环境科学

ENVIRONMENTAL SCIENCE

ISSN 0250-3301 CODEN HCKHDV

HUANJING KEXUE

■ 主办 中国科学院生态环境研究中心

■ 出版 科学出版社

2020

Vol.41 No.1

第41卷 第1期

环境科学
(HUANJING KEXUE)
ENVIRONMENTAL SCIENCE
第41卷 第1期
2020年1月15日

目 次

Eco-Environmental Knowledge Web
环 境 科 学
Environmental Science
第41卷第1期 2020年1月
Vol.41, No.1 Jan., 2020

宛山荡农田土壤氮迁移过程反硝化与厌氧氨氧化

陈志浩, 覃云斌, 丁帮璟, 胡优优, 陈湜, 李正魁*
(南京大学环境学院,污染控制与资源化研究国家重点实验室,南京 210023)

摘要: 为探究中国南方农田土壤氮迁移过程的反硝化与厌氧氨氧化(anaerobic ammonia oxidation, ANAMMOX)速率变化和脱氮贡献,本研究采集宛山荡麦稻轮作区农田不同层深土壤及农田、沟道、河岸带和湖泊沉积物等不同土地利用类型土壤样品,分析其理化性质,采用 Illumina MiSeq 测序和实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)技术探究土壤样品的微生物群落组成和功能基因丰度,应用同位素培养实验测定各样品的潜在反硝化与厌氧氨氧化速率(以 N_2 计,下同). 结果表明,土壤反硝化速率与 TOC、NH_4^+-N和NO_3^--N含量均显著正相关($P<0.05$),与 *nirS*、*nirK* 及 *nosZ* 等功能基因丰度亦呈显著正相关($P<0.05$). 农田表层土壤反硝化速率为(11.51 ± 1.04) nmol·(g·h)$^{-1}$,显著高于农田其他土壤层以及其他土地利用类型($P<0.05$),而农田土壤中厌氧氨氧化速率在 20~30 cm 层最高,达到(0.48 ± 0.07) nmol·(g·h)$^{-1}$. 此外,反硝化作用是农田表层土壤氮损失的主要原因,占 91.9%~99.7%,而厌氧氨氧化在深层土壤 N_2 的产生过程中占有重要地位.

关键词:氮迁移;同位素示踪;反硝化;厌氧氨氧化(ANAMMOX);脱氮贡献
中图分类号: X172 **文献标识码**: A **文章编号**: 0250-3301(2020)01-0412-08 **DOI**: 10.13227/j.hjkx.201904097

Denitrification and Anaerobic Ammonium Oxidation in Soil Nitrogen Migration Process in a Farmland of Wanshandang Lake

CHEN Zhi-hao, QIN Yun-bin, DING Bang-jing, HU You-you, CHEN Shi, LI Zheng-kui*
(State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210023, China)

Abstract: To explore the rate variation and contribution to N loss of denitrification and anaerobic ammonia oxidation (ANAMMOX) in the nitrogen migration process of farmland soils in southern China, we assess the physicochemical characteristics soil samples of different soil layers from farmland and different land use types (farmland, river channel, riparian zone, and lake sediment) in a wheat-rice rotation area of Wanshandang Lake. Illumina MiSeq sequencing and quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) are used to investigate the microbial community composition and functional gene abundances of the samples. The potential denitrification and ANAMMOX rate (calculated by N_2) of each sample was determined by an isotope culture experiment. It was demonstrated that the potential denitrification rate was significantly positively correlated with TOC, NH_4^+-N, and NO_3^--N ($P<0.05$), and with the abundances of *nirS*, *nirK*, and *nosZ* ($P<0.05$). The denitrification rate of surface soils was (11.51 ± 1.04) nmol·(g·h)$^{-1}$, which was significantly higher than other soil layers and other land use types ($P<0.05$). While the ANAMMOX rate in farmland soils was the highest in the 20-30 cm layer and reached (0.48 ± 0.07) nmol·(g·h)$^{-1}$. In addition, denitrification was the main cause of N loss in surface soils of the studied farmland, accounting for 91.9%-99.7% of overall loss, and ANAMMOX played an important role in the production of N_2 in deep soils.

Key words: nitrogen migration; isotope tracing; denitrification; anaerobic ammonia oxidation (ANAMMOX); contribution to N loss

氮(N)是限制农作物生长和谷物产量的关键营养素之一[1]. 近几十年来,为了农业增产而使用的氮肥越来越多,然而氮肥的过量使用会引起各种环境问题[2],包括水体富营养化和栖息地退化[3,4]等.

现有研究表明,环境中氮素的去除主要是植物吸收、微生物作用、氮素沉积在土壤及水体底泥这 3 条途径[5],微生物脱氮过程可以通过控制氮素的可利用性和排放通量来改变生态系统中的氮循环[6]. 目前研究较多的微生物脱氮反应主要是反硝化和厌氧氨氧化[7],其中,利用 NO_3^- 作为电子受体的反硝化作用已被确定为水生生态系统中氮损失的主要微生物途径[7~9],而厌氧氨氧化也是微生物氮循环中的重要过程,NH_4^+ 在厌氧条件下被 NO_2^- 氧化而生成 N_2[7].

农田是陆地生态系统中最重要的 N 汇之一[4],中国南方太湖流域农田的主要作物是水稻,该地区每年施氮量高达 300 kg·hm^{-2}[10],农田中一部分流失的氮肥通过水分进入深层土壤,而其他一些则随地表径流进入沟道、河岸带、河流和湖泊[11]. 氮肥地表径流损失已被确定为水环境氮污染的主要因素之一[12]. Yang 等[4]的研究表明,在中国南方稻田土壤中,反硝化和厌氧氨氧化贡献了大部分的氮去除. 因此,分析探讨从农田表层土壤到深层土壤以及从

收稿日期: 2019-04-10; **修订日期**: 2019-07-31
基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2017ZX07204-004,2018ZX07208-001)
作者简介: 陈志浩(1995~),男,硕士研究生,主要研究方向为微生物脱氮,E-mail: 2935518658@qq.com
* 通信作者,E-mail: zhkuili@nju.edu.cn

农田到其他土壤环境的这两个氮迁移过程中氮的不同途径去除情况，对于控制农田生态系统中氮污染以及增加人们对土壤氮循环的认识具有重要意义. 然而，目前关于氮素在农田生态系统中水平和竖直这两个迁移方向上的去除路径及脱氮贡献方面的研究还不多见.

本研究中，为探究中国南方农田土壤氮迁移过程的反硝化与厌氧氨氧化速率变化和脱氮贡献，选取太湖流域宛山荡麦稻轮作区作为研究区域，使用^{15}N示踪技术测量并比较农田不同层深土壤及不同土地利用类型（农田、沟道、湖泊河岸带和湖泊沉积物）表层土壤中的潜在反硝化和厌氧氨氧化速率，并评估它们对N_2产生的贡献和变化情况，确定环境变量对脱氮速率的影响，并通过 qPCR 技术从功能基因绝对丰度方面解释脱氮速率的差异，以及通过 MiSeq 测序确定不同土壤中不同微生物相对占比的差异.

1　材料与方法

1.1　研究区域及土壤样品采集

研究区域位于无锡市锡山区宛山荡附近（N31°34′32″～31°36′30″，E120°30′12″～120°32′24″），属太湖流域. 该地区农田实行稻麦轮作，其中水稻生长季节是 6～10 月，小麦季节是 11 月至次年 5 月. 实验采样时间为 2018 年 3 月，采集对象是农田 3 个不同层深土壤、沟道土壤、河岸带土壤以及湖泊沉积物，对于每种类型土壤/沉积物，使用柱状采泥器随机采集 5 个样本，为避免伪重复，它们之间至少相距 500 m，共计 30 个样本，且每个采样点样品是在同一区域采集 3 个样品混合而成，用以代表该处环境. 其中，农田土壤样品分为 0～10 cm 表层土壤、20～30 cm 耕作层和 60～70 cm 无扰动层 3 个土层；沟道、河岸带和湖泊的土壤/沉积物采集深度均为 0～10 cm，代表表层土壤. 采集后，将土壤/沉积物快速放入真空无菌塑料袋中并带回实验室. 去除样品中的杂质和根茎后，将每份样品分为 3 个子样品，分别用于添加同位素培养实验，在 −80℃下干燥以分析土壤/沉积物的理化特征，以及在 −80℃下储存用于微生物分析.

1.2　土壤特征分析

将土样在 105℃下干燥 12 h 以测定其含水率；将已冷冻干燥的样品与去离子水按 1∶2.5（质量浓度）比率混匀后，使用 pH 计测量样品的 pH；用 1 mol·L^{-1} HCl 除去样品中的无机碳后，使用元素分析仪（Elementar Vario MICRO，Germany）测定样品的总有机碳含量（TOC）[13]；使用 2 mol·L^{-1} KCl 浸提样品后，通过连续流分析仪（San + + System，Skalar Analytic，Breda，The Netherlands）测定样品中的NH_4^+-N、NO_2^--N和NO_3^--N含量[14].

1.3　同位素示踪培养

将采集的样品送至实验室后，取每份样品的一个子样品置于棕色玻璃瓶中，加入比例为 1∶2（质量浓度）的缺氧去离子水（通入高纯氦气以去除溶解氧），在室温下进行为期 5 d 的避光预培养. 随后取 20 g 该混匀泥浆加入 150 mL 血清瓶中，并加满缺氧去离子水，然后立即将瓶密封. 本实验分为 3 种处理组添加：① $^{15}NH_4Cl$，②$^{15}NH_4Cl$、$Na^{14}NO_3$ 和③$Na^{15}NO_3$. 最终的 N 添加量（以干土计，下同）为 135 mg·kg^{-1}［相当于 300 kg·(hm^2·a)$^{-1}$的化学氮肥］. 将泥浆在室温下培养 24 h 后，取 1 mL 饱和$ZnCl_2$溶液加入到血清瓶中以终止微生物活动. 从血清瓶中收集 15 mL 水样，并使用膜接口质谱仪（MIMS）分析$^{29}N_2$和$^{30}N_2$浓度，用以计算各样品的潜在反硝化速率与潜在厌氧氨氧化速率[15]，计算公式如下：

$$A_{total} = \frac{P_{29} + 2 \times (1 - F_N^{-1}) \times P_{30}}{F_N}$$

$$D_{total} = P_{30} \times F_N^{-2}$$

式中，A_{total}和D_{total}分别为厌氧氨氧化速率和反硝化速率［nmol·(g·h)$^{-1}$］；F_N 是添加 $Na^{15}NO_3$ 组中$^{15}NO_3^-$占总 NO_3^- 的百分比；P_{29}和 P_{30}分别是添加$Na^{15}NO_3$组中利用膜接口质谱仪测得的$^{29}N_2$ 和$^{30}N_2$ 产率［nmol·(g·h)$^{-1}$］.

1.4　DNA 提取、qPCR 和 Illumina MiSeq 分析

采用 FastDNA Spin Kit（MP，Biomedicals，CA，USA）从 0.5 g 经冷冻干燥的土壤/沉淀物样品中进行细菌 DNA 的提取. 使用 Nanodrop 2000UV-Vis 分光光度计（Thermo Scientific，USA）检测提取 DNA 的浓度和纯度. 为比较各土壤样品中功能基因的绝对丰度，在 ABI 7500 系统（Applied Biosystems，Foster City，CA，USA）中进行反硝化功能基因 *nirS*、*nirK* 和 *nosZ*，厌氧氨氧化功能基因 ANAMMOX bacterial 16S rRNA（*amx*）[16～18]的 qPCR 分析，细菌 16S rRNA 高变区 V4/V5 段扩增的正向引物是 515F（5′-GTGCCAGCMGCCGCGG-3′），反向引物是 907R（5′-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3′）[19]，各功能基因引物信息如表 1 所示；反应体系为：2X *Taq* Plus Master Mix 10 μL，引物 F（5 μmol·L^{-1}）0.8 μL，引物 R（5 μmol·L^{-1}）0.8 μL，模板 DNA 1 μL，ddH_2O 7.4 μL；反应条件为：95℃预变性 5 min，循环 1 次，95℃变性 30 s，退火 30 s（*nirS*、*nirK*、*nosZ* 和 *amx* 退

火温度分别为 50、55、58 和 50℃),循环 35 次,72℃延伸 1 min. 使用纯化后的 PCR 样品在上海美吉生物医药科技有限公司的 Illumina MiSeq 测序平台(Illumina Inc., USA)进行测序,所得到的数据在该公司 I-Sanger 云平台(www. i-sanger. com)分析,去除低质量序列并进行筛分后,选用相似水平为 97% 的 OTU 样本,最终可得到微生物群落组成信息,即不同细菌的相对占比.

表 1 反硝化与厌氧氨氧化功能基因引物

Table 1 Primers for functional genes of denitrification and ANAMMOX

功能基因	引物	引物序列(5′-3′)
nirS	cd3af	GTSAACGTSAAGGARACSGG
	R3cd	GASTTCGGRTGSGTCTTGA
nirK	FlaCu	ATCATGGTSCTGCCGCG
	R3Cu	GCCTCGATCAGRTTRTGGTT
nosZ	nosZF	CGYTGTTCMTCGACAGCCAG
	nosZR	CATGTGCAGNGCRTGGCAGAA
amx	AMX808F	ARCYGTAAACGATGGGCACTAA
	AMX1040R	CAGCCATGCAACACCTGTRATA

1.5 统计分析

本研究中,运用单因素方差分析(one way ANOVA)来确定各项理化性质、脱氮速率及功能基因丰度之间的显著性差异;皮尔逊相关分析(Pearson correlation)用于进一步评价数据之间的相关性;统计学显著性差异水平设置为 $P<0.05$. 采用 Excel 2010、SPSS 17.0 和 Origin 9.0 进行所有的数据分析与绘图.

2 结果与分析

2.1 土壤/沉积物理化性质

实验区域内农田、沟道、河岸带及湖泊的土壤/沉积物样本的基本理化性质测定结果如表 2 所示,不同生境差异性较大. 土壤/沉积物的 pH 范围为 5.44 ~ 7.97,在不同土地利用类型中,只有 0 ~ 10 cm 深的农田和沟道土壤呈弱酸性,土壤 pH 值分别为 5.98 ± 0.11 和 5.89 ± 0.14($n=5$). 沟道、河岸带土壤及湖泊沉积物含水率显著高于 0 ~ 10 cm 深的农田土壤含水率($P<0.05$),农田不同层深土壤含水率无明显差别. 随着深度的增加,农田土壤的 TOC 呈下降趋势($P<0.05$),与 0 ~ 10 cm 层的农田及沟道土壤相比,河岸带和湖泊的 TOC 显著降低($P<0.05$). NH_4^+-N和NO_3^--N的最高含量均出现在 0 ~ 10 cm 深的农田土壤中($P<0.05$). 各采样点NO_2^--N 含量无明显差异. 此外,样品 TOC 与无机氮呈显著正相关(与NH_4^+-N:$r=0.531$,$P=0.003$;与NO_3^--N:$r=0.453$,$P=0.012$).

表 2 土壤/沉积物物理化学性质1)

Table 2 Physicochemical characteristics of study area soils/sediments

项目	pH	含水率/%	TOC/%	NH_4^+-N /mg·kg^{-1}	NO_2^--N /mg·kg^{-1}	NO_3^--N /mg·kg^{-1}
农田 0 ~ 10 cm	5.98 ± 0.11c	20.37 ± 1.14c	1.56 ± 0.07a	17.12 ± 1.53a	0.14 ± 0.01a	2.49 ± 0.15a
农田 20 ~ 30 cm	7.20 ± 0.15b	23.87 ± 0.88c	0.82 ± 0.06b	9.43 ± 0.37cd	0.14 ± 0.01ab	1.47 ± 0.16bc
农田 60 ~ 70 cm	7.34 ± 0.12b	24.12 ± 0.27c	0.44 ± 0.09c	7.11 ± 0.33de	0.14 ± 0.01ab	1.80 ± 0.33b
沟道 0 ~ 10 cm	5.89 ± 0.14c	46.61 ± 3.49a	1.44 ± 0.12a	13.70 ± 1.45b	0.12 ± 0.00b	1.74 ± 0.32b
河岸带 0 ~ 10 cm	7.86 ± 0.04a	32.05 ± 3.98b	0.87 ± 0.17b	6.31 ± 0.58e	0.13 ± 0.00ab	0.93 ± 0.19c
湖泊 0 ~ 10 cm	7.66 ± 0.03a	43.56 ± 0.62a	0.49 ± 0.13c	11.17 ± 0.77bc	0.13 ± 0.00ab	0.81 ± 0.16c

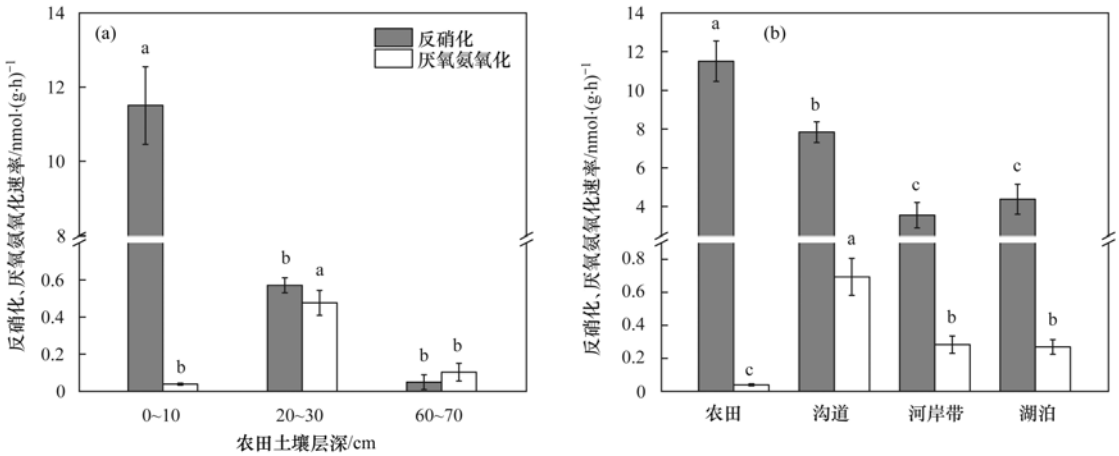
1)不同的小写字母表示在不同样本之间具有显著性差异($P<0.05$);$n=5$

2.2 潜在反硝化与厌氧氨氧化速率

根据 Thamdrup 等[15]的研究,可由$^{30}N_2$ 和$^{29}N_2$ 浓度计算得到各土壤/沉积物样品的潜在反硝化与厌氧氨氧化速率(图 1). 本研究结果表明,在农田各层土壤中,反硝化速率范围为 0 ~ 14.07 nmol·(g·h)$^{-1}$,0 ~ 10 cm 土壤层反硝化速率显著高于其他土壤层($P<0.05$),达到(11.51 ± 1.04) nmol·(g·h)$^{-1}$,而 0 ~ 10 cm 土壤层厌氧氨氧化速率最低,为(0.04 ± 0.01) nmol·(g·h)$^{-1}$, 20 ~ 30 cm 土壤层厌氧氨氧化速率显著高于其他层($P<0.05$),达到(0.48 ± 0.07) nmol·(g·h)$^{-1}$. 各土地利用类型中,与 0 ~ 10 cm 农田土壤相比,沟道、河岸带及湖泊样品的反硝化速率显著降低($P<0.05$),沟道土壤厌氧氨氧化速率显著高于农田 0 ~ 10 cm、河岸带土壤及湖泊沉积物($P<0.05$).

2.3 微生物群落变化

样品的 Illumina MiSeq 测序结果表明,研究区域土壤中反硝化微生物所在的门主要是变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidetes),而厌氧氨氧化微生物存在于浮霉菌门(Planctomycetes). 微生物群落测定结果显示(图 2),农田 0 ~ 10 cm、20 ~ 30 cm、60 ~ 70 cm、沟道、河岸带土壤及湖泊沉积物中反硝化微生物所在门的占比分别为 43.0%、45.0%、43.5%、47.7%、42.9% 和 60.4%,厌氧氨氧化微生物所在的浮霉菌门丰度分别是



(a)土壤剖面不同层深土壤中脱氮速率变化；(b)不同土地利用类型 0 ~ 10 cm 土壤/沉积物中脱氮速率变化；柱状上不同的小写字母表示反硝化/厌氧氨氧化速率在不同采样地之间统计上具有显著性差异($P < 0.05$)

图 1　潜在反硝化与厌氧氨氧化速率

Fig. 1　Potential rate of denitrification and ANAMMOX

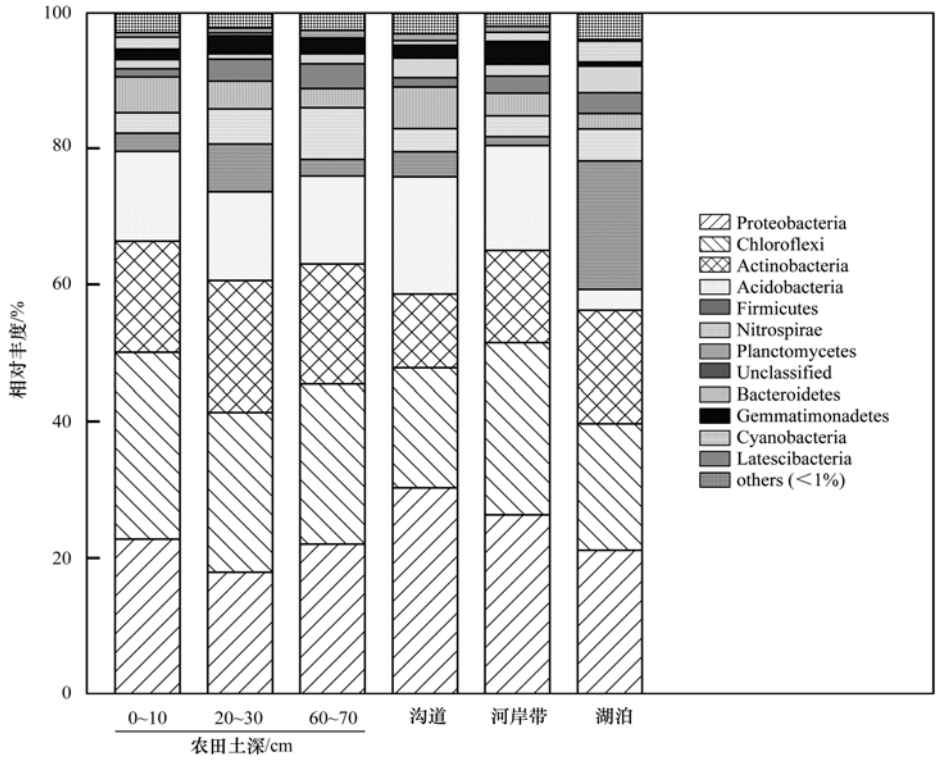


图 2　各采样点微生物门级别相对丰度

Fig. 2　Relative abundance of the phyla identified in different soils

5.3%、4.1%、2.8%、6.1%、3.3% 和 2.3%.

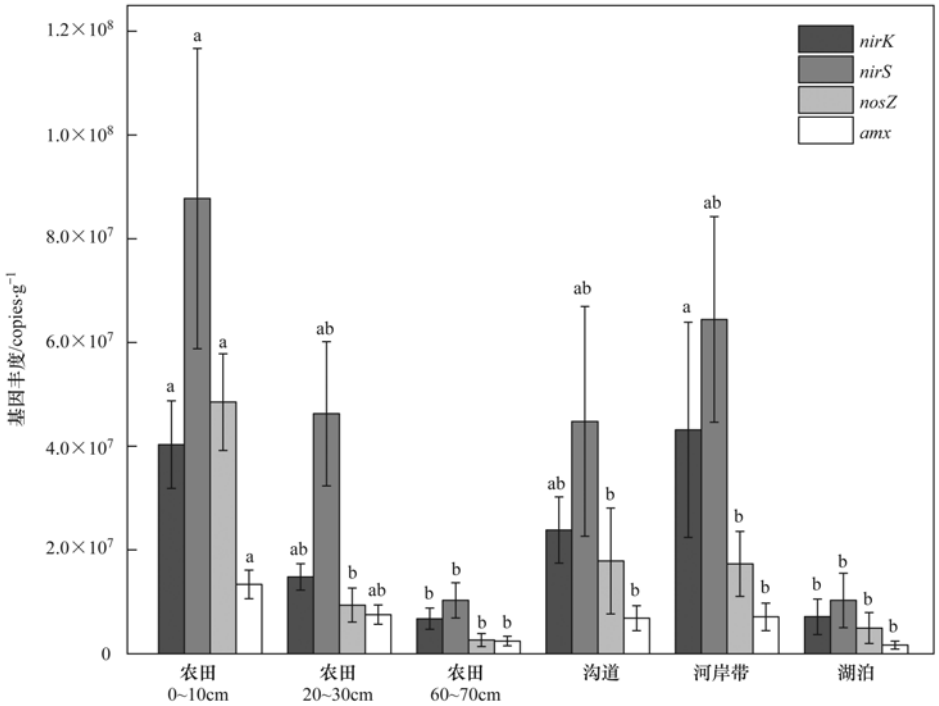
2.4　功能基因绝对丰度变化

各采样点反硝化功能基因(亚硝酸盐还原酶 *nirK*、*nirS* 和氧化亚氮还原酶 *nosZ*)及厌氧氨氧化基因(*amx*)绝对丰度的测定结果如图 3 所示，30 个样品中 *nirK*、*nirS*、*nosZ* 和 *amx* 的丰度范围分别是 $7.5\times10^5 \sim 1.2\times10^8$、$2.3\times10^6 \sim 1.6\times10^8$、$3.2\times10^5 \sim 7.1\times10^7$ 和 $3.1\times10^5 \sim 2.3\times10^7$ copies·g^{-1}. 在农田各层土壤中，0 ~ 10 cm 层的各基因丰度均显著高于其他土壤层($P < 0.05$)；在不同土地利用类型样品中，农田 0 ~ 10 cm 层 *nosZ* 与 *amx* 基因丰度显著高于沟道、河岸带及湖泊($P < 0.05$)；*nirS* 基因丰度比 *nirK* 基因丰度在环境中更高，且反硝化功能基因 *nirS* 和 *nirK* 丰度均显著高于厌氧氨氧化功能基因丰度($P < 0.05$).

3　讨论

3.1　环境因子对反硝化/厌氧氨氧化速率的影响

本研究结果表明(图 4)，土壤样品反硝化速率与 TOC、NH_4^+-N 和 NO_3^--N 呈显著正相关($P <$

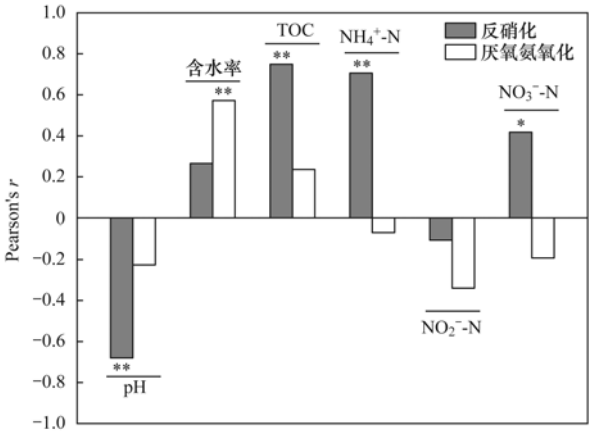


柱状上不同的小写字母表示反硝化/厌氧氨氧化速率在不同采样地之间统计上具有显著性差异($P<0.05$)

图3 各采样点功能基因绝对丰度

Fig. 3 Absolute abundance of the functional genes in different soils

0.05),与前人的研究结果一致[6,20~22],这是由于大部分反硝化菌属于异养菌,异养反硝化菌的世代时间明显低于自养菌,它们需要丰富的有机碳作为电子供体进行反硝化[23];在自然环境中,NH_4^+-N经硝化过程被氧化为NO_3^--N,而NO_3^--N是反硝化过程的底物,故无机氮含量高的环境有利于反硝化的进行.反硝化适宜的 pH 为 7.5,在各采样点中,不同于其他采样点的近中性环境,农田和沟道表层土壤 pH 呈弱酸性(表 2),而这两处反硝化速率又明显高于其他环境,可能受此影响,加之其他环境因子的共同作用,致使统计上表现为反硝化速率与 pH 显著负相关.不同于其他研究[4,7,24],厌氧氨氧化速率与 TOC、NH_4^+-N、NO_3^--N及反硝化速率之间均无显著相关性($P>0.05$),这可能是因为各采样点的厌氧氨氧化速率太低,受到的干扰较大.



*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$,$n=30$

图4 反硝化和厌氧氨氧化速率与环境因子相关性

Fig. 4 Correlations of denitrification and ANAMMOX rate with environmental factors

3.2 反硝化/厌氧氨氧化速率与功能基因相关性

在硝酸盐还原过程中,第二步是亚硝酸盐的还原,*nirS* 和 *nirK* 这两个基因用于编码亚硝酸盐还原酶,而第三步N_2O至 N_2 则需要 *nosZ* 编码的氧化亚氮还原酶来催化[25,26].统计分析结果表明,反硝化速率与 *nirS*、*nirK* 及 *nosZ* 等功能基因的绝对丰度均呈显著正相关(图 5),这与 Ding 等[16]和 Zhi 等[17]的研究结论相符;同时,由于本研究是以 N_2 产生表示反硝化,直接决定这一过程的 *nosZ* 的相关性与显著性($r=0.629$,$P=0.000$)均高于 *nirS*($r=0.367$,$P=0.046$)和 *nirK*($r=0.385$,$P=0.036$);*nirS* 基因比 *nirK* 基因在环境中更为丰富,表示它在亚硝酸盐还原过程中的主导作用,这与前人的研究结论[17,26]相符;反硝化功能基因 *nirS* 和 *nirK* 丰度均明显高于厌氧氨氧化功能基因丰度($P<0.05$),说明大部分环境中反硝化微生物丰度显著高于厌氧氨氧化微生物丰度.这些结果从分子水平上解释了反硝化速率的差异性.然而,厌氧氨氧化速率与 *amx* 之间并无显著相关性[图 5(d)],可能是由于引物覆盖不全和 PCR 扩增偏差,所选的 *amx* 不能全面覆盖厌氧氨氧化微生物的多样性,也有报道称是 mRNA 而不是基

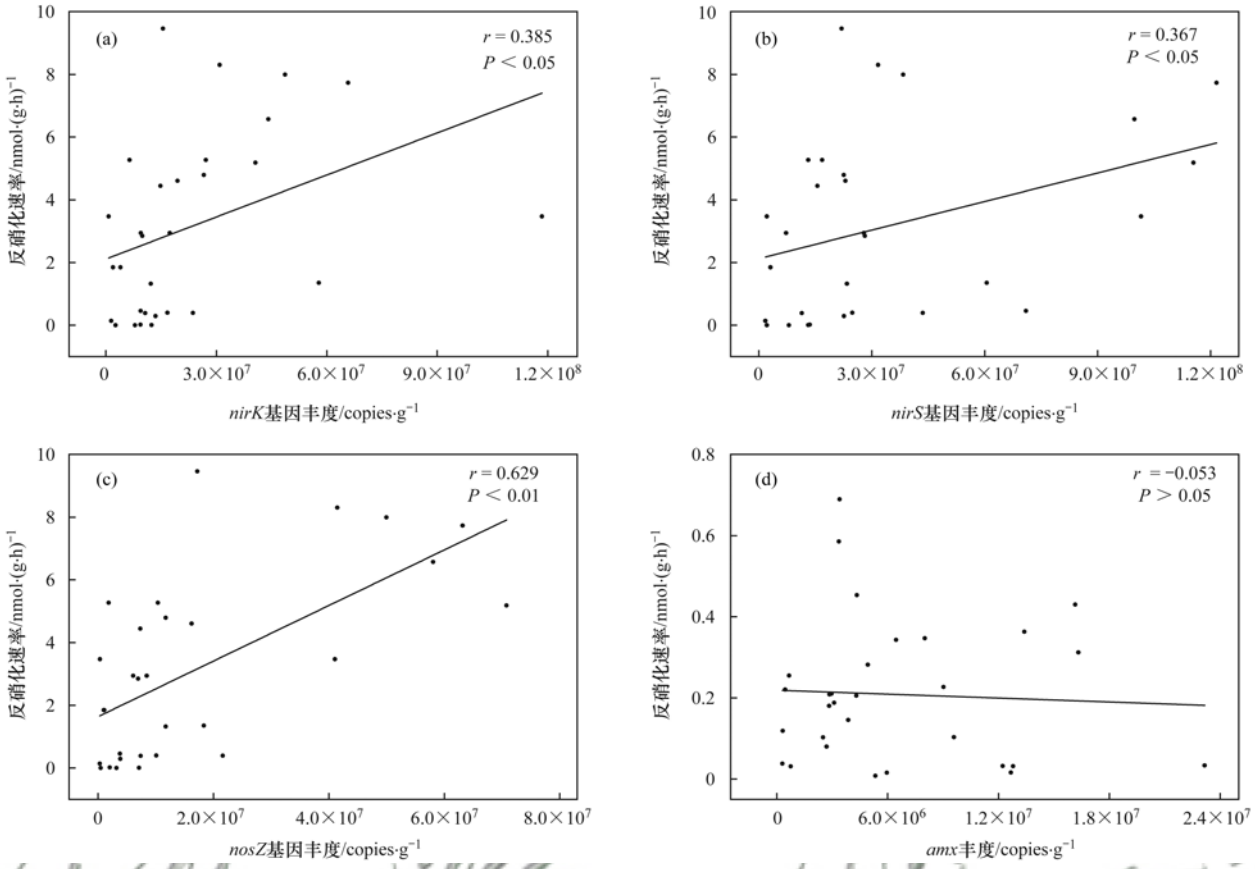


图 5　反硝化和厌氧氨氧化速率与功能基因绝对丰度相关性

Fig. 5　Correlations of denitrification and ANAMMOX rate with absolute abundance of functional genes

因丰度与 N_2 通量密切相关[21]. 值得一提的是,*nosZ* 丰度与 TOC、NH_4^+-N 和 NO_3^--N 含量均呈显著正相关,这可以进一步解释环境因子通过影响功能微生物进而对反硝化速率产生影响.

MiSeq 测序结果表明,反硝化速率及厌氧氨氧化速率与门级别或属级别的微生物群落相对丰度均无显著相关性,这可能受不同土壤层、不同土地利用类型中微生物绝对丰度、多样性及功能微生物活性不同的影响[16, 27].

3.3　氮肥迁移与反硝化/厌氧氨氧化速率变化

本研究结果表明,在氮肥的垂直迁移方向上,即农田各层土壤中,反硝化最为活跃的区域是 0 ~ 10 cm 土壤层(图 1),产生的 N_2 占 3 个土壤层反硝化总量的 94.9%,表明表层土壤反硝化占绝对主导地位,这与 Zhou 等[27]的研究结论一致,且本研究中农田表层土壤最高反硝化速率[14.07 nmol·(g·h)$^{-1}$]与该研究中的稻田表层土壤[13.40 nmol·(g·h)$^{-1}$]相接近. 大部分反硝化菌为异养菌,厌氧氨氧化菌以自养菌为主. 反硝化速率随土壤深度的增加而显著降低($P < 0.05$),这是由于 TOC、NH_4^+-N 和 NO_3^--N 等底物的减少所致(表 2),同时表层土壤功能微生物更为活跃,相关功能基因绝对丰度更高(图 3). 尽管表层土壤中厌氧氨氧化过程可以忽略不计,但它却是深层土壤中 N_2 的重要来源,且 20 ~ 30 cm 层的厌氧氨氧化速率超过 60 ~ 70 cm 层,这种趋势的原因可能是 20 ~ 30 cm 层缺氧环境比较稳定,干扰小于 0 ~ 10 cm 表层土壤,在农业生产中表层土壤经常受到扰动,导致氧气渗透到土壤中,而与 60 ~ 70 cm 层相比, 20 ~ 30 cm 土壤层存有更多的营养物质可以支持厌氧氨氧化过程. 然而,可能受采样季节不同的影响,本研究中农田土壤厌氧氨氧化速率[0.01 ~ 0.67 nmol·(g·h)$^{-1}$]显著低于 Zhu 等[14]研究的嘉兴稻田土壤[0.25 ~ 1.45 nmol·(g·h)$^{-1}$]和 Yang 等[4]研究的中国南方稻田土壤[0.14 ~ 2.63 nmol·(g·h)$^{-1}$].

本研究结果还表明,氮肥在水平方向上随地表径流从农田迁移至湖泊,不同土地利用类型中反硝化速率以农田为最高. 相比于沟道、河岸带和湖泊,农田表层土壤中有更为丰富的 TOC、NH_4^+-N 和 NO_3^--N 等营养物质(表 2)可以支持更高的反硝化微生物活性,这可能是稻田土壤更有利于反硝化的原因,*nirS*、*nirK* 及 *nosZ* 等反硝化功能基因绝对丰度的变化也与此一致(图 3). 沟道土壤中厌氧氨氧化速率最高,这可能是土壤含水率最高而创造的缺氧条件以及丰富的 NH_4^+-N 和 NO_3^--N 长期共存共同作用的结果[28].

3.4 反硝化与厌氧氨氧化脱氮贡献的比较

因为环境因子及功能微生物的分布与活性各不相同,反硝化与厌氧氨氧化对不同土壤层及不同土地利用类型表层土壤中的 N_2 产生有着不同的贡献. 在本研究区域内,农田 0 ~ 10 cm 土壤层中反硝化过程是产生 N_2 的最大贡献者,占该层 N_2 总产量的 99.7%;而在 20 ~ 30 cm 土壤层,厌氧氨氧化对该层 N_2 产生的贡献率与反硝化相接近,达到 45.5%;而当土壤深度为 60 ~ 70 cm 时,虽然厌氧氨氧化与反硝化速率均较低,但厌氧氨氧化过程 N_2 占比达到 67.5%,成为该层 N_2 的最大贡献者,这与 Yang 等[4]、Zhu 等[14]和 Xi 等[29]的研究结论类似. 尽管在表层土壤以下,厌氧氨氧化速率高于反硝化速率,但这些土壤层的 N_2 产生总速率只有表层土壤的 10% 左右,因此,反硝化过程是农田土壤 N_2 产生的主要原因,厌氧氨氧化过程对于深层土壤 N_2 产生具有显著贡献. 对于不同土地利用类型的表层土壤,除农田外,沟道、河岸带土壤及湖泊沉积物等环境中厌氧氨氧化过程对于 N_2 产生的贡献在 5.8% ~ 8.1%,说明在这些环境中反硝化仍然是 N 去除的主要贡献者,而厌氧氨氧化过程也不能忽略. 然而,本研究中厌氧氨氧化对 N_2 产生的贡献显著低于其它生态系统,如海洋沉积物(20% ~ 80%)[15],沉积物岩芯(59%)[30],河口沉积物(17% ~ 77%)[31]等,这可能是由于本研究区域内更高的反硝化活动所致.

值得说明的是,^{15}N 同位素示踪培养实验中,需要添加外源 ^{15}N 底物和预培养以在实验前去除泥浆中所有的本底 NO_2^--N、NO_3^--N 和 O_2,添加过量的 ^{15}N 底物和延长培养改变了微生物群落和不稳定有机碳的可用性,这可能导致高估反硝化和厌氧氨氧化速率[3, 4, 21]. 因此,尽管本研究已经证明了反硝化与厌氧氨氧化在氮素迁移过程中脱氮的重要性,进一步的研究可以建立原位条件以更准确地评估反硝化及厌氧氨氧化在 N 去除方面的贡献.

4 结论

(1)土壤/沉积物反硝化速率与 TOC、NH_4^+-N 和 NO_3^--N 含量均呈显著正相关.

(2)土壤/沉积物反硝化速率与功能基因 *nirS*、*nirK* 及 *nosZ* 的绝对丰度均呈显著正相关.

(3)受 TOC、NH_4^+-N 和 NO_3^--N 等营养物质及功能微生物的功能基因丰度的共同影响,在农田氮迁移竖直方向上,即在农田不同土壤层中,表层土壤反硝化速率最高,达到 $(11.51 \pm 1.04)\ nmol \cdot (g \cdot h)^{-1}$,20 ~ 30 cm 土壤层厌氧氨氧化速率最高;从农田氮迁移水平方向上看,农田表层土壤反硝化速率显著高于沟道、河岸带土壤及湖泊沉积物($P < 0.05$).

(4)在各土地利用类型表层土壤中,反硝化贡献了绝大部分 N_2 的产量(91.9% ~ 99.7%),而厌氧氨氧化对于深层土壤 N_2 的产生具有显著贡献.

参考文献:

[1] Xie Y, Tang L, Han Y L, *et al*. Reduction in nitrogen fertilizer applications by the use of polymer-coated urea: effect on maize yields and environmental impacts of nitrogen losses[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2019, **99**(5): 2259-2266.

[2] Yu C Q, Huang X, Chen H, *et al*. Managing nitrogen to restore water quality in China[J]. Nature, 2019, **567**(7749): 516-520.

[3] Long A, Heitman J, Tobias C, *et al*. Co-occurring anammox, denitrification, and codenitrification in agricultural soils[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, **79**(1): 168-176.

[4] Yang X R, Li H, Nie S A, *et al*. Potential contribution of anammox to nitrogen loss from paddy soils in Southern China[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, **81**(3): 938-947.

[5] 丁帮璟, 李正魁, 朱鸿杰, 等. 河岸带表层土壤的铁氨氧化(Feammox)脱氮机制的探究[J]. 环境科学, 2018, **39**(4): 1833-1839.
Ding B J, Li Z K, Zhu H J, *et al*. Insight into the mechanism of Feammox in the surface soils of a riparian zone[J]. Environmental Science, 2018, **39**(4): 1833-1839.

[6] Cao W Z, Guan Q S, Li Y, *et al*. The contribution of denitrification and anaerobic ammonium oxidation to N_2 production in mangrove sediments in Southeast China[J]. Journal of Soils and Sediments, 2017, **17**(6): 1767-1776.

[7] Kuypers M M M, Marchant H K, Kartal B. The microbial nitrogen-cycling network[J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, **16**(5): 263-276.

[8] Abbas T, Zhou H F, Zhang Q C, *et al*. Anammox co-fungi accompanying denitrifying bacteria are the thieves of the nitrogen cycle in paddy-wheat crop rotated soils[J]. Environment International, 2019, **130**: 104913.

[9] Yu Z J, Deng H G, Wang D Q, *et al*. Nitrous oxide emissions in the Shanghai river network: implications for the effects of urban sewage and IPCC methodology[J]. Global Change Biology, 2013, **19**(10): 2999-3010.

[10] 郭卉, 虞敏达, 何小松, 等. 南方典型农田区浅层地下水污染特征[J]. 环境科学, 2016, **37**(12): 4680-4689.
Guo H, Yu M D, He X S, *et al*. Pollution characteristics analysis in shallow groundwater of typical farmland area, Southern China[J]. Environmental Science, 2016, **37**(12): 4680-4689.

[11] García-Díaz A, Bienes R, Sastre B, *et al*. Nitrogen losses in vineyards under different types of soil groundcover. A field runoff simulator approach in central Spain[J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2017, **236**: 256-267.

[12] Zhang Y F, Liu H J, Guo Z, *et al*. Direct-seeded rice increases nitrogen runoff losses in Southeastern China[J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2018, **251**: 149-157.

[13] Tao J J, Bai T S, Xiao R, *et al*. Vertical distribution of ammonia-oxidizing microorganisms across a soil profile of the Chinese Loess Plateau and their responses to nitrogen inputs[J]. Science of the Total Environment, 2018, **635**: 240-248.

[14] Zhu G B, Wang S Y, Wang Y, *et al*. Anaerobic ammonia

oxidation in a fertilized paddy soil[J]. The ISME Journal, 2011, **5**(12): 1905-1912.

[15] Thamdrup B, Dalsgaard T. Production of N_2 through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, **68**(3): 1312-1318.

[16] Ding B J, Chen Z H, Li Z K, *et al*. Nitrogen loss through anaerobic ammonium oxidation coupled to Iron reduction from ecosystem habitats in the Taihu estuary region[J]. Science of the Total Environment, 2019, **662**: 600-606.

[17] Zhi W, Ji G D. Quantitative response relationships between nitrogen transformation rates and nitrogen functional genes in a tidal flow constructed wetland under C/N ratio constraints[J]. Water Research, 2014, **64**: 32-41.

[18] Han H Y, Li Z K. Effects of macrophyte-associated nitrogen cycling bacteria on ANAMMOX and denitrification in river sediments in the Taihu Lake region of China[J]. Ecological Engineering, 2016, **93**: 82-90.

[19] Ren G D, Zhang H Y, Lin X G, *et al*. Response of phyllosphere bacterial communities to elevated CO_2 during rice growing season [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, **98**(22): 9459-9471.

[20] Fernandes S O, Michotey V D, Guasco S, *et al*. Denitrification prevails over anammox in tropical mangrove sediments (Goa, India)[J]. Marine Environmental Research, 2012, **74**: 9-19.

[21] Shan J, Zhao X, Sheng R, *et al*. Dissimilatory nitrate reduction processes in typical Chinese paddy soils: rates, relative contributions, and influencing factors [J]. Environmental Science & Technology, 2016, **50**(18): 9972-9980.

[22] 王静，刘洪杰，雷禹，等. 三峡库区小江支流沉积物硝化反硝化速率在蓄水期和泄水期的特征[J]. 环境科学，2017，**38**(3): 946-953.
Wang J, Liu H J, Lei Y, *et al*. Nitrification and denitrification rates in a small tributary, Nanhe River, of Three Gorge Dam Reservoir during water collection and release events [J]. Environmental Science, 2017, **38**(3): 946-953.

[23] Li W, Liu S, Zhang M, *et al*. Oxidation of organic electron donor by denitratation: performance, pathway and key microorganism[J]. Chemical Engineering Journal, 2018, **343**: 554-560.

[24] Erler D V, Eyre B D, Davison L. The contribution of anammox and denitrification to sediment N_2 production in a surface flow constructed wetland[J]. Environmental Science & Technology, 2008, **42**(24): 9144-9150.

[25] 湛钰，高丹丹，盛荣，等. 磷差异性调控水稻根际 *nirK/nirS* 型反硝化菌组成与丰度[J]. 环境科学，2019，**40**(7): 3304-3312.
Zhan Y, Gao D D, Sheng R, *et al*. Differential responses of rhizospheric *nirK*-and *nirS*-type denitrifier communities to different phosphorus levels in paddy soil [J]. Environmental Science, 2019, **40**(7): 3304-3312.

[26] 刘若萱，贺纪正，张丽梅. 稻田土壤不同水分条件下硝化/反硝化作用及其功能微生物的变化特征[J]. 环境科学，2014，**35**(11): 4275-4283.
Liu R X, He J Z, Zhang L M. Response of nitrification/denitrification and their associated microbes to soil moisture change in paddy soil [J]. Environmental Science, 2014, **35**(11): 4275-4283.

[27] Zhou S, Borjigin S, Riya S, *et al*. Denitrification-dependent anammox activity in a permanently flooded fallow ravine paddy field[J]. Ecological Engineering, 2016, **95**: 452-456.

[28] Zhu G B, Jetten M S M, Kuschk 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.

[29] Xi D, Bai R, Zhang L M, *et al*. Contribution of anammox to nitrogen removal in two temperate forest soils[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, **82**(15): 4602-4612.

[30] Trimmer M, Risgaard-Petersen N, Nicholls J C, *et al*. Direct measurement of anaerobic ammonium oxidation (anammox) and denitrification in intact sediment cores [J]. Marine Ecology Progress Series, 2006, **326**: 37-47.

[31] Teixeira C, Magalhães C, Joye S B, *et al*. Potential rates and environmental controls of anaerobic ammonium oxidation in estuarine sediments[J]. Aquatic Microbial Ecology, 2012, **66**(1): 23-32.

HUANJING KEXUE Vol. 41 No. 1
Environmental Science (monthly) Jan. 15, 2020

CONTENTS