

## 夏季不同形式湿地中 2 类厌氧脱氮菌群的分布特征

曾宪磊<sup>1,2</sup>, 刘兴国<sup>2\*</sup>, 吴宗凡<sup>2</sup>, 时旭<sup>2</sup>, 陆诗敏<sup>2</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院渔业机械仪器研究所, 上海 200092)

**摘要:** 为研究不同形式湿地中厌氧脱氮菌的分布特征和关键影响因子, 选择池塘、沟渠、表流和潜流 4 种形式湿地, 采用 16S rDNA 克隆文库法和典型对应分析等方法, 分析了夏季 4 种形式湿地中厌氧氨氧化菌和反硝化型甲烷厌氧菌的菌群结构及其与环境因子的相关性。结果显示, 湿地中的 AMX 菌与 *Candidatus Brocadia fulgida* 相似性最高可达 99%, DAMO 菌与典型菌株 *C. Methyloirabilis oxyfera* 分在了不同的分支。夏季 4 种形式湿地中, AMX 菌的 Shannon 多样性依次为表流湿地 > 潜流湿地 > 沟渠 > 池塘, DAMO 菌的 Shannon 多样性依次为池塘 > 潜流湿地 > 沟渠 > 表流湿地。上覆水中 TOC 和  $\text{NO}_3^-$ -N 是影响 AMX 菌分布的主要因素, 上覆水中 TN、 $\text{NH}_4^+$ -N、pH 和 DO 对 DAMO 菌分布影响最大。研究表明, 夏季表流湿地底泥中所含 AMX 菌类别最多, 池塘底泥所含 DAMO 菌种类最多, 不同形式湿地中均有 AMX 菌存在, 但不确定是否存在 DAMO 反应, 影响 2 类菌群分布的主要相关因子是 C、N 以及 pH 和 DO。

**关键词:** 湿地; 厌氧氨氧化菌; 反硝化型甲烷厌氧菌; 分布特征

**中图分类号:** Q 938.8; S 917.1

**文献标志码:** A

人工湿地是一种人工构建的生态系统, 具有物理、化学和生物的协同作用<sup>[1]</sup>。应用人工湿地处理污水, 具有低成本、高效率、易管理的特点<sup>[2]</sup>。目前, 对人工湿地的研究主要集中在废水净化效率, 湿地设计和运行参数的相关性等方面<sup>[3-4]</sup>, 关于人工湿地中微生物群落的研究还很有限<sup>[5-6]</sup>, 尤其是关于不同形式湿地中厌氧氨氧化 (anaerobic ammonium oxidation, AMX) 和反硝化型甲烷厌氧化 (denitrifying anaerobic methane oxidation, DAMO) 菌的分布特征研究还未见报道。

AMX 和 DAMO 是 20 世纪 90 年代后期才被发现的生物厌氧脱氮反应, 具有较高的脱氮效率<sup>[7]</sup>。主导这两类反应的微生物属于化能自养细菌, 所需碳源分别是  $\text{CO}_2$  和  $\text{CH}_4$ , 在污水处理中不需要添加有机物, 大大降低了水处理成本和二次污染。目前, AMX 在淡水湖泊、低氧区域的海洋、海岸河口沉积物等多种水生生态系统中均

已被发现<sup>[8]</sup>。DAMO 在泥炭地土壤、水稻土、湖泊底泥及污水处理厂污泥中被检测到<sup>[9]</sup>。迄今为止, 发现具有 AMX 反应的微生物属于浮霉状菌目 (Planctomycetales), 该目细菌包括 2 个科, 9 个属, 其中 *Candidatus Brocadia* 与 *C. Kuenenia* 是淡水环境中最常见的厌氧氨氧化细菌<sup>[8]</sup>。在已报道的研究中, DAMO 富集培养物中通常为 NC10 门细菌, 其中 *C. Methyloirabilis Oxyfera* 是 Ettwig 等<sup>[10]</sup> 经过 19 个月研究并命名的 NC10 门细菌, 且具有 DAMO 现象。

生物厌氧脱氮过程广泛分布于各种类型的水生生态系统中, 多数以多种厌氧脱氮类群共存形式存在。湿地被证明存在两种以上甚至所有的厌氧脱氮过程<sup>[9]</sup>。湿地生态系统是最复杂的生态系统之一, 其中微生物的高度多样性, 使得湿地氮循环过程比其他生态系统有更多的化学变化和生物转移过程<sup>[11]</sup>。研究表明, 几乎所有的天然或人

收稿日期: 2014-11-23 修回日期: 2015-02-15

资助项目: 国家自然科学基金 (31372570); “十二五” 国家科技支撑计划 (2012BAD25B01); 公益性行业 (农业) 科研专项 (201203083)

通信作者: 刘兴国, E-mail: liuxingguo@fmiri.ac.cn

工湿地都能满足生物厌氧脱氮大部分条件,在湿地系统中多种脱氮菌群共同参与的生物厌氧脱氮过程是湿地脱氮潜力的源泉和主要途径<sup>[12]</sup>。养殖池塘(pond)、生态沟渠(ditch)、表流湿地(surface flow constructed wetland, SFCW)和潜流湿地(subsurface flow constructed wetland, SSFCW)是4种典型的人工湿地。夏季是湿地生态系统生物多样性的高峰期,夏季水质变化迅速,底泥沉积物微生物生化代谢活跃且复杂。研究夏季不同湿地系统中2类厌氧脱氮菌群特征,分析其与环境因素的关系,对于更全面的理解湿地系统中的氮循环具有重要意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 湿地形式

在中国水产科学研究院池塘生态工程研究中心(上海泖港, N30°57'1.89", E121°08'52.21"),选择养殖池塘(池塘湿地),生态沟渠(沟渠湿地),生态塘(表流湿地),潜流湿地4种形式的人工湿地作为研究对象。其中,养殖池塘面积为15 000 m<sup>2</sup>,主要养殖草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)和团头鲂(*Megalobrama amblycephala*),另外还搭配养殖鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙(*Aristichthys nobilis*)和鲫(*Carassius auratus*)等,养殖周期内的载鱼负荷量为0.20~0.82 kg/m<sup>3</sup>。生态沟渠面积500 m<sup>2</sup>,种植有水浮莲(*Pistia stratiotes*)、水葫芦(*Eichharnia crassipes*)等水生植物。表流湿地面积2 500 m<sup>2</sup>,种植有茭白(*Zizania latifolia*)、水葱(*Scirpus validus* Vahl)、再力花(*Thalia dealbata*)、菖蒲(*Acorus calamus*)、芦苇(*Phragmites australis*)等植物。潜流湿地面积1 500 m<sup>2</sup>,采用3级碎石级配,基质厚度70 cm,种植有美人蕉(*Canna indica*)、鸢尾(*Iris tectorum*)、菖蒲等水生植物<sup>[13]</sup>。

### 1.2 样品采集与处理

采样时间为2014年6月13日。在养殖池塘分别采集0~5 cm表层沉积物样3个,0~10 cm上覆水样3个。在沟渠湿地进水口2~3 m处、出水口2~3 m处,采集0~5 cm表层沉积物混合样各1个,上覆水样混合各1个。在表流湿地进水口2~3 m处、出水口2~3 m处,采集0~5 cm表层沉积物混合样1个,0~10 cm上覆水混合样1个。在潜流湿地进水口2~3 m处、排水口2~3 m处的上层(0~5 cm)、中层(20~25 cm)、下层(40~45 cm),采集基质样品6个,相应间隙水样品1个。

池塘、沟渠、表流湿地的底泥样品用彼得森采

泥器采集,潜流湿地基质样品用人工挖取,上覆水用有机玻璃水样采集器采集。底泥沉积物样品采集后立即装入无菌塑封袋,排除空气,密封。上覆水样立即装入无菌细口塑料瓶中。所有样品用冰盒保存送至实验室,置于-80℃冰箱中,一部分用于总DNA提取,一部分用于营养盐分析。

### 1.3 理化因子分析

用YSI 6920现场测定池塘、沟渠、表流湿地、潜流湿地上覆水中水温(T)、溶氧(DO)、pH和氧化还原电位(ORP)。

底泥沉积物中的TOC采用重铬酸钾氧化-分光光度法(HJ 615-2011)<sup>[14]</sup>,TN采用半微量开氏法,NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N采用氯化钾溶液提取-分光光度法(HJ 634-2012)<sup>[15]</sup>。

上覆水中的总有机碳(TOC)、总氮(TN)、总磷(TP)、溶解性磷酸盐(PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)、氨氮(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N)、硝氮(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N)、亚硝氮(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N),按《湖泊富营养化调查规范(第二版)》<sup>[16]</sup>进行测定。

### 1.4 总DNA提取与PCR扩增

使用FastDNA SPIN Kit for Soil(美国Mobio公司)试剂盒提取总DNA。其中,潜流湿地基质样品需先预处理,处理方法:在500 mL无菌塑料广口瓶中加入200 mL无菌水,放入半瓶基质样品,180 r/min摇床振荡30 min,去除基质,泥水混合物经0.22 μm滤膜过滤后,用于DNA提取。总DNA质量经1%琼脂糖凝胶电泳检测。

使用巢式PCR扩增2类厌氧脱氮菌的16S rDNA特异片段,设空白对照和阴性对照,空白对照组不加模板DNA,阴性对照以LB液体培养基自然生长的杂菌为模板。PCR反应体系为premix Ex Taq 12.5 μL, Forward primer 1 μL, Reverse primer 1 μL, 模板 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 9.5 μL。AMX菌巢式PCR:第一步使用引物pla46f和通用引物630r对浮霉菌属(*Planctomycetes*)进行扩增,反应程序:96℃ 5 min, 96℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30个循环,最后72℃ 10 min;第二步以第一步PCR产物为模板,使用AMX菌特异性引物Amx368f-Amx820r进行,反应程序:96℃ 5 min, 96℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 45 s, 30个循环,最后72℃ 10 min。DAMO菌扩增,首轮使用DAMO菌特异引物202F和细菌通用引物1545R,反应程序:94℃ 4 min, 94℃ 1 min, 57℃ 1 min, 72℃ 2.5 min, 35个循环,最后72℃ 10 min。次轮使用来源于定量PCR的DAMO菌特异引物对qP1F-qP2R,反应程

序:94 °C 4 min,94 °C 1 min,65 °C 1 min,72 °C 2.5 min,35 个循环,最后 72 °C 10 min,扩增产物不长期保存,尽快进行后续实验。

### 1.5 文库构建和系统发育分析

分别将池塘底质的 3 个 PCR 产物样和潜流湿地的 6 个产物样等量混合后,加上沟渠和表流湿地的产物样,得到 4 种形式湿地的样组,4 组样品进行琼脂糖凝胶电泳所得特异片段经切胶、GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo) 试剂盒纯化,用 pEASY-T1 Cloning Kit (全式金) 试剂盒连接,转入 Trans1-T1 感受态细胞。导入目的基因的感受态细胞经无氨苄 LB 培养基培养 1 h 后,涂布于含氨苄和蓝白斑检测试剂的固体 LB 平板,过夜培养后,每组样品挑取 20 个单克隆。采用菌落 PCR 进行阳性克隆检测,随机挑选 16 ~ 20 个阳性克隆接种于 1 mL 氨苄 LB 液体培养基,37 °C 摇床培养 10 h,送上海 Invitrogen 公司测序。所得序列经 DNASTar 软件编辑,去除载体序列后,用 NCBI-BLAST 工具比对,搜索相似序列。使用 MEGA 5.05 进行多重序列对齐,用邻接 (Neighbor-Joining) 法构建系统发育树。

### 1.6 菌群结构与理化因子的相关性分析

菌群结构采用 mothur 软件划分操作分类单元 (OTU),并计算多样性指数 Shannon、Simpson 和物种分布指数 chao 1,以 3% 的序列差异作为一个 OTU。

菌群多样性分析用 Shannon 指数<sup>[17]</sup>,其公式如下,

$$H' = - \sum_{i=1}^s [P_i \ln P_i]$$

式中: $P_i = n_i/N$ ,表示第  $i$  个种占总数的比例, $S$  为群落物种数。当群落中只有 1 个菌群存在时,Shannon 指数为 0;当群落中有两个以上的菌群存在,且每个菌群仅有 1 个成员时,Shannon 指数达到最大值  $\ln k$ 。

菌群均匀度分析用 Simpson 指数<sup>[17]</sup>,公式如下,

$$D = 1 - \sum_{i=1}^s P_i^2$$

式中, $P_i$  为个体数占群落中总个体数的比例, $S$  为群落物种数。

菌群内种类数分析用 chao 1 指数,指数越高说明群落物种数目越多<sup>[18]</sup>。公式如下,

$$S_{\text{chao 1}} = S_{\text{obs}} + \frac{n_1(n_1 - 1)}{2(n_2 + 1)}$$

式中, $S_{\text{chao 1}}$  为估算的群落 OTU 数, $S_{\text{obs}}$  为观测到的 OTU 数, $n_1$  为只有一条序列的 OTU 数目, $n_2$  为只有 2 条序列的 OTU 数目。

用 SPSS 19.0 和 canoco 4.5 软件分析 2 类厌氧脱氮菌群多样性与环境因子的相关性。

## 2 结果

### 2.1 不同形式湿地的理化特征

对不同形式湿地底泥和上覆水进行了分析 (表 1)。结果显示,在底泥沉积物中,池塘底泥沉积物的 TOC 含量明显高于沟渠和表流湿地 ( $P < 0.05$ ),沟渠沉积物中的氨氮含量显著高于其他形式湿地 ( $P < 0.01$ )。池塘底泥沉积物 TOC 含量较高,可能与夏季池塘养殖中有饲料大量投入有关。沟渠沉积物的氨氮明显高于其他形式湿地,可能与底泥中的生化反应不同有关。

在上覆水中,表流湿地上覆水的 TP 含量明显低于池塘和沟渠 ( $P < 0.05$ ), $\text{NO}_3^-$ -N 含量明显低于池塘 ( $P < 0.05$ ), $\text{NH}_4^+$ -N 含量显著低于池塘和沟渠 ( $P < 0.01$ )。潜流湿地上覆水的 TP 含量明显低于沟渠 ( $P < 0.05$ ),显著低于池塘 ( $P < 0.01$ ), $\text{NH}_4^+$ -N 含量显著低于池塘和沟渠 ( $P < 0.01$ ),表流湿地和潜流湿地 TP、TN 含量降低说明这两种湿地具有明显脱氮除磷作用。

### 2.2 不同形式湿地中 AMX 菌分布特征

测序共得到 74 条序列,其中池塘 19 条,沟渠 16 条,表流湿地 20 条,潜流湿地 19 条,片段长 471 ~ 477 bp,在 1%、3% 和 6% 差异度条件下,利用 mothur 软件将其划分为 16、11 和 8 个 OTU,覆盖率分别为 90.5%、97.3% 和 97.3%。

在 3% 差异度条件下,4 种形式湿地 OTU 分布情况分别为,池塘 100% 属于 OTU 1#。沟渠含有 3 类 OTU,12.5% 属于 OTU 2#,81.2% 属于 OTU 3#,6.25% 属于 OTU 4#。表流湿地含有 6 类 OTU,5% 属于 OTU 6#,15% 属于 OTU 7#,45% 属于 OTU 8#,10% 属于 OTU 9#,15% 属于 OTU 10#,10% 属于 OTU 11#。潜流湿地含有 3 类 OTU,15.8% 属于 OTU 2#,57.9% 属于 OTU 3#,26.3% 属于 OTU 5#。另外,除了 OTU 2# 和 OTU 3# 同时存在于沟渠和潜流湿地之外,其他类 OTU 只存在于 1 种形式湿地之中。

OTU 2# 与 AMX 菌代表菌株 *C. Brocadia fulgida* 相似性很高 (图 1)。通过 mothur 软件选出的 OTU 1# ~ OTU 11# 代表序列登陆号: KP701041 ~ KP701051。

表 1 4 种形式湿地底泥沉积物和水样理化指标  
 Tab. 1 Physicochemical parameters of sediment and water samples in 4 types of wetlands

位点 site	指标 index	池塘 pond	沟渠 ditch	表流湿地 SFCW	潜流湿地 SSFCW
底泥沉积物 sediment	TOC/(g/kg)	3.75 ± 0.77 <sup>a</sup>	2.97 ± 0.33 <sup>ab</sup>	2.89 ± 0.06 <sup>b</sup>	
	TN/(g/kg)	2.59 ± 0.13 <sup>a</sup>	2.58 ± 0.07 <sup>a</sup>	2.70 ± 0.06 <sup>a</sup>	
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N/(mg/kg)	36.77 ± 18.51 <sup>A</sup>	65.93 ± 4.44 <sup>B</sup>	21.15 ± 0.96 <sup>AC</sup>	
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/(mg/kg)	175.24 ± 29.75 <sup>a</sup>	165.55 ± 9.25 <sup>a</sup>	189.42 ± 23.46 <sup>a</sup>	
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N/(mg/kg)	130.63 ± 26.10 <sup>a</sup>	156.33 ± 23.78 <sup>a</sup>	120.26 ± 2.78 <sup>a</sup>	
上覆水 overlying water	TOC/(mg/L)	11.17 ± 0.47 <sup>a</sup>	10.74 ± 0.19 <sup>a</sup>	10.46 ± 0.41 <sup>a</sup>	8.92 ± 0.23 <sup>a</sup>
	TN/(mg/L)	16.44 ± 4.49 <sup>a</sup>	16.12 ± 3.25 <sup>a</sup>	13.65 ± 1.13 <sup>a</sup>	13.46 ± 1.39 <sup>a</sup>
	TP/(mg/L)	8.24 ± 4.23 <sup>Aa</sup>	8.71 ± 1.94 <sup>a</sup>	0.92 ± 0.14 <sup>b</sup>	0.62 ± 0.43 <sup>Bb</sup>
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N/(mg/L)	0.79 ± 0.08 <sup>A</sup>	0.70 ± 0.04 <sup>A</sup>	0.30 ± 0.01 <sup>B</sup>	0.33 ± 0.03 <sup>B</sup>
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/(mg/L)	0.03 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.03 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.005 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.02 ± 0.01 <sup>a</sup>
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N/(mg/L)	0.11 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.06 ± 0.00 <sup>ab</sup>	0.03 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.19 ± 0.10 <sup>ab</sup>
	T/°C	24.87	24.74	29.45	24.44
	pH	7.2	7.34	7.87	7.65
	ORP/mV	-63.22	-268.5	-109.7	-432.35
	DO/(mg/L)	2.55	3.21	8.92	1.74

注:方差不齐用 Tamhane 法进行多重比较,方差齐时用 LSD 法进行多重比较。同行不同小写字母者表示组间差异显著 ( $P < 0.05$ ), 不同大写字母表示组间差异极显著 ( $P < 0.01$ )

Notes: use Tamhane method for multiple comparison with variance inhomogeneity, use LSD method for multiple comparison with variance homogeneity. The same row with different small letters shows significant difference between groups ( $P < 0.05$ ); the same row with different capital letters shows very significant difference between groups ( $P < 0.01$ )

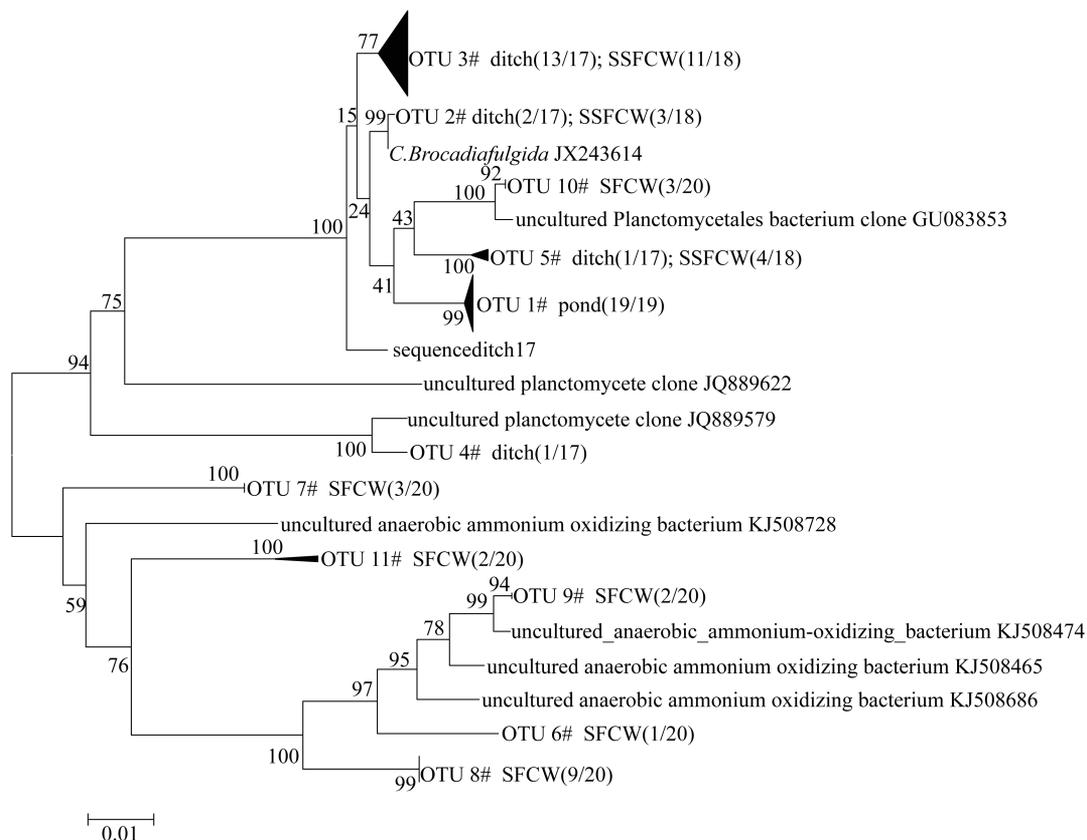


图 1 4 种形式湿地 AMX 菌的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree constructed by AMX sequences of 4 types of wetlands

在 3% 差异度范围内,4 种形式湿地的 Shannon 指数均低于 1.89<sup>[19]</sup>,表明 4 种形式湿地的 AMX 菌多样性较低。在 4 种形式湿地中,表流湿地的 Shannon 多样性指数最高,物种数目最大,其他形式湿地中 AMX 菌的多样性水平从高到低依次为潜流湿地、沟渠和池塘。除池塘多样性极低外(Shannon 指数为 0),其他形式湿地的 Shannon 多样性水平相差不大(表 2)。

相关分析显示,影响不同形式湿地中 AMX 菌群多样性的主要因子有沉积物和上覆水 TOC,以及上覆水 TN、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N、pH 和 DO。其中影响最为显著的是上覆水 TOC 和

NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 含量,TOC 和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 含量越高,AMX 菌的群落多样性越低(图 2)。

表 2 4 种形式湿地 AMX 菌多样性指数  
Tab.2 Diversity index of AMX bacteria in 4 types of wetlands

湿地 wetlands	香农指数 Shannon index	辛普森指数 Simpson index	物种丰富度 Chao 1
池塘 pond	0	1	1
沟渠 ditch	0.79	0.58	4.5
表流湿地 SFCW	1.54	0.23	6
潜流湿地 SSFCW	0.93	0.42	3

	Shannon	Simpson	Chao 1	OTU 种类数	TOC (水)	TN (水)	TP (水)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (水)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (水)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (水)	TOC (沉积物)	TN (沉积物)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (沉积物)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (沉积物)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (沉积物)	T	pH	ORP	DO
Shannon	1																		
Simpson	-0.999	1																	
Chao 1	0.978	-0.985	1																
OTU种类数	0.992	-0.986	0.942	1															
TOC(水)	-0.994	0.998	-0.994	-0.972	1														
TN(水)	-0.907	0.891	-0.799	-0.954	0.858	1													
TP(水)	-0.83	0.808	-0.694	-0.895	0.766	0.987	1												
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (水)	-0.934	0.92	-0.838	-0.972	0.891	0.998	0.974	1											
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (水)	-0.858	0.839	-0.731	-0.918	0.799	0.994	0.999	0.985	1										
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (水)	-0.992	0.996	-0.997	-0.967	1	0.846	0.751	0.881	0.786	1									
TOC(沉积物)	-0.911	0.926	-0.978	-0.85	0.95	0.654	0.526	0.704	0.571	0.957	1								
TN(沉积物)	0.817	-0.795	0.678	0.885	-0.752	-0.984	-1	-0.969	-0.997	-0.737	-0.508	1							
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (沉积物)	-0.329	0.294	-0.123	-0.449	0.227	0.696	0.801	0.645	0.767	0.206	-0.088	-0.813	1						
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (沉积物)	0.578	-0.547	0.394	0.679	-0.489	-0.868	-0.935	-0.832	-0.915	-0.469	-0.191	0.943	-0.961	1					
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (沉积物)	-0.265	0.229	-0.056	-0.388	0.161	0.645	0.758	0.592	0.722	0.139	-0.156	-0.772	0.998	-0.94	1				
T	0.846	-0.825	0.715	0.908	-0.784	-0.992	-1	-0.981	-1	-0.77	-0.551	0.999	-0.782	0.924	-0.738	1			
pH	0.943	-0.93	0.852	0.978	-0.902	-0.996	-0.968	-1	-0.98	-0.893	-0.722	0.963	-0.625	0.817	-0.571	0.975	1		
ORP	-0.231	0.267	-0.43	-0.102	0.333	-0.2	-0.352	-0.132	-0.301	0.353	0.611	0.372	-0.843	0.66	-0.877	0.324	0.106	1	
DO	0.903	-0.886	0.792	0.951	-0.852	-1	-0.989	-0.997	-0.996	-0.84	-0.646	0.986	-0.703	0.873	-0.654	0.993	0.994	0.21	1

图 2 AMX 多样性与理化因子的相关关系

Fig. 2 The correlation diagram between diversity index of AMX and physicochemical factors

### 2.3 不同形式湿地中的 DAMO 菌分布特征

测序得到 77 条有效序列,池塘 19 条,沟渠 20 条,表流湿地 20 条,潜流湿地 18 条,片段长度 455 ~ 460 bp。在 1%、3% 和 5% 差异度条件下,利用 mothur 软件将其划分为 27、18 和 15 个 OTU,覆盖率分别为 73.1%、85.9% 和 89.7%。

在 3% 差异度条件下,4 种形式湿地 DAMO 菌 OTU 划分情况如下:池塘含有从 OTU 1# ~ OTU 9# 共 9 类 OTU,所占比例依次是 43%、11%、5%、5%、16%、5%、5%、5% 和 5%。沟渠含有 7 类 OTU,50% 属于 OTU 1#,10% 属于 OTU 2#,10% 属于 OTU 3#,10% 属于 OTU 5#,5% 属于 OTU 6#,10% 属于 OTU 9#,5% 属于 OTU 17#。表流湿地含有 4 类 OTU,83.2% 属于 OTU 1#,5.6% 属于 OTU 5#,5.6% 属于 OTU 9#,5.6% 属

于 OTU 18#。潜流湿地含有 9 类 OTU,分别是 OTU 1#(50%),OTU 5#(5%),OTU 10#(5%),OTU 11#(10%),OTU 12#(5%),OTU 13#(5%),OTU 14#(5%),OTU 15#(5%) 和 OTU 16#(10%)。OTU 1# 和 OTU 5# 存在于所有形式湿地中,是分布最为普遍的两类。除了 OTU 2#、OTU 3#、OTU 6# 和 OTU 9# 分布在 2 种以上形式湿地之外,其余的只分布在 1 种形式湿地之中,所有形式湿地主要含有的都是 OTU 1# 种类。

77 条序列与 DAMO 菌典型细菌 *C. Methyloirabilis oxyfera* 分在不同的分支(图 3)。4 种形式湿地系统中存在的 NC10 门菌是否具有甲烷厌氧氧化并偶联反硝化作用仍需进一步验证。通过 mothur 软件选出的 OTU 1# ~ OTU 18# 代表序列登陆号:KP726359 ~ KP726376。

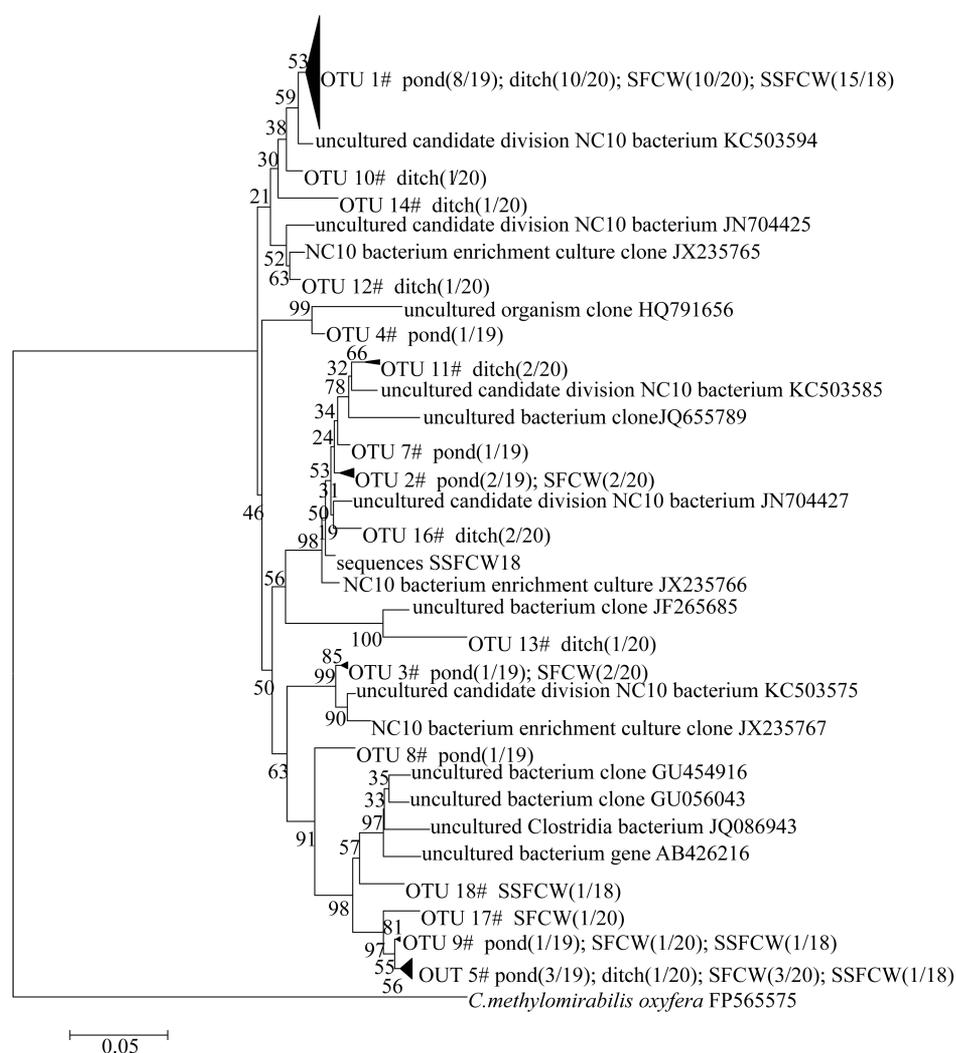


图3 4种形式湿地的 DAMO 菌系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree constructed by DAMO of 4 types of wetlands

3% 差异度条件下, 4 种形式湿地中池塘 Shannon 指数大于 1.89 (1.92 > 1.89) (表 3), 说明池塘 DAMO 菌的多样性大。其他形式湿地的多样性水平从高到低依次是潜流湿地、沟渠和表流湿地。

表 3 4 种形式湿地中 DAMO 菌多样性指数  
Tab. 3 Diversity index of DAMO bacteria in 4 types of wetlands

湿地 wetlands	香农指数 Shannon index	辛普森指数 Simpson index	物种丰富度 Chao 1
池塘 pond	1.92	0.17	20.5
沟渠 ditch	1.57	0.26	7.2
表流湿地 SFCW	0.63	0.69	7
潜流湿地 SSFCW	1.71	0.25	14

分析 4 种形式湿地 DAMO 的多样性指数与理化因子之间的相关关系 (图 4), 显示影响 DAMO 菌多样性的主要理化因子有上覆水中的 TN、 $\text{NH}_4^+$ -N 和 pH、DO。DAMO 的 Shannon 指数与水中 TN 和  $\text{NH}_4^+$ -N 的含量呈正相关, 与 pH 和 DO 呈负相关。

#### 2.4 不同形式湿地中 2 类厌氧脱氮菌分布的综合分析

应用 canoco 4.5 软件对 AMX 和 DAMO 共 30 个 OTU 以及 15 个环境因子进行典型对应分析 (CCA) (图 5)。

A6 - A11, D19 在表流湿地的个体数远远大于其他 3 类湿地, D4、D5、D8、D9、A1 在池塘湿地的个体数远远大于其他 3 类湿地 (图 5-a)。表流湿地与其他 3 类形式湿地的差异度最大。

图 5-b 显示了各个物种在任何环境变量上的相对最适值,比如 D2 相对于 D6 物种来说更适合生活在覆盖水 TP、TN 含量高的环境之中。

	Shannon	Simpson	Chao 1	OTU 种类数	TOC (水)	TN (水)	TP (水)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (水)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (水)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (水)	TOC (沉积物)	TN (沉积物)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (沉积物)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (沉积物)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (沉积物)	T	pH	ORP	DO
Shannon	1																		
Simpson	-0.995	1																	
Chao 1	0.719	-0.644	1																
OTU 种类数	0.967	-0.936	0.872	1															
TOC (水)	0.929	-0.886	0.925	0.993	1														
TN (水)	0.987	-0.998	0.598	0.914	0.858	1													
TP (水)	0.949	-0.977	0.464	0.838	0.766	0.987	1												
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (水)	0.996	-1	0.652	0.939	0.891	0.998	0.974	1											
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (水)	0.965	-0.987	0.511	0.866	0.799	0.994	0.999	0.985	1										
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (水)	0.92	-0.876	0.933	0.99	1	0.846	0.751	0.881	0.786	1									
TOC (沉积物)	0.766	-0.697	0.997	0.905	0.95	0.654	0.526	0.704	0.571	0.957	1								
TN (沉积物)	-0.943	0.972	-0.445	-0.826	-0.752	-0.984	-1	-0.969	-0.977	-0.737	-0.508	1							
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (沉积物)	0.572	-0.653	-0.159	0.344	0.227	0.696	0.801	0.645	0.767	0.206	-0.088	-0.813	1						
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (沉积物)	-0.777	0.838	-0.121	-0.591	-0.489	-0.868	-0.935	-0.832	-0.915	-0.469	-0.191	0.943	-0.961	1					
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (沉积物)	0.515	-0.6	-0.226	0.279	0.161	0.645	0.758	0.592	0.722	0.139	-0.156	-0.772	0.998	-0.94	1				
T	-0.958	0.983	-0.49	-0.854	-0.784	-0.992	-1	-0.981	-1	-0.77	-0.551	0.999	-0.782	0.924	-0.738	1			
pH	-0.998	0.999	-0.671	-0.948	-0.902	-0.996	-0.968	-1	-0.98	-0.893	-0.722	0.963	-0.625	0.817	-0.571	0.975	1		
ORP	-0.041	0.143	0.666	0.216	0.333	-0.2	-0.352	-0.132	-0.301	0.353	0.611	0.372	-0.843	0.66	-0.877	0.324	0.106	1	
DO	-0.985	0.998	-0.59	-0.909	-0.852	-1	-0.989	-0.997	-0.996	-0.84	-0.646	0.986	-0.703	0.873	-0.654	0.993	0.994	0.21	1

图 4 反硝化型甲烷厌氧菌多样性指数与理化因子的相关关系

Fig. 4 The correlation diagram between diversity index of DAMO and physicochemical factors

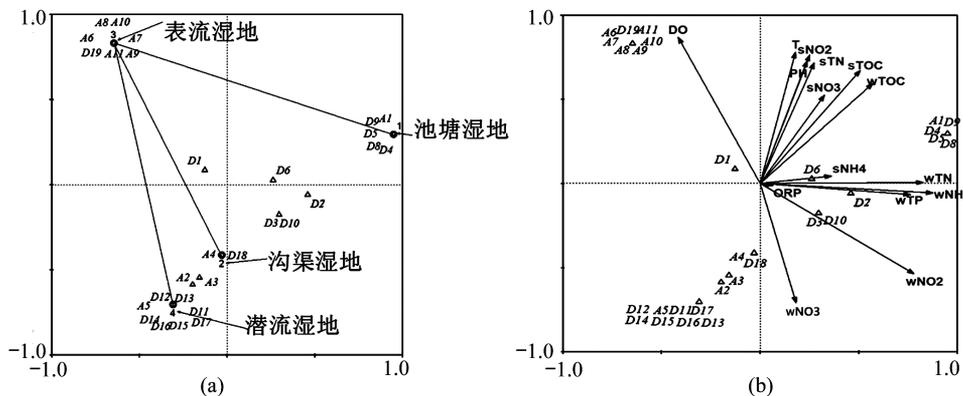


图 5 不同形式湿地中两类厌氧脱氮菌 CCA 排序图

(a) 4 种形式湿地与物种间的分布图。其中空心圆代表各样方, 三角形代表各物种, A1 - A11 代表 AMX OTU 1# - OTU 11#。D1 - D19 代表 DAMO OTU 1# - OTU 19#。(b) 物种与环境因子之间的关系图, 其中三角形代表各物种, 箭头代表各环境因子, s 代表沉积物 (sediment), w 代表上覆水 (water)

Fig. 5 CCA ordination plots of two kinds of anaerobic denitrifier bacteria in different wetlands

(a) distribution diagram between 4 type wetlands and species, and ring corresponded to every quadrat, trigon corresponded to every species, A1 - A11 corresponded to AMX OTU 1# - OTU 11#. D1 - D19 corresponded to DAMO OTU 1# - OTU 19#; (b) correlation diagram between species and environment factors, and trigon corresponded to every species, arrowhead corresponded to every environment factors, s corresponded to sediment, w corresponded to water

### 3 讨论

夏季是湿地生态系统生物多样性的高峰期。本研究表明, 夏季不同形式人工湿地中, 表流湿地 AMX 菌多样性最为丰富, Shannon 指数比其他类型湿地高出 1.5 倍以上, 这可能是表流湿地水体较浅, 水体中的 DO 较高, 沉积物 TOC 含量较低所致。池塘中 DAMO 菌的 Shannon 指数高出潜

流湿地 3 倍以上, 而 AMX 菌多样性较低, 可能是池塘养殖投入的大量粪便、残饵沉积在池塘底部, 过多有机物诱发异养菌大量生长而压缩 AMX 菌的生存空间<sup>[20]</sup>所致。有机物的存在为 CH<sub>4</sub> 产生提供了条件, CH<sub>4</sub> 不仅为 DAMO 提供底物来源, 还可以培养大量反硝化细菌, 增强反硝化活性, 抑制 AMX 菌的生长<sup>[21]</sup>。

NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 和 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 是 AMX 的两大主要底

物,  $\text{NO}_2^-$ -N 同时也是 DAMO 的主要底物之一, N 不仅作为底物影响着这两类厌氧脱氮菌, 较高的硝态氮和亚硝态氮浓度还会产生较高的氧化还原电位和毒性作用<sup>[22]</sup>, 从而影响 AMX 菌和 DAMO 菌的多样性。本实验发现上覆水中的 TN、 $\text{NH}_4^+$ -N、 $\text{NO}_3^-$ -N 与 AMX 菌多样性相关系数较大, 上覆水 TN、 $\text{NH}_4^+$ -N 与 DAMO 菌多样性相关系数较大, 与其他相关研究结果基本一致<sup>[19,21-22]</sup>, 相关结论可以作为 AMX 菌和 DAMO 菌调控的重要依据。pH 值不仅会直接影响微生物的活性, 还会影响溶液中基质或抑制物的含量, 从而间接影响微生物的活性<sup>[23]</sup>。本研究发现两类厌氧脱氮菌的 Shannon 指数和 Simpson 指数与 pH 分别呈不同的相关关系, 说明 pH 对 AMX 菌和 DAMO 菌的影响不同, 为进一步开展 2 类厌氧脱氮菌研究提供了方向。此外, 一些研究认为 AMX 和 DAMO 只能在氧浓度低于  $2 \mu\text{mol/L}$  的环境中进行<sup>[24]</sup>, 本研究还发现上覆水中的 DO 对两类厌氧脱氮菌影响作用不同, DO 与 AMX 正相关, 与 DAMO 负相关, 具体影响机理尚需进一步研究。

已有研究表明 AMX 反应占海洋环境中氮素损失的 50% 以上<sup>[25]</sup>; 淡水环境中, AMX 反应也占氮素损失的 9%~40%<sup>[26]</sup>。Zhu 等<sup>[27]</sup> 研究了一块长期施肥稻田的 AMX 速率, 发现 AMX 反应占氮素损失的 4%~37%。本研究在所有样品中均检测到 AMX 菌特异序列, 且与 *C. Brocadia fulgida* 相似性最高可达 99%, 表明 4 种形式湿地中均存在 AMX 反应, 但其在湿地生态系统氮素循环中的贡献仍需进一步研究。研究也发现 DAMO 菌特异片段, 但并未发现与 DAMO 反应典型菌株 *C. Methyloirabilis oxyfera* 高度相似的种类。Kojima 等<sup>[28]</sup> 认为 DAMO 菌适合分布于深水湖泊底泥的表层, 朱群等<sup>[29]</sup> 在西湖的浅底泥中发现了 DAMO 菌的存在, 但甲烷厌氧化与反硝化相偶联的反应是否在更浅的养殖池塘中存在还需进一步的证实。

#### 参考文献:

- [1] Liu Q, Li Y F, Cheng L. Constructed wetland purification function of pollutant and the existing problems[J]. Liaoning Chemical Industry, 2008, 37(4):255-257. [刘强, 李亚峰, 程琳. 人工湿地对污染物的净化功能及存在问题. 辽宁化工, 2008, 37(4):255-257.]
- [2] Matamoros V, Puigagut J, Garcia J, et al. Behavior of selected priority organic pollutants in horizontal subsurface flow constructed wetlands: A preliminary screening [J]. Chemosphere, 2007, 69(9):1374-1380.
- [3] Liikanen A, Puustinen M, Koskiaho J, et al. Phosphorus removal in a wetland constructed on former arable land [J]. Journal of Environmental Quality, 2004, 33(3):1124-1132.
- [4] Mander U, Lohmus K, Teiter S, et al. Gaseous fluxes from subsurface flow constructed wetlands for wastewater treatment [J]. Journal of Environmental Science and Health-Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering, 2005, 40(6-7):1215-1226.
- [5] Truu J, Nurk K, Juhanson J, et al. Variation of microbiological parameters within planted soil filter for domestic wastewater treatment [J]. Journal of Environmental Science and Health-Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering, 2005, 40(6-7):1191-1200.
- [6] Nicomrat D, Dick W A, Tuovinen O H, et al. Assessment of themicrobial community in a constructed wetland that receives acid coal mine drainage [J]. Microbial Ecology, 2006, 51(1):83-89.
- [7] Erler D V, Eyre B D, Davison L. The contribution of anammox and denitrification to sediment  $\text{N}_2$  production in a surface flow constructed wetland [J]. Environmental Science & Technology, 2008, 42(24):9144-9150.
- [8] Wang J, Hao J A, Zhang A J, et al. Research advances in anaerobic ammonia ammonification reaction [J]. Technology of Water Treatment, 2014, 40(3):1-4. [王静, 郝建安, 张爱君, 等. 厌氧氨氧化反应研究进展. 水处理技术, 2014, 40(3):1-4.]
- [9] Yuan M D, Zhu J, Wu W X, et al. Progress of microbial denitrification of anaerobic methane oxidation [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(2):129-138. [袁梦东, 朱静, 吴伟祥, 等. 微生物厌氧甲烷氧化反硝化研究进展. 微生物学报, 2014, 54(2):129-138.]
- [10] Ettwig K F, van Alen T, van de Pas Schoonen K T, et al. Enrichment and molecular detection of denitrifying methanotrophic bacteria of the NC10 phylum [J]. Applied and Environmental

- Microbiology, 2009, 75(11): 3656 - 3662.
- [11] Morris J T. Effects of nitrogen loading on wetland ecosystems with particular reference to atmospheric deposition [ J ]. Annual Review of Ecology and Systematics, 1991, 22(1): 257 - 279.
- [12] Zhu G, Jetten M S, Kusch P, *et al.* Potential roles of anaerobic ammonium and methane oxidation in the nitrogen cycle of wetland ecosystems [ J ]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 86 ( 4 ): 1043 - 1055
- [13] Liu X G, Liu Z P, Xu H, *et al.* Pond aquaculture system of circulating water of ecological engineering [ J ]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2010, 26 ( 11 ): 237 - 244. [ 刘兴国, 刘兆普, 徐皓, 等. 生态工程化循环水池塘养殖系统. 农业工程学报, 2010, 26 ( 11 ): 237 - 244. ]
- [14] HJ 615 - 2011. Soil determination of organic carbon potassium dichromate oxidation spectrophotometric method [ S ]. Beijing: China Environment Science Press, 2011. [ HJ 615 - 2011, 土壤有机碳的测定 - 重铬酸钾氧化分光光度法. 北京: 中国环境科学出版社, 2011. ]
- [15] HJ 634 - 2012. Soil determination of ammonium, nitrite and nitrate by extraction with potassium chloride solution spectrophotometric methods [ S ]. Beijing: China Environment Science Press, 2012. [ HJ 634 - 2012, 土壤氨氮、亚硝酸盐氮、硝酸盐氮的测定 - 氯化钾溶液提取分光光度法. 北京: 中国环境科学出版社, 2012. ]
- [16] Jin X C, Tu Q Y. Criterion of investigation on lake eutrophication ( 2nd ed ) [ M ]. Beijing: China Environment Science Press, 1990: 138 - 208. [ 金相灿, 屠清瑛. 湖泊富营养化调查规范(2版). 北京: 中国环境科学出版社, 1990: 138 - 208. ]
- [17] Xu Q, Zhang F, Xu Z Q, *et al.* An analysis of the characteristics and the " dilution effect" of Simpson index and Shannon-Wiener index [ J ]. Pratacultural Science, 2011, 28(4): 527 - 531. [ 许晴, 张放, 许中旗, 等. Simpson 指数和 Shannon-Wiener 指数若干特征的分析及“稀释效应”. 草业科学, 2011, 28 ( 4 ): 527 - 531. ]
- [18] Cui T T. Intestinal flora diversity study of captive adult pandas in autumn based on 16SrDNA-RFLP technology [ D ]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2011. [ 崔婷婷. 基于 16SrDNA-RFLP 技术对圈养成年大熊猫秋季肠道菌群多样性的研究. 成都: 四川农业大学, 2011. ]
- [19] Xu Y H, Liu M M, Zhang S J, *et al.* The anaerobic ammonia oxidation bacteria community structure effects on reactor and sludge morphology [ J ]. Journal of University of Chinese Academy of Sciences, 2014, 31(1): 67 - 84. [ 徐亚慧, 刘苗苗, 张树军, 等. 反应器形式及污泥形态对厌氧氨氧化菌群落结构的影响. 中国科学院大学学报, 2014, 31(1): 67 - 84. ]
- [20] Hao X D, Cao X Q, Cao Y L, *et al.* Simulation and prediction of anaerobic ammonia oxidation bacteria play a major role in the denitrification biofilm system [ J ]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2004, 24 ( 6 ): 1007 - 1013. [ 郝晓地, 曹秀芹, 曹亚莉, 等. 厌氧氨氧化细菌在生物膜系统中起主要脱氮作用的模拟预测. 环境科学学报, 2004, 24(6): 1007 - 1013. ]
- [21] Lin Y F, Chen K C. Denitrification and methanogenesis in a co-immobilized mixed culture system [ J ]. Water Research, 1995, 29(1): 35 - 43.
- [22] Zu B, Zhang D J, Zhang P, *et al.* The coupling influence factors of anaerobic ammonium oxidation and methanation denitrification [ J ]. Journal of applied and Environmental Biology of China, 2007, 13(3): 438 - 442. [ 祖波, 张代钧, 张萍, 等. 影响厌氧氨氧化与甲烷化反硝化耦合的因素. 应用与环境生物学报, 2007, 13(3): 438 - 442. ]
- [23] Yang Y, Zuo J E, Shen P, *et al.* Effects of temperature, pH and organic matter on the activity of anammox sludge [ J ]. Chinese Journal of Environmental Science, 2006, 27(4): 691 - 695. [ 杨洋, 左剑恶, 沈平, 等. 温度、pH 和有机物对厌氧氨氧化污泥活性的影响. 环境科学, 2006, 27(4): 691 - 695. ]
- [24] Thamdrup B. New pathways and processes in the global nitrogen cycle [ J ]. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 2012, 43 ( 1 ): 407 - 428.
- [25] Thamdrup B, Dalsgaard T, Jensen M M, *et al.* Anaerobic ammonium oxidation in the oxygen-deficient waters off northern Chile [ J ]. Limnology and Oceanography, 2006, 51(5): 2145 - 2156.
- [26] Yoshinaga I, Amano T, Yamagishi T, *et al.* Distribution and diversity of anaerobic ammonium oxidation ( anammox ) bacteria in the sediment of a eutrophic freshwater lake, Lake Kitaura, Japan [ J ]. Microbes and Environments, 2011, 26 ( 3 ): 189 - 197.
- [27] Zhu G B, Wang S Y, Wang Y, *et al.* Anaerobic ammonia oxidation in a fertilized paddy soil [ J ].

- ISME Journal,2011,5(12):1905-1912.
- [28] Kojima H, Tsutsumi M, Ishikawa K, *et al.* Distribution of putative denitrifying methane oxidizing bacteria in sediment of a freshwater lake, Lake Biwa [J]. Systematic And Applied Microbiology,2012,35(4):233-238.
- [29] Zhu Q, Shen L D, Hu B L, *et al.* Molecular biological detection of denitrifying anaerobic methane oxidation in the sediment of West Lake [J]. Acta Scientiae Circumstantiae,2013,33(5):1321-1325. [朱群,沈李东,胡宝兰,等. 西湖底泥中的反硝化型甲烷厌氧氧化菌的分子生物学检测. 环境科学学报,2013,33(5):1321-1325.]

## Distribution characteristics of two types of anaerobic denitrifier bacteria in different wetlands in summer

ZENG Xianlei<sup>1,2</sup>, LIU Xingguo<sup>2\*</sup>, WU Zongfan<sup>2</sup>, SHI Xu<sup>2</sup>, LU Shimin<sup>2</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Fishery Machinery and Instrument Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200092, China)

**Abstract:** In order to explore the distribution characteristics of anaerobic ammonium oxidation (AMX) and denitrifying anaerobic methane oxidation (DAMO) bacteria in four different wetlands in summer and the key environmental factors influencing the two anaerobic denitrifier bacteria, several 16S rDNA clone libraries were constructed and correlation analysis and canonical correspondence analysis were conducted. The selected wetlands include pond wetland, ditch wetland, surface flow constructed wetland, and subsurface flow constructed wetland. The obtained results showed that the highest identity of AMX sequences related to the representative strain *Candidatus Brocadia fulgida* were 99%, whereas the DAMO sequences were grouped as a clade separated to the DAMO representative strain *C. Methyloirabilis oxyfera*. In four wetlands in summer, the Shannon indices of AMX bacteria from high to low were: surface flow constructed wetland > subsurface flow constructed wetland > pond > ditch, and the Shannon indices of DAMO bacteria was in the order of pond > subsurface flow constructed wetland > ditch > surface flow constructed wetland. The TOC and  $\text{NO}_3^-$ -N in overlying water were the main factors influencing the distribution of AMX bacteria and the water TN,  $\text{NH}_4^+$ -N, pH and DO had large effects on the distribution of DAMO. Moreover, the OTU number of AMX is the highest in sediments of surface flow constructed wetland and that of DAMO is the highest in pond. These findings demonstrated the presence of AMX in all wetlands studied, but the presence of DAMO reaction is still uncertain. The main factors affecting the distribution of two kinds of anaerobic denitrifier bacteria were C, N and pH and DO.

**Key words:** wetlands; anaerobic ammonium oxidation bacteria; denitrifying anaerobic methane oxidation bacteria; distribution characteristics

**Corresponding author:** LIU Xingguo. E-mail: liuxingguo@fmiri.ac.cn