

沈李东,胡宝兰,郑平,等.2011.西湖底泥中厌氧氨氧化菌的分子生物学检测[J].环境科学学报,31(8):1609-1615

Shen L D , Hu B L , Zheng P , *et al.* 2011. Molecular detection of anammox bacteria in the sediment of West Lake , Hangzhou [J]. Acta Scientiae Circumstantiae 31(8):1609-1615

西湖底泥中厌氧氨氧化菌的分子生物学检测

沈李东,胡宝兰,郑平,钱轶超,陈婷婷,胡安辉,楼莉萍*

浙江大学环境工程系 杭州 310029

收稿日期:2010-11-09

修回日期:2010-12-09

录用日期:2010-12-26

摘要: 厌氧氨氧化(anaerobic ammonium oxidation, anammox)在海洋氮素循环中起了重要作用,而有关天然淡水生态系统中 anammox 的研究报道并不多.本研究采用 16S rRNA 基因克隆文库技术首次考察了西湖淡水底泥中 anammox 菌的分布与种群多样性水平.16S rRNA 系统发育分析表明,西湖底泥中的 anammox 菌种群多样性水平较高,明显高于目前已报道的大部分自然生态系统,检测结果发现 *Brocadia*, *Kuenenia*, *Scalindua* 三个属的 anammox 菌共存于西湖底泥中.此外,本研究在西湖底泥中还发现了两个新的 anammox 菌序列群,其与目前已知 anammox 菌的序列相似度都较低(分别仅为 92.9%~93.3% 和 91.6%~92.7%).与海洋底泥不同(海洋底泥中 *Scalindua* 属的 anammox 菌占主导地位),西湖淡水底泥中 *Kuenenia* 属的 anammox 菌明显占优.

关键词: 厌氧氨氧化菌;淡水底泥;分布;种群多样性;西湖底泥

文章编号:0253-2468(2011)08-1609-07

中图分类号:X171

文献标识码:A

Molecular detection of anammox bacteria in the sediment of West Lake , Hangzhou

SHEN Lidong , HU Baolan , ZHENG Ping , QIAN Yichao , CHEN Tingting , HU Anhui , LOU Liping*

Department of Environmental Engineering , Zhejiang University , Hangzhou 310029

Received 9 November 2010;

received in revised form 9 December 2010;

accepted 26 December 2010

Abstract: Anaerobic ammonium oxidation (anammox) plays a very important role in the marine nitrogen cycle. But reports on the distribution of anammox bacteria in natural freshwater ecosystems are few. We firstly investigated the distribution and diversity of anammox bacteria in the sediment of West Lake by constructing 16S rRNA gene colony libraries. Phylogenetic analysis of 16S rRNA genes showed that the sequences of *Brocadia* , *Kuenenia* and *Scalindua* could be simultaneously detected in the West Lake sediment , which showed a much higher diversity of anammox bacteria than most reported natural ecosystems. Furthermore , two new anammox bacterial clusters which only showed 92.9% ~ 93.3% and 91.6% ~ 92.7% sequence identity to described anammox bacteria were found in the West Lake sediments. The higher anammox bacterial diversity found in the sediment indicated a large variety of suitable ecological niches are provided for different anammox bacteria in West Lake freshwater ecosystems. As opposed to marine sediments where *Scalindua* bacteria dominated anammox guilds , *Kuenenia* organisms appeared to be the most common species in West Lake sediment.

Keywords: anaerobic ammonium oxidation bacteria; freshwater sediment; distribution; diversity; West Lake sediment

1 引言(Introduction)

在严格的缺氧条件下,以亚硝酸盐作为氧化剂将氨氧化成氮气的生物反应称为厌氧氨氧化(anaerobic ammonium oxidation, anammox) (Zheng *et al.* , 2004). Anammox 最初发现于人工脱氮系统 (Mulder *et al.* , 1995), 最近在许多天然生态系统中

也不断检测到 anammox 反应,并被证实具有重要作用. Kuenen (Kuenen , 2008) 认为在海洋氮素循环中, anammox 的贡献率达 50% 以上,其他大量研究者报道了不同区域环境中不同程度的 anammox 贡献率,其范围为 30%~70% (Arrigo *et al.* , 2005; Engström *et al.* , 2009; Trimmer and Nicholls , 2009). 此外,另有研究者在某些海洋水体的低氧区中只检测出了

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 40801198); 浙江省自然科学基金项目(No. Y507227); 中央高校基本科研业务费专项资助项目(No. 2009QNA6009)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 40801198) , the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No. Y507227) and the Chinese Universities Scientific Fund (No. 2009QNA6009)

作者简介: 沈李东(1986—),男, E-mail: shenlidong1986@yahoo.com.cn; * 通讯作者(责任作者) E-mail: loulp@zju.edu.cn

Biography: SHEN Lidong (1986—) , male , E-mail: shenlidong1986@yahoo.com.cn; * **Corresponding author** E-mail: loulp@zju.edu.cn

anammox 活性(反硝化活性无法被检出),并认为 anammox 是去除这些水体环境中无机氮的唯一生物途径(Kuypers *et al.* ,2005; Thamdrup *et al.* ,2006; Lam *et al.* ,2009). 参与 anammox 反应的微生物是 anammox 菌,anammox 菌是一群分支很深的浮霉状菌,目前已描述的 anammox 菌有 5 个属 8 个种: *Candidatus Brocadia* (*Candidatus Brocadia anammoxidans* (Strous *et al.* ,1999) *Candidatus Brocadia fulgida* (Kartal *et al.* , 2008)); *Candidatus Kuenenia* (*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* (Schmid *et al.* , 2000)); *Candidatus Scalindua* (*Candidatus Scalindua brodae* (Schmid *et al.* , 2003) , *Candidatus Scalindua wagneri* (Schmid *et al.* , 2003) , *Candidatus Scalindua sorokinii* (Kuypers *et al.* , 2003)); *Candidatus Anammoxoglobus propionicus*(Kartal *et al.* , 2007) 及 *Candidatus Jettenia asiatica*(Quan *et al.* ,2008).

Anammox 菌在海洋生态系统中广泛分布,大量分布于海洋底泥(Risgaard-Petersen *et al.* , 2004; Penton *et al.* ,2006; Schmid *et al.* ,2007)、海洋水体的低氧区(Hamersley *et al.* , 2007; Woebken *et al.* ,2007; Lam *et al.* ,2009) 以及河口环境(Tal *et al.* ,2005; Rich *et al.* ,2008; Dale *et al.* ,2009). 海洋环境中检测到的 anammox 菌种群结构较为单一,基本属于 *Scalindua* 属. 这是因为 *Scalindua* 属的 anammox 菌具有较强的耐盐能力,而 *Brocadia* 和 *Kuenenia* 属的 anammox 菌为淡水 anammox 菌种(Jetten *et al.* ,2003; Kartal *et al.* ,2006) 对盐度较为敏感,不适宜生存于海洋环境. Dale 等(2009) 的研究结果却发现,在开普菲尔河口(Cape Fear River Estuary) anammox 菌的分布呈现出了种群多样性,包括 *Brocadia* , *Kuenenia* , *Jettenia* 和 *Scalindua* 4 个属的 anammox 菌可同时被检测到. Amano 等(2007) 在淀川河口(Yodo Estuary) 处同样检测出了几种 anammox 菌的共存,包括 *Brocadia* , *Kuenenia* 和 *Scalindua* 属的 anammox 菌. 出现这种结果的原因推测是由于河口是海陆作用最为剧烈、生态结构最为复杂的区域之一,可营造适合不同种类 anammox 菌生存的微环境.

从发生 anammox 反应的条件看,淡水底泥具有缺氧和厌氧层、有氧和缺氧界面,是发生 anammox 反应的良好生境. 此外,淡水底泥中有机质的分解会释放出 NH_4^+ ,硝化和反硝化过程又可产生中间产物 NO_2^- ,为 anammox 菌提供了有利的生存条件. 然而目前只有为数不多的研究报道了淡水底泥中 anammox 菌的分布. Schubert 等(2006) 首次证明了天然淡水生态系统中 anammox 菌的分布,他们利用同位素试验测得热带淡水坦噶尼喀湖(Lake Tanganyika) 水体中 anammox 菌的最大活性(以 N_2 计) 为 $10 \text{ nmol} \cdot \text{h}^{-1}$,anammox 在该区域氮循环中的贡献率达 13% ,其活性和贡献率值并不亚于海洋生境中发生的 anammox 反应. 此外,Penton 等(2006) 和 Zhang 等(2007) 分别在美国的温特格林湖(Lake Wintergreen) 和中国江苏的新沂河淡水底泥中检测到了 anammox 菌的分布. 迄今为止已检测到的淡水生态系统中分布的 anammox 菌种群结构较为单一,以 *Scalindua* 属居多,而在新沂河底泥中则只发现了 *Candidatus Brocadia anammoxidans* 的分布(Zhang *et al.* ,2007). 已有的研究表明,anammox 在淡水生态系统的氮素循环过程中也起了不容忽视的作用.

杭州西湖位于杭州市西部,面积 5.6 km^2 (包括湖中岛屿为 6.3 km^2) ,湖岸周长 15 km. 西湖平均水深 1.5 m,最深处在 2.8 m 左右,最浅处不到 1 m. 湖南北长 3.3 km,东西宽 2.8 km,是一个小型城市淡水湖泊. 从 20 世纪 50 年代以来,西湖一直面临着富营养化及生态系统退化等严峻的问题. 为进一步了解西湖淡水生态系统中生物的氮素转化过程,本研究对西湖底泥进行原位采样分析,通过构建 anammox 菌 16s rRNA 基因克隆文库,首次检测了西湖底泥样品中分布的 anammox 菌,并对西湖底泥中的 anammox 菌种群多样性水平进行了评价.

2 材料与方法(Materials and methods)

2.1 底泥样品

本研究样品取自西湖底泥,采用抓斗式采泥器采集表层底泥. 底泥样品在分析之前,放入 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱冻存. 有关西湖底泥的基本理化特性见表 1.

表 1 西湖底泥样品的基本理化特性
Table 1 The basic physical and chemical parameters of sediments from West Lake

样品	pH	有机质含量 $/(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	TN $/(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	TP $/(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	含水率
西湖底泥(XH)	7.29	35.7	8800	720	85%

2.2 DNA 抽提与 PCR 扩增

用 Power Soil DNA Kit (Mo Bio Laboratories , Carlsbad , CA) 对西湖底泥样品进行总细菌基因组 DNA 抽提 ,操作步骤按其说明书进行. DNA 抽提结果用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测.

采用巢式 PCR 对底泥样品 DNA 进行扩增 ,即首先采用浮霉状菌通用引物(Pla46f) 与细菌通用引物(630r) 所构成的引物对(Pla46f-630r) 进行首轮 PCR 扩增 ,随后再用 anammox 菌的特异性引物 (Amx368f 和 Amx820r) 对 Pla46f-630r 的扩增产物进行二次 PCR. 本试验所用引物信息如表 2 所示.

表 2 试验所用 PCR 引物
Table 2 Primers used in this study

引物名称	引物序列(5'→3')	目标菌群	位点(大肠杆菌位点)	参考文献
Pla46f	GGATTAGGCATGCAAGTC	浮霉状菌	46 ~ 63	Neef <i>et al.</i> ,1998
630r	CAKAAAGGAGGTGATCC	所有细菌	1529 ~ 1545	Juretschko <i>et al.</i> ,1998
Amx368f	TTCGCAATGCCCCGAAAGG	所有 anammox 菌	368 ~ 385	Schmid <i>et al.</i> ,2003
Amx820r	AAAACCCCTCTACTTAGTGCCC	<i>Brocadia</i> / <i>Kuenenia</i>	820 ~ 841	Schmid <i>et al.</i> ,2000

2.3 克隆与测序

将含有目标条带的 PCR 产物连接到 PMD19-T 载体(TaKaRa ,日本) ,按试剂盒操作说明进行连接转化. 用菌液 PCR(1 μL 菌液作为模板 ,反应体系和反应条件参照 2.2 部分) 验证阳性克隆. 阳性克隆委托上海英俊生物技术有限公司完成测序. 本研究所得序列在 NCBI 中的基因登录号为 HQ540360-HQ540389.

2.4 16S rRNA 系统发育分析

用 MEGA 软件对序列进行编辑 ,用 BLAST 在 GenBank 中搜索相似序列 ,对这些序列进行多重序列对齐 ,最后采用 MEGA 4. 0 的邻接(Neighbor-Joining) 法构建系统发育树 ,采用 p-distance 计算 ,Bootstrap 分析为 1000 个样本.

3 结果(Results)

3.1 西湖底泥 anammox 菌的分布与种群多样性水平

通过巢式 PCR 成功在西湖底泥样品中扩增出了 anammox 菌的特异性条带 ,首次证明了在西湖底泥中有 anammox 菌的分布. 为进一步了解西湖底泥中 anammox 菌的种群结构与多样性水平 ,将 PCR 产物进行克隆测序 ,对 37 条有效序列处理后与已知的 anammox 菌的 16S rRNA 序列共同构建系统发育树 (图 1) .

PCR 反应体系为(总体积 25 μL) : 2. 0 μL dNTP(脱氧核糖核酸 ,2. 5 mmol · L⁻¹) ,2. 5 μL 10 × PCR buffer(含 15 mmol · L⁻¹ 的镁离子) ,1μL 上游引物 (10 mmol · L⁻¹) ,1μL 下游引物(10 mmol · L⁻¹) ,1 μL DNA 模板(1 ~ 10 ng) ,0. 2 μL rTaq 聚合酶 ,17. 3 μL DEPC 处理水(Rnase Free dH₂O) . PCR 反应条件: 95 ℃ 预变性 3 min; 95 ℃ 变性 1 min ,56 ℃ (首轮 PCR 扩增) /52 ℃ (次轮 PCR 扩增) 退火 1 min ,72 ℃ 延伸 1 min ,30 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min. PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测.

从系统发育树中可以看出 ,与海洋底泥不同 (海洋底泥通常只分布有 *Scalindua* 属的 anammox 菌) ,西湖淡水底泥样品中检测到的 anammox 菌群多样性水平较高 ,同时包含了 *Kuenenia* ,*Brocadia* 和 *Scalindua* 三种属的 anammox 菌. 系统发育树中共形成了 6 个独立的序列群 ,各序列群中的序列与亲缘关系最近的 anammox 菌的序列相似度见表 3. 由图 1 和表 3 可以发现 ,西湖底泥样品中含有纳入 *Kuenenia* 属的 anammox 菌序列群 ,即 *Kuenenia* cluster. 此序列群中的序列与 *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* 的相似度较高 ,为 98. 5% ~ 99. 2% . 此外 ,系统发育树中还包含了与 *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* 具有较远亲缘关系的两条单序列 ,XH-5 和 XH-27 ,两者与 *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* 的序列相似度分别仅为 95. 2% 和 96. 0% . *Brocadia* 属共包含了两个与 *Candidatus Brocadia fulgida* 亲缘关系相近的独立的 anammox 菌序列群 ,其中 *Brocadia* cluster I 中的序列与 *Candidatus Brocadia fulgida* 的序列相似度较高 ,为 97. 3% ~ 97. 9% ,而 *Brocadia* cluster II 的序列与 *Candidatus Brocadia fulgida* 的序列相似度相对较低 ,为 96. 0% ~ 97. 1% . *Scalindua* 属则仅包含了两条相同的序列 (XH-6 和 XH-7) ,其与 *Candidatus Scalindua brodae* 的亲缘关系最近 ,但序列相似度仅为 95. 8% . 这两条序列而与经富集培养后的海洋 anammox 菌序列相

似度最大 ,为 99% (EU142947) (van de Vossenberg *et al.* ,2008) .

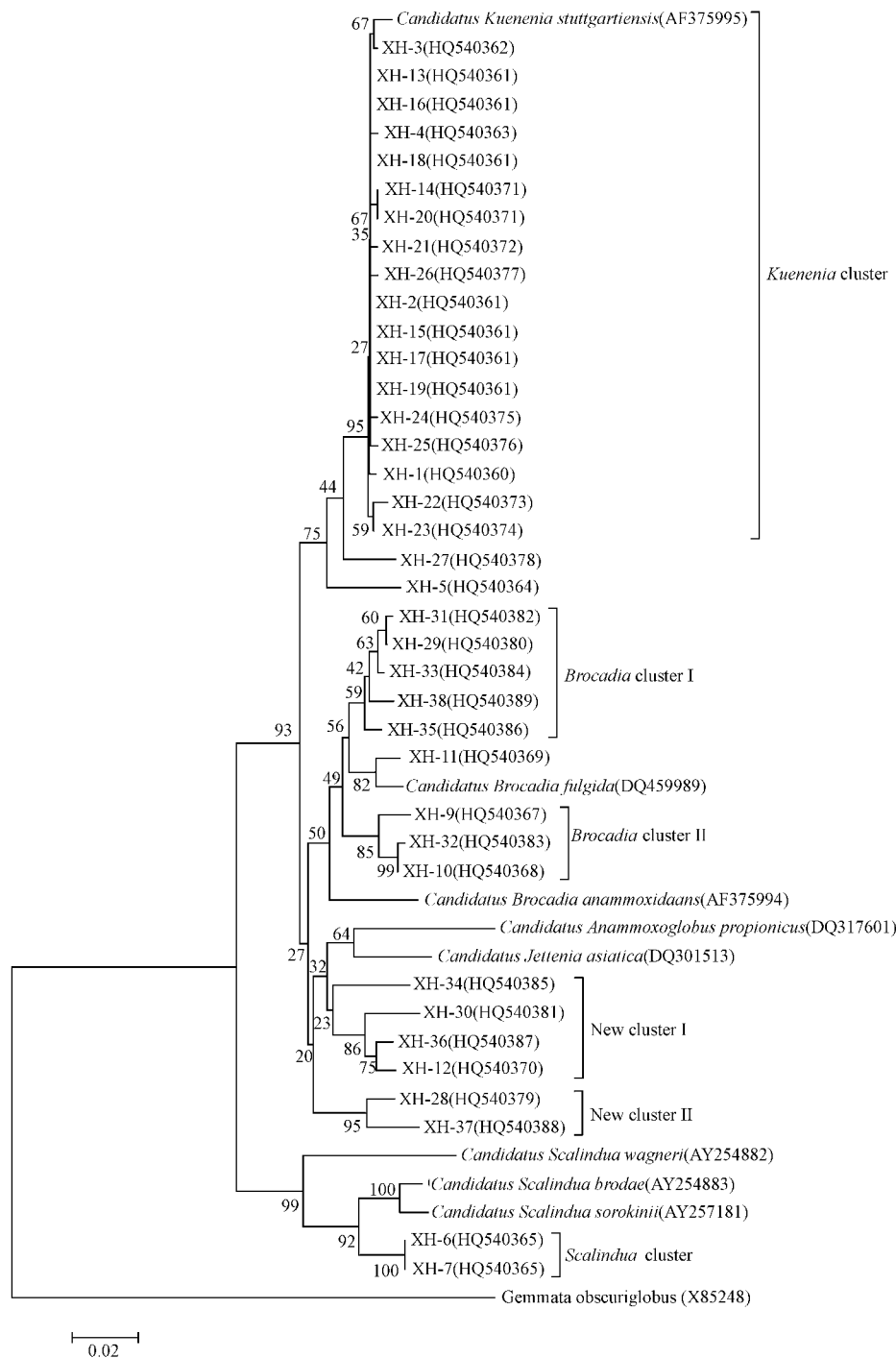


图1 西湖底泥中检测到的 anammox 菌与已知 anammox 菌的 16S rRNA 系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree showed the relationships of anammox bacteria-related 16S rRNA gene fragments in the clone libraries of samples from West Lake sediment to known anammox bacteria

此外 在所构建的系统发育树中还形成了两个新的 anammox 菌序列群 ,它们与已知 anammox 菌的亲缘关系都较远 ,分别记为 New cluster I 和 New cluster II. 这两个序列群与 *Candidatus Jettenia*

asiatica 有较远的亲缘关系 ,其中 New cluster I 的序列与 *Candidatus Jettenia asiatica* 的序列相似度为 92.9% ~93.3% . New cluster II 的序列与 *Candidatus Jettenia asiatica* 的序列相似度更低 ,仅为 91.6% ~

92.7% . 由于这两个 anammox 菌序列群与目前已知 anammox 菌的序列相似度都较低(<94.0%) ,因而认为它们可能分属于新的 anammox 属. 不过 ,这两个新的 anammox 属的生理生化特性以及是否具有 anammox 活性还有待进一步的研究证实.

表 3 各 anammox 菌序列群中的序列与已知 anammox 菌的序列相似度表

Table 3 Sequence identity of different anammox clusters to known anammox bacteria		
Anammox 菌序列群	亲缘关系最近的 anammox 菌种类	相似度
<i>Kuenenia</i> cluster	<i>Candidatus Kuenenia stuttgartiensis</i>	98.5% ~99.2%
<i>Brocadia</i> cluster I	<i>Candidatus Brocadia fulgida</i>	97.3% ~97.9%
<i>Brocadia</i> cluster II	<i>Candidatus Brocadia fulgida</i>	96.0% ~97.1%
<i>Scalindua</i> cluster	<i>Candidatus Scalindua brodae</i>	95.8%
New cluster I	<i>Candidatus Jettenia asiatica</i>	92.9% ~93.3%
New cluster II	<i>Candidatus Jettenia asiatica</i>	91.6% ~92.7%

3.2 西湖底泥 anammox 菌的优势菌种

由图 2 可知 ,与目前已报道的海洋和淡水生态系统中 anammox 菌的分布情况不同(*Scalindua* 属的 anammox 菌在海洋和已报道的淡水生态系统中占优势地位) ,西湖淡水底泥中 *Kuenenia* 属的 anammox 菌明显占优 ,该属的 anammox 菌序列占序列总数的 54.1% ,其次为 *Brocadia* 属的 anammox 菌 ,序列所占比例为 24.3% (*Brocadia* cluster I 和 *Brocadia* cluster II 分别占了 16.2% 和 8.1%) ,而 *Scalindua* 属的 anammox 菌仅占序列总数的 5.4% . 由于 *Kuenenia* 属的 anammox 菌在西湖底泥中广泛分布 ,推测 *Kuenenia* 属的 anammox 菌在西湖淡水生态系统的氮素循环中起着重要作用.

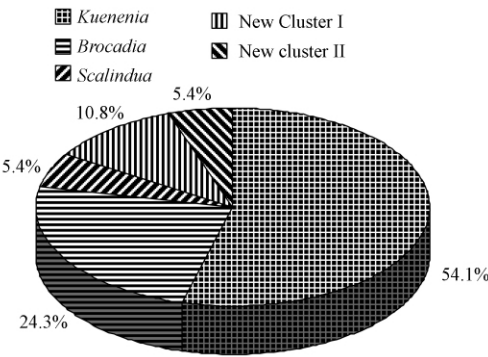


图 2 西湖底泥中不同种类 anammox 菌的丰度
Fig.2 Abundance of different anammox bacteria in West Lake sediment

4 讨论(Discussion)

本研究采用 16s rRNA 基因克隆文库技术成功

在西湖淡水底泥中检测出了 anammox 菌 ,证实了西湖底泥中存在 anammox 菌. 16S rRNA 系统发育分析表明 ,西湖底泥中的 anammox 菌种群多样性水平较高 .检测结果发现 *Brocadia* ,*Kuenenia* ,*Scalindua* 三个属的 anammox 菌共存于西湖底泥中 ,此外 ,还发现了两个新的 anammox 菌序列群 ,其与目前已知 anammox 菌的序列相似度都较低(分别仅为 92.9% ~93.3% 和 91.6% ~92.7%) . Penton 等(2006) 在温特格林淡水湖的底泥中只检测到了 *Scalindua* 属的 anammox 菌 ,anammox 菌的种群分布较为单一. 另一篇有关淡水底泥 anammox 菌的分布报道中 , Zhang 等(2007) 在新沂河底泥中也只检测出了单种 anammox 菌 ,*Candidatus Brocadia anammoxidans* . 从这两个研究报道中可以发现 ,与海洋底泥类似 ,淡水底泥中存在的 anammox 菌的种群多样性水平也较低 ,一般只存在单种属的 anammox 菌 ,这是由于不同种类的 anammox 菌所需的环境条件(生态位) 不同 ,在同一生态环境中往往只分布有单种属的 anammox 菌(Humbert *et al.* , 2010) . 而从本研究的检测结果表明 ,西湖淡水底泥中同时存在多种 anammox 菌 ,种群类型较为丰富 ,种群多样性水平明显高于大多数已报道的海洋生态系统和淡水生态系统 ,而与 anammox 菌种群多样性水平较高的河口环境相当(Amano *et al.* , 2007; Dale *et al.* , 2009) .

构建 anammox 菌 16S rRNA 基因克隆文库是目前评价自然生境中 anammox 菌种群多样性水平的重要手段之一. 但值得注意的是 ,不同自然生态系统中所发现的 anammox 菌种群多样性水平与构建克隆文库时所采用的引物密切相关. 先前较多的研究者采用了浮霉状菌的特异性引物(如 pla46f) 结合细菌的通用引物(如 630r) 直接进行环境样品中 anammox 菌序列的扩增(Schubert *et al.* , 2006; Penton *et al.* , 2007; Schmid *et al.* , 2007) . 此方法虽可获得几乎全长的 anammox 菌 16S rRNA 基因序列 ,但阳性克隆率低 ,所检测到的 anammox 菌基本属于 *Scaliudua* 属. 究其原因可能是由于此类方法未采用 anammox 菌的特异性引物 ,缺乏针对 anammox 菌的特异性 ,只能检测出丰度相对较高的 anammox 菌. *Scaliudua* 属的耐盐能力较强 ,其在海洋中的丰度相对较高 ,故海洋环境中通常只有此类 anammox 菌被检出. 本研究采用的巢式 PCR 不仅阳性克隆率高(95% 以上) ,而且在西湖底泥中检测出了多种 anammox 菌的共存. Amano 等(2007) 和 Dale 等

(2009) 同样采用巢式 PCR 在两处河口环境中检测出了多种 anammox 菌. 由于巢式 PCR 的次轮扩增时都采用了 anammox 菌的特异性引物, 针对 anammox 菌的特异性增强, 其可以扩增出不同种类的 anammox 菌序列(尽管不同种类 anammox 菌的丰度不同). 本研究中的巢式 PCR 能更好的反映自然生态系统中 anammox 菌的种群多样性水平. 此外, 不同自然生态系统中 anammox 菌的种群多样性水平还与自然环境中实际的生态环境息息相关. 大量研究已证实 *Scalindua* 属的 anammox 菌广泛分布于海洋和淡水环境. *Kuenenia* 和 *Brocadia* 属的 anammox 菌属于淡水菌种(Jetten *et al.*, 2003; Kartal *et al.*, 2006), 比较适宜生存于淡水环境. 而西湖底泥的淡水环境为这两种属的 anammox 菌提供了较为适宜的环境条件, 因而这两种属的 anammox 菌可被检出. Dale 等(2009) 在考察开普菲尔河口 anammox 菌的分布时也发现, *Kuenenia* 和 *Brocadia* 属的 anammox 菌的分布于仅限于低盐度的生态环境中.

从 anammox 菌的检测结果还可以发现, 西湖淡水底泥中 *Kuenenia* 属的 anammox 菌明显占优, 其次是 *Brocadia* 属的 anammox 菌. 正如上述, 这可能与 *Kuenenia* 和 *Brocadia* 属的 anammox 菌为淡水菌种(Jetten *et al.*, 2003; Kartal *et al.*, 2006), 比较适合生存于淡水环境有关. Humbert 等(2010) 也在多处土壤生态系统中发现优势的 anammox 菌为 *Kuenenia* 和 *Brocadia* 属. 结合本研究的检测结果可以认为, 除 *Scalindua* 属的 anammox 菌外, *Kuenenia* 和 *Brocadia* 属的 anammox 菌在自然界也广泛分布, 并可能在全球氮素循环中同样起着重要作用.

5 结论(Conclusions)

1) 通过巢式 PCR 成功在所试西湖淡水底泥样品中检测出了 anammox 菌序列, 首次证明了西湖淡水底泥中存在 anammox 菌, 为西湖淡水生态系统氮素循环增添了新的内容, 也为 anammox 菌在自然环境中的广泛性分布提供了有力证据.

2) 16s rRNA 系统发育分析表明, 西湖淡水底泥中存在多种属 anammox 菌, 同时包含了 *Brocadia*, *Kuenenia* 和 *Scalindua* 三种属的 anammox 菌, 以及两个与目前已知 anammox 菌亲缘关系较远的序列群, anammox 菌的种群多样性水平较高, 明显高于目前已报道的大部分天然生态系统.

3) 被检样品中不同种属 anammox 菌的分布情

况表明, 与目前被广泛研究的海洋底泥不同, 西湖淡水底泥中 *Kuenenia* 属的 anammox 菌明显占优.

责任作者简介: 楼莉萍(1974—), 女, 工学博士, 副教授, 硕士生导师. 主要研究方向: 流域与湖泊污染控制技术. E-mail: loulp@zju.edu.cn.

参考文献(References):

- Amano T, Yoshinaga I, Okada K, *et al.* 2007. Detection of anammox activity and diversity of anammox bacteria-related 16S rRNA genes in coastal marine sediment in Japan [J]. *Microbes Environ*, 22(3): 232–242
- Arrigo K R. 2005. Marine microorganisms and global nutrient cycles [J]. *Nature*, 437(7057): 349–355
- Bettazzi E, Caffaz S, Vannini C, *et al.* 2010. Nitrite inhibition and intermediates effects on Anammox bacteria: A batch-scale experimental [J]. *Process Biochemistry*, 45(4): 573–580
- Dale O R, Tobias C R, Song B. 2009. Biogeographical distribution of diverse anaerobic ammonium oxidizing (anammox) bacteria in Cape Fear River Estuary [J]. *Environ Microbiol*, 11(5): 1194–1207
- Engström P, Penton C R, Devol A H. 2009. Anaerobic ammonium oxidation in deep-sea sediments off the Washington margin [J]. *Limnol Oceanogr*, 54(5): 1643–1652
- Hamersley M R, Lavik G, Woebken D, *et al.* 2007. Anaerobic ammonium oxidation in the Peruvian oxygen minimum zone [J]. *Limnol Oceanogr*, 52(3): 923–933
- Humbert S, Tarnawski S, Fromin N, *et al.* 2010. Molecular detection of anammox bacteria in terrestrial ecosystems: distribution and diversity [J]. *ISME J*, 4(3): 450–454
- Jetten M S M, Sliekers A O, Kuypers M M M, *et al.* 2003. Anaerobic ammonium oxidation by marine and freshwater *Planctomycete*-like bacteria [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 63(2): 107–114
- Juretschko S, Timmermann G, Schmid M C, *et al.* 1998. Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like Bacteria as Dominant Populations [J]. *Appl Environ Microbiol*, 64(8): 3042–3051
- Kartal B, Koleva M, Arsov R, *et al.* 2006. Adaptation of a freshwater anammox population to high salinity wastewater [J]. *J Biotechnol*, 126(4): 546–553
- Kartal B, Rattray J, van Niftrik L A, *et al.* 2007. *Candidatus* ‘Anammoxoglobus propionicus’ a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria [J]. *Syst Appl Microbiol*, 30(1): 39–49
- Kartal B, van Niftrik L A, Rattray J, *et al.* 2008. *Candidatus* ‘*Brocadia fulgida*’: an autofluorescent anaerobic ammonium oxidizing bacterium [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 63(1): 46–55
- Kuenen J G. 2008. Anammox bacteria: from discovery to application [J]. *Nat Rev Microbiol*, 6(4): 320–326
- Kuypers M M M, Sliekers A O, Lavik G, *et al.* 2003. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea [J].

- Nature , 422(6932) : 608-611
- Kuypers M M M , Lavik G , Wöbken D , *et al.* 2005. Massive nitrogen loss from the Benguela upwelling system through anaerobic ammonium oxidation [J]. Proc Natl Acad Sci USA , 102(18) : 6478-6483
- Lam P , Lavik G , Jensen M M , *et al.* 2009. Revising the nitrogen cycle in the Peruvian oxygen minimum zone [J]. Proc Natl Acad Sci USA , 106(12) : 4752-4757
- Mulder A , Graaf A A , Robertson L A , *et al.* 1995. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor [J]. FEMS Microbiol Ecol , 16(3) : 177-184
- Neef A , Amann R I , Schlesner H , *et al.* 1998. Monitoring a widespread bacterial group: *in situ* detection of *Planctomycetes* with 16S rRNA-targeted probes [J]. Microbiology , 144(12) : 3257-3266
- Penton C R , Devol A H , Tiedje J M. 2006. Molecular evidence for the broad distribution of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in freshwater and marine sediments [J]. Appl Microbiol Biotechnol , 72(10) : 6829-6832
- Quan Z X , Rhee S K , Zuo J E , *et al.* 2008. Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor [J]. Environ Microbiol , 10(11) : 3130-3139
- Rich J J , Dale O R , Song B , *et al.* 2008. Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in Chesapeake Bay sediments [J]. Microb Ecol , 55(22) : 311-320
- Risgaard-Petersen N , Meyer R L , Schmid M C , *et al.* 2004. Anaerobic ammonia oxidation in estuarine sediment [J]. Aquat Microb Ecol , 36(3) : 293-304
- Schmid M C , Twachtmann U , Klein M , *et al.* 2000. Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation [J]. Syst Appl Microbiol , 23(1) : 93-106
- Schmid M C , Walsh K , Webb R I , *et al.* 2003. *Candidatus* 'Scalindua brodae' , sp. nov. , *Candidatus* 'Scalindua wagneri' , sp. nov. , two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria [J]. Syst Appl Microbiol , 26(4) : 529-538
- Schmid M C , Risgaard-Petersen N , van de Vossenberg J , *et al.* 2007. Anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in marine environments: widespread occurrence but low diversity [J]. Environ Microbiol , 9(6) : 1476-1484
- Schubert C J , Durisch-Kaiser E , Wehrli B , *et al.* 2006. Anaerobic ammonium oxidation in a tropical freshwater system (Lake Tanganyika) [J]. Environ Microbiol , 8(10) : 1857-1863
- Strous M , Fuerst J A , Kramer E H M , *et al.* 1999. Missing lithotroph identified as new planctomycete [J]. Nature , 400(6743) : 446-449
- Tal Y , Watts J E , Schreier H J. 2005. Anaerobic ammonia-oxidizing bacteria and related activity in Baltimore inner harbor sediment [J]. Appl Microbiol Biotechnol , 71(4) : 1816-1821
- Thamdrup B , Dalsgaard T , Jensen M M , *et al.* 2006. Anaerobic ammonium oxidation in the oxygen-deficient waters off northern Chile [J]. Limnol Oceanogr , 51(5) : 2145-2156
- Trimmer M , Nicholls J C , Deflandre B. 2003. Anaerobic ammonium oxidation measured in sediments along the Thames estuary , United Kingdom [J]. Appl Environ Microbiol , 69(11) : 6447-6454
- Trimmer M , Nicholls J C. 2009. Production of nitrogen gas via anammox and denitrification in intact sediment cores along a continental shelf to slope transect in the North Atlantic [J]. Limnol Oceanogr , 54(2) : 577-589
- van de Vossenberg J , Rattray J E , Geerts W , *et al.* 2008. Enrichment and characterization of marine anammox bacteria associated with global nitrogen gas production [J]. Environ Microbiol , 10(11) : 3120-3129
- Wöbken D , Fuchs B M , Kuypers M M M , *et al.* 2007. Potential interactions of particle-associated anammox bacteria with bacterial and archaeal partners in the Namibian upwelling system [J]. Appl Environ Microbiol , 73(14) : 4648-4657
- Zhang Y , Ruan X H , Op den Camp H J M , *et al.* 2007. Diversity and abundance of aerobic and anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in freshwater sediments of the Xinyi River (China) [J]. Environ Microbiol , 9(9) : 2375-2382
- 郑平 , 徐向阳 , 胡宝兰. 2004. 新型生物脱氮理论与技术 [M]. 北京: 科学出版社
- Zheng P , Xu X Y , Hu B L. 2004. Novel Theory and Technology for Biological Nitrogen Removal [M]. Beijing: Science Press (in Chinese)