

DOI:10.3880/j.issn.1004-6933.2016.01.002

淡水湖泊微生物硝化反硝化过程与影响因素研究

杨柳燕,王楚楚,孙旭,郭丽芸,肖琳,宋晓骏

(南京大学环境学院,江苏南京 210023)

摘要:简述了参与硝化反硝化过程的微生物类型及其影响因素,指出湖泊中底栖动物提高了沉积物中氨氧化菌的丰度,加快了沉积物和上覆水反硝化过程,同时底栖动物的肠道也是反硝化场所并释放 N₂O。研究淡水湖泊中硝化反硝化微生物群落结构组成及多样性,阐述硝化反硝化的分子生物学机制,探索底栖动物对参与氮循环微生物群落结构与功能影响。

关键词:淡水湖泊;微生物;硝化;反硝化;底栖动物

中图分类号:X172 文献标志码:A 文章编号:1004-6933(2016)01-0012-11

Study on microbial nitrification and denitrification processes and influence factors in freshwater lakes

YANG Liuyan, WANG Chuchu, SUN Xu, GUO Liyun, XIAO Lin, SONG Xiaojun
(School of Environment, Nanjing University, Nanjing 210023, China)

Abstract: Types and influence factors of microbe which take part in the nitrification and denitrification processes are resumed. It is pointed out that benthonic animals in lakes increase the abundance of ammonia oxidizing bacteria in sediments and accelerate the denitrification process in sediments and overlying water. Meanwhile, the intestines of benthonic animals are also the room of denitrification and release N₂O. The structure and diversity of microbe community which take part in the nitrification and denitrification processes are studied. Molecular biology mechanism of nitrification and denitrification is stated. Impacts of benthonic animals on structure and function of microbe community which play role in the nitrification and denitrification processes were also explored.

Key words: freshwater lake; microbe; nitrification; denitrification; benthonic animals

1 概 论

湖泊是陆地圈层重要组成部分。我国湖泊众多,面积大于 1.0 km² 的湖泊有 2 683 个,大约占国土总面积的 0.9%,然而我国部分湖泊富营养化问题日益严重,湖泊中大量死亡的水生生物沉降到湖底,分解耗氧,导致鱼类缺氧死亡,并产生氨、硫化物等物质,对水生态系统产生不利的影响^[1]。氮素是湖泊生态系统物质循环的重要组成部分,湖泊氮素循环在维持湖泊生态平衡中发挥重要的作用^[2],因此,研究湖泊氮素微生物硝化反硝化过程及其影响因素作用具有十分重要的现实意义。

湖泊生态系统氮循环是一个开放的循环模式,发生在气-水界面、水体、水-泥界面、沉积物等介质中^[3]。氮素通过大气沉降、地表径流和生物固氮等途径输入湖泊,据推算太湖生物固氮量只占外源总氮输入量的 0.11%,大气沉降总氮为同季节径流入湖氮素负荷的 18.6%,因此,通过径流外源性氮素输入是湖泊氮的主要来源^[5]。湖泊氮素以无机氮和有机氮的形式存在,被藻类、大型水生植物、底栖动物等生物吸收同化,转化为生物有机氮,这些生物死亡后又向水体和沉积物释放大量的有机氮和无机氮。水体和沉积物中氮循环过程主要包括硝化作用、反硝化作用和厌氧氨氧化作用等,其中硝化反硝

基金项目:太湖水污染治理专项资金课题(TH2014205);国家水体污染控制与治理重大专项(2012ZX07101006)
作者简介:杨柳燕(1963—),男,教授,主要从事环境污染生物修复和污染物生物处理技术研究。E-mail:yangly@nju.edu.cn

化过程是最重要的氮转化过程,将氨氮氧化成硝态氮,然后进行反硝化转化为氮气^[6],最终将结合态氮还原成 N₂O 或 N₂ 回到大气中。水体中无机氮不仅可以进行硝化反硝化,还可以通过沉降、扩散等物理过程储存在沉积物中,成为湖泊内源性氮,在沉积物中发生一系列氧化还原过程。本文主要综述微生物参与的氮素硝化反硝化过程及其影响因素。

2 湖泊微生物硝化过程

湖泊 NH₃ 的硝化过程分两个过程,①NH₃ 氧化成 NO₂⁻ 的氨氧化过程,②NO₂⁻ 氧化成 NO₃⁻ 的亚硝酸氧化过程。氨氧化过程是硝化过程的限速步骤,主要由氨氧化微生物催化完成,是一个耗氧过程,受溶解氧、微生物数量和硝化活性等因素影响^[7]。氨氧化细菌(Ammonia-oxidizing bacteria, AOB)和氨氧化古菌(Ammonia-oxidizing archaea, AOA)是氨氧化的关键微生物,过去认为氨氧化主要是由 AOB 驱动,但随着对氨单加氧酶基因(*amoA*)研究的深入,发现 AOA 也广泛参与氨氧化过程^[8-9]。图 1 为淡水湖泊氮素循环图。

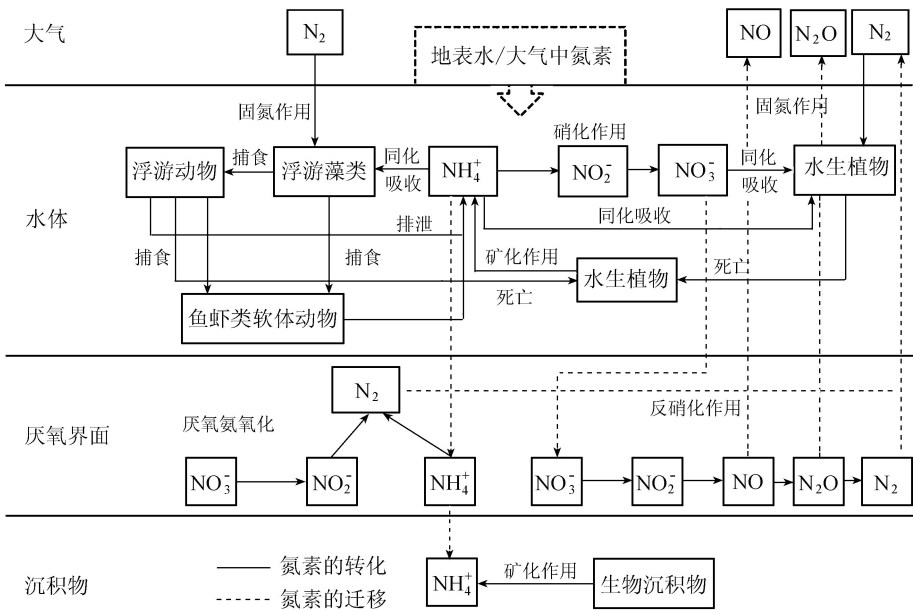
2.1 氨氧化细菌(AOB)

1892 年 Winogradsky 首次报道 AOB 的存在,随后分离出第一株氨氧化细菌 *Nitrosospira europaea*,到 20 世纪 60 年代,Watson 分离出 16 种 AOB,随着微生物培养技术的发展,更多的 AOB 被分离出来^[10-11]。基于 16S rRNA 可将 AOB 分为 5 个属,即 *Nitrosomonas*、*Nitrosococcus*、*Nitrosospira*、*Nitrosolobus* 和 *Nitrosovibrio*,除 *Nitrosococcus* 属于 γ 变形菌外,其余都是 β 变形菌。而其中 β-AOB 在环境中占大多

数,*Nitrosomonas* 和 *Nitrosospira* 是其主要类群^[12]。由于 AOB 细胞结构及其生理特性的差异,造成其分布具有一定的空间异质性,不同种属适应于特殊的环境,具有不同的生态位^[10,13]。

对太湖沉积物中主要 AOB 种类进行分子生物学鉴定,获得的所有序列分属于 5 个 OTUS,均为亚硝化单胞菌属,优势条带序列大多为 *N. oligotropha* lineage。表明太湖竺山湾沉积物中 AOB 中亚硝化单胞菌属特别是 *N. oligotropha* 丰度最高。同时蓝藻水华暴发前后,太湖 1~4 cm 深度沉积物中 AOB 群落的优势条带不变,表明该分支在淡水环境中广泛存在。蓝藻水华暴发后沉积物剖面在 5 cm 处的 AOB 群落中,条带 2 所代表的物种减少,表明 *N. oligotropha* lineage 菌群受到抑制。

李靖宇等^[14]通过提取沉积物和土壤总 DNA,对氨氧化细菌群落进行测序,分析了富营养化湖泊乌梁素海 4 个样点中 AOB 群落结构组成及环境因素的影响,发现在水陆过渡带的沉积物和土壤中, AOB 群落受 TN 和水溶盐总量影响, AOB 群落结构组成相似性逐渐降低,优势种群发生明显变化,从以 *Nitrosomonas* 为主要优势类群向 *Nitrosospira* 为主要优势类群转变。Coci 等^[15]比较淡水湖泊的底栖、浮游以及沉水植物表面附着的 AOB 群落,发现叶面附着 AOB 主要属于 *Nitrosospira cluster 3* 以及 *Nitrosomonas oligotropha*。刘东山等^[16]测定了不同时期东湖氮循环细菌在水体及底泥中的分布,发现水体中氨化细菌数量在平水期最高、丰水期次之,枯水期最低。邱珊莲^[17]以氨单加氧酶(*amoA*)基因作标记,用限制性片段长度多态性方法(RFLP)研究了



月湖中氨浓度不同的 5 个采样点沉积物中 AOB 的群落结构,结果表明 AOB 多样性与沉积物间隙水氨浓度正相关。

为了研究不同营养水平湖泊沉积物中 AOB 群落的异同,对江苏省太湖 (TH)、玄武湖 (XW)、洪泽湖 (HZ)、石臼湖 (SJ)、白马湖 (BM)、固城湖 (GC) 的细菌构建 10 个克隆文库。随机选择 AOB19-34 阳性克隆子测序,基于 3% 的序列差异水平,194 个克隆子分为 26 个可操作分类单元 (OTUs),其中 60.4% 的序列属于亚硝化螺旋菌属 (*Nitrosospira*-like), 18.7% 的序列属于亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas oligotropha* lineage)。在所有沉积物样品中都存在亚硝化螺旋菌属 (*Nitrosospira*-like), 而亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*) 仅仅出现在富营养化湖区中 (图 2)。采用限制性内切酶 Hpy8 I 对 AOB 基因片段进行酶切得到 8 个主要片段 T-RF60, T-RF97, T-RF104, T-RF154, T-RF234, T-RF256, T-RF264 和 T-RF491; 片段 T-RF60, T-RF104, T-RF154 仅在亚硝化螺旋菌属检测到,其中 T-RF60 最多,其他片段仅在亚硝化单胞菌属检测到^[18]。因此,湖泊水体和沉积物中广泛存在硝化细菌,其种类和数量随湖泊环境条件不同而存在较大差异。

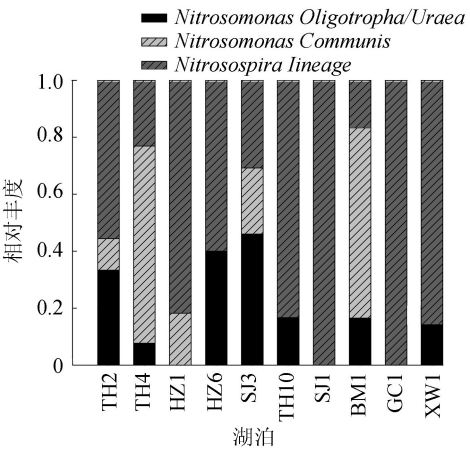


图 2 江苏不同湖泊沉积物中细菌 *amoA* 的相对丰度^[18]

2.2 氨氧化古菌 (AOA)

根据古生菌 16S rRNA 将古生菌划分为 3 个门,其中奇古菌 (Thaumarchaeota) 几乎囊括了所有的氨氧化古菌,主要包括 Group I、HWCG III、SAGMCG-1、FFS、YNPFFA、THSC1 等,而 Group I 是分布最多的,对于 Group I 又进一步分为 Group I. 1、Group I. 2、Group I. 3 和 MBG, Group I. 1 又能分为 Group I. 1a、Group I. 1b、Group I. 1c^[13]。在不同湖泊或同一湖泊不同湖区,由于环境条件差异导致 AOA 种类和数量变化较大。2010 年,对太湖沉积物 AOA 群落的研究表明,所有 AOA 的 *amoA* 基因序列分属 Group I. 1a 和 Group I. 1b,并以 Group I. 1b 为主。蓝

藻水华暴发后 AOA 的物种多样性减少,群落结构也发生变化。岳冬梅等^[19]采用荧光原位杂交 (FISH) 技术研究了太湖梅梁湾和贡湖湾湖区沉积物中微生物的主要种群及氮循环功能微生物的数量和分布,发现随着沉积物深度增加,细菌和古生菌数量均逐渐减少,但古生菌在总菌数中所占比例有所增加。在太湖沉积物中泉古菌普遍存在且数量高于氨氧化细菌,表明其在淡水湖泊氮循环中可能发挥重要作用。

2011 年 11 月,王文玲^[20]采用荧光定量 PCR 方法对南湖、三角湖、南太子湖、蔡甸西湖、后官湖、梁子湖、狮子口水库和马龙水库 8 个不同营养状态水体中水样和底泥中氨氧化古菌 *amoA* 基因拷贝数进行定量分析,结果表明水样中拷贝数为 $7.80 \times 10^4 \sim 1.34 \times 10^6$ 个/L,底泥中拷贝数在 $4.64 \times 10^4 \sim 3.19 \times 10^5$ 个/g 之间。水样中 *amoA* 基因拷贝数在不同湖泊和不同湖区存在显著差异性。小南湖、梁子湖、东湖和汤逊湖 4 个湖泊沉积物中氨氧化微生物的 *amoA* 基因数量定量 PCR 测定结果表明,小南湖 AOA 和 AOB 的 *amoA* 基因数量最多,分别达 2.1×10^4 copies/g 和 2.8×10^3 copies/g (干质量)。梁子湖仅检测到了 AOA *amoA* 基因的存在,平均值为 4.9×10^3 copies/g。东湖和汤逊湖的 AOA *amoA* 基因数量比较接近,约为 3.0×10^3 copies/g,而 AOB 的 *amoA* 基因数量在这 2 个湖泊中仅分别为 37 copies/g 和 86 copies/g。在这些采样点中,AOA 的 *amoA* 基因数量是 AOB 的 3 ~ 278 倍。

为了研究不同营养水平湖泊沉积物中 AOA 群落结构组成,选择江苏省太湖、玄武湖、洪泽湖、石臼湖、白马湖、固城湖的湖泊或湖区构建 10 个克隆文库。对于古生菌 *amoA* 文库而言,随机选择 17 ~ 31 阳性克隆子测序,基于 3% 的序列差异水平,142 个克隆子分为 19 个可操作分类单元 (OTUs),其中 93.1% 的序列属于泉古菌海洋簇 Crenarchaeotal Group (CG) I. 1a (M), 6.9% 的序列属于泉古菌土壤簇 CG I. 1b (S) (图 3)。泉古菌土壤簇 CG I. 1b (S) 的序列都集中在富营养湖区,而泉古菌海洋簇 CG I. 1a (M) 则所有区域都覆盖,同时这些序列进一步划分为 6 个亚簇,大多数序列为 S3、M1 and M2 三个亚簇,M2 亚簇在 10 个研究区域占优势 (图 3)。采用限制性内切酶 Msp I 对 AOA 序列进行酶切得到 4 个主要片段 T-RF56、T-RF196、T-RF239 和 T-RF635,片段 T-RF 56 在 Group (CG) I. 1a (M) 和 CG I. 1b (S) 都有,但主要集中在 (CG) I. 1a (M); 而片段 T-RF196、T-RF239 和 T-RF635 只出现在其中一个簇,主要集中在 CG I. 1b (S)^[18]。因此,淡水湖泊中存在大量 AOA,其群落结构受到各种因素影

响,湖泊富营养化水平越低,AOA 数量越多。

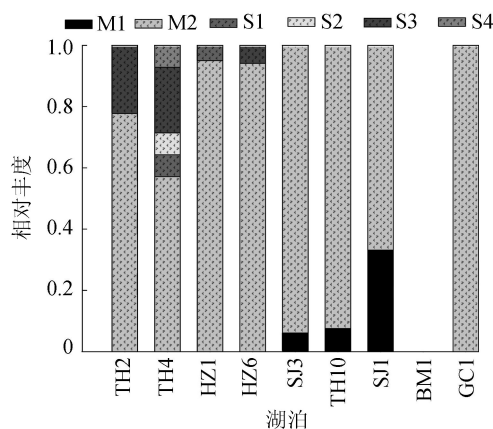


图3 江苏不同湖泊沉积物中古生菌 *amoA* 的相对丰度^[18]

2.3 厌氧氨氧化菌 (Anaerobic Ammonia-oxidizing bacteria)

20 世纪 90 年代荷兰的 Mulder 等发现了一种新型细菌—厌氧氨氧化菌,这类细菌可以在缺氧条件下以亚硝酸盐作为电子受体将氨氧化成氮气。厌氧氨氧化菌是严格厌氧自养菌,鉴定有 5 属 10 种,均归为细菌域浮霉菌门 (Planctomycetes),5 个属分别为 *Brocadia*、*Kuenenia*、*Anammoxoglobus*、*Jettenia* 和 *Scalindua*。Schubert 等^[21] 在天然淡水湖泊 Tanganyika 湖中发现了与 *Candidatus Scalindua brodae* 类似的序列,首次证明了淡水湖泊中存在厌氧氨氧化。近几年,在湖泊环境中发现的厌氧氨氧化菌及其反应过程使人们意识到厌氧氨氧化在湖泊中也具有重要作用。在自然环境中,厌氧氨氧化菌的种群多样性较低,每种细菌都有其特定的生存环境,大量研究已证实,*Scalindua* 属的厌氧氨氧化菌存在于海水中,具有一定的耐盐能力,而 *Kuenenia* 和 *Brocadia* 属的厌氧氨氧化菌属于淡水菌种,比较适宜生存于淡水环境。张亚平等^[22] 应用分子生物学方法鉴定浅水湖泊阳澄湖沉积物中厌氧氨氧化细菌和好氧氨氧化细菌,得到的厌氧氨氧化菌序列大多与 *Candidatus Brocadia fulgida* 相似性较高,提供了阳澄湖中好氧氨氧化菌与厌氧氨氧化菌共存的分子证据。王衫允等^[23] 结合同位素示踪与分子生物学技术研究了白洋淀湖泊湿地沉积物中厌氧氨氧化菌的群落结构、多样性及活性,发现了与 *Candidatus Brocadia fulgida* 和 *Candidatus Brocadia anammoxidans* 相似的厌氧氨氧化菌序列,但生物多样性相对较低,空间异质性较大。张钰^[24] 通过巢式 PCR 从污染较重的东湖、南湖、藕塘及鱼塘沉积物中扩增出了厌氧氨氧化菌的特异性条带,而在一些低污染河流和湖泊中,仅在少数采样点发现了厌氧氨氧化菌,表明在重污染水体中厌氧氨氧化菌的脱氮作用可能比低污

染水体更为重要。因此,不同湖泊中厌氧氨氧化菌群落组成存在差异,受湖泊富营养化程度影响。

3 湖泊微生物反硝化过程

在厌氧条件下,细菌、具有反硝化代谢活性的真核生物和古生菌利用有机化合物作为电子供体,将氧化态氮还原成 N_2O 或 N_2 ,称为反硝化作用。由于厌氧反硝化微生物对氧气比较敏感,所以只有当氧气浓度足够低时反硝化过程才会发生,除了受到氧气浓度影响外,硝态氮和有机物含量、pH 等都是影响反硝化作用的关键因素^[25-27]。对于湖泊生态系统而言,反硝化作用主要发生在沉积物中,在沉积物厌氧层内进行反硝化作用,把 NO_3^- 和 NO_2^- 还原成 N_2O 、 N_2 等气体,释放到大气,减轻内源氮负荷。在蓝藻水华暴发严重的湖泊,水体中也存在比较强烈的反硝化作用。

3.1 反硝化细菌

反硝化过程主要由反硝化微生物驱动,在自然环境中反硝化过程主要是由反硝化细菌完成^[28-29]。与氨氧化细菌相比,反硝化细菌的种类较多,已经发现约 50 个属 130 多个种细菌都具有反硝化功能,例如假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、副球菌属 (*Paracoccus*) 等^[30]。反硝化细菌大多集中在变形菌纲 (Proteobacteria) 和拟杆菌纲 (Bacteroidetes)^[28]。近年来发现在好氧环境下 NO_3^- 也能还原成 N_2O 或 N_2 ^[31],同时在沉积物中发现大量好氧反硝化细菌^[32-33],虽然在好氧环境下也能发生反硝化过程,但是通常所述的反硝化过程指的是厌氧反硝化过程。采用 16S rRNA 的分类方法不能将反硝化细菌划分为若干种群,因此,通常以反硝化酶功能基因为分子生物标记物来研究环境中反硝化细菌的结构组成^[34-36]。

以亚硝酸盐还原酶基因 (*NirS*) 为分子标记,探讨富营养化湖泊武汉东湖沉积物中 *NirS* 类反硝化细菌群落的结构和多样性,在武汉东湖 4 个典型子湖郭郑湖、汤菱湖、团湖和庙湖采集沉积物样品,基于 *NirS* 序列的生物多样性和丰富度分析,结果表明团湖生物多样性和丰富度指数最高,而庙湖各项指数均较低。各子湖供测试序列及其代表序列综合 RFLP 聚类分析表明,武汉东湖沉积物中 *NirS* 类反硝化微生物种群具有丰富的多样性。NJ 系统发育分析表明东湖沉积物 *NirS* 类反硝化菌群可分成 3 个群体 (群 I-III)。群 I 占总群体的 67.7%,广泛分布于不同的生态环境。来自郭郑湖代表菌中 81% *NirS* 类反硝化菌分布于群 I,而庙湖的代表菌中 65% *NirS* 类反硝化菌分布于群 II。比较分析发

现来自于东湖和人工湿地两种生境的 *NirS* 群落间具有较高的相似性,因此,淡水富营养型湖泊东湖沉积物中亚硝酸还原酶基因具有丰富的多样性^[37]。

3.2 反硝化分子机制

NO_3^- 还原成 N_2 的过程分别由硝酸盐还原酶 (Nitrate reductase, *Nar*)、亚硝酸盐还原酶 (Nitrite reductase, *Nir*)、一氧化氮还原酶 (Nitric oxide reductase, *Nor*) 和氧化亚氮还原酶 (Nitrous oxide reductase, *Nos*) 催化完成(图 4),这 4 类还原酶分别由 *nar*、*nir*、*nor*、*nos* 基因编码。反硝化过程第一步是硝酸盐还原成亚硝酸盐,由膜结合硝酸盐还原酶 (*Nar*) 和周质硝酸盐还原酶(*Nap*) 两类酶催化完成,它们在反硝化菌细胞内分布在不同部位,这两类酶对氧气的敏感程度不同,*Nar* 对氧气比较敏感,在厌氧环境下起作用,*Nap* 在有氧环境下优先表达。*Nar* 主要由 3 个亚基组成,分别是由 *narG* 基因编码的 α 亚基、*narH* 基因编码的 β 亚基、*narI* 编码的 γ 亚基;*Nap* 由 *napA* 和 *napB* 编码的两个二聚体组成^[29]。反硝化过程的第二步是亚硝酸盐还原酶催化亚硝酸盐转化成一氧化氮,这一过程是反硝化的限速步骤,亚硝酸盐还原酶 *Nir* 主要存在于细胞的周质空间,可分为 *nirK* 基因编码的 Cu 型亚硝酸盐还原酶和 *nirS* 基因编码的细胞色素 *cd1* 型亚硝酸还原酶两种,大多数情况下这两种亚硝酸盐还原酶不会同时出现在一个细菌细胞内^[37]。由于亚硝酸盐还原酶是关键酶,因此,常常选择 *nirK* 和 *nirS* 基因作为功能基因研究淡水沉积物等环境中反硝化菌群落结构和多样性^[34, 38]。环境中 *nirS* 菌分布较多,*nirK* 菌仅占反硝化菌的 30%,但分布的生理类群较广泛。

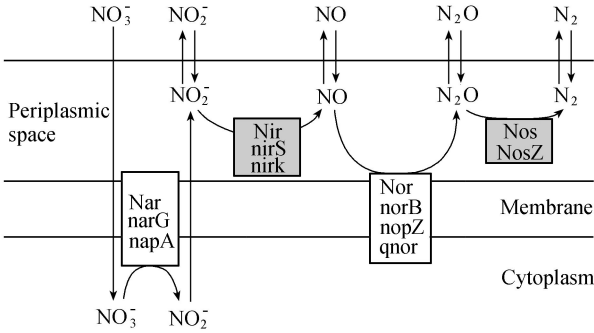


图 4 反硝化过程的关键功能酶

反硝化过程第三步是一氧化氮还原酶将一氧化氮催化转化成氧化亚氮,一氧化氮还原酶 *Nor* 主要存在于细胞膜中,主要由 *norC* 和 *norB* 基因编码的两个亚基组成^[35, 39]。反硝化过程的最后一步是由氧化亚氮还原酶将一氧化二氮催化成氮气,氧化亚氮还原酶主要由 *nosZ* 基因编码的含有 8 个 Cu 离子的两个相同亚基组成,*nosZ* 基因也广泛用来研究环

境中反硝化菌的群落结构^[40]。

4 影响湖泊微生物硝化反硝化过程的因素

4.1 影响湖泊硝化过程的环境因素

4.1.1 对氨氧化细菌 AOB 的影响

AOB 的空间异质性除与其自身的生理生化特性有关外,还与其栖息的环境有关。氨作为氨氧化反应的底物,是影响 AOB 分布的关键因子,不同种属 AOB 对氨的亲合力 (K_m) 以及耐氨能力差异较大^[41]。pH 是另一个调控 AOB 分布的关键因素^[42-44]。AOB 对 pH 的耐受范围较窄,当 pH 小于 7 时 AOB 的生长受到限制,此时非离子氨降低, AOB 受到底物浓度限制。虽然 AOB 的某些种属适应低 pH 环境,但是在 pH 小于 6.5 时基本检测不到其活性^[45-46]。提高温度能促进微生物的新陈代谢,有利于 AOB 的生长和硝化活性,但当温度大于 40℃ 时检测不到 AOB 存在^[46-49]。一些生物因子也会影响 AOB 的生长和活性,比如水体中大型水生植物通过根系泌氧作用促进 AOB 的生长,改变群落结构,沉积物的底栖动物通过捕食和扰动改变 AOB 的群落结构。

湖泊沉积物中栖息的底栖生物、水体中高等水生植物以及藻类等一方面可与 AOB 竞争 NH_4^+ 和氧,另一方面可为 AOB 提供不同的生态位,从而影响 AOB 的群落结构、丰度、活性等。湖泊不同湖区理化因子差异导致 AOB 数量发生很大变化,如太湖梅梁湾沉积物中氨氧化细菌及亚硝酸氧化细菌的数量均高于贡湖湾,随沉积物深度增加,两者数量均逐渐减少,但在贡湖湾其占总菌数的比例高于梅梁湾,表明水生植物可能对沉积物中微生物组成及氮循环具有重要影响。

梁龙^[50]通过蛭弧菌与氨氧化菌的共培养实验发现培养液中 NO_2^- 发生积累,表明蛭弧菌的存在在一定程度上加强氨氧化作用。王国祥等^[51]利用传统的 MPN 计数方法对太湖不同生态类型区氮循环细菌的分布及其作用进行了探讨,分析得出氨化细菌量在水生高等植物群落内水体中高于敞水区水体。李倩等^[52]研究发现,种植黑藻增加了沉积物-水界面的溶解氧量和表层沉积物有氧层厚度,根际沉积物中氨氧化细菌的数量也逐渐增加。李彬^[53]通过对紫阳湖、水果湖、菱角湖 3 个自然湖泊中细菌量及叶绿素的检测发现,藻类的生长抑制了 AOB 等硝化细菌的增殖。在实验室模拟实验中也发现在光照条件下藻类的生长抑制了硝化作用。除上述因素外,其他的非生物(氧、有机质、磷浓度、重金属、铁硫含量等)和生物(生态类型等)因子也会影响 AOB

的分布和活性。

4.1.2 对氨氧化古菌 AOA 的影响

随着编码氨单加氧酶 *amoA* 基因作为分子标记物的广泛应用,发现 AOA 广泛存在于环境中,其中在淡水沉积物中也发现大量的 AOA 存在^[54-55]。氨作为氨氧化反应的底物,影响 AOA 的分布和群落结构,不同种属 AOA 的最适氨浓度和耐氨浓度存在差异,总体而言 AOA 的 K_m 值较低,对氨的亲合力较高^[46,55]。研究表明环境中 NH_3 浓度增加会延长淡水或沉积物富集 AOA 的时间^[54]。pH 是另一个调控 AOA 生长的因素,AOA 对 pH 的耐受范围较宽,在 2.5 ~ 9.0 之间都能存活。Nicol 等^[44]发现 pH 会筛选出不同表型的 AOA,这些 AOA 都有不同的生理特征和生态位,并且 AOA 的丰度随 pH 增加而降低,表明在低 pH 环境下硝化过程可能由 AOA 驱动。

AOA 对温度的耐受范围较宽,在 0.2 ~ 97℃ 都能检测到 AOA 的存在。在低温环境中,AOA 的多样性降低,同时出现与低温相对应的特异性的 AOA,表明 AOA 通过自身群落结构的变化,出现适应温度的特异性菌属^[56-57]。于 2011 年 11 月对南湖、三角湖、南太子湖、蔡甸西湖、后官湖、梁子湖、狮子口水库、马龙水库 8 个不同营养负荷水平水体的水样和底泥中的氨氧化古菌 *amoA* 基因拷贝数进行定量测定,相关性分析显示水样中 *amoA* 拷贝数与 TN 和 NH_3 正相关,而与 pH、TP、透明度、Chl-a 不具相关性。底泥 *amoA* 拷贝数丰度与底泥总氮呈极其显著正相关,而与 pH、TP、 NH_3 、有机质、含水率等都不具相关性。

沉积物中 *amoA* 基因数量与间隙水中亚硝态氮无显著相关性,但与硝态氮浓度呈显著正相关。除了上面因素外,溶解氧^[9]、沉积物类型、硫和磷含量^[39]、有机质含量等都会影响 AOA 的分布和群落特征。对小南湖、梁子湖、东湖和汤逊湖 4 个湖泊沉积物中氨氧化微生物的 *amoA* 基因数量与环境因子之间的关系分析发现,随着湖泊营养水平和间隙水中氨的上升,AOA 和 AOB 的 *amoA* 基因数量均呈增加趋势,但氨增加对 AOB 的促进作用要大于 AOA,导致 AOA 和 AOB 的 *amoA* 基因数量比值与间隙水中氨浓度呈显著负相关。pH 上升对氨氧化微生物的抑制作用则与氨增加对它们的促进作用相反。

4.1.3 对厌氧氨氧化的影响

影响厌氧氨氧化菌活性的因素有很多,基质与产物、溶解氧及有机物都对其生长有重要影响。一般认为厌氧氨氧化菌能够耐受较高浓度的氨氮和硝酸盐,但高浓度的亚硝酸盐对其生长会产生明显抑制。由于厌氧氨氧化菌是严格厌氧菌,因此其活性

易被溶解氧所抑制。很多研究均表明,有机物的存在对厌氧氨氧化菌的生长有着不利影响。反硝化反应会释放出比厌氧氨氧化反应更高的自由能,且反硝化菌的生长速率要远大于厌氧氨氧化菌,因此在一定量有机物存在的条件下,厌氧氨氧化菌将难以与反硝化菌竞争亚硝酸盐。

影响厌氧氨氧化反应最显著的因素是厌氧氨氧化菌的种类和数量,还有一些其他的环境因子,如有机质、温度和 pH 值等,高浓度的有机质将与氨氮竞争电子受体,且往往有机质更易成为电子供体,从而使厌氧氨氧化的脱氮效率降低。温度和 pH 值的变化都是影响厌氧氨氧化菌的生长速率及酶活性的因子。在自然环境中厌氧氨氧化细菌表现出较强的温度适应范围,15 ~ 25℃ 为多数菌的最适温度,若温度超过 25℃,厌氧氨氧化反应速率急剧下降;若温度达到 27℃,反应基本处于停止状态。厌氧氨氧化适宜厌氧环境,氧气对厌氧氨氧化有明显的抑制作用,当溶解氧质量浓度高至 5 mg/L 时,厌氧氨氧化活性被完全抑制。

4.2 影响湖泊反硝化过程的因素

反硝化过程的调控因子主要包括硝态氮浓度、碳可利用性、溶解氧浓度、温度以及水生植物的生长、沉积物特性等。硝态氮浓度是反硝化过程的一个重要影响因素,当硝态氮浓度小于 1 mmol/L 时反硝化速率与硝态氮浓度呈显著正相关^[58],研究发现当硝态氮浓度从 2 mmol/L 增加到 20 mmol/L 时,反硝化速率反而受到抑制^[26]。硝态氮浓度也能调控反硝化的最终产物 N_2O 与 N_2 的比例,通常高浓度硝态氮时两者呈现高比例,因为反硝化菌在还原硝态氮过程中获得的能量比还原 N_2O 获得的要多,因此优先进行硝态氮还原。反硝化过程需要添加微生物可利用的碳源,理论上还原 1 mol 的硝态氮需要 1.25 mol 的碳,实验中则发现需要 2.86 mol 的 COD,这种差异主要是因为部分碳源需用于细胞合成。因此,异养反硝化过程受微生物可利用碳的影响,能影响碳矿化的因素也能影响反硝化过程。反硝化通常在厌氧环境下进行,氧气是抑制反硝化过程最重要的因素之一。少量的氧气(0.02 atm)就能导致潜在反硝化速率大幅度的降低,在反硝化还原酶中 Nos 对氧的敏感度最高,更易受到氧的抑制,导致不完全反硝化过程。

由于水体中有机物含量会影响湖泊反硝化过程,富营养化湖泊藻华暴发会提供大量碳源,有利于湖泊反硝化脱氮过程。模拟研究自然或人工沉降的太湖蓝藻在厌氧条件下作为碳源对底泥微生物反硝化脱氮具有促进作用,藻体中大量生物可降解碳素

在厌氧分解后产生挥发性脂肪酸等一些可供反硝化菌直接利用的小分子物质,促进了硝态氮和亚硝态氮还原成 N_2 和 N_2O 的过程,提高湖泊水体脱氮能力。

4.3 底栖动物对氮转化的影响

底栖动物 (zoobenthos) 是指生活史的全部或大部分时间生活于水体底部的水生动物群。湖泊沉积物中存在大量的底栖动物和氮转化微生物,底栖动物能通过生物扰动、摄食、排泄等方式,增加溶解氧在沉积物的渗透深度,使上覆水中有机质进入沉积物,加速无机氮 (DIN) 和颗粒性有机氮 (PON) 在沉积物与上覆水之间好氧-厌氧界面的氮循环,改变氮在湖泊中的转化途径^[59-60]。

对掘穴类底栖动物而言,受扰动的沉积物洞穴内好氧-厌氧界面增多,更多的可溶性有机质沉降到穴壁,溶解氧和 DIN 浓度随底栖动物的活动呈现波动性变化,而氨含量则增加^[61]。底栖动物通过扰动和自身排泄增加掘穴内溶解氧和氨浓度,从而增强硝化菌活性,使穴内硝化菌丰度高于未受扰动沉积物中硝化菌丰度,同时在底栖动物掘穴过程中,消耗部分溶解氧,上覆水中可溶性有机质和硝态氮进入穴内,促进耦合的硝化反硝化过程^[62]。掘穴底栖动物中某些种属(摇蚊幼虫、寡毛类正颤蚓、沙蚕等)能通过密度依赖型影响水体氮循环,通常高密度的底栖动物伴随较高的通气环境,提高泥水间氮循环速率和 DIN 的转化通量。研究表明高密度摇蚊幼虫能显著促进沉积物硝化反硝化作用,加快 DIN 在泥水界面的交换,而反硝化作用只有在底栖动物显著改变掘穴内好氧状况时才受到影响^[63]。

造礁类底栖动物主要栖息在浅水湖泊的硬质沉积物表层,在造礁结构中,底栖动物能改变水流状况和沉积物沉降速率,通过生物沉降和自身排泄增加有机质和氨,其滤食特性能使水质变清从而增加透明度,明显影响浅水湖泊中微生物介导的营养盐转化,尤其是氮循环。双壳类底栖动物为微生物膜的形成提供一个载体,硝化细菌和古生菌附着在壳表面的生物膜内,代谢产生氨和 CO_2 ^[64]。在低流速封闭的水域环境中双壳类底栖动物通过滤食活动加速悬浮物沉降,降低水体浮游植物生物量,增加透明度和溶解氧,增加底栖大型藻的数量和活性,从而促进沉积物耦合的硝化反硝化作用^[65-66]。当双壳类底栖动物密度过高则会降低溶解氧,从而抑制沉积物的硝化作用^[67-69]。这类底栖动物能通过打捞的方式去除掉一部分的湖泊氮负荷^[68]。

刮食类底栖动物能捕食沉积物中微生物,减少底栖环境中氮循环相关微生物丰度,降低硝化反硝化速率^[70]。但底栖动物捕食的细菌和古生菌仅占

沉积物总细菌的很小一部分,对沉积物总细菌的影响并不大,沉积物细菌的快速繁殖能弥补被捕食的细菌数量^[71-72]。不过底栖动物通过持续的捕食能有效地降低沉积物中低生长速率的细菌数量,研究表明沉积层内摇蚊幼虫的存在导致生长较慢的硝化细菌丰度明显降低,而在通气层内总硝化细菌丰度显著高于下层沉积物,在下层沉积物中硝化速率降低。对某些底栖动物而言,捕食能影响 AOA 与 AOB 的相对比例,改变氨氧化微生物群落结构,从而影响硝化速率,但对氨氧化细菌总丰度没有影响^[61]。通过持续性的捕食对湖泊水体反硝化能力影响可能不大,这主要是由于反硝化细菌的高生长率以及反硝化细菌在底栖动物肠道的高存活率。

通过估算,底栖动物的存在能分别提高沉积物硝化和反硝化强度 3.0 倍和 2.4 倍,氨释放和硝态氮增加分别为 5.3 倍和 2.2 倍,DIN 的转移通量在无底栖动物和有底栖动物时分别为 $24 \mu\text{molN}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ 和 $162 \mu\text{molN}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ ^[62],底栖动物对沉积物硝化和反硝化作用的促进强度比较接近,而对氨释放促进强度要高于硝态氮。底栖动物不仅能加速氨从湖泊沉积物向上覆水的迁移,降低沉积物 DIN,还能促进沉积物释放 N_2O ^[63],其原因为底栖动物的扰动引起其栖息微环境的好氧厌氧交替变化,增加营养盐的浓度,提高氮转化速率,产生 N_2O ,同时排泄物内反硝化菌能进一步强化沉积物反硝化形成 N_2O ^[73]。

近年来研究表明底栖动物的肠道或表面生物膜也能释放 N_2O ,其释放量在 $0 \sim 93.1 \text{ nmol}/(\text{g} \cdot \text{h})$ 之间,底栖动物自身并不能释放 N_2O ,其主要是由肠道内反硝化微生物所产生^[63,74-75]。底栖动物肠道内氧气接近于 0, pH 在 7.7 ~ 8.2, 含有各类可溶性的有机酸和硝态氮、亚硝氮,为反硝化和其他厌氧微生物提供一个很好的微环境,经反硝化释放 N_2O 和 N_2 ^[76]。底栖动物肠道释放 N_2O 的能力与其觅食类型、体重、肠道氧浓度以及沉积物的硝态氮浓度和温度有关^[60,74]。研究表明 *Ephemer danica* 释放 N_2O 速率与其湿重显著正相关,栖息环境硝态氮浓度、温度、溶解氧是影响底栖动物的主要因素^[62]。这些因素超过一定阈值后才会促进底栖动物释放 N_2O ,例如当沉积物硝态氮浓度在 $25 \sim 50 \mu\text{mol/L}$ 时,摇蚊幼虫 (*Chironomus plumosus*) 释放 N_2O 速率才会随着温度升高而增加,当温度在 $4 \sim 10^\circ\text{C}$ 时, N_2O 释放速率才会随环境硝态氮浓度增加而增加^[60]。底栖动物释放 N_2O 速率存在一个季节性变化,这与湖泊沉积物反硝化的一个季节性波动有关,比如在温带湖泊沉积物硝态氮在夏季较低,冬季较高,而硝化速率则是在夏季较高,冬季较低,因此可以预测在夏季底

栖动物释放 N_2O 速率高而在冬季释放速率低。

湖泊蓝藻水华暴发会影响底栖动物肠道对氮素的转化。对肠道的反硝化功能基因进行定量 PCR 分析发现藻的存在能改变摇蚊幼虫肠道内含反硝化细菌丰度(图 5)。无藻时摇蚊幼虫肠道 *NirS* 基因丰度(6.5×10^3 copies/ng DNA)显著高于 *nirK* 基因丰度(1.1×10^3 copies/ng DNA)。而蓝藻存在时摇蚊幼虫肠道内 *NirS* 基因丰度下降至 4.8×10^3 copies/ng DNA, *nirK* 基因丰度上升至 2.9×10^3 copies/ng DNA, 但仍低于 *NirS* 基因丰度。无藻时摇蚊幼虫肠道内 *nosZ* 基因丰度虽然最高,但是与 *NirS* 基因丰度没有显著性差异,蓝藻存在时摇蚊幼虫肠道 *nosZ* 基因丰度急剧上升至 2.8×10^4 copies/ng DNA, 远远高于无藻时的 7.9×10^3 copies/ng DNA。同时 N_2O 还原酶基因丰度远高于 NO_2^- 还原酶基因丰度,反硝化更加彻底,形成更多的氮气而不是 N_2O 。蓝藻存在没有显著改变摇蚊幼虫肠道内 *NirS* 基因丰度,而 *nirK* 和 *nosZ* 基因丰度显著升高^[77]。因此,底栖动物不仅能影响沉积物硝化反硝化过程,而且通过肠道微生物的反硝化作用改变沉积物的氮素转化潜力。

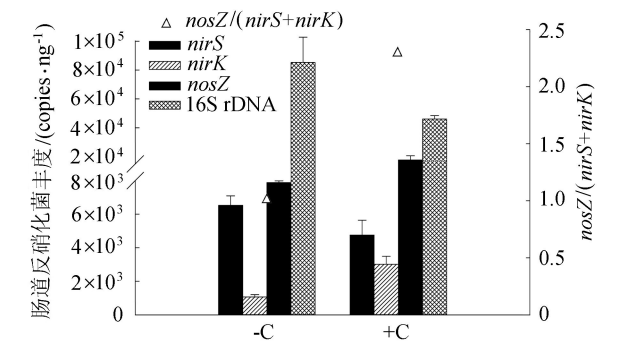


图 5 蓝藻对摇蚊幼虫肠道反硝化基因和 16S rDNA 丰度的影响(添加蓝藻+C)^[77]

5 展 望

对湖泊氮素转化的微生物群落结构组成和影响因素进行了大量研究,了解了生物硝化反硝化的微生物群落结构,湖泊水体和沉积物中都存在硝化反硝化过程,但是为了深入了解湖泊氮素转化过程,必须开展大量定量的氮素转化的分析,阐明氮素转化微生物的功能。因此,开展微生物硝化反硝化过程及底栖动物对其群落结构和功能影响及其自身氮转化的能力研究都具有十分重要的现实意义。

a. 针对非富营养化湖泊,开展氮素转化生物学机制定量研究。深入开展湖泊硝化反硝化潜力的研究,探索不同营养化水平湖泊反硝化脱氮潜力,同时分析硝化反硝化的微生物群落组成和多样性,开展氮素微生物硝化反硝化过程与影响因素研究,分析

不同微生物对氮素转化作用权重,阐明湖泊保持氮素平衡的生物学机制,有利于增加对湖泊氮素生物地球化学循环的认识。

b. 针对富营养化湖泊,开展氮素削减的生物学机制定量研究。对于蓝藻水华暴发的湖泊,由于藻密度大的区域,底栖动物与微生物数量也多,底泥中存在强烈的硝化反硝化过程,在夏天太湖蓝藻暴发时通常会由磷限制转变为氮限制,富营养化湖区的反硝化能力增强。因此,需进一步探索氮素转化与水生态系统结构关系。同时加强微生物硝化反硝化作用研究,探索增强硝化反硝化过程的影响因素和高效原位氮素转化的潜力,探索湖泊内源污染削减的新方法,加快湖泊水生态系统的恢复。

参考文献:

[1] 戴玄吏,汤佳峰,章霖之.“湖泛”恶臭物质分析及来源浅析[J]. 环境监控与预警,2010,2(3): 39-41. (DAI Xuanli, TANG Jiafeng, ZHANG Linzhi. Analysis of component and source of malodorant of the lake-flooding [J]. Environmental Monitoring and Forewarning,2010,2(3): 39-41. (in Chinese))

[2] GALLOWAY J N, TOWNSEND A R, ERISMAN J W, et al. Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions [J]. Science, 2008, 320 (5878): 889-892.

[3] 范俊楠,赵建伟,朱端卫. 湖泊氮素氧化及脱氮过程研究进展[J]. 生态学报,2012,32(15): 4924-4931. (FAN Junnan, ZHAO Jianwei, ZHU Duanwei. The research progresses on biological oxidation and removal of nitrogen in lakes [J]. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(15): 4924-4931. (in Chinese))

[4] 曾巾,杨柳燕,肖琳,等. 湖泊氮素生物地球化学循环及微生物的作用[J]. 湖泊科学,2007,19(4): 382-389. (ZENG Jin, YANG Liuyan, XIAO Lin, et al. Biogeochemical cycling of nitrogen in lakes and the role of microorganisms in conversion of nitrogen compounds [J]. Journal of Lake Sciences, 2007, 19(4): 382-389. (in Chinese))

[5] 吴雅丽,许海,杨桂军,等. 太湖水体氮素污染状况研究进展[J]. 湖泊科学,2014,26(1): 19-28. (WU Yali, XU Hai, YANG Guijun, et al. Progress in nitrogen pollution research in Lake Taihu [J]. Journal of Lake Sciences, 2014, 26(1): 19-28. (in Chinese))

[6] FRANCIS C A, BEMAN J M, KUYPERS M M. New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation [J]. International Society for Microbial Ecology, 2007, 1(1): 19-27.

[7] PROSSER J I, NICOL G W. Archaeal and bacterial

- ammonia-oxidisers in soil: the quest for niche specialisation and differentiation [J]. Trends in Microbiology, 2012, 20(11): 523-531.
- [8] PROSSER J I, NICOL G W. Relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment [J]. Environmental Microbiology, 2008, 10 (11): 2931-2941.
- [9] ERGUDER T H, BOON N, WITTEBOLLE L, et al. Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia-oxidizing archaea [J]. FEMS Microbiol Reviews, 2009, 33(5): 855-869.
- [10] KOOPS H P, PURKHOLD U, ANDREAS P R, et al. The lithoautotrophic ammonia-oxidizing bacteria [J]. Prokaryotes, 2006, 5: 778-811.
- [11] MONTEIRO M, SENECA J, MAGALHAES C. The history of aerobic ammonia oxidizers: from the first discoveries to today [J]. Journal of Microbiology, 2014, 52 (7): 537-547.
- [12] PURKHOLD U, POMMERENING-ROSER 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(12): 5368-5382.
- [13] STAHL D A, de la TORRE J R. Physiology and diversity of ammonia-oxidizing archaea [J]. Annual Review of Microbiology, 2012, 66: 83-101.
- [14] 李靖宇, 杜瑞芳, 武琳慧, 等. 乌梁素海湖泊湿地过渡带氨氧化细菌群落 [J]. 生态学杂志, 2014, 33(7): 1902-1910. (LI Jingyu, DU Ruifang, WU Linhui, et al. Community structure of soil ammonia-oxidizing bacteria along the transitional zone of inland Wuliangsu Lake [J]. Chinese Journal of Ecology, 2014, 33 (7): 1902-1910. (in Chinese))
- [15] COCI M, BODELIER P L E, LAANBROEK H J. Epiphyton as a niche for ammonia-oxidizing bacteria: detailed comparison with benthic and pelagic compartments in shallow freshwater lakes [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(7): 1963-1971.
- [16] 刘东山, 罗启芳. 东湖氮循环细菌分布及其作用 [J]. 环境科学, 2002, 23 (3): 29-35. (LIU Dongshan, LUO Qifang. Distribution and role of denitrifying, nitrifying, nitrosation and ammonifying bacteria in East Lake [J]. Chinese Journal of Environmental Science, 2002, 23 (3): 29-35. (in Chinese))
- [17] 邱珊莲. 富营养化浅水湖泊硝化菌和硝酸盐还原菌的数量与群落研究 [D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2009.
- [18] SUN Xu, WANG Aili, YANG Liuyan, et al. Spatial distribution of ammonia-oxidizing archaea and bacteria across eight freshwater lakes in sediments from Jiangsu of China [J]. Journal of Limnology. 2014, 73(2): 312-324.
- [19] 岳冬梅, 田梦, 宋炜, 等. 太湖沉积物中氮循环菌的微生物生态 [J]. 微生物学通报, 2011, 38 (4): 555-560. (YUE Dongmei, TIAN Meng, SONG Wei, et al. Research on the micro-ecology of nitrogen cycling bacteria in sediments of Lake Taihu [J]. Microbiology China, 2011, 38 (4): 555-560. (in Chinese))
- [20] 王文玲. 氨氧化古菌的丰度与水体营养水平的关系研究 [D]. 武汉: 华中师范大学, 2011.
- [21] SCHUBERT C J, DURISCH-KAISER E, WEHRLI B, et al. Anaerobic ammonium oxidation in a tropical freshwater system (Lake Tanganyika) [J]. Environmental Microbiology, 2006, 8(10): 1857-1863.
- [22] 张亚平, 阮晓红. 浅水湖泊 (阳澄湖) 沉积物氨氧化菌的分子证据 [J]. 环境科学学报, 2012, 32 (1): 182-189. (ZHANG Yaping, RUAN Xiaohong. Molecular evidence for ammonia oxidation bacteria in the sediments of shallow lake: a case study in Yangcheng Lake [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2012, 32 (1): 182-189. (in Chinese))
- [23] 王衫允, 祝贵兵, 曲冬梅, 等. 白洋淀富营养化湖泊湿地厌氧氨氧化菌的分布及对氮循环的影响 [J]. 生态学报, 2012, 32 (21): 6591-6598. (WANG Sanyun, ZHU Guibin, QU Dongmei, et al. Widespread of anaerobic ammonia oxidation bacteria in an eutrophic freshwater lake wetland and its impact on nitrogen cycle [J]. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32 (21): 6591-6598. (in Chinese))
- [24] 张钰. 湖泊沉积物微生物多样性和厌氧氨氧化菌鉴别研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.
- [25] BARNARD R, LEADLEY P. W, HUNGATE B A. Global change, nitrification, and denitrification: a review [J]. Global Biogeochemical Cycles, 2005, 19(1): 1-13.
- [26] SENBAYRAM M, CHENC R, BUDAID A, et al. N₂O emission and the N₂O/(N₂O + N₂) product ratio of denitrification as controlled by available carbon substrates and nitrate concentrations [J]. Agriculture, Ecosystems and Environment, 2012, 147: 4-12.
- [27] WYMAN M, HODGSON S, BIRD C. Denitrifying alphaproteobacteria from the Arabian Sea that express nosz, the gene nncoding nitrous oxide reductase, in oxic and suboxic waters [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(8): 2670-2681.
- [28] LU H, CHANDRAN K, STENSEL D. Microbial ecology of denitrification in biological wastewater treatment [J]. Water Research, 2014, 64: 237-254.
- [29] 郭丽芸, 时飞, 杨柳燕. 反硝化菌功能基因及其分子生态学研究进展 [J]. 微生物学通报, 2011, 38 (4): 583-590. (GUO Liyun, SHI Fei, YANG Liuyan. Advances in functional genes and molecular ecology in denitrifiers [J]. Microbiology China, 2011, 38 (4): 583-590. (in

- Chinese))
- [30] 肖晶晶,郭萍,霍炜洁,等.反硝化微生物在污水脱氮中的研究及应用进展[J].环境科学与技术,2009,32(12):97-102.(XIAO Jingjing, GUO Ping, HUO Weijie, et al. Application of denitrifying microbes to wastewater denitrification[J]. Environmental Science & Technology, 2009,32(12):97-102.(in Chinese))
 - [31] SU J J, LIU B. Y, LIN J, et al. Isolation of an aerobic denitrifying bacterial strain NS-2 from the activated sludge of piggery wastewater treatment systems in Taiwan possessing denitrification under 92% oxygen atmosphere [J]. Journal of Applied Microbiology, 2001, 91(5): 853-860.
 - [32] GUO L, CHEN Q, FANG F, et al. Application potential of a newly isolated indigenous aerobic denitrifier for nitrate and ammonium removal of eutrophic lake water [J]. Bioresource Technology, 2013, 142: 45-51.
 - [33] YAO S, NI J, MA T, et al. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature by a newly isolated bacterium, *Acinetobacter* sp. HA2 [J]. Bioresource Technology, 2013, 139: 80-86.
 - [34] BRAKER G, ZHOU J, WU L, Et al. Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific Northwest Marine Sediment Communities [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(5): 2096-2104.
 - [35] BRAKER G, TIEDJE J M. Nitric oxide reductase (*norB*) genes from pure cultures and environmental samples [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(6): 3476-3483.
 - [36] THROBACK I N, ENWALL K, JARVIS A, et al. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 49(3): 401-417.
 - [37] 程占冰,杨江科,李鹤,等.淡水富营养型湖泊沉积物亚硝酸还原酶基因(*nirS*)的多样性和系统发育[J].微生物学报,2011(5):667-675.(CHENG Zhanbing, YANG Jiangke, LI He, et al. Phylogeny diversity of the nitrite reductase gene (*nirS*) in the sediments of the eutrophic East Lake, Wuhan [J]. Microbiologica Sinica, 2011(5): 667-675.(in Chinese))
 - [38] HEYLEN K, GEVERS D, VANPARYS B, et al The incidence of *nirS* and *nirK* and their genetic heterogeneity in cultivated denitrifiers [J]. Environmental Microbiology, 2006, 8(11): 2012-2021.
 - [39] JI G, WANG R, ZHI W, et al. Distribution patterns of denitrification functional genes and microbial floras in multimedia constructed wetlands [J]. Ecological Engineering, 2012, 44: 179-188.
 - [40] VERBAENDERT I, HOEFMAN S, BOECKX P, et al. Primers for overlooked *nirK*, *qnorB*, and *nosZ* genes of thermophilic Gram-positive denitrifiers [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2014, 89(1): 162-180.
 - [41] KOOPS H P, BOTTCHER B, MOLLER U C, et al. Classification of eight new species of ammonia-oxidizing bacteria: *Nitrosomonas communis* sp. nov., *Nitrosomonas ureae* sp. nov., *Nitrosomonas aestuarii* sp. nov., *Nitrosomonas marina* sp. nova, *Nitrosomonas nitrosa* sp. nov., *Nitrosomonas eutropha* sp. nov., *Nitrosomonas oligotropha* sp. nov. and *Nitrosomonas halophila* sp. Nova [J] Journal of General Microbiology, 1991, 137: 1689-1699.
 - [42] HU H W, ZHANG L M, DAI Y, et al. pH-dependent distribution of soil ammonia oxidizers across a large geographical scale as revealed by high-throughput pyrosequencing [J]. Journal of Soils and Sediments, 2013, 13(8): 1439-1449.
 - [43] POMMERENING-ROSER A, KOOPS H P. Environmental pH as an important factor for the distribution of urease positive ammonia-oxidizing bacteria [J]. Microbiological Research, 2005, 160(1): 27-35.
 - [44] NICOL G. W, LEININGER S, SCHLEPER C, ET AL. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria [J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(11): 2966-2978.
 - [45] KOPER T E, EL-SHEIKH A F, NORTON J M, et al. Urease-Encoding Genes in Ammonia-Oxidizing Bacteria [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(4): 2342-2348.
 - [46] HATZENPICHLER R. Diversity, physiology, and niche differentiation of ammonia-oxidizing archaea [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(21): 7501-7510.
 - [47] WU Y, KE X, HERNANDEZ M, et al. Autotrophic growth of bacterial and archaeal ammonia oxidizers in freshwater sediment microcosms incubated at different temperatures [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(9): 3076-3084.
 - [48] AVRAHAMIS S, LIESACK W, CONRAD R. Effects of temperature and fertilizer on activity and community structure of soil ammonia oxidizers [J]. Environmental Microbiology, 2003, 5(8): 691-705.
 - [49] KIM D J, LEE D I, KELLER J. Effect of temperature and free ammonia on nitrification and nitrite accumulation in landfill leachate and analysis of its nitrifying bacterial community by FISH [J]. Bioresource Technology, 2006, 97(3): 459-468.
 - [50] 梁龙. 湖泊沉积物中类蛭弧菌与氨氧化菌群的分布及其捕食关系 [D]. 北京:中国科学院大学, 2013.
 - [51] 王国祥,濮培民,黄宜凯,等.太湖反硝化、硝化、亚硝化

- 及氨化细菌分布及其作用[J]. 应用与环境生物学报, 1998, 5 (2): 190-194. (WANG Guoxiang, PU Peimin, HUANG Yikai, et al. Distribution and role of denitrifying, nitrifying, nitrosation and ammonifying bacteria in the Taihu Lake [J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 1998, 5 (2): 190-194. (in Chinese))
- [52] 李倩,田翠翠,肖邦定. 黑藻根际对沉积物中氨氧化细菌和古菌的影响[J]. 环境工程学报, 2014, 8 (10): 4209-4214. (LI Qian, TIAN Cuicui, XIAO Bangding. Effect of *Hydrilla verticillata* rhizosphere on ammonia oxidizing bacteria and archaea in sediment [J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2014, 8 (10): 4029-4214). (in Chinese))
- [53] 李彬. 富营养化湖泊系统藻类水华与硝化细菌种群作用关系的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
- [54] FRENCH E, KOZLOWSKI J. A, MUKHERJEE M, et al. Ecophysiological characterization of ammonia-oxidizing archaea and bacteria from freshwater [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78 (16): 5773-5780.
- [55] LIMPIYAKORN T, FURHACKER M, HABERL R, et al. *amoA*-encoding archaea in wastewater treatment plants: a review [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97 (4): 1425-1439.
- [56] TOURNA M, FREITAG T E, NICOL G W, et al. Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms [J]. Environmental Microbiology, 2008, 10 (5): 1357-1364.
- [57] URAKAWA H, TAJIMA Y, NUMATA Y, et al. Low temperature decreases the phylogenetic diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in aquarium biofiltration systems [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74 (3): 894-900.
- [58] ZHONG J C, FAN C X, LIU G F, et al. Seasonal variation of potential denitrification rates of surface sediment from Meiliang Bay, Taihu Lake, China [J]. Journal of Environmental Sciences-China, 2010, 22 (7): 961-967.
- [59] STIEF P, POLERECKY L, POULSEN M, et al. Control of nitrous oxide emission from *Chironomus plumosus* larvae by nitrate and temperature [J]. Limnology and Oceanography, 2010, 55 (2): 872-884.
- [60] GILBERTSON W W, SOLAN M, PROSSER J I. Differential effects of microorganism-invertebrate interactions on benthic nitrogen cycling [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2012, 82 (1): 11-22.
- [61] KAMP A, WITTE U. Processing of C-13-labelled phytoplankton in a fine-grained sandy-shelf sediment (North Sea): relative importance of different macrofauna species. Marine Ecology Progress Series, 2005, 297: 61-70.
- [62] STIEF P. Stimulation of microbial nitrogen cycling in aquatic ecosystems by benthic macrofauna: mechanisms and environmental implications [J]. Biogeosciences, 2013, 10 (12): 7829-7846.
- [63] POULSEN M, KOFOED M V, LARSEN L H, et al. *Chironomus plumosus* larvae increase fluxes of denitrification products and diversity of nitrate-reducing bacteria in freshwater sediment [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2014, 37 (1): 51-59.
- [64] 王松波, RICHARD W M, 程国军, 等. 湖泊沉积物中氨氧化微生物的 *amoA* 基因数量 [J]. 环境科学研究, 2013 (10): 1088-1094. (WANG Songbo, RICHARD W M, CHENG Guojun, et al. Abundance of *amoA* genes of ammonia oxidizing microorganisms in lake sediments [J]. Research of Environmental Sciences, 2013, 26 (10): 1088-1094. (in Chinese))
- [65] SOUCHU P, VAQUER A, COLLOS Y, et al. Influence of shellfish farming activities on the biogeochemical composition of the water column in Thau lagoon [J]. Marine Ecology Progress Series, 2001, 218: 141-152.
- [66] NEWELL R I E, CORNWELL J C, OWENS M S. Influence of simulated bivalve biodeposition and microphytobenthos on sediment nitrogen dynamics: a laboratory study [J]. Limnology and Oceanography, 2002, 47 (5): 1367-1379.
- [67] NIZZOLI D, WELSH D T, BARTOLI M, et al. Impacts of mussel (*Mytilus galloprovincialis*) farming on oxygen consumption and nutrient recycling in a eutrophic coastal lagoon [J]. Hydrobiologia, 2005, 550: 183-198.
- [68] NIZZOLI D, BARTOLI M, VIAROLI P. Nitrogen and phosphorous budgets during a farming cycle of the Manila clam *Ruditapes philippinarum*: an in situ experiment [J]. Aquaculture, 2006, 261 (1): 98-108.
- [69] CARLSSON M S, GLUD R N, PETERSEN J K. Degradation of mussel (*Mytilus edulis*) fecal pellets released from hanging long-lines upon sinking and after settling at the sediment [J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2010, 67 (9): 1376-1387.
- [70] ALTMANN D, STIEF P, AMANN R, et al. In situ distribution and activity of nitrifying bacteria in freshwater sediment [J]. Environmental Microbiology, 2003, 5 (9): 798-803.
- [71] van OEVELEN D, MIDDELBURG J J, SOETAERT K, et al. The fate of bacterial carbon in an intertidal sediment: modeling an in situ isotope tracer experiment [J]. Limnology and Oceanography, 2006, 51 (3): 1302-1314.
- [72] van OEVELEN D, SOETAERT K, MIDDELBURG J J, et al. Carbon flows through a benthic food web: integrating biomass, isotope and tracer data [J]. Journal of Marine Research, 2006, 64 (3): 453-482.

(下转第 50 页)

(1): 63-33. (XIONG Ying, SU Zhigang, GAO Juming. Research on grow and purification capacity of emerging plants of seven species [J]. Environmental Science and Management, 2011, 36 (1) : 63-33. (in Chinese))

[7] 黄蕾,翟建平,蒋鑫焱,等. 三种水生植物在不同季节去污能力的对比研究[J]. 环境保护科学, 2005, 31 : 44-47. (HUANG Lei, ZAI Jianping, JIANG Xinyan, et al. Experimental study of decontamination ability of three hydrophytes in different seasons [J]. Environmental Protection Science, 2005, 31 : 44-47. (in Chinese))

[8] 杨德敏,曹文志,陈能汪,等. 厦门城市降雨径流氮、磷污染特征[J]. 生态学杂志, 2006, 15 (6) : 625-628. (YANG Demin, CAO Wenzhi, CHEN Nengwang, et al. Nitrogen and phosphorus pollution from urban stormwater runoff in Xiamen City [J]. Chinese Journal of Ecology, 2006, 15 (6) : 625-628. (in Chinese))

(收稿日期: 2015 - 12 - 10 编辑: 徐 娟)

(上接第 22 页)

[73] ALTMANN D, STIEF P, AMANN R, et al. Nitrification in freshwater sediments as influenced by insect larvae: quantification by microsensors and fluorescence in situ hybridization [J]. Microbial Ecology, 2004, 48 (2) : 145-153.

[74] STIEF P, SCHRAMM A. Regulation of nitrous oxide emission associated with benthic invertebrates [J]. Freshwater Biology, 2010, 55 : 1647-1657.

[75] SVENNINGSSEN N B, HEISTERKAMP I M, SIGBY-CLAUSEN M, et al. Shell biofilm nitrification and gut denitrification contribute to emission of nitrous oxide by the invasive freshwater mussel *Dreissena polymorpha* (zebra mussel) [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78 (12) : 4505-4509.

[76] STIEF P, ELLER G. The gut microenvironment of sediment-dwelling *Chironomus plumosus* larvae as characterised with O₂, pH, and redox microsensors [J]. Journal of Comparative Physiology: B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology, 2006, 176 (7) : 673-683.

[77] SUN Xu, HU Zhixin, JIA Wen, et al. Decaying cyanobacteria decrease N₂O emissions related to diversity of intestinal denitrifiers of *Chironomus plumosus* [J]. Journal of Limnology, 2015, 74 (2) : 261-271.

(收稿日期: 2015 - 10 - 01 编辑: 徐 娟)

(上接第 41 页)

[8] 罗缙,逢勇,林颖,等. 太湖流域主要入湖河道污染物通量研究[J]. 河海大学学报: 自然科学版, 2005, 33 (2) : 131-135. (LUO Jin, PANG Yong, LIN Ying, et al. Study on flux of pollutants discharged into Taihu Lake through main inflow river channels [J]. Journal of Hohai University: Natural Sciences, 2005, 33 (2) : 131-135. (in Chinese))

[9] LI Weixin, ZHANG Yongchun, LIU Zhuang, et al. Outline for establishment of the Taihu Lake Basin early warning system [J]. Ecotoxicology, 2009, 18 : 768-771.

[10] 李维新,张永春,张海平,等. 太湖流域水环境风险预警系统构建[J]. 生态与农村环境学报, 2010, 26 (增刊 1) : 4-8. (LI Weixin, ZHANG Yongchun, ZHANG Haiping, et al. Construction of water environmental risk early warning system for Taihu Lake Basin [J]. Journal of Ecology and Rural Environment, 2010, 26 (Sup1) : 4-8. (in Chinese))

[11] 罗缙. 平原河网区水环境时空变化模拟技术及应用研究: 以太湖流域为例 [D]. 南京: 河海大学, 2009.

[12] 谢蓉蓉,逢勇,王晓,等. 基于太湖流域跨界断面的跨界水环境综合管理区及控制单元划分研究[J]. 福建师范大学学报: 自然科学版, 2015, 31 (1) : 103-109. (XIE Rongrong, PANG Yong, WANG Xiao, et al. Delineation of the water environmental comprehensive management area and control unit in the trans-river cross-section of Taihu Basin [J]. Journal of Fujian Normal University: Natural Science Edition, 2015, 31 (1) : 103-109. (in Chinese))

(收稿日期: 2015 - 10 - 08 编辑: 彭桃英)

(上接第 45 页)

[5] 建城函[2014] 275 号 海绵城市建设技术指南: 低影响开发雨水系统构建(试行) [S]

[6] 廖朝轩,江育铨. 都市水环境与雨水利用计划[J]. 台湾环境与土地, 2014, 2 (2) : 50-59. (LIAW Chaohsien, JIANG Yuquan. Urban water environment and rainwater utilization plan [J]. Taiwan Environment and Land, 2014, 2 (2) : 50-59. (in Chinese))

[7] LIAW Chaohsien, TSAI Y L, CHENG M S. Hydrologic analysis of distributed small-scale stormwater control systems [J]. Journal of Hydroscience and Hydraulic Engineering, 2005, 23 (1) : 1-12.

[8] 鞠茂森. 关于海绵城市建设理念、技术和政策问题的思考[J]. 水利发展研究, 2015 (3) : 7-10. (JU Maosen. Reflections on the concept, technology and policy of sponge city construction [J]. Water Resources Development Research, 2015 (3) : 7-10. (in Chinese))

[9] National Research Council. Urban stormwater management in the United States [M]. New York: The National Academics Press, 2009.

[10] Water Environment Federation. Design of urban stormwater controls [M]. New York: McGraw Hill, 2012.

(收稿日期: 2015 - 10 - 08 编辑: 彭桃英)