

DOI:10.3876/j.issn.1000-1980.2021.06.006

小型浅水湖泊氨氧化细菌分布特征 及其对氮素垂向分布的响应

燕文明¹,温茂增¹,麻 林²,聂小保³,陈 翔¹,吴挺峰⁴

(1. 河海大学水文水资源与水利工程科学国家重点实验室,江苏 南京 210098;
2. 湖南省水利厅,湖南 长沙 410007;3. 长沙理工大学水利工程学院,湖南 长沙 410007;
4. 中国科学院南京地理与湖泊研究所,江苏 南京 210008)

摘要:以淮河流域里下河地区小型浅水湖泊为研究对象,采用分子生物学方法和细菌反硝化稳定同位素技术研究氨氧化细菌(AOB)的生物多样性和群落特征,探究不同类型的污染物对 AOB 丰度和群落特征的影响。结果表明,得胜湖 AOB 的生物多样性和丰度最高,而大纵湖北部最低,究其原因,认为是得胜湖较为复杂的污染来源和周围环境以及大纵湖湖心密集的水生植物造成的。amoA 基因的系统发育分析表明,研究区内丰度最高的是亚硝化单胞菌属,占 92.3%,亚硝化螺菌属占 7.7%;硝氮含量与 AOB 丰度具有一致性,AOB 丰度高的采样点上覆水中硝氮较高。同位素溯源分析表明污染物的来源差异导致了 $\delta^{15}\text{N}$ 的不同,长期的围网养殖会导致 $\delta^{15}\text{N}$ 降低,而腐烂植物的长期过度累积则会导致 $\delta^{15}\text{N}$ 增大。

关键词:浅水湖泊;氨氧化细菌;群落组成;多样性;丰度指数;同位素;淮河流域

中图分类号:X524 **文献标志码:**A **文章编号:**1000-1980(2021)06-0521-07

Distribution characteristics of ammonia-oxidizing bacteria of small shallow lakes and its response to vertical distribution of nitrogen

YAN Wenming¹, WEN Maozeng¹, MA Lin², NIE Xiaobao³, CHEN Xiang¹, WU Tingfeng⁴

(1. State Key Laboratory of Hydrology-Water Resources and Hydraulic Engineering, Hohai University, Nanjing 210098, China;
2. Water Conservancy Department of Hunan Province, Changsha 410007, China;
3. Changsha University of Science and Technology, Changsha 410007, China;
4. Nanjing Institute of Geography & Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

Abstract: In this study, with small shallow lakes in Huaihe River Basin as object, the biodiversity and distribution characteristics of ammonia-oxidizing bacteria (AOB) were analyzed. Simultaneously, to explore the role of different sources of nitrogen pollutants on the abundance and distribution characteristics of AOB, nitrate sources were investigated via molecular biological means and bacterial denitrification stable isotope technology. The results showed that the diversity and abundance of AOB were the highest in Desheng Lake, while those in the northern part of the Dazong Lake were the lowest, demonstrating that the complex pollution sources and surrounding environment of Desheng Lake and the dense aquatic plants in the center of Dazong Lake led to the increase of the diversity and abundance of AOB. Phylogenetic analysis of amoA gene showed that the two most abundant genera in Desheng Lake, Dazong Lake and Jiulongkou were Nitrosomonas (92.3%) and Nitrospirillum (7.7%). Based on the distribution of AOB, nitrate nitrogen and AOB changed consistent, and nitrate nitrogen in overlying water was high at the point with high AOB abundance. Isotope traceability analysis showed that long-term seine farming led to a decrease of $\delta^{15}\text{N}$ (0.57%) and the long-term over accumulation of decaying plants led to an increase of $\delta^{15}\text{N}$ (1.0%). The research is helpful for the further study of the nitrogen cycle and management of shallow lakes.

Key words: shallow lake; AOB; community composition; diversity; abundance index; isotope; Huaihe River Basin

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFC0405205);湖南省水利基金(XSKJ2019081-42);中央高校基本科研业务费专项(B200205026)

作者简介: 燕文明(1982—),女,高级实验师,博士,主要从事环境水文及水环境保护研究。E-mail:ywm0815@163.com

通信作者: 吴挺峰,副研究员。E-mail:tfwu@niglas.ac.cn

引用本文: 燕文明,温茂增,麻林,等. 小型浅水湖泊氨氧化细菌分布特征及其对氮素垂向分布的响应[J]. 河海大学学报(自然科学版), 2021,49(6):521-527.

YAN Wenming, WEN Maozeng, MA Lin, et al. Distribution characteristics of ammonia-oxidizing bacteria of small shallow lakes and its response to vertical distribution of nitrogen[J]. Journal of Hohai University(Natural Sciences), 2021,49(6):521-527.

氨氧化细菌(*Ammonia-Oxidizing Bacteria*, AOB)是氨氧化反应的主要承担者之一,广泛分布于土壤、湖泊及海洋等环境中^[1]。研究发现的 AOB 大多属于 β -Proteobacteria 亚纲和 γ -Proteobacteria 亚纲, β -Proteobacteria 分为亚硝化螺菌群(*Nitrosospira*)和亚硝化单胞菌群(*Nitrosomonas*),多存在于非海洋生境中,而 γ -Proteobacteria 亚纲多见于陆地、海洋生境中^[2]。目前,学者们已经开展了大量以 AOB 为主题的研究工作,Horz 等^[3]发现 AOB 会因温度、降水量等环境因子的改变产生明显的响应;Ruben 等^[4]发现城镇河流岸边与水体中 AOB 的群落组成相似;Garnier 等^[5]对塞纳河水体中的 AOB 优势种群进行分析,并研究了 AOB 丰度对环境变化产生的响应。可见,围绕某区域中 AOB 影响因素和群落特征的研究已较为深入,而不同来源污染物对 AOB 群落分布特征影响方面的研究相对较少。AOB 在地球氮素循环中扮演着重要的角色^[6]。本文选取淮河流域里下河地区浅水湖泊作为研究对象,识别不同污染类型的表层底泥中 AOB 群落的特征,解析 AOB 丰度和分布对硝酸盐外源输入的响应,研究成果可为沉积物氮素分布特征和迁移转化研究提供参考。

1 试验材料与方法

1.1 研究区概况和沉积物采集

淮河流域里下河地区湖荡众多,近年来受人类活动的影响,水体污染状况加剧,自净功能减弱^[7]。样品采集时间为初秋季节,采样点分别为得胜湖中心(DS)、九龙口东北入湖口(JLK)、大纵湖北部(DZ1)以及大纵湖中心(DZ2)(图1),平均水深分别为3.5 m、1.5 m、2.1 m 和 1 m,各采样点受人类活动影响的程度差别较大,污染物来源各不相同。得胜湖周边有化肥厂与采砂场,湖区有围网养殖;九龙口刚疏浚,上游存在渔畜禽类养殖区;大纵湖北部围网养殖密集,湖心水生植物繁密。使用抓斗式采样器采集表层 10 cm 左右的沉积物,速冻后运回实验室用于 DNA 提取和理化性质测定。

1.2 上覆水理化性质测定

利用多参数水质分析仪(美国 YSI V6600)现场测定上覆水的溶解氧(DO)、pH 值、水温;其他指标参照文献[8-9]测定,其中总氮(TN)、硝氮(NO_3^-)、亚硝氮(NO_2^-)、氨氮(NH_4^+)、总磷(TP)、磷酸盐(PO_4^{3-})采用流动注射分析仪(SAN++,SKALAR,荷兰)测定,总有机碳(TOC)使用 TOC 仪(Multi N/C 2100,Jena,德国)进行测定。

1.3 沉积物相关指标测定

沉积物样品的分析方法主要参照《土壤农业化学分析方法》^[10]。其中,TN 先后按照半微量-开氏消煮法、流动注射分析法进行测定; NH_4^+ 、 NO_3^- 和 NO_2^- 的测定则先用浸提法进行处理,接着采用流动注射分析法测定过滤后的浸提液。

1.4 DNA 提取、PCR 扩增与系统发育分析

将冻干过筛后的 0.5 g 沉积物进行 DNA 提取和纯化,经 70% 乙醇与 TE 溶液处理后体积为 50 μL , -20°C 保存。重复 3 次,合并稀释后作为模板进行 25 μL 体系扩增。采用特异性引物 amoA-1F (5'-GGGGTTTCTACTGCTGCT-3') 和 amoA-2R (5'-CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3')^[11] 进行 amoA 基因扩增。参考文献[12]克隆与测序,最后获得 AOB 核酸序列登录号为 KM516473- KM516706。使用 DOTUR 软件选取代表性序列,在 GenBank 中比对最相似序列,再选取参照序列,用 ClustalX 1.8、Jukes-Cantor 模型、MEGA 5.0 进行序列比对、计算距离和检验对比,通过 Kimura 2 参数矩阵的邻接法构建系统发育树^[13],并评估进化树的可靠性,自举值为 1 000 次。

1.5 多样性分析方法

通过 DOTUR 软件计算克隆文库覆盖率(*C*)、Shannon-Wiener 多样性指数、Simpson 多样性指数、Sace 丰度指数以及 Chao1 丰度指数。Shannon-Wiener 和 Simpson 多样性指数反映群落结构的复杂程度,Sace 丰度指数和 Chao1 丰度指数表示种类丰富程度。

$$C = [1 - (n_1/N)] \times 100\%$$

(1)

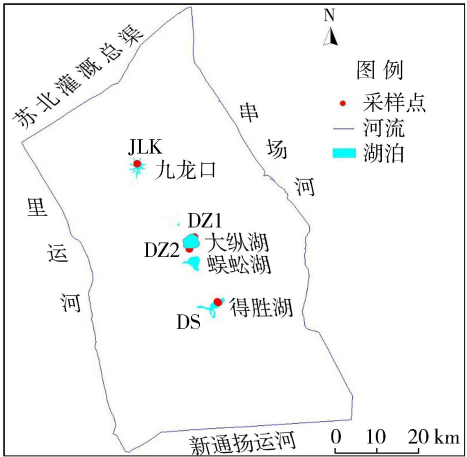


图1 研究区采样点布设与位置
Fig.1 Arrangement and location of sampling points in the study area

式中: n_1 ——分类操作单元 (operational taxonomic unit, OTU) 数目; N ——相应克隆库的总克隆数量^[14]。

1.6 反硝化同位素测定方法

菌种为致金色假单胞菌(*P. aureofaciens*),编号 NRRLB-1578。将复活复壮的菌株接种到胰蛋白大豆肉汤培养基,浓缩后倒入顶空瓶,用高纯 N₂ 吹出 N₂O,加入蒸馏水,搅拌、震荡、离心,用气密性注射器将离心后的上清液注入带有浓缩菌的顶空瓶中,倒置放入恒温箱 30℃ 过夜培养。第 2 天注入 NaOH 溶解培养产生 CO₂。用带有预浓缩装置和气相色谱仪的稳定同位素质谱仪 (MAT-253, Thermo, 美国) 分析 N₂O 中的 $\delta^{15}\text{N}$ ^[15]。

2 结果与讨论

2.1 基本理化性质

采样点基本理化指标见表 1,上覆水偏碱性,各采样点 TN、NH₄⁺ 质量浓度相差较大,TP 与 TOC 质量浓度相似;DS 中 TN、TP 质量浓度普遍高于其他采样点;JLK 的 NO₃⁻、NH₄⁺ 质量浓度较高;DZ2 与 DZ1 的 TN、TP 质量浓度偏低。4 个采样点 DO 质量浓度介于 3.14 ~ 6.85 mg/L 之间;NO₂⁻ 质量浓度接近于 0,远小于 NO₃⁻ 质量浓度,说明 NO₂⁻ 在水体中没有得到积累,可知 NO₂⁻ 氧化过程没有成为 3 个湖泊 NH₄⁺ 转化的限速步骤。

表 1 各采样点基本理化指标

Table 1 Basic physical and chemical indexes of each sampling point

采样点	pH 值	$\rho(\text{DO})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	水温/℃	$\rho(\text{TN})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$\rho(\text{NO}_2^-)/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$\rho(\text{NO}_3^-)/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$\rho(\text{NH}_4^+)/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$\rho(\text{TP})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$\rho(\text{PO}_4^{3-})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$\rho(\text{TOC})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$
DS	7.37	3.42	24.0	5.41	0.02	0.83	0.67	0.21	0.18	6.27
JLK	7.50	4.02	23.3	2.98	0.00	0.56	2.49	0.14	0.09	6.15
DZ1	7.83	6.85	22.1	2.93	0.01	0.27	0.32	0.11	0.05	7.77
DZ2	7.31	3.14	22.8	3.05	0.01	0.48	0.29	0.14	0.08	6.60

2.2 沉积物-水界面的氮素分布特征

2.2.1 间隙水中 TN 和可交换态氮的垂向分布特征

间隙水中可交换态氮的垂向分布特征如图 2 所示。(a) DZ2 的 TN 质量比较高;DS 中 TN 质量比随深度增加而缓慢增加;JLK 中 TN 质量比较低,随深度变化较小,这可能与该采样点刚经过疏浚有关;DZ1 的 TN 质量比随深度增加呈较大幅度的锯齿状变化。(b) 4 个采样点间隙水中 NO₃⁻ 的质量比在 0 ~ 4 cm 处随深度减小而减小,4 cm 以下较稳定,间隙水和上覆水间的浓度差导致了表层间隙水的 NO₃⁻ 向上覆水释放;DS 中的 NO₃⁻ 质量比小于其他 3 个采样点,与 DO、生物活性和植物密度有关。(c) 4 个采样点间隙水中 NO₂⁻ 质量比较低,随深度增加呈锯齿状减少,与 NO₂⁻ 本身不稳定有关。(d) 表层 3 cm 以上的间隙水中, DZ2 处 NH₄⁺ 质量比垂向变幅最大,可能与微生物硝化作用和水生植物的同化吸收有关。

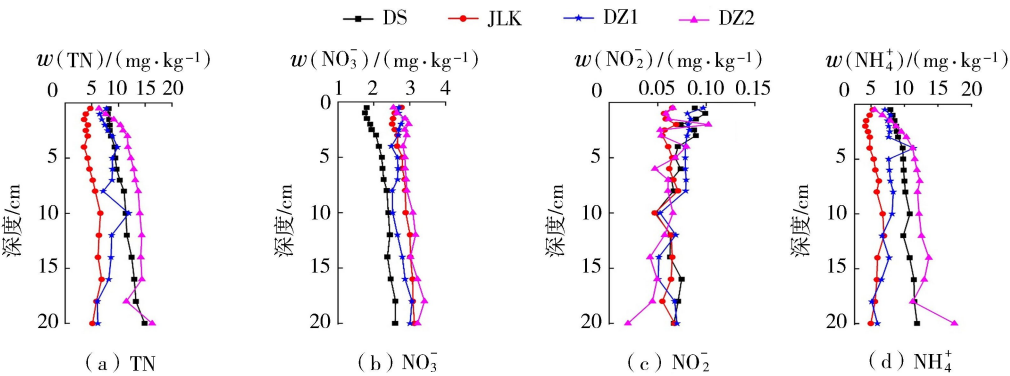


图 2 间隙水 TN 和可交换态氮的垂向分布特征

Fig. 2 Vertical distribution characteristics of TN and exchangeable nitrogen in interstitial water

2.2.2 沉积物中 TN 和可交换态氮的垂向分布特征

沉积物中 TN 和可交换态氮的垂向分布如图 3 所示。(a) 0 ~ 20 cm 的 TN 质量比介于 139.8 ~ 4623.0 mg/kg 之间,平均为 1494.3 mg/kg,表层 8 cm 以上 TN 垂向变化较大。DZ1 和 DZ2 的 TN 质量比约为 DS 和 JLK 同一分层处的 2 倍以上。DZ1 和 DZ2 表层 8 cm 以上的 TN 质量比高于 8 cm 以下,DS 表层 8 cm 以

上 TN 质量比低于 8 cm 以下,JLK 垂向变化较小。(b) NO_3^- 质量比随深度的增加而降低,表层 4 cm 变化明显,DS 垂向变幅最大。JLK 表层 3 cm 以上的 NO_3^- 质量比随深度缓慢增加,而到 4 cm 处突然降低。(c) 表层 4 cm 以上的 NO_2^- 质量比变幅较大,DZ1 表层 4 cm 处最低。(d) NH_4^+ 质量比呈先增后降的趋势,但峰值点出现深度不同,DS、JLK、DZ1 和 DZ2 分别出现在 14 cm、10 cm、4 cm 和 18 cm 处。

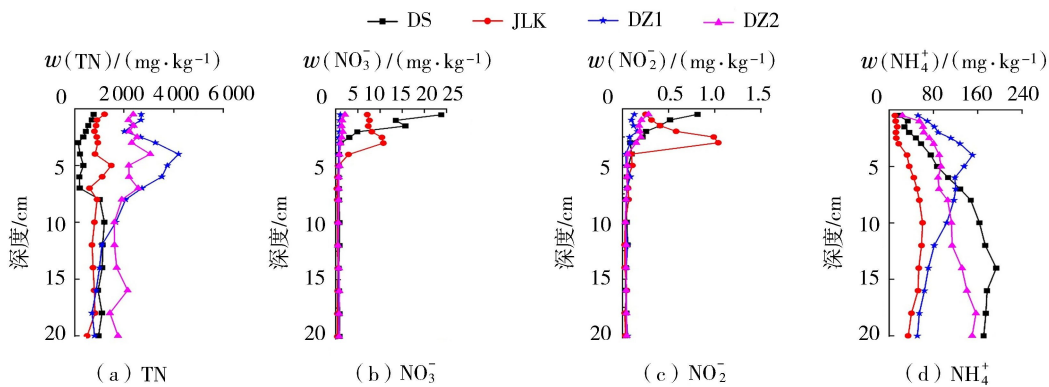


图3 沉积物中 TN 和可交换态氮的垂向分布

Fig.3 Vertical distribution of TN and exchangeable nitrogen in sediments

2.3 amoA 基因多样性分析

利用细菌特异性 PCR 引物来扩增 AOB 的 amoA 基因,获得 491 bp 的扩增产物。在挑出的 240 个克隆序列中,成功测定了 235 个,DS、JLK、DZ1、DZ2 的目的序列克隆数分别为 59 个、58 个、59 个、60 个。将测序结果用 ClustalX1.8 和 Dnadist 软件生成相似矩阵,用 DOTUR 软件进行 OTU 划分。根据式(1)计算的克隆文库的覆盖率大于 75%(表 2),包括了大多数的 amoA 基因的类型。通过表 2 可知,DS 的 Shannon-Wiener 和 Simpson 多样性指数大于其他采样点;DZ1 的 AOB 生物多样性最低;DZ2 与 DZ1 相比,多样性指数与丰度指数均较高。

表 2 AOB 的 amoA 多样性

Table 2 amoA diversity of ammonia-oxidizing bacteria

采样点	克隆数/个	分类操作单元数/个	C/%	Shannon-Wiener 多样性指数	Simpson 多样性指数	Sace 丰度指数	Chao1 丰度指数
DS	59	15	75	2.2	7.5	37.7	51
JLK	58	9	84	1.4	2.6	19.0	19
DZ1	58	4	93	0.7	1.4	5.4	5
DZ2	60	8	87	1.3	3.0	14.8	14

2.4 amoA 基因系统发育分析

按 95% 同源性将沉积物中 AOB 的 amoA 基因克隆序列分为 20 个 OTU,用 Blast 寻找参比序列,用 MEGA5.0 构建系统发育树(图 4),分为 4 个 Cluster,共 235 个序列。Cluster 1、Cluster 2 和 Cluster 3 聚类于亚硝化单胞菌属,Cluster 4 聚类于亚硝化螺菌属。Cluster1 中包含了 68 个序列,占 28.9%,被分为 7 个 OUT,分别从 DS、JLK、DZ1、DZ2 中分离得到 21 个、14 个、2 个和 31 个;参考序列来自长江口、废弃的矿业池塘、沙质河流沉积物和废水处理系统中。Cluster 2 中包含 147 个序列,占 62.6%,被分为 5 个 OUT,分别从 DS、JLK、DZ1、DZ2 中分离得到 32 个、39 个、50 个和 26 个;参考序列来自湖泊沉积物、河口沉积物、废水处理系统。Cluster3 中包含 2 个序列,仅占 0.9%,被分为 2 个 OUT;参考序列来源于废水处理系统。Cluster 4 中包含 18 个序列,占 7.7%,被分为 6 个 OUT,分别从 DS、JLK、DZ1、DZ2 中分离得到 4 个、6 个、6 个和 2 个。Cluster 4 同时又可分为两个亚 Cluster,第一个亚 Cluster 有 6 个序列,来自 DS、DZ2、JLK,分别有 3 个、1 个和 2 个,参考序列来源于城市饮用水配送系统和长江口;另一个亚 Cluster 有 12 个序列,来自 DS、DZ1、DZ2、JLK,分别有 1 个、6 个、1 个和 4 个,参考序列为城市饮用水配送系统和富营养化淡水沉积物。DS 和 DZ2 中的 AOB 主要聚类于 Cluster1 和 Cluster2;JLK 和 DZ1 的 AOB 主要聚类于 Cluster2。20 个 OUT 代表序列与参考序列的基因片段在核苷酸水平上的同源性均为 95%。在 20 个 OTU 中,聚类于 Cluster1 和 Cluster2 中的 OTU1 和 OTU12 能在所有样品中找到,序列数量最多,分别为 53 个(22.6%)和 122 个(51.9%)。4 个采样点表层沉

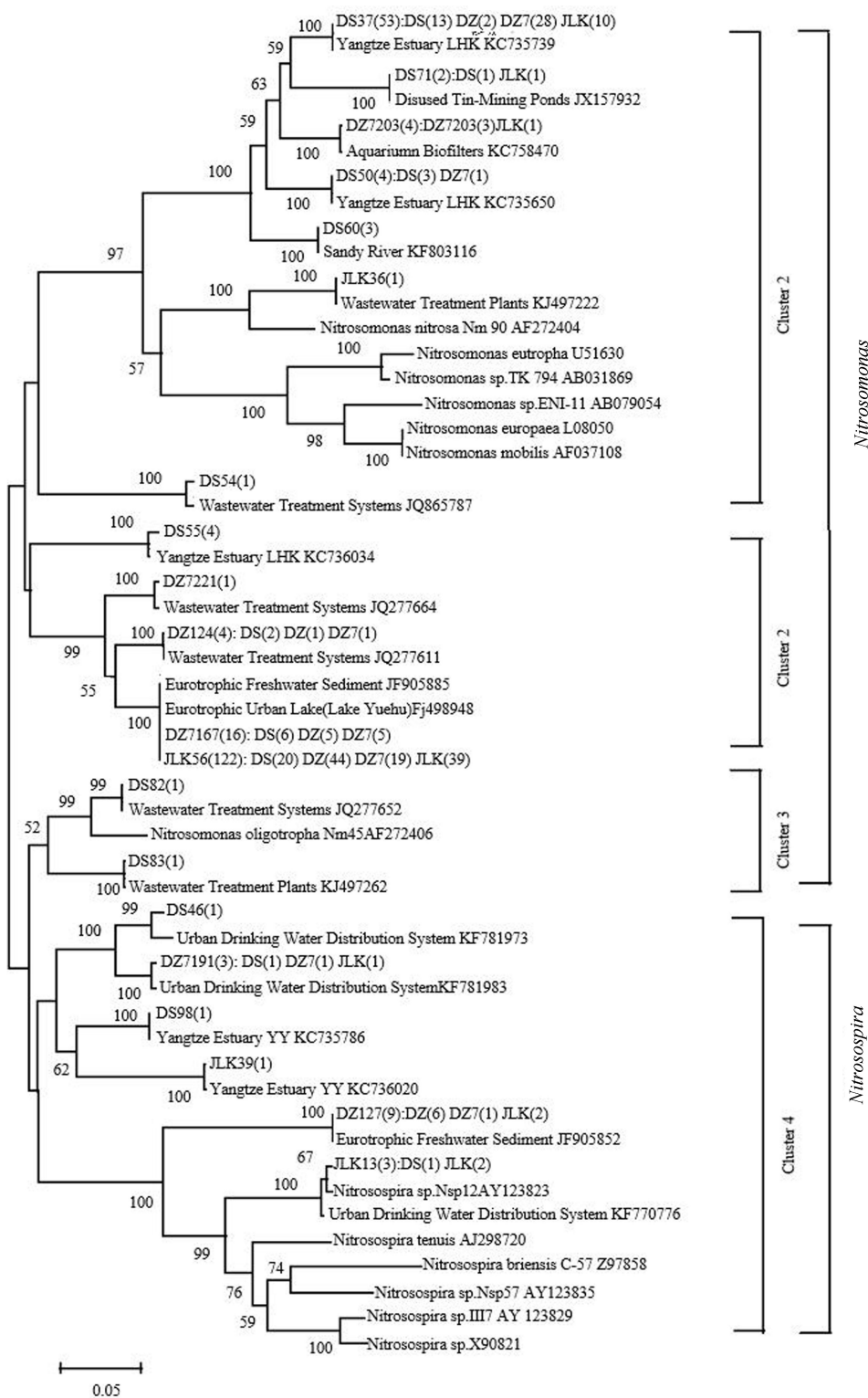


图 4 AOB 的 *amoA* 基因序列的系统发育分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis of *amoA* gene sequence of ammonia-oxidizing bacteria

沉积物 AOB 都属于 β -Proteobacteria 亚纲的亚硝化单胞菌群(占 92.3%)和亚硝化螺菌群。亚硝化单胞菌属共有 217 个克隆序列,占 14 个 OTU;亚硝化螺菌属只有 18 个序列,占 6 个 OTU。

2.5 AOB 的分布与同位素溯源分析

长期施肥处理影响 AOB 群落的组成^[16]。DS 周边农田的长期施肥及 JLK 上游畜禽养殖带来的面源污染增加了 AOB 的丰度和生物多样性,促进了表层沉积物中 NH_4^+ 向 NO_3^- 的转化,导致了 DS 表层 NO_3^- 质量浓度最大,JLK 次之。由于存在质量浓度梯度,间隙水中的 NO_3^- 通过扩散作用进入上覆水,增加了上覆水中的

NO₃⁻ 质量浓度,使得 DS 上覆水中的 NO₃⁻ 质量浓度较高(表 1)。JLK 表层沉积物中 AOB 的生物多样性和相对丰度低于 DS,这与 JLK 刚经过疏浚有关。

采样点表层 2 cm 以上沉积物中 TN 质量浓度从小到大依次为 DS、JLK、DZ2、DZ1;NH₄⁺ 为 JLK、DS、DZ2、DZ1;NO₃⁻ 为 DS、JLK、DZ2、DZ1。可见,DZ 的 NH₄⁺ 和 TN 质量浓度最高,NO₃⁻ 最低,长期围网养殖降低了 AOB 的生物多样性和相对丰度,降低了 NH₄⁺ 向 NO₃⁻ 的转化量。4 个采样点中 NH₄⁺ 与 TN 质量浓度顺序接近,与 AOB 的 Shannon-Wiener 多样性指数、Simpson 多样性指数、Sace 丰度指数和 Chao1 丰度指数大小相反;NO₃⁻ 质量浓度与多样性指数和丰度指数的大小一致。较高的多样性和丰度使得 AOB 群落对环境的反馈能力较强,保障了 AOB 群落结构具有较大的缓冲能力,促进了硝化反应,使得 DS 和 JLK 处产生的 NO₃⁻ 较多,并向上覆水中释放^[17]。较低的 AOB 生物多样性和丰度使得 NH₄⁺ 转化为 NO₃⁻ 的量较少,导致 DZ1 的 TN 和 NH₄⁺ 质量浓度最高,NO₃⁻ 最低。DZ2 采样点 NO₃⁻ 较低,一是由于 AOB 的生物多样性和丰度相对较低,硝化反应较弱;二是沉水植物的同化吸收。从 1~8 cm DS 和 JLK 间隙水中的 NO₃⁻ 质量浓度呈现增加趋势,而 DZ2 变化不大,DZ1 则有减小趋势,4 个采样点 1~8 cm 表层沉积物中 NO₃⁻ 质量浓度的垂向变化从大到小依次为 DS、JLK、DZ2、DZ1,这与 4 个采样点 AOB 的生物多样性和丰度顺序一致,说明 AOB 的生物多样性和丰度对该地区浅水湖泊沉积物-水界面 NO₃⁻ 的垂向分布有重要影响。

Purkhold 等^[18]的研究指出,亚硝化螺菌属易在低氮环境中更有优势的氨氧化功能,而亚硝化单胞菌属通常在富含氨氮环境中具有竞争优势;在 235 个 amoA 基因克隆序列中有 217 个序列属于亚硝化单胞菌群,占 92.3%,反映了氨氮污染程度较高的现状。DZ2 中 AOB 的 *Nitrosospira* 群落占该点总克隆序列的 3.34%,δ¹⁵N 为 1.0%,结合该点沉水植物密集的状况,认为硝酸盐主要来源于植物的腐烂。DS、DZ1、JLK 的 *Nitrosospira* 群落占各采样点总克隆序列的比例是 DZ2 的 2 倍以上,分别为 6.8%、10.4% 和 10.4%,氮同位素比值偏正(0.829%、0.569% 和 0.884%)。结合现场状况,既有养殖污染汇入,又有农业面源污染,导致了 *Nitrosospira* 群落较丰富,与已有研究存在共性^[19-21],即农牧废水湿地处理系统中 AOB 以 *Nitrosospira* 为主,而畜类粪便和冲洗水中以 *Nitrosomonas* 为主。DS 中的 AOB 生物多样性和丰度最高,可能与得胜湖 AOB 的来源较为复杂有关,硝酸盐定源结果为混合型污染(氮同位素比值为 0.829%)。

周边环境的复杂性影响 AOB 的生物多样性和相对丰度。DZ1 的 AOB 生物多样性和氮同位素比值低于 DS、DZ2 和 JLK,可能与该采样点受围网养殖的直接影响较大有关,长期围网养殖增加了人为污染源的注入量,降低了氮同位素比值,并造成该采样点生物多样性和相对丰度的降低。可见,同一区域拥有不同污染物来源的湖泊表层底泥中硝氮 δ¹⁵N 存在差异,长期的围网养殖(DZ1)会导致 δ¹⁵N 降低(0.57%)、AOB 的丰度和生物多样性降低;腐烂植物(DZ2)的长期过度累积会导致 δ¹⁵N 增大(1.0%),AOB 的丰度和生物多样性降低。

3 结 论

得胜湖、九龙口和大纵湖存在 AOB,丰度最多的是亚硝化单胞菌属(占 92.3%)。DS、DZ1 和 JLK 表层沉积物中亚硝化螺菌属相对丰度是 DZ2 的 2 倍以上。环境与污染来源复杂的地方 AOB 的生物多样性较高,得胜湖 AOB 生物多样性和丰度最高,大纵湖入湖口的 AOB 生物多样性最低。长期的围网养殖增加了人为污染源的注入量,降低了氮同位素比值,降低了 AOB 的丰度和生物多样性。

参考文献:

[1] 杨柳燕,王楚楚,孙旭,等.淡水湖泊微生物硝化反硝化过程与影响因素研究[J].水资源保护,2016,32(1):12-22. (YANG Liuyan,WANG Chuchu,SUN Xu,et al. Study on microbial nitrification and denitrification processes and influence factors in freshwater lakes[J]. Water Resources Protection,2016,32(1):12-22. (in Chinese))

[2] PURKHOLD U,POMMERENING-Röser A,JURETSCHKO S,et al. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis; implications for molecular diversity surveys[J]. Applied and Environmental Microbiology,2000,66:5368-5382.

[3] HORZ H P, BARBROOK A, FIELD C B, et al. Ammonia-oxidizing bacteria respond to multifactorial global change[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2004,101(42):15136-15141.

- [4] RUBEN A,NOBUYASU Y,KATSUJI T,et al. Change in the bacterial community of natural river biofilm during biodegradation of aniline-derived compounds determined by denaturing gradient gel electrophoresis[J]. *Journal of Health Science*,2003,49(5): 379-385.
- [5] GARNIER J A,MOUNIER E M,LAVERMAN A M,et al. Potential denitrification and nitrous oxide production in the sediments of the Seine River drainage network (France)[J]. *Journal of Environmental Quality*,2010,39(2): 449-459.
- [6] 孙旭,胡志新,杨柳燕. 湖泊水体营养状态对沉积物好氧氨氧化菌异质性的影响[J]. *水资源保护*,2018,34(4): 86-92. (SUN Xu, HU Zhixin, YANG Liuyan. Effect of lake trophic state on heterogeneity of aerobic ammonia-oxidizing archaea and bacteria in sediments [J]. *Water Resources Protection*,2018,34(4): 86-92. (in Chinese))
- [7] 李志伟,丁凌峰,唐洪武,等. 淮河干流污染物分布及变化规律[J]. *河海大学学报(自然科学版)*,2020,48(1): 29-38. (LI Zhiwei,DING Lingfeng,TANG Hongwu,et al. Distribution and variation of pollutants in main stream of Huaihe River[J]. *Journal of Hohai University (Natural Sciences)*,2020,48(1): 29-38. (in Chinese))
- [8] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法 [M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社,2002.
- [9] 夏倩,刘凌,王流通,等. 连续流动分析仪在水质分析中的应用[J]. *分析仪器*,2012(2): 64-68. (XIA Qian, LIU Ling, WANG Liutong,et al. Application of continuous flow analyzer in water analysis [J]. *Analytical Instruments*,2012(2): 64-68. (in Chinese))
- [10] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社,2000.
- [11] MOSIER A C,FRANCIS C A. Relative abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the San Francisco Bay Estuary [J]. *Environmental Microbiology*,2008,10(11): 3002-3016.
- [12] 燕文明,刘凌,赵倩维,等. 小型浅水湖泊表层沉积物氨氧化古菌群落结构特征[J]. *河海大学学报(自然科学版)*,2016,44(5): 449-453. (YAN Wenming, LIU Ling, ZHAO Qianwei, et al. Characteristics of community structure of AOA in surface sediments of small shallow lakes[J]. *Journal of Hohai University (Natural Science)*,2016,44(5): 449-453. (in Chinese))
- [13] TAMURA K,PETERSON D,PETERSON N,et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Molecular Biology and Evolution*,2011,28(10): 1244-1245.
- [14] MULLINS T D,BRITSCHGI T B,KREST R L,et al. Genetic comparisons reveal the same unknown bacterial lineages in Atlantic and Pacific bacterioplankton communities[J]. *Limnology and Oceanography*,1995,40(1): 1894-1903.
- [15] 张翠云,张俊霞,马琳娜,等. 硝酸盐氮同位素反硝化细菌法测试技术的建立[J]. *核技术*,2011,34(3): 237-240. (ZHANG Cuiyun,ZHANG Junxia,MA Linna,et al. A technique for measuring nitrogen isotopic composition of nitrate using the denitrifier method[J]. *Nuclear Technology*,2011,34(3): 237-240. (in Chinese))
- [16] HE Jizheng. 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[J]. *Environmental Microbiology*,2007,9(9): 2364-2374.
- [17] 朱亮,谈悦,陈琳,等. 库区植物塘水生植物附着细菌群落季节演替特征及影响因素[J]. *河海大学学报(自然科学版)*,2019,47(3): 202-208. (ZHU Liang,TAN Yue,CHEN Lin,et al. Seasonal succession characteristics and influencing factors of bacterial community attached to aquatic plants in reservoir plant pond[J]. *Journal of Hohai University (Natural Science)*,2019,47(3): 202-208. (in Chinese))
- [18] PURKHOLD U,WAGNER M,TIMMERMAN G,et al. 16S rRNA and amoA-based phylogeny of 12 novel betaproteo bacterial ammonia-oxidizing isolates: extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonads[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*,2003,53: 1485-1494.
- [19] IBEKWE A M,GRIEVE C M,LYON S R. Characterization of microbial communities and composition in constructed dairy wetland wastewater effluent [J]. *Applied and Environmental Microbiology*,2003,69(9): 5060-5069.
- [20] 陈晓丽,雷勇,黄国如. 北江飞来峡库区流域非点源污染现状评价[J]. *水资源保护*,2019,35(2): 44-48. (CHEN Xiaoli, LEI Yong,HUANG Guoru. Evaluation on non-point source pollution in Feilaixia Reservoir Area of Beijiang River[J]. *Water Resources Protection*,2019,35(2): 44-48. (in Chinese))
- [21] YAN Wenming, YU Zhongbo, ZHAO Dayong, et al. Community structures of ammonia-oxidizing and their role in the nitrogen circle in surface sediments of shallow lakes with different pollutant sources[J]. *Desalination and Water Treatment*,2017,64(2): 147-156.