

干湿交替频率影响下非饱和带有机氮转化的生物学机制

邱英英¹, 郑西来^{1,2,3}, 刘乐成¹, 郝玉洁¹, 马浩然¹

(1. 中国海洋大学环境科学与工程学院, 山东 青岛 266100; 2. 山东省环境地质工程重点实验室, 山东 青岛 266100; 3. 海洋环境与生态教育部重点实验室, 山东 青岛 266100)

摘要:为明晰非饱和带中溶解性有机氮(DON)在干湿交替频率影响下的转化机制,以大沽河流域集约化农业区为研究区,开展了不同干湿交替频率的室内批次试验,分析了氮素含量及其影响因素(土壤理化性质、微生物指标)的动态变化特征,通过冗余分析识别了氮素生物转化的驱动因子,基于环境因子、功能基因和氮素转化之间的关系建立了路径模型。结果表明:施加DON后快速发生氨化,干期 NO_3^- -N逐渐累积,而湿期 NO_3^- -N逐渐转化为 NO_2^- -N和 NH_4^+ -N,不同频率下干期均以硝化为主、湿期均以反硝化为主;随着非饱和带干湿循环次数从1次提高至3次,每个干期 NO_3^- -N累积量有所减少,但湿期 NO_3^- -N消耗量减少更为显著,导致最终土壤中 NO_3^- -N的赋存含量(每千克干土壤中 NO_3^- -N的质量)从14.28 mg/kg提高至34.16 mg/kg,频繁干湿交替增加了DON对地下水硝酸盐污染的潜在风险;随着干湿交替频率的提高,干期硝化菌属*Nitrospira*和湿期反硝化菌属*Pseudarthrobacter*相对丰度均逐渐下降,相关功能基因丰度也呈现下降趋势;含水率、氧化还原电位和溶解性有机碳会影响氮素转化相关基因表达,从而间接调节干湿交替下DON的转化行为。

关键词:溶解性有机氮;非饱和带;干湿交替;氮素转化;微生物群落;大沽河流域

中图分类号:X53

文献标志码:A

文章编号:1004-6933(2024)06-0242-09

Biological mechanism of dry-wet alternation frequency affecting organic nitrogen transformation in vadose zone// QIU Yingying¹, ZHENG Xilai^{1,2,3}, LIU Lecheng¹, HAO Yujie¹, MA Haoran¹ (1. College of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, China; 2. Key Laboratory of Environmental Geology and Engineering of Shandong Province, Qingdao 266100, China; 3. Key Laboratory of Marine Environment and Ecology, Ministry of Education, Qingdao 266100, China)

Abstract: To clarify the transformation mechanism of dissolved organic nitrogen (DON) in vadose zone under alternating dry and wet conditions, an intensive agricultural region within the Dagu River Basin was used as the study area, and indoor experiments were performed to analyze dynamic changes in nitrogen content and its influencing factors (soil physical and chemical properties and microbial indicators) under varying frequencies of dry-wet cycles. The driving factors of nitrogen transformation were identified through redundancy analysis, and a path model was established based on the relationships among environmental factors, functional genes, and nitrogen transformation. The results show that DON undergoes rapid ammonification, with an accumulation of NO_3^- -N during the dry period that subsequently transforms into NO_2^- -N and NH_4^+ -N during the wet period, suggesting a dominance of nitrification processes during the dry period and denitrification processes during the wet period across all dry-wet alternation frequencies. With an increase in the number of dry-wet cycles in vadose zone from one to three times, the cumulative amount of NO_3^- -N decreases during the dry period, while NO_3^- -N depletion has a more pronounced decrease during the wet period, resulting in the residual NO_3^- -N content (the mass of NO_3^- -N in per kilogram of dry soil) increasing from 14.28 mg/kg to 34.16 mg/kg. Therefore, frequent dry-wet alternations increase the potential risk of DON exacerbating groundwater nitrate pollution. The values of relative abundance of the nitrifying genus *Nitrospira* in the dry period and the denitrifying genus *Pseudarthrobacter* in the wet period gradually decrease with the increase of the dry-wet alternation frequency, and the values of abundance of related functional genes also show a downward trend. Water content, redox potential, and dissolved organic carbon affect the expression of nitrogen

基金项目:国家自然科学基金重点项目(41731280)

作者简介:邱英英(1999—),女,硕士研究生,主要从事土壤和地下水污染控制研究。E-mail:qyy123666888@163.com

通信作者:郑西来(1959—),男,教授,博士,主要从事地下水污染控制研究。E-mail:zhxilai@ouc.edu.cn

transformation-related genes, thereby indirectly regulating the transformation behavior of DON under dry-wet alternations.

Key words: dissolved organic nitrogen; vadose zone; dry-wet alternation; nitrogen transformation; microbial community; Dagu River Basin

地下水是经济和社会发展所必需且无法替代的重要资源^[1],全球近 50%的饮用水和近 40%的灌溉水来自地下含水层。然而,随着集约化农业、工业化和城镇化进程的快速推进,地下水硝酸盐污染已成为全球普遍关注的、最严重的环境地质问题之一^[2]。研究发现,农用氮肥中的溶解性有机氮(dissolved organic nitrogen, DON)在非饱和带中发生迁移和转化,已成为非饱和带遗留氮素以及地下水硝酸盐污染的重要原因^[3-4]。具体而言,非饱和带中易生物降解的 DON(如尿素、氨基酸和蛋白质)可通过氨化作用迅速转化为铵态氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$),随后通过硝化作用转化为硝态氮($\text{NO}_3^-\text{-N}$)^[4]。而通常 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 转化较慢,主要经反硝化转化为亚硝态氮($\text{NO}_2^-\text{-N}$)、一氧化二氮(N_2O)和氮气(N_2),未转化的 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 易垂向淋滤至含水层污染地下水。由此可见, DON 转化包括一系列氧化和还原过程,与非饱和带的氧化还原条件密切相关^[5]。例如:硝化作用通常在氧化还原电位 $E_h \geq 300 \text{ mV}$ 的好氧条件下更强,而缺氧/厌氧条件($E_h < 300 \text{ mV}$)更有利于 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 还原过程,如反硝化和硝酸盐异化还原为铵(dissimilatory nitrate reduction to ammonium, DNRA)^[6-7]。因此,需要考虑非饱和带氧化还原条件的动态变化,才能明晰 DON 的转化行为并准确评价其对地下水 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 污染的影响。

干湿交替是非饱和带普遍存在的水文波动现象。农田土壤的灌溉和蒸发^[8]、极端天气^[9]以及地下水位波动^[10]等都会使非饱和带经历不同程度和频次的干燥-湿润循环。场地调查研究表明,通常非饱和带含水率在 0~33.5%之间持续变化,且干湿交替引起的地下水位埋深在 1.47~8.88 m 范围内波动^[11]。这种水文波动能够影响土壤中溶解氧(dissolved oxygen, DO)浓度和氧化还原条件^[12],导致干期氧化条件下残留的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 经硝化作用生成大量 $\text{NO}_3^-\text{-N}$,而在湿期厌氧条件下 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 通过反硝化被消耗^[13-14]。更重要的是,干湿交替下这些环境因子波动会影响微生物群落结构、功能和代谢活性。当土壤进入干期时,部分微生物脱水死亡,再湿润后微生物又会快速增长并恢复活性^[15]。此外,土壤中溶解性有机碳(dissolved organic carbon, DOC)含量也会随着干湿交替发生波动,当土壤干旱时 DOC 含量减少,再湿润后 DOC 被暴露和释放,影响微生物的代谢活性^[16]。由于微生物是影响非饱和带氮素

转化的主要驱动力,而干湿交替会加剧氮素转化功能微生物群落和活性变化的复杂性。因此,在研究非饱和带氮素转化机制时不可忽视干湿交替的影响。以往关于干湿交替下非饱和带氮素转化的研究主要关注溶解性无机氮(dissolved inorganic nitrogen, DIN),尚未系统研究 DON 的转化行为。目前尚未厘清不同干湿交替频率影响下 DON 的转化机制,相关功能微生物对不同干湿交替频率的响应尚不明晰,环境因子、微生物指标和氮素转化的定量关系也有待进一步探讨。

本文以大沽河流域集约化农业区为研究区,研究不同干湿交替频率下 DON 的转化行为,重点探讨土壤理化性质(含水率、氧化还原电位和 DOC 含量)和微生物指标(群落结构和基因)的变化,并通过冗余分析识别氮素生物转化的驱动因子,基于路径模型阐明环境因子、氮素转化和相关功能基因之间的定量关系,以期解析地下水系统氮素污染过程提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品采集与处理

试验土壤样品采集于大沽河流域集约化农业区,该区域位于莱西市店埠镇(36° 72' 14" N、120° 37' 85" E)天井山村附近。取样时间为 2023 年 8 月,取样深度为 0~50 cm。将采集的土壤样品装入无菌自封袋中,4 °C 冷藏备用。试验前先将非饱和带土壤样品在室温(25 °C)下风干后筛分(2 mm 筛网)。

1.2 氮素转化试验

设置干湿交替批次试验条件,模拟非饱和带广泛存在的水文波动现象,尤其是波动频率的变化,氮素转化试验过程如图 1 所示。本文选用氨基酸(谷氨酸 $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$)作为非饱和带内的代表性外源 DON,其在土壤中的实际含量(文中不同形态氮素在土壤中的含量均指每千克干土壤中含有对应形态氮素的质量)为 0.6~367.3 mg/kg^[11]。首先进行预培养,调节土壤水分为 60%田间持水量,充分混合均匀后在恒温培养箱(25 °C)中预培养 10 d,以消除机械搅动干扰并恢复微生物活性。然后加入 60 mg/kg 的 DON 水溶液,调节初始土壤含水率为 20%,再将混匀后的土样分装到 50 mL 离心管中(含 25 g 干土)。设置 3 组不同干湿交替频率的试验组



图 1 氮素转化试验过程

Fig. 1 Procedure of nitrogen transformation test

DW1、DW2、DW3(分别对应 1、2、3 次干湿交替)和 1 组恒湿对照试验组 CM(恒定含水率 20%), 试验总周期均为 48 d, 如图 2 所示。干期置于恒温培养箱(25 °C)内培养, 将离心管覆盖无菌透气封口膜, 湿期置于厌氧手套箱内培养, 向离心管内加入预通氩气去除 DO 的超纯水, 调整土壤含水率为 20%, 并加盖封口保持厌氧环境。试验共设置 4 组, 每组做 3 个平行试验。CM 组在第 0、1、3、8、12、18、24、30、36、42、48 d 取样, 测定不同形态氮素(NO_3^- -N、 NO_2^- -N、 NH_4^+ -N、DON)含量、氧化还原电位和含水率; DW1~DW3 组在每个干期的第 0、1、3、8、12、18、24 d 和每个湿期的第 2、5、8、12、18、24 d 取样, 测定上述指标。所有试验组在每个干、湿期结束时测定 DOC 含量(每千克干土壤中含有 DOC 的质量), 在培养初期(第 1 个干期结束时)和末期(最后 1 个湿期结束时)对微生物群落结构和功能基因进行表征, 比较不同试验组干期和湿期微生物指标的差异。

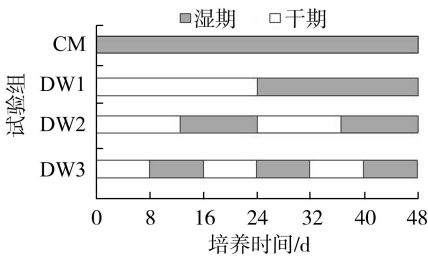


图 2 干湿交替频率

Fig. 2 Dry-wet alternation frequency

1.3 理化性质测定

结合筛分和激光粒度仪两种方法测定土壤样品粒度: 粒径大于或等于 0.5 mm 时采用筛分法测定, 粒径小于 0.5 mm 时采用激光粒度分析仪(RISE-2002, RISE, 中国)测定, 根据粒度划分土壤质地类型。采用烘干法(105 °C, 24 h)测定土壤含水率(以质量含水率表示), 采用环刀法测定田间持水量, 利用氧化还原电位计(ORP100P, HARVESON, 中国)监测土壤样品氧化还原电位的变化。土壤样品经磷酸酸化至 pH 值为 2~3 去除无机碳后, 采用 TOC 分析仪(TOC-2000, METASH, 中国)测定 DOC 含量。以 0.5 mol/L 的硫酸钾溶液为浸提剂, 将样品浸提后, 利用紫外可见分光光度计(UV-2800A, ONICO,

澳大利亚)分别采用紫外分光光度法、N-(1-萘基)乙二胺分光光度法和靛酚蓝比色法测定样品中 NO_3^- -N、 NO_2^- -N 和 NH_4^+ -N 等形态氮素的含量。采用过硫酸钾氧化法测定溶解性总氮(total dissolved nitrogen, TDN)含量, 并计算 TDN 和 DIN 含量的差值, 得到 DON 含量。本文采集的非饱和带样品中 NH_4^+ -N、 NO_3^- -N、DON、TDN 含量分别为 1.37、31.68、1.91、34.96 mg/kg; 田间持水量为 15.5%; DOC 含量为 61.82 mg/kg; 土壤为粉质壤土, 其中砂粒、粉粒、黏粒质量分数分别为 34.12%、51.64%、14.24%。

1.4 微生物测定

按照 Nai 等^[11]的方法进行 DNA 提取、细菌群落结构分析和定量 PCR(polymerase chain reaction)分析。使用试剂盒(MoBio PowerSoil © DNA Isolation Kit)从土壤中提取 DNA, 使用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计(Thermo Scientific 公司, 美国)分析分离 DNA 的量和纯度, 利用引物 338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和 806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT)扩增细菌 16S rRNA 基因的 V3~V4 区域, 使用 ABI 7300 实时定量 PCR 设备(Applied Biosystems, 美国)和引物测量 *amoA*、*nxrA*、*narG*、*nirK* 和 *nosZ* 基因丰度。

1.5 数据处理

使用 SPSS26 软件进行单因素方差分析和 Tukey 检验, 计算均数和标准差。利用 Canoco5 进行冗余分析, 解释影响功能菌丰度的主要环境因素。利用 SmartPLS4 建立偏最小二乘路径模型, 分析环境因子、氮素转化和相关功能基因之间的关系, 明确相关性路径系数。

2 结果与分析

2.1 干湿交替下含水率、氧化还原电位和 DOC 含量的动态变化

与恒湿组相比较, 所有干湿交替组干期的含水率均显著下降(图 3(a))。其中, DW1 组的含水率下降幅度最大, 经历 24 d 的干期后, 含水率降低至 0。DW2 组经历 2 个干湿循环, 在每个干期结束时, 含水率降为约 9.8%。DW3 组含水率波动幅度最

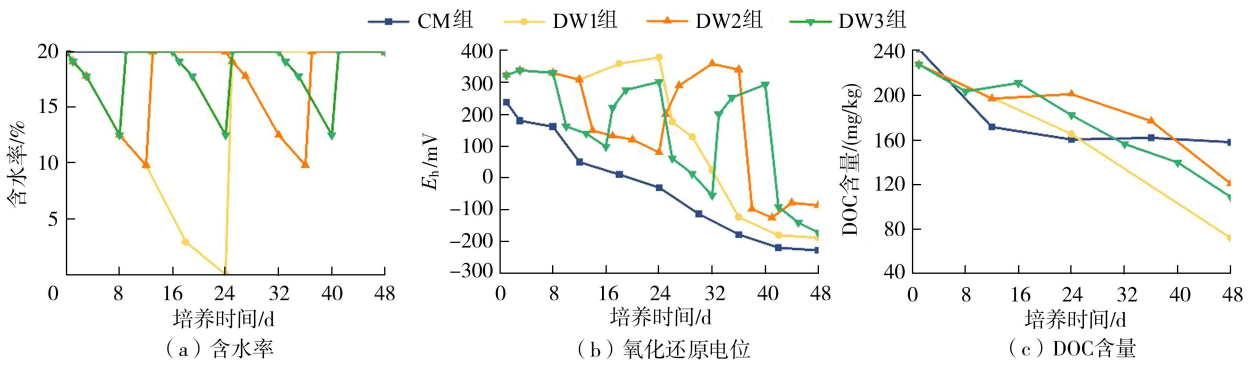


图3 含水率、氧化还原电位和 DOC 含量动态变化

Fig. 3 Dynamic changes of water content, redox potential, and DOC content

小,在每个干期结束时,含水率降低至约 12.5%。试验组进入湿期含水率维持在 20%。

含水率的变化引起非饱和带氧化还原电位波动(图 3(b))。恒湿组氧化还原电位随时间逐渐下降,培养结束时,氧化还原电位降低至 -228 mV,表明在恒湿条件下,土壤样品维持还原环境,氧气供应受限且生物还原过程持续进行,导致氧化还原电位逐渐下降。而所有干湿交替组氧化还原电位随时间呈现与含水率一致的波动趋势,即干期上升、湿期下降。与恒湿条件下相比,干湿交替后氧化还原电位下降更快,这可能因为干燥土壤再湿润后,Birch 效应增强,通过有机物的分解进一步降低了氧化还原电位^[17]。随着干湿交替次数的增加,湿期氧化还原电位越来越低,厌氧程度越来越强。以 DW3 组为例,第 1、2、3 个湿期的氧化还原电位最低值分别为 98、 -55 、 -172 mV,这可能归因于微生物群落在适应

水分波动后代谢效率的恢复^[18]。

干湿交替频率对土壤 DOC 含量产生显著影响(图 3(c))。恒湿组和干湿交替组 DOC 含量在 48 d 内均逐渐降低,其中下降最为显著的是 DW1 组,从 228 mg/kg 降低到 72.16 mg/kg。对于 DW2 和 DW3 组,与第 1 个干期结束时相比,第 1 个湿期结束时 DOC 含量略微增加,这一现象可能归因于 Birch 效应,即干燥土壤被重新湿润后,破坏了土壤团聚体,从而释放 DOC,导致 DOC 含量没有下降反而升高^[19]。在随后的干湿循环中,由于微生物呼吸代谢对 DOC 的消耗,DOC 含量呈现下降趋势。

2.2 干湿交替下氮素含量的动态变化

施加氨基酸后,观察到土壤样品中 DON、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量发生了显著变化(图 4)。恒湿组 DON 的含量在 8 d 内从 61.91 mg/kg 下降至约 6.0 mg/kg,91% 的 DON 发生

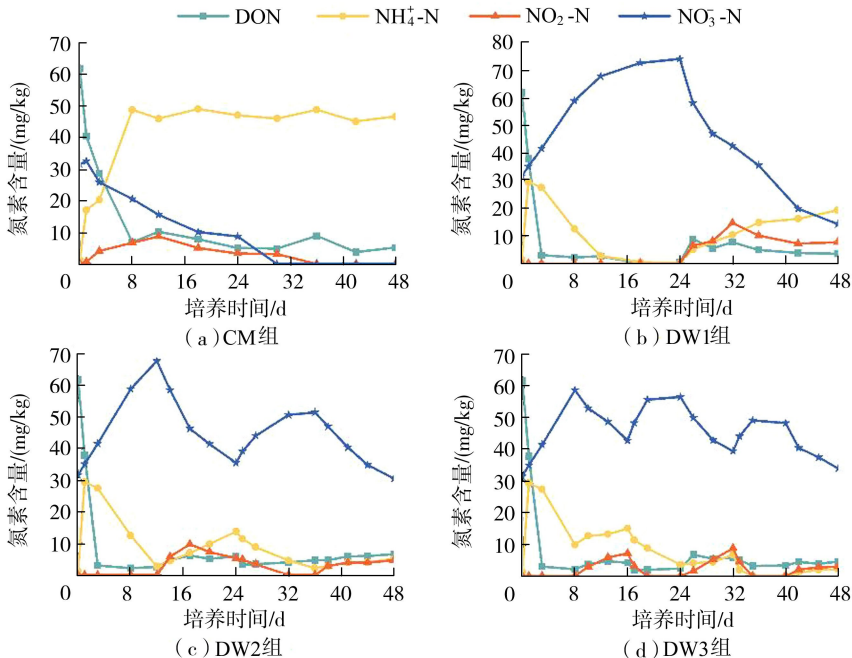


图4 不同干湿交替频率下氮素含量变化

Fig. 4 Changes in nitrogen content under different dry-wet alternation frequencies

转化,同时伴随着 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量增加,峰值达到 48.91 mg/kg 后保持稳定,表明恒湿阶段氮素转化过程主要包括 DON 的氨化作用产生 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 。此外, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量逐渐降低,在 30 d 时 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量降为 0,表明恒湿阶段发生 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 还原。在干期累积的 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 带负电荷,土壤对其吸附能力很弱, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 容易发生垂向淋滤,从而对地下水水质构成潜在风险。作为非饱和带自净的主要手段,硝酸盐的还原降低了其风险。

与恒湿组不同,干湿交替组 DON、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量在干期和湿期分别表现出不同的变化趋势。以 DW1 为例,进入干期, DON 含量仅在 3 d 内就从 61.91 mg/kg 迅速下降至约 3 mg/kg,而 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量急剧增加,在第 1 天达到峰值(29.46 mg/kg)后逐渐减少。这种 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的短暂积累现象在施加 DON 肥料的土壤中经常出现,主要是由于氨化作用产生 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 并进一步经硝化作用转化为 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ^[4]。 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 逐渐积累,在第 1 个干期结束时含量达到最大值。DW1 组从干期进入湿期后, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量逐渐降低至 14.28 mg/kg,同时出现 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的累积(最大含量为 14.66 mg/kg),且干湿频率越高, $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 累积量越少。通常认为, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 主要通过反硝化作用被还原为 $\text{NO}_2^-\text{-N}$,在这一过程中, $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 进一步转化为气态产物,如氧化亚氮(N_2O)和氮气(N_2)^[20-21]。此外, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 在经历 24 d 湿期后含量从 0 mg/kg 增加至 19.3 mg/kg,这种 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的累积可能是由于 DNRA 的发生。研究发现, DNRA 和反硝化这两种硝酸盐还原路径的竞争现象普遍存在于海洋、河口、湿地、湖泊和农田等各种缺氧生态系统中,且富含 DOC、碳氮比高、DO 浓度低和氧化还原电位低的环境更有利于 DNRA 的发生,这些有利条件与本文中湿期的条件相符,推测本文 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的累积可能来自 DNRA 作用^[22-23]。

与 DW1 组相比, DW2 和 DW3 组在第 1 个湿期 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 减少量较少, DW1、DW2、DW3 组在第 1 个湿期 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量分别减少了 60、32、16 mg/kg,这表明湿期时间越长, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的还原作用越强。上一个湿期积累的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 在第 2 和第 3 个干期通过硝化作用进一步转化为 $\text{NO}_3^-\text{-N}$,使 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量增加,但都没有恢复到第 1 个干期的水平,且干湿循环次数越多,干期 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的最大累积量越少(DW1、DW2、DW3 组最大含量分别为 74.19、67.9、58.98 mg/kg),归因于湿期发生反硝化作用导致了氮损失(以 N_2 和 N_2O 形式排放)。随着干湿循环次数的增加(以 DW3 组为例),湿期 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的增加量

减少,在第 1、2、3 个湿期 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量分别增加了 5.1、3.18、2.12 mg/kg,由此表明,干湿循环次数越多, DNRA 活性越弱,可能是因为微生物持续新陈代谢消耗 DOC,导致碳氮比持续下降。此外,从图 4 可以看出,干湿交替越频繁,最终累积的 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量越多(DW1、DW2、DW3 组其最终含量分别为 14.28、30.6、34.16 mg/kg),延缓了非饱和带硝酸盐自净进程。考虑到氮素转化过程主要由微生物驱动,陈意超等^[24]研究提出,频繁的干湿交替不利于 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 还原功能菌的生长代谢。为此,为进一步分析不同干湿交替频率影响下氮素转化的生物学机制,对氮素转化过程中微生物群落结构和基因丰度进行了检测。

2.3 干湿交替频率对微生物群落结构和功能的影响

利用 Shannon 指数和 Simpson 指数估算微生物的多样性,利用 Ace 指数和 Chao 指数分析微生物的丰富度(表 1)。在 CM 组中, Ace 指数从 2122.566 降低到 1852.081, Chao 指数也从 2109.58 降低到 1808.261, Shannon 指数由 4.981 降低到 3.473,而 Simpson 指数由 0.035 上升到 0.065,表明微生物丰富度和多样性均下降,可能因为长期处于厌氧环境中,一些需氧微生物会死亡或休眠^[25]。而在干湿交替组中,以 DW1 组为例,相比于干期,湿期微生物丰富度和多样性更高。DW2 和 DW3 组也呈现出湿期微生物丰富度和多样性高于干期的结果,是因为微生物在干期会积累诸如氨基酸、碳水化合物等高浓度溶质,通过脱水和降低渗透势来平衡干燥这一环境胁迫,这一过程消耗能量和碳源,抑制了微生物活性,甚至造成细胞脱水死亡^[26]。而复湿使土壤团聚体裂解并释放有机碳,生物可利用性碳源增加,提高了微生物活性^[27]。此外,随着干湿交替频率的增加,无论是干期还是湿期,微生物的丰富度和多样性均逐渐升高,原因可能是干湿频繁波动加强了微生物的适应性选择压力,

表 1 不同干湿交替频率下微生物多样性和丰富度指数

Table 1 Microbial diversity and richness indexes under different dry-wet alternation frequencies

试验组状态	丰富度指数		多样性指数	
	Ace 指数	Chao 指数	Shannon 指数	Simpson 指数
CM(湿初)	2122.566	2109.580	4.981	0.035
CM(湿末)	1852.081	1808.261	3.473	0.065
DW1(干末)	1906.942	1848.603	3.725	0.060
DW1(湿末)	2214.289	2179.360	4.612	0.044
DW2(干末)	1996.195	1942.127	4.638	0.051
DW2(湿末)	2152.703	2046.780	5.172	0.040
DW3(干末)	2034.010	1961.381	4.688	0.048
DW3(湿末)	2188.651	1998.012	5.740	0.037

促进了具有强适应能力的微生物种类增加^[28]。

从属水平上分析丰度较高的氮素转化功能微生物,结果见图 5。*Sphingomonas* 和 *Lysobacter* 在干期丰度较高,能够参与溶解性有机质降解矿化,造成干期 DOC 含量降低^[29-30]; *Nitrospira* 和 *Nocardioides* 是硝化菌属,在干期丰度升高、湿期丰度降低。以 DW1 组为例, *Nitrospira* 在干期结束时相对丰度为 17.61%,但在湿期结束时降至 0.92%,这表明干期有利于硝化反应。而 DW2 和 DW3 组在干期结束时 *Nitrospira* 的相对丰度分别为 15.33% 和 12.62%,均低于 DW1 组。随着干湿交替频率的增加,与硝化相关的功能菌属(如 *Nitrospira*) 丰度逐渐降低,这与氮素转化试验结果中干湿交替频率增加时,干期 NO_3^- -N 含量峰值降低的现象一致。YAN 等^[31-32] 研究表明, *Pseudarthrobacter*、*Flavisolibacter*、*Massilia*、*Cupriavidus* 和 *Ralstonia* 是控制地下水和土壤中硝酸盐还原过程(反硝化和 DNRA)的主要菌属,它们的相对丰度在湿期显著高于干期。如 *Pseudarthrobacter* 相对丰度最高的是 CM 组末期(达到 57.56%),表明长时间的湿润厌氧环境会促进硝酸盐还原。DW1~DW3 组的 *Pseudarthrobacter* 相对丰度均低于 CM 组,且随着干湿交替频率的增加,其相对丰度有所下降(DW1、DW2、DW3 组末期的相对丰度分别为 43.18%、42.77%、35.23%),说明在总周期相同的条件下,干湿交替次数越少,硝酸盐的还原能力越强,这也与本文中得出在湿期结束时 CM、DW1、DW2、DW3 组 NO_3^- -N 含量逐渐增大的结论一致,进一步表明干湿交替下氮素转化过程是多种功能微生物共同驱动的结果。

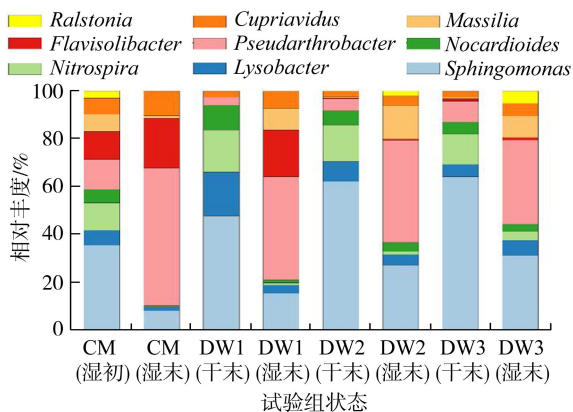


图 5 氮素转化功能菌(属水平)在干期和湿期变化特征
Fig. 5 Change characteristics of nitrogen transformation bacterium (genus level) in dry and wet periods

为了揭示干湿交替频率与参与 DON 转化主要功能基因之间的关系,对比分析干期和湿期的功能基因丰度,包括控制氨化过程的基因 *amoA*、硝化过程的基因 *nxrA* 和反硝化过程的基因(*narG*、*nirK* 和

nosZ)(表 2)。对于 CM 组, *amoA* 的丰度在末期显著高于初期, *nxrA* 丰度相对稳定且较低,这可能归因于 CM 组在恒湿条件下不利于硝化反应的持续进行。*narG*、*nirK* 和 *nosZ* 在湿期结束时丰度较高,表明恒湿厌氧环境有利于反硝化的持续进行。对于 DW1、DW2、DW3 组, *nxrA* 的丰度在干期高于湿期,且其丰度在 DW1 组最高, DW2 组次之, DW3 组最低,表明持续的干燥好氧环境有利于硝化过程进行得更充分。*narG*、*nirK* 和 *nosZ* 的丰度在湿期高于干期, DW3 组干湿交替频率最高且湿期持续时间最短,其反硝化基因丰度也较低,表明持续的湿润厌氧环境有利于硝酸盐还原为气态产物(NO 、 N_2O 和 N_2),从而减少非饱和带中 NO_3^- -N 赋存。以上结果表明,非饱和带经历频繁干湿交替会延缓其中 DON 和 NO_3^- -N 的自净进程,这一发现为有效防治由有机氮输入引发的地下水硝酸盐污染提供了新的视角。

表 2 氮素转化主要功能基因丰度

Table 2 Major nitrogen transformation-related functional genes

试验组状态	基因丰度 (copies/g)				
	<i>amoA</i>	<i>nxrA</i>	<i>narG</i>	<i>nirK</i>	<i>nosZ</i>
CM(湿初)	9 530 000	1 435 000	1 366 700	623 000	952 000
CM(湿末)	82 352 000	528 000	1 052 800	6 321 900	15 343 000
DW1(干末)	32 731 000	22 836 600	427 100	572 900	724 000
DW1(湿末)	20 004 000	15 272 300	1 652 300	9 422 000	10 861 200
DW2(干末)	20 004 000	9 283 000	934 900	1 005 500	1 182 000
DW2(湿末)	20 551 000	2 084 100	1 875 000	5 121 800	6 162 000
DW3(干末)	39 126 000	7 681 000	1 162 000	913 500	1 210 000
DW3(湿末)	24 382 000	1 182 000	1 482 000	3 838 000	9 724 000

2.4 氮素生物转化驱动因子识别和定量分析

利用冗余分析进一步探究了干湿交替条件下影响功能菌丰度的主要环境因素,冗余分析的第一轴解释度 RDA1 为 62.3%,第二轴解释度 RDA2 为 24.1%(图 6)。整体上分析,含水率、 E_h 和 DOC 的向量长度递减,表明这 3 种环境因素对干湿交替下非饱和带氮素转化的影响程度呈递减顺序。所有试验组中湿期结束时的数据点在第二、三象限离散分布,氮素转化以 NH_4^+ -N 和 NO_2^- -N 等还原态氮素的产生为主,参与氮素转化的菌属均是和硝酸盐还原相关的功能菌属(*Flavisolibacter*、*Cupriavidus*、*Pseudarthrobacter*、*Massilia* 和 *Ralstonia*),且主要受含水率的影响。所有试验组中干期结束时的数据点基本在中心点右侧分布,氮素转化以 NO_3^- -N 的产生为主,且 NO_3^- -N 含量与 *Nitrospira*、*Nocardioides*、*Sphingomonas* 和 *Lysobacter* 之间有显著的正相关关系,主要受 DOC 和 E_h 影响。值得注意的是,随着干湿交替越来越频繁,干期末数据点基本沿 DOC、 E_h 和 NO_3^- -N 向量的反方向分布,表明干湿交替频

率不仅影响 DOC 含量、 E_h 和 NO_3^- -N 含量的变化,且这些环境因子对氮素转化的影响越来越小,这与干湿交替频繁时硝化和反硝化进程是一致的。

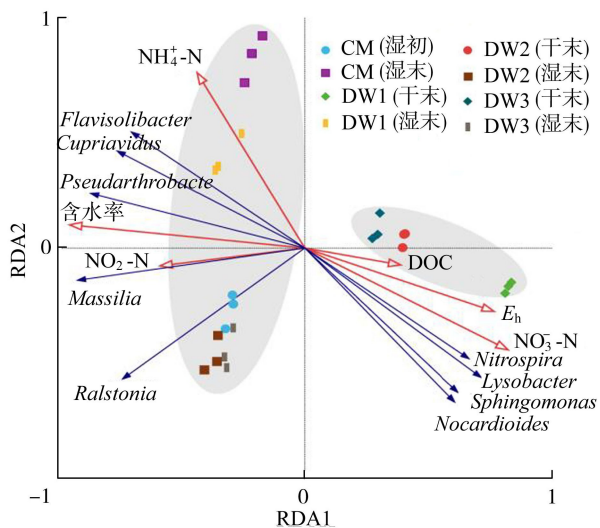


图 6 不同干湿交替频率下氮素转化功能菌(属水平)与环境因子的冗余分析

Fig. 6 Redundancy analysis of nitrogen transformation bacterium (genus level) and environmental factors under different dry-wet alternation frequencies

微生物指标分析结果表明,非饱和带内 DON 的转化由微生物驱动,可以微生物功能基因为中介,构建路径模型(图 7),阐明环境因子对各形态氮素转化的间接影响。图 7 中连线表示线两端变量具有显著相关性,其中,实线表示负相关,虚线表示正相关,数值为两个变量间的相关系数。与以往的研究一致^[33-34],含水率对反硝化基因(*nirK* 和 *nosZ*)产生正向影响,而对氨化基因(*amoA*)和硝化基因(*nxrA*)产生负向影响,这反映了反硝化基因适应还原环境,氨化基因和硝化基因适应氧化环境。 E_h 与反硝化基因(*nirK* 和 *narG*)呈负相关关系,而其对硝化基因的影响不显著,可能是由于干期的 E_h 相对稳定(图 3(b))。此外,DOC 对反硝化菌的影响比硝化菌更大,这可能与反硝化菌是异养型而硝化菌是自

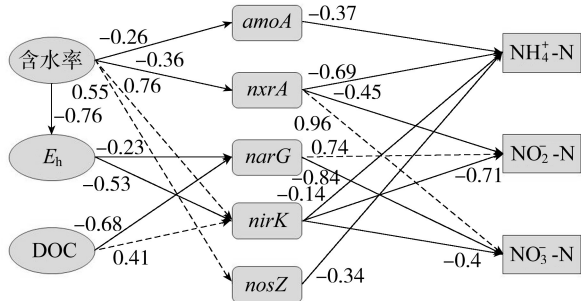


图 7 环境因子、氮素转化和相关功能基因的路径模型
Fig. 7 Path model of environmental factors, nitrogen transformation, and related functional genes

养型有关。本文中基因丰度对氮素含量的影响与其在氮素转化过程中的功能基本相符,如 *narG* 的作用是将 NO_3^- -N 还原为 NO_2^- -N,因此 *narG* 与 NO_3^- -N 含量呈负相关关系,与 NO_2^- -N 含量呈正相关关系。这些结果表明,非饱和带干湿交替下含水率、 E_h 和 DOC 含量显著影响功能微生物的群落结构和基因表达,从而间接调节 DON 转化过程中的各氮素含量。

3 结论

a. 干湿交替引发了非饱和带显著的氧化还原环境波动,造成干期 DON 含量下降,且出现了 NH_4^+ -N 的短暂累积,随后 NH_4^+ -N 经硝化作用转化为 NO_3^- -N,表明 DON 在干期主要发生氨化、硝化反应。进入湿期后, NO_3^- -N 含量逐渐降低, NO_2^- -N 也出现少量累积,表明湿期发生硝酸盐还原过程,且以反硝化作用为主。干湿交替越频繁,干期 NO_3^- -N 的最大累积量越少,但同时湿期 NO_3^- -N 的还原量也越少,最终累积较高的 NO_3^- -N 含量,延缓了非饱和带 NO_3^- -N 自净进程,从而对地下水水质构成潜在风险。

b. 干湿交替改变了氮素转化功能微生物群落结构和活性。干期相对丰度较高的菌属是 *Sphingomonas* 和 *Nitrospira*, 而湿期则以 *Pseudarthrobacter*、*Flavisolibacter* 和 *Cupriavidus* 等菌属为主导。从功能基因角度分析也得到一致的结果,干期氨化基因 *amoA* 和硝化基因 *nxrA* 的丰度较高,而反硝化基因(*narG*、*nirK*、*nosZ*) 在湿期表现出显著的丰度优势,进一步通过路径模型分析发现,干湿交替通过影响微生物进而调控非饱和带 DON 的转化过程。因此,在防治地下水硝酸盐污染时,可以通过调节农业水肥管理措施,降低非饱和带干湿交替频率,延长湿期进程,从而减少 NO_3^- -N 累积。

参考文献:

[1] 赵振,陈惠娟,秦光雄,等. 青海乌兰盆地地下水资源评价及可开采潜力分析[J]. 水资源保护, 2021, 37(6): 60-66. (ZHAO Zhen, CHEN Huijuan, QIN Guangxiong, et al. Groundwater resources evaluation and exploitable potential analysis in Wulan Basin, Qinghai Province[J]. Water Resources Protection, 2021, 37(6): 60-66. (in Chinese))

[2] KIM K H, YUN S T, MAYER B, et al. Quantification of nitrate sources in groundwater using hydrochemical and dual isotopic data combined with a Bayesian mixing model [J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2015, 199: 369-381.

[3] POSSINGER A R, BAILEY S W, INAGAKI T M, et al.

- Organo-mineral interactions and soil carbon mineralizability with variable saturation cycle frequency [J]. *Geoderma*, 2020, 375: 114483.
- [4] LIU H X, HAO Y J, WANG H, et al. Bidirectional potential effects of DON transformation in vadose zones on groundwater nitrate contamination: different contributions to nitrification and denitrification [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2023, 448: 130976.
- [5] 李勇, 单雅洁, 李娜, 等. 太湖潜流带有有机质含量对硝酸盐还原途径的影响[J]. *河海大学学报(自然科学版)*, 2022, 50(1): 44-51. (LI Yong, SHAN Yajie, LI Na, et al. Effects of organic matter content on nitrate reduction pathway in the hyporheic zone of Lake Taihu [J]. *Journal of Hohai University (Natural Sciences)*, 2022, 50(1): 44-51. (in Chinese))
- [6] ZHAO Shan, ZHANG Baoju, ZHOU Nianqing. Effects of redox potential on the environmental behavior of nitrogen in riparian zones of West Dongting Lake Wetlands, China [J]. *Wetlands*, 2020, 40(5): 1307-1316.
- [7] MINICK K J, PANDEY C B, FOX T R, et al. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium and N₂O flux: effect of soil redox potential and N fertilization in loblolly pine forests [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2016, 52(5): 601-614.
- [8] 周炜, 王洪峰, 栾清华, 等. 邯郸市永年区不同 PM 修正模型麦田蒸散模拟对比[J]. *河海大学学报(自然科学版)*, 2022, 50(6): 47-57. (ZHOU Wei, WANG Hongfeng, LUAN Qinghua, et al. Simulation comparison of wheat field evapotranspiration with different PM models in Yongnian District of Handan City [J]. *Journal of Hohai University (Natural Sciences)*, 2022, 50(6): 47-57. (in Chinese))
- [9] 杨肖丽, 马慧君, 吴凡, 等. 基于 CMIP6 的全球及干旱带干旱时空演变[J]. *水资源保护*, 2023, 39(2): 40-49. (YANG Xiaoli, MA Huijun, WU Fan, et al. Spatiotemporal evolution of global and arid zone drought based on CMIP6 [J]. *Water Resources Protection*, 2023, 39(2): 40-49. (in Chinese))
- [10] 宋子奕, 鲁程鹏, 吴成城, 等. 2009—2019 年河西走廊地下水水位时空分布及演变趋势[J]. *水资源保护*, 2023, 39(2): 160-167. (SONG Ziyi, LU Chengpeng, WU Chengcheng, et al. Spatiotemporal distribution and evolution trend of groundwater level in Hexi Corridor from 2009 to 2019 [J]. *Water Resources Protection*, 2023, 39(2): 160-167. (in Chinese))
- [11] NAI Hui, XIN Jia, LIU Yang, et al. Distribution and molecular chemodiversity of dissolved organic nitrogen in the vadose zone-groundwater system of a fluvial plain, northern China: implications for understanding its loss pathway to groundwater [J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 723: 137928.
- [12] 曹小闯, 刘晓霞, 马超, 等. 干湿交替灌溉改善稻田根际氧环境进而促进氮素转化和水稻氮素吸收[J]. *植物营养与肥料学报*, 2022, 28(1): 1-14. (CAO Xiaochuang, LIU Xiaoxia, MA Chao, et al. Alternative dry-wet irrigation improves the rhizospheric oxygen environment and nitrogen transformation, and increases nitrogen absorption by rice plants [J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2022, 28(1): 1-14. (in Chinese))
- [13] XU Chunmei, CHEN Liping, CHEN Song, et al. Rhizosphere aeration improves nitrogen transformation in soil, and nitrogen absorption and accumulation in rice plants [J]. *Rice Science*, 2020, 27(2): 162-174.
- [14] TAN Xuezhi, SHAO Dongguo, LIU Huanhuan, et al. Effects of alternate wetting and drying irrigation on percolation and nitrogen leaching in paddy fields [J]. *Paddy and Water Environment*, 2013, 11(1/2/3/4): 381-395.
- [15] BARNARD R L, BLAZEWCZ S J, FIRESTONE M K. Rewetting of soil: revisiting the origin of soil CO₂ emissions [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2020, 147: 107819.
- [16] 张梦瑶, 高永恒, 谢青琰. 干湿交替对土壤有机碳矿化影响的研究进展 [J]. *世界科技研究与发展*, 2017, 39(1): 17-23. (ZHANG Mengyao, GAO Yongheng, XIE Qingyan. Effects of alternate drying and wetting on soil organic carbon mineralization: a review [J]. *World Sci-Tech R&D*, 2017, 39(1): 17-23. (in Chinese))
- [17] WANG B, ZHA T S, JIA X, et al. Soil moisture modifies the response of soil respiration to temperature in a desert shrub ecosystem [J]. *Biogeosciences*, 2014, 11(2): 259-268.
- [18] WANG D Y, FELICE M L, SCOW K M. Impacts and interactions of biochar and biosolids on agricultural soil microbial communities during dry and wet-dry cycles [J]. *Applied Soil Ecology*, 2020, 152: 103570.
- [19] NAJERA F, DIPPOLD M A, BOY J, et al. Effects of drying/rewetting on soil aggregate dynamics and implications for organic matter turnover [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2020, 56(7): 893-905.
- [20] 胡朝晖, 余健, 刘钢, 等. 反硝化生物滤池除污性能及水头损失变化规律 [J]. *中国给水排水*, 2014, 30(11): 14-18. (HU Zhaohui, YU Jian, LIU Gang, et al. Pollutant removal performance and head loss in a denitrifying biofilter [J]. *China Water & Wastewater*, 2014, 30(11): 14-18. (in Chinese))
- [21] 陈小凤, 赵心玥, 何晓茜, 等. 外加生物炭对不同利用方式紫色土反硝化过程的影响 [J]. *土壤*, 2023, 55(6): 1289-1296. (CHEN Xiaofeng, ZHAO Xinyue, HE Xiaoqian, et al. Effects of biochar on denitrification of purple soils under different land use types [J]. *Soils*, 2023, 55(6): 1289-1296. (in Chinese))
- [22] FRIEDL J, DE ROSA D, ROWLINGS D W, et al. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA), not denitrification dominates nitrate reduction in subtropical pasture soils upon rewetting [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, 125: 340-349.

- [23] 蒋然,李召旭.典型河口区硝态氮短程还原成铵的活性氮累积途径研究进展[J].水资源保护,2014,30(4):10-13. (JIANG Ran, LI Zhaoxu. Active nitrogen accumulation mechanism in typical estuarine regions based on dissimilatory nitrate reduction to ammonium[J]. Water Resources Protection,2014,30(4):10-13. (in Chinese))
- [24] 陈意超,李伏生,李烙布.不同灌溉方式和尿素猪粪比例对稻田氮素转化相关微生物活性的影响[J].华南农业大学学报,2018,39(1):31-39. (CHEN Yichao, LI Fusheng, LI Luobu. Effects of different irrigation methods and ratios of urea pig manure on microbial activity related to nitrogen transformation in paddy soil[J]. Journal of South China Agricultural University, 39(1):31-39. (in Chinese))
- [25] LU Z, IMLAY J A. When anaerobes encounter oxygen: mechanisms of oxygen toxicity, tolerance and defence[J]. Nature Reviews Microbiology,2021,19(12):774-785.
- [26] 谢志煌,高志颖,郭丽丽,等.土壤微生物活性和生物量对干湿交替的响应[J].土壤与作物,2020,9(4):348-354. (XIE Zhihuang, GAO Zhiying, GUO Lili, et al. Responses of soil microbial activities and biomass to drying and wetting;a review[J]. Soils and Crops,2020,9(4):348-354. (in Chinese))
- [27] DENEK K, SIX J, PAUSTIAN K, et al. Importance of macroaggregate dynamics in controlling soil carbon stabilization: short-term effects of physical disturbance induced by dry-wet cycles [J]. Soil Biology and Biochemistry,2001,33(15):2145-2153.
- [28] ZHOU W P, SHEN W J, LI Y E, et al. Interactive effects of temperature and moisture on composition of the soil microbial community [J]. European Journal of Soil Science,2017,68(6):909-918.
- [29] LI Yi, XU Chen, ZHANG Wenlong, et al. Response of bacterial community in composition and function to the various DOM at river confluences in the urban area[J]. Water Research,2020,169:115293.
- [30] CHEN Danmei, LIU Qingfu, ZHANG Guangqi, et al. Enhancement of soil available nutrients and crop growth in sustainable agriculture by a biocontrol bacterium *Lysobacter enzymogenes* LE16: preliminary results in controlled conditions[J]. Agronomy,2023,13(6):1453.
- [31] YAN Junwei, SU Hantao, KUANG Xiaoxian, et al. Characteristics and mechanism of simultaneous nitrate and phenol removal by a newly isolated *Cupriavidus oxalaticus* T2[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2021,161:105234.
- [32] ZHENG Xuan, LIU Xing, YANG Hang, et al. Effect of macroporous zeolite substrate on denitrification in tidal flow constructed wetland[J]. Environmental Technology & Innovation,2023,32:103424.
- [33] YUAN Dongdan, ZHENG Lei, LIU Yongxin, et al. Nitrifiers cooperate to produce nitrous oxide in plateau wetland sediments [J]. Environmental Science & Technology,2023,57(1):810-821.
- [34] MA Lin, JIANG Xiaoliang, LIU Guihua. Environmental factors and microbial diversity and abundance jointly regulate soil nitrogen and carbon biogeochemical processes in Tibetan wetlands [J]. Environmental Science & Technology,2020,54(6):3267-3277.

(收稿日期:2024-03-06 编辑:施业)

(上接第223页)

- [66] LIU Mengkai, GUO Jing. Comparisons and improvements of eco-compensation standards for water resource protection in the Middle Route of the South-to-North Water Diversion Project[J]. Water Supply,2020,20(8):2988-2999.
- [67] 穆贵玲,汪义杰,李丽,等.水源地生态补偿标准动态测算模型及其应用[J].中国环境科学,2018,38(7):2658-2664. (MU Guiling, WANG Yijie, LI Li, et al. Development and application of the dynamic calculation model for proposing a water source eco-compensation standard[J]. China Environmental Science,2018,38(7):2658-2664. (in Chinese))
- [68] FANG Zhou, CHEN Junyu, LIU Gang, et al. Framework of basin eco-compensation standard valuation for cross-regional water supply: a case study in northern China[J]. Journal of Cleaner Production,2021,279:123630.
- [69] 李晓英,江崇秀,张琛.基于云模型的城市资源水价研究[J].河海大学学报(自然科学版),2020,48(3):215-221. (LI Xiaoying, JIANG Chongxiu, ZHANG Chen. Study on city resource water price based on cloud model[J]. Journal of Hohai University (Natural Sciences),2020,48(3):215-221. (in Chinese))
- [70] ZHAO Yue, WU Fengping, LI Fang, et al. Ecological compensation standard of trans-boundary river basin based on ecological spillover value: a case study for the Lancang-Mekong River Basin[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health,2021,18(3):1251.
- [71] 陈默,林育青,张建云,等.水生态系统生产总值核算体系及应用[J].水资源保护,2023,39(1):234-242. (CHEN Mo, LIN Yuqing, ZHANG Jianyun, et al. Accounting system of gross water ecosystem product and its application[J]. Water Resources Protection,2023,39(1):234-242. (in Chinese))
- [72] LI Huiqin, LYU Cuimei, LING Minhua, et al. Emergy analysis and ecological spillover as tools to quantify ecological compensation in Xuchang City, Qingyi River Basin, China[J]. Water,2021,13(4):414.
- [73] MENG Yu, ZHANG Hao, JIANG Pengkun, et al. Quantitative assessment of safety, society and economy, sustainability benefits from the combined use of reservoirs [J]. Journal of Cleaner Production,2021,324:129242.

(收稿日期:2023-10-11 编辑:施业)