

利用膜进样质谱同时测定河流沉积物反硝化和厌氧氨氧化

赵永强^{1,2}, 夏永秋¹, 李博伦^{1,2}, 颜晓元^{1*}

(1.中国科学院南京土壤研究所土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 南京 210008; 2.中国科学院大学, 北京 100049)

摘要:为深入了解水体脱氮过程及机理,结合膜进样质谱(MIMS)和¹⁵N同位素配对技术(¹⁵N IPT)测定太湖地区西部六条河流沉积物的反硝化和厌氧氨氧化潜势,即将¹⁵N标记的硝态氮和铵态氮加入到混匀沉积物的上覆水中进行培养,用MIMS直接在线测定培养过程产生的²⁹N₂和³⁰N₂。结果表明,用MIMS测定²⁹N₂和³⁰N₂的产生速率是合适的,应用该方法在太湖地区西部研究河流的测定值与已报道的相关研究结果具有可比性。河流沉积物反硝化和总脱氮潜势范围分别为(18.5±2.8)~(133.2±27.1) μmol N·m⁻²·h⁻¹和(30.0±2.4)~(161.1±30.4) μmol N·m⁻²·h⁻¹,其中反硝化脱氮贡献率在(61.3±4.5)%~(83.2±2.1)%之间,二者都表现为由研究区域西北部向西南部递减。河流沉积物厌氧氨氧化潜势范围为(10.4±2.3)~(28.0±4.4) μmol N·m⁻²·h⁻¹,其脱氮贡献率在(16.9±2.1)%~(38.7±4.5)%之间,厌氧氨氧化脱氮贡献率的空间变化趋势与反硝化潜势相反。相关分析显示,沉积物的硝态氮和可溶性有机碳含量是研究区域河流沉积物反硝化和厌氧氨氧化作用的关键影响因子。研究表明,MIMS和¹⁵N IPT结合的方法避免了复杂的脱气步骤可能带来的分析误差,同时具有测定直接、所需样品少以及测定速度快等优点,适用于淹水环境反硝化和厌氧氨氧化过程的同时测定,在今后深入开展水体氮循环研究中具有良好的应用前景。研究区域河流沉积物脱氮过程存在显著空间异质性且脱氮过程以反硝化作用为主,但厌氧氨氧化的脱氮作用也不容忽视。

关键词:太湖地区;膜进样质谱法;¹⁵N同位素配对技术;沉积物;反硝化;厌氧氨氧化

中图分类号:X524 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2014)04-0794-09 doi:10.11654/jaes.2014.04.026

Simultaneous Determination of Denitrification and Anaerobic Ammonium Oxidation in River Sediments Using Membrane Inlet Mass Spectrometry

ZHAO Yong-qiang^{1,2}, XIA Yong-qiu¹, LI Bo-lun^{1,2}, YAN Xiao-yuan^{1*}

(1.State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2.University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: We used membrane inlet mass spectrometry (MIMS) and ¹⁵N isotope pairing technique (¹⁵N IPT) to simultaneously measure denitrification and anammox in river sediments of Taihu Lake region. Homogenized sediment slurries were incubated with ¹⁵N-labeled NO₃⁻ and NH₄⁺ amendments to determine the potential rates of denitrification and anammox. Production of ²⁹N₂ and ³⁰N₂ in slurries was determined using MIMS. Laboratory experiments showed that using MIMS to determine the production rates of ²⁹N₂ and ³⁰N₂ was appropriate, and the measured values for river sediments of Taihu Lake region were similar to those reported in other freshwater systems. The potential rates of denitrification and total N removal in the sediments ranged from (18.5±2.8)~(133.2±27.1) μmol N·m⁻²·h⁻¹ and (30.0±2.4)~(161.1±30.4) μmol N·m⁻²·h⁻¹, respectively, and were significantly higher in the northwest than in the southwest part of the Taihu Lake region. The contribution of denitrification to the total N₂ production was (61.3±4.5)%~(83.2±2.1)%. Potential anammox rates varied from (10.4±2.3)~(28.0±4.4) μmol N·m⁻²·h⁻¹, and N removal by anammox accounted for (16.9±2.1)%~(38.7±4.5)% of the total N₂ production. The spatial

收稿日期:2013-10-25

基金项目:中国科学院知识创新工程项目(KZCX2-YW-GJ01);国家自然科学基金项目(41071196,41061140515)

作者简介:赵永强(1979—),男,博士研究生,主要研究方向为碳氮循环与全球变化。E-mail:yqzhao@issas.ac.cn

*通信作者:颜晓元 E-mail:yanxy@issas.ac.cn

variation of the percentages of anammox to total N_2 production was opposite to that of potential denitrification. The contents of nitrate and dissolved organic carbon in sediments were probably the main factors controlling denitrification and anammox. This study shows good applicability of MIMS in combination with ^{15}N IPT in simultaneous determination of denitrification and anammox rates in aquatic systems. Advantages of this method include: reduced analytical errors by avoiding complicated gas extraction steps, no need of sample preparation, rapid measurement, and small sample size. Our results indicate that potential rates of N removal in sediments show spatial variation and denitrification is responsible for N removal but anammox should not be ignored.

Keywords: Taihu Lake region; membrane inlet mass spectrometry; ^{15}N isotope pairing technique; sediment; denitrification; anammox

长期以来,反硝化一直被认为是水体去除无机氮的唯一生物途径^[1]。20世纪90年代发现的厌氧氨氧化反应打破了这一传统观念。厌氧氨氧化是指在厌氧条件下,微生物直接以 NH_4^+ 作为电子供体,以硝态氮或亚硝态氮作为电子受体将其中的氮转变成 N_2 的过程^[2]。目前国际上对海洋中厌氧氨氧化过程的研究已经十分成熟,发现其在海洋氮循环中的脱氮贡献率可高达 79%^[3-8],但目前国内外对淡水系统厌氧氨氧化反应的研究偏少且多限于富营养化湖泊系统中^[9-11],在淡水河流系统中,还很少报道。

大气中 N_2 背景值高达 79%,要在这么高的背景环境中直接测定反硝化和厌氧氨氧化的最终产物 N_2 ,需要测定精度达到 0.1%,而一般的方法很难达到此要求^[12]。另外,水生系统中氮循环的复杂过程以及复杂多变的环境特征也加大了同时测定并区分反硝化和厌氧氨氧化的难度。目前国际上用于测定并区分反硝化和厌氧氨氧化的方法普遍是基于 ^{15}N 同位素配对技术(^{15}N IPT)的使用^[3-7,13],其是指将 ^{15}N 标记的硝态氮或铵态氮加入到沉积物上覆水中,经过适当时间的预培养,通过计算反应最终产物氮气及其同位素组分($^{29}N_2$ 、 $^{30}N_2$)的比例从而达到区分不同脱氮机制的目的。实验方法基本都是选取典型的水体或沉积物经过适宜的厌氧培养后,通过一系列复杂的脱气过程,然后用同位素比率质谱仪测定分析 $^{29}N_2$ 和 $^{30}N_2$ 的丰度。复杂的脱气过程不仅增加了试验时间,同时加大了样品被污染的可能性,从而限制了分析的精度^[14]。Trimmer 等^[15]发展了基于测定 $^{15}N-N_2O$ 的方法来同时测定反硝化和厌氧氨氧化速率,在这个方法里 $^{15}N-N_2O$ 被认为全部来自反硝化,从而推算出反硝化速率及其比例,其余的认为来自厌氧氨氧化,这个方法同样存在上述问题。美国马里兰大学的 Kana 等^[14]开发的基于 $N_2:Ar$ 的膜进样质谱法(MIMS)可以直接测定水样中的溶解性氮气,其测定精度可达 0.03%,已被认为是目前最具潜力的直接测定淹水环境脱氮产物 N_2 的方法^[16-18]。但不足之处是 MIMS 测定的是净 N_2 通

量,并不能区分不同的脱氮过程,比如反硝化和厌氧氨氧化过程^[17,19]。所以目前报道的基于 $N_2:Ar$ 测定的水体反硝化速率应是水体的总脱氮速率,包括反硝化和厌氧氨氧化过程。事实上 MIMS 是装备有四极质谱杆的膜进样质谱装置,其不仅可以精确测定水样中总溶解性 N_2 ,也可以测定气体的同位素组分(比如 $^{18}O_2$ 和 $^{15}N_2$)^[14]。MIMS 可将测定水样中的溶解性气体分离出来,直接进入质谱在线测定,可以避免由于复杂的脱气步骤可能带来的分析误差。本实验结合 MIMS 和 ^{15}N IPT 测定河流沉积物反硝化和厌氧氨氧化潜势,即通过 MIMS 装备的半透性硅胶膜将溶解性气体从待测水样中分离,在真空系统驱动下进入四级杆质谱在线测定水样中 $^{15}N-N_2$ ($^{29}N_2$ 、 $^{30}N_2$),然后根据 $^{29}N_2$ 和 $^{30}N_2$ 的产生比例计算沉积物中反硝化和厌氧氨氧化潜势,具有测定直接、需要样品量少以及速度快的特点。

太湖地区西部分布着大量的入湖河流,其污染状况和生态类型的不同直接影响着河流沉积物的脱氮能力及其向太湖输入的氮量。本文选择太湖西部六条河流,结合 MIMS 和 ^{15}N IPT,测定河流沉积物反硝化和厌氧氨氧化潜势。这一研究将有助于确定太湖地区主要入湖河流沉积物的脱氮能力及其控制因子,为深入理解流域氮素的迁移转化过程及其影响机制提供理论依据。

1 材料和方法

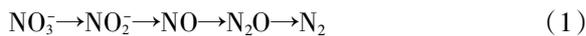
1.1 样品采集和处理

本文选择太湖地区西部六条环湖河流进行研究,自研究区域西北部向西南部依次为河南埂、殷村港、乌溪港、合溪新港、杨家浦港和小沉渚港(图 1)。2013年5月采集殷村港和河南埂河流沉积物样品,8月采集乌溪港、合溪新港、杨家浦港和小沉渚港河流沉积物样品(采样点位置及沉积物理化性质见表 1)。每条河流分别选定三个代表性采样点,用奥地利 Uwhitec 无扰动沉积物采样器(PVC,内径 8 cm,高 30 cm)采集每个样点 0~10 cm 3 个原位沉积物和上覆水柱样,

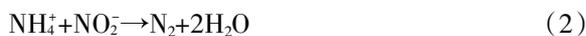
min⁻¹转动,其可以模拟河流水体的流动也可以混匀培养过程中产生的溶解性气体。取样时,需将出水管插至细长的螺口取样瓶(7 mL, Labco Limited, UK)底部,打开进水管的止水夹让水样在重力作用下缓慢注入直至溢出,同时将出水管缓慢抽出,立即拧紧盖子密封,避免空气污染水样,这即为0 h样品,之后分别在2、4、6、8 h取样,每次样品均取三个重复。培养柱中上覆水的体积约为1000 mL,而取样瓶的体积为7 mL,因此整个实验过程中每个培养柱中采取的全部水样约为其上覆水体积的10%。取样瓶注满水样后立即用移液枪加入20 μL饱和HgCl₂以终止微生物反应,然后马上密封。取好的样品可以放入5℃冰箱保存待测。

1.2 ¹⁵N 同位素配对法测定反硝化和厌氧氨氧化的原理及计算

反硝化反应是在厌氧条件下反硝化细菌利用NO₃⁻作为其合成能量时的最终电子受体,将NO₃⁻还原为N₂O和N₂的过程。反应过程如公式(1)所示:



厌氧氨氧化是不同于传统氮循环的新途径,是指在厌氧条件下,微生物直接以NH₄⁺作为电子供体,以NO₂⁻作为电子受体,将其中的氮转变成N₂的过程。具体反应过程见公式(2):



由反应过程公式可以看出,在厌氧环境下,反硝化和厌氧氨氧化反应均产生氮气,但是机理存在差异。反硝化反应由硝态氮经一系列中间反应产生氮气,氮气的两个氮原子均来自NO₃⁻。厌氧氨氧化反应由铵态氮和亚硝态氮分别作为电子供体和受体产生氮气,氮气分子是由NO₃⁻和NH₄⁺各提供一个氮原子组成。当进行¹⁵N同位素示踪实验时,反硝化和厌氧氨氧化反应的反应差异可以通过产生氮气中²⁸N₂、²⁹N₂和³⁰N₂的组成得以体现。

本研究采用Risgaard-Petersen等^[13]的河口沉积物厌氧氨氧化实验分析方法进行¹⁵N同位素示踪实验,共有三个处理:处理①仅加¹⁵NH₄⁺是为了检测前期预培养过程是否达到了实验所需的厌氧条件以及沉积物本底的¹⁴NO₃⁻是否已经消耗完全。如果达到实验所需的厌氧条件,则不会有耦合硝化-反硝化反应的发生,从而观察不到³⁰N₂累积;同样如果预培养过程中沉积物本底的¹⁴NO₃⁻已经消耗完全,也观察不到²⁹N₂的明显累积。处理②中,如果达到了实验所需的厌氧条件,则不会有³⁰N₂明显累积,而来自¹⁵NH₄⁺中的

¹⁵N和¹⁴NO₃⁻的¹⁴N的拟合,会导致²⁹N₂的明显累积,用以证明厌氧氨氧化过程的存在。处理③加入用¹⁵N特殊标记过的NO₃⁻,其和沉积物本底的¹⁴NH₄⁺在缺氧或厌氧的环境下会发生反硝化和厌氧氨氧化反应。二者的反应差异可以通过产生氮气中²⁸N₂、²⁹N₂和³⁰N₂的组成得以体现,因此本处理可以用来检测样本的全部脱氮潜势(包括反硝化和厌氧氨氧化)。

处理①、②分别为对照反应,处理③为正常反应,样本的反硝化和厌氧氨氧化潜势通过各自氮气产生量对时间的回归获得^[4,10,13],现以处理③为例说明计算过程。厌氧氨氧化过程产生的N₂是由NO₃⁻和NH₄⁺各提供一个N原子组成,因此处理③中,厌氧氨氧化过程只产生²⁸N₂和²⁹N₂,二者的量由加入的¹⁵NO₃⁻的比例决定:

$$A_{28} = A_{\text{total}} \times (1 - F_N), A_{29} = A_{\text{total}} \times F_N \quad (3)$$

式中:A₂₈和A₂₉分别表示厌氧氨氧化过程中各自N₂的产生量,μmol·L⁻¹;F_N为NO₃⁻中¹⁵N的比例(F_N=0.995),其计算公式为:F_N= $\frac{[(\text{NO}_3^-)_a - (\text{NO}_3^-)_b]}{(\text{NO}_3^-)_a}$,下标字母a,b分别表示添加¹⁵NO₃⁻后和添加¹⁵NO₃⁻前上覆水中¹⁵N丰度。反硝化过程产生的N₂均来自NO₃⁻,处理③中反硝化反应产生的N₂应包括²⁸N₂、²⁹N₂和³⁰N₂:

$$D_{28} = D_{\text{total}} \times (1 - F_N)^2, D_{29} = D_{\text{total}} \times 2 \times (1 - F_N) \times F_N, D_{30} = D_{\text{total}} \times F_N^2 \quad (4)$$

式中:D₂₈、D₂₉和D₃₀分别表示反硝化过程中各自N₂的产生量,μmol·L⁻¹。用P₂₉和P₃₀分别表示MIMS测得的各自N₂总量,μmol·L⁻¹,结合公式(3)和(4),且D₃₀=P₃₀,从而可以得到:

$$D_{\text{total}} = P_{30} \times F_N^{-2} \quad (5)$$

$$D_{29} = P_{30} \times 2 \times (1 - F_N) \times F_N^{-1} \quad (6)$$

$$A_{29} = P_{29} - D_{29} = P_{29} - P_{30} \times 2 \times (1 - F_N) \times F_N^{-1} \quad (7)$$

$$A_{28} = A_{29} \times F_N^{-1} \times (1 - F_N) \quad (8)$$

叠加公式(7)和(8)可得:

$$A_{\text{total}} = F_N^{-1} \times [P_{29} + 2 \times (1 - F_N^{-1}) \times P_{30}] \quad (9)$$

D_{total}和A_{total}分别为各样品中反硝化和厌氧氨氧化反应的N₂产生量(μmol·L⁻¹)。将所得各样品N₂产生量与相应样品采集时间点进行线性回归,即可得到该样品的反硝化和厌氧氨氧化潜势。

则反硝化和厌氧氨氧化各自的脱氮贡献率(R_d%和R_a%)可由下列公式计算得出:

$$R_d\% = \frac{D_{\text{total}}}{D_{\text{total}} + A_{\text{total}}} \times 100\%, R_a\% = \frac{A_{\text{total}}}{D_{\text{total}} + A_{\text{total}}} \times 100\% \quad (10)$$

1.3 氮气同位素组分的测定和计算

溶解性 $^{15}\text{N}-\text{N}_2$ 气体($^{29}\text{N}_2$ 和 $^{30}\text{N}_2$)的信号值用膜进样质谱仪测定(MIMS, Bay Instruments, Easton, MD, USA)^[14]。MIMS 配备有法拉第检测器和二次电子倍增检测器,在测定 $^{29}\text{N}_2$ 和 $^{30}\text{N}_2$ 时要打开二次电子倍增检测器,其可以灵敏地捕捉到相对微弱的 $^{15}\text{N}-\text{N}_2$ 粒子流信号值。由于质谱系统长时间运行可能会有信号漂移,需要通过 Weiss 气体溶解度方程^[20]和间断测量标准水样的离子流信号值进行质谱系统的漂移校正。标准水样制备的方法是用去离子水配制与待测水样一致盐度的溶液约 600 mL,装入 1 L 圆底烧瓶后浸没与培养水温一致的恒温水浴中,用浸过去离子水的海绵塞住瓶口以维持 100%的湿度,然后调节转子搅拌标准水样使其达到完全气液平衡,一般约需 3 h,具体制备方法及其装置见文献[17]。具体校正原理如下^[21]:由于大气中 N 的 ^{15}N 同位素的自然丰度是 0.003 65 (0.365%), 因此理论上 $^{29}\text{N}_2:^{28}\text{N}_2$ 和 $^{30}\text{N}_2:^{28}\text{N}_2$ 比率分别为 7.32×10^{-3} 和 1.34×10^{-5} 。当测定一定培养温度下达到水气平衡的标准水样时, $^{28}\text{N}_2$ 在培养温度下的理论值可由 Weiss 气体溶解度方程^[20]计算得到,而 $^{29}\text{N}_2$ 的理论值等于 $7.32\times 10^{-3}\times^{28}\text{N}_2$ 的理论值。因此, $^{28}\text{N}_2$ 和 $^{29}\text{N}_2$ 信号值的校正系数可以直接用其理论值除以标准水样的实测值获得,二者的校正系数应很接近。MIMS 运行过程中 N_2 和 O_2 反应会产生 NO^+ , 因此仪器中可能会有高 mass30 背景值存在,从而导致 $^{30}\text{N}_2:^{28}\text{N}_2$ 比率常常高于预期的 1.34×10^{-5} 。假定 $^{28}\text{N}_2$ 和 $^{29}\text{N}_2$ 的校正系数适合 $^{30}\text{N}_2$ 的校正系数计算,取二者的平均值作为 $^{30}\text{N}_2$ 的校正系数。综上, $^{29}\text{N}_2$ 和 $^{30}\text{N}_2$ 浓度的计算公式如下:

$$C(^{29}\text{N}_2 \text{ or } ^{30}\text{N}_2) (\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}) = (IC_{29,30(\text{sample})} - IC_{29,30(\text{standard})}) \times F \quad (11)$$

这里的 $IC_{29,30(\text{sample})}$ 表示样品中 $^{29}\text{N}_2$ 和 $^{30}\text{N}_2$ 实测值, $IC_{29,30(\text{standard})}$ 表示标准水样 $^{29}\text{N}_2$ 和 $^{30}\text{N}_2$ 的实测值, F 是 $^{29}\text{N}_2$ 和 $^{30}\text{N}_2$ 的校正系数。

1.4 环境因子和统计分析

每次采取河流沉积物样品时,同时用便携式多参数测定仪(Hach Company, Loveland, CO)测定各个采样点水体温度($^{\circ}\text{C}$)、pH、溶解氧。另外,同时采集约 200 mL 水样,带回实验室后过滤($0.7\ \mu\text{m}$),测定 NO_3^--N 、 NH_4^+-N 和可溶性有机碳(DOC)。沉积物 NO_3^--N 、 NH_4^+-N 、可溶性总氮(TDN)采用 $2\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl 浸提、过滤后用流动分析仪(Skalar Analytical, Breda, The Netherlands)测定,DOC 用去离子水浸提、离心、过滤后采用 TOC 分析

仪测定(Aanalytik Jena AG, Germany)。

1.5 统计分析

应用单因素方差分析(ANOVA)结合最小显著差法(LSD)对不同采样点,不同河流的平均反硝化、厌氧氨氧化和总脱氮潜势进行差异显著性分析。采用一元线性回归法分析反硝化、厌氧氨氧化和总脱氮潜势与不同环境因子的相关性。数据统计分析采用 SPSS 19.0(USA)软件,作图应用 SigmaPlot 12.0(USA)软件。

2 结果与讨论

2.1 ^{15}N 同位素实验

本试验中,3 种处理形式所得 $^{29}\text{N}_2$ 和 $^{30}\text{N}_2$ 气体产生量随时间变化的情况如图 2 所示,其与先前报道的海洋和淡水系统中的相关研究一致^[4,10,13,22]。只添加 $^{15}\text{NH}_4^+$ 的培养处理中没有检测到 $^{29}\text{N}_2$ 和 $^{30}\text{N}_2$ 的积累,表明前期预培养过程中其中硝酸盐消耗殆尽。添加 $^{15}\text{NH}_4^+ + ^{14}\text{NO}_3^-$ 后我们可以观测到 $^{29}\text{N}_2$ 的显著积累,但并没有 $^{30}\text{N}_2$ 积累,表明该处理形式中确实存在厌氧氨氧化反应且具有一定活性,与已报道的海洋和淡水环境沉积物厌氧氨氧化过程类似^[4,10,13,22]。 $^{15}\text{NO}_3^-$ 培养处理中, $^{29}\text{N}_2$ 和 $^{30}\text{N}_2$ 浓度随着时间变化明显地增加(图 2),表明样品中厌氧氨氧化和反硝化过程的发生。 $^{30}\text{N}_2$ 浓度的累积明显高于 $^{29}\text{N}_2$,可见反硝化的反应强度要高于厌氧氨氧化。

2.2 沉积物反硝化和总脱氮潜势

研究区域河流沉积物总脱氮潜势范围为 $(30.0\pm 2.4)\sim(161.1\pm 30.4)\ \mu\text{mol N}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$,表现出较强的空间异质性,自太湖地区西北部向西南部递减(图 3)。张波等^[23]用 ^{15}N 同位素配对法测定了太湖流域江苏和上海境内主要河流沉积物的脱氮作用,发现夏季河流总反硝化速率在 $0\sim 167.9\ \mu\text{mol N}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ 之间,与我们的测定结果较为接近。同样采用 ^{15}N 同位素法, Pind 等^[24]测定了丹麦东部 Gelbæk 河流沉积物的反硝化速率,发现沉积物的反硝化速率在 $0\sim 750\ \mu\text{mol N}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ 之间,与本研究所测定的总脱氮潜势具有可比性。由于丹麦 Gelbæk 河水体硝态氮浓度变化范围约为 $0.6\sim 7.3\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,远高于本研究区域河流($0.1\sim 2.6\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,表 1)。因此这可能是 Pind 等^[24]的测定结果高于本研究河流沉积物总脱氮潜势的原因。

我们的研究结果显示河流沉积物反硝化潜势范围为 $(18.5\pm 2.8)\sim(133.2\pm 27.1)\ \mu\text{mol N}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$,其占总氮气产生量的 $(61.3\pm 4.5)\%\sim(83.2\pm 2.1)\%$,表明了研究区域河流沉积物脱氮活动以反硝化作用为主。河流

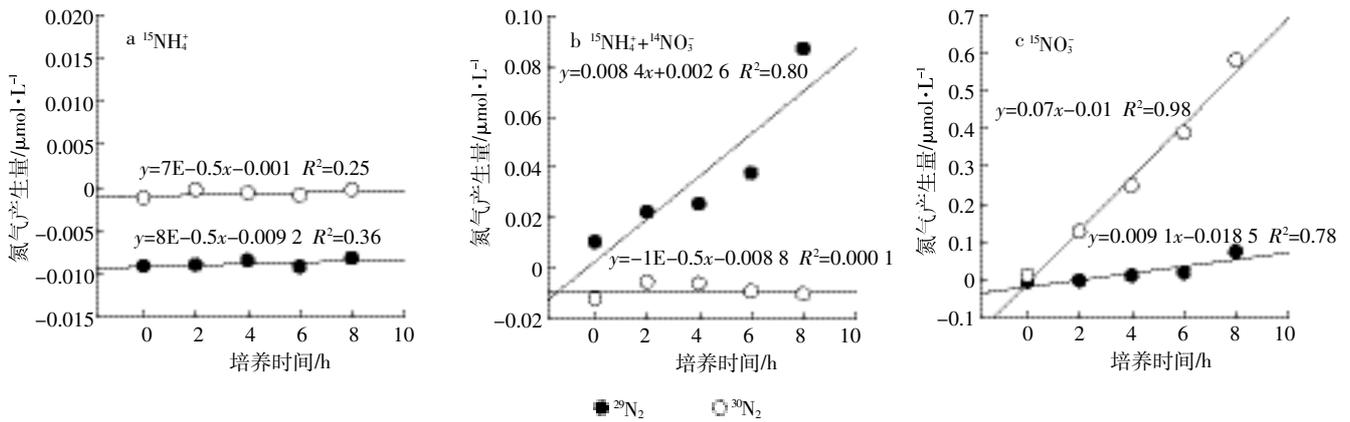


图2 $^{15}\text{NH}_4^+$ 、 $^{15}\text{NH}_4^+ + ^{14}\text{NO}_3^-$ 和 $^{15}\text{NO}_3^-$ 三个不同的处理中 $^{29}\text{N}_2$ 和 $^{30}\text{N}_2$ 产生量随培养时间的变化(以河南埂为例)

Figure 2 Production of $^{29}\text{N}_2$ and $^{30}\text{N}_2$ in sediment slurries sampled from Henangeng River under treatments with $^{15}\text{NH}_4^+$, $^{15}\text{NH}_4^+ + ^{14}\text{NO}_3^-$, and $^{15}\text{NO}_3^-$

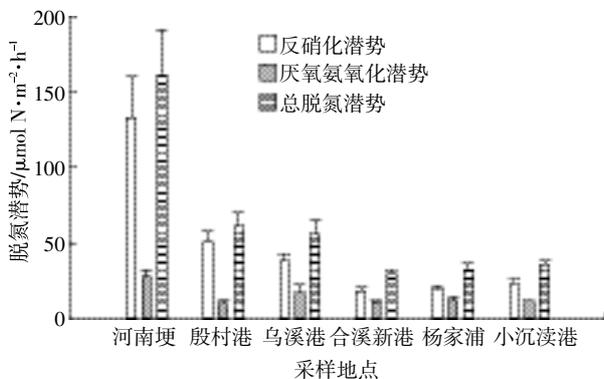


图3 不同采样河流沉积物反硝化、厌氧氨氧化和总脱氮潜势(均值±标准偏差)

Figure 3 Potential rates of denitrification, anammox and total nitrogen removal in sediments from different rivers [Error bars represent SE of the mean ($n=3$)]

沉积物反硝化潜势的空间变化与总脱氮潜势一致,都表现为河南埂最高、合溪新港最低,由流域西北部向西南部递减(图3)。研究区西北部河流水层和沉积物的硝态氮和总氮含量都远大于西南部河流(表1),因此西北部河流相对较高的底物浓度可能提供了更有利于反硝化细菌活动的生境。有关沉积物反硝化过程研究表明沉积物氮含量与沉积物反硝化速率有着显著的正相关关系^[23,25]。本研究也观测到了沉积物 NO_3^- -N含量与反硝化和总脱氮潜势呈现显著的正相关关系(图4a、图4b)。由于反硝化的发生需要有有机质提供电子供体,因此有机质含量的高低往往也是反硝化的另一个主要限制性因子,已有大量的文献报道沉积物有机质含量与反硝化速率呈显著的正相关关系^[26-28]。本研究中,沉积物DOC含量也与总脱氮(图4d)和反硝化潜势(图4e)呈显著正相关关系,而其他环境参数

经相关分析发现与反硝化潜势的关系并不显著。因此沉积物 NO_3^- -N和DOC含量很可能是研究区域河流沉积物总脱氮和反硝化潜势空间变化的关键影响因素。

2.3 河流沉积物厌氧氨氧化潜势

我们前期已对殷村港河流进行了近一年的研究^[21],发现殷村港河流沉积物中存在厌氧氨氧化菌且其16S rRNA基因序列隶属于*Candidatus Kuenenia*,*Candidatus Jettenia*和*Candidatus Scalindua*,其中*C. Kuenenia*是厌氧氨氧化细菌群落的优势种,这一研究证实了太湖地区淡水河流系统中厌氧氨氧化菌存在。本研究结合MIMS和 ^{15}N IPT测得河流沉积物厌氧氨氧化潜势范围为 $(10.4 \pm 2.3) \sim (28.0 \pm 4.4) \mu\text{mol N} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$,其占总氮气产生量的 $(16.9 \pm 2.1)\% \sim (38.7 \pm 4.5)\%$ (图3、图5)。基于 ^{15}N 同位素配对技术,Moore等^[29]对加拿大一氮污染的地下水系统研究发现,其厌氧氨氧化脱氮贡献率为18%~36%;在日本富营养化湖泊Lake Kizaura^[9],也发现其厌氧氨氧化脱氮贡献率可高达40%,这些研究结果与我们的测定值具有一定可比性。

研究区域河流沉积物厌氧氨氧化潜势也存在明显的空间异质性但规律性不明显(图3),然而厌氧氨氧化过程在整个脱氮过程中所占的比率范围表现出与反硝化潜势相反的空间变化趋势,即自西北向西南递增(图5)。有关海洋沉积物厌氧氨氧化研究发现,在高有机碳的沉积物环境下,以氨氮为电子供体、亚硝酸盐为电子受体的厌氧氨氧化过程与有机碳作为电子供体的反硝化过程竞争时,并不能获得竞争优势^[5,7-8],可见,沉积物有机碳含量影响着厌氧氨氧化过程。本研究中,河流沉积物DOC含量与厌氧氨氧化脱氮贡献率呈显著负相关关系(图4f),也验证了这一

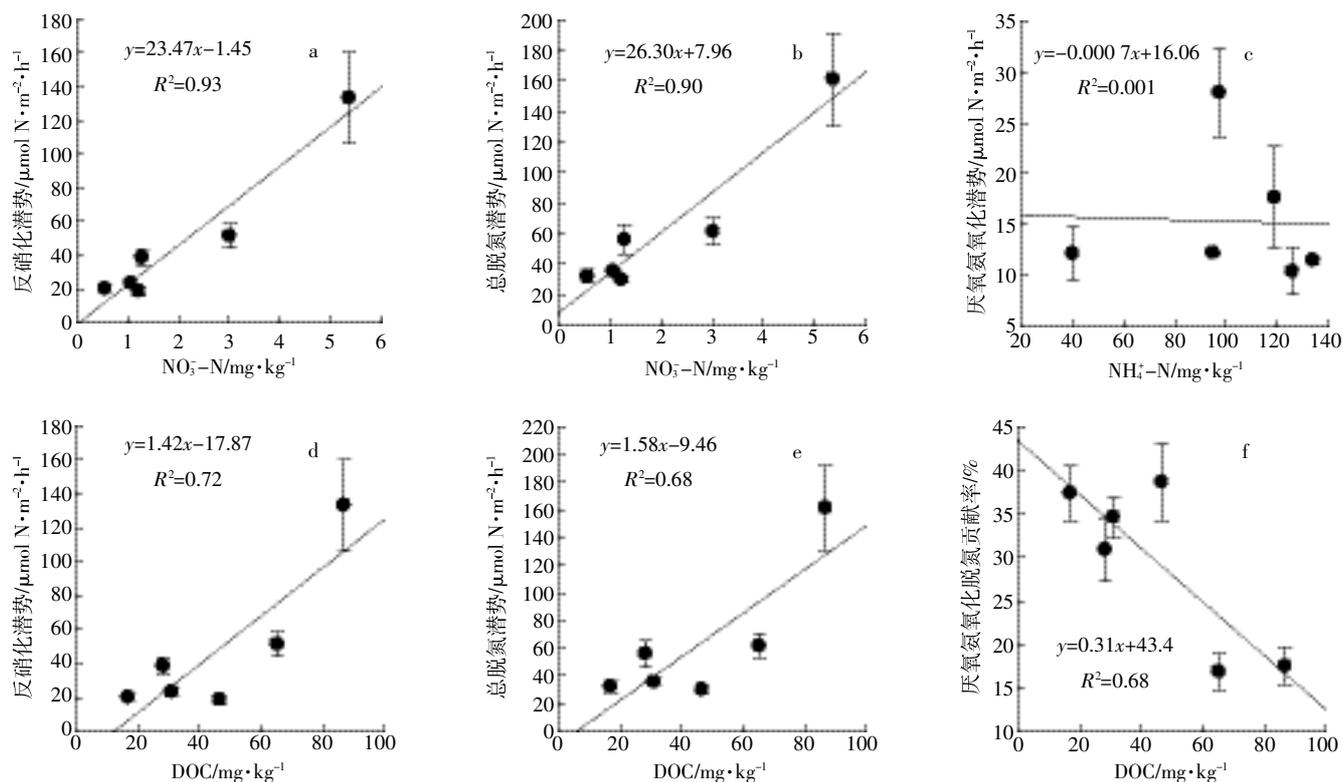


图4 沉积物硝态氮含量与沉积物反硝化(a)和总脱氮潜势(b)相关性;沉积物铵态氮含量与沉积物厌氧氨氧化潜势(c)相关性以及沉积物DOC含量与沉积物反硝化(d)、总脱氮潜势(e)和厌氧氨氧化脱氮贡献率(f)相关性($n=6$)

Figure 4 Relationships between NO_3^- -N contents in sediments and (a) potential denitrification rates and (b) potential total nitrogen removal rates, between NH_4^+ -N contents in sediments and (c) potential anammox rates, and between DOC contents in sediments and (d) potential denitrification rates, (e) potential total nitrogen removal rates, and (f) relative contribution of anammox to total N_2 production ($n=6$)

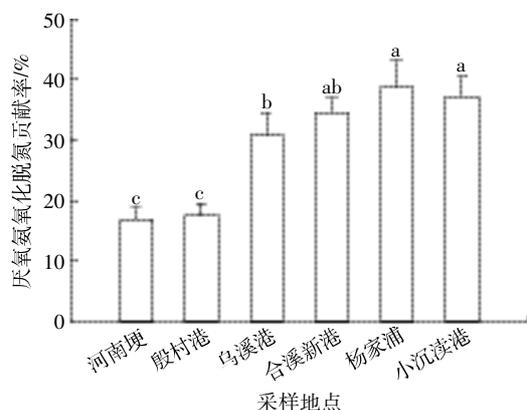


图5 不同采样河流沉积物厌氧氨氧化脱氮贡献率(均值±标准偏差)

Figure 5 Percentages of anammox to total N_2 production in sediments from different rivers [Error bars represent SE of the mean ($n=3$)]

点。研究区西北部河流相对较高的底物浓度和DOC含量增强了反硝化活动,虽然反硝化过程释放出的 NO_3^- 量也不断增多,也进一步刺激了厌氧氨氧化活动,但反硝化活动增加的强度大于厌氧氨氧化,致使

厌氧氨氧化在河流沉积物氮素循环中的贡献率反而有所降低,从而导致本实验中厌氧氨氧化脱氮贡献率的空间变化表现出与反硝化潜势相反的变化趋势。

研究区河流沉积物铵态氮含量远高于硝态氮含量(表1),但经相关分析发现沉积物铵态氮含量并不制约着厌氧氨氧化活动(图4c),由于厌氧氨氧化反应体系中铵态氮与硝酸盐是1:1的摩尔比例关系^[4,10],因此推断研究区河流沉积物铵态氮含量并不是厌氧氨氧化反应的限制性因子。

2.4 测定方法评价

理论上 $^{29}\text{N}_2:^{28}\text{N}_2$ 和 $^{30}\text{N}_2:^{28}\text{N}_2$ 比率分别应为 7.32×10^{-3} 和 1.34×10^{-5} ,但实际测定中,如果待测水样中存在 O_2 ,MIMS运行过程中 N_2 和 O_2 反应会产生 NO^+ ,从而导致质谱仪中mass30高背景值的存在而使 $^{30}\text{N}_2:^{28}\text{N}_2$ 比率高于理论值。本实验中,沉积物已完全浸入上覆水中预培养48~96h,以保证厌氧氨氧化必需的厌氧条件。在此条件下,应没有或很少有氧气存在影响 $^{30}\text{N}_2$ 的测定。我们课题组先前已用两组平行的处理验证了这个假设的成立^[21],即分别加入10 mL事先

配好的 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ }^{14}\text{NO}_3^-$ 和 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ }^{15}\text{NO}_3^-$ (99.19% ^{15}N) 的 N 溶液到沉积物的上覆水中(上覆水体积约为 1000 mL) 使其最终浓度分别为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ }^{14}\text{NO}_3^-$ 和 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ }^{15}\text{NO}_3^-$ (99.19% ^{15}N), 然后用 MIMS 测定 $^{28}\text{N}_2$ 、 $^{29}\text{N}_2$ 和 $^{30}\text{N}_2$ 浓度随时间的变化。结果表明^[21], 添加 $^{14}\text{NO}_3^-$ 处理中几乎检测不到 $^{30}\text{N}_2$ 信号值且其并不随培养时间而发生变化; 相比之下, 在 $^{15}\text{NO}_3^-$ 处理中, $^{30}\text{N}_2$ 信号值与培养时间呈显著的线性关系。虽然在 $^{14}\text{NO}_3^-$ 处理中, $^{30}\text{N}_2$: $^{28}\text{N}_2$ 比值高于预期理论值, 但与 $^{15}\text{NO}_3^-$ 处理相比, $^{30}\text{N}_2$: $^{28}\text{N}_2$ 比率非常低 ($^{15}\text{NO}_3^-$ 和 $^{14}\text{NO}_3^-$ 处理在 8 h 培养时间内 $^{30}\text{N}_2$: $^{28}\text{N}_2$ 的比率范围分别为 $7.43 \times 10^{-5} \sim 1.98 \times 10^{-3}$ 和 $8.07 \times 10^{-6} \sim 2.90 \times 10^{-5}$), 可见质谱仪产生的 NO 值并不影响测定 $^{30}\text{N}_2$ 的产生速率, 用 MIMS 测定 $^{29}\text{N}_2$ 和 $^{30}\text{N}_2$ 的产生速率是合适的。

MIMS 可以直接在线测定水样中的溶解性氮气及其同位素组分, 从而避免了复杂的脱气步骤可能带来的分析误差, 同时具有测定速度快(每小时测定约 20~30 个样品)和所需样品量少(小于 10 mL)的优点^[14, 17-19]。应用该方法在太湖地区西部研究河流可观测到明显的反硝化和厌氧氨氧化过程, 且测定值与已报道的相关研究的测定结果具有可比性^[23-24, 29]。

3 结论

我们的研究表明, 本文所建 MIMS 和 ^{15}N IPT 结合的方法避免了复杂的脱气步骤可能带来的分析误差, 同时具有测定直接、所需样品少以及测定速度快等优点, 适用于淹水环境反硝化和厌氧氨氧化过程的同时测定, 在今后深入开展水体氮循环研究中具有良好的应用前景。测得河流沉积物反硝化和总脱氮潜势范围分别为 $(18.5 \pm 2.8) \sim (133.2 \pm 27.1) \mu\text{mol N} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ 和 $(30.0 \pm 2.4) \sim (161.1 \pm 30.4) \mu\text{mol N} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, 其中反硝化脱氮贡献率在 $(61.3 \pm 4.5) \% \sim (83.2 \pm 2.1) \%$ 之间, 二者都表现出较强的空间异质性, 自太湖流域西北部向西南部递减。河流沉积物的厌氧氨氧化潜势范围为 $(10.4 \pm 2.3) \sim (28.0 \pm 4.4) \mu\text{mol N} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, 其脱氮贡献率在 $(16.9 \pm 2.1) \% \sim (38.7 \pm 4.5) \%$ 之间, 表明研究区域河流沉积物脱氮活动以反硝化活动为主, 但厌氧氨氧化的脱氮作用也不容忽视。相关分析显示, 沉积物 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 和 DOC 含量很可能是研究区域河流沉积物脱氮过程空间异质性的主要影响因子。

参考文献:

[1] Seitzinger S P. Denitrification in freshwater and coastal marine ecosys-

tems—ecological and geochemical significance[J]. *Limnology and Oceanography*, 1988, 33: 702-724.

[2] Mulder A, Vandegraaf A A, Robertson L A, et al. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized-bed reactor[J]. *Fems Microbiology Ecology*, 1995, 16: 177-183.

[3] Thamdrup B, Dalsgaard T. The fate of ammonium in anoxic manganese oxide-rich marine sediments[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2000, 64: 4157-4164.

[4] 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: 1312-1318.

[5] Dalsgaard T, Thamdrup B, Canfield D E. Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in the marine environment[J]. *Research in Microbiology*, 2005, 156: 457-464.

[6] Engström P, Dalsgaard T, Hulth S, et al. Anaerobic ammonium oxidation by nitrite (anammox): Implications for N_2 production in coastal marine sediments[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2005, 69: 2057-2065.

[7] Trimmer M, Nicholls J C. Production of nitrogen gas via anammox and denitrification in intact sediment cores along a continental shelf to slope transect in the North Atlantic[J]. *Limnology and Oceanography*, 2009, 54: 577-589.

[8] Gihring T M, Lavik G, Kuypers M M M, et al. Direct determination of nitrogen cycling rates and pathways in Arctic fjord sediments (Svalbard, Norway)[J]. *Limnology and Oceanography*, 2010, 55(2): 740-752.

[9] Yoshinaga I, Amano T, Yamagishi T, et al. Distribution and diversity of anaerobic ammonium oxidation (anammox) bacteria in the sediment of a eutrophic freshwater lake, Lake Kitaura, Japan[J]. *Microbes and Environments*, 2011, 26: 189-197.

[10] 王衫允, 祝贵兵, 曲冬梅, 等. 白洋淀富营养化湖泊湿地厌氧氨氧化菌的分布及对氮循环的影响[J]. *生态学报*, 2012, 32(21): 6591-6598.

WANG Shan-yun, ZHU Gui-bing, QU Dong-mei, et al. Widespread of anaerobic ammonia oxidation bacteria in an eutrophic freshwater lake wetland and its impact on nitrogen cycle[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(21): 6591-6598.

[11] Wenk C B, Brees J, Zopfi J, et al. Anaerobic ammonium oxidation (anammox) bacteria and sulfide-dependent denitrifiers coexist in the water column of a meromictic south-alpine lake[J]. *Limnology and Oceanography*, 2013, 58: 1-12.

[12] Butterbach-Bahl K, Gasche R, Willibald G, et al. Exchange of N-gases at the Hglwald Forest: A summary[J]. *Plant and Soil*, 2002, 240: 117-123.

[13] Risgaard-Petersen N, Meyer R L, Schmid M, et al. Anaerobic ammonium oxidation in an estuarine sediment[J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 2004, 36: 293-304.

[14] Kana T M, Darkangelo C, Hunt M D, et al. Membrane inlet mass spectrometer for rapid high-precision determination of N_2 , O_2 , and Ar in environmental water samples[J]. *Analytical Chemistry*, 1994, 66: 4166-4170.

[15] 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.
- [16] Groffman P M, Altabet M A, Bohlke J K, et al. Methods for measuring denitrification: Diverse approaches to a difficult problem[J]. *Ecological Applications*, 2006, 16:2091-2122.
- [17] 李晓波, 夏永秋, 郎漫, 等. $N_2:Ar$ 法直接测定淹水环境反硝化产物的产生速率[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(6):1284-1288.
LI Xiao-bo, XIA Yong-qiu, LANG Man, et al. $N_2:Ar$ technique for direct determination of denitrification rate of aquatic ecosystems using membrane inlet mass spectrometry[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2013, 32(6):1284-1288.
- [18] 陈能汪, 吴杰忠, 段恒轶, 等. $N_2:Ar$ 法直接测定水体反硝化产物溶解 N_2 [J]. 环境科学学报, 2010, 30(12):2497-2483.
CHEN Neng-wang, WU Jie-zhong, DUAN Heng-yi, et al. $N_2:Ar$ method for direct measurement of denitrification product(dissolved N_2) using membrane inlet mass spectrometry (MIMS)[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2010, 30(12):2497-2483.
- [19] 徐徽, 张路, 商景阁, 等. 太湖梅梁湾水土界面反硝化和厌氧氨氧化[J]. 湖泊科学, 2009, 21(6):775-781.
XU Hui, ZHANG Lu, SHANG Jing-ge, et al. Denitrification and anammox on the sediment-water interface in the Meiliang Bay of Lake Taihu[J]. *Journal of Lake Science*, 2009, 21(6):775-781.
- [20] Weiss R F. The solubility of nitrogen, oxygen and argon in water and seawater[J]. *Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts*, 1970, 17:721-735.
- [21] Zhao Y Q, Xia Y Q, Kana T M, et al. Seasonal variation and controlling factors of anaerobic ammonium oxidation in freshwater river sediments in the Taihu Lake region of China[J]. *Chemosphere*, 2013, 93:2124-2131.
- [22] Rich J J, Dale O R, Song B, et al. Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in Chesapeake Bay sediments[J]. *Microbial Ecology*, 2008, 55:311-320.
- [23] 张波, 杜应响, 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.
- [24] Pind A, Risgaard-Petersen N, Revsbech N P. Denitrification and microphytobenthic NO_3^- consumption in a Danish lowland stream: diurnal and seasonal variation[J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 1997, 12:275-284.
- [25] 王东启, 陈振楼, 许世远, 等. 长江口潮滩沉积物反硝化作用及其时空变化特征[J]. 中国科学(B辑), 2007, 37(6):604-611.
WANG Dong-qi, CHEN Zhen-lou, XU Shi-yuan, et al. The denitrification and the temporal and spatial variation in intertidal sediments of the Yangtze Estuary[J]. *Science in China(Series B)*, 2007, 37(6):604-611.
- [26] Knowles R. Denitrification[J]. *Microbiological Reviews*, 1982, 46:43-70.
- [27] Inwood S E, Tank J L, Bernot M J. Patterens of denitrification associated with land use in 9 midwestern headwater streams[J]. *Journal of the North American Benthological Society*, 2005, 24(2):227-245.
- [28] Arango C P, Tank J L, Schaller J L, et al. Benthic organic carbon influences denitrification in streams with high nitrate concentration[J]. *Freshwater Biology*, 2007, 52:1210-1222.
- [29] Moore T A, Xing Y P, Lazenby B, et al. Prevalence of anaerobic ammonium oxidizing bacteria in contaminated groundwater[J]. *Environmental Science and Technology*, 2011, 45:7217-7225.