分类号: X524

密级:公开

单位代码:10878

学号:20203303045

硕士专业学位论文

(全日制)

论文题目入湖口氮转化功能基因时空分布

特征及其影响因素

专业学位类别工程硕士

专业学位领域土木水利

作者姓名曼亚灿

导师姓名黄健

完成时间2023年02月

入湖口氮转化功能基因时空分布特征及其影响因素

Spatio-temporal Distribution Characteristics and Influencing Factors of Nitrogen Transformation Functional Genes at the Lake Inlet

专业学位类别工程硕士

专业学位领域土木水利

作者姓名曼亚灿

导师姓名黄健

完成时间2023年02月

安徽建筑大学

本论文经答辩委员会全体委员审查，确认符合安徽建筑大学硕士学位论文质量要求。

答辩委员会签名

主席：

委员：

导师：

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得安徽建筑大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名： 签字日期： 年 月 日

导师签名： 签字日期： 年 月 日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解 安徽建筑大学 有保留、使用学位论文的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位属于 安徽建筑大学 。学校有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权 安徽建筑大学 可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。（保密的学位论文在解密后适用本授权书）

学位论文作者签名： 签字日期： 年 月 日

导师签名： 签字日期： 年 月 日

摘要

湖泊水体富营养化是当今中国乃至世界所面临的严峻水环境问题之一,而氮是造成水体富营养化的主要元素。湖泊生态系统具有一定的自我调节能力,过量的氮元素可以通过微生物参与的氮转化过程硝化-反硝化、厌氧氨氧化等得到去除,因此系统内参与氮转化过程的功能微生物成为解决富营养化水体氮污染的关键因素之一。微生物参与的氮转化过程从本质上受到功能基因的调控,通过分子生物学技术对氮转化功能基因进行研究可以绕过传统微生物分离培养的局限性,并从核酸水平解释微生物群落变化特征。探究湖泊中氮转化功能基因的时空分布特征及其影响因素有利于进一步揭示湖泊生态系统内氮转化过程的深层次机理,并为富营养化湖泊水体的氮污染防治工作提供科学理论基础。

研究以富营养化巢湖三个入湖口为研究对象,通过在不同季节对南淝河、派河、杭埠河入湖口处上覆水与沉积物进行采样,对COD、氮磷营养盐、粒径以及溶解性有机质等指标进行测定,并对入湖口沉积物中的细菌基因组DNA进行提取,利用分子生物学QPCR技术对参与硝化-反硝化、厌氧氨氧化以及固氮过程的功能基因进行绝对定量分析,在此基础上利用主成分分析、Mantel Test等统计学方法对巢湖入湖口氮转化功能基因丰度的时空变化特征以及不同时期下氮转化功能基因与环境因子之间的相关性做出讨论。实验研究结果表明:

(1)巢湖入湖口上覆水氮污染较为严重,枯水期三个入湖口TN指标均已超过Ⅴ类水标准,平水期污染状况有所缓和,丰水期水质最好。入湖口沉积物TN、TP指标时间上呈现出由枯水期到丰水期不断升高的趋势,空间上杭埠河入湖口沉积物TN、TP相对较高。入湖口沉积物粒径百分比分布显示,枯水期杭埠河入湖口处粒径大于79.433μm的沉积物颗粒占比较多;平水期三个入湖口的粒径百分比分布差异性较小;枯水期南淝河入湖口处粒径小于52.481μm的沉积物颗粒占比较多。入湖口沉积物DOM主要成分以蛋白质为主,不同组分占比的时空差异性较小;而DOM总荧光强度的季节差异性较明显,三个入湖口都在平水期达到最高值,然后再在丰水期出现大幅下降。环境因子PCA分析结果显示,上覆水水质时空差异性较为明显,TN、NH4+、COD、T四项指标是对巢湖入湖口上覆水进行时空差异性划分的决定性因子;TP、DOM指标是入湖口沉积物环境进行时空差异性划分的决定性因子。

(2)功能基因QPCR结果显示,总细菌功能基因Bacterial 16S rRNA、古细菌功能基因Archaeal 16S rRNA丰度值由枯水期到丰水期出现略微升高的趋势,Bacterial 16S rRNA丰度值在1012数量级;Archaeal 16S rRNA丰度值在107~108数量级。硝化功能基因中nxrA丰度最高,在平水期与丰水期可以达到109数量级;AOB\_amoA丰度的时空差异性并不明显,平均值在4.83E+05 copies/g左右;AOA\_amoA丰度在丰水期杭埠河入湖口样本点中最高,达到2.07~9.39E+07 copies/g。反硝化功能基因中narG、napA、nirK都出现由枯水期到丰水期不断升高的趋势;但nirS在枯水期的丰度值最高,达到108数量级;nosZ、norB基因丰度都在丰水期大幅升高,分别达到6.14E+07~1.07E+09、1.80~16.93E+06 copies/g。厌氧氨氧化功能基因hzsA、hzsB、hzo在枯水期都维持在较低水平,hzsA、hzsB丰度最高值出现在丰水期杭埠河,达到107数量级;hzo丰度一直处于较低水平,仅有104~105。枯水期固氮功能基因nifH的丰度值在104左右,枯水期与丰水期升高至106左右。

(3)相关性分析表明,枯水期pH与硝化功能基因AOA\_amoA、反硝化功能基因nirK、nosZ以及固氮功能基因nifH都呈现负相关关系,说明枯水期弱碱性的pH可能会对入湖口沉积物环境中的硝化-反硝化作用以及固氮作用产生抑制;平水期反硝化功能基因与粒径指标d0.5、d0.9、(d0.9- d0.1)/d0.5呈现负相关关系,丰水期反硝化功能基因与粒径指标d0.5、d0.9呈现负相关关系,说明巢湖入湖口沉积物环境中的反硝化功能微生物更适宜在粒径较小且粒径均匀程度较高的环境内生存;厌氧氨氧化功能基因受到了DO、T以及DOM等多种环境因子的抑制作用,导致在三个时期内hzo基因丰度一直处于较低水平。

图[23]表[10]参[143]

关键词:巢湖入湖口;氮转化功能基因;Mantel 检验;主成分分析

分类号:X524

Abstract

The eutrophication of lake water is one of the serious water environment problems that China and the world are facing today, and nitrogen is the main element that causes eutrophication of water. The lake ecosystem has a certain self-regulation ability, and excess nitrogen can be removed through the nitrogen transformation process involving microorganisms such as nitrification-denitrification, anaerobic ammonium oxidation, etc. One of the key factors of water nitrogen pollution. The nitrogen conversion process that microorganisms participate in is regulated by functional genes in essence. The study of nitrogen conversion functional genes by molecular biology techniques can bypass the limitations of traditional microbial isolation and culture, and explain the characteristics of microbial community changes from the nucleic acid level. Exploring the temporal and spatial distribution characteristics of nitrogen transformation functional genes in lakes and their influencing factors will help to further reveal the deep-level mechanism of nitrogen transformation in lake ecosystems, and provide a scientific theoretical basis for the prevention and control of nitrogen pollution in eutrophic lake water.

The study took the three inlets of Chaohu Lake with eutrophication as the research object. By sampling the overlying water and sediments at the inlets of the Nanfei River, Pai River, and Hangbu River in different seasons, COD, nitrogen and phosphorus nutrients, Particle size and dissolved organic matter and other environmental factor indicators were measured, and the bacterial genome DNA in the sediment was extracted, and molecular biology QPCR technology was used to conduct absolute quantitative analysis of microbial functional genes involved in nitrogen transformation. Statistical methods such as component analysis and Mantel Test were used to discuss the temporal and spatial variation characteristics of the abundance of nitrogen transformation functional genes at the entrance of Chaohu Lake and the correlation between nitrogen transformation functional genes and environmental factors in different periods. Experimental research results show that:

(1) Nitrogen pollution in the overlying water at the inlet of Chaohu Lake is relatively serious. The TN indicators of the three lake inlets in the dry season have exceeded the standard for Class V water. The TN and TP indicators of the estuary sediments showed a rising trend from the dry season to the wet season in time, and the TN and TP of the Hangbu River estuary sediments were relatively high spatially. The particle size distribution of the estuary sediments shows that the sediment particles with a particle size larger than 79.433μm at the estuary of the Hangbu River in the dry season account for a large proportion; The sediment particles with a particle size smaller than 52.481μm at the mouth of the Nanfei River accounted for a large proportion. The total fluorescence intensity of DOM in the sediments at the estuary of the lake reaches the highest in the flat water period, and drops sharply in the wet season; the main component of DOM is mainly protein, and the temporal and spatial differences in the proportion of different components are small, while the total fluorescence intensity of DOM The seasonal differences of the three lake inlets all reached the highest value in the flat water period, and then dropped sharply in the wet season. The results of PCA analysis of environmental factors show that the temporal and spatial differences of the overlying water quality are more obvious, and the four indicators of TN, NH4+, COD, and T are the decisive factors for the division of the temporal and spatial differences of the overlying water at the entrance of Chaohu Lake; Determinant factors for temporal and spatial differentiation of lake mouth sediment environment.

(2) The QPCR results of functional genes showed that the abundance of Bacterial 16S rRNA and Archaeal 16S rRNA showed a slight increase from dry season to wet season, and the abundance of Bacterial 16S rRNA was on the order of 1012; The abundance of 16S rRNA in Archaeal was in the order of 107~108. Among the nitrification functional genes, nxrA has the highest abundance, which can reach the order of 109 in the normal and high water seasons; the spatio-temporal difference in the abundance of AOB\_amoA is not obvious, with an average of about 4.83E+05 copies/g; The highest among the sample points at the estuary of the Hangbu River in the early period reached 2.07~9.39E+07 copies/g. Among the denitrification functional genes, narG, napA, and nirK all showed a rising trend from the dry season to the wet season; but the abundance of nirS was the highest in the dry season, reaching an order of magnitude of 108; the abundances of nosZ and norB genes were significantly increased in the wet season increased, reaching 6.14E+07~1.07E+09 and 1.80~16.93E+06 copies/g respectively. The anammox functional genes hzsA, hzsB, and hzo all maintained at a low level in the dry season, and the highest abundance values of hzsA and hzsB appeared in the Hangbu River in the wet season, reaching an order of magnitude of 107; the abundance of hzo was always at a low level, only There are 104~105. The abundance value of nitrogen fixation functional gene nifH was about 104 in dry season, and increased to about 106 in dry and wet seasons.

(3) Correlation analysis showed that the pH in the dry season was negatively correlated with the nitrification functional gene AOA\_amoA, the denitrification functional gene nirK, nosZ and the nitrogen fixation functional gene nifH. The nitrification-denitrification and nitrogen fixation were inhibited; the denitrification functional genes in the flat water period showed negative correlation with the particle size indicators d0.5, d0.9,(d0.9-d0.1)/d0.5, and the abundance There is a negative correlation between the denitrification functional genes and the particle size indicators d0.5 and d0.9 in the water season, indicating that the denitrification functional microorganisms in the sediment environment at the entrance of Chaohu Lake are more suitable for smaller particle size and higher particle size uniformity. Survival in the environment; ANAMMOX functional genes were inhibited by various environmental factors such as DO, T and DOM, resulting in a low level of hzo gene abundance in the three periods.

Figure[23] Table[10] Refer[143]

Key words: the entrance of Chaohu Lake; functional genes for nitrogen transformation; Mantel test; principal component analysis

Classification number: X524

目 录

摘要 I

Abstract III

目 录 VI

插图目录 IX

插表目录 X

第一章 绪论 1

1.1 前言 1

1.2 研究背景 5

1.3 研究内容、目标及拟解决的关键问题 7

1.3.1 研究内容 7

1.3.2 研究目标 8

1.3.3 拟解决的关键问题 8

1.4 创新点与技术路线图 9

1.4.1 创新点 9

1.4.2 技术路线图 9

第二章 实验及分析方法 11

2.1 样品采集 11

2.1.1 湖泊上覆水样品的采集 12

2.1.2 湖泊沉积物样品的采集 12

2.2 实验前样品的预处理 12

2.2.1 上覆水预处理 12

2.2.2 沉积物预处理 12

2.3 理化指标测定方法 13

2.3.1 上覆水理化指标的测定 13

2.3.2 沉积物理化指标的测定 13

2.4 QPCR实验方法 14

2.4.1 引物的选择 14

2.4.2 沉积物基因组DNA提取 18

2.4.3 PCR扩增 18

2.4.4 凝胶产物的回收与纯化 19

2.4.5 标准曲线的建立 19

2.4.6 沉积物DNA提取样品Q-PCR实验 20

2.5 实验仪器与设备 20

2.6 统计学分析方法 21

2.6.1 特征标准化 21

2.6.2 主成分分析 22

2.6.3 Mantel检验 23

2.6.4 开发环境 24

第三章 入湖口环境因子时空变化特征分析 25

3.1 前言 25

3.2 上覆水环境因子时空变化特征 25

3.3 沉积物环境因子时空变化特征 27

3.3.1 沉积物TN、TP时空变化 27

3.3.2 沉积物粒径时空变化特征 28

3.3.3 沉积物DOM时空变化特征 29

3.4 环境因子PCA分析 32

3.4.1 关键因子分析 32

3.4.2 可视化分析 35

3.5 本章小结 36

第四章 沉积物功能基因时空变化特征分析 38

4.1 前言 38

4.2 不同时期下功能基因空间差异性分析 39

4.2.1 枯水期功能基因空间差异性分析 39

4.2.2 平水期功能基因空间差异性分析 40

4.2.3 丰水期功能基因空间差异性分析 42

4.3 功能基因PCA分析 44

4.3.1 关键功能基因分析 44

4.3.2 可视化分析 46

4.4 本章小结 47

第五章 不同季节功能基因与环境因子相关性分析 49

5.1 前言 49

5.2 枯水期功能基因与环境因子相关性分析 49

5.2.1 相关性网络图分析 49

5.2.2 Mantel Test分析 51

5.3 平水期功能基因与环境因子相关性分析 52

5.3.1 相关性网络图分析 52

5.3.2 Mantel Test分析 53

5.4 丰水期功能基因与环境因子相关性分析 54

5.4.1 相关性网络图分析 54

5.4.2 Mantel Test分析 55

5.5 本章小结 56

第六章 结论与展望 58

6.1 结论 58

6.2 展望 59

致谢 67

作者简介及研究生期间主要科研成果 68

插图目录

图 一1 参与硝化-反硝化、厌氧氨氧化以及固氮过程的功能基因2

图 一2 2021年巢湖流域水质分布图[5] 6

图 一3 技术路线图 10

图 二1 入湖口空间位置分布图 11

图 三1 上覆水环境因子时空变化图 26

图 三2 沉积物TN、TP时空变化图 27

图 三3 入湖口沉积物粒径百分比分布时空变化图 28

图 三4 入湖口沉积物粒径等级分布图 29

图 三5 沉积物DOM光谱各分区Pi,n百分比分布图 30

图 三6 沉积物DOM光谱各分区积分标准体积分布图 31

图 三7 DOM荧光光谱特征参数时空变化 32

图 三8 环境因子PCA可视化分析图 36

图 四1 枯水期各入湖口功能基因丰度图 40

图 四2 平水期各入湖口功能基因丰度图 42

图 四3 丰水期各入湖口功能基因丰度图 44

图 四4 功能基因PCA可视化分析图 47

图 五1 枯水期功能基因与环境因子相关性网络图 50

图 五2 枯水期氮转化功能基因与环境因子Mantel检验图 52

图 五3 平水期功能基因与环境因子相关性网络图 53

图 五4 平水期氮转化功能基因与环境因子Mantel检验图 54

图 五5 丰水期功能基因与环境因子相关性网络图 55

图 五6 丰水期氮转化功能基因与环境因子Mantel检验图 56

插表目录

表 二.1 取样点经纬度范围表 11

表 二.2 上覆水理化指标测定方法表 13

表 二.3 功能基因引物设计表 15

表 二.4 功能基因对应的PCR扩增程序表 18

表 二.5 实验所用仪器与设备 20

表 三.1 三维荧光光谱图区域划分表 30

表 三.2 上覆水环境因子PCA分析方差解释表 32

表 三.3 沉积物环境因子PCA分析方差解释表 33

表 四.1 氮转化功能基因PCA分析方差解释表 45

第一章绪论

1.1前言

湖泊水生态系统与人类社会生活息息相关,其在水力发电、渔业养殖、城市供水、水路航运以及旅游资源开发等方面都发挥着不可替代的作用,是国民经济发展的重要保障。同时,湖泊水生态系统也是重要的国土资源,调查结果显示中国面积大于1.0 km2的湖泊共有2928个,合计总面积91019.6 km2,达到国土面积的0.9%[1]。自上世纪70年代开始,很多地区都在发展自身经济的同时却忽视了对湖泊水生态环境的保护,进而导致人类生产活动对其干扰逐渐加剧,氮营养盐等污染物浓度逐渐升高。由于我国大部分湖泊都属于封闭性水体,流动性较差,当外源污染物的输入量远远超出其自身的净化能力时,就会引起水质恶化、生物多样性锐减、系统生态功能退化以及水体富营养化等一系列水生态问题,严重影响了流域内人居生活满意度的提高以及社会经济的可持续性发展[2]。近些年来,虽然湖泊水环境保护得到了国家的高度重视并投入大量金用于生态修复,但治理效果并不理想,湖泊水体营养化现象依然广泛存在[3-6]。

氮素是引起水体富营养化的主要元素,且湖泊生态环境中的氮转化过程主要由微生物驱动,因此参与氮转化过程的功能微生物成为治理富营养化水体氮污染的关键因素。湖泊生态系统中的氮转化过程主要包括硝化-反硝化、厌氧氨氧化以及氮固定等,微生物参与的氮转化过程从本质上受到功能基因的调控,因此可以通过研究氮转化功能基因去从本质上揭示湖泊生态系统氮转化过程中的深层次机理[7]。硝化-反硝化和厌氧氨氧化过程是湖泊生态系统内去除氮的主要方式[8],参与该过程的功能基因主要是有硝化功能基因(AOA、AOB、nxrA)[9,10]、反硝化功能基因(narG、napA、nirK、nirS、nosZ、norB)[11-13]以及厌氧氨氧化功能基因(hzsA、hzsB、hzo)[14,15]。除此之外,沉积物中还含有大量参与固氮过程的微生物,nifH功能基因在其中发挥着重要作用[16]。

图一1参与硝化-反硝化、厌氧氨氧化以及固氮过程的功能基因

硝化-反硝化脱氮过程是湖泊生态系统中N去除的途径。

在有氧条件下,自养型亚硝酸菌(氨氧化菌)首先把氨态氮转化为亚硝态氮,然后再由硝酸菌把亚硝态氮转化为硝态氮的过程被称为硝化作用。氨氧化菌包括氨氧化古细菌(Ammonia-oxidizing archaea, AOA)和氨氧化细菌(Ammonia-oxidizing bacteria, AOB)[17-19]。AOA是湖泊沉积物中的优势种,数量可以达到AOB的10倍甚至上万倍以上,造成这种差异的主要原因是AOB对环境因子的变化更为敏感[20,21]。虽然在湖泊沉积物中AOA的丰度往往更高,但AOB群落丰度却与潜在硝化速率(Potential nitrification rate, PNR)呈现极显著的正相关关系[9]。氨单加氧酶(ammonia monooxygenase, AMO)和羟胺氧化还原酶(hydroxylamine oxidoreductase, HAO)是氨态氮转化为亚硝态氮过程中的关键生物酶,其中三聚体膜结合蛋白AMO由amoA、amoB、amoC基因所编码的α、β、γ三个亚基所组成。而amoA由于其在功能结构上保守性较强的优点,在微生物遗传多样性分析方面有相当的优势,因此经常被用于氨氧化菌的分子标记[18,19]。参与亚硝态氮氧化反应的微生物主要是亚硝酸盐氧化菌(Nitrite-oxidizing bacteria, NOB),亚硝酸盐氧化菌和氨氧化菌以协同作用共存。亚硝酸盐氧化酶(NXR)的作用是催化进一步氧化为,nxrA是该过程中的关键性功能基因,常被作为研究NOB多样性的参考基因[22]。上覆水与沉积物中环境因子的差异性会导致相关功能微生物以及基因的分布与丰度产生变化[4,23]。张惠淳等采用变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术对官厅水库水体和底泥中的硝化功能微生物群落进行检测发现,由于水体和底泥环境的差异性,导致其中的硝化功能菌群的群落结构以及多样性指数都存在明显的差异,AOB菌群在上覆水和底泥中的多样性没有表现出较大的差异,但NOB优势种群多集中在上覆水中[24]。Hou等使用QPCR技术对中国典型富营养化湖泊巢湖与太湖中的硝化功能基因进行研究发现,AOA与AOB的丰度对水体富营养化程度表现出相反的变化趋势,从中营养区域到富营养区域,AOA丰度逐渐下降,而AOB丰度与多样性都逐渐上升[25]。

兼性厌氧的硝酸盐还原菌将硝化作用产物硝酸盐依次还原为NO、NO2、N2的过程称为反硝化作用。与硝化菌不同,在微生物学中反硝化菌并没有一个专门的类群,完整的反硝化过程是由多种反硝化功能菌共同配合完成[26]。反硝化阶段由4种生物酶进行催化,分别是硝酸还原酶Nar、亚硝酸还原酶Nir、一氧化氮还原酶Nor和一氧化二氮还原酶Nos,它们分别由narG与napA、nirS与nirK、norB、nosZ基因编码[7,27]。硝酸盐还原作用既可以被膜靠硝酸盐还原酶(NarG)催化,也可以被可溶性细胞质硝酸盐还原酶(NapA)催化,硝酸还原酶Nar的主要作用是将硝酸盐催化至亚硝酸盐,在这个过程中narG与napA分别编码Nar酶的关键功能基因,因此硝酸盐还原酶编码基因narG及napA经常被用于对反硝化菌进行分子生物学的研究[11,28]。亚硝酸还原酶Nir负责将亚硝酸盐催化为一氧化氮,这一步是反硝化过程中的限速步骤,nirS和nirK常被用作研究这一过程的标记基因[29]。一氧化氮还原酶Nor负责催化NO转化为N2O,常被用于研究温室气体N2O排放和城市污水处理厂生物处理过程中的污泥膨胀问题[30]。Nor酶包含两个亚基:NorB亚基和NorC亚基,其中NorB亚基由norB基因编码且具有催化活性[31]。反硝化过程的最后一步由一氧化二氮还原酶Nos催化N2O转化为N2,因此编码Nos酶的nosZ基因可以用作检测环境系统内反硝化过程是否完全进行的标记基因[12,28]。生态系统中环境因子会对微生物的新陈代谢等生命活动产生影响,进而影响到系统内的整个物质循环过程。Hang等对武汉东湖沉积物中的反硝化与厌氧氨氧化功能基因进行研究发现,与含量对参与反硝化过程氮转化功能基因nirK、nirS、hzsB的影响最为显著,且充足含量的可以显著提高湖泊沉积物中反硝化与厌氧氨氧化进程的脱氮速率[8]。Zhang等通过对淮河流域沉积物的大规模调查研究发现,总氮和N:P是反硝化功能基因的关键影响因子,且nirS比nirK、nosZ功能基因更容易受到环境因子的影响作用[32]。夏瑜等对污水生物处理MBR与OD工艺对比研究发现,不同工艺中环境因子的差异性导致其中的微生物功能基因也存在一定的差异性[33]。Wu等研究了洪湖中淹没植被对沉积物氮循环细菌群落的影响,发现C:N对nirS+nirK+nosZ组合细菌的丰度有显著影响[34]。

厌氧氨氧化是指在厌氧环境中和发生歧化反应生成N2的过程[35]。大量研究表明厌氧氨氧化反应广泛存在于海洋[36]、湖泊[37]、土壤[38]、污水处理厂[39]等生态系统的氮转化过程中。厌氧氨氧化过程由3种生物酶催化进行,分别是亚硝酸还原酶Nir、联氨合成酶Hzs和联氨氧化酶Hzo。其中有关厌氧氨氧化菌nir基因多样性的研究较少[12];编码Hzs酶的功能基因hzsA和hzsB尚未在其它微生物基因组发现,因此可以作为厌氧氨氧化菌的特异性分子标记,多用于微生物多样性和定量检测相关研究[40];hzo基因负责编码厌氧氨氧化菌的Hzo酶,相对于nir和hzs基因,hzo功能基因具有更高的特异性与高效性,因此hzo更广泛地被应用于厌氧氨氧化功能微生物多样性以及群落结构的相关研究中[40,41]。Weng等对多种修复技术下城市河流生态系统中氮转化微生物的群落特征和遗传多样性进行研究发现,hzsB功能基因菌属Candidatus Jettenia与Alloactinosynnema对与C:N的相关性完全相反,Candidatus Jettenia与呈现正相关性与C:N呈现显著负相关,而Alloactinosynnema与呈现负相关与C:N呈现极显著正相关[42]。Wang等对长江入海口到东海沉积物环境中的厌氧氨氧化功能基因hzsB进行研究发现,hzsB基因丰度由入海口到东海呈现不断升高的趋势,盐分和营养物是造成厌氧氨氧化功能菌分布差异性的主要因素[43]。

固氮微生物是氮转化过程中十分重要的功能菌,nifH基因负责编码固氮酶一个多亚基的金属蛋白酶。nifH是所有固氮微生物中含有的最保守的功能基因,且分布范围广泛[44]。Li等对受砷污染的表层土壤和河流沉积物进行研究发现,nifH基因与砷污染同步出现,Thiobacillus、Anaeromyxobacter菌属分别是土壤、沉积物环境中的砷依赖型固氮微生物[45]。Fan探究了不同施肥条件下黄土高原半干旱地区耕地中nifH基因丰度的变化,研究结果发现相比于多样性,nifH基因的丰度对土壤团聚体更加敏感,且nifH基因和β多样性共同影响农作物的产量[46]。Kaela对北美地区五大湖中的nifH型菌进行研究发现,氮固定速率与叶绿素a浓度呈现正相关关系,而与、浓度呈现负相关关系[47]。微生物是湖泊生态系统氮转化过程中的重要组成部分,从分子生物学功能基因的角度对氮转化过程进行研究绕过了传统微生物分离培养方法的局限性,可以更全面的了解氮转化过程中微生物的作用机理。

不同时空下生态系统内环境因子的异质性为微生物提供了具有差异性的生态环境,而差异性的生态环境是生物多样性的基础[48,49]。环境因子的时空差异性会对微生物以及功能基因的分布与丰度产生影响[50,51]。了解湖泊中氮转化微生物功能基因随环境因子改变而产生的响应,这对全面认识湖泊氮循环的影响因素有着积极的意义,因此亟需对湖泊生态系统中氮转化功能基因的时空变化特征及其影响因素进行深入研究。目前,大部分关于氮转化功能基因的研究多集中在对硝化-反硝化[27,52,53]、厌氧氨氧化[37]等某一特定氮转化过程进行分析,但湖泊水生态系统中的氮转化过程是非常复杂的,发生在其中的氮转化过程是所有氮转化相关功能基因共同作用的结果,单独研究某一特定过程的功能基因显然不能全面揭示完整的氮转化规律。分析巢湖入湖口沉积物中氮转化功能基因丰度的时空变化特征及其影响因素是探究湖泊水体富营养化问题产生原因过程中亟需解决的关键性科学问题,更是实现生物治理湖泊氮污染、实现其持久并且高效生物脱氮的重要理论基础。

PCR技术和QPCR技术是分子生物学中对微生物功能基因进行研究的有效方法。PCR技术的主要步骤是将高温变性、低温退火(复性)及适温延伸等反应设置为一个周期循环进行,从而使得目的基因可以进行迅速扩增以获得大量特定目的基因[54]。实时荧光定量PCR(Quantitative polymerase chain reaction, QPCR)是指在PCR反应体系中加入荧光染料或荧光标记的特异性的探针,并根据荧光信号的变化来实时监测整个反应进程,实现对PCR产物进行标记跟踪,最后通过制作标准曲线实现对未知样品中的功能基因丰度进行定量分析。国内外学者采用分子生物学PCR技术对土壤[55]、海洋[56]、森林[57]、湿地[58]、河流[59]、湖泊[60]、污水处理厂[61]等系统中的功能基因进行了一系列的定量或者定性分析。在湖泊氮转化功能基因方面的相关研究中,以往多集中在单一时期或者仅在湖泊内部区域取点。而针对于类似巢湖的半封闭性浅水湖泊,其水量、水质都受到入湖河流的调控与影响,入湖口作为连接河流与湖泊的唯一通道,具有其独特的重要性。因此探究巢湖入湖口沉积物环境中氮转化功能基因的时空分布特征,阐明不同时期下环境因子对氮转化功能基因丰度的影响作用,有利于进一步开发和利用巢湖流域微生物资源、更好地发挥氮转化微生物自身的净化作用、保护巢湖流域水体的生态环境,具有重要的环境保护和社会经济意义。

研究以巢湖西部南淝河、派河、杭埠河入湖口为研究对象,在不同汛期内对三个不同入湖口的上覆水与沉积物进行取样,通过分子生物学QPCR技术对沉积物中氮转化功能基因进行定量分析,并对上覆水与沉积物中的多项理化指标进行检测。使用主成分分析对功能基因与环境因子的时空差异性进行分析,再结合Mantel Test等统计学方法,探究不同季节下氮转化功能基因与环境因子之间的相关性并对氮转化功能基因丰度的影响因素进行分析。研究有利于进一步揭示湖泊生态系统氮转化过程中微生物的作用机理,对做好巢湖生态系统内的氮污染防治工作有非常重要的实际意义。

1.2研究背景

巢湖位于长江中下游安徽省中部,是中国唯一临近省会城市的五大淡水湖。湖泊面积825平方公里,流域面积13486平方公里,其流域包含周围合肥、安庆、马鞍山、六安等5市16县,承担着防洪、供水、交通、渔业以及旅游等多种生态功能。自上世纪七十年代以来,伴随着湖域周围城镇化进程的不断推进,工业废水、农业生产废水以及居民生活污水大量产生并随入湖河流进入巢湖。巢湖属于人工控制的半封闭性水域,湖水主要靠西部入湖河流补给,其入湖河流大部分都经过城镇、工业和农村区域,这也就导致多年以来大量污染物经入湖河流排入湖泊内,进而造成水体富营养化现象的发生,严重地限制了当地社会和经济的可持续发展,引起了当地政府和国家的极大重视。自上世界80年代以来,安徽省政府就开始对巢湖水体富营养化进行治理,随着国家环保政策的完善,外源污染输入已经逐步得到了有效控制,但是水体富营养化现象仍有发生[62]。2022年5月,中华人民共和国生态环境部公布的《2021年中国生态环境状况公报》显示,巢湖整体上仍处于轻度污染状态,其中西半湖为中度富营养。巢湖作为合肥市打造"大湖名城"的一张城市名片,其水体富营养化现象的发生严重影响了社会、经济和环境的可持续发展。

图一22021年巢湖流域水质分布图[5]

巢湖流域内各水系主要是以西水补给,杭埠河、派河、南淝河是巢湖西部主要的入湖河道,三条河流径流量占流域总径流量的80%以上,其中杭埠河注入巢湖水量最大,其次为南淝河,分别占总径流量的65.1%和9.4%。南淝河是合肥市的母亲河,也是合肥市唯一通航的河道,其上游的董铺水库是合肥市区的水源地之一,作为穿越合肥市城区的主要支流,有着其特殊的地位和重要性[63]。派河位于巢湖西北部,属于一级支流,是我国"引江济淮"工程的重要输水通道,其水质的优劣直接对巢湖水质安全以及"引江济淮"工程都有着重要影响[64]。杭埠河是巢湖流域水量最大、流域面积最广的入湖河流,其也是巢湖底泥沉积物的主要来源,其对巢湖入湖泥沙的贡献率可以达到50%以上[65]。南淝河、派河、杭埠河作为巢湖西半湖的主要入湖河流,其水质将直接影响到巢湖的水质,研究这些河流入湖口沉积物环境中氮转化功能基因的时空分布特征及其影响因素,对巢湖水质尤其是巢湖西半湖的氮污染防治具有十分重要的作用。

目前针对巢湖的研究多集中在流域污染现状以及治理措施等方面,而针对氮转化功能基因时空分布特征及其影响因素的研究相对较少。湖泊沉积物中微生物参与的氮转化过程从本质上受到功能基因的调控,本研究从分子生物学角度入手,利用荧光定量PCR技术测定不同汛期下巢湖三个入湖口沉积物中氮转化功能基因的绝对丰度,然后结合主成分分析、Mantel Test、Pearson相关性分析等统计学方法揭示富营养化巢湖入湖口沉积物环境中氮转化功能基因丰度的时空变化特征并对不同季节下氮转化功能基因与环境因子的相关性进行探究,为推动湖泊氮转化功能基因在参与湖泊可利用氮吸收和转化机制等方面的研究提供科学依据,为湖泊氮转化的驱动作用研究提供基因层面的理论基础。

1.3研究内容、目标及拟解决的关键问题

1.3.1研究内容

(1)不同时期不同入湖口沉积物与上覆水中理化指标的时空差异性特征分析

分汛期对巢湖入湖口上覆水和沉积物进行系统采样,对上覆水指标TN、、、、COD、DO、T,沉积物指标TN、TP、溶解性有机质以及粒径进行检测,利用PCA方法分析入湖口上覆水、沉积物环境的时空差异性,揭示巢湖入湖口氮磷营养盐、溶解性有机质、粒径等指标的时空分布特征。

(2)不同时期不同入湖口沉积物中氮转化功能基因的定量分析

对沉积物微生物DNA进行提取,通过PCR与凝胶电泳实验对基因引物Bacterial 16S rRNA、Archaeal 16S rRNA、AOA\_amoA、AOB\_amoA、nxrA、narG、napA、nirK、nirS、nosZ、norB、hzsA、hzsB、hzo、nifH的特异性进行检验,通过制作标准品来确定各个功能基因的标准曲线,然后使用荧光定量PCR仪对样本中的氮转化功能基因进行定量检测,利用PCA方法分析入湖口沉积物中氮转化功能基因的时空差异性,揭示巢湖入湖口沉积物中氮转化功能基因绝对丰度的时空变化特征。

(3)不同季节下氮转化功能基因影响因素研究

在前两步研究的基础之上,采用Mantel Test、Pearson相关性分析等统计学方法,对不同季节下沉积物氮转化功能基因与环境因子之间的相关性进行分析,揭示不同季节下环境因子对氮转化功能基因的影响作用。

1.3.2研究目标

湖泊水体中的氮形态转化与氮转化功能基因息息相关,而分子生物学PCR技术是对氮转化功能基因进行定量与定性分析的重要手段。本研究对巢湖不同季节不同入湖口(南淝河、派河、杭埠河)的沉积物与上覆水进行采样分析,通过分子生物学QPCR技术对巢湖入湖口沉积物中的氮转化功能基因进行定量分析,并对沉积物与上覆水中的多项指标进行检测,结合Mantel Test、主成分分析等统计学方法,分析巢湖入湖口氮转化功能基因的时空变化特征以及不同季节下氮转化功能基因与环境因子之间的相关性。

湖泊水体氮污染仍然是全球所面临的严峻水环境问题之一。合肥市是中国唯一独立怀拥五大淡水湖之一的省会城市,巢湖作为合肥市打造"大湖名城"的一张城市名片,其水质直接或间接地影响着合肥市社会、经济的发展。通过对巢湖入湖口氮转化功能基因时空变化特征及其影响因子的分析,可以从分子生物学角度揭示湖泊沉积物中环境因子对氮转化过程的影响作用,从而为富营养化湖泊氮污染防治提供重要的理论依据。

1.3.3拟解决的关键问题

(1)巢湖入湖口沉积物环境中氮转化功能基因的丰度变化以及关键功能基因

通过选取富营养化巢湖西部的三个主要入湖口为研究对象,从时间和空间两个尺度对氮转化功能基因丰度进行定量分析,明确参与硝化-反硝化、厌氧氨氧化以及固氮作用功能基因的丰度变化,结合主成分分析、聚类分析等统计学方法,分析富营养化湖泊沉积物环境中氮转化功能基因丰度的时空变化特征并对关键功能基因进行筛选。

(2)驱动巢湖入湖口环境中氮转化功能基因的影响因素

相关性分析是探究不同季节下氮转化功能基因影响因素的关键方法。本研究通过测定上覆水中TN、、、、COD、DO、T,沉积物TN、TP、溶解性有机质以及粒径等理化指标,结合Mantel Test、Pearson相关性分析探究巢湖入湖口沉积物中氮转化功能基因的主要影响因素。

1.4创新点与技术路线图

1.4.1创新点

从时间和空间两个维度对巢湖入湖口沉积物中氮转化功能基因丰度的时空变化特征及其在不同季节下的影响因素进行了全面、系统的分析。

1.4.2技术路线图

在不同季节对富营养化巢湖三个主要入湖口(杭埠河、南淝河、派河)的沉积物与上覆水进行野外采样,当天低温运送至实验室,对上覆水TN、、、、COD、DO、T以及沉积物TN、TP、DOM、粒径等多项理化指标进行检测。对沉积物微生物DNA进行提取,使用分子生物学Q-PCR技术检测功能基因绝对丰度。基于Q-PCR实验以及化学检测结果,结合PCA等统计学方法对氮转化功能基因与环境因子的时空变化特征进行讨论,在此基础之上利用Mantel Test、Pearson相关性分析对不同季节下氮转化功能基因与环境因子之间的相关性做出分析,探究不同季节下氮转化功能基因的影响因素。技术路线图如图一3技术路线图所示。

图一3技术路线图

2.1样品采集

研究以巢湖西部的南淝河、派河、杭埠河入湖口为研究对象,探究不同时期不同入湖口氮转化功能基因丰度以及环境因子的时空变化特征,并对不同季节下氮转化功能基因与环境因子之间相关性做出分析。入湖口及巢湖位置分布见图二1入湖口空间位置分布图所示,采样点分布在各个入湖口两岸,经纬度范围见表二.1取样点经纬度范围表所示。采样时间安排在巢湖的不同汛期中,分别在枯水期(Dry Season,2021年12月末)、平水期(Level Season,2022年05月初)与丰水期(Wet Season,2022年08月末)三个时期。对枯水期、平水期、丰水期分别标记为D-、L-、W-,对三个入湖口分别标记为N(南淝河)、P(派河)、H(杭埠河)。

图二1入湖口空间位置分布图

表二.1取样点经纬度范围表

入湖河流取样点经纬度范围

南淝河31.7039023N,117.4160238E ~31.7032688N,117.4163431E

派河31.6600073N,117.2920089E ~31.6673889N,117.2933015E

杭埠河31.5507340N,117.3581874E ~31.5530407N,117.3622991E

2.1.1湖泊上覆水样品的采集

水样使用有机玻璃采水器于水面下20~50 cm处采样,样品采集后装入经过使用超声波清洗的采样瓶内,在保持溢流的状态下拧紧瓶盖,尽量使采样瓶内不含空气。其中,有机玻璃采水器和采样瓶在使用前需经湖水润洗。采样瓶装入水样后立即至于低温冷藏箱内,当天运输至实验室内。在每个采样点记录准确的GPS定位信息。

2.1.2湖泊沉积物样品的采集

使用抓斗式取泥器与柱状式取泥器对沉积物进行采集,每个位点采取三份沉积物进行均匀混合,去除大块杂物后使用无菌聚乙烯自封袋封装。每份底泥样品均匀分为三部分,一份保存在-80℃冰箱内用于后续分子生物学实验;一份用于沉积物常规理化指标的分析;一份留存冰箱内备用。

2.2实验前样品的预处理

2.2.1上覆水预处理

取回水样临时保存在4℃冰箱内,使用微孔滤膜(孔径,爱尔兰Millex)过滤50 ml,在一个星期内完成水样化学指标的检测。

2.2.2沉积物预处理

用于理化指标检测的沉积物需要经过2周自然风干处理,并用100目筛过滤除去石块、植物根茎等大块杂质;用于分子生物学实验的沉积物需要进行多份分装,避免因多次提取DNA而引起样品频繁冻融,进而导致核酸降解。

2.3理化指标测定方法

2.3.1上覆水理化指标的测定

上覆水水质化学指标的检测方法参照国家相关标准:

表二.2上覆水理化指标测定方法表

指标分析方法标准号

化学需氧量(COD)重铬酸盐法 HJ 828-2017

总氮(TN)碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法 HJ 636-2012

氨氮(NH4+)纳氏试剂分光光度法 HJ 535-2009

亚硝酸盐氮(NO2-)分光光度法 GB 7493-87

硝酸盐氮(NO3-)紫外分光光度法 HJ/T 346-2007

使用便携式溶解氧仪现场测定上覆水物理指标水温(T)、pH以及溶解氧(DO),测量三次取平均值。

2.3.2沉积物理化指标的测定

沉积物TN的测定采用凯式定氮法[66],TP的测定使用SMT法[67]。

沉积物粒径百分比分布使用Malvern Mastersizer 2000型激光粒度仪进行分析,设置每个样品测量3次然后取平均值作为最后结果。d0.1、d0.5(中值粒径)与d0.9分别表示根据等效球理论处理后沉积物颗粒累积到10%、50%与90%体积的粒径值。径距(d0.9-d0.1)/d0.5用于表示粒度分布的离散程度,数值越大说明样本中粒径离散程度越高,沉积物粒径分布越宽。

使用日立F-7000荧光光谱仪对沉积物中溶解性有机质(Dissolved Organic Matter, DOM)结构特征和组成成分进行表征。具体方法如下:将Milli-Q超纯水与过筛后的沉积物按照水:土(v/w)=10:1进行混合,使用恒温振荡器在室温下震荡24h,转速设置为220 r/min,然后使用离心机离心10min,转速设置为10000 r/min,最后将离心后的上清液过0.45μm玻璃纤维滤膜,滤液保存在4℃冷藏,在一个星期内完成测定[68]。每次测定前需等待样品恢复至室温,以及等待仪器预热。仪器具体设置参数为:激发波长(Ex)200~450 nm,发射波长(Em)为280~550 nm;Ex、Em的扫描间隔分别设置为5 nm和2 nm;扫描速度为12000 nm/min。仪器得到的三维荧光数据需要去除拉曼散射与瑞利散射。在对每批次样品进行检测时,都需要使用与实验操作过程相同的Mill-Q超纯水作为空白样,将得到的样品原始数据矩阵减去空白样检测的数据矩阵即可去除拉曼散射。瑞利散射需要根据仪器以及具体的测量参数进行调整,使用Python编程语言读取原始数据矩阵,按照式(2.1)中的过滤条件进行调整。

(2.1)

2.4QPCR实验方法

2.4.1引物的选择

PCR引物是一对可以高效地对样品中目的DNA序列进行扩增的核苷酸片段,其设计的优劣直接关系到整个QPCR实验的成功与否。课题所使用引物基于国内外大量相关科学研究总结,引物序列见表二.3功能基因引物设计表所示,委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。在使用前需将干粉状态引物使用离心机离心(4000 rpm,60s),然后按照需求加入适量TE buffer(pH=8.0)缓冲溶液,再经震荡混匀之后,放入-20℃冰箱存储,作为后续母液使用。每次使用前取5μl母液,并加入45μl缓冲溶液进行稀释后再作为使用液。

表二.3功能基因引物设计表

基因名称引物引物序列(5'→3')碱基数 Tm值扩增片段长度(bp)目标微生物参考文献

Bacterial 16S rRNA 338F ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG 2062.5217总细菌[69]

518R ATT ACC GCG GCT GCT GG 1759.4

Archaeal 16S rRNA Arch21F TTC CGG TTG ATC CYG CCG GA 2063.6919总古细菌[70-72]

Arch958R YCC GGC GTT GAM TCC AAT T 1956.7

AOA\_amoA Arch-amoAF STA ATG GTC TGG CTT AGA CG 2052.6635硝化细菌[17]

Arch-amoAR GCG GCC ATC CAT CTG TAT GT 2057.9

AOB\_amoA amoA-1F GGG GTT TCT ACT GGT GGT 1854.2491[17,73]

amoA-2R CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC 2160.1

nxrA F1norA CAG ACC GAC GTG TGC GAA AG 2059.5323[22]

R1norA TCY ACA AGG AAC GGA AGG TC 2055.6

narG narG-2F CTC GAY CTG GTG GTY GA 1754.189反硝化菌[11]

narG-2R TTY TCG TAC CAG GTS GC 1753.3

napA napA-3F CCC AAT GCT CGC CAC TG 1757.6130[11]

napA-3R CAT GTT KGA GCC CCA CAG 1855.5

nirK nirK-876 ATY GGC GGV CAY GGC GA 1763.7164[29]

nirK-1040 GCCTCGATCAGRTTRTGGTT 2054.8

nirS cd3aF GTS AAC GTS AAG GAR ACS GG 2057.7410[12]

R3cd GAS TTC GGR TGS GTC TTG A 1956.1

nosZ nosZ-2F CGC RAC GGC AAS AAG GTS MSS GT 2368.1267[28]

nosZ-2R CAK RTG CAK SGC RTG GCA GAA 2161.4

norB cnorB-2F GAC AAG NNN TAC TGG TGG T 1952.8390[13]

cnorB-6R GAA NCC CCA NAC NCC NGC 1860.0

hzsA hzsA-1597f WTY GGK TAT CAR TAT GTA G 1943.2261厌氧氨氧化菌[14]

hzsA-1857r AAA BGG YGA ATC ATA RTG GC 2051.9

hzsB hzsB\_396F ARG GHT GGG GHA GYT GGA AG 2059.4385[15]

hzsB\_742R GTY CCH ACR TCA TGV GTC TG 2055.9

hzo Hzocl1F1 TGY AAG ACY TGY CAY TGG 1852.0471[74]

Hzocl1R2 ACT CCA GAT RTG CTG ACC 1852.6

nifH PolF TGC GAY CCS AAR GCB GAC TC 2062.6360固氮菌[16,22]

PolR ATS GCC ATC ATY TCR CCG GA 2059.5

注:Y代表简并碱基C或T;V代表简并碱基G或C或A;R代表简并碱基G或A。

2.4.2沉积物基因组DNA提取

商业核酸提取试剂盒具有提取产量大、完整性好等特点,研究使用Solarbio公司土壤基因组DNA提取试剂盒(北京Solarbio,货号D2600)对沉积物DNA进行提取。从-80℃冰箱中取出经过分装后的沉积物样品,经冷冻干燥机干燥后进行DNA的提取操作。称取干燥后的沉积物样品0.3 g于2 ml圆底离心管中,严格按照试剂盒说明书推荐方法进行DNA提取。每个沉积物样品分别进行3次DNA的提取,然后混合摇匀组成该样品的DNA样本。整个提取DNA的实验操作应尽快连续操作完成,以防DNA在操作过程中发生降解。提取完成的DNA保存在-20℃冰箱供后续实验使用,DNA浓度通过超微量紫外可见分光光度计进行检测。

2.4.3PCR扩增

PCR产物是否为特异性扩增,结果是否可靠,必须对其进行严格的分析与鉴定,才能得出正确的结论。通过凝胶电泳来判断PCR程序是否可以较好地扩增出目标基因,以及所选取的基因引物特异性是否合格。利用合成引物对沉积物微生物DNA进行普通PCR扩增,反应体系为2×MasterMix(包括Tap、Pfu、Tap plus以及核酸染料等)25μl、上下游引物各2μl、DNA模板1μl,最后加上ddH2O补足50μl。根据凝胶电泳结果选取可以得到分离效果好、无断裂、条带清晰无拖影并且条带位置与DNA Ladder(北京Solarbio,货号M1200)对照相吻合的PCR程序作为实验使用程序。每种基因选择的对应程序如表二.4功能基因对应的PCR扩增程序表所示。

表二.4功能基因对应的PCR扩增程序表

基因名称1 Hold 3Tmp 2 Holds

预变性变性退火延伸循环数最后延伸\*

Bacterial 16S rRNA 94℃/5min 94℃/50s 52℃/50s 72℃/2min 2572℃/10min

Archaeal 16S rRNA 94℃/5min 94℃/50s 52℃/50s 72℃/1.5min 2572℃/10min

AOA\_amoA 94℃/5min 94℃/1min 56℃/1min 72℃/2min 2572℃/10min

AOB\_amoA 95℃/15min 95℃/1min 54℃/1min 72℃/1min 4572℃/10min

nxrA 94℃/3min 94℃/30s 55℃/45s 72℃/45s 3572℃/5min

narG 94℃/5min 94℃/30s 60℃/45s 72℃/1.5min 3072℃/10min

napA 94℃/5min 94℃/30s 60℃/45s 72℃/1.5min 3072℃/10min

nirK 94℃/2min 94℃/1min 60℃/1min 72℃/1min 3072℃/5min

nirS 95℃/5min 94℃/1min 57℃/45s 72℃/1min 4072℃/10min

nosZ 94℃/5min 94℃/30s 53℃/15s 72℃/1min 4072℃/10min

norB 95℃/10min 94℃/30s 55℃/1min 72℃/1min 3072℃/5min

hzsA 95℃/5min 95℃/15s 52℃/30s 72℃/30s 4072℃/5min

hzsB 95℃/3min 95℃/30min 59℃/30s 72℃/30s 4072℃/5min

hzo 94℃/4min 94℃/1min 50℃/30s 72℃/45s 3572℃/10min

nifH 95℃/5min 94℃/30s 57℃/45s 72℃/30s 3572℃/10min

\*:所有基因的PCR程序延伸结束后都在4℃下保存。

2.4.4凝胶产物的回收与纯化

使用琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(北京Solarbio,货号D1200)对产物DNA进行回收。在紫外灯下,使用经过紫外灭菌后的干净刀片切下含有目的片段DNA条带的琼脂糖凝胶。切胶时应尽快操作,避免紫外灯照射对DNA造成的损伤。将经过紫外灭菌的2 ml离心管称重并记录,然后将切下的凝胶块放入离心管中再次称重,计算前后重量的差值。严格按照试剂盒说明书推荐方法进行后续回收DNA操作,回收后的DNA产物保存于-20℃冰箱。

2.4.5标准曲线的建立

建立标准曲线是QPCR实验过程中的重要一步,可以用来测定实验的扩增效率、灵敏度、重复性和工作范围[54]。大肠杆菌感受态细胞DH5α(北京Takara,货号9057)在使用前需要等待其融化,轻微混匀后取100μl装入2 ml圆底试管内,然后将已经与纯化后的PCR产物相连接的pMD19-T Vector载体(北京Takara,货号6013)加入试管内,在冰上放置30min。之后再在预加热至42℃的水浴锅中放置45秒,热激结束后快速转移至冰中放置1~2min。试管内添加SOC培养基(预先在37℃保温)至终体积1 ml,37℃振荡培养1小时,摇床160r/min。取适量涂布于选择培养基中,于37℃生化培养箱中倒置过夜培养(12~14h)。质粒DNA成功转化至大肠杆菌细胞后,菌落会均匀分布在平板上。使用无菌牙签挑选单克隆菌落接种到盛有培养液的灭菌试管内,然后进行摇菌操作(37℃,220r/min,12h),菌液可临时保存在4℃环境下。取培养好的新鲜菌液进行碱基测序,然后再将成功通过blast序列对比的菌液进行培养纯化。构建标准曲线需要制备一系列梯度稀释的参照模板,将纯化后的样品依次以10倍比梯度稀释用作QPCR标准品,并使用与待检验样品相同的条件进行扩增,然后从中间最少挑取连续的5个点进行标准曲线的拟合,只要R2>0.98即可认为实验结果可信[54]。按式(2.2)计算基因拷贝数(copies/g):

(2.2)

其中K为标准曲线二元一次方程的斜率;b为标准曲线的截距。扩增效率E的计算公式为:

(2.3)

2.4.6沉积物DNA提取样品Q-PCR实验

对每个样品中的15种功能基因进行实时荧光定量PCR分析。QPCR反应通过使用荧光染料SYBR Green Ⅰ Realtime PCR试剂盒(北京Solarbio,货号PC1220)在荧光定量PCR仪上进行。使用经过紫外消毒后的QPCR专用96孔板配置50μl反应体系,具体配比为2×SYBR Green PCR mix 25μl、正反向引物各3μl、DNA模板10μl以及ddH2O 9μl。

2.5实验仪器与设备

实验所用仪器与设备如下表所示:

表二.5实验所用仪器与设备

仪器型号厂家

pH计 HQ30D HACH,美国

溶解氧仪 HQ30D HACH,美国

4℃冷藏柜 BC/BD-418DT 安徽美菱

-70℃冷冻柜 DW-HL398S 安徽美菱

恒温搅拌水浴锅 HH-8江苏杰瑞尔

COD消解仪6B-20江苏盛奥华

高压蒸汽灭菌锅 YXQ-LS-100SII 上海博迅

涡旋振荡器 Vortex-Genie 2 Scientific Industries,美国

抓斗式采泥器 CN-100广州瑞彬

活塞式柱状采泥器 PSC-600A 上海锦锚

高速冷冻离心机 JW-2017HR 安徽嘉文

真空冷冻干燥机 FD-1A-50北京博医康

生化培养箱

紫外可见分光光度计 T6新世纪北京普析

电热恒温鼓风干燥箱 DHG-9101上海三发

电子天平 FA1004B 上海越平

PCR扩增仪9700 Applied Biosystems,美国

实时荧光定量PCR仪7500 Applied Biosystems,美国

电脑三恒多用电泳仪 DYY-10C 北京六一

双稳定时电泳仪 DYY-6C 北京六一

激光粒度仪 Mastersizer 2000 Malvern,英国

超声波清洗机 KQ3200B 昆山舒美

pH计 PHS-3C 上海仪电

恒温振荡器 IS-RSV1精骐,美国

荧光分光光度计 F-7000日立,日本

酶标仪 Bio-RAD 680伯乐,美国

超微量紫外可见分光光度计 FC-3100杭州遂真生物

2.6统计学分析方法

2.6.1特征标准化

特征标准化是机器学习中对数据进行预处理的常用方法。在进行数据分析的过程中,数据矩阵中不同列之间的数据差异性可能较大,进而导致尺度大的特征会对分析的最终结果起决定性作用,而小尺度特征的作用可能会被忽略。对原始数据进行特征归一化,即可消除特征间单位和尺度差异的影响。零均值标准化(Z-Score Normalization)是一种基于数据原始特征的均值和标准差进行标准化的方法。该方法会将一列数据的特征映射到均值为0,偏差为1的分布上,从而使得一列非标准的正态分布随机变量转化成为一列标准的正态分布随机变量。具体的公式定义见式(2.4)、(2.5)、(2.6)。

(2.4)

(2.5)

(2.6)

主成分分析前需对各列因子数据进行标准化,以消除不同列数据之间量纲的影响,数据矩阵经过归一化后所有列的样本量纲得到了统一,提高了计算精度与收敛速度。

2.6.2主成分分析

主成分分析(Principal Component Analysis, PCA)是一种用于数据降维的统计学方法,通过数据降维可以使得源数据矩阵中多个列的变量信息在尽量少的列变量中得到保存[75]。1901年,Pearson在处理非随机变量问题时将其引入,1933年Hotelling将此方法进一步推广到随机向量的情形。主成分分析的主要思想是将数据矩阵中的n维原数据通过变换映射到一个新的k维数据矩阵上,得到的全新k维数据矩阵相互正交的特征被称为主成分。在进行降维的过程中,对源数据矩阵的n维特征进行了重新构造,得到一组信息的k维特征。源数据矩阵中已存在的变量列信息经过PCA处理后实现了压缩,经过降维后的列变量不在等于原有数据矩阵中的任何列变量,而是由它们线性组合起来的新变量。主成分分析的基本思想和方法如下:

存在一个源数据矩阵表,每一行代表一条数据元素,每一列代表一个变量。假设存在可以用来表示数据元素各个变量的权重,那么其加权和就是:

(2.7)

记为经过加权后的综合值,PCA的过程就是寻找出经过加权之后数据元素之间仍可以很好区分的加权方式,使得源数据矩阵表中m个元素的n个变量在经过降维后,其综合值仍然仍然很分散,可以很好地进行区分。为了防止各个变量加权值变得无穷大而失去意义,通常规定:

(2.8)

在数学上,通常使用方差反应数据的差异性程度,方差最大也就意味着得到了一组数据的最大变异。在式(2.8)的约束条件下去求方差的最优解。由于这个解是一个n维空间的一个单位向量,代表着一个"方向",它就是PCA中的主成分方向。但是在通常情况下,一个主成分不足以解释原来的n个变量,往往需要继续寻找第二个甚至第三个主成分。为了防止第二个主成分中再次包含第一个主成分的信息,在几何上可以让这两个主成分的方向正交。具体确定各个主成分的步骤如下:

设表示第个主成分,且,可得:

(2.9)

对于其中的每一个,均有,且可以使得达到最大;在计算第二个主成分时,使得在与正交的情况下,还可以让达到最大;在计算第三个主成分时,使得在与、正交的情况下,还可以让达到最大,以此类推即可得到第个主成分[76]。其中是总方差中所占比例最大的,依次减小。

由于输入数据矩阵的不确定性,数据矩阵在进行PCA分析之前需对各列因子数据进行标准化,以消除不同列数据之间量纲的影响,数据矩阵经过归一化后所有列的样本量纲得到了统一,提高了计算精度与收敛速度。

2.6.3Mantel检验

1967年,美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)的生物统计学家Nathan Mantel提出了Mantel Test分析方法[77]。在统计学中,传统相关系数只能用于计算分析一个数据矩阵中每两列变量之间的相关性,而在面对两个矩阵之间的相关性时就一筹莫展。Mantel Test的出现克服了传统相关系数用于分析相关性的缺陷,可以对两个数据矩阵之间的相关性进行分析。自Mantel Test推出以来,其在微生物群落生态学、动植物种群遗传学等领域都得到快速发展与应用,在分析微生物菌群与环境因子之间的相关性方面更是得到了广泛的应用[78,79]。

在使用Mantel Test分析环境因子与微生物群落的相关性时,通常对微生物群落OTU数据矩阵使用Bray-Curtis相异度(Bray-Curtis dissimilarity)式(2.10)来计算微生物群落结构之间的差异性;而对环境变量数据矩阵采用欧氏距离(Euclidean Distances)式(2.11)进行差异性计算[80]。

(2.10)

(2.11)

Mantel Test运用了假设-检验的思想,计算前假设两个数据矩阵之间不存在相关性。然后对功能基因数据矩阵使用Bray-Curtis相异度式(2.10)计算其距离矩阵,对环境因子数据矩阵使用欧式距离计算其距离矩阵;再将两个距离矩阵进行压缩得到两个压缩距离列,再计算这两列的相关性;在完成一次计算后,对原数据矩阵中的任意两列进行置换,重新计算距离矩阵以及压缩距离列,计算新的相关性系数;经过成千上万次的置换后,观察实际数据的r值在经过多次置换后所得的r值分布中的位置,如果跟随机置换得到的结果站队较近,则说明相关性不显著,相反则说明两个矩阵具有较强的显著相关性。

2.6.4开发环境

实验数据处理及分析全部使用编程语言Python(3.10)基于Windows 11平台完成,其中主成分分析、Pearson相关性分析以及Mantel检验基于Python中pandas、NumPy、SciPy以及机器学习库scikit-learn等包并经过二次封装实现。Pearson相关性分析的可视化网络分析图使用Gephi(0.9)软件完成;箱型图使用Python包matplotlib、seaborn绘制;Mantel Test的可视化采用R(4.1.3)包ggcor、linkET完成。

3.1前言

不同时空下生态系统内环境因子的异质性为微生物提供了具有差异性的生态环境,而差异性的生态环境是系统中生物多样性的基础。为了更好地了解河流、湖泊生态系统中环境因子对微生物的影响作用,学者们从各个角度使用统计学方法对河流、湖泊环境因子的时空变化特征进行了研究。杨先兴使用灰色关联分析法与模糊综合评价法对松花江哈尔滨段进行分析,得到了松花江哈尔滨段水环境质量评价指标体系并构建了城市水环境质量评价计算模型[81];曾凤连等使用Spearman秩相关系数法、Mann-Kendall检验法对淮河干流水环境进行研究,发现流域内面源污染特征逐步显现,尤其是农业面源污染是当前改善淮河流域水环境的重要任务[82];刘幸春对白洋淀主要入淀河流之一的府河进行研究发现,雨季降雨会导致大气沉降以及沉积物扰动,进而引起水体污染程度升高,且夏季适宜的温度促进了代谢酶的活性,导致代谢相关功能基因的增加[83]。来自不同区域的陆地污染物在进入河流-湖泊生态系统中后,会发生一系列的物理化学和生物化学的转化,在这个过程中,不同流域之间的差异性特征、污染物的异质性以及不同的水文条件等因素都会导致污染物浓度及形态出现复杂的时空变化。从时间和空间两个维度对巢湖入湖口上覆水与沉积物中污染物浓度的变化规律进行研究,不仅有助于对巢湖流域的污染状况进行评价,更有助于进一步探究功能基因对环境因子的响应特征。

本章主要探究巢湖入湖口上覆水指标TN、、、、COD、DO、T,以及沉积物指标TN、TP、粒径、DOM的时空变化特征,并对上覆水与沉积物中所检测指标分别进行PCA分析,探究巢湖入湖口上覆水与沉积物环境的时空差异性,为进一步分析不同季节下氮转化功能基因与环境因子的相关性奠定基础。

3.2上覆水环境因子时空变化特征

三个时期中各个入湖口上覆水常规指标变化如图三1上覆水环境因子时空变化图所示。受大气降水以及温度的影响,巢湖入湖河流流量与水质的季节性变化较大,因此导致上覆水环境指标的季节性变化较为明显。由于时间上季节性降雨的逐渐增多,上覆水中各形态氮N指标由枯水期到丰水期整体上都呈现出逐渐下降的趋势。空间分布上,TN指标呈现出南淝河>派河>杭埠河的规律。枯水期南淝河、派河、杭埠河TN范围分别为3.61~3.99、3.25~3.91、2.69~3.00 mg/L,平水期2.21~2.82、2.03~2.37、1.65~2.66 mg/L,丰水期1.71~2.54、1.56~1.84、1.10~1.90 mg/L。根据《地表水环境质量标准》(GB3838-2002),枯水期三个入湖口以及平水期南淝河、派河入湖口TN均高于Ⅴ类水标准,说明巢湖入湖口上覆水氮污染较严重。南淝河与派河主要污染源为城镇与工业点源污染,而杭埠河则主要为农业非点源污染为主[63,84,85]。NO3-、NO2-、NH4+的最高浓度均出现在枯水期南淝河入湖口,平均值分别达到了0.27、0.18、2.82 mg/L。COD由枯水期到丰水期呈现逐渐下降的趋势,其最高值出现在枯水期南淝河,达到了13.78~16.52 mg/L。DO在时间上由枯水期到平水期出现大幅下降,出现这种情况的原因可能是随着夏季温度的升高,微生物新陈代谢等生命活动逐渐增强,进而导致DO被大量消耗。在丰水期派河、杭埠河入湖口DO又出现大幅度升高,这是因为当季为了防治巢湖水体富营养化现象的发生,在派河、杭埠河入湖口人工增设了水体曝气装置。三个入湖口上覆水pH值没有较明显的变化规律,但在各个时期内基本都呈现弱碱性,在丰水期的派河入湖口达到最大值,范围在8.97~9.46之间。上覆水水体温度随着季节的变化逐渐上升,枯水期水体温度在10.5~14.7℃之间,平水期与丰水期的温度范围分别为18.4~20.5、19.6~29.2℃。

图三1上覆水环境因子时空变化图

3.3沉积物环境因子时空变化特征

3.3.1沉积物TN、TP时空变化

沉积物TN、TP指标的时空变化如图三2沉积物TN、TP时空变化图所示。TN指标在时间上由枯水期到丰水期呈现逐渐上升的趋势,枯水期杭埠河入湖口浓度最高,平均值达到了912.00 mg/kg;平水期派河入湖口沉积物TN浓度最低,平均值为1139.17 mg/kg;丰水期派河、杭埠河入湖口沉积物TN指标显著高于南淝河,范围分别在1055.00~2465.00、1325.00~2575.00 mg/kg。入湖口沉积物TP指标在时间上的变化规律并不明显。枯水期杭埠河入湖口TP指标显著高于南淝河与派河,平均值达到了908.51 mg/kg。平水期三个入湖口TP指标平均值分别为831.475、791.33、870.10 mg/kg,南淝河、派河入湖口相比于枯水期有略微升高,杭埠河入湖口则略微降低。丰水期南淝河入湖口不同位点沉积物的TP指标差异性较大,由箱型图可以看出,数据的离散程度较高,最大值达到了1353.71 mg/kg,最小值为837.71 mg/kg;派河、杭埠河入湖口沉积物TP相比于平水期有所上升,平均值分别达到了833.90、949.05 mg/kg。

图三2沉积物TN、TP时空变化图

3.3.2沉积物粒径时空变化特征

三个入湖口不同时期的沉积物粒径检测结果如图三3入湖口沉积物粒径百分比分布时空变化图所示。由图(a)可以看出枯水期内各入湖口沉积物粒径的整体分布情况,当粒径小于52.481μm时,派河入湖口沉积物粒径对应百分比较大,南淝河略小于派河,杭埠河则显著小于两者。但当粒径大于79.433μm时,杭埠河入湖口沉积物粒径百分比开始逐渐高于南淝河与派河,说明枯水期杭埠河沉积物粒径整体分布偏大。由图(b)可以看出平水期内各入湖口沉积物粒径的整体分布情况,平水期三个入湖口中的沉积物粒径百分比分布较为接近,相比于枯水期差异性有所减小。当粒径小于52.481μm时,南淝河与派河入湖口对应沉积物粒径百分比略高于杭埠河;当粒径大于52.481μm时,杭埠河入湖口沉积物对应粒径百分比开始逐渐增大。由图(c)可以看出丰水期内各入湖口沉积物粒径整体分布情况,当粒径范围在10.0~52.481μm时,派河入湖口对应粒径百分比显著大于南淝河与杭埠河;当粒径范围在79.433~239.883μm时,派河入湖口沉积物粒径百分比显著小于南淝河与杭埠河。丰水期内南淝河与杭埠河沉积物粒径整体分布较为接近。

图三3入湖口沉积物粒径百分比分布时空变化图

去除异常值后的沉积物粒径等级分布如图三4入湖口沉积物粒径等级分布图所示,枯水期内南淝河沉积物粒径等级分布d0.1、d0.5、d0.9的平均值分别为19.33、41.400、162.366μm,派河为11.947、37.752、102.112μm,杭埠河为21.732、84.622、164.072μm。枯水期杭埠河粒径等级分布d0.1、d0.5、d0.9都要高于南淝河与派河,说明相比之下杭埠河沉积物粒径整体分布都较大。使用径距(d0.9-d0.1)/d0.5的计算值作为判断沉积物粒径离散程度的标准,枯水期南淝河、派河径距平均值分别为2.416、2.359,杭埠河个别样本点(D-H2、D-H3)径距值可以达到3以上,说明枯水期杭埠河沉积物粒径离散程度较高。平水期内三个入湖口粒径等级分布d0.1、d0.5、d0.9较为接近,杭埠河d0.5、d0.9略高于南淝河与派河,粒径离散指标(d0.9-d0.1)/d0.5分别为2.176、2.230、2.405,说明与枯水期相比平水期入湖口沉积物粒径的离散程度减小。丰水期内三个入湖口d0.1较为接近,但南淝河与杭埠河的沉积物粒径指标中值粒径d0.5、d0.9、径距(d0.9-d0.1)/d0.5都要显著高于派河,说明丰水期派河沉积物粒径整体分布偏小且粒径大小较为集中。

图三4入湖口沉积物粒径等级分布图

3.3.3沉积物DOM时空变化特征

溶解性有机质(Dissolved Organic Matter, DOM)是一类结构复杂的混合物,其中的组成成分包含腐殖酸、富里酸以及多种亲水性有机酸、羧酸、氨基酸和碳水化合物等[68]。DOM既可以为异养微生物提供碳源,又可以作为溶解性有机氮(Dissolved organic nitrogen, DON)的载体,因此其对氮转化过程中微生物的生命活命也会产生直接或者间接的影响[86]。根据有关学者的研究将DOM荧光光谱图划分为五个区域,分别用来代表不同的溶解性有机质[87]。采用荧光区域积分(FRI)法计算每个区域特定有机物的相对含量[88]。另外通过三维荧光光谱特征参数FI、HIX、BIX与β:α来确定DOM组成的有关信息[89]。

表三.1三维荧光光谱图区域划分表

区域有机物类型激发波长(Em)/nm 发射波长(Ex)/nm

Ⅰ芳香族蛋白质Ⅰ220~250280~330

Ⅱ芳香族蛋白质Ⅱ220~250330~380

Ⅲ类富里酸220~250380~500

Ⅳ可溶性微生物降解副产物250~280280~380

Ⅴ类胡敏酸250~400380~500

将三个时期各个入湖口表层沉积物实验样品的原始荧光数据进行预处理后,特定荧光区域的积分体积(Φi)由荧光区域积分(FRI)方法积分计算得到,再此基础上再对Φi进行标准化得到每个荧光区域积分的标准体积Φi,n,用来表示DOM各个区域中特定有机物的相对百分比含量。Pi,n表示各个荧光区域积分标准体积占总体积标准体积的百分比,沉积物DOM光谱各分区Pi,n百分比分布如图三5沉积物DOM光谱各分区Pi,n百分比分布图所示。由图中可以看出,巢湖入湖口表层沉积物中DOM组成成分的时空差异性较弱,主要成分为Ⅰ区(芳香族蛋白质Ⅰ)、Ⅱ区(芳香族蛋白质Ⅱ)、Ⅲ区(类富里酸)三种荧光组分,三者的平均比例分别为17.92%、33.07%、25.79%,而可溶性微生物降解副产物所占比例平均值仅有3.28%左右,说明巢湖入湖口表层沉积物DOM成分主要以蛋白质为主,受城市生活污水排放的影响较大[86]。

图三5沉积物DOM光谱各分区Pi,n百分比分布图

入湖口沉积物DOM光谱各分区积分标准体积分布如图三6沉积物DOM光谱各分区积分标准体积分布图所示。从时间角度来看平水期入湖口沉积物DOM荧光强度最高,枯水期稍弱于平水期,丰水期整体荧光强度最低。可能原因是因为由枯水期到平水期巢湖地区季节性降雨逐渐增多,陆源DOM可以直接随降雨通过入湖河流进入巢湖入湖口,进而导致表层沉积物中DOM荧光强度的升高[90]。由平水期到丰水期,各入湖口沉积物中DOM荧光强度总和剧烈下降,可能是因为随着降雨的继续增多,上覆水得到稀释,沉积物中的DOM向上覆水中进行了扩散。在枯水期与丰水期,派河入湖口沉积物DOM荧光强度整体上高于南淝河与杭埠河,说明这两个时期内派河入湖口表层沉积物中溶解性有机质较为丰富。平水期三个入湖口的DOM总荧光强度较为接近,杭埠河最高,派河次之,南淝河最低。

图三6沉积物DOM光谱各分区积分标准体积分布图

三维荧光光谱特征参数如图三7 DOM荧光光谱特征参数时空变化所示。三个时期各入湖口沉积物DOM荧光指数FI变化程度较小,以枯水期为例,南淝河DOM荧光指数FI值为1.79~2.25、派河为1.77~2.09、杭埠河为1.59~1.91,说明三个时期沉积物DOM中腐殖质主要是陆地、生物混合来源,且生物源所占比例更高[91]。BIX指标常被用来表示微生物来源有机质和外源有机质的比例,以便衡量自生源有机质所占比例的大小。枯水期与平水期三个入湖口沉积物DOM荧光指数BIX范围在0.692~1.11之间,而丰水期范围在0.74~1.28,说明丰水期各入湖口沉积物中DOM具有较强的自源特征,而枯水期与平水期自生组分较少。南淝河荧光指数HIX在三个时期内逐步上升,分别为0.44~1.64、1.43~7.59、2.33~8.30,说明由枯水期到丰水期南淝河入湖口沉积物腐殖化程度和稳定性都逐渐上升。丰水期三个入湖口沉积物DOM荧光指数β:α范围分别在0.77~0.96、0.80~1.18、0.70~0.90,显著高于其他时期,说明丰水期三个入湖口沉积物中新生DOM在整体DOM中所占比例有所增大,生物活性也得到增强。

图三7 DOM荧光光谱特征参数时空变化

3.4环境因子PCA分析

3.4.1关键因子分析

按照2.6.2章主成分分析的原理和计算步骤,选取入湖口上覆水TN、NO3-、NO2-、NH4+、COD、DO、pH、T指标合并为数据矩阵,使用Python编程语言对其进行PCA分析。通过计算方差解释表,可以确定主成分数量以及各个主成分对于数据矩阵中各列变量的解释贡献率。

表三.2上覆水环境因子PCA分析方差解释表

成分初始特征值

特征根方差解释率(%)累积方差解释率(%)

14.25253.15%53.15%

21.35216.90%70.05%

30.7869.82%79.87%

40.5576.97%86.84%

50.45.00%91.83%

60.3053.81%95.64%

70.2292.86%98.50%

80.121.50%100%

由表三.2上覆水环境因子PCA分析方差解释表可以看出,前两个主成分对应特征根都大于1,且解释方差累计达到70.05%,说明提取的2个主成分能够代表原来数据矩阵中8个变量信息的70.05%,累计方差越大也就意味着特征所带的信息量越多。提取2个主成分,分别记为PCA0 F0和PCA1 F1,其中PCA0 F0所占权重为75.9%,PCA1 F1所占权重为24.1%。通过计算两个主成分系数,得到F0与F1的线性组合:

(4.1)

(4.2)

由上述公式可以得到,在第一主成分PCA0 F0中,TN、NH4+、COD、T的系数绝对值相对较大,说明主成分PCA0 F0是这4项上覆水常规指标的综合反映,也说明TN、NH4+、COD、T是研究中对巢湖入湖口上覆水水质进行时空差异性划分的关键因子。在第二主成分PCA1 F1中,DO、pH的系数绝对值相对较大,所以DO、pH是主成分PCA1 F1方向上对入湖口上覆水进行时空差异性划分的关键因子。

表三.3沉积物环境因子PCA分析方差解释表

成分初始特征值

特征根方差解释率(%)累积方差解释率(%)

13.43634.36%34.35%

22.47724.77%59.12%

31.39113.91%73.03%

40.9189.18%82.20%

50.8648.64%90.84%

60.4824.82%95.66%

70.1981.98%97.64%

80.1371.37%99.01%

90.0820.82%99.82%

100.0180.18%100%

选取入湖口沉积物营养盐指标TN、TP,粒径指标d0.1、d0.5、d0.9,DOM光谱各分区积分标准体积指标ΦⅠ、ΦⅡ、ΦⅢ、ΦⅣ、ΦⅤ合并为数据矩阵进行PCA分析。由表三.3沉积物环境因子PCA分析方差解释表可以看出,前两个主成分可以解释全部方差的59.12%,且对应特征根大于1,说明前两个主成分能够代表原来数据矩阵中10个变量信息的59.12%。分别记为PCA0 F1和PCA1 F2,其中PCA0 F0所占权重为58.1%,PCA1 F1所占权重为41.9%。F0与F1的线性组合为:

(4.3)

(4.4)

由上述公式可以得到,在第一主成分PCA0 F0中,TP以及5项DOM指标的绝对值都相对较大,说明TP与DOM指标是PCA0方向上的关键因子,且TP与DOM指标是区分巢湖入湖口沉积物环境时空差异性的决定性环境因子;在第二主成分PCA1 F1中,3项粒径指标的绝对值相对较大,说明粒径指标是PCA1方向上的关键因子。

3.4.2可视化分析

使用PCA算法对数据矩阵进行降维后,选择前两个主成分绘制PCA可视化图。上覆水常规指标PCA可视化如图三8环境因子PCA可视化分析图(a)所示。由图中可以看出,入湖口上覆水水质的时空差异性较大。上覆水的季节差异性主要体现在PCA0方向上,枯水期样本点集中在PCA0>0.9区域,平水期样本点多集中在-0.7<PCA0<0.9区域,丰水期样本点多集中在PCA0<-0.7区域。由主成分分析过程可得,TN、NH4+、COD、T是PCA0方向上的关键因子,因此研究中TN、NH4+、COD、T是决定巢湖入湖口上覆水季节差异性的主要环境因子。枯水期三个入湖口的样本点之间具有明显的区分,说明枯水期三个入湖口水质差异性较大。枯水期杭埠河与平水期南淝河、派河数据点较为接近,由图三1上覆水环境因子时空变化图也可以看出,枯水期杭埠河TN、NH4+、COD三项指标与平水期南淝河、派河数据较为接近。平水期南淝河、派河样本点较为集中,说明平水期南淝河与派河上覆水的污染程度相似。丰水期三个入湖口样本点有较为明显区分,说明该时期内入湖口上覆水水质差异性较大。丰水期南淝河与平水期杭埠河样本点较为接近,由图三1上覆水环境因子时空变化图可以看出,丰水期南淝河TN、NH4+、COD三项指标与平水期杭埠河数据较为接近。在PCA1方向上,丰水期派河样本点显著偏离于整体分布,这是因为DO是PCA1方向上的关键因子,而丰水期派河入湖口的DO范围在10.31~13.64 mg/L,显著高于其他样本点。

沉积物指标PCA分析如图三8环境因子PCA可视化分析图(b)所示。由图中可以看出,入湖口沉积物环境的时空差异性较弱,大部分样本点都集中在PCA0<4, PCA1>-2的区域内。平水期南淝河样本点L-N7、L-N8在PCA0方向上偏离于整体分布,位于PCA0>4区域。沉积物环境因子PCA结果分析表明,TP指标是PCA0方向上的决定性因子,而L-N7、L-N8两点的TP指标分别达到了911.43、932.57 mg/kg,而同时期南淝河其他位点的TP指标平均值仅有786.21 mg/kg,说明平水期南淝河样本点L-N7、L-N8的偏离是由于其沉积物TP指标偏高造成的。丰水期南淝河D-N2、D-N3位点,杭埠河D-H5位点在PCA1方向上偏离于整体,PCA1<-4区域。沉积物环境因子PCA结果分析表明,粒径指标是PCA1方向上的决定性因子,因此可能是这几个位点的粒径分布显著区别于其他位点,因此在PCA1方向有所偏离于整体。

图三8环境因子PCA可视化分析图

3.5本章小结

研究通过在不同季节对巢湖不同入湖口的上覆水与沉积物进行系统采集,分析了三个入湖口上覆水与沉积物环境中氮磷营养盐、粒径以及DOM等指标的时空变化特征。

(1)入湖口上覆水N营养盐指标由枯水期到丰水期呈现出逐渐降低的趋势,枯水期三个入湖口的TN指标均已超过Ⅴ类水标准;空间上南淝河与派河的N污染较为严重,杭埠河相对较轻。入湖口pH值没有较为明显的变化规律,三个入湖口上覆水都呈现出弱碱性的特征。DO由枯水期到平水期大幅下降,丰水期派河、杭埠河入湖口受到人工曝气的影响,DO值显著高于南淝河。

(2)入湖口沉积物TN指标的时空差异性较为明显,时间上由枯水期到丰水期逐渐增高,空间上杭埠河入湖口TN污染最为严重。沉积物TP指标的时空差异性较弱,丰水期南淝河、杭埠河入湖口沉积物TP指标平均值显著高于其他时期。枯水期内南淝河、派河的沉积物粒径百分比分布较为相似,杭埠河则是粒径大于79.433μm的颗粒占比较多,且杭埠河粒径离散程度较高。到平水期时,三个入湖口粒径百分比分布的差异性有所减小。丰水期内则是南淝河与杭埠河粒径百分比分布较为接近,派河入湖口粒径范围在10.0~52.481μm的沉积物颗粒占比较多,在69.183~239.883μm范围内的占比相对较小。枯水期杭埠河沉积物粒径分布较为离散,而南淝河与派河相对较为集中;平水期内三个入湖口沉积物粒径离散程度差值不大;丰水期内杭埠河与南淝河沉积物粒径离散程度较大,派河相对较小。入湖口沉积物DOM指标时空差异性较小,DOM总荧光强度由枯水期到平水期略微升高,但在丰水期出现大幅度下降。各分区物质所占相对百分比没有较为明显的时空变化特征,主要以芳香族蛋白质与类富里酸为主。

(4)环境因子PCA分析表明,入湖口上覆水环境的时空差异性较明显,TN、NH4+、COD、T是决定时空差异性的关键因子;入湖口沉积物环境的时空差异性较弱,TP、DOM指标PCA0方向上的关键因子。

4.1前言

入湖口生态系统内的细菌群落是介导物质循环和能量代谢的关键,对河流-湖泊生态系统的稳定具有重要作用[50]。参与氮转化过程的不同类群微生物都有着其各自特定的功能,湖泊沉积物中发生的氮转化过程有硝化-反硝化、厌氧氨氧化以及固氮作用等,每个氮转化过程都由特定的生物酶参与并调控,而生物酶又由相对应的功能基因编码,对微生物氮转化功能基因进行定量研究可以从分子生物学角度来评价其参与氮转化过程潜力的大小[92]。

近年来,国内外学者从分子生物学功能基因的角度对河流、湖泊等环境中的氮转化过程展开了一系列的研究。Maitreyee对圣劳伦斯五大湖中的硝化功能微生物进行研究发现,在硝酸盐浓度较高的Superior湖中,AOA丰度远远高于AOB;而在硝酸盐浓度较低的Erie湖中,AOB丰度比AOA要高[93]。Li等对滇池芦苇河岸湿地中的反硝化功能基因narG、nirK、nirS、nosZ进行调查研究发现,河岸湿地土壤环境中的nirS、nosZ功能基因丰度存在显著差异性,而narG、nirK功能基因丰度的差异性则不明显;上覆水中的与沉积物中的TN、是滇池河岸湿地环境中N2O产生的主要调节因子[94]。王海英等对长江下游上覆水及沉积物中的厌氧氨氧化功能基因进行研究发现,上覆水中由于溶解氧的限制导致厌氧氨氧化功能基因丰度极低,沉积物中氧氨氧化功能基因丰度在秋季达到最高,是长江下游沉积物中厌氧氨氧化功能细菌生长的限制性因子[37]。

目前针对湖泊入湖口沉积物中氮转化功能基因时空变化特征的研究相对较少,研究通过在不同汛期对巢湖西部南淝河、派河、杭埠河三个主要入湖口中的沉积物进行取样,使用分子生物学QPCR技术对总细菌功能基因Bacterial 16S rRNA,古细菌功能基因Archaeal 16S rRNA,硝化功能基因AOA\_amoA、AOB\_amoA、nxrA,反硝化功能基因narG、napA、nirK、nirS、nosZ、norB,厌氧氨氧化功能基因hzsA、hzsB、hzo,以及固氮功能基因nifH进行绝对定量分析,揭示巢湖入湖口沉积物中氮转化功能基因在时空上的差异性分布特征。

4.2不同时期下功能基因空间差异性分析

4.2.1枯水期功能基因空间差异性分析

枯水期三个入湖口功能基因丰度如图四1枯水期各入湖口功能基因丰度图所示。总细菌丰度在7.97~43.03E+11 copies/g之间,且杭埠河整体丰度分布略高于南淝河与派河,说明枯水期杭埠河沉积物中微生物丰度要高于南淝河与派河。古细菌在南淝河、派河、杭埠河的丰度分别为1.32~9.31E+07、1.30~8.04E+07、2.82~11.61E+07 copies/g。枯水期南淝河总细菌与古细菌丰度都要低于派河与杭埠河,说明枯水期南淝河微生物种群丰度整体都相对较低。南淝河作为合肥市唯一通航且承担接纳合肥市主要市区生活污水与工业废水的河流,已经是巢湖入湖河流中污染最为严重的支流,因此可能是因为南淝河入湖口处污染物浓度较高,进而抑制了微生物的生长[95]。硝化功能基因包括AOA\_amoA、AOB\_amoA与nxrA,其中三个入湖口沉积物中的AOB\_amoA丰度较为接近,范围在2.39~6.05E+05 copies/g之间,低于AOA\_amoA、nxrA两个数量级左右。这是因为AOB对pH、温度、富营养化程度等环境因子的敏感性较强[25]。大量研究也表明AOA不仅分布广泛,在海洋、土壤、河口沉积物等环境中可以生存,其丰度也要远远高于AOB[96]。由narG基因编码的硝酸盐还原酶控制着反硝化进程的第一步,narG丰度在杭埠河处最高,达到5.22~61.93E+04 copies/g,说明枯水期杭埠河入湖口沉积物中硝酸盐还原作用的潜力较强。napA、nirK功能基因在派河入湖口处丰度最高,分别达到6.44~42.45E+05、5.83~18.76E+05 copies/g。三个入湖口nirS功能基因丰度分别为1.42~4.17E+08、8.84~39.71E+07、7.56~49.84E+07 copies/g。norB功能基因在三个入湖口沉积物中的丰度都较低,仅有8.05~38.19 E+04 copies/g,说明枯水期巢湖入湖口沉积物环境中反硝化过程的限速步骤可能是一氧化氮还原反应。nosZ在派河入湖口的丰度最高,达到6.58~23.99 E+05 copies/g。厌氧氨氧化功能基因中hzsA、hzsB丰度整体都呈现出杭埠河>派河>南淝河的规律,且两者的数量级都在105~106之间,而hzo功能基因丰度仅有104数量级。固氮功能基因nifH在派河入湖口沉积物中的丰度最高,平均值为4.67E+04 copies/g,最高值可以达到1.10E+05 copies/g,高于同时期南淝河、杭埠河入湖口1~2个数量级。

图四1枯水期各入湖口功能基因丰度图

4.2.2平水期功能基因空间差异性分析

平水期三个入湖口功能基因丰度如图四2平水期各入湖口功能基因丰度图所示。平水期总细菌、古细菌丰度相比于枯水期有所上升,平均值分别由2.33E+12、4.75E+07 copies/g上升至3.13E+12、6.69E+07 copies/g,可能是因为平水期环境温度有所上升且污染物浓度有所降低,从而更适宜微生物的生存。三个入湖口总细菌丰度平均值都在1012数量级,派河入湖口最高,达到3.58E+12 copies/g。由箱型图可以看出南淝河入湖口样本点丰度值离散程度高,最小值为1.22E+12 copies/g,最大值为7.60E+12 copies/g。古细菌在南淝河、派河、杭埠河的丰度范围分别为1.45~10.09E+07、1.72~12.82E+07、3.25~15.33E+07 copies/g。平水期硝化功能基因AOA\_amoA与AOB\_amoA的丰度相比较于枯水期没有较明显的变化。AOA\_amoA仍然在派河入湖口丰度最高,达到1.54~4.57E+07 copies/g;三个入湖口的AOB\_amoA丰度仍处于105数量级。nxrA是NOB功能菌属的主导功能基因,平水期nxrA功能基因丰度显著升高,由107数量级升高至109数量级,三个入湖口的平均值达到1.69E+09 copies/g。于雪研究发现酸性条件对nxrA基因活性影响更大,且在不同pH条件下nxrA基因拷贝数相对大小为pH7.5>pH8.5>pH6.0[10]。研究中平水期三个入湖口的平均pH值分别为8.31、8.27、7.67,因此巢湖入湖口弱碱性的pH环境非常适合nxrA功能菌的生长。平水期反硝化功能基因中narG、napA、nirS丰度都在杭埠河入湖口达到最大值,平均值分别达到了8.00E+05、2.55E+06、6.82E+07 copies/g,但nirK、norB在杭埠河入湖口处的丰度平均值却最小,仅有2.51E+06、2.40E+05 copies/g。平水期厌氧氨氧化功能基因丰度整体都有所升高,hzsA、hzsB功能基因丰度都在杭埠河入湖口的平均值最高,分别为6.47E+06、3.10E+06 copies/g;hzo功能基因丰度在枯水期仅在104数量级,到了平水期有显著的升高,三个入湖口处的丰度范围分别为2.56~6.38E+05、1.79~3.82E+05、1.30~3.03E+05 copies/g。平水期固氮功能基因nifH在派河入湖口处的丰度平均值最高,达到了1.12E+06 copies/g。

图四2平水期各入湖口功能基因丰度图

4.2.3丰水期功能基因空间差异性分析

丰水期三个入湖口功能基因丰度如图四3丰水期各入湖口功能基因丰度图所示。丰水期派河、杭埠河入湖口总细菌丰度高于平水期,分别达到2.33~4.14E+12、2.26~5.08E+12 copies/g,但南淝河入湖口总细菌丰度却相对减小,丰度平均值由平水期的3.25E+12 copies/g下降至2.16E+12 copies/g。杭埠河古细菌丰度平均值显著高于南淝河与派河,达到7.88E+07~2.48E+08 copies/g。丰水期硝化功能基因AOB\_amoA丰度相对平水期变化不大,仍保持在105数量级;AOA\_amoA、nxrA的丰度值都有所升高;丰水期硝化功能基因丰度在空间上都呈现出杭埠河>派河>南淝河的规律,说明丰水期杭埠河入湖口沉积物中硝化作用潜力最强,而南淝河相对较弱。丰水期杭埠河AOA\_amoA硝化功能基因显著高于南淝河与派河,这是因为南淝河穿越合肥市区,沿途受到大量工业生产废水和城市生活污水的汇入,而杭埠河主要流经大面积的农村地区,在丰水季节农业种植区中大量附着在土壤颗粒上的古菌会随河流顺势而下进入河口区域并沉淀,因此杭埠河入湖口存在着独特的AOA种群[96]。硝化功能基因AOA\_amoA、nxrA在丰水期的杭埠河入湖口沉积物中丰度较高,可能与环境中较高浓度的TN有关。Siripong学者对污水生物处理构筑物内的硝化菌进行研究发现,AOB细菌的种群结构具有明显的季节差异性,在夏季温度较高时,AOB以Nitrosomona群落为主,当冬季环境温度较低时,Nitrosospira种群的比例开始明显增加[97]。但在研究中,硝化功能基因AOB\_amoA的丰度在三个时期内一直都处于105数量级左右,可能是因为受到巢湖入湖口水体富营养化程度的限制导致。三个入湖口的反硝化功能基因narG、nirK、nirS、nosZ丰度范围都较为接近,平均值分别为4.62E+06、3.09E+07、7.41E+07、4.77E+08 copies/g;napA功能基因丰度在派河入湖口最低,范围在6.25E+05~1.18E+07 copies/g之间;norB功能基因丰度在南淝河入湖口最低,范围在1.80E+05~1.69E+06 copies/g之间。厌氧氨氧化功能基因中hzsA、hzsB丰度整体上相较于平水期有所升高,且在杭埠河入湖口处的丰度范围显著高于另外两个入湖口,分别达到1.20E+07~3.44E+07、8.44E+06~9.93E+07 copies/g;hzo功能基因丰度相较于平水期变化不大,三个入湖口的平均值为3.56E+05 copies/g。丰水期固氮功能基因nifH丰度有略微升高,三个入湖口的丰度平均值为2.44E+06 copies/g。

图四3丰水期各入湖口功能基因丰度图

4.3功能基因PCA分析

4.3.1关键功能基因分析

对三个时期不同入湖口沉积物中氮转化功能基因丰度进行PCA分析,得到表四.1氮转化功能基因PCA分析方差解释表。

表四.1氮转化功能基因PCA分析方差解释表

成分初始特征值

特征根方差解释率(%)累积方差解释率(%)

15.46242.02%42.02%

21.51911.69%53.70%

31.2969.97%63.67%

41.1698.99%72.66%

50.9046.95%79.61%

60.7255.57%85.19%

70.5163.97%89.16%

80.453.46%92.61%

90.2692.07%94.69%

100.2341.80%96.49%

110.1941.49%97.98%

120.1431.10%99.08%

130.1190.92%100.00%

可以看出,第一主成分与第二主成分累计可以解释全部方差的53.70%,对应特征根也都大于1,说明前两个主成分能够代表原来氮转化功能基因数据矩阵中13个变量信息的53.70%。虽然前4个主成分的特征根都大于1,且累计方差解释率可以达到72.66%,但是提取4个主成分不容易进行绘图可视化观察。因此,记第一主成分为PCA0 F0,第二主成分为PCA1 F1。通过主成分系数得到F0与F1的线性组合:

(5.1)

(5.2)

第一主成分可以解释全部变量的42.02%,由F0线性组合公式可以看出,第一主成分PCA0 F0中硝化功能基因AOA\_amoA与nxrA、反硝化功能基因nirK与nosZ、厌氧氨氧化功能基因hzsB的系数绝对值相对较大,代表这5种功能基因在PCA0 F0方向上起到决定性作用,也说明在巢湖入湖口沉积物环境中,硝化功能基因AOA\_amoA、nxrA,反硝化功能基因由nirK、nosZ以及厌氧氨氧化功能基因hzsB对是氮转化过程的关键因子。

4.3.2可视化分析

入湖口不同时空下各位点氮转化功能基因PCA可视化结果如图四4功能基因PCA可视化分析图所示。整体上看来,不同时期下入湖口氮转化功能基因在空间上的区分并不明显;而在时间上,不同时期的样本点之间有较为明显的区分,枯水期样本点主要集中在PCA0>2区域,平水期样本点多集中在0<PCA0<2区域内,丰水期样本点多集中PCA0<0区域。说明巢湖入湖口沉积物环境中氮转化功能基因的季节差异性较为明显,但相同时期下不同入湖口之间的空间差异性较弱。由4.3.1章分析过程可知,在不同时空入湖口沉积物环境的氮转化过程中,硝化功能基因AOA\_amoA、nxrA,反硝化功能基因由nirK、nosZ以及厌氧氨氧化功能基因hzsB是PCA0方向上的关键因子,而季节差异性又可以在PCA0得到很好的表现,因此AOA\_amoA、nxrA、nirK、nosZ、hzsB基因丰度的变化是造成巢湖入湖口氮转化功能基因季节差异性的关键。不同季节下,枯水期、平水期三个入湖口的样本点聚集程度较高,说明枯水期、平水期三个入湖口沉积物环境中参与氮转化过程的功能基因表达程度较为相似,氮转化微生物种群丰度以及结构特征可能较为接近。丰水期三个入湖口的样本点较为分散,尤其是杭埠河W-H2、W-H8、W-H10、W-H11、W-H12样本点相比较于整体出现了较大偏差,说明丰水期杭埠河入湖口不同位点之间参与氮转化的功能基因丰度差异性大。

图四4功能基因PCA可视化分析图

4.4本章小结

本章通过分子生物学QPCR技术对不同汛期下巢湖南淝河、派河、杭埠河入湖口沉积物中总细菌功能基因Bacterial 16S rRNA,古细菌功能基因Archaeal 16S rRNA,硝化功能基因AOA\_amoA、AOB\_amoA、nxrA,反硝化功能基因narG、napA、nirK、nirS、nosZ、norB,厌氧氨氧化功能基因hzsA、hzsB、hzo,以及固氮功能基因nifH进行定量分析,得到如下结论:

(1)巢湖入湖口沉积物中总细菌、古细菌丰度在时间上由枯水期到丰水期呈现出逐渐升高的趋势,总细菌丰度在1012数量级,古细菌丰度在107~108数量级。各个时期内,不同入湖口中总细菌丰度差异性较小,古细菌丰度在三个时期内都在杭埠河入湖口处最高。

(2)硝化功能基因AOA\_amoA由枯水期到平水期丰度变化程度较小,但是在丰水期丰度显著升高;AOB\_amoA丰度时空差异性较弱,在三个时期的三个入湖口中一直稳定在105数量级;nxrA在枯水期时三个入湖口的平均值为1.03E+07 copies/g,到平水期时升高至109数量级,丰水期丰度值相比于平水期继续有略微的升高。

(3)反硝化功能基因narG、napA、nirK丰度由枯水期到丰水期都呈现出逐渐升高的趋势;nirS在枯水期丰度最高,达到108数量级,而平水期与丰水期下降至107数量级;枯水期与平水期的nosZ丰度值在106左右,丰水期升高至108数量级;norB在三个时期内的丰度值一直都维持在较低水平,枯水期与平水期仅有105,丰水期所有增加,达到106左右。

(4)厌氧氨氧化功能基因hzsA、hzsB呈现出相似的时空变化规律,时间上由枯水期到丰水期丰度不断升高,在空间上呈现出杭埠河>派河>南淝河的规律,其丰度最大值都出现在丰水期杭埠河入湖口,平均值分别为1.06E+07、2.01E+07 copies/g。hzo丰度一直都在较低水平,枯水期仅有104数量级,平水期有所升高,三个入湖口的平均值达到了2.96E+05 copies/g,丰水期丰度值变化不明显;在三个不同时期内,hzo均在南淝河入湖口沉积物中达到丰度最高值。

(5)枯水期固氮功能基因nifH仅在104数量级,到平水期上升至106数量级左右,丰水期继续有微弱升高;在三个时期内,固氮功能基因nifH的丰度平均值均在派河入湖口处最高。

5.1前言

环境因子在不同时空下的差异性会导致功能基因的分布与丰度也产生变化,目前国内外学者针对功能基因与环境因子的相关性开展了一系列研究。Jin等利用QPCR与PCR-DGGE技术对太湖地区不同施肥条件土壤中的硝化功能基因amoA与反硝化功能基因nirK进行研究发现,未施肥土壤环境中amoA、nirK基因丰度较低,且amoA丰度与土壤有机碳、TN指标呈现正相关关系,nirK丰度与有机碳、TN、TP呈现正相关关系[98]。唐丹青研究发现在武汉东湖与南湖沉积物环境中,厌氧氨氧化细菌数量与全氮和有机质都呈现显著相关性[99]。靳振江等对波形潜流人工湿地中的硝化-反硝化细菌与重金属进行检测分析发现,环境中全量铜、全量镍和铬的活化率显著抑制了amoA、nirK功能菌的生长[100]。沉积物粒径指标对功能基因的分布也会产生影响,Zhang等学者通过对比实验研究了磺胺甲恶唑、四环素和氧氟沙星在有无沉积物环境中对反硝化功能微生物的影响,结果表明在有沉积物的情况下,反硝化功能基因napA、nirS等的丰度值都会显著提高[101]。除了空间上的差异性,不同时间下环境因子的异质性也会导致微生物功能基因的丰度产生变化。Zhang等的研究发现,南淝河流域中空间差异性对沉积物微生物和功能基因群的影响较弱,而季节性的差异会对功能基因群造成较强的影响,且dsrB、mcrA、hzo功能基因是是季节异质性的敏感指标[48]。

研究不同汛期下入湖口沉积物环境中氮转化功能基因与环境因子的相关性有助于从分子生物学角度对氮转化过程的影响因素进行探究,这对全面评价河流-湖泊生态系统中的氮转化过程有着积极的意义。本章利用Mantel Test、Pearson相关性分析方法,对不同季节下的功能基因丰度与环境因子之间的相关性进行分析并对功能基因丰度的影响因素进行讨论。

5.2枯水期功能基因与环境因子相关性分析

5.2.1相关性网络图分析

枯水期功能基因与环境因子之间的Pearson相关性分析如图五1枯水期功能基因与环境因子相关性网络图所示。网络图中节点代表功能基因或者环境因子,节点与节点之间的连线代表两者之间的Pearson相关性,连线颜色代表相关性(红色为正相关,绿色为负相关,颜色越深即相关性越强);连线宽度代表显著性,宽度越宽代表显著性越强。

图五1枯水期功能基因与环境因子相关性网络图

AOA参与的氨氧化作用是硝化过程的第一步反应和限速步骤,枯水期硝化功能基因AOA\_amoA与pH呈现较强的负相关关系(r=-0.679, p<0.01)。除了硝化功能基因AOA\_amoA以外,反硝化功能基因nirK(r=-0.639, p=0.01)、nosZ(r=-0.601, p<0.05)以及固氮功能基因nifH(r=-0.610, p<0.02)都与pH呈现负相关关系,说明枯水期pH抑制了入湖口沉积物环境中的硝化-反硝化作用以及固氮作用。pH是湖泊沉积物中重要的环境因子,甚至可以作为微生物群落结构的预测因子[102]。pH对微生物的影响机理可以分为直接和间接两个方面,直接方面pH可以通过在一定范围内的变化而对微生物施加生理限制,进而影响微生物的生长;间接方面pH可以通过对微生物生长所需营养物质、有机碳含量、土壤水分等环境因子产生影响进而对微生物的生长产生促进或者抑制的作用[103]。反硝化功能基因norB的主要作用是编码的一氧化氮还原酶Nor,而Nor负责把NO还原为无毒的N2O。枯水期norB功能基因与沉积物TN呈现正相关关系(r=0.599, p<0.05),说明枯水期沉积物环境中高浓度的N促进了反硝化微生物norB功能基因的表达。厌氧氨氧化功能基因hzsA与DOM指标Ⅲ-Area(r=0.517, p<0.05)、HIX(r=0.591, p<0.05)呈现正相关关系,说明DOM中类胡敏酸百分比越高、腐殖化程度越强的沉积物环境越适合厌氧氨氧化功能菌的生长。

5.2.2Mantel Test分析

将氮转化功能基因丰度数据矩阵分为4组,分别是负责硝化过程的功能基因AOA\_amoA、AOB\_amoA与nxrA,负责反硝化过程的功能基因narG、napA、nirK、nirS、nosZ与norB,负责厌氧氨氧化过程的功能基因hzsA、hzsB与hzo,以及负责固氮过程的功能基因nifH。使用式(2.10)Bray-Curtis相异度分别计算其距离矩阵,然后进行Mantel Test分析。枯水期氮转化功能基因与环境因子的Mantel Test分析如图五2枯水期氮转化功能基因与环境因子Mantel检验图所示。

枯水期厌氧氨氧化功能基因与沉积物TP呈现正相关关系(r=0.423, p<0.05),与上覆水TN(r=0.390, p<0.05)、(r=0.435, p<0.05)呈现正相关关系。厌氧氨氧化功能菌可以在缺氧环境下以为电子受体把氧化为N2,、都是厌氧氨氧化功能菌直接利用的营养物质,但平水期三个入湖口浓度范围在1.45~2.98 mg/L,浓度范围在0.008~0.280 mg/L,两者的比例远远大于厌氧氨氧化过程的最佳配比1:1.32,因此低浓度的可能是厌氧氨氧化功能菌生长的限制性因子[104]。除此之外,厌氧氨氧化功能菌与DO呈现负相关关系(r=-0.373, p<0.05),说明上覆水溶解氧含量对表层沉积物环境中的厌氧氨氧化功能菌的生长产生了一定的抑制。厌氧氨氧化功能菌属于厌氧细菌,通常生存在有较大无机氮通量的缺氧环境中。最适合其生存的溶解氧浓度为0.065 mg/L[105],由图三1上覆水环境因子时空变化图可知,枯水期三个入湖口DO范围在9.42~11.64 mg/L,已经达到了其最适生存浓度的144~179倍,因此较高的DO值是枯水期厌氧氨氧化功能基因处于较低水平的原因之一。固氮功能基因nifH与沉积物TP呈现显著正相关关系(r=0.448, p<0.01),这是因为沉积物中N负荷的升高会促进碱性磷酸酶的分泌进而引起P的释放,而P又是蓝藻合成固氮酶的重要元素之一,因此TP有利于nifH型固氮菌的生长[106]。

图五2枯水期氮转化功能基因与环境因子Mantel检验图

5.3平水期功能基因与环境因子相关性分析

5.3.1相关性网络图分析

平水期功能基因与环境因子之间的Pearson相关性分析如图五3平水期功能基因与环境因子相关性网络图所示。nxrA是亚硝酸盐氧化还原酶基因的一种,常被用于反应亚硝酸盐氧化菌NOB的活性。nxrA功能基因与呈现正相关关系(r=0.513, p=0.01),这是因为nxrA基因属于Nitrobacter菌群的功能基因,其在低浓度的环境下对基质的亲和力更大,因此也就更具有竞争优势[107]。反硝化功能基因nirK(r=0.439, p<0.05)、厌氧氨氧化功能基因hzo(r=0.415, p<0.05)都与TN指标表现出明显的正相关关系,说明TN浓度的提高可以促进了反硝化与厌氧氨氧化过程相关功能基因的表达。反硝化功能基因nirS功能基因与(r=-0.672, p<0.01)、(-r=0.468, p<0.05)都呈现负相关关系。厌氧氨氧化功能基因hzo与溶解性有机质芳香族蛋白质Ⅰ(I-Area)、芳香族蛋白质Ⅱ(Ⅱ-Area)以及可溶性微生物降解副产物(Ⅳ-Area)都呈现明显负相关关系(r=-0.353、-0.477、-0.456),说明平水期内DOM的存在对厌氧氨氧化功能微生物的生长产生了一定的抑制作用。Hzo与DO呈现显著负相关关系(r=-0.673, p<0.001)。由平水期到枯水期,虽然环境温度有了大幅度的提升,更适于厌氧氨氧化功能微生物的生长[108],但DO浓度仍远远高于其生长条件,因此Hzo在平水期内依然保持较低的丰度水平。古细菌(r=-0.618, p<0.002)、反硝化功能基因narG(r=-0.429, p<0.05)以及厌氧氨氧化功能基因hzsB(r=-0.419, p<0.05)与上覆水pH呈现负相关关系。固氮功能基因nifH与沉积物粒径指标d0.1(r=0.539, p<0.001)、d0.9(r=0.438, p<0.05)呈现正相关关系,说明固氮微生物更适合在颗粒粒径较大的沉积物环境中生存。

图五3平水期功能基因与环境因子相关性网络图

5.3.2Mantel Test分析

平水期氮转化功能基因与环境因子的Mantel Test分析如图五4平水期氮转化功能基因与环境因子Mantel检验图所示。虽然有研究表明是沉积物中影响硝化速率以及AOA与AOB群落结构特征的关键环境因子[109],但在研究中与硝化功能基因整体上的相关性并不强,可能是因为系统内COD较高,进而硝化过程受到抑制[110],相关性网络图显示硝化功能基因AOB\_amoA与COD呈现较强的负相关关系(p<0.01, r=-0.562)。由图三1上覆水环境因子时空变化图可以看出,三个入湖口COD平均值从枯水期到平水期有了明显的下降,由11.280 mg/L下降至9.154 mg/L,但Mantel检验仍显示硝化功能基因整体与COD呈现显著负相关关系(r=-0.561, p<0.05),说明在平水期内COD仍然对硝化功能微生物的生长产生抑制作用。反硝化功能基因与呈现微弱正相关关系(r=0.200, p<0.05)。厌氧氨氧化功能基因与TN(r=0.680, p=0.001)、(r=0.625, p=0.001)呈现显著正相关关系。反硝化功能基因与沉积物粒径指标d0.5(r=-0.131)、d0.9(r=-0.178)、(d0.9- d0.1)/d0.5(r=-0.171)都呈现微弱负相关关系,说明粒径越小的沉积物环境越适合反硝化功能微生物的生长。粒径分布对氮转化过程中的微生物群落结构以及丰度都会产生影响[111],不同粒径的沉积物可以形成不同的氧化还原条件,越小粒径的颗粒物越容易吸附可以消耗氧气的无机离子,也越容易附着好氧微生物,而更低的氧含量则有助于反硝化功能菌的生长[112,113]。因此说明巢湖入湖口环境中,粒径越小的沉积物微环境越有利于反硝化功能基因的表达。固氮功能基因与沉积物DOM指标BIX(r=0.258, p<0.05)、β:α(r=0.258, p<0.05)呈现显著正相关。

图五4平水期氮转化功能基因与环境因子Mantel检验图

5.4丰水期功能基因与环境因子相关性分析

5.4.1相关性网络图分析

丰水期功能基因与环境因子之间的Pearson相关性分析如图五5丰水期功能基因与环境因子相关性网络图所示。总细菌丰度与DO(r=0.680, p<0.01)、T(r=0.622, p=0.01)呈现显著正相关关系。硝化功能基因AOA\_amoA与DOM指标Ⅲ-Area(r=0.501, p=0.05)、Ⅴ-Area(r=0.488, p=0.05)呈现正相关关系。亚硝酸盐氧化还原酶Nxr的作用是将催化为,因此是硝化反应的底物。硝化功能基因nxrA与呈现正相关关系(r=0.437)。分子态的被称为游离亚硝酸(Free nitric acid, FNA),在生物脱氮系统中FNA浓度是与呈现正相关关系,其对NOB功能菌的活性表现出"低促高抑"的影响[107,114]。丰水期巢湖入湖口处于较低的范围,南淝河、派河浓度范围在0.02~0.06 mg/L,杭埠河所有样本点均低于最低检测阈值,因此丰水期虽然浓度较低,但得益于nxrA基因所属Nitrobacter菌群在低浓度环境下对基质亲和力更大的特点以及FNA对NOB功能菌"低促高抑"的影响,硝化功能基因nxrA仍与表现为正相关关系。反硝化功能基因napA(r=-0.508, p<0.05)、厌氧氨氧化功能基因hzo(r=-0.514, p<0.05)与pH呈现负相关关系。在生物反应器中,环境pH在7.5~8.0之间时厌氧氨氧化功能菌的活性最高[115,116]。丰水期三个入湖口的pH平均值为8.98,最小值也达到了8.15。在弱碱性的环境中,更多的会转化为游离氨(Free ammonia, FA),而高浓度的FA通过细胞膜进入细胞后,改变了微生物细胞内部的pH,诱发微生物氨中毒,进而影响其活性[117,118]。因此丰水期过高的pH环境对反硝化功能基因napA、厌氧氨氧化功能基因hzo的表达产生了抑制作用。

图五5丰水期功能基因与环境因子相关性网络图

5.4.2Mantel Test分析

丰水期氮转化功能基因与环境因子的Mantel Test分析如图五6丰水期氮转化功能基因与环境因子Mantel检验图所示。硝化功能基因与粒径指标d0.5呈现正相关关系(r=0.363, p<0.01)。反硝化过程的影响因子包括硝酸盐浓度、可利用碳的含量、溶解氧浓度以及温度等[119-121]。丰水期反硝化功能基因与沉积物TP(r=0.363, p<0.01)呈现正相关关系,这是因为湖泊沉积物中氮磷营养盐的污染来源、形态特征以及其在湖泊生态系统中的迁移转化过程具有很高的相似性[122]。丰水期反硝化功能基因与沉积物粒径指标d0.5(r=-0.345, p<0.01)、d0.9(r=-0.287, p<0.05)呈现负相关关系,说明在丰水期巢湖入湖口沉积物环境中,反硝化功能基因仍然在粒径较小的环境中表达程度更高。厌氧氨氧化反应广泛存在于海洋、湖泊、河流等等生态系统中,但其对环境条件的要求也较为苛刻,且硝化-反硝化进程也会与其形成竞争关系[123,124]。虽然厌氧氨氧化功能基因在丰水期的丰度值有所提高,但其与环境因子的Mantel检验结果显著性都不高,由图五5丰水期功能基因与环境因子相关性网络图可以看出,在厌氧氨氧化功能基因hzo与pH(r=-0.514, p<0.05)、DO(r=-0.501, p<0.05)都呈现出负相关关系,说明丰水期内虽然温度有所提高,更适合厌氧氨氧化功能微生物的生长,但是pH、DO指标仍然对其hzo功能基因的表达产生抑制。

图五6丰水期氮转化功能基因与环境因子Mantel检验图

5.5本章小结

研究利用Mantel Test、Pearson相关系数方法对不同季节下氮转化功能基因与环境因子之间的相关性进行分析,揭示不同时期下巢湖入湖口沉积物环境中氮转化功能基因的影响因素。主要结论如下:

(1)枯水期:pH与硝化功能基因AOA\_amoA,反硝化功能基因nirK、nosZ以及固氮功能基因nifH都呈现负相关关系;norB功能基因与沉积物TN呈现正相关关系;厌氧氨氧化功能基因与沉积物TP,以及上覆水TN、呈现正相关关系;固氮功能基因nifH与沉积物TP呈现显著正相关关系。

(2)平水期:pH与nxrA呈现负相关关系;厌氧氨氧化功能基因hzo与多个DOM指标呈现负相关关系,说明丰水期巢湖入湖口沉积物中DOM荧光强度的升高也对部分厌氧氨氧化功能菌的生长产生了抑制作用;Mantel Test结果说明COD与硝化功能基因丰度呈现负相关关系;反硝化功能基因与沉积物粒径指标d0.5、d0.9、(d0.9- d0.1)/d0.5都呈现负相关关系,说明参与反硝化的微生物更适合在小粒径且粒径均匀程度较高的环境内生存;厌氧氨氧化功能基因与TN、呈现显著正相关关系。

(3)丰水期:总细菌丰度与DO、T呈现显著正相关关系;DOM指标Ⅲ-Area、Ⅴ-Area与AOA\_amoA成正相关关系;硝化功能基因nxrA与呈现正相关关系;pH对反硝化功能基因napA、厌氧氨氧化功能基因hzo的表达产生了抑制作用;反硝化功能基因与沉积物粒径指标d0.5、d0.9呈现负相关关系。

6.1结论

综上,研究在不同汛期对富营养化湖泊巢湖西部南淝河、派河、杭埠河三个主要入湖口中的上覆水与沉积物进行采样,测定上覆水与沉积物中氮磷营养盐、粒径、溶解性有机质等多项指标,并利用分子生物学QPCR技术对沉积物中氮转化功能基因丰度进行绝对定量分析。系统地对巢湖入湖口生态环境中环境因子以及参与硝化-反硝化、厌氧氨氧化、固氮过程功能基因的时空分布特征做出讨论,同时结合PCA、Mantel Test等统计学分析方法对氮转化功能基因的时空差异性以及不同季节下环境因子对其影响作用的变化特征做出分析。具体得出了如下结论:

(1)巢湖入湖口上覆水水质时空差异性较为明显,时间上枯水期氮污染最为严重,三个入湖口TN指标均已超过Ⅴ类水标准,丰水期污染程度最轻;空间上南淝河水体氮污染最为严重,派河仅次于南淝河,杭埠河污染程度最轻。上覆水各项指标PCA结果表明,TN、、COD、T 4项指标是巢湖入湖口上覆水进行时空差异性划分的决定性因子。入湖口沉积物TN、TP指标在时间上由枯水期到丰水期呈现逐渐上升的趋势,空间上杭埠河入湖口污染较为严重。三个入湖口沉积物粒径百分比分布在平水期最为接近,而枯水期、丰水期都有一定的差异性。入湖口沉积物中DOM受城市生活污水排放的影响较大,主要成分是芳香族蛋白质与类富里酸,DOM各成分占比的时空差异性并不明显,但DOM总荧光强度的季节差异性较为明显,三个入湖口都在平水期达到最高值,且在丰水期出现大幅下降。沉积物各项指标PCA结果表明,研究中TP、DOM指标是造成巢湖入湖口沉积物环境时空差异性的关键因子。

(2)QPCR结果显示,总细菌丰度值在三个时期内一直都处于1012数量级,时间上由枯水期到丰水期有上升的趋势,空间上的差异性并不明显。古细菌丰度在107~108数量级,时间上丰水期丰度最高,空间上杭埠河入湖口处丰度值略高。硝化功能基因中AOB\_amoA在三个时期内丰度基本没有变化,一直处于105数量级;nxrA在硝化功能基因中丰度最高。反硝化功能基因中narG、napA、nirK三者的丰度值由枯水期到丰水期出现不断升高的趋势;nirS在枯水期的丰度值最高,达到108数量级,平水期与丰水期则在108以下;nosZ在枯水期与丰水期的丰度值仅有106左右,丰水期增长至108数量级;norB丰度在三个时期内一直都处于较低水平,仅有105~106。厌氧氨氧化功能基因hzsA、hzsB丰度值呈现出相似的时空变化特征,时间上都在丰水期达到最大值,空间分布上都在杭埠河入湖口处的丰度值最高;hzo基因丰度在枯水期仅有104~105,平水期升高至105以上,且在南淝河入湖口处丰度值最高。

(3)功能基因与环境因子的相关性分析表明,巢湖入湖口弱碱性的pH环境对氮转化功能基因的表达存在抑制作用,枯水期pH与硝化功能基因AOA\_amoA,反硝化功能基因nirK、nosZ以及固氮功能基因nifH都呈现负相关关系;平水期pH与nxrA功能基因呈现负相关关系;丰水期pH与反硝化功能基因napA、厌氧氨氧化功能基因hzo呈现负相关关系。Mantel Test结果显示平水期反硝化功能基因与沉积物粒径指标d0.5、d0.9、(d0.9- d0.1)/d0.5呈现负相关关系,丰水期反硝化功能基因与沉积物粒径指标d0.5、d0.9呈现负相关关系,说明在巢湖入湖口沉积物环境中,反硝化功能基因在沉积物颗粒较小且粒径大小较为均匀的环境中表达程度更高。厌氧氨氧化功能菌对环境条件的要求较为苛刻,巢湖入湖口环境中的DO、T等环境因子都不利于厌氧氨氧化菌的生长,导致hzo功能基因丰度一直处于较低水平;厌氧氨氧化功能菌基因丰度在枯水期与平水期内都与TN呈现正相关关系,说明环境中高浓度的TN可以促进厌氧氨氧化菌功能基因的表达。

6.2展望

入湖口生态系统内的氮转化过程是河流-湖泊生态系统中化学物质循环的重要组成部分,影响着系统内环境的稳定。沉积物中参与氮转化过程的微生物在氮形态转化过程中发挥着不可替代的作用。分子生物学QPCR技术是从功能基因角度研究河流-湖泊生态系统中与氮转化过程紧密联系的微生物种群结构与丰度的变化特征的重要手段。由于实验设备、技术和时间等方面的限制,课题研究方向上还有可以进一步挖掘与拓展的空间。

(1)氮转化速率可以通过硝化速率、反硝化速率、厌氧氨氧化速率以及DNRA速率等来进行表征,后续对课题的深入研究可以考虑增加氮转化功能基因与氮转化速率之间的相关性分析。

(2)不同深度沉积物环境中的微生物群落也不尽相同,后续可以增加对不同深度沉积物环境中氮转化微生物以及功能基因的研究,完善入湖口沉积物纵向环境中微生物参与氮转化过程的作用机理。

参考文献

[1] 马荣华, 杨桂山, 段洪涛, et al. 中国湖泊的数量、面积与空间分布[J]. 中国科学：地球科学, 2011, 41(3): 394-401.

[2] 杨桂山, 马荣华, 张路, et al. 中国湖泊现状及面临的重大问题与保护策略[J]. 湖泊科学, 2010, 22(6): 799-810.

[3] LE C, ZHA Y, LI Y, et al. Eutrophication of lake waters in China: cost, causes, and control[J]. Environmental Management, 2010, 45(4): 662-8.

[4] 姚璐. 长江中下游湖泊沉积物的关键脱氮过程及其影响因素研究[D]; 中国科学院大学(中国科学院武汉植物园), 2018.

[5] 中华人民共和国生态环境部. 2021年中国生态环境状况公报[M]. 2022.

[6] QIN B, GAO G, ZHU G, et al. Lake eutrophication and its ecosystem response[J]. Chinese Science Bulletin, 2013, 58(9): 961-70.

[7] YANG N, ZHANG C, WANG L, et al. Nitrogen cycling processes and the role of multi-trophic microbiota in dam-induced river-reservoir systems[J]. Water Research, 2021, 206: 117730.

[8] ZHANG D, LI M, YANG Y, et al. Nitrite and nitrate reduction drive sediment microbial nitrogen cycling in a eutrophic lake[J]. Water Research, 2022, 220: 118637.

[9] HOU J, SONG C, CAO X, 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): 2285-96.

[10] 于雪. 温度,pH值和游离亚硝酸对亚硝酸盐氧化菌活性动力学及微生物种群结构影响研究[D]; 兰州交通大学, 2019.

[11] SMITH C J, NEDWELL D B, DONG L F, et al. Diversity and abundance of nitrate reductase genes (narG and napA), nitrite reductase genes (nirS and nrfA), and their transcripts in estuarine sediments[J]. Applied and environmental microbiology, 2007, 73(11): 3612-22.

[12] THROBäCK I N, ENWALL K, JARVIS Å, et al. Reassessing PCR primers targeting nirS, nirK and nosZ genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 49(3): 401-17.

[13] BRAKER G, TIEDJE J M. Nitric oxide reductase (norB) genes from pure cultures and environmental samples[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(6): 3476-83.

[14] HARHANGI H R, LE ROY M, VAN ALEN T, et al. Hydrazine synthase, a unique phylomarker with which to study the presence and biodiversity of anammox bacteria[J]. Applied and environmental microbiology, 2012, 78(3): 752-8.

[15] YANG Y, LI M, LI H, et al. Specific and effective detection of anammox bacteria using PCR primers targeting the 16S rRNA gene and functional genes[J]. Science of The Total Environment, 2020, 734: 139387.

[16] POLY F, MONROZIER L J, BALLY R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of nifH genes in communities of nitrogen fixers in soil[J]. Research in Microbiology, 2001, 152(1): 95-103.

[17] JIN T, ZHANG T, YAN Q. Characterization and quantification of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and bacteria (AOB) in a nitrogen-removing reactor using T-RFLP and qPCR[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2010, 87(3): 1167-76.

[18] FRANCIS C A, O'MULLAN G D, WARD B B. Diversity of ammonia monooxygenase (amoA) genes across environmental gradients in Chesapeake Bay sediments[J]. Geobiology, 2003, 1(2): 129-40.

[19] 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 and environmental microbiology, 1997, 63(12): 4704-12.

[20] 杨宏, 李会琳, 路璐. 嘉陵江(南充段)水体及其底泥中氨氧化微生物群落空间分布特征及其与环境因子关系[J]. 长江流域资源与环境, 2018, 27(8): 1836-46.

[21] 陈静. 太湖沉积物中铁-氮耦合循环研究[D]; 扬州大学, 2021.

[22] POLY F, WERTZ S, BROTHIER E, et al. First exploration of Nitrobacter diversity in soils by a PCR cloning-sequencing approach targeting functional gene nxrA[J]. FEMS microbiology ecology, 2008, 63(1): 132-40.

[23] HAYAKAWA A, NAKATA M, JIANG R, et al. Spatial variation of denitrification potential of grassland, windbreak forest, and riparian forest soils in an agricultural catchment in eastern Hokkaido, Japan[J]. Ecological Engineering, 2012, 47: 92-100.

[24] 张惠淳, 孙寓姣, 陈程, et al. 官厅水库水体及底泥中硝化功能细菌的群落多样性研究[J]. 北京师范大学学报：自然科学版, 2013, 49(Z1): 282-5.

[25] HOU J, SONG C, CAO X, 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): 2285-96.

[26] 姚倩. 生物脱氮系统中硝化菌的种群结构、功能及反应动力学研究[D]; 西安建筑科技大学, 2018.

[27] KIM H, BAE H-S, REDDY K R, et al. Distributions, abundances and activities of microbes associated with the nitrogen cycle in riparian and stream sediments of a river tributary[J]. Water Research, 2016, 106: 51-61.

[28] HENRY S, BRU D, STRES B, et al. Quantitative detection of the nosZ gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, narG, nirK, and nosZ genes in soils[J]. Applied and environmental microbiology, 2006, 72(8): 5181-9.

[29] HENRY S, BAUDOIN E, LóPEZ-GUTIéRREZ J C, et al. Quantification of denitrifying bacteria in soils by nirK gene targeted real-time PCR[J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 59(3): 327-35.

[30] 杨睿, 袁林江, 王刚, et al. 活性污泥中一氧化氮还原酶的提取和测定优化[J]. 中国环境科学, 2021, 041(011): 5169-76.

[31] 李明振. 一氧化氮还原酶催化亚基编码基因(cnorB)在反硝化细菌种群分析中的应用研究[D]; 浙江大学, 2004.

[32] ZHANG M, DARAZ U, SUN Q, et al. Denitrifier abundance and community composition linked to denitrification potential in river sediments[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2021: 1-12.

[33] 夏瑜. 城市污水处理系统微生物多样性和时间动态变化[D]; 清华大学, 2021.

[34] WU H, HAO B, CAI Y, et al. Effects of submerged vegetation on sediment nitrogen-cycling bacterial communities in Honghu Lake (China)[J]. Science of The Total Environment, 2021, 755: 142541.

[35] 郝晓地, 仇付国, VANDERSTAR W R L, et al. 厌氧氨氧化技术工程化的全球现状及展望[J]. 中国给水排水, 2007, 23(18): 15-9.

[36] ZHAO Z, CAO Y, FAN Y, et al. Ladderane records over the last century in the East China sea: Proxies for anammox and eutrophication changes[J]. Water Research, 2019, 156: 297-304.

[37] 王海英, 潘瑞, 刘树枫, et al. 长江下游厌氧氨氧化细菌标记基因相对丰度及影响因素[J]. 北京大学学报：自然科学版, 2019, 55(3): 519-25.

[38] DING B, LI Z, CAI M, et al. Feammox is more important than anammox in anaerobic ammonium loss in farmland soils around Lake Taihu, China[J]. Chemosphere, 2022, 305: 135412.

[39] YANG Y, LI M, HU Z, et al. Deep insights into the green nitrogen removal by anammox in four full-scale WWTPs treating landfill leachate based on 16S rRNA gene and transcripts by 16S rRNA high-throughput sequencing[J]. Journal of Cleaner Production, 2020, 276: 124176.

[40] 谢雅琪. 单级填料床亚硝化-厌氧氨氧化工艺快速启动及影响因素研究[D]; 中国矿业大学(江苏), 2020.

[41] HIRSCH M D, LONG Z T, SONG B. Anammox Bacterial Diversity in Various Aquatic Ecosystems Based on the Detection of Hydrazine Oxidase Genes (hzoA/hzoB)[J]. Microbial Ecology, 2011, 61(2): 264-76.

[42] WENG R, HE Y, WANG J, et al. Quantitative characterization and genetic diversity associated with N-cycle pathways in urban rivers with different remediation techniques[J]. Science of The Total Environment, 2022, 804: 150235.

[43] WANG J, KAN J, QIAN G, et al. Denitrification and anammox: Understanding nitrogen loss from Yangtze Estuary to the east China sea (ECS)[J]. Environmental Pollution, 2019, 252: 1659-70.

[44] 文都日乐, 李刚, 杨殿林, et al. 呼伦贝尔草原土壤固氮微生物nifH基因多样性与群落结构[J]. 生态学杂志, 2011, 30(4): 790-7.

[45] LI Y, GUO L, YANG R, et al. Thiobacillus spp. and Anaeromyxobacter spp. mediate arsenite oxidation-dependent biological nitrogen fixation in two contrasting types of arsenic-contaminated soils[J]. Journal of Hazardous Materials, 2023, 443: 130220.

[46] FAN Z, LI R, GUAN E, et al. Fertilization regimes affect crop yields through changes of diazotrophic community and gene abundance in soil aggregation[J]. Science of The Total Environment, 2023, 866: 161359.

[47] NATWORA K E, SHEIK C S. Assessment of nitrogen fixation rates in the Laurentian Great Lakes[J]. Journal of Great Lakes Research, 2021, 47(5): 1288-95.

[48] ZHANG M, WU Z, SUN Q, et al. Response of chemical properties, microbial community structure and functional genes abundance to seasonal variations and human disturbance in Nanfei River sediments[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 183: 109601.

[49] KAESTLI M, SKILLINGTON A, KENNEDY K, et al. Spatial and Temporal Microbial Patterns in a Tropical Macrotidal Estuary Subject to Urbanization[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1313-27.

[50] 张宗啸. 河口潮滩湿地细菌群落多样性与功能特征研究[D]; 华东师范大学, 2021.

[51] ARANGO C P, TANK J L. Land Use Influences the Spatiotemporal Controls on Nitrification and Denitrification in Headwater Streams[J]. Journal of the North American Benthological Society, 2008, 27(1): 90-107.

[52] 莫旭华, 麻威, 史荣久, et al. 氮肥对小麦田土壤nirS型反硝化细菌多样性的影响[J]. 微生物学报, 2009, 49(9): 1203-8.

[53] GAO Y, ZHANG W, LI Y, et al. Dams shift microbial community assembly and imprint nitrogen transformation along the Yangtze River[J]. Water Research, 2021, 189: 116579.

[54] J.萨姆布鲁克, D.W.拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 科学出版社, 2002.

[55] ZYBIN D I, PROSTYAKOVA A I, KAPUSTIN D V. Single-step isolation of DNA from the soil samples for PCR-analysis using two-component system containing polyaniline-modified silica and alginate microspheres[J]. Microchemical Journal, 2021, 166: 106225.

[56] IMSLAND A K D, MICALLEF G, KORSNES K, et al. Consumption of sea lice by lumpfish (Cyclopterus lumpus): qPCR quantification and use of a non-destructive sampling method[J]. Aquaculture, 2019, 500: 640-4.

[57] TIAN H, BAI P, TAN Y, et al. A new method to detect methylation profiles for forensic body fluid identification combining ARMS-PCR technique and random forest model[J]. Forensic Science International: Genetics, 2020, 49: 102371.

[58] DONG X, REDDY G B. Soil bacterial communities in constructed wetlands treated with swine wastewater using PCR-DGGE technique[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(4): 1175-82.

[59] AGOLA E L, MWANGI I N, MAINA G M, et al. Transmission sites for Schistosoma haematobium and Schistosoma bovis identified in localities within the Athi River basin of Kenya using a PCR-RFLP assay[J]. Heliyon, 2021, 7(2): e06114.

[60] HU W, SU C, LIU Q, et al. Comparison of fish communities using environmental DNA metabarcoding and capture methods in a freshwater lake: A new set of universal PCR primers[J]. Fisheries Research, 2022, 253: 106365.

[61] MáRQUEZ P, GUTIéRREZ M C, TOLEDO M, et al. Activated sludge process versus rotating biological contactors in WWTPs: Evaluating the influence of operation and sludge bacterial content on their odor impact[J]. Process Safety and Environmental Protection, 2022, 160: 775-85.

[62] 杨碧莹. 基于统计模型的巢湖水体富营养化模拟研究[D]; 安徽理工大学, 2020.

[63] 纪岚, 杨立武, 李菁. 南淝河水污染现状与可持续发展对策研究[J]. 安徽大学学报(自然科学版), 2006, 30(004): 91-4.

[64] 张欢, 崔康平, 张强, et al. 派河水体中DOM的光谱分析及其来源解析[J]. 环境科学研究, 2019, 32(02): 227-34.

[65] 周慧, 吴立, 马春梅, et al. 巢湖杭埠河流域湖相沉积物多指标揭示的全新世以来环境演变[J]. 湖泊科学, 2020, 32(6): 1869-81.

[66] 王功芹, 张硕, 李大鹏, et al. 环境因子对海州湾表层沉积物中氨氮吸附-解吸的影响[J]. 生态环境学报, 2017, 26(1): 95-103.

[67] 宋倩文. 太湖沉积物磷形态空间分布的研究及其环保疏浚范围的确定[D]; 东北林业大学, 2013.

[68] 王圣瑞. 湖泊沉积物-水界面过程,基本理论与常用测定方法[M]. 科学出版社, 2014.

[69] 陶怡乐, 张晨枫, 徐琳, et al. 北京大学未名湖水质与底泥菌群结构的时空变化[J]. 北京大学学报：自然科学版, 2017, 53(6): 1150-60.

[70] 张琳, 熊格生, 吴莎莎, et al. 沼气池污泥微生物总DNA提取方法的比较[J]. 激光生物学报, 2011, 20(6): 847-52+59.

[71] DELONG E F. Archaea in coastal marine environments[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992, 89(12): 5685-9.

[72] YIN Q, FU B, LI B, et al. Spatial Variations in Microbial Community Composition in Surface Seawater from the Ultra-Oligotrophic Center to Rim of the South Pacific Gyre[J]. Plos One, 2013, 8(2): e55148.

[73] 宋协法, 王学超, 董登攀. 三种因素对海水生物流化床启动期间营养盐去除及amoA基因表达的影响[J]. 渔业现代化, 2017, 44(6): 24-31.

[74] SUN F, SU X, KANG T, et al. Integrating landfill bioreactors, partial nitritation and anammox process for methane recovery and nitrogen removal from leachate[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 27744.

[75] 司守奎, 孙玺菁. Python数学建模算法与应用[M]. 国防工业出版社, 2022.

[76] 张文彤, 董伟. SPSS统计分析高级教程[M]. 高等教育出版社, 2013.

[77] MANTEL N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach[J]. Cancer Res, 1967, 27(2): 209-20.

[78] TAI X, LI R, ZHANG B, et al. Pollution Gradients Altered the Bacterial Community Composition and Stochastic Process of Rural Polluted Ponds[J]. Microorganisms, 2020, 8(2): 311.

[79] SUNAGAWA S, COELHO L P, CHAFFRON S, et al. Structure and function of the global ocean microbiome[J]. Science, 2015, 348(6237): 1261359.

[80] DUAN X Z, SUN J T, WANG L T, et al. Recent infection by Wolbachia alters microbial communities in wild Laodelphax striatellus populations[J]. Microbiome, 2020, 8(1): 104.

[81] 杨先兴. 松花江哈尔滨段水环境质量时空变化特征分析[D]; 哈尔滨工业大学, 2014.

[82] 曾凤连, 杨刚, 王萍, et al. 淮河干流水环境质量时空变化特征及污染趋势分析[J]. 水生态学杂志, 2021, 42(05): 86-94.

[83] 刘幸春. 白洋淀入淀河流污染特征及微生物群落结构研究[D]; 河北大学, 2021.

[84] 张广萍, 周美正, 张延, et al. 安徽派河流域水污染特征及原因分析[J]. 人民长江, 2014, 45(18): 20-4.

[85] 王鑫杰. 基于SWAT模型的杭埠河流域农业非点源污染分析[D]; 天津大学, 2012.

[86] 宁成武. 巢湖入湖河流溶解性有机质时空变化研究[D]; 安徽大学, 2021.

[87] CHEN W, WESTERHOFF P, LEENHEER J A, et al. Fluorescence excitation-emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter[J]. Environmental Science & Technology, 2003, 37(24): 5701-10.

[88] HU A, LI L, HUANG Y, et al. Photochemical transformation mechanisms of dissolved organic matters (DOM) derived from different bio-stabilization sludge[J]. Environment International, 2022, 169: 107534.

[89] HE J, WU X, ZHI G, et al. Fluorescence characteristics of DOM and its influence on water quality of rivers and lakes in the Dianchi Lake basin[J]. Ecological Indicators, 2022, 142: 109088.

[90] 朱金杰, 邹楠, 钟寰, et al. 富营养化巢湖沉积物溶解性有机质光谱时空分布特征及其环境意义[J]. 环境科学学报, 2020, 40(7): 2528-38.

[91] 李燚. 不同土地利用类型土壤中DOM组成特征、紫外荧光特性和来源分析[D]; 西安建筑科技大学, 2021.

[92] LEVY-BOOTH D J, PRESCOTT C E, GRAYSTON S J. Microbial functional genes involved in nitrogen fixation, nitrification and denitrification in forest ecosystems[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2014, 75: 11-25.

[93] MUKHERJEE M, RAY A, POST A F, et al. Identification, enumeration and diversity of nitrifying planktonic archaea and bacteria in trophic end members of the Laurentian Great Lakes[J]. Journal of Great Lakes Research, 2016, 42(1): 39-49.

[94] LI W, YUAN L, LAN X, et al. Methane and nitrous oxide production and their driving factors in Phragmites riparian wetlands of Dianchi Lake, China[J]. Ecological Indicators, 2022, 145: 109696.

[95] 潘宝. 南淝河主要水体污染物时空分布特征—与污染源解析[D]; 合肥工业大学, 2017.

[96] 何天良. 巢湖两个入湖河口沉积物氨氧化古菌群落结构时空差异的分子生态学研究[D]; 安徽农业大学, 2012.

[97] SIRIPONG S, RITTMANN B E. Diversity study of nitrifying bacteria in full-scale municipal wastewater treatment plants[J]. Water Research, 2007, 41(5): 1110-20.

[98] JIN Z-J, LI L-Q, LIU X-Y, et al. Impact of Long-Term Fertilization on Community Structure of Ammonia Oxidizing and Denitrifying Bacteria Based on amoA and nirK Genes in a Rice Paddy from Tai Lake Region, China[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2014, 13(10): 2286-98.

[99] 唐丹青. 武汉东湖和南湖沉积物脱氮微生物空间分布特征[D]; 华中农业大学, 2014.

[100] 靳振江, 黄海涛, 刘杰, et al. 铬、铜和镍对人工湿地硝化细菌与反硝化细菌群落结构分布的影响[J]. 生态环境学报, 2013, 22(12): 1936-44.

[101] ZHANG R, XU X, JIA D, et al. Sediments alleviate the inhibition effects of antibiotics on denitrification: Functional gene, microbial community, and antibiotic resistance gene analysis[J]. Science of The Total Environment, 2022, 804: 150092.

[102] LAUBER C L, HAMADY M, KNIGHT R, et al. Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale[J]. 2009, 75(15): 5111-20.

[103] LIU S, REN H, SHEN L, et al. pH levels drive bacterial community structure in sediments of the Qiantang River as determined by 454 pyrosequencing[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 285.

[104] STROUS M, HEIJNEN J J, KUENEN J G, et al. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1998, 50(5): 589-96.

[105] STROUS M, GERVEN E V, KUENEN J G, et al. Effects of aerobic and microaerobic conditions on anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) sludge[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(6): 2446-8.

[106] 杨文焕, 甄玉, 姚植, et al. 高原盐化湖泊沉积物氮代谢特征解析[J]. 中国环境科学, 2022: 1-13.

[107] 杨昕怡, 常焕焕, 于雪, et al. 游离亚硝酸对亚硝酸盐氧化菌活性的抑制作用机制[J]. 化学与生物工程, 2022, 39(1): 25-30.

[108] TOMASZEWSKI M, CEMA G, ZIEMBIŃSKA-BUCZYŃSKA A. Influence of temperature and pH on the anammox process: A review and meta-analysis[J]. Chemosphere, 2017, 182: 203-14.

[109] STRAUSS E A, RICHARDSON W B, BARTSCH L A, et al. Nitrification in the Upper Mississippi River: patterns, controls, and contribution to the NO3− budget[J]. Journal of the North American Benthological Society, 2004, 23(1): 1-14.

[110] JULIE, K., CRONK. Constructed wetlands to treat wastewater from dairy and swine operations: a review[J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 1996, 58(2-3): 97-114.

[111] ZHANG W, WANG H, LI Y, et al. Bend-induced sediment redistribution regulates deterministic processes and stimulates microbial nitrogen removal in coarse sediment regions of river[J]. Water Research, 2020, 170: 115315.

[112] JIA Z, LIU T, XIA X, et al. Effect of particle size and composition of suspended sediment on denitrification in river water[J]. Science of The Total Environment, 2016, 541: 934-40.

[113] 李强, 霍守亮, 王晓伟, et al. 巢湖及其入湖河流表层沉积物营养盐和粒度的分布及其关系研究[J]. 环境工程技术学报, 2013, 3(2): 147-55.

[114] 孙洪伟, 于雪, 李维维, et al. 游离亚硝酸抑制硝化杆菌属(Nitrobacter)活性动力学研究[J]. 中国环境科学, 2018, 38(11): 4246-54.

[115] MA B, ZHANG X, WEI D, et al. Simultaneous nitrogen and sulfur removal using Anammox coupled sulfide-denitrification process: Impact of pH[J]. Journal of Water Process Engineering, 2022, 49: 103176.

[116] 张黎, 胡筱敏, 姜彬慧. 低基质浓度下pH和DO对厌氧氨氧化反应效能的影响[J]. 环境工程, 2015, 33(6): 59-62.

[117] JUNG J Y, KANG S H, CHUNG Y C, et al. Factors affecting the activity of anammox bacteria during start up in the continuous culture reactor[J]. Water Science and Technology, 2007, 55(1-2): 459-68.

[118] VANGSGAARD A K, MAURICIO-IGLESIAS M, VALVERDE-PéREZ B, et al. pH variation and influence in an autotrophic nitrogen removing biofilm system using an efficient numerical solution strategy[J]. Water Science and Technology, 2013, 67(11): 2608-15.

[119] JAYAKUMAR A, O"MULLAN G D, WARD S W A N B. Denitrifying Bacterial Community Composition Changes Associated with Stages of Denitrification in Oxygen Minimum Zones[J]. Microbial Ecology, 2009, 58(2): 350-62.

[120] HENDERSON S L, DANDIE C E, PATTEN C L, et al. Changes in Denitrifier Abundance, Denitrification Gene mRNA Levels, Nitrous Oxide Emissions, and Denitrification in Anoxic Soil Microcosms Amended with Glucose and Plant Residues[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2010, 76(7): 2155-64.

[121] KRISHNANI K. Detection and diversity of nitrifying and denitrifying functional genes in coastal aquaculture[J]. Aquaculture, 2010, 302: 57-70.

[122] 王艳平, 徐伟伟, 韩超, et al. 巢湖沉积物氮磷分布及污染评价[J]. 环境科学, 2021, 42(02): 699-711.

[123] LU X, BADE D L, LEFF L G, et al. The relative importance of anammox and denitrification to total N2 production in Lake Erie[J]. Journal of Great Lakes Research, 2018, 44(3): 428-35.

[124] XU J, BAO S, XIANG D, et al. Effects of silver nanoparticles on denitrification and anammox in sediments of hypertrophic and mesotrophic lakes[J]. Science of The Total Environment, 2023, 858: 159933.

致谢

三年时光转瞬即逝,眨眼间我的硕士研究生学习生活已经接近尾声了。这三年,是我人生中成长最快的时光。这三年让我明白,顺境时的成长并不能让一个人真正地去长大,只有学会在逆境中生存,才能真正地适应这个本就十分残酷的世界。

感谢我的导师黄健教授三年里对我学业的关心以及对我生活上的照顾。三年的时光里,黄老师不仅仅在学业上对我们悉心指导,学习之余还会带我们参加大量横向课题以及一些具体的工程实例,让我们真正地去感受了我们专业到底是干什么,做的哪些工作。在这些过程中,不但丰富了我们的闲暇时光,也为我们以后走上工作岗位提供了扎实的基础条件。在参与横向课题的过程中,黄老师也经常性地传授我们一些人生经验,让我们切切实实地感受到了做人乃立身之本。

其次还要感谢张华教授对我三年科研学习的指导,从前期的文献阅读、试验取样、试验方案确定以及后期试验过程中的问题排查,张华老师无私地为我提供了很多帮助。在三年的科研道路上,她那严谨的学术作风以及对论文、试验细节部分的追求深深地影响了我们。除了在学习上,在生活中张老师也对我们关怀备至,让我们在实验室也能感受到家的温暖,万分感谢张老师三年的指导!

感谢于孝坤、袁新锐、吴兆亮、陈昊、李丽、刘亚丽、曹雪枫、蒋伟、李梦云、张慧、方楠、尚润、庄雪晴、陶海涛、刘皖彦、刘海林等师兄师姐在我学习和生活中的帮助,是你们让我学会了如何适应研究生的生活,教会了我如何在实验室学会成长。刚来实验室的时候,自己总是不太适应,是你们的安慰与鼓励让我逐渐开始慢慢地尝试改变自己的心态,换一种生活方式去面对自己的不适。感谢同门孙运运、李虎、范少松、陶传奇、辛浩洋、孙旭东、梁海龙、周宇、朱小杰的陪伴,三年里我们一起搞科研、一起出差、一起成长、相互扶持鼓励,见证了彼此心态上的成长。是你们一直陪伴着我鼓励着我,我才能走到现在,顺利完成自己的硕士研究生学业。

感谢宝丰的家人们和朋友们,你们塑造了我人生最初的三观,教会了我如何去做人做事。真正爱你的人无需多言,陪伴便是最真情的告白。这三年里,很感谢你们的关心与鼓励。迄今为止,虽离开已有七年之久,但因为有了你们的存在那个叫宝丰的小城仍是我最喜欢地方。

最后,还要感谢在百忙之中抽出时间参加盲审和答辩的教授、老师们,感谢你们对我论文的指导,感谢你们的辛苦付出,衷心感谢各位。

曼亚灿

2023年02月

作者简介及研究生期间主要科研成果

作者简介:

曼亚灿,男,汉族。1998年10月01日生,河南宝丰人。2020年毕业于安徽理工大学地球与环境学院给排水科学与工程专业;2020年至今,于安徽建筑大学环境与能源工程学院土木水利专业攻读硕士研究生,主要研究方向为水生态污染控制学。

读研期间发表学术论文:

[1] Yacan Man, Hua Zhang, Jian Huang, Shanshan Xi, Jinhua Wang, Haitao Tao, Yu Zhou. Combined effect of tetracycline and copper ion on catalase activity of microorganisms during the biological phosphorus removal[J]. Journal of environmental management,2021,304:114218.