

蔡张杰, 崔丽娟, 李 晶, 等. 低温条件下人工湿地氨氧化微生物的群落结构特征[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(2): 373-383.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2020.02.017

低温条件下人工湿地氨氧化微生物的群落结构特征

蔡张杰^{1,2,3}, 崔丽娟^{1,2,3}, 李 晶^{1,2,3}, 李 伟^{1,2,3}, 雷茵茹^{1,2,3}

(1. 中国林业科学研究院湿地研究所, 北京 100091; 2. 湿地生态功能与恢复北京市重点实验室, 北京 100091; 3. 北京汉石桥湿地生态系统国家定位观测研究站, 北京 101399)

摘要: 为了解冬季低温条件下人工湿地沉积物的氨氧化潜力及其影响因素, 以北京市汉石桥湿地自然保护区内的人工湿地为研究对象, 测定了不同湿地单元沉积物的硝化潜势(PNR)及其相关功能基因的丰度。结果表明, 沉积物的PNR较高, 说明冬季人工湿地具有较高的硝化潜力。PNR从入水段到出水段呈现先增加后减少的趋势。通过建立硝化活性与功能微生物丰度的线性回归模型发现, 氨氧化古菌(AOA, 以AOA的*amoA*基因丰度表征)是影响硝化潜势的主要功能微生物。进一步构建硝化微生物丰度与环境因子的回归方程, 发现影响AOA *amoA*基因丰度的主要环境因子是碳氮比(C/N), 影响氨氧化细菌(AOB, 以AOB的*amoA*基因丰度表征)丰度的主要环境因子是全氮(TN)含量。高通量测序测定人工湿地沉积物AOA和AOB的群落组成, 各湿地单元检测到的AOB群落优势门为Proteobacteria, 主要是 β -Proteobacteria纲, AOA主要属于Crenarchaeota和Thaumarchaeota 2个门类。湿地4单元和5单元, 1单元和6单元在AOB菌群群落组成上较为接近; 湿地6单元、7单元、8单元在AOA菌群群落组成上较为接近。

关键词: 人工湿地; 硝化潜势; 功能基因丰度; 群落结构; 环境因子

中图分类号: X171.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2020)02-0373-11

Community structure characteristics of ammonia-oxidizing microorganisms in constructed wetland at low temperature

CAI Zhang-jie^{1,2,3}, CUI Li-juan^{1,2,3}, LI Jing^{1,2,3}, LI Wei^{1,2,3}, LEI Yin-ru^{1,2,3}

(1. Institute of Wetland Research, Chinese Academy of Forest, Beijing 100091, China; 2. The Beijing Key Laboratory of Wetland Ecological Function and Restoration, Beijing 100091, China; 3. Beijing Hanshiqiao National Wetland Ecosystem Research Station, Beijing 101399, China)

Abstract: To understand the potential nitrification rate of the constructed wetland sediments under low temperature conditions in winter and its influencing factors, the constructed wetland in the Hanshiqiao Wetland Nature Reserve in Beijing was selected as the research area, and the potential nitrification rate (PNR) and the abundance of their related functional genes were investigated. The results showed that the PNR of the sediment was higher, indicating that the constructed wetland had higher nitrification potential in winter. The PNR increased first and then decreased from the inlet section to the outlet section. By establishing a linear regression model of nitrification activity and functional microbial abundance, we found that ammonia-oxidizing archaea (AOA, characterized by the abundance of *amoA* gene in AOA) was the main functional microorganism affecting the nitrification potential. By further constructing the regression equation of microbial abundance and environmental factors, it was found that the main environmental factor affecting the abundance of AOA *amoA* gene was carbon-nitrogen ratio (C/N), and the main

environmental factor affecting the abundance of ammonia-oxidizing bacteria (AOB, characterized by abundance of *amoA* gene in AOB) was total nitrogen (TN) content. High-throughput sequencing was used to determine the community composition of AOA and AOB in constructed wetland sediments. The dominant phylum of AOB community in each wet-

收稿日期: 2019-06-03

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFC0506200); 国家自然科学基金项目(41601577)

作者简介: 蔡张杰(1992-), 男, 河南郸城人, 硕士研究生, 主要从事湿地微生物生态学研究。(E-mail) caizhangjie2017@163.com

通讯作者: 崔丽娟, (E-mail) lkyclj@126.com

land unit was Proteobacteria, which was mainly composed of β -subdivision of Proteobacteria, and AOA mainly belonged to Crenarchaeota and Thaumarchaeota. In terms of community composition, for AOB, wetland units 4 and 5, 1 and 6 were relatively similar in flora composition, for AOA, wetland units 6, 7, 8 were relatively close.

Key words: constructed wetland; potential nitrification rate; functional genes' abundance; community structure; environmental factor

人工湿地能够有效处理氮素污染,其主要的除氮机制为植物和微生物的作用^[1-2]。微生物以其主导的硝化-反硝化作用等过程可去除60%~90%的氮^[3-5]。氨氧化作用是硝化作用的限速步骤,是氮循环的中心环节。在中国北方,冬季低温条件下,植物衰老死亡后其吸收的氮素分解回归湿地环境,微生物代谢缓慢,有机质在基质中积累^[6],导致人工湿地生态系统在冬季低温时运行效率较低^[7-8],进而影响人工湿地的推广普及。近年来,国内外学者开展了对人工湿地冬季低温条件下运行状况的研究。这些研究多用水体氮形态变化表征除氮效果,较少涉及沉积物的硝化作用,也较少从功能微生物的角度评价除氮效果。

本研究以北京市汉石桥湿地自然保护区的人工湿地为对象,采集冬季冰封期不同处理单元的沉积物,测定其硝化潜势,并测定氨氧化功能基因(*amoA*)的丰度以及环境因子,揭示冬季低温条件下人工湿地的硝化潜势及其生物和非生物影响因素,以期为提高湿地冬季运行效率提供理论参考。此外本研究采用 Miseq 高通量测序的方法分析不同处理单元的反硝化细菌群落,利用冗余分析方法探究其与环境因子的关系,以期为人造湿地氨氧化细菌、氨氧化古菌群落结构的分布以及细菌环境因子的研究提供依据,为人造湿地微生物除氮机制研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究区概况及样品采集

北京市汉石桥人工湿地建于2015年,共有8个处理单元(图1)。1单元的水源是游船区的湖水,2单元的水源是附近餐厅和厕所的污水。人工湿地总面积约为3 400 m²,种植的植物为香蒲、菖蒲、水葱、芦苇等。各单元底部均铺有砂石或砾石防渗,单元之间通过下方管道实现水流的连通。湿地内的水经多级处理,达到Ⅱ类水的标准后,通过地下管道从8单元排入附近河道。人工湿地在每年3月中旬蓄水,11月底入冬后排干。于2018年3月1日湿地

无水期,在人工湿地8个处理单元各采集0~20 cm深的3个沉积物样品,共24个样品。

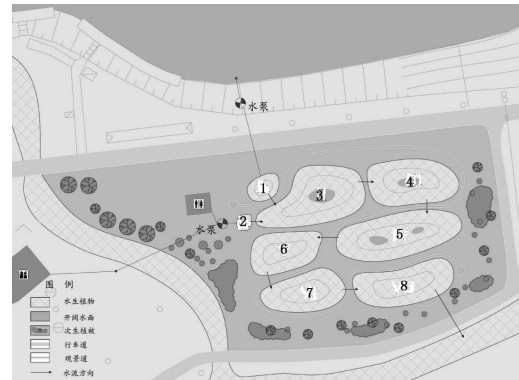


图1 北京市汉石桥人工湿地示意图

Fig.1 Sketch map of the constructed wetland in the Hanshiqiao Wetland Nature Reserve in Beijing

1.2 沉积物理化性质和活性指标的测定

按照文献[9]的方法,测定沉积物的pH值以及有机质(OM)、全碳(TC)、全氮(TN)、铵态氮(NH₄⁺-N)、硝态氮(NO₃⁻-N)含量。用电位法(土水比1.0:2.5,质量比)测定pH值,用Cytation 5多功能酶标仪(Biotek, USA)测定有机质含量,用Vario II元素分析仪(Elementar, German)测定TC和TN含量,用SmartChem200全自动间断化学分析仪(WestCo, USA)测定NH₄⁺-N和NO₃⁻-N含量。硝化潜势(PNR)的测定(以NO₂⁻-N计)采用氯酸盐抑制法^[10]。

1.3 DNA的提取和PCR扩增

利用Power Soil土壤DNA提取试剂盒(German, QIAGEN)提取基因组DNA。氨氧化古菌(AOA)和氨氧化细菌(AOB)的*amoA*基因定量PCR分析均在Light Cycler[®] 480II(Roche, Switzerland)上进行。PCR反应体系为25.0 μl,包含12.5 μl TB Green Premix Ex Taq II(TaKaRa公司产品),正、反向引物各1.0 μl, DNA模板1.0 μl,其余用ddH₂O(Takara, Japan)补足至25.0 μl。定量PCR所用引物及反应条件见表1。全部样品使用AxyPrepDNA凝胶回收试剂盒(AXY-

GEN 公司产品)切胶回收 PCR 产物,Tris_HCl 洗脱,2%琼脂糖凝胶电泳检测。将纯化产物通过 Illumina

MiSeq 平台的标准测试方法进行高通量测序(由美吉桑格生物医药科技有限公司完成测序)。

表 1 PCR 扩增引物

Table 1 Primers for PCR

目的基因	引物名	引物序列(5'→3')	扩增条件	参考文献
氨氧化细菌 <i>amoA</i> 基因	<i>amoA</i> -1F	GGGTTTCTACTGCTGGT	95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 10 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,共 35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min	[10]
	<i>amoA</i> -2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC		
氨氧化古菌 <i>amoA</i> 基因	Arch- <i>amoA</i> F	STAATGGTCTGGCTTAGACG	95 ℃ 预变性 3 min;95 ℃ 变性 10 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,共 35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min	[11]
	Arch- <i>amoA</i> R	GCGGCCATCCATCTGTATGT		

1.4 序列处理

应用 Usearch 软件将所有优化序列 Map 至 OUT 代表序列,选出与 OUT 代表序列相似性在 97% 以上的序列,生成 OUT 表格。使用 Qimme 平台与 RDP Classifier 贝叶斯算法对 97% 相似水平的 OUT 代表序列进行分类学分析,对比 SILVA 数据库,统计每个样品的群落组成。若分类学数据库中出现一些分类学谱系中的中间等级没有科学名称,以 norank 作为标记。分类学对比后根据置信度阈值进行筛选,如果某些分类谱系在某一分级别分值较低,在统计时以 Unclassified 标记。

1.5 数据处理和分析

使用 Microsoft Excel2013 软件(Microsoft,USA)进行试验数据初步处理,使用 SPSS22.0 软件(Chicago,IL,USA)进行统计分析,在 OriginPro2018 软件(OriginLab,USA)上完成制图。采用单因素方差分析(one-way ANOVA)的 Duncan's 法($P < 0.05$)检验多组样本之间的差异性,采用成对数据 t 检验分析 AOA 与 AOB *amoA* 丰度的差异性。采用 Spearman

相关系数分析两组变量之间的相关性,并用线性回归进一步确定变量之间的关系。使用上海美吉生物医药科技有限公司的 I-Sanger 云平台进行微生物的多样性分析和分类学分析。

2 结果与分析

2.1 人工湿地沉积物主要理化性质与硝化活性

测定结果(表 2)表明,人工湿地沉积物 pH 值介于 7.97 与 8.34 之间,呈弱碱性,在 1 单元和 2 单元之间 pH 值有显著差异,其他单元之间均无显著差异,1 单元和 6 单元 pH 值最大,分别为 8.25 和 8.34。OM、TC、TN 含量从 2 单元至出水单元(8 单元)均显著降低($P < 0.05$)。C/N 在 1~5 单元和 6~8 单元间存在显著差异($P < 0.05$),其变化范围为 8.59~14.11。 NH_4^+ -N 含量在 1、4 单元间存在显著差异,其他单元之间不存在显著差异,但存在一定的先增加后减少的趋势。 NO_3^- -N 含量在 4、5 单元和其他单元之间存在显著差异,该湿地各单元 NH_4^+ -N 和 NO_3^- -N 含量均处于较高水平。

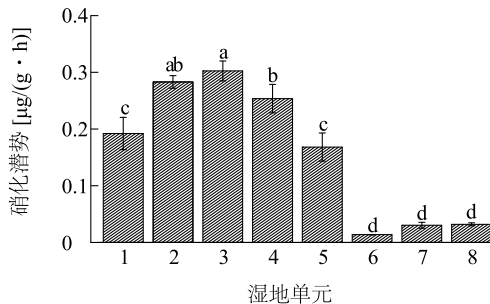
表 2 人工湿地沉积物理化因子指标

Table 2 Physical and chemical indices of sediments in constructed wetland

湿地单元	pH	有机质(OM)含量(%)	全碳(TC)含量(%)	全氮(TN)含量(%)	C/N 比值	NH_4^+ -N 含量(mg/kg)	NO_3^- -N 含量(mg/kg)
1	8.25±0.10a	0.64±0.18ab	1.21±0.08b	0.13±0.01b	9.56±0.65b	21.60±3.21b	8.30±1.31b
2	7.97±0.11b	1.01±0.19a	2.46±1.04a	0.24±0.11a	10.39±0.59b	27.66±8.35ab	8.83±1.51b
3	8.18±0.03ab	0.55±0.16b	1.09±0.26b	0.13±0.02b	8.59±0.69b	24.05±3.05ab	9.23±2.60b
4	8.22±0.06a	0.52±0.10b	1.02±0.07b	0.09±0.01b	10.82±0.11b	30.17±8.70ab	12.42±2.16a
5	8.17±0.07ab	0.63±0.13ab	1.19±0.06b	0.11±0.00b	10.76±0.31b	35.22±12.26a	12.49±0.50a
6	8.34±0.07a	0.38±0.10b	0.86±0.04b	0.06±0.00b	14.11±0.47a	22.96±2.86ab	9.35±1.70b
7	8.13±0.27ab	0.51±0.50b	1.10±0.77b	0.09±0.07b	14.07±2.15a	23.24±4.22ab	8.48±1.02b
8	8.12±0.07ab	0.47±0.15b	0.84±0.27b	0.06±0.03b	13.66±2.42a	30.55±1.34ab	8.55±1.00b

同列不同小写字母表示不同湿地单元之间在 0.05 水平上存在显著差异。

图 2 显示,3 单元的硝化潜势 (PNR) 最高 $[(0.30 \pm 0.02) \mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{h})]$,6 单元最低 $[(0.01 \pm 0) \mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{h})]$ 。从 3 单元到 8 单元沉积物的 PNR 呈现显著降低的趋势 ($P < 0.05$)。



同列不同小写字母表示不同湿地单元之间在 0.05 水平上存在显著差异。

图 2 人工湿地不同单元硝化潜势

Fig.2 Potential nitrification rates in different units of constructed wetland

2.2 人工湿地氨氧化微生物功能基因丰度

利用实时荧光定量 PCR 技术对各湿地单元沉积物样品的氨氧化细菌 (AOB) 和氨氧化古菌 (AOA) 的 *amoA* 基因进行分析 (图 3)。成对数据 *t* 检验结果表明,在所有湿地单元中,AOA *amoA* 基因丰度均显著高于 AOB *amoA* 基因丰度 ($t = 6.678, P < 0.01$),二者的比值为 1.44~31.35。在所有湿地单元中,AOA 和 AOB 的 *amoA* 基因丰度分别为 $1 \text{ g } 1.55 \times 10^7 \sim 2.65 \times 10^8$ 拷贝、 $8.12 \times 10^6 \sim 1.58 \times 10^7$ 拷贝。单因素方差分析结果表明,人工湿地 3 单元和 4 单元 AOA *amoA* 基因丰度与其他单元存在显著差异 ($F = 168.506, P < 0.01$)。人工湿地入水单元 (1 单元、2 单元) AOB *amoA* 基因丰度与其他单元存在显

著差异 ($F = 9.471, P < 0.01$)。

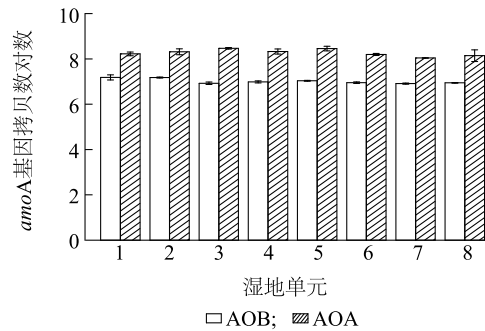


图 3 人工湿地不同单元氨氧化细菌 (AOB) 和氨氧化古菌 (AOA) *amoA* 基因丰度

Fig.3 Abundance of *amoA* gene in ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and ammonia-oxidizing archaea (AOA) under different units of constructed wetland

分析 PNR 与相关功能基因的关系,结果表明 PNR 与沉积物中 AOA *amoA* 基因丰度呈极显著正相关关系 (相关系数为 0.693^{**}, $P < 0.01$),AOA *amoA* 基因丰度越高,PNR 越大。说明该人工湿地在低温条件下,AOA 在硝化过程中作用较为重要。进一步分析氨氧化功能基因丰度与环境因子的关系,结果 (表 3) 表明人工湿地冬季沉积物 AOA *amoA* 基因丰度与沉积物 C/N 呈极显著负相关关系。AOB *amoA* 基因丰度与 OM、TC、TN 含量呈极显著正相关关系。

进一步对各功能基因与环境因子进行多元逐步回归。结果 (表 4) 表明,沉积物 C/N 比对人工湿地 AOA *amoA* 基因丰度影响最大,回归方程决定系数 R^2 为 0.225;沉积物 TN 含量对 AOB *amoA* 基因丰度影响最大,回归方程 R^2 为 0.332。

表 3 人工湿地低氨氧化功能基因丰度与环境因子的相关系数

Table 3 Correlation coefficient between ammonia oxidation functional genes' abundance and environmental factors in constructed wetland

功能基因	pH 值	OM 含量	TC 含量	TN 含量	C/N 比	$\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量	$\text{NO}_3\text{-N}$ 含量
AOA <i>amoA</i>	0.037	0.021	-0.049	0.080	-0.507 ^{**}	0.017	0.286
AOB <i>amoA</i>	-0.281	0.597 ^{**}	0.530 ^{**}	0.559 ^{**}	-0.387	-0.013	-0.094

AOA:氨氧化古菌;AOB:氨氧化细菌。**表示相关性在 0.01 水平 (双侧) 上显著相关。

2.3 人工湿地氨氧化微生物的 α -多样性

α -多样性指标 (OUT 水平) 可以在一定程度上表示样点的群落特征。本研究中计算的 α -多样性指标有:丰富度指数 (Chao1、ACE),表示一个群落中物种的复杂程度,值越高表明群落内物种的数目越多;优势度指数 (Simpson 指数),表示一个群落中

优势菌群的地位和贡献,值越高表明群落内物种数量差异越大,优势菌群的主导地位越突出;多样性指数 (Shannon 指数),是物种丰富度和均匀度的综合指标,也是对 Chao1 指数和 Simpson 指数综合的一个指数^[12]。为了保证样品的序列数一致,在计算各指标之前,对样本 OUT 数目进行随机抽平。计算结

果(表 5)显示,氨氧化细菌 Chao1 指数最高的是 3 单元(58.00),最低的是 5 单元(31.00);Simpson 指数最高的为 1 单元(0.27),最低的为 8 单元(0.13);Shannon 指数最高的为 8 单元(2.47),最低的是 1 单元(1.58)。氨氧化古菌 Chao1 指数最高的是 3 单元(68.00),最低的是 2 单元(36.50);Simpson 指数最高的为 5 单元(0.34),最低的为 8 单元(0.10);Shannon 指数最高的为 8 单元(2.88),

最低的是 2 单元(1.53)。

表 4 功能基因丰度与土壤主要理化因子逐步回归拟合

Table 4 Stepwise regression between functional genes' abundance and soil physicochemical factors

功能基因	顺序	进入因子	标准化回归方程	调整后 R^2	P
AOA <i>amoA</i>	1	$C/N(x_1)$	$Y_1 = -0.510x_1$	0.225	0.013
AOB <i>amoA</i>	1	TN 含量(x_2)	$Y_2 = 0.602x_2$	0.332	0.002

AOA、AOB 见表 3 注。

表 5 人工湿地不同单元沉积物氨氧化细菌(AOB)和氨氧化古菌(AOA)α多样性指数

Table 5 α-diversity index of ammonia-oxidizing archaea (AOA) ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in each units of constructed wetland sediments

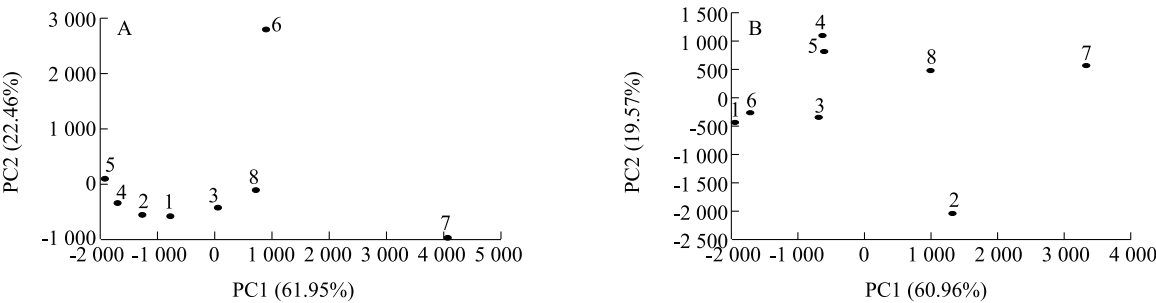
微生物	指数	湿地单元							
		1	2	3	4	5	6	7	8
AOB	Chao1	34.00	37.00	58.00	47.67	31.00	38.67	44.86	57.43
	Simpson	0.27	0.15	0.23	0.20	0.18	0.24	0.15	0.13
	Shannon	1.58	2.27	1.88	2.09	2.09	1.81	2.17	2.47
AOA	Chao1	49.25	36.50	68.00	44.14	62.00	41.00	65.00	61.00
	Simpson	0.26	0.30	0.19	0.31	0.34	0.18	0.18	0.10
	Shannon	1.66	1.53	2.15	1.61	1.62	1.96	2.49	2.88

AOA、AOB 见表 3 注。

2.4 人工湿地氨氧化微生物的β-多样性

β-多样性(OUT 水平)可以用来比较各样点间群落的差异,基于 Bray-Curtis 差异度指数计算样点间的差异,进而对微生物群落排序,选取解释度最大的两轴做 PCA 图(图 4)。对于 AOB,两轴对排序结果的解释度分别为 60.96%和 19.57%。1 单元和 6 单元,4 单元和 5 单元的距离较近,说明这两组的氨氧化细菌群落结构更相似。1 单元和 7 单元距离最

远,说明这 2 个单元的氨氧化细菌群落结构差异较大。对于 AOA,两轴对排序结果的解释度分别为 61.95%和 22.46%。1~5 单元距离很近,说明这 5 个单元的氨氧化古菌群落结构更相似;6 单元和 7 单元距离最远,说明这 2 个单元的氨氧化古菌群落结构差异较大。这个结果与人工湿地沉积物氨氧化微生物的聚类结果(OUT 水平)类似(图 5)。



A:氨氧化细菌群落的 PCA 排序;B:氨氧化古菌群落的 PCA 排序。

图 4 人工湿地沉积物氨氧化微生物群落的 PCA 排序

Fig.4 PCA analysis for ammonia oxidation microbial community in constructed wetland sediments

2.5 人工湿地氨氧化微生物的群落组成

对人工湿地沉积物样品氨氧化细菌的所有序列

进行聚类,共得到 109 个 OTU,通过分类学统计得到门、属 2 个水平的细菌群落结构组成。分别统计其

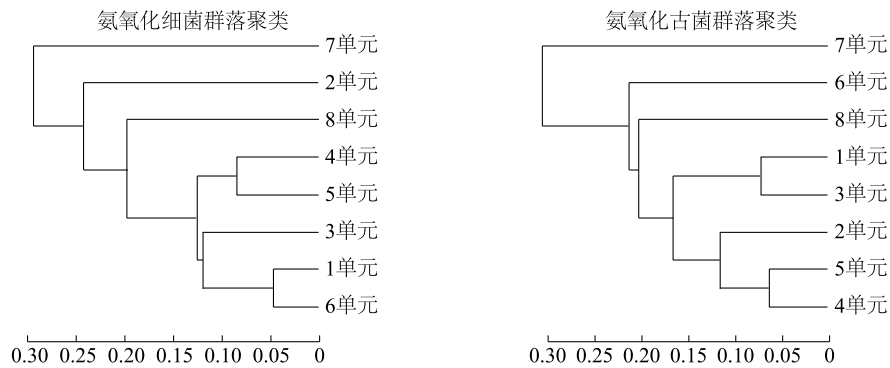


图5 人工湿地氨氧化微生物群落聚类

Fig.5 Cluster analysis of ammonia oxidation microbial community in constructed wetlands

门、属类别的构成,形成柱状图(图6),同时分析其在各个水平上的菌群结构。结果显示检测所得 OUT 主要属于 3 个门类,分别是 Proteobacteria (77.52%)、Unclassified_k_norank_d_Bacteria (21.68%)、Ammonia_oxidising_bacteria_ensemble (0.69%)。在属水平上,所得 OUT 主要属于 9 个属,分别为 Unclassified_o_Nitrosomonadales (30.28%)、Unclassified_k_norank_d_Bacteria (21.68%)、Nitrosospira (19.64%)、Norank_f_environmental_samples (15.88%)、Norank_o_environmental_sample_c_Betaproteobacteria (0.05%)、Nitrosomonas (0.05%)、Environmental_samples_f_Nitrosomonadaceae (0.009%)、Nitrosovibrio (0.008%)、Norank_p_ammonia_oxidising_ensemble (0.007%)。

对沉积物样品氨氧化古菌的测序序列进行聚类后,共得到 74 个 OTU,通过分类学统计得到在门和属上的群落结构组成(图7)。检测所得 OUT 主要属于 4 个门类,分别是 Unclassified_k_norank_d_Archaea (66.09%)、Crenarchaeota (24.02%)、Environmental_sample_k_norank_d_Archaea (7.48%)、Thaumarchaeota (2.32%)。在属水平上,所得 OUT 主要属于 4 个属,分别是 Unclassified_k_norank_d_Archaea (66.09%)、Norank_c_environmental_samples_p_Crenarchaeota (24.02%)、Norank_p_environmental_sample_k_norank (7.48%)、Nitrososphaera (2.26%)。

为比较不同单元氨氧化微生物群落组成的差异,应用 Bray-Curtis 距离算法和 Complete 聚类方法,将高丰度和低丰度的物种分块聚类,通过颜色梯度及相似程度反应多个样本在各分类水平上群落组成(属水平)的相似性和差异性(图8)。结果表明,氨氧化细菌群落相似度最高为 86.6%,相似度较

高,4 单元与 5 单元,1 单元与 6 单元菌群群落组成较为相近。氨氧化古菌群落相似度最高为 87.2%,相似度较高,6 单元、7 单元、8 单元与 3 单元、5 单元、4 单元、1 单元、2 单元群落组成相差较大,其中 1 单元与 2 单元,7 单元与 8 单元菌群群落组成较为相似。

2.6 人工湿地氨氧化微生物与沉积物理化性质的相关性

对沉积物理化环境因子与氨氧化微生物主要菌落(属)所占比重进行中心标准化,并进行校正(蒙特卡洛置换检验),提取第一与第二坐标轴信息,进行冗余分析,发现对于氨氧化细菌,第一和第二坐标轴对方差总解释率为 83.10%。在所测样品中, Nitrosomonas、Norank_o_environmental_samples_c_Betaproteobacteria、Norank_f_environmental_samples 与沉积物中 TC 含量、TN 含量、OM 含量、C/N 比呈正相关关系,与 pH、 NO_3^- -N 含量呈负相关关系。而 Environmental_samples_f_Nitrosomonadaceae、Unclassified_o_Nitrosomonadales 与 pH、 NO_3^- -N 含量呈正相关关系,与 TC 含量、TN 含量、OM 含量、C/N 比呈负相关关系。对于氨氧化古菌, Nitrososphaera、Unclassified_k_norank_d_Bacteria、Norank_c_environmental_samples_p_Crenarchaeota 与 pH、C/N 比呈正相关关系,与 TC 含量、TN 含量、OM 含量、 NH_4^+ -N 含量、 NO_3^- -N 含量呈负相关关系。

进一步进行环境因子与物种的相关分析(图9)。对于氨氧化细菌,pH 值与 Nitrosovibrio、Unclassified_o_Nitrosomonadales 呈显著正相关关系 ($r=0.810, P<0.05$; $r=0.714, P<0.05$) 与 Norank_o_environmental_sample_c_Betaproteobacteria 呈显著负相

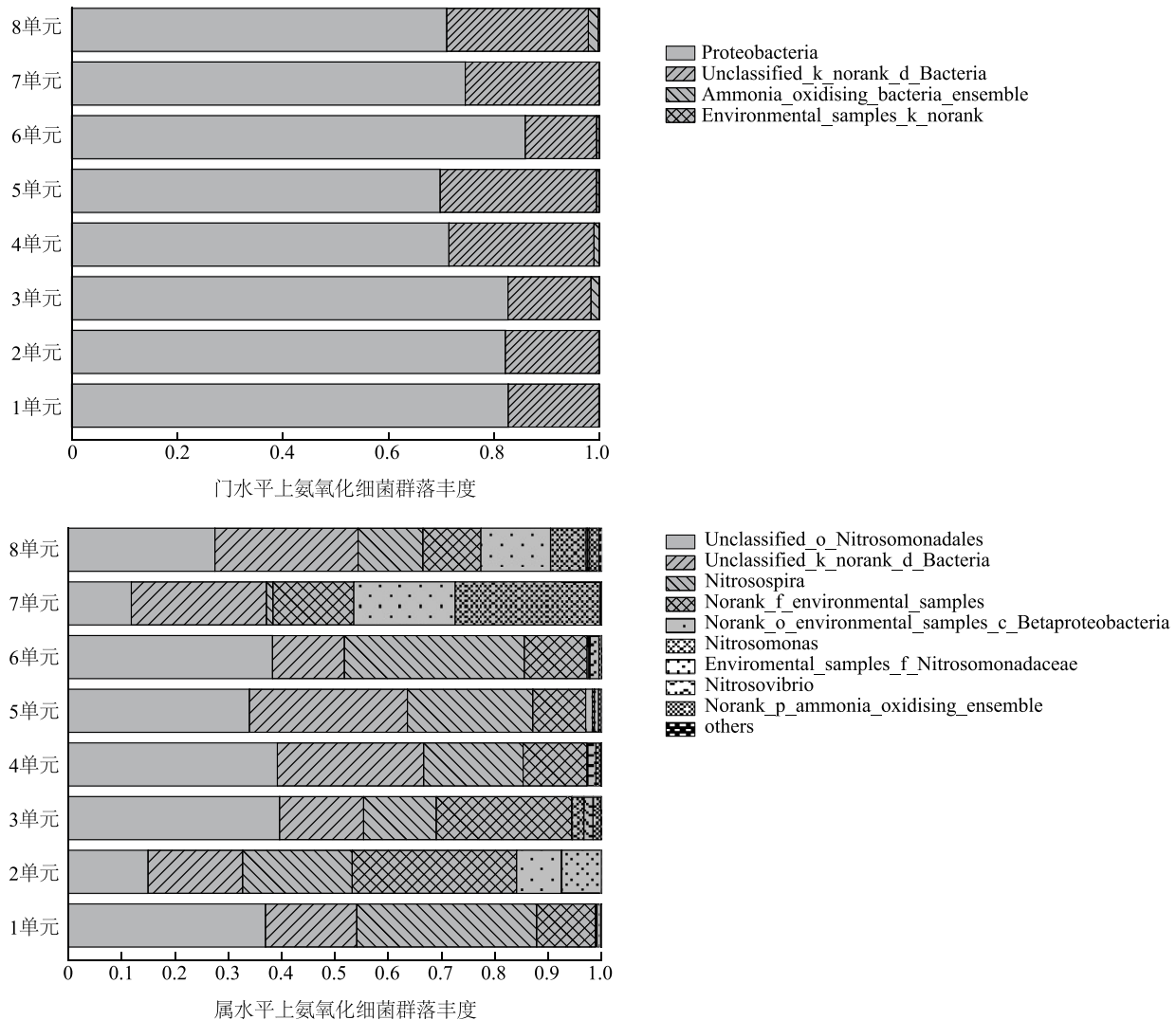


图6 人工湿地不同单元氨氧化细菌群落结构

Fig.6 Community structure of ammonia-oxidizing bacteria in different units of constructed wetland

关关系($r = -0.738, P < 0.05$), *Environmental_samples_f_Nitrosomonadaceae* 与 NO_3^- -N 含量呈显著负相关关系($r = -0.756, P < 0.05$)。对于氨氧化古菌, OM 含量与 *Norank_c_environmental_samples_p_Crenarchaeota* 呈负相关关系($r = -0.785, P < 0.05$)。

3 讨论

本研究探讨了低温条件下人工湿地沉积物硝化潜势,并应用高通量测序技术,针对氨氧化微生物的功能基因 *amoA* 进行扩增,较全面地考察了人工湿地冬季低温时期沉积物中氨氧化微生物的群落组成,从 α -多样性、 β 多样性、群落组成及其与环境因子的关系等方面进行分析。硝化潜势是短期人为添

加外源氮条件下的硝化强度,反映的是硝化作用的第一步——氨氧化作用的潜力,其产物 NO_2^- 是一些厌氧过程底物的重要来源,硝化作用是湿地环境有氧无氧界面的一个重要过程^[10]。本研究中,冬季人工湿地沉积物 PNR 最大值为 $0.30 \mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{h})$,高于国内农田和森林生态系统 PNR 的平均水平,低于草地生态系统 PNR^[13]。

土壤微生物是土壤生化过程的驱动者,其生物量、群落结构、活性等特性都会直接影响到土壤硝化潜势^[5,14]。在本研究中,沉积物 AOA *amoA* 基因丰度显著高于 AOB *amoA* 基因丰度。相关分析结果也表明,硝化潜势和 AOA *amoA* 基因丰度呈现极显著的正相关关系, AOA 在本研究的人工湿地硝化作用

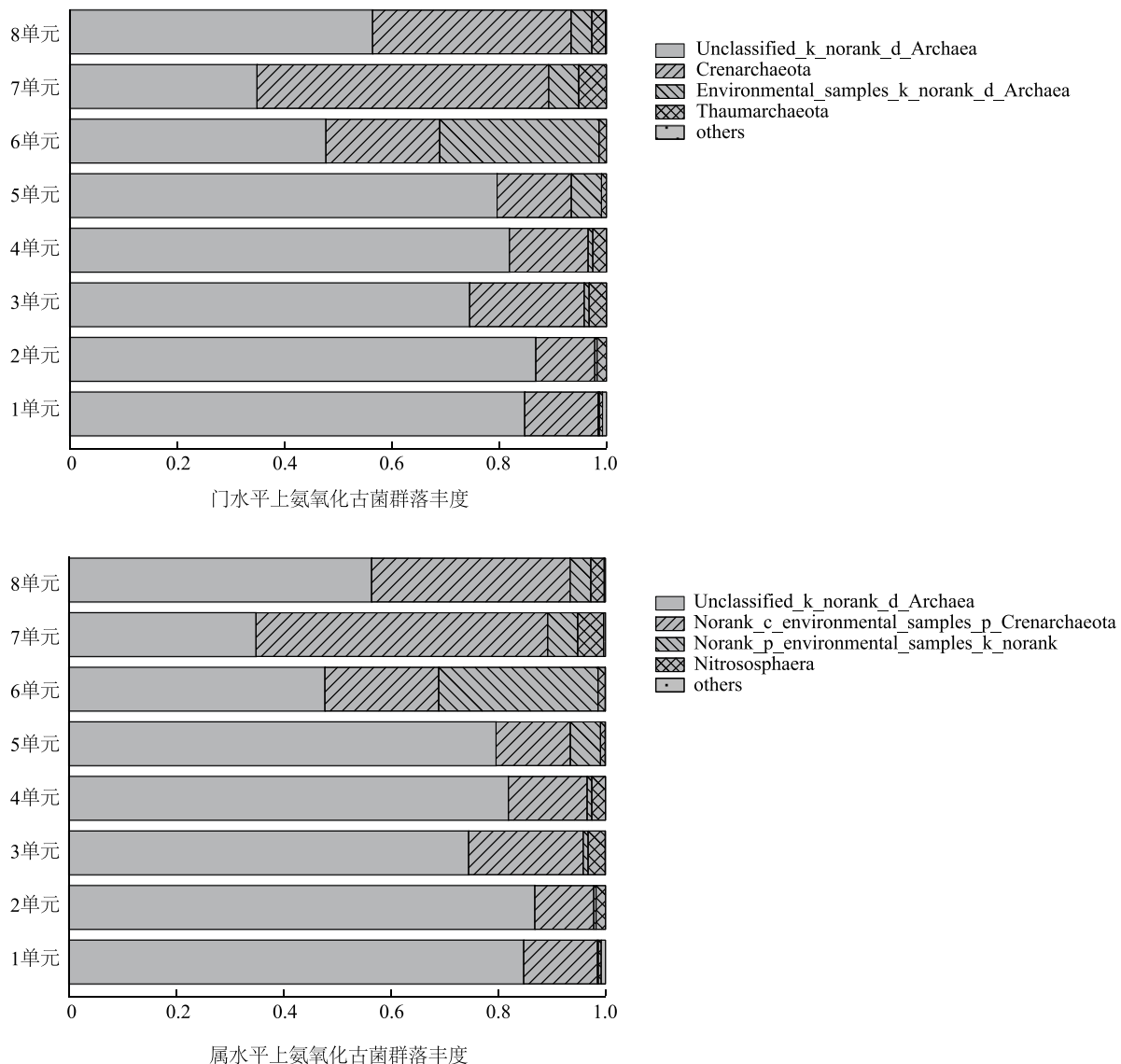
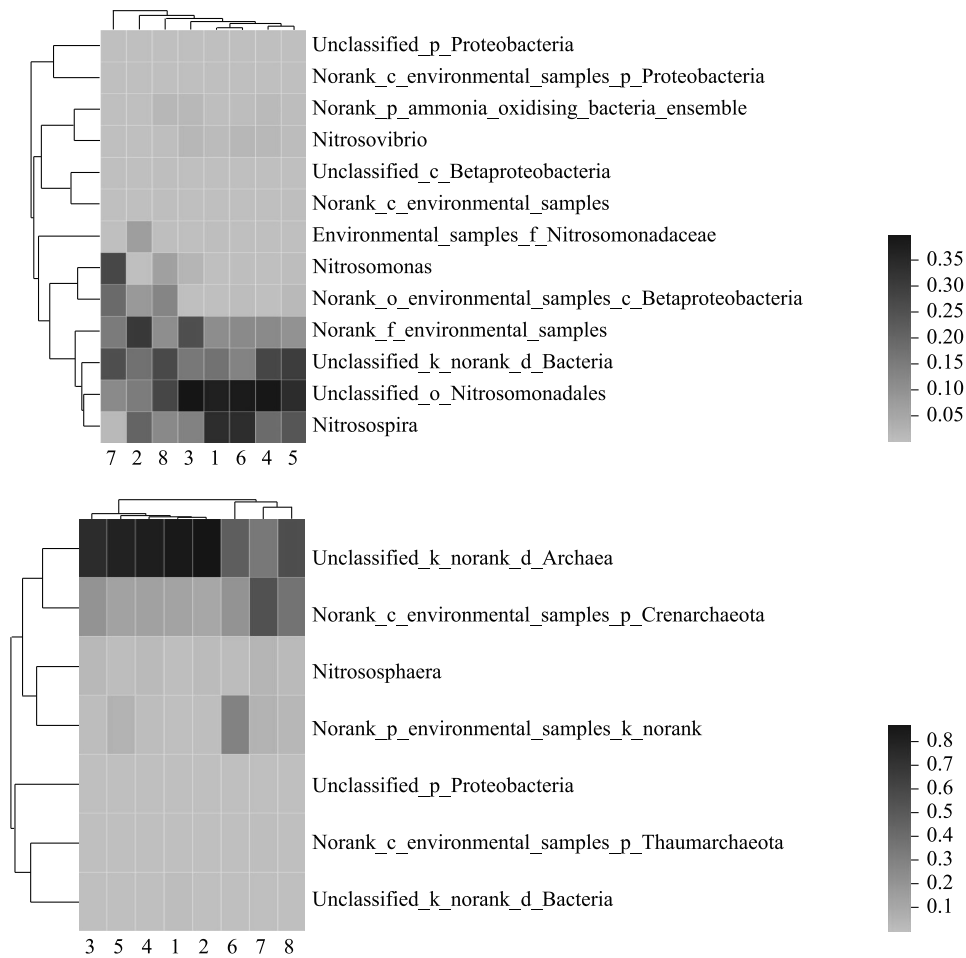


图7 人工湿地不同单元氨氧化古菌群落结构

Fig.7 Community structure of ammonia-oxidizing archaea in different units of constructed wetland

中发挥着重要的作用,这与杭州湾滨海湿地沉积物及中国南方酸性土壤中 AOA 占主导优势的结论相一致^[15-16]。AOA 和 AOB 有生态位分异的特征^[16]。本研究中,人工湿地沉积物 AOA *amoA* 基因丰度与 C/N 比值呈极显著负相关关系,AOB *amoA* 基因丰度与 OM、TC、TN 含量均呈极显著正相关关系,这与章芳等^[17]的研究结果相似。多元回归分析结果表明,C/N 比值是影响 AOA *amoA* 丰度的主要环境因子,C/N 比值影响有机质的矿化,C/N 比值越低,有机质分解速率越快^[17]。TN 含量是影响 AOB *amoA* 的主要环境因子。

在计算氨氧化细菌 (AOB) 和氨氧化古菌 (AOA) 的 α -多样性时,由于各指数计算方法的不同,不同指标给出的结果略有差异。本研究中 Chao1 指数(丰富度指数)最高单元的 Shannon 指数(多样性指数)并不是最高,同样,Shannon 指数最高单元的 Chao1 指数也并不是最高。例如 3 单元 AOB 的 Chao1 指数最高,但其 Shannon 指数仅为 1.88,其最大值为 2.47;3 单元 AOA 的 Chao1 指数最高,但其 Shannon 指数仅为 2.15,最高为 2.88。8 单元 AOB 的 Shannon 指数最高,但其 Chao1 指数为 57.43,最高为 58.00;8 单元 AOA 的 Shannon 指数



1、2、3、4、5、6、7、8 分别表示单元号。灰色相似度最差,黑色相似度最高。

图8 人工湿地氨氧化微生物群落聚类热图

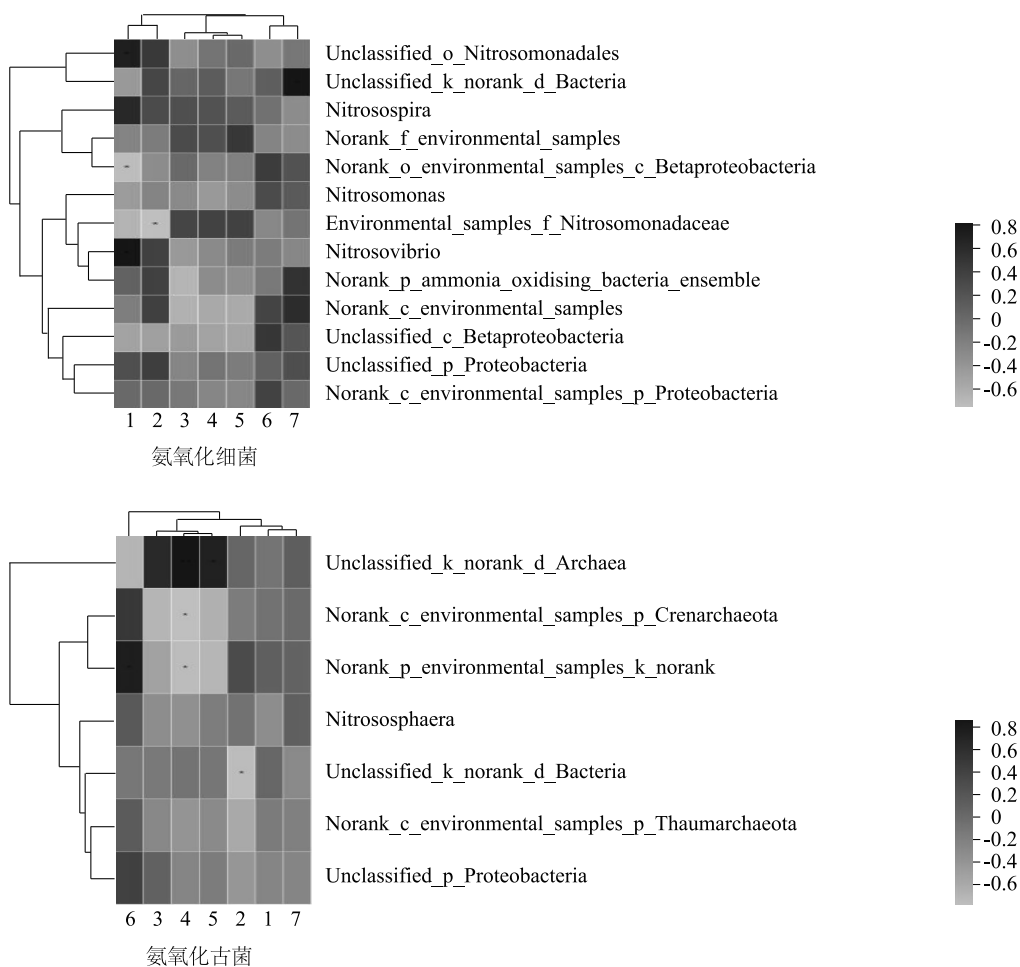
Fig.8 Heatmap of ammoxidation microbial community cluster in the constructed wetland

最高,但其 Chao1 指数为 61.00,最高为 68.00。出现这种现象的原因是,3 单元中氨氧化微生物的群落组成最复杂,但群落内个体数目的分布不均匀,而 8 单元群落组成不是最复杂,但其群落组成分布均匀。而 Simpson 指数(优势度指数)较高单元的 Chao1 指数(丰富度指数)往往较低,Simpson 指数较低单元的 Chao1 指数往往较高。

氨氧化微生物在氮素循环中占有重要的地位,是土壤中较敏感的功能性微生物类群^[18]。在群落组成上,氨氧化细菌的群落多样性高于氨氧化古菌。本研究中,各湿地单元检测到的氨氧化细菌群落优势门为 Proteobacteria,主要是由 β -Proteobacteria (77.51%) 组成。 β -Proteobacteria 作为优势门的优势纲,常见于淡水环境中^[19],海洋中较少发现。人工湿地中 β -Proteobacteria 绝大多数属于 Nitro-

somonadales 目 Nitrosomonadaceae 科。Nitrosomonadaceae 科主要包含 Nitrospira 和 Nitrosomonas 2 个属^[20]。Nitrosomonas 在硝化作用第一阶段起主导作用,可以促进 NH_4^+ 氧化成 NO_2^- ; Nitrospira 是陆地生态系统中的优势种,可作为硝化细菌,将亚硝酸盐氧化为硝酸盐^[21]。本研究中人工湿地氨氧化细菌最多的属为 Unclassified_o_Nitrosomonadales,即在科水平上未分类的 Nitrosomonadales 目细菌。本研究中 Nitrospira 丰度高高于 Nitrosomonas,表明 Nitrospira 在硝化作用中的数量优势。Nitrosomonas 青睐于低氨态氮环境,而 Nitrospira 更适应高氨态氮的污染环境^[22]。不同菌属的分布不同, Nitrosomonas 属在 7、8 单元的丰度高于 1~6 单元,而 Nitrospira 属在 7、8 单元的丰度低于 1~6 单元。

氨氧化古菌在淡水湿地生态系统氮循环过程中



黑色表示正相关,灰色表示负相关。1:pH;2:NO₃⁻-N;3:TC;4:OM;5:TN;6:C/N;7:NH₄⁺-N。

图9 氨氧化微生物与环境因子的相关性热图

Fig.9 Heatmap of correlation between ammonia-oxidizing microorganisms and environmental factors

占有重要地位,但人们对其在氨氧化过程中的贡献的了解还不够充分^[23]。在陆地生态系统中,氨氧化古菌的数量远远高于氨氧化细菌的数量,但是氨氧化古菌是酸性土壤硝化作用的主导者^[24]。泉古菌门(Crenarchaeota)和奇古菌门(Thaumarchaeota)是古菌的2种门类,Crenarchaeota是氨氧化古菌的主要类群^[25],但在洞庭湖岸边沉积物中,发现的AOA主要是属于Thaumarchaeota^[26]。本研究的人工湿地中,AOA主要属于Crenarchaeota和Thaumarchaeota 2个门类,且以Crenarchaeota丰度占优。本研究中,不同湿地单元的AOB与AOA存在一定的群落差异性,4单元和5单元、1单元和6单元在AOB菌群组成上较为接近,而6、7、8单元与其他单元之间AOA菌群组成存在较大差异。

氨氧化微生物的多样性受沉积物多种环境因子的影响。AOB中丰度较大的Unclassified_o_Nitrosomonadales与pH值和NO₃⁻-N含量呈正相关关系,其中与pH值的关系达到显著水平。本研究中,人工湿地沉积物pH值为7.97~8.34,为碱性。AOA中Nitrososphaera与pH值、C/N比值呈正相关关系,与TC、TN、OM、NH₄⁺-N、NO₃⁻-N含量呈负相关关系。

参考文献:

- [1] HERNANDEZ M E, MITSCH W J. Denitrification in created riverine wetlands: Influence of hydrology and season[J]. Ecological Engineering, 2007, 30(1): 78-88.
- [2] 崔丽娟,李伟,张曼胤,等. 复合人工湿地运行2年净化水禽污水效果[J]. 农业工程学报, 2011, 27(12): 234-240.
- [3] YE F X, YING L. Enhancement of nitrogen removal in towery hy-

- brid constructed wetland to treat domestic wastewater for small rural communities[J]. *Ecological Engineering*, 2009, 35(7):1043-1050.
- [4] SONG K, LEE S H, KANG H. Denitrification rates and community structure of denitrifying bacteria in newly constructed wetland[J]. *European Journal of Soil Biology*, 2011, 47(1):24-29.
- [5] 陈亮,刘锋,肖润林,等. 人工湿地氮去除关键功能微生物生态学研究进展[J]. *生态学报*, 2017, 37(18):6265-6274.
- [6] 黄翔峰,谢良林,陆丽君,等. 人工湿地在冬季低温地区的应用研究进展[J]. *环境污染与防治*, 2008, 30(11):84-89.
- [7] 彭焱,徐栋,贺锋,等. 人工湿地系统在寒冷地区的运行及维护[J]. *给水排水*, 2007, 33(S1):82-87.
- [8] 吴海明. 表面流人工湿地处理北方污染河水的长期净化效果及相关机理研究[D]. 济南:山东大学, 2011.
- [9] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3版.北京:高等教育出版社, 2000.
- [10] KUROLA J, SALKINOJASALONEN M, AARNIO T, et al. Activity, diversity and population size of ammonia-oxidising bacteria in oil-contaminated landfarming soil[J]. *Fems Microbiology Letters*, 2005, 250(1):33-38.
- [11] ROTTHAUWE J H, WITZEL K P, LIESACK W. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1997, 63(12):4704-4712.
- [12] 庄林杰,夏超,田晴,等. 高通量测序技术研究典型湖泊岸边陆向深层土壤中厌氧氨氧化细菌的群落结构[J]. *环境科学学报*, 2017, 37(1):261-271.
- [13] 郭志英,贾仲君. 中国典型生态系统土壤硝化强度的整合分析[J]. *土壤学报*, 2014, 51(6):1317-1324.
- [14] 吕璐. 湖北省主要水稻产区水稻土硝化、反硝化潜势及其与铁、锰的关系[D]. 武汉:华中农业大学, 2017.
- [15] ZHANG Y, CHEN L, DAI T, et al. The influence of salinity on the abundance, transcriptional activity, and diversity of AOA and AOB in an estuarine sediment: a microcosm study[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(22):9825-9833.
- [16] 张苗苗,王伯仁,李冬初,等. 长期施加氮肥及氧化钙调节对酸性土壤硝化作用及氨氧化微生物的影响[J]. *生态学报*, 2015, 35(19):6362-6370.
- [17] 章芳,吴梦纤,王晓亮,等. 新疆玛纳斯湿地土壤细菌生理类群数量变化及其与土壤环境的相关分析[J]. *江苏农业科学*, 2015, 43(8):327-332.
- [18] 刘丽,杨静,李成云. 玉米-大豆间作对玉米根际氨氧化微生物的影响[J]. *江苏农业学报*, 2017, 33(6):1278-1287.
- [19] 丛耀辉,张玉玲,张玉龙,等. 黑土区水稻土有机氮组分及其对可矿化氮的贡献[J]. *土壤学报*, 2016, 53(2):457-467.
- [20] 魏佳明. 表流湿地细菌及反硝化细菌群落结构研究[D]. 北京:中国林业科学研究院, 2017.
- [21] 魏琳琳,杨殿林,侯萌瑶,等. 氮高效转基因水稻 OsNRT2.3b 对土壤氨氧化细菌群落多样性的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2017, 36(6):1149-1159.
- [22] 潘彦羽,代嫣然,王飞华,等. 东湖表层沉积物中氨氧化古菌和氨氧化细菌丰度及多样性研究[J]. *水生生物学报*, 2018, 42(2):406-415.
- [23] 刘正辉. 氨氧化古菌及其对氮循环贡献的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(4):774-782.
- [24] 李景云,李秀玲,葛鹏,等. 土壤氨氧化古菌及其可能代谢类型[J]. *土壤通报*, 2015(6):1428-1432.
- [25] 刘晶静,吴伟祥,丁颖,等. 氨氧化古菌及其在氮循环中的重要作用[J]. *应用生态学报*, 2010, 21(8):2154-2160.
- [26] 周磊榴,祝贵兵,王衫允,等. 洞庭湖岸边带沉积物氨氧化古菌的丰度、多样性及对氨氧化的贡献[J]. *环境科学学报*, 2013, 33(6):1741-1747.

(责任编辑:张震林)