系统中的新增“活性”氮不断增加^[9-10],全球氮循环严重失衡。可以预见,随着工业和生活水平的提高,氮素固定量仍会持续增加,其可能带来的严重后果是土壤和水体的富营养化、全球范围的酸雨以及臭氧层流失的加剧。随着全球范围内氮污染以及氮循环失衡的加剧,研究氮汇的大小以及了解与氮汇相关的过程变得至关重要。河流每年向海洋输送的氮量约为 35 Tg,约为全球氮肥总产量的 40.6%^[3,11-12],且将近一半的进入河流的氮在流至海洋的过程中,由于反硝化作用被释放至大气^[3],这些均表明河流是陆地生态系统的一个重要氮汇。首先,作为一个重要氮汇,河流氮循环的研究对氮污染、氮循环失衡的改善发挥着重要作用。目前对河流氮循环的研究集中在河口以及河源地区,一些研究结果显示一级支流(即处于河源区的支流)的植物和微生物过程对河流氮素的去除至关重要^[13-14];一些关于较大河流域的氮输送模型研究结果显示河口氮的输送通量受较小支流中氮的动力学影响显著^[15-16]。其次,河流氮循环同时也影响着其他重要的地球化学循环过程,如改变了河流、湖泊、海域等水体中溶解氧含量、磷与硅等元素的比例,会使河流的富营养化问题变得更加突出^[17-18]。再者,流域的管理必须要建立在对氮素和其他元素循环认识的基础上,才能够有助于更好地改善流域环境,维持良好的生态系统。最后,河流作为连接陆地和海洋的主要枢纽,其氮污染不仅会影响河流生态系统,也会加剧湖泊、地下水和海滨地区的富营养化问题。因此,河流氮循环的研究不仅有利于河流氮污染的改善,而且对湖泊、地下水、海洋以及土壤环境质量的改善均起到重要作用,且河流氮循环的研究有助于解决氮循环失衡问题的改善和增强对其他元素地球化学循环过程的认识,是目前国内外研究的一个热点。而就目前来讲,河流作为氮汇究竟有多大尚不清楚,且对流域尺度乃至全球尺度上河流氮循环的大小和速率的研究仍然比较匮乏^[19]。

2 河流氮去除的机制及反硝化作用的产物组成

目前,人们对河流氮循环的研究集中在和“氮汇”相关的一些过程,即河流氮素的去除过程。这是因为:氮的有效性是第一生产力的限制因素,也是食物链上能量的基础,因此河流氮去除过程的研究能够改善河流的氮污染,有助于人为固氮量增加所导致的氮循环严重失衡问题的解决,成为河流氮循环研究的焦点^[10,20-21]。河流氮的去除主要包括生物吸收、化学脱氮及颗粒物吸附沉降等过程。其中,河流化学脱氮方式主要有反

硝化作用、厌氧氨氧化作用和甲烷厌氧氧化作用^[22-23]。厌氧氨氧化过程(Anaerobic ammonium oxidation)是指在缺氧条件下, NH_4^+ 在厌氧氨氧化菌的作用下被 NO_2^- 氧化成 N_2 的过程^[24-25]。最近又发现,在缺氧环境中,甲烷可以在微生物作用下被 NO_2^- 氧化,从而达到 NO_2^- 还原脱氮的目的,即甲烷厌氧氧化过程(Anaerobic methane oxidation)^[22-23]。尽管厌氧氨氧化过程在河口、海洋以及淡水中广泛存在,但由于研究的匮乏,厌氧氨氧化机制及其对河流、湖泊等淡水脱氮的贡献率到底有多大尚不清楚^[23,25-26],而关于河流甲烷厌氧氧化过程脱氮的报道则更加稀少^[23]。

反硝化过程(Denitrification)是河流氮去除的重要途径,它是指在厌氧条件下,微生物将 NO_3^- 还原成 NO_2^- 或进一步还原成气体(N_2 或 N_2O)的形式扩散至大气中($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2\text{O}, \text{N}_2$),从而实现了地球上从 N_2 到 N_2 的氮循环过程,使初级生产者可利用的氮减少,达到改善水质的目的。反硝化作用的化学反应过程可用下式来表示^[12]:



反硝化作用能把硝酸盐彻底的从自然环境中去除,是公认的去流氮素的最佳途径,是调节局部甚至全球尺度上水和大气质量的关键过程^[5],是被证明了的全球氮循环重要且必不可少的过程^[2]。河流反硝化在氮循环中发挥着必不可少的重要作用。研究认为,由于反硝化的作用,将近一半进入河流的氮在流至海洋的过程中释放至大气^[5],河流、湖泊和地下水总反硝化量占全球总反硝化量的 20%^[27]。当然,河流脱氮不仅仅只通过反硝化作用,但仅有的一些研究结果显示,反硝化过程对脱氮的贡献要显著高于厌氧氨氧化过程对脱氮的贡献^[2,27-28]。例如:长江口表层沉积物反硝化脱氮量占总脱氮量的 77%~95%,高于厌氧氨氧化脱氮量^[29];对阿拉伯海的研究也表明,反硝化产生的氮气占总脱氮量的 87%~99%^[28]。

在反硝化产物组成方面,除了反硝化的最终产物氮气以外,氧化亚氮是反硝化过程一个重要的副产物,由于氧化亚氮是一种强力温室气体,河流反硝化过程产生的氧化亚氮也受到广泛关注,但反硝化过程产生的氧化亚氮和氮气的质量比仍然不十分确定。一般情况下,这一比例变化范围为 0.04%~5.6%^[30],而 Weier 等^[31]的研究估算为 5%左右,Yan 等^[32]对长江反硝化和氧化亚氮释放的研究显示这一比例的范围为 0.51%~1.12%。可见对于河流反硝化的研究,有助于理解哪些影响因子控制反硝化的产物组成,以利于增加反硝化

最终产物氮气的释放,减少温室气体氧化亚氮的释放,从而加强对河流氧化亚氮排放的管理。

3 河流反硝化速率及时空差异性

不同尺度河流生态系统反硝化过程的研究,对弄清楚河流作为氮汇的大小以及全球氮汇的精确计算等至关重要。河流反硝化的空间差异性表现在:不同类型的河流、同一河流不同河段以及同一河段不同位置反硝化速率均不相同。

相对于海洋和湖泊等水体,河流反硝化速率的空间差异性最大^[9,33-34]。不同土地利用类型的河流反硝化速率差异较大,如美国中西部地区的一些农业河流如 Sangamon 河、Embarras 河、卡斯卡斯基亚河的沉积物反硝化速率分别为 969、970、1069 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ^[35],美国城镇河流南普拉特河沉积物反硝化速率高达 4821 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ^[36]。Mulholland 等^[3]研究并比较了 8 个区域的 72 条河流,结果显示农业河流和城镇河流的反硝化速率要比其他植被类型的河流高。表 1 总结了全球一些河流的反硝化速率。

除了不同类型河流反硝化存在空间差异外,河流反硝化的空间差异性还可能表现在同一条河流的不同河段,如太湖流域江苏和上海境内主要河流沉积物的反硝化作用差异性显著 (0~168 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, 25 $^{\circ}\text{C}$)^[37];但新英格兰 Providence River 河口底泥反硝化速率在空间上并不存在显著差异^[38]。另外,反硝化在同一条河段不同位置也存在着差异。河流发生反

硝化场所包括河流水体和沉积物,除了一些较大的河流外,河流沉积物是反硝化发生的主要场所。这主要是由于河底沉积物中的有机底物以及微生物的含量是上层水体含量的数倍,且在沉积物中的停留时间要远远长于在上覆水体中的停留时间^[27,39-40]。一般来讲,对于同一段河流,沉积物中反硝化速率要高于上覆水体的反硝化率,且目前对反硝化的研究也大部分集中在沉积物中。

河流反硝化不仅存在空间上的差异性,而且在时间上也存在着变化。时间差异性包括年际变化和年季变化。年季变化指季节变化,这是世界上大多数河流反硝化均具有的特征,且大部分河流在夏季反硝化速率达到全年的最大值^[9],如美国南普拉特河反硝化速率波动范围为 0~9.17 $\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$,4 月到 8 月水体反硝化速率最高,冬季河流反硝化速率全年最低^[36]。图 2 是全球尺度上河流反硝化速率的季节变化,可以看出河流大部分在 6、7 两个月内,反硝化速率达到最大值。近几十年间,河流反硝化速率是否增大,人为活化氮素的增加是否是河流反硝化速率增大的原因,也是近期国内外学者研究的热点问题,但由于目前测定方法的局限性,关于河流反硝化速率长时间序列的研究报道多采用模型法进行估算,且这方面的报道也比较少。Boyacioglu 等^[41]运用 WASP5 模型(Water Quality Analysis Simulation Program)对萨勒河的四级支流 Weisse Elster 河的反硝化速率进行预测,得出该河流在 2050—2054 年期间的反硝化速率高于 1995—

表 1 国内外不同河流反硝化速率

Table 1 Denitrification rates in different rivers in the world

河流名称	反硝化速率/ $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$	采样位置	采用时间	测定方法	参考文献
密西西比河上游支流	0~4400	沉积物	1999—2001	^{15}N 同位素配对技术 N ₂ :Ar 比值法	[42]
美国纽斯河河口	0~275	沉积物	1999.09—2000.12	N ₂ :Ar 比值法	[43]
新英格兰 Province River	10~90	沉积物	2005.05, 2006.09	N ₂ :Ar 比值法	[38]
法国加龙河	577	沉积物	1999.06—09	乙炔抑制法	[44]
法国塞纳河河口	11 429	水体	2000.09	^{15}N 同位素配对技术	[45]
美国南普拉特河	方法 1:4821 方法 2:6279	水体	2000.05—2001.08	方法 1:N ₂ :Ar 比值法 方法 2:质量平衡法	[36]
美国卡斯卡斯基亚河	1069	沉积物	2001.06—09	乙炔抑制法	[35]
长江下游—河口	2.82±1.18 5.74±2.92	水体 水体	2003.03 2002.10	N ₂ :Ar 比值法	[46]
长江口	100.3~514.0	沉积物	2006.06	乙炔抑制法	[47]
黄河口	30.3~76.5	沉积物	2006.11	乙炔抑制法	[47]
珠江口	30~840	沉积物		乙炔抑制法	[48]
九龙江河口	-120.8~2 783.0	沉积物	2010.07	N ₂ :Ar 比值法	[49]
九龙江河口	-116.7~2 787.5	沉积物	2010.07—2011.08	N ₂ :Ar 比值法	[27]

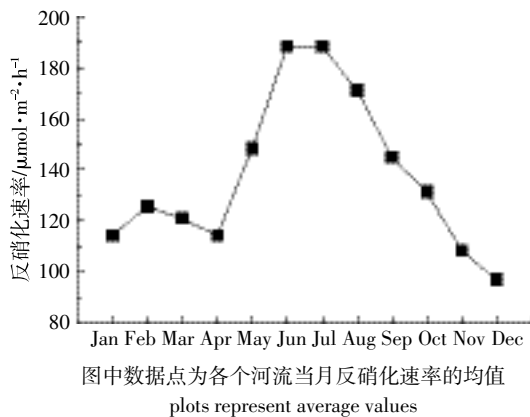


图2 世界河流反硝化速率季节变化汇总图^[9]

Figure 2 Seasonal variation of denitrification rates in rivers in the world

1999年期间的反硝化速率,其中,夏季反硝化速率从 $1012 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ 增至 $1548 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$,冬季反硝化速率从 $476 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ 增至 $804 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$;Fulweiler等^[38]估算出近30年内新英格兰 Providence-River 河口底泥反硝化速率未发生显著变化。

由于反硝化仅仅是技术上初步满足了研究的需要,模型预测还存在很大困难,河流反硝化时空差异性的研究现在依然处于刚刚起步阶段。目前,世界上关于河流反硝化的研究主要集中在 $25\sim 60^\circ\text{N}$ 的北温带,欧洲、美国河流反硝化的报道占绝大部分,亚洲和大洋洲的河流仅有少量报道^[9]。关于时间差异性的研究多半集中在对河流反硝化季节变化性上,由于技术的局限性,长时间序列的研究数据比较缺乏;另外,现有的关于氮循环的研究绝大部分停留在较小的流域尺度上,对大流域尺度乃至全球尺度的研究甚少。

4 河流反硝化的主要影响因素

理解水生生态系统中反硝化过程的控制因素对改善河流氮污染、控制温室气体 N_2O 的释放以及预测环境的变化带来的氮生物地球化学过程的变化都非常重要^[42]。围绕影响河流反硝化的因素,本文主要从化学(例如硝酸盐浓度、DOC浓度、溶解氧含量)、物理(河流水文特征)和生物因素(例如微生物机制)等方面进行综述。

反硝化发生的基本条件是 NO_3^- 、有机碳以及缺氧,故 NO_3^- 、有机碳以及缺氧如何影响反硝化便成为研究目标。通常, NO_3^- 作为反硝化反应的底物是影响反硝化速率的因素之一,也有学者认为 NO_3^- 浓度是反硝化速率的控制因素^[50-51]。Graham等^[51]在研究一条草原河流时发现 NO_3^- 浓度是反硝化速率的控制因素;密

西西比河上游两大支流底泥 NO_3^- 浓度的增加促进了反硝化速率的增加^[42];Mulholland等^[3]研究了美国72条河流,发现随着河流 NO_3^- 浓度的增加,河流通过反硝化去除的氮量也增加,但河流反硝化去除氮的效率(河流通过反硝化去除的氮量占河流氮负荷量的比例)随着硝酸盐浓度的增加反而下降。有机碳在反硝化过程中充当电子供体且为反硝化过程的发生提供能量,故影响着反硝化过程,但也有例外。如美国东北部俄亥俄州的3条河流水体DOC的变化对反硝化速率并没有影响^[52],也有学者发现增加整个河流DOC的含量,反硝化速率并未发生改变^[53];但不同的是,河流底泥有机碳对反硝化速率的影响却非常明显^[33-34]。新英格兰滨海底泥中C:N的时空变化与反硝化速率的时空变化一致,底泥中有机碳的含量越高,反硝化速率越高^[33];卡拉马祖河的9条支流底泥有机碳含量与反硝化速率呈正比^[34];Taylor和Townsend^[54]研究也指出从流域至河口,随着有机碳的有效性的增加,硝酸盐的累积量会相应增加。DO是反硝化的又一影响因素,反硝化必须在缺氧的条件下才能进行。关于硝态氮、有机物、厌氧三者对反硝化的影响,通常情况下,当河流有机污染物增加,微生物会大量增加,降解矿化有机物,同时消耗水中的氧,先是消耗游离态的氧(即DO),其次是硝态氮中的氧,然后是硫酸根中的氧,等等。正是因为微生物的作用,所以反硝化过程在夏季高于冬季,污染严重的水域(有机物含量丰富)高于污染轻的水域。如珠江入海河段沉积物中反硝化作用与上覆水中DO的含量密切相关,夏、秋季DO含量低,反硝化速率较高,冬季上覆水中DO值高,反硝化作用几乎消失^[48]。但另一方面,在有硝化-反硝化耦合作用情况下,太低的DO会不利于硝化作用的进行,从而反过来影响反硝化作用的进行^[47]。

硝化作用是影响反硝化过程的重要因素。当水体中 NO_3^- 的含量不足时,硝化作用产生的 NO_3^- 可以为反硝化作用提供反应底物,因此许多水体的硝化和反硝化过程是相互耦合的。在低氧环境中,反硝化过程在高底物浓度和厌氧反应条件下,与硝化反应的耦合性增强,速率也会加快,两者的共同作用可以将河水中的无机氮最终以氮气或氧化亚氮气体的形式排放到大气中。徐继荣等^[48]采用乙炔抑制法对珠江口入海河段的硝化和反硝化作用进行研究,发现由于珠江口底层严重缺氧和严重的氮污染,该流域的硝化和反硝化作用速率较高,且两者存在较好的耦合关系。同位素技术测定Colne河入海口处的硝化和反硝化的结果

显示:耦合反硝化作用在某些河段占全年总反硝化作用的60%^[55]。

河流水文特征是在大尺度上控制河流反硝化氮流失的因素。有研究表明氮流失基本上随着流速、水深或水力滞留时间、水力负荷(单位表面积的水流量)的增加而降低^[2]。水力滞留时间被认为是决定输入氮的反硝化去除率的控制因素之一,并有学者将水体输入氮的年反硝化去除率表示成关于水力滞留时间的函数^[21]:

$$Y=23.4X^{0.204} \quad (R^2=0.56)$$

式中: Y 为输入氮的反硝化去除率,%; X 为水力滞留时间,月。

水力滞留时间越长,输入氮的反硝化去除率越高;相应地,对于同一个河流水系,越靠近下游,河流流量越大,水力滞留时间越短,则输入氮的反硝化去除率越低^[56-58]。水力负荷同样是控制河流氮释放(主要是反硝化)的重要因素之一。经验模型显示在大尺度河流中河流氮流失基本上随着水力负荷(单位表面积的水流量)的增加而降低^[2]。

此外,环境条件也会对反硝化产生影响,如水温、磷含量等。水温对反硝化的影响主要体现在温度的升高能够提高酶的活性,故大部分研究显示反硝化速率与温度呈正相关关系。例如:九龙江河口区溶解 N_2 的净增量与水温极显著正相关^[49];在15~30℃温度范围内,以色列 Kinneret 湖温度每增高10℃反硝化速率增加1.35倍^[59]。但因硝化速率、DO、氮输入量等均随着温度的变化而变化,故单独研究温度对反硝化的影响变得比较困难^[21,59]。磷作为营养元素之一,对反硝化也会产生影响,如当九龙江河口总磷的浓度低于 $0.97 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,水体有较高的反硝化速率^[49],这可能是由于较高的氮磷比有利于反硝化细菌新陈代谢进而促进反硝化进行^[9]。但磷是如何影响反硝化过程的,目前研究人员并不清楚。

随着分子技术(如以PCR为基础的PCR-DGGE、PCR-RFLP、PCR-SSCP和以荧光染色为基础的核酸杂交分析技术等)的发展,人们开始从微生物角度深入了解反硝化过程。反硝化菌群的群落结构对反硝化的影响成为近期反硝化研究的热点,但目前的研究主要集中在土壤生态系统,淡水系统在此方面的研究很少^[51,60]。目前发现的亚硝酸盐还原酶基因组有nir系列基因(如nirS、nirK)、16S rRNA和nosZ等^[50-51],但关于反硝化菌群的群落结构是否会对反硝化反应产生影响说法不一。例如:Knapp等^[60]利用Q-PCR(PCR反应

体系中加入荧光基因)对一条城镇河流中亚硝酸盐还原酶基因nirS和nirK数量的空间分布情况进行定量分析,发现基因nirS和nirK数量的空间差异性会对反硝化速率产生一定的影响;Graham等^[51]在研究一条草原河流反硝化时发现其亚硝酸盐还原酶的丰富度对反硝化效率会产生一定的影响,但反硝化速率的控制因素是 NO_3^- 浓度;Wallenstein等^[61]认为反硝化菌的菌落结构对反硝化速率并不产生影响。也有学者认为由于研究水平及技术条件有限,限制了人们对水生生态系统中“反硝化菌群结构对反硝化速率或者反硝化进行程度的影响”的认识^[62]。

人们对上述因子在特定区域(河流、河口等)对反硝化的影响均做了较为详尽的报道,结果显示不同河段影响反硝化过程的控制因素并不一致。迄今为止,不同河流系统中影响因素对反硝化的作用尚缺乏系统的研究,故探索哪一个或者哪些因素是控制流域乃至全球尺度反硝化过程的关键因子仍然是迫切需要解决的问题。

5 河流反硝化测定技术的发展

由于大气中 N_2 背景值很高,反硝化主要产物 N_2 的准确测定变得非常困难,并且反硝化过程的时空差异性也给反硝化的准确测定带来了很大困难。迄今为止,反硝化的测定方法经历了由原来主要测定 N_2O 的方法为主逐渐发展到目前的以测定 N_2 产生量来估算反硝化速率的过程。目前反硝化的测定方法(表2)主要有乙炔抑制法、 ^{15}N 同位素配对法、氮通量法、 $N_2:\text{Ar}$ 比值法、质量平衡法、化学计量法、模型法等^[20]。

乙炔抑制法是目前应用最为广泛的反硝化测定方法,该方法在陆地生态系统和水生生态系统均得到了广泛的应用和发展^[47,63-65]。乙炔抑制法不仅操作简单快捷、成本低,而且可以同时进行大批样品的同时测定。但该方法抑制了硝化作用,当 NO_3^- 成为反硝化的限制因子时,将低估反硝化损失量,从而影响测定结果的准确度。此外还存在一些其他问题,如在水生生态系统中硫化物的干扰和低浓度的 NO_3^- 会削弱乙炔的抑制效果,造成反硝化速率测定的不准确^[66-67]。最近还有研究表明,高浓度的乙炔($>0.1 \text{ Pa}$)会促进 NO 的氧化和分解,从而造成反硝化速率的低估^[68]。虽然乙炔抑制法存在诸多缺点,但由于它可以进行大批量样品的同时测定,特别适用于数据需求量大的研究,故该方法仍被沿用^[65]。

^{15}N 同位素配对技术因具有较高的灵敏度,而得

到了广泛的应用^[3,20,42]。在水生生态系统的应用中,¹⁵N同位素配对技术是将¹⁵NO₃加入到沉积物上覆水中,加入的¹⁵NO₃与上覆水中¹⁴NO₃混合后,经过沉积物的硝化反硝化作用产生²⁸N₂、²⁹N₂、³⁰N₂,从而可通过测定这些产物,区分反硝化作用所需的硝酸盐来自于沉积物的耦合硝化-反硝化(Coupled Nitrification denitrification, Dn)和反硝化作用所需的硝酸盐来自于上覆水的非耦合硝化-反硝化(Uncoupled Nitrification-denitrification, Dw)过程^[20]。此外,河流脱氮生成的N₂可能是由反硝化和厌氧氨氧化共同产生的,¹⁵N同位素技术可以分别计算反硝化和厌氧氨氧化等作用在脱氮过程中的贡献率^[30,69]。例如:Schubert等^[70]利用¹⁵N同位素技术发现坦噶尼喀淡水湖底层水柱中反硝化脱氮占总脱氮量的87%~91%;李勇^[29]利用¹⁵N同位素技术测得长江口表层沉积物反硝化脱氮量占总脱氮量的77%~95%,厌氧氨氧化脱氮量占5%~23%。¹⁵N同位素法是建立在假定加入到系统中的¹⁵N能够和系统中¹⁵N快速均匀混合的基础上的,而水生生态系统较为复杂,水生植物、底泥物质等的干扰对¹⁵N同位素配对技术的应用带来挑战。除了沉积物之外,生物膜、附着生物、腐殖质几乎都能在短时间内成为反硝化的高发区,这就使得加入的¹⁵N难以实现短时间内的均匀混合。因此,在许多诸如小的溪流、湿地、滨海等生态系统中,¹⁵N配对技术可能不如传统的乙炔抑制法更为适用^[20]。另外,¹⁵N配对技术在氮负荷低的河流中会高估反硝化速率^[69],且对于大流域尺度的反硝化研究,¹⁵N配对技术费用昂贵,实际操作起来也不可行。

基于膜质谱仪(MIMS)开展的N₂:Ar比值法被认为是目前最具应用潜力的水体反硝化直接测定技

术^[71-72]。该方法主要分为两大类,即密闭实验法测定N₂通量和开放系统测定环境中N₂:Ar比值。密闭实验测定N₂通量法主要应用于沉积物反硝化的测定^[74-75];开放式N₂:Ar比值法主要应用于流动河流水体反硝化的直接测定^[75-76],开放式N₂:Ar比值法建立的基础是流动水体中N₂浓度的测定。两种方法均是通过利用膜进样质谱仪(MIMS)法测定样品中N₂:Ar比值的增量来定量反硝化产生的净氮增量Δ[N₂],计算公式如下:

$$\Delta[\text{N}_2] = [\text{N}_2]/[\text{Ar}] \times [\text{Ar}]^* - [\text{N}_2]^*$$

式中:[N₂]/[Ar]为经质谱仪校准过的水样中N₂:Ar比值;[Ar]^{*}、[N₂]^{*}为特定温度下Ar、N₂的理论平衡浓度。

因为MIMS法对N₂:Ar比值的测定精度很高(检测限为0.03%),而且Ar是惰性气体,性质非常稳定,所以这种方法具有很高的时间分辨率,测量速度快(<2 min),进样量小(<7 mL),操作简单,对于短期内水体反硝化速率的测定具有一定的优势。但由于水气界面氮气的扩散通量的计算要受制于扩散系数的精确测定,通常情况下,河流的水深、水的流速、风速等因素都会显著影响扩散系数,从而影响扩散通量的精确计算,故N₂:Ar比值法的适宜性仍然需要进一步的研究^[77]。

由于反硝化在时空尺度上存在很大的差异性,且实验室和现场测定方法的诸多局限性及数据的有限性,模型法便成为大时空尺度上理解反硝化过程及控制因素的重要方法。迄今为止,反硝化的所有模型均估算出反硝化是大尺度氮循环中重要和必不可少的组成部分,有的模型推测出河流氮流失基本上随着流速、水深或水力滞留时间、水力负荷(单位面积的水流量)的增加而降低^[2]。目前河流反硝化模型有经验回归模型和水质模型等。一类经验回归模型是将水体中反硝化氮流失描述成一个关于氮浓度的函数,如氮浓度

表2 各种反硝化测定方法的原理及特点

Table 2 Principles and characteristics of different methods for measuring denitrification

方法	原理	优点	缺点	参考文献
乙炔抑制法	利用乙炔抑制N ₂ O向N ₂ 转化,将反硝化产物控制为N ₂ O,测定N ₂ O的产量来推算反硝化速率	操作简便快捷、成本低,能批量测定样品,可以同时测定硝化-反硝化	低估了反硝化速率	[44]
¹⁵ N同位素技术	见文中	快捷简便,能同时区分耦合和非耦合硝化-反硝化	成本高;氮负荷低的水生生态系统中误差较大	[3, 42]
N ₂ :Ar比测量法	见文中	精度高、进样量少、测定速度快、时间分辨率高等		[75]
N ₂ 通量法	密闭的培养器皿中对沉积物进行长时间恒温的培养,根据生成的N ₂ 计算沉积物反硝化速率的方法	不需要任何的抑制剂、测得的反硝化速率包括了硝化和反硝化的耦合作用,比较接近真实值	测定沉积物反硝化误差较大	[20]
质量平衡法	根据系统中氮素输入和输出量的差值来估测反硝化损失	能较好的估测大尺度的陆地生态系统或水体生态系统中	测量结果的可信度低	[82]
化学计量法	有机碳的元素组成固定,通过其他元素通量的准确变化来计算氮素的变化	能较好的估测大尺度的陆地生态系统或水体生态系统中	测定结果误差较大,特别是淡水系统	[83]

随着反应时间的增加而呈指数降低,表达式如下^[2]:

$$C_{\text{min}}^{\text{N}} = C_{\text{min}}^{\text{N}} \exp(-k_c \text{TR})$$

式中: $C_{\text{min}}^{\text{N}}$ 是河流上游氮初始浓度; $C_{\text{min}}^{\text{N}}$ 河流下游氮最终浓度;TR溶质平均输送时间; $-k_c$ 反应速率系数。

模型反映出氮流失在很大程度上与河流深度有关(河流深度影响TR),但模型忽略了河流沿途氮的输入。许多学者在此模型基础上进行了改进,将河流沿途氮的输入都假定在河长一半处输入^[78]。另外一类氮的经验回归模型是将氮去除率描述成一个关于河底沉积物的输送模型。表达式如下^[2]:

$$C_{\text{min}}^{\text{N}} = C_{\text{min}}^{\text{N}} \exp[-v(\text{TR}/d)]$$

式中: v 表示传质系数; d 表示河流平均水深;其他符号意义同上。

这种指数形式的表达式被应用到许多反硝化模型中。传质系数经常被用于比较不同尺度河流反硝化速率^[13,79-80]。传质系数大体上能真实地描述非水文因素对氮去除的影响,如沉积物颗粒的大小、有机碳、DO和微生物丰富度等^[81]。Seitzinger等^[16]运用经验模型“RivR-N模型”估算得出美国部分河流的整个河网系统反硝化除氮效率,得到反硝化除氮占河流输入总氮的37%~76%,其中50%去除的氮是由占河网总长度90%的1st~4th支流完成的,另外50%是由仅占河网总长度10%的5th以上的支流完成的,在整个河网系统中,水库对氮去除率的影响很小,且流域输入氮的去除率(37%~76%)要高于流域氮的输入率(<20%)。

除了经验回归模型之外,水质模型也是常用的模型之一,如SPARROW水质经验模型,其表达式如下^[2]:

$$N_i^{\text{N}} = N_j^{\text{N}} \exp(-\theta_k^i \text{TR}_k^i)$$

式中: N_i^{N} 表示河段*i*出口处的氮通量; N_j^{N} 表示由河段*j*输入的氮通量; k 表示河流等级(由河深来划分), θ_k^i 为依赖河流大小的反应速率常数。

SPARROW水质经验模型涵盖了88%~96%的河流沿途氮的输入,对某一河段来讲该模型估算的误差范围为20%~55%。相比于传统的经验回归模型,SPARROW水质经验模型显著提高了估算的精度。Boyacioglu等^[41]运用水质模型预测出萨勒河的支流Weisse Elster河在2050—2054年的反硝化速率明显高于1995—1999年期间的反硝化速率。

但无论是经验回归模型还是水质模型,均没有涵盖微生物动力学,因而目前的模型只是对反硝化发生的环境条件进行拟合,利用现场和实验室测定的数据进行矫正。由于反硝化的时空差异性,现场和实验室测定技术以及质量平衡等方法的局限性,使

得河流反硝化的研究长久以来仅仅局限在河源、河口以及某些小的支流上。研究数据的匮乏,再加上研究者所用测定方法各异,更削弱了可用数据的量,给水体反硝化模型的建立和应用带来了很大的不确定性。因此,未来反硝化模型应该在现场测定技术改进及数据量丰富度增加的基础上,逐步改进模型结构、提高模型的精确度。

质量平衡法和化学计量法一般应用在大尺度的陆地生态系统或水体生态系统中,但计算结果误差较大^[82-83]。氮通量法测定结果比较接近真实值,但在测定沉积物中反硝化速率时误差较大^[20]。

虽然运用测定 N_2O 的方法研究反硝化仍然是目前的主流,但随着近期 ^{15}N 同位法、 $\text{N}_2:\text{Ar}$ 比值法逐渐被应用在海洋沉积物、河口反硝化研究上,使得人们对反硝化的认识有了进一步发展。但另一方面,不同研究的反硝化测定技术不同,使得各个研究数据的对比变差,数据也无法实现积累,从而阻碍了人们对河流反硝化的认识。 $\text{N}_2:\text{Ar}$ 比测量法在测定水生生态系统中具有快速、准确、进样量少等优点,今后可以考虑把这种方法加以改进,并结合 ^{15}N 同位素技术广泛应用于较大尺度的河流生态系统反硝化过程的研究中。此外,逐步改进模型结构对于大尺度生态系统反硝化的研究是今后研究发展的一个趋势。

6 我国河流反硝化的研究进展

国内关于河流反硝化的报道多集中于主要河流的河口区域,对较小溪流及整个流域的报道鲜见(见表1)。例如:Yan等^[46]较早即运用 $\text{N}_2:\text{Ar}$ 比值法测定长江反硝化率,发现夏秋季长江反硝化率为 $(5.74 \pm 2.92) \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ 左右,显著高于冬春季的反硝化率 $(2.82 \pm 1.18) \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$;李佳霖^[47]测定黄河口沉积物反硝化速率为 $30.3 \sim 76.5 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$;徐继荣等^[48]利用乙炔抑制法测得珠江口沉积物反硝化速率为 $30 \sim 840 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ 。对反硝化时间差异的研究,我国学者研究结果显示我国主要河流反硝化速率峰值均出现在夏季,在特定河段对反硝化的影响因素大都做了详细的报道:李佳霖^[47]指出长江河口沉积物反硝化速率的决定因素是反硝化菌数量,同时受到盐度、溶解氧和氨氮含量的显著影响,黄河口底泥反硝化速率也受到反硝化菌数量的显著影响;陈能汪等^[49]研究指出影响九龙江河口水体反硝化的重要因子是温度和氮磷等营养盐的浓度。但因缺乏对不同河流水系反硝化影响因素的系统研究,故究竟哪些因素是影响我国河流

水系反硝化的控制因素尚不清楚。我国测定河流反硝化常用的方法是乙炔抑制法^[47-48],对反硝化最终产物 N_2 进行直接测定和分析的还很少^[46]。近年来, $N_2:Ar$ 比值法和 ^{15}N 同位素法等方法才被逐渐应用到河流反硝化的研究之中,例如:晏维金等^[49]在国内首先运用 $N_2:Ar$ 比值法测定长江反硝化率;吴杰忠等^[27]利用 $N_2:Ar$ 比值法研究了九龙江口沉积物反硝化速率为 $-116.7\sim-2787.5\mu mol N\cdot m^{-2}\cdot h^{-1}$;李勇^[29]利用 ^{15}N 同位素技术测得长江口表层沉积物反硝化脱氮量占总脱氮量的77%~95%,厌氧氨氧化脱氮量占5%~23%。另外,由于反硝化研究数据积累量少,且技术方法较国外落后,我国关于河流长时间序列的反硝化研究及反硝化模型报道鲜见。

7 结论与建议

人为活化氮的急剧增加势必导致生态系统氮素的显著上升,河流反硝化过程的研究为解决河流氮污染及全球氮循环失衡问题具有紧迫和现实的意义。目前,反硝化的研究尚处于起步阶段,大流域尺度及全球尺度上河流反硝化的研究、影响机制及测定方法仍然是今后河流氮循环研究的重点和难点。

笔者认为,未来河流氮循环的研究可以从以下几个方向深入开展。

(1)河流氮循环要与其他物理、化学和生物因子相联系,研究反硝化作用的影响因子和发展趋势,其次要从宏观尺度上建立反硝化的模型,在大量测量数据的基础上建立从土壤、河流、近海到远海的反硝化模型体系,从机理上研究反硝化作用与水文特征之间的联系。

(2)河流氮循环和碳、磷等元素的循环是一个有机的整体,它们之间的量化关系及各个元素循环的区域特征等也是今后需要进一步研究和探讨的重点。

(3)分子生物学技术的建立和广泛应用使得将功能微生物与环境效应有机结合成为可能,这对硝化和反硝化作用机制及对氮循环的贡献研究和发展趋势均具有十分重要的意义,但目前这方面的工作还很少,有待研究者的深入探讨。

(4)探索新的途径,寻找新的方法仍然是今后河流氮循环过程研究的重点和难点。

总之,水生生态系统厌氧氨氧化研究的不断拓展和深入,给河流氮循环的研究,特别是河流脱氮机制中对反硝化和厌氧氨氧化作用的研究带来巨大挑战。基于分子技术和微生物基因组的测定技术,结合同位

素分析技术和质谱分析等手段,研究河流的脱氮机制将是一个新的方向和突破。

参考文献:

- [1] Galloway J N, Cowling E B, Seitzinger S P, et al. Reactive nitrogen: Too much of a good thing[J]. *Ambio*, 2002, 31(2): 60-63.
- [2] Boyer E W, Howarth R W, Galloway J N, et al. Riverine nitrogen export from the continents to the coasts[J]. *Global Biogeochemical Cycles*, 2006, 20(1). doi: 10.1029/2005GB002537.
- [3] Mulholland P J, Helton A M, Poole G C, et al. Stream denitrification across biomes and its response to anthropogenic nitrate loading[J]. *Nature*, 2008, 452(7184): 202-205.
- [4] Yan W J, Mayorga E, Li X Y, et al. Increasing anthropogenic nitrogen inputs and riverine DIN exports from the Changjiang River basin under changing human pressures[J]. *Global Biogeochemical Cycles*, 2010, 24(4): 1-15.
- [5] Galloway J N, Aber J D, Erisman J W, et al. The nitrogen cascade[J]. *Bioscience*, 2003, 53(4): 341-356.
- [6] Schlesinger W H, Reckhow K H, Bernhardt E S. Global change: The nitrogen cycle and rivers[J]. *Water Resource Research*, 2006, 42(3): 1-2.
- [7] Martin T L, Kaushik N K, Trevors J T, et al. Review: Denitrification in temperate climate riparian zones[J]. *Water Air Soil Pollution*, 1999, 111: 171-186.
- [8] Galloway J N, Schlesinger W H, Levy H, et al. Nitrogen fixation: Anthropogenic enhancement-environmental response[J]. *Global Biogeochemistry Cycles*, 1995, 9: 235-252.
- [9] Piña-Ochoa E, Álvarez-Cobelas M. Denitrification in aquatic environments: A cross-system analysis[J]. *Biogeochemistry*, 2006, 81: 111-130.
- [10] Trimmer M, Grey J, Heppell C M, et al. River bed carbon and nitrogen cycling: State of play and some new directions[J]. *Science of the Total Environment*, 2012, 434: 143-158.
- [11] 晏维金. 人类活动影响下营养盐向河口/近海的输出和模型研究[J]. *地理研究*, 2006, 25(5): 825-835.
YAN Wei-jin. Summary of human activities on global nutrient export from watersheds to estuaries and coastal. water: Biogeochemical cycles and modeling[J]. *Geographical Research*, 2006, 25(5): 825-835.
- [12] 晏维金, 王蓓, 李新艳, 等. 河流溶存 N_2O 的环境化学过程及其在水-气界面交换过程的研究[J]. *农业环境科学学报*, 2008, 27(1): 1-8.
YAN Wei-jin, WANG Bei, LI Xin-yan, et al. Summary of studies on environmental chemical process of dissolved N_2O in rivers and the exchange flux between water-air interface [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2008, 27(1): 1-8.
- [13] Peterson B J, Wollheim W M, Mulholland P J, et al. Control of nitrogen export from watersheds by headwater streams[J]. *Science*, 2001, 292, 86-90.
- [14] Bernhardt E S, Likens G E. Dissolved organic carbon enrichment alters nitrogen dynamics in a forest stream[J]. *Ecology*, 2002, 83: 1689-1700.
- [15] Alexander R B, Smith R A, Schwarz G E. Effect of stream channel size on the delivery of nitrogen to the Gulf of Mexico[J]. *Nature*, 2000, 403: 758-761.
- [16] Seitzinger S P, Styles R V, Boyer E W, et al. Nitrogen retention in

- rivers; Model development and application to watersheds in the north-eastern U. S. A[J]. *Biogeochemistry*, 2002, 57/58: 199–237.
- [17] Kulkarni M V, Groffman P M, Yavitt J B. Solving the global nitrogen problem: It's a gas! [J]. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2008, 6: 199–206.
- [18] Tilman D, Fargione J, Wolff B, et al. Forecasting agriculturally driven global environmental change[J]. *Science*, 2001, 292: 281–284.
- [19] Reckhow K, Band L E, Duffy C, et al. Designing hydrologic observatories: A paper prototype of the Neuse watershed[R]. Consortium of Univ. for the Adv. of Hydrol. Sci., Inc. Tech Rep, Washington, D. C: 2004.
- [20] Groffman P, Altabet M A, Böhlke J K, et al. Methods for measuring denitrification: Diverse approaches to a difficult problem[J]. *Ecological Applications*, 2006, 16(6): 2091–2122.
- [21] Seitzinger S, Harrison J A, Böhlke J K, et al. Denitrification across landscapes and waterscapes: A synthesis[J]. *Ecol Appl*, 2006, 16: 2064–2090.
- [22] Ettwig K F, Butler M K, Le Paslier D, et al. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria[J]. *Nature*, 2010, 464: 543–548.
- [23] Zhu G B, Jetten M S M, Kusch P, et al. Potential roles of anaerobic ammonium and methane oxidation in the nitrogen cycle of wetland ecosystems[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(4): 1043–1055.
- [24] Jetten M S M, Logemann S, Muyzer G, et al. Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1997, 71(1–2): 75–93.
- [25] Zhu G B, Wang S Y, Wang W D, et al. Hotspots of anaerobic ammonium oxidation at land–freshwater interfaces[J]. *Nature Geoscience*, 2013, 6: 103–107.
- [26] Dalsgaard T, Thamdrup B, Caneld D E. Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in the marine environment[J]. *Res Microbiol*, 2005, 156: 457–464.
- [27] Wu J Z, Chen N W, Hong H S, et al. Direct measurement of dissolved N_2 and denitrification along a subtropical river–estuary gradient[J]. *China Marine Pollution Bulletin*, 2013, 66: 125–134.
- [28] Ward B B, Devol A H, Rich J J, et al. Denitrification as the dominant nitrogen loss process in the Arabian Sea[J]. *Nature*, 2009, 461: 78–82.
- [29] 李 勇. 长江口潮滩环境下厌氧氨氧化(Anammox)过程及形成机制研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2011.
LI Yong. Distribution and formation mechanism of anammox in intertidal sediments of the Yangtze Estuary [D]. Shanghai: East China Normal University, 2011.
- [30] Beaulieu J J, Jennifer L T, Stephen K H, et al. Nitrous oxide emission from denitrification in stream and river networks[J]. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 2010, 108(1): 214–219.
- [31] Weier K L, Doran J W, Power J F, et al. Denitrification and dinitrogen / nitrous oxide ratio as affected by soil water, available carbon, and nitrate[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1993, 57: 55–73.
- [32] Yan W J, Yang L B, Wang F, et al. Riverine N_2O concentrations, exports to estuary and emissions to atmosphere from the Changjiang River in response to increasing nitrogen loads [J]. *Global Biogeochem. Cycles*, 2012, 26(4). doi: 10. 1029/2010GB003984.
- [33] Heiss E M, Fields L, Fulweiler R W. Directly measured net denitrification rates in offshore New England sediments[J]. *Continental Shelf Research*, 2012, 45: 78–86.
- [34] Inwood S E, Tank J L, Bernot M J. Factors controlling sediment denitrification in midwestern streams of varying land use[J]. *Microbial Ecology*, 2007, 53: 247–258.
- [35] Royer T V, Tank J L, David M B. Transport and fate of nitrate in headwater agricultural streams in IL Linois[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2004, 33: 1296–1304.
- [36] Pribyl A L, Mccuthhan J, Lenal W M, et al. Whole-system estimation of denitrification in a plains river: A comparison of two methods[J]. *Biogeochemistry*, 2005, 73: 439–455.
- [37] 张 波, 杜应旸, 陈宇炜, 等. 太湖流域典型河流沉积物的反硝化作用[J]. *环境科学学报*, 2012, 32(8): 1866–1873.
ZHANG Bo, DU Ying-yang, CHEN Yu-wei, et al. Denitrification in sediments of typical rivers in Taihu Basin[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2012, 32(8): 1866–1873 .
- [38] Fulweiler R W, Nixon S W. Net sediment N_2 fluxes in a southern New England estuary: Variations in space and time[J]. *Biogeochemistry*, 2012, 111: 111–124.
- [39] Fellows C S, Clapcott J E, Udy J W, et al. Benthic metabolism as an indicator of stream ecosystem health[J]. *Hydrobiologia*, 2006, 572: 71–87.
- [40] Findlay S. Importance of surface–subsurface exchange in stream ecosystems: The hyporheic zone[J]. *Limnol Oceanogr*, 1995, 40: 159–164.
- [41] Boyacioglu H, Vetter T, Krysanova V, et al. Modeling the impacts of climate change on nitrogen retention in a 4th order stream[J]. *Climate Change*, 2012, 113: 981–999.
- [42] Smith L K, Voyter M A, Böhlke J K, et al. Denitrification in nitrate-rich streams: Application of $N_2:Ar$ and ^{15}N -tracer methods in intact cores[J]. *Ecological Applications*, 2006, 16(6): 2191–2207.
- [43] Fear J M, Thompson S P, Gallo T E, et al. Denitrification rates measured along a salinity gradient in the eutrophic Neuse River estuary[J]. *North Carolina, USA. Estuaries*, 2005, 28(4): 608–619.
- [44] Teissier S, Torre M. Simultaneous assessment of nitrification and denitrification on freshwater epilithic biofilms by acetylene block method[J]. *Water Resource*, 2002, 36: 3803–3811.
- [45] Sebilo M, Billen G, Mayer B, et al. Assessing nitrification and denitrification in the seine river and estuary using chemical and isotopic techniques[J]. *Ecosystems*, 2006, 9(4): 564–577.
- [46] Yan W J, Laursen A E, Wang , et al. Measurement of denitrification in the Changjiang River[J]. *Environmental Chemistry*, 2004, 1: 95–98.
- [47] 李佳霖. 典型河口区沉积物的硝化和反硝化过程[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.
LI Jia-lin. Nitrification and denitrification processes in sediment of typical estuarine sea area[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2009.
- [48] 徐继荣, 王友绍, 殷建平, 等. 珠江口入海河段 DIN 形态转化与硝化和反硝化作用[J]. *环境科学学报*, 2005, 25(5): 686–692.
XU Ji-rong, WANG You-shao, YIN Jian-ping, et al. Transformation of dissolved inorganic nitrogen species and nitrification and denitrification processes in the near sea section of Zhujiang river[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2005, 25(5): 686–692.
- [49] 陈能汪, 吴杰忠, 洪华生. 九龙江河口区夏季反硝化作用初探[J]. *环境科学*, 2011, 32(11): 3229–3234.
CHEN Neng-wang, WU Jie-zhong, HONG Hua-sheng. Preliminary results concerning summer-time denitrification in the Jiulong River estuary

- ary[J]. *Environmental Science*, 2011, 32(11):3229–3234.
- [50] Baxter A M, Johnson L, Royer T, et al. Spatial differences in denitrification and bacterial community structure of streams; Relationships with environmental conditions[J]. *Aquatic Sciences*, 2013, 75:275–284.
- [51] Graham D W, Trippett C, Dodds W K, et al. Correlations between *in situ* denitrification activity and *nir*-gene abundances in pristine and impacted prairie streams[J]. *Environmental Pollution*, 2010, 158:3225–3229.
- [52] Herrman K S, Bouchard V, Moore R H. Factors affecting denitrification in agricultural headwater streams in Northeast Ohio, USA[J]. *Hydrobiologia*, 2008, 598:305–314.
- [53] Bernhardt E S, Likens G E. DOC enrichment alters nitrogen dynamics in a forest stream[J]. *Ecology*, 2002, 83:1689–1700.
- [54] Taylor P G, Townsend A R. Stoichiometric control of organic carbon–nitrate relationships from soils to the sea[J]. *Nature*, 2010, 464:1178–1181.
- [55] Dong L F, Thornton D C O, Nedwell D B, et al. Denitrification in sediments of the River Colne estuary, England[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2000, 203:109–122.
- [56] Downing J A, McClain M, Twilley R, et al. The impact of accelerating land–use change on the N–Cycle of tropical aquatic ecosystems: Current conditions and projected changes[J]. *Biogeochemistry*, 1999, 46:109–148.
- [57] Kaushal S S, Groffman P M, Mayer P M, et al. Effects of stream restoration on denitrification in an urbanizing watershed[J]. *Ecology Application*, 2008, 18:789–804.
- [58] Perryman S E, Rees G N, Walsh C J, et al. Urban stormwater runoff drives denitrifying community composition through changes in sediment texture and carbon content[J]. *Microbiology of Aquatic Systems*, 2011, 61:932–940.
- [59] Cavari B Z, Phelps G. Denitrification in Lake Kinneret in the presence of oxygen[J]. *Freshwater Biology*, 1977, 7(4):385–391.
- [60] Knapp C W, Dodds W K, Wilson K C, et al. Spatial heterogeneity of denitrification genes in a highly homogenous urban stream[J]. *Environmental Science Technology*, 2009, 43:4273–4279.
- [61] Wallenstein M D, Myrold D D, Firestone M, et al. Environmental controls on denitrifying communities and denitrification rates: Insights from molecular methods[J]. *Ecology Application*, 2006, 16:2143–2152.
- [62] Perryman S E, Rees G N, Walsh C J. Analysis of denitrifying communities in streams from an urban and non–urban catchment[J]. *Aquatic Ecology*, 2008, 49:95–101.
- [63] Tiedje J M, Sextone A J, Myrold D D, et al. Denitrification: Ecological niches, competition and survival[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1982, 48:569–583.
- [64] Nieder R, Schollmayer G, Richter J. Denitrification in the rooting zone of cropped soils with regard to methodology and climate: A review[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1989, 8:219–226.
- [65] Groffman P M, Holland E, Myrold D D, et al. Denitrification [M]// Robertson G P, Bledsoe C S, Coleman D C. Standard soil methods for long term ecological research: New York, Oxford University Press: 1999: 272–288.
- [66] Rudolph J, Frenzel P, Pfennig N. Acetylene inhibition technique underestimates *in situ* denitrification rates in intact cores of freshwater sediment[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1991, 85:101–106.
- [67] Zhong J C, Fan C X, Liu G F, et al. Seasonal variation of potential denitrification rates of surface sediment from Meiliang Bay, Tailu Lake, China [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2010, 22(7):961–967.
- [68] Bollmann, A, Conrad R. Acetylene blockage technique leads to underestimation of denitrification rates in oxic soils due to scavenging of intermediate nitric oxide [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1997, 29:1067–1077.
- [69] Thamdrup B, Dalsgaard T. Production of N₂ through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 2002, 68:1312–1318.
- [70] Schubert C J, Durisch–Kaiser E, Wehrli B, et al. Anaerobic ammonium oxidation in a tropical freshwater system (Lake Tanganyika)[J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(10):1875–1863.
- [71] Kana T M, Darkangelo C, Hunt M D, et al. Membrane inlet mass spectrometer for rapid high–precision determination of N₂, O₂, and Ar in environmental water samples[J]. *Analytical Chemistry*, 1994, 66:4166–4170.
- [72] Seitzinger S, Nixon S, Pilson M E Q, et al. Denitrification and N₂O production in near–shore marine sediments[J]. *Geochim Cosmochim Acta*, 1980, 44:1855–1860.
- [73] Devol A H. Direct measurements of nitrogen gas fluxes from continental shelf sediments[J]. *Nature*, 1991, 349:319–321.
- [74] Cornwell J C, Kemp W M, Kana T M. Denitrification in coastal ecosystems; Environmental controls and aspects of spatial and temporal scale[J]. *Aquatic Ecology*, 1999, 33:41–54.
- [75] McCutchan J H, Saunders J F, Pribyl A L, et al. Open–channel estimation of denitrification[J]. *Limnology and Oceanography: Methods*, 2003, 1:74–81.
- [76] Baulch H M, Venkiteswaran J J, Dillon P J, et al. Revisiting the application of open–channel estimates of denitrification[J]. *Limnology and Oceanography: Methods*, 2010, 8:202–215.
- [77] Laursen A E, Seitzinger S P. Measurement of denitrification in rivers: An integrated, whole reach approach[J]. *Hydrobiologia*, 2002, 485(1–3):67–81.
- [78] Smith R A, Schwarz G E, Alexander R B. Regional interpretation of water–quality monitoring data[J]. *Water Resources Research*, 1997, 33:2781–2798.
- [79] Böhlke J K, Harvey J W, Voytek M A. Reach scale isotope tracer experiment to quantify denitrification and related processes in a nitrate–rich stream, mid–continent USA [J]. *Limnology and Oceanography*, 2004, 49:821–838.
- [80] Kelly C A, Hesslein J W M, Chindler D W, et al. Prediction of biological acid neutralization in lakes[J]. *Biogeochemistry*, 1987, 3:129–140.
- [81] Stream Solute Workshop. Concepts and methods for assessing solute dynamics in stream ecosystems[J]. *Journal of the North American Benthological Society*, 1990, 9:95–119.
- [82] Allison F E. The enigma of soil nitrogen balance sheets[J]. *Advances in Agronomy*, 1955, 7:213–250.
- [83] Sterner R W, Elser J J. Ecological stoichiometry: The biology of elements from molecules to the biosphere[M]. Princeton: Princeton University Press, 2002.