

富氧灌溉池塘中反硝化细菌丰度昼夜垂直变化特征分析

易能, 邸攀攀, 王岩, 张振华, 刘新红, 张力, 严少华, 高岩*

(江苏省农业科学院农业资源与环境研究所, 南京 210014)

摘要: 为了探讨农用灌溉池塘蓄积的生活污水在富氧条件下反硝化细菌丰度变化及其与水质参数的相关性, 应用实时荧光定量聚合酶链式反应技术对富氧灌溉池塘水体不同深度水层中(上层 10~30 cm、中层 90~110 cm、和下层 150~170 cm)反硝化功能基因丰度昼夜变化特征进行了研究。结果表明: 水质参数中溶解氧(dissolved oxygen, DO)浓度、pH 值、水温、光照度及 NO_3^- -N 浓度均具有垂向分层效应, 随水层的加深而逐渐降低, NH_4^+ -N 及 PO_4^{3-} -P 浓度则呈现与前者相反的趋势, 随水层加深而逐渐升高; *nirK*, *nirS* 和 *nosZ* 3 类反硝化基因受 DO 浓度和 pH 值调节作用显著, 均表现为白天丰度高, 晚间丰度低的时间效应; 3 类反硝化基因丰度整体表现为表层水体中的基因丰度高, 其次为中层水体, 底层水体中的丰度最低的趋势, 即同样表现出垂向分层效应。*nirS* 基因丰度总是比 *nirK* 基因丰度高, 说明 *nirS* 型反硝化细菌更能适应富氧灌溉池塘水质环境。3 类反硝化基因丰度与环境参数中的 DO 浓度和 pH 值呈显著正相关 ($P < 0.01$)。综上, 富氧条件下灌溉池塘水质参数尤其是 DO 浓度昼夜垂向变化促使 *nirK*, *nirS* 和 *nosZ* 3 类反硝化细菌丰度变化具有一定的时间效应和垂直空间分层效应, 说明在自然条件下也可能有大量的好氧反硝化细菌存在, 并且因为长时间受富氧条件驯化, 导致反硝化细菌丰度受 DO 浓度变化影响较大, 可能会促使不同深度水层断面发生的氮转化过程及其强度具有差异。进而为原位状态下好氧反硝化脱氮的可能性提供了更有利的佐证。该研究为富氧污水在用于农田灌溉使用时提供背景参数。

关键词: 富营养化; 灌溉; 水质; 反硝化细菌; 昼夜变化; 富氧

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2015.15.011

中图分类号: X52; Q178.51⁺4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2015)-15-0080-07

易能, 邸攀攀, 王岩, 张振华, 刘新红, 张力, 严少华, 高岩. 富氧灌溉池塘中反硝化细菌丰度昼夜垂直变化特征分析[J]. 农业工程学报, 2015, 31(15): 80—86. doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2015.15.011 <http://www.tcsae.org>
Yi Neng, Di Panpan, Wang Yan, Zhang Zhenhua, Liu Xinhong, Zhang Li, Yan Shaohua, Gao Yan. Diel vertical variability analysis of denitrifying bacteria abundance in oxygen-enriched irrigation pond[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2015, 31(15): 80—86. (in Chinese with English abstract) doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2015.15.011 <http://www.tcsae.org>

0 引言

污水灌溉是一种利用土壤环境自净功能, 使污水资源化的重要应用工程措施^[1]。中国环境保护部 2013 年环境统计年报显示 2013 年城镇生活污水排放量占全国污水排放量的 69.8%, 而 2014 年中国统计年鉴显示中国农业用水量能达到全年总用水量的 60%以上。因此, 生活污水高排放量及农田灌溉的高需求量促使开发利用污水资源, 用以农业灌溉^[2-3]。目前关于污水灌溉的研究多数集中在污水中养分促进农作物生长的潜力及污水中重金属等污染物的潜在风险^[4-6], 关于灌溉水在存储过程中生物理化性质变化的研究较少。

生活污水氮、磷及有机物质浓度高, 微生物的代谢活动极其强烈, 污水在蓄积和存储的过程中, 营养盐度等各理化指标均会发生显著变化。其中, 溶解氧(dissolved oxygen, DO)浓度及氮循环微生物在存储过程中的变化可能会影响灌溉后农田系统中氮的型态及有效性, 也会影响农田系统的氮循环微生物^[7-8]。根据项目组前期调查, 本文研究的农用灌溉生活污水在存储过程中具有高溶解氧的特征, 夏季表层 DO 可高达 15 mg/L。然而, 关于富氧条件下水体氮循环微生物的研究鲜有报道。溶解氧是影响反硝化微生物种群多样性、丰度及活性的关键环境因子之一。在自然条件下, 反硝化微生物驱动的反硝化作用将水体中的无机氮转化为 N_2O 、 N_2 返回到大气中, 是水生系统维持氮浓度相对稳定的重要机制^[9]。传统理论认为在 DO 浓度较高时不利于发生反硝化脱氮作用, 然而, 随着对微生物反硝化过程认识的逐步深入, 发现好氧反硝化过程也可能成为自然条件下将无机态氮转化气态氮的重要途径^[10-11]。李佳霖等^[12]研究表明反硝化细菌数量与反硝化速率相关性达到 0.95。因此, 通过研究高溶解氧浓度水体中反硝化微生物分布特征有助于预测其反硝化脱氮的潜力及强度, 可为进一步理解富氧污水对农田生态系统中氮利用及氮转化过程的影响提供理论依据。

收稿日期: 2015-05-18 修订日期: 2015-07-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(41401592); 江苏省科技支撑计划项目(BE2013436); 江苏省自然科学基金(BK20140737); 江苏省农业科技自主创新资金项目(CX(14)5047)

作者简介: 易能, 女, 湖南邵阳人, 博士, 助理研究员, 研究方向为富营养化水体生物修复及机理研究。南京 江苏省农业科学院农业资源与环境研究所, 210014。Email: yn2010203011@foxmail.com

*通信作者: 高岩, 女, 吉林延边人, 博士, 副研究员, 研究方向为富营养化水体生物修复及机理研究。南京 江苏省农业科学院农业资源与环境研究所, 210014。Email: jaas.gaoyan@yahoo.com

研究发现在湖泊、水库、富营养化水塘等水域中，热力学分层效应会阻碍表层和底层水体间物质交换，导致 DO 浓度及其他理化指标（pH、氮磷浓度及可溶性有机碳等）出现垂向分层效应^[13-14]。这些理化环境参数的垂向分层现象可能会导致微生物在不同深度水层的数量与分布出现差异，进一步影响生物地球化学循环过程。目前还鲜有关于分层效应影响特定功能的菌群数量和分布的研究。鉴于高溶解氧农用灌溉池塘在江苏南京等丘陵地区主要用于稻田灌溉，本文主要对该类水体在夏季稻田灌溉高峰期不同深度水层理化参数及反硝化细菌丰度昼夜动态变化特征展开研究。以含有编码亚硝酸还原酶的 *nirK* 和 *nirS* 基因和编码 N₂O 还原酶的 *nosZ* 基因的反硝化细菌为研究对象，期望能够掌握富氧生活污水存储过程中反硝化细菌的昼夜垂向分层变化特征及环境因素的调节作用，为污水灌溉利用提供反硝化微生物特征的背景资料。

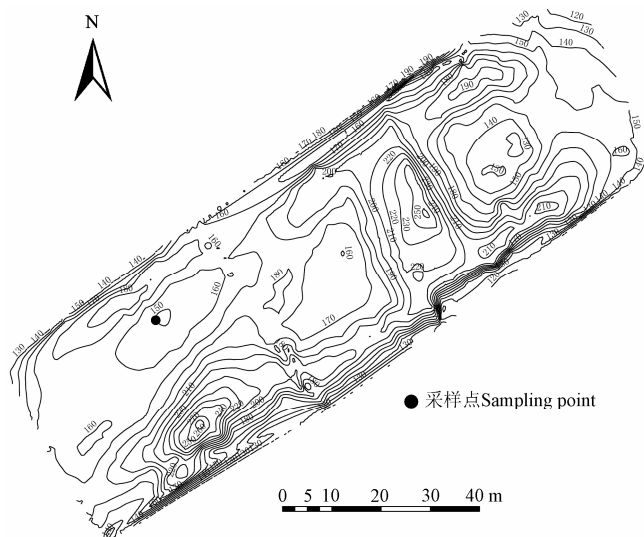
1 材料和方法

1.1 采样区概况

试验池塘为江苏省农业科学研究院 2 号蓄水塘（32°02'21"N、118°52'37"E）。该蓄水塘水源主要为生活污水及雨水，水体指标达到中等富营养化水平，为农科院试验基地种植水稻、玉米等农作物的灌溉用水。水塘面积约 5 400 m²（长 120 m、宽 46 m）；蓄水塘中心区域水深约 4 m，底泥有机质质量分数为 41.3 mg/g。该蓄水塘水温的变化范围为-5（冬季）~39℃（夏季）。蓄水塘水力停留时间约 1 个月甚至更长，在雨季停留时间较短。

1.2 水样采集时间

试验采样点布置如图 1 所示。



注：等深线上数值为水深，m。
Note: Values in contours are water depth, m.

图 1 富氧灌溉池塘等深图及采样点

Fig.1 Sketch of distribution of water depths and sampling site located in oxygen-enriched irrigation pond

试验前期对池塘的水深、水动力做过的系统调查，也通过预试验验证了所选取的采样点受灌溉开闸放水口

和污水排放进水口的冲击最小，对水体的扰动最小，是在蓄水过程中相对稳定的一个区域。同时，因为前期研究发现选取采样点区域内水体热力学分层特征非常稳定。在晴好天气条件下，相同月份内每日下不同深度水层各种理化指标的变化很小，又因 24 h 连续监测不同水层样品（包括 YSI 现场分析、实验室分析氮磷浓度等、微生物总 DNA 提取及荧光定量 PCR），工作量较大，所以不考虑采用不同日期进行重复测定，在水体热力学分层稳定的情况下选取 1 个采样点，重点研究 24 h 内的昼夜变化规律。在 24 h 内，每个时间点每层水体采样全部进行 3 次重复。

于 2013 年 8 月 15 日 12:00、8 月 16 日 00:00、04:00、08:00 及 12:00 进行定时定点分层监测，8 月 15 日和 8 月 16 日南京市气象数据见表 1。试验过程中采用 YSI Pro Plus 多功能水质参数测定仪（YSA，美国）对环境因子进行现场监测，环境因子测定指标有水温（water temperature, WT）、溶解氧（DO）、pH 值；采用水下空气两用光照度计（ZDS-10W-2D，中国）监测水体光照强度。水样采集装置是利用不同长度的乳胶管绑在标好尺度的铁杆上，乳胶管另一端连接在真空泵上，通过真空泵再分别连接到采样瓶中，从而可同时互不干扰地采集每 10 cm 垂直分段的水样，本研究主要采集水塘上层水样（10~30 cm）、中层水样（90~110 cm）和下层水样（50~170 cm），即各层分别由其区间内的 3 个 10 cm 分段的 1L 水样混合而成最终用以分析的 3 L 水样，且每个水样重复 3 次，采样瓶均为经过高温高压灭菌处理。将装有水样的采样瓶存放于冰盒中并迅速运回实验室进行分析。各水样取 500 mL 经 0.45 μm 孔径的纤维素酯混合滤膜（上海新亚，中国）过滤等预处理后使用流动分析仪 SEAL AutoAnalyzer 3（SEAL Analytical 公司，英国）测定水体中 NO³-N、NH₄⁺-N 及 PO₄³-P 含量，另取 500 mL 在 4℃ 条件下保存，并尽快提取其中微生物总 DNA 含量。滤膜由精硝化棉，加入适量醋酸纤维素、丙酮、正丁醇、乙醇等制成，不含有氮磷等元素。

表 1 2013 年试验期间气象数据
Table 1 Meteorological data during experiment in 2013

监测日期 Monitoring date	平均 风速 Average wind velocity/ (m·s ⁻¹)	平均气温 Day average temperature/℃	日照时数 Sunshine duration/h	最低气温 Minimum air temperature/℃	最高气温 Maximum air temperature/℃
08-15	2.7	32.4	7.4	28.5	37.2
08-16	2.8	31.7	9.0	27.8	36.9

1.3 反硝化细菌丰度测定

1.3.1 细菌总 DNA 提取

参考 Yi 等^[15]方法提取水体中总细菌 DNA：取 500 mL 水体样品经 30~50 μm 纤维素定量滤纸去除大颗粒杂质，滤液再经 0.22 μm 微孔滤膜（上海新亚，中国）真空抽滤，将含过滤菌体的滤膜放入 Eppendorf 管中，在无菌条件下剪成 1~2 mm 碎屑，按照 OMEGA Bio-Tek 水体 DNA 提取试剂盒 E.Z.N.A.® Water DNA Kit（OMEGA Bio-Tek Inc.,

Doraville, GA, USA) 操作步骤提取水体细菌总 DNA。

1.3.2 实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR)

利用 3 对引物对 (*nosZ*-F: *nosZ*1622R^[15]、Cd3af:R3cd^[15]和 F1aCu: R3Cu^[15]) 分别对对水体微生物总 DNA 基因组 3 个目标片段 (*nosZ*、*nirS* 和 *nirK*) 进行定量分析。将 3 个目标片段通过分子克隆方法分别插入质粒, 然后提取重组质粒 DNA, 测定其浓度, 计算出拷贝数, 再将质粒 DNA 溶液按 10 倍系列进行梯度稀释, 作为 qPCR 的标准模板, 3 个目标基因标准曲线的稀释范围均为 $1.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^7$ copies/mL。定量 PCR 反应使用 SYBR Green 作为荧光染料, 在 ABI 7500 (ABI, USA) 定量 PCR 仪上进行定量扩增反应。反应体系为: 20 μ L: 2 \times SYBR real time PCR premix (Takara 试剂盒提供, 大连) 10 μ L, 样品 DNA 模板或标准质粒 1 μ L, 上下游引物各 0.4 μ L, ROX (Takara 试剂盒提供) 0.4 μ L, 其余用无菌 Mili-Q 水 (自备) 补足 20 μ L。*nosZ* 基因片段扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 热启动 2 min; 35 个循环为 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 在 72 $^{\circ}$ C 延伸时收集荧光; *nirK* 和 *nirS* 基因片段扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 热启动 2 min; 35 个循环为 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 在 72 $^{\circ}$ C 延伸时收集荧光。所有样品重复 3 次。每次反应结束均用熔解

曲线来判断扩增子的特异性。

1.3.3 数据处理

采用 SPSS 18 软件对不同时间点、不同水层功能基因丰度进行 One-way ANOVA 显著性差异分析和 Student-Newman-Keuls 检验, 应用 SPSS 软件对数据进行 Pearson 相关性分析, 图形采用 Sigma Plot 12.5 制作。

2 结果与分析

2.1 富营养化水体主要环境因子分析

不同时间点及不同水层营养盐等水质参数 (NO_3^- -N、 NH_4^+ -N、 PO_4^{3-} -P、DO、pH 值、水温和光照度) 如表 2 所示。夏季污水灌溉水塘水温随着水深增加呈略微下降趋势, 且水体昼夜温差较小。而 10~170 cm 3 层水体中光照强度随时间而变化, 12:00 时光照强度最大, 表层、中层和底层的光照强度分别约为 34000、58.5 和 67.9 lx; 0:00 和 4:00 各水层之间光照度均为 0; 08:00 以后各水层光照强度逐渐增强。DO 浓度和 pH 值表现出明显的垂直差异和昼夜变化特征: 在 12:00 时 DO 浓度最高, 此后逐渐降低, 凌晨 04:00—08:00 之间 DO 浓度最低, 且 DO 浓度一直是表层最高, 中层其次, 底层最低。

表 2 富氧灌溉池塘水体中采样点主要理化参数

Table 2 Main physical and chemical parameters at sampling points in oxygen-enriched irrigation pond

采样日期 Sampling date	采样时间 Sampling time	水层 Water layer/cm	溶解氧 Dissolved oxygen/(mg·L ⁻¹)	pH 值 pH value	水温 Water temperature/ $^{\circ}$ C	光照度 Illuminance/lx	NO_3^- -N/ (mg·L ⁻¹)	NH_4^+ -N/ (mg·L ⁻¹)	PO_4^{3-} -P/ (mg·L ⁻¹)
08-15	12:00	10~30	8.83	8.94	32.44	34000	1.33	1.23	1.42
		90~110	4.38	8.48	31.60	585	1.11	1.55	1.68
		150~170	4.80	8.17	31.33	67.5	1.04	1.92	1.78
08-16	00:00	10~30	4.50	8.67	31.76	0	1.13	1.41	1.51
		90~110	2.99	8.36	31.68	0	1.12	1.54	1.58
		150~170	0.46	7.60	31.33	0	0.97	2.53	1.95
08-16	04:00	10~30	2.10	8.16	31.40	0	1.06	1.77	1.87
		90~110	2.05	8.14	31.40	0	1.07	1.80	1.94
		150~170	1.95	8.11	31.36	0	1.06	1.78	1.82
08-16	08:00	10~30	2.13	8.07	31.30	12200	1.33	1.95	3.02
		90~110	1.29	7.95	31.22	419	1.03	2.20	2.74
		150~170	0.99	7.82	31.19	52.5	1.03	2.47	2.74
08-16	12:00	10~30	7.28	8.76	31.00	20000	1.17	1.22	1.61
		90~110	1.45	8.02	31.30	415	1.05	2.10	2.16
		150~170	0.24	7.79	31.04	49.7	0.98	2.16	2.25

水体 NO_3^- -N 浓度在不同时间点相对稳定: 10~30、90~110 和 150~170 cm 水层 NO_3^- -N 浓度分别在 1.06~1.33、1.03~1.11 和 0.97~1.06 mg/L 范围内变动; 不同水层间则表现出明显的垂向变化特征, 表层浓度最高, 中层其次, 底层最低; 水体中 NH_4^+ -N、 PO_4^{3-} -P 浓度随时间变化与 NO_3^- -N 浓度变化趋势一致, 但垂向变化特征则刚好与后者相反, 底层浓度最高, 中层其次, 表层最低。

2.2 夏季富营养化水体反硝化细菌丰度昼夜变化规律

夏季富营养化水体表层的反硝化细菌 *nirK*、*nirS*、*nosZ* 功能基因丰度随时间及垂向分层变化特征 (图 2)

可知, *nirK* 基因丰度不同水层在 24 h 内的变化特征并不完全一致, 丰度在 $3.23 \times 10^4 \sim 1.50 \times 10^5$ copies/mL 范围内波动, 在 8 月 16 日 04:00 和 08:00 时丰度较低, 且 3 层水体间丰度较为接近, 在 8 月 16 日 00:00 和 12:00 表层水体中的 *nirK* 基因丰度则显著高于中层和底层水体中的丰度 (图 2a); *nirS* 基因丰度与 *nirK* 基因丰度变化趋势相似, 丰度在 $1.93 \times 10^6 \sim 3.81 \times 10^7$ copies/mL 之间变化, 且在 8 月 16 日的 04:00 和 08:00 时丰度相对较低且 3 层水体间丰度较为接近, 同时除 8 月 15 日表层 *nirS* 基因丰度低于中层水体之外, 其余采样时间点水体中的 *nirS* 基

因丰度均表现为相似的垂直变化特征即表层最高，中间层其次，底层最低（图 2b）。*nosZ* 基因丰度同样表现出明显的时空变化特征：除 8 月 16 日 04:00 及 08:00 时 3 层水体间丰度数值较为接近且均低于其余时间点丰度外，其余采样时间点均表现出表层水体远远高于中间层及底层水体的 *nosZ* 基因丰度（见图 2c）。最高丰度值为 8 月 16 日 12:00 时 *nirS* 丰度 3.03×10^7 copies/mL，而最低丰度则出现在 8 月 16 日 04:00 时为 *nosZ* 基因丰度 1.54×10^3 copies/mL。

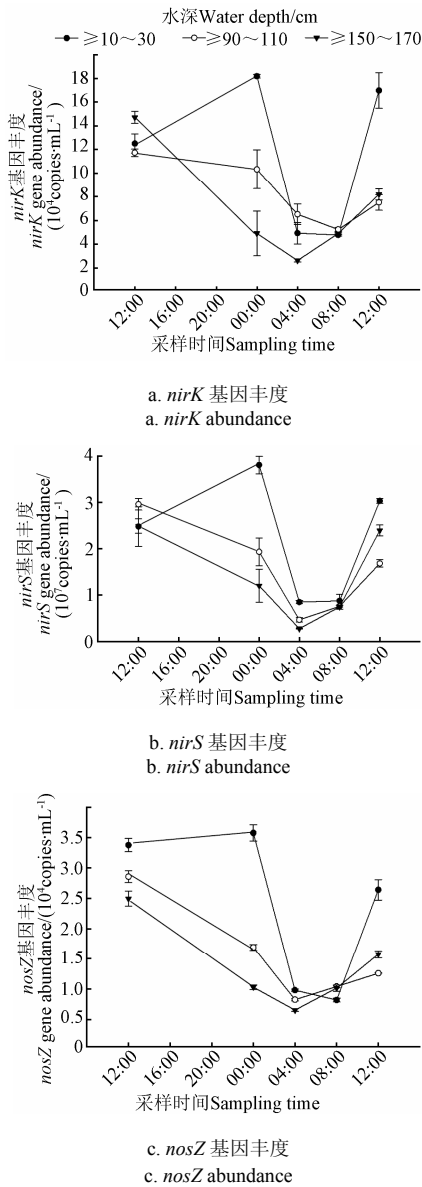


图 2 8 月 15 日-8 月 16 日富氧灌溉池塘水体中 *nirK*, *nirS* 和 *nosZ* 基因丰度的昼夜变化
Fig.2 Diel vertical variability of *nirK*, *nirS*, and *nosZ* abundances in oxygen-enriched irrigation pond during 15th-16th August

2.3 反硝化细菌的昼夜变化特征与环境因子相关性
水体反硝化功能基因丰度与水体环境因子相关性如表 3 所示。*nirK*、*nosZ* 基因丰度与水体理化指标 DO 浓度和 pH 值呈现极显著正相关 ($P<0.01$)，而与 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度及 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 浓度呈极显著负相关 ($P<0.01$)；*nirS* 基

因丰度与 DO 浓度、pH 值显著正相关 ($P<0.05$) 而与 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度及 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 浓度呈显著负相关 ($P<0.05$)；3 类反硝化功能基因和光照度表现出极相关，其中 *nosZ* 基因丰度受光照度影响较为显著。而 *nirK*、*nosZ*、*nirS* 丰度与水体的 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度的相关性不显著 ($P>0.05$)。

表 3 *nirK*、*nirS* 和 *nosZ* 基因丰度和水质参数的 Pearson 相关性
Table 3 Pearson correlation coefficient of *nirK*, *nirS* and *nosZ* genes abundances in eutrophic water with water quality parameters

水质参数 Water parameters	<i>nirK</i> 丰度 <i>nirK</i> abundance	<i>nirS</i> 丰度 <i>nirS</i> abundance	<i>nosZ</i> 丰度 <i>nosZ</i> abundance
DO	0.755**	0.623*	0.813**
pH 值	0.744**	0.634*	0.799**
水温 Water temperature	0.623*	0.528*	0.730**
$\text{NO}_3^-\text{-N}$	0.292	0.227	0.398
$\text{NH}_4^+\text{-N}$	-0.679**	-0.573*	-0.692**
$\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$	-0.626*	-0.577*	-0.650**
光照度 Illuminance	0.339**	0.272**	0.457**

注：**为极显著相关 ($P<0.01$)；*为显著性相关 ($P<0.05$)
Note: ** is highly significant correlation ($P<0.01$); * is significant correlation ($P<0.05$).

3 讨 论

本文的研究结果验证了笔者提出的科学假设，即反硝化细菌在高溶解氧生活污水塘中存在垂向空间异质分布的特征。除个别情况外，反硝化细菌在不同深度水体中的总体趋势为表层的反硝化细菌丰度高于中层及底层水体。一般情况下，生活污水蓄水塘都修建在相对较为封闭的区域，风力对水体的扰动小，水动力学条件稳定。在夏季气温较高的时候，表层水体升温较快，但风力对蓄水塘水体垂向空间的扰动力不足。这样就导致表层水体不能与底层水体充分混合，出现表层水体温度高、底层水体温度低的现象，容易形成稳定的热力学分层；另外，富营养化生活污水中通常伴有藻类的大量繁殖，同时也存在大量的悬浮颗粒，非常浑浊。藻类和悬浮颗粒进一步阻碍了温度从水体表层向底层的扩散，加速了热力学分层现象的形成。稳定的热力学分层现象形成后，阻碍了营养盐在上、下水层之前的交换，本研究中发现 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 、 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 浓度均存在明显的垂向空间异质分布现象，这些都是与反硝化细菌分布、繁殖、代谢息息相关的主要因子^[16]。光照及热力在水层之间分布不均匀也导致藻类光合作用产生 O_2 过程在水层之间的差异，最终引起了本研究中生活污水不同深度水体 DO、pH 值具有明显差异^[17]。这些环境因子的垂向分布差异造成了反硝化细菌在不同深度水层的垂向空间异质特征。

同时，各水层反硝化细菌丰度还具有昼夜动态变化的时间效应。白天水体中反硝化细菌功能基因的丰度比夜间高。这可能是由于藻类具有昼夜垂直迁移的能力，白天垂直向上迁移获得充足的光照来满足光合作用的需求，夜间垂直向下迁移吸收营养物质^[18]。藻类聚集的地方也往往伴随着细菌的富集。由于藻类的光合作用使得水体含有更高的 DOC 和 DO 浓度，从而间接促进细菌的生长繁殖^[19]。另外，浮游动物数量也具有明显的昼夜变化

现象,浮游动物的数量和生物量均在午夜达到最高峰^[20]。白天池塘中藻类大多分布在表层水体而浮游动物分布在底层水体^[21],减少了对表层水体中细菌的滤食作用。这也是引起表层水体反硝化细菌丰度较高的一个可能原因。入夜后,藻类下沉,DO 和 DOC 浓度也随着光合作用的降低而降低,影响了细菌的繁殖生长;同时伴随着浮游动物上浮,加剧了对细菌的滤食作用,最终导致夜间反硝化细菌丰度降低。因此,本研究中所监测的三类反硝化细菌的功能基因丰度均表现出明显的昼夜变化特征。

本研究还发现不同时间点及不同水层中 *nirS* 基因丰度均高于 *nirK* 基因丰度,尽管两者时空变化特征极为相似,说明 *nirS* 型反硝化细菌更能适应富氧灌溉池塘水质环境。这与以往的研究结果并不一致,Knapp 等^[16]发现 *nirS* 一般在低氧区,而 *nirK* 型反硝化细菌一般在溶氧浓度较高的水域中,*nir*-型反硝化细菌具有特定的生态位选择。而本研究结果刚好与之相反,这可能和 *nir*-反硝化细菌长期耐受高浓度 DO 后表现出对 DO 浓度的适应性分化有关。因此,尽管 *nirK* 和 *nirS* 编码的亚硝酸盐还原酶具有相同的催化功能,且其对水环境分层特征尤其是 DO 浓度变化的响应趋势一致,但却存在丰度上的极大差异,必然有其更深层次的生态意义,值得进一步研究。

反硝化细菌垂向空间分布的特征与特定环境因子 DO、pH 值有显著的相关性。影响水体细菌丰度的非生物因素主要有水温、DO 浓度、pH 值、有机物的性质和浓度、无机盐和某些痕量元素的浓度等^[22]。反硝化细菌基因 *nirK*, *nirS* 和 *nosZ* 的丰度与 DO 浓度均具有显著相关性,而以往调查研究显示,浮游细菌分布与水体溶解氧含量呈负相关,浮游细菌生长繁殖和代谢过程都需要消耗溶解氧,说明水体中溶解氧含量是造成细菌丰度及生物量变化的重要原因之一。尽管传统理论认为反硝化作用是在严格的厌氧条件下发生的, O_2 被认为是可抑制反硝化还原酶的因素之一^[23],然而,随着好氧反硝化细菌及好氧反硝化酶系的不断被发现,好氧反硝化作用脱氮成为可能。大多数好氧反硝化细菌菌种可耐受 3 mg/L 以下的溶解氧,部分菌种在高氧分压下也具有反硝化活性,少数可耐受 5~6 mg/L 溶解氧浓度^[24-25]。另外,Körne 等^[26]研究表明亚硝酸盐还原酶(*nirK* 和 *nirS*)对氧气都是非常敏感的。Berks 等^[27]从富氧和厌氧条件下生长的反硝化细菌中提纯了 N_2O 还原酶,发现他们具有相似之处,说明一些反硝化细菌的 N_2O 还原酶活性并不受氧抑制,在有氧条件下,反硝化细菌仍然能够把 N_2O 还原成 N_2 。这些研究表明人工筛选和驯化后好氧反硝化细菌具有了耐高溶解氧浓度的能力,因此,在本研究中这种在表层超饱和溶解氧条件下,反硝化细菌丰度反而较高的现象极有可能是由于在污染水体持续富氧条件下,反硝化细菌已经适应高浓度的溶解氧,并随着溶解氧浓度的变化而表现出一定的特征性。然而,虽然在自然富氧水体中可能存在好氧反硝化细菌的丰度较高的情况,但其反硝化能力及反硝化酶的活性还需要进一步研究。

反硝化细菌基因 *nirK*, *nirS* 和 *nosZ* 的丰度与 pH 值也具有显著相关性。基因 *nosZ* 与 *nirK* 的丰度与 pH 值的相关显著性高于 *nirS* 基因丰度,说明 pH 值对 *nosZ* 和 *nirK* 型反硝化细菌的生长繁殖具有更为显著的影响,而对 *nirS* 型反硝化细菌生长繁殖的影响要比其他两类反硝化细菌小,这与其他研究者的发现有 *nosZ* 受 pH 值影响不大^[28]或这 3 类反硝化功能基因和 pH 值并无相关的结果有所不同^[29],这可能由于在不同的环境条件下的反硝化细菌对 pH 值的响应不一样,而这个响应机制也是受其他环境因子的调节和制约,因此,综合考虑 DO、pH 值及其他环境因子对反硝化细菌丰度的影响,进一步优化对富氧条件下灌溉水存储过程中的管理,促进其自净能力的同时,减少后续应用于灌溉过程中的负面效应。

尽管本研究经过了大量系统调查和一系列预试验确定了一个最具有代表性的采样点,但也因为环境条件及人力物力的限制,一个采样点变化特征对反硝化细菌丰度变化规律的研究和解释仍然是有限的。在后续研究中,会进一步优化监测位点,完善富氧污水池塘中反硝化细菌的变化规律,为指导农田灌溉提供更完整的功能微生物背景资料。

4 结 论

1) 富氧池塘水质热力学分层效应导致 *nirK*、*nirS* 和 *nosZ* 3 类反硝化基因丰度具有明显的垂向变化:除个别情况外,表层水体中的基因丰度高,其次为中层水体,底层水体中的丰度最低;且各水层反硝化细菌昼夜变化特征表现为白天丰度高,晚间丰度低:最高丰度值为 8 月 16 日 12:00 时 *nirS* 丰度 3.03×10^7 copies/mL,而最低丰度则出现在 8 月 16 日 04:00 时为 *nosZ* 基因丰度 1.54×10^3 copies/mL。

2) 富氧池塘水体中 *nirS* 基因丰度在 $1.93 \times 10^6 \sim 3.81 \times 10^7$ copies/mL 之间变化,而具有相同功能的 *nirK* 基因丰度则在 $3.23 \times 10^4 \sim 1.50 \times 10^5$ copies/mL 范围内波动,即 *nirS* 型反硝化细菌丰度均显著高于 *nirK* 型反硝化细菌丰度,但两者昼夜及垂向分层变化特征极为相似,说明具有同一催化功能而编码基因不同的 2 类 *nir*-型反硝化细菌对环境变化的响应规律较为一致,但 *nirS* 型反硝化细菌在富氧水体中较前者而言是为优势菌群。

3) 3 类反硝化基因丰度与环境参数中的 DO 浓度及 pH 值呈显著正相关($P < 0.01$)。由此说明在自然条件下也可能具有大量好氧反硝化细菌,由于长期暴露在富氧条件下,反硝化细菌丰度受 DO 浓度影响显著为原位状态下好氧反硝化脱氮的可能性提供了更有利的佐证。

[参 考 文 献]

- [1] 夏立江,王宏. 土壤污染及其防治[M]. 上海:华东理工大学出版社,2001.
- [2] Horswell J, Speir T, Van Schaik A. Bio-indicators to assess impacts of heavy metals in land-applied sewage sludge[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2003, 35(11): 1501—1505.

- [3] Mahesh J, Amerasinghe P, Pavelic P. An integrated approach to assess the dynamics of a pen-urban watershed influenced by wastewater irrigation[J]. *Journal of Hydrology*, 2015, 523(4): 427—440.
- [4] Lubello C, Gori R, Nicese F P, et al. Municipal-treated wastewater reuse for plant nurseries irrigation[J]. *Water Research*, 2004, 38(12): 2939—2947.
- [5] Yadav R, Goyal B, Sharma R, et al. Post-irrigation impact of domestic sewage effluent on composition of soils, crops and ground water—a case study[J]. *Environment International*, 2002, 28(6): 481—486.
- [6] 邵孝侯, 廖林仙, 李洪良. 生活污水灌溉小白菜的盆栽试验研究[J]. *农业工程学报*, 2008, 24(1): 89—93.
Shao Xiaohou, Liao Linxian, Li Hongliang, Pot experiment of treated domestic wastewater reuse for irrigation of Chinese cabbage[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE)*, 2008, 24(1): 89—93 (in Chinese with English abstract).
- [7] Zema D A, Bombino G, Andiloro S, et al. Irrigation of energy crops with urban wastewater: Effects on biomass yields, soils and heating values[J]. *Agricultural Water Management*, 2012, 115(12): 55—65.
- [8] 朱练峰, 刘学, 禹盛苗, 等. 增氧灌溉对水稻生理特性和后期衰老的影响[J]. *中国水稻科学*, 2010, 24(3): 257—263.
Zhu Lianfeng, Liu Xue, Yu Shengmiao, et al. Effects of aerated irrigation on physiological characteristics and senescence at late growth stage of rice[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2010, 24(3): 257—263 (in Chinese with English abstract).
- [9] 张旺锋, 王振林, 余松烈, 等. 膜下滴灌对新疆高产棉花群体光合作用冠层结构和产量形成的影响[J]. *中国农业科学*, 2002, 35(6): 632—637.
Zhang Wangfeng, Wang Zhenlin, Yu Songlie, et al. Effect of under-mulch-drip irrigation on canopy apparent photosynthesis, canopy structure and yield formation in high-yield cotton of Xinjiang[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2002, 35(6): 632—637. (in Chinese with English abstract).
- [10] Zhang Qingling, Liu Ying, Ai Guomin, et al. The characteristics of a novel heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium, *Bacillus methylotrophicus* strain L7[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 108(6): 35—44.
- [11] Guo Liyun, Fang Fei, Hu Zhixin, et al. Application potential of a newly isolated indigenous aerobic denitrifier for nitrate and ammonium removal of eutrophic lake water[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 142(16): 45—51.
- [12] 李佳霖, 白洁, 高会旺, 等. 长江口海域夏季沉积物反硝化细菌数量及反硝化作用[J]. *中国环境科学*, 2009, 29(7): 756—761.
Li Jialin, Bai Jie, Gao Huiwang et al. Quantification of denitrifying bacteria and denitrification process in surface sediment at adjacent sea area of the Yangtze River Estuary in summer[J]. *China Environmental Science*, 2009, 29(7): 756—761. (in Chinese with English abstract)
- [13] Jacquelynne R King BJS, Ann P Zimmerman. Signals of climate trends and extreme events in the thermal stratification pattern of multibasin Lake Opeongo, Ontario[J]. *Canadian Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, 1999, 56(5): 847—852.
- [14] Wilhelm S, Adrian R. Impact of summer warming on the thermal characteristics of a polymictic lake and consequences for oxygen, nutrients and phytoplankton[J]. *Freshwater Biology*, 2008, 53(2): 226—237.
- [15] Yi Neng, Gao Yan, Long Xiaohua, et al. *Eichhornia crassipes* cleans wetlands by enhancing the nitrogen removal and modulating denitrifying bacteria community[J]. *Clean—Soil, Air, Water*, 2014, 42(5): 664—673.
- [16] Knapp C W, Dodds W K, Wilson K C, et al., Spatial heterogeneity of denitrification genes in a highly homogenous urban stream[J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(12): 4273—4279.
- [17] Song Keunyea, Xenopoulos Marguerie A, Buttle James M, et al. Thermal stratification patterns in urban ponds and their relationships with vertical nutrient gradients[J]. *Journal of environmental management*, 2013, 127(14): 317—323.
- [18] John D M, Whitton B A, Brook A J. *The Freshwater Algal Flora of the British Isles: An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae*[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2002: 172—230.
- [19] Barbosa A B, Galvão H M, Mendes P, et al. Short-term variability of heterotrophic bacterioplankton during upwelling off the NW Iberian margin[J]. *Progress in Oceanography*, 2001, 51(2): 339—359.
- [20] Christaki U, Gaudy R, Kerambrun P. A study of the effects of migratory zooplankton on microbial populations in surface waters of the NW Mediterranean[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1998, 225(2): 173—183.
- [21] 何志辉. 淡水生物学[M]. 北京: 农业出版社, 1987: 17.
- [22] 白洁, 张昊飞, 李岍然, 等. 海洋异养浮游细菌生物量及生产力的制约因素[J]. *中国海洋大学学报: 自然科学版*, 2004, 34(4): 594—602.
Bai Jie, Zhang Haofei, Li Kuiran et al. Limiting factors of biomass and production of marine heterotrophic bacterioplankton[J]. *Periodical of Ocean University of China: Science*, 2004, 34(4): 594—602. (in Chinese with English abstract)
- [23] Ferguson S J. Denitrification and its control[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1994, 66(1/3): 89—110.
- [24] Su Jung eng, Liu B Y, Lin J, et al. Isolation of an aerobic denitrifying bacterial strain NS-2 from the activated sludge of piggery wastewater treatment systems in Taiwan possessing denitrification under 92% oxygen atmosphere[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2001, 91(5): 853—860.
- [25] Kim M, Jeong S Y, Yoon S J, et al. Aerobic denitrification of *Pseudomonas putida* AD-21 at different C/N ratios[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2008, 106(5): 498—502.
- [26] Körner H, Zumft W G. Expression of denitrification enzymes in response to the dissolved oxygen level and respiratory substrate in continuous culture of *Pseudomonas stutzeri*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55(7): 1670—1676.
- [27] Berks B C, Baratta D, Richardson D J, et al. Purification and characterization of a nitrous oxide reductase from *Thiosphaera pantotropha*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1993, 212 (2): 467—476.

- [28] Philippot L, Hallin S. Finding the missing link between diversity and activity using denitrifying bacteria as a model functional community[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2005, 8(3): 234—239.
- [29] Smith C J, Nedwell DB, Dong L F, et al. Diversity and abundance of nitrate reductase genes (*narG* and *napA*), nitrite reductase genes (*nirS* and *nrfA*), and their transcripts in estuarine sediments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(11): 3612—3622.

Diel vertical variability analysis of denitrifying bacteria abundance in oxygen-enriched irrigation pond

Yi Neng, Di Panpan, Wang Yan, Zhang Zhenhua, Liu Xinhong, Zhang Li, Yan Shaohua, Gao Yan^{*}

(Institute of Agricultural Resources and Environment, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: In China, there are an increasing number of ponds receiving sewage effluents with high concentrations of nitrogen (N) and dissolved oxygen (DO) for agricultural purposes. Therefore, it is worthwhile to understand the essential N transformation processes as well as the characteristics of N-cycling bacteria driving these processes under the condition of high DO concentrations. In order to evaluate the diel vertical variation of denitrifying bacteria in the water column of the ponds during the process of accumulation and storage of sewage, an experiment was carried out to monitor the changes of denitrifying genes abundance and chemical and physical characteristics at the different depths of sewage water reserved in a pond at Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing, China. The water samples were collected from a sampling site where had the most stable hydrodynamic condition and least disturbance due to the discharge of sewage water during irrigation season. Water samples were collected from the different water depths of 10-30, 90-110 and 150-170 cm, periodically (5 consecutive time points, 12:00 pm, 0:00 am, 4:00 am, 08:00 am and 12:00 pm at the next day), within 24 hours during 15th -16th August 2013. The collected samples were then analyzed with the abundances of denitrifying genes (*nirK*, *nirK*, and *nosZ*) using real-time polymerase chain reaction (PCR), and water parameters including pH, water temperature, illuminance and the concentrations of DO, NO_3^- -N, NH_4^+ -N and PO_4^{3-} -P. The correlations between the changes of *nirK*, *nirK*, and *nosZ* genes abundance and water parameters were statistically analyzed. The results showed that the strong and persistent stratification formed along vertical profile of sewage water with regards to all above monitored physical and chemical parameters. The relatively higher pH, water temperature, illuminance, and the concentrations of DO and NO_3^- -N were observed in the surface water layers (10-30 cm), decreasing with the increase of water depths. On the contrast, the higher concentrations of NH_4^+ -N and PO_4^{3-} -P were observed in the bottom water, which means that they were increased with the increase of water depths. Due to high photosynthetic activity of microscopic algae in the pond, the concentrations of DO concentration increased during the daylight and decreased during night. Diurnal variation of pH was positively ($P<0.001$) correlated with DO concentration in the vertical profile of the water column in the pond, with pH in the ponds also followed the diurnal cycle of sunlight intensity. The abundances of *nirK*, *nirK*, and *nosZ* genes were strongly affected by the diurnal distribution patterns of pH and DO concentrations along vertical profile of water, with significant higher abundance during the daytime while lower abundance during the night at all the different water depths. Heterogeneous distribution of denitrifying bacteria abundances along the vertical profile of sewage water column were also demonstrated, with the least abundances in the bottom water (150-170 cm) and the highest in the surface water column (10-30 cm). Although the *nirK* and *nirS* are functionally equivalent, denitrifying bacteria harboring either nitrite reductase seem to be likely not under the same community assembly rules. The abundance of *nirS* gene was always greater than that of *nirK* gene in all water samples, suggesting that the sewage water in this study was more suitable for the growth of *nirS*-type denitrifying bacteria. This speculation was consistent with previously identified habitat preferences of *nirS*- and *nirK*-gene bearing organisms. The abundances of *nirK*, *nirS*, and *nosZ* genes were significantly correlated with DO concentration and pH ($P<0.01$). These results demonstrated that the diel vertical variability of the water physical and chemical parameters, especially DO concentrations, in the oxygen-enriched sewage water could affect the diel vertical distribution patterns of *nirK*, *nirS*, and *nosZ* genes abundances. This may suggest that a large number of aerobic denitrifying bacteria could have extensively developed in sewage water under the condition of high DO concentrations during the process of conservation in the pond. These aerobic denitrifying bacteria can have an important impact on the nitrogen transformation processes in the vertical profile of sewage water column.

Key words: eutrophication; irrigation; water quality; denitrifying bacteria; day and night change; oxygen enrichment