DOI: 10.5846/stxb20170405058

陈秋阳,赵彬洁,袁洁,张健,谭香,张全发.人工遮光和营养添加对河流反硝化活性和反硝化细菌群落结构的影响.生态学报,2018,38(15):

Chen Q Y, Zhao B J, Yuan J, Zhang J, Tan X, Zhang Q F.Influences of artificial shading and nutrient addition on denitrification activity and community structure of denitrifying bacteria in a stream. Acta Ecologica Sinica, 2018, 38(15): - .

人工遮光和营养添加对河流反硝化活性和反硝化细菌 群落结构的影响

陈秋阳^{1,2},赵彬洁^{1,2},袁 洁^{1,2},张 健¹,谭 香^{1,*},张全发¹ 1中国科学院武汉植物园水生植物与流域生态重点实验室,武汉 430074

2 中国科学院大学,北京 100049

摘要:河流生态系统受到人类活动例如河岸带森林植被毁损和农业活动施肥等的干扰日益加剧,而这些活动使河流接收的光照 增多、河流的氮磷营养盐浓度增加。微生物的反硝化作用是河流去除氮的有效途径。我们在汉江的一级支流金水河上游核心 保护区内选取 6 条溪流开展野外控制实验,利用营养添加模拟河流中营养的增加,遮盖河面来模拟源头溪流的隐蔽状态,来研 究河流沉积物中微生物的反硝化作用对光照和营养改变的响应,并利用高通量测序(MiSeq)技术研究在两种处理下河流沉积 物中 nirS 型反硝化细菌的群落结构变化。结果显示:营养添加增加了沉积物的反硝化活性,河面遮盖降低了沉积物的反硝化活 性。营养添加和河面遮盖两种处理均能降低金水河上游区域优势菌属脱氯单胞菌属的相对丰度,同时也均会降低该区域 nirS 型反硝化菌群的物种多样性。本研究初步证实了光照增加和河流的营养增加提高了河流沉积物反硝化活性,并为提高河流的 脱氮能力提供科学依据。

关键词:反硝化细菌;nirS基因;河流沉积物;群落结构;多样性

Influences of artificial shading and nutrient addition on denitrification activity and community structure of denitrifying bacteria in a stream

CHEN Qiuyang^{1,2}, ZHAO Binjie^{1,2}, YUAN Jie^{1,2}, ZHANG Jian¹, TAN Xiang^{1,*}, ZHANG Quanfa¹ 1 Key Laboratory of Aquatic Botany and Watershed Ecology, Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China 2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: River ecosystems have been disturbed and aggravated by increasing human activities including those activities wherein forest area is changed to agricultural area in riparian zones and intensive fertilizer usage in agriculture. These anthropogenic activities lead to an increase in the light received by the surface of the river and nutrient (nitrogen and phosphorus) enrichment in the river. Denitrification driven by microorganisms in sediments is the most important path for the removal of nitrogen from aquatic ecosystems. The alteration of light intensity influences the denitrification process owing to the change in the amount of available organic carbon produced via the metabolism of algae and photosynthetic bacteria. We added slow-releasing fertilizer into the river to simulate nutrient enrichment similar to the effect of fertilization from the agricultural industry. We also covered a part of the stream surface to achieve conditions similar to those of rivers in headwaters with thick forest coverage. We selected six streams to conduct manipulated experiments at the core area in the natural reserve in the upper Jinshui River, Hanjiang, to assess the responses of denitrification to the different treatments—

收稿日期:2017-04-05; 网络出版日期:2018-00-00

基金项目:国家自然科学基金项目(31570463, 31200354, 31130010)

^{*} 通讯作者 Corresponding author.E-mail: xtan@ wbgcas.cn

nutrient addition and coverage. We also analyzed subsequent changes in community structure and diversity of bacteria using the encoding nirS gene by MiSeq high-throughput sequencing technology. The results showed that artificial shading above streams can reduce the denitrification activity of sediments, relative abundances of dominant bacteria (*Dechloromonas*) and the diversity of bacteria as indicated by the encoding nirS gene. Furthermore, nutrient addition into the stream increased the denitrification activity of sediments, whereas there was a decrease in relative abundance of dominant bacteria and the diversity of bacteria. The preliminary results confirmed the increase in denitrification activity of stream sediments as a result of increasing light intensity and nutrient content. This study has allowed us to understand the denitrifying capacity of rivers and provides scientific primary data for river management.

Key Words: denitrifying bacteria; nirS gene; stream sediment; community structure; diversity

反硝化既是去除河流氮污染、调节氮循环的关键过程。大气氮沉降、氮肥的使用、粪便的排放和生物固氮 等方式输入河流的氮元素,在最终汇入海洋前,有将近一半由反硝化的作用去除,释放到大气中^[1]。河流中 的氮循环微生物参与了包括固氮、硝化、反硝化、厌氧氨氧化和氨化等生态过程,各形态的氮作为主要反应物, 河流中的氮素水平直接影响了微生物的群落特征和功能作用,因此施肥行为将显著改变氮循环微生物的群落 结构,增强其生物功能活性。研究表明,在河流砂质沉积物内添加氮质营养能促进反硝化进程^[2];氮肥的施 用促进了反硝化细菌的活性,有机肥还能提高土壤反硝化细菌多样性^[3]。光照的强度对底栖和浮游藻类的 生长具有显著的影响^[4],从而影响藻类对河流沉积物中氮磷营养盐和有机碳的吸收和释放^[5-7]。比如,暗光 环境会抑制沉积物中异养细菌的生长,低光照强度能降低异养细菌的碳生物量贡献率^[8]。

迄今为止,反硝化细菌群落对营养响应的生态试验常见于农业土壤和水产养殖沿岸土壤的研究中^[9-10],利用野外原位生态试验探索营养添加和遮光处理对河流沉积物反硝化微生物多样性影响的研究鲜有报道。 本实验选择汉江上游金水河流域中的森林溪流,采集进行原位营养添加和遮光处理后的河流砂质沉积物,选用 nirS 功能基因作分子标记,采用 16S rDNA 技术研究两种处理对反硝化细菌群落结构和物种多样性的影响,可以为深入理解人类活动对流域脱氮能力的改变提供依据。

1 实验方法

1.1 研究区域

控制实验于 2015 年 10 月至 2015 年 12 月在陕西省秦岭南坡的佛坪县境内金水河流域进行。金水河是 汉江上游区域的一级支流,发源于佛坪县,在洋县的黄金峡峡口汇入汉江,河流长度 87 km,流域面积 730 km²,全流域无工业区分布,中下游两岸土地被开垦为农田。金水河流域处于北亚热带山地暖温带湿润季风 气候区,多年平均气温 11.5—14.5℃,降水量在 900—1244 mm 之间。实验样地位于金水河流域上游的佛坪国 家自然保护区的核心区域内,人为干扰小,森林覆盖率高(>95%),其中竹林面积占 44.7%^[11]。金水河的河水 水质较好,呈弱碱性,离子含量较低,水化学类型为 Ca²⁺-HCO₃型,河水中离子主要是受碳酸盐岩和硅酸盐岩 风化的控制^[12]。

在金水河上游的东河及其支流中选取6条溪流作为实验样地,分布如图1,自上游到下游分别为李家沟、 东河、倒流水沟、牌坊沟、瓦房沟和转弯沟。

1.2 实验设计

实验区域选取有连续水域的开阔河段,长 20 m、宽 8 m,自上游至下游每长 5 m、宽 8 m 分一段,分为设为 对照区(O: Open)、遮光区(S: Shaded)、营养区(ON: Open & Nutrient)和遮光营养区(SN: Shaded & Nutrient),每个区域之间的间隔为 30 m。图 2 是对照区和 3 个处理区的实验布置示意图。对照区(O)不做任 何处理;遮光区(S)的河面以上 50 cm 处覆盖遮光率大于 95%的黑色遮阳网;营养区(ON)的沉积物中均匀施 加 50 kg 缓释肥;遮光营养区(SN)在沉积物中均匀施加 50 kg 缓释肥后,在河面以上 50 cm 处覆盖遮光率大

3



图 1 实验样地分布图 Fig.1 Map of the study area and sampling sites

于 95%的黑色遮阳网。遮光处理是为了模拟河流源头区域森林郁闭度极高的河流光照强度水平,营养添加 处理是为了模拟河流中下游人类的农耕活动和生活污水的排放对河流的营养输入状态。实验中施加的缓释 肥是美国 Scotts 公司生产的精准奥绿肥(Osmocote Exact),N:P:K 的有效成分比是 15:19:12。营养添加和遮 光处理时长 2 个月,每一个处理中采集 3 个平行河水样品和砂质沉积物样品用于后期测量反硝化活性和分析 细菌物种多样性。河流水体中的温度(Temperature)、溶解氧含量(Dissolved Oxygen)、pH 和浊度(Turbidity)均 由 YSI6920 水质检测仪现场测定。总氮(Total Nitrogen; TN)由碳氮仪 Multi N/C ®2100 测定,总磷(Total Phosphorus; TP)由钼酸铵分光光度法(GB 11893-89)测得。





Fig.2 The experiment diagram of coverage and enrichment treatments

1.3 样品的采集和反硝化活性测定

营养添加及河面遮盖 2 个月后,取每条溪流四个区域的沉积物。用采样袋采集 200 g 砂质沉积物,放入

干冰和保温箱中带回实验室,冻干后用于 DNA 的提取。用采样袋采集 500 g 砂质沉积物,在 4℃条件下带回 实验室,测定反硝化活性,即,利用乙炔抑制法培养沉积物4h,用真空气瓶收集产生的 N,O 气体,N,O 浓度用 装有⁶³Ni 电子捕获器(Electron Capture Detector)的气相色谱仪测定。每个样品 3 个重复。评价沉积物的反硝 化活性的指标是培养沉积物样品 4 h 内 N₂O 生成速率, 根据 Terry 等提供的公式计算水中溶解 N₂O 的浓 度^[13]。4h内的平均反硝化速率v为:

 $v = \frac{1}{4} \times \frac{Ct \times (Vh + \infty \times Vw) \times P \times 28}{CFn \times 1000 \times RTMs}$

单位是:µg N,O-N g⁻¹ h⁻¹,表示每1g烘干沉积泥沙在4h内产生的 N,O 态 N 的质量。其中 Ct 是4h 后 顶空气体中 N₂O 的浓度; Wh 是顶空气体的体积; Ww 是加入的水的体积; α为本森系数; CFn 是修正系数, 当只 抽取一次气体时, CFn 的值为1: Ms 为烘干后的沉积物质量: T 为培养时的温度: P 为压强: R=8.31451 KPa $mol^{-1}K^{-1}$

1.4 细菌总 DNA 提取和 PCR 扩增

选取倒流水沟和东河两条溪流的各区域河流砂质沉积物进行反硝化微生物分析,分析流程如下:

DNA提取		合成引物	╞	PCR扩增纯化	\rightarrow	PCR产物定量		PCR free文库 制备		PE250测序]
-------	--	------	---	---------	---------------	---------	--	------------------	--	---------	---

其中, DNA 提取使用的使 Omega Soil kit 试剂盒; DNA 纯度检测方法用 NanoDrop; DNA 浓度检测用 Qubit 完 成;DNA 完整性检测方法为琼脂糖凝胶电泳。

选择反硝化细菌的 16SrDNA 的 Cd3aF-R3cd 测序区域,引物是 Cd3aF(5'- GTSAACGTSAACGARACSGG-3')和R3cd(5'-GASTTCGGRTGSGTCTTGA-3')。PCR 采用 TransStart Fastpfu DNA Polymerase, 20 µL 反应 体系。

1.5 序列分析

OTU(Operational Taxonomic Unit)及物种群落分析:使用 Uparse 软件(Uparse v7.0.1001)对所有样品的全 部有效标记(Effective Tags)序列进行一致性(Identity)聚类,形成 OTU。在对 OTU 注释并去除污染 OTU 后, 使用 R 软件进行各个分类等级的注释比例和物种相对丰度的统计。选取关注细菌属的 OTU 使用 QIIME 软 件进行系统进化树构建,进行系统进化关系展示。最后使用R软件进行纲级别的相对丰度热图绘制,同时进 行样本间和物种间的聚类分析。

Chao 指数是常用的通过预测样品中 OTU 数量,衡量样品中 OTU 丰富度的指数,用来评估沉积物样本的 物种多样性,指数越高,表明样本的多样性越复杂。覆盖百分率(Coverage)通过下列公式计算:

Coverage = $\left(1 - \frac{n1}{N}\right) \times 100\%$

式中,n1表示克隆文库中只出现一次的 OTU 数量,N表示每个克隆文库的克隆总数。覆盖百分率越高,表 明文库表达真实环境中 nirS 基因群落结构的置信度越高。在文库库容相同的情况下,覆盖百分率越高, nirS 型反硝化细菌的群落多样性就越低。

1.6 统计分析

多样性指数(Chao),使用 QIIME 软件计算。

沉积物反硝化活性在遮光和营养添加处理下的差异显著性分析,以及遮光和营养添加处理下沉积物 nirS 型反硝化细菌物种相对丰度和物种数量的差异显著性分析,由 SPSS 16.0 进行方差分析(ANOVA)和 LSD 多 重比较分析方法。

2 结果

2.1 河流水体的基本理化性质

实验实施前(2015年10月),金水河上游6条溪流河水的理化指标数值如表1所示。2015年12月实验

进行两个月后,营养添加处理前后溪流河水的理化性质见表 2 和表 3。6 条溪流的河水呈弱碱性,溶解氧含量 较高,水体十分清澈。经过了短期(2 个月)的处理,较对照区域(0),和营养区域(ON)的河水 pH 显著(P<0. 05)降低,溶解氧含量 DO 显著(P<0.05)上升。其它的水质指标在 6 条河流中的变化各不相同。李家沟 (LJG)、东河(DH)、瓦房沟(WFG)和转弯沟(ZWG)在对照区和营养区的总氮 TN 没有显著差异;较对照区而 言,倒流水(DLSG)和牌坊沟(PFG)在营养区的总氮 TN 显著(P<0.05)增加。东河(DH)、瓦房沟(WFG)在对 照区和营养区的总磷 TP 没有显著差异;较对照区而言,李家沟(LJG)、倒流水沟(DLSG)、牌坊沟(PFG)和转 弯沟(ZWG)在营养区的总磷 TP 显著(P<0.05)增加。

Та	ble 1 The original physical and chemical parameters of water in control segments(O) of 6 streams (October)						
对照区 Open		溶解氧 Dissolved oxygen/ (mg/L)	рН	浊度 Turbidity/ NTU	总氮 Total Nitrogen/ (mg/L)	总磷 Total Phosphorus/ (mg/L)	
东河 DH		6.46 ± 0.07	$7.01 \pm < 0.01$	$0.6 \pm < 0.01$	0.80±0.17	$0.015 \pm < 0.01$	
李家沟 LJG		7.95 ± 0.21	7.08 ± 0.11	$0.1 \pm < 0.01$	0.79 ± 0.17	0.015 ± 0.01	
倒流水 DLSG		9.55 ± 0.10	$7.42 \pm < 0.01$	$0.2 \pm < 0.01$	0.81 ± 0.06	$0.016 \pm < 0.01$	
牌坊沟 PFG		8.40 ± 0.02	7.13 ± 0.01	$0.2 \pm < 0.01$	0.68 ± 0.04	0.015 ± 0.01	
瓦房沟 WFG		9.98 ± 0.08	$7.23 \pm < 0.01$	$0.2 \pm < 0.01$	1.54 ± 0.11	$0.012 \pm < 0.01$	
转弯沟 ZWG		8.65 ± 0.16	$7.56 \pm < 0.01$	$0.3 \pm < 0.01$	0.83 ± 0.05	$0.010 \pm < 0.01$	

表1 对照区(Open)6条溪流河水的基本理化性质监测初始值(10月)

第一列缩写为对应的拼音首字母缩写,表中数值为:平均值±标准偏差,重复次 n=3;NTU 为 Nephelometric Turbidity Unit,是散射比浊测定法 测定浊度的单位

	Table 2 The physical and ch	emical parameters of	water in control segmen	nts(O) of 6 streams (De	ecember)
对照区 Open	溶解氧 Dissolved oxygen/ (mg/L)	рН	浊度 Turbidity/ NTU	总氮 Total Nitrogen/ (mg/L)	总磷 Total Phosphorus/ (mg/L)
东河 DH	9.33±0.04a	7.71± <0.01a	0.6± <0.01a	0.96± <0.01a	0.031±0.01a
李家沟 LJG	7.13±1.16 a	8.22±0.37 a	0.7±0.07a	0.79±0.21a	0.027±0.01a
倒流水沟 DLSG	9.02±0.03 a	7.71±0.01a	0.5±0.07a	$1.06 \pm 0.08a$	$0.03 \pm < 0.01 a$
牌坊沟 PFG	8.31±0.05 a	8.11±0.01a	1.2± <0.01a	$0.74 \pm 0.08 a$	0.027±0.01a
瓦房沟 WFG	8.37±0.03 a	$7.31 \pm < 0.01a$	$0.5 \pm < 0.01 a$	1.47±0.12a	$0.013 \pm < 0.01a$
转弯沟 ZWG	13.59±0.22 a	7.71±0.04a	0.5±0.19a	0.72±0.04a	$0.021 \pm < 0.01a$

表 2 对照区(Open)6条溪流河水的基本理化性质(12月)

表中数值为:平均值±标准偏差(Mean±SD),重复次 n=3;小写字母 a 和 b 表示在 P<0.05 水平上的差异;NTU 为 Nephelometric Turbidity Unit, 是散射比浊测定法测定浊度的单位

表 3 营养区(Open & Nutrient) 6 条溪流河水的基本理化性质(12 月)

Table 3	The physical and chemical p	arameters of water i	n nutrient segments (Ope	n&Nutrient) of 6 strea	ms (December)
対照区 Open	溶解氧 Dissolved oxygen/ (mg/L)	рН	浊度 Turbidity/ NTU	总氮 Total Nitrogen/ (mg/L)	总磷 Total Phosphorus/ (mg/L)
东河 DH	$9.81{\pm}0.02{\rm b}$	$7.40 \pm 0.01 \mathrm{b}$	$0.4 \pm < 0.01 \mathrm{b}$	0.93±0.05a	0.026±<0.01a
李家沟 LJG	$9.08 \pm 0.02 \mathrm{b}$	$7.13 \pm 0.01 \mathrm{b}$	$0.3 \pm 0.07 \mathrm{b}$	0.64±0.01a	$0.046 \pm < 0.01 \mathrm{b}$
倒流水沟 DLSG	$10.64 \pm 0.01 \mathrm{b}$	$7.32 \pm 0.01 \mathrm{b}$	$0.9 \pm < 0.01 \mathrm{b}$	$1.61 \pm 0.05 \mathrm{b}$	$0.093{\pm}0.01{\rm b}$
牌坊沟 PFG	$9.35 \pm 0.02 \mathrm{b}$	$7.5 \pm < 0.01 \mathrm{b}$	$0.6 \pm < 0.01 \mathrm{b}$	$0.88 \pm 0.02 \mathrm{b}$	$0.049 \pm < 0.01 \mathrm{b}$
瓦房沟 WFG	$9.80{\pm}0.06{\rm b}$	$7.27{\pm}0.01{\rm b}$	0.6±<0.01a	1.34±0.01a	0.012±<0.01a
转弯沟 ZWG	$14.42 \pm 0.08 \mathrm{b}$	$7.53 \pm 0.02 \mathrm{b}$	$0.2 \pm < 0.01 \mathrm{b}$	0.79±0.05a	$0.053 \pm < 0.01 \mathrm{b}$

表中数值为:平均值±标准偏差(Mean±SD),重复次数 n=3;小写字母 a 和 b 表示在 P < 0.05 水平上的差异;NTU 为 Nephelometric Turbidity Unit,是散射比浊测定法测定浊度的单位

2.2 沉积物反硝化活性变化

对4种处理下6条河流的沉积物4h平均反硝化 速率做单因素方差分析和LSD法多重比较分析,结果 表明,遮光处理S与对照O、营养添加ON和遮光且营 养添加SN这3种处理之间的差异性显著(P<0.05),O、 ON和SN3种处理之间彼此没有显著差异(P>0.05)。 如图3所示是在6条河流中4种处理下的河流沉积物 反硝化活性。相比于对照区(O),河面遮光处理(S)显 著(P<0.05)降低了沉积物的反硝化活性,营养添加处 理(ON)和营养添加且河面遮盖处理(SN)的沉积物反 硝化活性略微增加,但与对照区(O)没有显著的差异 (P>0.05)。均进行了遮光处理的S和SN两组之间比 较,遮光且营养添加处理(SN)显著(P<0.05)提高了沉 积物的反硝化活性。





纵坐标反硝化速率的单位 ng N₂O-N g⁻¹ h⁻¹,表示每 1 g 烘干沉积 泥沙在 4 h 内产生的 N₂O 态 N 的质量;O:对照区(Open),S:遮光 区(Shading), ON: 营养区(Open&Nutrient), SN: 遮光营养区 (Shading&Nutrient); a 和 b 表示小写字母表示在 P < 0.05 水平上 的差异

见表 4,6 条河流中,经过 S、ON 和 SN 3 种处理后, 倒流水沟的沉积物反硝化活性变化幅度最大,4 h 内平均反硝化速率在河面遮盖区域达到最小值 15.98 ng N_2 O-N g⁻¹h⁻¹,在营养添加区域达到最大值 114.90 ng N_2 O-N g⁻¹h⁻¹。牌坊沟的沉积物反硝化活性变化幅度最小, 4 h 内平均反硝化速率在河面遮盖区域达到最小值 63.15 ng N_2 O-N g⁻¹h⁻¹,在营养添加区域达到最大值 77.70 ng N_2 O-N g⁻¹h⁻¹。

	Tuble 1 Alteruge demandent fute of the sediments from 1 segments in o streams									
处理 Treatments	李家沟	倒流水沟	牌坊沟	东河	瓦房沟	转弯沟				
0	70.19 ± 18.75	90.51±32.60	71.27±23.09	75.67±14.16	73.60 ± 9.77	87.25±28.20				
S	24.98 ± 8.18	15.98 ± 2.360	63.15 ± 18.92	29.02±3.22	41.14±12.64	18.18±10.33				
ON	72.76 ± 30.58	114.90 ± 30.61	77.70 ± 25.81	98.84±18.77	85.60 ± 20.01	89.91±12.19				
SN	60.80 ± 10.79	86.09±15.86	75.49 ± 25.52	87.17±30.28	70.57 ± 29.52	71.83±20.74				

表 4 4 种处理下 6 条河流沉积物 4h 内的反硝化速率平均值 (ng N₂O-N g⁻¹ h⁻¹) Fable 4 Average denitrification rate of the sediments from 4 segments in 6 streams

O:对照区,Open;S:遮光区,Shading;ON:营养区,Open & Nutrient;SN:遮光营养区,Shading & Nutrient;表中数值为:平均值±标准偏差(Mean ±SD),重复次数 n=3

2.3 OTU 系统进化与丰度聚类分析

扇形的面积表示不同处理区域内的样品在该细菌分类上相对丰度的比例大小;分类名下方的数字表示 4 种处理区域种的所有沉积物样品在该分类上的平均相对丰度百分率

选取 6条河流中的东河(DH)和倒流水沟(DL)进行沉积物中反硝化细菌的序列分析。基于样本内的 OTU 的物种系统进化关系及相对丰度信息,在属水平上,选择每个分类中所有样品相对丰度最大的前 10 个 分类,分别是 Alpha 变形菌纲的趋磁螺菌属(Magnetospirillum),β 变形菌纲的未分类 Beta 变形菌(Candidatus_ Accumulibacter_phosphatis)、纤毛菌属(Leptothrix、Rubrivivax)、固氮螺菌属(Azospira)、脱氯单胞杆菌属 (Dechloromonas)和冻胶菌属(Zoogloea),Gamma 变形菌纲的假单胞菌属(Pseudomonas)和黄杆菌属 (Rhodanobacter),还有非变形菌门的环境样品(environmental_samples_norank)。其中,脱氯单胞杆菌属的平均 相对丰度百分率最高,占所有测序物种的 15.476%,远高于其它属,且在两条河流八个处理区域的沉积物样品 中均为优势属(图4)。

对东河与倒流水沟采用营养添加、河面遮盖、营养添加且河面遮盖这3种处理后,河流沉积物反硝化微生物的群落产生了较为明显的变化。相比于对照区的样点,3种处理点的细菌在沉积物中所有 nirS 型细菌的总



图 4 4 种处理区域内沉积物中 nirS 型反硝化细菌在各分类学分支的分布 Fig.4 Taxonomic distribution of denitrifying bacteria by encoding nirS gene in sediments from 4 segments

相对丰度均有变化,在河面遮盖点的降幅约为14.29%±1.21%,在营养添加点的降幅约为9.22%±0.83%,在营养添加且河面遮盖的点降幅为10.66%±0.98%。此外,细菌的物种组成和各物种丰度也发生了相应的改变。 在东河及其倒流水沟的沉积物中,优势属均为脱氯单胞杆菌属,在各支流沉积物反硝化细菌中的相对丰度在 19.46%—74.99%之间。3种处理方式均降低了脱氯单胞杆菌在沉积物中 nirS 型反硝化细菌里的相对丰度。 将3种处理点和控制点对比,河面遮盖的处理非常显著(P<0.001)增加了假单胞菌属的物种数量和相对丰 度,显著(P<0.05)降低了固氮螺菌属和脱氯单胞杆菌属的物种数量和物种丰度;营养添加的处理非常显著 (P<0.001)增加了假单胞菌的物种丰度,显著(P<0.05)降低了脱氯单胞杆菌的物种丰度。

根据所有样品在纲水平的物种注释及丰度信息绘制热图,对样品进行聚类分析。图 5 中横向为样品信息,纵向为物种注释信息,图中左侧的聚类树为物种聚类树,上方的聚类树为样品聚类树,中间热图对应的值为每一行物种相对丰度经过标准化处理后得到的标准化值(http://en.wikipedia.org/wiki/Standard_score),即,一个样品在该分类上的相对丰度和所有样品在该分类的平均相对丰度的差除以所有样品在该分类上的标准差所得到的值。黄色柱形高度代表标准化值相对大小。在此丰度聚类分析中,东河的控制区域(DH.O)和营养添加区域(DH.S)与营养添加且河面遮盖区域(DH.SN)分属两类;倒流水沟的控制区域(DL.O)和营养添加区域(DL.ON)沉积物反硝化细菌聚为一类,河面遮盖区 (DL.S)与营养添加且河面遮盖区域(DL.SN)聚为一类。

2.4 沉积物反硝化细菌 nirS 基因多样性分析

表 5 第二列为反硝化细菌群落 OTU 种类划分,可以看出倒流水沟(DL)各处理状态下沉积物的划分的 OTU 种类均低于同处理状态下的东河(DH)各区域。本次实验样品文库覆盖率均达到 78%以上,说明能够较 为真实的反映出测序结果的真实情况。在倒流水沟的四个处理中,控制区域的沉积物反硝化细菌的 Chao 指 数最大,即物种多样性最大,营养添加区域 Chao 指数最小,即物种多样性最小;在东河的 4 个处理中,控制区域 的沉积物反硝化细菌物种多样性最大,营养添加区域物 种多样性最小。

3 讨论

反硝化还原酶编码基因作为反硝化微生物的功能 基因,常用来筛选和检测环境中反硝化微生物。微生物 将有机化合物作为电子供体,以氮氧化物作为电子受 体,具体过程为:NO₃→NO₂→NO→N₂O→N₂,分别由硝 酸盐还原酶、亚硝酸盐还原酶、氧化亚氮还原酶、氧化氮 还原酶和氧化亚氮还原酶催化完成。亚硝酸盐还原的 过程是反硝化作用的标志性过程,也是最重要的限速步 骤,因此亚硝酸盐还原酶(Nitrite reductase, Nir)的两种 编码基因 nirS 和 nirK 是最早且最常用来研究反硝化细 菌分子生态学的功能基因^[14]。反硝化作用在细菌、真 菌、放线菌、酵母菌和深海孔虫中均由发现^[15],但在自 然环境中的反硝化过程主要是由反硝化细菌完成 的^[16]。目前发现的反硝化细菌约有 50 个属 130 多个 种,大多集中在变形菌纲(Proteobacteria)和拟杆菌纲 (Bacteroidetes),但由于目前数据库中反硝化功能基因



图 5 东河与倒流水沟各处理区沉积物 nirS 反硝化细菌在纲级别 的丰度聚类

Fig.5 Class-level clustering of denitrifying bacteria by encoding nirS gene in sediments from all segments in DH and DL streams DL.O: 倒流水沟对照区, Dao Liushui Open; DL.S: 倒流水沟遮光 区, Dao Liushui Shaded; DL.ON: 倒流水沟营养区, Dao Liushui Open and Nutrient; DL.SN: 倒流水沟遮光营养区, Dao Liushui Shaded and Nutrient; DH.O: 东河对照区, Dong He Open; DH.S: 东 河遮光区, Dong He Shaded; DH.ON: 东河营养区, Dong He Open and Nutrient; DH. SN: 东 河 遮 光 营 养 区, Dong He Shaded and Nutrient

的序列较少,即使是研究最多的 nirS 和 nirK 基因,其设计的引物在经过扩增之后只能识别出变形菌门的一些属^[17]。

,		8	101	8 8		8	
处理 Treatment	OTU 种类 OTUs	Chao 指数 Chao Index	文库覆盖度 Coverage/%	处理 Treatment	OTU 种类 OTUs	Chao 指数 Chao Index	文库覆盖度 Coverage/%
DL.O	589	713.56	79.38	DH.O	934	1107.31	88.27
DL.S	649	680.54	85.39	DH.S	814	936.31	93.46
DL.ON	505	524.5	88.28	DH.ON	655	728.23	87.80
DL.SN	594	632.01	78.05	DH.SN	845	920.87	90.96

表 5 东河与倒流水沟各处理区沉积物 nirS 基因型反硝化细菌的 OTU 种类、Chao 指数和覆盖率 Table 5 OTUs, Chao index and coverage of denitrifying bacteria by encoding nirS gene in sediments from all segments in DH and DL streams

DL.O: 倒流水沟对照区 Dao Liushui Open; DL.S: 倒流水沟遮光区 Dao Liushui Shaded; DL.ON: 倒流水沟营养区 Dao Liushui Open and Nutrient; DL.SN: 倒流水沟遮光营养区 Dao Liushui Shaded and Nutrient; DH.O: 东河对照区 Dong He Open; DH.S: 东河遮光区 Dong He Shaded; DH. ON: 东河营养区 Dong He Open and Nutrient; DH.SN: 东河遮光营养区 Dong He Shaded and Nutrient

金水河上游森林溪流沉积物中检测到的反硝化细菌以好氧菌和兼性异养菌为主,这可能与溪流水体中较高的溶解氧含量有关。在沉积物样品 nirS 型反硝化细菌相对丰度最大的 10 个分类属中,γ 变形菌纲的假单胞菌属和 β 变形菌纲的冻胶菌属是目前已证实的好氧反硝化细菌,其反硝化能力受沉积物中溶解氧含量的限制较少,部分假单胞菌属的菌株甚至在环境中 0₂浓度达到 92%时,也能在 60 h 内到达 99.2%的反硝化率^[18]。在倒流水沟和东河的四种处理区域中,营养的添加增加了溶解氧含量,则营养区的假单胞菌属和冻胶 菌属的相对丰度均非常显著(*P*<0.001)的高于对照区;遮光处理阻碍了溪流中藻类和光合细菌的光合作用, 该区域溶解氧含量相对较低,而假单胞菌属和冻胶菌属的相对丰度在遮光区显著(*P*<0.05)低于对照区。β 变形菌纲的红长命菌属是金水河上游溪流中相对丰度仅次于脱氯单胞杆菌属的细菌,是兼性异养型,具有直 接光合作用的能力,它不能直接利用硝酸盐,仅在厌氧条件下进行反硝化作用将亚硝酸盐还原成 N₂^[19]。在 东河与倒流水沟遮光区和营养区的沉积物中,红长命菌属的相对丰度均显著(P<0.05)高于对照区,但遮光且 营养区的红长命菌属反硝化细菌的相对丰度在两条河流中均略低于遮光区或营养区,说明遮光和营养添加两 种处理对红长命菌属的相对丰度增加没有累加效应。

好氧反硝化细菌在脱氮的同时,兼具除磷的作用。除了假单胞菌属和冻胶菌属以外,β变形菌纲红环菌 目(*Rhodocyclales*)中的脱氯单胞杆菌属和固氮螺菌属,也都是重要的兼性反硝化除磷菌,可直接利用硝酸盐 为电子受体,常见于除磷污泥的工艺中^[20]。红环菌目是一类聚磷菌,大量存在于水污染处理中的脱磷除氮系 统内,尽管有研究表明添加磷矿石有利于红环菌目的细菌生长^[21],但在众多活性污泥系统内好氧反硝化菌脱 氮除磷效果研究中,磷营养盐的供应量对磷去除效率的影响较小,污泥中的溶解氧含量、可利用的碳源含量和 种类都能对除磷效果产生较为明显的影响,但影响机制较为复杂,通常与菌种在不同溶氧环境下对不同有机 碳源的吸收利用能力有关^[22-24]。脱氯单胞杆菌属的反硝化细菌在金水河上游溪流中是优势菌属,具有最大 的相对丰度。在东河与倒流水沟中,无机营养盐的添加处理均略微降低了脱氯单胞杆菌属细菌的相对丰度, 遮光处理却显著降低了脱氯单胞杆菌属细菌的相对丰度,这可能与遮光后溶解氧含量的降低与光合作用受阻 导致的水体机碳含量减少有关。

在不同环境下反硝化微生物组成差异较大,导致环境的变化对反硝化微生物群落结构、丰度和物种多样性的响应模式各不相同。比如在大量关于水稻种植土壤 nirS 型反硝化细菌的研究中,nirS 型反硝化细菌对施加无机肥的敏感性不足,但同时施加有机肥和无机肥能更显著提高细菌的种群丰度^[25-27]。金水河上游溪流中存在大量的反硝化除磷菌,在 NPK 为主成分的缓释肥添加 2 个月后,反硝化除磷菌的相对丰度下降,但沉积物的反硝化活性增加。

不同的土地利用类型也会对反硝化微生物产生影响。林地河岸带土壤中的反硝化酶活性大于农田和草 地河岸带,这是因为农田和草地上的人类活动导致了河岸带土壤中的全氮和有机碳的流失^[28],在对河口湿地 潮滩的研究中也证明了,由于有机碳含量较大的缘故,植被区剖面沉积物的反硝化活性大于无植被区^[29]。由 此可见,不同土地利用类型对反硝化作用的影响大多是通过地表可利用的碳源和氮源来控制的。水体中的藻 类光合同化产生有机碳,蓝藻和光合细菌大都具有固氮作用,为水体中的微生物提供了丰富的有机碳和无机 氮。自然水体中大量分布藻菌共生体系,形成光能自养生物膜,藻类代谢为异养微生物提供碳源。研究表明, 光照强度增加能光能自养生物膜中多糖的产生,从而作为碳源被系统内的异养反硝化细菌利用,增强反硝化 细菌的活性和对水体硝酸盐的去除能力^[3]。在无光照时,生物膜内层处于相对缺氧的状态,只能靠厌氧菌或 兼性菌的生理活动实现脱氮。长期缺乏光照的状态下,异养反硝化细菌会因为营养物质的缺乏而导致反硝化 活性降低。金水河上游溪流控制实验中,遮光处理(S)下的沉积物反硝化活性显著下降,优势菌属脱氯单胞 菌的物种数量和相对丰度降低,可能是因为长期缺乏光照导致河水中藻类和光合细菌的光合作用不足,水体 处于贫营养状态,抑制了部分异养反硝化细菌的生长。在营养添加且遮光(SN)区,由于缓释肥的加入,微生 物的营养缺乏状态得以缓解,因此营养添加且遮光区域沉积物的反硝化活性得以恢复。

4 结论

(1)营养添加和河面遮盖对选取的6条实验河流中沉积物的反硝化活性产生了相似的影响:营养添加增加了沉积物的反硝化活性,河面遮盖降低了沉积物的反硝化活性。

(2)在东河与倒流水沟各处理区域的沉积物样品中,优势属均为脱氯单胞杆菌属。河面遮盖和营养添加 这两种处理方式均降低了脱氯单胞杆菌属的相对丰度。河面遮盖的处理能显著增加了假单胞菌属的物种数 量和相对丰度,并显著降低固氮螺菌属和脱氯单胞菌的物种数量和物种丰度;营养添加的处理则显著增加了 假单胞菌属的相对丰度与物种数量,显著降低了脱氯单胞杆菌的相对丰度。

(3)在东河与倒流水沟各处理区域中,NPK 营养的添加和河面遮盖均会降低 nirS 型反硝化菌群的物种多

样性。在两条河流中,营养添加处理区域的沉积物 nirS 型反硝化细菌的物种多样性均是各处理中最低的。

参考文献(References):

- Galloway J N, Aber J D, Erisman J W, Seitzinger S P, Howarth R W, Cowling E B, Cosby B J. The nitrogen cascade. BioScience, 2003, 53(4): 341-356.
- [2] Magalhães C M, Joye S B, Moreira R M, Wiebe W J, Bordalo A A. Effect of salinity and inorganic nitrogen concentrations on nitrification and denitrification rates in intertidal sediments and rocky biofilms of the Douro River estuary, Portugal. Water Research, 2005, 39(9): 1783-1794.
- [3] 陈哲,袁红朝,吴金水,魏文学.长期施肥制度对稻田土壤反硝化细菌群落活性和结构的影响.生态学报,2009,29(11):5923-5929.
- [4] 庄树宏, Sven H. 光强和光质对底栖藻类群落影响Ⅱ. 群落和种群的动态和适应模式. 生态学报, 2001, 21(12): 2057-2066.
- [5] 姚扬,金相灿,姜霞,李丽和.光照对湖泊沉积物磷释放及磷形态变化的影响研究.环境科学研究,2004,17(S1):30-33.
- [6] 王琦. 浅水湖泊沉积物磷释放的生物学机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2006.
- [7] 操家顺,单淇.光照强度对光能自养生物膜去除低污染水体中硝态氮的影响研究.环境污染与防治,2013,35(3):15-19.
- [8] 余立华. 秋季长江口不同辐照和氮、磷浓度水平下浮游植物营养盐吸收动力学及生长变化研究[D]. 上海:华东师范大学, 2006.
- [9] Wakelin S A, Nelson P N, Armour J D, Rasiah V, Colloff M J. Bacterial community structure and denitrifier (*nir-gene*) abundance in soil water and groundwater beneath agricultural land in tropical North Queensland, Australia. Soil Research, 2011, 49(1): 65-76.
- [10] Krishnani K K. Detection and diversity of nitrifying and denitrifying functional genes in coastal aquaculture. Aquaculture, 2010, 302(1/2): 57-70.
- [11] 王婧, 袁洁, 谭香, 李思悦, 张全发. 汉江上游金水河悬浮物及水体碳氮稳定同位素组成特征. 生态学报, 2015, 35(22): 7338-7346.
- [12] 蒋保刚. 秦岭南坡山区小流域水化学及氢氧同位素研究——以金水河流域为例[D]. 保定: 河北大学, 2013.
- [13] Terry R E, Tate III R L, Duxbury J M. The effect of flooding on nitrous oxide emissions from an organic soil. Soil Science, 1981, 132(3): 228-232.
- [14] Braker G, Zhou J Z, Wu L Y, Devol A H, Tiedje J M. Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in pacific northwest marine sediment communities. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(5); 2096-2104.
- [15] Risgaard-Petersen N, Langezaal A M, Ingvardsen S, Schmid M C, Jetten M S M, den Camp H J M O, Derksen J W M, Piña-Ochoa E, Eriksson S P, Nielsen L P, Revsbech N P, Cedhagen T, van der Zwaan G J. Evidence for complete denitrification in a benthic foraminifer. Nature, 2006, 443 (7107): 93-96.
- [16] Lu H J, Chandran K, Stensel D. Microbial ecology of denitrification in biological wastewater treatment. Water Research, 2014, 64: 237-254.
- [17] 杨柳燕,王楚楚,孙旭,郭丽芸,肖琳,宋晓骏.淡水湖泊微生物硝化反硝化过程与影响因素研究.水资源保护,2016,32(1):12-22, 50-50.
- [18] Su J J, Liu B Y, Liu C Y. Comparison of aerobic denitrification under high oxygen atmosphere by *Thiosphaera pantotropha* ATCC 35512 and *Pseudomonas stutzeri* SU2 newly isolated from the activated sludge of a piggery wastewater treatment system. Journal of Applied Microbiology, 2001, 90(3): 457-462.
- [19] Nagashima S, Kamimura A, Shimizu T, Nakamura-Isaki S, Aono E, Sakamoto K, Ichikawa N, Nakazawa H, Sekine M, Yamazaki S, Fujita N, Shimada K, Hanada S, Nagashima K V P. Complete genome sequence of phototrophic betaproteobacterium *Rubrivivax gelatinosus* IL144. Journal of Bacteriology, 2012, 194(13): 3541-3542.
- [20] 吕小梅. 反硝化除磷菌群结构与工艺调控策略[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2014.
- [21] 张建美, 郝春博, 冯传平, 李思远, 张丽娜, 郝会玲, 朱江. 磷对地下水反硝化系统中细菌菌群结构的影响. 地学前缘, 2014, 21(4): 191-198.
- [22] 李相昆, 张杰, 黄荣新, 马力, 鲍林林, 姜安玺. 反硝化聚磷菌的脱氮除磷特性研究. 中国给水排水, 2006, 22(3): 35-39.
- [23] 于大禹,郭威,张金榜,张贺,杨鹏.好氧反硝化菌的筛选及其脱氮除磷性质的研究.微生物学通报,2009,36(4):598-603.
- [24] 姜丽丽. 生物膜污水处理系统脱氮除磷性能及微生物群落结构研究[D]. 邯郸:河北工程大学, 2012.
- [25] Yin C, Fan F L, Song A L, Li Z J, Yu W T, Liang Y C. Different denitrification potential of aquic brown soil in Northeast China under inorganic and organic fertilization accompanied by distinct changes of *nirS*-and *nirK*-denitrifying bacterial community. European Journal of Soil Biology, 2014, 65: 47-56.
- [26] 罗希茜,陈哲,胡荣桂,吴敏娜,秦红灵,魏文学.长期施用氮肥对水稻土亚硝酸还原酶基因多样性的影响.环境科学,2010,31(2): 423-430.
- [27] 尹昌, 范分良, 李兆君, 宋阿琳, 朱平, 彭畅, 梁永超. 长期施用有机和无机肥对黑土 nirS 型反硝化菌种群结构和丰度的影响. 环境科学, 2012, 33(11): 3967-3975.
- [28] 陈刚亮,李建华,杨长明.崇明岛不同土地利用类型河岸带土壤反硝化酶活性特征.应用生态学报, 2013, 24(10): 2926-2932.
- [29] 游丽丽.河口潮滩湿地植被对沉积物反硝化过程影响初探[D].上海:华东师范大学,2014.