

研究报告

温州市境内城市河流底泥氨氧化菌富集培养物
微生物群落结构分析高怡宁¹ 陈锴新¹ 余诗怡¹ 潘怡秀¹ 陶珺杨¹ 王婷^{1,2} 蔡贤雷^{1,2*}

(1. 温州医科大学浙江省流域水环境与健康风险研究重点实验室 浙江 温州 325035)

(2. 浙南水科学研究院 浙江 温州 325035)

摘要:【背景】城市河流底泥含有丰富的微生物资源,底泥表面更是硝化作用的主要位点之一,其表面微生物在河流生态系统氮的转化过程中发挥着重要作用。【目的】以温州市境内的城市河流水系温瑞塘河茶山段舜沔河和横江河的4条河道作为采样点,比较分析4种不同环境下城市河流表层底泥氨氧化菌富集培养物的微生物群落结构。【方法】通过野外采样及室内培养对底泥中氨氧化功能菌进行富集培养,采用高通量测序技术分析微生物群落的组成、丰度和多样性。【结果】富集培养后主要优势类群为变形菌门(Proteobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)。4个样品共涉及氨氧化细菌3个属,分别为亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)、亚硝化螺菌属(*Nitrospira*)、亚硝化球菌属(*Nitrosococcus*),涉及氨氧化古菌1个属为 *Nitrososphaera*,其中所有样品均以 *Nitrosomonas* 为主。不同底泥富集样品氨氧化微生物可操作分类单元(Operational taxonomic unit, OTU)组成存在明显差异,栽种有水生植物的河道底泥样品 DA2 具有最高的氨氧化细菌 OTU 数量和相对丰度,而存在生活餐饮污染的河道底泥样品 DA4 具有最高的氨氧化古菌 OTU 数量和相对丰度;相较于滞留水体,采自相对流动水体的富集样品 DA2、DA4 具有更高的氨氧化微生物 OTU 数量和相对丰度。【结论】阐述了4种不同环境下城市河流底泥氨氧化菌富集培养物微生物群落结构的多样性,确定了富集培养之后的优势类群,为氨氧化微生物培养源的选择提供了参考,也为城市河流底泥中氨氧化菌进一步的筛选分离及其生理生态特征的研究提供了科学依据。

关键词: 氨氧化, 微生物, 富集培养, 群落结构, 高通量测序

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (41601528); Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LQ16C030005); Wenzhou Medical University Scientific Research and Development Fund Project (QTJ13014)

*Corresponding author: E-mail: caixl@wmu.edu.cn

Received: October 16, 2017; **Accepted:** May 23, 2018; **Published online** (www.cnki.net): June 12, 2018

基金项目: 国家自然科学基金(41601528); 浙江省自然科学基金(LQ16C030005); 温州医科大学科技发展基金(QTJ13014)

*通信作者: E-mail: caixl@wmu.edu.cn

收稿日期: 2017-10-16; **接受日期:** 2018-05-23; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2018-06-12

Microbial community structure of ammonia-oxidizing enrichments from urban river sediments in Wenzhou City

GAO Yi-Ning¹ CHEN Kai-Xin¹ YU Shi-Yi¹ PAN Yi-Xiu¹ TAO Jun-Yang¹
WANG Ting^{1,2} CAI Xian-Lei^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Watershed Science and Health of Zhejiang Province, Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang 325035, China)

(2. Southern Zhejiang Water Research Institute, Wenzhou, Zhejiang 325035, China)

Abstract: [Background] Urban river sediments are rich in microbial resources, and the surface sediment is a major site for nitrification. Microorganisms in surface sediment play an important role in nitrogen transformations of river ecosystems. [Objective] To compare and analyze the microbial communities of ammonia-oxidizing microorganism enrichments from sediments under different environmental conditions, sediment samples were collected at four sampling sites at the Shunao and Hengjiang Rivers, which are tributaries of the Wen-Rui Tang River located in Wenzhou. [Methods] Ammonia-oxidizing microorganism enrichments were obtained through field sampling and laboratory cultivation. The microbial composition, abundance and diversity of ammonia-oxidizing microorganism enrichments were studied by high-throughput sequencing. [Results] Proteobacteria and Bacteroidetes were the two dominant phyla in enrichments. The microbial communities in four samples contained three genera of ammonia-oxidizing bacteria (*Nitrosomonas*, *Nitrosospira* and *Nitrosococcus*) and one genus of ammonia-oxidizing archaea (*Nitrososphaera*), of which the genus *Nitrosomonas* was dominant in each sample. There were marked differences in the composition of ammonia-oxidizing microorganism OTUs (operational taxonomic units) among different enrichments. The number and relative abundance of ammonia-oxidizing bacteria OTUs were highest in the sample DA2 from the site that has many aquatic plants, while those of ammonia-oxidizing archaea OTUs were highest in the sample DA4 from the site where untreated municipal wastes are often dumped there. The number and relative abundance of ammonia-oxidizing microorganism OTUs were higher in the enrichment samples DA2 and DA4 from lotic-dominated sites compared to those from lentic-dominated sites. [Conclusion] The results revealed microbial diversity in enrichments from urban river sediments under four different environments, and described the dominant phyla in enrichments. Such data provides a reference for selecting the culture source of ammonia-oxidizing microorganism, and provides fundamental knowledge for isolation and further study of ammonia-oxidizing microorganism in urban river sediments.

Keywords: Ammonia oxidation, Microorganism, Enrichment culture, Community structure, High throughput sequencing

河流是陆地水生态系统的重要组成部分, 在营养元素的生物地球化学循环过程中发挥着重要的作用, 其中河流氮营养元素的循环转化过程受到特别的关注^[1-3]。与自然河流相比, 城市河流受到人类的影响更为剧烈^[4], 水质的富营养化程度也更高, 普遍存在氮污染的现象。在城市河流体系中, 底泥不仅是水体氮磷等营养元素、有机颗粒物等物质的接纳库, 也是水体悬浮颗粒物、化学物质等的释放源, 更含有丰富的微生物资源, 是集化学物质和微

生物于一体的特殊生态环境^[5-6]。底泥中的微生物是自然界物质循环的主要推动者之一, 有研究表明底泥表面是硝化作用的主要位点之一^[7], 其表面微生物在河流生态系统氮的转化过程中发挥着重要作用^[8-10]。在氮循环的硝化作用中, 氨氧化过程是氨氮进入氮循环的起始步骤, 因催化这一反应的氨氧化菌生长缓慢, 使得氨氧化过程成为影响硝化作用的一个限速步骤^[11], 进而影响以硝氮为底物的反硝化作用^[12], 甚至最终影响氮的去除。由于城市河流

底泥中氨氧化过程有助于氮污染物的净化,因此,加强对城市河流底泥中氨氧化微生物及氨氧化过程的研究不仅具有重要的生物学和地学意义,而且在城市河流生态治理、环境保护中具有潜在的应用价值。而已有的一些研究表明,氨氧化菌群在富集培养条件下与自然环境条件下具有较高的相似性^[13-14],因此,对于不同环境城市河流底泥中的氨氧化菌群的富集培养及相关研究,不仅可以获得有应用价值的高效转化氨氮的菌群,而且有利于从微生物角度深入理解与阐明氨氮的转化机理,从理论上揭示微生物在城市河流氮循环过程中的作用。

温瑞塘河是典型的南方平原河网,位于瓯江以南、飞云江以北的温瑞平原,也是温州市境内十分重要的城市河流水系。20 世纪 80 年代以来,各种生活污水和工业废水不断进入河网,导致温瑞塘河水系的污染问题变得越来越突出,至 90 年代,大部分河段的水质恶化为劣 V 类水,许多河道甚至发黑发臭,已经严重制约了温州的经济发展^[15]。目前,氨氮已是温瑞塘河中最主要的氮污染物^[16],而如何控制及去除河道水体中的氨氮是当地一个亟待解决的问题。另外,鉴于平原河网水流较缓、相对静止的状态,导致在温瑞塘河水系内创造了许多独特且相对稳定的生境,这为一些相关实验的开展提供了良好的野外条件。因此,本研究拟以温瑞塘河为研究对象,通过野外采样及室内培养,对底泥中氨氧化功能菌进行富集培养,结合高通量测序研究不同环境条件下城市河流底泥中的氨氧化功能菌群的群落结构及其差异,以期说明城市河流不同环境条件下底泥富集培养物中氨氧化菌群的群落特征,研究结果不仅可为氨氧化微生物培养源的选择提供参考,也可为城市河流底泥中氨氧化菌进一步的筛选分离及其生理生态特征的研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 培养基

氨氧化微生物富集培养基^[17](g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.00, K_2HPO_4 0.75, NaH_2PO_4 0.25, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.03, CaCO_3 5.00, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01, 调 pH 至 7.2。

1.2 主要试剂和仪器

DNA 提取试剂盒, Omega 公司;聚碳酸酯滤膜, Millipore 公司。彼得森采泥器, 厦门登迅仪器设备有限公司;采水器, 北京普雷德仪器设备有限公司; NanoDrop 分光光度计、Qubit 2.0 荧光定量仪, Thermo Scientific 公司。

1.3 样品采集

采样区域(N27°55', E120°42')位于浙江省温州市温瑞塘河茶山段舜岙河和横江河,地处温州医科大学茶山校区附近,依据河道水质及周边环境,筛选 4 条河道作为采样点,分别标记为 DA1、DA2、DA3 和 DA4 (图 1)。其中, DA1 和 DA3 分别位于两条盲肠河段, DA1 周边为学校教学区和公路;而 DA3 周边为当地的小吃街和居民居住区,受到生活污染排污的影响较严重。DA2 和 DA4 位于横江河上, DA2 处于学校教学区和运动区之间,周边种植有大量挺水植物荷花,具有较好的景观环境; DA4 周边为硬质化河岸,处于学生生活区,两边分别为大型食堂,虽与 DA2 处于同一条河上,但环境差异较大。底泥采集时间为 2015 年 6 月 20 日,利用彼得森采泥器采集表层底泥样品,置于已高压灭菌

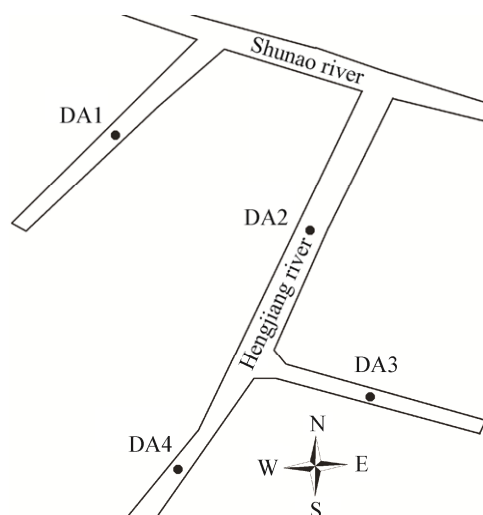


图 1 采样点位示意图

Figure 1 Location of sampling sites

的保鲜袋中, 用保温箱冷藏带回实验室做后续处理; 同时利用采水器采集表层水样, 水质指标参照《湖泊富营养化调查规范》^[18]进行测定, 采样当日的水质状况见表 1。

1.4 富集培养

称取新鲜沉积物 1 g, 置于 150 mL 高压灭菌的氨氧化微生物富集培养液中, 在 25 °C 培养箱中进行暗培养。每周取样采用纳氏试剂比色法对其氨氮含量进行测定, 当培养液中消耗 80% 的氨氮时, 按体积比 1:9 将原始富集液转移入新的富集培养液中进行富集培养, 连续进行接种转移培养 5 次。

1.5 DNA 提取、PCR 扩增及高通量测序分析

采用 0.2 μm 孔径的聚碳酸酯滤膜分别对 100 mL 的富集培养液进行过滤, 以此方法获得不同沉积物富集培养样品的 DNA 提取源。利用 DNA 提取试剂盒, 参照试剂盒使用说明提取样品中的总 DNA, 用 NanoDrop 分光光度计检测 DNA 样本的光密度(Optical density, OD)值, Qubit 2.0 荧光定量仪检测 DNA 样本的浓度, 合格样本进行 16S rRNA 基因 V3-V4 区扩增(引物 F: 5'-CCTAC GGGNGGCWGCAG-3'; R: 5'-GACTACHVGGGT ATCTAATCC-3')^[19]。委托上海祥音生物科技有限公司利用 Illumina HiSeq 2500 进行高通量测序。通过 Barcode 区分样品序列, 并对各样本序列做质量控制, 去除非特异性扩增序列及嵌合体。在 97% 的相似性水平下, 基于可操作分类单元(Operational

taxonomic unit, OTU)聚类及获得各 OTU 的物种分类信息, 进行各样本多样性指数、群落结构及种群相对丰度差异分析。

2 结果与分析

2.1 4 种底泥富集培养物微生物群落的 α 多样性

虽然所选择的采样河道周边环境存在较大的差异, 但采样时间处于当地的汛期, 所以水质指标之间的差异并不大, 然而从表 1 可以发现 DA3、DA4 点位的溶解氧含量明显低于 DA1、DA2 点位, 但氨氮浓度却明显高于 DA1、DA2 点位, 水质指标反映出 DA3、DA4 点位存在相对更重的生活餐饮污染, 与平时的观察存在较好的契合。而来自这 4 种不同环境的底泥样品, 经过富集培养后, 其培养物测序后的基本情况见表 2。4 种底泥样品富集培养物的优化序列数量分别为: DA1 样品 48 410 条, DA2 样品 97 205 条, DA3 样品 73 478 条, DA4 样品 55 419 条, 其中 DA2 具有最高的序列数。不同序列在 97% 相似度下将其聚类为用于物种分类的 OTU, 各样品分别获得的 OTU 数为: DA1 1 673, DA2 3 259, DA3 2 684, DA4 8 808, 各样品的 OTU 数存在较大差异, 其中 DA4 具有最高的 OTU 数量。通过 Ace 和 Chao1 指数可以估计富集样品的群落丰度, 通过 Shannon 和 Simpson 指数可以估计富集样品的群落多样性, 从表 2 可知, 相比较而言, 4 个底泥富集样品的群落多样性比较相近, 而群落丰度上存在相对更高的差异。

表 1 采样点位的水环境状况

Table 1 Differences in the physical and chemical parameters at different sampling sites

Parameters	DA1 site	DA2 site	DA3 site	DA4 site
Water temperature (°C)	26.84	26.61	26.73	26.69
Conductivity (mS/cm)	0.337	0.314	0.335	0.328
Dissolved oxygen (mg/L)	2.70	2.47	1.80	1.23
Total nitrogen (mg/L)	6.60	6.58	6.51	8.22
Ammonia nitrogen (mg/L)	3.51	3.25	4.14	4.25
Nitrite nitrogen (mg/L)	0.08	0.07	0.11	0.08
Total phosphorus (mg/L)	0.83	0.87	0.92	0.78
Orthophosphate (mg/L)	0.12	0.05	0.11	0.06

表 2 不同底泥富集培养物的测序序列统计及多样性指数

Table 2 Sequence statistics and diversity index of the different sediment enrichment samples

Sample	Reads	OTUs	Shannon	Ace	Chao1	Simpson
DA1	48 410	1 673	3.54	29 306	10 950.8	0.070
DA2	97 205	3 259	3.59	59 117	20 861.7	0.080
DA3	73 478	2 684	3.93	57 153	19 409.5	0.061
DA4	55 419	8 808	4.53	262 717	95 217.1	0.076

2.2 不同底泥富集样品的群落组成和比较

采用培养氨氧化微生物的液体培养基对不同来源的底泥微生物进行富集培养，目的在于富集城市河流底泥中的氨氧化微生物。虽然经过富集培养，但是所获得的培养物依旧是混合菌群，而氨氧化微生物只是成为其中的优势种群，为了更好地了解氨氧化微生物的富集情况，需要先了解不同底泥富集样品的微生物组成情况。

4个底泥富集样品中所含的微生物涉及31个门66个纲1 003个属，并存在不少 OTU 归为Unclassified，尤其是在DA1样品中Unclassified相对丰度占比达到5.17%。各个样品优势门水平(相对丰度超过1%)的菌群组成情况见图2。由图2可知，变形菌门(Proteobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)为4个富集培养物中的优势门，其中，变形菌门具有最高的相对丰度，DA1的变形菌门相对丰度超

过70%，4个样品中DA4的变形菌门相对丰度最低但也超过50%；各样品中拟杆菌门相对丰度与变形菌门相对丰度的高低呈相反的趋势，4个样品中DA1的拟杆菌门相对丰度最低，而DA4拟杆菌门相对丰度最高。除此以外，4个底泥富集样品微生物群落组成在其他门水平上也存在较大差异，比如放线菌门(Actinobacteria)的相对丰度从DA1到DA4逐渐升高，而芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)在DA4中具有相对较高的相对丰度，而在DA2其相对丰度低于1%，另外，厚壁菌门(Firmicutes)在DA4中具有最高的相对丰度，而在DA1中相对丰度低于1%。通过文氏图可以了解样品之间共有和独有的 OTU 数目，可以比较直观地发现不同样品之间在 OTU 数目组成上的重叠和分离情况，有利于进一步了解不同样品之间的群落结构差异(图3)，通过图3可以发现，各个样品所独

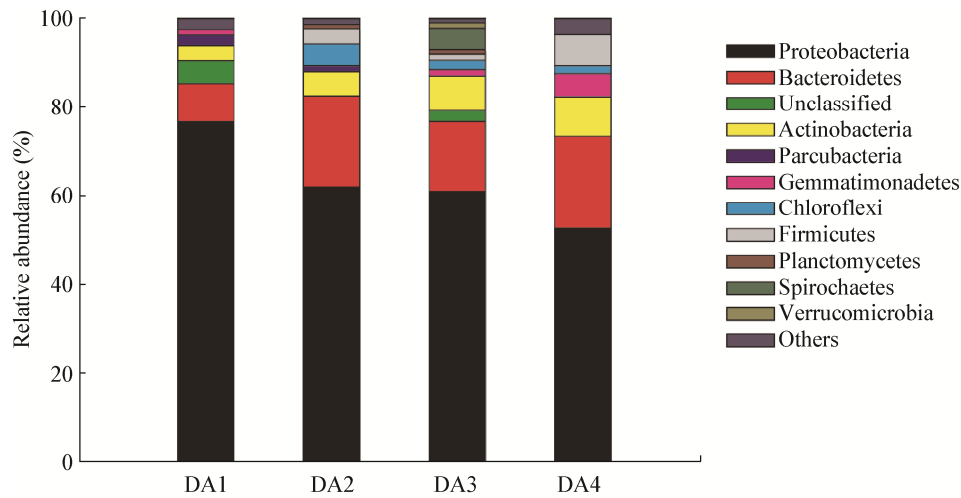


图 2 不同底泥富集培养物门水平的微生物群落组成

Figure 2 The composition of different sediment enrichment samples at phylum

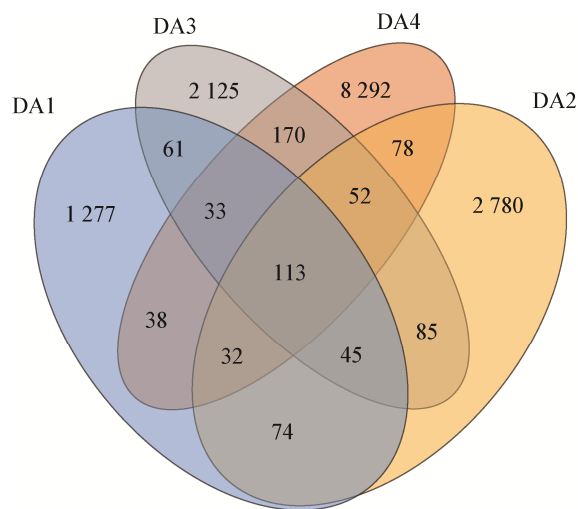


图 3 不同底泥富集样品 OTU 组成文氏图
Figure 3 Venn diagram of OTUs from different sediment enrichment samples

有的 OTU 数量均较高, DA1 所独有的 OTU 占其总数的 76.3%, DA2 为 85.3%, DA3 为 79.2%, DA4 为 94.1%。表明不同样品之间群落组成差异较大, 而通过对共有 OTU 进行统计可以发现, DA1 与 DA2 共有 OTU 数为 264, 与 DA3 共有 OTU 数为 252, 与 DA4 共有 OTU 数为 216; DA2 与 DA3 共有 OTU 数为 295, 与 DA4 共有 OTU 数为 275; DA3 与 DA4 共有 OTU 数为 368。DA3 与 DA4 相同的 OTU 数量最高, DA1 与 DA4 相同的 OTU 数量最低。

2.3 底泥富集样品中氨氧化功能菌群分析

在实验中采用富集氨氧化微生物的培养液进行富集培养, 因此在关注培养物整体微生物群落结构的同时, 对氨氧化功能菌的组成情况进行了特别关注。为了更加深入了解 4 个样品富集培养后氨氧化功能菌群的组成情况, 对氨氧化菌的相对丰度、OTU 数量等进行了分析, 结果如表 3 所示。4 个样品中共检出亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)、亚硝化螺菌属(*Nitrospira*)、亚硝化球菌属(*Nitrosococcus*)、*Nitrososphaera* 4 个属的氨氧化功能类群, 其中 *Nitrososphaera* 属于古菌奇古菌门(Thaumarchaeota); 而亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)、亚硝化螺菌属(*Nitrospira*)属于变形菌门(Proteobacteria) β-变形菌纲(Betaproteobacteria); 亚硝化球菌属(*Nitrosococcus*)属于变形菌门(Proteobacteria) γ-变形菌纲(Gammaproteobacteria)。通过表 3 可知, 不同底泥富集样品中氨氧化功能类群均以亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)为主, 但不同样品其相对丰度、OTU 数量均存在较大差异, 其中 DA1 的 *Nitrosomonas* 相对丰度为 6.82%, 所属的 OTU 数量为 74, 而 DA2 的 *Nitrosomonas* 相对丰度为 21.71%, 所属的 OTU 数量高达 402。另外, 不同底泥富集样品中虽然相对丰度不高, 但均有古菌 *Nitrososphaera* 的检出, 尤其是在 DA4 样品中, 归于 *Nitrososphaera* 的 OTU 数量高达 121。

表 3 不同底泥富集样品氨氧化功能菌群组成情况
Table 3 The composition of ammonia-oxidizing microorganisms from different sediment enrichment samples

Genera	DA1		DA2		DA3		DA4	
	OTUs	Abundance (%)	OTUs	Abundance (%)	OTUs	Abundance (%)	OTUs	Abundance (%)
<i>Nitrosomonas</i>	74	6.820 0	402	21.710 0	121	7.860 0	180	13.560 0
<i>Nitrosococcus</i>	—	—	—	—	—	—	1	0.001 8
<i>Nitrospira</i>	—	—	—	—	—	—	4	0.007 2
<i>Nitrososphaera</i>	1	0.004 1	3	0.004 1	2	0.006 8	121	0.570 0
Total	75	6.820 0	405	21.720 0	123	7.870 0	306	14.140 0

3 讨论与结论

底泥作为水体重要的组成部分,其自身的成分非常复杂,不仅含有动植物残骸、有机物、金属矿物质等,也蕴藏着大量的细菌和古菌^[20]。在本实验中我们对4个来自不同环境的城市河流底泥富集培养物进行高通量测序研究。Sun等^[21]认为原核微生物的单个基因组内经常有16S rRNA基因的多样性,此种基因组内多样性的存在会导致对原核微生物多样性的高估。在进行高通量测序研究中,我们对16S rRNA基因V3-V4区进行扩增测序,在97%相似性水平上进行分析,参照Sun等的研究结果^[21],发现原核微生物的单个基因组内多样性对本次实验原核微生物多样性评估的高估率低于5%,影响有限,表明我们实验的测序数据基本能较好地反映微生物的群落组成情况。在研究中经过高通量测序发现4个来自不同环境的城市河流底泥富集培养物涉及微生物31个门66个纲1 003个属,并存在不少OTU归为Unclassified(图2),表明我们所研究的城市河流底泥中存在丰富的微生物物种资源。一般通过对不同的底泥样品进行富集培养,会使原来混合菌群中优势菌群的门类减少、组成比例增长,我们的实验结果显示4个底泥富集样品中相对丰度超过1%的优势门水平的数量为10个,占总数的三分之一,主要优势类群为变形菌门(Proteobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes),其中,变形菌门相对丰度最高达76.6%。另外,对不同底泥富集样品的群落组成进行对比,可以发现来自不同环境的底泥富集培养物在微生物OTU数量、群落丰度、群落多样性等指标上(表2)存在明显的差异,同时,通过文氏图可以直观地发现,不同底泥富集培养物在OTU组成上存在较大差异,其独有的OTU数量占比相对较大,最低的DA1样品占比也达到76.3%(图3),说明4个底泥富集培养物微生物物种组成存在较大差异。虽然实验中采用的是相同的富集培养方法,但是底泥却来自不同的河道,并且所选择的4条河道周边环境存在较大的差异,DA3和DA4周边存

在生活餐饮污染物的汇入,而DA2和DA1周边没有生活污染物的汇入,但DA2周边栽种有大量的挺水植物荷花,而DA1为盲肠河道,生境相对比较简单。微生物群落作为水体食物网中最复杂的生物群体,对环境的变化会作出迅速的响应,并会调整群落结构以适应生态环境等的变化^[22]。而河道周边环境的差异,往往会使其其中底泥的理化性质出现较大的差异,导致不同河道的底泥往往含有不同的微生物群落组成。同时考虑到采样时间处于汛期,存在大雨和大量地表水进入水系的可能,从而有可能冲刷底泥表面,进而打乱底泥表面的微生物生态体系,使不同来源的底泥表层微生物有趋于相同的可能,因此我们在汛期采集底泥富集培养的结果所显示的这种微生物组成之间的明显差异,更能说明不同环境来源的底泥对富集培养的影响效应。另外,对比不同样品之间共有OTU数量的多少,可以发现均具有生活餐饮污染物汇入的DA3和DA4样品,其共有的OTU数量是最高的,从侧面反映相似的周边环境往往也会使底泥样品中具有相似的微生物群落组成。

本研究采用培养氨氧化微生物的液体培养基进行富集培养,目的在于富集城市河流底泥中的氨氧化微生物。通过富集培养并结合高通量测序,发现不同底泥富集培养物中均检出了氨氧化细菌和氨氧化古菌,且氨氧化功能菌在4个样品中的相对丰度均较高。4个底泥样品总共涉及氨氧化细菌3个属,分别为亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)、亚硝化螺菌属(*Nitrospira*)、亚硝化球菌属(*Nitrosococcus*),涉及氨氧化古菌一个属为*Nitrososphaera*,其中4个底泥样品均以亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)为主,并均含有氨氧化古菌*Nitrososphaera*属的OTU。Gao等对10个污水处理系统活性污泥中氨氧化古菌和细菌的丰度及多样性的研究显示,10个污水处理系统中均含有氨氧化细菌和氨氧化古菌,其中亚硝化单胞菌(*Nitrosomonas*)是10个污水处理系统中氨氧化细

菌的主要种群,氨氧化古菌的优势菌群为 *Nitrososphaera*,另外研究中还发现氨氧化细菌种群比古菌具有更高的多样性^[23]。本研究中发现的氨氧化微生物种群组成与该结果有些类似,这可能是因为所研究的城市河流受到较高的有机物和氮污染物的影响,导致其水环境状况与污水处理系统的比较近似,从而有比较类似的氨氧化微生物种群结构。另外,通过进一步对比4个样品中氨氧化微生物种群的 OTU 数量、组成情况及相对丰度(表3),可以发现不同样品之间存在较大的差异。通过对比我们发现受到生活餐饮污染物污染的河道底泥 DA3、DA4 富集培养物中的氨氧化微生物 OTU 数量及相对丰度比无生活餐饮污染物直接汇入河道底泥样品 DA1 要高,且 DA4 样品中含有最高的氨氧化古菌的 OTU 数量和相对丰度。Racz 等通过 *amoA* 克隆测序、T-RFLP 分析以及 FISH 实验表明与单一有机碳源(葡萄糖)相比,复杂的有机碳源(蛋白胨)会导致更为多样化的氨氧化菌群结构^[24]。Hou 等对太湖、巢湖不同营养梯度下氨氧化细菌和氨氧化古菌的转变情况开展的研究表明,富营养化程度越高氨氧化细菌的丰度、多样性也会越高^[25]。与远离生活餐饮污染的河道相比,受到生活餐饮污染的河道其水体的富营养化程度会更高,并且会受到各种形态有机物的污染,这可能是导致本研究中出现污染相对更为严重的 DA3、DA4 样品与 DA1 样品相比具有更多氨氧化微生物 OTU 数量和丰度的原因。另外,与其他样品相比,栽种有水生植物的河道底泥样品 DA2 具有最高的氨氧化细菌的 OTU 数量及相对丰度,这可能与水生植物根系分泌物有一定的关联。邢鹏等研究了水生植被恢复对底泥氨氧化细菌种群的影响,结果表明水生植物根际氨氧化细菌密度显著高于无水生植物的表层底泥,并且发现尽管不同植物根际氨氧化细菌主要种类有所区别,但基本属于亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*),并认为水生植物根际的氧化环境有利于促进氨氧化作用的发生,其根际微环境对氨氧

化细菌具有一定的富集作用^[26]。这可能是在本研究中,与其他样品相比,DA2 样品出现高的氨氧化细菌 OTU 数量及相对丰度的另一个原因。此外,DA1 与 DA3 位点处于盲肠河道,是个相对静止的环境;相反,DA2 和 DA4 处于联通的河道上,经常有船只航行,是个相对流动的环境。两者相比较,可以发现采自相对流动水体的富集样品 DA2、DA4 具有更高的氨氧化微生物 OTU 数量和相对丰度,这可能是因为流动水体存在更多的物质输移,使其能够接触来源更为多样化的含微生物的物质。通过对这些底泥富集样品中氨氧化微生物组成结构与底泥来源之间进行对比,可以发现富集培养所采用底泥的来源环境与富集培养的结果存在关联。这些研究结果可为氨氧化微生物培养源的选择提供参考。

综上,本研究结果表明,城市河流底泥中存在丰富的微生物物种资源,经过富集培养后主要优势类群为变形菌门(Proteobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes),其中,变形菌门相对丰度最高达 76.6%。4 个底泥富集样品总共涉及氨氧化细菌 3 个属,分别为亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)、亚硝化螺菌属(*Nitrosospira*)、亚硝化球菌属(*Nitrosococcus*),涉及氨氧化古菌的一个属为 *Nitrososphaera*,其中 4 个底泥样品均以亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)为主,但不同底泥富集培养物中氨氧化微生物 OTU 组成存在差异,栽种有水生植物的河道底泥样品 DA2 具有最高的氨氧化细菌 OTU 数量和相对丰度,而存在生活餐饮污染的河道底泥样品 DA4 具有最高的氨氧化古菌 OTU 数量和相对丰度;相较于滞留水体,采自相对流动水体的富集样品 DA2、DA4 具有更高的氨氧化微生物 OTU 数量和相对丰度。

REFERENCES

- [1] Howarth RW, Marino R. Nitrogen as the limiting nutrient for eutrophication in coastal marine ecosystems: evolving views over three decades[J]. *Limnology and Oceanography*, 2006, 51: 364-376
- [2] Dai M, Wang L, Guo X, et al. Nitrification and inorganic nitrogen distribution in a large perturbed river/estuarine system:

- the Pearl River Estuary, China[J]. *Biogeosciences*, 2008, 5(5): 1227-1244
- [3] Sun W, Xia CY, Xu MY, et al. Community structure and distribution of planktonic ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the Dongjiang River, China[J]. *Research in Microbiology*, 2014, 165(8): 657-670
- [4] Song QH, Yang ZF. Thinking of integrated management of urban rivers in China[J]. *Advances in Water Science*, 2002, 13(3): 377-382 (in Chinese)
宋庆辉, 杨志峰. 对我国城市河流综合管理的思考[J]. *水科学进展*, 2002, 13(3): 377-382
- [5] Wobus A, Bleul C, Maassen S, et al. Microbial diversity and functional characterization of sediments from reservoirs of different trophic state[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 46(3): 331-347
- [6] Qu JH, Li BZ, Yuan HL. Methodology in studies of microbial resource in sediment[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(6): 2636-2641 (in Chinese)
屈建航, 李宝珍, 袁红莉. 沉积物中微生物资源的研究方法及其进展[J]. *生态学报*, 2007, 27(6): 2636-2641
- [7] Satoh H, Nakamura Y, Okabe S. Influences of infaunal burrows on the community structure and activity of ammonia-oxidizing bacteria in intertidal sediments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(4): 1341-1348
- [8] Cooper AB. Activities of benthic nitrifiers in streams and their role in oxygen consumption[J]. *Microbial Ecology*, 1984, 10(4): 317-334
- [9] Herrmann M, Scheibe A, Avrahami S, et al. Ammonium availability affects the ratio of ammonia-oxidizing bacteria to ammonia-oxidizing archaea in simulated creek ecosystems[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(5): 1896-1899
- [10] Yanuka-Golub K, Arnon S, Nejdat A. Impact of streambed morphology on the abundance and activity of ammonia-oxidizing bacteria[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 90(1): 175-183
- [11] Horz HP, Barbrook A, Field CB, et al. Ammonia-oxidizing bacteria respond to multifactorial global change[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(42): 15136-15141
- [12] Burgin AJ, Hamilton SK. Have we overemphasized the role of denitrification in aquatic ecosystems? A review of nitrate removal pathways[J]. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2007, 5(2): 89-96
- [13] Mosier AC, Francis CA. Relative abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the San Francisco Bay estuary[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11): 3002-3016
- [14] Qiu ZZ, Luo ZX, Zhao YL, et al. Effect of dissolved oxygen on diversity of ammonia-oxidizing microorganisms in enrichment culture from estuarine wetland surface sediments and ammonia-oxidizing rate[J]. *Environmental Science*, 2013, 34(2): 532-539 (in Chinese)
邱昭政, 罗专溪, 赵艳玲, 等. 溶氧对富集培养的河口湿地表层沉积物氨氧化菌多样性及氨氧化速率的影响[J]. *环境科学*, 2013, 34(2): 532-539
- [15] Ma XX, Wang LC, Liao LL. Spatio-temporal characteristics and source identification of water pollutants in Wenruitang River watershed[J]. *Environmental Science*, 2015, 36(1): 64-71 (in Chinese)
马小雪, 王腊春, 廖玲玲. 温瑞塘河流域水体污染时空分异特征及污染源识别[J]. *环境科学*, 2015, 36(1): 64-71
- [16] Lu P, Mei K, Zhang YJ, et al. Spatial and temporal variations of nitrogen pollution in Wen-Rui Tang River watershed, Zhejiang, China[J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2011, 180(1/4): 501-520
- [17] Li ZG, Luo YM, Teng Y. *Soil and Environmental Microbial Research Method*[M]. Beijing: Science Press, 2008 (in Chinese)
李振高, 骆永明, 滕应. *土壤与环境微生物研究法*[M]. 北京: 科学出版社, 2008
- [18] Jin XC, Tu QY. *Lake Eutrophication Survey Norms*[M]. 2nd ed. Beijing: China Environmental Science Press, 1990 (in Chinese)
金相灿, 屠清瑛. *湖泊富营养化调查规范*[M]. 2版. 北京: 中国环境科学出版社, 1990
- [19] Klindworth A, Priesse E, Schweer T, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(1): e1
- [20] Orcutt BN, Sylvan JB, Knab NJ, et al. Microbial ecology of the dark ocean above, at, and below the seafloor[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2011, 75(2): 361-422
- [21] Sun DL, Jiang X, Wu QL, et al. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(19): 5962-5969
- [22] Paerl HW, Dyble J, Moisaner PH, et al. Microbial indicators of aquatic ecosystem change: current applications to eutrophication studies[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 46(3): 233-246
- [23] Gao JF, Luo X, Wu GX, et al. Abundance and diversity based on amoA genes of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in ten wastewater treatment systems[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(7): 3339-3354
- [24] Racz L, Datta T, Goel R. Effect of organic carbon on ammonia oxidizing bacteria in a mixed culture[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(16): 6454-6460
- [25] Hou J, Song CL, Cao XY, et al. Shifts between ammonia-oxidizing bacteria and archaea in relation to nitrification potential across trophic gradients in two large Chinese lakes (Lake Taihu and Lake Chaohu)[J]. *Water Research*, 2013, 47(7): 2285-2296
- [26] Xing P, Kong FX, Chen KN, et al. Ammonia-oxidizing bacteria community composition at the root zones of aquatic plants after ecological restoration[J]. *Environmental Science*, 2008, 29(8): 2154-2159 (in Chinese)
邢鹏, 孔繁翔, 陈开宁, 等. 生态修复水生植物根际氨氧化细菌的研究[J]. *环境科学*, 2008, 29(8): 2154-2159