第四章　湖泊沉积物界面氮氧化及其微生物学过程

第一节 沉积物中氨氧化原核生物垂直分布及其特征

了解湖泊沉积物中氨氧化原核微生物的分布及其与环境因子的关系，不仅对于了解这些微生物的生态分布具有重要的促进作用，而且对以进一步认识湖泊中的氮循环规律具有重要意义。目前，化学方法很难区分三类氨氧化原核生物的活性，采用分子生态学方法，可以较好地分析沉积物柱样中的AOB、AOA和厌氧氨氧化细菌的垂直分布和多样性，了解沉积物中氨氧化原核生物的群落特征，寻找潜在的环境调控因子，以增进对湖泊氮循环规律的了解。

一、 微生物结构与理化环境

2008 年 11 月 19 日，用自制采样器于太湖的竺山湾（120°14′1″E，31°27′0″N）采集一个沉积物柱状样。表层 5cm 沉积物每 1cm 分层; 第 6-19cm，每隔 2cm 分层，命名为 D1－D19，于切样同时，用电位仪测定各层的氧化还原电位（oxidation-reduction potential，ORP）和 pH， 2M KCl 溶液提取沉积物中可交换态氮，用连续流动分析仪（SAN++，Skalar，Holand）分析硝态氮（NO_x^--N，为 NO_2^--N 和 NO_3^--N 的总和）和铵态氮（NH_4^+-N）。

称取0.5 g冻干沉积物，采用土壤DNA提取方法，经PowerClean™ DNA Clean-Up Kit试剂盒纯化，获得沉积物DNA。采用0.8％琼脂糖电泳检验，及230nm、260nm、280nm吸光值测定检验提取效率和纯度。选择AOB和AOA的氨单加氧酶基因（ammonia monooxygenase subunit A，*amoA*）、厌氧氨氧化细菌16S rRNA基因作为分子标记，其PCR扩增方案如表2.1所示（PTC200，MJ Research，USA）。25 μl扩增体系包含1×PCR缓冲液、2 mM $MgCl_2$、200 μM四种dNTP、0.2 μM引物、1.5 U rTaq DNA聚合酶。

对AOB和AOA的*amoA*扩增产物进行DGGE分析（DGGE-2001，C.B.S.，USA）。在变性梯度分别20－70%，20－60%的6％聚丙烯酰胺凝胶上，恒温60 ℃、恒压75 V、电泳19 h。 电泳结束后，用SYBR Green I核酸染料染色30 min，用GelDoc XR凝胶成像系统（BIO-RAD Laboratories，USA）拍照。切下AOB DGGE图谱上的主要条带，放入无菌离心管（含50 μL无菌水），4 ℃放置24 h。以此为模板，采

用AOB引物（如表4-1）进行PCR扩增，进行分子克隆及后续分析。

对PCR扩增产物进行克隆分析（pGEM T-Easy，Promega，USA）。 经连接、转化、验证后，随机选取阳性克隆委托测序（上海英骏）。获得的序列经去除载体和引物序列后，用网络程序Bellerophon（http://foo.maths.uq.edu.au/~huber/bellerophon.pl，*amoA*及16S rRNA基因）和Chimera Check（http://rdp8.cme.msu.edu/cgis/chimera.cgi?su=SSU，16S rRNA基因）排除可能的嵌合体。利用DOTUR[84]比较序列，将操作分类单元（operational taxonomic unit，OTU）定义为相似性差异≤5%的序列群。通过BLAST（http://www.ncbi.nlm.nih.gov /BLAST/）搜索GenBank中最相似序列，用ClustalX 1.83进行多序列比对，并采用Mega 4.0软件重建系统发育树（邻接法，1000次抽样bootstrap检验）。

所获得的细菌、古菌*amoA*以及厌氧氨氧化细菌的16S rRNA基因序列在GenBank中的登录号分别是：GQ231457-GQ231481、GQ231448-GQ231456和GQ214254-GQ214259。

太湖竺山湾沉积物ORP、pH、NH_4^+-N与NO_x^--N沿剖面的变化如图4-4所示。ORP动态表明，沉积物各层均呈还原态，沉积物－上覆水界面的还原性最弱，向下到4cm深度则迅速增强；5cm以下，除15cm处有一异常低值，ORP保持相对稳定。随着上层沉积物中ORP的迅速降低，NH_4^+-N的浓度随之上升。在整个剖面中，ORP与NH_4^+-N呈显著负相关关系（r＝-0.586，P＜0.05；若排除D15的异常值，则r＝-0.832，P＜0.01）。但在ORP或NH_4^+-N与pH、NO_x^-N参数之间并无类似关系。这是因为各种扰动导致表层沉积物的复氧较为充分，因此这里的有氧氨氧化活性较为强烈，导致氨及时被消耗。而沉积物下层由于缺乏氧气，氨氧化活性一般低于表层，容易造成氨的积累。综合ORP与NH_4^+-N的情况来看，1cm至4cm深度变化较为明显，5cm以下变化较为平缓，而4－5cm为过渡区（图4-1中灰色区域所示）。

表 4-1 PCR 扩增方案

Table 4-1 Primers and PCR programs for amplification of *amoA* or 16S rRNA gene of ammonia-oxidizing prokaryotes

	目标基因	引物[a]	引物序列（5’－3’）	片段长度(bp)	热循环条件
AOB	*amoA*	aomA-1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	491	95 ℃ 5 min－94 ℃ 30 s，53 ℃ 30 s， 72 ℃ 30 s，45 次循环－72 ℃ 10 min
		amoA-2R-TC	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC		
AOA	*amoA*	Arch-amoAF	STAATGGTCTGGCTTAGACG	635	95 ℃ 5min－94 ℃ 30 s，53 ℃ 1 min， 72 ℃ 1 min，45 次循环－72 ℃ 10 min
		Arch-amoAR	GCGGCCATCCATCTGTATGT		
厌氧氨氧化细菌（巢式PCR）	16S rRNA	pla46F	GGATTAGGCATGCAAGTC	1346	95 ℃ 4min－94 ℃ 45 s，55 ℃ 50 s， 72 ℃ 2 min，40 次循环－72 ℃ 10 min
		1392R	GACGGGCGGTGTGTACAA		
		AMX368F	CCTTTCGGGCATTGCGAA	452	95 ℃ 4min－94 ℃ 30 s，56 ℃ 45s， 72 ℃ 1 min，40 次循环－72 ℃ 10 min
		AMX820R	AAAACCCCTCTACTTAGTGCCC		

a：由于GC夹的引入显著降低PCR扩增效率，造成部分样品无法获得足够的PCR产物用于分析，因此所有DGGE分析均基于无GC夹引物扩增产物。

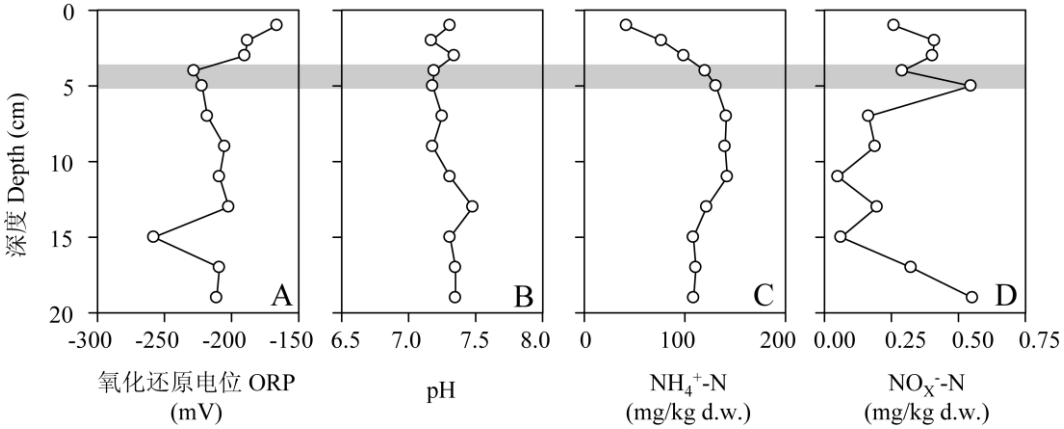


图4-1 沉积物剖面环境因子的垂直变化

A： ORP；B：pH；C：NH_4^+-N； D：NO_x^-N

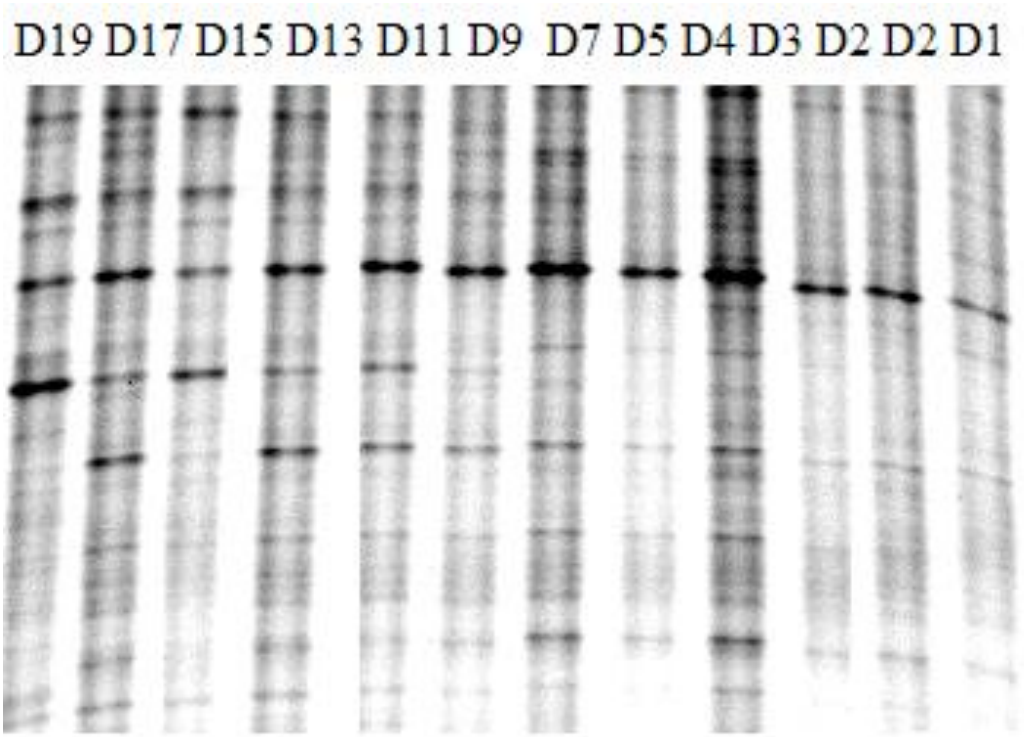


图4-2 沉积物样品D1－D19中总细菌 16 S rRNA基因的DGGE分析

二、AOB与AOA群落结构变化

利用细菌引物（341F-GC /518R）对沉积物样品中的总细菌进行PCR扩增，通过DGGE（变性梯度为50%－70%的8％聚丙烯酰胺凝胶）可以得到沉积物总细菌的群落信息。如图4-2所示，太湖竺山湾沉积物各深度的样品中细菌的DGGE条带数很多，群落多样性很高。D1-D19中，有一优势条带，且随着深度变化，条带都较亮，说明这一条带所代表的物种在

各深度的丰度都较高。总的来看，随深度的变化，总细菌物种组成变化不大。

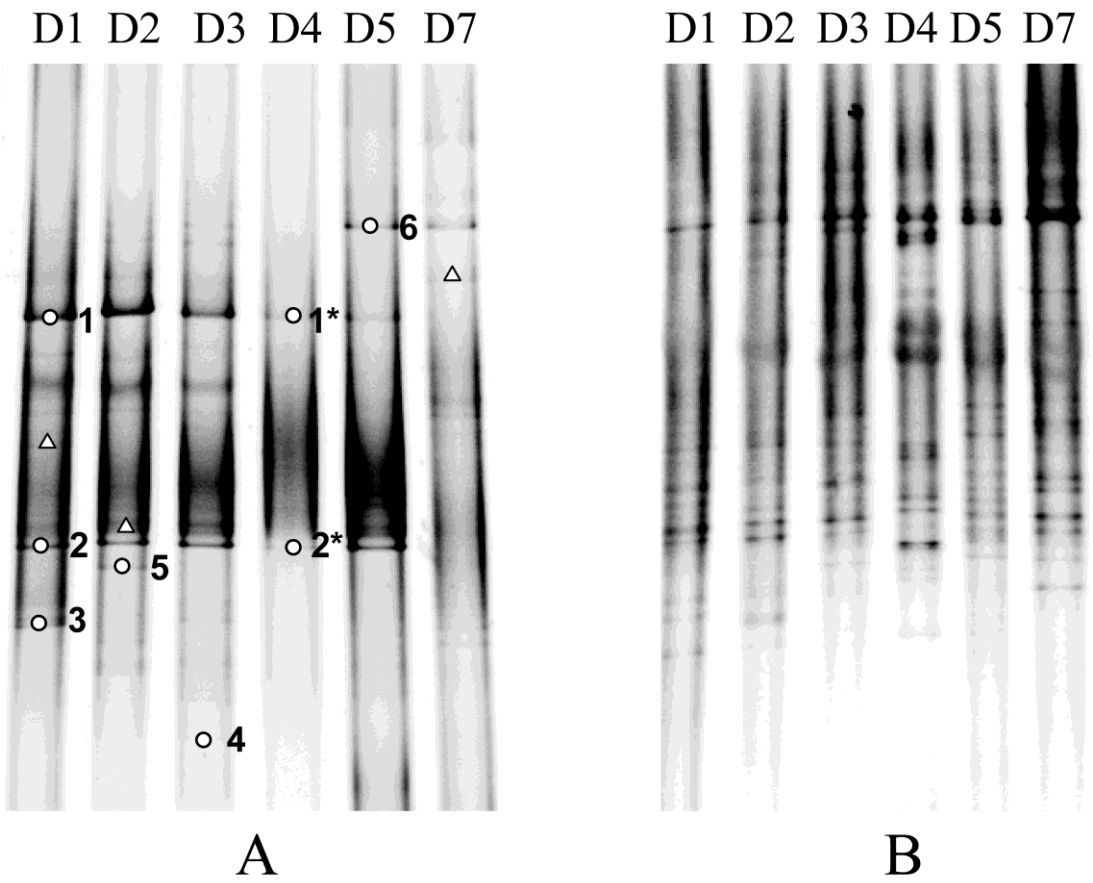


图4-3 沉积物样品D1－D7中AOB（A）和AOA（B）*amoA*基因的DGGE分析

采用表4-1列出的引物与PCR条件，对D1－D19（不同深度的湖泊表层沉积物）样品中AOB和AOA的*amoA*基因分别进行扩增，均能获得强度不一的预期条带，表明AOB和AOA共存于整个沉积物剖面，共同参与氨氧化过程。考虑到氧对下层沉积物的渗透有限，加上ORP与NH_4^+-N的主要变化发生在D1－D7之间（图1），应用DGGE方法，着重对D1－D7样品中的AOB和AOA群落结构进行了分析。如图 4-6所示，AOB的DGGE条带数较少，群落多样性较低。在D1－D4中，两个优势条带（1和2）是构成AOB群落的主要成分。但是，在D5中出现了新的优势条带6，尤其在D7中，条带6成为主要的优势条带，条带1和2基本消失，表明在5－7cm处，AOB的群落结构发生了较大变化。相比之下，AOA的DGGE图谱中可以分辨出多个条带，其多样性较AOB高。总的来看，D1－D7各样品中的AOA优势条带较为类似，物种组成变化不大（图4-3）。

环境条件对于氨氧化反应具有重要的调控作用。ORP决定着氧化还原反应的发生方向，而NH_4^+-N是氨氧化反应的底物，其浓度可以指示氨氧化反应的强度[36]。本研究中，沉积物剖面ORP和NH_4^+-N具有相似的垂直变化规律，在4－5cm深度存在着从急剧变化到相对稳定

的过渡区域（图4-4：A、C）。相应地，AOB优势种也从5cm开始发生改变，7cm深度的群落结构已经与1－4cm处存在很大差异，并与ORP和NH_4^+-N的变化相符，提示这两个重要环境因子对沉积物中AOB具有潜在影响。另一方面，随沉积物深度变化，AOA的群落结构差异不大。这一结果与其他湖泊沉积物中的古菌变化规律相类似，其原因在于古菌与细菌具有不同的生理与代谢特性，导致两者对环境的不同响应。

三、 氨氧化微生物的分子系统发育

1.3.1 氨氧化细菌（AOB）

对DGGE中的部分条带进行割胶回收（条带编号如图4-3所注，○和Δ分别代表成功及未成功测序的条带），经再次PCR扩增和克隆后，每个条带随机挑选3－4个阳性克隆测序，共获得25个序列。根据系统发育分析，这些序列可分为4个类群（Group 1－4）（图4-4A）：优势条带1、2（以及同一位置条带1*和2*）和6所回收的序列中，大多数（75％）属于Group 1；条带3回收的1个序列属于Group 2；条带4回收的4个序列均属于Group 3；条带5回收序列分属Group 3和4。其中，Group 1－3属于亚硝化单胞菌中的*Nitrosomonas oligotropha* lineage，Group 4属于*N. communis* lineage。

上述所有获得的序列均属于亚硝化单胞菌，优势条带序列大多为*N. oligotropha* lineage，表明太湖竺山湾沉积物AOB种群中，亚硝化单胞菌、特别是*N. oligotropha*丰度最高。*N. oligotropha* lineage是常见的淡水环境AOB优势种，广泛分布于各种淡水环境，而*N. communis* lineage在土壤和富营养化淡水中更为常见，提示它们比较适应富含氨的环境。竺山湾沉积物中AOB的特殊组成提示其生态位分离，即环境对AOB物种选择作用在湖泊表层沉积物中的存在。

1.3.2 氨氧化古菌（AOA）

DGGE图谱（图4-4B）表明，沉积物中AOA多样性较高，群落组成相对复杂，考虑到对DGGE条带逐一测序的成功率难以保证，因此采用构建*amoA*克隆文库并随机测序的方法分析AOA的系统发育关系。通过构建太湖竺山湾表层沉积物样品D1古菌*amoA*克隆库并随机测序，共获得9个序列，分属6个OTUs。系统发育分析（图4-4B）表明，所有序列分属Soils & other environments lineage（对应于泉古菌CG1.1b）和Marine water & other environments lineage（对应于泉古菌CG1.1a）两个主要分支，并以前者中的序列为主（78％）。CG 1.1b广泛分布于土壤中，CG 1.1a在海洋生态系统中则更为常见，鉴于太湖地区历史上经历过多次海陆交替，这两类序列的共存可能说明了陆地与海浸过程对竺山湾表层沉积物AOA成分的潜在共同影响。

在土壤、海洋等环境中，AOA普遍存在且较AOB具有数量优势 。太湖竺山湾表层沉积物中古菌*amoA*基因的成功扩增，证实了AOA在富营养化淡水环境中的存在。这种存在必然

对湖泊氮循环产生影响，促使人们进一步深入了解湖泊氮循环的新途径和机制。

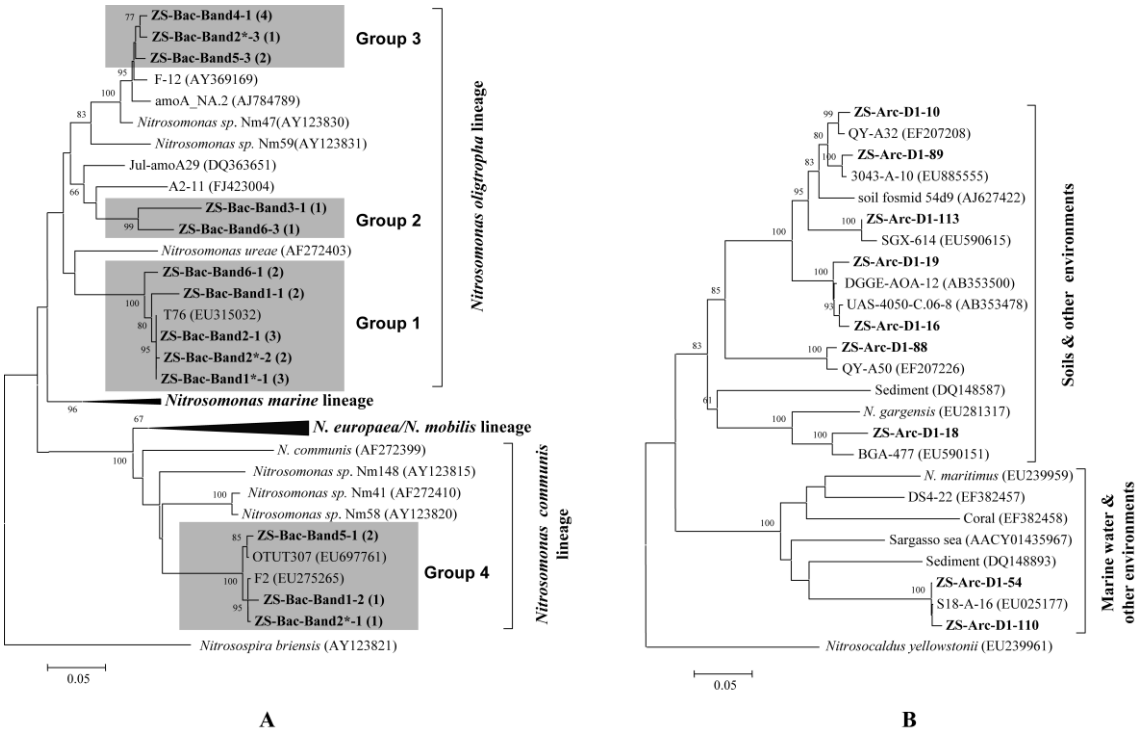


图4-4　AOB（A）与AOA（B）的系统发育树*

*文中得到的序列加前缀ZS-Bac-或ZS-Arc-D1-；括号中数字表示同一OTU中的序列数；比例尺表示每个核苷酸位置的替换率为0.05

1.3.3 厌氧氨氧化细菌

采用厌氧氨氧化细菌特异引物巢式扩增所有样品（D1－D19），仅D5获得扩增产物，这可能是因为厌氧氨氧化细菌的丰度低于检测限，无法扩增。意外的是，D5扩增产物长度为750 bp左右，高出预期的450 bp，对该长片段克隆测序，BLAST比对发现所获6个序列彼此高度相似，形成一个独立的cluster，但与基因库中序列最高相似度仅有81%。系统发育分析表明，这些序列与已知厌氧氨氧化细菌聚为一类，但距离较远（图4-5）。

16S rRNA基因的扩增是目前检测环境中厌氧氨氧化细菌的主要方法，但引物的特异性是影响检测效果的重要因素。AMX368F和AMX820R均为高度特异的厌氧氨氧化细菌引物，已成功应用于海洋及河口环境，但也常常获得非厌氧氨氧化细菌来源的序列。应用特异性引物扩增从太湖竺山湾表层沉积物中得到了非预期长度的条带，一方面可能因为引物特异性较低，另一方面也可能是沉积物中厌氧氨氧化细菌物种较为特殊，因而获得异常的扩增产物。

厌氧氨氧化细菌需要在无氧或低浓度氧的条件下氧化氨。在浅水湖泊，风浪作用显著，大气复氧使得整个水柱中的溶解氧含量差异不显著，因此，厌氧氨氧化对于湖泊氮素的消减可能并非关键过程。但是，从太湖竺山湾沉积物厌氧氨氧化结构及其活性的分析结果看，在

浅水富营养化湖泊的表层沉积物中极有可能存在厌氧氨氧化过程。研究获得的序列是来自类似厌氧氨氧化细菌的浮霉菌。

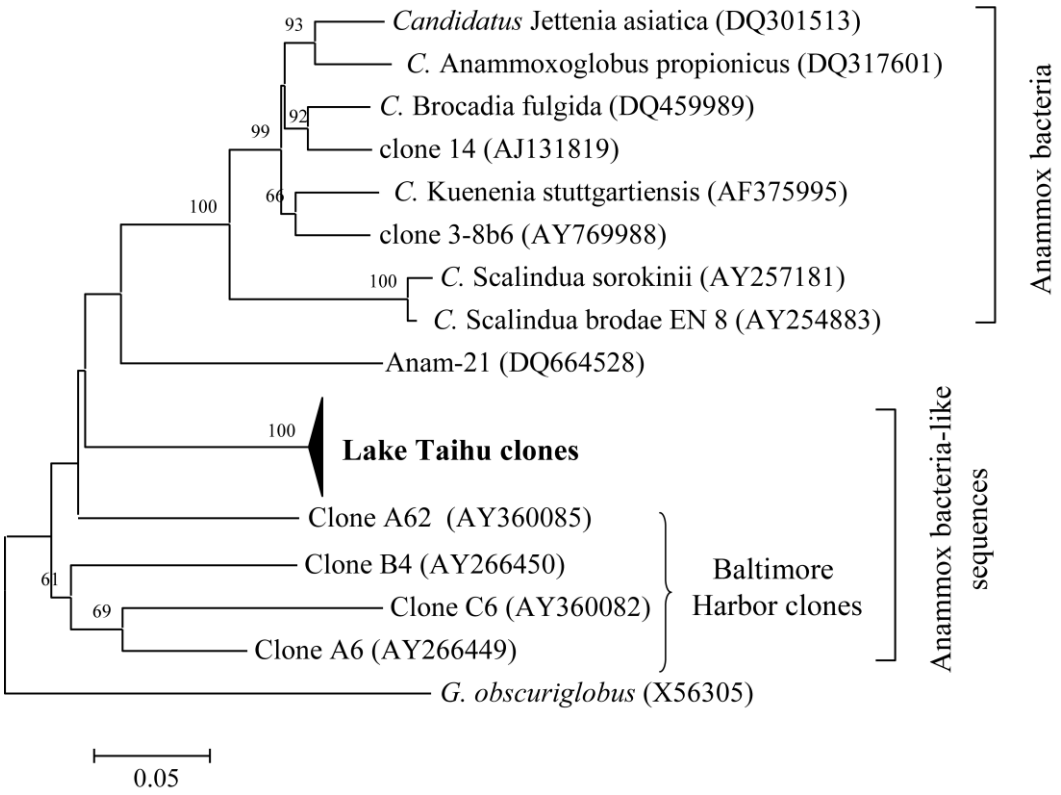


图4-5 厌氧氨氧化细菌的系统发育树*

Figure 4-8 Phylogenetic tree of anammox bacteria

*比例尺表示每个核苷酸位置的替换率为0.05

总结上述对太湖竺山湾沉积物柱样中的氨氧化原核生物进行的分子生态学分析：（1）沉积物中同时存在 AOB 和 AOA，表明其两者可能共同参与太湖沉积物中的硝化过程。（2）AOB 群落结构在 5cm 深度处发生明显变化，这应与 ORP 和 NH_4^+-N 的变化趋势有关，AOB 优势种为 *N. oligtropha* lineage，反映了环境条件对物种的选择；AOA 的群落结构沿沉积物 1－7cm 深度变化不大。（3）厌氧氨氧化细菌的丰度可能较低，回收的 16S rRNA 序列虽与厌氧氨氧化细菌聚为一类，但距离较远。上述结果对于理解富营养化淡水湖泊的氮循环过程具有一定意义。

第二节 表层沉积物中氨氧化原核生物的水平分布及其特征

尽管氨氧化原核生物在沉积物表现出垂直分布变化，且与ORP等因素有一定关系，但是与海洋、土壤等环境相比，目前对淡水生态系统中氨氧化原核生物的存在和生态规律的了解还很缺乏，GenBank中仅有2％的*amoA*序列来自淡水环境。湖泊表层沉积物具有高度的异质性，了解湖泊沉积物中氨氧化原核微生物的水平分布及其与环境因子的关系，对于了解这些微生物的生态分布及其对湖泊氮循环具有重要意义

一、群落组成和相对丰度

太湖（30°55’40”- 31°32’58”N, 119°52’32”- 120°36’10”E）是一个生态类型和沉积物性质在空间分布上极其多样性化的湖泊。从优势物种角度，太湖东南部（主要包括东太湖、胥口湾等区域）为典型的草型湖区，其余大部分为藻型湖区。在两种状态的交界处存在草、藻过渡区。太湖沉积物具有高度异质性，不同湖区的沉积物在分布、深度、粒径及其他理化性质方面存在很大差异（范成新、张路，2009）。这些高度异质的沉积物性质无疑对其中的微生物群落具有潜在的影响。根据太湖沉积物分布、生态类型、水文状况和地理特征，2008 年 7 月 20 至 21 日用柱状采样器采集了 20 个样点的沉积物样品，命名为 A－T。样点分布如图 4-6 所示。在这些样点中，根据历史记录（范成新、张路，2009）和现场观察，A 至 K 为藻型湖区，L 至 T 为草型湖区；由于受到强烈的物理扰动，湖心样点（F－J）的沉积物深度不到 0.1 m，属于典型的硬质湖底；K 和 L 分别位于主要入湖河流的河口（宜兴东氿和苕溪）。采用第二节中相通的方法对表层沉积物中氨氧化原核生物的结构进行了分析，获得的核酸序列在基因库中的登录号为：FJ951648–FJ951746（古菌 *amoA*）、FJ951747–FJ951827（细菌 *amoA*）、GQ148881-GQ148913 和 GQ421750-GQ421771（厌氧氨氧化细菌 16S rRNA）。

AOA *amoA* 基因片段的 DGGE 分析结果如图 4-7 所示。在 DGGE 图谱中，总共出现 27 个独特条带，各样点从 4 条（C）到 13 条（K）不等。两个优势条带（bands *i* 和 band *iv*）存在于除 S 外的所有样点中。聚类分析显示，在 61％相似度水平，所有的样点形成两大类群（图 4-8）：Cluster A 中的样点比较分散，而 Cluster B 主要由湖心及邻近样点组成，这表明太湖沉积物中 AOA 的群落组成具有明显的平面空间分布的特征。此外还存在几个相对独特的群落结构，例如样点 K（河口）、S 和 T（东太湖）。

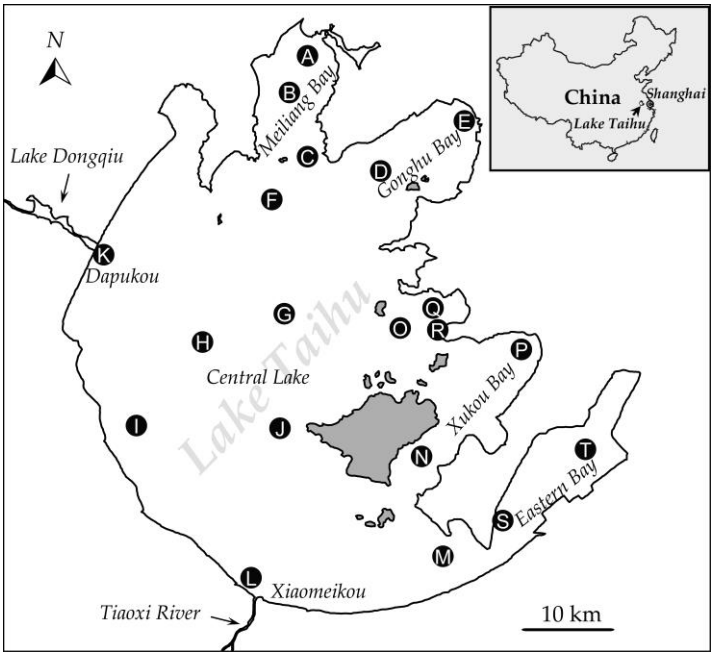


图 4-6　表层沉积物样点分布图

定量 PCR 方法结果显示（图 4-9），每克干重沉积物中，古菌 *amoA* 拷贝数从 1.14×10^4 至 1.00×10^8，细菌 *amoA* 拷贝数从 5.19×10^4 至 1.84×10^7。古菌 *amoA* 对细菌 *amoA* 的比值在样点 I 最高，为 153；在样点 S 最低，为 0.2。在大多数样点，古菌 *amoA* 丰度更高，AOB 的数量仅在东太湖超过 AOA。鉴于东太湖在营养状态上的特殊性，表明环境可能对湖泊表层沉积物中 AOA 的群落结构及相对丰度具有重要的调节作用。

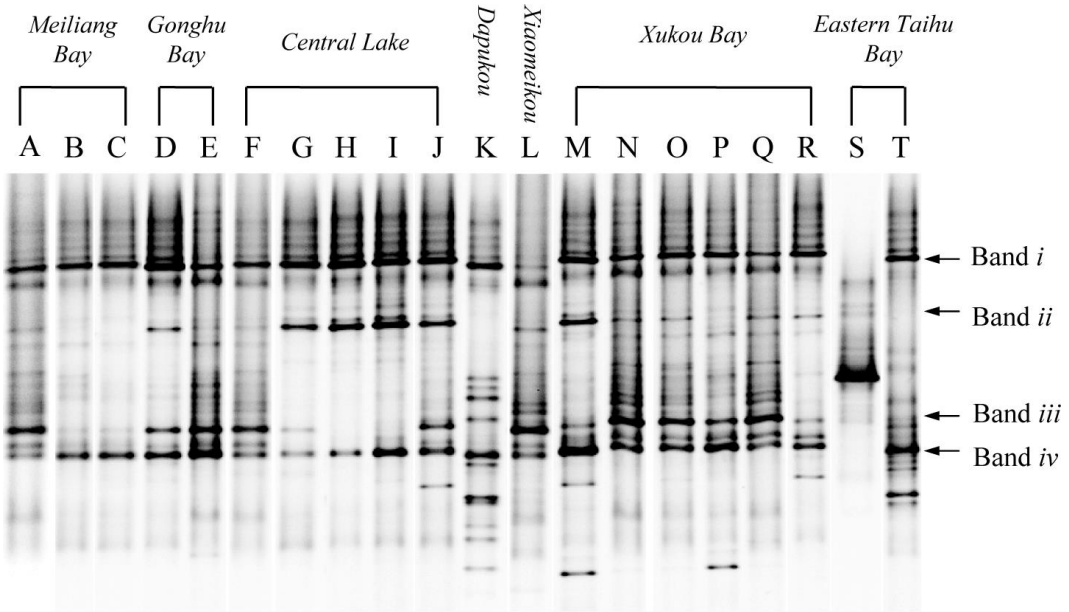


图 4-7 表层沉积物中古菌 *amoA* 基因片段的 DGGE 分析*

*Band *i*－*iv* 的系统发育信息参见图 8.3.5A

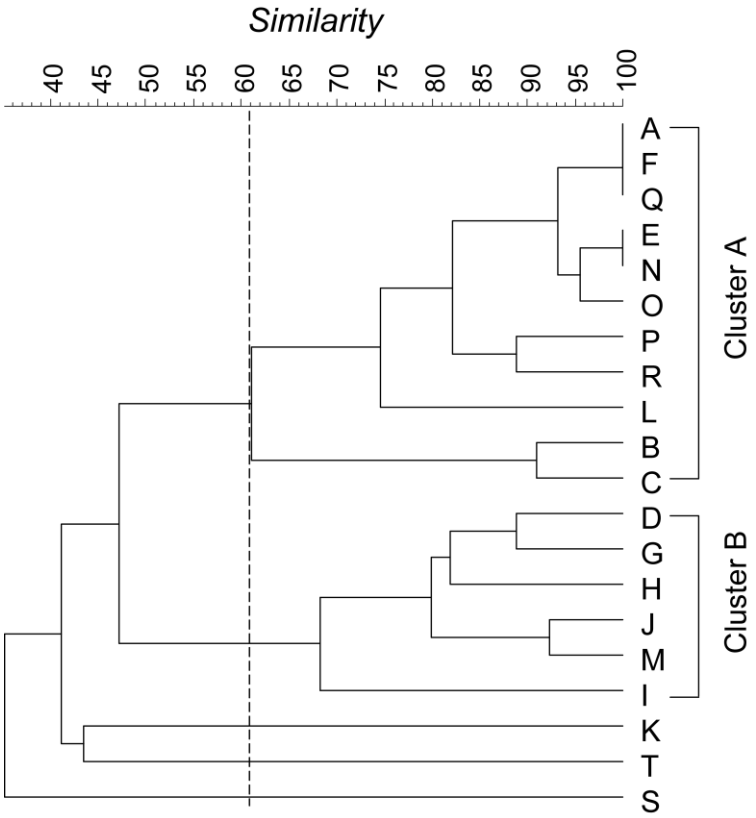


图 4-8 表层沉积物 AOA 群落结构的聚类分析

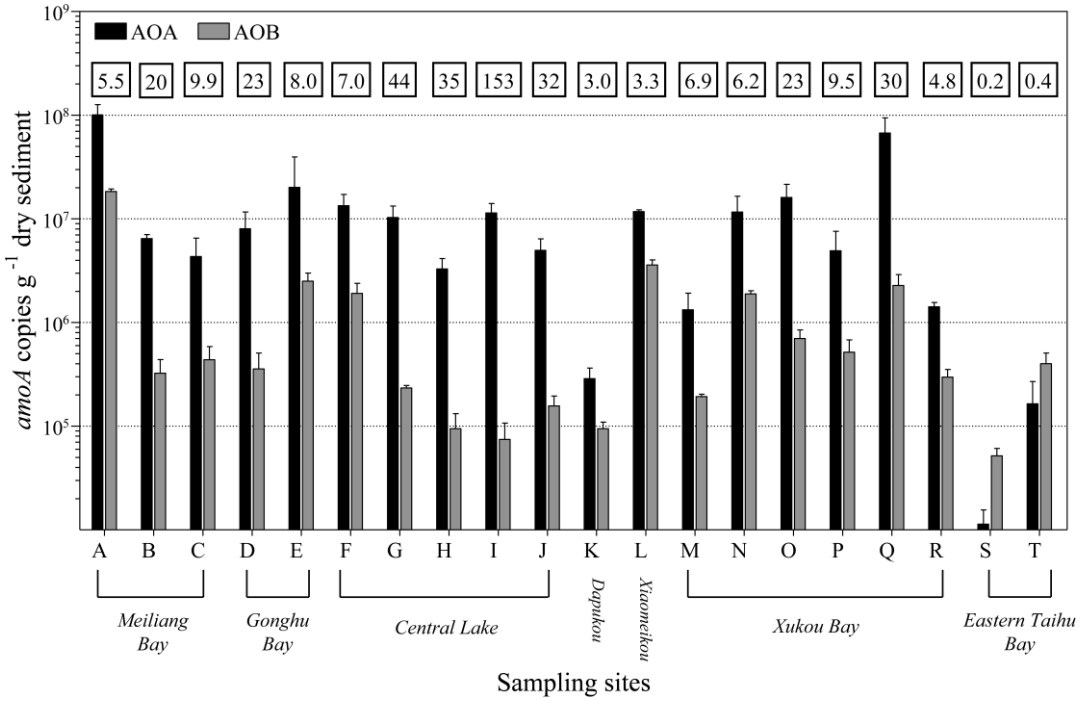


图 4-9 表层沉积物中 AOA 与 AOB 的丰度 *amoA*[*]

[*]方框中的数字表示古菌 *amoA* 与细菌 *amoA* 拷贝数的比值

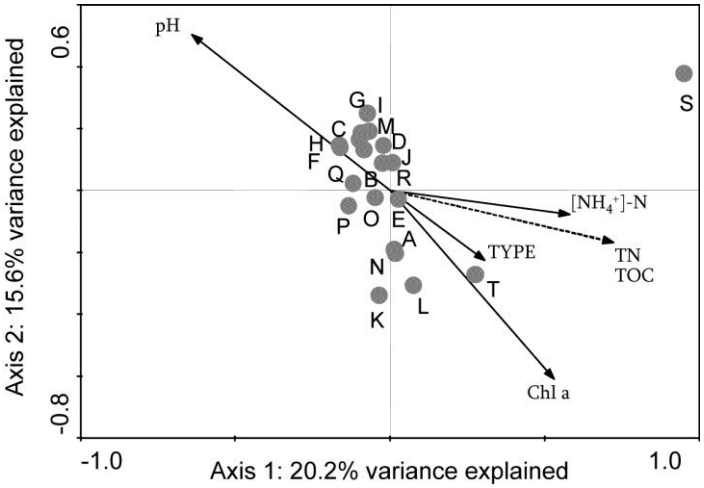


图 4-10　表层沉积物古菌 *amoA* 的 CCA 排序图*

*实线箭头表示对群落结构具有显著效应的环境因子（$P < 0.05$）

虚线箭头表示具有边际显著性的环境因子（$0.05 < P < 0.1$）

二、环境因子影响

对古菌 *amoA* 的 DGGE 与沉积物理化性质作 CCA 排序的 Forward 分析表明，$[NH_4^+]$-N、pH、Chl a 以及生态类型对 AOA 的群落结构具有显著影响，TOC、TN 具有边际显著性（图 4-10 ）。

环境的空间差异对 AOA 群落的影响还体现在丰度方面。相关分析表明，古菌 *amoA* 拷贝数和 TOC、TN、$[NH_4^+]$-N 和 Chl a 之间存在显著的负相关关系，和 pH 之间存在显著正相关关系（表 4-2）。古菌、细菌 *amoA* 拷贝数比值与上述环境因子也存在相似的关联。

表 4-2 环境因子和古菌 *amoA* 基因丰度间的相关性 [a]

		丰度（Abundance）[b]		
		古菌 *amoA*	细菌 *amoA*	古菌、细菌 *amoA* 比值
TOC		-0.708**	-0.205	-0.767**
TP		-0.298	0.087	-0.494*
TN		-0.707**	-0.206	-0.766**
$[NH_4^+]$-N		-0.712**	-0.326	-0.653**
$[NO_2^-]$-N		0.329	0.351	0.104
$[NO_3^-]$-N		0.265	0.287	0.079
Chl a		-0.623**	0.063	-0.792**
pH		0.559**	-0.031	0.797**

[a] ** 表示极显著关联（$P<0.01$），　* 表示显著关联（$P < 0.05$）

[b] Pearson 相关系数；*amoA* 拷贝数及相对比值经对数转换

水生植被对浮游细菌的群落结构具有重要影响（Wu et al., 2007），植物根系可以促进氧

的传输、分泌多种有机化合物，导致 AOA 数量增加（Herrmann 等，2009）。但在太湖表层沉积物中，并未发现草型湖区和藻型湖区的 AOA 及 AOB 的群落结构及相对丰度之间存在明显差异。太湖草型湖区采样点的优势物种大多数为眼子菜（*Potamogeton* spp.），此类沉水植物的根系不很发达，氧气传输及分泌有机碳的能力较弱，因此可能使得包括 AOA 在内的微生物数量及其活性受到影响（Karjalainen 等，2001）。

有机碳的富集可能是调节太湖 AOA 丰度更主要的因子（表 4-2），高浓度的有机碳对 AOA 具有明显的抑制作用，在富含有机质的环境中 AOA 的相对重要性下降。比如在东太湖，由于高强度的围网养殖，导致大量有机质积聚在表层沉积物中，同时这里 AOA 的相对丰度最低、群落结构最特殊。有机质的积聚往往使得沉积物中铵态氮和 TN 偏高，已有的研究证实，高浓度的铵也对 AOA 具有抑制作用。Chl-a 、TOC、[NH_4^+]-N 之间的正相关关系（表 4-2）反映太湖沉积物中的有机物质可能来自浮游植物的沉降，并在后者的分解过程中产生相应数量的铵。

pH 可能是影响太湖沉积物中 AOA 的另一重要因素（表 4-2）。在前人的研究中，pH 对 AOA 丰度的影响并不一致：Nicol 等（2008）发现 AOA 更适应偏酸性的土壤环境（pH 研究范围 4.9-7.5），在淡水沉积物中也有类似的发现（pH 4.8-7.7）（Herrmann 等，2009）。有研究认为，在酸性土壤（pH 3.7-5.8）中，pH 与 AOA 丰度呈正相关（He 等，2007）。不过，当所研究环境的 pH 范围较窄（<1）时，AOA 丰度与 pH 间没有显著的关联，因此，pH 对 AOA 丰度的效应可能与 AOA 对环境 pH 的敏感度有关。此外，有机质的富集可以导致沉积物 pH 下降（表 4-2），因此 pH 的效应可能实际上受控于其它因素。

在样点 K 处具有最高的 AOA 多样性以及特殊的群落组成（图 4-6，表 4-3），样点 L 处则具有最高的 AOB 多样性（表 4-3）。这两个样点均处于入湖河口，是上游地区氨氧化原核生物群落与太湖群落的交错区，其特殊的 AOA 与 AOB 群落特征印证了长江口沉积物中 AOA 高多样性的边缘效应（群落交错区中生物种类增加和某些种类密度增大的现象[134]）在太湖河口交错区沉积物中也同样可以出现。

三、AOA 和 AOB 的分子系统发育

在梅梁湾、湖心、河口、胥口湾和东太湖的代表性样点，建立 6 个克隆文库（A、J、K、L、O、S），随机选取 19-34 个克隆进行测序（表 4-3）。在 5%序列差异水平，136 个克隆中总共有 11 个 OTU，有 58.1%的序列属于泉古菌 CG 1.1a（M），41.9%属于 CG 1.1b（S）。根据系统发育树（图 4-11A）中的位置，这些序列可进一步分为 6 个亚类，大多数序列属于其中的 S1、S3 和 M2。CG 1.1b 的 AOA 在样点 J、K、S 占优势，CG 1.1a 的 AOA 在样点 A、L、O 占优势，从相对丰度角度反映出 AOA 分布的异质性（图 4-11A）。

表 4-3 古菌 *amoA* 与细菌 *amoA* 克隆文库的多样性*

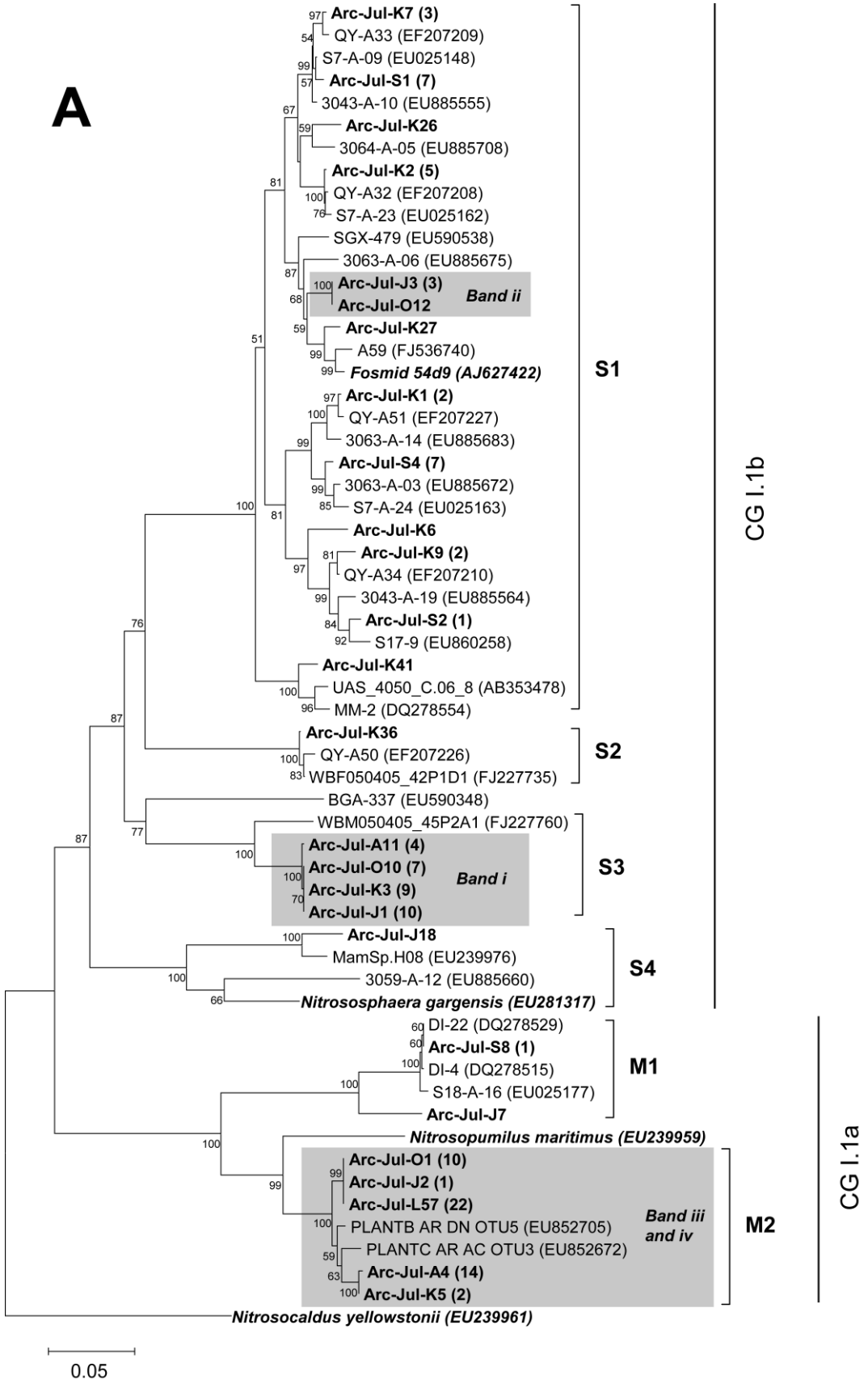
		古菌 *amoA*					细菌 *amoA*		
		序列数	OTUs	Chao 1	DGGE 条带		序列数	OTUs	Chao 1
A		20	2	2	10		22	3	3
J		19	5	5.5	6		—	—	—
K		34	8	11	13		23	3	3
L		23	1	1	12		42	12	13
O		20	3	3	11		21	4	5
S		20	4	4	6		27	4	4
T		—	—	—	—		22	3	3
Total		136	11	14			157	20	23.75

* OTU 定义为 DNA 序列 5%差异

DGGE 图中的优势条带 band *i*（图 4-7）经鉴定对应于系统发育树中的 S3 亚类，是 CG 1.1b 一个很深的分支（图 4-11A）。序列分析表明，该条带与 Genbank 中群外序列的相似度仅为 83%。Purkhold 等（2000）认为，AOB *amoA* 基因序列 80%的相似度可以作为判断新种的依据。尽管没有证据表明 AOA 也存在类似的规律，但可以推测太湖表层沉积物中，可能存在较为特殊的 AOA 优势种。

对于 AOB，同样建立了 6 个克隆文库（A、K、L、O、S 和 T），分别挑选 21-42 个克隆进行测序（表 4-3）。基于 5%序列差异，总共 157 个克隆中存在 20 个 OTU，这些序列都来自 *Nitrosomonas*，分别属于 *N. oligotropha*，*N. communis* 以及两个未鉴定的 *Nitrosomonas* 分支（图 4-11B）。所有 6 个文库中，*N. oligotropha* 均占据优势，*N. communis* 仅存在于河口样点 K 和 L。未鉴定分支 2（Undefined lineage 2）分布于梅梁湾的 A、L 点和东太湖的 S、T 样点，提示它们可能在富营养化程度较高的位点占据优势（图 4-11B）。

Nitrosomonas 是常见的淡水环境 AOB 优势种（Speksnijder 等，1998）。太湖表层沉积物中 AOB 的相对丰度差异（图 4-12B）提示可能存在生态位分离现象。具体来看，在样点 K，*N. nitrosa* 相似序列丰度较高（图 4-11B、图 4-12B），未鉴定分支 2 在 A、S、T 样点丰度较高。这两个分支常见于富营养化淡水沉积物和生物膜反应器（Koops 等，2001；Nogueira 等，2002），表明它们可能更适应高营养的环境。*N. oligotropha* 则普遍存在于所有 6 个文库，反映其在淡水环境中的广泛分布。


A
Arc-Jul-K7 (3)
QY-A33 (EF207209)
S7-A-09 (EU025148)
Arc-Jul-S1 (7)
3043-A-10 (EU885555)
Arc-Jul-K26
3064-A-05 (EU885708)
Arc-Jul-K2 (5)
QY-A32 (EF207208)
S7-A-23 (EU025162)
SGX-479 (EU590538)
3063-A-06 (EU885675)
Arc-Jul-J3 (3)
Arc-Jul-O12
Band ii
Arc-Jul-K27
A59 (FJ536740)
Fosmid 54d9 (AJ627422)
Arc-Jul-K1 (2)
QY-A51 (EF207227)
3063-A-14 (EU885683)
Arc-Jul-S4 (7)
3063-A-03 (EU885672)
S7-A-24 (EU025163)
Arc-Jul-K6
Arc-Jul-K9 (2)
QY-A34 (EF207210)
3043-A-19 (EU885564)
Arc-Jul-S2 (1)
S17-9 (EU860258)
Arc-Jul-K41
UAS_4050_C.06_8 (AB353478)
MM-2 (DQ278554)
S1
Arc-Jul-K36
QY-A50 (EF207226)
WBF050405_42P1D1 (FJ227735)
S2
BGA-337 (EU590348)
WBM050405_45P2A1 (FJ227760)
Arc-Jul-A11 (4)
Arc-Jul-O10 (7)
Arc-Jul-K3 (9)
Arc-Jul-J1 (10)
Band i
S3
Arc-Jul-J18
MamSp.H08 (EU239976)
3059-A-12 (EU885660)
Nitrososphaera gargensis (EU281317)
S4
CG I.1b
DI-22 (DQ278529)
Arc-Jul-S8 (1)
DI-4 (DQ278515)
S18-A-16 (EU025177)
Arc-Jul-J7
M1
Nitrosopumilus maritimus (EU239959)
Arc-Jul-O1 (10)
Arc-Jul-J2 (1)
Arc-Jul-L57 (22)
PLANTB AR DN OTU5 (EU852705)
PLANTC AR AC OTU3 (EU852672)
Arc-Jul-A4 (14)
Arc-Jul-K5 (2)
Band iii and iv
M2
CG I.1a
Nitrosocaldus yellowstonii (EU239961)
0.05

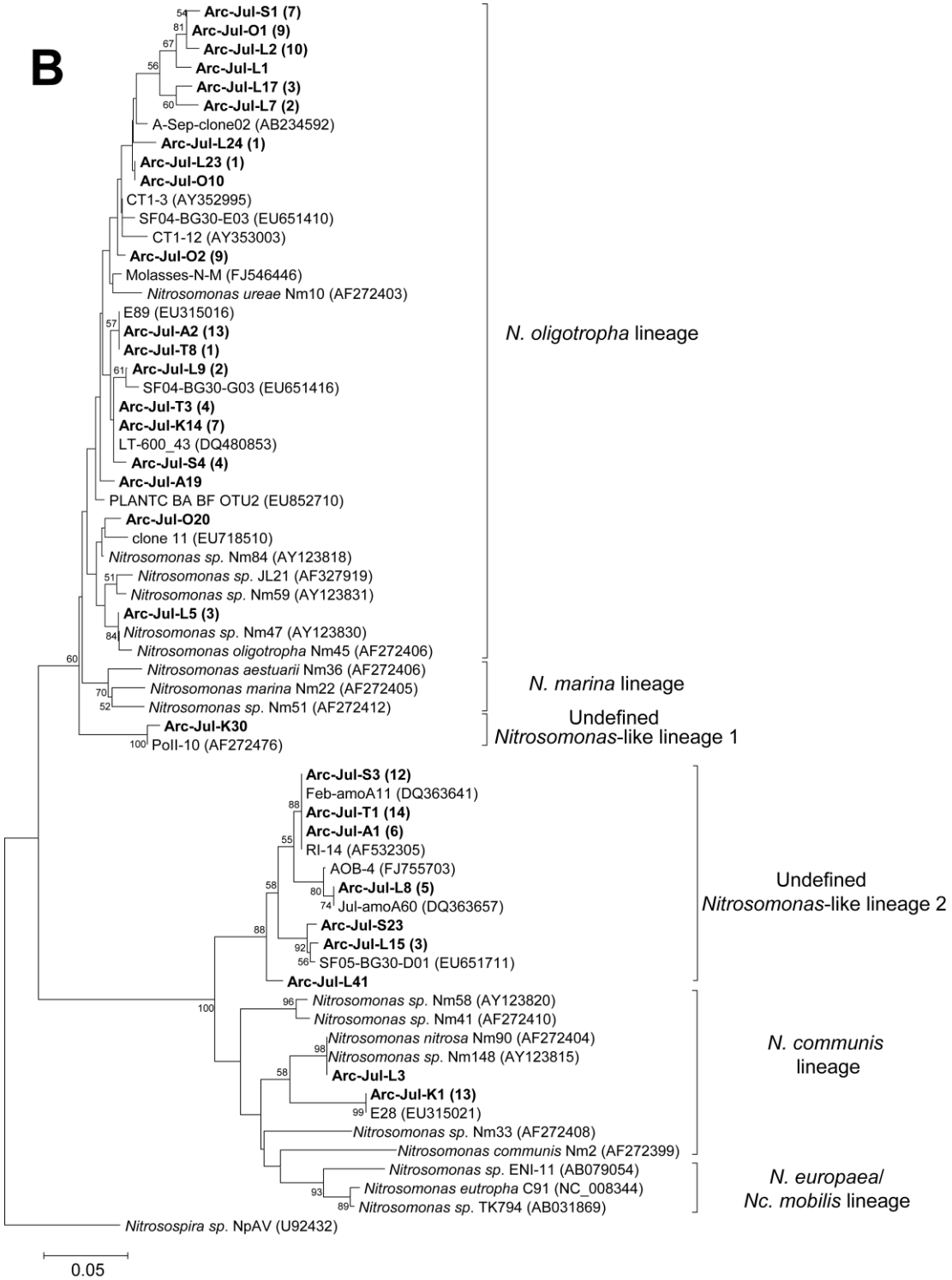


图 4-11 表层沉积物中 AOA（A）和 AOB（B）的系统发育树*

*太湖序列以黑体表示，并加前缀 Arc-Jul-（AOA）或 Bac-Jul-（AOB），序列后的数字表示该 OTU 中包含的序列数；节点处的数字为 Bootstrap 值。

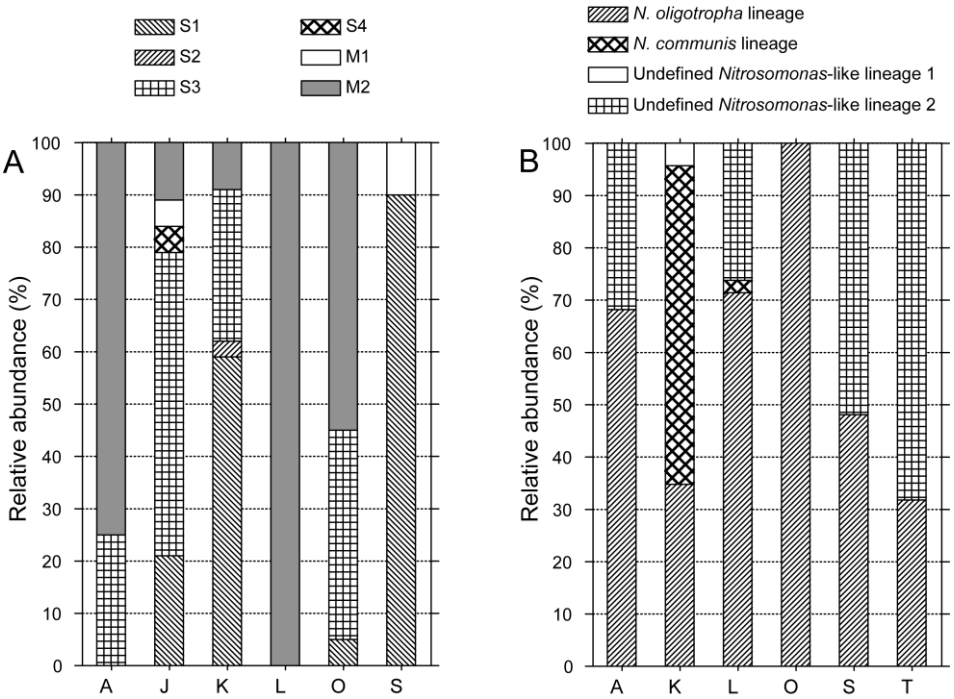


图 4-12 沉积物中古菌 *amoA*（A）与细菌 *amoA*（B）的相对丰度

四、厌氧氨氧化细菌群落结构

采用表 4-1 中所列引物对 Pla46f/1392r 和 Amx368f/AmxBS820r，对太湖 20 个样点样品进行巢式 PCR 扩增，有 11 个获得扩增（图 4-13）。有 8 个样本获得明显高于预期大小（478 bp）的片段。克隆测序后发现，该序列与厌氧氨氧化细菌 16S rRNA 序列较为接近。

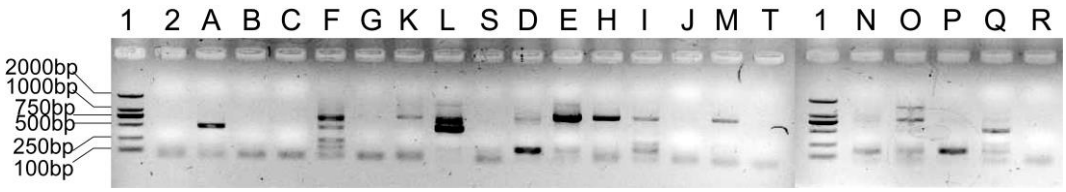


图 4-13 沉积物 anammox 细菌 16S rRNA 基因扩增结果

1：DL2000 分子量标记；2：阴性对照；A－R：各样本扩增结果

对太湖 A、E、L、O、Q 等 5 个表层沉积物样品中符合预期的片段进行了克隆测序分析，获得的所有 91 个序列均属于厌氧氨氧化细菌中的第一亚群（subgroup），即由 *Kuenenia*、*Brocadia*、*Jettenia* 和 *Anammoxglobus* 组成的亚群（第二亚群由 *Scalindua* 组成）（Woebken 等，2008）（图 4-14）。这些结果与化学测定的活性一起，证实太湖沉积物中存在厌氧氨氧化细菌。

在所有 91 个 16S rRNA 基因序列中，仅有样本 O 的 2 个序列属于 *Brocadia*，与淡水环境较为常见的 *Brocadia fulgida* 相似性达 97%。其余 89 个序列形成两个稳定的分支，这里分

别命名为 Taihu group I (TGI)和 Taihu group II (TGII) (图 4-14)。TGI 在样点 A 占据绝对优势，也出现在样点 E 和 O（图 4-15），与厌氧氨氧化细菌已知 5 个属的相似度达 86－93％。TGII 在样点 E、L、O、Q 占据优势，分支内的相似度达 94－100％。TGI 和 TGII 可能代表了两类新的厌氧氨氧化细菌。

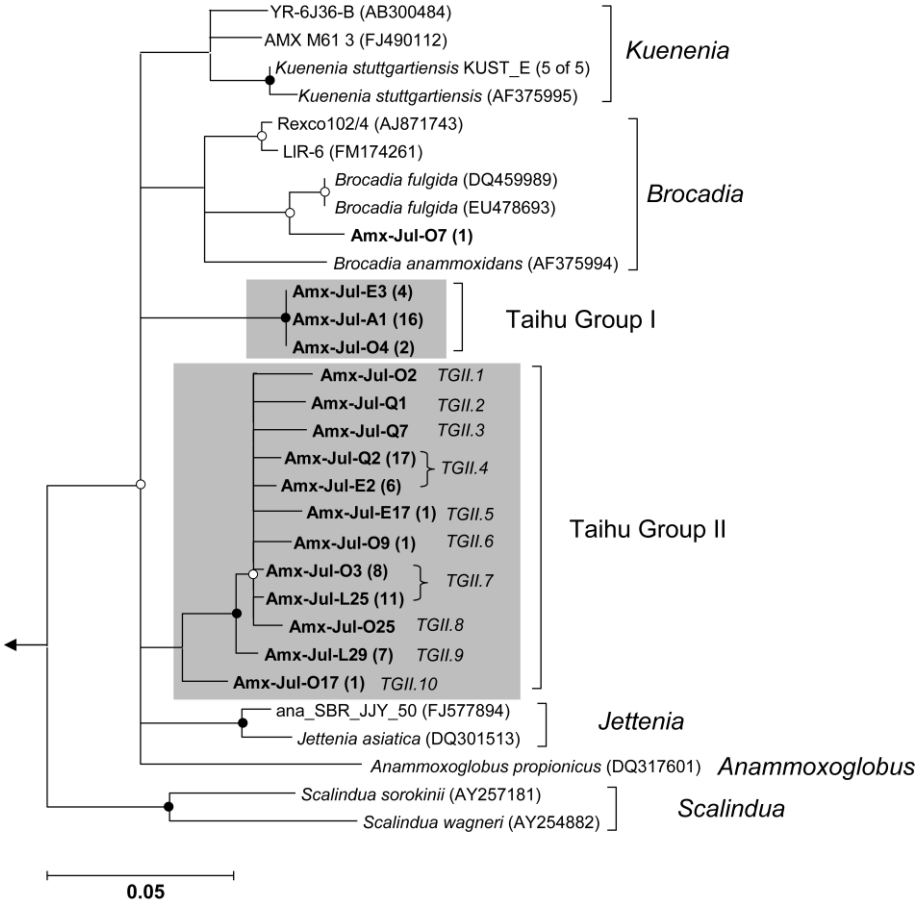


图 4-14 沉积物厌氧氨氧化细菌的分子发育树*

*图中，以 *Planctomyces maris* DSM 8797T (AJ231184)作为外群（outgroup）。本研究中获得的序列前缀 Amx-Jul-，粗体表示。每个序列后括号中的数字表明同一 OTU（1％序列差异）包含的序列数。节点处的●和○分别表示大于 90％和 70％的 bootstrap 值（maximum-likelihood method）。Bootstrap 值低于 70％时以多分支（multifurcations）表示

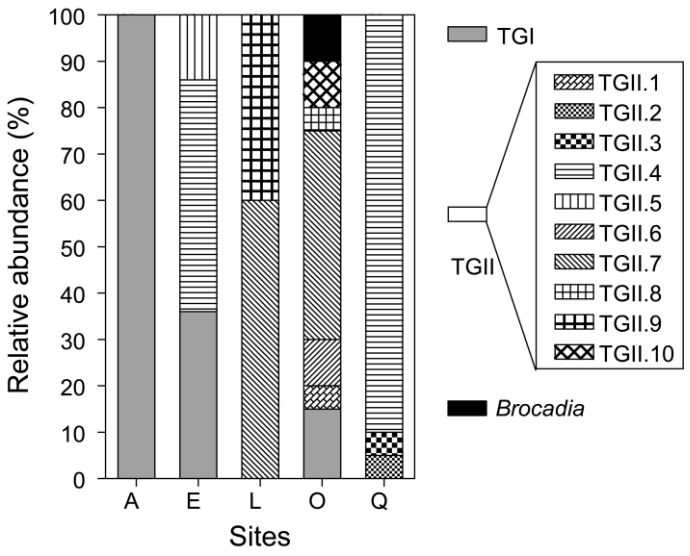


图 4-15 表层沉积物中厌氧氨氧化细菌的相对丰度*

*Taihu Group 的命名参见图 4-17

在微多样性（microdiversity）层次，太湖沉积物中的厌氧氨氧化细菌群落具有较高的异质性。比如，基于 3%的序列差异水平（$OTU_{0.03}$），L 和 Q 样点的厌氧氨氧化细菌群落完全相同，但如果基于 1%的序列差异水平（$OTU_{0.01}$）则完全不同（图 4-15）。通过分别计算 1%和 3%差异的 Jaccard (J_{abd})和 Sørensen (L_{abd})相似性指数（表 4-4），可以发现在微多样性（1%序列差异）的层次，不同样点间 anammox 细菌群落间很少重叠，根据∫-Libshuff 中的 Monte Carlo 检验，仅 O 和 E 之间没有显著的差异（$P > 0.05$）。因此说明，在太湖不同的样点存在着不同的厌氧氨氧化细菌群落。然而，当 OTU 基于更高的序列差异时（如 3%），样点 E、L、O、Q 之间的 L_{abd} 大于 0.5（表 4.2），即对于成对克隆文库中的特定序列，有高于 50%的可能同时出现于两个文库之中。

表 4-4 太湖表层沉积物中厌氧氨氧化细菌 16S rRNA 克隆文库间的 Jaccard 和 Sørensen 相似性指数 [a]

	A	E	L	O	Q
A		0.36 (0.36)	0 (0)	0.15 (0.15)	0 (0)
E	0.53 (0.53)		0 (0.64)	0.24 (0.80) *	0.47 (0.64)
L	0 (0)	0 (0.78)		0.28 (0.65)	0 (1.00)
O	0.26 (0.26)	0.39 (0.89) *	0.44 (0.79)		0.10 (0.65)
Q	0 (0)	0.64 (0.78)	0 (1.00)	0.18 (0.79)	

[a] 表中右半部分是 Jaccard 指数，左半部分是 Sørensen 指数。括号内和括号外分别根据 $OTU_{0.03}$ 和 $OTU_{0.01}$ 计算。*标注的表明两个文库间没有现属性差异（$P >$

0.05）。

基于 $OTU_{0.01}$ 的 Rarefaction 分析，Chao 1 指数和 Shannon-Wiener 多样性指数分别见图 4-16 和表 4-5。样点 O 的多样性最高，其他 4 个样点多样性较低，尤其是样点 A，仅有 1 个 OTU。考虑到这 5 个样点的地理环境的异质性，推测厌氧氨氧化细菌的多样性可能与沉积物中的环境因子相关。

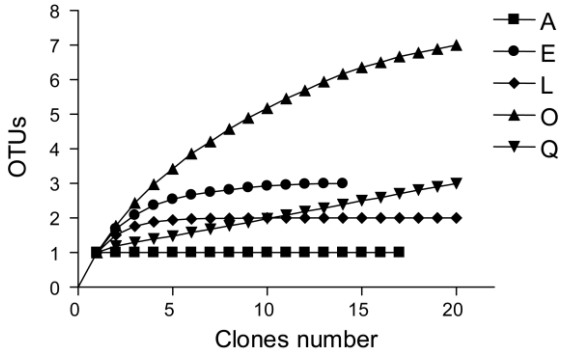


图 4-16 环境异质性沉积物样点中厌氧氨氧化细菌的 Rarefaction 曲线

表 4-5 沉积物中厌氧氨氧化细菌的多样性分析 [a]

	样　点				
	A	E	L	O	Q
序列数	17	14	20	20	20
OTUs	1	3	2	7	3
Chao1	1	3	2	7.3	3.1
Shannon-Wiener 指数	0	0.99	0.67	1.63	0.39

太湖沉积物中优势厌氧氨氧化细菌（TGI 和 TGII）的分布差异可以用底物有效性来解释。如表 4-6 所示，TGI 和 TGII 序列的相对比例与厌氧氨氧化的底物（NH_4^+-N 和 NO_2^--N）存在显著的关联。TGI 更倾向于富含 NH_4^+和 NO_2^-的环境（如样点 A），而 TGII 正好相反。

表 4-6 厌氧氨氧化细菌类群和环境因子间的关联 [a]

	TOC	TP	TN	$[NH_4^+]$-N	$[NO_2^-]$-N	$[NO_3^-]$-N	Chl a	pH
TGI (%)	0.522	0.026	0.518	***0.954***	***0.897***	0.708	0.382	-0.828
TGII (%)	-0.487	0.020	-0.479	***-0.927***	***-0.926***	-0.673	-0.304	0.802

[a] Pearson 相关，粗斜体表明显著相关（$P < 0.05$）

同一生境中极少发现不同的厌氧氨氧化细菌，不同 anammox 细菌有其特定的生境要求。例如，当同一泥样分别添加乙酸盐或丙酸盐进行富集培养，结果获得的优势物种分别为 *Brocadia fulgida* 和 *Anammoxoglobus propionicus*（Kartal 等，2008），这些发现证实不同厌氧氨氧化细菌的生态位分离现象。但是，在包括湖泊在内的淡水生态系统中，厌氧氨氧化细菌生态位分离的关键环境因子尚不明确。有研究通过测定厌氧氨氧化速率指出氨的供应影响厌氧氨氧化过程的活性（Risgaard-Petersen 等，1997），证实底物供应对于厌氧氨氧化群落调控的作用。TGI 和 TGII 分别适应不同的铵及亚硝酸根含量的生境，反映底物可能是导致富营养化湖泊沉积物中中厌氧氨氧化生态位分离的关键因子。

第三节 表层沉积物的硝化与反硝化潜力

氮的来源、转化和归趋是影响湖泊生态系统结构和功能的重要因素。由于氮的循环转化依赖于微生物和酶系统的参与，受环境条件及底物的影响，且存在气、固、液三相转化，使得氮循环过程极其复杂,其中反硝化和硝化过程是研究者最为关注的两个过程，前者是直接的脱氮过程，因此对水体氮的收支具有较大影响；后者是将氨态氮依次氧化为亚硝态和硝态氮的过程。

一、反硝化速率分布

反硝化过程是微生物主导的过程，在这一过程中 NO_3^-还原成 N_2O 或 N_2，异氧微生物即反硝化菌在这一过程中起着主导作用（Payne，1973），反硝化过程在湖泊氮的收支中起着关键的作用（Cavari and Phelips，1977）。由于沉积物的反硝化作用代表着氮从水生生态系统中永久性去除，所以在氮的输出这一点上反硝化过程至关重要（Seitzinger, 1988; Sjodin et al., 1997）。

利用经典的乙炔抑制法研究了太湖梅梁湾反硝化作用的特征及其限制因子，研究反映太湖梅梁湾（湾内和湾外）反硝化速率具有明显的季节性特征（图 4-17），夏季和初秋季节反硝化速率较低，春季具有较高的速率。在内湾，反硝化速率的浮动范围为 2.8 到 51.5nmolN_2/(g.h),最高的速率出现在 3 月;在外湾，反硝化速率的浮动范围为 1.5 到 81.1 nmolN_2/(g.h)，最高的速率出现在 4 月。反硝化速率与水柱中 NO_3^--N 浓度显著正相关关系（$p<0.05$），说明水柱中 NO_3^--N 浓度是太湖梅梁湾反硝化速率关键的限制因子。这个结论与采用氮 15 同位素示踪，结合同位素配对法（IPT）计算的总反硝化速率与水柱硝酸盐浓度正相关的结论一致。而利用 IPT 法，我们还区分了水柱中硝酸盐含量对反硝化过程的影响机制。季节性硝酸盐的浓度变化主要影响了沉积物非耦合反硝化过程（水柱硝酸盐被有机碳还原），而沉积物耦合反硝化过程与水柱硝酸盐含量无关。

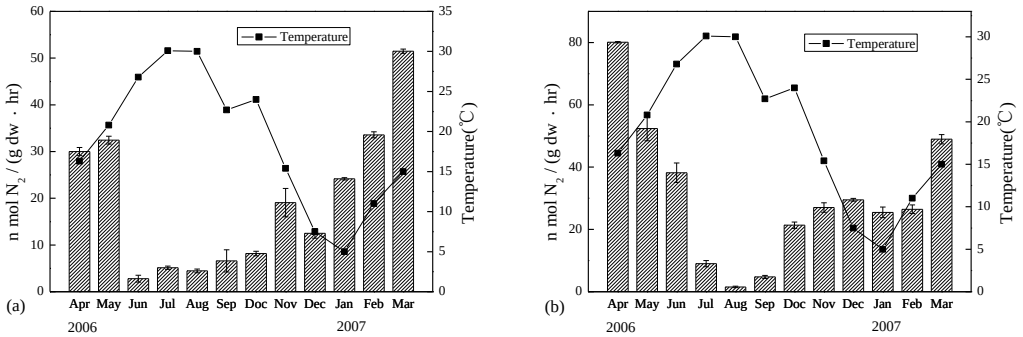


图 4-17 太湖梅梁湾沉积物平均反硝化速率年变化（2006-2007）

(a) 湾内; (b) 湾外

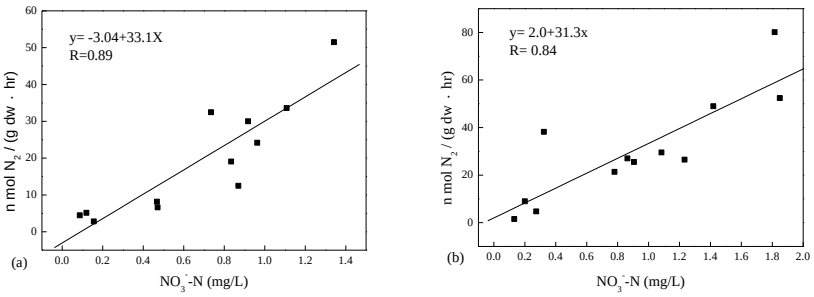


Fig. 4-18 沉积物反硝化速率与 NO_3^--N 含量间的线性关系

(a) 湾内; (b) 湾外

二、硝化潜力分布

硝化潜力（PNR）是微生物以氧为电子受体，将氨态氮依次氧化为亚硝态氮和硝态氮的能力。对于沉积物界面环境，硝化作用是沉积物-水界面氮迁移转换的重要形式之一。

2008 年 7 月 20 至 21 日和 2009 年 1 月 16 至 17 日以同样方法在太湖的 20 个样点（图 4-6）采集表层沉积物样品，测定沉积物的潜在硝化活性（potential nitrification rate, PNR）。将 5.0 g 沉积物（鲜重）加入含 20 ml PBS 缓冲液的无菌离心管，并加入 1 mM 的$(NH_4)_2SO_4$作为氨氧化底物。在 25 ℃ 暗处培养 12 h 后，用 5 ml 2M KCl 提取并测定沉积物中的亚硝态氮，计算单位时间、单位重量沉积物产生的亚硝态氮作为 PNR（Kurola 等，2005）。

统计 20 个沉积物样品的主要理化性质（表 4-7），不同形态氮变化结果反映（图 4-19），东太湖表层沉积物中氮形态及其含量比较特殊，其它 5 个湖区则比较相似。主要表现为东太湖沉积物的 TN 和 NH_4^+-N 最高，NO_3^--N 和 NO_2^--N 最低。

东太湖是太湖东南部的一个草型湖湾，高强度的围网养殖和大型水生植物的过度生长加速了东太湖的淤积，并向沼泽化发展。因此，东太湖是太湖沉积物氮污染生态风险最高的区域之一，仅次于五里湖。东太湖沉积物除了具有最高的 TN、铵态氮外，还具有最高的 TOC、Chl a 以及最低的 pH 值，PCA 分析也明显反映出在氮的形态及其含量方面，东太湖是最特殊的区域之一（图 4-20）。

表 4-7 太湖表层沉积物理化性质与 PNR [a]

Table4-7 Physical and chemical properties of surface sediments from Taihu Lake [a]

	TOC g/kg	TP g/kg	TN g/kg	$[NH_4^+]$-N mg/kg	$[NO_2^-]$-N mg/kg	$[NO_3^-]$-N mg/kg	Chl a ug/g	pH	PNR μg $[NO_2^-]$-N g^{-1} dry sediment h^{-1}	生态类型
A	11.03	0.72	1.10	66.3	0.38	2.50	5.35	7.4	5.92 ±1.30	藻型
B	9.66	0.67	0.97	53.3	0.40	2.41	2.41	7.7	6.53 ±1.14	藻型
C	6.96	0.57	0.69	33.3	0.28	2.07	1.07	7.7	1.71 ±0.97	藻型
D	6.86	0.62	0.68	26.3	0.17	0.86	1.07	7.5	2.67 ±0.79	藻型
E	14.94	1.13	1.49	28.8	0.22	0.94	6.95	7. 5	2.04 ±1.32	藻型
F	8.12	0.57	0.81	15.6	0.24	1.99	0.80	7.6	9.33 ±1.33	藻型
G	7.69	0.53	0.77	43.6	0.22	1.40	1.34	7.6	5.22 ±1.77	藻型
H	7.92	0.64	0.79	29.4	0.26	1.25	1.34	7.7	4.51 ±0.74	藻型
I	7.35	0.64	0.75	43.1	0.17	0.83	2.94	8.0	8.99 ±3.77	藻型
J	8.20	0.60	0.82	13.2	0.12	0.57	0.80	7.4	1.37 ±0.58	藻型
K	9.32	0.87	0.93	68.1	0.26	1.13	11.49	7.4	4.53 ±0.88	藻型
L	7.05	0.89	0.71	12.7	0.22	1.83	5.08	7.6	0.26 ±0.40	草型
M	13.03	0.57	1.30	36.9	0.21	0.91	4.54	7.7	0.39 ±0.09	草型
N	17.29	0.67	1.73	32.0	0.22	0.12	7.48	7.2	0.50 ±0.23	草型
O	6.87	0.63	0.66	14.3	0.28	0.62	1.60	7.7	3.55 ±0.74	草型
P	11.43	0.62	1.14	16.2	0.17	0.30	3.74	7.5	0.26 ±0.07	草型
Q	7.06	0.61	0.71	24.4	0.21	0.47	3.21	7.8	0.71 ±0.16	草型
R	7.23	0.62	0.72	23.8	0.33	1.05	1.87	7.8	no data	草型
S	37.39	1.04	3.74	142.6	0.15	0.85	11.76	7.0	0.77 ±0.18	草型
T	21.89	0.64	2.19	83.1	0.14	0.13	15.24	6.8	0.39 ±0.09	草型

[a] 理化性质系 2008 年 7 月样品数据；PNR 系 2009 年 1 月样品数据

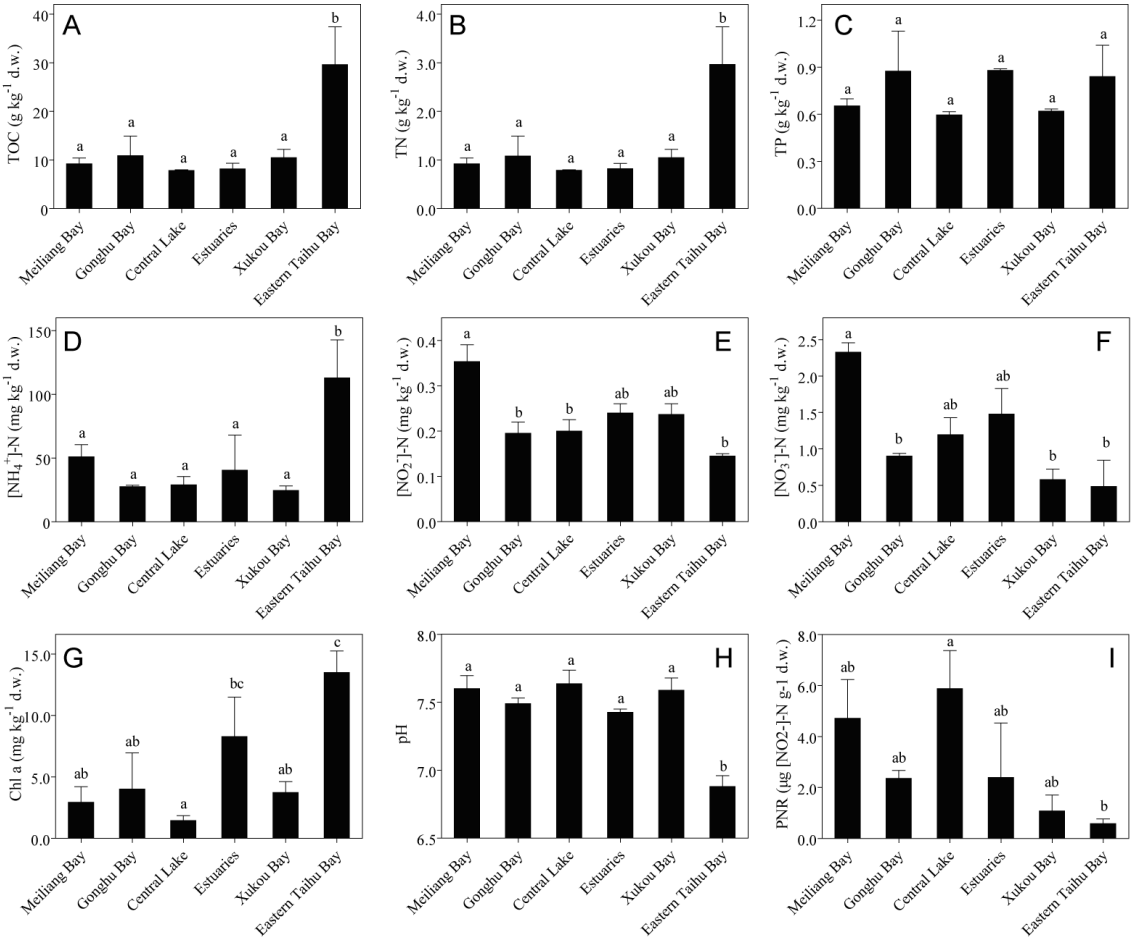


图 4-19 太湖表层沉积物理化性质与 PNR 的空间变异*

* (A) TOC, (B) TN, (C) TP, (D) $[NH_4^+]$-N, (E) $[NO_2^-]$-N, (F) $[NO_3^-]$-N, (G) Chl a, (H) pH, (G) PNR. 根据地理位置，将 20 个样点分为 6 组，分别是：梅梁湾（A－C）、贡湖湾（D、E）、湖心（F－J）、河口区（K、L）、胥口湾（M－R）、东太湖（S、T）。图中不同的字母表示存在显著差异（P< 0.05）

在各湖区水体中，氨呈现有规律的年度变化，总体上为冬季最高，夏季至秋季最低；在沉积物中也有类似规律，总氮和铵氮多表现为冬季高而夏季低。这一现象与夏季温度高、硝化细菌活性高、氨氮经过硝化转换量大有直接关系。而在冬季死亡的水生动植物残体沉降至沉积物，虽然降解慢，但是厌氧不完全降解的主要产物之一氨氮因硝化活性低而会产生积累，另外一方面，低温也不利于氨氮自沉积物向水体释放，因此水生动植物残体转化的氨氮在沉积物中的赋存表现出明显的冬季高、夏季低的特征。

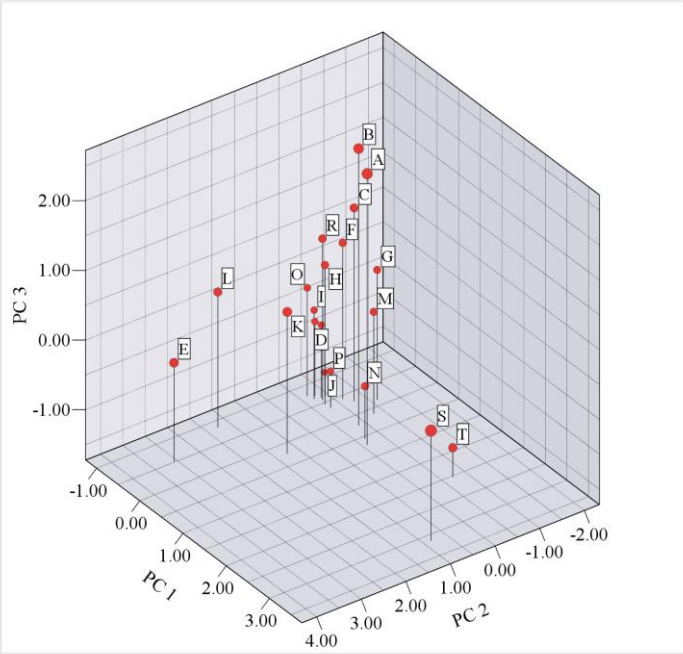


图 4-20 太湖表层沉积物理化性质的 PCA 分析(前三个主成分（PC）合并解释了 87.1％的总变异)

PNR 可反映沉积物中好氧氨氧化原核生物的活跃程度，对太湖沉积物的硝化潜力（PNR）分析显示，太湖草型湖区的 PNR 为 0.85 ± 1.11 μg [NO_2^-]-N g^{-1} d.w. h^{-1}，藻型湖区 PNR 为 4.80 ± 2.76 μg [NO_2^-]-N g^{-1} d.w. h^{-1}，两者之间存在极显著的差异（$P < 0.01$）。最高和最低的 PNR 分别出现在湖心区和东太湖（图 4-19）。但是，并未发现 PNR 与沉积物理化因子间存在显著相关性。

三、温度及碳源差异影响

温度对沉积物反硝化速率具有一定影，沉积物反硝化速率随着培养温度升高而升高（图 4-21），反映沉积物反硝化速率受温度的限制。反硝化细菌活性对温度具有较宽的最佳适应范围，一般认为 20-37℃时反硝化细菌具有最佳的生物活性，因此，季节性的温度变化对反硝化速率将产生重要影响。冬季初春虽然太湖水体中硝酸盐较为充分，但低温对湖泊水体硝酸盐的反硝化去除不利。

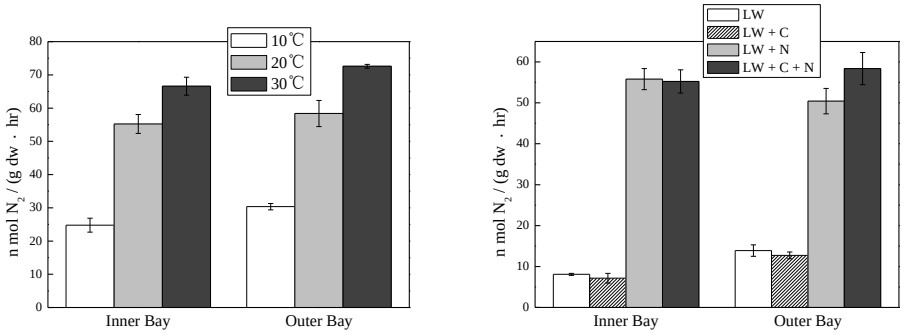


图 4-21　温度(左)、葡萄糖和硝酸根(右)对反硝化速率的影响

有机质是反硝化过程中的电子供体，其含量对氧气和硝酸盐两种电子受体代表的底泥呼吸作用及异养反硝化过程的竞争产生影响。有机质含量较高的沉积物其反硝化相对较强。对太湖的沉积物反硝化研究发现，当添加葡萄糖（易利用碳源）为碳源时，沉积物反硝化速率无显著增加（图 4-19）。当添加草酸盐后，3 个样点水土界面的脱氮速率仅有小幅增加，但经 T 检验分析后未达到统计显著水平。沉积物中有机碳水平较高（3%－6%），大大高于海洋沉积物的有机碳水平，因此，海洋沉积物反硝化通常受电子供体－有机碳的限制的特征在湖泊中并不显著。

表层沉积物的溶氧水平在很大程度上决定了沉积物的反硝化潜力。反硝化层深度局限在含氧层向无氧层转化的几个 cm 内。利用微溶解氧电极测定太湖梅梁湾北部河口区溶氧侵入深度最低，仅为 3.5mm，较浅的溶解氧层反映出反硝化层位较浅，上覆水硝酸盐向反硝化层位迁移距离最短，越有利于非耦合的反硝化过程发生。而梅梁湾外溶解氧侵入深度达 9.5mm，非耦合反硝化的速率最低。

沉积物反硝化过程一般发生在距离湖泊水－土界面几毫米到几厘米之间较薄的沉积物缺氧层内，这一深度恰恰是底栖动物赋存密度最大，生物扰动最为强烈的层位。大量底栖动物赋存于上层沉积物，发生各种生物扰动形式（如摇蚊钻穴、水丝蚓引灌等），势必强烈改造反硝化层的深度和空间分布特征，改变反硝化底物在沉积物中的垂向分布，使得在这些生物扰动因素叠加下的反硝化模式更加复杂。

沉积物污染较高的北部湖区底栖动物，特别是摇蚊和水丝蚓等耐污种的密度远高于湖心区。如位于梅梁湾河口区和竺山湖总反硝化速率分别为 212.3 μmol/(m^2 ·h)和 229.5 μmol/(m^2 ·h)，其中非耦合反硝化的比例分别为 76.4%和 69.6%，为全太湖最高的区域，而湖心区总反硝化速率仅为 38.4μmol/(m2 ·h)，而其反硝化产物主要来源于沉积物耦合的硝化－反硝化产物。反硝化总速率以及耦合与非耦合两种反硝化过程的比例差异在不同湖区如此之大，不仅仅是因为水体氮负荷及反硝化微生物和酶活性的差异，生物扰动造成的界面环境条件的差异也是不可忽视的因素。

第四节 沉积物中生物体对氮循环微生物分布和多样性影响

一、沉降蓝藻影响

蓝藻水华逐渐成为一个全球性的水体生态环境问题。蓝藻水华暴发、沉淀和降解，降低水体透明度以及消耗水体中溶氧等，在太湖还出现一种被称为“黑水团”的现象，使得一些水生动物死亡。由于光照和氧气的渗透有限，蓝藻水华使得沉积物表层接收到的光照极其有限，氧气的缺乏，使氨氧化活性降低，大量营养物质被释放到沉积物中，使沉积物中可利用性有机物显著增加，对微生物群落结构和活性有重要影响。另外，藻类的沉淀导致表层沉积物硝化活性的降低，氨氮增加，影响沉积物中氨氧化原核生物的群落结构和多样性。因而，蓝藻水华暴发，致使湖底生物地球化学过程剧烈变化，对氨氧化原核生物的分布和群落等必将产生显著影响。沉积物作为氮素营养物的“源”和“汇”，其中的一些氮转化过程，如氨氧化过程可以直接或者与其它氮转化过程耦合产生气体N_2离开水体，使环境中含氮量减低，影响湖泊氮平衡。

11 月份是我国东部地区湖泊藻类沉降比例最高的时期，这个时期的底栖生态系统研究将会有特别重要的意义。2008 年 11 月 19 日在太湖的竺山湾（120°14′1″E，31°27′0″N）采集沉积物柱状样进行蓝藻沉降影响试验，具体为：在上覆水中添加新鲜的微囊藻使藻浓度为 75mg/L（另外一根则保持原位条件作为空白对照），模拟黑暗室温（约 15℃），并用磁力转子搅动上覆水（约 60rpm），培养 10 天。去掉表面覆盖的蓝藻后，1-2cm 分样，冷冻保存（和第一节相同）。测定理化环境因子（ORP、pH、NO_x^--N、NH_4^+-N）。氨氧化原核微生物的分析和第一节相同。

物化分析表明，覆盖藻类与空白对照的两柱状样中，pH沿沉积物剖面没有明显的变化。添加藻类的柱中，仅5cm以上的较上层检测到NO_3^--N ，而空白柱整个剖面都检测到NO_3^--N含量。NH_4^+-N、NO_2^--N与ORP沿沉积物剖面的变化如图4-22所示。很明显，微囊藻的覆盖显著增加了沉积物中NH_4^+-N和NO_2^--N的含量，这个影响可以达到沉积物的近16cm处；表层沉积物的ORP动态受到藻类覆盖的显著影响，在14cm以上区域，藻类的覆盖总体上降低了沉积物的ORP。

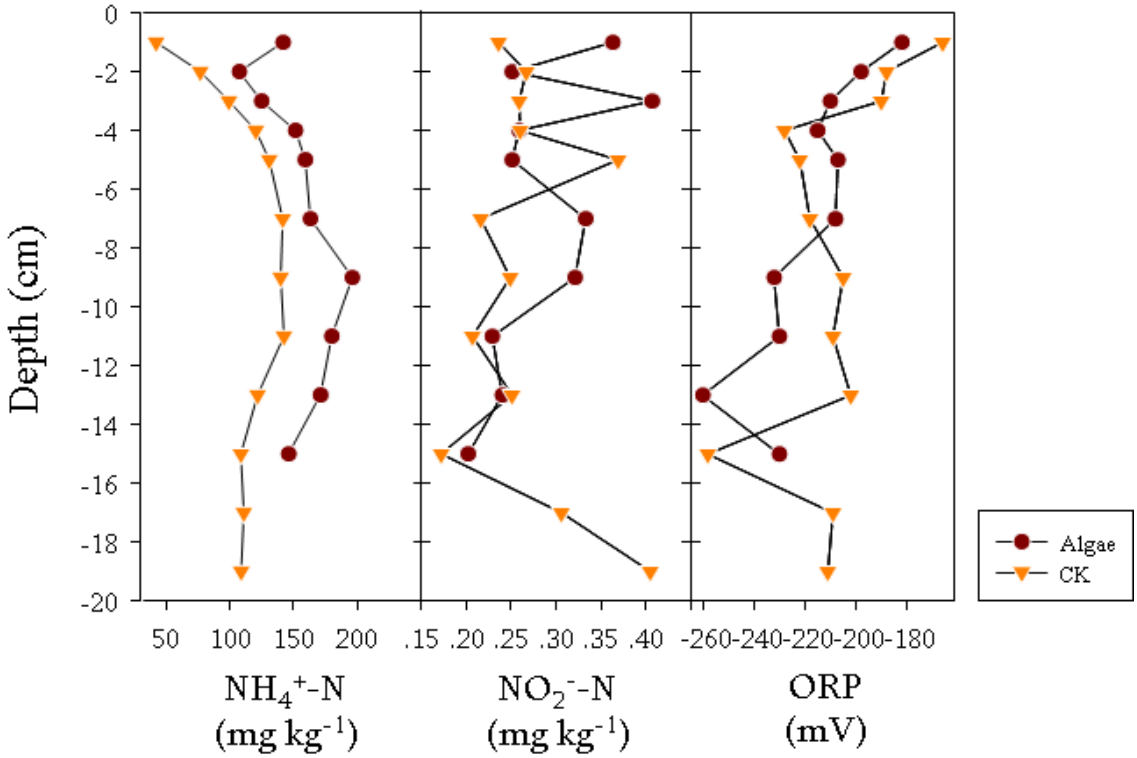


图4-22 蓝藻水华叠加前后，沉积物剖面环境因子的垂直变化

总细菌的DGGE图谱（图4-23）显示，各样品的DGGE剖面中大部分条带相同，15cm处有一条带变亮，可能提示某物种在此富集。深度1-15cm之间的平均条带数略高，但是无显著区别（图4-24），都是在5cm深度处得到最少条带数。从聚类分析（图4-25）可以看出，深度4-15cm之间的总细菌，在70%的相似度水平，可以聚为两大类群：深度4-13cm之间的总细菌聚在Cluster A（相似性约75%），并且C4-C13（覆盖藻类）之间（相似性约80%）较D4-D13（空白）之间（相似性约75%）的总细菌群落相似度略高，提示蓝藻水华叠加后，此深度之间的总细菌发生了较多的交换过程，或者是使某些细菌得到富集；C15和D15的总细菌（相似度约90%）聚在Cluster B，在下层同一深度（15cm深度处）的总细菌群落高度相似，说明蓝藻水华的叠加对沉积物中总细菌的影响程度受深度限制。从图4-25还可以看到一个现象，即对于任一沉积物剖面，相邻深度的样品聚在一起，相似度较高。这些结果提示在深度4-15cm之间总细菌群落组成具有某种垂直分布特征。另外，在此深度之间群落沿沉积物剖面的变化较小，且较下层（4-15cm）的总细菌群落，无显著变化。蓝藻水华叠加前后的沉积物剖面在深度4-15cm之间的营养都较丰富（图4-22），这是相应深度总细菌群落之间没有明显变化的重要原因。泥水界面样C1与D1的细菌群落相似度较低，仅约45%，说明蓝藻水华覆盖之后，对沉积物-水界面的总细菌群落产生了重要影响，其中可能与泥水界面的NH_4^+-N显著增加有关。

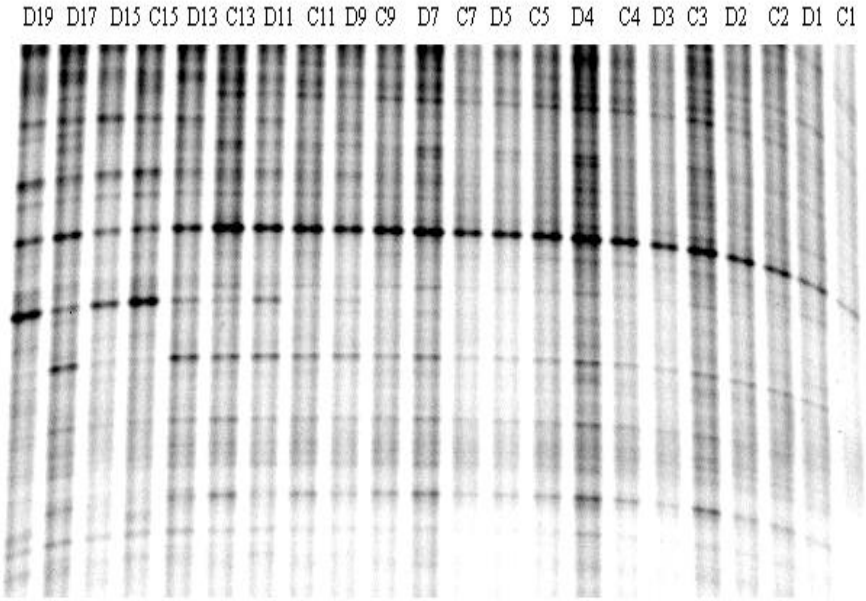


图4-23 沉积物样品中基于16S rRNA基因的总细菌结构DGGE分析（D为空白柱；C为覆盖蓝藻的柱；数字代表的是柱样的深度，cm）

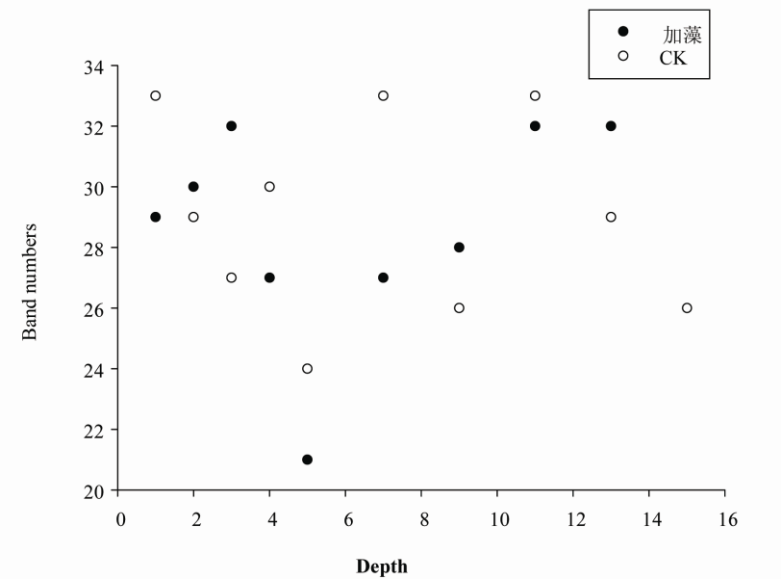


图4-24 蓝藻叠加前后总细菌DGGE图谱中条带数随深度的变化（CK为空白，D1-D19; 加藻：C1-C19）

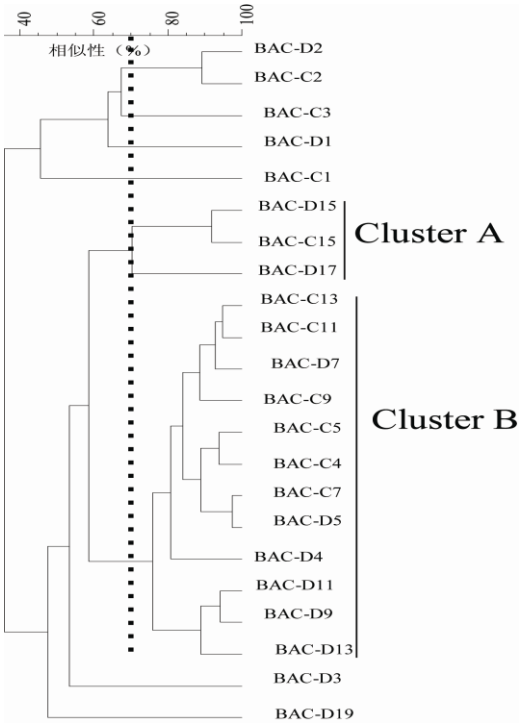


图4-25 各深度样品中总细菌的DGGE聚类分析

采用表4-1列出的引物与PCR条件，对所有样品中AOB的*amoA*基因进行扩增，获得强度不一的预期条带。考虑到氧对沉积物的渗透有限，NH_4^+-N和ORP的主要变化发生在泥深1－7cm之间，应用DGGE方法，对C1-C7（覆盖藻类）和D1-D7（不覆盖藻类）样品中AOB群落结构分析表明（图4-26），各样品中AOB的DGGE条带数都较少，说明它们的物种多样性较低。深度1－4cm之间的各样品，两个优势条带（1和2）是构成AOB群落的主要成分。但是，在D5中出现了新的优势条带，在D7中条带6成为主要的优势条带，条带1和2基本消失,说明蓝藻水华叠加前的沉积物中，AOB的群落结构在深度7cm左右发生显著变化，叠加后，沉积物剖面，在C5中条带2变弱或消失。聚类分析（图4-27）也表明，蓝藻水华叠加与否，深度1-4cm之间的AOB群落相似性较高，AOB的群落结构在－7cm发生了较大变化。Laanbroek等（2008）也发现在沼泽沉积物深度4-5cm之间，AOB的物种组成明显改变；同时，C5与D5以及C7与D7的AOB群落结构相似性都较低，表明蓝藻水华沉降有可能使得太湖较下层沉积物（-7cm）中AOB的垂直分布状况改变。

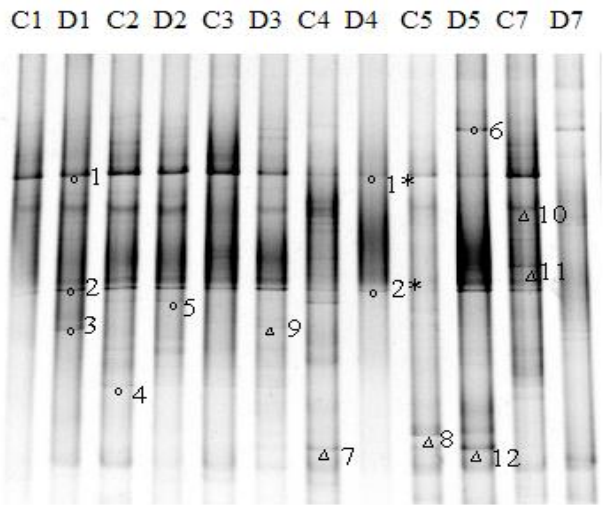


图4-26 各沉积物样品中AOB *amoA*基因的DGGE分析

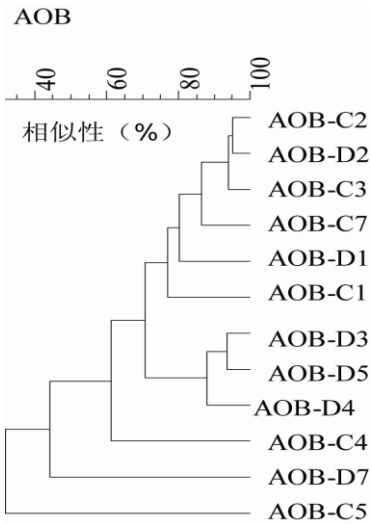


图4-27 各深度样品AOB的聚类分析

环境条件对于氨氧化反应具有重要的调控作用。ORP决定着氧化还原反应的发生方向，而NH_4^+-N是氨氧化反应的底物，其浓度可以指示氨氧化反应的强度。蓝藻水华叠加前后的AOB群落与环境因子的RDA中，第一与第二排序轴合并分别解释了78.3%、60.7%的群落结构变异（图4-28）。在RDA中，都是第一排序轴的变异占优势，其中，ORP的变化对第一轴贡献最多。覆盖蓝藻和未覆盖蓝藻的两沉积物剖面NH_4^+-N具有相似的垂直变化规律，且无论是否有蓝藻水华覆盖，

ORP与NH_4^+-N都呈显著负相关。在1-4cm的近表层沉积物中，还原性以及NH_4^+-N均迅速增加，AOB的群落结构则在1-4cm之间变化较小，且两个沉积物剖面的AOB群落变化也不明显。自4cm深度向下至7cm，两个沉积物剖面ORP和NH_4^+-N的变化都减缓，表现出蓝藻沉降前后AOB垂直分布出现了差异。

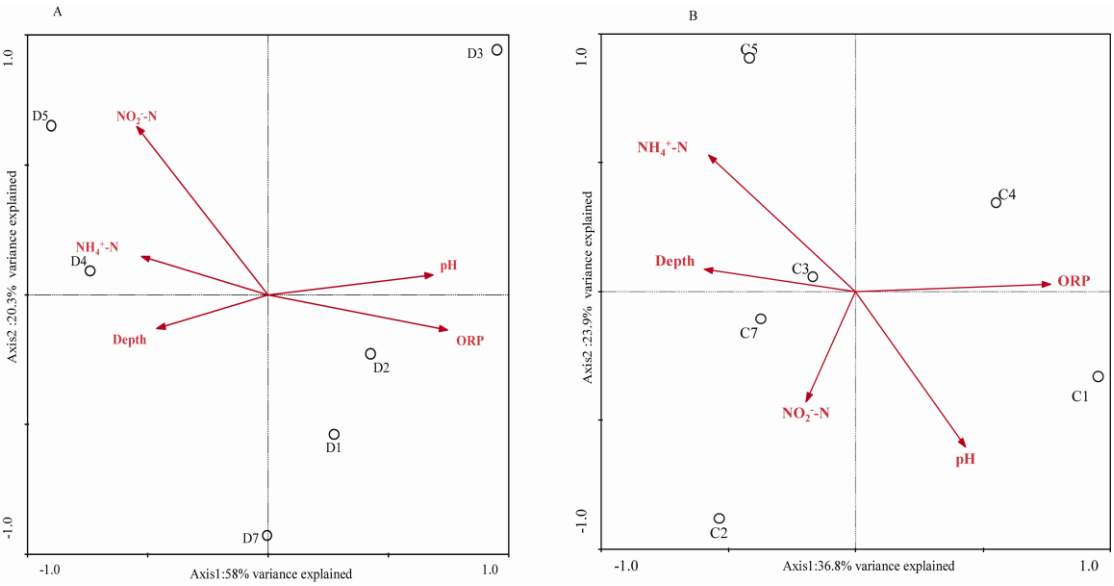


图4-28　AOB群落与深度（Depth）、pH、NH_4^+-N、NO_2^--N与ORP变化的RDA排序图

对所有分层样品AOA的*amoA*基因进行扩增和DGGE分析，可以分辨出多个条带（图4-29），表明AOA多样性较AOB高。聚类分析显示（图4-30），在约61%相似度水平，除了C1外，深度1-15cm之间的样品形成两大类群，D1-D7和C2-C11都聚在Cluster A，相似性约64%；D9-D15（另加D17和D19）与C13-C15聚在Cluster B，相似性超过82%，提示在此深度之间的AOA群落结构高度相似。根据聚类分析还可看出，深度7cm以下的样品，往往是相邻深度的样品聚在一起，而在较上层却没有类似规律，也可能与上层沉积物中理化因子的显著变化有关。蓝藻沉降使得上层的某些AOA物种发生向下移动，从而使AOA的垂直分布状态发生变化。但是这两个沉积物-水界面之间的AOA群落差异尤为显著（相似度仅约35%），这与表层AOB对蓝藻水华叠加的响应明显不同，却符合Schwarz等（2007）所报道的古菌对加藻响应的规律。这一结果显示，AOA和AOB群落发生重大变化和响应的深度差异与它们的生理代谢活性受影响有关。

没有覆盖蓝藻的情况下，RDA排序分析（第一和第二轴）仅能解释32.7%的群落结构变异（图4-31A），说明所测的各理化因子不是驱动AOA群落结构沿剖面改变的主要原因。而在覆盖了蓝藻的沉积物剖面样中，RDA分析（图4-31BB）中第一与第二排序轴合并解释了51.9%的群落结构变异，且ORP对蓝藻水华叠加后的沉积物中AOA群落结构有显著影响，提示该剖面13cm处ORP的显著增加可能是AOA群落发生变化的重要原因。

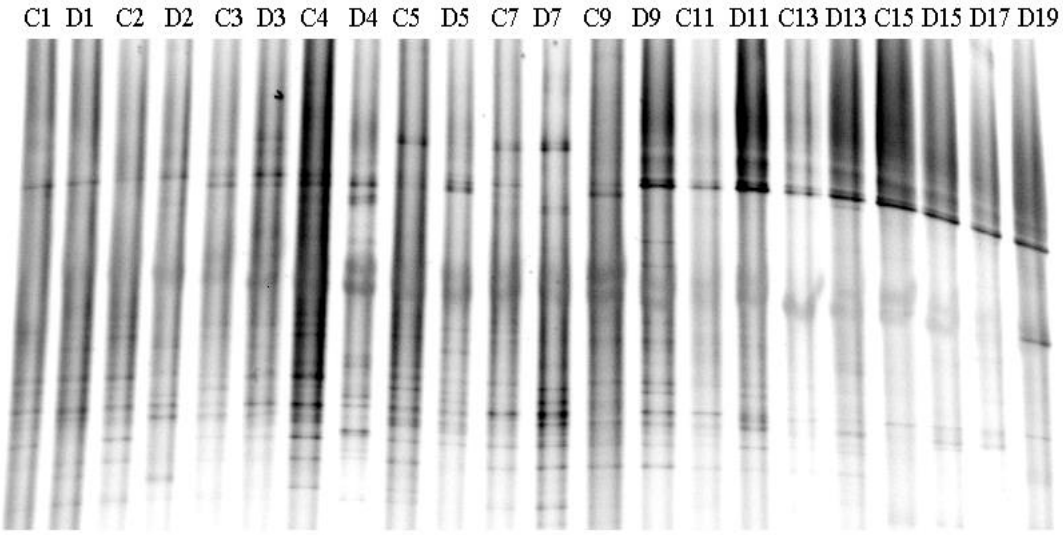


图4-29 沉积物样品中AOA *amoA*基因的DGGE分析

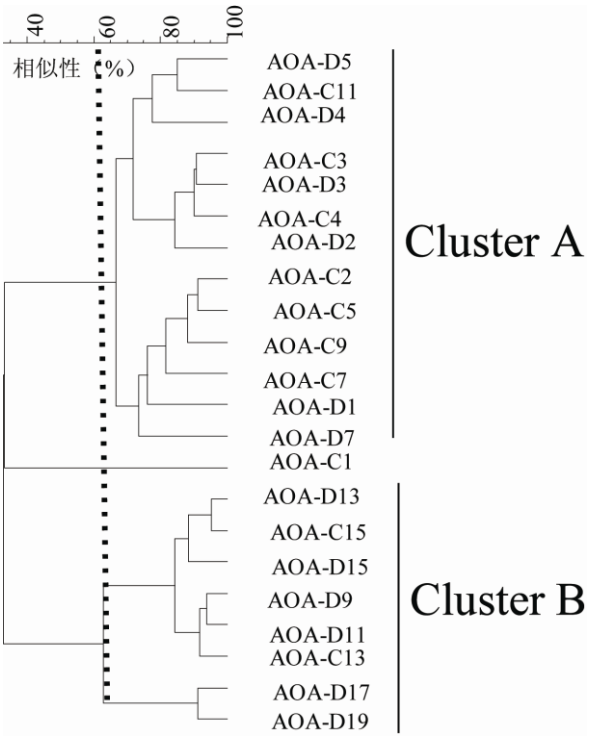


图4-30 各深度样品中AOA的聚类分析

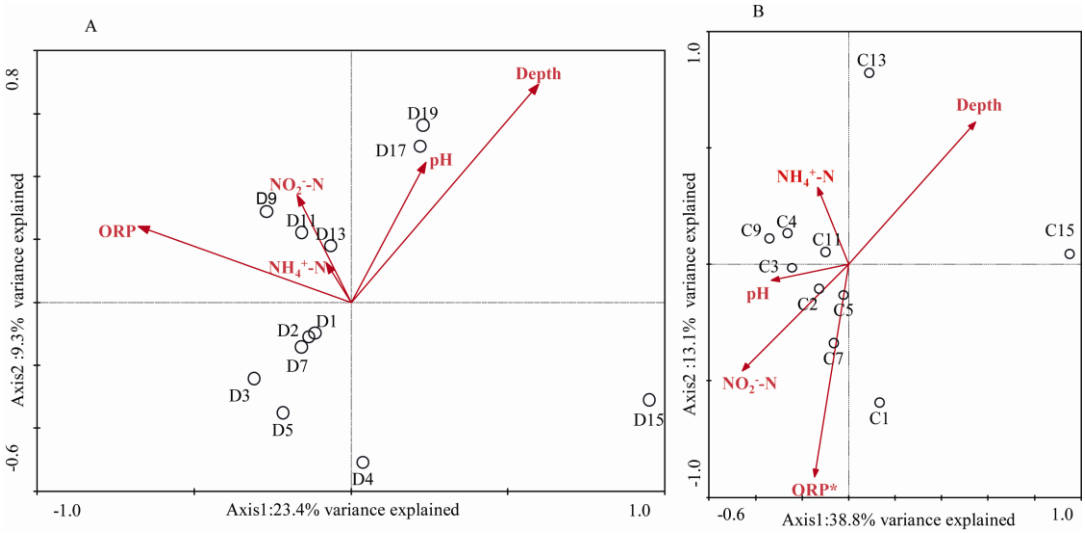


图 4-31 蓝藻水华叠加前后 AOA 群落与深度（Depth）、pH、NH_4^+-N、NO_2^--N 与 ORP 变化的 RDA 排序图,带*号的表示对群落结构有显著效应的环境因子(P<0.05)

二、水生植物根际影响

扎根于底泥中的水生植物不仅是湖水和底泥间营养元素交换的直接媒介，还能通过改变湖水的动力学状态和减小湖水对底泥的冲刷强度间接地促进营养元素由湖水向底泥的转移。由于植物的根系可以向外分泌营养物质，因此，水生植物根部是微生物集中和活跃的区域。尽管根着大型水生植物不仅可以通过其根茎部分吸收氮磷等物质，还可以通过其根系的吸收作用减轻底泥中的污染负荷。但是根据大量的物质平衡计算发现 N 的去除机制上占主导地位的是细菌的分解转化作用，水生植物的吸收起辅助作用，但由于植物形成了重要的根区微生态环境，这对于底泥特别是沉积物表层及近界面发生的硝化和反硝化作用非常重要。研究含氮污染物在水生植物区沉积物中的去除机理，必须了解不同植物根区环境中与 N 循环有关的特定微生物的群落结构特征。氨氧化细菌可以将氨氧化为亚硝酸，是硝化过程的第一步，同时也是整个硝化过程的限速步骤。反硝化细菌将硝化作用产生的无机氮盐(NO_3^-及NO_2^-)还原为气态的 N_2O 和 N_2，并释放到大气中，从而减轻了水体的氮负荷。因此硝化和反硝化作用对于富营养化湖泊的净化具有特别重要的意义。

2006 年 5 月 20 日于太湖五里湖水生植物修复区（图 4-32），选取 4 种根部着生在底泥中的水生植物为研究对象，其中 1 号点的芦苇(*Phragmites communis*)和 2 号点的窄叶香蒲(*Typha angustifolia L.*)代表挺水植物，3 号点 的菹草(*Potamogeton crispus L.*)代表沉水植物，4 号点的荇菜(*Limnanthemun nymphoides*)代表浮叶植物，同时选取工程区外无高等水生植物生长的区域作为对照点。采用最大或然数(most probable number，MPN)方法分析样品中氨氧化细菌的数量，采用针对 AOB16S rRNA 基因的特异引物，巢式 PCR-DGGE 分析细菌群落结构，通过对主要 DGGE 条带的回收测序，进行种类鉴定（参见第二节）。

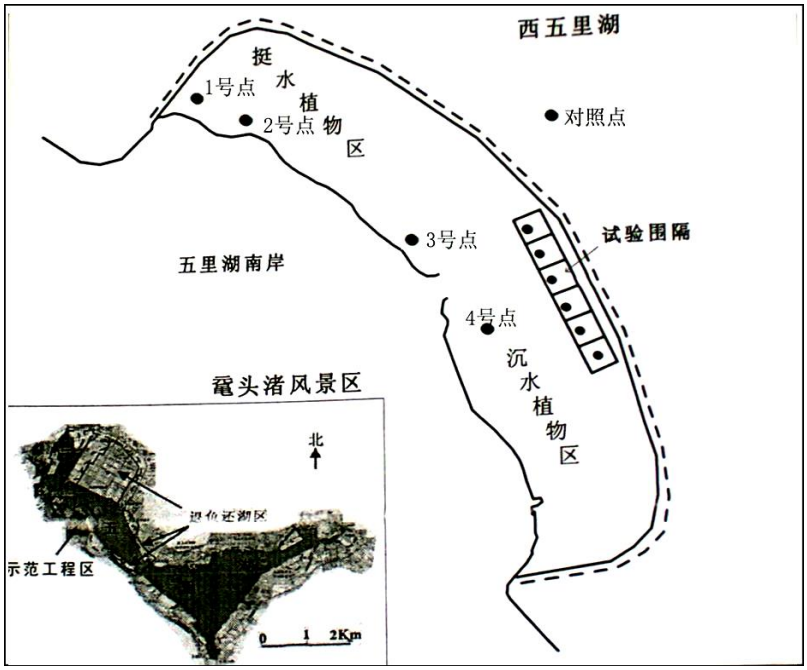


图4-32 围隔示范工程及采样点位置

芦苇和窄叶香蒲 均为多年生挺水植物，沉积物中的地下茎发达，蔓延成群，地上部分的生物量较高，分别达到 1000 和 800 g/m^2。菹草为多年生沉水植物，夏末麦黄季节植物逐渐死亡，同时形成冬芽，冬季发芽生长，春季即形成草丛群落。菹草地上部分的生物量也较大，估计在 450 g/m^2 左右。荇菜叶部浮于水面，地下茎生底泥中，地上部分的生物量估计为 100 g/m^2 左右。对水生植物根区及表层沉积物氧化还原电位的测定显示，水生植物根区 ORP > 0，即呈氧化环境，同时芦苇和窄叶香蒲根区 ORP 要高于菹草和荇菜。无草着生的沉积物表层(1－5cm)呈现弱还原条件，表层之下(6－10cm)还原性增强。根区及无草着生的沉积物表层的 pH 值均大于 7，且表层沉积物碱性更强。表层沉积物中 NH_4^+的浓度大于水生植物根区，而 NO_3^-的含量各样品之间的差异不明显。

用 MPN 计数法对水生植物根区及其沉积物分析，根区的氨氧化细菌密度高于无水生植物的表层底泥；挺水植物芦苇和窄叶香蒲根区氨氧化细菌的密度又高于沉水植物菹草和浮叶植物荇菜；芦苇和香蒲根区的氨氧化细菌数量比无水生植物的表层底泥高 1－2 个数量级（表 4-8）。

表 4-8 采样点根区环境参数以及 MPN 法氨氧化细菌计数结果

样品名称	采样点	植物类型	水生植物现存量 (g/m^2)	氧化还原电位 (mv)	pH	NH_4^+ (mgN/kg)	NO_3^- (mgN/kg)	MPN 计数 (cells/g干沉积物)
Phc	芦苇根区	挺水植物	1000	118±10	7.46	2.68±0.13	3.78±0.30	2.8×10^5
Ta	窄叶香蒲根区	挺水植物	800	150±13	7.31	2.77±0.19	4.26±0.24	4.3×10^5
Poc	菹草根区	沉水植物	450	77±5	7.57	3.43±0.18	3.03±0.28	9.3×10^4
Ln	荇菜根区	浮叶植物	100	68±6	7.73	4.11±0.22	2.95±0.11	7.7×10^4
BS-1	无草沉积物 (1-5cm)	—	—	-45±8	7.90	5.67±0.31	2.57±0.26	2.1×10^4
BS-2	无草沉积物 (6-10cm)	—	—	-133±10	7.95	8.04±0.38	3.03±0.19	3.5×10^4

采用巢式 PCR 的方法扩增氨氧化细菌， PCR 产物经纯化后 DGGE 结果如图 4-33 所示。对其中相对含量大于 10%，且位置存在一定区别的条带进行割胶回收（图 4-43）。6 个样品共回收得到 14 个条带，其中芦苇样品 (Phc) 中回收 2 条 (AE-1, AE-2)，窄叶香蒲样品 (Ta) 回收 3 条 (AE-3, AE-4, AE-5)，菹草样品回收 (Poc) 4 条 (AE-6, AE-7, AE-8, AE-9)，荇菜样品 Ln 回收 1 条(AE-10)，无草区表层 1-5cm 沉积物样品 (BS-1) 回收 2 条 (AE-11, AE-12)，无草区表层 6-10cm 沉积物样品 (BS-2) 回收 2 条 (AE-13, AE-14)。回收的条带中 AE-2 与 AE-8，AE-9 与 AE-11 在 DGGE 图谱中的位置几乎相同。通过对回收条带的 PCR 扩增及 DGGE，重复 2－3 次，确认条带的单一性及同在最初的 DGGE 图谱中位置一致。回收的条带与 GenBank 中已有序列的相似度均高于 97%。在回收的 14 条序列中（表 4-9），除 AE-13 与 AE-14 外，均与 Genbank 中已知的 AOB 序列相似。尽管与各序列相似度最高的已知序列各不相同，但基本都属于亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)。AE-13 与草酸杆菌属(*Oxalobacter*)的 AY367029 相似度较高，而 AE-14 与未培养的 beta-proteobacterium AF141482 相似度达到 99%。其中，与 AE-1，AE-9/11，AE-10/12 相似度最高的序列均为未获得培养的 *Nitrosomonas*。

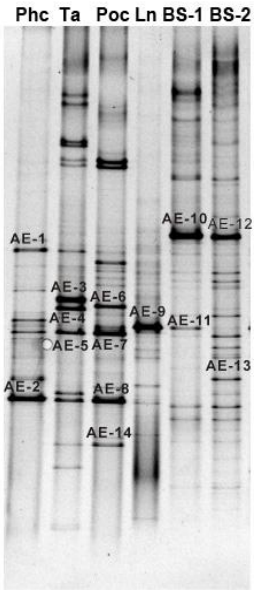


图 4-33 DGGE 分析巢式 PCR 产物. Phc: 芦苇; Ta: 窄叶香蒲; Poc: 菹草; Ln: 荇菜; BS-1: 无草表层沉积物(1-5cm); BS-2: 无草表层沉积物(6-10cm)

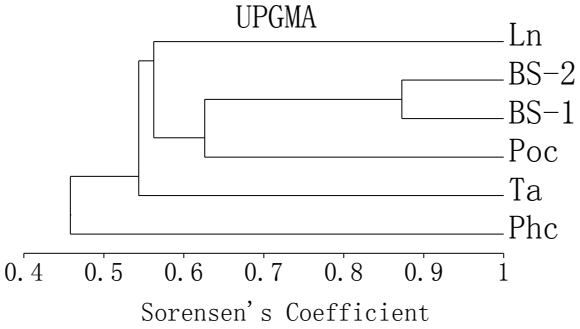


图 4-34 UPGMA 分析氨氧化细菌群落组成及其相似性. Phc: 芦苇; Ta: 窄叶香蒲; Poc: 菹草; Ln: 荇菜; BS-1: 无草表层沉积物(1-5cm); BS-2: 无草表层沉积物(6-10cm)

测序及比对结果显示，不同样品中主要的 AOB 种类(条带相对含量大于 10%)存在一定的共同点。例如，芦苇根区(Phc)的 AE-2 同荇菜(Poc)根区的 AE-8 序列相似度大于 99%。窄叶香蒲(Ta)根区的 AE-5 同菹草(Ln)根区的 AE-7 序列相似度大于 99%。荇菜根区的 AE-9 同

表 4-9 采用 BLASTN 软件在 GenBank 数据库中搜索到的与 DGGE 胶回收条带序列最相近的 16S rRNA 基因序列

Table 4-9 Closest matches between 16S rRNA gene sequences of bands excised from sample-derived denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) profiles and sequences from the GenBank databases obtained, using the BLASTN search tool

条带编号	相似碱基数/ 序列长度 (相似度)	GenBank中最相近序列 (检索号)	参考文献
AE-1	174/177 (98%)	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone CL1-1/E 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (DQ068702)	Freitag et al. 2006
AE-2/8	175/177 (98%)	*Nitrosomonas cryotolerans* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. (AF272423)	Purkhold et al. 2000
AE-3	177/177 (100%)	*Nitrosomonas* sp. Is79A3 16S rRNA gene, isolate Is79A3 (DQ068705)	Freitag et al. 2006
AE-4	173/177 (97%)	*Nitrosomonas* sp. Nm51 partial 16S rRNA gene, isolate Nm51 (AJ298737)	Aakra et al. 2001
AE-5/7	174/177 (98%)	*Nitrosomonas* sp. R7c140 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (AF386753)	Burrell et al. 2001
AE-6	177/177 (100%)	*Nitrosomonas* sp. Nm51 partial 16S rRNA gene, isolate Nm51 (AJ298737)	Aakra et al. 2001
AE-9/11	177/177 (100%)	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone LD1-B6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (AY114347)	Freitag & Prosser, 2003
AE-10/12	175/177 (98%)	Uncultured *Nitrosomonas* sp. isolate DGGE band L1 16S ribosomal RNA (DQ887679)	Sundberg et al. 2007
AE-13	174/177 (97%)	*Oxalobacter* sp. Es2-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. (AY367029)	Vacca et al. 2005
AE-14	176/177 (99%)	Uncultured beta Proteobacterium clone CRE-FL68 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (AF141482)	Crump et al. 1999

无草区表层底泥(BS-1) AE-10 序列相似度大于 99%。无草区表层底泥(BS-1) AE-11 同表层以下(BS-2)的 AE-12 序列相似度大于 99%。同时，不同样品之间主要的氨氧化细菌种类也存在差别，如从 DGGE 图谱上看来，与 AE-1 位置相同的条带也存在于其他样品中，但均未出现明显优势。尽管 AE-3，AE-4 和 AE-6 位置极为相近，但其序列相似度不高。聚类分析(UPGMA)分析巢式 PCR－DGGE 图谱，结果显示，无草区表层底泥 (BS-1) 同表层以下 (BS-2) 的相似度最高首先聚为一类；其次，与荇菜和菹草相似度较高，而与芦苇和窄叶香蒲的相似度较低（图 4-34）。

虽然在湿地以及其他生态系统中，植物本身对营养物质的直接去除所占的比例很小，但是如前所述，植物是整个系统中必不可少的一部分，植物会从不同途径影响不同氮化合物的微生物转化：(1) 植物根系的呼吸作用导致氧气的消耗，从而形成厌氧微环境，促进反硝化的进行；(2) 微生物的生长离不开各种营养物质，根系的分泌物为微生物的生长提供碳源；(3) 植物与微生物竞争硝酸氮，起到一定的氮去除的作用,尽管比例不高；(4)植物能够从大气中输送不同的气体(氧气、气态氮) 到底泥，反之亦然，促进氮循环过程的完成；(5) 植物对水分的吸收改变底泥通风状态，从而影响气体和溶解态营养物质的扩散。

MPN计数的结果显示，水生植物根区氨氧化细菌的数量高于对照区，同时芦苇和窄叶香蒲根区的氨氧化细菌密度又高于菹草和荇菜。不同植物的根系发达程度不同，因此对根区环境所产生的影响存在差异。

对DGGE条带回收测序的结果显示，除条带AE-13和AE-14外，其他12个序列均同氨氧化细菌的亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)具有较高的相似性。Speksnijder 等研究显示在淡水水域沉积物中常见的氨氧化细菌主要为*Nitrosomonas*-like。Freitag 等通过比较从河流入海口到开阔海域中氨氧化细菌的种类，发现氨氧化细菌由亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*) 向亚硝化螺菌属 (*Nitrosopire*) 演化。这可能是由于不同的氨氧化细菌所适合的生态位存在差异。DGGE及聚类分析的结果显示不同水生植物区氨氧化细菌主要的优势种存在差异，可见水生植物对细菌具有一定的选择性。水生植物不同，其根系形态和在底泥中的分布情况也不相同，本研究显示芦苇和窄叶香蒲根区环境氧化性更强，因此对氧浓度需求量高的AOB群落可能适合生存在该区，而在无草的表层沉积物中分布的AOB群落可能对低氧浓度具有较强的耐受性。

主要参考文献

Amano, T., I. Yoshinaga, K. Okada, T. Yamagishi, S. Ueda, A. Obuchi, Y. Sako,Y. Suwa, Detection of anammox activity and diversity of anammox bacteria-related 16S rRNA genes in coastal marine sediment in Japan. Microbes Environ, 2007. **22**(3): 232-242.

Beisner, B.E., P.R. Peres, E.S. Lindstrom, A. Barnett,M.L. Longhi, The role of environmental and spatial processes in structuring lake communities from bacteria to fish. Ecology, 2006.

87(12): 2985-2991.

Beman, J.M.,C.A. Francis, Diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the sediments of a hypernutrified subtropical estuary: Bahia del Tobari, Mexico. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(12): 7767-7777.

Bodelier, P.L.E., J.A. Libochant, C. Blom,H.J. Laanbroek, Dynamics of nitrification and denitrification in root-oxygenated sediments and adaptation of ammonia-oxidizing bacteria to low-oxygen or anoxic habitats. Appl Environ Microbiol, 1996. **62**(11): 4100-4107.

Bollmann, A., M.-J. Bar-Gilissen,H.J. Laanbroek, Growth at low ammonium concentrations and starvation response as potential factors involved in niche differentiation among ammonia-oxidizing bacteria. Appl Environ Microbiol, 2002. **68**(10): 4751-4757.

Burrell, P.C., C.M. Phalen,T.A. Hovanec, Identification of Bacteria Responsible for Ammonia Oxidation in Freshwater Aquaria. Appl. Environ. Microbiol., 2001. **67**(12): 5791-5800.

Carini, S.A.,S.B. Joye, Nitrification in Mono Lake, California: Activity and community composition during contrasting hydrological regimes. Limnol Oceanogr, 2008. **53**(6): 2546-2557.

Cébron, A., M. Coci, J. Garnier,H.J. Laanbroek, Denaturing gradient gel electrophoretic analysis of ammonia-oxidizing bacterial community structure in the lower Seine River: Impact of Paris wastewater effluents. Appl Environ Microbiol, 2004. **70**(11): 6726-6737.

Chen, G.-Y., S.-L. Qiu,Y.-Y. Zhou, Diversity and abundance of ammonia-oxidizing bacteria in eutrophic and oligotrophic basins of a shallow Chinese lake (Lake Donghu). Res Microbiol, 2009. **160**(3): 173-178.

Chen, X.-P., Y.-G. Zhu, Y. Xia, J.-P. Shen,J.-Z. He, Ammonia-oxidizing archaea: important players in paddy rhizosphere soil? Environ Microbiol, 2008. **10**(8): 1978-1987.

Chu, H., T. Fujii, S. Morimoto, X. Lin,K. Yagi, Population size and specific nitrification potential of soil ammonia-oxidizing bacteria under long-term fertilizer management. Soil Biology and Biochemistry, 2008. **40**(7): 1960-1963.

Coci, M., D. Riechmann, P.L.E. Bodelier, S. Stefani, G. Zwart,H.J. Laanbroek, Effect of salinity on temporal and spatial dynamics of ammonia-oxidising bacteria from intertidal freshwater sediment. FEMS Microbiology Ecology, 2005. **53**(3): 359-368.

Coci, M., P.L.E. Bodelier,H.J. Laanbroek, Epiphyton as a niche for ammonia-oxidizing bacteria: detailed comparison with benthic and pelagic compartments in shallow freshwater lakes. Appl Environ Microbiol, 2008. **74**(7): 1963-1971.

Dale, O.R., C.R. Tobias,B. Song, Biogeographical distribution of diverse anaerobic ammonium oxidizing (anammox) bacteria in Cape Fear River Estuary. Environ Microbiol, 2009. **11**(5): 1194-1207.

de Bie, M.J.M., A. Speksnijder, G.A. Kowalchuk, T. Schuurman, G. Zwart, J.R. Stephen, O.E. Diekmann,H.J. Laanbroek, Shifts in the dominant populations of ammonia-oxidizing beta-subclass *Proteobacteria* along the eutrophic Schelde estuary. Aquat Microb Ecol, 2001. **23**(3): 225-236.

Fierer, N., K.M. Carney, M.C. Horner-Devine,J.P. Megonigal, The biogeography of ammonia-oxidizing bacterial communities in soil. Microbial Ecology, 2009. **58**(2): 435-445.

Francis, C.A., J.M. Beman,M.M.M. Kuypers, New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. ISME J, 2007. **1**(1): 19-27.

Francis, C.A., K.J. Roberts, J.M. Beman, A.E. Santoro,B.B. Oakley, Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. Proc Natl Acad Sci USA, 2005. **102**(41): 14683-14688.

Ge, Y., J.Z. He, Y.G. Zhu, J.B. Zhang, Z.H. Xu, L.M. Zhang,Y.M. Zheng, Differences in soil bacterial diversity: driven by contemporary disturbances or historical contingencies? ISME J, 2008. **2**(3): 254-264.

Gruber, N.,J.N. Galloway, An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. Nature, 2008. **451**(7176): 293-296.

Guo, L., Doing battle with the green monster of Taihu Lake. Science, 2007. **317**(5842): 1166.

He, J.-Z., J.-P. Shen, L.-M. Zhang, Y.-G. Zhu, Y.-M. Zheng, M.-G. Xu,H. Di, Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. Environ Microbiol, 2007. **9**(9): 2364-2374.

Herrmann, M., A.M. Saunders,A. Schramm, Archaea dominate the ammonia-oxidizing community in the rhizosphere of the freshwater macrophyte *Littorella uniflora*. Appl Environ Microbiol, 2008. **74**(10): 3279-3283.

Herrmann, M., A.M. Saunders,A. Schramm, Effect of lake trophic status and rooted macrophytes on community composition and abundance of ammonia-oxidizing prokaryotes in freshwater sediments. Appl Environ Microbiol, 2009. **75**(10): 3127-3136.

Horner-Devine, M.C.,A.C. Martiny, News about nitrogen. Science, 2008. **320**(5877): 757-758.

Horz, H.-P., A. Barbrook, C.B. Field,B.J.M. Bohannan, Ammonia-oxidizing bacteria respond to multifactorial global change. Proc Natl Acad Sci USA, 2004. **101**(42): 15136-15141.

Huber, T., G. Faulkner,P. Hugenholtz, Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. Bioinformatics, 2004. **20**(14): 2317-2319.

Junier, P., O.-S. Kim, O. Hadas, J.F. Imhoff,K.-P. Witzel, PCR primer selectivity and phylogenetic specificity evaluated using amplification of 16S rRNA genes from betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in environmental samples. Appl Environ Microbiol, 2008. **74**(16): 5231-5236.

Karjalainen, H., G. Stefansdottir, L. Tuominen,T. Kairesalo, Do submersed plants enhance microbial activity in sediment? Aquat Bot, 2001. **69**(1): 1-13.

Karner, M.B., E.F. DeLong, D.M. Karl, Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. Nature, 2001. **409**(6819): 507-510.

Kartal, B., L. van Niftrik, J. Rattray, J. van de Vossenberg, L. C. M. , M.C. Schmid, J.S. Damst, M.S.M. Jetten,M. Strous, *Candidatus* "Brocadia fulgida": an autofluorescent anaerobic ammonium oxidizing bacterium. FEMS Microbiol Ecol, 2008. **63**(1): 46-55.

Kartal, B., M. Koleva, R. Arsov, W. van de Star, M.S.M. Jetten,M. Strous, Adaptation of a freshwater anammox population to high salinity wastewater. J Biotech, 2006. **126**: 546-553.

Kartal, B., M.M.M. Kuypers, G. Lavik, J. Schalk, H.J.M. Op den Camp, M.S.M. Jetten,M. Strous, Anammox bacteria disguised as denitrifiers: nitrate reduction to dinitrogen gas via nitrite and ammonium. Environmental Microbiology, 2007. **9**(3): 635-642.

Kim, O.-S., P. Junier, J.F. Imhoff,K.-P. Witzel, Comparative analysis of ammonia monooxygenase (*amoA*) genes in the water column and sediment-water interface of two lakes and the Baltic Sea. FEMS Microbiol Ecol, 2008. **66**(2): 367-378.

Klotz, M.G., M.C. Schmid, M. Strous, H.J.M. op den Camp, M.S.M. Jetten,A.B. Hooper, Evolution of an octahaem cytochrome *c* protein family that is key to aerobic and anaerobic ammonia oxidation by bacteria. Environ Microbiol, 2008. **10**(11): 3150-3163.

Klotz, M.G.,L.Y. Stein, Nitrifier genomics and evolution of the nitrogen cycle. FEMS Microbiol Lett, 2008. **278**(2): 146-156.

Koizumi, Y., S. Takii,M. Fukui, Depth-related change in archaeal community structure in a freshwater lake sediment as determined with denaturing gradient gel electrophoresis of

amplified 16S rRNA genes and reversely transcribed rRNA fragments. FEMS Microbiol Ecol, 2004. **48**: 285-292.

Koops, H.-P.,A. Pommerening-Röser, Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. FEMS Microbiol Ecol, 2001. **37**(1): 1-9.

Kowalchuk, G.A., J.R. Stephen, W. De Boer, J.I. Prosser, T.M. Embley,J.W. Woldendorp, Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. Appl. Environ. Microbiol., 1997. **63**(4): 1489-1497.

Kowalchuk, G.A.,J.R. Stephen, Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. Annu Rev Microbiol, 2001. **55**: 485-529.

Kuenen, J.G., Anammox bacteria: from discovery to application. Nat Rev Micro, 2008. **6**(4): 320-326.

Kurola, J., M. Salkinoja-Salonen, T. Aarnio, J. Hultman,M. Romantschuk, Activity, diversity and population size of ammonia-oxidising bacteria in oil-contaminated landfarming soil. FEMS Microbiol Lett, 2005. **250**(1): 33-38.

Kuypers, M.M.M., A.O. Sliekers, G. Lavik, M. Schmid, B.B. Jorgensen, J.G. Kuenen, J.S. Sinninghe Damste, M. Strous,M.S.M. Jetten, Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. Nature, 2003. **422**(6932): 608-611.

Kuypers, M.M.M., G. Lavik, D. Woebken, M. Schmid, B.M. Fuchs, R. Amann, B.B. Jorgensen,M.S.M. Jetten, Massive nitrogen loss from the Benguela upwelling system through anaerobic ammonium oxidation. Proc Natl Acad Sci USA, 2005. **102**(18): 6478-6483.

Laanbroek, H.J.,A.G.C.L. Speksnijder, Niche separation of ammonia-oxidizing bacteria across a tidal freshwater marsh. Environ Microbiol, 2008. **10**(11): 3017-3025.

Lau, S.C.K.,W.-T. Liu, Recent advances in molecular techniques for the detection of phylogenetic markers and functional genes in microbial communities. FEMS Microbiology Letters, 2007. **275**(2): 183-190.

Mahmood, S., T.E. Freitag,J.I. Prosser, Comparison of PCR primer-based strategies for characterization of ammonia oxidizer communities in environmental samples. FEMS Microbiol Ecol, 2006. **56**(3): 482-493.

McCaig, A.E., T.M. Embley, J.I. Prosser, Molecular analysis of enrichment cultures of marine ammonia oxidisers. FEMS Microbiology Letters, 1994. **120**(3): 363-367.

Mincer, T.J., M.J. Church, L.T. Taylor, C. Preston, D.M. Karl,E.F. DeLong, Quantitative distribution of presumptive archaeal and bacterial nitrifiers in Monterey Bay and the North Pacific Subtropical Gyre. Environ Microbiol, 2007. **9**(5): 1162-1175.

Mulder, A., A.A. van de Graaf, L.A. Robertson,J.G. Kuenen, Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. FEMS Microbiol Ecol, 1995. **16**(3): 177-183.

Nicol, G.W., S. Leininger, C. Schleper,J.I. Prosser, The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. Environ Microbiol, 2008. **10**(11): 2966-2978.

Nicolaisen, M.H.,N.B. Ramsing, Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. J Microbiol Methods, 2002. **50**(2): 189-203.

Nogueira, R., L.F. Melo, U. Purkhold, S. Wuertz,M. Wagner, Nitrifying and heterotrophic population dynamics in biofilm reactors: effects of hydraulic retention time and the presence of organic carbon. Water Res, 2002. **36**(2): 469-481.

Offre, P., J.I. Prosser,G.W. Nicol, Growth of ammonia-oxidizing archaea in soil microcosms is

inhibited byacetylene. FEMS Microbiol Ecol, 2009. **70**: 99-108.

Okano, Y., K.R. Hristova, C.M. Leutenegger, L.E. Jackson, R.F. Denison, B. Gebreyesus, D. Lebauer,K.M. Scow, Application of real-rime PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. Appl Environ Microbiol, 2004. **70**(2): 1008-1016.

Park, H.-D., G.F. Wells, H. Bae, C.S. Criddle,C.A. Francis, Occurrence of ammonia-oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactors. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(8): 5643-5647.

Payne W J, 1973. Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. Bacteriological Reviews, 37: 409—452

Prosser, J.I.,G.W. Nicol, Relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment. Environ Microbiol, 2008. **10**(11): 2931-2941.

Purkhold, U., A. Pommerening-Roser, S. Juretschko, M.C. Schmid, H.-P. Koops,M. Wagner, Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. Appl Environ Microbiol, 2000. **66**(12): 5368-5382.

Qin, B., Lake Taihu, China (Dynamics and Environmental Change). Monographiae Biologicae, ed. H.J. Dumont. Vol. 87. 2008: Springer.

Qu, W., M. Dickman,S. Wang, Multivariate analysis of heavy metal and nutrient concentrations in sediments of Taihu Lake, China. Hydrobiologia, 2001. **450**(1): 83-89.

Quan, Z.-X., S.-K. Rhee, J.-E. Zuo, Y. Yang, J.-W. Bae, J.R. Park, S.-T. Lee,Y.-H. Park, Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor. Environ Microbiol, 2008. **10**(11): 3130-3139.

Rich, J.J., O.R. Dale, B. Song,B.B. Ward, Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in Chesapeake Bay sediments. Microb Ecol, 2008. **55**: 311-320.

Risgaard-Petersen, N., M.H. Nicolaisen, N.P. Revsbech,B.A. Lomstein, Competition between ammonia-oxidizing bacteria and benthic microalgae. Appl. Environ. Microbiol., 2004. **70**(9): 5528-5537.

Risgaard-Petersen, N.,K. Jensen, Nitrification and denitrification in the rhizosphere of the aquatic macrophyte *Lobelia dortmanna* L. Limnol Oceanogr, 1997. **42**(3): 529-537.

Satoh, H., Y. Nakamura,S. Okabe, Influences of infaunal burrows on the community structure and activity of ammonia-oxidizing bacteria in intertidal sediments. Appl Environ Microbiol, 2007. **73**(4): 1341-1348.

Scheffer, M., S.H. Hosper, M.L. Meijer, B. Moss,E. Jeppesen, Alternative equilibria in shallow lakes. Trends Ecol Evol, 1993. **8**(8): 275-279.

Schloss, P.D., B.R. Larget,J. Handelsman, Integration of microbial ecology and statistics: a test to compare gene libraries. Appl Environ Microbiol, 2004. **70**(9): 5485-5492.

Schloss, P.D.,J. Handelsman, Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(3): 1501-1506.

Schloss, P.D.,J. Handelsman, Introducing SONS, a tool for operational taxonomic unit-based comparisons of microbial community memberships and structures. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(10): 6773-6779.

Schmid, M.C., A.B. Hooper, M.G. Klotz, D. Woebken, P. Lam, M.M.M. Kuypers, A. Pommerening-Roeser, H.J.M.o.d. Camp,M.S.M. Jetten, Environmental detection of octahaem cytochrome *c* hydroxylamine/hydrazine oxidoreductase genes of aerobic and anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. Environ Microbiol, 2008. **10**(11): 3140-3149.

Schmid, M.C., B. Maas, A. Dapena, K. van de Pas-Schoonen, J. van de Vossenberg, B. Kartal, L.

van Niftrik, I. Schmidt, I. Cirpus, J.G. Kuenen, M. Wagner, J.S. Sinninghe Damste, M. Kuypers, N.P. Revsbech, R. Mendez, M.S.M. Jetten,M. Strous, Biomarkers for *in situ* detection of anaerobicammonium-oxidizing (anammox) bacteria. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(4): 1677-1684.

Schramm, A., D. De Beer, A. Gieseke,R. Amann, Microenvironments and distribution of nitrifying bacteria in a membrane-bound biofilm. Environmental Microbiology, 2000. **2**(6): 680-686.

Schubert, C.J., E. Durisch-Kaiser, B. Wehrli, B. Thamdrup, P. Lam,M.M.M. Kuypers, Anaerobic ammonium oxidation in a tropical freshwater system (Lake Tanganyika). Environ Microbiol, 2006. **8**(10): 1857-1863.

Seitzinger S P, 1988. Denitrification in freshwater and coastal marine ecosystems: ecological and geochemical significance. Limnology and Oceanography, 33: 702--724.

Sjodin A L, Lewis W M, Saunders J F, 1997. Denitrification as a component of the nitrogen budget for a large plains river. Biogeochemistry, 39: 327--342.

Soranno, P.A., K.E. Webster, J.L. Riera, T.K. Kratz, J.S. Baron, P.A. Bukaveckas, G.W. Kling, D.S. White, N. Caine, R.C. Lathrop,P.R. Leavitt, Spatial Variation among Lakes within Landscapes: Ecological Organization along Lake Chains. Ecosystems, 1999. **2**(5): 395-410.

Speksnijder, A., G.A. Kowalchuk, K. Roest,H.J. Laanbroek, Recovery of a *Nitrosomonas*-like 16S rDNA sequence group from freshwater habitats. Syst Appl Microbiol, 1998. **21**(2): 321-330.

Strous, M., E. Pelletier, S. Mangenot, T. Rattei, A. Lehner, M.W. Taylor, M. Horn, H. Daims, D. Bartol-Mavel, P. Wincker, V. Barbe, N. Fonknechten, D. Vallenet, B. Segurens, C. Schenowitz-Truong, C. Médigue, A. Collingro, B. Snel, B.E. Dutilh, H.J.M. Op den Camp, C. van der Drift, I. Cirpus, K.T. van de Pas-Schoonen, H.R. Harhangi, L. van Niftrik, M. Schmid, J. Keltjens, J. van de Vossenberg, B. Kartal, H. Meier, D. Frishman, M.A. Huynen, H.-W. Mewes, J. Weissenbach, M.S.M. Jetten, M. Wagner,D. Le Paslier, Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. Nature, 2006. **440**(7085): 790-794.

Strous, M., E. Van Gerven, J.G. Kuenen,M. Jetten, Effects of Aerobic and Microaerobic Conditions on Anaerobic Ammonium-Oxidizing (Anammox) Sludge. Appl. Environ. Microbiol., 1997. **63**(6): 2446-2448.

Strous, M., J.A. Fuerst, E.H.M. Kramer, S. Logemann, G. Muyzer, K.T. van de Pas-Schoonen, R. Webb, J.G. Kuenen,M.S.M. Jetten, Missing lithotroph identified as new planctomycete. Nature, 1999. **400**(6743): 446-449.

Strous, M., J.G. Kuenen, J.A. Fuerst, M. Wagner,M.S.M. Jetten, The anammox case - A new experimental manifesto for microbiological eco-physiology. Antonie Van Leeuwenhoek, 2002. **81**(1-4): 693-702.

Tal, Y., J.E.M. Watts,H.J. Schreier, Anaerobic ammonia-oxidizing bacteria and related activity in Baltimore inner harbor sediment. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(4): 1816-1821.

Tamura, K., J. Dudley, M. Nei,S. Kumar, MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol, 2007. **24**(8): 1596-1599.

ter Braak, C.J.F.,P. Šmilauer, CANOCO Reference Manual and CanoDraw for Windows User's Guide. 2002, Wageningen: Biometris.

Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin,D.G. Higgins, The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucl. Acids Res., 1997. **25**(24): 4876-4882.

van der Gucht, K., K. Cottenie, K. Muylaert, N. Vloemans, S. Cousin, S. Declerck, E. Jeppesen, J.M. Conde-Porcuna, K. Schwenk, G. Zwart, H. Degans, W. Vyverman,L. De Meester, The power of species sorting: Local factors drive bacterial community composition over a

wide range of spatial scales. Proc Natl Acad Sci USA, 2007. **104**(51): 20404-20409.

Wang, H., J. Lu, W. Wang, P. Huang,C. Yin, Spatio-temporal distribution of nitrogen in the undulating littoral zone of Lake Taihu, China. Hydrobiologia, 2007. **581**(1): 97-108.

Wang, J.J., Y.C. Wu, H.C. Jiang, C.H. Li, H.L. Dong, Q.L. Wu, J. Soininen,J. Shen, High beta diversity of bacteria in the shallow terrestrial subsurface. Environ Microbiol, 2008. **10**(10): 2537-2549.

Whittaker, R.H., Evolution and measurement of species diversity. Taxon, 1972. **21**(2/3): 213-251.

Woebken, D., P. Lam, M. Kuypers, S.W.A. Naqul, B. Kartal, M. Strous, M.S.M. Jetten, B.M. Fuchs,R. Amann, A microdiversity study of anammox bacteria reveals a novel *Candidatus* Scalindua phylotype in marine oxygen minimum zones. Environ Microbiol, 2008. **10**(11): 3106-3119.

Wu, Q., Y. Chen, K. Xu, Z. Liu,M. Hahn, Intra-habitat heterogeneity of microbial food web structure under the regime of eutrophication and sediment resuspension in the large subtropical shallow Lake Taihu, China. Hydrobiologia, 2007. **581**(1): 241-254.

Wu, Q.L., G. Zwart, J. Wu, M.P.K.-v. Agterveld, S. Liu,M.W. Hahn, Submersed macrophytes play a key role in structuring bacterioplankton community composition in the large, shallow, subtropical Taihu Lake, China. Environ Microbiol, 2007. **9**(11): 2765-2774.

Wu Y, Xiang Y, Wang J, Zhong J, He J, Wu QL. 2010. Heterogeneity of archaeal and bacterial ammonia-oxidizing communities in Lake Taihu, China. Environ Microbiol Rep 2:569-576.

Wu Y, Xiang Y, Wang J, Wu QL. Molecular detection of novel anammox bacterial clusters in the sediments of the shallow freshwater Lake Taihu. Geomicrobiology Journal. In press.

Xing, P.,F. Kong, Intra-habitat heterogeneity of environmental factors regulating bacterioplankton community composition in Lake Taihu, China. Aquat Microb Ecol, 2007. **48**(2): 113-122.

Zhang, C.L., Q. Ye, Z. Huang, W. Li, J. Chen, Z. Song, W. Zhao, C. Bagwell, W.P. Inskeep, C. Ross, L. Gao, J. Wiegel, C.S. Romanek, E.L. Shock,B.P. Hedlund, Global occurrence of archaeal amoA genes in terrestrial hot springs. Appl Environ Microbiol, 2008. **74**(20): 6417-6426.

Zhang, Y., X.-H. Ruan, H.J.M. Op den Camp, T.J.M. Smits, M.S.M. Jetten,M.C. Schmid, Diversity and abundance of aerobic and anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in freshwater sediments of the Xinyi River (China). Environ Microbiol, 2007. **9**(9): 2375-2382.

Zhou, J., M.A. Bruns,J.M. Tiedje, DNA recovery from soils of diverse composition. Appl Environ Microbiol, 1996. **62**(2): 316-322.

范成新，王春霞主编。 长江中下游湖泊环境地球化学与富营养化. 2007, 北京: 科学出版社.

贺纪正,张丽梅。 氨氧化微生物生态学与氮循环研究进展. 生态学报, 2009. **29**(1): 406-415.

刘凌，崔广柏,王建中。 太湖底泥氮污染分布规律及生态风险. 水利学报，2005. **36**(8): 900-905.

卢升高,吕军。 环境生态学. 2004, 杭州: 浙江大学出版社.

鲁如坤主编。 土壤农业化学分析方法. 2000, 北京: 中国农业科技出版社.

王苏民，窦鸿身，中国湖泊志. 1998, 北京: 科学出版社.

邢鹏，孔繁翔，陈开宁，陈美军,吴晓东。 生态修复水生植物根际氨氧化细菌的研究. 环境科学, 2008. **29**(8): 2154－2159.

徐徽，张路，商景阁，代静玉，范成新。 太湖梅梁湾水土界面反硝化和厌氧氨氧化. 湖泊科学, 2009. **21**(6): 775-781.