

DOI:10.3876/j.issn.1000-1980.2021.03.010

硝氮对狐尾藻附着生物膜细菌群落的影响

张松贺,袁 强,陈 洁,张子秋

(河海大学环境学院,江苏 南京 210098)

摘要:为探讨关于沉水植物表面附着微生物群落对硝态氮的响应机制,以沉水植物狐尾藻为研究对象,利用扫描电镜、16S rRNA 高通量测序以及 PCR 扩增技术,探究 4 种硝氮浓度(2 mg/L、8 mg/L、20 mg/L 和 40 mg/L)和对照条件下狐尾藻表面细菌群落特征及相关反硝化基因的变化规律。结果表明:硝氮对生物膜的生长具有促进作用,但降低了生物膜细菌 α 多样性; β_{SOR} 多样性指数表明硝酸盐胁迫下细菌群落构建由物种更替主导;Proteobacteria、Planctomycetes、Cyanobacteria 和 Bacteroidetes 是生物膜的优势门;与对照相比,硝氮刺激了反硝化细菌(*Rhodobacter*、*Acinetobacter* 和 *Bacillu*)的生长及反硝化基因(*napG*、*nirS*、*cnorB*、*qnorB* 和 *nosZ*)丰度的增加;网络分析表明生物膜微生物间存在复杂的相互作用。这些结果表明微生物反硝化作用在湿地硝酸盐去除中发挥着重要作用。
关键词:硝氮;沉水植物;高通量测序;微生物群落;反硝化细菌;反硝化基因
中图分类号:X524 **文献标志码:**A **文章编号:**1000-1980(2021)03-0272-07

Effects of nitrate on bacterial communities of biofilm attached on *Myriophyllum Verticillatum*

ZHANG Songhe, YUAN Qiang, CHEN Jie, ZHANG Ziqiu
(College of Environment, Hohai University, Nanjing 210098, China)

Abstract: To reveal the response mechanism of bacterial communities of biofilm to nitrate, this study took the submerged macrophyte *Myriophyllum Verticillatum* as the research object and explored the variations of bacterial community structure and related denitrification genes on the submerged macrophyte under four kinds of nitrate loading (2 mg/L, 8 mg/L, 20 mg/L and 40 mg/L), with the scanning electron microscope, 16S rRNA high-throughput sequencing and PCR amplification technology. The results showed that nitrate stimulated the growth of biofilm but reduced the bacterial α -diversity. The β_{SOR} diversity index showed that the bacterial community construction under nitrate loading was dominated by species replacements. Proteobacteria, Planctomycetes, Cyanobacteria and Bacteroidetes were the dominant phyla in biofilm. Compared with the control group, nitrate stimulated the growth of denitrifying bacteria (*Rhodobacter*, *Acinetobacter* and *Bacillus*) and the abundance of denitrifying genes (*napG*, *nirS*, *cnorB*, *qnorB* and *nosZ*). Network analysis showed that there were complex interactions among the microbes in biofilm. These results indicate that microbial denitrification plays an important role in the process of nitrate removal in wetland.
Key words: nitrate; submerged macrophyte; high-throughput sequencing technology; microbial community; denitrifying bacteria; denitrifying gene

氮是引起水体富营养化的重要物质之一。水体中无机氮的形态主要包括氨氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$)、亚硝氮($\text{NO}_2^-\text{-N}$)和硝氮($\text{NO}_3^-\text{-N}$),其中氨氮和亚硝氮很容易被氧化为更稳定的硝态氮^[1]。高浓度硝氮对水生植物和微生物具有毒性,长期饮用硝氮超标的水也会引起严重的人类健康问题^[2]。因此,硝酸盐控制与减排是水生态环境恢复中一个重要而具有挑战性的问题。
湿地作为一种经济实用、环保有效的措施广泛应用于污水处理中。水生植物吸收及微生物反硝化是湿地去除硝氮的主要途径^[2]。与挺水和浮叶植物相比,沉水植物几乎全株生长在水面下,可直接从水体中积累养分^[3]。生物膜是一种由细菌、真菌、藻类以及其他非生物成分组成的复杂微孔生物反应器^[4],沉水植物

基金项目: 国家自然科学基金(E51879084,E51579075)
作者简介: 张松贺(1977—),男,教授,博士,主要从事水生态修复与水资源保护研究。E-mail: shzhang@hhu.edu.cn
引用本文: 张松贺,袁强,陈洁,等. 硝氮对狐尾藻附着生物膜细菌群落的影响[J]. 河海大学学报(自然科学版),2021,49(3):272-278.
ZHANG Songhe, YUAN Qiang, CHEN Jie, et al. Effects of nitrate on bacterial communities of biofilm attached on *Myriophyllum Verticillatum* [J]. Journal of Hohai University(Natural Sciences),2021,49(3):272-278.

可为其附着生物膜的生长提供合适的附着面以及稳定的有机碳源^[2]。生物膜中的微生物在硝化反硝化等营养循环中起着关键作用^[5]。然而,关于硝氮负荷下沉水植物附着微生物群落结构及相关反硝化微生物的响应机制仍不清楚。

本文以针状叶、根系不发达的沉水植物狐尾藻(*Myriophyllum Verticillatum*)为对象,研究不同硝氮浓度条件下狐尾藻叶片及其附着微生物的形态特征变化,利用高通量测序和定量 PCR 分析技术探讨微生物群落结构和反硝化基因丰度的变化规律,系统分析生物膜在硝态氮转化中的潜在作用,以期为沉水植物生态修复以及水环境保护提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验方法

狐尾藻从南京高淳水生植物基地购买。试验装置使用 140 L(700 mm×500 mm×400 mm)的水箱,添加 7 cm混合均匀的沉积物(取自南京乌龙潭湖)以及 30 cm 的自来水。稳定一周后,每个水箱种植 60 株株高约 30 cm 且形态相近的狐尾藻(种植密度约 300 株/m²,种植深度为 5 cm)。待植物驯化 2 周后,分别控制水体硝氮浓度为 2 mg/L(M2)、8 mg/L(M8)、20 mg/L(M20)和 40 mg/L(M40),并设置空白对照组 M0。每 2 d 监测 1 次硝氮浓度,添加硝酸盐化合物($w(\text{NaNO}_3):w(\text{KNO}_3)=1:1$)以维持设定浓度。每组试验设置 3 个平行样,于河海大学浅水湖泊综合治理与资源开发教育部重点实验室温室内进行。

1.2 样品测定

1.2.1 水质及理化指标测定

采用便携式多参数分析仪(HACH, USA)每 2 d 上午 8:00—9:00 测定上覆水中溶解氧(DO)、pH、电导率(E_c)和氧化还原电位(ORP)。试验期间每 2 d 采集 1 次水样,使用自动分析仪(SEAL, Germany)测定水体中的 NO₃-N 浓度。

1.2.2 扫描电镜

试验第 14 天,分别采集 M0 和 M20 组的狐尾藻叶片。将植物切片后(5 mm×5 mm),依次使用 30%、50%、70%、80%、90% 浓度的酒精脱水 15 min,再用 100% 浓度的酒精脱水 2 次,每次 15 min,冷冻干燥 12 h 后备用。最终使用日立 S-4800 场发射扫描电镜进行观察。

1.2.3 生物膜采集

在水面下 10~20 cm 处采集约 50 g 的狐尾藻叶片,采集过程中注意避免沉积物的污染。将采集后的样品转移到含有 500 ml 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 为 7.4)的聚乙烯瓶中,超声处理(150 W, 40 kHz)1 min, 225 r/min 转速下振荡 30 min 后,通过 50 μm 的筛子去除植物碎屑,最后离心 10 min(8 000 rpm)。离心后的生物膜保存在-80 ℃用于提取 DNA。

1.2.4 PCR 扩增

使用特定引物^[2],利用定量聚合酶链反应(qPCR)方法测定生物膜 DNA 样品中反硝化基因的丰度。采用荧光染料 SYBR-Green 法,使用 MyiQ2 实时 PCR 检测系统(Bio-Rad)在 20 μL 反应混合物中进行 qPCR 扩增,反应物包括 supermix(10 μL)、上下游引物(0.5 μL)、DNA 模板(1 μL)和超纯水(8 μL)。qPCR 扩增共包括 40 个循环。

1.3 数据分析

硝氮去除率及反硝化基因丰度使用 Origin 8.0 处理制图;利用 SPSS(2000 版)进行 Pearson 相关性指数分析和单因素方差分析;使用 PAST 软件(Version 3.10)基于 Bray-Curtis 距离在 OTU 水平上对细菌群落结构聚类分析; β_{SOR} (Sørensen 差异性指数)、 β_{SIM} 和 β_{NES} 使用 R 语言(Version 3.5.3)中的 betapate 软件包计算;生物膜门水平上的细菌群落分布使用 R 语言中的 cirilize 软件包分析;利用 Heml 软件绘制术细菌属水平热图;利用 CANOCO(Version 4.5, USA)进行冗余分析;网络分析使用 R 语言中的 psych 包,基于 Spearman 相关系数($|r|>0.6, P<0.05$)分析后,使用 Gephi 软件可视化。

2 结果与讨论

2.1 不同处理组对硝氮去除率及水体理化指标的变化

本研究监测了试验 14 d 内狐尾藻对硝酸盐的去除效果(图 1),结果表明:各处理组前 3 d 对 NO₃-N 的去除

率高达 92.11%~94.17%,但随着时间的累积均显著下降,在试验末期低于 40%。初期阶段氮的去除可能与狐尾藻对硝氮的吸收吸附作用有关^[6]。处理 3 d 后,M2 对硝氮的去除率在 13.09%~43.88%之间,但在同一取样时间点都始终大于其他 3 组的去除效果(2.96%~27.38%)。已有研究表明,沉水植物在过量氮负荷下会吸收比它们营养所需的更多氮,但这种额外的吸收会随着时间的推移接近饱和而减少^[7]。Li 等^[8]研究表明,暴露于硝氮浓度为 10 mg/L 的水体 14 d 后,沉水植物苦草的生理活性受到显著抑制。这些结果说明高硝氮可能对狐尾藻产生了胁迫。

试验 14 d 内监测了各处理组水体理化参数,如表 1 所示。电导率 E_c 随硝酸盐浓度升高而升高。与对照 M0 相比,M2-M40 处理组水体的 pH、DO 和 ORP 的均值均下降。高浓度硝氮负荷下水体 DO 和 pH 的降低与狐尾藻受抑制的光合系统有关,植物减少了对二氧化碳吸收及氧气释放^[8];另外,生物膜形成过程中微生物的繁殖也会加大水体耗氧^[9]。

表 1 试验 14 d 内对照 (M0) 及硝酸盐处理组 (M2-M40) 水体的理化特征

Table 1 Physicochemical characteristics of overlying water in control (M0) and nitrate treatments (M2-M40) within 14 days of experiment

水体样品	pH	$\rho(\text{DO})/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	ORP 值/mV	$E_c/(\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1})$
M0	9.07±0.69	5.34±0.75	522.5±22.3	293.0±17.1
M2	9.07±0.37	4.69±1.12	470.3±21.9	300.8±23.5
M8	8.86±0.45	4.35±1.01	491.7±29.0	335.5±28.3
M20	8.38±0.48	3.75±1.20	499.9±22.4	418.6±33.5
M40	8.88±0.47	3.44±1.20	488.9±23.3	525.0±108.3

2.2 狐尾藻叶片及表面附着生物膜形态变化

根据电镜图像,对照处理下狐尾藻叶片结构清晰可见,附着了少量微生物,存在有典型的杆菌群落(图 2(a));而 20 mg/L 硝氮处理 14 d 后,狐尾藻表面附着了大量的细菌(球菌、芽孢杆菌和其他细菌)、微生物聚集团和藻类等微生物,这些微生物通过自身分泌的物质粘连聚集在一起,形成了明显的生物膜群落结构^[10](图 2(b))。这表明硝氮施加刺激了沉水植物附着生物膜的增长^[9],过量附着微生物会影响植物对光的接收,进而抑制沉水植物生长。

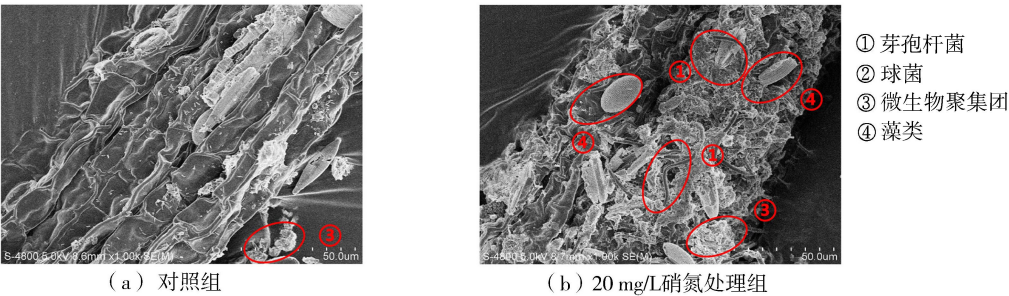


图 2 狐尾藻叶片表面扫描电镜照片

Fig. 2 SEM photographs of Myriophyllum Verticillatum leaves surface

2.3 不同处理组狐尾藻附着生物膜细菌群落特征

根据高通量测序结果,对细菌多样性指数进行了分析(表 2)。与对照 M0 相比,M2-M40 的细菌物种丰富度(OTU 数量)、群落多样性(shannon 和 simpson 指数)和群落均匀度(simpson 均匀度)均显著降低(ANOVA, $P < 0.05$)。这些结果说明硝酸盐的富集显著降低

表 2 生物膜样品细菌测序 α 多样性指数

Table 2 α -diversity indexes of biofilm samples by bacterial sequencing

水体样品	OTU 数量	shannon 指数	simpson 指数	simpson 均匀度
M0	1268 ^a	5.84 ^a	128.21 ^a	0.108 ^a
M2	579 ^b	4.69 ^b	48.01 ^b	0.082 ^b
M8	618 ^b	4.74 ^b	51.55 ^b	0.087 ^b
M20	590 ^b	4.63 ^b	44.98 ^b	0.085 ^b
M40	798 ^b	4.74 ^b	39.98 ^b	0.053 ^b

注:上标 a、b 表示各样品间存在差异显著(ANOVA, $P < 0.05$)。

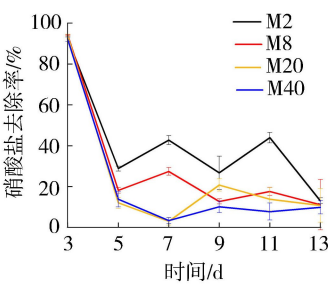


图 1 狐尾藻对硝酸盐去除率的变化
Fig. 1 Changes of nitrate removal rate by Myriophyllum Verticillatum

了狐尾藻附着生物膜细菌群落的生物多样性。与本研究结果类似,Zhang 等^[2]发现水体中的硝氮负荷降低了金鱼藻附生生物膜的微生物多样性。

聚类分析将 5 个生物膜样品分为 2 组:硝氮处理样品 M2-M40 聚集为组 I,而对照 M0 单独在组 II 内(图 3(a)),这表明硝氮的施加显著改变了狐尾藻附着生物膜的细菌群落结构。 β_{SOR} 多样性可用来描述微生物群落间的差异程度。根据物种的存在与否, β_{SOR} 可将生物多样性过程归结于两种生物现象: β_{NES} (生物因死亡或迁移造成的物种损失)和 β_{SIM} (物种更替)^[11]。研究中 β_{SOR} 多样性结果表明,硝酸盐胁迫下细菌群落多样性构建过程中($\beta_{\text{SOR}} = 0.60$),物种更替现象($\beta_{\text{SIM}} = 0.44$)大于物种损失($\beta_{\text{NES}} = 0.16$)。

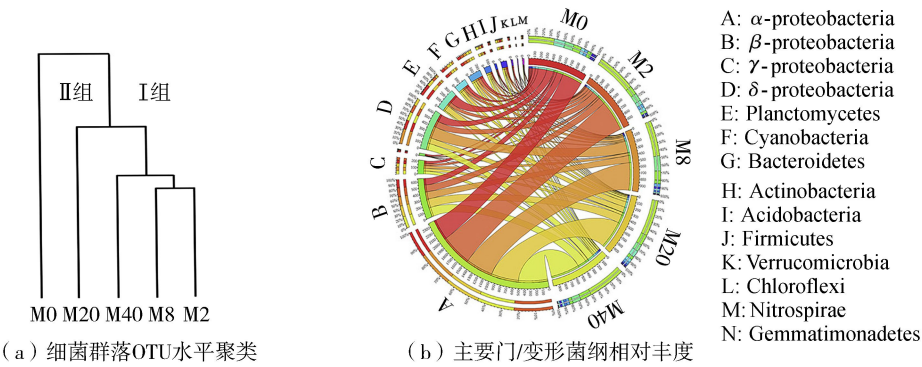


图 3 细菌群落 OTU 水平聚类 and 主要门/变形菌纲相对丰度

Fig. 3 OTU level cluster analysis of bacterial community, and relative abundance of major phyla/Proteobacteria

在 5 个附着生物膜样品中共有 12 个细菌门占优势(至少在一个生物膜样品中排前 10)(图 3(b))。Proteobacteria(53.57% ~ 71.92%)是最主要的门,其次是 Planctomycetes (9.60% ~ 20.1%)、Cyanobacteria (1.86% ~ 15.12%)、Bacteroidetes (2.37% ~ 5.13%)、Actinobacteria (3.66% ~ 4.80%)、Acidobacteria (1.22% ~ 3.74%)、Firmicutes (0.28% ~ 1.34%)、Verrucomicrobia (1.12% ~ 2.76%)、Chloroflexi (0.04% ~ 1.69%) 和 Nitrospirae (0.03% ~ 0.70%) 等。在 Proteobacteria 内,5 个生物膜样品内均检测到 α -proteobacteria (35.94% ~ 53.77%)、 β -proteobacteria (11.06% ~ 15.54%)、 γ -proteobacteria (3.58% ~ 4.75%) 和 δ -proteobacteria (0.25% ~ 1.89%)(图 3(b))。

与氨氮的施加相比^[4],硝酸盐负荷下沉水植物附着生物膜中 Nitrospirae 和 Chloroflexi 的相对丰度较低,而 Planctomycetes 的相对丰度较高。 α -proteobacteria 和 β -proteobacteria 在异养反硝化反应器中对硝酸盐的去除起着重要作用^[12],其在 M2、M8、M20、M40 样品中的丰度也显著高于 M0 ($P < 0.05$)。Planctomycetes 含碳水化合物水解基因^[2],Bacteroidetes 和 Actinobacteria 能消化植物纤维、水解有机物^[13]。这些结果表明硝氮可刺激与硝酸盐转化相关细菌的生长。蓝细菌门 Cyanobacteria 光合能力较强,是河湖系统中常见的自养细菌^[14],其丰度在对照 M0 中较高。

2.4 优势属及反硝化基因的变化

5 个生物膜样品中共监测出 23 个优势属(至少在一个生物膜样品中排前 10)(图 4(a))。其中包含 7 个反硝化细菌属:*Rhodobacter* (7.53% ~ 27.68%)、*Hyphomicrobium* (1.09% ~ 5.42%)、*Agrobacterium* (0.38% ~ 2.59%)、*Flavobacterium* (0.66% ~ 1.66%)、*Acinetobacter* (0% ~ 1.06%)、*Pseudomonas* (0.08% ~ 0.91%) 和 *Bacillus* (0.08% ~ 0.31%)^[2]。反硝化是自然生态系统中氮循环的重要一环。在本研究中,*Rhodobacter* 是生物膜中最主要的反硝化细菌。*Rhodobacter*、*Acinetobacter* 和 *Bacillus* 的丰度在 M2、M8、M20、M40 样品中均高于 M0。*Rhodobacter* 在异养条件下可去除大量硝态氮^[15];Pang 等^[16]发现 *Rhodobacter* 和 *Acinetobacter* 也是狐尾藻附着生物膜的优势反硝化细菌;*Bacillus* 是污水处理厂和湿地脱氮中常见的异养反硝化菌^[17]。这些结果表明硝氮刺激了上述反硝化细菌的增长,在湿地微生物反硝化过程中发挥了重要作用。

反硝化作用是一个复杂的过程,硝酸盐在反硝化细菌作用下逐步被还原为亚硝酸盐、一氧化氮、一氧化二氮和氮气($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$)^[2,18]。其中,硝酸盐还原基因(*napA/narG*)、亚硝酸盐还原基因(*nirK/nirS*)、一氧化氮还原基因(*cnorB/qnorB*)和一氧化二氮还原基因(*nosZ*)是反硝化过程中的关键基因^[1]。与对照 M0 相比,硝氮负荷刺激了反硝化基因 *napG*、*nirS*、*cnorB*、*qnorB* 和 *nosZ* 丰度的增加。基因 *nirG* 和 *nirK* 分别与 *nirA* 和 *nirS* 具有相似的功能^[2,5]。本研究中,与 *napA* 和 *nirK* 相比,硝氮的施加对基因 *nirG* 和

nirK 丰度的增加更为显著。Yan 等^[3]的研究表明总氮负荷增加了沉水植物表面生物膜中 *nirS*、*napG* 和 *corB* 基因的丰度,而 Lin 等^[6]研究发现氨氮负荷刺激了轮叶黑藻附着生物膜中基因 *qnorB* 和 *nosZ* 的丰度。基因 *nosZ* 常被用作检测微生物是否完全反硝化的分子标记^[5],其编码的酶参与 N_2O 转化为 N_2 的过程。在 7 个反硝化基因中,*nosZ* 基因的丰度最高($3.10\times10^6\sim1.25\times10^8$ copies/g),因此在本研究的反硝化过程中可能会抑制 N_2O 的排放而释放更多的 N_2 ^[19]。

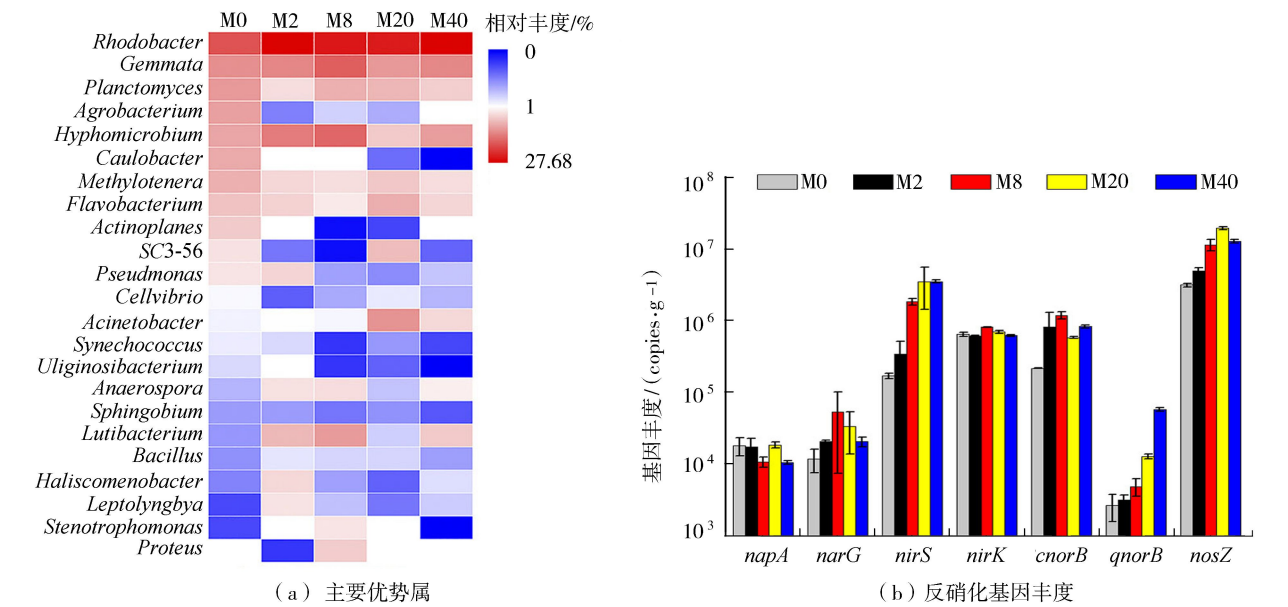


图4 5个生物膜样品中主要优势属及反硝化基因丰度

Fig.4 Dominant genera and abundance of denitrification genes in five biofilm samples

2.5 优势属和反硝化基因对环境参数的响应

采用 RDA 方法描述了环境参数与生物膜内优势属、反硝化基因间的潜在关系(图5),结果显示反硝化细菌(*Rhodobacter*、*Acinetobacter* 和 *Bacillus*)及反硝化基因(*nirS*、*cnorB*、*qnorB* 和 *nosZ*)与硝氮浓度呈正相关,这与 Yan 等^[3]的研究结果总体一致。基因 *napA* 需在完全好氧条件下表达及发挥功能^[17],好氧反硝化细菌 *Hyphomicrobium* 和 *Pseudomonas*^[2]及基因 *napA* 均与 DO 呈正相关。pH 也是影响反硝化的重要指标,已有研

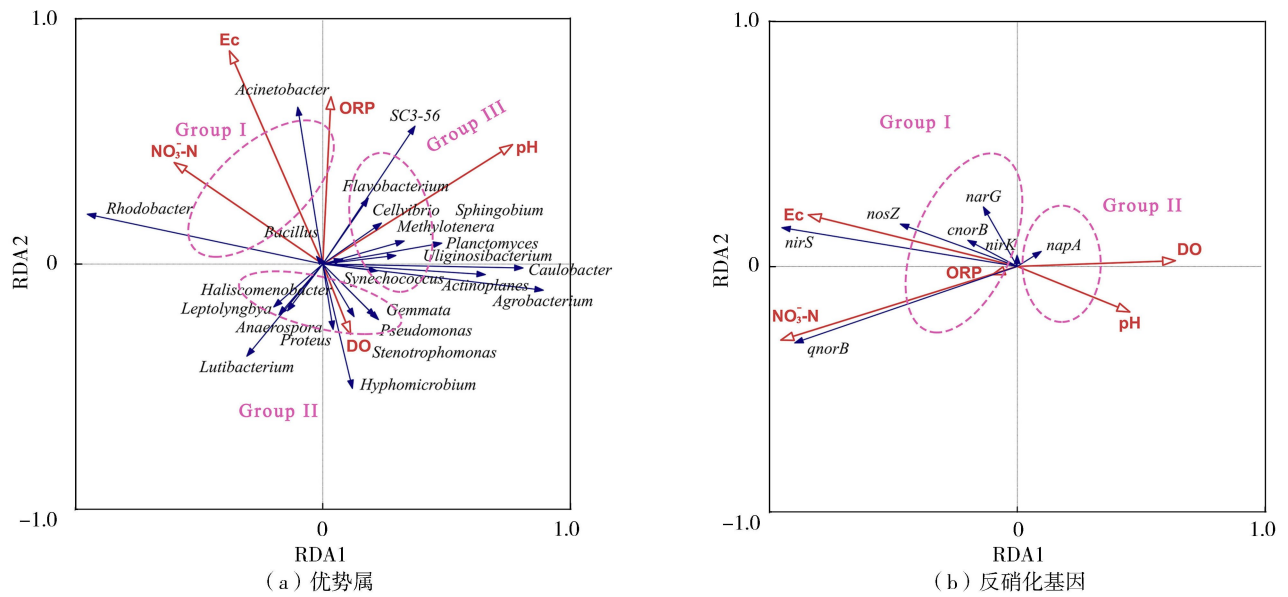


图5 优势属和反硝化基因对环境参数响应的冗余分析(RDA)

Fig.5 Redundancy analysis (RDA) of the response of dominant genera and denitrification genes to environmental parameters

究表明 pH 值较低的环境会抑制反硝化细菌 *Agrobacterium*^[20] 和 *Flavobacterium*^[21] 的增长。在本研究中这两种反硝化菌的丰度也均与 pH 呈正相关。这些结果说明硝氮负荷下,硝氮浓度、DO 和 pH 是影响湿地反硝化微生物群落的主要环境因素。

2.6 优势属和反硝化基因的网络分析

生物膜微生物间存在复杂的相互作用^[2],网络共现性分析常用于描述系统内微生物间的相互作用。本研究对 23 个优势属及 7 个反硝化基间的相互关系进行了分析(图 6),其中每个节点代表一个属/基因,每条边代表其所连接属/基因间的相关性(红色为正相关,蓝色为负相关)。对无任何显著相关性的节点剔除后,共得到 25 个节点(20 个细菌属,5 个反硝化基因),74 条具有显著相关性边(52 条边呈正相关,22 条边呈负相关)。参与有机物降解菌 *Anaerospora*^[22] 和 *Lutibacterium*^[23] 分别具有 8 条和 7 条相关关系边,是本研生物膜网络结构的关键节点,在营养循环及维持生物膜结构稳定方面起着关键作用^[22]。

研究表明,蓝细菌属 *Synechococcus* 与 *Methylothera* 和 *Sphingobium* 呈正相关;*Leptolyngbya* 与 *Rhodobacter* 和 *Haliscomenobacter* 呈正相关,而与 *Anaerospora*、*Actinoplanes*、*Planctomyces* 和 *Uliginosibacterium* 呈负相关。这些结果说明蓝细菌与一些细菌菌属关系密切,不仅存在相互促进的互利共生关系,也存在相互竞争的关系。比如蓝细菌通过光合作用为好氧微生物提供氧气和有机物,而抑制对氧气敏感的厌氧氨氧化细菌 *Planctomyces*(可能存在于生物膜内或颗粒内部低氧环境中)^[14, 24]。反硝化基因 *nirS*、*qnorB* 和 *nosZ* 之间互相呈正相关,*nirA* 和 *nirZ* 分别与反硝化细菌 *Flavobacterium* 和 *Acinetobacter* 呈正相关,这表明 *Flavobacterium* 和 *Acinetobacter* 可能分别参与 NO₃⁻-N 和 N₂O 的还原。然而,沉水植物附生物膜对硝氮的微生物去除机制以及生物膜微生物间复杂的相互作用有待进一步研究。

3 结 语

沉水植物狐尾藻对湿地水体中硝态氮的初次去除具有显著效果(92.11%~94.17%),而后去除效率逐步降低。硝酸盐负荷对生物膜的生长具有促进作用,但降低了附着生物膜细菌多样性。 β_{SOR} 多样性指数表明硝酸盐胁迫下,细菌群落多样性构建过程中物种更替现象($\beta_{SIM} = 0.44$)大于物种损失($\beta_{NES} = 0.16$);硝酸盐负荷对附着生物膜的细菌微生物群落结构具有显著影响,且刺激了反硝化细菌(*Rhodobacter*、*Acinetobacter* 和 *Bacillu*)的生长及反硝化基因(*napG*、*nirS*、*cnorB*、*qnorB* 和 *nosZ*)丰度的增加;生物膜微生物间存在复杂的相互作用,参与有机物质降解菌属 *Anaerospora* 和 *Lutibacterium* 是生物膜网络结构的关键节点。

参考文献:

[1] KUYPERS M M M, MARCHANT H K, KARTAL B. The microbial nitrogen-cycling network[J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, 16(5):263-276.

[2] ZHANG Ziqiu, CHEN Hezhou, MU Xiaoying, et al. Nitrate application decreased microbial biodiversity but stimulated denitrifiers in epiphytic biofilms on *Ceratophyllum demersum*[J]. Journal of Environmental Management, 2020, 269:110814.

[3] YAN Liying, ZHANG Songhe, LIN Da, et al. Nitrogen loading affects microbes, nitrifiers and denitrifiers attached to submerged macrophyte in constructed wetlands[J]. Science of the Total Environment, 2018, 622:121-126.

[4] YAN Lingling, MU Xiaoying, HAN Bing, et al. Ammonium loading disturbed the microbial food webs in biofilms attached to submersed macrophyte *Vallisneria natans*[J]. Science of the Total Environment, 2019, 659:691-698.

[5] MU Xiaoying, LYU Xiaoyang, LIU Wei, et al. Biofilms attached to *Myriophyllum spicatum* play a dominant role in nitrogen removal in constructed wetland mesocosms with submersed macrophytes: evidence from N-15 tracking, nitrogen budgets and metagenomics analyses[J]. Environmental Pollution, 2020, 266:115203.

[6] LIN Da, ZHU Lin, QIU Changhao, et al. Ammonium loading drives bacterial community shifts in biofilms attached to the

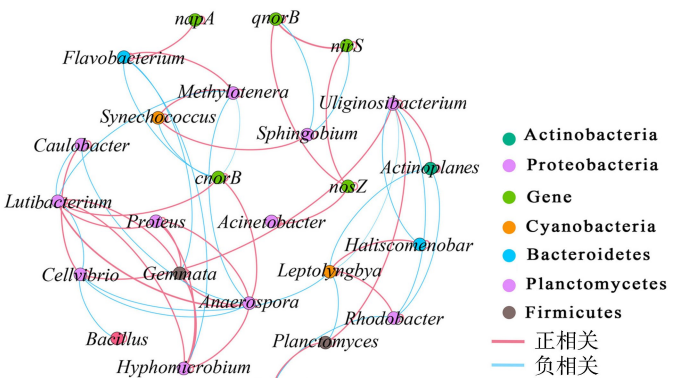


图 6 优势属及反硝化基因之间相互关系网络
Fig. 6 Relationship network diagram among dominant genera and denitrification genes

- submerged macrophyte *Hydrilla verticillata*[J]. *Aquatic Microbial Ecology*,2020,85:59-69.
- [7] CAO Te, NI Leyi, XIE Ping, et al. Effects of moderate ammonium enrichment on three submersed macrophytes under contrasting light availability[J]. *Freshwater Biology*,2011,56(8):1620-1629.
- [8] LI Dingxin, ZHANG Songhe, ADYEL T M, et al. Negative effects on the leaves of submerged macrophyte and associated biofilms growth at high nitrate induced-stress[J]. *Aquatic Toxicology*,2020,226:105559.
- [9] GONG Lixue, ZHANG Songhe, CHEN Deqiang, et al. Response of biofilms-leaves of two submerged macrophytes to high ammonium[J]. *Chemosphere*,2018,192:152-160.
- [10] 刘凯辉,张松贺,吕小央,等. 南京花神湖3种沉水植物表面附着微生物群落特征[J]. *湖泊科学*,2015,27(1):103-112. (LIU Kaihui, ZHANG Songhe, LYU Xiaoyang, et al. The characteristics of epiphytic microbes of three submerged macrophytes in Lake Hua-shen[J]. *Journal of Lake Sciences*,2015,27(1):103-112. (in Chinese))
- [11] BASELGA A. Determinants of species richness, endemism and turnover in European longhorn beetles[J]. *Ecography*,2008,31(2):263-271.
- [12] LEE H W, PARK Y K, CHOI E, et al. Bacterial community and biological nitrate removal: comparisons of autotrophic and heterotrophic reactors for denitrification with raw sewage[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*,2008,18(11):1826-1835.
- [13] ZHAO Jing, FENG Lijuan, YANG Guangfeng, et al. Development of simultaneous nitrification-denitrification (SND) in biofilm reactors with partially coupled a novel biodegradable carrier for nitrogen-rich water purification[J]. *Bioresource Technology*,2017,243:800-809.
- [14] 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 Sciences)*,2019,47(3):202-208. (in Chinese))
- [15] IDI A, IBRAHIM Z, MOHAMAD S E, et al. Biokinetics of nitrogen removal at high concentrations by *Rhodobacter sphaeroides* ADZ101[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*,2015,105:245-251.
- [16] PANG Si, ZHANG Songhe, LYU Xiaoyang, et al. Characterization of bacterial community in biofilm and sediments of wetlands dominated by aquatic macrophytes[J]. *Ecological Engineering*,2016,97:242-250.
- [17] JI Bin, YANG Kai, ZHU Lei, et al. Aerobic denitrification: a review of important advances of the last 30 years[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*,2015,20(4):643-651.
- [18] 华祖林,朱翔,沈健,等. 骆马湖水质对菹草不同生长期的响应研究[J]. *水资源保护*,2019,35(2):25-31. (HUA Zulin, ZHU Xiang, SHEN Jian, et al. Response of water quality to different growth periods of *Potamogeton crispus* in Luoma Lake[J]. *Water Resources Protection*,2019,35(2):25-31. (in Chinese))
- [19] SUN Haimeng, YANG Zhongchen, WEI Caijie, et al. Nitrogen removal performance and functional genes distribution patterns in solid-phase denitrification sub-surface constructed wetland with micro aeration[J]. *Bioresource Technology*,2018,263:223-231.
- [20] 周权男,谢黎黎,黄天带,等. 温度和 pH 对农杆菌介导转化橡胶树悬浮细胞的影响[J]. *西北林学院学报*,2013,28(3):131-133,209. (ZHOU Quannan, XIE Lili, HUANG Tiandai, et al. Effects of co-culture medium pH and temperature on *Agrobacterium*-mediated transformation of *Hevea brasiliensis* embryogenic cell suspension[J]. *Journal of Northwest Forestry University*,2013,28(3):131-133,209. (in Chinese))
- [21] VERMA V, PRASED Y, SINGH B R. Effect of pH and salinity on pathogenicity of *Flavobacterium columnare* and *Myxobacterium* sp in Indian cat fish, *Clarias batrachus* (Linn.) and *Heteropneustes fossilis* (Bloch.)[J]. *Journal of Environmental Biology*,2011,32(5):573-577.
- [22] LUKWAMBE B, NICHOLAUS R, ZHAO Li, et al. Microbial community and interspecies interaction during grazing of ark shell bivalve (*Scapharca subcrenata*) in a full-scale bioremediation system of mariculture effluents[J]. *Marine Environmental Research*,2020,158:104956.
- [23] SONG Weilong, LEE L Y, YOU Hong, et al. Microbial community succession and its correlation with reactor performance in a sponge membrane bioreactor coupled with fiber-bundle anoxic bio-filter for treating saline mariculture wastewater[J]. *Bioresource Technology*,2020,295:122284.
- [24] XIA Zhenguang, WANG Qun, SHE Zonglin, et al. Nitrogen removal pathway and dynamics of microbial community with the increase of salinity in simultaneous nitrification and denitrification process[J]. *Science of the Total Environment*,2019,697:134047.

(收稿日期:2021-01-14 编辑:张志琴)