

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210420003

http://www.yyqxjz.cn/

朱文君, 袁晟译, 李健, 常志强. 菲律宾蛤仔对养殖池塘沉积物/水界面反硝化和厌氧氨氧化反应速率的影响. 渔业科学进展, 2022, 43(3): 110–117

ZHU W J, YUAN S Y, LI J, CHANG Z Q. Effects of *Ruditapes philippinarum* on denitrification and anaerobic ammonia oxidation rates of the sediment/water interface in seawater aquaculture pond. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(3): 110–117

# 菲律宾蛤仔对养殖池塘沉积物/水界面反硝化和厌氧氨氧化反应速率的影响\*

朱文君<sup>1,2</sup> 袁晟译<sup>1,2</sup> 李健<sup>2</sup> 常志强<sup>2①</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266071)

**摘要** 养殖尾水氮含量过高等富营养化问题是影响当前我国池塘养殖产业健康可持续发展的重要因素,反硝化和厌氧氨氧化是自然水生态系统中重要的氮循环过程,是沉积物氮素营养迁出的主要途径,埋栖型贝类通过滤水和蠕动等生命活动不仅能净化水质,还可以使沉积物颗粒混合并改变沉积物/水界面的物质交换。本研究于2020年9、10、11、12月采集菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)养殖池塘贝类区域(有贝区)和对照区域(无贝区)的沉积物表层样品,进行泥浆培养实验,利用氮稳定同位素示踪技术检测其反硝化和厌氧氨氧化反应速率,并分析了其与间隙水理化参数的相关性。结果显示,菲律宾蛤仔养殖池塘有贝区10月和11月样品检测到厌氧氨氧化反应,并有反硝化—厌氧氨氧化耦合反应;有贝区9—12月沉积物反硝化反应速率均高于无贝区,有贝区9月的反硝化反应速率最高(0.005 8 μmol/kg·h);水体温度与沉积物反硝化反应速率呈极显著正相关( $P<0.01$ ),氨氮( $\text{NH}_4\text{-N}$ )浓度与厌氧氨氧化反应速率呈极显著正相关( $P<0.01$ )。研究表明,海水池塘养殖生态系统中也存在厌氧氨氧化过程,养殖菲律宾蛤仔等埋栖型贝类有利于池塘沉积物/水界面的反硝化和厌氧氨氧化反应,有效地促进池塘沉积物脱氮过程,研究结果不仅丰富了海水养殖生态系统氮循环理论,也为开展尾水生物净化工作提供了新思路。

**关键词** 菲律宾蛤仔;反硝化;厌氧氨氧化;沉积物

中图分类号 S967.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2022)03-0110-08

近年来,我国海水池塘养殖产业发展迅速,养殖规模逐渐扩大,产量日益增长(农业农村部渔业渔政管理局等,2020),同时,近岸海水富营养化问题也引起人们普遍关注(陆尚明等,2020),陆源 N、P

过量排放被认为是造成海水富营养化的主要原因(施沁璇等,2021)。虾、蟹养殖池塘中放养菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)、缢蛏(*Sinonovacula constricta*)等埋栖型滩涂贝类的多营养层次综合养

\* 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”专项课题(2019YFD0900403)、国家自然科学基金面上项目(31873039)、财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系(CARS-48)共同资助 [This work was supported by National Key Research and Development Program of China (2019YFD0900403), the National Natural Science Foundation of China (31873039), and China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-48)]. 朱文君, E-mail: zhuwj53123@163.com

① 通讯作者:常志强,研究员, E-mail: changzq@ysfri.ac.cn

收稿日期:2021-04-20, 收修改稿日期:2021-06-07

殖(IMTA)可获得较好的经济和生态效益(Chang *et al.*, 2020)。其中, 贝类不仅能通过自身滤水作用净化水质(董世鹏等, 2020), 其扰动作用还可以使沉积物颗粒混合, 改变沉积物/水界面物质交换(杜永芬等, 2004), 改善沉积物微生物群落结构(Lukwambe *et al.*, 2018)。

本研究以人工构建的菲律宾蛤仔养殖池塘为研究对象, 采用稳定同位素示踪方法, 通过沉积物泥浆培养实验和氮稳定同位素检测, 以期深入揭示菲律宾蛤仔对养殖池塘沉积物/水界面发生的反硝化(Denitrification)和厌氧氨氧化作用(Anaerobic ammonia oxidation)的影响。研究结果将有助于全面了解海水池塘 IMTA 系统氮素营养的迁移转化过程, 并为海水养殖尾水的生物净化处理技术研发提供参考数据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验地点

本研究在山东省日照市东港区涛雒镇的日照开航水产有限公司(35°19'18"N; 119°24'40"E)进行。实验池塘总面积约 0.4 hm<sup>2</sup>, 池塘内修建长为 60 m、顶宽为 1.5 m、水深为 0.5 m 的贝台 10 个, 贝台之间由深沟相隔, 沟底水深为 1.0~1.2 m。2020 年 4 月初, 实验池塘中的 9 个贝台放养规格为 4000~6000 粒/kg 的菲律宾蛤仔, 设有贝区, 另一个贝台不放养任何贝类, 作为对照区域(无贝区)。

### 1.2 实验方法

分别于 9、10、11、12 月选择有贝区的 6 个贝台, 于各贝台中心点处采用玻璃采泥器采集沉积物表层(10 cm)样品, 分别编号为 B1、B2、B3、B4、B5、B6。现场将样品 B1 与 B2、B3 与 B4, B5 与 B6 进行两两混合, 得到 3 份有贝区样品, 另外, 选择无贝区中心点和两端点处采集无贝区样品共 3 份, 分别编号 C1、C2 和 C3。沉积物样品收集间隙水后, 现场进行泥浆培养实验。

### 1.3 间隙水水质检测

温度采用 YSI 多参数便携式水质检测仪进行检测, 亚硝酸盐(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)、硅酸盐(SiO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Si)、氨氮(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N)、硝酸盐(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)和总磷(TP)等理化参数指标采用营养盐自动分析仪(Skalar SAN<sup>plus</sup> Analyzer, 荷兰)

检测, 叶绿素 *a* 浓度的测量参照《叶绿素的测定(分光光度法) SL88-1994》的方法。

### 1.4 泥浆培养实验

每个月有贝区和无贝区沉积物样品均分别取 60 g 置于 250 mL 烧杯里, 加 100 mL 池塘沉积物上覆水, 采用无菌玻璃棒搅拌使其形成匀浆形式, 后在厌氧条件下, 使用 He 吹 30 min。取 36 个 12 mL 顶空进样瓶(Labco Exetainer, Lampeter, 英国), 分为 E\_ctrl、E\_amox 和 E\_denit 3 个实验组, 每组 24 个。其中, E\_ctrl 为控制组, 添加 <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (99%<sup>15</sup>N), 用于判断体系中是否达到厌氧状态, 以及本底的 <sup>14</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 是否已经消耗完。E\_amox 为验证组, 添加 <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (99%<sup>15</sup>N)+<sup>14</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 用于确定厌氧氨氧化的存在。E\_denit 为计算组, 添加 <sup>15</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (99.19%<sup>15</sup>N), 用于计算反硝化反应速率及厌氧氨氧化反应速率(表 1)。分别取 4 mL 泥浆样品加入顶空进样瓶, 采用 He 吹 30 min, 以便排尽瓶中空气。所有顶空进样瓶先在避光条件下旋转培养 5 d(180 r/min), 使其充分达到厌氧状态, 并消耗尽沉积物本底中的 <sup>14</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup>。各实验组分别加入 <sup>15</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、<sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、<sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、<sup>14</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 标准溶液并使最终浓度达到 100 μmol/L, 在添加 <sup>15</sup>N 标记物后的第 0、3、6、9 小时, 每个实验组分别取 3 个平行样品, 加入 200 μL 的 ZnCl<sub>2</sub> 溶液(7 mol/L) 终止反应, 共取得 36 个样品, 样品均于 4℃ 低温保存以测定 <sup>29</sup>N<sub>2</sub>、<sup>30</sup>N<sub>2</sub> 含量(张满平, 2017)。根据公式(1)和公式(2)分别计算厌氧氨氧化和反硝化速率(Thamdrup *et al.*, 2002; Dalsgaard *et al.*, 2002)。

$$A_{\text{total}} = \frac{P_{29} + 2 \times (1 - F_N^{-1}) \times P_{30}}{F_N} \quad (1)$$

$$D_{\text{total}} = P_{30} \times F_N^{-2} \quad (2)$$

式中,  $A_{\text{total}}$  为厌氧氨氧化速率[μmol/(kg·h)];  $D_{\text{total}}$  为反硝化速率[μmol/(kg·h)];  $F_N$  为实验组 E\_denit 中 <sup>15</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 占总 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的百分比;  $P_{29}$  和  $P_{30}$  分别是实验组 E\_denit 中 <sup>29</sup>N<sub>2</sub> 和 <sup>30</sup>N<sub>2</sub> 的生成速率[μmol/(kg·h)]。

### 1.5 <sup>15</sup>N 同位素测定

泥浆培养终止后, 离心进样瓶, 取 1 mL 顶空气体至 He (99.999%)吹扫后的 Labco 真空采样瓶中, 置于 GasBench II 样品盘中, 使用稳定同位素质谱仪(GasBench II - 253plus, 美国)测定 <sup>29</sup>N<sub>2</sub>、<sup>30</sup>N<sub>2</sub> 的生成量。

表1  $^{15}\text{N}$  泥浆培养试验分组  
Tab.1  $^{15}\text{N}$  slurry incubation experiment groups

实验组 Groups	同位素药品 Isotope medicine	添加同位素 Tracer added	最终浓度 Final concentration/( $\mu\text{mol/L}$ )	测定相 Isotopes measured
E_ctrl	$^{15}\text{N NH}_4\text{Cl}$	$^{15}\text{NH}_4^+$	100	$^{29}\text{N}_2, ^{30}\text{N}_2$
E_amox	$^{15}\text{N NH}_4\text{Cl}+^{14}\text{N NO}_3^-$	$^{15}\text{NH}_4^++^{14}\text{NO}_3^-$	100+100	$^{29}\text{N}_2, ^{30}\text{N}_2$
E_denit	$^{15}\text{N NO}_3^-$	$^{15}\text{NO}_3^-$	100	$^{29}\text{N}_2, ^{30}\text{N}_2$

## 1.6 数据统计与处理

采用 Microsoft Excel 2016 软件进行数据整理和计算, 采用 SPSS 25.0 软件进行单因素方差分析 (one-way ANOVA),  $P<0.05$  为显著差异,  $P<0.01$  为极显著差异。

## 2 结果

### 2.1 沉积物间隙水理化指标

沉积物间隙水理化指标分析结果见表2。从表2可以看出, 整个养殖期间, 有贝区和无贝区间隙水

理化指标存在明显差异。其中, 有贝区叶绿素  $a$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{SiO}_4^{2-}\text{-Si}$  和  $\text{NO}_3^-$  含量在各月均低于无贝区。有贝区的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$  和  $\text{SiO}_4^{2-}\text{-Si}$  含量在养殖期间总体呈逐渐下降的趋势。有贝区 TP 含量在 10 月有所下降, 11 月最高, 12 月又降至最低水平, 而无贝区 TP 含量在养殖过程中趋于稳定。

### 2.2 反硝化与厌氧氨氧化反应速率

2.2.1 有贝区 有贝区  $^{29}\text{N}_2$ 、 $^{30}\text{N}_2$  生成量见图1。从图1可以看出, E\_ctrl 实验组4个月中  $^{29}\text{N}_2$  和  $^{30}\text{N}_2$  均未累积, 表明达到厌氧条件且没有发生硝化、反硝化的耦合反应, 沉积物本底中的  $^{14}\text{NO}_3^-$  完全消耗完。

表2 沉积物间隙水理化指标  
Tab.2 Physicochemical parameters of porewater at sampling sites

月 Month	样品 Samples	温度 Temperature / $^{\circ}\text{C}$	叶绿素 $a$ Chl- $a$ /( $\text{mg/L}$ )	亚硝酸盐 $\text{NO}_2^-$ /( $\mu\text{g/L}$ )	硅酸盐 $\text{SiO}_4^{2-}\text{-Si}$ /( $\mu\text{g/L}$ )	氨氮 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ /( $\text{mg/L}$ )	硝酸盐 $\text{NO}_3^-$ /( $\mu\text{g/L}$ )	总磷 TP /( $\mu\text{g/L}$ )
9月 Sep.	YB	23.9	1.6	49.7	2 134.6	3.2	455.8	8.8
	WB	24.1	1.9	60.2	3 203.1	2.6	600.5	10.1
10月 Oct.	YB	16.8	1.5	17.0	1 965.0	3.0	173.4	5.4
	WB	16.9	2.4	79.3	3 005.4	3.1	197.7	10.3
11月 Nov.	YB	8.8	0.3	15.0	784.5	2.9	127.3	13.1
	WB	8.7	0.6	24.9	2 071.9	3.6	315.6	11.0
12月 Dec.	YB	8.1	0.2	12.3	366.7	1.9	32.3	1.3
	WB	7.9	0.3	28.3	1 772.4	2.3	314.0	10.3

注: YB 为有贝区, WB 为无贝区

Note: YB represents area with clams, and WB represents area without clams

E\_amox 处理组中, 9月,  $^{29}\text{N}_2$ 、 $^{30}\text{N}_2$  均未累积, 表明达到厌氧条件且不存在厌氧氨氧化反应; 10月,  $^{30}\text{N}_2$  有所累积, 表明达到所需厌氧条件,  $^{29}\text{N}_2$  有所累积, 表明存在厌氧氨氧化反应; 11月,  $^{29}\text{N}_2$  检测到累积, 表明存在厌氧氨氧化反应; 12月,  $^{29}\text{N}_2$ 、 $^{30}\text{N}_2$  均未累积, 表明达到厌氧条件且不存在厌氧氨氧化反应。

E\_denit 处理组中, 9月,  $^{29}\text{N}_2$  未累积, 而  $^{30}\text{N}_2$  生成速率逐渐上升, 表明不存在厌氧氨氧化反应但

存在反硝化反应, 经计算可知, 反硝化速率为  $0.0058 \mu\text{mol}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ ; 10月,  $^{29}\text{N}_2$  和  $^{30}\text{N}_2$  均有累积且  $^{30}\text{N}_2$  生成速率大于  $^{29}\text{N}_2$ , 表明存在厌氧氨氧化和反硝化反应, 且反硝化速率大于厌氧氨氧化速率, 经计算可知, 反硝化速率为  $0.0039 \mu\text{mol}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ , 厌氧氨氧化反应为  $0.00092 \mu\text{mol}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ ; 11月,  $^{29}\text{N}_2$  有所累积, 表明存在厌氧氨氧化反应, 经计算可知, 厌氧氨氧化反应速率为  $0.00093 \mu\text{mol}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ , 而  $^{30}\text{N}_2$  有所累积, 表明存在反硝化反应, 经计算可知, 反硝化

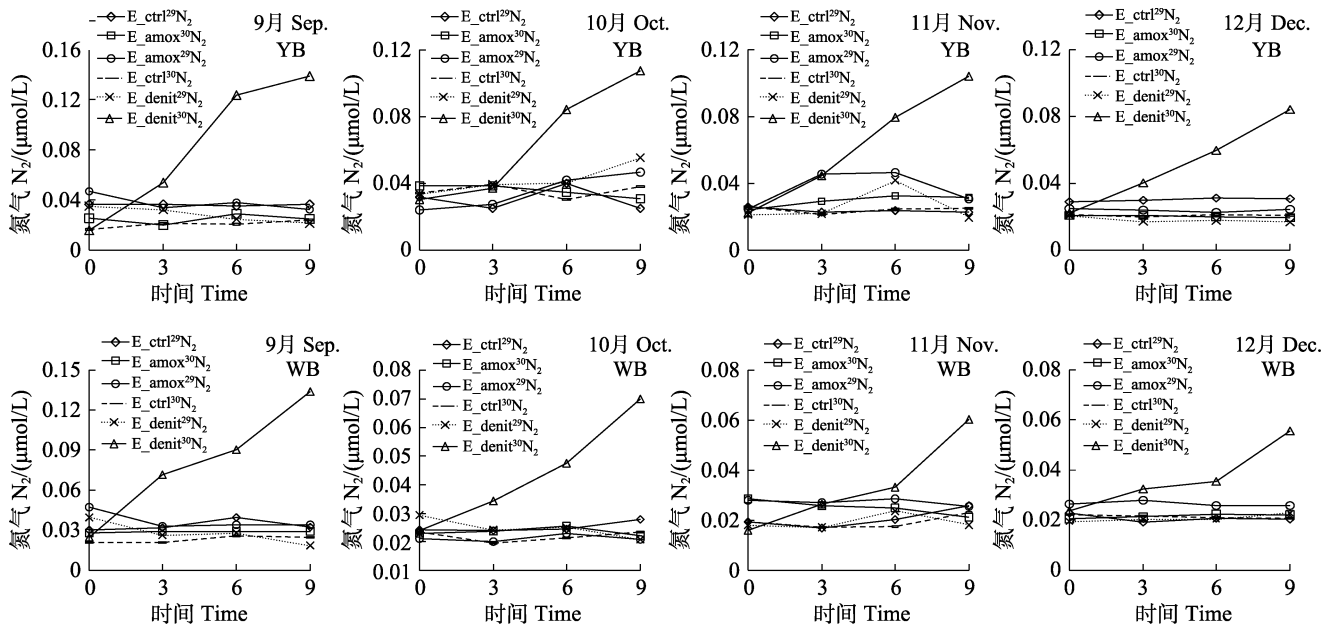


图 1 有贝区(YB)与无贝区(WB)样品的 <sup>29</sup>N<sub>2</sub>、<sup>30</sup>N<sub>2</sub> 生成量  
Fig.1 The amount of <sup>29</sup>N<sub>2</sub> and <sup>30</sup>N<sub>2</sub> in samples obtained in the area with (YB) or without (WB) clams

反应速率为 0.003 9 μmol/(kg·h); 12 月, <sup>29</sup>N<sub>2</sub> 未累积而 <sup>30</sup>N<sub>2</sub> 逐渐累积, 表明仅存在反硝化反应, 经计算可知, 反硝化反应速率为 0.002 8 μmol/(kg·h)。

**2.2.2 无贝区** 无贝区 <sup>29</sup>N<sub>2</sub>、<sup>30</sup>N<sub>2</sub> 生成量见图 1。从图 1 可以看出, E\_ctrl 处理组中, 4 个月样品的 <sup>29</sup>N<sub>2</sub> 和 <sup>30</sup>N<sub>2</sub> 均未累积, 表明达到厌氧条件且样品本底中的 <sup>14</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 完全消耗完, 无贝区没有发生硝化、反硝化的耦合反应。E\_amox 处理组中, 9—12 月样品的 <sup>29</sup>N<sub>2</sub> 和 <sup>30</sup>N<sub>2</sub> 均未累积, 表明达到厌氧条件, 但不存在厌氧氨氧化反应; E\_denit 处理组中, 9 月, <sup>29</sup>N<sub>2</sub> 未累积而 <sup>30</sup>N<sub>2</sub> 逐渐累积, 表明不存在厌氧氨氧化反应, 但存在反硝化反应, 经计算可知, 反硝化反应速率为 0.004 8 μmol/(kg·h); 10 月, <sup>30</sup>N<sub>2</sub>

逐渐累积而 <sup>29</sup>N<sub>2</sub> 未累积, 表明存在反硝化反应但没有厌氧氨氧化反应, 经计算可知, 反硝化速率为 0.002 1 μmol/(kg·h); 11 月, <sup>29</sup>N<sub>2</sub> 未检测到累积, <sup>30</sup>N<sub>2</sub> 有所累积, 表明不存在厌氧氨氧化反应, 仅存在反硝化反应, 经计算可知, 反硝化反应速率为 0.001 9 μmol/(kg·h); 12 月, <sup>29</sup>N<sub>2</sub> 未累积而 <sup>30</sup>N<sub>2</sub> 有所累积, 表明不存在厌氧氨氧化反应而仅存在反硝化反应, 经计算可知, 反硝化反应速率为 0.001 4 μmol/(kg·h)。

**2.3 反硝化和厌氧氨氧化反应速率影响因素**

有贝区沉积物厌氧氨氧化反应速率、反硝化反应速率与间隙水理化参数相关性分析结果见表 3。从表 3 可以看出, 整个养殖过程中, 池塘沉积物/

表 3 沉积物的氮循环反应速率与环境因子相关性分析

Tab.3 Correlation analysis between nitrogen cycling reaction rates of sediment and environmental factors

项目 Items	温度 Temperature/°C		叶绿素 a Chl-a /(mg/L)		亚硝酸盐 NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /(μg/L)		氨氮 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N /(mg/L)		硝酸盐 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /(μg/L)		总磷 TP/(μg/L)	
	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A
	有贝区 Area with clams	0.9**	-0.3	0.6*	0.1	0.9**	-0.5*	0.8**	0.9**	0.9**	-0.3	0.5*
无贝区 Area without clams	0.9**	—	0.5*	—	0.4	—	-0.2	—	0.9**	—	-0.5*	—

注: D: 反硝化反应速率; A: 厌氧氨氧化反应速率; \*表示显著差异(P<0.05); \*\*表示极显著差异(P<0.01)

Note: D: Denitrification rates; A: Anammox rates; \* indicates a significant correlation at the P<0.05 level; \*\* indicates a significant correlation at the P<0.01 level

水界面的反硝化反应速率与间隙水温度、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-$ 含量相比具有极显著差异( $P<0.01$ ),与叶绿素 $a$ 浓度、TP含量相比呈显著相关( $P<0.05$ )。厌氧氨氧化反应速率与 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量相比具有极显著差异( $P<0.01$ ),与TP、 $\text{NO}_2^-$ 含量相比存在显著差异( $P<0.05$ ),与温度、叶绿素 $a$ 浓度、 $\text{NO}_3^-$ 含量相比无显著差异( $P>0.05$ )。

无贝区沉积物反硝化反应速率与间隙水理化参数相关性分析结果见表3。从表3可以看出,无贝区沉积物/水界面的反硝化反应速率与间隙水温度、 $\text{NO}_3^-$ 含量相比具有极显著差异( $P<0.01$ ),与叶绿素 $a$ 、TP含量相比显著差异( $P<0.05$ ),与 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量相比差异不显著( $P>0.05$ )。

### 3 讨论

水生态系统的沉积物/水界面氮循环过程主要包括硝化(Nitrification)、反硝化、厌氧氨氧化等。硝化是硝化细菌在有氧条件下将铵盐( $\text{NH}_4^+$ )转化为 $\text{NO}_2^-$ 和 $\text{NO}_3^-$ 的过程,能有效去除有机物(程海华等,2016)。反硝化作用是反硝化细菌在厌氧条件下,将 $\text{NO}_3^-$ 还原生成 $\text{N}_2\text{O}$ 和 $\text{N}_2$ 的过程,而厌氧氨氧化则是厌氧氨氧化细菌在厌氧条件下,将 $\text{NO}_2^-$ 和 $\text{NH}_4^+$ 转化为 $\text{N}_2$ 的过程。目前,关于水生态系统氮循环过程的研究主要以硝化和反硝化反应为主,涉及海洋(张日钊等,2020)、陆地河流(叶萌,2017)、湖泊(江海洋,2017)、水库(黄亚琦,2020)、稻田(Dien *et al.*, 2019)等生态系统,长期以来,反硝化过程一直被认为是水生态系统氮迁出的唯一途径。据Tanaka等(2004)和Middleburg等(1996)对海洋沉积物氮迁出的研究结果显示,反硝化可去除海洋中67%~80%的含氮化合物,而其他一些关于河口海湾区氮迁出的研究表明,反硝化可清除20%~60%的陆源氮负荷(Barnes *et al.*, 1999)。自Mulder等(1995)首次在生物脱氮流化床反应器中发现,厌氧氨氧化反应以来,它作为氮迁出的全新途径颠覆了人们对氮循环的传统认识,成为环境科学等领域的研究热点。

Thamdrup等(2002)最早报道了自然生态系统中的厌氧氨氧化反应,并认为波罗的海—北海过渡带沉积物氮迁出中高达67%是由厌氧氨氧化反应完成的。此后,在其他大陆边缘的海底沉积物(Fernandes *et al.*, 2016)、河口区域沉积物(Meyer

*et al.*,2005)以及缺氧海水区域(Kuypers *et al.*, 2003)等海洋生态系统中发现厌氧氨氧化反应的报道大量增多,海洋生态系统沉积物依靠厌氧氨氧化菌驱动氮迁出的途径也很快被人们接受(Fernandes *et al.*, 2016)。近年来,我国科学家在湿地生态系统水陆交错带(Zhu *et al.*, 2013)、水稻田土壤(Zhu *et al.*, 2011)和淡水鱼养殖池塘(Shen *et al.*, 2016)等陆地水生生态系统中也陆续发现了厌氧氨氧化反应参与沉积物氮迁出的过程,但有关海水养殖池塘系统中是否存在厌氧氨氧化反应尚未见报道。本研究发现,菲律宾蛤仔养殖池塘有贝区沉积物/水界面存在厌氧氨氧化反应,进一步丰富了人们对水生态系统氮循环的认识,这可能是由于放养菲律宾蛤仔导致其周边间隙水含氧量下降,同时,菲律宾蛤仔能直接排泄 $\text{NH}_4^+$ (邓可,2011),为厌氧氨氧化反应提供了反应底物。厌氧氨氧化反应不稳定,受环境因素影响较多(王刚,2017)。本研究中,有贝区也仅在10月和11月这一贝类生长较快的时期出现厌氧氨氧化反应,而且反应速率明显低于反硝化反应。

稻虾综合养殖池塘相关研究发现,由于进水口的富营养化,使稻虾净水机制中养分含量高,导致反硝化反应速率增加(Dien *et al.*, 2019)。本研究中,有贝区样品的反硝化速率高于无贝区,可能由于贝类的代谢导致贝类沉积物中有机质含量增高,同时,贝类的代谢活动导致有机质的增加,沉积物中微生物的代谢导致溶解氧(DO)含量的下降,为反硝化反应提供更多有利环境。在有贝区与无贝区反硝化速率的检测中发现,9月反硝化反应速率达到最大值,可能是因为9月菲律宾蛤仔养殖池塘中温度较其他采样时间温度高。李瑶(2017)研究表明,温度越高反硝化反应速率越大,温度的增加可促进反硝化反应活动,另外,本研究发现,9月 $\text{NO}_3^-$ 浓度最高,大量的 $\text{NO}_3^-$ 含量可为反硝化反应提供反应底物,促进反硝化反应的发生。

此外,由于菲律宾蛤仔在沉积物中扰动的灌溉作用,使含氧的上覆水进入沉积物中,促使沉积物中间隙水的 $\text{O}_2$ 含量增加,促进硝化反应,为反硝化反应提供更多反应底物( $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$ )。同时, $\text{O}_2$ 含量的增加会抑制反硝化反应,而这又与沉积物中含氮有机物的含量有关,含量较高时,有机质的氧分解会迅速耗尽沉积物中间隙水的DO,形成厌氧环境,虽然,有利于反硝化反应的发生,但也可能因为硝

化反应的终止而失去反应底物。另外,反硝化反应和厌氧氨氧化反应在进行时会共同利用亚硝氮(朱泽沅等,2016),因此,在反应过程中也存在耦合现象。

本研究发现,有贝区、无贝区沉积物反硝化反应速率与温度具有极显著性相关( $P < 0.01$ ),温度高则反硝化反应速率大,这与李瑶(2017)研究结果相一致。有贝区厌氧氨氧化反应速率与 $\text{NH}_4^+$ 呈现出极显著性相关( $P < 0.01$ ),这可能是由于 $\text{NH}_4^+$ -N作为厌氧氨氧化反应发生的底物, $\text{NH}_4^+$ -N浓度的增加可促使厌氧氨氧化反应的进行。有贝区与无贝区反硝化反应速率与叶绿素 $a$ 浓度均表现出显著性相关( $P < 0.05$ ),叶绿素 $a$ 浓度高则表示水体中存在大量藻类,藻类可为反硝化菌提供底物(赵峰等,2021),促进反硝化细菌的增加,因此,可能会导致池塘沉积物反硝化速率有所增加。 $P$ 是水体中初级生产力因子,在沉积物中会与 $\text{Fe}^{3+}$ 结合形成 $\text{Fe}$ 结合 $P$ ,菲律宾蛤仔的生物扰动可能会促进上覆水中的 $\text{DO}$ 进入沉积物,把更多的 $\text{Fe}^{2+}$ 氧化成 $\text{Fe}^{3+}$ 而结合固定更多的 $P$ ;厌氧环境则有利于 $P$ 的析出,因为在缺少其他氧化还原物质时, $\text{Fe}^{3+}$ 会被用于氧化有机质的电子受体,从而解脱结合的 $P$ 。在菲律宾蛤仔养殖池塘中, $\text{TP}$ 浓度是厌氧氨氧化反应以及反硝化反应的影响因素之一。此外,本研究中,有贝区反硝化反应对 $\text{NH}_4^+$ -N、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$ 浓度以及无贝区与 $\text{NO}_3^-$ 浓度均表现出相关性。虽然 $\text{NH}_4^+$ -N与反硝化反应存在正相关看似不合理,这可能由于硝化反应的发生为反硝化反应提供了 $\text{NO}_3^-$ 和 $\text{NO}_2^-$ 底物,使这一现象存在。厌氧氨氧化反应和 $\text{NO}_2^-$ 和 $\text{NH}_4^+$ -N浓度具有相关性,符合厌氧氨氧化反应的反应过程。

综上所述,海水池塘中养殖菲律宾蛤仔对于沉积物/水界面的氮循环过程产生了明显影响,本研究结果不仅丰富了水生态系统氮循环理论,也为开展海水养殖尾水生物净化工作提供了新思路。

## 参 考 文 献

- BARNES J, OWENS N J P. Denitrification and Nitrous Oxide Concentrations in the Humber Estuary, UK, and Adjacent Coastal Zones. *Marine Pollution Bulletin*, 1999, 37(3/4/5/6/7): 247–260
- Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook 2020. Beijing: China Agriculture Press, 2020 [农业农村
- 部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2020 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2020]
- CHANG Z Q, NEORI A, HE Y Y, *et al.* Development and current state of seawater shrimp farming, with an emphasis on integrated multi-trophic pond aquaculture farms. *Reviews in Aquaculture*, 2020, 12(4): 2544–2558
- CHENG H H, ZHU J X, QU K M, *et al.* Effect of different organic carbon sources and C/N on the bio-filter purification. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(1): 127–134 [程海华, 朱建新, 曲克明, 等. 不同有机碳源及C/N对生物滤池净化效果的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(1): 127–134]
- DALSGAARD T, THAMDRUP B. Factors controlling anaerobic ammonium oxidation with nitrite in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(8): 3802–3808
- DENG K. Nutrient exchange fluxes and biological disturbances at sediment-water interface in typical coastal areas of my country. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2011 [邓可. 我国典型近岸海域沉积物—水界面营养盐交换通量及生物扰动的影响. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2011]
- DIEN L D, SANG, N V, Faggotter, S J, *et al.* Seasonal nutrient cycling in integrated rice-shrimp ponds. *Marine Pollution Bulletin*, 2019, 149: 110647
- DONG S P, LIN F, JIANG W W, *et al.* Estimation of carrying capacity of Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in Jiaozhou Bay based on spatial and temporal distribution of chlorophyll  $a$ . *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(6): 100–107 [董世鹏, 蔺凡, 姜妮妮, 等. 基于叶绿素 $a$ 时空分布的胶州湾菲律宾蛤仔养殖容量评估. *渔业科学进展*, 2020, 41(6): 100–107]
- DU Y F, ZHANG Z N. The effect of bioturbation of Philippine clams on the vertical distribution of sediment particle. *Periodical of Ocean University of China (Natural Sciences)*, 2004, 34(6): 988–992 [杜永芬, 张志南. 菲律宾蛤仔的生物扰动对沉积物颗粒垂直分布的影响. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2004, 34(6): 988–992]
- FERNANDES S O, JAVANAUD C, MICHOTÉY V D, *et al.* Coupling of bacterial nitrification with denitrification and anammox supports N removal in intertidal sediments (Arcachon Bay, France). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2016, 179: 39–50
- JIANG H Y. Study on nitrogen and carbon cycles in lakes in the middle and late period of algal bloom outbreak. Doctoral Dissertation of Yangzhou University, 2017 [江海洋. 藻华暴发中后期湖泊氮素、碳素循环研究. 扬州大学博士研究生学位论文, 2017]
- HUANG Y Q. Study on vertical distribution characteristics and flux of  $\text{N}_2\text{O}$  dissolved concentrations in the large and large reservoirs of Lancang River. Master's Thesis of Xi'an University of Technology, 2020 [黄亚琦. 澜沧江深大水库

- 氧化亚氮溶存浓度的垂向分布特征及通量研究. 西安理工大学硕士研究生学位论文, 2020]
- KUYPERS M M M, SLIEKERS A O, LAVIK G, *et al.* Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature*, 2003, 422: 608–611
- LI Y. Study on the effects of temperature on denitrification and carbon releasing in constructed wetland filled with Bark. Doctoral Dissertation of Wuhan University of Technology. 2017 [李瑶. 温度对树皮填料人工湿地反硝化和释碳的影响研究. 武汉理工大学博士研究生学位论文, 2017]
- LUKWAMBE B, YANG W, ZHENG Y, *et al.* Bioturbation by the razor clam (*Sinonovacula constricta*) on the microbial community and enzymatic activities in the sediment of an ecological aquaculture wastewater treatment system. *The Science of the total environment*, 2018, 643: 1098–1107
- LU S M, LU G Y, ZHANG L, *et al.* Comparison and analysis of water quality between industrialized ecological pond farming and traditional pond farming. *Journal of Aquaculture*. 2020, 41(8): 7–12, 25 [陆尚明, 芦光宇, 张莉, 等. 池塘工业化生态养殖与传统池塘养殖水质比较分析. 水产养殖, 2020, 41(8): 7–12, 25]
- MEYER R L, RISGAARD-PETERSEN N, ALLEN D E. Correlation between anammox activity and microscale distribution of nitrite in a subtropical mangrove sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71: 6142–6149
- MIDDELBURG J J, SOETAERT K, HERMAN P M J, *et al.* Denitrification in marine sediments: A model study. *Global Biogeochemical Cycles*, 1996, 10(4): 661–673.
- MULDER A, VANDEGRAAF A A, ROBERTSON L A, *et al.* Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized-bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology*, 1995, 16: 177–183
- SHEN L, WU H, GAO Z, *et al.* Evidence for anaerobic ammonium oxidation process in fresh water sediments of aquaculture ponds. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23: 1344–1352
- SHI Q X, HAO G J, YE T, *et al.* Research on eutrophication and its driving factors in reservoirs of the Quzhou area. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(1): 18–28 [施沁璇, 郝贵杰, 叶霆, 等. 衢州地区渔业水域水库水体富营养化水平及驱动因子研究. 渔业科学进展, 2021, 42(1): 18–28]
- TANAKA T, GUO LD, DEAL C, *et al.* N deficiency in a well-oxygenated cold bottom water over the Bering Sea shelf influence of sedimentary denitrification. *Continental Shelf Research*, 2004, 24: 1271–1283
- THAMDRUP B, DALSGAARD T. Production of N<sub>2</sub> through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(3): 1312–1318
- WANG G. Nitrogen removal of sludge liquor based on simultaneous partial nitrification/anammox/denitrification (SNAD) process. Doctoral Dissertation of Dalian University of Technology, 2017 [王刚. 基于同时亚硝化/厌氧氨氧化/反硝化(SNAD)技术的污泥消化液脱氮工艺研究. 大连理工大学博士研究生学位论文, 2017]
- YE M. Study of influence factors on ammonia Nitrogen removal in Wenzhou typical rivers. Doctoral Dissertation of Lanzhou University of Technology, 2017 [叶萌. 温州典型河道水中氨氮去除的影响因素研究. 兰州理工大学博士研究生学位论文, 2017]
- ZHANG M P. Spatial and temporal distribution of nitrite-dependent anaerobic ammonium and methane oxidation bacteria in mangrove wetland. Master's Thesis of Xiamen University, 2017 [张满平. 红树林湿地亚硝酸盐型厌氧氨氧化和厌氧甲烷氧化微生物时空分布. 厦门大学硕士研究生学位论文, 2017]
- ZHANG R Z, Li F R, YUAN Q Q, *et al.* Marine nitrogen cycle and prediction based on genome-scale metabolic network model. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(6): 1130–1147 [张日钊, 李斐然, 袁倩倩, 等. 海洋氮循环过程及基于基因组代谢网络模型的预测. 微生物学报, 2020, 60(6): 1130–1147]
- ZHAO F, XU H, ZHAN X, *et al.* Spatial differences and influencing factors of denitrification and anammox rates in spring and summer in Lake Taihu. *Environmental Science*, 2021, 42(5): 2296–2302 [赵峰, 许海, 詹旭, 等. 太湖春夏两季反硝化与厌氧氨氧化速率的空间差异及其影响因素. 环境科学, 2021, 45(5): 2296–2302]
- ZHU G, WANG S, WANG W, *et al.* Hots pots of anaerobic ammonium oxidation at land-freshwater interfaces. *Nature Geoscience*, 2013, 6: 103–107
- ZHU G, WANG S, WANG Y, *et al.* Anaerobic ammonia oxidation in a fertilized paddy soil. *The ISME Journal*, 2011, 5: 1905–1912
- ZHU Z Y, YU D S, Li J. Influence of C/N on nitrogen removal performance and kinetics characteristics of ANAMMOX/denitrification synergistic interaction. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2016, 10(6): 2813–2818 [朱泽沅, 于德爽, 李津. C/N 比对 ANAMMOX 与反硝化协同脱氮性能影响及其动力学. 环境工程学报, 2016, 10(6): 2813–2818]

## Effects of *Ruditapes philippinarum* on Denitrification and Anaerobic Ammonia Oxidation Rates of the Sediment/Water Interface in Seawater Aquaculture Pond

ZHU Wenjun<sup>1,2</sup>, YUAN Shengyi<sup>1,2</sup>, LI Jian<sup>2</sup>, CHANG Zhiqiang<sup>2</sup><sup>①</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao, Shandong 266071, China)

**Abstract** The eutrophication problem caused by various reasons such as excessive nitrogen level in aquaculture wastewater are the most critical obstacle to the sustainability of aquaculture industry in China at present. Denitrification and anaerobic ammonium oxidation (Anammox) are important nitrogen cycling processes in natural water ecosystems, which are the main nitrogen removal pathways in the sediments. Clams could not only purify aquaculture water column by their water-filtering activities and wriggle behaviors, but also change the material transportation which occurs in the sediment/water interface. In the present study, the slurry incubation experiments using the sediment samples collected at the area with or without Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in a biological wastewater treatment pond in Sept., Oct., Nov. and Dec., 2020 have been performed to investigate the potential denitrification and anammox activity rate, and the relationship between the denitrification or anammox activity rate and the porewater physicochemical parameters have also been analyzed. The results showed that the anammox was found in the sediment of clam culture area in Oct. and Nov., and the denitrification-anammox coupling were also found. The denitrification activity rate of sediments with clam culture in the four months were higher than that of sediments without clam, and the highest rate (0.005 8  $\mu\text{mol}/\text{kg}\cdot\text{h}$ ) was found in the sample of Sept. There was a significant positive correlation ( $P<0.01$ ) between the denitrification activity rate and porewater temperature in clam culture area, and between the porewater  $\text{NH}_4^+$  level and anammox activity rate. The anammox has been found in the seawater aquaculture pond. The clam promoted denitrification and anammox processes in sediment/water interface which showed a vital role in nitrogen removal in sediment in the present study. The results will not only enrich the nitrogen cycling theory of aquaculture ecosystem, but also provided insights to establishing new biological wastewater treatment measures.

**Key words** *Ruditapes philippinarum*; Denitrification; Anaerobic ammonia oxidation; Sediment

① Corresponding author: CHANG Zhiqiang, E-mail: changzq@ysfri.ac.cn