

太湖竺山湾沉积物中氨氧化原核生物的垂直分布与多样性

向燕^{1,2}, 吴宇澄^{2,*}, 刘国锋², 刘正文^{1,2}, 吴庆龙²

(1. 暨南大学生命科学技术学院 水生生物研究所, 广州 510632;

2. 中国科学院南京地理与湖泊研究所 湖泊与环境国家重点实验室, 南京 210008)

摘要: 原核生物驱动的氨氧化过程对于富营养化湖泊的氮循环具有重要意义。为了解太湖藻型湖区沉积物中氨氧化原核生物的垂直分布和多样性特征, 采用分子生态学方法, 对竺山湾沉积物剖面中氨单加氧酶基因(*amoA*)或16S rRNA基因等特征分子标记的变化和序列特征进行了分析。结果表明, 氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)和氨氧化古菌(ammonia-oxidizing archaea, AOA)共存于沉积物各层。AOB的优势种在5 cm深度以下发生明显改变, 这可能与沉积物氧化还原电位及铵态氮的变化有关; 所有细菌*amoA*序列均属亚硝化单胞菌(*Nitrosomonas*)。AOA群落结构自表层至7 cm深度变化不大, 所有古菌*amoA*序列分属泉古菌CG 1.1b和CG 1.1a两大类群, 这可能与太湖形成历史上的海陆交替过程有关。此外, 沉积物各层均未发现典型厌氧氨氧化(anaerobic ammonium oxidation, anammox)细菌16S rRNA基因序列。这些发现丰富了对太湖藻型湖区氨氧化原核生物分布、多样性及环境调控原理的认识, 对理解富营养化湖泊氨氧化规律、认识湖泊生态系统氮循环功能具有借鉴意义。

关键词: 氨氧化细菌; 氨氧化古菌; 厌氧氨氧化细菌; 多样性; 太湖; 沉积物

Vertical distribution and diversity of ammonia-oxidizing prokaryotes in a sediment core from Zhushan Bay, Lake Taihu

XIANG Yan^{1,2}, WU Yucheng^{2,*}, LIU Guofeng², LIU Zhengwen^{1,2}, WU Qinglong²

1 Institute of Hydrobiology, College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China

2 State Key Laboratory of Lake Science and Environment, Nanjing Institute of Geography & Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China

Abstract: Prokaryotes-driven ammonia oxidation plays an important role in global nitrogen cycling. The vertical distribution and diversity of ammonia oxidizing prokaryotes in a sediment core collected in Zhushan Bay, which is located in the northern part of Lake Taihu and being strongly influenced by heavy eutrophication and algae blooms. The samples were investigated by molecular approaches targeting at either the ammonia monooxygenase subunit A (*amoA*) or 16S rRNA gene. Our findings showed that both ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and archaea (AOA) coexisted in the sediment profile. It was clearly indicated by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) pattern that the dominating species of AOB shifted below 5 cm depth of the sediment core, highlighting the influences of key environmental factors, i. e. oxidation-reduction potential and NH_4^+ -N, on AOB community; the dominance of *Nitrosomonas oligotropha* lineage sequences also suggested the environmental selection of AOB population in Lake Taihu. In contrast, the community composition of AOA in top 7 cm sediment was less variable. All retrieved archaeal *amoA* sequences belonged to either Soil & other environments or Marine & other environments lineages, which correspond to the CG1.1b and CG1.1a of *Crenarchaeota*, respectively. On the other hand, the anaerobic ammonium oxidizing (anammox) bacteria-like 16S rRNA gene sequences were retrieved at 5 cm depth only, which are distantly related to the known anammox bacteria. In this communication, we report for the first time a detailed simultaneous study on the three groups of ammonia-oxidizing prokaryotes in Lake Taihu sediment, which would

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目(40730528); 国家重点基础研究发展计划资助项目(2008CB418104); 中国博士后科学基金资助项目(200801382, 20080431127); 江苏省博士后科研资助计划资助项目(0702057C); 中国科学院王宽诚博士后工作奖励基金资助项目

收稿日期: 2009-06-26; 修订日期: 2009-12-01

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: yewu@niglas.ac.cn

enrich our understanding for ammonia oxidation process and nitrogen cycles in eutrophic lake ecosystems.

Key Words: AOB; AOA; anammox bacteria; diversity; Lake Taihu; sediment

原核生物驱动的氨氧化(硝化)是全球氮循环的中心环节之一^[1]。传统上认为,仅有某些化能自养的氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)能以分子氧为电子受体,催化氨氧化^[2]。近年来的研究极大地拓展了对氨氧化原核生物多样性及其功能的认识^[3-4]。新发现的氨氧化微生物包括:氨氧化古菌(ammonia-oxidizing archaea, AOA),它们广泛分布于环境中,具有与 AOB 类似的氨氧化机制;厌氧氨氧化细菌,属于浮霉菌门(phylum Planctomycetes)中的 *Brocadiales* 目^[5],能在无氧或低浓度氧条件下,以 NO_2^- 为电子受体,将氨氧化为氮气($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$)。

氮是导致淡水湖泊富营养化的关键营养元素之一^[6]。氨氧化通过直接或耦合过程(硝化-反硝化)产生气态氮分子,对于湖泊氮平衡具有重要意义。但是,目前化学方法很难区分三类氨氧化原核生物的活性,因此,从微生物生态学角度获取它们的分布、多样性及环境调控信息,对于认识湖泊氨氧化过程的生物驱动因素、理解氮循环规律具有重要的意义。

本文采用分子生态方法,对太湖竺山湾沉积物柱样中的 AOB、AOA 和厌氧氨氧化细菌的垂直分布和多样性进行了分析,目的在于了解太湖藻型湖区沉积物中氨氧化原核生物的群落特征,并寻找潜在的环境调控因子,以增进对太湖氮循环规律的了解,也为富营养化湖泊生态系统的氮素控制提供更多依据。

1 材料与方法

1.1 样点描述、样品的采集和预处理

为了强调环境对氨氧化原核生物的调控作用,本文对单一沉积物柱样中的 AOB、AOA 和厌氧氨氧化细菌进行考察。采样点位于太湖北部的竺山湾($120^\circ 14' 1''\text{E}$, $31^\circ 27' 0''\text{N}$),这里是太湖富营养化最为严重的区域之一,也是太湖蓝藻水华爆发的重灾区^[7],是太湖藻型湖区的典型代表。2008 年 11 月 19 日,以自制采样器采集一个沉积物柱状样,两端用橡皮塞塞紧,竖直放置,迅速带回实验室分样。表层 5 cm 沉积物每 1 cm 切样;第 6—19 cm,每隔 2 cm 切样,命名为 D1—D19(数字代表沉积物深度)。样品经冷冻干燥后,用于提取 DNA 和其他理化因子分析。

1.2 沉积物理化因子分析

于切样同时,用电位仪测定各层的氧化还原电位(oxidation-reduction potential, ORP);沉积物的 pH 分析参照文献进行^[8];采用 2 mol/L KCl 溶液提取沉积物中的可交换态氮,用连续流动分析仪(SAN++ , Skalar, Holland)分析硝态氮(NO_x^- -N, 为 NO_2^- -N 和 NO_3^- -N 的总和)和铵态氮(NH_4^+ -N, 为水溶态和交换态的总和)。

1.3 沉积物 DNA 的提取

称取 0.5 g 冻干沉积物,采用土壤 DNA 提取方法^[9],经 PowerClean™ DNA Clean-Up Kit(MoBio Laboratories, Carlsbad, USA)试剂盒纯化,获得沉积物 DNA。采用 0.8% 琼脂糖电泳检验,及 230、260、280 nm 吸光值测定检验提取效率和纯度。

1.4 PCR 扩增和变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)分析

选择 AOB 和 AOA 的氨单加氧酶基因(ammonia monooxygenase subunit A, *amoA*)、厌氧氨氧化细菌 16S rRNA 基因作为分子标记,其 PCR 扩增方案如表 1 所示(PTC200, MJ Research, USA)。25 μL 扩增体系包含 1 $\times$ PCR 缓冲液、2 mmol/L MgCl_2 、200 $\mu\text{mol/L}$ 4 种 dNTP、0.2 $\mu\text{mol/L}$ 引物、1.5 U rTaq DNA 聚合酶(Takara, 大连)。

对 AOB 和 AOA 的 *amoA* 扩增产物进行 DGGE 分析(DGGE-2001, C. B. S., USA)。在变性梯度分别 20%—70%, 20%—60% 的 6% 聚丙烯酰胺凝胶上,恒温 60 $^\circ\text{C}$ 、恒压 75 V、电泳 19 h。电泳结束后,用 SYBR Green I 核酸染料染色 30 min,用 GelDoc XR 凝胶成像系统(BIO-RAD Laboratories, USA)拍照。切下 AOB

DGGE 图谱上的主要条带,放入无菌离心管(含 50 μ l 无菌水),4 $^{\circ}$ C 放置 24 h。以此为模板,采用 AOB 引物(表 1)进行 PCR 扩增,进行分子克隆及后续分析。

1.5 克隆文库构建和系统发育分析

对 PCR 扩增产物进行克隆分析(pGEM T-Easy, Promega, USA)。经连接、转化、验证后,随机选取阳性克隆委托测序(上海英骏)。获得的序列经去除载体和引物序列后,用网络程序 Bellerophon (<http://foo.maths.uq.edu.au/~huber/bellerophon.pl>, *amoA* 及 16S rRNA 基因)和 Chimera Check ([http://rdp8.cme.msu.edu/cgis/chimera.cgi?su=SSU, 16S rRNA 基因](http://rdp8.cme.msu.edu/cgis/chimera.cgi?su=SSU,16S+rRNA+gene))排除可能的嵌合体。利用 DOTUR^[10] 比较序列,将操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)定义为相似性差异 $\leq 5\%$ 的序列群。通过 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)搜索 GenBank 中最相似序列,用 ClustalX 1.81 进行多序列比对,并采用 Mega 4.0 软件重建系统发育树(邻接法,1000 次抽样 bootstrap 检验)。

1.6 统计分析

采用 SPSS 13.0 软件计算数据间的 Pearson 相关系数,单侧检验分析其显著性。

1.7 序列登录号

本文所获得的细菌、古菌 *amoA* 以及厌氧氨氧化细菌的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中的登录号分别是:GQ231457—GQ231481、GQ231448—GQ231456 和 GQ214254—GQ214259。

表 1 PCR 扩增方案

Table 1 Primers and PCR programs for amplification of *amoA* or 16S rRNA gene of ammonia-oxidizing prokaryotes

	目标基因 Target	引物 ^a Primer	引物序列(5'—3') Sequence (5'—3')	片段长度 Length/bp	热循环条件 PCR procedure	参考文献 Reference
AOB	amoA	aomA-1F amoA-2R-TC	GGGGTTTCTACTGGTGGT CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	491	95 ℃ 5 min—94 ℃ 30 s, 53 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s,45 次循环—72 ℃ 10 min	[11]
AOA	amoA	Arch-amoAF Arch-amoAR	STAATGGTCTGGCTTAGACG GCGGCCATCCATCTGTATCT	635	95 ℃ 5min—94 ℃ 30 s, 53 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min,45 次循环—72 ℃ 10 min	[12]
厌氧氨氧化细菌(巢式 PCR)	16S rRNA	pla46F	GGATTAGGCATGCAAGTC	1346	95 ℃ 4min—94 ℃ 45 s, 55 ℃ 50 s, 72 ℃ 2 min,40 次循环—72 ℃ 10 min	[13]
		1392R	GACGGGCGGTGTGTACAA			
		AMX368F	CCTTTCGGGCATTGCGAA	452	95 ℃ 4min—94 ℃ 30 s, 56 ℃ 45s, 72 ℃ 1 min,40 次循环—72 ℃ 10 min	
		AMX820R	AAAACCCCTCTACTTTAGTCCCC			

a: 由于 GC 夹的引入显著降低 PCR 扩增效率,造成部分样品无法获得足够的 PCR 产物用于分析,因此所有 DGGE 分析均基于无 GC 夹引物扩增产物。

2 结果与讨论

2.1 沉积物剖面环境因子变化情况

ORP、pH、 NH_4^+ -N 与 NO_x^- -N 沿沉积物剖面的变化如图 1 所示。ORP 动态表明,沉积物各层均呈还原态,沉积物-上覆水界面的还原性最弱,向下到 4 cm 深度则迅速增强;5 cm 以下,除 15 cm 处有一异常低值,ORP 保持相对稳定。同时,随着上层沉积物中 ORP 的迅速降低, NH_4^+ -N 的浓度随之上升。在整个剖面中,ORP 与 NH_4^+ -N 呈显著负相关关系($r = -0.586, P < 0.05$;若排除 D15 的异常值,则 $r = -0.832, P < 0.001$)。但在 NH_4^+ -N 或 ORP 与 pH、 NO_x^- -N 之间并无类似关系。这可能是因为各种扰动导致表层沉积物的复氧较为充分,因此这里的有氨氧化活性较为强烈,导致氨及时被消耗。而沉积物下层由于缺乏氧气,氨氧化活性一般低于表层^[14],容易造成氨的积累。综合 ORP 与 NH_4^+ -N 的情况来看,1 cm 至 4 cm 深度变化较为明显,5 cm 以下变化较为平缓,而 4—5 cm 为过渡区(图 1 中灰色区域所示)。

2.2 沉积物剖面中的 AOB 与 AOA 群落结构变化

采用表 1 列出的引物与 PCR 条件,对 D1—D19 样品中 AOB 和 AOA 的 *amoA* 基因分别进行扩增,均能获得强度不一的预期条带,表明 AOB 和 AOA 共存于整个沉积物剖面,可能共同参与氨氧化过程。考虑到氧对沉积物的渗透有限,加上 ORP 与 NH_4^+ -N 的主要变化发生在 D1—D7 之间,本研究应用 DGGE 方法,着重对

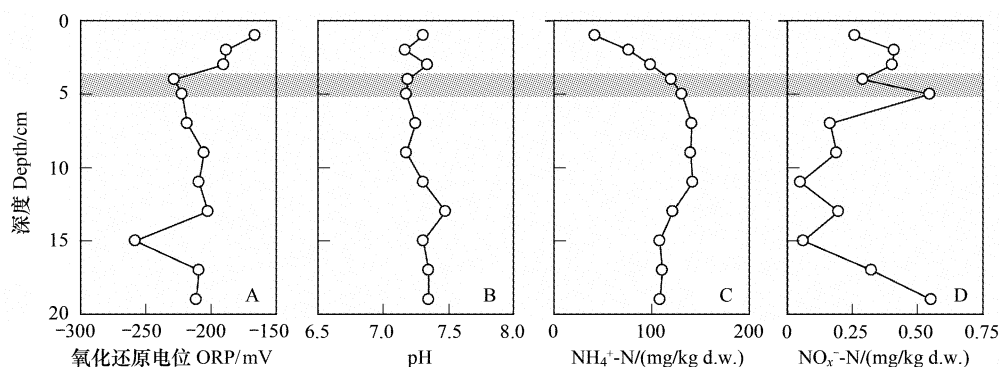


图1 沉积物剖面环境因子的垂直变化

Fig. 1 Vertical profile of environmental parameters in the sediment core

A: 氧化还原电位 ORP; B: pH; C: $\text{NH}_4^+ - \text{N}$; D: $\text{NO}_3^- - \text{N}$

D1—D7 共 6 个样品中的 AOB 和 AOA 群落结构进行了分析。如图 2A 所示, AOB 的 DGGE 条带数较少, 说明其群落多样性较低。D1—D4 中, 两个优势条带(1 和 2)是构成 AOB 群落的主要成分。但是, 在 D5 中出现了新的优势条带 6, 尤其在 D7 中, 条带 6 成为主要的优势条带, 条带 1 和 2 基本消失。这表明在 4—7 cm 处, AOB 的群落结构发生了较大变化。相比之下, AOA 的 DGGE 图谱中可以分辨出多个条带, 表明其多样性较 AOB 高。总的来看, D1—D7 各样品中的 AOA 优势条带较为类似, 物种组成变化不大(图 2B)。

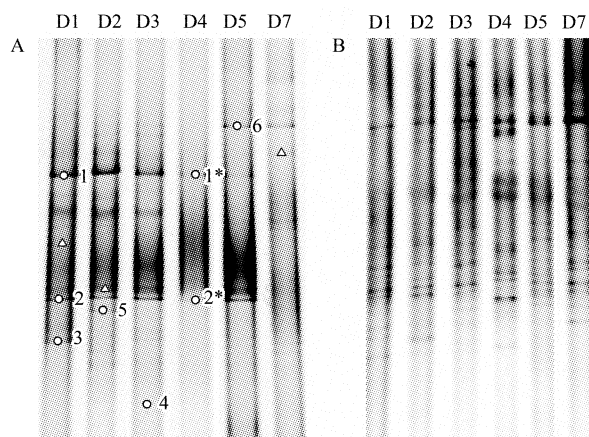
环境条件对于氨氧化反应具有重要的调控作用。ORP 决定着氧化还原反应的发生方向, 而 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 是氨氧化反应的底物, 其浓度可以指示氨氧化反应的强度^[12]。本研究中, 沉积物剖面 ORP 和 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 具有相似的垂直变化规律, 在 4—5 cm 深度存在着从急剧变化到相对稳定的过渡区域(图 1A、C)。相应地, AOB 优势种也从 5 cm 开始发生改变, 7 cm 深度的群落结构已经与 1—4 cm 处存在很大差异, 与 ORP 和 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 的变化相符, 提示这两个环境因子对沉积物中 AOB 的潜在影响。另一方面, 随沉积物深度变化, AOA 的群落结构差异不大。这一结果与其他湖泊沉积物中的古菌变化规律相类似^[15], 其原因可能在于古菌与细菌具有不同的生理与代谢特性, 导致两者对环境的不同响应。

2.3 氨氧化微生物系统发育分析

2.3.1 AOB

为了分析沉积物中主要 AOB 物种的系统发育信息, 对 DGGE 中的部分条带进行了割胶回收(条带编号如图 2A 所注, ○和△分别代表成功及未成功测序的条带), 经再次 PCR 扩增和克隆后, 每个条带随机挑选 3—4 个阳性克隆测序, 共获得 25 个序列。根据系统发育分析, 这些序列可分为 4 个类群(Group 1—4)(图 3A): 优势条带 1、2(以及同一位置条带 1* 和 2*) 和 6 所回收的序列中, 大多数(75%)属于 Group 1; 条带 3 回收的 1 个序列属于 Group 2; 条带 4 回收的 4 个序列均属于 Group 3; 条带 5 回收序列分属 Group 3 和 4。其中, Group 1—3 属于亚硝化单胞菌中的 *Nitrosomonas oligotropha* lineage, Group 4 属于 *N. communis* lineage^[16]。

DGGE 分析中, 常会出现单一条带回收获得多个序列的情况。尽管如此, 本研究获得的所有序列均属于亚硝化单胞菌, 优势条带序列大多为 *N. oligotropha* lineage, 表明太湖竺山湾沉积物 AOB 种群中, 亚硝化单胞菌、特别是 *N. oligotropha* 丰度最高, 这与其他研究结果^[17]是一致的。*N. oligotropha* lineage 是常见的淡水环

图2 沉积物样品 D1—D7 中 AOB(A) 和 AOA(B) *amoA* 基因的 DGGE 分析Fig. 2 DGGE analysis of (A) bacterial and (B) archaeal *amoA*

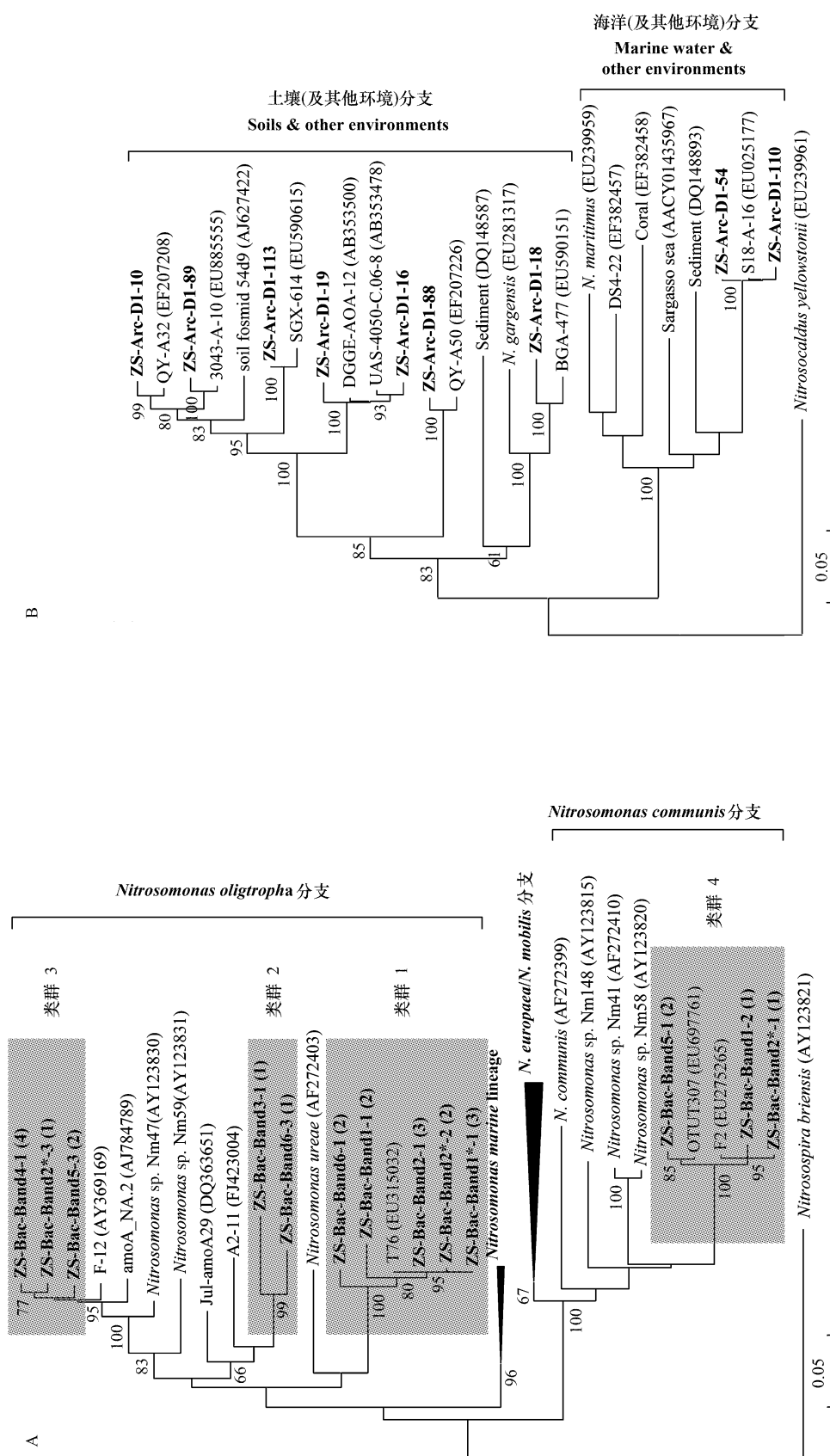


图 3 AOB (A) 与 AOA (B) 的系统发育树
Fig. 3 Phylogenetic trees of (A) AOB and (B) AOA

本文中得到的序列加前缀 ZS-Bac-或 ZS-Arc-D1-; 括号中数字表示同一 OTU 中的序列数; 比例尺表示每个核苷酸位置的替换率为 0.05

境 AOB 优势种^[18-19],广泛分布于各种淡水环境,而 *N. communis* lineage 在土壤和富营养化淡水中更为常见^[20],提示它们比较适应富含氨的环境。竺山湾沉积物中 AOB 的特殊组成提示生态位分离,即环境对 AOB 物种选择作用^[21]的存在。但富营养化湖泊中环境如何影响 AOB 的物种分布,则需要更广泛和深入的研究。

2.3.2 AOA

DGGE 图谱(图 2B)表明,沉积物中 AOA 多样性较高,群落组成相对复杂,考虑到对 DGGE 条带逐一测序的成功率难以保证,因此采用构建 *amoA* 克隆文库并随机测序的方法分析 AOA 的系统发育关系。通过构建表层沉积物样品 D1 古菌 *amoA* 克隆库并随机测序,共获得 9 个序列,分属 6 个 OTUs。系统发育分析(图 3B)表明,所有序列分属 Soils & other environments lineage(对应于泉古菌 CG1. 1b)和 Marine water & other environments lineage(对应于泉古菌 CG1. 1a)两个主要分支^[22],并以前者中的序列为主(78%)。已知 CG 1. 1b 广泛分布于土壤中,CG 1. 1a 在海洋生态系统中更为常见^[23],鉴于太湖地区历史上经历过多次海陆交替^[24],这两类序列的共存可能说明了陆地与海浸过程对竺山湾沉积物 AOA 成分的潜在共同影响。

目前仅有少数研究涉及对淡水生态系统中的 AOA^[25-26]。但在土壤、海洋等环境中,AOA 普遍存在且较 AOB 具有数量优势^[27-29]。太湖竺山湾沉积物中古菌 *amoA* 基因的成功扩增,再次证实了 AOA 在富营养化淡水环境中的存在。由于目前的研究缺乏 AOB 和 AOA 的活性信息,还不能定量评价它们对好氧氨氧化的相对贡献,这就需要在未来的研究中综合运用生物、化学的方法,特别是基于功能基因 RNA 分析^[30]和同位素示踪^[31]等技术手段,对 AOB 和 AOA 的生态意义进行深入探究。

2.3.3 厌氧氨氧化细菌

采用厌氧氨氧化细菌特异引物巢式扩增所有样品(D1—D19),仅 D5 获得扩增产物,这可能是因为厌氧氨氧化细菌的丰度低于检测限,无法扩增。意外的是,D5 扩增产物长度为 750 bp 左右,高出预期的 450 bp,对该长片段克隆测序,BLAST 比对发现所获 6 个序列彼此高度相似,形成一个独立的 cluster,但与 Genbank 中序列最高相似度仅有 81%。系统发育分析表明,这些序列与已知厌氧氨氧化细菌聚为一类,但距离较远(图 4)。Baltimore 港沉积物中也存在类似情况^[32](图 4)。

16S rRNA 基因的扩增是目前检测环境中厌氧氨氧化细菌的主要方法^[33],但引物的特异性是影响检测结果的重要因素。AMX368F 和 AMX820R 均为高度特异的厌氧氨氧化细菌引物,已成功应用于海洋及河口环境^[34],但也常常获得非厌氧氨氧化细菌来源的序列^[13]。本研究应用特异性引物扩增得到非预期长度的条

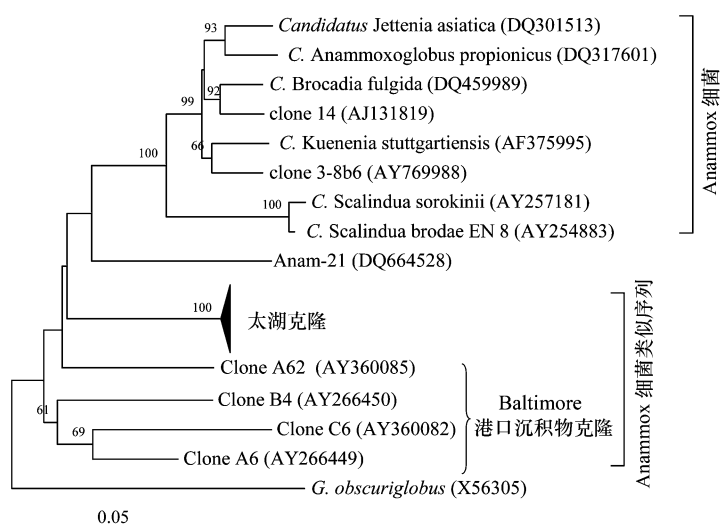


图 4 厌氧氨氧化细菌的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of anammox bacteria

比例尺表示每个核苷酸位置的替换率为 0.05

带,一方面可能是因为引物特异性较低,另一方面也可能是竺山湾沉积物中厌氧氨氧化细菌物种较为特殊,因而获得异常的扩增产物。功能基因(如联氨氧化还原酶 hydrazine oxidoreductase gene, *hzo*)引物将有助于提高扩增的特异性^[35]。

厌氧氨氧化细菌需要在无氧或低浓度氧的条件下氧化氨。浅水湖泊中,水体不分层,氧含量较高,anammox 对于湖泊氮素的消减可能并非关键过程。但是,太湖竺山湾沉积物中的厌氧氨氧化活性有力证明其中极有可能存在厌氧氨氧化细菌。本研究获得的序列,来自类似厌氧氨氧化细菌的浮霉菌,但是其确切种属,需要结合富集培养及分离纯化进一步鉴定。

3 结论

本文对太湖竺山湾一个沉积物柱样中的氨氧化原核生物进行了较为全面的分子生态学分析,主要发现包括:(1)沉积物中同时存在 AOB 和 AOA,因此 AOB 和 AOA 可能共同参与太湖沉积物中的硝化过程。(2)AOB 群落结构在 5 cm 深度处发生明显变化,这可能和 ORP 和 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 的变化趋势有关;AOB 均为亚硝化单胞菌,优势种为 *N. oligitropha* lineage,反映了环境条件对物种的选择。AOA 的群落结构沿沉积物 1—7 cm 深度变化不大,分别来自 Soils & other environments lineage 或 Marine water & other environments lineage。(3)厌氧氨氧化细菌的丰度可能较低,回收的 16S rRNA 序列虽与厌氧氨氧化细菌聚为一类,但距离较远。这些结果,丰富了对太湖藻型湖区氨氧化原核生物多样性及分布的认识,对于理解富营养化淡水湖泊的氮循环过程、认识湖泊生态系统功能具有一定意义。但是,这三类微生物在沉积物氨氧化中的功能尚不清楚,深入研究应着重于分析它们的数量、活性及其与湖泊环境因子之间的关系等方面。

References:

- [1] Gruber N, Galloway J N. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature*, 2008, 451(7176): 293-296.
- [2] Kowalchuk G A, Stephen J R. Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annual Review of Microbiology*, 2001, 55: 485-529.
- [3] He J Z, Zhang L M. Advances in ammonia-oxidizing microorganisms and global nitrogen cycle. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(1): 406-415.
- [4] Francis C A, Beman J M, Kuypers M M M. New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *International Society for Microbial Ecology*, 2007, 1(1): 19-27.
- [5] Jetten M S M, van Niftrik L, Strous M, Kartal B, Keltjens J T, op den Camp H J M. Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 44(2/3): 65-84.
- [6] Conley D J, Paerl H W, Howarth R W, Boesch D F, Seitzinger S P, Havens K E, Lancelot C. Controlling eutrophication: nitrogen and phosphorus. *Science*, 2009, 323(5917): 1014-1015.
- [7] Ma R H, Kong F X, Duan H T, Zhang S X, Kong W J, Hao J Y. Spatio-temporal distribution of cyanobacteria blooms based on satellite imageries in Lake Taihu, China. *Journal of Lake Sciences*, 2008, 20(6): 687-694.
- [8] Hou H Z. Determination of soil pH // Lu R K ed. *Analytical Methods for Soil and Agrochemistry*. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000:12-14.
- [9] Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(2): 316-322.
- [10] Schloss P D, Handelsman J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(3): 1501-1506.
- [11] Nicolaisen M H, Ramsing N B. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 2002, 50(2): 189-203.
- [12] Francis C A, Roberts K J, Beman J M, Santoro A E, Oakley B B. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2005, 102(41): 14683-14688.
- [13] Amano T, Yoshinaga I, Okada K, Yamagishi T, Ueda S, Obuchi A, Sako Y. Detection of anammox activity and diversity of anammox bacteria-related 16S rRNA genes in coastal marine sediment in Japan. *Microbes and Environment*, 2007, 22(3): 232-242.
- [14] Carini S A, Joye S B. Nitrification in Mono Lake, California: Activity and community composition during contrasting hydrological regimes. *Limnology and Oceanography*, 2008, 53(6): 2546-2557.
- [15] Koizumi Y, Takii S, Fukui M. Depth-related change in archaeal community structure in a freshwater lake sediment as determined with denaturing gradient gel electrophoresis of amplified 16S rRNA genes and reversely transcribed rRNA fragments. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 48: 285-292.

- [16] Purkhold U, Wagner M, Timmermann G, Pommerening-Rüser A, Koops H P. 16S rRNA and *amoA*-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing isolates: extension of the dataset and proposal of a new lineage within the *nitrosomonads*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53(5): 1485-1494.
- [17] Xing P, Kong F X, Chen K N, Chen M J, Wu X D. Ammonia-oxidizing bacteria community composition at the root zones of aquatic plants after ecological restoration. *Environment Science*, 2008, 29(8): 2154-2159.
- [18] Chen G Y, Qiu S L, Zhou Y Y. Diversity and abundance of ammonia-oxidizing bacteria in eutrophic and oligotrophic basins of a shallow Chinese lake (Lake Donghu). *Research in Microbiology*, 2009, 160(3): 173-178.
- [19] de Bie M J M, Speksnijder A, Kowalchuk G A, Schuurman T, Zwart G, Stephen J R, Diekmann O E. Shifts in the dominant populations of ammonia-oxidizing beta-subclass *Proteobacteria* along the eutrophic Schelde estuary. *Aquatic Microbial Ecology*, 2001, 23(3): 225-236.
- [20] Koops H P, Pommerening-Rüser A. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 37(1): 1-9.
- [21] Purkhold U, Pommerening-Rüser A, Juretschko S, Schmid M C, Koops H P, Wagner M. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(12): 5368-5382.
- [22] Prosser J I, Nicol G W. Relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11): 2931-2941.
- [23] Schleper C, Jurgens G, Jonuscheit M. Genomic studies of uncultivated archaea. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(6): 479-488.
- [24] Wang S M, Dou H S eds. *Lakes of China*. Beijing: Science Press, 1998: 261-268.
- [25] Herrmann M, Saunders A M, Schramm A. Archaea dominate the ammonia-oxidizing community in the rhizosphere of the freshwater macrophyte *Littorella uniflora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(10): 3279-3283.
- [26] Herrmann M, Saunders A M, Schramm A. Effect of lake trophic status and rooted macrophytes on community composition and abundance of ammonia-oxidizing prokaryotes in freshwater sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(10): 3127-3136.
- [27] He J Z, Shen J P, Zhang L M, Zhu Y G, Zheng Y M, Xu M G, Di H J. Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(9): 2364-2374.
- [28] Leininger S, Urlich T, Schlöter M, Schwark L, Qi J, Nicol G W, Prosser J I, Schuster S C, Schleper C. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 2006, 442(7104): 806-809.
- [29] Wuchter C, Abbas B, Coolen M J L, Herfort L, van Bleijswijk J, Timmers P, Strous M, Teira E, Herndl G J, Middelburg J J, Schouten S, Damste J S S. Archaeal nitrification in the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2006, 103(33): 12317-12322.
- [30] Shen J P, Zhang L M, Zhu Y G, Zhang J B, He J Z. Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(6): 1601-1611.
- [31] Jia Z, Conrad R. *Bacteria* rather than *Archaea* dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(7): 1658-1671.
- [32] Tal Y, Watts J E M, Schreier H J. Anaerobic ammonia-oxidizing bacteria and related activity in Baltimore inner harbor sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(4): 1816-1821.
- [33] Schmid M C, Maas B, Dapena A, van de Pas-Schoonen K, van de Vossenberg J, Kartal B, van Niftrik L, Schmidt I, Cirpus I, Kuenen J G, Wagner M, Damste J S S, Kuypers M, Revsbech N P, Mendez R, Jetten M S M, Strous M. Biomarkers for in situ detection of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(4): 1677-1684.
- [34] Dale O R, Tobias C R, Song B. Biogeographical distribution of diverse anaerobic ammonium oxidizing (anammox) bacteria in Cape Fear River Estuary. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(5): 1194-1207.
- [35] Schmid M C, Hooper A B, Klotz M G, Woebken D, Lam P, Kuypers M M M, Pommerening-Rüser A, Op den Camp H J M, Jetten M S M. Environmental detection of octahem cytochrome c hydroxylamine/hydrazine oxidoreductase genes of aerobic and anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11): 3140-3149.

参考文献:

- [3] 贺纪正, 张丽梅. 氨氧化微生物生态学与氮循环研究进展. *生态学报*, 2009, 29(1): 406-415.
- [7] 马荣华, 孔繁翔, 段洪涛, 张寿选, 孔维娟, 郝景燕. 基于卫星遥感的太湖蓝藻水华时空分布规律认识. *湖泊科学*, 2008, 20(6): 687-694.
- [8] 侯惠珍. 土壤 pH 值的测定//鲁如坤主编. *土壤农业化学分析方法*. 北京: 中国农业科技出版社, 2000: 12-14.
- [17] 邢鹏, 孔繁翔, 陈开宁, 陈美军, 吴晓东. 生态修复水生植物根际氨氧化细菌的研究. *环境科学*, 2008, 29(8): 2154-2159.
- [24] 王苏民, 窦鸿身. *中国湖泊志*. 北京: 科学出版社, 1998: 261-268.