

水-土体系中的反硝化作用 ——含氮化合物沿土壤剖面的 分布及 N_2O 的测定*

王永华 金羽**

(北京大学地理学系)

摘 要

本文建立了GC/ECD测定氧化亚氮的方法,调查了干旱、半干旱地区化肥厂排放废水中含氮化合物沿粘土土壤剖面的分布规律,重点研究了在封闭体系内,氧化亚氮和亚硝酸盐氮的变化规律及诸因素对反硝化作用的影响。实验结果说明,氧化亚氮随时间的变化呈二次曲线关系,亚硝酸盐氮的生物降解符合一级反应动力学方程,在20℃下,半衰期为34小时。再次证明反硝化主要是生物作用,并在厌氧条件下进行。

反硝化作用是氮循环中的一个基本反应。目前,研究反硝化作用的目的在于寻求可行途径,既避免氮肥损失,促进农业生产,又防止过量氮化合物对大气、土壤和水环境的污染。本文在作者前文研究工作的基础上^[1],重点调查了某化肥厂以漫灌方式排放生产废水后,各种无机氮化合物沿粘土土壤剖面的分布规律;研究并建立了GC/ECD和GC/TCD测定反硝化气体的方法;通过实验室模拟及反硝化气体的分析,着重探讨了反硝化作用的规律及其影响因素。

材 料 与 方 法

1.样品:黄土,采自黄土高原,多年自然风干;水稻土,采自北京清华园水稻土,自然风干,过20目筛,有机质含量为2.77%,pH为7.5。

2.培养装置:用100ml过滤瓶,瓶口及支管分别用橡皮塞及硅橡胶管密封。

将水稻土或黄土加入培养瓶中,再定量加入硝酸盐或亚硝酸盐标准水溶液,以4L/min流量通Ar气10min,立即密封培养瓶,置20℃恒温培养箱中培养。定时用注射器抽取100μl气体注入GC,测定 N_2O 、 N_2 、 CO_2 和 O_2 等。定时用注射器抽取1ml水样,稀释后测定 $NO_2^- - N$ 。

* 国家自然科学基金资助项目

**本系1988届毕业生

3. 仪器: GC-9A气相色谱仪、C-R2A色谱数据处理机、ECD和TCD检测器均为日本岛津公司制。N₂O测定条件: 检测器ECD, INJ300°C, COL45°C, 高纯N₂载气, 流量30 ml/min, 电流0.5nA; 色谱柱为porapack Q(50—80目), 长1.6m×3.2mm(i.d)的玻璃柱。N₂, O₂和CO₂的测定均用TCD检测器, INJ30°C, COL30°C, 桥电流130mA, 氢载气流量30ml/min; 柱1为porapack Q(50—80目)柱, 柱2为5 Å分子筛柱, 长1.6m×3.2mm, 均为玻璃柱。

结果与讨论

1. 反硝化气体的测定

本研究要求对所产生的气体如N₂O, NO₂, N₂和O₂能完全分离测定; 要求线性范围宽, 在广泛的浓度范围内能准确定量; 灵敏度要高; 取样量对反应体系的浓度影响可以忽略, 能排除水峰干扰。应用多孔聚合物为柱填料分离反硝化气体, 虽比微压计法有显著改善, 但N₂和O₂不能分离。无机吸附剂如5 Å分子筛等虽能分离N₂和O₂, 但对N₂O及CO₂有不可逆吸附, 使两者不出峰。对气体分析多数采用串连双柱TCD检测器, 其缺点是灵敏度低, 尤其不适应N₂O的分析^[2]。我们注意到Simmonds应用ECD测定N₂O的方法^[3], 并进行了部分条件实验。

N₂O在ECD上的响应属离子型电子捕获, 其特征是响应讯号随温度的升高而增加。不同温度下, N₂O的峰面积响应值随温度的变化见图1。由于GC-9A仪器限定ECD的最高使用温度为350°C, 为安全起见, 我们选定300°C。在300°C下, 进样量与峰高成线性关系, 其校正曲线见图2, 相关系数为0.9991。除N₂O外, 其余气体均用5 Å分子筛柱和TCD测定。

气体在Porapack Q柱上出峰顺序为: 空气, CO₂, N₂O和H₂O, 在5 Å分子筛柱上的顺序为O₂, N₂。定量方法采用标样单点校正法。气体标准样品的配制采用静态法, 标样浓度为0.05%(V/V), 每次测定均用标样校正。模拟反硝化是在恒温恒容体系中进行。气体产物引起体系压力增加对化学平衡尤其是生物反应平衡的影响可以忽略。由于压力较小, 采用注射器进样所引起的定量误差也可忽略^[2]。

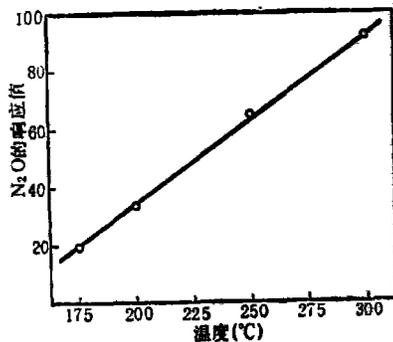


图1 N₂O的响应值随ECD温度的变化
Fig.1 Detector response to N₂O versus ECD temperature

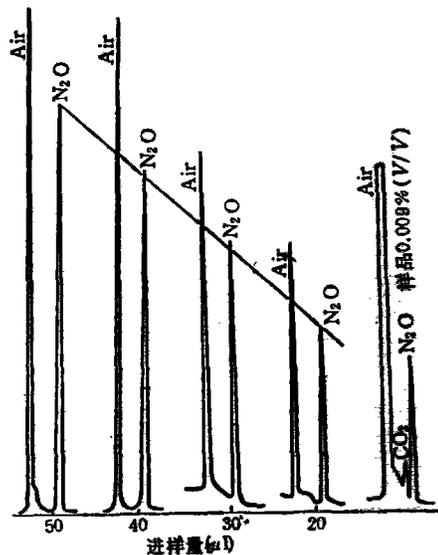


图2 N₂O校正曲线
Fig.2 Calibration curve for N₂O

2. 含氮化合物沿土壤剖面的分布规律

某化肥厂位于我国西北干旱地区，该地区土壤为粘土。废水排放有15年历史，排放方式为湿干交替漫灌式。此处我们取一典型土壤剖面，剖面深度为1m，每隔10cm为一层，土壤经自然风干过筛后，分别测定NO₃-N、NO₂-N和NH₄-N，结果列于表1和图3—5中。从表1和图3看出，NO₃-N随土壤深度变化急剧减少，在1m深度内减少了100倍。其浓度对数随土壤深度(m)变化呈线性规律，相关方程为 $\lg C_{NO_3-N} = 2.415 \times 10^{-2} M + 1.842$ ，相关系数-0.9942。由此只

表1 土壤剖面无机氮化合物含量分布
Table 1 Vertical distribution of inorganic nitrogen compound in soil profile

深度 (cm)	NO ₃ -N (mg/100g土)	NO ₂ -N (mg/100g土)	NH ₄ -N (mg/100g土)
0—10	45.23	超出范围	0.497
10—20	20.43	超出范围	0.464
20—30	11.37	0.300	0.393
30—40	8.38	0.111	0.381
40—50	4.52	0.068	0.321
50—60	2.42	0.057	0.299
60—70	0.97	0.049	0.287
70—80	0.78	0.056	0.271
80—90	0.67	0.058	0.260
90—100	0.44	0.064	0.249

* NO₃-N用酚二磺酸比色法；NO₂-N用α-萘胺比色法；NH₄-N用纳氏试剂比色法。

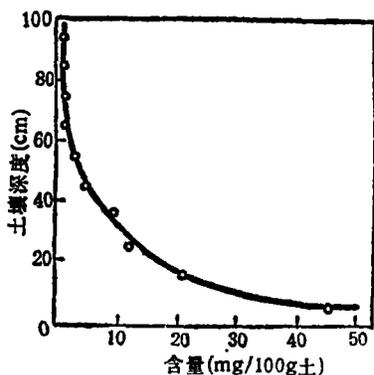


图3 NO₃-N沿土壤剖面分布
Fig.3 Vertical distribution of NO₃-N in the soil profile

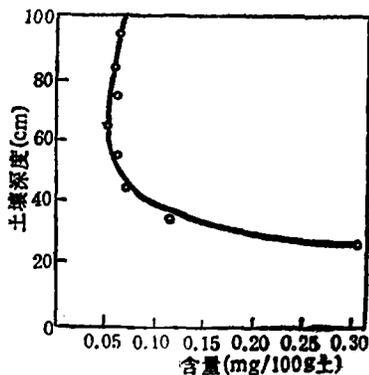


图4 NO₂-N沿土壤剖面分布
Fig.4 Vertical distribution of NO₂-N in the soil profile

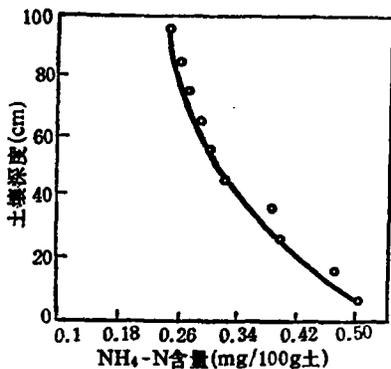


图5 NH₄-N沿土壤剖面分布
Fig.5 Vertical distribution of NH₄-N in the soil profile

要土壤性质一致，可预测任一深度的NO₃-N含量。生产废水中主要成分是NH₄-N，而土壤表层则主要是NO₃-N，这是由于西北干旱、半干旱环境，好氧条件较好，NH₄-N矿化所致。NO₂-N表层含量较高，以后逐渐降低，从70—80cm深度开始，又逐渐增加。呈现这种规律是由于表层NH₄-N矿化产生NO₂-N，而其含量在底层增加，则是由于深层厌氧条件，由NO₃-N反硝化所产生。相比之下，NH₄-N沿土壤剖面的变化幅度较小，1m深度只减少了1倍，这可解释为表层NH₄-N大部分矿化

后, 剩余部分沿土壤下渗, 由于 $\text{NH}_4\text{-N}$ 是最低还原态, 因此, 在深层厌氧环境中也不会再变化。由此可预测, 进入深层土壤的 $\text{NH}_4\text{-N}$, 除土壤代换吸附外, 不会有其它生物化学变化。

3. 实验模拟反硝化作用的规律性及影响因素

3.1 N_2O 的变化规律

在培养瓶内, 通 Ar 气 10 分钟, 可使 O_2 含量降至 1.66%。在水土比为 2.5:1 条件下, 加入 500ppm $\text{NO}_3\text{-N}$, 在 20°C 培养, N_2O 随时间的变化规律见图 6。从图 6 看出, N_2O 到 288h 才达到最高峰值, 随后逐渐减少。 N_2O 含量 ($C_{\text{N}_2\text{O}}$) 与时间 (t) 成抛物线关系:

$$C_{\text{N}_2\text{O}} = -1.007 \times 10^{-6} (t - 288)^2 + 7.58 \times 10^{-2}$$

若 $C_{\text{N}_2\text{O}}$ 对 $(t - 288)^2$ 作图应得线性关系, 见图 7。相关系数为 0.9089。利用此式可以预测相同条件下任一时间 N_2O 的浓度。

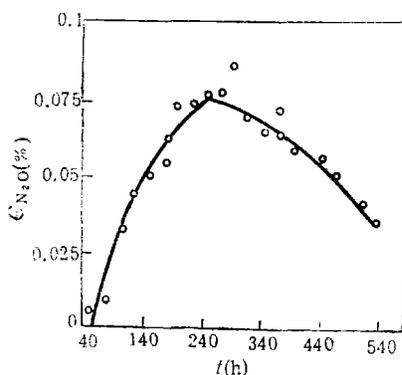


图 6 20°C 厌氧培养下 $C_{\text{N}_2\text{O}}$ 的变化规律

Fig.6 Variation $C_{\text{N}_2\text{O}}$ with anaerobic culture at 20°C

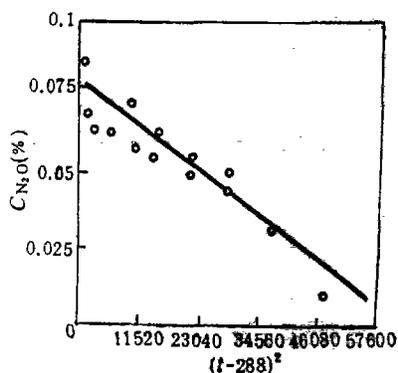


图 7 $C_{\text{N}_2\text{O}}$ 与 $(t-288)^2$ 的线性关系

Fig.7 Relationship between $C_{\text{N}_2\text{O}}$ and $(t-288)^2$

一般说反硝化速度随温度升高而增强, 至 60°C 左右反应最强烈^[4]。在此温度下 24h, N_2O 降至本底值。本文是在 20°C 下培养, 反硝化速度很慢。

3.2 反硝化过程中 N_2 和 O_2 的变化规律

在厌氧还原环境下, $\text{NO}_2\text{-N}$ 及 N_2O 均可经由不同的反应途径被还原成 N_2 。除非在生物固氮菌作用下, 否则 N_2 将不发生变化。并在反硝化过程中总是增加的, 其随时间的变化有很好的线性关系, 见图 8。线性方程为 $C_{\text{N}_2} = 0.06096t$, 相关系数为 0.9894, 具有明显的零级反应动力学规律, 反应速度与反应物浓度无关, 这与文献报道的结果一致。

在 20°C 恒温厌氧培养过程中, CO_2 几乎没有变化, 见图 9。开始培养时, 氧浓度为 1.66%, 气相中氧的分压很小。与 20°C 时饱和和溶解氧浓度比较, O_2 在水土中的浓度很小。 $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$ 及 N_2O 替代 O_2 成为电子受体, 本身被还原。

3.3 N_2O 的还原速率

在培养瓶中, 加入 15ml N_2O , 厌氧培养, N_2O 开始还原较快, 以后减慢, 随时间的变化成对数关系, 见图 10。

若以 $\lg C_{\text{N}_2\text{O}}$ 对 t 作图, 得一直线, 相关方程为: $\lg C_{\text{N}_2\text{O}} = -0.18 \times 10^{-2}t + 1.31$,

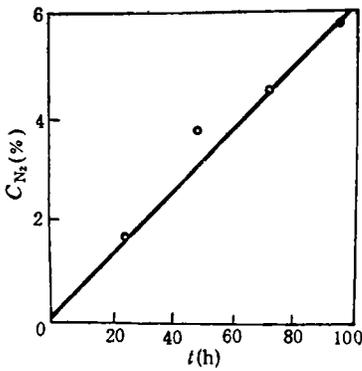


图8 C_{N_2} 随时间(t)的变化关系
Fig.8 Variation of C_{N_2} with time

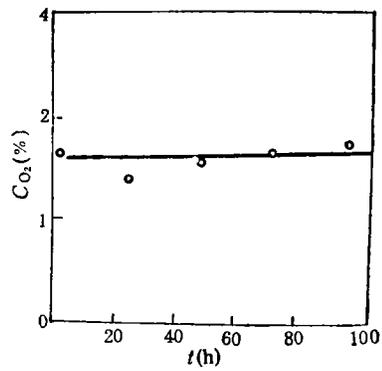


图9 CO_2 变化曲线
Fig.9 Variation of CO_2 with time

$R = -0.982$, 负斜率表示反应物随时间增加而减少。应当说,这并不能完全反映 N_2O 的还原规律,因为在静置状态下培养,很大程度上受控于 N_2O 向水土系统的扩散速度,只有 N_2O 与水土接触,才能被细菌作用还原成 N_2 。严格的作法应该是测试水中 N_2O 含量或在摇动条件下培养。

3.4 有机质及微生物对反硝化作用的影响

采用多年风干黄土加 NO_3-N 恒温厌氧培养,数天内 N_2O 没有生成。原因是黄土有机质含量甚少,且多年风干,微生物死亡,故没有反硝化作用发生。

NO_3-N 在厌氧培养时, N_2O 随时间呈抛物线关系,但在加入 $HgCl_2$ 杀菌后,数天内却未发现 N_2O 生成,这确说明,反硝化作用主要是微生物作用所致^[1]。从化学角度说, NO_3-N 和 NO_2-N 具有一定的氧化性,在灭菌厌氧培养中,它们可以将有机质氧化为 CO_2 ,而本身被还原。图11证实了上述解释。但限于分析测试技术,主要是GC的选择性分离及检测器的灵敏度,本文未发现 NO_3-N 及 NO_2-N 的化学还原产物。与生物作用比较,化学作用是极微弱的。

在厌氧及灭菌厌氧条件下,分别加入 NO_2-N 培养,结果分别见表2和图12—13。厌氧条件下培养, NO_2-N 随时间变化呈对数关系。即以 $lg C_{NO_2-N}$ 对时间(t)作图,呈直线关系,线性方程为: $lg C_{NO_2-N} = -0.0203t + 0.281$,

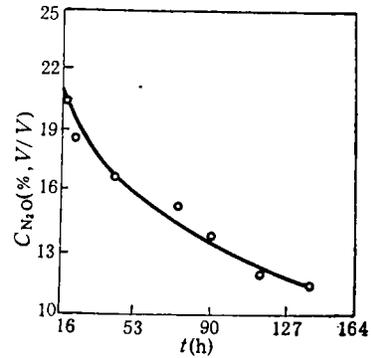


图10 C_{N_2O} 随时间的变化关系
Fig.10 Variation of C_{N_2O} with time

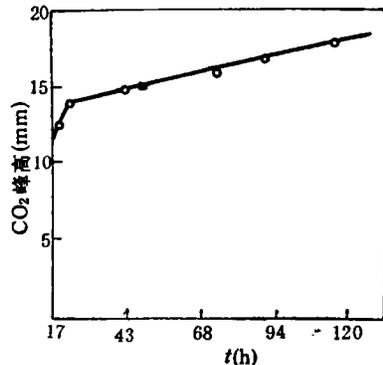


图11 CO_2 峰高随时间的变化
(厌氧灭菌培养)
Fig.11 Variation of CO_2 peak height with time

相关系数为 0.9420。按一级动力学方程计算, $\text{NO}_2\text{-N}$ 在 20°C 的半衰期为 34h, 图 13 中最后两点偏离线性是因为原土壤中的 $\text{NO}_3\text{-N}$ 在厌氧条件下还原为 $\text{NO}_2\text{-N}$ 所致。在加入 HgCl_2 杀菌后, 数小时内未发现 $\text{NO}_2\text{-N}$ 有明显变化, 见表2和图12, 进一步说明反硝化作用是以微生物作用为主的。

表 2 灭菌及未灭菌条件下 $\text{C}_{\text{NO}_2\text{-N}}$ 的变化*
Table 2 Variation of $\text{C}_{\text{NO}_2\text{-N}}$ with and without disinfection

时间 (h)	24	48	54	72	78	90	96	114
$\text{C}_{\text{NO}_2\text{-N}}$	0.978	0.149	0.136	0.038	0.049	0.036	—	—
$\text{C}_{\text{NO}_2\text{-N}}$ (加 HgCl_2)	0.44	0.38	—	0.40	—	0.33	0.42	0.39

* $\text{C}_{\text{NO}_2\text{-N}}$ 用 α -萘胺比色法测定

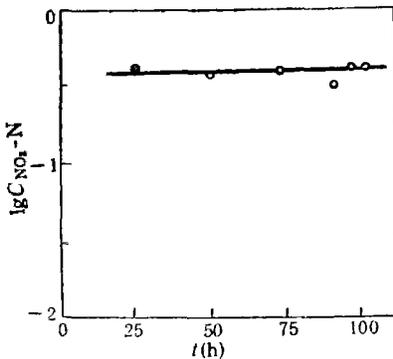


图 12 $\lg \text{C}_{\text{NO}_2\text{-N}}$ 随 t 的线性变化
Fig. 12 Variation of $\lg \text{C}_{\text{NO}_2\text{-N}}$ with time

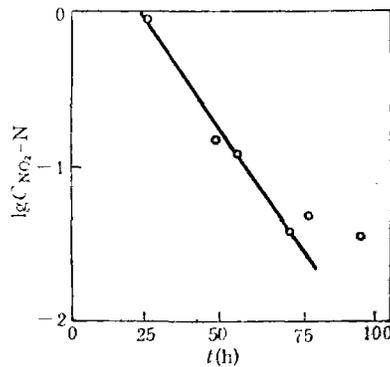
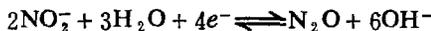


图 13 灭菌时 $\lg \text{C}_{\text{NO}_2\text{-N}}$ 随 t 的变化
Fig. 13 Variation of $\lg \text{C}_{\text{NO}_2\text{-N}}$ with time under disinfection

对于 $\text{NO}_2\text{-N}$ 的反硝化作用, 其反应方程式可写作:



在酸性条件下, 由于 $\text{H}^+ + \text{OH}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}$ 而使平衡向右移动, 有利于反硝化。实验结果说明酸性条件反硝化速度确实大于碱性条件。本文实验方式还不足以说明 pH 对微生物反硝化的影响, 因为 $\text{NO}_2\text{-N}$ 在酸性条件下确实不稳定。

3.5 O_2 含量对反硝化作用的影响

反硝化作用是在厌氧条件下 $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$ 及 N_2O 代替 O_2 成为电子受体而引起的。因此, O_2 含量的多少, 将直接影响反硝化的强弱。反硝化作用的反应方程式为:



O_2 含量既抑制 $\text{NO}_3\text{-N}$ 的转化, 也阻止 N_2O 的转化, 但程度不同。据文献报道, 由 $\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ 所需的氧化还原电位为 250mV, 低于由 $\text{NO}_3\text{-N} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$ 的电位 (320mV), 而 $\text{NO}_2\text{-N} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$ 在 500mV 也可发生。以 O_2 浓度作为参数, N_2O 随时间的变化关系见图 14。其实验方法是在一系列培养瓶中, 各加入 2, 5, 7, 10ml 空气, 定时测定 N_2O 含量。从图 14 中看出氧含量少, N_2O 的浓度高, 而加 5, 7, 10ml 空气的 N_2O 的变化曲线基本重合, N_2O 随

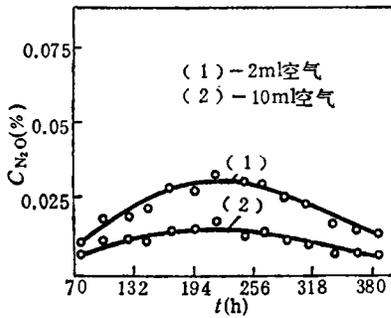


图14 C_{N₂O}随时间的变化
Fig.14 Variation of C_{N₂O} with time

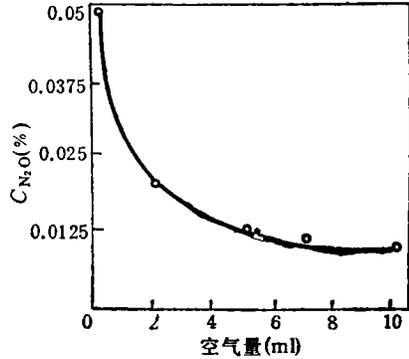


图15 C_{N₂O}与O₂含量之间的关系
Fig.15 Relationship between C_{N₂O} and O₂ amount

氧含量的变化从图15中看的更明显。文献曾报道^[5]，在30cm和60cm土壤深度，CO₂与C_{N₂O}的关系见图16。从图16的统计结果可以看出，O₂含量高的N₂O浓度低。野外实际调查的结果与本文模拟的结论是一致的。

结 论

1. Porapack Q柱GC/ECD方法是测定反硝化气体中N₂O的灵敏方法。在本文特定色谱条件下，进样100μl，检测限为5ppm(V/V)。每天测定一次标样，7次测定的均值为41.1 (mm)，标准偏差为0.718，变异系数1.75%。

2. 在干旱好氧环境中，土壤表层主要含氮成分是NO₃-N，其对数值随土壤深度的变化呈线性规律。相关方程为lgC_{NO₃-N} = -2.415 × 10⁻²M + 1.842，相关系数-0.9942。NH₄-N垂直变化幅度较小，而NO₂-N变化较大，且主要来自NH₄-N的氧化。

3. 在模拟厌氧培养中，N₂O随时间的变化呈抛物线关系；N₂随时间的变化符合零级反应动力学方程；而NO₂-N的变化规律则符合lgC_{NO₂-N} = -2.03 × 10⁻²t + 0.281线性方程，按准一级动力学作处理，其在20℃下的半衰期为34h。环境反硝化作用主要是微生物作用所致，其速度受温度、有机质和氧含量的影响。

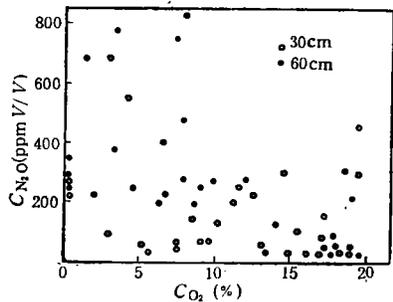


图16 两种深度下粘土土壤中CO₂和C_{N₂O}间的关系
Fig.16 Relationship between C_{O₂} and C_{N₂O} at two depths in a clay soil

参 考 文 献

[1] 王永华, 江德爱, 艾素珍, 1984. 水-土壤体系反硝化作用模拟研究. 环境化学, 3 (3) :19
[2] Zumft Kurtfrunzke, Walter G, 1984. Rapid, Single Sample Analysis of H₂, O₂, N₂,NO,CO, N₂O and CO₂ by Isothermal Gas Chromatography:Applications to the Study of Bacterial Denitrification. J.Chromat., 299:477
[3] Simmonds P G, 1978. Direct Determination of Ambient Carbon Dioxide and Nitrous Oxide with a High-Temperature ⁶³Ni Electron-Capture Detector. J.Chromat. Ogr., 166:593

- [4] Keeney D R et al., 1979. Effect of Temperature on the Gaseous Nitrogen Products of Denitrification in a Silt Loam Soil. *Soil Science Society of America Journal*, 43(5):1124
- [5] Nielsen Donald R, MacDonald J G, 1978. Nitrogen in the Environment. New York, San Francisco London. p370

1988年10月24日收到。

DENITRIFICATION IN THE WATER-SOIL SYSTEM —DISTRIBUTION OF NITROGEN COMPOUNDS ACROSS A CLAY SOIL PROFILE AND DETERMINATION OF NITROUS OXIDE

Wang Yonghua Jin Yu

(Department of Geography, Beijing University)

ABSTRACT

A GC/ECD procedure for nitrous oxide determination was developed and applied to the study of the distribution of inorganic nitrogen compounds from fertilizer wastewater across a clay soil profile in arid and semi-arid areas. The transformation of N_2O and NO_2-N and the factors affecting denitrification were investigated as well. The results showed that a second order curve could fit the relation between N_2O concentration and time quite well and the biological degradation of NO_2-N followed a first order reaction pattern. The half-life of NO_2-N was measured to be 34h at 20°C, indicating that anaerobic biological process plays a major role in denitrification.