

高岩, 易能, 张志勇, 等. 2012. 凤眼莲对富营养化水体硝化、反硝化脱氮释放 N_2O 的影响[J]. 环境科学学报, 32(2): 349-359
Gao Y, Yi N, Zhang Z Y, et al. 2012. Effect of water hyacinth on N_2O emission through nitrification and denitrification reactions in eutrophic water[J].
Acta Scientiae Circumstantiae, 32(2): 349-359

凤眼莲对富营养化水体硝化、反硝化脱氮释放 N_2O 的影响

高岩¹, 易能^{1,2}, 张志勇¹, 刘海琴¹, 邹乐^{1,2}, 朱华兵¹, 严少华^{1,*}

1. 江苏省农业科学研究院农业资源与环境研究所, 南京 210014
2. 南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095

收稿日期: 2011-03-28 修回日期: 2011-05-16 录用日期: 2011-06-01

摘要: 以往有关大型水生漂浮植物消减富营养化水体氮(N)的研究主要侧重于植物对 N 的吸收效果, 而忽略了硝化、反硝化反应途径对水体脱氮的贡献。基于此, 本研究中借助具创新性的收集凤眼莲种植水体释放 N_2O 的装置和方法, 通过模拟实验研究了凤眼莲对富营养化水体硝化、反硝化脱氮中间产物 N_2O 的影响。结果表明, 凤眼莲可以促进富营养化水体的硝化、反硝化、成对硝化-反硝化反应过程, 在本实验条件下凤眼莲种植水体在整个培养期内释放的 N_2O 气体浓度累积升高幅度较大, 为 453 ~ 4055 $nL \cdot L^{-1}$ (未加硝化抑制剂处理), 通过释放 N_2O 而脱除氮素的量占整个水体 N 消减量的 1.36%, 为相应未种植凤眼莲水体的 4.31 倍。种植凤眼莲水体试验期间释放 N_2O -N 的量与水体氨态氮或硝态氮浓度的变化量均存在显著相关关系 ($p < 0.05$), 说明 N_2O 释放量受到水体中 NH_4^+ 、 NO_3^- 浓度变化的影响。种植凤眼莲在实验中后期可以增加水体中硝化、反硝化细菌的数量, 但其数量远低于凤眼莲根系附着硝化反硝化细菌。水体中反硝化细菌数量与水体释放 N_2O 浓度之间并无显著相关性, 说明种植凤眼莲水体反硝化脱氮释放 N_2O 过程可能主要是由根系共生微生物驱动的。

关键词: 富营养化水体; 凤眼莲; 植物修复; 硝化、反硝化脱氮; N_2O 释放

文章编号: 0253-2468(2012)02-349-11 中图分类号: X52 文献标识码: A

Effect of water hyacinth on N_2O emission through nitrification and denitrification reactions in eutrophic water

GAO Yan¹, YI Neng^{1,2}, ZHANG Zhiyong¹, LIU Haiqin¹, ZOU Le^{1,2}, ZHU Huabing¹, YAN Shaohua^{1,*}

1. Institute of Agricultural Resources and Environment, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014
2. College of Resources and Environment Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095

Received 28 March 2011; received in revised form 16 May 2011; accepted 1 June 2011

Abstract: Direct uptake of nitrogen (N) by floating macrophytes was widely studied with the aim of removing nitrogen from eutrophic water, while the contribution of nitrification and denitrification process was ignored in the past studies. In this study, an innovative method of collecting N_2O released from water cultivated with the floating macrophyte, water hyacinth (*Eichhonia crassipes*), was developed to study the effect of *Eichhonia crassipes* on N_2O emission through the nitrification and denitrification reactions in eutrophic water. It was found that cultivation of *Eichhonia crassipes* stimulated the nitrification, denitrification and coupled nitrification - denitrification reactions. Under the conditions of this experiment, concentrations of N_2O released from water with cultivation of *Eichhonia crassipes* ranged 453 ~ 4055 $nL \cdot L^{-1}$, and the N_2O -N loss accounted for 1.36% of the total N removal (in treatment without addition of nitrification inhibitor). This proportion was 4.31 times higher than that in water without cultivation of *Eichhonia crassipes*. During the experiment, the amount of N_2O -N loss was significantly ($p < 0.05$) correlated with the changes of NH_4^+ or NO_3^- concentration in water with cultivation of *Eichhonia crassipes*, indicating that N_2O emission was influenced by the change of NH_4^+ or NO_3^- concentration. The quantity of nitrifying and denitrifying bacteria in water was increased by cultivation of *Eichhonia crassipes*, but was still much lower than that attached to *Eichhonia crassipes* roots. However, there was no significant correlation between quantity of nitrifying or denitrifying bacteria in water and concentration of N_2O released from water. This may indicate that bacteria attached to *Eichhonia crassipes* roots were the major contributor to stimulate N_2O emission through nitrification and

基金项目: 国家支撑计划项目 (No. 2009BAC63B01); 江苏省农业科技自主创新项目 (No. CX(10)429); 云南省社会发展专项项目 (No. 2009CA034)

Supported by the National Key Technology R&D Program (No. 2009BAC63B01), the Jiangsu Agricultural Science and Technology Independent Innovation Project (No. CX(10)429) and the Yunnan Social Development Special Fund Project (No. 2009CA034)

作者简介: 高岩 (1978—), 女, 助理研究员, E-mail: lucy.gaoyan@yahoo.com.cn; * 通讯作者 (责任作者), E-mail: shyan@jaas.ac.cn

Biography: GAO Yan (1978—), female, assistant research, E-mail: lucy.gaoyan@yahoo.com.cn; * **Corresponding author**, E-mail: shyan@jaas.ac.cn

denitrification reactions in water.

Keywords: eutrophic water; water hyacinth; phytoremediation; nitrification and denitrification; N_2O emission

1 引言 (Introduction)

水体富营养化是当今国际上重大的水环境问题之一,已引起世界各国的高度重视.为了寻求高效、低耗水体富营养化修复技术,近年来,国内学者在富营养化水体的水生植物净化方面进行了大量研究,并取得了一定的成果(童昌华等,2004;孙利芳等,2009;赵迪等,2010).研究结果显示,通过在太湖、滇池流域水体对大型漂浮植物凤眼莲进行高效控制性种植,利用其吸收湖水中的氮磷,并通过机械化大规模采收,将收获的风眼莲制成沼气、有机肥和饲料,不仅可改善水体水质,还实现了凤眼莲的资源化利用(盛婧等,2009;李瑞君等,2010).目前,人们已在太湖、滇池流域展开了控制性种植凤眼莲的规模化修复实践应用研究(郑建初等,2008;邓辅唐,2009).然而,有关大型水生漂浮植物修复富营养化水体的机理尚不明确.

凤眼莲(*Eichhornia crassipes*)具有促进富营养化水体硝化、反硝化脱氮反应过程的潜力.根据 Moorhead 与 Reddy(1988)的研究,凤眼莲根系可以向水体释放 O_2 ,在凤眼莲根系活性表面形成 O_2 逐级渗透的微生物生物膜(Snoeknah, 2000).凤眼莲的根系非常发达,长度可达 5~100 cm,每千克干物质的凤眼莲根系表面积可达到 2.5~8.0 m^2 (Kim *et al.*, 2000; Yi *et al.*, 2009),能够为硝化、反硝化微生物提供良好的附着和繁殖界面,形成凤眼莲-根际微生物非特异性结合的根际微生态系统(夏会龙等,2001),从而为硝化、反硝化过程提供良好的根际微域环境.

以往有关漂浮植物修复富营养化水体机理的研究主要侧重于植物对水体氮的吸收效果(Fox *et al.*, 2008),而忽略了其它途径对水体脱氮的贡献.本课题组近期的研究表明,凤眼莲在修复不同程度富营养化水体过程中(总 N 浓度分别为 6.22、15.06、20.08 $mg \cdot L^{-1}$),其对 N 的吸收量占各水体 N 去除总量的 82.72%、46.41%、42.32%.利用质量平衡法,根据水体总输入氮量、排出氮量、植物吸氮量、底泥释放量,估算出仍有 22.32%、37.73%、55.34%的 N 去除途径不明确,推测硝化、反硝化作用可能对这部分氮的去除了起了主要贡献作用(张志勇,2009).

N_2O 是硝化、反硝化过程的重要中间产物,并且在某些条件下可成为该过程的主要产物(邹国元等,2002),因此,水体-大气界面释放 N_2O 的情况可在一定程度上反映出水体的硝化、反硝化反应脱氮强度.目前,用于研究种植大型水生漂浮植物水体释放 N_2O 、 N_2 的实验装置和方法还未见正式报道.Arth 等(1998)利用 He 置换背景 N_2 的 N_2 通量法(N_2 flux method)原理,设计了适合收集种植水稻的土壤通过硝化、反硝化过程产生 N_2 的密闭装置.因此,本研究中参考该装置的设计理念,利用 N_2 通量法原理并结合排水集气原理,根据大型水生漂浮植物的特性,尽量降低空气 N_2O 、 N_2 背景值的干扰,设计收集种植凤眼莲水体释放 N_2O 、 N_2 的研究装置.同时,通过模拟实验观测凤眼莲修复富营养化水体过程中凤眼莲对水体-大气界面释放 N_2O 气体浓度的影响,研究硝化、反硝化脱氮释放 N_2O 对凤眼莲种植水体脱氮的贡献,探讨水体 N_2O -N 释放量与水体 NH_4^+ -N、 NO_3^- -N 浓度变化的相关关系,水体和根系附着的硝化反硝化细菌数量,以及水体硝化反硝化细菌数量变化与水体释放 N_2O 浓度的相关关系.期望借助该装置,通过以上研究,阐明凤眼莲对富营养化水体硝化、反硝化脱氮释放 N_2O 过程的影响.

2 材料与方法 (Materials and methods)

2.1 供试植物

凤眼莲(*Eichhornia crassipes*),俗称水葫芦,属雨久花科,为大型漂浮水生植物.试验开始前,在江苏省农业科学院 2[#]塘凤眼莲种养区选取植株健壮且长势一致的凤眼莲进行移栽.

2.2 供试富营养化水体

富营养化水体的来源为江苏省农科院 1[#]蓄水塘污水,向其中以 $(NH_4)_2SO_4$ 和 KNO_3 的形式加入一定浓度的 NH_4^+ -N 和 NO_3^- -N,使得 NH_4^+ -N 与 NO_3^- -N 的质量比约为 3:1.最后取配置的水样测定 NH_4^+ -N、 NO_3^- -N 和 TN 浓度,分别为 9.35~9.52 $mg \cdot L^{-1}$ 、2.00~2.35 $mg \cdot L^{-1}$ 和 11.83~12.62 $mg \cdot L^{-1}$.水样的 pH 为 7.5~7.7.

2.3 实验方法

2.3.1 实验方案 实验设为富营养化水体种植与不种植凤眼莲,并同时设有加与不加硝化抑制剂双氰胺(DCD)处理.每个处理重复 3 次.具体表示为:

①处理 1, 富营养化水体 (EuW); ②处理 2, 富营养化水体 + 凤眼莲 (EuW + WH); ③处理 3, 富营养化水体 + 硝化抑制剂 (EuW + DCD); ④处理 4, 富营养化水体 + 凤眼莲 + 硝化抑制剂 (EuW + WH + DCD)

加入硝化抑制剂的目的是研究氨氮是否主要通过成对硝化-反硝化反应途径 (coupled nitrification and denitrification) 脱氮 (Arth *et al.*, 1998).

2.3.2 实验设计 实验在玻璃温室中进行, 自 2010 年 8 月 20 日第一次采样开始至 2010 年 9 月 9 日收获凤眼莲结束共计 21 d. 本实验为了尽量降低空气中 N_2 或 N_2O 本底值对监测气体浓度变化的影响, 并达到原位收集种植凤眼莲水体经硝化、反硝化反应释放的气态产物的目的, 将凤眼莲限制在气体采集密闭装置内生长 (图 1). 该采气装置是由透明有机玻璃制成的 (45 cm × 30 cm × 45 cm, 长 × 宽 × 高). 根据凤眼莲漂浮在水面生长的特点, 利用排水集气原理, 在实验开始前借助外力先将采气装置和凤眼莲完全沉没入 200 L 富营养化水体中, 赶除装置内部来源于空气中的气体 (此时装置顶部的两个通气阀门处于打开状态). 当采气装置完全浸入水里后, 从装置底部向水中通入 79% $He/21\% O_2$ 10 min, 目的是尽量降低水体里溶存的 N_2 及 N_2O 含量. 然后, 关闭装置顶部的通气阀门, 继续从装置底部向密闭箱体中的水中通入 79% $He/21\% O_2$, 此时移去外力, 使得采气装置浮出水面一定体积, 作为用于凤眼莲茎叶生长和抽取气体样品的顶空 (顶空体积 45 cm × 30 cm × 15 cm, 长 × 宽 × 高). 最后在采气装置四角悬挂重物, 并将重物沉入水底, 使得采气装置平衡地浮在水中 (横截面积约占水箱面积的 1/3). 然后, 通过装置顶部的通气阀门向箱体顶空通入 79% $He/21\% O_2$ 5 min (此时阀门 1 作为进气阀门, 阀门 2 作为出气阀门), 进一步排除顶空中可能存在的 N_2O 、 N_2 气体. 在未种植凤眼莲的处理中, 也采用相同的方式采集气体. 在种植凤眼莲的处理中, 200 L 水体中种植覆盖度约为 60% 的凤眼莲, 初始放养量约为 2.0 kg (以鲜重计). 实验期间将 1/3 总量的凤眼莲限制在采气装置内生长, 每日通过通气阀门 1 向装置内充入一定量 95% O_2 + 5% CO_2 , 以保证凤眼莲在生长过程中进行正常的光合作用和呼吸作用. 在一定时间间隔内 (1、2、3、4、5、6、8、10、12、15、18、21 d) 通过箱体上的毛细管定期抽取装置内部凤眼莲根系附近水样, 测定水体中 NH_4^+ 、 NO_3^- 及总氮的浓度变化及硝化、反硝化细菌

数量, 并通过装置上的取气孔定期从顶空抽取气体样品测定 N_2O 气体浓度 (目前, 气体样品中 N_2 浓度还未获得完整的数据结果, 因此, 该文先对硝化、反硝化中间产物 N_2O 进行讨论). 采样时间在上午 8:00—10:00, 采样时采气装置箱体内温度变化为 28 ~ 35 °C, 外界环境气温变化为 22 ~ 30 °C. 凤眼莲种植 3 周后收获, 测定根系硝化、反硝化细菌数量及植株体内氮含量.

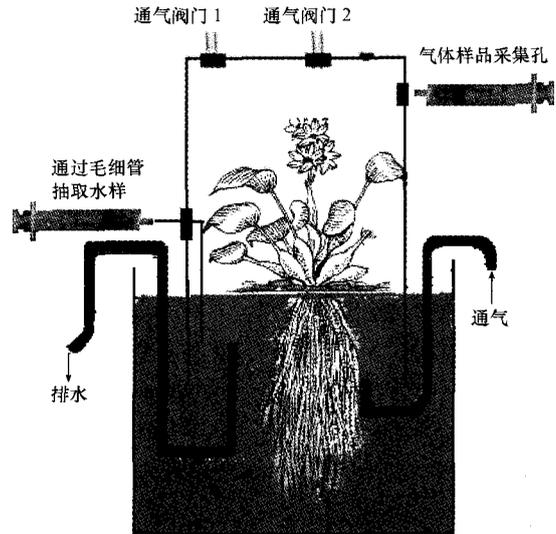


图 1 原位采集种植凤眼莲水体释放 N_2O 的密闭装置示意图

Fig. 1 Sketch diagram of enclosed chamber for *in situ* collecting N_2O released from water with cultivation of *Eichhornia crassipes*

2.3.3 N_2O 气体测定方法 N_2O 由带有 ^{63}Ni 电子捕获检测器的岛津 GC-14B 气相色谱仪测定, 柱温 65 °C, 检测温度为 300 °C, 载气流速 40 mL·min⁻¹.

2.3.4 水样 NH_4^+ 、 NO_3^- 及 TN 浓度测定 水样经过滤后直接用德国 Seal 公司的 AutoAnalyzer 3 流动分析仪测定 NH_4^+ 、 NO_3^- 及 TN 浓度.

2.3.5 硝化、反硝化细菌计数方法 采集的水样经过滤去除脱落的根系后进行硝化、反硝化细菌计数. 采集的新鲜凤眼莲根系用研钵磨细后制备成悬液进行计数 (2 g 鲜根匀浆转移到 100 mL 水中从而获得初始菌悬液). 硝化、反硝化细菌数量采用 96 孔板微量分析 MPN 法计数 (Rowe, 1977; Staley *et al.*, 1981). 硝化细菌培养基采用的是氨-碳酸钙培养基 (Rowe, 1977). 反硝化细菌培养基采用的是硝酸盐肉汤培养基 (Staley *et al.*, 1981).

2.4 计算方法

水体 N 消减量 (R)、单位面积水体累积释放的 N_2O 气体量 (E_{N_2O}) 和一定面积水体以释放 N_2O 气

体形式损失的 N 量 (E_{N_2O-N}) 的计算公式如下:

$$R = (C_0 - C_i) \times V \quad (1)$$

$$E_{N_2O} = C_{N_2O_i} \times \rho \times 10^{-3} \times V_{H_0} / S_{H_0} \quad (2)$$

$$E_{N_2O-N} = E_{N_2O} \times S_c \times k \times 10^3 \quad (3)$$

式中, C_0 为水体初始的总氮浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 以 N 计); C_i 为实验结束时水体的总氮浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 以 N 计); V 为水体的体积 (L); E_{N_2O} 为单位面积水体累积释放 N_2O 量 ($\text{g} \cdot \text{m}^{-2}$); $C_{N_2O_i}$ 为实验结束时最后一次测得的 N_2O 浓度 ($\mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$, 因为实验期间采气装置一直密闭收集水体释放的气态产物, 所以在理想状态下采气装置覆盖的一定面积水体释放的 N_2O 全部累积在采气装置顶空. 在这种情况下直接用实验结束时最后一次测得的 N_2O 浓度, 并参考孙志高等(2007)、丁洪等(2004)使用的 N_2O 气体质量计算方法, 计算获得水体累积释放 N_2O 量); ρ 为标准状态下被测气体的密度, 取值为 $1.964 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ (N_2O 的摩尔质量 $44 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ 比上气体在标准状况下的摩尔体积 $22.4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$); V_{H_0} 为气体采集装置顶空体积 (m^3); S_{H_0} 为气体采集装置覆盖水体面积 (m^2); E_{N_2O-N} 为一定面积水体以释放 N_2O 气体形式损失的 N 量 (mg); S_c 为水体总面积 (m^2); k 为参数, 取值为 $2 \times \text{N 原子数} / N_2O \text{ 分子数}$, 具体为水体释放的 N_2O 中 N_2O 分子数和 N 原子数.

2.5 统计方法

各处理的水体 N_2O 释放浓度、水体硝化细菌数量或水体反硝化细菌数量平均值之间采用 SPSS 13.0 软件进行多重比较 Student-Newman-Keul (SNK) 检验, 显著水平为 5%. 水体 N_2O-N 释放量与水体 NH_4^+-N 、 NO_3^--N 浓度变化的相关关系分析, 以及水体硝化反硝化细菌数量变化与水体释放 N_2O 浓度的相关关系均采用 SigmaPlot 11.0 软件进行分析.

3 结果 (Results)

3.1 凤眼莲对水体-大气界面释放 N_2O 气体浓度的影响

由图 2 可知, 在 3 个星期的培养期内, 未种植凤眼莲的富营养化水体向大气界面释放一定浓度的 N_2O 气体, 释放 N_2O 的浓度分别为 $345 \sim 923 \text{ nL} \cdot \text{L}^{-1}$ (未加硝化抑制剂处理) 和 $309 \sim 397 \text{ nL} \cdot \text{L}^{-1}$ (加入硝化抑制剂处理). 种植凤眼莲的富营养化水体在整个培养期内向大气界面释放的 N_2O 气体浓度累积升高幅度较大, 分别为 $453 \sim 4055 \text{ nL} \cdot \text{L}^{-1}$ (未加硝化抑制剂处理) 和 $419 \sim 1607 \text{ nL} \cdot \text{L}^{-1}$ (加入硝化抑制剂处理), 显著高于未种植凤眼莲的相应对照水体 ($p < 0.05$). 加入硝化抑制剂在一定程度上减弱了未种植凤眼莲水体及种植凤眼莲水体释

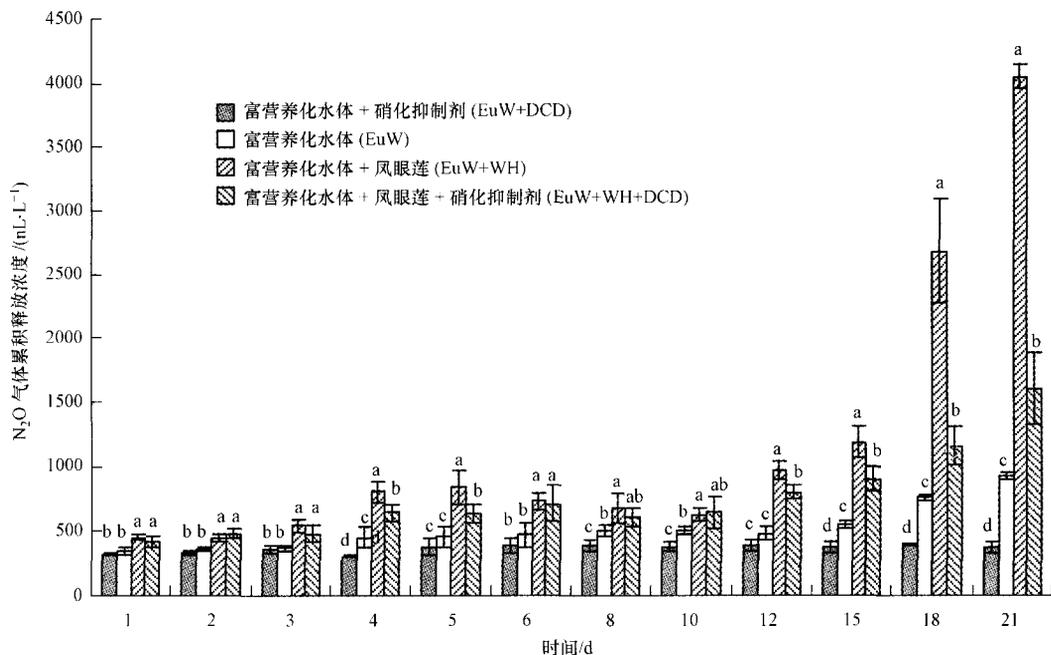


图 2 种植或未种植凤眼莲的富营养化水体-大气界面释放 N_2O 气体浓度

Fig. 2 Concentrations of N_2O released from eutrophic water with or without water hyacinth

放 N_2O 的强度,尤其在培养后期(15~21 d)测得的 N_2O 气体浓度均显著低于相应处理的未加硝化抑制剂的水体释放 N_2O 的浓度($p < 0.05$),这一方面证明了硝化抑制剂起到了抑制水体中氨氮硝化反应的作用,也从另一方面证明了在微生物的驱动下富营养化水体中的氨氮出现了成对硝化-反硝化(coupled nitrification and denitrification)脱氮过程。

3.2 硝化、反硝化脱氮释放 N_2O 气体对水体脱氮的贡献

在 3 个星期的培养期内,未种植凤眼莲的富营

养化水体(未加硝化抑制剂处理)以向大气界面累积释放 N_2O 气体形式损失的氮量为 3.25 mg(N_2O-N 量,以 N 计),占整个水体 N 消减量的 0.35%(表 1)。而种植了凤眼莲处理的富营养化水体(未加硝化抑制剂处理)以向大气界面累积释放 N_2O 气体形式损失的氮量为 14.02 mg(N_2O-N 量,以 N 计),占相应未种植凤眼莲水体释放 N_2O 量的 4.31 倍,占整个水体 N 消减量的 1.36%(表 1),说明在本实验条件下凤眼莲促进了水体硝化、反硝化反应过程,增加了水体释放 N_2O 的量。

表 1 水体硝化、反硝化释放 N_2O 气体及植物吸收对水体脱氮的贡献

Table 1 Contribution of N_2O emission from nitrification and denitrification reaction in water and plant uptake to N removal from water

处理	水体-大气界面释放 N_2O-N		植物吸收 N	
	累积释放量/mg	比例 ^a	吸收 N 量/mg	比例 ^b
EuW + DCD	1.42 ± 0.17	0.21%	—	—
EuW	3.25 ± 1.20	0.35%	—	—
EuW + WH	14.02 ± 0.37	1.36%	823.82 ± 0.01	79.65%
EuW + WH + DCD	6.57 ± 1.10	0.60%	809.78 ± 0.01	74.46%

注:a. 水体-大气界面释放 N_2O-N 量占水体氮消减量的比例;b. 植物吸收 N 占水体氮消减量的比例。

实验过程中,未种植和种植凤眼莲水体释放的 N_2O 量(均未加硝化抑制剂处理)与水体中氨态氮浓度消减变化量及硝态氮浓度变化量(为培养 t 时

刻取样测定的水体硝态氮浓度减去初始硝态氮浓度,负值表示水体硝态氮浓度减少)均显著相关($p < 0.05$)(图 3b, 3c, 4b, 4c),说明水体发生的硝

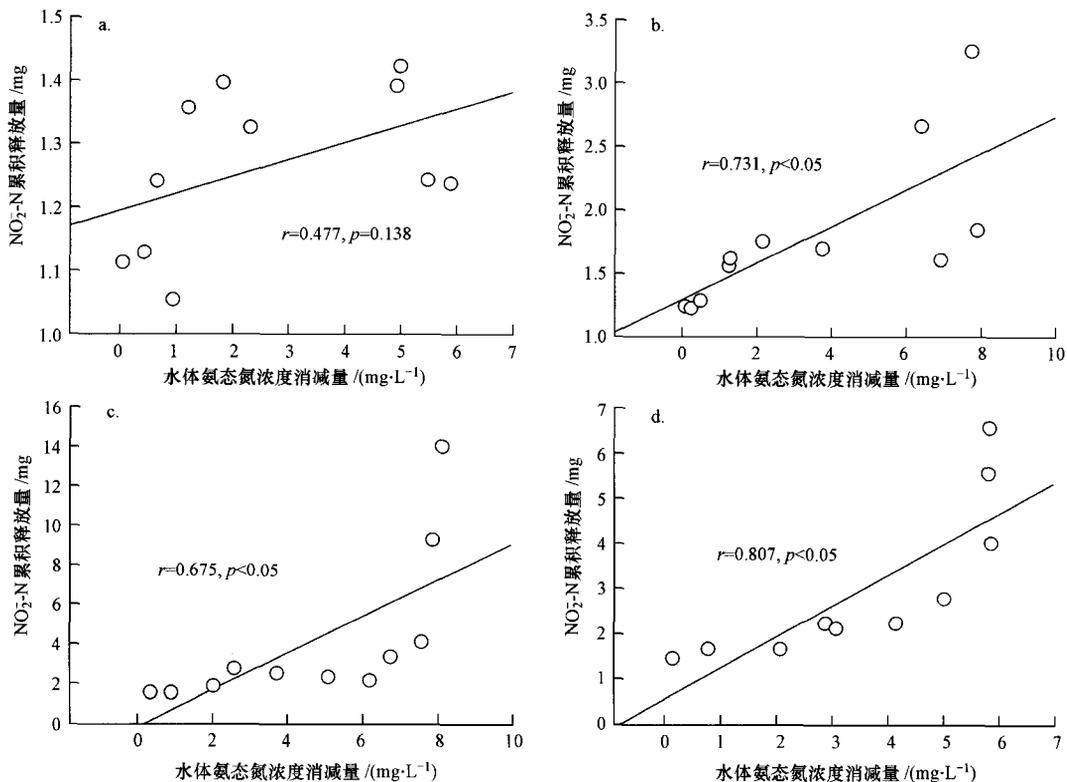


图 3 水体 NH_4^+-N 浓度消减量与水体 N_2O-N 累积释放量之间的相关关系(a. EuW + DCD, b. EuW, c. EuW + WH, d. EuW + WH + DCD)

Fig. 3 Correlations between the quantity of N_2O-N released from water and the reduction of NH_4^+ concentration in water (a. EuW + DCD, b. EuW, c. EuW + WH, d. EuW + WH + DCD)

化、反硝化反应释放的气态中间产物 N_2O 受到水体中 NH_4^+ 、 NO_3^- 浓度变化量的影响,也从另一方面说明凤眼莲促进了水体中 NH_4^+ 、 NO_3^- 转化及 N_2O 的释放。

在未种植凤眼莲的处理中,加入硝化抑制剂后水体释放 N_2O 的量显著 ($p < 0.05$) 低于未加硝化抑制剂的水体,且水体释放的 N_2O 量与水体中氨态氮浓度消减变化量及硝态氮的浓度变化量均无显著相关性(图 3a, 4a)。这说明了加入硝化抑制剂起到了抑制硝化反应的作用,也从另一方面证明了水体中的氨态氮通过对硝化-反硝化过程脱氮。在种植

凤眼莲的处理中,加入硝化抑制剂后同样减少了水体释放 N_2O 量,且水体释放 N_2O 的量与水体中硝态氮的浓度变化量无相关性(图 4d)。但是,水体释放 N_2O 的量与水体中氨态氮浓度消减变化量呈显著相关 ($p < 0.05$) (图 3d),可能是因为凤眼莲通过吸收水体中氨氮而增加水体 NH_4^+ 浓度变化量的同时促进了水体硝化、反硝化反应释放 N_2O 过程,在一定程度上减缓了硝化抑制剂的抑制作用。

水体脱氮的另一重要途径就是植物吸收。在本实验中,凤眼莲吸收的 N 占水体消减量的 74.46% ~ 79.65%。

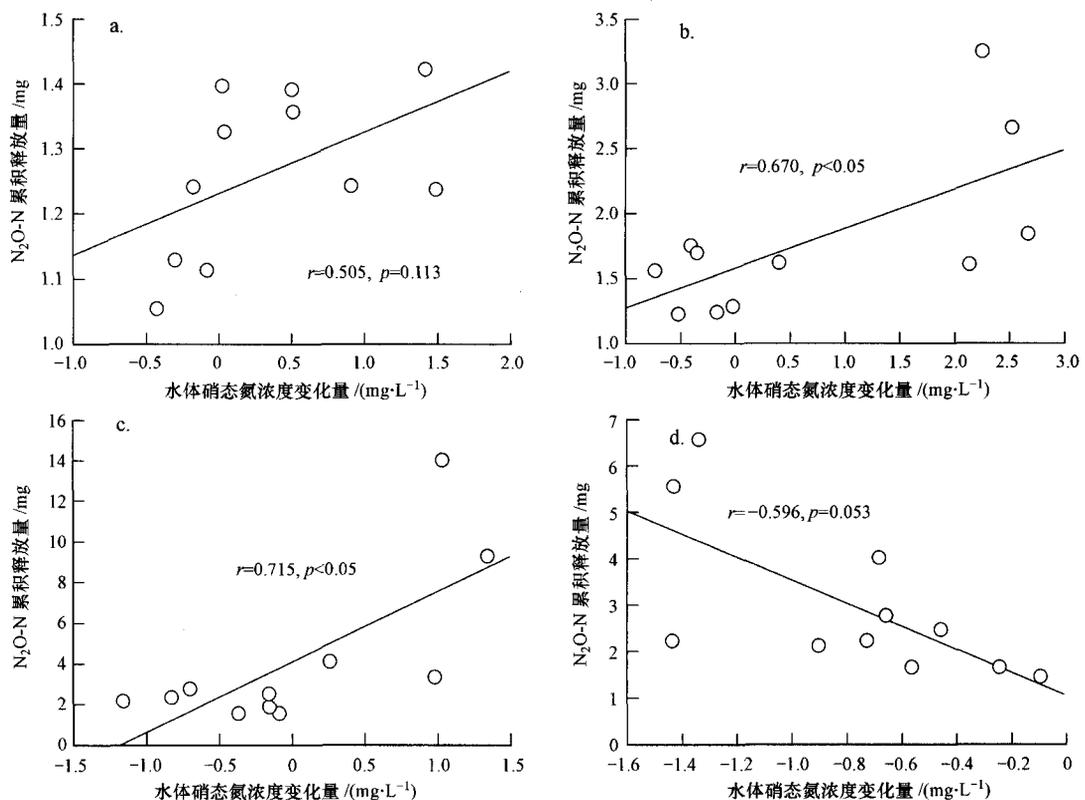


图 4 水体 NO_3^- -N 浓度变化量与水体 N_2O -N 累积释放量之间的关系 (a. EuW + DCD, b. EuW, c. EuW + WH, d. EuW + WH + DCD)

Fig. 4 Correlations between the quantity of N_2O -N released from water and the changes of NO_3^- -N concentration in water (a. EuW + DCD, b. EuW, c. EuW + WH, d. EuW + WH + DCD)

3.3 水体及凤眼莲根系中硝化、反硝化细菌数量

在未加硝化抑制剂的处理中,试验期间未种植凤眼莲的富营养化水体中硝化细菌的数量 ($C_{硝化}$) 变化范围为 $8.52 \times 10^2 \sim 3.52 \times 10^3$ $MPN \cdot mL^{-1}$ (MPN 法表示细菌数量的标准单位),反硝化细菌数量 ($C_{反硝化}$) 变化范围为 $3.41 \times 10^3 \sim 1.50 \times 10^4$ $MPN \cdot mL^{-1}$;而种植凤眼莲水体中硝化、反硝化细菌的数量在实验后期(尤其是 12 d 后)均显著高于未

种植凤眼莲水体细菌数量 ($p < 0.05$) (图 5,图中以细菌数量的对数值表示),变化范围分别为 $1.36 \times 10^3 \sim 1.98 \times 10^4$ $MPN \cdot mL^{-1}$ 和 $7.8 \times 10^3 \sim 7.92 \times 10^4$ $MPN \cdot mL^{-1}$,说明种植凤眼莲可以增加水体中硝化、反硝化细菌的数量。实验过程中种植凤眼莲水体的硝化细菌数量与水体释放 N_2O 浓度之间存在显著相关关系 ($p < 0.05$) (图 6c, EuW + WH 处理),说明种植凤眼莲可以通过增加水体中硝化细菌的数量

而促进水体氮的转化. 然而, 水体中反硝化细菌数量与水体释放 N₂O 浓度之间并无显著相关性 ($r = 0.241, p = 0.475$) (图 6d, EuW + WH 处理), 可能是因为种植凤眼莲水体的反硝化细菌并不是水体反硝化脱氮释放 N₂O 过程的主要贡献者, 而这一过程主要是由根系共生微生物驱动的. 凤眼莲根系共生的硝化、反硝化细菌数量远远高于水体中, 分别为 $5.60 \times 10^5 \sim 1.95 \times 10^6$ MPN·mL⁻¹ 和 $2.25 \times 10^6 \sim 3.74 \times 10^6$ MPN·mL⁻¹, 这进一步说明凤眼莲根系微生物可能是凤眼莲促进富营养化水体反硝化反应过程的主要贡献者.

在加入硝化抑制剂的处理中, 未种植凤眼莲水体中硝化、反硝化细菌数量变化范围分别为 $8.52 \times 10^2 \sim 7.05 \times 10^3$ MPN·mL⁻¹ 和 $3.41 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^4$ MPN·mL⁻¹, 其中, 硝化细菌数量显著低于未加硝化抑制剂水体的细菌数量 ($p < 0.05$) (图 5), 并且硝化、反硝化细菌数量与水体释放 N₂O 浓度之间呈负相关关系 (相关性不显著) (图 6a, b, EuW + WH 处理), 证明了硝化抑制剂可能在一定程度上对水体中硝化、反硝化细菌产生了抑制作用, 从而抑制了水体的硝化、反硝化过程.

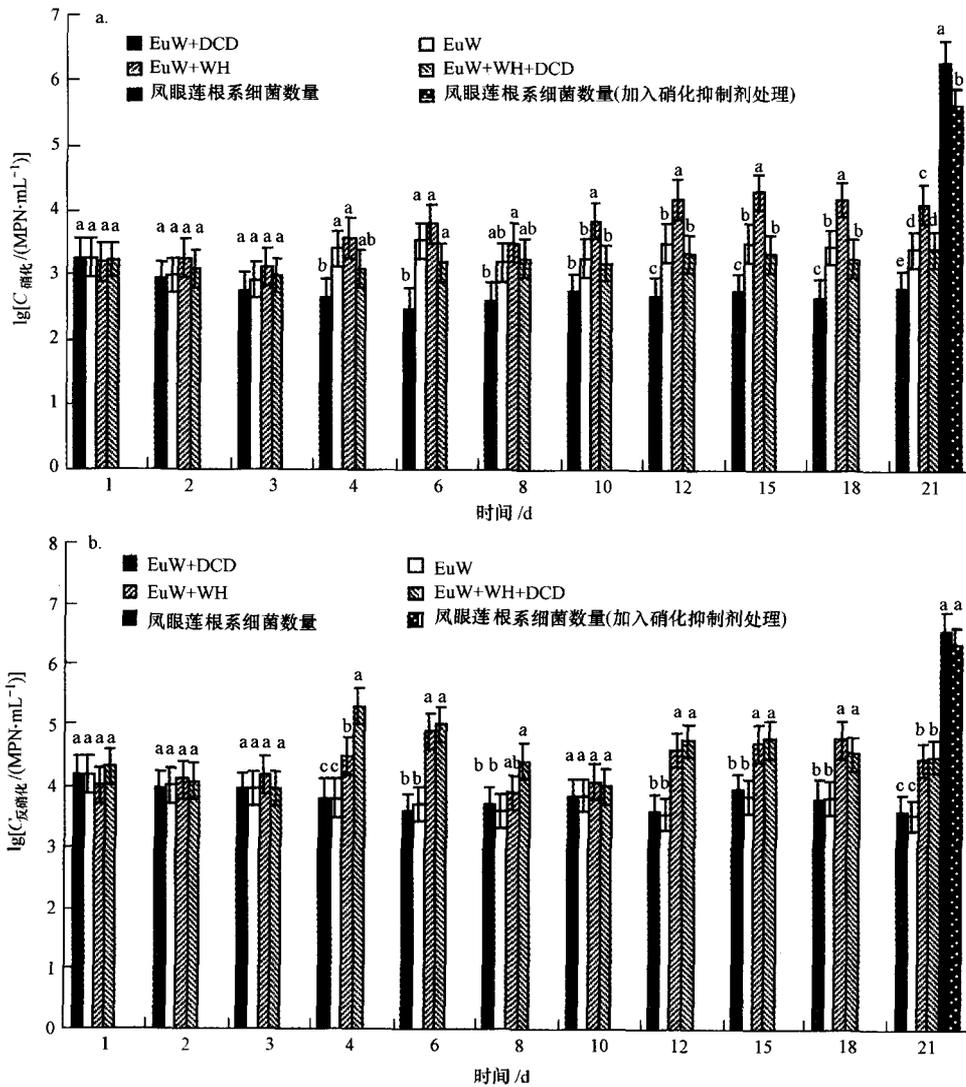


图 5 水体及凤眼莲根系附着硝化细菌(a)和反硝化细菌(b)数量

Fig. 5 Quantity of nitrifying bacteria(a) and denitrifying bacteria(b) in water and attached to *Eichhornia crassipes* roots

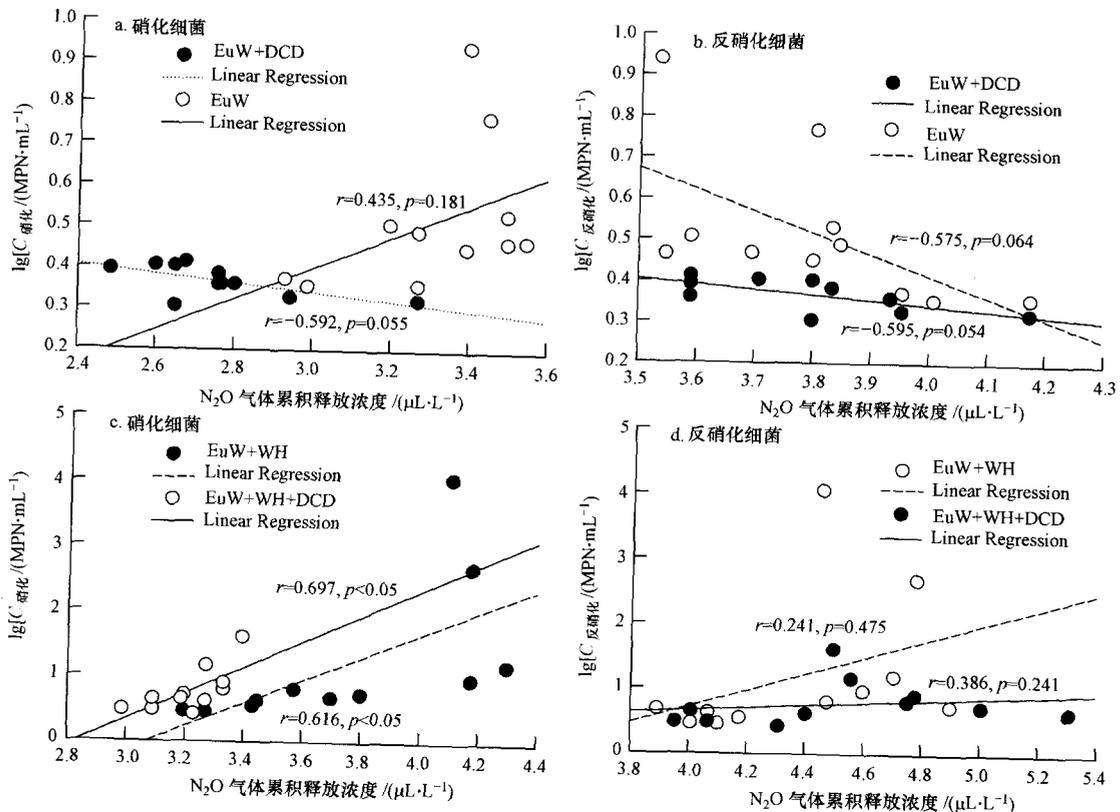


图 6 水体硝化细菌 (a,c) 和反硝化细菌 (b,d) 数量与水体释放 N_2O 浓度之间的关系

Fig. 6 Correlations between the quantity of nitrifying bacteria (a,c) and denitrifying bacteria (b,d) in water and concentrations of N_2O released from water

4 讨论 (Discussion)

由于大型漂浮植物对氮、磷等营养物质具有较强的富集能力,以往有关漂浮植物净化富营养化水体的研究主要侧重于植物对水体氮的吸收效果 (Fox *et al.*, 2008),而忽略了修复过程中硝化、反硝化作用释放气态产物 N_2O 、 N_2 对水体脱氮的贡献. 本研究表明,在未加硝化抑制剂条件下,种植了凤眼莲的富营养化水体以释放 N_2O 气体形式去除的氮量达 14.02 mg (N_2O -N 量,以 N 计),为相应未种植凤眼莲水体释放 N_2O 量 (3.25 mg) 的 4.31 倍,占整个水体 N 消减量的 1.36%. 说明种植凤眼莲促进了水体的硝化、反硝化脱氮反应过程,是富营养化水体脱氮的脱氮机理之一. 同时,凤眼莲也从水体吸收一定量的 N,占水体氮消减量的 79.65% (未加硝化抑制剂处理),说明植物吸收是大型漂浮植物净化富营养水体的另一重要途径. 通常情况下,水生植物 (包括凤眼莲) 优先选择吸收水体中的 NH_4^+ -N (Reddy *et al.*, 1988; Snooknah, 2002). 在本实验水体 NH_4^+ 含量较高的条件下,凤眼莲可能通过直接

吸收水体中的 NH_4^+ -N 与硝化、反硝化微生物竞争硝化、反硝化反应的作用底物,一定程度上限制了水体的硝化、反硝化反应脱氮反应. 另外,根据本课题组前期研究表明,凤眼莲在修复具有不同总 N 浓度的富营养化水体过程中 (6.22、15.06、20.08 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),凤眼莲对 N 的吸收量占各水体 N 去除总量的比例不同,分别占 82.72%、46.41%、42.32%. 相应地,利用质量平衡法估算出通过硝化、反硝化作用从水体中去除的 N 量也并不相同,分别为 22.32%、37.73%、55.34% (张志勇, 2009). 说明凤眼莲在修复 N 营养盐浓度较高的水体过程中,硝化、反硝化反应过程对消减水体氮的贡献程度较大.

外界环境因素,如温度、氮营养元素浓度、溶解氧 DO 等对硝化、反硝化脱氮释放 N_2O 过程也有重要的影响作用 (孙志高等, 2008). 外界环境温度较高、水体氮浓度较高均有利于提高硝化、反硝化脱氮释放 N_2O 的速率 (Zhang *et al.*, 2000; Barton *et al.*, 2002). 本实验开展时期为夏季高温期,同时为了研究高氨氮浓度条件下水体硝化、反硝化脱氮释放 N_2O 的情况,实验设定的水体氨氮浓度较高,

接近污水处理厂一级 B 排放标准,可能都在一定程度上提高了水体硝化、反硝化脱氮释放 N_2O 的速率. 在本研究中,种植凤眼莲水体在不同培养时间点释放的 N_2O 量与氨态氮浓度消减变化量及硝态氮浓度的变化量均存在显著相关关系 ($p < 0.05$),证明了水体硝化、反硝化释放的 N_2O 量受到了水体氨氮浓度的影响. 水体溶解氧是硝化、反硝化脱氮过程的另一关键性影响因素,在本实验中,种植凤眼莲水体的溶解氧 DO 变化范围为 $2.4 \sim 3.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,明显低于未种植凤眼莲水体的 DO 值 ($4.6 \sim 6.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). 这是由于凤眼莲叶片遮盖水面,限制了空气中 O_2 向水体传输的大气复氧过程 (Snooknah, 2000),在一定程度上降低了水体中的溶解氧,营造了利于反硝化反应的低溶解氧水体环境.

环境介质中,氨氮主要通过氨挥发、硝化反应、成对硝化-反硝化反应途径 (coupled nitrification and denitrification) 产生气态产物 N_2O 、 N_2 (蔡祖聪, 2003; Bateman *et al.*, 2005). 当 pH 低于 8 时,氨挥发的量很小,可以忽略 (宋勇生等, 2003; Hayashi *et al.*, 2011). 在本实验条件下,水体 pH 值在整个实验期间保持在 $6.5 \sim 6.8$ (种植凤眼莲水体) 和 $7.1 \sim 7.8$ (未种植凤眼莲水体) 之间,因此,水体中氨氮通过氨挥发损失的量非常有限. 本课题组的相关研究工作也表明,种植凤眼莲和未种植凤眼莲的富营养化水体 (pH $7.0 \sim 7.5$) 的氨挥发量很低,并未检测到氨挥发 (硼酸吸收法测定氨挥发,数据未发表). 在成对硝化-反硝化反应途径中,反硝化微生物必须利用硝化反应产生的 NO_3^- 进行反硝化反应. 为了验证种植凤眼莲水体是否发生了成对硝化-反硝化过程,实验设计中加入了硝化抑制剂双氰胺 DCD. 加入硝化抑制剂后种植凤眼莲水体释放 N_2O 的累积量比未加硝化抑制剂水体的释放量降低了 62.3%. 这就说明加入硝化抑制剂起到了抑制硝化反应的作用,也从另一方面证明了凤眼莲影响下成对硝化-反硝化反应是水体中氨态氮产生气态产物 N_2O 的重要过程. Arth 等 (1998) 的研究表明,加入硝化抑制剂 (1% 的 methyl fluoride) 后,种植水稻的土壤的 N_2 释放量降低了近 80%,说明施入土壤的尿素 N (水解即变成氨氮) 通过硝化反应生成 NO_3^- 是反硝化反应的必要前提条件,即主要通过成对硝化-反硝化反应途径产生气态产物 N_2 或 N_2O .

微生物是环境介质中硝化、反硝化反应的驱动者. 在本实验中,种植凤眼莲增加了水体中硝化、反

硝化细菌的数量,并且种植凤眼莲水体的硝化细菌数量与水体释放 N_2O 浓度之间存在显著相关关系 ($p < 0.05$),说明种植凤眼莲可以通过增加水体中硝化细菌的数量而促进水体氮的转化,这可能是凤眼莲促进水体的硝化、反硝化脱氮反应的原因之一. 这与张鸿等 (1999) 的研究结果一致,即种植凤眼莲、水芹 (*Oenanthe javanica*) 处理组水体和根面的硝化细菌、反硝化细菌数量均显著高于无植物处理组. 然而,水体中反硝化细菌数量与水体释放 N_2O 浓度之间并无显著相关性,可能是因为种植凤眼莲水体的反硝化细菌并不是水体反硝化脱氮释放 N_2O 过程的主要贡献者,而这一过程主要是由根系共生微生物参与的. 凤眼莲根系共生的硝化、反硝化细菌数量远远高于水体中,进一步说明了凤眼莲根系微生物可能是凤眼莲促进富营养化水体反硝化反应过程的主要贡献者.

5 结论 (Conclusions)

1) 凤眼莲可以促进富营养化水体的硝化、反硝化、成对硝化-反硝化反应过程,凤眼莲种植水体在整个培养期内释放的 N_2O 气体浓度累积升高幅度较大,为 $453 \sim 4055 \text{ nL} \cdot \text{L}^{-1}$ (未加硝化抑制剂处理),通过释放 N_2O 而脱除氮素的量占整个水体 N 消减量的 1.36% (未加硝化抑制剂处理),为相应未种植凤眼莲水体的 4.31 倍.

2) 在本实验设定的水体富营养化条件下 ($NH_4^+ - N$ 与 $NO_3^- - N$ 质量比为 3:1, $NH_4^+ - N$ 浓度 $9.35 \sim 9.52 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $NO_3^- - N$ 浓度 $2.00 \sim 2.35 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),凤眼莲吸收占水体氮消减量的 79.65% (未加硝化抑制剂处理),是修复富营养水体的主要途径.

3) 种植凤眼莲水体在实验期间释放的 N_2O -N 量与水体氨态氮浓度消减量及硝态氮浓度的变化量均存在显著相关关系,说明 N_2O 释放量受到水体中 NH_4^+ 、 NO_3^- 浓度变化的影响.

4) 种植凤眼莲在实验中后期可以增加水体中硝化、反硝化细菌的数量,但远低于凤眼莲根系附着的细菌数量,并且水体中反硝化细菌数量与水体释放 N_2O 浓度之间并无显著相关性,说明种植凤眼莲水体反硝化脱氮释放 N_2O 过程可能主要是由根系共生微生物驱动的.

责任作者简介:严少华 (1956—),男,研究员,博士生导师,

目前主要从事富营养化水体生物治理与资源化利用研究工作. E-mail: shyan@jaas. ac. cn.

参考文献 (References):

- Arth I, Frenzel P, Conrad R. 1998. Denitrification coupled to nitrification in the rhizosphere of rice [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 30: 509-515
- Barton P K, Atwater J W. 2002. Nitrous oxide emissions and the anthropogenic nitrogen in wastewater and solid waste [J]. *Journal of Environmental Engineering*, 128: 137-150
- Bateman E J, Baggs E M. 2005. Contributions of nitrification and denitrification to N_2O emissions from soils at different water-filled pore space [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 41: 379-388
- 蔡祖聪. 2003. 尿素和 KNO_3 对水稻土无机氮转化过程和产物的影响 II. N_2O 生成过程 [J]. *土壤学报*, 40 (3): 414-419
- Cai Z C. 2003. Effects of urea and KNO_3 on processes and products of inorganic nitrogen transformation in paddy soils II. Processes for N_2O production [J]. *Acta Pedologica Sinica*, 40 (3): 414-419 (in Chinese)
- 邓辅唐, 孙珮石, 卿小燕, 等. 2009. 凤眼莲净化滇池水体及其资源化工程示范研究 [J]. *武汉理工大学学报*, 31(12): 84-86
- Deng F T, Sun P S, Qing X Y, et al. 2009. Pilot-scale study on purification of the polluted water in Dianchi Lake by plating *Eichhornia crassipes* and its reutilization [J]. *Journal of Wuhan University of Technology*, 31(12): 84-86 (in Chinese)
- 丁洪, 王跃思, 项虹艳, 等. 2004. 菜田氮素反硝化损失与 N_2O 排放的定量评价 [J]. *园艺学报*, 31(6): 762-766
- Ding H, Wang Y S, Xiang H Y, et al. 2004. Denitrification loss and N_2O emission from nitrogen fertilizer applied to vegetable field [J]. *Acta Horticulture Sinica*, 31(6): 762-766 (in Chinese)
- Fox L J, Struik P C, Appleton B L, et al. 2008. Nitrogen phytoremediation by water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) solms) [J]. *Water, Air, and Soil Pollution*, 194: 199-207
- Hayashia K, Koga N, Fueki N. 2011. Limited ammonia volatilization loss from upland fields of andosols following fertilizer applications [J]. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 140: 534-538
- Kim Y, Kim W. 2000. Roles of water hyacinths and their roots for reducing algal concentrations in the effluent from waste stabilization ponds [J]. *Water Research*, 34: 3285-3294
- 李瑞君, 陈砺, 严宗诚, 等. 2010. 水葫芦厌氧发酵试验及其产气模型研究 [J]. *中国农学通*, 26(24): 421-425
- Li R J, Chen L, Yan Z C, et al. 2010. Study on anaerobic fermentation and methane production model of water hyacinth [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 26(24): 421-425 (in Chinese)
- Moorhead K K, Reddy K R. 1988. Oxygen transport through selected aquatic macrophytes [J]. *Journal of Environment Quality*, 17: 138-142
- Reddy K R, Tucker J C. 1988. Productivity and nutrient uptake of water hyacinth, *Eichhornia crassipes* I. Effect of nitrogen source [J]. *Economic Botany*, 37: 237-247
- Rowe R, Todd R, Waide J. 1977. Microtechnique for most-probable-number analysis [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 33: 675-680
- 盛婧, 郑建初, 陈留根, 等. 2009. 水葫芦富集水体养分及其农田施用研究 [J]. *农业环境科学学报*, 28(10): 2119-2123
- Sheng J, Zheng J C, Chen L G, et al. 2009. Absorption of water nutrients by hyacinth and its application in wheat production [J]. *Journal of Agro-Environmental Science*, 28(10): 2119-2123 (in Chinese)
- Snooknah R. 2000. A review of the mechanisms of pollutant removal in water hyacinth systems [J]. *Science and Technology, Research Journal of University of Mauritius*, 6: 49-57
- 宋勇生, 范晓晖. 2003. 稻田氮挥发研究进展 [J]. *生态环境*, 12(2): 240-244
- Song Y S, Fan X H. 2003. Summary of research on ammonia volatilization in paddy soil [J]. *Ecology and Environment*, 12(2): 240-244 (in Chinese)
- Staley T E, Griffin J B. 1981. Simultaneous enumeration of denitrifying and nitrate reducing bacteria in soil by a microtiter most-probable-number (MPN) procedure [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 13: 385-388
- 孙利芳, 孙一香, 周长芳, 等. 2009. 植物组合及水体营养梯度对三种功能性植物生物量累积与分配的影响 [J]. *应用生态学报*, 20(10): 2370-2376
- Sun L F, Sun Y X, Zhou C F, et al. 2009. Effects of plant species combination and water body nutrient level on the biomass accumulation and allocation of three kinds of functional plants [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 20(10): 2370-2376 (in Chinese)
- 孙志高, 刘景双, 杨继松, 等. 2007. 三江平原典型小叶章湿地土壤硝化-反硝化作用与氧化亚氮排放 [J]. *应用生态学报*, 18(1): 185-192
- Sun Z G, Liu J S, Yang J S, et al. 2007. Nitrification-denitrification and N_2O emission of typical *Calamagrostis angustifolia* wetland soils in Sanjiang Plain [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 18(1): 185-192 (in Chinese)
- 孙志高, 刘景双, 于君宝, 等. 2008. 湿地土壤 NH_3 挥发、 N_2O 释放过程及影响因素 [J]. *湿地科学*, 6(3): 429-439
- Sun Z G, Liu J S, Yu J B, et al. 2008. Ammonia volatilization, nitrous oxide emission processes in wetland soil and affecting factors [J]. *Wetland Science*, 6(3): 429-439 (in Chinese)
- 童昌华, 杨肖娥, 濮培民. 2004. 富营养化水体的水生植物净化试验研究 [J]. *应用生态学报*, 15(8): 1447-1450
- Tong C H, Yang X E, Pu P M. 2004. Purification of eutrophicated water by aquatic plant [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 15(8): 1447-1450 (in Chinese)
- 夏会龙, 吴良欢, 陶勤南. 2001. 凤眼莲加速水溶液中马拉硫磷降解 [J]. *中国环境科学*, 21(6): 553-555
- Xia H L, Wu L H, Tao Q N. 2001. Water hyacinth accelerating the degradation of malathion in aqueous solution [J]. *China Environmental Science*, 21(6): 553-555 (in Chinese)
- Yi Q, Kim Y C, Tateda M. 2009. Evaluation of nitrogen reduction in water hyacinth ponds integrated with waste stabilization ponds [J].

- Desalination, 249: 528-534
- 张鸿,陈光荣,吴振斌,等.1999.两种人工湿地中氮、磷净化率与细菌分布关系的初步研究[J].华中师范大学学报(自然科学版),33(4):575-578
- Zhang H, Chen G R, Wu Z B, et al. 1999. The study on the relationship between N, P removing rates and the distribution of bacteria in two artificial wetlands [J]. Journal of Central China Normal University (Natural Sciences), 33 (4): 575-578 (in Chinese)
- Zhang X J, Xu H, Chen G X. 2000. Effects of soil moisture and temperature on CH_4 oxidation and N_2O emission of forest soil [J]. Journal of Forestry Research, 11: 203-206
- 张志勇.2009.凤眼莲净化系统去除富营养化水体氮、磷的效果及机理的研究[D].南京:江苏省农业科学院农业资源与环境研究所.1-80
- Zhang Z Y. 2009. Studies on removal efficiency and mechanism of *Eichhonia crassipes* purifying system to nitrogen and phosphorus from eutrophic water [D]. Nanjing: Institute of Agricultural Resources and Environment, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences. 1-80 (in Chinese)
- 赵迪,徐文娟,李勇,等.2010.刺苦草对富营养化水体净化作用的研究[J].中国农学通,26(2):189-192
- Zhao D, Xu W J, Li Y, et al. 2010. Purification of eutrophicated water by *Vallisneria spinulosa* [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 26(2):189-192
- 郑建初,常志州,陈留根,等.2008.凤眼莲治理太湖流域水体氮磷污染的可行性研究[J].江苏农业科学,3:247-250
- Zheng J C, Chang Z Z, Chen L G, et al. 2008. The feasibility investigation of using water hyacinth *Eichhonia crassipes* to control nitrogen and phosphorus contamination in Taihu Lake [J]. Jiangsu Agricultural Science, 3: 247-250 (in Chinese)
- 邹国元,张福锁.2002.根际反硝化作用与 N_2O 释放[J].中国农业大学学报,7(1):77-82
- Zhou G Y, Zhang F S. 2002. Denitrification in rhizosphere and N_2O emission [J]. Journal of China Agricultural University, 7 (1): 77-82 (in Chinese)