李进芳, 柴延超, 陈顺涛, 等.利用膜进样质谱仪测定水稻土几种厌氧氮转化速率[J]. 农业环境科学学报, 2019, 38(7): 1541-1549. LI Jin-fang, CHAI Yan-chao, CHEN Shun-tao, et al. Measurement of denitrification, Anammox, DNRA rates, and net N₂ flux in paddy soil using a membrane inlet mass spectrometer[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2019, 38(7): 1541-1549.

## 利用膜进样质谱仪测定水稻土几种厌氧氮转化速率

李进芳<sup>1,2</sup>, 柴延超<sup>1</sup>, 陈顺涛<sup>1,3</sup>, 单 军<sup>1,2\*</sup>, 颜晓元<sup>1,2</sup>

(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; 3.中国 药科大学,南京 210009)

摘 要:为了在同一体系下区分和测定水稻土反硝化、厌氧氨氧化(Anammox)和硝酸根异化还原成铵(DNRA)过程发生速率和相 互关系,并获取近似原位情况下的净脱氮速率,本研究通过将'\*NHi化学氧化法测定 DNRA速率和添加尿素模拟原位土柱测定净 脱氮速率与膜进样质谱法(MIMS)进行联用,完善了一套基于膜进样质谱法(MIMS)的稻田硝态氮转化测定方法体系,利用该方法 测定了5种典型的水稻土[辽宁营口(YK)、江苏宜兴(YX)、浙江金华(JH)、广西桂林(GL)和四川广安(GA)]的反硝化、Anammox、 DNRA和净脱氮4种氮转化速率。结果显示:基于 MIMS的方法体系可实现对水稻土中反硝化、Anammox、DNRA和净脱氮速率的 测定,5种水稻土反硝化、Anammox、DNRA和净脱氮速率范围分别为(358.63±25.37)~(479.96±22.12)、(-14.81±0.22)~(5.29±1.22)、(25.76±12.71)~(109.87±3.88)g N·hm<sup>-2</sup>·h<sup>-1</sup>和(33.33±11.16)~(72.74±14.18)g N·hm<sup>-2</sup>·h<sup>-1</sup>,相关结果与其他方法研究结果具 有可比性。相关性分析显示:水稻土NO3、可溶性有机碳(DOC)和土壤Fe<sup>2+</sup>含量是反硝化过程的主要限制因素; 而土壤 DOC和Fe<sup>2+</sup>含量是 DNRA 过程的主要限制因素。基于 MIMS的方法体系可以在短时间内(1周)测定水稻 土四种厌氧氮转化速率,且所需样品量低、精确度高,在稻田或湿地土壤厌氧氮转化过程研究中有很好的应用前景。

关键词:水稻土;<sup>15</sup>N示踪;反硝化;厌氧氨氧化;硝酸根异化还原成铵

中图分类号:X830.2 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2019)07-1541-09 doi:10.11654/jaes.2018-1635

# Measurement of denitrification, Anammox, DNRA rates, and net N<sub>2</sub> flux in paddy soil using a membrane inlet mass spectrometer

LI Jin-fang<sup>1,2</sup>, CHAI Yan-chao<sup>1</sup>, CHEN Shun-tao<sup>1,3</sup>, SHAN Jun<sup>1,2\*</sup>, YAN Xiao-yuan<sup>1,2</sup>

(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; 3.China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

**Abstract**: Denitrification, anaerobic ammonium oxidation (Anammox), and dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) are the three nitrate reduction processes that largely control the fate of chemical N fertilizers in flooded rice paddies. Previous studies related to the nitrate reduction process mainly focused on one or two independent processes (e.g., denitrification and Anammox), whereas a simultaneous investigation of denitrification, Anammox, and DNRA and their relative contributions to total nitrate removal is lacking. Because of method-ological limitations, the near *in situ* measurement of net  $N_2$  flux is also rare. In this study, using membrane inlet mass spectrometry (MIMS) combined with laboratory soil slurry-based <sup>15</sup>N tracer and soil core incubation-based  $N_2$ /Ar techniques, denitrification, Anammox, DNRA,

收稿日期:2018-12-28 录用日期:2019-04-02

作者简介:李进芳(1994—),女,青海海东人,硕士研究生,从事稻田氮循环研究。E-mail:jfli@issas.ac.cn

<sup>\*</sup>通信作者:单 军 E-mail:shanjun@issas.ac.cn

**基金项目**:国家自然科学基金项目(41571289);国家重点研发计划项目(2017YFD0200101);中国科学院战略性先导科技专项(B类) (XDB15040202);中国科学院南京土壤研究所"一三五"计划领域前沿项目(ISSASIP1653)

Project supported: The National Natural Science Foundation of China (41571289); The National Key Research and Development Plan of China (2017YFD0200101); The Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (B) (XDB15040202); The "135" Plan and Frontier Project of the Institute of Soil Science(ISSASIP1653)

and net N<sub>2</sub> flux were investigated in five paddy soils collected from different rice regions of China (Yingkou, YK; Yixing, YX; Jinhua, JH; Guilin, GL; Guangan, GA). The measured rates of denitrification, Anammox, DNRA, and net N<sub>2</sub> flux across all paddy soils were ( $358.63 \pm 25.37$ )~( $479.96 \pm 22.12$ ),( $-14.81 \pm 0.22$ )~( $5.29 \pm 1.22$ ),( $25.76 \pm 12.71$ )~( $109.87 \pm 3.88$ ), and( $33.33 \pm 11.16$ )~( $72.74 \pm 14.18$ ) g N·hm<sup>-2</sup>· h<sup>-1</sup>, respectively, which were comparable with previous studies. The soil NO<sub>3</sub>, DOC (dissolved organic carbon), and Fe<sup>2+</sup> contents were the three dominating factors affecting denitrification. By comparison, the Anammox rates only correlated with the soil NO<sub>3</sub> content, whereas the DNRA rates closely related to the soil DOC and Fe<sup>2+</sup> content. These results demonstrate that the MIMS combined with laboratory soil slurry-based <sup>15</sup>N tracer and soil core incubation-based N<sub>2</sub>/Ar techniques is a viable, rapid, and precise method for the measurement of denitrification, Anammox, DNRA rates, and net N<sub>2</sub> flux in flooded paddy soil, with an obvious advantage that a smaller sample size is required for determination compared to other methods.

Keywords: paddy soil; <sup>15</sup>N tracer; denitrification; Anammox; DNRA

水稻田作为一类特殊的人工湿地,是我国农田生 态系统的重要组成部分,由于水稻生长过程中需淹水 栽培,导致水稻土不论在结构、功能还是物质循环过 程方面均显著有别于旱地土壤中。我国水稻田氮肥 投入量高,占世界水稻氮肥用量的37%<sup>[2]</sup>,但稻田氮肥 利用率低下(28.3%)<sup>[3]</sup>,导致大量的活性氮经各种途 径损失进入环境,从而引发一系列的生态环境问题。 研究发现,淹水稻田土壤的氮转化途径以反硝化(Denitrification)、厌氧氨氧化(Anaerobic ammonium oxidation, Anammox)和硝酸根异化还原成铵过程(Dissimilatory nitrate reduction to ammonium, DNRA)为主<sup>[4-6]</sup>。 其中,反硝化和Anammox过程可将土壤中的硝氮和 亚硝氮转化为N<sub>2</sub>排放到大气中,而DNRA过程可以将 硝氮直接异化还原为铵氮,使更多的氮素滞留在土壤 中<sup>[7-8]</sup>。具体到氮素转化过程层面,反硝化、Anammox 和DNRA途径都涉及硝酸根的还原过程,硝酸根是其 共同底物,因此,三者之间在同一体系中可能存在竞 争关系。由于终端产物都是 N2,反硝化和 Anammox 会导致肥料氮(尤其是硝氮)损失,但同时反硝化和 Anammox 也是将活性氮最终转化为惰性氮,终止其 负面环境影响的最重要自然过程,而DNRA 过程则是 一个保氮过程,也是农学上所希望的。如何在同一体 系下,准确量化上述几个硝酸根还原过程的发生速 率,明确其关键限制因素,进而探寻相关过程的调控 途径,对于降低硝酸根还原过程导致的稻田氮素损失 和负面环境效应,具有十分重要的理论与现实意义。

过去有关稻田厌氧氮转化过程的研究大多集中 在反硝化方面,然而稻田反硝化的研究一直受测定方 法的限制,因为大气背景 N<sub>2</sub>浓度高达 79%,要在如此 高 N<sub>2</sub>背景环境中直接测定反硝化产物 N<sub>2</sub>,需要方法 的精度达到 0.1%,一般方法难以满足此要求<sup>19</sup>。以往 采用的稻田反硝化研究方法主要包括乙炔抑制法、差 值法和大田<sup>15</sup>N标记肥料示踪法<sup>[10]</sup>。这几种方法缺陷 都很明显,乙炔抑制法虽然简单快捷、成本低,但是会 严重低估土壤反硝化速率,并且特别不适用于淹水环 境。对于差值法而言,所有其他氮素去向测定的误差 都累计到了反硝化过程中111,导致结果变异非常大。 大田<sup>15</sup>N肥料示踪法存在土壤微生物优先利用轻质同 位素、标记"N肥料和土壤本身"N混合不均匀等问 题,所获取的结果只能定性解释氮的去向,而不能准 确定量各种氮转化过程通量[12]。相对于海洋和河口 生态系统,稻田生态系统中 Anammox 和 DNRA 的研 究还较少[13-14],而稻田土壤特有的干湿交替环境和氧 化还原梯度很可能有利于 Anammox 和 DNRA 过程的 发生。有研究表明,一些 Anammox 菌如 K. stuttgartiensis 也能进行 DNRA 作用<sup>[15]</sup>, 而 DNRA 作用产生 的NHt可进一步经过 Anammox 被转化为 N2导致氮素 损失,但在稻田生态系统,DNRA能否与Anammox耦 合发生还有待进一步明确。目前用于测定稻田 Anammox和DNRA速率的方法多是基于<sup>15</sup>N示踪的气 相色谱-同位素比质谱(GC-IRMS)分析方法[16],由于 IRMS价格昂贵,一定程度上限制了其广泛应用。

近年来,基于 N<sub>2</sub>/Ar 测定原理的膜进样质谱 (Membrane Inlet Mass Spectrometer, MIMS)法的出现 和快速发展,使得直接、精确和原位测定淹水环境落 解性 N<sub>2</sub>成为可能,极大地推动了淹水环境氮转化过 程的研究<sup>[17-18]</sup>。前期,通过引进美国马里兰大学的 Kana 等<sup>[19]</sup>开发的 MIMS 装置,将 MIMS 和原状沉积物 采样及 <sup>15</sup>N 同位素配对技术联用,我们陆续建立了基 于 MIMS 测定湿地底泥净脱氮<sup>[20]</sup>、反硝化和 Anammox 速率的方法体系<sup>[21]</sup>。针对稻田生态系统的特点,我们 进行了相关培养方法的改进,进一步通过将 MIMS 与 <sup>15</sup>N 同位素配对、<sup>15</sup>NH<sub>4</sub>化学氧化法<sup>[7]</sup>和 Flow-through 培养装置联用,既可以实现对同一体系下水稻土 NO<sub>3</sub> 还原各过程(反硝化、Anammox和DNRA)的测定,也 可以用土柱模拟稻田土壤实现净脱氮速率的测定。 利用该方法,本文研究5种典型水稻土中反硝化、 Anammox、DNRA和净脱氮的速率,并分析了环境因 素对这几种厌氧氮转化速率的影响,相关结果可为深 入理解稻田厌氧氮转化过程提供科学依据。

#### 1 材料和方法

#### 1.1 土壤样品的采集和处理

为了验证 MIMS 测定方法的可靠性和测定结果的稳定性,实验采集了辽宁营口(YK)、江苏宜兴(YX)、浙江金华(JX)、广西桂林(GL)和四川广安(GA)5种较为典型的水稻土作为研究对象,保证了研究对象的代表性。

用土钻采集稻田表层0~20 cm的湿土,置于装有 冰袋的保温箱带回实验室,在通风阴凉处稍作风干后 过10目筛后混匀。然后分成两部分,一份置于阴凉 通风处完全风干用于测定土壤背景基本理化性质及 速效组分;另一份置于4℃冰箱保存,用于4种厌氧氮 转化速率的测定。

每次采集稻田土样时,记录稻田近期的施肥情况、地理位置等背景信息,测定的基本理化性质和速效组分包括pH、总氮(TN)、铵氮(NH<sup>‡</sup>)、硝氮(NO<sup>5</sup><sub>3</sub>)、有机碳(SOC)、溶解性有机碳(DOC)、亚铁(Fe<sup>2+</sup>)含量、土壤机械组成(Soil mechanical composition)等如表1所示。硝氮、铵氮用2mol·L<sup>-1</sup>的KCl浸提、过滤后用流动分析仪(Skalar Analytical, Breda, The Netherlands)测定;可溶解性有机碳可用去离子水按土水比1:5浸提后过0.45  $\mu$ m的滤膜,然后用TOC分析仪(Analytik Jena AG, Germany)测定。

#### 1.2 反硝化、Anammox和DNRA速率测定

在厌氧情况下,称取2.5g过筛土样于12mLLabco圆底顶空瓶中,每种土样设置24个重复,5种水稻 土共120个样品,加入充氦纯水(取纯水2L曝氦气 30 min),混匀泥浆后紧盖瓶盖(瓶内不能有气泡),室 温 25 ℃下放于垂直旋转培养器(转速为8 r•min<sup>-1</sup>)预 培养一周,消耗土样中的背景硝酸根和O<sub>2</sub>。

用充氦气至饱和的纯水配制K<sup>15</sup>NO<sub>3</sub>溶液,预培养 结束后用该K<sup>15</sup>NO<sub>3</sub>溶液标记样本,标记后使其每个样 本中<sup>15</sup>N的浓度为100 µmol·L<sup>-1</sup>(该值根据田面水和 土壤背景硝氮含量设定;前期研究[13,22-23]在测定水稻 土 Anammox 时进行3种处理,分别是NH4、NH4+15NO3 和仅加<sup>15</sup>NO5处理,结果已证明水稻土中存在Anammox 过程,因此这里仅进行了加<sup>15</sup>NO5处理)。取60个 预培养结束的样品(每个土样12个重复,5个土样)分 3份,每份20个样品(每个土样4个重复,5个土样)在 25 ℃恒温水浴培养箱中分别培养0、3、6h,每个取样 点4个重复,加入200  $\mu$ L7 mol·L<sup>-1</sup>的ZnCl<sub>2</sub>溶液进行 灭菌终止培养(ZnCl<sub>2</sub>通过破坏细菌细胞膜而起到灭 菌作用)。结束后将60个样品用离心机以2000 r· min<sup>-1</sup>的转速离心 5 min 后置于恒温水浴培养箱中 25 ℃保温,通过 MIMS 测定 <sup>29</sup>N<sub>2</sub>和 <sup>30</sup>N<sub>2</sub>浓度(设置温度 25℃),计算反硝化和Anammox速率。

剩余 60 个样品用于 DNRA 的测定,具体为:首 先,制备 NH:氧化剂(次溴酸盐碘溶液),将 120 mL溴 水缓慢滴入 600 mL 16 mol·L<sup>-1</sup>的 NaOH溶液中,注意 此时装有 NaOH溶液的烧杯要置于 5 ℃以下的冰水混 合物中,整个过程需要持续搅拌并始终保持冰水混合 物的温度在 5 ℃以下,混合后的溶液置于 4 ℃冰箱静 置一周后,取出用分液漏斗过滤,取上清液与0.2%的 KI溶液等体积混合后保存于 4 ℃冰箱,即得到次溴酸 盐碘溶液<sup>1241</sup>。其次,制作标准曲线,用充氦纯水配制 0、2、4、6、8、10、20  $\mu$ mol·L<sup>-1 15</sup>NH4Cl溶液,分别装满 12 mL Labco 圆底顶空瓶,盖紧瓶盖,然后加入 200  $\mu$ L NH 4 氧化剂将<sup>15</sup>NH 4 全部氧化为<sup>29</sup>N<sub>2</sub>和<sup>30</sup>N<sub>2</sub>后用 MIMS(设置温度 25 ℃)进行测定,并用总<sup>15</sup>N(<sup>29</sup>N<sub>2</sub>+ 2×<sup>30</sup>N<sub>2</sub>)浓度与初始<sup>15</sup>NH4Cl的浓度线性回归做成标准 曲线,用于 DNRA 速率的计算。需要指出的是 60 个

		5	1				1 5			
土样 Soil sample	рН	铵氮含量 NH‡/mg•kg <sup>-1</sup>	硝氮含量 NO3/mg·kg <sup>-1</sup>	亚铁含量 Fe <sup>2+</sup> /mg·kg <sup>-1</sup>	有机碳 SOC/%	总氮 TN/%	溶解性有机碳 DOC/mg·kg <sup>-1</sup>	黏粒含量 Clay/%	粉粒含量 Silt/%	砂粒含量 Sand/%
营口(YK)	4.9	3.64	31.12	26.23	2.9	0.12	60.05	36.5	31.7	31.8
宜兴(YX)	6.4	0.78	27.8	29.08	1.43	0.13	105.69	16.4	39.5	44.1
金华(JH)	6.2	7.53	19.47	31.83	1.27	0.11	316.02	27.7	45.7	26.6
桂林(GL)	6.4	1.31	36.19	14.76	1.98	0.43	85.1	40.3	33.4	26.3
广安(GA)	7.2	6.08	22.31	31.97	2.45	0.12	165.05	39.9	33.5	26.6

表1 5种水稻土的基本理化性质和速效组分 Table 1 Physicochemical properties and available component of the five paddy soils

样品的标记培养与反硝化、Anammox培养过程一致, 但 DNRA 的测定还需将培养结束的 60 个样品按不同 处理分别倒入 100 mL 广口瓶中进行充氦 0.5 h,排出样 品中反硝化、Anammox等过程产生的<sup>28</sup>N<sub>2</sub>、<sup>29</sup>N<sub>2</sub>和<sup>30</sup>N<sub>2</sub>后 分装到干净的 12 mL 顶空瓶中,加入 200 μL NH<sup>‡</sup>氧化 剂,充分摇匀使得样品中 DNRA 过程产生的<sup>15</sup>NH<sup>‡</sup>几乎 全部被氧化为<sup>29</sup>N<sub>2</sub>和<sup>30</sup>N<sub>2</sub>后,同样离心后置于恒温水浴 培养箱中 25 ℃保温,用 MIMS 测定总<sup>15</sup>N(<sup>29</sup>N<sub>2</sub>+2×<sup>30</sup>N<sub>2</sub>) 浓度,通过标准曲线计算 DNRA 速率。

#### 1.3 净脱氮过程速率的测定

通过将 MIMS 装置与 Flow-through 培养系统(图 1)联用,可以实现不添加<sup>15</sup>N标记物而直接测定体系 内的净脱氮速率,能最大限度地代表近似原位情况下 的 N<sub>2</sub>产生速率。具体地,称取 800 g水稻土(实验前 种植黑麦草使水稻土的硝氮含量降至10 mg·kg<sup>-1</sup>以 下)加入柱状采泥器,土柱高度约15 cm,上浮水高度 约25 cm,共3个平行样。将采泥器用带有磁转子的 盖子密封,连接好进水管与出水管,用事先混合及气 体平衡好的去离子水通过虹吸缓慢加入至采泥器,避 免土样表面被水流冲起,直至采泥器内无气泡。将采 泥器放入水浴磁力搅拌培养装置中,打开磁力搅拌 器,预培养1~2d。用注射器将尿素溶液通过进水孔 橡胶塞注入采泥器,使其中起始尿素氮含量为60 mg· kg<sup>-1</sup>,等待尿素在上覆水中混合均匀后采集水样,作为 0h的水样并记录时间,并在培养至24、48h时分别再 次采样,每个时间点每个土柱采集3个平行样品,所 以每个土样有27个样品(3个平行土柱×3个时间点× 每个时间点取3个平行样),故5种水稻土共需要采集





135个样品。采样时先空排 20 mL水样,消除管道内 水样影响,从7 mL的 Labco 顶空瓶瓶底注入水样,防 止产生气泡,水样采集后拧紧盖子,加入 200 μL 7 mol·L<sup>-1</sup>ZnCl<sub>2</sub>,混匀后置于4℃冰箱保存待测。

#### 1.4 原理和计算

1.4.1 反硝化、Anammox和DNRA速率计算

反硝化和 Anammox 过程得到的<sup>29</sup>N<sub>2</sub>和<sup>30</sup>N<sub>2</sub>浓度用 于反硝化和 Anammox 速率的计算<sup>[23,25]</sup>,其基本原理是 将高丰度的<sup>15</sup>NO<sub>3</sub>(>99%)加入到体系中,经培养后, 通过测定最终产物 N<sub>2</sub>及其同位素组分(<sup>29</sup>N<sub>2</sub>、<sup>30</sup>N<sub>2</sub>)的 比例,并利用 N<sub>2</sub>产生过程的随机配对原则计算反硝 化和 Anammox 的速率<sup>[25]</sup>,具体计算过程可参考 Shan 等<sup>[23]</sup>文章。

计算 DNRA 速率时,先通过标准曲线计算出不同 时间段 DNRA 过程产生的<sup>15</sup>NH<sub>4</sub>的含量,并与培养时 间回归得到<sup>15</sup>NH<sub>4</sub>的产生速率,单位为μmol·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>, 进一步用公式(1)求出 DNRA 的速率。

 R=(Slop1<sup>15</sup>NH4\*)×V)/W
 (1)

 式中:R为DNRA的潜势,nmol·g<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>;Slop1<sup>15</sup>NH4\*]

 为<sup>15</sup>NH4浓度与培养时间回归得到斜率(<sup>15</sup>NH4\*的产生

 速率);V为培养瓶的容积;W为干土质量。

1.4.2 净脱氮速率计算

在密闭的 flow-through 培养体系中,土壤净脱氮 过程的终端产物 N<sub>2</sub>的溶解浓度的变化可以计算得到 ( $\Delta C = C_{in} - C_{out}$ ),在一段时间内,净脱氮速率可以根据 不同培养时间 N<sub>2</sub>浓度和时间做线性回归得到,直线斜 率即是土柱上覆水中 N<sub>2</sub>浓度变化速率(µmol N<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>· h<sup>-1</sup>)。通过测定加入尿素后培养 0、24、48 h的样本 中<sup>28</sup>N<sub>2</sub>的浓度(µmol·L<sup>-1</sup>)与时间回归得到<sup>28</sup>N<sub>2</sub>的产生 速率(µmol·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>)。然后用公式(2)计算出净脱氮速 率如下:

$$R = (Slop_{l^{28}N_2} \times 2V)/W \tag{2}$$

式中:R为净脱氮的潜势,nmol·g<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>;Slop<sub>1</sub><sup>28</sup>N<sub>2</sub>为<sup>28</sup>N<sub>2</sub> 浓度与培养时间回归得到斜率(<sup>28</sup>N<sub>2</sub>的产生速率);V 为培养柱子的容积;W为干土质量。

### 1.5 数据处理和统计分析

采用Origin 8.6中的一元线性回归法将 MIMS测定的  $^{29}N_2$ 、 $^{30}N_2$ 、 $^{15}N$  ( $^{29}N_2+2\times^{30}N_2$ )及  $^{28}N_2$ 浓度分别与时间回归后得到  $^{29}N_2$ 、 $^{30}N_2$ 和总  $^{15}N$ 的产生速率,用于判定  $^{29}N_2$ 、 $^{30}N_2$ 、 $^{30}N_2$ 、 $^{21}N_2$ 的浓度是否随时间线性增加和计算反硝化、Anammox、DNRA及净脱氮速率。采用 SAS 8.0软件中单因素方差分析和 Duncan分析分别对不同水稻土间的反硝化、Anammox、DNRA及

净脱氮4种氮转化速率进行显著性分析(α=0.05)。 利用 SPSS 14.0 皮尔逊相关分析法考察了反硝化、 Anammox、DNRA 和净脱氮速率与土壤背景理化性质 包括总氮(TN)、铵氮(NH<sup>4</sup>)、硝氮(NO<sup>5</sup>)、有机碳 (SOC)、溶解性有机碳(DOC)和亚铁(Fe<sup>2+</sup>)含量之间 的相关性。

#### 2 结果与讨论

#### 2.1 4种氮转化速率的方法评估

本实验中5种水稻土<sup>15</sup>N标记培养0、3、6h后的<sup>29</sup>N<sub>2</sub>和<sup>30</sup>N<sub>2</sub>的浓度如图2所示,5种水稻土中的<sup>29</sup>N<sub>2</sub>和<sup>30</sup>N<sub>2</sub>的浓度随0、3、6h均呈显著的线性变化(P<0.05)。<sup>30</sup>N<sub>2</sub>的增长要明显高于<sup>29</sup>N<sub>2</sub>的增长,这与赵永强等<sup>[21]</sup>在河口沉积物中的研究一致,说明稻田中的反硝化速率高于Anammox速率,也表明了基于MIMS法与<sup>15</sup>N示踪技术可以准确测定水稻土的反硝化和Anammox潜势。

DNRA速率的测定中,制作的标准曲线如图3a, MIMS测定得到的总<sup>15</sup>N(<sup>29</sup>N<sub>2</sub>+2×<sup>30</sup>N<sub>2</sub>)随<sup>15</sup>NH‡浓度增 大呈显著线性增加(P<0.01),表明次溴酸盐碘溶液能 将<sup>15</sup>NH;彻底氧化为<sup>29</sup>N<sub>2</sub>和<sup>30</sup>N<sub>2</sub>。5种水稻土随0、3、6 h培养后产生的总<sup>15</sup>N如图3b所示,5种水稻土样本的 总<sup>15</sup>N均随培养时间呈线性增长趋势(P<0.05),从而 能够成功得到5种水稻土的DNRA速率,这表明了利 用MIMS和<sup>15</sup>NH;氧化法测定DNRA速率是可行的。

同样地,测定净脱氮时,MIMS测定的<sup>28</sup>N<sub>2</sub>的浓度 随0、24、48h呈显著线性增长趋势(图4;*P*<0.01),表 明了实验模拟原位土柱以及结合 MIMS 可以精确测 定水稻土中添加尿素后的净脱氮速率。

#### 2.2 水稻土反硝化、Anammox和DNRA潜势

5个采样点的反硝化、Anammox、DNRA速率分别 在(11.52±0.81)~(15.50±0.69)、(-0.44±0.06)~(0.15±0.04)、(0.82±0.41)~(3.50±0.12)nmol N·g<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>之间 (图 5a)。其中,营口(YK)和桂林(GL)水稻土的反硝 化速率显著高于其他 3种水稻土(P<0.01),而金华 (JH)的反硝化潜势最低。5种水稻土的 Anammox潜 势均很低,尤其金华和广安(GA)出现了负值,可能水 稻土中存在的固氮菌固定的<sup>29</sup>N<sub>2</sub>大于反硝化和 Anammox 过程产生的<sup>29</sup>N<sub>2</sub>所致<sup>[26]</sup>。基于<sup>15</sup>N示踪技术和同 位素比质谱仪(IRMS),Gu 等<sup>[27]</sup>对常熟水稻土的研究









Figure 3 Relationship of the known  $^{15}\rm NH_4^+$  concentrations with measured signal intensities of total  $^{15}\rm N(^{29}\rm N_2+2\times^{30}\rm N_2)(a)$  and the concentration of total  $^{15}\rm N$  in five paddy soils after incubation of 0, 3 and 6 h(b)





Figure 4 Concentration of  $^{28}N_2$  in five paddy soils after incubation of 0,24 and 48 h

#### 农业环境科学学报 第38卷第7期

发现其反硝化速率在 17.18~21.96 nmol N·g<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>之间, Anammox 速率为 1.80~2.08 nmol N·g<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>之间; Nie 等<sup>[28]</sup>对福建水稻土的研究发现反硝化速率在 20.10~36.10 nmol N·g<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>之间, Anammox 速率为 1.70~2.40 nmol N·g<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>, 与本实验结果具有可比性。 其他研究结果, 如浙江嘉兴及淮安等地的反硝化和 Anammox 速率<sup>[29-30]</sup>也均与本实验基于 MIMS 的<sup>15</sup>N示 踪技术测定结果具有很好的可比性。

宜兴(YX)、金华(JH)和广安(GA)的DNRA 潜势 显著高于营口(YK)和桂林(GL)水稻土样本(P< 0.01)。需指出DNRA 过程与反硝化过程出现了此消 彼长的现象(图5b),可能与两种过程共同和竞争利 用硝氮和DOC有关<sup>[23]</sup>,而DNRA 与 Anammox 速率并 不相关。Lu等<sup>[31]</sup>基于<sup>15</sup>N同位素示踪法和IRMS研究 测得日本筑波水稻田的DNRA 速率在 8.06~28.08 nmol N·g<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>之间,在数量级上也具有可比性。Shan 等<sup>[23,32]</sup>基于 MIMS 的<sup>15</sup>N示踪手段测定了江苏常熟水 稻土的DNRA 速率,测定值在 0.20~1.10 nmol N·g<sup>-1</sup>· h<sup>-1</sup>之间,与本实验结果类似,说明这一方法具有很好 的稳定性。

#### 2.3 水稻土总脱氮潜势

本实验中,5种水稻土的净脱氮速率分别为  $(1.65\pm0.01)$ ,  $(1.06\pm0.29)$ ,  $(2.32\pm0.37)$ ,  $(2.14\pm0.19)$ , (1.61±0.30)nmol N·g<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>,此速率均小于利用<sup>15</sup>N同 位素配对法测定的5种土相对应的反硝化与Anammox速率之和,我们推测加入的尿素先转化为NO3,再 通过反硝化和 Anammox 过程脱氮,这个过程并不像 直接加入硝氮那样顺利地进行脱氮过程,进而使得净 脱氮速率相对低于直接加NO5的处理,又因稻田中施 用尿素而非KNO3,所以这能更好地反映稻田中原位 净脱氮速率。目前有关稻田中的净脱氮速率的研究 很少,此前Shan等[23]利用MIMS测定净脱氮速率时, 未消耗土样中的背景 NO3, 从而有利于反硝化和 Anammox 过程的发生,测出的净脱氮速率范围为 8.27~30.00 nmol N·g<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>之间,此速率高于本实验结 果是可理解的。而李晓波等[3]对常熟农田生态系统 稻作农田的研究中,采用PVC柱从稻田采集原状土 样在室内进行混施和表施尿素处理,通过 MIMS测得 N<sub>2</sub>产生速率在0.92~1.66 nmol N·g<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>之间,这与我 们实验测得的净脱氮速率在数值上保持一致,从而表 明了 MIMS 装置结合 Flow-through 系统可以通过室内 模拟原位培养精确测定净脱氮潜势,而且操作过程简 单,样本量少,省去了在稻田原位测定带来的困扰。



DNRA rates(b) in the five paddy soils

需要指出的是,由于田间原位情况下,稻田氮素厌氧 转化受土壤理化性质、温度、水分、水稻生长周期时长 的影响,目前我们的实验体系测得的厌氧氮转化速率 仅能表征田间情况下氮素实际转化速率的潜势,并不 能真正指示田间原位氮素厌氧转化速率,未来还需进 一步结合田间原位采样技术进行研究。此外,由于实 际水稻田并非完全厌氧状态,而本文4种速率的测定 过程均在密闭厌氧条件下进行,相比较于田间状况可 能会抑制 NH:转化为 NO;这一过程,导致低估脱氮速 率。另外,由于N2O也是反硝化过程产生的中间产 物,可以直接被土壤释放,而本研究只测定了N<sub>2</sub>,也 会一定程度上导致反硝化及净脱氮速率偏低。但此 方法通过简单操作能在较短时间内同时测定反硝化、 Anammox、DNRA和净脱氮4种速率,在比较同一样本 不同速率间的差异时避免了测定时间不同带来的误 差,这一优势不可忽略。

#### 2.4 环境因素对几种厌氧氮转化速率的影响

5种水稻土的4种氮转化速率与土壤基本理化性 质之间的关系如表2所示。反硝化速率的主要环境 影响因子是NO3、DOC和土壤Fe<sup>2+</sup>含量;Anammox过 程的主要限制性因素为土壤 NO5; 而 DNRA 过程的主 要影响因子为 DOC 和土壤 Fe<sup>2+</sup>含量。反硝化速率与 水稻土背景硝氮含量呈显著正相关(表2;P<0.01)关 系,硝氮为反硝化过程提供了底物,水稻土中其含量 越大,反硝化潜势则越高,我们的分析结果与之相符。 土壤DOC不仅能够为反硝化和DNRA过程提供能量 和电子[8],还能促使土壤有机氮的矿化[34],进而促进这 两种氮转化过程的发生,本文分析结果也是如此(表 2)。已有大量研究证明亚铁离子氧化与反硝化过程 表2氮转化过程与土壤理化性质间的皮尔逊相关分析

Table 2 Pearson's correlation analyses between the N transformation rates and the physiochemical parameters of the five paddy soils(n=5)

相关系数 Correlation	硝氮 NO₃/mg•kg⁻¹	溶解性有机碳 DOC/mg·kg <sup>-1</sup>	亚铁含量 Fe <sup>2+</sup> content/ mg·kg <sup>-1</sup>
反硝化Dnitrification	0.88**	0.83**	0.75**
厌氧氨氧化 Anammox	0.69*		
DNRA		0.87**	0.89**

注:\* 表示在 0.05 的显著性水平上显著,\*\* 表示在 0.01 的显著性 水平上显著。

Notes: \* Correlation is significant at the 0.05, and \*\* Correlation is significant at the 0.01.

或DNRA过程发生耦合,进而促进这两种过程的发 生1351,本实验结果(表2)也证明了这一点,亚铁背景值 高的水稻土反硝化和 DNRA 速率也显著较高(P<  $(0.01)_{\circ}$ 

#### 结论 3

(1)本文完善了基于 MIMS 的方法体系,实现了 同一体系下对稻田土壤反硝化、Anammox 和 DNRA 的 测定,同时也能实现对稻田土壤净脱氮速率的近似原 位表征,相关结果与其他方法研究结果具有可比性, 且操作简单、实验周期短,在未来稻田土壤厌氧氮转 化过程方面有很好的应用前景。

(2)所研究的5种稻田土壤中,反硝化、Anammox、DNRA、净脱氮速率范围分别为(11.52±0.81)~  $(15.50 \pm 0.69)$ ,  $(-0.44 \pm 0.06) \sim (0.15 \pm 0.04)$ ,  $(0.82 \pm 0.04)$ 0.41 ~  $(3.50\pm0.12)$  ~  $(1.06\pm0.29)$  ~  $(2.32\pm0.37)$  nmol N ·  $g^{-1} \cdot h^{-1}$ ,  $\mathbb{P}(358.63 \pm 25.37) \sim (479.96 \pm 22.12) (-14.81 \pm 25.37) \sim (-14.81 \pm 25.37)$ 

0.22)~(5.29±1.22)、(25.76±12.71)~(109.87±3.88)、 (33.33±11.16)~(72.74±14.18)gN·hm<sup>-2</sup>·h<sup>-1</sup>。另外,水 稻土反硝化过程的主要限制因素有土壤NO<sub>3</sub>、DOC和土 壤Fe<sup>2+</sup>含量;Anammox的关键限制因素是NO<sub>3</sub>;DNRA 过程的主要限制因素有土壤DOC和土壤Fe<sup>2+</sup>含量。

#### 参考文献:

[1] 徐 琪, 杨林章, 董元华. 中国稻田生态系统[M]. 北京:中国农业出版社, 1998.

XU Qi, YANG Lin-zhang, DONG Yuan-hua. Paddy ecosystem in China[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1998.

[2] 彭少兵, 黄见良, 钟旭华, 等. 提高中国稻田氮肥利用率的研究策略 [J]. 中国农业科学, 2002, 35(9):1095-1103.

PENG Shao-bing, HUANG Jian-liang, ZHONG Xu-hua, et al. Research strategy in improving fertilizer-nitrogen use efficiency of irrigated rice in China[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2002, 35(9):1095-1103.

[3] 张福锁, 王激清, 张卫峰, 等. 中国主要粮食作物肥料利用率现状与提高途径[J]. 土壤学报, 2008, 45(5):915-924.
 ZHANG Fu-suo, WANG Ji-qing, ZHANG Wei-feng, et al. Nutrient

use efficiencies of major cereal crops in China and measures for improvement[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2008, 45(5):915–924.

- [4] 蔡祖聪. 尿素和KNO,对水稻土无机氮转化过程和产物的影响 I 无机氮转化过程[J]. 土壤学报, 2003, 40(2):239-245.
  CAI Zu-cong. Effects of urea and KNO<sub>3</sub> on processes and products of inorganic nitrogen transformation in paddy soils I. Processes of inorganic nitrogen[J]. Acta Pedologica Sinica, 2003, 40(2):239-245.
- [5] Kuypers M M M, Marchant H K, Kartal B. The microbial nitrogen-cycling network[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(5):263-276.
- [6] 胡晓婷,程 吕,林贤彪,等. 沉积物硝酸盐异化还原过程的温度敏 感性与影响因素——以长江口青草沙水库为例[J]. 中国环境科学, 2016, 36(9):2624-2632.

HU Xiao-ting, CHENG Lü, LIN Xian-biao, et al. Temperature sensitivity and controlling factors of dissimilatory nitrate reduction processes in sediments of Qingcaosha reservoir, Yangtze Estuary[J]. *China Environmental Science*, 2016, 36(9):2624–2632.

- [7] Yin G Y, Hou L B, Liu M, et al. DNRA in intertidal sediments of the Yangtze Estuary[J]. Journal of Geophysical Research: Biogeosciences, 2017, 122(8):1988-1998.
- [8] Van den Berg E M, Elisario M P, Kuenen J G, et al. Fermentative bacteria influence the competition between denitrifiers and DNRA bacteria [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8:1684.
- [9] Butterbach-Bahl K, Willibald G, Papen H, et al. Soil core method for direct simultaneous determination of N<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O emissions from forest soils[J]. *Plant and Soil*, 2002, 240(1):105–116.
- [10] 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(6):2091–2122.
- [11] David M B, Wall L G, Royer T V, et al. Denitrification and the nitrogen budget of a reservoir in an agricultural landscape[J]. *Ecological*

农业环境科学学报 第38卷第7期

Applications, 2006, 16(6):2177-2190.

- [12] Cornwell J C, Kemp W M, Kana T M. Denitrification in coastal ecosystems: methods, environmental controls, and ecosystem level controls, a review[J]. Aquatic Ecology, 1999, 33(1):41–54.
- [13] Yang X R, Li H, Nie S A, et al. The potential contribution of Anammox to nitrogen loss from paddy soils in Southern China[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 81(3):938–947.
- [14] Sato Y, Ohta H, Yamagishi T, et al. Detection of Anammox activity and 16S rRNA genes in ravine paddy field soil[J]. *Microbes and Envi*ronments, 2012, 27(3):316–319.
- [15] Kartal B, Kuypers M M M, Lavik G, et al. Anammox bacteria disguised as denitrifiers: Nitrate reduction to dinitrogen gas via nitrite and ammonium[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(3):635-642.
- [16] Saggar S, Jha N, Deslippe J, et al. Denitrification and N<sub>2</sub>O: N<sub>2</sub> production in temperate grasslands: Processes, measurements, modelling and mitigating negative impacts[J]. Science of the Total Environment, 2013, 465:173-195.
- [17] Hou L J, Zheng Y L, Liu M, et al. Anaerobic ammonium oxidation (Anammox) bacterial diversity, abundance, and activity in marsh sediments of the Yangtze Estuary[J]. Journal of Geophysical Research: Biogeosciences, 2013, 118(3):1237-1246.
- [18] 陈能汪, 吴杰忠, 段恒轶, 等. N<sub>2</sub>: Ar法直接测定水体反硝化产物溶解 N<sub>2</sub>[J]. 环境科学学报, 2010, 30(12): 2479-2483. CHEN Neng-wang, WU Jie-zhong, DUAN Heng-yi, et al. N<sub>2</sub>: Ar method for direct measurement of denitrification product (dissolved N<sub>2</sub>) using membrane inlet mass spectrometry (MIMS)[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2010, 30(12): 2479-2483.
- [19] Kana T M, Darkangelo C, Hunt M D, et al. Membrane inlet massspectrometer for rapid high-precision determination of N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, and Ar in environmental water water samples[J]. *Analytical Chemistry*, 1994, 66(23):4166-4170.
- [20] 李晓波, 夏永秋, 郎 漫, 等. N<sub>2</sub>: Ar法直接测定淹水环境反硝化产物 N<sub>2</sub>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<sub>2</sub>: 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.
- [21] 赵永强, 夏永秋, 李博伦, 等.利用膜进样质谱同时测定河流沉积 物反硝化和 Anammox[J].农业环境科学学报, 2014, 33(4):794-802.

ZHAO Yong-qiang, XIA Yong-qiu, LI Bo-lun, et al. Simultaneous determination of denitrification and anaerobic ammonium oxidation in river sediments using membrane inlet mass spectrometry[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2014, 33(4):794-802.

- [22] 聂三安, 於辰佳, 李 虎, 等. 水稻土厌氧氨氧化活性测定的同位 素示踪法方法探讨[J]. 农业现代化研究, 2015, 36(4):680-683. NIE San-an, YU Chen-jia, LI Hu, et al. Determination of Anammox activity in paddy soils with isotope-tracing technique[J]. *Research of Agricultural Modernization*, 2015, 36(4):680-683.
- [23] Shan J, Zhao X, Sheng R, et al. Dissimilatory nitrate reduction pro-

#### 2019年7月

cesses in typical Chinese paddy soils: Rates, relative contributions, and influencing factors[J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(18):9972–9980.

[24] 尹国宇.河口近岸氮素的削减途径及抗生素的机理研究[D].上海:华东师范大学,2014.

YIN Guo-yu. Processes of nitrogen removal and effects of antibiotic residues on denitrification in estuarine and coastal regions[D]. Shang-hai:East China Normal University, 2014.

- [25] Thamdrup B, Dalsgaard T. Production of N<sub>2</sub> through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(3):1312-1318.
- [26] Hayashi K, Tokida T, Matsushima M Y, et al. Free-air CO<sub>2</sub> enrichment(FACE) net nitrogen fixation experiment at a paddy soil surface under submerged conditions[J]. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 2014, 98(1):57-69.
- [27] Gu C, Zhou H F, Zhang Q C, et al. Effects of various fertilization regimes on abundance and activity of anaerobic ammonium oxidation bacteria in rice-wheat cropping systems in China[J]. Science of the Total Environment, 2017, 599;1064-1072.
- [28] Nie S A, Lei X M, Zhao L X, et al. Response of activity, abundance, and composition of Anammox bacterial community to different fertilization in a paddy soil[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2018, 54(8): 977–984.
- [29] Pan F X, Chapman S J, Li Y Y, et al. Straw amendment to paddy soil stimulates denitrification but biochar amendment promotes anaerobic ammonia oxidation[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2017, 17(10): 2428–2437.

- [30] Yang Y J, Zhang H P, Shan Y H, et al. Response of denitrification in paddy soils with different nitrification rates to soil moisture and glucose addition[J]. Science of the Total Environment, 2019, 651 (2) : 2097–2104.
- [31] Lu W W, Riya S, Zhou S, et al. In situ dissimilatory nitrate reduction to ammonium in a paddy soil fertilized with liquid cattle waste[J]. Pedosphere, 2012, 22(3);314-321.
- [32] Shan J, Yang P P, Rahman M M, et al. Tetracycline and sulfamethazine alter dissimilatory nitrate reduction processes and increase N<sub>2</sub>O release in rice fields[J]. *Environmental Pollution*, 2018, 242(A):788– 796.
- [33] 李晓波. 基于膜进样质谱法的湿地和稻田反硝化研究[D]. 南京: 中国科学院南京土壤研究所, 2013.
  LI Xiao-bo. Study of denitrification in the wetland and flooded ricepaddy in Eastern China by means of membrane inlet mass spectrometry[D]. Nanjing: Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, 2013.
- [34] 韩成卫,李忠佩,刘 丽,等.溶解性有机质在红壤水稻土碳氮转化中的作用[J].生态环境,2006,15(6):1300-1304.
  HAN Cheng-wei, LI Zhong-pei, LIU Li, et al. Influence of dissolved organic matter on transformations of carbon and nitrogen in paddy soils in subtropical China[J]. *Ecology and Environment*, 2006, 15(6): 1300-1304.
- [35] Robertson E K, Thamdrup B. The fate of nitrogen is linked to iron(II) availability in a freshwater lake sediment[J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2017, 205:84–99.